



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113473996 A

(43) 申请公布日 2021.10.01

(21) 申请号 202080016624.6

R·塞蒂瓦里

(22) 申请日 2020.02.27

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

(30) 优先权数据

62/813853 2019.03.05 US

代理人 徐舒

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.08.25

(51) Int.Cl.

A61K 31/765 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/020028 2020.02.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/180581 EN 2020.09.10

(71) 申请人 陶氏环球技术有限责任公司

地址 美国密歇根州

(72) 发明人 C·沃尔福-古普塔 A·斯科特

M·勒巴伦 D·威尔逊

S·L·乔丹 R·L·斯密特

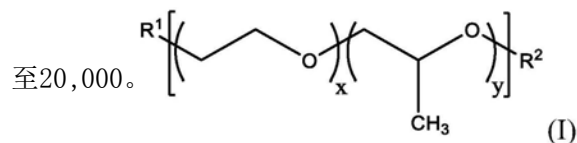
权利要求书1页 说明书8页

(54) 发明名称

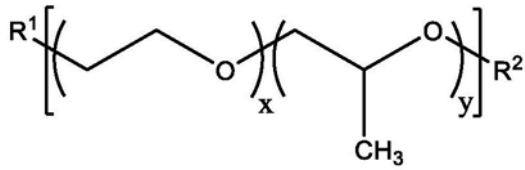
诱导胱天蛋白酶活性

(57) 摘要

实施方案涉及诱导胱天蛋白酶活性的方法。该方法包括使细胞与下式表示的治疗化合物接触,其中治疗化合物为无规共聚物,R¹选自氢和羟基,R²选自氢和羟基,R¹与R²不同,x和y之和为4至20,000。



1. 一种诱导胰天蛋白酶活性的方法,所述方法包括使细胞与下式表示的治疗化合物接触:



其中治疗化合物为无规共聚物,R¹选自氢和羟基,R²选自氢和羟基,R¹与R²不同,x和y之和为4至20,000。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述治疗化合物的数均分子量为200至2,000,000g/mol。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述治疗化合物在治疗培养基中的浓度为0.001毫摩尔至75毫摩尔。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述细胞是癌细胞。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述胰天蛋白酶是效应物胰天蛋白酶。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述胰天蛋白酶选自胰天蛋白酶3、胰天蛋白酶6、胰天蛋白酶7或其组合。

7. 根据权利要求1所述的方法,其进一步诱导细胞凋亡。

诱导胱天蛋白酶活性

技术领域

[0001] 本公开的实施方案涉及诱导胱天蛋白酶活性的方法。

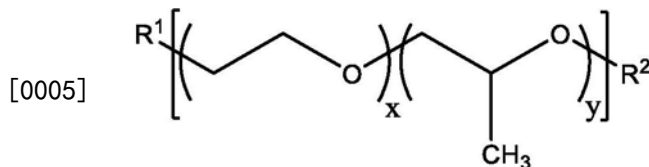
背景技术

[0002] 癌症是一组涉及异常细胞生长的疾病。结直肠癌,也称为结肠癌或肠癌,是一种由结肠或直肠中不受控制的细胞生长引起的癌症。

[0003] 结直肠癌是一种常诊断的恶性肿瘤。结直肠癌的治疗可包括手术、放射疗法和/或化学疗法。然而,仍然需要可用于治疗的新方法和/或新组合物。

发明内容

[0004] 本公开提供了诱导胱天蛋白酶活性的方法,该方法包括使细胞与下式表示的治疗化合物接触:



[0006] 其中治疗化合物为无规共聚物, R^1 选自氢和羟基, R^2 选自氢和羟基, R^1 与 R^2 不同, x 和 y 之和为4至20,000。

[0007] 本公开的以上发明内容并非旨在描述本公开的每个所公开的实施方案或每个实施方案。以下描述更具体地示范说明性实施方案。在本申请整篇的若干处,通过实例列表提供指导,所述实例可以各种组合形式使用。在每种情况下,所列举的列表仅充当代表性群组并且不应解释为排它性列表。

具体实施方式

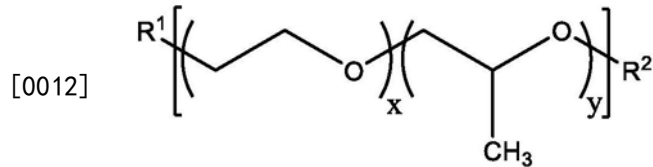
[0008] 虽然不希望受制于理论,但涉及结直肠癌发展的一种机制是产生APC蛋白的APC(腺瘤性结肠息肉)基因的突变。APC蛋白是基于蛋白质的破坏复合物的一部分,其有助于防止 β -联蛋白在细胞中积累。APC蛋白和 β -联蛋白是WNT(Wingless/Integrated)信号转导通路之一的一部分,该通路通过细胞表面受体将信号传递到细胞中。一般来说,当细胞受到WNT刺激时,破坏复合物失活, β -联蛋白会进入细胞核并与控制遗传信息转录的转录因子(TCF)结合。参与正常细胞进程的基因将被激活,并且这是一个受调控的过程。如果没有APC蛋白, β -联蛋白会不断积累到高水平并转移到细胞核中,与TCF结合,TCF再与DNA结合,并且激活原癌基因的转录。当原癌基因被不恰当地高水平表达时,它们就变成癌基因。激活的癌基因会导致指定要凋亡的细胞存活并增殖,这可能导致患上结直肠癌。

[0009] 本文公开了诱导胱天蛋白酶活性的方法。有利地,诱导胱天蛋白酶活性可以诱导细胞凋亡,即诱导细胞死亡。对于许多应用,与坏死相比,细胞凋亡是期望的。诱导胱天蛋白酶活性可以提供大量细胞内蛋白质的降解以导致细胞死亡。例如,细胞凋亡导致的细胞死

亡可能是对结直肠癌细胞的理想效果。

[0010] 如本文所用,除非另有说明,否则“一个”、“一种”、“该/所述”、“至少一个”、“许多”和“一个或多个”可以互换使用。术语“和/或”意指所列项目中的一个、一或多个或所有。通过端点对数值范围的叙述包括所述范围中所包含的所有数字(例如1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等)。

[0011] 如本文所公开的,诱导胱天蛋白酶活性的方法包括使细胞与治疗化合物接触。如本文所用,“治疗化合物”是指可由以下式I表示的化合物:



[0013] 其中治疗化合物为无规共聚物, R^1 选自氢和羟基, R^2 选自氢和羟基, R^1 与 R^2 不同, x 和 y 之和为4至20,000。

[0014] 包括从4到20,000的所有单个值和子范围;例如, x 和 y 的总和可以是4、5、6、7、8或10的下限到20,000、19,000、18,000、17,000、16,000或15,000的上限。

[0015] 如上所述,治疗化合物是无规共聚物。本公开的一个或多个实施方案规定 x 不同于 y 。本公开的一个或多个实施方案规定 x 与 y 相同。虽然式I示出了单个 x 基团和单个 y 基团,但本领域普通技术人员将理解,由式I表示的治疗化合物可以包括位于治疗化合物的聚合结构中不同位置的多个 x 基团和/或多个 y 基团,使得治疗化合物是无规共聚物。

[0016] 由式I表示的治疗化合物可被称为聚(乙二醇-无规-丙二醇)。本公开的实施方案规定,治疗化合物是无规共聚物,即无规环氧乙烷/环氧丙烷共聚物。例如,可以通过使用丙二醇和/或二丙二醇作为引发剂并加入环氧乙烷和环氧丙烷的混合原料来形成治疗化合物。

[0017] 一个或多个实施方案规定治疗化合物是未修饰的,其可称为未取代的。换言之,治疗化合物的聚合物主链仅包括衍生自环氧乙烷和环氧丙烷的结构单元。

[0018] 治疗化合物可包括基于治疗化合物的总重量为10至90重量%的衍生自环氧乙烷的结构单元。包括10至90重量%的所有个别值和子范围;例如,基于治疗化合物的总重量,治疗化合物可以包括10、15、20、30或40重量%的下限至90、85、80、70或60重量%的上限的衍生自环氧乙烷的结构单元。

[0019] 治疗化合物可包括基于治疗化合物的总重量为10至90重量%的衍生自环氧丙烷的结构单元。包括10至90重量%的所有个别值和子范围;例如,基于治疗化合物的总重量,治疗化合物可以包括10、15、20、30或40重量%的下限至90、85、80、70或60重量%的上限的衍生自环氧丙烷的结构单元。

[0020] 本公开的实施方案提供治疗化合物具有200至2,000,000g/mol的数均分子量(M_n)。包括从200到2,000,000g/mol的所有单个值和子范围;例如,治疗化合物可以具有从200、300、400、450、500或600g/mol的下限到2,000,000、1,750,000、1,500,000、1,250,000、1,000,000、750,000、500,000、250,000、100,000、75,000、50,000、25,000、10,000、8000、7500、7000或6500g/mol的上限。

[0021] 可使用已知方法、设备和/或条件制备治疗化合物,其对于不同应用可变化。治疗

化合物可商购获得。

[0022] 如提及的,如本文所公开的,诱导胱天蛋白酶活性的方法包括使细胞与治疗化合物接触。本公开的一个或多个实施方案提供在体内发生细胞与治疗化合物的接触。本公开的一个或多个实施方案提供在体外发生细胞与治疗化合物的接触。可以通过使用多种不同的已知方法、设备和/或条件使细胞与治疗化合物接触。各种方法、设备和/或条件可用于不同的应用。

[0023] 治疗化合物可以与已知的治疗培养基一起使用。例如,治疗化合物可以在接触细胞之前溶解在已知的治疗培养基中以提供有效量。一个或多个实施方案规定,治疗化合物和治疗培养基可以组合以形成溶液。该溶液可以是均匀溶液。治疗培养基的实例包括但不限于DMEM(Dulbecco's Modified Eagle培养基)、RPMI 1640和McCoy's 5A,以及它们的组合等。许多治疗培养基是可商购的。

[0024] 治疗化合物在治疗培养基中可以具有0.001毫摩尔(mM)至75mM的浓度。包括从0.001到75mM的所有单个值和子范围;例如,有效浓度可以是在治疗培养基中0.001、0.005、0.01、0.1或1.0mM的下限至75、72、70、68或65mM的上限的治疗化合物。

[0025] 细胞可以与有效量的治疗化合物接触。如本文所用,术语“有效量”可与“治疗有效量”和/或“治疗量”互换使用,是指足以提供预期应用例如诱导胱天蛋白酶活性的治疗化合物的量。使细胞与有效量的治疗化合物接触可以期望地提供疾病治疗,例如结直肠癌治疗,其中不期望的细胞因诱导胱天蛋白酶活性而导致的细胞凋亡而死亡。有效量可取决于具体应用(例如体外或体内)、所治疗的受试者(例如受试者的体重和年龄)、疾病状况的严重程度和/或施用方式等考虑因素而变化,本领域普通技术人员可以容易地确定。如本文所用,被治疗的“受试者”是指动物界的任何成员,例如哺乳动物,包括人。

[0026] 本公开的实施方案规定,具体剂量可以根据所使用的具体治疗化合物、要遵循的给药方案、施用时间和/或携带治疗化合物的物理递送系统而变化。例如,有效量的治疗化合物可以通过单次给药或多次给药与细胞接触。

[0027] 本公开的实施方案规定,与治疗化合物接触的细胞是癌细胞。例如,细胞可以是结直肠癌细胞。结直肠癌细胞也可称为结肠癌细胞、肠癌细胞和/或结直肠腺癌细胞。本公开的一个或多个实施方案规定,额外的细胞,即非癌细胞,可以与治疗化合物接触。

[0028] 尽管不打算受理理论的束缚,胱天蛋白酶(可以称为半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶)是参与细胞凋亡的半胱氨酸蛋白酶家族。有两种类型的胱天蛋白酶:起始物胱天蛋白酶,包括胱天蛋白酶2、8、9、10、11、12,和效应物胱天蛋白酶,包括胱天蛋白酶3、6、7。本公开的一个或多个实施方案提供了使细胞与治疗化合物接触诱导效应物胱天蛋白酶活性。本公开的一个或多个实施方案提供了胱天蛋白酶选自胱天蛋白酶3、胱天蛋白酶6、胱天蛋白酶7或其组合。

[0029] 如上所述,诱导胱天蛋白酶活性可以有利地诱导细胞凋亡。诱导的胱天蛋白酶活性可以通过多种不同的已知方法、设备和/或条件来确定。例如,诱导的胱天蛋白酶活性可由大于一(>1)的平均相对胱天蛋白酶活性证明,例如,对于多次实验运行,如通过胱天蛋白酶-Glo 3/7测定4.B确定的。96孔板中细胞的标准方案可从Promega获得。如本文所用,“相对胱天蛋白酶活性”可与相对细胞凋亡互换使用。

[0030] 与用于癌症治疗的一些其他聚合化合物相比,如本文所讨论的,使用治疗化合物

可以有利地提供改进的即降低的通便作用。与相对较大的通便作用相关的一些其他聚合化合物相比,这种降低的通便作用可有助于提供患者顺应性的期望增加。

[0031] 本公开的一个或多个实施方案提供了一种治疗结直肠癌的方法。该方法可以包括使结直肠癌细胞与治疗化合物接触。

[0032] 本公开的一个或多个实施方案提供了一种治疗癌症的方法。该方法可以包括向哺乳动物施用治疗化合物。

[0033] 实施例

[0034] 在实例中,使用材料的各种术语和名称,所述术语和名称包括例如以下:

[0035] 聚(乙二醇-无规-丙二醇)(Mn为2500g/mol;从Sigma-Aldrich获得);

[0036] 细胞(人结肠;结直肠腺癌;HT-29(ATCC®HTB-3);从ATCC获得);

[0037] McCoy's 5A(生长培养基;从ThermoFisher Scientific获得);

[0038] 胎牛血清(从ATCC获得);

[0039] Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(GIBCO 14190-144;从ThermoFisher Scientific获得);

[0040] 完全生长培养基(ATCC®30-2007;从ATCC获得);

[0041] 胰蛋白酶-EDTA(GIBCO胰蛋白酶-EDTA(0.25%);目录号25200056;从ThermoFisher Scientific获得);

[0042] 噻唑蓝四唑溴化物(得自ThermoFisher Scientific);

[0043] 含钙和镁的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(GIBCO 14040-133;从ThermoFisher Scientific获得);

[0044] Caspase-Glo 3/7 Assay(发光测定;目录号G8093;从Promega获得);

[0045] 二甲基亚砜(目录号276855;从Sigma-Aldrich获得)。

[0046] 培养启动和维持

[0047] 如下进行培养启动和维持。根据“解冻、繁殖和冷冻保存方案”NCI-PBCF-HTB38(HT-29)结肠腺癌(ATCC®HTB-38™);2012年2月27日;版本1.6进行培养启动和维持。

[0048] 启动HT-29(ATCC®HTB-38™)细胞(每mL含有约 1×10^6 个细胞)并接种到含有McCoy's 5A和胎牛血清(10%(v/v))的T-25烧瓶中。然后,使用ATCC®30-2007(在37°C水浴中温热至少15分钟)扩增HT-29细胞。细胞在保持在37°C和5%CO₂的加湿培养箱(SANYO INCT-16-CMT;MCO-19AIC(UV))中生长。然后,将细胞用1XDulbecco磷酸盐缓冲盐水冲洗并在T-75烧瓶中使用1X胰蛋白酶-EDTA每周传代培养1至3次,应用≤5分钟;通过向分离的细胞中加入完全生长培养基来终止胰蛋白酶-EDTA的酶促作用。然后,在达到80%到90%汇合时,将细胞分成以下分流比范围:1:5到1:16。记录传代培养和生长扩增活动,例如传代数、%汇合、%存活率(仅在实验设置日)和所有阶段的细胞形态。细胞保持对数期生长。

[0049] 细胞培养铺板(第0天)

[0050] 细胞培养铺板如下进行。用胰蛋白酶-EDTA和完全生长培养基从单个80%到90%汇合的T-75烧瓶中收集细胞悬浮液。为了获得细胞浓度和存活率,使用COUNTESS自动细胞计数器(INVITROGEN C10227;CNTR-7-CMT)获得细胞计数,其中每个载玻片的2个小室都提供10μL的1:1、0.4%台盼蓝染料(INVITROGEN T10282)和细胞悬液的每一种。对单个载玻片

的两个室的细胞计数和存活率百分比进行平均。然后,使用多通道移液器将含有完全生长培养基的活细胞(定义为存活率 $\geq 90\%$)铺板到无菌96孔板上。每个细胞密度,每孔5000到6000个细胞(每毫升40,000到48,000个细胞)被添加到每个孔中,除了用作‘仅盐水’无细胞对照孔的孔;从板上A开始到H行,每孔加入等体积的125 μL 细胞悬液。用于2个终点(细胞凋亡和细胞毒性)中的每一个的板分别是实心白色板和透明板。将细胞温育 24 ± 2 小时以允许附着。

[0051] 聚(乙二醇-无规-丙二醇)原料制备

[0052] 在无菌盐水中以各自目标浓度的聚(乙二醇-无规-丙二醇)制备储备溶液。对于测定,根据高分子量导致的溶解度限制,如有必要,调整至较低储备浓度制剂(w/v)以生成溶液或可移液悬浮液,或者在用于测定之前通过添加少量盐水、连续混合、涡旋、超声处理或搅拌实现增溶。如果溶解需要,在与聚(乙二醇-无规-丙二醇)混合之前将盐水预热至 37°C 。在细胞悬浮铺板当天(第0天),每种测试物质制备的总体积为10mL。

[0053] 细胞毒性试剂制备

[0054] 在含钙和镁的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水中,以5mg/mL制备溴化噻唑蓝四唑鎓。每个设置日(第0天)准备30mL的总体积(w/v)并储存在 4°C 下直至使用。

[0055] 给药溶液制备(第0天)

[0056] 在McCoy's 5A和1%胎牛血清每一种的总15mL中制备每种测试物质原液的给药溶液/悬浮液。使用不同量的给药原液以获得从0.0015到60mM的给药溶液/悬浮液。在无菌贮器中制备给药溶液/悬浮液并用移液管反复混合直至达到可见的均匀性。使用容量为2mL的无菌96深孔块,对于治疗组,将2mL给药溶液/悬浮液添加到6个重复孔中的每一个,对于仅盐水细胞对照和仅盐水‘无细胞’背景校正对照,添加到12个孔中的每一个。按照半随机统计设计建立所述板。每种测试物质都通过数字和颜色代码进行识别,用于识别待处理的孔。用密封胶带、板盖覆盖块,并放入 4°C 实验室冰箱(Fischer Scientific,135B1;RFR-22-CMT)中过夜。

[0057] 处理(第1天)

[0058] 从冰箱中取出所有含有给药溶液/悬浮液的96深孔块,并将其置于 37°C 珠浴中至少30分钟。在铺板后大约24小时,从培养箱中取出孔板并一次处理一个。使用从A行开始到H行的6孔抽吸装置抽吸细胞板中的所有孔。使用多通道移液器,将100 μL 的给药溶液/悬浮液(来自块)添加到96孔细胞处理板;从A行开始到H行(相同顺序)。所有孔一次抽吸和处理2行,以防止孔干燥并保持细胞附着和活力;每行都更换了移液器吸头。将所有板置于培养箱中,并在收获前处理 24 ± 2 或 48 ± 2 小时。

[0059] 收获(第2天和第3天)

[0060] 细胞凋亡

[0061] 如下进行细胞凋亡的评估。根据96孔板中细胞的“Caspase-Glo 3/7Assay”4.B.标准方案(Promega)进行细胞凋亡。将Caspase-Glo 3/7Assay组件预热至室温约60分钟。从培养箱中取出(一次一个)白板并吸出处理培养基。使用多通道移液器,将100 μL 的1X Dulbecco磷酸盐缓冲盐水加入96孔板的每个孔中。将测定试剂(缓冲液和底物)手动混合并添加到试剂贮器中;使用多通道移液器,将100 μL 测定试剂混合物添加到96孔板的每个孔中。将板(用箔保护避光)置于板振荡器上并允许在室温下以约800rpm旋转5分钟。然后在分

析前将板在室温下再温育25分钟。在FLUOstar Omega Plate Reader上对每个板以相对光单位 (RLU) 为单位记录发光。

[0062] 细胞毒性

[0063] 如下进行细胞毒性的评估。将如前所述的细胞毒性试剂 (5mg/mL) 预热至室温, 约30分钟, 然后稀释到含钙和镁的1X Dulbecco磷酸盐缓冲盐水中, 以提供0.675mg/mL的浓度 (最终)。从培养箱中取出透明板 (一次一个) 并吸出处理培养基。使用多通道移液器, 将200 μ L细胞毒性试剂 (最终) 加入96孔板的每个孔中; 然后将板用密封胶带覆盖并在加湿的37 $^{\circ}$ C培养箱中温育4小时。温育后, 吸出上清液, 将二甲基亚砜 (200 μ L) 添加到每个孔中。通过重复移液彻底混合后, 将细胞裂解物转移到新的透明96孔板中, 并在FLUOstar Omega读板机上对600和630nm处的吸光度进行定量。

[0064] 分析

[0065] 相对胰天蛋白酶活性计算如下: $(RLU_{\text{前景}}) - (RLU_{\text{仅盐水 无细胞 对照}}) = (RLU_{\text{背景校正}})$;

[0066] $(\text{每个含有测试物质的孔的 } (RLU_{\text{背景校正}})) / (12 \text{ 个仅盐水对照孔的平均值 } (RLU_{\text{前景}})) =$
相对胰天蛋白酶活性; 其中RLU=相对光单位。

[0067] 每个含有测试物质的孔的相对胰天蛋白酶活性/6次重复=平均相对胰天蛋白酶活性。表中报告了各种使用浓度的结果。

[0068] 细胞存活率计算如下:

[0069] $(Abs_{600\text{前景}}) - (Abs_{600\text{仅盐水 无细胞 对照}}) = (Abs_{600\text{背景校正}})$

[0070] $(Abs_{630\text{前景}}) - (Abs_{630\text{仅盐水 无细胞 对照}}) = (Abs_{630\text{背景校正}})$

[0071] $(Abs_{600\text{背景校正}}) - (Abs_{630\text{背景校正}}) = (Abs_{600-630})$

[0072] $(\text{每个含有测试物质的孔的 } (Abs_{600-630})) / (12 \text{ 个仅盐水对照孔的平均 } (Abs_{600-630})) =$
%细胞存活率

[0073] 每个含有测试物质的孔的%细胞存活率/6次重复=平均%细胞存活率。表2中报告了各种使用浓度的结果。

[0074] 表1

	聚(乙二醇-无规-丙二醇) [15 mM]	聚(乙二醇-无规-丙二醇) [30mM]	聚(乙二醇-无规-丙二醇) [60 mM]
平均相对胱天蛋白酶活性 (运行 1)	1.35	1.83	2.98
相对胱天蛋白酶活性标准偏差 (运行 1)	0.13	0.16	0.42
平均相对胱天蛋白酶活性 (运行 2)	1.36	1.44	1.64
相对胱天蛋白酶活性标准偏差 (运行 2)	0.09	0.11	0.27
平均相对胱天蛋白酶活性 (运行 3)	1.30	1.51	2.03
相对胱天蛋白酶活性标准偏差 (运行 3)	0.17	0.07	0.46
平均相对胱天蛋白酶活性 (运行 1、2、3)	1.34	1.59	2.22
相对胱天蛋白酶活性标准偏差 (运行 1、2、3)	0.03	0.21	0.69

[0076] 表1的数据说明,当细胞暴露于15、30和60mM浓度的聚(乙二醇-无规-丙二醇)时提供有利的相对胱天蛋白酶活性,即平均相对胱天蛋白酶活性>1,如各自平均相对胱天蛋白酶活性(运行1、2、3)值所示。

[0077] 表2

	聚(乙二醇-无规-丙二醇) [15 mM]	聚(乙二醇-无规-丙二醇) [30mM]	聚(乙二醇-无规-丙二醇) [60 mM]
平均存活率% (运行 1)	129	101	66
存活率标准偏差% (运行 1)	14	38	20
平均存活率% (运行 2)	155	158	54
存活率标准偏差% (运行 2)	42	29	45
平均存活率% (运行 3)	97	90	37
存活率标准偏差% (运行 3)	20	85	13
平均存活率% (运行 1、2、3)	127	116	52
存活率标准偏差% (运行 1、2、3)	29	37	15

[0079] 表2的数据说明,当细胞暴露于15、30和60mM浓度的聚(乙二醇-无规-丙二醇)时在24小时后提供期望的足够的存活率,即对于(运行1、2、3),平均存活率%为50%或更大。