



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110709102 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201880033583.4

(22)申请日 2018.02.16

(30)优先权数据

62/476,109 2017.03.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.11.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/000055 2018.02.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/174984 EN 2018.09.27

(71)申请人 耶鲁大学

地址 美国康涅狄格州

(72)发明人 D·吴 Q·肖

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 董志勇

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/00(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

权利要求书2页 说明书41页

序列表8页 附图48页

(54)发明名称

低密度脂蛋白受体相关蛋白5抑制阻抑肿瘤形成

(57)摘要

本发明涉及抑制Dickkopf 2(DKK2)和低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白5(LRP5)之间的交互作用和/或抑制LRP5阻抑肿瘤形成的发现。因此,在本文所述的各种实施方式中,本发明的方法涉及通过向患者施用有效量的阻断DKK2和LRP5之间的相互作用的抑制剂来治疗癌症的方法、通过向患者施用有效量的LRP5消耗剂来治疗癌症的方法、在受试者中提供抗肿瘤免疫的方法和/或在受试者中刺激对细胞群或组织的NK和T细胞介导的免疫反应的方法。此外,本发明包括用于治疗癌症的药物组合物。

1. 一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用在药学上可接受的载体中的有效量的抑制剂,所述抑制剂阻断Dickkopf 2 (DKK2) 与低密度脂蛋白(LDL) 受体相关蛋白5 (LRP5) 之间的相互作用。

2. 一种在受试者中提供抗肿瘤免疫的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的抑制剂以及药学上可接受的载体,所述抑制剂阻断Dickkopf 2 (DKK2) 与低密度脂蛋白(LDL) 受体相关蛋白质5 (LRP5) 之间的相互作用。

3. 一种在受试者中刺激对细胞群或组织的T细胞介导的免疫反应的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的抑制剂以及药学上可接受的载体,所述抑制剂阻断Dickkopf 2 (DKK2) 与低密度脂蛋白(LDL) 受体相关蛋白质5 (LRP5) 之间的相互作用。

4. 一种在受试者中刺激对细胞群或组织的自然杀伤(NK) 细胞免疫反应的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的抑制剂以及药学上可接受的载体,所述抑制剂阻断Dickkopf 2 (DKK2) 与低密度脂蛋白(LDL) 受体相关蛋白质5 (LRP5) 之间的相互作用。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述抑制剂是选自下列的至少一种: DKK2拮抗剂或其片段、DKK2抗体或其片段、LRP5拮抗剂或其片段、LRP5抗体或其片段、siRNA、核糖体、反义分子、适配体、拟肽物、小分子、CRISPR/Cas9编辑系统和其组合。

6. 根据权利要求1-4项中任一项所述的方法,其中所述DKK2抗体是5F8。

7. 一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用在药学上可接受的载体中的有效量的低密度脂蛋白(LDL) 受体相关蛋白质5 (LRP5) 基因消耗剂。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述LRP5消耗剂选自LRP5抗体、siRNA、核糖体、反义分子、适配体、拟肽物、小分子、CRISPR/Cas9编辑系统和其组合。

9. 根据权利要求7所述的方法,其中所述LRP5消耗剂具有中和活性。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述LRP5消耗剂不影响典型Wnt/ β -联蛋白信号传导。

11. 根据权利要求8所述的方法,其中所述LRP5抗体包括选自下列的抗体:多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、合成抗体、重链抗体、人类抗体、抗体的生物活性片段、抗体模拟物和其任何组合。

12. 根据权利要求7所述的方法,其中所述癌症选自结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌、肠癌、胰腺癌、食道癌、皮肤癌和肺癌。

13. 根据权利要求7所述的方法,进一步包括向所述受试者施用额外的药剂,所述额外的药剂选自化学治疗剂、抗细胞增殖剂、免疫治疗剂和其任何组合。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述额外的药剂是程序性细胞死亡1 (PD-1) 抗体。

15. 根据权利要求13所述的方法,其中所述LRP5消耗剂和所述额外的药剂共同施用于所述受试者。

16. 根据权利要求7所述的方法,其中所述施用的途径选自吸入、口服、直肠、阴道、肠胃外、局部、经皮、肺部、鼻内、口腔、眼部、鞘内和其任何组合。

17. 一种用于在受试者中治疗癌症的药物组合物,所述药物组合物包括LRP5消耗剂和药学上可接受的载体。

18. 根据权利要求17所述的药物组合物,其中所述LRP5消耗剂具有中和活性。

19. 根据权利要求17所述的药物组合物,其中所述LRP5消耗剂不影响典型Wnt/ β -联蛋白信号传导。

20. 根据权利要求17所述的药物组合物,其中所述LRP5消耗剂选自LRP5抗体、siRNA、核醣体、反义分子、适配体、拟肽物、小分子、CRISPR/Cas9编辑系统及其组合。

21. 根据权利要求20所述的药物组合物,其中所述LRP5抗体包括选自下列的抗体:多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、合成抗体、重链抗体、人类抗体、抗体的生物活性片段、抗体模拟物和任何组合。

22. 根据权利要求11所述的药物组合物,包括额外的药剂,所述额外的药剂选自化学治疗剂、抗细胞增殖剂、免疫治疗剂和其任何组合。

23. 根据权利要求22项所述的药物组合物,其中所述额外的药剂是程序性细胞死亡1 (PD-1) 抗体。

24. 根据权利要求22所述的药物组合物,其中所述癌症选自结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌、肠癌、胰腺癌、食道癌、皮肤癌和肺癌。

25. 一种用于在受试者中提供抗肿瘤免疫的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的LRP5抗体或其片段以及药学上可接受的载体。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述LRP5抗体包括选自下列的抗体:多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、合成抗体、重链抗体、人类抗体、抗体的生物活性片段、抗体模拟物和其任何组合。

27. 根据权利要求25所述的方法,进一步包括向所述受试者进一步施用额外的药剂,所述额外的药剂选自化学治疗剂、抗细胞增殖剂、免疫治疗剂和任何组合。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述额外的药剂是程序性细胞死亡1 (PD-1) 抗体。

29. 根据权利要求27所述的方法,其中所述LRP5抗体和所述额外的药剂共同施用于所述受试者。

30. 一种在受试者中刺激对细胞群或组织的T细胞介导的免疫反应的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的LRP5抗体或其片段以及药学上可接受的载体。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述LRP5抗体包括选自下列的抗体:多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、合成抗体、重链抗体、人类抗体、抗体的生物活性片段、抗体模拟物和其任何组合。

32. 根据权利要求30所述的方法,其中所述T细胞介导的免疫反应是CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 反应。

33. 一种在受试者刺激对细胞群或组织中的自然杀伤(NK) 细胞免疫反应的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的LRP5抗体或其片段以及药学上可接受的载体。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述LRP5抗体包括选自下列的抗体:多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、合成抗体、重链抗体、人类抗体、抗体的生物活性片段、抗体模拟物和其任何组合。

35. 根据权利要求1-4、7、25、30或33中任一项所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述哺乳动物是人类。

低密度脂蛋白受体相关蛋白5抑制阻碍肿瘤形成

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请依据35U.S.C.§119(e)要求以下美国临时专利申请的优先权:于2017年3月24日提交,申请号为62/476,109,该申请因而通过引用以其整体并入本文。

[0003] 关于联邦政府赞助研究或开发的声明

[0004] 本发明是以国立卫生研究院授予补助GM112182和CA214703,在政府支持下完成的。

[0005] 政府对本发明享有一定的权利。

背景技术

[0006] 癌症是造成人类死亡的主要原因。在过去的几十年中,癌症治疗和诊断方面有显著的进展。癌症的治疗选择包括手术、化学治疗、放射治疗和免疫治疗。最近,对于旨在刺激免疫系统的免疫治疗特别吸引了大量的研究目光。免疫系统识别并能够抑制癌症形成,然而,免疫检查点途径会被癌症改变或误导,以逃避免疫破坏,使得免疫系统受到免疫检查点途径的阻碍。扰乱免疫检查点的免疫治疗药物已显示临床疗效,其包括抗PD1、抗CTLA4和其他开发中的免疫治疗药物。检查点抑制剂已通过审查,并且在许多肿瘤的临床试验中显示效力证据,所述肿瘤包括晚期黑素瘤、鳞状NSCLC、和肾细胞恶性肿瘤及何杰金氏淋巴瘤,现有的检查点阻断抑制剂似乎对结肠直肠癌(CRC)不具有疗效(Brahmer, J., et al., 2012, N Engl J Med, 366:2455-2465; Chung, K., et al., 2010, J Clin Oncol, 28:3485-3490; Topalian, S. et al., 2015, Cancer Cell 27:450-461; Topalian, S. et al., 2012, N Engl J Med 366:2443-2454)。效用的这些变化性反映出已知的免疫检查点机制在不同癌症和/或个体患者中存在差异,并暗示还存在着尚未发现的肿瘤逃避(tumor evasion)机制。

[0007] 虽然免疫治疗可能是非常有效的,但只有少部分的患者(无论肿瘤起源的器官为何)通常对治疗有反应。显然在本领域中需要对于改善免疫治疗功效和特异性的新发现。

[0008] Wnt信号传导控制多种细胞过程,包括细胞命运决定(cell fate determination)、分化、极性、增殖和迁移。Wnt家族分泌蛋白结合数个种类的受体,例如低密度脂蛋白受体相关蛋白5及6(LRP5/6),导致数种不同的细胞内信号传导级联的活化,包括Wnt/ β -联蛋白(Wnt/ β -catenin)、Wnt/钙及Wnt/Jnk途径。Wnt与LRP5/6的结合通过阻断引发 β -联蛋白降解的多蛋白复合体(multiprotein complex)的功能,来特异性活化Wnt/ β -联蛋白途径,导致 β -联蛋白在细胞质及细胞核中的累积。核 β -联蛋白与Lef/TCF家族的转录因子成员复合并活化基因表达。尽管研究显示LRP5在非生理条件下的过度表达可以介导Wnt刺激的 β -联蛋白信号传导,但是体内丧失功能的研究暗示LRP6是调节 β -联蛋白信号传导的主导Wnt共同受体(co-receptor)。此外,取决于分析哪个组织,LRP5基因的失活对Wnt- β -联蛋白信号传导没有可检测的影响或仅有轻微影响。

[0009] 可能由于干细胞功能改变引起的病理状态,例如变性疾病和癌症,通常与Wnt/ β -联蛋白途径活性的改变有关。事实上,Wnt/ β -联蛋白途径的过度活化被认为诱导了干细胞的早衰(premature senescence)和与年龄相关的干细胞功能丧失(Brack et al., Science,

2007, Vol. 317 no. 5839 pp. 807-810; Liu et al., Science, 2007, Vol. 317 no. 5839 pp. 803-806)。在癌症中, Wnt/ β -联蛋白途径的过度活化——通常与其他细胞生长调节基因的突变结合, 可以导致异常的细胞生长 (Reya and Clevers, Nature, 2005, 434 (7035) : 843-50)。因此, 许多正在进行的研究集中于将Wnt/ β -联蛋白途径作为癌症的潜在治疗靶标 (Breuhahn et al., Oncogene, 2006, 25: 3787-3800; Greten et al., Br J Cancer, 2009, 100: 19-23)。具体而言, 包括癌症基因组测序计划在内的数个研究揭示超过80%的结肠癌具有突变, 甚至缺失腺瘤性结肠息肉病 (adenomatous polyposis coli, APC) 基因, 此基因是Wnt/ β -联蛋白途径的主要阻抑因子 (Kinzler and Vogelstein, Cell, 1996, Oct 18; 87 (2) : 159-70. Review; Sjoblom et al., Science, 2006, Oct 13; 314 (5797) : 268-74; Mann et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96 (4) : p. 1603-8)。APC与例如GSK3 β 和Axin等的蛋白质形成复合体, 其标记 β -联蛋白进行降解。APC中的突变破坏这种复合体, 并导致细胞质 β -联蛋白的水平增加及其核易位 (translocation)。由于 β -联蛋白是Wnt信号传导的最重要的衔接头, 响应于Wnt配体, 其促进致癌因子的表达。

[0010] Wnt信号传导也受到许多分泌型多肽拮抗剂的调控。这些包括四种分泌型 Dickkopf (DKK) 蛋白 (Monaghan et al., Mech Dev, 1999, 87: 45-56; Krupnik et al., Gene, 1999, 238: 301-13)。在这四种DKK蛋白质中, DKK1、2及4已被证实是典型Wnt信号传导的有效拮抗剂 (Mao et al., Nature, 2001, 411: 321-5; Semenov et al., Curr Biol, 2001, 11: 951-61; Bafico et al., Nat Cell Biol, 2001, 3: 683-6; Niehrs, Nature, 2006, 25: 7469-81), 其以高亲和力与Wnt共同受体LRP 5/6直接结合 (Mao et al., Nature, 2001, 411: 321-5; Semenov et al., Curr Biol, 2001, 11: 951-61; Bafico et al., Nat Cell Biol, 2001, 3: 683-6)。鉴于DKK蛋白是Wnt拮抗剂, 传统的观点是DKK的失活将增加Wnt活性, 并因此加速癌症形成。

[0011] DKK分子含有两个保守的富含半胱氨酸的结构域 (Niehrs, Nature, 2006, 25: 7469-81)。先前, 已显示DKK1和DKK2的第二富含Cys的结构域在抑制典型Wnt信号传导中起更重要的作用 (Li et al., J Biol Chem, 2002, 277: 5977-81; Brott and Sokol Mol. Cell. Biol., 2002, 22: 6100-10)。近来, DKK2的第二富含Cys的结构域的结构已被解开, 并界定了DKK与LRP5/6及Kremens相互作用所需的结构域上的氨基酸残基 (Chen et al., J Biol Chem, 2008, 283: 23364-70; Wang et al., J Biol Chem, 2008, 283: 23371-5)。DKK与LRP5/6的相互作用构成了DKK介导的Wnt抑制作用的主要机制。尽管DKK与Kremen (也是跨膜蛋白) 的相互作用显示促进了Wnt信号传导的DKK拮抗作用, 但这种相互作用可能具有其他尚未解开的功能。

[0012] Wnt信号传导也受到Wnt共同受体LRP 5/6的介导。LRP5在调节骨质量方面起基础作用。丧失LRP5功能突变已显示导致常染色体隐性疾病, 其特征为低骨质量, 而获得LRP5功能突变已在常染色体显性高骨质量中鉴定。DKK蛋白质与经由Wnt信号传导调控骨形成和骨损失 (在癌症和其他疾病中) 有关。然而, 尚未直接研究在不改变Wnt信号传导活性的情况下经由Wnt共同受体LRP5/6的DKK介导的信号传导的可能性。

[0013] 显然需要新的方法来减少癌细胞增殖、触发癌细胞死亡和治疗癌症。本发明满足了这些需求。此外, 本发明满足了改善抗癌免疫治疗及癌症诊断的需求。

发明内容

[0014] 本发明涉及在有需要的受试者中治疗癌症的组合物和方法。治疗癌症的方法包括向受试者施用在药学上可接受的载体中的有效量的抑制剂,该抑制剂阻断Dickkopf 2 (DKK2) 与低密度脂蛋白 (LDL) 受体相关蛋白质5 (LRP5) 之间的相互作用。

[0015] 在另一方面中,本发明提供在受试者中提供抗肿瘤免疫的方法。该方法包括向受试者施用有效量的抑制剂以及药学上可接受的载体,该抑制剂阻断DKK2与LRP5之间的相互作用。在另一方面中,本发明提供在受试者中刺激对细胞群或组织的T细胞介导的免疫反应的方法。该方法包括向受试者施用有效量的抑制剂以及药学上可接受的载体,该抑制剂阻断DKK2与LRP5之间的相互作用。在另一方面中,本发明提供在受试者中刺激对细胞群或组织的自然杀伤(NK) 细胞免疫反应的方法。该方法包括向受试者施用有效量的抑制剂以及药学上可接受的载体,该抑制剂阻断DKK2与LRP5之间的相互作用。

[0016] 在一些实施方式中,抑制剂是选自于下列的至少一种:DKK2拮抗剂或其片段、DKK2抗体或其片段、LRP5拮抗剂或其片段、LRP5抗体或其片段、siRNA、核糖体、反义分子、适配体、拟肽物(peptidomimetic)、小分子、CRISPR/Cas9编辑系统和其组合。在其他实施方式中,DKK2抗体是5F8。

[0017] 在又一方面中,本发明包括通过向受试者施用在药学上可接受的载体中的有效量的LRP5基因消耗剂(depleting agent) 治疗癌症的方法。

[0018] 在另一方面中,本发明包括用于在受试者中治疗癌症的药物组合物。本发明的药物组合物包括LRP5消耗剂和药学上可接受的载体。

[0019] 在又一其他方面中,本发明提供用于在受试者中提供抗肿瘤免疫的方法。该方法包括向受试者施用有效量的LRP5抗体或其片段以及药学上可接受的载体。在另一方面中,本发明提供在受试者中刺激对细胞群或组织的T细胞介导的免疫反应的方法。该方法包括向受试者施用有效量的LRP5抗体或其片段以及药学上可接受的载体。在一些实施方式中,T细胞介导的免疫反应是CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(CTL) 反应。在另一方面中,本发明提供在受试者刺激对细胞群或组织中的自然杀伤(NK) 细胞免疫反应的方法。该方法包括向受试者施用有效量的LRP5抗体或其片段以及药学上可接受的载体。

[0020] 在一些实施方式中,LRP5消耗剂选自LRP5抗体、siRNA、核糖体、反义分子、适配体、拟肽物、小分子、CRISPR/Cas9编辑系统和其组合。在其他实施方式中,LRP5消耗剂具有中和活性。在又一其他实施方式中,LRP5消耗剂不影响典型Wnt/ β -联蛋白信号传导。

[0021] 在一些实施方式中,LRP5抗体包括选自下列的抗体:多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、合成抗体、重链抗体、人类抗体、抗体的生物活性片段、抗体模拟物和其任何组合。

[0022] 在其他实施方式中,癌症选自结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌、肠癌、胰腺癌、食道癌、皮肤癌和肺癌。

[0023] 在一些实施方式中,本发明的方法和组合物包括额外的药剂,其选自化学治疗剂、抗细胞增殖剂、免疫治疗剂和其任何组合。在其他实施方式中,额外的药剂是程序性细胞死亡1 (PD-1) 抗体。在其他实施方式中,LRP5消耗剂和额外的药剂共同施用于受试者。在又一其他实施方式中,施用的途径选自吸入、口服、直肠、阴道、肠胃外、局部、经皮、肺部、鼻内、口腔、眼部、鞘内和其任何组合。

[0024] 在一些实施方式中,受试者是哺乳动物。在其他实施方式中,哺乳动物是人类。

附图说明

[0025] 为了说明本发明,在附图中描绘了本发明的某些实施方式。然而,本发明不限于附图中所描绘的实施方式的精确安排和手段。

[0026] 图1A-1G是一系列的柱形图和图片,其图解说明DKK2阻断减少了APCK0 ($APC^{Min}DKK2^{-/-}$)小鼠中的肿瘤负荷。图1A-C:DKK2基因的基因破坏降低了 $APC^{Min/+}$ 小鼠中的肿瘤负荷。同窝出生的小鼠在特定的无病原体条件下饲养(house)20周(雌性)或22周(雄性)。图1A:肿瘤/息肉数量 $n>5$,** $P<0.01$ 。图1B:肿瘤/息肉尺寸:APCK0肿瘤倾向小于APC小鼠的肿瘤, $n>5$,** $P<0.01$;* $P<0.05$ 。图1C:代表性苏木精-伊红染色(H and E staining)揭示APCK0小鼠中肿瘤较小及肿瘤出现的频率较少。图1D:ELISA结果显示5F8特异性地结合DKK2蛋白,但不结合DKK1蛋白。图1E:5F8拮抗DKK2介导的由Wnt3A诱发的Wnt报道基因活性的抑制。HEK293细胞用Wnt报道基因TOPFlash进行转染,并用Wnt3A条件培养基(CM)、DKK2 CM或5F8(120nM)进行处理。图1F:5F8抑制DKK2与LRP5的结合。用LacZ(对照)或LRP5表达质粒转染HEK293细胞。在存在或不存在5F8(120nM)的情况下,测量DKK2-AP融合蛋白与细胞的结合。图1G:5F8降低 $APC^{Min/+}$ 小鼠的肿瘤负荷。用5F8和IgG3(8mg/kg,每周两次,腹膜内注射)处理小鼠(10周,雌性)8周。肿瘤/息肉数量 $n=8$,** $P<0.01$ 。

[0027] 图2A-2H是一系列图表、柱形图和图片,其图解说明DKK2阻断通过增加细胞凋亡抑制肿瘤进展,如通过升高的粒酶B(gzmb)和活化的胱天蛋白酶3(Act. 胱天蛋白酶3)所测量的,但不会改变细胞的增殖或血管发生。图2A-2B和图2D-2G:使用同基因小鼠肿瘤模型,其中C57BL小鼠被皮下接种 3×10^3 个MC38细胞。从第14天开始进行5F8治疗(10mg/kg,每三天一次,腹腔内注射)。图2A:肿瘤体积和重量。在第14、17、20和22天收集肿瘤用以确定尺寸。第22天收集肿瘤用以称重。 $n=5$,** $P<0.01$; $n=5$ 。图2B:存活评估。用5F8处理的小鼠的存活率得以改善。 $n=10$ 。图2C:5F8不影响培养中的MC38细胞生长。图2D-2G:5F8处理不改变肿瘤血管发生(图2D)或肿瘤细胞增殖(图2E),但5F8处理显著增加了切除肿瘤内的细胞凋亡(图2F)和粒酶B阳性细胞(图2G)。对图2A中收集的肿瘤切片进行CD31、Ki67、活化的胱天蛋白酶3或粒酶B的染色,并用DAPI进行对比染色(counter-stained)。 $n=5$,** $P<0.01$ 。图2H:DKK2缺陷增加 $APC^{Min/+}$ 小鼠息肉中的细胞凋亡和粒酶B阳性细胞。从 $APC^{Min/+}$ 和 $APC^{Min/+}DKK2^{-/-}$ 小鼠(20周)收集的息肉组织切片用活化的胱天蛋白酶3抗体或粒酶B抗体以及DAPI进行染色。比例尺为150 μ m。

[0028] 图3A-3J是一系列图表及柱形图,其证明DKK2阻断增强了细胞毒性免疫细胞活化。图3A-3B:5F8无法改变NOD scid gamma(NSG)小鼠中的肿瘤进展。在NSG小鼠($n=5$)中皮下注射接种MC38细胞(5×10^3),并在第6天开始用5F8或IgG对照(10mg/kg,每三天一次)进行处理。图3C-3H:在急性5F8处理24小时后,流式细胞术分析肿瘤浸润的白细胞。在C57BL小鼠中以皮下注射接种MC38细胞(1×10^5)。当肿瘤达到600mm³的平均大小时,给小鼠注射一次5F8(10mg/kg,腹腔内注射)。在24小时内收集肿瘤以进行流式细胞术分析。图3C-3D:CD8⁺细胞或NK细胞的细胞群大小没有变化。图3E-3F:用5F8处理,相对于对照IgG,粒酶b(gzmb)大幅地上调。图3G-3H:急性5F8处理会诱发CD8⁺和NK细胞的活化标志物的显著增加。图3C针对CD45进行预设门(pre-gated),而图3D、3E和3G衍生自图3C。图3F衍生自图3D。MFI,平均荧光

强度。 $n=10$, ** $P<0.01$; * $P<0.05$ 。图3I-3J: NK1.1+或CD8+细胞的消耗 (depletion) 减少了5F8的肿瘤抑制作用。C57BL小鼠皮下注射接种 5×10^3 个MC38细胞。为了消耗NK细胞,在肿瘤细胞接种的第-1、5、11和17天以300ug/小鼠的剂量在腹腔内注射抗NK1.1 (anti-NK1.1) 或同种型 (Iso) 对照。为了CD8+消耗,在肿瘤细胞接种的第12、15和19天以300ug/小鼠的剂量在腹腔内注射抗CD8 α (anti-CD8 α) 或同种型对照。在NK细胞消耗实验的第12天开始5F8处理 (10mg/kg, 每三天一次, 腹腔内注射); 而对CD8+细胞消耗实验, 在第13天开始5F8处理 (10mg/kg, 每三天一次, 腹腔内注射)。 $n=5$; ** $P<0.01$; * $P<0.05$ 。

[0029] 图4A-4H是一系列图表及柱形图,其图解说明了DKK2抑制NK细胞活化。图4A-4D: 用5F8抗体处理NK细胞和肿瘤细胞的共培养物增加NK细胞中的粒酶b (gzmb) 并降低肿瘤细胞存活率。5F8的重演 (recapitulation) 对共培养物中的NK细胞和肿瘤细胞造成影响。将用IL-15扩增的初代小鼠NK细胞加入YUMM1.7或MC38细胞中, YUMM1.7或MC38细胞在之前一天在存在5F8或IgG3 (250nM) 持续9小时情况下进行接种。通过流式细胞术检查NK细胞中的粒酶B表达 (图4A, 图4D), 而通过Guava细胞计数器检测活肿瘤细胞 (图4B-4C)。图4A: 流式细胞术显示在与YUMM1.7细胞或与MC38细胞共培养的NK细胞中, gzmb上调。图4B-4C: 流式细胞术证实与IgG对照处理相比, 当用5F8处理共培养物时, 肿瘤细胞存活率降低。图4D: 单独5F8处理初代NK细胞不会增强粒酶B的产生。图4E-4F: DKK2直接抑制NK活性及粒酶B (gzmb) 的产生。分离的初代小鼠NK细胞用IL-15 (50ng/ml) 培养24小时。接着加入DKK2蛋白 (8nM) 持续另外24小时, 然后进行流式细胞术分析。 $n>3$; ** $P<0.01$; * $P<0.05$ 。图4G: DKK2处理的NK细胞显示降低的细胞毒活性。初代NK细胞在IL-15 (50ng/ml) 中扩增24小时, 然后用或不用DKK2 (8nM) 处理24小时。接着, 将NK细胞加入前一天以7:1比例接种的MC38细胞中。在共培养6小时后测定凋亡的MC38细胞的数量, 并且在共培养9小时后测定活MC38细胞的数量。[-]: 未添加, ** $P<0.01$ 。图4H: WNT3A或GSK抑制剂不影响NK活化。分离的初代小鼠NK细胞用IL-15 (50ng/ml) 培养24小时。接着, 加入DKK2蛋白 (8nM)、WNT3a (2nM) 和GSK3抑制剂CHIR99021 (CHIR, 1 μ M) 持续另外24小时, 然后进行流式细胞术分析。 $n>3$; ** $P<0.01$; * $P<0.05$ 。

[0030] 图5A-5E是一系列图片,其描绘DKK2阻碍磷酸-STAT5 (phospho-STAT5) 核定位。图5A-5C: DKK损害磷酸STAT5核定位。初代小鼠NK细胞如图4E中制备和处理。图5A: 蛋白质印迹分析显示用DKK2处理降低了粒酶b及穿孔蛋白 (perforin) 的水平。图5B: 用DKK2处理可检测到磷酸-STAT的细胞质定位。使用抗磷酸-STAT5、抗RAB8 (作为细胞质标记) 及DAPI进行免疫染色, 接着使用 AlexaFluor®647及FITC标记的二级抗体。比例尺为5 μ m。图5C: 在从5F8-处理的肿瘤分离的NK细胞中, 磷酸-STAT5的细胞质定位下降。通过FACS, 从用IgG3或5F8处理6天 (10mg/kg注射两次) 的MC38肿瘤, 分离肿瘤浸润的NK细胞。将细胞固定、透化并用抗RAB8 (胞质标记)、抗磷酸-STAT5 (anti-p-STAT5) 和DAPI进行染色, 接着使用 AlexaFluor®647及FITC标记的二级抗体。比例尺为5 μ m。图5D-5E: 利用DKK2处理, 磷酸-STAT5与早期/再循环内体 (early/recycling endosomes) 中的EEA1共定位, 但不与晚期内体标记LAMP1共定位。初代小鼠NK细胞如A中制备和处理, 随后使用抗磷酸-STAT5、DAPI和抗EEA-1 (图5D) 或抗LAMP1 (图5E) 进行免疫染色, 接着使用 AlexaFluor®647及FITC标记的二级抗体。比例尺为5 μ m。

[0031] 图6A-6I是一系列图表、柱形图和图片,其证明DKK2-介导的NK活化的抑制需要LRP5。图6A-6B: 从WT和LRP5-/-小鼠制备初代小鼠NK细胞, 并如上所述的进行处理, 接着进

行流式细胞术和蛋白质印迹分析(图6A)及以如图5B所述的免疫染色(图6B)。图6A:DKK2未抑制LRP5^{-/-}细胞中的NK细胞活化。蛋白质印迹证实LRP5^{-/-}细胞缺乏LRP5蛋白,但维持正常LRP6蛋白表达水平。图6B:DKK2未损害LRP5^{-/-}细胞中的磷酸-STAT5定位,使其定位于细胞核而非内体。在WT细胞中,DKK2处理诱使磷酸-STAT5定位至内体。图6C:造血(Hematopoietic)LRP5缺陷损害移殖的MC38肿瘤进展,并消除5F8对肿瘤进展的影响。接受LRP5^{f/f}/fMX1Cre(LRP5^{-/-})或LRP5^{f/f}(WT)骨髓的C57BL小鼠用poly-I:C处理,然后皮下注射接种 5×10^3 个MC38细胞。在第12、17及20天给予5F8处理(10mg/kg,腹腔内注射)** $P < 0.01$ 。图6D:在转染的HEK293细胞中,将LRP5胞内结构域C(LRP5C)和STAT5进行共免疫沉淀。图6E-6F:在重构的HEK293细胞中,LRP5C抑制通过IL-15诱导的STAT5报道基因活性。用表达JAK3、IL2/15R β 及共同 γ 亚单元(common γ subunit, R γ c)的慢病毒感染细胞。接着,用LRP5胞内结构域(LRP5C)、STAT5-1uc报道基因和RFP(内部对照)的质粒转染细胞24小时。在报道基因试验(图6E)和蛋白质印迹分析(图6F)之前,细胞用IL-15及IL15R α -Fc刺激6小时。图6G-6H:LRP5C抑制由活化的JAK1诱导的STAT5报道基因活性,但不影响STAT5磷酸化。如所指示的,将STAT5报道基因质粒和带有活化JAK1(JAK1CA, V658F)和LRP5C的质粒对HEK293细胞进行共转染。24小时后,分析细胞的报道基因活性,或者通过蛋白质印迹(图6G)或用磷酸-STAT5抗体和DAPI免疫染色(图6H)。免疫染色的细胞通过共聚焦显微镜检查并以假色(pseudocolor)呈现。比例尺为8 μ m。图6I:DKK2诱导LRP5内化,但不诱导LRP6。用DKK2(4nM)处理HEK293细胞持续指示的时间。将细胞表面蛋白质生物素化。通过蛋白质印迹分析生物素化的细胞表面蛋白质和细胞裂解产物蛋白质。

[0032] 图7A-7G是一系列的图片,其描绘DKK2和PD-1阻断组合的增强的抗肿瘤作用及免疫反应。图7A:DKK2和PD-1阻断组合在MC38肿瘤模型中的增强的抗肿瘤作用。C57BL/6小鼠皮下注射接种MC38细胞。从第18天开始每5天进行5F8和/或抗PD-1处理(10mg/kg,腹腔内注射)。以对数秩(Mantel-Cox)检验来评估存活率(所有的显著差异均已标记;*, < 0.05 ;**, $p < 0.01$)。在图13A中显示了个体肿瘤的生长迹线。图7B-7D:抗体处理对细胞毒性免疫细胞的影响。C57BL/6小鼠皮下注射接种MC38细胞。在第13天和第18天进行用5F8和/或抗PD-1处理(10mg/kg,腹腔内注射)。在第20天收集肿瘤进行流式细胞术分析。数据以平均值 \pm 标准误(means \pm sem)表示(*, < 0.05 ;**, $p < 0.01$;方差分析(Anova test))。图7E:DKK2重组蛋白对针对PD-1阻断的细胞毒性免疫细胞反应的影响。C57BL/6小鼠皮下注射接种MC38细胞。当肿瘤长到500mm³时,每8小时注射DKK2蛋白(600ng/25 μ l/肿瘤;每个肿瘤多个注射部位)三次。最后一次注射后1小时,收集肿瘤,通过流式细胞术分析浸润的白细胞。数据以平均值 \pm 标准误表示(*, < 0.05 ;**, $p < 0.01$;方差分析)。图7F:YUMM1.7肿瘤模型中,DKK2和PD-1阻断的抗肿瘤作用。C57BL/6小鼠皮下注射接种YUMM1.7细胞。从第12天开始每5天进行5F8和/或抗PD-1处理(10mg/kg,腹腔内注射)。以对数秩(Mantel-Cox)检验来评估存活率(所有的显著差异均已标记;*, < 0.05 ;**, $p < 0.01$)。平均和个体肿瘤生长迹线显示在图13D-13E。图7G:抗体处理对细胞毒性免疫细胞的影响。C57BL/6小鼠皮下注射接种YUMM1.7细胞。在第16天和第20天进行5F8和/或抗PD-1处理(10mg/kg,腹腔内注射)。在第21天收集肿瘤,进行流式细胞术分析。数据以平均值 \pm 标准误表示(*, < 0.05 ;**, $p < 0.01$;方差分析)。

[0033] 图8A-8G是一系列图和图片,其图解说明通过APC损失上调DKK2表达。图8A:在人类CRC样品中(相较于正常结肠直肠样品),以及在MSS CRC中(相较于MSI CRC),DKK2表达上

调。图表中的数字表示样品大小。图8B-8C:在小鼠肠息肉中,DKK2表达上调。使用从24周龄APC^{Min/+}小鼠解剖的正常小鼠肠和息肉(B)中分离的RNA,通过定量RT-PCR确定DKK2 mRNA水平,并通过使用抗DKK2抗体免疫染色肠切片来检测DKK2蛋白。图8D-8E:在APC损失的MC38细胞中,DKK2表达上调。使用从具有或不具有APC突变的MC38细胞(图8D)中,或从用不同β-联蛋白siRNA转染的APC突变MC38细胞中(图8E)分离的RNA,通过定量RT-PCR确定DKK2表达量。也显示了β-联蛋白水平的蛋白质印迹分析。图8F:在APC损失的HCT116人类结肠癌细胞中,DKK2表达上调。通过定量RT-PCR检测DKK2表达量。图8G:DKK2表达量与CRC患者存活率之间的相关性。通过Mantel-Cox对数秩检验,使用结肠直肠癌的TCGA临时数据集(provisional datasets)比较高(前15个百分点)和低(后15个百分点)DKK2表达者的总体和无复发存活率(图8A;对于总体存活率,n=56;对于无复发存活率,n=50)。

[0034] 图9A-9R是一系列图、柱形图和图片,其描绘5F8处理在CD8⁺和NK细胞中活化粒酶b产生,而不改变细胞群体。图9A-9G,肿瘤浸润的白细胞的流式细胞术分析。C57BL小鼠皮下注射接种5x10³个MC38细胞,在第9天和第12天开始5F8处理(10mg/kg,每三天一次,腹腔内注射)。在第14天收集肿瘤。通过胶原酶消化肿瘤,并通过流式细胞术分析细胞。图9D-9F是衍生自图9C,而图9G衍生自图9E。N=5;*P<0.05。图9A:与对照(IgG)相比,5F8治疗抑制肿瘤进展,如通过肿瘤体积和重量降低可视的。图9B-9E:在5F8和其同种型处理的样品之间,在骨髓细胞(Gr1^高CD11b^高或Gr1^低CD11b^高)、CD4⁺、CD8⁺、调节T细胞(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺)或NK1.1⁺细胞的百分比方面没有显著差异。图9F-9G:5F8在CD8⁺和NK1.1⁺细胞中均上调粒酶B。图9H-9K:肿瘤引流淋巴结(tumor draining lymph node)的流式细胞术分析。从上述小鼠收集腹腔沟淋巴结,并通过流式细胞术进行分析。n=5。图9H-9J:由于用5F8处理的CD4⁺、CD8⁺或NK1.1⁺细胞的群体没有显著差异。图9I:在5F8处理的CD8⁺细胞中有粒酶B增加的趋势。图9K:在5F8处理的NK1.1⁺细胞中粒酶B显著增加。图9L-9O,对APC^{Min/+}或APC^{Min/+}DKK2^{-/-}小鼠(20周龄)的派伊尔淋巴结(PPs)中的白细胞的流式细胞术分析。图9L-9M:在APC^{Min/+}或APC^{Min/+}DKK2^{-/-}小鼠中的,或者来自注射5F8剂(8mg/kg,腹腔内注射)24小时的APC^{Min/+}小鼠(图9N-9O)中的CD4⁺或CD8⁺细胞群之间的差异很小。图9N-9O:用5F8处理的APC^{Min/+}小鼠中的粒酶B阳性的CD8⁺细胞相对于对照急剧增加。显示的细胞群针对CD45预设门。图9P-9R:来自图3I至图3J的肿瘤浸润的白细胞通过流式细胞术进行分析,以确认清除效率。

[0035] 图10A-10E是与图4A-4H相关的一系列图片和图式,其显示DKK2直接抑制NK细胞活化。图10A,DKK2抑制人类NK细胞。从多个正常个体汇集的外周血分离人类NK细胞,在具有或不具有10nM人类DKK2蛋白的情况下,用人类IL-15(50ng/ml)孵育24小时,然后通过流式细胞术分析。图10B,DKK2抑制IL-15介导的小鼠初代CD8⁺T细胞的活化。从脾脏分离初代CD8⁺细胞,并在IL-15+IL15Rα-Fc中培养4天。然后在流式细胞术分析之前加入DKK2(10nM)24小时。数据以平均值±标准误表示(*,<0.01;**,<0.05;学生t检验(Student's t-test))。图10C,DKK2抑制小鼠IECs。从正常小鼠肠分离小鼠IEC,在具有或不具有10nM DKK2蛋白的情况下,用IL-15(100ng/ml)孵育24小时,然后用流式细胞术分析。图10D, TOPFLASH Wnt报道基因检测。对在前一天用TOPFLASH转染的细胞加入DKK2(5nM)、Wnt3a(2nM)和GSK3抑制剂CHIR(1μM)6小时。图10E,LRP5缺陷不影响初代小鼠NK细胞中WNT3A诱发的β-联蛋白累积。分离的初代小鼠NK细胞用IL-15(50ng/ml)扩增24小时,然后用WNT3A(5nM)孵育24小时,并通过蛋白质印迹进行分析。

[0036] 图11A-11E是与图6A-6I相关的一系列图式,其图解说明DKK2经由LRP5而不是LRP6抑制NK细胞。图11A:对于DKK2介导的NK活化的抑制,不需要LRP6。按照图6A,从WT和Lrp6^{-/-}小鼠制备初代小鼠NK细胞并处理,然后进行流式细胞术和蛋白质印迹分析。数据以平均值±标准误表示(*,<0.01;**,<0.05;学生t检验)。图11B:在NK细胞中WNT3A诱发的β-联蛋白稳定化(stabilization)需要LRP6。按照图10E来处理小鼠NK细胞。图11C-11D:图6C中所描述的肿瘤中的浸润的白细胞的流式细胞术分析。数据以平均值±标准误表示(*,<0.01;**,<0.05;学生t检验)。图11E:DKK2提供肿瘤免疫逃避的模型。由肿瘤细胞所产生的和可能由肿瘤浸润的基质细胞所产生的DKK2结合至NK细胞上的LRP5,这导致隔离(sequestration)磷酸-STAT5于内体,并减少其核定位。这继而导致了NK细胞活化的阻碍,包括减少粒酶B产生和减弱NK介导的肿瘤细胞杀伤。

[0037] 图12A-12C是与图7相关的一系列图片,其图解说明DKK2表达与患者存活率之间的校正(corrections)。通过Mantel-Cox对数秩检验,使用下列癌症的TCGA临时数据集比较高(前15个百分点)和低(后15个百分点)DKK2表达者的总体和无复发存活率:结肠直肠癌(图12A;对于总体存活率,n=56;对于无复发存活率,n=50)、肾乳头癌(kidney renal papillary carcinoma,图12B;对于总体存活率,n=43;对于无复发存活率,n=40)和膀胱尿路上皮癌(bladder urothelial carcinoma,图12C,对于总体存活率,n=61;对于无复发存活率,n=48)。

[0038] 图13A-13D是与图5A-5E相关的一系列图表及图片,其显示DKK2阻碍磷酸-STAT5的核定位。图13A-13B, RNA测序结果的分析揭示了DKK2处理与小鼠NK细胞中STAT信号传导的关系。如图4D制备并处理小鼠NK细胞,并对从这些NK细胞分离的mRNA进行测序。图13A显示途径富集(pathway enrichment),而图13B显示STAT5基序(motif)基因的改变。基因名称列在图15中。图13C-13D:图5B-5C的个体通道。

[0039] 图14A-14G是与图7A-7G相关的一系列图表,其图解说明DKK2和PD-1组合阻断的增强的抗肿瘤作用。图14A:图7A的个体肿瘤生长迹线。图14B:在含有PTEN损失和/或PI3K活化突变的人类黑素瘤中,DKK2上调。图表中的数字表示样品大小。图14C:在对于抗PD-1治疗具有抗性的黑素瘤中,DKK2表达有上调的趋势。图14D:PI3K抑制剂渥曼青霉素(Wortmannin)减少YUMM1.7细胞中的DKK2表达。用渥曼青霉素(5μM)处理细胞24小时,通过qRT-PCR测定DKK2 mRNA水平。图14E-14F:图7F的个体及平均肿瘤生长迹线。图14G:图7G的附加结果。图14H:DKK2表达与癌症患者存活率之间的相关性。通过Mantel-Cox对数秩检验,使用在肾乳头癌(N=43)和膀胱尿路上皮癌(N=61)的TCGA临时数据集比较高(前15个百分点)和低(后15个百分点)DKK2表达者的总体和无复发存活率。

[0040] 图15是列出了如图13A-13C中详细描述的小鼠NK细胞的RNA测序的内容中的基因名称和统计的表格。

[0041] 图16是本文用作引物的核酸序列的列表(SEQ ID NO:1-18)。

[0042] 图17是列出在小鼠NK细胞的RNA测序的内容中的关键基因的总结列表,该关键基因建议DKK2处理后在STAT5信号传导中的改变(参见图13A-13C和图15)。

具体实施方式

[0043] 本发明涉及意想不到的发现,即抑制Dickkopf 2 (DKK2) 和低密度脂蛋白(LDL)受

体相关蛋白5 (LRP5) 之间的相互作用,或直接抑制LRP5,导致抑制肿瘤形成,伴随增加的免疫效应细胞(包括自然杀伤(NK)细胞及CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(CTL))的细胞毒活性和增加的肿瘤细胞凋亡。在本文所述的各种实施方式中,本发明的方法涉及通过向患者施用有效量的(1)阻断DKK2和LRP5之间相互作用的抑制剂,或(2)LRP5基因消耗剂治疗癌症的方法,在受试者中提供抗肿瘤免疫的方法,以及刺激受试者中对细胞群或组织的免疫效应细胞介导的免疫反应的方法。此外,本发明包括用于治疗癌症的药物组合物。

[0044] 定义

[0045] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员理解的相同含义。尽管在测试本发明的实践中可以使用与本文描述的那些相似或等同的任何方法和材料,但是本文描述了优选的材料和方法。在描述和要求保护本发明时,将使用以下术语。

[0046] 应该理解的是,这里使用的术语的目的仅出于描述特定实施方式,而非旨在对本发明是限制性的。

[0047] 如本文所使用的,“一个(a和an)”是指一个或多于一个(即至少一个)该冠词的语法对象。举例来说,“一个元件”是指一个元件或多于一个元件。

[0048] 如本文所使用的,当提及例如量、持续时间等的可测量值时,术语“约”意味着包括距离指定值 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 、更优选地 $\pm 5\%$ 、甚至更优选地 $\pm 1\%$ 、还更优选地 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这样的变化适合于执行本文所公开的方法。

[0049] 如本文所使用的,比对照“大10%”是指表达水平至少比对照高10%或更多,例如高20%、30%、40%或50%、60%、70%、80%、90%或更多,和/或高1.1倍、1.2倍、1.4倍、1.6倍、1.8倍、2.0倍或更多,以及它们之间的任何和所有整体或部分增量。

[0050] 如本文所使用的,术语“对照(control)”或“参考(reference)”可互换使用,并指用作比较标准的值(例如,健康受试者中的LRP5表达水平)。

[0051] 如本文所使用的,“受试者”或“患者”可以是人类或非人类哺乳动物。非人哺乳动物包括例如家畜和宠物,例如绵羊、牛、猪、犬科动物、猫科动物和鼠类哺乳动物。优选地,受试者是人类。

[0052] 如本文所使用的,“突变”是DNA序列的改变,其导致由其天然状态的变更。突变可以包括至少一个脱氧核糖核酸碱基例如嘌呤(腺嘌呤和/或胸腺嘧啶)和/或嘧啶(鸟嘌呤和/或胞嘧啶)的缺失和/或插入和/或复制和/或取代。突变可以产生或不产生生物体(受试者)的可观察特征(表型)的可辨别的变化。

[0053] 如本文所使用的,术语“免疫原性”是特定物质(例如抗原或表位)在哺乳动物体内引发免疫反应的能力。这种免疫反应可以是体液和/或细胞介导的。

[0054] 如本文所使用的,术语“活化”是指在足够的细胞表面部分连接以诱发显著的生物化学或形态变化后的细胞的状态。在T细胞方面,这种活化是指T细胞已被充分刺激而诱发细胞增殖的状态。T细胞的活化还可以诱发细胞因子产生以及进行调控或细胞溶解效应子功能。在其他细胞方面,该术语推断特定物理-化学过程的上调或下调。术语“活化的T细胞”表示目前正在进行细胞分裂、细胞因子产生、进行调控或细胞溶解效应子功能,和/或近来已经历了“活化”过程的T细胞。

[0055] 如本文所使用的,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,并且指由通过肽键共

价连接的氨基酸残基所组成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸,并且不限制可构成蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数量。多肽包括任何肽或蛋白质,其包含通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸。如本文所使用的,该术语是指短链,其在本领域中通常也称为例如肽、寡肽及寡聚物;和较长的链,其在本领域通常称为蛋白质,其中有很多类型。“多肽”包括,例如,生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或其组合。

[0056] 在本发明的上下文中,对于通常存在的核酸碱基使用以下缩写。“A”是指腺苷(adenosine)、“C”是指胞嘧啶(cytosine)、“G”是指鸟苷(guanosine)、“T”是指胸苷(thymidine)、“U”是指尿苷(uridine)。

[0057] 如本文所使用的,术语“RNA”被定义为核糖核酸。

[0058] 如本文所使用的,术语“免疫治疗剂”意指包括调节患者免疫系统的任何药剂。“免疫疗法”是指改变患者免疫系统的治疗。

[0059] 如本文所使用的,术语“治疗的(therapeutic)”意指治疗处理和/或预防。治疗效果通过抑制、缓解或根除疾病状态获得。

[0060] 如在本发明的上下文中所使用的,术语“处理(treatment)”意指包括治疗性处理以及疾病或病症的预防性或抑制性措施。因此,例如,术语处理包括在疾病或病症发作之前或之后施用药剂,从而预防或消除疾病或病症的所有症状。另一个例子是,在疾病的临床表现之后施用药剂以对抗疾病的症状包括“处理”该疾病。这包括预防癌症。

[0061] 术语“生物样品”是指从生物体或生物体的组分(例如细胞)获得的样品。样品可以是任何生物组织或液体。样品通常是“临床样品”,其是来自患者的样品。这些样品包括但不限于骨髓、心脏组织、痰、血液、淋巴液、血细胞(例如白细胞)、组织或细针活检样品(fine needle biopsy sample)、尿、腹膜液及胸水或来自于这些的细胞。生物样品还可以包括组织切片,例如为了组织学目的而取得的冷冻切片。

[0062] “DKK蛋白质”是指含有一个或多个富含半胱氨酸结构域的DKK蛋白质家族的蛋白质。DKK蛋白质家族包括DKK1、DKK2、DKK3和DKK4,以及在序列水平下在结构或功能上与这些蛋白质中的一种或多种充分相关的任何其他蛋白质。该蛋白质家族例如描述于Krupnik et al. (1999) Gene 238:301。DKK蛋白的等位基因变体和突变体——例如本文所述的那些——也包括在此定义中。

[0063] 术语“等同”当用于参考核苷酸序列时,应理解为指编码功能上等同的多肽的核苷酸序列。等同的核苷酸序列将包括差异为一或多个核苷酸取代、添加或缺失的序列(例如等位基因变体);因此,包括如此序列,其由于遗传密码的简并性而不同于本文描述的核酸的核苷酸序列。

[0064] “粒酶B”是指来自细胞毒性淋巴细胞的颗粒的酶,其在进入细胞的胞质时,诱发凋亡和/或核DNA断裂。

[0065] “杂交”是指核酸链通过碱基配对与互补链结合的任何过程。两条单链核酸在形成双链体时“杂交”。双链区域可以包括单链核酸中的一个或两个的全长,或一个单链核酸全部和另一单链核酸的子序列,或者双链区域可以包括每个核酸的子序列。杂交还包括形成含有某些错配的双链体,条件是两条链仍然形成双链螺旋。“严格杂交条件”是指导致基本

上特异性杂交的杂交条件。探针与模板核酸靶位置的“特异性杂交”是指探针主要与靶标杂交,使得杂交信号可以被清楚地解释。如本文进一步所述的,导致特异性杂交的这些条件根据同源区域的长度、该区域的GC含量、杂交体的解链温度“ T_m ”而变化。因此,杂交条件将随着杂交溶液和洗涤剂的盐含量、酸度和温度而变化。

[0066] 如本文针对核酸(例如DNA或RNA)所使用的术语“分离”是指分子与存在于大分子的天然来源中的其他DNA或RNA分别分开。本文使用的术语“分离”还指当通过重组DNA技术产生时,基本上不含细胞物质、病毒物质或培养基、或当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学品的核酸或肽。此外,“分离的核酸”意指包括非天然作为片段发生并且不会在天然状态中发现的核酸片段。术语“分离”在本文中也用于意指与其他细胞蛋白分离的多肽,并且意在包括纯化及重组多肽。“分离的细胞”或“分离的细胞群”是不存在于其天然环境中的细胞或细胞群。

[0067] “LRP5”或“低密度脂蛋白受体相关蛋白5”是指所有脊椎动物核酸和多肽形式的LRP5。LRP5是细胞表面跨膜受体,其响应于配体(如DKK蛋白质)的结合而起作用。LRP5连同共同受体LRP6可介导典型的Wnt途径信号传导。LRP5信号传导也可独立于LRP6而发生。

[0068] “LRP6”或“低密度脂蛋白受体相关蛋白6”是指所有脊椎动物核酸和多肽形式的LRP6。LRP6是细胞表面跨膜受体,其响应于配体(如DKK蛋白质)的结合而起作用。LRP6连同共同受体LRP5可介导典型的Wnt途径信号传导。LRP6信号传导也可独立于LRP5而发生。

[0069] 如本文所使用的,术语“核酸”是指多核苷酸例如脱氧核糖核酸(DNA),以及适当时指核糖核酸(RNA)。该术语还应该理解为包括作为等同物的由核苷酸类似物所制备的RNA或DNA的类似物,并且可应用于本文所描述的实施方式中,单链(有义或反义)和双链多核苷酸。EST、染色体、cDNA、mRNA和rRNA是可被称为核酸的分子的代表性实例。

[0070] “穿孔蛋白”是指插入膜中、生成寡聚物并形成孔的蛋白质。穿孔蛋白透化细胞质膜,以允许分子(如粒酶)进入靶细胞。

[0071] “干细胞”是指能够分化成所需细胞类型的细胞。干细胞包括胚胎干(ES)细胞;成人干细胞;和体细胞干细胞,例如来自未定型中胚层的SP细胞。“全能”干细胞能够分化成所有组织类型,包括中、内和外胚层的细胞。“多潜能干细胞”或“多能干细胞”是能够分化成数种命运的至少两种的细胞。

[0072] 当在多核苷酸序列的上下文中使用时,术语“变体”可以涵盖与基因或其编码序列相关的多核苷酸序列。该定义还可以包括例如“等位基因”、“剪接”、“物种(species)”或“多态”变体。这些多肽通常相对于彼此具有显著的氨基酸同一性。多态变体是给定物种的个体之间的特定基因的多核苷酸序列的变异。多态变体可以包含“单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)”,其中多核苷酸序列中变化一个碱基。SNP的存在可以指示例如某一群体、疾病状态或疾病状态的倾向。

[0073] 术语“Wnt拮抗剂”或“Wnt抑制剂”是指经由Wnt途径下调(例如抑制或阻断)信号转导的分子或组合物。下调可以直接发生,例如通过抑制Wnt信号传导途径中蛋白质的生物活性;或间接发生,例如通过抑制Wnt信号传导的下游介质(如TCF3)或通过降低 β -联蛋白的稳定性等。Wnt拮抗剂的实例包括但不限于DKK多肽(Glinka et al., Nature, 1998, 391:357-62; Niehrs, Trends Genet, 1999, 15(8):314-9)、新月形(crescent)多肽(Marvin et al., Genes&Dev., 2001, 15:316-327)、cerberus多肽(U.S. Pat. No. 6,133,232)、WISE/骨硬素

(WISE/Sclerostin, Li et al., J Biol Chem, 2005.280:19883-7)、轴蛋白(axin)多肽(Zeng et al., Cell, 1997, 90(1):181-92; Itoh et al., Curr Biol, 1998, 8(10):591-4; Willert et al., Development, 1999, 126(18):4165-73)、Frzb多肽(Cadigan et al., Cell, 1998, 93(5):767-77; U.S. Pat. No. 6,133,232; U.S. Pat. No. 6,485,972)、醣原合酶激酶(GSK)多肽(He et al., Nature, 1995) 374(6523):617-22)、T细胞因子(TCF)多肽(Molenaar et al., Cell, 1996, 86(3):391-9)、显性阴性散乱(dominant negative dishevelled)多肽(Wallingford et al., Nature, 2000, 405(6782):81-5)、显性阴性N-钙黏着蛋白(N-cadherin)多肽(U.S. Pat. No. 6,485,972)、显性阴性 β -联蛋白多肽(U.S. Pat. No. 6,485,972)、下游转录因子(例如TCF等)的显性阴性物、Wnt多肽的显性阴性物、破坏LRP-frizzled-wnt复合体的试剂,以及隔绝Wnt(例如新月形及Wnts的抗体)的试剂。Wnt拮抗剂多肽可以是哺乳动物来源的,例如人类、小鼠、大鼠、犬科动物、猫科动物、牛科动物或绵羊,或非哺乳动物来源例如来自爪蟾、斑马鱼、果蝇、小鸡或鹌鹑。Wnt拮抗剂还包括各种多肽的片段、同系物、衍生物、等位基因变体和拟肽(peptidomimetic),所述多种多肽包括但不限于DKK、新月形、cerberus、轴蛋白、Frzb、GSK、TCF、显性阴性散乱蛋白、显性阴性N-钙黏着蛋白和显性阴性 β -联蛋白多肽。在其他实施方式中,Wnt拮抗剂还包括抗体(例如Wnt特异性抗体)、多核苷酸和小分子。

[0074] 如本文所使用的,术语“癌症”包括任何恶性肿瘤,其包括但不限于癌(carcinoma)、肉瘤(sarcoma)。癌症起因于细胞不受控制和/或异常分裂,然后侵入并破坏周围组织。如本文所使用的,“增殖(proliferating和proliferation)”是指进行有丝分裂的细胞。如本文所使用的,“转移”是指恶性肿瘤离开其起源区域的远处扩展。癌细胞可以通过血流、通过淋巴系统、穿过体腔或其任何组合而转移。

[0075] 术语“癌”是指恶性新生长,其由倾向于渗入周围组织的上皮细胞组成,并且引起转移。

[0076] 术语“癌症疫苗”是指如此疫苗,其刺激免疫系统以对抗癌症,或对抗有助于癌症发展的试剂。有两种广泛类型的癌症疫苗:预防性癌症疫苗,其旨在避免癌症在健康受试者中发展;和治疗性癌症疫苗,其旨在通过加强身体对抗癌症的天然防御,来治疗现有的癌症(Lollini et al., Nature Reviews Cancer, 2006; 6(3):204-216)。如本文所使用的,术语“癌症疫苗”应被解释为包括预防性和治疗性癌症疫苗二者。

[0077] 术语“转移”是指癌症从一个器官或部分扩展到另一个非相邻器官或部分。

[0078] 术语“血管发生”是指新血管的生成,其通常在组织或器官周围,或者进入组织或器官。在正常的生理条件下,只有在非常特殊限制的情况下,人类或动物才会经历血管发生。例如,血管发生通常在伤口愈合、胎儿和胚胎发育以及黄体、子宫内膜及胎盘的形中观察到。不受控制的(持续的和/或失调的)血管发生与多种疾病状态相关,并且在肿瘤生长及转移期间发生。

[0079] 术语“改善”或“治疗”意指因所执行的行为而减轻与癌症或黑素瘤相关的临床征兆和/或症状。待监测的征兆或症状是特定癌症或黑素瘤的特征,并且对于熟练的临床医生而言是公知的。对于监测征兆或症状的方法也是如此。例如,熟练的临床医生将知道,使用通常用于特定肿瘤的诊断成像方法(例如,使用超音波或磁共振成像(MRI)来监测肿瘤)可以监测肿瘤的大小或生长速率。

[0080] 如本文所使用的,术语“药物组合物”是指本发明可用的至少一种化合物与其它化学组分(如载体、稳定剂、稀释剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂和/或赋形剂)的混合物。该药物组合物有助于将化合物施用于生物体。本领域存在多种施用化合物的技术,包括但不限于:静脉内、口服、气溶胶、肠胃外、眼部、肺部及局部施用。

[0081] 语言“药学上可接受的载体”包括药学上可接受的盐、药学上可接受的材料、组合物或载体,例如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料,其涉及将本发明的化合物(一种或多种)携带或运输到受试者体内或携带或运输到受试者,使化合物可以进行其预期的功能。通常,这些化合物从一个器官或身体的一部分被携带或运输到另一个器官或身体的一部分。每种盐或载体必须是“可接受的”,其意义是与制剂的其他成分相容且对受试者无害。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:糖,例如乳糖、葡萄糖及蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素及醋酸纤维素;粉状黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;油,例如花生油、棉籽油、红花子油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇类,例如丙二醇;多元醇,例如甘油、山梨醇、甘露醇及聚乙二醇;酯类,例如油酸乙酯及月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;稀释剂;制粒剂;润滑剂;粘合剂;崩解剂;润湿剂;乳化剂;着色剂;释放剂;涂布剂;甜味剂;调味剂;芳香剂;防腐剂;抗氧化剂;塑化剂;胶凝剂;增稠剂;硬化剂;定型剂;悬浮剂;表面活性剂;保湿剂;载体;稳定剂;和药制剂中使用的其他无毒相容性物质,或其任何组合。如本文所使用的,术语“药学上可接受的载体”也包含任何及所有的涂料(coating)、抗细菌及抗真菌剂以及吸收延迟剂等,其与化合物的活性相容,并且对于受试者是生理上可接受的。补充活性化合物也可以并入组合物中。

[0082] 如本文所使用的,术语“抗体”或“Ab”是指源自免疫球蛋白分子的蛋白质或多肽序列,其特异性地结合抗原上的特定表位。抗体可以是源自天然来源或源自重组来源的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫反应性部分。可用于本发明的抗体可以以多种形式存在,包括例如多克隆抗体、单克隆抗体、细胞内抗体(“胞内抗体”)、Fv、Fab及F(ab)₂以及单链抗体(scFv)和人源化抗体(Harlow et al.,1998,Using Antibodies: A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY;Harlow et al.,1989,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,New York;Houston et al.,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;Bird et al.,1988,Science 242:423-426)。抗体可以来自天然来源或来自重组来源。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚体。

[0083] 如本文所使用的,术语“合成抗体”是指使用重组DNA技术生成的抗体,例如通过噬菌体表达的抗体,如本文所述的。该术语还应该解释为意指通过合成编码抗体的DNA分子生成的抗体,并且该DNA分子表达抗体蛋白质,或规定抗体的氨基酸序列,其中使用本领域可获得的和公知的合成DNA或氨基酸序列技术来获得DNA或氨基酸序列。

[0084] 术语“抗体片段”是指完整抗体或其重组变体的至少一部分,并且是指抗原结合结构域,例如完整抗体的抗原决定可变区,其足以赋予该抗体片段识别靶标(例如抗原)并与靶标特异性结合。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段、scFv抗体片段、线性抗体、单结构域抗体如sdAb(VL或VH)、VHH结构域和由抗体片段形成的多特异性抗体。术语“scFv”是指包括含有轻链可变区的至少一个抗体片段和含有重链可变区的至少一

个抗体片段的融合蛋白或,其中轻链和重链可变区经由短柔性多肽连接体连续地连接,并且能够被表达为单链多肽,并且其中scFv保留其来源的完整抗体的特异性。除非特别指出,否则如本文所使用的,scFv可具有任一顺序的VL和VH可变区,例如相对于多肽的N-端和C-端,scFv可包含VL-连接体-VH或可包含VH-连接体-VL。

[0085] 如本文所使用的,“抗体重链”是指在天然发生构象的抗体分子中存在的两种类型多肽链中较大的,其通常决定抗体所属的类别。

[0086] 如本文所使用的,“抗体轻链”是指在天然发生构象的抗体分子中存在的两种类型多肽链中较小的。Kappa (κ) 和lambda (λ) 轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

[0087] 如本文所使用的,术语“重组抗体”是指使用重组DNA技术生成的抗体,例如由噬菌体或酵母表达系统表达的抗体。该术语还应该解释为意指由合成编码抗体的DNA分子生成的抗体,该DNA分子表达抗体蛋白,或规定抗体的氨基酸序列,其中使用本领域可获得的和公知的重组DNA或氨基酸序列技术来获得DNA或氨基酸序列。

[0088] 如本文所使用的,术语“抗原”或“Ag”被定义为引起免疫反应的分子。这种免疫反应可能涉及抗体产生,或特定免疫活性细胞的活化,或两者。本领域技术人员理解,任何大分子(包括几乎所有的蛋白质或肽)都可以用作抗原。此外,抗原可以衍生自重组或基因组DNA。本领域技术人员理解,任何DNA(其包含编码引发免疫反应的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列)因此编码本文使用的术语“抗原”。此外,本领域技术人员理解,抗原不需要仅由基因的全长核苷酸序列来编码。显而易见的是,本发明包括但不限于使用多于一个基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列以各种组合排列以引起所需的免疫反应。此外,本领域技术人员理解抗原根本不需要由“基因”编码。显而易见的是,抗原可以是合成生成的,或可以源自生物样品。这样的生物样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物流体。

[0089] 术语“施加器(applicator)”——当该术语在本文中使用时——表示用于施用本发明的化合物和组合物的任何装置,其包括但不限于皮下注射器、移液管等。

[0090] 如本文所使用的,“适配体”是指可与另一分子特异性结合的小分子。适配体通常是基于多核苷酸或肽的分子。多核苷酸适配体是DNA或RNA分子,其通常包含数条核酸链,该数条核酸链采用高度特异性的三维构象,该构象被设计为对于特定靶分子如肽、蛋白质、药物、维生素、其他有机和无机分子等具有适当的结合亲和力和特异性。这类多核苷酸适配体可以从大量的随机序列中选择,其通过使用指数富集的配体系统进化。肽适配体通常是约10至约20个氨基酸的环,其附接至与特定配体结合的蛋白质支架。使用例如酵母菌双杂交系统的方法,可以从组合库中鉴定和分离肽适配体。

[0091] 如本文所使用的,术语“抗肿瘤作用”是指可以通过各种手段表现的生物学效应,其包括但不限于例如肿瘤体积减小、肿瘤细胞数量减少、转移的数量减少、预期寿命的增加、肿瘤细胞增殖的减少、肿瘤细胞存活的减少或与癌症相关的各种生理症状的改善。“抗肿瘤效应”也可以通过本发明的肽、多核苷酸、细胞和抗体首先预防肿瘤发生的能力来表现。

[0092] 如本文所使用的,术语“异种移植”指从一个物种的供给者获取并移植到另一物种的接受者中的组织移植物。

[0093] 如本文所使用的,术语“同种移植”指从一个物种的供给者获取并移植到相同物种

的接受者中的组织移植物。

[0094] 如本文所使用的,“ShRNA”或“短发夹RNA(short hairpin RNA)”是干扰RNA序列,其为如此双链RNA:当ShRNA与靶基因或序列处于相同细胞中时,能够减少或抑制靶基因或序列的表达。ShRNA可以在靶细胞内由DNA构建体连续产生,其中DNA构建体可以整合到靶细胞的细胞核中,或独立持续于靶细胞中。因此,该DNA指导的(DNA-directed) ShRNA,可以在靶细胞内连续地产生干扰RNA。

[0095] 范围:在本公开中,本发明的多个方面可以以范围形式呈现。应该理解的是,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,而不应该被解释为对本发明范围的僵化限制。因此,范围的描述应被视为已经具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如,从1到6的范围描述应该被视为已经具体公开了子范围,例如1到3、1到4、1到5、2到4、2到6、3到6等,以及在该范围内的单个数字,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围宽度如何,这都适用。

[0096] 描述

[0097] 免疫系统在激活和抑制之间保持平衡。免疫监视的逃避是肿瘤形成的先决条件之一。肿瘤逃避免疫监视的方法之一是产生升高水平的免疫抑制分子。多年来,越来越多的免疫抑制分子和机制已被鉴定。已经显示这些免疫抑制分子或其关联信号传导受体的中和在治疗多种恶性肿瘤中是有效的。

[0098] 本发明涉及发现膜结合受体LRP5与DKK蛋白质结合以抑制自然杀伤(NK)细胞和CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(CTL)活性,但不影响NK或CTL中的典型Wnt-β-联蛋白信号传导。研究显示,在非生理条件下,LRP5的过度表达可介导Wnt诱导的β-联蛋白稳定化和下游β-联蛋白信号传导;并且,这些LRP5介导的效应可以被DKK抑制。然而,本文描述的实验证据证实了在NK和CTL细胞中,LRP5而非LRP6具有Wnt非依赖性信号传导功能。本文公开的实验证据指出LRP5抑制剂和中和抗体是用于治疗表达DKK的癌症的关键免疫调节剂和肿瘤形成的阻抑因子。因此LRP5是治疗癌症的有希望靶标。

[0099] 本发明的方法

[0100] 本发明涉及在有需要的受试者中治疗癌症的方法。该方法包括向受试者施用在药学上可接受的载体中的有效量的抑制剂,该抑制剂阻断DKK2与LRP5之间的相互作用。在一些实施方式中,抑制剂是选自于下列的至少一种:DKK2拮抗剂或其片段、DKK2抗体或其片段、LRP5拮抗剂或其片段、LRP5抗体或其片段、siRNA、核糖体、反义分子、适配体、拟肽物、小分子、CRISPR/Cas9编辑系统和其组合。

[0101] 本发明也涉及在有需要的受试者中治疗癌症的方法。该方法包括向受试者施用药学上可接受的载体中的有效量的LRP5基因消耗剂。术语“LRP5基因消耗剂”是指抑制或降低LRP5表达或抑制或降低细胞、组织或体液中的LRP5活性的任何药剂。

[0102] 小干扰RNA(Small Interfering RNA, siRNA)

[0103] 在一实施方式中,消耗剂是小干扰RNA(siRNA)。siRNA是RNA分子,其包含靶向目标基因或多核苷酸的一组核苷酸。如本文所使用的,术语“siRNA”涵盖所有形式的siRNA,其包括但不限于(i)双链RNA多核苷酸,(ii)单链多核苷酸,和(iii)(i)或(ii)的多核苷酸,其中这类多核苷酸中具有一个、两个、三个、四个或更多个核苷酸改变或取代。siRNA及其用于抑制基因表达的用途在本领域中是众所周知的(Elbashir et al., Nature, 2001, 411 (6836):

494-988)。在本发明中,siRNA能够干扰目标基因如LRP5的表达和/或活性。

[0104] 核酶:

[0105] 在另一实施方式中,消耗剂是核酶。核酶及其用于抑制基因表达的用途在本领域中也是众所周知的(Cech et al.,1992,J.Biol.Chem.267:17479-17482;Hampel et al.,1989,Biochemistry 28:4929-4933;Eckstein et al.,国际公开号W0 92/07065;Altaian et al.,美国专利号5,168,053)。核酶是RNA分子,其具有以类似于DNA限制性内切核酸酶的方式来特异性切割其他单链RNA的能力。通过修饰编码这些RNA的核苷酸序列,可以改造分子使其识别RNA分子中的特定核苷酸序列并将其切割(Cech,1988,J.Amer.Med.Assn.260:3030)。这种方法的主要优点是核酶是序列特异性的事实。核酶有两种基本类型,即四膜虫型(tetrahymena-type,Hasselhoff,1988,Nature 334:585)和锤头型(hammerhead-type)。四膜虫型核酶识别长度为四个碱基的序列,而锤头型核酶识别长度为11-18个碱基的碱基序列。序列越长,该序列仅在靶mRNA种类中出现的可能性就越大。因此,为了让特定的mRNA种类失活,锤头型核酶优于四膜虫型核酶,并且18个碱基识别序列也优于较短的识别序列,较短识别序列会在多种不相关的mRNA分子内随机出现。可用于抑制目标基因(即LRP5)表达的核酶可通过将靶序列并入与所需基因的mRNA序列互补的基础核酶结构中来设计。靶向目标基因的核酶可以使用市售试剂(Applied Biosystems,Inc.,Foster City,CA)合成,或者它们可以从编码其的DNA遗传地表达。

[0106] 反义分子:

[0107] 在另一实施方式中,消耗剂是反义核酸序列。反义分子及其用于抑制基因表达的用途在本领域中是众所周知的(Cohen,1989,Oligodeoxyribonucleotides,Antisense Inhibitors of Gene Expression,CRC Press)。反义核酸是与特定mRNA分子的至少一部分互补的DNA或RNA分子,正如该术语在本文其他地方所定义的(Weintraub,1990,Scientific American262:40)。在细胞中,反义核酸与相对应的mRNA杂交,形成双链分子,从而抑制基因的翻译。如Inoue,1993,美国专利号5,190,931所教导的,可以使用编码反义分子的DNA,经由遗传表达将反义分子提供给细胞。可选地,可以合成地制备反义分子,然后将其提供给细胞。约10至约30之间的反义寡聚物是优选的,因为它们易于合成并且易被引入到靶细胞中。本发明考虑的合成反义分子包括本领域已知的寡核苷酸衍生物,其与未修饰的寡核苷酸相比,具有改进的生物学活性(美国专利号5,023,243)。

[0108] CRISPR/Cas9系统

[0109] CRISPR/Cas9系统是用于诱发靶向的遗传改变的简便且高效的系统。通过Cas9蛋白的靶标辨别在指导RNA(guide RNA,gRNA)内需要“种子”序列,并且在gRNA结合区上游也需要具有含有保守二核苷酸的前间区序列邻近基序(PAM)序列。因此,通过例如在细胞系(诸如293T细胞)中或初代细胞中重新设计gRNA,可以改造CRISPR/Cas9系统来切割实际上任何DNA序列。通过共同表达单个Cas9蛋白与两种或更多种的gRNA,可以使CRISPR/Cas9系统同时靶向多个基因座,使得该系统独特地适用于多基因编辑或靶基因的协同活化。

[0110] 小分子抑制剂

[0111] 本领域众所周知的是,位于人类LRP5的第三YWTD重复结构域的 β -螺旋桨(β -propeller)结构的顶部空腔处的一些氨基酸残基对DKK结合和DKK介导的Wnt拮抗作用来说是重要的(Zhang et al.,Mol Cell Biol.2004;24:4677-4684)。在本发明的一个实施方式

中,是小分子,其可以破坏DKK2和LRP5之间的相互作用,并且起到LRP5抑制剂的作用,其不影响经由Wnt共同受体LRP 5/6的典型Wnt- β -联蛋白信号传导。

[0112] 抗体

[0113] 本发明考虑使用包含抗DKK2抗体(例如5F8,SEQ ID NO:21-23)和/或抗LRP5抗体的组合物作为阻断DKK2和LRP5之间相互作用的药剂。在一个实施方式中,抗体包含选自多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、合成抗体、重链抗体、人类抗体和抗体的生物活性片段及其任何组合的抗体。

[0114] 生产抗体的方法是本领域已知的。生产根据本发明使用的抗体的示例性技术如本文所述。本领域技术人员理解,抗体包含任何免疫球蛋白分子,其无论源自天然来源还是源自重组来源,都能够特异性结合存在于靶分子上的表位。在一个实施方式中,靶分子包含

[0115] 当用于本发明的组合物和方法中针对靶分子的抗体是多克隆抗体(IgG)时,该抗体通过用包括全长靶蛋白或其片段、上游调控因子或其片段的肽接种适合的动物体来生成。这些多肽或其片段可以通过本领域已知的任何方法获得,所述方法包括化学合成和生物学合成。

[0116] 然后从获得自动物的流体中分离接种动物中产生的与靶分子或其片段特异性结合的抗体。可以以这种方式在几种非人类哺乳动物中生成抗体,所述哺乳动物例如但不限于山羊、绵羊、马、骆驼、兔和驴。用于生成多克隆抗体的方法是本领域公知的,并且描述于例如Harlow et al.,1998,In:Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor, NY中。

[0117] 针对全长靶分子的单克隆抗体或其片段可使用任何公知的单克隆抗体制备程序来制备,例如在Harlow等人(1998,In:Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,NY)和Tuszynski等人(1988,Blood,72:109-115)中所描述的。人类单克隆抗体可以通过美国专利公开号2003/0224490中所述的方法制备。针对抗原的单克隆抗体使用本文所提及的标准程序从用该抗原免疫的小鼠生成。使用本文所述程序获得的编码单克隆抗体的核酸可以使用本领域可用的技术进行克隆和测序,并且其描述于例如Wright et al.,1992,Critical Rev.Immunol.12(3,4):125-168,以及其中引用的参考文献中。

[0118] 当用于本发明的方法中的抗体是对应于全长靶分子的抗体或其片段的生物活性抗体片段或合成抗体时,该抗体如下制备:将编码所需抗体或其片段的核酸克隆到合适的载体中。将载体转染至适于生成大量抗体或其片段的细胞中。然后,编码所需抗体的DNA在细胞中表达,从而产生抗体。编码所需肽的核酸可以使用本领域可用的技术进行克隆和测序,其描述于例如Wright et al.,1992,Critical Rev.in Immunol.12(3,4):125-168,以及其中引用的参考文献中。可选地,还可以使用化学合成技术来合成出预计数量的所需抗体或其片段。如果抗体的氨基酸序列是已知的,则可以使用本领域已知的方法化学合成所需的抗体。

[0119] 本发明还可以包括使用与靶分子上存在的表位特异性反应的人源化抗体。这些抗体能够与靶分子结合。可用于本发明的人源化抗体具有人类框架(framework),并具有来自抗体通常是小鼠抗体的一个或多个互补决定区(CDR),其与靶向的细胞表面分子特异性地反应。

[0120] 当用于本发明的抗体是人源化的时,抗体可以如在Queen等人(美国专利号6,180,

370)、Wright等人,1992,Critical Rev.Immunol.12(3,4):125-168和其中引用的参考文献、或在Gu等人,1997,Thrombosis&Hematocyst 77(4):755-759中所述的来生成,或使用本领域已知的生成人源化抗体的其他方法来生成。Queen等人中公开的方法部分地针对设计人源化免疫球蛋白,所述人源化免疫球蛋白通过表达附接于编码受体的人类框架区的DNA片段的重组DNA片段来产生,所述重组DNA片段编码来自能够与所需抗原结合的供体免疫球蛋白的重链和轻链互补决定区(CDR)。一般来说,Queen专利中的发明具有针对设计基本上任何人源化免疫球蛋白的适用性。Queen解释说,DNA片段通常包括表达控制DNA序列,其与人源化免疫球蛋白编码序列可操作地连接——包括天然相关或异源启动子区域。表达控制序列可以是能够转化或转染真核宿主细胞的载体中的真核启动子系统,或者表达控制序列可以是能够转化或转染原核宿主细胞的载体中的原核启动子系统。一旦载体已经并入适当的宿主中,该宿主就被维持在适合该引入核苷酸序列高水平表达的条件下,接着,根据需要,收集和纯化人源化轻链、重链、轻/重链二聚体或完整的抗体、结合片段或其他免疫球蛋白形式(Beychok,Cells of Immunoglobulin Synthesis,Academic Press,New York,1979,该文献通过引用并入本文)。

[0121] 人类抗体的DNA序列,特别是互补决定区(CDR),可根据本领域公知的程序来进行分离。优选地,如国际专利申请公开号WO 1987/02671中所述,从无限增殖化B细胞中分离人类CDR DNA序列。可用于产生本发明的抗体的CDR可以类似地衍生自能够结合靶分子的DNA编码单克隆抗体。这种人源化抗体可以使用公知的方法在能够产生抗体的任何适宜的哺乳动物来源中生成,所述哺乳动物包括但不限于小鼠、大鼠、骆驼、美洲驼、兔子或其他脊椎动物。恒定区和框架DNA序列的适合细胞以及其中表达和分泌抗体的宿主细胞可以从许多来源获得,例如美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection),Manassa,VA。

[0122] 生成对LRP5反应性的特异性抗体或抗体片段的另一种方法涉及用LRP5蛋白或肽筛选表达库编码免疫球蛋白基因或其部分,其在细菌中表达。例如,可以使用噬菌体表达库,在细菌中表达完整的Fab片段、VH区和Fv区。参见例如Ward et al.,Nature,1989,341:544-546;Huse et al.,Science,1989,246:1275-1281;和McCafferty et al.,Nature,1990,348:552-554。用例如DKK2或LRP5肽来筛选这样的库,可以鉴定出与DKK2或LRP5反应的免疫球蛋白。可选地,可使用SCID-hu小鼠(可从Genpharm获得)产生抗体或其片段。

[0123] 在另一个实施方式中,抗体或抗体片段可以从抗体噬菌体库中分离,该抗体噬菌体库是使用McCafferty等人,Nature,1990,348:552-554所描述的技术生成的。Clackson等人,Nature,1991,352:624-628和Marks等人,J Mol Biol,1991,222:581-597分别描述了使用噬菌体库来分离鼠类和人类抗体。之后的公开文献描述了通过链改组(chain shuffling)来产生高亲和力(nM范围)的人类抗体(Marks et al.,BioTechnology,1992,10:779-783),也描述了组合感染和体内重组作为建构非常大噬菌体库的策略(Waterhouse et al.,Nuc.Acids.Res.,1993,21:2265-2266)。因此,这些技术都可以替代传统上用来分离单克隆抗体的单克隆抗体杂交瘤技术。

[0124] DNA也可以被修饰,例如,通过用人类重链和轻链恒定区的编码序列来取代同源鼠类序列(美国专利号4,816,567;Morrison,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1984,81:6851),或通过非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或部分共价连接至免疫球蛋白编码序列。通常地,这样的非免疫球蛋白多肽用来取代抗体的恒定区,或者,其用来取代抗体的

一个抗原结合位点的可变结构域,以产生嵌合二价抗体,其具有一个对第一抗原有特异性的抗原结合位点,以及另一个对不同抗原有特异性的抗原结合位点。

[0125] 目前已经开发出多种用于生产功能性抗体片段的技术。抗体片段可以包括抗体的可变区或抗原结合区。传统上,这些片段经由将完整抗体蛋白水解消化得到(参见例如 Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1992, 24:107-117 and Brennan et al., *Science*, 1985, 229:81)。然而,这些片段现在可以直接通过重组宿主细胞来产生。例如,抗体片段可以从上述抗体噬菌体库中分离。可选地,可以直接从大肠杆菌回收 Fab'-SH 片段并将其进行化学偶联以形成 F(ab')₂ 片段 (Carter et al., *Bio/Technology*, 1992, 10:163-167)。根据另一种方法, F(ab')₂ 片段可以从重组宿主细胞培养物中直接分离。产生抗体片段的其它技术对熟练的技术人员来说是显而易见的。在其他实施方式中,所选择的抗体是单链 Fv 片段 (scFv)。参见 W0 93/16185; 美国专利号 5,571,894; 及美国专利号 5,587,458。该抗体片段还可以是“线性抗体”,例如在美国专利号 5,641,870 中所述的。这种线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0126] 抗体模拟物或“非抗体结合蛋白”使用非免疫球蛋白支架,其包括 adnectins、avimer、单链多肽结合分子及类抗体结合拟肽 (antibody-like binding peptidomimetics), 其通过使用非免疫球蛋白支架作为抗体可变区的替代蛋白框架 (美国专利号 5,260,203; 5,770,380; 6,818,418 及 7,115,396)。已经开发出其他化合物,其以类似于抗体的方式靶向和结合靶标。这些“抗体模拟物”中的某些使用非免疫球蛋白支架作为抗体可变区的替代蛋白质框架。将抗体降低为较小的拟肽物 (称为“类抗体结合拟肽” (ABiP)) 的方法也可用作抗体的替代物 (Murali et al. *Cell Mol Biol.*, 2003, 49 (2):209-216)。

[0127] 通过体外外显子改组和噬菌体展示 (phage display) 从人类胞外受体结构域开发称为“avimers”的融合蛋白,其为包括多个结构域的单链多肽,其是一类与抗体有些类似对多种靶分子具有亲和力和特异性的结合蛋白 (Silverman et al. *Nat Biotechnol*, 2005, 23:1556-1561)。所得到的多结构域蛋白可以包括多个独立的结合结构域,与单表位结合蛋白相比,其可以展现出改善的亲和力 (在一些情况下为亚纳摩尔 (sub-nanomolar)) 和特异性。其他关于 avimers 的建构和使用的方法的细节公开于例如美国专利申请公开号 20040175756、20050048512、20050053973、20050089932 和 20050221384 中。

[0128] 除了非免疫球蛋白框架之外,还可利用包括但不限于 RNA 分子和非天然寡聚体 (例如,蛋白酶抑制剂、苯二氮平 (benzodiazepines)、嘌呤衍生物及 β -转角模拟物) 的化合物来模拟抗体性质,而上述所有都适用于本发明。这些旨在通过完全体外技术开发来设计定制特异性的抗体,以规避在动物内开发抗体的限制。

[0129] 如本领域所知的,适配体是由紧密结合特定分子靶标的核酸所组成的大分子。Tuerk 和 Gold (*Science*, 1990, 249:505-510) 公开了用于选择适配体的 SELEX (通过指数富集的配体系统进化) 方法。在 SELEX 方法中,用靶分子产生和/或筛选核酸分子的大型库 (例如,1015 个不同的分子)。然后,分离的适配体可以进一步进行精制,以消除对靶标结合和/或适配体结构无贡献的任何核苷酸 (即适配体被截断至其核心结合结构域)。参见例如 Jayasena 于 1999 年在 *Clin. Chem.* 45:1628-1650 中所发表的关于适配体技术的回顾性论文。

[0130] 关于本发明的抗 DKK2 和/或抗 LRP5 抗体的术语“中和”,或短语“中和 DKK2 活性的抗体”或“中和 LRP5 活性的抗体”,旨在指如此抗体,其与 LRP5 接触或结合导致抑制细胞增殖活

性、癌症转移、癌细胞侵入或癌细胞迁移、由DKK2和/或LRP5诱发的促进肿瘤形成微环境的建立。由于DKK2细胞外分泌,并作为癌细胞增殖、迁移、侵入和转移的必需因子起作用,因此一些抗DKK2抗体和/或LRP5抗体可以中和这些活性。本发明中的中和抗体在下列治疗应用中特别有用:预防或治疗难医治的疾病癌症和癌症转移。在一些实施方式中,本发明的中和抗体可以施用至患者,或与细胞接触,以抑制以DKK2的过表达为特征的癌症的转移。

[0131] 本发明的抗体可以通过本领域已知的任何方法来评估其免疫特异性结合。可以使用的免疫测定法包括但不限于竞争性或非竞争性测定系统,其使用例如蛋白质印迹、放射性免疫测定法、ELISA(酶联免疫吸附测定法)、“夹心”免疫测定法、免疫沉淀测定法、沉淀素反应法、凝胶扩散沉淀素反应法、免疫扩散测定法、凝集测定法、补体结合测定法(complement-fixation assays)、放射免疫测定法、荧光免疫测定法、蛋白质A免疫测定法等等。这样的测定是常规的并且是本领域所公知的(参见例如Current Protocols in Molecular Biology, (Ausubel et al., eds.), Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 2002)。

[0132] 组合疗法

[0133] 当本文描述的方法中确定的化合物与可用于治疗癌症的至少一种额外的化合物组合时,也可用于本发明的方法中。额外的化合物可以包含本文确定的化合物,或已知治疗、预防或减轻癌症和/或转移症状的化合物,例如市售化合物。

[0134] 在一方面中,本发明考虑可用于本发明中的试剂可以与治疗剂(例如抗肿瘤剂)组合使用,所述治疗剂包括但不限于化学治疗剂、免疫治疗剂、抗细胞增殖剂和其任何组合。例如,任何下列非限制性的示例性类别的常规化学治疗剂都包括在本发明中:烷化剂、亚硝基脲(nitrosoureas)、抗代谢剂、抗肿瘤抗生素、植物生物碱(plant alkyls)、紫杉烷类、激素药剂和其他药剂(miscellaneous agents)。

[0135] 烷化剂如此命名是因为其在存在于细胞中的条件下向许多负电性基团添加烷基的能力,从而其干扰DNA复制以防止癌细胞繁殖。大多数烷化剂是细胞周期非特异性的。在特定方面中,它们通过交联DNA双螺旋链中的鸟嘌呤碱基来终止肿瘤生长。非限制性的实例包括白消安(busulfan)、卡铂(carboplatin)、苯丁酸氮芥(Chlorambucil)、顺铂(Cisplatin)、环磷酰胺(Cyclophosphamide)、达卡巴嗪(dacarbazine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、盐酸氮芥(mechlorethamine hydrochloride)、美法仑(Melphalan)、甲基苄肼(procarbazine)、噻替派(thiotepa)和尿嘧啶氮芥(uracil mustard)。

[0136] 抗代谢剂在细胞周期的合成(S)阶段期间阻止碱基并入DNA中,这禁止细胞正常发育和分裂。抗代谢剂的非限制性实例包括以下药物,如5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil), 6-巯基嘌呤(6-mercaptapurine)、卡培他滨(capecitabine),阿糖胞苷(cytosine arabinoside)、氟尿苷(floxuridine)、氟达拉滨(fludarabine)、吉西他滨(gemcitabine)、甲氨蝶呤(methotrexate)和硫鸟嘌呤(thioguanine)。

[0137] 抗肿瘤抗生素通常通过干扰细胞分裂所需的酶,或通过改变围绕细胞的细胞膜来防止细胞分裂。这一类所包括的是蒽环类药物(anthracyclines),如多柔比星(doxorubicin),其通过破坏DNA结构并终止其功能来防止细胞分裂。这些药剂是细胞周期非特异性的。抗肿瘤抗生素的非限制性实例包括:阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(anthramycin)、重氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素

(bleomycins)、放线菌素C(cactinomycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、卡米诺霉素(carubicin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素D(dactinomycin)、道诺霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸(6-diazo-5-oxo-L-norleucine)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycins)、米托蒽醌(mitoxantrone)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycins)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(porfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链脲霉素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)。

[0138] 植物生物碱抑制或终止有丝分裂、或抑制阻止细胞制造细胞生长所需蛋白质的酶。常用的植物生物碱包括长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、长春地辛(vindesine)和长春瑞滨(vinorelbine)。然而,本发明不应被解释为仅限于这些植物生物碱。

[0139] 紫杉烷影响称为微管的细胞结构,微管在细胞功能中是重要的。在正常的细胞生长中,微管会在细胞开始分裂时形成,而一旦细胞停止分裂,则微管被分解或破坏。紫杉烷阻止微管分解,使得癌细胞被微管堵塞,导致它们不能生长和分裂。非限制性的示例性紫杉烷包括太平洋紫杉醇(paclitaxel)和多西紫杉醇(docetaxel)。

[0140] 激素药剂和类激素药物被用于治疗某些类型的癌症,包括例如白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。它们经常与其他类型的化疗药物一起使用,以增强其疗效。性激素用于改变雌性或雄性激素的作用或产生,并用于减缓乳腺癌、前列腺癌和子宫内膜癌的生长。通常可以使用抑制这些激素的产生(芳香化酶抑制剂(aromatase inhibitors))或作用(泰莫西芬(tamoxifen))作为治疗的辅助。一些其他肿瘤也是激素依赖性的。泰莫西芬是激素药剂的非限制性实例,其干扰促进乳腺癌细胞生长的雌激素活性。

[0141] 其他药剂包括化疗药物如博来霉素(bleomycins)、羟基脲(hydroxyurea)、L-天门冬酰胺酶(L-asparaginase)和甲基苄肼(procabazine)。

[0142] 化学治疗剂的其它实例包括但不限于下列药剂及其药学上可接受的盐、酸和衍生物:氮芥(nitrogen mustards),例如苯丁酸氮芥(Chlorambucil)、萘氮芥(chlomaphazine)、氯磷酰胺(chlorophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、盐酸氮芥(mechlorethamine hydrochloride)、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(Melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲洛磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);亚硝基脲(nitrosoureas)例如卡莫司汀(carmustine)、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine);嘌呤类似物如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮杂尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、脱氧氟尿苷

(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)、5-FU;雄激素如卡鲁唑酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸酯(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiothane)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺素如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂如亚叶酸(frolic acid)、醋葡醛内酯(aceglatone)、醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside)、氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid)、安吡啶(amsacrine)、倍曲布西(bestrabucil)、比生群(bisantrene)、依达曲沙(edatrexate)、地磷酰胺(defofamine)、秋水仙胺(demecolcine)、亚丝醌(diaziquone)、依氟鸟氨酸(eflornithine)、依利醋铵(elliptinium acetate)、依托格鲁(etoglucid)、氯化镓(gallium nitrate)、羟基脲(hydroxyurea)、香菇多糖(lentinan)、氯尼达明(lonidamine)、米托胍脘(mitoguazone)、米托蒽醌(mitoxantrone)、莫呱达醇(mopidamol)、尼曲吡啶(nitracrine)、喷司他丁(pentostatin)、蛋氨酸芥(phenamet)、吡柔比星(pirarubicin)、鬼臼酸(podophyllinic acid)、2-乙基酰肼(2-ethylhydrazide)、甲基苄肼(procarbazine)、PSK@雷佐生(razoxane)、西佐喃(sizofuran)、锗螺胺(spirogermanium)、细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid)、三氮杂醌(triaziquone)、2,2',2''-三氯三乙胺(2,2',2''-trichlorotriethylamine)、氨基甲酸乙酯(urethan)、长春地辛(vindesine)、达卡巴嗪(dacarbazine)、甘露醇氮芥(mannomustine)、二溴甘露醇(mitobronitol)、二溴卫矛醇(mitolactol)、呱泊溴烷(pipobroman)、格塞图辛(gacytosine)、阿拉伯糖苷("Ara-C")、环磷酰胺(Cyclophosphamide)、噻替派(thiotepa);紫杉醇类,例如太平洋紫杉醇(paclitaxel)(TAXOLO,Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)和多西紫杉醇(docetaxel)(TAXOTERE,Rhone-Poulenc Rorer,Antony,France);苯丁酸氮芥(Chlorambucil)、吉西他滨(gemcitabine)、6-硫鸟嘌呤(6-thioguanine)、巯基嘌呤(mercaptopurine)、甲氨蝶呤(methotrexate);铂类似物如顺铂(cisplatin)和卡铂(carboplatin);长春碱(vinblastine)、铂、依托泊苷(etoposide)(VP-16)、异环磷酰胺(ifosfamide)、丝裂霉素C(mitomycin C)、米托蒽醌(mitoxantrone)、长春新碱(vincristine)、长春瑞滨(vinorelbine)、诺维苯(navelbine)、盐酸米托蒽醌(novantrone)、替尼泊苷(teniposide)、道诺霉素(daunomycin)、氨基蝶呤(aminopterin)、希罗达(xeloda)、伊班膦酸钠(ibandronate)、CPT-11、拓扑异构酶抑制剂RFS 2000、二氟甲基鸟氨酸(difluoromethylornithine,DMFO)、视黄酸(retinoic acid)、埃斯培拉霉素(esperamicins)和卡培他滨(capecitabine)。

[0143] 抗细胞增殖剂可以进一步定义为细胞凋亡诱导剂或细胞毒性剂。凋亡诱导剂可以是粒酶、Bcl-2家族成员、细胞色素C、胱天蛋白酶或其组合。示例性的粒酶包括,粒酶A、粒酶B、粒酶C、粒酶D、粒酶E、粒酶F、粒酶G、粒酶H、粒酶I、粒酶J、粒酶K、粒酶L、粒酶M、粒酶N或其组合。在其他方面中,Bcl-2家族成员是例如Bax、Bak、Bcl-Xs、Bad、Bid、Bik、Hrk、Bok或其组合。

[0144] 在额外方面中,胱天蛋白酶是胱天蛋白酶-1、胱天蛋白酶-2、胱天蛋白酶-3、胱天蛋白酶-4、胱天蛋白酶-5、胱天蛋白酶-6、胱天蛋白酶-7、胱天蛋白酶-8、胱天蛋白酶-9、胱天蛋白酶-10、胱天蛋白酶-11、胱天蛋白酶-12、胱天蛋白酶-13、胱天蛋白酶-14或其组合。在具体方面中,细胞毒性剂是TNF- α 、白树毒蛋白(gelonin)、灵菌红素(Prodigiosin)、核糖体

抑制蛋白(ribosome-inhibiting protein,RIP)、假单胞菌外毒素(Pseudomonas exotoxin)、艰难梭状芽孢杆菌毒素B(Clostridium difficile Toxin B)、幽门螺杆菌VacA(Helicobacter pylori VacA)、小肠结肠炎耶氏杆菌YopT(Yersinia enterocolitica YopT)、紫色杆菌素(Violacein)、二乙烯三胺五乙酸(diethylenetriaminepentaacetic acid)、伊洛福芬(irofulven)、白喉毒素(Diphtheria Toxin)、米托洁林(mitogillin)、蓖麻毒素(ricin)、肉毒杆菌毒素(botulinum toxin)、霍乱毒素(cholera toxin)、皂草素6(saporin 6)或其组合。

[0145] 免疫治疗剂可以是但不限于白介素-2或其他细胞因子、程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)信号传导的抑制剂(例如与PD-1结合的单克隆抗体伊匹单抗(ipilimumab))。免疫治疗剂还可以阻断细胞毒性T淋巴细胞相关抗原A-4(CTLA-4)的信号传导,并且其还可以涉及癌症疫苗和基于树突细胞的疗法。

[0146] 免疫治疗剂进一步可以是活化和扩增的NK细胞,其活化和扩增借助细胞因子处理,或通过过继细胞疗法(adoptive cell therapy)和/或通过造血干细胞移植来转移外源性细胞来进行。适用于过继细胞疗法的NK细胞可以源自不同来源,包括离体扩增自体NK细胞、来自外周血的未刺激或扩增的同种异体NK细胞、来自外周血和脐带血的CD34+造血祖细胞,和NK细胞系。本发明中也考虑表达嵌合抗原受体或细胞因子的基因修饰的NK细胞。可用于本发明的另一种免疫治疗剂是基于过继T细胞疗法(adoptive T cell therapy,ACT)的试剂,其中将肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes,TIL)施用至患者。施用的T细胞可以被遗传工程化以表达肿瘤特异性抗原受体,例如嵌合抗原受体(CAR),其以非主要组织相容性(MHC)限制方式来识别细胞表面抗原;或者它们可以是传统的 α BTcr,其识别由MHC分子所呈递的细胞内抗原的表位。

[0147] 药物组合物和制剂。

[0148] 本发明预期将包含LRP5消耗剂的药物组合物用于本发明方法中的用途。

[0149] 药物组合物以适于施用于受试者的形式,或者药物组合物可以进一步包含一或多种药学上可接受的载体、一种或多种额外的成分,或这些的一些组合。药物组合物的各种组分可以以生理学上可接受的盐的形式存在,例如本领域所熟知的,其与生理上可接受的阳离子或阴离子结合。

[0150] 在一个实施方式中,可以施用可用于实践本发明方法的药物组合物,以递送1ng/kg/天和100mg/kg/天之间的剂量。在另一实施方式中,可以使用可用于实践本发明的药物组合物,以递送1ng/kg/天和500mg/kg/天之间的剂量。

[0151] 本发明药物组合物中的活性成分、药学上可接受的载体和任何额外的成分的相对量将根据所治疗受试者的身份、大小和状况而变化,并且还取决于施用组合物的途径。举例来说,组合物可以包含0.1%和100%(w/w)之间的活性成分。

[0152] 可用于本发明方法的药物组合物可适当地开发用于吸入、口服、直肠、阴道、肠胃外、局部、经皮、肺部、鼻内、口腔、眼部、鞘内、静脉内或另一种施用途径。其他考虑的制剂包括投放性的(projected)纳米颗粒、脂质体制剂、含有活性成分的再密封红细胞和基于免疫学的制剂。施用途径对于本领域技术人员而言是显而易见的,并取决于许多因素,包括正治疗的疾病类型和严重程度、正治疗的兽医或人类患者的类型和年龄等。

[0153] 本文描述的药物组合物的制剂可以通过任何药理学领域已知的或之后开发的方

法来制备。通常,这样的制备方法包括使活性成分与载体或一种或多种其他辅助成分关联的步骤,然后如果需要或可行的话,将产品成形或包装成所需的单剂量或多剂量单位。

[0154] 如本文所使用的,“单位剂量”是离散量的包含有预定量的活性成分的药物组合物。活性成分的量通常等于将被施用于受试者的活性成分的剂量,或为该剂量的适当分数,例如该剂量的一半或三分之一。单位剂型可以用于每日单次给药,或者用于每日多次给药(例如,每天约1至4次或更多次)中的一次给药。当使用每日多次给药时,每次给药的单位剂型可以是相同的或不同的。

[0155] 尽管本文提供的药物组合物的描述主要涉及适合于伦理上施用于人的药物组合物,但是本领域技术人员应该理解这样的组合物通常适于施用于所有种类的动物。为了使组合物适合施用于各种动物,对药物组合物进行改良是充分理解的,并且普通技术的兽医药学家仅需要利用普通(如果有的话)实验就可以设计和进行这种改良。预期施用本发明的药物组合物的受试者包括但不限于人类和其他灵长类、哺乳动物,其包括商业相关的哺乳动物,例如牛、猪、马、绵羊、猫和狗。

[0156] 在一个实施方式中,使用一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体来配制组合物。在一个实施方式中,药物组合物包含治疗有效量的LRP5消耗剂和药学上可接受的载体。可用的药学上可接受的载体包括但不限于甘油、水、盐水、乙醇和其他药学上可接受的盐溶液,例如磷酸盐和有机酸的盐。这些和其他药学上可接受的载体的实例描述于Remington's Pharmaceutical Sciences,1991,Mack Publication Co.,New Jersey中。

[0157] 载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)、其适合的混合物和植物油。适当的流动性可以例如通过使用如卵磷脂的涂层、通过在分散的情况下维持所需的颗粒尺寸和通过使用表面活性剂来维持。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯类(parabens)、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞(thimerosal)等来实现防止微生物作用。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、氯化钠或多元醇如甘露醇和山梨糖醇。可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝或明胶)带来可注射组合物的延长吸收。

[0158] 制剂可以与常规赋形剂混合使用,常规赋形剂即药学上可接受的有机或无机载体物质,其适用于口服、肠胃外、鼻腔、静脉内、皮下、肠内或其它任何本领域已知适合的施用模式。药物制品可以灭菌,并且如果需要,可以与辅助剂例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压缓冲液的盐、着色剂、调味剂和/或芳香物质等进行混合。如果需要,也可以将它们与其它活性剂,例如其他镇痛剂组合。

[0159] 本发明的组合物可以包含占组合物总重量约0.005%至2.0%的防腐剂。防腐剂用于防止组合物暴露于环境中的污染物时发生腐败。根据本发明可用的防腐剂的实例包括但不限于选自苯甲醇、山梨酸、对羟基苯甲酸酯类、咪唑烷基脲(imidurea)和其组合的那些。特别优选的防腐剂是约0.5%至2.0%的苯甲醇和0.05%至0.5%的山梨酸的组合。

[0160] 优选地,组合物包含抑制化合物降解的抗氧化剂和螯合剂。对于一些化合物而言,优选的抗氧化剂是BHT、BHA、 α -生育酚和抗坏血酸,优选范围为按重量计组合物总重量的约0.01%至0.3%,更优选的BHT范围为按重量计组合物总重量的0.03%至0.1%。优选地,螯合剂以按重量计组合物总重量的0.01%至0.5%的量存在。特别优选的螯合剂包括按重量计组合物总重量的约0.01%至0.20%的乙二胺四乙酸盐(例如依地酸二钠)和柠檬酸,更优

选的范围为按重量计组合物总重量的0.02%至0.10%。螯合剂可用于螯合组合物中的金属离子,所述金属离子可能对制剂的保存期限有害。虽然BHT和依地酸二钠分别是一些化合物的特别优选的抗氧化剂和螯合剂,但是如本领域技术人员所知的,可以用其他合适的和等同的抗氧化剂和螯合剂取代。

[0161] 施用/给药

[0162] 施用方案可能影响多少构成有效量。例如,可以在与癌症有关的外科手术之前或之后、或者在患者被诊断为患有癌症之后不久,将治疗性制剂施用于患者。此外,可以每天或顺序施用若干分开的剂量以及交错的剂量,或者药剂可以连续地输注,或者可以快速浓注。进一步,如治疗或预防情况的迫切情况所指示的,治疗制剂的剂量可按比例地增加或减少。

[0163] 将本发明组合物施用于患者,优选的哺乳动物,更优选的人类,可以使用已知的程序,以有效治疗患者癌症的剂量和时间段来进行。实现治疗效果所需的治疗性化合物的有效量可根据如下列因素而变化:所使用的具体化合物的活性;施用时间;化合物的排泄率;治疗的持续时间;与该化合物组合使用的其他药物、化合物或材料;正治疗的患者的疾病或病症的状态、年龄、性别、体重、状况、一般健康状态和先前病史,以及医学领域中众所周知的类似因素。可调整剂量方案以提供最佳的治疗反应。例如,可以每天施用几个分开的剂量,或者如治疗情况的迫切情况所指示的,可以按比例地减少剂量。本发明治疗性化合物的有效剂量范围的非限制性实例为约0.01至50mg/kg体重/每天。本领域的普通技术人员将能够研究相关因素并且在不进行过度实验的情况下关于治疗性化合物的有效量进行确定。

[0164] 化合物可以每天数次频繁地施用于动物,或者可以低不频繁地施用,例如每天一次、每周一次、每两周一次、每月一次、或者甚至更不频繁,如每隔几个月一次甚至每年一次或更少。可以理解的是,在非限制性实例中,每天给药的化合物的量可以是每天、每隔一天、每2天、每3天、每4天或每5天施用。例如,每隔一天施用、5毫克/天剂量可以在周一开始,其中在周三施用第一个随后的5毫克/天剂量,在周五施用第二个随后的5毫克/天剂量,等等。给药的频率对于技术人员而言是显而易见的,并取决于许多因素,例如但不限于正治疗的疾病的类型和严重程度,以及动物的类型和年龄。本发明药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可以改变,以获得对特定患者、组合物和施用模式有效实现所需治疗反应且对患者不造成毒性的活性成分的量。医生例如具有本领域通常知识的医师或兽医可以容易地确定和开出所需药物组合物的有效量。例如,医师或兽医可以从低于实现所需治疗效果所需水平的药物组合物中采用的本发明化合物的剂量开始,并逐渐增加剂量直至顺序所需效果。

[0165] 在具体的实施方式中,为了便于施用和剂量的一致性,以剂量单位形式配制化合物是特别有利的。如本文所使用的,剂量单位形式是指适合作为待治疗患者的单位剂量的物理分离单位;每个单位含有预定量的治疗性化合物,经计算与所需的药物载体关联产生所需的治疗效果。本发明的剂量单位形式由以下因素规定并直接取决于以下因素:(a) 治疗性化合物的独特特征和待实现的具体治疗效果,和(b) 混合/配制这种治疗性化合物用于治疗患者的癌症的领域中固有的限制。

[0166] 施用途径

[0167] 本领域的技术人员将认识到虽然可以使用多于一种途径进行施用,但是特定途径

可以提供比另一种途径更加直接和更有效的反应。

[0168] 本发明任何组合物的施用途径包括吸入、口服、鼻腔、直肠、肠胃外、舌下、经皮、经粘膜(例如舌下、舌、(经)口腔、(经)尿道、阴道(例如,经阴道及经阴道周围)、鼻腔(内)和(经)直肠)、膀胱内、肺内、十二指肠内、胃内、鞘内、皮下、肌肉内、皮内、动脉内、静脉内、支气管内、吸入和局部施用。适合的组合物和剂型包括例如片剂、胶囊、囊片、丸剂、囊形片(gel cap)、锭剂、分散剂、悬浮剂、溶液剂、糖浆剂、颗粒剂、珠剂、经皮贴剂、凝胶剂、粉剂、粒剂、糊剂(magmas)、糖锭(lozenges)、霜剂、膏剂(pastes)、硬膏剂(plasters)、洗剂、盘剂(discs)、栓剂、用于鼻或口服施用的液体喷雾剂、用于吸入的干粉或雾化制剂、用于膀胱内施用的组合物及制剂等。应该理解的是,可用于本发明的制剂及组合物不限于本文所述的特定制剂和组合物。

[0169] 控释制剂和药物递送系统:

[0170] 本发明的药物组合物的控释或缓释制剂可以使用常规技术制备。在一些情况下,待使用的剂型可以作为其中的一或多种活性成分的缓释或控释形式来提供,其使用例如羟丙基甲基纤维素、其他聚合物基质、凝胶、透性膜、渗透系统、多层涂层、微粒子、脂质体或微球体或其组合以提供不同比例的所需释放曲线。本领域普通技术人员已知的适合的控释制剂(包括本文所述的那些)可容易地被选择与本发明的药物组合物一起使用。因此,本发明涵盖了适用于口服施用的单一单位剂型,例如适用于控制释放的片剂、胶囊、囊形片(gelcap)和囊片。

[0171] 大多数控释药品的共同目标是相较于非控释药品所实现的药物治疗具有改进的药物治疗。理想情况下,在医学治疗中使用最佳设计的控释制品的特征在于能在最短的时间内使用最少量的药物来治愈或控制病症。控释制剂的优点包括延长的药物活性、降低的剂量频率和增加的患者顺应性。另外,控释制剂可用于影响作用开始的时间或其他特征,如药物的血液浓度,并因此可影响副作用的发生。

[0172] 免疫反应刺激

[0173] 在一个实施方式中,本发明包括通过向受试者施用有效量的阻断DKK2和LRP5之间的相互作用的抑制剂来提供抗肿瘤免疫和刺激T细胞介导的免疫反应的方法。在另一个实施方式中,本发明包括通过向受试者施用有效量的LRP5抗体或其片段及药学上可接受的载体来提供抗肿瘤免疫和刺激T细胞介导的免疫反应的方法,所述LRP5抗体或其片段抑制或降低LRP5表达或活性。

[0174] T淋巴细胞(T细胞)的活化及其用于治疗癌症和感染性疾病的免疫疗法中的用途在本领域中是公知的(Melief et al., Immunol. Rev., 1995, 145:167-177; Riddell et al., Annu. Rev. Immunol., 1995, 13:545-586)。如本发明所公开的,LRP5的消除导致CD8+细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的活化和肿瘤的抑制。

[0175] 用于CTL活化的标志物可以是但不限于如穿孔蛋白、粒酶和颗粒溶解素(granulysin)的细胞毒素、细胞因子、IL-2、IL-4、IFN- γ 、PD-1、CD25、CD54、CD69、CD38、CD45RO、CD49d、CD40L、CD107a、CD137、CD134、CD314。如本文实施例部分中提供的,在样品中测量这些标志物的至少一种的水平,可用于评估CTL活化。T细胞的分选或一般来说任何本发明的细胞的分选可以使用多种市售细胞分选仪中的任一种进行,其包括但不限于MoFlo分选仪(DakoCytomation, Fort Collins, Colo.)、FACSAria™、FACSArray™、FACSVantage™、

BD™ LSR II和FACSCalibur™(BD Biosciences, San Jose, Calif.)。

[0176] 自然杀伤细胞(NK细胞)的活化及其用于治疗癌症和感染性疾病的免疫疗法中的用途在本领域是公知的(Crouse, J. et al., 2015, Trends Immunol, 36:49-58; Marcus, A., et al., 2014, Adv Immunol 122:91-128; Palucka, A., et al., 2016, Cell 164:1233-1247)。如本发明所公开的,消除LRP5导致自然杀伤细胞(NK)的活化和肿瘤的抑制。

[0177] NK细胞活化的标志物可以是但不限于如穿孔蛋白、粒酶和颗粒溶解素的细胞毒素、细胞因子、IL-2、IL-4、IL-15、IFN- γ 、MHC-I单倍型、NKG2D配体(RAE-1 α - ϵ 、MULT-1和H60a-c)、Fas、TRAILR1/2、PD-1、CD25、CD54、CD69、CD38、CD45RO、CD49d、CD40L、CD107a、CD137、CD134或CD314。如本文实施例部分中提供的,在样品中测量这些标志物的至少一种的水平可用于评估NK细胞活化。NK细胞的分选或一般来说本发明任何细胞的分选可以使用多种市售细胞分选仪中的任一种进行,其包括但不限于MoFlo分选仪(DakoCytomation, Fort Collins, Colo.)、FACSAria™、FACSArray™、FACSVantage™、BD™ LSR II和FACSCalibur™(BD Biosciences, San Jose, Calif.)。

[0178] 血管发生

[0179] 血管发生是生长和发育以及伤口愈合和肉芽组织形成中的正常且重要的过程。血管发生的正常调节受到诱导血管形成的因素和停止或抑制该过程的因素之间的好平衡所支配。当这种平衡被破坏时,通常导致病理性血管发生,其造成增加的血管形成。病理性血管发生是癌症和各种缺血性和炎性疾病(例如心血管疾病)的标志。由于肿瘤不能生长超过某一尺寸,或在没有血液供应的情况下扩散,因此阻断肿瘤血管发生是抗癌疗法中的有效方法。此外,血管发生抑制剂(也称为抗血管发生剂)的使用在本领域中已知与治疗缺血性和炎性疾病相关。

[0180] 癌症的治疗

[0181] 在本发明的一些方面中,癌症的治疗可以包括治疗实体肿瘤或治疗转移。转移是一种癌症的形式,其中转化的或恶性的细胞正在将癌症从一个位置移动和扩散到另一个位置。这些癌症包括皮肤癌、乳癌、脑癌、子宫颈癌、睾丸癌等。更具体地,癌症可以包括但不限于以下器官或系统:心脏、肺、胃肠、生殖泌尿道、肝脏、骨骼、神经系统、妇科、血液学、皮肤和肾上腺。更具体地,本文的方法可用于治疗神经胶质瘤(神经鞘瘤、恶性胶质瘤、星形细胞瘤)、神经母细胞瘤、嗜铬细胞瘤、副神经节瘤、脑脊髓膜瘤、肾上腺皮质癌、肾癌、各种类型的血管癌、成骨细胞骨肉瘤、前列腺癌、卵巢癌、子宫肌瘤、唾液腺癌、脉络丛癌、乳腺癌、胰腺癌、结肠癌和巨核细胞白血病。皮肤癌包括恶性黑素瘤、基底细胞癌、鳞状细胞癌、Kaposi氏肉瘤、痣发育不良(moles dysplastic nevi)、脂瘤、血管瘤、皮肤纤维瘤、瘢痕瘤和牛皮癣。

[0182] 测量方法

[0183] 本领域技术人员已知的任何方法都可以用来确定DKK2或LRP5的表达水平。例如,可以使用微阵列。微阵列在本领域中是已知的,并由与基因产物(例如mRNA、多肽、其片段等)序列上对应的探针可特异性杂交或结合至已知位置的表面组成。为了检测至少一种目的基因,通过将测试样品与至少一种核酸探针接触,来形成杂交样品。用于检测DKK2或LRP5的优选探针是分别能够与DKK2或LRP5 mRNA杂交的标记核酸探针。核酸探针可以是例如全长核酸分子或其部分,例如长度为至少10、15或20个核苷酸并且足以在严格条件下与适当

靶标特异性杂交的寡核苷酸。杂交样品保持在足以允许核酸探针与目的靶标进行特异性杂交的条件下。适当地,特异性杂交可以在高度严格条件或中等严格条件下进行。在优选的实施方式中,用于特异性杂交的杂交条件是高度严格的。然后,使用标准方法检测特异性杂交——如果存在的话。如果核酸探针和测试样品中的基因之间发生特异性杂交,则存在于核酸探针中的序列也存在于受试者的mRNA中。也可以使用多于一种核酸探针。由扫描仪检测的杂交强度数据由Affymetrix Microarray Suite (MASS) 软件自动采集和处理。使用150的目标强度将原始数据标准化为表达水平。测量少量不同基因的mRNA表达曲线的替代方法是通过例如典型 TaqMan® 基因表达分析或 TaqMan® 低密度阵列微流体卡 (TaqMan® Low Density Array—micro fluidic cards, Applied Biosystems)。具体地,本发明优选地使用qPCR系统。非限制性实例包括商售试剂盒,例如可从Bio-rad (Berkley, California) 商购的 PrimePCRPathways®。

[0184] 样品特别是mRNA的转录状态也可以通过本领域已知的其他核酸表达技术进行测量。可以使用本领域技术人员已知的任何方法从样品中分离mRNA。非限制性实例包括商售试剂盒,例如可从Qiagen (荷兰) 商购的 RNeasy® 或可从Molecular Research Center, Inc. (Cincinnati, Ohio) 商购的 TRI Reagent® 的 Mini Kit, 可用于分离RNA。通常地,可以使用本领域已知的方法扩增分离的mRNA。利用例如PCR或RT-PCR方法的扩增系统是本领域技术人员已知的。对于扩增技术的一般概述,参见例如Dieffenbach等人, PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1995)。

[0185] 用于描绘mRNA表达轮廓的另一种精确方法可以使用下一代测序 (Next Generation Sequencing, NGS), 其包括第一、第二、第三以及随后的下一代测序技术。

[0186] 在本发明的其他方面中,测定肽、多肽的量或检测肽、多肽的生物活性可通过本领域中用于测定样品中肽或多肽的量的所有已知手段来实现。这些手段包括免疫测定装置和方法,其可以以各种夹心式、竞争式或其他测定形式利用标记分子。此类测定将产生指示肽或多肽存在或不存在的信号。此外,信号强度可以优选地与样品中存在的多肽的量直接或间接相关联(例如,反比)。进一步适合的方法包括测量对肽或多肽特异性的物理或化学性质,例如其精确的分子质量或NMR谱。所述方法优选地包括生物传感器,与免疫测定耦合的光学器件、生物芯片、分析装置如质谱仪、NMR-分析仪或层析装置。进一步,方法包括基于微板ELISA (micro-plate ELISA-based) 的方法、全自动或机器人免疫测定法(例如对于 Elecsys™ 分析仪可用的)、CBA (酶促钴结合测定, enzymatic Cobalt Binding Assay, 例如对于 Roche-Hitachi™ 分析仪可用的) 和乳胶凝集测定(例如对于 Roche-Hitachi™ 分析仪可用的)。

[0187] 实施例

[0188] 现在参考以下实施例描述本发明。提供这些实施例仅出于说明的目的,并且本发明绝不应该解释为限于这些实施例,而是本发明应该解释为涵盖由本文提供的教导变得显而易见的任何和所有变化。

[0189] 在没有进一步描述的情况下,相信本领域的普通技术人员可以使用前面的描述和下面的说明性实施例来制造和利用本发明的化合物并且实践所要求保护的方法。因此,下面的工作实施例具体地指出了本发明的优选实施方式,但不应被解释为以任何方式限制本

公开内容的剩余部分。

[0190] 这些实验中使用的材料和方法现如下所述。

[0191] 小鼠

[0192] 从杰克森实验室获取ApcMin/+ (C57BL/6J-ApcMin/J) 和MX1Cre [B6.Cg-Tg (Mx1-cre) 1Cgn/J] 小鼠。野生型C57BL/6小鼠购自Envigo (Harlan)。从Bart Williams (54) 获得LoxP-floxed Lrp5 (Lrp5f/f) 和Lrp6 (Lrp6f/f) 小鼠。在与MX1Cre杂交之前,Lrp5f/f和Lrp6f/f小鼠与C57/BL6回交超过7代。通过对Lrp5f1/f1MX1Cre小鼠每隔一天腹腔内注射40 μ l的poly-I:C (10mg/mL), 进行4次处理, 诱发LRP5和LRP6基因破坏。在poly-I:C处理后三周, 使用小鼠进行NK细胞分离。对于过继骨髓转移, 将来自Lrp5f1/f1MX1Cre小鼠的骨髓经由眶后注射转移至致死剂量照射的C57/BL6小鼠中 (8周龄)。恢复后 (8周), 用poly-I:C处理小鼠, 并在poly-I:C处理后三周在实验中使用。

[0193] 抗体

[0194] 磷酸-Stat5 (Tyr694) (CST, 4322s)、LAMP1 (sc-19992, Santa Cruz), EEA1 (BD Bioscience, 612006)、磷酸-AKT (丝氨酸473) (CST, 4060)、AKT1 (CST, 9272)、磷酸-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (CST, 4377)、ERK1/2 (CST9102)、穿孔蛋白 (CST, 3693)、粒酶B (CST, 4275)、 β -肌动蛋白 (CST, 3700)、FLAG (Sigma Aldrich, F3165)、 β -联蛋白 (BD Bioscience, 610153)、LRP5 (CST, 5731)、LRP6 (CST, 3395)、小鼠CD4-PE (eBioscience, 12-0042-82)、小鼠NK1.1 (BioLegend, 108710)、小鼠CD8a-PE-Cyanine7 (eBioscience, 25-0081-82)、小鼠CD69-PE (Biolegend, 104508)、人类/小鼠粒酶B-FITC (BioLegend, 515403)、小鼠CD314 (NKG2D)-PE-Cyanine7 (eBioscience, 25-5882-81)、小鼠CD3e-PE (eBioscience, 12-0031-82)、小鼠IFN γ -PE (eBioscience, 12-7311-81)、CTLA-4/CD152 (1B8)-FITC (Thermo Fisher, HMCD15201)、人类CD45-450 (eBioscience, 48-0459-41)、小鼠CD107a-V450 (BD, 560648)、小鼠CD8a-APC (eBioscience, 17-0081-81)、小鼠CD25-Alexa Fluor 488 (eBioscience, 53-0251-82)、小鼠CD279 (PD-1)-PE (BioLegend, 135205)、Ki67 (Abcam ab, 15580)、裂解的胱天蛋白酶-3 (Asp175) (CST, 9661S)、CD31 (Abcam ab, 28364)、荧光素 (FITC) 标记的AffiniPure F (ab')₂片段驴抗小鼠IgG (H+L) (杰克森实验室, 715-096-151)、小鼠整合素 α 4 β 7 (LPAM-1) APC (eBioscience, 17-5887-80)、人类CD56 (NCAM) APC (eBioscience, 17-0566-41)、人类CD16PE (eBioscience, 12-0167-42)、人类CD3 450 (eBioscience, 48-0037-42) 和Alexa 647-标记的AffiniPure F (ab')₂片段山羊抗兔IgG (H+L) (杰克森实验室, 111-606-045) 的抗体。使用标准杂交瘤技术, 在AbMax (北京, 中国) 通过用人类DKK2的合成肽 (KLNSIKSSLGGETPGC; SEQ ID NO: 21) 免疫小鼠, 来生成DKK2的小鼠单克隆抗体 (5F8)。5F8的重链和轻链肽序列分别如下:

[0195] GAELVRPGASVKLSCKASGYSFTNYWMNWKQRPGQGLEWIGMIHPSDSETRLNPKFKDKATLTVDKS SSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCAREGRLGLRSYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 22) 和

[0196] PSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRESGVPDRFVSGSGT DFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYITPLTFGAGTKLE (SEQ ID NO: 23)。其他DKK2的小鼠单克隆抗体也可以用于本发明, 例如但不限于使用标准杂交瘤技术, 在AbMax (中国北京) 通过用人类DKK2的合成肽 (CKVWKDATYSSKAR; SEQ ID NO: 24) 免疫小鼠而产生的抗体1A10。1A10的重链和轻链肽序列分别如下:

[0197] LQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFVNWVKQSHGKSLDWIGRIIPYNGDTFYNQKFKGKATLT VDKSSSTAHEMELLSLTSEDSAVYYCGRGDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:25) 和

[0198] PLTSLSVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTD FTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:26)。治疗性抗PD-1抗体是仓鼠mAb 克隆G4 (Hirano, F. et al. Cancer Res. 65, 1089-1096 (2005)) 和克隆J43 (BioXcell, BP0033-2), 并用多克隆亚美尼亚仓鼠IgG抗体 (BioXcell, BE0091) 的作为对照IgG。

[0199] 定量RT-PCR

[0200] 使用RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) 从细胞中分离全RNA。使用iScript cDNA合成试剂盒 (Bio-Rad), 从RNA合成互补的DNA。使用iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) 进行定量PCR。引物序列列于图16中 (SEQ ID NO:1-4)。

[0201] ELISA

[0202] 将封闭缓冲液 (PBS中1%BSA) 中的重组小鼠DKK2或DKK1蛋白 (20ng/ml, R&D) 在384-孔微量滴定板中在4°C下孵育过夜。用PBS洗涤该板两次, 并在室温下用封闭缓冲液孵育1小时。然后将该板用在封闭缓冲液中的抗DKK2 5F8抗体在室温下孵育1小时。反复洗涤后, 在室温下将该板用HRP-缀合的二抗孵育1小时。将化学发光底物 (Thermo Fisher 37070) 加入该板中, 并通过EnVision平板阅读器读出该板。

[0203] DKK2-AP结合测定

[0204] 如前述 (56) 进行结合测定。简言之, 使用Lipofectamine Plus将HEK293T细胞用LacZ或LRP5转染24小时。细胞用冷的洗涤缓冲液 (含1%牛血清白蛋白、20mM HEPES和0.5% NaN₃的Hanks缓冲盐溶液) 洗涤一次, 并用含有20%DKK2-AP条件培养基的洗涤缓冲液在冰上孵育2小时, 接着用洗涤缓冲液洗涤细胞三次, 并用1%Triton X-100和20mM Tris-HCl (pH7.5) 裂解细胞。将裂解物在65°C下加热10分钟, 以灭活内源性AP, 接着添加化学发光AP底物 (Thermo Fisher T1015)。通过EnVision平板阅读器测量活性。

[0205] 肿瘤移植。

[0206] 将MC38或YUMM1.7黑素瘤细胞 ($0.5 \sim 1 \times 10^6$) 与BD Matrigel (降低的基质生长因子, BD 354230) 以100 μ l混合, 并在雌性C57/BL小鼠 (8至10周龄) 背部右侧处进行皮下接种。通过卡尺测量肿瘤生长, 尺寸表示为垂直高度乘以宽度平方的一半, 以立方毫米为单位。对于抗体处理, 将对照IgG3抗体和抗DKK2抗体在PBS中稀释, 并以图中所指示的间隔在腹腔内注射100 μ l。对于存活率测试, 当MC38的肿瘤尺寸超过1800mm³和YUMM1.7的肿瘤尺寸超过1200mm³时, 将小鼠安乐死。

[0207] 肿瘤浸润性白细胞的制备。

[0208] 使用剪刀和解剖刀将肿瘤切碎, 并在37°C下的振荡器中用消化缓冲液 (含有RPMI1640、5%FBS、1%PS、25mM HEPES和300U胶原酶 (Sigma C0130)) 孵育2小时。通过70 μ m细胞过滤器来过滤分散的细胞, 以消除团块和碎片。在4°C下离心5分钟 (500xg) 后, 将细胞沉淀物重新悬浮于红细胞裂解缓冲液 (Sigma R7757) 中, 并在室温下孵育5分钟, 以去除红细胞。将细胞再次沉淀, 重新悬浮, 并在37°C下于0.05%胰蛋白酶/EDTA中孵育5分钟; 接着添加I型DNase (终浓度1 μ g/ml, Sigma D4263) 进行DNA消化5分钟, 通过加入FBS至5%终止胰蛋白酶消化, 并通过40 μ m细胞过滤器再次过滤细胞。最后, 将细胞再次沉淀并以 2×10^7 的浓度重新悬浮于PBS中。

[0209] 流式细胞术

[0210] 单细胞悬浮液中的细胞用2%PFA (Santa-Cruz sc-281692) 固定。用流式细胞术染色缓冲液 (Flow Cytometry Staining Buffer, eBioscience 00-4222-26) 洗涤后, 细胞在冰上于黑暗中用细胞表面标志物的抗体染色1小时。对于细胞内蛋白质的染色, 将细胞洗涤, 并重新悬浮于透化缓冲液 (Permeabilization Buffer, BD 554723) 中, 在冰上于黑暗通过透化缓冲液中的抗体染色1小时。接着使细胞沉淀并重新悬浮于流式细胞术染色缓冲液中, 以进行流式细胞术分析。

[0211] 肿瘤切片和免疫染色。

[0212] 将组织用4%PFA (Santa-Cruz sc-281692) 在4℃下的振荡器上固定4至6小时。接着用PBS洗涤组织三次, 并在4℃下用PBS中的20%蔗糖溶液灌注过夜。随后将组织固定在OCT包埋化合物中, 并首先在-20℃接着在-80℃下冷冻。使用恒冷箱, 以8μm厚度制备组织切片, 并将其固定到明胶涂布的组织学载玻片上, 其在-80℃的环境下储存。

[0213] 对于免疫染色, 将载玻片解冻至室温, 并在预冷的丙酮中固定10分钟, 然后在PBS中再水合10分钟。在封闭缓冲液 (PBS中1%马血清和0.02%Tween 20) 中将载玻片在室温下孵育1至2小时, 接着用一级抗体在4℃中孵育过夜, 该一级抗体用孵育缓冲液 (PBS中1%马血清和0.02%Tween 20) 稀释。接着, 将载玻片用PBS洗涤三次, 并在室温下用孵育缓冲液中的二级抗体[驴抗兔IgG H&L (DyLight® 550) 预吸附 (abcam ab96920)] 孵育1小时。重复清洗后, 用含有DAPI (Thermo Fisher P36931) 的防褪色固定培养基固定载玻片, 并使用共聚焦显微镜可视化。

[0214] 效应免疫细胞消耗。

[0215] 为了消耗NK细胞, 在肿瘤细胞接种的第-1、5、11和17天, 将抗NK1.1 (PK136, BioXcell BE0036) 或同种型对照 (BioXcell BE0085) 以300ug/小鼠进行腹腔内注射。为了CD8消耗, 在肿瘤细胞接种的第12、15和19天, 将抗CD8α (YTS169.4, BioXcell BE0117) 或同种型对照 (克隆LTF-2, BioXcell BE0090) 以300ug/小鼠进行腹腔内注射。

[0216] 小鼠初代NK、CD8+和IEL细胞的制备和处理。

[0217] 通过使用NK细胞和CD8+T细胞分离试剂盒, 分别根据制造商的说明书 (Miltenyi Biotec#130-090-864和#130-104-075), 从脾脏分离小鼠初代NK和CD8+T细胞。在用DKK2、CHIR99021或WNT3A处理之前, 将初代NK细胞在补充有10%FBS、青霉素 (100U/ml)、链霉素 (100μg/ml)、2-巯基乙醇 (500μM) 和HEPES (10mM) 的RPMI-1640 (Gibco, 11875-093) 中, 在存在重组鼠IL-15 (50ng/ml) 的情况下, 于37℃下 (补充有5%CO₂) 培养24小时。在DKK2处理之前, 将CD8+T细胞在与NK细胞相同的培养基和条件下培养96小时, 但额外补充了IL-15 (200ng/ml) 和IL-15Rα (来自R&D的1μg/ml重组小鼠IL-15受体αFc嵌合体蛋白)。如Little等人 (The Journal of Immunology 175, 6713-6722 (2005)) 及Li等人 (Infect Immun 80, 565-574 (2012)) 所述的, 制备小鼠初代上皮内淋巴细胞 (IEL)。简言之, 将小肠外翻, 分成四块, 并在含有100U/ml青霉素/链霉素的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中洗涤两次。然后将样本使用含有100U/ml青霉素-链霉素、5%胎牛血清 (FCS)、2mM二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 和5mM EDTA的预热的不含Ca²⁺和Mg²⁺的Hanks' 溶液中, 于37℃下搅拌孵育30分钟, 然后剧烈摇动30秒。将上清液通过两个尼龙羊毛柱, 以除去未消化的组织碎片。将获得的淋巴细胞合并, 并在不连续 (40%和70%) Percoll密度梯度上富集。收集40%至70%部分 (IEL) 之间的

界面处的细胞,用IL-15 (200ng/ml) 和DKK2 (200ng/ml) 处理,然后进行流式细胞术分析。

[0218] 人类NK细胞的制备。

[0219] 来自正常人类的外周血单核细胞购自ZenBio (SER-PBMC-200)。通过使用人类NK细胞分离试剂盒,根据生产商的说明书 (Miltenyi Biotec#130-092-657),从PBMC分离人类NK细胞。在用重组人类DKK2蛋白处理前,将人类NK细胞在补充有10%热失活的FBS、青霉素 (100U/ml)、链霉素 (100 μ g/ml)、2-巯基乙醇 (500 μ M) 和HEPES (10mM) 的RPMI-1640 (Gibco, 11875-093) 中,在存在有重组人类IL-15 (50ng/ml) 的情况下,于37 $^{\circ}$ C下 (补充有5%CO₂) 进行培养。

[0220] NK和肿瘤细胞共培养。

[0221] 如上所述的,从脾脏分离初代NK细胞,并在50ng/ml重组鼠IL-15存在的条件下培养24小时。同时,将肿瘤细胞平板接种在96孔板中过夜。在存在IgG3抗体或抗DKK2 5F8的情况下,将NK细胞以7:1的比例加入肿瘤细胞中,在37 $^{\circ}$ C下持续9小时。为了测试DKK2在共培养中的作用,将分离的NK细胞在50ng/ml重组鼠IL-15存在下培养24小时;接着,将NK细胞于存在或不存在DKK2的情况下再培养24小时,之后再将NK细胞以7:1 (NK:MC38) 的比例加入预先接种的MC38细胞。通过Guava流式细胞仪 (EMD millipore) 测定活肿瘤细胞的数量,而使用Annexin V凋亡检测试剂盒 (eBioscience, 88-8007) 通过流式细胞术评估细胞凋亡。

[0222] 免疫细胞染色

[0223] 如上所述的,制备初代NK细胞,并如附图所指出的进行处理。接着,将细胞放置于涂布有聚赖氨酸的盖玻片上,并在室温下孵育30分钟。如附图所指示的,转染并且刺激在盖玻片上生长的HEK293T细胞。细胞在室温下用4%PFA固定10分钟,并在-20 $^{\circ}$ C下用冰的甲醇透化10分钟。在用PBS洗涤3次后,在室温下用封闭缓冲液 (PBS中5%正常驴血清和0.5% triton) 封闭细胞1小时。然后将一级抗体以具有0.5%BSA的PBS稀释,并在4 $^{\circ}$ C下引用至细胞过夜孵育。用PBS洗涤细胞3次,并在室温下用稀释的荧光染料缀合的二级抗体 (在具有1%BSA的PBS中) 孵育1小时。最后,用PBS洗涤细胞3次,并用Prolong Gold Antifade溶液 (Thermo Fisher) 固定,进行共聚焦显微分析。

[0224] 免疫沉淀。

[0225] 将编码STAT5和/或LRP5C-Flag的质粒用Lipofectamine Plus转染293T细胞。转染24小时后,在冰上以含有蛋白酶抑制剂混合物 (Roche) 和磷酸酶抑制剂 (来自Roche的Phospo-stop) 的裂解缓冲液 (50mM HEPES (pH 7.4)、150mM NaCl、1%Triton X-100、10%甘油、2mM MgCl₂、2mM EGTA) 裂解细胞。离心细胞裂解物,以除去不溶性物质。用抗Flag抗体进行免疫沉淀过夜,然后在4 $^{\circ}$ C下进行Protein-A/G Plus珠子 (Santa Cruz) 的2小时孵育。重复洗涤珠子,并通过蛋白质印迹分析结合的蛋白质。

[0226] 报道基因分析。

[0227] Stat5报道基因分析在HEK293T细胞中进行,以分析激活JAK1诱发的活性,或在那些稳定表达JAK3、IL2/15R β 和共同受体 γ 亚单元 (common receptor γ subunit) 的细胞中进行,以分析IL15诱发的活性。将细胞以每孔 8×10^4 个细胞接种于48孔板中。第二天,通过Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 将pGL4.52-STAT5-荧光素酶 (Promega) 和tagRFP (内部对照) 质粒与表达目标基因的其他质粒一起转染细胞。质粒总量保持在125ng/孔。转染后24小时,细胞添加IL15/IL15R α -Fc复合物或空白对照。6小时后,将细胞裂解,并使用Envision

Multilabel平板阅读器进行RFP荧光和荧光素酶发光测量。报道基因活性针对RFP读数标准化后进行显示。LEF报道基因测定在用TOPFlash和GFP质粒转染的HEK293细胞中进行。其余部分与上述相同。报道基因活性针对GFP读数标准化后进行显示。

[0228] APC突变细胞的生成。

[0229] 如先前所述的 (Ran等人, Nat. Protoc 8, 2281-2308 (2013)), 使用CRISPR-Cas9系统进行MC38和HCT116细胞中的APC基因的基因编辑。用表达靶向APC基因的两种指导RNA的两种Cas9质粒转染细胞。这将导致基因的缺失和APC基因的移码。由于这两种指导RNA分别与GFP或RFP共表达, 所以将GFP+RFP+细胞以1.2个细胞/孔的密度直接分选到96孔板中。通过PCR检测APC的纯合缺失 (Homozygous deletion), 并通过DNA测序证实。汇集阳性克隆以避免克隆效应。指导序列和PCR序列已在图16中列出。

[0230] LRP内化测定。

[0231] 在培养基中, 以空白对照或重组小鼠DKK2蛋白 (4nM) 处理HEK293细胞指示的持续时间。将细胞用预冷的PBS洗涤, 并且将细胞表面蛋白质用0.5mg/ml的EZ-Link Sulfo-NHS-SS-生物素 (Thermo Fisher, 21445) 的PBS缓冲液在冰上生物素化30分钟。通过加入含有冰冷的50mM NH₄Cl的PBS终止反应, 然后用冰冷的PBS重复洗涤。接着将细胞在含有1.25% Triton X-100、0.25% SDS、50mM Tris HCl PH8.0、150mM NaCl、5mM EDTA、5mg/ml碘乙酰胺、10ug/ml PMSF和Roche蛋白酶抑制剂混合物的缓冲液中裂解。离心后, 取等分试样作为裂解物对照, 剩余上清液在用NeutrAvidin珠子 (Thermo Fisher, 29200) 的下拉实验 (pull-down) 中使用, 随后通过蛋白质印迹分析。

[0232] RNA测序和数据分析。

[0233] 如上所述的, 从脾脏分离初代NK细胞, 并在50ng/ml重组鼠IL-15存在的情况下培养24小时, 然后在存在或不存在10nM DKK2的情况下培养24小时, 之后, 分离mRNA, 并且通过使用RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) 进行纯化。使用TrueSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit (Illumina) 制备RNA-seq库, 并在Illumina HiSeq 2500上以50个碱基单端读取进行测序。如先前所述的, 准备并进行基因表达分析 (Trapnell et al., Nat Protoc 7, 562-578 (2012) with GENCODE annotation M1)。RNA测序结果的途径分析在 www.amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/enrich 进行。用Motif基因组 (Motif Gene Set, software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp, Subramanian et al., PNAS 102, 15545-15550 (2005)) 进行基因富集分析。

[0234] DKK2表达与患者存活率的相关性。

[0235] 从截至2016年7月20日的TCGA临时数据集中取得DKK2表达、总体存活率和无复发存活率的数据。使用15%的任意截断百分位数, 将高和低DKK2表达者进行分组。Mantel-Cox对数秩测试使用GraphPad Prism 7软件完成。

[0236] 现在, 在下列的实施例中描述实验的结果。

[0237] 实施例A: APC损失驱动DKK2表达。

[0238] 在Oncomine数据库 (www.oncomine.org) 上对Gaedcke群组 (Gaedcke et al., Genes Chromosomes Cancer 49, 1024-1034 (2010)) 的分析揭示相较于非肿瘤结肠直肠组织, 在人类CRC样品中的DKK2表达显著上调 (图8A)。这一观察结果与先前报道 (Matsui et al., Cancer Sci 100, 1923-1930 (2009)) 的发现一致。此外, 基于癌症基因组图谱网络 (The

cancer Genome Atlas Network, Nature 487, 330–337 (2012)) 中报道的数据库的分析,与微卫星不稳定 (microsatellite-unstable, MSI) CRC 相比,微卫星稳定 (microsatellite-stable, MSS) CRC (其超过80%具有APC突变) 中的DKK2表达显著更高(图8A)。检查从Apc^{Min/+}小鼠肠中分离的息肉中的DKK2 mRNA含量显示比正常肠高约四倍(图8B)。由于野生型等位基因的自发性损失,Apc^{Min/+}小鼠在Apc等位基因之一中具有突变并且产生频繁的肠肿瘤(Su et al., Science 256, 668–670 (1992))。此外,DKK2蛋白的免疫染色证实来自Apc^{Min/+}小鼠的息肉中的DKK2表达上调(图8C)。为了测试APC的损失是否经由Wnt-p-联蛋白途径驱动DKK2表达,通过使用CRISPR/Cas9技术在MC38细胞中使Apc基因突变,以引起APC蛋白从Gly-855处开始的纯合C端缺失,并且观察到在无APC的MC38细胞中DKK2表达显著上调(图8D)。DKK2表达的这种上调可以被p-联蛋白siRNA抑制(图8E),这暗示p-联蛋白参与驱动DKK2表达。通过分别从Gly-857和Ser-1346开始引入APC蛋白的纯合C端缺失,也在HCT116人类结肠癌细胞中突变APC基因。尽管这些细胞中存在一个p-联蛋白等位基因的突变,但APC突变导致DKK2表达的显著增加(图8F)。因此,这些结果一起证实APC的损失可以驱动小鼠和人类中的DKK2表达。

[0239] 实施例2:阻断DKK2阻抑APC损失诱发的肿瘤形成

[0240] 对TCGA CRC群组的数据集的分析揭示了高DKK2表达与低存活率之间的显著相关性(图8G)。这显示DKK2可能在CRC中发挥重要作用。考虑到DKK2是Wnt拮抗剂,传统的观点是DKK2的失活可能增加Wnt活性,并因此导致或加速癌症形成。为了研究DKK2是否参与肿瘤发生,观察DKK2^{-/-}小鼠上至一年,并且在包括胃肠道的组织中没有组织学上可辨别的发育不良。通过检查DKK-2缺陷对APC^{Min/+}小鼠(称为APC)和APC^{Min/+}DKK2^{-/-}(APCKO)小鼠中的息肉形成的影响,进一步测试DKK2在肿瘤发生中的作用。小鼠被安置在特定的无病原体动物饲养室中,并喂饲普通或高脂食物。将肠切片用亚甲基蓝染色,并在立体显微镜下计数息肉。在不存在DKK2的情况下,如肠息肉较小的数量和尺寸指示的(图1A和1B),肿瘤发生显著减少。在高脂和低脂饮食的雄性和雌性小鼠组别中,都观察到这种现象,其结果一致。如来自喂饲普通食物的雄性小鼠用苏木精和伊红染色的代表性的肠组织切片所示的,与APC^{Min/+}小鼠相比,APC^{Min/+}DKK2^{-/-}小鼠中的肠息肉较小且较少(图1C)。综上所述,这些数据强烈显示,在没有DKK2介导的信号传导的情况下,结肠癌的进展显著地降低。

[0241] 开发功能性小鼠单克隆抗DKK2抗体(5F8)以特异性靶向和中和DKK2,但不与DKK-1交叉反应。ELISA数据显示,5F8抗体以剂量依赖性方式特异性结合DKK2抗原(图1D)。已显示DKK2以及其他DKK家族蛋白通过以高亲和力与Wnt共同受体LRP 5/6结合并与Wnt分子竞争受体结合来抑制典型Wnt信号传导(MacDonald, B., et al., Dev Cell, 2009. 17 (1): p. 9–26; Bao, J., et al., Sci Signal, 2012. 5 (224): pe22)。为了确定5F8是否降低Wnt信号传导的DKK2抑制,使用Wnt报道基因测定来测量Wnt活性。用Wnt报道基因TOPFlash来转染HEK293细胞,并检测Wnt报道活性。如图1E所示的,Wnt3a增加Wnt报道活性,但添加DKK2以及Wnt3a抑制Wnt信号传导。综合上述考虑,该数据指示5F8经由Wnt共同受体LRP 5/6活性来介导抗肿瘤发生反应。

[0242] 为了检查5F8是否阻断DKK2结合LRP5,进行了结合测定。在该研究中,用LacZ(对照质粒)或LRP5表达质粒转染HEK293细胞。在存在或不存在5F8的情况下,测量DKK2-AP融合蛋白与在细胞表面上过度表达的LRP5的直接结合。如图1F所示的,5F8抗体阻断DKK2结合

LRP5。

[0243] 为了研究5F8抗体是否类似于APC^{Min/+}DKK2^{-/-}小鼠中的DKK2缺陷,减少APC^{Min/+}小鼠中的息肉形成,分析处理小鼠和对照小鼠中的肿瘤负荷。与未处理的小鼠相比,用5F8抗体处理APC^{Min/+}小鼠8周显著减少肠息肉的数量。此外,5F8处理的APC^{Min/+}小鼠中的息肉数目与5F8或对照IgG处理的APC^{Min/+}DKK2^{-/-}小鼠中所发现的息肉数目基本上相同(图1G)。综合上述考虑,结果提供了原则证据的证明:5F8是DKK2的阻断性抗体,经由Wnt共同受体LRP 5/6途径抑制肿瘤形成。此外,5F8阻断DKK2和LRP5之间的相互作用;但是这样做时,5F8也促进了DKK2介导的Wnt信号传导去抑制。

[0244] 实施例3:DKK2阻断调节肿瘤免疫微环境

[0245] 来自C57BL小鼠中的结肠癌的MC38细胞当移植到有免疫能力的WT C57BL小鼠时,进展非常快。因此,这种同种异体移植模型——也被称为同基因模型,可用于体内测试抗DKK2抗体5F8的治疗潜力,其利用功能宿主免疫系统进行。在一项研究中,将MC38细胞经由皮下(s.c.)途径移植至C57BL小鼠(10周龄雌性小鼠,每组n=5)。14天后,每3天使用小鼠IgG或5F8(8mg/kg)经由腹腔内(i.p.)注射处理小鼠。在第22天收集肿瘤并称重。图2A至2B显示,当与对照抗体(IgG3)处理相比时,用5F8处理显著抑制了C57BL小鼠中皮下移植的MC38细胞的致瘤生长。这些结果显示,尽管MC38细胞保留了有功能的APC(图8D-8E),但它们表达足量的DKK以使抗DKK治疗发挥作用。因为使用基因肿瘤模型(genetic tumor model)非常耗时且昂贵,所以使用这种同基因癌症模型来确认DKK2阻断抑制肿瘤进展的机制。因为5F8不影响MC38细胞在培养基中的生长(图2C),所以抗体可能通过改变肿瘤微环境来阻碍肿瘤进展。如果阻断DKK2信号传导不减少肿瘤细胞生长,则抗DKK2信号传导通过另一途径介导肿瘤抑制。

[0246] 为了测试5F8抗体对肿瘤细胞微环境的影响——如血管发生、增殖或凋亡的变化,使用免疫组织学方法来检测MC38肿瘤。在该研究中,经由皮下(s.c.)途径用MC38细胞移植C57BL小鼠(10周龄雌性小鼠,每组n=5)。14天后,每三天经由腹腔内(i.p.)途径用小鼠IgG或5F8(10mg/kg)处理小鼠。可视化MC38肿瘤的CD31的表达——参与血管发生的细胞外蛋白质,在处理或对照(IgG)的肿瘤中在血管发生方面没有显著差异(图2D;图表和代表性图像)。暴露于5F8或对照(IgG)处理的MC38肿瘤的Ki67表达(与细胞增殖有关的蛋白质)的组织学分析也显示在肿瘤细胞增殖方面没有显著差异(图2E)。为了测试DKK2表达是否可以改变肿瘤微环境,以经由适当的抗肿瘤免疫反应来诱发细胞凋亡,测量细胞毒性效应免疫细胞的水平和抗肿瘤活性。免疫细胞毒性细胞,如自然杀伤细胞(NK)和CD8+T淋巴细胞,能够通过分泌含有穿孔蛋白和粒酶的预先形成的颗粒,直接杀死肿瘤细胞。摄入粒酶B(gzmb),其为丝氨酸蛋白酶,经由涉及胱天蛋白酶的水解活化、Bid的切断和DNA的片断化的途径诱发靶细胞凋亡(Thornberry et al., J Biol Chem, 1997. 272 (29) :p. 17907-11; Heusel et al., Cell, 1994. 76 (6) :p. 977-87)。MC38肿瘤的组织学分析揭示5F8处理的细胞其粒酶B阳性细胞的数量与对照(IgG)细胞相比有显著增加(图2G)。此外,MC38肿瘤的切割的胱天蛋白酶3(活化的胱天蛋白酶3(Casp3),为经由凋亡途径诱导死亡的细胞标记)的可视化显示5F8处理的细胞相较于对照细胞凋亡显著增高(图2F)。综合上述考虑,数据显示通过5F8的DKK2阻断上调肿瘤细胞(或肿瘤)内的细胞凋亡,但未改变肿瘤细胞微环境中的肿瘤细胞增殖或血管发生。此外,数据显示,阻断由DKK2介导的LRP5-信号可以上调肿瘤细胞中的凋亡,并且

LRP5特异性抑制可以增加肿瘤细胞凋亡的水平,而不改变血管发生或肿瘤细胞增殖。

[0247] 此外,与Apc^{Min/+}息肉相比,在Apc^{Min/+}Dkk2^{-/-}息肉中,还观察到细胞凋亡和粒酶B染色的增加(图2H)。粒酶B主要由细胞毒性免疫细胞(包括自然杀伤(NK)和CD8⁺T细胞)产生,并诱发靶肿瘤细胞凋亡(Afonina et al., Immunol Rev 235,105-116(2010))。因此,上述数据显示,DKK2阻断可能是通过调节免疫微环境来发挥作用。与此结论一致,当MC38细胞移植到缺乏成熟白细胞(包括NK细胞和细胞毒性T淋巴细胞)的免疫缺陷NSG小鼠上时,5F8未显示其肿瘤抑制效果(图3A至图3B)。综合上述考虑,这些数据指示经由Wnt共同受体LRP5/6最小化DKK2信号传导基本上阻抑了肿瘤生长,并提高动物存活率。阻断LRP5介导的DKK2信号传导,而不改变Wnt信号传导,提供有效的治疗剂,以增加肿瘤细胞的凋亡。此外,数据显示,用LRP5特异性抗体治疗动物可以提高肿瘤抑制效果和动物存活率。

[0248] 实施例4:DKK2的阻断会增强NK和CD8⁺细胞的活化。

[0249] 为了理解免疫机制,对抗体处理的MC38肿瘤中的肿瘤浸润的白细胞进行流式细胞术分析(图9A至图9G)。骨髓细胞(Gr1^高CD11b^高 or Gr1^低CD11b^高)、CD4⁺、CD8⁺、T调节细胞(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺)或NK1.1⁺细胞的百分比,在5F8和其同种型处理的样品之间没有显著差异(图9B至图9E)。然而,5F8处理导致CD8⁺和NK1.1⁺细胞中粒酶B显著增加(图9F至图9G)。这些结果与免疫染色结果一致(图2G),并指示在免疫染色中所检测到的粒酶B阳性细胞是NK和CD8⁺T细胞。还分析肿瘤引流淋巴结。在CD4⁺、CD8⁺或NK1.1⁺细胞群中在5F8和同种型处理的样品之间没有显著差异。

[0250] 为了排除肿瘤尺寸对于流式细胞术结果的影响,将具有MC38肿瘤的小鼠用5F8及其同种型对照仅处理24小时,并收集肿瘤样本进行分析。在该时间点,肿瘤尺寸无明显差异。虽然在CD4⁺、CD8⁺或NK1.1⁺细胞群中没有显著差异(图3C至图3D),但与同种型处理的样本相比,在5F8处理的样本中,观察到肿瘤浸润的CD8⁺和NK1.1⁺细胞中出现粒酶B的剧烈增加(图3E至图3F)。检测CD8⁺和NK细胞的其他活化标志物,并且发现在CD8⁺细胞上的CD69、CD107a、CD314和CD25,以及NK细胞上的CD69和CD314,都显著的增加(图3G至图3H)。在5F8处理的样本中,CD8⁺和NK1.1⁺细胞也出现IFN γ 的增加的趋势(图3G至图3H),和CD8⁺细胞也出现PD-1增加的趋势(图3G)。类似地,与用对照IgG处理的那些相比,急性5F8处理也可显著增加Apc^{Min/+}小鼠PPs的粒酶B阳性CD8⁺细胞,而不影响T淋巴细胞群(图9N至图9O)。

[0251] 为了评估细胞毒性免疫效应细胞在DKK2阻断介导的肿瘤抑制中的重要性,在MC38肿瘤模型中分别用抗NK1.1抗体来清除NK细胞,并用抗CD8抗体来清除CD8⁺细胞(图9P至图9L)。NK或CD8⁺细胞的清除大幅度地减少了5F8的肿瘤抑制作用,其中NK细胞清除可能赋予更强的作用(图3I至图3J)。这些结果显示NK和CD8⁺细胞二者在DKK2阻断介导的肿瘤进展抑制中具有显著作用。

[0252] 实施例5:DKK2直接抑制细胞毒性免疫细胞。

[0253] 为了进一步了解抗DKK2抗体如何抑制肿瘤进展,在肿瘤细胞与初代NK细胞的共培养物中,检测了DKK2阻断促进肿瘤细胞死亡的能力。当IL-15扩增的初代小鼠NK细胞与MC38细胞共培养时,包括5F8导致NK细胞中粒酶B表达的显著增加(图4A),并且肿瘤细胞存活率降低(图4B)。相反地,当单独培养这些细胞时,5F8处理对于NK细胞中的粒酶B表达(图4C)或MC38的存活率(图2C)几乎没有影响。

[0254] 进行微阵列基因表达分析,与使用同种型IgG处理的相比,在5F8处理的MC38细胞

或肿瘤中,确实显示IL-2、IL-15、MHC-I单倍型、NKG2D配体(RAE-1a-e、MULT-1及H60a-c)、Fas或TRAILR1/2(其对于NK细胞活性都是重要的)表达的显著改变。此外,在NK细胞中,通过RT-PCR几乎检测不到DKK2 mRNA,而在MC38细胞中则很容易检测到DKK2 mRNA(图8D至图8E)。与上述共培养结果一起分析,由肿瘤细胞产生的DKK2可能直接作用于NK细胞。当将重组DKK2蛋白加到在IL-15存在下培养的分离的初代NK细胞中时,导致粒酶B以及包括CD69、IFN γ 、CD107a和CD314在内的许多其他NK活化标志物的显著减少(图4D至图4E)。DKK2对NK细胞活化的抑制作用是剂量依赖性的(图4F)。DKK2蛋白对NK活化标志物的这种作用可以转化为对肿瘤杀伤能力的显著影响,这是因为用DKK2蛋白预处理的NK细胞显示降低的引发肿瘤细胞凋亡和死亡的能力(图4G)。DKK2蛋白还可以抑制从外周血分离的人类NK细胞中的粒酶B表达(图10A)。此外,DKK2直接抑制从脾脏分离的小鼠初代CD8⁺细胞(图10B)和从肠分离的CD8⁺上皮内细胞(图10C)。因此,这些数据一起显示DKK2可以直接抑制IL-15介导的NK和CD8⁺细胞活化。

[0255] 实施例6: DKK2阻断增强了NK和CD8⁺细胞活化。

[0256] 为了理解DKK2阻断的免疫机制,对在抗体处理的MC38肿瘤中的浸润白细胞进行流式细胞术分析(图9A至图9G)。骨髓细胞($Gr1^{高}CD11b^{高}$ or $Gr1^{低}CD11b^{高}$)、CD4⁺、CD8⁺、T调节细胞(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺)或NK1.1⁺细胞的百分比,在5F8和其同种型处理的样品之间没有显著差异(图9B至图9E)。然而,5F8处理导致CD8⁺和NK1.1⁺细胞中粒酶B显著增加(图9F至图9G)。这些结果与免疫染色结果一致(图2G),并指示在免疫染色中所检测到的粒酶B阳性细胞是NK和CD8⁺T细胞。还分析肿瘤引流淋巴结。尽管在CD4⁺、CD8⁺或NK1.1⁺细胞群中在5F8和同种型处理的样品之间没有显著差异(图9H至图9J),但与对照(IgG3)处理的样品相比,5F8处理的样品的CD8⁺细胞中的粒酶B有增加的趋势(图9K),和NK1.1⁺细胞中的粒酶B有显著增加的趋势(图9K)。还检测了为肠肿瘤的引流淋巴结的派伊尔淋巴结(PPs)的粒酶B的水平。相较于APC^{Min/+}小鼠,在DKK2^{-/-}APC^{Min/+}小鼠的派伊尔淋巴结中,也观察到粒酶B阳性CD8⁺T细胞的增加;然而,在CD4⁺或CD8⁺细胞群中在动物之间差异很小(图9L至图9M)。

[0257] 为了排除肿瘤尺寸对于流式细胞术分析结果的影响,将具有MC38肿瘤的小鼠用5F8及其同种型(IgG)对照组仅处理24小时。收集肿瘤样本进行分析。在该时间点,5F8处理的动物和对照动物之间的肿瘤尺寸无明显差异。与本文先前的数据一致,处理与对照相比,CD4⁺、CD8⁺或NK1.1⁺细胞群之间(图3C至图3D)没有显著差异;此外,5F8处理的样本与同种型处理的样本相比,肿瘤浸润的CD8⁺和NK1.1⁺细胞中粒酶B剧烈增加(图3E至图3F)。还检测CD8⁺和NK细胞的其他活化标志物,并发现在CD8⁺细胞上的CD69、CD107a、CD314和CD25,以及NK细胞上的CD69和CD314,都显著的增加(图3G至图3H)。在5F8处理的样本中,CD8⁺和NK1.1⁺细胞也出现IFN γ 的增加的趋势(图3G至图3H),和CD8⁺细胞也出现PD-1增加的趋势(图3G)。类似地,与用对照IgG处理的那些相比,急性5F8处理也可显著增加Apc^{Min/+}小鼠PPs的粒酶B阳性CD8⁺细胞,而不影响T淋巴细胞群(图9N至图9O)。

[0258] 为了评估细胞毒性免疫效应细胞在DKK2阻断介导的肿瘤抑制中的重要性,在MC38肿瘤模型中分别用抗NK1.1抗体来清除NK细胞,并用抗CD8抗体来清除CD8⁺细胞。NK或CD8⁺细胞的清除大幅度地减少了5F8的肿瘤抑制作用(图3I至图3J);此外,数据显示在抵消5F8对肿瘤进展的改善作用方面,NK细胞清除比CD8⁺清除具有更强的作用(图3I至图3J)。这些结果显示NK和CD8⁺细胞二者在DKK2阻断介导的肿瘤进展抑制中具有显著作用。

[0259] 实施例7:DKK2独立于Wnt- β -联蛋白信号传导抑制NK细胞活化。

[0260] 鉴于DKK2可抑制Wnt- β -联蛋白信号传导的事实,本研究测试Wnt- β -联蛋白信号传导是否负责由DKK2进行的NK细胞调控。在Wnt报道基因测定中,WNT3A蛋白诱发报道基因活性的剧烈增加,其可被DKK2蛋白抑制(图10D)。另外,WNT3A在初代NK细胞中诱发了 β -联蛋白累积(图10E)。然而,WNT3A对NK细胞中的粒酶B表达没有显著影响(图4H)。还测试了CHIR99021(GSK3抑制剂,其绕过WNT及其受体增加 β -联蛋白稳定性)。尽管其对Wnt报道基因活性具有强烈影响(图10D),但CHIR99021显示对初代NK细胞中的粒酶B没有显著影响(图4H)。因此,导致NK细胞活化的DKK2信号传导的抑制不可能归因于其对Wnt- β -联蛋白信号传导的影响。这些结果与近来的报道(D'Amico,L.,et.al.2016.J.Exp.Med.213(5):827-40; Malladi,S.等,2016.Cell.165:45-60)在DKK2的作用机制方面有所区别,所述近来的报道指出Wnt- β -联蛋白信号传导参与调控肿瘤免疫微环境的。

[0261] 实施例8:DKK2阻止磷酸化的STAT5核定位。

[0262] 为了理解DKK2如何通过IL-15抑制细胞毒性免疫细胞活化,检查了DKK2处理对由IL-15刺激的各种信号传导事件的影响。在磷酸化的STAT5、ERK和AKT中没有检测到显著变化(图5A)。与流式细胞术结果一致,在DKK2处理的样品中观察到粒酶B的减少(图5A)。另外,在DKK2处理的样品中观察到穿孔蛋白的减少(图5A)。然而,与来自空白对照处理的那些相比,来自DKK2处理的初代NK细胞的mRNA的测序显示DKK2处理的STAT信号传导的改变(图13A至图13B,图15和图17)。接下来,检查磷酸化STAT5(磷酸-STAT)的定位。尽管IL15如预期地诱发磷酸-STAT5的核定位,但是在用DKK2处理的细胞中容易地检测到磷酸-STAT5的细胞质定位(图5B和图13C)。一致地,从5F8处理的肿瘤分离的NK细胞,与从对照IgG处理的肿瘤分离的那些相比,显示磷酸-STAT5的细胞质定位降低(图5C)。一致地,从5F8处理的肿瘤分离的NK细胞,与从对照IgG处理的肿瘤分离的那些相比,显示磷酸-STAT5的细胞质定位降低(图5C和图13D)。在DKK2处理的NK细胞中,磷酸-STAT5似乎与早期内体标志物:早期内体抗原1(Early Endosome Antigen,EEA1,图5D)部分共定位,但不与晚期内体标志物:溶酶体相关膜蛋白1(Lysosome Associated Membrane Protein 1,LAMP-1)共定位(图5E)。这些数据显示磷酸-STAT5可能被隔离在早期/再循环内体上,其包括EEA1阳性早期内体。因此,这些数据指示DKK2处理不会破坏IL-15信号传导导致STAT5磷酸化的机制,而是DKK2处理妨碍磷酸化的STAT5的核定位。

[0263] 实施例9:DKK2通过LRP5而非通过LRP6起作用。

[0264] DKK2与LRP5和LRP6结合。尽管DKK2仍然可以抑制缺乏LRP6的初代NK细胞的活化(图11A),但它不能抑制LRP5缺陷的NK细胞活化(图6A)。此外,DKK2未能造成妨碍缺乏LRP5的NK细胞中磷酸-STAT5的核定位(图6B)。综合上述考虑,这些结果指示LRP5而非LRP6是DKK2对NK细胞发生作用所需的。在NK细胞中,LRP5缺陷不影响Wnt3A所刺激的 β -联蛋白累积(图10E),进一步证实了DKK2-LRP5中轴对于NK活化的影响不依赖于Wnt- β -联蛋白信号传导。相反地,LRP6在NK细胞的Wnt- β -联蛋白信号传导中起了关键作用,因为WNT3A在LRP6缺陷的NK细胞中不诱发 β -联蛋白累积(图11B)。

[0265] 为了进一步测试LRP5在肿瘤进展中的重要性 and DKK2阻断的抗肿瘤作用,采用过继细胞转移模型。具体而言,将来自Lrp5f1/f1Mx1Cre小鼠的骨髓(BM)转移至致死剂量照射的WT C57BL小鼠中。在恢复和Cre表达诱发后,用MC38细胞移植小鼠。造血细胞中缺乏LRP5导

致显著阻碍移植肿瘤的进展(图6C)。重要的是,抗DKK2抗体5F8显示对肿瘤进展没有显著影响,但在接受WT BM转移的小鼠中,仍然保持其肿瘤抑制效果(图6C)。对肿瘤浸润的白细胞的流式细胞术分析提供与5F8经由LRP5来发挥其对细胞毒性免疫细胞活化和肿瘤抑制的作用的结论一致;此外,研究在造血细胞表型中LRP5缺陷对细胞毒性免疫活化中的5F8处理的影响,并且在造血细胞表型中LRP5缺陷废除了5F8对细胞毒性免疫细胞活化的作用(图11B至图11C)。这些数据连同图1F中的数据一起确定了最佳地抑制肿瘤形成的LRP5特异性抗体是有用的,因为它:(i)阻断DKK2与LRP5结合,也阻断经由LRP5的信号传导,和(ii)对Wnt信号传导没有影响,其主要由Wnt共同受体LRP6所介导。

[0266] 实施例10:LRP5C与STAT5相互作用并抑制STAT5。

[0267] 为了更好地理解LRP5如何干扰磷酸化的STAT5核定位,检查了LRP5胞内结构域(LRP5C)和STAT5之间的相互作用。LRP5C和STAT5在HEK293细胞中共免疫沉淀(图6D)。接下来,在表达JAK3、IL2/15 β 和共同 γ 受体亚单元的HEK293细胞中测试LRP5C对IL-15介导的STAT5报道基因活性活化的影响。当用IL-15刺激时,LRP5C的表达显著抑制了STAT5报道基因的活性(图6E),而不影响STAT5磷酸化(图6F)。此外,LRP5C可以通过在HEK293细胞中表达组成型活性JAK1突变体(V658F)来抑制STAT5报道基因活性(Haan, C. et al., 2011. Chem. Biol. 18:314-323)(图6G)。尽管LRP5C的表达不改变STAT5磷酸化(图6G),但它损害了通过活化JAK1表达所诱发的磷酸化STAT5的核定位(图6H)。这些数据与在初代NK细胞中观察的一致,并支持了DKK2通过经由LRP5C与STAT5相互作用来阻碍磷酸化STAT5的核定位进而抑制IL-15信号传导的结论。DKK2诱发LRP5而非LRP6的快速内化的观察(图6I)为图7描绘的机制提供了额外的支持,通过该机制DKK2通过内化的LRP5而非LRP6在内体处诱发磷酸化STAT5的细胞质隔离。

[0268] 实施例11:DKK2抑制对抗PD-1的肿瘤免疫反应。

[0269] 为了评估DKK2阻断的治疗潜力,使用MC38肿瘤模型测试DKK2阻断与PD-1阻断的组合作用。尽管PD-1和DKK2阻断均显示出肿瘤抑制作用,但该组合产生了进一步的抗肿瘤作用(图7A至图7B和图14A)。值得注意的是,用该组合治疗的少部分肿瘤显示完全消退(图14A)。流式细胞术分析显示尽管个体阻断导致肿瘤浸润的CD8⁺和NK细胞中的粒酶B水平增加,但该组合阻断导致这些细胞中的粒酶B水平进一步增加(图7B至图7D)。为了更直接地评估DKK2对由PD-1阻断引发的肿瘤免疫反应的影响,进行重组DKK2蛋白肿瘤内施用。DKK2蛋白抑制PD-1阻断诱发的肿瘤浸润CD45⁺和CD8⁺细胞的数量增加和CD8⁺和NK细胞的活化(图7E)。这些结果一起为组合阻断的额外肿瘤抑制作用提供了解释。

[0270] 皮肤黑素瘤(TCGA,临时的)群组的分析揭示了PTEN-功能损失和功能突变的PI3K增加与升高的DKK2表达的相关性(图14B)。这些突变导致磷脂酰肌醇(3,4,5)-三磷酸的细胞水平增加。此外,在人类黑素瘤中,观察到PD-1抗性与DKK2表达增加相关联的趋势(图14C, Hugo et al., Cell 165, 35-44 (2016)), 和与PTEN损失突变显著相关联的趋势(Peng et al., Cancer Discov 6, 202-216 (2016))。因此,使用YUMM1.7小鼠黑素瘤细胞测试DKK2阻断的抗肿瘤作用,将其与PD-1阻断或其组合比较。YUMM1.7细胞衍生自在C57BL/6小鼠中发展的Braf^{V600E}Pten^{-/-}Cdkn2a^{-/-}黑素瘤(Kaur et al., Nature, (2016))。YUMM1.7细胞中的DKK2 mRNA的水平比MC38细胞高出10倍以上,可以由PI3K抑制剂渥曼青霉素处理降低(图14D),这显示DKK2表达受到磷脂酰肌醇(3,4,5)-三磷酸升高的调控。重要的是,抗-DKK2抗

体在YUMM1.7肿瘤模型中,显著阻碍肿瘤进展,并延长具有肿瘤小鼠的存活率(图7F和图14E至图14F)。此外,DKK2阻断显示出比PD-1阻断更好性能的一般趋势(图7F和图14E至图14F)。当与MC38模型中的对照相比时,组合显示出比个体阻断更强的存活益处,其显著优于YUMM1.7黑素瘤模型的个体阻断(图7F和图14E至图14F)。另外,少部分用该组合处理的小鼠显示肿瘤完全消退(图14E)。对肿瘤浸润的白细胞的流式细胞术分析显示通过DKK2和PD-1阻断的组合,CD8⁺和NK细胞的活化显著更强(图7G和图14G)。这些数据支持先前提到的结论,并提示DKK2阻断在肿瘤治疗中更广泛的适用性。

[0271] 实施例12:总结

[0272] 在这项研究中,揭示了以前未知的DKK2在促进肿瘤进展中的功能。其阻断显示导致抑制小鼠模型中的肿瘤进展。DKK2阻断介导的肿瘤抑制显示取决于宿主免疫系统,特别是NK和CD8⁺细胞。DKK2显示具有通过IL-15直接抑制NK和CD8⁺细胞活化的能力,并且表征了这种DKK2作用的机制。在此机制中,DKK2特异性地通过LRP5,而非LRP6,阻断磷酸化STAT5的核定位,(图11E)。DKK2可以结合其在NK细胞中均可表达的LRP5(图1F)和LRP6(Li et al., PNAS 109,11402-11407(2012))。目前仍不清楚为什么只有LRP5是本文DKK2作用所需的。已知DKK2诱发磷酸化STAT5被隔离在内体处,与LRP6相比(图6I),LRP5响应DKK2而被内化的能力可以提供解释。之前已有报道,LRP6在配体结合后不被内化;并显示DKK1(Semenov, et al., J Biol Chem, (2008))和WNT3A(Kim et al., J Cell Biol.200,419-428(2013))均不诱导内源性LRP6的内化。LRP5和LRP6关于它们内化能力之间的一个主要区别在于LRP5具有三个推定的衔接头蛋白-2(adaptor protein-2,AP2)-结合基序,与之相比,如先前所提到的,LRP6在其胞内结构域中只有一个这样的基序(Kim et al., J Cell Biol.200,419-428(2013))。AP2是网格蛋白介导的胞吞作用中的成分,并且其功能之一是货物识别(cargo recognition,McMahon et al., Nat Rev Mol Cell Biol 12,517-533(2011),Ohno, J Cell Sci 119,3719-3721(2006))。

[0273] DKK2可对肿瘤中NK细胞比体外试验中NK细胞施加更有效的作用,这是因为如通过定量RT-PCR所测定的,肿瘤浸润NK细胞中的LRP5 mRNA水平比从脾脏分离的初代NK细胞高出8倍。尽管如此,DKK2蛋白在体外对磷酸化STAT5的核定位施加明确的作用。然而,DKK2似乎并未造成完全从核中排除磷酸化STAT5(图5B)。这种对磷酸化STAT5核定位的部分作用可以解释为什么DKK2仅对NK细胞的活化具有部分但生物学上显著的效应,而对NK细胞发育缺乏强效作用。这也可以解释为什么DKK2抑制不改变小鼠的NK细胞数量,考虑到STAT5或IL-15信号传导特异性IL15受体 α 亚单元的缺乏对NK细胞发育具有深远影响(K.Imada et al., J Exp Med 188,2067-2074(1998);S.Teglund et al., Cell 93,841-850(1998);E.Eckelhart et al., Blood 117,1565-1573(2011))。这些结果也可被解释为暗示NK细胞发育和完全活化对于STAT5信号传导具有不同的阈值。与此想法一致,在IL-15活化的NK细胞中,与粒酶B相比,DKK2似乎显示出对干扰素 γ 不同程度的抑制(图4F)。DKK2还可以抑制IL-15介导的CD8⁺细胞活化(图10B),这大概是通过类似于其抑制NK细胞中STAT5信号传导的机制。值得注意的是,据报道LRP5的表达在人类成熟CD8⁺细胞中被上调(Wu et al., Immunity 26,227-239(2007)),这显示DKK2也可能在体内对CD8⁺细胞具有更强的作用。然而,DKK2不抑制T细胞受体介导的初代T细胞活化。这提供了DKK2阻断对T细胞群缺乏影响的解释。它还显示了在小鼠中用DKK2阻断观察到的CD8⁺细胞的活化可能是由于DKK2直接调控

CD8⁺细胞和NK细胞介导的间接调控CD8⁺细胞的组合。虽然IL-15-STAT5信号传导在细胞毒性CD8⁺T细胞的活化中具有直接作用,但NK细胞也可以增强适应性的抗肿瘤免疫(Crouse et al., Trends Immunol 36, 49-58 (2015))。与IL-15-STAT5信号传导在CD8⁺上皮内细胞中的主导作用一致(Mishra et al., Clin Cancer Res 20, 2044-2050 (2014)), DKK2能够抑制从小鼠肠分离的CD8⁺IEL。DKK2对IEL的直接抑制可能在Apc^{min/+}肠肿瘤模型中的粒酶B阳性CD8⁺细胞的DKK2阻断相关的增加中具有更大的作用。综上所述, DKK2在体内的强效抗肿瘤作用可能不仅是其对NK和CD8⁺细胞直接作用的结果,而且也是这些免疫细胞相互作用的结果,并且这些机制的相对贡献可能有上下相依赖的(context-dependent)。

[0274] 搜索基因表达图谱(Gene Expression Atlas) (www.ebi.ac.uk/gxa/home) 揭示DKK2在各种正常人类和小鼠组织,特别是免疫组织中,通常以低水平表达。这显示DKK2抑制可能不是增加自身免疫的强风险因子。事实上,在上至12个月的特定无病原体条件下饲养的小鼠中, DKK2缺陷不改变各种造血细胞群。如本研究中所证实的, DKK2表达可由人类和小鼠结肠细胞二者中APC缺失所驱动(图8A至8G)。因为将DKK2蛋白直接施用到肿瘤中可以抑制由PD-1阻断引发的免疫反应(图7E),所以在包括无APC的肿瘤中存在DKK2将构成抵抗PD-1阻断的机制。DKK2阻止PD-1阻断作用的一种解释可能是由于为了完全活化抗肿瘤免疫力需要受DKK2阻断影响的STAT5信号传导和受PD-1阻断影响但不受DKK2阻断影响的TCR信号传导二者。这也可以解释DKK2和PD-1阻断组合的额外抗肿瘤作用,并且可能是人类CRC治疗中PD-1阻断效力较差的原因。

[0275] DKK2表达也受到APC损失以外的机制的调控。在人类黑素瘤中, DKK2表达与导致磷脂酰肌醇(3,4,5)-三磷酸升高的突变相关联(图14B)。在PD-1抗性的人类黑素瘤中,也具有DKK2表达上调的趋势(图14C)。另外,最近已报道,在人类黑素瘤中, PTEN损失用PD-1疗法的抗性显著校正(Peng et al., Cancer Discov 6, 202-216 (2016))。PTEN损失和DKK2表达之间的关系也在小鼠黑素瘤细胞系(YUMM1.7)中观察到,该细胞系源自携带有PTEN损失突变的基因改造黑素瘤模型(图14D)。在YUMM1.7肿瘤模型中, DKK2阻断特别是DKK2和PD-1阻断的组合的强抗肿瘤作用显示DKK2阻断可用于治疗PD-1抗性的黑素瘤和/或增强PD-1阻断治疗对于具有磷脂酰肌醇(3,4,5)-三磷酸升高突变的黑素瘤的功效。TCGA临时数据集的分析还揭示了高DKK2表达与肾乳头癌和膀胱尿路上皮癌存活率低下的显著相关性(图14H)。因此, DKK2阻断也可以作为单一疗法或与其他检查点抑制剂联合来治疗这些人类癌症。这些可能性和阻断DKK2受体LRP5在人类癌症疗法中的潜力值得在未来进一步研究。

[0276] 每个专利、专利申请和本文引用的公开文献以其全部内容在此通过引用并入本文。

[0277] 虽然本发明参照具体实施方式进行了公开,但本领域其他技术人员可设计出未脱离本发明精神与范畴的本发明的其他实施方式与变形。所附的权利要求旨在被解释应包含所有这类实施方式和等效变化。

序列表

<110> 耶鲁大学

D. 吴

Q. 肖

<120> 低密度脂蛋白受体相关蛋白5抑制阻抑肿瘤形成

<130> 047162-7103W01 (00682)

<150> US 62/476,109

<151> 2016-03-24

<160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 1

cgacacacca tgcaggccga 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 2

cctggtcagg ccgccaatcg 20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 3

tcaactccat caagtcctet c 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的
<400> 4
tcacattcct tatcactgct g 21
<210> 5
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 5
gugaaaauucu uggcuauua 19
<210> 6
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 6
gcgcuuggcu gaaccauca 19
<210> 7
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 7
aagcugaccu gauggaguu 19
<210> 8
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 8
cagcaaauca ugcgccuuu 19
<210> 9
<211> 25
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 9
caccgttggg gagagagcga ggtat 25
<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 10
aaacatacct cgctctctct ccaac 25
<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 11
caccgtgcca cacaatggaa ctcgg 25
<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 12
aaacccgagt tccatttgtt ggcac 25
<210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 13
caccgttggg gagagaacgc ggaat 25
<210> 14
<211> 25

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 14
aaacattccg cgttctctct ccaac 25
<210> 15
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 15
caccggtctt cctgagaggt atgaa 25
<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 16
aaacttcata cctctcagga agacc 25
<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 17
caccggttta tcttcagaat cagec 25
<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 18
aaacggctga ttctgaagat aaacc 25
<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 19

caccgtacat ctgctaaaca tgagt 25

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 20

aaacactcat gtttagcaga tgtac 25

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 21

Lys Leu Asn Ser Ile Lys Ser Ser Leu Gly Gly Glu Thr Pro Gly Cys

1 5 10 15

<210> 22

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 22

Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys

1 5 10 15

Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln

20 25 30

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile His Pro Ser Asp

35 40 45

Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr

50 55 60

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 25

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Pro | Glu | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Ile | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Ser | Phe | Thr | Gly | Tyr | Phe | Val | Asn |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Trp | Val | Lys | Gln | Ser | His | Gly | Lys | Ser | Leu | Asp | Trp | Ile | Gly | Arg | Ile |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Ile | Pro | Tyr | Asn | Gly | Asp | Thr | Phe | Tyr | Asn | Gln | Lys | Phe | Lys | Gly | Lys |
| | | 50 | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Ala | Thr | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Ser | Thr | Thr | Ala | His | Met | Glu | Leu |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Leu | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Gly | Arg | Gly |
| | | | | | 85 | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Ser | Val | Thr | Val | Ser | Ser | | | |
| | | | 100 | | | | | | 105 | | | | | | |

<210> 26

<211> 105

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 26

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Leu | Thr | Leu | Ser | Val | Thr | Ile | Gly | Gln | Pro | Ala | Ser | Ile | Ser | Cys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Lys | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Lys | Thr | Tyr | Leu | Asn |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Trp | Leu | Leu | Gln | Arg | Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Lys | Arg | Leu | Ile | Tyr | Leu |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Val | Ser | Lys | Leu | Asp | Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Thr | Gly | Ser | Gly |
| | | 50 | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Lys | Ile | Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Glu | Asp |
| 65 | | | | 70 | | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Leu | Gly | Val | Tyr | Tyr | Cys | Trp | Gln | Gly | Thr | His | Phe | Pro | Gln | Thr | Phe |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

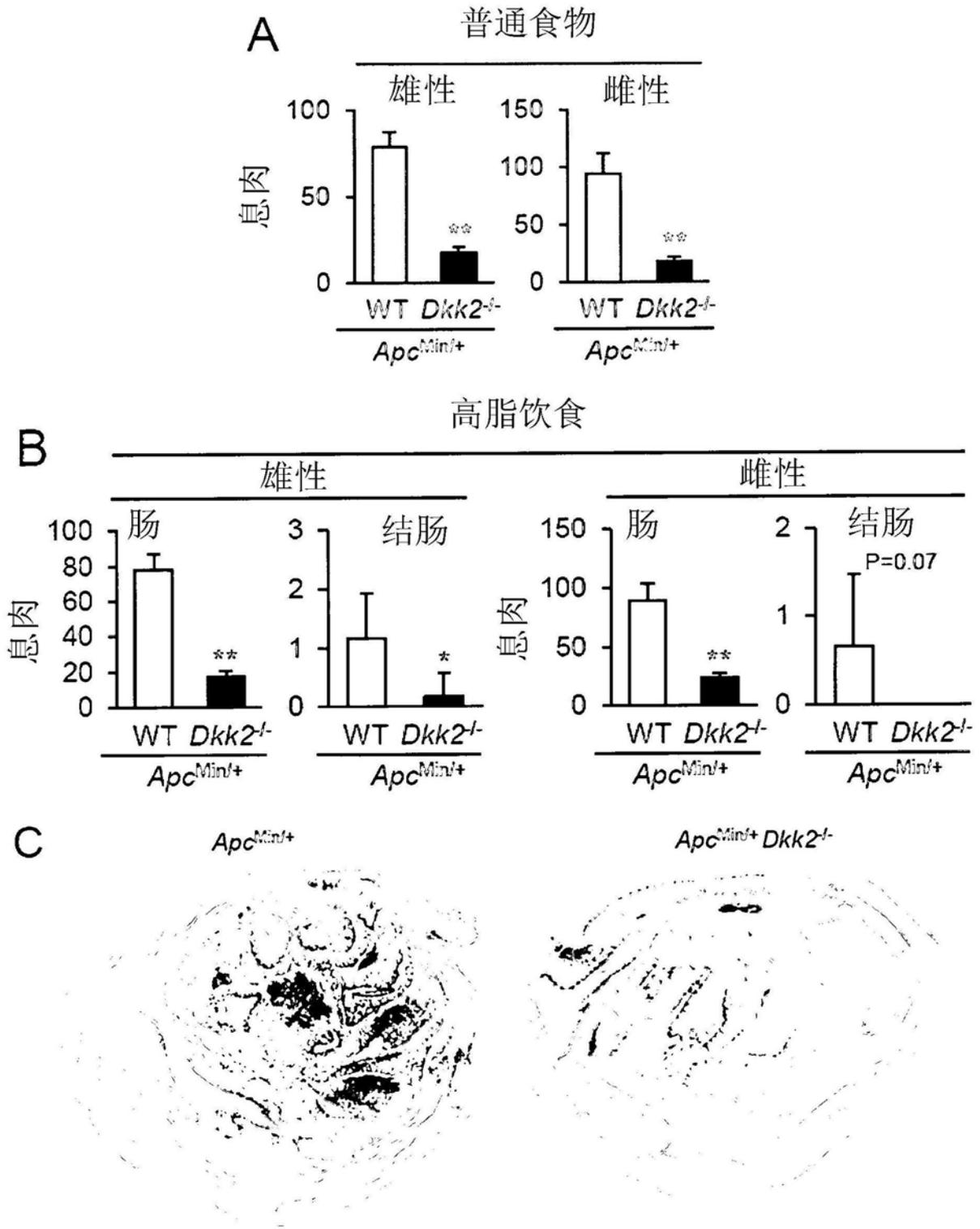


图1A-1C

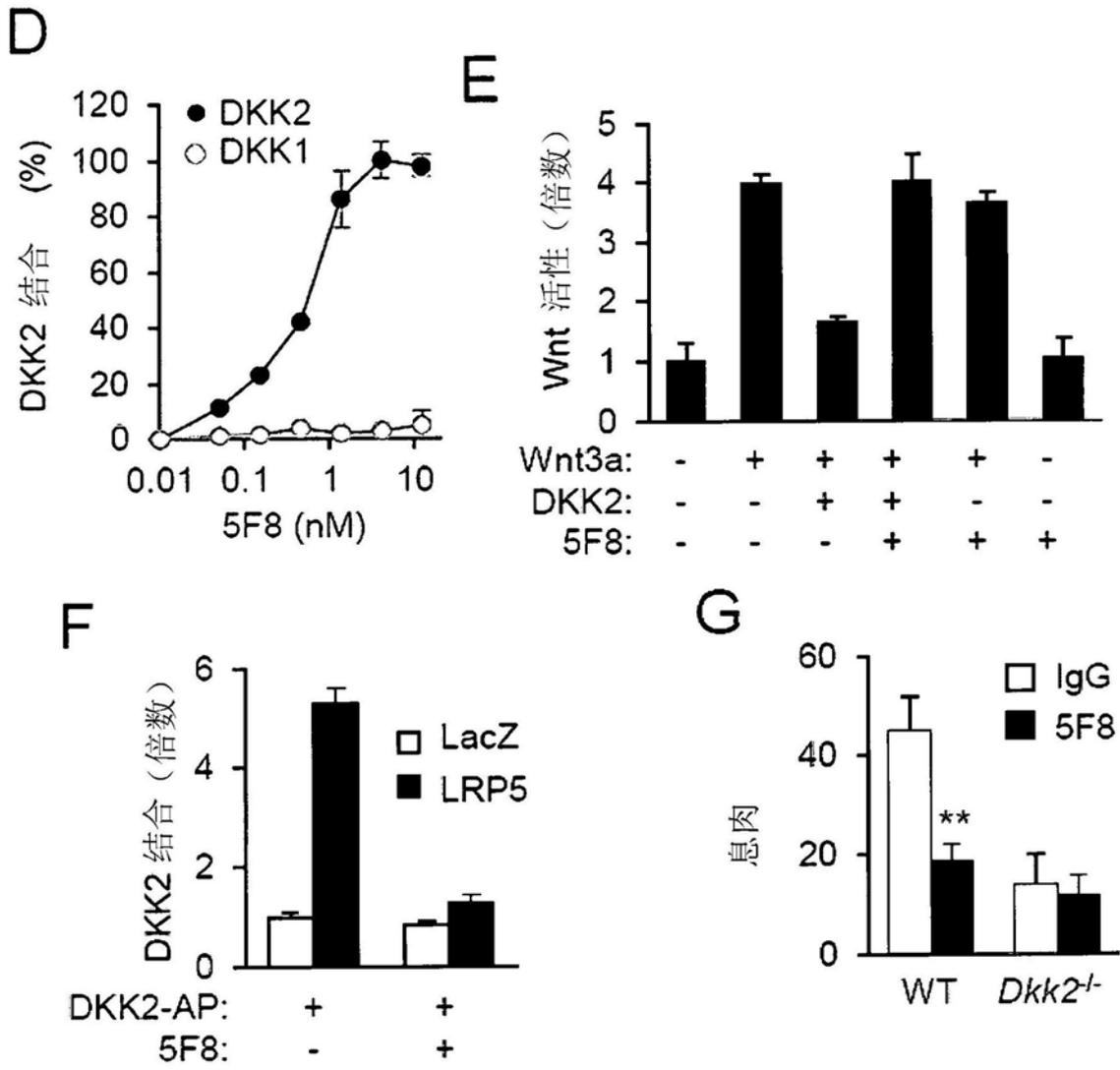


图1D-1G

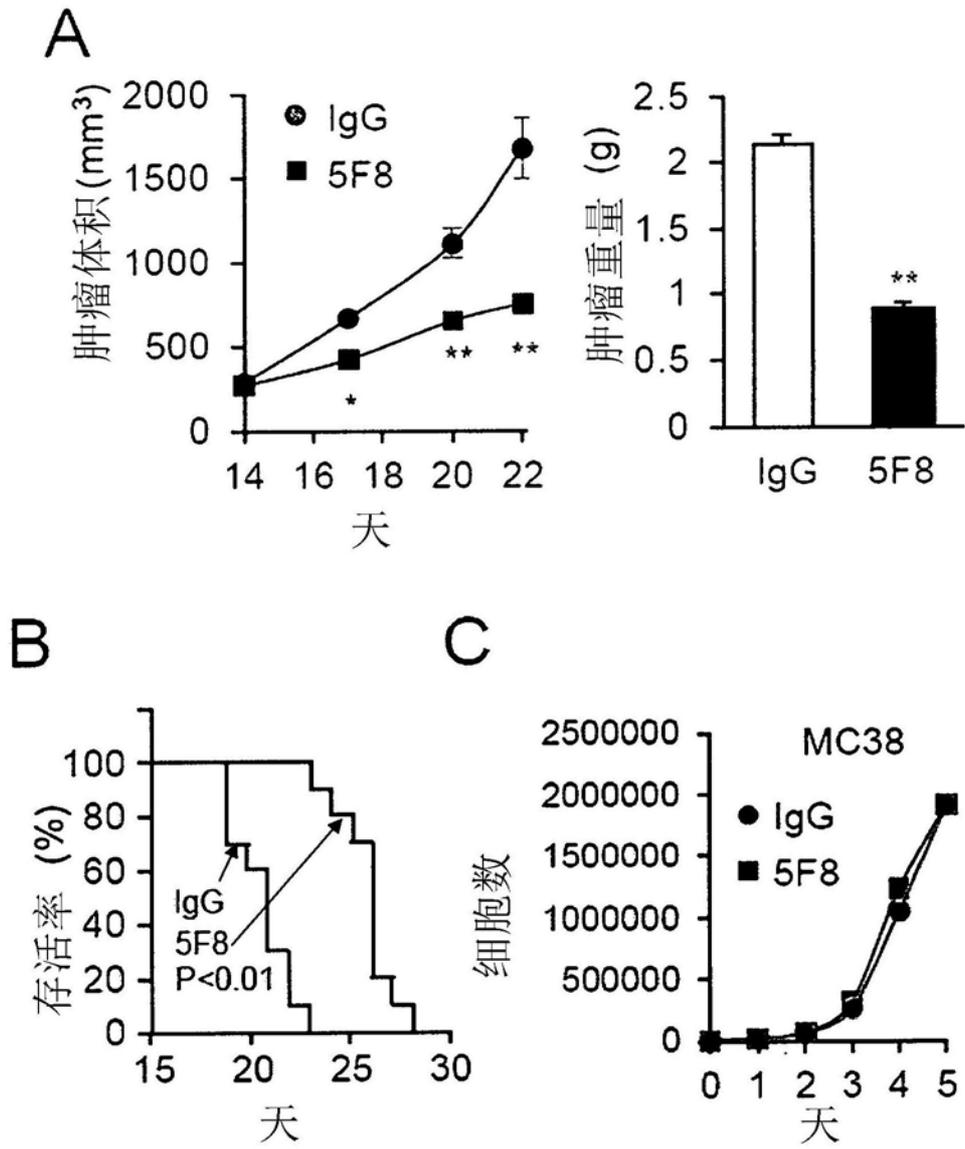


图2A-2C

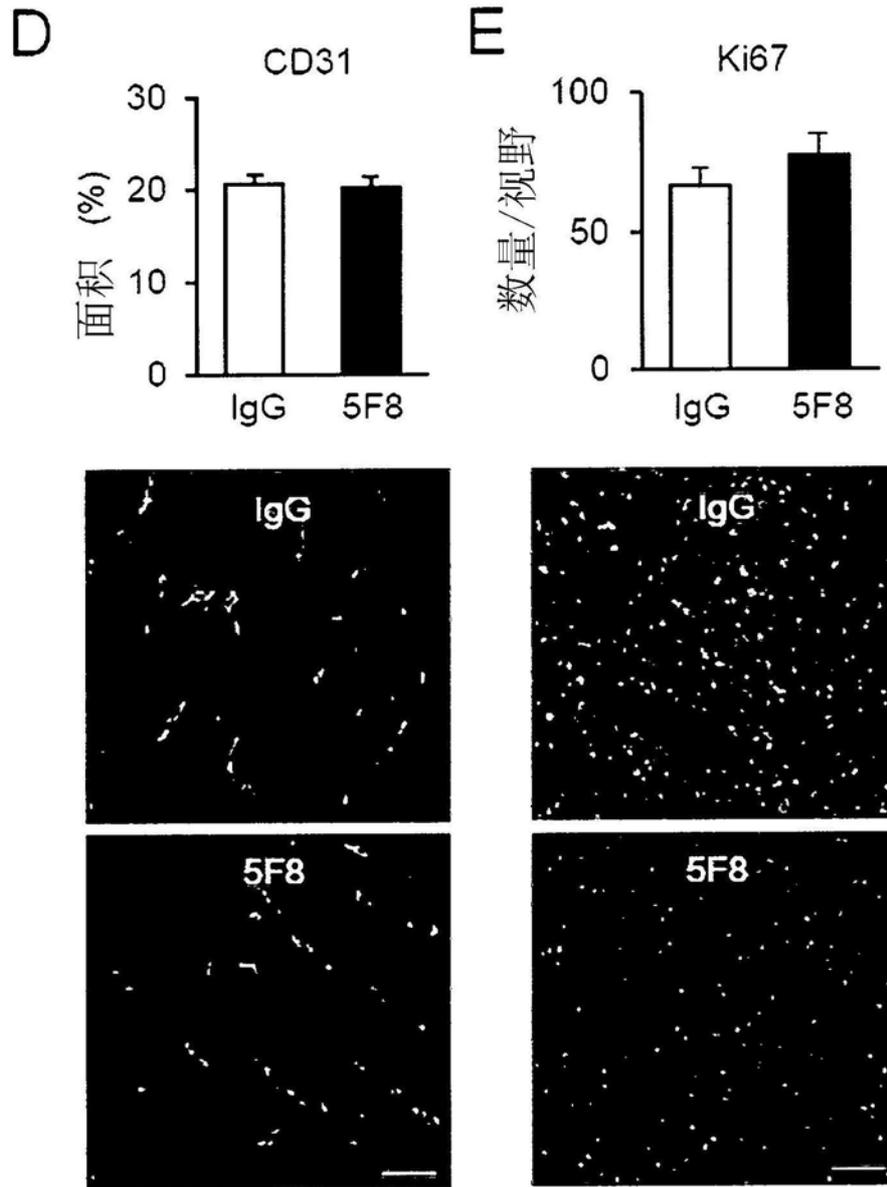


图2D-2E

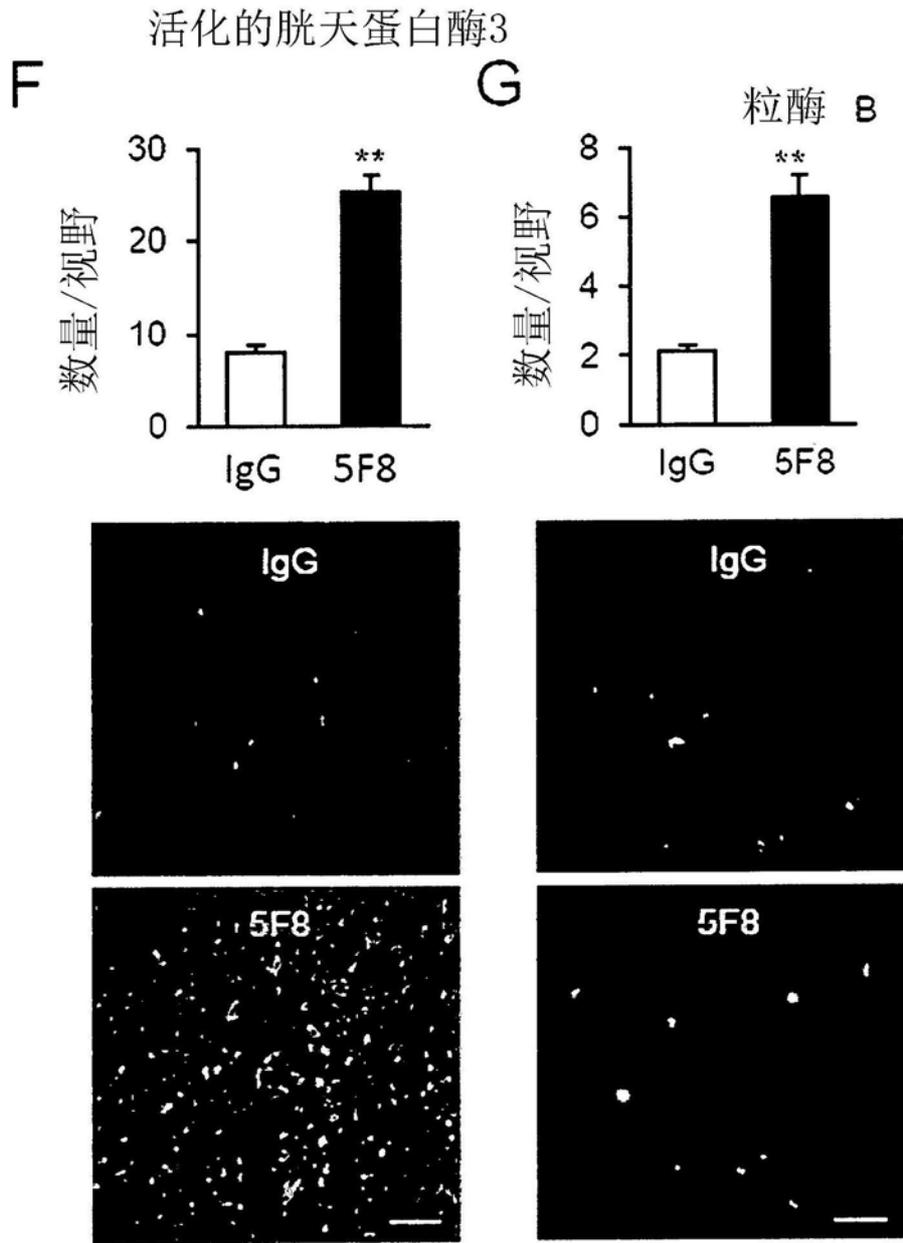
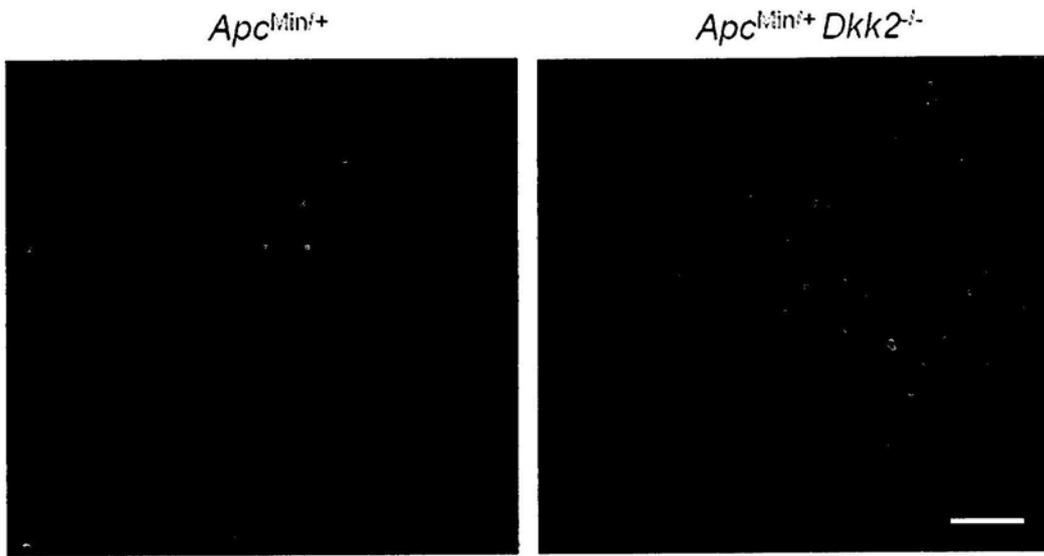
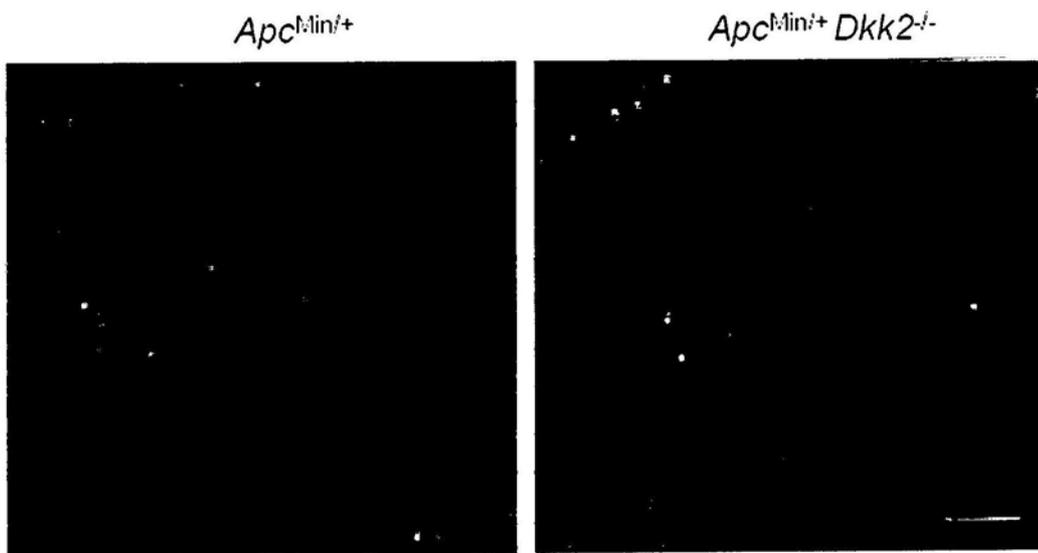


图2F-2G

H



活化的胰天蛋白酶3



GZMB

图2H

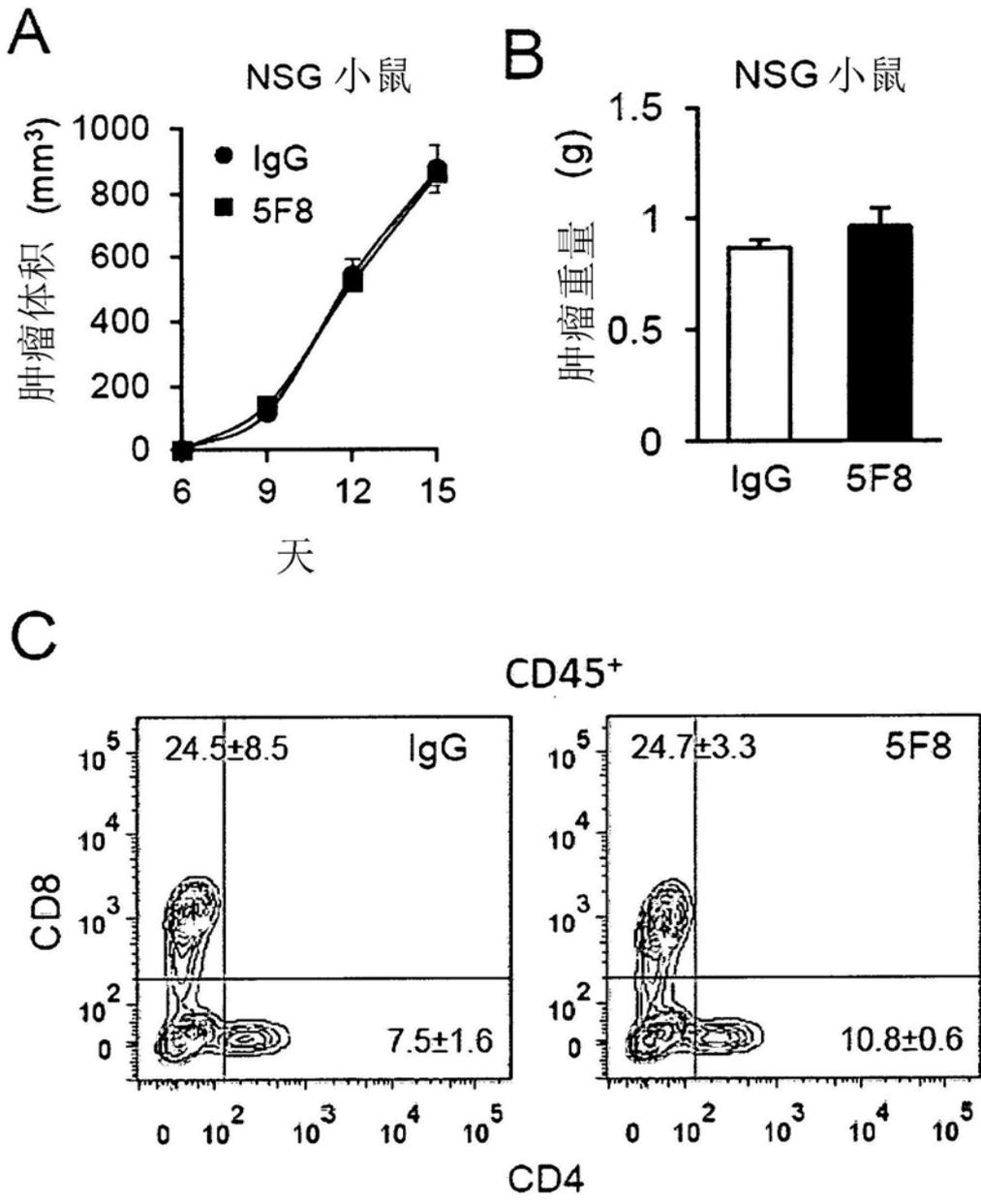


图3A-3C

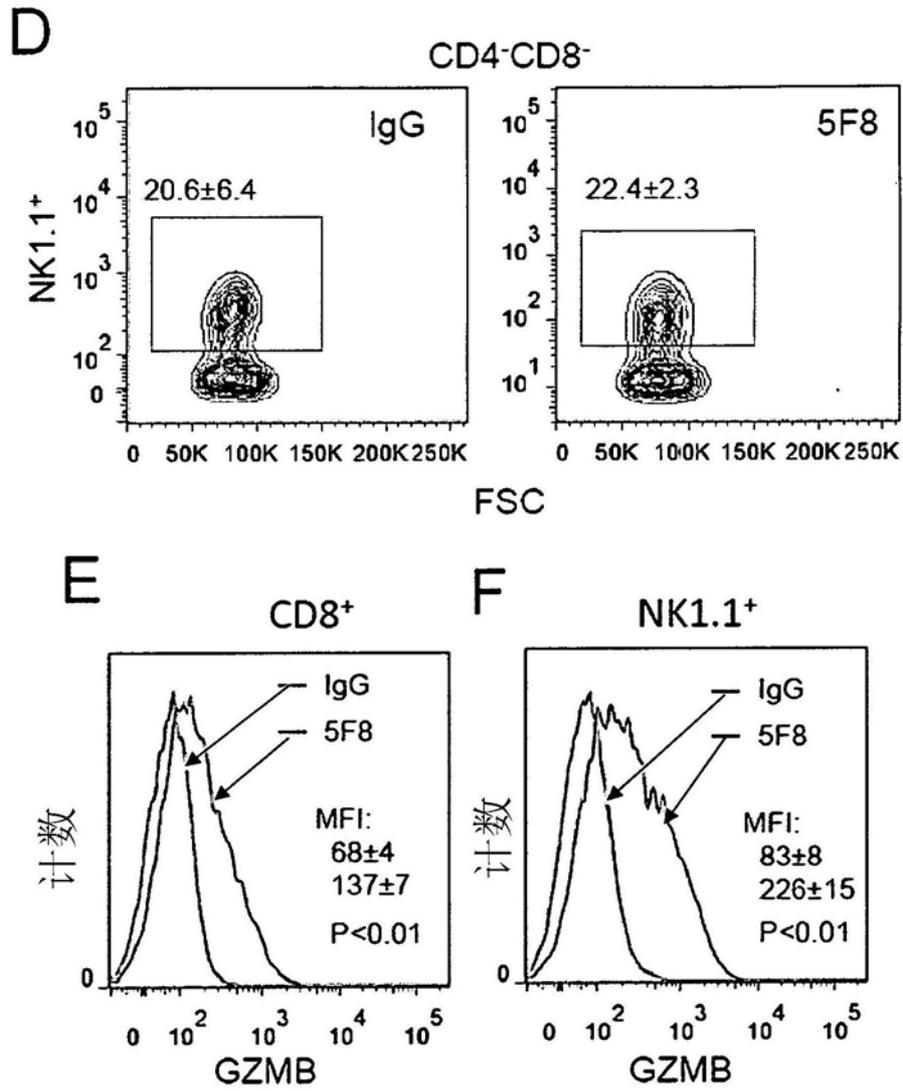
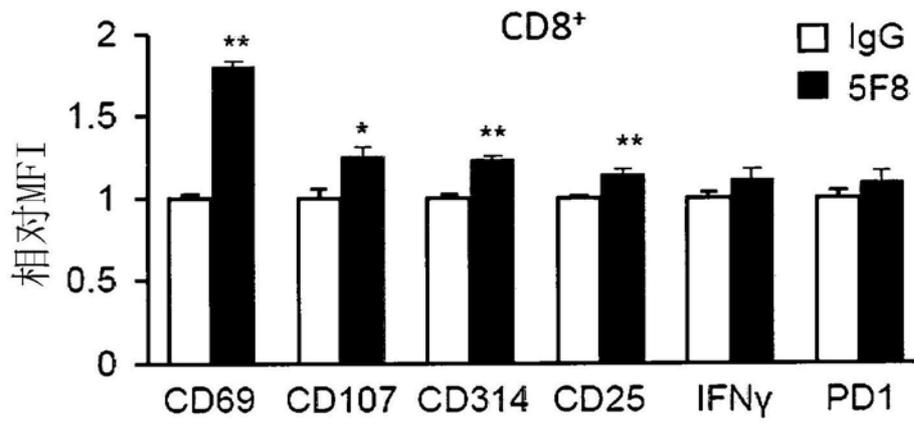


图3D-3F

G



H

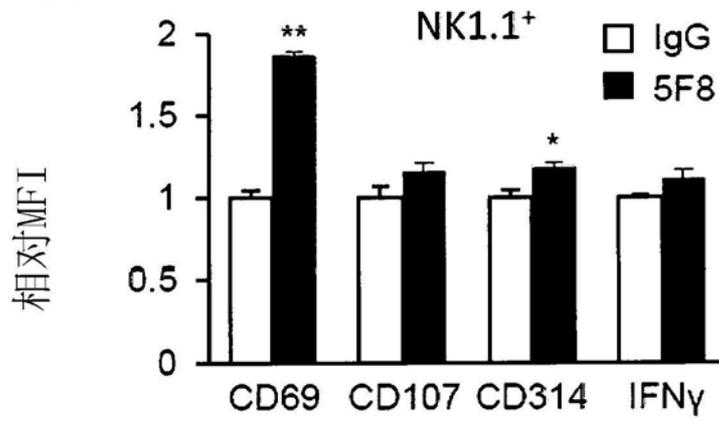


图3G-3H

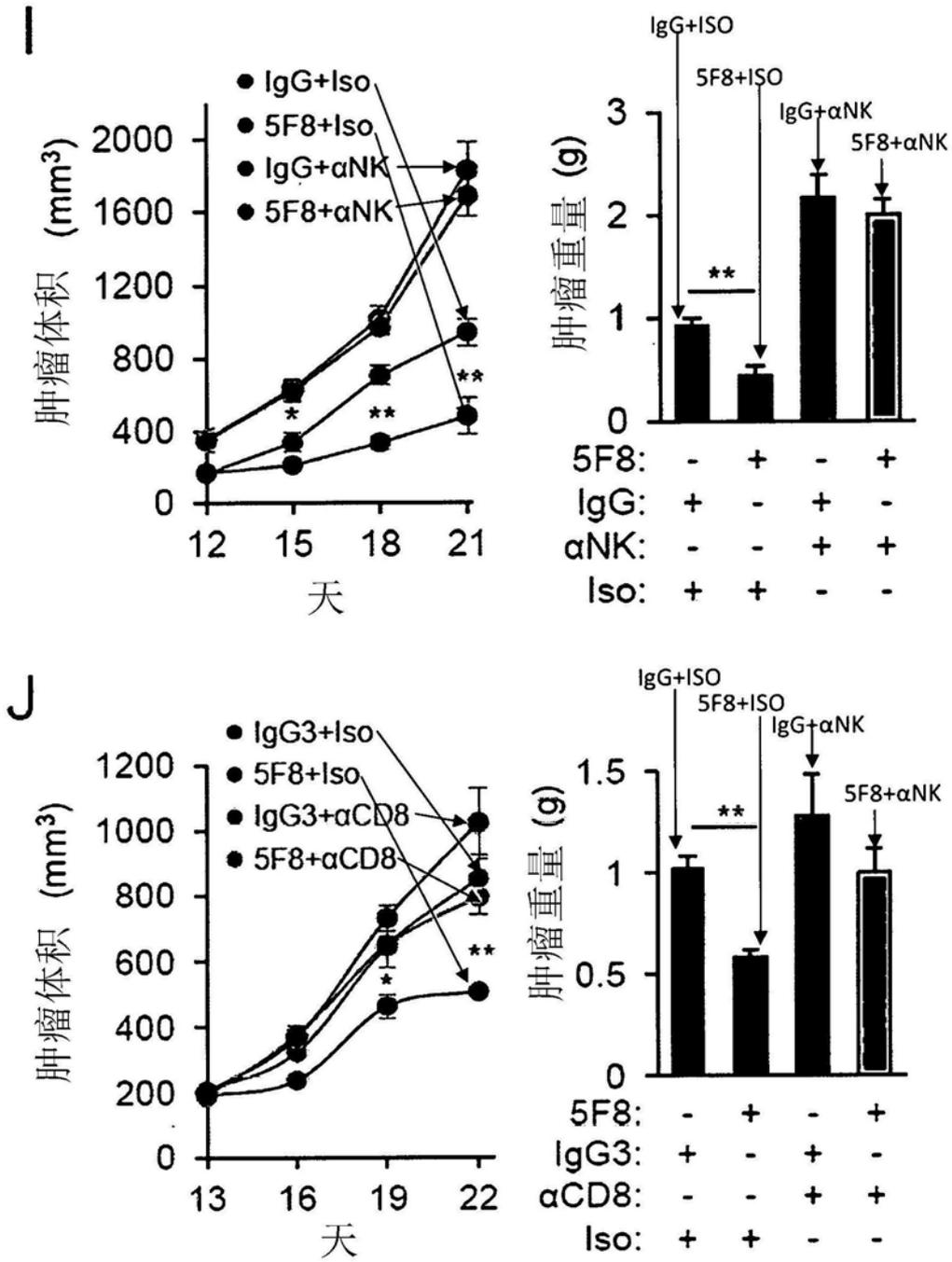


图3I-3J

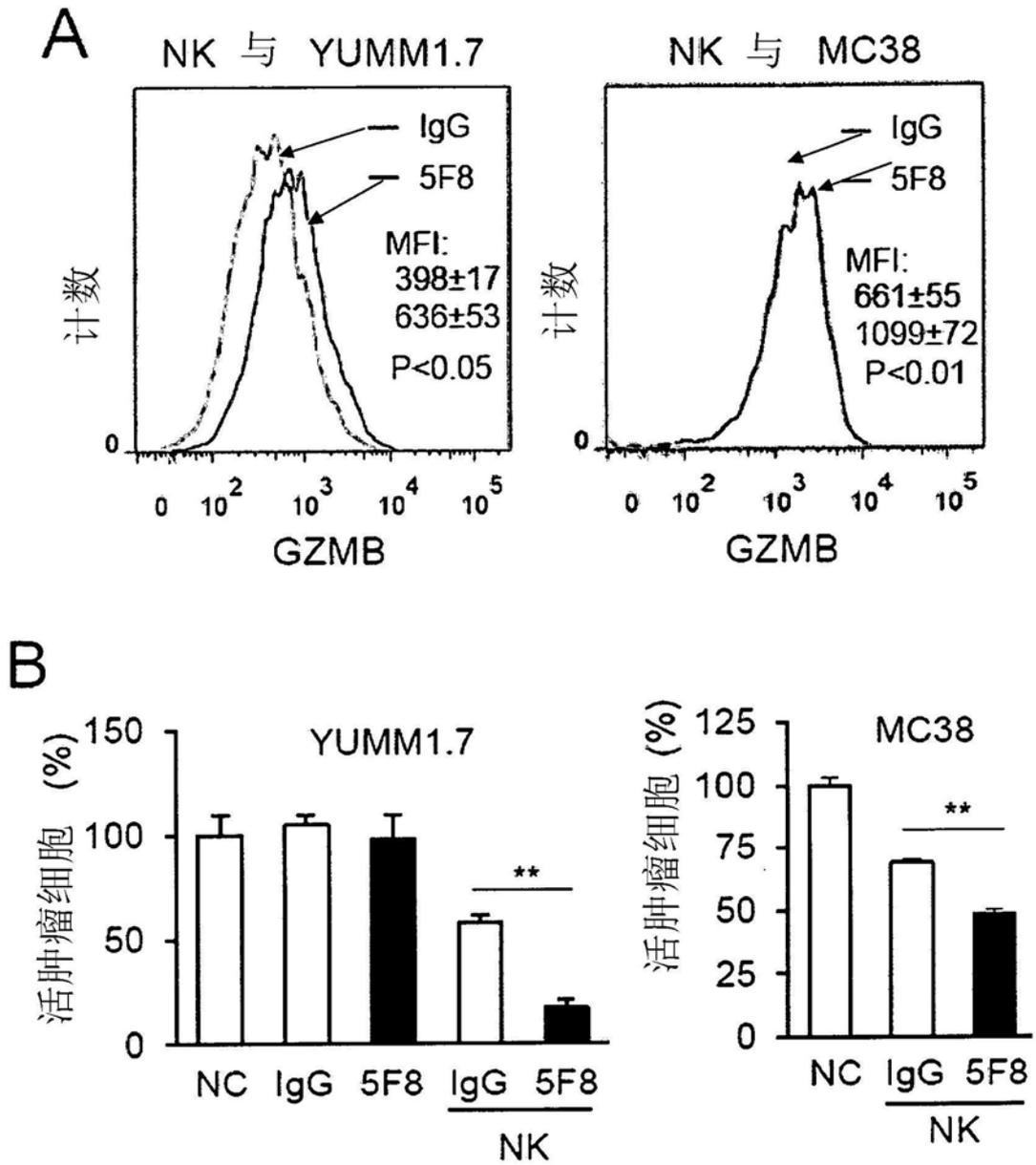


图4A-4B

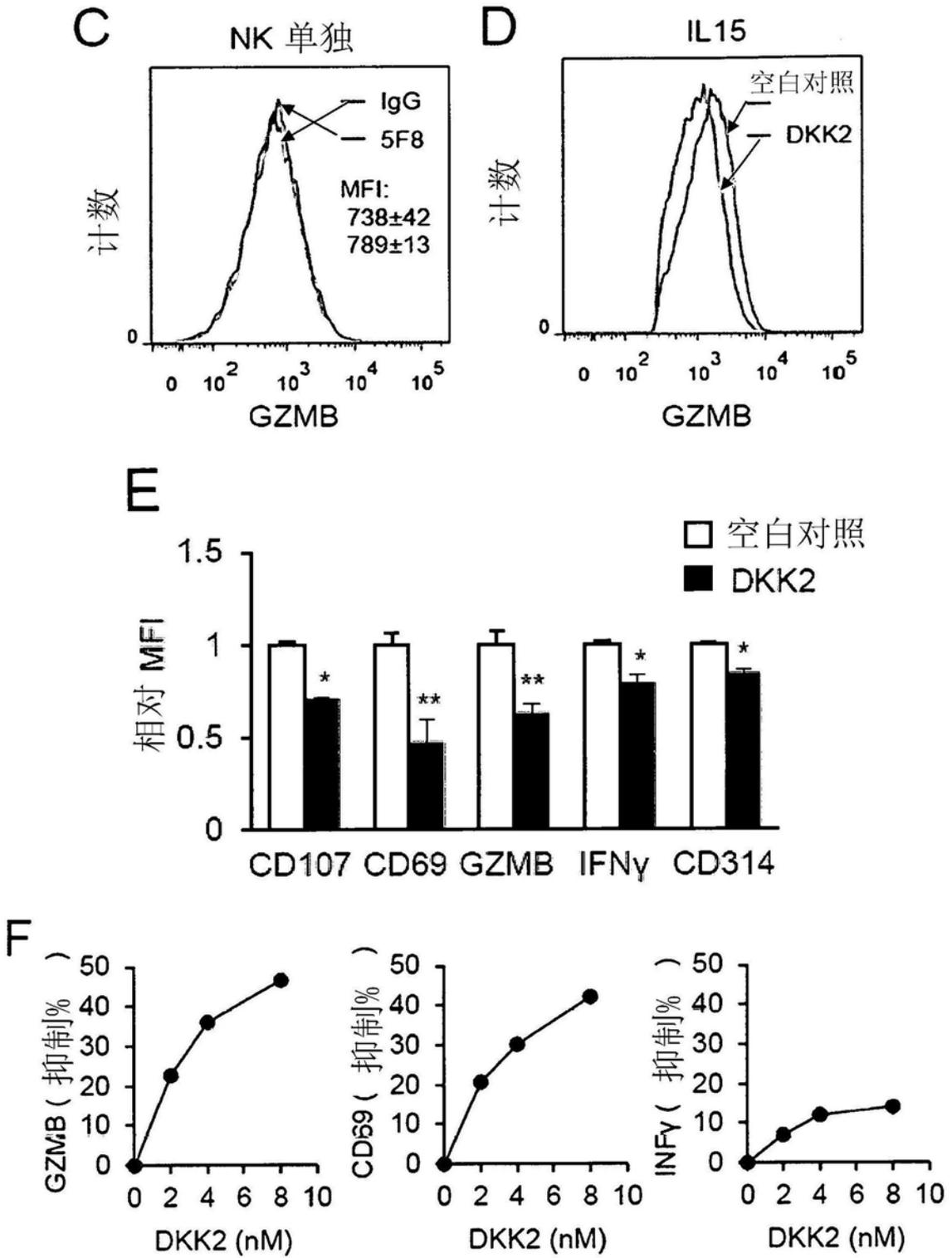


图4C-4F

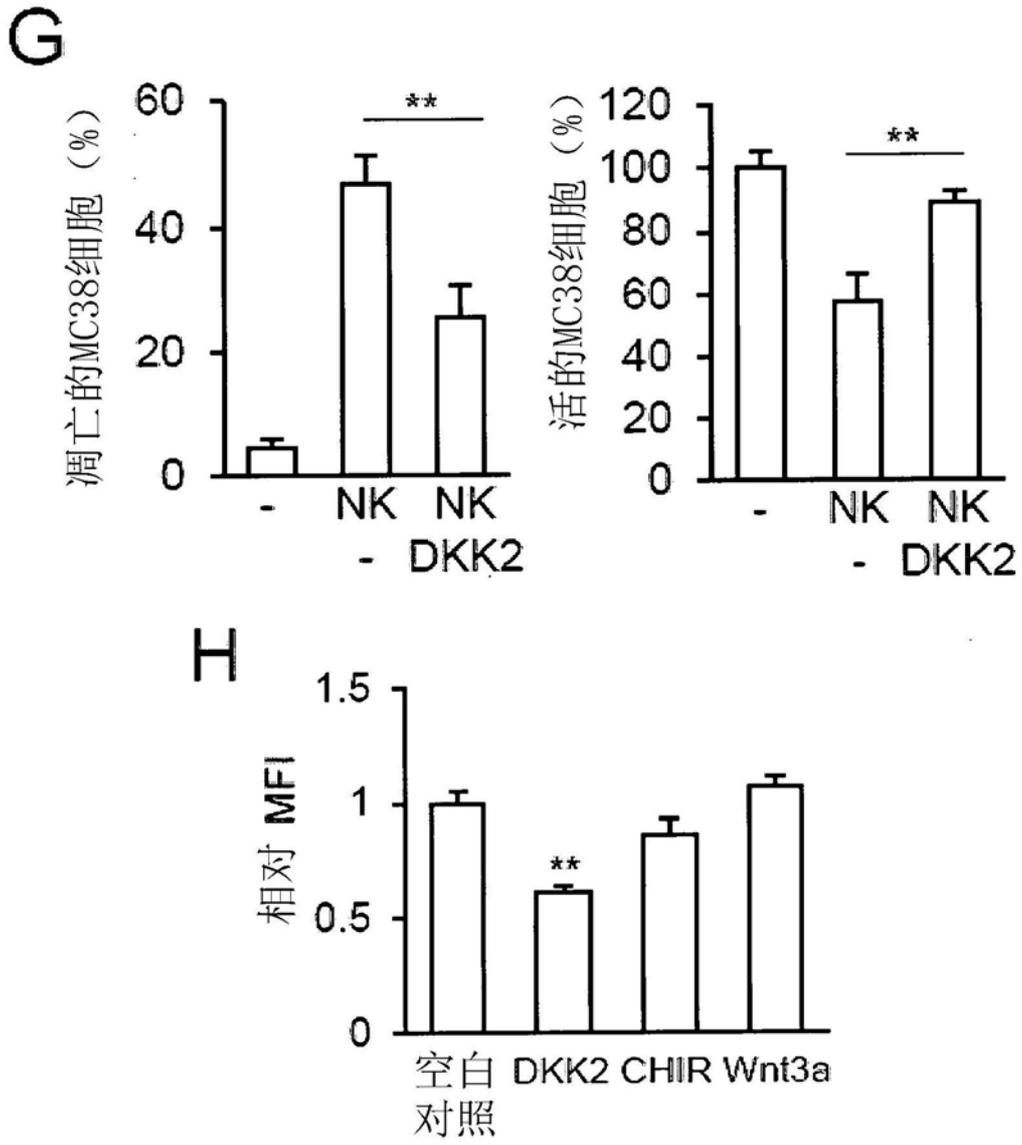


图4G-4H

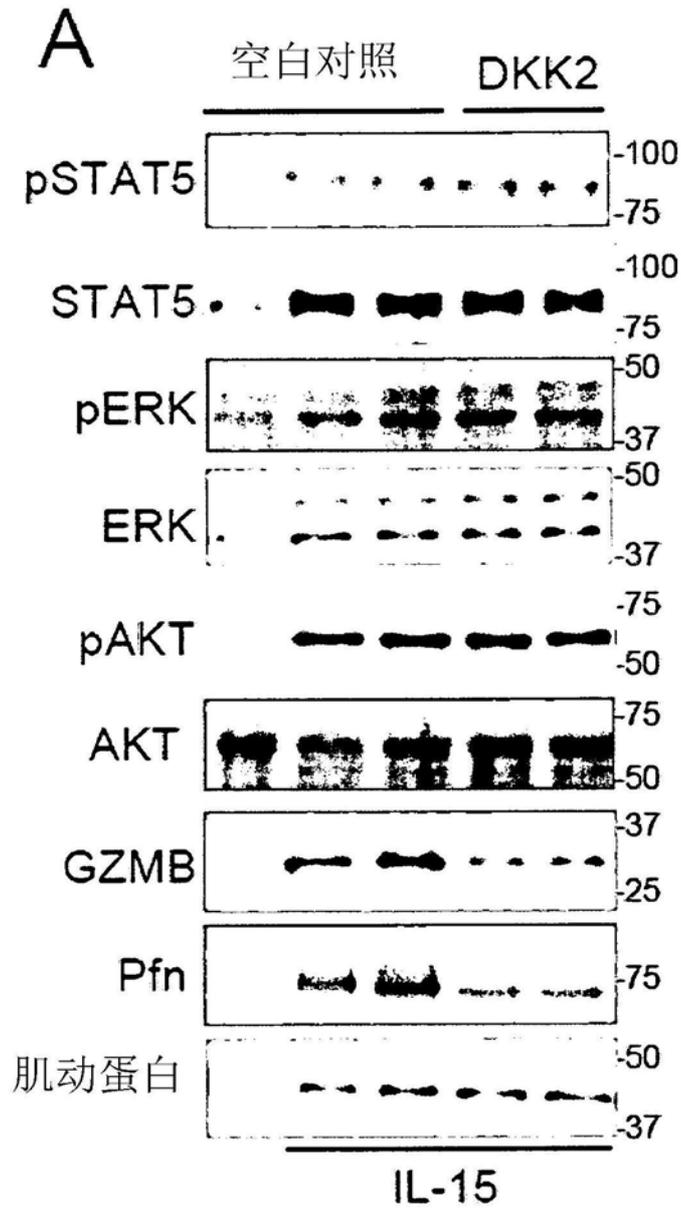


图5A

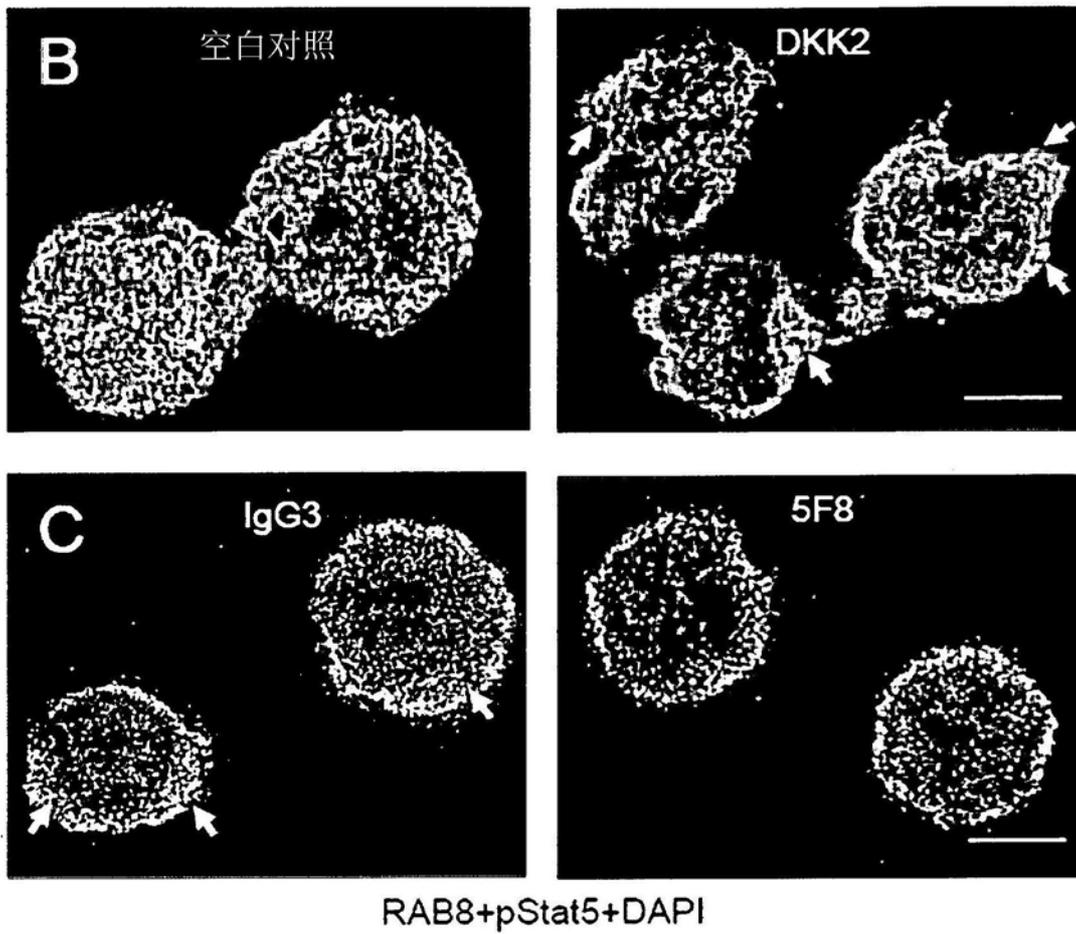


图5B-5C

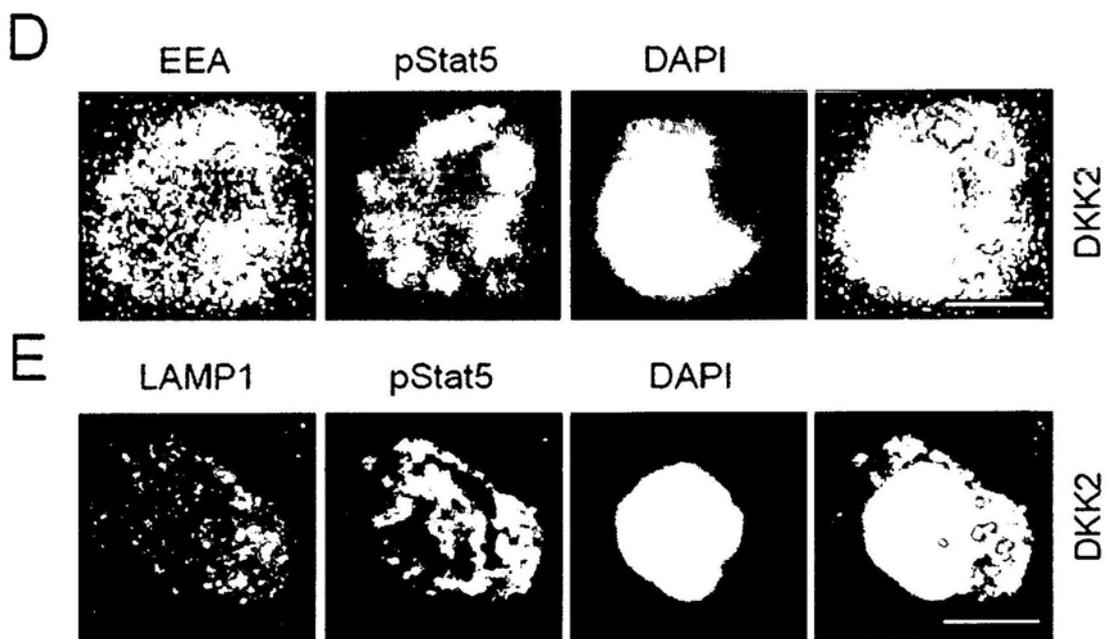
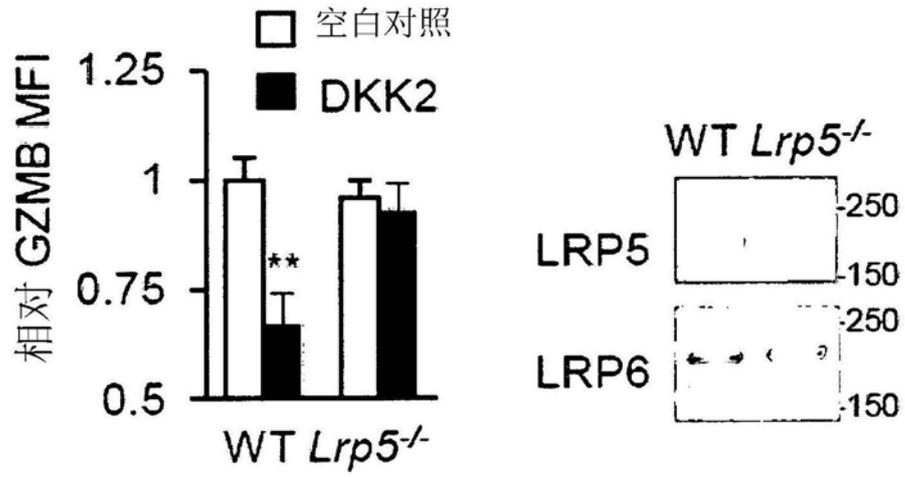


图5D-5E

A



B

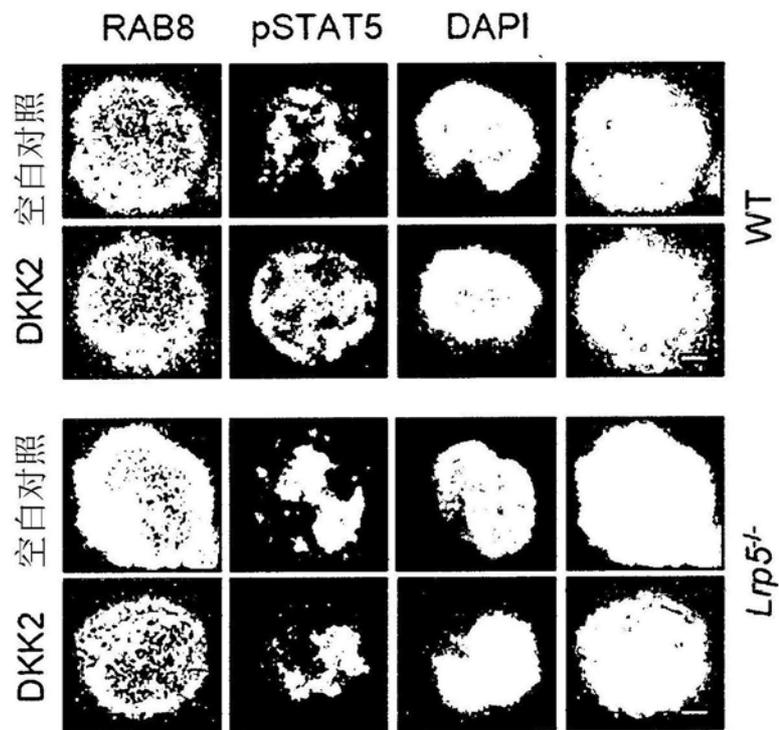


图6A-6B

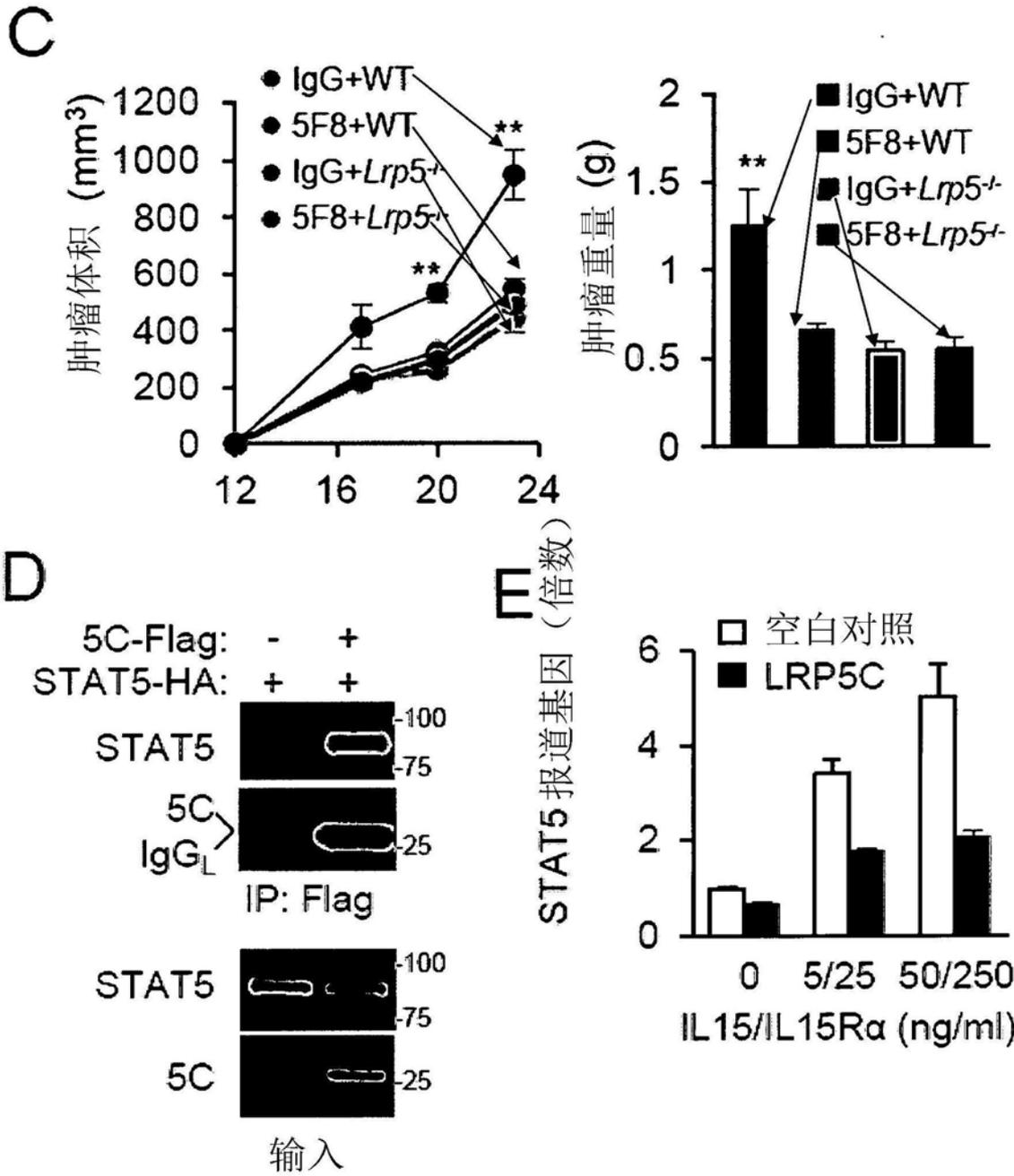


图6C-6E

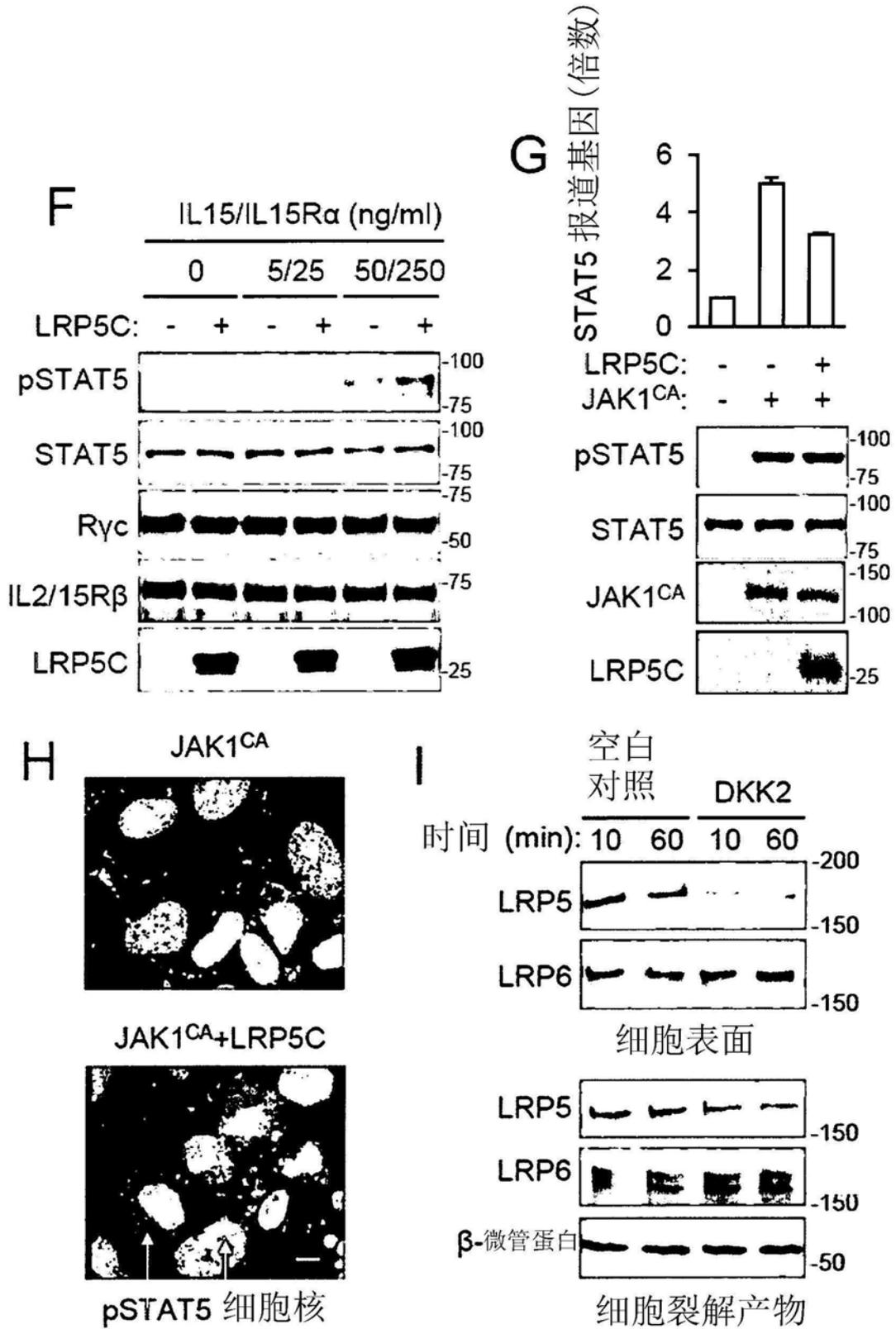


图6F-6I

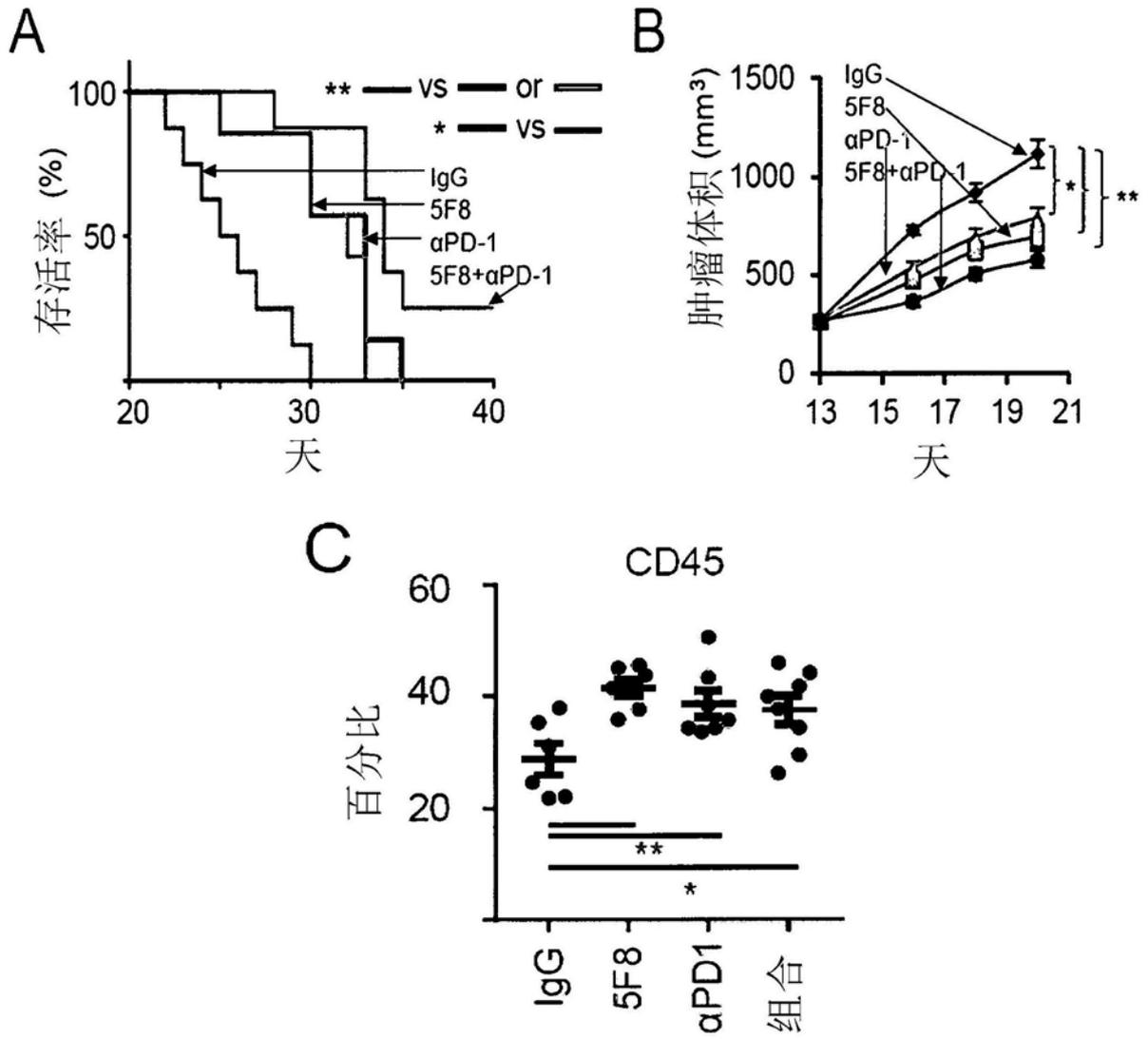


图7A-7C

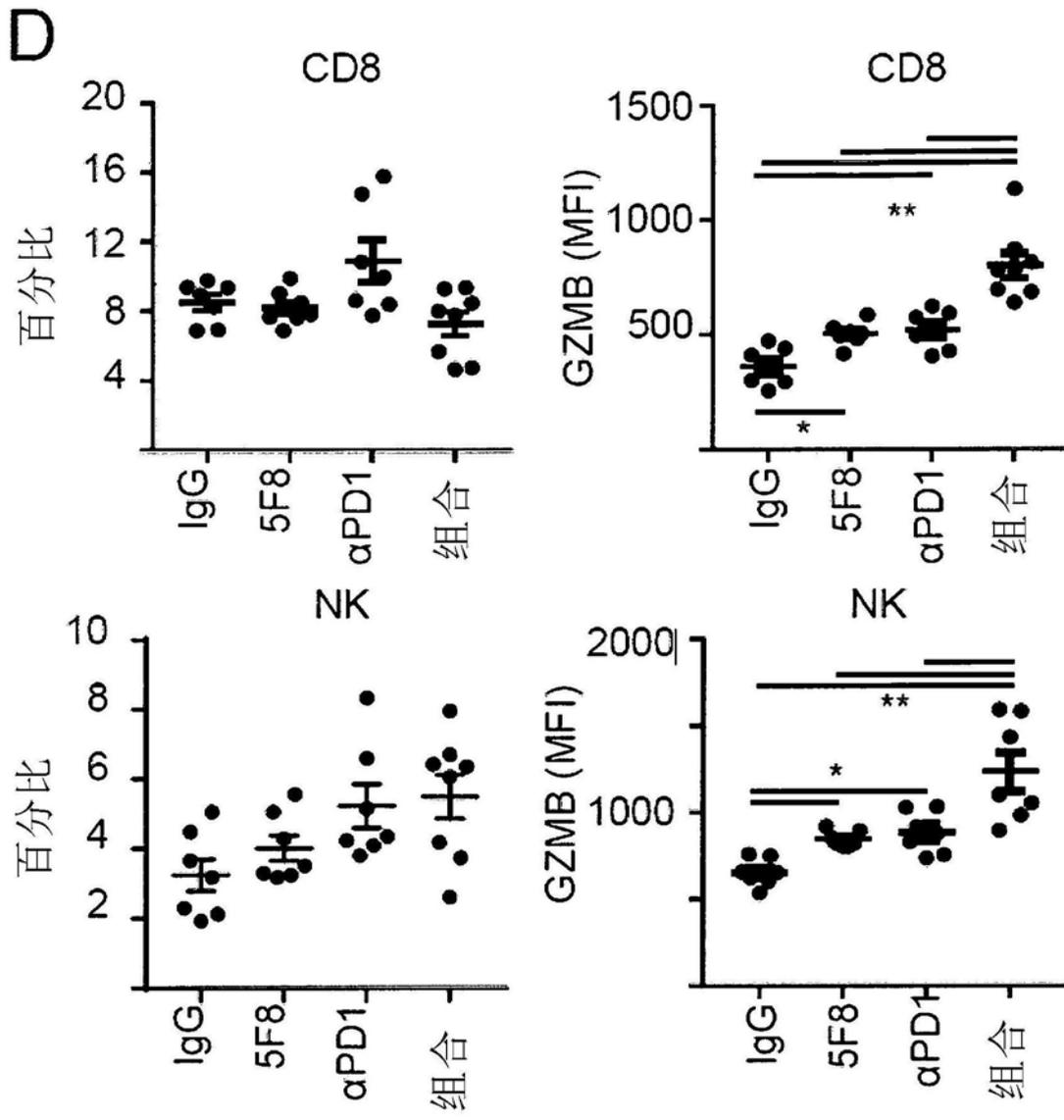


图7D

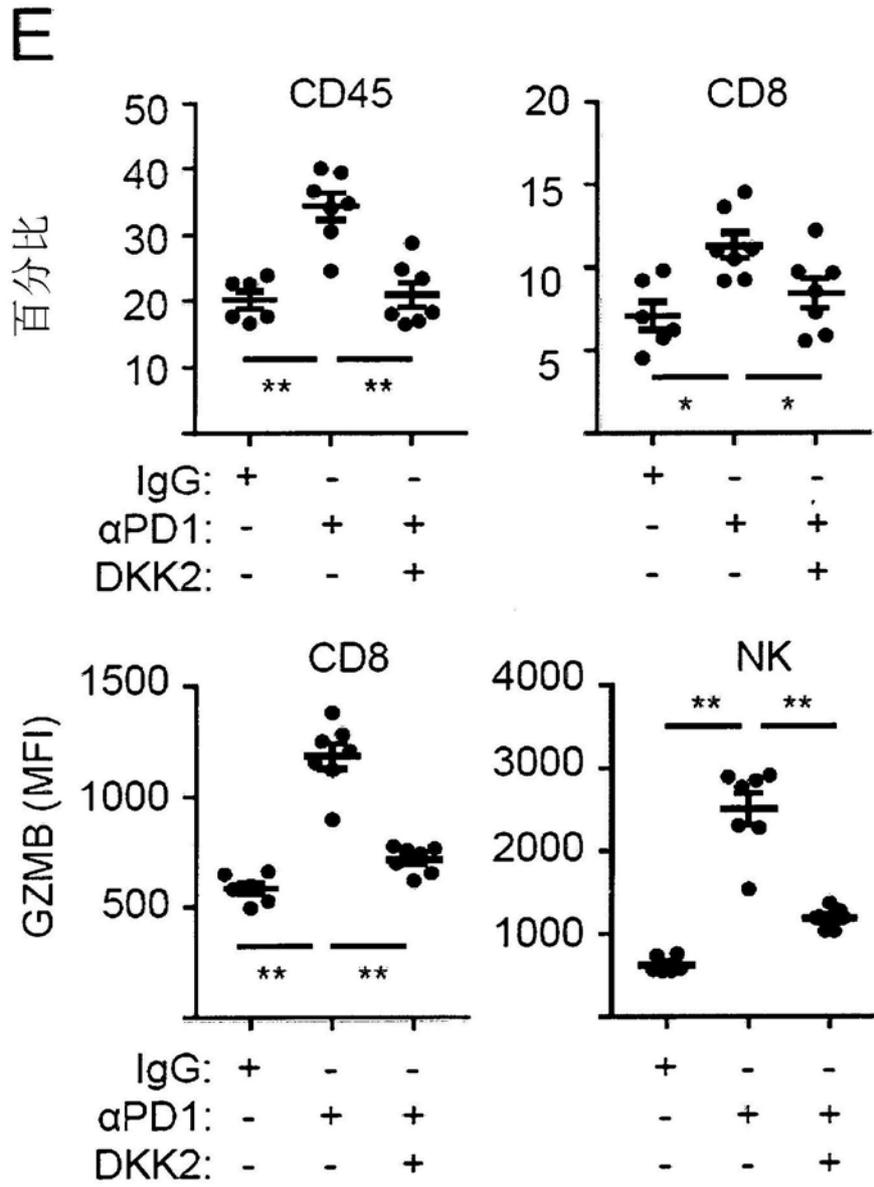


图7E

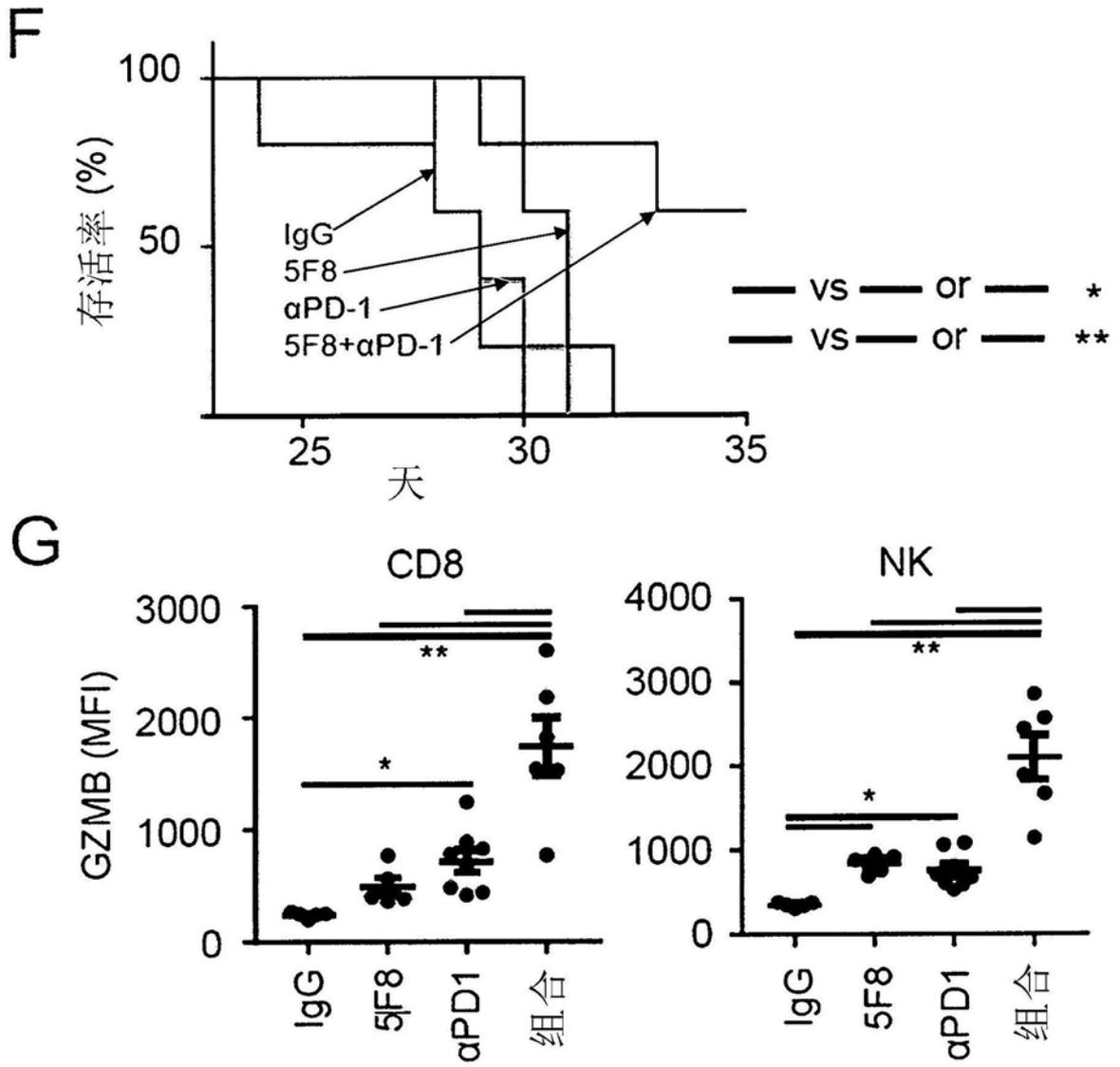


图7F-7G

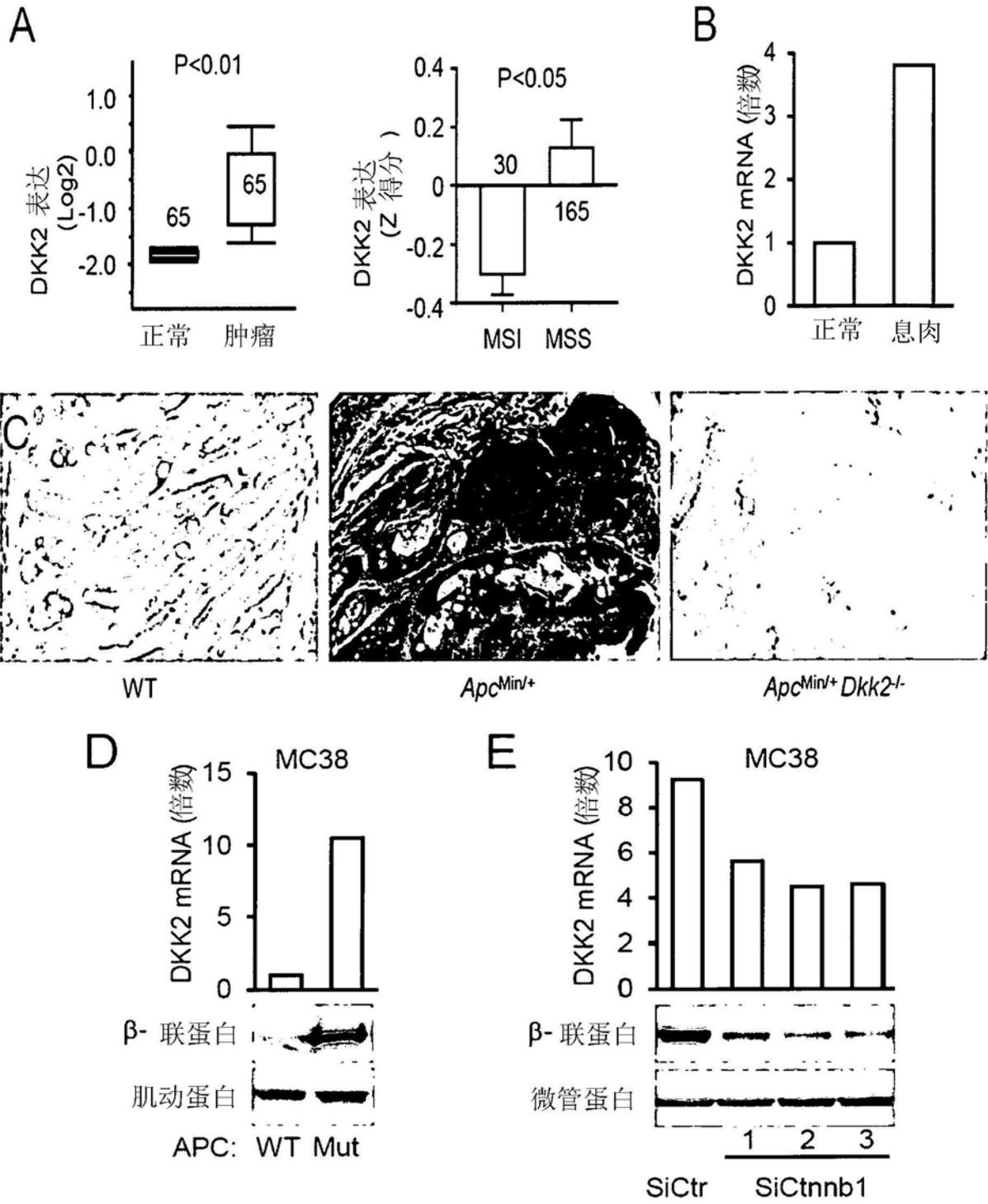


图8A-8E

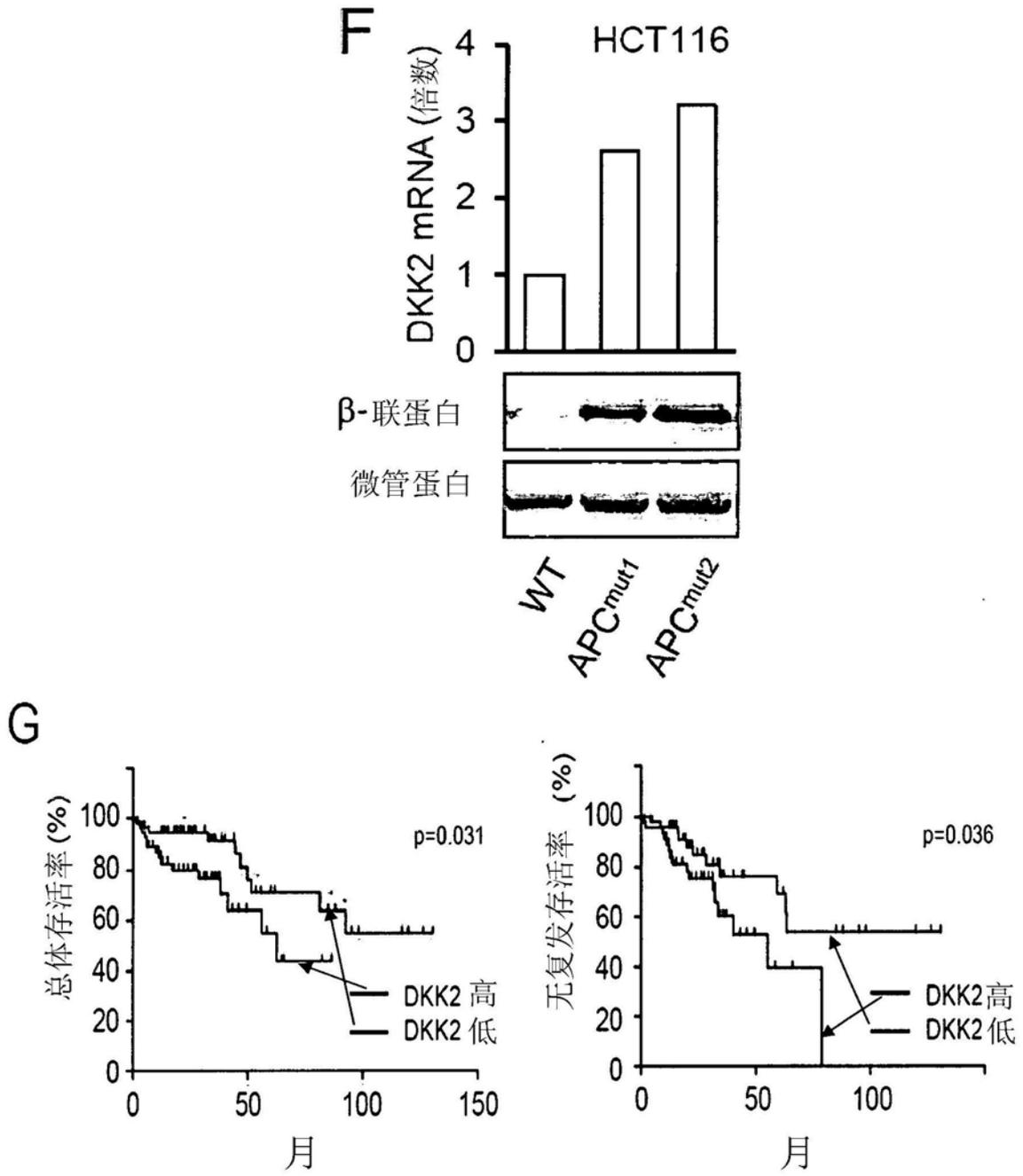


图8F-8G

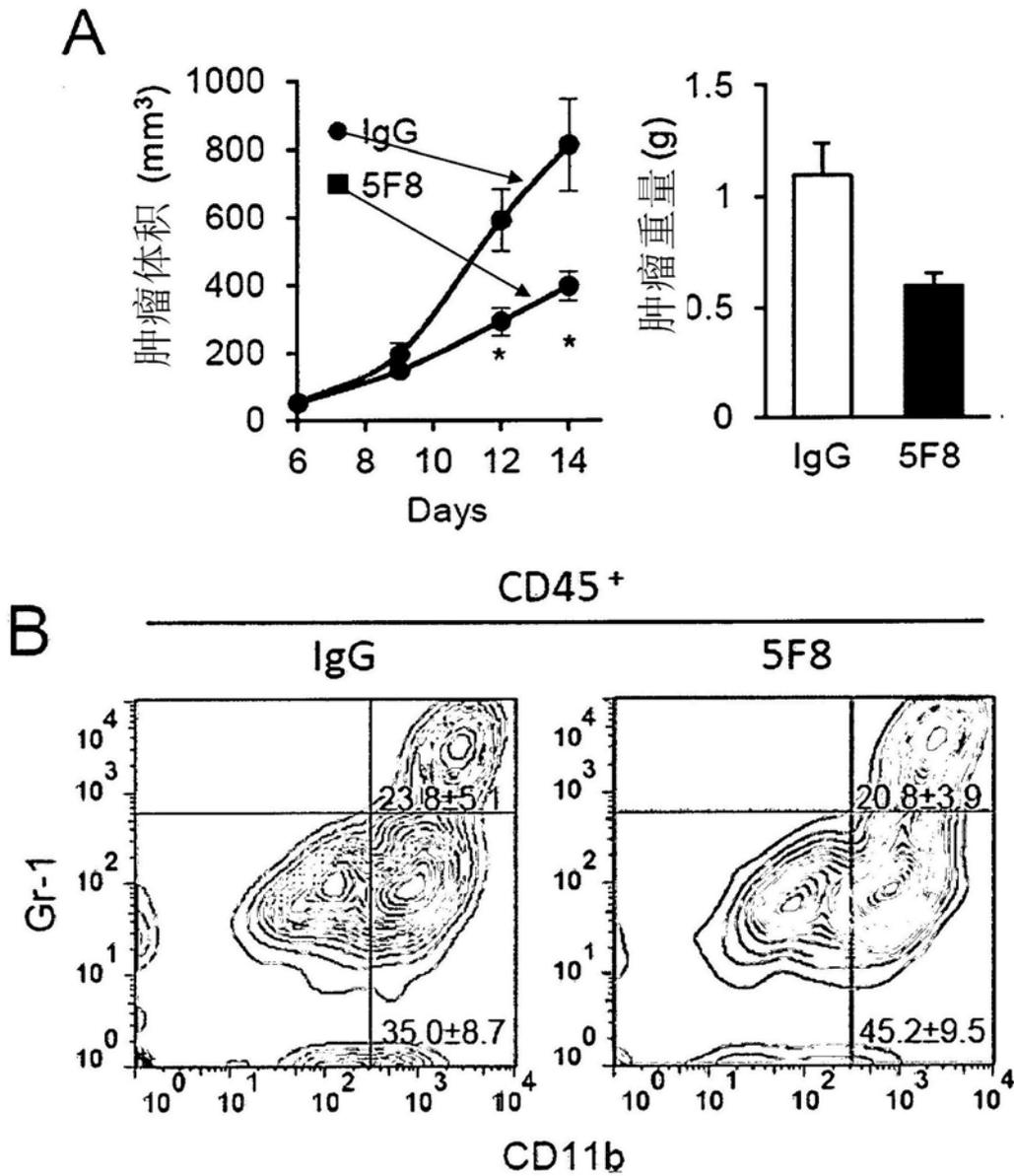


图9A-9B

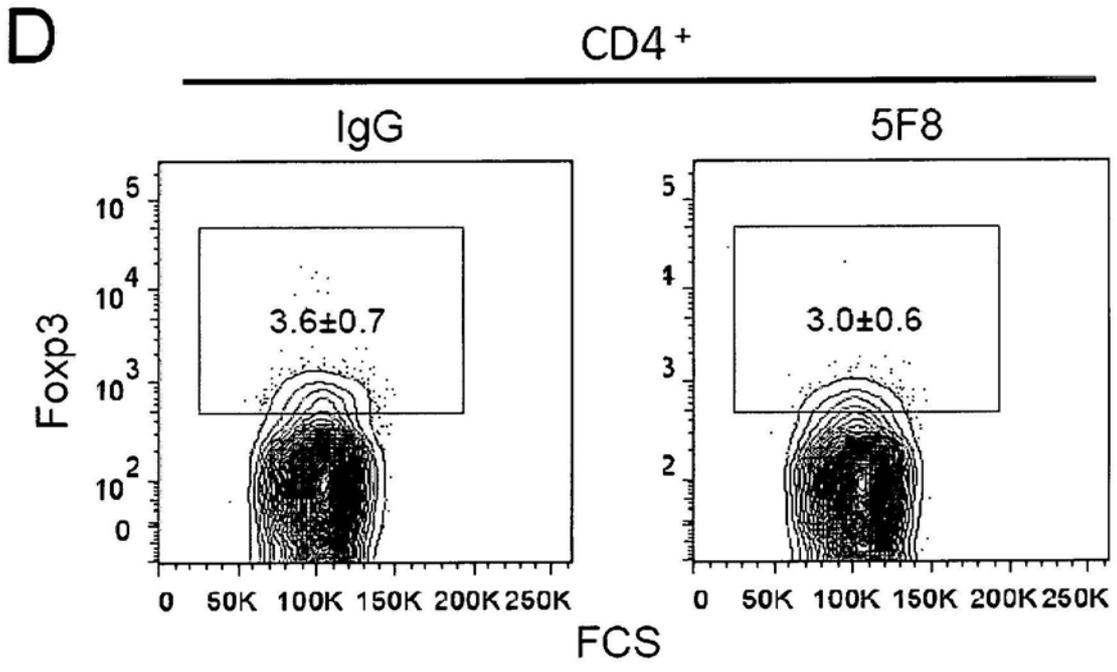
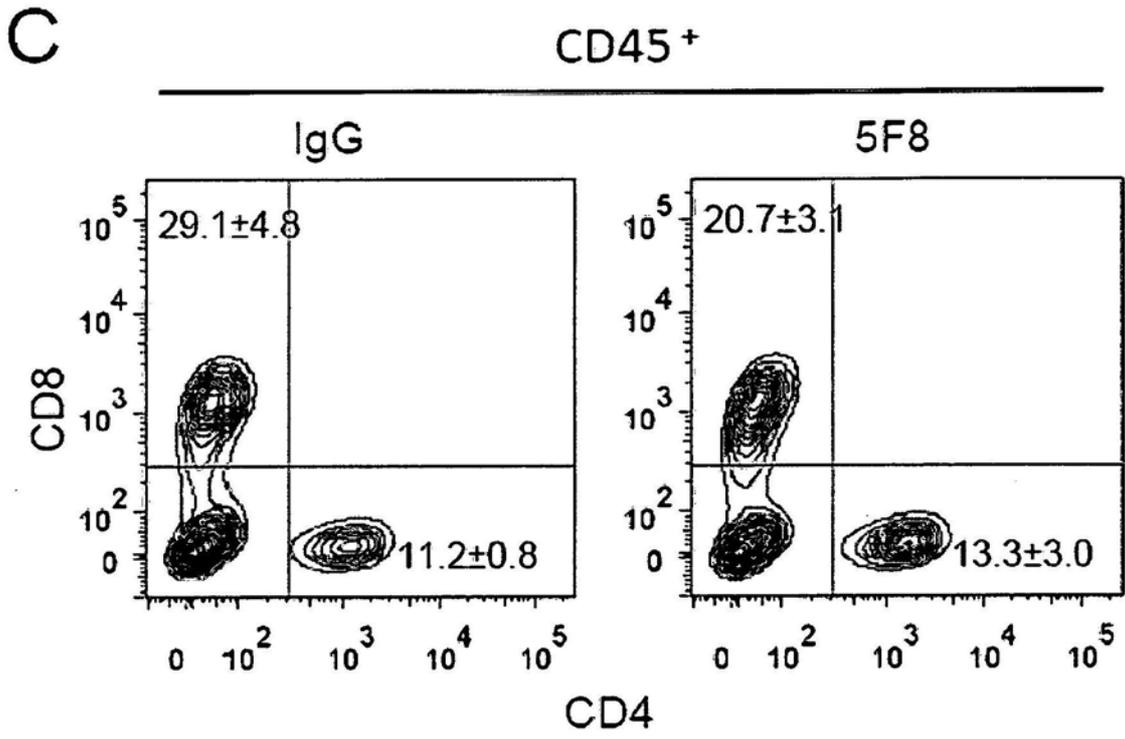


图9C-9D

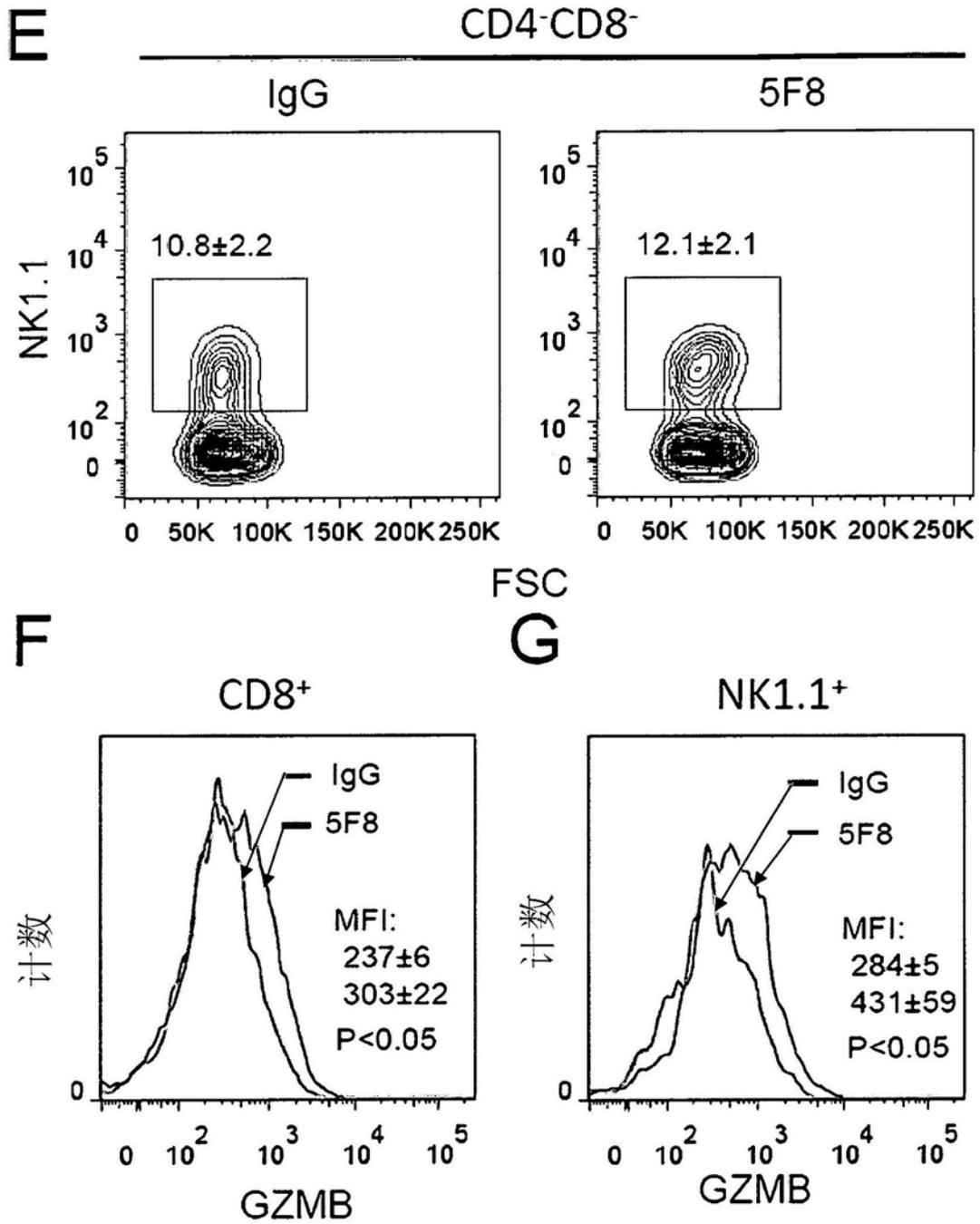


图9E-9G

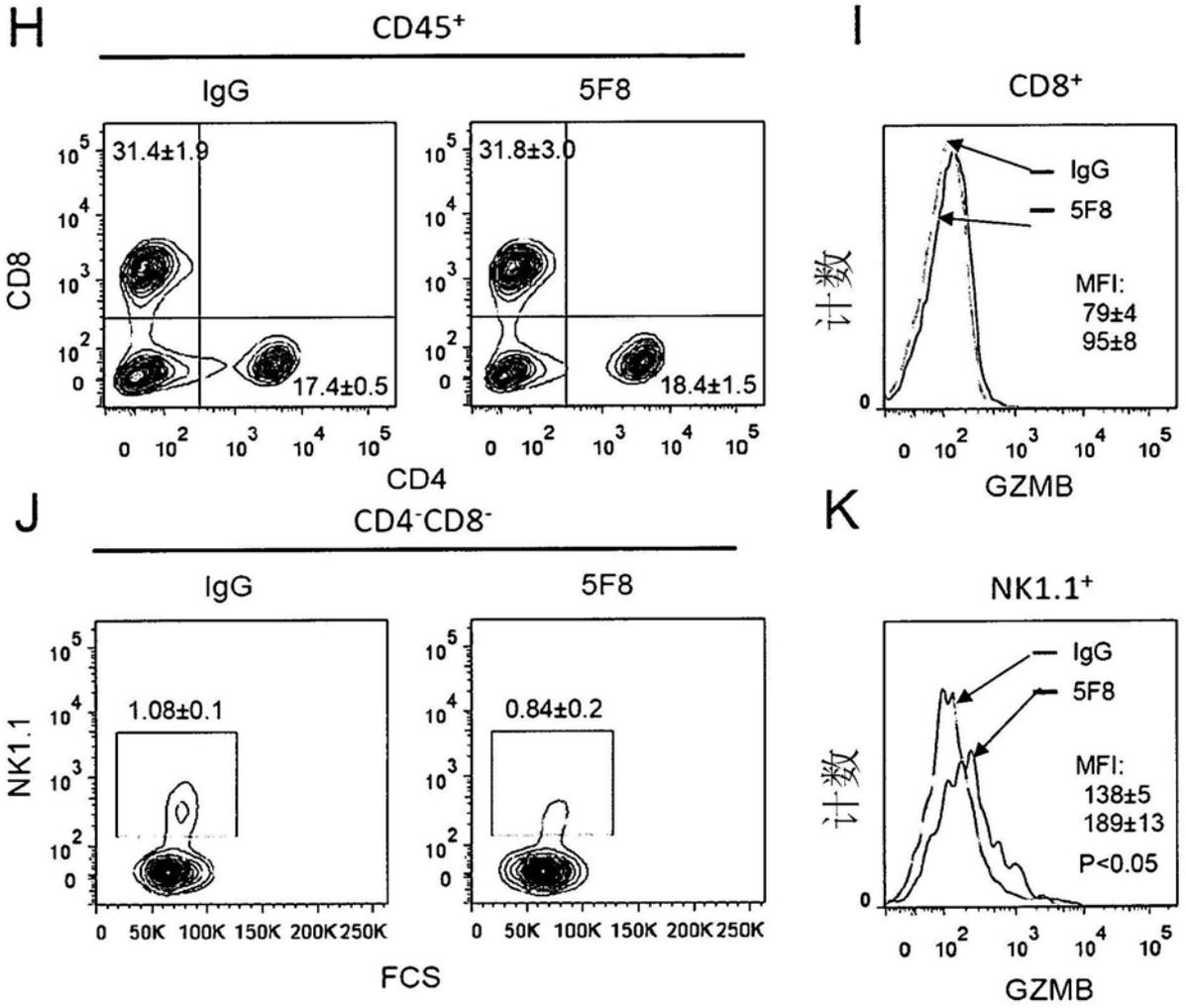


图9H-9K

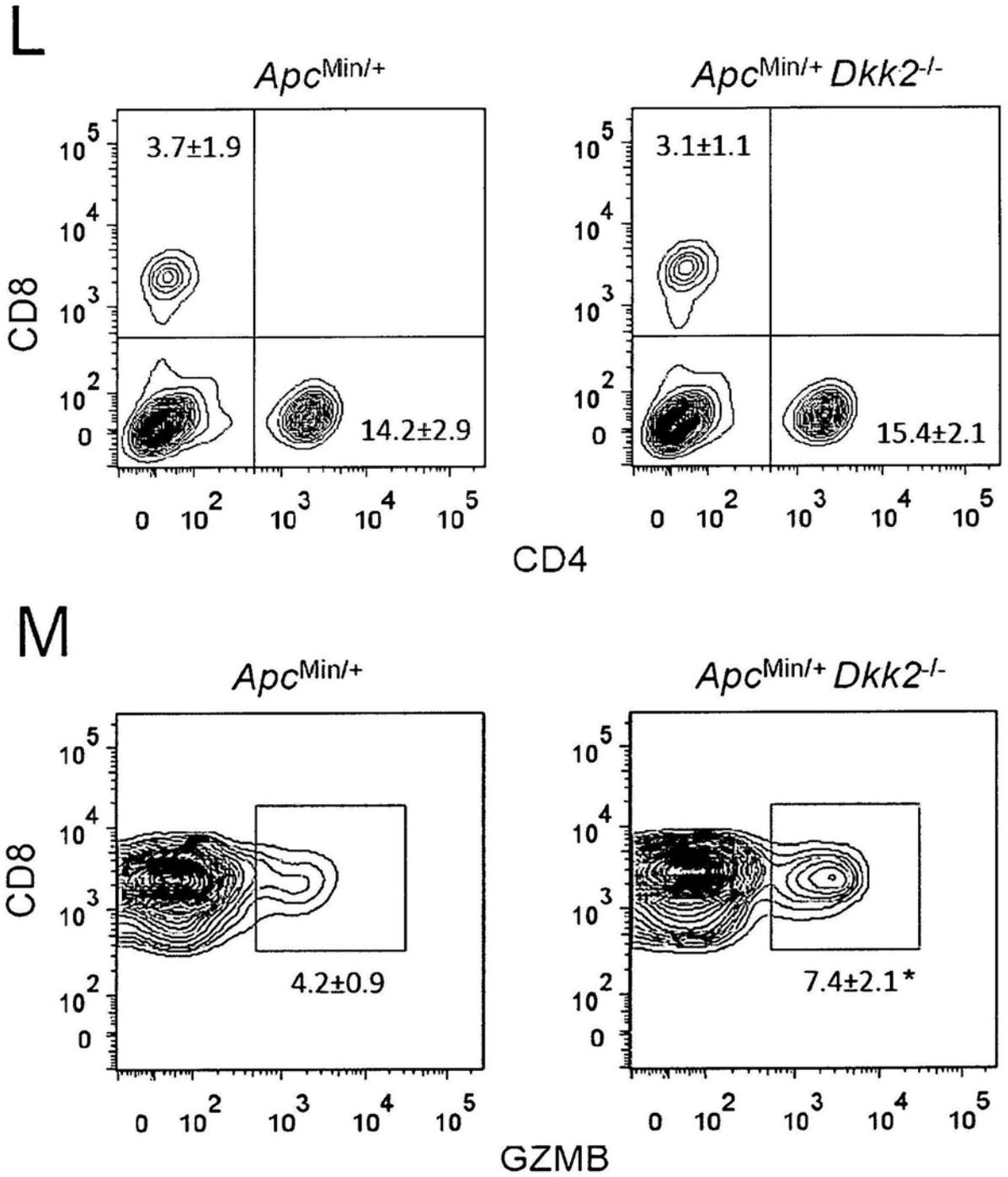


图9L-9M

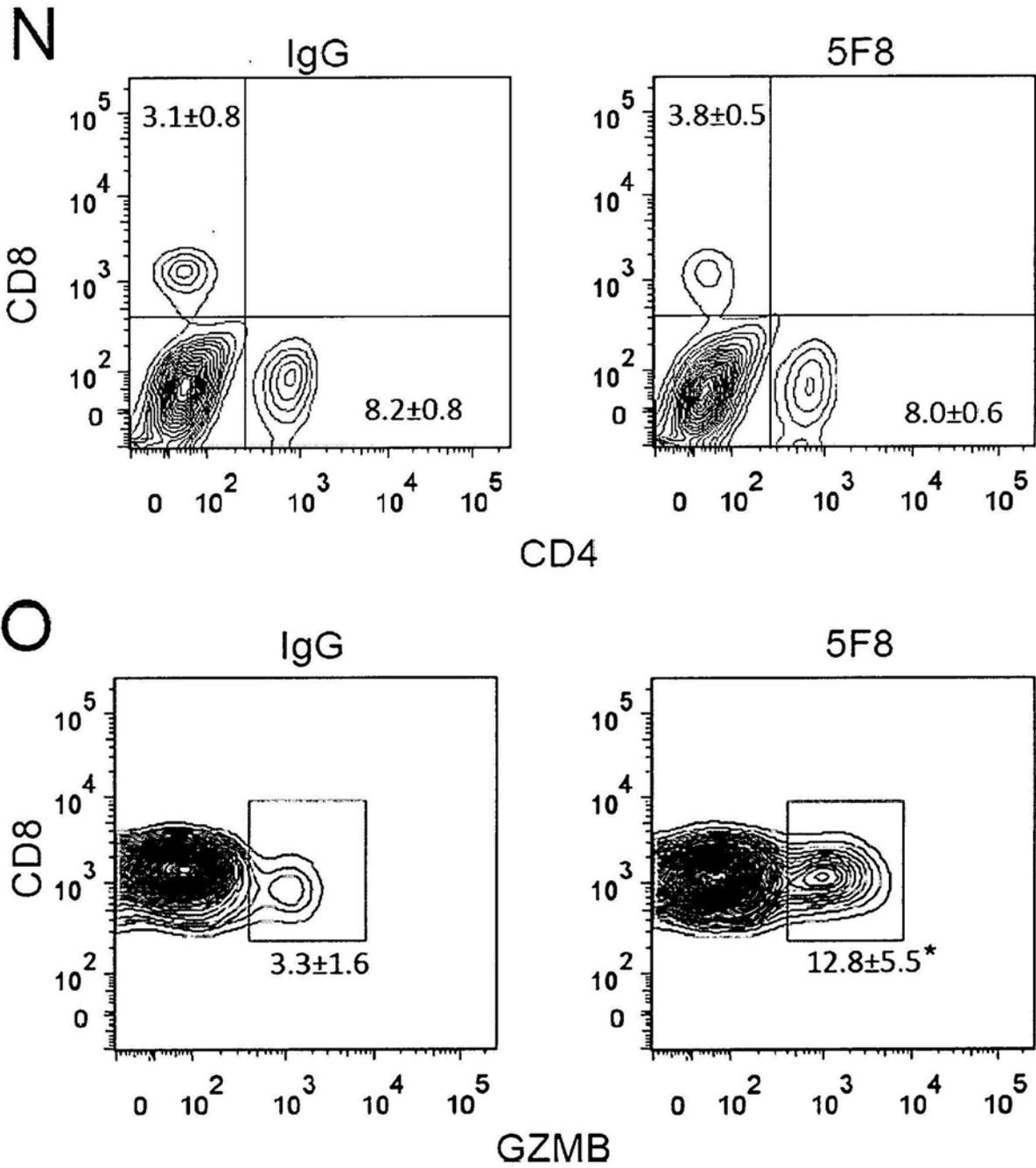


图9N-90

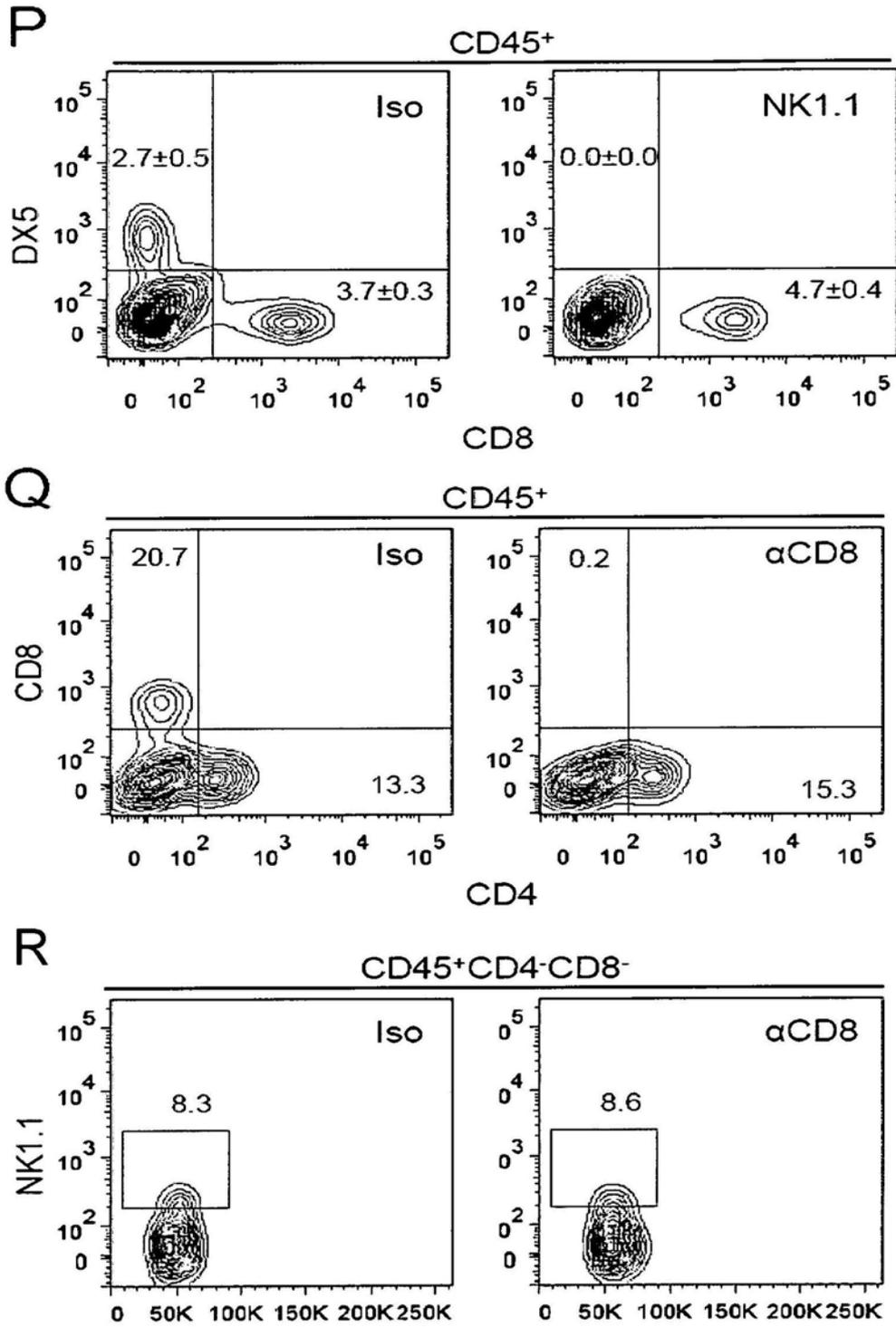


图9P-9R

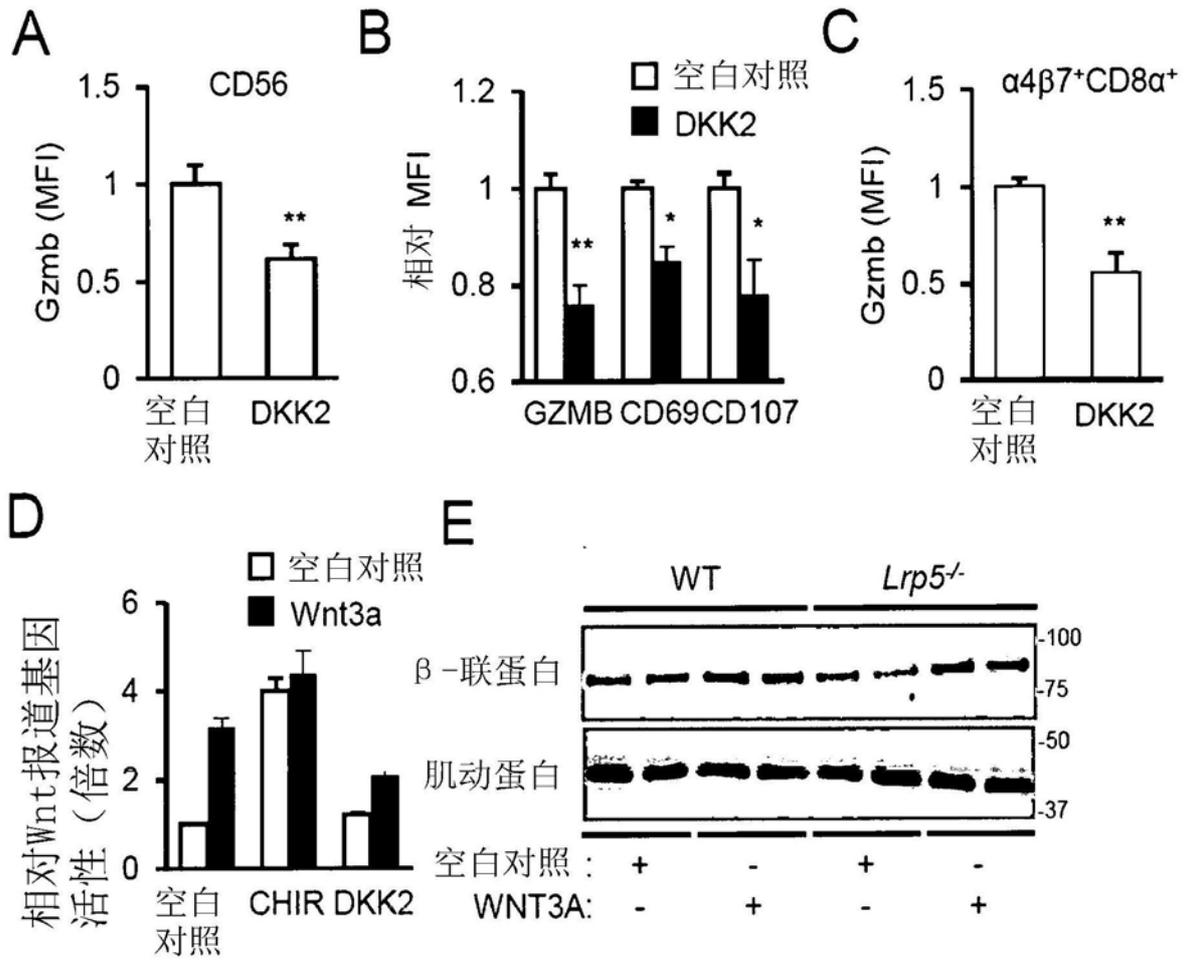


图10A-10E

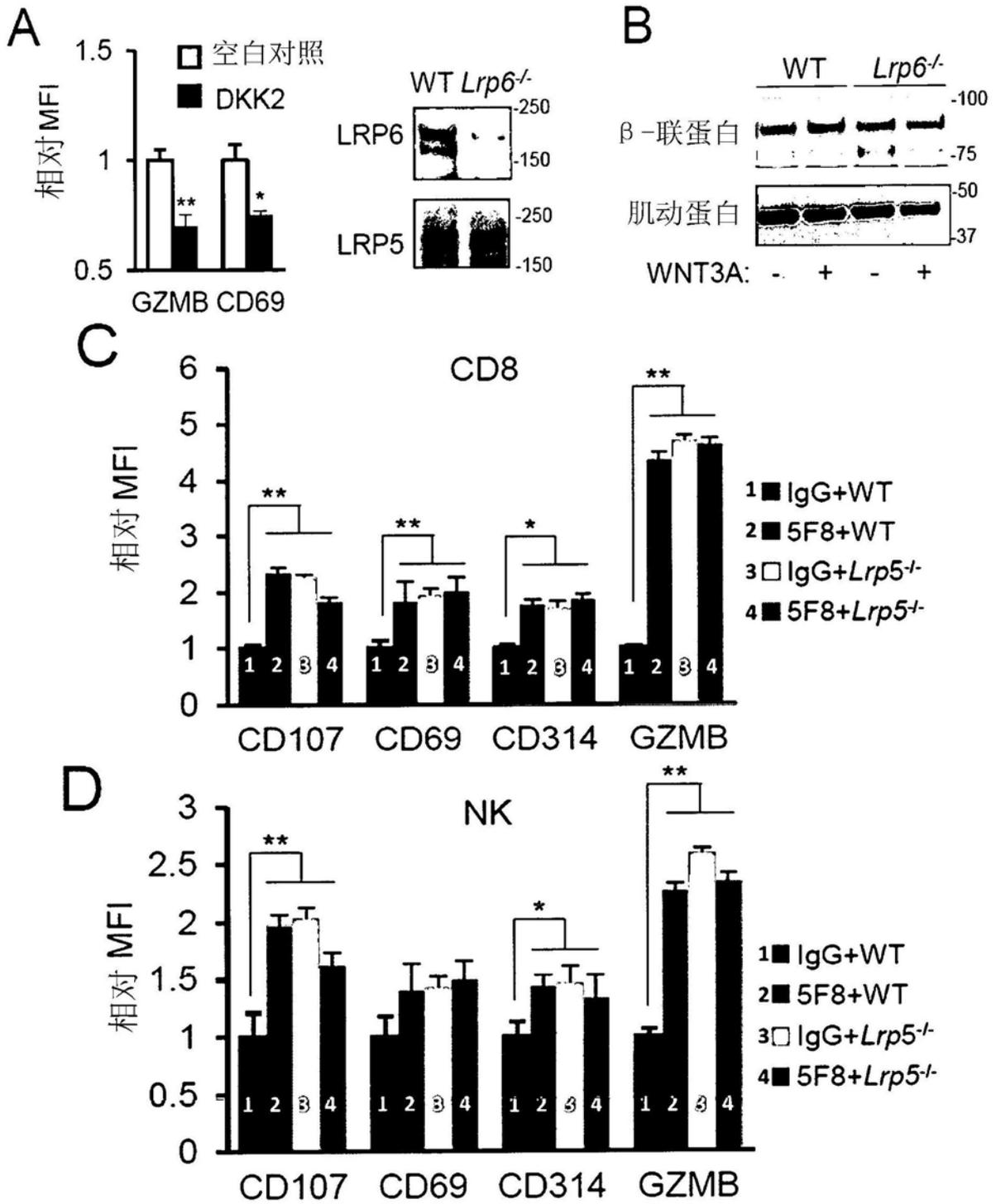


图11A-11D

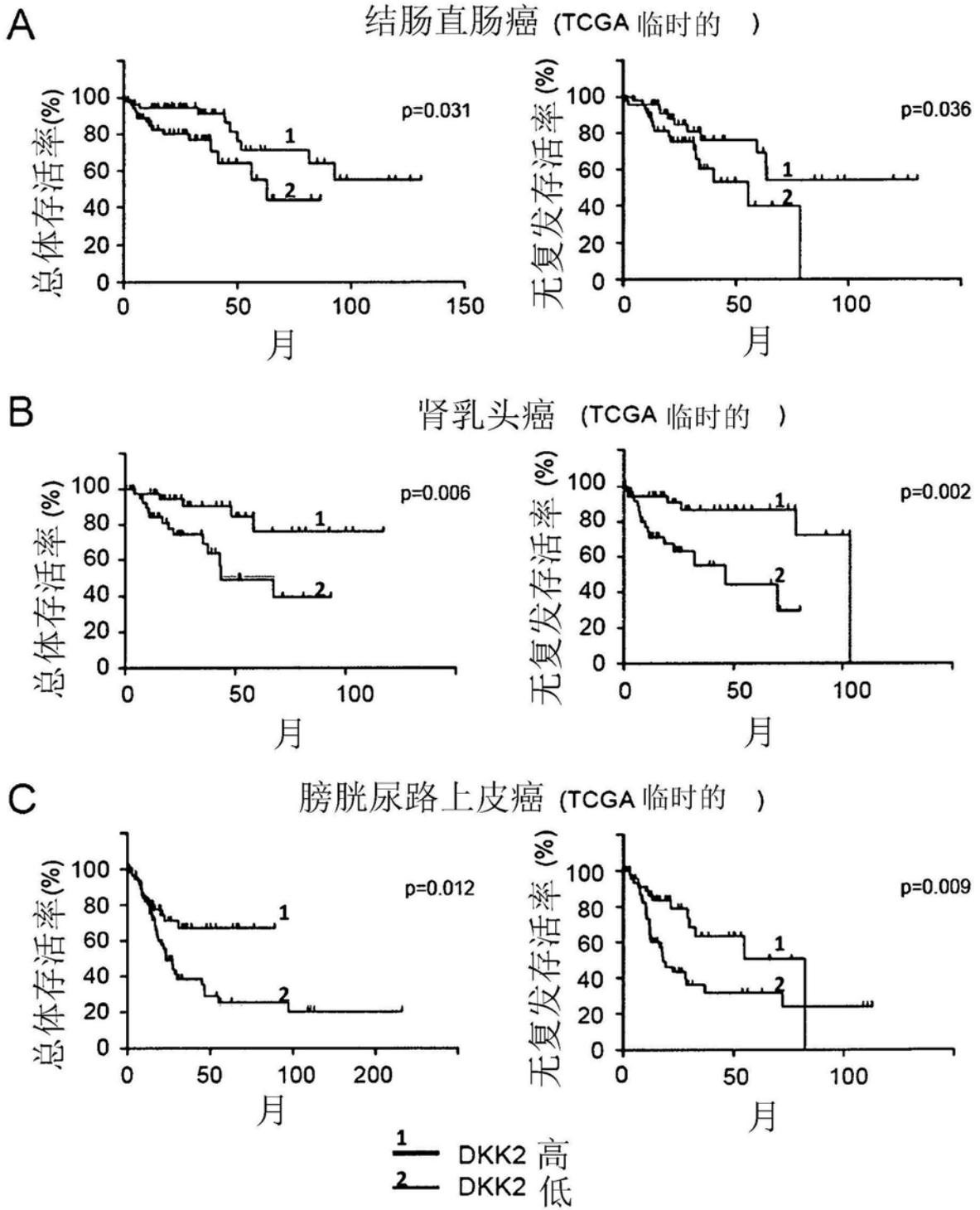


图12A-12C

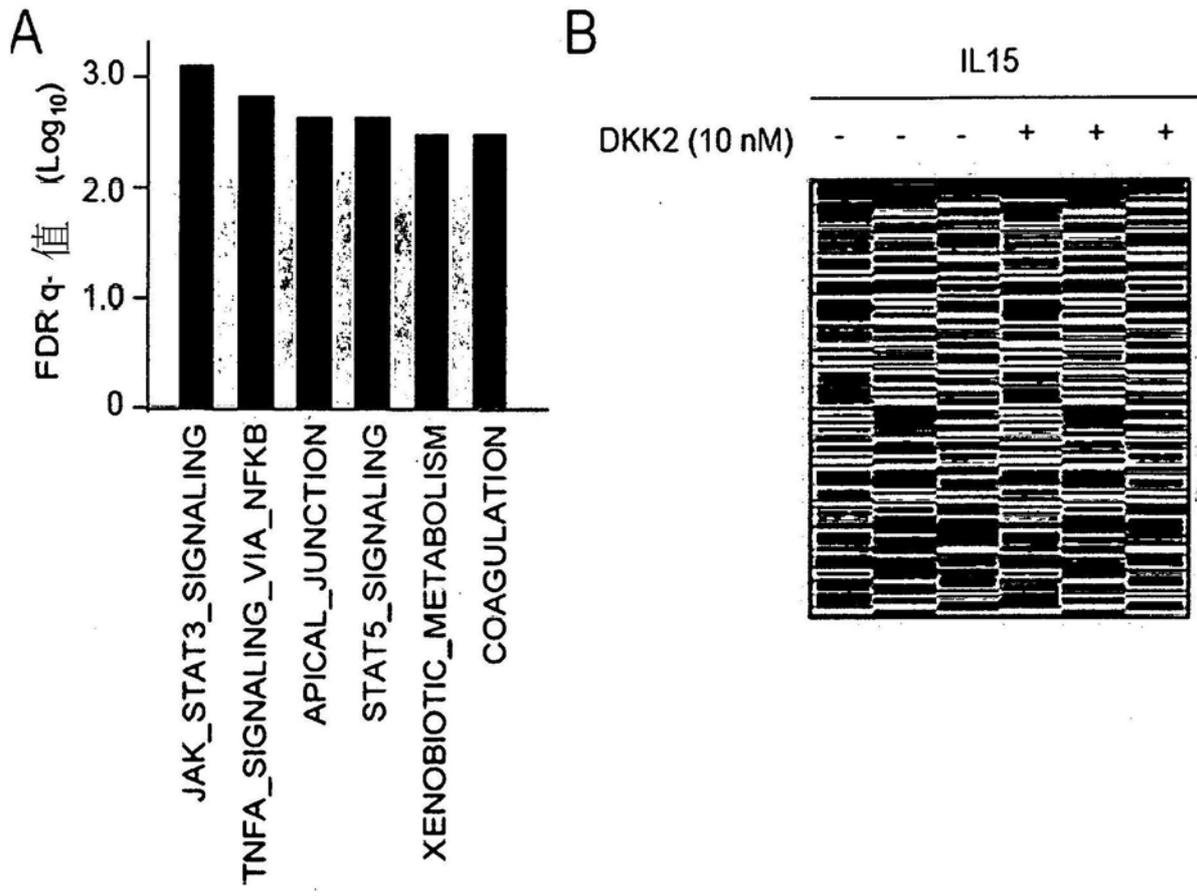


图13A-13B

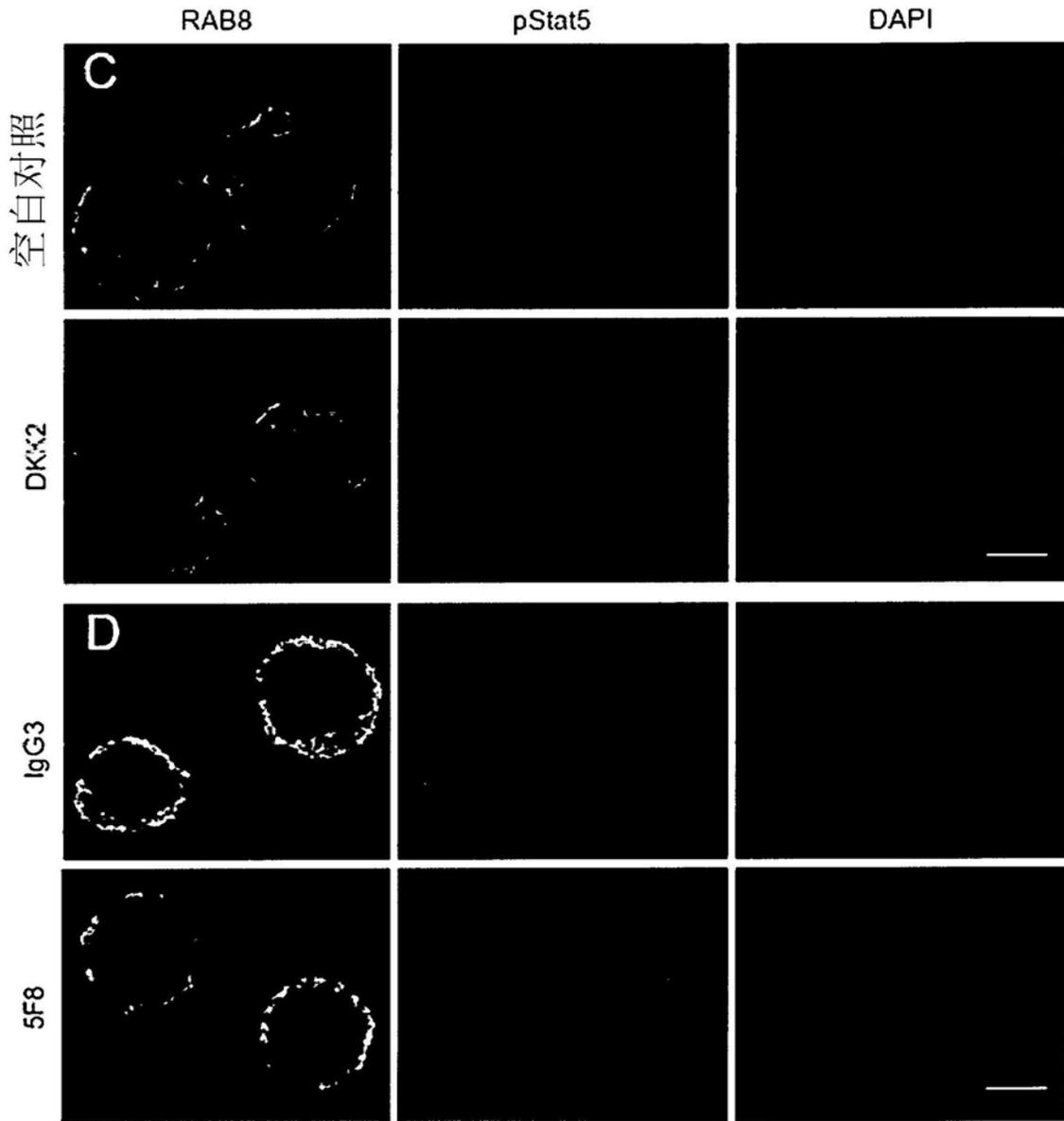


图13C-13D

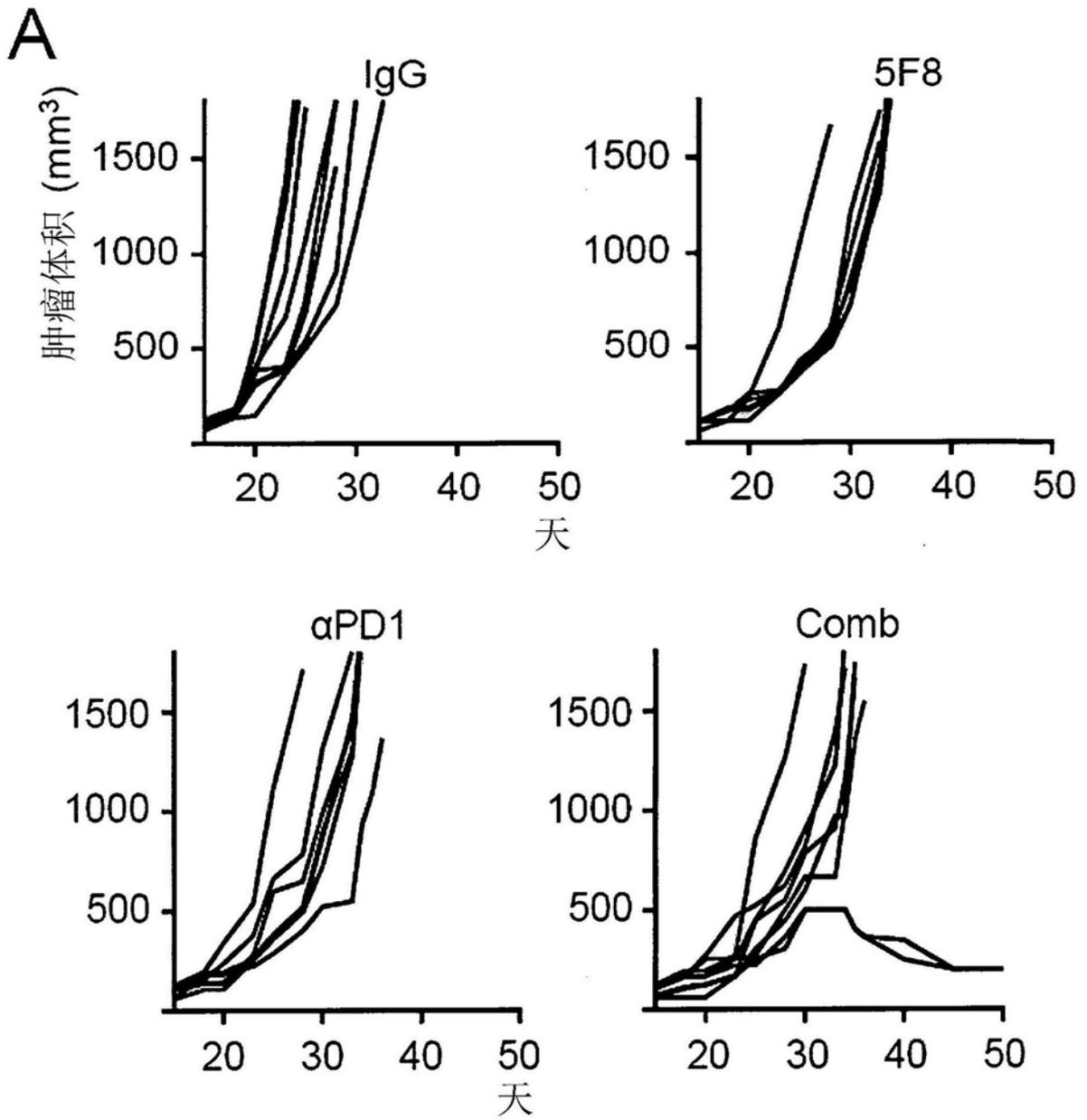


图14A

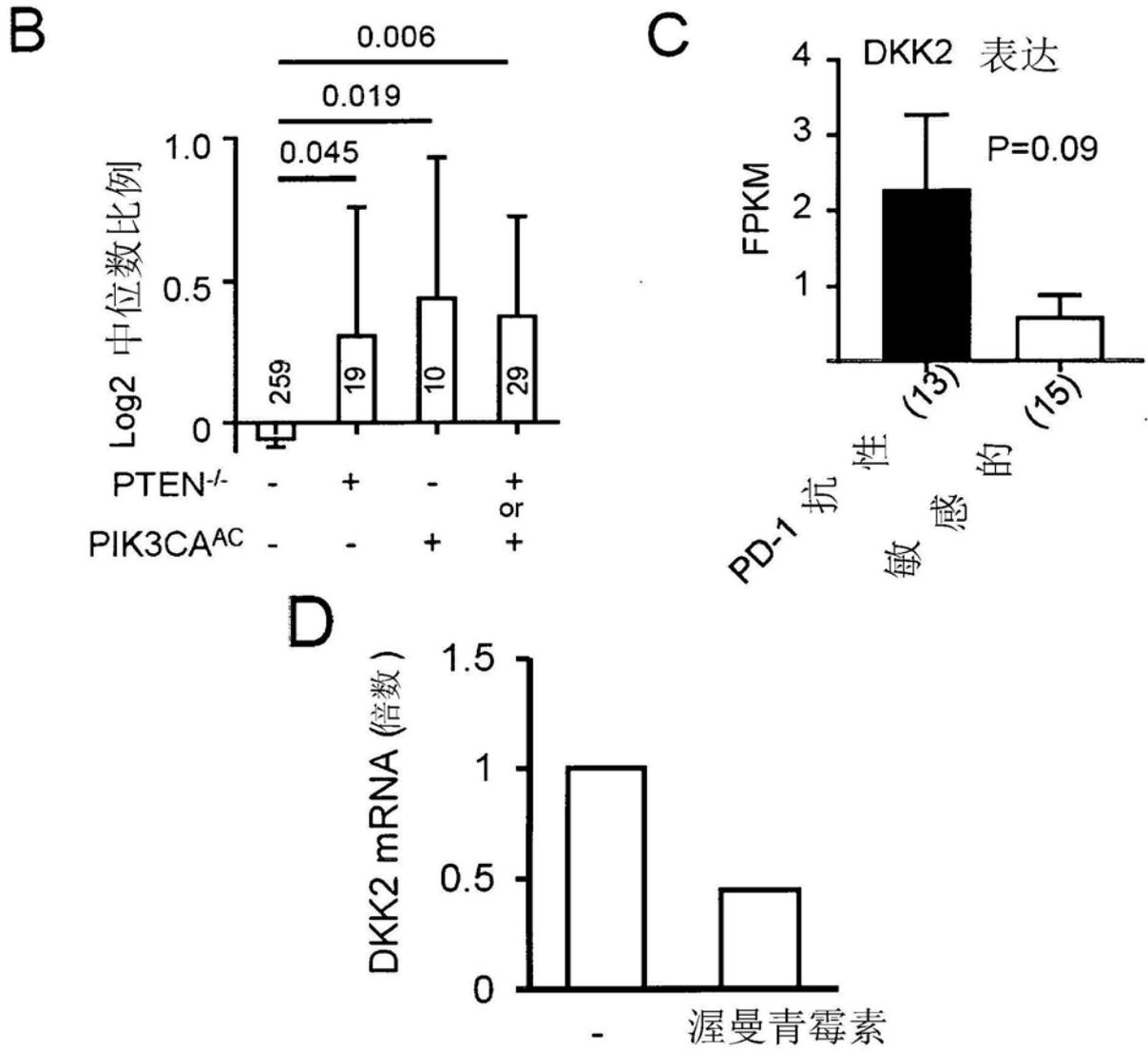


图14B-14D

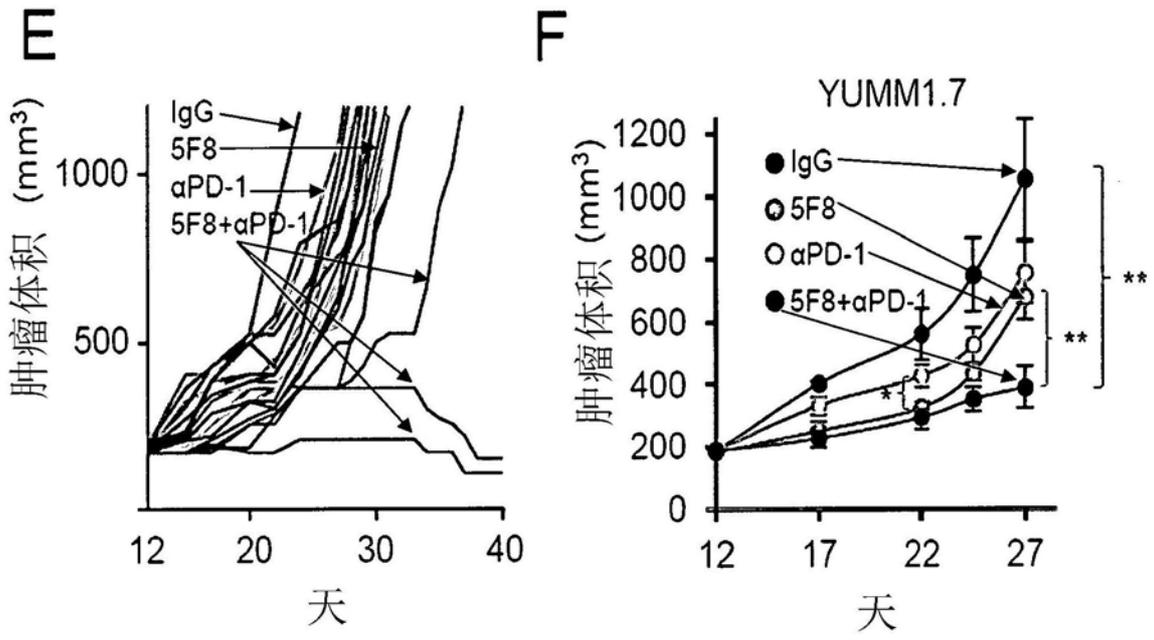


图14E-14F

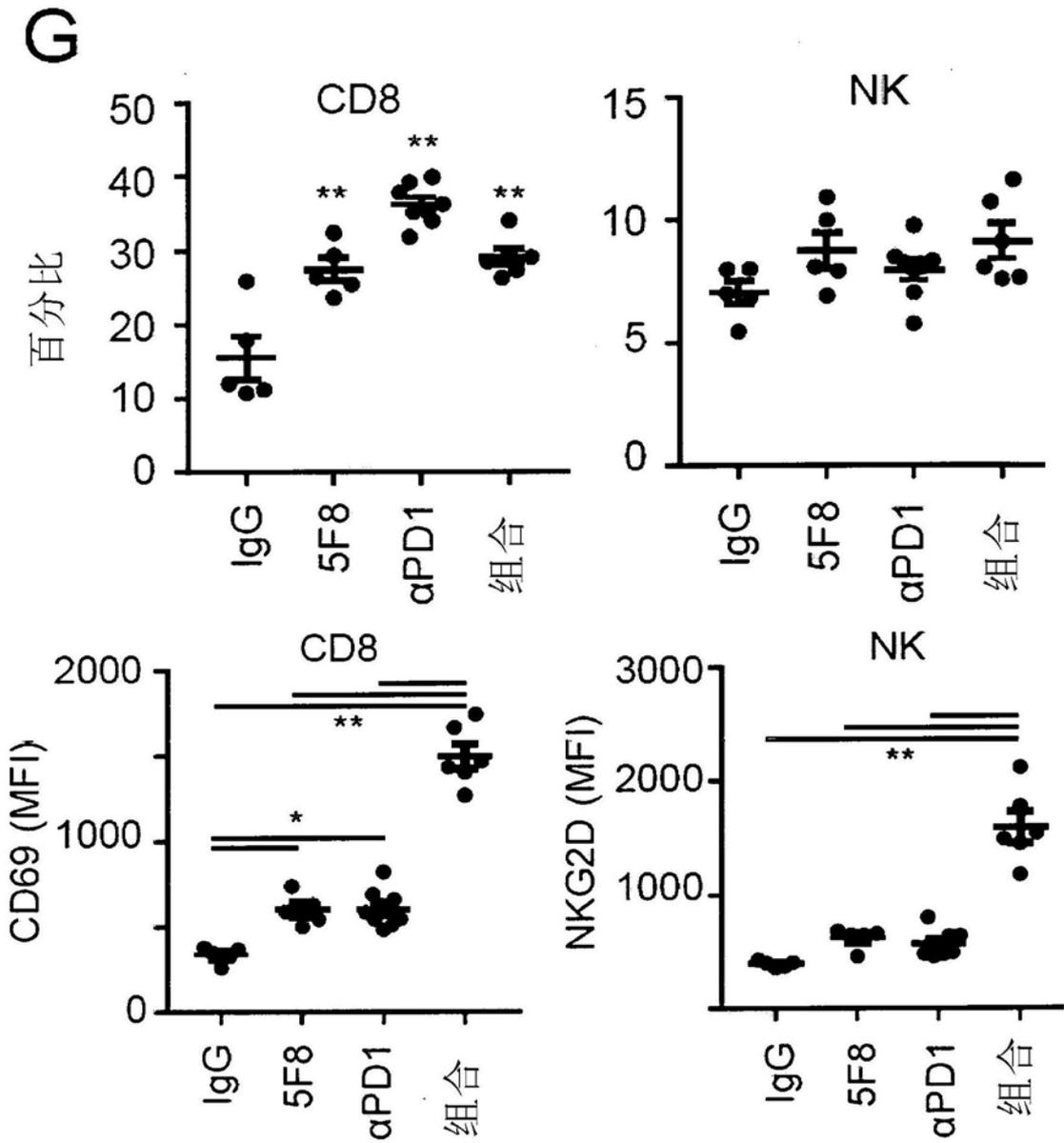


图14G

| 基因 | 1.对照 | 2.对照 | 3.对照 | 1.DKK2 | 2.DKK2 | 3.DKK2 | 总和 | T 检验 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| FBXW7 | 0.92129 | 1.173155 | 0.880302 | -0.92129 | -1.17315 | -0.8803 | 0.991582 | 0.000106 |
| ETV5 | 1.009616 | 1.169622 | 0.782726 | -1.00962 | -1.16962 | -0.78273 | 0.987321 | 0.00024 |
| ANKHD1 | 1.172739 | 0.76964 | 1.016039 | -1.17274 | -0.76964 | -1.01604 | 0.98614 | 0.000287 |
| HMGNS | 0.8164 | 0.911184 | 1.226064 | -0.8164 | -0.91118 | -1.22606 | 0.98455 | 0.000356 |
| GABPA | 0.836456 | 0.844407 | 1.259888 | -0.83646 | -0.84441 | -1.25989 | 0.98025 | 0.000581 |
| CEP55 | 0.723763 | 0.999583 | 1.215319 | -0.72376 | -0.99958 | -1.21532 | 0.979555 | 0.000623 |
| TMEM163 | 0.649514 | 1.07187 | 1.195503 | -0.64951 | -1.07187 | -1.1955 | 0.972295 | 0.001141 |
| DACH2 | 1.218979 | 1.04728 | 0.645985 | -1.21898 | -1.04728 | -0.64598 | 0.970748 | 0.001271 |
| PBX1 | 0.527643 | 0.988892 | 1.320487 | -0.52764 | -0.98889 | -1.32049 | 0.945674 | 0.004347 |
| RNF115 | 0.624361 | 0.786445 | 1.411268 | -0.62436 | -0.78644 | -1.41127 | 0.940691 | 0.005172 |
| KBTBD8 | 0.687278 | 0.688962 | 1.432823 | -0.68728 | -0.68896 | -1.43282 | 0.936354 | 0.005947 |
| MYO3B | 1.243951 | 1.134127 | 0.407851 | -1.24395 | -1.13413 | -0.40785 | 0.928643 | 0.007456 |
| MRPS18B | 1.180775 | 1.209613 | 0.377632 | -1.18077 | -1.20961 | -0.37763 | 0.922673 | 0.008738 |
| GRAMD1C | 1.474039 | 0.689137 | 0.593546 | -1.47404 | -0.68914 | -0.59355 | 0.918908 | 0.009597 |
| KDM6A | 0.286721 | 1.065295 | 1.335267 | -0.28672 | -1.06529 | -1.33527 | 0.895761 | 0.015732 |
| FZD6 | 1.406196 | 0.283214 | 0.970774 | -1.4062 | -0.28321 | -0.97077 | 0.886728 | 0.018519 |
| MAFF | 0.950017 | 0.276393 | 1.421645 | -0.95002 | -0.27639 | -1.42164 | 0.882685 | 0.019837 |
| ATP11C | 0.322342 | 0.751334 | 1.526956 | -0.32234 | -0.75133 | -1.52696 | 0.866877 | 0.025403 |
| DIXDC1 | 0.892956 | 1.47569 | 0.158018 | -0.89296 | -1.47569 | -0.15802 | 0.842221 | 0.035377 |
| ITPR1 | 0.469316 | 0.448847 | 1.605702 | -0.46932 | -0.44885 | -1.6057 | 0.841288 | 0.035785 |
| MIR17HG | 0.620044 | 0.309841 | 1.587307 | -0.62004 | -0.30984 | -1.58731 | 0.839064 | 0.036766 |
| HNRNPR | 0.072795 | 1.153316 | 1.29018 | -0.07278 | -1.15332 | -1.29018 | 0.838764 | 0.0369 |
| CITED2 | 0.336048 | 0.584284 | 1.59552 | -0.33605 | -0.58428 | -1.59552 | 0.838617 | 0.036965 |
| EHD4 | 0.915924 | 1.465237 | 0.119012 | -0.91592 | -1.46524 | -0.11901 | 0.833391 | 0.039325 |
| COL4A3BP | 0.286436 | 0.579506 | 1.6069 | -0.28644 | -0.57951 | -1.6069 | 0.824281 | 0.043603 |
| LRRC16A | 1.315411 | 1.126633 | 0.019804 | -1.31541 | -1.12663 | -0.0198 | 0.820616 | 0.045382 |
| NFIL3 | 0.347777 | 0.44847 | 1.636437 | -0.34778 | -0.44847 | -1.63644 | 0.810895 | 0.05026 |
| EIF4E | 0.813415 | 0.089421 | 1.526552 | -0.81341 | -0.08942 | -1.52655 | 0.809796 | 0.050826 |
| GZMB | 0.750821 | 0.121533 | 1.556116 | -0.75082 | -0.12153 | -1.55612 | 0.80949 | 0.050984 |
| TM9SF3 | 0.510341 | 0.281406 | 1.631062 | -0.51034 | -0.28141 | -1.63106 | 0.807603 | 0.051964 |
| SPRED1 | 0.300108 | 0.4495 | 1.645565 | -0.30011 | -0.4495 | -1.64557 | 0.798391 | 0.056872 |
| ATP2A2 | -0.06492 | 1.1423 | 1.30036 | 0.064917 | -1.1423 | -1.30036 | 0.792581 | 0.060072 |
| ARIH1 | 0.437271 | 0.289405 | 1.650769 | -0.43727 | -0.28941 | -1.65077 | 0.792482 | 0.060127 |
| PTCH1 | 0.306592 | 1.655841 | 0.405204 | -0.30659 | -1.65584 | -0.4052 | 0.789213 | 0.061964 |
| TRAF6 | -0.07569 | 1.424936 | 0.981748 | 0.075693 | -1.42494 | -0.98175 | 0.776997 | 0.069051 |
| ZFR | 1.527484 | -0.02315 | 0.816245 | -1.52748 | 0.023153 | -0.81625 | 0.773526 | 0.071128 |
| MTF2 | 0.365554 | 0.274394 | 1.670652 | -0.36555 | -0.27439 | -1.67065 | 0.7702 | 0.073144 |
| SCYL2 | 0.381205 | 1.670059 | 0.256101 | -0.3812 | -1.67006 | -0.2561 | 0.769121 | 0.073804 |
| CMTM6 | 0.014668 | 1.58117 | 0.706884 | -0.01467 | -1.58117 | -0.70688 | 0.767574 | 0.074755 |
| NFIA | 0.970263 | 1.429899 | -0.11824 | -0.97026 | -1.4299 | 0.118235 | 0.760642 | 0.079082 |
| PHF17 | -0.16944 | 1.250019 | 1.186905 | 0.169436 | -1.25002 | -1.18691 | 0.755829 | 0.08215 |
| FUT8 | 0.867446 | -0.11456 | 1.494795 | -0.86745 | 0.114563 | -1.4948 | 0.749226 | 0.086446 |
| IWS1 | -0.19642 | 1.328806 | 1.093479 | 0.196417 | -1.32881 | -1.09348 | 0.741956 | 0.091289 |
| MBNL1 | -0.21052 | 1.2341 | 1.196946 | 0.210517 | -1.2341 | -1.19695 | 0.740176 | 0.092492 |
| LCOR | -0.1098 | 0.795098 | 1.534849 | 0.109801 | -0.7951 | -1.53485 | 0.740049 | 0.092579 |
| ELMO1 | -0.06145 | 1.588647 | 0.687331 | 0.061454 | -1.58865 | -0.68733 | 0.738175 | 0.093854 |
| HACE1 | 1.581957 | -0.07837 | 0.700906 | -1.58196 | 0.078368 | -0.70091 | 0.734832 | 0.096149 |
| BTBD1 | 0.822466 | -0.15271 | 1.516651 | -0.82247 | 0.152705 | -1.51665 | 0.728804 | 0.100348 |
| SREK1 | 0.244598 | 0.241808 | 1.697557 | -0.2446 | -0.24181 | -1.69756 | 0.727988 | 0.100923 |

图15 (1/5部分)

| | | | | | | | | |
|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| POLA1 | -0.2797 | 1.184291 | 1.232566 | 0.279704 | -1.18429 | -1.23257 | 0.712385 | 0.112188 |
| MAP2K3 | 1.082484 | 1.323269 | -0.27783 | -1.08248 | -1.32327 | 0.277826 | 0.709309 | 0.11447 |
| SLC30A7 | -0.21867 | 0.805318 | 1.517778 | 0.218666 | -0.80532 | -1.51778 | 0.701476 | 0.120373 |
| BTK | 1.445722 | 0.917157 | -0.26213 | -1.44572 | -0.91716 | 0.262129 | 0.70025 | 0.121309 |
| SMC1A | -0.18051 | 1.568203 | 0.71285 | 0.180511 | -1.5682 | -0.71285 | 0.700181 | 0.121362 |
| PRKCE | 1.300187 | 1.10204 | -0.30826 | -1.30019 | -1.10204 | 0.308256 | 0.697991 | 0.123041 |
| EXT1 | 1.144884 | 1.259738 | -0.31985 | -1.14488 | -1.25974 | 0.319845 | 0.694926 | 0.125409 |
| PPP2R2A | 0.986338 | -0.29745 | 1.392358 | -0.98634 | 0.297449 | -1.39236 | 0.693749 | 0.126323 |
| SMC4 | 0.187476 | 0.168746 | 1.713586 | -0.18748 | -0.16875 | -1.71359 | 0.689936 | 0.129305 |
| BEND4 | 0.112149 | 1.712654 | 0.23289 | -0.11215 | -1.71265 | -0.23289 | 0.685898 | 0.132496 |
| UGCG | -0.2335 | 0.744698 | 1.546255 | 0.233496 | -0.7447 | -1.54626 | 0.685819 | 0.132558 |
| GEN1 | 0.221934 | 0.111594 | 1.714145 | -0.22193 | -0.11159 | -1.71414 | 0.682558 | 0.13516 |
| 42620 | 0.495146 | -0.11887 | 1.655506 | -0.49515 | 0.118869 | -1.65551 | 0.677261 | 0.139432 |
| FLI1 | -0.22024 | 0.666185 | 1.583569 | 0.220243 | -0.66619 | -1.58357 | 0.676504 | 0.140048 |
| PURA | 0.058964 | 0.242381 | 1.713994 | -0.05896 | -0.24238 | -1.71399 | 0.67178 | 0.143914 |
| GPR34 | 0.87435 | -0.32003 | 1.460511 | -0.87435 | 0.320032 | -1.46051 | 0.67161 | 0.144053 |
| AP4E1 | -0.3373 | 1.460053 | 0.868605 | 0.337297 | -1.46005 | -0.8686 | 0.663787 | 0.150556 |
| PLS3 | 0.489547 | 1.652914 | -0.16799 | -0.48955 | -1.65291 | 0.167987 | 0.658158 | 0.155311 |
| DMD | 0.94247 | 1.402903 | -0.37896 | -0.94247 | -1.4029 | 0.378962 | 0.655471 | 0.157603 |
| RLIM | -0.19924 | 0.519425 | 1.640274 | 0.199243 | -0.51943 | -1.64027 | 0.653486 | 0.159305 |
| TUG1 | -0.33536 | 0.792556 | 1.503127 | 0.33536 | -0.79256 | -1.50313 | 0.653441 | 0.159344 |
| CALR | 0.364728 | -0.13022 | 1.688199 | -0.36473 | 0.130223 | -1.6882 | 0.640901 | 0.170275 |
| PPP1R10 | 1.136399 | 1.222331 | -0.46315 | -1.1364 | -1.22233 | 0.463145 | 0.631862 | 0.178343 |
| NFYB | 0.971079 | 1.363704 | -0.4442 | -0.97108 | -1.3637 | 0.444204 | 0.630193 | 0.179849 |
| SPRY4 | -0.41785 | 0.856497 | 1.44631 | 0.41785 | -0.8565 | -1.44631 | 0.628319 | 0.181547 |
| RYBP | -0.3172 | 1.59276 | 0.602079 | 0.3172 | -1.59276 | -0.60208 | 0.62588 | 0.183767 |
| EMP1 | 0.602264 | -0.31824 | 1.592483 | -0.60226 | 0.318239 | -1.59248 | 0.625503 | 0.184111 |
| IFT80 | 0.34791 | 1.689078 | -0.16117 | -0.34791 | -1.68908 | 0.161168 | 0.625273 | 0.184321 |
| PBK | 0.927156 | -0.44868 | 1.392504 | -0.92716 | 0.44868 | -1.3925 | 0.62366 | 0.185797 |
| ADAMTS6 | 0.664349 | 1.553676 | -0.38044 | -0.66435 | -1.55368 | 0.380436 | 0.61253 | 0.196114 |
| FAM178A | -0.27786 | 0.428875 | 1.65495 | 0.27786 | -0.42888 | -1.65495 | 0.601988 | 0.206095 |
| ANKRD28 | -0.05759 | 0.137911 | 1.725591 | 0.057587 | -0.13791 | -1.72559 | 0.601972 | 0.206111 |
| MARCKS | -0.48997 | 0.857788 | 1.422718 | 0.489974 | -0.85779 | -1.42272 | 0.596844 | 0.211039 |
| TMEM70 | 0.628585 | -0.40738 | 1.561704 | -0.62859 | 0.407382 | -1.5617 | 0.594303 | 0.213499 |
| ANGPT1 | 1.731465 | -0.00769 | 0.044372 | -1.73147 | 0.007691 | -0.04437 | 0.589382 | 0.218294 |
| ITGA2 | 0.066119 | 1.730545 | -0.02899 | -0.06612 | -1.73055 | 0.028993 | 0.589224 | 0.218449 |
| SYNCRIP | -0.04878 | 0.083193 | 1.729364 | 0.048785 | -0.08319 | -1.72936 | 0.587924 | 0.219723 |
| CDC37L1 | 0.676414 | -0.45949 | 1.52687 | -0.67641 | 0.45949 | -1.52687 | 0.581265 | 0.226298 |
| INPP5F | -0.47648 | 0.692281 | 1.5145 | 0.476484 | -0.69228 | -1.5145 | 0.576766 | 0.230784 |
| GFM1 | -0.101 | 0.095367 | 1.726471 | 0.101004 | -0.09537 | -1.72647 | 0.573611 | 0.233951 |
| NUDCD1 | 0.194744 | -0.19255 | 1.710262 | -0.19474 | 0.192554 | -1.71026 | 0.570818 | 0.236769 |
| LIX1L | -0.57913 | 1.348158 | 0.920369 | 0.57913 | -1.34816 | -0.92037 | 0.563132 | 0.244591 |
| TNFRSF9 | 1.721537 | -0.16981 | 0.086449 | -1.72154 | 0.169814 | -0.08645 | 0.546057 | 0.262325 |
| UBR1 | 0.103558 | 1.718923 | -0.18595 | -0.10356 | -1.71892 | 0.185955 | 0.545509 | 0.262903 |
| PPAPDC2 | -0.56867 | 0.747838 | 1.455112 | 0.568671 | -0.74784 | -1.45511 | 0.54476 | 0.263693 |
| SMC6 | -0.11781 | -0.00987 | 1.728011 | 0.117815 | 0.009869 | -1.72801 | 0.533442 | 0.275735 |
| AKT1 | -0.11133 | 1.728283 | -0.02538 | 0.111328 | -1.72828 | 0.025376 | 0.530526 | 0.278871 |
| HEMGN | 0.210171 | -0.3282 | 1.687636 | -0.21017 | 0.328196 | -1.68764 | 0.523204 | 0.286806 |
| TMEM57 | -0.52696 | 1.568668 | 0.511459 | 0.526962 | -1.56867 | -0.51146 | 0.517722 | 0.292802 |
| PATL1 | -0.55262 | 1.545413 | 0.55345 | 0.552624 | -1.54541 | -0.55345 | 0.515413 | 0.295341 |

图15继续 (2/5部分)

| | | | | | | | | |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| ORC4 | 0.089141 | -0.25802 | 1.710404 | -0.08914 | 0.258019 | -1.7104 | 0.513842 | 0.297073 |
| NME7 | 1.712147 | -0.25143 | 0.073042 | -1.71215 | 0.251431 | -0.07304 | 0.511253 | 0.299937 |
| PRDM1 | -0.50503 | 1.609918 | 0.391296 | 0.505026 | -1.60992 | -0.3913 | 0.498729 | 0.313931 |
| MNS1 | -0.45847 | 1.642457 | 0.303545 | 0.45847 | -1.64246 | -0.30355 | 0.495844 | 0.317188 |
| PMCH | -0.7518 | 1.09431 | 1.112333 | 0.751798 | -1.09431 | -1.11233 | 0.484949 | 0.329601 |
| IPO11 | -0.27619 | 0.020782 | 1.709762 | 0.276193 | -0.02078 | -1.70976 | 0.484783 | 0.329791 |
| MBNL3 | -0.76328 | 0.995403 | 1.194392 | 0.763283 | -0.9954 | -1.19439 | 0.475504 | 0.340501 |
| DDX17 | -0.77089 | 1.144503 | 1.046828 | 0.770885 | -1.1445 | -1.04683 | 0.473482 | 0.342851 |
| USO1 | -0.17367 | -0.12518 | 1.71877 | 0.173669 | 0.125176 | -1.71877 | 0.473308 | 0.343053 |
| TMOD3 | -0.59016 | 0.435058 | 1.569214 | 0.590162 | -0.43506 | -1.56921 | 0.47137 | 0.345312 |
| FYTTD1 | 0.114544 | -0.39471 | 1.682583 | -0.11454 | 0.394709 | -1.68258 | 0.467473 | 0.34987 |
| KLF9 | -0.37442 | 1.68888 | 0.086574 | 0.37442 | -1.68888 | -0.08657 | 0.467011 | 0.350411 |
| TUBA1A | 1.45166 | -0.69689 | 0.63799 | -1.45166 | 0.696887 | -0.63799 | 0.464254 | 0.353649 |
| CCND2 | -0.67354 | 1.48856 | 0.574916 | 0.673543 | -1.48856 | -0.57492 | 0.463311 | 0.35476 |
| CHCHD3 | 0.432105 | -0.61126 | 1.561936 | -0.4321 | 0.611262 | -1.56194 | 0.460927 | 0.357573 |
| KCNA3 | 0.128724 | 1.670214 | -0.44024 | -0.12872 | -1.67021 | 0.440243 | 0.452898 | 0.367101 |
| RNF17 | 1.16044 | -0.81011 | 0.998549 | -1.16044 | 0.810111 | -0.99855 | 0.449626 | 0.37101 |
| NMNAT3 | 0.213616 | -0.51582 | 1.639604 | -0.21362 | 0.515818 | -1.6396 | 0.4458 | 0.375598 |
| MED24 | 0.197023 | 1.63867 | -0.5253 | -0.19702 | -1.63867 | 0.525303 | 0.436796 | 0.386474 |
| AIF1L | 1.693168 | -0.02135 | -0.36432 | -1.69317 | 0.021348 | 0.364317 | 0.435834 | 0.387642 |
| CHD2 | -0.67666 | 1.531154 | 0.444633 | 0.67666 | -1.53115 | -0.44463 | 0.433042 | 0.39104 |
| DARS | 0.229751 | -0.57003 | 1.619346 | -0.22975 | 0.57003 | -1.61935 | 0.426355 | 0.399218 |
| ARRDC3 | 0.641831 | 1.407042 | -0.77993 | -0.64183 | -1.40704 | 0.779926 | 0.422982 | 0.403365 |
| BZW1 | 0.260236 | -0.60152 | 1.603264 | -0.26024 | 0.601515 | -1.60326 | 0.420662 | 0.406227 |
| TRPS1 | 0.053342 | 1.66576 | -0.47159 | -0.05334 | -1.66576 | 0.471592 | 0.415836 | 0.412199 |
| IKZF2 | -0.40775 | 1.683041 | -0.03338 | 0.40775 | -1.68304 | 0.033381 | 0.41397 | 0.414516 |
| NT5C2 | -0.84806 | 1.280523 | 0.800664 | 0.848055 | -1.28052 | -0.80066 | 0.411044 | 0.418158 |
| AKAP1 | -0.66348 | 0.325497 | 1.566476 | 0.663478 | -0.3255 | -1.56648 | 0.409499 | 0.420086 |
| MITF | 1.69544 | -0.31982 | -0.15232 | -1.69544 | 0.319816 | 0.152315 | 0.40777 | 0.422247 |
| CPSF7 | -0.73964 | 0.451966 | 1.499553 | 0.73964 | -0.45197 | -1.49955 | 0.40396 | 0.42702 |
| CTPS | 0.176794 | -0.60089 | 1.614832 | -0.17679 | 0.600885 | -1.61483 | 0.396914 | 0.435895 |
| CREM | 1.442031 | -0.80055 | 0.528827 | -1.44203 | 0.800554 | -0.52883 | 0.390101 | 0.444531 |
| AMD1 | 0.682957 | -0.86224 | 1.337948 | -0.68296 | 0.862244 | -1.33795 | 0.386221 | 0.449475 |
| PRELID2 | 1.441133 | -0.81157 | 0.514282 | -1.44113 | 0.811573 | -0.51428 | 0.38128 | 0.455794 |
| EHBP1 | -0.66851 | 1.582151 | 0.223371 | 0.668509 | -1.58215 | -0.22337 | 0.379004 | 0.458715 |
| HIST2H2BE | 0.116988 | 1.601793 | -0.64852 | -0.11699 | -1.60179 | 0.648516 | 0.356755 | 0.48757 |
| ARPC2 | 1.660948 | -0.13879 | -0.47116 | -1.66095 | 0.138791 | 0.471158 | 0.350333 | 0.496 |
| NR4A3 | -0.97518 | 1.031313 | 0.992682 | 0.97518 | -1.03131 | -0.99268 | 0.349605 | 0.496957 |
| FNBP1 | -0.33679 | 1.674009 | -0.29028 | 0.336793 | -1.67401 | 0.290285 | 0.348977 | 0.497784 |
| SEC24C | -0.54705 | 1.641669 | -0.07521 | 0.547052 | -1.64167 | 0.075207 | 0.339804 | 0.509913 |
| ATP5J | 1.286615 | 0.674399 | -0.9433 | -1.28661 | -0.6744 | 0.943297 | 0.339239 | 0.510662 |
| TNIP2 | 1.610911 | 0.040296 | -0.63509 | -1.61091 | -0.0403 | 0.635092 | 0.338705 | 0.51137 |
| BCLAF1 | -0.02421 | -0.59174 | 1.627653 | 0.024213 | 0.591743 | -1.62765 | 0.337232 | 0.513328 |
| MPP6 | 0.445295 | -0.86802 | 1.43117 | -0.4453 | 0.868024 | -1.43117 | 0.336147 | 0.514771 |
| FAM71B | 0.406955 | 1.452115 | -0.85191 | -0.40696 | -1.45212 | 0.851909 | 0.335721 | 0.515338 |
| POLE2 | 0.229907 | -0.78195 | 1.528297 | -0.22991 | 0.781954 | -1.5283 | 0.325417 | 0.529105 |
| PLEKHA1 | -0.7381 | 1.559211 | 0.155126 | 0.738103 | -1.55921 | -0.15513 | 0.325412 | 0.529112 |
| RAP2A | -0.64153 | 1.608862 | 0.000655 | 0.64153 | -1.60886 | -0.00065 | 0.322662 | 0.532803 |
| CEBPG | -1.01002 | 0.837946 | 1.130355 | 1.010022 | -0.83795 | -1.13035 | 0.319426 | 0.537157 |
| UBAP2L | -0.60456 | 1.621741 | -0.0668 | 0.604561 | -1.62174 | 0.066805 | 0.316792 | 0.540709 |

图15继续 (3/5部分)

| | | | | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| CCDC25 | 1.172358 | -1.0057 | 0.783672 | -1.17236 | 1.005701 | -0.78367 | 0.316776 | 0.540729 |
| C2CD3 | 0.062216 | 1.583976 | -0.69796 | -0.06222 | -1.58398 | 0.697961 | 0.316077 | 0.541673 |
| CBL | 0.005747 | 1.600066 | -0.66314 | -0.00575 | -1.60007 | 0.663141 | 0.314224 | 0.544177 |
| SOCS2 | -0.4888 | -0.21961 | 1.647072 | 0.4888 | 0.21961 | -1.64707 | 0.312887 | 0.545985 |
| TUT1 | -0.50745 | 1.644144 | -0.1982 | 0.507452 | -1.64414 | 0.198197 | 0.312832 | 0.54606 |
| WIPF1 | -0.8364 | 1.493818 | 0.262574 | 0.836398 | -1.49382 | -0.26257 | 0.306665 | 0.554422 |
| POLK | -0.84227 | 0.206886 | 1.499259 | 0.842271 | -0.20689 | -1.49926 | 0.287958 | 0.580002 |
| GPBP1 | 0.983393 | -1.07013 | 0.942206 | -0.98339 | 1.070134 | -0.94221 | 0.285155 | 0.583861 |
| LAPTM4B | 1.622857 | -0.20001 | -0.57125 | -1.62286 | 0.20001 | 0.571253 | 0.283865 | 0.58564 |
| VANGL1 | -0.50817 | 1.631603 | -0.28219 | 0.508173 | -1.6316 | 0.282194 | 0.280412 | 0.590407 |
| TNFSF11 | -0.25168 | -0.56063 | 1.619368 | 0.251682 | 0.560628 | -1.61937 | 0.269019 | 0.606205 |
| PHTF1 | 1.236121 | 0.608304 | -1.04975 | -1.23612 | -0.6083 | 1.049749 | 0.264892 | 0.611956 |
| DUSP9 | -0.91703 | 0.265543 | 1.445179 | 0.917031 | -0.26554 | -1.44518 | 0.264564 | 0.612413 |
| NUFIP2 | -0.43111 | -0.41871 | 1.624447 | 0.43111 | 0.418708 | -1.62445 | 0.25821 | 0.621293 |
| CNOT2 | -0.9952 | 0.345993 | 1.374725 | 0.995199 | -0.34599 | -1.37472 | 0.24184 | 0.644312 |
| DUSP4 | -0.96012 | 0.265634 | 1.4169 | 0.960121 | -0.26563 | -1.4169 | 0.240804 | 0.645775 |
| KIF24 | -0.19745 | 1.586207 | -0.66705 | 0.197449 | -1.58621 | 0.667055 | 0.240567 | 0.64611 |
| BACH2 | -0.53282 | 1.605572 | -0.3718 | 0.532823 | -1.60557 | 0.371805 | 0.233648 | 0.655905 |
| NRAS | 0.063649 | -0.88755 | 1.486002 | -0.06365 | 0.887551 | -1.486 | 0.2207 | 0.674325 |
| LONRF3 | -1.04829 | 1.337492 | 0.334956 | 1.048294 | -1.33749 | -0.33496 | 0.208051 | 0.692426 |
| PSMA6 | 0.794026 | -1.17686 | 0.992229 | -0.79403 | 1.176862 | -0.99223 | 0.203131 | 0.699495 |
| TSPAN4 | -1.17829 | 0.980372 | 0.806542 | 1.178287 | -0.98037 | -0.80654 | 0.202875 | 0.699862 |
| TRIM46 | 0.676956 | 1.075014 | -1.17732 | -0.67696 | -1.07501 | 1.177317 | 0.191551 | 0.716187 |
| PCYOX1 | 0.144991 | 1.410865 | -0.9942 | -0.14499 | -1.41086 | 0.994202 | 0.187218 | 0.722455 |
| IRF4 | 0.202514 | 1.378513 | -1.02893 | -0.20251 | -1.37851 | 1.028926 | 0.184034 | 0.727066 |
| LSM12 | -0.46284 | -0.566 | 1.570168 | 0.46284 | 0.565996 | -1.57017 | 0.180444 | 0.732272 |
| TIAL1 | 0.308926 | -1.08794 | 1.311851 | -0.30893 | 1.08794 | -1.31185 | 0.177612 | 0.736383 |
| FGF13 | 0.353006 | 1.280346 | -1.1118 | -0.35301 | -1.28035 | 1.1118 | 0.173851 | 0.741851 |
| YWHAQ | 0.635025 | -1.19837 | 1.077337 | -0.63502 | 1.198369 | -1.07734 | 0.171331 | 0.745518 |
| CTAGE5 | -0.20269 | -0.82552 | 1.509116 | 0.202692 | 0.825521 | -1.50912 | 0.160301 | 0.761609 |
| AP2M1 | 0.871308 | 0.842962 | -1.23703 | -0.87131 | -0.84296 | 1.237028 | 0.159081 | 0.763392 |
| EP300 | -0.64998 | 1.548323 | -0.42453 | 0.649979 | -1.54832 | 0.424527 | 0.157939 | 0.765061 |
| SNX18 | -1.15483 | 1.237488 | 0.367418 | 1.154828 | -1.23749 | -0.36742 | 0.150026 | 0.77665 |
| BBX | -0.91994 | 1.464261 | -0.09821 | 0.919941 | -1.46426 | 0.098215 | 0.148702 | 0.778592 |
| TBCD | 0.033809 | 1.401912 | -1.01661 | -0.03381 | -1.40191 | 1.016612 | 0.139703 | 0.791809 |
| PPARGC1A | 1.210421 | 0.384817 | -1.17762 | -1.21042 | -0.38482 | 1.177623 | 0.139205 | 0.792541 |
| ARFGEF1 | -1.26312 | 0.840542 | 0.835481 | 1.263115 | -0.84054 | -0.83548 | 0.137636 | 0.79485 |
| DGKZ | -0.54502 | 1.537091 | -0.58335 | 0.545022 | -1.53709 | 0.583355 | 0.136238 | 0.796907 |
| ID3 | 1.53083 | -0.55422 | -0.5911 | -1.53083 | 0.554224 | 0.591096 | 0.128504 | 0.808306 |
| ASXL1 | -0.72025 | 1.51385 | -0.43531 | 0.720255 | -1.51385 | 0.435307 | 0.119429 | 0.821708 |
| RUNX1 | -1.22983 | 1.136248 | 0.443248 | 1.229825 | -1.13625 | -0.44325 | 0.116557 | 0.825956 |
| ZBTB20 | 1.10813 | -1.24488 | 0.471513 | -1.10813 | 1.244879 | -0.47151 | 0.111588 | 0.833312 |
| DENND2C | -0.06397 | -1.00864 | 1.40661 | 0.063973 | 1.00864 | -1.40661 | 0.111332 | 0.833691 |
| PSMA1 | 0.674817 | -1.2878 | 0.941378 | -0.67482 | 1.2878 | -0.94138 | 0.109465 | 0.836458 |
| RALGDS | 0.000168 | 1.377619 | -1.04984 | -0.00017 | -1.37762 | 1.049841 | 0.109316 | 0.83668 |
| MAP2K7 | -0.47416 | 1.507188 | -0.70962 | 0.47416 | -1.50719 | 0.709616 | 0.107804 | 0.838921 |
| STAT3 | -0.39108 | 1.486464 | -0.79843 | 0.391076 | -1.48646 | 0.798426 | 0.098987 | 0.852004 |
| PRDX1 | 1.374435 | -1.05373 | -0.02401 | -1.37444 | 1.053732 | 0.024014 | 0.098896 | 0.852139 |
| UGDH | 1.494884 | -0.47681 | -0.73347 | -1.49488 | 0.476805 | 0.73347 | 0.09487 | 0.858123 |
| NFATC2 | -0.91295 | 1.448818 | -0.2597 | 0.912954 | -1.44882 | 0.259697 | 0.092056 | 0.862306 |

图15继续 (4/5部分)

| | | | | | | | | |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| CISH | -0.88702 | 1.457217 | -0.29951 | 0.887025 | -1.45722 | 0.299509 | 0.090228 | 0.865025 |
| SPEF1 | -0.7786 | 1.484211 | -0.43693 | 0.778597 | -1.48421 | 0.436926 | 0.089563 | 0.866015 |
| RBM39 | 0.75884 | -1.32773 | 0.813194 | -0.75884 | 1.327734 | -0.81319 | 0.081433 | 0.87812 |
| HELQ | -0.21926 | -0.96131 | 1.42401 | 0.219263 | 0.961311 | -1.42401 | 0.081145 | 0.878549 |
| MYL6B | -0.93716 | 1.433253 | -0.25985 | 0.937156 | -1.43325 | 0.259853 | 0.078748 | 0.882122 |
| LIN54 | -0.85247 | -0.37373 | 1.460694 | 0.852468 | 0.373725 | -1.46069 | 0.078167 | 0.882988 |
| DTX2 | -0.4687 | 1.472291 | -0.78274 | 0.468704 | -1.47229 | 0.782736 | 0.073617 | 0.889774 |
| PIK3R1 | -0.70066 | 1.468279 | -0.59434 | 0.700659 | -1.46828 | 0.594335 | 0.057761 | 0.913455 |
| BLZF1 | 0.995025 | -1.32591 | 0.501877 | -0.99502 | 1.325913 | -0.50188 | 0.056996 | 0.914598 |
| ARF3 | -0.13249 | 1.362018 | -1.06177 | 0.132494 | -1.36202 | 1.061769 | 0.055918 | 0.91621 |
| SUMO2 | -1.35588 | 0.634285 | 0.87137 | 1.355875 | -0.63428 | -0.87137 | 0.049926 | 0.925173 |
| Prf1 | -1.23164 | 0.169038 | 1.206021 | 1.231641 | -0.16904 | -1.20602 | 0.047806 | 0.928345 |
| SSBP3 | -0.05398 | 1.316673 | -1.12404 | 0.053984 | -1.31667 | 1.124036 | 0.046218 | 0.930723 |
| MAP4K4 | -0.64649 | 1.458338 | -0.67476 | 0.646492 | -1.45834 | 0.674758 | 0.045696 | 0.931504 |
| TRAF3 | -1.02907 | 1.375201 | -0.22324 | 1.029071 | -1.3752 | 0.22324 | 0.040963 | 0.938589 |
| S100A4 | 1.235508 | 0.093335 | -1.21029 | -1.23551 | -0.09333 | 1.210293 | 0.039517 | 0.940756 |

图15继续 (5/5部分)

qRT 引物

| | |
|-------|--------------------------------------|
| hDKK2 | CGACACACCATGCAGGCCGA (SEQ ID NO: 1) |
| hDKK2 | CCTGGTCAGGCCGCCAATCG (SEQ ID NO: 2) |
| mDKK2 | TCAACTCCATCAAGTCCTCTC (SEQ ID NO: 3) |
| mDKK2 | TCACATTCTTATCACTGCTG (SEQ ID NO: 4) |

SiRNA 序列

| | |
|------------|--|
| siCTNNB1-1 | Mixed (GUGAAAUUCUUGGCUAUUA, SEQ ID NO: 5; GCGCUUGGCUGAACCAUCA, SEQ ID NO: 6; AAGCUGACCUGAUGGAGUU, SEQ ID NO: 7; 和 CAGCAAUCAUGCGCCUUU, SEQ ID NO: 8) |
| siCTNNB1-2 | GUGAAAUUCUUGGCUAUUA (SEQ ID NO: 5) |
| siCTNNB1-3 | GCGCUUGGCUGAACCAUCA (SEQ ID NO: 6) |

SgRNA 指导序列

| | |
|----------------------|--|
| Cas9 mAPC-1F | CACCGTTGGAGAGAGAGCGAGGTAT (SEQ ID NO: 9) |
| Cas9 mAPC-1R | AAACatacctcgctctctctcaaC (SEQ ID NO: 10) |
| Cas9 mAPC-2F | CACCGTGCCACACAATGGAACCTCGG (SEQ ID NO: 11) |
| Cas9 mAPC-2R | AAACccgagttccattgtgtggcaC (SEQ ID NO: 12) |
| hAPC 855aa Cas9-1F1 | CACCGTTGGAGAGAGAACGCGGAAT (SEQ ID NO: 13) |
| hAPC 855aa Cas9-1R1 | AAACattcccggttctctctcaaC (SEQ ID NO: 14) |
| hAPC 900aa cas9-1F2 | CACCGGTCTTCTGAGAGGTATGAA (SEQ ID NO: 15) |
| hAPC 900aa cas9-1R2 | AAACttcatacctctcaggaagacC (SEQ ID NO: 16) |
| hAPC 1345aa cas9-2F1 | CACCGGTTTATCTTCAGAATCAGCC (SEQ ID NO: 17) |
| hAPC 1345aa cas9-2R1 | AAACggctgattctgaagataaacC (SEQ ID NO: 18) |
| hAPC 1385AA cas9-2F2 | CACCGTACATCTGCTAAACATGAGT (SEQ ID NO: 19) |
| hAPC 1385AA cas9-2R2 | AAACactcatgttagcagatgtaC (SEQ ID NO: 20) |

图16

| 基因符号 | 1. 对照 | 2. 对照 | 1.DKK2 | 2.DKK2 |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| DACH2 | 1.134291418 | 0.837028498 | -0.7989581 | -1.17236182 |
| ATP2A2 | 1.125646644 | 0.843963719 | -1.18600457 | -0.7836058 |
| TRAF6 | 0.707956444 | 1.245124141 | -1.12007019 | -0.83301039 |
| GABPA | 0.795629313 | 1.145082364 | -0.67660469 | -1.26410698 |
| CPSF7 | 0.61789126 | 1.317507259 | -1.03662422 | -0.8987743 |
| LIF | 1.267547989 | 0.666072892 | -1.16709042 | -0.76653046 |
| KBTBD8 | 1.311749802 | 0.611822649 | -0.79607561 | -1.12749684 |
| CXADR | 0.961553377 | 0.960529814 | -0.57014795 | -1.35193524 |
| RYBP | 1.110673586 | 0.811190912 | -1.32258949 | -0.59927501 |
| GZMB | 1.327468792 | 0.586402749 | -0.78015019 | -1.13372135 |
| MTF2 | 1.356238161 | 0.555187192 | -0.84254954 | -1.06887582 |
| MBNL3 | 0.819714839 | 1.074392976 | -1.38290085 | -0.51120697 |
| MBNL1 | 1.406649866 | 0.478676452 | -0.85612604 | -1.02920028 |
| CNOT2 | 0.728268669 | 1.147095489 | -1.38226127 | -0.49310288 |
| PHF17 | 0.494819716 | 1.377503379 | -0.70720631 | -1.16511679 |
| ATP11C | 0.635351836 | 1.231913801 | -0.52413559 | -1.34313004 |
| SMC1A | 0.900380767 | 0.962219247 | -1.44550288 | -0.41709713 |
| FZD6 | 1.156898099 | 0.703866253 | -1.39671741 | -0.46404694 |
| RUNX1 | 1.34830992 | 0.474703147 | -1.29558267 | -0.52743039 |
| ELMO1 | 1.045394847 | 0.772946974 | -1.48211031 | -0.33623152 |
| TMEM163 | 1.447204212 | 0.368095023 | -1.15508685 | -0.66021239 |
| SPRED1 | 0.316037626 | 1.479245294 | -0.67355086 | -1.12173206 |
| PURA | 0.559594139 | 1.235114653 | -0.37254187 | -1.42216692 |
| SPRY4 | 1.496913016 | 0.293910016 | -0.70920631 | -1.08161672 |
| CMTM6 | 1.44587472 | 0.34237932 | -1.20500999 | -0.58324405 |
| ZBTB20 | 1.175749257 | 0.599404997 | -1.47184634 | -0.30330792 |
| AKAP1 | 0.268512591 | 1.502859469 | -1.10977856 | -0.6615935 |
| PTCH1 | 1.480121654 | 0.219832553 | -1.24746382 | -0.45249038 |
| ANKRD28 | 0.252777962 | 1.445609037 | -0.3997168 | -1.2986702 |
| HMGNS | 0.293850769 | 1.389849125 | -0.31055508 | -1.37314481 |
| WIPF1 | 1.251465807 | 0.429709726 | -1.48711978 | -0.19405575 |
| PPP2R3A | 0.253338693 | 1.427711392 | -0.3483386 | -1.33271149 |
| Prf1 | 1.450652674 | 0.195478548 | -1.3243245 | -0.32180672 |
| OPN3 | 0.148401627 | 1.426873165 | -0.19549527 | -1.37977952 |
| LCOR | 0.115537556 | 1.410049502 | -1.40882121 | -0.11676585 |

图17