



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118240025 A

(43) 申请公布日 2024.06.25

(21) 申请号 202410388873.8

(22) 申请日 2018.07.10

(30) 优先权数据

62/530,674 2017.07.10 US

(62) 分案原申请数据

201880055897.4 2018.07.10

(71) 申请人 斯坦福国际研究院

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 凯瑟琳·C·布朗

柯蒂斯·奥尔雷德

迈克尔·麦圭尔

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

专利代理师 王玮玮 郑霞

(51) Int.Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A61K 47/64 (2017.01)

A61K 47/60 (2017.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

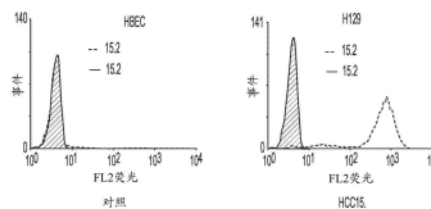
权利要求书1页 说明书18页
序列表(电子公布) 附图34页

(54) 发明名称

用于治疗癌症的肽皂草素缀合物

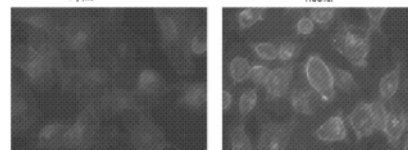
(57) 摘要

本申请涉及用于治疗癌症的肽皂草素缀合物。本文公开了包含一种或多种分子导向系统(MGS)肽和细胞毒性剂的组合物。本文还描述了向患有癌症的患者施用所述组合物的方法。



H1299

- Dapi
- WGA-AF488
- HCC15.2-Qdots



1. 一种分子导向系统 (MGS) 肽, 其选自:
d (Leu) -RGDLATLRQL (SEQ ID NO:8)、RGDLATLRQL、CH₃CO-RGDLATLRQL、EHPWFNMWSWATQVQEKKK (SEQ ID NO:22)、LQWRRNFGVWARYRL (SEQ ID NO:31)、CH₃CO-LQWRRNFGVWARYRL和CH₃CO-YAAWPASGAWT-PEG₁₁-C-NH₂ (SEQ ID NO:71)。
2. 根据权利要求1所述的MGS肽, 其中所述MGS肽直接地或经由接头与细胞毒性剂共价连接。
3. 根据权利要求2所述的MGS肽, 其中所述细胞毒性剂包括皂草素。
4. 一种组合物, 其包含直接地或经由接头与细胞毒性剂共价连接的一种或多种分子导向系统 (MGS) 肽, 其中所述一种或多种MGS肽选自:
d (Leu) -RGDLATLRQL (SEQ ID NO:8)、RGDLATLRQL、CH₃CO-RGDLATLRQL、EHPWFNMWSWATQVQEKKK (SEQ ID NO:22)、LQWRRNFGVWARYRL (SEQ ID NO:31)、CH₃CO-LQWRRNFGVWARYRL-PEG₁₁-C-NH₂ (SEQ ID NO:72)、CH₃CO-LQWRRNFGVWARYRL、EHPWFNMWSWATQVQE (SEQ IDNO:38)、CH₃CO-YAAWPASGAWT-PEG₁₁-C-NH₂ (SEQ ID NO:71) 及其组合。
5. 根据权利要求4所述的组合物, 其中所述组合物包含经由一种或多种接头与一种或多种细胞毒性剂缀合的两种MGS肽, 其中所述一种或多种接头彼此共价连接以形成二聚体结构, 并且其中所述MGS肽彼此不直接连接。
6. 根据权利要求4所述的组合物, 其中所述组合物包含经由一种或多种化学接头与一种或多种细胞毒性剂缀合的四种MGS肽, 其中所述接头彼此共价连接并形成四聚体结构, 并且其中所述肽彼此不直接连接。
7. 根据权利要求4至6中任一项所述的组合物, 其中所述细胞毒性剂是皂草素。
8. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求1至3中任一项所述的MGS肽或根据权利要求4至7中任一项所述的组合物以及药学上可接受的载体。
9. 根据权利要求8所述的药物组合物, 其中所述药物组合物被配制用于静脉内施用。
10. 一种靶向细胞内靶标的方法, 其中所述方法是体外方法, 所述方法包括施用根据权利要求4至7中任一项所述的组合物或根据权利要求8或9所述的药物组合物。

用于治疗癌症的肽皂草素缀合物

[0001] 本申请是申请日为2018年07月10日,申请号为201880055897.4,发明名称为“用于治疗癌症的肽皂草素缀合物”的申请的分案申请。

背景技术

[0002] 美国癌症协会估计,今年将在美国诊断出超过160万新的癌症病例,其中近600,000人将死于癌症。社会付出的代价是巨大的。NIH估计,癌症每年耗费2166亿美元,其中890亿美元是直接医疗费用。大多数癌症的一线治疗仍依赖于细胞毒性疗法。这些疗法需要主动分裂细胞,从而导致不良的副作用。通常以最大耐受剂量而非最大有效剂量给予治疗。另外,这些治疗在静止期癌细胞、干细胞或分化较差的癌细胞中是无效的,因为它们不主动分裂。这导致复发。对肿瘤生物标志物更具特异性的大多数靶向疗法具有细胞生长抑制作用,而不具有细胞毒性。因此,它们可减慢肿瘤的生长,但不能治愈。最后,对靶向和非靶向疗法的抗性是临床现实。因此,需要具有最小副作用的新的特异性细胞毒性疗法。

发明内容

[0003] 皂草素是不具有细胞进入结构域的核糖体失活蛋白(RIP,34KD)。给予进入细胞的进入机制,它可以从核糖体大亚基的核糖体RNA中催化除去单个腺嘌呤,从而使其完全失活。因此,如果可将其递送到细胞内部,则它是快速杀死细胞的有效毒素。本文描述了包含一种或多种MGS肽和植物毒素皂草素的靶向癌症疗法。在一些方面,本文所述的组合物可以结合癌细胞并介导所述组合物内化到癌细胞中,从而导致细胞快速死亡。由于MGS肽的癌症特异性,所述治疗对正常组织的影响很小。

[0004] 本文所述的组合物可以作为融合蛋白或通过化学缀合产生。可以递送缀合物,并且MGS将皂草素引导至肿瘤并介导其在肿瘤细胞中的摄取,在所述肿瘤细胞中所述皂草素可以结合其靶标。与目前的疗法相比,此化合物具有若干优点。例如,在一些方面,所公开的组合物(1)可以允许将高效的细胞毒性剂细胞内递送至其发挥功能之处;(2)MGS可以是癌症特异性的,从而使毒素在其他组织中的摄取最少;(3)因为所有细胞,甚至是非分裂细胞,都依赖于蛋白质合成,所以MGS肽-皂草素缀合物可有效对抗普通细胞毒性剂难以治愈的细胞;(4)抗性不太可能是由作为蛋白质的作用机制造成的,因此多种抗药性泵不太可能抑制活性;并且(5)肽类靶向剂比抗体靶向剂小、相对便宜,并且可以与皂草素缀合。

[0005] 本文公开了包含一种或多种分子导向系统(MGS)肽和细胞毒性剂的组合物。

[0006] 本文公开了用于跨脂质膜运输的膜可透性缀合物,其包含:一种或多种分子导向系统(MGS)肽和细胞毒性剂。

[0007] 本文公开了靶向细胞内靶标的方法,所述方法包括施用与细胞毒性剂缀合的一种或多种MGS肽,其中细胞毒性剂靶向细胞内靶标。

[0008] 在下面的描述、附图和权利要求中说明了本发明的组合物和方法的其他特征和优点。

附图说明

[0009] 并入本说明书中并且构成本说明书的一部分的附图说明所公开方法和组合物的若干实施方案,并且与描述一起用于阐释所公开方法和组合物的原理。

[0010] 图1示出HCC15.2对癌细胞具有特异性并内化于其中。

[0011] 图2示出HCC15.2与NSCLC的所有亚型结合。

[0012] 图3示出肽内化是受体介导的。

[0013] 图4示出与SEQ ID NO:1的单体相比,SEQ ID NO:1的四聚化不显著改善内化。

[0014] 图5示出来自N末端和C末端的截短物揭示了最小结合序列(FHAVPQSFYTAP,SEQ ID NO:1;FHAVPQSFYTA,SEQ ID NO:2;和FHAVPQSFYT,SEQ ID NO:3)。

[0015] 图6示出乙酰化改善了截短肽的结合(SEQ ID NO:3,FHAVPQSFYTAP,SEQ ID NO:1)。

[0016] 图7示出肽与溶酶体共定位。

[0017] 图8示出HCC15.2随时间积聚在溶酶体中。

[0018] 图9示出与皂草素缀合的HCC15.2的体外药物数据。

[0019] 图10示出HCC15.2-皂草素缀合物在人NSCLC异种移植模型中减少肿瘤生长。

[0020] 图11示出来自流式细胞术实验的直方图和直方图的量化。

[0021] 图12是示出HCC15.2与其他癌细胞系结合的条形图。

[0022] 图13是示出用于测量KD的流式细胞术结果的线形图。

[0023] 图14示出四聚化不显著改善半最大结合。

[0024] 图15示出来自N末端和C末端的截短物揭示了最小结合序列。上图从上到下指示以下序列:SEQ ID NO:1、2、3、78和79。下图从上到下指示以下序列:SEQ ID NO:1、2、3、78、79和80。

[0025] 图16示出HCC15.2随时间积聚在溶酶体中。

[0026] 图17示出靶向HCC15.2的NIR染料在体内积聚到肿瘤中。

[0027] 图18示出靶向HCC15.2的染料随时间保留在肿瘤中。

[0028] 图19展示离体肿瘤显示出靶向HCC15.2的染料的明显积聚。

[0029] 图20示出器官的离体成像的结果。

[0030] 图21示出HCC15.2在体外使皂草素靶向癌细胞。

[0031] 图22是癌细胞杀伤测定的一个实例,其示出HCC15.2在体外使皂草素靶向癌细胞。

[0032] 图23示出皂草素的HCC15.2靶向显著减慢肿瘤生长。

[0033] 图24是列出各种MGS、适应症、细胞类型靶标、细胞定位和所递送的有效负载的表格。

[0034] 图25示出选定的MGS肽的序列(从上到下按顺序:SEQ ID NO:22、39、40、23、47、25、26、27、28和29)、细胞定位、化合价、癌症特异性和结合图谱信息。

[0035] 图26是示出选定的MGS肽的进一步表征的表格。从上到下的起始序列:SEQ ID NO:7、5、36、32和1。从上到下的当前序列:SEQ ID NO:81、82、83、84和80。

[0036] 图27示出H1299.3 15聚体与自噬体的共定位(上图),以及体内施用后的结果。

[0037] 图28是示出与正常细胞结合相比1299.3Ac-15聚体癌细胞结合的条形图。

[0038] 图29是示出利用其他肽(除HCC15.2以外未优化的亲本肽)实现的皂草素体外递送

的表格。

[0039] 图30是多聚体MGS肽的一个实例,以及使用多聚体MGS肽 (SEQ ID NO:22) 的实验结果。

具体实施方式

[0040] 通过参考以下具体实施方案及其中包括的实施例的详细描述以及附图及其之前和之后的描述,可以更容易地理解所公开的方法和组合物。

[0041] 在公开并描述本发明的组合物和方法之前,应理解,除非另外规定,否则它们不限于特定的合成方法,或者除非另外规定,否则它们不限于特定的试剂,因此它们当然可以改变。还应当理解,本文所用的术语仅仅出于描述特定方面的目的,而并不意图进行限制。虽然与本文描述的那些类似或等效的任何方法和材料可以用于本发明的实践或测试,但现在描述示例性方法和材料。

[0042] 此外,应理解,除非另外明确陈述,否则本文阐述的任何方法决不意图被理解为要求按特定顺序执行其步骤。因此,在方法权利要求项未实际叙述其步骤要遵循的顺序或在权利要求或描述中未另外具体陈述各步骤将限于特定顺序的情况下,决不意图在任何方面推断顺序。这适用于任何可能的未表达的解釋原则,包括关于步骤安排或操作流程的逻辑事项,从语法组织或标点符号得出的明显含义,以及说明书中描述的各方面的数量或类型。

[0043] 本文提及的所有出版物都以引用的方式并入本文,以结合所引用的出版物公开并描述方法和/或材料。本文中讨论的出版物仅提供它们在本申请的提交日期之前的公开内容。本文中的任何内容均不应解释为承认由于先前发明而使本发明无权先于这些出版物。此外,本文中提供的公布日期可能不同于实际的公布日期,它们可能需要单独确认。

[0044] 定义

[0045] 如说明书和所附权利要求中所使用,除非上下文另外明确规定,否则单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包括复数个/种指示物。

[0046] 如本文所用的词语“或”意指特定列表的任何一个成员并且还包含所述列表的成员的任组合。因此,例如,提及“一种MGS肽”包括多种这样的MGS肽,提及“所述MGS肽”是提及本领域技术人员已知的一种或多种MGS肽及其等同物,诸如此类。

[0047] 在本说明书的描述和权利要求全篇中,词语“包括(comprise)”和所述词语的变体(如“包括(comprising)”和“包括(comprises)”)是指“包括但不限于”,并且不意图排除例如其他添加物、组分、整数或步骤。具体地,在陈述为包括一个或多个步骤或操作的方法中,特别地预期每个步骤都包括所列出的内容(除非所述步骤包括如“由……组成”之类的限制性术语),这意味着每个步骤都不旨在排除例如未在步骤中列出的其他添加物、组分、整数或步骤。

[0048] 范围可在本文中表现为从“约”或“近似”一个特定值,和/或至“约”或“近似”另一个特定值。当表述这种范围时,另一方面包括从一个特定值和/或至另一个特定值。类似地,当通过使用先行词“约”或“近似”将值表示为近似值时,应理解,特定值形成另一方面。还应当理解,每个范围的端值不论是相对于另一个端值,还是独立于另一个端值都是有意义的。还应理解,本文公开了多个值,并且每个值除所述值本身之外在本文中公开为“约”所述特定值。例如,如果公开了值“10”,则也公开了“约10”。还应理解,还公开了两个特定单位之

间的每个单位。例如,如果公开了10和15,则也公开了11、12、13和14。

[0049] 如本文所用,术语“任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或情形可能发生也可能不发生,并且所述描述包括所述事件或情形发生的情况和不发生的情况。

[0050] 如本文所用,术语“受试者”是指施用的靶标,例如人。因此,所公开方法的受试者可以是脊椎动物,如哺乳动物、鱼、鸟、爬行动物或两栖动物。术语“受试者”也包括驯养动物(例如,猫、狗等)、家畜(例如,牛、马、猪、绵羊、山羊等)和实验动物(例如,小鼠、兔、大鼠、豚鼠、果蝇等)。在一个方面,受试者是哺乳动物。在另一方面,受试者是人。所述术语不指示特定年龄或性别。因此,旨在涵盖成人、儿童、青少年和新生儿受试者以及胎儿,无论是男性还是女性。

[0051] 如本文所用,术语“患者”是指患有疾病或病症的受试者。术语“患者”包括人和兽医医学受试者。在所公开方法的一些方面中,“患者”已被诊断为需要治疗自身免疫病症,例如,在施用步骤之前。

[0052] 如本文所用,术语“氨基酸序列”是指表示氨基酸残基的缩写、字母、字符或词语的列表。本文所用的氨基酸缩写是氨基酸的常规单字母代码,并且表示如下:A,丙氨酸;C,半胱氨酸;D,天冬氨酸;E,谷氨酸;F,苯丙氨酸;G,甘氨酸;H,组氨酸;I,异亮氨酸;K,赖氨酸;L,亮氨酸;M,甲硫氨酸;N,天冬酰胺;P,脯氨酸;Q,谷氨酰胺;R,精氨酸;S,丝氨酸;T,苏氨酸;V,缬氨酸;W,色氨酸;Y,酪氨酸。

[0053] 如本文所用,“多肽”是指任何肽、寡肽、多肽、基因产物、表达产物或蛋白质。多肽由连续的氨基酸组成。术语“多肽”涵盖天然存在或合成的分子。

[0054] 另外,如本文所用,术语“多肽”是指通过肽键或经修饰的肽键彼此连接的氨基酸,例如肽等排体(peptide isosteres)等,并且可含有除20种基因编码的氨基酸以外的经修饰氨基酸。多肽可以通过天然过程如翻译后加工或通过本领域众所周知的化学修饰技术进行修饰。修饰可以发生在多肽中的任何位置,包括肽主链、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。相同类型的修饰可以相同或不同的程度存在于给定多肽的几个位点。另外,给定多肽可以具有许多类型的修饰。修饰包括但不限于乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、共价交联或环化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、二硫键形成、去甲基化、半胱氨酸或焦谷氨酸的形成、甲酰化、 γ -羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、聚乙二醇化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒酰化(selenoylation)、硫酸盐化和转运RNA介导的向蛋白质中添加氨基酸,如精氨酰化。(参见Proteins-Structure and Molecular Properties第2版,T.E.Creighton,W.H.Freeman and Company,New York (1993);Posttranslational Covalent Modification of Proteins,B.C.Johnson编著,Academic Press,New York,第1-12页(1983))。

[0055] 如本文所用,短语“核酸”是指能够通过Watson-Crick碱基配对与互补核酸杂交的天然存在或合成的寡核苷酸或多核苷酸,无论是DNA或RNA还是DNA-RNA杂合体、单链还是双链、有义还是反义。本发明的核酸还可以包括核苷酸类似物(例如,BrdU)和非磷酸二酯核苷间键(例如,肽核酸(PNA)或硫代二酯键)。具体地,核酸可包括但不限于DNA、RNA、cDNA、gDNA、ssDNA、dsDNA或其任何组合。

[0056] 如本文所用,“样品”是指动物;来自动物的组织或器官;细胞(在受试者体内,直接

取自受试者,或保持在培养物中或来自培养细胞系的细胞);细胞裂解物(或裂解物级分)或细胞提取物;或包含来源于细胞或细胞材料的一种或多种分子(例如多肽或核酸)的溶液,其如本文所述进行测定。样品还可以是包含细胞或细胞组分的任何体液或排泄物(例如但不限于血液、尿液、粪便、唾液、泪液、胆汁)。

[0057] 如本文所用,“调节”是指通过增加或减少进行改变。

[0058] 如本文所用,化合物的“有效量”是指足以提供所需效果的化合物的量。所需的精确量将因受试者而异,这取决于受试者的物种、年龄和一般状况、所治疗疾病(或潜在的遗传缺陷)的严重程度、所用的具体化合物、其施用模式等。因此,不可以指定精确的“有效量”。然而,本领域普通技术人员仅使用常规实验即可确定适当的“有效量”。

[0059] 如本文所用,“分离的多肽”或“纯化的多肽”是指基本上不含该多肽在自然界中通常与之相关联的材料的多肽(或其片段)。本发明的多肽或其片段可以例如通过从天然来源(例如,哺乳动物细胞)中提取,通过表达编码所述多肽的重组核酸(例如,在细胞或无细胞翻译系统中)或通过化学合成所述多肽而获得。另外,多肽片段可通过这些方法中的任一种或通过切割全长蛋白质和/或多肽而获得。

[0060] 如本文所用,“分离的核酸”或“纯化的核酸”是指不含在本发明的DNA所来源的生物体的天然存在的基因组中处于该基因侧翼的基因的DNA。因此,该术语包括,例如,重组DNA,其被并入载体中,如自主复制质粒或病毒;或被并入原核生物或真核生物的基因组DNA中(例如转基因);或以单独分子的形式存在(例如,通过PCR、限制性内切核酸酶消化或化学或体外合成产生的cDNA或基因组或cDNA片段)。它还包括为编码另外的多肽序列的杂合基因的一部分的重组DNA。术语“分离的核酸”还指RNA,例如由分离的DNA分子编码的,或化学合成的,或与至少一些细胞组分例如其他类型的RNA分子或多肽分子分离或基本上不含所述细胞组分的mRNA分子。

[0061] 如本文所用,“治疗”是指将本发明的化合物或分子施用于患有癌症的受试者,如人或其他哺乳动物(例如,动物模型),以便预防或延迟疾病或病状的影响的恶化,或部分或完全逆转疾病的影响。

[0062] 如本文所用,“预防”是指使得癌症的易感性增加的受试者得癌症的机会最小。

[0063] 如本文所用,“特异性结合”是指抗体识别其同源抗原或靶标(例如,所公开的合成MGS序列)并与其实际发生相互作用,并且不显著识别其他抗原或靶标并与其相互作用;这样的抗体可以通过本领域众所周知的技术产生的多克隆抗体或单克隆抗体。

[0064] 如本文所用,“探针”、“引物”或“寡核苷酸”是指限定序列的单链DNA或RNA分子,其可以与含有互补序列的第二DNA或RNA分子(“靶标”)碱基配对。所得杂合体的稳定性取决于发生的碱基配对的程度。碱基配对的程度受如探针与靶分子之间的互补程度和杂交条件的严格程度之类的参数的影响。杂交严格程度受如温度、盐浓度和如甲酰胺的有机分子的浓度之类的参数的影响,并通过本领域技术人员已知的方法确定。对能够编码所公开的MGS序列的核酸(例如,基因和/或mRNA)具有特异性的探针或引物与能够编码与其杂交的所公开的MGS序列的核酸区域具有至少80%-90%序列互补性,优选地至少91%-95%序列互补性,更优选地至少96%-99%序列互补性,并且最优选地100%序列互补性。探针、引物和寡核苷酸可通过本领域技术人员众所周知的方法以放射性或非放射性方式可检测地标记。探针、引物和寡核苷酸用于涉及核酸杂交的方法,如:核酸测序、通过聚合酶链式反应进行的逆转

录和/或核酸扩增、单链构象多态性 (SSCP) 分析、限制性片段多态性 (RFLP) 分析、Southern 杂交、Northern 杂交、原位杂交、电泳迁移率变动分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA)。

[0065] 如本文所用,“特异性杂交”是指探针、引物或寡核苷酸在高严格条件下识别基本上互补的核酸(例如,能够编码所公开的 MGS 序列的核酸)并与其实发生相互作用(即,碱基配对),并且基本上不与其他核酸碱基配对。

[0066] 如本文所用,“高严格条件”是指允许杂交与在含有 pH 7.2 的 0.5M NaHPO₄、7% SDS、1mM EDTA 和 1% BSA (部分 V) 的缓冲液中,在 65°C 的温度下,或在含有 48% 甲酰胺、4.8X SSC、pH 7.6 的 0.2M Tris-Cl、1X Denhardt 溶液、10% 硫酸葡聚糖和 0.1% SDS 的缓冲液中,在 42°C 的温度下,使用长度为至少 40 个核苷酸的 DNA 探针产生的杂交相当的条件。用于高严格杂交如 PCR、Northern、Southern 或原位杂交、DNA 测序等的其他条件是分子生物学领域的技术人员众所周知的。(参见,例如, F. Ausubel 等人, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY, 1998)。

[0067] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与所公开的方法和组合物所属领域的技术人员通常所理解的含义。尽管类似于或等同于本文描述的那些方法和材料的任何方法和材料都可以用于本发明方法和组合物的实践或测试,但是特别有用的方法、装置和材料如所描述的那样。本文引用的出版物及其所引用的材料据此通过引用特定并入。本文中的任何内容均不应解释为承认由于先前发明而使本发明无权先于所述公开。不承认任何参考文献构成现有技术。参考文献的论述陈述其作者所声称的内容,并且本申请人保留质疑所引用文件的准确性和相关性的权利。应清楚理解,尽管在本文提及了多个出版物;但这一提及并不构成承认任何这些文件形成本领域的普通常识的一部分。

[0068] 公开了用于制备所公开组合物的组分以及将在本文公开的方法内使用的组合物本身。本文公开这些和其他材料,并且应了解当公开这些材料的组合、子集、相互作用、群组等时,虽然可能未明确地公开这些化合物的每个不同个别和共同组合以及排列的特定提到,但是其各自在本文中特定地预期并描述。因此,如果公开一类分子 A、B 和 C 以及一类分子 D、E 和 F,并且公开组合分子的实例 A-D,则即使未单独叙述每个组合,也应单独和共同预期每个组合,这意味着考虑公开组合 A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E 以及 C-F。同样地,还公开了这些分子的任何子集或组合。因此,例如,会考虑公开 A-E、B-F 和 C-E 的子组。此概念适用于本申请的所有方面,包括但不限于,制备和使用所公开组合物的方法中的步骤。因此,如果有可执行的各种附加步骤,应理解这些附加步骤各自可与所公开方法的任何特定实施方案或实施方案组合一起执行。

[0069] 还公开了用于制备所公开的组合物的组分以及在本文所公开的方法中使用的组合物本身。本文公开这些和其他材料,并且应了解当公开这些材料的组合、子集、相互作用、群组等时,虽然可能未明确地公开这些化合物的每个不同个别和共同组合以及排列的特定提到,但是其各自在本文中特定地预期并描述。

[0070] 本文公开了一种靶向癌症疗法,其包含肽缀合物,所述肽缀合物包含与植物毒素皂草素缀合的肽序列 FHAVPQSFYT (SEQ ID NO:3)。皂草素是不具有细胞进入结构域的核糖体失活蛋白 (RIP, 34KD)。给予进入细胞的进入机制,它可以从核糖体大亚基的核糖体 RNA 中催化除去单个腺嘌呤,从而使其失活。因此,如果可将其递送到细胞内部,则它是快速杀死

细胞的有效毒素。如本文所述,此问题可以通过将皂草素与肽缀合来克服,所述肽对癌细胞具有选择性并结合癌细胞且介导毒素在所述癌细胞中的内化,从而导致癌细胞快速死亡。由于本文公开的MGS肽缀合物的癌症特异性,所述治疗对正常组织的影响极小。

[0071] 本文公开了一种抗癌疗法,其应用于肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌和胰腺癌。本文所公开的化合物、组合物或肽缀合物代表可在癌的治疗中具有广泛适用性的靶向细胞毒性疗法。

[0072] 本文所公开的组合物或缀合物(例如,MGS肽-皂草素缀合物)可以作为融合蛋白或通过化学缀合产生。可以递送缀合物,并且MGS肽可以将毒素(例如,皂草素)引导至肿瘤或癌细胞,在其中它介导皂草素在肿瘤细胞中的摄取,在所述肿瘤细胞中毒素可以结合其靶标。

[0073] 本文所公开的组合物的递送,例如,当一种或多种分子导向系统(MGS)肽在偶联或缀合于皂草素时可以靶向癌细胞并且将皂草素特异性地递送至所述癌细胞,同时避免或最小化皂草素在正常细胞中的摄取。本文所公开的MGS肽对上皮来源的癌症的子集具有低的纳摩尔亲和力。因为这些MGS肽很小,所以它们可以容易地与皂草素缀合或表达为融合蛋白。在美国,每年约160万例新诊断和近60万例死亡导致每年大约890亿美元的医疗保健费用,本文所公开的缀合物为癌提供了一种新疗法,其可克服当前癌症疗法的局限性。

[0074] 可以通过除去一个或多个氨基酸将肽HCC15.2截短。另外,可以将PEG接头添加至单体肽,并且可以将氨基末端乙酰化。

[0075] 组合物

[0076] MGS肽。本文公开了分子系统导向肽(MGS)或肿瘤靶向肽。这些肽可以选择性地结合包括恶性肿瘤的肿瘤。可以在所公开的组合物中使用或修饰的MGS肽的实例可以包括但不限于McGuire等人,Sci Rep.2014年3月27日;4:4480中公开的一种或多种MGS肽。还可用于所公开的组合物和方法中的MGS肽的实例包括但不限于表1以及图24和图25中所示的MGS序列。

[0077] 表1.肽序列。

[0078]

肽名称	肽序列	SEQ ID NO:
HCC15.2	FHAVPQSFYTAP	1
	FHAVPQSFYTA	2
	FHAVPQSFYT	3
	FHAVPQSFY	78
	HAVPQSFYT	79
	CH ₃ CO-FHAVPQSFYT	80
H1299.1	VSQTMRQTAVPLLWFWTGSL	4
H1299.2	YAAWPASGAWTGTAPCSAGT	5
	YAAWPASGAWT	6
	CH ₃ CO-YAAWPASGAWT	82
H2009.1	RGDLATLRQLAQEDGVVGVR	7
	D-Leu-RGDLATLRQL	8
	CH ₃ CO-D-Leu-RGDLATLRQL	81
H460.1	EAMNSAEQSAAVVQWEKRRI	9
HCC15.1	ATEPRKQYATPRVFWTDAPG	10
A549.1	MTVCNASQRQAHAQATAVSL	11
HCC95.1	MRGQTGKLPTEHFTDTGVAF	12
H1155.1	MTGKAAAPHQEDRHANGLEQ	13
H661.1	TNSCRGDWLCDAVPEKARV	14

[0079]

	EHPWFNMWSWATQVQE	15
H2009.2	YPGSPTQYPSSMHEYHSSSE	16
H2009.3	AHTIDDEWASYHMQQWNSPP	17
	FEEFYSRQSNTIPYPQQYKG	18
	THGNKHQSWTYPSEINHKNY	19
	NLADTWTQTQQHDFHVLRGTR	20
	GYSWWQPNWPSSTWDT	21
H1299.4	EHPWFNMWSWATQVQEKKK	22
H2009.4	NLADTWTQTQQHDFHVLRGTR	23
H1993.1	SVEYWGERMYDVMESLGFS	24
H1993.2	FAAKRAEWWDPGQLWDAVWN	25
H1993.3	QEALEEWFVKMMPWSGSPGQ	26
H1993.4	TWTDFGQWPWPFGAEGTRAF	27
H1993.5	MDGATWWTQLDPLLWEGET	28
H1993.5	SADWFQGPAEWLLEGWMGPL	29
H1299.3	LQWRRDDNVHNFVWARYRL	30
	LQWRRNFGVWARYRL	31
HCC15.1	ATEPRKQYATPRVFWTDAPG	32
	KQYATPRVFWT	33
	CH ₃ CO-KQYATPRVFWT	84
MGS_H1299.1	VSQTMRQTAVPLLWFWTGSL	34
MGS_1299.2	YAAWPASGAWTGTAPCSAGT	35
MGS_1299.3	LQWRRDDNVHNFVWARYRL	36
	CH ₃ CO-LQWRRDDNVHNFVWARYRL	83
MGS_H2009.1	RGDLATLRQLAQEDGVVGVV	37
MGS_H2009.2	EHPWFNMWSWATQVQE	38
MGS_H2009.3	YPGSPTQYPSSMHEYHSSSE	39
MGS_H2009.4	AHTIDDEWASYHMQQWNSPP	40
MGS_H2009.5	FEEFYSRQSNTIPYPQQYKG	41
MGS_HCC15.1	ATEPRKQYATPRVFWTDAPG	42
MGS_HCC15.2	FHAVPQSFYTAP	43
MGS_H460.1	EAMNSAEQSAAVVQWEKRRI	44
MGS_A549.1	MTVCNASQRQAHAQATAVSL	45
MGS_MCF7.1	LTVHGRGPEYNPSWNRRAFP	46
MGS_H1993.1	SVEYWGERMYDVMESLGFS	47
MGS_H1993.2	FAAKRAEWWDPGQLWDAVWN	48
MGS_H1993.3	QEALEEWFVKMMPWSGSPGQ	49
MGS_H1993.4	TWTDFGQWPWPFGAEGTRAF	50
MGS_H1993.5	MDGATWWTQLDPLLWEGET	51
MGS_H1993.6	SADWFQGPAEWLLEGWMGPL	52
MGS_HCC95.1	MRGQTGKLPTHEFTDTGVAF	53
MGS_H1155.1	MTGKAAAPHQEDRHANGLEQ	54
MGS_H1155.2	MEKLPLSKTGRTVSEGVSP	55
MGS-H666.1	TNSCRGDWLCDAVPEKARV	56
MGS_A20.1	SAKTAVSQRVWLPSHRGGEP	57

	MGS_A20.2	KSREHVNNSACPSKRITAAL	58
	MGS_PCM.1	WLSEAGPVVTVRALRGTGSW	59
	MGS_C2C12.1	TGGETSGIKKAPYASTTRNR	60
	MGS_C2C12.2	SHHGVAGVDLGGGADFKSIA	61
	MGS_C2C12.3	SNSPLGLKDEATQRLVLEQAKWLA	62
	MGS_XS52.1	GPEDTSRAPENQKTFHRRW	63
	MGS_XS52.2	SGETGSNLVGHEDFRPGSPSP	64
	MGS_XS106.1	RYSAPAATAEGRSVSKELLRV	65
	MGS_717US.1	GQELGAWTRSKGPEVQTSVL	66
	MGS_717S.1	ASTWRGTSAGGNRLEKMEVT	67
	MGS_RIP.1	LSGTPERSGQAVKVKLKAIP	68
	MGS_RIP.2	GAWEAVRDRIAEGSWGIPS	69
	MGS_MArg.1_细菌	AMDMYSIEDRYFGGYAPEVG	70
[0080]	MGS_1299.2 V4	CH ₃ CO-YAAWPASGAWT-PEG ₁₁ -C-NH ₂	71
	MGS_1299.3 V2	CH ₃ CO-LQWRRNFGVWARYRL-PEG ₁₁ -C-NH ₂	72
	MGS_2009.1 V4	CH ₃ CO-RGDLATLRQL-PEG ₁₁ -YC-NH ₂	73
	MGS_H2009.1 V5	CH ₃ CO-d(Leu)-RGDLATLRQL-PEG ₁₁ -YC-NH ₂	74
	MGS_HCC15.1 V4	CH ₃ CO-LQWRRNFGVWARYRL-PEG ₁₁ -C-NH ₂	75
	MGS_HCC15.2 V8	CH ₃ CO-FHAVPQSFYT-PEG ₁₁ -C-NH ₂	76
	MGS_HCC15.2 V9	CH ₃ CO-FHAVPQSFYT-PEG ₁₁ -C-NH ₂	77

[0081] 在一个方面,所述组合物包含一种或多种分子导向系统(MGS)肽和细胞毒性剂。在一个方面,用于跨脂质膜运输的膜可透性缀合物可包含一种或多种分子导向系统(MGS)肽和细胞毒性剂。

[0082] 在一个方面,一种或多种MGS肽可以是本文所公开的任何MGS肽。在一个方面,一种或多种MGS肽包含SEQ ID NO:1、2、3、34、35、36、37、38、39、40、41、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、5、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83或84或其组合。在一个方面,一种或多种MGS肽包含SEQ ID NO:1、2或3。在一个方面,细胞毒性剂可以是皂草素或其生物活性变体。在一个方面,一种或多种MGS肽可以是SEQ ID NO:3,并且细胞毒性剂可以是皂草素。在一个方面,所述组合物可以包含一种或多种MGS肽,例如,在一些方面,所述组合物可以包含一种、两种、三种、四种或五种MGS肽。在一个方面,一种或多种MGS肽可以形成四聚体支架蛋白。在一个方面,本文所公开的一种或多种MGS肽可以是截短的。在一个方面,一种或多种MGS肽可以是经修饰的。在一个方面,一种或多种MGS肽可以在N末端乙酰化。图26提供了已进一步表征的选定的MGS肽的实例。在一个方面,一种或多种MGS肽可以化学缀合至细胞毒性剂。在一个方面,化

学缀合物可以是聚乙二醇 (PEG)。在一个方面,PEG单元的数目可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或更多。在一个方面,PEG单元的数目可以具有足够的长度,以将一种或多种MGS肽与细胞毒性剂分开,从而防止一种或多种MGS肽与细胞毒性剂之间的任何空间干扰。例如,本文公开了包含化学缀合物的组合物,其中化学缀合物是PEG,并且PEG包括11个PEG单元。在一个方面,一种或多种MGS肽包含SEQ ID NO:3,其中SEQ ID NO:3可以在N末端乙酰化并且可以化学缀合至PEG;并且细胞毒性剂可以是皂草素,其中皂草素可以共价连接于PEG。

[0083] 细胞毒性剂。广泛多种毒性(例如,细胞毒性)剂可以包括在所公开的组合物中。细胞毒性剂可以与本文所公开的一种或多种MGS肽共价缀合或形成融合蛋白。细胞毒性剂可以是蛋白质。在一个方面,细胞毒性剂可以是细菌或植物毒素。在一些方面,细胞毒性剂可以是植物毒素。在一个方面,细胞毒性剂可以是皂草素或其生物学变体。细胞毒性剂可以是经修饰的。在一个方面,细胞毒性剂是细菌或植物毒素的片段。

[0084] 制备缀合物或融合蛋白的方法是本领域普通技术人员已知的,并且可以使用已知技术进行。在一个方面,使用聚乙二醇将MGS肽缀合至细胞毒性剂(例如,皂草素)。将本文所公开的MGS肽与最佳的PEG单元化学缀合在本领域普通技术人员的技能范围内。

[0085] 标记。本文还描述了包含一种或多种分子导向系统(MGS)肽和标记的组合物。例如,本文所公开的组合物可以包括可检测标记。此类可检测标记可以包括但不限于被设计用于检测(例如,纯化或定位)所表达的多肽或序列的标签序列。标签序列包括,例如,绿色荧光蛋白、谷胱甘肽S-转移酶、聚组氨酸、c-myc、血凝素或FlagTM标签,并且可以与所编码的核酸融合。此类可检测标记可以包括但不限于荧光剂、酶标记或放射性同位素。

[0086] 药物组合物

[0087] 本文公开了包含一种或多种本文所公开的组合物和上述药学上可接受的载体的药物组合物。在一些方面,MSG肽可以是SEQ ID NO:3,并且细胞毒性剂可以是皂草素或其生物学变体,并且药物组合物被配制用于静脉内施用。本公开的组合物还包含治疗有效量的如本文所述的细胞毒性剂。可以将组合物配制用于通过多种施用途径中的任一种施用,并且可以包括一种或多种生理学上可接受的赋形剂,其可以根据施用途径而变化。如本文所用,术语“赋形剂”是指任何化合物或物质,包括也可以称为“载体”或“稀释剂”的那些。制备药学和生理学上可接受的组合物在本领域中被认为是常规的,因此,如果需要,本领域普通技术人员可以向众多机构寻求指导。

[0088] 如本文所公开的药物组合物可以被制备用于口服或肠胃外施用。被制备用于肠胃外施用的药物组合物包括被制备用于静脉内(或动脉内)、肌内、皮下、腹膜内、经粘膜(例如鼻内、阴道内或直肠)或经皮(例如局部)施用的那些药物组合物。气雾剂吸入也可用于递送融合蛋白。因此,可以制备用于肠胃外施用的组合物,其包含溶解或悬浮在可接受载体中的融合蛋白,所述可接受载体包括但不限于水性载体,如水、缓冲水、盐水、缓冲盐水(例如PBS)等。所包括的一种或多种赋形剂可以有助于接近生理条件,如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂、洗涤剂。在组合物包含固体组分(在它们可用于口服施用时)的情况下,一种或多种赋形剂可以用作粘结剂或填充剂(例如,用于配制片剂、胶囊等)。在组合物被配制用于应用于皮肤或粘膜表面的情况下,一种或多种赋形剂可以是用于配制乳膏、软膏等的溶剂或乳化剂。

[0089] 药物组合物可以是无菌的,并且通过常规灭菌技术灭菌或无菌过滤。水性溶液可

以包装以便原样使用,或冻干,本公开涵盖的冻干制剂可以在施用前与无菌含水载体混合。药物组合物的pH通常将在3与11之间(例如,在约5与9之间)或在6与8之间(例如,在约7与8之间)。可以将固体形式的所得组合物以多个单剂量单位包装,每个单位包含固定量的一种或多种上述药剂,如在片剂或胶囊的密封包装中。固体形式的组合物也可以包装在容器中以获得灵活的量,如在被设计用于局部应用的乳膏或软膏的可挤出管中。

[0090] 治疗方法

[0091] 本文公开了治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括:(a) 鉴定需要治疗的受试者;以及(b) 向受试者施用治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含一种或多种分子导向系统(MGS)肽和细胞毒性剂,以及药学上可接受的载体。MGS肽可以是本文公开的任何MGS肽。细胞毒性剂可以是皂草素或其生物学变体。

[0092] 本文公开了靶向细胞内靶标的方法。所述方法可包括施用与细胞毒性剂缀合的一种或多种MGS肽。细胞毒性剂可以靶向细胞内靶标。在一个方面,细胞内靶标可以是溶酶体、高尔基体、内质网、细胞质或细胞核。

[0093] 在一个方面,技术人员可以确定所公开的组合物或所公开的融合蛋白或所公开的融合蛋白的有效剂量、有效时间方案或有效施用途径,以便诱导靶向细胞内靶标,使得可以使细胞内靶标失活。

[0094] 在本文的任何所公开方法的一个方面,本文所述的组合物、缀合物或融合蛋白可以与一种或多种另外的疗法组合。在一个方面,组合物、缀合物或融合蛋白可以单独施用或与其他生物活性剂组合成适于施用给受试者的组合物。在一个方面,本文所公开的涉及治疗患有癌症或处于患癌症风险中的受试者的方法、组合物、缀合物或融合蛋白可以与例如治疗有效量的放射疗法、免疫疗法或化学疗法或其组合相组合。组合疗法可以作为共制剂施用或分开施用。当分开施用时,可以同时或顺序地施用组合疗法。可以使用本领域常规方法制备制剂。

[0095] 可以将上述药物组合物配制成包括治疗有效量的如本文所公开的组合物、缀合物或融合蛋白。治疗性施用涵盖预防性应用。基于基因检测和其他预后方法,与其患者协商的医师可以选择预防性施用,其中患者对一种或多种自身免疫疾病具有临床上确定的倾向性或增加的易感性(在一些情况下,大大增加的易感性),或患者对癌症具有临床上确定的倾向性或增加的易感性(在一些情况下,大大增加的易感性)。

[0096] 本文所述的药物组合物可以足以延迟、减少或优选地预防临床疾病发作的量施用于受试者(例如,人受试者或人患者)。因此,在一些方面,受试者是人受试者。在治疗应用中,将组合物以足以至少部分地改善体征或症状或抑制(并优选地阻止)病状的症状、其并发症和后果的进展的量施用于已患有或被诊断患有自身免疫疾病的受试者(例如人受试者)。将足以实现这一点的量定义为“治疗有效量”。药物组合物的治疗有效量可以是实现治愈的量,但是该结果只是可以实现的若干结果之一。如同所指出的那样,治疗有效量包括提供治疗的量,其中癌症的发作或进展被延迟、阻碍或预防,或者自身免疫疾病或自身免疫疾病的症状得到改善。一种或多种症状可以不那么严重。可以加快已经被治疗的个体的康复。

[0097] 在一些方面,癌症可以是原发性、继发性、难治性或复发性肿瘤。在一个方面,癌症可以是肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌或胰腺癌。

[0098] 对此用途有效的量可以取决于受试者的癌症的严重程度和体重以及一般状态和

健康状况。用于初次施用和加强施用的合适方案的代表是初次施用,接着是一次或多次按每小时、每天、每周或每月间隔的重复剂量,然后是后续施用。

[0099] 本文所公开的药物组合物中的缀合物或融合蛋白的总有效量可以作为单剂量,以大丸剂形式或通过输注经相对短的时间段施用给哺乳动物,或者可以使用分次治疗方案进行施用,其中多次剂量经更长的时间段施用(例如,每4-6、8-12、14-16或18-24小时或每2-4天、1-2周一次剂量,或每月一次)。可选地,足以维持血液中的治疗有效浓度的连续静脉内输注也在本公开的范围之内。

[0100] 存在于本文所述的组合物中并在应用于哺乳动物(例如人)的如本文公开的方法中使用的毒素(或细胞毒性剂)的治疗有效量可以由本领域普通技术人员通过考虑年龄、体重和其他一般状况的个体差异(如上文所提及)进行确定。因为本公开的组合物、缀合物和融合蛋白在血清和血流中可以是稳定的,并且在一些情况下更具特异性,所以包含任何单独组分的组合物、缀合物和融合蛋白的剂量可以低于(或高于)未结合时任何单独组分的有效剂量。因此,在一些方面,与毒素单独或不作为缀合物或融合蛋白的一部分施用相比,所施用的毒素当作为缀合物或融合蛋白的一部分施用时可以具有增加的功效或减少的副作用。

[0101] 载体

[0102] 公开了包含编码一种或多种所公开的组合物的核酸序列的载体。在一些方面,载体仅包含能够编码一种或多种所公开的MGS肽的核酸序列。

[0103] 试剂盒

[0104] 上述材料以及其他材料可以以任何合适的组合包装在一起,作为可用于执行或帮助执行所公开的方法的试剂盒。如果给定试剂盒中的试剂盒组分经过设计并适于在所公开的方法中一起使用,那么所述试剂盒是有用的。例如,公开了包括一种或多种所公开的组合物的试剂盒。

[0105] 在一些方面,试剂盒包括MGS肽和细胞毒性剂以及用于缀合的说明书。

[0106] 在一些方面,试剂盒包括细胞系,所述细胞系包含编码一种或多种MGS肽的核酸序列。

[0107] 实施例

[0108] 实施例1:HCC15.2显示出对癌细胞的特异性且内化于其中

[0109] 为了使肽成为临床上有用的试剂,区分正常细胞和癌细胞可能是重要的。图1示出MGS肽HCC15.2积聚在癌细胞中并且与对照相比具有特异性。通过流式细胞术分析对HCC15.2结合进行分析(参见图1)。HCC15.2不结合正常的HBEC,而是结合LC系H1299。结合是序列依赖性的,并且对于单个组织病理学类别不具特异性(参见图2)。

[0110] 使用标准的固相FMOC技术在Prelude合成仪(Protein Technologies Inc.)上合成MGS肽。通过反相HPLC在C18制备柱上将MGS肽纯化至>95%纯度,并通过MALDI-TOF进行验证。优化的HCC15.2肽序列为Ac-FHAVPQSFYT-PEG11-生物素,分子量为2394Da;Ac-FHAVPQSFYT-PEG11-C,分子量为1940Da。四聚体HCC15.2通过先前公布的方案合成。在PBS pH 7.4中制备储备溶液,并且通过在Nanodrop 2000(Thermo Fisher Scientific)上280nm处的吸光度确定浓度。

[0111] 流式细胞术。在室温下,将生物素化的肽与链霉亲和素-R-藻红蛋白(1:1)缀合30

分钟。链霉亲和素上的其余结合位点用RPMI 1640淬灭,并且将溶液稀释至25nM。使肿瘤细胞在12孔板中生长至90%汇合,然后与500 μ l肽-染料缀合物在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。1小时后,除去肽并且将细胞用PBS洗涤3次,进行5分钟,用酸冲洗2次,并且用PBS冲洗1次。添加300 μ l胰蛋白酶直到细胞浮起(lift),然后添加700 μ l RPMI+5%FBS以使胰蛋白酶失活。将细胞转移到流式管中,并在黑暗中置于冰上。流式细胞术在BD FACSCelesta上运行,并且在Flowing软件上分析数据。在阴性对照中建立了包含<5%细胞的区域,并通过将阳性细胞的%乘以荧光强度来计算每个样品的McGuire得分。

[0112] 对于流式细胞术实验,用其上具有染料的肽(例如,MGS肽)处理细胞一小时。如果肽进入一个或多个细胞,则染料也将进入一个或多个细胞(参见图11)。接下来,将细胞洗涤并放置于管中以进行流式细胞术。流式细胞术可以测量10,000个或更多单个细胞的亮度。

[0113] 共焦显微镜检查(Confocal Microscopy)。具有用GFP标记的细胞器特异性标志物的质粒购自Addgene,并电穿孔到H1299细胞中。在G418选择之后,在研究前一天将GFP标记的肿瘤细胞涂布在8孔腔室载玻片上。在室温下,将生物素化的肽与链霉亲和素-AlexaFluor555(1:1)缀合30分钟,并用RPMI淬灭,然后以50nM添加到孔中。孵育1小时后,将细胞用PBS洗涤3次,进行5分钟,用酸冲洗2次,并用PBS冲洗1次。将细胞在2%甲醛中固定10分钟,用PBS洗涤,在固定培养基中用DAPI染色,并添加盖玻片。在具有Pln Apo63x/1.4油DIC III物镜的Zeiss LSM 700上实现显微镜检查。使用ImageJ软件最大强度投影获得压缩图像。

[0114] 对于显微镜检查实验,用其上具有染料的肽(例如,MGS肽)处理细胞一小时。如果肽进入一个或多个细胞,则染料也将进入一个或多个细胞(参见图1)。接下来,将细胞洗涤并固定在玻璃板上。细胞的其他部分(例如,细胞膜、细胞器或细胞核)被染色。进行荧光显微镜检查以评估细胞中的染料。使用共焦显微镜检查拍摄一系列切片图像,所述图像可用于构建3D图片(如MRI)。

[0115] 实施例2:HCC15.2内化是受体介导的

[0116] 进行实验,其显示HCC15.2可以内化并且这种内化是受体介导的(参见图3)。更具体地讲,HCC15.2与NSCLC和其他肿瘤细胞的特定子集结合(参见图12)。噬菌体阻断用作对照。HCC15.2被特定组的细胞系而不是其他细胞系内化。结果还显示,受体介导的内化是序列特异性的。在添加HCC15.2之前用胰蛋白酶处理2分钟不导致内化。另外,HCC15.2在4 $^{\circ}$ C下不内化。

[0117] 图4示出HCC15.2的四聚体不显著改善受体介导的内化。这一结果是令人惊讶的,因为通过FOX3分子导向系统研究和鉴定的大多数肽在结合/内化中均具有非加性增加(non-additive increase)。

[0118] 实施例3:HCC15.2的截短物。

[0119] 图5和图15示出来自HCC15.2肽的N末端和C末端的截短物揭示了最小结合序列。

[0120] 图6示出乙酰化改善截短肽的结合。

[0121] 实施例4:肽与溶酶体共定位。

[0122] 图7示出MGS肽与溶酶体共定位并随时间积聚在溶酶体中(参见图8和图16)。

[0123] 实施例5:与皂草素缀合的HCC15.2。

[0124] 进行另外的实验以在细胞活力测定中检查与皂草素缀合的HCC15.2(参见图9和表

2)。为此,将肿瘤细胞系涂布在黑壁的透明平底96孔板上。第二天,将培养基替换为浓度梯度的Hcc15.2-皂草素、单独的皂草素或不进行处理。孵育1小时后,除去处理并替换为培养基。72小时后,使用Cell Titer Glo®测量细胞活力,并在来自LJL Biosystems的Analyst HT上测量发光。在Graphpad Prizm上计算IC50。

[0125] 执行癌细胞杀伤测定(参见图22)。将癌细胞放入培养皿中。24小时后,给予细胞不同剂量的肽-皂草素,持续1小时。洗去肽-皂草素,并将细胞再放置72小时。执行用以测量活细胞的测定。图21示出HCC15.2在体内使皂草素靶向癌细胞。这些结果表明,皂草素本身并不进入细胞,但是,当与所需的MGS肽(例如HCC15.2)缀合时,皂草素确实进入细胞。结果还显示,HCC15.2-皂草素降低脱靶效应并从细胞内囊泡逃逸。

[0126] 表2. 多个细胞系中的细胞活力。

细胞系	肽-药物	重复数	平均KD
[0127] H1299	15.2-皂草素	3	4.97e-09
	对照-皂草素	2	1.05e-07
H2009	15.2-皂草素	2	5.55e-09
	对照-皂草素	2	2.43e-07
HBEC	15.2-皂草素	2	2.58e-07
	对照-皂草素	1	4.18e-07

[0128] 图10示出,与游离皂草素相比,与皂草素缀合的HCC15.2在人NSCLC异种移植模型中减少肿瘤生长。

[0129] 实施例6:四聚化不显著改善半最大结合。

[0130] 进行流式细胞术以测量KD。用浓度逐渐增加的肽-染料处理细胞一小时。进入或纳入细胞中的一种或多种MGS肽随带染料。将细胞洗涤并放置在管中以进行流式细胞术。流式细胞术可以测量10,000个或更多单个细胞的亮度。量化每种浓度并作图(参见图13和图14)。使曲线在数学上与数据拟合,并且中间点为KD(例如,对结合程度的量度)。

[0131] 实施例7:靶向HCC15.2的NIR染料在体内积聚到肿瘤中。

[0132] 体内成像。将H2009肿瘤细胞悬浮在106个细胞/100 μ l无菌PBS中,并皮下注射到雌性无胸腺裸小鼠的侧腹(Jackson Labs)。使半胱氨酸标记的肽在无菌PBS pH 7.4中与马来酰亚胺Alexafluor-750C5(1:1.1)缀合1小时。将肽-染料缀合物在无菌PBS中稀释至每100 μ l 115 μ g染料,并通过侧尾静脉向每组4只小鼠静脉内注射100 μ l。用Isothesia将小鼠麻醉并于12、24、48和72小时在IVIS上收集完整的动物图像。然后对离体肿瘤和器官称重并在72小时成像。

[0133] 进行体内动物成像研究。对于这些实验,将人癌细胞放置在小鼠皮肤下,并使肿瘤生长到一定大小。当肿瘤达到预定大小时,静脉内注射具有染料的肽。将动物麻醉并在12、24、48和72小时成像。器官和肿瘤在72小时成像。黄色显示大多数肽,栗色/红色显示较少的肽,没有颜色是很少/没有肽。靶向HCC15.2的NIR染料积聚到肿瘤中(参见图17),并随时间保留在肿瘤中(参见图18)。图19和图20示出离体成像的结果。

[0134] 皮下肿瘤生长测定。在无胸腺裸小鼠的侧腹皮下建立H2009肿瘤(Jackson Labs)。

与链霉亲和素缀合的皂草素 (SAZAP) 购自 Advanced Targeting Systems, 并与经优化的生物素化 Hcc15.2 和对照肽 1:1 缀合。当肿瘤的大小达到 ~1003mm 时, 通过侧尾静脉向小鼠静脉内注射非靶向的皂草素 (无 MGS 肽)、15.2-皂草素缀合物, 或不进行任何注射。靶向和非靶向的皂草素毒素以 ~7ug/剂量每周施用 2 次, 持续 2.5 周。每隔一天用卡尺盲测肿瘤, 并使用等式 $\pi/6 * (\text{长度} * \text{宽度})^2 / 2$ 计算肿瘤体积。

[0135] 对于下一组实验, 将人癌细胞放置在小鼠皮肤下, 并使肿瘤生长至某一预定大小。当肿瘤达到预定大小时, 静脉内注射与皂草素缀合或连接的肽。动物经 2.5 周以 7 或 7.5 μg /剂量接受 5 剂。每隔一天测量肿瘤。图 23 示出皂草素的 HCC15.2 靶向显著减慢肿瘤生长。

[0136] 实施例 8: H1299.3 肽的进一步表征。

[0137] 评估了融合原始 MGS 肽: LQWRRNFGVWARYRL (SEQ ID NO: 31) 的氨基酸 1-5 和 11-20 的经修饰的 MGS 肽 (SEQ ID NO: 31)。这种 MGS 肽保持其癌症特异性, 并增加其转运至自噬体的能力。乙酰化保护体内降解并改善溶解度。此 MGS 肽在动物中自动瞄准 (homo to) NSCLC 肿瘤 (参见图 27)。数据显示, 对于非乙酰化型式, 未观察到肿瘤靶向。此 MGS 肽 (例如, 经修饰的 15 聚体) 在心脏、肺和肾肿瘤中具有 >2 倍的减少 (参见图 27)。1299.3Ac-15 聚体细胞结合结果示于图 28 中。

[0138] 细胞培养。提供了人 NSCLC 系。在具有 L-谷氨酰胺和 5% FBS 的 RPMI 1640 中于 37°C 和 5% CO₂ 下培养细胞。

[0139] 实施例 9: 使用其他肽实现的皂草素的体外递送。

[0140] 图 29 示出与选定的 MGS 肽缀合或连接的皂草素的施用在各种细胞系中的 IC₅₀。

[0141] 本领域技术人员显而易见可产生本发明的各种修改和变化而不背离本发明的范围或精神。通过考虑本文公开的本发明的说明书和实践, 本发明的其他方面对于本领域技术人员而言将是显而易见的。意图仅将本说明书和实施例认为是示例性的, 其中本发明的真实范围和精神由随附权利要求来指示。

[0142] 本领域技术人员将认识到或者能够仅仅使用常规实验确定本文所述的方法和组合物的具体实施方案的许多等效方案。此类等效方案旨在由以下权利要求涵盖。

[0143] 本文还提供以下项目:

[0144] 1. 一种组合物, 其包含一种或多种分子导向系统 (MGS) 肽和细胞毒性剂。

[0145] 2. 如项目 1 所述的组合物, 其中所述一种或多种 MGS 肽包含 SEQ ID NO: 1、2、3、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84 或其组合。

[0146] 3. 如项目 1-2 中任一项所述的组合物, 其中所述一种或多种 MGS 肽包含 SEQ ID NO: 1、2、3、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83 或 84。

[0147] 4. 如项目 1-3 中任一项所述的组合物, 其中所述细胞毒性剂是皂草素或其生物活性变体。

[0148] 5. 如项目 1 所述的组合物, 其中所述一种或多种 MGS 肽是 SEQ ID NO: 3, 并且所述细胞毒性剂是皂草素。

- [0149] 6. 如项目1所述的组合物,其中所述一种或多种MGS肽是四种MGS肽。
- [0150] 7. 如项目6所述的组合物,其中所述一种或多种MGS肽形成四聚体支架蛋白。
- [0151] 8. 如项目1所述的组合物,其中所述一种或多种MGS肽在N末端乙酰化。
- [0152] 9. 如项目1-8中任一项所述的组合物,其中所述一种或多种MGS肽与所述细胞毒性剂化学缀合。
- [0153] 10. 如项目9所述的组合物,其中化学缀合物是聚乙二醇(PEG)。
- [0154] 11. 如项目10所述的组合物,其中所述PEG的长度为11个单元。
- [0155] 12. 如项目1所述的组合物,其中所述一种或多种MGS蛋白包含SEQ ID NO:3,其中SEQ ID NO:3在N末端乙酰化并与PEG化学缀合;并且所述细胞毒性剂是皂草素,其中所述皂草素共价连接于PEG。
- [0156] 13. 一种用于跨脂质膜运输的膜可透性缀合物,其包含:一种或多种分子导向系统(MGS)肽和细胞毒性剂。
- [0157] 14. 如项目13所述的缀合物,其中所述一种或多种MGS肽包含SEQ ID NO:1、2、3、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84或其组合。
- [0158] 15. 如项目13-14中任一项所述的缀合物,其中所述一种或多种MGS肽包含SEQ ID NO:1、2、3、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83或84。
- [0159] 16. 如项目13-15中任一项所述的组合物,其中所述细胞毒性剂是皂草素或其生物活性变体。
- [0160] 17. 如项目13所述的组合物,其中所述一种或多种MGS肽是SEQ ID NO:3,并且所述细胞毒性剂是皂草素。
- [0161] 18. 如项目13所述的组合物,其中所述一种或多种MGS肽是四种MGS肽。
- [0162] 19. 如项目13所述的组合物,其中所述一种或多种MGS肽形成四聚体支架蛋白。
- [0163] 20. 如项目13所述的组合物,其中所述一种或多种MGS肽在N末端乙酰化。
- [0164] 21. 如项目13-20中任一项所述的组合物,其中所述一种或多种MGS肽与所述细胞毒性剂化学缀合。
- [0165] 22. 如项目21所述的组合物,其中化学缀合物是聚乙二醇(PEG)。
- [0166] 23. 如项目22所述的组合物,其中所述PEG的长度为11个单元。
- [0167] 24. 如项目13所述的组合物,其中所述一种或多种MGS蛋白包含SEQ ID NO:3,其中SEQ ID NO:3在N末端乙酰化并与PEG化学缀合;并且所述细胞毒性剂是皂草素,其中所述皂草素共价连接于PEG。
- [0168] 25. 一种药物组合物,其包含如项目1所述的组合物和药学上可接受的载体。
- [0169] 26. 如项目1所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制用于静脉内施用。
- [0170] 27. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括:(a) 鉴定需要治疗的患者;(b) 向所述患者施用治疗有效量的如项目1-27中任一项所述的组合物;以及(c) 药学上可接受的载体。
- [0171] 28. 如项目27所述的方法,其中所述患者是人患者。

- [0172] 29. 如项目27所述的方法,其中所述癌症是原发性、继发性、难治性或复发性肿瘤。
- [0173] 30. 如项目27所述的方法,其中所述癌症是肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌或胰腺癌。
- [0174] 31. 如项目27所述的方法,其还包括向所述患者施用治疗有效量的放射疗法、免疫疗法或化学疗法或其组合。
- [0175] 32. 一种靶向细胞内靶标的方法,所述方法包括施用与细胞毒性剂缀合的一种或多种MGS肽,其中所述细胞毒性剂靶向细胞内靶标。
- [0176] 33. 如项目32所述的方法,其中所述细胞内靶标是溶酶体。
- [0177] 34. 一种组合物,其包含一种或多种分子导向系统(MGS)肽和细胞毒性剂,其中所述一种或多种MGS肽选自表1中所列的群组。
- [0178] 35. 一种MGS肽,其如本文所公开。
- [0179] 36. 一种核酸序列,其能够编码本文公开的MGS肽。
- [0180] 37. 一种载体,其包含如项目36所述的核酸序列。
- [0181] 38. 一种细胞系,其包含如项目34所述的MGS肽、如项目36所述的核酸序列或如项目37所述的载体。
- [0182] 39. 一种MGS肽,其包含以下的序列:SEQ ID NO:1、2、3、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83或84。
- [0183] 40. 一种核酸序列,其能够编码如项目39所述的MGS肽。
- [0184] 41. 一种载体,其包含如项目40所述的核酸序列。
- [0185] 42. 一种细胞系,其包含如项目39所述的MGS肽、如项目40所述的核酸序列或如项目41所述的载体。

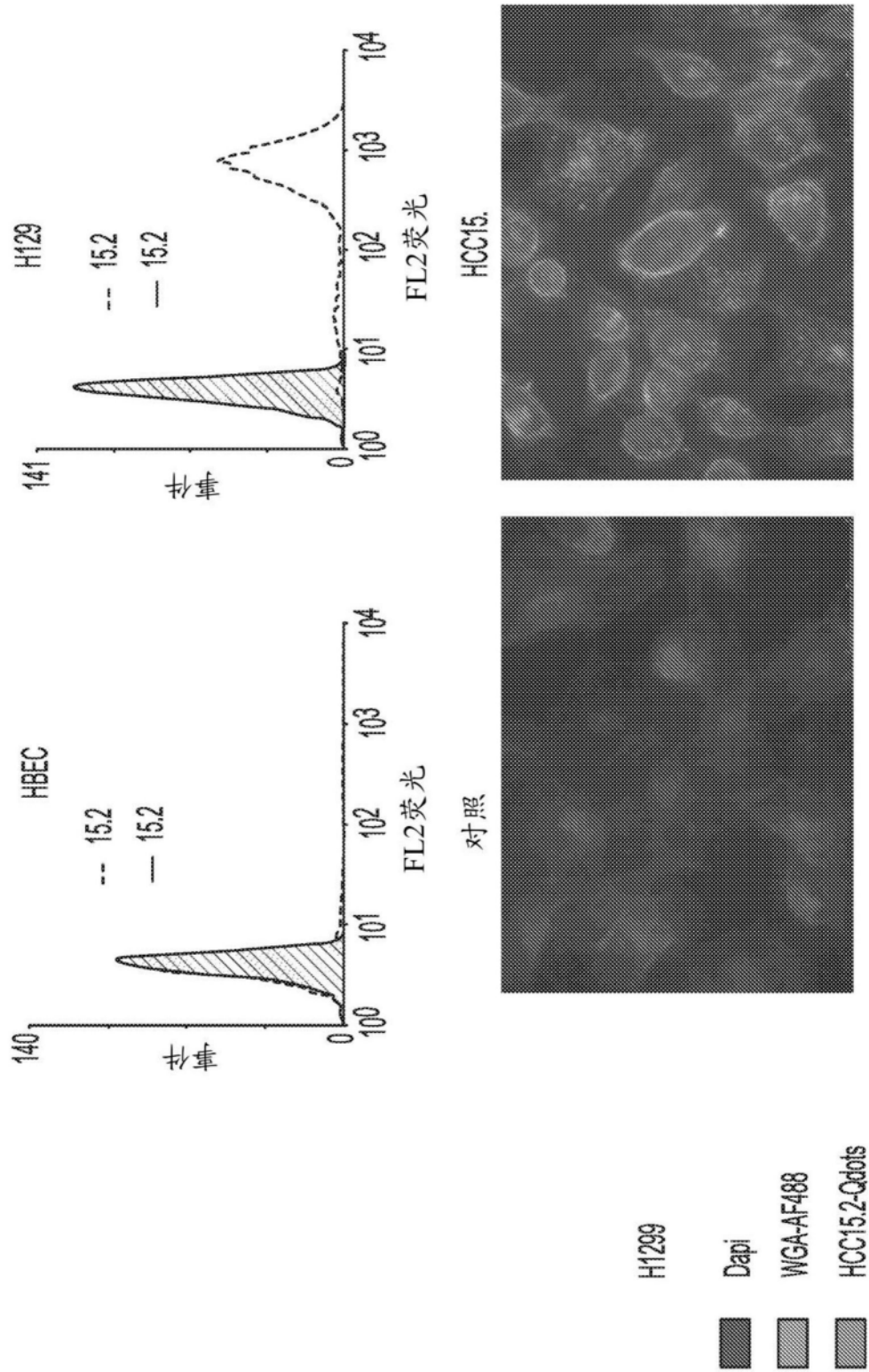


图1

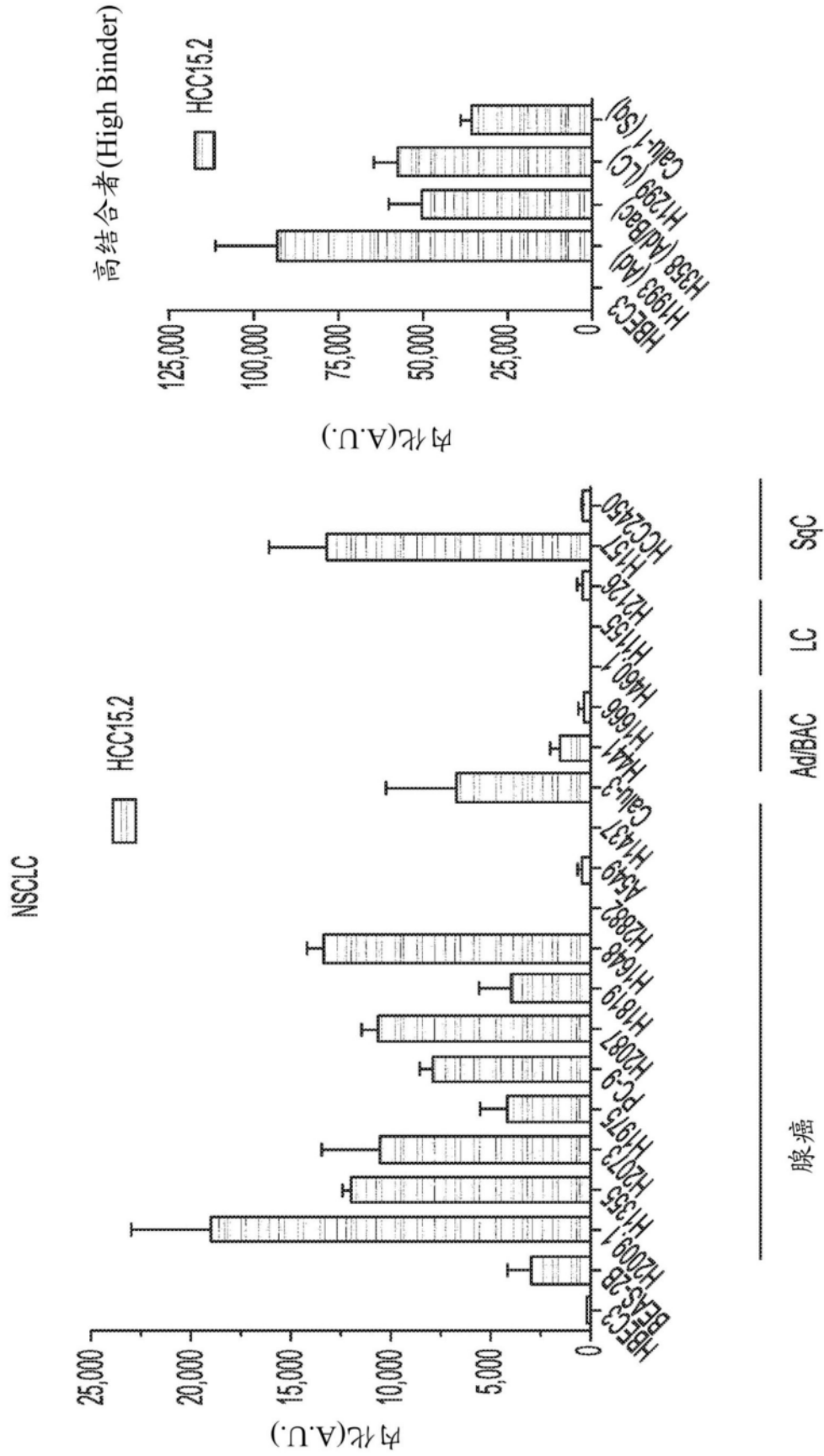


图2

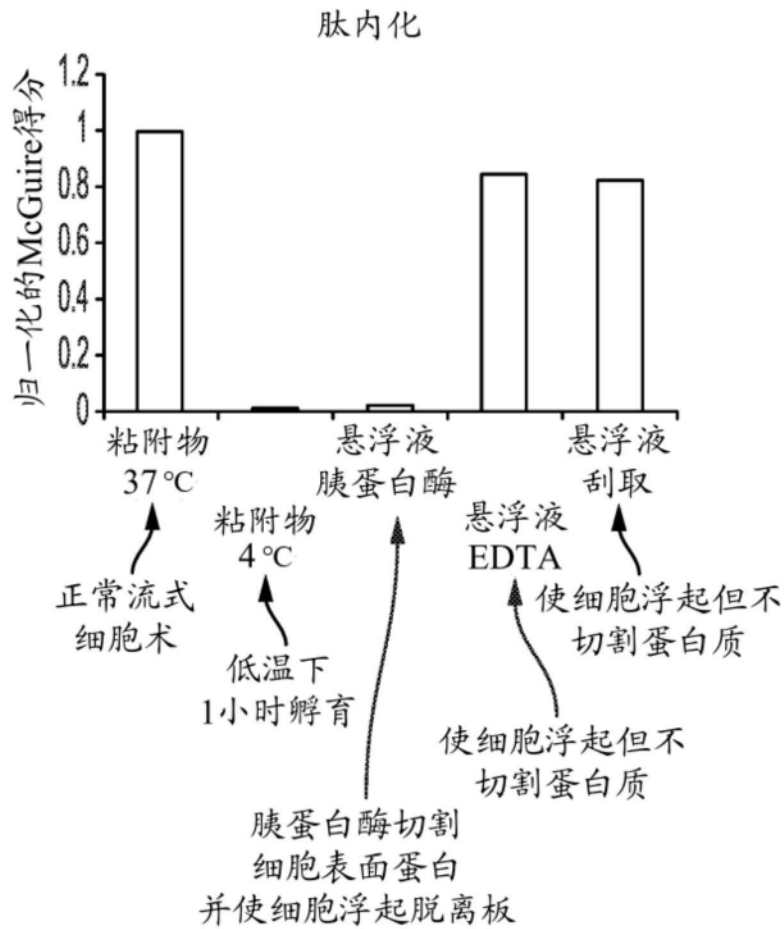
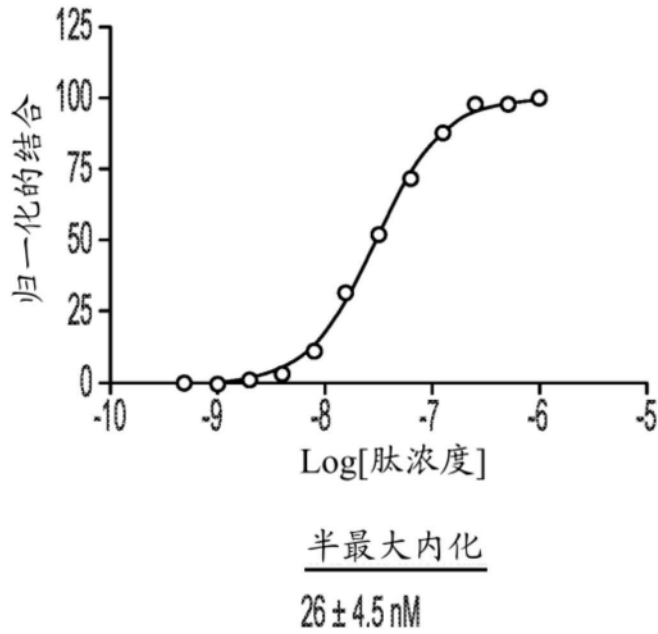


图3

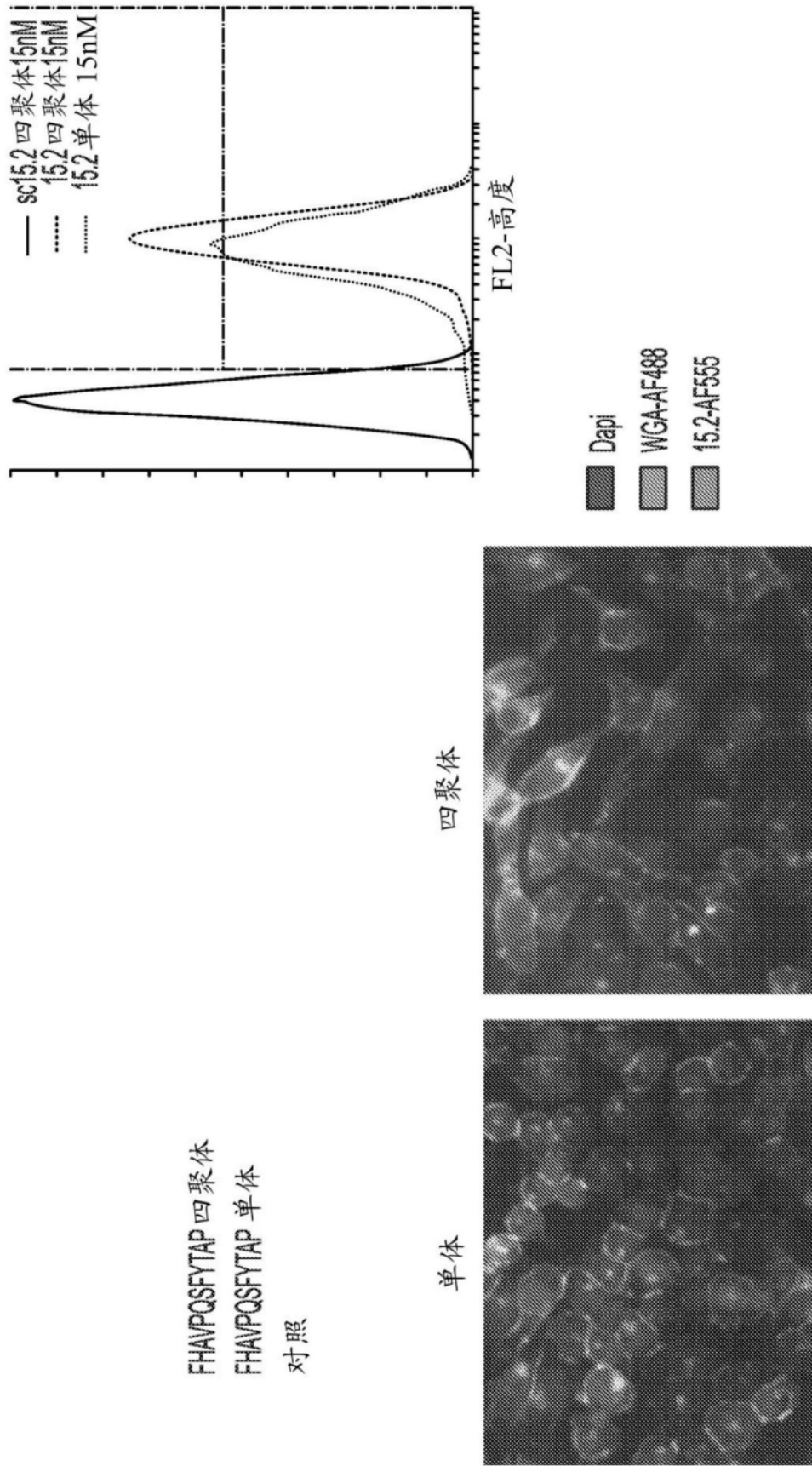


图4

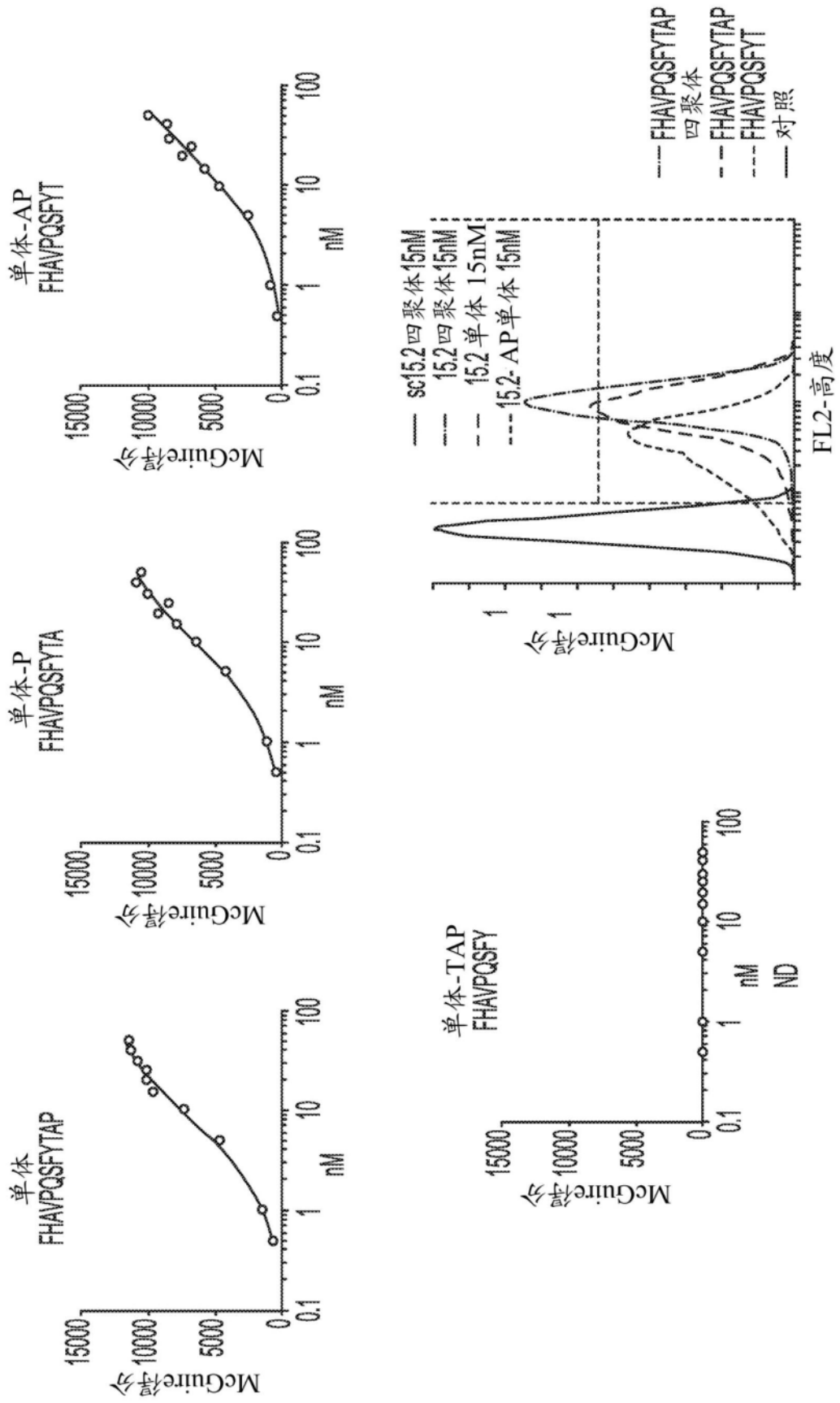


图5

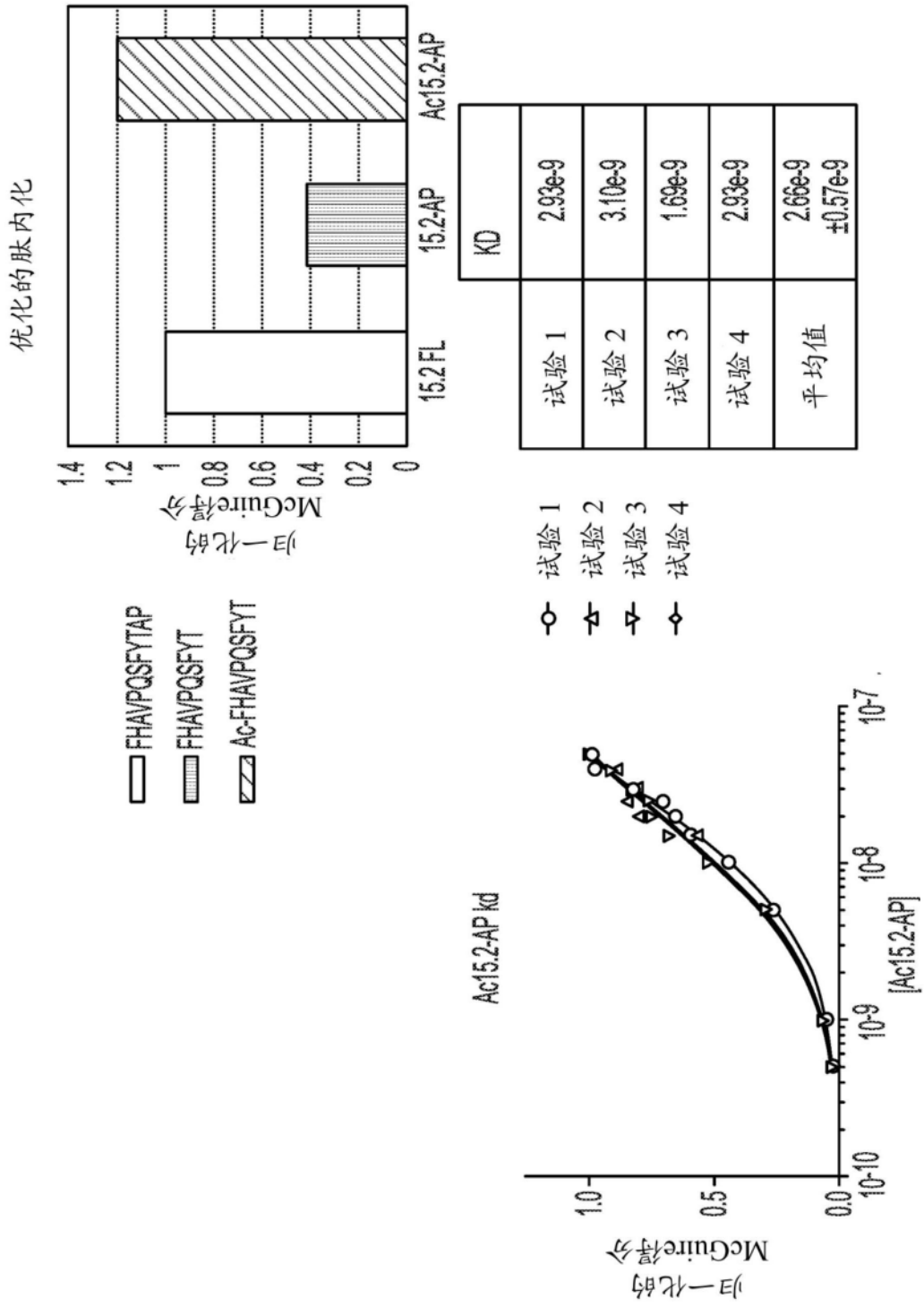


图6

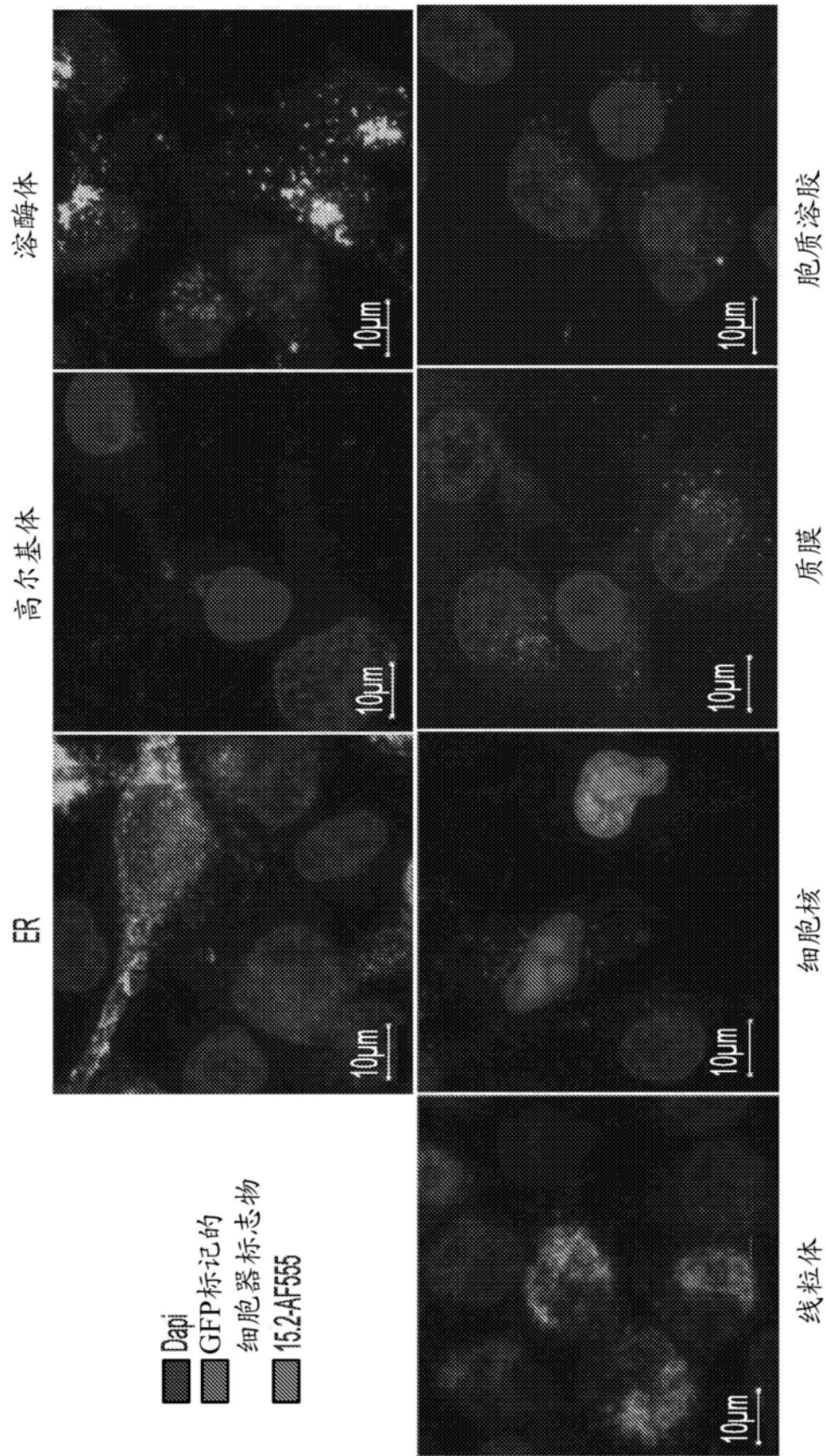


图7

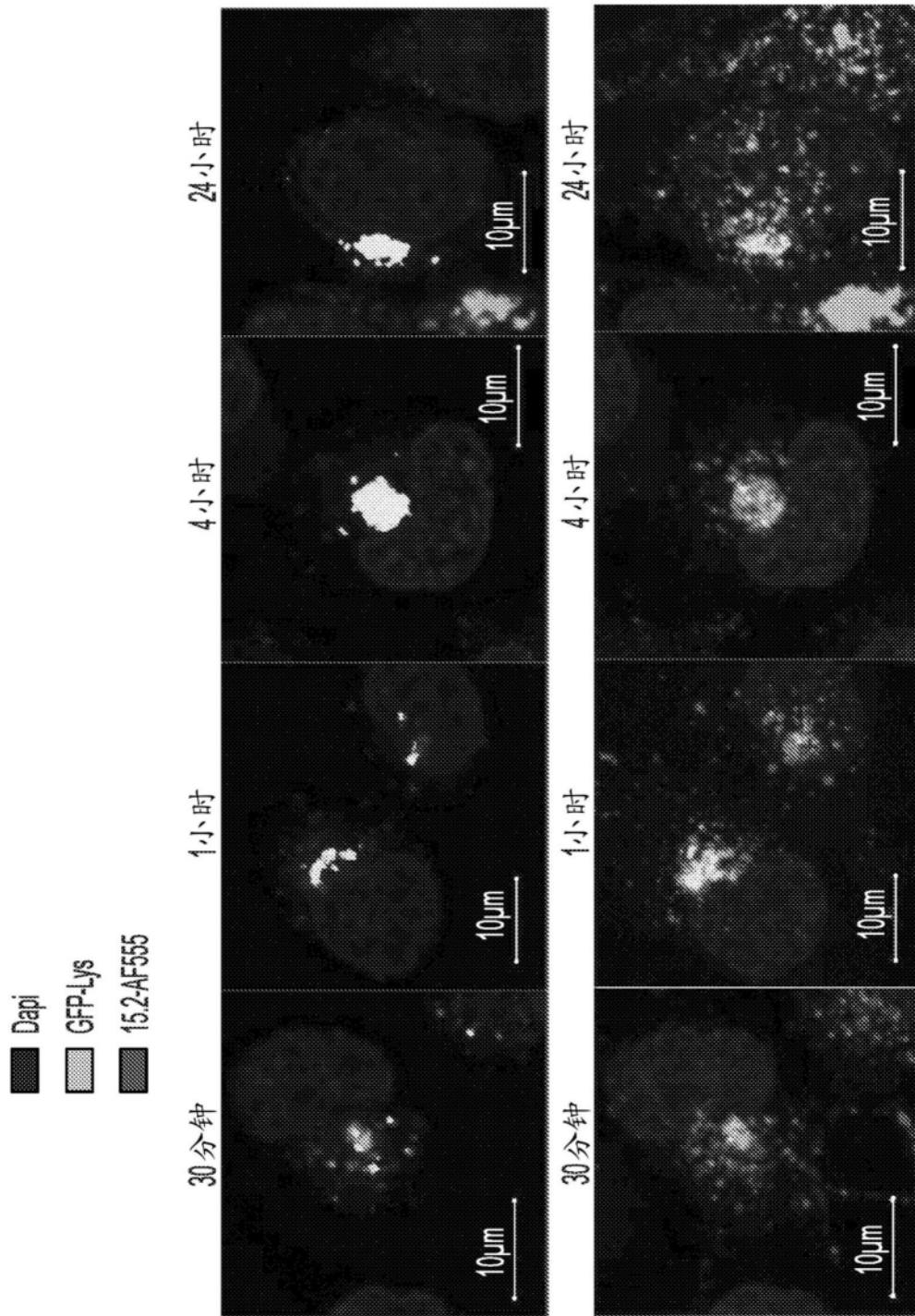


图8

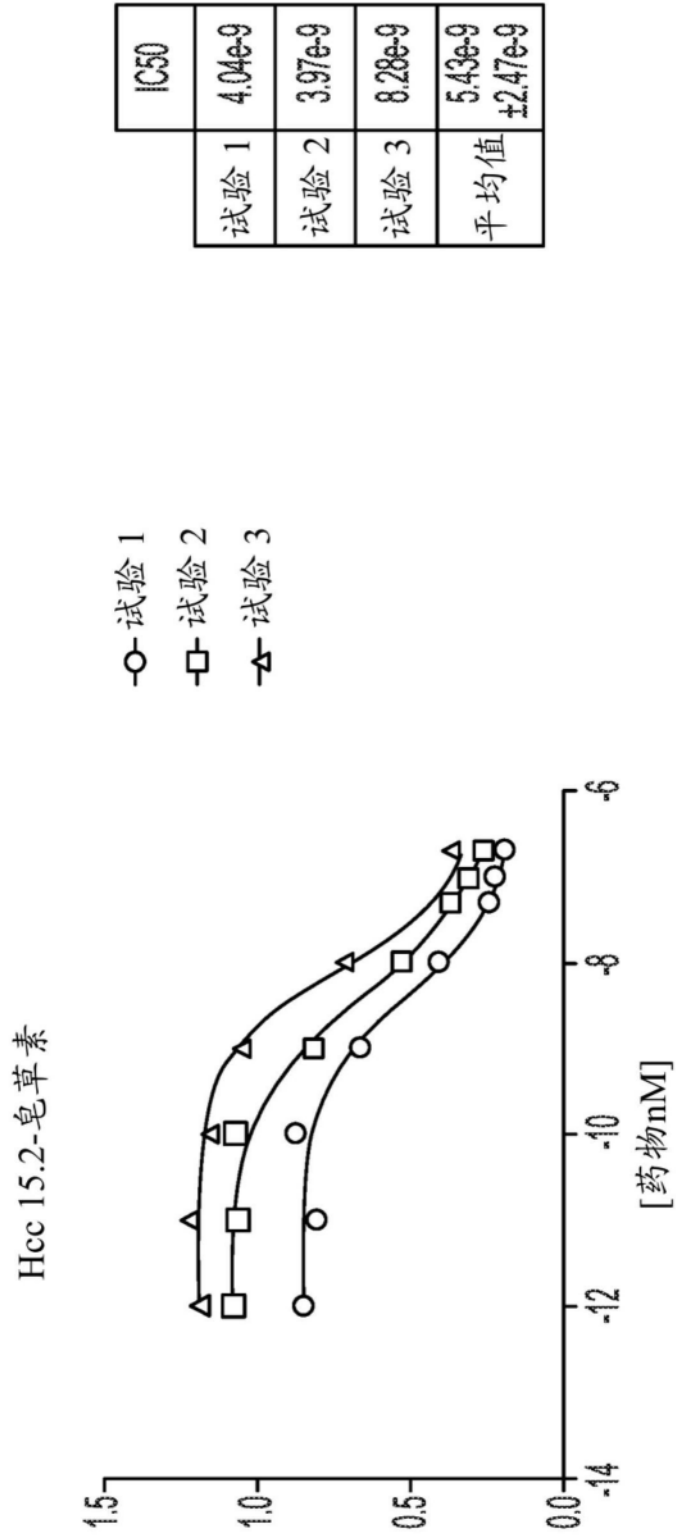


图9

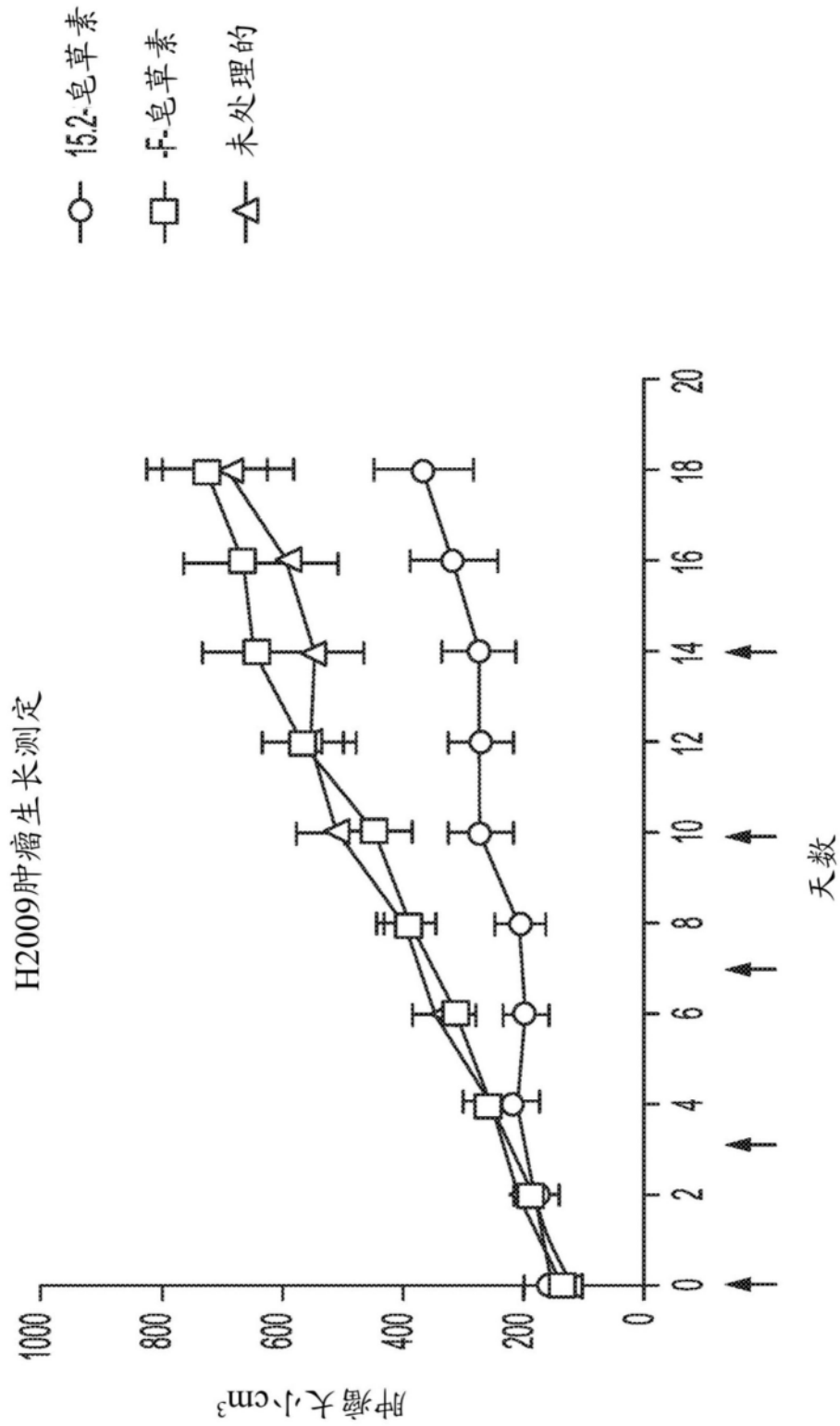


图10

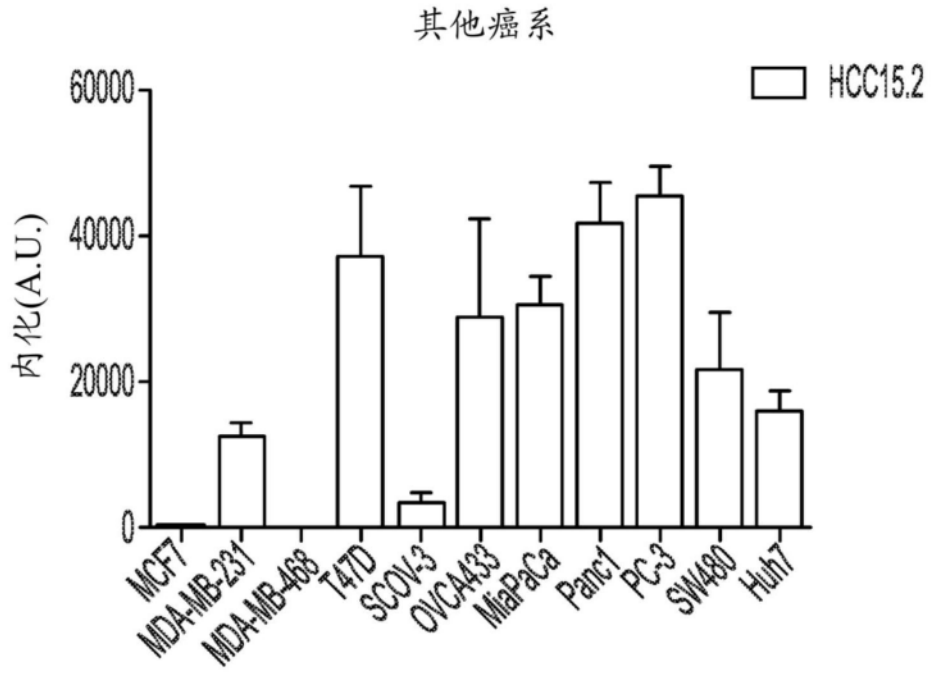


图12

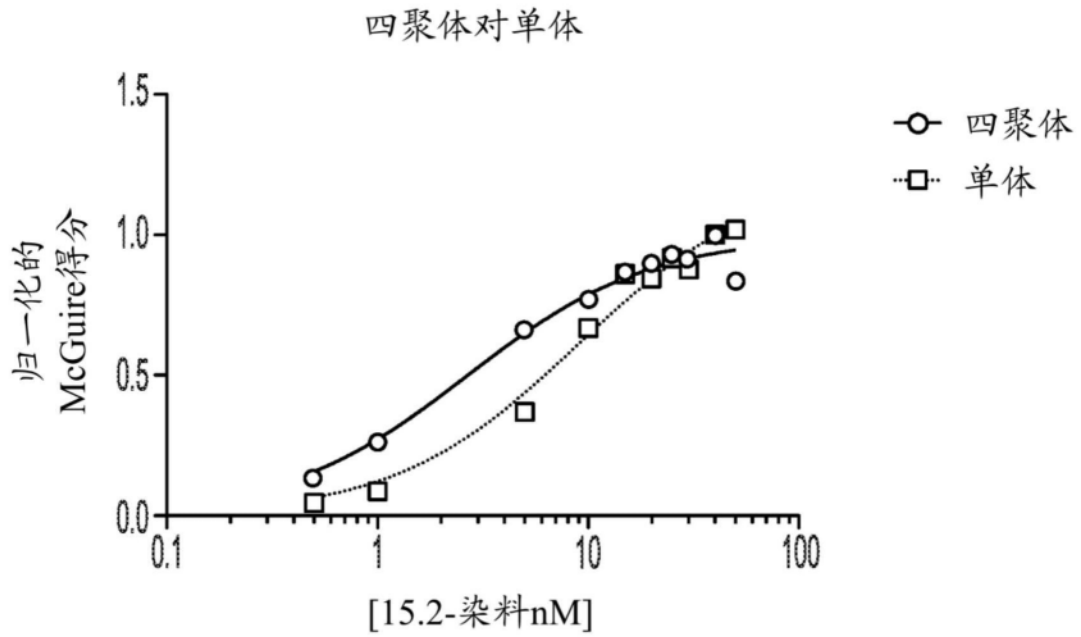


图13

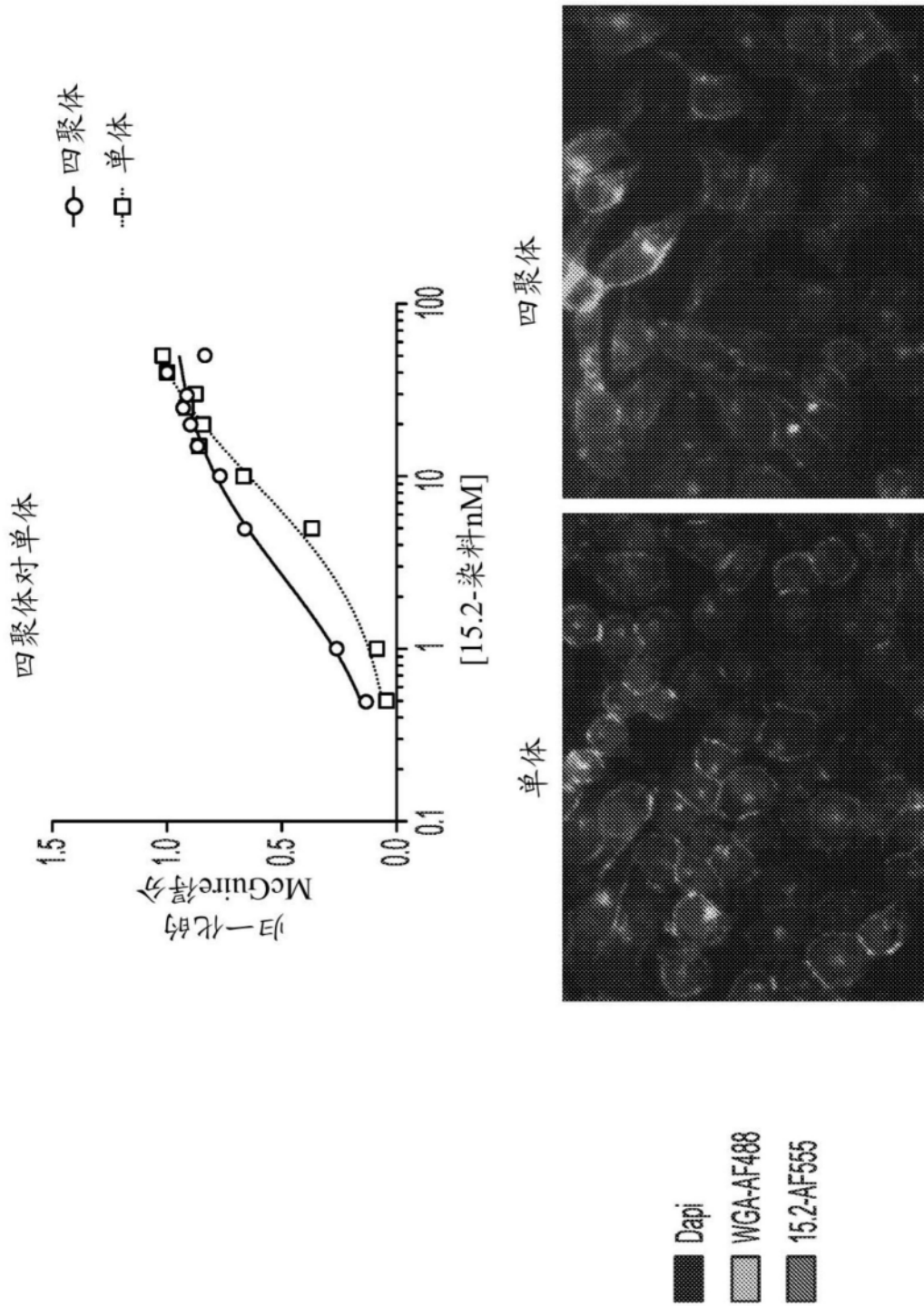


图14

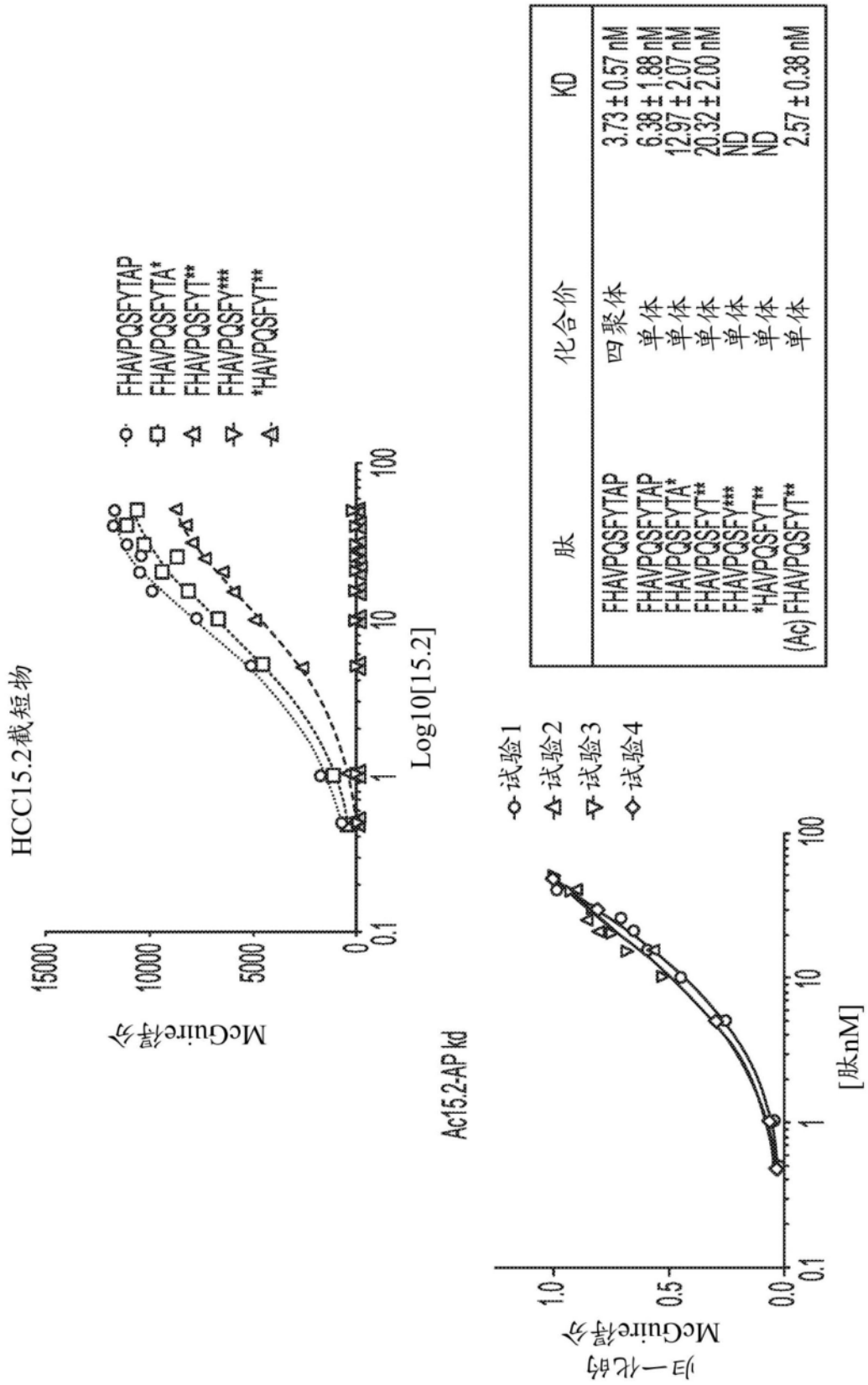
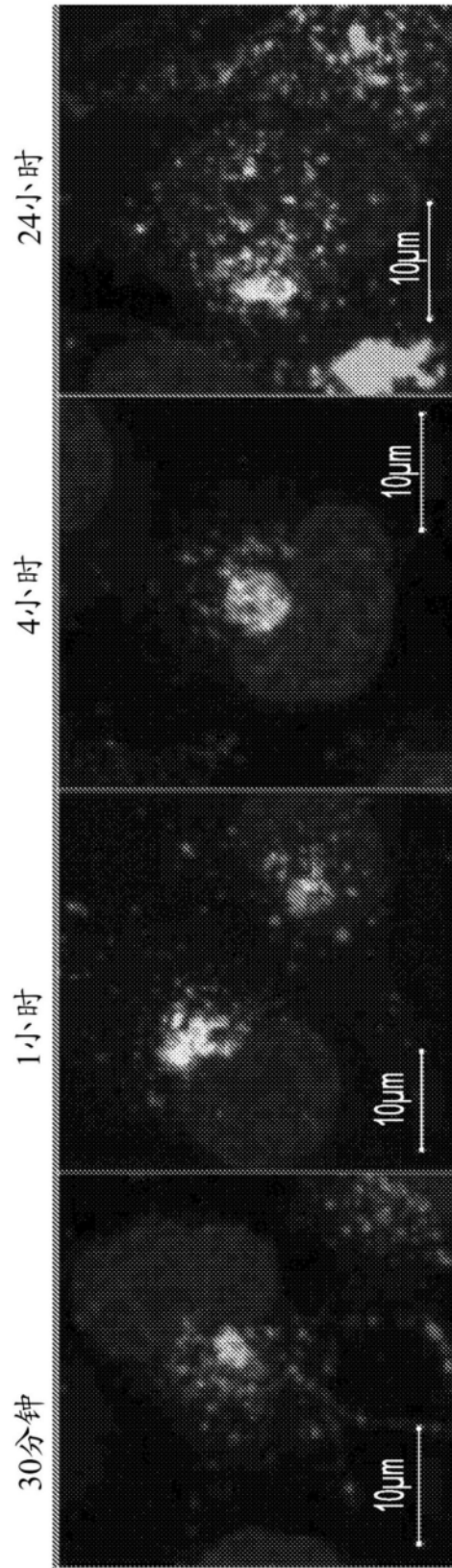


图15



最大
投影

图16续

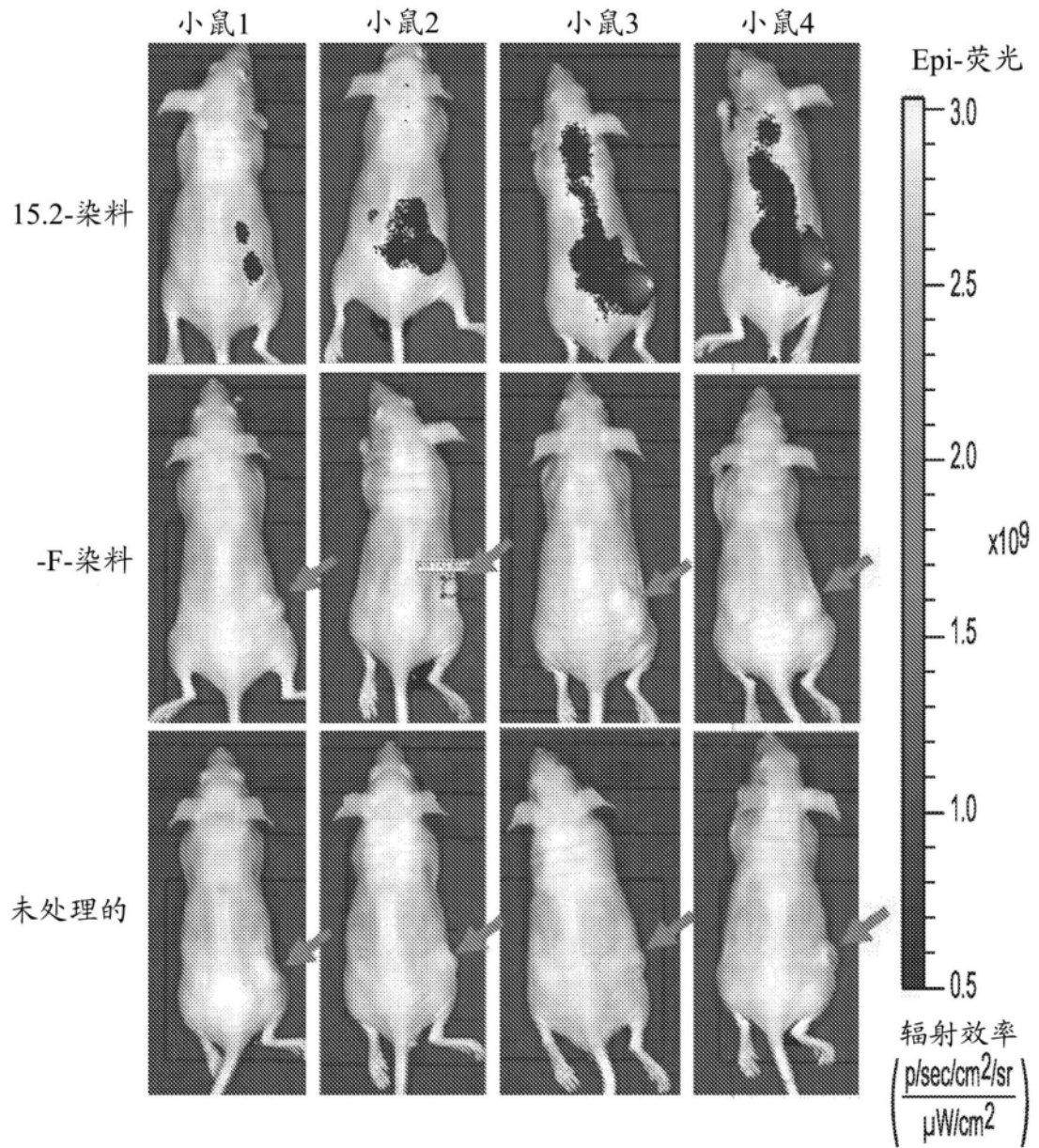


图17

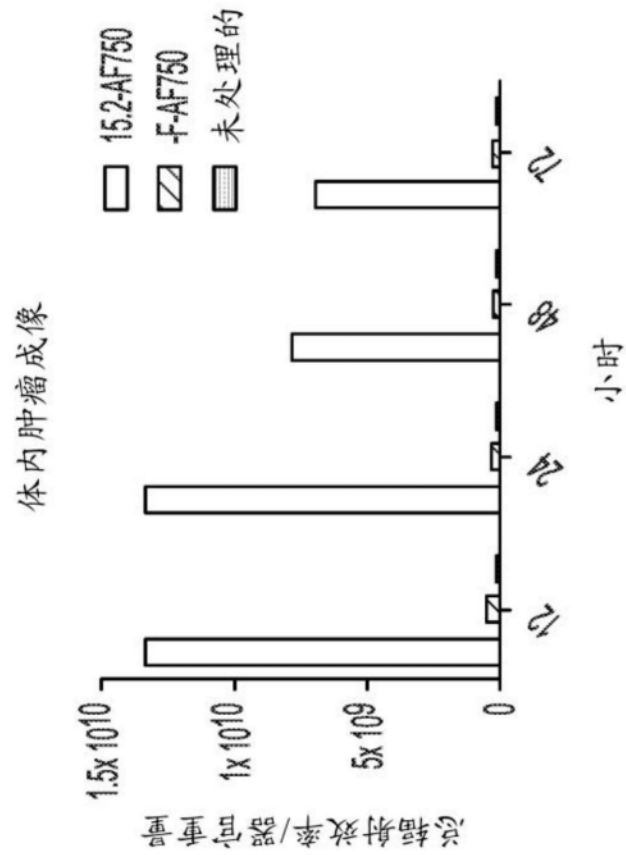
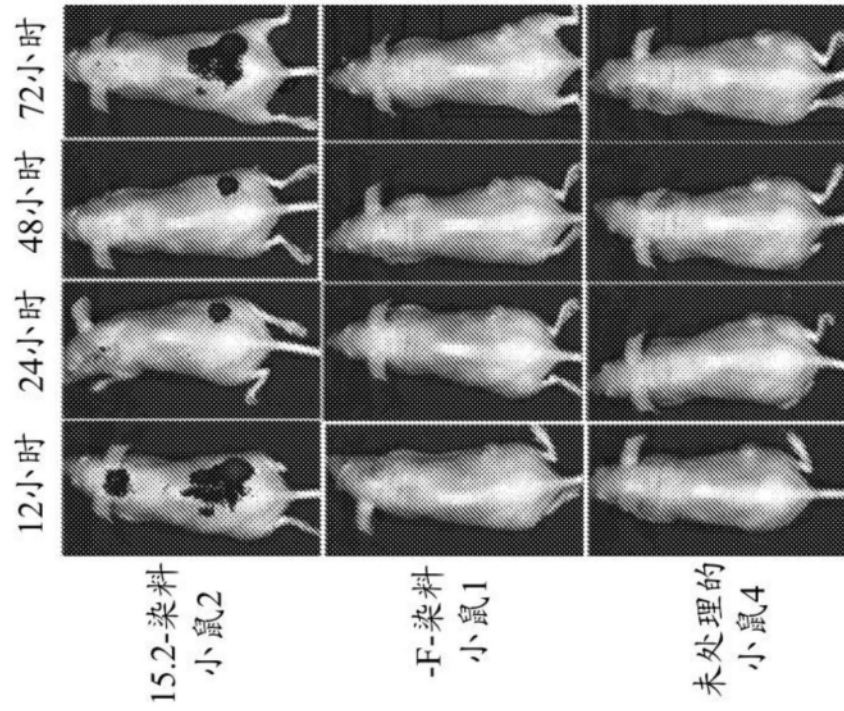


图18

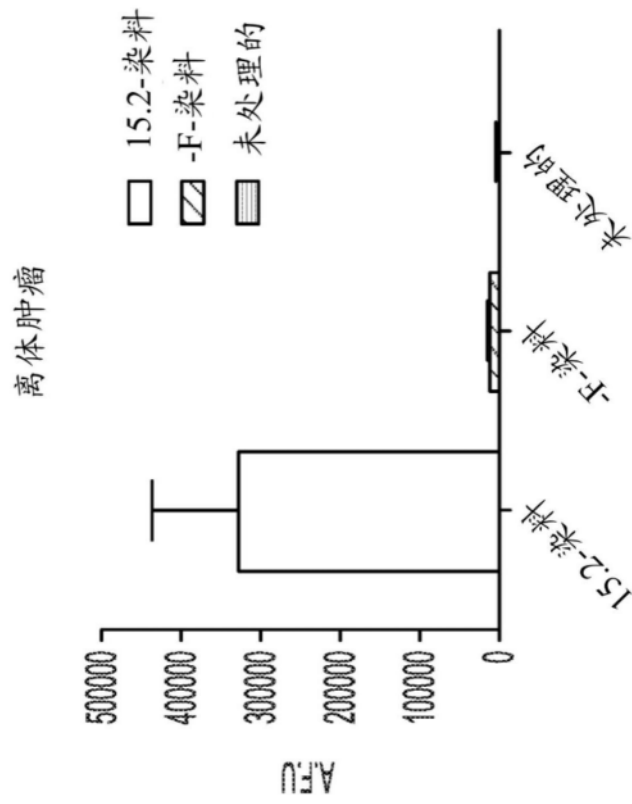
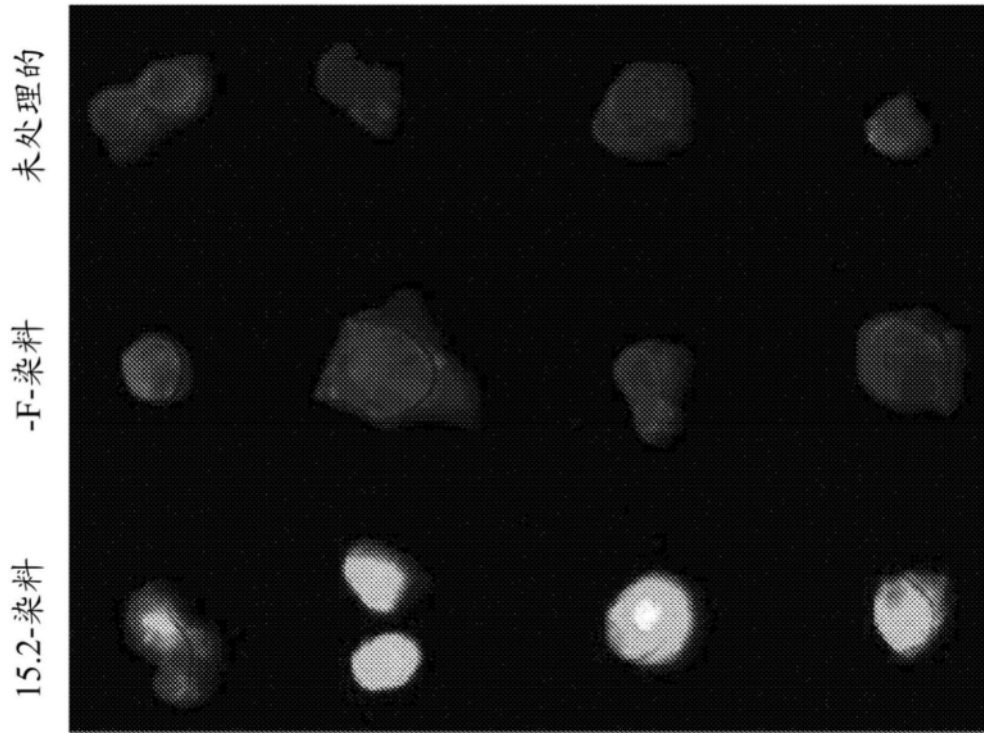


图19

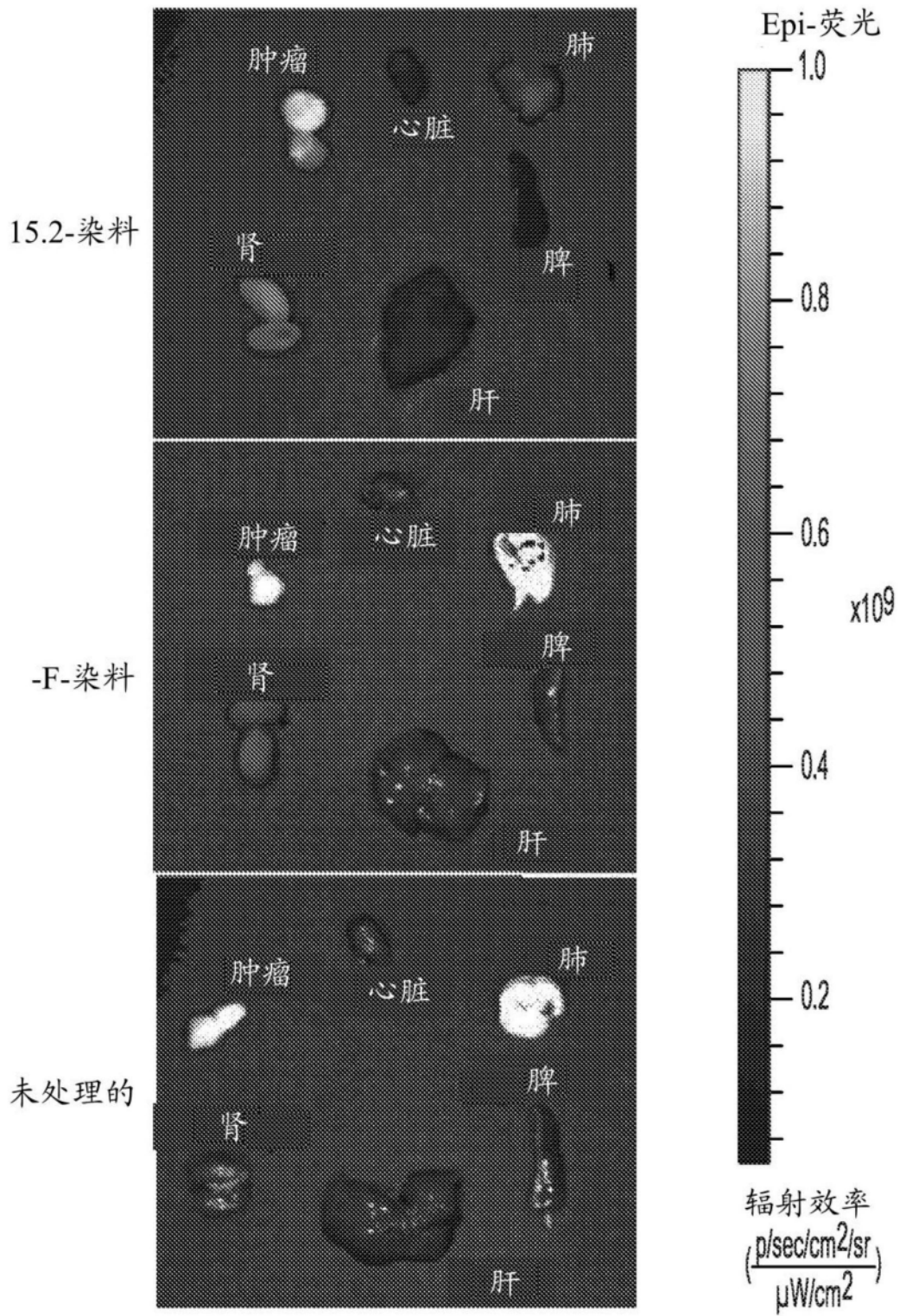


图20

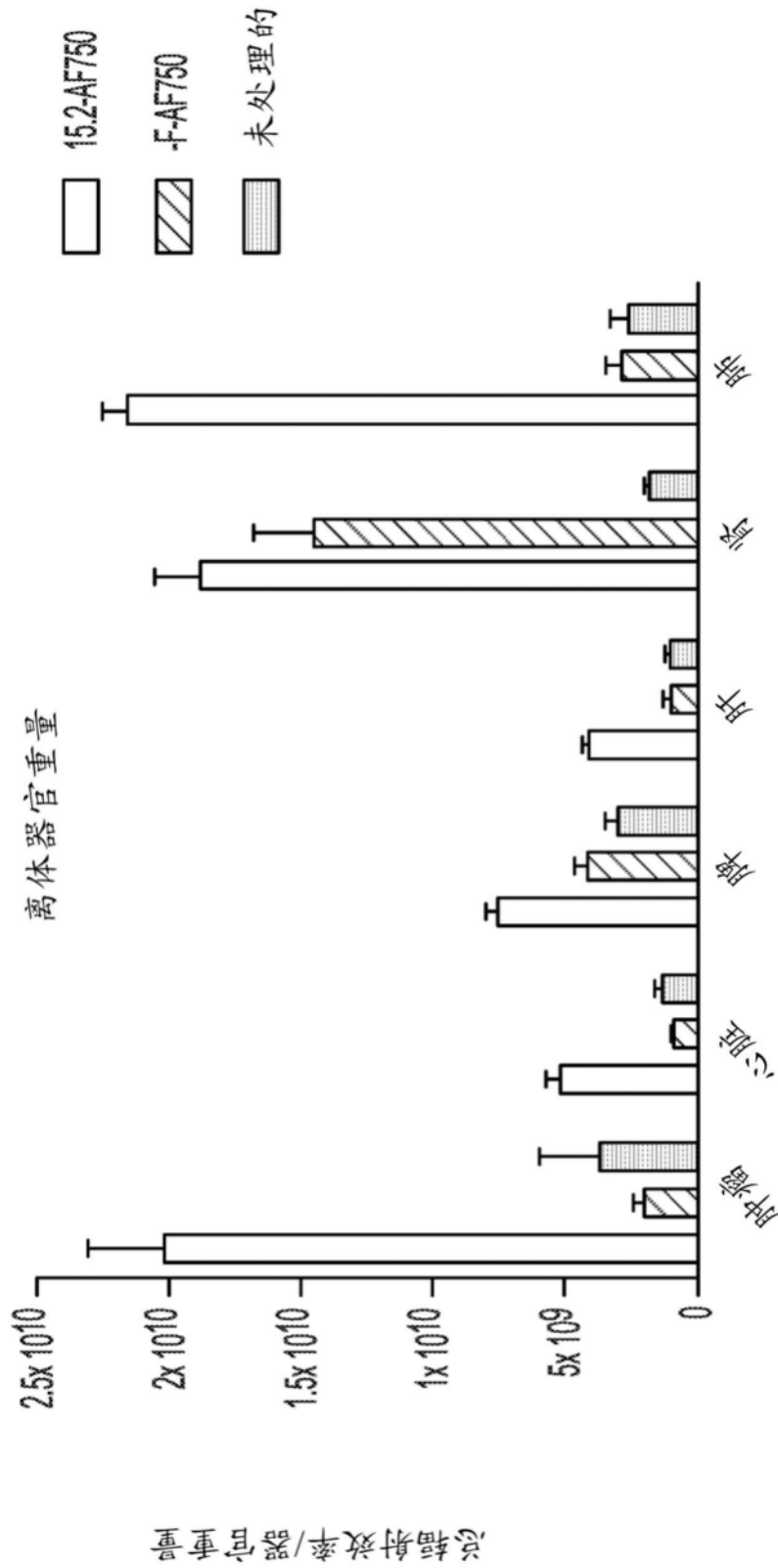


图20续

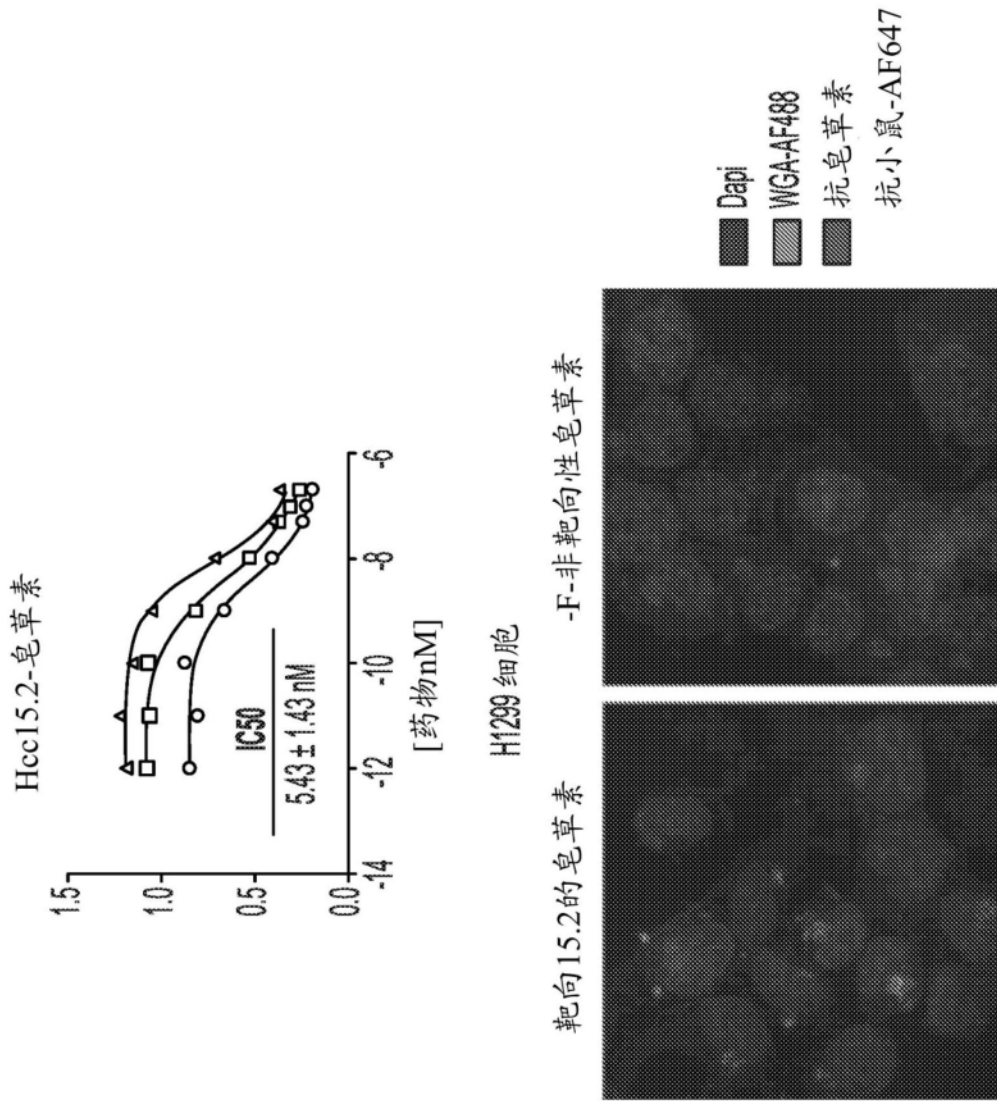


图21

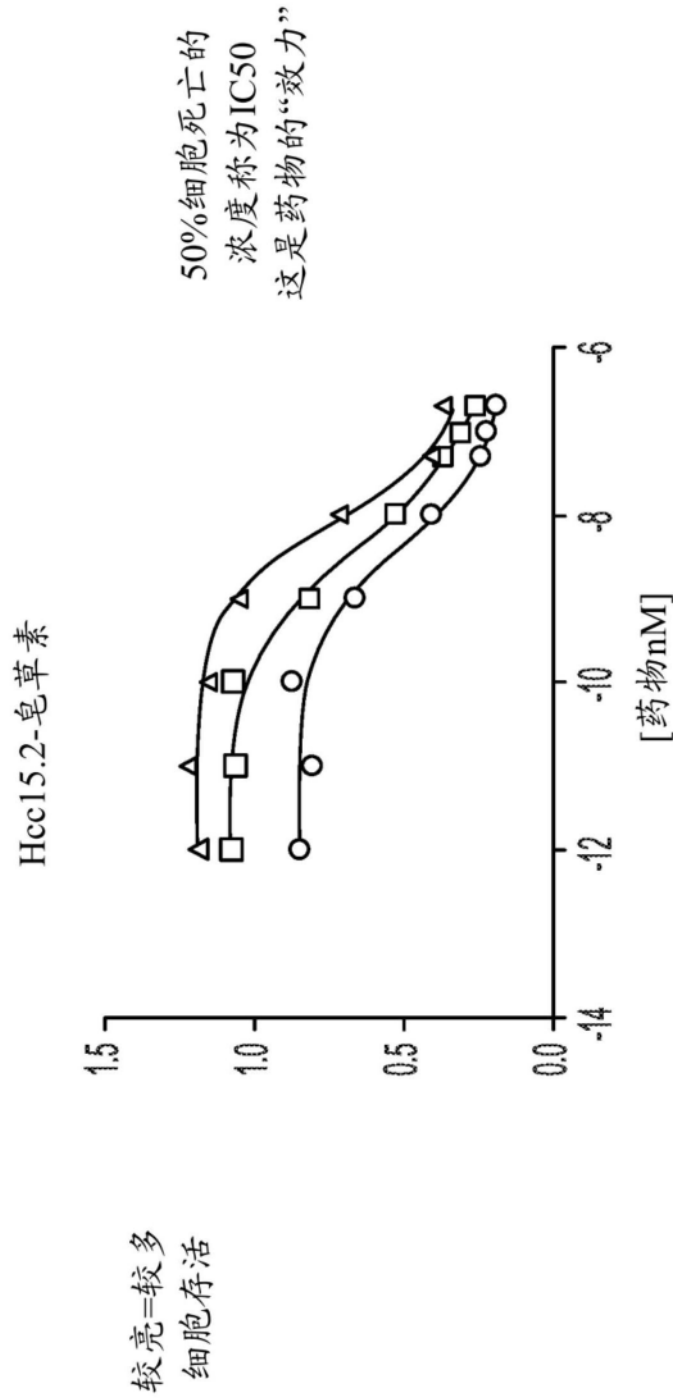


图22

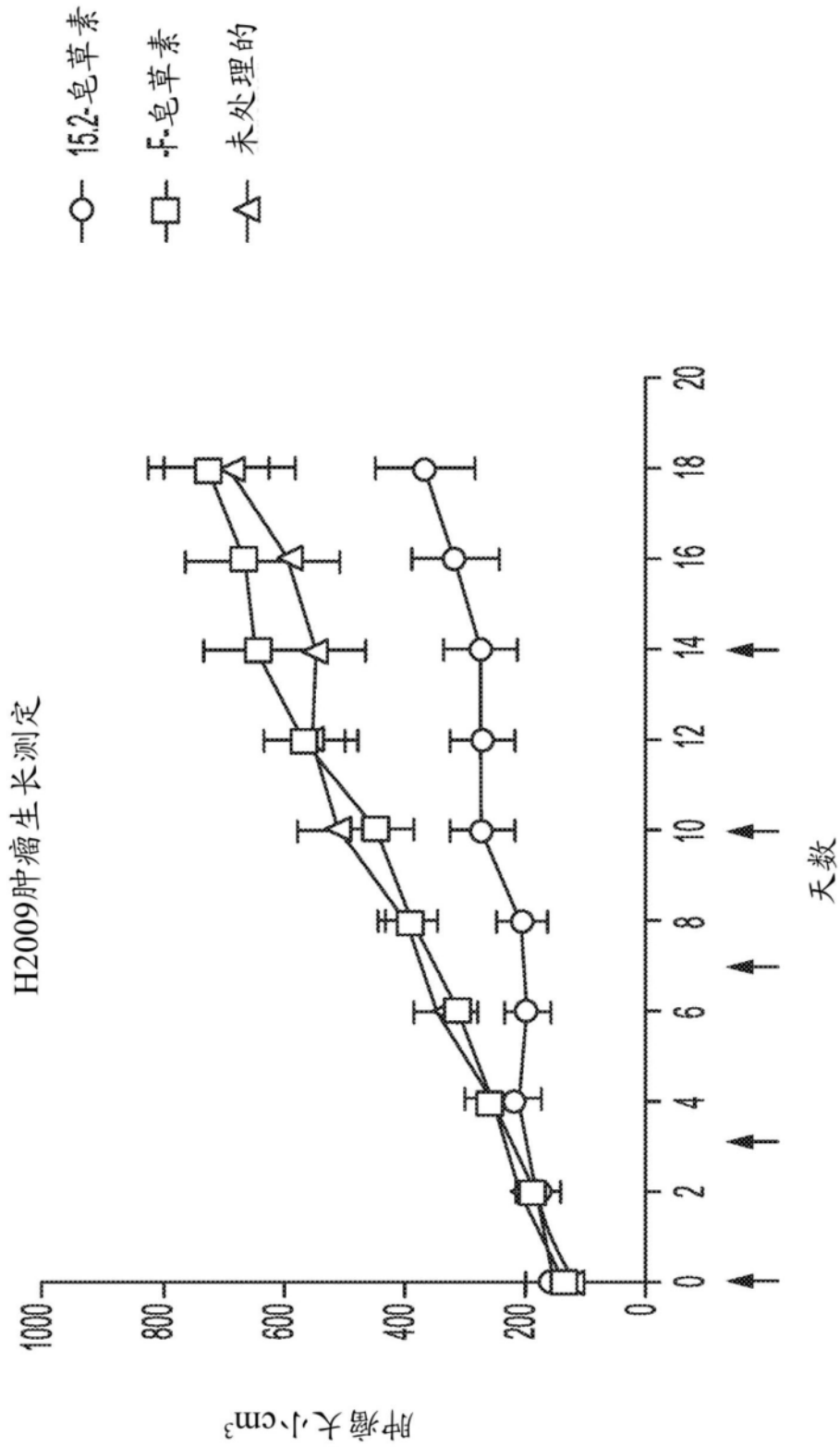


图23

鉴定的MGS			
适应症	靶向的细胞类型	MSG代码和细胞定位	递送的有效负载
癌和实体肿瘤	人非小细胞肺癌细胞	MGS_H1299.1_细胞内 MGS_H1299.2_细胞内 MGS_H1299.3_自噬体 MGS_H2009.1_高尔基体 MGS_H2009.2_溶酶体 MGS_H2009.3_溶酶体 MGS_H2009.4_高尔基体/ER MGS_H2009.5_ER/溶酶体 MGS_H1993.1_溶酶体 MGS_H1993.2_细胞内 MGS_H1993.3_细胞内 MGS_H1993.4_仅有丝分裂前细胞 MGS_H1993.5_细胞内 MGS_H1993.6_细胞内 MGS_H460.1_质膜 MGS_HCC15.1_细胞内 MGS_HCC15.2_溶酶体 MGS_A549.1_细胞内 MGS_HCC95.1 MGS_H1155.1 MGS_H1155.2 MGS_H1666.1	<ul style="list-style-type: none"> ● 单克隆抗体 ● 小分子治疗剂 (阿霉素、紫杉醇、DM1、鹅膏蕈碱、奥瑞他汀和倍癌霉素) ● 荧光团 ● 纳米粒子(脂质体、胶束、量子点、SPIO) ● 显像剂(PET、NIR、MR) ● 肽和蛋白质 ● 蛋白质毒素 ● 抗原性肽 ● 基于珠粒的捕获

图24

淋巴瘤和白血病	淋巴瘤细胞	MGS_A20.1_质膜 MGS_A20.2_质膜 MGS_PCM1_质膜	<ul style="list-style-type: none"> ● 蛋白质 ● 荧光团 ● 基于珠粒的捕获
疫苗开发	树突状细胞	MGS_XS52.1_细胞内 MGS_XS52.3_细胞内	<ul style="list-style-type: none"> ● 脂质体 ● DNA ● 蛋白抗原 ● 荧光团
糖尿病	胰岛的β细胞	MGS_RII.1 MGS_RII.2	<ul style="list-style-type: none"> ● 蛋白质 ● 放射性核素
病原体感染的细胞	精氨酸支原体感染的细胞	MGS_MArg.1_细菌	<ul style="list-style-type: none"> ● 荧光染料 ● 基于珠粒的捕获
心血管疾病	心肌细胞	MGS_PCM.1_细胞内	<ul style="list-style-type: none"> ● DNA ● 荧光团
<p>1. 细胞内指示已确认细胞摄取，但尚未确定精确的细胞内区室。 2. 没有定位信息的MGS指示已确认细胞结合但不确定细胞定位。 3. 蓝色突出显示的肽已显示出在动物模型中归巢(home to)至其靶细胞。 4. 靶向NSCLC的肽还与源自其他器官部位的癌症结合，如胰腺癌、结肠直肠癌、乳腺癌和卵巢癌。</p>			

图24续

在SRI分离出的新靶向肽(MGS)					
肽 代码	细胞定位	序列	化合价	癌症特异性	
H1299.4	溶酶体	EHPWFNMWSWATQVQEKKK	四聚体	10倍	
H2009.2	溶酶体	YPGSPTQYPSSMHEYHSSE	四聚体	进行中	
H2009.3	高尔基体/ER	AHTIDDEWASYHMQQWNSPP	四聚体	进行中	
H2009.4	ER/溶酶体	NLADTWTQTQQHDFHVLRT	四聚体	进行中	
H1993.1	溶酶体	SVEYWGEMYYDVMSLGFSS	四聚体	30倍	
H1993.2	细胞内	FAAKRAEWNDPQQLWDVWVN	四聚体	70倍	
H1993.3	细胞内	QEALEEWFVKMMPWSPSGQ	四聚体	2900倍	
H1993.4	有丝分裂前细胞	TWTFGQWPWPFGAEGTRAF	四聚体	600倍	
H1993.5	细胞内	MDGATWWTQLDLLVWEGET	四聚体	20倍	
H1993.5	细胞内	SADWFGQPAEWLLEGWVGPL	四聚体	30倍	

图25

SRI的新靶向肽的结合图谱

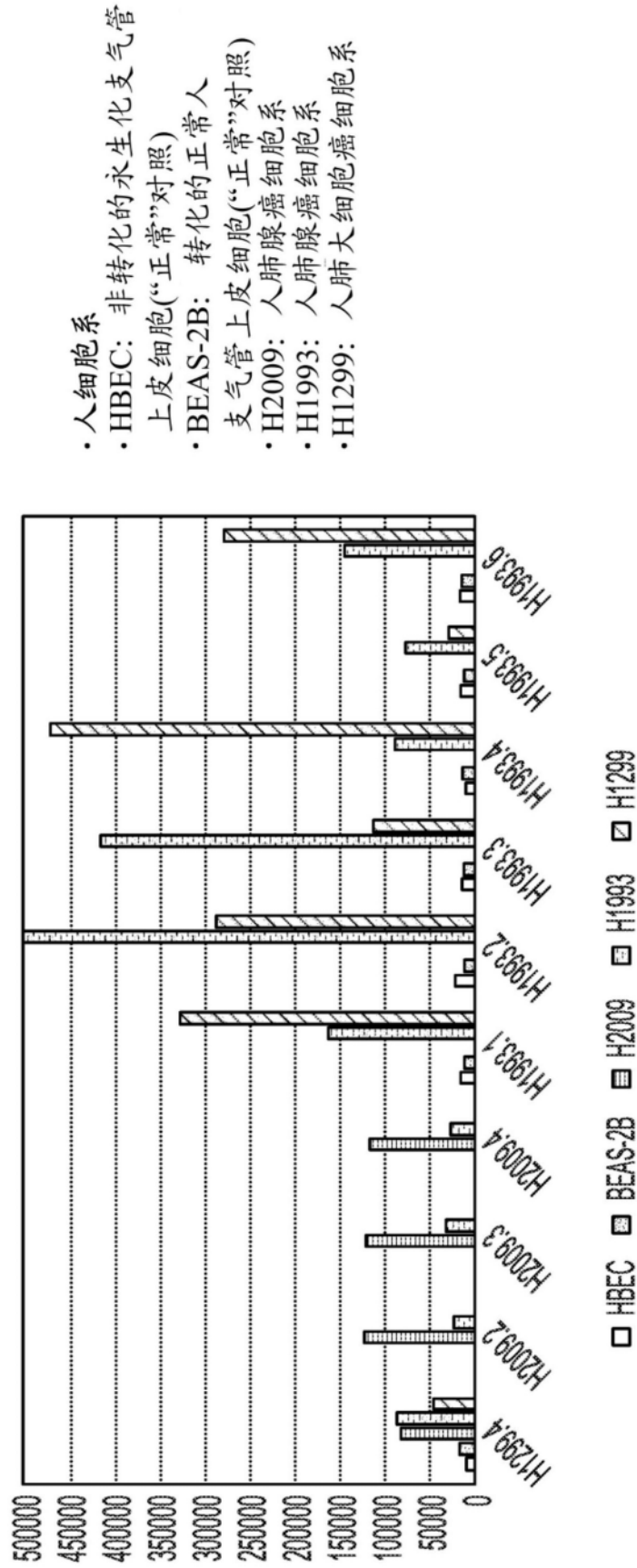


图25续

	起始序列	当前序列	化合价	对靶细胞的半最大结合	血清稳定性	^b 癌症特异性	亚细胞定位	体内验证
aH2009.1	RGDLATLRQLAQED GVGVR	Ac-D-Leu-RGDLATLRQL	二聚体	17 nM	在12H时>99%完整		高尔基体	是
H1299.2	YAAWPASGAWTGT APCSAGT	Ac-YAAWPASGAWT	二聚体	3.4 nM			内化	
cH1299.3	LQWRRDDNVHNFV VWARYRL	Ac-LQWRRNFGVWARYRL	二聚体			>250倍	自噬体	是
HCC15.1	ATEPRKQYATPRVF WTDAPG	Ac-KQYATPRVFWT	二聚体	5.6 nM			内化	
HCC15.2	FHAVPQSFTAP	Ac-FHAVPQSFT	单体	2.7 nM			溶酶体	是

- a. 我们应进一步讨论这种肽
- b. 相对于正常对照细胞; HBEC, 我们知道优化的肽仍显示出特异性, 但是不清楚相对于HBEC细胞系的数值, 这些正在进行中
- c. 与2015年12月17日提交的SRI PCTI/US15/66519相关

图26

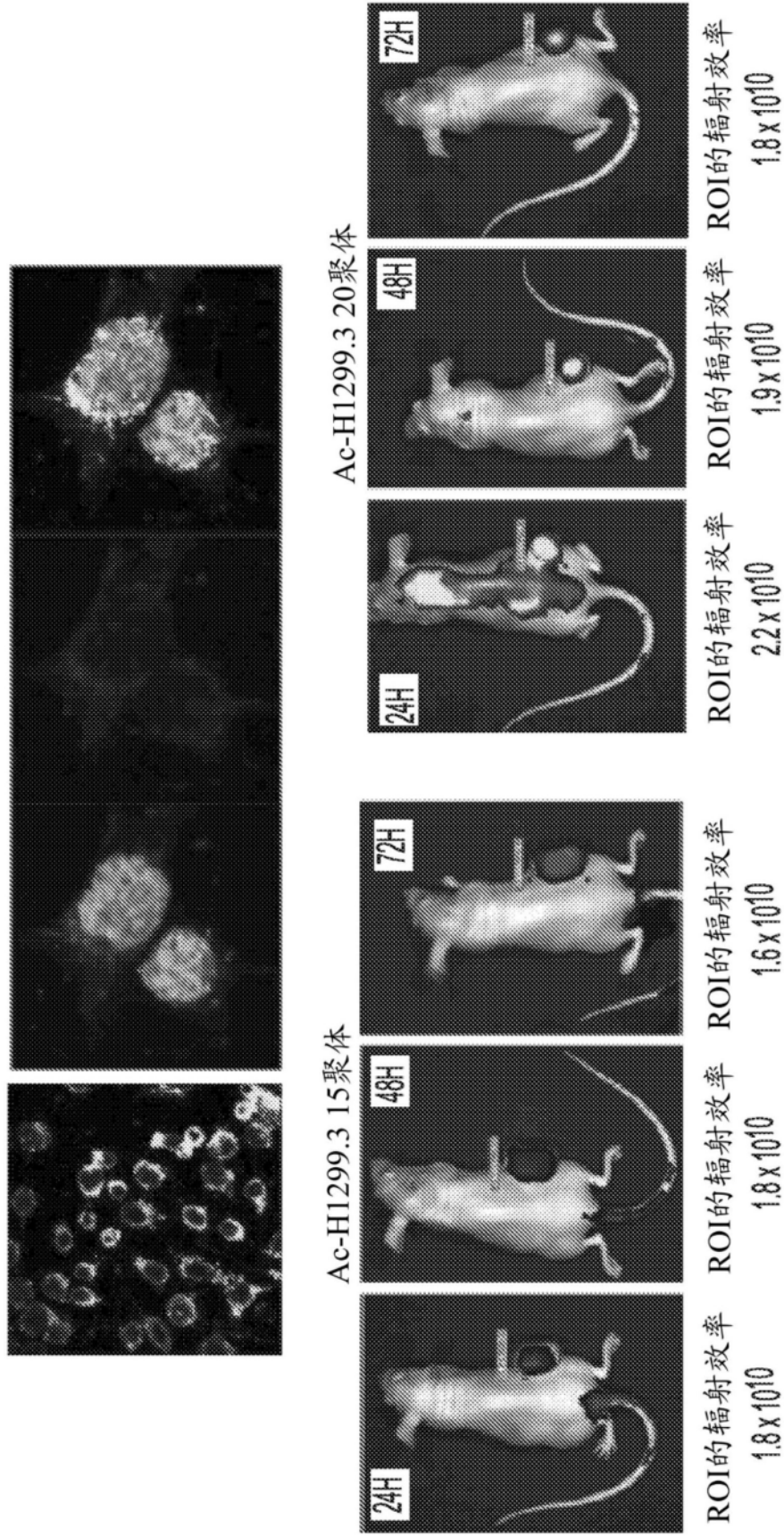


图27

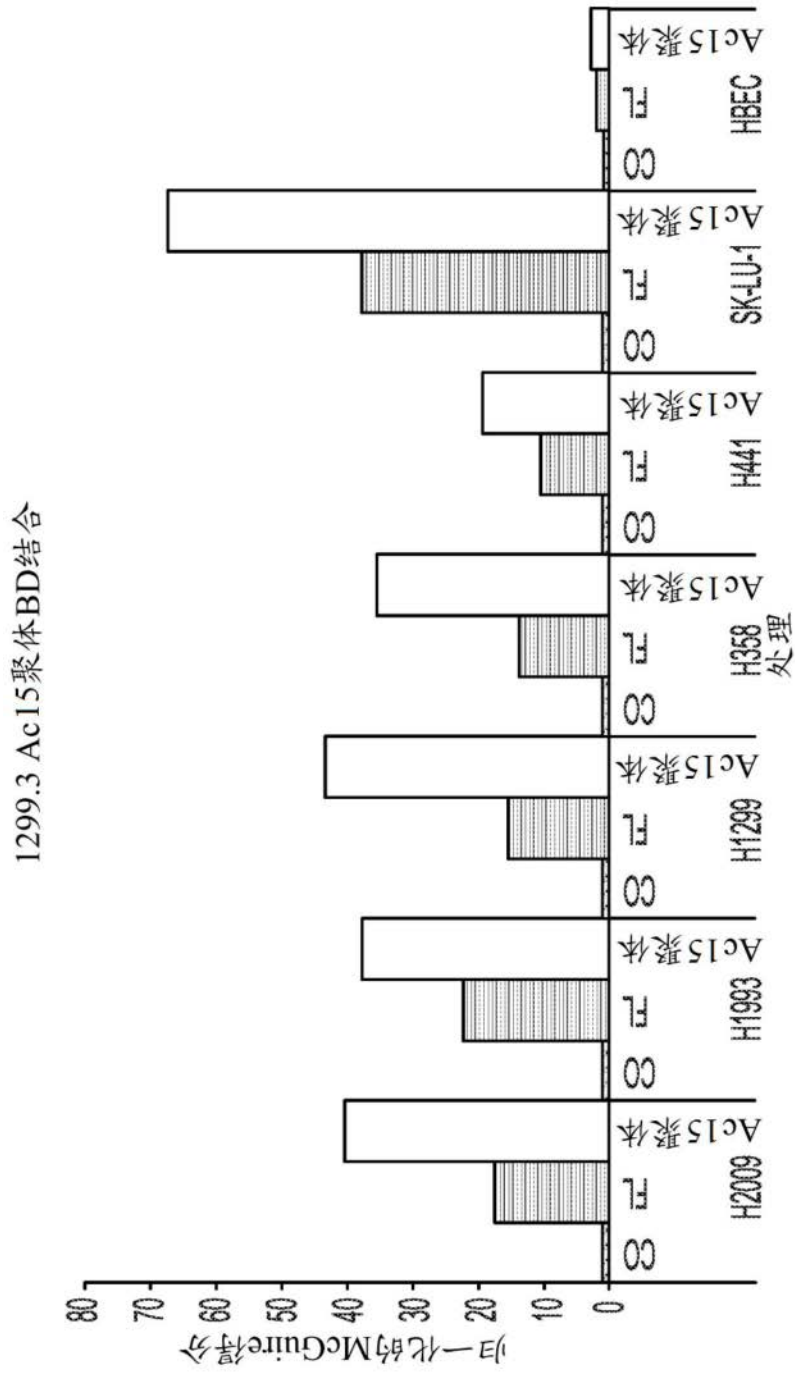


图28

皂草素递送		
MGS	细胞系	IC50
H2009.1	H2009	1.8 nM
H1299.2	H1299	2.3 nM
H1299.3	H1299	840 nM
HCC15.1	H1299	2.5 nM
HCC15.2	H1299	4.6 nM
H1299.4	H2009	84 nM

图29

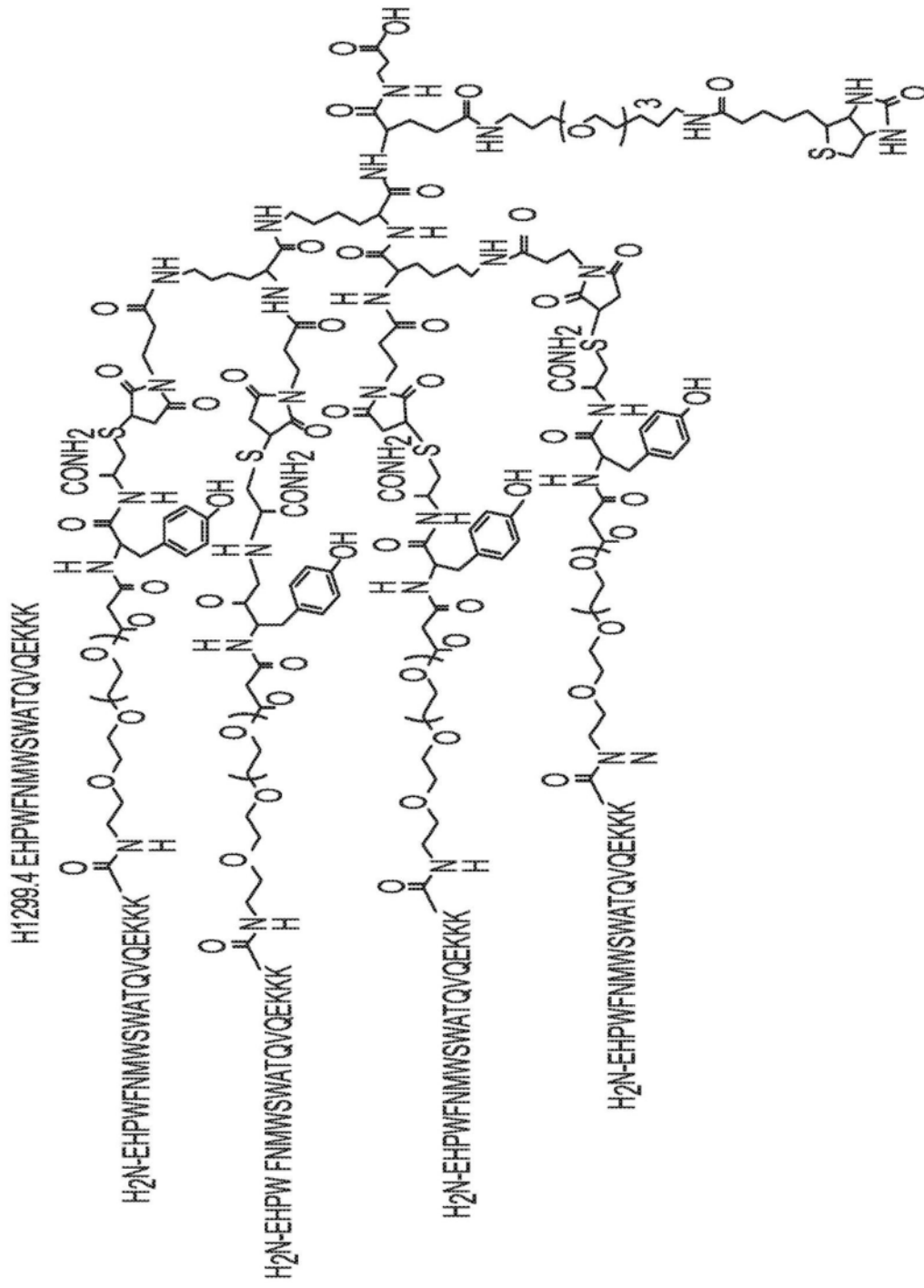
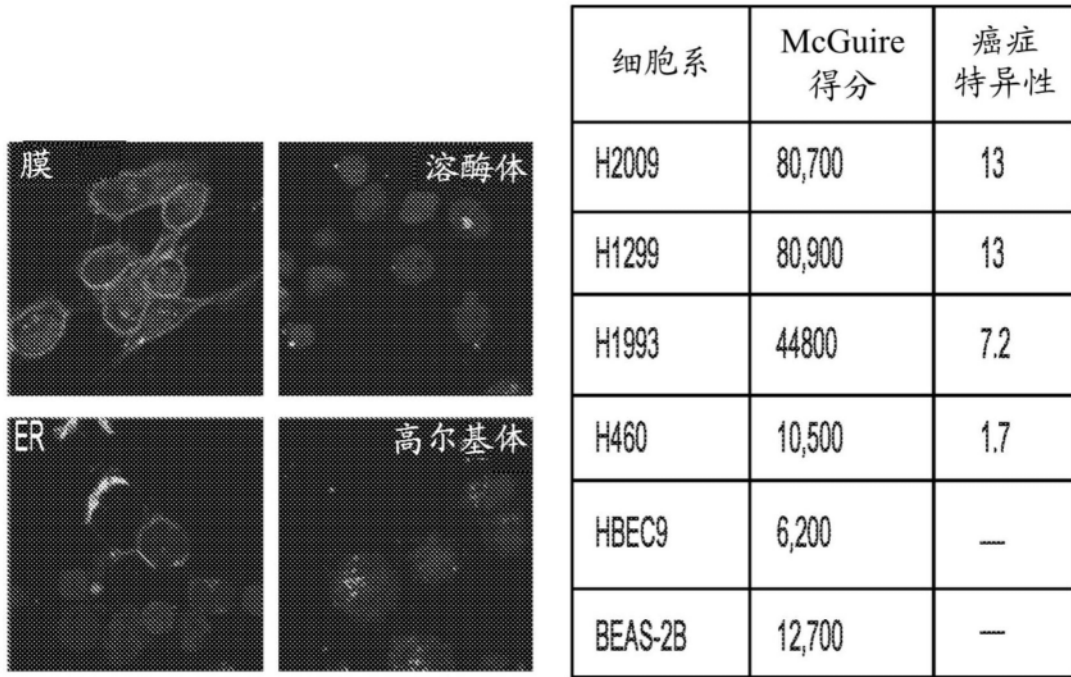
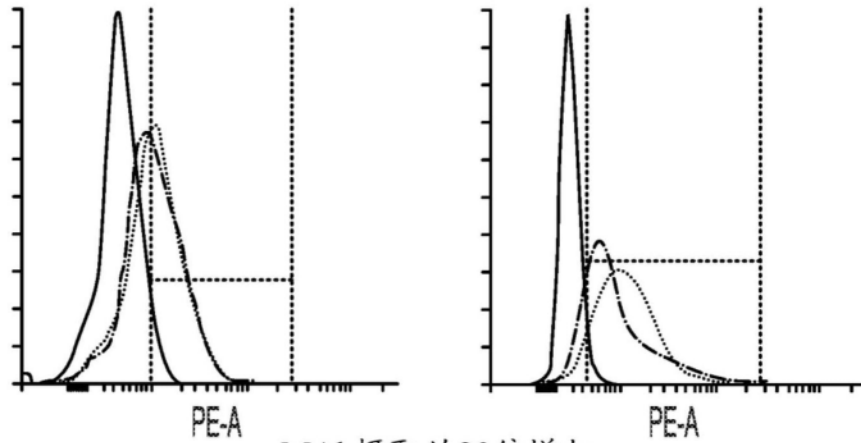


图30



— SUSAN H1993 CELL_PE_001.fcs — 0716 SUSAN H2009 CELL_PE_001.fcs
 SAN H1993 CELL_20091_002.fcs 6 SUSAN H2009 CELL_20091_002.fcs
 - - - SAN H1993 CELL_K3TB_004.fcs - - - USAN H2009 CELL_K3TB AW_010.fcs



MAb摄取的20倍增加
皂草素递送

图30续