



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114173805 A

(43) 申请公布日 2022.03.11

(21) 申请号 202080049571.8

本杰明·D·苏利文

(22) 申请日 2020.06.03

(74) 专利代理机构 北京安杰律师事务所 11627

代理人 杨剑 吴立

(30) 优先权数据

62/856,514 2019.06.03 US

63/013,427 2020.04.21 US

(51) Int.Cl.

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.01.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/035841 2020.06.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/247440 EN 2020.12.10

(71) 申请人 卢布里斯有限责任公司

地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 西林·邦尼 阿努西·萨卡尔

丹宁·A·施密特

权利要求书4页 说明书37页

序列表8页 附图47页

(54) 发明名称

PRG4治疗癌症的用途

(57) 摘要

本文公开了使用也被称为润滑素的PRG4糖蛋白治疗或预防癌症的方法。

1. 一种在患者中治疗癌症或减缓癌症的生长或进展的方法,所述方法包括向所述患者给药PRG4以治疗所述癌症或减缓所述癌症的生长或进展。

2. 权利要求1所述的方法,其中所述PRG4是包含SEQ ID NO:1的第25-1404位残基的氨基酸序列的重组人PRG4。

3. 权利要求1所述的方法,其中所述PRG4具有与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基具有至少99%同一性的氨基酸序列。

4. 权利要求1所述的方法,其中所述PRG4具有与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基具有至少99.5%同一性的氨基酸序列。

5. 权利要求1-4中的任一项所述的方法,其中所述癌症选自肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑/CNS癌、基底细胞皮肤癌、乳腺癌、Castleman病、宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、隆凸性皮肤纤维肉瘤、尤文家族肿瘤、眼癌、胆囊癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、胃癌、妊娠滋养细胞病、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、霍奇金病、卡波斯肉瘤、肾癌、喉癌和下咽癌、白血病、肺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性间皮瘤、梅克尔细胞癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、神经内分泌癌、成神经细胞瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、口腔和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体肿瘤、前列腺癌、肾癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、鳞状细胞皮肤癌、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、华氏巨球蛋白血症或肾母细胞瘤。

6. 权利要求1-5中的任一项所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌。

7. 权利要求1-5中的任一项所述的方法,其中所述癌症是肝细胞癌。

8. 权利要求1-4中的任一项所述的方法,其中所述癌症是头或颈癌、乳腺癌、胰腺癌、胃肠癌、结肠直肠癌、前列腺癌、结肠癌、膀胱癌或白血病。

9. 权利要求1-8所述的方法,其中PRG4与另一种抗癌药剂联合给药。

10. 权利要求9所述的方法,其中所述抗癌药剂以比在没有PRG4而单独使用所述抗癌药剂时治疗所述癌症所需的所述抗癌药剂的治疗有效剂量更低的剂量给药。

11. 权利要求9或10所述的方法,其中所述抗癌药剂是化疗或放疗。

12. 权利要求11所述的方法,其中所述化疗选自放线菌素、白蛋白结合型紫杉醇、六甲蜜胺、aranose、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、苯达莫司汀、博来霉素、硼替佐米、白消安、卡巴他赛、卡培他滨、卡铂、卡莫氟、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、氮芥、氯脲霉素、顺铂、克拉屈滨、氯法拉滨、克唑替尼、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素D、达沙替尼、柔红霉素、地西他滨、多西他赛、去氧氟尿苷、多柔比星、表柔比星、雌莫司汀、乙基亚硝基脲、埃罗替尼、依托泊苷、氟尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、福莫司汀、吉非替尼、吉西他滨、羟基脲、羟基尿素、伊达比星、异环磷酰胺、伊立替康、伊马替尼、伊沙匹隆、拉帕替尼、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺、马法兰、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托蒽醌、奈达铂、奈拉滨、尼莫司汀、尼罗替尼、N-亚硝基-N-甲基脲、丙卡巴肼、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、喷司他丁、雷莫司汀、雷替曲塞、瑞格非尼、罗米地辛、司莫司汀、索拉非尼、链脲佐菌素、tafluposide、他莫昔芬、泰索帝、替加氟、替莫唑胺、西罗莫司脂化物、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、托法替尼、拓扑替康、戊柔比星、维罗非尼、长春碱、长春新碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁、长春瑞滨、伏立诺他或维莫德吉。

13. 权利要求11所述的方法,其中所述化疗是选自阿仑单抗、贝伐珠单抗、博纳吐单抗、

本妥昔单抗、赛妥珠单抗、西妥昔单抗、达雷木单抗、地妥昔单抗、替伊莫单抗、奥比妥珠单抗、奥法木单抗、奥拉单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗、雷莫芦单抗、利妥昔单抗、司妥昔单抗、曲妥珠单抗、利妥昔单抗、英妥珠单抗、吉妥珠单抗、贝伐珠单抗、西米普利单抗或斯巴达珠单抗的抗体治疗。

14. 权利要求9-12中的任一项所述的方法,其中所述化疗或抗癌药剂是索拉非尼和/或瑞格非尼。

15. 权利要求14所述的方法,其中索拉非尼的剂量低于每天两次400mg。

16. 权利要求14所述的方法,其中瑞格非尼的剂量低于每天一次160mg。

17. 权利要求11所述的方法,其中所述放疗是外照射放疗、近距离放疗或立体定向体部放疗(SBRT)。

18. 权利要求1-17所述的方法,其中所述PRG4被系统性给药。

19. 权利要求18所述的方法,其中所述给药是皮下、肌肉内或静脉内给药。

20. 权利要求1-17所述的方法,其中所述PRG4被局部给药到所述癌症的位置。

21. 权利要求18-20所述的方法,其中所述给药是通过注射。

22. 权利要求1-21所述的方法,其中所述PRG4以0.1 μ g/kg至4,000 μ g/kg的量给药。

23. 权利要求9-22所述的方法,其中所述PRG4增强所述癌症对所述抗癌药剂的化学敏感性。

24. 权利要求9-23所述的方法,其中PRG4和所述抗癌药剂的组合治疗所述癌症。

25. 一种预防或抑制以前治疗过的癌症的复发的方法,所述方法包括向有需要的患者给药治疗有效量的PRG4,以在所述患者中预防以前治疗过的癌症的复发或生长。

26. 权利要求25所述的方法,其中所述PRG4被局部给药到以前治疗过的癌症部位。

27. 权利要求26所述的方法,其中所述PRG4被局部给药或通过注射到所述部位给药。

28. 权利要求25所述的方法,其中所述PRG4被系统性给药到所述患者。

29. 权利要求25-28所述的方法,其中通过手术切除从所述患者移除所述以前治疗过的癌症,并在所述肿瘤的手术切除后将PRG4给药到所述患者。

30. 权利要求29所述的方法,其中所述PRG4被局部给药到所述肿瘤的手术切除的部位。

31. 权利要求25-30所述的方法,其中所述PRG4以0.1 μ g/kg至4,000 μ g/kg的量给药。

32. 权利要求25-31所述的方法,其中所述PRG4是包含SEQ ID NO:1的第25-1404位残基的氨基酸序列的重组人PRG4。

33. 权利要求25-31所述的方法,其中所述PRG4具有与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基具有至少99%同一性的氨基酸序列。

34. 权利要求25-31所述的方法,其中所述PRG4具有与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基具有至少99.5%同一性的氨基酸序列。

35. 权利要求25-34所述的方法,其中所述癌症选自肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑/CNS癌、基底细胞皮肤癌、乳腺癌、Castleman病、宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、隆凸性皮肤纤维肉瘤、尤文家族肿瘤、眼癌、胆囊癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、胃癌、妊娠滋养细胞病、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、霍奇金病、卡波斯肉瘤、肾癌、喉癌和下咽癌、白血病、肺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性间皮瘤、梅克尔细胞癌、黑素瘤、多发性骨髓瘤、骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、神经内

分泌癌、成神经细胞瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、口腔和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体肿瘤、前列腺癌、肾癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、鳞状细胞皮肤癌、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、华氏巨球蛋白血症或肾母细胞瘤。

36. 权利要求25-35所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌。

37. 权利要求36所述的方法,其中所述癌症是三阴性乳腺癌。

38. 权利要求25-35所述的方法,其中所述癌症是头或颈鳞状细胞癌、乳腺癌、胰腺癌、胃肠癌、结肠直肠癌、前列腺癌、结肠癌、膀胱癌或白血病。

39. 权利要求25-35所述的方法,其中所述癌症是肝细胞癌。

40. 权利要求25-39所述的方法,其中所述患者从所述以前治疗过的癌症完全缓解。

41. 权利要求25-39所述的方法,其中所述患者从所述以前治疗过的癌症部分缓解。

42. 权利要求25-41所述的方法,其中通过所述PRG4的给药将所述以前治疗过的癌症的复发阻止1年、2年、3年、4年或5年。

43. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的患者给药PRG4和免疫疗法药剂的组合,其中所述PRG4和免疫疗法的组合治疗所述癌症。

44. 权利要求43所述的方法,其中所述免疫疗法是抗PD1或抗PD-L1抗体。

45. 权利要求44所述的方法,其中所述免疫疗法选自阿特殊单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、伊匹单抗。

46. 权利要求43-45中的任一项所述的方法,其中用PRG4和免疫疗法药剂治疗所述患者与单独使用所述免疫疗法的治疗相比改进了所述癌症的治疗。

47. 权利要求43-46中的任一项所述的方法,其中所述癌症选自肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑/CNS癌、基底细胞皮肤癌、乳腺癌、Castleman病、宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、隆凸性皮肤纤维肉瘤、尤文家族肿瘤、眼癌、胆囊癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、胃癌、妊娠滋养细胞病、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、霍奇金病、卡波斯肉瘤、肾癌、喉癌和下咽癌、白血病、肺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性间皮瘤、梅克尔细胞癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、神经内分泌癌、成神经细胞瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、口腔和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体肿瘤、前列腺癌、肾癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、鳞状细胞皮肤癌、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、华氏巨球蛋白血症或肾母细胞瘤。

48. 权利要求43-46中的任一项所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌。

49. 权利要求48所述的方法,其中所述癌症是三阴性乳腺癌。

50. 权利要求43-46中的任一项所述的方法,其中所述癌症是头或颈鳞状细胞癌、乳腺癌、胰腺癌、胃肠癌、结肠直肠癌、前列腺癌、结肠癌、膀胱癌或白血病。

51. 权利要求43-46中的任一项所述的方法,其中所述癌症是肝细胞癌。

52. 权利要求43-51中的任一项所述的方法,其中所述PRG4被系统性给药到所述患者。

53. 权利要求43-51中的任一项所述的方法,其中所述PRG4被局部给药到所述患者的癌症部位处。

54. 权利要求43-53中的任一项所述的方法,其中所述PRG4以0.1 μ g/kg至4,000 μ g/kg的

量给药。

55. 权利要求43-54中的任一项所述的方法,其中所述PRG4是包含SEQ ID NO:1的第25-1404位残基的氨基酸序列的重组人PRG4。

56. 权利要求43-54中的任一项所述的方法,其中所述PRG4具有与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基具有至少99%同一性的氨基酸序列。

57. 权利要求43-54中的任一项所述的方法,其中所述PRG4具有与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基具有至少99.5%同一性的氨基酸序列。

58. 一种用于治疗癌症的PRG4,其中所述PRG4是包含SEQ ID NO:1的第25-1404位残基的氨基酸序列的重组人PRG4,或具有与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基具有至少99%同一性的氨基酸序列,或具有与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基具有至少99.5%同一性的氨基酸序列。

PRG4治疗癌症的用途

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年6月3日提交的美国临时专利申请号62/856,514和2020年4月21日提交的美国临时专利申请号63/013,427的优先权,每个所述临时申请的内容整体通过参考并入本文。

[0003] 序列列表

[0004] 本申请含有以ASCII格式电子提交并整体通过参考并入本文的序列列表。所述于2020年6月2日创建的ASCII副本被命名为LUB_032WO_SL.txt,大小为19,246字节。

技术领域

[0005] 本发明涉及也被称为润滑素的人类糖蛋白PRG4的新用途。更具体来说,本发明涉及使用PRG4治疗癌症和与癌症相关或癌症附带的病症。

背景技术

[0006] 蛋白聚糖4基因 (PRG4) 编码巨核细胞刺激因子 (MSF) 以及也被称为润滑素的“浅表区蛋白”的高度差异糖基化的剪接变体和糖型。浅表区蛋白最初被定位在来自于浅表区的外植体软骨的表面处,并在调制培养基中鉴定到。润滑素最初从滑液中分离,并在软骨-玻璃界面处和乳胶-玻璃界面中表现出与滑液相似的体外润滑能力。晚些时候,它被鉴定为滑膜成纤维细胞的产物,并且发现它的润滑能力依赖于由外显子6编码的940个氨基酸的大的黏蛋白样结构域中的O-连接的 $\beta(1-3)$ Gal-GalNAc寡糖。润滑素分子被差异糖基化,并且已报道了几种天然存在的剪接变体。它们在本文中被统称为PRG4。已显示PRG4存在于身体内部滑膜、肌腱、关节软骨例如半月板的表面处以及眼睛的保护膜等部位中,并在关节润滑和滑膜稳态中发挥重要作用。

[0007] 全长重组人PRG4 (rhPRG4) 蛋白已被成功地大规模表达,使其可用于基础和基于翻译的研究。已显示rhPRG4保留了适合的高级结构和糖基化,因此表现出高效的体外润滑和抗粘附功能 (Abubacker等, *Ann Biomed Eng.* 2016; 44 (4) :1128-37; Samsom等, *Exp Eye Res.* 2014; 127:14-9)。重要的是, rhPRG4在临床前体内骨关节炎模型中通过关节内注射在保护关节健康方面提供有效的体内治疗价值 (Elsaid等, *Osteoarthritis and Cartilage.* 2015; 23 (1) :114-21; Walker等, *Am. J. Sports Med.*, 2017; 45 (7) :1512-21)。本申请人现在发现, 润滑素对癌细胞有作用, 并且可用于治疗癌症和癌症附带的病症。具体来说, 本申请人确定了PRG4可以改变赘生性细胞的表型以及赘生性细胞的应激反应, 例如使肿瘤细胞侵袭性和迁移性降低。

发明内容

[0008] 一方面, 本发明包括一种在患者中治疗癌症或减缓癌症的生长或进展的方法, 其中将PRG4给药到所述患者以治疗所述癌症或减缓所述癌症的生长或进展。

[0009] 在一个实施方式中, 所述PRG4是包含SEQ ID NO:1的第25-1404位残基的氨基酸序

列的重组人PRG4。在一个实施方式中,所述PRG4与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基具有至少99%序列同一性。在另一个实施方式中,所述PRG4与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基具有至少99.5%序列同一性。

[0010] 在一个实施方式中,所述癌症选自肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑/CNS癌、基底细胞皮肤癌、乳腺癌、Castleman病、宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、隆凸性皮肤纤维肉瘤、尤文家族肿瘤、眼癌、胆囊癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、胃癌、妊娠滋养细胞病、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌(HCC)、霍奇金病、卡波斯肉瘤、肾癌、喉癌和下咽癌、白血病、肺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性间皮瘤、梅克尔细胞癌、黑素瘤、多发性骨髓瘤、骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、神经内分泌癌、成神经细胞瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、口腔和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体肿瘤、前列腺癌、肾癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、鳞状细胞皮肤癌、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、华氏巨球蛋白血症或肾母细胞瘤。例如,所述癌症可以是乳腺癌。例如,所述癌症可以是头或颈癌、乳腺癌、胰腺癌、胃肠癌、结肠直肠癌、前列腺癌、结肠癌、膀胱癌或白血病。例如,所述癌症可以是肝细胞癌。

[0011] 在一个实施方式中,所述PRG4与另一种抗癌药剂联合给药。例如,所述抗癌药剂可以是化疗或放射治疗。所述放射治疗可以是例如外照射放疗、近距离放疗或立体定向体部放疗(SBRT)。

[0012] 在一个实施方式中,所述PRG4与另一种抗癌药剂联合给药,其中所述抗癌药剂以比所述抗癌药剂在没有PRG4而单独给药以治疗所述癌症时的治疗有效剂量更低的剂量给药。例如,在一个实施方式中,所述抗癌药剂是索拉非尼,其以每天低于800mg或每天两次低于400mg的剂量给药。在另一个实施方式中,所述抗癌药剂是瑞格非尼,其以每天低于160mg的剂量给药。在另一个实施方式中,所述癌症是肝细胞癌。

[0013] 在一个实施方式中,所述化疗可以选自放线菌素、白蛋白结合型紫杉醇、六甲蜜胺、aranose、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、苯达莫司汀、博来霉素、硼替佐米、白消安、卡巴他赛、卡培他滨、卡铂、卡莫氟、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、氮芥、氯脲霉素、顺铂、克拉屈滨、氯法拉滨、克唑替尼、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素D、达沙替尼、柔红霉素、地西他滨、多西他赛、去氧氟尿苷、多柔比星、表柔比星、雌莫司汀、乙基亚硝基脲、埃罗替尼、依托泊苷、氟尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、福莫司汀、吉非替尼、吉西他滨、羟基脲、羟基尿素、伊达比星、异环磷酰胺、伊立替康、伊马替尼、伊沙匹隆、拉帕替尼、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺、马法兰、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托蒽醌、奈达铂、奈拉滨、尼莫司汀、尼罗替尼、N-亚硝基-N-甲基脲、丙卡巴肼、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、喷司他丁、雷莫司汀、雷替曲塞、瑞格非尼、罗米地辛、司莫司汀、索拉非尼、链脲佐菌素、tafluposide、他莫昔芬、泰索帝、替加氟、替莫唑胺、西罗莫司脂化物、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、托法替尼、拓扑替康、戊柔比星、维罗非尼、长春碱、长春新碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁、长春瑞滨、伏立诺他或维莫德吉。在一个实施方式中,所述化疗是索拉非尼和/或瑞格非尼。在其他实施方式中,所述癌症是肝细胞癌,并且化疗是索拉非尼和/或瑞格非尼。

[0014] 在另一个实施方式中,所述化疗可以是抗体治疗,其选自阿仑单抗、贝伐珠单抗、博纳吐单抗、本妥昔单抗、赛妥珠单抗、西妥昔单抗、达雷木单抗、地妥昔单抗、替伊莫单抗、

奥比妥珠单抗、奥法木单抗、奥拉单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗、雷莫芦单抗、利妥昔单抗、司妥昔单抗、曲妥珠单抗、利妥昔单抗、英妥珠单抗、吉妥珠单抗、贝伐珠单抗、西米普利单抗或斯巴达珠单抗。

[0015] 根据一个实施方式,其中所述PRG4被系统性给药到所述患者,然而在其他实施方式中PRG4通过皮下、肌肉内或静脉内给药来给药。PRG4也可以被局部给药到所述癌症的位置。给药可以通过注射来进行。PRG4可以以0.1 μ g/kg至4,000 μ g/kg的量给药。

[0016] 在某些实施方式中,所述PRG4增强所述癌症对所述抗癌药剂的化学敏感性。在某些实施方式中,所述PRG4和抗癌药剂的组合治疗所述癌症。

[0017] 另一方面,本发明提供了一种预防或抑制以前治疗过的癌症的复发的方法。所述方法包括向有需要的患者给药治疗有效量的PRG4,以在所述患者中预防以前治疗过的癌症的复发或生长。在一个实施方式中,所述PRG4是包含SEQ ID NO:1的第25-1404位残基的氨基酸序列的重组人PRG4。在一个实施方式中,所述PRG4与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基具有至少99%序列同一性。在另一个实施方式中,所述PRG4与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基具有至少99.5%序列同一性。

[0018] 在某些实施方式中,所述以前治疗过的癌症是选自肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑/CNS癌、基底细胞皮肤癌、乳腺癌、Castleman病、宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、隆凸性皮肤纤维肉瘤、尤文家族肿瘤、眼癌、胆囊癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、胃癌、妊娠滋养细胞病、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、霍奇金病、卡波斯肉瘤、肾癌、喉癌和下咽癌、白血病、肺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性间皮瘤、梅克尔细胞癌、黑素瘤、多发性骨髓瘤、骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、神经内分泌癌、成神经细胞瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、口腔和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体肿瘤、前列腺癌、肾癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、鳞状细胞皮肤癌、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、华氏巨球蛋白血症或肾母细胞瘤的癌症。例如,在一个实施方式中,所述癌症是乳腺癌。在另一个实施方式中,所述癌症是三阴性乳腺癌。在又一个实施方式中,所述癌症是头或颈鳞状细胞癌、乳腺癌、胰腺癌、胃肠癌、结肠直肠癌、前列腺癌、结肠癌、膀胱癌或白血病。在一个实施方式中,所述癌症是肝细胞癌。

[0019] 在某些实施方式中,所述PRG4被局部给药到所述以前治疗过的癌症的部位。例如,可以通过局部给药或通过注射到所述部位来进行局部给药。在其他实施方式中,所述PRG4被系统性给药到所述患者。PRG4可以以0.1 μ g/kg至4,000 μ g/kg的量给药。

[0020] 在某些实施方式中,通过手术切除从所述患者移除所述以前治疗过的癌症,并在所述肿瘤的手术切除后将PRG4给药到所述患者。在这种情况下,PRG4可以被局部给药到所述肿瘤的手术切除的部位。PRG4可以以0.1 μ g/kg至4,000 μ g/kg的量给药。

[0021] 根据所述方法的某些实施方式,所述患者从所述以前治疗过的癌症完全缓解,而在其他实施方式中,所述患者从所述以前治疗过的癌症部分缓解。在某些实施方式中,通过所述PRG4的给药将所述以前治疗过的癌症的复发阻止1年、2年、3年、4年或5年。

[0022] 另一方面,本发明包括一种治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的患者给药PRG4和免疫疗法药剂的组合,其中所述PRG4和免疫疗法的组合治疗所述癌症。在一个实施方式中,所述免疫疗法是抗PD1或抗PD-L1抗体。在另一个实施方式中,所述免疫疗法选自阿

特殊单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、伊匹单抗。在其他实施方式中,使用PRG4和免疫疗法药剂治疗所述患者与单独使用所述免疫疗法的治疗相比改进所述癌症的治疗。

[0023] 根据本发明的这种方法,所述癌症可以选自肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑/CNS癌、基底细胞皮肤癌、乳腺癌、Castleman病、宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、隆凸性皮肤纤维肉瘤、尤文家族肿瘤、眼癌、胆囊癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、胃癌、妊娠滋养细胞病、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌(HCC)、霍奇金病、卡波斯肉瘤、肾癌、喉癌和下咽癌、白血病、肺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性间皮瘤、梅克尔细胞癌、黑素瘤、多发性骨髓瘤、骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、神经内分泌癌、成神经细胞瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、口腔和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体肿瘤、前列腺癌、肾癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、鳞状细胞皮肤癌、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、华氏巨球蛋白血症或肾母细胞瘤。所述癌症在一个实施方式中可以是乳腺癌,在另一个实施方式中是三阴性乳腺癌,或者所述癌症可以是头或颈癌、乳腺癌、胰腺癌、胃肠癌、结肠直肠癌、前列腺癌、结肠癌、膀胱癌或白血病。在一个实施方式中,所述癌症是肝细胞癌。

[0024] 根据一个实施方式,所述PRG4被系统性给药到所述患者,而在另一个实施方式中,所述PRG4被局部给药到所述患者的癌症部位处。在一个实施方式中,所述PRG4以0.1 μ g/kg至4,000 μ g/kg的量给药。在又一个实施方式中,所述PRG4是包含SEQ ID NO:1的第25-1404位残基的氨基酸序列的重组人PRG4。在一个实施方式中,所述PRG4与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基具有至少99%序列同一性。在另一个实施方式中,所述PRG4与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基具有至少99.5%序列同一性。

[0025] 在一个实施方式中,本发明包含用于治疗癌症的PRG4。例如,在一个实施方式中,所述PRG4是包含SEQ ID NO:1的第25-1404位残基的氨基酸序列的重组人PRG4。在一个实施方式中,所述PRG4与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基具有至少99%序列同一性。在另一个实施方式中,所述PRG4与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基具有至少99.5%序列同一性。

附图说明

[0026] 图1A-C是条形图,其呈现的通过TMB-ELISA在450nm检测的数据证实了重组人蛋白聚糖4(rhPRG4)、高分子量透明质酸(HMW HA)和中分子量透明质酸(MMW HA)与重组人CD44受体的结合。数据代表4次独立实验的平均值,每组三个平行孔。图1A描绘了rhPRG4、HMW HA、MMW HA和玻连蛋白与CD44-IgG1Fc的结合,并使用了IgG1 Fc。星号(*)表明对于rhPRG4、HMW HA和MMW HA来说,CD44-IgG1 Fc孔中的450nm吸收值统计显著地高于IgG1Fc孔($p < 0.001$)。图1B示出了rhPRG4、HMW HA和MMW HA的浓度依赖性CD44结合。CD44与rhPRG4的结合显著高于与HMW HA或MMW HA的结合($p < 0.001$)。双星号(**)表明CD44与rhPRG4的结合显著高于与MMW HA的结合($p < 0.001$)。图1C描绘了rhPRG4(5 μ g/mL)与HMW HA或MMW HA(0.01 μ g/mL至50 μ g/mL)之间对与包被在96孔ELISA板上的CD44的结合的竞争。星号(*)表明在HMW HA+rhPRG4孔中结合的CD44的百分率显著低于rhPRG4孔($p < 0.05$);(**)表明在MMW HA+rhPRG4孔中结合的CD44的百分率显著低于rhPRG4孔($p < 0.05$)。

[0027] 图2A-B描绘了使用表面等离子体共振测定的重组人蛋白聚糖4(rhPRG4)与重组

CD44的结合和rhPRG4与高分子量透明质酸(HMW HA)之间对CD44结合的竞争。图2A是描绘了rhPRG4(300 μ g/mL至50 μ g/mL)与固定的CD44-IgG₁Fc的浓度依赖性结合和解离的传感图。虚线曲线表示rhPRG4与CD44嵌合蛋白的结合曲线,黑线表示拟合的1:1结合模型。图2B是示出了HMW HA结合的相对响应相比于rhPRG4结合的相对响应的图。rhPRG4与HMW HA之间对与固定的CD44-IgG₁Fc的结合的竞争。rhPRG4以300(1)、250(2)、200(3)、150(4)、100(5)、50(6)和0(7) μ g/mL进样。在rhPRG4解离后,HMW HA以50 μ g/mL进样。随着rhPRG4浓度提高,随后与CD44结合的HMW HA减少。

[0028] 图3A-B示出了重组人蛋白聚糖4(rhPRG4)的唾液酸酶-A和O-糖苷酶消化对rhPRG4与CD44的结合的影响。数据表示4次独立实验的平均值,每组3个平行孔。图3A是描绘了rhPRG4、唾液酸酶-A消化的rhPRG4、O-糖苷酶消化的rhPRG4和唾液酸酶-A+O-糖苷酶消化的rhPRG4与CD44的结合的条形图。将不同组中的450nm吸光值归一化到未消化的rhPRG4组中的吸光值。(*)表明与未消化的rhPRG4相比,在唾液酸酶A消化和O-糖苷酶消化的rhPRG4中CD44结合显著更高($p < 0.01$)。(**)指示与唾液酸酶-A消化、O-糖苷酶消化和未消化的rhPRG4相比,唾液酸酶-A+O-糖苷酶消化的rhPRG4中的CD44结合显著更高($p < 0.01$)。图3B是rhPRG4、唾液酸酶-A消化的rhPRG4、O-糖苷酶消化的rhPRG4和唾液酸酶-A与O-糖苷酶的组合消化的rhPRG4的SDS-PAGE的照片。凝胶用考马斯蓝染色过夜。用唾液酸酶-A和O-糖苷酶消化导致rhPRG4的表观分子量减小。

[0029] 图4A-G:rhPRG4抑制MDA-MB-231细胞衍生的类器官的TGF β 诱导的侵袭性生长。图4A:未处理的或与含有100pM TGF β 并且不含或含有浓度逐渐增加的rhPRG4(0.1、10和100 μ g/mL)的完全生长培养基温育的8日龄三维MDA-MB-231细胞衍生的类器官的代表性DIC光学显微镜图像。图4B:描绘了来自于包括图A中所示的在内的4个独立实验的球形类器官的比例的平均值 \pm SEM的条形图,所述比例被表示成为每种实验条件计数的总集落的百分率。图4C:与完全生长培养基中的10 μ g/mL小鼠IgG或抗PRG4 mAb 4D6并含有或不含100pM TGF β 和100 μ g/mL rhPRG4的各种不同组合温育的8日龄三维MDA-MB-231细胞衍生的类器官的代表性DIC光学显微镜图像。图4D:描绘了来自于包括图C中所示的在内的3个独立实验的球形类器官的比例的平均值 \pm SEM的条形图,所述比例被表示成为每种实验条件计数的总集落的百分率。图4E:使用与介质或100 μ g/mL rhPRG4混合的基质胶,未处理或100pM TGF β 处理的8日龄三维MDA-MB-231细胞衍生的类器官的代表性DIC光学显微镜图像。图4F:描绘了来自于包括图E中所示的在内的3个独立实验的球形类器官的比例的平均值 \pm SEM的条形图,所述比例被表示成为每种实验条件计数的总集落的百分率。图4G:未处理的或与含有TGF β 且含有或不含rhPRG4的完全生长培养基温育的甲醛固定的8日龄MDA-MB-231细胞衍生的类器官的细胞核(Hoechst 33342,蓝色)、肌动蛋白(TRITC-鬼笔环肽,黄色)和层粘连蛋白(大鼠抗层粘连蛋白/抗大鼠Alexa 647,红色)染色的代表性荧光显微镜图像。这个实验被独立地重复两次,具有相似的结果。显著差异,ANOVA:* $P \leq 0.05$,** $P \leq 0.01$,*** $P \leq 0.001$ 。标尺条指示50 μ m。对于图4A、4C和4E来说,绿色和红色箭头分别指示球形和侵入性类器官。绿色箭头出现在图4A的顶部行上的所有框中以及底部行上右侧的两个框中。底部行中左侧的两个框具有红色箭头。在图4C中,在顶部行上,从左至右第一、第三和第四个框具有绿色箭头,而从左起第二个框具有红色箭头。在图4C中,底部行中左侧第一个框具有绿色箭头,而底部行上的其余框具有红色箭头。在图4E中,除了底部行上的左侧框具有红色箭头之外,其他所有框

均具有绿色箭头。对于图4G来说,绿色箭头指示皮层肌动蛋白(对于TGFβ⁺和TGFβ⁻两者来说,底部行的中间框),黄色箭头指示应力纤维样肌动蛋白(对于TGFβ⁺和TGFβ⁻两者来说,顶部行的中间框),蓝色箭头指示完整层粘连蛋白环(TGFβ⁻的顶部和底部行中的最右侧图像,以及TGFβ⁺的底部行中的最右侧图像),红色箭头指示层粘连蛋白环的破坏(TGFβ⁺,顶部行最右侧图像),并且白色箭头(TGFβ⁺,顶部行最右侧图像)指示层粘连蛋白丧失的代表性位点。

[0030] 图5A-D:rhPRG4抑制乳腺癌细胞的侵袭和迁移能力。图5A:出现在transwell插片的基质胶包被的膜的底侧上的结晶紫染色的12h血清饥饿的MDA-MB-231细胞的代表性DIC光学显微镜图像,在底部孔中含有不含(-)或包含单独的100pM TGFβ或还含有10μM TβRI抑制剂SB435142(KI)或100μg/mL rhPRG4的完全生长培养基。标尺条表示150μm。图5B:条形图,描绘了来自于包括A中所示的在内的3个独立实验的从为每个实验条件随机选择的8个不重叠视野计数的侵入细胞的比例的平均值±SEM。图5C:接种在12孔板的孔中的血清饥饿的MDA-MB-231细胞,在引入刮痕并与不含(-)或包含单独的100pM TGFβ或还含有10μM KI或100μg/mL rhPRG4的含有0.2%FBS的培养基温育0和36h时的代表性DIC光学显微镜图像。标尺条表示500μm。图5D:条形图,描绘了来自于包括C中所示的在内的3个独立实验的每个实验条件的5个不重叠图像在36h相对于0小时的刮痕闭合比例(%)的平均值±SEM。显著差异,ANOVA:*P≤0.05,**P≤0.01,***P≤0.001。

[0031] 图6A-D:rhPRG4不影响TGFβ-Smad信号传导。图6A:未处理的(对照)或与含有100pM TGFβ且不含或含有10μM KI或100μg/mL rhPRG4的完全生长培养基温育12h的MDA-MB-231细胞的裂解液的磷酸化Smad2(pSmad2)、总Smad2/3(tSmad2/3)和肌动蛋白免疫印迹。图6B:条形图,代表了来自于包括在A中所示的在内的4个独立实验的pSmad2相对于Smad2/3的总蛋白丰度的比例的平均值±SEM,所述丰度被表示为相比于对照的变化倍数。图6C:3TP-Lux报告基因构建物的示意图,其含有3个连续的TPA(12-O-十四酰基佛波醇13-乙酸酯)响应元件(TRE)和纤溶酶原激活物抑制剂1(PAI-1)启动子区的一部分,用于驱动萤光素酶基因的表达。TGFβ处理触发磷酸化、核转位和Smads与3TP启动子的结合,导致萤光素酶的丰度提高。图6D:将MDA-MB-231细胞用3TP-Lux报告基因构建物和由CMV启动子驱动的海肾萤光素酶表达构建物一起转染。将细胞不处理(对照)或与含有100pM TGFβ且不含或包含100μg/mL rhPRG4的含有0.2%FBS的培养基温育。条形图表示归一化到海肾萤光素酶表达(相对光单位)的3TP启动子驱动的萤光素酶值,并将所述归一化的数据相对于未处理细胞的裂解液中的归一化萤光素酶数据来表述。显著差异,ANOVA:***P≤0.001。

[0032] 图7A-E:rhPRG4抑制乳腺癌细胞的低分子量透明质酸(LMWHA)诱导的侵袭。图7A:使用CD44抗体(CD44 IP)或非特异性大鼠IgG抗体(IgG IP)对MDA-MB-231细胞的裂解液进行免疫沉淀,然后对免疫沉淀物进行CD44免疫印迹分析。裂解液中的CD44蛋白丰度也通过CD44免疫印迹(输入)来确认。图7B:与不含或单独含有浓度逐渐增加的LMWHA(10、100或400μg/mL)或还含有100μg/mL rhPRG4的生长培养基温育的8日龄三维MDA-MB-231细胞衍生的类器官的代表性DIC光学显微镜图像。标尺条指示50μm。绿色箭头(顶部行中的两个左侧图像和底部行中的所有图像)和红色箭头(顶部行中的两个右侧图像)分别指示球形和侵入性类器官。图7C:条形图,描绘了来自于包括在B中所示的在内的3个独立实验的球形类器官的比例的平均值±SEM,所述比例被表示成为每个实验条件计数的总集落的百分率。图7D:出

现在transwell插片的基质胶包被的膜的底侧上的结晶紫染色的12h血清饥饿的MDA-MB-231细胞的代表性DIC光学显微镜图像,在底部孔中含有不含(-)或包含单独的400 μ g/mL LMWHA或还含有5 μ g/mL CD44中和抗体或100 μ g/mL rhPRG4的完全生长培养基。标尺条表示150 μ m。图7E:条形图,描绘了来自于包括D中所示的在内的3个独立实验的从为每个实验条件随机选择的8个不重叠视野计数的侵入细胞相对于对照的比例的平均值 \pm SEM。ANOVA:显著差异,ANOVA:* $P \leq 0.05$,** $P \leq 0.01$,*** $P \leq 0.001$ 。

[0033] 图8A-F:在MDA-MB-231细胞中CD44对TGF β 诱导的侵袭性是至关重要的。图8A:用pU6 RNAi载体(载体对照)或表达靶向CD44mRNA的两个不同序列的shRNA的质粒CD44i-1、CD44i-2单独或一起(CD44i-1+2)转染的MDA-MB-231细胞的裂解液的CD44免疫印迹。肌动蛋白被用作载样对照。图8B:与A中相同进行转染的MDA-MB-231细胞的代表性CD44、GFP和细胞核荧光显微镜图像,所述细胞还进行了抗CD44抗体间接免疫荧光(大鼠抗CD44/抗大鼠Alexa 647,红色;颜色出现在图像的底部行中)并用Hoechst 33342荧光核苷酸染料复染(蓝色;出现在图像的顶部行中)以可视化细胞核。GFP(绿色;出现在图像的中间行中)信号指示载体对照或CD44 RNAi-1/2转染的细胞。箭头显示了载体(左侧)、CD44i-1(第2列)、CD44i-2(第3列)和CD44i-1+2(右侧)转染的细胞的实例,以突出内源CD44被两个CD44 RNAi质粒的敲减。这个实验被重复三次,具有相似的结果。图8C:在完全生长培养基中未处理(-)、100pM TGF β 或400 μ g/mL LMWHA处理的8日龄三维类器官的代表性DIC光学显微镜图像,所述类器官源自于用载体对照或单独或组合的CD44i-1和CD44i-2转染的MDA-MB-231细胞。图8D:条形图,描绘了来自于包括C中所示的在内的3个独立实验的球形类器官的比例的平均值 \pm SEM,所述比例被表示成为每个实验条件计数的总集落的百分率。图8E:用空载体或CD44/FLAG表达质粒转染的MDA-MB-231细胞的裂解液的CD44和FLAG免疫印迹。肌动蛋白被用作载样对照。图8F:在不含(-)或包含单独的100pM TGF β 或400 μ g/mL LMWHA或还含有100 μ g/mL rhPRG4的完全生长培养基中生长的载体对照或表达CD44/FLAG的8日龄MDA-MB-231细胞衍生的类器官的代表性DIC光学显微镜图像。图8G:条形图,描绘了来自于包括F中所示的在内的3个独立实验的球形类器官的比例的平均值 \pm SEM,所述比例被表示成为每个实验条件计数的总集落的百分率。显著差异,ANOVA:* $P \leq 0.05$,** $P \leq 0.01$,*** $P \leq 0.001$ 。标尺条指示50 μ m。绿色箭头和红色箭头分别指示球形和侵入性类器官。绿色箭头出现在图8C中除了中间和底部行的最右侧图像之外的所有图像中;红色箭头出现在图8F-rhPRG4中除了顶部行最左侧为绿色的图像之外的所有图像上;绿色箭头出现在+rhPRG4图中的所有图像上。

[0034] 图9A-D:在乳腺癌细胞中TGF β 以HA-CD44依赖性方式诱导侵袭性。图9A:未处理的(-)或与含有不同浓度的LMWHA(100或400 μ g/mL)且不含或包含100pM TGF β 并且包含或不包含KI(10 μ M)、CD44中和抗体(2.5 μ g/mL)或rhPRG4(100 μ g/mL)的完全生长培养基温育的8日龄三维MDA-MB-231细胞衍生的类器官的代表性DIC光学显微镜图像。图9B:条形图,描绘了来自于包括A中所示的在内的3个独立实验的球形类器官的比例的平均值 \pm SEM,所述比例被表示成为每个实验条件计数的总类器官的百分率。图9C:用不含或包含0.5mM 4-MU、不含或包含100pM TGF β 并且包含或不包含400 μ g/mL LMWHA以及LMWHA和100 μ g/mL rhPRG4的完全生长培养基处理的8日龄三维MDA-MB-231细胞衍生的类器官的代表性DIC光学显微镜图像。图9D:条形图,描绘了来自于包括C中所示的在内的3个独立实验的球形类器官的比例的平均值 \pm SEM,所述比例被表示成为每个实验条件计数的总集落的百分率。显著差异,ANOVA:** P

≤ 0.01 , $***P \leq 0.001$ 。标尺条指示 $50\mu\text{m}$ 。绿色箭头和红色箭头分别指示球形和侵入性类器官。在图9A的顶部图中,除了顶部行中左起第1、第3和第4个图像和第二行中左起第3个图像之外,所有箭头均为红色。在图9A的底部图中,所有箭头均为绿色。在图9C的顶部图中,除了右上图中的箭头是红色之外,所有箭头均为绿色。在图9C的中间图中,所有箭头均为红色。在图9C的下方图中,所有箭头均为绿色。

[0035] 图10A-E:rhPRG4和TGF β 对CD44和HAS2的蛋白质丰度具有相反的影响。图10A:在不含(对照)或单独含有100pM TGF β 或还含有10 μM KI或100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rhPRG4的完全生长培养基中温育的MDA-MB-231细胞的裂解液的CD44和磷酸化Smad2 (pSmad2) 免疫印迹。肌动蛋白被用作载样对照。图10B:条形图,描绘了来自于包括图A中所示的在内的4个独立实验的每种处理条件下CD44免疫反应性条带的比例的平均值 \pm SEM。图10C:在不含或包含单独的100pM TGF β 或还含有100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rhPRG4的完全生长培养基中温育的固定的8日龄MDA-MB-231细胞衍生的类器官的代表性CD44(大鼠抗CD44/抗大鼠Alexa 647,红色;出现在标为“CD44”的列中)和细胞核(Hoechst,蓝色;出现在标为“细胞核”的列中)荧光显微镜图像。这个实验被重复两次,具有相似的结果。标尺条指示 $50\mu\text{m}$ 。图10D:在不含(对照)或单独包含100pM TGF β 或还含有10 μM KI或100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rhPRG4的完全生长培养基中温育的MDA-MB-231细胞的裂解液的HAS2和磷酸化Smad2 (pSmad2) 免疫印迹。肌动蛋白被用作载样对照。图10E:条形图,描绘了来自于包括在D中所示的在内的3个独立实验的每种处理条件下HAS2免疫反应性条带的比例的平均值 \pm SEM。显著差异,ANOVA:*** $P \leq 0.001$;** $P \leq 0.01$;* $P \leq 0.05$,未配对T检验:# $P = 0.0164$ 。

[0036] 图11是全长(非截短的)人PRG4的氨基酸序列(SEQ ID NO:1:1404个残基)。第1-24位残基(用粗体示出)代表信号序列,第25-1404位残基代表人PRG4的成熟序列。所述糖蛋白在其活性形式中更不需要前导序列。

[0037] 图12是编码全长1404AA的人PRG4蛋白的PRG4基因的核酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0038] 图13示出了基于感兴趣的标志物(润滑素、CSPG4、VCAN和HSPG2)的内源组织mRNA表达水平的肝细胞癌(HCC)患者的Kaplan Meier存活曲线。Y轴是累积生存率,X轴是以月为单位的生存期。所述患者根据值高于或低于任何感兴趣的标志物的中位数mRNA表达值而分层为高或低。所述数据显示润滑素表达与HCC患者生存率正相关。

[0039] 图14A-B示出了润滑素蛋白在HCC中的表达和组织定位。图14A示出了在14位HCC患者的肿瘤和肿瘤周成对组织中润滑素蛋白水平的Western印迹分析和定量。图14B示出了HCC肿瘤组织的免疫荧光,显示了润滑素(绿色)和 α SMA(红色)的定位。细胞核用蓝色表示。在底部行的最右侧图中,只看到蓝色和红色。在顶部行的第1和第2个图中,最大程度地看到绿色和红色在一起。在顶部行的最后一个图和底部行的前两个图中较小程度低看到绿色和红色在一起。

[0040] 图15是一系列条形图,显示了在CAF(顶部行)和离体培养的HCC组织(底部行)中TGF β 诱导润滑素表达。在图的顶部行中,在每个图中从左至右示出了对照、LY、TGF和TGF+LY的mRNA水平。在图的底部行中,在每个图中从左至右示出了LY、TGF和TGF+LY中的每一者相对于对照的mRNA水平。示出了 α SMA、CSPG4、HSPG2、润滑素和VCN的水平。在处理48小时的源自于HCC肿瘤的CAF($n=5$)和处理48小时的离体HCC组织($n=6$)中的润滑素mRNA表达。T-检验:* $p < 0.05$;** $p < 0.01$;*** $p < 0.001$ 。

[0041] 图16示出了Kaplan Meier曲线,显示了78个HCC病例的累积生存率。按照值高于或低于相对中位数将患者分层。润滑素的肿瘤表达与HCC中的更好预后相关,并伴有低CD44水平。用↑标注的存活曲线对应于图例中指定的分子为↑,而未标注的存活曲线对应于图例中的分子为↓。在顶部行中从左至右,第一个曲线的图例显示润滑素↑和润滑素↓, $p=0.000$;第二个曲线的图例显示TGFβ1↑和TGFβ1↓, $p=0.084$ 。在底部行中,第一个曲线的图例显示αSMA↑和αSMA↓, $p=0.637$;第二个曲线的图例显示CD44↑和CD44↓, $p=0.302$ 。对于标记“润滑素↑”的曲线来说,图例显示TGFβ1↑和TGFβ1↓, $p=0.478$,而对标记“润滑素↓”的曲线来说,图例显示TGFβ1↑和TGFβ1↓, $p=0.024$ 。对于标记“CD44↑”的曲线来说,图例显示润滑素↑和润滑素↓, $p=0.187$,而对于标记“CD44↓”的曲线来说,图例显示润滑素↑和润滑素↓, $p=0.000$ 。

[0042] 图17A-B显示HCC细胞中的CD44沉默损害细胞与rhPRG4的粘附,但不损害迁移。在图17A中,条形图将在HLE和HLF细胞中的细胞粘附显示为FN的%。Y轴是作为FN的%的细胞粘附。深色条表示对照shRNA,而浅色条表示CD44-shRNA。从左至右示出了未包被、润滑素和FN的结果。对于孔板图像来说,顶部行是对照shRNA,底部是CD44-shRNA,从左至右表示未包被、润滑素和FN的孔。将细胞接种在未包被或rhPRG4或纤连蛋白(Fn)包被的板的表面上,并允许其附着和蔓延30分钟。在图17B中,将细胞接种在trans-well膜(预先用Fn在下侧面上包被)的顶上,并允许其在下层区室中存在或不存在可溶性rhPRG4的情况下迁移16小时。T-检验:* $p<0.05$;** $p<0.01$ *** $p<0.001$ 。代表介质的图像在顶部行中,而代表润滑素的图像在底部行中。伴随的条形图从左至右示出了对于对照-shRNA(HLE)、CD44-shRNA(HLE)、对照-shRNA(HLF)和CD44-shRNA(HLF)来说,介质相比于润滑素的每个显微镜视野的细胞数目。

[0043] 图18显示rhPRG4增强索拉非尼和瑞格非尼在抑制细胞增殖方面的有效性,优选地在高表达CD44的HCC细胞中。在存在或不存在索拉非尼、瑞格非尼(2.5μM)和浓度逐渐增加的rhPRG4(0至100μg/ml)的情况下测试细胞的生长速率72小时。药物有效性被计算为生长抑制的%减去rhPRG4的抑制贡献。T-检验:* $p<0.05$;** $p<0.01$ *** $p<0.001$ 。细胞计数被显示在顶部行上的图中,而第二行显示了细胞生长相对于rhPRG4浓度的图,并且第三行显示了药物诱导的细胞生长抑制的%相对于rhPRG4浓度的图。对照用深色线表示,索拉非尼的结果用“X”标注,瑞格非尼的结果用“T”标注。

[0044] 图19A-B示出了HCC细胞中的CD44沉默抵消了润滑素对药物有效性的增强。在图19A中,将细胞通过慢病毒感染进行转导,并进一步选择稳定的CD44沉默。进行72小时的增殖试验,并将对于对照和CD44-shRNA细胞两者来说润滑素在增强索拉非尼或瑞格非尼抑制作用方面的净效应作图。第一行示出了细胞生长与rhPRG4浓度的关系图。对照用深色线显示,而索拉非尼的结果用“X”标示,瑞格非尼的结果用“T”标示。第二行示出了对于对照-shRNA(实线)和CD44-shRNA(虚线)来说,药物抑制效应增强的%与rhPRG4浓度的关系图。图19B,将HCC CAF用TGFβ1刺激48小时,并进一步在无血清条件下温育48小时(无TGFβ1),以允许富集调制培养基(CM)。然后对CM进行润滑素浓缩和耗竭或不耗竭。图19B的左侧是western印迹,示出了从TGFβ1处理的CAF的CM进行润滑素耗竭。ID=使用同种型或抗润滑素抗体免疫耗竭的TGFβ1处理的CAF-CM;IP=使用同种型或抗润滑素抗体从TGFβ1处理的CAF-CM免疫沉淀的润滑素。在图19B的右侧,示出了润滑素耗竭/未耗竭的TGFβ1处理的CAF-CM对索拉非尼和瑞格非尼对HLF细胞增殖的抑制作用的影响;在1%FBS存在下,将20μg/ml的CM

蛋白用于72小时生长试验中。T-检验： $*p<0.05$ ； $**p<0.01$ ； $***p<0.001$ 。

[0045] 图20示出了在用带有对照非靶向(V)或特异性靶向CD44的shRNA序列的慢病毒粒子转导的HLE和HLF细胞系中CD44的沉默效率。

[0046] 图21A-B示出了在从新鲜收集的手术切除的HCC样本分离的原代HCC细胞系PLC/DC19的表面上检测到的各种不同干细胞性标志物(OV6、CD133、CD44和CD90)、上皮标志物(AFP、E-Cadh、EpCAM)、间充质标志物(Vim、N-Cadh、 α SMA)和其他癌症相关表面蛋白(CD13、CD151)的水平。

[0047] 详细描述

[0048] 转移是癌症相关的发病率和死亡率的主要原因。癌细胞变得侵袭和迁移的能力显著促进了转移性生长,使得有必要鉴定新的抗迁移和抗侵袭治疗方法。与周围细胞外基质(ECM)组分的粘附对于癌细胞侵入ECM并最终变得转移至关重要。本申请人现已发现,PRG4抑制分泌蛋白转化生长因子 β (TGF β)诱导癌细胞侵袭性生长的能力,并且rhPRG4通过抑制下游透明质酸(HA)-细胞表面分化簇44(CD44)信号传导轴来抑制TGF β 诱导的癌细胞的侵袭性。此外,本申请人发现rhPRG4抑制CD44和参与HA生物合成的酶HAS2的蛋白质丰度的TGF β 依赖性增加。TGF β 在癌症中具有肿瘤抑制和肿瘤促进两种作用,这一点已被普遍接受。本申请人发现rhPRG4对抗TGF β 对HAS2和CD44的诱导,这一发现暗示了下调肿瘤促进作用同时保持TGF β 作用的肿瘤抑制方面的意义。这些发现支持了PRG4作为癌症治疗性治疗的临床效用。

[0049] PRG4蛋白

[0050] 也被称为润滑素的PRG4是一种润滑性多肽,其在人类中从也被称为PRG4的巨核细胞刺激因子(MSF)基因表达(参见NCBI登记号AK131434-U70136)。润滑素是包被身体的关节表面的一种遍在内源糖蛋白。润滑素是一种具有高表面活性的分子(例如保持在水面上),其主要起到强力细胞保护、抗粘附和边界润滑剂的作用。所述分子具有位于末端蛋白结构域之间的长的中央黏蛋白样结构域,允许所述分子附着并保护组织表面。在所有调查过的哺乳动物中,它的天然形式含有与KEPAPTT(SEQ ID NO:3)具有至少50%同一性的氨基酸序列的多个重复。天然润滑素通常含有多个冗余形式的这种重复序列,所述重复序列通常包含脯氨酸和苏氨酸残基,并且在大多数重复序列中至少一个苏氨酸被糖基化。所述苏氨酸锚定的O-连接糖侧链对于润滑素的边界润滑功能来说是关键的。所述侧链组成部分通常是 β (1-3)Gal-GalNAc组成部分,并且 β (1-3)Gal-GalNAc通常被唾液酸或N-乙酰神经氨酸封端。所述多肽还含有N-连接的寡糖。编码天然存在的全长润滑素的基因含有12个外显子,并且天然存在的MSF基因产物含有1,404个氨基酸(包括分泌序列),具有与玻连蛋白同源的多个多肽序列,包括血色素结合蛋白样和生长调节素样区域。位于中央的外显子6含有940个残基。外显子6编码所述富含重复序列的O-糖基化的黏蛋白样结构域。这种广泛的O-连接的糖基化黏蛋白样结构域,对于PRG4在身体中的各种不同生物界面包括关节软骨、肌腱、心包和眼表面处的边界润滑和剥离特性来说是必需的(Jay等,Matrix Biol.,2014;39:17-24)。

[0051] 润滑素的蛋白质骨架的氨基酸序列可能随着人类MSF基因的外显子的可选剪接而有所不同。这种针对非均质性的鲁棒性被示例如下:当研究人员产生从中央黏蛋白结构域缺失474个氨基酸的重组形式的润滑素时,仍然获得了尽管减弱但仍合理的润滑(Flannery等,Arthritis Rheum 2009;60(3):840-7)。已显示PRG4不仅作为单体存在,而且作为通过

在N-和C-端两者处保守的富含半胱氨酸的结构域而二硫键合的二聚体和多聚体存在。Lubris, LLC已开发出全长的重组形式的人类润滑素。所述分子使用Selexis中华仓鼠卵巢细胞系(CHO-M)表达,最终表观分子量为450-600kDa,通常测量到的多分散多聚体为1,000kDa或更大,所有分子量都是通过用SDS tris-乙酸盐3-8%聚丙烯酰胺凝胶上与分子量标准品进行比较而估算的。在完全糖基化情况下,大约一半含有两个糖单元(GalNAc-Gal),一半含有三个糖单元(GalNAc-Gal-唾液酸)。这种重组人PRG4生产方法公开在国际专利申请号PCT/US014/061827中。

[0052] 各种不同的本源和重组PRG4蛋白和亚型中的任一者或多者可用于本文中描述的各个实施方式中。例如,美国专利号6,433,142、6,743,774、6,960,562、7,030,223和7,361,738公开了如何制造各种不同形式的人PRG4表达产物,每个所述专利通过参考并入本文。在本发明的实践中优选地使用从CHO细胞表达的全长糖基化重组PRG4或润滑素。这种蛋白包含1,404个氨基酸(参见图11;SEQ ID NO:1),包括包含用O-连接的 β (1-3)Gal-GalNAc寡糖进行各种不同糖基化的序列KEPAPTT(SEQ ID NO:3)的重复序列的中央外显子,并包括与玻连蛋白具有同源性的N和C-端序列。所述分子是多分散的,各个分子的糖基化模式可变,并且可以包含单体、二聚体和多聚体形式。

[0053] 当在本文中使用时,术语“PRG4”可以与术语“润滑素”互换使用。广义上,这些术语是指任何有功能的、分离或纯化的本源或重组PRG4蛋白、同源物、功能性片段、亚型和/或其突变体。所有有用的分子均包含由外显子6编码的序列或其同源物或截短的版本,例如在这个优选地同时具有O-连接的糖基化的中央黏蛋白样KEPAPTT重复序列结构域内具有较少重复序列的版本。所有有用的分子还至少包含由外显子1-5和7-12编码的序列的生物活性部分,即负责赋予所述分子对ECM和内皮细胞表面的亲和性的序列。在某些实施方式中,优选的PRG4蛋白具有50kDa至500kDa之间、优选地224至467kDa之间的平均摩尔质量,包含所述PRG4蛋白的一个或多个生物活性部分或有功能的片段例如润滑片段或其同源物。在更优选实施方式中,PRG4蛋白包含平均摩尔质量在220kDa至约280kDa之间的单体。在某些实施方式中,PRG4与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基的氨基酸序列具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%或至少99.7%的氨基酸序列同一性。在一个实施方式中,所述与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基的氨基酸序列的序列同一性为至少98%。在一个实施方式中,PRG4与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基的氨基酸序列的序列同一性为至少99%。在一个实施方式中,PRG4与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基的氨基酸序列的序列同一性为99.5%。在一个实施方式中,PRG4与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基的氨基酸序列的序列同一性为99.6%。在一个实施方式中,PRG4与SEQ ID NO:1的第25-1404位残基的氨基酸序列的序列同一性为99.7%。

[0054] 用于蛋白质例如PRG4蛋白的分离、纯化和重组表达的方法在本领域中是公知的。在某些实施方式中,所述方法始于使用标准的分子生物学技术例如PCR或RT-PCR克隆和分离编码PRG4蛋白或亚型的mRNA和cDNA。然后将所述编码PRG4蛋白或亚型的分离的cDNA克隆到表达载体中,在用于生产重组PRG4蛋白的宿主细胞中表达,并从细胞培养上清液分离。用于生产重组人PRG4的方法提供在国际专利申请号PCT/US014/061827中。

[0055] 迄今为止,PRG4的功能几乎完全与减少关节之间的摩擦和防止磨损以及界面组织例如眼睛表面与眼睑之间的润滑相关。PRG4在关节维持中的功能重要性已通过人类中引起屈曲指-关节病-髓内翻-心包炎(CACP)病综合征的突变显示出来。CACP表现为屈曲指、非炎性关节炎和肥大性滑膜炎,伴有髓内翻畸形、心包炎和胸腔积液。此外,在PRG4缺陷型小鼠中,观察到软骨退化和随后的关节衰竭。因此,PRG4表达是健康滑膜关节的必要组分。然而,本申请人现已确定PRG4可用于治疗或抑制癌症。

[0056] PRG4用于治疗癌症

[0057] 本申请人已确定,PRG4能够结合CD44,因此能够下调CD4介导的受体信号传导。CD44是一种糖蛋白和重要的细胞表面受体,具有通过可选剪接和糖基化产生的各种不同亚型,在炎症中发挥重要作用(Cutly等,J Cell Biol 1992;116(4):1055-62),并参与各种细胞-细胞相互作用、肿瘤转移和淋巴细胞激活。CD44在大量哺乳动物细胞类型中表达,其表达水平随细胞类型和它们的活化状态而变。癌性或赘生性细胞也可能表达CD44,并且CD44在此类细胞上的存在表明它参与癌症的调控和转移。在人类中,CD44由1号染色体上的CD44基因编码。通过CD44的信号传导诱导T细胞增殖和IL-2生产、NK细胞毒性活性的剂量响应依赖性增强和巨噬细胞的细胞因子和趋化因子生产以及其他功能。

[0058] CD44的已确立的配体是透明质酸,包括高分子量透明质酸(HMW HA),其中HMW HA结合到CD44中与其他HA结合蛋白具有同源性的细胞外基序,导致随后HMW HA的细胞内摄入(Knudson等,Matrix Biol 2002;21(1):15-23;Harada等,J Biol Chem 2007;282(8):5597-607;Tibesku等,Ann Rheum Dis 2006;65(1):105-8)。低分子量和中分子量透明质酸(LMW HA和MMW HA)也是CD44的配体。在各种不同疾病状态中HA/CD44相互作用是普遍存在的。例如,从结肠上皮细胞产生的癌倾向于在富含HA的微环境中发展,其中上皮肿瘤细胞上的CD44受体激活酪氨酸激酶介导的细胞存活途径,导致未受检查的细胞分裂和增殖(Misra S等,Connect Tissue Res.2008;49(3):219-24)。然而,CD44也被认为是癌症干细胞(CSC)的标志物,并且HA被癌细胞表达(Chen等,J.Hematol.Oncol.,2018;1:64)。例如,在头颈部鳞状细胞癌、乳腺癌、胰腺癌、胃肠癌、结肠直肠癌、前列腺癌、结肠癌、膀胱癌和白血病中已注意到CD44的表达(Chen等,J.Hematol.Oncol.,2018;1:64)。HA与CD44的结合引起细胞信号传导途径的激活,其诱导细胞增殖,提高细胞存活率,调节细胞骨架变化并增强细胞移动性(Chen等,J.Hematol.Oncol.,2018;1:64)。

[0059] 其他CD44配体包括细胞外基质组分例如胶原蛋白、纤连蛋白和层粘连蛋白(Naor等,Adv Cancer Res 1997;71:241-319;Knudson等,Cell Mol.Life Sci.2002;59:36-44)、基质金属蛋白酶-9、HA-血清来源的透明质酸相关蛋白复合体(HA-SHAP)、血红素结合蛋白、EMMPRIN、生长调节素-B、骨桥蛋白、OCT3或补体相关蛋白(例如C3a、CD3、CD46)。

[0060] 正如由下面的实施例1中呈现的数据所证实的,润滑素-CD44相互作用显示出这种糖蛋白具有在其边界润滑和机械性能之外的功能。事实上,实施例1A-D显示润滑素充当结合CD44的配体。因此,由于润滑素结合CD44,润滑素可用作CD44拮抗剂以阻止CD44与配体例如透明质酸的结合,因此阻止通过CD44活化导致的细胞信号传导途径的激活,所述细胞信号传导途径的激活诱导细胞增殖、增加细胞存活、调节细胞骨架变化并增强细胞运动性,这些活性与癌症有关。此外,实施例2-7中的数据证实rhPRG4抑制癌细胞的侵袭和迁移能力,特别是显示了PRG4给药可以对限制肿瘤进展所必需的癌细胞的负面行为产生直接影响。正

如由本文中呈现的数据所证实的,这至少通过rhPRG4的抑制经CD44的低分子量透明质酸(LMW HA)信号传导,从而阻止诱导癌细胞生长的能力来实现。

[0061] 证据表明,CD44信号传导参与癌症的进展,并且也可能干扰某些化疗药物的有效性。例如,已显示多发性骨髓瘤对使用地塞米松化疗药剂的治疗的抗性可以由CD44与HA的结合引起(Ohwada等,Eur J Heamatol 2008;80:245)。因此,PRG4可用于与癌细胞表面上的CD44结合,以抑制参与癌细胞生长、存活能力、进展或转移活性的CD44信号传导。在另一个实施方式中,将PRG4给药到癌症患者或具有发生癌症的风险的患者,以治疗癌症或减缓癌症或肿瘤的生长或进展。根据另一个实施方式,PRG4可以与癌症的化疗或放疗同时施用。因此在一个实施方式中,将PRG4给药到癌症患者,其中所述PRG4的给药是为了治疗所述癌症,或者其中将所述润滑素与另一种癌症药物或治疗联合给药,以便治疗所述癌症。在一个实施方式中,所述癌症发生在人类受试者中。

[0062] 根据一个实施方式,将PRG4与用于癌症的化疗或放疗相组合给药到所述患者。例如,在一个实施方式中,所述化学治疗剂选自放线菌素、白蛋白结合型紫杉醇、六甲蜜胺、aranose、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、苯达莫司汀、博来霉素、硼替佐米、白消安、卡巴他赛、卡培他滨、卡铂、卡莫氟、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、氮芥、氯脲霉素、顺铂、克拉屈滨、氟达拉滨、克唑替尼、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素D、达沙替尼、柔红霉素、地西他滨、多西他赛、去氧氟尿苷、多柔比星、表柔比星、雌莫司汀、乙基亚硝基脲、埃罗替尼、依托泊苷、氟尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、福莫司汀、吉非替尼、吉西他滨、羟基脲、羟基尿素、伊达比星、异环磷酰胺、伊立替康、伊马替尼、伊沙匹隆、拉帕替尼、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺、马法兰、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托蒽醌、奈达铂、奈拉滨、尼莫司汀、尼罗替尼、N-亚硝基-N-甲基脲、丙卡巴肼、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、喷司他丁、雷莫司汀、雷替曲塞、瑞格非尼、罗米地辛、司莫司汀、索拉非尼、链脲佐菌素、tafluposide、他莫昔芬、泰索帝、替加氟、替莫唑胺、西罗莫司脂化物、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、托法替尼、拓扑替康、戊柔比星、维罗非尼、长春碱、长春新碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁、长春瑞滨、伏立诺他或维莫德吉。在一个实施方式中,所述化疗药剂是瑞格非尼和/或索拉非尼。在一个实施方式中,所述化疗药剂是瑞格非尼和/或索拉非尼,并且所述癌症是肝细胞癌。

[0063] 例如,在一个实施方式中,所述化疗药剂是选自阿仑单抗、贝伐珠单抗、博纳吐单抗、本妥昔单抗、赛妥珠单抗、西妥昔单抗、达雷木单抗、地妥昔单抗、替伊莫单抗、奥比妥珠单抗、奥法木单抗、奥拉单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗、雷莫芦单抗、利妥昔单抗、司妥昔单抗、曲妥珠单抗、利妥昔单抗、英妥珠单抗、吉妥珠单抗、贝伐珠单抗、西米普利单抗或斯巴达珠单抗的抗体。

[0064] 根据一个实施方式,所述PRG4与用于癌症的放疗相组合给药到所述患者。例如,在一个实施方式中,所述放疗是外照射放疗、近距离放疗或立体定向体部放疗(SBRT)。

[0065] 在一个实施方式中,PRG4与用于癌症的化疗或放疗的联合给药增强了所述癌症对所述化疗或放疗的敏感性或反应性。因此,在一个实施方式中,PRG4与化疗或放疗的联合给药与单独使用所述化疗或放疗的治疗相比改进了所述癌症的治疗。例如,与单独使用所述化疗或放疗的治疗相比,所述联合的结果提高了患者经治疗从所述癌症部分或完全缓解的速度,或者所述联合提高了患者经治疗从所述癌症部分或完全缓解的可能性。换句话说,与单独使用化疗或放疗的治疗相比,所述联合疗法在治疗癌症方面更加有效。

[0066] PRG4与抗癌药剂的共同给药,通过允许这些药剂以在患者中具有较低毒性作用的较低剂量给药,可以降低它们的毒性。因此,在另一个实施方式中,PRG4与用于癌症的化疗或放疗的联合给药允许所述化疗或放疗以比在单独给药所述化疗或放疗时用于治疗所述癌症的治疗性剂量更低的剂量给药。“治疗有效剂量”是指被证实在人类患者中在治疗特定癌症中显示出功效的剂量。“单独给药的“治疗有效剂量”是指当抗癌药剂是给药到人类患者以治疗特定癌症的唯一抗癌药剂时,所述抗癌药剂的被证实在所述患者中在治疗所述特定癌症中显示出功效的剂量。所述剂量可以是在定义治疗过程的时间段内给药的每日剂量。所述剂量可以是作为定义治疗过程的给药时间表的一部分在一个时间给药的单一剂量。所述治疗有效剂量可以是由政府机构批准的剂量。例如,所述治疗有效剂量可以是由欧洲药品管理局批准的治疗给定癌症的剂量。所述治疗有效剂量可以是由美国食品和药品监督管理局批准的治疗癌症的剂量。在一个实施方式中,PRG4与瑞格非尼一起给药,其中瑞格非尼以低于160mg/天的剂量给药。在一个实施方式中,PRG4与瑞格非尼一起给药,其中瑞格非尼以低于160mg/天的剂量给药,并且所述癌症是肝细胞癌。在另一个实施方式中,PRG4与索拉非尼一起给药,其中索拉非尼以低于800mg/天或400mg/每天两次的剂量给药。在另一个实施方式中,PRG4与索拉非尼一起给药,其中索拉非尼以低于800mg/天或400mg/每天两次的剂量给药,并且所述癌症是肝细胞癌。正如本文中例如实施例13中证实的,当PRG4与抗癌治疗例如化学治疗剂共同给药时,PRG4提高这些抗癌治疗的治疗效果。因此,这些抗癌治疗可以以比治疗功效原本所需的更低的剂量给药。

[0067] 在另一个实施方式中,PRG4与治疗癌症的免疫疗法联合给药,其中所述联合治疗所述癌症。例如,所述免疫疗法可以是阿特殊单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、伊匹单抗或靶向PD-L1或PD-1的另一种药物。因此,在一个实施方式中,PRG4与免疫疗法的联合给药与单独使用所述免疫疗法的治疗相比改进了所述癌症的治疗。例如,与单独使用所述免疫疗法的治疗相比,所述联合的结果提高了患者经治疗从所述癌症部分或完全缓解的速度,或者所述联合提高了患者经治疗从所述癌症部分或完全缓解的可能性。换句话说,与单独使用所述免疫疗法的治疗相比,所述联合疗法在治疗癌症方面更加有效。

[0068] 在另一个实施方式中,本发明提供了一种在患者中预防或抑制以前治疗过的癌症复发的方法。所述方法包括向患者给药治疗有效量的PRG4以抑制或预防所述患者中癌症的复发,其中所述患者以前已接受过癌症治疗并经历过所治疗的癌症的缓解,或已进行手术以切除所述癌症。在一个实施方式中,所述患者以前已经历过所述癌症的完全缓解,而在另一个实施方式中,所述患者以前已经历过所述癌症的部分缓解。在一个实施方式中,所述复发的预防或抑制持续至少1年、至少2年、至少3年、至少4年、至少5年、至少6年、至少7年、至少8年、至少9年、至少10年或更长时间。在另一个实施方式中,所述PRG4在所述患者经历癌症的缓解或切除后每年、每两年、每季度或每两年给药到以前治疗过的癌症的部位处,以在患者中预防或抑制以前治疗过的癌症的复发。在另一个实施方式中,所述PRG4在所述患者经历癌症的缓解或切除后每年、每两年、每季度或每两年系统性给药到所述患者,以在所述患者中预防或抑制以前治疗过的癌症的复发。

[0069] 在一个实施方式中,癌症的“治疗”是指导致肿瘤的数目和/或尺寸减小、转移肿瘤的数目和/或尺寸减小、肿瘤生长或增殖的速率降低或肿瘤症状的减轻的治疗性干预。在某

些情况下,根据本发明的方法治疗癌症导致患者经历所述癌症的完全缓解或部分缓解。在某些实施方式中,癌症的“预防”是指抑制癌症的部分或全部发展。例如,在某些实施方式中,“预防”癌症意味着抑制非癌性生长或肿瘤转变成癌性肿瘤,而在某些实施方式中,癌症的预防意味着抑制癌症复发,例如当癌症以前已处于缓解中时。

[0070] 可以根据本发明的方法使用PRG4治疗的癌症包括肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑/CNS癌、基底细胞皮肤癌、乳腺癌、Castleman病、宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、隆凸性皮肤纤维肉瘤、尤文家族肿瘤、眼癌、胆囊癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、胃癌、妊娠滋养细胞病、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌(HCC)、霍奇金病、卡波斯肉瘤、肾癌、喉癌和下咽癌、白血病、肺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性间皮瘤、梅克尔细胞癌、黑素瘤、多发性骨髓瘤、骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、神经内分泌癌、成神经细胞瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、口腔和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体肿瘤、前列腺癌、肾癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、鳞状细胞皮肤癌、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、华氏巨球蛋白血症或肾母细胞瘤。在一个实施方式中,所述癌症是乳腺癌。在另一个实施方式中,所述癌症是三阴性乳腺癌。在另一个实施方式中,所述癌症是肝细胞癌。

[0071] 根据本发明的方法,所述正在治疗癌症的患者优选为人,然而,所述患者可以是任何哺乳动物,例如马、奶牛、猪、大鼠、小鼠、狗或猫。

[0072] PRG4可以与任何上述抗癌药剂共同给药。在一个实施方式中,共同给药意味着PRG4和抗癌药剂的顺序给药,例如一个接一个地,例如在同一天。在其他实施方式中,共同给药可以在下述情况下进行,即PRG4与所述抗癌药剂在不同天给药。在另一个实施方式中,共同给药包括将PRG4和所述抗癌药剂一起在一个剂型中给药。在另一个实施方式中,PRG4和所述抗癌药剂的共同给药作为独立的剂型同时进行。在另一个实施方式中,共同给药是指PRG4和所述抗癌药剂在同一治疗过程中的不同时间提供,尽管它们不在同一时刻给药。在一个实施方式中,PRG4在抗癌药剂的给药之前给药。在另一个实施方式中,PRG4在抗癌药剂的给药之后给药。

[0073] PRG4的给药

[0074] 本发明设想了PRG4可以按照本文中公开的本发明的方法系统或局部给药到所述患者。在癌症局限于特定组织或器官,并且可以通过例如注射或局部给药进入所述组织或器官的情况下,局部给药可能是必要的。因此,根据本文公开的本发明的方法,润滑素可以被局部给药。例如,润滑素可以被表面或通过局部注射到肿瘤部位或肿瘤已被切除的部位中或肿瘤部位周围或附近的位置处来局部给药。在一个实施方式中,所述润滑素在肿瘤手术切除时给药到所述肿瘤已被移除后的切除部位。在另一个实施方式中,所述润滑素通过注射到不可切除的肿瘤中和/或所述不可切除的肿瘤的部位处或周围来给药。

[0075] 然而,润滑素可以按照本文公开的本发明的方法系统性给药。本发明的某些实施方式设想了系统性给药,例如,当所述癌症在血液、淋巴中或由于其他原因不能通过局部给药治疗时。当所述癌症不局限于患者的一个区域中而是遍布所述患者或在所述患者中的超过一个位置中时,例如在所述癌症已经转移的情况下,系统性给药也可能是必要的。可接受的系统性给药方式的实例包括肠内递送例如口服、直肠、舌下、唇下或颊递送,或肠胃外例如鼻、通过吸入、静脉内、肌肉内、皮下、真皮内、腹膜内或透黏膜递送。另一种可接受的系统

性给药方式是通过注射,例如通过静脉内给药、皮下注射或肌肉内注射。

[0076] 在这种方法的一个实施方式中,润滑素以不足以提供边界润滑的量提供。本申请人以确定,润滑素对癌症的效果可以在远低于实现边界润滑所必需的浓度下实现。因此,在一个实施方式中,润滑素以 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $4,000\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内的量给药。例如,润滑素可以以 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $2000\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内的量给药。例如,润滑素可以以 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $500\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内的量给药。例如,润滑素可以以 $500\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内的量给药。例如,润滑素可以以 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内的量给药。例如,润滑素可以以 $2000\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $3000\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内的量给药。例如,润滑素可以以 $2000\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $4000\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内的量给药。在另一个实施方式中,润滑素以 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $100\text{mg}/\text{mL}$ 或 $25-75\text{mg}/\text{mL}$ 或 $30-60\text{mg}/\text{mL}$ 范围内的量给药。在一个实施方式中,润滑素以 $30\text{mg}/\text{mL}$ 给药,并且在每剂 1 至 $100\mu\text{L}$ 的小体积中给药。在另一个实施方式中,润滑素在每剂 $100\mu\text{L}$ 至 4L 的体积中给药。在另一个实施方式中,润滑素被系统性给药以实现 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内的血液浓度。在又一个实施方式中,润滑素以 $100\mu\text{L}-5\text{mL}$ 的量小体积给药在肿瘤或切除肿瘤的部位处,其中所述润滑素的浓度被提供在 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内或 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $1\text{mg}/\text{mL}$ 的范围内。

[0077] 给药的润滑素的量取决于多种变量,例如所述癌症的尺寸、类型和位置 and 任何转移的程度、药物剂型和给药途径。初始剂量可以被提高到超过上限水平,以便快速实现所需的血液水平或组织水平。或者,所述初始剂量可以小于最适值,并且所述剂量可以在治疗过程中逐步提高。可以向患者提供诱导剂量以实现一定的血液水平,然后提供一剂或多剂治疗或维持药剂。所述最适剂量可以通过常规实验来确定。

[0078] PRG4可以按照本文公开的本发明的方法以各种不同的给药时间表给药。例如,在一个实施方式中,PRG4在癌症手术切除时局部给药一次。在另一个实施方式中,PRG4每天、每2天、每3天、每4天、每5天、每6天、每7天、每14天或每28天给药到患者以治疗或预防癌症。例如,所述患者可以接受PRG4治疗,直至所述患者经历完全或部分缓解。在另一个实施方式中,PRG4被每年、每两年、每季度或每月给药到具有尚无癌性的肿瘤的患者,以预防所述肿瘤变成癌性。在另一个实施方式中,所述PRG4在患者接受另一种抗癌治疗例如化疗或放疗的同一天给药到所述患者,并在每当所述患者接受该其他的抗癌治疗时给药。在另一个实施方式中,所述PRG4在患者接受另一种抗癌治疗例如化疗或放疗的前一天给药到所述患者,并在所述患者每次接受该其他的抗癌治疗之前的一天给药。在另一个实施方式中,所述PRG4在患者接受另一种抗癌治疗例如化疗或放疗之后的一天给药到所述患者,并在所述患者每次接受该其他的抗癌治疗之后的一天给药。

[0079] PRG4的剂型

[0080] 为了给药,优选地将润滑素与可药用载体合并。当在本文中使用时,“可药用载体”意味着适合与人类和动物的组织相接触使用,没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的利益/风险比相称的缓冲剂、载体和赋形剂。所述载体应该在与剂型中的其他成分相容并对接受者无害的意义上是“可接受的”。可药用载体包括与药物给药相容的缓冲剂、溶剂、分散介质、包衣、等渗和吸收延迟剂等。载体还可以包括生物材料例如基质、水凝胶、聚合物、组织支架和可吸收载体材料包括胶原海绵。外泌体等也可用作载体。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途在本领域中是已知的。有用的剂型可以通过制药领域中公知的方法来制备,例如参见《Remington制药学》(Remington's Pharmaceutical

Sciences)第18版(Mack Publishing Company,1990)。适合于肠胃外给药的剂型组分包括无菌稀释剂例如注射用水、盐水溶液、非挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂例如EDTA;缓冲剂例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节渗透度的试剂例如氯化钠或右旋糖。用于给药的润滑素可以以剂量单位形式存在,并且可以通过任何适合的方法制备,并且应该被配制成与其目标给药途径相容。

实施例

[0081] 实施例1:PRG4拮抗CD44的实验证据

[0082] 为了评估人PRG4与CD44受体之间的相互作用和这种相互作用的结果,进行了下述实验。

[0083] rhPRG4与CD44的结合和与高分子量透明质酸(HMW HA)的竞争使用直接酶联免疫吸附测定(ELISA)和表面等离子体共振来评估。进行rhPRG4的唾液酸酶-A和O-糖苷酶消化,并使用ELISA评估CD44的结合。将类风湿性关节炎成纤维细胞样滑膜细胞(RA-FLS)在存在或不存在20、40和80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rhPRG4或HMW HA的情况下用白介素-1 β (IL-1 β)或肿瘤坏死因子 α (TNF- α)刺激48小时并测量细胞增殖。CD44的贡献通过与抗CD44抗体(IM7)共温育来评估。在存在或不存在IM7的情况下用IL-1 β 或TNF- α 处理PrG4-/-滑膜细胞后,研究rhPRG4的抗增殖效果。

[0084] 首先对变量进行正态性和等方差检验。分别使用Student's t-检验或带有用于两个组或超过两个组的比较的Tukey's事后检验的方差分析(ANOVA)来检验满足两种假设的变量的统计显著性。不满足正态性假设的变量使用Mann-Whitney U检验或ANOVA对排序进行检验。统计显著性水平被设置到 $\alpha=0.05$ 。数据以图形方式表示为平均值 \pm 标准偏差。

[0085] 1A. 使用ELISA检测的rhPRG4、高分子量HA、中分子量HA和玻连蛋白与CD44的结合

[0086] 将高结合性微量滴定板(Corning, Sigma Aldrich, USA)用PBS缓冲液(每孔100 μL)中的400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rhPRG4($M_r \approx 240 \text{ KDa}$)、高分子量HA(HMW HA; $M_r \approx 1,500 \text{ KDa}$) (R&D System, USA)、中分子量HA(MMW HA; $M_r \approx 300 \text{ KDa}$) (R&D System)和玻连蛋白($M_r \approx 75 \text{ KDa}$) (Sigma Aldrich)在4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。rhPRG4是通过CHO-M细胞(Lubris, Framingham, MA, USA)生产的全长产物。在用PBS+0.1%吐温20清洗后,将孔用2%牛血清白蛋白(BSA;每孔300 μL)在室温阻断至少2小时。向板添加各自为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (每孔100 μl)的CD44-IgG₁Fc(R&D systems)或IgG₁Fc(R&D systems),并在室温温育60min。在用PBS+0.1%吐温20清洗后,以1:10,000的稀释率添加抗IgG₁Fc抗体-HRP(Sigma Aldrich)(每孔100 μL),并在室温温育60min。在用PBS+0.1%吐温20清洗后,使用一步Turbo TMB ELISA试剂(ThermoScientific, USA)将所述测定显色,并在450nm处测量吸光值。数据代表了4次独立测定的平均值,每次测定使用每组3个平行孔。

[0087] rhPRG4、HMW HA、MMW HA和玻连蛋白与CD44-IgG₁Fc融合蛋白和IgG₁Fc的结合呈现在图1A中。对于rhPRG4、HMW HA和MMW HA包被的孔来说,CD44-IgG₁Fc组中的450nm吸光值显著高于($p < 0.001$) IgG₁Fc组中的吸光值。相反,在玻连蛋白包被的孔中,CD44-IgG₁Fc与IgG₁Fc之间没有显著差异。

[0088] 这些数据显示rhPRG4结合CD44并干扰HMW HA的CD44结合。rhPRG4、HMW HA和MMW

HA与嵌合CD44特异性结合,具有极低的非特异性结合。相反,与润滑素具有显著序列同源性的玻连蛋白对CD44结合不显示出任何特异性。由于rhPRG4结合CD44,它可能起到CD44的拮抗剂的作用,从而干扰CD44促炎性信号传导。

[0089] 1B. 使用直接ELISA检测的rhPRG4、HMW HA、MMW HA与CD44的浓度依赖性结合以及rhPRG4与HA之间对与CD44的结合的竞争

[0090] rhPRG4、HMW HA和MMW HA与CD44的浓度依赖性结合,通过用400、200、100、20、4、2和0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的所述大分子包被微量滴定板来进行。所述测定如上所述来进行。从CD44 IgG₁Fc孔中的吸光值中减去IgG₁Fc孔中的吸光值,将所述校正的CD44 IgG₁Fc吸光值归一化到400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rhPRG4组的吸光值,并将数据表示成与CD44结合的百分率。rhPRG4、HMW HA和MMW HA与重组CD44的浓度依赖性结合描绘在图1B中。对于400、100、20、4和2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度来说,与HMW HA或MMW HA包被的孔相比,在rhPRG4包被的孔中重组CD44结合的百分率显著更高($p < 0.001$)。此外,对于200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度来说,与MMW HA包被的孔相比,rhPRG4包被的孔中重组CD44结合的百分率显著更高($p < 0.001$)。在0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下,在rhPRG4、HMW HA和MMW HA包被的孔之间CD44结合的百分率没有显著差异。数据代表了4次独立测定的平均值,每次测定使用每组3个平行孔。

[0091] 为了评估rhPRG4与HMW HA或MMW HA之间对与CD44的结合的竞争,将微量滴定板用1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CD44 IgG₁Fc或IgG₁Fc(每孔100 μL) 在4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。随后,将孔用PBS+0.1%吐温20清洗,并将孔用2% BSA(每孔300 μL) 在室温阻断至少2小时。向孔添加5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rhPRG4或rhPRG4(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与0.01、0.05、0.25、1、5或50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HMW HA或MMW HA的组合(每孔100 μL),并在室温温育60min。在用PBS+0.1%吐温20清洗后,以1:1,000的稀释度添加润滑素特异性单克隆抗体(Mab 9G3)(每孔100 μL),并在室温温育60min。在用PBS+0.1%吐温20清洗后,以1:1,000的稀释度添加山羊抗小鼠IgG抗体-HRP(Thermo Scientific)(每孔100 μL),并在室温温育60min。测定如上所述来显色。从CD44-IgG₁Fc孔中的吸光值中减去IgG₁Fc孔中的吸光值,将所述校正的rhPRG4+HA组中的吸光值归一化到rhPRG4组的吸光值,并将数据表示成与CD44结合的百分率。数据代表了4次独立测定的平均值,每次测定使用每组3个平行孔。

[0092] rhPRG4与HMW HA或MMW HA之间在与重组CD44的结合方面的竞争呈现在图1C中。0.05、0.25、1、5和25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HMW HA或MMW HA显著降低rhPRG4与CD44的结合($p < 0.05$)。

[0093] 这些数据证实rhPRG4以浓度依赖性方式与CD44结合,具有与HMW HA可比的亲和性。此外,rhPRG4在与CD44结合方面与HMW HA竞争。过量HMW或MMW HA的存在将rhPRG4与CD44的结合降低到仅仅大约50%。这些数据表明rhPRG4是CD44的拮抗剂;因此,它具有干扰CD44信号传导的潜力。

[0094] 1C. 使用表面等离子体共振测定的rhPRG4与CD44的浓度依赖性结合以及rhPRG4与HMW HA之间的竞争

[0095] 使用表面等离子体共振(Biacore T100,GE Healthcare Lifesciences,NJ,USA)研究了rhPRG4与CD44-IgG₁Fc的结合。参见图1C。将S系列芯片用人类抗体捕获试剂盒(GE Life Sciences)功能化,并允许CD44-IgG₁Fc或IgG₁FC分别在流动池1(Fc₁)和流动池2(Fc₂)中与所述功能化的芯片表面结合。将浓度为300、250、200、150、100和50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的rhPRG4以30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 进样8min,然后使用0.1M HEPES、1.5M NaCl、30mM EDTA和0.5% P20(GE Life Sciences)解离10min。在每个循环结束时将所述芯片的表面用3M MgCl₂的1min脉冲进行再

生。每种分析物浓度进样一式两份。将得到的曲线进行双重参比(即 $F_{C_2}-F_{C_1}$,然后减去 $0\mu\text{g}/\text{mL}$ 的曲线)。结合动力学和结合亲和力通过BiaEvaluation软件,分别使用1:1结合/构象变化模型或通过稳态平衡来确定。为了研究rhPRG4与HMW HA之间在与CD44结合方面的竞争,将rhPRG4以范围在0至 $300\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间的浓度如上所述进样。在解离阶段结束后,将HMW HA以 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ ($30\mu\text{L}/\text{min}$)进样1min。然后将rhPRG4(在各种不同浓度下)与CD44的双重参比结合信号针对在rhPRG4进样后HMW HA与CD44的结合产生的结合信号作图。

[0096] 使用表面等离子体共振确认了rhPRG4与重组CD44的结合。rhPRG4表现出与固定化的CD44-IgG₁Fc的浓度依赖性结合和解离(图2A),以 240KDa 的rhPRG4分子量计表观 $K_d \cong 38\text{ nM}$ 。rhPRG4干扰HMW HA与重组CD44的结合,正如由HMW HA结合信号强度(x-轴)与rhPRG4结合信号强度(y-轴)之间的反向关系所示(图2B)。

[0097] 这些数据证实rhPRG4以浓度依赖性方式与CD44结合,具有与HMW HA可比的亲和力。此外,正如在实施例1B和1C中所证实的,与CD44结合的rhPRG4的存在以浓度依赖性方式阻止HMW HA与CD44结合,并且可能表明rhPRG4和HMW HA在所述受体上享有共同的结合位点。在HA SF浓度比润滑素浓度高大约10倍的关节环境中,并且基于本文中显示的竞争性结合数据,预期润滑素能够与滑膜细胞和软骨细胞表面上的CD44结合,并在HA存在下行使CD44介导的生物功能,从而通过干扰原本促进炎症的介导体而提供关节稳态作用。

[0098] 1D. 除去黏蛋白结构域糖基化对rhPRG4与CD44的结合的影响

[0099] 润滑素的边界润滑能力由O-连接的($\beta 1-3$)Gal-GalNAc寡糖介导(Jay等, *Glucoconj J* 2001;18(10):807-15)。神经氨酸酶和 $\beta-1,3,6$ 半乳糖苷酶消化的组合将润滑素的边界润滑能力降低50%(Jay等, *Glucoconj J* 2001;18(10):807-15)。从RA SF样品分离的润滑素含有增加的核心1糖基化结构,并展示硫酸酯化表型,被认为是L-选择素配体的一部分(Estrella等, *Biochem J* 2010;429(2):359-67)。此外,来自于RA SF的润滑素以糖基化依赖性方式结合L-选择素,并包被召集到RA患者的发炎滑膜和SF的多形核粒细胞(Jin等, *J Biol Chem* 2012;287(43):35922-33)。

[0100] 将rhPRG4用唾液酸酶A(Prozyme,USA)、O-糖苷酶(New England Biolabs,USA)或唾液酸酶A和O-糖苷酶的组合在 37°C 消化16小时。在唾液酸酶A消化中,向rhPRG4添加 $12\mu\text{L}$ 酶($1\text{U}/200\mu\text{L}$),总反应体积为 $180\mu\text{L}$,rhPRG4终浓度为 $300\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在O-糖苷酶消化中,向rhPRG4添加 $4.8\mu\text{L}$ 酶(40 百万单位/ mL),总反应体积为 $180\mu\text{L}$,在非变性条件下rhPRG4终浓度为 $300\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在唾液酸酶-A和O-糖苷酶消化中,所述酶在与上述相同的体积中使用,并以如上所述的总反应体积和rhPRG4终浓度与rhPRG4温育。唾液酸酶-A和O-糖苷酶消化对rhPRG4表观分子量的影响使用4-12%Bis-Tris凝胶(NuPage,life technologies,USA),通过SDS-PAGE来确定。将总共 $20\mu\text{L}$ rhPRG4或酶消化的rhPRG4在还原条件下运行(200mV 60min),然后使用Gelcode蓝染色剂(Thermo Scientific,USA)染色。使用上述直接ELISA方法并使用 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 的rhPRG4包被浓度,将酶消化的rhPRG4与CD44的结合与未消化的rhPRG4进行比较。数据表示4次独立实验的平均值,每次实验使用每组3个平行孔。

[0101] 如图3A中所示,与未处理的对照相比,唾液酸酶-A消化导致rhPRG4与CD44的结合百分率显著提高($p < 0.001$)。同样,与未处理的对照相比,O-糖苷酶消化导致rhPRG4与CD44的结合百分率显著提高($p = 0.008$)。在唾液酸酶-A消化和O-糖苷酶共消化的rhPRG4之间,CD44结合百分率没有显著差异($p = 0.105$)。在唾液酸酶-A和O-糖苷酶消化的rhPRG4中,与

CD44结合的百分率显著高于唾液酸酶-A消化的rhPRG4 ($p=0.007$)、O-糖苷酶消化的rhPRG4 ($p<0.001$)和未处理的对照 ($p<0.001$)。用唾液酸酶-A和O-糖苷酶消化rhPRG4将rhPRG4的表现分子量减小到大约200KDa (图3B)。

[0102] 唾液酸和O-糖基化的去除显著提高rhPRG4的CD44结合 ($p<0.001$)。唾液酸酶-A和O-糖苷酶处理单独地导致rhPRG4与CD44受体的结合增强。累加的唾液酸酶-A和O-糖苷酶消化与单独的酶消化相比导致rhPRG4与CD44甚至更加显著的结合。唾液酸酶-A从糖蛋白切下支链和非支链末端唾液酸残基,而O-糖苷酶催化从糖蛋白移除核心1和2。CD44结合的增强表明rhPRG4与CD44的结合不需要核心1糖基化和唾液酸末端残基。因此,rhPRG4蛋白核心上唾液酸化和核心1糖基化的水平对于PRG4结合CD44的能力不是必不可少的。相反,除去这些残基可能在rhPRG4的半刚性杆状结构中引起构象变化,导致与CD44的相互作用增强。

[0103] 实施例2.用于实施例3-9的材料和方法

[0104] (1) 质粒

[0105] 被简称为CD44i-1和CD44i-2的pU6/CD44 RNA干扰-1/CMV-增强绿色荧光蛋白(EGFP)和pU6/CD44 RNA干扰-2/CMV-EGFP表达载体分别含有CD44序列5' GAGCAGCACTTCAGGAGGTTA3' 和5' CTCCATCTGTGCAGCAAACAA3', 如Sarker等(J.Biol.Chem.2005;280(13):13037-46)所述来产生。在质粒CD44i-1和CD44i-2每一者中,小鼠U6小RNA启动子和CMV启动子分别诱导靶向人CD44mRNA的短发夹(sh)RNA(shRNA)和EGFP的表达。pU6/CMV/EGFP对照RNAi载体已被描述过(Sarker等,J.Biol.Chem.2005;280(13):13037-46)。通过荧光显微术检测的EGFP蛋白的表达指示载体对照或CD44i-1/2转染的细胞。pCMV5B/CD44/FLAG表达载体通过使用T4 DNA连接酶(New England BioLabs,USA)将C-端带有FLAG标签的人开放阅读框CD44 cDNA(CD44/FLAG)连接到pCMV5B载体(Kavsak等,Molecular Cell.2000;6(6):1365-75)中来产生。CD44/FLAG DNA使用Pwo聚合酶(Roche Diagnostics,USA)、富含polyA的cDNA作为模板以及5' CCCACGCGTACCATGGACAAGT TTTGGTGGC 3' 和5' CCCTCTAGATTACTTGTCATCGTCGCTCTTG TAGTCCAGTCGACCCACCCAATCTTCA TGTC 3' 分别作为正向和反向引物,通过聚合酶链反应(PCR)产生。所述poly A cDNA通过使用SuperScript II转录酶(Invitrogen,Canada)和引物oligo-(dT)12-18(Amersham Biosciences,UK)对MDA-MB-231细胞的使用TRIzol(Ambion Life technologies,Canada)提取的mRNA进行反转录(RT)-PCR反应来产生。CD44i-1/2和CD44/FLAG质粒通过DNA序列分析(University of Calgary Core Sequencing Facility)来验证。

[0106] (2) 细胞系和转染

[0107] MDA-MB-231细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC,USA),并在增补有10%胎牛血清(FBS;Thermo Fisher,Canada)的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM;Invitrogen,Canada)中培养。将细胞保持在37°C下和5%CO₂加湿细胞培养箱中,并每3-4天常规传代。MDA-MB-231细胞使用Lipofectamine 3000试剂(Invitrogen,Canada)进行转染。

[0108] (3) 试剂

[0109] 在本研究中,在不同测定法中使用了下述试剂处理细胞:重组人蛋白聚糖4(rhPRG4;来自于Lubris Biopharma,USA的馈赠;储用物为1至2.5mg/mL,在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中)(Abubacker等,Ann Biomed Eng.2016;44(4):1128-37;Samsom等,Exp Eye Res.2014;127:14-9),重组人成熟转化生长因子β(TGFβ)(R&D systems,USA;储用物10μM),

低分子量透明质酸 (LMWHA;透明质酸钠;HA5K;Lifecore Biomedical,USA; 储用物10mg/mL, 在PBS中), 激酶抑制剂 (KI;SB431542;Millipore-Sigma,Canada; 储用物10mM) (Halder等, Neoplasia.2005;7 (5) :509-21), CD44中和抗体 (Thermo Fisher Scientific,Canada) (Kariya等,BBA Clinical.2015;3:126-34), 抗PRG4 mAb 4D6 (来自于Dr.Phillip Messersmith的馈赠,University of California,Berkeley) (Abubacker等,Connective Tissue Research.2016;57 (2) :113-23;Chawla等,Acta biomaterialia.2010;6 (9) :3388-94), 小鼠免疫球蛋白G (小鼠IgG;Santa Cruz,USA), 4-甲基伞形酮 (4-MU;Millipore-Sigma,Canada; 储用物10mM, 在DMSO中)。

[0110] (4) 三维培养物

[0111] 对于三维培养物测定来说,在96孔平底超低附着板 (BD Biosciences,Canada) 的每个孔中添加50 μ l冰冷却的在由含有10%FBS、青霉素、链霉素和两性霉素B的DMEM (Invitrogen,Canada) 构成的完全生长培养基中的33%生长因子减少的基质胶 (Corning Incorporated,USA), 然后将板在5%CO₂加湿培养箱中在37 $^{\circ}$ C储存1小时,以允许在孔中形成1mm厚的基质胶床。加下来,将悬浮在50 μ l冰冷却的完全生长培养基中的50%基质胶中的大约400个分离的MDA-MB-231细胞在96孔板的每个孔的基质胶床的顶上铺层,并在5%CO₂加湿培养箱中在37 $^{\circ}$ C温育。在添加基质胶-细胞悬液并37 $^{\circ}$ C温育后1小时,添加50 μ l完全生长培养基以覆盖所述固化的基质胶-细胞混合物。第二天以及每三天,所述三维培养物接受50 μ l不含或含有附图描述中列出的指定试剂的新鲜的完全生长培养基。在培养的第8天,使用光学显微镜,在30X物镜 (Olympus IX70,Canada) 下从每个孔捕获8个代表性类器官的微分干涉相差 (DIC) 图像。通过光学显微术在三维培养的不同天对所述基质胶包埋的培养物进行的观察,表明分离的细胞在经历连续分裂后,各自产生在本文中被称为类器官的多细胞结构。在对照情况下,大多数MDA-MB-231细胞衍生的类器官表现为表面光滑的球形表型,其可能随着3D培养物的温育条件而变。在每个孔中的8张代表性图像中,对被称为“球形”的没有任何突起的表面光滑的类器官的数目进行计数,然后将每种条件下球形类器官的百分率在条形图中作图。每个实验至少独立进行三次,用于统计分析。

[0112] (5) 免疫细胞化学和基于荧光的细胞分析

[0113] 对于3D-类器官的免疫荧光分析来说,在超低附着8孔细胞培养载玻片 (Millipore-Sigma,USA) 的每个孔中,将600个MDA-MB-231细胞在80 μ L 33%基质胶包被层顶上的80 μ L 50%基质胶中生长。在第8天进行DIC成像后,将活的多细胞结构用4%甲醛固定,然后用冰冷却的0.5%Triton X-100溶液通透化并用含有10%牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 阻断。对于单层细胞培养物的免疫荧光分析来说,将细胞接种在Falcon 8孔细胞培养载玻片 (Corning Incorporated,USA) 的孔上,然后如为所述3D培养物所述进行固定和通透化,并用含有5%BSA和5%小牛血清的PBS阻断。通过分别使用大鼠抗层粘连蛋白抗体 (Abcam,Canada) 和大鼠抗CD44抗体 (Thermo Fisher,Canada) 作为第一抗体并使用Alexa 647偶联的抗大鼠IgG抗体 (ThermoFisher,Canada) 作为第二抗体对所述三维或单层培养物进行间接免疫荧光,将细胞中的层粘连蛋白和CD44可视化。通过将所述固定的培养物与四甲基罗丹明异硫氰酸酯 (TRITC) 偶联的鬼笔环肽 (Millipore-Sigma,Canada) 温育,将细胞中的肌动蛋白可视化。细胞核使用DNA结合染料双苯甲酰亚胺 (Hoechst 33342; Invitrogen,Canada) 来检测。对于CD44敲减分析来说,通过GFP信号鉴定载体或CD44 shRNA

转染的细胞。使用带有40X物镜的落射荧光显微镜(Olympus Bx WI共聚焦显微镜,Canada)捕获免疫荧光图像。在每个实验中层粘连蛋白、肌动蛋白、细胞核和GFP特异性信号的曝光时间保持恒定。对于每种条件来说,每个实验捕获3个集落/视野,其被选择为每个实验的每个载玻片中的染色细胞的代表。每个实验独立地重复两次。

[0114] (6) 体外跨孔侵袭测定

[0115] 将用含有0.2%FBS的DMEM温育过夜的、即血清饥饿的MDA-MB-231细胞用于使用聚碳酸酯滤膜(24孔插板,孔眼尺寸8 μ m;BD Biosciences,Canada)的跨孔侵袭。在添加细胞之前,将每个插板置于24孔组织培养板的孔中,并用添加到上部和下部区室两者的0.5mL无血清DMEM在37 $^{\circ}$ C平衡2h。然后轻柔地除去平衡培养基,并将插板的上部区室表面用50 μ L 3%基质胶包被,并允许其在37 $^{\circ}$ C固化1h。将 1×10^5 个血清饥饿的MDA-MB-231细胞重悬浮在0.5mL无血清DMEM中,并添加到基质胶包被的上部区室。向下部区室添加单独的或含有如相应附图描述中所描述的特定试剂的500 μ L完全生长培养基。允许细胞在37 $^{\circ}$ C下侵袭基质12h,然后通过用PBS清洗上部区室上的细胞层三次,除去未附着的细胞。在第二次清洗期间,使用棉头涂抹器轻柔地刮掉膜的上表面上的附着细胞。通过将transwell插片浸泡在-20 $^{\circ}$ C的100%乙醇中10分钟,将侵入的细胞固定,然后用0.5%结晶紫染料(EMD Millipore,Canada)在室温染色1h。将每个染色膜的8个随机选择的视野在偶联有数字相机的DIC显微镜(Olympus IX70)的10X物镜下成像。通过使用手持计数器对每个视野中结晶紫染色细胞的数目进行计数来获得细胞数目。计算每种处理条件的所有图像的平均细胞数目,并将其用于进一步统计分析。每个实验独立地进行至少三次。

[0116] (7) 体外划痕测定

[0117] 将 5×10^5 个MDA-MB-231细胞接种在12孔组织培养板的每个孔中,在完全生长培养基中生长过夜至接近汇合,然后通过含有0.2%FBS的DMEM培养基在5%CO₂加湿培养箱中在37 $^{\circ}$ C温育过夜进行血清饥饿。使用200 μ L移液器头,沿着血清饥饿过夜的细胞单层的中线引入划痕,然后用PBS清洗以除去漂浮细胞,并将细胞与不含或单独包含TGF β 或还包含KI或rhPRG4的含有0.2%FBS的培养基在5%CO₂加湿培养箱中在37 $^{\circ}$ C温育36h。通过在引发划痕后0h和36h时使用偶联有数字相机的DIC显微镜(Olympus IX70)的3X物镜对每个孔中的划痕和周围细胞进行成像,跟踪每个孔中的划痕闭合。对于每个实验条件来说,沿着所述划痕的纵轴捕获5张图像。使用ImageJ(National Institutes of Health,USA)在每张图像的三个不同位置处测量每个划痕的宽度,总共进行15次测量,然后对每种实验条件进行平均。对于每种实验条件来说,将36h的宽度平均值从0h的宽度平均值中减去并相对于0h宽度进行表述,以获得划痕闭合,并表示成划痕闭合的百分数。

[0118] (8) 细胞提取物制备、免疫沉淀和免疫印迹

[0119] 将细胞用PBS清洗以除去所有生长培养基。向细胞单层添加适合体积的含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的TNTE裂解缓冲液(50mM Tris,150mM NaCl,1mM EDTA,0.5% [v/v] Triton-X-100),并在4 $^{\circ}$ C和剧烈振摇下温育20分钟。然后将裂解液收集在微量离心管中,并在4 $^{\circ}$ C以13,000g离心10分钟。使用基于Bradford的蛋白质测定法(Bio-Rad Laboratories,Canada)对5 μ L裂解液进行蛋白质浓度测定。将裂解液在含有二硫苏糖醇(DTT)的Laemml样品缓冲液中在95 $^{\circ}$ C煮沸3分钟。对于免疫沉淀分析来说,将裂解液与适合的抗体在4 $^{\circ}$ C和轻柔摇动下温育3h,然后将免疫复合物与蛋白G偶联的琼脂糖珠(UBPBio,USA)在4 $^{\circ}$ C和轻柔摇

动下温育3h。最后,将所述珠子用TNTE清洗缓冲液(0.1% [v/v] Triton-X-100)清洗,并在含有二硫苏糖醇(DTT)的Laemmlli样品缓冲液中在95℃煮沸5分钟。然后将免疫沉淀物和输入的裂解液通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)进行分离,并转移到硝酸纤维素膜(Bio-Rad Laboratories, Canada)上。将所述印迹用5%脱脂奶阻断,然后与作为第一抗体的小鼠抗肌动蛋白抗体(Santa Cruz, USA)、兔抗pSmad2抗体(Abcam, Canada)、小鼠抗Smad2/3抗体(Millipore-Sigma, Canada)、大鼠抗CD44抗体(Thermo Fisher, Canada)、小鼠抗HAS2抗体(Santa Cruz, USA)或小鼠抗FLAG抗体(Millipore-Sigma, Canada)在4℃温育过夜。然后向所述印迹添加HRP偶联的山羊抗小鼠或抗兔IgG抗体(Jackson Laboratories, USA)或抗大鼠IgG抗体(Millipore-Sigma, Canada),在室温下1h,然后使用VersaDOC 5000成像仪(Bio-Rad Laboratories)进行增强化学发光(Millipore-Sigma, Canada)和信号检测。光密度测量分析使用Quantity One软件(Bio-Rad Laboratories, Canada)来进行。

[0120] (9) 报告物测定法

[0121] 在转染前一天将MDA-MB-231细胞以大约 6×10^4 细胞/孔的量接种在24孔板中。将细胞用PAI1启动子驱动的萤火虫萤光素酶报告基因(3TP-Lux)和CMV-海肾萤光素酶对照报告基因构建物共转染。转染后18h,将细胞血清饥饿(含有0.2% FBS的DMEM)4h,然后在新鲜的含有低血清的(含有0.2% FBS的DMEM)培养基中,在不存在或存在单独的或一起的100pM TGF β 、100 μ g/mL rhPRG4的情况下温育并放置过夜。制备裂解液并使用可商购的双重萤光素酶测定试剂盒(Promega, Canada)分析萤光素酶活性。将任意萤光素酶活性(相对光单位)值归一化到海肾萤光素酶活性,以解释转染效率的变动。对于每种转染来说,也确定PAI1启动子驱动的萤光素酶报告基因表达提高的百分数,并相对于相应基础条件裂解液的萤光素酶活性来表示。每种实验条件进行一式三份。

[0122] (10) 统计分析

[0123] 通过Student's t-检验或单向方差分析(ANOVA),然后使用InStat(Graphpad, USA)进行Tukey-Kramer或Student-Newman-Keuls事后检验,对生物化学和类器官相关数据进行统计分析。 $P < 0.05$ 的值被认为是统计显著的。数据以图形方式呈现为来自于至少独立地重复三次的实验的平均值 \pm SEM。

[0124] 实施例2:rhPRG4促进3D-乳腺癌细胞衍生的类器官的抗侵袭性生长

[0125] 为了评估rhPRG4对乳腺癌细胞的侵袭性的影响,我们利用了三维(3D)细胞培养系统,其中允许细胞生长并与ECM组分例如与体内存在的ECM类似的基质胶相互作用(27)。与单层模型相反,已报告在三维培养物模型中细胞对刺激物例如生长因子、激素或药物的反应更好地预测了在活生物体中观察到的反应,因此更适合于为生长建模并评估正常和肿瘤细胞对外部刺激物的反应(Antoni等,Int. J. Mol. Sci. 2015;16(3):5517-27)。

[0126] 为了研究rhPRG4对TNBC衍生细胞的潜在抗侵袭效果,我们使用了一种三维模型,在其中可以容易地检测和量化这些肿瘤细胞对某些刺激物做出响应的迁移和侵袭行为。人TNBC MDA-MB-231乳腺癌细胞系代表了一种用于体外和体内癌症研究,包括在三维培养物模型中的广泛使用的TNBC细胞模型(Dadakhuaev等,Oncoscience. 2014;1(3):229-40; Chanda等,PloS One. 2017;12(5):e0177639),因此我们在我们的研究中使用了这些乳腺癌细胞。正如预期,我们发现在作为细胞外支持系统的基质胶的背景中培养的分离的单个MDA-MB-231细胞分裂并形成大多数表现为表面光滑的球形表型的多细胞聚集体(图4A、

4B)。分泌的多肽转化生长因子 β (TGF β) 在癌症中发挥复杂作用 (Massague, Nat. Rev. Mol Cell. Biol. 2012; 13 (10) : 616-30)。具体来说, TGF β 可以促进迁移和侵袭, 并且因此可能对癌症转移有贡献 (Massague, Nat. Rev. Mol Cell. Biol. 2012; 13 (10) : 616-30)。TGF β 重塑肿瘤微环境的细胞外基质 (ECM) 组分的能力对它增加肿瘤细胞的迁移和侵袭的作用有贡献 (Massague, Nat. Rev. Mol Cell. Biol. 2012; 13 (10) : 616-30)。正如预测的, 我们发现TGF β 破坏3D-基质胶-MDA-MB-231细胞衍生的类器官的光滑表面和球形性质, 并促进这些类器官的侵袭性生长 (Dadakhujaev等, Oncoscience. 2014; 1 (3) : 229-40; Chanda等, PloS One. 2017; 12 (5) : e0177639)。引人注目的是, rhPRG4以剂量依赖性方式起作用, 强烈阻遏3D-乳腺癌细胞衍生的类器官的TGF β 诱导的侵袭性。抗PRG4单克隆抗体 (mAb) 4D6特异性识别PRG4 (Abubacker等, Connective Tissue Res. 2016; 57 (2) : 113-23; Chawla等, Acta biomaterialia. 2010; 6 (9) : 3388-94)。有趣的是, 我们发现所述3D培养物与抗PRG4 mAb 4D6而不是与小鼠IgG对照的温育降低了rhPRG4抑制3D-乳腺癌细胞衍生的类器官的TGF β 诱导的侵袭性生长的能力 (图4C、4D)。合在一起, 这些数据表明rhPRG4以剂量依赖性和特异性方式起作用, 以抑制MDA-MB-231细胞衍生的类器官的侵袭行为。

[0127] PRG4以特异性方式起作用以即使在TGF β 存在下也保留TNBC衍生的类器官的非侵袭性表型这一发现, 提出了在添加分离的细胞之前向基质胶添加PRG4是否足以抵消乳腺癌细胞衍生的类器官的TGF β 诱导的侵袭性生长这个关键问题。引人注目的是, 甚至在三维培养物设置之前将rhPRG4施加到基质胶也足以抑制所述3D-TNBC衍生的类器官的TGF β 诱导的侵袭性生长 (图4E、4F)。

[0128] 基底层破坏和皮层到应力纤维样肌动蛋白的重新组织是细胞变得侵袭的两个必要因素 (Akhavan等, Cancer Res. 2012; 72 (10) : 2578-88; Tojkander等, J. Cell Sci., 2012; 125 (Pt 8) : 1855-64)。重要的是指出ECM蛋白层粘连蛋白富集在类器官的基底层处, 维持它们的结构完整性和极性, 并且随着肿瘤倾向性增加, 这种富集逐渐丧失 (Debnath等, Nat. Rev. Cancer, 2005; 5 (9) : 675-88; O'Brien等, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2002; 3 (7) : 531-7)。因此, 接下来, 使用间接免疫荧光分析 (层粘连蛋白)、荧光标记的鬼笔环肽 (肌动蛋白) 和Hoechst (nuclei) 染色测试了在3D-MDA-MB-231衍生的类器官中rhPRG4对TGF β 改变基底层和肌动蛋白组织的能力的影响。在未处理的MDA-MB-231细胞衍生的类器官中基底层是完整的, 正如由层粘连蛋白作为围绕类器官外表面的实心环出现所表明的, 而肌动蛋白被部分皮层取向 (图4G)。TGF β 破坏类器官周围的基底膜组织, 正如由类器官周围的层粘连蛋白环的丧失所指示的, 并促进肌动蛋白应力纤维样外观。这些TGF β 效应与它增加3D-MDA-MB-231类器官的细胞组分的移动性和侵袭性的能力相一致 (Dadakhujaev等, Oncoscience. 2014; 1 (3) : 229-40; Chanda等, PloS One, 2017; 12 (5) : e0177639)。有趣的是, rhPRG4在这些多细胞结构中, 在不存在或存在TGF β 的情况下促进皮层肌动蛋白组织和实心层粘连蛋白环的形成。合在一起, 这些数据表明rhPRG4诱导在ECM支持的背景下生长的3D-乳腺癌细胞衍生的类器官得抗侵袭性生长行为。

[0129] 实施例3: PRG4抑制乳腺癌细胞的侵袭和迁移

[0130] 使用体外跨孔测定法测试了rhPRG4对细胞侵袭的影响 (Dadakhujaev等, Oncoscience. 2014; 1 (3) : 229-40)。具体来说, 将血清饥饿的MDA-MB-231细胞接种在基质胶包被的膜顶上的上部区室中, 下部区室中具有含有10%FBS的生长培养基, 并且不存在或单

独存在TGFβ或还一起存在TGFβI型ser/thr激酶受体(TBRI)小分子激酶抑制剂SB431542(KI)或rhPRG4作为化学引诱物(Halder等,Neoplasia,2005;7(5):509-21)。TGFβ以TBRI信号传导依赖性方式起作用,与未处理的对照相比促进MDA-MB-231细胞的侵袭(图5A、5B)。有趣的是,在不存在或存在TGFβ的情况下,rhPRG4阻断MDA-MB-231细胞变得具有侵袭性的能力。除了侵袭之外,迁移也在癌细胞向原发肿瘤部位之外的部位移动引起转移的能力中发挥重要作用(Bendas等,Int.J.Cell Biol.2012:676731)。因此,进行了体外划痕测定以测试PRG4对癌细胞的迁移行为的影响。划痕沿着每个孔中过夜血清饥饿的汇合细胞单层的中线产生,然后与不含或单独含有TGFβ或还含有KI或rhPRG4的低血清培养基温育36h。与对照孔中相比,TGFβ信号传导增加了划痕闭合过程,而在不存在或存在TGFβ的情况下rhPRG4显著延迟划痕闭合过程(图5C、5D)。合在一起,这些结果证实rhPRG4在体外有效抑制乳腺癌细胞的侵袭和迁移特性。

[0131] 实施例4:rhPRG4不调控TGFβ-Smad信号传导

[0132] 进行了实验以确定rhPRG4如何促进抗侵袭和抗迁移细胞反应。由于rhPRG4在体外抑制MDA-MB-231细胞的TGFβ诱导的侵袭和迁移,因此试验了rhPRG4可能拮抗TGFβ信号传导途径的想法。TGFβ配体与细胞表面上的同源受体的结合导致受体调控蛋白Smad 2和3的磷酸化,它们对下游TGFβ信号传导来说是重要的(Massague,Nat.Rev.Mol.Biol.2012;13(10):616-30)。因此,进行了试验以确定在这些细胞中rhPRG4是否影响TGFβ诱导Smad2在其最后的C-端丝氨酸残基上的磷酸化的能力。有趣的是,与不含或单独包含TGFβ或一起还包含KI或rhPRG4的生长培养基温育的MDA-MB-231细胞的裂解液的免疫印迹分析揭示,rhPRG4不明显改变TGFβ诱导的Smad2在C-端第465和467位丝氨酸残基上的磷酸化(图6A、6B)。

[0133] 进行了进一步分析以确定rhPRG4是否影响TGFβ-Smad依赖性信号传导。具体来说,使用广泛使用的3TP-Lux报告物测定法确定了rhPRG4对TGFβ-Smad诱导的转录活性的影响,在所述测定法中萤火虫萤光素酶基因的表达在TPA响应元件的三个串联重复序列(3T)和TGFβ响应性基因纤溶酶原激活物抑制剂1(PAI-1)的启动子元件的控制之下(Hsu等,J.Biol.Chem.,2006;281(44):33008-18)。将用3TP-lux质粒和作为内部转染效率对照的CMV-海肾萤光素酶质粒一起共转染的MDA-MB-231细胞,与不含或单独包含TGFβ或还包含rhPRG4的含有低血清的生长培养基温育过夜,裂解,然后进行萤光素酶分析。正如预期,TGFβ导致3TP-Lux报告物活性的显著诱导(图6C、6D)。然而,rhPRG4不改变MDA-MB-231细胞中TGFβ诱导的3TP-Lux报告物活性。这些数据与rhPRG4对TGFβ诱导的Smad2磷酸化缺少影响相一致。合在一起,这些数据表明rhPRG4可能作用于TGFβ-Smad诱导的转录的下游,以影响迁移或侵袭的生物过程。

[0134] 实施例5:rhPRG4抑制乳腺癌细胞的透明质酸诱导的侵袭

[0135] 越来越多的证据表明,对TGFβ诱导的乳腺癌的侵袭和转移有贡献的关键下游信号传导轴是透明质酸(HA)-分化簇44(CD44)途径(Meran等,J.Biol.Chem.,2011;286(20):17618-30;Li等,Int.J.Mol.Med.,2015;36(1):113-22;Midgley等,J.Biol.Chem.,2013;288(21):14824-38)。许多报告表明TGFβ可以提高催化基质中透明质酸(HA)、特别是低分子量透明质酸(LMWHA)的生产和分泌的透明质酸合酶2(HAS2)的丰度(Misra等,Front.Immunol.,2015;6:201;Porsch等,Oncogene,2013;32(37):4355-65)。此外,提出了TGFβ提高肿瘤细胞上HA受体CD44的表达(Li等,Int.J.Mol.Med.,2015;36(1):113-22)。反

过来,证据表明LMWHA与CD44结合,触发增强肿瘤细胞的侵袭和转移能力的特定信号传导途径的激活(Meran等,J.Biol.Chem.,2011;286(20):17618-30;Li等,Int.J.Mol.Med.,2015;36(1):113-22;Midgley等,J.Biol.Chem.,2013;288(21):14824-38)。最近的体外数据支持下述想法,即除了是边界润滑剂和具有抗粘附特性之外,rhPRG4可能还与HA竞争CD44结合,这可能抑制下游信号传导,对骨关节炎和类风湿性关节炎衍生的滑膜细胞的增殖有贡献(Alquraini等,Arthritis Research&Therapy.2017;19(1):89;Al-Sharif等,Arthritis Rheumatol.2015;67(6):1503-13)。鉴于这些证据,我们想知道通过跨孔侵入和划痕愈合测定法检测到的rhPRG4对TGF β 介导的3D-乳腺癌细胞衍生的类器官的侵袭性生长以及细胞的侵袭性和迁移的抑制(图4A、5A、5C)是否涉及TGF β 控制的HA-CD44信号传导轴的破坏。为了解决这个问题,对MDA-MB-231细胞中CD44的稳态蛋白质水平进行了表征。细胞裂解液的免疫沉淀和随后的免疫印迹分析表明,CD44在MDA-MB-231细胞中表达(图7A),提高了活性CD44依赖性信号传导轴的可能性。为了解决这个问题,使用据报道在乳腺肿瘤基质和转移性疾病血清中升高的LMWHA(<10kDa)来评估HA对3D-MDA-MB-231细胞的侵袭行为的影响(Wu等,FASEB J.,2015;29(4):1290-8;Peng等,Intl.J.Cancer,2016;138(10):2499-509)。将所述3D-MDA-MB-231细胞不处理或与单独的或与rhPRG4组合的浓度逐渐提高的LMWHA温育。LMWHA以剂量依赖性方式起作用以提高侵入性类器官的比例,正如由球形类器官的比例降低所反映的(图7B、7C)。然而,rhPRG4抑制LMWHA促进乳腺癌细胞衍生的类器官的侵袭性生长的能力。与在跨孔侵袭测定中来自于3D培养物的结果相一致,我们发现LMWHA提高侵袭细胞的比例(图7D、7E)。另一方面,干扰HA-CD44相互作用的CD44中和抗体(Kariya等,BBA Clinical.2015;3:126-34)在LMWHA存在下也阻断细胞侵袭。同样地,在外源LMWHA存在下rhPRG4能够抑制乳腺癌细胞侵袭。合在一起,这些结果表明在3D培养物和跨孔侵袭测定两者中,LMWHA在MDA-MB-231细胞中诱导侵袭性行为,其可以通过rhPRG4来阻断。

[0136] 实施例6:在MDA-MB-231细胞中CD44对于TGF β 诱导的侵袭来说是至关重要的

[0137] 为了进一步研究MDA-MB-231细胞的TGF β 和LMWHA介导的侵袭性是否是CD44依赖的,使用了RNA干扰(RNAi)基因沉默方法来敲减这些细胞中的CD44。设计了两种小发夹RNA(shRNA),分别靶向CD44的外显子16和外显子4中的特定序列。用对照pU6 RNAi载体或单独或一起表达shRNA1、shRNA2的RNAi质粒转染的MDA-MB-231细胞的裂解液的CD44免疫印迹,证实了这些shRNA单独或一起高效地敲减内源性CD44(图8A)。用RNAi对照载体或表达CD44i-1/2的质粒转染的固定的MDA-MB-231细胞的CD44免疫荧光分析,显示出内源性CD44的剧烈的CD44i-1/2诱导的敲减(图8B)。

[0138] 接下来,试验了在存在或不存在TGF β 或LMWHA的情况下,内源性CD44被CD44 shRNA1/2的敲减对3D-MDA-MB-231细胞衍生的类器官的影响。有趣的是,CD44的敲减提高球形类器官的百分率并抑制TGF β 或LMWHA诱导侵袭行为的能力,正如由球形类器官的保留所证实的。有趣的是,在不存在或存在TGF β 或HA的情况下,CD44i-1和CD44i-2的共表达一致地急剧减小类器官的尺寸。这些数据表明CD44可能介导MDA-MB-231细胞衍生的类器官的侵袭性生长的TGF β 和LMWHA诱导(图8C、8D)。

[0139] 在MDA-MB-231衍生的类器官中已确立受体CD44对TGF β 和LMWHA诱导的侵袭性的重要性之后,分析了在不存在或存在TGF β 和HA的情况下CD44的过表达对这些类器官的影响。首先,使用RT-PCR从MDA-MB-231细胞扩增CD44 cDNA的开放阅读框,然后将其亚克隆到基于

CMV的质粒中,以在MDA-MB-231细胞中表达CD44/FLAG,这通过CD44和FLAG免疫印迹得以证实(图8E)。从用载体对照或CD44/FLAG表达质粒瞬时转染的MDA-MB-231细胞产生3D-类器官,并将其与不含或单独包含TGF β 、LMWHA或一起还包含rhPRG4的生长培养基温育。源自于载体对照转染的细胞的未处理的3D-类器官大多为球形,并在与TGF β 或LMWHA温育后变得具有侵袭性,而这些效应被rhPRG4显著逆转(图8F、8G)。然而,即使在不存在TGF β 或LMWHA的情况下,过表达的CD44/FLAG也促进3D-类器官的侵袭性生长。有趣的是,在不存在或存在TGF β 或LMWHA的情况下,rhPRG4抑制过表达的CD44促进MDA-MB-231细胞衍生的类器官的侵袭性生长的能力。这些结果进一步支持了rhPRG4以CD44依赖性方式抑制乳腺癌细胞侵袭性生长的见解。合在一起,来自于CD44敲减和过表达研究的发现表明rhPRG4抑制CD44介导的TGF β 或LMWHA对MDA-MB-231细胞衍生的类器官的侵袭表型的促进。

[0140] 实施例7:HA-CD44轴介导TGF β 诱导的乳腺癌细胞衍生的类器官的侵袭性生长

[0141] 为了进一步研究CD44在TGF β 诱导的MDA-MB-231细胞衍生的类器官的侵袭性生长中的作用,将3D培养物与生长培养基或单独或与TGF β 、KI、CD44中和抗体或rhPRG4的不同组合一起的浓度逐渐提高的LMWHA温育(图9A、9B)。与以前的发现相一致,3D-MDA-MB-231细胞来源的培养物与浓度逐渐提高的LMWHA的温育促进所述乳腺癌细胞衍生的类器官的侵袭性生长。TGF β 进一步增强了LMWHA诱导这些类器官的侵袭性生长的能力。有趣的是,抑制TGF β 诱导的侵袭性生长的KI不能逆转所述LMWHA效应,表明LMWHA介导的侵袭作用于TGF β 信号传导途径的下游。相反,CD44中和抗体抑制LMWHA和TGF β 刺激物两者诱导侵袭性生长的能力,并且事实上这种干预与KI处理相比显著增加了球形类器官的数目。此外,这些类器官的TGF β 诱导的侵袭性生长被CD44中和抗体的阻断,表明TGF β 在这些细胞中以CD44依赖性途径诱导侵袭性。与CD44抗体相似,PRG4抑制TGF β 和LMWHA诱导的MDA-MB-231细胞衍生的类器官的侵袭性生长。这些数据表明rhPRG4在LMWHA和TGF β 介导的途径两者的下游起作用。合在一起,这些结果表明HA-CD44轴对TGF β 诱导的MDA-MB-231细胞的侵袭性生长具有显著贡献,并且这种信号传导轴似乎是rhPRG4的靶。

[0142] 为了进一步确定HA-CD44途径对这些细胞的TGF β 诱导的侵袭性的影响,更具体来说是由透明质酸合酶(HAS)合成的HA的作用(Auvinen等,Breast cancer research and treatment,2014;143(2):277-86),调查了4-甲基伞形酮(4-MU,一种HAS抑制剂)对3D-MDA-MB-231细胞衍生的类器官的影响(Urakawa等,Int'l.J.Cancer,.2012;130(2):454-66)。具体来说,将3D-MDA-MB-231细胞衍生的类器官不与或与单独或与TGF β 一起的4-MU以及LMWHA和rhPRG4的不同组合温育(图9C、9D)。4-MU抑制TGF β 诱导的3D-MDA-MB-231细胞衍生的类器官的侵袭性生长,这通过添加外源LMWHA而被逆转。相反,rhPRG4抑制4-MU处理的3D-MDA-MB-231细胞衍生的类器官的LMWHA诱导的侵袭性生长。合在一起,这些数据表明TGF β 以HA依赖性方式诱导3D-MDA-MB-231细胞衍生的类器官的侵袭性生长。此外,rhPRG4对TGF β 和LMWHA两者诱导的3D-MDA-MB-231细胞衍生的球形的侵袭性生长的抑制,表明rhPRG4作用于HA生产及其信号传导途径的下游。

[0143] 总的来说,这些结果表明TGF β 信号传导与HA-CD44轴之间在促进3D-MDA-MB-231细胞衍生的类器官的侵袭性行为方面存在相互作用。重要的是,该数据表明rhPRG4可能作用于TGF β 的下游,以抑制HA-CD44轴的促进MDA-MB-231衍生的类器官的侵袭性生长的能力。

[0144] 实施例8:HA-CD44信号传导轴受到TGF β 和PRG4调控

[0145] 为了患者关于TGFβ可能调控CD44信号传导的分子机制的进一步见解,使用免疫印迹分析试验了TGFβ对MDA-MB-231细胞中CD44的蛋白质丰度的影响。有趣的是,这些实验显示TGFβ信号传导的激活促进MDA-MB-231细胞中的CD44蛋白质丰度(图10A、10B)。相反,我们发现在不存在或存在TGFβ的情况下PRG4降低CD44的蛋白质丰度。rhPRG4不降低TGFβ诱导的Smad2磷酸化,表明rhPRG4介导的CD44抑制可能不涉及所述途径的这个步骤。在使用未处理、TGFβ和/或PRG4处理的MDA-MB-231细胞衍生的类器官的CD44间接免疫荧光的其他分析中揭示,TGFβ增强CD44免疫染色信号,而在不存在或存在TGFβ的情况下rhPRG4降低这种信号,从而进一步证实了所述免疫印迹数据(图10C)。

[0146] HAS2抑制剂4-MU抑制TGFβ诱导的3D-乳腺癌细胞衍生的类器官的侵袭性,表明在MDA-MB-231细胞中TGFβ可能调控HA的产生。因此,我们研究了TGFβ对HAS蛋白水平的影响。在HAS1/2/3亚型中,HAS2是这些MDA-MB-231细胞中最普遍的酶(Schwertfeger等,Front Immunol.2015;6:236)。免疫印迹分析显示,TGFβ提高MDA-MB-231细胞中HAS2的蛋白质丰度(图10D、10E)。有趣的是,rhPRG4在不存在或存在TGFβ的情况下抑制HAS2的蛋白质丰度。

[0147] 重要的是,这些分析揭示出与TGFβ相反,rhPRG4在不存在或存在外源TGFβ的情况下导致CD44和HAS2的蛋白质丰度的降低,这可以提供rhPRG4抑制TGFβ诱导的乳腺癌细胞侵入性的一种机制。

[0148] 实施例9:从实施例3-8中提供的数据获得的发现的概述

[0149] 实施例3-8中提供的数据证实了黏蛋白样糖蛋白rhPRG4在源自于三阴性乳腺癌(TNBC)患者的癌细胞中新的抗迁移和抗侵袭作用。具体来说,通过抵消细胞因子TGFβ促进三维人类MDA-MB-231TNBC细胞衍生的类器官的侵袭性生长的能力,rhPRG4保护了这些多细胞结构的非侵袭性球形形态。上位性研究揭示出rhPRG4作用于TGFβ-Smad信号传导的下游以实现其抗迁移和抗侵袭效果。此外,所述数据表明rhPRG4破坏TGFβ诱导的HA-CD44信号传导激活,所述激活在这种细胞因子诱导的MDA-MB-231细胞衍生的类器官的侵袭性生长中发挥重要作用。所述数据显示,在生物化学分析中,在不存在或存在外源TGFβ的情况下,TGFβ信号传导增加而rhPRG4降低MDA-MB-231细胞中产HA的酶HAS2和HA受体CD44的蛋白质丰度,从而指出了rhPRG4在这些细胞中抑制侵袭和迁移的一种机制。合在一起,这些发现为rhPRG4的生物学功能和潜在治疗意义增添了重要见解。

[0150] rhPRG4在乳腺癌细胞中发挥抗迁移和抗侵袭效果证实了这种糖蛋白在代表大多数实体肿瘤的上皮组织来源癌症中的作用。这些发现贡献了重要证据以支持下述不断加强的观点,即rhPRG4可以调控细胞反应,从而超出其最初鉴定的纯粹作为软骨边界润滑剂的作用而发挥作用,并为重组糖蛋白的新兴生物治疗活性提出了新的维度。

[0151] 在免疫印迹和免疫组织化学分析的基础上发现特异性识别PRG4的抗PRG4 mAb 4D6 (Abubacker等,Connective Tissue Res.,2016;57(2):113-23;Chawla等,Acta biomaterialia.2010;6(9):3388-94) 干扰rhPRG4抑制乳腺癌细胞衍生的类器官的侵袭性生长的能力,表明mAb 4D6起到PRG4中和抗体的作用。这种以前未报道的抗PRG4活性可能反映出PRG4和与其抗侵袭活性相关的其他分子的相互作用被mAb 4D6阻碍。将来对PRG4中被该抗体靶向的表位的鉴定可能为rhPRG4的与其抗侵袭性质有关的功能结构域增添见解。

[0152] TGFβ在癌症起始和进展中发挥双重作用(31,46)。在赘生性疾病的起始阶段,证据表明TGFβ充当肿瘤抑制剂,而在癌症的较晚阶段,它可以促进包括乳腺癌在内的不同癌的

侵袭性和转移 (Massague, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2012; 13 (10) : 616-30; Lebrun等, *ISRN Mol. Biol.* 2012; 381428)。因此, 鉴定下调TGF β 的肿瘤促进作用而不影响其肿瘤抑制特性的方式, 可能进一步控制肿瘤生长。rhPRG4抑制TGF β 诱导的侵袭性生长而不影响受体调控的Smad (R-Smad, 例如Smad2) 的磷酸化和转录活性的发现, 提高了TGF β 抑制肿瘤生长的能力可能是完整的这种可能性, 这可以作为进一步研究的主题。rhPRG4对MDA-MB-231衍生的类器官的抗侵袭作用由LMWHA-CD44信号传导轴的阻断介导, 可能具有体内重要性。一般来说, 细胞表面糖蛋白CD44在包括乳腺肿瘤在内的肿瘤细胞中的富集与所述癌症的侵袭性和转移特征并因此与不良预后相关 (Zoller, *Nat. Rev. Cancer*, 2011; 11 (4) : 254-67)。在包括乳腺癌的不同癌的基质 (Auvinen等, *Am. J. Pathology*, 2000; 156 (2) : 529-36) 和血清 (Wu等, *FASEB J.*, 2015; 29 (4) : 1290-8; Peng等, *Intl. J. Cancer*, 2016; 138 (10) : 2499-509) 中升高的HA充当CD44的配体。取决于二糖重复单元的数目, HA通常被归类为高分子量透明质酸 (HMWHA) 和低分子量透明质酸 (LMWHA) (Misra等, *Front. Immunol.*, 2015; 6: 201)。重要的是, LMWHA-CD44结合可以触发不同信号传导途径的激活, 最终促进癌细胞侵袭、迁移和增殖 (Li等, *Int. J. Mol. Med.*, 2015; 36 (1) : 113-22; Wobus等, *Appl Immunohistochem. Mol Morphol.*, 2002; 10 (1) : 34-9; Nam等, *Cellular Signaling*. 2015; 27 (9) : 1882-94; Liu等, *Cancer Res.*, 2017; 77 (14) : 3791-801)。此外, LMWHA-CD44簇可以起作用, 以在肿瘤团块的侵袭前沿诱导基质ECM的重塑 (Yu等, *Genes&Development*, 1999; 13 (1) : 35-48)。本文中外源LMWHA促进MDA-MB-231细胞衍生的类器官的侵袭性生长的新发现, 与肿瘤基质中升高的LMWHA可以促进癌症侵袭性的想法相符 (Auvinen等, *Breast cancer research and treatment*, 2014; 143 (2) : 277-86)。rhPRG4负面影响HA-CD44诱导的癌细胞的侵袭性这个想法与表明PRG4拮抗HA-CD44介导的炎症信号传导的其他研究相符, 所述炎症信号传导在类风湿性关节炎和骨关节炎疾病中诱导滑膜细胞增殖, 并在人类和鼠类巨噬细胞中诱导大量炎症细胞因子生产 (Alquraini等, *Arthritis Research&Therapy*. 2017; 19 (1) : 89; Al-Sharif等, *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67 (6) : 1503-13; Qadri等, *Arthritis Res&Ther.*, 2018; 20 (1) : 192)。总的来说, 这些发现与rhPRG4和LMWHA竞争CD44结合的想法相符 (Al-Sharif等, *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67 (6) : 1503-13), 并将它们扩展到乳腺癌细胞和TGF β 途径。将来的研究可以调查rhPRG4在其他癌症类型、特别是在富含HA的基质环境中高表达CD44的癌细胞中的抗侵袭效果 (Misra等, *Front. Immunol.*, 2015; 6: 201; Zoller, *Nat. Rev. Cancer*, 2011; 11 (4) : 254-67)。

[0153] 本文中的数据显示, rhPRG4将TGF β 联系到在促进乳腺癌侵袭中HA-CD44途径的激活。已显示TGF β 促进HAS酶、特别是HAS2的表达, 这导致在乳腺癌细胞的ECM中积累高水平的HA (Misra等, *Front. Immunol.*, 2015; 6: 201; Porsch等, *Oncogene*, 2013; 32 (37) : 4355-65)。最后, 也已显示TGF β 以Smad依赖性方式促进CD44的表达 (Li等, *Int. J. Mol. Med.*, 2015; 36 (1) : 113-22; Tripathy等, *Mol. Cell.*, 2016; 64 (3) : 549-64)。在本研究中, 我们报告了TGF β 在MDA-MB-231细胞中提高HAS2和CD44两者的蛋白质丰度。总而言之, 这些结果与HAS2和CD44的功能丧失分析的抑制效果一起, 证实了HA-CD44途径在介导TGF β 诱导这些细胞的侵袭和迁移的能力中发挥关键作用。

[0154] rhPRG4对过表达的CD44诱导MDA-MB-231细胞衍生的类器官的侵袭性生长的能力的抑制, 可能涉及降低HA-CD44结合和/或CD44和HAS2蛋白质水平的降低, 正如通过免疫印

迹和免疫荧光分析所指示的。我们的结果证实, rhPRG4可以在MDA-MB-231细胞中降低TGF β 诱导的CD44和HAS2蛋白质丰度的上调而不影响Smad2的磷酸化, 表明它在TGF β -Smad信号传导途径的下游起作用。正如在以前的文献中所建议的 (Li等, *Int. J. Mol. Med.*, 2015; 36 (1) : 113-22), rhPRG4是否通过在这些细胞中抑制MAPK激活来抑制TGF β 诱导的HA-CD44信号传导轴, 仍有待阐明。此外, 正如以前使用不同细胞类型的研究所显示的 (Al-Sharif等, *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67 (6) : 1503-13), 在乳腺癌细胞中rhPRG4是否与HA竞争CD44结合, 需要进一步调查。不论rhPRG4抑制TGF β -HA-CD44诱导的TNBC乳腺癌细胞侵袭的可能潜在机制如何, 显然rhPRG4可以显著抑制TGF β 和LMWHA两者诱导的MDA-MB-231细胞的侵袭。

[0155] 这些数据证实了rhPRG4可以在体外至少部分通过抑制HA-CD44信号传导轴介导TGF β 刺激的能力来抑制TGF β 诱导的MDA-MB-231TNBC细胞的侵袭和迁移。我们的发现还证实了rhPRG4可以拮抗TGF β 诱导的CD44和HAS2的蛋白质丰度的提高, 这可以解释它对TGF β 诱导的这些细胞的侵袭的抑制。最后, rhPRG4也可以抑制LMWHA诱导的这些细胞的侵袭。鉴于TNBC的侵袭性和死亡率与高CD44表达相关 (Wang等, *Oncology Letters*, 2017: 14 (5) : 5890-8), 并且以前靶向TGF β 和CD44信号传导轴的治疗策略已显示出前景但仍具有不良副作用 (Misra等, *Front. Immunol.*, 2015; 6: 201; Neuzillet等, *Pharmacology&Ther.*, 2015; 147: 22-31), 以及将rhPRG4的快速翻译更新用于临床评估的潜力, rhPRG4代表了作为潜在生物抗癌疗法的理想候选物。总之, 这些发现有助于理解PRG4在以前未调查的乳腺癌领域中的生物活性, 并为未来不仅针对乳腺癌, 而且潜在地针对其存活、增殖和转移能力依赖于TGF β 和HA-CD44信号传导的其他癌症的研究提供了框架 (Misra等, *Front. Immunol.*, 2015; 6: 201; Zoller, *Nat. Rev. Cancer*, 11 (4) : 254-67)。

[0156] 实施例10: 三阴性乳腺癌患者的治疗

[0157] 通过局部注射到肿瘤区域, 向被诊断为患有非转移性三阴性乳腺癌的人类女性给药重组人PRG4 (rhPRG4)。给药在局部麻醉下进行。将总量为2mL的浓度为100ug/mL的rhPRG4在生理盐水中的溶液通过14号针头给药。在肿瘤中及其表面上进行了几次注射, 以使药剂分散到整个肿瘤区域。所述药剂每周给药一次共4周。4周后, CT扫描揭示出肿瘤尺寸已缩小。

[0158] 实施例11: 前列腺癌患者的治疗

[0159] 通过经中央静脉导管系统性给药, 向被诊断为患有结肠癌的80kg人类男性给药重组人PRG4 (rhPRG4)。给药在250mL生理盐水中浓度为2.0mg/mL润滑素的总量为500mg的rhPRG4, 以产生大约100ug/mL的血液浓度。所述药剂每周给药一次共4周。4周后, CT扫描揭示出结肠中的肿瘤尺寸已减小。

[0160] 实施例12: 三阴性乳腺癌患者的治疗

[0161] 通过局部注射到肿瘤区域, 向被诊断为患有非转移性三阴性乳腺癌的人类女性给药重组人PRG4 (rhPRG4)。给药在局部麻醉下进行。将总量为2mL的浓度为100ug/mL的rhPRG4在生理盐水中的溶液通过14号针头给药。在肿瘤中及其表面上进行了几次注射, 以使药剂分散到整个肿瘤区域。所述药剂每周给药一次共4周。在rhPRG4给药时间表期间, 所述患者还按照标准方案接受紫杉烷和多柔比星的混合物。4周后, CT扫描揭示出肿瘤尺寸已缩小, 并且比在仅用紫杉烷和多柔比星治疗的患者中速率更快。

[0162] 实施例13: 使用润滑素治疗肝细胞癌

[0163] 肝细胞癌(HCC)是最常见且致命的肿瘤之一,并且通常对目前使用的疗法表现出难治性。尽管索拉非尼和瑞格非尼给药是治疗这种癌症的优选的基于药物的方法,但总的来说它不产生令人满意的益处。然而,将这些药物与增强它们的有效性的各种其他化合物联用是一种越来越受欢迎的有希望的策略。在来自于78位HCC患者的肿瘤和肿瘤周组织的微阵列分析的基础上,本实施例显示了润滑素(PRG4)在HCC中表达,并且更重要的是它与HCC患者的生存率提高紧密相关($p < 0.001$)。从HCC患者分离的人类癌症相关的成纤维细胞(CAF)产生润滑素蛋白,并且在培养基中用转化生长因子 β (TGF β)处理的人类HCC样本释放出润滑素。更重要的是,这个实施例显示用全长重组人PRG4(rhPRG4)治疗急剧增强索拉非尼和瑞格非尼抑制HCC细胞增殖的能力,尽管它不显著影响细胞生长。这些数据表明了TGF β 潜在的新的肿瘤限制作用,并且还表明润滑素可以发挥肿瘤抑制作用。因此,本实施例显示单独的或与索拉非尼和瑞格非尼组合的非合成的生理产生的化合物rhPRG4可以充当抗肿瘤药剂,并在HCC的治疗中具有价值。

[0164] 肝细胞癌(HCC)是全世界最常见的癌症相关死亡的病因之一。由于大多数HCC患者不适合基于手术方法或射频消融的治愈性疗法,因此基于系统性药物的疗法是必要的。然而,给药诸如索拉非尼和瑞格非尼的化合物的多年经验在总存活率方面给出了令人失望的结果(Kudo等,Lancet 2018.doi:10.1016/S0140-6736(18)30207-1;Bruix等,Lancet 2017.doi:10.1016/S0140-6736(16)32453-9;Abou-Alfa等,N Engl J Med 2018.doi:10.1056/NEJMoal717002;Kok等,Cancers (Basel) 2019.doi:10.3390/cancers11070985)。对隐含在HCC的肿瘤进展之下的分子机制知之甚少,以及该疾病由于伴随的预先存在的肝病而表现出的高的肿瘤间和肿瘤内异质性,阻碍了精准医学方法的发展(Nault等,Clin Cancer Res 2015.doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2602;Torrecilla等,J Hepatol 2017.doi:10.1016/j.jhep.2017.08.013;Hung等,2019doi:10.1007/978-3-030-21540-8_14)。上皮癌细胞与周围微环境、特别是癌症相关的成纤维细胞(CAF)之间的交互作用,据信在HCC进展中发挥关键作用,并因此对临床结果产生关键影响(Kudo 2018,同上,Bruix 2017,同上)。

[0165] CAF的起源仍然是一个有争议的问题。已提出多种多样的肝内细胞类型经历表型变化,最终在慢性肝病的炎性和进行性纤维化演变期间以及HCC发展期间分化成CAF。在这种情况下,CAF可能被相邻的恶性细胞表型编程,并进而可能通过包括细胞外基质(ECM)蛋白在内的不同分子的沉积或分泌而增强HCC细胞增殖和扩散(Mazzocca A等,Hepatology 2011.doi:10.1002/hep.24485;Mazzocca等,Hepatology 2010.doi:10.1002/hep.23285)。事实上,CAF是包括纤维状胶原蛋白如I型和III型非胶原糖蛋白如纤连蛋白、层粘连蛋白、透明质酸、弹性蛋白和蛋白聚糖的ECM沉积的主要贡献者(Bataller R等,J Clin Invest 2005.doi:10.1172/JCI200524282)。蛋白聚糖(PG)是一类高度糖基化的高分子量蛋白,在所有纤维化组织、特别是软骨组织中广泛表达,它们在其中具有润滑功能,允许关节的滑动。某些PRG例如多能蛋白聚糖(VCAN)被转化生长因子(TGF)- β 上调,并且令人吃惊地促进癌症侵袭(Nikitovic等,IUBMB Life 2006.doi:10.1080/15216540500531713;Cross等,Prostate 2005.doi:10.1002/pros.20182)。最近已显示,人类重组形式的蛋白聚糖润滑素通过作用于CD44轴来抑制TGF β 介导的乳腺癌细胞的侵袭(Sarkar等,PLoS One 2019.doi:10.1371/journal.pone.0219697)。

[0166] 已广泛报道TGF β 在HCC中促进更具侵袭性和攻击性的表型(Mazzocca 2010,同上;Fransvea等,Hepatology 2008.doi:10.1002/hep.22201;Fransvea等,Hepatology 2009.doi:10.1002/hep.22731;Mazzocca等,Hepatology 2009.doi:10.1002/hep.23118;Fransvea等,Cancer Chemother Pharmacol 2011.doi:10.1007/s00280-010-1459-x)。已报道,TGF β 途径抑制剂Galunisertib在晚期HCC患者中的多中心临床试验中有效(Abou-Alfa等,N Engl J Med 2018.doi:10.1056/NEJMoa1717002)。此外,在临床前实验模型中,抑制TGF β 信号传导降低了HCC攻击性,降低了CD44表达(Rani等,Cell Death Dis 2018.doi:10.1038/s41419-018-0384-5)。鉴于润滑素的潜在抗肿瘤功能,本实施例研究了它在患者背景中的作用及其限制HCC细胞生长和增强索拉非尼和瑞格非尼的体外细胞生长抑制潜力的功能。

[0167] 材料和方法

[0168] 细胞和试剂:HLE和HLF细胞系购自JCRB细胞库(Japan)。Hep3B和PLC/PRF/5细胞系购自ATCC(USA)。所有这些细胞系在增补有丙酮酸钠、抗生素-抗真菌剂、Hepes和10%胎牛血清(FBS)的DMEM(Dulbecco改良的Eagle培养基)中培养。全长重组人PRG4(rhPRG4)由Lubris Biopharma(Weston,MA,USA)提供。

[0169] 稳定的CD44沉默:按照制造商的说明书(OriGene Technologies,Inc.,Rockville,MD 20850,USA),将HLE和HLF细胞系用带有对照非靶向(V)或特异性CD44靶向的shRNA序列(A至D)的慢病毒粒子转导,并使用嘌呤霉素二盐酸盐(Thermo Fisher Scientific)选择,以获得稳定的CD44沉默。对照-shRNA序列(V)和CD44-shRNA序列B被用于涉及CD44下调的所有实验中。CD44沉默效率示出在图20中。

[0170] 增殖测定:在100 μ l完全培养基中,将3,000个细胞接种在96孔板的孔中并放置过夜,以允许完全附着。第二天(时间t=0小时),除去培养基并用100 μ l存在/不存在索拉非尼(2.5 μ M)、瑞格非尼(2.5 μ M)、rhPRG4(12.5至100 μ g/ml)的新鲜培养基代替。二甲基亚砜(DMSO)和PBS+0.01%Tween-20分别被用作索拉非尼/瑞格非尼和rhPRG4的介质。将每种细胞系的三个平行孔中的细胞在t=0小时用4%聚甲醛(PFA,pH 7.6,10min温育)固定,然后用结晶紫(CV)染色并充分清洗,以除去过量染色。72小时后,通过向培养基直接添加100 μ l 4%PFA将细胞固定(2%PFA终浓度,20min温育),并如前所述处理用于CV染色。然后,向所述孔添加100或200 μ l 1%十二烷基硫酸钠,并将板留在振摇下直至CV从染色的细胞完全释放。光密度使用读板器在595nm波长处测量。

[0171] 免疫荧光:使用冷冻切片机切出5 μ m厚的HCC肿瘤样品切片。将切片与阻断缓冲液(RPMI中的10%FBS)温育30分钟以最小化非特异性抗体结合,然后与在相同缓冲液中稀释的第一抗体温育2小时,用PBS清洗3次(每次清洗在振摇下5min),最后与AF488或AF594偶联的第二抗体温育。在这个步骤结束时,如前所述将切片清洗4次,并用增补有DAPI的Vectashield防褪色封固剂封片。

[0172] 粘附测定:将在100 μ l无血清DMEM培养基(+0.5%BSA)中稀释的50,000个细胞接种在96孔板的未包被、rhPRG4或纤连蛋白(FN)包被的孔上,然后在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下温育30分钟。添加等体积的4%PFA(pH 7.2,在PBS中),并将板立即轻弹几秒钟以进行混合。30分钟后,除去培养基并将贴壁细胞用结晶紫染色10min。在用自来水和蒸馏水充分清洗后,允许染色的细胞干燥,然后将它们用100 μ l 1%十二烷基硫酸钠水溶液溶解。在595nm处读取吸

光值,其与贴壁细胞的数目成正比。

[0173] 跨孔迁移测定:所述测定如以前所述来进行(Dituri等,PLoS One 2013.doi:10.1371/journal.pone.0067109)。简单来说,将15,000个细胞装载到trans-well的顶部区室上,所述trans-well的膜预先用纤连蛋白在下表面上包被,然后在下部区室中存在/不存在用无血清DMEM培养基(+0.5%BSA)稀释的rhPRG4(25 μ g/ml)的情况下迁移16小时。然后将细胞用聚甲醛固定并用结晶紫染色。每个膜捕获5个视野,并测量每个视野的细胞数目。

[0174] Western印迹:使用增补有无EDTA的Halt蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(Thermo Fisher Scientific)的T-PER组织蛋白提取试剂提取组织蛋白。简单来说,使用组织匀浆器提取蛋白质。将裂解液在冰上温育30min并每10min涡旋振荡。然后,通过以13,000rpm(在4 $^{\circ}$ C)离心20min以沉淀不溶性碎片,将所述样品澄清。使用Bradford试剂(Bio-Rad)测定上清液(含有提取的蛋白质)的蛋白质浓度。然后将所述蛋白质与Laemmli缓冲液和10% β -巯基乙醇(BME)混合,并在95 $^{\circ}$ C变性5min。将10至20 μ g总蛋白载样到4-20%PAA凝胶上,并在SDS-PAGE中运行。

[0175] RNA提取和cDNA合成:将30至60 μ g冷冻的离体处理的HCC组织在液氮存在下用研钵和研杵研磨,直至得到细粉。将所述研磨的组织用0.5-1ml RLT缓冲液+1%(BME)裂解,然后按照制造商的推荐进行处理(RNeasy试剂盒,Qiagen)。从CAF分离RNA按照由RNeasy试剂盒手册建议的程序来进行。使用NanoDrop 2000/2000c(Thermo Fisher Scientific)测定得到的RNA的质量和浓度。根据相对数据表,使用High Capacity cDNA反转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific)合成cDNA。

[0176] 实时PCR:在总共20 μ l反应混合物中使用1ng/ μ l的cDNA,其中存在500nM针对特定感兴趣基因的每种正向和反向引物以及2x SYBR绿主混合物(Bio-Rad)。反应在CFX96 Touch实时检测系统(Bio-Rad)中进行。

[0177] CAF分离:在手术切除后,立即将HCC肿瘤和肿瘤周样本切碎成0.5-1cm小块,并放置在MACS组织储存溶液(Miltenyi Biotec)中。然后将组织进一步切成更小的碎块(1-2mm),在Hanks平衡盐溶液(HBSS)中清洗三次,然后在IV型胶原酶(Thermo Fisher Scientific)和3mM CaCl₂存在下,在HBSS中在37 $^{\circ}$ C和轻柔旋转下温育4小时。在这个步骤结束时,通过用大口径50ml移液管上下吸打所述消化的组织来机械促进解离。收集漂浮的细胞,用HBSS清洗三次,并接种在IMDM+20%FBS中在正常培养条件下。对倾倒入的部分消化的组织样本进行第二轮消化(如前所述)。将得到的解离细胞用HBSS清洗,并在IMDM+20%FBS中培养。这些细胞经历2-3次传代,以消除上皮/免疫/非贴壁细胞。为了评估CAF制备物的程度,进行免疫荧光或流式细胞术分析以评估间充质标志物(波形蛋白和 α SMA)的表达。极少量污染的非成纤维细胞(主要是癌性肝细胞、胆管上皮细胞和巨噬细胞)的存在,使用针对EpCAM、CD45和CD11b的抗体来评估。

[0178] CAF处理和CAF调制培养基的润滑素免疫耗竭:将CAF在存在/不存在终浓度为5ng/ml的TGF β 1(Peprotech)的情况下在完全IMDM培养基(+20%FBS)中处理48小时,然后用无血清培养基清洗三次,并在无血清培养基中继续温育48小时进行分泌蛋白质组富集。然后收集所述调制培养基,使用centricon装置(3kDa截留分子量,Merck-Millipore)浓缩,并按照制造商的说明书(SureBeads蛋白B,BioRad)与抗润滑素抗体或同种型抗体结合的PBS预清洗的磁性微珠温育。然后测定润滑素耗竭或未耗竭的培养基的蛋白质浓度,并将所述培养

基用于进一步试验。

[0179] 原代HCC细胞系PLC/DC/19的表征:原代HCC细胞系PLC/DC/19按照与分离CAF相同的分离程序,从新鲜收集的手术切除的HCC样本分离。在几次(<10)培养物传代后,通过使用抗体检测干细胞性标志物(0V6、CD133、CD44和CD90)、上皮标志物(AFP、E-Cadh、EpCAM)、间充质标志物(Vim、N-Cadh、 α SMA)和其他癌症相关表面蛋白(CD13、CD151)来进行细胞的免疫表型表征(图21)。

[0180] 微阵列分析:微阵列分析如已经描述过的来进行(gut 2016)。简单来说,使用Trizol(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA),从在首次鉴定到HCC时在前瞻性登记的患者组群中获得的非肿瘤(NT)和肿瘤(T)肝组织中分离总RNA。将RNA用4x44K全基因组基于寡核苷酸的基因表达微阵列(Agilent Technologies,Palo Alto,CA;Genomics Service Department of Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach,Germany)处理。标记和杂交程序按照由Agilent提供的说明书,使用Quick Amp标记试剂盒和单色基于微阵列的基因表达分析方案来进行。在将RNA转变成cDNA后,在标记和扩增步骤期间将cDNA转变成cRNA并用Cy3-CTP标记。在纯化后,将cRNA杂交到Agilent全人类基因组寡核苷酸微阵列4x44K。在使用线性低度法对信号量化并对结果归一化后,将数据导入到Resolver软件(Rosetta Biosoftware,Kirkland,WA)中进行数据库管理、质量控制和分析。所述基因表达数据可在Gene Expression Omnibus网站(www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)获得,登记号为GSE54236。

[0181] 统计分析:生存分析。使用Kaplan-Meier方法估算总生存的累积概率。在LT、死亡或最后一次可用的随访时对患者进行审查。使用对数秩检验来评估观察到的概率的差异。

[0182] 结果

[0183] HCC患者的肿瘤组织中的PRG表达水平:我们分析了在78位前瞻性征召的HCC患者的组群中包括硫酸软骨素蛋白聚糖4(CSPG4)、基底膜聚糖(HSPG2)、多能蛋白聚糖(VCAN)和润滑素(PRG4)在内的不同PRG的表达水平,并结合来自于相同受试者的成对肿瘤和肿瘤周组织的匹配的微阵列基因表达分析。根据每种PRG的mRNA表达水平高于或低于中位数值将患者分层。如以前所报道的,将肿瘤中感兴趣的基因的表达值从肿瘤周组织中的值中减去,以获得净基因表达变化,并将其归一化到相同基因的背景肿瘤周表达(Villa等,Gut 2016.doi:10.1136/gut.jnl-2014-308483)。值得注意的是,正如通过Kaplan-Meier分析所示,具有较高润滑素表达水平的患者与具有较低表达水平的患者相比存活时间更长($p=0.000$),而CSPG4、HSPG2和VCAN没有显示出与存活期的任何显著相关性(图13)。因此,这个实施例显示润滑素在HCC组织中表达,并且高水平与更长的存活期相关。

[0184] 润滑素存在于HCC肿瘤和肿瘤周组织中并在TGF β 刺激下表达:为了进一步确认我们以前的微阵列结果,我们通过western印迹研究了润滑素蛋白在两个正常肝脏和来自于HCC患者的14个肿瘤和配对的周围非癌性样本中的存在。然后,我们还比较了不同个样本中润滑素的量。正如在图14A中报告的,在正常肝脏、肿瘤和肿瘤周组织之间,润滑素的蛋白质表达水平相近,尽管在不同该样品之间存在高度可变性。这表明润滑素蛋白表达的量不是与肿瘤发展相关,而是与个体的肿瘤和肿瘤周组织微环境的独特特点相关的附带现象。

[0185] 为了了解润滑素在HCC进展中的牵涉程度,我们通过免疫荧光定位了它在HCC组织中的表达,其中它主要分布在肿瘤的基质区室中,大部分可以在 α 平滑肌肌动蛋白阳性(α SMA+)细胞的附近检测到(图14B)。

[0186] 为了支持基质细胞参与分泌润滑素,我们用TGF β 、TGF β RI抑制剂LY2157299 (galunisertib)或两者激惹CAF和离体HCC样本48小时,然后分析PRG4 mRNA表达。TGF β 在CAF ($p < 0.01$)和HCC样本 ($p < 0.05$)两者中显著增强润滑素的表达,而LY2157299抵消了这种效应 ($p < 0.01$)。有趣的是,与对照相比,LY2157299还下调润滑素的表达。这可能至少部分依赖于这种药物对内源性TGF β 途径的阻断。在相同的实验条件下,我们还分析了 α SMA、CSPG4、HSPG2和VCAN的mRNA表达。一致的是,TGF β 增加了CAF的肌成纤维细胞表型(正如由 α SMA表达的增强所示)。TGF β 还在HCC培养组织中显著提高HSPG2和VCAN的表达水平(分别为 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$),并在CAF中提高VCAN但不提高HSPG2的表达水平,表明CSPG4表达不受TGF β 调控,并且HSPG2可能在HCC中,在这种细胞因子控制下由CAF之外的其他细胞产生(图15)。

[0187] 润滑素与具有较低CD44表达的HCC患者中较好的预后相关:为了研究先前描述的关联的临床作用,我们根据润滑素和与肿瘤侵袭性和总生存率相关的其他相关基因的较高或较低表达水平将患者分层。肿瘤中润滑素的转录组学分析证实,较低的表达水平与较高的肿瘤生物学侵袭性相关(侵袭肿瘤相比于温和肿瘤: 11.1 ± 3.0 相比于 13.4 ± 1.6 , $p < .0001$)。尽管提高的润滑素表达与具有较低CD44表达的患者中较好的预后显著 ($p < 0.001$)相关,但TGF β 、CD44和 α SMA表达水平不与任何临床结果相关。然而,值得注意的是,在具有较低润滑素水平的患者中,高TGF β 表达与较差的预后相关,表明TGF β 的肿瘤抑制作用可能至少部分由它刺激润滑素表达的能力介导,而这种上调机制的任何缺失均可能导致解放的TGF β 肿瘤促进作用。甚至更有趣的是,润滑素作为“保护性”因子的假定效应在具有较高CD44表达的患者中丧失(图16)。

[0188] 润滑素抑制HCC细胞的粘附和迁移:为了了解润滑素如何在HCC患者中,特别是在CD44表达水平低于中位数值HCC患者中改善总体存活(图13和16),我们研究了rhPRG4是否影响HCC细胞侵袭性所需的某些关键特点、即粘附和迁移,以及CD44的表达是否进而牵涉其中。HLE和HLF是两种CD44阳性强侵袭性HCC细胞系(如下文所述,图18)。在CD44表达沉默后,与润滑素的粘附受损,对于与纤连蛋白的粘附而言也是如此(图17A)。此外,可溶性rhPRG4 ($25 \mu\text{g}/\text{ml}$)损害同样的细胞在纤连蛋白上的迁移,而CD44下调不影响运动性(图17B)。这表明在CD44受体表达较低时,在HCC微环境中表达的润滑素可能更有效地饱和CD44受体,并且CD44之外的其他润滑素受体可能参与限制细胞迁移和侵袭。

[0189] CD44/润滑素轴加强索拉非尼和瑞格非尼对HCC细胞的有效性:为了更详细地探索润滑素/CD44轴的生物学作用,我们在存在/不存在rhPRG4的情况下用索拉非尼和瑞格非尼激惹HLE、HLF和PLC/DC/19HCC CD44阳性细胞以及Hep3B和PLC/PRF5 HCC CD44阴性细胞。将所有HCC细胞在相同实验条件下,在存在/不存在rhPRG4和低于IC $_{50}$ ($\sim 5 \mu\text{M}$)的浓度 ($2.5 \mu\text{M}$)的索拉非尼或瑞格非尼的情况下生长72小时。单独的rhPRG4不显著损害细胞增殖,但当与索拉非尼或瑞格非尼联用时,它在 12.5 至 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度范围内强烈且协同地提高它们对HLE、HLF和PLC/DC/19细胞的有效性。在Hep3B增殖期间存在rhPRG4-药物的协同效应,即使低于使用HLE、HLF和PLC/DC/19细胞时获得的效应,但仅在最高的rhPRG4浓度下。相反,PLC/PRF5细胞完全没有反应(图18)。

[0190] 为了剖析CD44/润滑素轴的分子机制,我们使用了功能丧失方法,通过shRNA慢病毒转导方法沉默HCC细胞中的CD44表达。将对照-shRNA和CD44-shRNA HCC细胞在72小时的增殖测定中,在存在/不存在rhPRG4(浓度在 0 至 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内)并且不含或包含索拉非

尼或瑞格非尼(浓度为2.5 μ M)的情况下进行试验。与对照细胞相比,在CD44沉默的细胞中两种药物抑制细胞增殖的能力显著降低(取决于rhPRG4浓度, $p < 0.05$ 至 $p < 0.001$),证实了HCC细胞需要表达CD44以允许润滑素膜结合和随后体外HCC细胞增殖的增强的、药物诱导的损害(图19A)。这种在暴露于rhPRG4的CD44沉默的细胞中发生的药物有效性的减弱,与暴露于药物的CD44低表达的HCC细胞系PLC/PRF/5和Hep3B对rhPRG4的敏感性降低相符(图18)。

[0191] 由TGF β 刺激的CAF调制培养基通过润滑素分泌来提高索拉非尼和瑞格非尼的有效性:为了进一步证实润滑素的作用,我们在体外重现了类似于更符合生理情况的生物学级联,TGF β 通过所述级联刺激分泌润滑素的CAF,提高了索拉非尼和瑞格非尼两者对HCC细胞的药物有效性(图19B)。将CAF与TGF β 在完全培养基中温育48小时,并在饥饿培养基(无血清)中继续温育48小时(不含TGF β),以允许富集分泌的蛋白质。然后收集所述调制培养基,与同种型或抗润滑素抗体温育,测定蛋白质浓度,并用于激惹HCC细胞,以在存在1.5 μ M索拉非尼和瑞格非尼和/或20 μ g/ml来自于TGF β 刺激的CAF的润滑素耗竭或未耗竭的调制培养基(CM)的情况下增殖。所述来自于TGF β 刺激的CAF的调制培养基与润滑素耗竭的调制培养基相比,显著($p < 0.01$)提高了索拉非尼和瑞格非尼对HCC细胞的有效性(图19B)。这表明CD44/润滑素轴增强索拉非尼和瑞格非尼的药物有效性。

[0192] 讨论

[0193] 到目前为止,癌细胞一直被认为是唯一可靠的治疗靶点,少数几个例外是针对免疫检查点的药物,尽管在临床结果方面的结果通常并不令人满意,正如在HCC的情况下。在这种癌症中,细胞在源自于慢性肝病的含有丰富的ECM蛋白、炎症细胞和CAF的周围组织中生长并穿透所述周围组织。在这个实施例中,我们显示了目前已知存在于关节的软骨部位处的润滑素这种属于PG家族的糖蛋白,在肝脏中表达。此外,我们还在78位随访超过5年的患者组群中证实了它的表达与更长的生存期正相关(REF Villa,GUT)。在实验模型中,我们还证实了润滑素通过与CD44受体结合来抑制HCC细胞粘附和迁移。这有助于理解临床数据。它也与Sarkar等人的证明(PLoS One 2019.doi:10.1371/journal.pone.0219697)相符,即润滑素能够通过结合CD44并因此干扰其促侵袭性下游信号传导来抵消TGF β 诱导的乳腺癌细胞系MDA-MB231的迁移和侵袭的增强。此外,这些作者发现在与润滑素结合后,CD44的表达降低。

[0194] CD44是HCC中的干细胞性标志物,并且据报道它的表达受TGF β 诱导(Fernando等,Int J Cancer 2015.doi:10.1002/ijc.29097)并且一致的是受TGF β 抑制剂抑制(Rani等,Cell Death Dis 2018.doi:10.1038/s41419-018-0384-5),其在多中心临床试验中也被证明在HCC患者中是有效的(Kelley等,Clin Transl Gastroenterol 2019.doi:10.14309/ctg.0000000000000056)。最后,CD44/润滑素轴在体外增强索拉非尼和瑞格非尼对HCC细胞的抗增殖作用。迄今为止,润滑素的功能主要在癌症背景之外为人所知。Nahon等人显示在两种已经对动脉粥样硬化易感的高脂血症小鼠模型即载脂蛋白E敲除(ApoE KO)小鼠和低密度脂蛋白受体敲除(Ldlr KO)小鼠中,润滑素的缺失提高了对动脉粥样硬化的易感性(Nahon等,Atherosclerosis.2018.doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.883)。在人类中,TGF- β 信号传导的表达降低与年龄相关的骨关节炎有关。在有效重演人类骨关节炎的TGF- β 信号传导缺陷的小鼠中,已证明润滑素由于其关节润滑功能而有效预防这种疾病的发作(Chavez等,PLoS One 2019.doi:10.1371/journal.pone.0210601)。

[0195] 人们对润滑素在癌症中的作用越来越感兴趣,特别是鉴于最近的一份证实了润滑素与CD44之间的相互作用的报告。已发现在用白介素-1 β 或肿瘤坏死因子 α 刺激的类风湿性关节炎成纤维细胞样滑膜细胞中,润滑素可以与透明质酸竞争与CD44的结合,然后减弱该受体的支持生长的信号传导功能(Al-Sharif A等,Arthritis Rheumatol 2015.doi:10.1002/art.39087)。

[0196] 新出现的润滑素的抗肿瘤作用可能与它被TGF β 上调的证据明显矛盾,因为据信这种细胞因子在癌症的早期和晚期阶段发挥双重、相反的作用。事实上,迄今为止积累的知识表明TGF β 信号传导起到分子开关的作用,在实体恶性肿瘤例如HCC的初始步骤中具有细胞抑制/促凋亡作用,但在晚期阶段转变成有利于转移的因子(Moreno-Càceres等,Cell Death Dis 2017.doi:10.1038/cddis.2017.469;Fabregat等,FEBS J 2016.doi:10.1111/febs.13665;Arrese等,Curr Protein Pept Sci 2017.doi:10.2174/1389203718666171117112619)。更具体来说,TGF β 信号传导可以影响CD44表达/激活,并且显示依靠CD44的功能来促进癌性侵袭。还已证明,在肺成纤维细胞中,TGF β 通过EGR1介导的AP-1(激活物蛋白-1)激活来上调CD44癌症相关CD44V6亚型的表达(Ghatak等,J Biol Chem 2017.doi:10.1074/jbc.M116.752451)。然而,其他研究清楚地揭示了TGF β 通过诱导肿瘤抑制基因例如LATS1或DNA损伤修复蛋白(ATM、BRCA1和FANCF)的表达来限制HCC细胞的促肿瘤发生潜力的能力(Zhang等,Oncotarget 2017.doi:10.18632/oncotarget.14523;Chen等,Gastroenterology 2018.doi:10.1053/j.gastro.2017.09.007)。

[0197] 本实施例表明,由rhPRG4和索拉非尼或瑞格非尼的组合产生的协同抗增殖效应可能导致显著改善HCC患者的治疗效果。润滑素表达与HCC患者的总体生存期结果的强烈关联表明这种分子可能具有直接或间接的、尚未阐明的肿瘤限制活性。润滑素水平与具有CD44高表达的患者中的预期寿命之间没有正相关性这一发现,可能反映了在CD44受体的表达足够高时,润滑素的抗肿瘤活性未能克服CD44信号传导的促恶性功能。或者,CD44的不同转录变体可能不同程度地参与抵消药物有效性和内源性压力。这些变体中的某些变体可能不能结合润滑素,从而导致CD44下游信号传导不受影响。此外,在CD44的这些对润滑素不敏感的促肿瘤活性与通过可能的、目前未知的受体介导的限制肿瘤的润滑素活性之间,可能存在竞争(参见图19A-B)。

[0198] 总的来说,本实施例提出了一种新的干预框架,其中在CD44高表达的HCC中可以将CD44抑制与rhPRG4给药联用。此外,通过与rhPRG4协同给药,可以极大增强索拉非尼和瑞格非尼的效力。已证实,在除去唾液酸和O-糖基化后,润滑素与CD44结合的效率可以被显著提高(Al-Sharif等,Arthritis Rheumatol 2015.doi:10.1002/art.39087)。因此,通过使用较低浓度的这种处理过的形式,可以将润滑素的潜在有害的脱靶效应降至最低。润滑素外源给药的可能的负面影响尚未被仔细评估。

[0199] 总之,我们认为润滑素具有不仅充当抗肿瘤药剂,而且提高药物例如索拉非尼和瑞格非尼的有效性的潜力。可能通过鉴定新的润滑素偶联因子、可选受体或相互作用配偶体而获得的关于在基质HCC微环境中润滑素合成的分子机制及其功能特点的进一步见解,对于设计更加有效的药理学工具的目的来说可能是有价值的。

序列表

<110> 卢布里斯有限责任公司(LUBRIS LLC)

<120> PRG4治疗癌症的用途

<130> AJ4309PT2105

<150> 62/856,514

<151> 2019-06-03

<150> 63/013,427

<151> 2020-04-21

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1404

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Ala Trp Lys Thr Leu Pro Ile Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Ser Val
1           5           10           15
Phe Val Ile Gln Gln Val Ser Ser Gln Asp Leu Ser Ser Cys Ala Gly
           20           25           30
Arg Cys Gly Glu Gly Tyr Ser Arg Asp Ala Thr Cys Asn Cys Asp Tyr
           35           40           45
Asn Cys Gln His Tyr Met Glu Cys Cys Pro Asp Phe Lys Arg Val Cys
           50           55           60
Thr Ala Glu Leu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu Ser Phe Glu Arg
65           70           75           80
Gly Arg Glu Cys Asp Cys Asp Ala Gln Cys Lys Lys Tyr Asp Lys Cys
           85           90           95
Cys Pro Asp Tyr Glu Ser Phe Cys Ala Glu Val His Asn Pro Thr Ser
           100          105          110
Pro Pro Ser Ser Lys Lys Ala Pro Pro Pro Ser Gly Ala Ser Gln Thr
           115          120          125
Ile Lys Ser Thr Thr Lys Arg Ser Pro Lys Pro Pro Asn Lys Lys Lys
           130          135          140
Thr Lys Lys Val Ile Glu Ser Glu Glu Ile Thr Glu Glu His Ser Val
145          150          155          160
Ser Glu Asn Gln Glu Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
           165          170          175
Ser Thr Ile Arg Lys Ile Lys Ser Ser Lys Asn Ser Ala Ala Asn Arg

```


Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys
 500 505 510
 Glu Pro Ser Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys
 515 520 525
 Ser Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Ser
 530 535 540
 Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ser Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro
 545 550 555 560
 Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Lys Pro
 565 570 575
 Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro
 580 585 590
 Ala Pro Thr Thr Thr Lys Lys Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro
 595 600 605
 Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Thr Ala Pro Thr Thr Pro Lys Lys Leu
 610 615 620
 Thr Pro Thr Thr Pro Glu Lys Leu Ala Pro Thr Thr Pro Glu Lys Pro
 625 630 635 640
 Ala Pro Thr Thr Pro Glu Glu Leu Ala Pro Thr Thr Pro Glu Glu Pro
 645 650 655
 Thr Pro Thr Thr Pro Glu Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Ala Ala
 660 665 670
 Ala Pro Asn Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro
 675 680 685
 Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Thr
 690 695 700
 Ala Pro Thr Thr Pro Lys Gly Thr Ala Pro Thr Thr Leu Lys Glu Pro
 705 710 715 720
 Ala Pro Thr Thr Pro Lys Lys Pro Ala Pro Lys Glu Leu Ala Pro Thr
 725 730 735
 Thr Thr Lys Glu Pro Thr Ser Thr Thr Cys Asp Lys Pro Ala Pro Thr
 740 745 750
 Thr Pro Lys Gly Thr Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr
 755 760 765
 Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Gly Thr Ala Pro Thr
 770 775 780
 Thr Leu Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Lys Pro Ala Pro Lys
 785 790 795 800
 Glu Leu Ala Pro Thr Thr Thr Lys Gly Pro Thr Ser Thr Thr Ser Asp

	805	810	815
Lys Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Thr Ala Pro Thr Thr Pro Lys			
	820	825	830
Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Lys Pro Ala Pro Thr Thr Pro Glu			
	835	840	845
Thr Pro Pro Pro Thr Thr Ser Glu Val Ser Thr Pro Thr Thr Thr Lys			
	850	855	860
Glu Pro Thr Thr Ile His Lys Ser Pro Asp Glu Ser Thr Pro Glu Leu			
865	870	875	880
Ser Ala Glu Pro Thr Pro Lys Ala Leu Glu Asn Ser Pro Lys Glu Pro			
	885	890	895
Gly Val Pro Thr Thr Lys Thr Pro Ala Ala Thr Lys Pro Glu Met Thr			
	900	905	910
Thr Thr Ala Lys Asp Lys Thr Thr Glu Arg Asp Leu Arg Thr Thr Pro			
	915	920	925
Glu Thr Thr Thr Ala Ala Pro Lys Met Thr Lys Glu Thr Ala Thr Thr			
	930	935	940
Thr Glu Lys Thr Thr Glu Ser Lys Ile Thr Ala Thr Thr Thr Gln Val			
945	950	955	960
Thr Ser Thr Thr Thr Gln Asp Thr Thr Pro Phe Lys Ile Thr Thr Leu			
	965	970	975
Lys Thr Thr Thr Leu Ala Pro Lys Val Thr Thr Thr Lys Lys Thr Ile			
	980	985	990
Thr Thr Thr Glu Ile Met Asn Lys Pro Glu Glu Thr Ala Lys Pro Lys			
	995	1000	1005
Asp Arg Ala Thr Asn Ser Lys Ala Thr Thr Pro Lys Pro Gln Lys			
	1010	1015	1020
Pro Thr Lys Ala Pro Lys Lys Pro Thr Ser Thr Lys Lys Pro Lys			
	1025	1030	1035
Thr Met Pro Arg Val Arg Lys Pro Lys Thr Thr Pro Thr Pro Arg			
	1040	1045	1050
Lys Met Thr Ser Thr Met Pro Glu Leu Asn Pro Thr Ser Arg Ile			
	1055	1060	1065
Ala Glu Ala Met Leu Gln Thr Thr Thr Arg Pro Asn Gln Thr Pro			
	1070	1075	1080
Asn Ser Lys Leu Val Glu Val Asn Pro Lys Ser Glu Asp Ala Gly			
	1085	1090	1095
Gly Ala Glu Gly Glu Thr Pro His Met Leu Leu Arg Pro His Val			
	1100	1105	1110

Phe Met Pro Glu Val Thr Pro Asp Met Asp Tyr Leu Pro Arg Val		
1115	1120	1125
Pro Asn Gln Gly Ile Ile Ile Asn Pro Met Leu Ser Asp Glu Thr		
1130	1135	1140
Asn Ile Cys Asn Gly Lys Pro Val Asp Gly Leu Thr Thr Leu Arg		
1145	1150	1155
Asn Gly Thr Leu Val Ala Phe Arg Gly His Tyr Phe Trp Met Leu		
1160	1165	1170
Ser Pro Phe Ser Pro Pro Ser Pro Ala Arg Arg Ile Thr Glu Val		
1175	1180	1185
Trp Gly Ile Pro Ser Pro Ile Asp Thr Val Phe Thr Arg Cys Asn		
1190	1195	1200
Cys Glu Gly Lys Thr Phe Phe Phe Lys Asp Ser Gln Tyr Trp Arg		
1205	1210	1215
Phe Thr Asn Asp Ile Lys Asp Ala Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Phe		
1220	1225	1230
Lys Gly Phe Gly Gly Leu Thr Gly Gln Ile Val Ala Ala Leu Ser		
1235	1240	1245
Thr Ala Lys Tyr Lys Asn Trp Pro Glu Ser Val Tyr Phe Phe Lys		
1250	1255	1260
Arg Gly Gly Ser Ile Gln Gln Tyr Ile Tyr Lys Gln Glu Pro Val		
1265	1270	1275
Gln Lys Cys Pro Gly Arg Arg Pro Ala Leu Asn Tyr Pro Val Tyr		
1280	1285	1290
Gly Glu Thr Thr Gln Val Arg Arg Arg Arg Phe Glu Arg Ala Ile		
1295	1300	1305
Gly Pro Ser Gln Thr His Thr Ile Arg Ile Gln Tyr Ser Pro Ala		
1310	1315	1320
Arg Leu Ala Tyr Gln Asp Lys Gly Val Leu His Asn Glu Val Lys		
1325	1330	1335
Val Ser Ile Leu Trp Arg Gly Leu Pro Asn Val Val Thr Ser Ala		
1340	1345	1350
Ile Ser Leu Pro Asn Ile Arg Lys Pro Asp Gly Tyr Asp Tyr Tyr		
1355	1360	1365
Ala Phe Ser Lys Asp Gln Tyr Tyr Asn Ile Asp Val Pro Ser Arg		
1370	1375	1380
Thr Ala Arg Ala Ile Thr Thr Arg Ser Gly Gln Thr Leu Ser Lys		
1385	1390	1395
Val Trp Tyr Asn Cys Pro		

1400
 <210> 2
 <211> 5041
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 2
 gcggccgcga ctattcggta cctgaaaaca acgatggcat ggaaaacact tcccatttac 60
 ctgttggtgc tgctgtctgt tttcgtgatt cagcaagttt catctcaaga tttatcaagc 120
 tgtgcaggga gatgtgggga agggtattct agagatgcca cctgcaactg tgattataac 180
 tgtcaacact acatggagtg ctgccctgat ttcaagagag tctgcactgc ggagctttcc 240
 tgtaaaggcc gctgctttga gtccttcgag agagggaggg agtgtgactg cgacgcccaa 300
 tgtaagaagt atgacaagtg ctgtcccgat tatgagagtt tctgtgcaga agtgcataat 360
 cccacatcac caccatcttc aaagaaagca cctccacctt caggagcadc tcaaacctac 420
 aatcaacaa ccaaacttc acccaacca ccaacaaga agaagactaa gaaagttata 480
 gaatcagagg aaataacaga agaacattct gtttctgaaa atcaagagtc ctctctctcc 540
 tctctctctt cctctcttc ttcaacaatt tggaaaatca agtcttccaa aaattcagct 600
 gctaatagag aattacagaa gaaactcaaa gtaaaagata acaagaagaa cagaactaaa 660
 aagaaaccta ccccaaac accagttgta gatgaagctg gaagtggatt ggacaatggt 720
 gacttcaagg tcacaactcc tgacacgtct accaccaac acaataaagt cagcacatct 780
 cccaagatca caacagcaaa accaataaat cccagacca gtcttccacc taattctgat 840
 acatctaaag agacgtcttt gacagtgaat aaagagacaa cagttgaaac taaagaaact 900
 actacaacaa ataaacagac ttcaactgat ggaaaagaga agactacttc cgctaaagag 960
 acacaaagta tagagaaaac atctgctaaa gatttagcac ccacatctaa agtgcctggct 1020
 aaacctacac ccaaagctga aactacaacc aaaggcctg ctctcaccac tccaaggag 1080
 cccacgcca ccaactccaa ggagcctgca tctaccacac ccaagagcc cacacctacc 1140
 accatcaagt ctgcaccac caccccaag gagcctgac ccaccaccac caagtctgca 1200
 cccaccactc ccaaggagcc tgcaccacc accaccaagg agcctgcacc caccactccc 1260
 aaggagcctg caccaccac caccaaggag cctgcacca ccaccacaa gtctgcacc 1320
 accactcca aggagcctgc acccaccac ccaagaagc ctgccccaac taccccaag 1380
 gagcctgac ccaccactcc caaggagcct acaccacca ctccaagga gcctgcacc 1440
 accaccaagg agcctgcacc caccactccc aaagagcctg caccactgc cccaagaag 1500
 cctgccccaa ctacccccaa ggagcctgca cccaccactc ccaaggagcc tgcaccacc 1560
 accaccaagg agccttcacc caccactccc aaggagcctg caccaccac caccaagtct 1620
 gcaccacca ctaccaagga gctgcacc accactacca agtctgcacc caccactccc 1680
 aaggagcctt caccaccac caccaaggag cctgcacca ccaactccaa ggagcctgca 1740
 cccaccacc ccaagaagcc tgccccaaact accccaag agcctgcacc caccactccc 1800
 aaggaacctg caccaccac caccaagaag cctgcacca ccgctccaa agagcctgcc 1860
 ccaactacc ccaaggagac tgcaccacc accccaaga agctcacgcc caccacccc 1920
 gagaagctcg caccaccac ccctgagaag cccgcacca ccaccctga ggagctcgca 1980

cccaccacc ctgaggagcc cacaccacc acccctgagg agcctgctcc caccactccc 2040
aaggcagcgg ctccaacac ccctaaggag cctgctccaa ctaccctaa ggagcctgct 2100
ccaactacc ctaaggagcc tgctccaact acccctaagg agactgctcc aactaccctt 2160
aaagggactg ctccaactac cctcaaggaa cctgcacca ctactcccaa gaagcctgcc 2220
cccaaggagc ttgcaccac caccaccaag gagcccat ccaccacctc tgacaagccc 2280
gctccaacta cccctaagg gactgctcca actaccctta aggagcctgc tccaactacc 2340
cctaaggagc ctgctccaac tacccttaag gggactgctc caactaccct caaggaacct 2400
gcaccacta ctccaagaa gctgcccc aaggagcttg caccaccac caccaagggg 2460
cccacatcca ccaccttga caagcctgct ccaactacac ctaaggagac tgctccaact 2520
acccccaagg agcctgcacc cactacccc aagaagcctg ctccaactac tctgagaca 2580
cctctccaa ccacttcaga ggtcttact ccaactacca ccaaggagcc taccactatc 2640
cacaaaagcc ctgatgaatc aactcctgag ctttctgag aaccacacc aaaagctctt 2700
gaaaacagtc ccaaggaacc tgggtacct acaactaaga ctctgcagc gactaaacct 2760
gaaatgacta caacagctaa agacaagaca acagaaagag acttacgtac tacacctgaa 2820
actacaactg ctgcacctaa gatgacaaa gagacagcaa ctacaacaga aaaaactacc 2880
gaatcaaaa taacagctac aaccacaca gtaacatcta ccacaactca agataccaca 2940
ccattcaaaa ttactactct taaaacaact actcttgac ccaaagtaac tacaacaaa 3000
aagacaatta ctaccactga gattatgac aaacctgaag aacagctaa accaaaagac 3060
agagctacta attctaaagc gacaactcct aaacctcaa agccaaccaa agcaccctaa 3120
aaaccactt ctacaaaaa gccaaaaaca atgcctagag tgagaaaacc aaagacgaca 3180
ccaactccc gcaagatgac atcaacaatg ccagaattga accctacctc aagaatagca 3240
gaagccatgc tcaaaccac caccagacct aaccaactc caactcaa actagttgaa 3300
gtaaatcaa agagtgaaga tgcaggtggt gctgaaggag aacacctca tatgcttctc 3360
aggcccatg tgttcatgcc tgaagtact cccgacatgg attacttacc gagagtacc 3420
aatcaaggca ttatcatcaa tccatgctt tccgatgaga ccaatatatg caatggtgaa 3480
ccagtagatg gactgactac tttgcgcaat gggacattag ttgcattccg aggtcattat 3540
ttctggatgc taagtccatt cagtccacca tctccagctc gcagaattac tgaagtttg 3600
ggtattcctt ccccatgta tactgtttt actaggtgca actgtgaagg aaaaactttc 3660
ttctttaagg attctcagta ctggcgttt accaatgata taaaagatgc agggtagccc 3720
aaaccaattt tcaaaggatt tggaggacta actggacaaa tagtggcagc gctttcaaca 3780
gctaaatata agaactggcc tgaatctgtg tttttttca agagaggtgg cagcattcag 3840
cagtatatat ataaacagga acctgtacag aagtgcctg gaagaaggcc tgctctaat 3900
tatccagtgt atggagaaat gacacaggtt aggagacgtc gctttgaacg tgctatagga 3960
ccttctcaa cacacacat cagaattcaa tattcacctg ccagactggc ttatcaagac 4020
aaaggtgtcc ttcataatga agttaaagt agtatactgt ggagaggact tccaatgtg 4080
gttacctcag ctatatcact gcccaacatc agaaaacctg acggctatga ttactatgcc 4140
ttttctaaag atcaatacta taacattgat gtgcctagta gaacagcaag agcaattact 4200
actcgttctg ggcagacct atccaaagtc tggtaacaact gtccttagac tgatgagcaa 4260
aggaggagtc aactaatgaa gaaatgaata ataaatttg aactgaaaa acattttatt 4320

aataaagaat attgacatga gtataccagt ttatatataa aaatgttttt aaacttgaca 4380
atcattacac taaaacagat ttgataatct tattcacagt tgttattggt tacagacat 4440
ttaattaata tttcctctgt ttattcctcc tctccctccc attgcatggc tcacacctgt 4500
aaaagaaaaa agaatcaaat tgaatatatc ttttaagaat tcaaaactag tgtattcact 4560
taccctagtt cattataaaa aatatctagg cattgtggat ataaaactgt tgggtattct 4620
acaacttcaa tggaaattat tacaagcaga ttaatccctc tttttgtgac acaagtacaa 4680
tctaaaagtt atattggaaa acatggaaat attaaaattt tacactttta ctagctaaaa 4740
cataatcaca aagctttatc gtgttgata aaaaaattaa caatataatg gcaataggta 4800
gagatacaac aaatgaatat aacactataa cacttcatat tttccaaatc ttaatttgga 4860
tttaaggaag aaatcaataa atataaaata taagcacata tttattatat atctaaggta 4920
tacaaatctg tctacatgaa gtttacagat tggtaaatac cacctgctca acatgtaatt 4980
atttaataaa actttggaac attaaaaaaa taaattggag gcttaaaaaa aaaaaaaaaa 5040

a 5041

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr

1

5

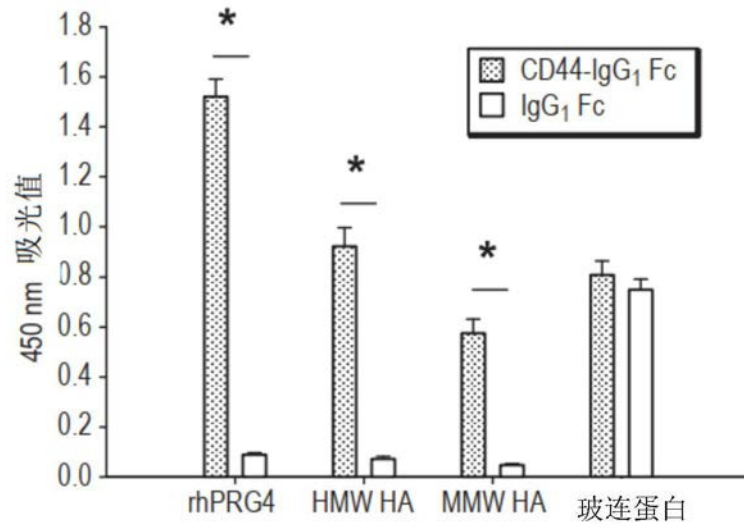


图1A

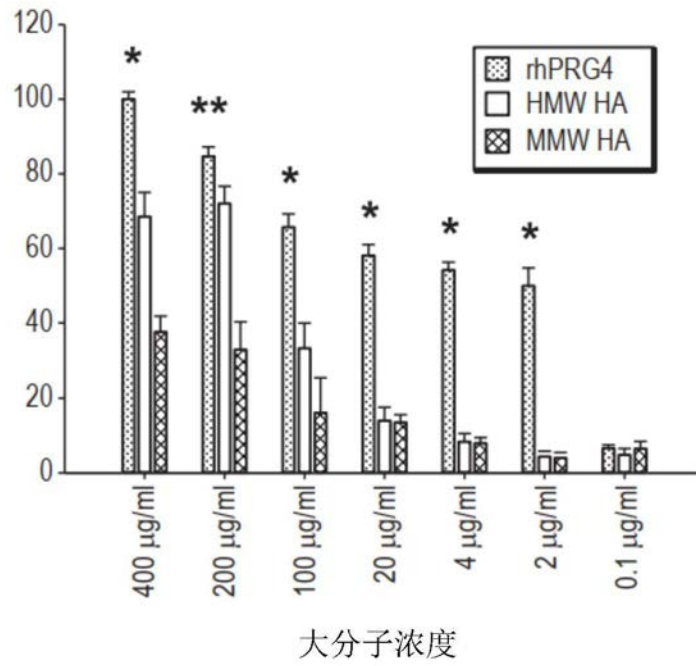


图1B

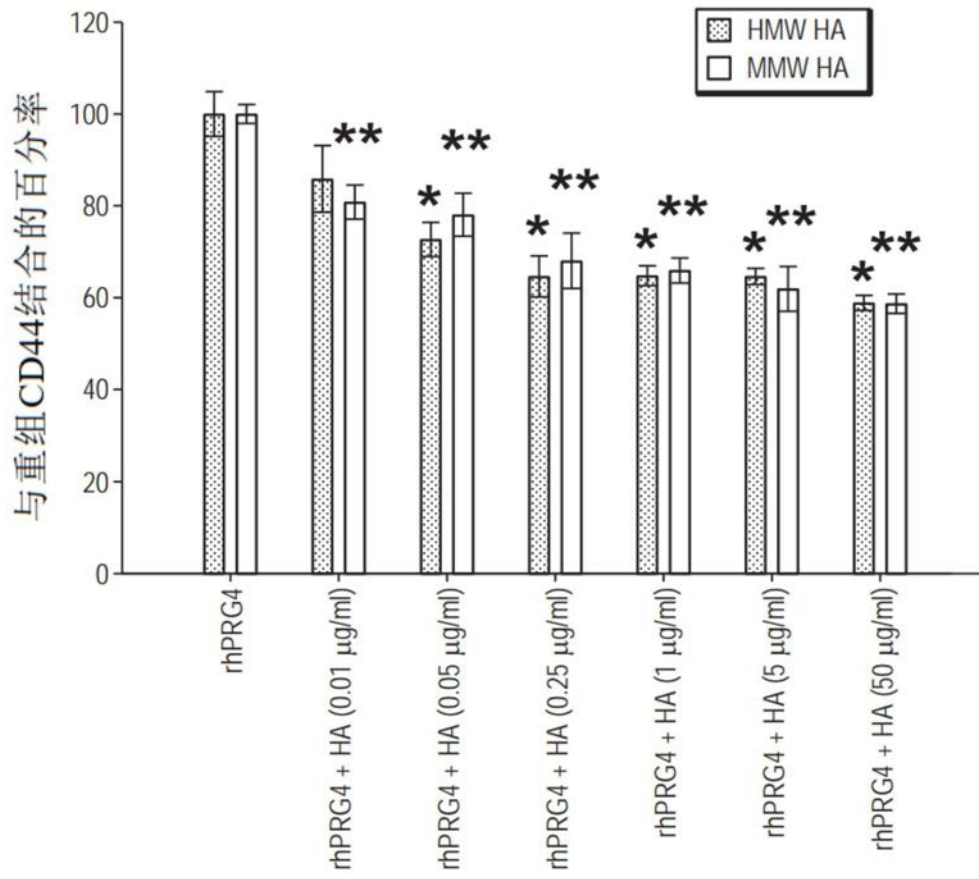


图1C

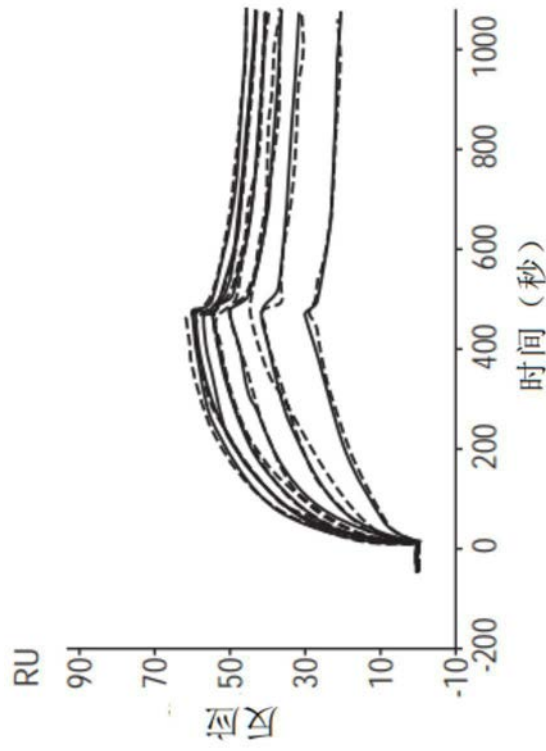


图2A

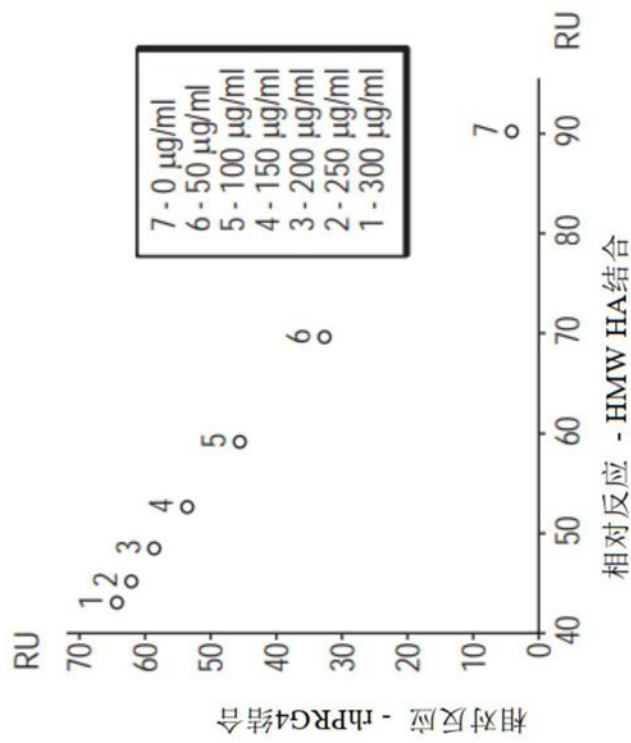


图2B

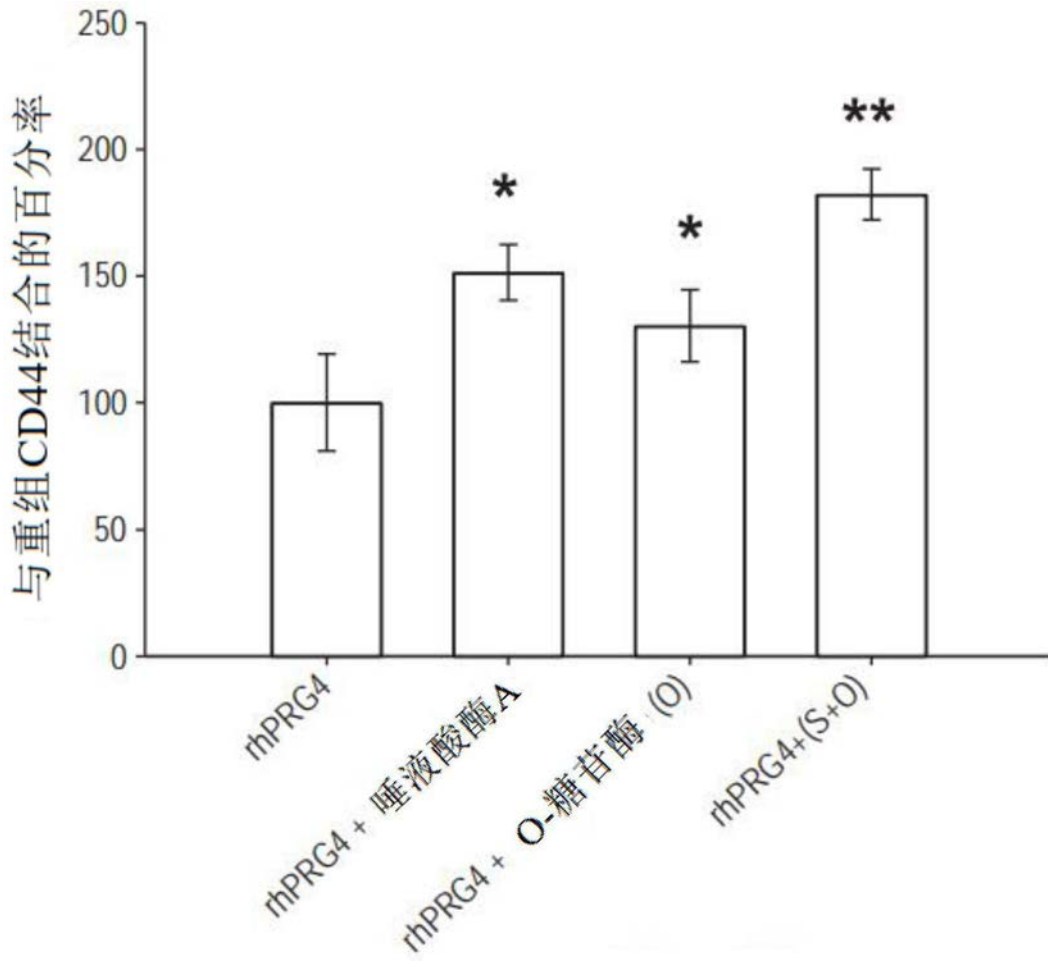


图3A

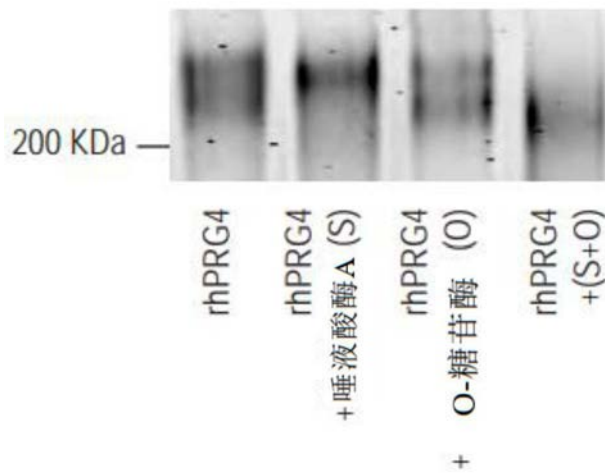


图3B

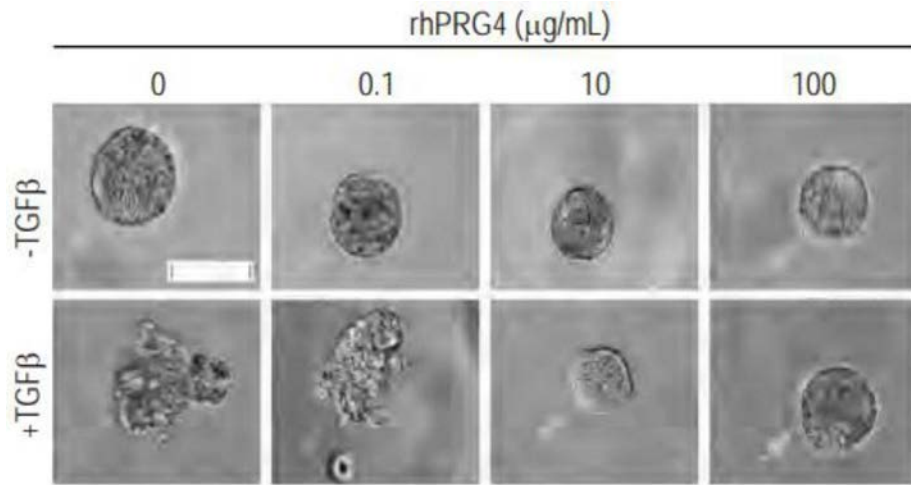


图4A

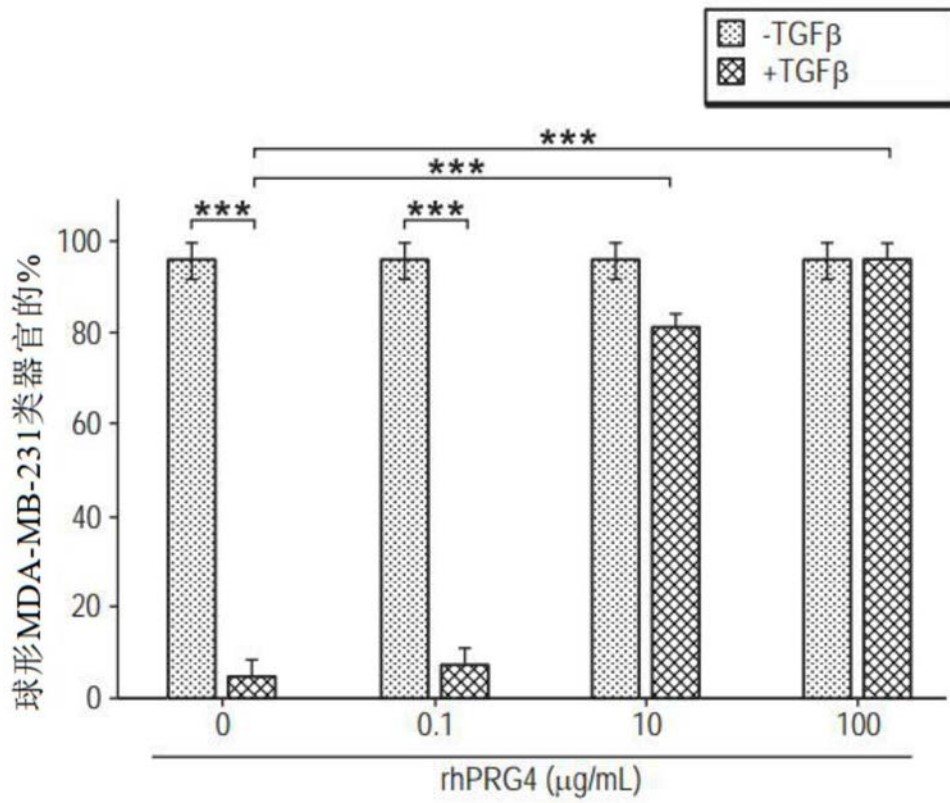


图4B

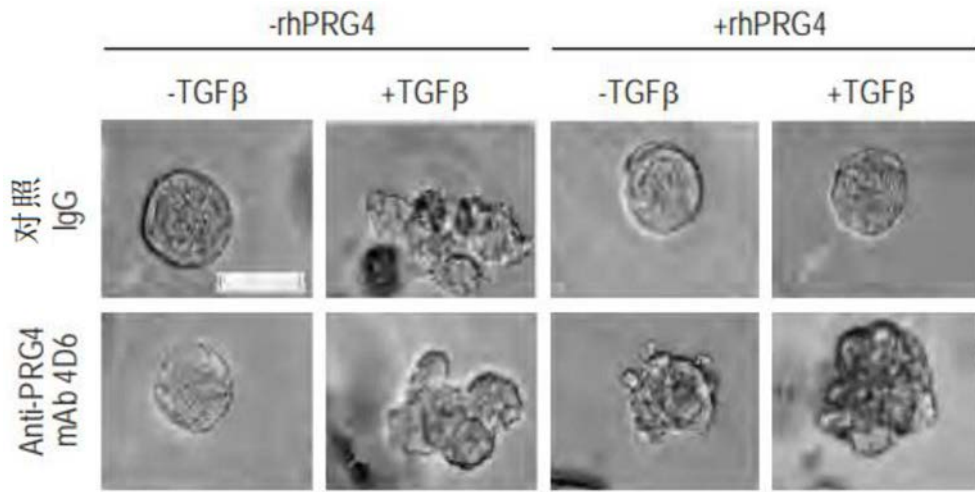


图4C

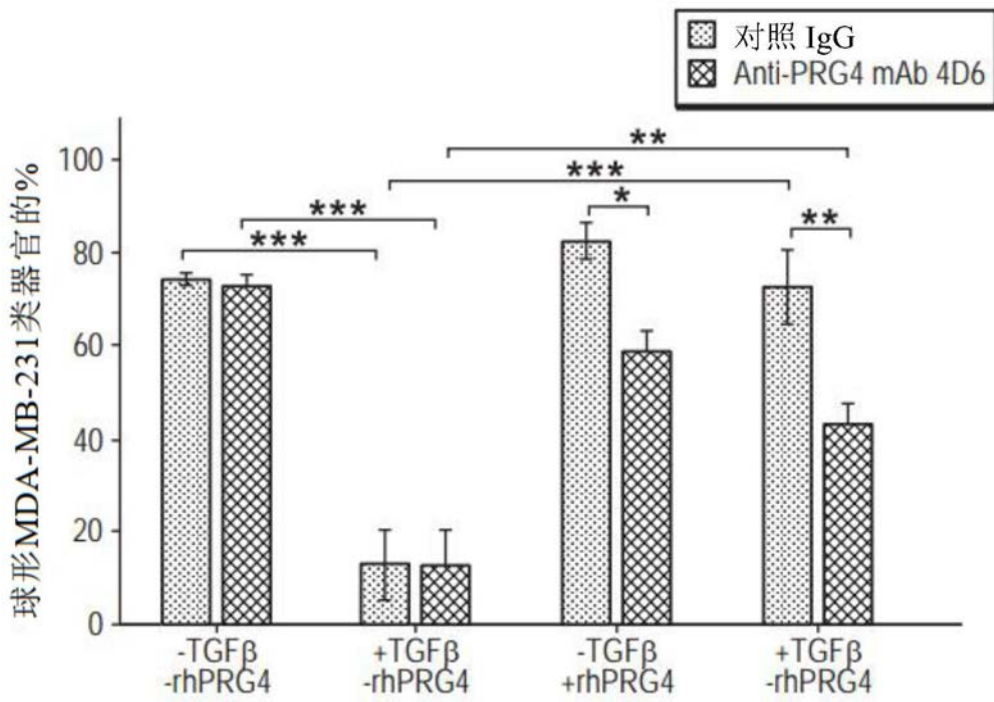


图4D

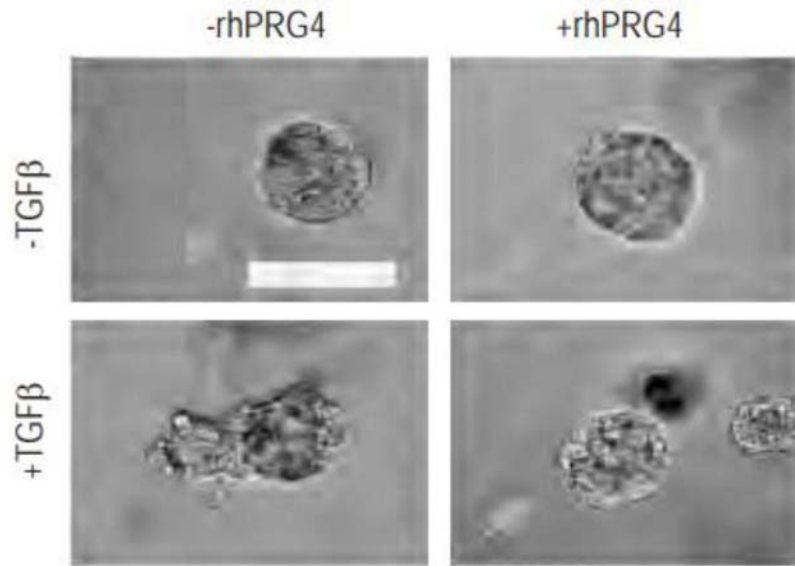


图4E

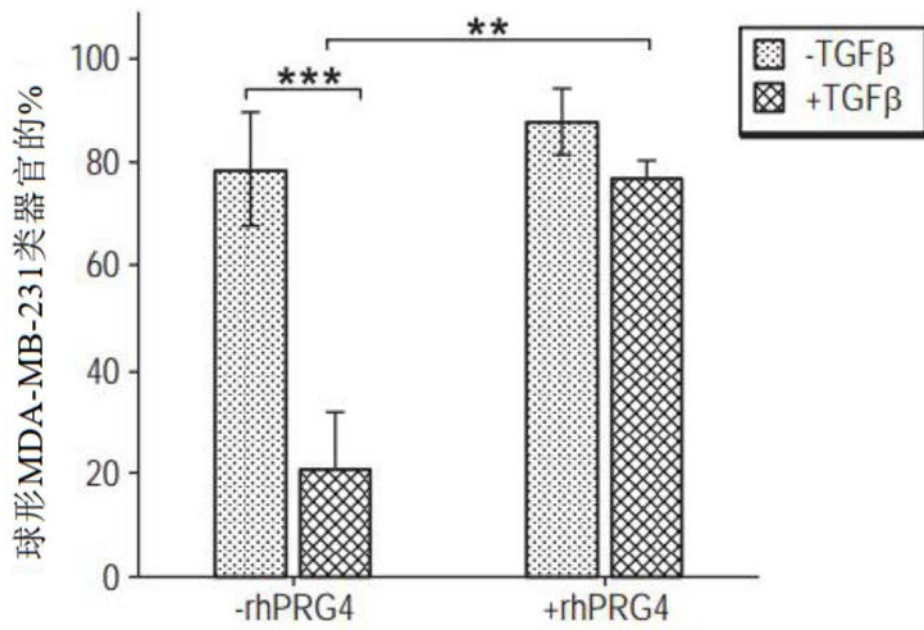


图4F

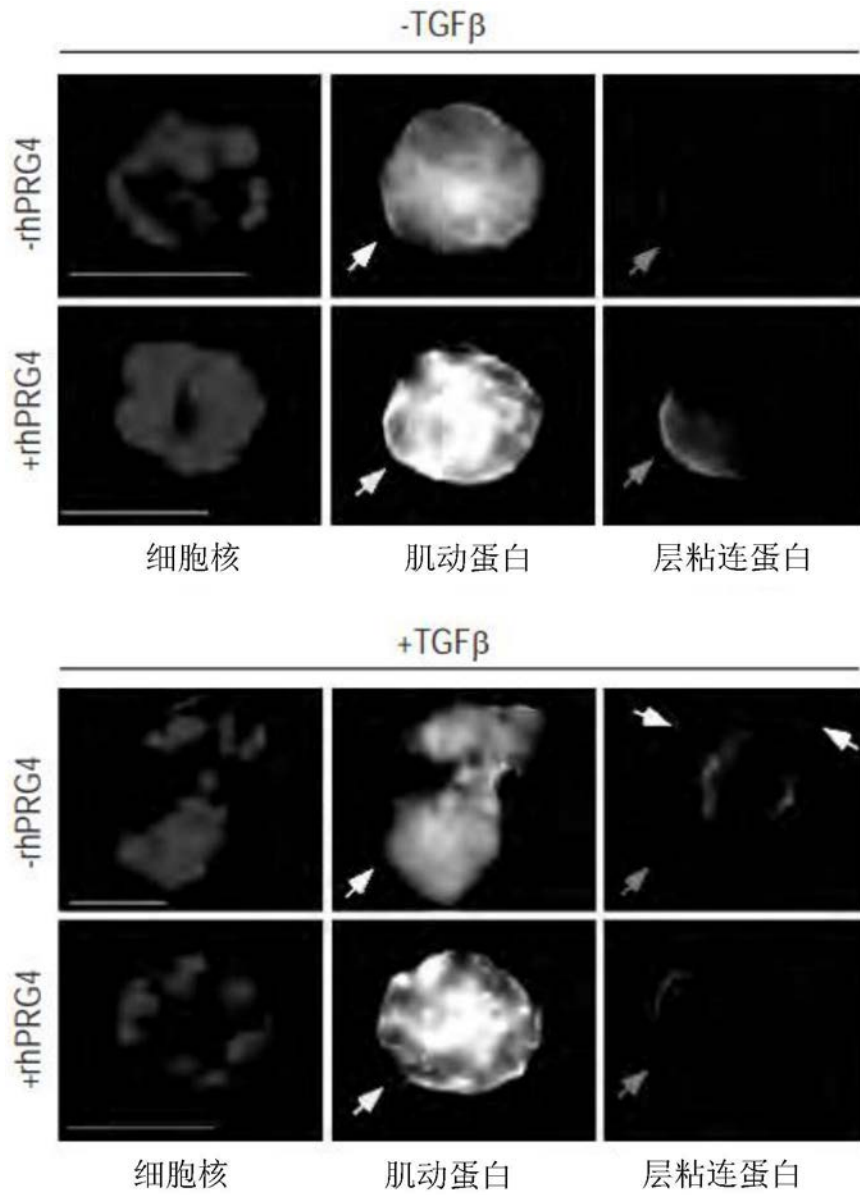


图4G

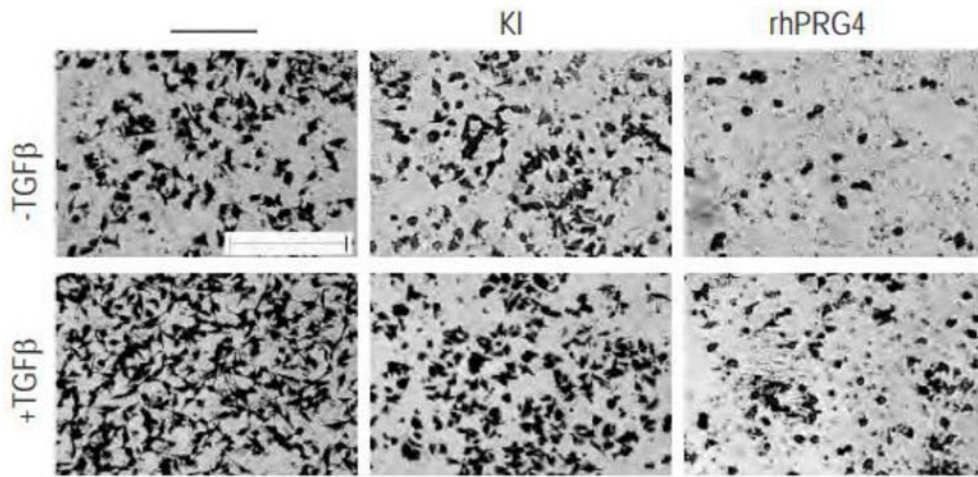


图5A

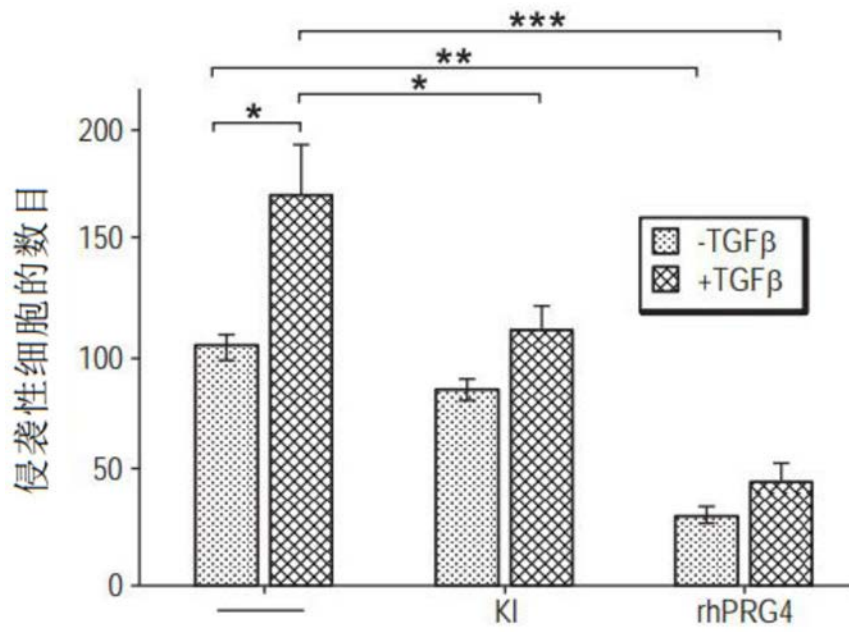


图5B

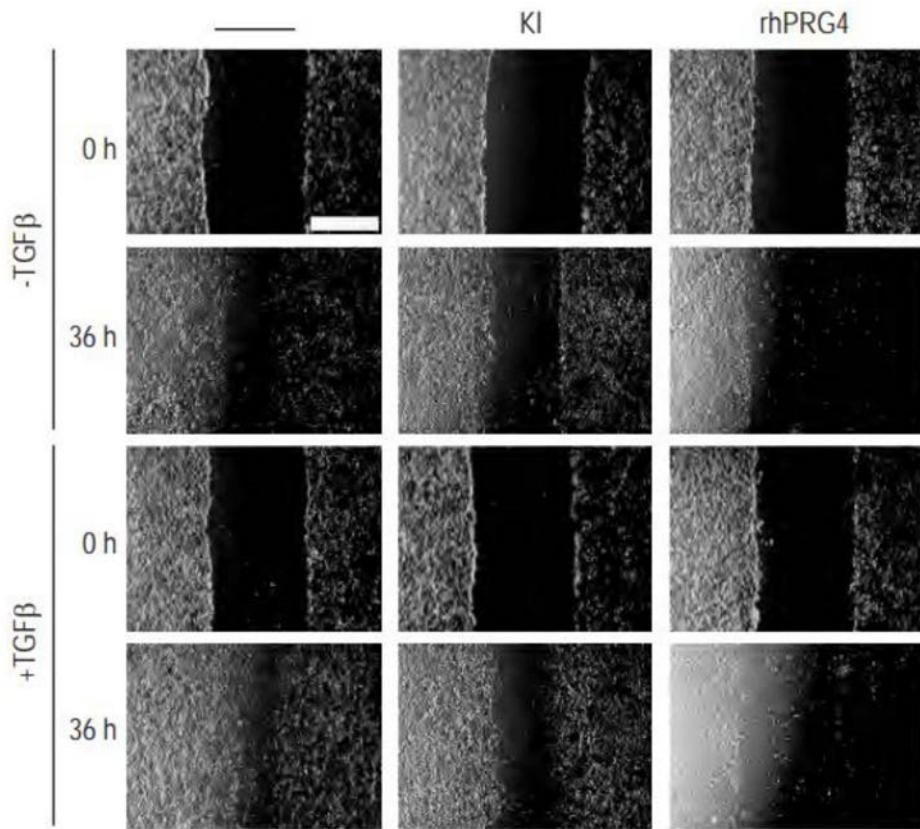


图5C

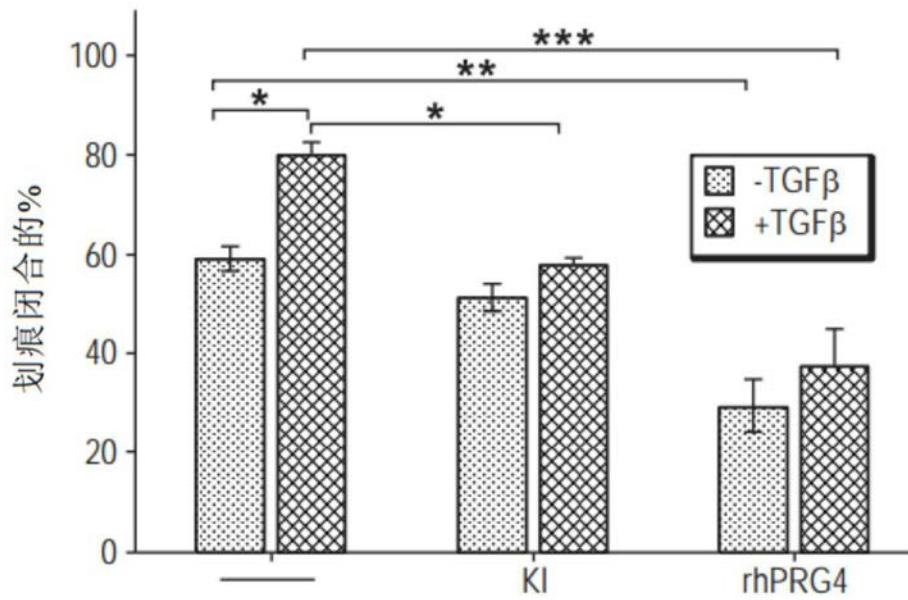


图5D

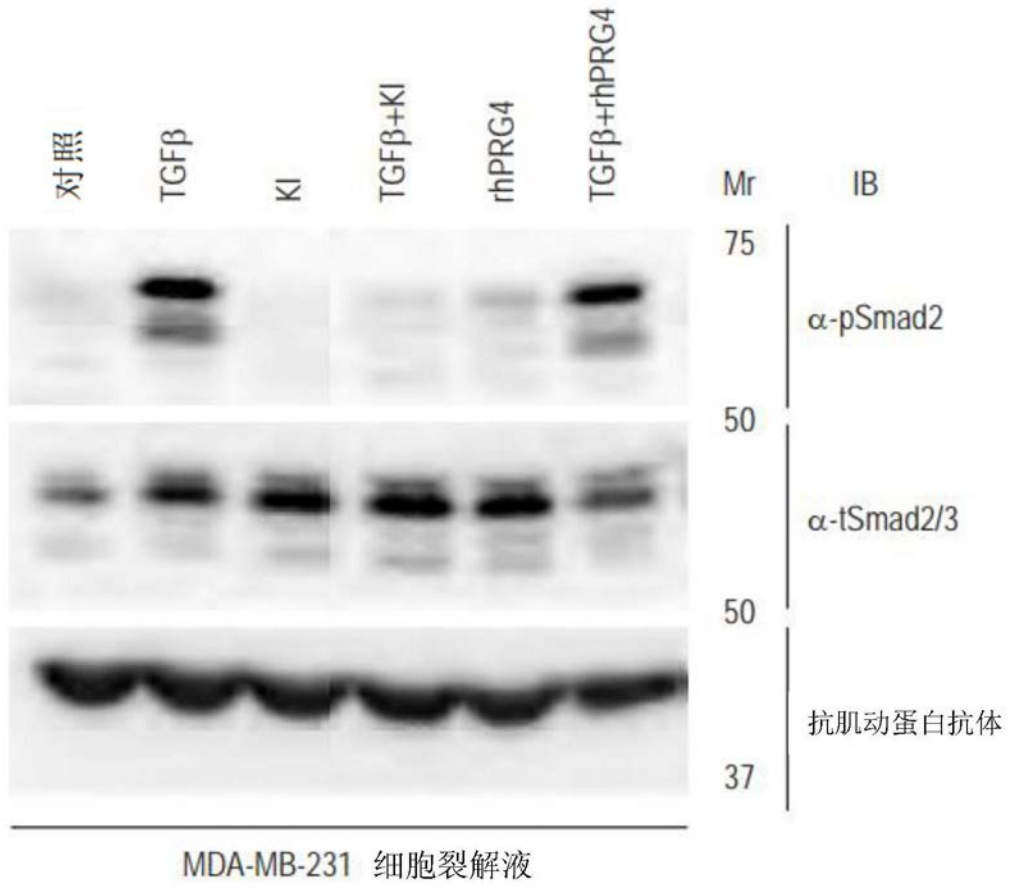


图6A

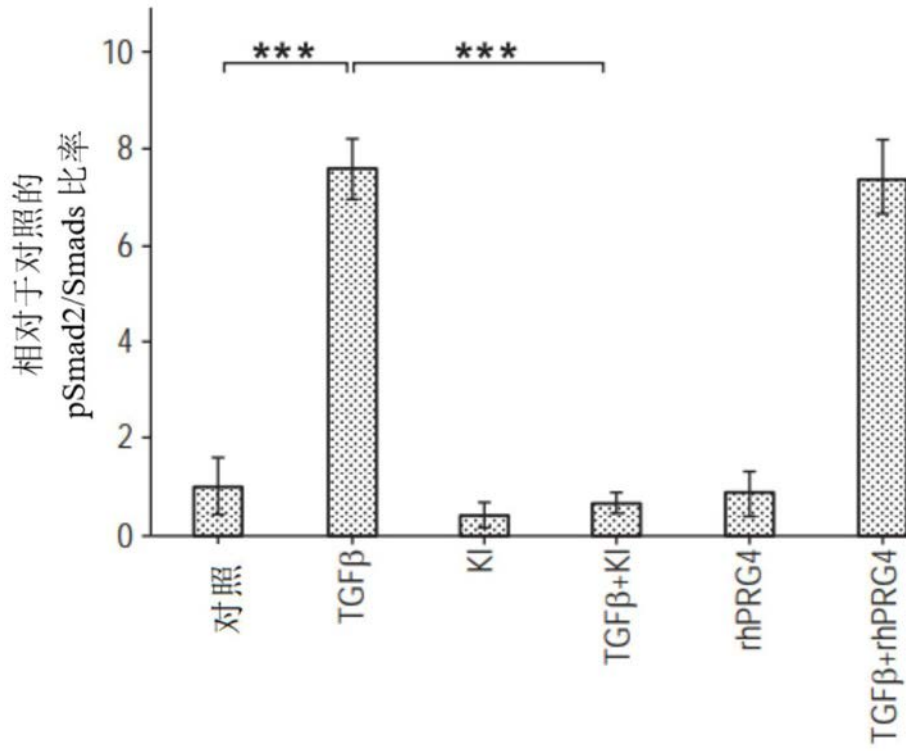


图6B

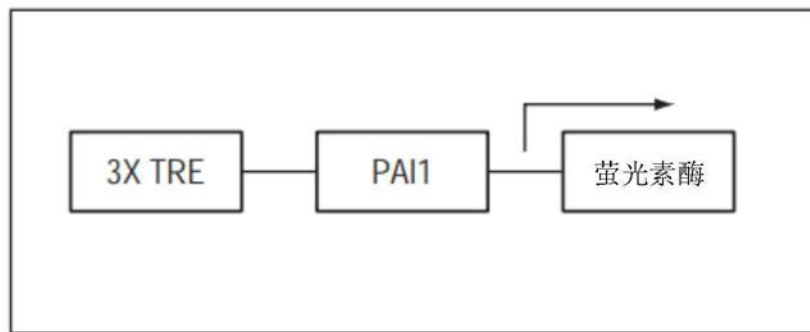


图6C

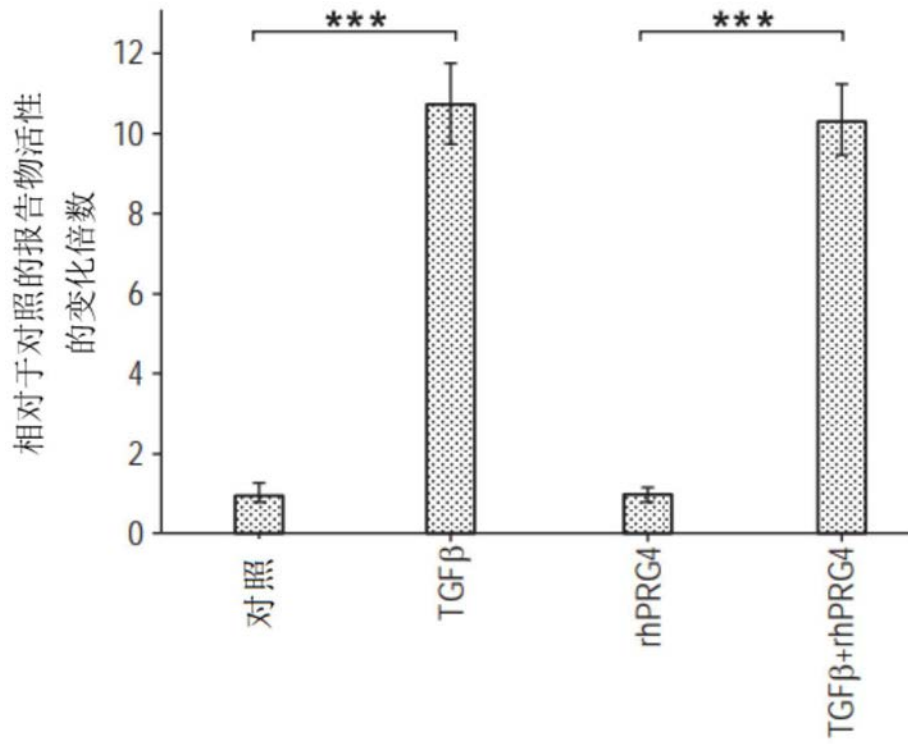


图6D

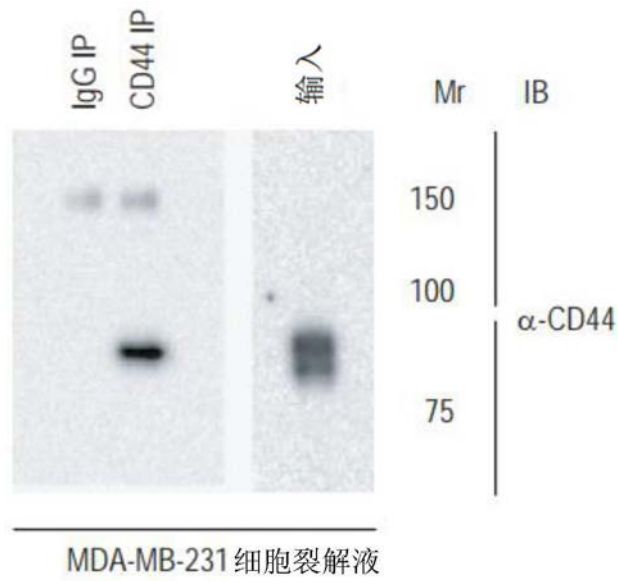


图7A

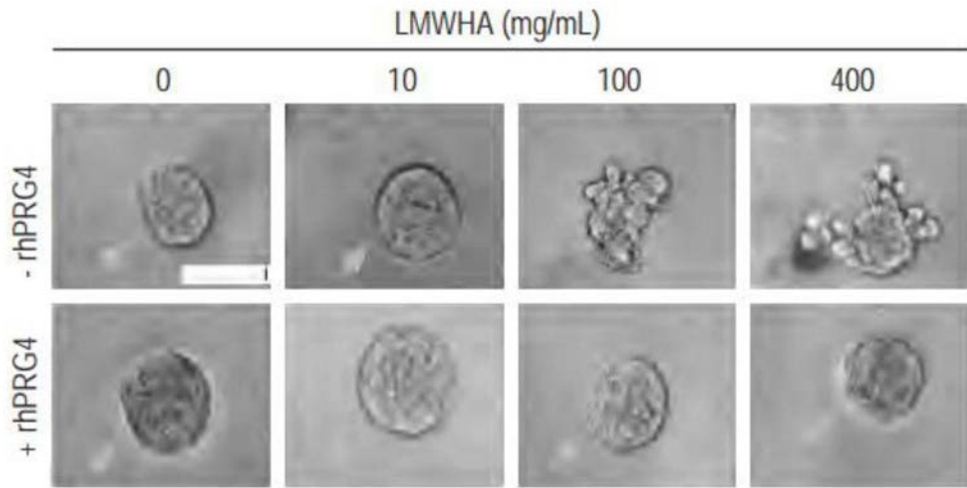


图7B

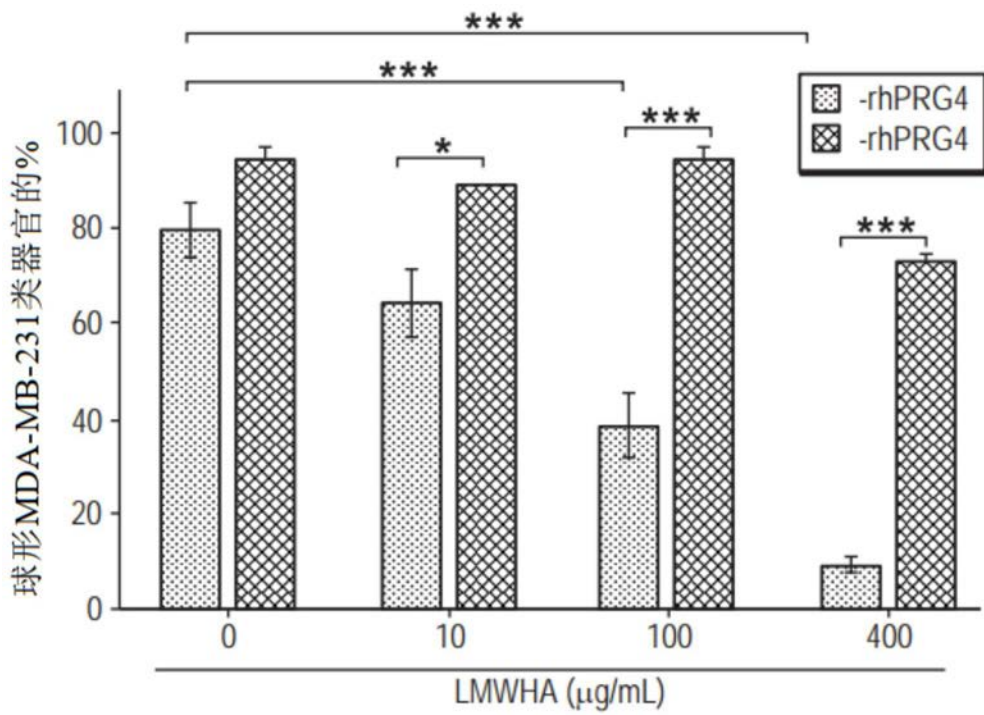


图7C

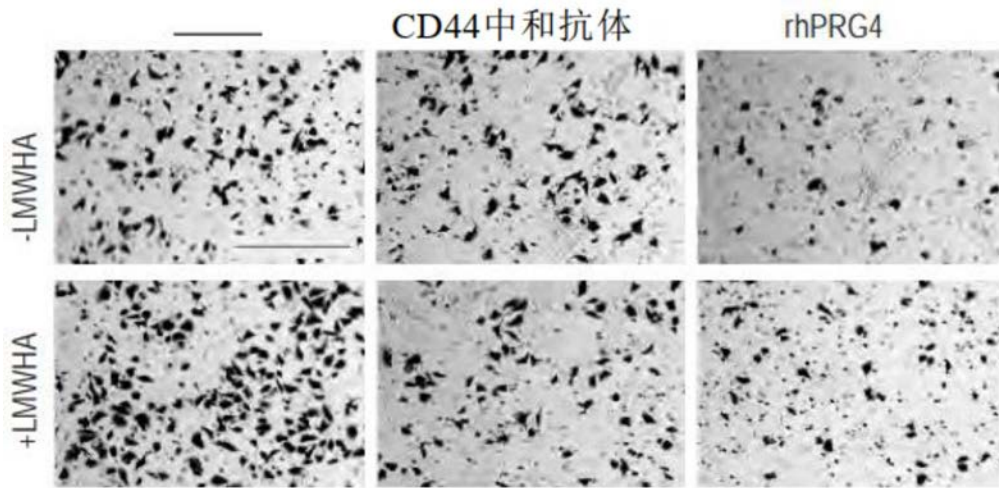


图7D

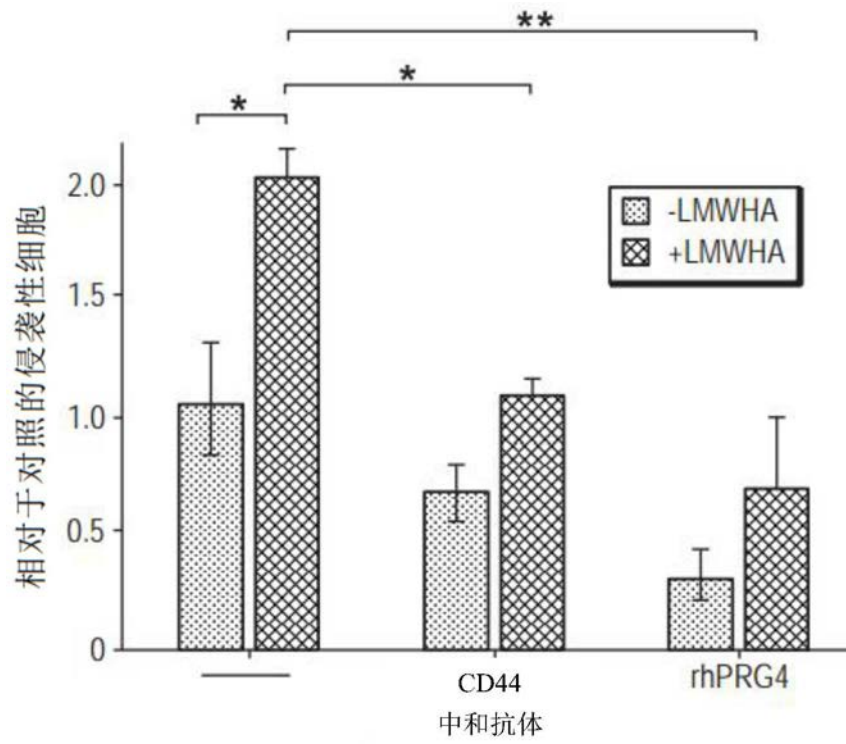


图7E

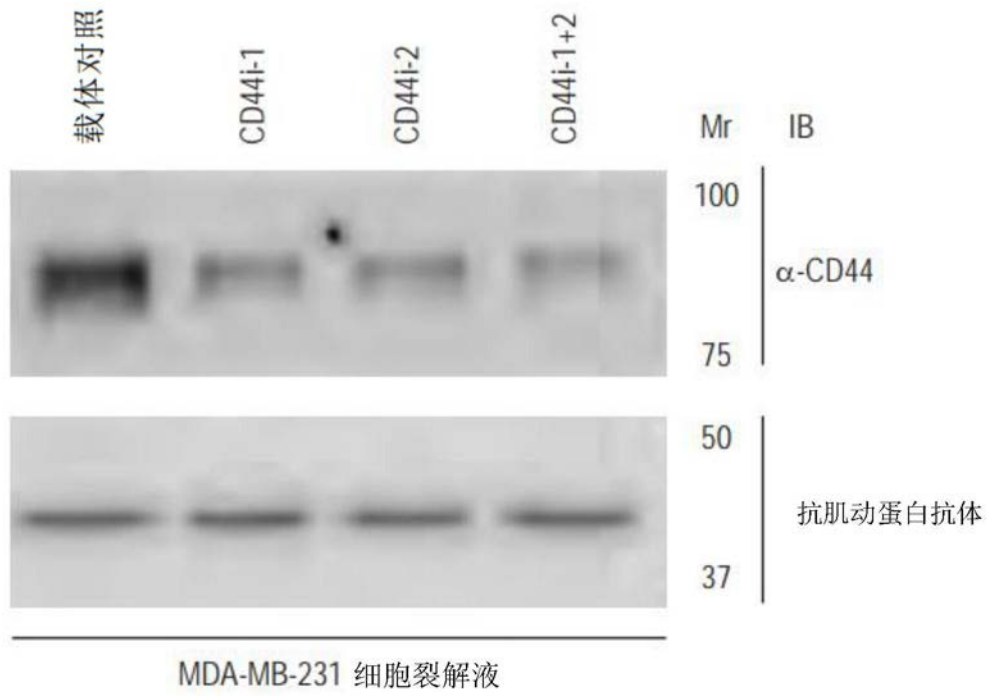


图8A

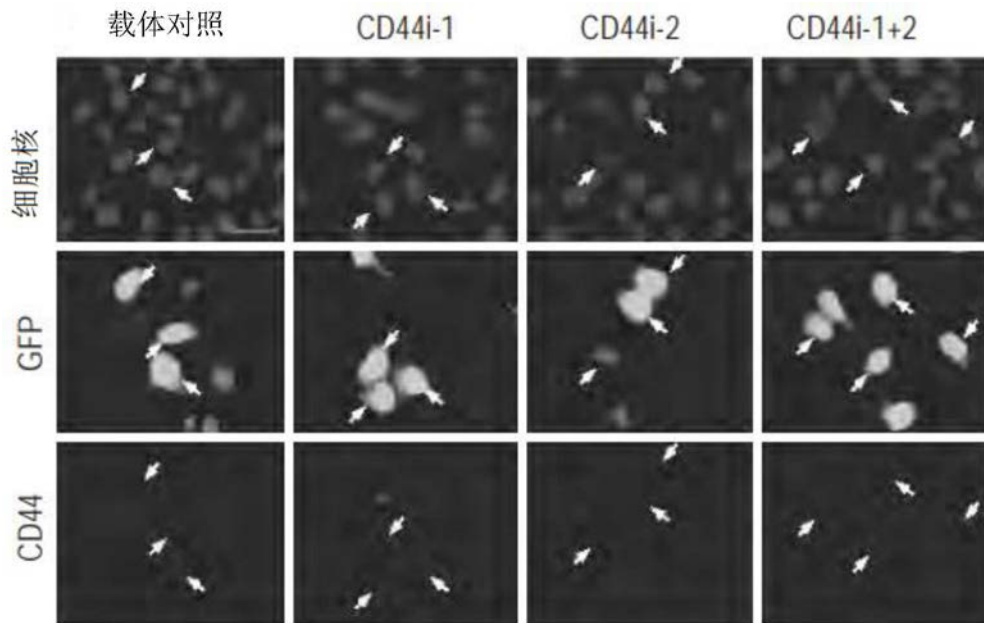


图8B

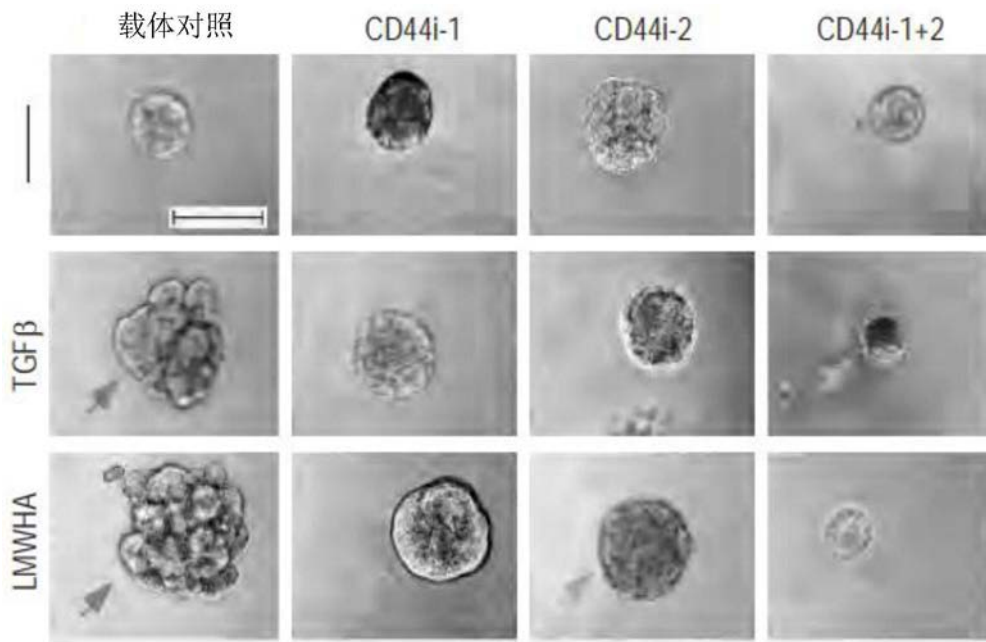


图8C

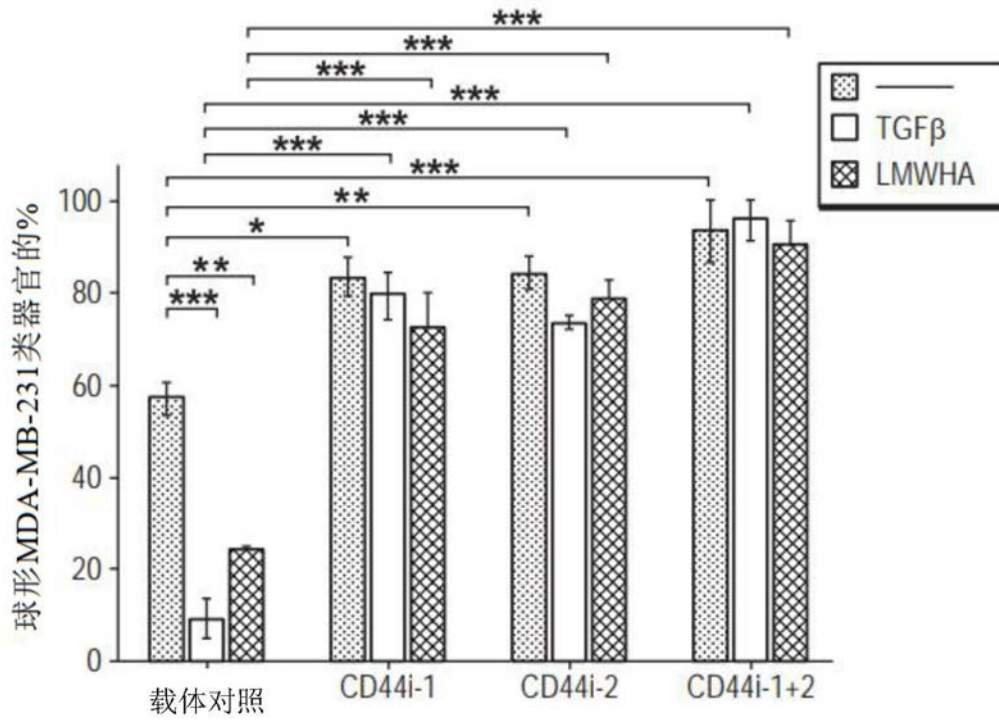


图8D

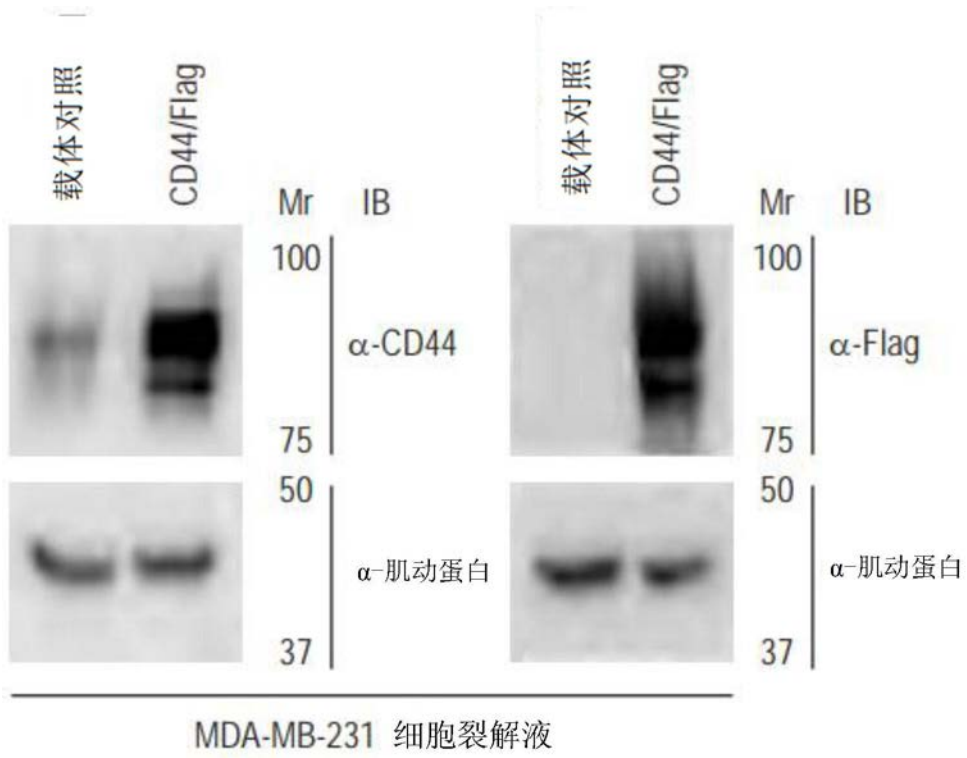


图8E

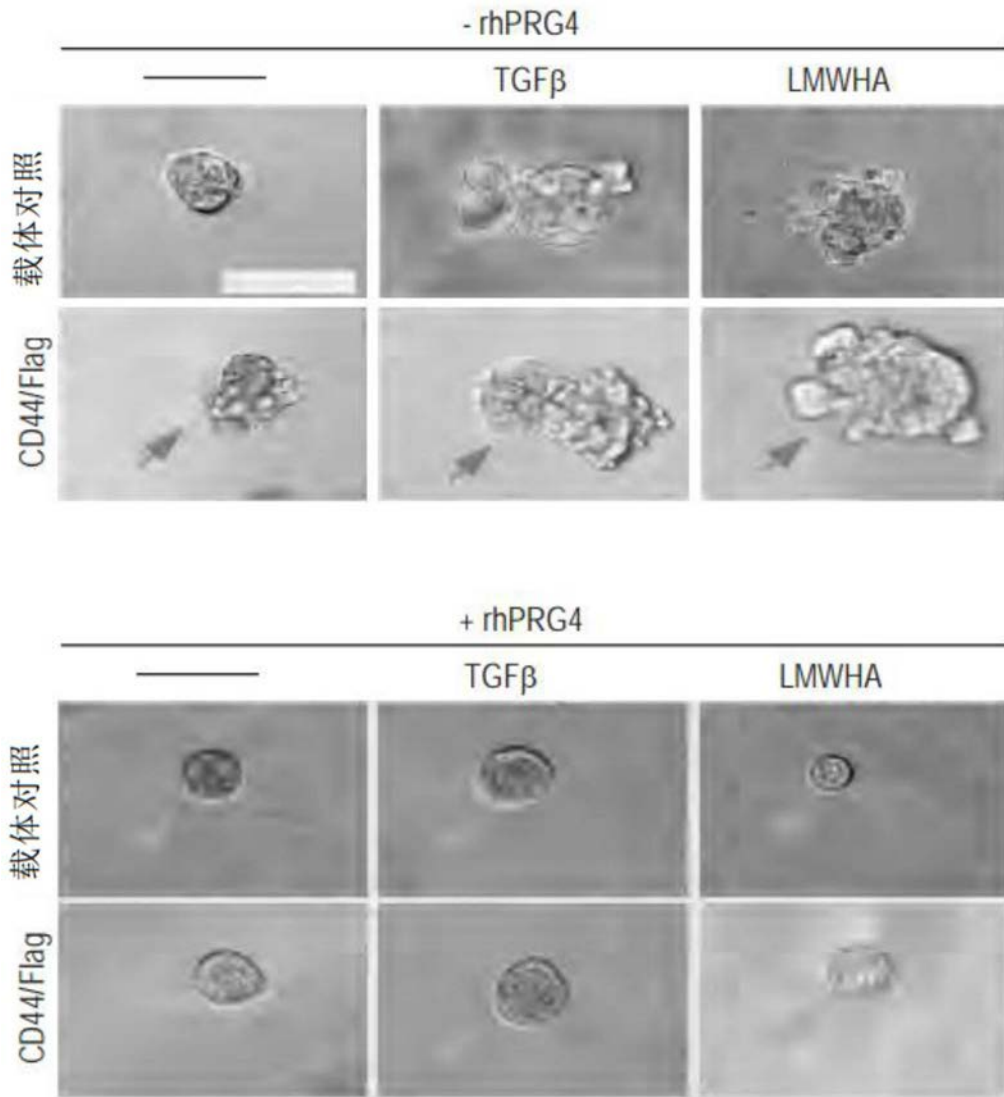


图8F

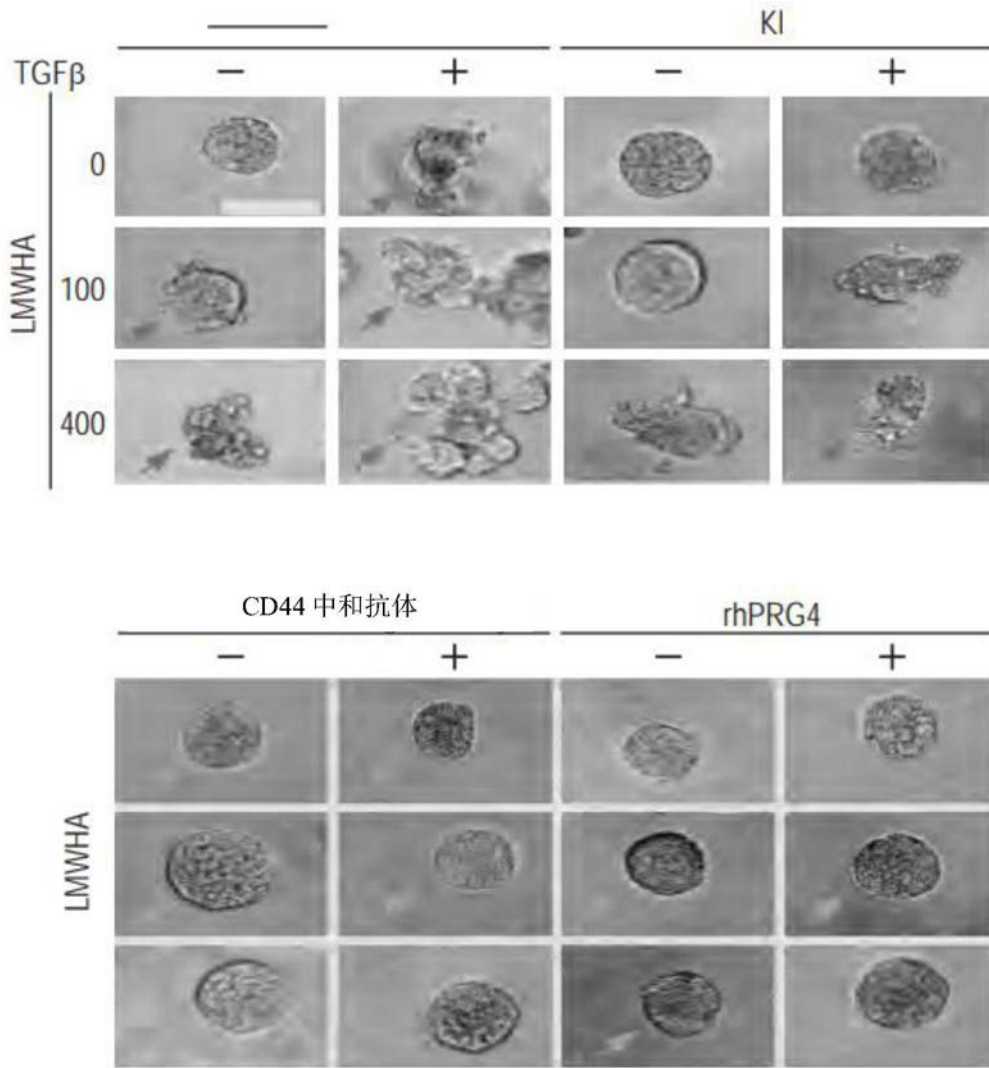


图9A

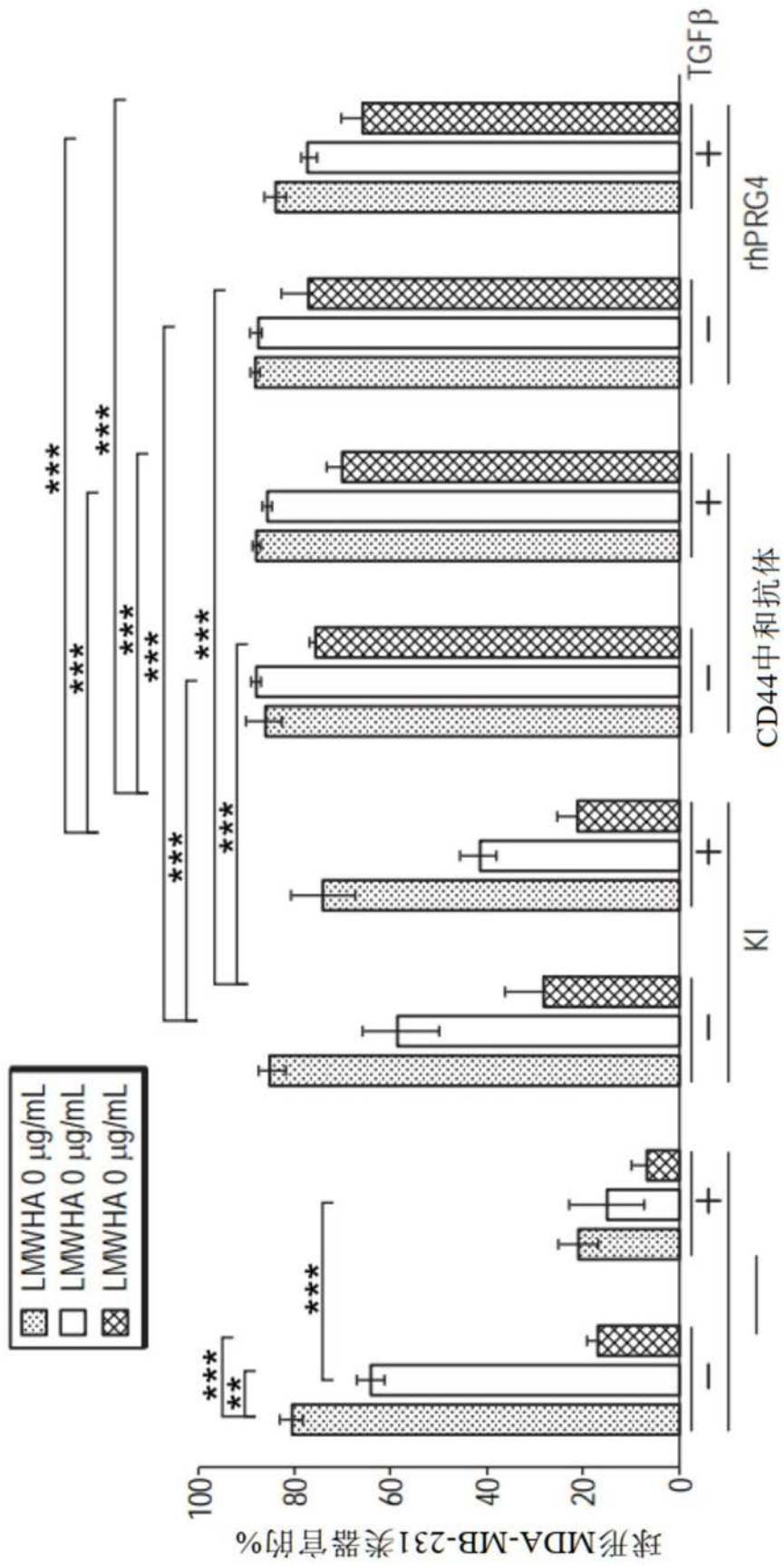


图9B

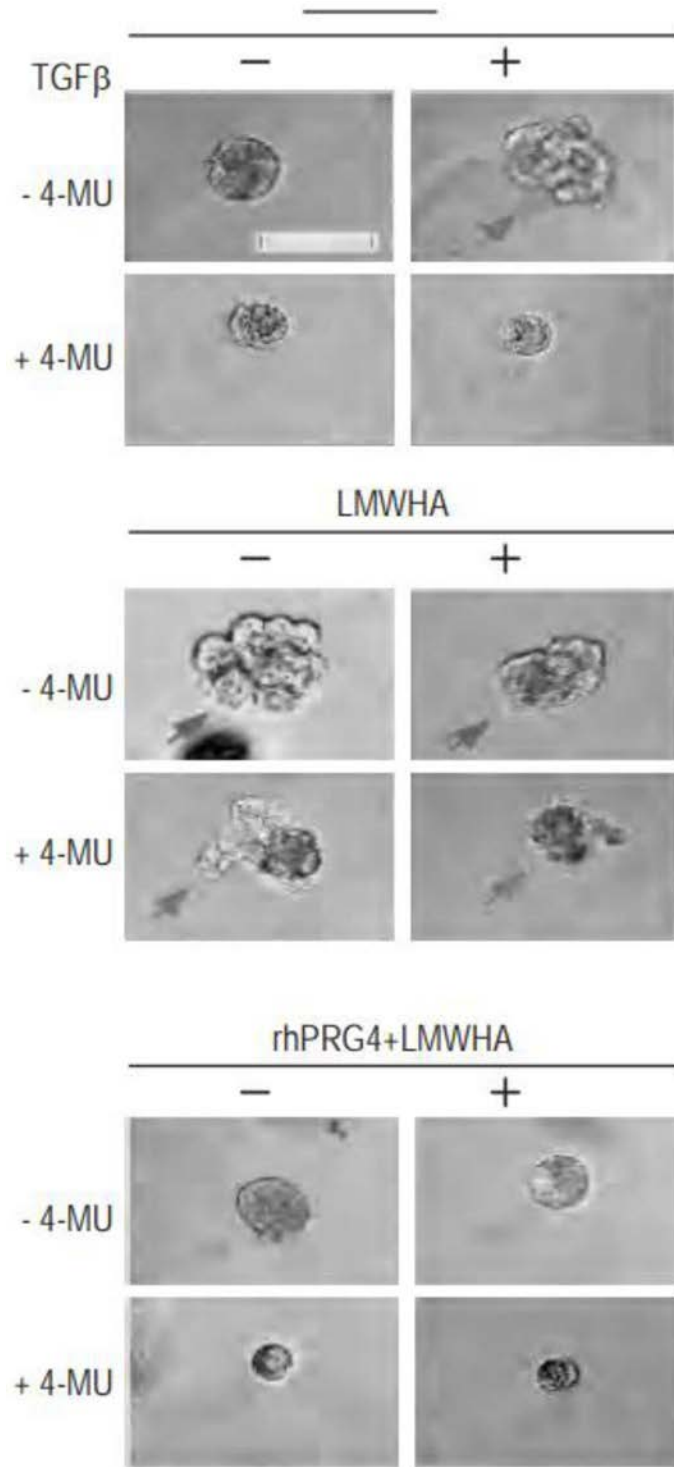


图9C

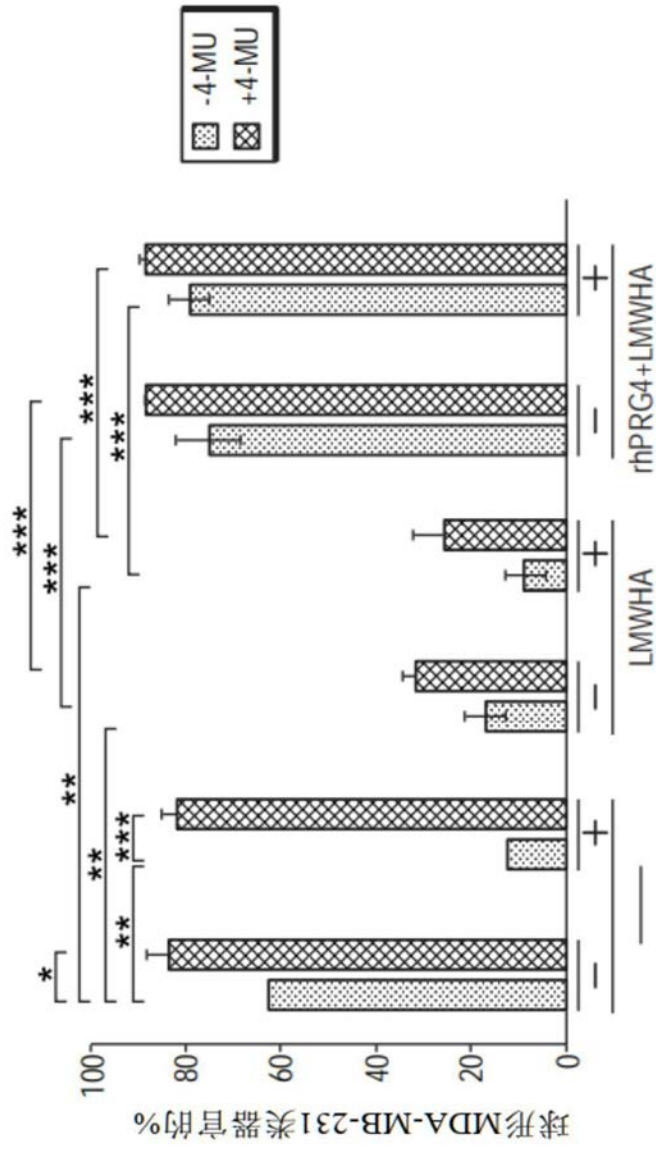


图9D

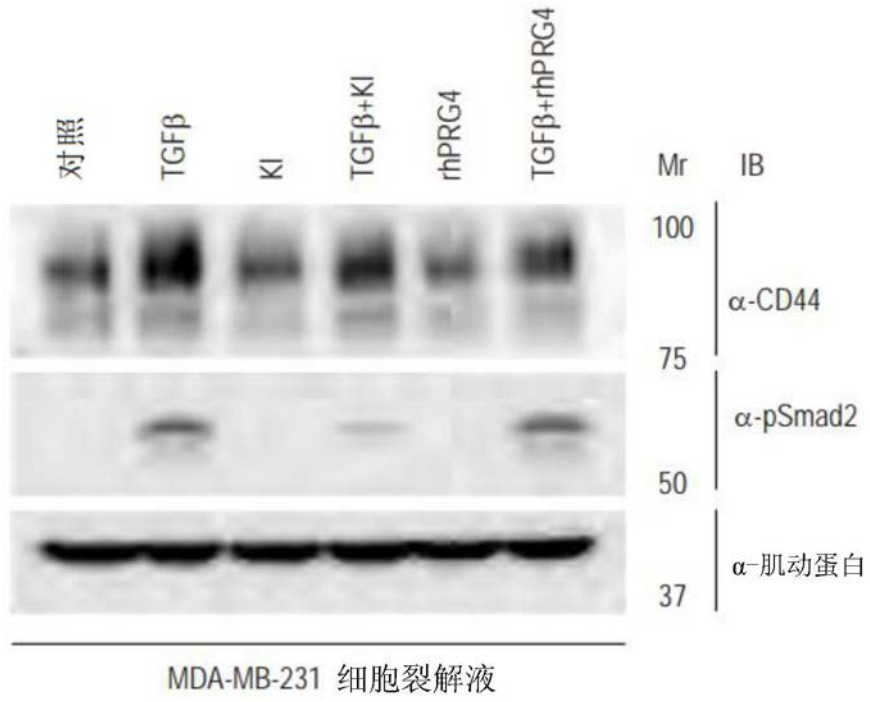


图10A

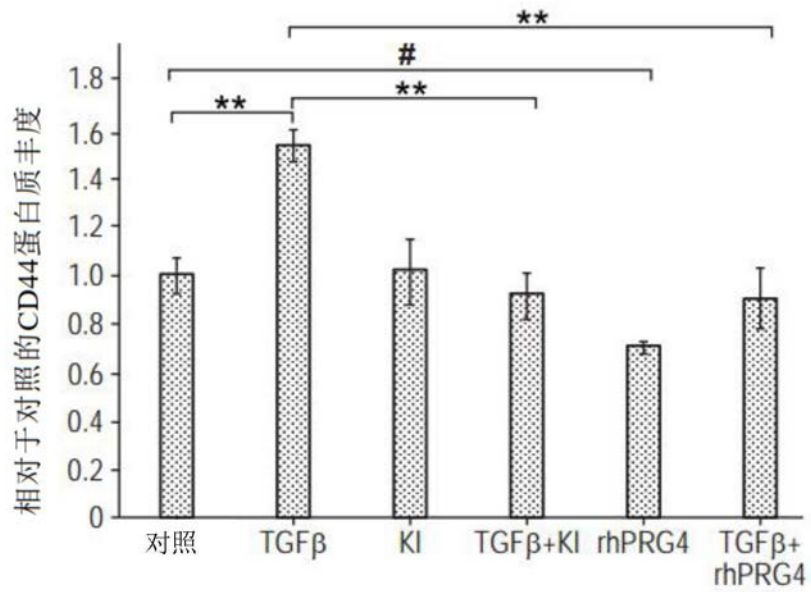


图10B

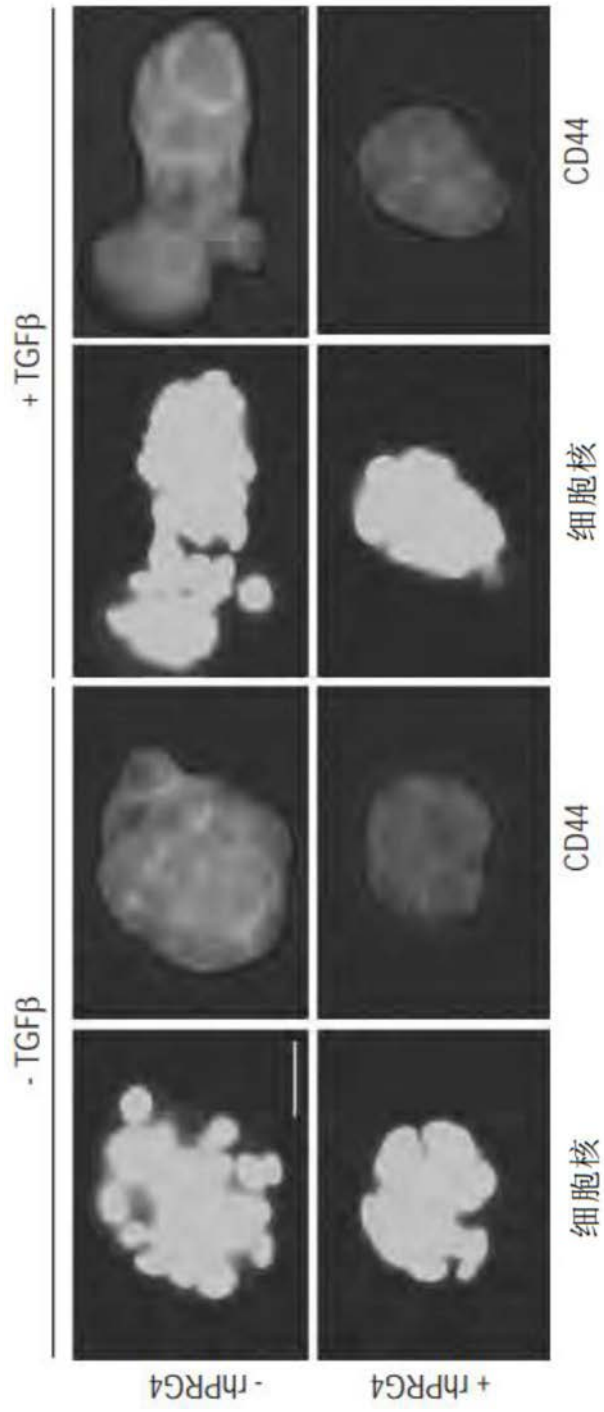
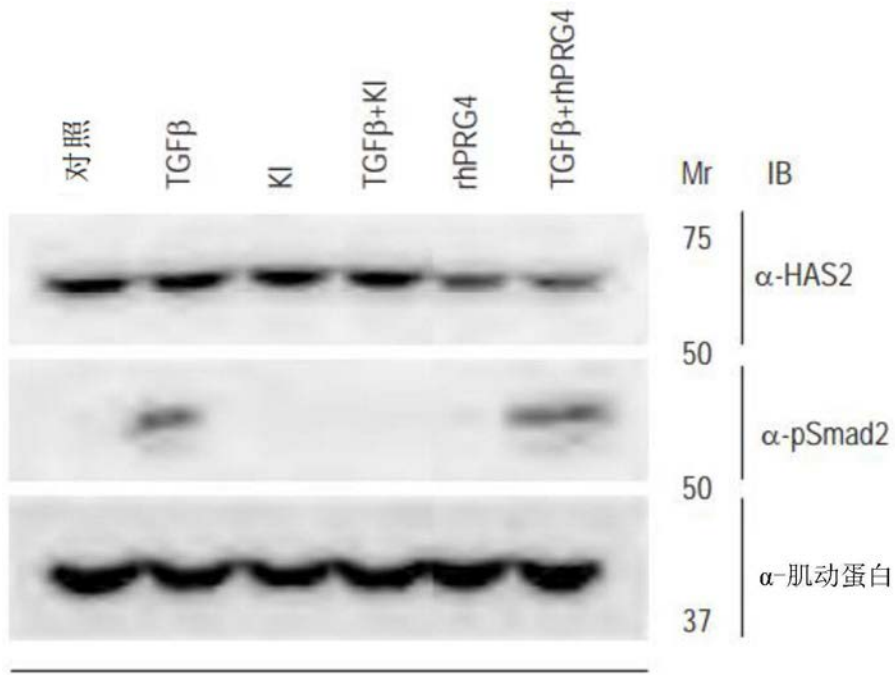


图10C



MDA-MB-231 细胞裂解液

图10D

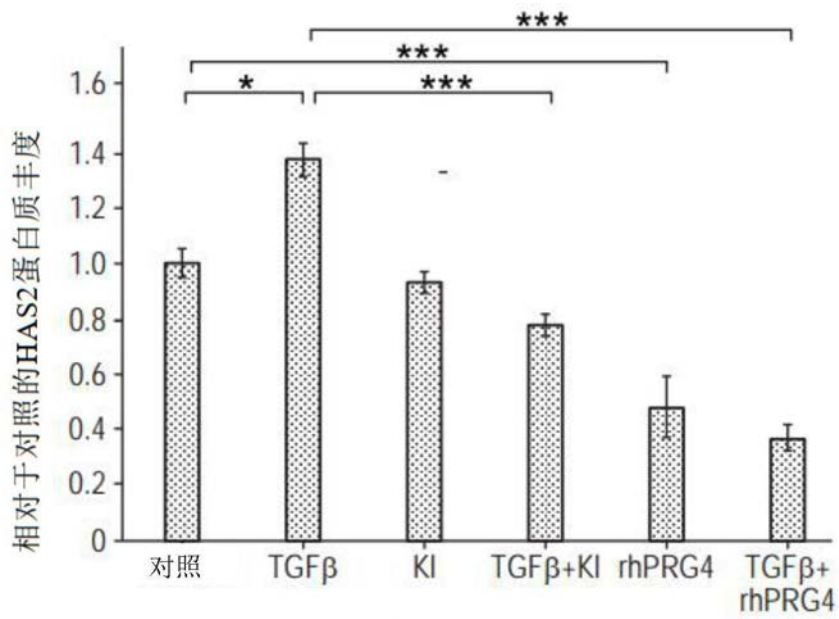


图10E

SEQ ID NO: 1, 长度: 1404, 生物体: 智人 (Homo sapiens), UniProt 登记号 Q92954:

```

MAWKTLPIYL LLLLSVFVIQ QVSSQDLSSC AGRCGEGYSR DATCNCDYNC QHYMECCPDF
KRVCTAELSC KGRCFESFER GRECDCDAQC KKYDKCCPDY ESFCAEVHNP TSPSSSKKAP
PPSGASQTIK STTKRSPKPP NKKKTKKVIE SEEITEEHSV SENQESSSSS SSSSSSSTIR
KIKSSKNSAA NRELQKKLV KDNKKNRTKK KPTPKPPVVD EAGSGLDNGD FKVTTTDTST
TQHNVSTSP KITTAKPINP RPSLPPNSDT SKETSLTVNK ETTVETKETT TTNKQSTSDG
KEKTTSAKET QSIEKTSAKD LAPTSKVLAK PTPKAETTTK GPALTTPKEP TPTTPKEPAS
TTPKEPTPTT IKSAPTTPKE PAPTTPKSAP TTPKEPAPT TKEPAPTTPK EPAPTTPKEP
APTTPKSAPT TPKEPAPTTP KKPAPTTPKE PAPTTPKEPT PTPKEPAPT TKEPAPTTPK
EPAPTAPKKP APTTPKEPAP TTPKEPAPT TKEPSPTTPK EPAPTTPKSA PTTTKEPAPT
TTKSAPTTPK EPSPTTPKEP APTTPKEPAP TTPKKPAPT PKEPAPTTPK EPAPTTPKKP
APTTPKEPAP TTPKETAPT PKKLTPTTPE KLAPTTPKEP APTTPEELAP TTPEEPTPTT
PEEPAPTTPK AAPNTPKEP APTTPKEPAP TTPKEPAPT PKETAPTTPK GTAPTTLKEP
APTTPKKPAP KELAPTTTKE PTSTTCDKPA PTPKGTAPT TPKEPAPTTP KEPAPTTPKG
TAPTTLKEPA PTPKKPAPK ELAPTTTKGP TSTTSDKPAP TTPKETAPT PKEPAPTTPK
KPAPTTPETP PPTTSEVSTP TTTKEPTTIH KSPDESTPEL SAEPTPKALE NSPKEPGVPT
TKTPAATKPE MTTTAKDKTT ERDLRTTPET TTAAPKMTKE TATTEKTTE SKITATTTQV
TSTTTQDTP FKITTLKTTT LAPKVTTTKK TITTTTEIMNK PEETAKPKDR ATNSKATTPK
PQKPTKAPK PTSTKKPKTM PRVRKPKTTP TPRKMTSTMP ELNPTSRIAE AMLQTTTRPN
QTPNSKLVEV NPKSEDAGGA EGETPHMLLR PHVFMPEVTP DMDYLPRVFN QGIIINPMLS
DETNICNGKP VDGLTTLRNG TLVAFRGHYF WMLSPFSPPS PARRITEVWG IPSPIDTVFT
RCNCEGKTFE FKDSQYWRFT NDIKDAGYPK PIFKGFGLT GQIVAALSTA KYKNWPESVY
FFKRGGSIQQ YIYKQEPVQK CPGRRPALNY PVYGETTQVR RRRFERAIGP SQHTIRIQY
SPARLAYQDK GVLHNEVKVS ILWRGLPNVV TSAISLPNIR KPDGYDYAF SKDQYYNIDV
PSRTARAITT RSGQTLKVV YNCP

```

图11

CCACTCCCAAGGAACCTGCACCCACCACCACCAAGAAGCCTGCACCCACCGCTCCCAAAGAGCC
TGCCCCAACTACCCCAAGGAGACTGCACCCACCACCCCAAGAAGCTCACGCCACCACCCCC
GAGAAGCTCGCACCCACCACCCCTGAGAAGCCCGCACCCACCACCCCTGAGGAGCTCGCACCCA
CCACCCCTGAGGAGCCACACCCACCACCCCTGAGGAGCCTGCTCCCACCACTCCCAAGGCAGC
GGTCCCAACACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACCTACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACCTACCCCT
AAGGAGCCTGCTCCAACCTACCCCTAAGGAGACTGCTCCAACCTACCCCTAAAGGGACTGCTCCAA
CTACCCTCAAGGAACCTGCACCCACTACTCCCAAGAAGCCTGCCCCAAGGAGCTTGCACCCAC
CACCACCAAGGAGCCACATCCACCACCTCTGACAAGCCCGCTCCAACCTACCCCTAAGGGGACT
GCTCCAACCTACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACCTACCCCTAAGGAGCCTGCTCCAACCTACCCCTA
AGGGGACTGCTCCAACCTACCCCTCAAGGAACCTGCACCCACTACTCCCAAGAAGCCTGCCCCAA
GGAGCTTGCACCCACCACCACCAAGGGGCCACATCCACCACCTCTGACAAGCCTGCTCCAACCT
ACACCTAAGGAGACTGCTCCAACCTACCCCAAGGAGCCTGCACCCACTACCCCAAGAAGCCTG
CTCCAACCTACTCCTGAGACACCTCCTCCAACCCTTCAGAGGTCTCTACTCCAACCTACCACCAA
GGAGCCTACCCTATCCACAAAAGCCCTGATGAATCAACTCCTGAGCTTTCTGCAGAACCCACA
CCAAAAGCTCTTGAAAACAGTCCCAAGGAACCTGGTGTACCTACAACCTAAGACTCCTGCAGCGA
CTAAACCTGAAATGACTACAACAGCTAAAGACAAGACAACAGAAAAGAGACTTACGTACTACACC
TGAAACTACAACCTGCTGCACCTAAGATGACAAAAGAGACAGCAACTACAACAGAAAAAACTACC
GAATCCAAAATAACAGCTACAACCACACAAGTAACATCTACCACAACCTCAAGATACCACACCAT
TCAAAATTACTACTCTTAAAACAACCTACTCTTGCACCCAAAAGTAACTACAACAAAAAAGACAAT
TACTACCACTGAGATTATGAACAAACCTGAAGAAACAGCTAAACCAAAAAGACAGAGCTACTAAT
TCTAAAGCGACAACCTCCTAAACCTCAAAGCCAACCAAAGCACCCAAAAAAACCCACTTCTACCA
AAAAGCCAAAAACAATGCCTAGAGTGAGAAAACCAAAGACGACACCAACTCCCCGCAAGATGAC
ATCAACAATGCCAGAATTGAACCCTACCTCAAGAATAGCAGAAGCCATGCTCCAAACCACCACC
AGACCTAACCAAAACCTCAAACCTCAAACCTAGTTGAAGTAAATCCAAAGAGTGAAGATGCAGGTG
GTGCTGAAGGAGAAACACCTCATATGCTTCTCAGGCCCATGTGTTTCATGCCTGAAGTTACTCC
CGACATGGATTACTTACCGAGAGTACCCAATCAAGGCATTATCATCAATCCCATGCTTTCCGAT
GAGACCAATATATGCAATGGTAAGCCAGTAGATGGACTGACTACTTTGCGCAATGGGACATTAG
TTGCATTCCGAGGTCATTATTTCTGGATGCTAAGTCCATTTCAGTCCACCATCTCCAGCTCGCAG
AATTACTGAAGTTTGGGGTATTCCTTCCCCATTGATACTGTTTTTACTAGGTGCAACTGTGAA
GGAAAAACTTTCTTCTTTAAGGATTCTCAGTACTGGCGTTTTTACCAATGATATAAAAGATGCAG
GGTACCCCAAACCAATTTTCAAAGGATTTGGAGGACTAACTGGACAAATAGTGGCAGCGCTTTC
AACAGCTAAATATAAGAAGTGGCCTGAATCTGTGTATTTTTTCAAGAGAGGTGGCAGCATTTCAG

图12(续)

CAGTATATTTATAAACAGGAACCTGTACAGAAGTGCCCTGGAAGAAGGCCTGCTCTAAATTATC
CAGTGTATGGAGAAATGACACAGGTTAGGAGACGTCGCTTTGAACGTGCTATAGGACCTTCTCA
AACACACACCATCAGAATTCAATATTCACCTGCCAGACTGGCTTATCAAGACAAAGGTGTCCTT
CATAATGAAGTTAAAGTGAGTACTGTGGAGAGGACTTCCAAATGTGGTTACCTCAGCTATAT
CACTGCCCAACATCAGAAAACCTGACGGCTATGATTACTATGCCTTTTCTAAAGATCAATACTA
TAACATTGATGTGCCTAGTAGAACAGCAAGAGCAATTACTACTCGTTCTGGGCAGACCTTATCC
AAAGTCTGGTACAACCTGTCCTTAGACTGATGAGCAAAGGAGGAGTCAACTAATGAAGAAATGAA
TAATAAATTTTGACACTGAAAAACATTTTATTAATAAAGAATATTGACATGAGTATACCAGTTT
ATATATAAAAATGTTTTAACTTGACAATCATTACACTAAAACAGATTTGATAATCTTATTCA
CAGTTGTTATTGTTTACAGACCATTTAATTAATATTTCTCTGTTTATTCTCCTCTCCCTCCC
ATTGCATGGCTCACACCTGTAAAAGAAAAAGAATCAAATTGAATATATCTTTTAAAGAATTCAA
AACTAGTGTATTCACCTACCCTAGTTCATTATAAAAAATATCTAGGCATTGTGGATATAAACT
GTTGGGTATTCTACAACCTCAATGGAAATTATTACAAGCAGATTAATCCCTCTTTTTGTGACAC
AAGTACAATCTAAAAGTTATATTGGAAAACATGGAAATATTAATAATTTTACACTTTTACTAGCT
AAAACATAATCACAAAGCTTTATCGTGTGTATAAAAAAATTAACAATATAATGGCAATAGGTA
GAGATACAACAAATGAATATAAACTATAAACTTCATATTTTCCAAATCTTAATTTGGATTTA
AGGAAGAAATCAATAAATATAAAATATAAGCACATATTTATTATATATCTAAGGTATACAAATC
TGTCTACATGAAGTTTACAGATTGGTAAATATCACCTGCTCAACATGTAATTATTTAATAAAAC
TTTGAACATTAATAAAATAAATTGGAGGCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图12(续)

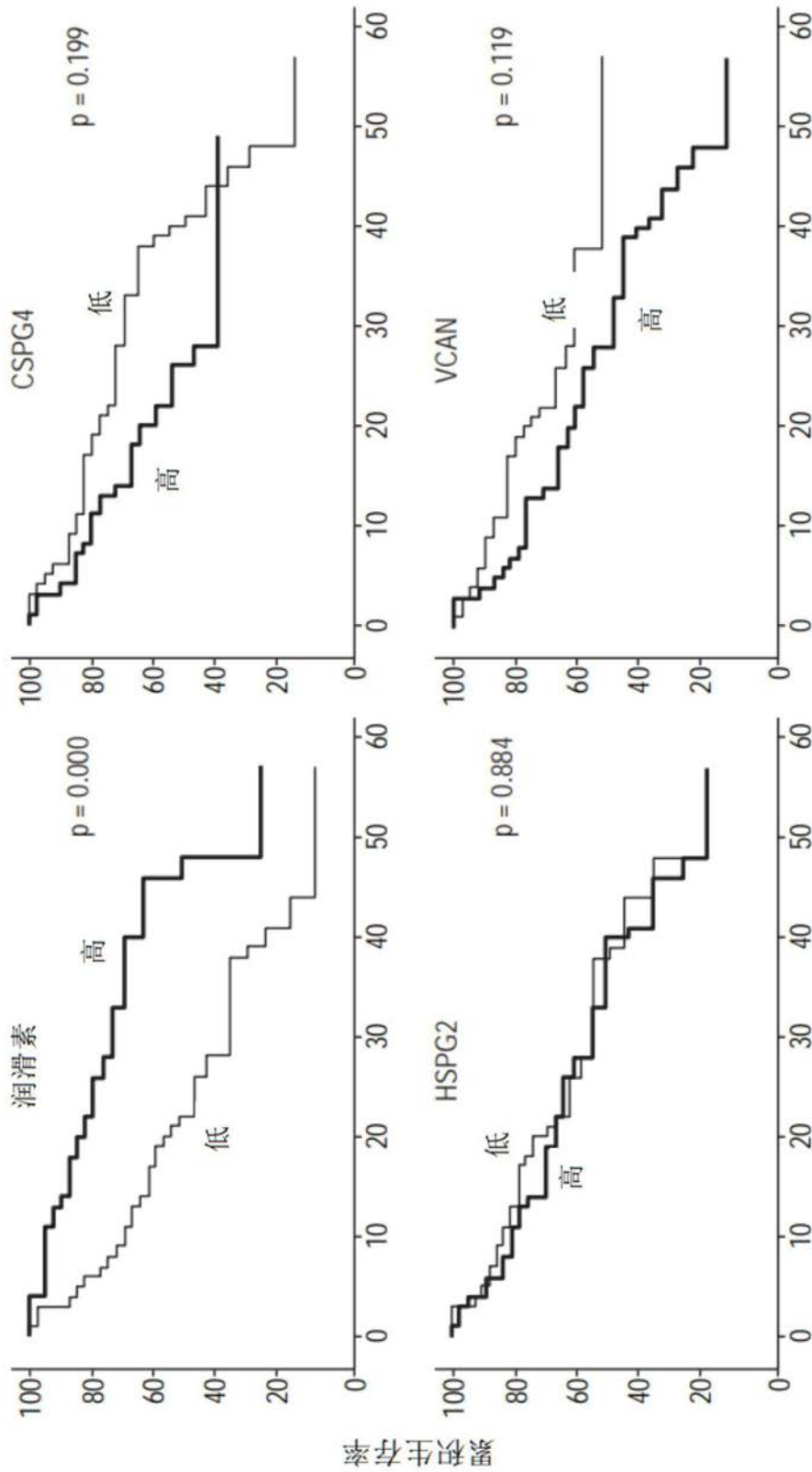


图13

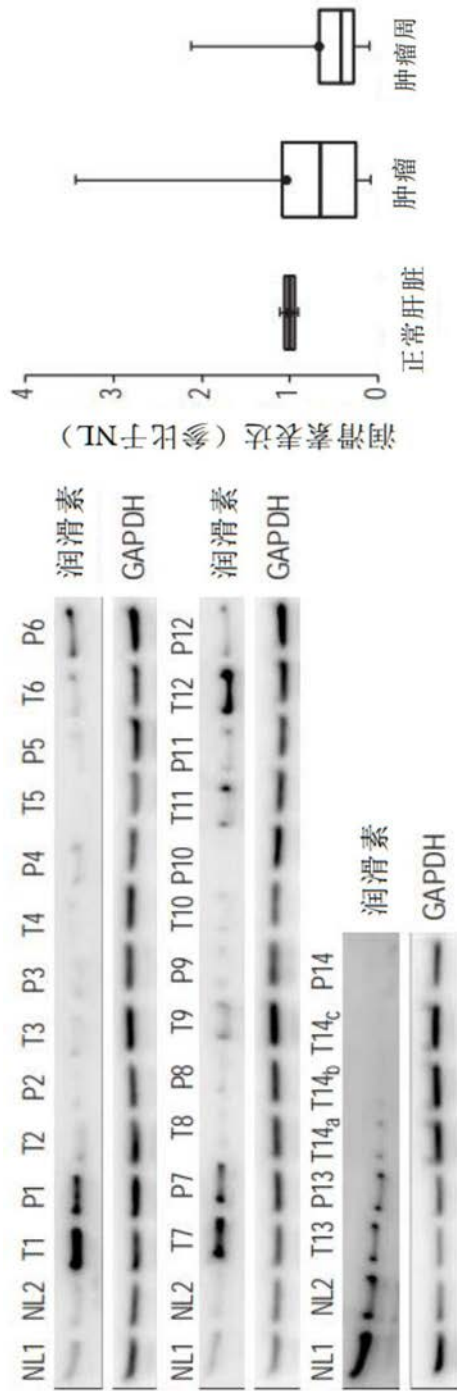


图14A

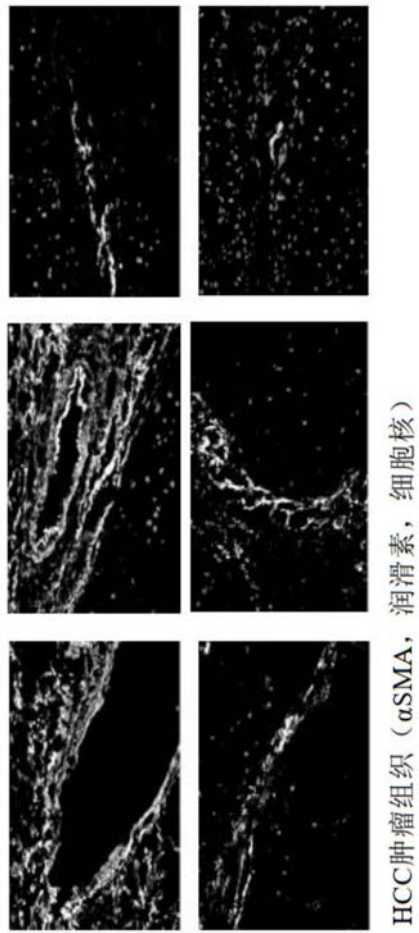


图14B

在HCC CAF和离体组织中PRG4被TGFβ上调

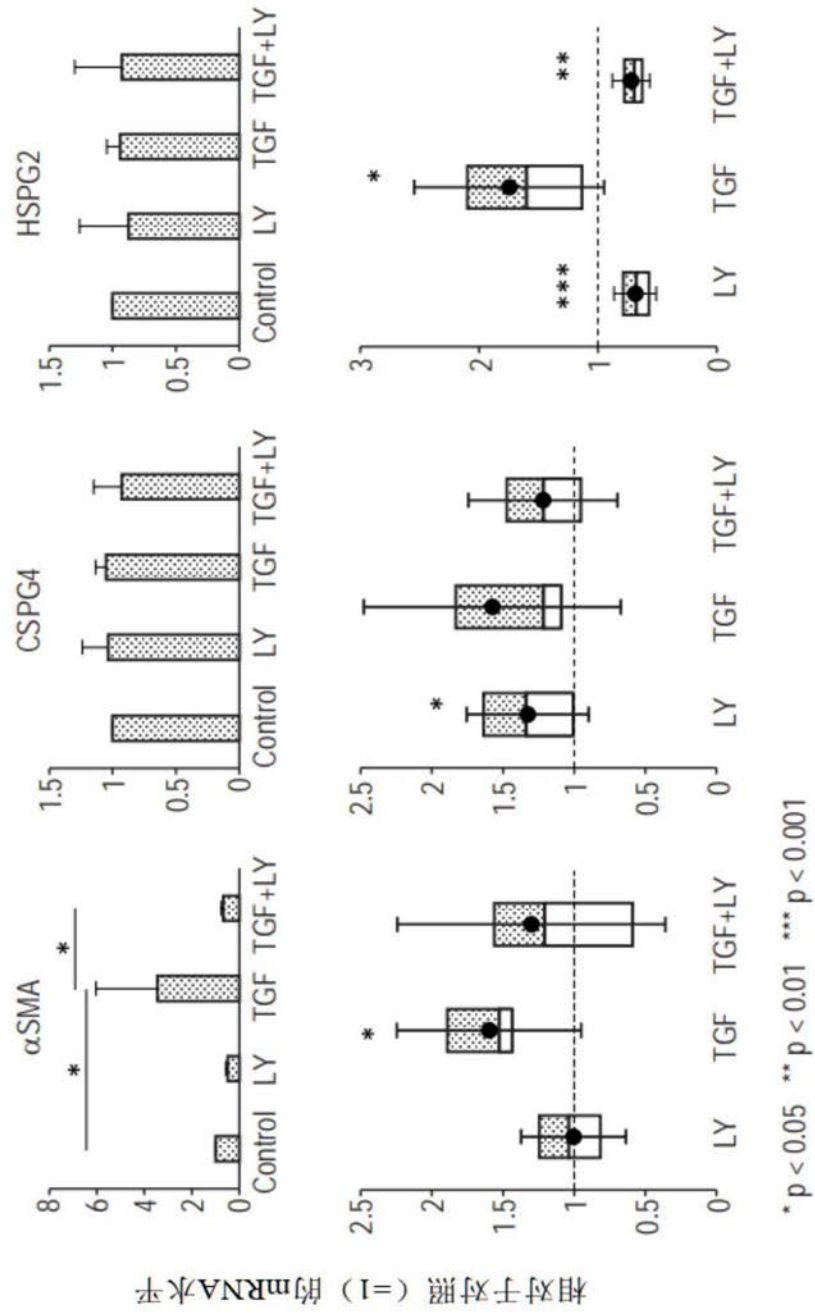


图15

在HCC CAF和离体组织中PRG4被TGFβ上调

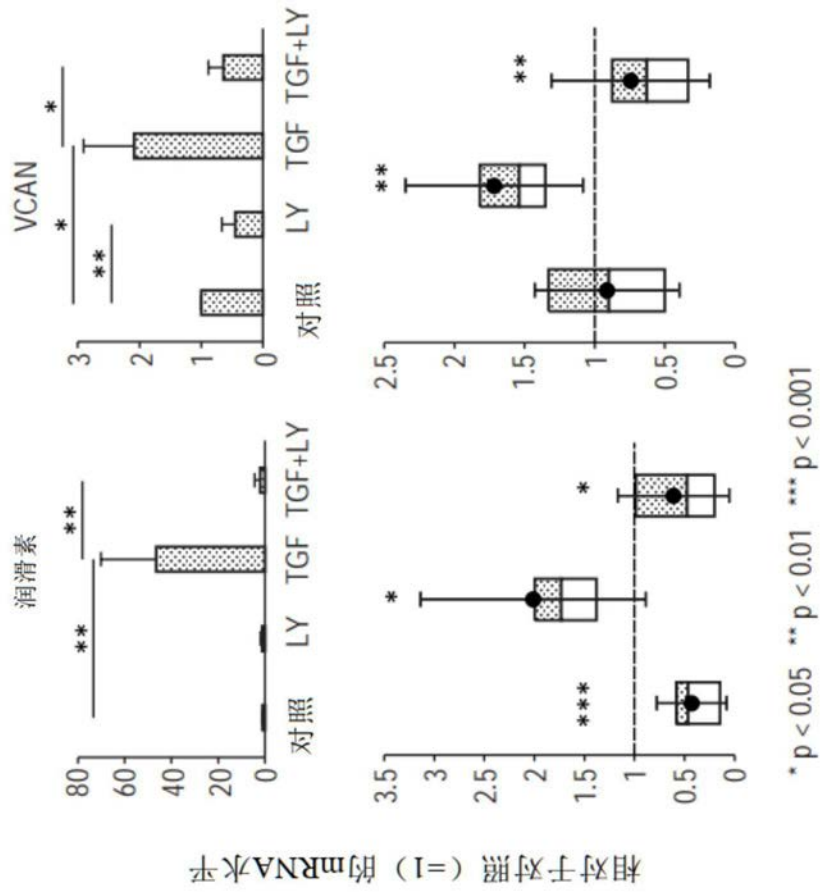


图15(续)

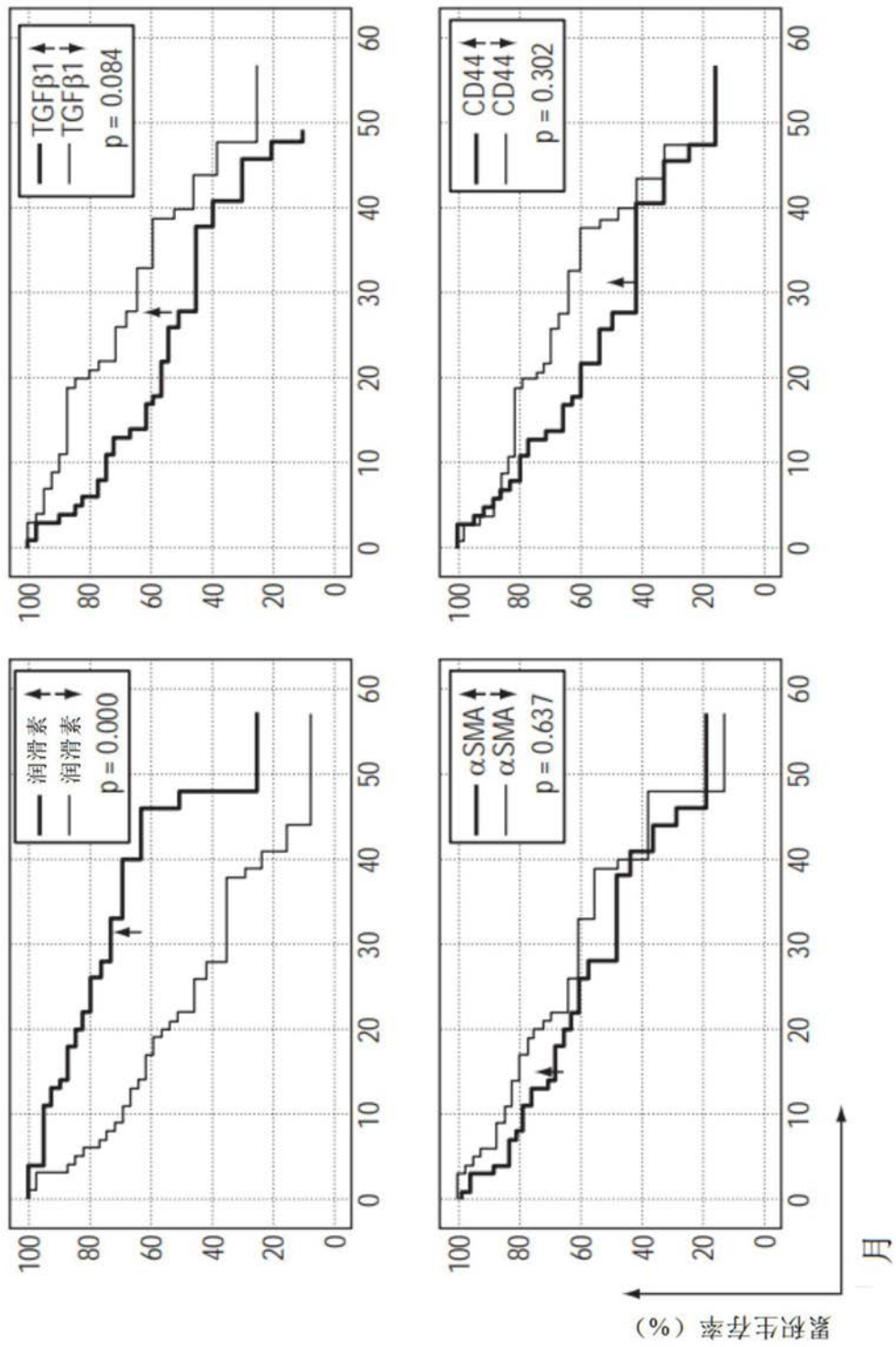


图16

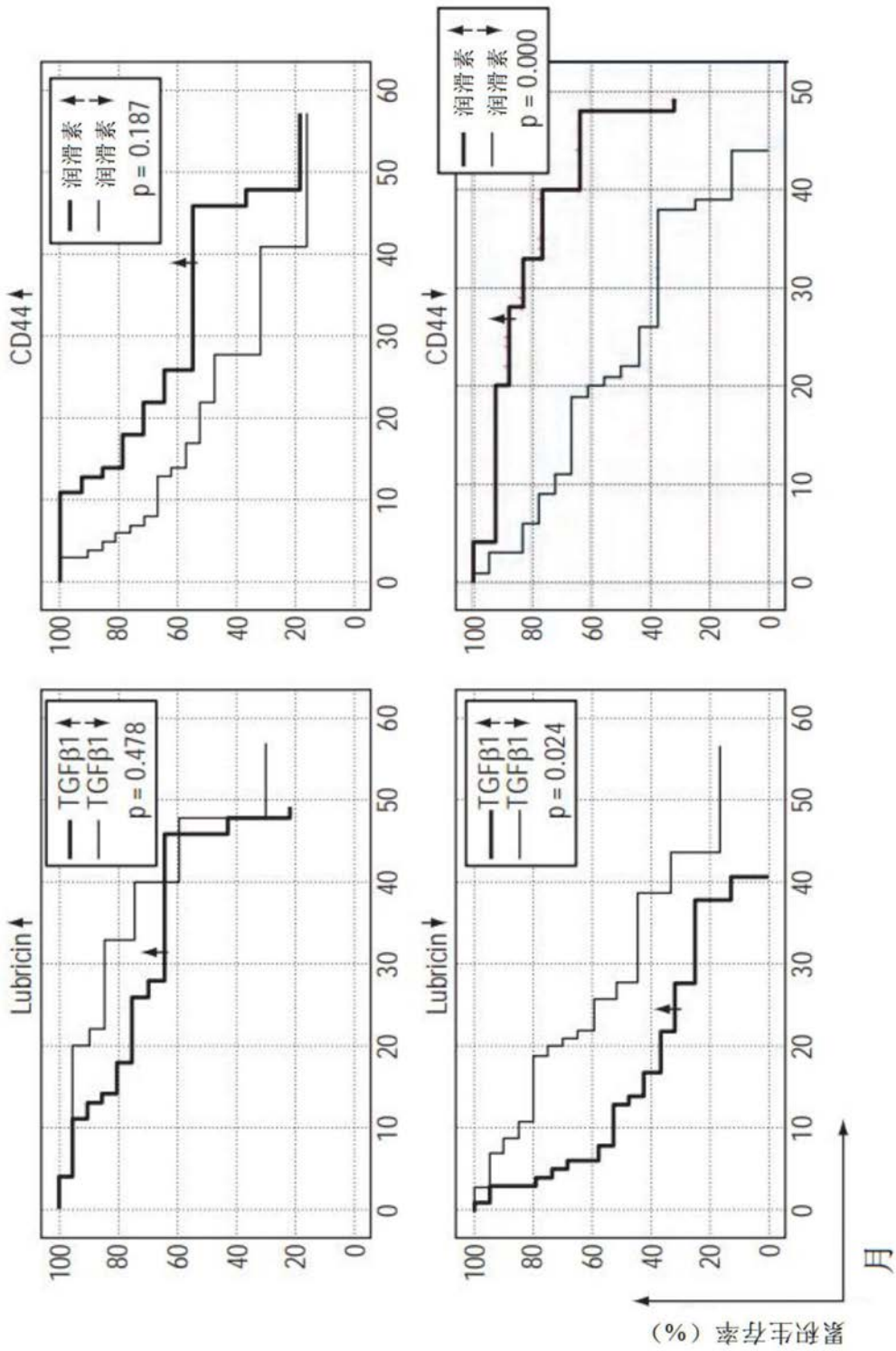


图16(续)

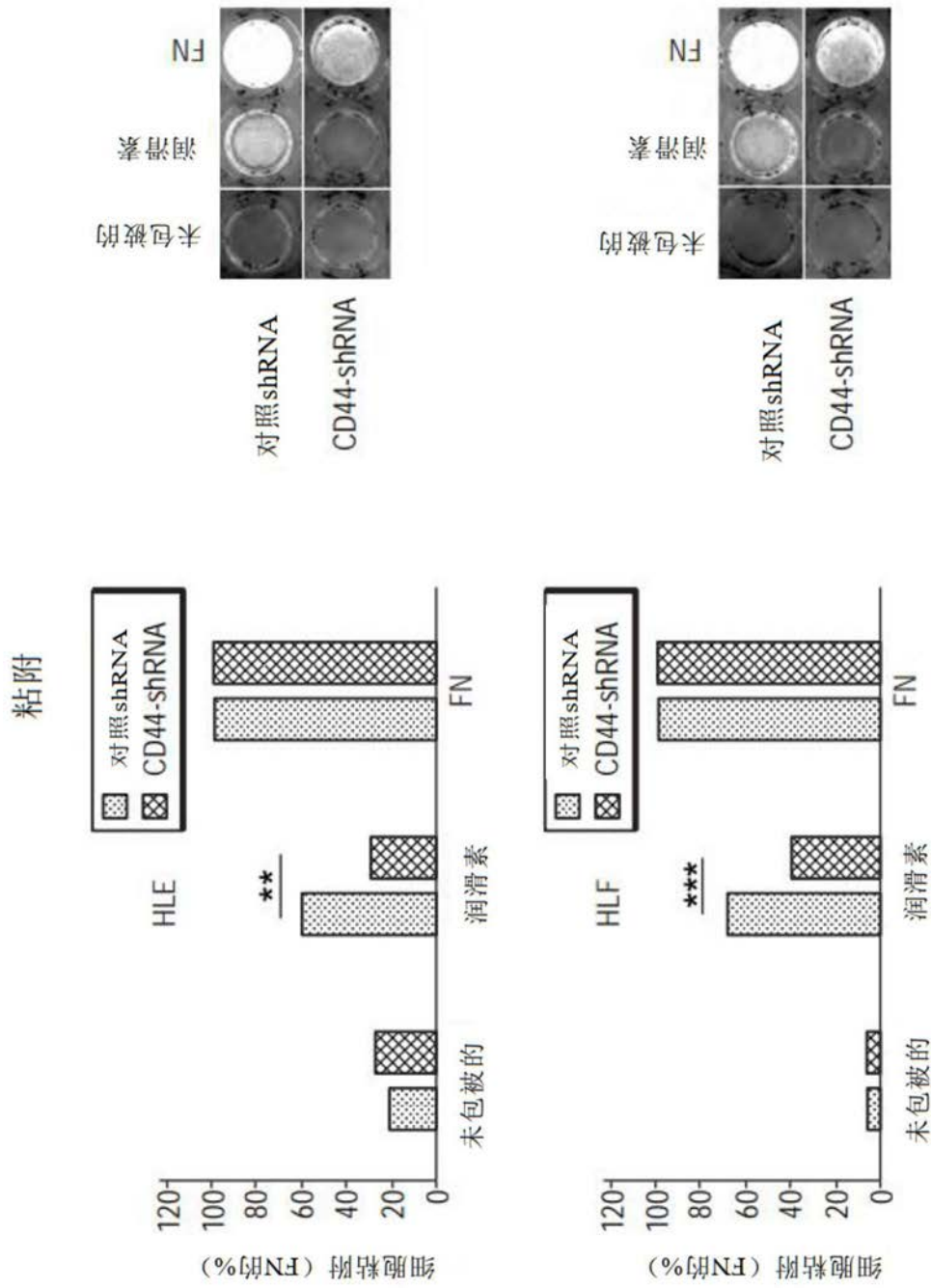


图17A

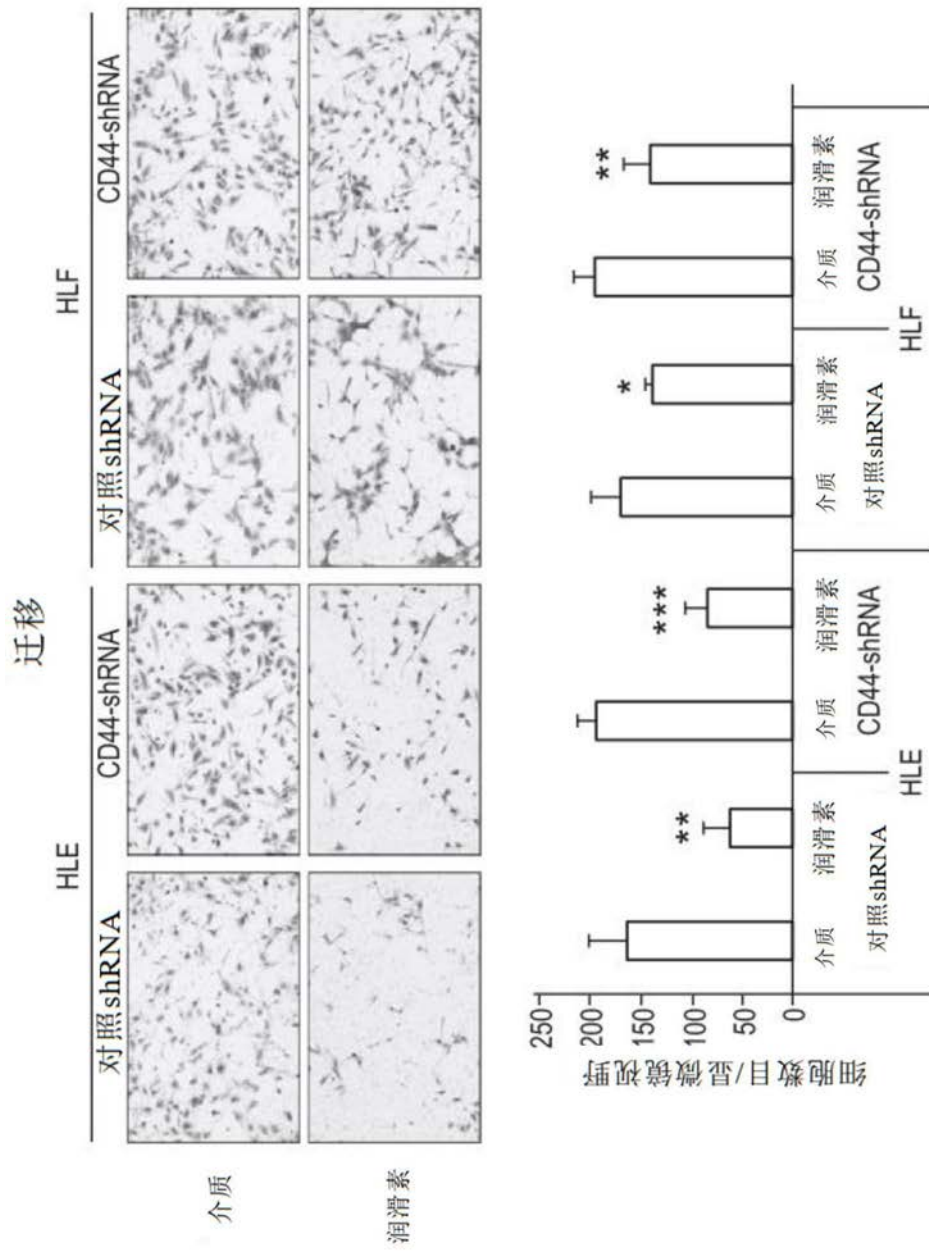


图17B

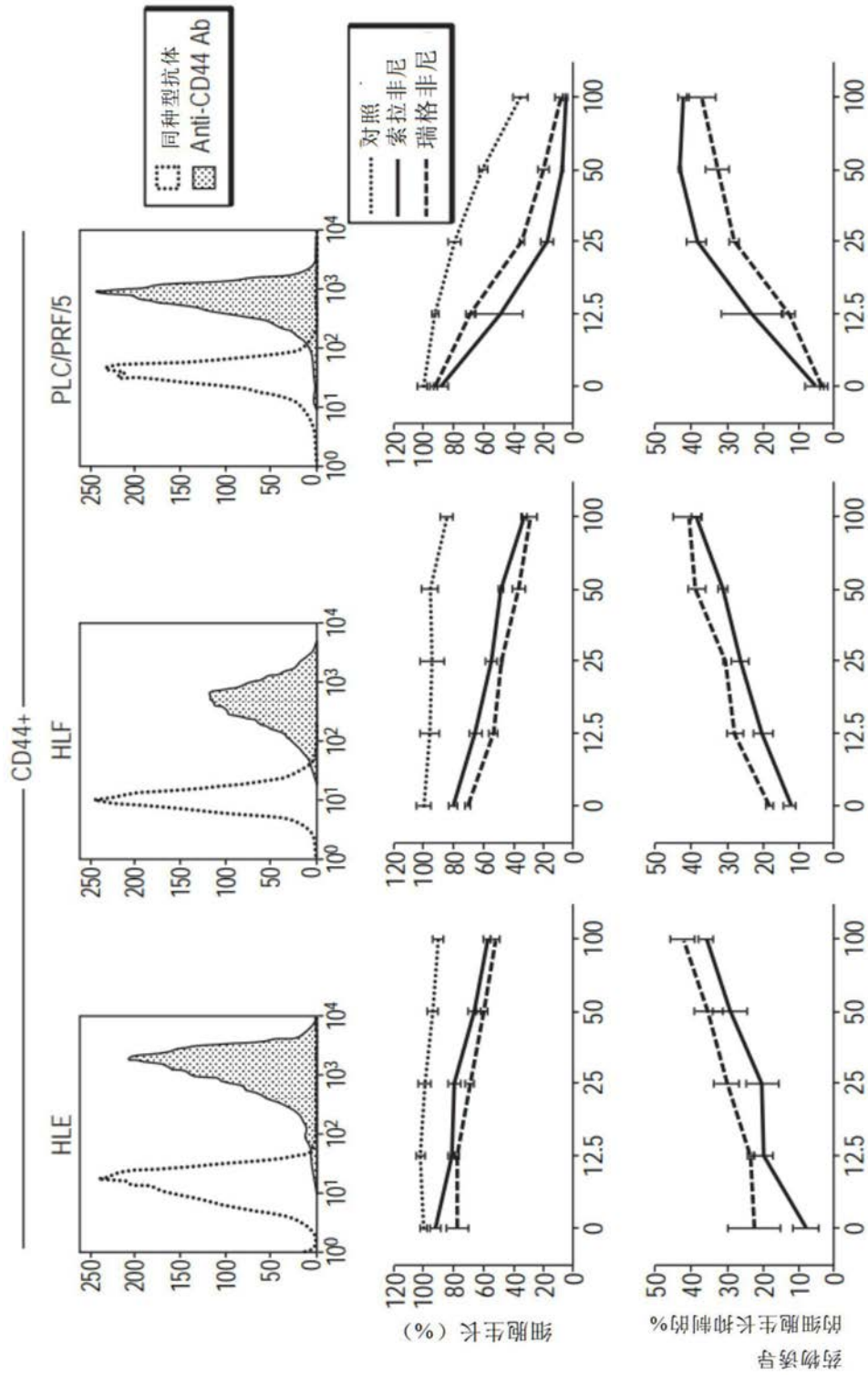


图18

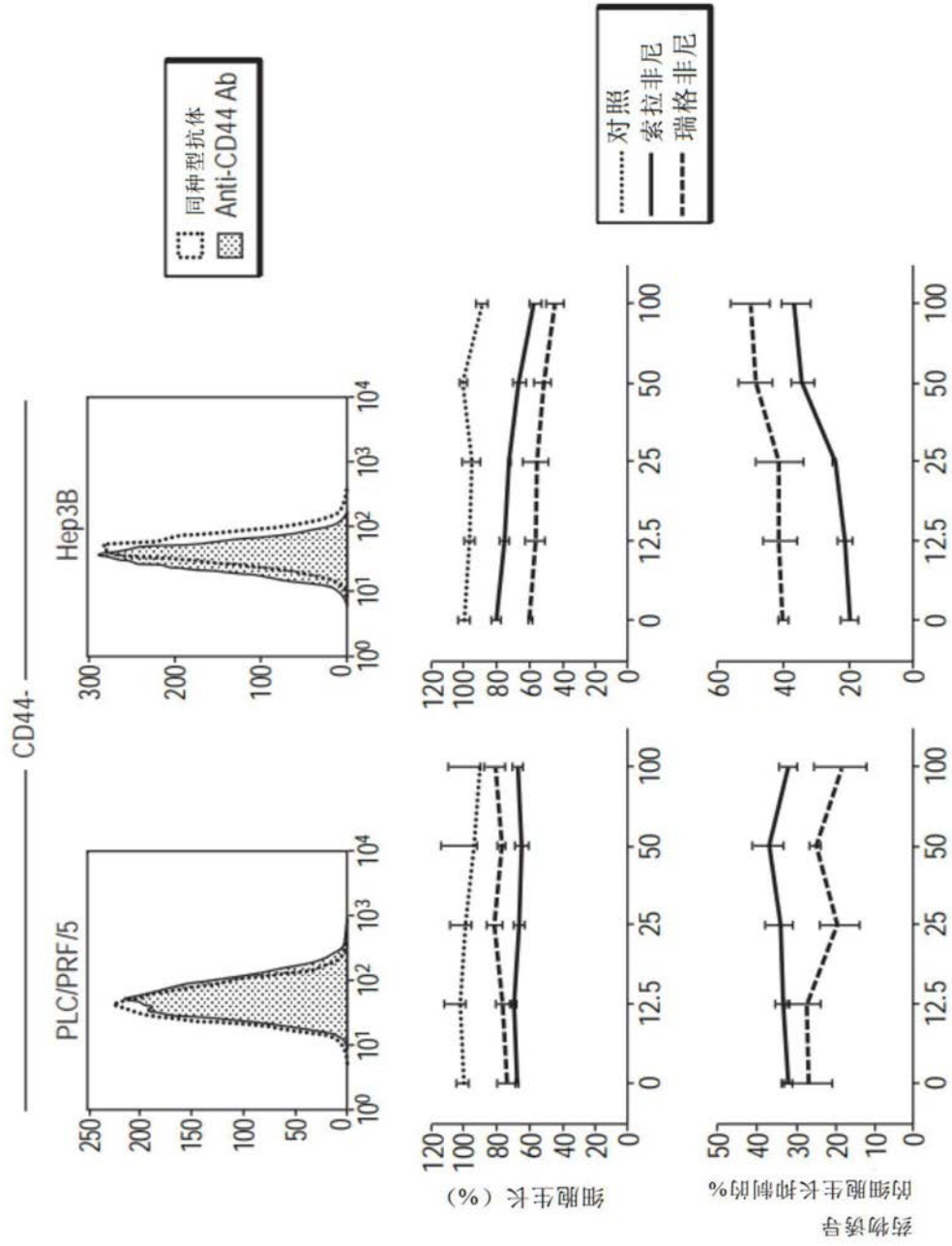


图18(续)

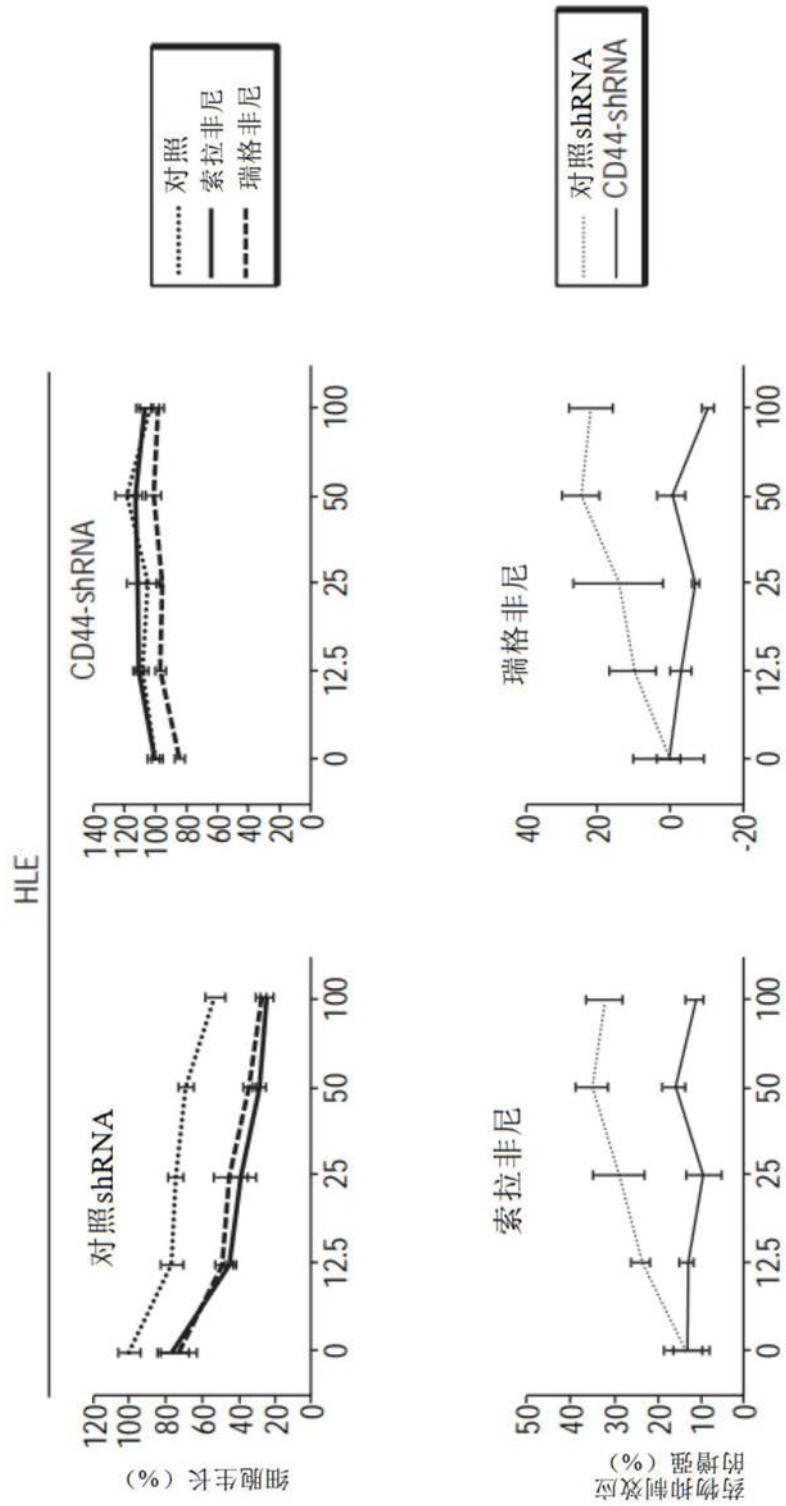


图19A

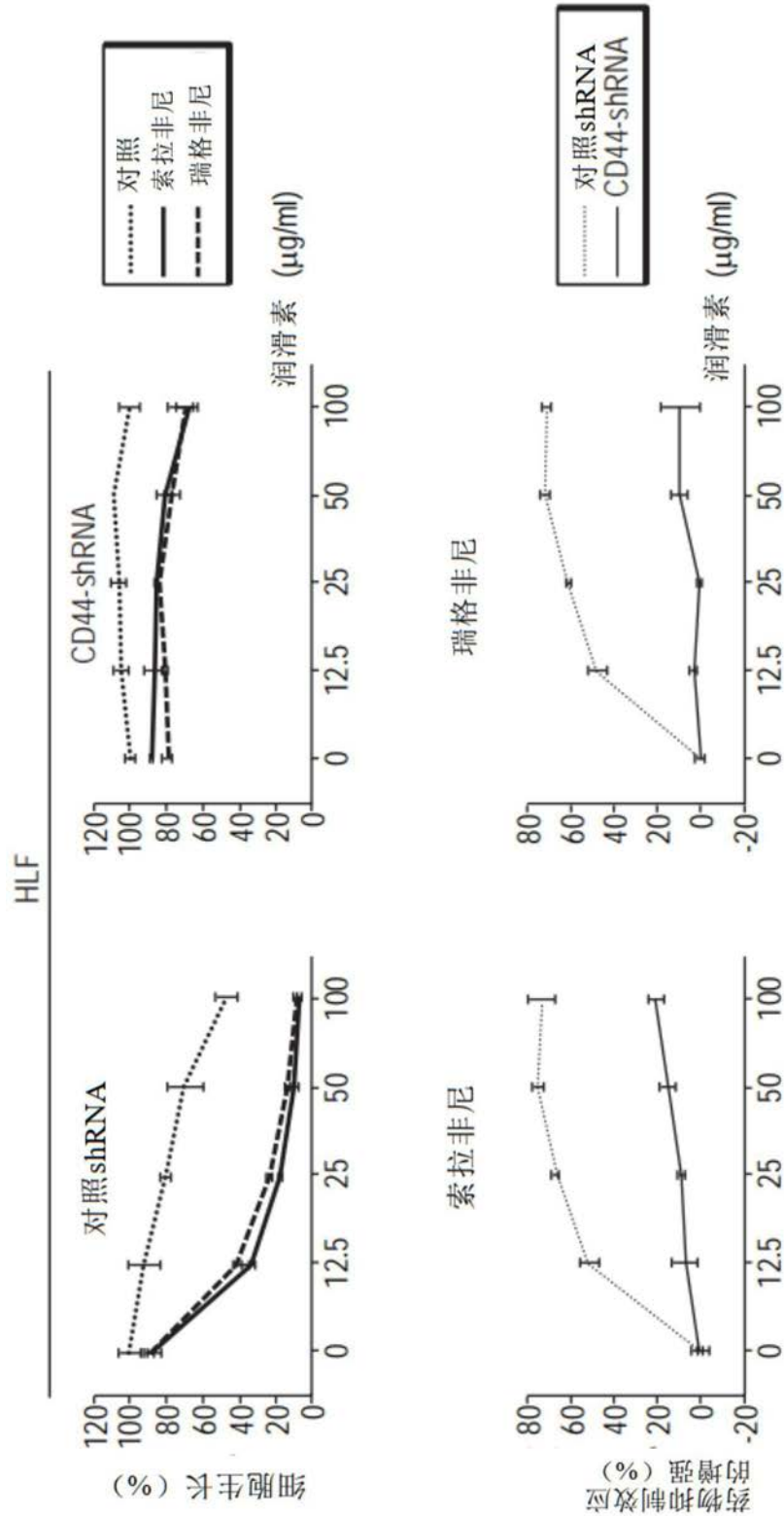


图19A (续)

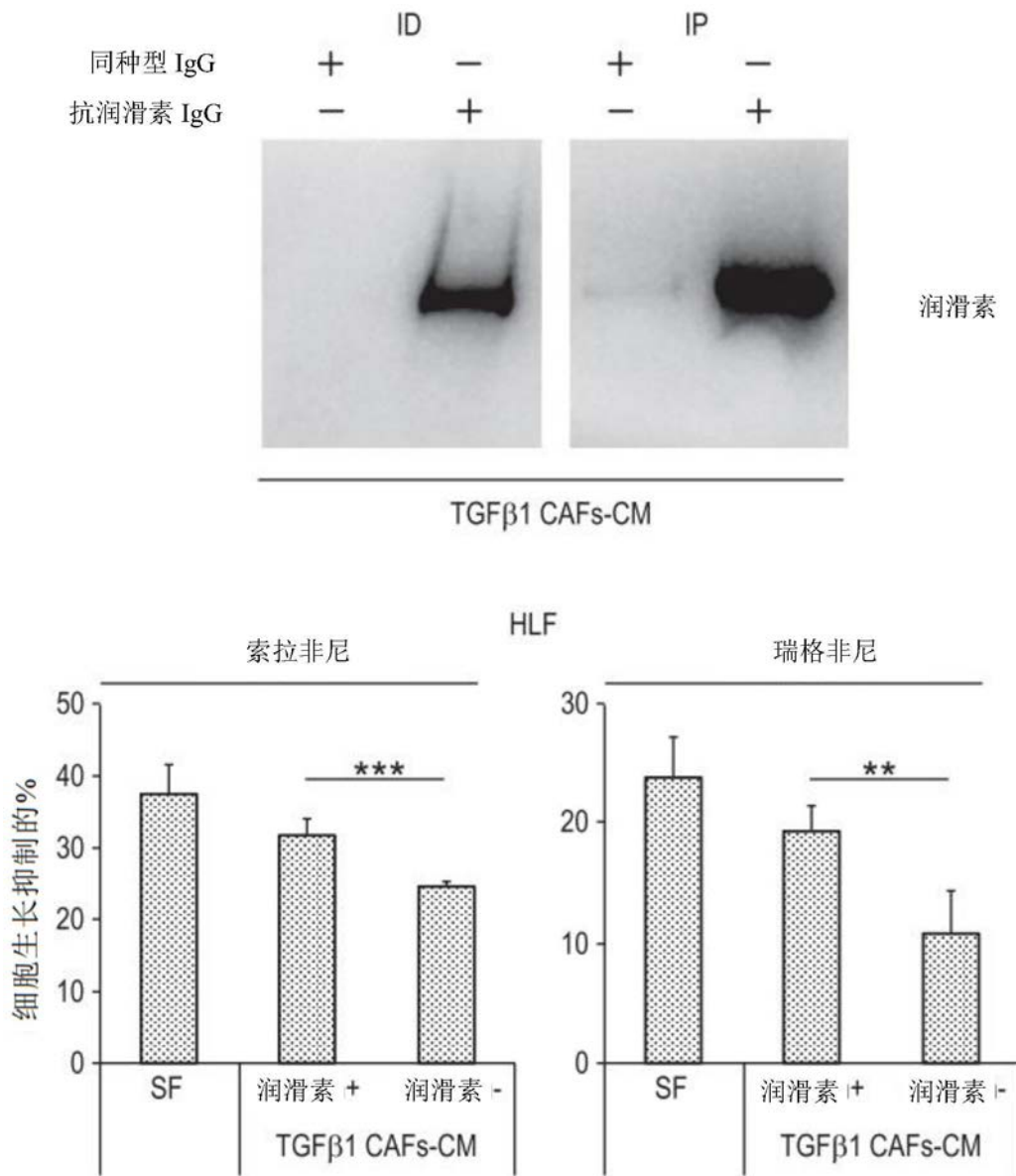


图19B

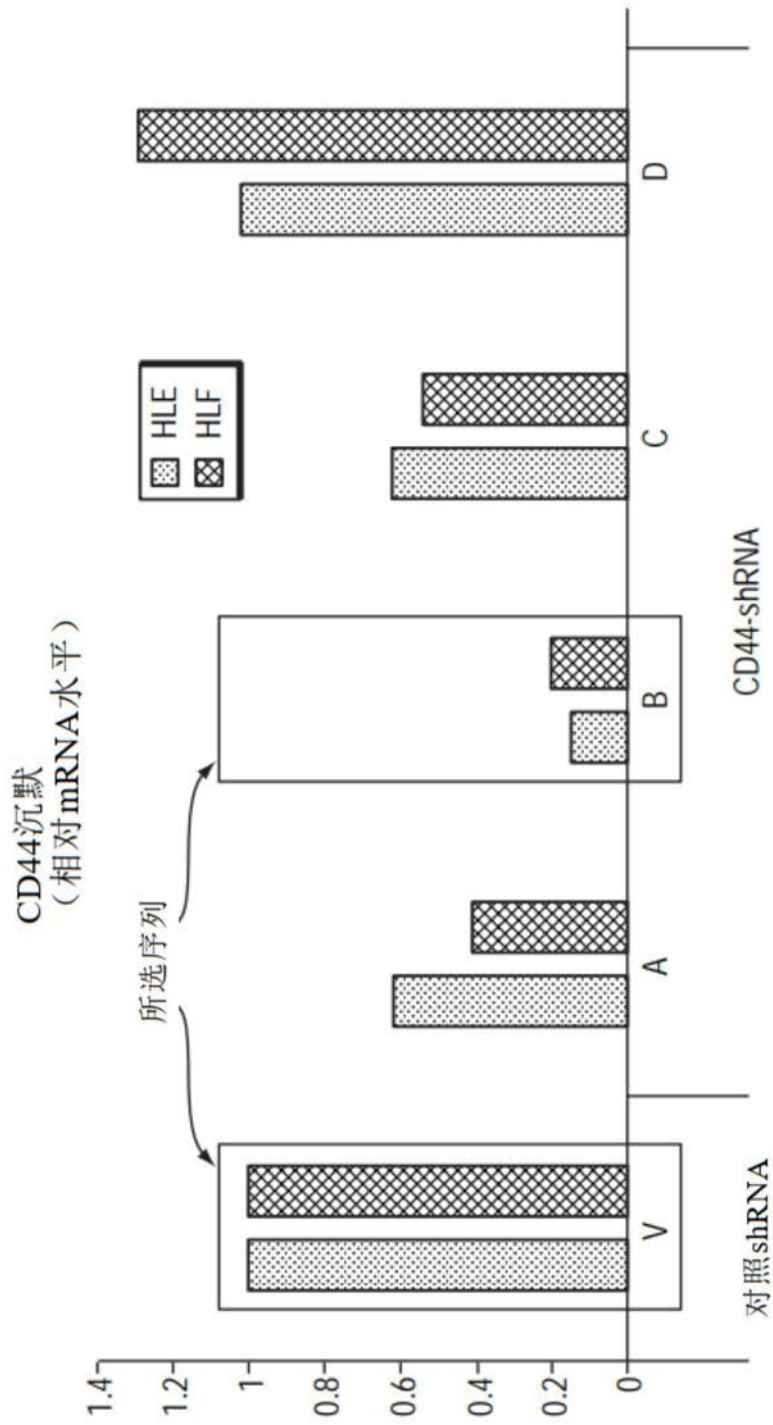


图20

PLC/DC/19 表征

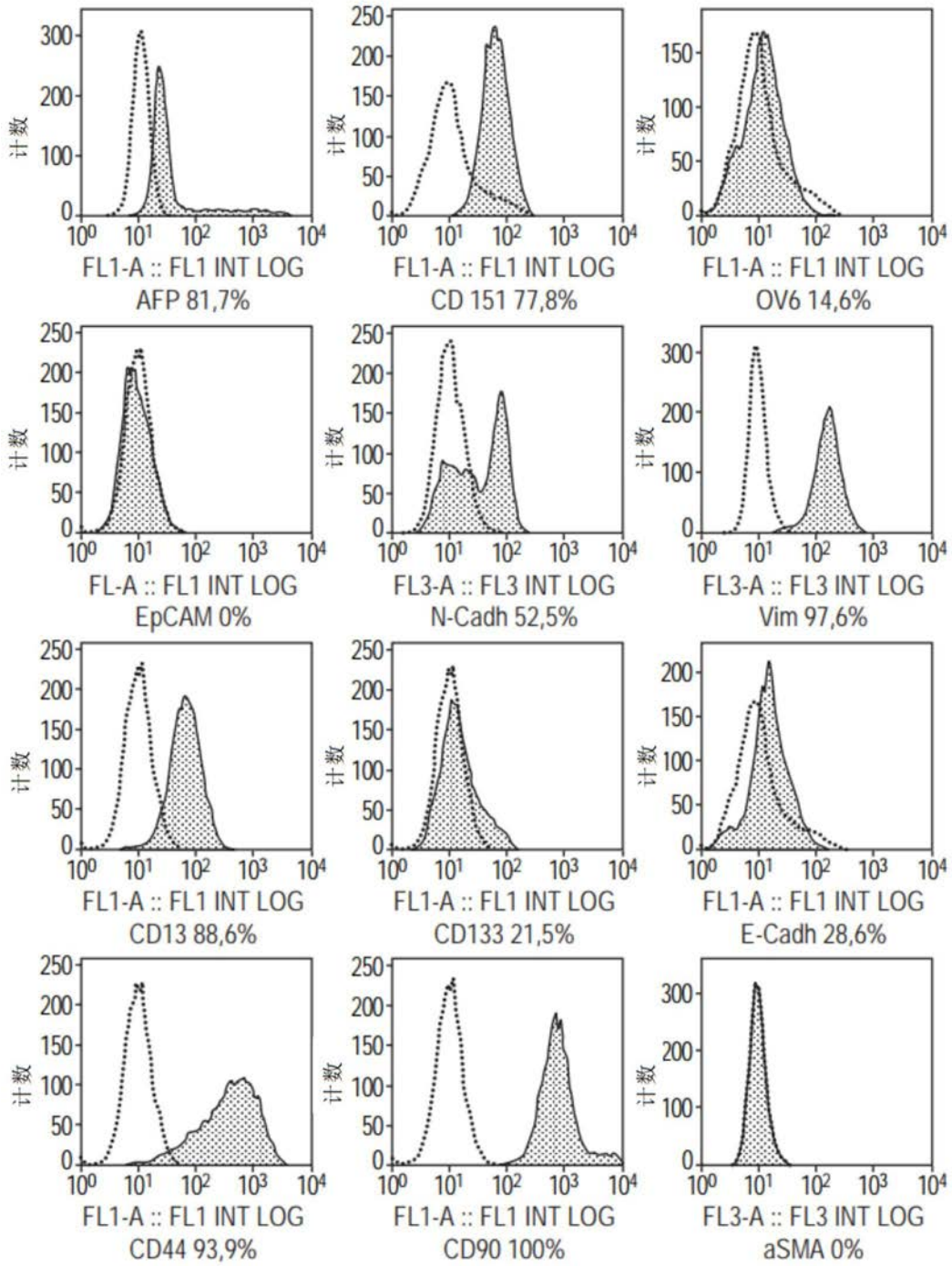


图21

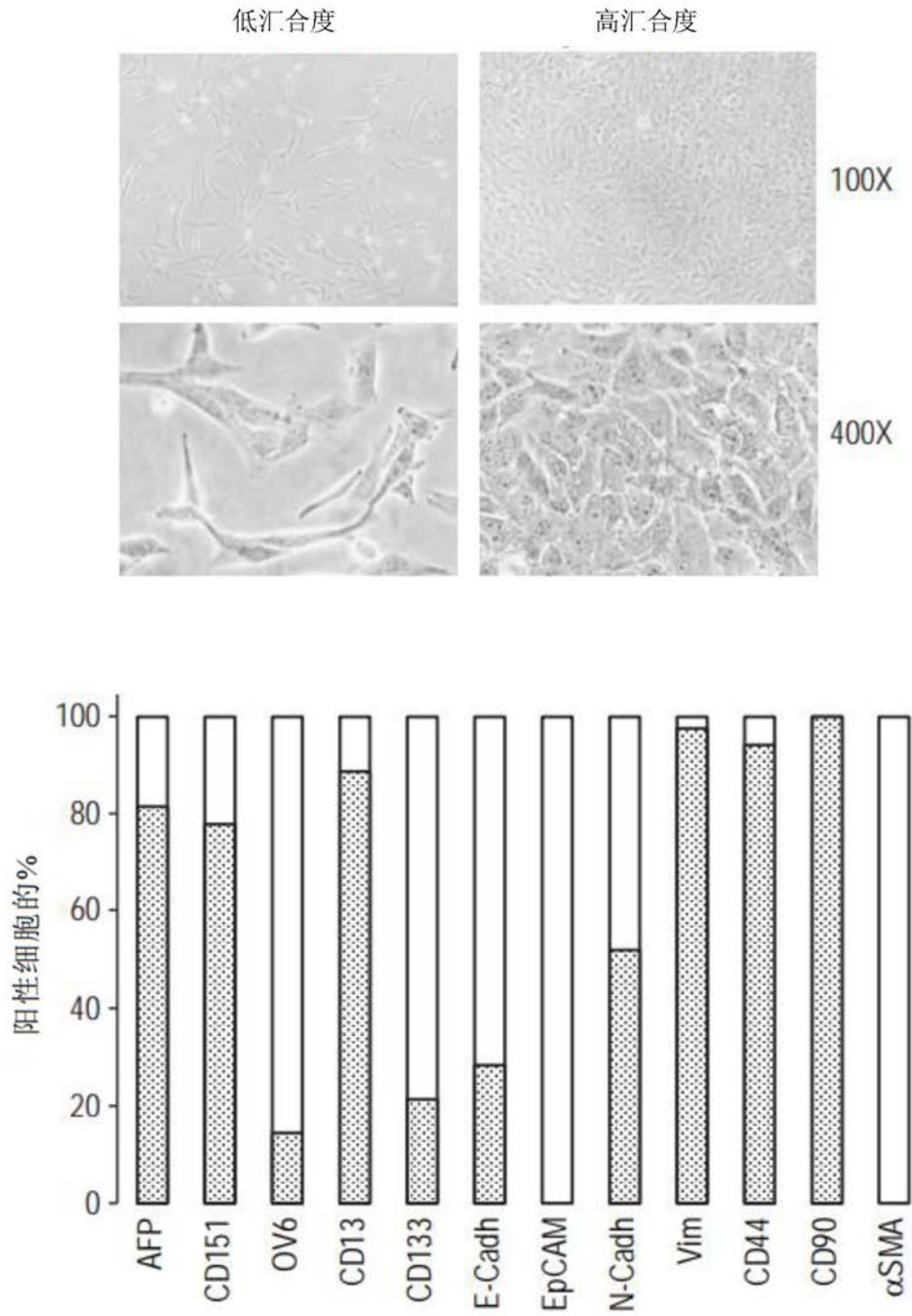


图21 (续)