[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61K 38/33
A61P 35/00

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98806692.0

[45] 授权公告日 2004 年 9 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1168497C

[22] 申请日 1998.4.26 [21] 申请号 98806692.0
[30] 优先权
[32] 1997. 4.29 [33] IL [31] 120733
[86] 国际申请 PCT/IL1998/000196 1998.4.26
[87] 国际公布 WO1998/048831 英 1998.11.5
[85] 进入国家阶段日期 1999.12.28
[71] 专利权人 耶达研究发展有限公司
地址 以色列雷霍沃特市
[72] 发明人 达利特·巴尔坎 巴焦·科亨
梅纳赫姆·鲁宾斯坦
审查员 吴希哲

[74] 专利代理机构 北京三幸商标专利事务所
代理人 刘激扬

权利要求书 1 页 说明书 23 页 附图 5 页

[54] 发明名称 作为肿瘤细胞增殖的抑制剂的莱普亭

[57] 摘要

公开了在肿瘤学中莱普亭和莱普亭相关分子的用途。

ISSN1008-4274

1. 活性剂作为肿瘤细胞增殖的抑制剂在制备药物中的用途，所述活性剂选自莱普亭和莱普亭融合蛋白质。

2. 根据权利要求1所述的活性剂作为哺乳动物中用于治疗恶性肿瘤的细胞增殖的抑制剂在制备药物中的用途。

3. 根据权利要求1或2所述的活性剂作为生长因子依赖肿瘤的抑制剂在制备药物中的用途。

4. 根据权利要求1或2所述的活性剂作为人胸癌细胞增殖的抑制剂在制备药物中的用途。

5. 根据权利要求4所述的活性剂在制备用于治疗人胸癌的药物中的用途。

6. 根据权利要求1所述的活性剂作为由胰岛素受体底物-1/生长因子受体相关结合蛋白质2途径介导的胰岛素对肿瘤细胞的生长刺激影响的抑制剂在制备药物中的用途。

7. 根据权利要求1所述的活性剂作为碱性和胰岛素诱导的细胞增殖的抑制剂在制备用于治疗人胸癌的药物中的用途。

8. 根据权利要求1所述的活性剂在制备药物中的用途，其中所述的活性剂是莱普亭，所述的莱普亭作为所述的抑制剂或用于所述的治疗。

作为肿瘤细胞增殖的抑制剂的莱普亭

发明领域

本发明涉及莱普亭(Leptin)，一种脂肪细胞产生的细胞因子，并且影响各种细胞和组织。更具体地说，本发明涉及肿瘤学领域莱普亭的新应用。

发明背景

莱普亭，一种脂肪细胞起源的细胞因子，可以调整体重，通过小鼠ob基因的位置克隆进行鉴定(Zhang等人，1994)，并且显示能够影响食物吸收和产热(Campfield等人，1995；Collins等人，1996；Halaas等人，1995；Pelleymounter等人，1995；Weigle等人，1995)。高亲和力莱普亭结合位点定位于脉络丛；来自这一组织的cDNA的表达克隆提供了莱普亭受体(OB-R)(Tartaglia等人，1995)。通过下丘脑中的受体介导莱普亭的已知活性。在其它器官，肾，肺和肝中也可表达莱普亭受体(Cioffi等人，1996，Lee等人，1996，Tartaglia等人，1995)。另外，在小鼠中以组织特异的方式表达区别在它们的细胞质区的莱普亭受体拼接变异体的不同组成部分(Lee等人，1996)。所以，除了控制食物吸收和体热，莱普亭还具有其它生理功能。

虽然脂肪细胞产生了莱普亭，在血清中过量脂肪和高水平莱普亭的相关性的最新发现与莱普亭减少食物吸收和体重的观点相反(Considine等人，1996，Frederich等人，1995，Lonnqvist等人，1995；Maffei等人，1995)。这一相关性和肥胖与胰岛素抗性

之间的确定的关系(Felber和Golay，1995)表明莱普亭可以调整胰岛素调节的应答。的确，最近的报道是莱普亭明显减弱胰岛素受体底物-1(IRS-1)的碱性和胰岛素诱导的酪氨酸磷酸化。莱普亭对IRS-1磷酸化的影响是特异的，因为胰岛素受体(IR)β链的酪氨酸磷酸化没有减弱(Cohen等人，1996)。

IR激酶的IRS-1的酪氨酸磷酸化在胰岛素受体信号级联放大中是关键步骤，导致许多已知的胰岛素活性(Araki等人，1994；Cheatham和Kahn，1995；Myers等人，1994，Myers等人，1994；Myers和White，1993；Rose等人，1994；Tamemoto等人，1994；White和Kahn，1994)。几个相关蛋白质介导IRS-1的下游信号，其中一个是生长因子受体的相关结合蛋白质-2(GRB2)(Cheatham和Kahn，1995)。

胰岛素受体被认为是代谢受体，介导胰岛素对葡萄糖稳态的影响。正如它在终端分化组织如脂肪组织，肝脏和肌肉上表达。但是，许多研究表明，当在肿瘤细胞中表达时，IR是体外和体内的潜在促有丝分裂受体。例如，在几个胸癌细胞系中鉴定了功能性IR，正如应答胰岛素处理的IR的酪氨酸磷酸化确定的。另外，正如[^{3}H]胸腺嘧啶掺入确定的，IR介导这些细胞中的促有丝分裂应答(Milazzo等人，1997；Millazzo等人，1992)。

到目前为止，还没有公开莱普亭在肿瘤学领域的应用，特别是，还没有公开莱普亭可用于抑制细胞的增殖，尤其是增殖的癌症细胞。

发明概要

本发明的目的是提供莱普亭作为细胞增殖的抑制剂的用途，如利用莱普亭作为癌细胞增殖的抑制剂。

本发明的另一个目的是提供莱普亭单独或结合其它治疗各种恶性肿瘤的治疗试剂的用途。

本发明的另一个目的是提供莱普亭，莱普亭融合蛋白质，莱普亭突变蛋白，莱普亭受体拮抗剂，任何其中之一的活性片断或部分，任何其中之一的活性类似物或衍生物，任何其中之一的盐，和任何其中之一的混合物，用于各种恶性肿瘤的治疗的用途。

本发明的另一个目的是提供含有一种或多种上述的莱普亭，莱普亭融合蛋白质，莱普亭突变蛋白，莱普亭受体拮抗剂，任何其中之一的活性片断或部分，任何其中之一的活性类似物或衍生物，和其中任何一个的盐的药物组合物用于处理各种恶性肿瘤。

本发明的其它目的将在本文的下面阐述。

本发明提供了作为细胞增殖的抑制剂的莱普亭的用途。莱普亭可以单独或结合其它治疗试剂或途径用于治疗各种恶性肿瘤。本发明的优选的实施例是利用莱普亭抑制人胸癌细胞增殖。在各种生长因子如胰岛素和IGF-I存在下增强了许多类型的肿瘤细胞的增殖。通过IRS-1/GRB2途径，至少部分地介导了胰岛素和IGF-I对细胞的生长刺激影响(Myers等人，1993)。莱普亭抑制这一途径。另外，IRS-1是其它生长因子和细胞因子，包括IL-4和IL-9的受体激酶的底物(Pernis等人，1995；Yin等人，1995；Yin等人，1994)。所以，莱普亭可以抑制一些或所有前面提到的生长因子和细胞因子以及其它生长因子的促有丝分裂应答，从而抑制了各种肿瘤细胞的增殖。如包括抑制人胸癌细胞系T-47D和MCF7的IGF-I诱导的增殖和胰岛素诱导的增殖。本发明也提供了莱普亭，莱普亭融合蛋白质，莱普亭突变蛋白，莱普亭受体拮抗剂，或任何一个的活性片断或部分，和任何一个的盐以及含有莱普亭，莱普亭融合蛋白质，莱普亭突变蛋白，莱普亭受体拮抗剂，任何一个的活性片断或部分，或任何一个的盐的药物

组合物用于治疗各种恶性肿瘤。

更具体地说，本发明提供了选自包括莱普亭，莱普亭融合蛋白，莱普亭突变蛋白，莱普亭受体拮抗剂，其任何一个的活性片断或部分，其任何一个的活性类似物或衍生物，其任何一个的盐，和其任何一个的混合物的活性剂用作肿瘤细胞增殖的抑制剂的用途。

本发明的上述实施例包括：

(i)作为细胞增殖的抑制剂的上述活性剂用于治疗哺乳动物中的恶性肿瘤。

(ii)作为生长因子依赖肿瘤的抑制剂的上述活性剂的用途。

(iii)作为人胸癌症细胞增殖的抑制剂的上述活性剂的用途。

(iv)治疗人胸癌症的上述活性剂的用途。

(v)正如通过胰岛素受体底物-1(IRS-1)/生长因子受体相关的结合蛋白质-2(GRB2)途径介导的，作为胰岛素和IGF-I对肿瘤细胞的生长刺激影响的抑制剂的上述活性剂的用途。

(vi)上述活性剂作为所有以IRS-1为底物的组的一个或多个受体激酶，生长因子和细胞因子在肿瘤细胞中促有丝分裂应答的抑制剂，用于治疗肿瘤。

(vii)作为碱性，IGF-I诱导和胰岛素诱导肿瘤细胞增殖的抑制剂的上述活性剂在治疗人胸癌症中的用途。

(viii)上述活性剂的用途，其中所述的活性成份是莱普亭，所述的莱普亭用作所述的抑制剂或所述的治疗。

同样，本发明也提供了选自包括莱普亭，莱普亭融合蛋白，莱普亭突变蛋白，莱普亭受体拮抗剂，其中任何一个的活性片断，其中任何一个活性类似物或衍生物，其中任何一个的盐，和其中任何一个的混合物的活性剂在制备抑制肿瘤细胞增殖的药剂的用途。

本发明的这一方面的实施例包括：

(i)如上述用于制备治疗哺乳动物中的恶性肿瘤的药物的活性剂。

(ii)如上述用于制备生长因子依赖肿瘤的抑制剂的药物的活性剂。

(iii)如上述用于制备抑制人胸癌细胞增殖的药物的活性剂。

(iv)如上述用于制备治疗人胸癌的药物的活性剂。

(v)如上述用于制备至少部分通过IRS-1/GRB2途径介导的IGF-I和胰岛素对肿瘤细胞的生长刺激影响的抑制剂的药物的活性剂。

(vi)如上述用于制备在肿瘤细胞抑制对所有的底物是IRS-1包括IGF-I，IL-4和IL-9的组的一个或多个受体激酶，生长因子和细胞因子的促有丝分裂应答的抑制剂的药物用于治疗肿瘤的活性剂。

(vii)如上述用于在抑制碱性，IGF-I诱导和胰岛素诱导肿瘤细胞增殖的抑制的药物用于治疗人胸癌的活性剂。

(viii)上述活性剂是莱普亭，并且所述的莱普亭用于制备所述的药物。

同样，另一方面，本发明提供了含有如上所述的作为活性成份的活性剂药物和药物可接受载体，稀释剂或赋形剂的药物组合物用于抑制肿瘤细胞的增殖。

本发明的这一方面的实施例包括：

(i)在哺乳动物中治疗恶性肿瘤的药物组合物。

(ii)抑制生长因子依赖肿瘤的药物组合物。

(iii)抑制人胸癌症细胞增殖，从而治疗人胸癌症的药物组合物。

(iv)抑制至少部分由IRS-1/GRB2途径介导的IGF-I和胰岛素对肿瘤细胞的生长刺激作用的抑制的药物组合物。

(v)抑制肿瘤细胞中对一个或多个受体激酶，生长因子和选自于

IL-4和IL-9的组的细胞因子的有丝分裂应答的药物组合物，其中所有的底物为IRS-1，从而治疗肿瘤。

(vi)抑制碱性，IGF-I诱导的和胰岛素诱导的肿瘤细胞增殖，从而治疗人乳腺癌的药物组合物。

(vii)药物组合物，其中所述的活性成份是莱普亭。

本发明也提供了治疗哺乳动物的肿瘤或抑制哺乳动物的肿瘤细胞增殖的方法，它包括以合适剂量形式的上述的本发明的药物组合物和通过合适的用药途径给患者服药。这种剂量形式和用药途径通常专业医生根据检查患者之后决定。

本发明的其它方面和实施例在下面进行说明。

附图说明

图1表示由MTT染色决定的T-47D细胞增殖对胰岛素的依赖性。

图2表示由MTT染色决定的T-47D细胞增殖对IGF-I的依赖性。

图3表示在10%胎牛血清(FBS)中小鼠莱普亭对胰岛素诱导的T-47D细胞增殖的抑制。

图4表示在结晶紫染色确定的小鼠莱普亭对2%FBS中胰岛素诱导的T-47D细胞增殖的抑制。

图5表示在MTT染色确定的小鼠莱普亭对10%FBS中IGF-I诱导的T-47D细胞增殖的抑制。

图6表示在结晶紫染色确定的小鼠莱普亭对2%FBS中IGF-I诱导的T-47D细胞增殖的抑制。

图7表示在结晶紫染色确定的人莱普亭对IGF-I诱导的T-47D细胞增殖的抑制。

图8表示在结晶紫染色确定的小鼠莱普亭对无血清中胰岛素诱导

MCF7细胞增殖的抑制。

图9表示在结晶紫染色确定的小鼠莱普亭对无血清中IGF-I诱导MCF7细胞增殖的抑制。

本发明的详细说明

本发明涉及莱普亭作为肿瘤细胞增殖的抑制剂的用途。通常，起源于各种肿瘤细胞的人原始细胞系，可在约10%体积浓度的胎牛血清补充的生长培养基中生长培养。下文确定这些条件下的细胞增殖为“碱性细胞增殖”。当将各种生长因子如胰岛素，表皮生长因子或胰岛素样生长因子-I(IGF-I)加入上面的补充血清的培养基时，许多肿瘤细胞系的生长明显增强。生长培养基中含有莱普亭的浓度范围从3到600纳摩尔能够减少碱性细胞增殖和生长因子依赖的增殖。

下面实施例给出的细胞培养实验的结果表明莱普亭可用于抑制各种肿瘤的生长。所以，莱普亭可用于各种恶性肿瘤的治疗。

在本发明的优选实施例中，莱普亭可用于抑制胸癌细胞增殖。当将莱普亭加入人胸导管癌T-47D细胞，(美国型培养物收藏中心，Rockville，MD，菌株号ATCC HTB 133)的培养基中时，它们的增殖程度减少了。同样，当将莱普亭加入人胸腺癌MCF7细胞的培养基中，(美国型培养物收藏中心，Rockville，MD；菌株号ATCC HTB 22)，它们的增殖程度减少了。莱普亭抑制了碱性T-47D和MCF7细胞的IGF-I诱导和胰岛素诱导的增殖。所以，莱普亭可以特定的用于治疗胸癌。

通过IRS-1的酪氨酸磷酸化和随后的IRS-1与GRB2结合至少部分地介导了胰岛素和IFG-I对细胞的生长刺激的影响导致促有丝分裂应答。莱普亭的抗有丝分裂作用可由于其减少碱性，胰岛素诱导和

IGF-I诱导的IRS-1的酪氨酸磷酸化的能力而产生，并导致GRB2与IRS-1的结合的减少。另外，IRS-1是其它生长因子和细胞因子包括IL-4和IL-9的受体激酶的底物(Pernis等人，1995；Yin等人，1995；Yin等人，1994)。所以，莱普亭可以抑制一些或所有前面提到的生长因子和细胞因子以及其它有丝分裂原的促有丝分裂应答，从而抑制各种肿瘤细胞的增殖。

本发明进一步涉及莱普亭衍生物和类似物包括莱普亭，莱普亭融合蛋白质，莱普亭突变蛋白，莱普亭受体拮抗剂，其中的活性部分，或所有这些同样的盐，用于治疗各种癌症。

本发明所用术语“突变蛋白”指莱普亭类似物，其中不同氨基酸残基替代了一个或多个氨基酸残基，或缺失，或在莱普亭的原始序列中加入一个或多个氨基酸残基而与野生型莱普亭或它的活性片断或部分比较时没有改变得到的产物的活性。通过已知的合成和/或通过定位诱变技术，或任何其它适当的已知技术可以制备这些突变蛋白。

任何这样的突变蛋白优选地具有足够双倍于莱普亭的氨基酸序列，如具有与莱普亭或它的活性片断或部分基本相似的活性。所以，通过常规实验，包括将突变蛋白例如进行简单的细胞增殖测试，可以确定是否任何给定的突变蛋白是否基本具有同样的莱普亭活性，由于阻止细胞增殖的突变蛋白保留了足够的莱普亭活性，因此至少具有莱普亭的一个公开的用途，且基本具有相似的活性。

在优选的实施例中，任何这样的突变蛋白与一种莱普亭的序列具有至少40%的同一性或同源性。更具体地说，它具有至少50%，至少60%，至少70%，至少80%，或更具体地说，至少90%的同一性或其同源性。

可以在本发明应用的莱普亭的突变蛋白或它的活性片断或部分

或编码它的核酸，包括作为本领域普通技术人员没有进行实验，基于本发明的理论和指导可以常规获得的替代肽或多聚核苷酸的基本相应序列的有限序列。对于蛋白质化学和结构的详细叙述，参见Schulz，G.E等人，蛋白质结构的原理，Springer-Verlag，纽约，1978；和Creighton，T.E.，蛋白质：结构和分子特性，W.H.Freeman和Co.，旧金山，1983，这些文献作为本发明的参考。对于核苷酸序列替代的出现，如优选的密码子，参见Ausubel等人，出处同上，A.1.1-A.1.24章，和Sambrook等人，分子生物学的最新方案，Interscience，纽约，6.3和6.4章(1987，1992)，参见附录C和D。

本发明的突变蛋白的优选变化是已知的“保守”替代。莱普亭多肽，蛋白质或它的活性片断或部分的保守氨基酸替代可包括具有足够相似的生理化学特性的组中的同义氨基酸以致在组中成员之间的替代将保留分子的生物学功能，Grantham，科学，185卷，862-864(1974)。很清楚，如果插入或缺失仅包括几个氨基酸，例如30以下，优选10个以下，并且没有除去或替代对于功能性构成的关键氨基酸，例如，半胱氨酸，氨基酸的插入和缺失也可以在上面确定的序列中进行而不改变它们的功能，Anfinsen，“控制蛋白质链的折叠的原理”，科学，181卷，223-230(1973)。在本发明的范围内出现了这样的缺失和/或插入产生的蛋白质和突变蛋白。

优选地，同义氨基酸组是那些在表I中确定的。更具体地说，同义氨基酸组是那些在表II中确定的，最优选地，同义氨基酸组是表III中确定的。

表I 优选的同义氨基酸组

氨基酸	同义组
Ser	Ser,Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

表II 更优选的同义氨基酸组

氨基酸	同义组
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

表III 最优选的同义氨基酸组

氨基酸	同义组
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

可以用于获得本发明所用的莱普亭或它的活性部分的突变蛋白中的氨基酸替代的生产实施例包括任何已知的步骤，如授予Mark等人的美国专利RE33,653，4,959,314，4,588,585和4,737,462，授予Koths等人的5,116,943；授予Namen等人的4,965,195；授予Chong等人的4,879,111；和授予Lee等人的5,017,691和美国专利4,904,584(Shaw等人)中公开的赖氨酸替代蛋白质。

在本发明的另一个实施例中，用于本发明的莱普亭或它的活性部分的任何突变蛋白具有基本对应于莱普亭的氨基酸序列。特别是涉及它抑制细胞增殖的范围内，术语“基本对应于”可理解为具有天然蛋白质的序列的最小变化，没有影响天然蛋白质的基本特征的蛋白质。通常认为在“基本对应于”内的变化的类型是由常规DNA编码莱普亭的诱变技术产生的，导致小的修饰，并且以上面讨论的方式筛选需要的活性。

本发明的突变蛋白包括在严格条件下与编码本发明的莱普亭的DNA或RNA杂交的核酸如DNA或RNA编码的蛋白质。这样的核酸将是引物候选物以便确定它是否编码保留本发明的莱普亭的功能活性的多肽。术语“严格条件”指那些本领域的普通技术人员通常称为“严格”的杂交和随后的洗涤条件。参见Ausubel等人，分子生物学中最新方案，出处同上，Interscience， NY，6.3和6.4章(1987，1992)，和Sambrook等人，出处同上。没有限制，严格条件的例子包括低于在研究中的杂交的计算Tm12~20℃的洗涤条件， 例如，2×SSC和0.5% SDS，5分钟，2×SSC和0.1% SDS，15分钟；0.1×SSC和0.5% SDS在37℃ 30~60分钟，然后在68℃ 0.1×SSC和0.5% SDS 30~60分钟。本领域的普通技术人员理解严格条件也依赖于DNA序列的长度，低聚核苷酸探针(如10~40个碱基)或混合的低

聚核苷酸探针。如果使用混合的探针，则优选用氯化四甲铵(TMAC)代替SSC，参见Ausubel，出处同上。

术语“莱普亭融合蛋白质”或简单的“融合蛋白”指与体液中具有残留时间的另一个蛋白质融合的含有莱普亭或它的活性部分或其突变蛋白的多肽。所以，莱普亭或它的活性部分可以与另一个蛋白质，多肽等融合。

术语“盐”指莱普亭，它的活性部分，突变蛋白或其莱普亭融合蛋白的羧基基团的盐和氨基的加酸盐。通过本领域已知的方法形成羧基基团的盐，并且包括无机盐，例如钠，钙，铵，铁或锌盐等及正如那些形成的含有有机碱的盐，例如含有胺，例如三乙醇胺，精氨酸，赖氨酸，哌啶，普鲁卡因等。加酸盐包括含有矿物质酸的盐例如，盐酸，硫酸和含有有机酸的盐，例如乙酸或草酸。当然，任何这样的盐必须具有与莱普亭或它的活性部分基本相似的活性。

本发明所用的“功能衍生物”的定义覆盖了通过本领域的已知方法制备的可以从作为侧链存在于残基或N-或C-末端基团的功能基团制备，并且这样它们尽可能长时间保留药物可接受的，即它们没有破坏与莱普亭的活性基本相似的蛋白质的活性，且含有它的组合物不具有毒性特征将包括的本发明中的制备的。这些衍生物包括可以模拟抗原位点和在体液中扩展莱普亭或它的活性部分的残留的聚乙烯甘油侧链。其它衍生物包括与铵或与初级或次级胺反应的羧基的脂族酯，羧基基团的酰胺，酰成份(例如链烷基或碳环芳香基团)形成的氨基酸残基的游离氨基基团的N酰基衍生物，或酰基成份形成的游离羟基基团(例如丝氨酰或苏氨酰残基)的O-酰基衍生物。

作为莱普亭，莱普亭突变蛋白和莱普亭融合蛋白质的“活性片

断或部分”，本发明覆盖莱普亭的片断或多肽链的前体，或含有莱普亭的任何这样的片断的融合蛋白质，或结合这些分子或与其连接的残基，例如糖或磷酸残基，或任何上面的衍生物的聚集体，提供所述的部分具有莱普亭相似的活性。

本发明进一步涉及抑制细胞增殖的能力基本相似于莱普亭的莱普亭受体的天然和合成拮抗剂的用途。这种拮抗剂选自肽的文库，肽类似物的文库或有机分子的任意文库。通过本领域已知的方法，基本上由结合莱普亭受体的选择拮抗剂的能力进行选择。例如，可以如携带DNA编码与载体蛋白融合的随机肽的原核生物表达质粒制备随机肽的文库。另一个例子为噬菌体表达系统，含有DNA编码随机肽和插入一个内部噬菌体蛋白质的噬菌体的表达系统。从噬菌体文库例如通过在包衣莱普亭受体的表面分离编码融合的肽拮抗剂或拮抗物的噬菌体。分离结合的噬菌体，然后在细菌中扩增。为了获得表达具有莱普亭受体的高亲和力的融合肽的噬菌体，通常需要几轮淘选-扩增。然后扩增分离的噬菌体并且确定了肽的DNA编码序列。另外，通过在多聚体小珠上用本领域已知的方法合成固体相制备随机肽文库或其它分子的文库。 例如通过结合标记莱普亭受体，例如荧光素标记的莱普亭受体可以从文库选择携带肽或具有莱普亭受体亲和力的其它分子的小珠。然后挑选阳性小珠，确定存在于小珠上的肽或其它分子的结构。如果小珠携带肽，通过蛋白质序列分析确定肽序列。如果小珠是代表有机分子的随机文库，那么从小珠上切出分子，通过本领域已知的方法例如质量光谱，核磁共振等确定它的结构。通过它们抑制细胞增殖的能力以前面提到的方法进一步选择由它们的莱普亭受体的亲

和力鉴定的候选物肽。

因此，莱普亭，它的活性部分，莱普亭突变蛋白，莱普亭融合蛋白，莱普亭受体拮抗剂或它们的盐，功能衍生物，和活性片断或其部分表明可用于治疗各种恶性肿瘤，对于生长因子依赖肿瘤，特别是胸癌。

本发明进一步涉及利用含有药物可接受载体的药物组合物和本发明的莱普亭，或它的活性突变蛋白，融合蛋白，莱普亭受体拮抗剂和它们的盐，功能衍生物或其活性部分。

通过混合莱普亭或它的衍生物，或莱普亭受体拮抗剂与生理可接受载体，和/或稳定剂和/或赋形剂可以制备用于给药的本发明的药物组合物，并且制备成剂量形式例如在剂量小瓶中冻干。给药的方法可以是任何可接受的相似试剂的给药方式，并且取决于治疗的条件，例如静脉，肌肉，皮下，局部注射或局部应用，或连续输入等。给药的活性化合物的量将取决于给药的途径，所治疗的疾病和病人的状况。如局部注射比静脉内输入就需要体重基础上的较少量的蛋白质。典型的注射莱普亭的活性量是0.1~1000微克/千克体重和优选地是1~10微克/千克。莱普亭衍生物和莱普亭受体拮抗剂的活性量基本与摩尔基础的莱普亭相同。

莱普亭可以通过注射，单独或结合其它治疗试剂或结合其它治疗途径给药莱普亭。

本发明将通过下面的非限定性实施例说明。

实施例1：通过MTT染色确定细胞增殖

试剂：

MTT储备液：在磷酸缓冲盐中的(3-[4，5-二甲基噻唑-2-基]-

2，5-二苯基四唑鎓溴)5毫克/毫升，—20℃储藏直到使用。

溶剂：在2-丙醇(100毫升)中HCl(450微升)。

方法：在96孔平板中，各种生长刺激剂和生长抑制剂存在时生长细胞。在要求的时间内向每个孔中加入MTT储备液(10微升)。在37℃温育2.5~3小时。利用细针管真空抽吸上清液。加入溶剂(100微升)并且在利用570纳米的过滤器的微板读数器，减去背景在630纳米处读取吸光值。

实施例2：通过晶紫染色确定细胞增殖

方法：在各种生长刺激剂和生长抑制剂存在时96孔平板中的生长细胞。在要求的时间内向每个孔中加入12.5%戊二醛(40微升)。在室温下温育30分钟。然后利用水洗涤微板，干燥和在每个孔中加入结晶紫(0.1%，0.1毫升)。进一步温育微板30分钟，用水洗涤，在540纳米读取，减去630纳米的背景。

实施例3：胰岛素依赖T-47D细胞增殖的确定

在96孔平板中以3×10^5细胞/毫升DMEM和10%胎牛血清(FBS)，每孔0.1毫升播种如T-47D细胞(美国型培养物收藏中心，Rockville， MD； 菌株号，ATCC HTB 133)。在不同孔中加入浓度渐增的人胰岛素。温育平板72小时，然后通过MTT染色确定细胞数目(图1)。结果是8个复份的平均。根据如图1显示的细胞增殖程度， 使用浓度为50纳米的胰岛素做进一步研究。

实施例4：确定IGF-I依赖的TA-47D细胞增殖

在96孔平板与3×10^5细胞/毫升DMEM和10% FBS 以每孔0.1毫升加入人T-47D细胞。 在不同孔中加入浓度渐增的人IGF-I，温育平板3天，然后通过MTT染色确定细胞数(图2)。结果是8个复份的平均。根据图2显示的细胞增殖的程度，使用浓度为50纳克/毫升IGF-I

做进一步研究。

实施例5：莱普亭抑制胰岛素诱导的T-47D细胞增殖

在96孔平板中(0.1毫升/孔)播种补充了10%FBS的DMEM中的T-47D细胞(3×10^5细胞/毫升)。利用胰岛素(50纳米)，有或没有标明浓度的小鼠莱普亭处理细胞。在37℃，5% CO_2温育平板48小时。然后利用MTT染色细胞。数据是平均士标准误差(SE，n=8)。结果显示莱普亭明显抑制胰岛素诱导的细胞增殖(图3)。

在96孔平板(0.1毫升/孔)播种补充 10% FBS 的 DMEM 中的T-47D细胞(3×10^5细胞/毫升)。在一天后，利用 2% FBS 补充的DMEM 替代培养基并且在一天后，利用含有或没有标明浓度的DMEM-2%FBS中的小鼠莱普亭处理细胞。在 37℃， 5% CO_2中温育平板48小时。利用结晶紫染色细胞。数据是平均士SE，(n=8)。结果显示了莱普亭明显抑制胰岛素诱导的细胞增殖(图4)。

实施例6：莱普亭抑制IGF-I诱导的T-47D细胞增殖

在96孔平板(0.1毫升/孔)中播种在补充10% FBS 的DMEM中的T-47D细胞(3×10^5细胞/毫升)。利用含有或没有标明浓度的小鼠莱普亭IGF-I(50纳克/毫升)处理细胞。在37℃，5% CO_2温育48小时。然后利用MTT染色细胞。数据是平均士标准误差(SE，n=8)。结果显示了莱普亭明显抑制IGF-I诱导的细胞增殖(图5)。

在96孔平板(0.1毫升/孔)播种10%FBS补充的DMEM中的T-47D细胞(3×10^5细胞/毫升)。在一天后，利用2% FBS补充的DMEM 替代培养基，并且在一天后，利用含有或没有标明浓度的DMEM-2% FBS 中的小鼠莱普亭的IGF-I(50纳克/毫升)处理细胞。在37℃，5% CO_2 温育平板48小时。然后利用结晶紫染色细胞。数据是平均士标准误差(SE，n=8)。结果显示了莱普亭明显抑制IGF-I诱导的细胞增殖(图6)。

在96孔平板(0.1毫升/孔)播种10% FBS 补充的DMEM中的T-47D细胞(3×10^5细胞/毫升)。在一天后，利用含有2% FBS的DMEM替代培养基，并且在一天后利用含有或没有DMEM-2% FBS中的标明浓度的人莱普亭的IGF-I(50纳克/毫升)处理细胞。在37℃，5% CO_2温育平板48小时。然后利用结晶紫染色细胞。数据是平均士标准误差(SE，n=8)。结果显示了莱普亭明显抑制IGF-I诱导的细胞增殖(图7)。

实施例8：莱普亭抑制胰岛素诱导的MCF7细胞增殖

在96孔平板(0.1毫升/孔)中播种6% FBS 补充的人胸腺癌MCF7细胞(3×10^4细胞/毫升，美国型培养物收藏中心，Rockville，MD；菌株号，ATCC HTB 22)。在一天后，利用无血清DMEM替代培养基，在一天后，利用含有或没有无血清培养基中的标明浓度的小鼠莱普亭的胰岛素(50纳米)处理细胞。在37℃，5% CO_2 温育48小时。然后利用结晶紫染色细胞。数据是平均士SE，(n=8)。结果显示了莱普亭明显抑制胰岛素诱导的细胞增殖(图8)。

实施例9：莱普亭抑制IGF-I诱导的MCF7细胞增殖

在96孔平板中播种10% FBS 补充的DMEM中的人胸腺癌MCF7细胞(3×10^4细胞/毫升，0.1毫升/孔)。在一天后，利用无血清培养基替代培养基。在一天后，利用在无血清培养基中含有或没有标明浓度的小鼠莱普亭的IGF-I(50纳克/毫升)处理细胞。在37℃，5% CO_2温育平板96小时。然后利用结晶紫染色细胞。数据是平均士SE，(n=8)。结果显示了莱普亭明显抑制胰岛素诱导的细胞增殖(图9)。

参考文献

Araki，E.，Lipes，M.A.，Patti，M.E.，Bruning，J.C.，Haag，B.r.，Johnson，R.S.，和Kahn，C.R.(1994)。胰岛素在IRS-1基因的靶理解的小鼠中发现的可替代途径[参见评论]。自然372，189-90。

Ausubel，F.M.等人，编辑，分子生物学中最新方案

Campfield，L.A.，Smith，F.J.，Guisez，Y.，Devos，R.，和Burn，P.(1995)。重组小鼠OB蛋白质：外周信号连接肥胖和中央神经系统的证据，科学，269，546-549。

Cheatham，B.，和Kahn，C.R.(1995)胰岛素作用和胰岛素发生信号系统。内分泌综述，16，117-42。

Cioffi，J.A.，Shafer，A.W.，Zupancic，T.J.，Smith-Gbur，J.Mikhail，A.，Platika，D.，和Snodgrass，H.R.(1996)，新B219/OB受体同工型：莱普亭在血细胞生成和再生中的可能作用。自然医学 2，585-589。

Cohen，B.，Novick，D.，和Rubinstein，M.(1996)。莱普亭调节胰岛素活性。科学274，1185-1188。

Collins，S.，Kuhn，C.M.，Petro，A.E.，Swick，A.G.，Chrunyk，B.A.，和Surwit，R.S.(1996)。莱普亭在脂肪调节中的作用自然，380，677。

Considine，R.V.，Sinha，M.K.，Heiman，M.L.，Kriauciunas，A.，Stephens，T.W.，Nyce，M.R.，Ohannesian，J.P.，Marco，C.C.，Mckee，L.J.，Bauer，T.L.，和 Caro，J.F.(1996)。在正常体重和肥胖的人中的血清免疫反应莱普亭浓度 N Engl J Med 334，292-295。

Felber，J.P.，和Golay，A.(1995)。营养代谢和能量支出的调节，代谢 44，2卷，4-9。

Frederich，R.C.，Hamann，A.，Anderson，S.，Lollmann，B.，Lowell，B.B.，和Flier，J.S.(1995)。在小鼠中莱普亭水平反映身体中脂含量：饮食诱导的对莱普亭作用的抗性的证据。自然方法 1，1311-1314。

Halaas，J.L.，Gajiwala，K.S.，Maffei，M.，Cohen，S.L.，Chait，B.T.，Rabinowitz，D.，Lallone，R.L.，Burley，S.K.，和 Friedman，J.M.(1995)。肥胖基因编码的血浆蛋白质的减重效果[参见评论]。科学 269，543-6。

Lee，G.H.，Proenca，R.，Montez，J.M.，Carroll，K.M.，Darvishzadeh，J.G.，Lee，J.I.，和Friedman，J.M.(1996)。糖尿病小鼠中莱普亭受体的不正常拼接。自然 379，632-635。

Lonnqvist，F.，Arner，P.，Nordfors，L.，和 Schalling，M.(1995)。肥胖基因(ob)在人肥胖受试者的脂肪组织中的过度表达。自然方法 1，950-953。

Maffei，M.，Halaas，J.，Ravussin，E.，Pratley，R.E.，Lee，G.H.，Zhang，Y.，Fei，H.，Kim，S.，Lallone，R.，Ranganathan，S.，Kern，P.A.，和Friedman，J.M.(1995)。在人和啮齿类动物中莱普亭水平：在肥胖和体重减少的受试者中血浆莱普亭和obRNA的测量。自然方法 1，1155-1161。

Milazzo，G.，Sciatta，L.，Papa，V.，Goldfine，I.D.，和Vigneri，R. (1997)。在人胸表皮细胞中ASPB-10胰岛素诱导的增加的促有丝分裂应答和表现型变化：与胰岛素样生长因子-1受体的增强的相互作用的证据。Molec.Carcinogenesis 18，19-25。

Millazzo，G.，Giorgino，F.，Damante，G.，Sung，C.，Stampfer，M.R.，Vigneri，R.，Goldfine，I.，和Belfiore，A.(1992)。在人胸癌细胞系中胰岛素受体的表达，癌症综述 52，3924-3930。

Myers，M.G.，Jr.，Sun，X.J.，Cheatham，B.，Jachna，B.R.，Glasheen，E.M.，Backer，J.M.，和White，M.F.(1993)。IRS-1是胰岛素和胰岛素样生长因子I发信号到磷脂酰肌醇3'-激酶中的共同元素。内分泌学 132，1421-30。

Myers，M.G.，Jr.，Sun，X.J.，和White，M.F.(1994)。IRS-1发信号系统。生物化学科学趋势 19，289-93。

Myers，M.G.，Jr.，Wang，L.M.，Sun，X.J.，Zhang，Y.，Yenush，L.，Schlessinger，J.，Peirce，J.H.，和White，M.F.(1994)。在胰岛素发信号中的IRS-1-GRB-2复合物。分子细胞生物学 14，3577-87。

Myers，M.G.，Jr.，和White，M.F.(1993)。胰岛素发信号的新元素。胰岛素受体底物-1和含有SH2区的蛋白质。糖尿病 42，643-50。

Pelleymounter，M.A.，Cullen，M.J.，Baker，M.B.，Hecht，R.，Winters，D.，Boone，T.，和 Collins，F.(1995)。在ob/ob小鼠中肥胖基因产物对体重调节的影响[参见评论]。科学 269，540-3。

Pernis，A.，Witthuhn，B.，Keegan，A.D.，Nelms，K.，Garfein，E.，Ihle，J.N.，Paul，W.E.，Pierce，J.H.，和Rothman，P.(1995)。经过两个相关途径的白细胞介素4的信号。美国科学院院刊 92，7971-7975。

Rose，D.W.，Saltiel，A.R.，Majumdar，M.，Decker，S.J.，和Olefsky，J.M.(1994)。胰岛素介导的促有丝分裂信号转导需要的胰岛素受体底物1。美国科学院院刊 91，797-801。

Sambrook等人，(1989)分子克隆：实验室手册，科尔德斯普林港实验室出版，科尔德斯普林港，纽约。

Tamemoto，H.，Kadowaki，T.，Tobe，K.，Yagi，T.，

Sakura，H.，Hayakawa，T.，Terauchi，Y.，Ueki，K.，K.aburagi，Y.，Satoh，S.，和等(1994)。在缺乏胰岛素受体底物-1的小鼠中的胰岛素抗性和生长滞后[参见评论]自然 372，182-6。

Tartaglia，L.A.，Dembski，M.，Weng，X.，Deng，N.H.，Culpepper，J.，Devos，R.，Richards，G.J.，Campfield，L.A.，Clark，F.T.，Deeds，J.，Muir，C.，Sanker，S.，Moriarty，A.，Moore，K.J.，Smutko，J.S.，Mays，G.G.，Woolf，E.A.，Monroe，C.A.，和Tepper，R.I.(1995)。莱普亭受体OB-R的鉴定和表达克隆。细胞 83，1263-1271。

Weigle，D.S.，Bukowski，T.R.，Foster，D.C.，Holderman，S.，Kramer，J.M.，Lasser，G.，Loftonday，C.E.，Prunkard，D.E.，Raymond，C.，和 Kuijper，J.L.(1995)。重组ob蛋白质在ob/ob小鼠中减少饮食和体重。临床研究杂志 96，2065-2070。

White，M.F.，和Kahn，C.R.(1994)。胰岛素发信号系统，生物化学杂志 269，1-4。

Yin，T.G.，Keller，S.R.，Quelle，F.W.，Witthuhn，B.A.，Tsang，M.L.S.，；Lienhard，G.E.，Ihle，J.N.，和Yang，Y.C.(1995)。通过JAK酪氨酸激酶白细胞介素-9诱导胰岛素受体底物-1的酪氨酸磷酸化。生物化学杂志 270，20497-20502。

Yin，T.G.，Tsang，M.L.S.，和Yang，Y.C.(1994)。JAK1激酶形成含有白细胞介素-4受体和4PS/胰岛素受体底物-1类似蛋白质，并且在T淋巴细胞中受到白细胞介素-4和白细胞介素-9的活化。生物化学杂志 269，26614-26617。

Zhang，Y.，Proenca，R.，Maffei，M.，Barone，M.，Leopold，L.，和Friedman，J.M.(1994)。小鼠肥胖基因的位置克隆和它的人同源物，自然 372，425-432。

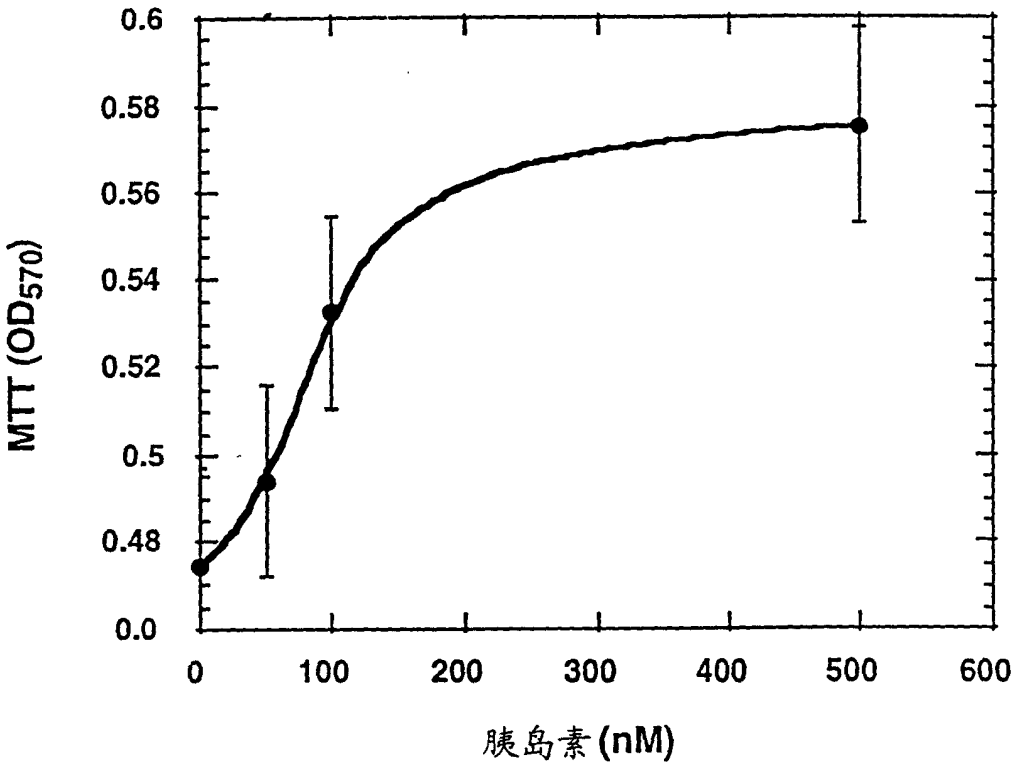

0.6
0.58
0.56
0.54
0.52
0.5
0.48
0.0
MTT (OD570)
0
100
200
300
400
500
600
胰岛素(nM)

图 1

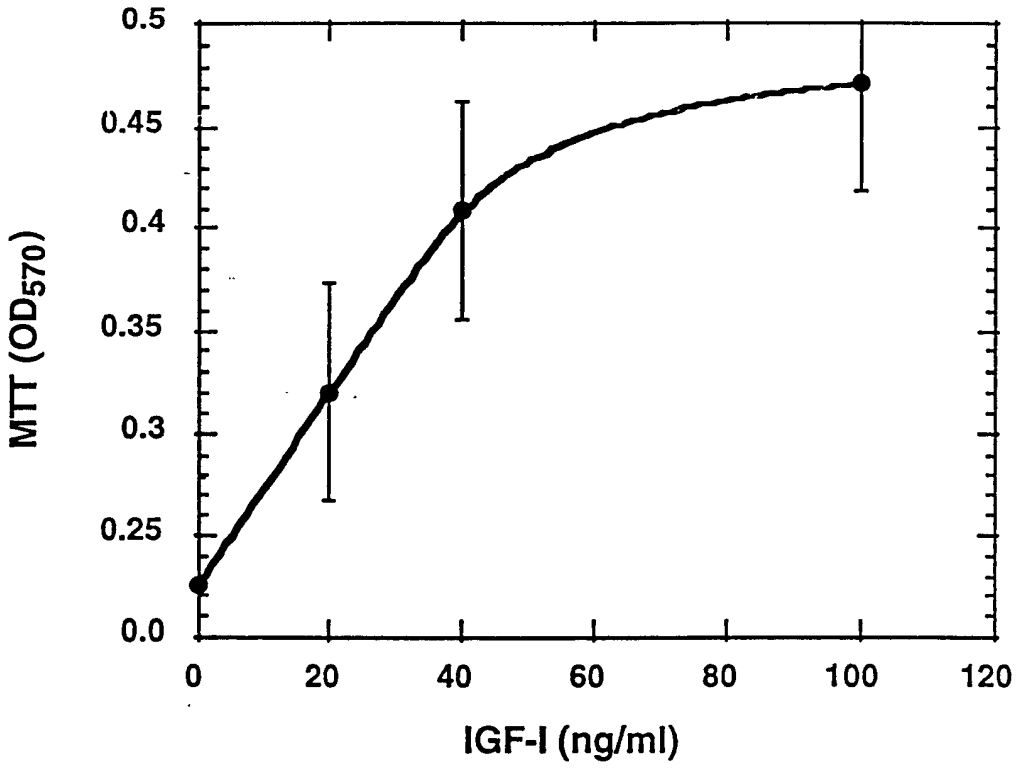

0.5
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.0
MTT (OD570)
0
20
40
60
80
100
120
IGF-I (ng/ml)

图 2

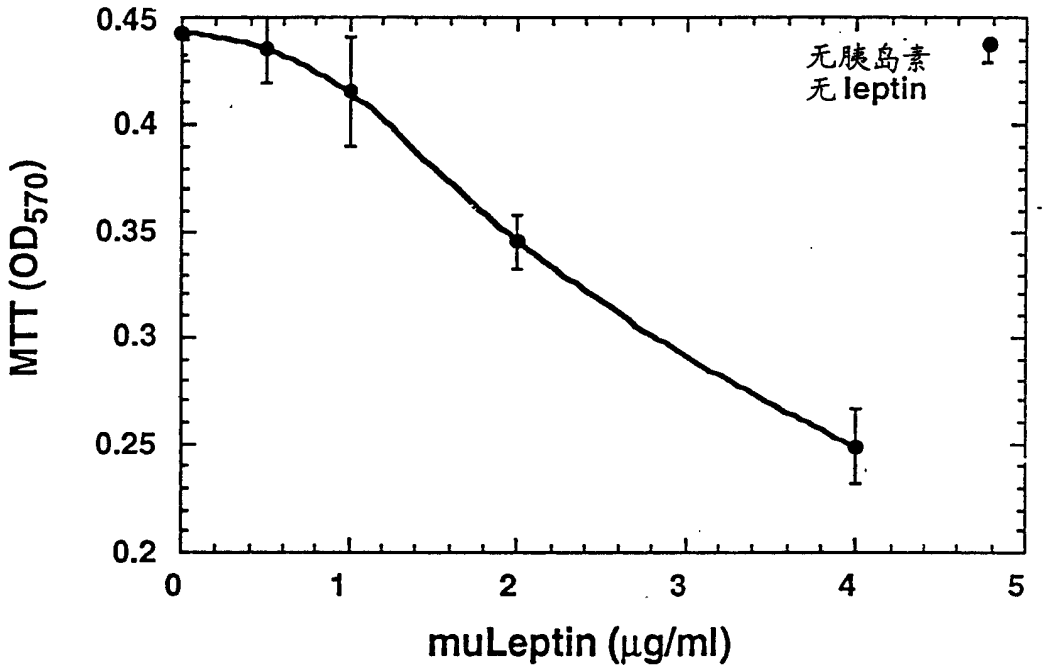

0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
MTT (OD570)
无胰岛素
无 leptin
0
1
2
3
4
5
muLeptin (μg/ml)

图 3

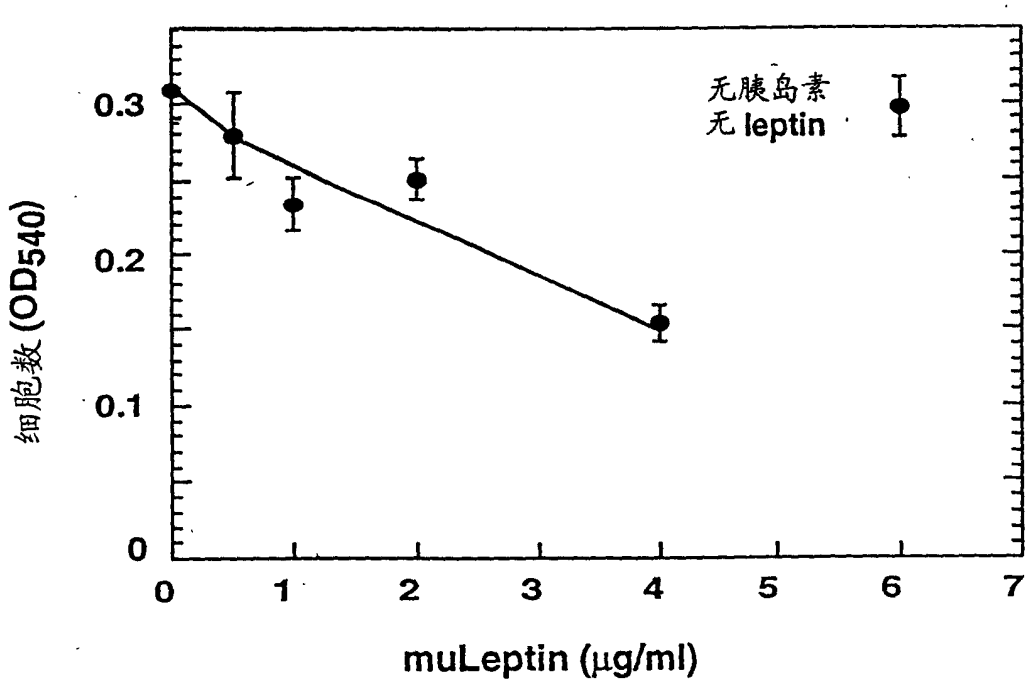

无胰岛素
无 leptin
细胞数 (OD540)
0.3
0.2
0.1
0
0
1
2
3
4
5
6
7
muLeptin (μg/ml)

图 4

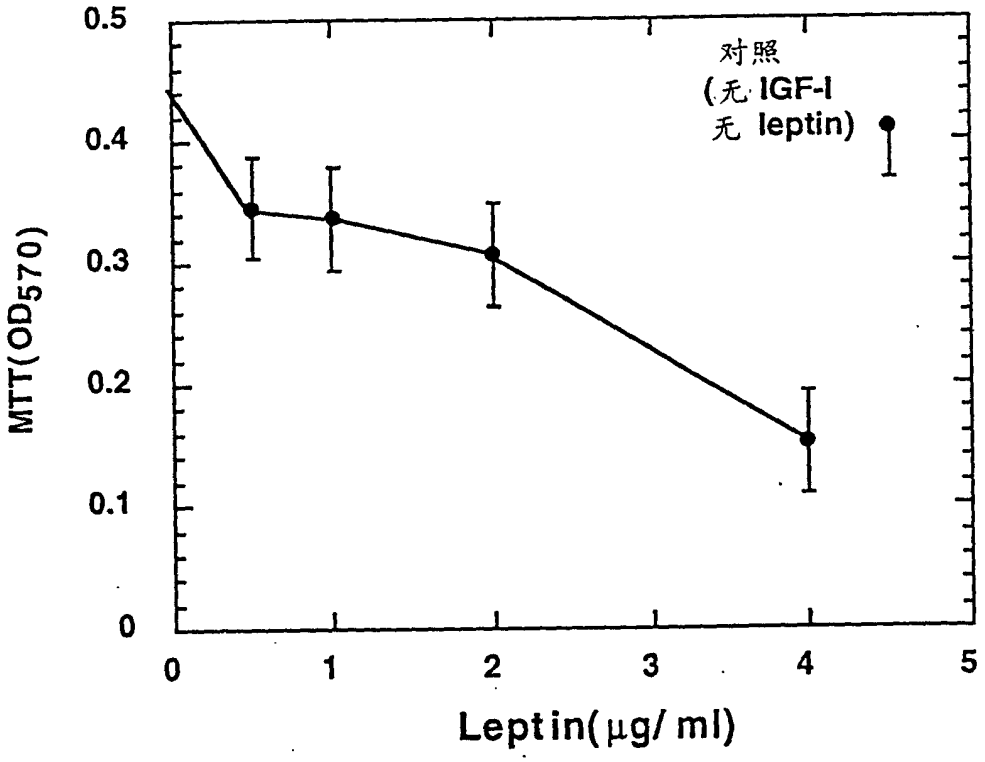

对照
(无 IGF-I
无 leptin)
MTT(OD570)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
1
2
3
4
5
Leptin(μg/ ml)

图 5

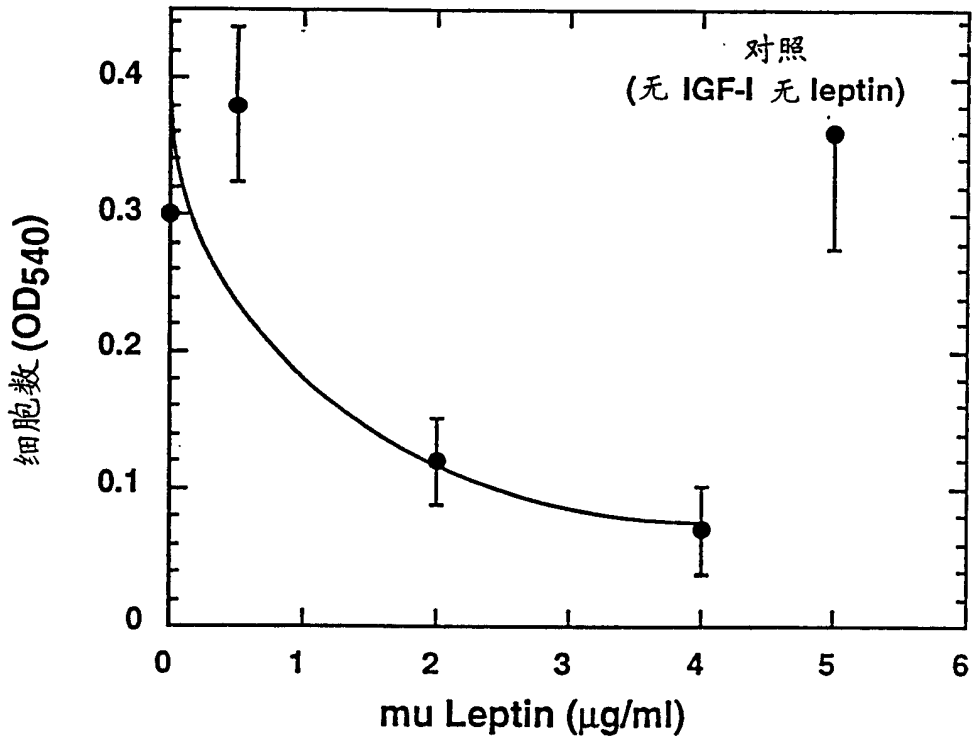

对照
(无 IGF-I 无 leptin)
细胞数 (OD540)
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
1
2
3
4
5
6
mu Leptin (μg/ml)

图 6

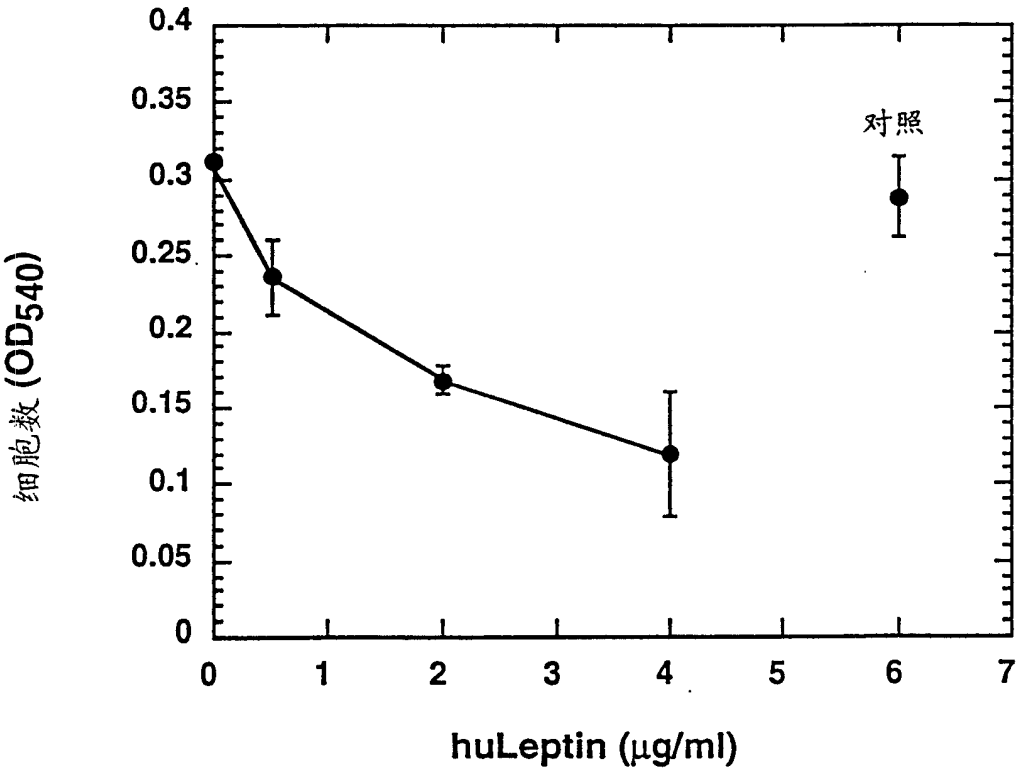

对照
细胞数 (OD540)
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
0
1
2
3
4
5
6
7
huLeptin (μg/ml)

图 7

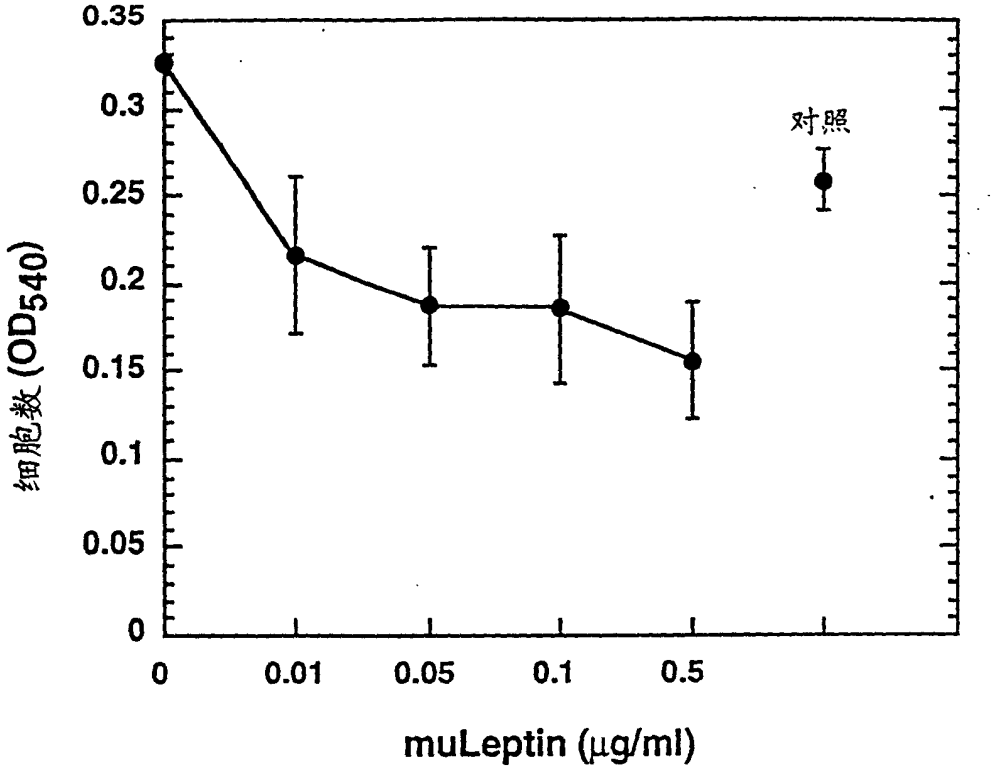

0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
细胞数 (OD540)
对照
0
0.01
0.05
0.1
0.5
muLeptin (μg/ml)

图 8

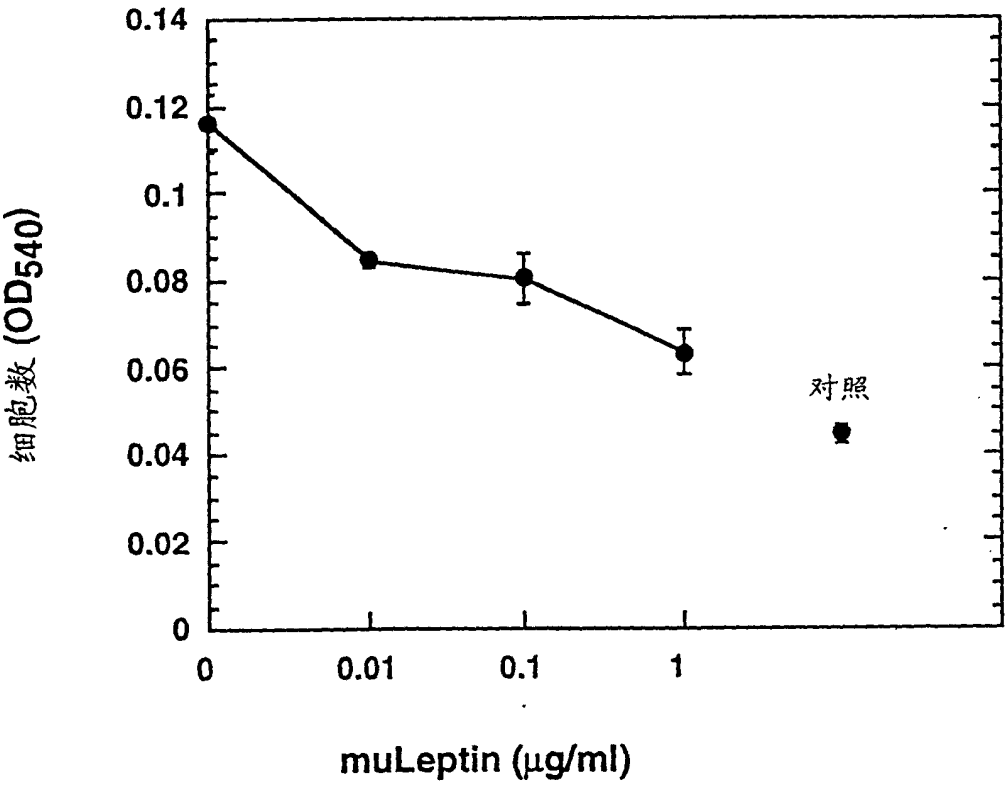

0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
细胞数 (OD540)
对照
0
0.01
0.1
1
muLeptin (μg/ml)

图 9