



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118556068 A

(43) 申请公布日 2024.08.27

(21) 申请号 202280088774.7

(22) 申请日 2022.11.11

(30) 优先权数据

63/278880 2021.11.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/079754 2022.11.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/086964 EN 2023.05.19

(71) 申请人 密歇根大学董事会

地址 美国密歇根州

(72) 发明人 T·D·王 X·梦

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 罗文锋 彭昶

(51) Int.Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

权利要求书2页 说明书22页
序列表(电子公布) 附图20页

(54) 发明名称

CD44结合肽试剂和方法

(57) 摘要

本公开涉及CD44结合肽试剂、用于使用所述肽试剂检测细胞,如肝细胞癌细胞的方法以及用于使用所述肽试剂靶向此类细胞的方法。

1. 一种试剂,其包括肽WKGWSYLWTQQA (SEQ ID NO:1) 或所述肽的多聚体形式,其中所述肽与CD44结合,并且其中至少一个可检测标记、至少一个治疗部分或两者附接到所述肽或所述肽的多聚体形式。
2. 根据权利要求1所述的试剂,其包括至少一个可检测标记,所述至少一个可检测标记附接到所述肽。
3. 根据权利要求2所述的试剂,其中所述可检测标记能通过光学、光声学、超声、正电子发射断层扫描或磁共振成像检测到。
4. 根据权利要求3所述的试剂,其中所述能通过光学成像检测到的标记是异硫氰酸荧光素 (FITC)。
5. 根据权利要求3所述的试剂,其中所述能通过光学成像检测到的标记是Cy5。
6. 根据权利要求3所述的试剂,其中所述能通过光学成像检测到的标记是Cy5.5。
7. 根据权利要求3所述的试剂,其中所述能通过光学成像检测到的标记是IRdye800。
8. 根据权利要求3所述的试剂,其中所述能通过磁共振成像检测到的标记是Gd或Gd-DOTA。
9. 根据权利要求1所述的试剂,其中所述肽的所述多聚体形式是用氨基己酸接头形成的二聚体。
10. 根据权利要求2所述的试剂,其中所述可检测标记通过肽接头附接到所述肽。
11. 根据权利要求10所述的试剂,其中所述接头的末端氨基酸是赖氨酸或半胱氨酸。
12. 根据权利要求11所述的试剂,其中所述接头包括SEQ ID NO:2中所示的序列GGGSK或序列GGGSC。
13. 根据1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12所述的试剂,其包括至少一个治疗部分,所述至少一个治疗部分附接到所述肽。
14. 根据权利要求13所述的试剂,其中所述治疗部分是化学治疗剂。
15. 根据权利要求13所述的试剂,其中所述治疗部分是聚合物纳米颗粒或胶束。
16. 根据权利要求14所述的试剂,其中所述胶束是石胆酸十八烷基酯胶束。
17. 根据权利要求16所述的试剂,其中所述纳米颗粒或所述胶束是聚乙二醇化的。
18. 根据权利要求14所述的试剂,其中所述纳米颗粒或所述胶束包封卡铂 (carboplatin)、紫杉醇 (paclitaxel)、顺铂 (cisplatin)、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、奥沙利铂 (oxaliplatin)、卡培他滨 (capecitabine)、伊立替康 (irinotecan)、苯丁酸氮芥 (chlorambucil) 或索拉非尼 (sorafenib)。
19. 一种组合物,其包括根据权利要求1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18所述的试剂以及药学上可接受的赋形剂。
20. 一种用于检测患者的肝细胞癌细胞的方法,所述方法包括向所述患者施用根据权利要求1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12所述的试剂,并检测所述试剂与肝细胞癌细胞的结合的步骤。
21. 一种确定针对患者的肝细胞癌的治疗的有效性的方法,所述方法包括向所述患者施用根据权利要求1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12所述的试剂,使用所述试剂标记的肝细胞癌细胞的第一量可视化,并将所述第一量与用所述试剂标记的细胞的先前可视化的第二

量进行比较的步骤，

其中所标记的所述第一量细胞相对于所标记的细胞的所述先前可视化的第二量的减少指示有效治疗。

22. 根据权利要求18所述的方法，其进一步包括获得由所述试剂标记的所述细胞的活检。

23. 一种用于将治疗部分递送到患者的肝细胞癌细胞的方法，所述方法包括向所述患者施用根据权利要求13所述的试剂的步骤。

24. 一种试剂盒，其用于将根据权利要求19所述的组合物施用于有需要的患者，所述试剂盒包括根据权利要求19所述的组合物、所述组合物的使用说明书以及用于将所述组合物施用于所述患者的装置。

25. 一种肽，其由氨基酸序列WKGWSYLWTQQA (SEQ ID NO:1) 组成。

CD44结合肽试剂和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求保护于2021年11月12日提交的美国临时专利申请第63/278,880号的优先权,所述美国临时专利申请通过引用整体并入本文。

[0003] 政府支持声明

[0004] 本发明是根据国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的授权号U01CA230669在政府支持下进行的。政府拥有本发明的某些权利。

[0005] 通过引用并入电子提交的材料

[0006] 通过引用以其整体并入了与此同时提交并且标识如下的计算机可读核苷酸/氨基酸序列表:57043A_Seqlisting.XML;大小:4,554字节;创建于:2022年11月8日。

技术领域

[0007] 本公开涉及CD44结合肽试剂、用于使用所述肽试剂检测肝细胞癌细胞的方法以及用于使用所述肽试剂靶向这些细胞的方法。

背景技术

[0008] 肝细胞癌(HCC)导致全球超过840,000例死亡,并迅速成为全球医疗负担的主要促成因素。由于很少患者会在早期被诊断出,因此5年存活率<7%,并且中值生存长度为<1年[Asrani等人,世界肝病负担(Burden of liver diseases in the world),70(1)(2019)151-171]。在美国,HCC的发病率稳步上升,并且目前比任何其它癌症都生长地更快[Ozakyol,肝细胞癌全球流行病学(HCC流行病学)(Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma(HCC Epidemiology)).《胃肠癌症杂志(J Gastrointest Cancer)》2017;48:238-2407]。常规用于肝成像方法在提供肿块的解剖特征方面表现出色。对患有肝硬化的患者建议进行超声,但超声不能区分恶性病变与良性病变。造影增强的CT和MRI基于增加的血管检测到HCC,但不能阐明<1-2cm的肝结节的病理学。恶性肝细胞独特地过表达可以被开发用于改进HCC诊断和疗法的靶标。因此,HCC的早期检测在全球仍然是一项重大的医疗挑战,并且迫切需要新的诊断选项。

[0009] 分化簇44(CD44)是一种多结构且多功能的细胞表面分子,其参与细胞增殖、分化、迁移和血管生成以及细胞因子、趋化因子和生长因子的呈递以及细胞信号传导。对CD44表达与癌症之间的联系的认识可以追溯到二十多年前。然而,CD44最近被证明是癌症干细胞/肿瘤起始细胞(CSC/TIC)上的通用标志物[Naor等人,《临床实验室科学批判性评论(Clinical Laboratory Sciences)》,39(6)(2002)527-579;Ghosh等人,《治疗靶标的专家意见(Expert Opinion on Therapeutic Targets)》16(7)(2012)635-650;Bose等人,《干细胞研究和疗法(J Stem Cell Res Ther)》,4(173)(2014)2;Ponta等人,《儿科病理学和分子医学(Pediatric Pathology&Molecular Medicine)》,18(4-5)(1998)381-393]。最近的研究揭示了,HCC中的CD44表达的增加与转移、复发、对化学疗法或放射疗法的抗性的增加以及存活率的降低相关[Mima等人,《癌症研究(Cancer Research)》,72(13)(2012)3414-

3423;Okabe等人,《英国癌症杂志(British Journal of Cancer)》,110(4)(2014)958-966; Ji等人,肝细胞癌中的癌症干细胞生物学的临床意义(Clinical implications of cancer stem cell biology in hepatocellular carcinoma),《肿瘤学研讨会(Seminars in Oncology)》,爱思唯尔出版社(Elsevier),2012,第461-472页]。

[0010] 本领域需要用于检测和治疗肝细胞癌的新产品和方法。

发明内容

[0011] 在一个方面中,本公开提供了一种试剂,其包括肽WKGWSYLWTQQA(SEQ ID NO:1)或所述肽的多聚体形式,其中所述试剂与CD44结合。所述多聚体形式可以是二聚体。所述肽试剂可以基本上由所述肽或所述肽的所述多聚体形式组成。

[0012] 所述试剂包括至少一个可检测标记、至少一个治疗部分或两者,所述至少一个可检测标记、所述至少一个治疗部分或两者附接到所述肽或所述肽的所述多聚体形式。

[0013] 所述可检测标记可以通过光学、光声学、超声、正电子发射断层扫描(PET)或磁共振成像检测到。所述可通过光学成像检测到的标记可以是异硫氰酸荧光素(FITC)、Cy5、Cy5.5或IRdye800。所述可通过磁共振成像检测到的标记可以是钆(Gd)或Gd-DOTA。所述可检测标记可以通过肽接头附接到所述肽。所述接头的末端氨基酸可以是赖氨酸。所述接头可以包括序列GGGSC。所述接头可以包括SEQ ID NO:2中所示的序列GGGSK。

[0014] 所述治疗部分可以是化学预防剂或化学治疗剂,如塞来昔布(celecoxib)、卡铂(carboplatin)、紫杉醇(paclitaxel)、顺铂(cisplatin)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、奥沙利铂(oxaliplatin)、卡培他滨(capecitabine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、索拉非尼(sorafenib)和伊立替康(irinotecan)。所述治疗部分可以是纳米颗粒或胶束,如聚合物纳米颗粒或聚合物胶束,所述纳米颗粒或所述胶束封装化学预防剂或化学治疗剂(包括但不限于塞来昔布、卡铂、紫杉醇、顺铂、5-氟尿嘧啶(5-FU)、奥沙利铂、卡培他滨、苯丁酸氮芥、索拉非尼和伊立替康)。

[0015] 所述试剂可以包括至少一个可检测标记和至少一个治疗部分,所述至少一个可检测标记附接到所述肽或所述肽的所述多聚体形式,所述至少一个治疗部分附接到所述肽或所述肽的所述多聚体形式。

[0016] 在另一个方面中,本公开提供了一种组合物,其包括本文所提供的试剂以及药学上可接受的赋形剂。

[0017] 在又另一个方面中,本公开提供了用于检测患者的HCC细胞的方法,所述方法包括向所述患者施用本文所提供的试剂并检测所述试剂与癌细胞的结合的步骤。

[0018] 在另一个方面中,本公开提供了一种确定针对患者的HCC和/或HCC转移或HCC复发的治疗的有效性的方法,所述方法包括向所述患者施用本文所提供的试剂,使用所述试剂标记的细胞的第一量可视化,并将所述第一量与用所述试剂标记的细胞的先前可视化的第二量进行比较的步骤,其中所标记的所述第一量细胞相对于所标记的细胞的所述先前可视化的第二量的减少指示有效治疗。所述方法可以进一步包括获得由所述试剂标记的所述细胞的活检。

[0019] 在又另一个方面中,本公开提供了一种用于将治疗部分递送到患者的HCC细胞的方法,所述方法包括向所述患者施用本文所提供的试剂的步骤。

[0020] 在一进一步的方面中,本公开提供了一种试剂盒,其用于将本文所公开的组合物施用于有需要的患者,所述试剂盒包括所述组合物、所述组合物的使用说明书以及用于将所述组合物施用于所述患者的装置。

[0021] 在另一个方面中,本公开提供了一种肽,其由氨基酸序列WKGWSYLWTQQA (SEQ ID NO:1) 组成。

[0022] 以下附图和具体实施方式(包含实例)说明了本文所设想的主题的各个非限制性方面。

附图说明

[0023] 本专利或申请文件含有至少一个彩色附图。在请求并支付必要的费用后,将由美国专利商标局(United States Patent and Trademark Office)提供带有彩色附图的本专利或专利申请出版物的副本。

[0024] 图1示出了初始候选肽序列与其CD44靶标之间的界面的接触图。

[0025] 图2示出了来自表1的许多所比对的肽/受体残基的配对频率。

[0026] 图3A-B示出了CD44的结构模型。使用结构模型(1UUH)评估了WKG*和WYK*与CD44结合的对接能量。A)发现序列WKGWSYLWTQQA以总能量 $E_t = -534$ 与CD44结合。B)此序列被置乱为WYKAQQWWTLGS,以用作对照,并产生 $E_t = -494$ 。

[0027] 图4A-D示出了对CD44具有特异性的经优化的肽。A)肽WKGWSYLWTQQA(蓝色)通过GGGSC接头(黑色)用IRDye800荧光团(红色)标记。B)序列被置乱为WYKAQQWWTLGS,以用作对照。C、D)3D模型示出了生化结构的差异。

[0028] 图5A-B示出了肽的质谱法结果。发现A)WKG*和B)WYK*的实验性质荷比(m/z)为1913.87,这与期望值1913.88一致。

[0029] 图6A-B示出了肽的光谱特性。分别地,发现WKG*-IRDye800和WYK*-IRDye800:A)在 $\lambda_{\text{abs}} = 775\text{nm}$ 处具有吸收峰值,并且B)在 $\lambda_{\text{em}} = 810\text{nm}$ 处具有发射峰值。

[0030] 图7A-F示出了对特异性肽结合的验证。A)WKG*-IRDye800(红色)和抗CD44-AF488(绿色)显示出与用对照siRNA(siCL)转染的人SK-Hep1 HCC细胞的表面强结合(箭头)。在合并的图像上可以看到两种肽的结合的共定位。乱序对照WKG*-IRDye800显示出结合最少。B-D)在CD44使用三种不同的siRNA敲低的情况下,测得的WKG*-IRDye800和抗CD44-AF488的荧光强度大大降低。WYK*-IRDye800显示出与敲低的细胞结合很少。E)荧光强度的定量显示出抗CD44-AF488的强度的显著差异(相对于siCD441、siCD442、siCD443, siCL强度的4.1、3.3和3.1倍变化)和WKG*IRDye800的强度的显著差异(4.0、3.1、3.1倍变化)。WYK*IRDye800显示出无显著差异。F)蛋白质印迹示出了对照(siCL)和敲低的(siCD44)细胞的CD44表达。

[0031] 图8A-C示出了结合共定位。A)WKG*-IRDye800和B)抗CD44-AF488与SK-Hep1细胞的表面结合(箭头)。C)在合并的图像上测得皮尔逊相关性系数 $\rho = 0.81$ 。

[0032] 图9A-C示出了以不同的CD44表达水平与HCC细胞的肽结合。A)使用共聚焦显微术,抗CD44-AF488(绿色)和WKG*-IRDye800(红色)显示出与人SK-Hep1细胞和Hep 3B HCC细胞的表面强结合。在合并的图像上可以看到结合的共定位。B)定量的测量结果显示出在与SK-Hep1结合方面,WKG*-IRDye800和抗CD44-AF488的强度显著大于WYK*-IRDye800(对照)的强度(分别为4.05和5.61倍变化)。对于与Hep3B细胞的结合,没有观察到强度的显著差异。C)

蛋白质印迹显示出SK-Hep1细胞和Hep 3B细胞的CD44表达水平。

[0033] 图10A-E示出了肽结合的特征。A) 通过WKG^{*}-IRDye800 (红色) 与SK-Hep1人HCC细胞的结合在与未标记的WKG^{*}竞争的情况下显著降低,但在添加B) WYK^{*} (对照) 的情况下未显著降低。C) 定量的荧光强度显示出浓度依赖性降低,其中在添加未标记的WKG^{*}时,相对于相等浓度的WYK^{*},强度显著降低(分别为1.02、0.61、0.36、0.12和0.10倍变化)。D) 测得WKG^{*}-IRDye800与SK-Hep1细胞结合的表观解离常数 $k_d=43\text{nM}$, $R^2=0.99$ 。E) 测得表观缔合时间常数 $k=0.26\text{min}^{-1}$ (6.8分钟), $R^2=0.95$ 。结果代表三个独立实验。

[0034] 图11示出了肽对CD44细胞信号传导和细胞活力的影响。浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的低分子量透明质酸(HA) (阳性对照) 在温育15分钟后诱导SK-Hep1细胞中的下游AKT (pAKT) 和Erk1/2 (pErk1/2) 的磷酸化。无HA (无) 充当阴性对照。相比之下,与4 μM 或300 μM 的WKG^{*}-IRDye800一起温育显示出对CD44下游信号传导没有影响。 β -肌动蛋白用作上样对照。

[0035] 图12示出了细胞活力。人SK-Hep1 HCC细胞与浓度在0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内的肽一起温育24小时。然后施用MTT测定评估细胞毒性。WKG^{*}-IRDye800和WYK^{*}-IRDye800显示出在最高浓度下细胞活力降低。

[0036] 图13A-B示出了血清稳定性。A) 将WKG^{*}-IRDye800在小鼠血清中温育0、0.5、1.0、2、4、8和24小时,并使用分析型RP-HPLC测量血清稳定性。B) 相对浓度通过峰下面积确定,并且测得半衰期 $T_{1/2}=5.1$ 小时, $R^2=0.99$ 。

[0037] 图14A-E示出了体外光声成像。A) 在静脉注射WKG^{*}-IRDye800之前(0小时)和之后0.5、1、1.5、1.75、2、4和24小时,在 $\lambda_{\text{ex}}=774\text{nm}$ 处的激发下收集原位人HCC异种移植肿瘤(SK-Hep1)的图像。短暂变化后,强度在1.75小时时达到峰值。示出了在WKG^{*}-IRDye800之前20分钟注射以竞争结合的未标记的WKG^{*} (阻断物 (block))、WYK^{*}-IRDye800和ICG的光声图像。B) MRI图像证实了HCC肿瘤的原位位置(箭头)。C) 示出了注射后1.75小时时,肿瘤的代表性3D光声图像重构,其中宽度为5.4mm,长度为9.4mm (顶部) 并且深度为4.4mm (侧面)。D) 定量的T/B比证实了肿瘤对WKG^{*}-IRDye800的摄取在1.75小时时达到峰值。阻断物和WYK^{*}-IRDye800显示出信号在24小时内减少。来自ICG的强度在早期低下,并在24小时内逐渐增加。E) 在注射后1.75小时时,WKG^{*}-IRDye800的定量的T/B比显著大于阻断物、WYK^{*}-IRDye800和ICG的T/B比(平均值 \pm SD: 分别地, 7.12 ± 0.77 、 1.74 ± 0.13 、 1.47 ± 0.13 和 1.39 ± 0.13 ,对每个组评估了 $n=5$ 只小鼠)。与肿瘤区具有相等面积的相邻的非肿瘤组织区用于背景。

[0038] 图15A-C示出了体外全身荧光成像。A) 在静脉注射WKG^{*}-IRDye800之前(0小时)和之后0.5、1、1.5、1.75、2、4和24小时,在 $\lambda_{\text{ex}}=800\text{nm}$ 处的激发下收集全身荧光图像。在WKG^{*}-IRDye800之前20分钟注射以竞争结合的未标记的WKG^{*} (阻断物) 和WYK^{*}-IRDye800显示出在24小时内值降低。ICG (对照) 的结果初始地低下,但随着时间的推移而增加。1.75小时时来自肿瘤部位(圆圈)的峰值信号支持光声结果。B) 定量的T/B比证实了肿瘤对WKG^{*}-IRDye800的摄取在1.75小时时达到峰值。与肿瘤区具有相等面积的相邻的非肿瘤组织区用于背景。C) WKG^{*}-IRDye800的定量的T/B比显著大于阻断物、WYK^{*}-IRDye800和ICG的T/B比(平均值 \pm SD: 分别地, 6.42 ± 0.69 、 1.09 ± 0.21 、 1.85 ± 0.30 和 0.46 ± 0.03 ,对每个组评估了 $n=5$ 只小鼠)。与肿瘤区具有相等面积的相邻的非肿瘤肝组织区用于背景。

[0039] 图16A-K示出了体外腹腔镜成像。代表性A) 超声(US) 和B) T_1 加权的MR图像(MRI) 证实了人HCC异种移植肿瘤的原位位置(箭头)。示出了注射C) WKG^{*}-IRDye800、D) WKG^{*} (阻断

物)、E) WYK^{*}-IRDye800和F) ICG后1.75小时时,体内收集的代表性白光(WL)和荧光(FL)图像。G) WKG^{*}-IRDye800的定量的T/B比显著大于阻断物、WYK^{*}-IRDye800和ICG的T/B比(平均值±SD:分别地,2.32±0.44、1.13±0.15、1.21±0.17和0.87±0.2,每个组中评估了n=8只小鼠)。背景被定义为与肿瘤区具有相等面积的相邻的非肿瘤区。使用H)人特异性抗细胞角蛋白和I)抗CD44的免疫组织化学(IHC)示出了与小鼠肝脏(箭头头部)相邻的HCC异种移植肿瘤(箭头)的存在,以证实原位位置。J)相邻部分的免疫荧光(IF)支持此结果。K)示出了来自相邻部分的组织学(H&E)。

[0040] 图17A-E示出了肽生物分布。示出了主要器官的代表性荧光图像。在静脉注射A) WKG^{*}-IRDye800、B) 阻断物、C) WYK^{*}-IRDye800和D) ICG后1.75小时对小鼠实施安乐死,每组n=5只小鼠。E) 定量的结果显示,相较于阻断物、WYK^{*}和ICG,WKG^{*}-IRDye800的摄取在肿瘤中显著更高(平均值±SD:分别地,2.91±0.17、1.36±0.09、1.46±0.23和1.65±0.24)。WKG^{*}-IRDye800强度在肿瘤区中显著大于相邻的正常肝脏区中(平均值±SD:2.91±0.17、0.92±0.45)。

[0041] 图18A-B示出了动物尸检。A)在注射WKG^{*}-IRDye800后48小时处死小鼠。在重要器官,包含心脏、肝、脾、肺、肾、胃、肠和脑,的组织学(H&E)上并且从B)血液学中均未看到急性毒性的迹象。示出的结果表示从n=3只小鼠中收集的平均值。

[0042] 图19A-G示出了离体与人HCC的特异性肽结合。A)使用免疫荧光,WKG^{*}-IRDye800(红色)和抗CD44-AF488(绿色)显示出与HCC的细胞表面强结合(箭头)。B)对于肝硬化,观察到扩散信号。C)在针对肝腺瘤的肽和抗体的情况下,看到轻度染色。D)对于正常人肝脏,看到强度最小。E)定量的荧光强度显示出,与HCC相关的强度显著大于腺瘤、肝硬化和正常人肝脏的强度(平均值±SD:1.47±0.50、0.93±0.35、0.67±0.34和0.56±0.21,对n=86个人类样本进行了评估)。F)ROC曲线示出了WKG^{*}-IRDye800的用于区分HCC与肝硬化的87%敏感性和69%特异性,其中AUC=0.79。G)ROC曲线示出了用于区分HCC与非HCC的87%敏感性和79%特异性,其中AUC=0.87。

[0043] 图20A-D示出了原位地植入在小鼠体内的细胞衍生的肝细胞癌(HCC)异种移植肿瘤。A)超声(US)、B)MRI(9.4T扫描仪)和C)活小鼠的腹腔镜检查证实了HCC肿瘤的原位位置。D)使用免疫组织化学(IHC)对肝脏进行评估,并且抗细胞角蛋白反应性增加证实了在小鼠肝脏内增殖的人HCC肿瘤组织的存在。

[0044] 图21A-E示出了原位地植入在小鼠体内的患者源性的异种移植(PDX)HCC肿瘤。A)腹腔镜图像示出了植入在小鼠肝脏中的活的人HCC肿瘤。B)T₁加权的MRI图像示出了注射用Gd-DOTA标记的先导CD44肽后1.5小时的原位PDX HCC肿瘤。从PDX HCC肿瘤中测得靶标与背景(T/B)比为2.68。C-E)PDX HCC肿瘤的免疫组织化学(IHC)分别显示出GPC3、CD44和EpCAM的强染色(箭头)。

[0045] 图22示出了对CD44具有特异性的经优化的肽。在图中,肽WKGWSYLWTQQA(黑色)通过GGGSK接头(蓝色)用Gd-DOTA(金色)标记。

具体实施方式

[0046] 除非在本文另外定义,否则本文使用的科学和技术术语具有所要求保护的主体所属领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0047] 靶向对HCC具有特异性的分子的过表达的图像引导的外科手术有助于实现完整肿瘤切除与组织功能的保持之间的平衡。靶向性成像还可以有助于使所剩的“正常”组织的体积最大化,以使术后功能最优化。另外,对HCC具有特异性的成像靶标可以充当用于评估患者预后的重要生物标志物。成像试剂可以提供疾病检测、预后、指导疗法的生物学基础,并且可以监测治疗应答。抗体一直最常用的,然而,其大小大、分子量高并且血浆半衰期长,所有这些使成像上的背景增加。肽是具有吸引力的成像工具,其大小小且分子量低,这使抗体无法实现的深层组织成像的特性得以改进。肽的免疫原性较低,从非靶组织中看是清晰的以降低背景,并且可以合成以提高结合亲和力。所有这些都促进深层组织渗透和有效靶向。

[0048] 在一个方面中,本公开提供了与在HCC细胞上表达的CD44结合的肽。肽包含但不限于肽WKGWSYLWTQQA (SEQ ID NO:1)。

[0049] 在一进一步的方面中,本公开提供了试剂,所述试剂包括本文所提供的肽。“肽试剂”包括至少两种组分,即本文所提供的肽和附接到所述肽的另一个部分。试剂中的有助于CD44的结合的唯一组分是CD44结合肽。换句话说,试剂“基本上由”本文所提供的肽组成。其它部分可以包括氨基酸,但是本文所提供的肽不与自然界中的氨基酸连接,并且其它氨基酸不影响肽与CD44的结合。此外,本文设想的试剂中的其它部分不是噬菌体展示文库中的噬菌体或肽展示文库中的任何其它类型的组分。

[0050] 试剂可以包括至少一个可检测标记,作为附接到本文所提供的肽的部分。可检测标记可以通过例如光学、超声、PET、SPECT或磁共振成像检测到。可通过光学成像检测到的标记可以是异硫氰酸荧光素 (FITC)、Cy5、Cy5.5或IRDye800 (还被称为IR800CW)。

[0051] 可检测标记可以通过肽接头附接到本文所提供的肽。接头的末端氨基酸可以是如示例性接头GGGSK (SEQ ID NO:2) 中的赖氨酸或者如示例性接头GGGSC中的半胱氨酸。

[0052] 试剂包括至少一个治疗部分,所述至少一个治疗部分附接到本文所提供的肽。治疗部分可以是化学预防剂或化学治疗剂。化学预防剂可以是塞来昔布。化学治疗剂可以是卡铂、紫杉醇、顺铂、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、奥沙利铂、卡培他滨、苯丁酸氮芥、索拉非尼或伊立替康。治疗部分可以是包封另一个治疗部分的纳米颗粒或胶束。卡铂、紫杉醇、顺铂、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、奥沙利铂、卡培他滨、苯丁酸氮芥、索拉非尼或伊立替康可以被包封。

[0053] 所述试剂可以包括至少一个可检测标记和至少一个治疗部分,所述至少一个可检测标记附接到所述肽或所述肽的所述多聚体形式,所述至少一个治疗部分附接到所述肽或所述肽的所述多聚体形式。

[0054] 在又一进一步的方面中,本公开提供了一种组合物,其包括本文所提供的试剂以及药学上可接受的赋形剂。

[0055] 在仍一进一步的方面中,本公开提供了一种用于特异性地检测患者的HCC细胞的方法,所述方法包括向患者施用附接到可检测标记的本文所提供的试剂,并检测所述试剂与所述细胞的结合的步骤。可检测结合可以在体外、体内或原位发生。

[0056] 短语“特异性地检测”意指在方法所执行的敏感性水平下,试剂与一种类型的细胞结合并被检测到与所述一种类型的细胞缔合,并且试剂不与另一种类型的细胞结合并且未被检测到其与所述另一种类型的细胞缔合。

[0057] 在一另外的方面中,本公开提供了一种确定针对患者的HCC、HCC转移或HCC复发的治疗的有效性的方法,所述方法包括向所述患者施用附接到可检测标记的本文所提供的试

剂,使用所述试剂标记的细胞的第一量可视化,并将所述第一量与用所述试剂标记的细胞的先前可视化的第二量进行比较的步骤,其中所标记的所述第一量细胞相对于所标记的细胞的所述先前可视化的第二量的减少指示有效治疗。减少5%可以指示有效治疗。减少约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或更多可以指示有效治疗。所述方法可以进一步包括获得由所述试剂标记的细胞的活检。

[0058] 在另一个方面中,本公开提供了一种用于将治疗部分递送到患者的方法,所述方法包括向所述患者施用附接到治疗部分的本文所提供的试剂的步骤。

[0059] 在又另一个方面中,本公开提供了一种用于将治疗部分递送到患者的HCC细胞的方法,所述方法包括向所述患者施用附接到治疗部分的本文所提供的试剂的步骤。

[0060] 在仍另一个方面中,本公开提供了一种试剂盒,其用于将本文所提供的组合物施用于有需要的患者,其中所述试剂盒包括本文所提供的组合物、所述组合物的使用说明书以及用于将所述组合物施用于所述患者的装置。

[0061] 接头、肽和肽类似物

[0062] 如本文所用,“接头”是位于本公开的肽的C末端处的氨基酸的序列。接头序列可以用,例如,半胱氨酸或赖氨酸残基封端。

[0063] 相较于不存在接头的情况下试剂的可检测结合,接头的存在可以使本文所提供的试剂与HCC细胞的可检测结合增加至少1%。可检测结合的增加可以是至少2%、至少3%、至少4%、至少5%、至少6%、至少7%、至少8%、至少9%、至少10%、至少11%、至少12%、至少13%、至少14%、至少15%、至少16%、至少17%、至少18%、至少19%、至少20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍、至少约50倍、至少约100倍或更多。

[0064] 术语“肽”是指2个至50个氨基酸的分子、3个至20个氨基酸的分子以及6个至15个氨基酸的分子。本文设想的肽和接头的长度可以是5个氨基酸。多肽或接头的长度可以是6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个或更多个氨基酸。

[0065] 在各个方面中,示例性肽是通过本领域已知的方法随机产生的、承载在多肽文库(例如且不限于噬菌体展示文库)中、通过蛋白质的消化产生或化学合成的。本公开中例示的肽已使用噬菌体展示技术开发,所述噬菌体展示技术是一种使用重组DNA技术以产生多肽的复杂文库,以通过优先与细胞表面靶标结合进行选择的强大组合方法[Scott等人,《科学(Science)》,249:386-390(1990)]。噬菌体的蛋白质衣壳,如丝状M13或二十面体T7被基因工程化为表达非常大量($>10^9$)的具有独特序列的不同多肽,以实现亲和力结合[Cwirla等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》,87:6378-6382(1990)]。然后通过针对过表达靶标的经培养的细胞和组织对噬菌体文库进行生物淘选来进行选择。然后回

收这些候选噬菌体的DNA序列,并将所述DNA序列用于合成多肽[Pasqualini等人,《自然(Nature)》,380:364-366(1996)]。优先与FGFR2结合的多肽任选地用荧光染料标记,所述荧光染料包含但不限于FITC、Cy 5.5、Cy 7和Li-Cor。

[0066] 肽包含D和L形式,为经纯化的或两种形式的混合物。本公开还设想了与本文所提供的肽竞争与HCC细胞结合的肽。

[0067] 本文所提供的试剂的肽可以以多聚体形式呈递。多种肽可以在其上呈递的各种支架在本领域是已知的。肽可以以多聚体形式在三赖氨酸树枝状楔形物上呈递。肽可以使用氨基己酸接头以二聚体形式存在。本领域已知的其它支架包含但不限于其它树枝状聚合物和聚合物(例如,PEG)支架。

[0068] 应当理解,本文所提供的肽和接头任选地并入本领域已知的修饰,并且这些修饰的位置和数量是可变的,以在肽和/或接头类似物中实现最佳效果。

[0069] 具有基于本文所公开的肽之一(“亲本肽”)的结构的肽类似物可以在一个或多个方面中不同于所述亲本肽。因此,如本领域的普通技术人员所理解的,关于本文所提供的亲本肽的教导也可以适用于肽类似物。

[0070] 肽类似物可以包括亲本肽的结构,不同之处在于肽类似物包括一个或多个代替肽键的非肽键。肽类似物可以包括代替肽键的酯键、醚键、硫醚键、酰胺键等。肽类似物可以是包括代替肽键的酯键的缩酚酸肽。

[0071] 肽类似物可以包括本文所描述的亲本肽的结构,不同之处在于肽类似物包括一个或多个氨基酸取代,例如,一个或多个保守氨基酸取代。保守氨基酸取代在本领域中是已知的,并且包含其中具有某些物理和/或化学特性的一种氨基酸交换为具有相同化学或物理特性的另一种氨基酸的氨基酸取代。例如,保守氨基酸取代可以是一种酸性氨基酸取代另一种酸性氨基酸(例如,Asp或Glu)、一种具有非极性侧链的氨基酸取代另一种具有非极性侧链的氨基酸(例如,Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val等)、一种碱性氨基酸替代另一种碱性氨基酸(Lys、Arg等)、一种具有极性侧链的氨基酸取代另一种具有极性侧链的氨基酸(Asn、Cys、Gln、Ser、Thr、Tyr等),等。

[0072] 肽类似物可以包括一种或多种合成氨基酸,例如对哺乳动物来说非天然的氨基酸。合成氨基酸包含 β -丙氨酸(β -Ala)、N- α -甲基-丙氨酸(Me-Ala)、氨基丁酸(Abu)、 γ -氨基丁酸(γ -Abu)、氨基己酸(ϵ -Ahx)、氨基异丁酸(Aib)、氨基甲基吡咯羧酸、氨基哌啶羧酸、氨基丝氨酸(Ams)、氨基四氢吡喃-4-羧酸、精氨酸N-甲氧基-N-甲基酰胺、 β -天冬氨酸(β -Asp)、氮杂环丁烷羧酸、3-(2-苯并噻唑基)丙氨酸、 α -叔丁基甘氨酸、2-氨基-5-脲基-正戊酸(瓜氨酸,Cit)、 β -环己基丙氨酸(Cha)、乙酰氨基甲基-半胱氨酸、二氨基丁酸(Dab)、二氨基丙酸(Dpr)、二羟基苯丙氨酸(DOPA)、二甲基噻唑烷(DMTA)、 γ -谷氨酸(γ -Glu)、高丝氨酸(Hse)、羟脯氨酸(Hyp)、异亮氨酸N-甲氧基-N-甲基酰胺、甲基-异亮氨酸(MeIle)、异二十二烷酸(Isn)、甲基-亮氨酸(MeLeu)、甲基-赖氨酸、二甲基-赖氨酸、三甲基-赖氨酸、甲基脯氨酸、甲硫氨酸-亚砷(Met(O))、甲硫氨酸-砷(Met(O₂))、正亮氨酸(Nle)、甲基-正亮氨酸(Me-Nle)、正缬氨酸(Nva)、鸟氨酸(Orn)、对氨基苯甲酸(PABA)、青霉素(Pen)、甲基苯丙氨酸(MePhe)、4-氯苯丙氨酸(Phe(4-Cl))、4-氟苯丙氨酸(Phe(4-F))、4-硝基苯丙氨酸(Phe(4-NO₂))、4-氰基苯丙氨酸((Phe(4-CN))、苯基甘氨酸(Phg)、哌啶基丙氨酸、哌啶基甘氨酸、3,4-脱氢脯氨酸、吡咯烷基丙氨酸、肌氨酸(Sar)、硒代半胱氨酸(Sec)、O-苄基-磷酸丝

氨酸、4-氨基-3-羟基-6-甲基庚酸(Sta)、4-氨基-5-环己基-3-羟基戊酸(ACHPA)、4-氨基-3-羟基-5-苯基戊酸(AHPPA)、1,2,3,4,-四氢-异喹啉-3-羧酸(Tic)、四氢吡喃甘氨酸、噻吩丙氨酸(Thi)、0-苄基-磷酸酪氨酸、0-磷酸酪氨酸、甲氧基酪氨酸、乙氧基酪氨酸、0-(双-二甲基氨基-膦酰基)-酪氨酸、硫酸酪氨酸四丁胺、甲基-缬氨酸(MeVal)和烷基化的3-巯基丙氨酸。

[0073] 肽类似物可以包括一个或多个非保守氨基酸取代,并且肽类似物仍以与亲本肽相似的程度、相同的程度或改进的程度起作用。肽类似物可以包括一个或多个非保守氨基酸取代,表现出相较于亲本肽,大约相同或更大的与HCC细胞的结合。

[0074] 相较于本文所描述的亲本肽,肽类似物可以包括一个或多个氨基酸插入或缺失。相较于亲本肽,肽类似物可以包括一个或多个氨基酸的插入。相较于亲本肽,肽类似物可以包括一个或多个氨基酸的缺失。相较于亲本肽,肽类似物可以包括在N或C末端处的一个或多个氨基酸的插入。相较于亲本肽,肽类似物可以包括在N或C末端处的一个或多个氨基酸的缺失。在所有这些情况下,肽类似物仍表现出大约相同或更大的与HCC细胞的结合。

[0075] 可检测标志物

[0076] 如本文所用,“可检测标志物”是可以用于标识本公开的组合物与HCC细胞的结合的任何标记。可检测标志物的非限制性实例是能够实现多肽的可视化的荧光团、化学标签或蛋白质标签。在某些方面中,可视化是通过肉眼或装置(例如且不限于内窥镜)进行的,并且还可以涉及替代性光或能量源。

[0077] 设想用于本文使用的荧光团、化学标签和蛋白质标签包含但不限于FITC、Cy5、Cy5.5、Cy 7、Li-Cor、放射性标记、生物素、荧光素酶、1,8-ANS(1-苯胺萘-8-磺酸)、1-苯胺萘-8-磺酸(1,8-ANS)、pH 9.0的5-(和-6)-羧基-2',7'-二氯荧光素、pH 9.0的5-FAM、5-ROX(5-羧基-X-罗丹明三乙基铵盐)、pH 7.0的5-ROX、5-TAMRA、pH 7.0的5-TAMRA、5-TAMRA-MeOH、6JOE、pH 9.0的6,8-二氟-7-羟基-4-甲基香豆素、pH 7.0的6-羧基罗丹明6G、6-羧基罗丹明6G盐酸盐、pH 9.0的6-HEX SE、pH 9.0的6-TET SE、pH 7.0的7-氨基-4-甲基香豆素、7-羟基-4-甲基香豆素、pH 9.0的7-羟基-4-甲基香豆素、Alexa350、Alexa 405、Alexa 430、Alexa 488、Alexa 532、Alexa 546、Alexa 555、Alexa 568、Alexa 594、Alexa 647、Alexa 660、Alexa 680、Alexa 700、pH 7.2的Alexa Fluor 430抗体缀合物、pH 8.0的Alexa Fluor 488抗体缀合物、Alexa Fluor 488酰肼-水、pH 7.2的Alexa Fluor 532抗体缀合物、pH 7.2的Alexa Fluor 555抗体缀合物、pH 7.2的Alexa Fluor568抗体缀合物、pH 7.2的Alexa Fluor 610R-藻红蛋白链霉亲和素、pH 7.2的Alexa Fluor647抗体缀合物、pH 7.2的Alexa Fluor 647R-藻红蛋白链霉亲和素、pH 7.2的Alexa Fluor660抗体缀合物、pH 7.2的Alexa Fluor 680抗体缀合物、pH 7.2的Alexa Fluor 700抗体缀合物、pH 7.5的别藻蓝蛋白、AMCA缀合物、氨基香豆素、APC(别藻青素)、Atto 647、pH 5.5的BCECF、pH 9.0的BCECF、BFP(蓝色荧光蛋白)、钙黄绿素、pH 9.0的钙黄绿素、钙深红、钙深红Ca²⁺、钙绿、钙绿-1Ca²⁺、钙橙、钙橙Ca²⁺、pH 10.0的羧基萘基荧光素、瀑布蓝、pH 7.0的瀑布蓝BSA、瀑布黄、pH 8.0的瀑布黄抗体缀合物、CFDA、CFP(青色荧光蛋白)、pH 2.5的CI-NERF、pH 6.0的CI-NERF、柠檬黄、香豆素、Cy 2、Cy 3、Cy 3.5、Cy 5、C5.5、CyQUANT GR-DNA、丹酰尸胺、丹酰尸胺MeOH、DAPI、DAPI-DNA、Dapoxyl(2-氨基乙基)磺酰胺、pH 9.0的DDAO、Di-8 ANEPPS、Di-8-ANEPPS-脂质、DiI、DiO、pH 4.0的DM-NERF、pH 7.0的DM-NERF、DsRed、DTAF、dTomato、eCFP(增强型青色荧光蛋

白)、eGFP(增强型绿色荧光蛋白)、曙红(Eosin)、pH 8.0的曙红抗体缀合物、pH 9.0的赤藓红-5-异硫氰酸酯、eYFP(增强型黄色荧光蛋白)、FDA、pH 8.0的FITC抗体缀合物、FlAsH、Fluo-3、Fluo-3 Ca²⁺、Fluo-4、Fluor-Ruby、荧光素、荧光素0.1M NaOH、pH 8.0的荧光素抗体缀合物、pH 8.0的荧光素右旋糖酐、pH 9.0的荧光素、Fluoro-Emerald、FM 1-43、FM 1-43脂质、FM 4-64、FM 4-64、2% CHAPS、Fura Red Ca²⁺、高Ca的Fura Red、低Ca的Fura Red、Fura-2 Ca²⁺、Fura-2、Fura-2 GFP(S65T)、HcRed、Indo-1 Ca²⁺、不含Ca的Indo-1、钙饱和的Indo-1、IDRdye800(IR800CW)、JC-1、pH 8.2的JC-1、丽丝胺罗丹明(Lissamine rhodamine)、荧光黄CH、镁绿、镁绿Mg²⁺、镁橙、海蓝、mBanana、mCherry、mHoneydew、mOrange、mPlum、mRFP、mStrawberry、mTangerine、NBD-X、NBD-X MeOH、NeuroTrace 500/525、绿色荧光Nissl染色-RNA、尼罗蓝、尼罗红、尼罗红-脂质、Nissl、俄勒冈绿488、pH 8.0的俄勒冈绿488抗体缀合物、俄勒冈绿514、pH 8.0的俄勒冈绿514抗体缀合物、太平洋蓝、pH 8.0的太平洋蓝抗体缀合物、藻红蛋白、pH 7.5的R-藻红蛋白、ReAsH、试卤灵(Resorufin)、pH 9.0的试卤灵、Rhod-2、Rhod-2 Ca²⁺、罗丹明、罗丹明110、pH 7.0的罗丹明110、罗丹明123MeOH、罗丹明绿、pH 7.0的罗丹明鬼笔环肽、pH 8.0的罗丹明红-X抗体缀合物、pH 7.0的罗丹明绿、pH 8.0的Rhodol绿抗体缀合物、蓝宝石、SBFI-Na⁺、钠绿Na⁺、磺基罗丹明101、pH 8.0的四甲基罗丹明抗体缀合物、pH 7.0的四甲基罗丹明右旋糖酐和pH 7.2的德州红-X抗体缀合物。

[0078] 本文设想的化学标签的非限制性实例包含放射性标记。例如且不限于,本公开的组合物和方法中设想的放射性标记包含¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸F、³²P、⁵²Fe、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁸⁹Zr、⁹⁰Y、⁹⁴mTc、⁹⁴Tc、⁹⁵Tc、⁹⁹mTc、¹⁰³Pd、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁹Pd、¹¹¹Ag、¹¹¹In、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁴⁰La、¹⁴⁹Pm、¹⁵³Sm、¹⁵⁴⁻¹⁵⁹Gd、¹⁶⁵Dy、¹⁶⁶Dy、¹⁶⁶Ho、¹⁶⁹Yb、¹⁷⁵Yb、¹⁷⁵Lu、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁹²Ir、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au和²¹²Bi。钆(Gd)广泛用于络合物中,并且占应用于临床的MR成像造影剂的大多数。一个实例是临床批准的Gd-GOTA(钆特酸葡胺)。

[0079] 对于正电子发射断层扫描(PET),使用示踪剂,包含但不限于碳-11、氮-13、氧-15和氟-18。

[0080] 本领域的普通技术人员将理解,存在许多此类可以用于使细胞在体外、体外或离体可视化的可检测标志物。

[0081] 治疗部分

[0082] 本文所设想的治疗部分包含但不限于多肽(包含蛋白质治疗剂)或肽、小分子、化学治疗剂或其组合。

[0083] 如本文所用,术语“小分子”是指化学化合物,例如可以任选地衍生的模拟肽或寡核苷酸,或任何其它低分子量有机化合物,无论是天然的还是合成的。

[0084] “低分子量”意指化合物的分子量小于1000道尔顿,通常介于300道尔顿与700道尔顿之间。在各个方面中,低分子量化合物为约100道尔顿、约150道尔顿、约200道尔顿、约250道尔顿、约300道尔顿、约350道尔顿、约400道尔顿、约450道尔顿、约500道尔顿、约550道尔顿、约600道尔顿、约650道尔顿、约700道尔顿、约750道尔顿、约800道尔顿、约850道尔顿、约900道尔顿、约1000道尔顿或更大道尔顿。

[0085] 治疗部分可以是蛋白质治疗剂。蛋白质治疗剂包含但不限于细胞蛋白质或循环蛋白质及其片段和衍生物。仍其它治疗部分包含多核苷酸,包含但不限于编码蛋白质的多核

苷酸、编码调节性多核苷酸的多核苷酸和/或本身是调节性的多核苷酸。任选地,组合物包括本文所描述的化合物的组合。

[0086] 蛋白质治疗剂可以包含细胞因子或成血因子,包括但不限于IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-11、集落刺激因子1(CSF-1)、M-CSF、SCF、GM-CSF、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、EPO、干扰素- α (IFN- α)、复合干扰素、IFN- β 、IFN- γ 、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、促血小板生成素(TPO)、血管生成素,例如Ang-1、Ang-2、Ang-4、Ang-Y、人类血管生成素样多肽、血管内皮生长因子(VEGF)、血管生长素、骨形态发生蛋白1、骨形态发生蛋白2、骨形态发生蛋白3、骨形态发生蛋白4、骨形态发生蛋白5、骨形态发生蛋白6、骨形态发生蛋白7、骨形态发生蛋白8、骨形态发生蛋白9、骨形态发生蛋白10、骨形态发生蛋白11、骨形态发生蛋白12、骨形态发生蛋白13、骨形态发生蛋白14、骨形态发生蛋白15、骨形态发生蛋白受体IA、骨形态发生蛋白受体IB、脑源性神经营养因子、睫状神经营养因子、睫状神经营养因子受体、细胞因子诱导的嗜中性粒细胞趋化因子1、细胞因子诱导的嗜中性粒细胞趋化因子2 α 、细胞因子诱导的嗜中性粒细胞趋化因子2 β 、 β 内皮细胞生长因子、内皮素1、表皮生长因子、上皮源性嗜中性粒细胞引诱剂、成纤维细胞生长因子4、成纤维细胞生长因子5、成纤维细胞生长因子6、成纤维细胞生长因子7、成纤维细胞生长因子8、成纤维细胞生长因子8b、成纤维细胞生长因子8c、成纤维细胞生长因子9、成纤维细胞生长因子10、酸性成纤维细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、神经胶质细胞系源性营养因子受体 α 1、神经胶质细胞系源性营养因子受体 α 2、生长相关蛋白、生长相关蛋白 α 、生长相关蛋白 β 、生长相关蛋白 γ 、肝素结合表皮生长因子、肝细胞生长因子、肝细胞生长因子受体、胰岛素样生长因子I、胰岛素样生长因子受体、胰岛素样生长因子II、胰岛素样生长因子结合蛋白、角化细胞生长因子、白血病抑制因子、白血病抑制因子受体 α 、神经生长因子、神经生长因子受体、神经营养蛋白3、神经营养蛋白4、胎盘生长因子、胎盘生长因子2、血小板源性内皮细胞生长因子、血小板源性生长因子、血小板源性生长因子A链、血小板源性生长因子AA、血小板源性生长因子AB、血小板源性生长因子B链、血小板源性生长因子BB、血小板源性生长因子受体 α 、血小板源性生长因子受体 β 、前B细胞生长刺激因子、干细胞因子受体、TNF,包含TNF0、TNF1、TNF2、转化生长因子 α 、转化生长因子 β 、转化生长因子 β 1、转化生长因子 β 1.2、转化生长因子 β 2、转化生长因子 β 3、转化生长因子 β 5、潜在转化生长因子 β 1、转化生长因子 β 结合蛋白I、转化生长因子 β 结合蛋白II、转化生长因子 β 结合蛋白III、肿瘤坏死因子受体I型、肿瘤坏死因子受体II型、尿激酶型纤溶酶原激活物受体、血管内皮生长因子以及其嵌合蛋白和生物或免疫活性片段。

[0087] 治疗部分还可以包含化学治疗剂。设想用于本文所提供的试剂的化学治疗剂包含但不限于烷基化剂,包含:氮芥类(nitrogen mustard),如氮芥(mechlor-ethamine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、异环磷酰胺(ifosfamide)、美法仑(melphalan)和苯丁酸氮芥;亚硝基脲,如卡莫司汀(carmustine,BCNU)、洛莫司汀(lomustine,CCNU)和司莫司汀(semustine,甲基-CCNU);亚乙基亚胺/亚甲基胺,如三亚甲基胺(TEM)、三乙烯、硫代磷酰胺(噻替派(thiotepa))、六甲蜜胺(hexamethylmelamine,HMM,六甲蜜胺(altretamine));烷基磺酸盐,如白消安(busulfan);三嗪,如达卡巴嗪(dacarbazine,DTIC);抗代谢物,包含叶酸类似物,如甲氨蝶呤(methotrexate)和三甲曲沙(trimetrexate);嘧啶类似物,如5-氟尿嘧啶、卡培他滨、氟脱氧尿苷、吉西他滨(gemcitabine)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(AraC,阿糖胞苷

(cytarabine)、5-氮杂胞苷、2,2'-二氟脱氧胞苷;嘌呤类似物,如6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、硫唑嘌呤、2'-脱氧助间型霉素(喷司他丁(pentostatin))、赤型羟基壬基腺嘌呤(erythrohydroxynonyladenine, EHNA)、磷酸氟达拉滨和2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨(cladribine), 2-CdA);天然产物,包含抗有丝分裂药,如紫杉醇、长春花生物碱,包含长春碱(vinblastine, VLB)、长春新碱(vincristine)和长春瑞滨(vinorelbine)、泰索帝(taxotere)、雌莫司汀(estramustine)和雌莫司汀磷酸盐(estramustine phosphate);表鬼臼毒素(epipodophylotoxin),如依托泊苷(etoposide)和替尼泊苷(teniposide);抗生素,如放线菌素D(actinomycin D)、道诺霉素(daunomycin, 红比霉素(rubidomycin))、阿霉素(doxorubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、伊达比星(idarubicin)、博来霉素(bleomycin)、普卡霉素(plicamycin, 光神霉素(mithramycin))、丝裂霉素C和放线菌素;酶,如L-天冬酰胺酶(L-asparaginase);生物应答调节剂,如干扰素- α 、IL-2、G-CSF和GM-CSF;其它药剂,包含铂配位络合物,如奥沙利铂、顺铂和卡铂;蒽二酮(anthracenedione),如米托蒽醌(mitoxantrone);经取代的脲,如羟基脲;甲基胍衍生物,包含N-甲基胍(MIH)和丙卡巴胍;肾上腺皮质抑制剂,如米托坦(o, p'-DDD)和氨鲁米特(aminoglutethimide);激素和拮抗剂,包含肾上腺皮质类固醇拮抗剂,如泼尼松(prednisone)和等效物、地塞米松(dexamethasone)和氨鲁米特;拓扑异构酶抑制剂,如伊立替康;孕酮,如己酸羟孕酮、乙酸甲羟孕酮和乙酸甲地孕酮;雌激素,如己烯雌酚和乙炔雌二醇等效物;抗雌激素,如他莫昔芬(tamoxifen);雄激素,包含丙酸睾酮和氟甲睾酮/等效物;抗雄激素,如氟他米特(flutamide)、促性腺激素释放激素类似物和亮丙瑞林(leuprolide);以及非甾体类抗雄激素,如氟他米特。还特别设想了如吉非替尼(gefitinib)、索拉非尼和厄洛替尼(厄洛替尼)等化学治疗剂。

[0088] 附接到本文所描述的肽的治疗部分还包含纳米颗粒或胶束,所述纳米颗粒或所述胶束进而包封另一个治疗部分。纳米颗粒可以是聚合物纳米颗粒,如Zhang等人,《ACS纳米(ACS NANO)》,2(8):1696-1709(2008)或Zhong等人,《生物大分子(Biomacromolecules)》,15:1955-1969(2014)中所描述的聚合物纳米颗粒。胶束可以是聚合物胶束,如Khondee等人,《受控释放杂志(J. Controlled Release)》,199:114-121(2015)和WO 2017/096076(公开于2017年6月8日)中描述的十八烷基石胆酸盐胶束。包括纳米颗粒或胶束的肽试剂可以包封例如卡铂、紫杉醇、顺铂、5-氟尿嘧啶(5-FU)、奥沙利铂、卡培他滨或伊立替康。

[0089] 所提供的治疗部分的剂量以,例如,以mg/kg为单位测量的剂量施用。所公开的治疗剂的所设想的mg/kg剂量包含约1mg/kg至约60mg/kg。以mg/kg为单位的剂量的具体范围包含约1mg/kg至约20mg/kg、约5mg/kg至约20mg/kg、约10mg/kg至约20mg/kg、约25mg/kg至约50mg/kg和约30mg/kg至约60mg/kg。受试者的精确有效量将取决于受试者的体重、大小和健康状况;病状的性质和程度;以及被选择用于施用的治疗剂或治疗剂的组合。对于给定情况的治疗有效量可以通过在临床医师的技能和判断内的常规实验来确定。

[0090] 如本文所用,“有效量”是指足以使所标识的疾病或病状可视化,或足以展现出可检测到的治疗或抑制作用的本文所提供的试剂的量。所述作用通过,例如,临床病状的改善或症状的减少来检测。受试者的精确有效量将取决于受试者的体重、大小和健康状况;病状的性质和程度;以及被选择用于施用的治疗剂或治疗剂的组合。对于给定情况的治疗有效量可以通过在临床医师的技能和判断内的常规实验来确定。

[0091] 试剂的可视化

[0092] 与HCC细胞的结合的可视化是通过本领域的普通技术人员已知的任何方式进行的。如本文所讨论的,可视化是例如且不限于体外、体外或原位可视化。

[0093] 当可检测标记为放射性标记时,所述放射性标记可以通过核成像检测到。

[0094] 当可检测标记为荧光团时,所述荧光团可以通过近红外(NIR)荧光成像检测到。

[0095] 当可检测标记具有磁性特性时,所述磁性特性可以通过磁共振(MR)成像检测到。

[0096] 本文所提供的方法可以包括从患者获取组织样品。组织样品可以是所述患者的组织或器官。

[0097] 调配物

[0098] 本文所提供的组合物用药学上可接受的赋形剂,如载剂、溶剂、稳定剂、佐剂、稀释剂等调配,这取决于特定施用模式和剂型。组合物通常被调配为实现生理上相容的pH,并且范围为约3的pH至约11的pH、约pH 3至约pH 7,这取决于调配物和施用途径。pH可以被调节到约pH 5.0至约pH 8的范围。组合物可以包括治疗有效量的如本文所描述的至少一种试剂,以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。任选地,组合物包括本文所描述的化合物的组合,或可以包含可用于治疗或预防细菌生长的第二活性成分(例如且不限于抗菌剂或抗微生物剂),或可以包含本文所提供的试剂的组合。

[0099] 合适的赋形剂包含例如载剂分子,所述载剂分子包含大型缓慢代谢的大分子,如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物和失活的病毒颗粒。其它示例性赋形剂包含抗氧化剂(例如且不限于抗坏血酸)、螯合剂(例如且不限于EDTA)、碳水化合物(例如且不限于糊精、羟烷基纤维素和羟烷基甲基纤维素)、硬脂酸、液体(例如且不限于油、水、盐水、甘油和乙醇)、湿润剂或乳化剂、pH缓冲物质等。

[0100] 如本文所用,“可以包括”或“可以是”表示发明人所设想的有功能性并且可用作所提供的主题的一部分的某物。

[0101] 实例

[0102] 虽然以下实例描述了具体实施例,但本领域的技术人员将想到变化和修改。因此,只有权利要求书中出现的这些限制才能适用于本发明。

[0103] 实例1

[0104] 对CD44具有特异性的肽的产生和表征

[0105] 通过分析CD44的胞外透明质酸结合结构域(1UUH)的结合活性的接触图(图1)形成候选肽序列的文库。

[0106] 从蛋白质数据库(PDB)获得CD44的胞外透明质酸结合结构域的晶体结构(1UUH)[Juliano等人,《威利跨学科评论:纳米医学与纳米生物技术(Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol)》2009,1,324-335]。使用CABS-dock软件[Ji,同上;Lee等人,《化学评论(Chem Rev)》2010;110:3087-111]以探索此CD44结构域的可能的肽结合位点并评估比对[Zhang等人,《化学学会评论(Chem Soc Rev)》2018;47:3490-3529]。此软件在对结合位点进行经验性搜索期间实现了肽结构的完全灵活性和蛋白质片段的大规模灵活性。选择分子间距离 $<4.5 \text{ \AA}$ 的肽/靶标残基对以优化结合亲和力和特异性。肽对示出于表1中。

[0107] 表1

[0108]

受体残基	肽残基
ASP B 167	ALA C 12
GLU B 166	GLN C 10
GLN B 113	GLN C 10
SER B 112	TRP C 8
THR B 111	TRP C 4
GLU B 48	GLN C 11
ASN B 39	GLN C 11
ILE B 22	ALA C 12
ALA B 20	ALA C 12
VAL A 148	TRP C 1
ASN A 94	TRP C 8
PRO A 93	THR C 9
ARG A 90	TYR C 6
CYS A 77	TYR C 6
GLU A 75	TYR C 6
HIS A 35	PRO C 3
THR A 27	TRP C 1
ASN A 25	TRP C 1
TYR B 169	GLN C 10
ASP B 167	GLN C 10
TYR B 114	TRP C 4
GLN B 113	TRP C 8
THR B 111	TRP C 8
SER B 109	TRP C 4
TYR B 42	THR C 9
LYS B 38	GLN C 11
GLN B 21	GLN C 11
ASN A 149	TRP C 1
ASN A 94	THR C 9
ASN A 94	TYR C 6
ILE A 91	TRP C 4
ARG A 78	PRO C 3
THR A 76	PRO C 3
GLU A 75	PRO C 3
THR A 27	HIS C 2
ILE A 26	TRP C 1
ASP B 167	GLN C 11
GLU B 160	ALA C 12
GLN B 113	THR C 9
SER B 112	TRP C 4
ASN B 110	TRP C 4
SER B 43	THR C 9
LYS B 38	ALA C 12
GLN B 21	ALA C 12

[0109]	ARG A 150	TRP C 1
	ILE A 96	LEU C 7
	ASN A 94	LEU C 7
	HIS A 92	THR C 9
	ARG A 90	TRP C 4
	THR A 76	TYR C 6
	GLU A 75	TRP C 4
	THR A 27	PRO C 3
	ILE A 26	HIS C 2

[0110] 配对多于五次的氨基酸被识别为具有高度相关性和亲和力,并保留在所设计的肽序列中(图2,红框)。使用通用肽序列WX1X2WX3X4X5X6TX7X8A,以在N末端处形成与CD44的亲水性相互作用,其中X1表示H或K。X2表示通常形成肽的“转角”的P或G。对于位点X3-X6,选择具有不同特性的氨基酸以增加序列多样性。X3表示S或N;X4表示Y、A、I或F;X5表示L、A、I或F;X6表示W、A、I或F。C末端处的X7-X8表示带负电荷的Q或D,所述带负电荷的Q或D对细胞的负外来被具有静电排斥作用,从而减少肽进入到细胞中。在所生成的肽的文库中,从X1到X8,序列是随机分布的,从而产生了 $2 \times 2 \times 2 \times 4 \times 4 \times 4 \times 2 \times 2 = 2048$ 的复杂度。然后使用Hex 8.0.0蛋白质-配体对接软件以评估每个候选肽与CD44透明质酸结合结构域的结合[Feng等人,《药物化学杂志(J Med Chem)》2021年9月30日.doi:10.1021/acs.jmedchem.1c00697]。此程序全面地评估每个候选序列的所预测的结合基序的所有可能组合,并且计算肽与靶标之间的结合的对接能量。Hex 8.0.0还用于标识用作对照的乱序序列。

[0111] 发现具有序列WKGWSYLWTQQA(SEQ ID NO:1)的肽,下文被称为WKG*,以 $E_t = -534$ 的总能量与CD44结合(图3A),并被选择以供进一步开发。此序列被置乱以产生肽WYKAQQWWTLGS(SEQ ID NO:3),下文被称为WYK*,以用作对照,并产生 $E_t = -494$,图3B。

[0112] 肽合成

[0113] 使用PS3自动合成器(蛋白质技术公司(Protein Technologies Inc))在rink酰胺MBHA树脂上使用标准Fmoc介导的固相化学合成来合成靶肽和对照肽。Fmoc(芴基甲氧基羰基)和Boc(丁氧基羰基)保护的L-氨基酸与标准HBTU/HOBt激活一起使用。组装后,将树脂用二甲基甲酰胺(DMF)和二氯甲烷(DCM)洗涤,用三氟乙酸混合物(TFA:茴香硫醚:苯酚:EDT:H₂O,87.5:5:2.5:2.5:2.5,v/v/v/v/v)切割。使所产生的肽在-20°C二乙醚中沉淀。然后使用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)纯化粗肽。将经纯化的肽冻干以产生白色粉末,并且用MALDI-TOF质谱法表征。

[0114] CD44导向的肽的C末端通过GGGSC接头与IRDye800,即近红外(NIR)荧光团共价连接,下文被称为WKG*-IRDye800,图4A。接头将肽与荧光团分开并防止空间位阻。乱序序列也用IRDye800标记,下文被称为WYK*-IRDye800,图4B。示出了3D模型,以突出生化结构之间的差异,图4C、D。通过HPLC合成纯度>95%的肽,并且使用质谱法测得实验质荷比(m/z)为1913.87,与期望值1913.88一致,图5A、B。

[0115] 光谱测量

[0116] 使用UV-Vis分光光度计(NanoDrop 2000c,赛默科技公司(Thermo Scientific))测量肽的吸收光谱。使用单模式二极管激光器(#iBEAM-SMART-785-S,TOPTICA Photonics

公司(TOPTICA Photonics))在 $\lambda_{\text{ex}}=785\text{nm}$ 处激发肽,并使用光谱仪(USB2000+,海洋光学公司(Ocean Insight))收集FL发射。使用Prism 5.0软件(GraphPad软件公司(GraphPad Inc))绘制光谱。峰值吸收和发射出现在近红外(NIR)光谱中,其中血红蛋白吸收、组织散射和组织自体荧光最少,6A、B。

[0117] siRNA敲低

[0118] 使用三种不同的siRNA敲低SK-Hep1细胞中的CD44表达,所述三种不同的siRNA包含:1)L-009999-00-0005,Dharmacon公司(Dharmacon);2)s2681,赛默飞世尔公司(Thermo Fisher);以及3)106160,赛默飞世尔科技公司。使用MISSION®siRNA通用阴性对照(SIC001,西格玛公司(Sigma))用于对照。将细胞用Lipofectamine 2000(11668027,英杰公司(Invitrogen))按照制造商说明转染,并且然后与 $4\mu\text{M}$ 的肽一起温育3分钟。使用1:3000稀释的兔抗CD44抗体(EPR18668,艾博抗公司(Abcam))用于阳性对照。在72小时内通过蛋白质印迹确定CD44表达。

[0119] 使用siRNA敲低人SK-Hep1 HCC细胞中的CD44表达,以验证WKG*-IRDye800与CD44的特异性结合。使用共聚焦显微术,WKG*-IRDye800和抗CD44-AF488抗体显示出与用siCL(对照)转染的SK-Hep1细胞的表面(箭头)强结合,而WYK*-IRDye800显示出结合最少,图7A。CD44敲低的SK-Hep1细胞的荧光强度显示出在任一肽的情况下强度最小,图7B-D。定量的结果显示,此降低是显著的,图7E。蛋白质印迹证实了SK-Hep1细胞中的CD44有效敲低,图7F。WKG*-IRDye800和抗CD44-AF488与Sk-Hep1细胞的表面的结合(箭头)共定位,其中在合并的图像上测得的相关性为 $\rho=0.81$,图8。

[0120] 共聚焦荧光显微术

[0121] 使大约 10^3 个SK-Hep1和Hep 3B细胞在24孔板中的盖玻片上生长到约70%汇合。将细胞用PBS洗涤1次,并与 $4\mu\text{M}$ 靶肽或对照肽一起温育3分钟。然后将细胞在PBS中洗涤3次,用4%多聚甲醛(PFA)固定8分钟,用PBS洗涤3次,然后与含2% BSA、1%山羊血清的PBS一起温育30分钟。将细胞与1:3000稀释的初级重组兔抗CD44抗体(#ab189524,艾博抗公司)一起在冰上温育30分钟,然后与1:500稀释的AF488标记的二级山羊抗兔免疫球蛋白G抗体(#A-11029,生命技术公司(Life Technologies))一起在 4°C 下温育12小时,并且然后在载玻片上使其安装有用含有DAPI的ProLong Gold试剂(英杰公司)。在徕卡SP8共聚焦显微镜(Leica SP8 confocal microscope)上使用63X油浸物镜收集共聚焦荧光图像。使用定制化MATLAB(迈斯沃克公司(Mathworks))软件对荧光强度进行定量。

[0122] 相较于Hep 3B细胞(CD44⁻)细胞,观察到WKG*-IRDye800和抗CD44-AF488与SK-Hep1细胞(CD44⁺)的结合的荧光强度显著更大,图9。

[0123] 实例2

[0124] 另外的肽表征

[0125] 通过添加未标记的肽,使用竞争性抑制来进一步验证与CD44的特异性肽结合。大约 10^3 个SK-Hep1细胞一式三份在盖玻片上生长到约70%汇合。将浓度为 $0\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 、 $40\mu\text{M}$ 、 $80\mu\text{M}$ 和 $100\mu\text{M}$ 的未标记的肽与细胞一起在 4°C 下温育30分钟。将细胞用PBS洗涤,并与 $5\mu\text{M}$ 靶肽一起在 4°C 下温育另外30分钟。将细胞洗涤并用4% PFA固定8分钟。将细胞用PBS洗涤并使其安装有用含有DAPI的ProLong Gold试剂(英杰公司)。

[0126] 测量与细胞的肽结合的表观解离常数 k_d ,以评估结合亲和力[31]。将IRDye800标

记的靶肽在PBS中以0nM、10nM、20nM、40nM、80nM、100nM和200nM的浓度连续稀释。将约 10^5 个SK-Hep1细胞与肽一起在4°C下温育1小时,用冰冷的PBS洗涤,并使用流式细胞仪测量平均荧光强度。平衡离解常数 $k_d = 1/k_a$ 是通过非线性方程 $I = (I_0 + I_{max} k_a [X]) / (I_0 + k_a [X])$ 进行数据的最小二乘拟合计算出的。 I_0 和 I_{max} 是初始荧光强度和最大荧光强度,分别对应于无肽和饱和时,并且[X]表示结合的肽的浓度。使用Prism 5.0软件(GraphPad软件公司)以计算 k_d 。

[0127] WKG*-IRDye800与CD44的特异性结合通过添加未标记的WKG*以竞争结合得到进一步支持。SK-Hep1细胞的荧光强度随着未标记的WKG*的浓度增加而显著降低,图10A,但在WYK*的情况下不会如此,图10B。定量的结果显示,降低是浓度依赖性的,图10C。这些结果表明,肽而非接头或荧光团介导结合相互作用。使用流式细胞术测得WKG*-IRDye800与SK-Hep1细胞的结合的表观解离常数 $k_d = 43\text{nM}$,图10D。测得表观缔合时间常数 $k = 0.26\text{min}^{-1}$ (6.8分钟),以支持快速结合开始,图10E。

[0128] 实例3

[0129] 肽对细胞信号传导的影响

[0130] 进行蛋白质印迹,以评估用于激活下游细胞信号传导的标志物,图11。将SK-Hep1细胞与透明质酸(HA)或肽一起温育,以评估与CD44结合后下游信号传导的激活。在15分钟内添加100ug/mL低分子量HA(GLR001,R&D系统公司(R&D Systems))。在15分钟内添加浓度为4 μM 和300 μM 的肽。根据制造商的说明使用抗CD44抗体(#ab189524,艾博抗公司)、抗AKT(#4691,细胞信号传导公司(Cell Signaling))、抗磷酸-AKT(#9271,细胞信号传导公司)、抗ERK1/2(#ab17942,艾博抗公司)、抗磷酸-ERK1/2(#ab50011,艾博抗公司)和抗 β -肌动蛋白(#4967,细胞信号传导技术公司(Cell Signaling Technology))。

[0131] 低分子量透明质酸(HA)作为阳性对照与SK-Hep1细胞一起温育显示出下游AKT和ERK1/2,分别包含pAKT和pERK1/2,的强磷酸化活性。相比之下,添加不同浓度的WKG*-IRDye800未引起下游底物的磷酸化的变化。

[0132] 实例4

[0133] 针对细胞毒性的测试

[0134] 将CD44结合肽和对照肽在一定浓度范围内连续稀释,并与接种在96孔板中的SK-Hep1细胞一起温育24小时。然后去除培养基,并添加MTT溶液(100 μL ,0.5mg/mL)。温育4小时后,去除MTT溶液,并且向每个孔中添加150 μL DMSO,以使由活细胞产生的甲瓚晶体溶解化。使用板读取器(VersaMaxTM可调微孔板读取器)测量在 $\lambda_{\text{abs}} = 570$ (测试)和630nm(参考)处的吸收。测量半最大抑制浓度(IC₅₀)。

[0135] 进行MTT测定以评估CD44肽的细胞毒性。将肽与SK-Hep1细胞一起以至多200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的递增浓度温育24小时。WKG*-IRDye800和WYK*-IRDye800肽显示出,在达到最高浓度之前对细胞活力没有影响,图12。

[0136] 实例5

[0137] 血清稳定性

[0138] 为了评估WKG*-IRDye800的血清稳定性,将肽与小鼠血清一起温育至多24小时,然后通过分析型RP-HPLC进行测量,图13。相对浓度通过峰下面积确定(Breeze 2,沃特世公司(Waters)),并且测得半衰期 $T_{1/2} = 5.1$ 小时, $R^2 = 0.99$,图13。

[0139] 实例6**[0140] 原位人HCC异种移植肿瘤的体外光声成像**

[0141] 将人HCC异种移植肿瘤原位地植入在雌性裸无胸腺小鼠中。首先,将约 5×10^6 个SK-Hep1肿瘤细胞皮下地注射到后肢肋腹中。然后每周两次监测肿瘤,并允许肿瘤在10-30天内生长到直径1-2cm。在胸骨下方开一个小的横向切口,以使肝脏暴露。用锋利的手术刀横向地平行于暴露的肝脏的表面切开肝脏。将一块尺寸为 $\sim 1 \times 1 \times 1 \text{mm}^3$ 的皮下肿瘤植入到切口中,并且然后用可吸收止血材料将所述部位封上(外科手术,强生公司(Johnson & Johnson))。确认止血后,将肝脏放回到其原始位置。

[0142] 将IRDye800标记的靶肽和对照肽($300 \mu\text{M}$ 于 $200 \mu\text{L}$ PBS中)静脉地注射在携带原位SK-Hep1肿瘤的小鼠体内。在所标记的肽之前30分钟注射未标记的肽(1.5mM , $100 \mu\text{L}$)以竞争结合。静脉地注射ICG(2.46mg/kg)作为对照。获取注射后0小时至48小时的三维(3D)图像,并使用PAI断层扫描系统(Nexus 128, Endra公司(Endra))使用 $\lambda_{\text{ex}} = 774 \text{nm}$ 激发重构所述三维图像。从二维(2D)最大强度投影(MIP)图像中测量光声信号强度,并将注射前图像用于背景。

[0143] 收集光声图像,以评估肽摄取的时间过程,图14A。在肽注射之前(0小时),从肿瘤中观察到强度最小。静脉施用 WKG^* -IRDye800后,强度在注射后1.75小时时达到峰值,并且直到约24小时返回到基线。在 WKG^* -IRDye800之前20分钟注射未标记的 WKG^* (7mM , $200 \mu\text{L}$),以竞争与CD44结合。观察到肿瘤的信号随着时间的推移减少。全身地施用 WYK^* -IRDye800用于对照,并且其显示出强度降低。为了进行比较,还施用(2.46mg/kg)吲哚菁绿(ICG)。注射后24小时内没有观察到ICG的峰值摄取。从携带肿瘤的小鼠收集T加权的MR图像,以证实原位地植入的HCC肿瘤的存在(箭头),图14B。3D重构示出了肿瘤尺寸,图14C。定量的强度证实了 WYK^* -IRDye800在肿瘤中的摄取在注射后1.75小时时达到峰值,并且直到约24小时返回到基线,图14E。在峰值摄取时, WKG^* 的平均T/B比显著大于阻断物、 WYK^* 和ICG平均T/B比,图14E。

[0144] 实例7**[0145] 原位人HCC异种移植肿瘤的体外全身成像**

[0146] 向携带SK-Hep1肿瘤的小鼠(如实例6中所描述的)产生)静脉地注射IRDye800标记的靶肽和对照肽($300 \mu\text{M}$ 于 $200 \mu\text{L}$ PBS中)。注射后至多24小时,使用NIR全身荧光成像系统(Pearl®, LI-COR生物科学公司(LI-COR Biosciences))标识肿瘤的空间范围和边缘。使用 $\lambda_{\text{ex}} = 800 \text{nm}$ 获取 $85 \mu\text{m}$ 分辨率和 $16.8 \times 12 \text{cm}^2$ 视场(FOV)的图像。使用Image Studio软件(Li-Cor生物科学公司)用于分析。测量面积等于肿瘤面积并且位置相邻的所关注的区(ROI),作为背景。

[0147] 从原位SK-Hep1异种移植肿瘤收集的全身荧光图像显示出在肽注射前(0小时)强度最小,图15A。静脉施用 WKG^* -IRDye800后,强度在注射后1.75小时时达到峰值,并且直到约24小时返回到基线。在 WKG^* -IRDye800之前20分钟注射未标记的 WKG^* (7mM , $200 \mu\text{L}$)以竞争与CD44结合(阻断物),并且在每个时间点从肿瘤中观察到荧光强度降低。全身地施用 WYK^* -IRDye800用于对照,并且其显示出强度降低。还施用ICG,作为比较,并且其显示出至多24小时的强背景。定量的强度证实了 WYK^* -IRDye800在肿瘤中的摄取在注射后1.75小时时达到峰值,并直到约24小时返回到基线,图15B。在峰值摄取时, WKG^* 的平均T/B比显著大于阻断

物、WYK*和ICG平均T/B比,图15C。

[0148] 实例8

[0149] 原位人HCC异种移植肿瘤的术中腹腔镜成像

[0150] 从小鼠(如实例6中所描述的)产生)收集超声(US)和T₁加权的MR图像,以证实所植入的HCC肿瘤的原位位置(箭头),图16A、B。

[0151] 将自构建的成像模块附接到标准外科手术腹腔镜(#49003AA,HOPKINS II简易望远镜0°,美国加利福尼亚州埃尔塞贡多的卡尔史托斯公司(Karl Storz,El Segundo,CA,USA)),以收集WL和NIR FL图像。将WL照明(MCWHL5,美国新泽西州纽顿的Thorlabs公司(Thorlabs,Newton,NJ,USA))和FL激发源($\lambda_{ex}=785\text{nm}$,#iBEAM-SMART-785-S,Toptica Photonics公司)耦接到腹腔镜中。分别通过彩色CCD相机(#GX-FW-28S5C-C,加拿大里士满BC V6W 1K7的灰点研究公司(Point Grey Research,Richmond,BC V6W1K7,Canada))和NIR CCD相机(Orca R-2,日本静冈县滨松市的滨松光子学株式会社(Hamamatsu Photonics,Hamamatsu City,Shizuoka Pref.,Japan))以1.2mW的激光功率同时收集WL和NIR FL图像。

[0152] 在成像前1.75小时,全身地施用WKG*-IRDye800、未标记的WKG*(阻断物)、WYK*-IRDye800和ICG。示出了在体外从暴露的肝脏中收集的代表性白光和荧光图像,图16C-F。对图像强度进行定量,并且WKG*的平均T/B比显著大于阻断物、WYK*和ICG的平均T/B比,图16G。成像完成后,对小鼠实施安乐死,并切除肝脏。在肿瘤切片上通过IHC对人特异性抗细胞角蛋白进行染色,以进一步证实所植入的人源性HCC肿瘤,图16H。通过IHC和IF证实CD44的过表达,图16I、J。示出了肿瘤的代表性组织学(H&E),图16K。

[0153] 实例9

[0154] 肽生物分布

[0155] 在WKG*-IRDye800、WYK*-IRDye800、WKG*和ICG注射后1.75小时处死如实例6所描述的产生的携带肿瘤的小鼠。在静脉注射靶肽和对照肽后,在峰值摄取时对动物实施安乐死。将主要器官,包含心脏、脾、肺、肝、脑、胃、肾、肠切除,并暴露,用于白光和荧光成像,以测量肽生物分布。从主要器官收集白光和NIR荧光图像,图17。

[0156] 发现WKG*-IRDye800在肿瘤中的摄取显著高于其它组的摄取。对于WYK*和WKG*,在除肾脏以外的所有其它器官中观察到低摄取,在所述肾脏中,肽被清除。由于身体清除途径不同,ICG显示来自胃和肠的强信号。

[0157] 实例10

[0158] 动物尸检

[0159] 在全身施用WKG*-IRDye800 48小时后,对正常健康小鼠实施安乐死。收集全血,用于评估血液学和化学。采集肝、肾、心脏、肺、脾、胃、肠和脑,并将其提交用于常规组织学(H&E)。所有载玻片均由肝脏病理学家进行评估。在心脏、肝、脾、肺、肾、胃、肠和脑中未看到毒性的迹象,图18A。未观察到急性肽毒性,图18B。

[0160] 实例11

[0161] 人HCC样本中的离体肽验证

[0162] 产生人HCC的组织微阵列(TMA),以研究CD44肽与人HCC的特异性结合。人肝脏的福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)切片从病理学部的存档组织库中获得。将样本在二甲苯中洗涤3次,持续3分钟,在100%乙醇中洗涤3分钟,在95%乙醇中洗涤3分钟,在70%乙醇中洗涤

3分钟,在H₂O中冲洗2分钟。通过将载玻片在pH 6.0的具有0.05% Tween的10mM柠檬酸钠缓冲液中煮沸15分钟来进行抗原去掩蔽。使载玻片冷却到RT,并在H₂O中洗涤3次,持续5分钟。在室温下用DAKO蛋白封闭剂(X0909,达科公司(DAKO))进行封闭,持续1小时。将1 μ M浓度的肽在RT下温育10分钟。将切片在PBST中洗涤3次,持续3分钟,并与400 μ L 1:500稀释的重组抗CD44(#ab189524,艾博抗公司)一起在4 $^{\circ}$ C下温育过夜。然后将切片在PBST中洗涤3次,持续5分钟。将1:500稀释的AF488标记的二级抗体(山羊抗兔Alexa Fluor[®]488)添加到每个切片中,并在RT下温育1小时。将二级抗体溶液取出,并用PBST洗涤3次,持续5分钟。然后使切片安装有含有DAPI的ProLong Gold试剂(英杰公司)。使用共聚焦显微术(SP8,徕卡公司(Leica))收集每个样本的荧光图像,并且从3个尺寸为20 \times 20 μ m²的盒中使用定制化MATLAB软件测量每个图像的平均荧光强度。避开饱和的图像强度区。

[0163] 肽和抗体两者均显示出对HCC的强染色,图19A。观察到腺瘤的染色最少并且肝硬化的弥漫性染色中度,图19B、C。正常人肝脏的代表性切片显示出染色可忽略,图19D。将结果与专家肝脏病理学家(EYC)解读的组织学进行比较。对荧光强度进行定量,并且HCC的平均(\pm SD)值显著大于其它组织学分类的平均值,图19E。ROC曲线示出用于区分HCC和肝硬化的87%敏感性和69%特异性,其中AUC=0.79,图19F,以及用于区分HCC和所有非HCC的87%敏感性和79%特异性,其中AUC=0.87,图19G。

[0164] 实例1-11的概述

[0165] 进行双侧韦尔奇的双样品t检验,以评估WKG*与HCC细胞的特异性结合,这允许进行比较的两个组中存在不等方差。所有检验均在邦弗朗尼校正的显著性水平(Bonferroni-corrected significance level) $\alpha=0.05/m$ 下进行,其中m是进行的统计检验的总数,以说明WKG*与各种对照之间进行的多重比较。例如,如果存在三种对照,则每个单独的检验将在 $\alpha=0.05/3=0.017$ 下进行,并且如果三种对照在九个组织中检查,则每种靶肽相对于对照的测试将在 $\alpha=0.05/27=0.0019$ 下进行。

[0166] 如上所述,使用结构模型以优化用于与CD44特异性结合的12聚体肽(WKG*)的序列。所述肽用IRDye800标记,并且通过敲低、竞争和共定位研究在体外验证特异性结合。标记的肽WKG*-IRDye800的结合特性通过表观解离常数 $k_d=43$ nM和表观缔合时间常数 $k=0.26$ min⁻¹(6.8分钟)来表征。将人HCC细胞原位地植入在小鼠肝脏中,并且在注射后1.75小时使用光声成像观察到肿瘤在体外的峰值摄取。使用全身成像和腹腔镜成像收集的荧光图像支持特异性WKG*-IRDye800肽摄取。通过用未标记的肽封闭所靶向的造影剂,进一步证实了在体外与CD44的特异性WKG*-IRDye800肽结合。使用人HCC样本的离体染色结果支持WKG*-IRDye800肽区分HCC与其它肝脏病理学的能力。在动物尸检上未观察到毒性的证据。

[0167] 已经报告了先前对CD44具有特异性的肽。使用通过M13噬菌体展示文库进行生物淘选来选择肽,以用于乳腺癌的检测[Park等人,《分子生物技术(Mol Biotechnol)》51(3)(2012)212-20]。对于FITC标记的肽和生物素化的肽,分别测得结合亲和力为115.8nM和256.5nM。未进行体内成像。开发了对CD44具有特异性的肽,用于胃癌的早期检测[Zhang等人,《世界胃肠病学杂志(World J Gastroenterol.)》,2012;18:2053-60;Zhang等人,《生物科技快报(Biotechnol Lett)》2015;37:2311-20;Zhang等人,《生物分子筛选杂志(J Biomol Screen)》2016;21:44-53;Li等人,《肿瘤靶标(Oncotarget)》2017;8:30063-30076]。使用结构模型评估与CD44的对接,并且报告了结合亲和力 $k_d=135.1$ nM。在皮下胃

肿瘤中进行荧光成像,并且在注射后三小时检测肿瘤中的峰值T/B比。生物分布显示出在肿瘤和肝两者中累积。另外,标识了对CD44v6具有特异性的肽,并且报告了结合亲和力 $k_d = 611.2\text{nM}$ [Zhang等人,《转化医学年鉴(Ann Transl Med)》2020;8(21):1442]。相比之下,本文中的肽WKG^{*}-IRDye800显示出结合亲和力的3倍改善,并主要展现出肾清除。此通路是优选的,因为造影剂在肝中的累积可以增加背景从而限制成像性能。

[0168] 多模式成像方法用于严格地验证在体外与CD44的特异性WKG^{*}-IRDye800肽结合。首先,使用超声和MRI以证实HCC肿瘤的原位位置。光声和荧光成像方法提供了不同的物理机制,通过这些物理机制从NIR标记的肽中产生信号,以证实与CD44靶标的特异性配体结合。光声图像将光和声音结合起来,以使肿瘤中肽累积的深度可视化。全身荧光图像证明了肽摄取的空间分布,以将肿瘤与其它身体器官进行比较。两种模式均显示出注射后1.75小时时达到峰值肿瘤摄取,并且直到~24小时清除。发现WKG^{*}-IRDye800肽在血清中稳定超过5小时。荧光腹腔镜检查在术中进行,并展示出在正常小鼠肝脏实质内肿瘤边缘清晰。使用超声和MRI以证实HCC肿瘤的原位位置。这些结果与未来作为用于HCC的早期检测和图像引导的外科手术的诊断成像剂的临床用途相容。

[0169] 以更大的频率使用图像引导的外科手术,以更精确地切除HCC肿瘤。小肿瘤,尤其是边缘模糊的肿瘤的术中诊断对HCC切除而言仍然是重大挑战。因此,特异性靶向剂有可能显著提高腹腔镜检查期间的诊断性能。有经验的外科医师可以实现非常好的患者结果,其中孤立性早期HCC的5年存活率超过70%。ICG是FDA批准的,并且是唯一目前用于在开放性外科手术和腹腔镜外科手术中实时标识肝肿瘤、肝区段和肝外胆管的造影剂[Jones等人,《欧洲肿瘤外科杂志(Eur J Surg Oncol)》2017;43:1622-1627]。此非特异性NIR荧光团通过增强的渗透和滞留(EPR)效应在HCC中被动地累积[Maeda等人,《控制释放杂志(J Control Release)》2000;65:271-84]。结果显示,ICG在注射后24小时内实现峰值摄取。对于在临床中的实际用途而言,此时间范围相当长。此外,与使用NIR标记的肽的肿瘤边缘相比,使用ICG的肿瘤边缘不明显。

[0170] 需要靶向性成像策略,以通过提供用于检测、表征和治疗肿瘤的新方法来改善患有HCC的患者的管理。目前的模式,如超声(US)、计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)和正电子发射断层扫描(PET)不能有效地确定大小<2cm的小结节的良性性质与恶性性质[Yu等人,《临床胃肠病学与肝病学(Clin Gastroenterol Hepatol)》2011;9:161-167]。虽然在血清学标志物方面取得了一些进展,但在组织标志物方面进展甚微。大多数HCC肿瘤源于肝硬化的背景。早期癌症检测依赖于开发一种识别可以区分HCC与非HCC的成像生物标志物的敏感的方法。来自对具有肝硬化的人HCC进行的WKG^{*}-IRDye800肽染色的离体数据显示出高度敏感性和特异性。因此,标识并验证与CD44特异性结合的肽WKG^{*}-IRDye800。此肽在患有HCC的患者的管理中具有许多可用于未来临床转化的特性,包含早期癌症检测和图像引导的外科手术。

[0171] 约80-90%的HCC患者患有潜在肝硬化,并且有效治疗取决于HCC的早期识别,因此开发一种可以在早期阶段识别可疑病变的存在并区分HCC与非HCC的敏感的诊断方法是成像的关键任务。本文的临床前数据支持此肽可以在患者样本上以87%敏感性和69%特异性区分HCC与肝硬化。由于HCC在瘤内方式和患者间方式两者下是一种高度异质性的恶性肿瘤,因此本文还设想了靶向CD44与其它HCC过表达的生物标志物(例如,GPC3和/或EpCAM)的

组合以提高诊断效率。

[0172] 总之,设想了本文所提供的CD44结合肽WKG*可以被标记并在临床上用于早期癌症检测、图像引导的切除,并且还可以用作靶向部分,例如在纳米载剂的表面上用于将装载药物的纳米颗粒选择性地递送到CD44肿瘤的靶向不分。

[0173] 实例12

[0174] 将人Hep3B HCC异种移植肿瘤原位地植入在活的裸无胸腺小鼠的肝脏中。动物研究由密歇根大学动物使用和护理委员会(University of Michigan University Committee on the Use and Care of Animals,UCUCA)批准。通过吸入式异氟醚维持麻醉。使用27号针向4-6周龄的裸无胸腺小鼠的肝脏的左叶注射含约 10^6 个Hep3B细胞团粒的50 μ L PBS和Matrigel基质混合物(1:1)。用缝线闭合外科手术切口,并允许动物恢复。图20A-C显示出来自活小鼠的A)超声(US)、B)MRI(9.4T扫描仪)和C)腹腔镜检查图像,这证实了HCC肿瘤的原位位置。使用免疫组织化学(IHC)对肝脏进行评估,并且图20D显示出抗细胞角蛋白反应性增加,这证实了在小鼠肝脏内增殖的人HCC肿瘤组织的存在。

[0175] 将PDX HCC异种移植肿瘤原位地植入在小鼠体内。使用新鲜的HCC样本,以开发患者源性异种移植(PDX)肿瘤,从而提供具有临床相关水平的靶标表达的病变。首先将人HCC样本皮下地植入,以验证生长,然后原位地植入在肝脏中用于MR成像。使用NOD Cg-Prkdc112rgSzJ(NSG)小鼠。这些小鼠携带严重联合免疫缺陷的突变(scid)和IL2受体共用 γ 链的完全无效等位基因(IL2rg^{nu11}),并且是极度免疫缺陷的。此模型维持细胞复杂度和来自供体的结构,并模拟后续传代的肿瘤微环境。将组织浸没在MACS组织储存溶液(美天旎生物技术有限公司(Miltenyi Biotec Inc))中。在无菌板中用汉克氏平衡盐溶液(Hank's Balanced Salt Solution,赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))冲洗两次后,使用无菌手术刀将肿瘤切碎成各自尺寸为~2-3mm的小块。将三个肿瘤块冷冻在液氮中用于RNA/DNA分析,一个块被处理用于常规组织学,并且每只动物植入两个新鲜的块。将小鼠以俯卧位置于手术台上。在小鼠的肋腹开一个小的横向切口。将肿瘤插入到皮下的空腔中。将外科手术切口用可吸收缝线和创伤夹闭合。向对照组注射PBS与Matrigel的混合物。每周通过超声监测肿瘤生长。图21A示出了代表性腹腔镜图像。

[0176] 然后,向具有PDX HCC异种移植肿瘤的小鼠注射Gd标记的[具体地钆特酸葡胺(Gd-DOTA)标记的]CD44结合肽WKG*(图22)(600mM于200mL PBS中)。在注射后1.5小时,使用7T扫描仪,磁共振(MR)成像示出PDX HCC肿瘤,图21B。从PDX HCC肿瘤中测得靶标与背景(T/B)比为2.68。通过使用免疫组织化学(IHC)分别对切除的人HCC样本中的GPC3、CD44和EpCAM的强染色还示出了小鼠肝脏中的成功肿瘤植入,图21C-E。

[0177] 本申请中引用的所有文件特此通过引用以其整体并入,特别注意其所引用的公开内容。

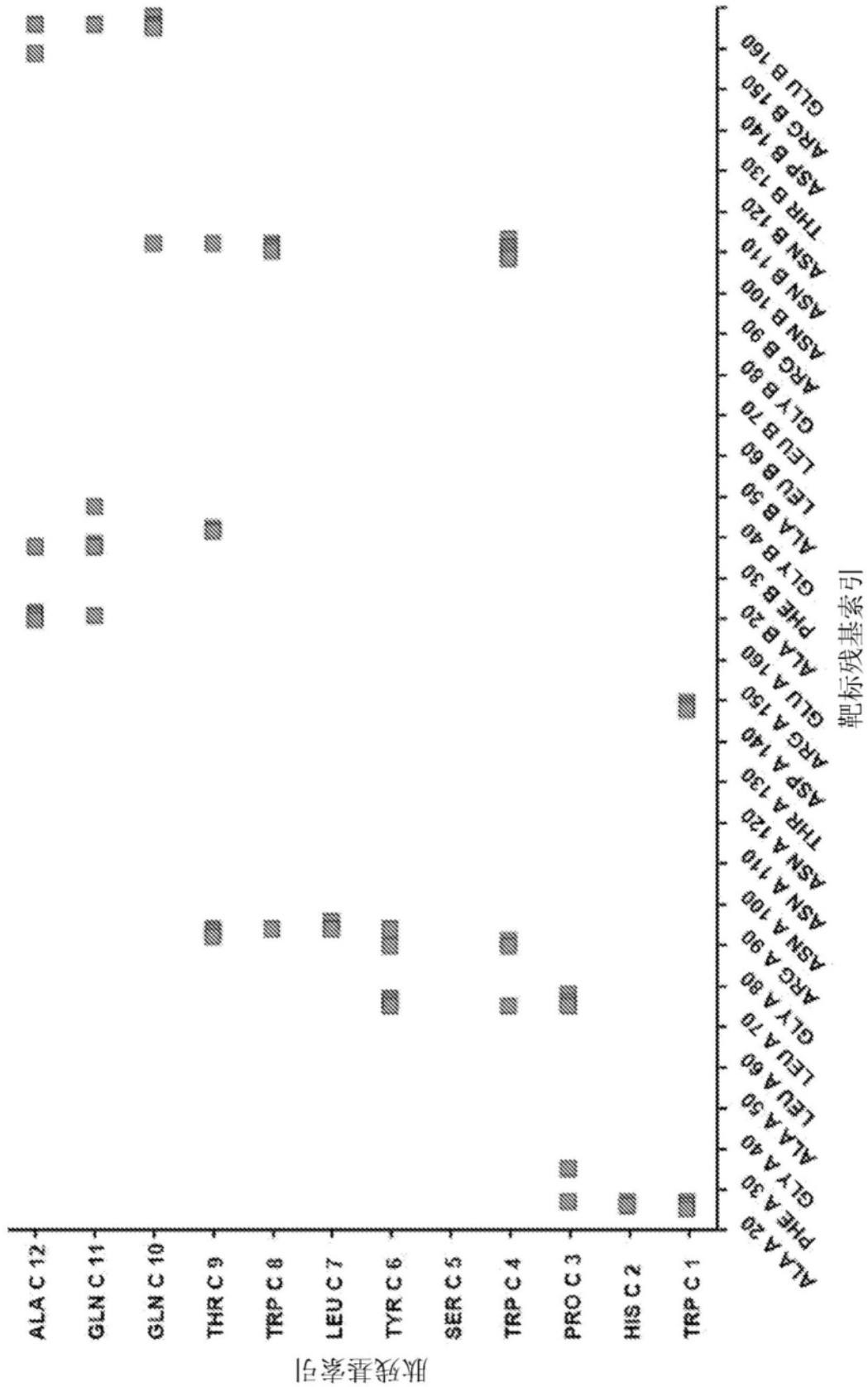


图1

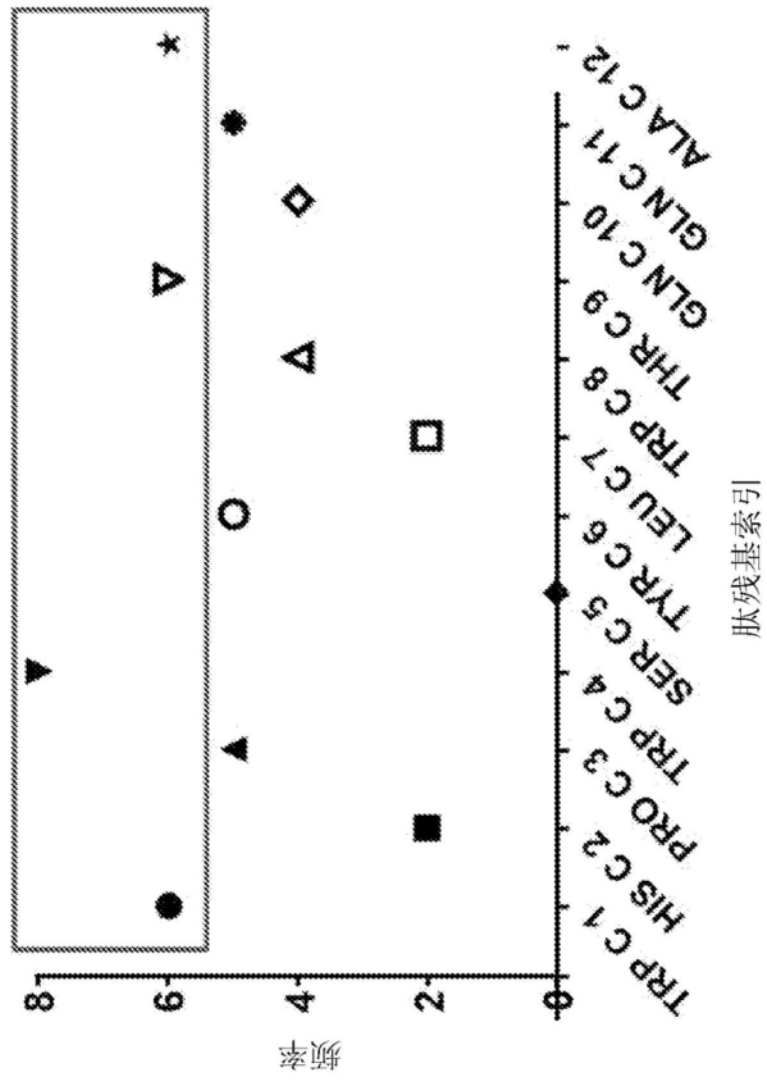


图2

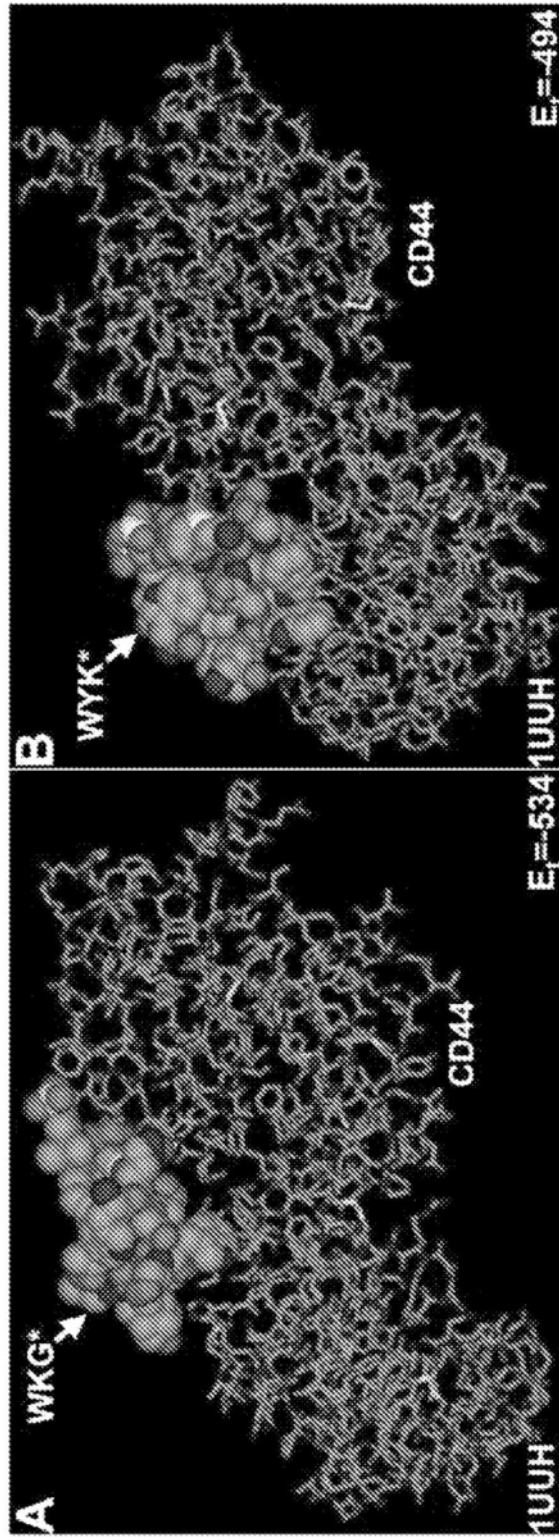


图3

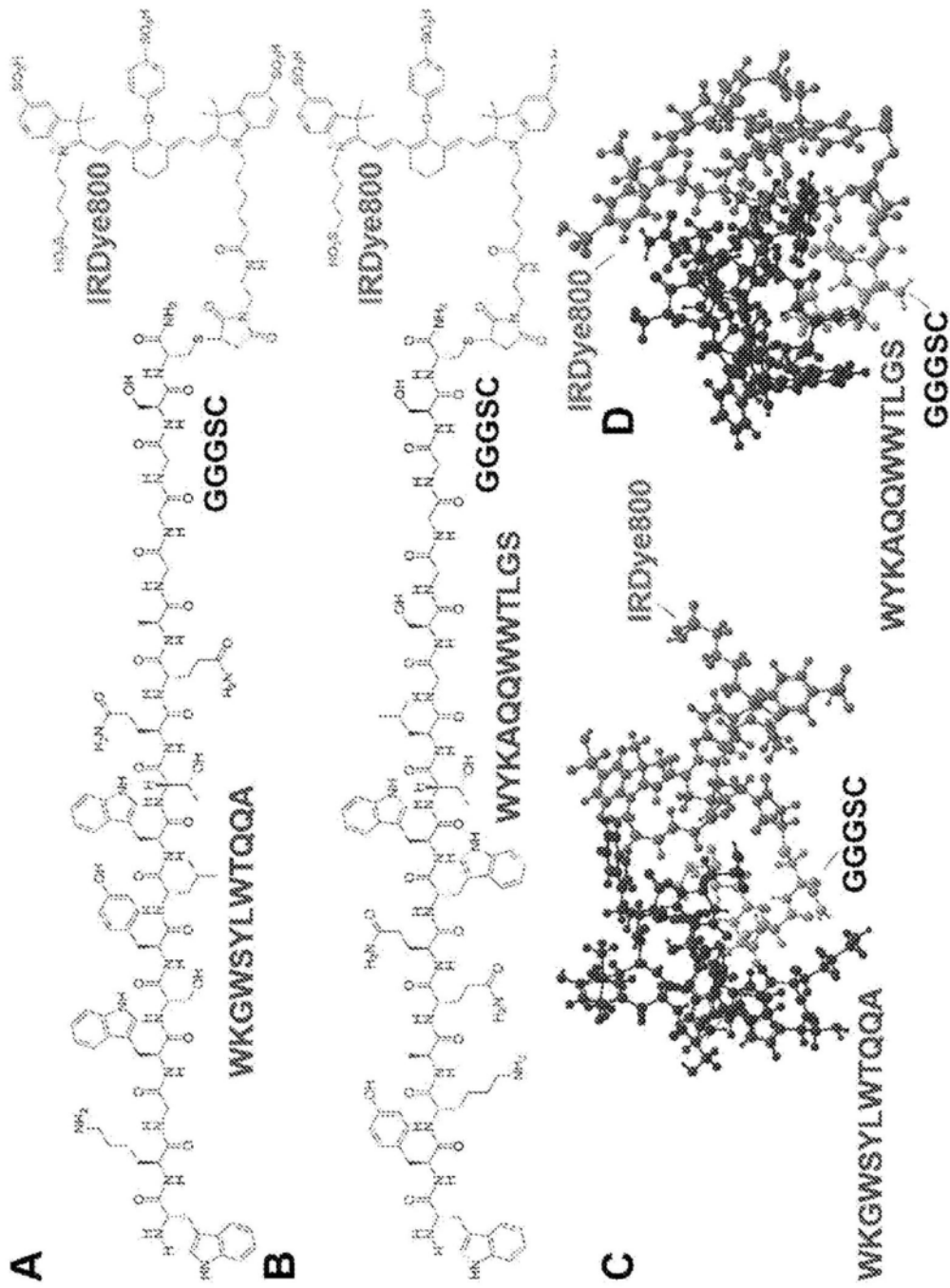


图4

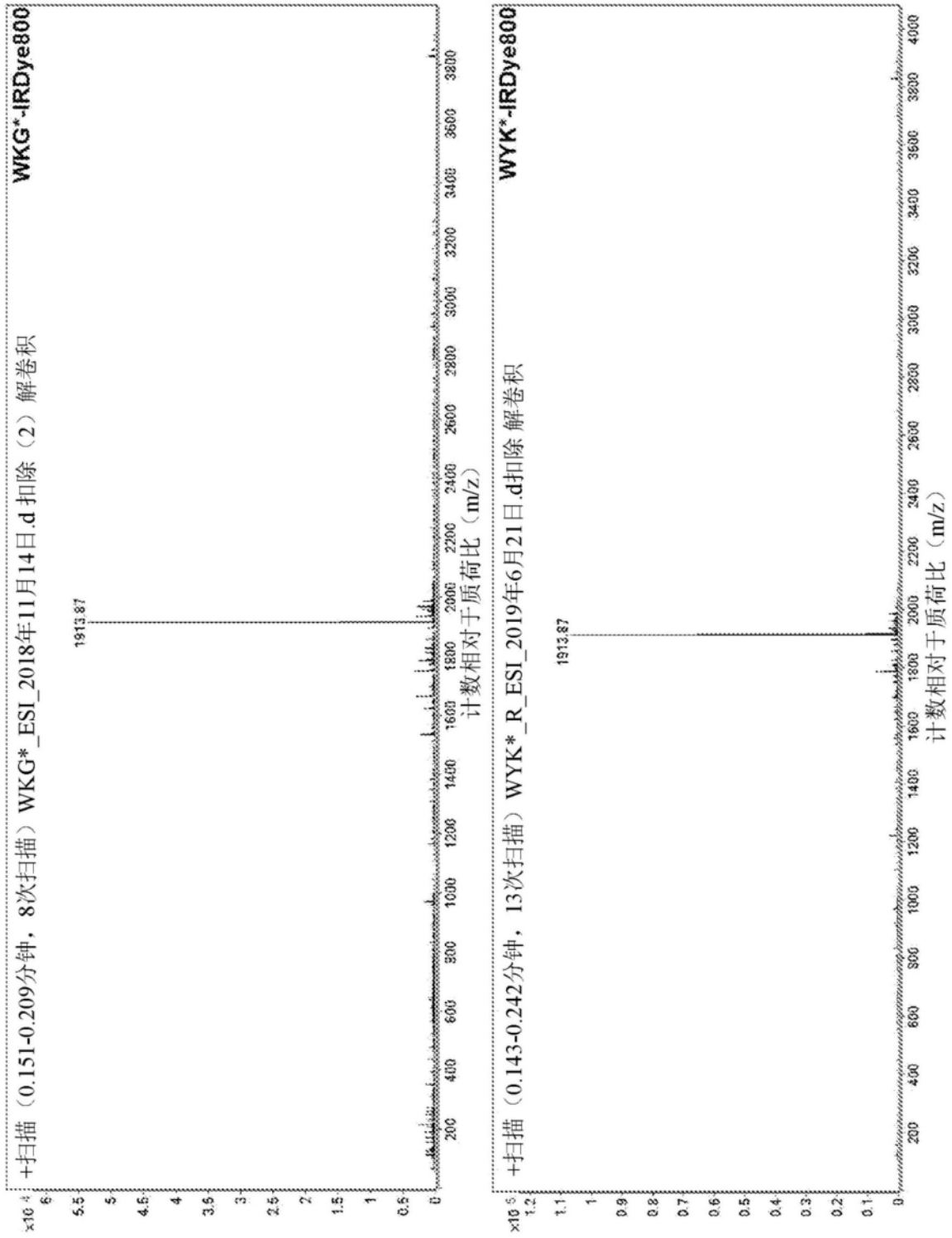


图5

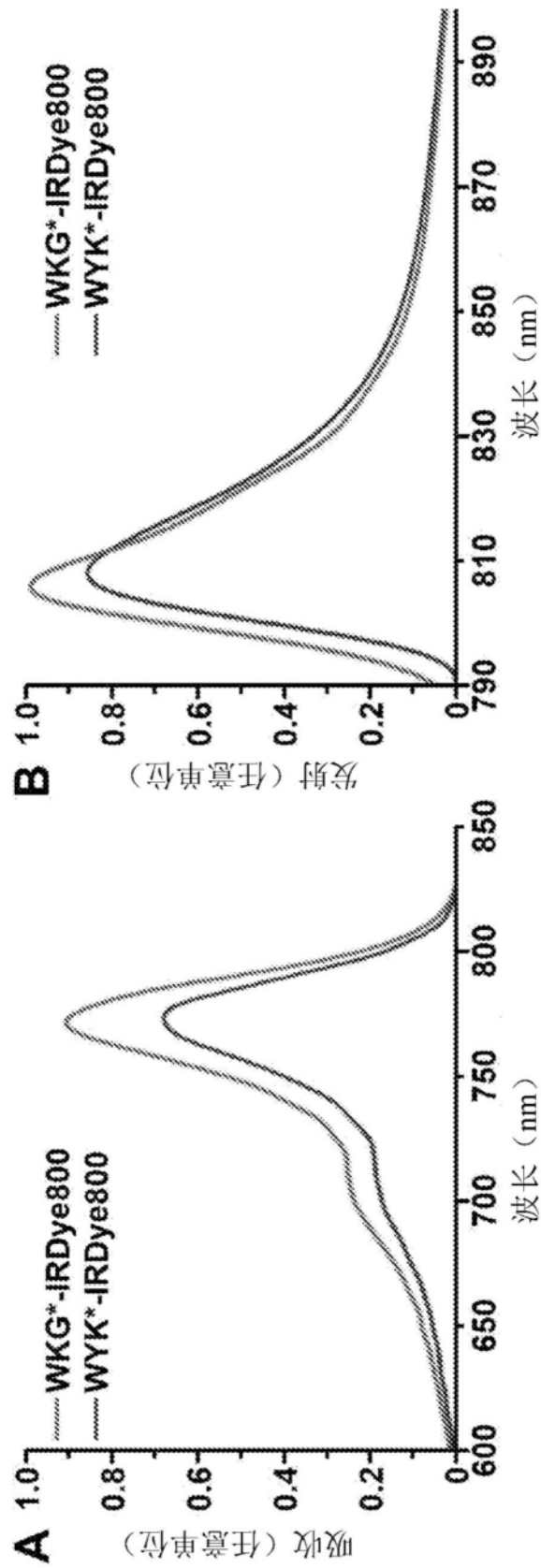


图6

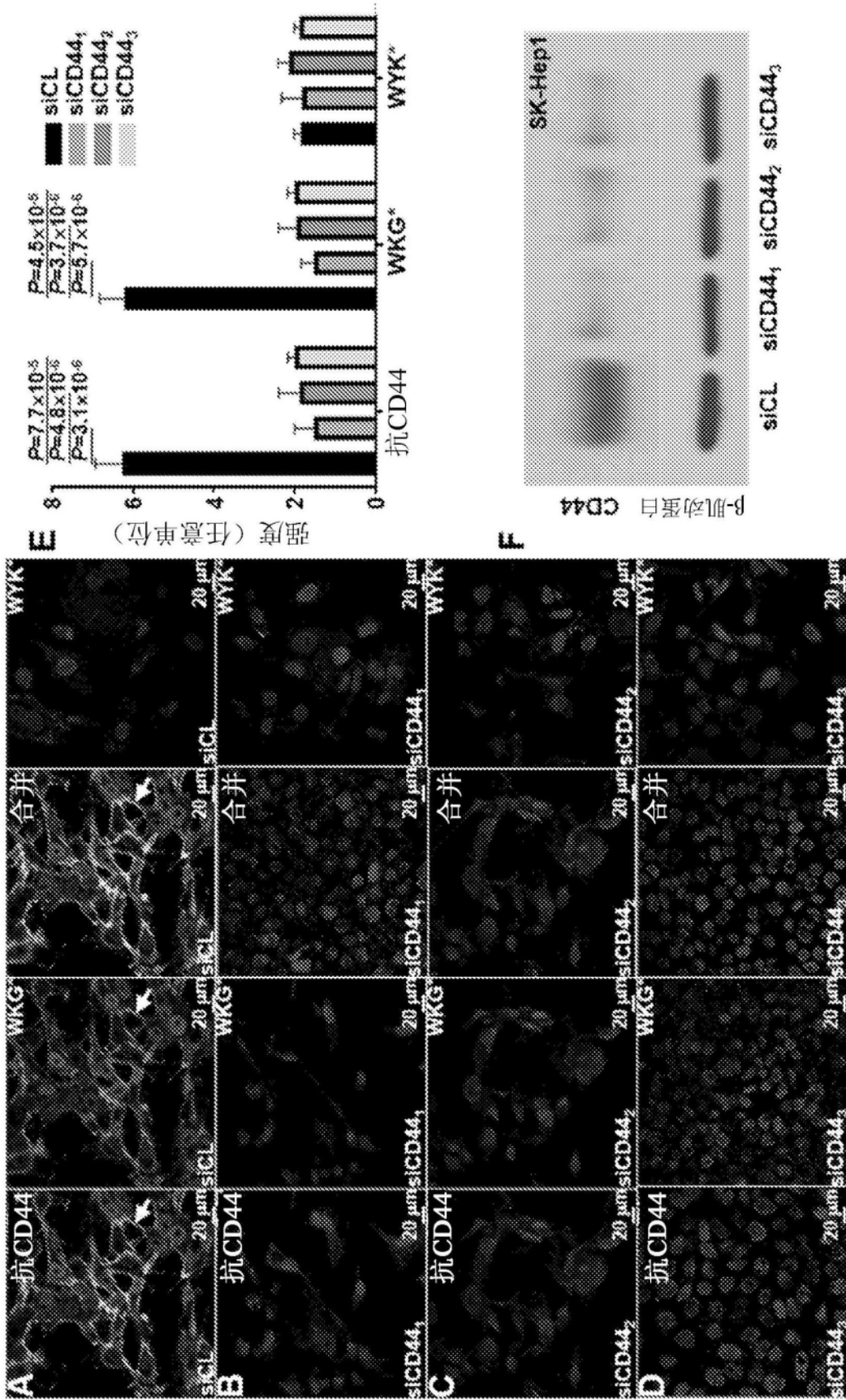


图7

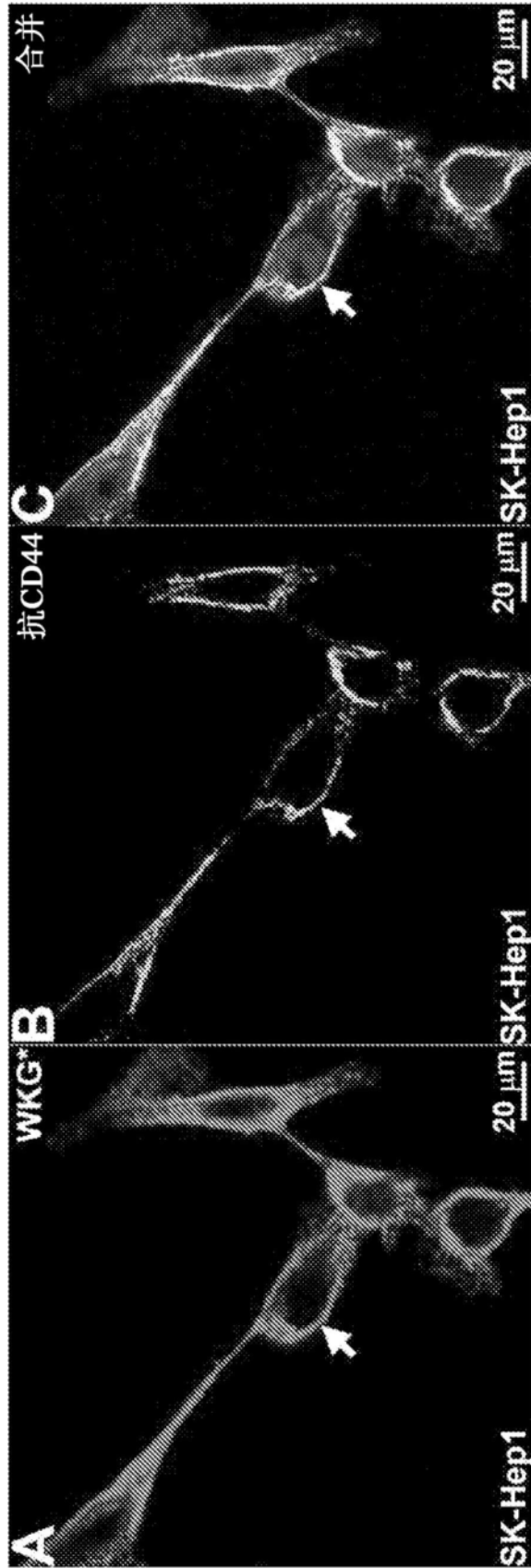


图8

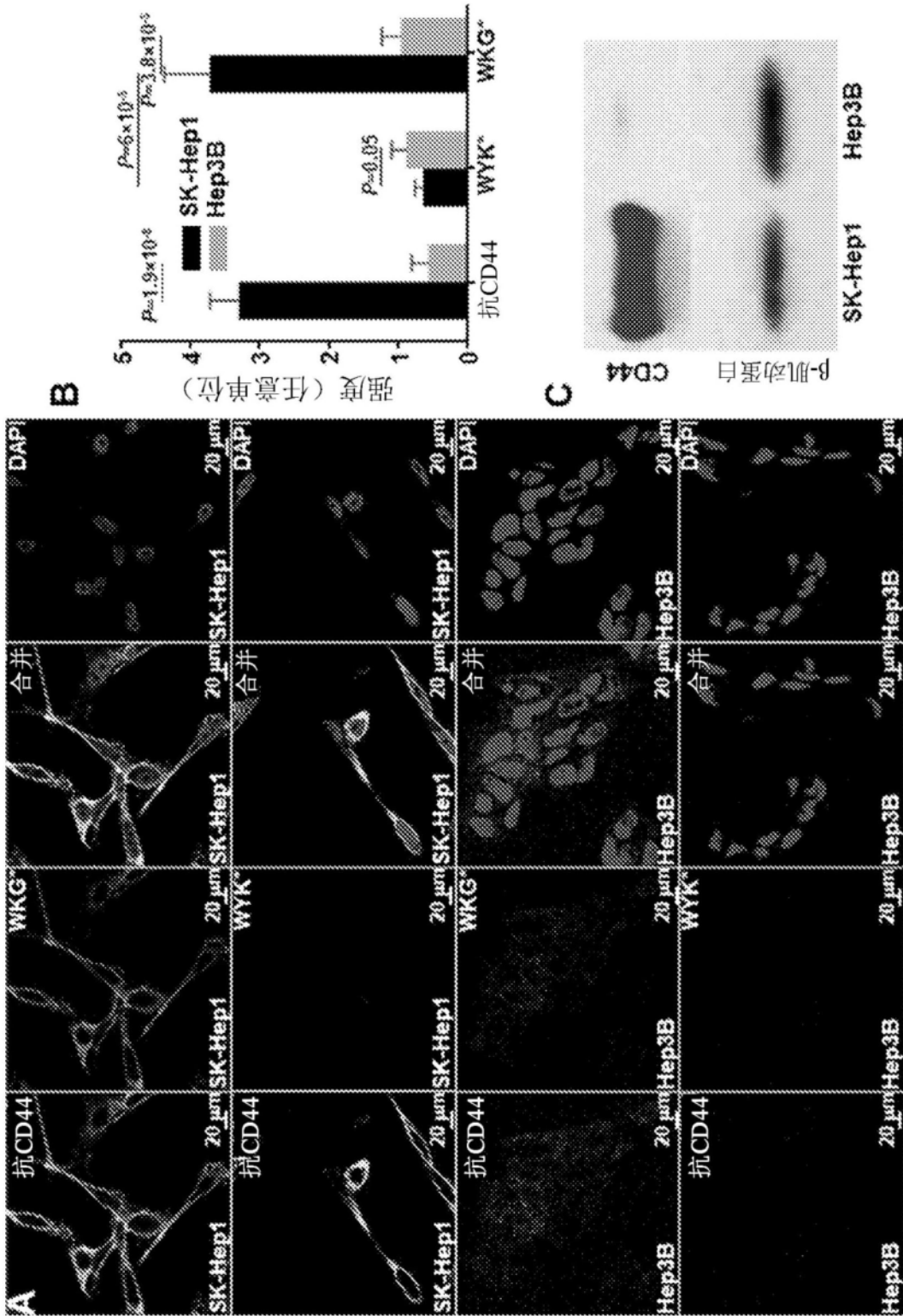


图9

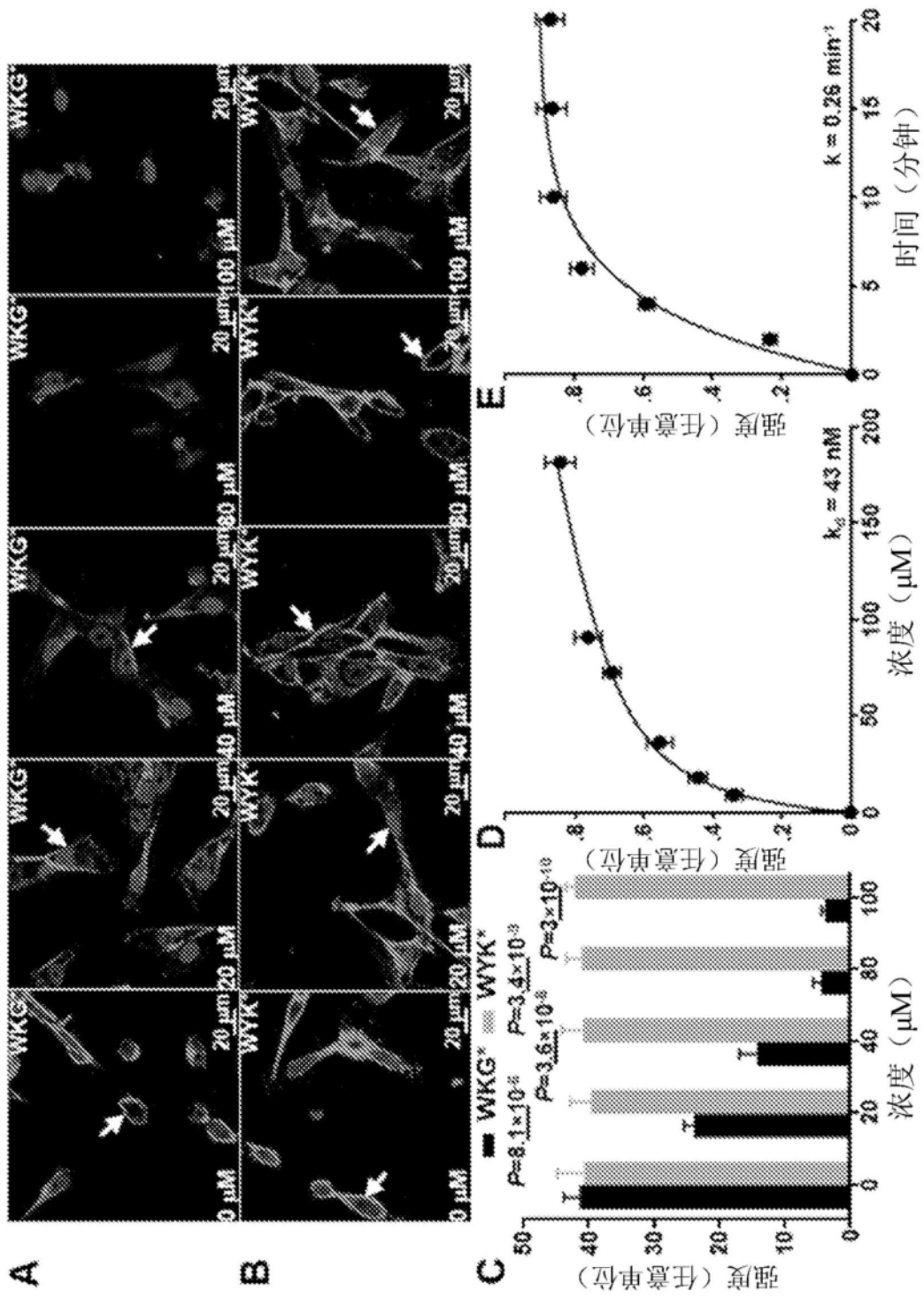


图10

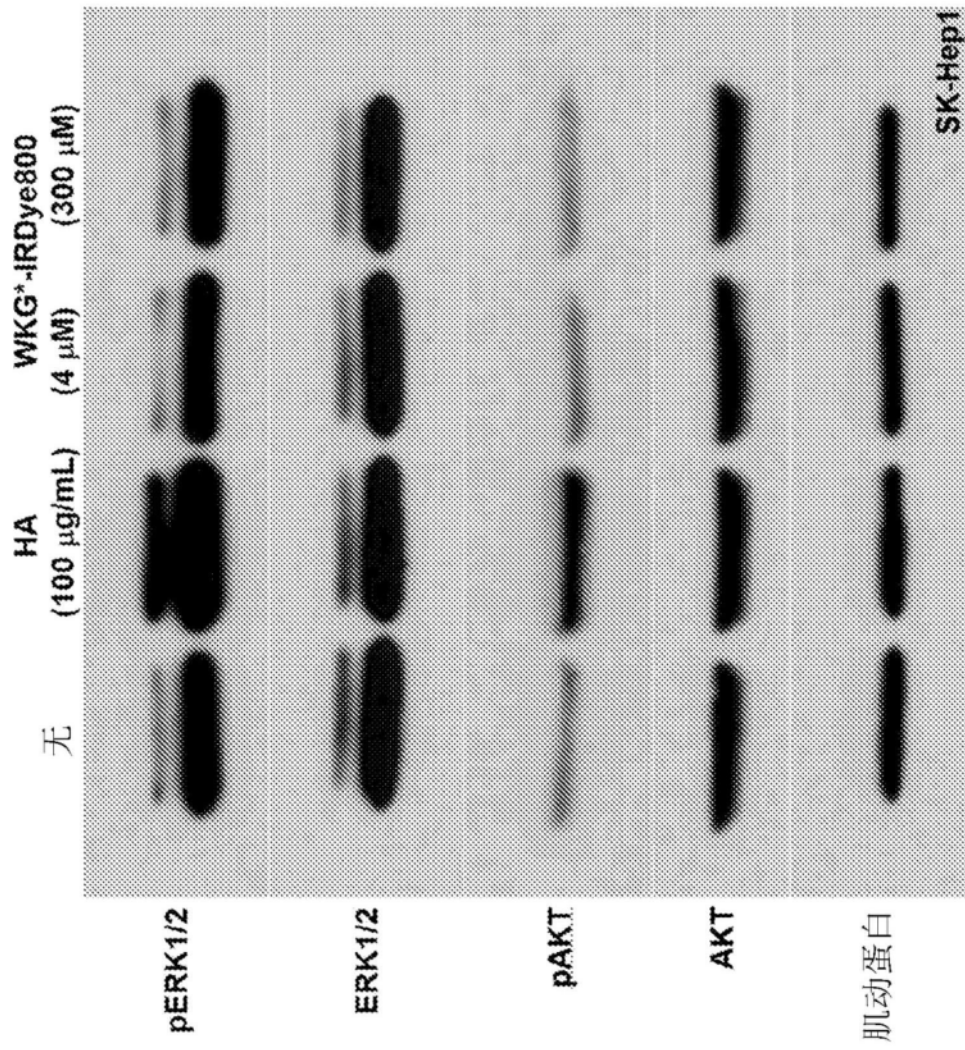


图11

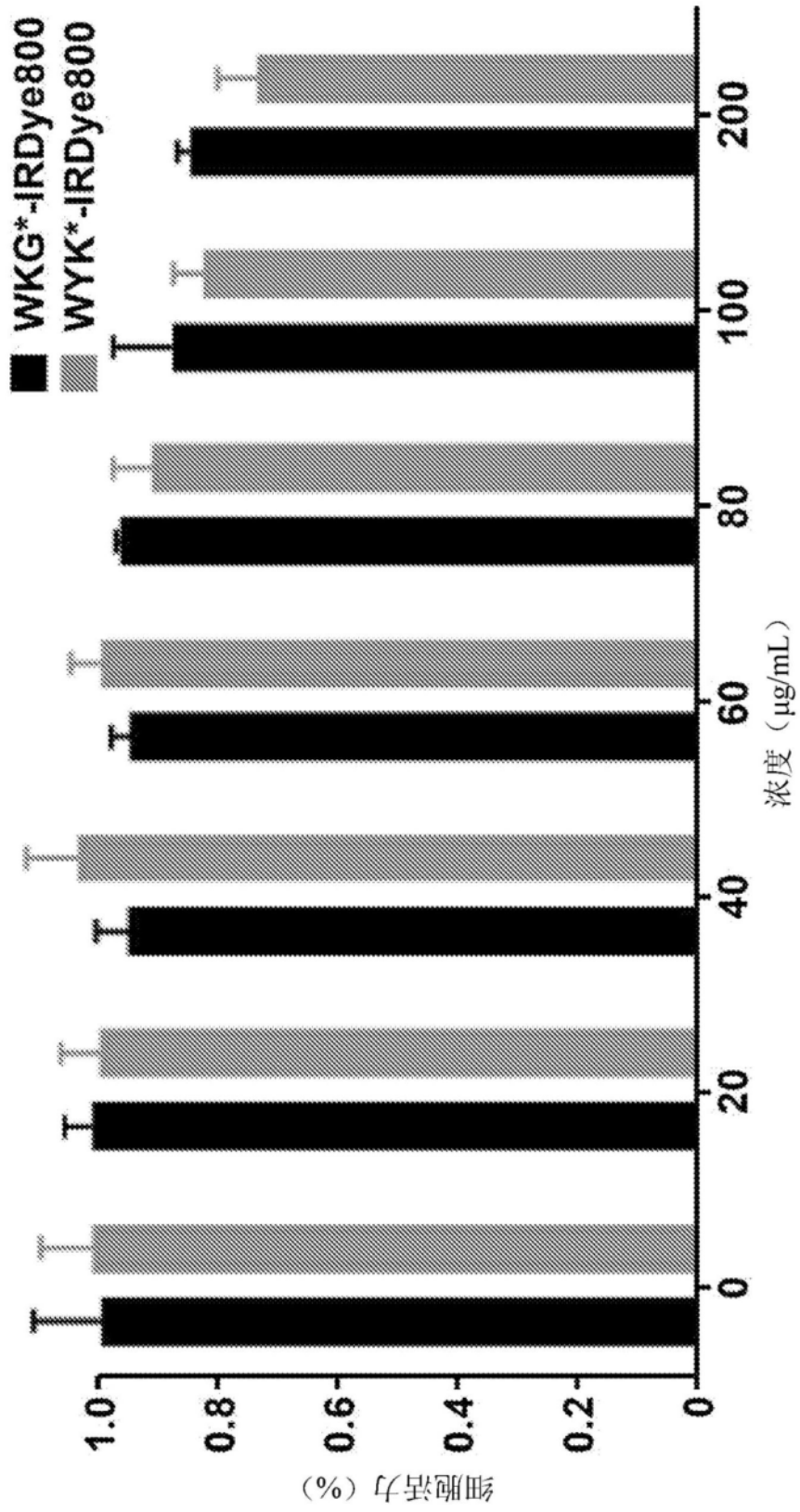


图12

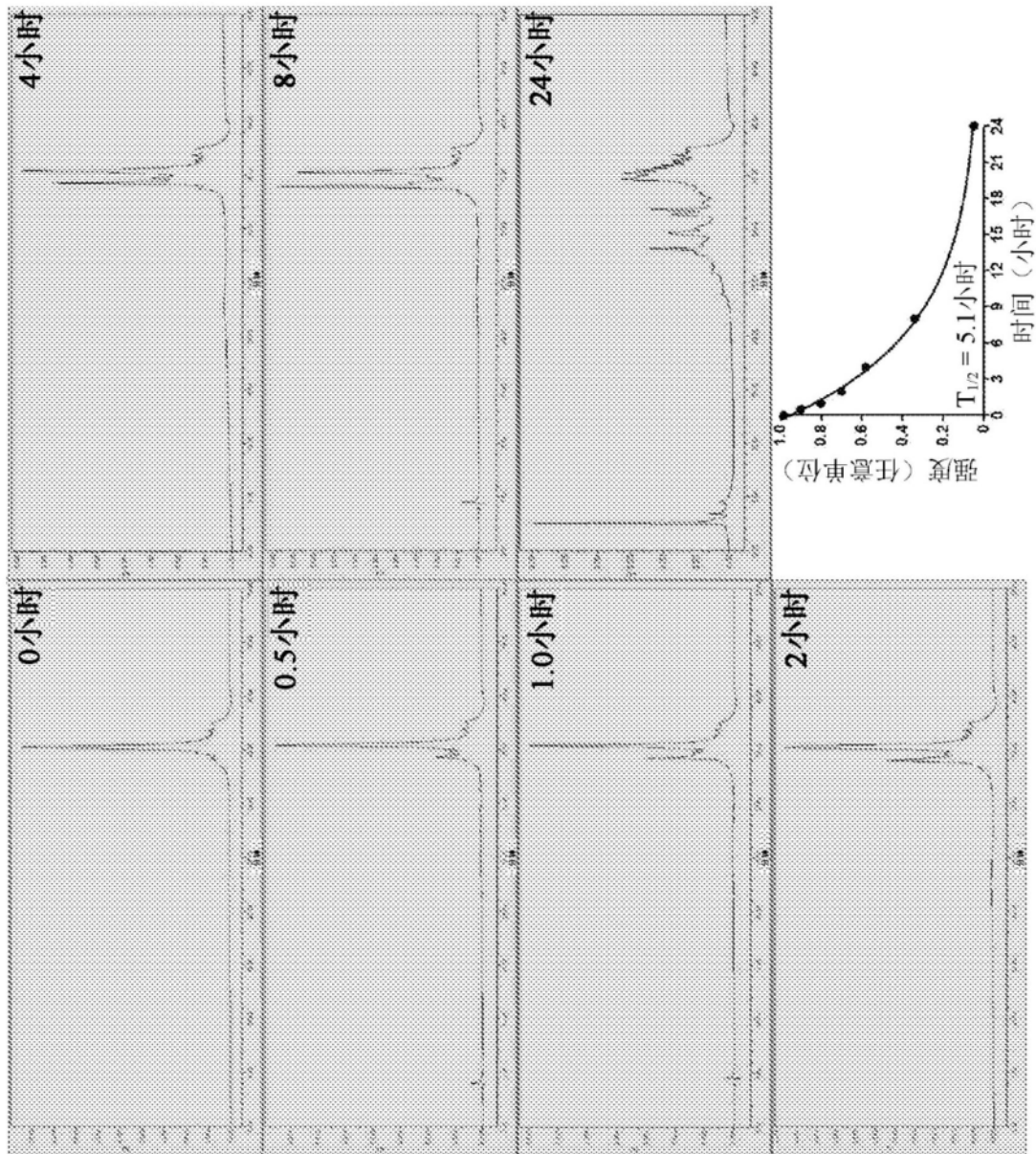


图13

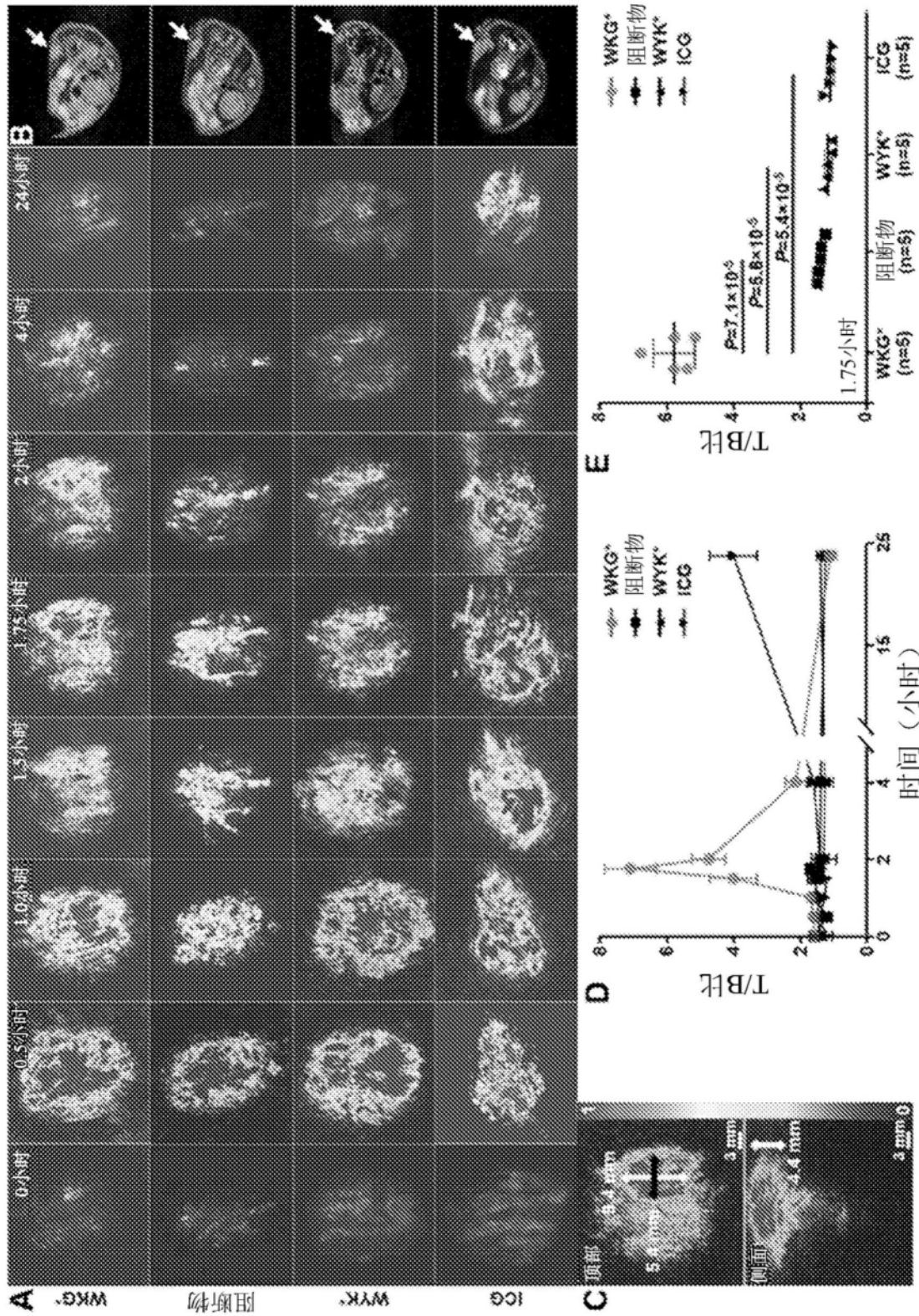


图14

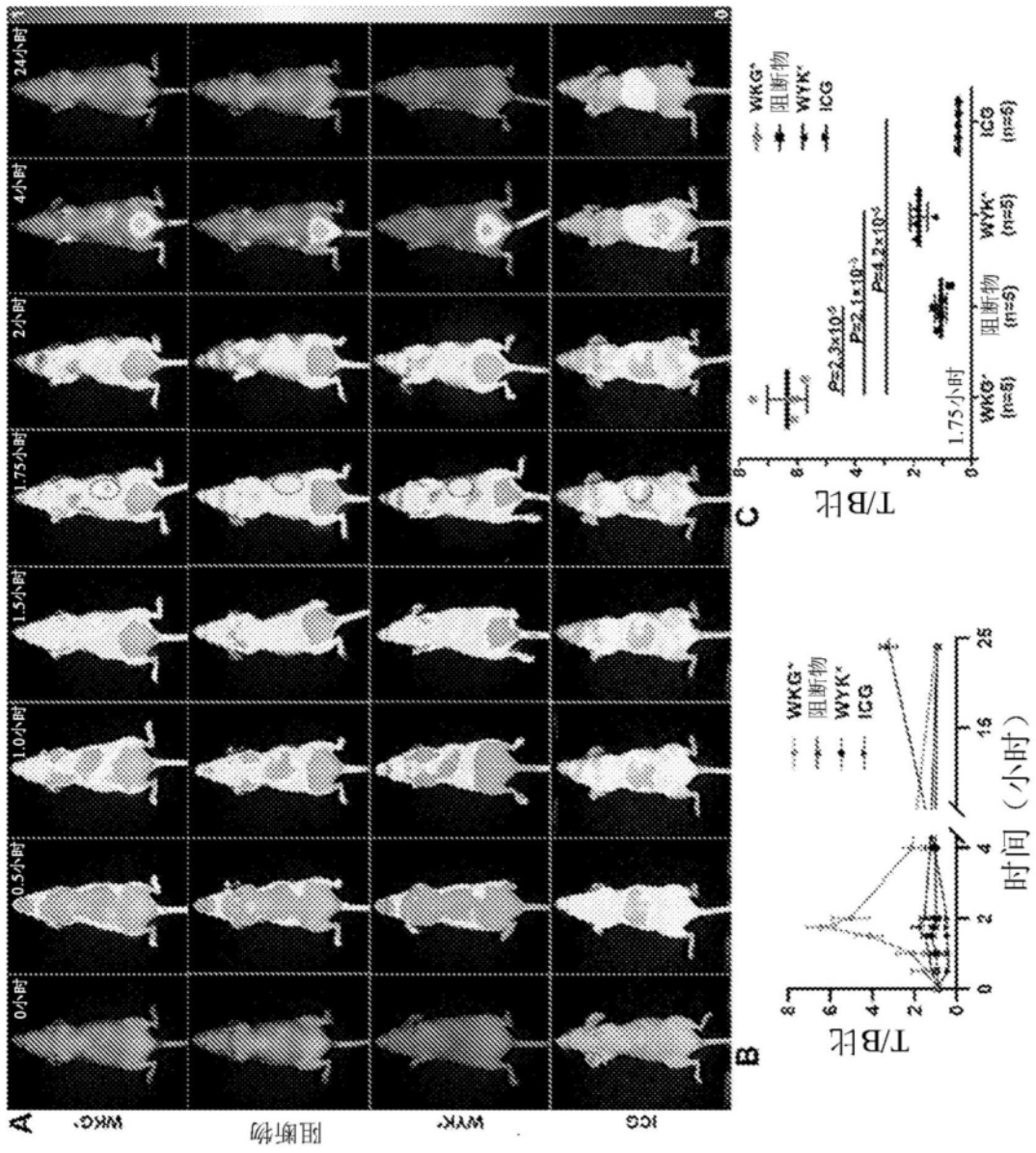


图15

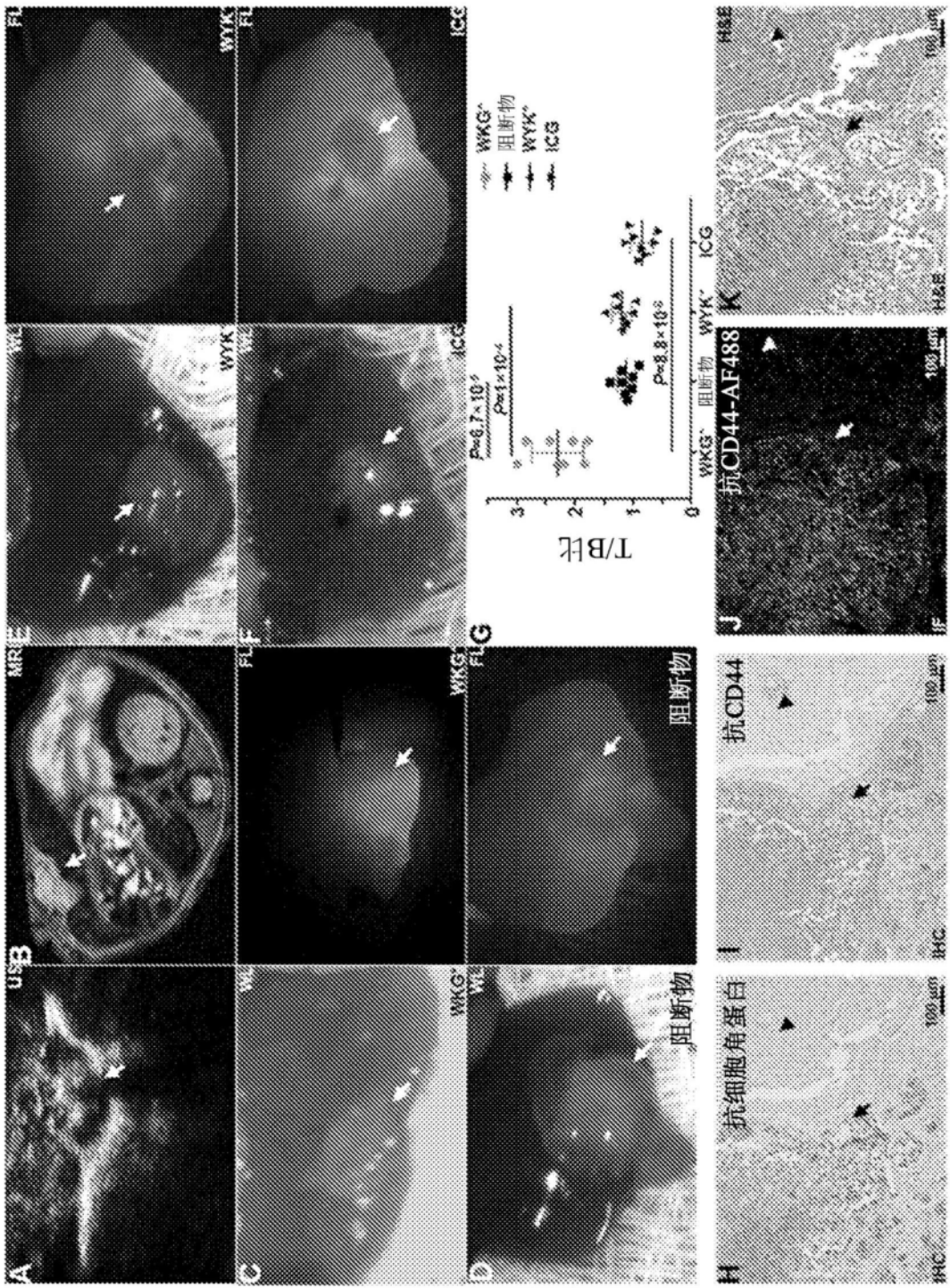


图16

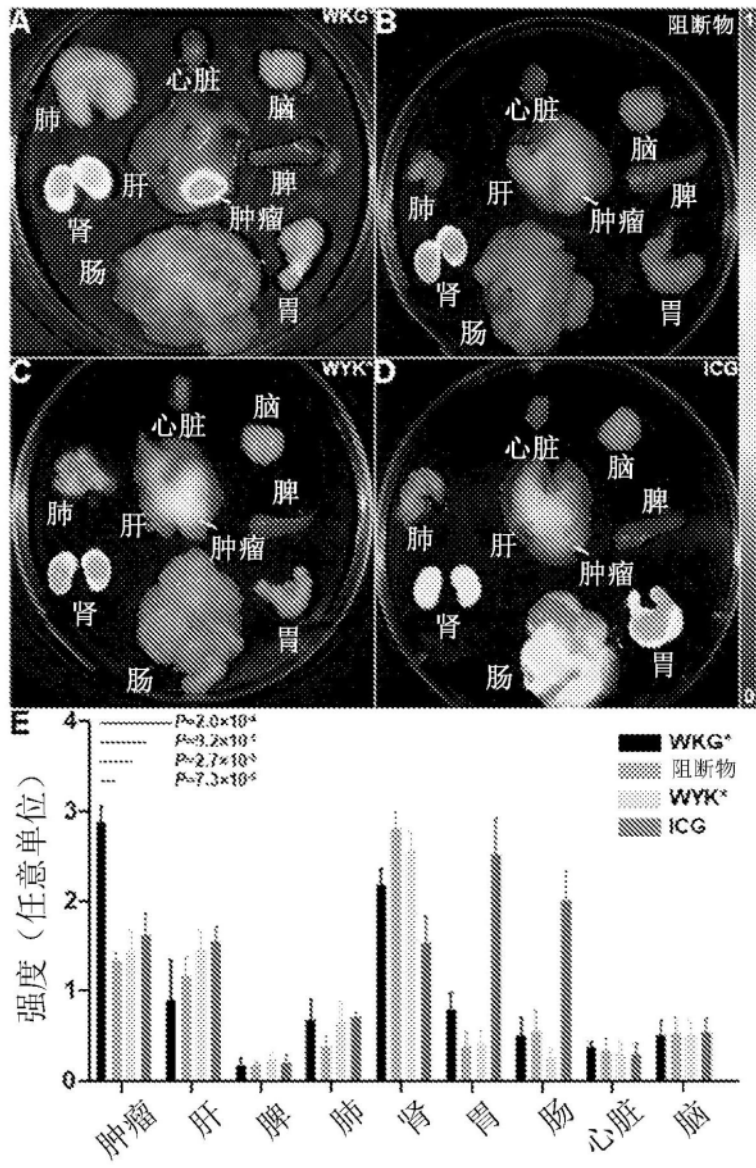


图17

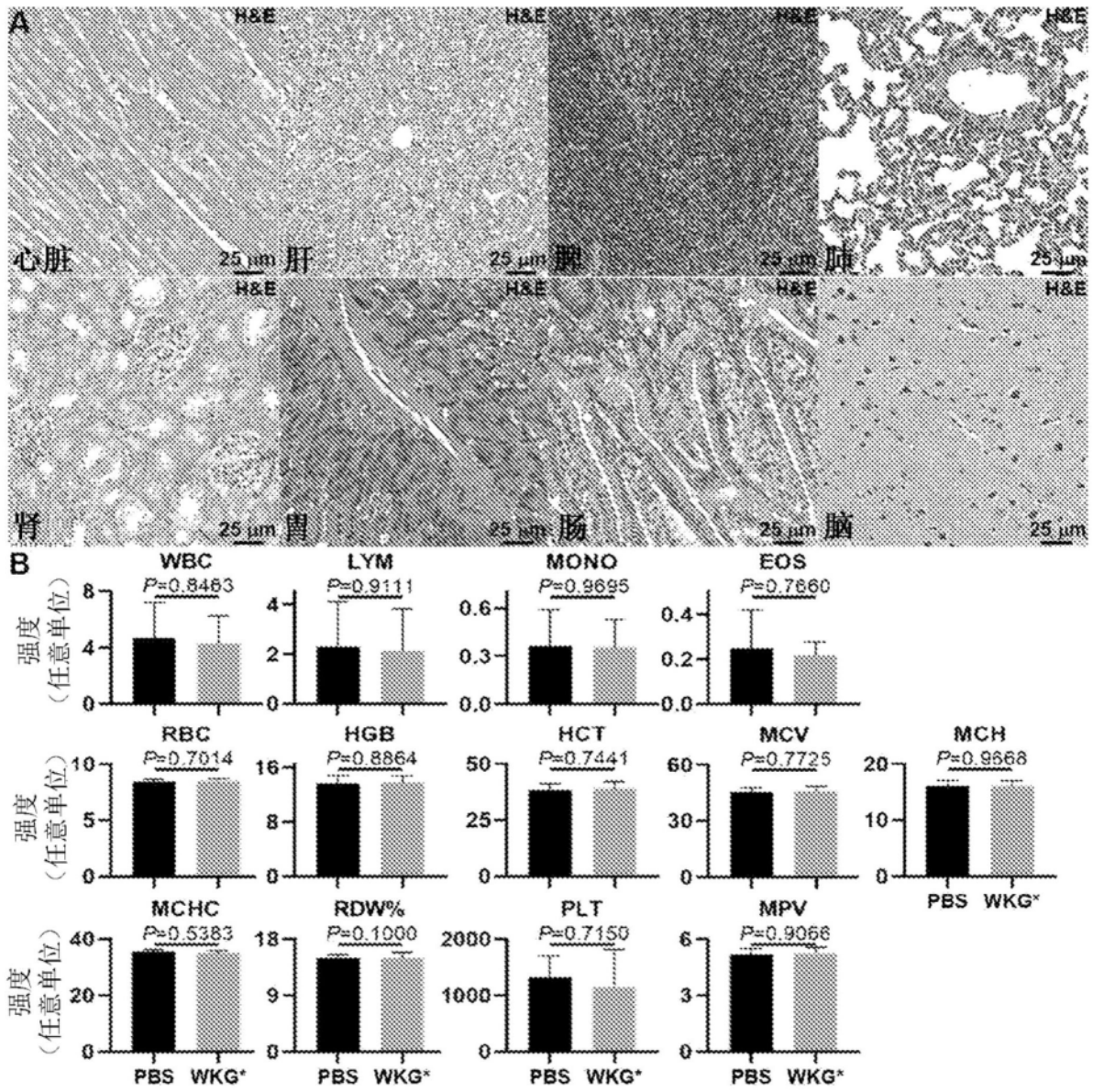


图18

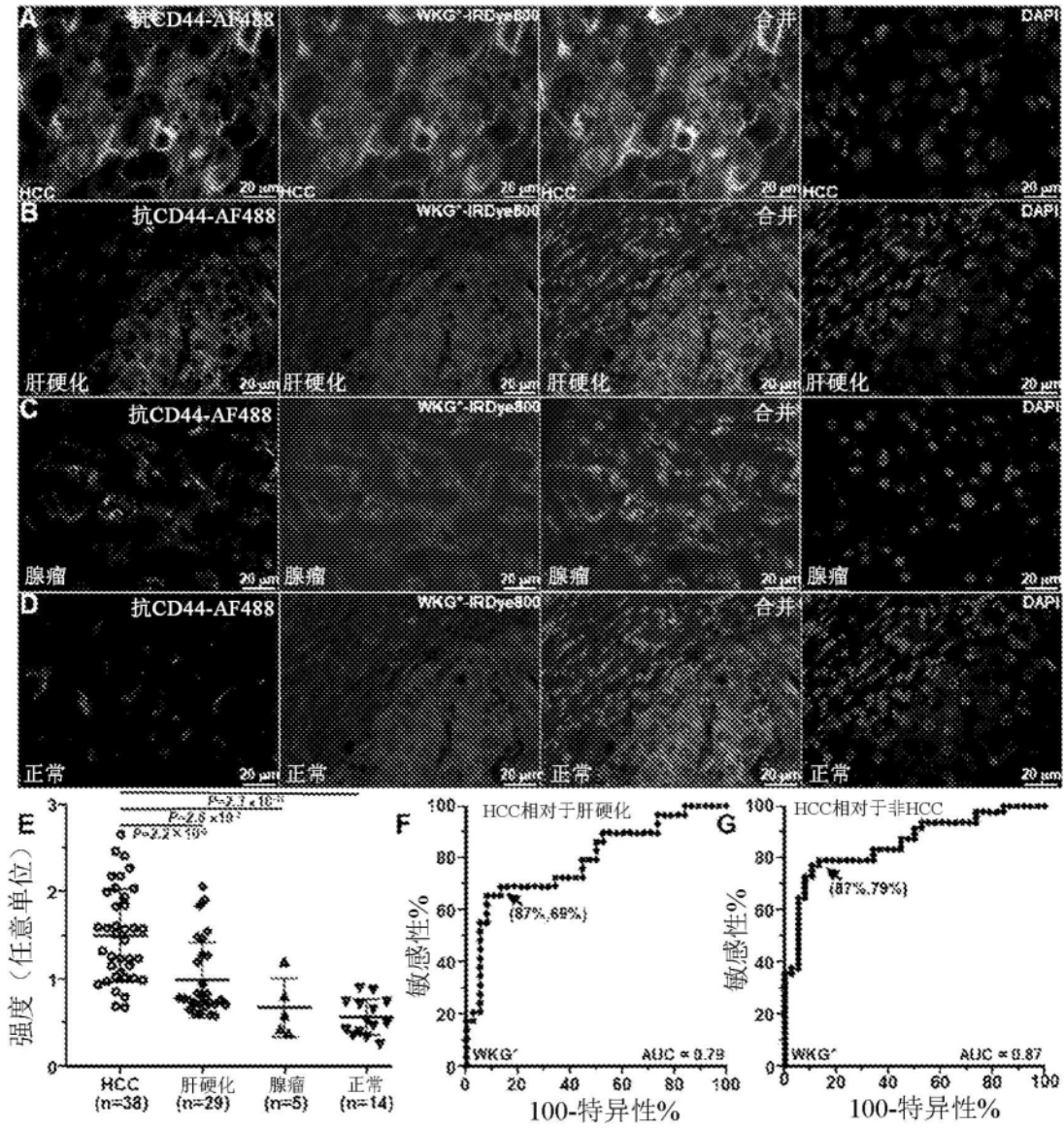


图19

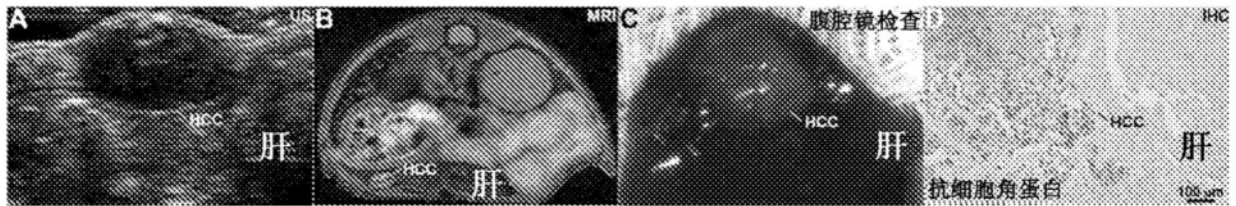


图20

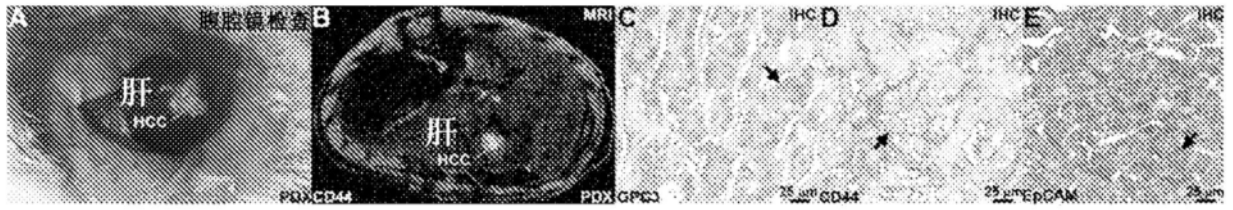


图21

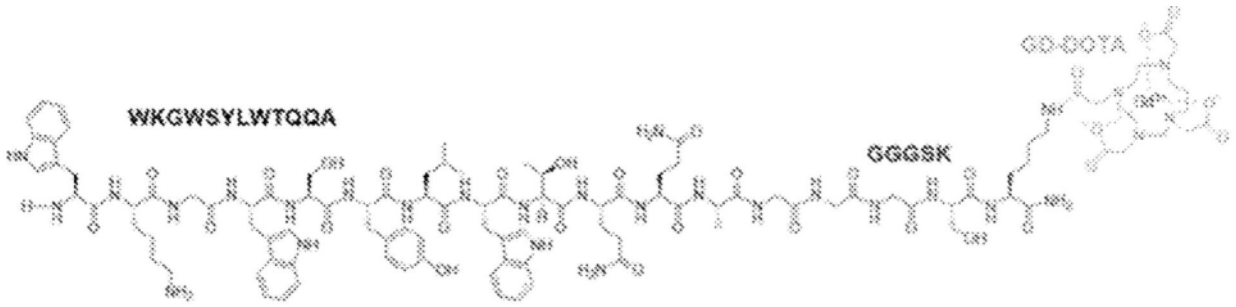


图22