



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102665748 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 12

(21) 申请号 201080033096. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 05. 27

A61K 38/00 (2006. 01)

A61K 38/10 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 38/09 (2006. 01)

61/181, 530 2009. 05. 27 US

61/253, 730 2009. 10. 21 US

61/303, 997 2010. 02. 12 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 01. 20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/036436 2010. 05. 27

(87) PCT申请的公布数据

W02010/138740 EN 2010. 12. 02

(71) 申请人 达娜 - 法勃肿瘤研究所公司

地址 美国马萨诸塞州

申请人 属肿瘤有限责任公司

(72) 发明人 唐纳德·W·库弗

苏伦德·克哈班达

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

公司 11227

代理人 顾晋伟 卢蓓

权利要求书 4 页 说明书 37 页

序列表 14 页 附图 24 页

(54) 发明名称

使用 MUC1 拮抗剂抑制炎症

(57) 摘要

本发明提供了来自 MUC1 细胞质结构域的肽以及使用其的方法。这些肽可以抑制 MUC1 寡聚化、抑制 MUC1 与 NF- κ B 或 STAT 的相互作用, 并且阻断由 NF- κ B 或 STAT 信号转导所介导的炎症应答。

1. 在表达 MUC1 的细胞中抑制炎症信号转导的方法,其包括将所述细胞与具有至少 4 个连续 MUC1 残基但不多于 20 个连续 MUC1 残基而且包含序列 CQC 的 MUC1 肽相接触,其中 CQC 的氨基端半胱氨酸的 NH₂ 端被不一定对应于天然 MUC-1 跨膜序列的至少一个氨基酸残基所覆盖。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述肽包含至少 5、6 或 7 个连续 MUC1 残基。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述序列包含 CQCR、CQCRR、CQCRRR、CQCRRRR、CQCRRK 或 CQCRRKN。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述肽包含 MUC1 的不多于 10 个连续残基、11 个连续残基、12 个连续残基、13 个连续残基、14 个连续残基、15 个连续残基、16 个连续残基、17 个连续残基、18 个连续残基或 19 个连续残基。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述 MUC1 阳性细胞是肿瘤细胞、内皮细胞或炎症细胞。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述炎症细胞是巨噬细胞、B 细胞、T 细胞、树突状细胞、骨髓源性抑制细胞、NK 细胞或嗜中性粒细胞。

7. 权利要求 1 的方法,其中所述肽与细胞递送结构域融合。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述细胞递送结构域是聚 D-R、聚 D-P 或聚 D-K。

9. 权利要求 1 的方法,其还包括将所述细胞与第二抗炎剂接触。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述第二抗炎剂是类固醇或 COX-2 抑制剂。

11. 权利要求 9 的方法,其中在所述肽之前接触所述第二抗炎剂。

12. 权利要求 9 的方法,其中在所述肽之后接触所述第二抗炎剂。

13. 权利要求 9 的方法,其中与所述肽同时地接触所述第二抗炎剂。

14. 权利要求 1 的方法,其中所述肽包含的全部是 L 氨基酸。

15. 权利要求 1 的方法,其中所述肽包含的全部是 D 氨基酸。

16. 权利要求 1 的方法,其中所述肽包含 L 和 D 氨基酸的混合物。

17. 权利要求 1 的方法,其中所述炎症信号转导包括 NF- κ B 介导的信号转导或 STAT 介导的信号转导。

18. 权利要求 17 的方法,其中 NF- κ B 介导信号转导的炎症信号转导包括 NF- κ B 激活选自 Bcl-xL 和 MUC1 的靶基因。

19. 权利要求 17 的方法,其中 STAT 介导的炎症信号转导包括 STAT3 激活。

20. 权利要求 19 的方法,其中 STAT3 介导的炎症信号转导包括 STAT3 激活选自细胞周期蛋白 D1、生存素、Idp1、Idp2、Cdkn1C、Lefty1、Mest、Aes1、Zfp57、Zfp3611、Sh3bp1、Ccmd3 和 MUC1 的靶基因。

21. 在表达 MUC1 的细胞中抑制 MUC1 与 NF- κ B 或 STAT 结合的方法,其包括将所述细胞与具有至少 4 个连续 MUC1 残基但不多于 20 个连续 MUC1 残基而且包含序列 CQC 的 MUC1 肽相接触,其中 CQC 的氨基端半胱氨酸的 NH₂ 端被不一定对应于天然 MUC-1 跨膜序列的至少一个氨基酸残基所覆盖。

22. 在表达 MUC1 的细胞中抑制 MUC1 与 I κ B α 竞争结合 NF- κ B 的方法,其包括将所述细胞与具有至少 4 个连续 MUC1 残基但不多于 20 个连续 MUC1 残基而且包含序列 CQC 的 MUC1 肽相接触,其中 CQC 的氨基端半胱氨酸的 NH₂ 端被不一定对应于天然 MUC-1 跨膜序列的至少一个氨基酸残基所覆盖。

23. 在表达 MUC1 的细胞中抑制 MUC1 诱导的 NF- κ B 核转位的方法,其包括将所述细胞与具有至少 4 个连续 MUC1 残基但不多于 20 个连续 MUC1 残基而且包含序列 CQC 的 MUC1 肽相接触,其中 CQC 的氨基端半胱氨酸的 NH₂ 端被不一定对应于天然 MUC-1 跨膜序列的至少一个氨基酸残基所覆盖。

24. 抑制对象中的炎性应答的方法,其包括向所述对象施用具有至少 4 个连续 MUC1 残基但不多于 20 个连续 MUC1 残基而且包含序列 CQC (SEQ ID NO :4) 的 MUC1 肽,其中 CQC 的氨基端半胱氨酸的 NH₂ 端被不一定对应于天然 MUC-1 跨膜序列的至少一个氨基酸残基所覆盖。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述肽包含至少 5、6 或 7 个连续 MUC1 残基。

26. 权利要求 25 的方法,其中所述序列包含 CQCR、CQCRR、CQCRRR、CQCRRRR、CQCRRK 或 CQCRRKN。

27. 权利要求 24 的方法,其中所述肽包含 MUC1 的不多于 10 个连续残基、11 个连续残基、12 个连续残基、13 个连续残基、14 个连续残基、15 个连续残基、16 个连续残基、17 个连续残基、18 个连续残基或 19 个连续残基。

28. 权利要求 24 的方法,其中所述炎性应答是由 NF- κ B 介导的信号转导或 STAT 介导的信号转导引起。

29. 权利要求 21 的方法,其中所述肽与细胞递送结构域融合。

30. 权利要求 29 的方法,其中所述细胞递送结构域是聚 D-R、聚 D-P 或聚 D-K。

31. 权利要求 24 的方法,其中施用包括静脉内、动脉内、口服、瘤内、皮下、表面或腹腔内施用。

32. 权利要求 24 的方法,其中施用包括局部、区域、全身或持续施用。

33. 权利要求 24 的方法,其中抑制包括抑制或解除所述炎性应答。

34. 权利要求 24 的方法,其还包括对所述对象施用第二抗炎治疗。

35. 权利要求 34 的方法,其中所述第二抗炎治疗是类固醇或 COX2 抑制剂。

36. 权利要求 34 的方法,其中所述第二抗炎治疗在所述肽之前施用。

37. 权利要求 34 的方法,其中所述第二抗炎治疗在所述肽之后施用。

38. 权利要求 34 的方法,其中所述第二抗炎治疗与所述肽同时施用。

39. 权利要求 24 的方法,其中所述对象是人。

40. 权利要求 24 的方法,其中所述肽以 0.1-500mg/kg/天施用。

41. 权利要求 24 的方法,其中所述肽以 10-100mg/kg/天施用。

42. 权利要求 24 的方法,其中所述肽每日施用。

43. 权利要求 42 的方法,其中所述肽每日施用,持续 7 天、2 周、3 周、4 周、1 个月、6 周、8 周、2 个月、12 周或 3 个月。

44. 权利要求 24 的方法,其中所述肽每周施用。

45. 权利要求 44 的方法,其中所述肽每周施用,持续 2 周、3 周、4 周、6 周、8 周、10 周或 12 周。

46. 权利要求 24 的方法,其中所述肽包含的全部是 L 氨基酸。

47. 权利要求 24 的方法,其中所述肽包含的全部是 D 氨基酸。

48. 权利要求 24 的方法,其中所述肽包含 L 和 D 氨基酸的混合物。

49. 药物组合物,其包含 (i) 具有至少 4 个连续 MUC1 残基但不多于 20 个连续 MUC1 残基而且包含序列 CQC 的 MUC1 肽,其中 CQC 的氨基端半胱氨酸的 NH₂ 端被不一定对应于天然 MUC-1 跨膜序列的至少一个氨基酸残基所覆盖;和 (ii) 除 (i) 外的第二抗炎剂。

50. 权利要求 49 的组合物,其中第二抗炎剂是类固醇或 COX-2 抑制剂。

51. MUC1 肽,其具有至少 7 个并且不多于 20 个的残基,具有 3-20 个连续 MUC1 残基,并且包含序列 CQC,其中 CQC 的氨基端半胱氨酸的 NH₂ 端被不一定对应于天然 MUC-1 跨膜序列的至少一个氨基酸残基所覆盖,而且其中所述肽还包含与第一氨基酸侧链连接的第一连接部分和与第二氨基酸侧链连接的第二连接部分,所述第一和第二连接部分 (a) 相互结合而且 (b) 由介于其间的三个氨基酸残基分隔开。

52. 权利要求 51 的肽,其中所述肽长 8-20 个残基、长 8-17 个残基、长 9-17 个残基、长 10-17 个残基、长 10-16 个残基或长 10-15 个残基。

53. 权利要求 51 的肽,其中所述肽长 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个残基。

54. 权利要求 51 的肽,其中所述连续 MUC1 残基数是 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17。

55. 权利要求 51 的肽,其还包含与第三氨基酸侧链连接的第三连接部分,所述第二和第三连接部分相互结合,而且所述第二和第三氨基侧链由介于其间的三个氨基酸残基分隔开,并且所述肽长至少 10 个残基。

56. 权利要求 51 的肽,其中所述肽包含 AIVYLALACQRRKNYG、IVYLALACQRRKNYGQ、VYLALACQRRKNYGQL 或 YLALACQRRKNYGQLD。

57. 权利要求 51 的肽,其中第一和第二氨基侧链分别位于 Y₄ 和 A₈。

58. 权利要求 55 的肽,其中第一和第二氨基侧链分别位于 A₈ 和 R₁₂。

59. 权利要求 55 的肽,其中所述肽包含 AIVYLALACQRRKNYG、IVYLALACQRRKNYGQ、VYLALACQRRKNYGQL 或 YLALACQRRKNYGQLD。

60. 权利要求 59 的肽,其中第一、第二和第三氨基酸侧链分别位于 Y₄、A₈ 和 R₁₂。

61. MUC1 肽,其具有至少 10 个并且不多于 20 个残基,具有 3-20 个连续 MUC1 残基,并且包含序列 CQC,其中 CQC 的氨基端半胱氨酸的 NH₂ 端被不一定对应于天然 MUC-1 跨膜序列的至少一个氨基酸残基所覆盖,而且其中所述肽还包含与第一氨基酸侧链连接的第一连接部分和与第二氨基酸侧链连接的第二连接部分,所述第一和第二连接部分 (a) 相互结合而且 (b) 由介于其间的七个氨基酸残基分隔开。

62. 权利要求 61 的肽,其中所述肽长 11-20 个残基、长 11-19 个残基、长 11-18 个残基、长 12-18 个残基、长 12-19 个残基或长 12-18 个残基。

63. 权利要求 61 的肽,其中所述肽长 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个残基。

64. 权利要求 61 的肽,其中所述连续 MUC1 残基数是 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17。

65. 权利要求 61 的肽,其还包含与第三氨基酸侧链连接的第三连接部分,所述第二和第三连接部分相互结合,并且所述第二和第三氨基侧链由介于其间的七个氨基酸残基分隔开,所述肽长至少 18 个残基。

66. 权利要求 61 的肽,其中所述肽包含 AIVYLALACQRRKNYGQ、IVYLALACQRRKNYGQL 或

VYLALACQRRKNYGQLD。

67. 权利要求 67 的肽,其中第一和第二氨基侧链分别位于 I₂ 和 Q₁₀。
68. 权利要求 67 的肽,其中第一和第二氨基侧链分别位于 A₈ 和 Y₁₆。
69. 权利要求 65 的肽,其中所述肽包含 AIVYLALACQRRKNYGQLD。
70. 权利要求 69 的肽,其中第一、第二和第三氨基酸侧链分别位于 Y₂、R₁₂ 和 D₂₀。

使用 MUC1 拮抗剂抑制炎症

[0001] 发明背景

[0002] 本申请要求 2009 年 5 月 27 日提交的美国临时申请序列号 61/181, 530、2009 年 10 月 21 日提交的美国临时申请序列号 61/253, 730 和 2010 年 2 月 12 日提交的美国临时申请序列号 61/303, 997 的优先权, 上述每个申请的全部内容均通过引用并入本文。

1. 发明领域

[0003] 本发明涉及炎性信号转导的调节。具体而言, 已证明来源于 MUC1 细胞质结构域特定区域的 MUC1 肽抑制 MUC1 与 NF- κ B 的相互作用, 从而抑制 NF- κ B 介导的炎性信号转导。此外, 已证明了针对 STAT3 介导的炎性信号转导的类似作用。

[0004] 2. 相关技术

[0005] NF- κ B 蛋白 (RelA/p65、RelB、c-Rel、NF- κ B1/p50 和 NF- κ B2/p52) 是普遍表达的转录因子。在无刺激时, NF- κ B 蛋白与 I κ B α 和 I κ B 抑制蛋白家族的其他成员形成复合物定位于细胞质中 (Hayden&Ghosh, 2008)。高分子量 I κ B 激酶 (IKK α 、IKK β 、IKK γ) 复合物对 I κ B α 的磷酸化诱导 I κ B α 的泛素化和降解, 从而释放 NF- κ B 进行核转位。继而 NF- κ B 靶基因的激活通过调节炎性应答、细胞增殖和存活促进肿瘤发生 (Karin&Lin, 2002)。NF- κ B p65 与家族其他成员一样包含负责二聚化和 DNA 结合的 N 端 Rel 同源结构域 (Rel homology domain, RHD)。RHD 还作为 I κ B α 蛋白中锚蛋白重复序列 (ankyrin repeats) 的结合位点发挥作用, 其阻断 NF- κ B p65 的核定位信号 (nuclear localization signal, NLS)。NF- κ B-I κ B α 复合物在核和细胞质之间穿梭 (Hayden&Ghosh, 2008)。典型 NF- κ B 通路的激活 (例如在对肿瘤坏死因子 α (TNF α) 的细胞应答中) 诱导 IKK- β 介导的 I κ B α 磷酸化和降解, 同时 NF- κ B p65 的平衡向核推移。核 NF- κ B 二聚体占据启动子和增强子区域中的 κ B 共有序列以及简并变体 (Hoffman 等, 2006 ; Gilmore, 2008)。NF- κ B 靶基因的激活还通过 NF- κ B p65 的翻译后修饰及其与转录共激活因子相互作用而进一步调节 (Hayden&Ghosh, 2008)。许多 NF- κ B 靶基因中的一个 I κ B α , 其的激活导致 I κ B α 的重新合成和 NF- κ B 转录应答的终止。

[0006] 粘蛋白是具有大量 O-糖基化的蛋白质, 其主要由上皮细胞表达。分泌的和膜结合的粘蛋白形成物理屏障, 其保护上皮细胞的顶边界不受由毒素、微生物和其他形式压力 (发生在与外界环境的交界处) 所引起的损害。跨膜粘蛋白 1 (MUC1) 也可通过其细胞质结构域将信号传递至细胞内部。除具有海胆精子的蛋白-肠激酶-agrin (protein-enterokinase-agrin, SEA) 结构域外, MUC1 没有与其他膜结合粘蛋白相似的序列 (Duraisamy 等, 2006)。因此, MUC1 翻译为单一多肽, 然后在 SEA 结构域经历自切割 (JBC, 1992 ; Macao, 2006)。

[0007] 跨膜 MUC1 的 C 端亚基 (MUC1-C) 作为受体起作用 (Ramasamy 等, 2007), 并包含足以诱导转化的 72 个氨基酸的细胞质结构域 (MUC1-CD) (Huang 等, 2005)。MUC1-C 亚基还通过依赖于其寡聚化的过程靶向核 (Leng 等, 2007)。MUC1-CD 作为被表皮生长因子受体 (Li 等, 2001)、c-Src (Li 等 2001)、糖原合酶激酶 3 β (GSK3 β) (Li 等, 1998) 和 c-Abl (Ahmad 等 2006) 磷酸化的底物起作用。MUC1-CD 还通过直接相互作用稳定 Wnt 效应物、 β -联蛋白, 因

此有助于转化 (Huang 等, 2005)。其他研究已证明 MUC1-CD 直接与 IKK β 和 IKK γ 相互作用, 并有助于激活 IKK 复合物 (Ahmad 等, 2007)。显然, 沉默 MUC1 下调 NF- κ B p65 在人癌细胞内的组成型激活, 提示 MUC1-CD 在 NF- κ B p65 通路的调节中起功能性作用 (Ahmad 等, 2007)。这些发现也暗示, 小分子可以靶向 MUC1-CD 的功能来干扰癌细胞中的 NF- κ B 信号转导。然而, 至今没有有关影响 NF- κ B 信号转导的 MUC1 拮抗剂的报道。

[0008] 信号转导和转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 家族成员也参与转化、肿瘤细胞存活、侵袭和转移 (Yu 和 Jove, 2004)。STAT3 转录因子被鉴定为白介素-6 (IL-6) 炎性应答的效应物 (Wegenka, 1994)。STAT3 通过以下来激活: Janus-激活激酶 (Janus-activated kinase, JAK)-1 磷酸化 IL-6 受体, 募集 STAT3, 之后磷酸化 STAT3 的 705 位保守酪氨酸 (Yu 和 Jove, 2004)。表皮生长因子受体的激活也与 STAT3 Tyr-705 的直接磷酸化相关。然后磷酸化的 STAT3 经历二聚化, 易位至核并诱导 STAT3 靶基因的激活, 所述靶基因编码细胞周期进展调节物 (细胞周期蛋白 D1 和 c-Myc) 和凋亡抑制物 (生存素和 Bcl-xL) (Alvarez, 2005, Alvarez, 2006)。激活的 STAT3 诱导转化 (Bromberg, 1999)。而且, STAT3 激活在多种癌和血液恶性肿瘤中被检测到 (Aaronson 和 Horvath, 2002; Bowman, 2000; Yu 和 Jove, 2004), 这与 STAT3 参与控制生长和存活之基因的转录相符。对此, JAK-1 \rightarrow STAT3 通路的小分子抑制剂在体外和动物模型中有抗癌活性 (Song, 2005; Siddiquee, 2007; Ahmad, 2008; Germain 和 Frank, 2007)。另外, 阻断 EGFR 至 STAT3 信号转导的适体抑制恶性上皮和血液细胞的生长 (Buerger, 2003)。这些发现共同支持 STAT3 通路在联系炎症与肿瘤发生中的重要性。

[0009] 发明概述

[0010] 因此, 按照本发明, 提供了在表达 MUC1 的细胞中抑制炎性信号转导的方法, 其包括将细胞与具有至少 4 个连续 MUC1 残基但不多于 20 个连续 MUC1 残基而且包含序列 CQC 的 MUC1 肽相接触, 其中 CQC 的氨基端半胱氨酸的 NH₂ 端被不一定对应于天然 MUC-1 跨膜序列的至少一个氨基酸残基所覆盖。所述肽可包含至少 5、6 或 7 个连续 MUC1 残基, 而且所述序列可更具体地包含 CQCR (SEQ ID NO: 54)、CQCRR (SEQ ID NO: 50)、CQCRRR (SEQ ID NO: 51)、CQCRRRR (SEQ ID NO: 52)、CQCRRK (SEQ ID NO: 4) 或 CQCRRKN (SEQ ID NO: 53)。所述肽可包含 MUC1 的不多于 10 个连续残基、11 个连续残基、12 个连续残基、13 个连续残基、14 个连续残基、15 个连续残基、16 个连续残基、17 个连续残基、18 个连续残基或 19 个连续残基。

[0011] MUC1 阳性细胞可以是肿瘤细胞、内皮细胞或炎性细胞, 例如巨噬细胞、B 细胞、T 细胞、树突状细胞、骨髓源性抑制细胞、NK 细胞或嗜中性粒细胞。所述肽可以与细胞递送结构域融合, 例如聚 D-R、聚 D-P 或聚 D-K。所述方法还可包括将细胞与第二抗炎剂接触, 例如类固醇或 COX-2 抑制剂。第二抗炎剂的接触可在肽之前、之后或与其同时进行。所述肽包含的可以全部是 L 氨基酸、全部是 D 氨基酸或者包含 L 和 D 氨基酸的混合物。炎性信号转导可包括 NF- κ B 介导的信号转导或 STAT 介导的信号转导, 例如 STAT3 介导的信号转导。NF- κ B 介导信号转导的炎性信号转导可包括 NF- κ B 激活选自 Bcl-xL 和 MUC1 的靶基因。STAT3 介导的炎性信号转导可包括 STAT3 激活选自以下的靶基因: 细胞周期蛋白 D1、生存素、Idp1、Idp2、Cdkn1C、Lefty1、Mest、Aes1、Zfp57、Zfp3611、Sh3bp1、Ccnd3 和 MUC1。

[0012] 在另一实施方案中, 提供了在表达 MUC1 的细胞中抑制 MUC1 与 NF- κ B 或 STAT 结合的方法, 其包括将细胞与具有至少 4 个连续 MUC1 残基但不多于 20 个连续 MUC1 残基而且

包含序列 CQC 的 MUC1 肽相接触,其中 CQC 的氨基端半胱氨酸的 NH₂ 端被不一定对应于天然 MUC-1 跨膜序列的至少一个氨基酸残基所覆盖。

[0013] 在另一实施方案中,提供了在表达 MUC1 的细胞中抑制 MUC1 与 I κ B α 竞争结合 NF- κ B 的方法,其包括将细胞与具有至少 4 个连续 MUC1 残基但不多于 20 个连续 MUC1 残基而且包含序列 CQC 的 MUC1 肽相接触,其中 CQC 的氨基端半胱氨酸的 NH₂ 端被不一定对应于天然 MUC-1 跨膜序列的至少一个氨基酸残基所覆盖。

[0014] 在另一实施方案中,提供了在表达 MUC1 的细胞中抑制 MUC1 诱导的 NF- κ B 核转位的方法,其包括将细胞与具有至少 4 个连续 MUC1 残基但不多于 20 个连续 MUC1 残基而且包含序列 CQC 的 MUC1 肽相接触,其中 CQC 的氨基端半胱氨酸的 NH₂ 端被不一定对应于天然 MUC-1 跨膜序列的至少一个氨基酸残基所覆盖。

[0015] 在又一实施方案中,提供了抑制对象中的炎症应答的方法,包括向所述对象施用具有至少 4 个连续 MUC1 残基但不多于 20 个连续 MUC1 残基而且包含序列 CQC (SEQ ID NO: 4) 的 MUC1 肽,其中 CQC 的氨基端半胱氨酸的 NH₂ 端被不一定对应于天然 MUC-1 跨膜序列的至少一个氨基酸残基所覆盖。所述肽可包含至少 5、6 或 7 个连续 MUC1 残基,而且所述序列可更具体地包含 CQCR、CQCRR、CQCRRR、CQCRRRR、CQCRRK 或 CQCRRKN。所述肽可包含 MUC1 的不多于 10 个连续残基、11 个连续残基、12 个连续残基、13 个连续残基、14 个连续残基、15 个连续残基、16 个连续残基、17 个连续残基、18 个连续残基或 19 个连续残基。

[0016] 炎症应答可由 NF- κ B 介导的信号转导或 STAT 介导的信号转导(例如 STAT3 介导的信号转导)引起。肽可与细胞递送结构域融合,例如聚 D-R、聚 D-P 或聚 D-K。施用可包括静脉内、动脉内、口服、瘤内、皮下、表面或腹腔内施用,或者局部、区域、系统或持续施用。抑制可包括抑制或解除炎症应答。所述方法还包括向对象施用第二抗炎治疗,例如类固醇或 COX2 抑制剂。第二抗炎治疗的施用可在肽之前、之后或与其同时进行。对象可以是人。所述肽可以以 0.1-500mg/kg/天施用,或更特别地,以 10-100mg/kg/天施用。所述肽可以每日施用,例如施用 7 天、2 周、3 周、4 周、1 个月、6 周、8 周、2 个月、12 周或 3 个月。所述肽可以每周施用,例如施用 2 周、3 周、4 周、6 周、8 周、10 周或 12 周。所述肽包含的可以全部是 L 氨基酸、全部是 D 氨基酸或者包含 L 和 D 氨基酸的混合物。

[0017] 在又一实施方案中,提供了药物组合物,其包含 (i) 具有至少 4 个连续 MUC1 残基但不多于 20 个连续 MUC1 残基而且包含序列 CQC 的 MUC1 肽,其中 CQC 的氨基端半胱氨酸的 NH₂ 端被不一定对应于天然 MUC-1 跨膜序列的至少一个氨基酸残基所覆盖;和 (ii) 除 (i) 外的第二抗炎剂。第二抗炎剂是类固醇或 COX-2 抑制剂。

[0018] 考虑本文描述的任何方法或组合物都可参照本文描述的任何其他方法或组合物实施。

[0019] 当在权利要求和/或说明书中无数量词与术语“包含”一起使用时,可以表示“一”,但也具有“一或更多”、“至少一”和“一或多于一”的含义。词“约”是指所示数值加或减 5%。

[0020] 根据下述详细说明,本发明的其他目的、特征和优点将变得显而易见。然而应当理解,指出本发明优选实施方案的详细描述和具体实施例仅仅以说明的方式给出,因为对本领域技术人员而言,根据该详细描述,在本发明的精神和范围内的各种变化和修饰将变得显而易见。

附图说明

[0021] 下述附图构成本发明说明书的一部分,包括它们以进一步阐明本发明的某些方面。参照一幅或多幅这些附图并结合详细说明可以更好地理解本发明。

[0022] 图 1A-D :MUC1-C 与 NF- κ B p65 相关联。(图 1A-C) 所示细胞的裂解物用抗-p65 或对照 IgG 进行免疫沉淀。沉淀物用抗-MUC1-C 和抗-p65 进行免疫印迹。(图 1D) 将 ZR-75-1 细胞的裂解物用结合了谷胱甘肽珠的 GST 或 GST-MUC1-CD 孵育。吸附物用抗-p65 进行免疫印迹。通过考马斯亮兰染色评估引入物 GST 蛋白。

[0023] 图 2A-D :MUC1 减弱 I κ B α 和 NF- κ B p65 的结合。(图 2A-C) 用抗-p65 或对照 IgG 对所示 ZR-75-1/ 载体、ZR-75-1/MUC1 siRNA(图 2A)、HeLa/ 载体、HeLa/MUC1(图 2B)、3Y1/ 载体和 3Y1/MUC1-CD(图 2C) 细胞的胞浆裂解物进行免疫沉淀。沉淀物用抗 I κ B α 和抗 p65 的抗体进行免疫印迹。(图 2D) 在存在或不存在递增量的 MUC1-CD 的情况下,将结合了谷胱甘肽珠的 GST 和 GST-I κ B α 用 p65(186-306) 孵育。吸附物用抗-p65 进行免疫印迹(上)。引入物(input)MUC1-CD 通过用抗-MUC1-C 进行免疫印迹来评估(中)。引入物 GST 和 GST-I κ B α 蛋白通过考马斯亮兰染色评估(下)。

[0024] 图 3A-D :MUC1-C 促进 NF- κ B p65 对 Bcl-xL 基因启动子的占据。(图 3A) 固定 ZR-75-1/ 载体和 ZR-75-1/MUC1siRNA 细胞并用抗-MUC1-C(绿色)和抗-NF- κ B p65(红色)双染色。细胞核用 TO-PRO-3 染色。(图 3B 和 3C) 将 ZR-75-1/ 载体、ZR-75-1/MUC1 siRNA(图 3B)、HeLa/ 载体和 HeLa/MUC1(图 3C) 细胞的可溶性染色质用抗 p65 或 IgG 对照进行免疫沉淀。最终的 DNA 提取物用覆盖 Bcl-xL 启动子 NF- κ B-RE(-597 至 -304) 或对照区域(-1001 至 -760) 的引物对进行 PCR 扩增。(图 3D) 将 ZR-75-1 细胞的可溶性染色质用抗 MUC1-C 或对照 IgG 进行免疫沉淀,并分析 Bcl-xL NF- κ B-RE 或对照区域序列(左)。在 Re-ChIP 实验中,抗 MUC1-C 沉淀物被释放,用抗 p65 再免疫沉淀,然后分析 Bcl-xL 启动子序列(右)。

[0025] 图 4A-D :在 MCF-10A 细胞对 TNF α 的应答中 MUC1-C 与 NF- κ B p65 相互作用。(图 4A) 将 MCF-10A 细胞用 20ng/ml TNF α 刺激所示时间。将裂解物用抗 MUC1-C 和抗 β -肌动蛋白进行免疫印迹。(图 4B) 将未处理或用 20ng/ml TNF α 刺激 24 小时的 MCF-10A 细胞裂解物用抗 p65 或对照 IgG 进行免疫沉淀。沉淀物用所示抗体进行免疫印迹。(图 4C) 将未处理或用 20ng/ml TNF α 刺激 24 小时的 MCF-10A 细胞可溶染色质用抗 MUC1-C 进行免疫沉淀,然后分析 MUC1 NF- κ B 结合基序启动子序列。(图 4D) 在 Re-ChIP 实验中,抗 MUC1-C 沉淀物被释放,用抗 p65 再免疫沉淀,然后分析 MUC1 NF- κ B 结合基序启动子序列。

[0026] 图 5A-D :MUC1-C 促进 NF- κ B p65 介导的 MUC1 启动子激活。(图 5A 和 5B) MCF-10A 细胞用对照或 p65siRNA 合并物转染 72 小时。不处理转染的细胞或将其用 TNF α 刺激 24 小时。将裂解物用所示抗体进行免疫印迹(图 5A)。然后转染细胞以表达 NF- κ B-Luc 报告物或 MUC1 启动子-Luc 报告物(pMUC1-Luc) 和 SV-40-Renilla-Luc 质粒(作为对照)(图 5B)。(图 5C 和 5D) 将 MCF-10A 细胞用对照或 MUC1siRNA 合并物转染 72 小时。不处理转染细胞或将其用 TNF α 刺激 24 小时。将裂解物用所示抗体进行免疫印迹(图 5C)。然后转染细胞以表达 NF- κ B-Luc 报告物或 MUC1 启动子-Luc 报告物(pMUC1-Luc) 和 SV-40-Renilla-Luc 质粒(作为对照)(图 5D)。转染后 48 小时测量萤光素酶的活性。结果表示为与用对照

siRNA 转染的未处理细胞（值指定为 1）所得相比的激活倍数（三次独立实验的平均数 ± 标准差）。

[0027] 图 6A-D :MUC1/CQC 肽阻断 MUC1 和 NF- κ B p65 之间的相互作用。（图 6A）具有聚-dArg 转导结构域的 MUC1/CQC (G0-201) 和 MUC1/AQA (CP-1) 肽的序列。在存在 MUC1/CQC 或 MUC1/AQA 的情况下，在室温下将 GST-MUC1-CD 用纯化的 NF- κ B p65 孵育 1 小时。将谷胱甘肽珠的吸附物用抗 p65 进行免疫印迹（左）。不处理 MCF-10A 细胞，或者在存在 5 μ M MUC1/CQC 或 MUC1/AQA 肽（每 24 小时添加）的情况下将其用 TNF α 刺激 72 小时。将抗 p65 沉淀物用所示抗体进行免疫印迹（右）。（图 6B 和 6C）不处理 MCF-10A 细胞，或者在存在 5 μ M MUC1/CQC 或 MUC1/AQA 肽（每 24 小时添加）的情况下将其用 TNF α 刺激 72 小时。将可溶染色质用抗 MUC1-C（左）或抗 p65（右）进行沉淀，然后分析 MUC1 NF- κ B 结合基序启动子序列（图 6B）。将裂解物用所示抗体进行免疫印迹（图 6C）。（图 6D）MUC1-C 以自诱导调节回路通过 IKK 与 p65 的相互作用激活 NF- κ B 通路的预计作用的模型。

[0028] 图 7A-E :MUC1-C 细胞质结构域与 NF- κ B p65 和 p65RHD 结合。（图 7A-B）将所示细胞的裂解物用抗 p65 或对照 IgG 进行免疫沉淀。将沉淀物用抗 MUC1-C 和抗 p65 进行免疫印迹。（图 7C）将 ZR-75-1 细胞的裂解物用结合了谷胱甘肽珠的 GST 或 GST-MUC1-CD 孵育。将吸附物用抗 p65 进行免疫印迹。引入物 GST 蛋白通过考马斯亮兰染色评估。（图 7D-E）用纯化的 p65(1-180)（图 7D）或 p65(186-306)（图 7E）孵育 GST、GST-MUC1-CD 和 GST-I κ B α 。吸附物和引入物用抗 p65 进行免疫印迹。

[0029] 图 8 :ZR-75-1 乳腺癌细胞中的 MUC1 沉默。使用 BLOCK-iT 靶点筛选系统 (Invitrogen) 产生小干扰 RNA (siRNA)，其靶向 MUC1 序列 (AAGTTCAGTGCCCAGCTCTAC (SEQ ID NO :55)) 和对照序列 (CGCTTACCGATTTCAGAATGG (SEQ ID NO :56))。siRNA 盒用于产生所述慢病毒 (Kawano 等, 2007)。在存在聚凝胺 (Sigma) 时以感染复数 5 用慢病毒感染 ZR-75-1 细胞。选择表达 EGFP 的细胞克隆。裂解物用所示抗体进行免疫印迹。

[0030] 图 9A-D :MUC1-C 直接与 STAT3DBD 结合。（图 9A）将 ZR-75-1（左）和 MCF-7（右）细胞的裂解物用抗 STAT3 或对照 IgG 进行免疫沉淀。将沉淀物用所示抗体进行免疫印迹。（图 9B）将 ZR-75-1 细胞的裂解物用结合了谷胱甘肽珠的 GST 和 GST-MUC1-CD 孵育。将吸附物用抗 STAT3 进行免疫印迹。引入物 GST 和 GST-MUC1-CD 蛋白通过考马斯亮兰染色评估。（图 9C）显示 MUC1 细胞质结构域的氨基酸序列，指示了磷酸化和结合位点。用纯化的重组 STAT3 孵育结合了谷胱甘肽珠的 GST、GST-MUC1-CD、GST-MUC1-CD(1-45) 和 GST-MUC1-CD(46-72)。将吸附物用抗 -STAT3 进行免疫印迹。引入物 GST 和 GST-MUC1-CD 融合蛋白质通过考马斯亮兰染色评估。（图 9D）STAT3 的结构。用纯化的 MUC1-CD 孵育结合了谷胱甘肽珠的 GST、GST-STAT3（全长；1-770 位氨基酸）、GST-MUC1-CD（N 端；1-257 位氨基酸）、GST-MUC1-CD（DBD；257-514 位氨基酸）和 GST-MUC1-CD（C 端；514-770 位氨基酸）。将吸附物用抗 MUC1-C 进行免疫印迹。引入物 GST 和 GST-STAT3 融合蛋白通过考马斯亮兰染色评估。

[0031] 图 10A-D :MUC1-C 与 STAT3 转录复合物相关联。（图 10A-B）表示 STAT 结合位点 (SBS) 位置的 MUC1 启动子区域略图。将 ZR-75-1（图 10A）和 MCF-7（图 10B）细胞的可溶染色质用抗 STAT3（左）和抗 MUC1-C（右）进行免疫沉淀。最终的 DNA 提取物用覆盖 MUC1 启动子 STAT 结合位点 (SBS；-689 至 -414) 和对照区域 (CR；+4524 至 +4745) 的引物对进行

PCR 扩增。(图 10C-D) 将所示细胞的可溶染色质用抗 STAT3 沉淀,并分析 MUC1 启动子 SBS 和 CR 序列。在 re-ChIP 实验中,抗 STAT3 沉淀物被释放,用抗 MUC1-C 再免疫沉淀,然后分析 MUC1 启动子序列。

[0032] 图 11A-D:在 MCF-10A 细胞对 IL-6 的应答中 MUC1-C 与 STAT3 相互作用。(图 11A) 将 MCF-10A 细胞用 IL-6 刺激所示时间。将全细胞裂解物(左)和核裂解物(右)用所示抗体进行免疫印迹。(图 11B) 用 IL-6 刺激 MCF-10A 细胞 24 小时。将裂解物用抗 STAT3 或对照 IgG 进行免疫沉淀。将沉淀物用所示抗体进行免疫印迹。(图 11C) 将被 IL-6 刺激所示时间的 MCF-10A 细胞的可溶染色质用抗 STAT3 或对照 IgG 进行沉淀。分析沉淀物的 MUC1 启动子 SBS 和 CR 序列。(图 11D) 将对照和 IL-6 刺激的 MCF-10A 细胞的可溶染色质用抗 STAT3 沉淀,并分析 MUC1 启动子 SBS 和 CR 序列。在 re-ChIP 实验中,释放抗 STAT3 沉淀物,用抗 MUC1-C 再免疫沉淀,然后分析 MUC1 启动子序列。

[0033] 图 12A-D:IL-6 对 MUC1 启动子的激活由 STAT3 介导。(图 12A 和 B)MCF-10A 细胞用对照或 STAT3 siRNA 合并物转染 72 小时。然后不处理转染细胞或将其用 IL-6 刺激 24 小时。裂解物用所示抗体进行免疫印迹(图 12A)。然后转染细胞以表达 MUC1 启动子-Luc 报告物(pMUC1-Luc)和 Renilla-Luc 质粒。转染后 48 小时测量萤光素酶的活性(图 12B)。结果表示为与用对照 siRNA 转染的未处理细胞(值指定为 1)所得相比的激活倍数(三次独立实验的平均数 ± 标准差)。(图 12C) 转染 MCF-10A 以表达野生型或在 STAT 结合位点突变(mSBS)的 pMUC1-Luc 以及 Renilla-Luc。24 小时后,不处理细胞或用 IL-6 刺激 24 小时,然后测定萤光素酶活性。结果表示为与用野生型 pMUC1-Luc 转染的未处理细胞(值指定为 1)所得相比的激活倍数(三次独立实验的平均数 ± 标准差)。(图 12D) 用对照或 STAT3siRNA 处理 MCF-10A。24 小时后,不处理细胞或将其用 IL-6 刺激 24 小时,然后分析萤光素酶活性。结果表示为与用对照 siRNA 转染的未处理细胞(值指定为 1)所得相比的激活倍数(三次独立实验的平均数 ± 标准差)。

[0034] 图 13A-D:MUC1-C 促进 STAT3 占据 MUC1 启动子。(图 13A 和 B)MCF-10A 细胞用对照或 MUC1siRNA 合并物转染 72 小时。然后不处理转染细胞或将其用 IL-6 刺激 24 小时。用抗 STAT3 沉淀可溶染色质,并分析 MUC1 启动子 SBS 和 CR 序列(图 13A)。然后转染细胞以表达 MUC1 启动子-Luc 报告物(pMUC1-Luc)和 Renilla-Luc 质粒。转染后 48 小时测量萤光素酶的活性(图 13B)。结果表示为与用对照 siRNA 转染的未处理细胞(值指定为 1)所得相比的激活倍数(三次独立实验的平均数 ± 标准差)。(图 13C) 用抗 STAT3 沉淀 ZR-75-1/载体和 ZR-75-1/MUC1 siRNA 细胞的可溶染色质,并分析 MUC1 启动子 SBS 和 CR 序列。(图 13D) 转染 ZR-75-1/载体和 ZR-75-1/MUC1 siRNA 细胞以表达 pMUC1-Luc 和 Renilla-Luc。转染后 48 小时测量萤光素酶的活性。结果表示为与 ZR-75-1/MUC1 siRNA 细胞(值指定为 1)所得相比的激活倍数(三次独立实验的平均数 ± 标准差)。

[0035] 图 14A-D:在 IL-6 刺激的 MCF-10A 细胞中 G0-201 阻断 MUC1-C 和 STAT3 之间的相互作用。(图 14A) 在室温中在 G0-201 或 CP-1 的存在下与纯化的 MUC1-CD 孵育 GST-STAT31 小时。谷胱甘肽珠的吸附物用抗 MUC1-C 进行免疫印迹(图 14B-C)。在 5mM G0-201 或 CP-1(每 24 小时添加)的存在下用 IL-6 刺激 MCF-10A 细胞 72 小时。抗 STAT3 沉淀物用所示抗体进行免疫印迹(图 14B)。用抗 STAT3 或抗 MUC1-C 沉淀可溶性染色质,并分析 MUC1 启动子 SBS 和 CR 序列(图 14C)。(图 14D)pMUC1-Luc。

[0036] 图 15 :MUC1-CD 吻合肽 (Stapled Peptide) 的序列。

[0037] 图 16A :MUC1-CD 吻合肽对非小细胞肺癌细胞 H1650 生长的作用。为评价对 MUC1 功能抑制的敏感性,用 1 和 5 μ M MUC1 CQC 吻合肽 (GO-200-1B) 处理 H1650NSCLC 细胞 7 天。用 5 μ M GO-200-1B 处理 H1650 细胞与生长的显著抑制和细胞数降低相关。

[0038] 图 16B :GO-200-2B 对细胞增殖的作用。非小细胞肺癌细胞系 H-1975 培养在含有 10% 热失活胎牛血清、100 单位 /mL 青霉素、100 μ g/ml 链霉素和 2mmol/L L- 谷氨酰胺的 DMEM。细胞在处理前一天重新接种。用 5 μ M GO-200-2B 处理细胞 3 天,细胞活力由台盼蓝排除法测定。

[0039] 图 17 :不同 MUC1-CD CQC 区域肽对激素依赖性乳腺癌细胞生长的作用。为确定暴露于包含不同 MUC1-CD CQC 区域的肽是否影响生长,用 5 μ M 不同的肽处理 ZR-75-1 乳腺癌细胞 4 天并监测细胞增殖。显著地,与未处理的细胞相比有极大的生长抑制。

[0040] 图 18 :不同 MUC1-CD CQC 区域肽对非小细胞癌细胞生长的作用。用 5 μ M GO-203、GO-203-2 或 GO-203cyc 处理非小细胞肺癌细胞 A5497 天。第 7 天的活细胞数通过台盼蓝排除法测定,通过比较未处理细胞的细胞生长来计算生长抑制百分比。

[0041] 图 19 :不同 MUC1-CD CQC 区域肽对非小细胞癌细胞 H1975 生长的作用。用 5 μ M 不同的 MUC1-CD CQC 区域肽处理非小细胞肺癌细胞 H1975 6 天。第 6 天的活细胞数通过台盼蓝排除法测定。结果证明,用 5 μ M 不同肽处理 H1975 细胞与显著的生长抑制相关。

[0042] 图 20 :不同 MUC1-CD CQC 区域肽对三阴性乳腺癌细胞生长的作用。用 5 μ M 不同的 MUC1-CD CQC 区域肽处理三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 6 天。第 6 天的活细胞数通过台盼蓝排除法确定。结果证明,用不同肽处理 MDA-MB-231 细胞与显著的生长抑制相关。

[0043] 图 21 :更短的 GO-203 肽对 ZR-75-1 乳腺癌细胞增殖的作用。将人 ZR-75-1 乳腺癌细胞培养在补充了 10% 热失活胎牛血清、100 单位 /mL 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 中。每天用 5 μ M 的不同肽处理细胞 4 天,细胞活力通过台盼蓝排除法确定。与 GO-210 相比,每天用 5 μ M GO-203 (SEQ ID NO :53)、GO-207 (SEQ ID NO :4)、GO-208 (SEQ ID NO :50) 和 GO-209 (SEQ ID NO :54) 处理 ZR-75-1 乳腺癌细胞 4 天与显著的生长抑制相关。

[0044] 说明性实施方案的描述

[0045] 本发明人和其他人已对 MUC1 在癌症中的作用进行了广泛研究。如上所述,人 MUC1 是异源二聚体糖蛋白,其作为单一多肽翻译,并在内质网中被切割成 N 端和 C 端亚基 (Ligtenberg 等,1992 ;Macao 等,2006 ;Levitin 等,2005)。MUC1 的异常过表达在大多数癌症中被发现 (Kufe 等,1984),其赋予非锚定依赖性生长和致瘤性 (Li 等,2003a ;Huang 等,2003 ;Schroeder 等,2004 ;Huang 等,2005)。其他研究已证明 MUC1 的过表达赋予对氧化应激和基因毒性抗癌剂所诱导凋亡的抗性 (Yin 和 Kufe,2003 ;Ren 等,2004 ;Raina 等,2004 ;Yin 等,2004 ;Raina 等,2006 ;Yin 等,2007)。

[0046] 栓系 (tethered) 和分泌的粘蛋白家族的作用是在上皮细胞表面提供保护性屏障。在上皮层有损坏时,邻近细胞间的紧密连接被破坏,由于细胞开始 heregulin 诱导的修复程序而丧失极性 (Vermeer 等 2003)。MUC1-N 从细胞表面脱落 (Abe 和 Kufe,1989),剩余 MUC1-C 的作用是作为将环境压力信号传至细胞内的转导物。对此,MUC1-C 与 ErbB 受体家族成员形成细胞表面复合物,而且 MUC1-C 应答于 heregulin 刺激而靶向核 (Li 等,2001 ;Li 等,2003c)。MUC1-C 还通过 MUC1 细胞质结构域 (CD) 与联蛋白家族成员的直接相互作用从而

将 ErbB 受体和 Wnt 信号转导通路整合来发挥作用 (Huang 等, 2005 ;Li 等, 2003c ;Yamamoto 等, 1997 ;Li 等, 1998 ;Li 等, 2001 ;Li 和 Kufe, 2001)。其他研究已证明, MUC1-CD 被糖原合酶激酶 3 β 、c-Src、蛋白激酶 C δ 和 c-Abl 磷酸化 (Raina 等, 2006 ;Li 等, 1998 ;Li 等, 2001 ;Ren 等, 2002)。

[0047] 负责 MUC1-C 核靶向的机制未知。包含典型核定位信号 (NLS) 的蛋白质通过首先结合至输入蛋白 α (importin α), 然后结合至输入蛋白 β 而输入核 (Weis, 2003)。承载物 (cargo)- 输入蛋白 α / β 复合物通过与核孔蛋白结合而停靠在核孔, 并且通过依赖于 Ran GTPase 的机制转运通过核孔。典型的 NLS 是单组分 (monopartite) 的, 其带有 4-5 个碱性氨基酸的单一簇; 或者是双组分 (bipartite) 的, 带有由 10-12 个氨基酸的接头分隔开的两簇碱性氨基酸。MUC1-CD 包含并不符合单组分 NLS 原型的 RRK 基序 (Hodel 等, 2002)。然而, 包含非典型 NLS 的某些蛋白质通过直接结合至输入蛋白 β 转运通过核孔 (Kau 等, 2004)。输入蛋白 β 与一些核孔蛋白相关联 (Ryan 和 Wentz, 2000), 所述核孔蛋白包括 Nup62, 其位于核孔复合物的细胞质和核质两面 (Percipalle 等, 1997)。其他研究已表明, β - 联蛋白通过不依赖于输入蛋白和核孔蛋白的机制输入核中 (Suh 和 Gumbiner, 2003)。

[0048] 2006 年, 本发明人报道 MUC1 通过涉及与 Nup62 结合的机制输入核 (Leng 等, 2007)。他们也证明 MUC1 通过 MUC1 细胞质结构域中的 CQC 基序形成寡聚体, 而且 MUC1 寡聚化是核输入所必需的。2007 年, 他们还证明 MUC1 在人癌细胞内的过表达与 NF- κ B p65 的组成型激活相关 (Ahmad 等, 2007)。已表明 MUC1 在体内与高分子量 I κ B 激酶 (IKK) 复合物相互作用, 而且 MUC1 细胞质结构域与 IKK β 和 IKK γ 直接结合。MUC1 与 IKK β 和 IKK γ 二者的相互作用对 IKK β 激活是必需的, 其导致 I κ B α 的磷酸化和降解。这些发现表明, MUC1 对 IKK β 的生理激活是重要的, 而且如在人癌症中所发现的, MUC1 过表达赋予 IKK β -NF- κ B p65 通路的持续诱导。

[0049] 在另外的未发表工作中, 本发明人已将其研究扩展至进一步阐明 CQC 基序在寡聚体形成中的作用。他们还证明对应于这一区域的短肽能够以干扰 MUC1 寡聚体形成, 阻止其转运至肿瘤细胞核中。这些肽能抑制肿瘤细胞生长, 而且诱导这些细胞的凋亡甚至肿瘤组织的坏死。

[0050] 考虑到 MUC1 在炎症疾病状态中的新作用, 本发明人试图研究这些肽是否能用于治疗炎症疾病。目前的研究证明, MUC1-CD 与 NF- κ B p65 直接结合并阻断 NF- κ B p65 和 I κ B α 之间的相互作用。本发明人现在证明, MUC1-C 亚基与 NF- κ B 靶基因启动子上的 NF- κ B p65 相关联, 并促进 NF- κ B 介导的转录。结果还证明 MUC1-C 寡聚化抑制剂阻断 MUC1 与 NF- κ B p65 的相互作用并且阻断炎症 NF- κ B 通路的组成型激活。此外, 已证明与 STAT3 (另一个炎性信号转导因子) 的类似相互作用, MUC1 对该过程的参与甚至更多。

[0051] 下面更详细地描述本发明的这些和另一些方面。

[0052] I. MUC1

[0053] A. 结构

[0054] MUC1 是粘蛋白型糖蛋白, 其表达于正常分泌性上皮细胞的顶边界 (Kufe 等, 1984)。MUC1 作为单一肽合成并在内质网中将前体切割成两个亚基, 之后形成异源二聚体 (Ligtenberg 等, 1992)。切割可通过自催化过程介导 (Levitan 等, 2005)。大于 250kDa 的 MUC1N 端 (MUC1N-ter, MUC1-N) 亚基包含数量可变的 20 个氨基酸的串联重复, 其因高度保

守变化而不完全并且被 O- 连接聚糖修饰 (Gendler 等,1988 ;Siddiqui 等,1988)。MUC1-N 通过与约 23kDa 的 C 端亚基 (MUC1C-ter,MUC1-C) 二聚化而栓系于细胞表面,所述 C 端亚基包含 58 个氨基酸的胞外区、28 个氨基酸的跨膜区和 72 个氨基酸的细胞质结构域 (CD ;SEQ ID NO :1) (Merlo 等,1989)。人 MUC1 序列在以下显示 :

[0055] GSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVFPF
FSAQSGAGVPGWGIALLLVLCVLAIVYLIALLAV **COCRRKNYGOLDIFPAR**
DTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAA TSANL (SEQ
ID NO :2)

[0056] 加粗序列表示 CD,下划线部分是寡聚化抑制肽 (SEQ ID NO :3)。随着正常上皮细胞转化成癌细胞,MUC1 在胞质内和整个细胞膜上异常过表达 (Kufe 等,1984 ;Perey 等,1992)。与细胞膜结合的 MUC1 通过网格蛋白介导的内吞作用靶向内涵体 (Kinlough 等,2004)。另外,MUC1-C 而不是 MUC1-N 靶向核 (Balduis 等,2004 ;Huang 等,2003 ;Li 等,2003a ;Li 等,2003b ;Li 等,2003c ;Wei 等,2005 ;Wen 等,2003) 和线粒体 (Ren 等,2004)。

[0057] B. 功能

[0058] MUC1 与 ErbB 受体家族成员 (Li 等,2001b ;Li 等,2003c ;Schroeder 等,2001) 以及 Wnt 效应子、 β - 联蛋白 (Yamamoto 等,1997) 相互作用。表皮生长因子受体和 c-Src 将 MUC1 细胞质结构域 (MUC1-CD) 的 Y-46 磷酸化,从而增加 MUC1 和 β - 联蛋白的结合 (Li 等,2001a ;Li 等,2001b)。MUC1 和 β - 联蛋白的结合也被糖原合酶激酶 3 β 和蛋白激酶 C δ 调节 (Li 等,1998 ;Ren 等,2002)。MUC1 与 β - 联蛋白共定位于核内 (Balduis 等,2004 ;Li 等,2003a ;Li 等,2003c ;Wen 等,2003),并共同激活 Wnt 靶基因的转录 (Huang 等,2003)。其他研究显示 MUC1 还与 p53 直接结合并调节 p53 靶基因的转录 (Wei 等,2005)。值得注意的是,MUC1 过表达足以诱导非锚定依赖性生长和致癌性 (Huang 等,2003 ;Li 等,2003b ;Ren 等,2002 ;Schroeder 等,2004)。

[0059] 大多数线粒体蛋白质在核内编码,并且通过线粒体外膜和内膜中的易位复合物输入线粒体内。某些线粒体蛋白质包含 N 端线粒体靶向序列,并且与线粒体外膜中的 Tom20 相互作用 (Truscott 等,2003)。其他线粒体蛋白质包含内部靶向序列,并且与 Tom70 受体相互作用 (Truscott 等,2003)。近期工作显示,无内部靶向序列的线粒体蛋白质通过 HSP70 与 HSP90 的复合物递送至 Tom70 (Young 等,2003)。

[0060] II. MUC1 肽

[0061] A. 结构

[0062] 本发明考虑设计、生产及使用多种 MUC1 肽。这些肽的结构特征如下。首先,所述肽具有不多于 20 个的连续 MUC1 残基。因此,术语“具有不多于 20 个的连续残基的肽”(甚至包含术语“包含”时)不应被理解为包含更多数量的连续 MUC1 残基。其次,所述肽包含 CQC 基序,而且还可包含 CQCR、CQCRR 或 CQCRRK 基序。因此,所述肽具有 (至少)MUC1-C 结构域的这 4、5 或 6 个连续残基。第三,所述肽有至少 1 个氨基酸残基与 CQCRRK 基序第一个 C 残基的 NH₂ 端一侧连接,使得所述第一个 C 残基被与其连接的至少一个氨基酸所“覆盖”。该残基可以是 MUC1 中天然存在的 (即来自跨膜结构域),可以随机选择 (选自 20 个天然氨基酸或其类似物中的任一个),或者可以是另一肽序列的一部分 (例如,用于纯化的标签序列、稳定化序列或细胞递送结构域)。

[0063] 通常,所述肽为 50 个残基或更少,并且包含不多于 20 个的连续 MUC1 残基。全长可以是 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 或 50 个残基。考虑的肽长度范围是 4-50 个残基、7-50 个残基、4-25 个残基、7-25 个残基、4-20 个残基、7-20 个残基、3-15 个残基和 7-15 个残基。连续 MUC1 残基数可以是 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20。考虑的连续残基范围是 4-20 个残基、5-20 个残基、6-20 个残基、7-20 个残基、4-15 个残基、5-15 个残基、6-15 个残基和 7-15 个残基。

[0064] 本发明可以使用 L- 构型氨基酸、D- 构型氨基酸或其混合物。尽管 L 氨基酸占蛋白质中所发现氨基酸的绝大多数,但 D- 氨基酸在异域海生生物(例如海蜗牛)产生的一些蛋白质中发现。它们也是细菌细胞壁肽聚糖的主要组分。D- 丝氨酸可在脑中起神经递质的作用。氨基酸构型的 L 和 D 规则不涉及氨基酸本身的光学活性,而是涉及理论上可合成氨基酸的甘油醛异构体的光学活性(D- 甘油醛是右旋的,L- 甘油醛是左旋的)。

[0065] “全 D”肽的一种形式是逆反(retro-inverso)肽。天然多肽的逆反修饰涉及这样的氨基酸的合成组装,即其具有与相应 L- 氨基酸立体化学相反的 α - 碳,即 D- 氨基酸相对于天然肽序列顺序相反。因此逆反类似物具有颠倒的末端和颠倒的肽键方向(NH-CO 而不是 CO-NH),而大概维持了与天然肽序列相同的侧链拓扑结构。见美国专利 6,261,569,其通过引用并入本文。

[0066] 如上所述,本发明考虑融合或缀合细胞递送结构域(也称为细胞递送载体,或细胞转导结构域)。该结构域是本领域公知的,而且通常以短的两性或阳离子肽和肽衍生物为特征,通常包含多个赖氨酸和精氨酸残基(Fischer, 2007)。特别感兴趣的是聚 D-Arg 和聚 D-Lys 序列(例如,右旋残基,长 8 个残基)。

[0067] 表 1

	CDD/CTD 肽	SEQ ID NO
	QAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRPFVE	5
	RQIKIWFQNRRMKWKK	6
	RRMKWKK	7
	RRWRRWRRWRRWRR	8
	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	9
	YGRKKRRQRRR	10
	RKKRRQRRR	11
	YARAAARQARA	12
	RRRRRRRR	13
	KKKKKKKK	14
	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKXIL	15
	LLILLRRIRKQANAHSK	16
	SRRHCRSKAKRSRHH	17
	NRARRNRKRV	18
	RQLRIAGRRLRGRSR	19
	KLIKGRTPKFGK	20
[0068]	RRIPNRRPRR	21
	KLALKLALKALKAALKLA	22
	KLAKLAKKLAKLAK	23
	GALFLGFLGAAGSTNGAWSQPKKKRKV	24
	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	25
	GALFLGWLGAAGSTMGAKKKRKV	26
	MGLGLHLLVLAAALQGAKSKRKV	27
	AAVALLPAVLLALLAPAAANYKKPKL	28
	MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP	29
	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	30
	DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGDXPDP	31
	PPPPPPPPPPPP	32
	VRLPPPVRLLPPPVRLLPPP	33
	PRPLPPRPG	34
	SVRRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPP	35
	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	36
	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	37
	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK	38

	CDD/CTD 肽	SEQ ID NO
	ALWMTLLKKVLKAAAKAALNAVLVGANA	39
	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	40
	INLKALAALAKKIL	41
	GFFALIPKIISSPLPKTLLSAVGSALGGSGGQE	42
[0069]	LAKWALKQGFAKLKS	43
	SMAQDIISTIGDLVKWHIQTVNXFTKK	44
	LLGDFFRKSKFKIGKFKRIVQRIKQRIKDFLANLVPRTES	45
	LKKLLKLLKLLKLLKLLKLL	46
	KLKLLKLLKLLKLLKLL	47
	PAWRKAFRWAWRMLKAA	48

[0070] 如上所述,还考虑为体内使用而修饰的肽,其通过在氨基和 / 或羧基端添加阻断剂来利于肽在体内的存活。它们可用于肽末端在细胞摄取前倾向于被蛋白酶降解的情况。这种阻断剂可以包括但不限于连接于待施用肽的氨基和 / 或羧基端残基的另外的相关或不相关肽序列。这些试剂可通过肽合成期间化学添加,或通过本领域熟知方法由重组 DNA 技术添加。或者,阻断剂(例如焦谷氨酸或其他本领域已知分子)可以与氨基和 / 或羧基末端残基连接。

[0071] B. 合成

[0072] 使用固相合成技术来生产肽是有利的 (Merrifield, 1963)。其他肽合成技术是本领域技术人员公知的 (Bodanszky 等, 1976 ; Peptide Synthesis, 1985 ; Solid Phase Peptide Synthesis, 1984)。用于这些合成的适当保护基在上文和 Protective Groups in Organic Chemistry, 1973 中描述。这些合成方法涉及将一个或多个氨基酸残基或合适的经保护氨基酸残基依次添加到正在增长的肽链上。通常,第一个氨基酸残基的氨基或羧基被可选择性移除的合适保护基团保护。将不同的可选择性移除保护基团用于包含反应性侧链基团的氨基酸,例如赖氨酸。

[0073] 例如使用固相合成时,被保护或被衍生的氨基酸通过其未保护的羧基或氨基连接到惰性固体支持物上。然后氨基或羧基的保护基被选择性移除,序列中具有适当保护的互补(氨基或羧基)基团的下一个氨基酸与已附于固相支持物上的残基混合并反应。之后将氨基或羧基的保护基团从这个新添加的氨基酸残基上移除,然后加入下一个氨基酸(适当保护的),以此类推。所有期望的氨基酸以正确顺序连接后,任何剩余末端和侧链保护基团(和固相支持物)相继或同时移除,以提供最终的肽。本发明的肽优选不具有苄基化或甲基苄基化的氨基酸。这些保护基团部分可用于合成过程,但在使用肽前移除它们。可能需要另外的反应(如别处所述)以形成分子内连接来限制构型。

[0074] 除可使用 20 个标准氨基酸外,有大量的“非标准”氨基酸。其中两个可由遗传密码确定,但在蛋白质中相当罕见。硒半胱氨酸在 UGA 密码子(通常为终止密码子)处整合入一些蛋白质。吡咯赖氨酸在一些产甲烷古生菌的酶中被用于产生甲烷。它由密码子 UAG 编码。在蛋白质中未发现的非标准氨基酸的实例包括羊毛硫氨酸、2-氨基异丁酸、脱氢丙氨酸和神经递质 γ -氨基丁酸。非标准氨基酸常作为中间产物出现在标准氨基酸的代谢通路中,例如鸟氨酸和瓜氨酸出现在尿素循环(氨基酸分解代谢的一部分)中。非标准氨基酸

通常通过对标准氨基酸进行修饰形成。例如,同型半胱氨酸通过转硫途径或通过甲硫氨酸的脱甲基化经中间代谢物 S-腺苷甲硫氨酸形成,而羟脯氨酸由脯氨酸的翻译后修饰产生。

[0075] C. 接头

[0076] 可使用接头或交联剂将 MUC1 肽融合至其他蛋白质性序列。双功能交联剂已广泛地用于多种目的,包括亲和基质的制备、不同结构的修饰和稳定、配体和受体结合位点的鉴定以及结构研究。已证实带有两个相同功能性基团的同源双功能试剂高效诱导相同和不同的大分子或大分子亚基之间的交联,以及多肽配体与其特异性结合位点的连接。异双功能试剂包含两种不同的功能性基团。通过利用两种不同功能性基团的不同反应性,可选择性和顺序性地控制交联。双功能交联剂可根据其功能性基团的特异性区分,例如氨基、巯基、胍基、吡啶或羧基特异性基团。其中,靶向游离氨基的试剂尤其流行,因为它们可购得、易于合成而且它们可以采用温和的反应条件。大多数异双功能交联剂包含伯胺反应基团和巯基反应基团。

[0077] 在另一实例中,异双功能交联剂和使用交联剂的方法在美国专利 5,889,155 中描述,其具体通过整体引用并入本文。交联剂将亲核酰肼残基与亲电马来酰亚胺残基联合,在一个实例中使得醛和游离巯基偶联。可修饰交联剂以交联多种功能基团,从而用于交联多肽。在具体的肽在其天然序列中不包含能接受给定交联剂之残基的情况下,可利用一级序列的保守性遗传改变或合成氨基酸改变。

[0078] D. 设计、变体和类似物

[0079] 一方面,本发明关注包含 CQCRRK 序列的肽。鉴定出 MUC1 寡聚体形成的该关键结构后,本发明人还考虑可使用 CQCRRK 序列的变体。例如,满足 CQCRRK 序列结构限制的某些非天然氨基酸可被替换而不丧失(也许改进)生物学功能。另外,本发明人还考虑,可配制结构类似的化合物来模拟本发明肽或多肽的关键部分。这些化合物(可称为肽模拟物)可以以与本发明肽相同的方式使用,从而成为功能等同物。

[0080] 在 Johnson 等(1993)中描述了一些模拟蛋白质二级和三级元件的类似物。使用肽模拟物的基本原理是蛋白质的肽骨架主要为定向氨基酸侧链而存在,其存在方式利于分子相互作用,例如抗体和/或抗原的相互作用。因此设计肽模拟物以促成类似于天然分子的分子相互作用。

[0081] 产生特定结构的方法已在本领域公开。例如, α -螺旋模拟物在美国专利 5,446,128 ;5,710,245 ;5,840,833 和 5,859,184 中公开。产生构型限制的 β -转角和 β -凸起的方法在例如美国专利 5,440,013 ;5,618,914 和 5,670,155 中描述。其他类型的模拟转角包括反向和 γ -转角。反向转角模拟物在美国专利 5,475,085 和 5,929,237 中公开,而 γ -转角类似物在美国专利 5,672,681 和 5,674,976 中描述。

[0082] “分子建模”是指基于三维结构信息和蛋白质-蛋白质相互作用模型,定量和/或定性分析蛋白质-蛋白质物理相互作用的结构和功能。这包括传统的基于数字的分子动力学和能量最小化模型、交互式计算机图形模型、改进的分子力学模型、距离几何学和其他基于结构的受限模型。分子建模通常用计算机完成的,并且可用已知方法优化。使用 X-射线晶体学数据的计算机程序在该化合物的设计中尤其有用。例如,程序(如 RasMol)可用于产生三维模型。计算机程序(如 INSIGHT(Accelrys, Burlington, MA)、GRASP(Anthony Nicholls, Columbia University)、Dock(Molecular Design Institute, University of

California at San Francisco) 和 Auto-Dock(Accelrys)) 允许进一步操控和引入新结构的能力。所述方法可涉及将化合物的 3-D 结构模型输出至输出设备的额外步骤。另外, 候选化合物的 3-D 数据可与计算机数据库比较, 例如, 3-D 结构的数据库。

[0083] 本发明的化合物还可使用其他基于结构的设计 / 模拟技术 (例如见 Jackson, 1997 ; Jones 等, 1996) 从本文所述化合物的结构信息交互式设计。之后候选化合物可用本领域技术人员熟知的标准测定测试。本文描述了示例性测定。

[0084] 生物大分子 (例如蛋白质、核酸、碳水化合物和脂类) 的 3-D 结构可从通过多种方法获得的数据中确定。这些方法 (已最为有效地用于蛋白质 3-D 结构的评价中) 包括: (a) X- 射线晶体学; (b) 核磁共振 (NMR) 光谱; (c) 分析大分子确定位点之间形成的物理距离限制, 例如, 蛋白质残基之间的分子内化学交联 (例如, PCT/US00/14667, 其公开内容通过引用整体并入本文), 和 (d) 以目的蛋白质一级结构知识为基础的分子建模法, 例如, 同源建模技术、线程算法 (threading algorithm) 或 ab initio 结构模型 (使用计算机程序, 如 MONSSTER (Modeling Of New Structures from Secondary and Tertiary Restraints) (例如见国际申请 No. PCT/US99/11913, 其公开内容通过引用整体并入本文)。根据本发明, 也可使用其他分子模型技术 (例如, Cohen 等, 1990 ; Navia 等, 1992, 其公开内容通过引用整体并入本文)。所有这些方法生成能用计算机分析的数据。也可用于本发明方法的其他光谱方法 (但目前不提供生物分子原子水平的结构细节) 包括圆二色谱和荧光和紫外 / 可见光吸收光谱。一个优选的分析方法是 X- 射线晶体学。以下提供该方法和核磁共振光谱的描述。

[0085] X- 射线晶体学。X- 射线晶体学是基于目的分子或分子复合物晶体中原子核周围电子云的特征波长的 X- 射线衍射。该技术使用纯化的生物大分子或分子复合物的晶体 (但这些通常包括溶剂组分、辅因子、底物或其他配体) 来确定组成特定生物大分子的原子近原子解析。通过 X- 射线晶体学解析 3-D 结构的先决条件是能使 X- 射线强烈衍射的排序良好的晶体。该方法将 X- 射线束引导至许多相同分子的规则重复阵列上, 以使 X- 射线从阵列衍射, 其衍射模式可导出单个分子的结构。例如, 排序良好的球状蛋白质分子晶体是大的球形或椭球形物体, 有不规则的表面。晶体包含单个分子之间的大通道。这些通道 (正常情况下占据一半以上的晶体体积) 充满了无序的溶剂分子, 而且蛋白质分子只在少数小区域相互接触。这是为什么蛋白质晶体的结构通常与溶液中蛋白质的结构相同的原因。

[0086] 获得目的蛋白质的方法描述如下。晶体的形成依赖于许多不同的参数, 包括 pH 值、温度、生物大分子的浓度、溶剂和沉淀剂的性质以及加入的离子或蛋白质配体的存在。可能需要许多常规结晶实验来筛选所有这些参数, 以得到给出适用于 X- 射线衍射分析的晶体的参数组合。结晶机器人可自动化和加快可重复性设置大量结晶实验的工作 (例如见美国专利 5, 790, 421, 其公开内容通过引用整体并入本文)。

[0087] 多肽结晶发生在溶液中, 其中多肽浓度超过其最大溶解度 (即多肽溶液是过饱和的)。这种溶液可通过减少多肽浓度恢复平衡, 优选通过多肽晶体的沉淀。通常, 通过添加试剂 (其改变多肽的表面电荷或干扰多肽和大量水之间的相互作用多肽以促进引起结晶的结合) 可从过饱和溶液中引起结晶。

[0088] 结晶通常是在 4°C 和 20°C 之间实施。通常使用被称为 “沉淀剂” 的物质, 通过多肽分子周围形成不利于能量的沉淀消耗层来减少多肽在浓缩溶液中的溶解度 (Weber,

1991)。除了沉淀剂,有时向多肽结晶溶液添加其他材料。这些包括调整溶液 pH 值和盐的缓冲液,和降低多肽溶解度的盐。本领域已知多种沉淀剂,并且包括以下物质:乙醇、3-乙基-2-4 戊二醇和许多聚二醇,例如聚乙二醇 (PEG)。沉淀溶液可包括,例如,13-24% PEG 4000、5-41%硫酸铵和 1.0-1.5M 氯化钠,而且 pH 值范围是 5.0-7.5。其他添加剂可包括 0.1M HEPES、2-4% 丁醇、20-100mM 醋酸钠、50-70mM 柠檬酸、120-130mM 磷酸钠、1mM 乙二胺四乙酸 (EDTA) 和 1mM 二硫苏糖醇 (DTT)。这些试剂在缓冲液中制备,以多种组合滴加至结晶缓冲液。待结晶的蛋白质可被修饰,例如,通过磷酸化或通过使用磷酸模拟物(例如钨酸、甲次砷酸或硫酸)。

[0089] 常用的多肽结晶方法包括以下技术:成批、悬滴、晶种引发和透析。在每个这些方法中,重要的是在成核后通过维持过饱和溶液而促进持续的结晶。在成批方法中,多肽与沉淀剂混合以达到过饱和,并且容器被密封并静置直到晶体出现。在透析法中,多肽被保存在置于含有沉淀剂之溶液中的封闭透析膜中。跨膜平衡增加多肽和沉淀剂的浓度,从而使多肽达到过饱和水平。

[0090] 在优选的悬滴技术 (McPherson, 1976) 中,通过将沉淀剂加入浓缩的多肽溶液中制备最初的多肽混合物。多肽和沉淀剂的浓度使得在该最初形式中多肽不结晶。将该混合物的小滴置于载玻片上,载玻片倒置并悬于第二溶液储库之上。然后密封系统。通常,第二溶液包含较高浓度的沉淀剂或其他脱水剂。沉淀剂浓度的差异使蛋白质溶液有比第二溶液更高的蒸汽压力。由于包含两种溶液的系统是密封的,平衡得以建立,水从多肽混合物转移到第二溶液。该平衡增加多肽溶液中的多肽和沉淀剂的浓度。在多肽和沉淀剂的临界浓度,可形成多肽晶体。

[0091] 结晶的另一种方法将成核位点引入到浓缩的多肽溶液中。通常,制备浓缩的多肽溶液,并将多肽晶种引入至该溶液。如果多肽和任何沉淀剂的浓度正确,晶种将提供成核位点,其周围形成更大晶体。

[0092] 结晶的又一种方法是电结晶法,其中使用在电极附近亥姆霍兹层自动排列的蛋白质大分子的偶极矩(例如见美国专利 5,597,457,其公开内容通过引用整体并入本文)。

[0093] 一些蛋白质可能难于结晶。然而,本领域技术人员已可获得几种技术来诱导结晶。例如,移除蛋白质氨基或羧基末端的柔性多肽区段可利于结晶蛋白质样品的产生。移除这种区段可通过使用分子生物学技术或用蛋白酶(例如胰蛋白酶、糜蛋白酶或枯草杆菌蛋白酶)处理蛋白质来实现。

[0094] 在衍射实验中,X-射线的窄平行光束来自 X-射线源,并指向晶体以产生衍射光束。该入射的主光束对大分子和溶剂分子都造成损害。因此,冷却晶体(例如,至 -220°C 和 -50°C 之间)以延长其寿命。主光束必须从多个方向照射晶体以产生所有可能的衍射点,因此实验中的晶体是在光束里旋转的。衍射点记录在胶片上或使用电子探测器记录。曝光的胶片要在扫描装置进行数字化和量化,而电子探测器将其检测到的信号直接输入计算机。电子区域探测器显著减少收集和测量衍射数据所需的时间。每个衍射束(其作为胶片上或探测器板上的点被记录)由三个属性定义:振幅,从点的强度测量;波长,由 X-射线源设定;和相,其在 X-射线实验中丢失。对所有衍射光束均需要所有三个属性,以确定引起衍射光束的原子的位置。确定相的方法之一叫做多重同晶置换 (Multiple Isomorphous Replacement, MIR),其需要将外源的 X 射线散射物质(例如重原子,如金属原子)引入至晶

体的晶胞。对 MIR 更详细的说明见美国专利 6,093,573(15 列),其公开内容通过引用整体并入本文。

[0095] 原子坐标参照源自涉及数据傅立叶合成的数学方程的直角坐标系(X、Y 和 Z 定位),该数据源自经晶体形式目的生物大分子的原子(散射中心)衍射的 X-射线单色光束获得的模式。衍射数据被用来计算在晶体(晶胞)重复单位的电子密度图。电子密度图是用来建立晶体的单位晶胞内单个原子的位置(原子坐标)。原子坐标的绝对值表示原子间的空间关系,因为来自原子坐标的绝对值可通过沿 X、Y 和 / 或 Z 轴旋转和 / 或平移(共同或单独)而改变,同时保持原子间相同的相对空间关系。因此,认为绝对原子坐标值组可旋转或平移调整以与之前从另一样品的分析中确定的设定值相符生物大分子(例如蛋白质)具有与从其他样品所获得大分子相同的原子坐标。

[0096] X-射线晶体学的更多细节可从共同待决美国申请 No. 2005/0015232、美国专利 6,093,573 和国际申请 No. PCT/US99/18441、PCT/US99/11913 和 PCT/US00/03745 中获得。所有这些专利文件的公开内容通过引用整体并入本文。

[0097] NMR 光谱。X-射线结晶学需要目的大分子的单晶,而 NMR 测量在接近生理条件的溶液中进行。然而,NMR 衍生结构不如晶体衍生结构详细。

[0098] 尽管直到最近 NMR 光谱学的使用仅限于阐明相对小分子(例如 100-150 个氨基酸残基的蛋白质)的 3-D 结构,最近的进展(包括目的分子的同位素标记和横向弛豫优化光谱(transverse relaxation-optimized spectroscopy,TROSY))已允许该方法扩展到分析更大的分子,例如分子量为 110kDa 的蛋白质(Wider,2000)。

[0099] NMR 使用射频辐射检测用特定射频脉冲化的均匀磁场中的磁原子核环境。该脉冲干扰这些原子与非零自旋核的核磁化。系统回到平衡时检测瞬态时域信号。瞬态信号傅立叶转变成频域产生一维 NMR 光谱。这些谱峰代表多种活性核的化学位移。原子的化学位移是由其局部电子环境决定的。二维 NMR 实验可提供在结构和三维空间中多种原子接近的信息。蛋白质结构可通过实施数个二维(有时三维或四维)NMR 实验并且在一系列蛋白质折叠模拟中使用所得信息作为限定而确定。

[0100] 更多关于 NMR 光谱的信息(包括从 NMR 实验中获得的原始数据如何可用于确定大分子 3-D 结构的详细描述)可见:Protein NMR Spectroscopy,Principles and Practice,(1996);Gronenborn 等(1990);和 Wider(2000),如上,所有它们的公开内容通过整体引用并入本文。

[0101] 还感兴趣的是基于本发明肽化合物的氨基酸序列设计的肽模拟化合物。肽模拟化合物是合成化合物,具有与选定肽三维构型基本上相同的三维构型“基序”。肽基序为肽模拟化合物提供了抑制 MUC1 寡聚化的能力。肽模拟化合物可具有增强其体内效用的另外特性,例如增加的细胞通透性和延长的生物半衰期。肽模拟物通常有部分或完全非肽的骨架,但侧链基团与存在于肽(肽模拟物所基于的肽)氨基酸残基上的侧链基团相同。在本领域已知几种化学键(例如酯、硫酸酯、硫代酰胺、逆酰胺(retroamide)、还原羰基、二亚甲基和酮亚甲基键)通常用于在构建蛋白酶抗性肽模拟物时取代肽键。

[0102] 吻合/缝合(Stitched)肽。肽用作治疗剂时的一种特定修饰是 Aileron Therapeutics 的所谓“吻合肽(Stapled Peptide)”技术。“吻合”肽的一般做法是通过经氨基酸侧链连接接头来修饰肽内的两个关键残基。一旦合成,接头通过催化剂连接,从而生

成将肽物理性限制在其天然 α -螺旋形状的桥。除了帮助保持与靶分子相互作用所需的天然结构外,该构型还提供抵抗肽酶的稳定性而且促进细胞渗透性。

[0103] 更具体地,术语“肽吻合”可涵盖使用任何数量的反应条件和/或催化剂以便于连接两个含双键的侧链、两个含三键的侧链或一个含双键和一个含三键的侧链(它们可存在于多肽链中),来提供单个“吻合”多肽。在一个具体的实施方案中,引入吻合物(staple)需要标准肽合成的修饰:在沿肽链的两个位置上引入 α -甲基、 α -烯基氨基酸,它们之间由三个或六个中间残基($i+4$ 或 $i+7$)分隔开。这些间隔使吻合的氨基酸位于 α -螺旋的同-边,跨越一个($i+4$)或两个($i+7$)螺旋转角。充分延长并结合了树脂的肽可暴露于钌催化剂,其通过烯烃复分解反应促进烯烃链交联,从而形成全烃大环交联。美国专利 7,192,713 和 7,183,059 以及美国专利公开 2005/02506890 和 2006/0008848 描述了该技术,它们通过引用并入本文。也见 Schafmeister 等, *Journal of the American Chemical Society*, 122(24):5891-5892(2000); Walensky 等, *Science* 305:1466-1470(2004)。此外,术语“肽缝合”涉及单一肽链中的多个串联“吻合”事件,以提供“缝合”(多吻合)多肽,其中每个通过引用并入本文。缝合肽技术的一个具体实施例见 WO 2008/121767。

[0104] IV. 治疗

[0105] A. 药物制剂和施用途径

[0106] 在涉及临床应用时,需要以适于目的施用的形式制备药物组合物。通常,这需要制备基本上无热源并且无可对人或动物有害的其他杂质的组合物。

[0107] 通常期望使用适合的盐和缓冲液以使递送载体稳定并能被靶细胞摄取。当将重组细胞引入患者时也会使用缓冲液。本发明的含水组合物包含溶解或分散在可药用运载体或水基质中的有效量的细胞载体。这些组合物还被称为接种物。短语“可药用的”是指当施用给动物或人时,分子实体和组合物不产生不利、过敏或其他意外反应。本文所用的“可药用载体”包括任何和所有溶剂、分散基质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。对药物活性物质使用这些基质和试剂是本领域公知的。除了与本发明的载体或细胞不相容的任何常规基质或试剂外,考虑了其在治疗组合物中的使用。补充的活性成分也可掺入组合物中。

[0108] 本发明的活性组合物可包括常规药物制剂。本发明的这些化合物通过任何常规途径施用,前提是通过该途径可到达靶组织。这些途径包括口服、鼻、口含、直肠、阴道或表面途径。或者,可通过原位、皮内、皮下、肌内、瘤内、腹腔内或静脉内注射施用。这些组合物通常可作为可药用组合物施用,如前所述。

[0109] 活性化合物还可以肠胃外或腹腔内施用。作为游离碱或可药用盐的活性化合物溶液还可在适当混合了表面活性剂(例如羟丙基纤维素)的水中制备。分散体系还可在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油中制备。在正常储存和使用条件下,这些制剂包含防腐剂以防止微生物生长。

[0110] 适合注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散液和无菌粉末(用于临时制备无菌可注射溶液或分散液)。在所有情况下,所述形式必须是无菌的,而且必须以容易注射的程度流动。其在制造和储存的条件下必须是稳定的,而且必须在保存中防止微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。载体可以是溶剂或分散基质,包括例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其适合的混合物和植物油。可保持适当的流动性,例如

通过使用包衣（例如卵磷脂）、在分散液的情况下通过保持所需的粒径，和通过使用表面活性剂。微生物作用的防止可通过多种抗菌剂和抗真菌剂来实现，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况下，优选包含等渗剂，例如糖或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中使用延缓吸收剂（例如单硬脂酸铝和明胶）来实现。

[0111] 无菌可注射溶液这样制备：通过将所需量的活性化合物与根据需要的上述多种其他组分一起掺入适当溶剂中，然后过滤除菌。通常，分散液通过将多种无菌活性组分掺入无菌载体中来制备，所述无菌载体包含基础分散基质和所需上述其他组分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术，从之前经无菌过滤的溶液中产生活性组分和任何其他期望组分的粉末。

[0112] 本文所用的“可药用载体”包括任何和所有溶剂、分散基质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。对药物活性物质使用这些基质和试剂是本领域公知的。除了与所述活性组分不相容的任何常规基质或试剂外，考虑了其在治疗组合物中的使用。补充的活性成分也可掺入组合物中。

[0113] 对于口服施用，本发明的多肽可与赋形剂一起掺合，并且以非吞服漱口剂和洁牙剂的形式使用。可通过将所需量的活性组分掺入合适的溶剂（例如硼酸钠溶液（Dobell's 溶液））中来制备漱口剂。或者，可将活性组分掺入包括硼酸钠、甘油和碳酸氢钾的杀菌洗液中。活性组分还可分散于洁牙剂（包括凝胶、软膏、粉末和浆体）中。可将治疗有效量的活性组分添加到牙膏中，所述牙膏可包含水、粘合剂、磨料、调味剂、发泡剂和湿润剂。

[0114] 本发明的组合物可以以中性或盐的形式制备。可药用盐包括酸加成盐（与蛋白质的游离氨基一起形成）和与无机酸（例如盐酸或磷酸）或有机酸（例如醋酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等）形成的盐。与游离羧基形成的盐也可衍生自无机碱（例如钠、钾、铵、钙或铁的氢氧化物）和有机碱（如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等）。

[0115] 制成后，溶液以与剂型相容的方式并且以治疗有效量施用。制剂易于以多种剂型施用，例如注射溶液、药物释放胶囊等。对于含水溶液的肠胃外施用，例如，如需要应适当地缓冲溶液，而且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释液等渗。这些特定的水溶液特别适合静脉内、肌内、皮下和腹腔内施用。对此，根据本发明公开内容本领域技术人员已知可用的无菌水基质。例如，一剂量可溶解在 1ml 等渗 NaCl 溶液中，加入 1000ml 皮下输注液中，或在输注的推荐位点注射（见例如，“Remington's Pharmaceutical Sciences,” 第 15 版，1035-1038 页和 1570-1580 页）。根据待治疗对象的状态需要进行一些剂量变化。在任何情况下，负责给药的人员将为个体对象确定适当的剂量。此外，对于人的施用，制剂应满足 FDA 生物制品标准处要求的无菌性、致热原性、一般安全性和纯度标准。

[0116] B. 炎性疾病状态和病症

[0117] i. 败血症 (Sepsis)

[0118] 败血症是严重的医学病症，其特征为感染引起的全身炎症状态。传统上术语败血症与败血病 (septicaemia, septicemia) (“血液中毒”) 互换使用。然而，这些术语不再被视为同义，认为败血病 (septicemia) 是败血症的亚类型。

[0119] 败血症的症状通常涉及潜在的感染过程。当败血症发生感染时，由此产生的症状是全身炎性应答综合征 (SIRS)：一般性炎症、发热、白细胞数升高（白细胞增多）以及心率增加（心动过速）和呼吸频率增加（呼吸急促）。除上述外，症状还包括流感样畏寒。

[0120] 导致败血症的免疫应答是全身性炎症应答,其引起的炎症和凝血途径的广泛激活。这可发展为循环系统功能失常,即使在最佳治疗下,也可导致多器官功能失常综合征,并最终导致死亡。

[0121] 如果高度怀疑或已证实感染,并且满足两个或更多个以下全身炎症应答综合征(SIRS)标准,则认为患败血症:

[0122] 心率 > 每分钟 90 次

[0123] 体温 < 36 (96.8° F) 或 > 38°C (100.4° F)

[0124] 换气过度(呼吸频率高) > 每分钟 20 次,或对于血气, P_aCO_2 小于 32mmHg。

[0125] 白细胞计数 < 4000 细胞/mm³ 或 > 12000 细胞/mm³ (< 4×10^9 或 > 12×10^9 细胞/L),或杆状形式大于 10% (不成熟白血细胞)。

[0126] 然而,公认的定义随最新增加的败血症征兆和症状列表持续更新,以反映临床实践经验。

[0127] 较严重的败血症亚类型是严重败血症(有急性器官功能障碍的败血症)和败血性休克(有难治性动脉低血压的败血症)。或者,当满足两个或更多个全身炎症应答综合征标准而无感染迹象时,患者可被简单地诊断为“SIRS”。患 SIRS 和急性器官功能障碍的患者可以被称为“严重 SIRS”。

[0128] 如果患者有败血症和全身灌注不足的迹象;远端器官功能障碍或血清乳酸大于 4mmol/dL,则他们被确定为患“严重败血症”。如果患者患有败血症并且在适当的流体团(fluid bolus)(通常 20mg/kg crystalloid)后有低血压,则他们被确定为患有败血性休克。成人的败血症标准不适用于一个月以下的婴儿。对婴儿,只有出现感染和与感染的全身应答相符的“群发(constellation)”的征兆和症状才需要进行诊断。

[0129] 败血症的治疗依赖于抗生素、被感染积液的手术引流、补液和对器官功能障碍的适当支持。这可包括对肾衰竭的血液透析、对肺功能障碍的机械通气、对循环衰竭的血液制品输注以及药物和流体治疗。在长期患病期间确保足够营养(如需要通过肠胃外给养)是重要的。

[0130] 在对败血症患者的充分护理中存在的问题是,确认败血症后治疗的施用被延迟。发表的研究证明,每延迟施用适当的抗生素治疗一小时与死亡率上升 7% 相关。成立了名为“Surviving Sepsis Campaign”的大型国际合作组织来对传授败血症的知识,并改善败血症患者的预后。该组织已发表了以证据为基础的严重败血症护理策略综述,其目的是在随后几年发表一套完整的标准。

[0131] 针对炎症过程本身的大部分治疗未能改善预后,然而,已证明 drotrecogin alfa(激活蛋白 C,凝血因子之一)将严重败血症的死亡率从约 31% 降低至约 25%。要施用 drotrecogin alfa,患者必须患有严重败血症或败血性休克,其 APACHE II 评分为 25 或更大并且出血风险低。对于具有相对肾上腺功能不全(通过 ACTH 刺激检测)的败血性休克患者,已证明低剂量的氢化可的松治疗是有希望的。

[0132] 疑似患败血症的婴儿的标准治疗由以下组成:支持性护理、用静脉内流体保持流体状态,和 β -内酰胺抗生素(例如氨苄青霉素)和氨基糖甙(例如庆大霉素)的组合。

[0133] ii. 外伤

[0134] 身体外伤是严重的改变身体的物理损伤,例如截肢。钝力外伤是因钝器或用钝器

进行碰撞或施加其他外力所引起的一类身体外伤,而穿刺性外伤是皮肤或组织被物体穿刺的一类身体外伤。外伤也可描述为意外(例如事故)或计划(手术的情况)两者。二者的特征都可以是轻微至严重的组织损伤、失血和/或休克,而且二者都可导致随后的感染,包括败血症。本发明提供了外伤的治疗,包括预防治疗(在医疗程序的情况下)和外伤损伤发生后的治疗。

[0135] 手术。手术对患者使用操作指南和仪器技术来调查和/或治疗病理状态(例如疾病或损伤)以帮助改善身体功能或外表,或有时为其他原因而进行。本发明可解决如下所述的手术造成的外伤。

[0136] 作为一般性规则,当程序涉及切割患者组织或闭合之前形成的伤口时,认为该程序是手术。不一定属于该类的其他程序(例如血管成形术或内视镜检查)如果涉及普通外科程序或装置(例如使用无菌环境、麻醉、灭菌条件、常用手术器械和缝合或订合(stapling),所述程序可被认为是手术。认为所有形式的手术都是侵入性程序;所谓的非侵入性手术通常是指不穿透待处理结构(例如激光角膜消融)的切除或到放射手术程序(例如肿瘤照射)。手术可持续几分钟到几小时。

[0137] 手术程序通常根据紧迫性、程序类型、涉及的身体系统、侵袭程度以及特殊仪器分类。进行选择手术(elective surgery)以矫正不危及生命的疾病,并且应患者的要求实施,取决于外科医生和手术设施的可获得性。急诊手术是必须迅速完成以拯救生命、肢体或功能能力的手术。进行探查性手术以帮助诊断或确诊。治疗性手术治疗之前诊断过的疾病。

[0138] 截肢涉及切掉身体部分,通常是肢或指。再植涉及重新连接截断的身体部分。重建手术涉及受伤、残缺或变形身体部分的重建。进行整容手术以改善其他方面正常的结构的外观。切除是将患者的器官、组织或其他身体部分切除。移植手术是通过在患者中植入来自不同人(或动物)的另一器官或身体部分来进行替代。从活人或动物移除的器官或身体部分用于移植也是一类手术。

[0139] 在一个器官系统或结构上进行手术时,可通过涉及的器官、器官系统或组织分类。实例包括心脏手术(在心脏上进行)、胃肠手术(在消化道及其附属器官内进行)和矫形手术(在骨骼和/或肌肉上进行)。

[0140] 微创手术涉及较小的外切口来将小型化仪器插入体腔或结构,如在腹腔镜手术或血管成形术中所进行的。与之相反,开放手术过程(open surgical procedure)需要大切口以接近目标区域。激光手术涉及用激光代替手术刀或类似手术器械来切割组织。显微手术涉及外科医生使用手术显微镜来观察微小结构。机器人手术使用手术机器人(例如达芬奇或宙斯手术系统)以在外科医生指导下控制仪器。

[0141] 外伤性出血。外伤性出血造成了大部分的大范围国际影响损伤,引起大比例的死亡,在伤者中造成大的发病率。尽管入院前护理不同,外伤性出血的急性处理在世界各地是类似的,并遵循被广泛接受的已公布准则。重伤患者的护理有四个阶段(经常重叠):复苏、手术和重症监护阶段。在所有外伤护理阶段,出血的诊断和控制应放在首位,而且这对失血性休克的患者尤其重要。出血控制的早期实施包括用直接按压、压力包扎或止血带直接控制可见的严重出血源;固定长骨和骨盆骨折;和保持患者温暖。在复苏阶段,在手术前温暖静脉内流体、降压复苏控制出血并且提供血液和血液制品的适当输注。在手术阶段,手

术控制大出血和任何其他损伤,并另外提供输血。最后,重症监护阶段提供术后支持和组织灌注。

[0142] iii. 急性胰腺炎

[0143] 急性胰腺炎是迅速发病的胰腺炎症。根据其严重程度,即使治疗它也可导致严重并发症和高死亡率。虽然轻微病例通常通过保守方法或腹腔镜成功治疗,严重病例需要侵入性手术(通常多于一种的干预)来控制疾病进展。

[0144] iv. 急性呼吸窘迫综合征

[0145] 急性呼吸窘迫综合征(ARDS)(又称呼吸窘迫综合征(RDS)或成人呼吸窘迫综合征(与IRDS不同))是对多种形式肺损伤的严重反应。这是导致通透性肺水肿增加的最重要疾病。

[0146] ARDS是由多种直接和间接损害引起的严重的肺部疾病。其特征是导致换气受损的肺实质炎症,伴随全身释放的炎性介质引起的炎症、低氧血症,并经常导致多器官功能衰竭。该病症危及生命而且经常是致命的,一般需要机械通气和进入加护病房。不太严重的形式被称为急性肺损伤(ALI)。

[0147] ARDS可发生在损伤或急性疾病攻击的24至48小时内。在这种情况下,患者通常表现出呼吸浅短、呼吸急促和与病因相关的症状,即休克。长期患病也可触发ARDS,例如疟疾。ARDS可在特别急性的感染病例发病后的某一时间发生。

[0148] 动脉血气分析和胸部X-射线透视允许通过使用上述标准进行推断来正式诊断。虽然通常包括严重低氧血症,从未系统地研究定义异常PaO₂的适当阈值。应排除肺水肿的任何心脏原因。这可通过放置肺动脉导管以测量肺动脉楔压来进行。但这不是必需的而且现在很少实施,因为出现的大量证据表明使用肺动脉导管不会导致危重病(包括ARDS)患者的治疗效果改善。在大多数病例中,胸部X-射线平片足以记录双侧肺泡浸润。而CT扫描得出ARDS肺实质的更准确图像,其在ARDS患者的临床护理上应用很少,仍主要是研究工具。

[0149] 急性呼吸窘迫综合征通常在加护病房用机械通气治疗。通气通常通过过口-气管插管或气管造口术(当认为需要长时间通气时(≥ 2 周))递送。非侵入性通气的可能性限于疾病的极早期,或更好的情况是用来在个体中防止疾病(非典型性肺炎、肺挫伤、大手术患者)发生的风险。治疗根本原因是必要的,因为它倾向于保持以ARDS为主。得到微生物培养物结果后,必须尽快施用适当的抗生素治疗。如果局部微生物监测有效,则经验性治疗可能是适当的。多于60%的ARDS患者在肺损伤发病之前或之后经历了(医院内)肺部感染。当用手术可治疗时,必须对感染源进行手术。当诊断出败血症时,应制定适当的局部治疗方案。

[0150] v. 缺血再灌注损伤

[0151] 再灌注损伤是指在缺血期后血液供应返回组织时引起的组织损伤。血液中氧气和营养物质的缺乏产生了这样的状态,即其中循环的恢复通过诱导氧化应激导致炎症和氧化损伤,而不是正常功能的恢复。

[0152] 再灌注损伤的损害部分归因于受损组织的炎性应答。新返回血液运载至区域中的白血细胞释放应答于组织损伤的大量炎性因子(例如白细胞介素)和自由基。返回的血流重新将氧气引入细胞,损害细胞蛋白质、DNA和质膜。细胞膜的损害可继而导致更多自由基

的释放。这种反应性物质还可间接作用于氧化还原信号转导从而启动凋亡。白细胞也可在小毛细血管中积聚,将其阻塞并导致更多的缺血。

[0153] 再灌注损伤在脑缺血性级联(其涉及中风和脑外伤)中起作用。认为反复发作的缺血和再灌注损伤是导致慢性伤口(例如褥疮和糖尿病足溃疡)形成和难以愈合的一个因素。持续压力限制血液供应并导致缺血,并且再灌注期间发生炎症。随着该过程的重复,最终损伤组织并足以引起伤口。

[0154] 在长期缺血(60分钟或以上)中,次黄嘌呤作为ATP代谢的分解产物形成。由于可获得较多的氧气,黄嘌呤脱氢酶转变为黄嘌呤氧化酶。该氧化导致氧分子被转变成高反应性的过氧化物和羟基。黄嘌呤氧化酶还产生尿酸,其可作为氧化强化剂和反应性物质(例如过氧亚硝基)的清除物。再灌注过程中产生的过量一氧化氮与过氧化物反应产生强反应性物质过氧亚硝基。这些基团和反应性氧物质攻击细胞膜脂质、蛋白质和葡萄糖胺聚糖,造成更多的损害。它们还可通过氧化还原信号启动特定的生物过程。

[0155] vi. 心血管疾病

[0156] 心血管疾病是指涉及心脏或血管(动脉和静脉)的疾病类型。尽管该术语在技术上是指影响心血管系统的任何疾病,它通常是用来指与动脉粥样硬化相关的疾病(动脉疾病)。这些病症有相似的原因、机制和治疗。心血管疾病的治疗取决于每个患者具体的疾病形式,但有效的治疗无例外地包括上述预防性的生活方式改变。药物(例如降血压药物,阿司匹林和他汀类降胆固醇药物)可有所帮助。在一些情况下,可能需要用外科手术或血管成形术重新打开、修复或替换损伤血管。

[0157] 大多数西方国家面临高而且在持续上升心血管发病率。每年,与癌症相比心脏病使更多的美国人死亡。仅心脏疾病就造成全部死亡的30%,而心血管系统的其他疾病造成大量更多死亡和残疾。直到2005年,它在美国和大多数欧洲国家中是引起死亡和残疾的首要原因。大型组织学研究(PDAY)表明,血管损伤从青春期积累,使得有必要从儿童时期开始初级预防工作。

[0158] 认为一些生物标志物更详细地指示心血管疾病风险。然而,这些生物标志物的临床价值值得商榷。目前,可反映更高心血管疾病风险的生物标志物包括:

[0159] 纤维蛋白原和PAI-1的血液浓度较高

[0160] 同型半胱氨酸升高,或者甚至超过正常的一半

[0161] 不对称二甲基精氨酸的血液水平升高

[0162] 由C-反应蛋白测量的严重炎症

[0163] B型钠尿肽(BNP)的血液水平升高

[0164] 多种形式的心血管疾病包括动脉瘤、心绞痛、心律不齐、动脉粥样硬化、心肌病、脑血管病、先天性心脏病、充血性心脏衰竭、心肌炎、瓣膜病、冠心病、扩张型心肌病、舒张功能障碍、心内膜炎、血压高(高血压)、肥厚型心肌病、二尖瓣脱垂、心肌梗死和静脉血栓栓塞。

[0165] vii. 自身免疫性/炎性疾病

[0166] 本发明考虑了多种自身免疫性和/或炎性疾病状态的治疗,例如脊柱关节病、强直性脊柱炎、牛皮癣关节炎、反应性关节炎、肠病性关节炎、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、肠易激病、炎症性肠病、类风湿关节炎、青少年类风湿关节炎、家族性地中海热、肌萎缩性侧索硬化症、干燥综合征、早期关节炎、病毒性关节炎、多发性硬化症或牛皮癣。这些疾病的诊断

和治疗在文献中有详细记载。

[0167] viii. 化学治疗、放射治疗和细胞因子治疗的毒性

[0168] 在癌症患者中,多种形式的癌症治疗(包括化学治疗、放射治疗和细胞因子)与毒性相关,有时毒性是严重的。在至少部分毒性由组蛋白的细胞外作用所引起的范围内,本发明旨在用本发明的药物组合物来减少这种毒性,从而减少或缓解部分患者的不适,并且允许更高剂量的治疗。

[0169] ix. 烧伤

[0170] 在医学上,烧伤可以是由热、冷、电、化学物质、摩擦或辐射所引起的损伤。一度烧伤通常限于发红(红斑)、白色斑块和损伤部位的轻微疼痛。这些烧伤通常仅延伸入表皮。二度烧伤还另外地填充有澄清流体,皮肤表面起泡,并且可以根据累及神经的水平涉及或多或少的疼痛。二度烧伤涉及浅层(乳头状)真皮,并且还可涉及深层(网状)真皮层。三度烧伤还另外地具有皮肤的炭化,并产生硬的、皮革样焦痂。焦痂是与未受影响的身体部分分隔的结痂。通常还有紫色流体。这些类型的烧伤通常是无痛的,因为在烧伤区域神经末梢已被破坏。严重烧伤(尤其是如果覆盖了大面积的身体)可导致死亡;肺部的任何细微烧伤损伤(例如通过吸入烟尘)都是紧急医疗事故。

[0171] 损伤皮肤下组织(例如肌肉或骨)的烧伤有时被归类为四度烧伤。这些烧伤被分为另外三种程度:四度烧伤导致皮肤不可恢复地丧失,五度烧伤导致肌肉不可恢复地丧失,而六度烧伤导致骨被烧焦。

[0172] “表面厚度”,“部分厚度”(其分为表面和深层类)和“全厚度”的新分类更精确地指示皮肤的表皮、真皮和皮下层,而且被用来指导治疗并预测预后。

[0173] 化学烧伤通常是由化学化合物引起的,例如氢氧化钠(碱液)、硝酸银和更严重的化合物(例如硫酸)。可引起中度至重度化学烧伤大多数化合物(但不是全部)是强酸或强碱。硝酸(作为氧化剂)可能是引起最严重烧伤的化学物质之一。氢氟酸可消融至骨,其烧伤通常不会立即显示。可引起中度至重度化学烧伤的大多数化学物质被称为腐蚀性的。

[0174] 电烧伤是触电、闪电击中、未用导电凝胶而进行除纤颤或心脏复率等的常见症状。经受的内伤可能与看到的“烧伤”大小不成比例,因为这些只是电流进入和穿出的伤口。

[0175] 烧伤依据总体表面积(TBSA)来评价,它是部分厚度或全厚度烧伤(表面厚度烧伤不计在内)影响的百分比。九分法(the rule of nines)是估计受影响TBSA的快速有效方法。处理烧伤人员的第一步是终止燃烧过程。对于干粉烧伤,应先刷掉粉末。对于其他烧伤,受影响区域应用大量干净水冲洗以清除异物并帮助停止燃烧过程。不应将冷水用于大面积烧伤的任何人,因为它可严重损害烧伤受害者的体温状态。在该处理阶段,评估气道状态也很关键。如果患者经受了火灾,则必须假设他或她已遭受吸入损伤(直到证明不是这种情况),并进行相应的治疗。

[0176] 一旦燃烧过程停止并确保气道状态,应根据 Parkland 公式对患者进行体积复苏(volume resuscitated)。该式表明在损伤后第一个二十四小时内递送乳酸林格氏液的量是:

[0177] 流体 = $4cc \times \% TBSA \times \text{体重 (kg)}$

[0178] % TBSA 排除任何一度烧伤

[0179] 该流体的一半应在损伤后的第一个八小时内给予,剩余的在随后的 16 小时内

给予。该式仅用于指导,输注必须根据尿输出和中心静脉压来制定。流体复苏(fluid resuscitation)不充分导致肾衰竭和死亡。全烧伤中的严重水肿可用焦痂切开术治疗。

[0180] x. 癌症

[0181] 癌症由来自组织的细胞克隆类群的过度生长引起。癌症的发生(称为癌发生)可以以多种方式模型化和表征。早已了解癌症的发生和炎症之间的关系。炎症应答参与宿主对微生物感染的防御,也指导组织修复和再生。相当多的证据指出炎症和癌症发生风险之间的联系,即慢性炎症可导致发育异常。

[0182] 研究估计,近15%的全球癌症与微生物感染有关。如人乳头状瘤病毒(HPV)、乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒、HIV和幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)的生物已与癌症相联系。在其他情况下,导致慢性刺激和随后的炎症的环境条件也可引起癌症,包括香烟的烟雾、石棉和硅石。

[0183] 在一些类型的病毒感染情况下,病毒编码的基因可促进细胞转化。一个实例是HPV癌蛋白E6和E7。然而,与癌症相关的其他微生物不以这种方式发挥作用,因为它们不转化。例如幽门螺杆菌的一些菌株包含影响宿主细胞信号转导的因子,但不包含致癌基因。有趣的是,已观察到幽门螺杆菌诱导MUC1。

[0184] 慢性炎症状态可导致基因组损伤和肿瘤发生的其他方式是化学物质。例如,宿主细胞通过产生自由基来抵抗微生物感染。除了它们的抗微生物作用,这些分子导致氧化损伤和DNA碱基氮化,这甚至在宿主细胞中增加了DNA突变的风险。

[0185] 而另一细胞失调途径可以由感染或其他炎症侵害中发生的细胞死亡引起。缺失的细胞必须通过其他细胞的扩增重新补充,有时所述其他细胞是未分化的前体细胞如组织干细胞。意料之中的是,许多炎症通路的功能是介导存活和增殖。因此,为了介导组织修复,炎症应答可无意地对细胞提供过度的生存和增殖信号,从而导致肿瘤发生。

[0186] 由于癌症和炎症之间的联系,可在癌前或有癌症风险的情况下利用本发明的肽和肽类似物减少炎症信号通路的能力,从而防止或延迟异常增生性生长的发生。

[0187] C. 治疗方法

[0188] 抑制MUC1寡聚体形成的肽或类似物通常用作抗炎剂。它们可单独或与其他调节炎症的药物联合施用给哺乳动物对象(例如人患者)。化合物也可施用给这种对象,其遗传地和/或由于如生理和/或环境因素而易患炎症,例如有炎症性疾病家族史的对象,或有慢性炎症的对象或慢性应激的对象。

[0189] 所需剂量取决于给药途径的选择;制剂的性质;患者疾病的性质;对象的体型、重量、体表面积、年龄和性别;施用的其他药物;以及主治医师的判断。合适的剂量在0.0001-100mg/kg的范围内。鉴于可使用多种化合物并且多种施用途径的效率不同,预计所需剂量有很大不同。例如,口服施用预计比静脉内注射施用需要更高的剂量。如本领域公知的可使用用于优化的标准经验性途径来调整这些剂量水平的变化。施用可以单次或多次(例如2、3、4、6、8、10、20、50、100、150或更多次)。将多肽包封于合适的递送载剂(例如,聚合微粒或可植入装置)内可增加递送效率,尤其对于口服递送。

[0190] D. 组合治疗

[0191] 在许多医学领域,用多种治疗方式治疗疾病是常见的,通常被称为“组合治疗”。炎症性疾病也不例外。

[0192] 用本发明方法和组合物治疗炎性疾病时,通常会用 MUC1 拮抗剂和至少一种其他治疗来接触靶细胞或对象。这些治疗以有效实现一个或多个疾病参数降低的组合量提供。该过程可涉及将细胞 / 对象与药剂 / 治疗二者同时接触 (例如使用包含两种药剂的单一组合物或药物制剂),或通过将两种不同的组合物或制剂同时与细胞 / 对象接触,其中一种组合物包含 MUC1 拮抗剂而另一种包含另一药剂。

[0193] 或者, MUC1 拮抗剂可在其他治疗之前或之后,其间间隔几分钟到数周。通常确保每次递送的时间之间没有超过大的时间段,以使治疗仍能对细胞 / 对象发挥有利的组合作用。在这种情况下,考虑将细胞与两种方式接触,它们彼此的间隔在约 12-24 小时内、彼此在约 6-12 小时内,或仅有约 12 小时的延迟。在一些情况下,可期望极大地延长治疗时间段;然而,各自施用之间间隔数天 (2、3、4、5、6 或 7) 至数周 (1、2、3、4、5、6、7 或 8)。

[0194] 还可设想期望 MUC1 拮抗剂或其他治疗的多于一种的施用。可采用多种组合,其中 MUC1 拮抗剂是“A”,而另一治疗是“B”,例如:

[0195] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

[0196] A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

[0197] A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

[0198] 考虑了其他组合。

[0199] 适合用于针对炎性疾病的组合治疗中的试剂或因子包括类固醇、糖皮质激素、非甾体抗炎药 (NSAIDS ;包括 COX-1 和 COX-2 抑制剂)、阿司匹林、布洛芬和萘普生。镇痛药通常与抗炎药相关,但其没有抗炎作用。一个实例是对乙酰氨基酚 (paracetamol),在美国称为醋氨酚 (acetaminophen) 并以商品名泰诺 (Tylenol) 销售。相对于通过抑制 COX 酶来减少疼痛和炎症的 NSAIDS,最近证明对乙酰氨基酚阻断内源性大麻素的再摄取,这仅减少疼痛,可能解释了其为何对炎症的作用很小。

[0200] 本领域技术人员可参照“Remington's Pharmaceutical Sciences”第 15 版,第 33 章,具体为 624-652 页。根据待治疗对象的状况会需要进行一些剂量变化。在任何情况下,负责给药的人员将确定个体对象的合适剂量。此外,对于人施用,制剂应如 FDA 生物制品标准处所要求的满足无菌性、致热原性、一般安全性和纯度标准。

[0201] 还应当指出,任何上述治疗自身就可证明对治疗炎症有用。

V. 实施例

[0202] 包括下述实施例以展示本发明的一些优选实施方案。本领域技术人员应当理解,在下面实施例中公开的技术代表由本发明人发现的在本发明的实施中发挥良好功能的技术,因此可以视为构成其实施的优选方式。然而,本领域技术人员在参考本发明公开内容后应当理解,可以对公开的具体实施方案作出许多改变但仍获得同样或类似的结果,而不背离本发明的精神和范围。

[0203] 实施例 1- 材料和方法

[0204] 细胞培养。将人 ZR-75-1 乳腺癌和 U-937 白血病细胞培养在含有 10% 热灭活胎牛血清 (FBS)、100 单位 /ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素和 2mM L- 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基中。将人 HeLa 子宫颈癌和 MCF-7 乳腺癌细胞培养在具有 10% FBS、抗生素和 L- 谷氨酰胺的 Dulbecco's 改良 Eagle's 培养基中。将人 MCF-10A 乳腺上皮细胞培养在乳腺上皮细

胞生长培养基 (MEGM ;Lonza, Walkersville, MD) 中并用 20ng/ml TNF α (BD Biosciences, San Jose, CA) 处理。在 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的存在下用 siRNA 合并物 (Dharmacon, Lafayette, CO) 进行 MCF-10A 细胞的转染。用 MIT Biopolymer Laboratory (Cambridge, MA) 合成的 5 μ M MUC1/CQC 和 MUC1/AQA 肽处理细胞。

[0205] 免疫沉淀和免疫印迹。如所述制备亚汇合细胞的裂解物 (Ren 等, 2004)。可溶蛋白质用抗 NF- κ B p65 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 沉淀。对免疫沉淀物和细胞裂解物进行使用抗 -p65、抗 -p65(180-306) (Millipore, Billerica, MA)、抗 MUC 1-C (Ab5 ;Lab Vision, Fremont, CA)、抗 I κ B α (Santa Cruz Biotechnology)、抗 Bcl-xL (Santa Cruz Biotechnology) 和抗 β -肌动蛋白 (Sigma, St. Louis, MO) 的免疫印迹。用缀合了辣根过氧化物酶的第二抗体 (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ) 和增强化学发光 (GE Healthcare) 检测免疫复合物。

[0206] 体外结合测定。如所述制备 GST、GST-MUC1-CD、GST-MUC 1-CD(1-45) 和 GST-MUC 1-CD(46-72) (Ahmad 等, 2007), 并用 p65 和一些 p65 缺失突变体孵育。将纯化的 GST-MUC1-CD 用凝血酶切割以去除 GST 部分。在 25 $^{\circ}$ C 下在存在或不存在纯化的 MUC1-CD 时, 将 GST-I κ B α (Millipore, Billerica, MA) 用 p65(186-306) 孵育 2 小时。用免疫印迹分析谷胱甘肽缀合珠的吸附物。

[0207] 免疫荧光共聚焦显微观察。如所述进行细胞的固定和透化 (Raina 等, 2006)。在 4 $^{\circ}$ C 下用封闭缓冲液中的抗 MUC1-C 和抗 NF- κ B p65 孵育过夜。将细胞用 10% 山羊血清封闭, 用抗 MUC1-C 染色, 随后用缀合有 FITC 的第二抗仓鼠抗体孵育。然后将细胞用抗 NF- κ B p65 孵育, 随后用缀合了 Texas Red 的抗小鼠 Ig 缀合物 (Jackson Immuno-Research Laboratories, West Grove, PA) 孵育。将核用 2 μ M TO-PRO-3 染色。用 Zeiss LSM510 共聚焦显微镜以 1024 \times 1024 的分辨率捕获图像。

[0208] ChIP 测定。如所述制备可溶染色质 (Wei 等, 2006), 并用抗 p65、抗 MUC1-C 或未免疫对照 IgG 进行沉淀。对于 Re-ChIP 测定, 将来自初次 ChIP 的复合物用 10mM DTT 洗脱, 在 Re-ChIP 缓冲液中稀释, 并用抗 p65 再免疫沉淀。对于 PCR, 用 50 μ l DNA 提取物中的 2 μ l 进行 25-35 个循环的扩增。

[0209] 萤光素酶测定。在 Lipofectamine 存在下用 NF κ B-Luc (Ahmad 等, 2007) 或 pMUC1-Luc (Yin 等, 2003) 和 SV-40-Renilla-Luc (Promega, Madison, WI) 转染细胞。48 小时后, 在被动裂解缓冲液中裂解细胞。裂解物用双萤光素酶检测试剂盒 (Promega) 分析萤火虫和海肾萤光素酶活性。

[0210] 实施例 2- 结果

[0211] MUC1-C 与 NF- κ B p65 相关联。为确定 MUC1 是否与 NF- κ B 相互作用, 将来自 ZR-75-1 乳腺癌细胞的抗 NF- κ B p65 沉淀物与抗 MUC1-C 亚基细胞质结构域的抗体进行免疫印迹。结果证明 MUC1-C 与 NF- κ B p65 共沉淀 (图 1A)。使用来自也过表达内源性 MUC1 的 MCF-7 乳腺癌细胞的裂解物得到类似的发现 (图 1B)。为确定 MUC1-N 亚基对关联是否是必需的, 在稳定表达外源性 MUC1-C 但不表达 MUC1-N 的 U-937 细胞中进行研究 (Agata 等, 2008)。这些细胞中 NF- κ B p65 与 MUC1-C 的共沉淀说明 MUC1-N 对相互作用不是必需的 (图 1C)。将 ZR-75-1 细胞裂解物用 GST 或包含 MUC1-CD 的 72 个氨基酸的 GST 融合蛋白进行孵育进一步证明了 MUC1-CD 和 NF- κ B p65 相关联 (图 1D)。这些发现表明在人乳腺癌细

胞中, MUC1-C 亚基与 NF- κ B p65 组成型相关联, 而且该相互作用由 MUC1-C 细胞质结构域介导。

[0212] MUC1-CD 与 NF- κ B p65 直接结合。为确定 MUC1 是否直接与 NF- κ B 结合, 本发明人将 GST、GST-MUC1-CD 或 GST-MUC1-CD 缺失突变体 (图 7A, 上图) 用纯化的重组 NF- κ B p65 孵育。对吸附物的分析证明, GST-MUC1-CD 而不是 GST 与 NF- κ B p65 结合 (图 7A, 下图)。MUC1-CD 缺失突变体的孵育进一步证明该相互作用是由 MUC1-CD (46-72) 介导的, 而不是由 MUC1-CD (1-45) 介导 (图 7A, 下图)。NF- κ B p65 是 551 个氨基酸的蛋白质, 其包含 N 端 Rel 同源结构域 (RHD) 和 C 端反式激活结构域 (TAD) (图 7B, 上图)。用纯化的 NF- κ B 缺失突变体孵育 GST-MUC1-CD 证明是与 p65 (1-306) 而不是 p65 (354-551) 结合 (图 7B, 下图)。为进一步确定负责该相互作用的 NF- κ B 区域, 本发明人将 GST-MUC1-CD 用 p65 (1-180) 和 p65 (186-306) 孵育。结果显示, MUC1-CD 与 p65 (1-180) 结合 (图 7C)。作为对照, 未检测到 GST-I κ B α 与 p65 (1-180) 的相互作用 (图 7C)。对此, I κ B α 结合至 301-304 位氨基酸处 NLS 的紧邻上游序列 (Jacobs 等, 1998 ; Huxford 等, 1998)。然而值得注意的是, MUC1-CD 和 I κ B α 二者都与 p65 (186-306) 形成复合物 (图 7D)。这些发现表明 MUC1-CD 与 I κ B α 一样直接与 NF- κ B p65RHD 结合。

[0213] MUC1-CD 与 I κ B α 竞争结合 NF- κ B p65。保守 RHD 负责 DNA 结合、二聚化和与 I κ B 抑制蛋白相关联 (Ghosh 等, 1998 ; Chen 和 Greene, 2004)。为确定 MUC1 与 RHD 区域的结合是否影响 I κ B α 的关联, 本发明人首次研究了用 MUC1 siRNA 稳定沉默 MUC1 的 ZR-75-1 细胞 (图 8)。MUC1 的沉默与 NF- κ B p65 和 I κ B α 之间结合增加有关 (图 2A)。此外, 在 HeLa 细胞中稳定表达外源性 MUC1 (Ahmad 等, 2007) 降低了 NF- κ B p65 和 I κ B α 之间的相互作用 (图 2B)。在 3Y1 细胞中稳定表达 MUC1-CD 也足以阻断 NF- κ B p65 和 I κ B α 的结合 (图 2C), 这证实 MUC1-C 细胞质结构域而不是该亚基的其他区域负责该相互作用。为确定 MUC1 是否直接影响 NF- κ B p65 与 I κ B α 的结合, 本发明人进行了竞争实验, 其中在 MUC1-CD 存在时评价了 I κ B α 与 p65 (186-306) 的结合。如所预计的, 不存在 MUC1-CD 时, 可检测到 I κ B α 与 p65 (186-306) 的结合 (图 2D)。然而显著的是, 递增量的 MUC1-CD 的添加与 I κ B α 和 p65 (186-306) 相互作用的逐渐减少相关 (图 2D)。这些发现指出, NF- κ B p65 与 I κ B α 和 MUC1-CD 形成彼此互斥的复合物。

[0214] MUC1-C 与核中的 NF- κ B p65 相关联。ZR-75-1 细胞的共聚焦分析显示 MUC1-C 和 NF- κ B p65 在核中共定位 (图 3A)。此外, 与 MUC1-CD 竞争与 NF- κ B p65 的结合一致的是, 在 ZR-75-1 细胞中沉默 MUC1 与核 NF- κ B p65 定位至细胞质相关 (图 3A)。之前的研究证明, MUC1 有助于上调 Bcl-xL 的表达 (Ahmad 等, 2007)。为确定 MUC1-C 是否影响 NF- κ B p65 转录复合物, 本发明人用抗 p65 实施 ChIP 测定。通过半定量 PCR 分析 Bcl-xL 基因启动子 (GGGACTGCCC ; -366 至 -356) 中的 NF- κ B 反应元件 (RE) (Grillot 等, 1997) 的免疫沉淀。在 ZR-75-1 细胞中, NF- κ B p65 对 Bcl-xL 启动子的占据因 MUC1 沉默而减少 (图 3B)。作为对照, 与未免疫 IgG 进行的免疫沉淀中没有检测到信号 (图 3B)。也没有检测到 NF- κ B p65 占据 NF- κ B-RE 上游的 Bcl-xL 启动子的对照区域 (CR ; -1001 至 -760) (图 3B)。HeLa 细胞的分析还证明, 外源性 MUC1 的表达与 NF- κ B p65 对 Bcl-xL 启动子占据的增加有关 (图 3C)。为确定 MUC1-C 是否存在于 NF- κ B 转录复合物中, 用抗 -MUC1-C 进行 ChIP 测定。使用 ZR-75-1 细胞的染色质, 检测到 MUC1-C 占据了 NF- κ B-RE 而不是对照区域 (图 3D, 左)。

在 Re-ChIP 测定中,释放抗 MUC1-C 复合物,用抗 p65 再免疫沉淀然后通过 PCR 进行分析。在从抗 MUC1-C 释放后,抗 p65 沉淀 NF- κ B-RE 区域(图 3D,右),表明 MUC1-C 组成型存在于被 NF- κ B 转录复合物占据的 Bcl-xL 启动子区。

[0215] 乳腺上皮细胞 MCF-10A 中 NF- κ B p65 与 MUC1-C 的可诱导相互作用。非恶性 MCF-10A 乳腺上皮细胞(Soule 等,1990;Muthuswamy 等,2001)表达内源性 MUC1,但水平比乳腺癌细胞中发现的低(Ahmad 等,2007)。然而本发明人发现,用 TNF α 刺激 MCF-10A 细胞与 MUC1 表达显著上调有关(图 4A)。与乳腺癌细胞相比,MCF-10A 细胞极少(如果有)显示 NF- κ B p65 与 MUC1-C 之间的组成型相互作用(图 4B)。随之用 TNF α 刺激 MCF-10A 细胞诱导 NF- κ B p65 和 MUC1-C 之间的相互作用(图 4B)。NF- κ B 占据共有和简并的 κ B 结合序列(5' -GGGRNWYYCC-3' (SEQ ID NO:57),其中 R 为嘌呤,N 为任意碱基,W 是腺嘌呤或胸腺嘧啶,Y 是嘧啶)。MUC1 启动子包含用于 NF- κ B 结合的潜在序列(5' -GGAAAGTCC-3' ;-589 至 -580)(Lagow 等,2002)(图 4C)。用 ChIP 分析 TNF α 刺激的(而不是未刺激的)MCF-10A 细胞证明,MUC1-C 占据 MUC1 启动子的 NF- κ B 结合基序(图 4C)。Re-ChIP 分析进一步证明,NF- κ B p65 和 MUC1-C 占据 MUC1 启动子的相同区域(图 4D)。这些发现表明与乳腺癌细胞相比,NF- κ B p65 和 MUC1-C 之间的相互作用以及它们对 MUC1 启动子的 NF- κ B 结合基序的占据在 MCF-10A 细胞中是可诱导的。

[0216] MUC1 对 NF- κ B p65 介导的转录激活的作用。为确定 MUC1 是否影响 NF- κ B 介导的转录激活,本发明人在对照和 TNF α 刺激的 MCF-10A 细胞中将 NF- κ B p65 沉默(图 5A)。NF- κ B p65 的沉默减弱了 TNF α 诱导的 MUC1-C 表达的增加(图 5A),与 NF- κ B p65 在激活 MUC1 基因转录中的潜在作用相符。如所预计的,NF- κ B p65 的沉默减弱了 TNF α 诱导的 NF- κ B-Luc 报告物的激活(图 5B,左)。显著的是,TNF α 诱导的 MUC1 启动子-Luc(pMUC1-Luc)激活也被 NF- κ B p65 沉默减弱(图 5B,右)。为评估 MUC1-C 的作用,本发明人用 MUC1 siRNA 沉默 MCF-10A 细胞中的 MUC1 表达(图 5C)。与 MUC1 对 NF- κ B p65 占据 NF- κ B-RE 的作用相符,MUC1 沉默减弱了 TNF 诱导的 NF- κ B-Luc 报告物的激活(图 5D,左)。而且,MUC1 沉默减弱了 pMUC1-Luc 报告物的激活(图 5D,右)。这些发现表明 MUC1 促进 NF- κ B p65 介导的 MUC1 启动子的转录激活。

[0217] 靶向 MUC1-CD 阻断 NF- κ B p65 的功能。为进一步确定 MUC1 在 NF- κ B p65 功能中的作用,本发明人合成了对应于 MUC1-CD(1-15)的肽,其阻断寡聚化并因而阻断 MUC1-C 细胞质结构域的功能(Leng 等,2007)。此外,合成了 CQC 基序被突变成 AQA 对照肽(图 6A)。将聚 D-精氨酸转导结构域包含在合成中,以便于所述肽进入细胞(Fischer,2007)(图 6A)。MUC1/CQC 肽在体外阻断了 MUC1-CD 与 NF- κ B p65 之间的相互作用(图 6A,左)。与之不同,MUC1/AQA 肽对该相互作用极小(如果有)(图 6A,左)。用 MUC1/CQC 而不是 MUC1/AQA 处理 MCF-10A 细胞,肽也阻断 TNF α 诱导的 MUC1-C 与 NF- κ B p65 之间相互作用(图 6A,右)。MUC1 启动子的 ChIP 分析还表明,用 MUC1/CQC 肽处理减少了 TNF α 诱导的 MUC1-C 和 NF- κ B p65 对 NF- κ B 结合基序的占据(图 6B)。和这些结果相符,用 MUC1/CQC 肽处理减少了 TNF α 诱导的 MUC1 表达(图 6C)。MUC1/CQC 肽还减弱了 TNF α 诱导的 Bcl-xL 表达(图 6C)。这些发现表明,用 MUC1/CQC 肽干扰 MUC1-C 的功能减弱了 (i)MUC1-C 的核靶向和 (ii)NF- κ B p65 介导的 MUC1 和 Bcl-xL 表达的激活。

[0218] MUC1-C 直接与 STAT3 相互作用。MUC1-C 亚基与一些转录因子(包括 p53)相互作

用 (Wei, 2005 ;Wei, 2006 ;Wei, 2007)。为确定 MUC1-C 是否与 STAT3 相关联, 将 ZR-75-1 乳腺癌细胞的抗 STAT3 沉淀物用抗 MUC1-C 抗体进行免疫印迹。结果证明, MUC1-C 与 STAT3 组成型关联 (图 9A, 左)。在也表达内源性 MUC1 的 MCF-7 乳腺癌细胞中进行的共沉淀研究得到了类似的结果 (图 9A, 右)。将 ZR-75-1 细胞裂解物与 GST 或 GST-MUC1-CD 融合蛋白孵育进一步证明了 MUC1-CD 与 STAT3 的相互作用 (图 9A)。为确定该相互作用是否是直接的, 用纯化的重组 STAT3 进行研究。GST-MUC1-CD 而不是 GST 与 STAT3 相关联 (图 9C)。用 MUC1-CD 缺失突变体孵育进一步证明, MUC1 (46-72) 而不是 MUC1-CD (1-45) 直接与 STAT3 结合 (图 9C)。STAT3 的结构包含 N 端的二聚化结构域、中间的 DNA 结合结构域 (DBD) 和 C 端的反式激活结构域 (Yu 和 Jove, 2004) (图 9D)。用 STAT3 缺失突变体孵育 MUC1-CD 证明与 DBD 而不是二聚化或反式激活结构域结合 (图 9D)。这些发现表明, 在乳腺癌细胞中 MUC1-C 与 STAT3 相关联, 该相互作用通过 MUC1-C 细胞质结构域和 STAT3DBD 直接结合来介导。

[0219] 在乳腺癌细胞中 STAT3 和 MUC1-C 组成型占据 MUC1 启动子。MUC1-C 定位于乳腺癌细胞的核 (Wei, 2006)。为确定 MUC1-C 是否与核中的 STAT3 相关联, 本发明人对 MUC1 启动子中的共有 STAT 结合位点 (SBS ; -575 至 -564 ; GGGCTATTCCGGGAAGTGGTG (SEQ ID NO : 58)) 进行了染色质免疫沉淀 (ChIP) 测定 (Gaemers, 2001)。将 ZR-75-1 细胞的染色质用抗 STAT3 沉淀证明, STAT3 存在于 STAT 结合基序, 而不存在于对照区域 (CR ; +4524 至 +4745) (图 10A, 左)。ChIP 分析也证明, MUC1-C 组成型占据 STAT 结合位点 (图 10A, 右)。MCF-7 细胞中 MUC1 启动子的 ChIP 分析进一步证明, STAT3 和 MUC1-C 两者都组成型占据 STAT 结合位点而不占据对照区域 (图 10B)。而且, Re-ChIP 测定证明, 在 ZR-75-1 和 MCF-7 两种细胞中, MUC1-C 与 STAT3 占据 MUC1 启动子 (图 10C)。用 MUC1siRNA 稳定沉默 MUC1 的 MCF-7 细胞的分析还表明, MUC1-C 促进 STAT3 对 MUC1 启动子 SBS 的占据 (图 10D)。这些发现表明 MUC1-C 与 STAT3 转录复合物相关联。

[0220] 在 MCF-10A 乳腺上皮细胞中 IL-6 诱导 MUC1 的表达。非恶性 MCF-10A 乳腺上皮细胞表达内源性 MUC1, 但水平比 ZR-75-1 和 MCF-7 乳腺癌细胞中的低 (Ahmad, 2007)。然而, IL-6 (STAT3 通路的激活剂 (Yu 和 Jove, 2004)) 对 MCF-10A 细胞的刺激与 MUC1-C 表达上调 (图 11A, 左) 和 MUC1-C 到核的靶向相关 (图 11B, 右)。与乳腺癌细胞相比, 在 MCF-10A 细胞中 MUC1-C 与 STAT3 几乎没有组成型关联 (图 11B)。而且, 用 IL-6 刺激诱导了 MUC1-C 和 STAT3 的结合 (图 11B)。MUC1 启动子的 ChIP 分析还显示, IL-6 诱导 STAT3 和 MUC1-C 二者对 STAT 结合位点的占据 (图 11C)。此外, re-ChIP 研究证明, MUC1-C 通过 IL-6 依赖性机制在 MUC1 启动子上与 STAT3 相关联 (图 11D)。这些发现表明, 在 MCF-10A 细胞中 MUC1-C 和 STAT3 之间的相互作用及它们对 MUC1 启动子的占据是可以被 IL-6 诱导的。

[0221] IL-6 通过 STAT3 依赖性机制激活 MUC1 启动子。为证实 STAT3 促使 IL-6 诱导的 MUC1 上调, 本发明人在 MCF-10A 细胞中沉默了 STAT3 (图 12A)。结果证明, IL-6 通过 IL-6 依赖性机制诱导 MUC1 的表达 (图 12A)。IL-6 对 MCF-10A 细胞的刺激与 MUC1mRNA 水平上调 (由 RT-PCR 确定) 相关 (图 12B)。为确定 IL-6 是否激活 MUC1 启动子, 转染 MCF-10A 细胞以表达 MUC1 启动子 - 萤光素酶构建体 (pMUC1-Luc)。IL-6 的刺激与 pMUC1-Luc 表达激活相关 (图 12C)。与之相反, 在 pMUC1-Luc 中突变 STAT 结合位点减弱了 IL-6 诱导的报告物激活, 与通过 STAT3 诱导的激活相符 (图 12C)。而且, STAT3 的沉默阻断了 pMUC1-Luc 应答于 IL-6 的激活 (图 12D)。这些发现证明, IL-6 对 MUC1 启动子的激活依赖于 STAT3。

[0222] MUC1-C 促进 STAT3 靶向 MUC1 启动子。为评估 MUC1-C 在 STAT3 转录复合物中的作用, 本发明人沉默了 MCF-10A 细胞中的 MUC1 (图 13A, 左), 然后对 MUC1 启动子进行 ChIP 测定。结果证明, IL-6 诱导的 STAT3 对 MUC1 启动子的靶向被 MUC1 沉默减弱 (图 13A, 右)。与这些结果相符, MUC1 沉默也减弱了 IL-6 诱导的 pMUC1-Luc 报告物的激活 (图 13B)。在 ZR-75-1 细胞中, MUC1 沉默 (图 13C, 左) 与 STAT3 对 MUC1 启动子的占据减少相关 (图 13C, 右)。而且, ZR-75-1 细胞中的 MUC1 沉默减少了 pMUC1-Luc 报告物的组成型激活 (图 13D)。这些发现表明 MUC1 帮助 STAT3 靶向 MUC1 启动子, 从而有助于 STAT3 介导的激活。

[0223] 在 MCF-10A 细胞中抑制 MUC1-C 的功能阻断 IL-6 诱导的 STAT3 对 MUC1 启动子的靶向。为进一步评估 MUC1-C 在 STAT3 调节中的作用, 本发明人合成了 GO-201, 其是 MUC1-C 寡聚化和细胞质结构域功能的肽抑制剂 (Raina, 2009)。还合成了对 MUC1-C 功能没有影响的对照 CP-1 肽 (Raina, 2009)。GO-201 而不是 CP-1 在体外阻断了 MUC1-CD 和 STAT3 之间的相互作用 (图 14A)。用 GO-201 而不是 CP-1 处理 MCF-10A 细胞也阻断了 IL-6 诱导的 MUC1-C 和 STAT3 之间的相互作用 (图 14B)。而且, GO-201 抑制了 IL-6 诱导的 STAT3 和 MUC1-C 对 MUC1 启动子的靶向 (图 14C)。与这些结果一致, GO-201 减弱了 IL-6 诱导的 pMUC1-Luc 报告物激活 (图 14C)。这些发现证明, 抑制 MUC1-C 功能阻断 STAT3 介导的 MUC1 转录激活。

[0224] MUC1-C 端的 CQC 吻合肽。控制许多生物通路的细胞内蛋白质-蛋白质相互作用经常由蛋白质的 α -螺旋结构介导。螺旋肽还可干扰或稳定蛋白质-蛋白质相互作用。由于效力低、不稳定和递送至细胞的效率低, 天然螺旋肽作为治疗剂有很大缺点。最近的研究表明, 这些问题可通过 α -螺旋肽的被称为烃吻合 (hydrocarbon stapling) 的化学修饰来克服。

[0225] 本发明人使用了 MUC1-C 端内源肽序列 (AIVYLIALAVCQCRRKNYG) 和通过烃吻合生成的两个 α -螺旋肽, GO-200-1B 和 GO-200-2B:

[0226] GO-200-1B :Ac-AIVYL-S5-ALA-S5-CQCRRKNYG-NH₂

[0227] GO-200-2B :Ac-AKKYL-S5-ALA-B5-CQC-S5-RKNY-NH₂

[0228] 为确定暴露于 GO-200-1B 是否影响非小细胞肺癌细胞的生长, 将 H-1650 细胞用 1 和 5 μ M GO-200-1B 处理 7 天并监测生长。结果证明, 用 5 μ M GO-200-1B 处理细胞与显著的生长抑制相关 (图 16A)。而且, 将另一种非小细胞肺癌细胞系 H-1975 用 5 μ M GO-200-2B 处理 3 天并监测细胞生长和细胞死亡。结果证明, 用 GO-200-2B 处理 H-1975 细胞 3 天与超过 80% 的细胞增殖抑制相关。而且, GO-200-2B 还与显著的细胞死亡诱导相关 (图 16B)。这些发现表明, MUC1-C 吻合肽有效诱导人 MUC1 阳性癌细胞的生长停滞和死亡。

[0229] GO-203 类似物。本发明人近期的研究表明, MUC1 C 端肽 (CQCRRKNYGQLDIFP) 有抑制多种癌细胞系生长的活性。他们还证明, 更短的 MUC1-C 端肽 CQCRRKN 也有杀死肿瘤细胞的活性。然而, 这些 MUC1-C 端肽由 L-氨基酸组成。重要的是, 有 L-氨基酸的肽易受蛋白水解酶的降解, 而已证明含有 D-氨基酸的肽更稳定。因此, 他们生成了所有均为右旋形式的上述更短的 MUC1 C 端肽, 其中 L-氨基酸变为 D-氨基酸 (GO-203)。而且, 为确定保留细胞杀伤活性所需的最少 MUC1-C 端区域氨基酸残基, 他们还生成了许多如图 15 所述的不同形式的 GO-203。

[0230] 多种肿瘤细胞系 (ZR-75-1 激素依赖性乳腺癌; MDA-MB-231 三阴性乳腺癌; A549 非小细胞肺癌; H-1975 非小细胞肺癌) 培养在补充了 10% 热灭活胎牛血清、100 单位 /ml

青霉素和 100 μ g/mL 链霉素和 2mmol/L L-谷氨酰胺的 RPMI-1640 中。分别用 5 μ M 不同的 GO-203 类似物处理细胞 (图 15) 3 到 7 天, 并通过台盼蓝排除法测定活力。将不同细胞系的增殖与仅用载剂处理的细胞比较。结果证明, 用 5 μ M 不同的 GO-203 类似物处理多种肿瘤细胞系与显著的生长抑制相关 (图 17-21)。

[0231] 实施例 3- 讨论

[0232] 之前的研究。MUC1 的过表达足以诱导非锚定依赖性生长和致癌性 (Li 等, 2003a; Huang 等, 2003; Huang 等, 2005)。然而值得注意的是, 将细胞质结构域的 CQC 基序突变为 AQA 使 MUC1 的转化作用被消除 (Leng 等, 2007)。MUC1 形成寡聚体, 而 CQC 基序是该寡聚化必需的 (Leng 等, 2007)。此外, 寡聚体的形成是 MUC1-C 亚基靶向核必需的 (Leng 等, 2007)。本发明人合成了 MUC1 衍生肽, 其包含 CQC 基序和用于进入细胞的聚 -Arg 细胞递送结构域。用该 MUC1/CQC 肽进行的初步研究表明, 其在体外抑制 MUC1-CD 的寡聚化, 而 MUC1/AQA 不产生抑制。显著地而且与 MUC1 的核靶向依赖于寡聚化 (Leng 等, 2007) 一致的是, MUC1/CQC 肽的摄取与 MUC1-C 在核内水平下调相关。此外而且值得注意的是, 将细胞暴露于 MUC1/CQC 而不是 MUC1/AQA 与生长停滞以及坏死的诱导相关。其他发现指出, 对 MUC1/CQC 肽的敏感性依赖于 MUC1 的过表达和 MUC1 的恶性表型相关功能。因此 MUC1/CQC 肽表现为负显性 (dominant-negative) 活性, 其对过表达 MUC1 的癌细胞是选择性的。最后, 本发明人发现将 MUC1/CQC 肽以 10 和 30mg/kg/天施用于荷瘤小鼠 21 天的耐受良好, 无明显急性毒性, 而且这些剂量的治疗有效消除肿瘤生长。以 50mg/kg/天施用 MUC1/CQC 肽 7 天也证明在治疗后很长时间内肿瘤生长仍停滞。

[0233] MUC1 与 NF- κ B p65 结合并阻断 I κ B α 相互作用。NF- κ B 蛋白包含保守的 300 个氨基酸的 RHD, 其赋予 DNA 结合、二聚化和与 I κ B 蛋白结合的功能 (Hayden&Ghosh, 2008)。本发明证明, MUC1-C 亚基与细胞内的 NF- κ B 相关联, 而且 MUC1-C 细胞质结构域直接与 p65 结合。更详细的结合实验表明, MUC1-CD 与 p65(1-306) 形成复合物, 而不是 p65(354-551), 提示 MUC1-CD 与 RHD 相互作用。这一观察结果被 MUC1-CD 与 p65(1-180) 和 p65(186-306) 的结合证实。NF- κ B 和 I κ B α 共晶体的结构分析证明, I κ B α 锚蛋白重复序列与刚好位于 NF- κ B p65RHD C 端的 NLS 之前的氨基酸残基相互作用 (Jacobs 等, 1998; Huxford 等, 1998)。I κ B α 与 NF- κ B p65RHD 该区域的结合在空间上掩盖 NLS(287-300 位氨基酸), 从而将 NF- κ B p65 靶向核。MUC1-CD 像 I κ B α 一样与 p65(186-306) 结合的发现引发了这样的可能性: 即 MUC1-C 亚基可干扰 I κ B α 和 NF- κ B p65 的相互作用。的确, 对获得和丧失 MUC1 表达之细胞的研究表明, MUC1 与 I κ B α 竞争结合 NF- κ B p65, 而且 MUC1-CD 足以进行这样的竞争。与这些结果相符, 在 ZR-75-1 细胞中沉默内源性 MUC1 与核 NF- κ B p65 靶向细胞质相关的。此外, 与纯化蛋白质的直接结合实验证实, MUC1-CD 阻断 NF- κ B p65 和 I κ B α 之间的相互作用。NF- κ B p65 与影响 DNA 结合和转录的多种蛋白质相互作用 (Natoli 等, 2005)。然而, 根据本发明人所知, 没有报道过与 NF- κ B p65RHD 相互作用并干扰与 I κ B α 的结合的蛋白质。因此, 基于这些发现, 在人恶性肿瘤中过表达 MUC-C 可通过竞争性阻断 NF- κ B p65-I κ B α 相互作用而破坏 NF- κ B p65 的细胞质滞留。

[0234] MUC1 增加 NF- κ B p65 对 NF- κ B 靶基因的占据。核 NF- κ B 以负反馈回路激活 I κ B α 的表达, 促进形成新的 NF- κ B-I κ B α 复合物并将 NF- κ B 运送回细胞质 (Hayden&Ghosh, 2008)。在这种情况下, MUC1-C 与 NF- κ B p65 相关联可通过阻断与 I κ B α 的

相互作用而减弱 NF- κ B 信号转导的下调。本结果对 MUC1-C 与 NF- κ B p65 结合导致 NF- κ B p65 靶向 NF- κ B 靶基因启动子的模型提供了支持 (图 6D)。用 TNF α 刺激 MCF-10A 上皮细胞与 MUC1-C 和 NF- κ B p65 结合以及这些复合物对 Bcl-xL 基因启动子中 NF- κ B-RE 的占据相关。在 ZR-75-1 细胞中, NF- κ B p65 对 Bcl-xL NF- κ B-RE 的占据可被组成型检测到, 并且因 MUC1 沉默而减少。与对 Bcl-xL NF- κ B-RE 的发现相符, NF- κ B p65 和 MUC1-C 占据 MUC1NF- κ B 结合基序在 ZR-75-1 乳腺癌细胞中可被组成型检测到, 并且在 MCF-10A 上皮细胞中可被诱导。这些发现以及对于 MUC1 沉默减弱 NF- κ B-Luc 和 pMUC1-Luc 报告物之激活 (像 NF- κ B p65 一样) 的证实表明, MUC1-C 对 NF- κ B p65 转录功能的激活是重要的。之前的工作表明, NF- κ B 信号转导的下调在 I κ B α 不存在时推迟 (Gerondakis 等, 2006; Pasparakis 等, 2006), 因此 MUC1 在人肿瘤中的过表达可通过抑制 NF- κ B p65-I κ B α 相互作用产生类似的作用。

[0235] 用 MUC1 抑制剂破坏 NF- κ B p65-MUC1-C 相互作用。MUC1-C 亚基通过依赖于细胞质结构域中的 CQC 基序的机制形成寡聚体 (Leng 等, 2007)。MUC1-C 寡聚化对其与输入蛋白 β 的相互作用和对核的靶向是必需的 (Leng 等, 2007)。如上所述, 对应于包含 CQC 基序之 MUC1 细胞质结构域的 15-mer 肽在体外阻断 MUC1-CD 寡聚化, 在细胞内阻断 MUC1-C 的寡聚化。本结果表明, 同样的 MUC1/CQC 肽在体外阻断 MUC1-CD 和 NF- κ B p65 的直接结合, 提示 MUC1-CD 的寡聚化对该相互作用至少在部分是必需的。在 MCF-10A 细胞中 TNF α 诱导的 NF- κ B p65 和 MUC1-C 的关联也被 MUC1/CQC 肽处理所阻断。MUC1/CQC 肽的特异性进一步被以下支持: 在体外和细胞内, 突变的 MUC1/AQA 肽对 MUC1-CD 和 NF- κ B p65 之间的相互作用缺乏作用。用 MUC1/CQC 肽阻断 NF- κ B p65-MUC1-C 相互作用与 NF- κ B p65 对 MUC1 启动子中 NF- κ B 结合基序占据的减少以及 MUC1 表达的减少相关。MUC1/CQC 肽还降低 Bcl-xL 的表达。因此这些发现对 NF- κ B p65-MUC1-C 相互作用在 NF- κ B p65 靶向 NF- κ B 靶基因启动子中的潜在重要性提供了支持。

[0236] MUC1-C-NF- κ B p65 相互作用是否有助于人肿瘤利用生理性防御机制? TNF α 对 TNF 受体 1 的刺激诱导细胞膜复合物的形成, 其导致以下的激活 (i) NF- κ B 和存活, 或者 (ii) 胱天蛋白酶 -8 和凋亡 (Micheau&Tschopp, 2003; Schneider-Brachert 等, 2004)。如在人乳腺癌中发现的 (Kufe 等, 1984), MUC1 的过表达阻断应答于 TNF α 和其他死亡受体配体的胱天蛋白酶 -8 和凋亡的激活 (Agata 等, 2008)。在 MCF-10A 细胞中, 作为对死亡受体刺激诱导的应答, MUC1-C 与胱天蛋白酶 -8 和 FADD 相互作用, 并阻断死亡受体复合物对胱天蛋白酶 -8 的募集 (Agata 等, 2008)。其他工作已证明, MUC1-C 与 IKK 复合物相关联并将其激活 (Ahmad 等, 2007) (图 6D)。在本研究所显示的, MCF-10A 细胞中 TNF α 诱导的 MUC1-C 表达上调直接促进 NF- κ B p65 的激活。因此, MUC1-C 可通过与 IKK 和 p65 二者的相互作用而激活 NF- κ B 通路, 从而促进存活应答 (图 6D)。此外, MUC1-C 的上调通过阻断胱天蛋白酶 -8 激活来针对凋亡诱导进行保护。本发现还表明, 通过与 NF- κ B p65 结合, MUC1-C 可以以自诱导回路促进 MUC1 基因的激活, 从而延长生存 (虽然是以可逆的方式)。因此, MUC1 可发挥这样的生理作用: 在对死亡受体刺激的可诱导应答中短暂支配细胞的命运。与之不同, 癌细胞中由 MUC1-C-NF- κ B p65 调节回路产生的 MUC1 表达的不可逆激活可以通过对 NF- κ B p65 的持续激活和对胱天蛋白酶 -8 的持续抑制来赋予稳定抵抗细胞死亡的表型。MUC1-C-NF- κ B p65 回路的不可逆激活和促生存的 NF- κ B 靶基因的上调也可有助

于MUC1诱导的人癌细胞对基因毒性、氧化和缺氧压力之凋亡应答的阻断 (Ren 等, 2004 ;Yin 等, 2003 ;Raina 等, 2004 ;Yin 等, 2004 ;2007)。因此, 旨在于死亡受体刺激期间保护上皮细胞的生理机制可被人癌利用以在不利条件下生存。

[0237] MUC1-C 直接与 STAT3 相互作用。STAT3 的组成型激活已在多种人癌 (包括乳腺癌和某些血液学恶性肿瘤) 中被鉴定 (Aaronson, 2002 ;Bowman, 2000 ;Yu, 2004)。MUC1 在乳腺癌和其他癌中组成型过表达的发现提示了 MUC1 和 STAT3 通路之间相互作用的可能性。本结果证明, 在 ZR-75-1 和 MCF-7 乳腺癌细胞中, MUC1-C 亚基与 STAT3 相关联。此外, 在非恶性 MCF-10A 乳腺上皮细胞对 IL-6 刺激的应答中可诱导 MUC1-C 和 STAT3 之间的相互作用。该结果还证明, MUC1-C 细胞质结构域直接结合至 STAT3DBD。很少有与 STAT3DBD 相互作用的其他蛋白质的报道 (Shuai, 2000)。c-Jun 的 C 端区域与 STAT3 的卷曲螺旋结构域和 DBD 结合, 从而有助于 STAT3 和 c-Jun 之间在推动转录中的合作 (Zhang, 1999)。其他研究证明, STAT3DBD 在介导与 NF- κ B p65 的相互作用中是必不可少的 (Yu, 2004)。另外, STAT3 介导的 NF- κ B p65 乙酰化, 以及由之产生的 NF- κ B 活性的维持需要 STAT3DBD (Lee, 2009)。因此, MUC1-C 与 STAT DBD 的结合可以影响 STAT3 与 c-Jun 或 NF- κ B p65 的相互作用和基因转录的调控。在这种情况下, ChIP 分析证明, MUC1-C 与可溶染色质中的 STAT3 相关联, 并且可在 MUC1 启动子的 STAT 结合位点上检测与 STAT3 一起被检测到。发现 MUC1-C 和 STAT3 对 MUC1 启动子 STAT 结合位点的这种占据在乳腺癌细胞中是组成型的, 并且在 MCF-10A 乳腺上皮细胞中是可以被 IL-6 诱导的。之前已经证明 STAT3 与 MUC1 启动子相互作用, 并且激活 MUC1 基因转录 (Gaemers, 2001)。然而, 根据本发明人所知, 还没有对 MUC1-C 构成 STAT3 转录复合物之一部分的报道。

[0238] MUC1-C 促进 STAT3 介导的转录。为评估 MUC1-C 在 STAT3 转录复合物中的作用, 本发明人首先证明, MCF-10A 细胞应答于 IL-6 的 MUC1 启动子的激活确实由 STAT3 以及 STAT3 对 MUC1 启动子 STAT 结合位点的占据而介导。然而出人意料地, 在 MCF-10A 细胞中的沉默 MUC1 减弱了 IL-6 诱导的 STAT3 对 STAT 结合位点之靶向, 说明 MUC1-C 可在起始 STAT3 对该位点的占据或在延迟 STAT3 的潜伏中起作用。对 MUC1-C 还促进 STAT3 介导之 MUC1 启动子激活的证明进一步提供了对自诱导回路的诱导的支持, 在该回路中 MUC1-C 和 STAT3 协同激活 MUC1 基因的表达。与这些观察相符, 在乳腺癌细胞中沉默 MUC1 与以下的减少相关 (i) STAT3 对 STAT 结合位点的组成型占据, 和 (ii) MUC1 启动子的组成型激活。为提供对自诱导回路的进一步支持, 用 G0-201 (MUC1-C 寡聚化抑制剂 (Raina, 2009)) 进行研究。G0-201 而不是无活性的 CP-1 突变体在体外和 IL-6 刺激的 MCF-10A 细胞中阻断 MUC1-C 细胞质结构域和 STAT3 之间的相互作用。显著地, G0-201 还阻断 IL-6 诱导的 MUC1-C 和 STAT3 对 MUC1 启动子的靶向, 再次证明 MUC1-C 促进 STAT3 对 STAT 结合位点的占据。此外, G0-201 阻断 IL-6 诱导的 MUC1 启动子激活。从 IL-6 刺激的 MCF-10A 细胞中获得的结果在乳腺癌细胞中被确认, 并证明 G0-201 抑制 MUC1-C 和 STAT3 对 MUC1 启动子的组成型占据和 MUC1 启动子的组成型激活。因此, 这些发现提供了对以下的支持: MUC1-C-STAT3 相互作用在 STAT3 对 MUC1 启动子的靶向中以及在以自诱导回路促进 MUC1 基因激活中的潜在重要性 (图 7D)。

[0239] MUC1-C-STAT3 相互作用是否促进人肿瘤利用的生理性防御机制? 上皮细胞屏障暴露于多种压力, 包括与细胞因子 (例如肿瘤坏死因子 α 、干扰素- γ 和 IL-6) 产生相关的炎症环境。因此上皮细胞需要强大的防御机制以在这种损害的存在下生存。对此, MUC1-C

亚基（尤其是其细胞质结构域）足以赋予对多种损害（包括基因毒性、氧化和缺氧压力）应答之死亡的抵抗 (Ren, 2004 ; Raina, 2004 ; Yin, 2003 ; Yin, 2004 ; Yin, 2007)。本结果表明，IL-6 介导的 STAT3 通路激活诱导 MUC1 的表达，其是在炎性应答过程中针对上皮损伤进行保护的潜在机制。在该模型中，MUC1 可发挥瞬时支配细胞命运的生理作用。与之不同，经 MUC1-C-STAT3 自诱导回路的 MUC1 表达的不可逆激活可赋予稳定抵抗细胞死亡的表型。因此，炎性应答过程中保护上皮细胞的生理机制可被人乳腺癌利用以在不利条件下生存。本结果还表明，在乳腺癌细胞中靶向 MUC1-C 功能可影响 STAT3 通路的组成型激活。

[0240] * * * * *

[0241] 根据本发明公开内容，可以制备和无需过多的实验地实施本文中所公开和要求保护的所有组合物和 / 或方法。虽然已按照一些优选实施方案描述了本发明的组合物和 / 或方法，但对本领域技术人员显而易见的是，在不背离本发明的概念、精神和范围的情况下，可以对本文描述的组合物和 / 或方法以及方法的步骤或步骤的顺序进行改变。更具体地，显而易见的是，在化学和生理学上均相关的某些药剂可以替代本文描述的药剂而获得相同或类似的结果。对本领域技术人员显而易见的是，所有这些类似的替代和变化都被认为在所附权利要求所限定的本发明的精神、范围和概念内。

[0242] VIII. 参考文献

[0243] 下述参考文献具体地通过引用并入本文，其程度在于其提供作为本文所述内容之补充的示例性方法或其他细节：

[0244] 美国专利 5, 440, 013

[0245] 美国专利 5, 446, 128

[0246] 美国专利 5, 475, 085

[0247] 美国专利 5, 597, 457

[0248] 美国专利 5, 618, 914

[0249] 美国专利 5, 670, 155

[0250] 美国专利 5, 672, 681

[0251] 美国专利 5, 674, 976

[0252] 美国专利 5, 710, 245

[0253] 美国专利 5, 790, 421

[0254] 美国专利 5, 840, 833

[0255] 美国专利 5, 859, 184

[0256] 美国专利 5, 889, 155

[0257] 美国专利 5, 929, 237

[0258] 美国专利 6, 093, 573

[0259] 美国专利 6, 261, 569

[0260] 美国专利申请 2005/0015232

[0261] Aaronson and Horvath, *Science*, 296 (5573) :1653-5, 2002.

[0262] Abe and Kufe, *Cancer Res.*, 49 (11) :2834-2839, 1989.

[0263] Agata at al., *Cancer Res.*, 68 :6136-44, 2008.

[0264] Ahmad at al., *Cancer Res.*, 68 :2920-2926, 2008.

- [0265] Ahmad et al., *J. Biol. Chem.*, 281 :35764-9, 2006.
- [0266] Ahmad et al., *Nat. Cell Biol.*, 9 :1419-1427, 2007.
- [0267] Alvarez et al., *Cancer Res.*, 65(12) :5054-62, 2005.
- [0268] Alvarez et al., *Cancer Res.*, 66(6) :3162-8, 2006.
- [0269] Baldus et al., *Clin. Cancer Res.*, 10(8) :2790-2796, 2004.
- [0270] Bodanszky et al., *J. Antibiot.*, 29(5) :549-53, 1976.
- [0271] Bowman et al., *Oncogene*, 19(21) :2474-88, 2000.
- [0272] Bromberg et al., *Cell*, 98(3) :295-303, 1999.
- [0273] Buerger et al., *J. Biol. Chem.*, 278(39) :37610-21, 2003.
- [0274] Chen&Greene, *Mol. Cell. Biol.* 5 :392-401, 2004.
- [0275] Cohen et al., *J. Med. Chem.*, 33 :883-894, 1990.
- [0276] Duraisamy et al., *Gene*, 373 :28-34, 2006.
- [0277] Fischer, *Med. Res. Rev.*, 27(6) :755-796, 2007.
- [0278] Gaemers et al., *J. Biol. Chem.*, 276 :6191-6199, 2001.
- [0279] Gendler et al., *J. Biol. Chem.*, 263 :12820-12823, 1988.
- [0280] Germain and Frank, *Clin. Cancer Res.*, 13(19) :5665-9, 2007.
- [0281] Gerondakis et al., *Oncogene* 25(51) :6781-99, 2006.
- [0282] Ghosh et al., *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 16 :225-60, 1998.
- [0283] Gilmore, available from NF-kB.org, 2008.
- [0284] Grillot et al., *J. Immunol.*, 158 :4750-7, 1997.
- [0285] Gronenborn et al., *Anal. Chem.*, 62(1) :2-15, 1990.
- [0286] Hayden and Ghosh, *Cell*, 132 :344-62, 2008.
- [0287] Hodel et al., *Mol. Cell*, 10(2) :347-58, 2002.
- [0288] Hoffman et al., *Oncogene*, 25 :6706-16, 2006.
- [0289] Huang et al., *Cancer Biol Ther.*, 2 :702-706, 2003.
- [0290] Huang et al., *Cancer Res.*, 65 :10413-10422, 2005.
- [0291] Huxford et al., *Cell* 95(6) :759-70, 1998.
- [0292] Jackson, *Seminars in Oncology*, 24 :L164-172, 1997.
- [0293] Jacobs et al., *Cell*, 95 :749-58, 1998.
- [0294] Johnson et al., In: *Biotechnology And Pharmacy*, Pezzuto et al. (Eds.), Chapman and Hall, NY, 1993.
- [0295] Jones et al., *J. Med. Chem.*, 39 :904-917, 1996.
- [0296] Karin&Lin, *Nat. Immunol.*, 3 :221-7, 2002.
- [0297] Kau et al., *Nat. Rev. Cancer*, 4(2) :106-17, 2004.
- [0298] Kawano et al., *Cancer Res.*, 67 :11576-84, 2007.
- [0299] Kinlough et al., *J. Biol. Chem.*, 279(51) :53071-53077, 2004.
- [0300] Kufe et al., *Hybridoma*, 3 :223-232, 1984.
- [0301] Lagow and Carson, *J. Cell. Biochem.*, 86 :759-72, 2002.
- [0302] Lee et al., *Cancer Cell*, 15(4) :283-293, 2009.

- [0303] Leng et al., *J. Biol. Chem.*, 282 :19321-19330, 2007.
- [0304] Levitan et al., *J. Biol. Chem.*, 280 :33374-33386, 2005.
- [0305] Li et al., *Cancer Biol. Ther.*, 2 :187-193, 2003b.
- [0306] Li et al., *J. Biol. Chem.*, 276 :35239-35242, 2001.
- [0307] Li et al., *J. Biol. Chem.*, 276 :6061-6064, 2001.
- [0308] Li et al., *Mol. Cancer Res.*, 1 :765-775, 2003c.
- [0309] Li et al., *Mol. Cell Biol.*, 18 :7216-7224, 1998.
- [0310] Li et al., *Oncogene*, 22 :6107-6110, 2003a.
- [0311] Ligtenberg et al., *J. Biol. Chem.*, 267, 6171-6177, 1992.
- [0312] Macao, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13, 71-76, 2006.
- [0313] McPherson, *J. Biol. Chem.*, 251 :6300-6306, 1976.
- [0314] Merlo et al., *Cancer Res.*, 49, 6966-6971, 1989.
- [0315] Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85 :2149-2154, 1963.
- [0316] Micheau&Tschopp, *Cell*, 114 :181-90, 2003.
- [0317] Muthuswamy, *Nat. Cell Biol.*, 3(9) :785-92, 2001.
- [0318] Natoli et al., *Nat. Immunol.*, 6 :439-45, 2005.
- [0319] Navia et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2 :202-210, 1992.
- [0320] Pasparakis et al., *Cell Death Differ.* 13 :861-72, 2006.
- [0321] PCT 申请 PCT/US00/03745
- [0322] PCT 申请 PCT/US00/14667
- [0323] PCT 申请 PCT/US99/11913
- [0324] PCT 申请 PCT/US99/18441
- [0325] Peptide Synthesis, 1985
- [0326] Percipalle et al., *J. Mol. Biol.*, (4) :722-32, 1997.
- [0327] Perey et al., *Cancer Res.*, 52(22) :6365-6370, 1992.
- [0328] Protective Groups in Organic Chemistry, 1973
- [0329] Protein NMR Spectroscopy, Principles and Practice, J. Cavanagh et al., Academic Press, San Diego, 1996.
- [0330] Raina et al., Direct targeting of the MUC1 oncoprotein blocks survival and tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Cancer Res.*, 2009 (IN PRESS).
- [0331] Raina et al., *EMBO J.*, 25 :3774-3783, 2006.
- [0332] Raina et al., *J. Biol. Chem.*, 279 :20607-20612, 2004.
- [0333] Ramasamy et al., *Mol. Cell*, 27 :992-1004, 2007.
- [0334] Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., 1035-1038 and 1570-1580, 1990.
- [0335] Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., 3 :624-652, 1990.
- [0336] Ren et al., *Cancer Cell*, 5 :163-175, 2004.
- [0337] Ren et al., *J. Biol. Chem.*, 277 :17616-17622, 2002.
- [0338] Ryan and Wentz, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12(3) :361-71, 2000.

- [0339] Schneider-Brachert et al., *Immunity*, 21 :415-28, 2004.
- [0340] Schroeder et al., *J. Biol. Chem.*, 276(16) :13057-13064, 2001.
- [0341] Schroeder et al., *Oncogene*, 23 :5739-5747, 2004.
- [0342] Shuai, *Oncogene*, 19(21) :2638-44, 2000.
- [0343] Siddiquee et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(18) :7391-6, 2007.
- [0344] Siddiqui et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 :2320-2323, 1988.
- [0345] *Solid Phase Peptide Synthesis*, 1984
- [0346] Song et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(13) :4700-5, 2005.
- [0347] Soule et al., *Cancer Res.*, 50(18) :6075-6086, 1990.
- [0348] Suh and Gumbiner, *Exp. Cell Res.*, 290(2) :447-56, 2003.
- [0349] Truscott et al., *J Cell Biol.*, 163(4) :707-713, 2003.
- [0350] Vermeer et al., *Nature*, 422(6929) :322-6, 2003.
- [0351] Weber, *Advances Protein Chem.*, 41 :1-36, 1991.
- [0352] Wegenka et al., *Mol. Cell Biol.*, 14(5) :3186-96, 1994.
- [0353] Wei et al., *Cancer Cell*, 7 :167-178, 2005.
- [0354] Wei et al., *Cancer Res.*, 67(4) :1853-8, 2007.
- [0355] Wei et al., *Mol. Cell.*, 21 :295-305, 2006.
- [0356] Weis, *Cell*, 112(4) :441-51, 2003.
- [0357] Wen et al., *J. Biol. Chem.*, 278 :38029-38039, 2003.
- [0358] Wider, *BioTechniques*, 29 :1278-1294, 2000.
- [0359] Yamamoto et al., *J. Biol. Chem.*, 272 :12492-12494, 1997.
- [0360] Yin et al., *J. Biol. Chem.*, 278 :35458-35464, 2003.
- [0361] Yin et al., *J. Biol. Chem.*, 279 :45721-45727, 2004.
- [0362] Yin et al., *J. Biol. Chem.*, 282 :257-266, 2007.
- [0363] Young et al., *Cell*, 112(1) :41-50, 2003.
- [0364] Yu and Jove, *Nat. Rev. Cancer*, 4(2) :97-105, 2004.
- [0365] Zhang et al., *Mol. Cell Biol.*, 19 :7138-7146, 1999.

[0001]

IP1136652P. 序列表. (官).txt

序列表

<110> DONALD, KUFE W.
 KHARBANDA, SURENDER
 <120> 使用MUC1拮抗剂抑制炎症
 <130> GENU. P0023W0
 <140> UNKNOWN
 <141> 2010-05-27
 <150> 61/303, 997
 <151> 2010-02-12
 <150> 61/253, 730
 <151> 2009-10-21
 <150> 61/181, 530
 <151> 2009-05-27
 <160> 58
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 合成肽
 <400> 1
 Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala
 1 5 10 15
 Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His
 20 25 30
 Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys
 35 40 45
 Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu
 65 70
 <210> 2
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 合成肽
 <400> 2
 Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile
 1 5 10 15
 Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala
 20 25 30
 Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val
 35 40 45

[0002]

IP1136652P. 序列表. (官). txt

Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly
50 55 60

Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val
65 70 75 80

Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly
85 90 95

Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu
100 105 110

Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr
115 120 125

Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu
145 150 155

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 3

Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro
1 5 10 15

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 4

Cys Gln Cys Arg Arg Lys
1 5

<210> 5
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 5

Gln Ala Ala Thr Ala Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr
1 5 10 15

Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Pro
20 25 30

[0003]

IP1136652P. 序列表. (官). txt

Val Glu

<210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 6

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 7

Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 8

Arg Arg Trp Arg Arg Trp Trp Arg Arg Trp Trp Arg Arg Trp Arg Arg
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 9

Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr
 1 5 10 15

Gly Arg

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 10

[0004]

IP1136652P. 序列表. (官). txt

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 11

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 12

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
 1 5 10

<210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 13

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 14

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 1 5

<210> 15
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa可以是任何天然氨基酸

<400> 15

[0005]

IP1136652P.序列表.(官).txt

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
 1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Xaa Ile Leu
 20 25

<210> 16
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 16

Leu Leu Ile Leu Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala Asn Ala His
 1 5 10 15

Ser Lys

<210> 17
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 17

Ser Arg Arg His His Cys Arg Ser Lys Ala Lys Arg Ser Arg His His
 1 5 10 15

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 18

Asn Arg Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Val Arg
 1 5 10

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 19

Arg Gln Leu Arg Ile Ala Gly Arg Arg Leu Arg Gly Arg Ser Arg
 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

[0006]

IP1136652P. 序列表. (官). txt

<223> 合成肽

<400> 20

Lys Leu Ile Lys Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys
 1 5 10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<400> 21

Arg Arg Ile Pro Asn Arg Arg Pro Arg Arg
 1 5 10

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<400> 22

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ala

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<400> 23

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys
 1 5 10

<210> 24

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<400> 24

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Asn Gly
 1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 20 25

<210> 25

<211> 21

<212> PRT

[0007]

IP1136652P. 序列表. (官).txt

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<400> 25

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
 20

<210> 26

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<400> 26

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
 1 5 10 15

Ala Lys Lys Lys Arg Lys Val
 20

<210> 27

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<400> 27

Met Gly Leu Gly Leu His Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala Leu Gln Gly
 1 5 10 15

Ala Lys Ser Lys Arg Lys Val
 20

<210> 28

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<400> 28

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu
 20 25

<210> 29

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工

<220>

[0008]

IP1136652P. 序列表. (官). txt

<223> 合成肽

<400> 29

Met Ala Asn Leu Gly Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr Met Trp
 1 5 10 15

Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro
 20 25

<210> 30

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<400> 30

Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
 20

<210> 31

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> Xaa可以是任何天然氨基酸

<400> 31

Asp Pro Lys Gly Asp Pro Lys Gly Val Thr Val Thr Val Thr Val Thr
 1 5 10 15

Val Thr Gly Lys Gly Asp Pro Xaa Pro Asp
 20 25

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<400> 32

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
 1 5 10

<210> 33

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

[0009]

IP1136652P. 序列表. (官). txt

<400> 33

Val Arg Leu Pro Pro Pro Val Arg Leu Pro Pro Pro Val Arg Leu Pro
 1 5 10 15

Pro Pro

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<400> 34

Pro Arg Pro Leu Pro Pro Pro Arg Pro Gly
 1 5 10

<210> 35

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<400> 35

Ser Val Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro
 1 5 10 15

Pro Pro Phe Phe Pro Pro Arg Leu Pro Pro Arg Ile Pro Pro
 20 25 30

<210> 36

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<400> 36

Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His
 1 5 10 15

Arg Leu Leu Arg Lys
 20

<210> 37

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成肽

<400> 37

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe
 1 5 10 15

[0010]

IP1136652P.序列表.(官).txt

Val Gly Glu Ile Met Asn Ser
20

<210> 38
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 38

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Glu Lys Val Gly Gln Asn Ile Arg
1 5 10 15

Asp Gly Ile Ile Lys Ala Gly Pro Ala Val Ala Val Val Gly Gln Ala
20 25 30

Thr Gln Ile Ala Lys
35

<210> 39
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 39

Ala Leu Trp Met Thr Leu Leu Lys Lys Val Leu Lys Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15

Ala Ala Leu Asn Ala Val Leu Val Gly Ala Asn Ala
20 25

<210> 40
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 40

Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu
1 5 10 15

Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln
20 25

<210> 41
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 41

Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
1 5 10

[0011]

IP1136652P. 序列表. (官). txt

<210> 42
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 42

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Pro Lys
 1 5 10 15

Thr Leu Leu Ser Ala Val Gly Ser Ala Leu Gly Gly Ser Gly Gly Gln
 20 25 30

Glu

<210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 43

Leu Ala Lys Trp Ala Leu Lys Gln Gly Phe Ala Lys Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 44
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa可以是任何天然氨基酸

<400> 44

Ser Met Ala Gln Asp Ile Ile Ser Thr Ile Gly Asp Leu Val Lys Trp
 1 5 10 15

Ile Ile Gln Thr Val Asn Xaa Phe Thr Lys Lys
 20 25

<210> 45
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 45

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
 1 5 10 15

[0012]

IP1136652P. 序列表. (官). txt

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu
 20 25 30

Ala Asn Leu Val Pro Arg Thr Glu Ser
 35 40

<210> 46
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 46

Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu
 1 5 10 15

Leu Lys Lys Leu
 20

<210> 47
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 47

Lys Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu
 1 5 10 15

Lys Leu

<210> 48
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 48

Pro Ala Trp Arg Lys Ala Phe Arg Trp Ala Trp Arg Met Leu Lys Lys
 1 5 10 15

Ala Ala

<210> 49
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成肽

<400> 49

Lys Arg Arg Cys Gln Cys
 1 5

[0013]

IP1136652P. 序列表. (官). txt

<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 50

Cys Gln Cys Arg Arg
1 5

<210> 51
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 51

Cys Gln Cys Arg Arg Arg
1 5

<210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 52

Cys Gln Cys Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 53

Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn
1 5

<210> 54
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 54

Cys Gln Cys Arg
1

<210> 55
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

[0014]

IP1136652P. 序列表. (官). txt

<220>
<223> 合成引物

<400> 55
aagttcagtg cccagctcta c

21

<210> 56
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成引物

<400> 56
cgcttaccga ttcagaatgg

20

<210> 57
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成引物

<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (4)..(4)
<223> R = 嘌呤

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> n 是a, c, g或t

<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (6)..(6)
<223> W = 腺嘌呤或胸腺嘧啶

<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (7)..(8)
<223> Y = 嘧啶

<400> 57
gggrnwyycc

10

<210> 58
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成引物

<400> 58
ggcctattcc ggggaagtgg tg

22

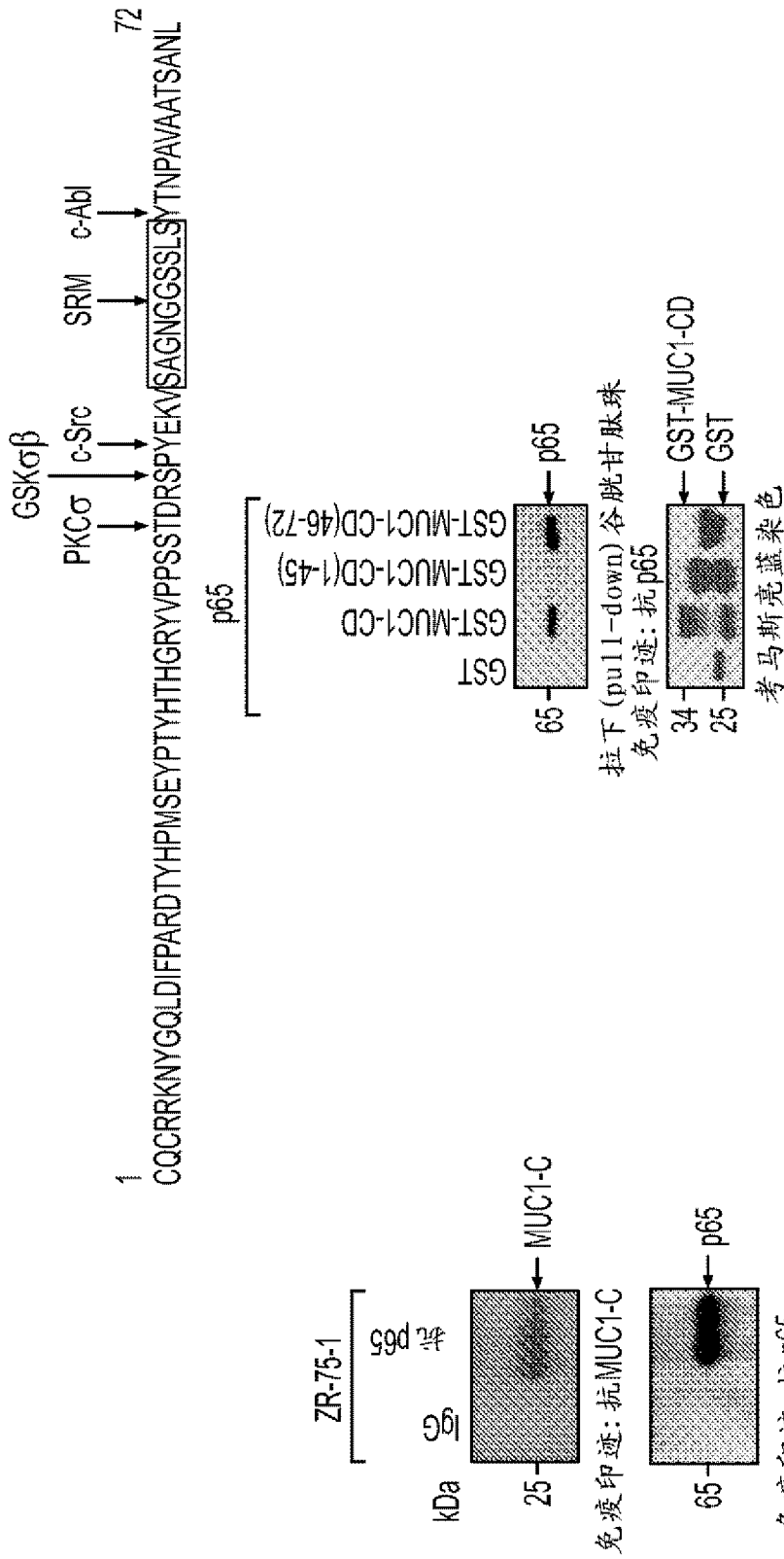


图 1B

图 1A

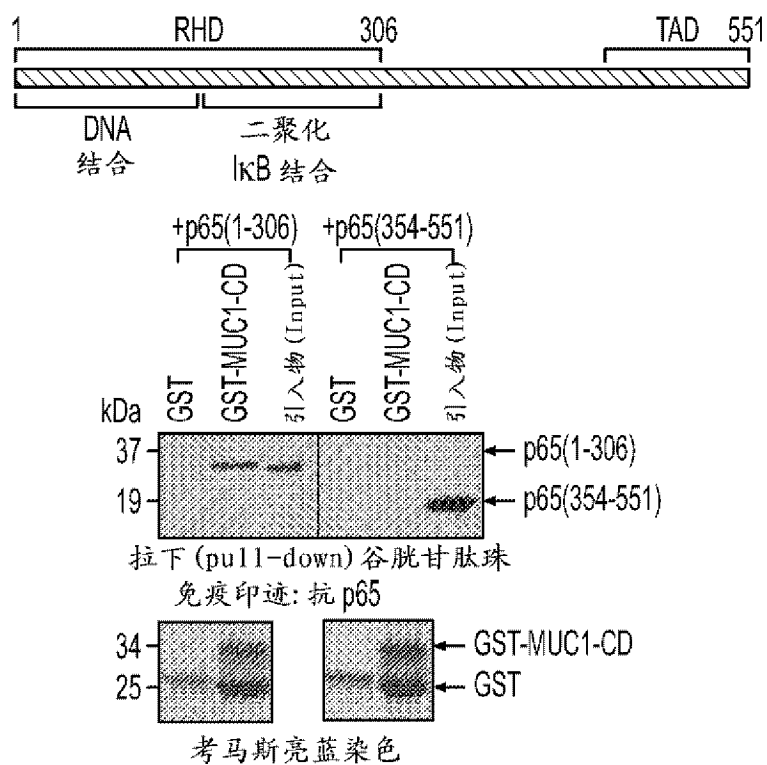


图 1C

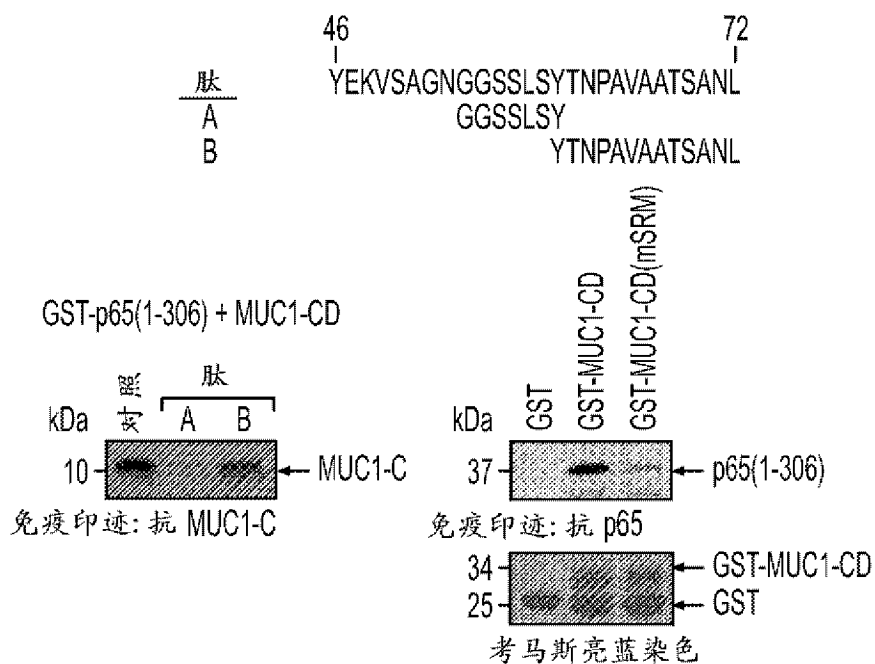


图 1D

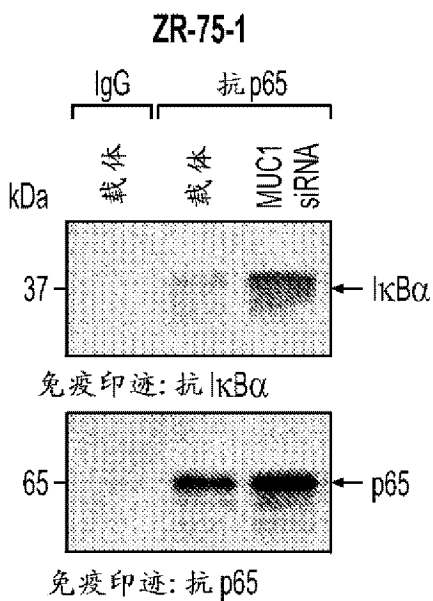


图 2A

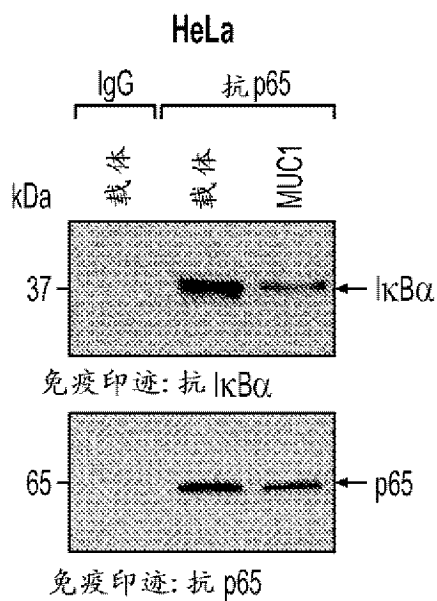


图 2B

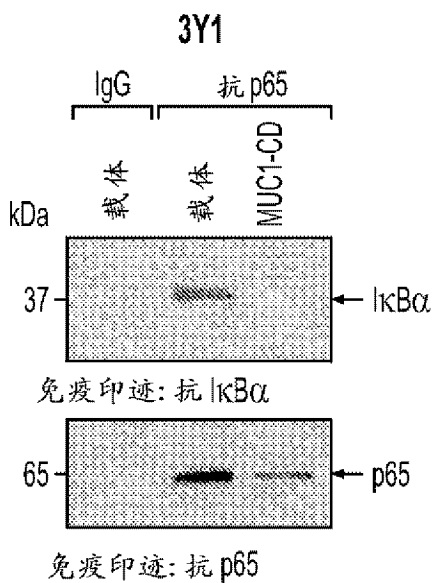


图 2C

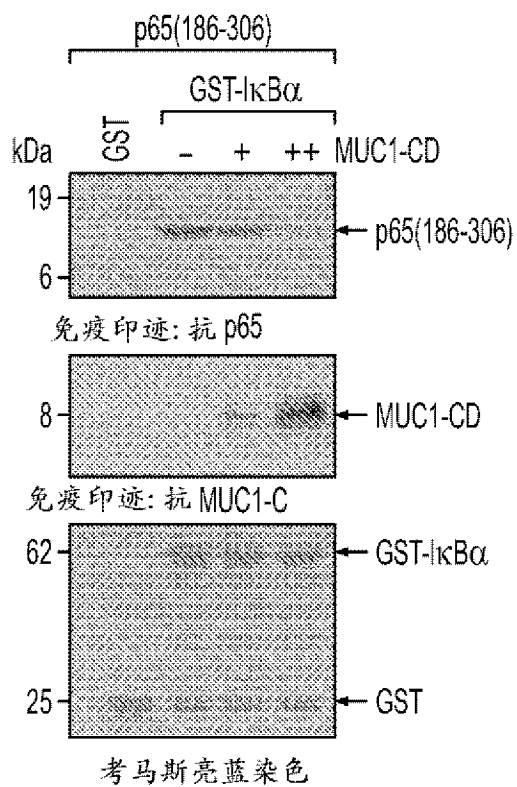


图 2D

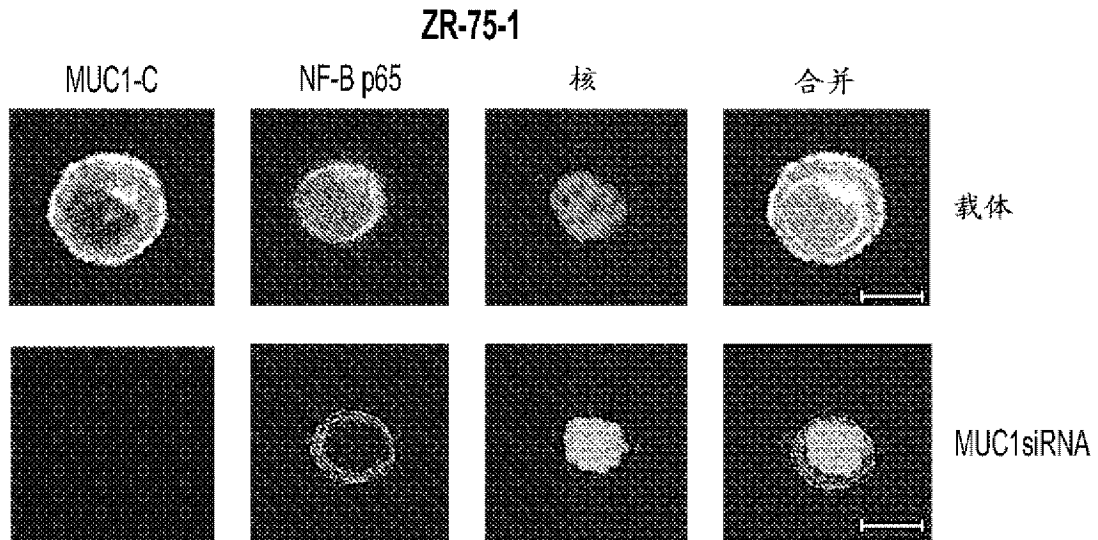


图 3A

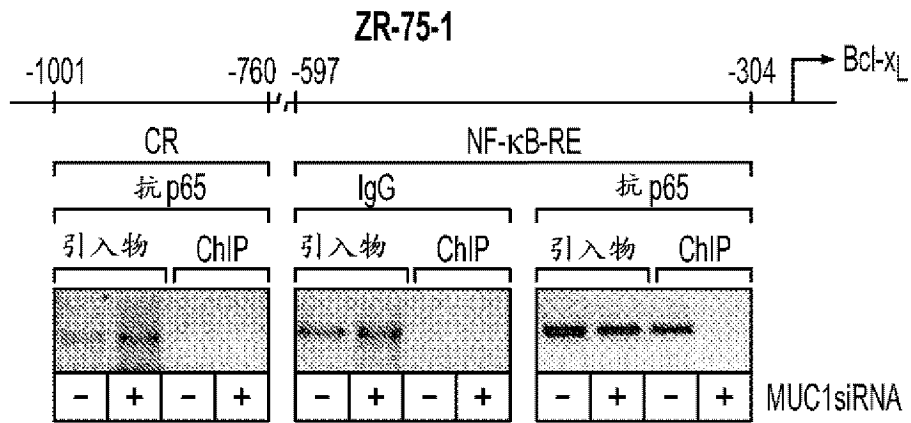


图 3B

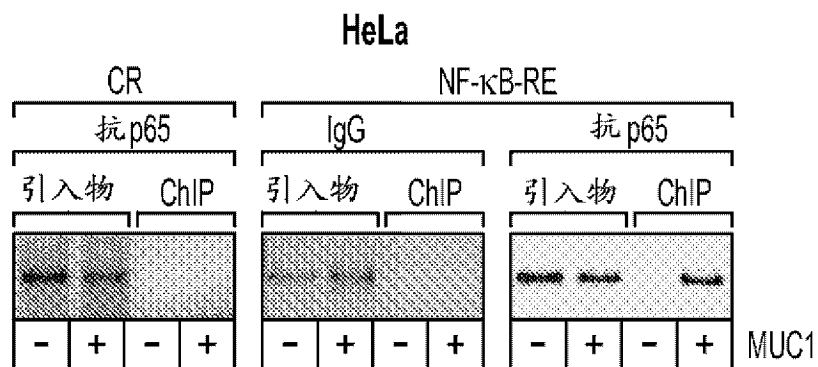


图 3C

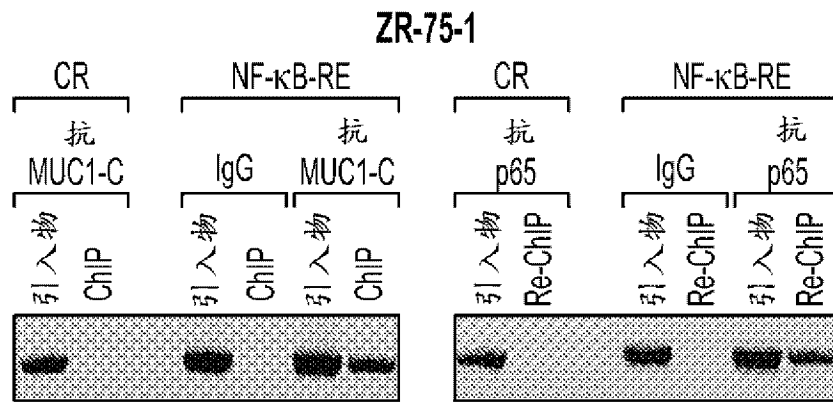


图 3D

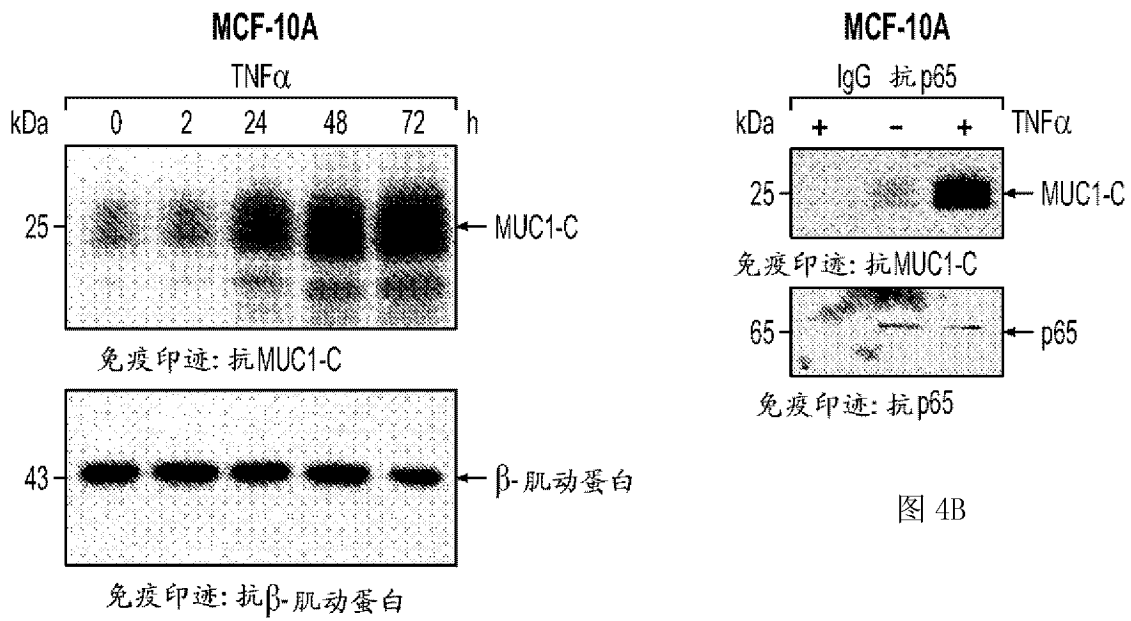


图 4B

图 4A

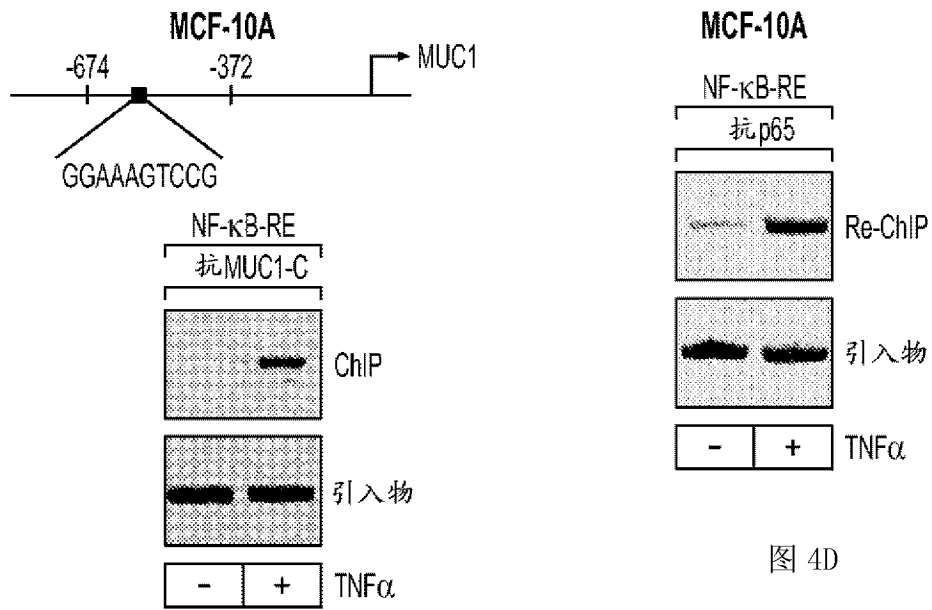


图 4C

图 4D

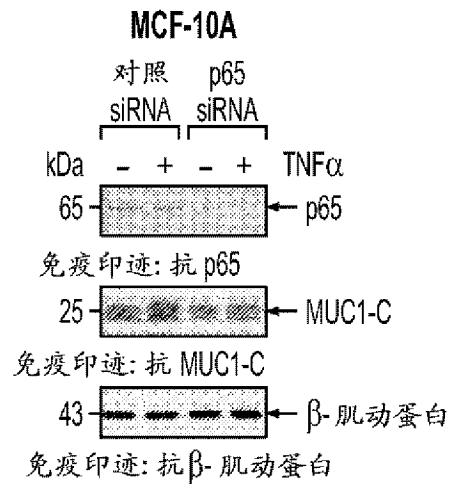


图 5A

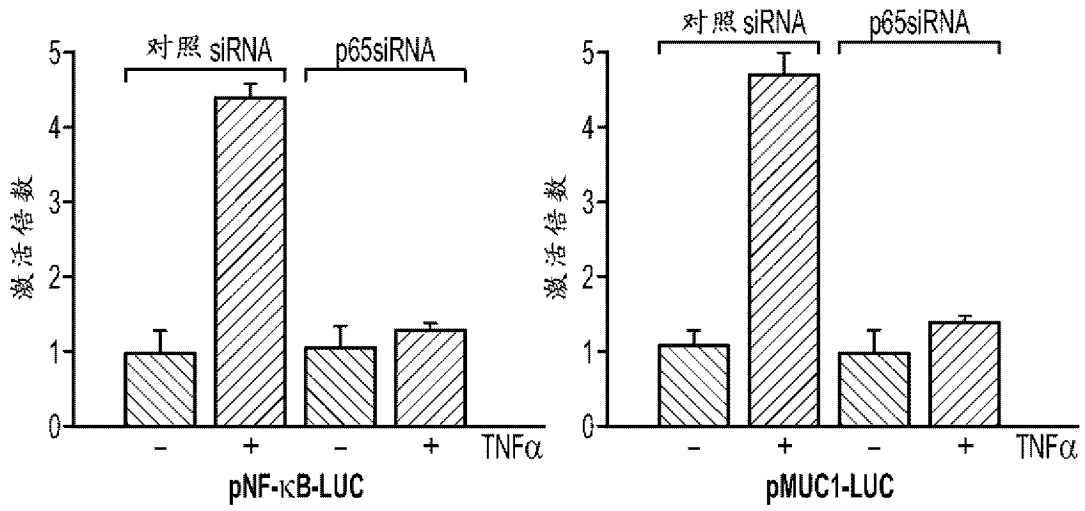


图 5B

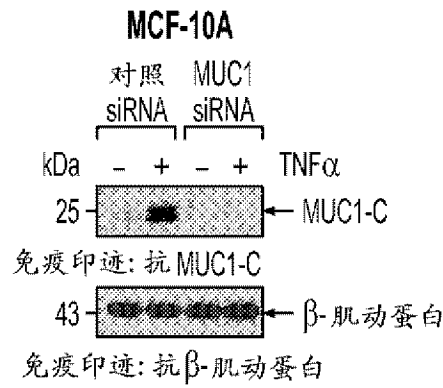


图 5C

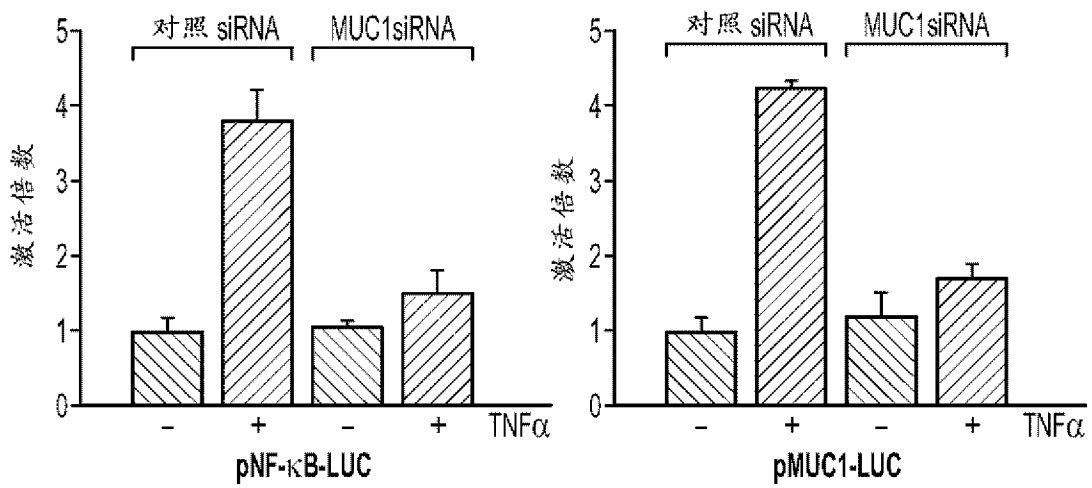


图 5D

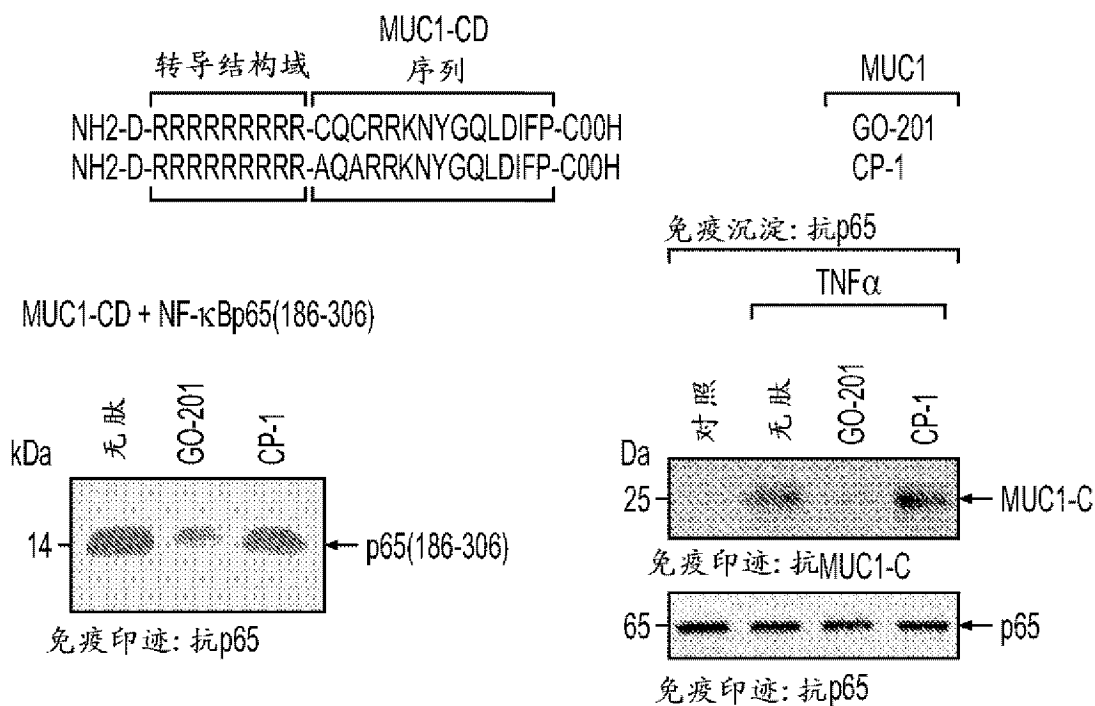


图 6A

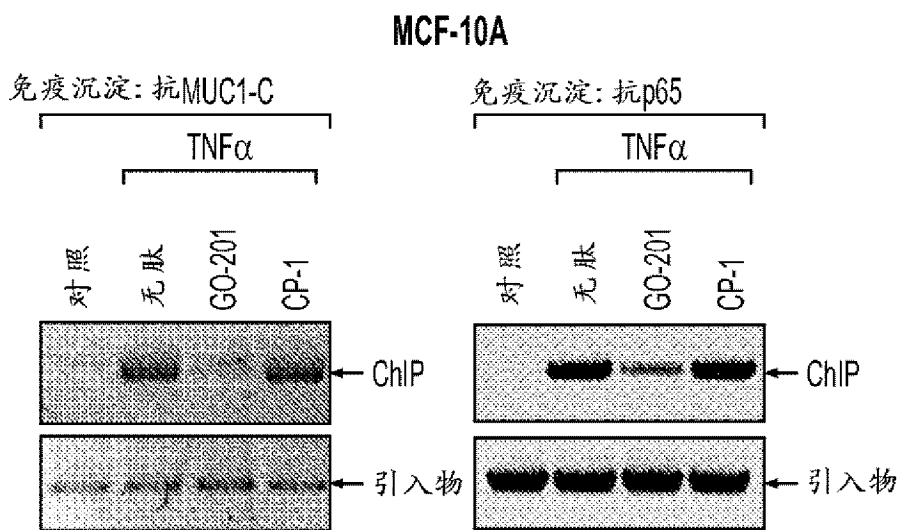


图 6B

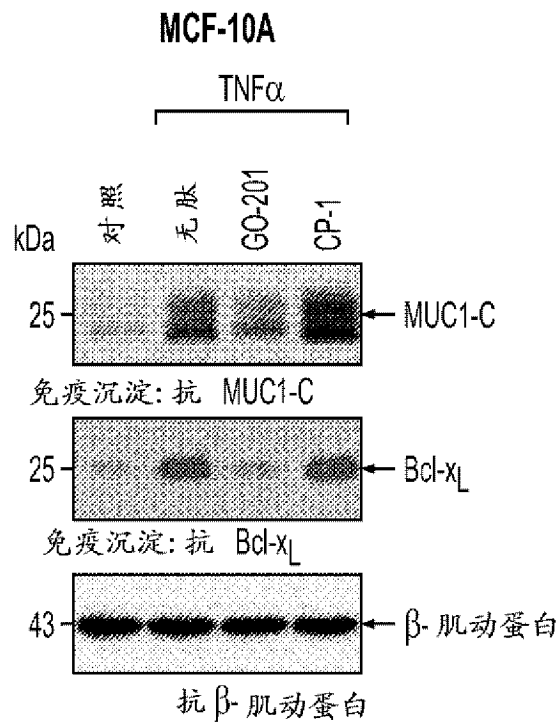


图 6C

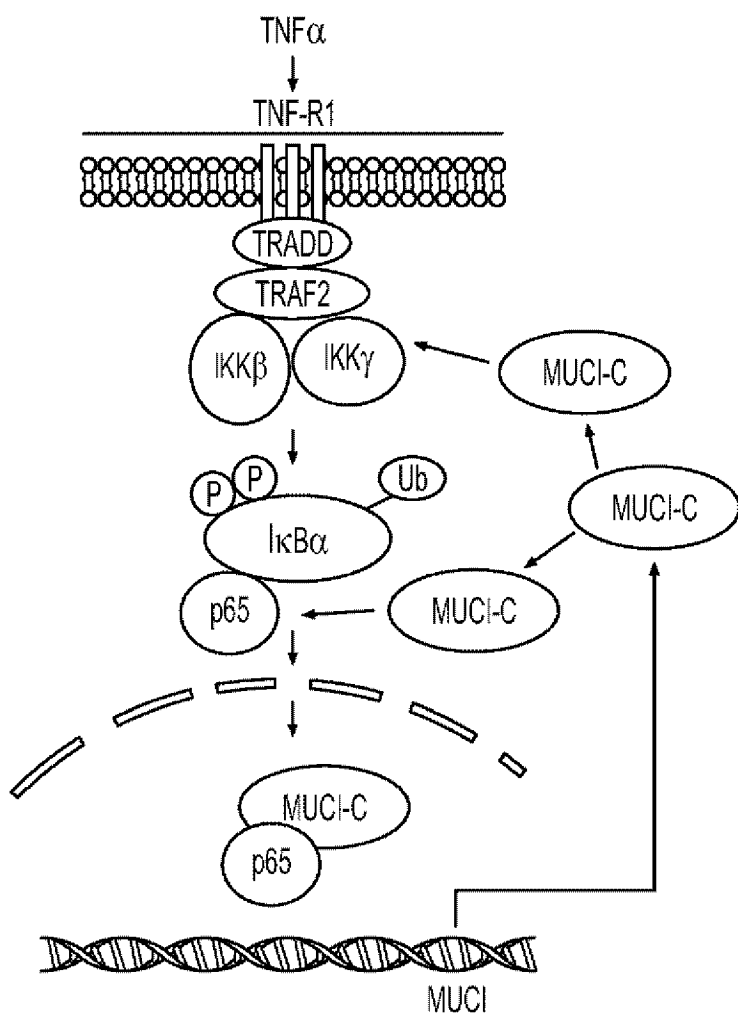


图 6D

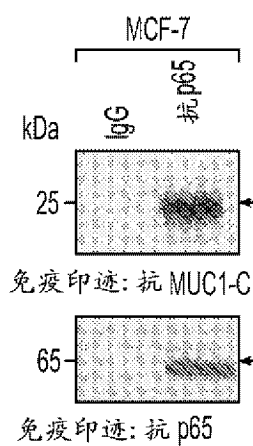


图 7A

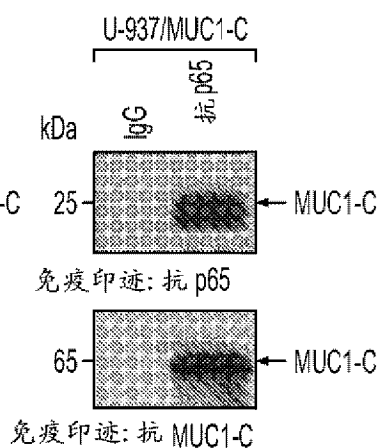


图 7B

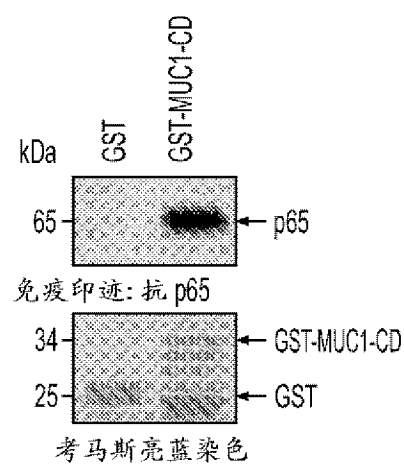


图 7C

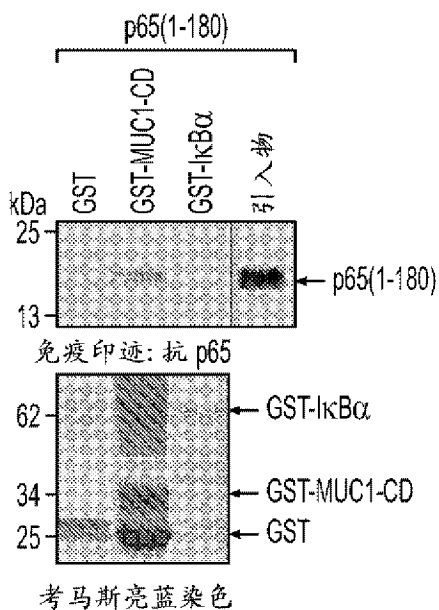


图 7D

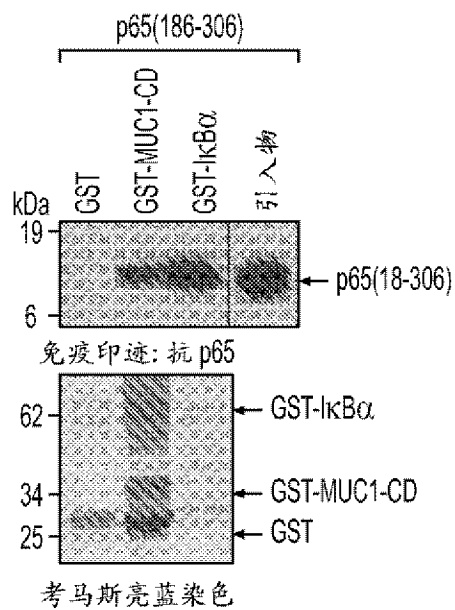


图 7E

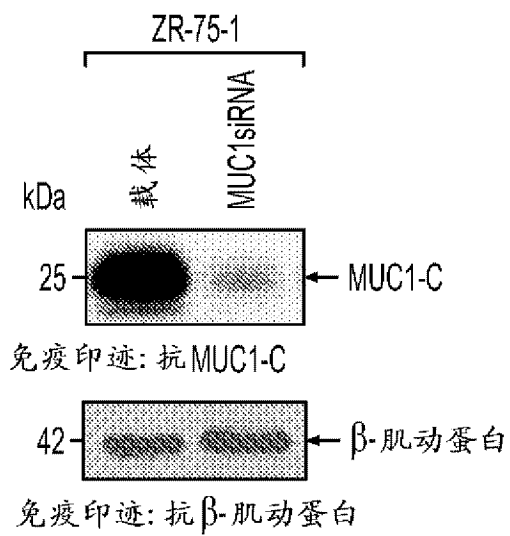


图 8

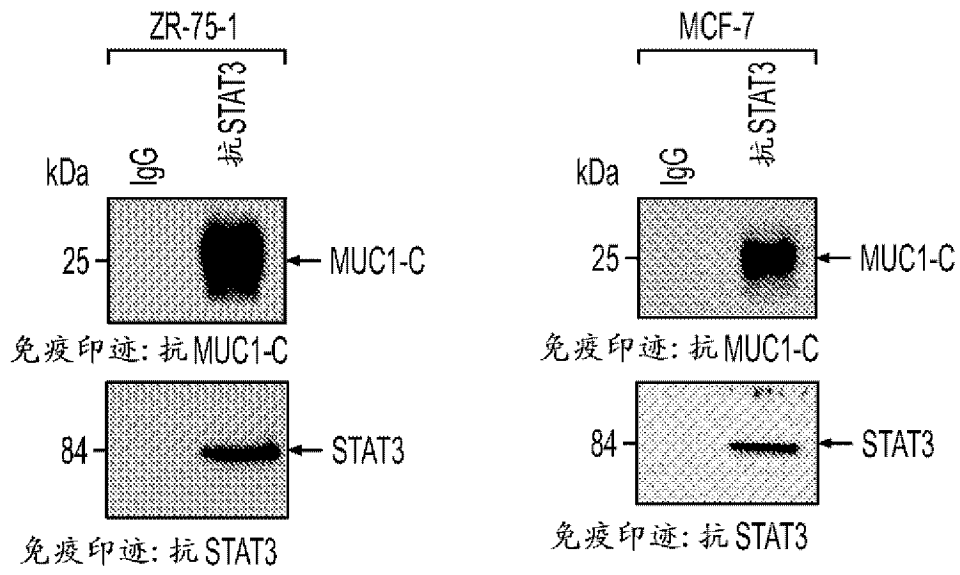


图 9A

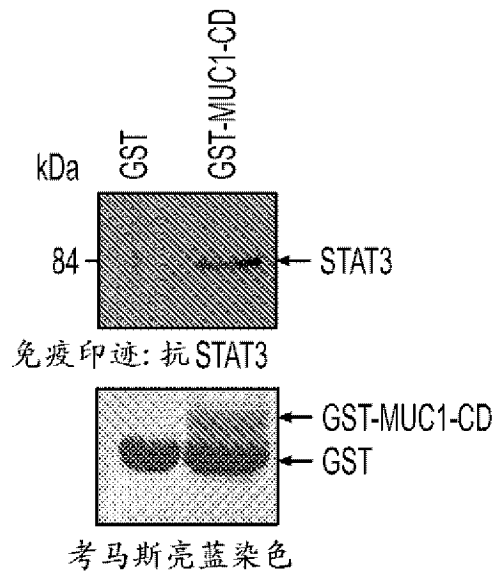


图 9B

1 8 20 26 29 35 46 60 72
CQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAASANL MUC1-CD

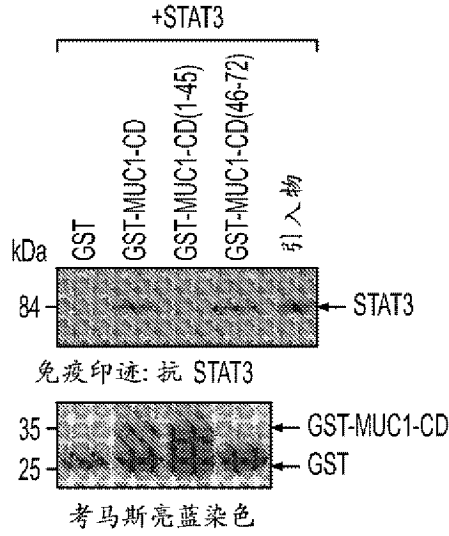


图 9C

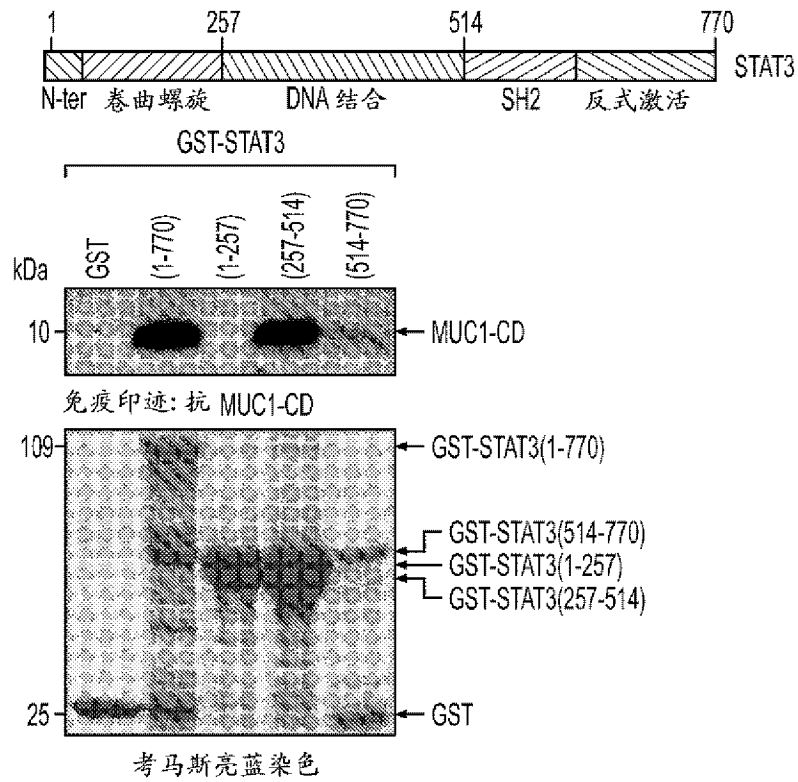


图 9D

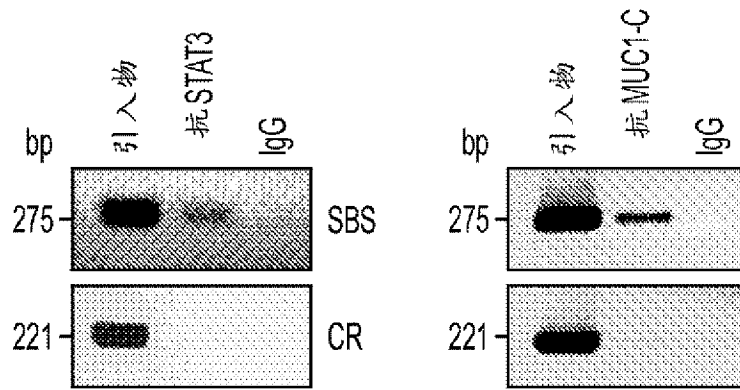
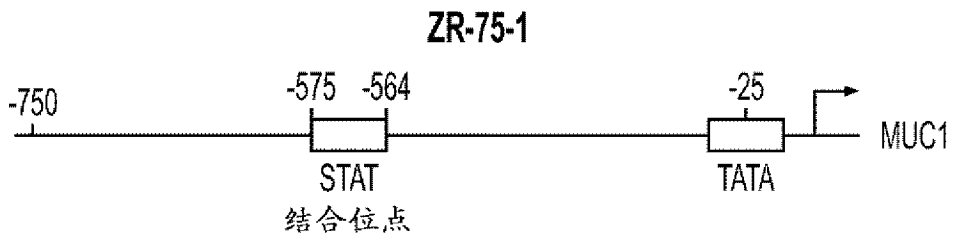


图 10A

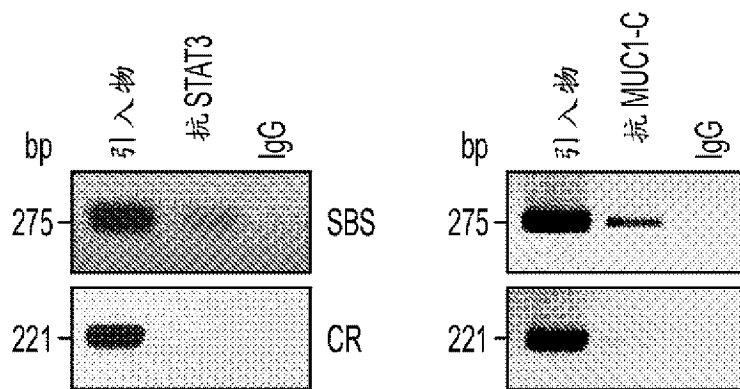


图 10B

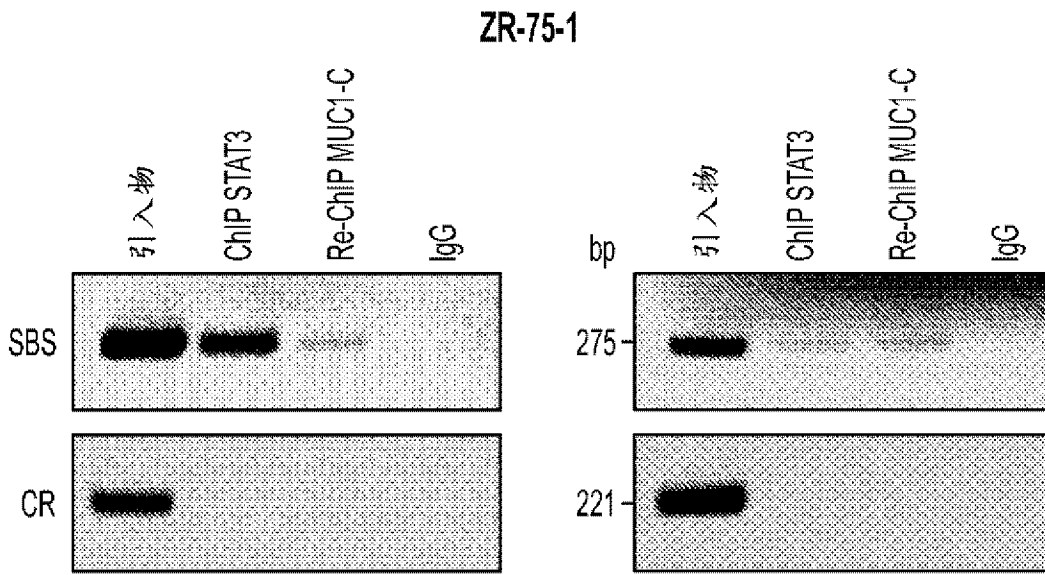


图 10C

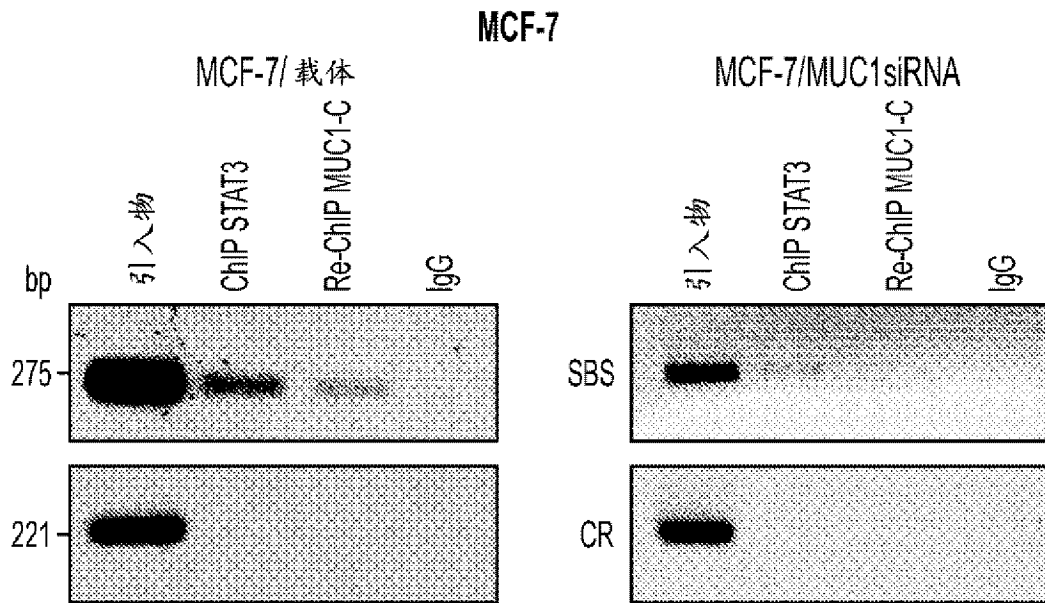


图 10D

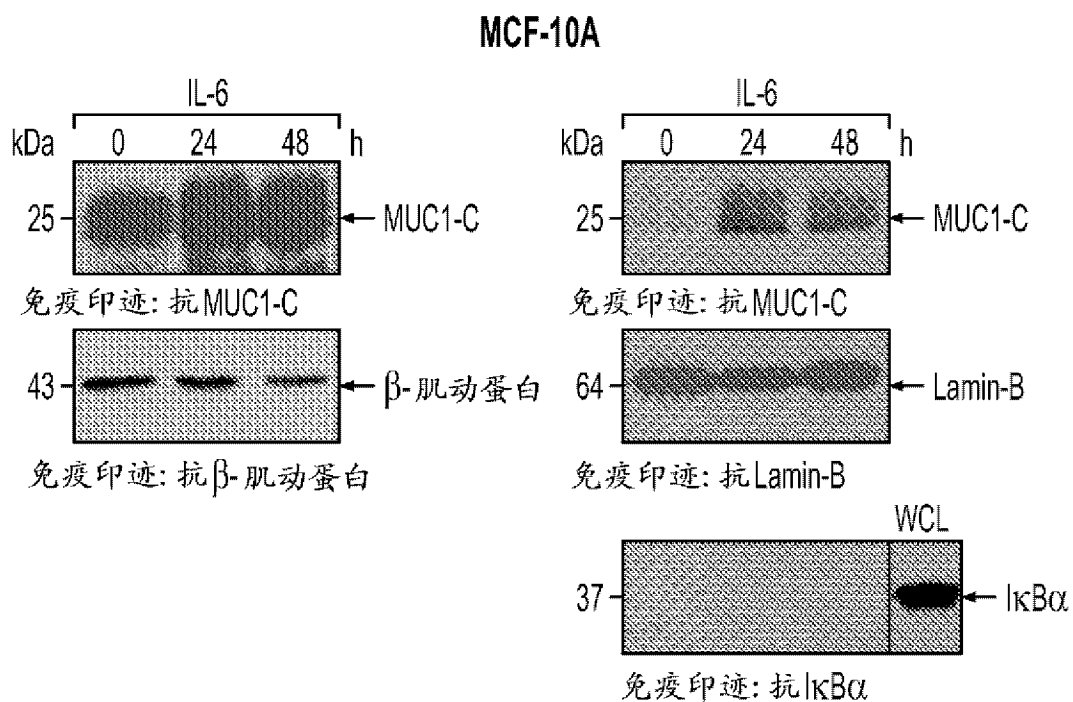


图 11A

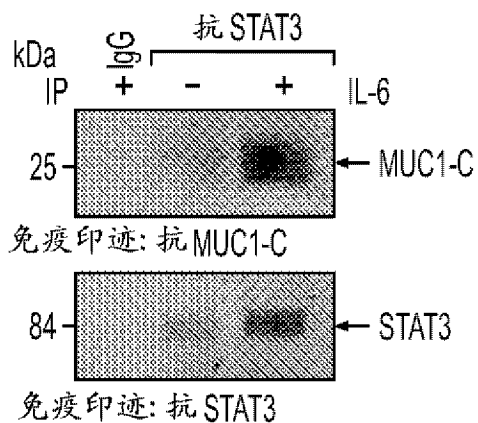


图 11B

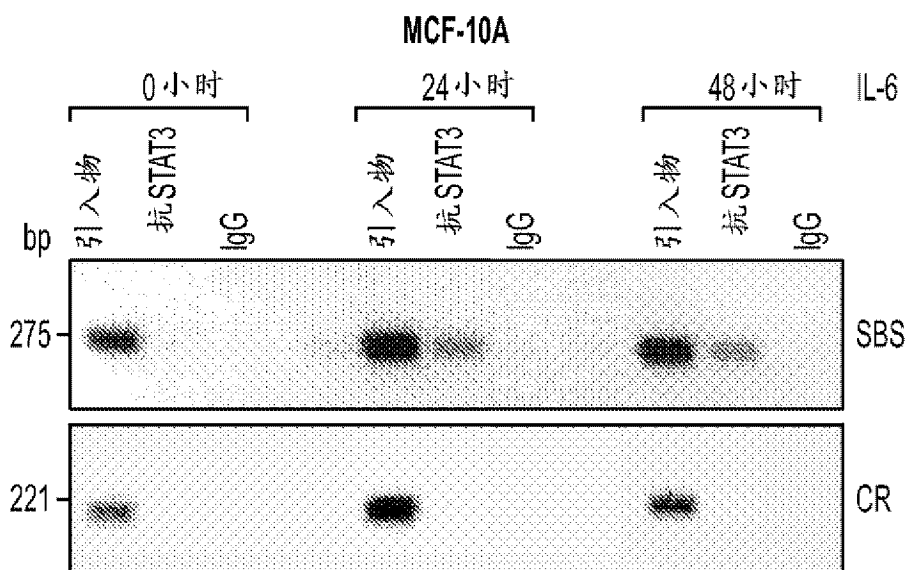


图 11C

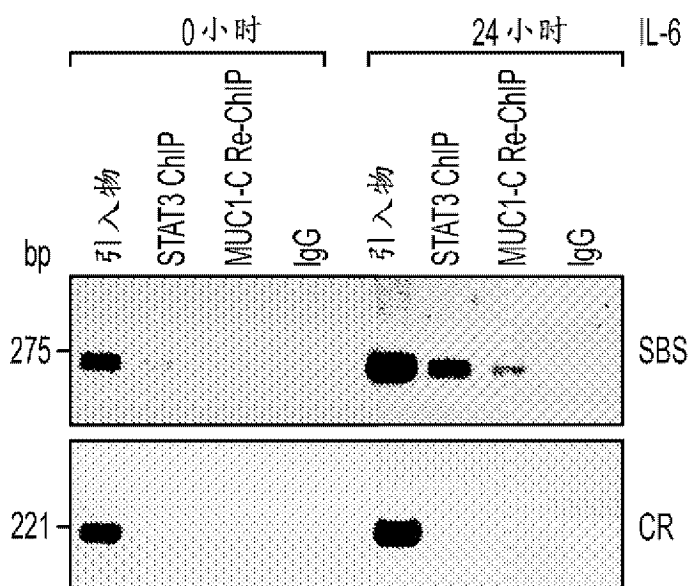


图 11D

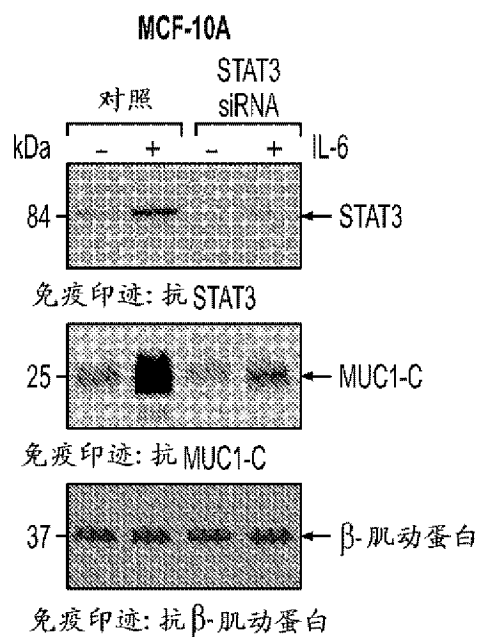


图 12A

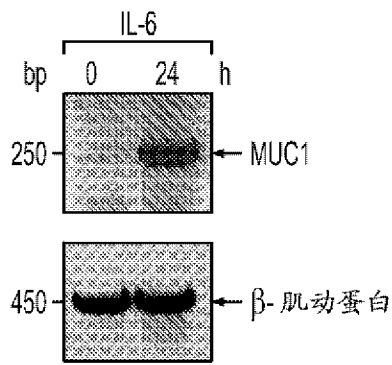


图 12B

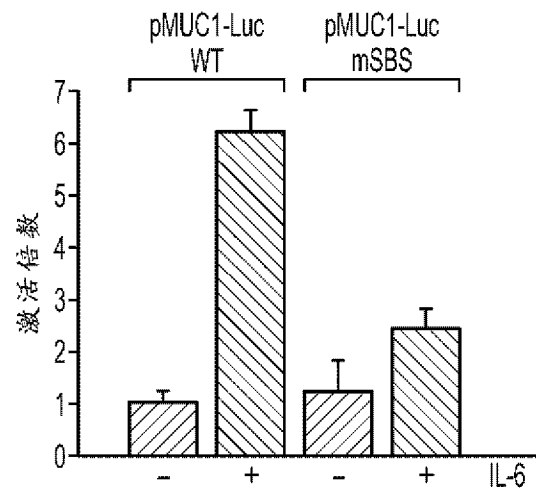


图 12C

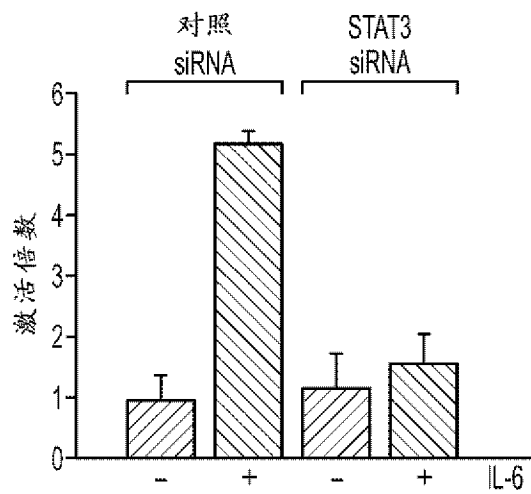


图 12D

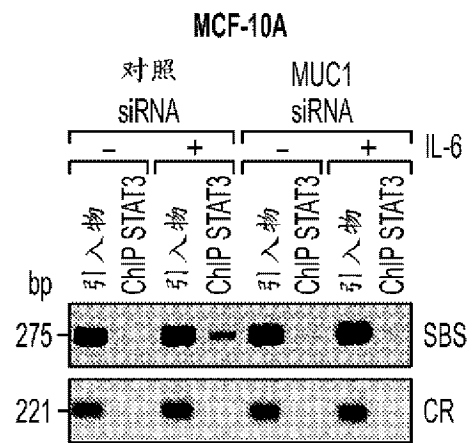


图 13A

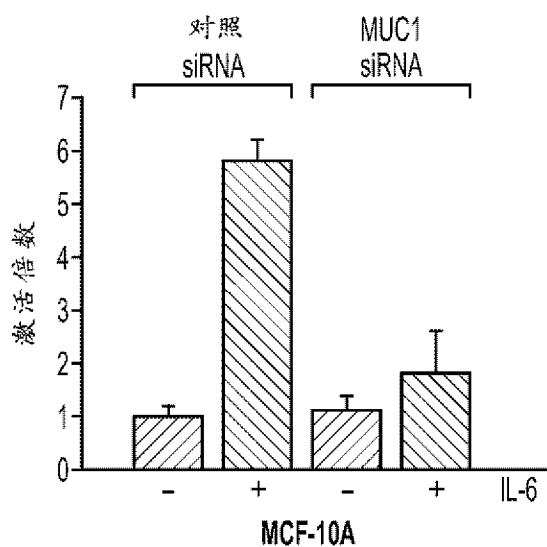


图 13B

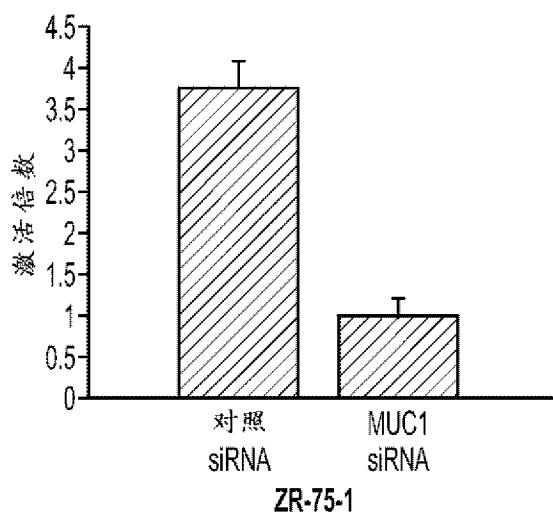


图 13D

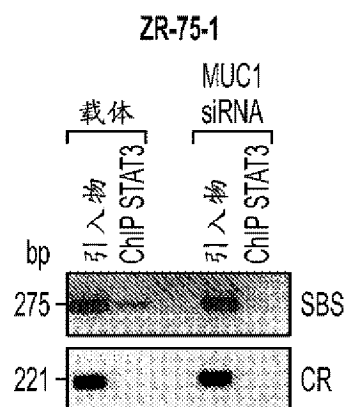


图 13C

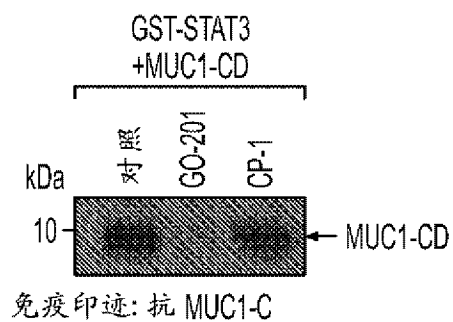


图 14A

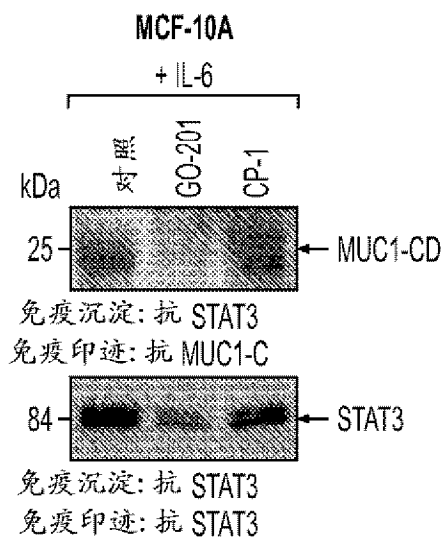


图 14B

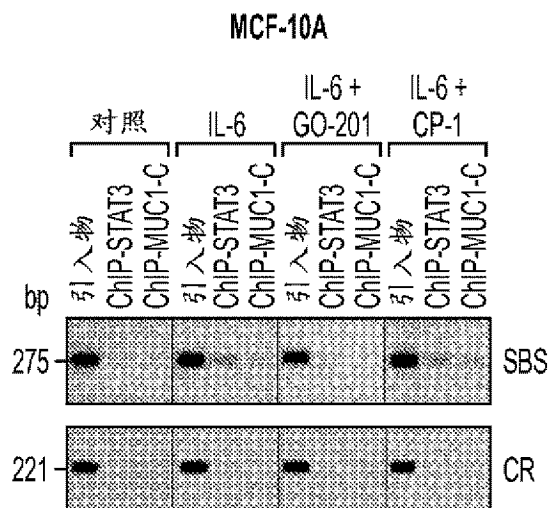


图 14C

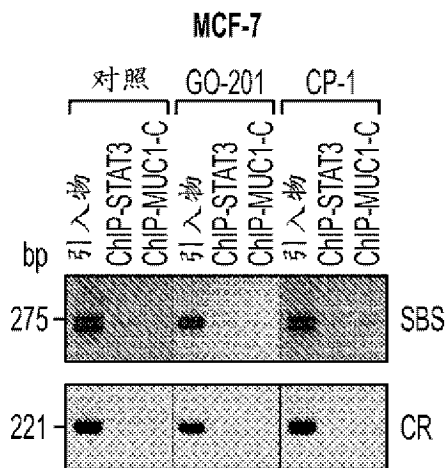


图 14D

MUC1-CD

CQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDRSPYEKVSAGNGGSSLYTNPAVAAASL
(SEQ ID NO:62)

			SEQ ID NOS:
内源	AIVYLIALAVCQCQCRRKNYG		55
GO-200-1B	Ac-AIVYL-S5-ALA-S5-CQC-R-RKNYG-NH2		56
GO-200-2B	Ac-AKKYL-S5-ALA-B5-CQC-S5-RKNY-NH2		57
GO-201	NH2-[dR] ₉ -CQCRRKNYGQLDIFP-COOH	TFA	3
GO-202	NH2-[dR] ₉ -CQCRRKN-COOH	TFA	53
GO-203	NH2-[dR] ₉ -dC dQ dC dR dR dK dN-COOH	TFA	53
GO-203-1	Acetyl- [dR] ₉ -dC dQ dC dR dR dK dN -NH2	TFA	53
GO-203-2	Acetyl- [dR] ₉ -dC dQ dC dR dR dK dN -NH2	HCL	53
GO-203a	NH2-dR- dR- dR -dC dQ dC dR dR dK dN dR -COOH	TFA	58
GO-203b	NH2-dR- dR- dC dQ dC dR dR dK dN dR -COOH	TFA	58
GO-203c	Acetyl-dR- dR -dC dQ dC dR dR dK dN- NH2	TFA	53
GO-203-cyc	Acetyl- [dR] ₉ -dC dQ dC dR dR dK dN -NH2	TFA	53
GO-203-cyc-1	Acetyl-dR- dR -dC dQ dC dR dR dK dN- NH2	TFA	53
GO-204	NH2- dC dQ dC dR dR dK dN-[dR] ₉ -COOH	TFA	53
GO-205	Acetyl- [dR] ₉ -dN dK dR dR dC dQ dC -NH2	TFA	59
GO-206	NH2- dN dK dR dR dC dQ dC-[dR] ₉ -COOH	TFA	59
GO-207	NH2-[dR] ₉ -dC dQ dC dR dR dK -COOH	TFA	4
GO-208	NH2-[dR] ₉ -dC dQ dC dR dR -COOH	TFA	50
GO-209	NH2-[dR] ₉ -dC dQ dC dR -COOH	TFA	54
GO-210	NH2-[dR] ₉ -dC dQ dC-COOH	TFA	
CP-1	NH2-[dR] ₉ -AQAARRKNYGQLDIFP-COOH	TFA	60
CP-2	NH2-[dR] ₉ -dA dQ dA dR dR dK dN-COOH	TFA	61

图 15

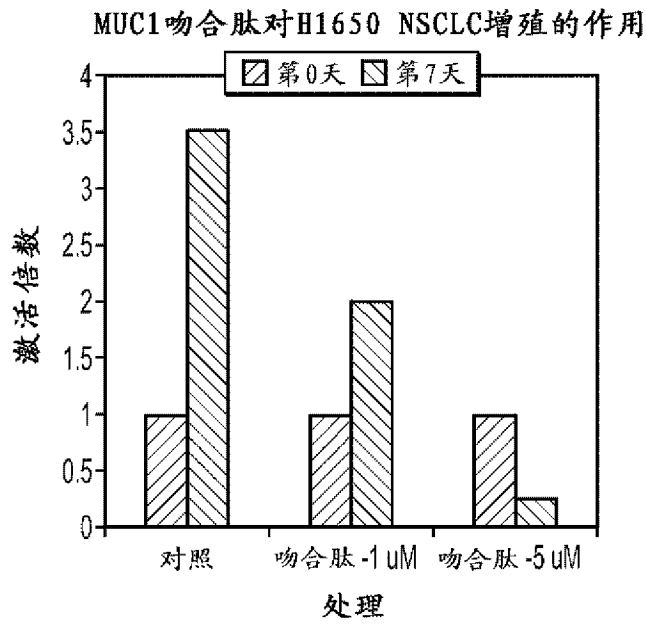


图 16A

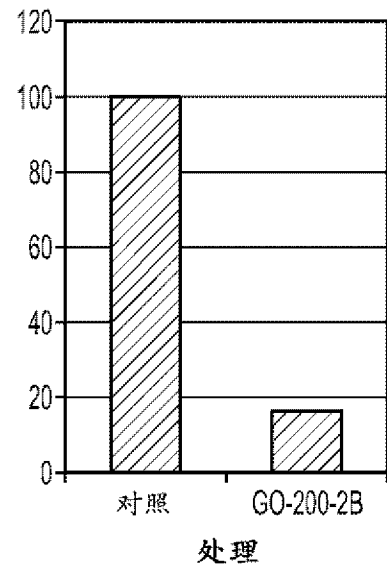


图 16B

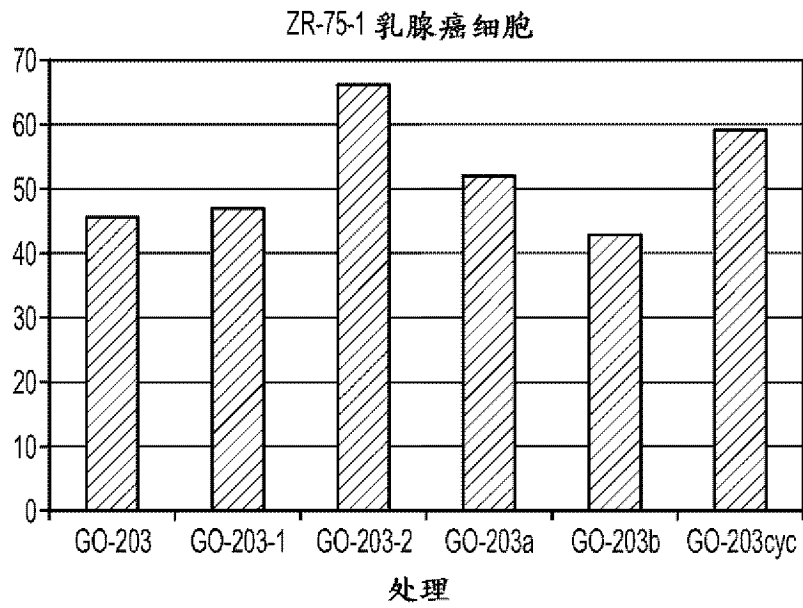


图 17

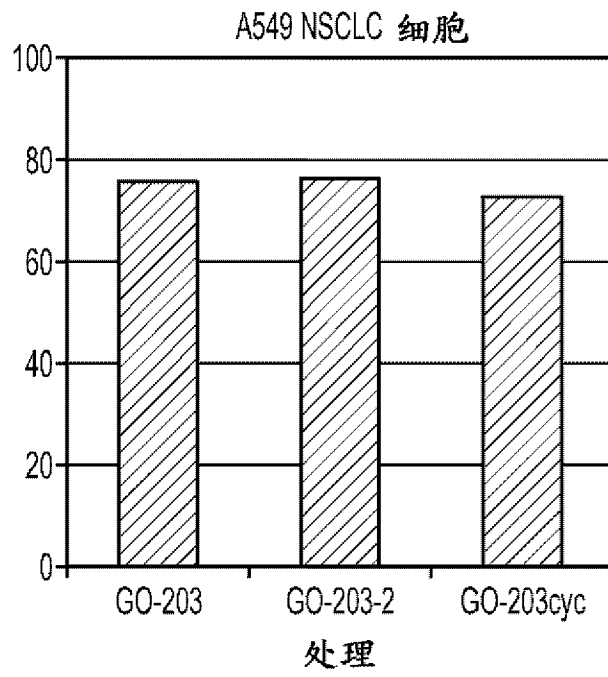


图 18

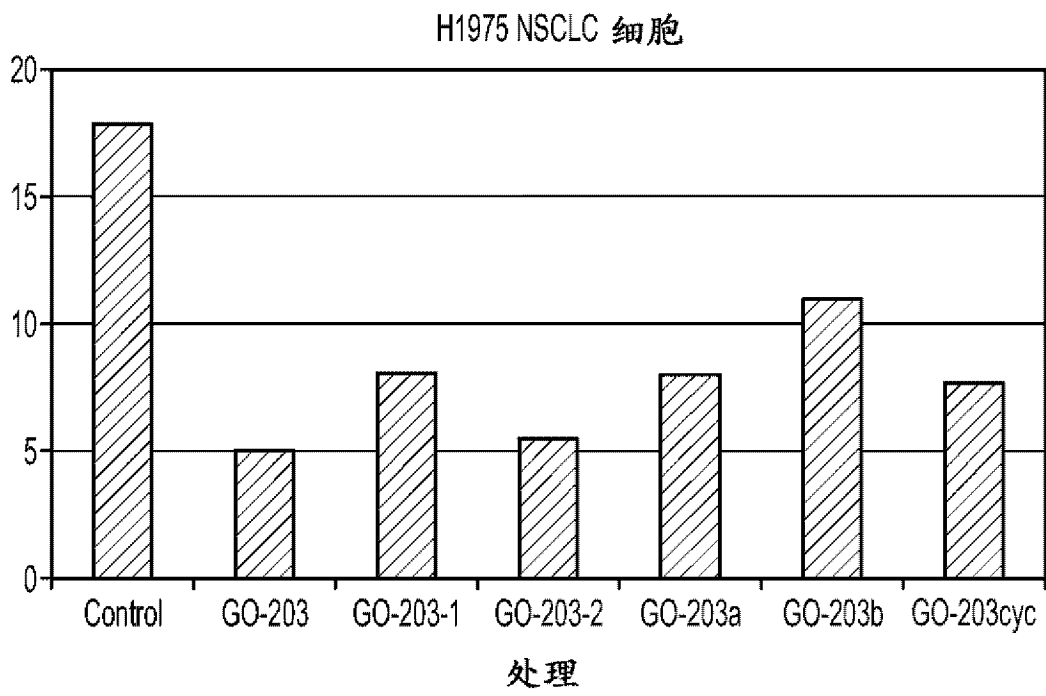


图 19

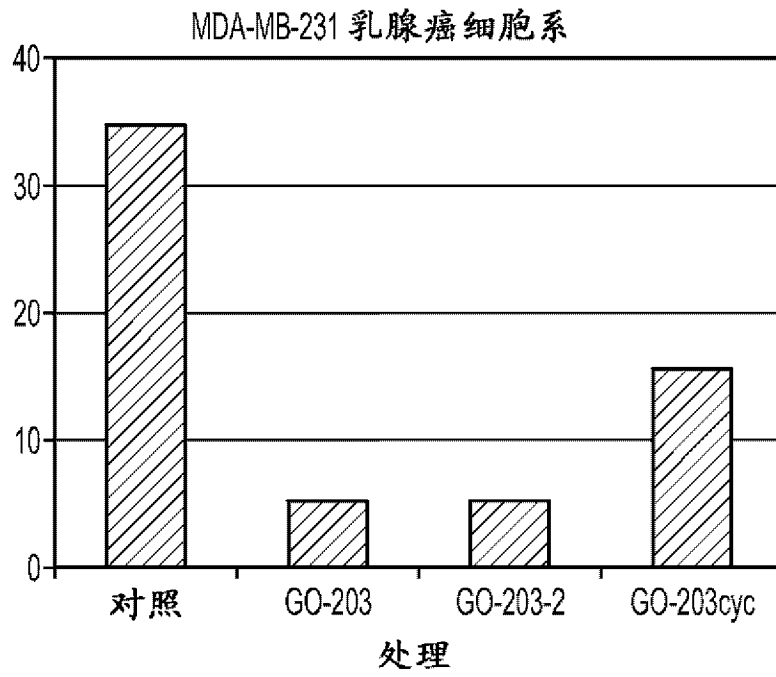


图 20

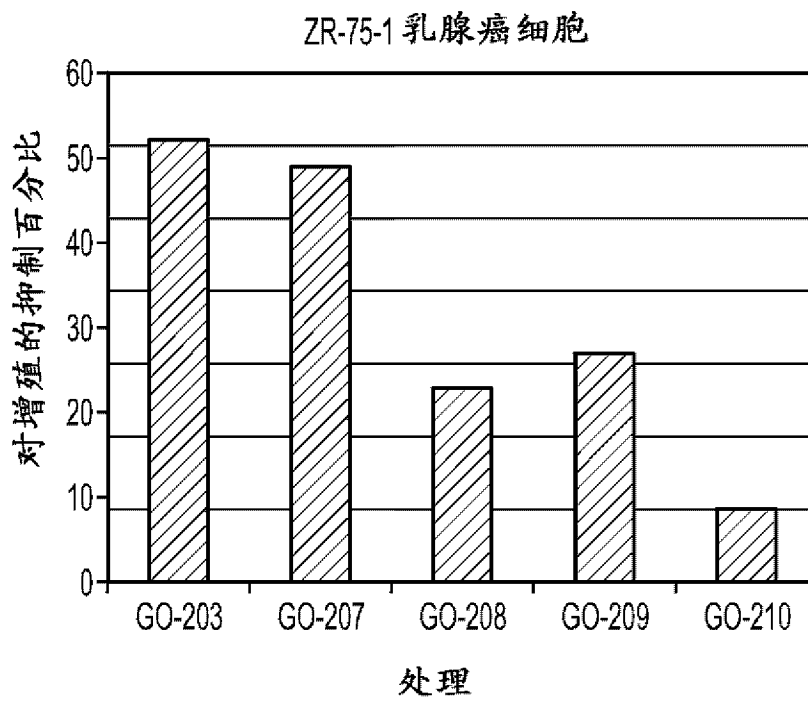


图 21