



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 105939724 B

(45)授权公告日 2020.01.14

(21)申请号 201480074295.5

(22)申请日 2014.12.04

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105939724 A

(43)申请公布日 2016.09.14

(30)优先权数据
61/912,156 2013.12.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.07.27

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2014/051058 2014.12.04

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/083167 EN 2015.06.11

(73)专利权人 免疫系统密钥有限公司
地址 以色列耶路撒冷

(72)发明人 Y·德瓦里 U·桑德勒

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270

代理人 康艳青 姚开丽

(51)Int.Cl.
A61K 38/10(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 35/04(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)

(56)对比文件
W0 2006046239 A3,2006.07.13,
W0 2007122622 A1,2007.11.01,
Uziel Sandler et al.NEROFE™ - A novel
human hormone-peptide with anti-cancer
activity.《Journal of Experimental
Therapeutics and Oncology》.2010,第327-339
页.

审查员 刘春杰

权利要求书1页 说明书21页
序列表3页 附图7页

(54)发明名称

用于治疗 and 预防转移癌的药物组合物和方
法

(57)摘要

本发明提供了可用于预防或治疗癌症转移
的分离的肽、其片段和衍生物以及包含其的药物
组合物。

1. 由氨基酸序列SEQ ID NO:4组成的分离的肽在制备用于预防或治疗癌症转移的药物组合物中的用途,其中所述癌症是转移癌,并且其中所述转移癌是胰腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、结肠腺癌、直肠腺癌、非小细胞肺癌、小肠癌、梭形细胞瘤或肝癌。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述药物组合物适用于与至少一种另外的抗癌治疗一起施用。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述至少一种另外的癌症治疗选自由以下各项组成的组:抗血管生成剂治疗、细胞毒性剂治疗、化疗剂治疗、激素治疗、放疗以及免疫治疗。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述药物组合物是通过选自由以下各项组成的组的途径来施用的:静脉内、腹膜内、肌内、皮下、经皮、局部、关节内、结膜下、口服、鼻内以及眼内。

5. 由氨基酸序列SEQ ID NO:4组成的分离的肽在制备用于减少癌细胞运动性的药物组合物中的用途,其中所述癌是转移癌,其中所述癌是胰腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、结肠腺癌、直肠腺癌、非小细胞肺癌、小肠癌、梭形细胞瘤或肝癌。

6. 由氨基酸序列SEQ ID NO:4组成的分离的肽在制备用于预防或抑制癌症患者的血管生成的药物组合物中的用途,其中所述癌症是胰腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、结肠腺癌、直肠腺癌、非小细胞肺癌、小肠癌、梭形细胞瘤或肝癌。

用于治疗 and 预防转移癌的药物组合物和方法

技术领域

[0001] 本公开大体上涉及转移癌治疗学。

现有技术

[0002] 被认为作为与本发明所公开的主题相关的背景技术的参考文献列于下文中：

[0003] [1]Fiorio Pla,A.和Gkika,D.2013Frontiers in Physiology 4(论文311):1-12。

[0004] [2]Benoist,S.等,2006J.Clinical Oncology 24(24):3939-3945。

[0005] [3]WO 2006/046239。

[0006] [4]WO 2007/122622。

[0007] [5]WO 2007/091240。

[0008] [6]WO 2008/075349。

[0009] [7]Diaz,V.M.等,2004GUT 53:993-1000。

[0010] [8]Kumar,S.等,2002The Journal of Biological Chemistry,第270卷(46):27905-27913。

[0011] [9]Gillibert-Duplantier,J.等,2012Oncogene 31:3516-3524。

[0012] 在本文对上述参考文献的承认不应当被推断为意味着这些参考文献以任何方式与本发明所公开的主题的可专利性有关。

[0013] 背景技术

[0014] 根据世界卫生组织(World Health Organization),在2008年在世界范围内有760万人死于癌症。公知的是,癌症是与可影响身体的任何部位的一大组疾病相关的通用术语。癌症的一个定义性特征是异常细胞的快速形成,这些细胞生长超越它们通常的边界,然后可能侵袭身体的邻近部位并且通过被称为转移的过程扩散到其它器官中。

[0015] 转移是癌症死亡的主要原因,并且依赖于两个关键的过程:癌细胞癌细胞侵袭到相邻组织中的细胞迁移,继而内渗到血管/淋巴管和肿瘤脉管系统中,这提供了进入血流的通道(1)。已知癌症转移是一个复杂的多步过程,所述过程使得癌症在整个身体内扩散并且有时需要与被选用于治疗原发癌的方法不同的治疗方法。

[0016] 举例来说,在作为最常见的癌症之一的结肠直肠癌中,约50%的结肠直肠癌患者在他们的疾病过程中的某一时刻产生肝脏转移(2)。作为手术切除肝脏转移的候选者的患者可以期望延长的生存期或甚至治愈。令人遗憾的是,只有10%至25%的患者是肝脏切除手术的候选者并且在有不可切除的转移的患者中,化疗是首选治疗。

[0017] 在癌症中对治疗的完全响应通常被定义为在成像时靶病灶的消失。然而,如由Benoist,S.等(2)所报道,在超过25%的病例中,在手术探查期间在基于成像被认为已经消失的肝脏转移的部位处发现肉眼可见的残留疾病。此外,在手术时没有明显疾病的患者中,在来自80%患者的最初肝脏转移的部位的所切除的样品中观测到细微的癌。最终,在没有更多的肿瘤被观测到并且完全响应部位被留在原处的患者中,在1年后在74%的病例中观

测到原位复发。

[0018] 这些数据证实了尽管在成像时所看到的完全响应可能是用于评价化疗的功效的有用的标准,但是它在大多数情况下并不意味着癌症的治愈。此外,虽然某些类型的转移癌是作为慢性疾病被治疗的,从而延长了患者的生命,但是许多类型的转移癌仍被认为是不能治愈的。

[0019] 人胸腺特有的cDNA编码的被称作“T101”的肽被鉴定出。这种肽特别参与到经由它作为免疫系统的刺激物的作用来治疗癌症(WO 2006/046239,3)。WO 2006/046239证实T101能够刺激免疫系统并且减小肿瘤尺寸,这表明所述肽影响了癌细胞的增殖。使用T101治疗癌症还在WO 2007/122622(4)中被提出,该文献特别证实了T101对各种类型的肿瘤发展的作用。肽T101还在WO 2007/091240(5)中被描述为与治疗免疫疾病有关,并且在WO 2008/075349(6)中被描述为与治疗或预防涉及具有T1/ST2受体的细胞的疾病有关。

发明内容

[0020] 通过本发明的各方面中的一个方面,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:3的分离的肽或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物,用于预防或治疗癌症转移的方法中。

[0021] 通过本发明的另外的方面,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:3的分离的肽或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物,用于在癌症患者中减少癌细胞运动性、预防或抑制血管生成、或者在癌症患者中降低血管内皮生长因子(VEGF)的水平的方法中。

[0022] 通过本发明的各方面中的又另一个方面,本发明提供了一种预防或治疗癌症转移的方法,所述方法包括向有需要的癌症患者施用药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的含有氨基酸序列SEQ ID NO:3的分离的肽或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物。

[0023] 在另外的方面,本发明提供了一种在癌症患者中减少癌细胞运动性、预防或抑制血管生成、或降低癌症患者的血清中VEGF的水平的方法,所述方法包括向被诊断为患有具有转移潜能的癌症的癌症患者施用药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的含有氨基酸序列SEQ ID NO:3的分离的肽或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物。

[0024] 在一些实施方案中,如本文所限定的分离的肽含有氨基酸序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2、或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物。

[0025] 在其它实施方案中,根据本发明的分离的肽由氨基酸序列SEQ ID NO:3组成。

[0026] 在另外的实施方案中,如本文所限定的分离的肽含有SEQ ID NO:3的修饰的氨基酸序列,其中一个或多个氨基酸残基通过保守替代被置换,与具有氨基酸序列SEQ ID NO:3的未修饰的肽相比,所述保守替代没有显著影响修饰的肽的生物学特征。

[0027] 在具体实施方案中,如本文所限定的分离的肽含有SEQ ID NO:3的修饰的氨基酸序列,其中一个或多个氨基酸残基被相应的D-氨基酸残基置换。

[0028] 在另外的具体实施方案中,根据本发明的分离的肽含有氨基酸序列SEQ ID NO:4。

[0029] 在再另外的实施方案中,如本文所限定的分离的肽由氨基酸序列SEQ ID NO:4组成。

[0030] 在上述和其它实施方案中,本发明涉及一种癌症,所述癌症是转移癌。

[0031] 在一些实施方案中,所述转移癌选自由以下各项组成的组:胰腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、结肠腺癌、直肠腺癌、乳腺癌、皮肤癌、肺癌、非小细胞肺癌、肾癌、多发性骨髓瘤、甲状腺癌、前列腺癌、腺癌、头颈部癌、胃肠道癌、胃癌、小肠癌、梭形细胞瘤、肝癌 (hepatic carcinoma)、肝脏癌 (liver cancer) 以及女性生殖道的恶性肿瘤。

[0032] 在另外的实施方案中,根据本发明的供使用的药物组合物适用于与至少一种另外的抗癌治疗一起施用。在一些实施方案中,根据本发明的预防或治疗癌症转移的方法进一步包括向所述癌症患者施用至少一种另外的抗癌治疗。

[0033] 在其它实施方案中,如本文所限定的至少一种另外的癌症治疗选自由以下各项组成的组:抗血管生成剂、细胞毒性剂、化疗剂、激素治疗、放疗以及免疫治疗。

[0034] 在另外的其它实施方案中,根据本发明的供使用的药物组合物和方法如下,其中所述施用是通过选自由以下各项组成的组的途径实现的:静脉内、腹膜内、肌内、皮下、经皮、局部、关节内、结膜下、口服、鼻内以及眼内。

附图说明

[0035] 为了更好地理解本文所公开的主题以及为了举例说明如何可以在实践中实施所述主题,现将仅通过非限制性实例的方式并参考附图来描述实施方案,其中:

[0036] 图1:在BrdU掺入测定中所测定的Nerofe肽 (1 μ g/ml-50 μ g/ml) 对人类腺癌胰腺癌细胞增殖的作用的图表表示(上线)。下部条形图示出了Nerofe肽 (1 μ g/ml-50 μ g/ml) 对人类腺癌胰腺癌细胞向细胞培养基中分泌组织纤溶酶原激活物 (TPA) 的能力的作用。缩写:TPA:组织纤溶酶原激活物;BrdU:溴脱氧尿苷;以及细胞系1、细胞系2和细胞系3:人类腺癌胰腺癌细胞。

[0037] 图2:是在BrdU掺入测定中所测定的Nerofe肽 (1 μ g/ml-50 μ g/ml) 对人类腺癌胰腺癌细胞增殖的作用的图表表示(上线)。下部条形图示出了Nerofe肽 (1 μ g/ml-50 μ g/ml) 对人类腺癌胰腺癌细胞的sST2分泌的作用。缩写:sST2:可溶性ST2;BrdU:溴脱氧尿苷;以及细胞系1、细胞系2和细胞系3:人类腺癌胰腺癌细胞。

[0038] 图3A-图3D:是在细胞迁移测定开始时 (图3A和图3B) 以及在开始迁移测定后的27小时之时 (图3C和图3D) 所拍摄的人类腺癌胰腺癌细胞的显微照片。在开始测定前将细胞在25 μ g/ml的Nerofe肽存在下 (图3B和图3D) 或在不存在所述肽的情况下 (图3A和图3C) 孵育48小时。

[0039] 图4:是条形图,所述条形图示出了使用人类腺癌胰腺癌细胞进行的细胞迁移测定中无细胞面积百分比,在开始所述细胞迁移测定前将所述细胞在25 μ g/ml的Nerofe肽存在下孵育48小时。进行两次独立的测定 (T1和T2)。用于四次独立测定中的对照细胞由CON1、CON1、CON3以及CON4指示。无细胞面积百分比是通过用在开始实验后的27小时之时所获得的无细胞面积除以在开始实验后的1小时之时所获得的无细胞面积来计算的。

[0040] 图5:接受了6mg/m² (每公斤体重0.16mg,虚线) 或12mg/m² (每公斤体重0.32mg,实线) 的肽Nerofe施用的患者在所示的时间点的血清VEGF水平的图表表示。缩写:pt002、pt004、pt007、pt011:患有结肠癌的患者;pt005:患有结肠直肠癌的患者;以及pt006:具有梭形细胞瘤癌症的患者。

[0041] 图6:接受了 $24\text{mg}/\text{m}^2$ (每公斤体重 0.64mg ,虚线) 或 $48\text{mg}/\text{m}^2$ (每公斤体重 1.28mg ,实线) 的肽Nerofe施用的患者在所示的时间点的血清VEGF水平的图表表示。缩写:pt012:患有胰腺癌的患者;pt013:患有小肠癌的患者;pt015:患有非小细胞肺癌的患者;pt016:患有肝癌的患者;pt017:患有结肠腺癌的患者;以及pt019:患有直肠腺癌的患者。

具体实施方式

[0042] 本发明是基于以下的观测结果:具有氨基酸序列Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys的其中全部氨基酸残基呈其D构型的肽在本文被称作“Nerofe”,该肽减少了癌细胞的已知与癌症转移有关的蛋白质(即组织纤溶酶原激活物(TPA)和可溶性ST2(sST2))的分泌。这种肽被证实在体外直接抑制癌细胞的迁移。此外,所述肽被证实降低了癌症患者的血管内皮生长因子(VEGF)的血清水平。

[0043] 基于在暴露于Nerofe肽后癌细胞的TPA和sST2的分泌减少、所述肽在体外对癌细胞的迁移能力的直接作用、以及基于在癌症患者中所观测到的Nerofe肽对VEGF的血清水平的作用,本发明提供了Nerofe肽抑制癌症转移的方法和用途。

[0044] 因此,在本发明的各个方面之一方面,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:3的分离的肽、或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物,用于预防或治疗癌症转移的方法中。

[0045] 如本文所定义的术语“肽”指的是氨基酸残基的分子链,如果需要的话,该分子链可以在它的氨基酸残基中的每一个处被修饰,例如通过甘露糖基化(manosylation)、糖基化、酰胺化(例如C末端酰胺)、羧化或磷酸化而被修饰。所述肽可以通过合成、经由遗传工程化方法、在宿主细胞中表达、或经由任何其它合适的手段而获得。用于产生肽的方法是本领域公知的。

[0046] 术语“分离”指的是诸如氨基酸序列或肽的分子从它们的自然环境中被取出、分离或分开。

[0047] 如本文所用的术语“氨基酸”指的是天然存在的氨基酸残基和合成氨基酸残基、以及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些、以及随后被修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、以及O-磷酸丝氨酸。

[0048] 术语氨基酸还涵盖了D-氨基酸,它们是L-氨基酸的镜像,其中在碳 α 处手性已经反转。D-氨基酸对蛋白酶介导的降解具有高度的抗性并且具有低免疫原性反应。

[0049] 术语“氨基酸序列”或“肽序列”还涉及其中由肽键连接的氨基酸残基位于肽和蛋白质中的链中的顺序。序列一般是从含有游离氨基的N末端向含有游离羧基的C末端报道的。

[0050] 如下文所举例说明,在本文被称作“Nerofe”的肽具有序列Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys,其中全部氨基酸残基呈其D构型(由SEQ ID NO:4表示),该肽被证实减少了癌细胞的TPA和sST2的分泌并且直接抑制癌细胞的迁移,这表明了它在抑制癌症转移方面的潜能。

[0051] 具有氨基酸序列Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys、其中全部氨基酸残基均为L型氨基酸残基的肽(在本文由SEQ ID NO:3表示)是W0

2006/046239 (3) 中所述的被称作“完整T101肽”的肽的C末端片段。

[0052] 完整T101肽是具有84个氨基酸的长度的序列,在本文由SEQ ID NO:1表示。它的N末端的33个氨基酸的信号肽的缺失产生了在本文由SEQ ID NO:2表示并且被称作“T101肽”的肽片段。T101肽具有51个氨基酸的长度。氨基酸序列SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2以及SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4详述于下表1中。

[0053]

SEQ ID NO.	序列	说明
1	MMALRSQGLMLPQSCPQLAF LTL SALAAVSFSALHLWLSG EPVQSSGTKDMRSKSDSKRV SDKQLISKAVWWTFFLPSTL WERK	全长胸腺肽, 也被称作“完整T101肽”。
2	LHLWLSGEPVQSSGTKDMRS KSDSKRVSDKQLISKAVWWT FFLPSTLWERK	缺少N末端33个氨基酸的全长胸腺肽, 也被称作“T101肽”。
3	WWTFFLPSTLWERK(全部均呈L型)	“完整T101肽”(或“T101肽”)的C末端的14个氨基酸的片段。
4	WWTFFLPSTLWERK(全部均呈D型)	“完整T101肽”(或“T101肽”)的C末端的14个全部呈D型的氨基酸的片段。

[0054] 表1:肽的氨基酸序列

[0055] 根据本发明的分离的肽至少包含在本文被称作“完整T101肽”的肽的连续C末端片段,例如但不限于由SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列,该氨基酸序列是完整T101肽的C末端的14个氨基酸残基的片段。

[0056] 在一些实施方案中,根据本发明的分离的肽包含完整T101肽的连续C末端片段,所述片段包含来自完整T101肽(由SEQ ID NO:1表示)的C末端的至少10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个或84个氨基酸残基。

[0057] 特别地说,根据本发明的术语“分离的肽”指的是包含由SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列的分离的肽、或所述分离的肽的任何功能片段和衍生物。在一些实施方案中,根据本发明的分离的肽是如下文所定义完整T101肽(具有SEQ ID NO:1)或所述分离的肽的任何

功能片段和衍生物。在其它实施方案中,根据本发明的分离的肽是缺少N末端33个氨基酸的胸腺肽T101(具有SEQ ID NO:2)或所述分离的肽的任何功能片段和衍生物。

[0058] 术语“包含/含有”意指根据本发明的分离的肽不仅包含由SEQ ID NO:3或SEQ ID NO 4表示的肽,还可以在由SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4表示的肽的N末端或C末端处包含另外的氨基酸残基,例如但不限于根据本发明的分离的肽可以包含由SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2表示的序列,如下文所详述。

[0059] 因此,在一些实施方案中,根据本发明的供使用的药物组合物涉及一种含有有如由SEQ ID NO:3所表示的氨基酸序列Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys的分离的肽、或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物。

[0060] 在其它实施方案中,根据本发明的供使用的药物组合物是其中所述分离的肽含有氨基酸序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2、或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物。

[0061] 在另外的实施方案中,根据本发明的供使用的药物组合物是其中所述分离的肽由氨基酸序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物组成。

[0062] 在再另外的实施方案中,根据本发明的供使用的药物组合物是其中所述分离的肽由氨基酸序列SEQ ID NO:3组成。

[0063] 如本文所限定的分离的肽的衍生物和修饰的肽也由本发明所涵盖。术语“修饰”、“衍生物”或“分离的肽的衍生物”意指包括如下的肽,所述肽在整体序列中有一个或多个氨基酸不同,即,具有缺失、替代(例如至少一个氨基酸通过保守替代被另一个氨基酸置换)、倒位或添加。这个术语还涵盖了整体序列中的至少一个氨基酸残基被它的对应的D型氨基酸残基置换。

[0064] 举例来说,肽Nerofe(由SEQ ID NO:4表示)具有氨基酸序列SEQ ID NO:3,其中所有的氨基酸残基已经被它们相应的D型氨基酸置换。

[0065] 氨基酸“替代”是将一个氨基酸置换为具有相似的结构和/或化学特性的另一个氨基酸即保守氨基酸置换的结果。氨基酸替代可以基于所涉及的残基在极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性、和/或两亲性质上的相似性来进行。举例来说,以下八组中的每一组含有对于彼此来说是保守替代的氨基酸:

[0066] 1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);

[0067] 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0068] 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0069] 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0070] 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);

[0071] 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);

[0072] 7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);以及

[0073] 8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。

[0074] 如本文所限定的肽的片段也包括在本发明中。术语“片段”指的是比根据本发明的分离的肽短至少一个氨基酸的任何肽,通过使至少一个氨基酸残基从根据本发明的肽中缺失而获得。

[0075] 确切地说,根据本发明的包含完整T101肽(由SEQ ID NO:1表示)的分离的肽的片段可以是来自完整T101肽的C末端的至少约10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、

18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个或84个氨基酸残基的片段。

[0076] 本发明所包括的分离的肽的具体的修饰的肽是包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3以及SEQ ID NO:4的修饰的氨基酸序列的分离的肽,其中一个或多个氨基酸残基通过保守替代被置换,分别与具有氨基酸序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3以及SEQ ID NO:4的未修饰的肽相比,所述保守替换没有显著影响修饰的肽的生物学特征。

[0077] 在一些实施方案中,SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3以及SEQ ID NO:4的修饰的氨基酸序列分别与相应序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3以及SEQ ID NO:4具有至少70%、优选地80%、更优选地90%、特别是100%的同一性。

[0078] 根据本发明的肽衍生物还涵盖了包含氨基酸序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的任何融合蛋白或缀合物,以及经由残基中的至少一个与另外的药剂(例如稳定剂、抗血管生成剂、细胞毒性剂等)偶联的如本文所限定的任何分离的肽。

[0079] 修饰的片段也由本发明所囊括。举例来说,修饰的片段可以是如下的肽,所述肽包含来自完整T101肽的C末端的至少10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个或至少80个氨基酸残基的连续序列,所述连续序列与完整T101肽中所包含的至少10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个或至少80个氨基酸残基的相应序列具有至少70%、优选地至少80%、更优选地至少90%并且特别是至少100%的同一性程度。

[0080] 应当了解的是,这些肽片段或衍生物不得改变原始肽的生物活性。术语“功能”或“与未修饰的肽相比没有显著影响修饰的肽的生物学特征”意在表示所述修饰的肽保留了从定性上与所述未修饰的肽类似的生物活性。

[0081] 术语“生物学特征”在涉及本发明的分离的肽时涵盖了抑制癌细胞迁移、降低组织型纤溶酶原激活物(TPA)的分泌水平、降低癌细胞中可溶性ST2的分泌水平以及降低VEGF的分泌水平。

[0082] 为了确定某个肽是否保留了它的从性质上类似于未修饰的肽的生物学特征,可以进行一种或多种测定,例如像其中将修饰的肽与被并行测定的相应的未修饰的肽相比较的体外实验、体内实验或临床实验;或其中对修饰的肽进行测定以研究它是否具有与未修饰的肽的生物效应类似的生物效应(如通过单独进行的实验所获知)的实验。可以例如以下文实施例中所述的方式进行这样的实验。

[0083] 在一些具体的实施方案中,本发明涉及功能片段、衍生物或修饰的肽,其中所述功能片段、衍生物或修饰的肽具有如下的氨基酸序列,所述氨基酸序列与本发明的未修饰的分离的肽的氨基酸序列即与由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列之一至少70%、优选地至少80%、更优选地至少90%并且特别是至少95%同一。

[0084] 在其它实施方案中,根据本发明的供使用的药物组合物是其中所述分离的肽包含其中一个或多个氨基酸残基通过保守替代被置换的SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的修饰的

氨基酸序列,分别与具有氨基酸序列SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的未修饰的肽相比,所述保守替代没有显著影响所述修饰的肽的生物学特征。

[0085] 在另外的实施方案中,根据本发明的供使用的药物组合物是其中所述分离的肽包含其中一个或多个氨基酸残基通过保守替代被置换的SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的修饰的氨基酸序列,分别与具有氨基酸序列SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的未修饰的肽相比,所述保守替代没有显著影响所述修饰的肽的生物学特征,其中所述修饰的氨基酸序列分别与具有氨基酸序列SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的未修饰的肽的氨基酸序列至少70%、优选地至少80%、更优选地至少90%并且特别是至少95%同一。

[0086] 在再另外的实施方案中,根据本发明的供使用的药物组合物是其中所述分离的肽包含其中一个或多个氨基酸残基被相应的D-氨基酸残基置换的SEQ ID NO:3的修饰的氨基酸序列。

[0087] 在再另外的实施方案中,根据本发明的供使用的药物组合物是其中所述分离的肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:4。

[0088] 在又另外的实施方案中,根据本发明的供使用的药物组合物是其中所述分离的肽由氨基酸序列SEQ ID NO:4组成。

[0089] 如下文所举例说明,在本文被称作“Nerofe”的肽被证实直接抑制胰腺癌细胞和乳腺癌细胞的细胞运动性或迁移。癌细胞从它们的原始位点迁移到体内不同的位置的能力是癌症转移中的基本步骤之一。

[0090] 如本文所定义的术语“癌症转移”指的是癌症从其最初产生的位置扩散或迁移到体内另一位置或部位的过程。术语癌症转移还指由转移癌细胞在与所述转移癌细胞的原始位点不同的位置处形成的肿瘤。由转移癌细胞形成的肿瘤也被称作转移性肿瘤。

[0091] 癌细胞转移通常包括以下步骤:癌细胞向邻近正常组织的局部侵袭;内渗,借此癌细胞侵袭并且移动穿过邻近的淋巴管壁或血管壁;癌细胞经由淋巴系统和血流循环到身体其它部位;停滞和外渗,借此癌细胞停滞在远端位置处的小血管中,然后侵袭毛细血管壁并且迁移到周围组织中(外渗);癌细胞在远端位置处增殖以形成被称为微转移的小肿瘤;以及血管生成,微转移刺激新血管生长以获得血液供应。癌症转移的最常见的部位是骨、肝脏、肺以及脑。

[0092] 本发明涵盖了可以形成转移或二次生长的任何癌症疾病。

[0093] 预测哪些类型的癌症最终将产生转移可以由熟练的医师(例如专攻肿瘤学的医师)进行。癌症的转移潜能的预测特别是基于癌症的总体阶段,包括尺寸、深度、以及淋巴结是否被累及。其它指标可以是肿瘤分级以及基因和蛋白质测试。

[0094] 鉴定或诊断癌症转移可以由熟练的医师、例如通过密切注意诸如骨痛、持续咳嗽、以及头痛等可能是转移癌的体征的症状的出现来进行。此外,转移癌可以通过常规的扫描如血液检查、成像(例如X射线、正电子发射断层摄影术以及计算机断层摄影术(PET/CT)、磁共振成像(MRI)、骨扫描、MRI以及CT)以及通常进行以确认疑似诊断的活检来检测。

[0095] 因此,在一些实施方案中,本发明涉及一种癌症,所述癌症被分类为“转移癌”,即本领域已知具有转移潜能的任何癌症类型。

[0096] 因此,在上述和其它实施方案中,由本发明所涵盖的癌症是转移癌。

[0097] 在具体的实施方案中,如本文所限定的转移癌选自由以下各项组成的组:胰腺癌、

结肠癌、结肠直肠癌、结肠腺癌、直肠腺癌、乳腺癌、皮肤癌、肺癌、非小细胞肺癌、肾癌、多发性骨髓瘤、甲状腺癌、前列腺癌、腺癌、头颈部癌、胃肠道癌、胃癌、小肠癌、梭形细胞瘤、肝癌 (hepatic carcinoma)、肝脏癌 (liver cancer) 以及女性生殖道的恶性肿瘤。

[0098] 如所附实施例中所示,在以 $24\text{mg}/\text{m}^2$ 或 $48\text{mg}/\text{m}^2$ (以体表面积单位给出并且分别转换成每公斤体重约 0.64mg 或约 1.28mg) 的剂量向癌症患者施用肽Nerofe时,VEGF的血清水平降低了约30%-40%。VEGF的血清水平的降低对于患有小肠和直肠腺癌的癌症患者来说是特别有意义的。

[0099] 如本领域已知的是,血管内皮生长因子 (VEGF) 是由刺激血管发生和血管生成的细胞产生的信号蛋白。VEGF的正常功能是在胚胎发育期间形成新的血管、在损伤后形成新的血管、在运动后形成肌肉、以及形成新的血管以绕过阻塞的血管。已知的是,VEGF的过表达可以导致疾病。由于实体癌症在没有充足的血液供应的情况下不能生长超出有限的尺寸,因此可以表达VEGF的癌症才能够生长和转移。

[0100] 所观测到的由于向癌症患者施用肽Nerofe而引起的VEGF血清水平的降低是Nerofe肽的明确的抗血管生成作用。

[0101] 因此,通过本发明的各个方面中的另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含如本文所限定的分离的肽,用于预防或抑制癌症患者的血管生成的方法中。

[0102] 在一个具体的实施方案中,所述血管生成是肿瘤相关的血管生成。在另一个具体的实施方案中,所述血管生成与VEGF有关。

[0103] 在具体的实施方案中,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的分离的肽或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物,用于预防或抑制血管生成的方法中。

[0104] 在另外的具体的实施方案中,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含由氨基酸序列SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4组成的分离的肽或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物,用于预防或抑制血管生成的方法中。

[0105] 如本领域已知的是,术语“血管生成”指的是新血管形成的过程并且涉及各种生理过程以及病理过程,包括伤口修复、繁殖、对缺血的响应、关节炎、银屑病、视网膜病、实体肿瘤生长以及转移性肿瘤扩散。血管生成是一个高度受控的过程,它依赖于促进因子和抑制因子这两者的复杂的平衡。

[0106] 术语“预防或抑制血管生成”意指血管生成至少约1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或约100%的任何限制、延缓、减轻、减少或减弱。

[0107] 术语预防或抑制血管生成还意指预防或抑制任何新血管形成,包括但不限于抑制血管发生 (内皮细胞由中胚层细胞前体的从头形成)。

[0108] 如本文所限定的分离的肽对血管生成的作用可以通过本领域已知的任何方法来监测,例如通过成像或通过监测与血管生成相关的生理标志物 (例如血管内皮生长因子)。

[0109] 如本领域已知和如上文所示的那样,血管内皮生长因子 (VEGF) 是刺激包括内皮细胞迁移、管形成和增殖的促血管生成特性的促有丝分裂因子。认识到VEGF是病理状态下血管生成的主要刺激物已经促使各种尝试以阻断VEGF活性。

[0110] 不希望受理论所束缚,如图6中所示,所观测到的由于向癌症患者施用肽Nerofe所引起的VEGF血清水平的降低表明了Nerofe肽的抗血管生成作用。

[0111] 因此,在本发明的各个方面中的又一个方面,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含如本文所限定的分离的肽,用于降低癌症患者的VEGF水平的方法中。

[0112] 可以使用本领域已知的任何方法对接受如本文所限定的分离的肽施用的癌症患者的VEGF水平进行测量,例如通过在用如本文所限定的分离的肽开始治疗之前以及在治疗期间和之后的多个时间点从所述患者获得生物样品(例如血液)来测量。可以遵循本领域公知的程序来测定这些生物样品中VEGF的水平。

[0113] 当在用如本文所限定的分离的肽开始治疗后从癌症患者获得的一个或多个生物样品中VEGF的血清水平低于在开始治疗之前从癌症患者获得的一个或多个生物样品中VEGF的血清水平时,观测到VEGF水平的降低。

[0114] 接受如本文所限定的分离的肽施用的癌症患者的血液中VEGF的血清水平的任何降低均由本发明所涵盖。在具体的实施方案中,VEGF的血清水平可以降低至少约1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或约100%。

[0115] 在具体的实施方案中,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的分离的肽或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物,用于降低VEGF水平的方法中。

[0116] 在具体的实施方案中,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含由氨基酸序列SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4组成的分离的肽或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物,用于降低VEGF水平的方法中。

[0117] 在另外的实施方案中,本发明涉及一种转移癌,所述转移癌与VEGF的过表达有关。举例来说,如本文所限定的转移癌可以是但不限于胰腺癌、小肠癌、直肠腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、梭形细胞瘤、非小细胞肺癌、肝癌以及直肠腺癌。

[0118] 在另外的具体实施方案中,本发明涉及一种转移癌,所述转移癌是胰腺癌、乳腺癌、小肠癌或直肠腺癌。

[0119] 如本领域已知的是,如本文所定义的术语“胰腺癌”指的是构成胰腺(位于胃后面的腺器官)的细胞不受控制的生长。这些癌细胞具有侵袭或扩散到身体其它部位的能力。存在许多不同类型的胰腺癌,但是胰腺腺癌占病例的约85%。

[0120] 如本文所定义以及如本领域已知的术语“乳腺癌”指的是在乳房组织中形成的癌症。乳腺癌的最常见的类型是导管癌,它起始于输乳管的内层。乳腺癌的另一种类型是小叶癌,它起始于乳房的小叶(乳腺)。侵袭性乳腺癌是如下的乳腺癌,所述乳腺癌已经从它在乳腺导管或小叶中起始之处扩散到周围正常的组织。

[0121] 如本领域已知的是,术语“小肠癌”是一种罕见的疾病,其中恶性癌细胞在小肠的组织中形成。

[0122] 术语“直肠腺癌”指的是癌细胞在直肠组织中形成的疾病。腺癌占结肠癌和直肠癌的绝大多数(98%)并且较罕见的直肠癌包括淋巴瘤(1.3%)、类癌(0.4%)、以及肉瘤(0.3%)。

[0123] 在另外的具体实施方案中,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含

含有氨基酸序列SEQ ID NO:4的分离的肽、或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物,用于预防或治疗胰腺癌或乳腺癌转移的方法中。

[0124] 在再另外的具体实施方案中,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含由氨基酸序列SEQ ID NO:4组成的分离的肽、或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物,用于预防或治疗胰腺癌转移的方法中。

[0125] 用于根据本发明的方法使用的药物组合物的预期用途是预防或治疗有需要的受试者的癌症转移。

[0126] 因此,在一些实施方案中,用于根据本发明的方法使用的药物组合物旨在预防被诊断为患有癌症的患者形成癌症转移。在这些情况下,本发明的药物组合物本身可以被施用或与作为“预防”计划或辅助计划的其它抗癌剂组合施用,所述“预防”计划或辅助计划待与施用于被诊断为患有癌症的个体施用的主要治疗一起施用。所述主要治疗可以是例如手术和/或化疗。

[0127] 术语“辅助治疗”指的是除了初级、主要或初步治疗之外所给予的治疗。当前已知的向癌症患者施用的辅助治疗的一些非限制性实例是化疗、激素治疗、生物治疗、放疗、或其组合,这取决于癌症的类型。辅助治疗被设计成降低未来转移的风险,但是并不保证不复发。

[0128] 因此,在一些实施方案中,根据本发明的供使用的药物组合物是其中所述药物组合物适用于与至少一种另外的抗癌治疗一起施用。

[0129] 即,在本发明的各个方面之一方面,本发明提供了用于治疗被诊断为患有癌症的受试者(癌症患者)的方法和药物组合物,所述方法和药物组合物任选地与初级、主要或初步治疗组合,以预防癌症转移的产生。

[0130] 根据本发明的药物组合物的施用可以在至少一种另外的抗癌治疗的施用之前、同时或之后进行。

[0131] 如本文所定义的术语“至少一种另外的抗癌治疗”指的是本领域已知的任何抗癌治疗,例如但不限于抗血管生成剂、细胞毒性剂、化疗剂(例如烷化剂、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂以及细胞毒性抗生素)、激素治疗(例如用于治疗乳腺癌的他莫昔芬(Tamoxifen))、放疗以及免疫治疗(例如基于细胞的治疗、抗体治疗或细胞因子治疗)。

[0132] 如本文所定义的术语“抗血管生成剂”指的是抑制新血管生长(血管生成)的物质。抑制血管生成的药剂的一些非限制性实例是减少促血管生成因子的产生的药剂以及VEGF通路的抑制剂等等。VEGF通路抑制剂可以是例如酪氨酸激酶抑制剂以及针对VEGF或VEGFR的抗体,如与VEGF结合并且抑制它与VEGF受体结合的贝伐单抗(Bevacizumab)(阿瓦斯汀(Avastin))。

[0133] 因此,在上述和其它实施方案中,所述至少一种另外的癌症治疗选自以下各项组成的组:抗血管生成剂、细胞毒性剂、化疗剂、激素治疗、放疗以及免疫治疗。

[0134] 如本文所定义的术语“预防”意指对被诊断为患有癌症的个体(癌症患者)的癌症转移的形成的任何限制、延缓、减轻、减少、阻止、抑制、阻碍或压制,其中所述癌症可以任选地被诊断为转移癌。

[0135] 如本文所定义的术语预防意指被诊断为患有癌症的个体的癌症转移的形成至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、

80%、85%、90%、95%、或约100%的任何限制、延缓、减轻、减少、阻止、抑制、阻碍或压制。

[0136] 本发明还提供了如本文所限定的用于治疗癌症转移的方法中的药物组合物。换句话说,根据本发明的方法还可以用于“治疗癌症转移”,这在本文被定义为在癌症患者中诊断出癌症转移后防止转移癌细胞的继续或进一步扩散。

[0137] 如本文所定义的术语“癌症患者”或“有需要的癌症患者”因此指的是被诊断为患有癌症特别是转移癌的温血动物,特别是人类。术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”或其各种形式意指预防、抑制、阻止或缓解患者的疾病或病况。

[0138] 对癌症转移形成的阻止、抑制、阻碍或压制的水平可以通过在本发明的分离的肽存在下进行合适的测定以实验方式来评价,如本领域已知的那样。对癌症转移形成的阻止、抑制、阻碍或压制的水平的临床评价可以由熟练的医师来进行,例如如上文所述。

[0139] 所述药物组合物或根据本发明的供使用的药物组合物可以根据良好医疗实践来施用和给予,例如通过肠胃外、静脉内、腹膜内或肌内注射全身给药。在另一个实施例中,所述药物组合物可以通过任何合适的途径被引入到部位中,所述途径包括静脉内、皮下、经皮、局部、肌内、关节内、结膜下、或粘膜,例如口服、鼻内、或眼内施用。

[0140] 在一些实施方案中,根据本发明的施用是通过选自以下各项组成的组的途径实现的:静脉内、腹膜内、肌内、皮下、经皮、局部、关节内、结膜下、口服、鼻内以及眼内。

[0141] 如下文所举例说明,肽“Nerofe”被证实直接抑制了胰腺癌细胞的细胞运动性。

[0142] 因此,在本发明的各个方面中的另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:3的分离的肽、或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物,用于减少癌细胞运动性的方法中。

[0143] 在一些实施方案中,如本文所限定的药物组合物用于减少被诊断为患有具有转移潜能的癌症的癌症患者的癌细胞运动性的方法中。

[0144] 术语“减少癌细胞运动性”意指对癌细胞从它们的位置进行迁移的能力的任何部分或完全抑制、减弱或降低。可以通过本领域已知的任何方法,例如通过下文所举例说明的细胞迁移测定来监测癌细胞迁移。

[0145] 如本文所定义的术语“组合物”或“药物组合物”一般包含活性剂,所述活性剂是根据本发明的分离的肽;以及缓冲剂、调节其渗透压的试剂、和任选的如本领域已知的至少一种药学上可接受的载体、赋形剂和/或添加剂中的至少一种。

[0146] 根据本发明的药物组合物可以根据医药行业公知的常规技术来制备。这样的技术包括使活性成分与药学上可接受的一种或多种载体、一种或多种赋形剂或一种或多种添加剂缔合的步骤。

[0147] 举例来说,如本文所用的术语“药学上可接受的载体”包括如本领域公知的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂以及抗真菌剂。每一种载体应当在与其它成分相容以及对患者无害的意义上是药学上和生理学上可接受的。

[0148] 药学上可接受的载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇以及液体聚乙二醇等)、其合适的混合物以及植物油的溶剂或分散介质。

[0149] 还可以将补充或附加的活性成分例如另外的抗癌剂并入到本发明的药物组合物中。

[0150] 应当了解的是,在考虑到所讨论的制剂的类型的情况下,除了上文特别提到的成

分之外,制剂还可以包括本领域中常规的其它试剂,例如适用于口服施用的那些制剂可以包括调味剂。

[0151] 因此,在上述和其它实施方案中,所述药物组合物和根据本发明的供使用的药物组合物进一步包含至少一种药学上可接受的载体、赋形剂和/或添加剂。

[0152] 通过本发明的各个方面中的另一个方面,本发明提供了一种预防或治疗癌症转移的方法,所述方法包括向有需要的癌症患者施用药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的分离的肽或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物。

[0153] 在一些实施方案中,根据本发明的预防或治疗癌症转移的方法是其中所述如本文所限定的分离的肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物。

[0154] 在其它实施方案中,根据本发明的预防或治疗癌症转移的方法是其中所述分离的肽由氨基酸序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物组成。

[0155] 在另外的实施方案中,根据本发明的预防或治疗癌症转移的方法是其中所述分离的肽由氨基酸序列SEQ ID NO:3组成。

[0156] 在再另外的实施方案中,根据本发明的预防或治疗癌症转移的方法是其中所述分离的肽包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的修饰的氨基酸序列,其中一个或多个氨基酸残基通过保守替代被置换,分别与具有氨基酸序列SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的未修饰的肽相比,所述保守替代没有显著影响所述修饰的肽的生物学特征。

[0157] 在又另外的实施方案中,根据本发明的预防或治疗癌症转移的方法是其中所述分离的肽包含SEQ ID NO:3的修饰的氨基酸序列,其中一个或多个氨基酸残基被相应的D-氨基酸残基置换。

[0158] 在一些实施方案中,根据本发明的预防或治疗癌症转移的方法是其中所述分离的肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:4。

[0159] 在一些实施方案中,本发明提供了一种预防或治疗癌症转移的方法,所述方法包括向有需要的癌症患者施用药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的由氨基酸序列SEQ ID NO:4组成的分离的肽。

[0160] 在其它实施方案中,根据本发明的预防或治疗癌症转移的方法是其中所述方法进一步包括向所述癌症患者施用如本文所限定的至少一种另外的抗癌治疗。

[0161] 本发明进一步提供了一种减少癌细胞运动性的方法,所述方法包括向被诊断为患有具有转移潜能的癌症的癌症患者施用药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的分离的肽或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物。

[0162] 在本发明的各个方面中的另一个方面,本发明提供了一种预防或抑制癌症患者的血管生成的方法,所述方法包括向有需要的癌症患者施用药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的分离的肽或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物。

[0163] 通过本发明的各个方面中的再另一个方面,本发明提供了一种降低有需要的癌症患者的血清中VEGF的水平的方法,所述方法包括向所述癌症患者施用药物组合物,所述药

物组合物包含治疗有效量的包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的分离的肽或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物。

[0164] 在一些实施方案中,根据本发明的减少癌细胞运动性的方法、预防或抑制血管生成的方法或降低有需要的癌症患者的血清中VEGF的水平的方法是其中所述药物组合物包含治疗有效量的包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的分离的肽。

[0165] 在其它实施方案中,根据本发明的减少癌细胞运动性的方法、预防或抑制血管生成的方法或降低有需要的癌症患者的血清中VEGF的水平的方法是其中所述药物组合物包含治疗有效量的由氨基酸序列SEQ ID NO:4组成的分离的肽。

[0166] 根据本发明的用于本文所限定的目的的分离的肽的“一个治疗有效量”(或多个治疗有效量)是通过本领域已知的这样的考虑因素来确定以治疗、预防、抑制、阻止或缓解癌症转移。

[0167] 根据本发明的分离的肽或包含其的药物组合物可以单次剂量或分多次剂量以治疗有效量向有需要的患者施用。

[0168] 施用如本文所限定的分离的肽或包含其的药物组合物的给药方案和给药时间表可以由本领域技术人员基于本领域已知的考虑因素例如但不限于遵循下表3中所汇总的临床测定来确定。

[0169] 如本文所限定的治疗方法和供使用的药物组合物旨在抑制、阻止或减慢癌症转移的进展。监测如本文所限定的分离的肽的治疗作用(或癌症患者对如本文所限定的治疗的响应性)可以由熟练的医师定期进行,例如通过评估所有的肿瘤以及跟踪它们的尺寸和转移或通过跟踪癌症患者的如本领域已知的癌症转移的症状,例如如上文所述来进行。

[0170] 举例来说,确定癌症患者对包括施用如本文所限定的供使用的药物组合物的治疗的响应性可以通过跟踪来自含有细胞的生物样品的癌症转移特异性标志物来进行,所述标志物例如但不限于分泌的可溶性ST2、TPA或VEGF的水平中的至少一种,所述生物样品是在通过如本文所限定的方法和供使用的药物组合物进行治疗之前以及在治疗之后以定期的方式(例如每周一次、每两周一次、每月一次)从癌症患者获得的。

[0171] 术语“生物样品”是以它的最广泛的意义使用的。生物样品可以是来自动物(包括人类)获得的并且涵盖流体(例如血液)、固体以及组织。

[0172] 在本发明的各个方面中的又一个方面,本发明提供了如本文所限定的分离的肽或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物用于制备用于预防或治疗癌症转移的药物组合物的用途。

[0173] 在一些实施方案中,本发明提供了包含氨基酸序列SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的分离的肽或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物用于制备用于预防或治疗癌症转移的药物组合物的用途,所述预防或治疗包括向有需要的癌症患者施用。

[0174] 本发明进一步提供了如本文所限定的分离的肽或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物用于制备用于减少癌细胞运动性的药物组合物的用途。

[0175] 在具体的实施方案中,本发明提供了包含氨基酸序列SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的分离的肽或所述分离的肽的任何功能片段或衍生物用于制备用于减少癌细胞运动性的药物组合物的用途。

[0176] 如本文所用的术语“约”表明与所提到的值相比可以偏差多达1%、更确切地说

5%、更确切地说10%、更确切地说15%、并且在一些情况下比所提到的值高或低多达20%的值,所述偏差范围包括整数值,并且如果适用的话,同样包括非整数值,从而构成连续的范围。

[0177] 如所公开和描述,应当了解的是,本发明不限于本文所公开的具体的实施例、方法、步骤、以及组合物,这是因为这些方法、步骤以及组合物可以有所变化。还应当理解的是,本文所使用的术语只是用于描述具体实施方案的目的,而不意图具有限制性,这是因为本发明的范围将仅由所附权利要求书和其等同方案来限制。

[0178] 必须指出的是,除非上下文另外明确规定,否则如本说明书和所附权利要求书中所用,单数形式“a/an(一)”和“所述”包括复数指代对象。

[0179] 在整个本说明书和实施例以及所附权利要求书中,除非上下文另外要求,否则词语“包含(comprise)”以及诸如“包含(comprises)”和“包含(comprising)”之类的变化形式将被理解成表示包括所述整数或步骤或者整数或步骤的组,但并不排除任何其它整数或步骤或者整数或步骤的组。

[0180] 以下实施例代表了本申请的发明人在实施本发明的方面中所使用的技术。应当了解的是,虽然这些技术示例了用于实施本发明的优选的实施方案,但是本领域技术人员根据本公开将认识到可以进行许多修改而不脱离本发明的精神和预期范围。

[0181] 实施例

[0182] 在没有进行进一步详细描述的情况下,认为本领域技术人员能够使用前述说明将本发明利用到它的最大程度。以下优选的具体实施方案因此仅应当被视作是说明性的,而不会以任何方式限制要求保护的本发明。

[0183] 本领域已知并且在本文没有具体描述的标准分子生物学方案大体上如Sambrook和Russell,2001中那样来遵循。

[0184] 实验程序

[0185] 细胞培养(细胞传代)

[0186] 在烧瓶中将细胞(人类腺癌胰腺癌细胞和人类乳腺癌细胞)在37℃、5%CO₂下培养在孵育箱中直到达到70%-80%的密度为止。在达到70%-80%的密度时,如下处理细胞:弃去培养基,并且将烧瓶用胰蛋白酶EDTA(5ml,Biological industries公司目录号:03-052-1B)洗涤。然后将另外5ml体积的胰蛋白酶EDTA添加到细胞中,并且在37℃、5%CO₂下将细胞在孵育箱中放置几分钟(5分钟-10分钟),直到大部分的细胞从烧瓶上脱落为止。建议避免在烧瓶上敲击以增加细胞脱落。烧瓶购自Nunc公司(目录号:178905)。

[0187] 然后将RPMI培养基(10ml)添加到经过胰蛋白酶处理的细胞中。通过将RPMI 1640(含有L-谷氨酰胺和25mM HEPES,Reium公司目录号:52400)补充以50ml FBS(Biological industries公司目录号:04-121-1A)、5ml丙酮酸钠(Biological industries公司目录号:03-042-1B)、5ml青霉素-链霉素(Biological industries公司目录号:03-031-1B)以及5ml非必需氨基酸(Biological industries公司目录号:03-340-1B)来制备培养基。然后将培养基和经胰蛋白酶处理的细胞分到2个烧瓶中,并且将每一个烧瓶补充以另外的15ml新鲜培养基。将细胞培养2天-3天直到达到70%-80%的细胞密度为止。然后重复上述程序。

[0188] 肽的制备

[0189] 如下制备和使用具有14个氨基酸残基的长度的肽,其中所有的氨基酸残基均呈它

们的D构型,所述肽具有氨基酸序列Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys (或WWTFFLPSTLWERK (单个字母代码),如由SEQ ID NO:4所表示),在本文也被称作“Nerofe”:由Novetide公司在优良制造规范(GMP)条件下合成所述肽并且将所述肽冻干成粉末。将Nerofe粉末用二甲亚砜(DMSO)溶解以获得10mg/ml或20mg/ml的Nerofe溶液,然后进一步用培养基稀释以获得所期望的测定浓度的两倍,而在最终的细胞悬浮液中不超过总2%DMSO的浓度。实验中所用的最终Nerofe浓度是1 μ g/ml、10 μ g/ml、25 μ g/ml以及50 μ g/ml。将相似量的DMSO添加到对照细胞中,所述对照细胞在不存在Nerofe下孵育。

[0190] 溴脱氧尿苷(BrdU)掺入测定

[0191] 如上文所述在烧瓶中将人类腺癌胰腺癌细胞和人类乳腺癌细胞培养直到达到70%-80%的密度为止,并且使用胰蛋白酶EDTA使所述细胞从烧瓶上脱落(使用上述用于细胞培养的方案直到将10ml培养基添加到经过胰蛋白酶处理的细胞中的步骤为止)。然后将悬浮在培养基和胰蛋白酶中的细胞转移到50ml锥形管中并且以300g离心(10分钟,4 $^{\circ}$ C)。然后弃去上清液并且将细胞沉淀物重悬于新鲜培养基(如上文所述所制备的2ml培养基)中。

[0192] 然后使细胞流化并且再将3ml培养基添加到细胞悬浮液中以使得细胞重悬于总体积5ml的培养基中。然后将细胞计数并且稀释到每毫升培养基20,000个细胞的浓度。随后,将细胞放置在96孔板(Nunc公司目录号:167008)中,每孔放置100 μ l的细胞悬浮液,因此每一个孔容纳2000个细胞。然后将细胞在孵育箱中在37 $^{\circ}$ C孵育过夜。

[0193] 将浓缩的Nerofe肽悬浮在总体积100 μ l的培养基中并且添加到96孔板中的所测定的细胞中以达到1 μ g/ml、10 μ g/ml、25 μ g/ml以及50 μ g/ml的最终浓度。在不存在所述肽的情况下进行对照(背景)测定,即将100 μ l培养基添加到对照细胞中。

[0194] 在37 $^{\circ}$ C将细胞在Nerofe肽存在下孵育24小时或48小时。然后,在收集细胞前24小时之时将每孔20 μ l的溴脱氧尿苷(BrdU)试剂(密理博公司(Millipore)目录号:2752,在培养基中1:500稀释)添加到孔中。即,在一与所述肽一起孵育就立即添加BrdU,或在其中将细胞孵育48小时的实验中在前24小时孵育之后添加BrdU。根据制造商的方案使用BrdU试剂盒(细胞信号转导有限公司(Cell Signaling Ltd))。

[0195] 组织型纤溶酶原激活物(TPA)人类ELISA测定

[0196] 如上文所述在烧瓶中将人类腺癌胰腺癌细胞培养直到达到70%-80%的密度为止并且使用胰蛋白酶EDTA使所述细胞从烧瓶上脱落。然后将悬浮在培养基和胰蛋白酶中的细胞离心并且重悬在2ml新鲜培养基(如上文对于BrdU掺入测定所述)中。

[0197] 然后使细胞流化并且将3ml培养基添加到细胞悬浮液中以使得细胞重悬于总体积5ml的培养基中。将细胞计数并且稀释到每毫升培养基50,000个细胞的浓度。随后,通过每孔放置2ml的细胞培养物将细胞放置在6孔板(Nunc公司目录号:140675)的每一个孔中,因此每一个孔容纳100,000个细胞。随后将细胞在孵育箱中在37 $^{\circ}$ C孵育过夜。

[0198] 将上清液弃去并且替换为含有2.5%FBS的1ml RPMI培养基。然后将细胞在37 $^{\circ}$ C在1 μ g/ml、10 μ g/ml、25 μ g/ml以及50 μ g/ml最终浓度的Nerofe肽存在下孵育24小时或48小时。通过将细胞离心(以300g,5分钟,4 $^{\circ}$ C)来收集上清液并且储存在-20 $^{\circ}$ C。

[0199] 随后,如下进行TPA ELISA测定:将上清液解冻并且保持在冰上,然后用随试剂盒(x1N,艾博抗公司(Abcam)目录号:ab108914)所提供的TPA稀释剂1:15稀释。根据制造商的方案继续程序并且将ELISA板在450/590的光密度(O.D.)下读数。

[0200] 可溶性ST2 (sST2) ELISA测定

[0201] 如上文所述在烧瓶中将人类腺癌胰腺癌细胞和人类乳腺癌细胞 (MDA-MB-231) 培养直到达到70%-80%的细胞密度为止并且使用胰蛋白酶EDTA使所述细胞从烧瓶上脱落。然后将悬浮在培养基和胰蛋白酶中的细胞离心并且重悬在2ml新鲜培养基 (如上文对于BrdU掺入测定所述) 中。

[0202] 然后使细胞流化并且将3ml培养基添加到细胞悬浮液中以使得细胞重悬于总体积5ml的培养基中。然后将细胞计数并且稀释到每毫升培养基50,000个细胞的浓度。将细胞以每个板2ml放置在6孔板的每一个孔中,因此每一个孔容纳100,000个细胞。将细胞在孵育箱中在37℃孵育过夜。

[0203] 将上清液弃去并且替换为含有2.5%FBS的1ml RPMI培养基。然后将细胞在37℃在1μg/ml、10μg/ml、25μg/ml以及50μg/ml最终浓度的Nerofe肽存在下孵育24小时或48小时。通过将细胞离心 (5分钟,300g,4℃) 来收集上清液并且储存在-20℃。

[0204] 随后,如下进行sST2ELISA测定:首先,通过将sST2肽 (Genmed公司,项目ID 35622B型,序列:HTVRLSRKNPSKECF) 在PBS (Biological industries公司,02-023-5A) 中从10,000pg/ml到156pg/ml连续稀释来为sST2肽制备校准曲线。然后,将上清液样品解冻并且保持在冰上 (将浓缩的样品在PBS中稀释)。通过在Maxisorp 96孔板 (NUNC公司,F96Maxisorp,442404) 中加入100μl一式两份的每一个样品和标准品来进行上样。将经过上样的板在4℃在轻微的轨道振荡下孵育过夜。

[0205] 然后通过去除液体并且将板使用多道移液器或自动化洗涤器用300μl于PBS中的0.05%TW-20 (Amresco公司,0777-1L) 洗涤3次来洗涤样品。通过在PBS中稀释5%BSA (MP biomedical公司,160069) 并且将300μl的封闭缓冲液加入每一个孔中来将样品封闭。封闭步骤包括在振荡 (350RPM) 下在室温 (RT) 1小时的孵育期。随后,如上文所述洗涤样品。

[0206] 通过稀释的抗sST2亲和纯化抗体 (Genmed公司,项目ID 35622 B型) (在稀释剂 (于PBS中的0.05%TW-20、0.1%BSA) 中1:100稀释) 对sST2进行检测,其中将100μl的检测抗体加到每一个孔上。然后将样品在室温在振荡 (350RPM) 下孵育1.5小时并且如上文所述进行洗涤。然后将稀释的 (1:500,在稀释剂中) 山羊抗兔HRP缀合抗体 (细胞信号转导公司,7074) 加到每一个孔上 (100μl),并且再将样品在室温在振荡下孵育30分钟。然后如上文所述将样品洗涤并且通过将100μl的3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB,密理博公司,ES001-500ML) 添加到每一个孔中,等待蓝色显色,并且最终添加100μl的2N H₂SO₄ (Frutarom公司,5552540) 来显色。在微孔板读数器中在450nm/590nm的O.D.获得板吸光度。

[0207] 人类癌细胞的细胞迁移测定

[0208] 如上文所述在烧瓶中将人类腺癌胰腺癌细胞培养直到达到70%-80%的细胞密度为止并且使用胰蛋白酶EDTA使所述细胞从烧瓶上脱落。然后以300g将悬浮在培养基和胰蛋白酶中的细胞离心10分钟 (4℃) 并且重悬在2ml新鲜培养基 (如上文对于BrdU掺入测定所述) 中。

[0209] 然后使细胞流化并且添加3ml培养基以使得细胞悬浮于5ml体积的培养基中,并且随后计数并且稀释到每毫升培养基150,000个或300,000个细胞的浓度。

[0210] 或者,使用补充有50ml FBS (Biological industries公司目录号:04-121-1A)、5ml Hepes 1M (Biological industries公司目录号:03-025-1C)、0.5ml两性霉素B 2500μ

g/ml (Biological industries公司目录号:03-029-1) 以及5ml硫酸庆大霉素 (Gentamycin sulfate) 50mg/ml (Biological industries公司目录号:03-035-1) 的杜氏改良伊格氏培养基 (Dulbecco's modification of Eagle's medium) (DMEM, Biological Industries公司目录号:01-055-1A) 来进行细胞培养和重悬并且将细胞重悬到每毫升培养基100,000个细胞的最终浓度。

[0211] 根据制造商的方案制备radius 96孔细胞迁移测定板 (Cell Biolabs公司目录号: CBA-126) 并且向每一个孔中加入100 μ l的细胞, 因此每一个孔容纳10,000个、15,000个或30,000个细胞。将细胞在孵育箱中孵育过夜 (37 $^{\circ}$ C)。随后, 将上清液弃去并且替换为含有2.5%FBS的100 μ l RPMI。然后将细胞通过悬浮在总体积100 μ l培养基中的Nerofe肽 (以1 μ g/ml和10 μ g/ml的最终浓度) 处理, 因此每一个孔容纳200 μ l的总体积。然后将细胞在孵育箱中在37 $^{\circ}$ C孵育24小时。

[0212] 或者, 将上清液弃去并且替换为含有2.5%FBS和所需处理即对照 (没有Nerofe)、10 μ g/ml、25 μ g/ml或50 μ g/ml的Nerofe的200 μ l DMEM。然后将细胞在孵育箱中在37 $^{\circ}$ C孵育48小时。

[0213] 当细胞达到70%-80%密度时, 将上清液弃去并且在没有影响细胞附着的情况下将凝胶从孔的中央去除, 如制造商的方案中所述。然后, 在零时间时 (即在去除凝胶后立即)、然后每两小时使用倒置共聚焦显微镜 (以40倍的放大倍数) 对无细胞的区域进行拍照。通过根据制造商的方案对细胞进行染色来结束测定。

[0214] 使用Photoshop软件来计算在每个时间点时没有细胞的面积以确定细胞行进到空区域中的速度。按一式两份进行所有实验。

[0215] 实施例1:Nerofe肽对人类胰腺癌细胞中组织型纤溶酶原激活物 (TPA) 的水平的作用

[0216] 已经报道的是, 胰腺癌细胞中组织纤溶酶原激活物 (TPA) 的过表达在体外促进了侵袭和增殖以及在体内促进了肿瘤生长和血管生成 (7)。

[0217] 研究了Nerofe肽在体外对胰腺癌细胞的TPA分泌的作用, 所述肽具有全部呈D型的氨基酸的序列 Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys (如由SEQ ID NO:4所表示)。图1 (下部条形图) 示出了在1 μ g/ml-50 μ g/ml的Nerofe肽存在下孵育24小时、然后通过ELISA测定评估TPA水平的人类腺癌胰腺癌细胞, 如上文所述。

[0218] 如图1 (下部条形图) 中所示, 在Nerofe肽存在下, 与没有与所述肽一起孵育的对照细胞相比, 在测试细胞 (在本文也被称作“细胞系1”、“细胞系2”以及“细胞系3”) 中检测到分泌的TPA的水平更低。

[0219] 如上文所示, 胰腺癌细胞中TPA的过表达促进了细胞侵袭。因此, TPA水平的降低可以影响癌细胞的侵袭或转移潜能, 由此, 所证实的在所述肽存在下TPA水平的降低表明了所述肽可以有效减少细胞运动性。

[0220] 实施例2:Nerofe肽对人类胰腺癌细胞中可溶性ST2的水平的作用

[0221] T1/ST2受体 (也被称为白细胞介素1受体样1) 是Toll样受体超家族的成员。可溶性T1/ST2受体和膜结合型T1/ST2受体这两者在体内均主要表达在造血组织中 (8)。最近已经报道的是, ST2的可溶性形式 (sST2) 的基因敲低在多种细胞系中减少了ErbB2诱导的细胞运动性 (9)。

[0222] 如图2(下部条形图)中所示,在1 μ g/ml-50 μ g/ml的Nerofe肽存在下,与没有与所述肽一起孵育的细胞中sST2的水平相比,在所有测试细胞(人类腺癌胰腺癌细胞)中均检测到更低的sST2水平。所观测到的Nerofe肽的作用具有剂量依赖性。由于sST2与细胞运动性有关,因此所证实的在所述肽存在下sST2水平的降低表明了所述肽可以有效减少细胞运动性或侵袭。

[0223] 在相似的测定条件下在Nerofe肽存在下在人类乳腺癌细胞(MDA-MB-231)中也表现出sST2水平有约80%的降低(数据未示)。

[0224] 实施例3:Nerofe肽对人类腺癌胰腺癌细胞增殖的作用

[0225] 由胸腺肽(被称作“T101肽”,如上表1中所示)的C末端51个氨基酸残基组成的具有由SEQ ID NO.2所表示的氨基酸序列的肽先前由本申请的发明人证实显著地减小了成年Balb/C小鼠模型中的肿瘤尺寸(3)。

[0226] 此外,Nerofe肽先前被证实在造血系统起源的多种癌细胞中抑制细胞增殖,所述Nerofe肽是T101肽的修饰的肽片段,由其C末端14个氨基酸残基组成,所述氨基酸残基全部都是D型氨基酸残基(由SEQ ID NO.4表示)。“对细胞增殖的抑制作用”在本文被定义为与在不存在所述肽的情况下进行的对照测定相比,在所述肽存在下细胞增殖被抑制了至少40%。

[0227] 惊人的是,本申请的发明人现在证实了Nerofe肽被发现对人类腺癌胰腺癌细胞增殖仅有很小的作用,如图1和图2中的上线所示。

[0228] 使用溴脱氧尿苷(BrdU)掺入测定对人类腺癌胰腺癌细胞的增殖进行测定以评估合成DNA的细胞的量,如上文所述。如图1和图2(上线)中所示,与在不存在Nerofe肽的情况下进行的对照测定相比,在1 μ g/ml、10 μ g/ml、25 μ g/ml以及50 μ g/ml的Nerofe肽存在下孵育的人类胰腺癌细胞在所述肽存在下在它们的BrdU掺入能力方面仅表现出不太大的降低(最多26%抑制)。此外,在Nerofe肽的浓度与抑制程度之间没有发现相关性。

[0229] 实施例4:Nerofe肽对人类腺癌胰腺癌细胞的细胞迁移的作用

[0230] 使用Radius细胞迁移测定,根据制造商的方案直接测定Nerofe肽对细胞迁移的作用。简单地说,将细胞接种到Radius 96孔板(Cell Biolabs公司目录号:CBA-126)的孔中并且使所述细胞在除了孔中央之外的任何地方附着,在所述孔中央处,放置了生物相容性水凝胶点。在细胞形成单细胞层后,通过轻轻地将凝胶用可去除的溶液溶解,从而留下可以进行细胞迁移的空隙来开始测定。

[0231] 如下表2中所示,与对照细胞(其没有与所述肽一起孵育)相比,当在Nerofe肽(以10 μ g/ml的最终浓度)存在下将细胞孵育8小时之时,细胞向孔中央的迁移对于细胞系1来说减少了30%并且对于细胞系2来说减少了82%。细胞系“1”和细胞系“2”都是腺癌胰腺癌细胞。

[0232] 这些结果是Nerofe肽对癌细胞的迁移潜能的作用的直接证据。

[0233]

细胞系	用 Nerofe(10 μ g/ml)处理	在 8 小时后的迁移%	对迁移的抑制%
1	-	100	
1	+	70	30
2	-	100	
2	+	18	82

[0234] 表2:Nerofe肽对细胞迁移的作用

[0235] 在不同的测定条件下,即通过将细胞在开始测定前在0 μ g/ml、10 μ g/ml、25 μ g/ml以及50 μ g/ml的Nerofe肽存在下孵育48小时的时间,来进一步测定Nerofe肽对人类腺癌胰腺癌细胞的迁移能力的作用。

[0236] 通过将人类腺癌胰腺癌细胞在25 μ g/ml的Nerofe肽存在下孵育所进行的测定的结果呈现于图3中。如通过比较图3C和图3A可知,没有通过Nerofe肽处理的对照癌细胞迁移到板中央,其中图3C在开始迁移测定后27小时之时获得,图3A在开始迁移测定后1小时之时获得。

[0237] 相比之下,如通过比较图3D和图3B所证实,在Nerofe肽存在下孵育的细胞的迁移基本上被抑制。

[0238] 这种抑制作用还以图表方式呈现于图4中,该图4示出了在使用在开始迁移测定前在25 μ g/ml的Nerofe肽存在下孵育48小时的人类腺癌胰腺癌细胞进行的两次独立的迁移测定(T1和T2)中所获得的结果以及在使用对照细胞进行的四次独立的测定(CON1、CON2、CON3、以及CON4)中所获得的结果。

[0239] 如图4中以图表方式所示,使用先前暴露于Nerofe肽的细胞进行的细胞迁移测定中的无细胞面积在迁移测定期间基本上被维持,这表明了这些细胞的迁移在很大程度上被抑制。

[0240] 所观测到的在Nerofe肽存在下分泌的TPA和sST2的水平降低以及Nerofe对癌细胞迁移的直接抑制作用表明了这种肽在抑制癌症转移方面的特定治疗潜能。

[0241] 不希望受理论所束缚,Nerofe肽的这些所观测到的作用并不一定与细胞增殖机制有关,这是因为Nerofe被证实对细胞增殖仅有很小的抑制作用,如图1和图2中所举例说明。

[0242] 实施例5:Nerofe肽对癌症患者的血管内皮生长因子的血清水平的作用

[0243] 血管内皮生长因子(VEGF)是由刺激血管发生和血管生成的细胞产生的信号蛋白。如上文所示,可以表达VEGF的癌症能够生长和转移。

[0244] 因此,在接受肽Nerofe施用的癌症患者中进行跟踪VEGF的血清水平的临床研究。参与所述研究的患者被诊断为患有不同的癌症类型,即结肠癌、结肠直肠癌、梭形细胞瘤、胰腺癌、小肠癌、非小细胞肺癌、肝癌、结肠腺癌以及直肠腺癌,如下表3中所汇总。

[0245] 患者被包括在群组1、群组2、群组3以及群组4中的至少一个中并且分别在所示的时间点接受6mg/m²、12mg/m²、24mg/m²或24mg/m²(每公斤体重约0.16mg、0.32mg、0.64mg或1.28mg)剂量的肽Nerofe。

[0246] 使用人类VEFG的Elisa试剂盒(R&D系统公司(R&D systems))在从这些患者获得的血液样品中测量VEGF的血清水平并且结果呈现于图5(对于群组1和群组2的患者)和图6(对

于群组3和群组4的患者)中。

[0247] 如图5中所示,在群组1和群组2中,参加的癌症患者的VEGF的血清水平升高。然而,如图6中所示,在群组3和群组4的患者的血清中,VEGF的血清水平降低了30%-40%,这证实了Nerofe在癌症患者中的明确的抗血管生成作用。

[0248] 这一所观测到的作用对于患有小肠癌和直肠腺癌的癌症患者即分别是患者13和19来说是特别有意义的。

[0249]

患者	天	群组	Nerofe 剂量	癌症类型
002	1、15、29	1	6 mg/m ²	结肠癌
004	1、15	1	6 mg/m ²	结肠癌
005	1、15、29、116	1	6 mg/m ²	结肠直肠癌
	145、174、189、217	2	12 mg/m ²	
006	1、15、29、58、77、87、116	2	12 mg/m ²	梭形细胞瘤
	145、174、203、238	3	24 mg/m ²	
007	1、15、24	2	12 mg/m ²	结肠癌
011	1、15、29、58、77、101	2	12 mg/m ²	结肠癌
012	1、15、44、58、66	3	24 mg/m ²	胰腺癌
013	1、15、29、55	3	24 mg/m ²	小肠癌
015	1、15、29、44、58	3	24 mg/m ²	非小细胞肺癌

[0250]

016	1、15、29、44	4	48 mg/m ²	肝癌
017	1、15、29、44、55	4	48 mg/m ²	结肠腺癌
019	1、15、29	4	48 mg/m ²	直肠腺癌

[0251] 表3:用Nerofe进行的临床研究的汇总

[0252] 由于转移和肿瘤细胞迁移经由血管来进行,因此在降低VEGF水平后,血管渗透性变低并且转移可以被抑制。

序列表

<110> 免疫系统密钥有限公司
 <120> 用于治疗 and 预防转移癌的药物组合物和方法
 <130> 2318215
 <150> US 61/912,156
 <151> 2013-12-05
 <160> 4
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 1

Met Met Ala Leu Arg Ser Gln Gly Leu Met Leu Pro Gln Ser Cys Pro
1 5 10 15

Gln Leu Ala Phe Leu Thr Leu Ser Ala Leu Ala Ala Val Ser Phe Ser
20 25 30

[0001]

Ala Leu His Leu Trp Leu Ser Gly Glu Pro Val Gln Ser Ser Gly Thr
35 40 45

Lys Asp Met Arg Ser Lys Ser Asp Ser Lys Arg Val Ser Asp Lys Gln
50 55 60

Leu Ile Ser Lys Ala Val Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu
65 70 75 80

Trp Glu Arg Lys

<210> 2
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 分离的合成肽(T 101肽的片段)

<400> 2

Leu His Leu Trp Leu Ser Gly Glu Pro Val Gln Ser Ser Gly Thr Lys
1 5 10 15

Asp Met Arg Ser Lys Ser Asp Ser Lys Arg Val Ser Asp Lys Gln Leu
20 25 30

Ile Ser Lys Ala Val Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp
35 40 45

Glu Arg Lys
50

<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 分离的人工肽(T101肽的C末端片段)

<400> 3

Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys
1 5 10

[0002] <210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽“Nerofe”

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa等于D-Trp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa等于D-Trp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa等于D-Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa等于D-Phe

<220>

	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(5).. (5)
	<223>	Xaa等于D-Phe
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(6).. (6)
	<223>	Xaa等于D-Leu
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(7).. (7)
	<223>	Xaa等于D-Pro
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(8).. (8)
	<223>	Xaa等于D-Ser
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(9).. (9)
	<223>	Xaa等于D-Thr
[0003]	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(10).. (10)
	<223>	Xaa等于D-Leu
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(11).. (11)
	<223>	Xaa等于D-Trp
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(12).. (12)
	<223>	Xaa等于D-Glu
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(13).. (13)
	<223>	Xaa等于D-Arg
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(14).. (14)
	<223>	Xaa等于D-Lys
	<400>	4
	Xaa	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
	1	5 10

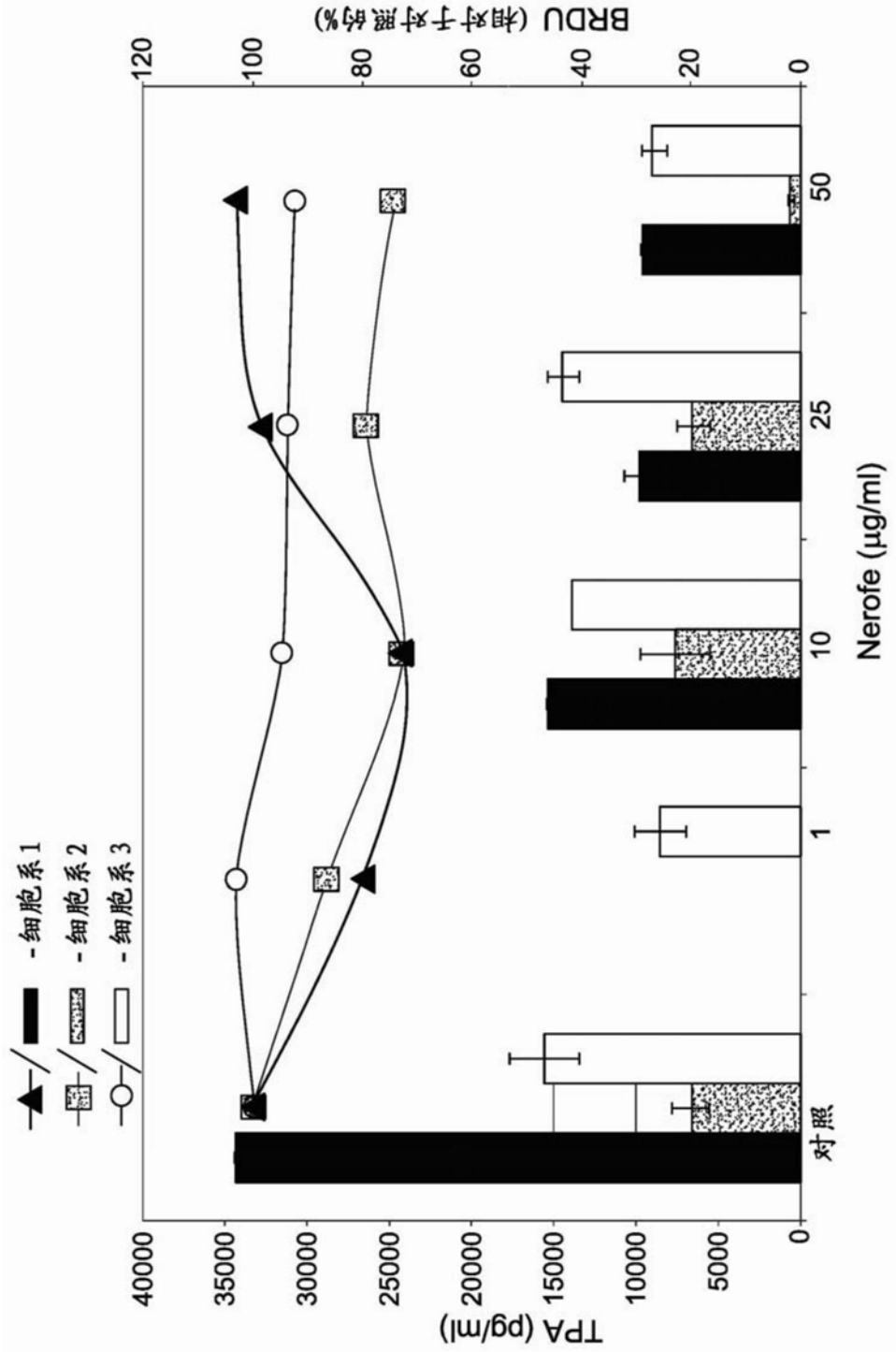


图1

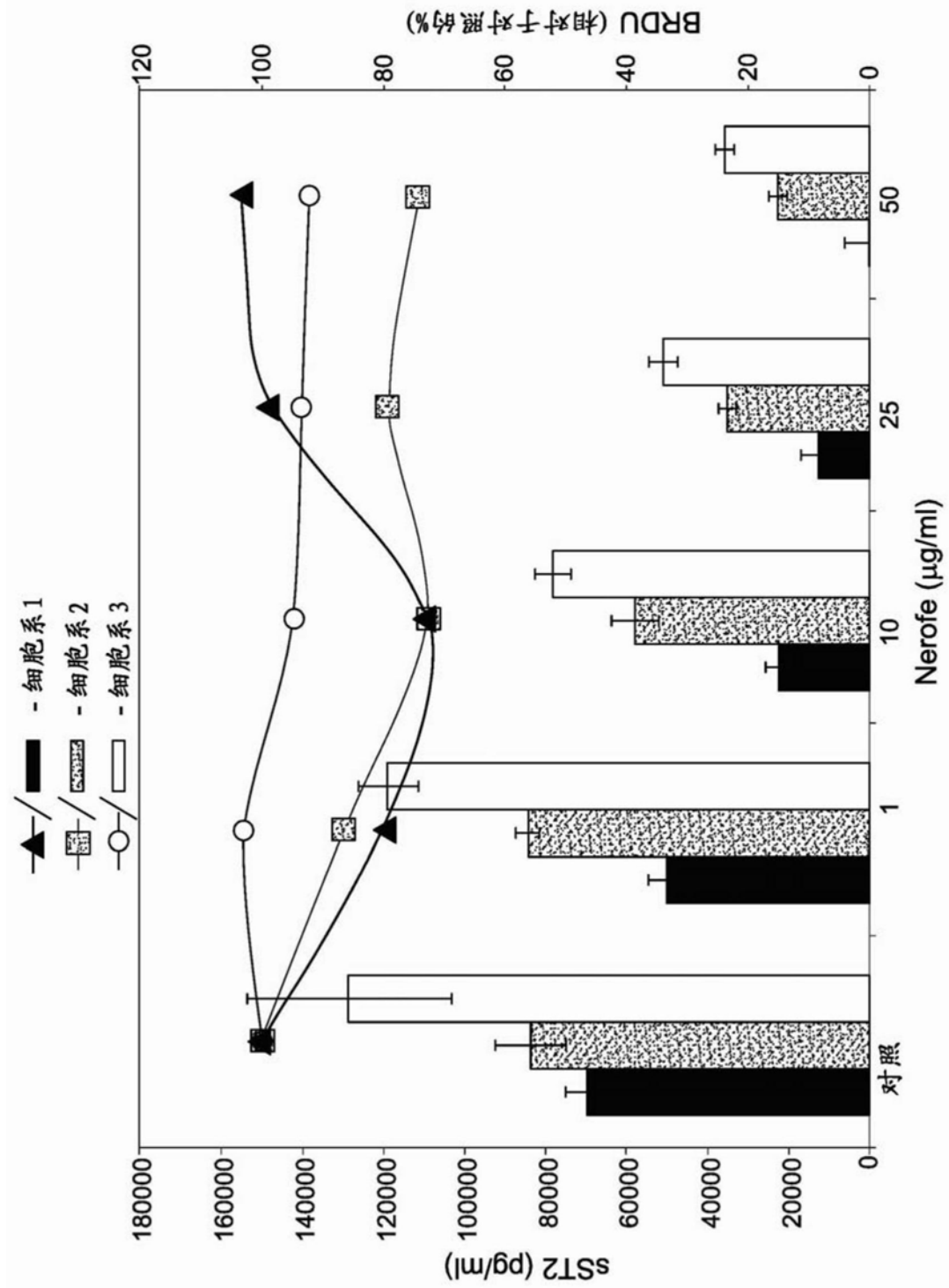


图2

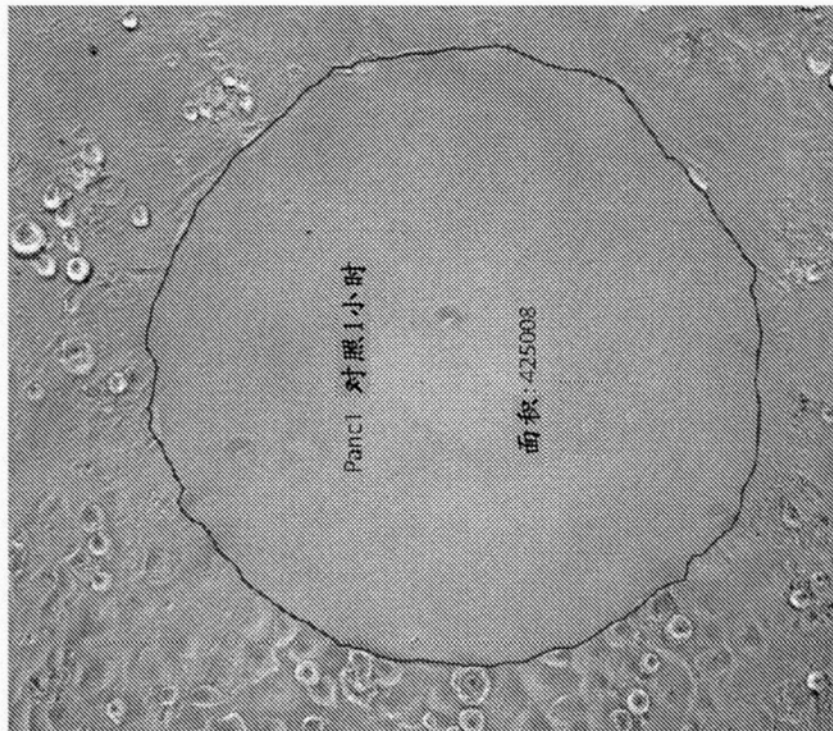


图3A

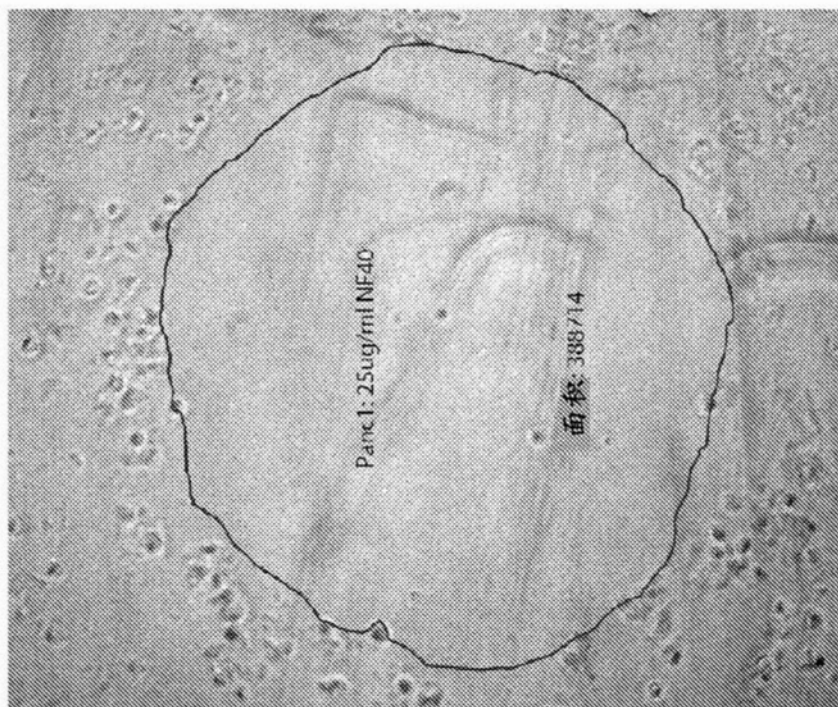


图3B

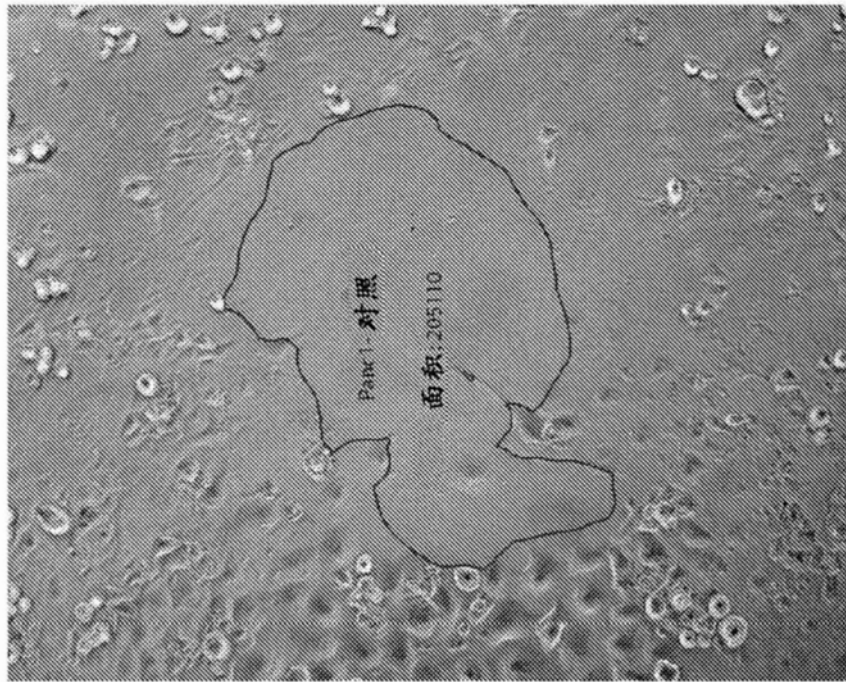


图3C

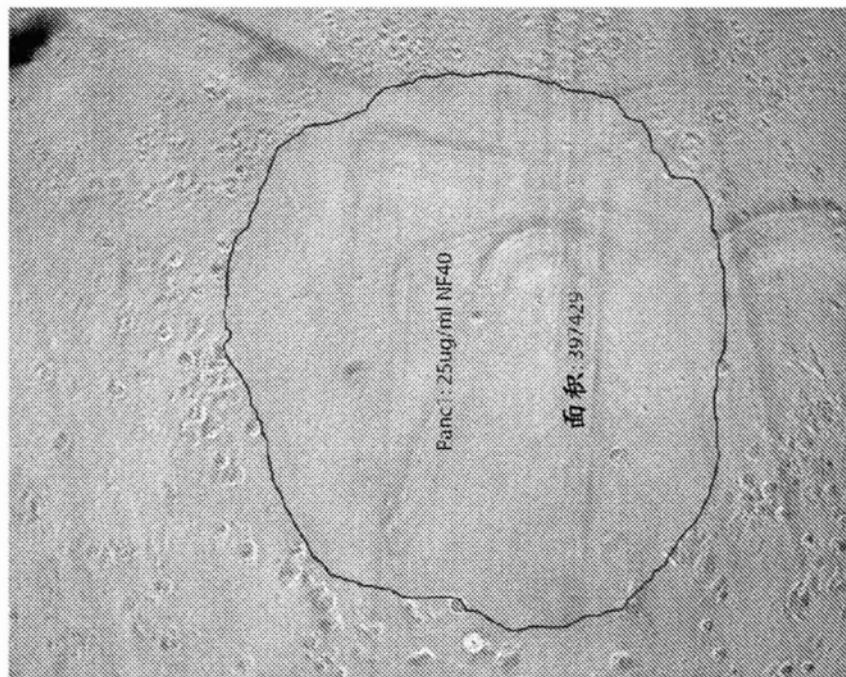


图3D

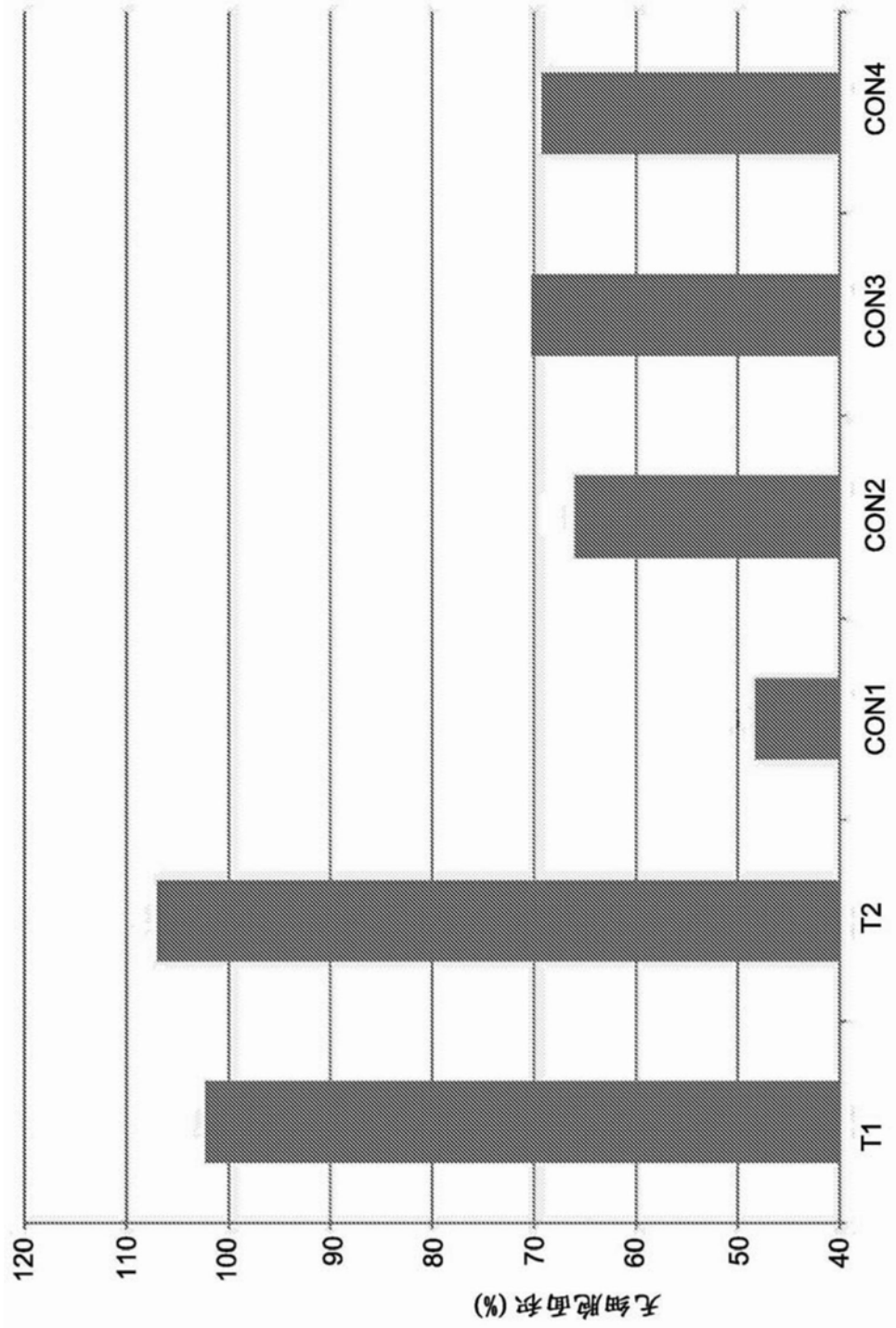


图4

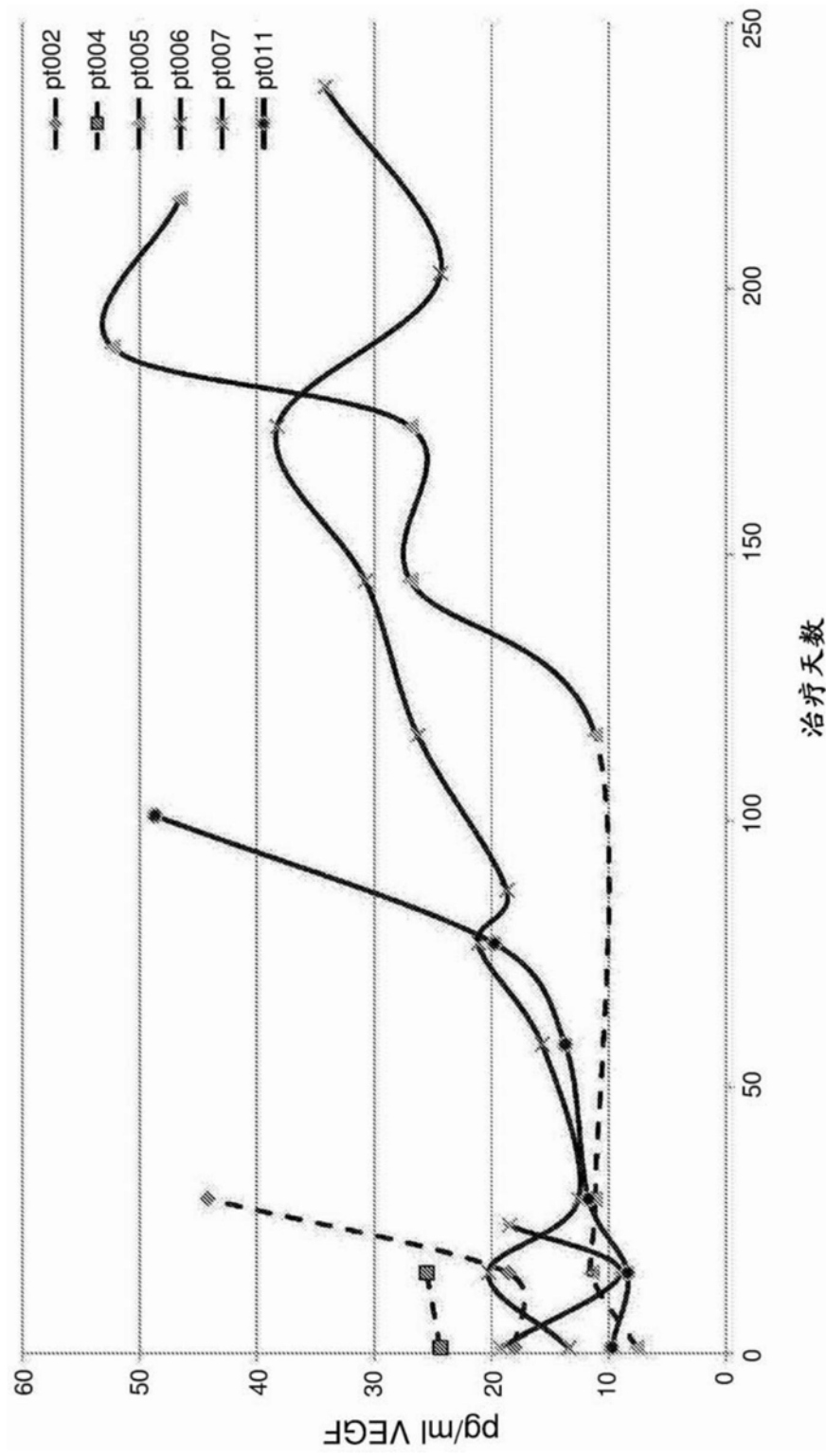


图5

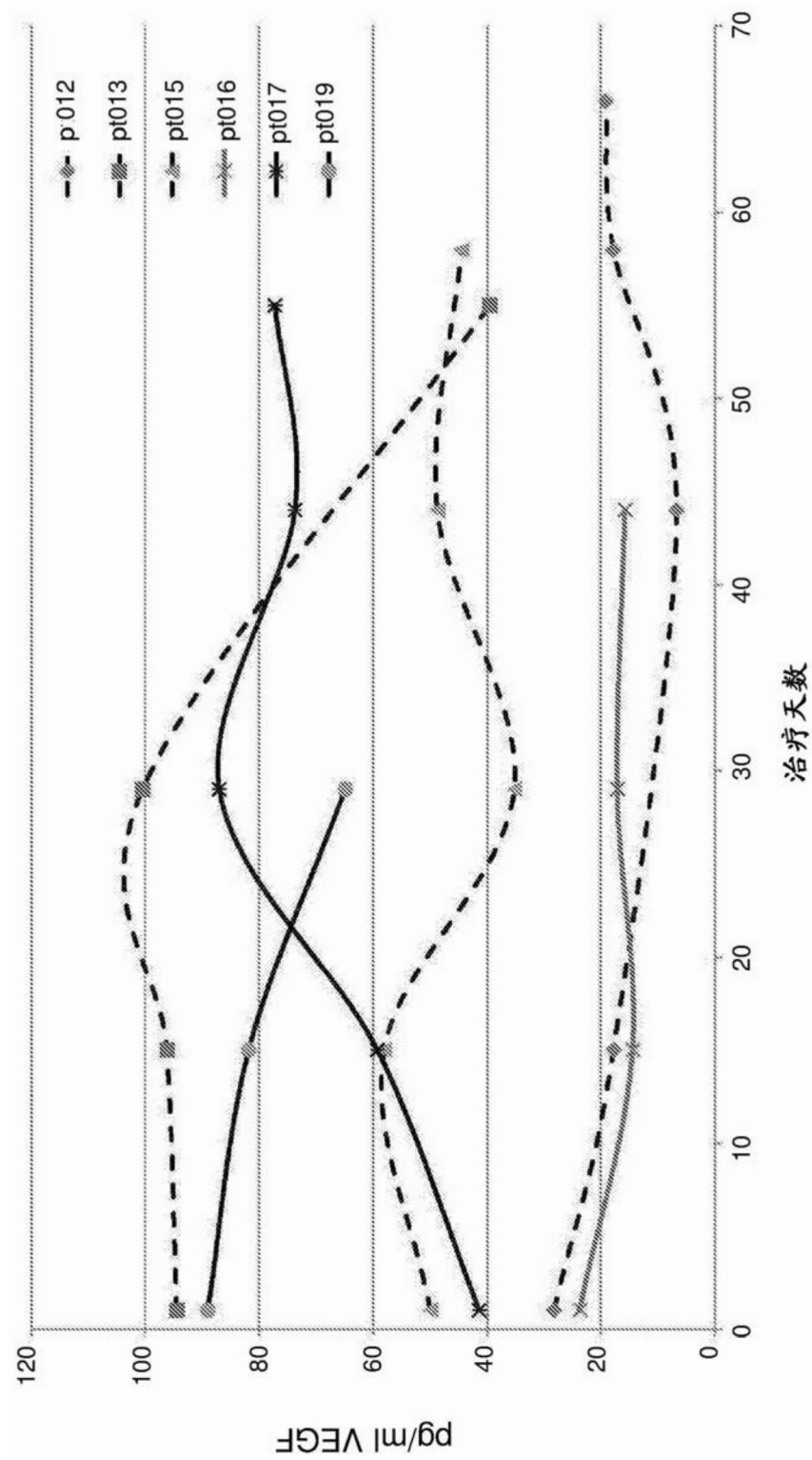


图6