



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104080472 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 01

(21) 申请号 201280068303. 6

代理人 高瑜 郑霞

(22) 申请日 2012. 12. 07

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

*A61K 38/19* (2006. 01)

12177329. 5 2012. 07. 20 EP

*A61P 35/00* (2006. 01)

61/567, 899 2011. 12. 07 US

61/673, 912 2012. 07. 20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 07. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/068628 2012. 12. 07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/086459 EN 2013. 06. 13

(71) 申请人 阿拉食品公司

地址 丹麦维比

申请人 福塞斯儿童口腔医院(以福塞斯研究所名义营业)

(72) 发明人 苏珊·R·里特林

彼得·朗堡·魏谢 安雅·塞丽娜

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

权利要求书2页 说明书21页

序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

用于在抑制或预防肿瘤生长中使用的骨桥蛋白变体和包含这类骨桥蛋白变体的组合物

(57) 摘要

本发明涉及包括骨桥蛋白变体的药用组合物和营养补充剂,以及这类组合物和补充剂用于治疗或预防肿瘤生成型癌症的医学用途。

1. 用于在治疗或预防涉及至少一种癌肿瘤的癌症中使用的一种 OPN 变体，其中所述 OPN 变体包括相对于 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 2 具有至少 80% 的序列一致性的活性 OPN 分子、和 / 或 OPN 分子活性片段，所述片段相对于 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位的序列或相对于 SEQ ID NO. 2 的 17-170 位的序列具有至少 80% 的序列一致性。
2. 根据权利要求 1 所述的 OPN 变体，其中该癌肿瘤具有升高水平的 OPN。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的 OPN 变体，其中该治疗或预防是通过口服给药。
4. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，其中该治疗或预防是通过肠胃外给药，例如像通过静脉内或腹膜内给药。
5. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，用于抑制肿瘤细胞生长或复制。
6. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，用于抑制肿瘤生长。
7. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，用于预防肿瘤细胞生长或复制。
8. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，用于预防肿瘤生长。
9. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，用于减少患有涉及至少一种癌肿瘤的癌症的受试者的体内转移风险。
10. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，用于预防患有涉及至少一种癌肿瘤的癌症的受试者的体内转移。
11. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，其中待治疗的受试者患有涉及至少一种癌肿瘤的癌症，该癌肿瘤具有升高水平的 OPN。
12. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，其中具有癌肿瘤的受试者在其血浆中具有升高浓度的 OPN。
13. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，其中给予该 OPN 变体的受试者对发展涉及至少一种癌肿瘤的癌症具有增加的风险。
14. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，其中该 OPN 变体是以治疗的受试者的大约 0.05mg/kg 体重至大约 5g/kg 体重范围中的每日剂量给药。
15. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 10% (w/w) 的 OPN 分子活性片段总量。
16. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，包括相对于该 OPN 变体的总重量的 10% -90% (w/w) 范围中的活性 OPN 分子总量，以及相对于该 OPN 变体的总重量的 10% -90% (w/w) 范围中的 OPN 分子活性片段总量。
17. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，包括相对于该 OPN 变体的总重量的 10% -40% (w/w) 范围中的活性 OPN 分子总量，以及相对于该 OPN 变体的总重量的 60% -90% (w/w) 范围中的 OPN 分子活性片段总量。
18. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 10% (w/w) 的活性 OPN 分子总量。
19. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，其中该 OPN 变体是从牛乳中分离。
20. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，其中所述 OPN 变体是相对于 SEQ ID NO. 1 具有至少 80% 序列一致性的活性 OPN 分子、和 / 或相对于 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位的序列具有至少 80% 序列一致性的 OPN 分子活性片段。
21. 根据以上权利要求中任一项所述的 OPN 变体，其中所述 OPN 变体是相对于 SEQ ID

NO. 2 具有至少 80% 序列一致性的活性 OPN 分子、和 / 或相对于 SEQ ID NO. 2 的 17-170 位的序列具有至少 80% 序列一致性的 OPN 分子活性片段。

22. 一种治疗或预防癌症的方法, 该方法包括: 向患有癌症的受试者、或向处于患癌症风险的受试者给予对治疗或预防所述癌症有效的量的一种 OPN 变体, 并且其中所述癌症涉及至少一种癌肿瘤,

所述 OPN 变体包括相对于 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 2 具有至少 80% 序列一致性的活性 OPN 分子、和 / 或 OPN 分子活性片段, 所述片段相对于 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位的序列或相对于 SEQ ID NO. 2 的 17-170 位的序列具有至少 80% 序列一致性。

23. 根据权利要求 22 所述的治疗或预防癌症的方法, 该方法包括: 向患有该癌症的受试者、或向处于患该癌症风险的受试者给予对抑制肿瘤细胞生长或复制有效的量的一种 OPN 变体, 其中所述 OPN 变体包括相对于 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 2 具有至少 80% 序列一致性的活性 OPN 分子、和 / 或 OPN 分子活性片段, 所述片段相对于 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位的序列或相对于 SEQ ID NO. 2 的 17-170 位的序列具有至少 80% 序列一致性。

23. 一种减少患有涉及至少一种癌肿瘤的癌症的受试者的体内转移风险或预防转移的方法, 该方法包括: 向该受试者给予对减少转移风险或预防转移有效的量的一种 OPN 变体,

其中所述 OPN 变体包括相对于 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 2 具有至少 80% 序列一致性的活性 OPN 分子、和 / 或 OPN 分子活性片段, 所述片段相对于 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位的序列或相对于 SEQ ID NO. 2 的 17-170 位的序列具有至少 80% 序列一致性。

24. 一种药用组合物, 包括:

- 一种 OPN 变体, 该变体包括相对于 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 2 具有至少 80% 序列一致性的活性 OPN 分子、和 / 或 OPN 分子活性片段, 所述片段相对于 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位的序列或相对于 SEQ ID NO. 2 的 17-170 位的序列具有至少 80% 序列一致性, 以及

- 一种药学上可接受的载体。

25. 根据权利要求 24 所述的药用组合物, 包括 0.01% -90% (w/w) 范围中的量的 OPN 变体。

26. 根据权利要求 24 或 25 所述的药用组合物, 进一步包括一种或多种另外的治疗剂。

27. 根据权利要求 26 所述的药用组合物, 其中该一种或多种另外的治疗剂包括抗癌剂。

28. 根据权利要求 24-27 中任一项所述的药用组合物, 其中该药用组合物被配制用于口服给药、舌下给药、颊给药、鼻给药、或静脉给药。

29. 一种营养补充剂, 包括

- 营养有效量的一种 OPN 变体, 该 OPN 变体包括相对于 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 2 具有至少 80% 序列一致性的活性 OPN 分子、和 / 或 OPN 分子活性片段, 所述片段相对于 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位的序列或相对于 SEQ ID NO. 2 的 17-170 位的序列具有至少 80% 序列一致性, 以及

- 一种或多种选自下组的组分, 该组由碳水化合物来源、脂质来源、以及蛋白质来源组成。

## 用于在抑制或预防肿瘤生长中使用的骨桥蛋白变体和包含 这类骨桥蛋白变体的组合物

### 发明领域

[0001] 本发明涉及包括骨桥蛋白变体的药用组合物和营养补充剂,以及这类 OPN 变体用于治疗或预防肿瘤生成型癌症的医学用途。

### [0002] 发明背景

[0003] 骨桥蛋白 (OPN) 是最初分离自矿化骨的胶原细胞外基质的一种分泌的黏着糖蛋白 (弗兰岑 (Franzen) 1985)。OPN 由多种不同的细胞类型表达,这些细胞类型包括成骨细胞、动脉平滑肌细胞、白细胞、几种类型的上皮细胞、以及不同谱系的转化细胞 (丹哈特 (Denhardt) 1995)。因此,已经在许多组织中检测到 OPN,这些组织包括肾、胎盘、内耳的分泌上皮细胞和神经节、以及血管系统的平滑肌 (巴特勒 (Butler) 1996)。OPN 还存在于许多体液例如血浆、尿、胆汁和乳中,并且它在许多转化细胞中显示升高表达 (森杰 (Senger) 1988)。这种蛋白质是高度酸性的,有大概 25% 的氨基酸是天冬氨酸盐 / 天冬氨酸以及谷氨酸盐 / 谷氨酸,并且 OPN 具有相当大数量的磷酸化氨基酸 (索伦森 (Sorensen) 1994)。

### [0004] 发明概述

[0005] 诸位发明人已经出人意料地发现口服给予的骨桥蛋白变体抑制并且可能甚至预防癌肿瘤的生长。这种效果是完全没有预期到的。首先,从来没有记录过给予 OPN 具有与治疗癌症相关的有益效果,并且其次,非常出人意料的是口服给予的蛋白质和肽在肠胃系统外具有医学效果。

[0006] 因此,本发明的一个方面涉及用于在治疗或预防涉及至少一种癌肿瘤的癌症中使用的一种 OPN 变体。

[0007] 例如本发明的一个方面涉及用于在治疗或预防涉及至少一种癌肿瘤的癌症中使用的一种 OPN 变体,其中所述 OPN 变体包括相对于 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 2 具有至少 80% 序列一致性的活性 OPN 分子、和 / 或 OPN 分子活性片段,所述片段相对于 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位的序列或相对于 SEQ ID NO. 2 的 17-170 位的序列具有至少 80% 序列一致性。

[0008] 在本发明的背景中,术语“涉及一种癌肿瘤的癌症”涉及癌症疾病,其中至少一种癌肿瘤在患者体内或体外形成。该至少一种癌肿瘤可以是该癌症的原发性癌肿瘤或后续转移。

[0009] 本发明的一个另外的方面涉及一种治疗或预防癌症的方法,该方法包括:向患有癌症的受试者、或向处于患癌症风险的受试者给予对治疗或预防所述癌症有效的量的一种 OPN 变体,并且其中所述癌症涉及至少一种癌肿瘤。

[0010] 本发明的另一个方面涉及一种药用组合物,该药用组合物包括:

[0011] - 一种 OPN 变体,以及

[0012] - 一种药学上可接受的载体。

[0013] 本发明的一个另外的方面涉及一种营养补充剂,该营养补充剂包括

[0014] - 营养有效量的一种 OPN 变体,以及

[0015] 一种或多种选自下组的组分,该组由碳水化合物来源、脂质来源、以及蛋白质来源组成。

[0016] 此处提供的一些方面涉及方法,该方法包括向具有肿瘤细胞团的受试者给予对于抑制肿瘤细胞生长或复制有效的量的 OPN 变体。

[0017] 在某些实施例中,该 OPN 变体是以大约 0.05mg/ml 至大约 1g/ml 的浓度给予的。在其他实施例中,该 OPN 变体是以大约 0.05mg/kg 体重至大约 5g/kg 的一个量给予。

[0018] 在具体实施例中,该 OPN 变体是黏膜给予的。在其他实施例中,该 OPN 变体是口服、舌下、经颊、或经鼻给予的。

[0019] 在一些实施例中,该肿瘤细胞可以是一种皮下肿瘤细胞,并且在前述实施例中任一项中,该肿瘤细胞可存在于胸部、宫颈、卵巢、前列腺、肺、结肠、直肠、胰、胃、肾、或甲状腺中。

[0020] 在某些实施例中,该 OPN 变体分离自牛乳。该 OPN 变体可以是例如牛乳 OPN。

[0021] 在具体实施例中,该 OPN 变体是重组 OPN。

[0022] 在一些实施例中,该 OPN 变体是以经过纯化的 OPN 变体来源提供。在某些实施例中,提供该 OPN 变体的经过纯化的来源是至少大约 95% 纯的。

[0023] 此处提供的其他方面针对包括该 OPN 变体的药用组合物,优选地处于对于抑制肿瘤细胞生长或复制有效的量的 OPN 变体,以及一种药学上可接受的载体。

[0024] 在某些实施例中,该 OPN 变体在该药用组合物中的量是大约 0.05mg/ml 至大约 1g/ml。

[0025] 在具体实施例中,该药用组合物被配制用于黏膜给药。该药用组合物可以例如被配制用于口服给药、舌下给药、颊给药、或鼻给药。

[0026] 在一些实施例中,该药学上可接受的载体选自下组,该组由以下各项组成:乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇、糖溶液、山梨糖醇、缓冲剂、盐水、以及水。

[0027] 在某些实施例中,该药用组合物是固体、液体、或乳液。

[0028] 在具体实施例中,该药用组合物是作为片剂或喷雾给予的。

[0029] 在前述实施例中任一项中,该药用组合物可包括一种掩味剂。

[0030] 在前述实施例中任一项中,该药用组合物可包括一种或多种抗癌靶向治疗剂或化疗剂。

[0031] 在前述实施例中任一项中,该药用组合物可包括一种或多种免疫抑制剂或免疫刺激剂。

[0032] 此处提供的其他方面针对包括该 OPN 变体的营养补充剂,优选地处于对于抑制肿瘤细胞生长或复制有效的量的 OPN 变体。

[0033] 在一些实施例中,该补充剂是液体或粉剂。

[0034] 在某些实施例中,该补充剂包括一种或多种水果、一种或多种蔬菜、酸牛乳、乳、冰淇淋、或其组合。

[0035] 在前述实施例中任一项中,该补充剂可被以下各项增强:蛋白质、维生素、矿物质、抗氧化剂、益生元 (prebiotics)、益生菌、或其组合。

[0036] 在前述实施例中任一项中,该补充剂可以不含乳糖和 / 或不含谷蛋白。

[0037] 在某些实施例中,该补充剂是有机的。

[0038] 在一些实施例中,该补充剂是思慕雪(smoothie)或汁,而在其他实施例中,该补充剂是乳。

[0039] 将结合以下的附图和详细说明描述本发明的这些以及其他方面。

[0040] 附图简要说明

[0041] 图 1A 显示小鼠中的肿瘤体积( $\text{cm}^3$ , +/-SEM),这些小鼠从第 0 天开始接受了不同浓度的 OPN 制剂的口服剂量。

[0042] 图 1B 显示小鼠中的肿瘤体积( $\text{cm}^3$ , +/-SEM),这些小鼠从第 5 天开始接受了不同浓度的 OPN 制剂的口服剂量。

[0043] 图 2A-C 显示了在第 15、17、以及 19 天所有组中的肿瘤尺寸的比较;表明了显著差异。

[0044] 图 3 显示了对照和喂养 OPN 小鼠(饮用水中 0.3mg/ml)的平均肿瘤尺寸,三个独立试验的合并的结果。N = 30(0mg/ml OPN 制剂)或 32(0.3mg/ml OPN 制剂)。

[0045] 本发明的详细说明

[0046] 如所述的,本发明的一个方面涉及用于在治疗或预防涉及至少一种癌肿瘤的癌症中使用的一种 OPN 变体。

[0047] 在本发明的一些优选实施例中,该 OPN 变体包括或甚至由以下各项组成:相对于 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 2 具有至少 80%序列一致性的活性 OPN 分子、和/或 OPN 分子活性片段,所述片段相对于 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位的序列或相对于 SEQ ID NO. 2 的 17-170 位的序列具有至少 80%序列一致性。

[0048] 在本发明的背景中,术语“骨桥蛋白变体”或“OPN 变体”涉及天然 OPN(例如可以在哺乳动物乳汁中发现)以及人工 OPN(相对于天然 OPN 的序列包含少量氨基酸序列变异)。该 OPN 变体可以例如通过从 OPN 的天然来源例如哺乳动物乳汁,优选地牛乳纯化而制备,或它可以通过发酵或合成制备。术语“骨桥蛋白变体”或“OPN 变体”涉及一种组合物(例如一种药用或营养补充剂)的组分,它们是 OPN 分子和例如通过水解或截断 OPN 分子而衍生自 OPN 分子的肽。

[0049] 在本发明的背景中,术语“骨桥蛋白分子”或“OPN 分子”涉及具有给定氨基酸序列的一种 OPN 分子的群体。这样一个群体可包含该 OPN 分子的几种磷-亚型和糖-亚型。

[0050] 另外,该 OPN 变体可包含一种第二活性 OPN 分子,以及甚至进一步的活性 OPN 分子。

[0051] 如将被理解的,该 OPN 变体是一种药学上有活性的 OPN 变体并包含一种或多种药学上有活性的 OPN 分子和/或 OPN 分子的一种或多种药学上有活性的片段。在本发明的背景中,OPN 变体、活性 OPN 分子、或 OPN 分子的片段,如果能够降低癌肿瘤在哺乳动物受试者中的生长,就被视为“药学上有活性的”或“有活性的”。OPN 变体、或个体 OPN 分子或 OPN 分子的片段的药学活性可以例如使用实例 1 中概述的程序进行测试。

[0052] 在本发明的一些优选实施例中,该 OPN 分子是相对于 SEQ ID NO. 1(牛 OPN; UniProtKB/Swiss-Prot 条目 P31096)具有至少 80%序列一致性的一种肽。例如该活性 OPN 分子可以是相对于 SEQ ID NO. 1 具有至少 90%序列一致性的一种肽。优选地,该活性 OPN 分子是相对于 SEQ ID NO. 1 具有至少 95%序列一致性的一种肽。甚至更优选地,该活性 OPN 分子可以是例如相对于 SEQ ID NO. 1 具有至少 98%序列一致性的一种肽。该活性 OPN 分子

可以例如具有 SEQ ID NO. 1 的氨基酸序列。

[0053] 在本发明的背景中,术语“序列一致性”涉及在两个氨基酸序列之间或在两个核酸序列之间(优选地是等长的)进行的一致性程度的定量测量。如果待比较的两个序列不是等长的,必须将它们对齐以最佳地拟合。序列一致性可以被计算为

$$[0054] \quad (N_{\text{ref}} - N_{\text{dif}}) * 100 / (N_{\text{ref}}),$$

[0055] 其中  $N_{\text{dif}}$  是对齐时这两个序列中不一致的残基的总数,并且其中  $N_{\text{ref}}$  是参考序列的残基的数目。因此,DNA 序列 AGTCAGTC 与序列 AATCAATC ( $N_{\text{dif}} = 2$  并且  $N_{\text{ref}} = 8$ ) 将具有 75% 的序列一致性。空位算作特定一个(多个)残基的不一致,即 DNA 序列 AGTGTC 与 DNA 序列 AGTCAGTC ( $N_{\text{dif}} = 2$  并且  $N_{\text{ref}} = 8$ ) 将具有 75% 的序列一致性。可以例如使用合适的 BLAST- 程序,例如由国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)(NCBI),USA 提供的 BLASTp- 算法计算序列一致性。

[0056] 在本发明的一些优选实施例中,该活性 OPN 分子是相对于 SEQ ID NO. 2(人类 OPN; UniProtKB/Swiss-Prot 条目 P10451) 具有至少 80% 序列一致性的一种肽。例如该活性 OPN 分子可以是相对于 SEQ ID NO. 2 具有至少 90% 序列一致性的一种肽。优选地,该活性 OPN 分子是相对于 SEQ ID NO. 2 具有至少 95% 序列一致性的一种肽。甚至更优选地,该活性 OPN 分子可以是相对于 SEQ ID NO. 2 具有至少 98% 序列一致性的一种肽。

[0057] 在本发明的其他优选实施例中,该活性 OPN 分子是人类 OPN(SEQ ID NO. 2)。

[0058] 可替代地,或另外地,该 OPN 变体可包含 OPN 分子活性片段。

[0059] 在本发明的背景中,术语“骨桥蛋白分子的活性片段”或“OPN 分子活性片段”涉及 OPN 分子的活性片段的群体,所述片段具有给定氨基酸序列。这样一个群体也可包含该 OPN 分子活性片段的几种磷-亚型和糖-亚型。该“OPN 分子活性片段”优选地是天然 OPN 分子长 n- 端片段(例如可以在哺乳动物乳汁中发现)以及人工 OPN 分子长 n- 端片段(相对于天然 OPN 分子长 n- 端片段的序列包含少量氨基酸序列变异)。OPN 分子活性片段可以例如通过从 OPN 片段的天然来源例如哺乳动物乳汁,优选地牛乳纯化而制备,或它可以通过发酵或合成制备。

[0060] 因此,在本发明的一些优选实施例中,该 OPN 变体包含活性 OPN 分子的一个第一群体和 OPN 分子活性片段的一个第二群体。另外,这些群体可包含该活性 OPN 分子和该 OPN 分子活性片段的几种磷-亚型和糖-亚型。

[0061] 在本发明的一些优选实施例中,该 OPN 分子活性片段是相对于 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位(牛 OPN 的 17-163 位;UniProtKB/Swiss-Prot 条目 P31096) 的序列具有至少 80% 序列一致性的一种肽。例如该 OPN 分子活性片段可以是相对于 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位的序列具有至少 90% 序列一致性的一种肽。优选地,该 OPN 分子活性片段是相对于 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位的序列具有至少 95% 序列一致性的一种肽。甚至更优选地,该 OPN 分子活性片段可以是相对于 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位的序列具有至少 98% 序列一致性的一种肽。

[0062] 在本发明的一些优选实施例中,该 OPN 分子活性片段是相对于 SEQ ID NO. 2 的 17-170 位(人类的 17-170 位;UniProtKB/Swiss-Prot 条目 P10451) 的序列具有至少 80% 序列一致性的一种肽。例如该 OPN 分子活性片段可以是相对于 SEQ ID NO. 2 的 17-170 位的序列具有至少 90% 序列一致性的一种肽。优选地,该 OPN 分子活性片段是相对于 SEQ ID

NO. 2 的 17-170 位的序列具有至少 95% 序列一致性的一种肽。甚至更优选地, 该 OPN 分子活性片段可以是相对于 SEQ ID NO. 2 的 17-170 位的序列具有至少 98% 序列一致性的一种肽。

[0063] 在本发明的一些优选实施例中, 该 OPN 变体是天然 OPN, 即天然存在于哺乳动物, 例如于哺乳动物乳汁中的一种 OPN 变体。

[0064] 在本发明的一些实施例中, 该 OPN 变体包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 10% (w/w) 的 OPN 分子活性片段总量。该 OPN 变体可以例如包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 15% (w/w) 的 OPN 分子活性片段总量。可替代地, 该 OPN 变体可以包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 30% (w/w) 的 OPN 分子活性片段总量。该 OPN 变体可以例如包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 50% (w/w) 的 OPN 分子活性片段总量。

[0065] 甚至更高含量的活性片段可以是所希望的, 因此, 在本发明的一些实施例中, 该 OPN 变体包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 60% (w/w) 的 OPN 分子活性片段总量。该 OPN 变体可以例如包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 70% (w/w) 的 OPN 分子活性片段总量。可替代地, 该 OPN 变体可以包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 80% (w/w) 的 OPN 分子活性片段总量。该 OPN 变体可以例如包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 90% (w/w) 的 OPN 分子活性片段总量。例如, 该 OPN 变体可以包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 95% (w/w) 的 OPN 分子活性片段总量。

[0066] 在本发明的一些实施例中, 该 OPN 变体包括相对于该 OPN 变体的总重量的 10% -90% (w/w) 范围中的活性 OPN 分子总量, 以及相对于该 OPN 变体的总重量的 10% -90% (w/w) 范围中的 OPN 分子活性片段总量。

[0067] 在本发明的一些实施例中, 该 OPN 变体包括相对于该 OPN 变体的总重量的 10% -40% (w/w) 范围中的总活性 OPN 分子总量, 以及相对于该 OPN 变体的总重量的 60% -90% (w/w) 范围中的 OPN 分子活性片段总量。

[0068] 例如, 该 OPN 变体可包括相对于该 OPN 变体的总重量的 15% -35% (w/w) 范围中的活性 OPN 分子总量, 以及相对于该 OPN 变体的总重量的 75% -85% (w/w) 范围中的 OPN 分子活性片段总量。

[0069] 在本发明的一些实施例中, 该 OPN 变体包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 10% (w/w) 的活性 OPN 分子总量。

[0070] 该 OPN 变体可以例如包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 15% (w/w) 的活性 OPN 分子总量。可替代地, 该 OPN 变体可以包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 30% (w/w) 的活性 OPN 分子总量。该 OPN 变体可以例如包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 50% (w/w) 的活性 OPN 分子总量。

[0071] 甚至更高含量的活性片段可以是所希望的, 因此, 在本发明的一些实施例中, 该 OPN 变体包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 60% (w/w) 的活性 OPN 分子总量。该 OPN 变体可以例如包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 70% (w/w) 的活性 OPN 分子总量。可替代地, 该 OPN 变体可以包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 80% (w/w) 的活性 OPN 分子总量。该 OPN 变体可以例如包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 90% (w/w) 的活性 OPN 分子总量。例如, 该 OPN 变体可以包括相对于该 OPN 变体的总重量的至少 95% (w/w) 的活性 OPN 分子总量。

[0072] 在本发明的一些实施例中,该 OPN 变体分离自牛乳。

[0073] 在本发明的一些优选实施例中,该 OPN 变体是牛 OPN。牛 OPN 可以例如分离自牛乳,在这种情况下,它一般是磷酸化的和糖基化的。使用来自牛乳的以去磷酸化和 / 或去糖基化形式的 OPN 也是可能的。

[0074] 牛乳 OPN 包含牛全长 OPN (SEQ ID NO. 1) 以及截断的 OPN 亚型 (具有 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位序列的一种肽)。

[0075] 因此,在本发明的一些优选实施例中,该 OPN 变体包括或甚至由以下各项组成:相对于 SEQ ID NO. 1 具有至少 80% 序列一致性的活性 OPN 分子、和 OPN 分子活性片段,所述片段相对于 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位的序列具有至少 80% 序列一致性。

[0076] 例如,该 OPN 变体可包括或甚至由以下各项组成:相对于 SEQ ID NO. 1 具有至少 90% 序列一致性的活性 OPN 分子、和 OPN 分子活性片段,所述片段相对于 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位的序列具有至少 90% 序列一致性。可替代地,该 OPN 变体可包括或甚至由以下各项组成:相对于 SEQ ID NO. 1 具有至少 95% 序列一致性的活性 OPN 分子、和 OPN 分子活性片段,所述片段相对于 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位的序列具有至少 95% 序列一致性。例如,OPN 变体可包括或甚至由以下各项组成:具有 SEQ ID NO. 1 的序列的活性 OPN 分子、和具有 SEQ ID NO. 1 的 17-163 位序列的 OPN 分子活性片段。

[0077] 在本发明的一些实施例中,该 OPN 变体可包括或甚至由以下各项组成:相对于 SEQ ID NO. 2 具有至少 80% 序列一致性的活性 OPN 分子、和 / 或相对于 SEQ ID NO. 2 的 17-170 位的序列具有至少 80% 序列一致性的 OPN 分子活性片段。

[0078] 例如,该 OPN 变体可包括或甚至由以下各项组成:相对于 SEQ ID NO. 2 具有至少 90% 序列一致性的活性 OPN 分子、和 OPN 分子活性片段,所述片段相对于 SEQ ID NO. 2 的 17-170 位的序列具有至少 90% 序列一致性。可替代地,该 OPN 变体可包括或甚至由以下各项组成:相对于 SEQ ID NO. 2 具有至少 95% 序列一致性的活性 OPN 分子、和 OPN 分子活性片段,所述片段相对于 SEQ ID NO. 2 的 17-170 位的序列具有至少 95% 序列一致性。例如,OPN 变体可包括或甚至由以下各项组成:具有 SEQ ID NO. 2 的序列的活性 OPN 分子、和具有 SEQ ID NO. 2 的 17-170 位序列的 OPN 分子活性片段。

[0079] 一种癌肿瘤包括几种肿瘤细胞 (赘生性细胞),这些细胞特征是不正常的细胞生长或复制。在一些例子中,不正常的细胞生长 (例如局部区域的细胞) 导致肿瘤细胞团 (赘生物,实质性病变) 的形成。不正常的细胞生长是相对于不形成肿瘤细胞团的细胞生长。不正常的细胞可表现出与正常细胞相比不正常的 (例如增加的) 分裂速率。在一些实施例中,肿瘤细胞是恶化前的或恶性的。恶性肿瘤细胞可被称作癌症细胞,并且具有转移或传播到相邻组织或体内其他位置、并在那里生长为新的肿瘤的能力。

[0080] 特别优选地是,至少一种癌肿瘤具有升高水平的 OPN。

[0081] 因此,在本发明的一些优选实施例中,该 OPN 变体用于在治疗或预防涉及至少一种癌肿瘤的癌症中使用,该癌肿瘤具有升高水平的 OPN。

[0082] 在本发明另外的优选实施例中,该肿瘤能够在具有该肿瘤的受试者的血浆中诱导升高水平的 OPN。

[0083] 在某些实施例中,该肿瘤细胞是上皮起源。上皮细胞以一层或多层存在,它们覆盖身体的整个表面,并且衬里于身体的除了血管、淋巴管、和心脏内部构造 (它们由内皮衬

里),以及胸腔和腹腔(它们由间皮衬里)之外的大部分空心结构。

[0084] 上皮肿瘤包括良性和恶化前的上皮肿瘤,例如乳腺纤维腺瘤以及结肠腺瘤,以及恶性的上皮肿瘤。恶性的上皮肿瘤包括原发性肿瘤(也被称作癌(carcinoma))以及继发性肿瘤(也被称作上皮起源的转移)。癌包括腺泡癌、腺泡状癌(acinous carcinoma)、肺泡腺癌(也叫腺样癌、腺肌上皮瘤、筛状癌和圆柱瘤)、腺癌(carcinoma adenomatousum)、腺癌(adenocarcinoma)、肾上腺皮质癌、肺泡癌、肺泡细胞癌(也称为细支气管癌、腺泡细胞肿瘤和肺腺瘤)、基底细胞癌(basal cell carcinoma)、基底细胞癌(carcinoma basocellulare)(也称为基底细胞上皮癌、基底样细胞瘤、以及毛母质癌)、基底细胞样癌、基底鳞状细胞癌、乳腺癌、细支气管肺泡癌、细支气管癌、支气管癌、脑样癌(cerebriform carcinoma)、胆管细胞癌(也称为胆管瘤和胆管癌)、绒毛膜癌、胶质性癌(colloid carcinoma)、粉刺癌、子宫体癌、筛状癌、铠甲状癌(carcinoma en cuirasse)、皮肤癌(carcinoma cutaneum)、圆柱癌、圆柱细胞癌、导管癌、硬癌(carcinoma durum)、胚胎性癌、髓样癌(encephaloid carcinoma)、眼球上癌、表皮样癌、腺样上皮细胞癌、溃疡原癌(carcinoma exulcere)、纤维癌(carcinoma fibrosum)、胶样癌(gelatiniform carcinoma)、胶状癌(gelatinous carcinoma)、巨大细胞癌(giant cell carcinoma)、巨细胞癌、腺状癌(glandular carcinoma)、颗粒细胞癌、毛母质癌、血样癌、肝细胞癌(也称为肝细胞瘤、恶性肝肿瘤和肝癌)、许特尔细胞癌(Hurthle cell carcinoma)、透明癌(hyaline carcinoma)、肾细胞癌、幼稚型胚胎性癌、原位癌、表皮内癌、上皮内癌、克龙派切尔癌(Krompecher's carcinoma)、库切兹凯细胞癌(Kulchitzky-cell carcinoma)、豆状癌(lenticular carcinoma)、豆状癌(carcinoma lenticulare)、脂肪瘤癌、淋巴上皮癌、乳腺炎性癌、髓样癌(carcinoma medullare)、髓样癌(medullary carcinoma)、黑色素癌(carcinoma melanodes)、黑色素鳞癌(melanotic carcinoma)、粘液癌(mucinous carcinoma)、粘液癌(carcinoma muciparum)、粘液细胞癌(carcinoma mucocellulare)、粘液表皮样癌、粘液癌(carcinoma mucosum)、黏液腺癌(mucous carcinoma)、粘液瘤样癌(carcinoma myxomatodes)、鼻咽癌、黑色素癌(carcinoma nigrum)、燕麦细胞癌、骨化性癌、类骨质癌、卵巢癌、乳头状癌、门静脉周癌、浸润前期癌(preinvasive carcinoma)、前列腺癌、肾的肾细胞癌(又称肾的腺癌和hypernephroid carcinoma)、储备细胞癌、肉瘤样癌(carcinoma sarcomatodes)、scheindlerian carcinoma、硬癌(scirrhus carcinoma)、阴囊癌(carcinoma scroti)、印戒细胞癌、单纯癌、小细胞癌、马铃薯状癌(solanoid carcinoma)、球形细胞癌、梭形细胞癌、海绵样癌(carcinoma spongiosum)、鳞状癌、鳞状细胞癌、绳捆癌(string carcinoma)、血管扩张性癌(carcinoma telangiectaticum)、毛细管扩张性癌(carcinoma telangiectodes)、移行细胞癌、结节性皮癌(carcinoma tuberosum)、结节性皮癌(tuberous carcinoma)、疣状癌和绒毛癌(carcinoma vilosum)。

[0085] 在本发明的一些优选实施例中,该癌肿瘤是纤维肉瘤。

[0086] 在其他实施例中,该肿瘤细胞是间充质起源的,例如形成肉瘤的肿瘤细胞。肉瘤是稀见的发生于骨和软组织的间充质赘生物。不同类型的肉瘤包括脂肪肉瘤(包括黏液状脂肪肉瘤和多形脂肪肉瘤)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、恶性末梢神经鞘肿瘤(也称作恶性神经鞘瘤、神经纤维肉瘤、或神经源性肉瘤)、尤因肿瘤(Ewing's tumor)(包括骨的尤因肉瘤、骨外[非骨]尤因肉瘤、以及原始神经外胚层肿瘤[PNET])、滑膜肉瘤、血管肉

瘤 (angiosarcomas)、血管肉瘤 (hemangiosarcomas)、淋巴管肉瘤、卡波西肉瘤 (Kaposi's sarcoma)、血管内皮瘤、纤维肉瘤、硬纤维肿瘤 (也称作侵袭性纤维瘤)、隆凸性皮肤纤维肉瘤 (DFSP)、恶性纤维组织细胞瘤 (MFH)、血管外皮细胞瘤、恶性间叶瘤、软组织腺泡状肉瘤、上皮样肉瘤、透明细胞肉瘤、促结缔组织增生性小细胞瘤、胃肠道间质瘤 (GIST) (也称作 GI 间质肉瘤)、骨肉瘤 (也称作骨原发性肉瘤) - 骨骼和骨外的、以及软骨肉瘤。

[0087] 在本发明的一些优选实施例中,该癌肿瘤是腺癌或乳腺癌。

[0088] 在一些实施例中,这些肿瘤细胞是黑素细胞起源的。黑色素瘤是从皮肤和其他器官的黑素细胞系统发生的肿瘤。黑色素瘤的实例包括恶性雀斑样痣黑色素瘤、浅表扩散性黑色素瘤、结节性黑色素瘤、以及肢端雀斑样黑色素瘤。

[0089] 在仍其他实施例中,这些肿瘤细胞包括在以下各项中发现的肿瘤细胞:胆道癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、上皮内赘生物 (包括博文氏病 (Bowen's disease) 和佩吉特氏病 (Paget's disease))、肝癌、口腔癌 (包括鳞状细胞癌)、肉瘤 (包括纤维肉瘤和骨肉瘤)、皮肤癌 (包括黑色素瘤)、卡波西肉瘤、睾丸癌 (包括胚组织肿瘤 (精原细胞瘤、非-精原细胞瘤 (畸胎瘤、绒毛膜癌))、间质肿瘤和生殖细胞肿瘤、甲状腺癌 (包括甲状腺腺癌和髓质瘤)、以及肾癌 (包括腺癌和维尔姆斯肿瘤 (Wilms' tumor))。

[0090] 在具体实施例中,这些肿瘤细胞可起源于骨、肌肉或结缔组织。这些肿瘤细胞可在骨和结缔组织的原发性肿瘤 (例如肉瘤) 中发现。

[0091] 在其他实施例中,这些肿瘤细胞可以是转移性的。在一些实施例中,这些转移性肿瘤是上皮起源的。癌可转移至骨 (如乳腺癌中观察到的) 和肝 (如有时在结肠癌情况下)。此处提供的方法针对抑制转移性肿瘤的生长或复制而不考虑转移位点和 / 或原发性肿瘤位点。

[0092] 该 OPN 变体可以例如包括 OPN 分子。在本发明的一些优选实施例中,该 OPN 变体可以包含 OPN 分子或甚至由其组成。

[0093] 该 OPN 变体、或个体活性 OPN 分子或 OPN 分子活性片段可分离自这类化合物的天然来源。可替代地,该 OPN 变体可通过发酵或通过化学合成制备。

[0094] 在某些实施例中,该 OPN 变体分离自乳,并且在具体实施例中该乳是牛乳。在其他实施例中,该 OPN 变体分离自其他家养的产乳哺乳动物,包括山羊、绵羊、水牛、美洲驼和骆驼。关于从乳中分离 OPN 变体的方法参见例如美国专利号 7,259,243,通过引用将其全部披露结合在此。

[0095] 在一些实施例中,将 OPN 变体的来源针对该 OPN 变体进行纯化。在一些实施例中,OPN 变体的来源是至少大约 50% 至大约 60%、至少大约 60% 至大约 70%、或至少大约 70% 至大约 80% 纯的。在一些实施例中,它是至少大约 80% 至大约 90% 纯的,而在其他实施例中,OPN 变体的来源是至少大约 90% 至大约 95% 纯的,或更多。在某些实施例中,OPN 变体的纯化来源是至少大约 95% 纯的,例如 95%、96%、97%、98%、99%、或 99.5% 纯的,或更多。

[0096] 在特定实施例中,该 OPN 变体的纯化来源是纯化的牛 OPN 制品,例如像 Lacprodan OPN-10® (阿尔拉食品配料 (Arla Foods Ingredients), 维比 (Viby), 丹麦) (也参见美国专利号 7,259,243)。Lacprodan OPN-10® 包括大概 22% (w/w) 的全长牛乳 OPN 以及大概 65% (w/w) 的牛乳 OPN 亚型 (全长 OPN 的截断版)。

[0097] 在其他实施例中,该 OPN 变体是重组蛋白质或肽。

[0098] 该 OPN 变体可以按几种方式给药。

[0099] 在本发明的一些优选实施例中,该治疗或预防是通过口服给药。口服给药可以例如包括舌下给药和 / 或颊给药。可替代地,或另外地,口服给药可包括,该 OPN 变体进入胃肠系统。

[0100] 可替代地,该 OPN 变体可以通过胃肠外,例如通过注射或输注给药。因此,在本发明的一些优选实施例中,该治疗或预防可以例如是通过静脉内 (IV) 给予该 OPN 变体。在本发明的其他优选实施例中,该治疗或预防可以例如通过肌内或皮下给药,例如肌内或皮下注射。在本发明的其他优选实施例中,该治疗或预防可以例如通过腹膜内给药,例如腹膜内注射。

[0101] 在本发明的另外的实施例中,该治疗或预防可以例如通过鼻给药。

[0102] 在本发明的一些实施例中,该治疗或预防是用于抑制和 / 或降低肿瘤细胞生长或复制。例如该治疗或预防可用于预防肿瘤细胞复制。该治疗或预防可以例如用于预防肿瘤细胞生长。

[0103] 在本发明的一些优选实施例中,此处提供的医学用途和方法针对抑制和 / 或降低肿瘤细胞的生长或复制而不考虑它们的起源位点。

[0104] 该治疗或预防还可用于抑制和 / 或降低癌肿瘤生长。

[0105] 在本发明的一些优选实施例中,该治疗是用于预防癌肿瘤生长。例如该治疗可用于预防癌肿瘤的癌细胞的生长和 / 或复制。

[0106] 在本发明的一些实施例中,该治疗或预防是用于减少患有涉及至少一种癌肿瘤的癌症的受试者的体内转移风险。例如,该治疗或预防可用于预防患有涉及至少一种癌肿瘤的癌症的受试者的体内转移。

[0107] 该治疗或预防可以例如预防肿瘤细胞生长或复制。

[0108] 在本发明的一些优选实施例中,待治疗的受试者是人类受试者。

[0109] 在本发明的一些优选实施例中,待治疗的受试者患有涉及至少一种癌肿瘤的癌症,该癌肿瘤具有升高水平的 OPN。

[0110] 在本发明的背景中,如果癌肿瘤中的 OPN 的水平是至少 1 纳克 / 微克蛋白质,则该癌肿瘤具有升高水平的 OPN。癌肿瘤中的 OPN 的水平是根据实例 3 确定的。在本发明的一些实施例中,如果癌肿瘤中的 OPN 的水平是至少 5 纳克 / 微克蛋白质,则该癌肿瘤被视为具有升高水平的 OPN。例如,如果癌肿瘤中的 OPN 的水平是至少 10 纳克 / 微克蛋白质,则该癌肿瘤可被视为具有升高水平的 OPN。在本发明的其他实施例中,如果癌肿瘤中的 OPN 的水平是至少 20 纳克 / 微克蛋白质,则该癌肿瘤被视为具有升高水平的 OPN。例如,如果癌肿瘤中的 OPN 的水平是至少 50 纳克 / 微克蛋白质,则该癌肿瘤可被视为具有升高水平的 OPN。

[0111] 可替代地,癌肿瘤中的 OPN 的升高水平可通过如针对人类肿瘤样品描述的必要的免疫组织化学确定 (塔克 (Tuck) 1998)。将 4-6 微米段的福尔马林固定的石蜡包埋的肿瘤组织再水化并通过在 0.01M 柠檬酸钠 (pH6.0) 中煮 12 分钟使其经受抗原修复。在 5% 山羊血清中阻断之后,根据生产商指示稀释抗骨桥蛋白抗体 (R&D#AF808 或圣克鲁兹生物技术 (Santa Cruz Biotechnologies)mAK2A1) 并与这些组织片段孵育 1 小时。使用载体 ABC 亿利达 (Elite) 试剂盒执行第二抗体孵育和检测,该试剂盒包括生物素酰化的抗山羊抗体

和抗生物素蛋白-生物素复合物(载体目录号 #PK-6105);通过用二氨基联苯胺(DAB,包含在试剂盒中)进行染色达成检测。染色的程度和强度是用显微镜确定并根据描述于(塔克(Tuck)1998)中的半定量系统分级。具有大于4的得分的肿瘤样品将被视为具有升高水平的OPN。

[0112] 在本发明的其他优选实施例中,具有该癌肿瘤的受试者在衍生自其血液的血浆中具有升高浓度的OPN。

[0113] 在本发明的背景中,如果OPN的血浆浓度是至少80纳克/mL,则该受试者在其血浆中具有升高浓度的OPN。衍生自受试者血液的血浆中的OPN的浓度是根据实例4确定的。在本发明的一些实施例中,如果OPN的血浆浓度是至少100纳克/mL,则该受试者在其血浆中具有升高浓度的OPN。例如,如果OPN的血浆浓度是至少120纳克/mL,则受试者在其血浆中可具有升高浓度的OPN。在本发明的其他实施例中,如果OPN的血浆浓度是至少140纳克/mL,则该受试者在其血浆中具有升高浓度的OPN。例如,如果OPN的血浆浓度是至少180纳克/mL,则受试者在其血浆中可具有升高浓度的OPN。

[0114] 应注意,在该癌肿瘤或在血浆中测量的OPN是由该受试者产生的OPN,并且它不需要与该OPN变体相同。

[0115] 在本发明的一些优选实施例中,给予或待给予该OPN变体的受试者对发展涉及至少一种癌肿瘤的癌症具有增加的风险。

[0116] 在本发明的背景中,如果受试者发展癌肿瘤的终生风险比针对来自己匹配性别、年龄和种族的普通人群的人所计算的高至少20%,则该受试者被视对发展涉及至少一种癌肿瘤的癌症具有增加的风险。

[0117] 增加风险的一个实例是具有患有乳腺癌的一级亲属的一名55岁的女性:该女性发展乳腺癌的终身风险比普通群体高36%(参见例如 [www.cancer.gov/bcrisktool/](http://www.cancer.gov/bcrisktool/) 处的乳腺癌风险评估工具(the Breast Cancer Risk Assessment Tool),该工具是由美国国家癌症研究所(NCI)设计的一个交互工具)。

[0118] 增加的风险可由遗传或环境情况或由该受试者的生活方式引起。

[0119] 在本发明的一些实施例中,该增加的风险是由环境情况引起。该受试者可以例如已暴露于显著量的放射性辐射或显著量的致癌物质。

[0120] 在本发明的其他实施例中,该增加的风险是由该受试者的生活方式引起。该受试者可以例如是一个吸烟者或前吸烟者。

[0121] 在本发明的仍其他实施例中,该增加的风险是由来自该受试者的亲代的继承引起。该受试者可以例如具有至少一位患有乳腺癌、肺癌、卵巢癌或结肠癌的一级亲属,例如母亲、父亲、姐妹或兄弟。

[0122] 具有发展癌症的增加了的风险的受试者可以例如具有与发展涉及至少一种癌肿瘤的癌症的增加了的风险相关的一个遗传谱。

[0123] 在本发明的背景中,术语“遗传谱”涉及该受试者从其亲代继承的基因或涉及由环境情况引起的基因突变。

[0124] 在本发明的一些实施例中,该遗传谱包括至少一个与发展涉及至少一种癌肿瘤的癌症的增加了的风险相关的遗传的基因。这类基因的一个实例是BRCA1基因或BRCA2基因。参见例如纳尔逊(Nelson)2005。

[0125] 在本发明的背景中,如果遗传谱的携带者发展该癌症的终生风险比非携带者高至少 20%,则该遗传谱被视与发展涉及至少一种癌肿瘤的癌症的增加的风险相关。

[0126] 在本发明的一些优选实施例中,还用另一种类型的抗癌治疗对治疗的或待治疗的受试者进行治疗。这样的其他种类的抗癌治疗的实例是例如化疗、化学预防、靶向治疗、骨髓移植、放疗、外科手术、或其组合。

[0127] 在本发明的一些优选实施例中,该 OPN 变体是以治疗的受试者的大约 0.05mg/kg 体重至大约 5g/kg 体重范围中的每日剂量给药。

[0128] 如果将该 OPN 变体给予(例如口服)该受试者,在受试者体内的肿瘤细胞生长速率以及因此的肿瘤细胞团的总尺寸可被降低并且在某些实施例中统计学上显著降低。由于受试者接受有效量的该 OPN 变体而导致的肿瘤细胞生长的抑制是相对于在该受试者接受该 OPN 变体之前相同肿瘤的肿瘤细胞生长速率,或相对于未暴露于有效量的该 OPN 变体的受试者体内可比较的肿瘤(在细胞团的初始尺寸和细胞类型上可比较)的肿瘤细胞生长。肿瘤细胞生长可指细胞分裂或复制的速率,或该肿瘤细胞团的总尺寸(例如体积或周长)。测量肿瘤细胞团的方法在本领域中是熟知的。例如,参见特美克(Tomayko)1989,通过引用结合在此。

[0129] 在本发明的背景中,癌肿瘤的尺寸是指该肿瘤的体积。癌肿瘤的生长速率是指该肿瘤每个时间单位的体积增长。癌肿瘤的体积可通过常规成像技术例如 MRI 扫描仪或超声成像确定。

[0130] 在某些实施例中,相对于未暴露于治疗有效量的该 OPN 变体的相似肿瘤的生长速率或尺寸,肿瘤细胞团的生长速率或尺寸可被降低至少大约 5%至大约 10%。在其他实施例中,该肿瘤细胞团可被降低至少大约 10%至大约 15%、至少大约 15%至大约 20%、至少大约 20%至大约 25%、至少大约 25%至大约 30%、至少大约 30%至大约 35%、至少大约 35%至大约 40%、至少大约 40%至大约 45%、至少大约 45%至大约 50%、至少大约 50%至大约 55%、至少大约 55%至大约 60%、至少大约 60%至大约 65%、至少大约 65%至大约 70%、至少大约 70%至大约 75%、至少大约 75%至大约 80%、至少大约 80%至大约 85%、或至少大约 85%至大约 90%、或更多。在又其他实施例中,该肿瘤细胞团被降低至少大约 50%。在具体实施例中,该肿瘤细胞团被降低至少大约 75%。

[0131] 可替代地,相对于未暴露于治疗有效量的该 OPN 变体的相似肿瘤的生长速率或尺寸,肿瘤细胞团的生长速率可被降低大约 5%至大约 100%。例如肿瘤细胞团的生长速率可被降低大约 20%至大约 95%。优选地,肿瘤细胞团的生长速率被降低大约 40%至大约 100%。甚至更优选地,肿瘤细胞团的生长速率被降低大约 60%至大约 100%。

[0132] 可以按对抑制肿瘤细胞的生长或复制有效的量将如此处所述的该 OPN 变体给予受试者。在某些实施例中,该 OPN 变体可以按大约 0.05mg/ml 至大约 1mg/ml 的浓度给予。在一些实施例中,它可以按大约 0.05mg/ml 至大约 0.1mg/ml、大约 0.1mg/ml 至大约 0.15mg/ml、大约 0.15mg/ml 至大约 0.2mg/ml、大约 0.25mg/ml 至大约 0.3mg/ml、大约 0.3mg/ml 至大约 0.35mg/ml、大约 0.35mg/ml 至大约 0.4mg/ml、大约 0.4mg/ml 至大约 0.45mg/ml、大约 0.45mg/ml 至大约 0.5mg/ml、大约 0.55mg/ml 至大约 0.6mg/ml、大约 0.6mg/ml 至大约 0.65mg/ml、大约 0.65mg/ml 至大约 0.7mg/ml、大约 0.7mg/ml 至大约 0.75mg/ml、大约 0.75mg/ml 至大约 0.8mg/ml、大约 0.85mg/ml 至大约 0.9mg/ml、大约 0.9mg/ml 至大约

0.95mg/ml、或大约 0.95mg/ml 至大约 1mg/ml 的浓度给予。在一个实施例中,该 OPN 变体可以按 0.03mg/ml 的浓度给予。在另一个实施例中,该 OPN 变体可以按 0.12mg/ml 的浓度给予。在又一个实施例中,该 OPN 变体可以按 0.3mg/ml 的浓度给予。

[0133] 在具体实施例中,该 OPN 变体可以按大约 1mg/ml 至大约 0.1g/ml 的浓度给予。在一些实施例中,它可以按大约 1mg/ml 至大约 5mg/ml、大约 5mg/ml 至大约 10mg/ml、大约 10mg/ml 至大约 15mg/ml、大约 15mg/ml 至大约 20mg/ml、大约 20mg/ml 至大约 25mg/ml、大约 25mg/ml 至大约 30mg/ml、大约 30mg/ml 至大约 35mg/ml、大约 35mg/ml 至大约 40mg/ml、大约 40mg/ml 至大约 45mg/ml、大约 45mg/ml 至大约 50mg/ml、大约 50mg/ml 至大约 55mg/ml、大约 55mg/ml 至大约 60mg/ml、大约 60mg/ml 至大约 65mg/ml、大约 65mg/ml 至大约 70mg/ml、大约 70mg/ml 至大约 75mg/ml、大约 75mg/ml 至大约 80mg/ml、大约 80mg/ml 至大约 85mg/ml、大约 85mg/ml 至大约 90mg/ml、大约 90mg/ml 至大约 95mg/ml、或大约 95mg/ml 至大约 0.1g/ml 的浓度给予。

[0134] 在一些实施例中,该 OPN 变体可以按大约 0.1g/ml 至大约 1g/ml 的浓度给予。在其他实施例中,它可以按大约 0.1g/ml 至大约 0.15g/ml、大约 0.15g/ml 至大约 0.2g/ml、大约 0.2g/ml 至大约 0.25g/ml、大约 0.25g/ml 至大约 0.3g/ml、大约 0.3g/ml 至大约 0.35g/ml、大约 0.35g/ml 至大约 0.4g/ml、大约 0.4g/ml 至大约 0.45g/ml、大约 0.45g/ml 至大约 0.5g/ml、大约 0.5g/ml 至大约 0.55g/ml、大约 0.55g/ml 至大约 0.6g/ml、大约 0.6g/ml 至大约 0.65g/ml、大约 0.65g/ml 至大约 0.7g/ml、大约 0.7g/ml 至大约 0.75g/ml、大约 0.75g/ml 至大约 0.8g/ml、大约 0.8g/ml 至大约 0.85g/ml、大约 0.85g/ml 至大约 0.9g/ml、大约 0.9g/ml 至大约 0.95g/ml、或大约 0.95g/ml 至大约 1g/ml 的浓度给予。

[0135] 在某些实施例中,该 OPN 变体可以按大约 0.05mg/kg 体重至大约 1mg/kg 体重的每日剂量给予。在本发明的背景中,在该 OPN 变体的每日剂量背景中提到的单位“mg/kg”或“g/kg”涉及以 mg 或 g OPN 变体/kg 待治疗的受试者的体重计的每日量。

[0136] 在一些实施例中,它可以按大约 0.05mg/kg 至大约 0.1mg/kg、大约 0.1mg/kg 至大约 0.15mg/kg、大约 0.15mg/kg 至大约 0.2mg/kg、大约 0.25mg/kg 至大约 0.3mg/kg、大约 0.3mg/kg 至大约 0.35mg/kg、大约 0.35mg/kg 至大约 0.4mg/kg、大约 0.4mg/kg 至大约 0.45mg/kg、大约 0.45mg/kg 至大约 0.5mg/kg、大约 0.55mg/kg 至大约 0.6mg/kg、大约 0.6mg/kg 至大约 0.65mg/kg、大约 0.65mg/kg 至大约 0.7mg/kg、大约 0.7mg/kg 至大约 0.75mg/kg、大约 0.75mg/kg 至大约 0.8mg/kg、大约 0.85mg/kg 至大约 0.9mg/kg、大约 0.9mg/kg 至大约 0.95mg/kg、或大约 0.95mg/kg 至大约 1mg/kg 的每日剂量给予。

[0137] 在其他实施例中,该 OPN 变体可以按大约 1mg/kg 至大约 0.1g/kg 体重的每日剂量给予。在其他另外的实施例中,它可以按大约 1mg/kg 至大约 5mg/kg、大约 5mg/kg 至大约 10mg/kg、大约 10mg/kg 至大约 15mg/kg、大约 15mg/kg 至大约 20mg/kg、大约 20mg/kg 至大约 25mg/kg、大约 25mg/kg 至大约 30mg/kg、大约 30mg/kg 至大约 35mg/kg、大约 35mg/kg 至大约 40mg/kg、大约 40mg/kg 至大约 45mg/kg、大约 45mg/kg 至大约 50mg/kg、大约 50mg/kg 至大约 55mg/kg、大约 55mg/kg 至大约 60mg/kg、大约 60mg/kg 至大约 65mg/kg、大约 65mg/kg 至大约 70mg/kg、大约 70mg/kg 至大约 75mg/kg、大约 75mg/kg 至大约 80mg/kg、大约 80mg/kg 至大约 85mg/kg、大约 85mg/kg 至大约 90mg/kg、大约 90mg/kg 至大约 95mg/kg、或大约 95mg/kg 至大约 0.1g/kg 的每日剂量给予。

[0138] 在本发明的一些实施例中,该 OPN 变体可以按大约 0.1g/kg 至大约 1g/kg 体重的每日剂量给予。在某些实施例中,它可以按大约 0.1g/kg 至大约 0.15g/kg、大约 0.15g/kg 至大约 0.2g/kg、大约 0.2g/kg 至大约 0.25g/kg、大约 0.25g/kg 至大约 0.3g/kg、大约 0.3g/kg 至大约 0.35g/kg、大约 0.35g/kg 至大约 0.4g/kg、大约 0.4g/kg 至大约 0.45g/kg、大约 0.45g/kg 至大约 0.5g/kg、大约 0.5g/kg 至大约 0.55g/kg、大约 0.55g/kg 至大约 0.6g/kg、大约 0.6g/kg 至大约 0.65g/kg、大约 0.65g/kg 至大约 0.7g/kg、大约 0.7g/kg 至大约 0.75g/kg、大约 0.75g/kg 至大约 0.8g/kg、大约 0.8g/kg 至大约 0.85g/kg、大约 0.85g/kg 至大约 0.9g/kg、大约 0.9g/kg 至大约 0.95g/kg、或大约 0.95g/kg 至大约 1g/kg 的每日剂量给予。

[0139] 在具体实施例中,该 OPN 变体可以按大约 1g/kg 至大约 5g/kg 体重的每日剂量给予。在一些实施例中,它可以按大约 1g/kg 至大约 1.5g/kg、大约 1.5g/kg 至大约 2g/kg、大约 2g/kg 至大约 2.5g/kg、大约 2.5g/kg 至大约 3g/kg、大约 3g/kg 至大约 3.5g/kg、大约 3.5g/kg 至大约 4g/kg、大约 4g/kg 至大约 4.5g/kg、大约 4.5g/kg 至大约 5g/kg 的每日剂量给予。

[0140] 在某些实施例中,该 OPN 变体是以大约 0.05mg/kg 至 5g/kg 范围中的每日剂量给予的。例如,该 OPN 变体可以按大约 1mg/kg 至 0.5g/kg 范围中的每日剂量给予。可替代地,该 OPN 变体可以按大约 0.005g/kg 至 0.2g/kg 范围中的每日剂量给予。该 OPN 变体可以例如按大约 0.01g/kg 至 0.1g/kg 范围中的每日剂量给予。

[0141] 在其他实施例中,该 OPN 变体是以大约 1mg/kg 体重至 300mg/kg 体重范围中的每日剂量给予的。例如,该 OPN 变体可以按大约 5mg/kg 体重至 250mg/kg 体重范围中的每日剂量给予。可替代地,该 OPN 变体可以按大约 10mg/kg 体重至 200mg/kg 体重范围中的每日剂量给予。该 OPN 变体可以例如按大约 30mg/kg 体重至 150mg/kg 体重范围中的每日剂量给予。

[0142] 本发明的又一个方面涉及一种 OPN 变体(包括一种 OPN 变体或甚至由其组成)在制造一种用于治疗或预防涉及至少一种癌肿瘤的癌症的药剂中的用途。

[0143] 本发明的又一个方面涉及一种治疗或预防癌症的方法,该方法包括:向患有癌症的受试者、或向处于患癌症风险的受试者给予对治疗或预防所述癌症有效的量的一种 OPN 变体(包括一种 OPN 变体或甚至由其组成),并且其中所述癌症涉及至少一种癌肿瘤。

[0144] 在本发明的一些优选实施例中,该方法包括:向患有该癌症的受试者、或向处于患癌症风险的受试者给予对抑制肿瘤细胞生长或复制有效的量的一种 OPN 变体(包括一种 OPN 变体或甚至由其组成)。

[0145] 治疗的方法可以例如是一种减少患有涉及至少一种癌肿瘤(例如一种具有升高水平的 OPN 的癌肿瘤)的癌症的受试者的体内转移风险或预防转移的方法,该方法包括:向该受试者给予对减少转移风险或甚至预防转移有效的量的一种 OPN 变体。

[0146] 本发明的一个方面涉及通过向受试者给予对于抑制肿瘤细胞生长或复制有效的量的该 OPN 变体、或一种包括该 OPN 变体的药用组合物而抑制肿瘤细胞在该受试者体内生长或复制的方法。这样的有效量在此处可以指治疗有效量。

[0147] 如此处使用的术语“有效量”或“治疗有效量”指直接给予该受试者或包括在药用组合物或营养补充剂内的 OPN 变体的量是足够引起提到的效果(例如抑制肿瘤生长和/或抑制肿瘤细胞在该受试者体内生长或复制)的量。该有效量可通过本领域内普通技术人员

例如执业医师经验性地确定。当例如确定对抑制肿瘤生长和 / 或肿瘤细胞生长或复制有效的该 OPN 变体的量时, 可以要考虑因素例如受试者的年龄、身高和体重。

[0148] 本发明的另一个方面涉及一种药用组合物, 该药用组合物包括:

[0149] - 一种 OPN 变体, 以及

[0150] - 一种药学上可接受的载体。

[0151] 该 OPN 变体优选地以药学上有效量存在。

[0152] 在本发明的一些优选实施例中, 该药用组合物包括在 0.01% -90% (w/w) 范围中的量的该 OPN 变体。例如, 该药用组合物可包括在 0.1% -80% (w/w) 范围中的量的该 OPN 变体。可替代地, 该药用组合物可包括在 1% -70% (w/w) 范围中的量的该 OPN 变体。

[0153] 在本发明的一些实施例中, 该药用组合物包括在 5% -60% (w/w) 范围中的量的该 OPN 变体。例如, 该药用组合物可包括在 10% -50% (w/w) 范围中的量的该 OPN 变体。可替代地, 该药用组合物可包括在 0.1% -20% (w/w) 范围中的量的该 OPN 变体。

[0154] 除了该 OPN 变体之外, 该药用组合物还可包括一种或多种另外的治疗剂。该一种或多种另外的治疗剂优选地是一种抗癌剂。

[0155] 靶向治疗剂的实例包括小分子, 例如甲磺酸伊马替尼 (GLEEVEC®), 也称作 STI - 571)、吉非替尼 (IRESSA®, 也称作 ZD1839)、埃罗替尼 (Tarceva®)、硼替佐米 (VELCADE®)、Bcl-2 抑制剂 (例如甲磺酸奥巴克拉 (obatociclib)、ABT-263、以及棉酚)、PARP 抑制剂 (例如 iniparib、奥拉帕尼)、两面神激酶抑制剂 (Janus kinase inhibitor)、PI3K 抑制剂、阿帕替尼 (一种选择性 VEGF 受体 2 抑制剂)、以及沙利霉素。靶向治疗剂的实例还包括单克隆抗体, 例如利妥昔单抗 (销售为 MABTHERA® 或 RITUXAN®)、群司珠单抗 (HERCEPTIN®)、西妥昔单抗 (ERBITUX®)、贝伐单抗 (AVASTATIN®)。实例还包括抗体 - 药物偶联物。

[0156] 化疗剂的实例包括烷化剂 (例如顺铂、卡铂、奥沙利铂、氮芥、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、依弗酰胺)、抗代谢药 (例如嘌呤 (例如硫唑嘌呤、巯基嘌呤) 以及嘧啶)、植物碱和萜类化合物 (例如长春花碱, 例如长春新碱、长春质碱、长春瑞宾、以及长春地辛, 鬼臼毒素, 以及紫杉烷)、拓扑异构酶抑制剂 (例如伊立替康、拓扑替康、安吡啶、依托泊苷、磷酸依托泊苷、以及替尼泊苷)、以及细胞毒素抑制剂 (例如放线菌素例如放线菌素 D, 蒽环类例如阿霉素 (L01DB01)、柔红霉素 (L01DB02)、戊柔比星、伊达比星、表柔比星 (L01DB03)、以及其他细胞毒素抗生素例如博来霉素 (L01DC01)、普卡霉素 (L01DC02)、以及丝裂霉素 (L01DC03))。

[0157] 有用的治疗剂的另一个实例是一种整合蛋白阻滞剂, 例如  $\alpha_v\beta_3$  整合蛋白阻滞剂, 例如西仑吉肽。

[0158] 免疫抑制剂的实例包括糖皮质激素类、细胞抑制剂 (例如烷化剂和抗代谢物, 例如叶酸类似物 (例如甲氨蝶呤)、嘌呤类似物 (例如硫唑嘌呤、巯基嘌呤)、嘧啶类似物、以及蛋白质合成抑制剂)、抗体 (例如多克隆和单克隆)、作用于免疫亲和素的药物 (例如环孢素、他克莫司、西罗莫司)、以及其他药物 (包括干扰素类、阿片类、TNF 结合蛋白、霉酚酸酯、以及小生物剂 (例如芬戈莫德、多球壳菌素))。

[0159] 此处所述的其他方面包括药用组合物, 该药用组合物包括该 OPN 变体和一种药学上可接受的载体, 适合于给予人类或其他动物的一种或多种兼容固体或液体填充剂、或一

种或多种稀释剂或成胶囊剂。为了被认为适合于给予治疗中的受试者,载体(或其他试剂)应该是足够纯的和足够低毒的。载体可以是惰性的或可具有其本身的药学上有利的特性。在与该 OPN 变体的组合中使用的载体的量可以足够改善该 OPN 变体(例如递送至细胞的 OPN 变体或由细胞摄取的 OPN 变体)的递送和效力,并且可通过本领域内普通技术人员经验性地确定。

[0160] 另外的载体或可包括在此处所述的药用组合物内的其他(无活性的)试剂的实例包括糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;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、乙基纤维素和甲基纤维素;粉状黄蓍胶;明胶;滑石;固体润滑剂,例如硬脂酸和硬脂酸镁;硫酸钙;植物油,例如花生酱、棉花籽油和玉米油;多元醇,例如丙二醇、甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇;海藻酸;乳化剂,例如 TWEEN®;润湿剂,例如十二烷基硫酸钠;染料;调节剂;制丸剂;稳定剂;抗氧化剂;防腐剂;无热原水;等张生理溶液,葡萄糖溶液和磷酸盐缓冲溶液;甜味剂,例如甘油、丙二醇、山梨糖醇、蔗糖);调节剂;调味剂;色素;防腐剂,例如甲基-或 n-丙基-对羟基苯甲酸盐、山梨酸、苯甲酸甲酯、苯甲酸盐。

[0161] 可向该药用组合物添加不会显著影响本发明的化合物的活性的任选的活性剂。这类活性剂包括抗癌靶向治疗剂和化疗剂,以及免疫抑制剂或免疫刺激剂。

[0162] 在某些实施例中,包含该 OPN 变体的药用组合物被配制用于黏膜给药和/或口服给药。可以按包含常规的无毒的药学上可接受的载体、佐剂和介质的标准剂型口服、舌下、或经颊给予这些组合物。术语“口服”或“口服地”可囊括“舌下”或“舌下地”或“颊”或“经颊”。

[0163] 特别用于黏膜给药和/或口服给药的药学上可接受的载体在本领域内是熟知的,并且包括一种或多种糖、淀粉、纤维素及其衍生物、麦芽、明胶、滑石、硫酸钙、植物油、合成油、多元醇、海藻酸、磷酸盐缓冲溶液、乳化剂、等张生理溶液、乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇、糖溶液、山梨糖醇以及水。这类组合物还可包含镇痛剂。

[0164] 适合于口服给药的形式包括片剂或颗粒剂、硬或软胶囊、软锭剂、锭剂、水或油中悬浮液、乳剂、可分散性粉剂或颗粒剂、或糖浆剂或者酞剂。可根据本领域中已知的用于制备这类组合物的任意方法制备配制用于口服给药的药用组合物。

[0165] 片剂典型地包含常规的药学上兼容的助剂,例如惰性稀释剂,例如碳酸钙、碳酸钠、甘露醇、乳糖和纤维素;粘合剂,例如淀粉、明胶和蔗糖;分散剂,例如淀粉、海藻酸和交联羧甲基纤维素;润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸和滑石。助流剂例如二氧化硅可被用于改善粉剂组合物的流动性特征。针对外观,可添加染料例如 FD&C 染料。甜味剂和调节剂例如阿斯巴甜、糖精、薄荷醇、薄荷和水果香精是对于咀嚼片剂有用的佐剂。胶囊(包括持续释放和延迟释放制剂)典型地包含一种或多种上述固体稀释剂。载体组分的选择通常取决于次级因素,例如口味、价格和贮存稳定性。

[0166] 片剂或胶囊形式的药用组合物也可以使用常规方法、典型地用一种 pH 依赖性涂料进行涂覆。这类剂型典型地包含一种或多种来自以下各项中的组分:邻苯二甲酸乙酸纤维素、聚乙酸乙烯邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、乙基纤维素、尤特奇(Eudragit)涂料、蜡和虫胶以及其他材料。

[0167] 包含该 OPN 变体的用于口服给药的制剂可被配制为硬的明胶胶囊,其中该 OPN 变

体与惰性固体稀释剂（例如碳酸钙、磷酸钙和高岭土）混合，或处于软的明胶胶囊的形式，其中该 OPN 变体与水或油介质（例如花生酱、液体石蜡或橄榄油）混合。

[0168] 水性悬浮液可包括 OPN 变体，该 OPN 变体处于与适合于获得水性悬浮液的赋形剂的混合物中。这些赋形剂可以是助悬剂，例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄芪胶和阿拉伯树胶；分散剂或润湿剂；天然存在的磷脂例如卵磷脂，或环氧烷烃与脂肪酸的缩合产物例如硬脂酸聚氧乙烯酯，或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物例如与十七烷乙烯氧基十六烷醇，或环氧乙烷与产生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物例如取代的聚氧乙烯山梨糖醇，或环氧乙烷与产生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物例如取代的聚氧乙烯脱水山梨糖醇。水性悬浮液还可包含一些防腐剂，例如乙基 - 或 n- 丙基 -p- 羟基苯甲酸盐。

[0169] 可以通过将该 OPN 变体悬浮于植物油，例如花生酱、橄榄油、芝麻油以及椰子油；或矿物油，如液体石蜡中来制备油悬浮液。油悬浮液可包含增稠剂，例如蜂蜡、固体石蜡或十六烷醇。可以添加一些甜味剂（例如上面提到的）和调节剂以获得令人愉悦的口服制剂。这些组合物可以通过添加抗氧化剂，如抗坏血酸来保存。

[0170] 当该 OPN 变体展示出不足的溶解度时，可以使用增溶方法。这类方法是本领域中普通技术人员已知的，并包括使用共溶剂例如二甲亚砜 (DMSO)、使用表面活性剂例如 TWEEN®、或溶解于碳酸氢钠水性溶液中以及其他方法。

[0171] 在此所述的药用组合物也可以处于水包油乳剂形式。油相可以表示植物油例如橄榄油或花生酱，或矿物油例如液态石蜡，或其混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的树胶，例如阿拉伯树胶或黄芪胶；天然存在的磷脂，例如大豆卵磷脂，以及产生自脂肪酸和己糖醇酐的酯或偏酯，例如脱水山梨糖醇单油酸酯，以及所述偏酯与环氧乙烷的缩合产物，例如聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯。

[0172] 适合于制备水性悬浮液的分散粉剂以及颗粒剂包括与一种分散剂或润湿剂、助悬剂以及一种或多种防腐剂混合的 OPN 变体。合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂包括已经在以上示例的试剂。

[0173] 在一个实施例中，该 OPN 变体或包括该 OPN 变体的药用组合物可以按鼻剂型（例如鼻喷雾）给药。这类组合物典型地包含一种或多种填充剂，例如蔗糖、山梨糖醇和甘露醇，以及粘合剂，例如阿拉伯树胶、微晶纤维素、羧甲基纤维素和羟丙基甲基纤维素。也可以结合以上所述的助流剂、润滑剂、甜味剂、染料、抗氧化剂和调节剂。

[0174] 用于吸入的药用组合物可以以一种溶液、悬浮液或乳剂配制，可以将其以干粉剂的形式或以气雾剂的形式使用常规推进剂（例如二氯二氟甲烷和三氯氟甲烷）给药。

[0175] 在本发明的一些优选实施例中，该药用组合物被配制用于口服给药、舌下给药、颊给药、或鼻给药。

[0176] 在本发明的其他实施例中，该药用组合物被配制用于静脉给药，例如用于注射。

[0177] 在本发明的一些实施例中，该药用组合物处于这样一种剂型，针对成年受试者其包含 90% -110% (w/w) 的每日剂量。在本发明的其他实施例中，该药用组合物处于这样一种剂型，针对成年受试者其包含 45% -55% (w/w) 的每日剂量。在本发明的另外的实施例中，该药用组合物处于这样一种剂型，针对成年受试者其包含 28% -38% (w/w) 的每日剂量。

[0178] 在本发明的一些实施例中,该药用组合物处于一种剂型,该剂型包括在 0.1mg-10g/剂型的范围中的量的该 OPN 变体。例如该口服剂型可包含在 1mg-1g/剂型的范围中的量的该 OPN 变体。可替代地,该口服剂型可包含在 10mg-800mg/剂型的范围中的量的该 OPN 变体。该口服剂型可包含例如在 25mg-500mg/剂型的范围中的量的该 OPN 变体。

[0179] 本发明的又一个方面涉及一种营养补充剂,该营养补充剂包括

[0180] - 营养有效量的一种 OPN 变体,以及

[0181] - 一种或多种选自下组的组分,该组由碳水化合物来源、脂质来源、以及蛋白质来源组成。

[0182] 在本发明的一些优选实施例中,该营养补充剂包括在 0.01% -90% (w/w) 范围中的量的该 OPN 变体。例如,该营养补充剂可包括在 0.1-80% (w/w) 范围中的量的该 OPN 变体。可替代地,该营养补充剂可包括在 1% -70% (w/w) 范围中的量的该 OPN 变体。

[0183] 在本发明的一些实施例中,该营养补充剂包括在 5% -60% (w/w) 范围中的量的该 OPN 变体。例如,该营养补充剂可包括在 10-50% (w/w) 范围中的量的该 OPN 变体。可替代地,该营养补充剂可包括在 0.1% -20% (w/w) 范围中的量的该 OPN 变体。

[0184] 在本发明的其他实施例中,该营养补充剂包括在 0.001% -5% (w/w) 范围中的量的该 OPN 变体。例如,该营养补充剂可包括在 0.005-2% (w/w) 范围中的量的该 OPN 变体。可替代地,该营养补充剂可包括在 0.01% -1% (w/w) 范围中的量的该 OPN 变体。该营养补充剂可以例如包括在 0.05% -0.5% (w/w) 范围中的量的该 OPN 变体。

[0185] 包括该 OPN 变体的营养补充剂可以液体或粉末状形式被预封装(例如罐装或瓶装液体饮品)。在一些实施例中,将该粉末状形式添加到一种食物或饮料中以提供另外的营养素。在某些实施例中,可与例如水果、蔬菜、酸牛乳、乳、和/或冰淇淋配制该营养饮料。在一些实施例中,将该营养补充剂共混为思慕雪(smoothie)稠度。在具体实施例中,可用例如蛋白质、维生素、矿物质、抗氧化剂、益生菌和/或益生元增强该营养饮料。在某些实施例中,该营养饮料不含乳糖和/或不含谷蛋白。在一些实施例中,该营养补充剂是有机的。儿童营养饮料的实例包括 **PEDIASURE®**、**PEDIASMART®**、以及仅针对儿童的 **RESOURCE®**。成人营养饮料的实例包括 **ENSURE®**、**BOOST®**、**NESTLE® CARNATION® INSTANT BREAKFAST®**、**GLUCERNA®**、**GLYTROL®**、**NUTREN®**、以及 **PEPTAMEN®**。营养补充剂还包括乳,豆乳和牛乳(例如全脂、半脱脂或低脂、脱脂或无脂(例如克莱文戴尔(Cravendale))、不含乳糖(例如 **LACTOFREE®**))。

[0186] 包括在此处所述的营养补充剂内的该 OPN 变体的量可以与上述针对包含该 OPN 变体的药用组合物的那些量相同或相似,但也可以是更低或更高的量。在具体实施例中,该 OPN 变体在该营养补充剂中的量是大约 0.05mg/ml 至大约 1g/ml。在一些实施例中,该受试者可以是哺乳动物。在一些实施例中,该受试者可以是鼠、犬、猫、羊(ovine)、牛、猪、或马,而在其他实施例中,该受试者是人。

[0187] 本发明在它的应用上并不限于在以下说明中所提出的或附图中所展示的结构和部件安排的细节。本发明可以有其他的实施方案,并且能够以不同的方式被实施或进行。

另外,在此所用的措辞和术语是用于描述目的,并且不应视为限制性的。此处使用“包括”、“包含”或“具有”、“含”、“涉及”及其变体是指囊括此后列出的术语及其等效物连同另外的术语。

[0188] 通过引用将每个前述专利、专利申请和参考文献结合在此,特别针对在此引用的教导。

[0189] 因此已经说明了本发明的至少一个实施例的几方面,要理解本领域的技术人员容易想到多种改变、修饰和改善。这类改变、修饰和改善旨在成为本披露的部分,并且旨在处于本发明的精神和范围内。因此,前述说明和附图仅通过举例的方式。

[0190] 实例

[0191] 实例 1 :向 129B6F1 荷瘤小鼠口服给予骨桥蛋白

[0192] 将牛 OPN 制品 (Lacprodan OPN-10<sup>®</sup>,阿尔拉食品配料,维比 (Viby),丹) 溶解于去离子水中,过滤,并从接种肿瘤细胞的那天(第 0 天)或五天之后(第 5 天)开始,以 0.03、0.12、或 0.3mg/ml 的最终浓度给予 129B6F1 荷瘤小鼠。最初将这些小鼠用  $5 \times 10^4$  无支原体 275-3-2 鼠 ras- 转化的成纤维细胞接种(参见吴 (Wu) 2000)。通过测径器测量肿瘤尺寸并监测直至这些肿瘤达到这些动物的体重的 20%,此时将这些小鼠处死,并采集组织/血浆样品。使用单向 ANOVA 以邦费罗尼 (Bonferroni) 事后检验计算统计显著性。

[0193] 在第 9 天初次检测肿瘤。从第 19 天开始,一些肿瘤已经长得如此之大以至于这些小鼠必须被处死。在第 25 天终止该试验。图 1A 显示在肿瘤注射时给予该 OPN 制剂对高达 17 天的肿瘤的尺寸没有显著影响。然而,当在肿瘤细胞注射之后五天发起给予该 OPN 制剂时,分别在 15 和 17 天,在 0.12mg/ml 和 0.3mg/ml 组中该肿瘤的尺寸统计学上显著地降低(图 1b)。图 2 显示了在第 15、17、以及 19 天所有组中的肿瘤尺寸的比较;表明了显著差异。图 3 显示了对照和喂养 OPN 小鼠的平均肿瘤尺寸,三个独立试验的合并的结果。N = 30(0mg/ml OPN 制剂)或 32(0.3mg/ml OPN 制剂)。

[0194] 这些结果清楚地显示口服给予的牛 OPN 制剂可抑制癌肿瘤的生长速率并且甚至可能预防肿瘤生长。给予这些小鼠的大约 1.5mg 的量的蛋白质没有显著改变它们的总蛋白质摄取,这一处理对小鼠重量也没有任何影响。因此,我们推断,这一处理对肿瘤或减慢该肿瘤生长的相关的宿主细胞具有特定的影响。剂量试验表明使用的最高的 OPN 制剂的剂量 0.3mg/ml 是最有效的,并且甚至更高的剂量可对肿瘤生长具有更大的影响。

[0195] 实例 2 :口服给予的 OPN 对乳腺癌小鼠模型中的原发性肿瘤生长和转移的影响

[0196] 4T1 细胞是经转化的小鼠乳腺上皮细胞(艾斯拉克森 (Aslakson) 1992),这些细胞在原位注射到该小鼠乳腺之后形成转移性肿瘤(莱勒卡切斯 (Lelekakis) 1999)。该自发性转移形成-原发于肺,尽管可涉及其他组织-是这些细胞的关键特征,比直接注射转移模型更准确可靠地反映人类癌症中的转移发展。因此,这些细胞被广泛用作针对人类侵入性乳腺癌的模型。4T1 细胞也表达高水平的 OPN(米 (Mi) 2004),这是最大肿瘤生长所需要的。

[0197] A. 小鼠肿瘤发展。4T1 细胞从 ATCC 获得。在最初试验中,OPN 的表达将得到确认,并且将针对支原体测试细胞,并且如果需要则进行补救。当处于指数增长时收获细胞,洗涤,并将  $1 \times 10^5$  细胞注射到 36 同系的 Balb/c 小鼠的乳腺脂肪垫中。将这些小鼠随机分为三组,从注射肿瘤细胞五天之后开始,使其中两组接受在饮用水中 0.3mg/ml OPN 制剂。这些 4T1 细胞快速形成肿瘤;预期在 7-10 天之后检测到肿瘤,而最大肿瘤体积在 25-30 天达

到。当任一乳腺肿瘤达到体重的 20% 时或如果检测到任何病理学 ( $n = 12/$  组) 时, 将对照小鼠和一组喂养 OPN 的小鼠进行处死。如我们预期的, 如果在喂养 OPN 的动物中该原发性肿瘤的生长受到抑制, 则维持第二组的喂养 OPN 的小鼠直至它们的肿瘤达到体重的 20%。在处死时, 执行尸体剖检并记录转移的位点。采集血液、肿瘤、肺、以及其他转移组织。

[0198] B. 小鼠组织的分析。将原发性肿瘤针对低温贮藏、甲醛固定和生物化学分析分为三个交叉部分。为了确定转移负荷对肺进行固定, 该转移负荷是通过表面结节进行计数并且通过几个肺切片的组织学检验评估的。在已经受口服给予 OPN 的小鼠和对照小鼠之间对每一小鼠的表面转移的数目进行比较作为主要结果。如果在原发性肿瘤生长速率中看到差异, 则通过 CD31 和 vWF 染色评估不同肿瘤中的血管密度和管形态学, 并且淋巴管密度是通过 LYVE-1 染色。如果时间允许, 对 VEGF 信号的方面进行分析: 通过蛋白质印迹评估不同 VEGF 亚型的表达、VEGF 受体的表达以及这些受体的磷酸化水平以测试以下假设: 口服给予 OPN 引起 VEGF 信号改变。这些分析将在原发性肿瘤和转移性病变中进行。

[0199] C. 预期结果。我们的假设和先前数据表明口服给予 OPN 变体会抑制用 4T1 细胞注射的小鼠中的原发性乳腺肿瘤的生长。如果是这种情况, 并且喂养 OPN 小鼠中相应的转移负荷更低, 则另外一组喂养 OPN 的小鼠将被包括, 其中允许肿瘤生长至与对照肿瘤相同的尺寸 (当处死它们时), 并确定转移负荷。如果与对照相比, 在这些动物中看到更低数目的转移, 我们将推断口服给予 OPN 对转移具有直接影响。我们期望口服给予 OPN 变体可导致血管尺寸增加, 伴随着 VEGF 信号通路的活性的增加。

[0200] 实例 3: 肿瘤中 OPN 水平的确定

[0201] 这个实例说明了如何确定肿瘤中 OPN 的水平。

[0202] 样品制备:

[0203] 获得讨论中的肿瘤样品, 并随后快速冷冻并匀浆化 (在蛋白酶抑制剂 (罗氏应用科学 (Roche Applied Science) 目录号 05892791001) 的存在下, 在细胞裂解缓冲液 (细胞信号技术公司 (Cell Signaling Technologies), 目录号 9803) 中大约 50mg 肿瘤样品 / 0.25ml 缓冲液)。在 1.8ml 埃彭道夫 (Eppendorf) 管中使用塑料研杵在冰上执行匀浆化, 持续 30 秒至 1 分钟。

[0204] 总蛋白质的确定:

[0205] 使用二喹啉甲酸 (BCA) 测定试剂盒 (皮尔斯生物技术 (Pierce Biotechnology) 目录号 23227) 确定该肿瘤提取物的蛋白质浓度。

[0206] OPN 水平的确定:

[0207] 通过 ELISA 使用针对重组 OPN 产生的抗体确定该组织提取物的 OPN 水平, 该重组 OPN 对于取血样的受试者是天然的。

[0208] 在人类受试者的情况下, 应使用针对人血清 OPN 的单克隆抗体。根据生产商说明可以例如使用测定设计试剂盒 (Assay Designs Kit) (恩佐生命科学 (Enzo Life Sciences), 目录号 ADI-900-142)。用处于从 2-32ng/ml 的不同浓度的纯化重组人 OPN 的对照样品校准该测定。

[0209] 在鼠受试者的情况下, 应使用针对鼠血清 OPN 的单克隆抗体。根据生产商说明可以例如使用小鼠骨桥蛋白 ELISA Duoset 试剂盒 (R&D 系统公司 (R&D Systems), 目录号 DY441)。用处于从 31-1000pg/ml 的不同浓度的纯化重组鼠血清 OPN 的对照样品校准该测

定。

[0210] 所得的 OPN 在该肿瘤中的水平表示为纳克 OPN/ 微克该肿瘤样品中的总蛋白质。

[0211] 实例 4 :OPN 在血浆中浓度的确定

[0212] 这个实例说明了如何确定 OPN 在血浆中的浓度。

[0213] 样品制备:

[0214] 血浆是在 1.8mg Na-EDTA/mL 血液的存在下从采集自该受试者的血液制备的。

[0215] OPN 浓度的确定:

[0216] 通过 ELISA 使用针对重组 OPN 产生的单克隆抗体确定 OPN 浓度,该重组 OPN 对于取血样的受试者是天然的。

[0217] 在人类受试者的情况下,应使用针对人血清 OPN 的单克隆抗体。根据生产商说明可以例如使用测定设计试剂盒 (Assay Designs Kit) (恩佐生命科学 (Enzo Life Sciences), 目录号 ADI-900-142)。正常人类血浆中的 OPN 水平是从 14-45ng/ml 变化。用处于从 2-32ng/ml 的不同浓度的纯化重组人 OPN 的对照样品校准该测定。

[0218] 在鼠受试者的情况下,应使用针对鼠血清 OPN 的单克隆抗体。根据生产商说明可以例如使用小鼠骨桥蛋白 ELISA Duoset 试剂盒 (R&D 系统公司 (R&D Systems), 目录号 DY441)。用处于从 31-1000pg/ml 的不同浓度的纯化重组鼠血清 OPN 的对照样品校准该测定。

[0219] 所得的 OPN 在该血浆中的水平表示为纳克 OPN/ml 血浆。

[0220] 参考文献

[0221] 艾斯拉克森 (Aslakson) 1992 艾斯拉克森 (Aslakson), C. J., 和米列尔 (Miller), F. R. (1992), 由小鼠乳腺肿瘤亚种群的顺序传播分析定义的转移过程中的选择性事件 (Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor), 癌症研究 (Cancer Res) 52, 1399-1405。

[0222] 安博和 (Anborgh) 2009 安博和 (Anborgh), P. H., 威尔逊 (Wilson), S. M., 塔克 (Tuck), A. B., 温奎斯特 (Winqvist), E., 施密特 (Schmidt), N., 哈特 (Hart), R., 科恩 (Kon), S., 梅达 (Maeda), M., 尤伊德 (Uede), T., 斯蒂特 (Stitt), L. W. 等人 (2009), 新双单克隆 ELISA 测定血浆骨桥蛋白作为一种生物标志物与生存相关的前列腺癌:多个 ELISAs 临床验证和比较 (New dual monoclonal ELISA for measuring plasma osteopontin as a biomarker associated with survival in prostate cancer:clinical validation and comparison of multiple ELISAs), 临床化学 (Clin Chem) 55, 895-903。

[0223] 巴特勒 (Butler) 1996 巴特勒 (Butler) W T 等人 1996, 骨桥蛋白 (Osteopontin), 于比莱泽奇恩 (Bilezikian) J P, 拉伊 (Rai) L G, 罗丹 (Rodan) G A (编辑) 骨生物学原理 (Principles of bone biology), 学术出版社 (Academic Press), 圣地亚哥, 加利福尼亚州, 美国, 第 167-181 页。

[0224] 丹哈特 (Denhardt) 1995 丹哈特 (Denhardt) D T 等人 (编辑) 1995, 骨桥蛋白:在细胞发射信号和粘附中的作用 (Osteopontin:role in cell signaling and adhesion), 美国科学院年鉴 (Ann. N. Y. Acad. Sci.), 760

[0225] 冯 (Feng) 2000 冯 (Feng), F., 和瑞特林 (Rittling), S. R. (2000), MMTV-c-myc/

MMTV-v-Ha-ras 转基因小鼠中的乳腺肿瘤发展不受骨桥蛋白缺乏症影响 (Mammary tumor development in MMTV-c-myc/MMTV-v-Ha-ras transgenic mice is unaffected by osteopontin deficiency), 乳腺癌研究和治疗 (Breast Cancer Res. Treat.) 63, 71-79。

[0226] 弗兰岑 (Franzen) 1985 弗兰岑 (Franzen) A, 海德内格 (Heineg) 1985, 生物化学期刊 (Biochem. J.) 232:715-724

[0227] 莱勒卡切斯 (Lelekakis) 1999 莱勒卡切斯 (Lelekakis), M., 摩斯利 (Moseley), J. M., 马丁 (Martin), T. J., 哈兹 (Hards), D., 威廉姆斯 (Williams), E., 霍 (Ho), P., 洛温 (Lowen), D., 简维尼 (Javni), J., 米列尔 (Miller), F. R., 斯莱文 (Slavin), J. 等人 (1999), 一个新的乳腺癌转移至骨的原位模型 (A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone), 临床与实验转移 (ClinExpMetastasis) 17, 163-170。

[0228] 米 (Mi) 2004 米 (Mi), Z., 郭 (Guo), H., 和井 (Wai), P. Y., 高 (Gao), C., 魏 (Wei), J., 以及郭 (Kuo), P. C. (2004), 在鼠乳腺癌细胞的表型上不同的亚克隆介导转移行为中的差异性骨桥蛋白表达 (Differential osteopontin expression in phenotypically distinct subclones of murine breast cancer cells mediates metastatic behavior), 生物化学杂志 (J Biol Chem) 279, 46659-46667。

[0229] 纳尔逊 (Nelson) 2005 纳尔逊 (Nelson) 等人, 内科医学年鉴 (Annals of Internal Medicine), 第 143 卷, 第 5 期, 2005 年 9 月 6 日, 第 362-379 页

[0230] 瑞特林 (Rittling) 1997 瑞特林 (Rittling), S. R., 以及诺维克 (Novick), K. E. (1997), 在乳腺发育和肿瘤发生中的骨桥蛋白表达 (Osteopontin expression in mammary gland development and tumorigenesis), 细胞生长与分化 (Cell Growth and Differentiation) 8, 1061-1069。

[0231] 瑞特林 (Rittling) 2002 瑞特林 (Rittling), S. R., 陈 (Chen), Y., 冯 (Feng), F., 以及吴 (Wu), Y. (2002), 肿瘤衍生的骨桥蛋白是非基质相关地可溶的 (Tumor-derived osteopontin is soluble, not matrix associated), 生物化学期刊 (Journal of Biological Chemistry) 277, 9175-9182。

[0232] 森杰 (Senger) 1988 森杰 (Senger) D R 等人 1988, 肿瘤研究 (Cancer Res.) 48:5770-5774

[0233] 索伦森 (Sorensen) 1994 索伦森 (Sorensen) E S 等人 1994, 蛋白质科学 (Protein Sci.) 4:2040-2049

[0234] 特美克 (Tomayko) 1989 特美克 (Tomayko) 和雷诺兹 (Reynolds); 癌症化疗与药理学 (Cancer Chemotherapy and Pharmacology) (1989), 第 24 卷, 第 3 期, 第 148-154 页

[0235] 塔克 (Tuck) 1998 塔克 (Tuck), A. B., 奥马利 (O' Malley), F. P., 辛格尔 (Singhal), H., 哈里斯 (Harris), J. F., 童金 (Tonkin), K. S., 柯克弗利特 (Kerkvliet), N., 萨德 (Saad), Z., 多伊格 (Doig), G. S., 以及钱伯斯 (Chambers), A. F. (1998), 一组淋巴结阴性乳腺癌患者中的骨桥蛋白表达 (Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients), 国际癌症期刊 International Journal of Cancer) 79, 502-508。

[0236] 吴 (Wu) 2000 吴 (Wu), Y. 等人, 英国癌症期刊 (Br. J. Cancer) (2000) 83:156-163

[0001]

序列表

<110> 福赛斯儿童牙科医院 (d/b/a 福赛斯研究所 )  
阿拉食品公司

<120> 用于在抑制或预防肿瘤生长中使用的骨桥蛋白变体和包括这类骨桥蛋白变体的组合物

<130> P1326PC00

<160> 2

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 278

<212> PRT

<213> 家牛

<220>

<221> 来源

<222> 1..278

<223> /分子类型="蛋白质"  
/生物体="家牛"

<220>

<221> 基序

<222> 152..154

<223> RGD

<400> 1

```

Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Ala Ser Ala
1      5      10      15
Leu Pro Val Lys Pro Thr Ser Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu
20     25     30
Asn Asn Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Lys Pro Asp Pro
35     40     45
Ser Gln Lys Gln Thr Phe Leu Ala Pro Gln Asn Ser Val Ser Ser Glu
50     55     60
Glu Thr Asp Asp Asn Lys Gln Asn Thr Leu Pro Ser Lys Ser Asn Glu
65     70     75     80
Ser Pro Glu Gln Thr Asp Asp Leu Asp Asp Asp Asp Asn Ser Gln
85     90     95
Asp Val Asn Ser Asp Ser Asp Asp Ala Glu Thr Thr Asp Asp Pro
100    105    110
Asp His Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp Glu Ser Asp Glu Val Asp
115    120    125
Phe Pro Thr Asp Ile Pro Thr Ile Ala Val Phe Thr Pro Phe Ile Pro
130    135    140
Thr Glu Ser Ala Asn Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Ala Tyr Gly Leu
145    150    155    160
Lys Ser Arg Ser Lys Lys Phe Arg Arg Ser Asn Val Gln Ser Pro Asp
165    170    175
Ala Thr Glu Glu Asp Phe Thr Ser His Ile Glu Ser Glu Glu Met His
180    185    190
Asp Ala Pro Lys Lys Thr Ser Gln Leu Thr Asp His Ser Lys Glu Thr
195    200    205
Asn Ser Ser Glu Leu Ser Lys Glu Leu Thr Pro Lys Ala Lys Asp Lys
210    215    220
Asn Lys His Ser Asn Leu Ile Glu Ser Gln Glu Asn Ser Lys Leu Ser
225    230    235    240
Gln Glu Phe His Ser Leu Glu Asp Lys Leu Asp Leu Asp His Lys Ser
245    250    255
Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Ile Arg Ile Ser His Glu Leu Asp Ser
260    265    270
Ala Ser Ser Glu Val Asn
275

```

[0002]

<210> 2  
 <211> 314  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <220>  
 <221> 来源  
 <222> 1..314  
 <223> /分子类型="蛋白质"  
 /注释="人类 OPN"  
 /生物体="智人"

<400> 2  
 Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Thr Cys Ala  
 1 5 10 15  
 Ile Pro Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu  
 20 25 30  
 Tyr Asn Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Asn Pro Asp Pro  
 35 40 45  
 Ser Gln Lys Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Asn Ala Val Ser Ser Glu  
 50 55 60  
 Glu Thr Asn Asp Phe Lys Gln Glu Thr Leu Pro Ser Lys Ser Asn Glu  
 65 70 75 80  
 Ser His Asp His Met Asp Asp Met Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp His  
 85 90 95  
 Val Asp Ser Gln Asp Ser Ile Asp Ser Asn Asp Ser Asp Asp Val Asp  
 100 105 110  
 Asp Thr Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp Glu  
 115 120 125  
 Ser Asp Glu Leu Val Thr Asp Phe Pro Thr Asp Leu Pro Ala Thr Glu  
 130 135 140  
 Val Phe Thr Pro Val Val Pro Thr Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly  
 145 150 155 160  
 Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Lys Lys Phe Arg Arg  
 165 170 175  
 Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala Thr Asp Glu Asp Ile Thr Ser His  
 180 185 190  
 Met Glu Ser Glu Glu Leu Asn Gly Ala Tyr Lys Ala Ile Pro Val Ala  
 195 200 205  
 Gln Asp Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg Gly Lys Asp Ser  
 210 215 220  
 Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser His  
 225 230 235 240  
 Lys Gln Ser Arg Leu Tyr Lys Arg Lys Ala Asn Asp Glu Ser Asn Glu  
 245 250 255  
 His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Glu Leu Ser Lys Val Ser Arg Glu  
 260 265 270  
 Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu Asp Met Leu Val Val Asp  
 275 280 285  
 Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe Arg Ile Ser His  
 290 295 300  
 Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Val Asn  
 305 310

第0天开始OPN

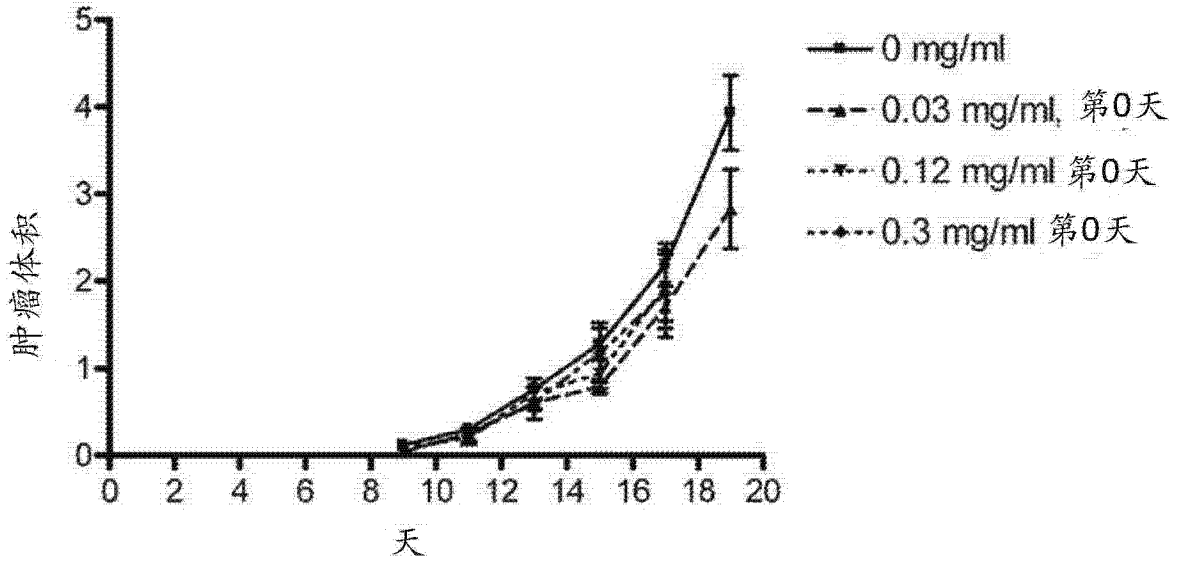


图 1a

第5天开始OPN

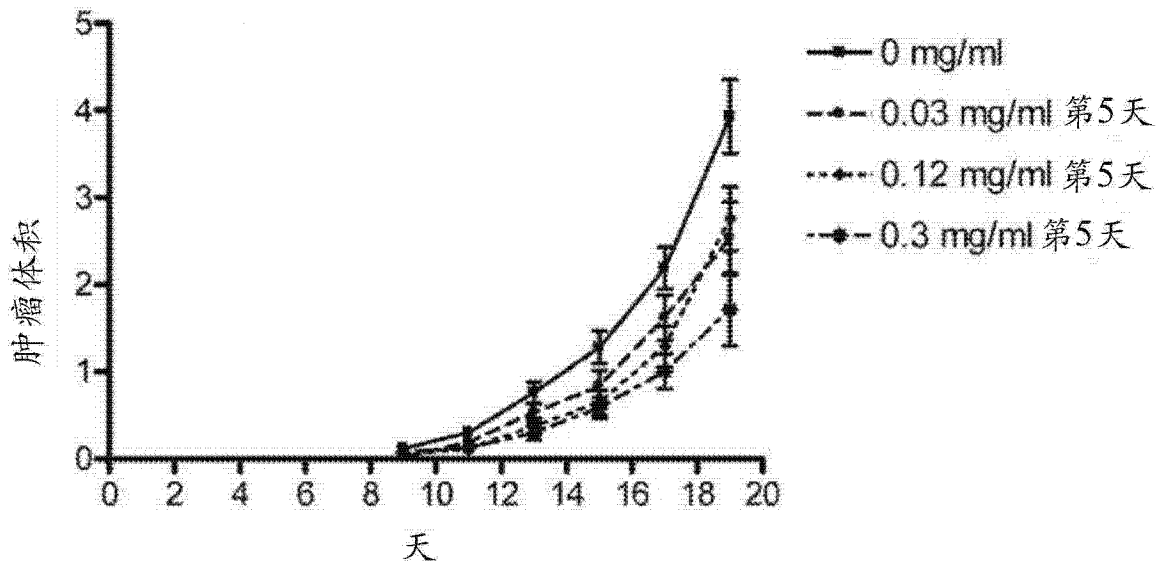


图 1b

第15天肿瘤体积

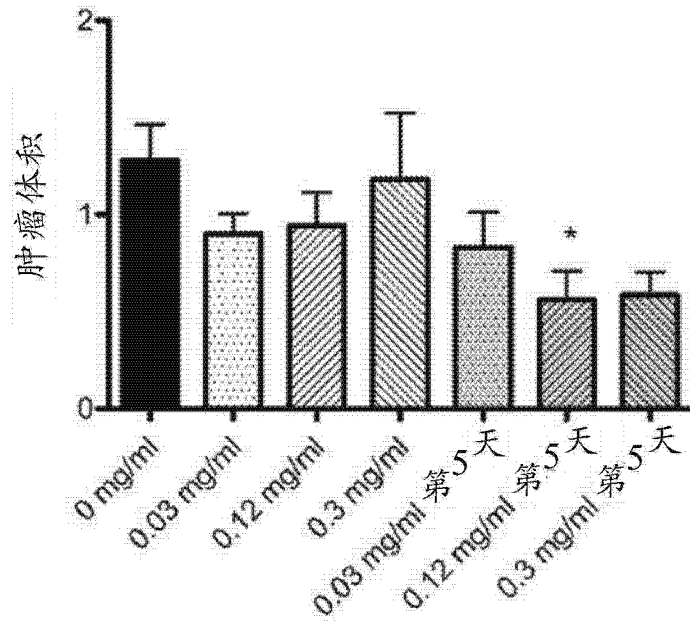


图 2a

第17天肿瘤体积

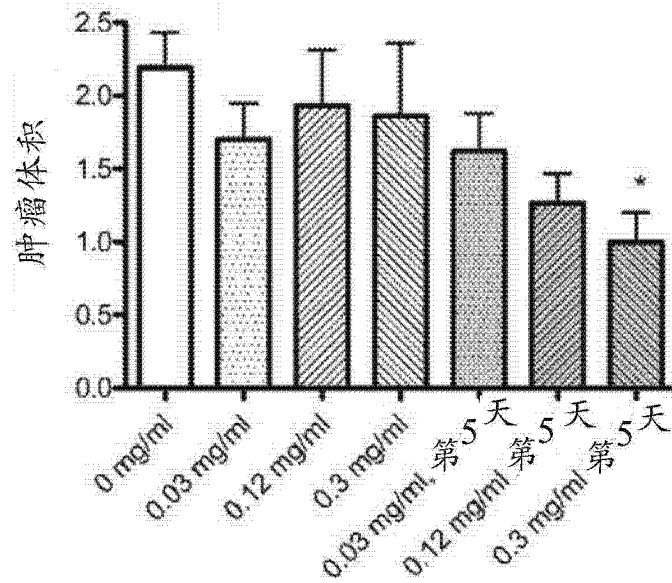


图 2b

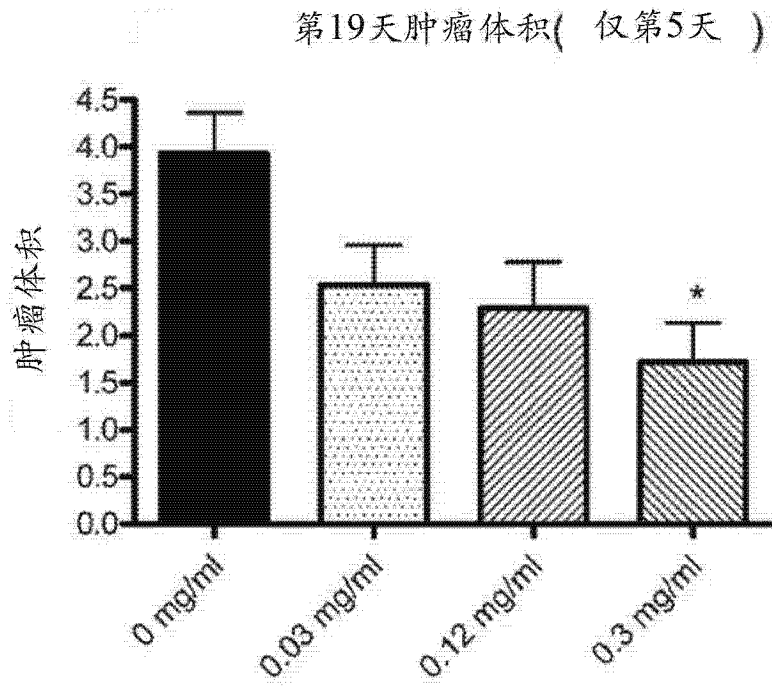


图 2c

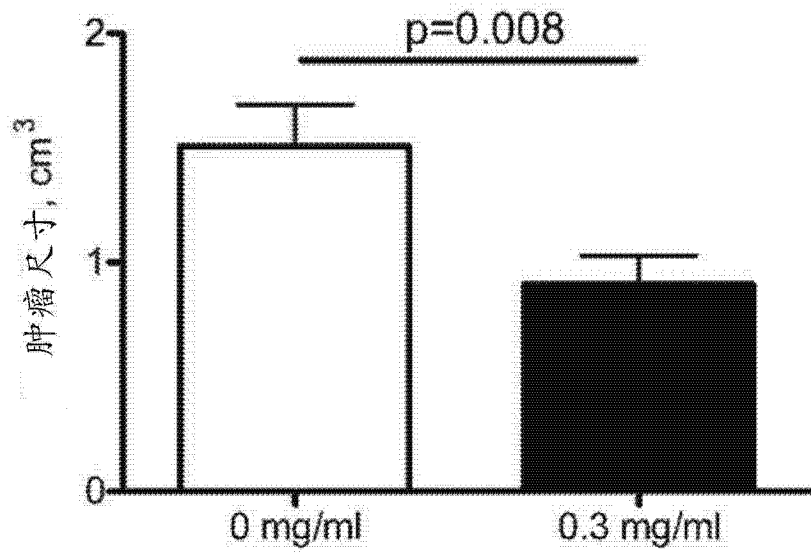


图 3