

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 9/127 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680016591.5

[43] 公开日 2009年3月18日

[11] 公开号 CN 101389314A

[22] 申请日 2006.3.14

[21] 申请号 200680016591.5

[30] 优先权

[32] 2005.3.14 [33] US [31] 60/661,680

[32] 2005.12.22 [33] US [31] 60/753,632

[86] 国际申请 PCT/US2006/009044 2006.3.14

[87] 国际公布 WO2007/149062 英 2007.12.27

[85] 进入国家阶段日期 2007.11.14

[71] 申请人 得克萨斯大学体系董事会

地址 美国得克萨斯

[72] 发明人 J·林 R·B·阿林豪斯 孙 彤

L·X·冀 B·奥兹伯拉特

G·洛佩兹-波雷斯泰因

J·A·罗斯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 陈轶兰

权利要求书6页 说明书79页 序列表4页  
附图26页

[54] 发明名称

生物活性 FUS1 肽和纳米颗粒-多肽复合物

[57] 摘要

包含生物活性多肽结合纳米颗粒的纳米颗粒-多肽复合物,其中通过添加促进细胞摄入蛋白质的化学部分,修饰生物活性多肽。所述多肽可以是蛋白质或肽。在有些实施方案中,蛋白质或肽的氨基酸序列源自肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列。

1. 纳米颗粒-多肽复合物, 其包含:

- a) 生物活性多肽, 结合
- b) 纳米颗粒,

其中通过添加促进细胞摄入所述多肽的化学部分, 修饰所述生物活性多肽。

2. 权利要求 1 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述多肽是肽。

3. 权利要求 2 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述肽的氨基酸序列源自肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列。

4. 权利要求 3 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述肿瘤抑制基因是在表 4 中列出的基因, 促凋亡基因, 或细胞毒性基因。

5. 权利要求 1 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述生物活性肽是 FUS-1 肽, 触角同源异型框基因 (Antp) 肽, HIV Tat 肽, 疱疹病毒 VP22 肽, 模型两亲肽, transportan 肽, SV 40 T 抗原肽, 或内源性抗微生物多肽 I 肽。

6. 权利要求 5 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述生物活性肽是 FUS-1 肽。

7. 权利要求 5 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述 FUS-1 肽包含 SEQ ID NO: 1。

8. 权利要求 5 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述 FUS-1 肽是 SEQ ID NO: 1。

9. 权利要求 5 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述生物活性肽包含 KLALKLALKALKAALKLA (SEQ ID NO: 2), RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 3), GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 4), MGLGLHLLVLAALQGAWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 5), GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 6), GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 7), RGGRLSYSRRRFSTSTGR (SEQ ID NO: 8) 或 RRLSYSRRRF (SEQ ID NO: 9)。

10. 权利要求 9 的纳米颗粒-多肽复合物,其中所述生物活性肽包含 KLALKLALKALKAALKLA (SEQ ID NO: 2)。

11. 权利要求 3 的纳米颗粒-多肽复合物,其中所述肽包含肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列的功能域。

12. 权利要求 3 的纳米颗粒-多肽复合物,其中所述肽包含肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列的预测功能域。

13. 权利要求 12 的纳米颗粒-多肽复合物,其中所述预测功能域通过对所述肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列的计算机辅助序列分析来鉴定。

14. 权利要求 1 的纳米颗粒-多肽复合物,其中所述多肽是蛋白质。

15. 权利要求 13 的纳米颗粒-多肽复合物,其中所述蛋白质的氨基酸序列源自肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列。

16. 权利要求 14 的纳米颗粒-多肽复合物,其中所述肿瘤抑制基因是在表 4 中列出的基因。

17. 权利要求 16 的纳米颗粒-多肽复合物,其中所述肿瘤抑制基因是 FUS-1。

18. 权利要求 1 的纳米颗粒-多肽复合物,其中所述纳米颗粒是基于脂质的纳米颗粒,超顺磁性纳米颗粒,纳米壳,半导体纳米晶体,量子点,基于聚合物的纳米颗粒,基于硅的纳米颗粒,基于二氧化硅的纳米颗粒,基于金属的纳米颗粒,富勒烯或纳米管。

19. 权利要求 18 的纳米颗粒-多肽复合物,其中所述纳米颗粒是基于脂质的纳米颗粒。

20. 权利要求 18 的纳米颗粒-多肽复合物,其中所述基于脂质的纳米颗粒是脂质体,中性脂质体,DOPC 脂质体或 DOTAP:胆固醇囊泡。

21. 权利要求 20 的纳米颗粒-多肽复合物,其中所述脂质体是 DOPC 脂质体。

22. 权利要求 18 的纳米颗粒-多肽复合物,其中所述纳米颗粒是超顺磁性纳米颗粒。

23. 权利要求 18 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述纳米颗粒是超顺磁性纳米颗粒, 且所述纳米颗粒-多肽复合物是在脂质体或 DOTAP: 胆固醇囊泡内。

24. 权利要求 23 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述脂质体是 DOPC 脂质体。

25. 权利要求 1 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述化学部分是脂肪酸。

26. 权利要求 25 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述脂肪酸是 C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub> 脂肪酸。

27. 权利要求 25 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述脂肪酸是硬脂酸或肉豆蔻酸。

28. 权利要求 1 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述化学部分是细胞穿透肽。

29. 权利要求 28 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述细胞穿透肽源自 HIV Tat, 疱疹病毒 VP22, 或果蝇触角同源异型框基因产物。

30. 权利要求 1 的纳米颗粒-多肽复合物, 还包含与纳米颗粒相结合的第二种生物活性多肽。

31. 权利要求 30 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中第一种和第二种生物活性多肽是生物活性肽, 各自包含源自不同肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列。

32. 权利要求 1 的纳米颗粒-多肽复合物, 还包含靶向部分, 后者将纳米颗粒-多肽复合物靶向组织或细胞。

33. 纳米颗粒-多肽复合物, 其包含:

a) 生物活性多肽, 结合

b) 纳米颗粒,

其中通过添加硬脂酸部分修饰所述生物活性多肽, 且所述纳米颗粒是 DOTAP: 胆固醇囊泡, DOPC 脂质体或超顺磁性纳米颗粒。

34. 分离的肽, 其包含:

a) 氨基酸序列 KLRRVHKNLIPQGIVKLDHPR (SEQ ID NO: 1); 或

b) 其生物活性变体。

35. 权利要求 34 的肽, 其中所述肽的长度是 10-100 个氨基酸残基。

36. 权利要求 35 的肽, 其中所述肽的长度是 10-75 个氨基酸残基。

37. 权利要求 36 的肽, 其中所述肽的长度是 10-50 个氨基酸残基。

38. 权利要求 37 的肽, 其中所述肽的长度是 10-25 个氨基酸残基。

39. 权利要求 38 的肽, 其中所述肽的长度是 10 个氨基酸残基。

40. 权利要求 34 的肽, 其中通过添加促进细胞摄入所述肽的化学部分, 修饰所述肽。

41. 权利要求 40 的肽, 其中所述化学部分是脂肪酸。

42. 权利要求 41 的肽, 其中所述化学脂肪酸是 C4-C18 脂肪酸。

43. 权利要求 42 的肽, 其中所述脂肪酸是硬脂酸或肉豆蔻酸。

44. 权利要求 40 的肽, 其中所述化学部分是细胞穿透肽。

45. 权利要求 44 的肽, 其中所述细胞穿透肽源自 HIV Tat, 疱疹病毒 VP22, 或果蝇触角同源异型框基因产物。

46. 纳米颗粒-多肽复合物, 其包含:

a) 权利要求 34-45 之任一项的生物活性肽

b) 纳米颗粒。

47. 权利要求 46 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述纳米颗粒是基于脂质的纳米颗粒, 超顺磁性纳米颗粒, 纳米壳, 半导体纳米晶体, 量子点, 基于聚合物的纳米颗粒, 基于硅的纳米颗粒, 基于二氧化硅的纳米颗粒, 基于金属的纳米颗粒, 富勒烯或纳米管。

48. 权利要求 47 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述纳米颗粒是基于脂质的纳米颗粒。

49. 权利要求 48 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述基于脂质的纳米颗粒是脂质体或 DOTAP: 胆固醇囊泡。

50. 权利要求 47 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述纳米颗粒是超顺磁性纳米颗粒。

51. 权利要求 47 的纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述纳米颗粒是超顺磁性纳米颗粒, 且所述纳米颗粒-多肽复合物是在脂质体或 DOTAP: 胆固醇囊泡内。

52. 纳米颗粒-多肽复合物, 其包含:

a) 氨基酸序列 KLRRVHKNLIPQGIVKLDHPR (SEQ ID NO: 1) 的肽, 结合

b) 纳米颗粒,

其中通过添加硬脂酸部分来修饰所述肽, 且所述纳米颗粒是脂质体, DOTAP: 胆固醇囊泡, DOPC 脂质体或超顺磁性纳米颗粒。

53. 治疗疾病的方法, 其包括给受试者施用药物组合物, 该组合物包含在药学可接受的稀释剂中的权利要求 1-52 之任一项的任一种肽或纳米颗粒-多肽复合物。

54. 权利要求 53 的方法, 其中所述疾病是癌症。

55. 权利要求 53 的方法, 还包括给受试者施用化疗剂。

56. 权利要求 55 的方法, 其中所述化疗剂是伊马替尼。

57. 权利要求 54 的方法, 其中所述癌症是肺癌。

58. 权利要求 57 的方法, 其中所述肺癌是 NSCLC。

59. 权利要求 53 的方法, 还包括给受试者施用辐射。

60. 权利要求 53 的方法, 还包括给受试者施用第二种生物活性多肽。

61. 向细胞递送多肽的方法, 其包括:

a) 制备权利要求 1 - 33 和 46 - 52 之任一项的任一种纳米颗粒-多肽复合物; 和

b) 在足以允许细胞摄入生物活性多肽的条件下, 使细胞接触所述纳米颗粒-多肽复合物。

62. 治疗受试者肿瘤的方法, 其包括给受试者施用治疗有效量的权利要求 1-52 之任一项的任一种肽或纳米颗粒-多肽复合物, 其中纳

米颗粒复合物中的多肽是基于肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列。

63. 权利要求 62 的方法, 其中所述施用是腹腔内注射。

64. 权利要求 62 的方法, 其中所述肿瘤是胃肠肿瘤。

65. 制备纳米颗粒-多肽复合物的方法, 其包括:

a) 鉴别生物活性多肽序列中的一个或多个功能域;

b) 制备包含至少一个功能域的肽;

c) 选择具有预期生物活性的肽; 和

d) 通过使肽结合纳米颗粒, 制备纳米颗粒-多肽复合物。

66. 权利要求 65 的方法, 其中所述鉴别包括使用计算机辅助结构分析。

67. 权利要求 66 的方法, 其中所述计算机辅助结构分析导致鉴别出推定蛋白激酶相互作用位点、推定肉豆蔻酰化位点、PDZ II 类域基序或 A 激酶锚定蛋白 (AKAP) 基序。

68. 权利要求 65 的方法, 还包括通过添加促进细胞摄入肽的化学部分来修饰所述肽。

69. 权利要求 65 的方法, 其中所述功能域是肿瘤抑制基因的氨基酸序列的预测功能域。

70. 抑制蛋白酪氨酸激酶的方法, 其包括使所述激酶接触权利要求 34 - 45 之任一项的任一种肽。

71. 权利要求 70 的方法, 其中所述激酶是 EGFR, PDGFR, cKit, cAbl, 或 Erk。

72. 诱导肿瘤细胞凋亡的方法, 其包括使肿瘤细胞接触权利要求 34 - 45 之任一项的任一种肽。

73. 诱导肿瘤细胞凋亡的方法, 其包括使肿瘤细胞接触权利要求 46 - 51 之任一项的任一种纳米颗粒-多肽复合物。

74. 用于磁共振成像的组合物, 其包含权利要求 1 - 32 和 46 - 51 之任一项的任一种纳米颗粒-多肽复合物, 其中所述纳米颗粒是超顺磁性纳米颗粒。

## 生物活性 FUS1 肽和纳米颗粒-多肽复合物

### 发明背景

本申请要求享有 2005 年 12 月 22 日提交的美国临时申请系列号 60/753,632 和 2005 年 3 月 14 日提交的美国临时申请系列号 60/661,680 的利益,它们的所有内容和公开特别通过参考并入本文而无具体放弃。根据 NIH 的资助号 P50CA70907-07 和 DOD 的 DAMD17002-1-0706,政府拥有本发明的权利。

#### 1. 发明领域

本发明总体上涉及分子生物学和癌症治疗领域。

#### 2. 相关技术描述

在细胞内起作用的蛋白质和肽的治疗用途在对癌症和其它疾病的治疗中非常有前景。但是,难以有效地将多肽导入细胞中。因而,需要将多肽导入细胞中的新方法。

癌症是许多因素存在的结果。突变可以发生在原癌基因中,造成细胞增殖的增加。突变也可以发生在正常功能是调节细胞增殖的肿瘤抑制基因中。DNA 修复酶中的突变,会损害细胞在增殖之前修复损伤的能力。

肿瘤抑制基因是正常基因,它们的缺失(丧失或失活)可以导致癌症。肿瘤抑制基因编码减慢细胞生长和分裂的蛋白质。肿瘤抑制基因的野生型等位基因会表达抑制异常细胞增殖的蛋白质。当编码肿瘤抑制蛋白的基因突变或缺失时,得到的突变蛋白质或肿瘤抑制蛋白表达的完全缺乏可能不能正确地调节细胞增殖,异常的细胞增殖可能发生,尤其当已经存在对细胞调节机理的损害时。已经证实多个经充分研究的人肿瘤和肿瘤细胞系具有缺失的或无功能的肿瘤抑制基因。肿瘤抑制基因的实例包括但不限于,视网膜母细胞瘤易感性基因或 RB 基因, p53 基因, 在结肠癌中缺失的 (DDC) 基因和神经纤维瘤病 1 型 (NF-1)



肿瘤抑制基因 (Weinberg, 1991)。功能的丧失或肿瘤抑制基因的失活, 可能在相当大数量的人癌症的起始和/或进展中起重要作用。

目前, 对许多常见癌症类型的治疗仅有极少有效选择。对给定个体的疗程取决于诊断, 疾病已经发展到的阶段, 和诸如患者的年龄、性别、和总体健康等因素。癌症治疗的最常规选择是手术, 放疗和化疗。这些治疗各自都伴有不同的副作用, 且它们具有不同程度的功效。因而, 需要继续开发癌症治疗, 包括基于肿瘤抑制多肽的治疗。

### 发明概述

在一个方面, 本发明提供了包含生物活性多肽结合纳米颗粒的纳米颗粒-多肽复合物, 其中通过添加促进细胞摄入蛋白质的化学部分, 修饰生物活性多肽。所述多肽可以是蛋白质或肽。在有些实施方案中, 蛋白质或肽的氨基酸序列源自肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列。示例性的肿瘤抑制蛋白是源自表 4 列出的肿瘤抑制基因的那些, 包括 CACNA2D2, PL6, 101F6, NPR1.2, BLU, RASSF1, FUS1, HYAL2 和 HYAL1。

在其它实施方案中, 所述肽可以包含肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列的预测功能域, 或这类域的生物活性变体。所述预测功能域可以通过对肿瘤抑制基因产物的计算机辅助序列分析鉴别出, 且可以是诸如肉豆蔻酰化位点基序、PKA 激酶基序、AKAP 结合基序、或 PDZ II 类域基序等结构域。

所述纳米颗粒可以是基于脂质的纳米颗粒, 超顺磁性纳米颗粒, 纳米壳, 半导体纳米晶体, 量子点 (quantum dot), 基于聚合物的纳米颗粒, 基于硅的纳米颗粒, 基于二氧化硅的纳米颗粒, 基于金属的纳米颗粒, 富勒烯或纳米管。在具体实施方案中, 所述纳米颗粒是基于脂质的纳米颗粒或超顺磁性纳米颗粒。基于脂质的纳米颗粒的实例包括脂质体和 DOTAP: 胆固醇囊泡。

在有些实施方案中, 所述化学部分是脂肪酸。优选地, 所述脂肪酸是 C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub> 脂肪酸。甚至更优选地, 所述脂肪酸是硬脂酸或肉豆蔻酸。在其它实施方案中, 所述化学部分是细胞穿透肽, 例如源自 HIV Tat、

疱疹病毒 VP22、果蝇 (*Drosophila*) 触角 (Antennapedia) 同源异型框基因产物、信号序列、融合序列、或内源性抗微生物多肽 (protegrin) I 的那些。

纳米颗粒-多肽复合物可以含有与纳米颗粒相结合的第二种生物活性多肽。两种多肽可以均是蛋白质或二者都可以是肽,或一种可以是蛋白质,另一种是肽。在具体实施方案中,第一种和第二种多肽均是生物活性肽,各自包含源自不同肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列。纳米颗粒-多肽复合物也可以含有3种或更多种生物活性多肽,蛋白质和多肽任意组合。

另外,在有些实施方案中,包含超顺磁性纳米颗粒的纳米颗粒-多肽复合物包裹在脂质体或 DOTAP:胆固醇囊泡之内。

在另一个方面,本发明提供了具有抗癌性质的分离的肽,其包含氨基酸序列 KLRRVHKNLIPQGIVKLDHPR (SEQ ID NO: 1)或其生物活性变体。

分离的肽的长度优选是10-100个氨基酸残基、更优选10-75个残基、更优选10-50个残基、更优选10-25个残基、更优选10个残基。如本文所述,通过添加促进细胞摄入肽的化学部分,可以修饰任何分离的肽。并且,可以将任何分离的肽掺入任一种本文所述的纳米颗粒-多肽复合物中。

本发明也提供了药物组合物。药物组合物可以包含在药学可接受的稀释剂中的任一种本文所述的纳米颗粒-多肽复合物,或任一种基于氨基酸序列 KLRRVHKNLIPQGIVKLDHPR (SEQ ID NO: 1)的肽。

本发明另外提供了向细胞递送蛋白质的方法。所述方法包含,制备任一种本文所述的纳米颗粒-多肽复合物,和在足以允许细胞摄入生物活性多肽的条件下,使细胞接触纳米颗粒-多肽复合物。在某些实施方案中,所述细胞是人体内的细胞。

在本发明中也提供了治疗受试者肿瘤的方法。所述方法包含,给受试者施用治疗有效量的任一种本文所述的纳米颗粒-多肽复合物,或任一种基于氨基酸序列 KLRRVHKNLIPQGIVKLDHPR (SEQ ID NO: 1)的肽,

其中纳米颗粒复合物中的多肽是基于肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列。治疗另外可以包含，给受试者施用化疗剂、辐射或第二种生物活性多肽。

本发明也提供了制备纳米颗粒-多肽复合物的方法。在某些实施方案中，所述方法包含：a) 鉴别生物活性多肽序列中的一个或多个功能域，b) 制备包含至少一个功能域的肽，c) 选择具有预期生物活性的肽，和d) 通过使肽结合纳米颗粒，制备纳米颗粒-多肽复合物。在某些实施方案中，通过对肿瘤抑制基因产物的计算机辅助序列分析，鉴别功能域。在某些实施方案中，所述方法包括，通过添加促进细胞摄入肽的化学部分，修饰所述肽。

本发明也提供了抑制蛋白酪氨酸激酶的方法。所述方法包含，使所述激酶接触任一种本文所述基于氨基酸序列 KLRRVHKNLIPQGIVKLDHPR (SEQ ID NO: 1) 的肽。在某些具体实施方案中，所述激酶是 EGFR, PDGFR, cKit, cAbl, 或 Erk。

本发明另外提供了诱导肿瘤细胞凋亡的方法。所述方法包含，使肿瘤细胞接触任一种基于氨基酸序列 KLRRVHKNLIPQGIVKLDHPR (SEQ ID NO: 1) 的本文所述肽或纳米颗粒-多肽复合物。

本发明也提供了用于磁共振成像的组合物。所述组合物包含任一种本文所述纳米颗粒-多肽复合物，其中所述纳米颗粒是超顺磁性纳米颗粒。

本发明的一个方面涉及纳米颗粒-多肽复合物，其包含与纳米颗粒相结合的生物活性多肽，其中通过添加促进细胞摄入多肽的化学部分，修饰生物活性多肽。所述多肽可以是肽。所述肽的氨基酸序列可以源自肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列。在某些实施方案中，所述肿瘤抑制基因是在表 4 中列出的基因，促凋亡基因，或细胞毒性基因。所述生物活性肽可以是 FUS-1 肽，触角同源异型框基因 (Antp) 肽，HIV Tat 肽，疱疹病毒 VP22 肽，模型两亲肽，transportan 肽，SV 40 T 抗原肽，或内源性抗微生物多肽 I 肽。在某些实施方案中，所述生物活性肽是 FUS-1 肽。FUS-1 肽可以包含 SEQ ID NO: 1。在某些实施方案中，

所述 FUS-1 肽是 SEQ ID NO:1。生物活性肽可以包含 KLALKLALKALKAALKLA (SEQ ID NO: 2), RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 3), GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 4), MGLGLHLLVLAALQGAWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 5), GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 6), GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 7), RGGRLSYSRRRFSTSTGR (SEQ ID NO: 8) 或 RRLSYSRRRF (SEQ ID NO: 9)。生物活性肽可以包含 KLALKLALKALKAALKLA (SEQ ID NO: 2)。

所述肽可以包含肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列的功能域。所述肽包含肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列的预测功能域。预测功能域通过计算机辅助序列分析肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列鉴别出来。所述多肽可以是蛋白质。蛋白质的氨基酸序列可以源自肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列。肿瘤抑制基因可以是在表 4 中列出的基因。在某些实施方案中, 所述肿瘤抑制基因是 FUS-1。

纳米颗粒可以是基于脂质的纳米颗粒, 超顺磁性纳米颗粒, 纳米壳, 半导体纳米晶体, 量子点, 基于聚合物的纳米颗粒, 基于硅的纳米颗粒, 基于二氧化硅的纳米颗粒, 基于金属的纳米颗粒, 富勒烯或纳米管。纳米颗粒可以是基于脂质的纳米颗粒。基于脂质的纳米颗粒可以是脂质体, 中性脂质体, DOPC 脂质体或 DOTAP:胆固醇囊泡。脂质体可以是 DOPC 脂质体。在某些实施方案中, 所述纳米颗粒是超顺磁性纳米颗粒。在某些实施方案中, 所述纳米颗粒是超顺磁性纳米颗粒, 且所述纳米颗粒-多肽复合物是在脂质体或 DOTAP:胆固醇囊泡内。脂质体可以是 DOPC 脂质体。化学部分可以是脂肪酸(例如, C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub> 脂肪酸, 硬脂酸或肉豆蔻酸)。化学部分可以是细胞穿透肽。细胞穿透肽可以源自 HIV Tat, 疱疹病毒 VP22, 或果蝇触角同源异型框基因产物。

在某些实施方案中, 纳米颗粒-多肽复合物还包含与纳米颗粒相结合的第二种生物活性多肽。第一种和第二种生物活性多肽可以是生物活性肽, 各自包含源自不同肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列。纳米颗粒-多肽复合物还可以包含靶向部分, 后者将纳米颗粒-多肽复合物靶

向到组织或细胞。

本发明的另一个方面涉及纳米颗粒-多肽复合物,其包含与纳米颗粒相结合的生物活性多肽,其中通过添加硬脂酸部分,修饰生物活性多肽,且所述纳米颗粒是 DOTAP:胆固醇囊泡, DOPC 脂质体或超顺磁性纳米颗粒。

本发明的另一个方面涉及包含氨基酸序列 KLRRVHKNLIPQGIVKLDHPR (SEQ ID NO:1)的分离的肽或其生物活性变体。所述肽的长度可以是 10<sup>-100</sup>, 10<sup>-75</sup>, 10<sup>-50</sup>, 10<sup>-25</sup> 或 10 个氨基酸残基。所述肽可以通过添加促进细胞摄入肽的化学部分进行修饰。化学部分可以是脂肪酸(例如, C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub> 脂肪酸, 硬脂酸或肉豆蔻酸)或细胞穿透肽。细胞穿透肽可以源自 HIV Tat, 疱疹病毒 VP22, 或果蝇触角同源异型框基因产物。

本发明的另一个方面涉及纳米颗粒-多肽复合物,其包含本发明的生物活性肽和纳米颗粒。纳米颗粒可以是基于脂质的纳米颗粒(例如, 脂质体或 DOTAP:胆固醇囊泡), 超顺磁性纳米颗粒, 纳米壳, 半导体纳米晶体, 量子点, 基于聚合物的纳米颗粒, 基于硅的纳米颗粒, 基于二氧化硅的纳米颗粒, 基于金属的纳米颗粒, 富勒烯或纳米管。在某些实施方案中,所述纳米颗粒是超顺磁性纳米颗粒,且所述纳米颗粒-多肽复合物是在脂质体或 DOTAP:胆固醇囊泡内。

本发明的另一个方面涉及纳米颗粒-多肽复合物,其包含与纳米颗粒相结合的氨基酸序列 KLRRVHKNLIPQGIVKLDHPR (SEQ ID NO:1)的肽,其中所述肽通过添加硬脂酸部分进行修饰,且所述纳米颗粒是脂质体, DOTAP:胆固醇囊泡, DOPC 脂质体或超顺磁性纳米颗粒。

本发明的另一个方面涉及治疗疾病的方法,其包含,给受试者施用药物组合物,该组合物包含在药学可接受的稀释剂中的本发明的肽或纳米颗粒-多肽复合物。所述疾病可以是癌症(例如,肺癌, NSCLC)。所述方法还可以包含,给受试者施用化疗剂(例如,伊马替尼(imatinib))。所述方法还可以包含,给受试者施用辐射或第二种生物活性多肽。

本发明的另一个方面涉及向细胞递送多肽的方法，其包含，制备本发明的纳米颗粒-多肽复合物，和在足以允许细胞摄入生物活性多肽的条件下，使细胞接触纳米颗粒-多肽复合物。

本发明的另一个方面涉及治疗受试者肿瘤的方法，其包含，给受试者施用治疗有效量的本发明的肽或纳米颗粒-多肽复合物，其中纳米颗粒复合物中的多肽是基于肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列。所述施用可以是腹腔内的注射。所述肿瘤可以是胃肠肿瘤。

本发明的另一个方面涉及制备纳米颗粒-多肽复合物的方法，其包含，鉴别生物活性多肽序列中的一个或多个功能域，制备包含至少一个功能域的肽，选择具有预期生物活性的肽，和通过使肽结合纳米颗粒，制备纳米颗粒-多肽复合物。所述鉴别可以包含，使用计算机辅助结构分析。计算机辅助结构分析可以导致鉴别出推定蛋白激酶相互作用位点、推定肉豆蔻酰化位点、PDZ II 类域基序或 A 激酶锚定蛋白 (AKAP) 基序。所述方法还可以包含，通过添加促进细胞摄入肽的化学部分，修饰所述肽。功能域可以是肿瘤抑制基因的氨基酸序列的预测功能域。

本发明的另一个方面涉及抑制蛋白酪氨酸激酶的方法，其包含，使激酶(例如，EGFR，PDGFR，cKit，cAbl，或 Erk)接触本发明的肽。

本发明的另一个方面涉及诱导肿瘤细胞凋亡的方法，其包含使肿瘤细胞接触本发明的肽。

本发明的另一个方面涉及诱导肿瘤细胞凋亡的方法，其包含，使肿瘤细胞接触本发明的纳米颗粒-多肽复合物。

本发明的另一个方面涉及用于磁共振成像的组合物，其包含，本发明的纳米颗粒-多肽复合物，其中所述纳米颗粒是超顺磁性纳米颗粒。

预见到，本文所述任意方法或组合物相对于本文所述任意其它方法或组合物都是可以实施的。

当在权利要求和/或说明书中与术语“包含”结合使用时，使用词语“一种”或“一个”可以表示“一种(个)”，但是它也与“一种(个)或多种(个)”、“至少一种(个)”和“一种(个)或超过

一种(个)”的含义相一致。

从下面的详述,可以明白本发明的其它目的、特征和优点。但是,应当理解,详述和特定实施例,指示着本发明的特定实施方案,仅作为解释来提供,因为本领域技术人员从该详述会明白在本发明精神和范围内的各种不同变化和修改。

### 附图简述

下述附图构成本说明书的一部分,且包括在内用于进一步展示本发明的某些方面。参考这些附图中的一幅或多幅结合本文所述特定实施方案的详述,可以更好地理解本发明。

图 1: Fus1 蛋白质结构的示意分析,提供了在实施例中使用的 Fus1 肽的列表。

图 2: 各种肽的疏水常数。

图 3: Fus1 肽的预测极性。

图 4: SPIO 纳米颗粒-肽复合物的示意图。

图 5: 显示肽-DOTAP:胆固醇纳米颗粒、和肽-SPIO-DOTAP:胆固醇颗粒的示意图。

图 6: Fus1 肽对细胞生长的影响。

图 7: Fus1 肽在细胞中的 IC50 值。

图 8: Fus1 肽对细胞生长和细胞凋亡的影响。

图 9: Fus1 肽和吉非替尼(Gefitinib)的联合治疗的效果。

图 10: Fus1 肽对 Gleevec-敏感的和 Gleevec-抗性的细胞的影响。

图 11: Fus1 肽对细胞中 c-Abl 活性的影响。

图 12: 肽处理的细胞中 c-Abl 的相对活性。

图 13: Fus1 肽-纳米颗粒复合物对肿瘤细胞生长的抑制。

图 14: 用 Fus1 肽-纳米颗粒复合物处理的细胞中细胞凋亡的诱导。

图 15: 不同细胞系中的酪氨酸磷酸化。

图 16: 用 STI (甲磺酸伊马替尼; 也称作 STI-571 或 Gleevec) 处理 Rat-1 SH2 细胞的结果。

图 17: 用硬脂酸化的 Fus1 肽处理 Rat-1 SH2 细胞的结果。

图 18: 在软琼脂中用 STI-571 处理细胞的结果。

图 19: 在软琼脂中用 STI-571 处理细胞的结果。

图 20: Fus 1 肽对磷酸化的抑制。

图 21: Fus 1 肽对 c-Ab1 激酶的线性抑制。

图 22: DMSO 或硬脂酸对 c-Ab1 激酶无影响。

图 23: 在 48 小时中基于 DOPC 和 DOTAP 的包含 Fus1 肽的脂质体对非小细胞肺癌细胞 (H1299 细胞) 的生长的影响。

图 24A-C. 硬脂酸 Fus1 肽对 Ab1 酪氨酸激酶的浓度-依赖性抑制。

图 24A, 硬脂酸修饰的 Fus1 肽对商品化的 Ab1 酪氨酸激酶的抑制。图 24B, 硬脂酸 Fus1 肽对 Ab1 酪氨酸激酶的线性抑制。图 24C, 非硬脂酸修饰的 Fus1 肽不抑制 Ab1 酪氨酸激酶活性。

图 25A-C. FUS1 表达抑制 c-Ab1 酪氨酸激酶活性。

图 26A-C. 图 26A, 将 1000 个 H1299 细胞平板接种在含有 0 $\mu$ M、1  $\mu$ M、或 5  $\mu$ M 伊马替尼的 0.35%软琼脂中。培养细胞 18 天, 每 2 天更换含有各个相应浓度的伊马替尼的培养基。图 26B, 伊马替尼对软琼脂中 H1299 集落形成的剂量依赖性抑制。图 26C, 将 1000 个 H1299 细胞平板接种在含有 10  $\mu$ M 伊马替尼或未处理的 0.35%软琼脂中。培养细胞 18 天, 每 2 天更换含有各个相应浓度的伊马替尼的培养基。

### 例示性实施方案的描述

#### I. 纳米颗粒-POLY 肽复合物

本发明提供了用于向细胞递送多肽的组合物和方法。所述组合物和方法对任意生物活性蛋白质或肽具有普遍效用, 并提供了用于治疗许多类型的疾病的治疗试剂。更具体地, 本发明提供了纳米颗粒-多肽复合物, 和使用这样的复合物向细胞内递送多肽的方法。所述复合物包含与纳米颗粒相结合的生物活性多肽。本文使用的“结合”指物理结合、化学结合或二者。例如, 结合可以涉及共价键, 疏水相互作用, 包囊, 表面吸附等。



在细胞内起作用的蛋白质和肽具有作为治疗药物的实质价值。对于源自酶缺失的代谢疾病，可以通过细胞内递送提供关键酶活性的蛋白质或肽，来治疗疾病。癌症的治疗也可以从向肿瘤细胞中导入蛋白质或肽药物获益，例如，通过导入会抑制癌基因、促进细胞凋亡、预防血管发生和/或恢复或提供肿瘤抑制基因产物功能的蛋白质和/或肽。通过提供细胞内递送多肽的组合物和方法，本发明提供了用于治疗众多不同疾病的有效治疗剂。

本发明可以提供有效治疗剂，其用于治疗涉及蛋白质功能或活性丧失、或蛋白质活性的不适当表达的疾病和病症。例如，代谢疾病包含超过 1,000 种遗传病症，其中存在代谢遗传缺陷。代谢涉及身体基本组分的形成(合成代谢)或基本身体组分的分解(分解代谢)。代谢途径的每个步骤由酶控制。遗传缺陷导致酶活性的降低或丧失。代谢病症可以造成身体任意系统和细胞的疾病，尽管疾病的严重性可能是不同的和不可预测的。有些缺陷会造成较少的问题，其它缺陷会导致严重疾病和死亡。本发明可以提供纳米颗粒-多肽复合物形式的治疗剂，其为受影响的细胞提供必要的酶活性，从而减轻或消除疾病状态。

或者，就涉及蛋白质活性的不适当表达的疾病而言，蛋白质活性抑制剂的应用可以提供实质益处。例如，许多疾病状态与蛋白激酶-介导的事件触发的异常细胞应答有关。这些疾病包括自身免疫病、炎症性疾病、代谢疾病、神经疾病和神经变性疾病、癌症、心血管疾病、变态反应和哮喘、阿尔茨海默氏病和激素相关疾病等疾病。预期破坏酶活性或干扰蛋白激酶的细胞内定位的蛋白激酶抑制剂是用于治疗这样的疾病的有价值的治疗剂。实际上，已经鉴别出抑制蛋白激酶的催化活性的肽(Hvalby 等, 1994)和破坏蛋白激酶的亚细胞靶向的肽(Colledge 和 Scott, 1999)。本发明提供了可以用于向细胞递送这些和其它抑制蛋白激酶的多肽的组合物和方法。因而，本发明提供了治疗多种疾病的通用方式。

多肽通常难以穿过细胞膜。蛋白质和肽通常具有带电荷的和不带电荷的氨基酸残基。带电荷的残基可以妨碍膜结合和向细胞内的膜运

输。本发明通过例如将化学部分连接到生物活性多肽上来促进细胞摄入，克服了该困难。在本发明的某些实施方案中，这通过使生物活性多肽融合到促进细胞摄入的肽上来实现。

例如，已经从果蝇触角同源异型框基因 (Antp) 的第三个螺旋、HIV Tat 和疱疹病毒 VP22 鉴别出了细胞穿透肽(或“蛋白质转导域”)，它们都含有带正电荷的富含精氨酸和赖氨酸残基的结构域(Schwarze 等, 2000; Schwarze 等, 1999)。另外，已经将源自信号序列的疏水肽鉴别为细胞穿透肽(Rojas 等, 1996; Rojas 等, 1998; Du 等, 1998)。已经证实，将这些肽偶联到标志蛋白质例如 $\beta$ -半乳糖苷酶上，会使标志蛋白质有效内化到细胞中，且已经使用含有这些肽的嵌合框内融合蛋白，体外和体内地将蛋白质递送到广谱细胞类型(Drin 等, 2002)。这些细胞穿透肽与根据本发明的生物活性多肽的融合，可以增强细胞对多肽的摄入。

在其它实施方案中，通过向多肽连接脂质例如硬脂酸或肉豆蔻酸，来促进细胞摄入。已经证实脂质化会增强肽通过进入细胞(REF)。脂质部分的结合是本发明增强细胞摄入多肽的另一种方式。下面进一步讨论了细胞摄入。

通过增强生物活性多肽的摄入，本发明可以减少治疗所需的蛋白质或肽的量。这又可以显著减少治疗成本，并增加治疗剂的供给。更低的剂量也可以使肽的潜在免疫原性最小化，并限制毒副作用。这样，本发明的组合物和方法会为治疗性治疗提供显著益处。

根据本发明，生物活性多肽可以结合纳米颗粒，以形成纳米颗粒-多肽复合物。在有些实施方案中，所述纳米颗粒是脂质体或其它基于脂质的纳米颗粒，例如基于脂质的囊泡(例如，DOTAP:胆固醇囊泡)。如在癌症治疗中使用的，脂质体利用癌新血管系统中增加的窗孔，来增加肿瘤部位的脂质体浓度。在其它实施方案中，所述纳米颗粒是基于氧化铁的超顺磁性纳米颗粒。直径范围为约 10-100 nm 的超顺磁性纳米颗粒小得足以避免被脾隔离，但是又大得足以避免被肝清除。这样大小的颗粒可以穿透非常小的毛细血管，且可以在身体组织中有效

分布。超顺磁性纳米颗粒-多肽复合物可以用作MRI造影剂，以鉴别和追踪摄入生物活性多肽的那些细胞。在某些实施方案中，所述纳米颗粒是半导体纳米晶体或半导体量子点，二者都可以用于光学成像。在其它实施方案中，所述纳米颗粒可以是纳米壳，它包含在二氧化硅核心外的金层。纳米壳的一个优点是，使用标准化学，可以将多肽缀合到金层上。在其它实施方案中，所述纳米颗粒可以是富勒烯或纳米管(Gupta等，2005)。

肽会被肾从循环中快速去除，且对血清中蛋白酶的降解是敏感的。通过使生物活性肽结合纳米颗粒，本发明的纳米颗粒-多肽复合物可以保护免受降解，并减少被肾清除。这会增加多肽的血清半衰期，从而减少有效治疗所需的多肽剂量。同样，这会降低治疗成本，并使免疫问题和治疗的毒性反应最小化。

根据本发明，纳米颗粒-多肽复合物可以靶向特定组织和细胞。这可以通过使细胞靶向部分缀合到纳米颗粒上来实现。靶向部分可以是但不限于，蛋白质，肽，脂质，甾族化合物，糖，碳水化合物或合成化合物。细胞靶向部分(例如配体)会识别和结合它们在细胞表面上的同源受体。类似地，抗体可以通过识别它们在细胞表面上的同源抗原，充当细胞靶向部分。通过提供靶向的纳米颗粒-多肽复合物，本发明可以增强疾病治疗的特异性，并增加进入靶向细胞的治疗剂的量。

根据本发明多肽与纳米颗粒的结合，提供了对多肽的高效、靶向递送，多肽的强细胞摄入，对经处理细胞的灵敏的分子成像，减少的治疗剂量和成本，和治疗的免疫问题和毒性作用最小化。本发明的纳米颗粒-多肽复合物提供了用于高效率且有效地治疗许多疾病的组合物和方法。

关于癌症，本发明提供了癌症治疗的组合物和方法。

现在公认，许多癌症至少部分地由遗传学的异常情况造成，后者导致一个或多个基因的过表达，或一个或多个异常或突变基因的表达。例如，在许多情况下，已知癌基因的表达会导致癌症的发生。"癌基因"是遗传上改变的基因，它的突变的表达产物会破坏正常的细胞功能或

控制 (Spandidos 等, 1989)。已经发现, 迄今研究的大多数癌基因是作为正常细胞基因即"原癌基因"的编码区中的突变的结果而被"激活", 所述突变导致表达的蛋白质产物中的氨基酸置换。该改变的表达产物会表现出参与肿瘤形成过程的异常生物学功能 (Travali 等, 1990)。现在已经在不同程度上鉴别和表征了许多癌基因和癌基因家族, 包括 ras, myc, neu, raf, erb, src, fms, jun 和 abl (Travali 等, 1990)。

细胞癌基因的 ras 基因家族编码小 GTP-结合蛋白。已经发现 ras 基因在许多种类的人肿瘤中突变。ras 蛋白 (Ras) 是诱导生长和/或分化的刺激的转导中涉及的细胞内信号传递途径的重要组分, 其通过 raf 基因编码的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶起作用。myc 是编码转录因子的细胞癌基因, 与转录因子 Max 形成结合 DNA 的异源寡聚体。Src 和 fms 是酪氨酸蛋白激酶, 如同 abl 一样。阻断或干扰癌基因活性的蛋白质和肽, 可以作为抗癌剂, 且是本发明的实施方案。

如上所述, 肿瘤抑制基因是正常基因, 它们的缺失 (丧失或失活) 可以导致癌症。肿瘤抑制基因可以编码减慢细胞生长和分裂的蛋白质。它们的丧失因而可以导致失调的细胞生长和癌症。因此, 重新活化肿瘤抑制基因产物、或提供与肿瘤抑制基因产物有关的活性的蛋白质和肽, 可以用作抗肿瘤治疗剂。肿瘤抑制基因蛋白质和肽可以用于本发明, 且包含在本发明中。

刺激细胞凋亡的蛋白质或肽可以用作抗癌剂。细胞凋亡是细胞的程序性死亡。细胞凋亡是正常胚胎发育, 维持成年组织的体内稳态, 和抑制癌发生的基本过程 (Kerr 等, 1972)。刺激癌细胞中的细胞凋亡的多肽, 可以提供抗癌活性, 且是本发明的一部分。

血管发生是肿瘤进展所必需的 (Folkman 和 Shing, 1992; Fidler 和 Ellis, 1994; Folkman, 1995; Hanahan 和 Folkman, 1996)。血管发生是从先前存在的血管形成新的毛细血管。尽管直径 1-2 mm 的肿瘤可以通过扩散接受所有营养物, 进一步的生长依赖于通过血管发生形成足够的血液供给。因而, 血管发生的抑制剂可以用作抗肿瘤剂。本发明包括起血管发生抑制剂作用的多肽。

在具体实施方案中,本发明提供了用于治疗癌症的肽和纳米颗粒-多肽复合物。可以凭经验或通过理论方法,鉴别出抗癌肽。为肿瘤抑制基因 p53 提供了凭经验鉴别抗癌肽的非限制性实例。p53 基因编码转录因子。废除活性的 p53 基因突变会导致癌症。已经证实,包含来自 p53 转录因子羧基末端的氨基酸序列的肽,可以重新活化某些 p53 突变体,和重建对细胞生长的控制。因而,与 p53 羧基末端肽形成的纳米颗粒-多肽复合物,会提供治疗某些 p53 肿瘤的抗癌剂。

通过筛选组合肽文库,也可以实验地鉴别出抗癌肽。作为非限制性实例,可以筛选基于组合化学的肽-噬菌体文库或肽文库中会抑制癌基因蛋白质活性的肽。其它抗癌肽可以基于实验鉴别的细胞凋亡肽,例如肽 KLAKLAKKLAKLAK (SEQ ID NO:10)和其它细胞凋亡肽(参见,例如,Ellerby 等,1999)。新的或以前鉴别的抗癌肽在纳米颗粒-多肽复合物中的应用,显示了本发明用于治疗癌症的普遍适用性。

或者,通过分析肿瘤抑制基因产物的氨基酸序列中的预测功能域,可以鉴别出潜在抗癌肽。然后,通过本领域众所周知的适当测定,可以测定包含预测功能域的肽的抗癌活性。在实施例中描述了该方案的一个实例。发明人进行了 FUS1 基因产物的氨基酸序列分析,并鉴别出了预测的“A 激酶锚定蛋白”(AKAP)基序。测试了含有该功能基序的肽的抑制不同酪氨酸激酶和阻断集落形成的能力。阳性活性确认,该蛋白质是抗癌剂。根据本发明,提供纳米颗粒-Fus1 肽复合物治疗癌症的治疗剂。

如该实施例所证实的,本发明提供了鉴别基于肿瘤抑制基因产物的预测功能域的抗癌肽和蛋白质的方法。该方法是快速得到用作治疗剂的抗癌多肽和纳米颗粒-多肽复合物的有力方式。

一旦鉴别出抗癌蛋白或肽,可以基于蛋白质或肽的氨基酸序列制备这些多肽的变体。这些多肽和它们的变体都可以用于本发明,且包含在本发明中。

本发明可以用于将生物活性多肽递送给细胞。例如,本发明提供了治疗癌症的方法和组合物。癌症可以是任何下述类型的癌症:黑素

瘤，非小细胞肺癌，小细胞肺癌，肺癌，肝癌，视网膜母细胞瘤，星形细胞瘤，成胶质细胞瘤，牙龈癌，舌癌，白血病，神经母细胞瘤，头，颈，乳房，胰腺，前列腺，肾，骨，睾丸，卵巢的癌症，间皮瘤，子宫颈，胃肠的癌症，淋巴瘤，脑，结肠，或膀胱的癌症。在某些实施方案中，所述癌症包含上皮癌细胞。在具体实施方案中，所述癌症是肺癌。

#### A. 多肽

本文使用的术语“多肽”指蛋白质或肽。肽被认为具有 3-100 个氨基酸。蛋白质被认为具有超过 100 个氨基酸。

在某些实施方案中，多肽分子的大小可以包含但不限于，5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 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, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500 或更多个氨基分子残基, 和其中可推导出的任意范围。

在某些实施方案中，本发明的生物活性多肽可以包含 3 -2500、更优选 3 -1000、更优选 3 -500、更优选 5 -250、更优选 7 -250、更优选 10 -100、更优选 10 -50、更优选 10 -40、最优选 10 -35 个氨基分子残基。

本文使用的“氨基分子”指任意氨基酸、氨基酸衍生物或氨基酸模仿物，如本领域普通技术人员已知的。在某些实施方案中，多肽的残基是连续的，没有任何非氨基分子间断氨基分子残基序列。在其它

实施方案中，所述序列可以包含一个或多个非氨基分子部分。在具体实施方案中，多肽残基序列可以被一个或多个非氨基分子部分中断。

因此，术语“多肽”包括包含至少一个天然合成蛋白质中的 20 种常见氨基酸、或至少一个经修饰的或不常见的氨基酸（包括但不限于在下面表 1 中列出的那些）的氨基分子序列。

缩写	氨基酸	缩写	氨基酸
Aad	2-氨基己二酸	EtAsn	N-乙基天冬酰胺
Baad	3-氨基己二酸	Hyl	羟赖氨酸
Bala	$\beta$ -丙氨酸, $\beta$ -氨基-丙酸	AlHyl	别-羟赖氨酸
Abu	2-氨基丁酸	3Hyp	3-羟脯氨酸
4Abu	4-氨基丁酸, 哌啶酸(piperidinic acid)	4Hyp	4-羟脯氨酸
Acp	6-氨基己酸	Ide	异锁链素
Ahe	2-氨基庚酸	AlIle	别-异亮氨酸
Aib	2-氨基异丁酸	MeGly	N-甲基甘氨酸, 肌氨酸
Baib	3-氨基异丁酸	MeIle	N-甲基异亮氨酸
Apm	2-氨基庚二酸	MeLys	6-N-甲基赖氨酸
Dbu	2, 4-二氨基丁酸	MeVal	N-甲基缬氨酸
Des	锁链素	Nva	正缬氨酸
Dpm	2, 2'-二氨基庚二酸	Nle	正亮氨酸
Dpr	2, 3-二氨基丙酸	Orn	鸟氨酸
EtGly	N-乙基甘氨酸		

在某些实施方案中，所述纳米颗粒-多肽复合物包含生物相容的多肽。本文使用的术语“生物相容的”指，当根据本文所述方法和量应用或施用于给定生物时，几乎不产生或不产生显著的不利效果的物质。这样的不利或不希望的效果是显著的毒性或有害的免疫反应等。在优选的实施方案中，生物相容的多肽或纳米颗粒-多肽复合物通常是哺乳动物蛋白质或肽或合成的蛋白质或肽，它们各自基本上不含有毒素、病原体和有害免疫原。

通过本领域技术人员已知的任意技术，可以制备蛋白质和肽，包

括通过标准分子生物学技术表达蛋白质和肽，从天然来源分离蛋白质和肽，或化学合成蛋白质和肽。以前已经公开了不同基因的核苷酸和多肽序列，且可以在本领域普通技术人员已知的计算机化数据库中找到。一个这样的数据库是国家生物技术信息中心的 Genbank 和 GenPept 数据库(可以在环球网上 [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov) 找到)。使用本文公开的或本领域普通技术人员已知的技术，可以扩增和/或表达这些已知基因的编码区。或者，蛋白质和肽的各种商品化制品是本领域技术人员已知的。

在某些实施方案中，多肽可以是分离的或纯化的。通常，“分离的”或“纯化的”指已经进行分级分离以去除各种其它多肽的特定多肽组合物，且该组合物基本上保持它的活性，这可以通过例如蛋白质测定来评估，如本领域普通技术人员关于特定或目标蛋白质或肽已知的。

在某些实施方案中，使用治疗有效量的多肽或纳米颗粒-多肽复合物来治疗受试者的肿瘤。治疗有效量是，当施用活性成分一次或一段时间时，会导致施用活性成分所针对的状况的改善或希望的变化量。如已知的，该量随待治疗的状况的类型、特定活性成分、状况的严重性和患者特征等详细因素而变化。

### 1. 变体

术语“多肽”、“蛋白质”和“肽”也包括蛋白质或肽的氨基酸序列变体。本发明多肽的氨基酸序列变体可以是置换、插入或缺失变体。缺失变体缺少对于功能或免疫原活性非必需的一个或多个天然蛋白质的残基，如缺少跨膜序列的整合膜蛋白的变体所例示的。另一个常见类型的缺失变体是缺少分泌信号序列或指导蛋白质结合细胞特定部位的信号序列的变体。插入突变体通常包含在多肽的非末端点添加物质。这可以包括，插入免疫反应性的表位或仅仅一个残基。下面讨论了称作融合蛋白的末端添加。

置换变体通常在多肽内的一个或多个位点含有一个氨基酸与另一个氨基酸的交换，且可以设计成用于调控多肽的一种或多种性质，例



如抗溶蛋白性裂解的稳定性，而不丧失其它功能或性质。这类置换优选地是保守的，换言之，将一个氨基酸替换为类似形状和电荷的氨基酸。保守置换是本领域众所周知的，包括例如：丙氨酸替换为丝氨酸；精氨酸替换为赖氨酸；天冬酰胺替换为谷氨酰胺或组氨酸；天冬氨酸替换为谷氨酸；半胱氨酸替换为丝氨酸；谷氨酰胺替换为天冬酰胺；谷氨酸替换为天冬氨酸；甘氨酸替换为脯氨酸；组氨酸替换为天冬酰胺或谷氨酰胺；异亮氨酸替换为亮氨酸或缬氨酸；亮氨酸替换为缬氨酸或异亮氨酸；赖氨酸替换为精氨酸；蛋氨酸替换为亮氨酸或异亮氨酸；苯丙氨酸替换为酪氨酸，亮氨酸或蛋氨酸；丝氨酸替换为苏氨酸；苏氨酸替换为丝氨酸；色氨酸替换为酪氨酸；酪氨酸替换为色氨酸或苯丙氨酸；和缬氨酸替换为异亮氨酸或亮氨酸。

术语“生物学功能等同”是本领域非常理解的，且在本文中进一步具体定义。因此，具有约70%至约80%、更优选约81%至约90%、或甚至更优选约91%至约99%的氨基酸与生物活性多肽的氨基酸相同或功能上等同的序列，在本发明的范围内，只要能维持多肽的生物活性。

术语“功能上等同的密码子”在本文中用于指编码相同氨基酸的密码子，例如精氨酸或丝氨酸的6个密码子，也指编码生物学上等同的氨基酸的密码子(参见下面的表2)。

表 II

密码子表

氨基酸			密码子
丙氨酸	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
半胱氨酸	Cys	C	UGC UGU
天冬氨酸	Asp	D	GAC GAU
谷氨酸	Glu	E	GAA GAG
苯丙氨酸	Phe	F	UUC UUU
甘氨酸	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
组氨酸	His	H	CAC CAU
异亮氨酸	Ile	I	AUA AUC AUU
赖氨酸	Lys	K	AAA AAG
亮氨酸	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
蛋氨酸	Met	M	AUG
天冬酰胺	Asn	N	AAC AAU
脯氨酸	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
谷氨酰胺	Gln	Q	CAA CAG

精氨酸	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
丝氨酸	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
苏氨酸	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
缬氨酸	Val	V	GUA GUC GUG GUU
色氨酸	Trp	W	UGG
酪氨酸	Tyr	Y	UAC UAU

也应当理解，氨基酸序列可以包含附加的残基，例如附加的 N-或 C-末端氨基酸，且仍然基本上如本文公开的序列之一所述，只要该序列满足上述标准，包括维持生物活性。

下面的讨论是基于蛋白质氨基酸的变化，以创建等同的、或甚至改进的第二代分子。例如，蛋白质结构中的某些氨基酸可以置换为其它氨基酸，而不显著丧失与抗体的抗原结合区或底物分子上的结合部位等结构的相互作用结合能力。由于蛋白质的相互作用能力和性质决定了蛋白质的生物功能活性，可以在蛋白质序列中产生某些氨基酸置换，但是仍然产生具有类似性质的蛋白质。发明人因而预见到，可以在本文所述多肽的氨基酸序列中产生多种不同的变化，而不显著丧失它们的生物效用或活性，如下面所讨论的。表 2 显示了编码特定氨基酸的密码子。

在产生这样的变化时，可以考虑氨基酸的亲水指数。亲水氨基酸指数在赋予蛋白质相互作用生物功能中的重要性，是本领域普遍理解的 (Kyte & Doolittle, 1982)。已经接受，氨基酸的相对亲水特性会促成所得到的蛋白质的二级结构，这又确定了蛋白质与其它分子（例如，酶，底物，受体，DNA，抗体，抗原等）的相互作用。

本领域还理解，可以在亲水性的基础上有效地进行类似氨基酸的置换。通过参考并入本文的美国专利 4,554,101 声称，蛋白质的最大局部平均亲水性（由它的邻近氨基酸的亲水性控制）与蛋白质的生物性质相关联。如美国专利 4,554,101 所详述的，已经为氨基酸残基指定了下面的亲水性值：精氨酸 (+3.0)；赖氨酸 (+3.0)；天冬氨酸 (+3.0 ± 1)；谷氨酸 (+3.0 ± 1)；丝氨酸 (+0.3)；天冬酰胺 (+0.2)；谷氨酰胺 (+0.2)；甘氨酸 (0)；苏氨酸 (-0.4)；脯氨酸

(-0.5 ± 1); 丙氨酸 (-0.5); 组氨酸 \*-0.5); 半胱氨酸 (-1.0); 蛋氨酸 (-1.3); 缬氨酸 (-1.5); 亮氨酸 (-1.8); 异亮氨酸 (-1.8); 酪氨酸 (-2.3); 苯丙氨酸 (-2.5); 色氨酸 (-3.4)。

应当理解, 可以将氨基酸置换为另一个具有类似亲水性值的氨基酸, 且仍然产生生物学等同的和免疫学等同的多肽。在这样的变化中, 亲水性值在 ±2 之内的氨基酸置换是优选的, 在 ±1 之内是特别优选的, 在 ±0.5 之内是更特别优选的。

如上所述, 氨基酸置换通常是基于氨基酸侧链取代基的相对相似性, 例如, 它们的疏水性, 亲水性, 电荷, 大小等。考虑各种前述特征的示例性置换是本领域技术人员众所周知的, 包括: 精氨酸和赖氨酸; 谷氨酸和天冬氨酸; 丝氨酸和苏氨酸; 谷氨酰胺和天冬酰胺; 和缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

制备根据本发明的多肽的另一个实施方案是肽模仿物的应用。模仿物是模仿蛋白质二级结构的元件的含肽分子。参见例如, Johnson 等, 1993。应用肽模仿物的基础原理是, 蛋白质的肽主链的主要存在方式是, 使氨基酸侧链朝向有利于分子相互作用 (例如抗体和抗原的相互作用) 的方向。预期肽模仿物允许类似于天然分子的分子相互作用。这些原理可以与上述原理结合使用, 以改造具有本文所述多肽的许多天然性质、但是具有改变的或甚至改进的特征的二代分子。

在另一个实施方案中, 肽含有 D-氨基酸, 而不是在生物蛋白质中常见的 L-氨基酸。在化学合成肽的过程中, 可以置换 D-氨基酸。另外, 预见到反转-D 肽。反转-D 肽保持与 L-氨基酸肽相同的三级构象, 并因此保持相同的活性, 但是对体外和体内酶降解更稳定, 因而具有比原始肽更大的治疗功效 (Brady 和 Dodson, 1994; Jameson 等, 1994)。

如本领域众所周知的, 可以给蛋白质和肽缀合荧光的、化学发光的或其它类型的检测标签或标记。

## 2. 融合蛋白

插入变体的一种专门类型是融合蛋白。该分子通常具有天然分子

的全部或实质部分,其在 N-或 C-末端连接到第二种多肽的全部或一部分上。例如,融合可以采用来自其它物种的先导序列,以允许在异源宿主中重组表达蛋白质。另一种有用的融合包括添加免疫活性结构域,例如抗体表位,以促进融合蛋白的纯化。在融合接头处或附近包含切割位点,会促进在纯化后去除外来多肽。其它有用的融合包括连接功能域,例如来自酶(例如水解酶)的活性部位,糖基化结构域,细胞靶向信号或跨膜区域。特别优选的融合包含,将细胞穿透肽连接到多肽上,以促进细胞对多肽的摄入。

例如,可以在本发明中使用来自 HIV Tat 多肽、果蝇触角同源异型框基因 (Antp) 的第三个螺旋、流感病毒血凝素和/或疱疹病毒 VP22 多肽的肽,建立融合蛋白。这些蛋白质含有带正电荷的富含精氨酸和赖氨酸残基的结构域,且已经将源自信号序列和融合序列的疏水肽鉴别为细胞穿透肽。这些肽可以用于体外和体内地递送蛋白质到广谱细胞类型中。在本发明中,这些肽可以用于促进细胞摄入生物活性蛋白质和肽。

### 3. 多肽纯化

可能需要纯化或分离本文所述的多肽。蛋白质纯化技术是本领域技术人员众所周知的。这些技术包含,在一个水平,将细胞环境粗分离成多肽和非多肽级分。将多肽与其它蛋白质和肽分离后,可以使用色谱和电泳技术进一步纯化目标多肽,以达到部分或完全纯化(或纯化至同质)。特别适用于制备纯肽的分析方法是离子交换色谱,排阻色谱;聚丙烯酰胺凝胶电泳;等电聚焦。纯化肽的特别有效的方法是快速蛋白质液相色谱和 HPLC。

当使用术语“基本上纯化的”或“基本上分离的”时,该命名指蛋白质或肽构成组合物的主要组分的组合物,例如占组合物中蛋白质的约 50%,约 60%,约 70%,约 80%,约 90%,约 95%或更多。

### 4. 促进细胞摄入

在有些实施方案中，通过添加促进细胞摄入多肽的化学部分，可以修饰所述多肽。增强细胞摄入的部分的实例包括但不限于：疏水基团（例如，脂质或脂肪酸），细胞穿透肽（参见，例如，美国专利 6,610,657; Drin, 等, 2002), 和某些金属螯合物。

脂肪酸通常是包含碳链、在链末端具有酸性部分（例如，羧酸）的分子。脂肪酸的碳链可以是任意长度，但是，碳链的长度优选地是至少 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 或更多个碳原子，和其中可推导的任意范围。在某些实施方案中，脂肪酸链部分中碳链长度是 4-18 个碳原子。在某些实施方案中，脂肪酸碳链可以包含奇数个碳原子，但是，链中偶数个碳原子在某些实施方案中可能是优选的。在碳链中仅包含单键的脂肪酸称作饱和的，而在链中包含至少一个双键的脂肪酸称作不饱和的。脂肪酸可以是分支的，尽管在本发明的优选实施方案中，它是不分支的。具体脂肪酸包括但不限于，亚油酸，油酸，棕榈酸，亚麻酸，硬脂酸，月桂酸，肉豆蔻酸，花生酸，棕榈油酸，花生四烯酸。

如上所述，已经鉴别出了多种细胞穿透肽。表 III 列出了一些这样的肽和它们的氨基酸序列。在某些实施方案中，细胞穿透肽具有多个正电荷，大小范围是 10-27 个氨基酸残基。预见到任意这样的肽适用于本发明。

表 III

肽名称	序列
MAP (模型两亲肽)	KLALKLALKALKAAKLA (SEQ ID NO: 2)
pAntp <sub>43-58</sub> (或穿透素)	RQIKIWFQNRMMKWK (SEQ ID NO: 3)
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 4)
SBP (来自 SV40 T 抗原的基于信号序列的肽)	MGLGLHLLVLAALQGAWSQPKKRKY (SEQ ID NO: 5)
FSB (来自 SV40 T 抗原的基于融合序列的肽)	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKRKY (SEQ ID NO: 6)
Tat (HIV Tat 肽)	GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 7)
SynB1 (来自内源性抗微生物多肽 I)	RGGRLSYSRRRFSTSTGR (SEQ ID NO: 8)
SynB3 (来自内源性抗微生物多肽 I)	RRLSYSRRRF (SEQ ID NO: 9)

在某些实施方案中，可以生成融合蛋白，其含有负责多肽的生物

活性(例如,治疗)性质的区域以及提高细胞摄入蛋白质的区域。例如,在某些实施方案中,所述融合蛋白可以含有流感病毒血凝素蛋白的一部分或全部。

## B. 纳米颗粒

本文使用的术语“纳米颗粒”指具有 1-1,000 nm 范围的尺度的任意材料。在有些实施方案中,纳米颗粒具有 2-200 nm 范围的尺度,优选 2-150 nm,和甚至更优选 2-100 nm。在本发明中使用的纳米颗粒包括例如下述纳米级材料:基于脂质的纳米颗粒,超顺磁性纳米颗粒,纳米壳,半导体纳米晶体,量子点,基于聚合物的纳米颗粒,基于硅的纳米颗粒,基于二氧化硅的纳米颗粒,基于金属的纳米颗粒,富勒烯和纳米管(Ferrari, 2005)。多肽与纳米颗粒的缀合,提供了具有潜在应用的结构,所述潜在应用用于靶向递送,控释,增强的细胞摄入和细胞内运输,以及体外和体内治疗肽的分子成像(West, 2004; Stayton 等, 2000; Ballou 等, 2004; Frangioni, 2003; Dubertret 等, 2002; Michalet 等, 2005; Dwarakanath 等, 2004)。

### 1. 超顺磁性氧化铁(“SPIO”)纳米颗粒

超顺磁性氧化铁(“SPIO”)纳米颗粒已经试验性地用于磁共振成像(“MRI”)对比度增强,组织修复,免疫测定,细胞分离,和药物递送(Gupta, 2004; Sestier 等, 1998; Wilhelm 等, 2003)。

通过本领域技术人员已知的任意方法(Gupta 等, 2005),可以制备和储存用于本发明的 SPIO 纳米颗粒。也可以使用商品化制备的 SPIO 纳米颗粒。为了结合多肽,可以给 SPIO 纳米颗粒包被聚合材料例如聚乙二醇或葡聚糖,多肽通过酰胺或酯键结合到聚合物表面。可以使用许多化学方案来结合多肽,包括碳化二亚胺化学,二异氰酸酯连接物,和琥珀酰亚胺基酯。已经用于结合多肽的连接物分子包括 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐, N-琥珀酰亚胺基 3-(2 吡啶基联硫基)丙酸酯, N-羟基琥珀酰亚胺,和 N, N' 亚甲双丙烯酰胺(Lewin 等, 2000; Roberts 等, 2002)。

例如, 通过使用异双功能连接物的 2 步方法, 将肽缀合到纳米颗粒上, 可以制备 SPIO 纳米颗粒-肽复合物。首先, 通过与表氯醇交联, 衍生商品化制备的葡聚糖包被的 SPIO 颗粒 (来自 Advanced Magnetics Inc., Cambridge, MA 的 “Feridex I.V” 或 “Combindex”, 或来自 Guerbet, Aulnay-sous-Bois, France 的 “Endorem”), 然后与氨反应, 以在葡聚糖包衣上生成氨基。然后, 可以用 SMCC 修饰纳米颗粒, 以提供马来酰亚胺部分 (SPIO-SMCC)。其次, 通过 SPIO-SMCC 中的马来酰亚胺基团与在 TCEP 还原二硫键之后得到的肽衍生物的巯基的反应, 将肽-胺衍生物缀合到 SPIO-SMCC 上。通过紫外-可见分光光度法, 测定所得到的肽-SPIO 缀合的比例, 并通过 G-25 凝胶过滤柱的大小排阻色谱进一步纯化。浓缩纯化的缀合物, 在 -20°C 保藏备用。使用类似的化学, 将药物衍生物缀合到 SPIO。关于 SPIO 的荧光标记, 用 DTPA 异硫代氰酸酯螯合剂 (I-24221, Molecular Probes) 偶联上述 SPIO 葡聚糖衍生物的伯胺, 以导入对多种金属离子的高亲和力结合位点, 然后用 Fluo-3 钾 (橙红) (F-3715, Molecular Probes) 标记。通过共焦荧光成像或 FACS 分析, 可以使用荧光标记的 FP-SPIO 纳米颗粒在体外和体内监测细胞摄入、细胞内运输、和生物分布。

可以在羧基末端修饰多肽, 添加赖氨酸或半胱氨酸残基, 以提供用于缀合到 SPIO 纳米颗粒上的游离伯胺或巯基官能团。类似地, 可以将修饰的多肽缀合到其它纳米颗粒上, 例如纳米壳, 量子点, 富勒烯和纳米管。

例如, 在自动合成仪上使用标准 Fmoc 肽化学合成的过程中, 可以将赖氨酸残基添加到肽上。可以以相同的方式, 添加半胱氨酸残基。对于通过重组方法制备的多肽, 可以将赖氨酸或半胱氨酸密码子添加到编码该多肽的 DNA 序列上, 在重组表达系统中表达所得到的多肽。

## 2. 基于脂质的纳米颗粒

基于脂质的纳米颗粒包括脂质体, 脂质制品和基于脂质的囊泡 (例如, DOTAP: 胆固醇囊泡)。基于脂质的纳米颗粒可以是带正电荷的, 带负电荷的或中性的。在某些实施方案中, 所述基于脂质的纳米颗粒

是带中性电荷的(例如, DOPC 脂质体)。

#### a. 脂质体

“脂质体”是一个总称, 它包括通过生成包封的脂质双层或聚集体形成的多种单层和多层脂质载体。脂质体可以表征为具有双层膜的囊泡结构, 通常包含磷脂, 和通常包含水性组合物的内部介质。本发明的脂质体包括单层脂质体, 多层脂质体和多泡脂质体。本发明的脂质体可以是带正电荷的, 带负电荷的或带中性电荷的。在某些实施方案中, 所述脂质体的电荷是中性的。

多层脂质体具有多个被水性介质分开的脂质层。当将包含磷脂的脂质悬浮于过量的水性溶液中时, 它们自发形成。脂质组分经历自重排, 然后形成密闭结构, 并在脂质双层之间包入水和溶解的溶质(Ghosh 和 Bachhawat, 1991)。亲脂分子或具有亲脂区域的分子也可以溶于脂质双层中, 或与脂质双层结合。

在具体方面, 多肽可以例如包封在脂质体的水性内部, 散布在脂质体的脂质双层之内, 通过与脂质体和多肽结合的连接分子结合到脂质体上, 包入脂质体中, 与脂质体复合等。

如本领域普通技术人员已知的, 可以通过不同方法制备根据本发明使用的脂质体。例如, 将磷脂 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)、例如中性磷脂二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)溶于叔丁醇中。然后将脂质与生物活性多肽和/或其它组分相混合。将 Tween 20 加入脂质混合物, 使得 Tween 20 是组合物重量的约 5%。将过量叔丁醇加入该混合物, 使得叔丁醇的体积是至少 95%。涡旋混合物, 在干冰/丙酮浴中冷冻, 并低压冻干过夜。将低压冻干的制品保藏在 $-20^{\circ}\text{C}$ , 可以使用最长达 3 个月。当需要时, 在 0.9%盐水中重配低压冻干的脂质体。

或者, 通过在容器内的溶剂中混合脂质, 可以制备脂质体, 所述容器例如玻璃梨形烧瓶。该容器应当具有比预期脂质体悬浮液的体积大 10 倍的体积。使用旋转蒸发器, 在负压下在约  $40^{\circ}\text{C}$  去除溶剂。根据脂质体的预期体积, 通常在约 5 分钟至 2 小时内去除溶剂。可以在真空下在干燥器中进一步干燥组合物。干燥的脂质通常在约 1 周后抛



弃，因为存在随着时间而变质的趋势。

通过摇动直到所有脂质膜重新悬浮，可以在无菌的无热原水中以约 25-50 mM 磷脂水合干燥的脂质。然后将含水脂质体分成等份，分别置于小瓶中，低压冻干，并在真空下密封。

如上所述制备的干燥的脂质或低压冻干的脂质体可以脱水，并在蛋白质或肽溶液中重配，并用适当溶剂（例如，DPBS）稀释至适当浓度。然后，在涡旋混合仪中剧烈振摇混合物。通过在 29,000 × g 离心去除未包封的其它物质，例如试剂，包括但不限于激素、药物、核酸构建体等，并洗涤脂质体沉淀。以适当的总磷脂浓度，例如约 50-200 mM，重新悬浮经洗涤的脂质体。根据标准方法，可以确定包封的其它物质或活性试剂的量。确定脂质体制品中包封的其它物质或活性试剂的量以后，可以将脂质体稀释至适当浓度，在 4℃ 保藏备用。包含脂质体的药物组合物通常包含无菌的、药学可接受的载体或稀释剂，例如水或盐水溶液。

在其它替代方法中，可以根据其它已知实验室方法制备脂质体（例如，参见 Bangham 等，1965；Gregoriadis，1979；Deamer 和 Uster，1983；Szoka 和 Papahadjopoulos，1978，各自在相关部分通过参考并入本文）。可以用于本发明的其它脂质体包括阳离子脂质体，例如，如 W002/100435A1，美国专利 5,962,016，美国申请 2004/0208921，W003/015757A1，W004029213A2，美国专利 5,030,453，和美国专利 6,680,068 中所述，它们都没有放弃地整体以参考方式并入本文。在 W004/002453A1 中也描述了制备脂质体的方法。中性脂质可以掺入阳离子脂质体中（例如，Farhood 等，1995）。在以参考方式并入本文的美国专利 5,855,911 中公开了可以在某些实施方案中使用的多种中性脂质体。这些方法的不同在于它们各自的包封水性物质的能力和它们各自的水性空间/脂质比。

脂质体的大小随合成方法而异。本发明中的脂质体可以是许多尺寸。在某些实施方案中，所述脂质体较小，例如，外径小于约 100 nm，约 90 nm，约 80 nm，约 70 nm，约 60 nm，或小于约 50 nm。在制备这

样的脂质体中，可以使用本文所述的或本领域普通技术人员已知的任意方案。制备脂质体的其它非限制性实例记载在美国专利 4,728,578, 4,728,575, 4,737,323, 4,533,254, 4,162,282, 4,310,505, 和 4,921,706; 国际申请 PCT/US85/01161 和 PCT/US89/05040; 英国专利申请 GB 2193095 A; Mayer 等, 1986; Hope 等, 1985; Mayhew 等 1987; Mayhew 等, 1984; Cheng 等, 1987; 和脂质体 Technology, 1984 中, 它们各自以参考方式并入本文。

#### b. 中性脂质体

在某些实施方案中，基于脂质的纳米颗粒是中性脂质体（例如，DOPC 脂质体）。本文使用的“中性脂质体”或“不带电荷的脂质体”定义为具有产生基本上中性的净电荷（基本上不带电荷的）的一种或多种脂质组分的脂质体。“基本上中性的”或“基本上不带电荷的”是指，在给定群体（例如，脂质体群体）内的极少（如果有任何的话）脂质组分包含未被另一组分的相反电荷抵消掉的电荷（即，少于 10% 的组分包含未抵消的电荷，更优选少于 5%，最优选少于 1%）。在某些实施方案中，中性脂质体可以主要包含在生理条件（即，在约 pH7）下本身是中性的脂质和/或磷脂。

本发明的脂质体和/或基于脂质的纳米颗粒可以包含磷脂。在某些实施方案中，单一一类磷脂可以用于制备脂质体（例如，中性磷脂，例如 DOPC，可以用于制备中性脂质体）。在其它实施方案中，超过一类磷脂可以用于制备脂质体。

磷脂包括，例如，磷脂酰胆碱，磷脂酰甘油，和磷脂酰乙醇胺；因为磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱在生理条件（即，在约 pH 7）下是不带电荷的，这些化合物可以特别适用于制备中性脂质体。在某些实施方案中，磷脂 DOPC 用于制备不带电荷的脂质体。在某些实施方案中，可以使用非磷脂的脂质（例如，胆固醇）。

磷脂包括甘油磷脂和某些鞘脂。磷脂包括但不限于，二油酰基磷脂酰胆碱（“DOPC”），卵磷脂酰胆碱（“EPC”），二月桂酰基磷脂酰胆碱（“DLPC”），二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱（“DMPC”），二棕榈酰基磷脂酰胆

碱 ("DPPC"), 二硬脂酰基磷脂酰胆碱 ("DSPC"), 1-肉豆蔻酰基-2-棕榈酰基磷脂酰胆碱 ("MPPC"), 1-棕榈酰基-2-肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱 ("PMPC"), 1-棕榈酰基-2-硬脂酰基磷脂酰胆碱 ("PSPC"), 1-硬脂酰基-2-棕榈酰基磷脂酰胆碱 ("SPPC"), 二月桂酰基磷脂酰甘油 ("DLPG"), 二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油 ("DMPG"), 二棕榈酰基磷脂酰甘油 ("DPPG"), 二硬脂酰基磷脂酰甘油 ("DSPG"), 二硬脂酰基鞘磷脂 ("DSSP"), 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 ("DSPE"), 二油酰基磷脂酰甘油 ("DOPG"), 二肉豆蔻酰基磷脂酸 ("DMPA"), 二棕榈酰基磷脂酸 ("DPPA"), 二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺 ("DMPE"), 二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺 ("DPPE"), 二肉豆蔻酰基磷脂酰丝氨酸 ("DMPS"), 二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸 ("DPPS"), 脑磷脂酰丝氨酸 ("BPS"), 脑鞘磷脂 ("BSP"), 二棕榈酰基鞘磷脂 ("DPSP"), 二肉豆蔻基磷脂酰胆碱 ("DMPC"), 1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 ("DAPC"), 1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 ("DBPC"), 1,2-dieicosenoyl-sn-甘油-3-磷酸胆碱 ("DEPC"), 二油酰基磷脂酰乙醇胺 ("DOPE"), palmitoyloeoyleoyl 磷脂酰胆碱 ("POPC"), palmitoyloeoyleoyl 磷脂酰乙醇胺 ("POPE"), 溶血磷脂酰胆碱, 溶血磷脂酰乙醇胺, 和二亚油酰基磷脂酰胆碱。

磷脂可以来自天然或合成来源。但是, 在某些实施方案中, 不使用来自天然来源的磷脂 (例如卵或大豆磷脂酰胆碱, 脑磷脂酸, 脑或植物磷脂酰肌醇, 心磷脂和植物或细菌磷脂酰乙醇胺) 作为主要磷脂 (即, 占总磷脂组合物的 50% 或更多), 因为这可能导致得到的脂质体不稳定和泄漏。

### c. 基于脂质的囊泡

考虑用于本发明的另一类基于脂质的纳米颗粒是基于脂质的囊泡。基于脂质的囊泡可以使用上述的一种或多种脂质制备。

在某些实施方案中, 所述基于脂质的囊泡是 DOTAP: 胆固醇囊泡。DOTAP: 胆固醇囊泡通过混合阳离子脂质 DOTAP (1,2-双(油酰基氧)-3-(三甲基铵)-丙烷) 和胆固醇来制备。用 DNA 制备的囊泡可以形

成这样的结构(称作“三明治”),其中DNA看起来凝缩在2个脂质双层之间(美国专利6,770,291和6,413,544)。

可以如下面非限制性实例所述制备DOTAP:胆固醇-多肽复合物。如前所述(美国专利6,770,291和6,413,544; Templeton, 1997)合成DOTAP:胆固醇(DC)纳米颗粒(大小为50-100 nm)。简而言之,在氯仿中以1:1比例(20  $\mu$ M DOTAP和20  $\mu$ M 胆固醇)混合DOTAP和胆固醇,并在冰冷却的旋转式蒸发器中蒸发。将得到的混合物重新悬浮于5%葡萄糖中,在55  $^{\circ}$ C脉冲超声处理,并低压冻干。将低压冻干的产品溶于5%葡萄糖,通过递减大小(1.0, 0.45, 0.2, 和 0.1  $\mu$ m)的小型挤压机(Avanti Lipids, A1)进行挤压,产生50-100 nm的平均粒径。类似地制备不含胆固醇的DOTAP。在4  $^{\circ}$ C保存合成的纳米颗粒,并用于制备纳米颗粒复合物。

为了制备DOTAP:胆固醇-肽纳米颗粒,将20  $\mu$ g肽稀释在100  $\mu$ l 5%葡聚糖水溶液(“D5W”)中,与等体积经稀释的DOTAP:胆固醇或单独的DOTAP(在D5W中将40  $\mu$ l 20 mM  $\mu$ M DOTAP:胆固醇或单独的DOTAP稀释至总体积100  $\mu$ l)轻轻混合,这会产生100 mg/ml肽和4 mM DOTAP:胆固醇或DOTAP的终浓度。用不同比例的肽/DOTAP:胆固醇或DOTAP,优化配方。分别通过N4 Plus Submicron Particle Sizer (N4颗粒大小分析仪)和Delsa 440SX Zeta Potential Analyzer (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA)测得,得到的肽-纳米颗粒具有100-250 nm的平均大小和+ 50 mV的正电荷。

在本发明的有些实施方案中,将用超顺磁性纳米颗粒制备的纳米颗粒-多肽复合物掺入DOTAP:胆固醇囊泡。为了将肽-SPIO缀合物装配在DOTAP:胆固醇囊泡中,可以通过最佳化摩尔比的每种组分的自装配过程,将肽-SPIO缀合物包封在DOTAP:胆固醇囊泡中。通过首先在D5W中混合5-50  $\mu$ M肽-SPIO缀合物或5-50  $\mu$ M肽 + 0.1-1 mg Fe (SPIO)/ml 1小时,然后与等体积的在D5W中的40-100 mM DOTAP:胆固醇囊泡相合并,装配肽-SPIO纳米颗粒,或各肽和SPIO组分。通过分光光度计测量分析在400nm的光密度,监测在D5W中肽-SPIO-DOTAP:胆固醇颗

粒和胶体稳定性。通过 FACS 分析测定用 Fluo-3 标记的肽-SPIO 缀合物转染的肿瘤细胞中的细胞摄入，优化包囊过程。

### 3. 纳米颗粒的靶向

通过添加配体而不损害纳米颗粒递送其多肽有效负载的能力，实现靶向递送。预见到，这会递送到特定细胞、组织和器官。基于配体的递送系统的靶向特异性是基于配体受体在不同细胞类型上的分布。靶向配体可以与纳米颗粒非共价或共价结合，且可以通过本文讨论的许多方法，缀合到纳米颗粒上。

可以用于靶向纳米颗粒的蛋白质或肽的实例包括转铁蛋白质，乳铁蛋白质，TGF- $\alpha$ ，神经生长因子，白蛋白质，HIV Tat 肽，RGD 肽，和胰岛素等 (Gupta 等，2005; Ferrari, 2005)。

## II. 生物活性多肽

本发明提供了纳米颗粒-多肽复合物和使用这样的复合物向细胞递送多肽的方法。所述复合物包含与纳米颗粒相结合的生物活性多肽。

“生物活性”多肽是具有一些希望的生物功能或活性的蛋白质或肽。作为一个实例，对于抗癌治疗希望的生物功能包括，抑制蛋白激酶，促进细胞凋亡，抑制血管发生等。因而，生物活性抗癌多肽可以是会抑制蛋白激酶、促进细胞凋亡或抑制血管发生的多肽。

根据本发明，通过使生物活性肽结合纳米颗粒，可以形成纳米颗粒-多肽复合物。特别预见到包含目标蛋白质的一个或多个功能域的生物活性肽。

### A. 创建生物活性多肽

本发明提供了鉴别和产生生物活性多肽(例如，生物活性肽)的方法。在某些实施方案中，生物活性多肽可以通过鉴别多肽中的一个或多个功能域来制备。

通过使用本领域众所周知的分子和细胞生物学方法进行结构-功能研究，可以凭经验确定蛋白质的功能域。例如，通过重组 DNA 方法，可以制备蛋白质的缺失突变体或置换突变体，且可以研究这样的突变

蛋白质的生物性质。或者，通过氨基酸序列分析，可以鉴别蛋白质序列中的推定功能域，且可以设计含有这些预测功能域的肽并测试其生物活性。

在某些实施方案中，计算机辅助的结构分析可以用于鉴别多肽中的功能域。通常，计算机辅助的结构分析包含，评价基因的氨基酸和/或核苷酸序列。计算机辅助的结构分析可以用于鉴别例如功能域，例如蛋白激酶（例如，PKC）激活或相互作用位点，肉豆蔻酰化位点，PDZ II 类域或 A 激酶锚定蛋白（AKAP）基序。计算机辅助的结构分析可以鉴别出推定功能域。推定功能域的鉴别可足以鉴别出生物活性肽。但是，如果需要确认功能域的活性，则可以使用本领域已知的多种不同生物测定来证实功能域的活性。用于进行计算机辅助结构分析的软件包括 Scansite 程序和 在 ExPASy 蛋白质组学服务器上找到的其它分析程序。

在本发明的具体实施方案中，预见到具有抗癌性质的肽。这样的肽可以基于肿瘤抑制基因产物。

#### B. 肿瘤抑制基因

肿瘤抑制癌基因起抑制过度细胞增殖的功能。这些基因的失活会破坏它们的抑制活性，导致失调的增殖。

一个研究较多的肿瘤抑制基因是 p53。在通过化学致癌作用、紫外线辐射和几种病毒转化的许多细胞中，已经发现了高水平的突变型 p53。p53 基因是许多种人肿瘤中突变灭活的常见靶物，且已经证实是常见人癌症中最经常突变的基因。它在超过 50% 的人 NSCLC (Hollstein 等, 1991) 和许多种其它肿瘤中突变。

p53 基因编码 393 个氨基酸的磷蛋白，后者可以与宿主蛋白质（例如大-T 抗原和 E1B）形成复合物。该蛋白质存在于正常组织和细胞中，但是其浓度与转化的细胞或肿瘤组织相比很小。

认为野生型 p53 是许多细胞类型中重要的生长调节剂。错义突变对于 p53 基因是常见的，且是癌基因的转化能力所必需的。点突变引起的单个遗传改变，可以产生致癌的 p53。但是，与其它癌基因不同，

已知 p53 点突变发生在至少 30 个不同密码子中,经常产生造成细胞表型漂移的显性等位基因,而无纯合性的降低。另外,许多这样的显性负等位基因看起来在生物中是耐受的,且在种系中传递。多种不同的突变型等位基因表现出从最小功能障碍至强穿透性的显性负等位基因 (Weinberg, 1991)。

细胞增殖的另一种抑制剂是 p16。真核生物细胞周期的主要转换由细胞周期蛋白依赖性的激酶或 CDK 触发。一种 CDK, 细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (CDK4), 会调节通过  $G_1$  的进展。该酶的活性可能是在  $G_1$  晚期磷酸化 Rb。CDK4 的活性由激活亚基、D-型细胞周期蛋白、和抑制亚基控制, 已经将 p16<sup>INK4</sup> 生物化学地表征为特异性地结合和抑制 CDK4 的蛋白质, 因而可以调节 Rb 磷酸化 (Serrano 等, 1993; Serrano 等, 1995)。因为 p16<sup>INK4</sup> 蛋白是 CDK4 抑制剂 (Serrano, 1993), 该基因的缺失可能增强 CDK4 的活性, 导致 Rb 蛋白的高度磷酸化。还已知 p16 会调节 CDK6 的功能。

p16<sup>INK4</sup> 属于新描述的 CDK-抑制蛋白类别, 所述蛋白还包括 p16<sup>B</sup>, p19, p21<sup>WAF1</sup>, 和 p27<sup>KIP1</sup>。p16<sup>INK4</sup> 基因作图到 9p21, 即在许多肿瘤类型中频繁缺失的染色体区。p16<sup>INK4</sup> 基因的纯合缺失和突变在人肿瘤细胞系中常见。该证据表明, p16<sup>INK4</sup> 基因是肿瘤抑制基因。但是, 该解释已经受到下述发现的挑战, 即原代非培养肿瘤中 p16<sup>INK4</sup> 基因改变的频率远远低于培养的细胞系 (Caldas 等, 1994; Cheng 等, 1994; Hussussian 等, 1994; Kamb 等, 1994; Kamb 等, 1994; Mori 等, 1994; Okamoto 等, 1994; Nobori 等, 1995; Orlow 等, 1994; Arap 等, 1995)。用质粒表达载体转染恢复野生型 p16<sup>INK4</sup> 功能, 减少了有些人癌症细胞系的集落形成 (Okamoto, 1994; Arap, 1995)。

在表 IV 中列出了根据本发明可以使用的其它肿瘤抑制基因。在表 IV 中列出的基因作为可以用于本发明的肿瘤抑制基因的非限制性实例而提供。此外, 预见到实际上现在已知或可能以后发现的任意肿瘤抑制基因 (例如, 促凋亡基因, 或对癌细胞是细胞毒性的基因) 都可以用于本发明。预见到实际上表现出肿瘤抑制作用的任意人基因产物都可

以用于衍生抗癌生物活性肽。

表 IV

肿瘤抑制基因

基因	基因	基因	基因
101F6	DAF-18	HYAL2	PTEN
ABR	D-APC	IGBP7	PTPN13
ADPRTL3	DBC2	IGSF4	PTPRG
ANP32C	DCC	ING1	RASSF1
ANP32D	DDX26	ING1L	RB1
APC2	DEC1	ING4	RBBP7
APC	DLC1	1 (2) tid	RBM6
ARF	DLEC1	1 (3) mbn	RBX1
ARHGAP8	DLEU1	1 (3) mbt	RECK
ARHI	DLEU2	LAPSER1	RFP2
AT1G14320	DLG1	LATS1	RIS1
ATM	DLGH1	LATS2	RPL10
ATP8A2	DLGH3	LDOC1	RPS29
AXUD1	DMBT1	LOHIICR2A	RRM1
BAP1	DNAJA3	LRPIB	S100A2
BECN1	DOC-1	LUCA3	SEMA3B
BIN1	DPCH	MAD	SF1
BRCA1	DPH2L	MAP2K4	SFRP1
BRCA2	EGR1	MAPKAP3	SLC22AK
BTG1	FABP3	MCC	SLC26A3
BTG2	FAT	MDC	SMARCA4
C1orf1	FGL1	MEN1	ST7
C5orf4	FHIT	ML-1	ST7L
C5orf7	FLJ10506	MLH1	ST13
Cables	FOXD1	MRV11	ST14
CACNA2D2	FOXP1	MTAP	STIM1
CAP-1	FT	MX11	TCEB2
CARS	FUS1	NAP1L4	THW
CAV1	FUS2	NBR2	Timp3
CD81	GAK	NF1	TP53
CDC	GAS1	NF2	TP63
CDK2AP1	GAS11	NORE1	TRIM8
CDKN1A	GLD-1	NPR2L	Tsc2
CDKN1C	GLTSCR1	NtRb1	TSG1-1
CDKN2A	GLTSCR2	OVCA2	TSSC1
CDKN2B	GRC5	PDGFRL	TSSC3
CDKN2X	GRLF1	PHEMX	TSSC4



基因	基因	基因	基因
Ciaol***	HDAC3	PHyde	VHL
CLCA2	HEMK	PIG8	Vh1h
CREBL2	HIC1	P1K3CG	WFDC1
CTNNA1	HRG22	P1NX1	WIT-1
CUL2	HSAL2	PLAGL1	WT1
CW17R	HTS1	PRDM2	WFOX
DAB2	HYAL1	PTCH	p53
bak	MDA-7	p21	bax
fas			

### C. 来自人染色体 3p21.3 的肿瘤抑制基因

肿瘤抑制基因 (TSG) 在人肺癌和其它癌症的发病机理中起重要作用。肺癌细胞携带多个已知显性和隐性癌基因的突变和缺失 (Sekido 等, 1998; Virmani 等, 1998)。在染色体区域 3p, 5q, 6p, 8p, 9p, 和 11p 以及其它位点已经发现了已知的 TSG, 例如 Rb, p53, 和推定 TSG (Sekido 等, 1998; Gazdar 等, 1994; Minna, 1997)。新鲜肺肿瘤和肿瘤细胞的细胞遗传学和等位基因分型研究证实了在多个位点的肿瘤细胞等位基因丧失, 表明存在一个或多个这样的 TSG (Sekido 等, 1998; Virmani 等, 1998; Gazdar 等, 1994; Minna 等, 1997)。但是, 已经证实在染色体 3 短臂 (3p) 上的细胞遗传学改变和等位基因缺失最频繁地涉及约 90% 的小细胞肺癌 (SCLC) 和 >50% 的非小细胞肺癌 (NSCLC) (Sekido 等, 1998; Gazdar 等, 1994; Minna, 1997; Daly 等, 1993)。SCLC 和 NSCLC 是肺肿瘤的 2 个治疗组, 由 4 个组织学类型组成。鳞状细胞-、腺-、和大细胞癌是在 NSCLC 组中。小细胞肺癌是在 SCLC 组中。约 75% 的肺肿瘤是 NSCLC。NSCLC 的转移发生得比 SCLC 晚。SCLC 是实体瘤中转移性最高之一 (Mabry 等, 1998)。另外, 已经在肺癌以外的其它几种癌症中观察到类似的 3p 改变, 例如肾癌、乳腺癌、头颈癌、胰腺癌、肾癌、口腔癌和子宫颈癌 (Roth, 1998; Zbar 等, 1987; Gazdar 等, 1998; Sekido 等, 1998; Buchhagen 等, 1996; Gorunova 等, 1998; Hughson 等, 1998; Uzawa 等, 1998; Kersemaekers 等, 1998; Wistuba 等, 1997)。此外, 已经在 3p21.3 处 450-kb 区域中定位和分离了通过肺癌中纯合缺失所定义的一组 TSG (Sekido 等,

1998; Minna 等, 1997; Hung 等, 1995; Sekido 等, 1996; Wistuba 等, 1999)。肺癌肿瘤形成前的研究表明, 3p21 等位基因缺失是迄今检测的肺癌中最早的遗传异常, 发生在增生病损中; 这证实了一个或多个 3p-隐性癌基因在许多人癌症的分子发病机理中起"看门人"的作用, 包括肺癌, 其中它可能涉及所有病例的>50%(Sekido 等, 1998; Minna 等, 1997; Hung 等, 1995; Sekido 等, 1996; Wistuba 等, 1999; Kohno 等, 1999; Wistuba 等, 1999)。

在人染色体 3p21.3 的 120-kb 关键肿瘤纯合缺失区(见于肺癌和乳腺癌中)中已经鉴别出一组基因。这些基因已经命名为 CACNA2D2, PL6, 101F6, NPR1.2, BLU, RASSF1, FUS1, HYAL2 和 HYAL1。研究了一些这样的基因的表达对几种类型的人 NSCLC 细胞的细胞增殖的影响。这些研究表明, FUS1, 101F6, HYAL2 和 NPRL2 以及其它基因是候选肿瘤抑制基因(Ji 等, 2000)。

腺病毒载体-或 DOTAP:胆固醇纳米颗粒-介导的基因转移对 3p21.3-缺陷型人肺癌细胞中野生型-FUS1 功能的恢复, 在体外和体内通过诱导细胞凋亡和细胞动力学改变而抑制这些肿瘤细胞的生长(Ito 等, 2004)。这证实了 FUS1 的肿瘤抑制活性。

### III. 药物制剂

本发明的药物组合物包含有效量的一种或多种肽, 纳米颗粒-多肽复合物或其它试剂(溶于或分散在药学可接受的载体中)。短语"药学或药理学可接受的"指当施用给动物(例如, 人, 在适合时)时不会产生不利的、过敏性的或其它不良反应的分子实体和组合物。本领域技术人员考虑本说明书的公开内容, 会明白含有至少一种肽或纳米颗粒-多肽复合物或其它活性成分的药物组合物的制备, 如在以参考方式并入本文的 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990 中所例示的。此外, 对于动物(例如, 人)施用而言, 应当理解制剂应当满足 FDA 生物标准办公室要求的无菌、致热原性、一般安全和纯度标准。

本文使用的"药学可接受的载体"包括任意和所有的溶剂,分散介质,包衣,表面活性剂,抗氧化剂,防腐剂(例如,抗细菌剂,抗真菌剂),等渗剂,吸收延迟剂,盐,防腐剂,药物,药物稳定剂,凝胶,粘合剂,赋形剂,崩解剂,润滑剂,甜味剂,矫味剂,染料,类似的物质和其组合,如本领域普通技术人员已知的(参见,例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, 其以参考方式并入本文)。除了任何常规载体与活性成分不相容以外,预见到它在治疗或药物组合物中的应用。

药物组合物可以包含不同类型的载体,这取决于它是否以固体、液体或气雾剂形式施用,和这样的给药途径如注射是否需要是无菌的。本发明可以如下施用:静脉内地,真皮内地,动脉内地,腹腔内地,病损内地,颅内地,关节内地,前列腺内地,胸膜内地,气管内地,鼻内地,玻璃体内地,阴道内地,直肠内地,外用地,瘤内地,肌肉内地,腹膜内地,皮下地,结膜下地,膀胱内地,粘膜地,心包内地,脐带内地,眼内地,口服地,外表地,局部地,吸入(例如气雾剂吸入),注射,输注,连续输注,直接、通过导管、通过灌洗来局部灌注浸浴靶细胞,在乳剂中,在脂质组合物(例如,脂质体)中,或通过其它方法或前述方式的任意组合,如本领域普通技术人员已知的(参见,例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, 以参考方式并入本文)。

在某些实施方案中,腹腔内地施用所述药物组合物。在其它实施方案中,腹腔内地施用所述药物组合物,以治疗癌症(例如,癌性肿瘤)。例如,可以腹腔内地施用所述药物组合物,以治疗胃肠癌。在某些实施方案中,可能希望施用药物组合物到肿瘤内或附近。

在某些优选实施方案中,经口施用所述药物组合物以治疗癌症(例如,胃肠癌)。

通过身体和生理因素,例如体重、病症的严重性、待治疗疾病的类型、以前或并行的治疗干预、患者的特发病和给药途径,可以确定

施用给患者的本发明组合物的实际剂量。在任何情况下，负责给药的从业医生会确定组合物中活性成分的浓度和适合个体受试者的剂量。

在某些实施方案中，药物组合物可以包含，例如，至少约 0.1% 的活性化合物。在其它实施方案中，例如，所述活性化合物可以占约 2% - 约 75% 重量单位，或约 25% - 约 60%，和其中可推导的任意范围。在其它非限制性实例中，剂量也可以包含，每次施用药约 1 微克/kg/体重，约 5 微克/kg/体重，约 10 微克/kg/体重，约 50 微克/kg/体重，约 100 微克/kg/体重，约 200 微克/kg/体重，约 350 微克/kg/体重，约 500 微克/kg/体重，约 1 毫克/kg/体重，约 5 毫克/kg/体重，约 10 毫克/kg/体重，约 50 毫克/kg/体重，约 100 毫克/kg/体重，约 200 毫克/kg/体重，约 350 毫克/kg/体重，约 500 毫克/kg/体重，至约 1000 mg/kg/体重或更多，和其中可推导的任意范围。在本文列出的数值的可推导范围的非限制性实例中，基于上述数值，可以施用药约 5 mg/kg/体重至约 100 mg/kg/体重，约 5 微克/kg/体重至约 500 毫克/kg/体重，等。

在任何情况下，组合物可以包含各种不同的抗氧化剂，以延迟一种或多种组分的氧化。另外，使用防腐剂可以预防微生物作用，所述防腐剂例如各种不同的抗细菌剂和抗真菌剂，包括但不限于对羟苯甲酸酯（例如，对羟苯甲酸甲酯，对羟苯甲酸丙酯），三氯叔丁醇，苯酚，山梨酸，硫柳汞或其组合。

可以将一种或多种肽、纳米颗粒-多肽复合物或其它试剂配制成游离碱、中性或盐形式的组合物。药学可接受的盐，包括酸加成盐，例如，与蛋白质性组合物的游离氨基形成的盐，或与无机酸（例如，盐酸或磷酸）或有机酸（例如，乙酸，草酸，酒石酸或扁桃酸）形成的盐。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱（例如，氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁）或有机碱（例如，异丙胺，三甲胺，组氨酸或普鲁卡因）。

在其中组合物是液体形式的实施方案中，载体可以是溶剂或分散介质，其包含但不限于，水，乙醇，多元醇（例如，甘油，丙二醇，

液体聚乙二醇等), 脂质 (例如, 甘油三酯, 植物油, 脂质体) 和其组合。例如通过使用包衣 (例如卵磷脂), 通过分散在载体 (例如, 液体多元醇或脂质) 中而维持需要的粒度, 使用表面活性剂 (例如, 羟丙基纤维素), 或这些方法的组合, 可以维持适当的流动性。在许多情况下, 优选地包含等渗剂, 例如, 糖, 氯化钠或其组合。

在其它实施方案中, 本发明中可以使用滴眼液、鼻溶液或喷雾剂、气雾剂或吸入剂。这样的组合物通常设计成与靶组织类型相容。在一个非限制性实例中, 鼻溶液通常是设计成在滴液或喷雾剂中施用给鼻道的水性溶液。将鼻溶液制备成在许多方面与鼻分泌物相类似, 从而维持正常的纤毛作用。因而, 在优选的实施方案中, 水性鼻溶液通常是等渗的, 或轻微缓冲至维持在 pH 约 5.5-约 6.5。另外, 如果需要, 可以在制剂中包含抗微生物防腐剂, 类似于在眼制剂、药物中使用的那些, 或适当的药物稳定剂。例如, 各种不同的商品化的鼻制剂是已知的, 包括抗生素或抗组胺药等药物。

在某些实施方案中, 制备用于口服等途径给药的一种或多种肽或纳米颗粒-多肽复合物。在这些实施方案中, 固体组合物可以包含, 例如, 溶液, 悬浮液, 乳剂, 片剂, 丸剂, 胶囊剂 (例如, 硬或软壳明胶胶囊), 持续释放制剂, 含服组合物, 含锭, 酏剂, 悬浮液, 糖浆, 薄片, 或其组合。口服组合物可以与饮食食物直接掺合。用于经口给药的优选载体包含惰性稀释剂, 可同化食用载体或其组合。在本发明的其它方面, 口服组合物可以制备成糖浆或酏剂。糖浆或酏剂可以包含, 例如, 至少一种活性剂, 甜味剂, 防腐剂, 矫味剂, 染料, 防腐剂, 或其组合。

在某些优选实施方案中, 口服组合物可以包含一种或多种粘合剂, 赋形剂, 崩解剂, 润滑剂, 矫味剂, 和其组合。在某些实施方案中, 组合物可以包含下述一种或多种: 粘合剂, 例如, 西黄蓍胶, 阿拉伯胶, 玉米淀粉, 明胶或其组合; 赋形剂, 例如, 磷酸二钙, 甘露醇, 乳糖, 淀粉, 硬脂酸镁, 糖精钠, 纤维素, 碳酸镁或其组合; 崩解剂, 例如, 玉米淀粉, 马铃薯淀粉, 海藻酸或其组合; 润滑剂, 例如, 硬脂酸镁;

甜味剂，例如，蔗糖，乳糖，糖精或其组合；矫味剂，例如，薄荷，冬青油，樱桃香料，橙子香料等；或前述组合。当剂量单位形式是胶囊时，它可以在上述类型的物质之外还含有载体，例如液体载体。多种其它物质可以作为包衣或以其它方式修饰剂量单位的物理形式。例如，可以用虫胶、糖或二者包被片剂、丸剂或胶囊。

适用于其它给药模式的其它制剂包括栓剂。栓剂是不同重量和形状的固体剂型，通常通过插入直肠、阴道或尿道进行给药。插入后，栓剂会软化、融化或溶解在腔液中。通常，就栓剂而言，传统载体可以包括，例如，聚亚烷基二醇，甘油三酯或其组合。在某些实施方案中，可以从包含例如范围为约 0.5% - 约 10%、优选约 1% - 约 2% 的活性成分的混合物制备栓剂。

通过将需要量的活性化合物掺入根据需要含有多种上述其它成分的适当溶剂中，然后进行过滤除菌，可以制备无菌注射溶液。通常，通过将各种灭菌活性成分掺入含有基础分散介质和/或其它成分的无菌介质中，制备分散系。在用于制备无菌注射溶液、悬浮液或乳剂的无菌粉末的情况下，优选的制备方法是真空干燥或冷冻干燥技术，它们会产生活性成分和来自先前无菌过滤的液体介质的任何其它希望的成分的粉末。如果需要，应当适当缓冲液体介质，在用足够的盐水或葡萄糖注射之前，首先使液体稀释剂等渗。也预见到用于直接注射的高度浓缩的组合物的制备，其中预见到使用 DMSO 作为溶剂会导致非常快速的穿透，将高浓度的活性试剂递送到小区域。

组合物必须在生产和保藏条件下是稳定的，并防止微生物（例如细菌和真菌）污染作用。应当理解，应当将内毒素污染保持最低（在安全水平），例如，低于 0.5 ng/mg 蛋白质。

在具体实施方案中，通过在组合物中使用延迟吸收的试剂，例如，单硬脂酸铝，明胶或其组合，可以实现注射组合物的延长吸收。

#### IV. 磁共振成像

在磁共振成像 (MRI) 中，患者躺在静磁场中，并使用射频 (RF) 脉冲

以及空间和时间磁场梯度进行成像分析。MRI 使用核自旋性质来收集图像数据。具有不成对核子(质子或中子)的核具有称作自旋的性质,这会产生可以用于进行 MRI 的非零磁矩(参见,例如,美国专利 5,397,987)。氢核具有单个质子,且许多 MRI 技术利用氢核,因为它们在人组织中是普遍的。当将受试者置于主磁场中时,它的核按磁场的方向排列(即,沿着"磁化轴");核的朝向可以表达为磁化矢量(参见,例如,Horowitz, 1995)。在磁共振的经典物理描述中,这些自旋核可以以围绕磁化轴的圆锥方式旋进,通常彼此相对异相。

为了在特定核的共振频率诱导同相自旋,在该共振频率传播大功率射频激发脉冲,经常在千瓦量级。该射频脉冲也会造成样品(例如,人脑)中的核相对于主磁场产生的磁化矢量进行旋转(参见,例如,Horowitz, 1995)。样品中的自旋核产生射频信号,它会随时间衰减。在射频激发脉冲之后应用随时间改变的梯度磁场,以在空间上分辨衰减的射频信号。因而,射频激发脉冲和随时间改变的梯度磁场一起造成样品发射随时间改变的磁共振射频信号,后者称作"自由感应衰减"(FID)信号。磁共振(MR)扫描仪的天线会接收这些 FID 信号,这些 MR 成像信号传送到处理器。处理器使用这些信号产生 MR 图像,它们反映了自旋核的空间分布或化学环境。

使用造影剂来增加目标区域与背景之间的信号差异。超顺磁性纳米颗粒可以用作 MRI 的造影剂(Gupta 等, 2005; Ferrari, 2005)。颗粒可以在组织(例如肿瘤)中累积,无论被动地还是通过靶向递送(Morawski 等, 2005)。也可以使用磁场来将这样的颗粒定位在特定组织中。靶向递送也可以包含掺入特定蛋白,例如如上所述的转铁蛋白。

本发明的超顺磁性纳米颗粒-多肽复合物可以用于 MRI 中,以鉴别摄入生物活性多肽的组织 and 细胞。

在使用之前,可以体外评价纳米颗粒(例如,肽-SPIO-DOTAP:胆固醇颗粒)的细胞毒性。人癌症细胞可以用于体外评价肽-SPIO-DOTAP:胆固醇颗粒对细胞生长的影响和细胞凋亡的诱导。作为一个非限制性实例,通过 XTT 测定,在 96-孔平板中用  $1 \times 10^4$  细胞/孔进行细胞毒

性测量。用 PBS 冲洗细胞,与在无血清培养基中稀释至终浓度为约 1-10 mM 肽-SPIO 缀合物的肽-SPIO-DOTAP:胆固醇颗粒、和 4-10 mM DOTAP:胆固醇一起温育。肽, SPIO, 和 DOTAP:胆固醇颗粒在 96-孔磁性板上用作对照 30 min (Dyna1 Biotech Inc., Brown Deer, WI)。通过用 PBS 冲洗 3 次,去除过量的未结合的颗粒。然后,向孔中加入新鲜培养基。在处理 24, 48, 和 72 h, 测定细胞毒性和细胞凋亡的诱导。根据生产商的说明书,使用 XTT 测定 (Roche Biochemicals) 测量细胞生存力,通过使用 TUNEL-染色的 FACS 分析,测量细胞凋亡。肽-DOTAP:胆固醇颗粒可以用作阳性对照。

为了体外评价肽-SPIO 纳米颗粒的细胞摄入和运输,通过 FACS 分析,可以将如上处理过的肿瘤细胞用于定量测量随肽-SPIO 浓度而变化的 Fluo-3-标记的肽-SPIO 纳米颗粒的摄入。也可以通过磁共振 (MR) 测定细胞摄入并定量分析。作为一个非限制性实例,在 42°C, 将肽-SPIO-转染的 H1299 细胞以 0, 315, 625, 125, 2500, 5000, 和 10000 细胞/ml 的不同细胞浓度悬浮于 15% 明胶,然后冷却至室温,在 1.5 ml-微量离心机塑料管中形成明胶细胞块。使用 4.7-T Bruker MR, 得到幻影 (phantoms) 的 T2-加权 MR 图像。3 维梯度回音序列用于数据获取。序列参数是: TR25 msec, TE5.1 msec, 和 AC128。使用下述量纲矢向地定向 3 维板: FOV632.4 cm, 矩阵 25612896。然后,在 Paravision 采集和处理软件包 (Bruker, Germany) 内重建斜投影 (相对于磁体轴), 以得到解剖相关的平面。通过具有不同几何学的类似序列, 测量含有肽-SPIO-转染的 H1299 细胞的幻影: FOV6 cm, 矩阵 256256, 切片厚度 1 mm。在有些情况下,关于幻影 MR 仅测量一个切片。通过 MR146, 基于从肽-SPIO-DOTAP:胆固醇颗粒在溶液中的系列稀释液产生的标准曲线, 计算细胞中的肽-SPIO 浓度。通过使用锥虫蓝淬灭测定来熄灭胞外荧光, 并使用共焦荧光显微镜来观察肽-SPIO 缀合物的内在化,也可以使用 Fluo-3-标记的肽-SPIO 纳米颗粒来评价内在化。

为了体内评价纳米颗粒 (例如, 肽-SPIO-DOTAP:胆固醇或肽



-SPIO-DOPC) 的磁力驱动的靶向递送和治疗功效,人癌症小鼠可以用于评价肽-SPIO 纳米颗粒的全身给药的磁力靶向递送和治疗功效。作为一个非限制性实例,通过前述的胸腔内注射,将肿瘤细胞接种进裸鼠。肿瘤细胞接种后 7-10 天,给小鼠注射 100  $\mu$ l 肽-SPIO-DOTAP:胆固醇颗粒,浓度为约 5 mM 肽-SPIO 缀合物、4 mM DOTAP:胆固醇,将肽-DOTAP:胆固醇和 SPIO-DOTAP:胆固醇颗粒用作对照,单独的 PBS 用作假对照。3 只动物用于每个处理组,注射后 5-30 min 肿瘤部位经历磁梯度场,预定场强度以及定位距离和区域基于在肺肿瘤部位 10-30 min 的 MRI。MRI 用于治疗计划,定位和监测肽-SPIO 分布和治疗后的治疗功效,其中使用 4.7 T, 40 cm Bruker Biospec MR 仪器。

#### V. 联合治疗

为了增加本发明的肽或纳米颗粒-多肽复合物的有效性,可能希望组合这些组合物和能有效治疗目标疾病的其它试剂。

作为一个非限制性实例,可以用本发明的抗癌生物活性肽或纳米颗粒-多肽复合物连同其它抗癌剂实施癌症的治疗。“抗癌”试剂能负面地影响受试者的癌症,例如,通过杀死癌细胞,诱导癌细胞的细胞凋亡,减少癌细胞的生长速率,减少转移的发生率或数量,减小肿瘤大小,抑制肿瘤生长,减少向肿瘤或癌细胞的血液供给,促进抗癌细胞或肿瘤的免疫应答,预防或抑制癌症的进展,或增加癌症患者的寿命。更通常地,这些其它组合物以能有效杀死或抑制细胞增殖的组合物提供。该过程可能包含,使细胞同时接触抗癌肽或纳米颗粒-多肽复合物和试剂或多种因子。这可以如下实现:通过使细胞接触包含两种试剂的单一组合物或药物制剂,或通过使细胞同时接触 2 种不同的组合物或制剂,其中一种组合物包含抗癌肽或纳米颗粒-多肽复合物,另一种包含第二种试剂。在具体实施方案中,抗癌肽可以是一种试剂,抗癌纳米颗粒-多肽复合物可以是另一种试剂。

使用抗癌肽或纳米颗粒-多肽复合物的治疗,可以在其它试剂治疗之前或之后,间隔时间从几分钟至几周。在将其它试剂和抗癌肽或纳米颗粒-多肽复合物分别应用于细胞的实施方案中,通常需要确保,在

每次递送的时间之间没有经过显著长的时间段，从而使试剂和抗癌肽或纳米颗粒-多肽复合物仍然能对细胞发挥有利的联合作用。在这样的情况下，预见到可以使细胞在彼此相隔约 12-24 小时内、更优选彼此相隔约 6-12 小时内接触两种模态。在有些情况下，可能希望明显延长治疗的时间段，其中在各次给药之间经历几天(例如，2, 3, 4, 5, 6 或 7 天) 至几周(例如，1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 或 8 周)。

可以采用各种不同的组合，其中抗癌肽或纳米颗粒-多肽复合物是“A”，第二种试剂(例如放疗或化疗)是“B”：

A/B/A	B/A/B	B/B/A	A/A/B	A/B/B	B/A/A	A/B/B/B	B/A/B/B
B/B/B/A	B/B/A/B	A/A/B/B	A/B/A/B	A/B/B/A	B/B/A/A		
B/A/B/A	B/A/A/B	A/A/A/B	B/A/A/A	A/B/A/A	A/A/B/A		

本发明的治疗性抗癌肽或纳米颗粒-多肽复合物向患者的施用，遵循施用化疗剂的一般方案，并考虑载体的毒性(如果存在)。预期可以根据需要重复治疗周期。还预见到，各种不同的标准治疗以及外科手术干预可以与所述过度增殖细胞治疗组合应用。

#### a. 化疗

癌症治疗也包括许多与基于化学试剂和辐射的治疗的联合治疗。联合化疗剂包括，例如，吉非替尼，顺铂(CDDP)，卡铂，丙卡巴肼，氮芥，环磷酰胺，喜树碱，异环磷酰胺，美法仑，苯丁酸氮芥，白消安，硝基脲，放线菌素 D，柔红霉素，多柔比星，博来霉素，plicomycin，丝裂霉素，依托泊苷(VP16)，他莫昔芬，雷洛昔芬，雌激素受体结合剂，紫杉醇，吉西他滨，诺维本，法呢基-蛋白质转移酶抑制剂，反铂，5-氟尿嘧啶，长春新碱，长春碱，Gleevac(甲磺酸伊马替尼)，和甲氧蝶呤，或前述试剂的任意类似物或衍生物变体。在某些实施方案中，本发明可以与吉非替尼联合使用。在其它实施方案中，本发明可以与 Gleevac(例如，可以向患者施用药 400-约 800 mg/天的 Gleevac)联合实施。在某些实施方案中，可以与本发明联合使用一种或多种化疗剂。

#### b. 放疗

会造成 DNA 损伤且已经广泛使用的其它因子包括通常已知的  $\gamma$ -射线, X-射线, 和/或向肿瘤细胞定向递送放射性同位素。也预见到其它形式的 DNA 损伤因子, 例如微波和紫外辐射。最可能地, 所有这些因子会对 DNA、DNA 前体、DNA 的复制和修复、和染色体的装配和维持造成广范围的损伤。X-射线的剂量范围是, 从长期(3-4周)的日剂量 50-200 伦琴, 至单次剂量 2000-6000 伦琴。放射性同位素的剂量范围可以广泛变化, 取决于同位素的半衰期、发射的辐射的强度和类型、和肿瘤细胞的摄入。

当应用于细胞时, 术语“接触”和“暴露”在本文中用于描述将治疗性组合物和化疗剂或放疗剂递送给靶细胞或置于与靶细胞直接并置的过程。为了实现细胞杀死或停滞, 将两种试剂以有效杀死细胞或阻止它分裂的组合量递送给细胞。

### c. 免疫治疗

免疫治疗剂通常依赖于免疫效应细胞和分子的应用, 以靶向和破坏癌细胞。免疫效应物可以是, 例如, 对肿瘤细胞表面上的一些标志物特异性的抗体。抗体单独可以用作治疗的效应物, 或它可以募集其它细胞, 以实际上实现细胞杀死。抗体也可以缀合到药物或毒素(化疗剂, 放射性核素, 蓖麻毒素 A 链, 霍乱毒素, 百日咳毒素等)上, 并仅仅用作靶向试剂。或者, 效应物可以是淋巴细胞, 其携带与肿瘤细胞靶物直接或间接相互作用的表面分子。各种不同的效应细胞包括细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞。

免疫治疗因而可以用作联合治疗的一部分, 与本发明的肽或纳米颗粒-多肽复合物相联合。在下面讨论了联合治疗的一般方案。通常, 肿瘤细胞必须携带一些适合靶向的标志物, 即, 不存在于大多数其它细胞上的标志物。存在许多肿瘤标志物, 它们中的任一种都可适用于本发明上下文中的靶向。常见的肿瘤标志物包括癌胚抗原, 前列腺特异性抗原, 泌尿肿瘤相关抗原, 胎儿抗原, 酪氨酸酶(p97), gp68, TAG-72, HMFG, 唾液酸 Lewis 抗原, MucA, MucB, PLAP, 雌激素受体, 层粘连蛋白受体, *erb B* 和 p155。

#### d. 基因治疗

在另一个实施方案中，第二种治疗是基因治疗，其中在治疗性组合物之前、之后或与其同时施用治疗性多核苷酸。用于表达基因产物的病毒载体是本领域众所周知的，包括真核生物表达系统，例如腺病毒，腺伴随病毒，逆转录病毒，疱疹病毒，慢病毒，痘病毒包括痘苗病毒，和乳头瘤病毒包括 SV40。或者，通过基于脂质的载体，例如脂质体或 DOTAP:胆固醇囊泡，可以实现表达构建体的施用。所有这些方法是本领域众所周知的（参见，例如 Sambrook 等，1989；Ausubel 等，1998；Ausubel，1996）。

编码下述基因产物之一的载体的递送，对靶组织具有联合的抗过度增殖作用。本发明包括许多种蛋白质，下面描述了其中的一些。

##### i. 细胞增殖的抑制剂

如上所述，肿瘤抑制癌基因起抑制过度的细胞增殖的作用。这些基因的失活会破坏它们的抑制活性，导致失调的增殖。

可以用作根据本发明的第二种治疗的基因包括 p53, p16, Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, zac1, p73, VHL, MMAC1 / PTEN, DBCCR-1, FCC, rsk-3, p27, p27/p16 融合体, p21/p27 融合体, 抗血栓基因 (例如, COX-1, TFPI), PGS, Dp, E2F, *ras*, *myc*, *neu*, *raf*, *erb*, *fms*, *trk*, *ret*, *gsp*, *hst*, *abl*, E1A, p300, 参与血管发生的基因 (例如, VEGF, FGF, 血小板反应蛋白, BAI-1, GDAIF, 或它们的受体), MCC 和在表 IV 中列出的其它基因。

##### ii. 程序性细胞死亡的调节剂

细胞凋亡, 或程序性细胞死亡, 是正常胚胎发育、维持成年组织的体内稳态、和抑制癌发生的基本过程 (Kerr 等, 1972)。已经证实 Bcl-2 家族的蛋白质和 ICE-样蛋白酶是其它系统细胞凋亡的重要调节剂和效应物。伴随滤泡性淋巴瘤发现的 Bcl-2 蛋白, 在控制细胞凋亡和响应于不同细胞凋亡刺激的增强细胞存活中起重要作用 (Bakhshi 等, 1985; Cleary 和 Sklar, *Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA*, 82(21):7439-43, 1985; Cleary 等, 1986; Tsujimoto 等, 1985;

Tsujimoto 和 Croce, 1986)。进化上保守的 Bcl-2 蛋白现在被公认为是相关蛋白质家族的成员，其可以分成死亡激动剂或死亡拮抗剂。

在它的发现之后，证实了 Bcl-2 起抑制许多刺激触发的细胞死亡的作用。并且，现在显然存在 Bcl-2 细胞死亡调节蛋白家族，它们具有共同的结构和序列同源性。已经证实这些不同的家族成员具有与 Bcl-2 类似的功能（例如，Bcl<sub>XL</sub>, Bcl<sub>w</sub>, Bcl<sub>s</sub>, Mcl-1, A1, Bfl-1），或抵消 Bcl-2 功能和促进细胞死亡（例如，Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri）。

#### e. 手术

约 60% 的癌症患者会接受某一类型的手术，包括预防性的、诊断性的或分期性的、治疗性的和姑息性的手术。治疗性的手术是可以与其它治疗联合使用的癌症治疗，所述其它治疗例如本发明的治疗，化疗，放疗，激素治疗，基因治疗，免疫治疗和/或可选的治疗。

治疗性的手术包括切除，其中物理地去除、切离和/或破坏癌组织的全部或一部分。肿瘤切除指物理地去除肿瘤的至少一部分。除了肿瘤切除以外，手术治疗包括激光手术，冷冻手术，电外科，和显微控制的手术（莫氏手术）。另外预见到，本发明可以与去除浅表癌、初癌、或附带量的正常组织联合使用。

切除一部分或全部癌性细胞、组织或肿瘤后，可能在体内形成空腔。通过灌注、直接注射或在该区域局部应用附加抗癌治疗，可以实现治疗。可以重复这样的治疗，例如，每 1, 2, 3, 4, 5, 6, 或 7 天，或每 1, 2, 3, 4, 和 5 周，或每 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 或 12 个月。这些治疗也可以是不同的剂量。

#### f. 其它试剂

预见到，其它试剂可以与本发明联合使用，以提高治疗的疗效。这些其它试剂包括免疫调控剂，影响细胞表面受体和 GAP 连接的上调的试剂，细胞抑制和分化试剂，细胞粘附的抑制剂，或增加过度增殖细胞对细胞凋亡诱导物的敏感性的试剂。免疫调控剂包括肿瘤坏死因子；干扰素  $\alpha$ ,  $\beta$ , 和  $\gamma$ ；IL-2 和其它细胞因子；F42K 和其它细胞因子类

似物;或 MIP-1, MIP-1 $\beta$ , MCP-1, RANTES, 和其它趋化因子。另外预见到, 细胞表面受体或它们的配体(例如 Fas / Fas 配体, DR4 或 DR5 / TRAIL)的上调, 会通过对过度增殖细胞建立自分泌或旁分泌作用, 增强本发明诱导细胞凋亡的能力。通过升高 GAP 连接的数目来增加细胞间信号传递, 会增加对邻近过度增殖细胞群体的抗过度增殖作用。在其它实施方案中, 细胞生长抑制剂或分化剂可以与本发明联合使用, 以提高治疗的抗过度增殖功效。预见到细胞粘附抑制剂会提高本发明的功效。细胞粘附抑制剂的实例是黏着斑激酶(FAK)抑制剂和洛伐他汀。另外预见到, 会增加过度增殖细胞对细胞凋亡的敏感性的其它试剂, 例如抗体 c225, 可以与本发明组合使用, 以提高治疗功效。

激素治疗也可以与本发明联合使用, 或与前述的任意其它癌症治疗组合使用。激素可以用于治疗某些癌症, 例如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌或子宫颈癌, 以降低某些激素例如睾酮或雌激素的水平或阻断其作用。该治疗经常与至少一种其它癌症治疗组合使用, 作为一种治疗选择, 或减少转移风险。

\* \* \* \* \*

包括下面的实施例用于展示本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当明白, 在下面的实施例中公开的技术代表发明人发现的会较好实现本发明的技术, 因而可以视作构成实现它的优选模式。但是, 本领域技术人员参考本说明书的公开内容后应当明白, 可以对公开的具体实施方案作出许多改变, 且仍然获得相似或类似的结果, 而不背离本发明的精神和范围。

### 实施例

#### 实施例 1

*FUS1* 是在人染色体 3p21.3 区中鉴别出的新肿瘤抑制基因(TSG), 它在许多人癌症中经常改变或缺失, 且已经证实起 Apaf1-相关细胞凋亡途径的关键介质的功能, 是有效的体外和体内肿瘤抑制剂。已经在大多数 NSCLC 和几乎所有 SCLC 中, 发现了 *FUS1* 蛋白质的表达丧失和翻译后修饰缺陷。在体外和体内, 腺病毒载体-或 DOTAP:胆固醇纳米

颗粒-介导的基因转移对 3p21.3-缺陷型人肺癌细胞中 wt-FUS1 功能的恢复，通过诱导细胞凋亡和细胞动力学的改变，抑制这些肿瘤细胞的生长。在本研究中，发明人使用计算机辅助的 Fus1 蛋白质结构分析，发现了 Fus1 蛋白质序列中的几个潜在的 PKC 激活/相互作用位点和 A 激酶锚定蛋白 (AKAP)-相互作用基序。基于这些功能域预测，发明人已经开发了一组直接衍生自 wt-Fus1 蛋白质序列的肽，包括含有 wt-Fus1 氨基酸序列 (wt-FP) 或功能突变 (mt-FP) 的肽。wt-FP 源自有些肺癌细胞系中检测到的突变型 Fus1 蛋白质之一中缺失的区域，且含有潜在 AKAP 信号传递/相互作用序列基序研究。功能障碍的 mt-FP (其中几个高度疏水的氨基酸残基被替换为亲水残基，以改变生物功能上关键的疏水微环境) 被设计用作 wt-FP 活性的对照。将 18-C 硬脂酸饱和脂肪酸链添加到每个肽的 N-末端，使它可透过细胞，且也维持存在于正常细胞中的原始肉豆蔻酰化 wt-FUS1 蛋白质的功能完整性。

发明人评价了 wt-FP 的体外生物功能，发现硬脂酸-wt-FP (st-wt-FP) 起有效蛋白酪氨酸激酶 (PTK) 抑制剂的功能，并表现出对 NSCLC 和 SCLC 细胞中的几种关键致癌 PTK (例如 EGFR, PDGFR, c-Kit, c-Abl, Erk) 活性的抑制作用。也在用 st-wt-FP 处理的多种不同肺癌细胞中，观察到肿瘤细胞生长的显著抑制和细胞凋亡的诱导 (与相同浓度的对照肽处理的细胞相比)，IC50 值范围是 5-20  $\mu$ M。发明人研究使用 wt-FP 作为调控剂，以增强 PTK 抑制剂 (例如吉非替尼和 Gleevec) 的化疗效力，以分别克服吉非替尼和 Gleevec-敏感的和抗性的 NSCLC 和 SCLC 细胞的化疗抗性。发明人发现，wt-FUS1 处理可以显著敏化对吉非替尼或 Gleevec 治疗的反应。在用 wt-FP 处理过的 SCLC 细胞中，观察到显著的生长抑制和细胞凋亡。在用 wt-FP 和 gleevec 的组合处理过的 gleevec-抗性的 H69R 和 N417 细胞中，检测到与单独任一种试剂处理的细胞相比增强的生长抑制。在用单独 wt-FP 或 wt-FP 与 gleevec 的组合处理过的 SCLC 细胞中，也显著抑制了磷酸化的 c-Abl 和 c-Kit 蛋白质的活性，如使用免疫沉淀的磷酸

-c-Abl 或磷酸-c-Kit 蛋白质的免疫印迹分析和活性测定所证实的。

发明人还开发了制备 FP-纳米颗粒的方法和规程，其中使 FP 和其它非特异性对照肽 (NSP) 与用于体外和体内递送治疗肽的 DOTAP 或 DOTAP:胆固醇纳米颗粒相复合。与用未复合的肽处理的细胞相比，在用 FP-纳米颗粒处理过的细胞中，肽的细胞摄入显著增加，如通过使用荧光-标记的肽的荧光成像分析所证实的。与未处理的或用未复合的 wt-FP、NSP 或 NSP-纳米颗粒对照处理过的细胞相比，在用 wt-FP-纳米颗粒处理过的 NSCLC 细胞中，也观察到细胞凋亡的显著诱导。

结果证实了 FP-纳米颗粒对 NSCL 和 SCLC 的体外和体内治疗功效，并暗示使用全身施用单独的 FP-纳米颗粒或 FP-纳米颗粒与其它化疗剂的组合来有效治疗肺癌和其它人癌症的平移应用。

## 结果

### 1. FUS1 肽的设计和合成

计算机辅助的 Fus1 蛋白质结构分析揭示了 Fus1 蛋白质序列中的几个潜在的 PKC 激活/相互作用位点和 A 激酶锚定蛋白 (AKAP)-相互作用基序，如图 1 所示。使用 Scansite 程序 (Obenauer 等, 2003) 和其它可以从 (scansite.mit.edu) 和 ExPASy 蛋白质组学服务器 (us.expasy.org) 得到的序列分析程序进行分析。基于这些功能域预测，发明人制备了一组直接衍生自 wt-Fus1 蛋白质序列的肽，包括含有 wt-Fus1 氨基酸序列 (wt-FP) 或功能突变 (mt-FP) 的肽。将 18-C 硬脂酸饱和脂肪酸链添加到每个肽的 N-末端，使它是细胞透性的，也维持存在于正常细胞中的原始肉豆蔻酰 (一种 14-C 饱和脂肪酸) 化的 wt-FUS1 蛋白质的功能完整性。硬脂酸侧链也是它抑制酪氨酸激酶活性的生物活性所必需的，如同肉豆蔻酸对于 wt-FUS1 肿瘤抑制活性。

在得克萨斯大学 M. D. Anderson 癌症中心由 Peptide Synthesis Core 使用 CLEAR 树脂作为支持物，使用 HBTU-HOBT 作为偶联试剂，在 Rainin Symphony Quartet 自动肽合成仪上合成了 FUS1 肽 ("FP")。每个偶联步骤进行 3 小时，用 5-倍过量的试剂重复 2 次。使用 CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H-苯甲醚和水混合物 (95%-2.5%-2.5%)，进行切割 3 小时。使用在水中



的 0-70% 乙腈的线性梯度 (经 40 分钟), 通过 RP-HPLC 纯化粗肽。每种溶剂含有 0.1% 三氟乙酸。

用 5-倍过量的试剂, 使用与氨基酸偶联相同的方法, 进行与硬脂酸的缀合。使用摇床来更好地混合试剂。切割条件与 FP 的条件相同。使用 Vydac 半制备二苯基柱 (RP 219TP510), 通过 RP-HPLC 纯化粗硬脂酸-FP。

发明人已经发现, wt-FP 源自在有些肺癌细胞系中检测到的突变型 Fus1 蛋白质之一中缺失的区域, 且含有潜在蛋白激酶 (PKA, PKC, 和蛋白酪氨酸激酶) 信号传递/相互作用序列基序。功能障碍的 mt-FP (其中几个高度疏水的氨基酸残基被替换为亲水残基, 以改变生物功能上关键的疏水微环境) 被设计用作 wt-FP 活性的对照 (图 2), 但是, 这些肽的极性几乎未变, 这可以确保在生理条件下类似的溶解度和可达性 (图 3)。将 18-C 硬脂酸饱和脂肪酸链添加到每个肽的 N-末端, 使它是细胞透性的, 且也维持存在于正常细胞中的原始肉豆蔻酰 (一种 14-C 饱和脂肪酸) 化的 wt-FUS1 蛋白质的功能完整性 (图 1)。也合成了对蛋白激酶活性不表现出影响的非特异性对照肽 (NSP), 并用作对照 (图 1, AKAP-NSP)。要合成肉豆蔻酸-肽, 用于与硬脂酸-肽对比。

## 2. DOTAP: Chol-复合的 FUS1 肽纳米颗粒的合成和制备

如所述 (Templeton, 1997) 合成了 DOTAP: 胆固醇 (“DC”) 纳米颗粒 (大小为 50 -100 nm)。简而言之, 以 1:1 比例 (20  $\mu$ M DOTAP 和 20  $\mu$ M 胆固醇) 在氯仿中混合 DOTAP 和胆固醇, 并在冰冷的旋转式蒸发器中蒸发。将得到的混合物重新悬浮于 5% 葡萄糖, 在 55  $^{\circ}$ C 脉冲超声处理, 并低压冻干。将低压冻干的产品溶于 5% 葡萄糖, 通过递减大小 (1.0, 0.45, 0.2, 和 0.1  $\mu$ m) 的小型挤压机 (Avanti Lipids, A1) 进行挤压, 产生 50 - 100 nm 的平均粒径。类似地还制备不含胆固醇的 DOTAP, 用作体外转染试剂, 因为众所周知 DC 介导的转染在体外是无效的, 且 DOTAP 最适合体外转染。在 4  $^{\circ}$ C 保存合成的纳米颗粒, 并用于制备 DNA-纳米复合物。

DC-DNA 纳米颗粒: 为了制备含有表达基因的质粒 DNA 的纳米复

合物, 将 150  $\mu\text{g}$  质粒 DNA 与 20 mM DOTAP:Chol 纳米颗粒以 300  $\mu\text{l}$  体积相混合, 产生 150  $\mu\text{g}$  DNA 和 4 mM 纳米颗粒的终浓度。DNA-纳米复合物的平均粒度范围是 300-325 nm, 如使用 N4 粒度分析仪 (Coulter, Miami, FL) 所测定的, 并带+ 45 mV 正电荷。

DC-肽纳米颗粒: 为了制备肽-纳米颗粒, 将 20  $\mu\text{g}$  肽稀释于 100  $\mu\text{l}$  D5W 中, 与等体积的稀释的 DOTAP:胆固醇 (DC) 或 DOTAP (D) (在 D5W 中将 40  $\mu\text{l}$  20 mM DC 或 D 稀释至总体积 100  $\mu\text{l}$ ) 轻轻混合, 这会产生 100 mg/ml 肽和 4 mM DC 或 D 的终浓度。用不同比例的肽/DC 或 D, 优化配方。在图 4 和 5 中解释了肽-纳米颗粒的结构。得到的肽-纳米颗粒具有 100-200 nm 的平均大小和+ 50 mV 的正电荷, 分别通过 N4 Plus Submicron Particle Sizer (N4 颗粒大小分析仪) 和 Delsa 440SX Zeta Potential Analyzer (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) 测得。

用荧光染料标记肽: 根据生产商的说明书, 使用蛋白质-荧光标记试剂盒 (Molecular Probe, Eugene, OR), 用 Alex Fluor 555 (Cy3-NHS 酯, 橙红) 荧光染料来标记肽。使用 Cy3-标记的肽, 通过体外和体内荧光成像分析, 来监测细胞摄入和肽-纳米颗粒的生物分布。简而言之, 将约 500 mg 肽溶于 100 ml 0.1 M 碳酸氢钠 (pH 8.3) 缓冲液 (终浓度为 5 mg 肽 /ml)。将 Cy3-琥珀酰亚胺酯 (Cy3-NHS) 溶于 DMSO, 终浓度为 10 mg/ml。混合 100 ml 肽溶液和 10 ml Cy3-NHS 溶液, 在旋转下在室温温育混合物 1 小时 (或在 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜)。通过在 Sephadex G-25 柱上运行, 纯化缀合产物, 通过测量 280 nm OD 和 555 nm OD, 测定标记的效率, 并使用生产商所述的方程进行计算。

肽与超顺磁性氧化铁 (SPIO) 纳米颗粒的缀合: 发明人也使用 NHS 酯-胺反应, 将肽直接与葡聚糖-包被的 SPIO 纳米颗粒 (SP) 缀合, 然后用 DC 包封 SP-纳米颗粒。

FP-胺衍生物的合成: 根据公开的方法, 用 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳化二亚胺 (EDC) 盐酸盐 ( $\sigma$ , St. Louis, MO) 激活 FP 的 C-末端羧基, 然后与 3-(2-吡啶基联硫基) 丙酸酰肼 (PPA) (ProChem,

Inc., Rockford, IL) 反应历经 3 天, 以得到 >90% FP-脘衍生物产物产率。通过 HPLC 追踪反应进展, 使用 Zorbax Rx C18 柱 (25 cm × 4.6 mm), pH 4.7 的 CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (7:3) 中 10 mM (NH<sub>4</sub>)(H<sub>2</sub>P<sub>0</sub>4) 的等度梯度, 流速为 1 ml/min。通过 UV (280 nm) 检测 FP-脘, 游离 FP 和酰脘。Aldrich.

FP 和 SPIO 的缀合: 通过使用异双功能连接物的 2 步方法, 将 FP 缀合到 SPIO 上。首先, 通过与表氯醇交联, 可衍生葡聚糖-包被的 SPIO 颗粒 Feridex I.V. 或 Combidex (Advanced Magnetics Inc., Cambridge, MA) 或 Endorem (Guerbet, Aulnaysous-Bois, France), 然后与氨反应, 以在葡聚糖包衣上产生氨基, 然后用 SMCC 修饰, 以提供马来酰亚胺部分 (SPIO-SMCC)。其次, 通过 SPIO-SMCC 中的马来酰亚胺基团与在 TCEP 还原二硫键之后得到的 FP 衍生物的巯基的反应, 将 FP 衍生物缀合到 SPIO-SMCC 上。通过紫外-可见光分光光度法, 测定所得到的 FP-SPIO 缀合的比例, 并通过 G-25 凝胶过滤柱的大小排阻色谱进一步纯化。浓缩纯化的缀合物, 在 -20℃ 保藏备用。使用类似的化学, 将药物衍生物缀合到 SPIO。关于 SPIO 的荧光标记, 用 DTPA 异硫氰酸酯螯合剂 (I-24221, Molecular Probes) 偶联上述 SPIO 葡聚糖衍生物的伯胺, 以导入对许多金属离子的高亲和力结合位点, 然后用 Fluo-3 钾 (橙红) (F-3715, Molecular Probes) 标记。通过共焦荧光成像或 FACS 分析, 可以使用荧光标记的 FP-SPIO 纳米颗粒来体外和体内监测细胞摄入、细胞内运输和生物分布。

在体内将 DC-SP-纳米颗粒 (DC-SPN) 用于全身递送治疗肽, 并用于使用 SPIO 作为 MR 造影剂通过 MR 进行非侵入成像 (图 5)。

3. NSCLC 和 SCLC 细胞中 Fus1-衍生的肽和 Gleevec 对肿瘤细胞生长的抑制

细胞系。发明人具有对多种不同化疗药物 (例如 CDDP, 紫杉醇, 吉西他滨, 吉非替尼, Gleevec, 和其它 PTK 抑制剂) 具有不同敏感性的 NSCLN 和 SCLC 细胞系的收藏。这些细胞系在临床上具有天然的药物敏感或抗性的特性, 或通过从敏感的亲代系针对特定药物选择来建立。已经测定了这些细胞系中的特征如每种药物的 IC<sub>50</sub> 值, 关键 TSG 例如

3p21.3 基因和 p53) 和致癌 PTK (例如 EGFR) 的遗传和表达状态以及体内(在小鼠中)致肿瘤性。为了评价 *FUS1* 或 FP 与 PTK 抑制剂 (包括吉非替尼 (AstraZeneca), 用于阻断 EGFR; 和 LY294002 (ComChem), 用于抑制 PI3K/Akt) 对肿瘤细胞生长和细胞凋亡的联合作用, 体外使用了 4 种人吉非替尼-抗性的 NSCLC 细胞系 H1299, H460, H358, 和 A549, 和 2 种吉非替尼-敏感的 NSCLC 系 HCC827 (具有 EGFR 功能突变的增益) 和 H1817 (具有 EGFR 的激活扩增)。人 SCLC 细胞系 gleevec-敏感的 H69 和 H128, 和 gleevec-抗性的 H69R 和 N417, 用于评价 Fus1 肽、FP-纳米颗粒单独或与 gleevec 和其它小分子化疗药物组合的处理。

wt-FP 处理对肿瘤细胞生长的抑制。为了评价 wt-FP 的生物活性, 发明人通过 XTT 测定, 通过直接应用硬脂酸-wt-FP, 分析了 wt-FP 对肿瘤细胞生长的影响。发明人发现, 与用功能突变型 Fus1 肽 mt-FP2 和 mt-FP5、和非特异性对照肽 (NSP) 处理的细胞相比 (图 6), wt-FP 表现出对 NSCLC H1299 和 A549 细胞生长的显著抑制作用 (图 6)。发明人也测定了 st-wt-FP 在 NSCLC H1299 ( $IC_{50} = 12.7 \mu M$ ) 和 A549 ( $IC_{50} = 6.9 \mu M$ ) 细胞以及可在没有添加生长因子下生长的正常支气管上皮 CCD16 ( $IC_{50} = 60 \mu M$ ) 细胞中的  $IC_{50}$  值 (图 7)。以对所有其它 NSCLC 细胞的  $IC_{80}$  剂量, 用 st-wt-FP 处理的正常细胞中没有观察到显著的细胞毒性, 暗示着治疗性 FP 的肿瘤细胞选择性。类似地, 也已经在 wt-FP-处理的 SCLC H128 (图 8A 和 C) 和 H146 细胞 (图 8B 和 D) 中, 观察到与 mt-FP-处理的或未处理的细胞对照相比, 对肿瘤细胞生长的显著抑制 (图 8A 和 B) 和细胞凋亡的增强诱导 (图 8C 和 D)。这些初步结果证实了使用 wt-FP 作为肺癌抗肿瘤治疗剂的潜力。

wt-FP 与小分子药物 PTK 抑制剂的联合处理对肿瘤细胞生长的增强的抑制作用。使用我们实验室开发的等效线图解建模和统计方法, 在体外定量和统计学地分析了 *FUS1*-纳米颗粒或 Fus1-肽加上 PTK 抑制剂的不同组合的联合作用。Fus1 和 PTK 抑制剂之间的相互作用可以表征为协同作用、累加作用和拮抗作用。可以用假定最大转染效率的固定剂量的 hTMC-*FUS1*-纳米颗粒转染细胞, 或用不同浓度的 FP 处理,

并与不同剂量的 PTK 抑制剂相组合。在预定的时间点，通过 XTT 测定来测量对细胞生长的影响。通过在对应等效线图上绘制观察到的实验数据，定量和统计地分析组合治疗剂对肿瘤细胞生长的影响。进行 Wilcoxon 氏符号秩检验，以对比观察数据的平均值与累加性预测的最小或最大值。如果观察数据的平均值等于或小于预测最大值，但是等于或大于预测最小值，认为组合效应是累加的。如果观察数据的平均值小于预测最小值，认为组合效应是协同的；如果大于预测最大值，是拮抗的，认为  $P < 0.05$  是显著的。使用 Statistica 软件 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma)，进行所有统计分析。来自这些体外实验的发现，会为我们提供 *FUS1* 和 PTK 抑制剂联合治疗实现的协同作用的经统计学检验的定量验证，并用作引导我们临床前和临床试验中联合治疗设计的数据库。

为了探查 wt-*FUS1* 基因产物或衍生的 *FUS1* 肽作为增强肺癌细胞中的化疗效力和克服药物抗性的化疗药物调控剂的能力，发明人评价了 wt-FP + 吉非替尼联合处理对吉非替尼-敏感的和抗性的 NSCLC 细胞的肿瘤细胞生长的影响。发明人发现，重新激活 3p-缺陷的和吉非替尼-抗性的 NSCLC H1299, H358, 和 H460 细胞中的 wt-FP，会显著敏化这些细胞对吉非替尼治疗的应答，如通过对肿瘤细胞生长的超过累加抑制作用所证实的 (图 9A)。在 wt-FP 和吉非替尼共同处理的 H322 和 H460 细胞中，也检测到对 EGFR 表达的显著抑制，如蛋白质印迹分析所证实的 (图 9B)。这些初步结果表明，wt-FP 可能在调控肿瘤细胞对化疗剂 (例如 DNA 损伤试剂顺铂和 PTK EGFR 抑制剂吉非替尼) 的敏感性中起关键作用，且 *FUS1*-纳米颗粒-介导的分子治疗与这些小分子化疗剂的联合治疗可以是对肺癌的有效治疗策略。

此外，发明人也检测了与任一种单独处理或非特异性肽 (NSP) 或 mt-FP 对照的组合 (图 10) 相比，SCLC Gleevec-敏感的 H69-S (图 10) 和 Gleevec-抗性的 H69-R (图 10) 细胞分别对与 wt-FP 共同处理 48 h 和 96 h 的 Gleevec 的增强的敏感性。这些初步发现表明，Fus1 肿瘤抑制蛋白的活性之一可能是干扰 PTK 功能。PTK 抑制剂 Gleevec

+FUS1-纳米颗粒或 Fus1-衍生的肽的联合治疗, 可以在肺癌中增强 Gleevec 的抗癌功效和克服 Gleevec-抗性的有用策略。

#### 4. NSCLC 和 SCLC 细胞中 Fus1-肽对 PTK 活性的抑制

蛋白酪氨酸激酶 (PTK) 在控制细胞增殖、分化、代谢和细胞凋亡的信号转导途径中起关键作用。PTK 对蛋白质的磷酸化, 是调节这些生物机制所必需的, 这些途径中的缺陷可能导致许多人疾病, 包括癌症。这些酶在细胞调节中的重要方面, 得到了下述事实的证实, 即对于许多激酶而言, 已经鉴别出了对应的病毒癌基因产物。蛋白酪氨酸激酶活性经常与膜受体蛋白酪氨酸激酶 (例如 EGF-, PDGF-, CFS-, IGF-1 和胰岛素受体) 和可溶性非-受体酪氨酸激酶 (例如 p60c-Src, yes, lck, lyn, fyn) 相关。测定 PTK 活性, 允许表征蛋白酪氨酸激酶, 阐明它们的生物功能以及辅助开发特定 PTK 抑制剂。

发明人根据生产商的说明书, 使用酪氨酸激酶活性测定试剂盒 (CHEMICON, Temecula, CA), 分析了 FP-处理过的 NSCLC H1299 和 A549 细胞中的 c-Ab1 酪氨酸激酶活性。简而言之, 用 5  $\mu$ M 的 wt-FP 或 mut-FP 处理  $1 \times 10^7$  NSCLC H1299 或 A549 细胞 6 小时, 或用 10  $\mu$ g wt-FUS1 表达质粒 DNA-DOTAP 纳米颗粒转染 24 小时。在含有 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM 氯化钠, 1% (w/v) 去氧胆酸钠, 1 mM DTT, 1% (v/v) NP-40, 0.1% (w/v) SDS, 和完全蛋白酶抑制剂 (Roche) 的 RIPA 缓冲液中, 制备细胞裂解物。使用 1 mg 蛋白质裂解物, 进行小鼠抗-c-Ab1 抗体 (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA) 蛋白质的免疫沉淀 (IP)。将免疫沉淀的复合物重新悬浮于 50  $\mu$ l PTK 测定缓冲液中, 后者含有 5 mM ATP, 在 TBS (25 mM Tris, 0.15 M NaCl) pH 7.2 中的 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.01% 硫柳汞, 和完全蛋白酶抑制剂。然后, 将 c-Ab1 IP 复合物与含有多个酪氨酸残基的合成的生物素化底物聚 [Glu: Tyr, 4: 1] 一起温育, 且可以用广范围的 PTK 在 30°C 磷酸化 45 min。通过加入 500 mM EDTA, 终止反应。通过结合链霉抗生物素-包被的平板, 固定化磷酸化的和去磷酸化的底物。使用缀合到 HRP 上的磷酸酪氨酸单克隆抗体和随后的发色底物反应, 观察磷酸化

底物的级分。使用磷酸肽标准曲线，确定掺入酪氨酸激酶底物中的磷酸的量。在 A549 细胞中检测到 c-Abl 活性的显著抑制，该细胞通过 wt-FP 处理或 wt-FUS1-纳米颗粒转染，表现出与那些未处理的对照或用 mut-FP 或 Gleevec 处理过的细胞(图 11)相比，激活的(磷酸化的) c-Abl 蛋白的高水平表达(数据未显示)。通过在 H1299 中用 wt-FP 处理，也抑制了 c-Abl 蛋白的活性，它具有比 A549 细胞低水平的 c-Abl 蛋白表达。

类似地，发明人也观察到，wt-FP 肽和 wt-Fus1 蛋白质的外源表达 2 种处理，都强烈抑制 c-abl 酪氨酸激酶活性，如在 SCLC N417 中使用单克隆抗-磷酸-abl (Tyr-323-p) 抗体通过最佳酪氨酸激酶肽底物的酪氨酸磷酸化所测得的(图 12)。另外，在用 wt-FP 单独或与 Gleevec 的组合(wt-FP + G)处理 48h 的 SCLC N417 和 H69 细胞中，也检测到了 wt-FP 对几种 PTK(包括 c-abl 和 c-Kit)的活性的抑制作用，如使用抗-c-abl 或抗-c-Kit 抗体的免疫沉淀(IP)和使用抗-磷酸-Tyr (pY20) 抗体的免疫印迹 (IB) 进行分析所证实的。

此外，在吉非替尼-敏感的 NCC827 和 H1819 细胞中，也在用 FUS1-纳米颗粒或 wt-FP 单独或与吉非替尼组合处理过的细胞中检测到了磷酸化的 EGFR, ERK 和 Akt 蛋白质的显著抑制，如通过磷酸-EGFR、ERK 或 Akt-特异性抗体的蛋白质印迹分析所证实的。但是，在总 PTK 蛋白质水平没有检测到影响，表明 FP 会特异性地抑制激活的致癌 TPK，并导致对由于 EGFR 的突变或异常扩增而具有高度激活的 PTK 活性的这些细胞中肿瘤细胞增殖和细胞凋亡的抑制。

#### 5. 肽-纳米颗粒在体外的增强的细胞摄入

发明人通过荧光成像分析，使用 Cy3-fluor 标记的肽，在 NSCLC h1299 细胞中对比了未复合的肽与肽-纳米颗粒的细胞摄入。在 st-P-处理过的细胞中，观察到了弱的细胞摄入(微弱荧光)，但是在非-硬脂酸肽-处理的细胞中没有观察到。在肽-和硬脂酸-肽(st-p)-纳米颗粒处理过的细胞中，观察到与相同浓度的未复合的肽处理过的细胞相比显著增强的细胞摄入，指示着肽-纳米颗粒介导的细胞摄入的高效率。

## 6. H1299 细胞中 FP-纳米颗粒处理对肿瘤细胞生长的抑制

发明人使用 Fus1 肽 (FP)-纳米颗粒, 来评价它对 NSCLC H1299 细胞中肿瘤细胞生长的影响。与用对照品处理过的那些细胞相比, 在 FP-纳米颗粒-处理过的细胞中观察到肿瘤细胞生长的显著抑制。与以更低剂量的肽 (以  $IC_{20}$  水平的 FP) 用 FP 处理的细胞相比, 在 FP-纳米颗粒-处理过的细胞中, 也检测到对肿瘤细胞生长的显著增强的抑制。

## 7. FP-纳米颗粒体外处理对细胞凋亡的诱导

发明人使用原位细胞凋亡分析与 TUNEL 反应, 通过荧光成像和 FACS 分析, 评价了 H1299 细胞中单独 FP 或 FP-纳米颗粒处理对细胞凋亡的诱导。与用非特异性的和 mt-FP-纳米颗粒对照处理过的细胞相比, 在用 FP-纳米颗粒处理过的细胞中检测到细胞凋亡的显著诱导 (图 14)。通过使用原位 TUNEL 染色的荧光成像分析 ( $2 \mu\text{M}$  肽, 72 小时), 观察到 FP-纳米颗粒-处理过的 H1299 细胞中细胞凋亡的诱导。这些结果清楚地证实了 FP-纳米颗粒的体外生物有效性。在携带人肿瘤的小鼠中, 通过全身给药, 评价 FP-纳米颗粒的细胞摄入和治疗功效的实验正在进行。

## 8. 治疗性基因和肽在 DC-纳米颗粒中的包囊

发明人在 DC 或 D 纳米颗粒中包囊了治疗或报告基因表达质粒 DNA 和肽, 以研究使用单一纳米颗粒递送多种治疗剂的可能性和潜力。发明人包囊了表达 GFP 的 pDNA 和 Cy3-标记的 FP 肽, 称作 GFP-FP-纳米颗粒。在相同细胞中, 可以同时检测到 GFP 表达 (绿色荧光) 和肽摄入 (橙红), 表明单一纳米颗粒有效递送了 DNA 和肽。在 2 小时和 24 小时, 测量了 H1299 细胞中 GFP DNA/NSP 肽-纳米颗粒的细胞摄入 (NSP 终浓度 =  $4 \mu\text{M}$ )。

### 实施例 2

FUS1 是肺癌中涉及的肿瘤抑制基因。发明人已经发现, Fus1 肽在体外抑制 c-Abl 酪氨酸激酶。有趣的是, 抑制序列源自在有些肺癌细胞系中检测到的突变型 Fus1 蛋白质之一中缺失的区域。重要的是,



硬脂酸修饰形式的该肽是抑制所需的。该硬脂酸-fus1 肽也抑制由激活的 c-Abl 蛋白质致癌转化的成纤维细胞中的集落形成。这些发现表明, Fus1 肿瘤抑制蛋白的活性之一是干扰 c-Abl 酪氨酸激酶功能。

在小细胞肺癌 (SCLC) 和非小细胞肺癌 (NSCLC) 中染色体臂 3p 上的一个等位基因的频繁缺失, 提供了在该染色体区域存在肿瘤抑制基因 (TSG) 的有力证据。这些候选 TSG 之一 (FUS1) 没有表现出与任何已知基因的同源性。发现它在肺癌中仅具有极少突变, 且通常在肺癌中在 mRNA 水平表达。几种 NSCLC 具有相同的无义突变, 其源自异常 mRNA 剪接。该异常形式缺少在 FUS1 的 C-末端或附近的序列, 产生与野生型蛋白质的 110 个氨基酸相比 82 个氨基酸的截短预测蛋白质 (Kondo 等, 2001)。

c-Abl 酪氨酸激酶在所有组织中普遍表达。当它融合逆转录病毒 Gag 序列和 Bcr 序列时, 它会变成致癌蛋白 (Ben-Neriah 等, 1986)。c-ABL 基因编码酪氨酸激酶。通过称作 Abelson 白血病病毒的复制缺陷型小鼠逆转录病毒, 获取 c-ABL 基因的一部分。正常 c-Abl 的酪氨酸激酶活性受到高度调节, 抑制剂存在于核 (Wang, 2000) 和胞质 (Butturini 等, 1996) 中。c-Abl 蛋白质存在于核和胞质中。核 c-Abl 功能包含对 DNA 损伤的应答 (Wang, 2000)。c-Abl 的胞质功能包含细胞迁移和细胞粘附功能。重要的是, 胞质 c-Abl 蛋白质的激活会导致致癌活性。例如, Gag-Abl 蛋白质是一种参与在感染了 Abelson 白血病病毒的小鼠中引起白血病的有力癌蛋白。另外, Bcr-Abl 癌蛋白是几种人白血病的成因因子。Gag-Abl 和 Bcr-Abl 都具有高水平的酪氨酸激酶活性 (Kloetzer 等, 1985)。

但是, c-ABL 基因尚未涉入其它类型的癌症中。当然, c-Crk (c-Abl 的主要底物) 的过表达, 已经与肺腺癌中的侵袭表型相关联 (Miller 等, 2003)。在另一个研究中, c-Crk-11 的免疫组织化学分析表明, 肺和结肠癌中 c-Crk-11 的水平显著升高 (Nishihara 等, 2002)。考虑到我们的下述发现, 即 Fus1 肿瘤抑制蛋白可下调 c-Abl, 这些发现是令人感兴趣的。总之, 这些观察表明, c-Abl 途径可能在某些肺癌中

激活。

### 方法和结果

Fus1 肽会抑制 c-Ab1 酪氨酸激酶。发明人使用 Fus1 肽，并在几个测定中观察到，它会强烈抑制 Ab1 酪氨酸激酶，如最适底物的酪氨酸磷酸化所测得的。深度分析表明，Fus1 肽会以剂量-依赖性的方式抑制 c-Ab1。观察到了 Fus-1 肽抑制商品化的 Ab1 对 Crk 的磷酸化；对照组包括肽，DMSO，和 (DMSO + 硬脂酸)。估计 IC50 是 30  $\mu$ M。该肽具有序列—硬脂酸-KLRRVHKNLIPQGIVKLDHR (SEQ ID NO: 11)。发明人发现，硬脂酸部分是抑制所需的，但是硬脂酸本身不具有抑制作用。无硬脂酸的 FUS1 肽不会抑制商品化的 Ab1 对 Gst-Crk 的磷酸化。

Fus1 肽会抑制 c-Ab1 转化的 Rat-1 细胞中的集落形成。发明人使用用激活的 c-Ab1 酪氨酸激酶转化的 Rat-1 细胞，测试了该 Fus1 肽对集落形成的影响。发明人发现，硬脂酸-Fus-1 肽会阻断集落形成。硬脂酸没有作用。令人感兴趣地，FUS1 肽没有抑制 ABL 转化的细胞的增殖，仅仅抑制了导致集落形成的致癌活性。

c-Ab1 在人肺癌细胞系中被激活的证据。发明人分析了在 FUS1 基因中具有改变的 2 个肺癌细胞系，并分析了它们中激活的 c-Ab1 的证据。在这些实验中，发明人使用检测人 Ab1 的单克隆抗-Ab1 抗体 (p6D) 进行了免疫沉淀。针对包含氨基酸 52-64 的人 Ab1 肽，制备了该单克隆抗体 (Sun 等, 2001)。用抗-磷酸酪氨酸, 抗-Ab1 (8E9) 和 p6D 抗体, 印迹免疫复合物。32D P210 用作阳性对照, CCD16 正常肺成纤维细胞用作阴性对照。NSCLC 细胞 H1299 和 A549 表现出有活性的 c-Ab1。结果表明, A549 细胞系包含激活的 Ab1-相关蛋白质, 大小为约 110 kDa。通过使用 2 种不同的序列特异性的 ABL 抗体抗-Ab1 8E9 (对 SH2 结构域特异性的) 和 p6D 抗-Ab1 单克隆抗体的印迹, 对其进行检测。有趣的是, 该 Ab1-相关蛋白质的大小小于真正的 c-Ab1 蛋白 (145 kDa)。重要的是, 用抗-磷酸酪氨酸检测了该 Ab1-相关蛋白质, 表明它可有激酶活性。含有靠近氨基末端的序列 (由 p6D 抗体识别) 的缩短形式的 c-Ab1 的存在, 暗示着它可能在 C-末端被截短。这可能是重要的, 因

为完整的 c-Ab1 通过 C-末端序列与肌动蛋白质丝相结合 (Woodring 等, 2003)。另外, 肌动蛋白质丝结合的 c-Ab1 具有减少的酪氨酸激酶活性 (Woodring 等, J2003), 表明肌动蛋白质丝结合会抑制 c-Ab1 酪氨酸激酶。因此, c-Ab1 的 C-末端的去除, 可能是激活 c-Ab1 的一种方式。

图 27, 图 16, 图 17, 图 18 和图 19 显示了其它实验的结果。

在证实硬脂酸化的 Fus1 肽 KLRRVHKNLIPQGIVKLDHR (SEQ ID NO: 11) 对商品化的 c-Ab1 酪氨酸激酶的抑制的其它实验中, 将硬脂酸化的 Fus1 肽与仅含有 SH2 和 SH1 结构域的截短的商品化的 (New England Bio-Labs) cAb1 酪氨酸激酶 (45kD)、GST-CRK (Ab1 优选的底物) 和  $^{32}\text{P}$ -ATP 合并。在  $30^\circ\text{C}$  温育 30 min 后, 用 2x SDS 样品缓冲液煮沸样品, 上 8% SDS PAGE 凝胶。将凝胶干燥, 暴露于磷酸成像仪。泳道 1 是无肽对照, 泳道 2-5 分别是 10, 20, 30, 和 40  $\mu\text{M}$  的肽。图 20 证实, 该肽会抑制对 GST-CRK 的 c-Ab1 酪氨酸磷酸化。也观察到了肽对 c-Ab1 酪氨酸激酶的浓度依赖性的抑制。评价了无肽对照, DMSO 对照, DMSO + 硬脂酸对照, 和 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 和 55  $\mu\text{M}$  的肽。图 21 显示了肽对 c-Ab1 酪氨酸激酶的线性抑制。该曲线代表着 GST-CRK 磷酸化的抑制。图 22 显示, DMSO 和硬脂酸不会影响 c-Ab1 酪氨酸激酶活性。

在其它实验中, 证实了人肺癌细胞系含有 Ab1 相关的酪氨酸磷酸化的蛋白质。在去污缓冲液中裂解 Rat-1, Rat1 SH2 (激活的 Ab1 酪氨酸激酶), H1299 (p53 阴性) 和 A549 (p53 阳性) 人肺癌细胞系。使用抗-Ab1 P6D 单克隆抗体来免疫沉淀 Ab1 蛋白质。使用蛋白 A 琼脂糖珠子断开免疫复合物。从珠子洗脱蛋白质, 然后上 SDS PAGE 凝胶。印迹和封闭后, 用抗-Ab1 8E0 (抗-Ab1 SH2 域) 抗体处理膜。使用 8E9 抗体、4G10 抗体和 P6D 抗体, 在 A549 细胞中观察到有活性的 Ab1。使用抗-磷酸酪氨酸抗体 (4G10) 进行免疫印迹。剥离膜上的 8E9 抗体, 并用 P6D 抗-Ab1 抗体重新探测。

在其它实验中, 研究了 Fus1 肽对 c-Ab1 诱导的集落形成的影响。在细胞变成汇合后, 用硬脂酸化的 Fus1 肽处理 Rat-1 SH2 细胞 ( $10\ \mu\text{M}$

Fus1 肽，每 2 天更换培养基，直到观察到集落)。Rat-1 SH2 细胞会表达 GFP 作为标志物。为经肽处理的发出绿色荧光的 Rat-1 SH2 细胞拍摄荧光照片。制备该视野的相差照片。也制备了未处理的 Rat-2 SH2 细胞的荧光照片，并制备相差照片。对 (Rat-1 SH2 + M74) 和 (Rat-1 SH2 + 硬脂酸) 成像。DMSO (0.2%) 和硬脂酸 (30  $\mu$ M) 对集落形成没有影响。

### 实施例 3

FUS1-纳米颗粒和吉非替尼的联合处理对 EGFR 酪氨酸激酶活性和 NSCLC 细胞生长的协同抑制

设计成通过基因转移来恢复缺陷基因和基因产物在肿瘤抑制和细胞凋亡途径中的功能、并通过“智能药物”例如蛋白酪氨酸激酶抑制剂 (PTKI) 靶向关键信号传递途径中特异性的且经常发生的分子改变的新癌症治疗，会在根本上改变癌症治疗，并具有治疗肺癌的希望。*FUS1* 是在人染色体 3p21.3 区中鉴别出的新肿瘤抑制基因 (TSG)，它在许多人癌症中经常改变或缺失，且已经证实起 Apaf1-相关细胞凋亡途径中的关键介质的功能，是有效的体外和体内肿瘤抑制剂。考虑到我们最近的发现，即 FUS1-介导的 PTK 抑制和 FUS1 与 PTK 和 Apaf1 蛋白质的直接相互作用，以及其它研究人员现在的发现，即在 NSCL 患者的吉非替尼-应答者中 EGFR 基因的激活突变，和这些突变在选择性激活细胞存活信号传递和阻断促细胞凋亡途径中的作用，在本研究中，发明人通过在吉非替尼-敏感的和抗性的 NSCLC 细胞中同时灭活细胞存活和增殖信号传递和激活促凋亡途径，探查了使用多功能 FUS1 作为增强吉非替尼的化疗效力和克服吉非替尼-抗性的调控剂的能力。发明人发现，在 3p-缺陷的和吉非替尼-抗性的 NSCLC H1299, H358, 和 H460 细胞中，*FUS1*-纳米颗粒-介导的基因转移或 wt-FUS1-衍生肽 (wt-FP) 的处理对 wt-FUS1 的重新激活，会显著敏化这些细胞对吉非替尼处理的应答，如对肿瘤细胞生长的超过累加抑制作用和对细胞凋亡的协同诱导所证实的。在用 FUS1-纳米颗粒和非常低剂量的吉非替尼 (在  $IC_{10}$

的水平)共同处理过的吉非替尼-敏感的 HCC827(具有 EGFR 的激活突变)和 H1819 (具有 EGFR 的扩增)细胞中,也观察到增强的生长抑制。在用 FUS1-纳米颗粒或 wt-FP 单独或与吉非替尼组合处理过的细胞中,也检测到对磷酸化的 EGFR 和 Erk 蛋白质活性的显著抑制,如通过磷酸-EGFR 或 Erk-特异性抗体的蛋白质印迹分析所证实的。我们的结果表明, wt-Fus1 可能在调控肿瘤细胞对化疗剂(例如 PTKI)的敏感性中起关键作用,且 FUS1-纳米颗粒-介导的分子治疗与这些小分子化疗剂的联合治疗可能是对肺癌的有效治疗策略。

#### 实施例 4

在体外和体内 FUS1-纳米颗粒和 Gleevec 的联合处理对 c-Abl 和 c-Kit 活性的灭活和对 SCLC 细胞生长的抑制

*FUS1* 是在关键人染色体 3p21.3 区中鉴别出的新肿瘤抑制基因,它在超过 95%的 SCLC 细胞中具有 LOH,或在有些 SCLC 中纯合地缺失。在测试的所有 SCLC 细胞中,*FUS1* 蛋白质的表达是缺失的,并且 *FUS1*-缺陷型肺癌细胞中 wt-*FUS1* 的重新激活会通过诱导细胞凋亡抑制它们的生长。另一方面,蛋白酪氨酸激酶(PTK)例如 BCR-Abl, c-Kit 和 PDGFR 在 SCLC 中经常改变和扩增,是重要的治疗靶物。已经证实小分子药物 gleevec 会通过靶向 c-Kit/SCF 途径,体外抑制 SCLC 细胞生长,但是在动物模型或人临床试验中没有表现出显著的治疗功效。发明人假设, DOTAP: Chol-复合的 *FUS1*-纳米颗粒和 gleevec 的联合治疗策略,可能通过同时灭活致癌 PTK 信号传递和激活促细胞凋亡途径,促进对 SCLC 生长的协同抑制。与用 *GFP*-纳米颗粒或肽对照处理的细胞相比,在用 *FUS1*-纳米颗粒或 wt-*FUS1*-衍生的肽 (wt-FP)处理 72 h 的 SCLC H69, H128, H146, 和 N417 细胞中,观察到显著的生长抑制和细胞凋亡,但是用 *FUS1* 蛋白质或肽的功能障碍突变体没有观察到。与用任一种试剂单独处理的细胞相比,在用 *FUS1*-纳米颗粒或 wt-FP 与 gleevec 的组合处理过的 gleevec-抗性的 H69R 和 N417 细胞中检测到增强的生长抑制。在 *FUS1*-纳米颗粒或者 wt-FP 单独或与 gleevec 组合处理过的

H69 和 N417 细胞中,也显著抑制了磷酸化的 c-Abl 和 c-Kit 蛋白质的活性,如使用免疫沉淀的磷酸-c-Abl 或磷酸-c-Kit 蛋白质的免疫印迹分析和活性测定所证实的。发明人开发了胸内 SCLC N417 肿瘤异种移植裸鼠模型,并通过非侵入的和定量的 MR 成像分析,评价了 *FUS1*-纳米颗粒全身治疗和 Gleevec 口服给药的治疗功效。发明人发现,在用 *FUS1*-纳米颗粒单独或与 gleevec 组合治疗的小鼠中,在少于 2 周内显著抑制了 N417 肿瘤异种移植物的生长 ( $P < 0.001$ ),但是在 gleevec 单独治疗的小鼠中没有检测到显著功效,如 MR 成像和体积分析所证实的。我们的结果清楚地证实了 *FUS1*-纳米颗粒对 SCLC 的体外和体内治疗功效,并暗示全身施用 *FUS1*-纳米颗粒单独或其它化疗剂组合和 MRI 用于 SCLC 治疗的平移应用。

### 实施例 5

FUS1 单倍体机能不全的非小细胞肺癌中的激活的 c-Abl

Abl 蛋白在所有组织中广泛表达,但是致癌性激活形式的 c-Abl 限于造血恶性肿瘤(例如包含 BCR-ABL 融合体的费城染色体+慢性髓细胞性白血病)。c-Abl 蛋白质是紧密调节的酪氨酸激酶,它位于胞质和核中。已知 DNA 损伤会引起核形式的 c-Abl 蛋白的激活。胞质 c-Abl 与生长因子受体信号传递、细胞运动性、和细胞粘附相关。已知 Bcr 蛋白质是 c-Abl 和 Bcr-Abl 癌蛋白的负调节剂(Lin 等, 2001; Ling 等, 2003)。另外, PAG 会通过 SH3 域的相互作用,下调 c-Abl (Wen 和 Van Etten, 1997)。在肺癌中,在小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC)中经常观察到染色体臂 3p 的一个等位基因的缺失,提供了该染色体区中肿瘤抑制基因(TSG)的证据(Kondo 等, 2001; Uno 等, 2004)。已经在该关键染色体区中鉴别出了 FUS1 基因,并认为是新的肿瘤抑制基因。不清楚 Fus1 肿瘤抑制活性的机制。发明人已经发现, Fus1 肽会体外抑制 c-Abl 酪氨酸激酶(IC50 35  $\mu\text{M}$ )。该抑制序列源自有些肺癌细胞系中检测到的突变型 Fus1 蛋白质之一中缺失的区域。重要的是,硬脂酸(C18 脂肪酸)修饰形式的该肽是抑制所需的,但是

单独的硬脂酸不是抑制性的。感兴趣的是，认为结合到 c-Ab1 的氨基末端区段上的肉豆蔻酸 (C14) 脂肪酸会参与 c-Ab1 的自抑制 (Hantschel 等, 2003)。发明人使用激活的 c-Ab1 酪氨酸激酶转化的 Rat-1 细胞，测试了 Fus1 肽对集落形成的影响。发明人发现，硬脂酸-Fus-1 肽 (40  $\mu$ M) 会阻断集落形成。这些发现表明，Fus1 肿瘤抑制蛋白的活性之一是干扰 c-Ab1 酪氨酸激酶功能。分析在该 3p21.3 区具有等位基因缺失的 2 个肺癌细胞系，所述缺失导致 FUS1 基因的单倍体机能不全，表明激活的 c-Ab1 可能在 FUS1 缺失的肺癌中起作用。免疫沉淀/ pTyr 蛋白质印迹研究和体外 Ab1 激酶测定证实，A549 和 H1299 细胞系包含激活的 c-Ab1 蛋白。其它研究正在进行中，以研究 Fus1/Ab1 相互作用和鉴别 FUS1 内对 c-Ab1 酪氨酸激酶抑制而言关键的序列。

### 实施例 6

FUS1-纳米颗粒和吉非替尼的联合处理对非小细胞肺癌 (NSCLC) 中 EGFR 酪氨酸激酶和肿瘤细胞生长的协同抑制

*FUS1* 是在人染色体 3p21.3 区中鉴别出的新肿瘤抑制基因 (TSG)，它在 Apaf1-相关细胞凋亡途径中起作用，是有效的肿瘤抑制剂。发明人探查了 FUS1 用于增强吉非替尼-敏感的和抗性的 NSCLC 细胞中吉非替尼的化疗效力和克服吉非替尼-抗性的用途。

#### 方法和结果

发明人发现，在 FUS1-缺陷的和吉非替尼-抗性的 NSCLC H1299, H358, 和 H460 细胞中 FUS1-纳米颗粒-介导的基因转移对 wt-FUS1 的表达，会显著敏化对吉非替尼治疗的应答，如通过对肿瘤细胞生长的超过累加抑制作用和对细胞凋亡的协同诱导所证实的。在 FUS1-纳米颗粒和低剂量的吉非替尼 ( $IC_{10}$ ) 共同处理的吉非替尼-敏感的 HCC827 (EGFR 突变体) 和 H1819 (EGFR 扩增) 细胞中，也观察到增强的生长抑制。在用 FUS1-纳米颗粒单独或与吉非替尼组合处理过的细胞中，也检测到对磷酸化的 EGFR 蛋白的显著抑制，如磷酸-EGFR-特异性抗体的蛋白质印迹分析所证实的。与未处理或 GFP-纳米颗粒处理过的细胞相

比, 在用 FUS1-纳米颗粒处理的动物中在小于 2 周处理内检测到肿瘤生长的显著抑制 ( $P < 0.001$ ), 如通过 MR 成像和体积分析所证实的。通过冷冻组织样品中 TUNEL 染色的原位细胞凋亡测定, 也检测到用 FUS1-纳米颗粒处理过的小鼠的肿瘤细胞中细胞凋亡的诱导。发明人正在已经进行化疗的 IV 期 NSCLC 患者中, 进行静脉内施用单试剂 FUS1-纳米颗粒的 I 期研究。在迄今入选的 7 位患者中, 较好地耐受治疗, 生存中值是 17 多个月。

### 结论

我们的结果表明, wt-FUS1 可能在调控肿瘤细胞对蛋白酪氨酸激酶抑制剂的敏感性中起关键作用。

### 实施例 7

我们以前的实验证实, 源自已知在来自有些肺癌细胞系的 Fus1 中缺失的 Fus1 序列的合成肽, 会抑制商品化的 Abl 的激酶活性。发明人通过抗-Abl 免疫沉淀 (IP) /pTyr 蛋白质印迹, 筛选了 2 个人非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞系, A549 和 H1299, 并检测到激活的 c-Abl 蛋白质。为了证实 c-Abl 在 FUS1 缺失的 NSCLC 细胞系中的激活, 使用 c-Abl 抗体 IP 进行体外激酶测定。A549 和 H1299 对激活的 c-Abl 是阳性的, 而 CCD16, 即一种正常人肺成纤维细胞细胞系, 是阴性的。

为了进一步研究 c-Abl 在 NSCLC 细胞系中的活性, 在 H1299 细胞的软琼脂集落测定中使用甲磺酸伊马替尼 (也称作 STI-571 或 Gleevec), 即一种已知的 c-Abl 酪氨酸激酶抑制剂。用伊马替尼 (10  $\mu$ M) 处理细胞, 会导致与未处理对照相比集落数的几乎完全减少。与未处理的细胞相比, 在有伊马替尼存在下形成的那些集落的大小减小。

为了测定 Fus1 对细胞内 c-Abl 的直接影响, 将 c-Abl cDNA 与野生型 FUS1 或 c-末端缺失的 FUS1 或空载体共转染进 COS-1 细胞。我们的数据表明, 存在与野生型 Fus1 共表达有关的 c-Abl 酪氨酸磷酸化的减少, 但是该减少在缺乏 Fus1 肽的抑制肽序列的 FUS1 缺失突变体中没有观察到。



参考本发明的公开内容，不经过度的试验，可以制备和执行本文公开的和要求保护的所有组合物和方法。尽管已经就优选实施方案描述了本发明的组合物和方法，本领域技术人员显而易见，可以将变化应用于组合物和方法、和本文所述方法的步骤或步骤次序中，而不背离本发明的构思、精神和范围。更具体地，显然可以将化学和生理上相关的某些试剂替换本文所述的试剂，同时达到相同或类似的结果。本领域技术人员显而易见的所有这样的类似的置换和修饰，视作在所附权利要求书定义的本发明的精神、范围和构思内。

### 实施例 8

#### 通过中性脂质体纳米颗粒递送 FUS-1 肽

在本实施例中使用的递送系统包含基于中性纳米颗粒(1, 2-二油酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DOPC)(Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)的脂质体和肽(Fus 1)。在叔丁醇中制备 DOPC 原液(20 mg/ml)，并以 90%:10%(v/v) (DOPC:吐温 20)的比例，与在蒸馏水中稀释(1:1000)的吐温-20 (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ)相混合。向混合物加入过量的无水叔丁醇(95%叔丁醇, 5%脂质, v/v)，低压冻干过夜。将干脂质混合物与已经在蒸馏水中溶解的肽相混合。在这些实验中使用的 DOPC 和肽比例是 10:1 摩尔比(DOPC:肽)。稀释含有 100  $\mu$ M 肽的 dd 水，用于处理肺癌细胞(H1299)。阳离子脂质 DOTA 和肽用作阳性对照(DOTAP:肽 (1:1), M/M)。

用递增剂量的空脂质体和含有 fus 1 肽(1, 5, 10, 和 20  $\mu$ M 肽)的脂质体或含有染料-标记的肽(1, 5, 10, 和 20  $\mu$ M)的脂质体处理肺癌细胞(5000/孔) 48 h。在 20 和 48h 时间点，使用荧光显微镜观察脂质体的摄入。在处理 20 和 48h，拍摄细胞照片研究形态学和生存力。在 48h 后，计数用空脂质体(对照)处理的细胞和用含有肽的脂质体处理的细胞的细胞生存力，将结果绘图(图 23)。

### 实施例 9

## 分析任选地含有 FUS-1 肽的 DOPC 和 DOTAP:胆固醇纳米颗粒的毒性

给 C3H 小鼠注射含有肽 (FUS-1 肽或非特异性肽) 的纳米颗粒, 随后在注射后 1, 2 和 3 周, 分析各种毒理学参数。给对照小鼠 (“IX 组”) 注射 PBS。评价的毒理学参数包括血液学参数 (即, 红细胞计数 “RBC” 和白细胞计数 “WBC”), 肝功能分析 (即, AST, ALT, 和总胆红素分析) 和肾功能分析 (即, 肌酸酐水平的评价)。使用了 DOTAP:胆固醇纳米颗粒或 DOPC (中性脂质体) 纳米颗粒。施用给 C3H 小鼠的含有肽的纳米颗粒的量, 从 2 mg/kg 至 5 mg/kg。在下面的表 V 中总结了这些研究。

表 V. 纳米颗粒的毒性分析

在 C3H 小鼠中对 FP-纳米颗粒的毒性研究 (5 只小鼠/组)

血液学参数	组 I	组 II		组 III		组 IV		组 V		组 VI	组 VII	组 VIII	组 IX	
		FP (mg/kg)		NSP (mg/kg)		FP-DC (mg/kg)		NSP-DC (mg/kg)		DOPC	FP-DOPC	NSP-DOPC	PBS	
		2	5	2	5	2	5	2	5	5mg/kg	5mg/kg	5mg/kg		
WBC (x10 <sup>9</sup> )	DC													
	1st周													
	2nd周	3.37±0.42	1.6±0.43	1.93±0.58	1.6±0.24	1.5±0.51	1.77±0.57	3.03±1.63	0.67±0.29	1.3±0.28	2±0.29	0.53±0.09	1.93±1.26	
	3rd周	2.0±0.74	2±0.49	1.73±0.09	1.6±0.14	1.87±0.31	2.23±0.45	2.97±2.19	1.37±0.33	1.63±0.39	2.67±0.41	1.93±0.63	1.86±0.39	
	RBC (x10 <sup>9</sup> )	1st周												
		2nd周	3.83±1.07	8.13±0.96	8.5±1.19	6.23±0.33	7.47±2.28	6.37±2.22	6.6±2.37	6.8±1.61	5.33±0.33	6.73±1.08	3.17±1.56	6.38±2.22
		3rd周	7.7±2.43	7.87±0.49	5.6±0.76	5.7±1.14	6.67±0.69	7.07±0.09	5.63±2.71	8.03±1.74	6.23±1.27	8.6±0.50	5.67±0.74	5.93±0.58
	AST (U/L)	1st周	337.5±193.5	199±31.02	162±25.57	183±6	148.5±13.5	133.5±34.5	142.67±39.42	108.67±12.5	117.07±15.97	106.07±9.46	103.67±14.64	76±13.44
		2nd周	161.33±86.23	106.33±2.49	100.33±25.3	146±45.31	96.33±20.24	88.33±9.74	120.67±33.11	155.33±32.79	128.33±19.74	212±0	175.33±23.17	159.33±9.53
3rd周		124.33±27.35	88±15.30	130±62.01	94.67±28.59	83.67±23.63	103±20.83	154±57.88	93.33±11.67	98.67±16.50	100.67±22.29	123±52.62	82.67±39.85	
ALT (U/L)	1st周	84±30	84±8.49	88±5.1	76±7.87	91.5±7.5	72±12.96	71±9.9	51.33±4.11	57±9.42	45.33±3.3	50±3.74	44±4.97	
	2nd周	61.33±18.19	58±6.16	46.33±0.94	61.67±5.44	54±9.93	46.67±3.68	54.67±7.72	56±4.32	46±3.74	47±0	56.67±2.49	51.33±4.71	
	3rd周	58.33±6.13	52.67±4.92	53±8.83	58.67±12.55	50±6.16	51.33±4.11	56.67±8.99	50.67±8.26	52±2.16	48.67±6.60	57.67±10.87	45.67±9.43	
总胆红素 (mg/dl)	1st周	1.8±0	2.7±1.07	1.65±0.75	2.7±0	1.8±1.2	1.05±0.15	1.57±0.71	1.2±0.16	1.03±0.26	1.3±0.37	1.07±0.34	0.57±0.17	
	2nd周	2.15±1.25	0.9±0.16	0.6±0.45	1.13±1.09	0.7±0.28	0.43±0.33	1.2±0.57	2.57±0.84	1.4±0.16	5.3±2.5	3.27±0.47	2.17±0.52	
	3rd周	0.9±0.36	0.63±0.25	1.13±0.63	0.6±0.42	0.43±0.12	0.8±0.22	1.17±0.17	0.83±0.17	0.93±0.12	0.73±0.19	0.9±0.65	0.57±0.38	
肾功能 (mg/dl)	1st周	0.24±0	0.34±0	0.37±0.07	0.6±0	0.317±0.02	0.16±0	0.49±0.25	0.64±0.08	0.52±0.08	0.54±0.11	0.39±0.05	0.42±0.06	
	2nd周	0.51±0.10	0.51±0.14	0.48±0.05	0.5±0.10	0.35±0.02	0.32±0.03	0.36±0.02	0.43±0.05	0.44±0.08	0.50±0.04	0.31±0.11	0.40±0.00	
	3rd周	0.55±0.08	0.50±0.01	0.54±0.05	0.38±0.09	0.32±0.04	0.38±0.04	0.46±0.03	0.44±0.01	0.52±0.03	0.38±0.02	0.36±0.09	0.27±0.06	

注:

1. 由于样品的严重溶血, 在第 1 周的一些血液学参数没有得到。
2. 隔日通过尾静脉注射 FP-纳米颗粒 3 次, 每次剂量的总体积是 200ul。
3. 采血的时间点代表自最后处理的时间。
4. DC: DOTAP/胆固醇-纳米颗粒, FP: FUS1 肽, NSP: 非特异性肽。

### 实施例 10

肿瘤抑制基因产物 Fus1 对 c-Ab1 的抑制: 缺乏 FUS1 表达的非小细胞肺癌细胞中 c-Ab1 的致癌激活

硬脂酸-Fus1 肽会抑制 c-Ab1 的酪氨酸激酶活性。Fus1 是与 NSCLC 有关的肿瘤抑制基因 (Ji 等, 2002; Lerman 和 Minna, 2000; Kondo 等, 2001)。从肺癌肿瘤细胞系分离了 FUS1 的 C-末端缺失突变体 (Kondo 等, 2001), 它编码 110 个氨基酸野生型 Fus1 蛋白质的前 80 个氨基酸 (Kondo 等, 2001)。发明人合成了源自 Fus1 (1-80) 中缺失的序列 (KLR 序列除外) 的硬脂酸-Fus1 肽 (KLRRVHKNLIPQGIVKLDHR; SEQ ID NO: 11) (参见表 VI)。在使用细菌纯化的 Abl 激酶的 Abl 酪氨酸激酶测定中, 该肽是强抑制性的 (图 24A)。令人惊奇地, 缺乏硬脂酸 N-末端部分的 Fus1 肽无 Abl 激酶抑制剂活性 (图 24B)。单独的硬脂酸也是非抑制性的。硬脂酸 Bcr 肽无 Abl 激酶抑制剂活性; 与硬脂酸 Fus1 肽大致相同氨基酸数目的硬脂酸 Bcr 肽对细菌纯化的 Abl 激酶不具有任何抑制作用。总之, 这些结果表明, 硬脂酸部分和 Fus1 肽内的氨基酸序列是抑制 c-Ab1 激酶所必需的。

如图 24A 所示, 将硬脂酸 Fus1 肽与截短的商品化的仅含有 SH2 和 SH1 域的 Abl 酪氨酸激酶 (45kD) (New England Bio-Labs)、GST-CRK (c-Ab1 优选底物)、100uM 冷 ATP、和 32P ATP 一起温育。在 30 度温育 30 分钟后, 用 2x SDS 样品缓冲液煮沸样品, 上 8% SDS PAGE 凝胶。干燥凝胶, 并暴露于磷酸成像仪。

图 24B 显示了硬脂酸 Fus1 肽对 Abl 酪氨酸激酶的线性抑制。该曲线代表 GST-CRK 磷酸化的抑制。非-硬脂酸修饰的 Fus1 肽没有抑制 Abl 酪氨酸激酶活性 (图 24C)。将 45kD Abl 酪氨酸激酶 (New England BioLabs) 与 0-60  $\mu\text{M}$  的非-硬脂酸 Fus1 肽、100  $\mu\text{M}$  冷 ATP、和 32P ATP、和 GST-Crk 一起温育。使用磷酸成像仪, 对 GST-Crk 磷酸化定量。

在下面的表 VI 中, 显示了 Fus1 氨基酸序列和硬脂酸-Fus1 肽序列。下面标下划线的氨基酸序列是衍生出 Fus1 肽的区域。除了 KLR N-末端以外, 肽序列位于在有些 NSCLC 细胞系中表达的突变截短形式的 FUS1 [FUS1 (1-80)] 中缺失的区域 (Kondo 等, 2001)。

表 VI

Fus1 肽:

硬脂酸<sup>-78</sup>KLRRVHKNLIPQGIVKLDHR SEQ ID NO: 11

Fus1 氨基酸序列

1 mgasgskarg lwpfasaagg ggseaagaeq  
 31 alvrprgrav ppfvftrrgs mfydedgdla SEQ ID NO: 12  
 61 hefyetivt kngqkraklr rvhknlipgg  
 91 ivkldhprih vdfpvilyev

在 NSCLC 细胞系中 c-Abl 酪氨酸激酶被激活。检查了几种 NSCLC 细胞系中激活的 c-Abl 的存在 (表 VII)。A549 和 H1299 细胞系含有酪氨酸激酶活性的 c-Abl 蛋白, 如用抗-Abl P6D 进行的免疫复合物激酶测定所测得的。来自这些细胞系的细胞裂解物的抗-Abl 免疫复合物, 也含有酪氨酸-磷酸化的 c-Abl 蛋白质。

表 VII. NSCLC 细胞系中减少的 FUS1 表达与激活的 c-Abl 活性相关联

细胞系	FUS1 表达	激活的 c-Abl
对照细胞系		
Rat 1	未知	否
Rat1 SH2	未知	是
正常肺成纤维细胞		
CCD16	未知	否
<b>NSCLC</b>		
A549	否	是
H358	否	是
H1299	否	是
H2089	否	是
H2122	否	是

证实了 NSCLC 细胞系含有激活的 c-Abl 酪氨酸激酶。用抗-c-Abl 抗体 P6D 温育来自 Bcr-Abl 阳性细胞系 32D P210、正常肺成纤维细胞 CCD16、和 NSCLC 细胞系 H1299 和 A549 的全细胞裂解物 (Ling 等, 2003)。用蛋白 A 琼脂糖珠子断开 P6D 和免疫复合物。用 2  $\mu$ Ci  $^{32}$ P ATP 在冰上温育蛋白 A 珠子 20 分钟。在 2 $\times$  SDS 样品缓冲液中煮沸上清液, 在 8% SDS-PAGE 凝胶上分析。用抗-c-Abl 抗体 P6D 温育来自正常 Rat 1 细胞、c-Abl 转化的 Rat 1 细胞、ABL 转化的 Rat1 细胞 (Ling 等, 2003)、和 NSCLC 细胞 H1299 和 A549 的全细胞裂解物。用蛋白 A 琼脂糖珠子收获 P6D 免疫复合物。在 2 $\times$  SDS 样品缓冲液中煮沸蛋白 A 珠子, 通过 SDS-PAGE 分析。用抗-c-Abl 抗体 8E9 探测 bBlot (Guo 等, 1994)。然后剥离印迹, 用磷酸酪氨酸抗体 4G10 (Upstate) 探测。

COS1 细胞中 FUS1 和 c-ABL 共表达会抑制 c-Abl 酪氨酸激酶活性。为了评价 Fus1 抑制激活的 c-Abl 的能力, 我们在 COS1 细胞中共表达了这些 cDNA, 并测量酪氨酸-磷酸化的 c-Abl 的水平。c-ABL 与 FUS1 的共表达, 会抑制 c-Abl 在酪氨酸残基上的磷酸化 (图 25A)。相比之下, FUS (1-80) 与 c-ABL 的共表达对 c-Abl 酪氨酸磷酸化几乎没有抑制作用 (图 25A)。令人感兴趣地, 用 N-末端 Fus1 抗体免疫沉淀 Fus1 连同 Fus1 一起共沉淀了 c-Abl, 表明 Fus1 与 c-Abl 结合。c-Abl 的酪氨酸 412 的磷酸化, 是 c-Abl 酪氨酸激酶激活的衡量指标。因此, 我们评价了共表达 FUS1 之后 c-Abl 中磷酸酪氨酸 412 序列的水平 (图

25B)。FUS1 与 c-Abl 的共表达, 会强烈抑制 c-Abl 蛋白质中磷酸酪氨酸 412 的水平。相反地, FUS (1-80) 与 c-ABL 的共表达, 不会抑制酪氨酸 412 的磷酸化(图 25B)。研究已经证实, Fus1 的肉豆蔻酰化是它在 NSCLC 中的肿瘤抑制活性所需的。c-ABL 与 FUS1 的肉豆蔻酰化-缺陷型突变体在 COS1 细胞中的共表达, 导致与野生型 FUS1 和 c-ABL 的共表达相比磷酸酪氨酸 c-Abl 的微小降低(图 25C)。因而, 该结果表明, Fus1 与 c-Abl 的相互作用会阻断它的酪氨酸激酶激活, 作为自身磷酸化的结果, 或通过另一上游激酶例如 c-Src 的 Abl 激活(Plattner 等, 1999)。

在图 4a 中, 用 c-ABL 和野生型 FUS1 或 FUS (1-80) 共转染 COS1 细胞。在转染后 48 小时, 收获细胞, 用 N-末端 Fus1 抗体温育裂解物。在 2× SDS 样品缓冲液中煮沸用蛋白 A 珠子收获的 Fus1 免疫复合物, 并通过 SDS-PAGE 分析。用抗磷酸酪氨酸抗体 4G10 (Upstate) 探测印迹。然后剥离印迹, 并用抗-c-Abl 抗体 8E9 重新探测。在图 4b 中, 用 c-Abl 以及空载体、FUS (1-80) 或野生型 FUS1, 共转染 COS1 细胞。在转染后 48 小时, 收获细胞, 并用抗-c-Abl P6D 温育裂解物, 如图 4a 中。用 c-Abl 抗-磷酸酪氨酸 412 (Abcam) 探测印迹。然后剥离印迹, 并用抗-c-Abl 抗体 8E9 重新探测。

伊马替尼会抑制 NSCLC 细胞的集落形成。 广泛已知甲磺酸伊马替尼 (Gleevec) 抑制 Bcr-Abl 的激活的酪氨酸激酶活性的能力 (Druker 等, 1996)。发明人因此测试了伊马替尼对软琼脂中 H1299 细胞的集落形成的影响(图 26A-C)。伊马替尼处理会以剂量依赖性的方式强烈抑制 H1299 细胞的集落形成能力; 集落的数目和大小都受到抑制(图 26A-C)。在这些测定中使用 1-10  $\mu\text{M}$  的伊马替尼, 因为以前的研究已经证实了在这些浓度对 c-Abl 激酶活性的强抑制 (Zipfel 等, 2004)。

讨论。 以前的研究已经证实了 FUS1 的抗肿瘤活性 (Kondo 等, 2001; Uno 等, 2004), 但是迄今尚未鉴别出 FUS1 基因的靶物。在我们的研究中, 发现 c-Abl 受到 Fus1 蛋白质的负调节。使用源自在有些 NSCLC 患者中观察到的突变型 FUS1 (1-80) (Kondo 等, 2001) 中缺乏的序列

的 FUS1 肽,我们能抑制 c-Abl 激酶磷酸化 Crk( c-Abl 的正常靶物(17) ) 的能力(图 24A-C)。令人感兴趣地,仅仅硬脂酸修饰形式的 FUS1 肽对 c-Abl 激酶具有抑制作用(图 24A-C)。已经证实, FUS1 的肉豆蔻酰化是产生 FUS1 的肿瘤抑制作用所需的(Plattner 等, 1999)。令人感兴趣地, c-Abl(同种型 1b)的 N-末端也含有肉豆蔻酸残基,后者已经参与 c-Abl 的自身抑制(Hantschel 等, 2003)。通过 COS1 细胞中的共表达测定,证实了细胞培养物中野生型 Fus1 和 c-Abl 的相互作用(例如,图 25A-C)。酪氨酸 412 的磷酸化,是导致 c-Abl 激酶激活的关键步骤(Brasher 和 Can Etten, 2000)。相对于 c-Abl 与在有些 NSCLC 细胞系中发现的截短的 FUS1(缺乏抑制肽序列)(Wang, 2000)或空载体共表达时任何一种信号的仅仅非常小量的降低,野生型 FUS1 和 c-ABL 的共表达会导致 c-Abl 的总磷酸酪氨酸水平和磷酸酪氨酸 412 含量水平的显著降低(图 25A-C)。这些发现提供 Fus1 蛋白质直接抑制 c-Abl 酪氨酸激酶的有力证据。

这些结果证实,非小细胞肺癌(NSCLC)细胞系会表达酪氨酸激酶活性的 c-Abl(图 24A-C)。考虑到 c-Abl 是一种紧密调节的酪氨酸激酶,且它的致肿瘤性通常与白血病细胞中的嵌合蛋白质 Bcr-Abl 相关,该结果是令人感兴趣的。为了支持这些发现(显示 c-Abl 在 NSCLC 系中的激活),以已知会抑制 c-Abl 酪氨酸激酶的剂量,伊马替尼对 NSCLC 细胞系的处理以剂量依赖性的方式强有力地抑制软琼脂中的集落形成(图 26A-C)。因此,我们的发现将 c-Abl 鉴别为肿瘤抑制基因产物 FUS1 的可能靶物,并表明 c-Abl 可能是有些形式的 NSCLC 的致肿瘤性的重要贡献者。因而,众所周知的 c-Abl 抑制剂伊马替尼看起来可能具有成功地治疗 NSCLC 的潜力。

### 参考文献

下面的参考文献就其提供补充本文所述内容的示例性程序细节或其它细节的程度,特别以参考方式并入本文。



美国专利 4,162,282

美国专利 4,310,505

美国专利 4,533,254

美国专利 4,554,101

美国专利 4,728,575

美国专利 4,728,578

美国专利 4,737,323

美国专利 4,921,706

美国专利 5,030,453

美国专利 5,397,987

美国专利 5,855,911

美国专利 5,962,016

美国专利 6,413,544

美国专利 6,610,657

美国专利 6,680,068

美国专利 6,770,291

美国申请 2004/0208921

Arap 等, *Cancer Res.*, 55(6):1351-1354, 1995.

Ausubel 等, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.,  
New York, N.Y., 1996; 1998

Bakhshi 等, *Cell*, 41(3):899-906, 1985.

Ballou 等, *Bioconjugate Chemistry*, 15:79-86, 2004.

Ben-Neriah 等, *Science*, 233:212-214, 1986.

Brady and Dodson, *Nature*, 368:692-693, 1994.

Buchhagen 等, *Head and Neck*, 18:529-537, 1996.

Butturini 等, *Leukemia Res.*, 20(6):523-529, 1996.

Caldas 等, *Nat. Genet.*, 8(1):27-32, 1994.

Cheng 等, *Cancer Res.*, 54(21):5547-5551, 1994.

Cheng 等, *Invest. Radiol.*, 22(1):47-55, 1987.

- Cleary and Sklar, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82(21):7439-43, 1985.
- Cleary 等, J. Exp. Med., 164(1):315-320, 1986.
- Colledge and Scott, Trends in Cell Biology, 9:216-221, 1999.
- Daly 等, Oncogene, 8:1721-1729, 1993.
- Drin 等, AAPS Pharm. Sci., 4(4):1-7, 2002.
- Du 等, J. Pept. Res., 51:235-243, 1998.
- Dubertret 等, Science, 298:1759-1762, 2002.
- Dwarakanath 等, Biochem. Biophysical Res. Commun., 325:739-743, 2004.
- Ellerby 等 Nature Med., 9:1032-1038, 1999.
- Farhood 等, Biochim. Biophys. Act, 289-295, 1995.
- Ferrari, Nature Reviews, 5:161-171, 2005.
- Fidler and Ellis, Cell, 79(2):185-188, 1994.
- Folkman and Shing, J. Biol. Chem., 267(16):10931-10934, 1992.
- Folkman, Nature Med., 1:27-31, 1995.
- Frangioni, Current Opin. Chem. Biol., 7:626-634, 2003.
- Gazdar 等 In: Sym. Quant. Biol., Cold Spring Harbor, 59:565-572, 1994.
- Gazdar 等, Intl. J. Cancer, 78:766-774, 1998.
- Ghosh and Bachhawat, In: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands, Wu 等 (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- Gorunova 等, Genes Chrom. Cancer, 23:81-99, 1998.
- Great Britain Appln. 2193095 A
- Gupta 等, Biomaterials, 26:3995-4021, 2005.
- Gupta 等, Biomaterials, 26:3995-4021, 2005.
- Gupta 等, Biomaterials, 26:3995-4021, 2005.
- Gupta, IEEE Trans.Nanobioscience., 3:66-73, 2004.
- Hanahan and Folkman, Cell, 86(3):353-364, 1996.
- Hantschel 等, Cell, 112:845-857, 2003.
- Hollstein 等, Science, 253(5015):49-53, 1991.

- Hope 等, 1985
- Horowitz, In: MRI Physics for Radiologists: A Visual Approach, 1995
- Hughson 等, Cancer Genet. Cytogenet., 106:93-104, 1998.
- Hussussian 等, Nat. Genet., 8(1):15-21, 1994.
- Hvalby 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4761-4765, 1994.
- Ito 等, Cancer Gene Therapy, 11:733-739, 2004.
- Jameson 等, Nature 368: 744-746, 1994
- Ji 等, Cancer Res., 62:2715-2720, 2000.
- Johnson 等, J. Virol., 67:438-445, 1993.
- Kamb 等, Nat. Genet., 8(1):23-26, 1994.
- Kamb 等, Science, 267:436-440, 1994.
- Kerr 等, Br. J. Cancer, 26(4):239-257, 1972.
- Kerr 等, Br. J. Cancer, 26(4):239-257, 1972.
- Kersemaekers 等, Intl. J. Cancer, 79:411-417, 1998.
- Kloetzer 等, Virology, 140(2):230-238, 1985.
- Kohno 等, Cancer, 85:341-347, 1999.
- Kondo 等, Oncogene, 20:6258-6262, 2001.
- Kondo 等, Oncogene, 20:6258-6262, 2001.
- Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol., 157(1):105-132, 1982.
- Lewin 等, Nat. Biotechnol., 18:410-414, 2000.
- Lin 等, Oncogene, 20:1873-1881, 2001.
- Ling 等, Cancer Res., 63:298-303, 2003.
- Liposome Technology, Gregoriadis (Ed.), Boca Raton, FL, CRC Press, 1984.
- Mabry 等, In: Lung Cancer in the Genetic Basis of Human Cancer, Vogelstein and Kinzler (Eds.), McGraw Hill, 671-679, 1998.
- Mayer 等, Biochim. Biophys. Acta, 858(1):161-168, 1986.
- Mayhew 等, Biochim. Biophys. Acta, 775(2):169-174, 1984.
- Mayhew 等, Methods Enzymol., 149:64-77, 1987.
- Michalet 等, Science, 307:538-544, 2005.

- Miller 等, *Oncogene*, 22: 6006-6013, 2003.
- Minna 等, In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 5th Ed., Philadelphia: Lippincott, 849-857, 1997.
- Morawski 等, *Current Opinion Biotech.*, 16, 89-92, 2005.
- Mori 等, *Cancer Res.*, 54(13): 3396-3397, 1994.
- Nishihara 等, *Cancer Letter*, 180(1): 55-61, 2002.
- Nobri 等, *Nature (London)*, 368: 753-756, 1995.
- Obenauer 等, *Nucleic Acids Res.*, 31(13): 3635-3641, 2003.
- Okamoto 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(23): 11045-11049, 1994.
- Orlow 等, *Cancer Res*, 54(11): 2848-2851, 1994.
- Orlow 等, *Int. J. Oncol.*, 15(1): 17-24, 1994.
- PCT 申请 PCT/US85/01161
- PCT 申请 PCT/US89/05040
- PCT 申请 WO 02/100435A1
- PCT 申请 WO 03/015757A1
- PCT 申请 WO 04/002453A1
- PCT 申请 WO 04029213A2
- Pure & Appl. Chem.*, 63(3): 427-463, 1991
- Remington' s *Pharmaceutical Sciences*" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580, 1990.
- Roberts 等, *Adv. Drug Del. Rev.*, 54(4): 459-476, 2002.
- Rojas 等, *J. Biol. Chem.*, 271: 27456-27461, 1996.
- Rojas 等, *Nature Biotechnol.*, 16: 370-375, 1998.
- Roth, *Forum*, 8: 368-376, 1998.
- Sambrook 等, In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989
- Schwarze 等, *Science*, 285: 1569-1572, 1999.
- Schwarze 等, *Trends Cell Biol.*, 10: 290-295, 2000.
- Sekido 等, *Biochimica. Biophysica. Acta*, 1378: F21-F59, 1998.

- Sekido 等, *Oncogene*, 16: 3151-3157, 1998.
- Sekido 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 4120-4125, 1996.
- Serrano 等, *Nature*, 366: 704-707, 1993.
- Serrano 等, *Science*, 267(5195): 249-252, 1995.
- Sestier 等, *Electrophoresis*, 19: 1220-1226, 1998.
- Spandidos 等, *Anticancer Res.*, 9(2): 383-386, 1989.
- Stayton 等, *J. Controlled Release*, 65: 203-220, 2000.
- Sun 等, *Biopolymers*, 60(1): 61-75, 2001.
- Templeton, *Nature Biotech.*, 15: 647-652, 1997.
- Templeton, *Nature Biotechnology*, 15: 647-652, 1997.
- Travali 等, *FASEB J.*, 4(14): 3209-3214, 1990.
- Tsujimoto and Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(14): 5214-5218, 1986.
- Tsujimoto 等, *Science*, 228(4706): 1440-1443, 1985.
- Uno 等, *Cancer Research*, 64: 2969-2976, 2004.
- Uzawa 等, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 107: 125-131, 1998.
- Virmani 等, *Genes Chrom Cancer*, 21: 308-319, 1998.
- Wang, *Oncogene*, 19(49): 5643-5650, 2000.
- Weinberg, *Science*, 254(5035): 1138-1146, 1991.
- Weinberg, *Science*, 254: 1138-1146, 1991.
- Wen and Van Etten, *Genes and Development*, 11: 2456-2467, 1997.
- West, *Methods in Molec. Biol.*, 238: 113-122, 2004.
- Wilhelm 等, *Biomaterials*, 24: 1001-1011, 2003.
- Wistuba 等, *Cancer Res.*, 57: 3154-3158, 1997.
- Wistuba 等, *Cancer Res.*, 59: 1973-1979, 1999.
- Wistuba 等, *Oncogene*, 18: 643-650, 1999.
- Woodring 等, *J. Cellular Science*, 116(Pt. 13): 2613-2626, 2003.
- Zbar 等, *Nature*, 327: 721-724, 1987.
- Arlinghaus, *Oncogene*, 21: 8560-8567, 2002.
- Brasher and Van Etten, *J. Biol. Chem.*, 275: 35631-35637, 2000.

- 
- Donaldson 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:14053-14058, 2002.
- Druker 等, Nature Med., 2:561-566, 1996.
- Guo 等, Blood, 83:3629-3637, 1994.
- Hantschel 等, Cell, 112:845-957, 2003.
- Heisterkamp 等, Nature, 344:251-253, 1990.
- Ji 等, Cancer Res., 62:2715-2720, 2002.
- Kondo 等, Oncogene, 20:6258-6262, 2001.
- Lerman and Minna, Cancer Res., 60:6116-6133, 2000.
- Ling 等, Cancer Res., 63:298-303, 2003.
- Plattner 等, Genes and Dev., 13:2400-2411, 1999.
- Taagepera 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:7457-7462, 1998.
- Uno 等, Cancer Res., 64:2969-2976, 2004.
- Wang, Oncogene, 19:5643-5650, 2000.
- Wen and Van Etten, Genes and Dev., 11:2456-2467, 1997.
- Woodring 等, J. Cell Biol., 165:493-503, 2004.
- Zabarovsky 等, Oncogene, 21:6915-6935, 2002.
- Zipfel 等, Current Biol., 14:1222-1231, 2004.

<110> LIN, JACKI  
 ARLINGHAUS, RALPH B.  
 SUN, TONG  
 LIN, JI  
 OZPOLAT, BULENT  
 BERESTEIN-LOPEZ, GABRIEL  
 ROTH, JACK

<120> 生物活性 FUS1 肽和纳米颗粒-多肽复合物

<130> UTFC:920WO

<140> PCT/US2006/009044

<141> 2006-03-14

<150> 60/661,680

<151> 2005-03-14

<150> 60/753,632

<151> 2005-12-22

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成肽

<400> 1

Lys Leu Arg Arg Val His Lys Asn Leu Ile Pro Gln Gly Ile Val Lys  
 1 5 10 15

Leu Asp His Pro Arg  
 20

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成肽

<400> 2

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

Leu Ala

<210> 3

<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的说明: 合成肽

<400> 3  
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
 1 5 10 15

<210> 4  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的说明: 合成肽

<400> 4  
 Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu  
 1 5 10 15

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

<210> 5  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的说明: 合成肽

<400> 5  
 Met Gly Leu Gly Leu His Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala Leu Gln Gly  
 1 5 10 15

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

<210> 6  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的说明: 合成肽

<400> 6  
 Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly  
 1 5 10 15

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



<210> 7  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的说明: 合成肽

<400> 7  
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln  
 1 5 10

<210> 8  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的说明: 合成肽

<400> 8  
 Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr  
 1 5 10 15

Gly Arg

<210> 9  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的说明: 合成肽

<400> 9  
 Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe  
 1 5 10

<210> 10  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的说明: 合成肽

<400> 10  
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys  
 1 5 10

<210> 11  
 <211> 20  
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成肽

<400> 11

Lys Leu Arg Arg Val His Lys Asn Leu Ile Pro Gln Gly Ile Val Lys  
1 5 10 15

Leu Asp His Arg  
20

<210> 12

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成肽

<400> 12

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

Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ala Ala Gly Ala Glu Gln Ala Leu  
20 25 30

Val Arg Pro Arg Gly Arg Ala Val Pro Pro Phe Val Phe Thr Arg Arg  
35 40 45

Gly Ser Met Phe Tyr Asp Glu Asp Gly Asp Leu Ala His Glu Phe Tyr  
50 55 60

Glu Glu Thr Ile Val Thr Lys Asn Gly Gln Lys Arg Ala Lys Leu Arg  
65 70 75 80

Arg Val His Lys Asn Leu Ile Pro Gln Gly Ile Val Lys Leu Asp His  
85 90 95

Pro Arg Ile His Val Asp Phe Pro Val Ile Leu Tyr Glu Val  
100 105 110

源自Fus1蛋白质序列的潜在治疗性肽

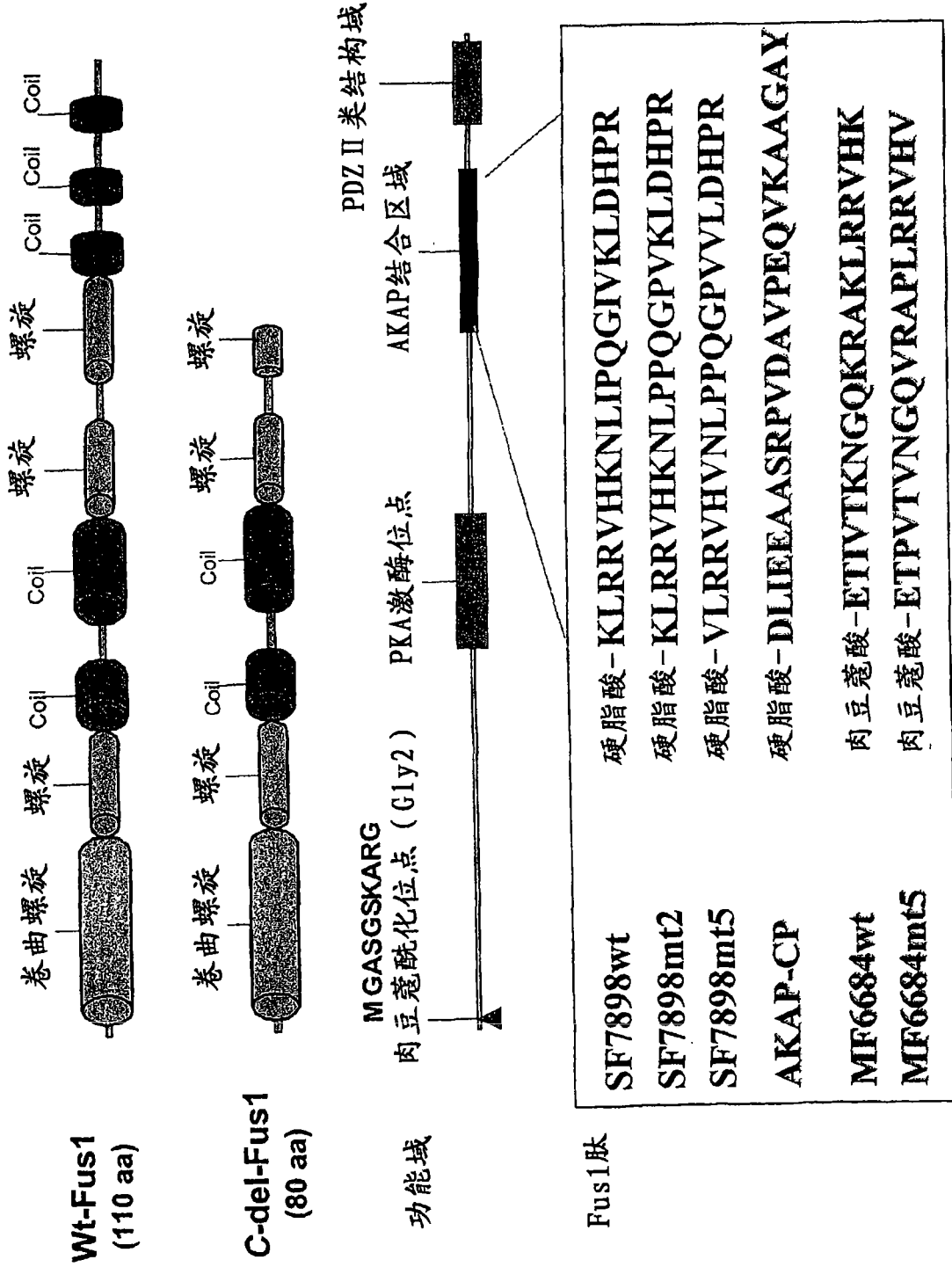
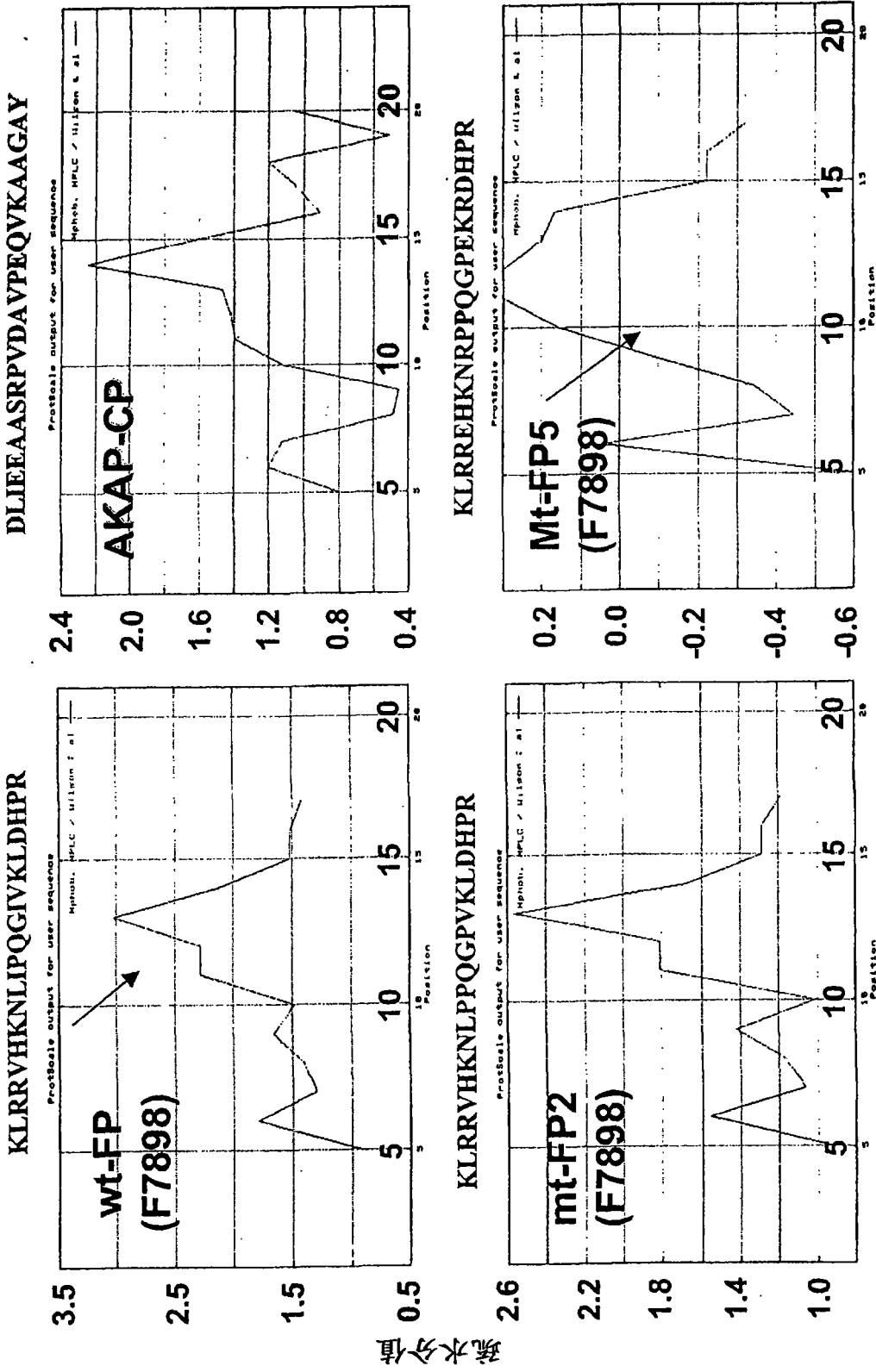


图1

通过Wilson, Honegger, Stotzel, Hughes模型,  
源自HPLC肽保留时间的疏水常数

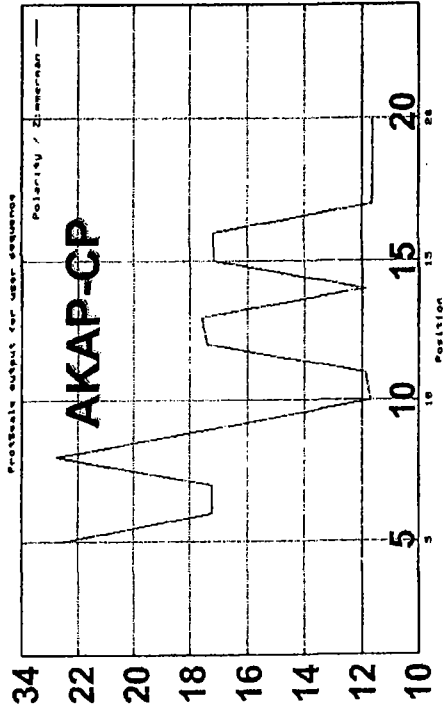


氨基酸残基位置

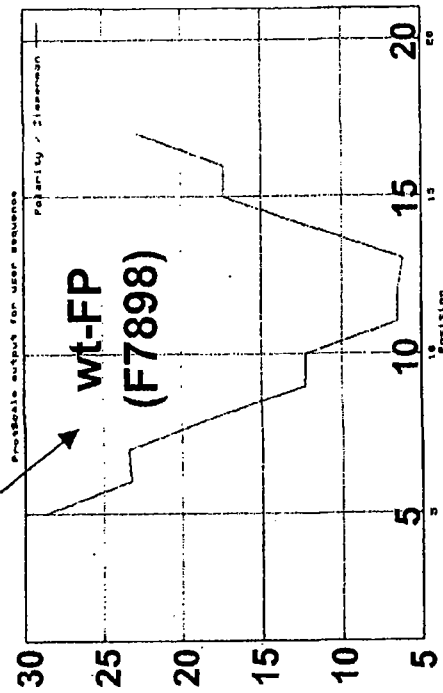
图2

通过Zimmerman J.M., Eliezer N., Simha R模型  
预测wt-FUS1和mt-FUS1肽的极性

**DLIEEAASRPVDAVPEQVKAAGAY**

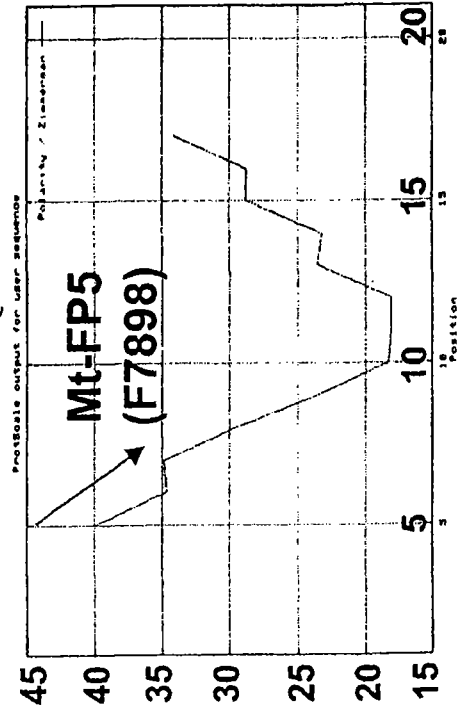


**KLRRVHKNLIPQGIKLDHPR**

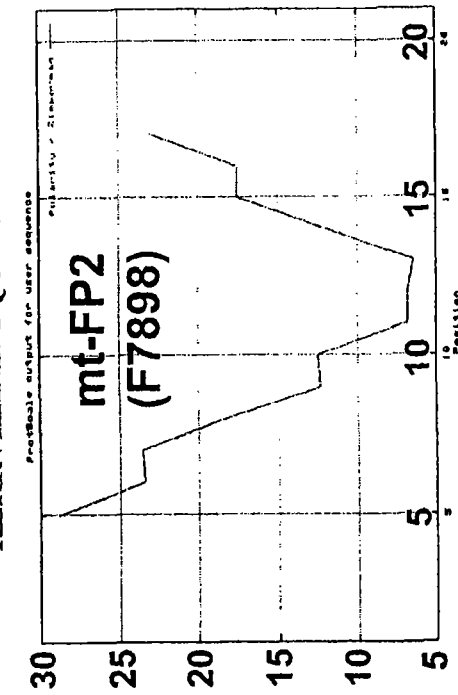


极性分值

**KLRREHKNRPPQGPKEKRDHPR**



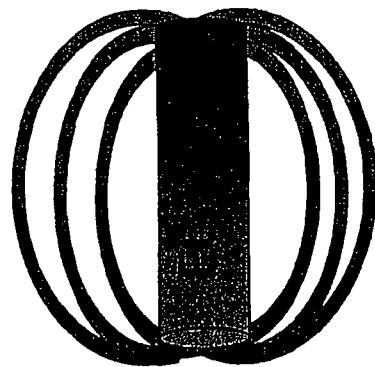
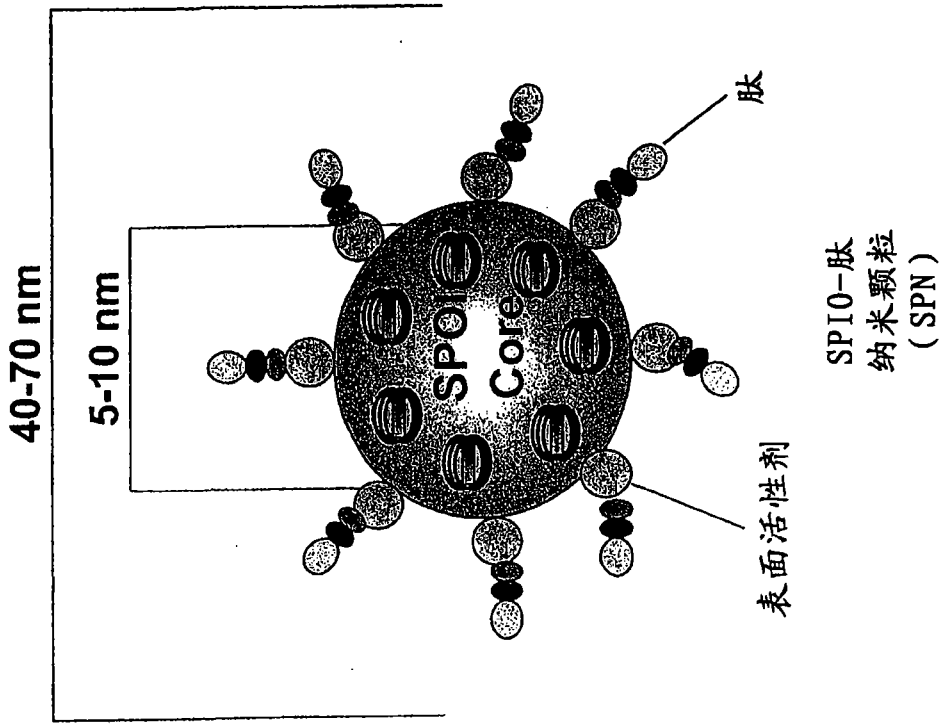
**KLRRVHKNLPPQGPVKLDHPR**



氨基酸残基位置

图3

SPIO-肽纳米颗粒 (SPN) 的示意图



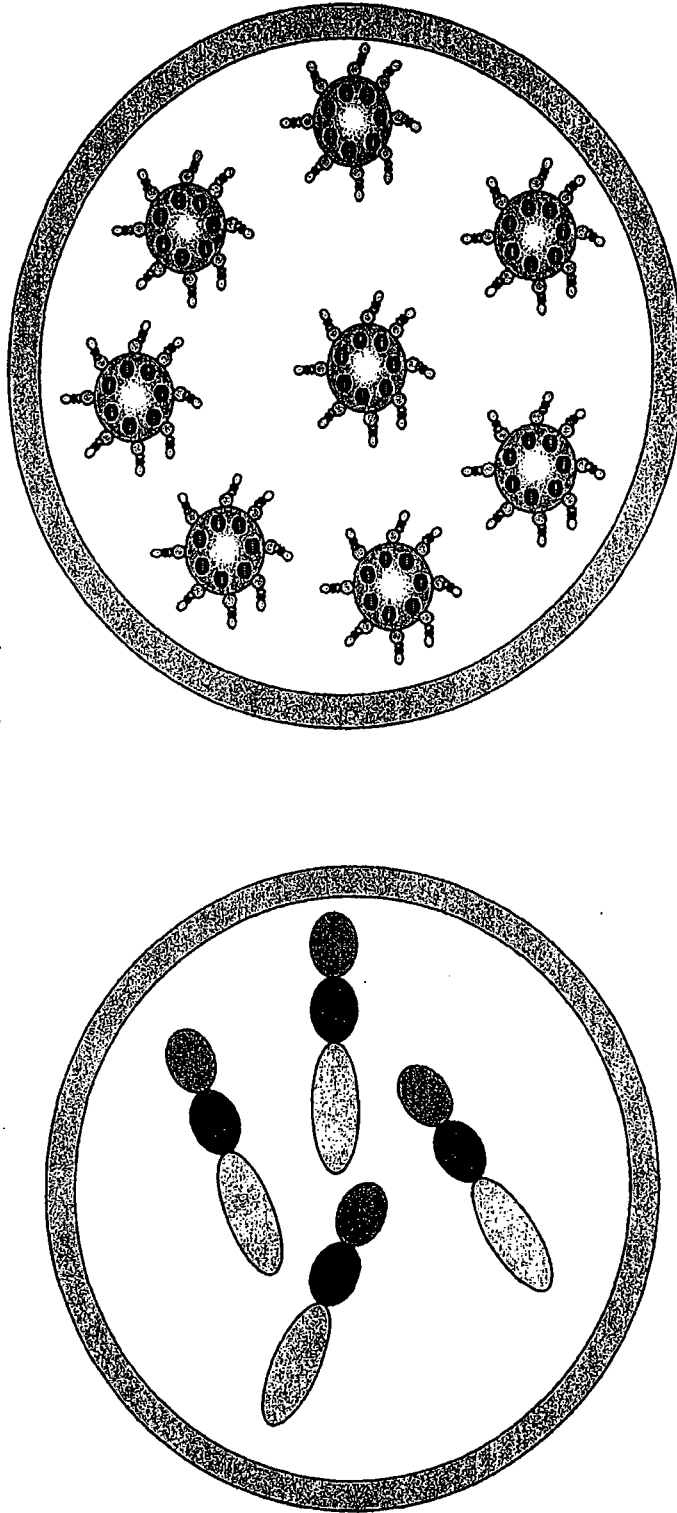
SPIO  
(超顺磁性氧化铁)



治疗肽

图 4

通过全身施用于抗癌治疗和用于体内MR成像的DOTAP:  
胆固醇包封的治疗肽纳米颗粒 (DC-PN) 和SPI0-肽纳米  
颗粒 (DC-SPN) 的结构



DC-PN

DC-SPN

图5

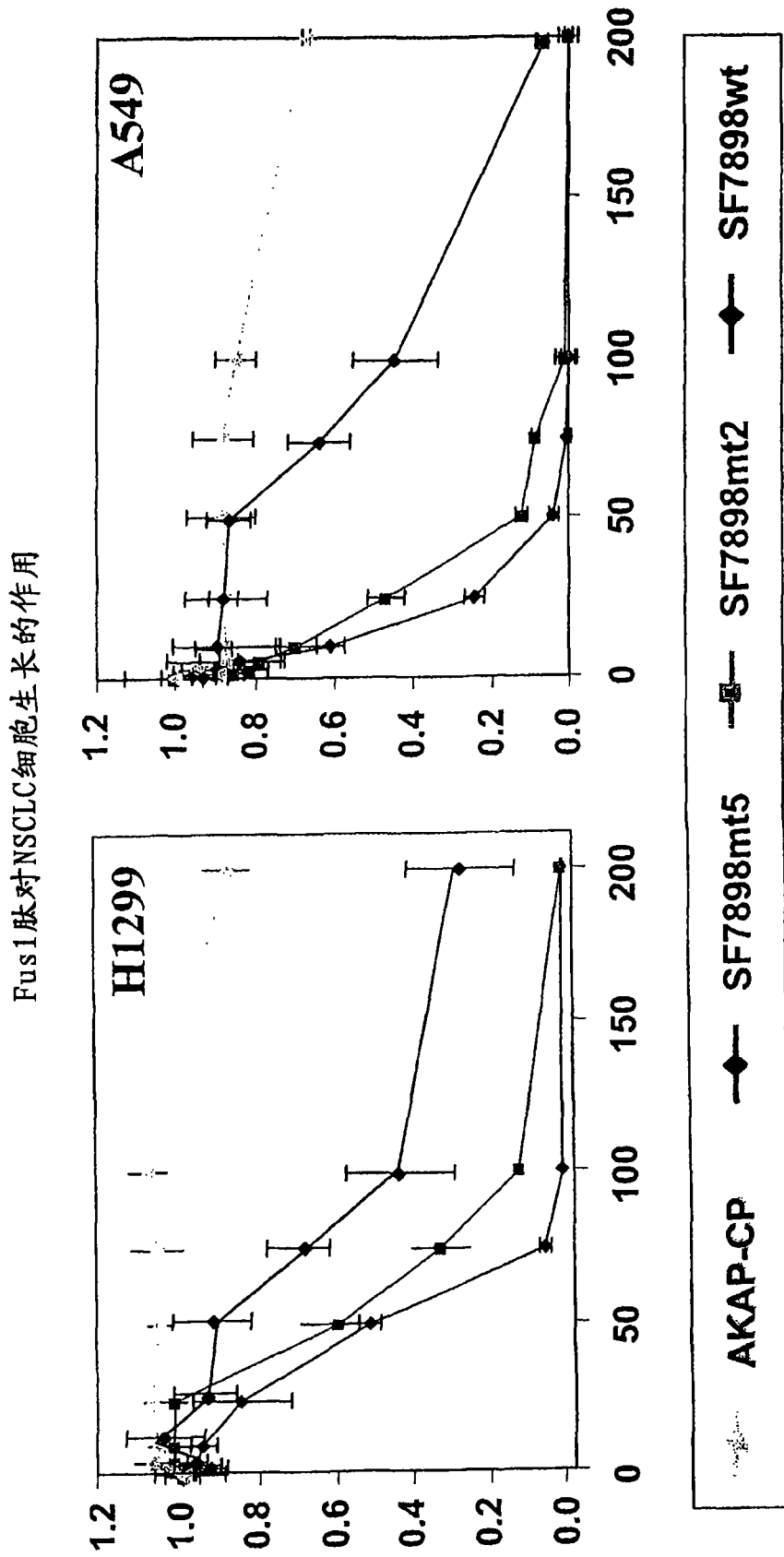


图6



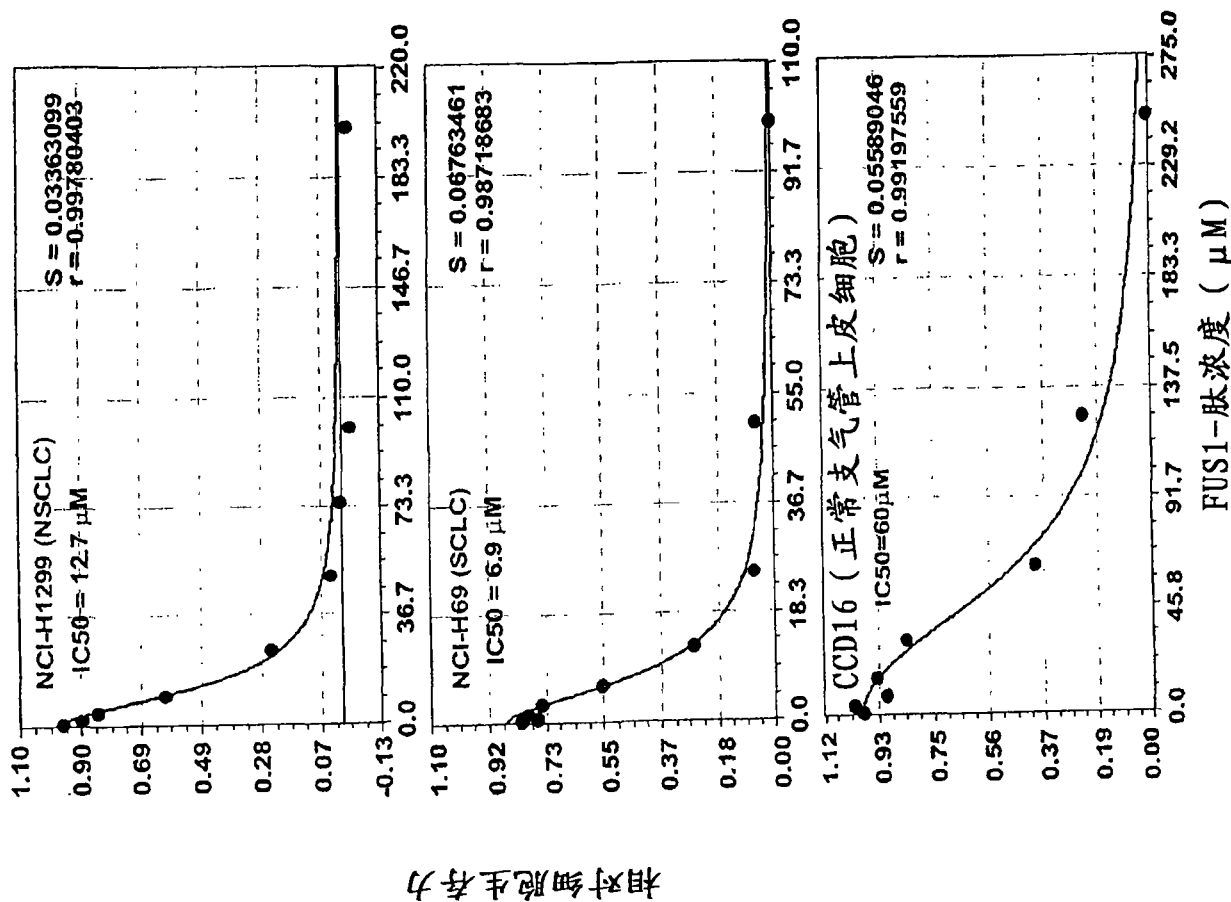


图7

硬脂酸-wt-FP在NSCLC  
和正常支气管上皮  
CCD16细胞中的IC50值

Fus1肽 (FP) 对SCLC H128和H146细胞的  
细胞生长和细胞凋亡的影响 (48小时)

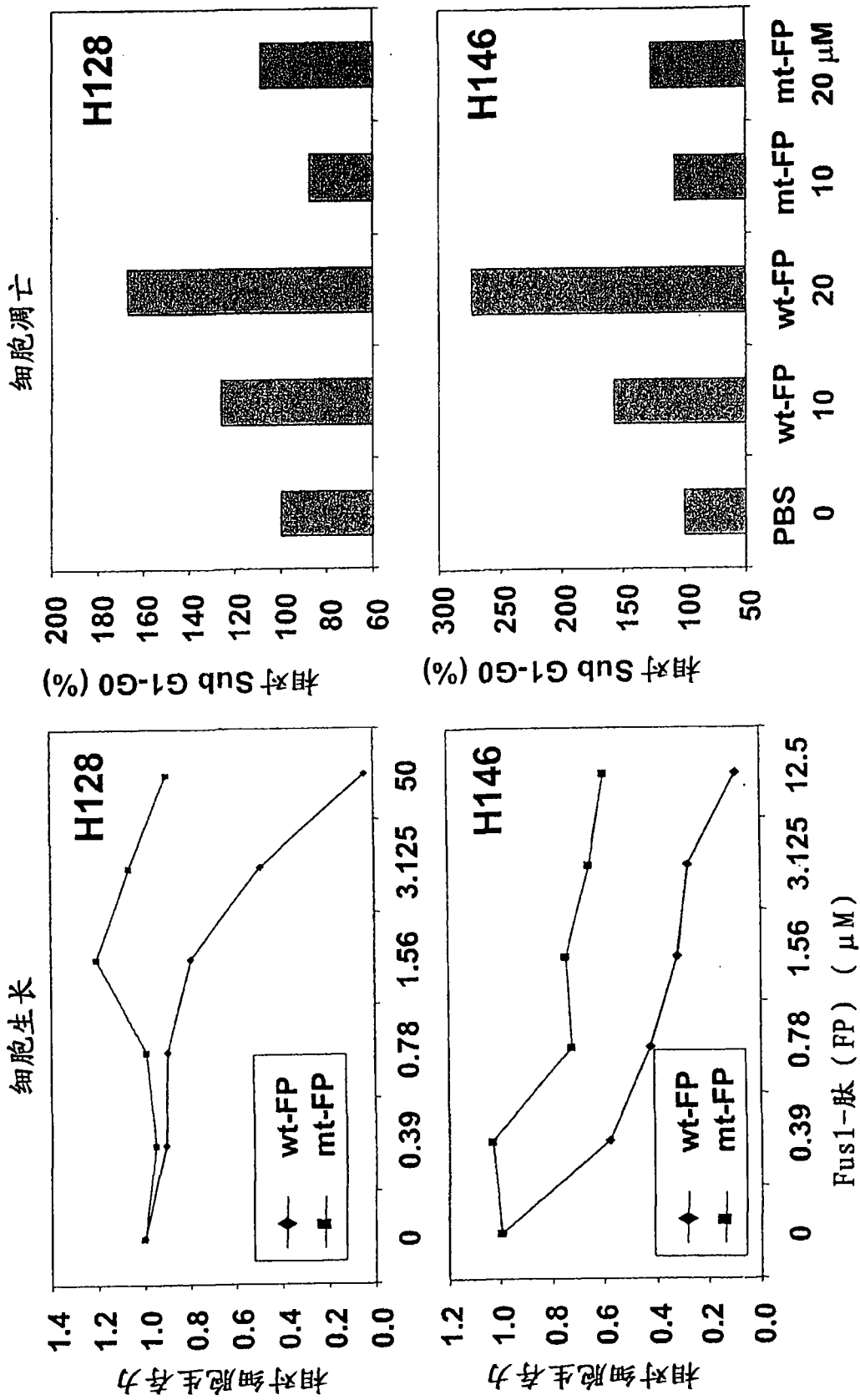
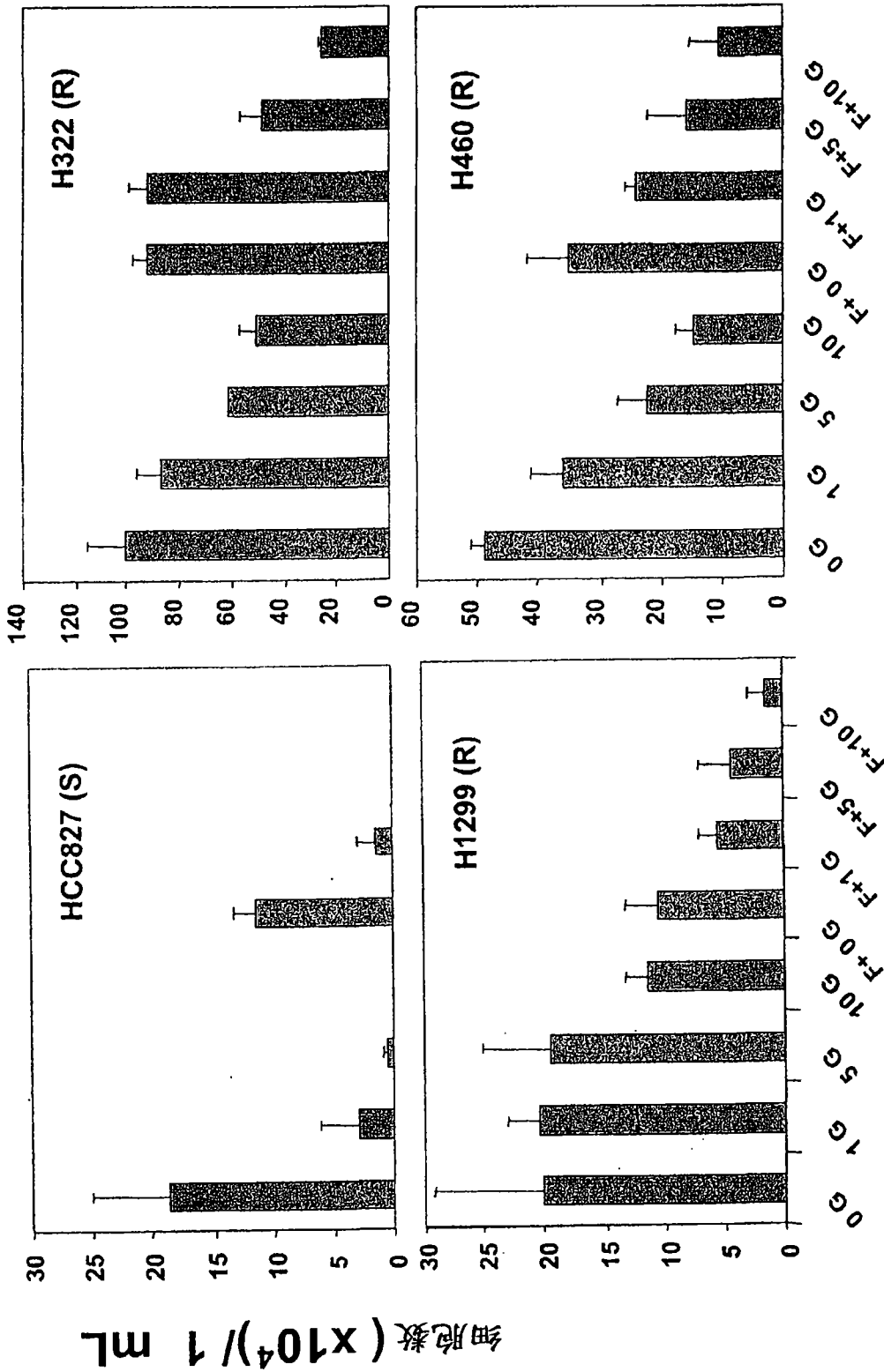


图8

FUS1肽与吉非替尼的联合处理在吉非替尼-敏感 (S) 和抗性 (R) 的NSCLC细胞中的作用



处理 [G=吉非替尼, μM; F=FUS1肽10 μM]

图9

Wt-FUS1和FUS1-肽对SCLC H69-S (Gleevec敏感的) 和H69-R (Gleevec抗性的) 细胞的生长的影响

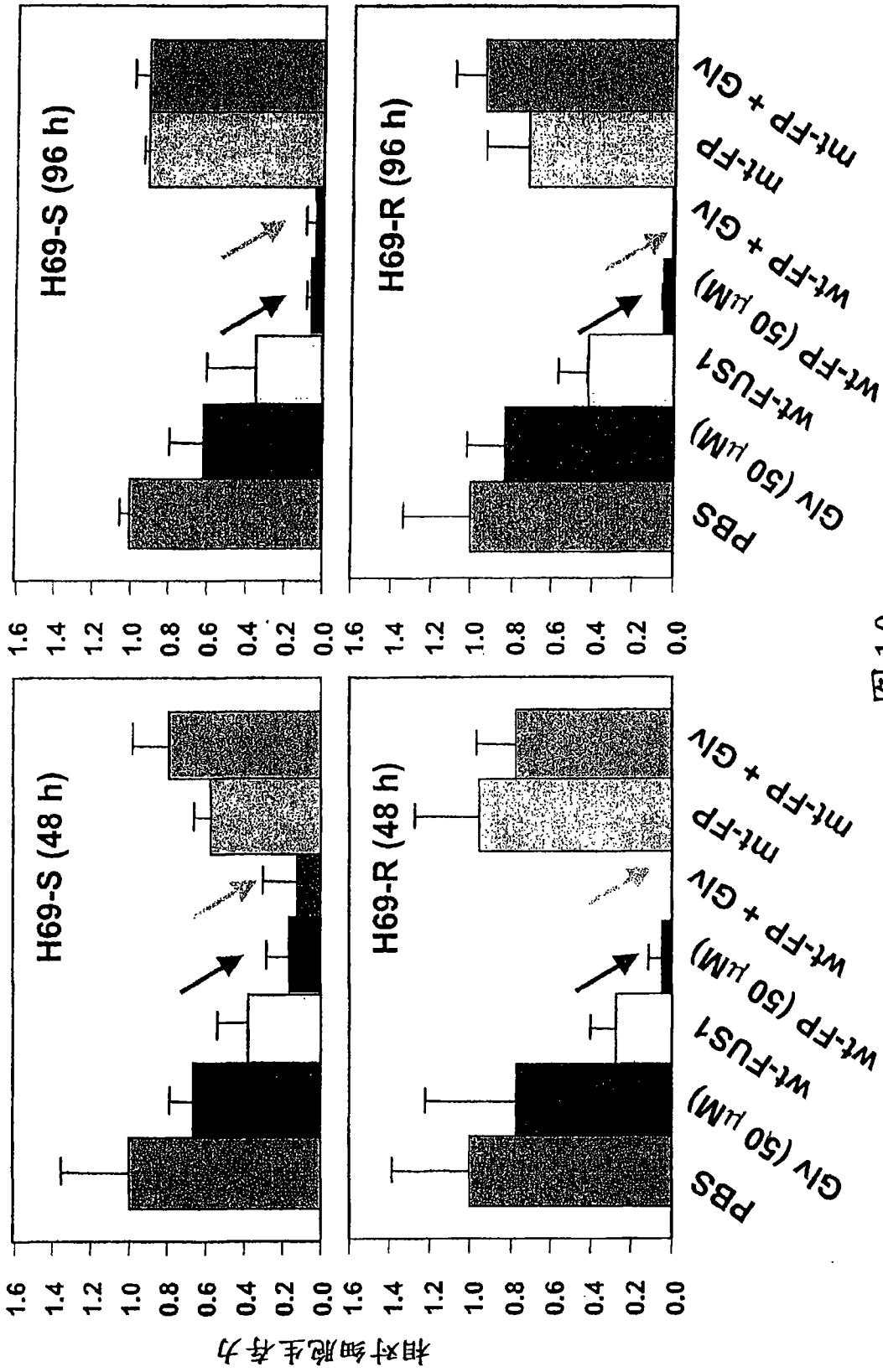
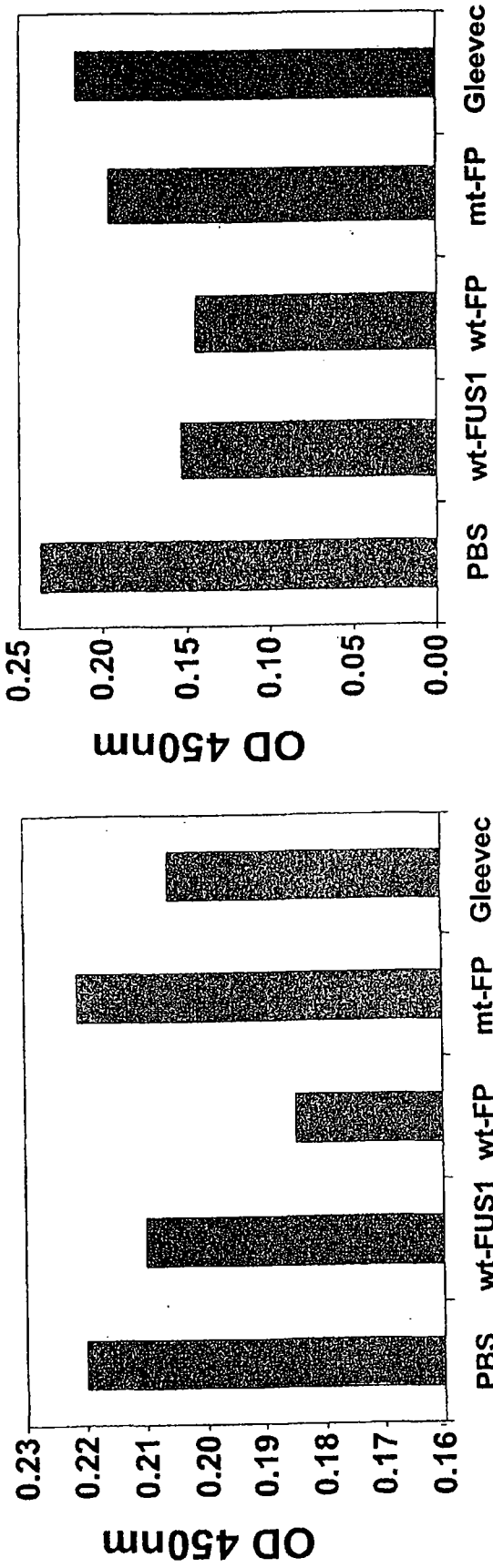


图10

wt-FUS1和FUS1-衍生的肽对NSCLC细胞中的c-Ab1活性的影响  
(通过ELISA测定)

A549 H1299



Wt-FUS1: 质粒 (10 µg)  
 Mt-FP: 突变型FUS1肽 (5 µM)  
 Wt-FP: FUS1肽 (5 µM)  
 Gleevec: 500nM

图 11

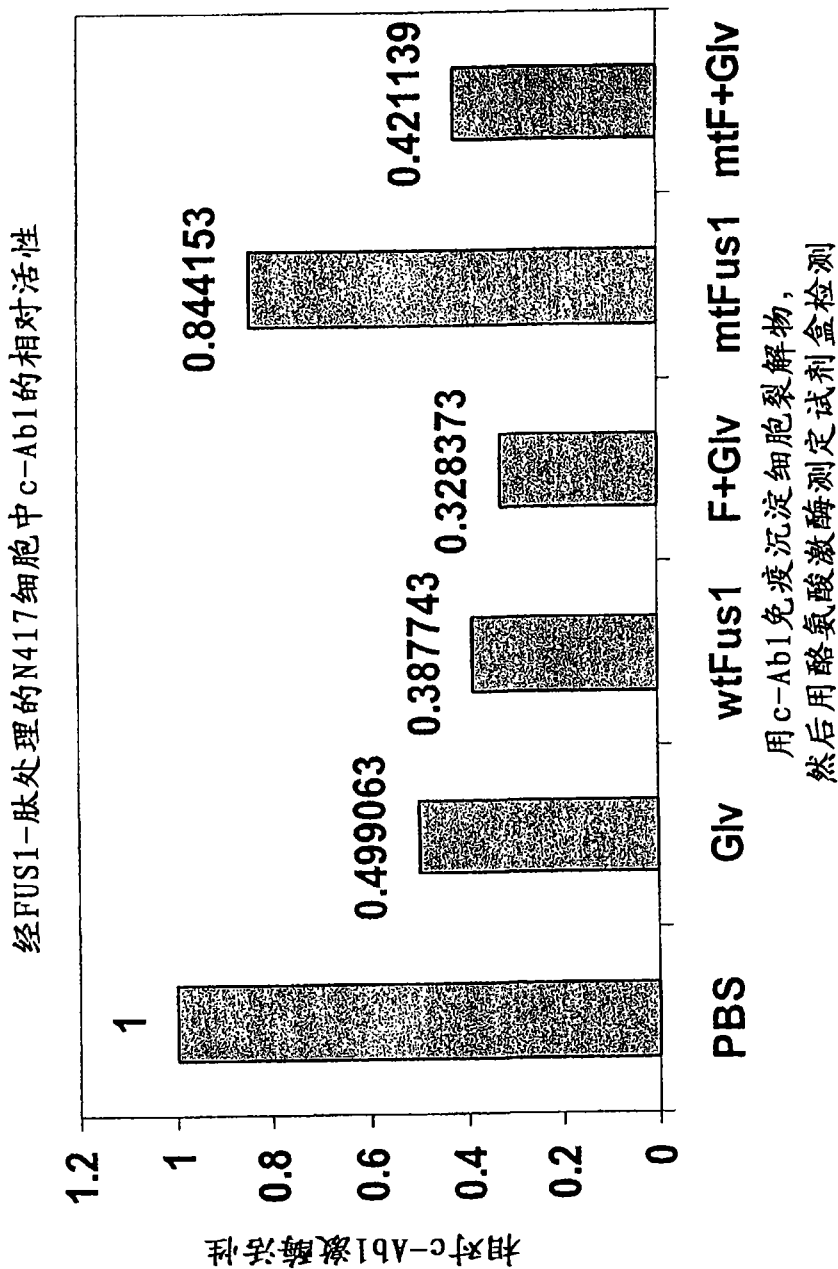


图12

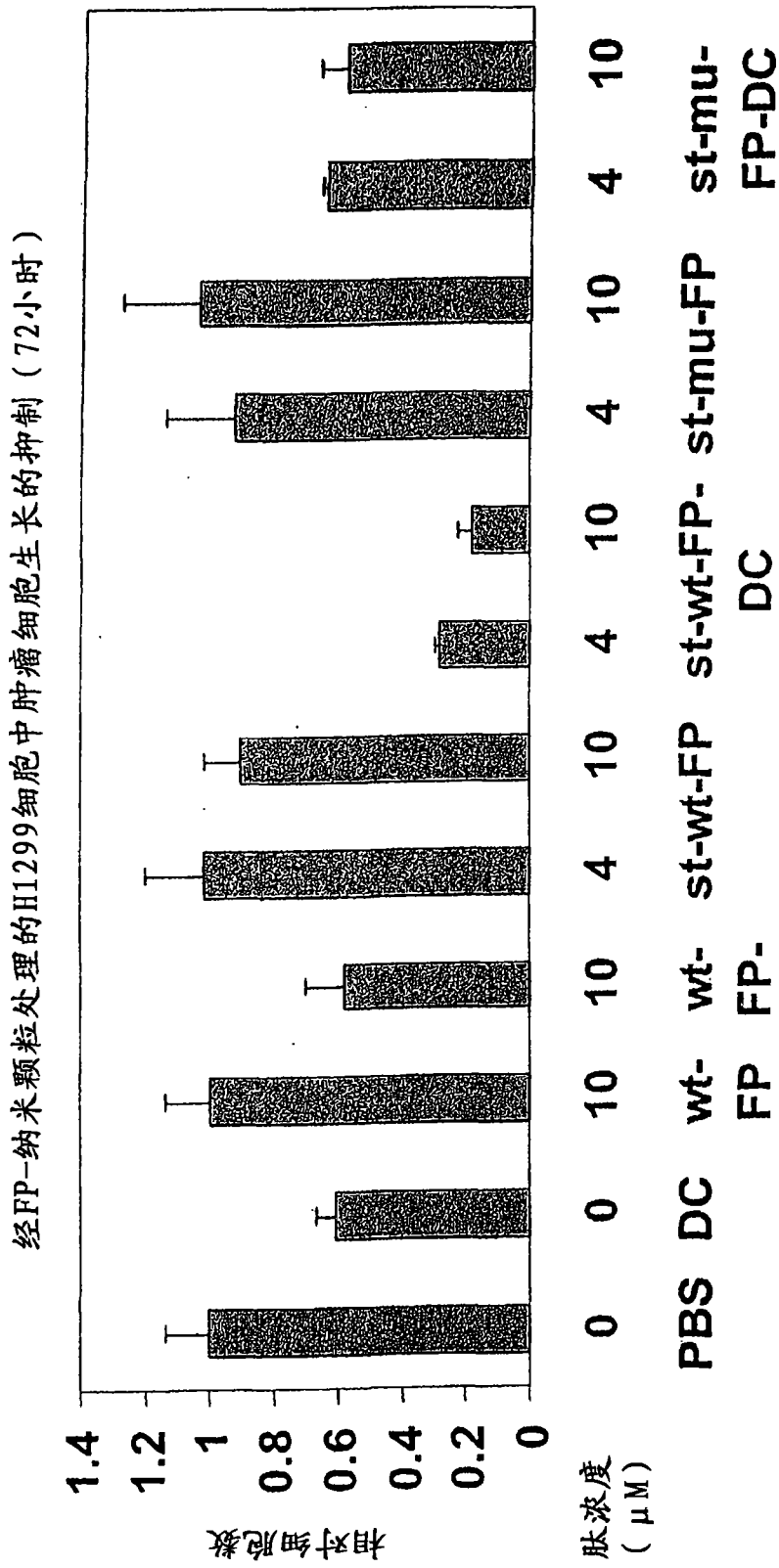


图13

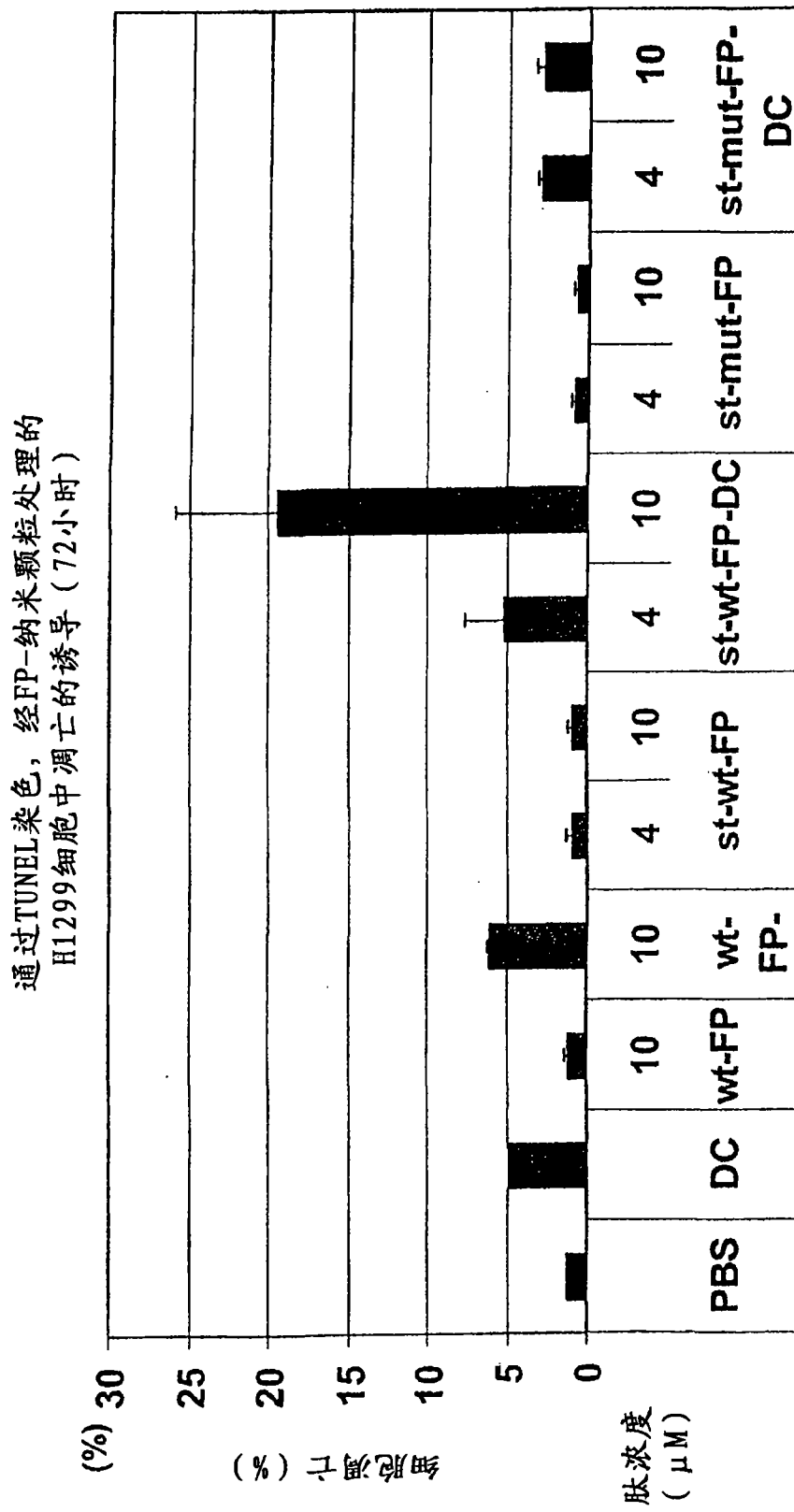
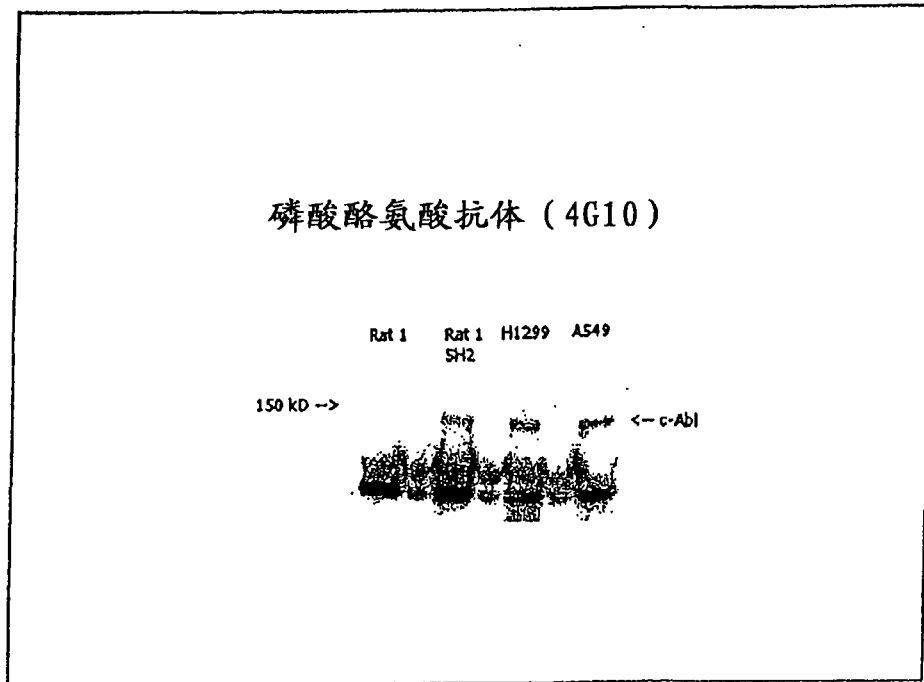


图14

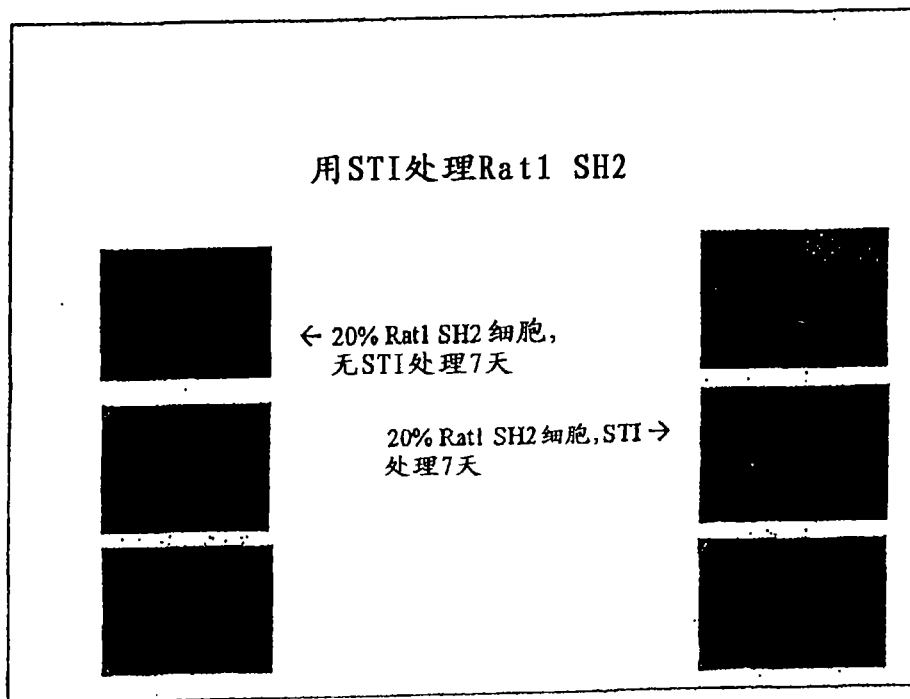




使用P6D的IP Western  
用4G10探测  
H1299和A549细胞中的活性c-Abl

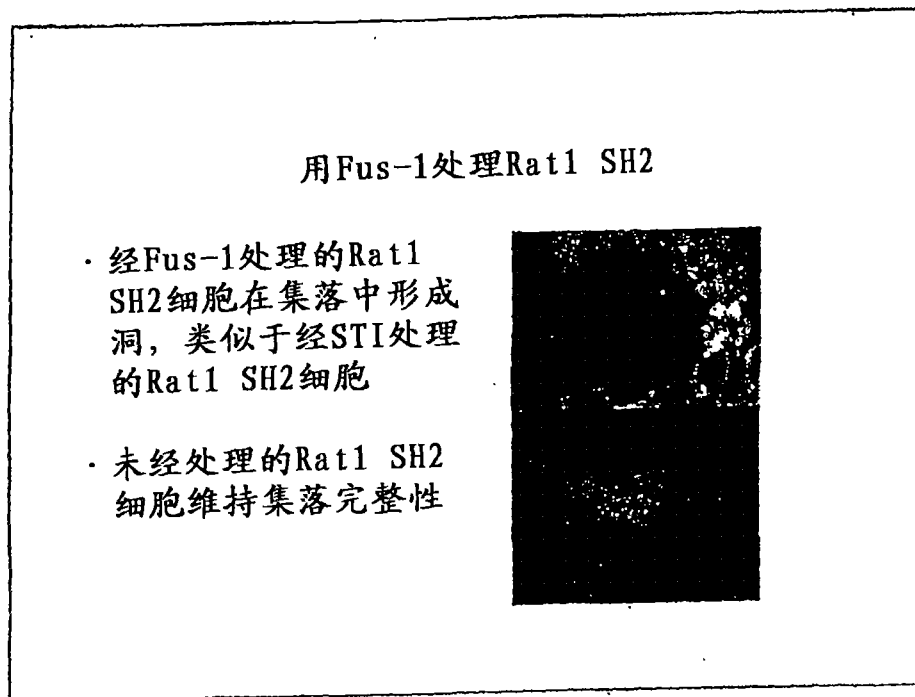
Rat1阴性对照  
Rat1 SH2阳性对照

图15



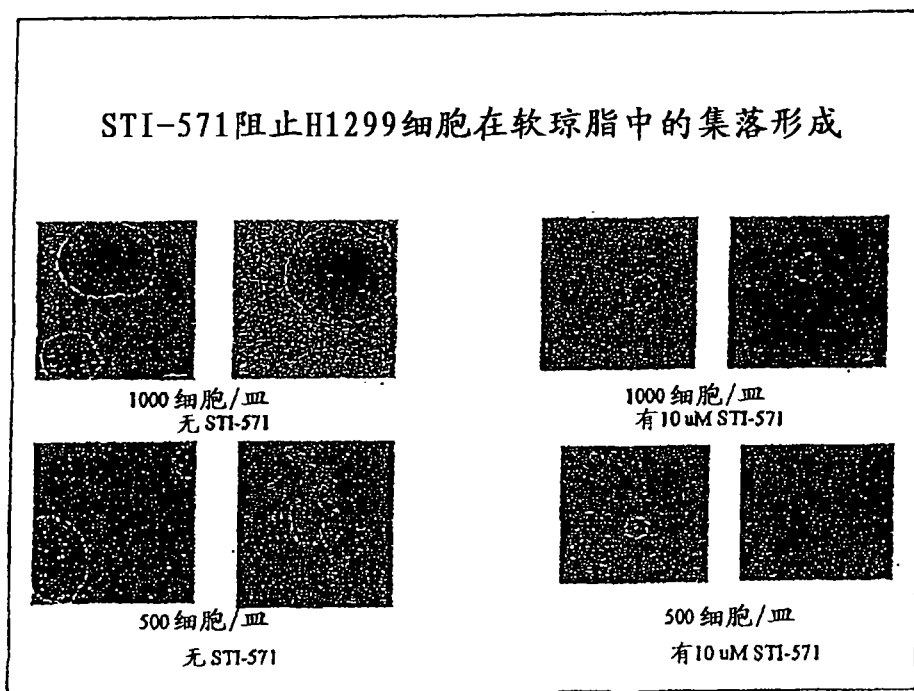
20% (20, 000) Rat1 SH2细胞(GFP阳性)与80% (80, 000) Rat1细胞(GFP阴性)平板接种  
平板接种后那天开始STI处理, 持续7天  
细胞生长至汇合后拍照  
用10 μM STI处理7天的Rat1 SH2具有出现在集落中间的孔洞

图16



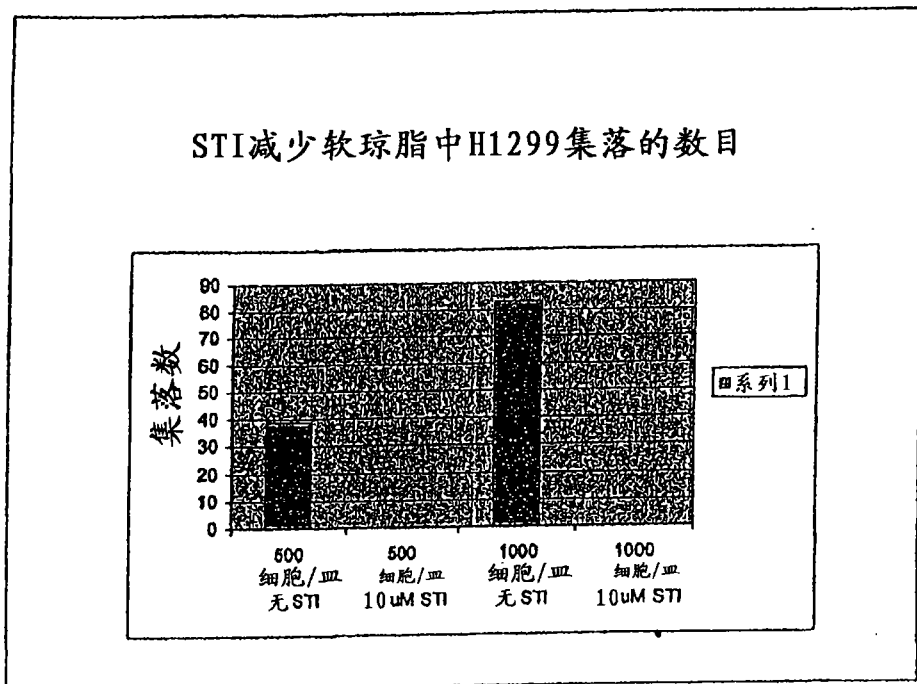
用50  $\mu$ M FUS1肽处理的Rat1 SH2细胞vs. 未经处理的Rat1 SH2细胞与STI类似的对Rat1 SH2的作用

图17



在软琼脂中接种500或1000个H1299细胞  
一组用10  $\mu$ M STI处理  
经STI-571处理的皿在染色后无可见集落  
相比之下，未经处理的皿分别有83（1000个细胞）  
和39（500个细胞）个集落

图18



经STI-571处理的皿在染色后无可见集落  
相比之下，未经处理的皿分别有83（1000个细胞）  
和39（500个细胞）个集落

图19

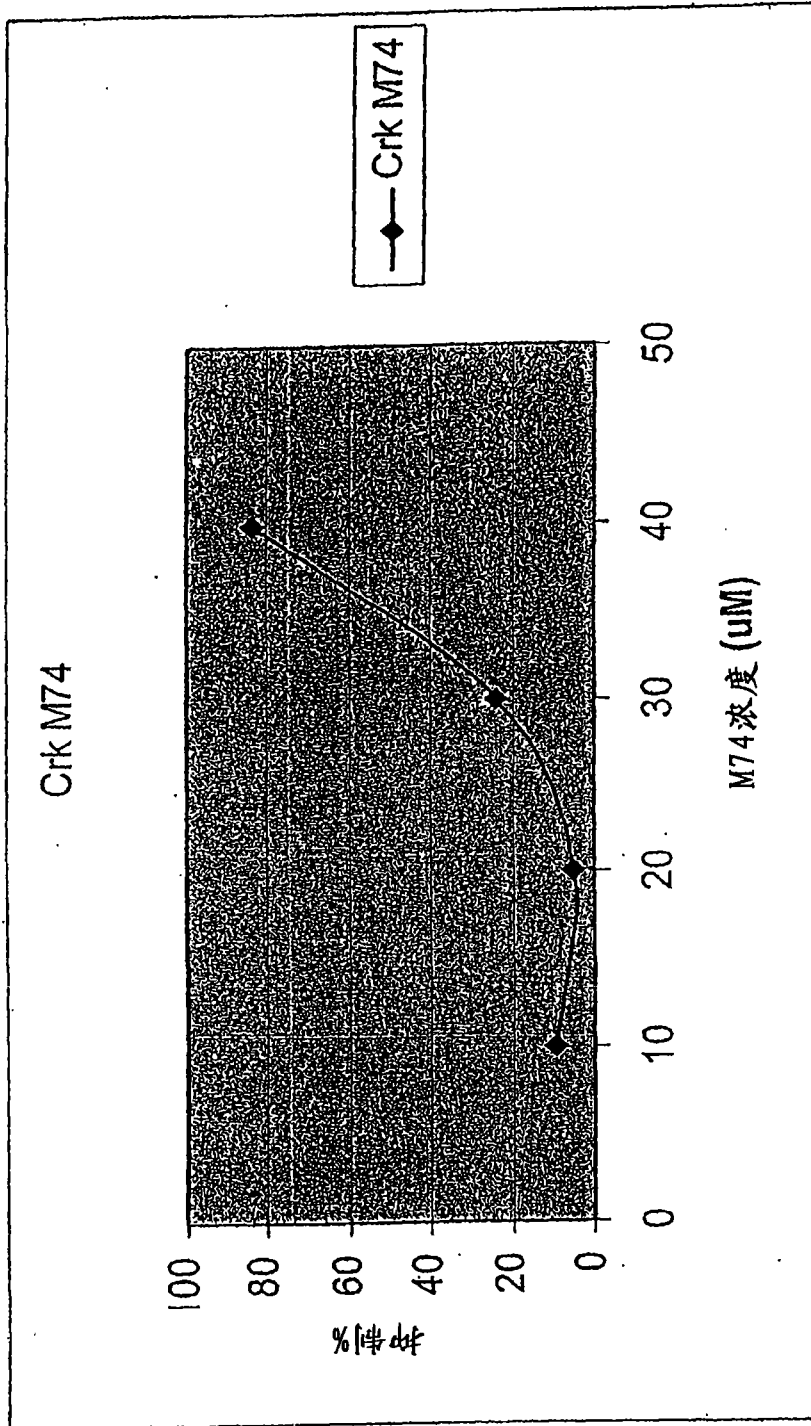


图20

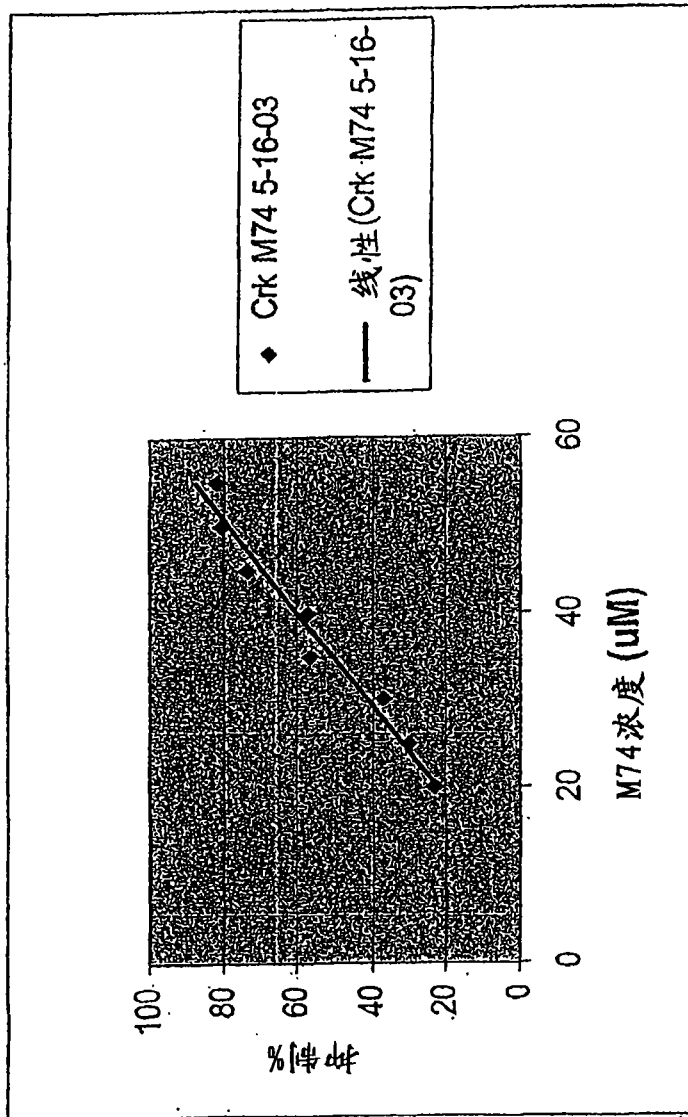


图21

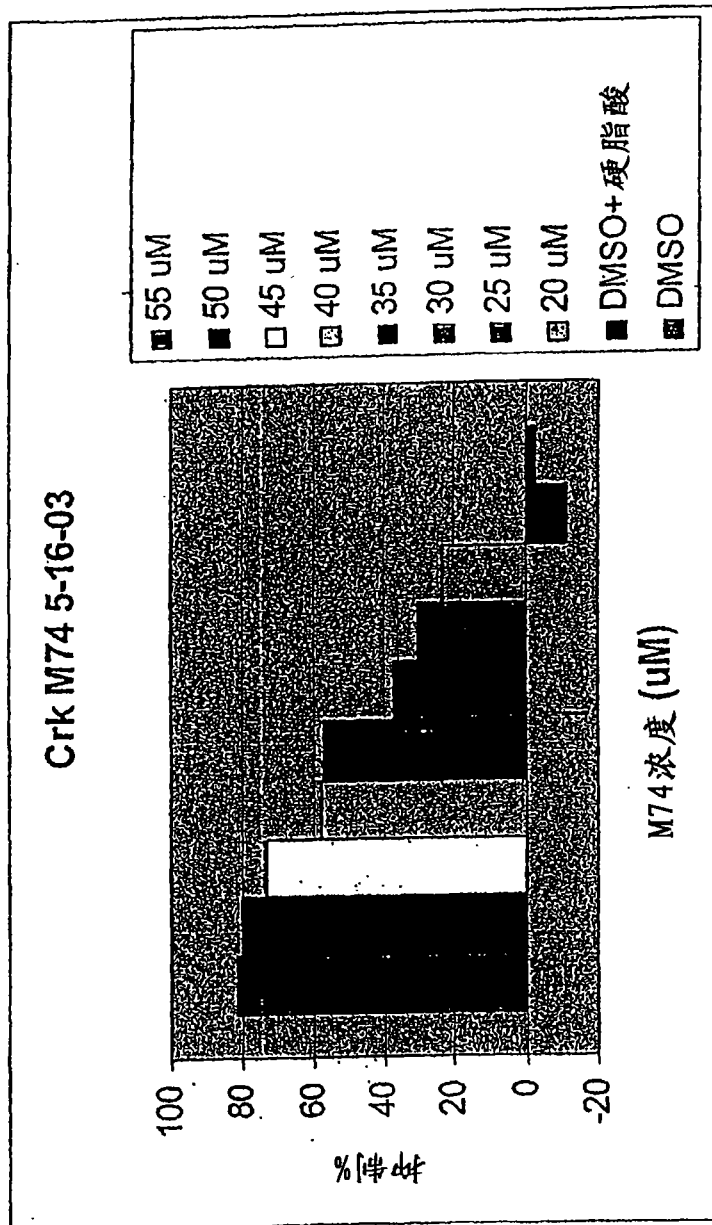


图 22



含有Fus1肽的基于DOPC和DOTAP的脂质体在48小时  
对非小细胞肺癌细胞（H1299细胞）的生长的影响

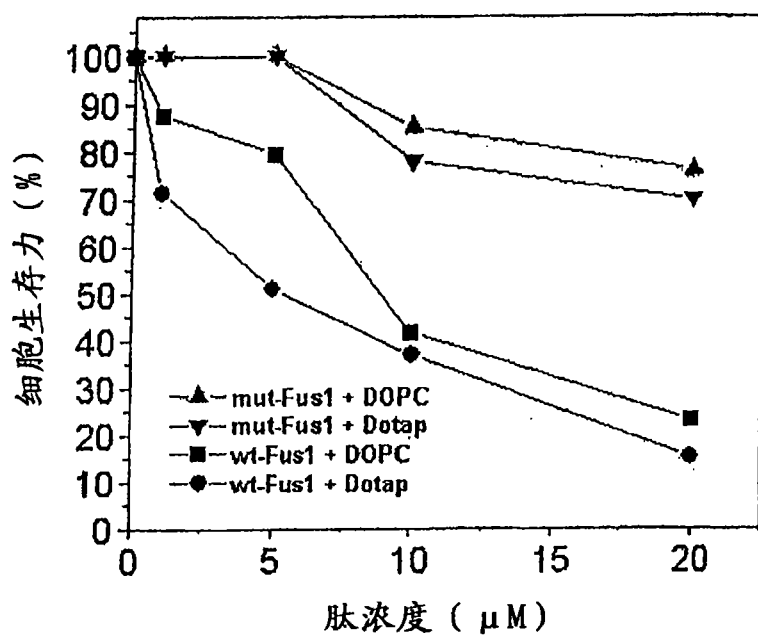


图 23

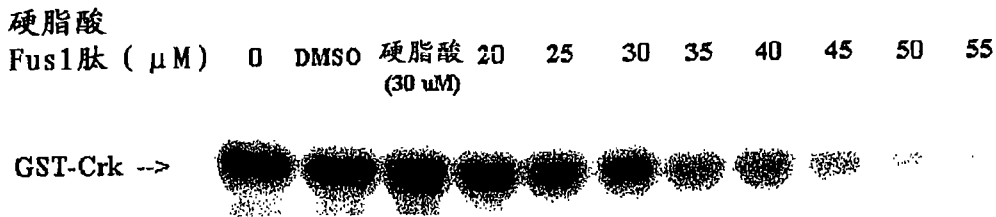


图 24A

硬脂酸Fus1肽对Crk磷酸化的抑制 (IC50 35 μM)

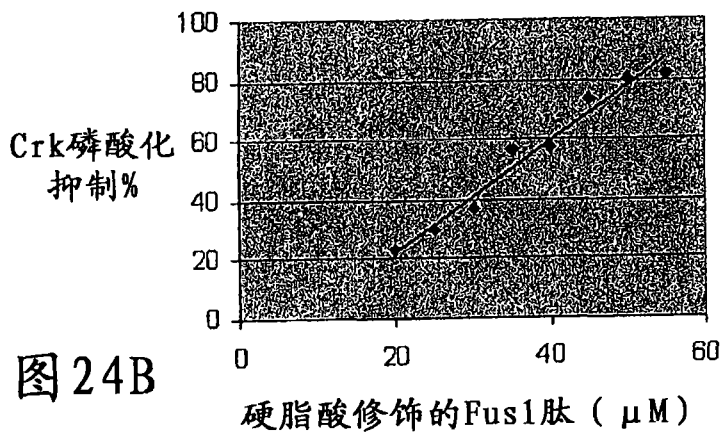


图 24B

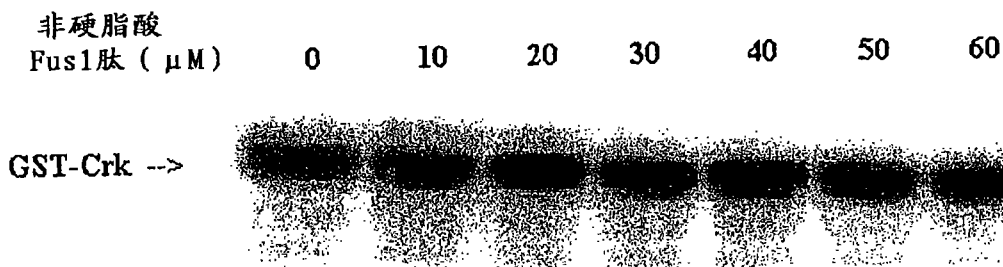


图 24C

图 24A-C

### 野生型FUS1和c-Abl的共表达导致c-Abl中酪氨酸412磷酸化的减少

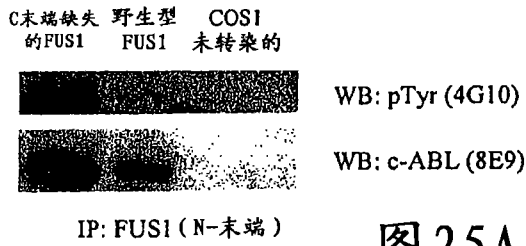


图 25A

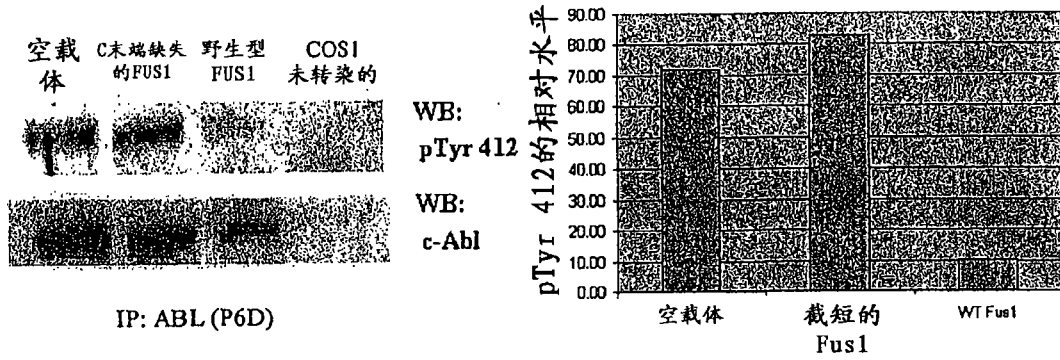


图 25B

### FUS1的肉豆蔻酰化缺陷型突变体不抑制c-Abl的酪氨酸磷酸化

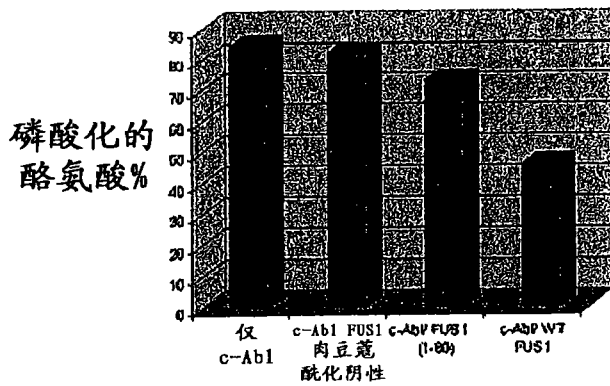


图 25C

图 25A-C

伊马替尼阻止软琼脂中H1299细胞的集落形成

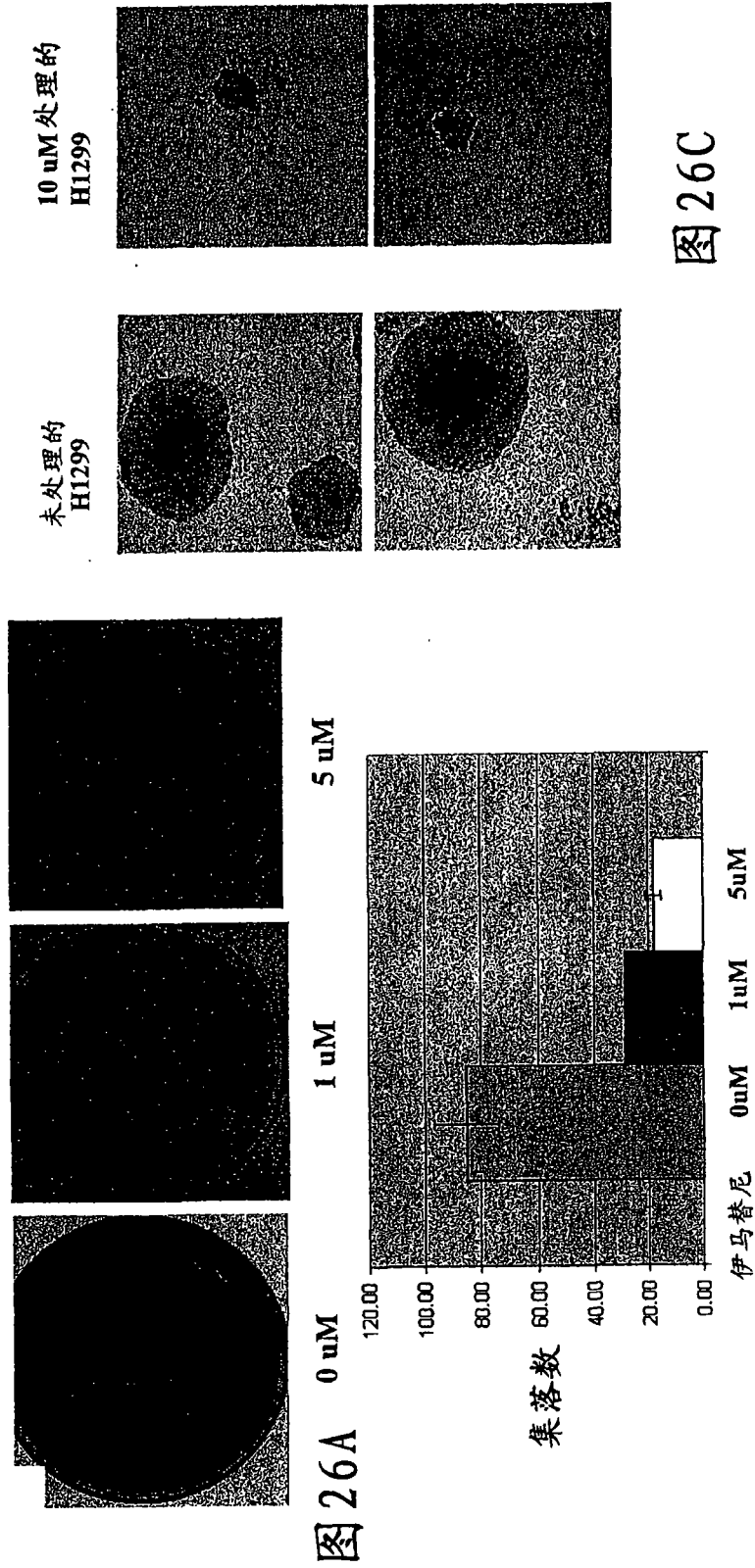


图 26A

图 26B

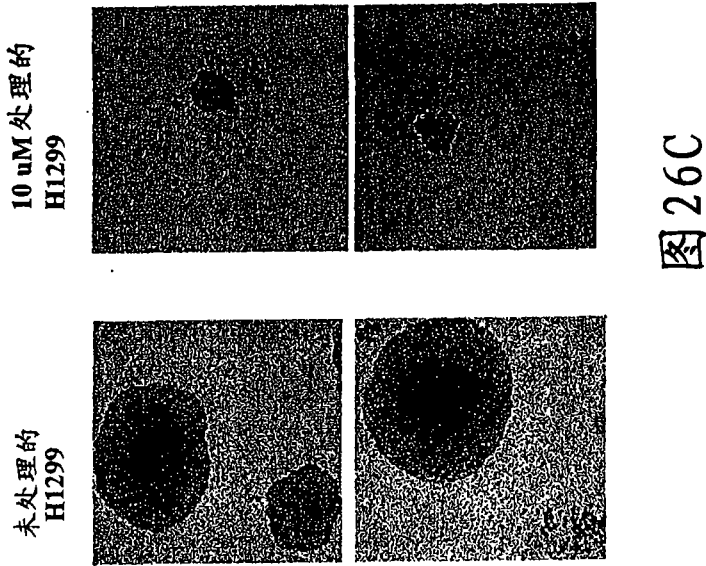


图 26C

图 26A-C