[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780023555.6

[43] 公开日 2009 年 7 月 8 日

[11] 公开号 CN 101478988A

[22] 申请日 2007.5.4
[21] 申请号 200780023555.6
[30] 优先权
[32] 2006. 5. 4 [33] GB [31] 0608806.6
[86] 国际申请 PCT/GB2007/001671 2007.5.4
[87] 国际公布 WO2007/132178 英 2007.11.22
[85] 进入国家阶段日期 2008.12.23
[71] 申请人 利波佩普蒂德有限公司
地址 瑞典斯德哥尔摩
[72] 发明人 莫娜·斯塔勒 贡特尔·韦伯
[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司
代理人 高龙鑫 吴小瑛
权利要求书 6 页 说明书 69 页 附图 25 页

[54] 发明名称

联合治疗产品及其应用

[57] 摘要

本发明提供了一种组合产品，其包含抑制 hCAP18/LL－37 生物活性的第一试剂和抑制 EGF 受体生物活性的第二试剂，其中将组分(A)和(B)分别与药学上可接受的辅料、稀释剂或载体配成混合物。 在优选的实施方案中，所述试剂改变 hCAP18/LL－37 和/或 EGF 受体的转录、翻译和/或结合特性。 优选地，所述试剂选自于由小干扰 RNA(siRNA)分子、反义寡核苷酸和对 hCAP18/LL－37 和/或 EGF 受体具有结合亲和力的化合物组成的组。本发明还提供了抑制患者体内癌细胞增殖和/或转移的方法以及用于癌症治疗的药物组合物。

1. 一种组合产品，其包含：

（A）第一试剂，其抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性；和

（B）第二试剂，其抑制 EGF 受体的生物活性；

其中将组分（A）和（B）中的每一个与药学上可接受的辅料、稀释剂或载体混合进行配制。

2. 如权利要求 1 所述的组合产品，其包括药物制剂，所述药物制剂包含抑制 hCAP18/LL-37 生物活性的第一试剂、抑制 EGF 受体生物活性的第二试剂和药学上可接受的辅料、稀释剂或载体。

3. 如权利要求 1 所述的组合产品，其包括包含以下组分的试剂盒：

（A）药物制剂，其包含抑制 hCAP18/LL-37 生物活性的第一试剂与药学上可接受的辅料、稀释剂或载体的混合物；以及

（B）药物制剂，其包含抑制 EGF 受体生物活性的第二试剂与药学上可接受的辅料、稀释剂或载体的混合物，

其中组分（A）和（B）都以适合彼此联合给药的方式提供。

4. 如前述任一项权利要求中所述的组合产品，其中被第二试剂抑制的所述 EGF 受体选自 ErbB1（EGF-R）、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 中的至少一个。

5. 如前述任一项权利要求中所述的组合产品，其中所述第一试剂通过改变 hCAP18/LL-37 的转录、翻译和/或结合特性来抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性，和/或所述第二试剂通过改变 EGF 受体的转录、翻译和/或结合特性来抑制 EGF 受体的生物活性。

6. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的组合产品，其中所述第一试剂是 hCAP18/LL-37 转录的抑制剂，和/或所述第二试剂是 EGF 受体转录的抑制剂。

7. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的组合产品，其中所述第一试剂是 hCAP18/LL-37 翻译的抑制剂，和/或所述第二试剂是 EGF 受体翻译的抑制剂。

8. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的组合产品，其中所述第一试剂是 hCAP18/LL-37 结合特性的抑制剂，和/或所述第二试剂是 EGF 受体结合特性的抑制剂。

9. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的组合产品，其中所述第一试剂是

hCAP18/LL-37 受体的拮抗剂，和/或所述第二试剂是 EGF 受体的拮抗剂。

10. 如权利要求 9 所述的组合产品，其中所述 hCAP18/LL-37 受体为 FPRL1 或相关受体。

11. 如前述任一项权利要求所述的组合产品，其中所述第一试剂能够选择性地抑制癌细胞内的 hCAP18/LL-37 的生物活性，和/或所述第二试剂能够选择性地抑制癌细胞内的 EGF 受体的生物活性。

12. 如前述任一项权利要求所述的组合产品，其中与没有接触所述第一试剂的癌细胞内的 hCAP18/LL-37 的生物活性相比，所述第一试剂能够抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性 10%或更多；和/或与没有接触所述第二试剂的癌细胞内的 EGF 受体的生物活性相比，所述第二试剂能够抑制 EGF 受体的生物活性 10%或更多。

13. 如前述任一项权利要求所述的组合产品，其中所述第一试剂和/或第二试剂选自由小干扰 RNA（siRNA）分子、反义寡核苷酸、对 hCAP18/LL-37 和/或对 EGF 受体具有结合亲和力的化合物、以及小抑制剂化合物组成的组。

14. 如前述任一项权利要求所述的组合产品，其中所述第一试剂和/或第二试剂为小干扰 RNA（siRNA）分子。

15. 如权利要求 14 所述的组合产品，其中所述 siRNA 分子的长度为 19 至 23 个核苷酸。

16. 如权利要求 14 或 15 所述的组合产品，其中所述第一试剂为 siRNA 分子，其包含核苷酸序列 SEQ ID NO:1 的片段或其变体，或由核苷酸序列 SEQ ID NO:1 的片段或其变体组成。

17. 如权利要求 14 至 16 中任一项所述的组合产品，其中所述第二试剂为 siRNA 分子，其包含 ErbB1（EGF-R）、ErbB2、ErbB3 或 ErbB4 mRNA 的核苷酸序列的片段或其变体，或由 ErbB1（EGF-R）、ErbB2、ErbB3 或 ErbB4 mRNA 的核苷酸序列的片段或其变体组成。

18. 如权利要求 1 至 13 中任一项所述的组合产品，其中所述第一试剂和/或第二试剂为反义寡核苷酸。

19. 如权利要求 18 所述的组合产品，其中所述反义寡核苷酸的长度为 15 至 35 个核苷酸。

20. 如权利要求 18 或 19 所述的组合产品，其中所述第一试剂为反义寡

核苷酸，其包含核苷酸 SEQ ID NO:1 的片段或其变体，或由核苷酸 SEQ ID NO:1 的片段或其变体组成。

21. 如权利要求 18 至 20 中任一项所述的组合产品，其中所述第二试剂为反义寡核苷酸，其包含 ErbB1（EGF-R）mRNA、ErbB2 mRNA、ErbB3 mRNA 或 ErbB4 mRNA 的核苷酸序列的片段或其变体，或由 ErbB1（EGF-R）、ErbB2、ErbB3 或 ErbB4 mRNA 的核苷酸序列的片段或其变体组成。

22. 如权利要求 1 至 13 中任一项所述的组合产品，其中所述第一试剂为对 hCAP18/LL-37 具有结合亲和力的化合物，并且/或所述第二试剂为对 EGF 受体具有结合亲和力的化合物。

23. 如权利要求 22 所述的组合产品，其中所述化合物包含多肽或由多肽组成。

24. 如权利要求 23 所述的组合产品，其中所述多肽为抗体或其抗原结合片段。

25. 如权利要求 24 所述的组合产品，其中所述抗体或其抗原结合片段选自由 Fv 片段、Fab 样片段、单可变域和域抗体组成的组。

26. 如权利要求 24 或 25 所述的组合产品，其中所述抗体或其抗原结合片段是人源化的。

27. 如权利要求 1 至 13 的任一项所述的组合产品，其中所述第一试剂和/或第二试剂为小抑制剂化合物。

28. 如权利要求 27 所述的组合产品，其中所述化合物对 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体具有配体结合能力。

29. 如前述任一项权利要求所述的组合产品，其中所述第一试剂和/或第二试剂能够被选择性地递送至癌细胞和/或被癌细胞选择性地激活。

30. 如权利要求 29 所述的组合产品，其中所述第一试剂和/或第二试剂包含靶细胞特异性部分。

31. 如权利要求 30 所述的组合产品，其中所述靶细胞特异性部分为抗体或其抗原结合片段。

32. 如权利要求 31 所述的组合产品，其中所述抗体或其抗原结合片段是人源化的。

33. 如权利要求 31 或 32 所述的组合产品，其中所述抗体或其抗原结合

片段对表达在癌细胞表面的抗原具有特异性。

34. 如权利要求 33 所述的组合产品，其中表达在所述癌细胞表面的抗原选自以下组成的组：EGF 受体（如 ErbB2）、C46、85A12、H17E2、NR-LU-10、HMFG1、SM-3（IgG1）、W14、L6（IgG2a）、1F5（IgG2a）、甲胎蛋白、Ca-125、前列腺特异性抗原和表皮生长因子受体家族的成员。

35. 如权利要求 34 所述的组合产品，其中所述表达在癌细胞表面的抗原为 ErbB2。

36. 如前述任一项权利要求所述的组合产品，其中所述第一试剂和/或第二试剂是被癌细胞选择性激活的前药。

37. 如前述权利要求 1 至 36 的任一项所述的组合产品，其中所述组分（A）和（B）在癌症治疗中适合贯序、单独和/或同时使用。

38. 如权利要求 37 所述的组合产品，其中所述癌症治疗包括抑制癌细胞的增殖和/或转移。

39. 如权利要求 38 所述的组合产品，其中所述癌细胞为上皮细胞。

40. 如权利要求 38 所述的组合产品，其中所述癌细胞为鳞状细胞。

41. 如权利要求 38 至 40 的任一项所述的组合产品，其中所述癌细胞选自于由以下癌细胞组成的组：乳腺癌细胞、胆管癌细胞、脑癌细胞、结肠癌细胞、胃癌细胞、生殖器官癌细胞、肺和气管癌细胞、皮肤癌细胞、胆囊癌细胞、肝癌细胞、鼻咽癌细胞、神经细胞癌细胞、肾癌细胞、前列腺癌细胞、淋巴腺癌细胞、胃肠道癌细胞和内分泌系统癌细胞。

42. 如权利要求 41 所述的组合产品，其中所述癌细胞为乳腺癌细胞。

43. 如权利要求 42 所述的组合产品，其中所述乳腺癌细胞为 Elston III 级细胞。

44. 如权利要求 38 至 43 中任一项所述的组合产品，其中所述癌细胞是转移性的。

45. 制备如权利要求 1 至 44 中任一项所定义的组合产品的方法，其包括将权利要求 1 至 44 中任一项所定义的组分（A）与权利要求 1 至 44 中任一项所定义的组分（B）组合，从而使所述两个组分适合彼此联合给药。

46. 试剂盒，其包括

（i）如权利要求 1 至 44 中任一项所定义的组分（A）和（B）中的至少

一个；以及

（ii）所述组分与另一个组分联合使用的说明书。

47. 如权利要求 1 至 44 中任一项所述的组合产品或如权利要求 46 定义的试剂盒，其用于癌症治疗中。

48. 治疗癌症的方法，其包括给患有癌症或易患癌症的患者施用如权利要求 1 至 44 中任一项所定义的组合产品或如权利要求 46 所定义的试剂盒。

49. 抑制患者体内癌细胞增殖和/或转移的方法，其包括给患者施用权利要求 1 至 44 所定义的组合产品。

50. 如权利要求 49 所述的方法，其中所述患者为人。

51. 如权利要求 49 或 50 所述的方法，其中所述试剂被选择性地递送至癌细胞和/或被癌细胞选择性地激活。

52. 如权利要求 1 至 44 中任一项所述的组合产品，其用于医药中。

53. 如权利要求 52 所述的组合产品，其用于癌症治疗中。

54. 药物组合物，其包含权利要求 1 至 44 中任一项所述的组合产品和药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

55. 如权利要求 54 所述的药物组合物，其适合非肠胃给药。

56. 如权利要求 54 或 55 所述的药物组合物，其中所述制剂能够向所述癌细胞靶向递送所述试剂。

57. 权利要求 1 至 41 中任一项所述的组合产品在制备用于抑制癌细胞增殖和/或转移的药物中的应用。

58. 如权利要求 48 至 51 中任一项所述的方法或如权利要求 57 所述的应用，其中所述癌细胞为上皮细胞。

59. 如权利要求 48 至 51 中任一项所述的方法或如权利要求 57 所述的应用，其中所述癌细胞为鳞状细胞。

60. 如权利要求 48 至 51 中任一项所述的方法或如权利要求 57 所述的应用，其中所述癌细胞选自由以下癌细胞组成的组：乳腺癌细胞、胆管癌细胞、脑癌细胞、结肠癌细胞、胃癌细胞、生殖器官癌细胞、肺和气管癌细胞、皮肤癌细胞、胆囊癌细胞、肝癌细胞、鼻咽癌细胞、神经细胞癌细胞、肾癌细胞、前列腺癌细胞、淋巴腺癌细胞和胃肠道癌细胞。

61. 如权利要求 60 所述的方法或应用，其中所述癌细胞为乳腺癌细胞。

62. 如权利要求 61 所述的方法或应用，其中所述乳腺癌细胞是雌激素阳性的。

63. 如权利要求 60 至 62 中任一项所述的方法或应用，其中所述癌细胞是转移性的。

联合治疗产品及其应用

发明领域

本发明涉及药学活性物质或试剂（agent）的新组合在癌症治疗中的应用。特别地，本发明提供了能够抑制乳腺癌细胞增殖和/或转移的联合疗法。

背景技术

抗菌蛋白是先天性免疫系统中的重要效应物。人cathelicidin抗菌蛋白hCAP18是人体中唯一已知的cathelicidin，由保守的cathelin域和称为LL-37的可变C末端组成（Gudmundsson等, 1996, *Eur J Biochem* 1238: 325-32; Zanetti等, 1995, *FEBS Lett* 374: 1-5）。对全蛋白进行细胞外蛋白水解处理释放LL-37肽，LL-37肽具有广泛的抗菌活性（Gudmundsson等, 1995, *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7085-9; Agerberth等, 1995, *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 195-99）和对宿主细胞的作用，其中一些作用由G蛋白偶联受体甲酰化肽样受体1（FPRL1）介导（Yang等, 2000, *J Exp Med* 192: 1069-74; Koczulla等, 2003, *J Clin Invest* 111: 1665-72）。hCAP18存在于白细胞中（Cowland等, 1995, *FEBS Lett* 368: 173-76）并在对其上调的皮肤和其它上皮细胞中表达，这种上调与炎症（Cowland等, 1995, *FEBS Lett* 368: 173-76; Frohm等, 1997, *J Biol Chem* 272: 15258-63）和损伤（Dorschner等, 2001, *J Invest Dermatol* 117: 91-97; Heilborn等, 2003, *J Invest Dermatol* 120: 379-89）相关并与先天性屏障保护中的作用一致。最近，已经提出包括cathelicidin的抗菌蛋白还在对抗肿瘤的非特异性宿主防御中起作用（Winder等, 1998, *Biochem Biophys Res Commun* 242: 608-12; Ohtake等, 1999, *Br J Cancer* 181: 393-403.）。

表皮生长因子（EGF）家族受体酪氨酸激酶由EGF-R（ErbB1）、ErbB2（Neu）、ErbB3和ErbB4四种受体组成。EGF-R家族的成员包括细胞质内酪氨酸激酶域、单跨膜域和参与配体结合以及受体二聚化的细胞外域。EGF-R的活化触发一系列不同的细胞通路。

在对毒性环境刺激（例如，紫外线照射或受体与EGF结合）的应答过程

中，EGF-R形成均二聚体或与其它家族成员形成异二聚体。每一种二聚受体复合体都将通过招募包含不同Src同源区2（SH2）的效应蛋白触发特定的信号通路。二聚作用引起自磷酸化作用，从而触发下游事件级联使细胞应答（例如，细胞增殖或凋亡）达到最高程度。

激活的 EGF-R 二聚体与偶联在鸟嘌呤核苷酸释放因子 SOS 上的衔接蛋白 Grb 形成复合体。所述 Grb-SOS 复合体可以直接地或通过 Shc 间接地结合所述受体的磷酸化酪氨酸位点。这些蛋白质的相互作用使 SOS 与 Ras 紧密接近从而激活 Ras。Ras 的激活随后激活 ERK 和 JNK 信号通路，进而依次激活转录因子（例如 c-fos、AP-1 和 Elk-1）从而促进基因表达并导致细胞增殖。

由于基因放大作用产生的过量 EGRT 受体分子与细胞分裂的增加相关，并且可能参与癌性细胞的形成。例如，在 25%的乳腺癌中发现 ErbB2 的过量表达。

发明概述

在本发明的第一方面提供了组合产品，其包含：

（A）抑制 hCAP18/LL-37 生物活性的第一试剂；和

（B）抑制表皮生长因子（EGF）受体生物活性的第二试剂；

其中将组分（A）和（B）分别与药学上可接受的辅料、稀释剂或载体混合进行配制。

所述“试剂”包括所有化学物质，例如，寡核苷酸、多核苷酸、多肽、模拟肽和小化合物。

在优选的实施方案中，本发明的组合产品包括药物制剂，所述药物制剂包含抑制 hCAP18/LL-37 生物活性的第一试剂、抑制 EGF 受体生物活性的第二试剂和药学上可接受的辅料、稀释剂或载体。

在可选的实施方案中，本发明的组合产品包括试剂盒，所述试剂盒包含以下组分：

（A）药物制剂，其包含抑制 hCAP18/LL-37 活性的第一试剂与药学上可接受的辅料、稀释剂或载体的混合物；以及

（B）药物制剂，其包含抑制 EGF 受体活性的第二试剂与药学上可接受的辅料、稀释剂或载体的混合物，

其中组分（A）和（B）中的每一个以适合相互联合给药的形式提供。

通过使所述两个组分相互“组合（联合）”，所述试剂盒的组分（A）和（B）可以：

（i）以单独制剂（即彼此独立）的方式提供，随后将其一起用于联合治疗中相互组合的应用；或者

（ii）以“组合包装”的单独组分的方式包装并呈递，用于联合治疗中相互组合的应用。

因此，关于本发明的组合产品，术语“组合（联合）给药”包括同时或者在时间上足够相近地施用（任选重复施用）组合产品的两个组分（抑制hCAP18/LL-37活性的第一试剂和抑制EGF受体活性的第二试剂），从而与在没有另一组分存在的情况下，于一段疗程内单独施用（任选重复施用）含抑制hCAP18/LL-37活性的第一试剂的制剂或者单独施用含抑制EGF受体活性的第二试剂的制剂相比，使患者能够在相同疗程内获得更多的有益效果。对于确定在一段疗程后组合产品是否对某具体病症产生了更多的有益效果，这将依赖于待治疗或预防的病症，但可以由技术人员按常规方法获知。

优选被抑制的EGF受体选自ErbB1（EGF-R）、ErbB2、ErbB3和ErbB4中的至少一个。

在本发明的优选实施方案中，所述第一试剂通过改变hCAP18/LL-37的转录、翻译、剪切和/或结合特性来抑制hCAP18/LL-37的生物活性，和/或所述第二试剂通过改变EGF受体的转录、翻译和/或结合特性来抑制EGF受体的生物活性。

这种试剂可以利用本领域熟知的方法进行鉴定，例如：

（a）通过例如Northern杂交或定量RT-PCR测定测试试剂对hCAP18/LL-37或EGF受体mRNA表达水平的影响；

（b）通过例如使用抗hCAP18/LL-37或抗EGF受体抗体的免疫测定来测定测试试剂对hCAP18/LL-37或EGF受体蛋白质水平的影响；和

（c）通过测定测试试剂对hCAP18/LL-37或EGF受体活性的功能标志物（例如ErbB2的磷酸化）的影响。

在一个优选实施方案中，所述第一试剂是hCAP18/LL-37的转录抑制剂和/或所述第二试剂是EGF受体的转录抑制剂。

在可选的实施方案中，所述第一试剂是 hCAP18/LL-37 的翻译抑制剂和/或所述第二试剂是 EGF 受体的翻译抑制剂。

在另一个可选的实施方案中，所述第一试剂是 hCAP18/LL-37 结合特性的抑制剂和/或所述第二试剂是 EGF 受体结合特性的抑制剂。例如，所述试剂可以改变 hCAP18/LL-37 构象使其不能再与其受体结合。

在另一个可选实施方案中，所述第一试剂是 hCAP18/LL-37 受体的拮抗剂和/或所述第二试剂是 EGF 受体的拮抗剂。本领域技术人员理解，所述试剂可以通过阻断受体功能直接（即作为受体拮抗剂）或间接地抑制其生物活性。

在一个实施方案中，所述 hCAP18/LL-37 受体为 FRP 家族的受体。

在优选实施方案中，所述第一试剂能够抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性和/或所述第二试剂能够抑制 EGF 受体的生物活性。例如，所述第一试剂可以为 cathelicidin 蛋白水解过程的抑制剂，例如蛋白酶（例如，蛋白酶 3）抑制剂。

在另一个优选实施方案中，癌细胞内的 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体的生物活性受到选择性抑制。

所述“选择性（地）”表示所述试剂以大于其调节其它蛋白质活性的程度抑制癌细胞内的 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体的生物活性。优选地，所述试剂仅抑制 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体的生物活性，但可以理解，作为选择性抑制 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体的下游结果，癌细胞内其它蛋白质的表达和活性也会改变。因此，我们排除了对基因表达和/或癌细胞生长具有非特异性作用的试剂。

本领域的技术人员可以理解，本发明的试剂可以完全地或部分地抑制 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体的生物活性。例如，与没有接触所述试剂的癌细胞内的 hCAP18/LL-37 的生物活性相比，所述试剂可以抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性的至少 10%，优选至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或 90%，并且最优选 100%。在优选实施方案中，与没有接触所述试剂的癌细胞内 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体的生物活性相比，所述试剂能够抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性 50%或以上。

有利地，与没有接触所述第一试剂的癌细胞中 hCAP18/LL-37 的生物活性相比，所述第一试剂能够抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性 50%或更多；和/或与没有接触所述第二试剂的癌细胞中 ERBB2 的生物活性相比，所述第一试剂能够抑制 hCAP18/LL-37 的生物活性 50%或更多。

优选地，所述第一和/或第二试剂选自于由小干扰 RNA（siRNA）分子、反义寡核苷酸和对 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体具有结合亲和力的化合物和小的抑制剂化合物组成的组。

所述第一试剂也可以是小的抑制剂化合物，例如维生素 D 的拮抗剂，如 ZK159222（Schering AG）和 TEI-9647（Tejin Institute for Medical Research,, Tokyo）和维生素 A 的拮抗剂，如 AGN193109（Allergen Pharmaceuticals）。

EGF 受体抑制剂的实例包括：赫赛汀（Herceptin）药物（曲妥珠单抗，Genentech），其是对 ErB2 具有特异性的抗体；爱必妥（Erbitux）药物（西妥昔单抗，Bristol-Meyers Squibb），其是对 EGF-R（ErbB1）具有特异性的抗体；其它单克隆抗体如 MAB225；小分子 IRESSA（吉非替尼（gefitinib），Astra Zeneca），其通过抑制酪氨酸激酶抑制 EGF 受体；和其它酪氨酸激酶抑制剂（例如，PD153035、GW572016 和其它可从如 Calbiochem/Merck 的供应商处商购的抑制剂）。

在优选实施方案中，第一试剂和第二试剂中至少一个为小干扰 RNA（siRNA）分子。

RNA 干扰是一个具有两个步骤过程。第一个步骤称为起始步骤，可能通过 dsRNA 特异性核糖核酸酶 Rnase III 家族成员 Dicer 的作用将输入 dsRNA 降解成 21-23 个核苷酸（nt）的小干扰 RNA（siRNA），所述 Dicer 以 ATP 依赖的方式加工（剪切）dsRNA（直接引入或通过转基因或病毒引入）。连续的剪切将所述 RNA 降解成 19-21bp 的双链（siRNA），每条双链带有长度为 2 个核苷酸的 3'-悬端（Hutvagner & Zamore, 2002, *Curr. Opin. Genetics and Development* 12: 225-232; Bernstein, 2001, *Nature* 409: 363-366）。

在效应步骤中，siRNA 双链与核酸酶复合体结合形成 RNA 诱导沉默复合体（RISC）。RISC 的激活需要 ATP 依赖的 siRNA 双链的解螺旋。随后，活性 RISC 通过碱基配对相互作用靶向同源转录本并从 siRNA 的 3'末端将 mRNA 剪切成 12 个核苷酸的片段（Hutvagner & Zamore, 2002, 如上文；

Hammond 等, 2001, *Nat. Rev. Gen.* 2: 110-119 (2001); Sharp, 2001, *Genes. Dev.* 15: 485-90)。虽然剪切的机制尚未被阐明，但研究表明每一个 RISC 都包含单个 siRNA 和 RNase（Hutvagner & Zamore, 2002, 如上文)。

考虑到 RNAi 突出的能力，现已提出 RNAi 通路中存在放大步骤。放大作用可能通过复制输入 dsRNA 以产生更多 siRNA，或者通过复制所形成的 siRNA 而产生。可选择地或另外地，可能通过 RISC 的多个周转实现放大作用（Hammond 等, 2001, 如上文; Hutvagner & Zamore, 2002, 如上文)。关于 RNAi 的其它信息可以在以下综述中找到：Tuschl, 2001, *Chem. Biochem.* 2: 239-245, Cullen, 2002, *Nat. Immunol.* 3: 597-599 和 Brantl, 2002, *Biochem. Biophys Act.* 1575: 15-25。

可以参考下文完成适合本发明使用的 RNAi 分子的合成。首先，扫描 hCAP18/LL-37 mRNA 序列中 AUG 起始密码子的下游得到 AA 二核苷酸序列。记录出现的每一个 AA 和 3'相邻的 19 个核苷酸作为潜在的 siRNA 靶位点。因为非翻译区（UTR）更富含调控蛋白质的结合位点，优先从开放阅读框中选择 siRNA 靶位点。UTR 结合蛋白质和/或翻译起始复合体可能干扰 siRNA 核酸内切酶复合体的结合（Tuschl, *ChemBiochem.* 2: 239-245)。然而可以理解，靶向非翻译区的 siRNA 也可以起作用。

第二，利用如 BLAST（www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）等序列比对软件比较潜在的靶位点和适当的基因组数据库（如人、小鼠、大鼠等)。选出与其它编码序列具有显著同源性的推定靶位点。

选择合格的靶序列作为 siRNA 合成的模板。优选序列是那些包括低 G/C 含量的序列，因为已经证明与那些具有大于 55%的 G/C 含量的序列相比，这些低 G/C 含量的序列在介导基因沉默中更有效。优选沿靶基因长度选择多个靶位点进行评估。为了更好的评价所选择的 siRNA，优选同时使用阴性对照。阴性对照 siRNA 优选包括与所述 siRNA 相同的核苷酸组成但缺少与基因组的显著同源性。因此，优选使用所述 siRNA 的置乱核苷酸序列(scrambled nuleotide sequence)，前提是所述置乱核苷酸序列与任何其它基因都不具有显著的同源性。

抑制 hCAP18/LL-37 的所述 siRNA 分子优选包含核苷酸序列（SEQ ID NO：1）的片段或其变体。

HCAP18/LL-37 mRNA（登记号：*MN 004345*）

1 taaagcaaac cccagcccac accctggcag gcagccaggg atgggtggat caggaaggct
61 cctggttggg cttttgcatc aggctcaggc tgggcataaa ggaggctcct gtgggctaga
121 gggaggcaga catggggacc atgaagaccc aaagggatgg ccactccctg gggcggtggt
181 cactggtgct cctgctgctg ggcctggtga tgcctctggc catcattgcc caggtcctca
241 gctacaagga agctgtgctt cgtgctatag atggcatcaa ccagcggtcc tcggatgcta
301 acctctaccg cctcctggac ctggacccca ggcccacgat ggatggggac ccagacacgc
361 caaagcctgt gagcttcaca gtgaaggaga cagtgtgccc caggacgaca cagcagtcac
421 cagaggattg tgacttcaag aaggacgggc tggtgaagcg gtgtatgggg acagtgaccc
481 tcaaccaggc caggggctcc tttgacatca gttgtgataa ggataacaag agatttgccc
541 tgctgggtga tttcttccgg aaatctaaag agaagattgg caaagagttt aaaagaattg
601 tccagagaat caaggatttt ttgcggaatc ttgtacccag gacagagtcc tagtgtgtgc
661 cctaccctgg ctcaggcttc tgggctctga gaaataaact atgagagcaa tttcaaaaaa
721 aaaaaaaaaa aaaaaaaaa [SEQ ID NO：1]

所述 siRNA 分子也可包含转录自 ENSG00000164047（基因组序列）的核苷酸序列的片段。

抑制 EGF 受体的所述 siRNA 分子优选包含编码 ErbB1（EGF-R）、ErbB2、ErbB3 或 ErbB4 的 mRNA 核酸序列的片段或其变体。

以下为示例性 mRNA 序列：

EGFR： ENST00000275493（ENSEMBL 数据库登记号）

ERBB2：ENST00000269571

ERBB3：ENST00000267101

ERBB4：ENST00000342788

所述“片段”表示至少 10 个核苷酸，例如至少 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个核苷酸。

所述“变体”表示与 SEQ ID NO：1 的片段具有至少 90%序列一致性或者与 SEQ ID NO：1 的片段具有至少 95%序列一致性，例如至少 95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性的核苷酸序列。

可以利用合适的电脑程序（例如，Wisconsin University of Genetic Computing Group 的 GAP 程序）确定两个多核苷酸间序列一致性的百分比，并且可以理解，一致性的百分比是由序列已经进行最佳比对的多核苷酸计算的。

或者，可以利用 Clustal W 程序（如 Thompson 等, 1994, *Nuc. Acid Res.* 22: 4673-4680 中的阐述）进行比对。

所使用的参数可以如下：

快速两两比对参数：K-tuple（字）大小（K-tuple（word）size）：1；窗口大小（window size）：5；空位开放罚分（gap open penalty）：3；顶部对角线的数量（number of top diagonals）：5。打分方法：x 百分数。

多重比对参数：空位开放罚分（gap open penalty）：10，空位延伸罚分（gap extension penalty），0.05。

打分矩阵：BLOSUM.

或者，可以使用 BESTFIT 程序测定局部序列比对。

siRNA 分子的长度为 19 至 23 个核苷酸是有利的。

在另一个可选实施方案中，第一试剂和第二试剂中至少一个为反义寡核苷酸。

设计能够有效降低 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体的水平/活性的反义分子需要考虑反义方法中关键的两个方面。第一个方面是寡核苷酸向癌细胞细胞质中的递送，第二个方面是寡核苷酸的设计，所述寡核苷酸在细胞中以抑制指定 mRNA 翻译的方式与其特异结合。

现有技术公开了一些递送方式，这些方式可以用于将寡核苷酸有效递送至多种细胞类型中（例如，参见 Luft, 1998, *J Mol Med* 76: 75-6; Kronenwett 等, 1998, *Blood* 91: 852-62; Rajur 等, 1997, *Bioconjug Chem* 8: 935-40; Lavigne 等, 1997, *Biochem Biophys Res Commun* 237: 566-71; Aoki 等, 1997, *Biochem Biophys Res Commun* 231: 540-5）。

此外，可以利用基于热动力学循环鉴定与其靶 mRNA 具有最高预测结合亲和性的序列的算法，其中所述热动力学循环表明了靶 mRNA 和寡核苷酸结构改变的热力学（例如，参见 Walton 等, 1999, *Biotechnol Bioeng* 65: 1-9）。

已知还有一些利用体外系统设计和预测特定寡核苷酸功效的方法（如，

参见 Matveeva 等, 1998, *Nature biotechnology* 16: 1374-1375）。

若干临床试验已经证明反义寡核苷酸的安全性、可行性和活性。例如，已经成功地使用了适合癌症治疗的反义寡核苷酸（Holmlund 等, 1999, *Curr Opin Mol Ther* 1: 372-85; Gerwitz, 1999, *Curr Opin Mol Ther* 1: 297-306）。最近，报道了反义介导的人肝素酶基因表达的抑制可在小鼠模型中抑制人癌细胞的胸膜扩散（Uno 等, 2001, *Cancer Res* 61: 7855-60）。

因此，本领域的技术人员能够容易地设计和实施适合于下调 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体表达的反义方法。

抑制 hCAP18/LL-37 的反义寡核苷酸优选包含核苷酸（SEQ ID NO：1）的片段或其变体。

抑制 EGF 受体的反义寡核苷酸优选包含编码 ErbB1（EGF-R）、ErbB2、ErbB3 或 ErbB4 的 mRNA 核酸序列的片段或其变体。

反义寡核苷酸的长度为 15 至 35 个核苷酸是有利的。例如，现已证明 20-mer 寡核苷酸可抑制表皮生长因子受体 mRNA 的表达（Witters 等, *Breast Cancer Res Treat* 53: 41-50(1999)），并证明 25-mer 寡核苷酸可将促肾上腺皮质激素的表达降低 90%以上（Frankel 等 *J Neurosurg* 91: 261-7(1999)）。然而可以理解，也可以使用长度超出此范围的寡核苷酸，例如 10、11、12、13 或者 14 个碱基，或者 36、37、38、39 或 40 个碱基的寡核苷酸。

本领域的技术人员还可以理解，寡核苷酸可以被细胞内源的核酸酶降解或失活。为了解决这个问题，可以使用修饰寡核苷酸，如改变核苷酸间连接的修饰核苷酸，在所述核苷酸中，天然磷酸二酯键连接已经被其它连接所代替。例如，Agrawal 等(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7079-7083 证实使用寡核苷酸氨基磷酸酯和硫代磷酸酯可使 HIV-1 的组织培养中的抑制提高。Sarin 等(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7448-7451 证明利用寡核苷酸甲基磷酸酯对 HIV-1 的抑制提高。Agrawa 等(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7790-7794 证实可使用核苷酸序列特异性寡核苷酸硫代磷酸酯抑制早期感染和慢性感染的细胞培养物中的 HIV-1 复制。Leither 等(1990)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3430-3434 报道了通过寡核苷酸硫代磷酸酯抑制组织培养中流感病毒的复制。

具有人工连接的寡核苷酸已经显示对体内降解的抗性。例如，Shaw 等

(1991)在 *Nucleic Acids Res.* 19, 747-750 中报道当通过某些加帽结构封闭未修饰的寡核苷酸的 3'末端时，使其变得更能抵抗体内核酸酶，并且未加帽的寡核苷酸硫代磷酸酯在体内不被降解。

在 Agrawal 和 Tang (1990) *Tetrahedron Letters* 31, 7541-7544 中提供了关于合成寡核苷硫代磷酸酯的 H-硫酸酯方法的详细阐述，其公开通过引用并入本文。寡核苷甲基磷酸酯、二硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸酯、桥联氨基磷酸酯、桥联硫代磷酸酯的合成是本领域已知的技术。参见例如 Agrawal 和 Goodchild (1987) *Tetrahedron Letters* 28, 3539; Nielsen 等 (1988) *Tetrahedron Letters* 29, 2911; Jager 等 (1988) *Biochemistry* 27, 7237; Uznanski 等 (1987) *Tetrahedron Letters* 28, 3401; Bannwarth (1988) *Helv. Chim. Acta.* 71, 1517; Crosstick 和 Vyle (1989) *Tetrahedron Letters* 30, 4693; Agrawal 等 (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1401-1405，其公开通过引用并入本文。也可能使用其它的合成或生产方法。虽然也可以合成并使用核糖核酸（RNA）序列，但在优选实施方案中所述寡核苷酸为脱氧核糖核酸（DNA）。

优选本发明中使用的寡核苷酸经过设计使其能够抵抗内源性核酸水解酶的降解。寡核苷酸的体内降解产生长度减小的寡核苷酸断裂产物。与其全长的对应物相比，这种断裂产物更有可能参与非特异杂交且更不可能有效。因此，期望使用抵抗体内降解并能够到达靶细胞的寡核苷酸。可以通过用一个或多个分子内人工核苷酸间的连接取代天然的磷酸二酯连接（例如，通过将连接的磷酸酯替换成硫）从而使本发明的寡核苷酸更能够抵抗体内降解。可以使用的连接的实例包括硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、砜、硫酸酯、羰自由基、二硫代磷酸酯、多种氨基磷酸酯、磷酸酯、桥联硫代磷酸酯和桥联氨基磷酸酯。因为其它核苷酸间连接是本领域熟知的，所以这些实例是说明性的而非限制性的。合成具有一个或多个用于取代核苷酸间磷酸二酯连接的所述连接的寡核苷酸是本领域熟知的技术，包括用于产生具有混合的核苷酸间连接的寡核苷酸的合成途径。

可以通过在 5'或 3'末端核苷酸上“加帽”或引入类似基团使寡核苷酸抵抗内源酶的延伸。加帽试剂可商购自如 Applied BioSystems Inc, Foster City, CA 的 Amino-Link II™。加帽方法阐述于如 Shaw 等(1991) *Nucleic Acids Res.* 19, 747-750 和 Agrawal 等(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (17), 7595-7599。

使寡核苷酸抵抗核酸酶攻击的另一个方法是其“自稳定”，如 Tang 等 (1993) *Nucl. Acids Res.* 21, 2729-2735 的阐述。自稳定的寡核苷酸在其 3’末端具有发夹环结构，并且显示提高的对蛇毒磷酸二酯酶、DNA 聚合酶 I 和胎牛血清降解的抗性。寡核苷酸的自稳定区域不干扰与互补核酸的杂交，并且小鼠的药代动力学和稳定性研究表明与其线性对应物相比，自稳定的寡核苷酸在体内的持久性增强。

例如，本发明的 siRNA 分子和/或反义寡核苷酸可以包含选自于下表中的序列或由选自于下表中的序列组成（所述序列也描述于随后的实施例中）：

siRNA 名称	编号	正义序列 （5->3'）	反义序列 （5->3'）
siRNA-CAMP1	14402	GGUCCUCAQCUACAAGGAAtt	UUCCUUGUAGCUGAGGACCtg
siRNA-CAMP2	146365	GGACAGAGUCCUAGUGUGUtt	ACACACUAGGACUCUGUCCtg
siRNA-CAMP3	146364	CCAGAGGAUUGUGACUUCAtt	UGAAGUCACAAUCCUCUGGtg
siRNA-CAMP4	14586	GGAUAACAAGAGAUUUGCCtt	GGCAAAUCUCUUGUUAUCCtt

在另一个可选实施方案中，所述第一试剂是对 hCAP18/LL-37 具有结合亲和力的化合物，所述第二试剂为对 EGF 受体具有结合亲和力的化合物，如蛋白质或碳水化合物。

例如，所述化合物可以与 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体的活性位点基本可逆或基本不可逆地结合。在另一实例中，所述化合物可以与 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体的非活性位点部分结合，从而干扰 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体与配体或受体的结合。在另一实例中，所述化合物可以与 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体的一部分结合，从而通过变构效应降低所述蛋白质的活性。这种变构效应可能是参与 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体活性的自然调控的变构效应，如通过“上游活化剂”激活 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体的变构效应。

检测测试化合物和蛋白质（例如，hCAP18/LL-37 或 EGF 受体）间相互作用的方法是本领域熟知的。例如，可以使用带有离子喷雾质谱/HPLC 的超滤方法或其它物理或分析方法。此外，可以使用荧光能量共振转移（FRET）方法，其中当两个荧光标记部分彼此紧密靠近时，可以通过测定荧光标记的相互作用测定所述荧光标记部分的结合。

检测多肽与大分子（例如 DNA、RNA、蛋白质和磷脂）结合的可选择方法包括表面等离子共振试验，如在 Plant 等, 1995, *Analyt Biochem* 226(2), 342-348 中阐述的。所述方法可以使用标记有如具有放射标记或荧光标记的多肽。

另一个鉴定能够结合多肽的化合物的方法是将多肽与化合物接触并检测和/或测定化合物与所述多肽的任何结合。可以测定化合物与多肽结合的结合常数。本领域技术人员熟知并可以实施适用于检测和/或测定（定量）化合物与多肽结合的方法，例如利用能够高通量操作的方法，如基于芯片的方法。称为 VLSIPS™的新技术已经实现含数十万个或更多不同分子探针的极小芯片的生产。这些生物芯片或阵列具有排列在阵列中的探针，每一个探针具有指定的一个特定位点。现已生产出每个位点是例如 10 微米的尺度的生物芯片。所述芯片可以用于测定靶分子是否与芯片上的任一探针相互作用。在所选择的试验条件下将阵列与靶分子接触后，扫描设备可以检测阵列中的每一个位点，并测定靶分子是否与在所述位点上的探针相互作用。

另一种鉴定对 hCAP18/LL-37 具有结合亲和力的化合物的方法是酵母双杂交系统，在该系统中可以使用本发明的多肽“捕获”结合 hCAP18/LL-37 的蛋白质。在 Fields & Song, *Nature* 340: 245-246 (1989)阐述了所述酵母双杂交系统。

在另一个可选的实施方案中，所述化合物是对 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体具有配体结合能力的化合物。例如，所述第一试剂可以是 hCAP18/LL-37 受体（例如但不限于 FPRL1）的可溶片段。

例如，所述试剂可以是 hCAP18/LL-37 受体（如 FPRL1）的可溶片段。或者，所述试剂可以是模仿抗体的高亲和力分子(所谓“亲和体”（affibody））（例如参见，US 5,831,012 和 www.affibody.se)。这些配体是由基于蛋白 A（金黄色葡萄球菌的表面蛋白质）中一个 IgG 结合域的支架结构的三螺旋束组成的小而简单的蛋白质。这种支架结构具有作为亲和配体的优秀特征，并且可以进行设计使其以高亲和力与任一给定靶蛋白结合。

在另一个可选的实施方案中，所述第一试剂和/或第二试剂为小抑制剂化合物。

所述第一试剂和/或第二试剂优选包含多肽或由多肽组成。

在优选实施方案中，所述多肽为抗体或其抗原结合片段，优选所述抗体或其抗原结合片段选自由 Fv 片段、Fab 样片段、单可变域和域抗体组成的组。所述抗体或其抗原结合片段为人源化的是有利的。所述“抗体”包含基本完整的抗体分子，以及嵌合抗体、人源化抗体、人抗体（其中相对于天然存在的人抗体，至少一个氨基酸被突变）、单链抗体、双特异性抗体（例如对 hCAP18/LL-37 和 EGF 受体都具有亲和力的双特异性抗体）、抗体重链、抗体轻链、抗体重链和/或轻链的同源二聚体或异源二聚体和其抗原结合部分及衍生物。

所述“抗原结合片段”表示抗体中能够结合 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体的功能片段。

优选地，抗原结合片段选自以下构成组：Fv 片段（例如，单链 Fv 和通过有二硫键结合的 Fv）、Fab 样片段（例如，Fab 片段、Fab'片段和 $F(ab)_2$ 片段）、单个可变区（例如，V_H 和 V_L 域）和域抗体（dAbs，包括单域形式和双域形式（即 dAb-连接子-dAb））。

使用抗体片段而不是整个抗体可产生数倍的优势。较小体积的片段可以引起药学特性的提高，例如，对固体组织更好的渗透性。此外，抗原结合片段（例如 Fab、Fv、ScFv 和 dAb 抗体片段）可以在大肠杆菌中表达并分泌，这样可以容易地生产大量的所述片段。

抗体与其抗原结合片段的修饰形式（例如，通过聚乙二醇或其它合适聚合物进行的共价结合修饰）也包括在本发明范围内。

产生抗体和抗体片段的方法是本领域熟知的。例如，可以通过多个方法中的任一个产生抗体，在所述方法中利用了体内诱导产生抗体分子、筛选免疫球蛋白库（Orlandi.等, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 3833-3837; Winter 等, 1991, *Nature* 349: 293-299）或通过培养细胞系产生单克隆抗体。这些方法包括但不限于杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术和 Epstein-Barr 病毒（EBV）-杂交瘤技术（Kohler 等, 1975. *Nature* 256: 4950497; Kozbor 等, 1985. *J. Immunol. Methods* 81: 31-42; Cote 等, 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030; Cole 等, 1984. *Mol. Cell. Biol.* 62: 109-120）。

可以通过已知技术制备抗所选抗原的合适单克隆抗体，例如那些公开在 *"Monoclonal Antibodies: A manual of techniques"*, H Zola (CRC Press, 1988) 和

"Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982)中的技术。

可以利用本领域熟知的方法获取抗体片段（参见，例如 Harlow & Lane, 1988, "*Antibodies: A Laboratory Manual*", Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。例如，可以通过抗体的蛋白水解或通过在大肠杆菌或哺乳动物细胞(例如，中国仓鼠卵巢细胞培养或其它蛋白质表达系统）中表达编码本发明的片段的 DNA 来制备本发明的所述抗体片段。或者，可以通过常规方法由胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完全抗体获取抗体片段。

本领域的技术人员可以理解为了用于人类的治疗和诊断，优选使用人源化的抗体。非人（如小鼠）抗体的人源化形式是基因工程加工的嵌合抗体或优选具有衍生自非人抗体的最小部分的抗体片段。人源化抗体包括这样的抗体，在所述抗体中人抗体（recipient antibody，受者抗体）互补决定区被替换成来自于具有期望功能的非人种属（donor antibody，供者抗体）如小鼠、大鼠或兔的互补决定区的残基。在一些实例中，人抗体的 Fv 骨架残基被相应的非人残基取代。人源化抗体还可以包含这样的残基，所述残基既没有在受者抗体中发现也没有在引入的互补决定区或骨架序列中发现。通常，人源化抗体包含基本上所有的至少一个并且通常为两个的可变域，在所述可变域中所有或基本上所有互补决定区均对应于相应的非人类抗体的互补决定区，并且所有或基本上所有骨架区均相对于相应的人共有序列的骨架区。人源化抗体最好还包含通常衍生自人抗体的抗体恒定区的至少一部分，例如 Fc 区（参见，例如 Jones 等, 1986. *Nature* 321: 522-525; Riechmann 等, 1988, *Nature* 332: 323-329; Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596)。

用于非人抗体人源化的方法是本领域熟知的。通常，人源化的抗体具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基（通常称为引入残基）通常从所引入的可变域获取。基本上可以根据文献所述（参见，如, Jones 等, 1986, *Nature* 321: 522-525; Reichmann 等, 1988. *Nature* 332: 323-327; Verhoeyen 等, 1988, *Science* 239: 1534-1536l; US 4,816,567)，通过用相应的啮齿动物互补决定区取代人的互补决定区进行人源化。因此，这种人源化抗体是嵌合抗体，其中基本上小于完整的人可变域的部分被来自非人类物种的相应序列取代。在实践中，人源化抗体可以通常是人抗体，在所述抗

体中一些互补决定区残基以及可能的一些骨架残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点取代。

还可以利用本领域已知的多种技术鉴定人抗体，包括噬菌体展示库（参见，例如 Hoogenboom & Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 227: 381; Marks 等, 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581; Cole 等, 1985, In: *Monoclonal antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pp. 77; Boerner 等, 1991. *J. Immunol.* 147: 86-95）。

一旦获得合适的抗体，就可以通过例如 ELISA 等检测其活性。

在优选的实施方案中，所述第一试剂和所述第二试剂中至少一个能够被选择性地递送至癌细胞或选择性地由癌细胞激活。

所述“选择性地”表示所述试剂优先发挥在癌细胞或癌细胞内发挥对 hCAP18/LL-37 和/或 EGF 受体生物活性的抑制作用（而不是将所述试剂局部施用于癌细胞位点）。

使试剂靶向于特定细胞类型（例如，癌细胞）的方法是本领域熟知的（例如，参见 Vasir & Labhasetwar, 2005, *Technol Cancer Res Treat.* 4(4): 363-74; Brannon-Peppas & Blanchette, 2004, *Adv Drug Deliv Rev.* 56(11): 1649-59 and Zhao & Lee, 2004, *Adv Drug Deliv Rev.* 56(8): 1193-204）。

所述第一试剂和/或所述第二试剂优选包含靶细胞特异性部分，所述靶细胞特异部分是可人源化的抗体或其抗原结合片段时是有利的。

所述“靶细胞特异性”部分表示所述试剂中包含一个或多个结合位点的部分，所述结合位点识别并结合靶癌细胞上的实体。一旦与靶细胞接触，所述靶细胞特异性部分就可以与抑制剂部分一起被内化。

由靶细胞特异性部分识别的实体主要且优选专有地在靶癌细胞上表达。靶细胞特异性部分可以包含一个或多个用于同一靶细胞类型上表达的不同实体的结合位点，或者一个或多个用于一种或多种不同靶细胞类型上表达的不同实体的结合位点。

优选地，靶细胞特异性部分以高亲和力识别靶细胞。

所述“高亲和力”表示靶细胞特异性部分识别靶细胞的结合常数至少为 $K_d = 10^{-6}$ M，优选至少为 $K_d = 10^{-9}$ M，合适地为 $K_d = 10^{-10}$ M，更合适地为 $K_d = 10^{-11}$ M，再合适地为 $K_d = 10^{-12}$ M，并且更优选 $K_d = 10^{-15}$ M 乃至 $K_d = 10^{-18}$ M。

在一个优选实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段对在癌细胞表面表

达的抗原具有特异性。

所述被识别的实体可以是在肿瘤细胞上表达的任意合适实体。通常，所述被识别的实体为抗原。

抗原的实例包括表 1 中列出的抗原。

表 1

肿瘤相关抗原

抗原	抗体	目前用途
癌胚抗原	C46（Amersham） 85A12（Unipath）	结肠/直肠肿瘤的成像和治疗。
胎盘碱性磷酸酶	H17E2（ICRF, Travers & Bodmer）	睾丸和卵巢癌的成像和治疗。
Pan Carcinoma	NR-LU-10（NeoRx Corporation）	包括小细胞肺癌在内的多种癌的成像和治疗。
多形上皮细胞粘蛋白（人乳脂肪小球）	HMFG1（Taylor-Papadimitriou，ICRF） （Antisoma plc）	卵巢癌、胸腔积液、乳腺癌、肺癌和其它常见上皮肿瘤的成像和治疗。
人乳粘蛋白核心蛋白	SM-3（IgG1）[1]	乳腺癌的成像和治疗
β-人绒毛促性腺激素	W14	使酶（CPG2）靶向裸鼠中的人异种移植物绒毛癌。（Searle 等 (1981) Br. J. Cancer 44, 137-144）
人癌瘤上的碳水化合物	L6（IgG2a）[2]	碱性磷酸酶的靶向。（Senter 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4842-4846
B 淋巴细胞（正常和癌变 B 淋巴细胞）上的 CD20 抗原	1F5（IgG2a）[3]	碱性磷酸酶的靶向。（Senter 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4842-4846

[1] Burchell 等(1987) *Cancer Res.* 47, 5476-5482

[2] Hellström 等(1986) *Cancer Res.* 46, 3917-3923

[3] Clarke 等(1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1766-1770

其它抗原包括甲胎蛋白、Ca-125、前列腺特异性抗原和表皮生长因子受体家族的成员，即 erb B1（EGFR）、erb B2、erb B3 和 erb B4。

因此，在一个实施方案中，所述第二试剂可以是抗 EGF 受体的抗体，例如，抗 erb B2 的抗体（即赫赛汀（Herceptin））。如果第二试剂与所述第一试剂融合或者结合，所述第二试剂可以发挥 EGF 受体抑制剂和靶向剂两者的作用。

便利地，所述靶细胞特异性部分包含针对靶细胞的两个或多个结合位点，其中所述靶细胞特异性部分为抗体或其二价片段。所述靶细胞特异性部分可以分别具有相互识别同一实体或识别不同实体的“臂”。

在本发明试剂的一个实施方案中，靶细胞特异性部分具有识别相同靶细胞上的不同分子的两个“臂”，其中所述相同靶细胞上的不同分子并不局限于所述细胞类型，其还可以存在于其它一些细胞类型上。例如，靶细胞特异性部分的一个“臂”可以识别细胞类型 I、II 和 III 上的分子，而另一个“臂”可以识别细胞类型 I、IV 和 V 上的分子。因此，与细胞类型 II、III 和 IV 相比，包含这种靶细胞特异性部分的本发明试剂对细胞类型 I 具有更大的特异性。本发明的这个方面尤其有用，原因是发现的完全靶细胞特异性分子极少，而存在于一些细胞类型上并在本发明的这个方面有用的分子是熟知的。这种分子通常为细胞表面抗原，针对所述细胞表面抗原的交叉反应抗体是已知的。

已经知道与表 1 中所列的多个抗原结合的单克隆抗体，在任何情况下，都可以利用与单克隆抗体技术有关的现有技术制备抗大多数抗原的抗体（参见上文）。

被识别的实体可以是也可以不是抗原性的，但可以通过一些其它方式被识别并被选择性地结合。例如，它可以是特征性细胞表面受体如在黑素瘤细胞中大量表达的促黑素细胞激素（MSH）受体。或者，所述实体可以是引入至靶细胞的实体。那么所述细胞特异性部分可以是以一种非免疫方式与所述实体结合的化合物或其一部分，例如，作为细胞表面酶的底物或其类似物或者作为信使与所述实体结合。

优选地，高亲和力靶细胞特异性部分包含针对靶细胞的两个或多个不同结合位点。

针对靶细胞的不同结合位点可以是也可以不是靶向所述靶细胞上表达的不同实体的两个或多个不同抗体或其片段。可选地，针对靶细胞的所述不同结合位点可以以其它一些非免疫方式识别并选择性地结合所述细胞。

可以理解，靶向部分可以通过保留两个部分的功能活性的任何合适方式连接到本发明的抑制剂试剂上。例如，当靶向部分和抑制剂部分都为多肽时，它们可以彼此融合产生融合多肽。这种融合的实例是本领域技术人员熟知的。

优选所述第一试剂和/或所述第二试剂是被癌细胞选择性激活的前药。

本申请中使用的术语“前药”指药学活性物质的前体或衍生形式，与母药相比，其对肿瘤细胞的毒性较小并能够被酶活化或转化成活性更高的母体形式（参见，例如 D.E.V. Wilman “Prodrugs in Cancer Chemotherapy” *Biochemical Society Transactions* 14, 375-382 (615th Meeting, Belfast 1986)和 V.J. Stella 等“Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery” *Directed Drug Delivery* R. Borchardt 等(ed.)第 247-267 页(Humana Press 1985))。

用于产生这种前药试剂的合适方法是本领域熟知的（例如，参见 Denny, 2004, *Cancer Invest.* 22 (4): 604-19; Rooseboom 等, 2004, *Pharmacol Rev.* 2004 56(1): 53-102; WO 03/106491）。

在选择用于前药活化的酶时需要考虑一些因素。这些因素包括所述酶的分子量和物理特性，其在生理条件下的活性和稳定性，以及由所述酶所产生的试剂的性质。

所述策略适应多种酶的应用，从而具有释放大量机制不同的抗肿瘤剂的潜能。尤其有价值的事实是单个 Mab-酶偶联物可以产生治疗有效量的机制不同但具有增效作用的抗肿瘤剂。由于免疫原性的原因，这应该很重要。在这些方面，很多 β-内酰胺酶因为其有利的动力学和宽泛的底物特异性以及其消除头孢霉素底物 3’-位置附加取代物的能力，具有很大潜能（参见 Svensson 等(1992) “Mab-β-lactamase conjugates for the activation of a cephalosporin mustard prodrug” *Bioconjugate Chem.* 3, 176-181）。

已经将源于哺乳动物和非哺乳动物的酶用于多种前药的活化（Senter 等,

1993. Generation of cytotoxic agents by targeted enzymes. Bioconjugate 4, 3-9; Senter 等, 1991. Activation of prodrugs by antibody-enzyme conjugates. *In* Immunobiology of Proteins and Peptides VI, ed. M.Z.Atassi. Plenum Press, New York, pp 97-105）。源于哺乳动物的酶的优势在于其减少的免疫原性，而它们作用的前药可能是相应内源酶的底物。

在一个优选实施方案中，组分（a）和（b）适合贯序(sequential)、单独(separate)和/或同时(simultaneous)用于癌细胞的治疗。

本领域的技术人员可以理解，本发明的试剂可以用于抑制不同类型癌细胞的增殖。优选所述癌细胞为上皮细胞和/或鳞状细胞。

有利地，癌细胞选自于由以下癌细胞组成的组：乳腺癌细胞、胆管癌细胞、脑癌细胞、结肠癌细胞、胃癌细胞、生殖器官癌细胞、肺和气管癌细胞、皮肤癌细胞、胆囊癌细胞、肝癌细胞、鼻咽癌细胞、神经细胞癌细胞、肾癌细胞、前列腺癌细胞、淋巴腺癌细胞、胃肠道癌细胞和内分泌系统癌细胞。

优选所述癌细胞是乳腺癌细胞。

最优选所述癌细胞是雌激素阳性的。然而，本发明的所述试剂和方法还可以用于治疗其它癌症类型。

在一个实施方案中，所述乳腺癌细胞为 Elston III 级细胞，并且可以是转移性的。

本发明的第二方面提供了制备本发明第一方面定义的组合产品的方法，所述方法包括将本发明第一方面所定义的组分（a）与本发明第一方面所定义的组分（b）组合，从而使所述两个组分适合彼此联合给药。

本发明的第三方面提供了试剂盒，所述试剂盒包含：

（i）如权利要求 1 至 44 中任一项所定义的组分（A）和（B）中的至少一个；以及

（ii）所述组分与两组分的另一组分联合使用的说明书。

在关于本发明试剂盒的描述中，术语“联合/组合”包括可在施用另一个组分之前、之后和/或同时施用（任选重复施用）所述两个制剂中的一个或另一个。用于此描述时，术语“同时施用”（administered simultaneously，administered at the same time）包括使施用单个剂量抑制 hCAP18/LL-37 活性的所述第一试剂和施用单个剂量抑制 EGF 受体活性的所述第二试剂的彼此

间隔不超过 48 小时（例如，24 小时）。

本发明的第四方面提供了如本发明第一方面所定义的组合产品或者本发明第三方面所定义的试剂盒，其用于癌细胞的治疗中。

本发明的第五方面提供了治疗癌细胞的方法，其包括向患有或易患癌症的患者施用本发明第一方面所定义的组合产品或者本发明第三方面所定义的试剂盒。

所述“治疗”包括对患者的治疗性治疗和预防性治疗。所用术语“预防性”涵盖使用本文所阐述的多肽或制剂防止或降低患者或受试者体内发生癌症的可能性。

所述治疗方法优选包括抑制患者体内癌细胞的增殖和/或抑制癌细胞的转移。

所述患者优选为人，并且将所述试剂选择性地递送至癌细胞或选择性地由癌细胞激活是有利的。

本发明的第六方面提供了如本发明第一方面的组合产品，其用于医药中。

所述组合产品优选用于癌症治疗中。

本发明的第七方面提供了包含本发明第一方面的组合产品以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体的药物组合物。

优选地，所述药物组合物适合于非肠胃给药。

在一个优选实施方案中，所述药物组合物的制剂能够向所述癌细胞靶向递送所述试剂。

本发明的第八方面提供了本发明第一个实施方案中的组合产品在制备抑制癌细胞增殖药物中的应用。

在优选实施方案中，所述癌细胞为上皮细胞和/或鳞状细胞。

癌细胞优先选自以下癌细胞组成的组：乳腺癌细胞、胆管癌细胞、脑癌细胞、结肠癌细胞、胃癌细胞、生殖器官癌细胞、肺和气管癌细胞、皮肤癌细胞、胆囊癌细胞、肝癌细胞、鼻咽癌细胞、神经细胞癌细胞、肾癌细胞、前列腺癌细胞、淋巴腺癌细胞和胃肠道癌细胞。

所述癌细胞最优选为乳腺癌细胞，例如 Elston III 级细胞，所述细胞可以是转移性的。

本文所使用的“药物制剂”表示本发明的治疗有效制剂。

本文中所使用的“治疗有效量”或“有效量”或“对治疗有效”指对给定病情和施药方案产生治疗效果的量。这是经过计算以使所述活性物质和所需的添加剂和稀释剂（即载体或施药载体或溶剂）联合产生期望的治疗效果的预定量。进一步，还表示足以降低（优选为预防）宿主在机能、功能和响应方面的临床性显著不足的量。或者，治疗有效量足以引起宿主临床显著病情的改善。本领域的技术人员可以理解，可以根据其具体功能改变化合物的量。合适的剂量数可以包含预定量的活性成分，所述预定量经过计算以使所述活性成分和所需的稀释剂联合产生期望的治疗效果。在本发明组合物的生产方法和使用中，提供了治疗有效量的活性成分。可以根据本领域熟知的患者特征，例如年龄、体重、性别、病情、并发症和其它疾病等由普通医生或兽医确定治疗有效量。

本领域的技术人员可以理解，可以以单次大剂量（即，急性施药）或更优选以一段时间内的系列剂量（即，慢性施药）递送这种有效量的所述试剂或其制剂。

可以根据所使用化合物的功效/毒性以及其用于治疗的适应症，以多种浓度配制本发明的试剂。优选地，所述制剂包含浓度在 0.1μM 和 1mM 之间的本发明的试剂，更优选 1μM 和 100μM 之间、5μM 和 50μM 之间、10μM 和 50μM 之间、20μM 和 40μM 之间，最优选约 30μM。对于体外施用，所述制剂可以包含更低浓度的本发明化合物，例如浓度在 0.0025μM 和 1μM 之间。

本领域的技术人员可以理解，本发明的试剂通常与合适的药物赋形剂、稀释剂或载体混合进行施予，所述药物赋形剂、稀释剂或载体根据所需施药途径和标准药物实践（如，参见 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19th edition, 1995, Ed. Alfonso Gennaro, Mack Publishing Company, Pennsylvania, USA）进行选择。

例如，本发明的试剂可以以片剂、胶囊、ovules、酏剂、溶液或悬液的形式口部经口、口腔或舌下服用，所述胶囊、ovules、酏剂、溶液或悬液可以含芳香剂或着色剂，用于即释、缓释或控释。本发明的试剂还可以通过阴茎海绵体内注射给药。

片剂可以包含赋形剂，例如微晶纤维素、乳糖、柠檬酸钠、碳酸钙、磷酸氢钙和甘氨酸，崩解剂，例如淀粉（优选玉米、马铃薯、或木薯淀粉）、淀

粉乙醇酸钠、交联羧甲基纤维素钠和某些复杂的硅酸盐，以及制粒粘合剂，例如聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素（HPMC）、羟丙基纤维素（HPC）、蔗糖、明胶和阿拉伯胶。此外，可以包含润滑剂，例如硬脂酸镁、硬脂酸、山嵛酸甘油酯和滑石。

类似类型的固体组合物还可以用作明胶胶囊的填充物。本发明中优选的赋形剂包括乳糖、淀粉、纤维素、乳糖或高分子量的聚乙二醇。对于水悬液和/或酏剂，本发明的化合物可以与多种甜味剂或芳香剂、着色物或染料，与乳化剂和/或助悬剂，与稀释剂如水、乙醇、聚乙二醇和甘油，及其组合进行组合。

本发明的试剂还可以肠胃外施予，如经静脉、关节内、动脉内、腹腔内、鞘内、心室内、胸腔、颅腔、肌内或皮下施予，或者可以通过输注技术施予。最好以无菌水溶液的形式使用，所述无菌水溶液可以包含其它物质，如足以使所述溶液与血液等渗的盐或葡萄糖。如果需要，所述水溶液应被适当地缓冲（优选从3至9的pH）。通过本领域技术人员熟知的标准制药技术很容易在无菌条件下实现合适胃肠外制剂的制备。

适合肠胃外施药的制剂包括水或非水无菌注射溶液，所述溶液可以包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与期望接受者的血液等渗的溶质；以及水和非水的无菌悬液，所述悬液可以包含助悬剂和增稠剂。所述制剂可以存在于单位剂量或多剂量容器中，例如密封的针剂或小瓶，并且可以储存在冷冻干燥（冻干）条件下，仅需要在临使用前加入无菌液态载体，例如注射水。可以根据上述种类的无菌粉末、颗粒和片剂制备即用的注射溶液和悬液。

为了给人类患者口服和肠胃外施药，本发明的试剂的日剂量水平通常为每个成人1至1000mg（即约0.015至15mg/kg），单次或分次剂量给药。

本发明的试剂还可以经鼻腔或通过吸入给药，并且以来自高压容器、泵、喷雾器或雾化器的干粉吸入剂或气溶胶喷雾的形式方便地递送，所述干粉吸入剂或气溶胶喷雾使用合适的推进剂，例如二氯二氟甲烷，三氯氟甲烷，二氯四氟乙烷，氢氟烷烃（例如1,1,1,2-四氟乙烷（HFA 134A3）或1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷（HFA 227EA3）），二氧化碳或其它合适的气体。在高压气溶胶的情况下，可以通过提供可计量阀门确定递送的剂量单位。高压容器、泵、喷雾器或雾化器可包含所述活性化合物的溶液或悬液，例如使用乙醇和推进剂的

混合物用作溶剂的溶液或悬液，还可以包含润滑剂，例如失水山梨醇三油酸酯。在吸气器或吸药器中使用的胶囊（capsule）和筒（cartridge）（如由明胶制备）可经配制以包含本发明化合物与合适粉末基质（例如乳糖或淀粉）的粉末混合物。

优选安排气溶胶或干粉制剂以使每个计量剂量或每次“喷施”都包含至少1mg递送给患者的本发明化合物。可以理解，气溶胶每天的全部剂量根据患者的不同而不同，并且可以在全天内以单次剂量或更常见的多次剂量施药。

本发明的试剂还可以以栓剂或阴道栓的形式施予，或者以洗剂、溶液、乳霜、药膏或散粉的形式局部施用。本发明的化合物还可以透皮施予，如通过使用皮肤贴片。本发明的化合物还可以通过经眼途径给药。

针对眼科使用，本发明的试剂可以配制成等渗、调节了pH的无菌生理盐水的微粉化悬液，或者优选地，配制成等渗、调节了pH的无菌生理盐水的溶液，任选与防腐剂如苯扎氯铵联合。可选地，将其配制在如凡士林等药膏中。

针对皮肤的局部应用，可以将本发明的试剂配制成含活性化合物的合适药膏，所述活性化合物悬浮或溶解在例如具有以下一种或多种物质的混合物中：矿物油、液态凡士林、白凡士林、丙二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。本发明的试剂还可被配制成合适的洗剂或乳膏，活性成分悬浮或溶解在例如以下一种或多种物质的混合物中：矿物油、失水山梨醇单硬脂酸酯、聚乙二醇、液态石蜡、聚山梨醇酯60、十六烷基酯蜡、棕榈醇、2-辛基十二碳醇、苯甲醇和水。

适合在口腔局部施药的制剂包括在芳香基质（通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶）中包含所述活性成分的糖锭剂；在惰性基质（例如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶）中包含所述活性成分的锭剂；以及在合适液态载体中包含所述活性成分的漱口剂。

当所述试剂为多肽时，可以优选使用缓释给药系统，如微球。这些系统经特别设计以减少注射的频率。这种系统的一个实例是Nutropin Depot，其将重组人生长激素（rhGH）包裹到可生物降解的微球中，这样一旦注射就在持续的时间内缓慢释放rhGH。

还可以通过将所述药物直接释放到期望位点的手术植入设备施予本发明的多肽试剂。

还可以将电穿孔治疗（EPT）系统应用于蛋白质或多肽的施药。向细胞施加脉冲电场的设备提高了细胞膜对药物的渗透性，从而导致细胞内药物递送的显著增强。

蛋白质和多肽也可以通过电结合（EI）递送。当皮肤表面上直径达30微米的小颗粒受到电穿孔中使用的相同或相似的电脉冲时，发生EI。在EI中，这些颗粒被驱动通过角质层并进入皮肤的更深层。所述颗粒可以负载或包被有药物或基因，或者可以简单地作为“子弹”在皮肤中产生所述药物能够进入的小孔。

蛋白质和多肽递送的一个可选方法是热敏性可注射ReGel。低于体温时，ReGel是可注射的液态，然而在体温时它立即形成凝胶储藏器，缓慢地消耗并溶解成已知的安全、可生物分解的聚合物。在生物聚合物溶解的时间过程中递送所述活性药物。

蛋白质和多肽药物还可以口服递送。一种此类系统将体内口服吸收维生素B12的天然过程应用于共递送蛋白质和多肽。所述蛋白质或多肽可以依靠维生素B12的吸收系统通过肠壁。由维生素B12类似物和所述药物制备的所述复合体在其维生素B12部分中保留了对内在因子（IF）的显著亲和力并且保留了所述复合体药物部分的显著生物活性。

施予本发明的寡核苷酸或多核苷酸试剂的方法也是本领域熟知的(参见，Dass, 2002, J Pharm Pharmacol. 54(1): 3-27; Dass, 2001, Drug Deliv. 8(4): 191-213; Lebedeva等, 2000, Eur J Pharm Biopharm. 50(1): 101-19; Pierce等, 2005, Mini Rev Med Chem. 5(1): 41-55; Lysik & Wu-Pong, 2003, J Pharm Sci. 2003 2(8): 1559-73; Dass, 2004, Biotechnol Appl Biochem. 40(Pt 2): 113-22; Medina, 2004, Curr Pharm Des. 10(24): 2981-9)。

例如，通过利用逆转录病毒的方法可以将本发明的构建体引入到细胞中，从而使所述构建体插入到细胞的基因组中。例如，在Kuriyama等(1991) Cell Struc. and Func. 16, 503-510中施予纯化的逆转录病毒。可以利用本领域熟知的方法制备包含上述多核苷酸的逆转录病毒DNA构建体。通常使用生长在含10%胎牛血清（FCS）的Dulbecco's modified Eagle's培养基（DMEM）中的亲嗜性psi2包装细胞系从此类构建体产生活性逆转录病毒。可通过硫酸钙共转染方便地转染所述细胞系，并且通过加入终浓度为1 mg/ml的G418选择稳定

的转染株（假定逆转录病毒构建体含neo^R基因）。分离并放大单独的克隆，移出培养上清、滤过0.45 μm孔径的滤器并在-70°C储存。通过直接注射添加有10 μg/ml聚凝胺（polybrene）的逆转录病毒上清简便地将逆转录病毒引入到肿瘤细胞中。对于直径超过10 mm的肿瘤，适合注射0.1 ml~1 ml的逆转录病毒上清，优选0.5 ml。

也可以如 Culver 等(1992) *Science* 256, 1550-1552 中所述，注射产生逆转录病毒的细胞。对产生逆转录病毒的细胞进行改造以使其主动产生逆转录病毒载体颗粒，从而在原位肿瘤块内持续产生所述载体。因此，如果与产生逆转录病毒载体的细胞混合，增殖细胞就可以成功地在体内被转导。

靶向性逆转录病毒也可用于本发明，例如可将赋予特异性结合亲和力的序列插入到预先存在的病毒 *env* 基因中（参见，Miller & Vile (1995) *Faseb J.* 9, 190-199 for a review of this and other targeted vectors for gene therapy）。

其它方法包括只将构建物递送到细胞中以在有限的时间内表达，或随后整合到基因组以在更长的时间内表达。后一种方法的实例包括脂质体（Nässander 等(1992) *Cancer Res.* 52, 646-653）。

为了制备免疫脂质体，根据 Martin & Papahadjopoulos (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 286-288 的方法合成 MPB-PE（N-4-(对-马来酰亚胺苯基)丁酰磷脂酰乙醇胺）。将 MPB-PE 引入脂质体双分子层中以使抗体或其片段共价偶联到脂质体表面。例如，通过在所述试剂溶液中形成脂质体，随后在达 0.8 Mpa 的氮气压力下将其连续挤出通过带有 0.6 μm 和 0.2 μm 孔径的聚碳酸酯膜滤器，从而将本发明的试剂（如 DNA 或其它基因构建体）方便地负载到用于向靶细胞递送的所述脂质体上。在挤出后，于 80000×g 超离心 45min 从而将捕获的 DNA 构建体和游离的 DNA 构建体分离。新制备的 MPB-PE-脂质体与新制备的抗体（或其片段）在脱氧缓冲液中混合，并在 4°C、氮气氛中进行偶联反应，持续旋转过夜。通过 80000×g 超速离心 45min 将免疫脂质体与未偶联的抗体分离。免疫脂质体可以注射到腹腔内或直接注射到肿瘤中。

其它递送方法包括通过抗体-聚赖氨酸桥携带外源 DNA 的腺病毒（参见 Curiel *Prog. Med. Virol.* 40, 1-18）和作为载体的运铁蛋白-聚阳离子偶联物（Wagner 等 (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3410-3414）。在这些方法中，首先，使用本发明的寡核苷酸试剂形成聚阳离子-抗体复合体，其中所述抗体

是野生型腺病毒或腺病毒变体特异性的，在所述腺病毒变体中引入了结合所述抗体的新表位。聚阳离子部分通过与磷脂骨架的静电相互作用结合寡核苷酸试剂。因为含未改变的纤突（fibre）和腺病毒亚单位蛋白，腺病毒被内化到细胞中并随之将本发明的寡核苷酸试剂运送到细胞中。优选聚阳离子为聚赖氨酸。

所述寡核苷酸试剂还可以通过腺病毒递送，其中所述寡核苷酸试剂存在于腺病毒颗粒内部，例如，如下文中所述的腺病毒颗粒。

在一个可选方法中，应用了由受体介导的细胞内吞作用将 DNA 大分子递送到细胞中的高效核酸递送系统。通过将运送铁的蛋白质运铁蛋白与结合核酸的聚阳离子共轭结合得到这种系统。通过二硫键将人运铁蛋白或鸡同系物伴清蛋白或其组合物共价连接到结合 DNA 的小蛋白质精蛋白或连接到多种大小的聚赖氨酸上。这些修饰的运铁蛋白分子保持了结合其同源受体的能力和介导向细胞有效转运铁的能力。运铁蛋白-聚阳离子分子与本发明的 DNA 构建体或其它基因构建体（无论核酸大小，如从短寡核苷酸至 21k 碱基对的 DNA）形成电泳稳定的复合体。当运铁蛋白-聚阳离子和本发明 DNA 构建体或其它基因构建体的复合体应用于肿瘤细胞时，期望在细胞中由所述构建体产生高水平表达。

也可以利用由 Cotten 等(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6094-6098 的方法产生的缺陷或化学失活腺病毒颗粒的内体破坏活性，进行由受体介导的本发明 DNA 构建体或其它基因构建体的高效递送。这种方法似乎依赖于以下事实：使腺病毒适合于不经过溶酶体途径而在内体释放其 DNA，并且在存在有例如与本发明 DNA 构建体或其它基因构建体连接的运铁蛋白的情况下，所述构建体通过与腺病毒颗粒相同途径被细胞吸收。

这种方法具有以下优势：不需要使用复杂的逆转录构建体，没有如逆转录病毒感染时发生的基因组的持久修饰，使靶向表达系统与靶向递送系统偶联从而降低对其它细胞类型的毒性。

可以理解，“裸 DNA”和与阳离子和中性脂质形成复合体的 DNA 还可以用于将本发明的 DNA 引入到待治疗个体的细胞中。在 Ledley (1995) *Human Gene Therapy* 6, 1129-1144 中阐述了基因治疗的非病毒方法。

还已知其它可选的靶向递送系统，如 WO 94/10323 中阐述的修饰的腺病

毒系统，其中通常在腺病毒或类腺病毒颗粒内载有所述 DNA。Michael 等(1995) *Gene Therapy* 2, 660-668 阐述了将细胞选择性部分加入到纤突蛋白而对腺病毒进行修饰。选择性地在 p53 缺陷型人肿瘤细胞中复制的突变腺病毒，如 Bischoff 等(1996) *Science* 274, 373-376 中阐述的那些突变腺病毒，也可以用于将本发明的基因构建体递送到细胞中。因此，可以理解，本发明的另一个方面提供了包含本发明的基因构建体的病毒或类病毒颗粒。其它合适的病毒或类病毒颗粒包括 HSV、AAV、痘苗病毒和细小病毒（parvovirus）。

在另一个实施方案中，选择性地抑制 hCAP18/LL-37 功能的试剂为能够靶向剪切 hCAP18/LL-37 mRNA 或 DNA 的核酶。可以按与反义分子基本相同的方式并利用基本相同的载体施予表达所述核酶的基因。

在 US 5,180,818、US 5,168,053、US 5,149,796、US 5,116,742、US 5,093,246 和 US 4,987,071 中阐述了可以在本文所公开的病毒或类病毒颗粒中编码的核酶。

可以理解，可能期望利用细胞特异性启动子元件表达所述反义分子或核酶。

在本发明制剂的一个特别优选的实施方案中，所述制剂能够向癌细胞靶向递送本发明的试剂。

本领域的技术人员还将理解，本发明的试剂和药物制剂可应用于医药（medicine）和兽医领域中。因此，本发明的试剂可以用于人和非人动物（如马、狗和猫）的治疗。然而，优选地，患者为人。

附图说明

参考以下附图，在下文非限制性实施例中阐述了本发明的优选方面。

图 1：hCAP18/LL-37 在乳腺癌中高表达

（a）III 级乳腺导管癌（7 号患者，表 2）的切片显示对基质岛（st）周边肿瘤细胞（红色沉淀）中的 hCAP18 蛋白质的强免疫反应性。（b）原位杂交显示来自同一组织的切片中与 hCAP18 mRNA 匹配的信号。在暗视野光源下强烈的放射自显影信号显示为白色颗粒。（c）在高倍下观察癌细胞，显示出与缺乏免疫反应性的肿瘤细胞相邻的强免疫反应性细胞。（d）血管内的 hCAP18 免疫反应性乳腺癌细胞。（e）利用 cathelin 重组肽的免疫吸附完全消

除了 hCAP18 免疫反应性（与图 1a 相同的组织）。（f）在免疫吸附过程中作为阳性对照的 hCAP18 的常规染色（与图 1a 相同的组织）。（g）正常乳腺上皮细胞显示弱的 hCAP18 免疫反应性。使用用 1：500 稀释的抗 hCAP18 抗体获得显示于显微照片（a、c-g）的结果。比例尺（a，b）= 100 μm;（c，d）= 25 μm;（e，f，g）= 10 μm。

图 2：通过免疫印迹在乳腺癌中检测 hCAP-18/LL-37

患者的临床数据在表 2 中显示（样本 1-10）。重组 cathelin（C）和 LL-37 肽（L）用作分子量大小参照（size reference）。第 1 道表示正常乳房组织。第 2、4 和 5 道表示 Elston I 级肿瘤。第 3 道表示 II 级肿瘤，第 6-10 道表示 III 级肿瘤。在所有组织中都有与完整的未处理 18 kDa 全蛋白相对应的免疫反应条带。5 个 III 级肿瘤（第 7-10 号）中有 4 个可以观察到经处理的 LL-37 肽（4 kD）。

图 3：上皮细胞中 hCAP18 的转基因表达提高了细胞增殖

（a）*上部，左侧泳道*：利用抗 LL-37 抗血清对 HEK293 提取物的免疫印迹。转染双顺反子载体 hCAP18 + EGFP （hCAP18/E）的细胞显示 hCAP18 蛋白质的表达。*上部，右侧泳道*：仅转染 EGFP（E）的 HEK293 细胞。*下部*：与对照细胞（E）相比，HEK293 细胞（hCAP18/E）显示显著升高的增殖速率（用流式细胞术评价）。丽春红染色作为上样对照。（b）*上部，左侧泳道*：如（a）所述转染 HaCaT 细胞。*下部*：与对照细胞相比，转染了 hCAP18 的 HaCaT 细胞显示显著升高的增殖速率（用 3H-胸苷掺入法评价）。

图 4：利用合成的 LL-37 肽处理提高了上皮细胞的细胞增殖

与没有处理的（对照）HaCaT 细胞相比，通过 72 小时血清饥饿随后用 10 μg/ml 合成的生物活性 LL-37 肽处理 36 小时被同步化的 HaCaT 细胞（在 DMEM + 5% FCS + PEST 中）显示显著提高的细胞增殖。用[^{3}H]-胸苷掺入法评价增殖速率。

图 5：LL-37 受体 FPRL 在乳腺癌和正常乳腺上皮细胞中的表达

（a)对肿瘤细胞中 FPRL1 受体具有突出免疫反应性(红色沉淀)的 Elston 2 级乳腺导管癌的切片（第 12 号患者，表 2)。(b）正常乳腺上皮细胞切片在导管区（红色沉淀）显示对 FPRL1 的免疫反应性。显微照片显示使用 1：400 稀释的 FPRL1 抗血清获取的结果。比例尺（a）= 50μm；（b）= 10 μm。(c）免疫印迹显示在正常（N）和乳腺癌（T）组织中都表达 LL-37 受体 FPRL1。（d）通过实时 PCR 证明转染双顺反子载体 hCAP18 + EGFP（hCAP18/E）的细胞中 FPRL1 受体 mRNA 的表达显著增加。使用仅转染 EGFP(E)的 HaCaT 细胞作为对照。

图 6：在雌激素受体（ER）和淋巴结（N）阳性的乳腺肿瘤中 hCAP18/LL-37 的表达提高（显示为对数比例）

从 140 个乳腺肿瘤和 4 个未患病的乳房组织样本中提取 RNA，并用随机六聚体作为引物反转录。根据标准方法利用 10ng cDNA 通过实时 PCR 测定 hCAP18 转录本的表达。样本通过 18S-RNA 的定量进行标准化。将未患病样本的平均表达设定为 1。通过方差统计评价平均值和偏差。

图 7：LL-37 在 HEK 细胞（A）和 HaCat 细胞（B）中抑制喜树碱诱导的凋亡

A．用不同浓度的 LL-37（1μM、2μM 和 4μM）处理半汇合的细胞。单独用培养基处理的细胞为对照细胞（a)。随后在有（a 至 d）或没有（e 至 h）6μM 喜树碱存在的情况下将所得细胞进一步培养 24 小时。对所收集的细胞进行两种颜色的凋亡试验和流式细胞术并根据荧光强度进行四象限分析分类：存活(没有或几乎没有荧光)，凋亡(FL-1 YOPRO 染料阳性)和坏死(FL-1 和 PI 荧光阳性)。该图显示了代表性的三个独立试验，且每个试验都一式作三份。

B．凋亡细胞的定量分析

图 8：HEKn 细胞的流式细胞术分析表明使用 LL-37 预处理 HEKn 细胞可防止喜树碱诱导的凋亡

通过 24 小时的喜树碱处理（d-f）来诱导 1μM 或 2μM LL-37 处理 24 小时的细胞（b、c、e、f）和未处理的细胞（a、d）进行凋亡。随后通过流式

细胞术分析细胞以检测非凋亡（2N 至 4N）和凋亡细胞群（小于 2N）。该图是 3 个试验的代表性结果，且每次试验一式作三份。

图 9：LL-37 降低 HEKn 细胞中 caspase-3 的喜树碱激活

在存在或没有 LL-37 和喜树碱的情况下培养细胞，随后收集所述细胞并通过 VDVAD-AMC 的体外水解分析 caspase-3 的活性。通过用 LL-37 处理细胞降低了用喜树碱温育 24 小时诱导的 Caspase 活性。数值是三个不同试验的平均值，每一次试验都一式作三份。

图 10：LL-37 处理提高了 IAP2 的表达

用 2μM LL-37 处理 HEKn 细胞并在刺激后的不同时间点收集。对来自这些细胞的 RNA 进行反转录并通过实时 PCR 测定 IAP-2 的表达。每个时间点 IAP-2 的转录水平相对于 18S RNA 标准化并是相对于未处理细胞（每个时间点的对照设定为 1）进行显示。

图 11：LL-37 提高了 HEK 细胞中前列腺素内过氧化物合酶 2（COX-2）的表达

用 2μM LL-37 处理 HEKn 细胞并在刺激后的第 6、12 和 24 小时收集。在每个时间点都将未处理的细胞作为对照（浅灰色柱）。对来自这些细胞的 RNA 进行反转录并通过上述 qPCR 确定相对于对照的 COX-2 的相对表达。

图 12：对 COX-2 的抑制阻碍了 LL-37 诱导的 IAP-2 的增加

使用或不用 COX-2 特异性抑制剂 SC-791（25nM）处理 HEKn 细胞并进一步用或不用 LL-37（2μM）温育 6 小时。通过 RT-PCR 分析 IAP-2 mRNA 基因的水平并以相对与未处理对照样本的方式显示。

图 13：LL-37 通过 Heregulin 增强 EGFR 信号系统的激活

如图所示，对乳腺癌系 ZR75-1 提取物进行磷酸化蛋白质的 Western 印迹分析。

图 14：通过蛋白质印迹分析定量 ERBB2 磷酸化（第 1248 位酪氨酸）

在相对于丽春红染色标准化后对化学发光信号进行定量。

图 15：LL-37 通过 EGFR 家族激活 MAPK

LL-37 通过 EGFP 家族激活 MAPK，并且所述激活可以被酪氨酸激酶抑制剂 PD153035 完全阻断。完全抑制所需要的浓度为 2.5 μM，高于 EGFR 所需要的浓度但却是阻断 ERBB2 活性所必需的。

图 16：LL-37 抑制乳腺癌细胞的转移

利用乳腺癌系 ZR75-1 在群落形成试验中研究了 LL-37 的致瘤潜能。在低血清浓度下，LL-37 独自降低了群落数，然而 LL-37 与 Heregulin 的联合提高了群落数（见图 A）。表型的改变更为显著。在有 LL-37 存在的情况下，群落的紧密结构被破坏并且出现了单个的细胞卫星（见图 B）。Heregulin 恢复了所述群落的密度，但当存在 LL-37 时不阻止单个细胞的脱离。

图 17：hCAP18 表达载体的构建

将来自 Image clone 3057931 19 的 Bfa1 片段亚克隆至双顺反子载体 pIRES2-EGFP（BD Biosciences, Bedford, MA）的 Sma1 位点中以构建 hCAP18 表达载体，所述 Bfa1 片段包含具有 16bp 的 5'非翻译区的完整编码序列。

图 18：体内次生肿瘤的形成

（A）用亲本 MCF7 注射的 SCID 小鼠中的原发肿瘤。

（B）用 MCF7-hCAP18 转基因注射的 SCID 小鼠具有多个转移瘤。

（C）LL-37 在从注射有乳腺癌细胞的 SCID 小鼠收集的腹水转染细胞中的表达，所述乳腺癌细胞中转染并过量表达 hCAP18。通过绿色荧光蛋白标记物（下图）的共表达确定 hCAP18 在 MCF7 腹水细胞中的活性转录（上图）。

图 19：通过 siRNA 对肿瘤中 hCAP18/LL-37 蛋白质表达的抑制

在将其它情况下过表达 hCAP18/LL-37 蛋白质的 MCF7-hCAP18 转基因细胞处理 48 小时后发现由 hCAP18 mRNA 特异性小干扰 RNA（siRNA）引

起的剂量依赖性强抑制（参见实施例 G 中材料与方法“hCAP18 在 MCF7 衍生细胞中的转基因表达”一节）。经 HPLC 纯化、双链化的即用型阴性对照 siRNA 和四个 hCAP18/LL-37 特异性 siRNA 购自（Ambion, Austin, USA），包括用于优化转染效率和增殖率的 siPORT NeoFX 转染试剂。

将所有四个 siRNA-CAMP（siRNA-CAMP1-4，在实施例 H 中阐述）混合成混合物以将非特异性作用减至最小，并对所述阴性 siRNA 对照进行类似的操作。在与 siPORT 转染试剂配套的详细方案中提供了用于优化转染的说明书。所有试验过程均根据生产商的说明进行。SiRNA 的终浓度为 10nM、25nM 或 100nM。根据实施例 C 材料与方法中的阐述，在蛋白质印迹中利用 1/2000 稀释的抗 hCAP18 抗体分析经处理的乳腺癌细胞的细胞提取物中的 hCAP18/LL-37 蛋白质。通过 CCD 相机（Fujifilm, Tokyo, Japan）捕获增强的化学发光（ECL）信号（Amersham Biosciences, Piscataway, NJ），并在相对于丽春红染色标准化后进行定量。

图 20：人抗菌蛋白 hCAP18/LL-37 诱导乳腺癌转移的表型，其可被 hCAP18 特异性 siRNA 逆转

（A）*在乳腺癌中的过表达 hCAP18/LL-37 导致癌细胞的转移性更强的表型*。进行 Matrigel 侵袭力试验（Matrigel Invasion Assay）以评估与不表达 hCAP18/LL-37 的 MCF7-IRES 转基因对照细胞相比，过表达 hCAP18/LL-37 蛋白质的 MCF7-hCAP18 转基因细胞的转移潜能（参见实施例 G 中材料与方法“hCAP18 在 MCF7 衍生细胞中的转基因表达”一节）。

完全根据生产商的说明书使用 BioCoat Matrigel Invasion Chamber 试剂盒（Becton Dickinson Bioscience, Bedford, MA, USA）。在将细胞转移至 Matrigel 滤膜前，细胞在不含 FCS 的 DMEM（Gibco-BRL）中饥饿 24h。在使用当天，用 0.25% Tryp-EDTA（Invitrogen, cat#25200-056）胰酶消化细胞并通过加入 50μl 胰酶抑制剂和 100μl DMEM 终止胰酶消化。将 200μl 220,000 个细胞/ml 的细胞悬液接种至具有 Matrigel 包被滤膜的 Transwell 插入小室（transwell insert chamber）中，并放置在装有 750μl 包含 5% FCS 的 DMEM 的下室中。将小室在 37°C、5% CO_2 气氛下温育 48h。随后，移去插入小室并除去留在滤膜上方的非侵袭癌细胞。将已经侵袭至滤膜下方的细胞染色，在相差显微镜下观察并计数。癌细胞的侵袭能力用已经侵袭至滤膜下方的平均细胞数量

表示。所述试验一式作三份。

（B）*通过用 hCAP18/LL-37 特异性 siRNA 处理乳腺癌细胞抑制了由 hCAP18/LL-37 诱导的侵袭性转移表型*。

为了证明其通过减少肿瘤表达的 hCAP18/LL-37 抑制癌细胞转移潜能的能力，使用了 RNA 干扰。

将全部四个 siRNA-CAMP 一起作为 10 nM 的混合物使用以使非特异性作用减至最小，并对阴性 siRNA 对照进行同样操作以进行 RNA 干扰。在进行如（A）中所阐述的 Matrigel 侵袭试验前 40 小时进行 siRNA 处理（见图 19）。siRNA 的 RNA 干扰证明通过减少侵袭肿瘤细胞数量能够明显抑制癌细胞转移潜能。

（详情也可见实施例 C，“转录后抑制研究和侵袭性诱导”一节）

实施例

实施例 A：抗菌蛋白 hCAP18/LL-37 在乳腺癌中高表达，并推定其为上皮细胞生长因子

介绍

在此实施例中，研究了 hCAP18/LL-37 在一系列乳腺癌中的表达谱，证明 hCAP18 mRNA 和蛋白质在所述肿瘤细胞中而没有在其相邻基质中显著上调。有趣的是，在具有最高组织学分级的肿瘤中检测到最高水平的 hCAP18 蛋白质，然而在一些低级别肿瘤中 hCAP18 水平等于正常乳房组织。这些发现与针对抗菌肽提出的假定的抗肿瘤作用明显相反，但却与新近提出的 hCAP18/LL-37 在上皮细胞修复和血管产生中起作用的发现相一致[5,10]。在本文中我们证明通过合成的生物活性 LL-37 肽的处理以及通过 hCAP18 的转基因表达显著增强了上皮细胞的增殖，这进一步支持 hCAP18/LL-37 是生长促进因子。

材料和方法

组织

从瑞典斯德哥尔摩 Danderyd 医院的病理科获取 28 个乳腺癌患者的冷冻

肿瘤组织（表 2）。所述肿瘤根据 Elston 和 Ellis I-III 按照建立的指导方针[13]进行分级。使用细胞周期蛋白 A 作为增殖标记（Nova-Castra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK）。在常规处理的石蜡切片上评估雌激素受体的状况。使用来自 8 位乳腺癌患者和来自两位经受了乳房缩减手术的健康个体的无肿瘤乳房组织（uninvolved mammary tissue）作为对照。所有样本都由同一位病理学家（*B.S.*）检查并按常规分类（表 2）。所有患者均给出了书面知情同意书。本研究由地方伦理委员会（Regional Committee of Ethics）核准。

hCAP18 原位杂交

使用亚克隆至 pBluescript 中的 435bp 全长 hCAP18 cDNA 以体外转录[^{35}S]标记的反义和正义探针，并基本按照阐述[8]对样本 0-17 进行原位杂交（表 2）。

免疫组化

对样本 0-17 进行免疫组化试验（表 2）。如前文所述[10]，根据间接过氧化物酶方法利用 Vectastain 试剂盒（Vector Laboratories, Burlingame, USA），使用 1：500 稀释的 Cathelin-亲和纯化的兔抗重组 hCAP1814 抗血清。为了确定染色的特异性，根据之前的报道[10]进行免疫吸收试验。根据间接过氧化物酶方法，使用 1：400 稀释的亲和纯化山羊多克隆抗体（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA）检测 FPRL1 受体。

蛋白质提取和蛋白质印记分析

利用电动匀浆仪在裂解缓冲液中将冷冻的 16-60 mg 肿瘤组织匀浆。根据标准方法[15]在含 SDS 的样本缓冲液中提取来自肿瘤组织和细胞系的蛋白质。通过分光光度试验测定蛋白质的浓度并用含 SDS 的样本缓冲液将蛋白质浓度调整至相等[16]。将所述提取液在 16.5% Tris-Tricine Ready 凝胶（Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA）上分离以检测 hCAP18/LL-37。重组 cathelin 17 和合成的 LL-37 肽作为分子大小的参照(size reference)。将蛋白质分别在 12% 和 8%的 Tris-甘氨酸凝胶上分离以检测 ERK1/2 和 FPRL1。为了证实各样本中被印记蛋白质的量大致相等，在与一抗温育前，使用含 3%丽春红 S 溶液（Sigma Aldrich, USA）的 3%TCA 对滤膜进行可逆染色。所有亲和纯化的抗 cathelin 抗血清[17]、亲和纯化的抗 LL-37 抗血清[10]、抗 FPRL1 抗血清（sc18191, Santa Cruz Biotechnology, CA）和单克隆抗 ERK1/2 抗体（Cell Signaling

Technology, Beverly MA）都以 1：1000 稀释后使用。在电印迹至硝酸纤维素滤膜（Schleicher & Schuell, Dassel, Germany）并随后与一抗和辣根过氧化物酶共轭结合的 IgG（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA）温育后，用 CCD 相机（LAS 1000, Fujifilm, Tokyo, Japan）捕获来自增强的化学发光（ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ）的信号。

ELISA

利用之前阐述[17]的夹心 ELISA 对来自正常乳腺和肿瘤组织的蛋白质提取物中的 hCAP18 进行定量。

通过实时 PCR 分析 hCAP18 的表达

用 Qiagen RNeasy 试剂盒（Operon Biotechnologies, Cologne, Germany）提取四个正常样本和四个肿瘤样本的 RNA 并使用第一链合成试剂盒（Amersham Biosciences, Norwalk, CT）进行反转录。利用 10ng cDNA 根据标准方法在 ABI Prism 7700 （Applied Biosystems）上通过实时 PCR 对 RNA 进行定量。所述样本一式作三份进行评价。序列为：引物序列 5'-GTCACCAGAGGATTGTGACTTCAA-3' [SEQ ID NO: 2] 和 5'-TTGAGGGTCACTGTCCCCATA-3' [SEQ ID NO: 3]，荧光探针序列 6-FAM-5'-CCGCTTCACCAGCCCGTCCTT-3'-BHQ1 [SEQ ID NO: 4]。样本通过 18S-RNA 的定量进行标准化（在 Demand, Applied Biosystems 上进行试验）。将正常样本中的平均表达设定为 1。

合成的 LL-37 肽

合成 LL-37 肽并通过 HPLC 纯化至纯度为 98%（PolyPeptide Laboratories A/S, Hillerød, Denmark）。在抗菌试验[18]中确认所述肽的生物活性。

上皮细胞的 LL-37 肽处理

在补充有 10% FCS（胎牛血清，Hy-Clone，Boule Nordic AB Huddinge，Sweden）和抗生素（PEST = 50 U/l 青霉素和 50 mg/ml 链霉素，Gibco BRL）的 DMEM（Dulbecco's modified Eagle's 培养基，Gibco BRL，Life Technologies，Scotland）中培养自发永生化的人角化细胞系（HaCaT）[19]。在 70%汇合时收集细胞并接种在 96 孔板中，每孔为含 2000 个细胞的 100 μl 培养基（DMEM + 10% FCS 和 PEST）。12 小时后，将培养基更换成无血清的培养基（DMEM + PEST），通过 72 小时的血清饥饿将细胞同步化到 G0/G1 期，随后用 100 μl

含 10μg/ml 合成的生物活性 LL-37 肽的培养基（DMEM + 5% FCS + PEST）处理。使用仅经过 DMEM + 5% FCS 和 PEST 处理的细胞作为对照。所述试验一式做四份。通过[^{3}H]-胸苷掺入试验评价细胞增殖。用 1 μCi/孔的[3H]-胸苷（20.00 Ci/mmol，Perkin Elmer Life Sciences Inc. Boston，MA）处理细胞 12 小时并收集到玻璃纤维滤膜（Wallac Oy Turku, Finland）上。所述试验重复进行两次，每次做六份。

hCAP18 在 HEK293 和 HaCaT 细胞中的转基因表达

将来自 Image clone 3057931 [20] 的 Bfa1 片段亚克隆至双顺反子载体 pIRES2-EGFP （BD Biosciences, Bedford, MA）的 Sma1 位点中，所述 Bfa1 片段包含具有 16bp 的 5'非翻译区的完整编码序列。在标准条件下利用 Fugene（Roche Diagnostics，Indianapolis，IN）转染 HEK293 和 HaCaT 细胞，并用 400 ng/ml G418（Invitrogen, Paisley, UK）选择培养两周。根据 EGFP 的表达，用 MoFlo®高速细胞分选流式细胞仪（DakoCytomation, Fort Collins, CO）使用 Summit™数据分析软件分选细胞，通过免疫印迹定量所述细胞的 CAP18 表达。同样通过转染仅表达 EGFP 的载体建立对照细胞系。在没有任何选择的连续数月培养过程中所述细胞系保持稳定的 CAP18 表达。所述试验重复两次，每次做 30 份。

稳定转染了 hCAP18 的 HEK293 和 HaCaT 细胞的增殖试验

在 70%汇合时收集转染 hCAP18 的 HEK293 细胞并接种至 24 孔板中。24 小时后，更换培养基并将细胞培养在 2ml 补充有 5% FCS 和 PEST 的培养基（Optimem，Gibco BRL，Life Technologies，Scotland）中。在第 6 天收集细胞并通过流式细胞仪（Becton Dickinson，Bedford，MA）计数。利用台盼蓝测定细胞存活率，在所有试验中都有少于 5%的细胞是台盼蓝阳性的。所有试验都一式作三份。使用转染仅表达 EGFP 的载体的 HEK293 细胞为对照细胞。

在 70%汇合时收集转染了 hCAP18 的 HaCaT 细胞并以每孔 2000 个细胞接种至 96 孔板含 10%FCS + PEST 的 DMEM 中。12 小时后将培养基更换成补充有 5% FCS + PEST 的 DMEM。培养 24 小时后，如上所述，用 1 μCi/孔的[^{3}H]-胸苷处理细胞 12 小时、收集并进行分析。使用转染仅表达 EGFP 的载体的 HaCaT 细胞为对照。

FPRL1 的表达分析

使用 RNeasy 试剂盒（Qiagen）从 HaCaT 细胞提取 RNA 并使用第一链合成试剂盒（Amersham-Pharmacia）进行反转录。如上所述，通过实时 PCR 对 RNA 进行定量并相对于 18S-RNA 进行标准化。序列为：引物序列 5'-TCTGCTGGCTACACTGTTCTGC-3' [SEQ ID NO: 2] 和 5'-GACCCCGAGGACAAAGGTG-3' [SEQ ID NO: 3]，荧光探针序列 6-FAM-5'-CCCAAGCACCACCAATGGGAGGA-3'-BHQ1 [SEQ ID NO: 4]。

百日咳毒素试验

为了评估 FPRL 在介导由 hCAP18/LL-37 诱导的上皮细胞增殖刺激中的参与作用，使用 G 蛋白偶联受体抑制剂百日咳毒素处理 HaCaT 细胞。在 LL-37 处理前，将细胞与毒素终浓度为 20 ng/ml 的百日咳毒素（Sigma-Aldrich, Switzerland）一起预温育 24h。细胞接种 48 小时后更换培养基，使用分别含 5 或 10 μg/ml 合成的、具生物活性的 LL-37 的 100μl 培养基（DMEM + 5% FCS 和 PEST）处理 HaCaT 细胞。使用仅经 DMEM + 5% FCS 和 PEST 处理的细胞为对照。

LL-37 处理的 HaCaT 细胞的磷酸化 ERK1/2 试验

以 10%的汇合接种 HaCaT 细胞并在含 0.2% FCS 的 DMEM 中培养 36 小时。在其后 48 小时中，在含有或不含 10μg/ml LL-37 的情况下，在分别含 1% 或 5% FCS 的 DMEM 中培养细胞，并且每天更换培养基。使用 10 ng/ml EGF 作为阳性对照。利用小鼠单克隆抗体（Cell Signaling Technology, Beverly MA）通过蛋白质印记分析评价磷酸化 ERK 1/2 的表达。

统计分析

数值用每分钟计数细胞的平均数±SD 表示。用双向 t 检验分析组间比较。P 值<0.05 认为结果具有统计显著性。为了分析肿瘤中的表达，对 hCAP18 蛋白质水平进行单侧 t 检验，显著性水平为<0.05。

结果

hCAP18/LL-37 在乳腺癌中表达

在表 2 中显示了患者的详细信息。

通过原位杂交，在健康对照（图 1g）和与乳腺癌无关(uninvolved breast cancer)（未显示）的乳房组织中有低的 *hCAP18* mRNA 信号（未显示）和对 hCAP1 蛋白质的微弱免疫反应性。所有乳腺癌组织都在肿瘤细胞中而未在基质中显示出对 hCAP18 的免疫反应性（图 1a、1c、1d）。对于 hCAP18 免疫反应性，所述肿瘤细胞群分布并不均匀，发现强阳性细胞与缺乏可测 hCAP18 的细胞相邻（图 1c）。利用 cathelin 重组蛋白的免疫吸收消除了 hCAP1 免疫反应性（图 1e、1f）。通过原位杂交，在同一区域检测到 *hCAP18* mRNA 的阳性信号，该信号与免疫组化（图 1b）获取的表达谱非常匹配。信号强度各不相同并且在高级别肿瘤中最突出。对照切片与缺乏 *hCAP18* mRNA 特异信号的正义 hCAP18 cRNA 探针杂交（未显示）。

通过 ELISA 对乳腺癌组织提取液中 hCAP18 蛋白质定量，定量结果显示 hCAP18 蛋白质在 Elston I 和 II 级肿瘤间没有差别，但是在最高恶性级别的肿瘤中具有明显较高的 hCAP18 水平（表 2）。Elston III 级和其它肿瘤间的差别具有统计显著性（$p<0.01$）。13 个 III 级肿瘤中有 10 个肿瘤的 hCAP18 浓度达到或超过 5 ng/mg 总蛋白质。在 18 个其它肿瘤样本中仅有 2 个样本达到这个水平。我们还检测了四个物种的健康乳房组织，显示其与 Elston I 或 II 级肿瘤具有相似的水平。为了证实通过 ELISA 获取的表达谱，我们对四个正常样本和四个肿瘤样本进行了实时 PCR。转录本定量的结果与蛋白质表达的数据一致（表 2）。

通过免疫印记，研究的所有肿瘤和正常乳房组织都显示与完整的未处理 18 kDa 全蛋白对应的免疫反应条带（图 2）。在所研究的 5 个 III 级肿瘤中，其中 4 个肿瘤（表 2，样本 6-10）检测到了与 LL-37（处理的 hCAP18 蛋白质）相对应的条带（图 2）。使用针对 hCAP18 全蛋白产生的抗血清并以高浓度检测 LL-37，即使所述抗血清针对 cathelin 肽进行了亲和纯化。

hCAP18/LL-37 提高了上皮细胞的增殖

与转染仅表达 EGFP（E）的载体的对照细胞相比，转染 *hCAP18*（hCAP18/E）表达载体的 HEK293 和 HaCaT 细胞显示显著增高的增殖速率（图 3A 和图 3B）。通过 HEK293 和 HaCaT 转染细胞蛋白质提取物的

免疫印迹，我们证实这些含 hCAP18 载体的细胞产生全蛋白（图 3A 和图 3B）并且在细胞培养基中检测到与 LL-37 对应的 4 kD 免疫反应条带（数据未显示）。此外，在 5%胎牛血清中培养并用 10μg/ml 合成的、具有生物活性的 LL-37 肽处理的 HaCaT 细胞显示细胞增殖的显著提高（图 4）。

表 2

样本号[a]	年龄（岁）	类型	分级[b]	ER[c]	细胞周期蛋白 A[d]	IH & ISH[e]	hCAP18[f] (ng/mg)	实时 PCR[g]	处理[h]	Axillar LN[i]	临床状况[j]
0	30	健康				•					
1	72	健康				•	0,7				
2	53	小叶	I	+	L	•	2,3		M, TAM	-	0
3	65	导管	II	+	H	•	1,1		M,CT	-	CIS
3b		正常				•					
4	37	导管	I	+	H	•	2,3		PM,Rx,TAM	-	0
5	69	胶质	I	+	L	•	1,7		PM,Rx,TAM	-	0
6	84	导管	III	-	H	•	5,4		M	-	†
7	53	导管	III	-	H	•	35,8		M,Rx,CT	+	0
8	55	导管	III	-	H	•	5	8	PM,Rx,CT	+	转移
9	73	导管	III	-	H	•	11,8		M,TAM	-	†
10	47	导管	III	-	H	•	5,3		M,CT,Rx	-	†
11	64	导管	II	+	H	•	1,6		M,Rx,TAM	-	0
12	52	导管	II	+	H	•	5		PM,Rx,CT	+	0
12b		正常				•					
13	69	导管	I	+	L	•	0,9		PM,Rx,TAM	+	0
14	31	导管	II	+	L	•	4		M,Rx,CT	+	0
14b		正常				•					
15	58	导管	I	+	L	•	3,9		PM,Rx,TAM	-	0
16	70 右	导管	I	+	L	•	4,12		PM,Rx,TAM	-	0
16	左	小叶	II	+	L	•	4,56		M,TAM	-	0
16b		正常				•					
17	70	小管	I	+	L	•			M,Rx,TAM	-	0
18	76	导管	I	+	L		3,9		M,Rx,CT	+	0
19	64	导管	III	+	H		3,9		PM,Rx,CT	-	0
20	69	导管	I	+	L		4,7		PM,Rx,TAM	-	0
21	78	小叶	III	+	H		38		M,CT	+	0

样本号[a]	年龄（岁）	类型	分级[b]	ER[c]	细胞周期蛋白 A[d]	IH & ISH[e]	hCAP18[f]（ng/mg）	实时 PCR[g]	处理[h]	Axillar LN[i]	临床状况[j]
22	67	导管	III	+	H		4,0		M,CT	nd	0
23	82	胶质	I	+	L		11,7		M,CT,	nd	0
24	76	导管	II	-	L		3,7		M,Rx,CT	-	0
25	44	导管	III	+	H		7,0	11	M,Rx,CT	+	0
26	79	脊髓	III	+	H		4,8	18	M,Rx,CT	+	0
27	66	导管	I	+	L		8,7		PM,Rx,CT	-	†
28	58	导管	III	-	H		41	11	M,Rx,CT	+	†
29	65	转移	-	+	H		29,5		CT	+	转移
30	54	小叶	III	+	H		5,8		M,Rx,CT	+	0
31	81	正常					1.2	0.6			
32	60	正常					2.9	1.1			
33	65	正常					2.9	1.5			
34	55	正常						1.1			

[a] 来自 28 位乳腺癌患者的组织，来自 8 位乳腺癌患者和 2 位经受乳房重建手术健康个体（第 0 和 1 号样本）的正常乳房组织。

[b] 根据 Elston 和 Ellis 的肿瘤分级。

[c] 用免疫组化进行雌激素受体（ER）状况的评估。

[d] 表达增殖标记细胞周期蛋白 A 的细胞的百分数。低（L）< 5%，高（H）≥ 5%。[e] 使用针对 hCAP18 的免疫组化（IH）和原位杂交（ISH）进行研究的组织（•）。[f] 来自所述组织的蛋白质提取物，用 ELISA 测定 hCAP18 mRNA 水平并表示为 ng hCAP18/mg 总蛋白质。[g] 来自所述组织的 RNA 提取物，使用实时 PCR（TaqMan）测定 hCAP18 mRNA，将正常组的平均值设定为 1。[h] M = 乳房切除，PM = 部分乳房切除，Rx = 放射，CT = 化疗，TAM = 他莫西芬。[i] 手术腋窝淋巴结状态。nd =未处理。[j] 在诊断 1.5-2 年后评估临床状况。† = 死亡 0 = 无临床复发，CIS = 原位癌。

LL-37 受体 FPRL1 在乳腺癌中的表达

已经表明 G 蛋白偶联受体 FPRL1 在白细胞中介导由 LL-37 诱导的作用[4,5]，为了评估 FPRL1 蛋白质在本发明中的潜在作用，我们研究了其在乳房组织中的表达并在乳腺癌细胞和正常腺上皮细胞中都发现对 FPRL1 的强免疫反应性（图 5a，5b）。免疫印迹证实在所述两个组织中都表达 FPRL1（图 5c）。此外，在 HaCaT 细胞中 *hCAP18* 的转基因表达显著提高了 FPRL1 mRNA 的表达（图 5d），这可能进一步支持 FPRL1 参与了 hCAP18/LL-37 信号传递。然而，用百日咳毒素预处理 HaCat 细胞没有完全终止而是约 50%的抑制了这些细胞的增殖（未显示），说明在这些细胞中 FPRL1 可能并不唯一参与介导 hCAP18/LL-37 生长刺激作用。我们使用合成的、具有生物活性的 LL-37 处理 HaCaT 细胞以检测 ERK1/2 参与激活上皮细胞增殖的可能性，但没有 ERK1/2 的显著激活，这说明 EGFR 不参与介导 LL-37 对 HaCaT 细胞增殖的刺激作用。

讨论

在本研究中，我们证明在正常乳腺上皮细胞中组成性地产生 hCAP18/LL-37。这与 LL-37 在人抗菌屏障保护中的作用一致，并与先前的报道一致，即在正常的静止上皮细胞中发现 LL-37 的低组成性表达，而观察到 LL-37 的显著表达与损伤和炎症相关[7-10]。先前已经在多种外分泌腺中检测到抗菌肽的组成性表达，例如，人汗腺中的 cathelicidin LL-37、小鼠唾液腺中的 cathelicidin CRAMP 和人唾液腺中的 β-防御素[21-23]。Bals 等在 1998 年报道了人 β-防御素-2（hBD-2）mRNA 在乳腺中的表达，最近其它研究组在未哺乳妇女的乳腺组织中和处于哺乳期的乳房组织和母乳中都发现组成性 hBD-1 表达[24-26]。

有趣的是，与正常乳房上皮细胞或低级别肿瘤相比，在高级别的肿瘤中 hCAP18 的产生增加得最为显著。然而 hCAP18 表达既不普遍也不均匀，即并不是所有的癌细胞都是 hCAP18 阳性的，但是发现明显阳性的细胞与缺乏可检测 hCAP18 mRNA 和蛋白质的细胞相邻（图 1c），并且表达程度在所有肿瘤类型的细胞中相当不一样。这可能反映了 hCAP18 复杂而严

格受控的调控，正如曾提出的针对肾细胞癌中人 α-防御素的调控[27]。

在我们的研究中，在最高组织学分类的肿瘤中检测到最高水平的 hCAP18/LL-37。虽然从一方面来看，高级肿瘤与低级和正常乳房之间 hCAP18 表达的差异是统计显著的，但是却没有明显相关性。在所有组中都有以健康样本的表达水平表达 hCAP18 的肿瘤，并且两个 I 级肿瘤显示了仅在 III 级肿瘤中观察到的相对高的表达。然而，考虑到样本数的局限性，我们的观察提示在恶性级别和 hCAP18/LL-37 表达之间具有潜在的相关性。一些人认为 hCAP18 在乳腺癌中的过表达可能是由于影响 *hCAP18* 调控的细胞内通路失效造成的，并且 hCAP18 表达反映了这些改变而非对肿瘤提供了生长的有利条件。然而，与本文提供的体外研究相结合，我们相信所述数据揭示了 LL-37 在促进肿瘤生长方面的潜在作用。

已经在多种口腔癌中发现了高浓度的 hBD-2 蛋白质和针对人 α-防御素和 β-防御素的显著免疫反应性，并且提示这些抗菌肽水平的提高可能是由细胞因子引起的感染和/或刺激的结果[28-30]。其它研究提出，从昆虫中分离的抗菌肽，例如蜂毒素和天蚕抗菌肽（ceropin）相关肽显示对哺乳动物肿瘤细胞的抗肿瘤作用[31-34]。此外，通过对人膀胱癌细胞系中蜂毒素和天蚕抗菌肽的编码序列进行载体介导的递送和表达抑制了裸鼠中肿瘤的形成[11]。同样，猪 cathelicidin PR-39 的转基因表达降低了人肝细胞癌的侵袭能力[12]。

这些抗菌肽的多功能作用变得越来越明显。除了通过直接的膜作用使病原体失活，LL-37 还在体外发挥趋化作用，诱导人中性粒细胞、单核细胞、T 细胞亚群和肥大细胞的迁移[4, 35, 36]。这种趋化活性依赖于 LL-37 与 FPRL1 的结合，FPRL1 是对百日咳毒素敏感的膜结合 G 蛋白偶联受体[4]。此外还提出 hCAP18/LL-37 的功能包括通过促进皮肤伤口的上皮再生和新血管形成修复上皮细胞和形成血管的作用[5, 10]。

因此，本文显示的 hCAP18/LL-37 在乳腺癌细胞中的显著表达反映了对这些肿瘤细胞的生长有利。为了检验这种假设，我们用 *hCAP18* 表达载体转染人上皮细胞系 HEK293 和 HaCaT，并发现转染细胞增殖的显著提高。此外，合成的、具有生物活性的 LL-37 肽显著提高了 HaCaT 细胞的增殖。这些发现与针对抗菌肽提出的可能的抗肿瘤作用形成鲜明的对比，

但与最近 Müller 等关于人 α-防御素可能调节肾细胞癌（RCC）发展的发现一致。这些防御素发现于 RCC 肿瘤细胞和正常肾管状上皮细胞中，并且以生理浓度刺激肿瘤细胞的增殖[27]。

我们的体外研究表明 LL-37 部分地通过 FPRL1 刺激上皮细胞的增殖，原因是用百日咳毒素阻断受体降低了外源 LL-37 约 50%的增殖作用，说明可能还有其它受体的参与。在最近的研究中，提出 LL-37 利用促分裂原激活蛋白激酶/细胞外信号调控激酶（MAPK/ERK 激酶 = MEK）的活化通过反式激活表皮生长因子受体（EGFR）激活气管上皮细胞。

综上所述，本文显示的结果表明 LL-37 促进肿瘤生长。

参考文献

1. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. Eur J Biochem 1996;238:325-32.

2. Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. FEBS Lett 1995;374:1-5.

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

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

5. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krotz F, Zahler S, Gloe T, Issbrucker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, 等 An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. J Clin Invest 2003;111:1665-72.

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

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

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

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

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

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

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

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

14. Sørensen O, Bratt T, Johnsen AH, Madsen MT, Borregaard N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is bound to lipoproteins in plasma. J

Biol Chem 1999;274:22445-51.

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

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

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

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

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

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

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

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

23. Sahasrabudhe KS, Kimball JR, Morton TH, Weinberg A, Dale BA. Expression of the antimicrobial peptide, human beta-defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva. J Dent Res 2000;79:1669-74.

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

25. Tunzi CR, Harper PA, Bar-Oz B, Valore EV, Semple JL,

Watson-MacDonell J, Ganz T, Ito S. Beta-defensin expression in human mammary gland epithelia. Pediatr Res 2000;48:30-5.

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

27. Müller CA, Markovic-Lipkovski J, Klatt T, Gamper J, Schwarz G, Beck H, Deeg M, Kalbacher H, Widmann S, Wessels JT, Becker V, Muller GA, et al., Human alpha-defensins HNPs-1, -2, and -3 in renal cell carcinoma: influences on tumour cell proliferation. Am J Pathol 2002;160:1311-24.

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

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

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

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

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

33. Moore AJ, Devine DA, Bibby MC. Preliminary experimental anticancer activity of cecropins. Pept Res 1994;7:265-9.

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

35. Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R,

Jörnvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha- defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. Blood 2000;96:3086-93.

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

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

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

材料和方法

从 140 个乳腺瘤组织样本和 4 个未受影响的(unaffected)乳房组织样本中提取 RNA 并利用随机六聚体作为引物进行反转录。根据标准方法利用 10ng cDNA 通过实时 PCR 测定 hCAP18 转录本的表达（如上所述）。

结果和讨论

结果在图 6 中显示。将未受影响的样本的平均表达设定为 1。通过偏差统计评价平均值和偏差。

当淋巴结已经形成时 hCAP18 在 ER 阳性肿瘤中的表达显著高于（约 5 倍）没有淋巴结时 hCAP18 在 ER 阳性肿瘤中的表达。

实施例 C：抑制 hCAP18/LL-37 活性的试剂的鉴定

可使用多个明确定义的体外和体内试验来证明 hCAP18/LL-37 对肿瘤发展的不同方面的作用，即熟知的信号转导通路的诱导、细胞增殖的刺激和凋亡的抑制、群落生长和非锚定生长的刺激、通过基底膜的侵袭刺激和在小鼠中加强肿瘤的生长和转移瘤的形成。

上文中归结的 hCAP18/LL-37 对原发角化细胞和上皮细胞系的特征也可

以在乳腺癌细胞系中得到证明。合适的靶细胞系是不表达 hCAP18 的低级别恶性的雌激素受体阳性细胞系 MCF7。为了对以上方面进行研究，建立了由重组质粒表达 hCAP18 的 MCF7 衍生细胞。由于 hCAP18 蛋白质的自分泌活性和旁分泌 LL-37 可能不同，如果试验的本身允许，还通过 LL-37 的外源加入而非通过细胞的内源产物进行体外试验。

虽然以上试验在于评价 hCAP18/LL-37 产生肿瘤的全部潜能，但是可以利用具有抗 hCAP18/LL-37 活性的试剂进行进一步的试验以证明其对这些作用的抑制。例如，合成的且有活性的蛋白质 LL-37 可以被认为是抗体抑制的靶标。此外，可以通过阻断启动子抑制 hCAP18 基因的转录和由 RNA 干扰引起的转录本的转录后下调，阻碍这种蛋白质的产生。

因此，试验可以在体外进行以证明作用的机制和靶标，也可以在小鼠体内的肿瘤上进行以证明在体内的作用。这种体外试验可以在以上阐述的 MCF7 衍生细胞中进行。针对 hCAP18 基因的调控试验，使用以低水平表达 hCAP18 但表达水平仍可清晰检测到的乳腺癌细胞系 ZR75-1。

针对以下阐述的试验，除非另有说明否则都使用以下条件：细胞在含 10% 胎牛血清的 Dulbecco's modified Eagles 培养基中培养。用于转基因细胞系的培养基含 150 μg/ml 潮霉素和 400 μg/ml 遗传霉素以保持所述转基因。对于持续不到 3 天的试验，在使用细胞前 24h 除去抗生素，并将胎牛血清浓度调整至每个特定试验所必需的浓度。LL-37 以 2μM 的浓度加入。

细胞增殖的刺激（参见 Heilborn 2005）

在 70%汇合时收集转基因细胞系和细胞系并以每孔 2000 个细胞接种在 96 孔板中，96 孔板中具有含 10%FCS 的 DMEM。24 小时后，将培养基更换成添加或未添加 LL-37 的含 5% FCS 的培养基。培养 24h 后，用 20Ci/mmol 的[^{3}H]-胸苷以 1 μCi/孔处理细胞 12 小时，并收集（Harvester 96; Tomtec, Orage, CT）到玻璃纤维滤膜（Wallac Oy Turku, Finland）上。利用液体闪烁计数器（Microbeta Plus, Wallac）确定[^{3}H]-胸苷的掺入。为了确定试验的统计显著性，针对每个条件/细胞系都使用 24 个孔。

细胞生长试验（参见 Lu 2005, Ludes-Meyers 2002）

本实验作为[^{3}H]-胸苷掺入试验的补充进行，以确定 hCAP18/LL-37 对细胞增殖的刺激。以 50 个细胞/mm^2 密度接种 MCF7 衍生细胞（在 6 孔板中大约 50,000 细胞/孔），每个时间点一式做三份。每隔 2 天用血细胞计数器计算总的细胞数量。通过台盼蓝评估细胞存活率。

由 hCAP18/LL-37 引起的凋亡抑制

为了诱导凋亡，将细胞以 25,000 细胞/孔接种到含具有 5% FCS 的培养基的 6 孔板中，并用 6μm 拓扑异构酶 I 抑制剂喜树碱（CAM）（Sigma Chemical Co., St. Luis, MO）处理 24h。

评价两个凋亡参数（DNA 含量和 Caspase-3 的活性）以确定由 hCAP18/LL-37 引起的凋亡抑制。所有试验进行 6 次以确定统计显著性。

通过流式细胞术分析 DNA 含量（参见 Warburton 2005）

在此分析中使用碘化丙啶（PI）/RNase 染色缓冲液（Becton Dickinson, San Jose, CA）。将胰酶消化的细胞固定在 70%（V/V）冷乙醇中，并保存到 4°C 直至使用。通过将 PI 掺入到 DNA 中测量 DNA 含量。利用 FACScan 流式细胞仪（Becton and Dickinson, Mountain View, CA, USA）进行荧光分析。同时测量颗粒的 FSC（前向光散射）和 SSC（侧向光散射）以确定细胞的尺寸和粒度。在 FL-4 窗口中（600 nm 带通滤波器和 35 nm 带宽）检测对核染色的 PI 红色荧光。荧光强度与细胞 DNA 含量成正比。将每个柱状图分成两部分：（1）代表不同步的非凋亡活细胞的 M1 区（DNA 含量等于 2N 至 4N 的 G1、S 和 G2 期细胞）；以及（2）代表与活细胞相比具有较少 DNA 量的凋亡细胞的 M2 区。

Caspase-3 活性试验

利用荧光底物 VDVAD-AMC（100 μM）和 DEVD-AMC（50 μM）计算 Caspase-3 酶活性。将细胞裂解物合并在反应缓冲液（100 mM HEPES、10% 蔗糖、5 mM 二硫苏糖醇（DTT）、10-6% NP-40 和 0.1% CHAPS，pH 7.25）中并加至微孔板中。通过 AMC 释放在 Fluoroscan II 读板仪（Labsystems, Stockholm, Sweden）中监测荧光团底物的裂解。利用游离 AMC 产生的标准

曲线将荧光单位转化为 pmol AMC。通过线性回归分析数据。

群落形成试验（参见 Ludes-Meyers 2002, Wang 2005）

本实验用于确定在没有支持性邻细胞的情况下细胞持续增殖的能力。这种性质被认为反映了细胞形成肿瘤的能力。

将转基因细胞维持在半汇合状态并在最大 70%的汇合度时进行胰酶消化，随后稀释至 5、10 和 25 个细胞/ml 生长培养基的浓度。细胞培养 3 至 7 天（基本足够增殖 3 至 4 倍），并测定每个群落的细胞数。如果重组质粒表达绿色荧光蛋白，就能够在荧光显微镜下计数细胞和群落。群落形成的结果表示为每个群落中荧光细胞的分布，利用 Wilcoxon's 秩和检验比较培养基中存在和不存在 LL-37 时不同转基因细胞系的分布。由于已知 MCF7 细胞仅在有 ß-雌激素存在的情况下形成肿瘤，可以检测 1-5nM 雌激素对转基因细胞生长的影响。

非锚定生长试验（参见 Fiucci 2002）

这个试验反映细胞形成转移瘤的能力。通过用 300u/ml 胰酶、20u/ml 弹性蛋白酶和 1mM EDTA 混合物的处理制备细胞。弹性蛋白酶的存在促使细胞的脱离而成单细胞悬液。将细胞悬浮在生长培养基中并以 1：1 的比例与含 0.7% Seaplaque 低熔点琼脂糖的生长培养基混合，终浓度为 500 细胞/ml 和 0.35%琼脂糖。将 1ml 这种混合物加入到 6 孔板中，铺在 2ml 固化的培养基/0.6%琼脂糖层上。通过每隔 3-4 天加入 100µl 生长培养基供养所述细胞。两星期后培养物的上层用 0.2%碘硝基四唑紫（Sigma）染色，并计算直径大于 100 µM 的群落。试验一式作三份，并重复进行两次。

侵袭性诱导（参见 Fiucci 2002）

将从 EHS 肉瘤产生的 Matrigel 作为基底膜。Matrigel 不仅包含基底膜成分（胶原蛋白、层粘连蛋白和蛋白聚糖）还包含基质降解酶/其抑制剂和生长因子。肿瘤细胞向 Matrigel 的侵袭用于表征细胞外基质受体和在肿瘤发展中起作用的基质降解酶的参与作用。

将 Matrigel 在无血清的冷却生长培养基中稀释成 2mg/ml，向 24 孔

transwell 的上部小室中加入 100 μl 并在 37°C 温育过夜以进行胶凝。收集细胞并以 10^6/ml 密度悬浮在含 1% FCS 的培养基中。用无血清的温培养基洗涤 matrigel 后，向上部加入 100 μl 细胞悬液。下部小室注满 600μl 含条件培养基作为趋化物的生长培养基。将所述小室在细胞培养箱中温育 6h 至 24h。对 transwell 进行染色（Diff-Quick 染色溶液, Fisher Scientific），并且在用棉签刮掉非侵袭细胞后，在光学显微镜下对侵袭细胞进行计数。

肿瘤在 SCID 小鼠中的生长（参见 2005 Warburton 2005）

收集半汇合的培养细胞并以 2.5×10^7 细胞/ml 悬浮在冷 PBS 中。向 4-6 周龄雌性 SCID 小鼠的脂肪垫或尾静脉中皮下注射 200 μl 的部分所述悬液。由于 MCF7 细胞的肿瘤形成通常依赖于雌激素，皮下植入可在 60 内每天释放 1.7mg ß-雌二醇的小球。所述小鼠每周触诊两次，并记录首次发现可触诊肿瘤的日期。人工监测肿瘤生长，并且最迟在肿瘤直径为 1cm 时处死小鼠。记录肿瘤的数量、尺寸和分布。通过对所述小鼠进行切片检测小的转移瘤，并扫描以诱导来自重组质粒表达的 GFP 的荧光。此外，对脾和肝进行胶原化，并在 FACS 分选仪中评价单细胞悬液以测定荧光细胞的数量。

hCAP18 转录拮抗剂的抑制研究（参见 Agarwal 1998, Andela 2004, Toell 2001, Ishizuka 2005, Weber 2005）

目前已知的最强的 hCAP18 转录诱导剂是维生素 D。维生素 D 受体通过结合 hCAP18 启动子中的效应元件直接激活 hCAP18 转录。由于小分子可以控制 hCAP18 的表达，系统地筛选抑制性化合物很有意义。最初的研究表明雌激素和其一些代谢物没有效果。维生素 A 在皮肤角化细胞中抑制转录但在乳腺癌细胞系 ZR-75-1 中刺激转录。根据这些发现，维生素 D 的拮抗剂如 ZK159222（Schering AG）和 TEI-9647（Tejin Institute for Medical Research, Tokyo），以及维生素 A 的拮抗剂如 AGN193109（Allergen Pharmaceuticals）都是用于本发明方法的潜在试剂。

hCAP18 转录抑制剂的筛选（参见 Weber 2005）

ZR75-1 细胞以 25%的汇合铺板并用终浓度为 100nM 的潜在抑制剂处理，

所述抑制剂以 100 μM 的浓度溶解在异丙醇或 DMSO 中。24h 后，用 Qiagen RNeasy 试剂盒（Operon Biotechnologies, Cologne, Germany）提取 RNA 并用第一链合成试剂盒（Amersham Biosciences, Norwalk, CT）进行反转录。利用 5ng cDNA 根据标准方法在 ABI Prism 7700（Applied Biosystems）上通过实时 PCR 对 RNA 进行定量。所述样本一式作三份进行评价。序列为：引物序列 5'-GTCACCAGAGGATTGTGACTTCAA-3' [SEQ ID NO: 2] 和 5'-TTGAGGGTCACTGTCCCCATA-3' [SEQ ID NO: 3]，荧光探针序列 6-FAM-5'-CCGCTTCACCAGCCCGTCCTT-3'-BHQ1 [SEQ ID NO: 4]。样本通过 18S-RNA 的定量进行标准化（在 Demand, Applied Biosystems 上进行试验）。

为了研究所述抑制的调控机制，通过使用重组质粒确定启动子的活性，在所述重组质粒中 hCAP18 启动子控制荧光素酶报告基因。将 ZR75-1 细胞以 25%的汇合铺在 6 孔板中，每孔用 3 μg 报告质粒和 6 μl jetPEI（qBiogene）的混合进行转染。转染 14h 后，加入如上所述的抑制剂。24h 后，裂解细胞并在检测系统（Promega）中测定荧光素酶的活性。所述活性相对于由 200ng 共转染质粒（pEF1/lacZ, Invitrogen）表达的 ß-半乳糖苷酶进行标准化。每个试验至少进行两次，每次作三份。

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

目前最有效的转录后抑制是 RNA 干扰，其主要诱导靶 mRNA 的序列特异性和酶促性降解。可以最简单地在转染小干扰 RNA 的细胞系中筛选到转录本中最有效的靶位点。由定量 PCR 和蛋白质印迹分析监测 RNA 干扰的功效。随后可以在设计用于在肿瘤位点表达靶分子的重组载体中表达成功的靶位点。

根据 hCAP18 编码序列设计并合成小干扰 RNA。所述 RNA 由 19-mer 的双链，并在任意一端具有 2 个碱基 dTdT 的悬端构成。最简单地，可以将商业 siRNA 数据库用于所述设计，在所述数据库中靶位点已经被预先选择出来（如针对 hCAP18，siRNA 为来自 Ambion 的第 14586、14402、146365 号）。用最大终浓度为 10nM 的 siRNA 转染 ZR75-1 细胞或转基因 MCF7 细胞以避免非特异性响应如干扰素相关通路。对照 siRNA 与靶序列相比含 2-3 个错配。转染 24-72h 后收集细胞，并通过如上所述的实时 PCR 和定量蛋白质印迹测

定 hCAP18 的表达。在含 SDS 的样本缓冲液中提取蛋白质，在 15%的 Tris-甘氨酸凝胶上进行分离，并电印迹到如上所述的硝酸纤维素膜上以进行所述蛋白印迹分析。在与 1：1000 稀释的亲和纯化的抗 LL-37 抗血清进行温育前，使用 3%丽春红 S 对所述滤膜进行可逆染色。如上所述，捕获并评价由共轭结合辣根过氧化物酶的二抗 IgG 经增强化学发光产生的信号。

针对 hCAP18 表达转录的最有效抑制剂设置体内试验。向 12 只小鼠注射表达转基因 hCAP 18 的 MCF7 细胞。其中一半小鼠每天接受溶解在 50 μl 橄榄油（Sigma）中的 30mg 抑制剂的皮下注射。一旦形成肿瘤，按如上所述检测肿瘤的尺寸和分布。对体内方法有效的 siRNA 应下调 hCAP18 表达至少 90%。

为了干扰小鼠体内肿瘤的形成，hCAP18 表达的下调需要保持数星期。已经证明每天向尾静脉注射高剂量 siRNA 是可行的，但针对治疗方法却似乎不现实。另一个选择是在生物体/肿瘤细胞中稳定表达 siRNA。已设计出的质粒（如 pSuper, OriGene Inc）将 RNA 表达为发夹结构，所述发夹结构随后在细胞内被转化成 siRNA。对于我们的最初方法，将由以上试验确定的靶 siRNA 序列克隆至 pSuper 中，并在植入到小鼠前用此构建体转染肿瘤细胞。目前尚未研发出肿瘤形成后递送表达载体的治疗方法，但是为了达到此目的，利用脂质体递送质粒以及构建逆转录病毒和腺病毒表达载体是得到普遍研究的课题。

相对于 RNAi 的另一种方法是“经典的”反义方法。将与靶转录本互补的长度为 20-3bp 的单链寡核苷酸直接加入到细胞培养基中或注射到小鼠中。通常对所述寡核苷酸的骨架都进行了修饰以抑制其降解并促进其在没有任何载体底物情况下的吸收。然而，由于抑制机制并非酶促机制，所以所述方法需要高剂量，并且骨架修饰提高了细胞毒性和非特异的副作用。在小鼠试验中，通常的施用范围为 100-500μg/动物/天。

用抗体抑制 LL-37 活性（参见 Warburton 2005）

已经产生鸡抗体，并且进行了足以进行所计划试验的大规模亲和纯化。之前已经显示抗 LL-37 的抗体能够抑制 LL-37 的活性。所以不需要体外试验。

针对体内试验，如上所述将肿瘤引入到小鼠中。可触及到肿瘤时每星期

注射抗体两次，最初用 1-100mg/kg 的抗体。

随后评估抗体对肿瘤形成的影响。

参考文献

Agarwal C et al.: AGN193109 is a highly effective antagonist of retinoid action in human ectocervical epithelial cells. J Biol Chem 271: 12209-12212 (1996).

Andela VB, Rosier RN: The proteosome inhibitor MGI32 attenuates retinoic acid receptor trans-activation and enhances trans-repression of nuclear factor B. Potential relevance to chemo-preventive interventions with retinoids. Molecular Cancer 3: 8-19 (2004).

Fiucci G, Ravid D, Reich R, Liscovitch M: Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF7 human breast cancer cells. Oncogene 21: 2365-2375 (2002).

Heilborn J et al.:Antimicrobial protein hCAP18/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells. Int J Cancer 114:713-9 (2005).

Ishizuka S et al.: (23S)-25-Dehydro-1{alpha}-hydroxyvitamin D3-26,23-lactone, a vitamin D receptor antagonist that inhibits osteoclast formation and bone resorption in bone marrow cultures from patients with Paget's disease. Endocrinology. 146:2023-2030 (2005).

Lu C, Shen Q et al.: cFos is critical for MCF7 breast cancer cell growth. Oncogene 24: 6516-6524 (2005).

Ludes-Meyers JH et al.: AP-1 blockade inhibits the growth of normal and malignant breast cells. Oncogene 20: 2771-2780 (2001).

Roh H et al.: HER2/neu antisense targeting of human breast carcinoma. Oncogene. 2000 Dec 11;19(53):6138-43.

Toell A et al.: Different molecular mechanisms of vitamin D3 receptor antagonists. Mol Pharmacol 59: 1478-1485 (2001).

Wang Y-h et al.: Knockdown of c-Myc expression by RNAi inhibits MCF7

breast tumour cells growth in vitro and in vivo. Breast Cancer Res 7: R220-R228 (2005).

Warburton C et al.: Treatment of HER-2/neu overexpressing breast cancer xenograft models with trastuzumab (Herceptin) and gefitinib (ZD1839): drug combination effects on tumour growth, HER-2/neu and epidermal growth factor receptor expression, and viable hypoxic cell fraction. Clin Cancer Res. 10:2512-24 (2004).

Weber G et al.: Vitamin D induces the antimicrobial protein hCAP18 in human skin. J Invest Dermatol. 124:1080-2 (2005).

Zhang M et al.: Silencing the epidermal growth factor receptor gene with RNAi may be developed as a potential therapy for non small cell lung cancer. Genet Vaccines Ther. 3:5-16 (2005).

实施例 D 人抗菌肽 LL-37 在培养的人角化细胞中抑制凋亡并上调凋亡蛋白抑制剂（IAP-2）的表达

介绍

Cathelicidin 是发现于多种哺乳动物物种的抗菌肽家族。它们由高度保守的氨基末端域、cathelin 和可变的羧基末端域组成，所述羧基末端域通过蛋白质水解被释放以使其获得抗菌活性(1、2)。这个家族的唯一人源成员是 18kDa 人阳离子抗菌蛋白（hCAP18），主要由中性粒细胞、多种上皮细胞和黏膜细胞（皮肤、支气管、口腔黏膜、食道、子宫颈、阴道、附睾和唾液腺）产生（3-8）。C-末端 37 个氨基酸域（即 LL-37）通过破坏膜的稳定性（11、12）产生针对广谱微生物的抗菌活性（9、10）。

除了抗菌功能，所述肽还涉及其它生物活性，如在血液和上皮细胞中的趋化性和细胞因子释放(8、13)、诱导上皮细胞增殖(14)以及血管产生(15)。最近的研究表明 LL-37 在伤口愈合的过程中高表达，影响人角化细胞的体外增殖并参与伤口的上皮再生（16、17）。

材料和方法

细胞培养

从 Cascade Biologics（Cascade Biologics, Eugene, OR）获取包皮表皮细胞并在 37°C 和 5% CO_2 的条件下，培养于 Epilife basal Medium（Cascade Biologics,.）中，所述培养基补充有 0.06 mM 钙、0.2%v/v BPE、5 μg/ml 牛胰岛素、0.18 μg/ml 氢化可的松、5 μg/ml 牛运铁蛋白、0.2 ng/ml 人表皮生长因子、100 U/ml 青霉素 G、100 μg/ml 链霉素硫酸盐和 0.25μg/ml 两性霉素 B（均来自 Cascade Biologics）。利用 0.025%（w/v）的胰酶和 0.01%（w/v）EDTA（Cascade Biologics）每周对细胞进行传代。

HaCaT 角化细胞培养在补充有 10%胎牛血清（hyClone, Boule Nordic AB Huddinge, Sweden）、2 mM 谷氨酸、青霉素（50 U/L Gibco-BRL）和链霉素（50mg/ml, Gibco-BRL）的 DMEM（Dulbecco's modified Eagle's 培养基；Gibco-BRL Technology, Paisley, UK）中。

细胞处理

以 25,000 细胞/孔铺至 6 孔板培养皿中。铺板 48h 后，使用 0、0.23、0.46、0.69、0.9、1.15、2.3、4.6 和 11.5 μM 的 LL-37 处理细胞，LL-37 的序列如下：

NH_2-Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val Pro Arg Thr Glu Ser-COOH. [SEQ ID NO.5]

每一次处理作三份。将所述肽稀释在培养基（HaCaT 细胞为含 5% FCS 的 DMEM；HEKn 细胞为含 0.1% FCS 的 Epilife basal Medium）中。总共处理细胞 24h。LL-37 刺激之后，向细胞中加入含拓扑异构酶 I 抑制剂喜树碱（CAM）（Sigma Chemical Co., St. Luis, MO）的二甲基亚砜溶液至终浓度为 6 μM。在分析前进一步温育细胞 24h。

通过流式细胞术评价凋亡

通过流式细胞术评价两个凋亡参数：膜完整性的丢失和 DNA 的下降。

膜完整性评价：在用 LL-37 刺激并用 CAM 处理后，通过胰酶消化收集细胞。随后在冷 Dulbecco's 磷酸盐缓冲溶液（PBS）中洗涤细胞并用血细胞计数器（Hausser Scientific, Horsham, PA）计数。用 PBS 将细胞密度调整至 $1x10^6$ 细胞/ml。通过用碘化丙啶和 YO-PRO-1 染料（Molecular Probes, Eugene,

OR）染色检测凋亡。在 FACScan（Beckton-Dickinson, San Jose, CA）上分析被染色的细胞。确定设门细胞以根据前向光散射（FSC）和侧向光散射（SSC）特征分析细胞。利用 Cell Quest 软件（Becton Dickinson）对具有 YO-PRO 和碘化丙啶（PI）的细胞进行分析，所述软件提供 YO-PRO 和 PI 阳性细胞的百分数。认为被 YO-PRO 染成绿色的细胞为凋亡细胞，同时还被碘化丙啶染成红的细胞为坏死细胞。活的存活细胞几乎不吸收或完全不吸收染料。

通过流式细胞术分析 DNA 含量：针对这个分析使用 PI/RNase 染色缓冲液（BectonDickinson）。将胰酶消化的细胞固定在 70%（V/V）冷乙醇中，并在 4°C 下保存直至使用。通过将 PI 掺入到 DNA 中测定 DNA 含量。利用 FACScan 流式细胞仪（Becton and Dickinson, Mountain View, CA, USA）进行荧光分析。同时测定颗粒的 FSC（前向光散射）和 SSC（侧向光散射）以确定细胞的尺寸和粒度。在 FL-4 窗口中（600 nm 带通滤波器和 35 nm 带宽）检测对核 PI 染色的红色荧光。荧光强度与细胞 DNA 含量成正比。将每个柱状图分成两部分：（1）代表不同步的、非凋亡活细胞的 M1 区（DNA 含量等于 2N 至 4N 的 G1、S 和 G2 期细胞）；以及（2）代表与活细胞相比其 DNA 量较少的凋亡细胞的 M2 区。

Caspase-3 活性试验

如前所述利用荧光底物 VDVAD-AMC（100 μM）和 DEVD-AMC（50 μM）评估 Caspase-3 的酶活性。简而言之，将细胞裂解物合并在反应缓冲液（100 mM HEPES、10%蔗糖、5 mM 二硫苏糖醇（DTT）、10-6% NP-40 和 0.1% CHAPS，pH 7.25）中并加至微孔板中。在 Fluoroscan II 读板仪（Labsystems, Stockholm, Sweden）中通过 AMC 释放监测荧光底物的裂解。利用游离 AMC 产生的标准曲线将荧光单位转化为 pmol AMC。通过线性回归分析数据并表示为每分钟的 pmol AM 释放。

RT-PCR

在不同处理后根据生产商的说明利用 Quiagen RNasy 试剂盒（Operon Biotechnologies, Cologne, Germany）从细胞中提取 RNA。用第一链合成试剂

盒（Amershan Biosciences）进行反转录。

结果

LL-37 对由 CAM 诱导的凋亡的抑制

我们检测了 LL-37 对 CAM 诱导的细胞死亡和凋亡的影响，其中 CAM 是一种被广泛地用作凋亡诱导试剂的药物。处理之后，利用两种方法通过流式细胞术分析膜的完整性和 DNA 的片段化。第一种方法是双染色系统，通过该系统我们可以辨别细胞膜渗透性的增加；分析未处理细胞的染色强度（图 7）并将其分成三种类型：存活的未染色细胞，凋亡的 YO-PRO 染色细胞和被 YO-PRO 和 PI 同时染色的坏死细胞。在第二种方法中，通过 PI 分析用乙醇进行渗透处理的细胞的 DNA 含量。已知凋亡细胞由于片段化其 DNA 的量较少。

为了选择诱导 HaCaT 和 HEKn 细胞凋亡的剂量和时间，之前先进行浓度和时间点试验（数据未显示）。当持续 24 小时接触 6 μM CAM 时，HaCaT 和角化细胞都显示具有凋亡特征的形态改变，例如膜完整性和 DNA 谱的改变（图 7）。当单独用 LL-37 或同时用 LL-37 和 CAM 处理细胞 24h 时，没有观察到凋亡细胞数量的改变（数据未显示）。然而，高浓度的 LL-37（4.6 μM 和 11.5 μM）具有细胞毒性，导致坏死细胞比例增加而凋亡细胞比例未增加。与所述同时处理相比，CAM 诱导凋亡前使细胞持续 24 小时接触 LL-37，两者的结果是不同的。在 0.23 μM 至高达 2.3 μM 的浓度时，LL-37 同时抑制 HEKn 和 HaCaT 细胞中 DNA 片段化和膜渗透性的损失（图 7 和图 8）。同时在这些条件下，较高浓度 LL-37（4.6μM 和 11.5μM）引起细胞死亡。即使在毒性浓度时凋亡细胞比例依然较低，这表明由 LL-37 引起的细胞死亡是通过非凋亡机制发生的。

LL-37 在 HaCaT 和 HEKn 细胞中抑制 CAM 对 Caspase-3 的诱导

由于 Caspase-3 是凋亡通路的重要蛋白质之一并且是凋亡的早期指示物，我们决定在经 LL-37 处理或未经 LL-37 处理的角化细胞中检测 Caspase-3 的活性。角化细胞中，在 CAM 处理的最初 12 个小时内 Caspase 的活性显著增加并在 24 小时达到顶峰。2.3μM LL-37 的预处理降低了由喜树碱诱导的

caspase 的激活（图 9a 和图 9b）。这些数据提示 LL-37 在人角化细胞中通过降低 caspase 活性来抑制凋亡。

LL-37 在人角化细胞中诱导 IAP-2 的表达

凋亡蛋白抑制剂（IAP）的成员被认为是重要的凋亡调控子。这个家族具有抑制 caspase-3 活性的能力。已经将猪 cathelicidin 成员 PR39 的抗凋亡功能与 IAP-2 表达的诱导联系起来。因此我们通过 RT-PCR 分析经不同浓度 LL-37 处理的角化细胞在不同时间点 IAP-2 的表达。2.3μM LL-37 的刺激提高了刺激后 6 小时至 12 小时的 IAP-2 mRNA（图 10）。浓度低于 2.3μM 的 LL-37 不影响 c-IAP-2 的水平（数据未显示）。

用 LL-37 刺激的角化细胞上调 COX-2

由于在上皮细胞中 COX-2 的抑制降低了 IAP-2 的表达，之前的研究已经将 COX-2 鉴定为 IAP-2 表达调控子。因此我们分析了用 2.3μM LL37 处理的 HEKn 细胞中 COX-2 的表达。发现 mRNA 水平是时间依赖性提高的（图 11），并且明显地在 12 小时后达到最高水平。为了检测在 LL-37 刺激后 COX-2 是否介导 IAP 表达的提高，用 25nM 特异性 COX-2 抑制剂 SC-791 预处理 HEKn 细胞 12h，随后用 2μM LL-37 刺激。在这些条件下，LL-37 处理没有像之前观察到的那样提高 IAP-2 mRNA 水平（图 12）。这些数据提示 LL-37 通过提高 COX-2 酶的表达来提高 IAP-2 的水平。

讨论

已经报道在皮肤损伤后，抗菌肽 LL-37 的表达提高。所述肽不仅通过抑制感染，还通过积极参与不同的伤口愈合相关的过程（例如趋化性、迁移、血管形成和上皮再生）而使其表达与伤口愈合的促进相关联。

本发明的数据显示 LL-37 还通过对凋亡的抑制作用参与促进角化细胞的细胞存活。

缩写

hCAP18/LL-37，人 cathelicidin 抗菌肽 18 kDa/LL-37；IAP-2，凋亡蛋白

-2 抑制剂；COX-2，环氧合酶-2；VDVAD-AMC，caspase 3 底物；HEKn，人新生表皮角化细胞；DMEM，Dulbecco's Modified Eagle's 培养基；PBS，磷酸盐缓冲溶液。DEVDase，天冬氨酸-谷氨酸-缬氨酸-天冬氨酸蛋白酶活性；CHAPS，3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲氨基]-1-丙磺酸；CAM：喜树碱。

参考文献

1. Zanetti, M., Gennaro, R., and Romeo, D. (1995) *FEBS Lett* 374(1), 1-5

2. Sorensen, O. E., Follin, P., Johnsen, A. H., Calafat, J., Tjabringa, G. S., Hiemstra, P. S., and Borregaard, N. (2001) *Blood* 97(12), 3951-3959

3. Sorensen, O., Arnljots, K., Cowland, J. B., Bainton, D. F., and Borregaard, N. (1997) *Blood* 90(7), 2796-2803

4. Bals, R., Wang, X., Zasloff, M., and Wilson, J. M. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16), 9541-9546

5. Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Stahle-Backdahl, M., Liden, S., Wigzell, H., and Gudmundsson, G. H. (1997) *J Biol Chem* 272(24), 15258-15263

6. Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H. G., and Gudmundsson, G. H. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(1), 195-199

7.Frohm Nilsson, M., Sandstedt, B., Sorensen, O., Weber, G., Borregaard, N., and Stahle-Backdahl, M. (1999) *Infect Immun* 67(5), 2561-2566

8. De, Y., Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., Oppenheim, J. J., and Chertov, O. (2000) *J Exp Med* 192(7), 1069-1074

9. Zasloff, M. (2002) *Nature* 415(6870), 389-395

10. Dorschner, R. A., Pestonjamasp, V. K., Tamakuwala, S., Ohtake, T., Rudisill, J., Nizet, V., Agerberth, B., Gudmundsson, G. H., and Gallo, R. L. (2001) *J Invest Dermatol* 117(1), 91-97

11. Oren, Z., Lerman, J. C., Gudmundsson, G. H., Agerberth, B., and Shai, Y. (1999) *Biochem J* 341 (Pt 3), 501-513

12. Ramanathan, B., Davis, E. G., Ross, C. R., and Blecha, F. (2002) *Microbes Infect* 4(3), 361-372

13. Braff, M. H., Hawkins, M. A., Di Nardo, A., Lopez-Garcia, B., Howell,

M. D., Wong, C., Lin, K., Streib, J. E., Dorschner, R., Leung, D. Y., and Gallo, R. L. (2005) *J Immunol* 174(7), 4271-4278

14. Shaykhiev, R., Beisswenger, C., Kandler, K., Senske, J., Puchner, A., Damm, T., Behr, J., and Bals, R. (2005) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289(5), L842-L848

15. Koczulla, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krotz, F., Zahler, S., Gloe, T., Issbrucker, K., Unterberger, P., Zaiou, M., Lebherz, C., Karl, A., Raake, P., Pfosser, A., Boekstegers, P., Welsch, U., Hiemstra, P. S., Vogelmeier, C., Gallo, R. L., Clauss, M., and Bals, R. (2003) *J Clin Invest* 111(11), 1665-1672

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

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

实施例 E：共温育 LL-37 与 Heregulin 对 EFG 受体活性的影响

材料与方法

磷酸化的蛋白质印迹分析

ERBB2、STAT3、p42/p44 MAPK（=ERK1/2），方法概述：

在所述研究的全过程中使用低级别恶性乳腺癌系 ZR75-1（从 ATCC 获取）。ZR75-1 以低水平表达 hCAP18 和 ERBB2。

处理：

所有试验都一式作三份。在添加 10% FCS 的 Optimem 中培养细胞，并以 50%的汇合铺在 12 孔板中。在重新贴壁后，细胞在没有 FCS 的 DMEM 中饥饿 48 小时。针对诱导试验，向培养基中加入预热的溶解在 PBS 中的底物，并且将细胞温育 20min。LL-37 的终浓度为 10 μg/ml，Heregulin 为 2 ng/ml 或 20 ng/ml。

室内合成 LL-37。从 Upstate, Lake Placid, NY 获取重组的 Heregulin-ß（EGF 域，ac 178-241）。

用含磷酸酶抑制剂（1 mM NaF + 1 mM Na_3VO_4）和作为蛋白酶抑制剂的2mM PMSF 的冰冷 PBS 洗涤细胞，并用含以上抑制剂的 200 μl SDS 样本缓冲液裂解细胞。样本匀浆并在 80℃变性，随后将 50μl 样本上样至 7.5% SDS-PAGE 凝胶上，分离并通过标准程序印迹在硝酸纤维素膜上。

在 TBS（0.1% 吐温 20，4 % NFDM）中封闭后，将所述膜与一抗在 4°C 温育过夜。

所使用的抗体：

pERBB2：1248 位磷酸化酪氨酸，兔源，Upstate（cat no. 06-229），以 1：2000 的比例使用，可以再次使用。

pMAPK 1/2（202 位磷酸化苏氨酸/204 位磷酸化酪氨酸），Cell Signalling Inc.

在洗涤并用 HRP 偶联的二抗温育 2h 后，所述膜用 ECL（Amersham）显色。用 CCD 相机通过定量程序（Fujifilm, Tokyo）的方式测定信号。

相对于丽春红染色对化学发光信号进行标准化。

在一个试验中，以从 20nM 至 2.5μM 逐渐增加的浓度加入酪氨酸激酶抑制剂 PD153035（Merck Biosciences）。

结果

图 13 中显示 LL-37 和 Heregulin 联合处理的效果。图 14 显示了定量数据。

图 13 显示在用 LL-37、Heregulin 或其组合处理后，ZR75-1 细胞中 ERBB2 和 MAPK 的激活。通过蛋白质印迹分析细胞提取物中的磷酸化 ERBB2 和 MAPK。用 CCD 相机捕获信号并在相对于丽春红染色标准化后进行定量。图 14 显示三份实验的结果，表明 LL-37 和 Heregulin 在所述激活方面相互协助。

发现 ERBB2 的磷酸化被酪氨酸激酶抑制剂 PD153035 抑制，表明 MAPK 在信号传导中有作用。

实施例 F：LL-37 在体外对乳腺癌细胞转移的影响

材料和方法

非锚定生长试验

这个试验反映细胞形成转移瘤的能力。通过用 300u/ml 胰酶、20u/ml 弹性蛋白酶和 1mM EDTA 的混合物的处理来制备细胞。弹性蛋白酶的存在促使细胞脱离成单细胞悬液。

在 70°C 水浴中将 1.4% SeaPlaque 琼脂糖融解于 Optimem（无添加物），冷却至 42°C 并以 1：1 的比例与含浓度为两倍终浓度的 FCS 和添加物的预热培养基混合。向带格子的 4cm 皮替氏皿中倒入 4ml 所述混合作为底层琼脂并使其凝固。

使胰酶消化的细胞穿过细胞滤网并以 1000 细胞/ml 的终浓度悬浮在培养基（含双倍浓度的添加物）中。将所述细胞悬液加热至 37°C 并以 1：1 的比例与如上制备的 0.7%琼脂糖溶液混合。放入 2ml 所述混合物作为所述底层琼脂的上层，并在室温保持 30min 使所述上层凝固。将所述平板放入培养箱中并每隔 3-4 天通过加入 100μl 生长培养基饲养细胞。两星期后培养物的上层用 0.2%对碘硝基四唑紫（Sigma）染色，并计数直径大于 100 μM 的群落。试验一式作三份，并重复进行两次。

添加物：

FCS：1-8%

Fungizone（两性霉素 B）：0.5μg/ml

潮霉素 B（使用转基因 MCF7 细胞系时）：150 μg/ml

青霉素 G/链霉素（使用 ZR75-1 细胞系时）：1%储备溶液（Invitrogen）

LL-37：10μg/ml

Heregulin（重组蛋白 Upstate）：2ng/ml

Fiucci 等, 2002, *Oncogene* 21: 2365-2375 中也阐述了检测非锚定生长的方法。

结果

结果在图 16 中显示。通过检测 LL-37 对软琼脂中乳腺癌细胞系 ZR75-1 群落形成的影响研究 LL-37 对体外肿瘤形成的作用。所述作用受到存在的其它因素（例如 FCS 和 Heregulin）的密切调节。图 16a 显示 2% FCS 时对群落数的影响。不存在 Heregulin 时，所使用的 LL-37 显著降低群落数。在 Heregulin 存在的情况下，LL-37 的负作用被完全消除，这表明需要它们的功能协助。

LL-37 和 Heregulin 显著影响软琼脂群落的外观。图 16b 显示软琼脂群落的代表性实例，所述群落在培养 14 天并进行活细胞染色后获取。单独接触 LL-37 导致较弱的群落染色和较不紧密的外观，表明群落密度骤减。不同的是，在母克隆（meternal clone）周围出现单个细胞的晕环。单独的 Heregulin 产生极小影响。当 Heregulin 和 LL-37 合并时，母群落（meternal colony）以和未处理群落相似的方式被染色。然而，LL-37 诱导的单细胞晕环仍得到保持。单个细胞从健康母克隆的脱离类似于/模仿了来自肿瘤的转移细胞的产生。总之，LL-37 似乎对原发肿瘤的生长不起作用但是决定性地刺激原发肿瘤产生转移瘤的潜能。因此 LL-37 的抑制剂应降低乳腺癌中转移瘤的产生。乳腺癌死亡的原因通常是转移瘤而非原发肿瘤。

实施例 G：LL-37 对体内乳腺癌转移的影响

材料和方法

hCAP18 在 MCF7 衍生细胞中的转基因表达

细胞系 MJ 1117 [由 M Egeblad 惠赠，参见 *Int J Cancer* 86, 617-625（2000）]是 MCF7 的衍生细胞，其由附加型表达载体表达 ERBB2。MJ 1005 是相应的具有空对照载体的对照细胞系。所述细胞系在含 5-10% FCS 和 150 μg/ml 潮霉素 B 的 Optimem 中培养。

将来自 Image clone 3057931 19 的 Bfa1 片段亚克隆至双顺反子载体 pIRES2-EGFP（BD Biosciences, Bedford, MA）的 Sma1 位点中以构建 hCAP18 的表达载体（参见图 17），其中所述 Bfa1 片段包含具有 16bp 的 5'非翻译区的完整编码序列。在标准条件下利用 Fugene（Roche Diagnostics, Indianapolis, IN）转染所述细胞系，并用 400 ng/ml G418（Invitrogen, Paisley, UK）选择培养两周。根据 EGFP 的表达，用 MoFlo®高速细胞分选流式细胞仪（DakoCytomation, Fort Collins, CO）使用 Summit™数据分析软件分选细胞，通过免疫印迹定量所述细胞的 CAP18 表达。同样通过转染仅表达 EGFP 的载体建立对照细胞系。在数月没有任何选择的连续培养过程中，所述细胞系保持了稳定的 CAP18 表达。

EGFP 和 hCAP18 的同时表达不仅促进细胞选择和保持，还允许在小鼠试验过程中检测血液和组织中的单个转移细胞。

SCID 小鼠中的肿瘤形成研究

在含 10%FCS、150μg/ml 潮霉素和 400 μg/ml G418 的 Optimem 中培养所述细胞。在以 50%的汇合收集细胞 24h 之前除去抗生素。细胞用胰酶消化并以 50,000,000 细胞/ml 悬浮在含 1mM $MgCl_2$ 的 PBS 中。向小鼠皮下注射 10,000,000 个细胞（200 μl）。由于 MCF7 细胞需要 ß-雌激素以形成肿瘤，在感染前向小鼠植入存储型药丸（1.7mg/天）。每天观察小鼠，并每星期触诊 2 次以了解肿瘤形成。在注射 1 星期后已经可以在注射位点观察到可触的浸润，但是持续生长的肿瘤在约 40 天后才明显。当肿瘤尺寸达到约 $1cm^3$ 时处死小鼠。切除或速冻所有肿瘤，包括注射位点的肿瘤或小鼠体内扩散的肿瘤。此外，将脾和肝进行匀浆，并在 0.17% NH_4Cl 裂解红细胞并离心除去碎片后，通过 FACS 分析 EGFP 表达细胞的存在。

结果

结果在图 18 中显示。

图 18a 显示 SCID 小鼠中由对照细胞系 MJ1005 IRES 形成的肿瘤的实例，其中 MJ1005 IRES 是 MCF7 的衍生细胞。目前尚未在对照小鼠的肝或脾中检测到次生肿瘤或转移细胞。

图 18b 显示 hCAP18 在同一细胞系的转基因表达的效果。与对照细胞系相比，原发肿瘤的生长并不更强劲。然而，次生肿瘤在多个位置都有发生，例如与原发肿瘤相邻的淋巴结和相对的侧面中，以及腹部大部分（abdominal masse）。腹水液体（图 18c）含大量表达绿色荧光蛋白的细胞，其中所述绿色荧光蛋白与 hCAP18 转基因同时产生。在产生 hCAP18 的细胞系感染的 SCID 小鼠中，四分之三的所述小鼠具有转移肿瘤或转移细胞向脾或肝的扩散。根据这些观察，我们得出结论：LL-37 导致原发肿瘤产生转移细胞。因此，LL-37 的抑制剂将抑制癌细胞向其它位置的扩散。

实施例 H：通过 siRNA 在肿瘤和乳腺癌细胞中抑制 hCAP18/LL-37

1. 通过 siRNA 在肿瘤中抑制 hCAP18/LL-37 蛋白质的表达

在处理 MCF7-hCAP18 转基因细胞 48 小时后，观察到由 hCAP18 mRNA 特异性小干扰 RNA（siRNA）引起的强剂量依赖性抑制，而非 hCAP18/LL-37 蛋白质的过量表达（参见实施例 G 中材料与方法“hCAP18 在 MCF7 衍生细胞中的转基因表达”一节）。经 HPLC 纯化、双链和即用型阴性对照 siRNA 和四个 hCAP18/LL-37 特异性 siRNA 购自（Ambion, Austin, USA），包括用于优化转染效率和重复能力的 siPORT NeoFX 转染试剂。

siRNA 名称	编号	正义序列（5->3'）	反义序列（5->3'）
siRNA-CAMP1	14402	GGUCCUCAQCUACAAGGAAtt	UUCCUUGUAGCUGAGGACCtg
siRNA-CAMP2	146365	GGACAGAGUCCUAGUGUGUtt	ACACACUAGGACUCUGUCCtg
siRNA-CAMP3	146364	CCAGAGGAUUGUGACUUCAtt	UGAAGUCACAAUCCUCUGGtg
siRNA-CAMP4	14586	GGAUAACAAGAGAUUUGCCtt	GGCAAAUCUCUUGUUAUCCtt

将所有四个 siRNA-CAMP 汇集作为混合物以将非特异性作用减至最小，并对所述阴性 siRNA 对照进行类似的操作。在与 siPORT 转染试剂配套的详细方案中提供了用于优化转染的说明书。所有试验过程均根据生产商的阐述进行。SiRNA 的终浓度为 10nM、25nM 或 100nM。针对 hCAP18/LL-37 蛋白质，如实施例 C 的材料和方法中的阐述，在蛋白质印迹中利用 1/2000 稀释的抗 hCAP18 抗体分析经处理的乳腺癌细胞的细胞提取物。通过 CCD 相机（Fujifilm, Tokyo, Japan）捕获增强的化学发光（ECL）信号（Amersham Biosciences, Piscataway, NJ），并在相对于丽春红染色标准化后进行定量。结果在图 19 中显示。

2. 人抗菌肽 hCAP18/LL-37 在乳腺癌中诱导的转移表型可被 hCAP18 特异性 siRNA 逆转

结果在图 20 中显示。

（A）*hCAP18/LL-37 在乳腺癌细胞中的过量表达导致癌细胞转移性更高的表型*

进行 Matrigel 侵袭试验以评价与不表达 hCAP18/LL-37 的 MCF7-IRES 转基因对照细胞相比，过表达 hCAP18/LL-37 蛋白质的 MCF7-hCAP18 转基因

细胞的转移潜能（参见实施例 G 中材料与方法“hCAP18 在 MCF7 衍生细胞中的转基因表达”一节）。

完全根据生产商的说明书使用 BioCoat Matrigel Invasion Chamber 试剂盒（Becton Dickinson Bioscience, Bedford, MA, USA）。在将细胞转移至 Matrigel 滤膜前，细胞在没有 FCS 的 DMEM（Gibco-BRL）中饥饿 24h。在使用当天，使用 0.25% Tryp-EDTA（Invitrogen, cat#25200-056）胰酶消化细胞并通过加入 50μl 胰酶抑制剂和 100μl DMEM 终止胰酶消化。将 200μl 220,000 个细胞/ml 的细胞悬液接种至具有 Matrigel 包被滤膜的 transwell 插入小室中，并放置在装有 750μl 包含 5% FCS 的 DMEM 的下室中。小室在 37°C、5% CO_2 气氛下温育 48h。随后，移去插入小室并除去保留在滤膜上方的非侵袭癌细胞。将已经侵袭至滤膜下方的细胞染色，在相差显微镜下观察并计数。癌细胞的侵袭能力用已经侵袭至滤膜下方的平均细胞数量表示。所述试验一式作三份。

（B）通过用 hCAP18/LL-37 特异性 siRNA 在乳腺癌细胞中抑制由 hCAP18/LL-37 诱导的侵袭性转移表型

为了证明其通过减少肿瘤内表达的 hCAP18/LL-37 而抑制癌细胞转移潜能的能力，使用了 RNA 干扰。

将全部四个 siRNA-CAMP 一起作为 10 nM 的混合物使用以将非特异性作用减至最小，并对所述阴性 siRNA 对照进行同样操作以进行 RNA 干扰。在进行如（A）所述的 Matrigel 侵袭试验前 40h 进行 siRNA 处理（参见图 19）。由 siRNA 引起的 RNA 干扰通过减少侵袭性肿瘤细胞的数量显示明显抑制癌细胞转移潜能的能力。

（详情也可见实施例 C，“转录后抑制研究和侵袭诱导”一节）

实施例 I：本发明试剂生产和体内应用

抗 hCAP18/LL-37 抗体和抗 erbB2 抗体的表达

在 NSO 骨髓瘤细胞中表达抗 hCAP18/LL-37 抗体。类似地，在分离的 NSO 骨髓瘤细胞中表达抗 erbB2 抗体。

简要而言，通过电转染编码融合蛋白的组成性轻链和重链的表达载体共转染 NSO 骨髓瘤细胞。随后通过 ELISA 试验选择并筛选产生抗体的转染骨髓瘤细胞。

向患者施药

将抗体配成无菌的注射水溶液。

随后通过 90 分钟的静脉（IV）输注将制剂施予患乳腺癌的患者。

根据每个患者的个体需求选择剂量，所述剂量由从医人员确定。然而，通常使用 4mg/kg 的初始剂量随后每周保持 2 mg/kg 的剂量。

监测疾病发展

随后通过常规的扫描/NMR 监测抗体治疗对乳腺癌发展尤其是癌细胞转移的影响。

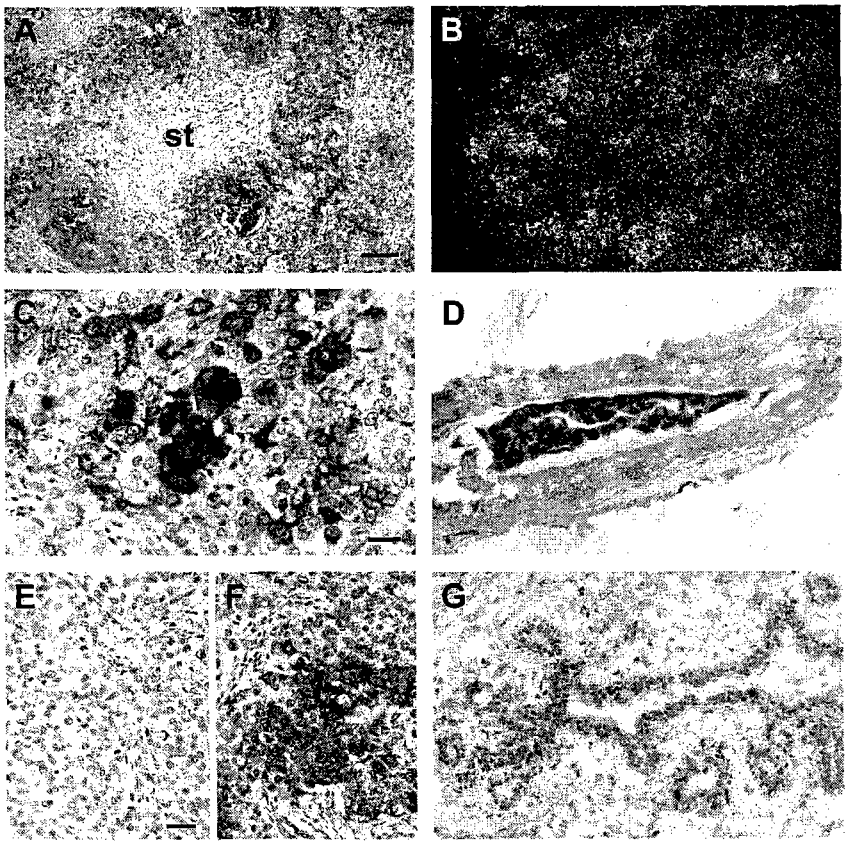


图1

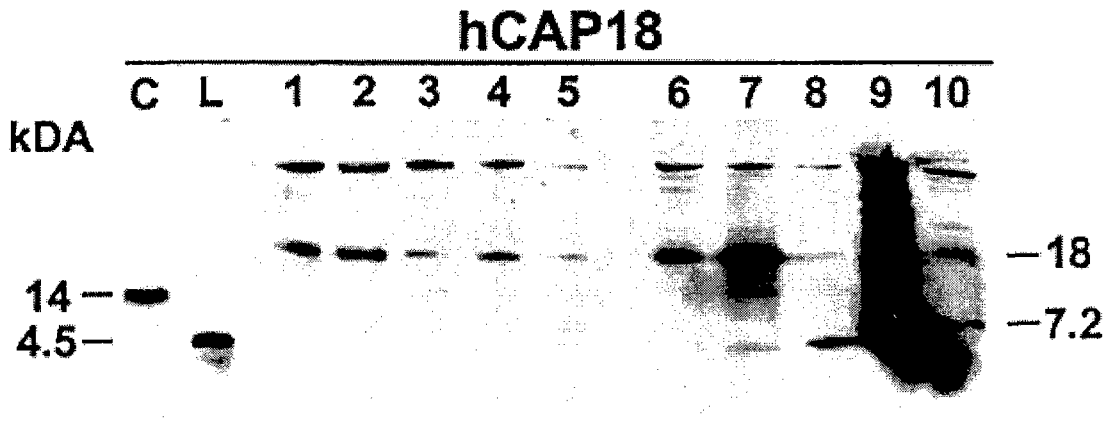


图2

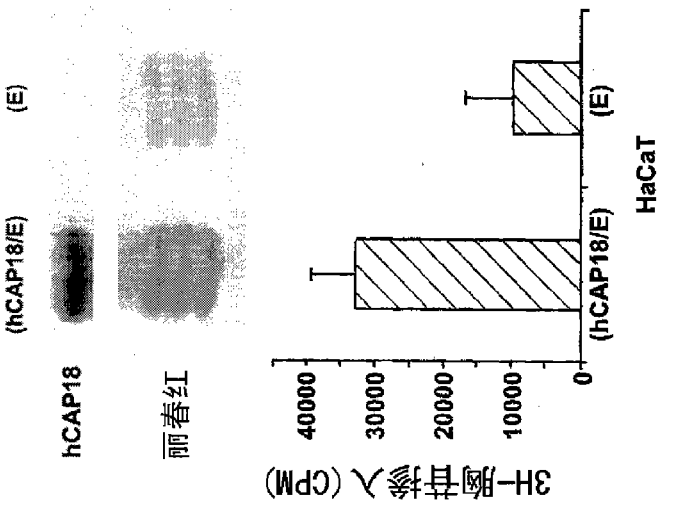

(hCAP18/E)
(E)
hCAP18
丽春红
3H-胸苷掺入(CPM)
40000
30000
20000
10000
0
(hCAP18/E)
(E)
HaCaT

图3 B

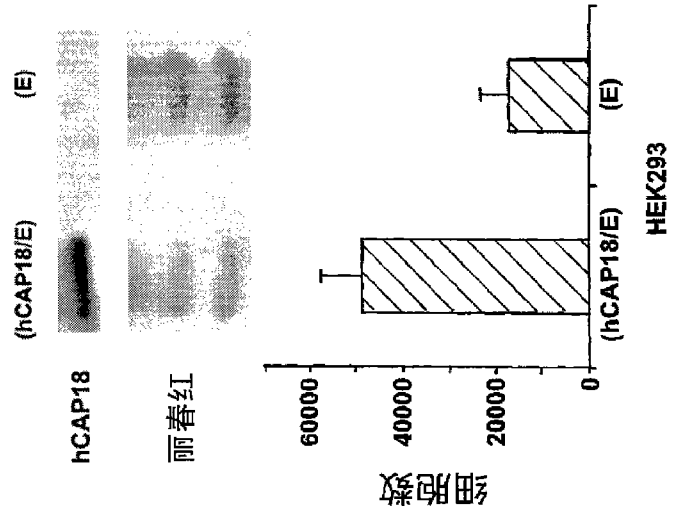

(hCAP18/E)
(E)
hCAP18
丽春红
细胞数
60000
40000
20000
0
(hCAP18/E)
(E)
HEK293

图3 A

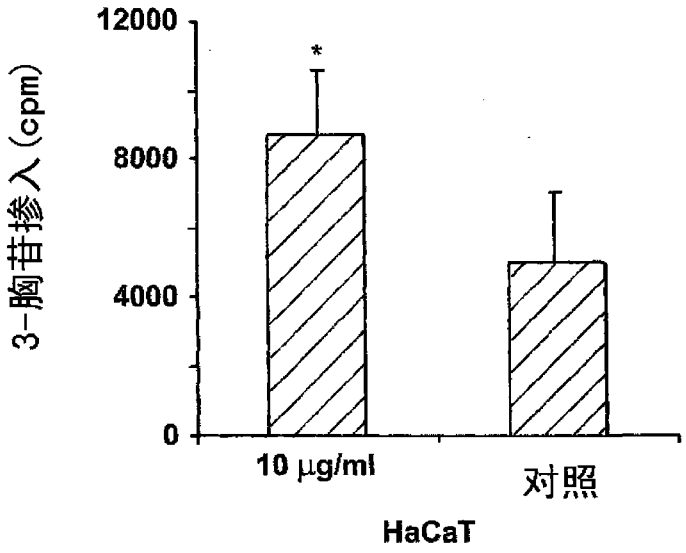


图4

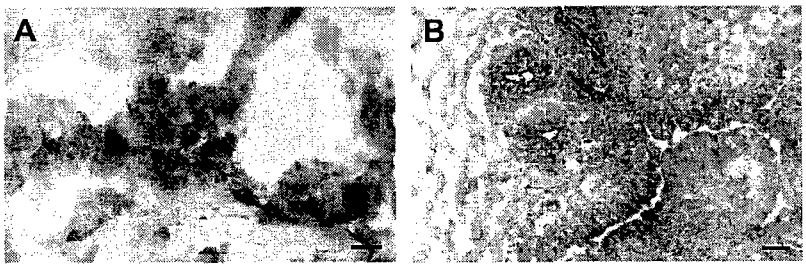


图5

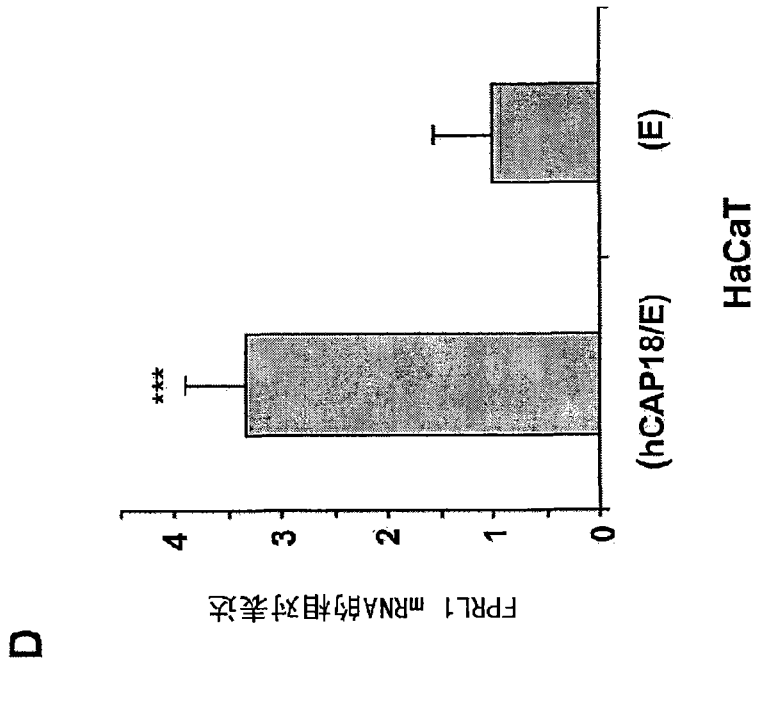


图5（续）

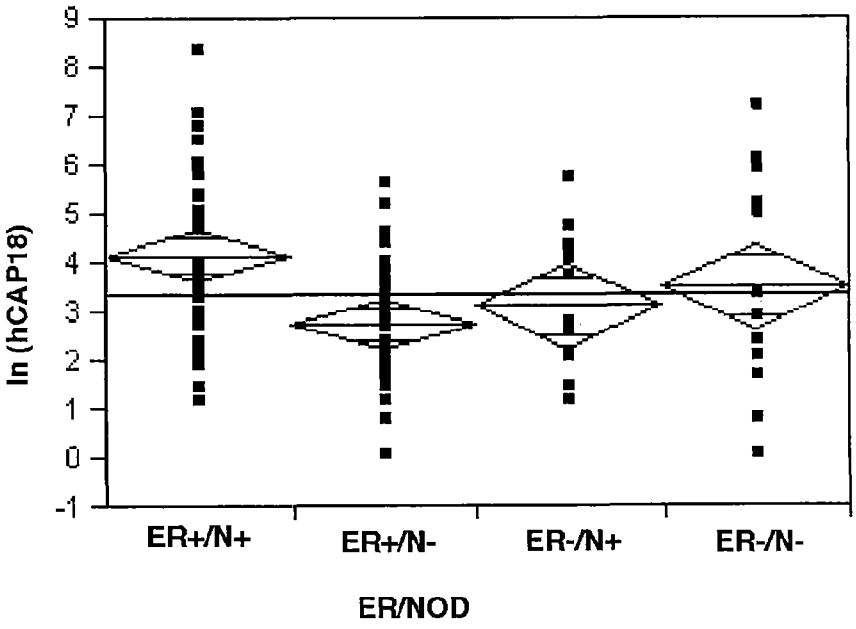


图6

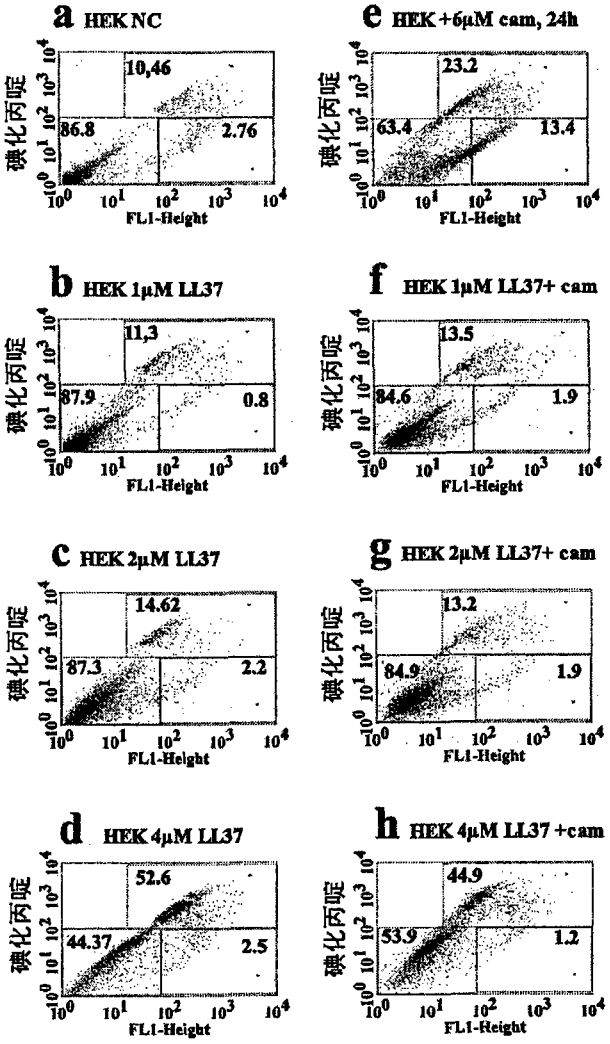

a HEK NC
10,46
86.8
2.76
b HEK 1μM LL37
11,3
87.9
0.8
c HEK 2μM LL37
14.62
87.3
2.2
d HEK 4μM LL37
52.6
44.37
2.5
e HEK +6μM cam, 24h
23.2
63.4
13.4
f HEK 1μM LL37+ cam
13.5
84.6
1.9
g HEK 2μM LL37+ cam
13.2
84.9
1.9
h HEK 4μM LL37 +cam
44.9
53.9
1.2
碘化丙啶
FL1-Height

图7A

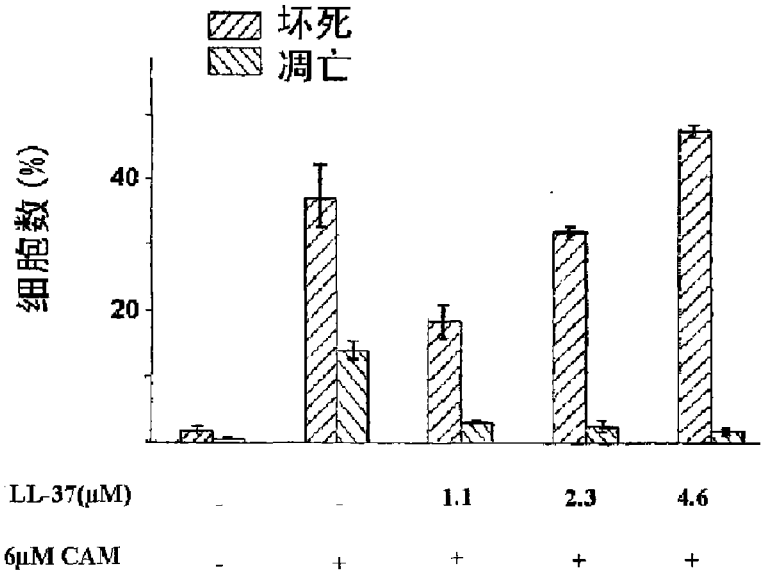


图7B

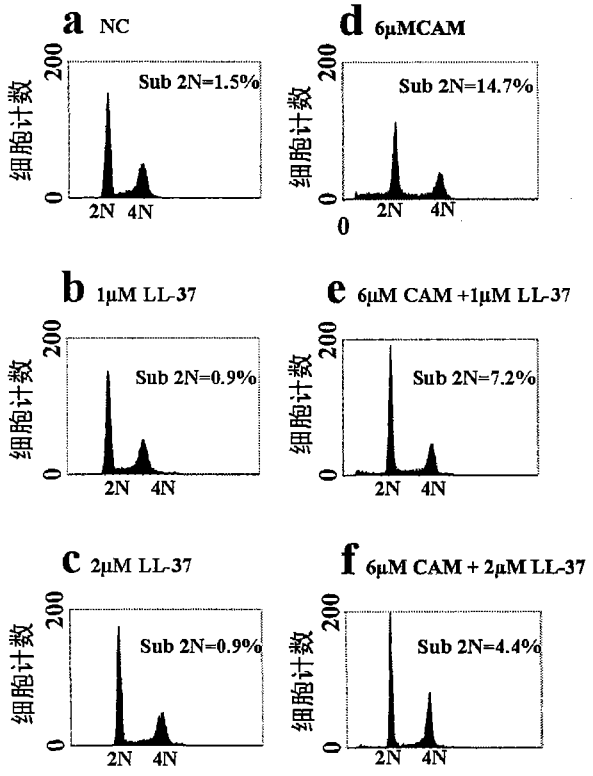

a NC
Sub 2N=1.5%
细胞计数
200
0
2N 4N
d 6μMCAM
Sub 2N=14.7%
细胞计数
200
0
2N 4N
0
b 1μM LL-37
Sub 2N=0.9%
细胞计数
200
0
2N 4N
e 6μM CAM +1μM LL-37
Sub 2N=7.2%
细胞计数
200
0
2N 4N
c 2μM LL-37
Sub 2N=0.9%
细胞计数
200
0
2N 4N
f 6μM CAM + 2μM LL-37
Sub 2N=4.4%
细胞计数
200
0
2N 4N

图8

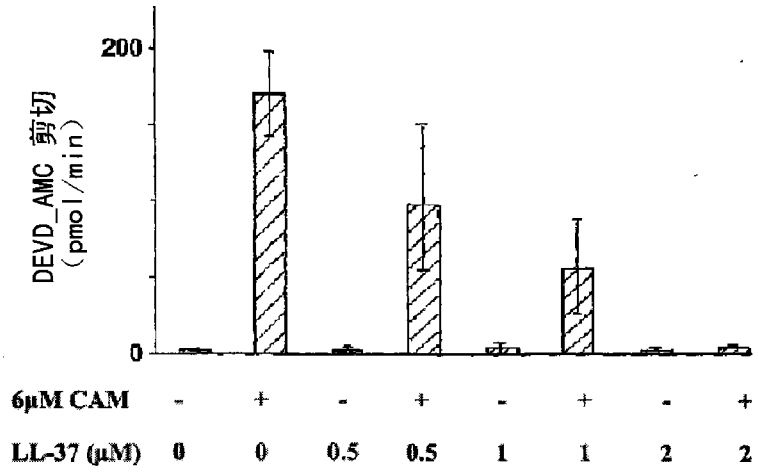


图9

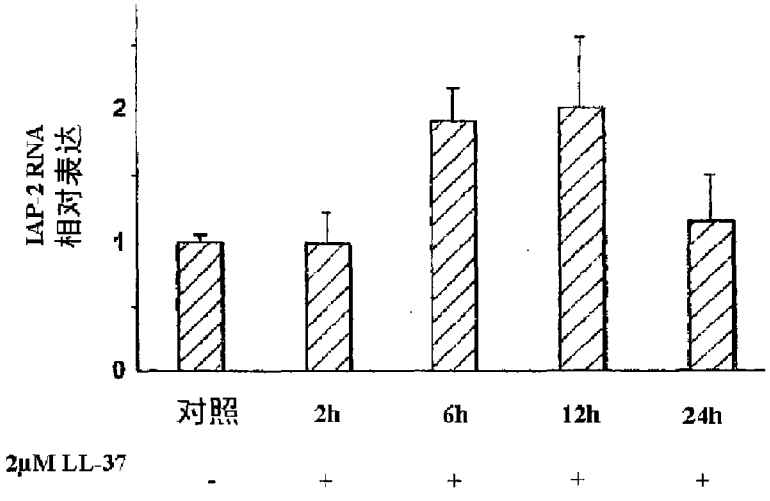


图10

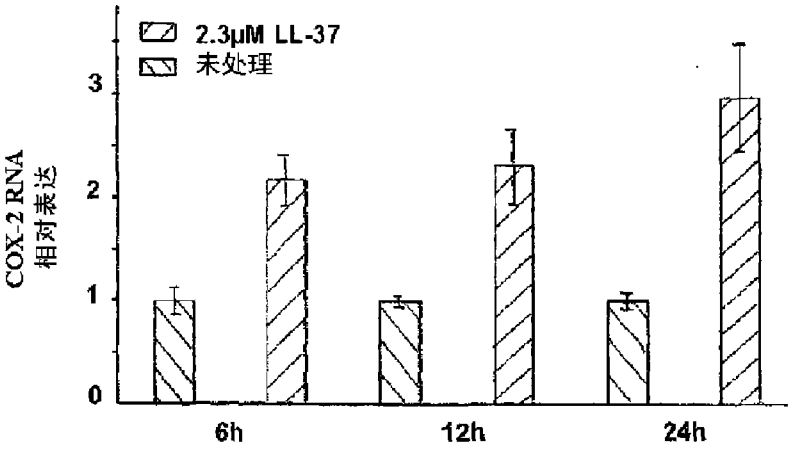


图11

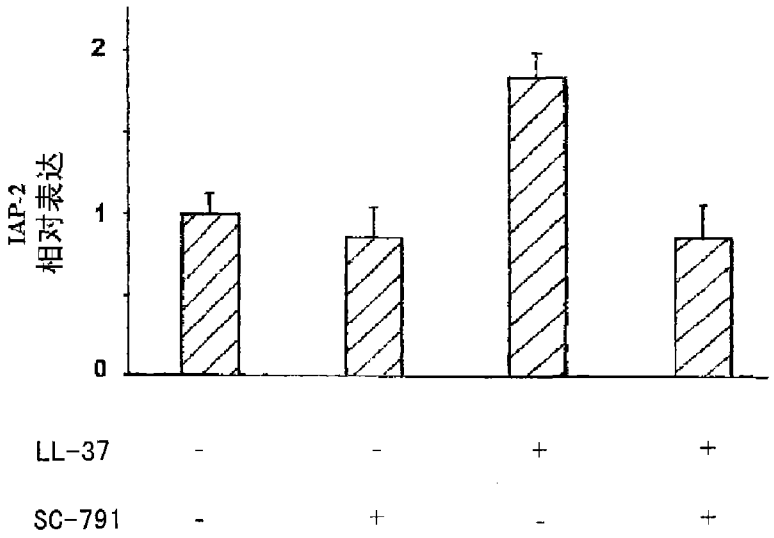


图12

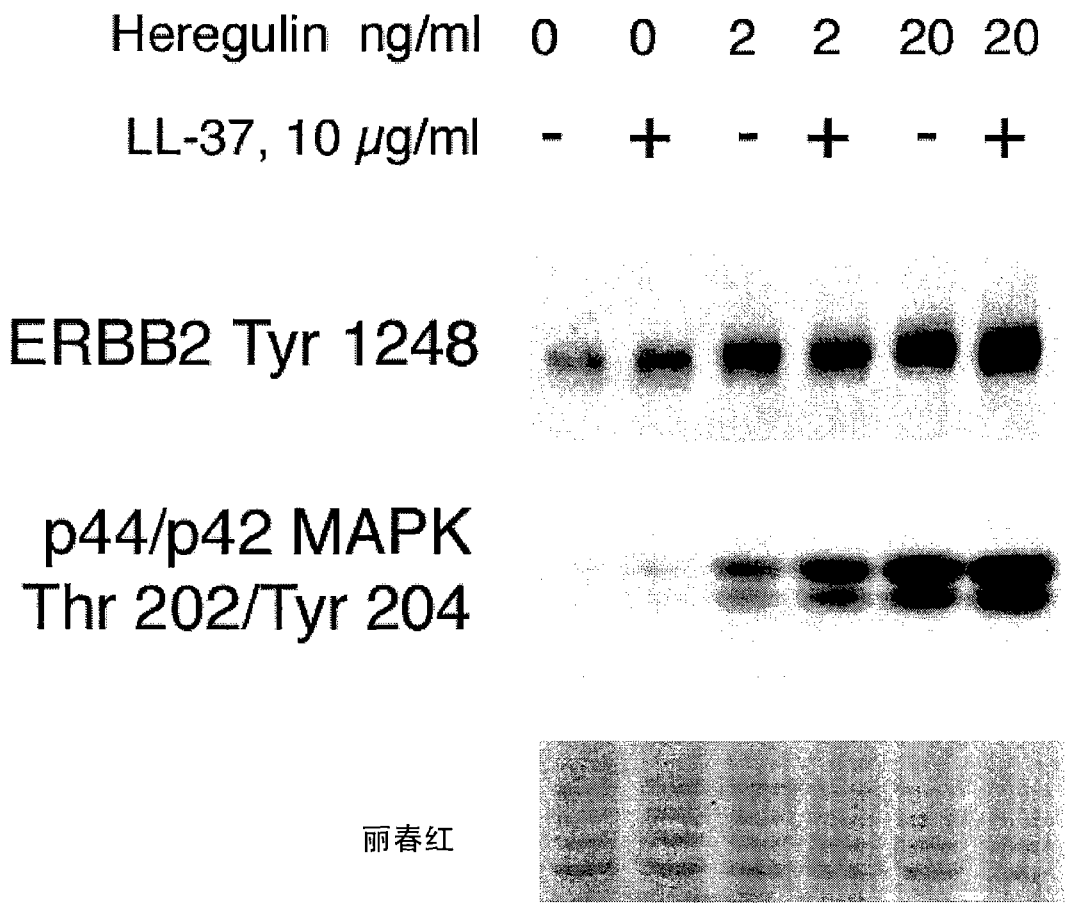

Heregulin ng/ml 0 0 2 2 20 20
LL-37, 10 μg/ml - + - + - +
ERBB2 Tyr 1248
p44/p42 MAPK
Thr 202/Tyr 204
丽春红

图13

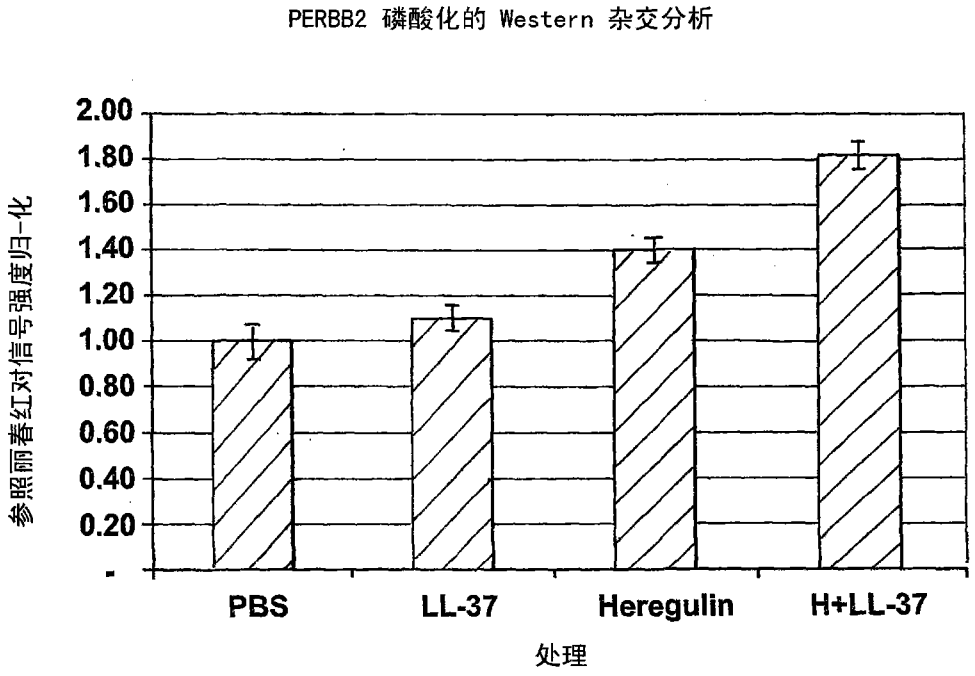

PERBB2 磷酸化的 Western 杂交分析
参照丽春红对信号强度归一化
2.00
1.80
1.60
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
-
PBS
LL-37
Heregulin
H+LL-37
处理

图14

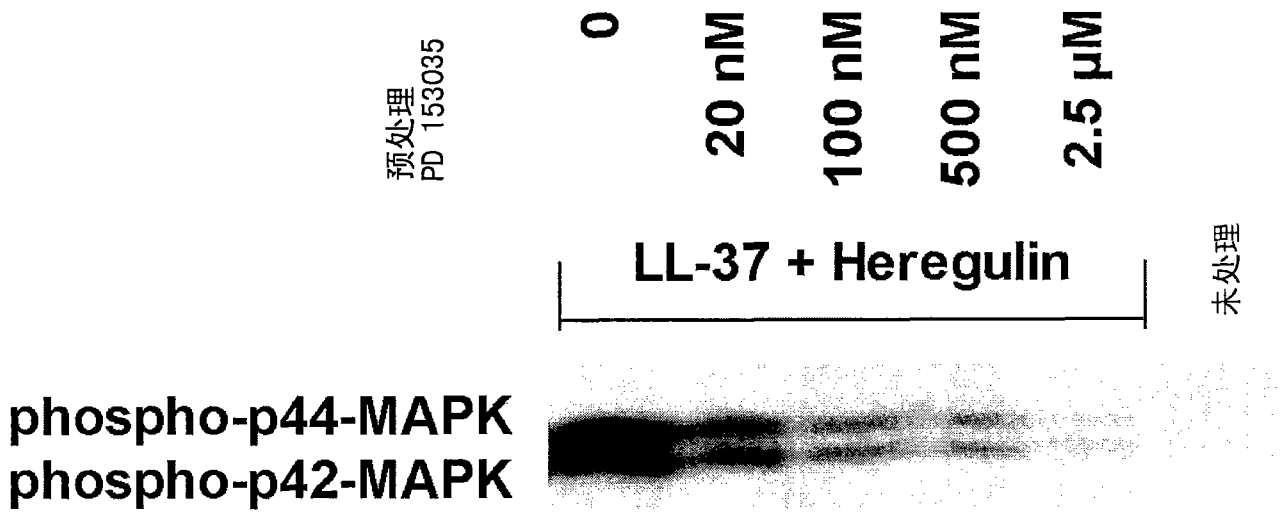

预处理
PD 153035
0
20 nM
100 nM
500 nM
2.5 μM
LL-37 + Heregulin
未处理
phospho-p44-MAPK
phospho-p42-MAPK

图15

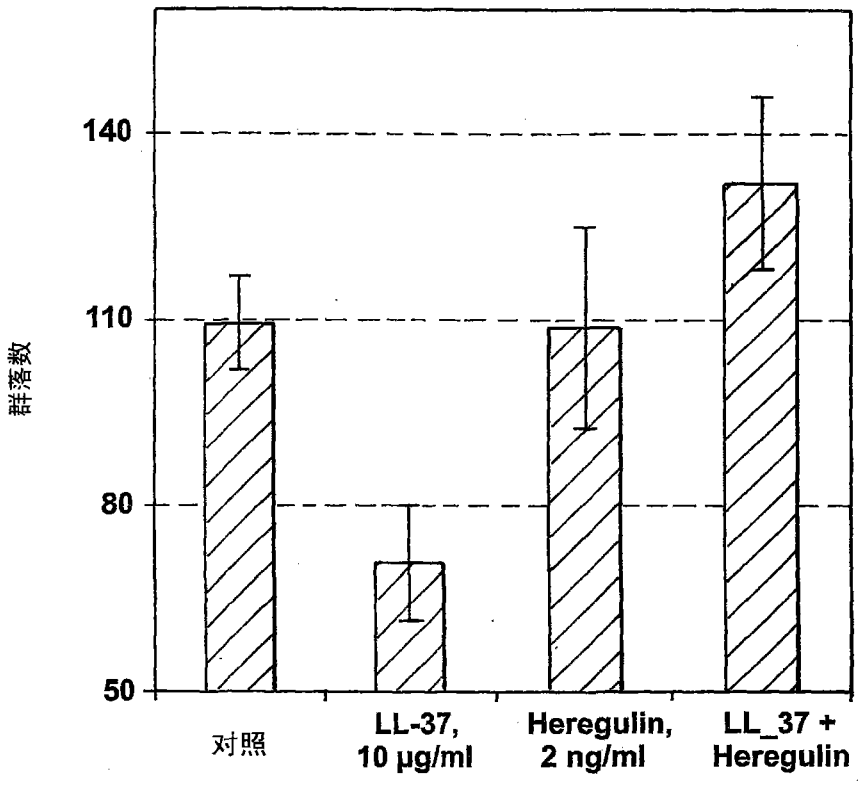

140
110
80
50
群落数
对照
LL-37,
10 µg/ml
Heregulin,
2 ng/ml
LL_37 +
Heregulin

图16(A)

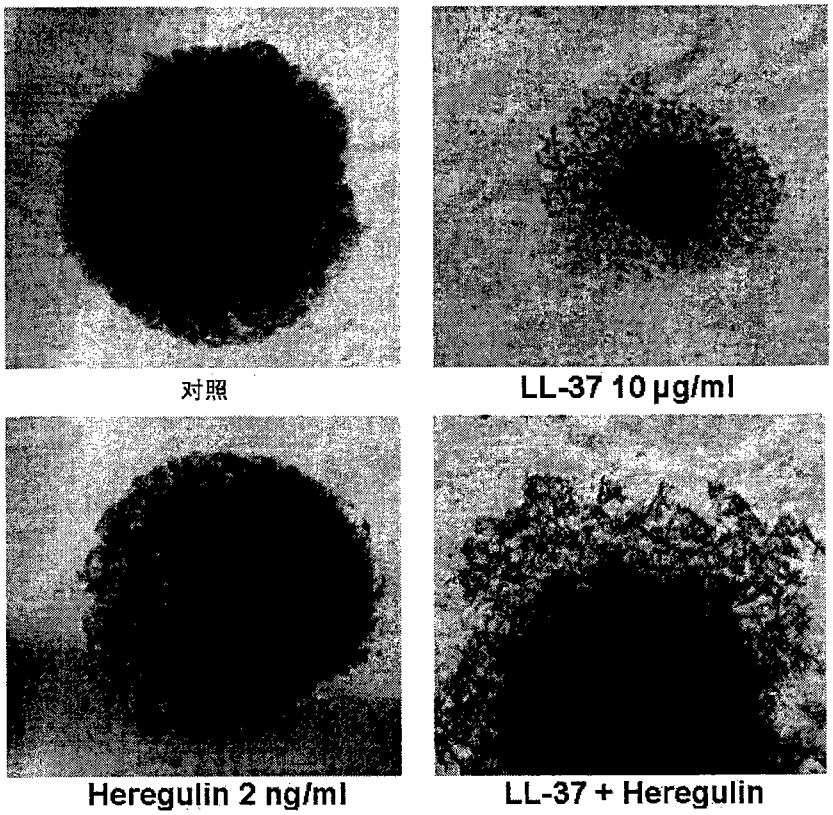


图16(B)

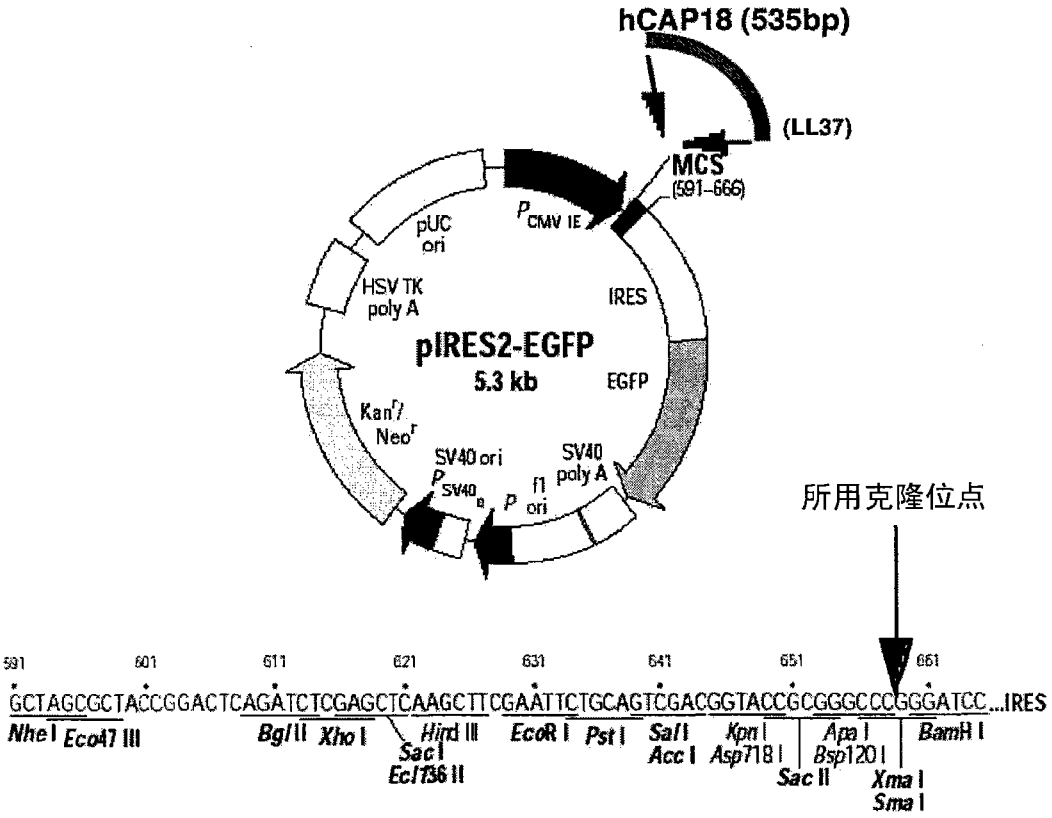

hCAP18 (535bp)
(LL37)
MCS
(591–666)
P CMV IE
pUC ori
HSV TK poly A
IRES
pIRES2-EGFP
5.3 kb
EGFP
Kan^r/ Neo^r
SV40 ori
P SV40
SV40 poly A
f1 ori
所用克隆位点
591 601 611 621 631 641 651 661
GCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCC...IRES
Nhe I Eco47 III
Bgl II Xho I
Sac I Ecl136 II
Hind III
EcoR I Pst I
Sal I Acc I
Kpn I Asp718 I
Apa I Bsp120 I
Sac II
Xma I Sma I
BamH I

图17

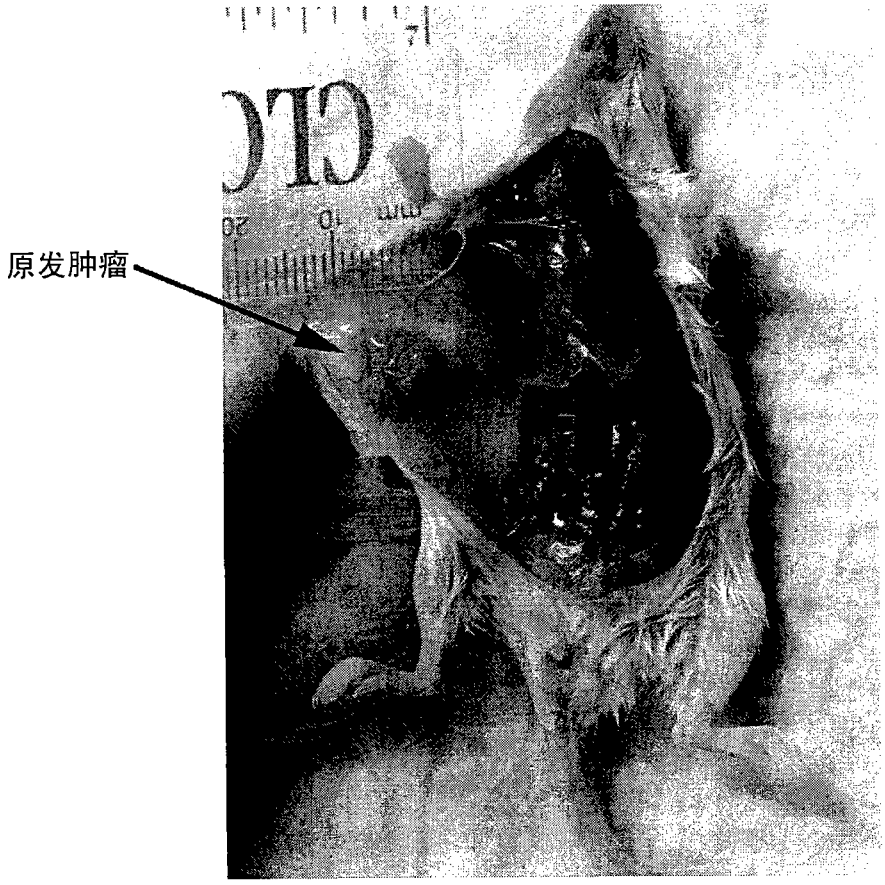


图18(A)

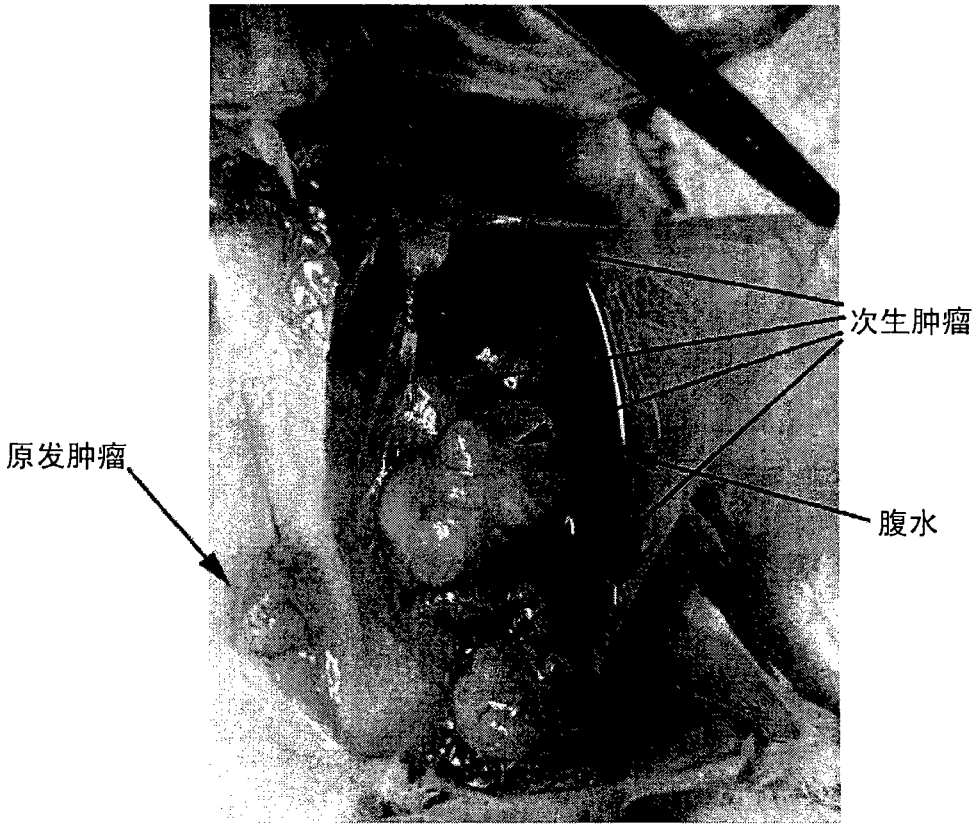
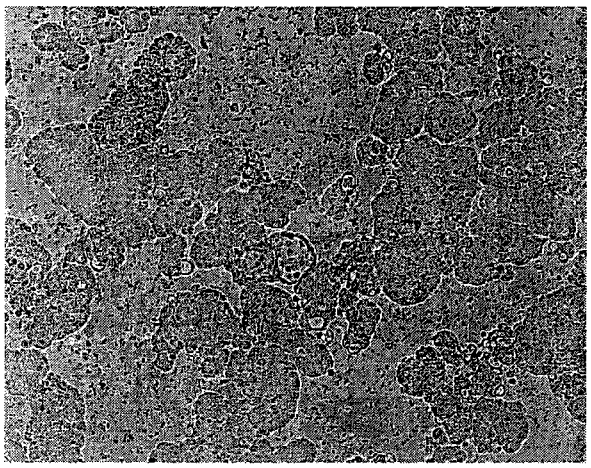
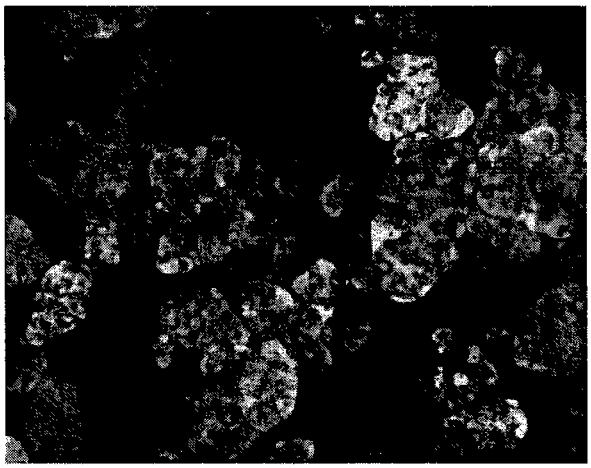


图18(B)



腹水细胞



肿瘤细胞的绿色荧光
表明GFP/hCAP18的表达

图18(C)

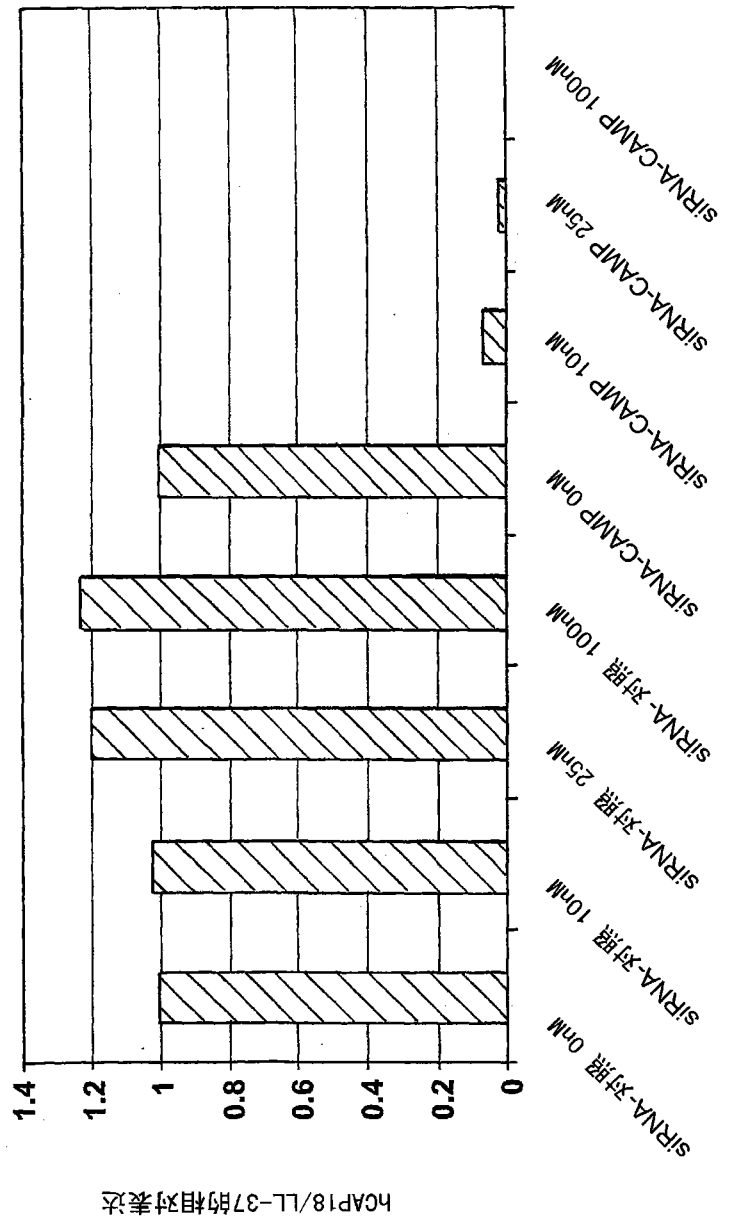

hCAP18/LL-37的相对表达
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
siRNA-对照 0nM
siRNA-对照 10nM
siRNA-对照 25nM
siRNA-对照 100nM
siRNA-CAMP 0nM
siRNA-CAMP 10nM
siRNA-CAMP 25nM
siRNA-CAMP 100nM

图19

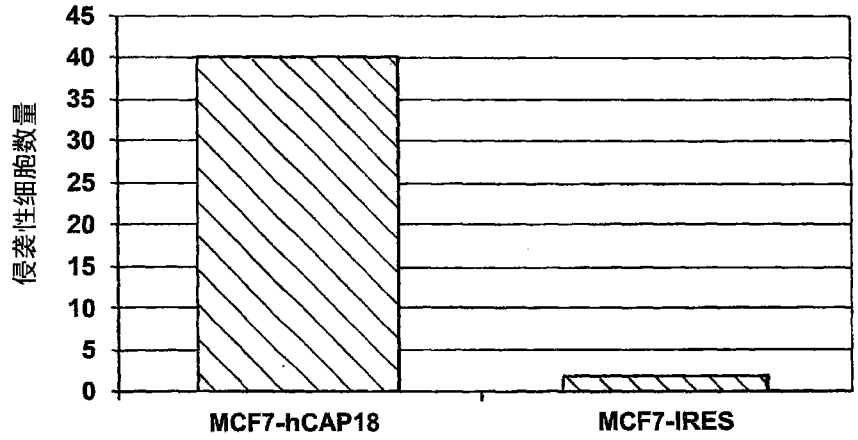

侵袭性细胞数量
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
MCF7-hCAP18
MCF7-IRES

图20 A

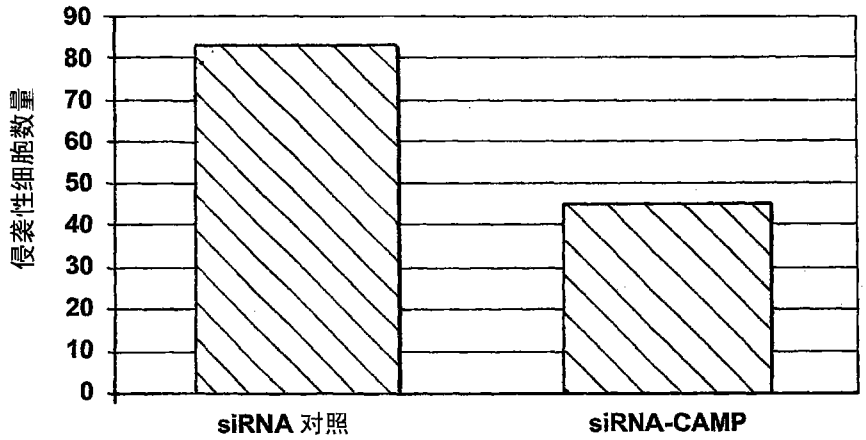

侵袭性细胞数量
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
siRNA 对照
siRNA-CAMP

图20 B