



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108430491 A

(43)申请公布日 2018.08.21

(21)申请号 201680074733.7

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

(22)申请日 2016.10.20

代理人 史文静 黄革生

(30)优先权数据

1518700.8 2015.10.21 GB

(51)Int.Cl.

A61K 38/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 14/47(2006.01)

2018.06.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2016/053282 2016.10.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/068353 EN 2017.04.27

(71)申请人 HOX治疗有限公司

地址 英国萨里郡

(72)发明人 R·摩根

权利要求书3页 说明书40页
序列表15页 附图8页

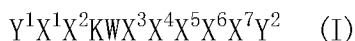
(54)发明名称

肽

(57)摘要

本发明涉及新的肽,其破坏基因转录的PBX依赖性调控,因此可用于治疗或预防发生异常细胞分裂的疾病。特别地,本发明提供了包含氨基酸序列(I)的肽:Y1X1X2KWX3X4X5X6X7Y2(I)其中,序列X1至X7是包含至少7个氨基酸的氨基酸序列,其可任选地被本文所定义的9个氨基酸位置中的一个或多个之间的一个或两个氨基酸残基中断;X1选自W、T、PE、KQI、VV、PQT、H、RI以及不存在;X2是具有芳香族侧链或半胱氨酸的氨基酸;X3是疏水性氨基酸;X4是具有带电侧链的氨基酸;X5是具有碱性侧链的氨基酸;X6是氨基酸或不存在;X7是一个或多个氨基酸或不存在;和Y1和Y2各自不存在或是包含碱性氨基酸的阳离子聚合物的肽,条件是存在Y1和Y2中的至少一个。

1. 一种包含式 (I) 的氨基酸序列的肽：



其中，

序列 X^1 至 X^7 是包含至少7个氨基酸的氨基酸序列，其可任选地在本文所定义的9个氨基酸位置中的一个或多个之间被一个或两个氨基酸残基中断；

X^1 选自W、T、PE、KQI、VV、PQT、H、RI以及不存在；

X^2 是具有芳香族侧链的氨基酸或半胱氨酸；

X^3 是疏水性氨基酸；

X^4 是具有带电侧链的氨基酸；

X^5 是具有碱性侧链的氨基酸；

X^6 是氨基酸或不存在；

X^7 是一个或多个氨基酸或不存在；和

Y^1 和 Y^2 各自不存在或是包含碱性氨基酸的阳离子聚合物的肽，条件是存在 Y^1 和 Y^2 中的至少一个。

2. 根据权利要求1所述的肽，其中 Y^1 和/或 Y^2 是细胞穿透部分。

3. 根据权利要求1或2所述的肽，其中 Y^1 和/或 Y^2 是碱性氨基酸的均聚物。

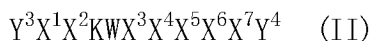
4. 根据前述权利要求中任一项所述的肽，其中 Y^1 和/或 Y^2 的碱性氨基酸选自精氨酸、赖氨酸和组氨酸。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的肽，其中 Y^1 和/或 Y^2 是聚精氨酸肽。

6. 根据权利要求5所述的肽，其中 Y^1 和/或 Y^2 是 $(Arg)_{6-12}$ 。

7. 根据权利要求6所述的肽，其中 Y^1 和/或 Y^2 是 $(Arg)_9$ 。

8. 一种包含式 (II) 的氨基酸序列的肽：



其中，

序列 X^1 至 X^7 是包含至少7个氨基酸的氨基酸序列，其可任选地在本文所定义的9个氨基酸位置中的一个或多个之间被一个或两个氨基酸残基中断；

X^1 选自W、T、PE、KQI、VV、PQT、H、RI以及不存在；

X^2 是具有芳香族侧链的氨基酸或半胱氨酸；

X^3 是疏水性氨基酸；

X^4 是具有带电侧链的氨基酸；

X^5 是具有碱性侧链的氨基酸；

X^6 是氨基酸或不存在；

X^7 是一个或多个氨基酸或不存在；和

Y^3 和 Y^4 各自不存在或是包含含有细胞穿透部分的序列的肽，条件是存在 Y^3 和 Y^4 中的至少一个；

其中所述肽的至少N端和C端氨基酸处于D-构象。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的肽，其中所述序列 X^1 至 X^7 选自WYKWMKKHH、WYKWMKKAA和WYKWMKK。

10. 根据权利要求8或9所述的肽，其中 Y^3 和/或 Y^4 是包含权利要求1至7中任一项所定义

的与Y¹和/或Y²有关的碱性氨基酸的阳离子聚合物的肽。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的肽,其中所述肽具有选自以下的序列:

WYKWMKKHHRRRRRRRRR;

WYKWMKKAARRRRRRRRR;和

WYKWMKKRRRRRRRRR。

12. 根据权利要求8或9所述的肽,其中所述细胞穿透部分包含氨基酸序列

X⁹Q X¹⁰X¹¹X¹²W F Q N X¹³X¹⁴M X¹⁵W X¹⁶X¹⁷

其中,

X⁹是R或Q或不存在;

X¹⁰、X¹²各自独立地是I或L;和

X¹¹、X¹³、X¹⁴、X¹⁵、X¹⁶和X¹⁷各自独立地是K或R。

13. 根据权利要求12所述的肽,其中所述细胞穿透部分包含20个氨基酸的序列:

QIKIWFQNRRMKWKK;

QIRIWFQNRRMKWKK;

QIKIWFQNKRMKWKK;

QIKIWFQNKMKWKK;

QIRIWFQNRKMKWKK;

QIRIWFQNRRMRWKK;

QIRIWFQNRRMKWRK;

QIRIWFQNRRMKWKR;

QIRIWFQNRRMKWRR;

QIRIWFQNRRMKWKK;

QIKIWFQNRRMKWRK;

QIRIWFQNKRMKWRK;

QIKLWFQNRRMKWKK;

QLKLWFQNRRMKWKK;或

QLRIWFQNRRMKWKK。

14. 根据权利要求8所述的肽,其中所述肽具有选自以下的序列:

WYKWMKKHHRQIKIWFQNRRMKWK;
WYKWMKKHHRQIKIWFQNRRMKWKK;
WYKWMKKHHRQIKIWFQNRRMKWK;
WYKWMKKHHRQIKIWFQNRRMKWKK
WYKWMKKHHRQIKIWFQNRRMKWK; 和
WYKWMKKHHRQIKIWFQNRRMKWKK。

15. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-14中任一项所述的肽和一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂和/或运载体。

16. 根据权利要求15所述的药物组合物,其与一种或多种另外的治疗剂组合。

17. 根据权利要求16所述的药物组合物,其中所述一种或多种另外的治疗剂各自选自细胞毒性剂和化学治疗剂。

18. 根据权利要求1至14中任一项所述的肽,其用作药物。

19. 根据权利要求1至14中任一项所述的肽,其用于治疗或预防其中发生异常细胞分裂的病况或病症。

20. 用于权利要求19的用途的根据权利要求19的肽,其中所述病症是癌症。

21. 根据权利要求19或20所述的肽,其与一种或多种用于根据权利要求19或20的用途的细胞毒剂或化学治疗剂组合。

22. 根据权利要求19至21中任一项所述的肽,其用于根据权利要求19至21中任一项的用途,其中所述细胞表达一种或多种Hox基因。

23. 根据任一项前述权利要求所述的用于根据权利要求19-22中任一项的用途的根据权利要求19-22中任一项的肽,其中PBX在所述细胞中不充当癌基因。

24. 根据权利要求1-14中任一项所定义的肽,用于减少细胞毒素或化学治疗剂的副作用。

25. 根据权利要求1至14中任一项所定义的肽,其用于在体内维持或扩增干细胞群。

26. 权利要求1至14中任一项所定义的肽在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防其中发生异常细胞分裂的病症。

27. 一种预防或治疗其中发生异常细胞分裂的病况或病症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求1至14中任一项所定义的肽。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述受试者还被施用细胞毒素或化学治疗剂。

29. 一种离体维持或扩增干细胞的方法,包括使所述干细胞与权利要求1至14中任一项所定义的肽接触。

肽

[0001] 本发明涉及损害PBX依赖性转录调控的新型肽,特别是影响HOX与PBX结合的新型肽及其在许多应用中的用途,包括减少异常细胞分裂,例如治疗某些癌症,以及维持干细胞的多能性,例如,在培养扩增期间维持干细胞的多能性。

[0002] 多种转录因子参与胚胎发育和成体干细胞成熟期间蛋白质表达的调控。同源异型框 (HOX) 基因含有高度保守的约180bp的核苷酸序列,其编码约60个氨基酸的同源结构域。同源结构域是一种DNA结合蛋白结构域,其可以与其他基因中的靶序列结合并在发育过程中调控其表达。聚簇的Hox基因是关键的发育调控因子,并且在整个进化过程中高度保守。它们编码的同源异型HOX蛋白作为转录因子起作用,通过调控从属下游基因如发育基因的转录来控制轴向模式。前B细胞转化相关基因 (PBX) 也是重要的调控蛋白,其通过与HOX协同作用以与靶DNA结合而控制发育过程中的基因表达 (Mann等人,1996,Trends Genet,12 (7),第258-262页)。

[0003] 已知通过抑制PBX与其结合配偶体的结合,可以减少异常细胞生长以预防或治疗发生此类细胞生长的病症或病况。已经发现这种抑制对干细胞具有深远而有用的作用,这允许保持这些细胞的多能性。这些发现提供了重要的临床应用,其中期望的细胞可以被保护并可能被扩增,同时可以防止有害细胞的生长 (Morgan,R.,Pirard,P.M.,Shears,L.,Sohal,J.,Pettengell,R.&Pandha,H.S. (2007) Antagonism of HOX/PBXdimer formation blocks the in vivo proliferation of melanoma.Cancer Res,67,5806-5813;Shears,L.,Plowright,L.,Harrington,K.,Pandha,H.S.& Morgan,R. (2008) Disrupting the interaction between HOXand PBXcauses necrotic and apoptotic cell death in the renal cancer lines CaKi-2and769-P.J Urol,180,2196-2201;Plowright,L.,Harrington,K.J.,Pandha,H.S.&Morgan,R. (2009) HOXtranscription factors are potential therapeutic targets in non-small-cell lung cancer (targeting HOXgenes in lung cancer).Br J Cancer,100,470-475;Daniels,T.R.,Neacato,II,Rodriguez,J.A.,Pandha,H.S.,Morgan,R.&Penichet,M.L. (2010) Disruption of HOXactivity leads to cell death that can be enhanced by the interference of iron uptake in malignant B cells.Leukemia,24,1555-1565;Morgan,R.,Plowright,L.,Harrington,K.J.,Michael,A.&Pandha,H.S. (2010) Targeting HOXand PBXtranscription factors in ovarian cancer.BMC Cancer,10,89;Morgan,R.,Boxall,A.,Harrington,K.J.,Simpson,G.R.,Gillett,C.,Michael,A.&Pandha,H.S. (2012) Targeting the HOX/PBXdimer in breast cancer.Breast Cancer Res Treat,136,389-398;Errico,M.C.,Felicetti,F.,Bottero,L.,Mattia,G.,Boe,A.,Felli,N.,Petrini,M.,Bellenghi,M.,Pandha,H.S.,Calvaruso,M.,Tripodo,C.,Colombo,M.P.,Morgan,R.&Care,A. (2013) The abrogation of the HOXB7/PBX2complexinduces apoptosis in melanoma through the miR-221&222-c-FOS pathway.Int J Cancer,133,879-892;Morgan,R.,Boxall,A.,Harrington,K.J.,Simpson,G.R.,Michael,A.&Pandha,H.S. (2014) Targeting HOXtranscription factors in prostate cancer.BMC Urol,14,17;为了所有目的将其内

容全部并入)。

[0004] 本发明提供了例如,通过干扰PBX及其辅助因子(优选HOX)与其靶DNA(例如影响HOX和PBX蛋白的结合)之间的相互作用来破坏PBX依赖性转录调控(例如激活或抑制)的新肽,其具有下游作用,其可以提供诸如阻止或减少异常细胞分裂和维持干细胞的多能性的巨大优点。特别地,本发明提供了充当PBX调控剂的新型肽,特别是拮抗剂,更特别是,HOX蛋白的六肽区域与PBX的结合的拮抗剂。

[0005] 在一个方面,本发明提供了包含式(I)的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)或由其组成的肽:

[0006] $Y^1X^1X^2KW^3X^4X^5X^6X^7Y^2$ (I)

[0007] 或可以任选地被例如,标签或附着部分取代的其功能等同的衍生物、变体或片段,

[0008] 其中,

[0009] 序列 X^1 至 X^7 是包含至少7个氨基酸的氨基酸序列,其可以任选地在本文所定义的9个氨基酸位置中被一个或多个之间的一个或两个氨基酸残基中断;

[0010] X^1 选自W、T、PE、KQI、VV、PQT、H、RI以及不存在;

[0011] X^2 是具有芳香族侧链的氨基酸或半胱氨酸;

[0012] X^3 是疏水性氨基酸;

[0013] X^4 是具有带电侧链的氨基酸;

[0014] X^5 是具有碱性侧链的氨基酸;

[0015] X^6 是氨基酸或不存在;

[0016] X^7 是一个或多个氨基酸或不存在;和

[0017] Y^1 和 Y^2 各自不存在或是包含碱性氨基酸的阳离子聚合物的肽,条件是存在 Y^1 和 Y^2 中的至少一个。

[0018] 在整个说明书和随后的权利要求中,除非上下文另有要求,否则词语“包含”或其各种词性形式应理解为包含所陈述的整体或步骤或整体或步骤组,但不排除任何其他整体或步骤或整体或步骤组。

[0019] 技术人员将会理解,当两个或更多个氨基酸结合形成肽时,水的元素被去除,并且每个氨基酸残留的被称为氨基酸残基。氨基酸残基是氨基酸的一部分,使其与所有其他氨基酸相比独一无二。同样地,在本文中在肽中所含氨基酸序列的上下文中的“氨基酸”的引用将被理解为适当地指相应的氨基酸残基。

[0020] 如本文所述的“肽”是具有少于100个氨基酸残基的分子;特别是长度小于50个残基;更特别是长度小于30个残基;更特别是长度为10至25个残基。

[0021] 这样的PBX调控剂肽对碱性氨基酸的阳离子聚合物例如聚精氨酸序列的附着可以产生改善的效力。特别是,通过使用这种阳离子聚合物作为细胞穿透部分,与使用其他细胞穿透序列相比,可以更迅速地观察到肽的作用。

[0022] 在一个实施例中, X^1 选自W、T、PE、KQI、VV、PQT、H和RI。在另一个实施方案中, X^1 是W。

[0023] 在一个实施方案中, X^2 选自C、Y、F和W。在另一个实施方案中, X^2 是Y。

[0024] 在一个实施方案中, X^3 选自M、I、V和L。在另一个实施方案中, X^3 是M。

[0025] 在一个实施方案中, X^4 选自K、D、R和H。在另一个实施方案中, X^4 选自K、D和R。在另一个实施方案中, X^4 是K或R。在又一个实施方案中, X^4 是K。

[0026] 在一个实施方案中, X^5 是 K 或 R。在另一个实施方案中, X^5 是 K。

[0027] 在一个实施方案中, X^6 选自 K、R、E、H、D、N、Q、S、T 和 A。在另一个实施方案中, X^6 是 H 或 A。在替代实施方案中, X^6 不存在。

[0028] 在一个实施方案中, X^7 选自 K、R、E、H、D、N、Q、S、T、A 和 G。在另一个实施方案中, X^7 是 H、HR、A、AR 或 G。在又一个实施方案中, X^7 是 H 或 A。在又一个实施方案中, X^7 是 A。在替代实施方案中, X^7 不存在。

[0029] 在一个实施方案中, Y^1 和 Y^2 各自不存在或是包含碱性氨基酸的阳离子均聚物的肽, 使得存在 Y^1 和 Y^2 中的至少一个。在另一个实施方案中, Y^1 和 Y^2 的碱性氨基酸 (如果存在的话) 选自精氨酸。

[0030] 在一个实施方案中, Y^1 和/或 Y^2 充当细胞穿透部分或包含充当细胞穿透部分的序列。

[0031] 适当地, Y^1 和/或 Y^2 部分充当细胞穿透部分以允许或帮助肽进入细胞。

[0032] 适当地, X^1 至 X^7 序列对应于能够干扰体内 HOX 和 PBX 之间相互作用的序列。

[0033] 本发明的肽包含本文所述的任何序列 X^1 至 X^7 或由其组成, 与本文所述的任何肽 Y^1 和/或 Y^2 连接。也就是说, 本文所述的任何碱性氨基酸的阳离子聚合物可以与本文所述的任何 X^1 至 X^7 序列组合使用, 并且可以位于肽 X^1 至 X^7 的 C 端、N 端或两个末端。

[0034] 在上述序列 (I) 中, X^1 至 X^4 形成六肽序列。

[0035] 在一个实施方案中, 式 (I) 的肽具有下式:

[0036] $Y^1WYKWMKKHHY^2$ (SEQ ID NO:3)

[0037] 或其功能等同的衍生物、变体或片段, 其中 Y^1 和 Y^2 如本文所定义。

[0038] 序列 X^1 至 X^7 可以是 WYKWMKKHH (SEQ ID NO:10) 或 WYKWMKKHHR (SEQ ID NO:11), 或者 X^1 至 X^7 可以是序列 WYKWMKKHH (SEQ ID NO:10) 的变体, 例如其中一个、两个、三个、四个或更多个氨基酸在上述式 (I) 的限制内变化的变体。例如, 位置 X^1 处的 W 可以不存在, 或者可以被选自 T、PE、KQI、VV、PQT、H 和 RI 中的任何一个代替; 位置 X^2 处的 Y 可以被另一个具有芳香族侧链的氨基酸或半胱氨酸代替, 特别是选自 C、F 和 W, 更特别是 C; X^3 可以被另一个疏水性氨基酸代替, 特别是选自 L、I 和 V; 位置 X^4 处的 K 可被具有带电侧链的另一氨基酸代替, 特别是选自 D、R 和 H, 更特别是 R; 位置 X^5 处的 K 可被具有碱性侧链的另一氨基酸代替, 特别是 R; 位置 X^6 处的 H 可以被另一种氨基酸代替, 特别是选自 K、R、E、D、N、Q、S 和 T, 更特别是 T; 位置 X^7 处的 H 可以被任何其他一个或多个氨基酸代替或可以不存在, 例如 X^7 可以是 T 或不存在。可以进行这些取代中的任何一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个以产生落入上述式 (I) 范围内的替代肽。

[0039] 在另一个实施方案中, 式 (I) 的肽具有下式:

[0040] $Y^1WYKWMKKAAY^2$ (SEQ ID NO:4)

[0041] 或其功能等同的衍生物、变体或片段, 其中 Y^1 和 Y^2 如本文所定义。

[0042] 序列 X^1 至 X^7 可以是 WYKWMKKAA (SEQ ID NO:12) 或 WYKWMKKAAR (SEQ ID NO:13), 或者 X^1 至 X^7 可以是序列 WYKWMKKAA (SEQ ID NO:12) 的变体, 例如其中一个、两个、三个、四个或更多个氨基酸在上述式 (I) 的限制内变化的变体。例如, 位置 X^1 处的 W 可以不存在, 或者可以被选自 T、PE、KQI、VV、PQT、H 和 RI 中的任何一个代替; 位置 X^2 处的 Y 可以被另一个具有芳香族侧链的氨基酸或半胱氨酸代替, 特别是选自 C、F 和 W, 更特别是 C; X^3 可以被另一个疏水性氨基

酸代替,特别是选自L、I和V;位置 X^4 处的K可被具有带电侧链的另一氨基酸代替,特别是选自D、R和H,更特别是R;位置 X^5 处的K可被具有碱性侧链的另一氨基酸代替,特别是R;位置 X^6 处的A可以被另一个氨基酸代替,特别是选自K、R、E、D、N、Q、S和T,更特别是T;位置 X^7 处的A可以被任何其他一个或多个氨基酸代替或可以不存在,例如 X^7 可以是T或不存在。可以进行这些取代中的任何一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个以产生落入上述式(I)范围内的替代肽。

[0043] 在另一个实施方案中,式(I)的肽具有下式:

[0044] $Y^1WYKWMKKY^2$ (SEQ ID NO:5)

[0045] 或其功能等同的衍生物、变体或片段,其中 Y^1 和 Y^2 如本文所定义。

[0046] 序列 X^1 至 X^7 可以是WYKWMKK (SEQ ID NO:14) 或WYKWMKKR (SEQ ID NO:15),或者 X^1 至 X^5 可以是序列WYKWMKK (SEQ ID NO:14) 的变体,例如其中一个、两个、三个、四个或更多个氨基酸在上述式(I)的限制内变化的变体。例如,位置 X^1 处的W可以不存在,或者可以被选自T、PE、KQI、VV、PQT、H和RI中的任何一个代替;位置 X^2 处的Y可以被另一个具有芳香族侧链的氨基酸或半胱氨酸代替,特别是选自C、F和W,更特别是C; X^3 可以被另一种疏水性氨基酸代替,特别是选自L、I和V;位置 X^4 处的K可被具有带电侧链的另一氨基酸代替,特别是选自D、R和H,更特别是R;位置 X^5 处的K可以被具有碱性侧链的另一氨基酸代替,特别是R。可以进行这些取代中的任何一个、两个、三个、四个或五个以产生落入上述式(I)范围内的替代肽。

[0047] 在一个实施方案中,氨基酸取代发生在位置 X^2 ,和 X^3 至 X^7 。在另一个实施方案中,氨基酸取代发生在位置 X^3 至 X^7 中的一个、两个、三个或四个。

[0048] 例如,在一个实施方案中,上式(I)中的残基 X^1 至 X^7 可以是:

[0049] $X^1=W$; $X^2=Y$ 或C; $X^3=M$ 、I、V或L; $X^4=K$ 、R或D; $X^5=K$ 或R; $X^6=H$ 、A、T或不存在; X^7 =任何氨基酸或不存在;

[0050] $X^1=W$; $X^2=Y$ 或C; $X^3=M$ 、I、V或L; $X^4=K$ 、R或D; $X^5=K$ 或R; $X^6=H$ 、A、T或不存在; $X^7=H$ 、HR、A、AR、T、G或不存在;

[0051] $X^1=W$; $X^2=Y$; $X^3=M$ 、I、V或L; $X^4=K$ 或R; $X^5=K$ 或R; $X^6=H$ 、A、T或不存在; X^7 =任何氨基酸或不存在;

[0052] $X^1=W$; $X^2=Y$; $X^3=M$ 、I、V或L; $X^4=K$ 或R; $X^5=K$ 或R; $X^6=H$ 、A或T; $X^7=H$ 、HR、A、AR、T、G或不存在。

[0053] X^1 至 X^7 的合适序列包括:

[0054] WYKWMKKHH (SEQ ID NO:10)

[0055] WCKWLDRHG (SEQ ID NO:19)

[0056] WYKWVKKHH (SEQ ID NO:20)

[0057] WYKWIKKHH (SEQ ID NO:21)

[0058] WYKWMRKHH (SEQ ID NO:22)

[0059] WYKWMKRHH (SEQ ID NO:23)

[0060] WYKWMRRHH (SEQ ID NO:24)

[0061] WYKWMKKTH (SEQ ID NO:25)

[0062] WYKWMKKHT (SEQ ID NO:26)

[0063] WYKWMKKTT (SEQ ID NO:27)

- [0064] WCKWMKKHH (SEQ ID NO:28)
- [0065] WCKWMRKHH (SEQ ID NO:29)
- [0066] WCKWMKRHH (SEQ ID NO:37)
- [0067] WCKWMRRHH (SEQ ID NO:38)
- [0068] WYKWMKRTH (SEQ ID NO:39)
- [0069] WYKWMRKTH (SEQ ID NO:40)
- [0070] WYKWMRRTH (SEQ ID NO:41)
- [0071] WYKWMRKHT (SEQ ID NO:42)
- [0072] WYKWMKRHT (SEQ ID NO:43)
- [0073] WYKWMRRHT (SEQ ID NO:44)
- [0074] WYKWMRRTT (SEQ ID NO:45)
- [0075] WYKWLRKHH (SEQ ID NO:46)
- [0076] WYKWLRHH (SEQ ID NO:47)
- [0077] WYKWMKKH (SEQ ID NO:48)
- [0078] WYKWMKAA (SEQ ID NO:12)
- [0079] WCKWLDRA (SEQ ID NO:49)
- [0080] WYKWVKAA (SEQ ID NO:50)
- [0081] WYKWKAA (SEQ ID NO:51)
- [0082] WYKWMKAA (SEQ ID NO:52)
- [0083] WYKWMKRAA (SEQ ID NO:53)
- [0084] WYKWMRRAA (SEQ ID NO:54)
- [0085] WYKWMKKA (SEQ ID NO:55)
- [0086] WYKWMKAT (SEQ ID NO:56)
- [0087] WCKWMKAA (SEQ ID NO:57)
- [0088] WCKWMKAA (SEQ ID NO:58)
- [0089] WCKWMKRAA (SEQ ID NO:59)
- [0090] WCKWMRRAA (SEQ ID NO:60)
- [0091] WYKWMKRTA (SEQ ID NO:61)
- [0092] WYKWMRKTA (SEQ ID NO:62)
- [0093] WYKWMRRTA (SEQ ID NO:63)
- [0094] WYKWMRKAT (SEQ ID NO:64)
- [0095] WYKWMKRAT (SEQ ID NO:65)
- [0096] WYKWMRRAT (SEQ ID NO:66)
- [0097] WYKWLRKAA (SEQ ID NO:67)
- [0098] WYKWLRKAA (SEQ ID NO:68)
- [0099] WYKWMKKA (SEQ ID NO:69)
- [0100] WYKWMKK (SEQ ID NO:14)

[0101] 这些变体 X^1 - X^7 序列中的任何一个可以与本文所述的任何 Y^1 和/或 Y^2 残基组合使用。例如,本文所述的任何 X^1 - X^7 序列可与(Arg)₆₋₁₂肽一起使用,例如(Arg)₆[SEQ ID NO:

90], (Arg)₇[SEQ ID NO:91], (Arg)₈[SEQ ID NO:92], (Arg)₉[SEQ ID NO:9], (Arg)₁₀[SEQ ID NO:93], (Arg)₁₁[SEQ ID NO:94]或(Arg)₁₂[SEQ ID NO:95]肽,其在C-端、N-端或两端连接。

[0102] 如上所述,Y¹和/或Y²是或包含碱性氨基酸的阳离子聚合物。通常,Y¹和/或Y²包含能够充当细胞穿透部分的序列。

[0103] 在一个实施方案中,Y¹通过X¹上的N端氨基连接。在替代实施方案中,Y¹通过X¹的侧链连接。在一个实施方案中,Y²通过X⁷上的C端羧基连接。在替代实施方案中,Y²通过X⁷的侧链连接。当存在时,Y¹和Y²各自适当地为任选被取代的50个氨基酸或更少的肽。

[0104] 如本文所用,“细胞穿透部分”是指帮助或促进其所连接的分子进入细胞的分子、结构或分子集合。

[0105] 在Y¹和/或Y²的背景中,可以使用任何可以允许或帮助分子(例如与其连接的肽)进入细胞的碱性氨基酸的阳离子聚合物。该部分可以是能够进入多种细胞类型的通常作用的物质,或者可以是对待处理的特定细胞类型特异的或靶向它的。

[0106] 细胞穿透部分可以直接与肽X¹至X⁷连接,或者可以通过一个或多个氨基酸的接头序列连接。接头序列可包含位置X⁷处的氨基酸。通常,接头包含不具有大体积侧基的氨基酸,因此不阻碍蛋白质例如丝氨酸和甘氨酸的折叠。接头允许细胞穿透部分辅助或促进肽进入细胞,并且还允许肽的HOX-PBX相互作用部分干扰HOX-PBX结合。接头可以是柔性的氨基酸接头。接头通常具有多达20个氨基酸的长度,例如5至18或10至16个,特别是15个氨基酸。

[0107] 或者,细胞穿透部分可以与肽X¹至X⁷结合,例如,可以与所述肽包封或形成复合物,例如,通过使用用于脂转染的脂质体或聚阳离子或阳离子脂质。如本文所用的“与...结合”是指该部分以某种方式附着到或连接至肽。

[0108] 在一个实施方案中,Y¹和/或Y²是或包含阳离子聚合物或其药学上可接受的盐。

[0109] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指保留本发明化合物的生物学有效性和性质并且通常不是生物学或其他方面不合需要的盐。由于存在氨基和/或羧基或与其类似的基团,本发明的肽能够形成酸和/或碱盐。

[0110] 药学可接受的酸加成盐可以使用无机酸和有机酸形成,例如乙酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、溴化物/氢溴酸盐、碳酸氢盐/碳酸盐、硫酸氢盐/硫酸盐、樟脑磺酸盐、氯化物/盐酸盐、chlorotheophyllonate、柠檬酸盐、乙二磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、马尿酸盐、氢碘酸盐/碘化物、羟乙基磺酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、萘甲酸盐、萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、十八酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、磷酸盐/磷酸氢盐/二氢磷酸盐、聚半乳糖醛酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、磺基水杨酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐、三氟乙酸盐和三氟甲基磺酸盐。

[0111] 可以衍生盐的无机酸包括,例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。可以衍生盐的有机酸包括,例如乙酸、丙酸、乙醇酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、甲苯磺酸、三氟甲基磺酸、磺基水杨酸等。药学可接受的碱加成盐可以与无机碱和有机碱形成。

[0112] 可以衍生盐的无机碱包括,例如铵盐和来自周期表I-XII栏的金属。在一些实施方

案中,盐可以衍生自钠、钾、铵、钙、镁、铁、银、锌和铜;特别合适的盐包括铵、钾、钠、钙和镁盐。

[0113] 可以衍生盐的有机碱包括,例如伯、仲和叔胺类、取代的胺类包括天然存在的取代的胺类、环胺类、碱性离子交换树脂等。一些有机胺类包括异丙胺、苄星青霉素、胆碱酸盐(choline)、二乙醇胺、二乙胺、赖氨酸、葡甲胺、哌嗪和氨丁三醇。

[0114] 此外,本发明的肽,包括它们的盐,也可以以其水合物的形式获得,或者包括用于其结晶的其它溶剂。

[0115] 本发明的肽,即含有能够充当氢键供体和/或受体的基团的式(I)的肽可能与适当的共晶形成剂形成共晶。这些共晶可以通过已知的共晶形成程序从式(I)的肽制备。这样的程序包括在结晶条件下研磨、加热、共升华、共熔化或在溶液中使式(I)化合物与共晶体形成剂接触并分离由此形成的共晶。适当的共晶体形成剂包括在WO 2004/078163中描述的那些。因此,本发明进一步提供了包含式(I)的肽的共晶。

[0116] 技术人员将理解,当存在碱性基团和酸性基团时,本发明的肽也可以形成内盐,例如两性离子。

[0117] Y^1 和/或 Y^2 是或包含碱性氨基酸的阳离子聚合物。适当的碱性氨基酸选自赖氨酸、精氨酸和组氨酸。这种聚氨基酸是从Sigma-Aldrich易于获得的。

[0118] Y^1 和/或 Y^2 可以是或可以包含碱性氨基酸的均聚物。例如, Y^1 和/或 Y^2 可以是聚精氨酸、聚赖氨酸或聚组氨酸。或者,聚氨基酸可以是一种或多种碱性氨基酸的聚合物,任选还包含一种或多种非碱性氨基酸。因此聚氨基酸可以包含一个或多个碱性氨基酸和任选的一个或多个其他氨基酸。这种共聚物通常包含大部分碱性氨基酸。例如,共聚物中50-100%的氨基酸可以是碱性的。适当地,60-90%或70-80%是碱性的。在一个实施方案中,共聚物中至少75%,例如至少85%、95%、98%或99%的氨基酸是碱性的。在一个实施方案中,这些碱性氨基酸或这样的碱性氨基酸组可以作为共聚物内仅碱性氨基酸的链位于一起。通常,碱性氨基酸包含赖氨酸、组氨酸和精氨酸中的一种或多种。当共聚物包含一种或多种非碱性氨基酸时,它们优选不是酸性氨基酸,例如天冬氨酸或谷氨酸。一种或多种非碱性氨基酸可以包括具有脂族或芳族侧链的氨基酸,例如苏氨酸、脯氨酸、色氨酸、丝氨酸或苯丙氨酸。

[0119] 任何上述聚氨基酸中的氨基酸可以是L或D氨基酸。

[0120] 在一个实施方案中,聚胺是精氨酸(Arg) $_x$ 或赖氨酸(Lys) $_x$ 的均聚物。聚-L-精氨酸或聚-L-赖氨酸是适当的,特别是聚-L-精氨酸。通常,均聚物具有约500至15000的分子量,例如500至10000、500至5000或500至1000。在一个实施方案中,上式中的x范围可以为3至100,例如3至50、3至30或3至20。

[0121] 小肽均聚物是特别适当的,例如具有500至1500,例如500至1250或700至1000的分子量的那些。通常,在小肽中,x具有3至15的值,例如6至12。例如, Y^1 和/或 Y^2 可以是或包含由6至12个精氨酸残基组成的聚精氨酸。本文例举的是其中 Y^1 和/或 Y^2 是(Arg) $_9$ 的肽,例如其中 Y^1 不存在且 Y^2 是Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg (SEQ ID NO:9)。

[0122] 特别地,适当的肽因此包括其中 Y^1 和/或 Y^2 =(Arg) $_9$ 的那些。

[0123] 特别地,适当的肽具有序列

[0124] WYKWMKKHHRRRRRRRRR (SEQ ID NO:6);

[0125] WYKWMKKAARRRRRRRRR (SEQ ID NO:7);

[0126] WYKWMKKRRRRRRRRR (SEQ ID NO:8) ;

[0127] 或其功能等同的衍生物、变体或片段。

[0128] 式(I)的肽中的氨基酸可以是L或D氨基酸。

[0129] 肽中的所有氨基酸可以具有相同的立体化学,例如,肽可以仅由L-氨基酸组成或仅由D-氨基酸组成。或者,肽可以包含L-和D-氨基酸的组合。如下所解释,通过改变肽中L-氨基酸和D-氨基酸的数量和位置,可能影响所得肽的稳定性,例如肽施用于身体后的稳定性。在一个实施方案中,肽的至少N端和C端的多数氨基酸为D-构象,而其余氨基酸为L-构象。

[0130] 任选地,一个、两个、三个、四个或更多个其他氨基酸也处于D构象。任选地,位置 X^7 或与位置 X^7 相邻的一个或多个氨基酸处于D-构象。任选地,位置 X^2 至 X^3 处的氨基酸处于L-构象。

[0131] 已知PBX调控剂肽的稳定性可以通过在肽中掺入一个或多个D-氨基酸来改进。特别是,通过在肽的至少N-和C-端位置使用D氨基酸可以改善血浆中肽的半衰期。在包含多种细胞穿透序列的肽中可见这种改善的半衰期。

[0132] 因此,在第二个实施方案中,本发明的肽包含式(II)的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)或由其组成:

[0133] $Y^3X^1X^2KW X^3X^4X^5X^6X^7Y^4$ (II)

[0134] 其中,

[0135] 序列 X^1 至 X^7 是包含至少7个氨基酸的氨基酸序列,其可以任选地在本文所定义的9个氨基酸位置中的一个或多个之间被一个或两个氨基酸残基中断;

[0136] X^1 选自W、T、PE、KQI、VV、PQT、H、RI以及不存在;

[0137] X^2 是具有芳香族侧链的氨基酸或半胱氨酸;

[0138] X^3 是疏水性氨基酸;

[0139] X^4 是具有带电侧链的氨基酸;

[0140] X^5 是具有碱性侧链的氨基酸;

[0141] X^6 是氨基酸或不存在;

[0142] X^7 是一个或多个氨基酸或不存在;和

[0143] Y^3 和 Y^4 各自不存在或是包含具有细胞穿透部分的序列的肽,条件是存在 Y^3 和 Y^4 中的至少一个;

[0144] 其中所述肽的至少N端和C端氨基酸处于D-构象;

[0145] 或其功能等同的衍生物、变体或片段。

[0146] 在一个实施例中, X^1 选自W、T、PE、KQI、VV、PQT、H和RI。在另一个实施方案中, X^1 是W。

[0147] 在一个实施方案中, X^2 选自C、Y、F和W。在另一个实施方案中, X^2 是Y。

[0148] 在一个实施方案中, X^3 选自M、I、V和L。在另一个实施方案中, X^3 是M。

[0149] 在一个实施方案中, X^4 选自K、D、R和H。在另一个实施方案中, X^4 选自K、D和R。在另一个实施方案中, X^4 是K或R。在又一个实施方案中, X^4 是K。

[0150] 在一个实施方案中, X^5 是K或R。在另一个实施方案中, X^5 是K。

[0151] 在一个实施方案中, X^6 选自K、R、E、H、D、N、Q、S、T和A。在另一个实施方案中, X^6 是H或A。在替代实施方案中, X^6 不存在。

[0152] 在一个实施方案中, X^7 选自 K、R、E、H、D、N、Q、S、T、A 和 G。在另一个实施方案中, X^7 是 H、A 或 G。在又一个实施方案中, X^7 是 H 或 A。在又一个实施方案中, X^7 是 A。在替代实施方案中, X^7 不存在。

[0153] 在上述序列中, X^1 至 X^4 形成六肽序列。

[0154] 在一个实施方案中, 式 (II) 的肽具有下式:

[0155] $Y^3WYKWMKKHHY^4$ (SEQ ID NO:16)

[0156] 或其功能等同的衍生物、变体或片段, 其中 Y^3 和 Y^4 如本文所定义。

[0157] 序列 X^1 至 X^7 可以是 WYKWMKKHH (SEQ ID NO:10) 或 WYKWMKKHHR (SEQ ID NO:11), 或者 X^1 至 X^7 可以是序列 WYKWMKKHH (SEQ ID NO:10) 的变体, 例如其中一个、两个、三个、四个或更多个氨基酸在上述式 (I) 的限制内变化的变体。例如, 位置 X^1 处的 W 可以不存在, 或者可以被选自 T、PE、KQI、VV、PQT、H 和 RI 中的任何一个代替; 位置 X^2 处的 Y 可以被另一个具有芳香族侧链的氨基酸或半胱氨酸代替, 特别是选自 C、F 和 W, 更特别是 C; X^3 可以被另一个疏水性氨基酸代替, 特别是选自 L、I 和 V; 位置 X^4 处的 K 可被具有带电侧链的另一氨基酸代替, 特别是选自 D、R 和 H, 更特别是 R; 位置 X^5 处的 K 可被具有碱性侧链的另一氨基酸代替, 特别是 R; 位置 X^6 处的 H 可以被另一种氨基酸代替, 特别是选自 K、R、E、D、N、Q、S 和 T, 更特别是 T; 位置 X^7 处的 H 可以被任何其他一个或多个氨基酸代替或可以不存在, 例如 X^7 可以是 T 或不存在。可以进行这些取代中的任何一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个以产生落入上述式 (II) 范围内的替代肽。

[0158] 在另一个实施方案中, 式 (II) 的肽具有下式:

[0159] $Y^3WYKWMKKAAY^4$ (SEQ ID NO:17)

[0160] 或其功能等同的衍生物、变体或片段, 其中 Y^3 和 Y^4 如本文所定义。

[0161] 序列 X^1 至 X^7 可以是 WYKWMKKAA (SEQ ID NO:12) 或 WYKWMKKAAR (SEQ ID NO:13), 或者 X^1 至 X^7 可以是序列 WYKWMKKAA (SEQ ID NO:12) 的变体, 例如其中一个、两个、三个、四个或更多个氨基酸在上述式 (II) 的限制内变化的变体。例如, 位置 X^1 处的 W 可以不存在, 或者可以被选自 T、PE、KQI、VV、PQT、H 和 RI 中的任何一个代替; 位置 X^2 处的 Y 可以被另一个具有芳香族侧链的氨基酸或半胱氨酸代替, 特别是选自 C、F 和 W, 更特别是 C; X^3 可以被另一个疏水性氨基酸代替, 特别是选自 L、I 和 V; 位置 X^4 处的 K 可被具有带电侧链的另一氨基酸代替, 特别是选自 D、R 和 H, 更特别是 R; 位置 X^5 处的 K 可被具有碱性侧链的另一氨基酸代替, 特别是 R; 位置 X^6 处的 A 可以被另一个氨基酸代替, 特别是选自 K、R、E、D、N、Q、S 和 T, 更特别是 T; 位置 X^7 处的 A 可以被任何其他一个或多个氨基酸代替或可以不存在, 例如 X^7 可以是 T 或不存在。可以进行这些取代中的任何一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个以产生落入上述式 (II) 范围内的替代肽。

[0162] 在另一个实施方案中, 式 (II) 的肽具有下式:

[0163] $Y^3WYKWMKKY^4$ (SEQ ID NO:18)

[0164] 或其功能等同的衍生物、变体或片段, 其中 Y^3 和 Y^4 如本文所定义。

[0165] 序列 X^1 至 X^7 可以是 WYKWMKK (SEQ ID NO:14) 或 WYKWMKKR (SEQ ID NO:15), 或者 X^1 至 X^5 可以是序列 WYKWMKK (SEQ ID NO:14) 的变体, 例如其中一个、两个、三个、四个或更多个氨基酸在上述式 (II) 的限制内变化的变体。例如, 位置 X^1 处的 W 可以不存在, 或者可以被选自 T、PE、KQI、VV、PQT、H 和 RI 中的任何一个代替; 位置 X^2 处的 Y 可以被另一个具有芳香族侧链的

氨基酸或半胱氨酸代替,特别是选自C、F和W,更特别是C;X³可以被另一种疏水性氨基酸置换,特别是选自L、I和V;位置X⁴处的K可被具有带电侧链的另一氨基酸代替,特别是选自D、R和H,更特别是R;位置X⁵处的K可以被具有碱性侧链的另一氨基酸代替,特别是R。可以进行这些取代中的任何一个、两个、三个、四个或五个以产生落入上述式(II)范围内的替代肽。

[0166] 在一个实施方案中,氨基酸取代发生在位置X²,和X³至X⁷。在另一个实施方案中,氨基酸取代发生在位置X³至X⁷中的一个、两个、三个或四个。

[0167] 例如,在一个实施方案中,上式(II)中的残基X¹至X⁷可以是:

[0168] X¹=W;X²=Y或C;X³=M、I、V或L;X⁴=K、R或D;X⁵=K或R;X⁶=H;A、T或不存在;X⁷=任何氨基酸或不存在;

[0169] X¹=W;X²=Y或C;X³=M、I、V或L;X⁴=K、R或D;X⁵=K或R;X⁶=H、A、T或不存在;X⁷=H、HR、A、AR、T、G或不存在;

[0170] X¹=W;X²=Y;X³=M、I、V或L;X⁴=K或R;X⁵=K或R;X⁶=H、A、T或不存在;X⁷=任何氨基酸或不存在;

[0171] X¹=W;X²=Y;X³=M、I、V或L;X⁴=K或R;X⁵=K或R;X⁶=H、A或T;X⁷=H、HR、A、AR、T、G或不存在。

[0172] 这些变体X¹至X⁷序列中的任何一个可以与本文所述的任何Y³和/或Y⁴残基结合使用。例如,本文所述的任何X¹至X⁷序列可以与(Arg)₆₋₁₂肽,例如(Arg)₇、(Arg)₈或(Arg)₉肽一起使用,所述肽附着在C端、N端或在两端。或者,本文所述的任何X¹至X⁷序列可以与在C-端、N-端或两端附着的穿透肽(例如下文所述的那些)一起使用。

[0173] 如上文所定义的,“细胞穿透部分”是指帮助或促进其所附着的分子进入细胞的分子、结构或分子集合。

[0174] 多种这样的部分是本领域众所周知的,并且包括肽如穿透肽(penetratin)、tat-衍生的蛋白质、允许细胞进入的肽信号序列,包含此类肽信号的肽以及合成的和/或嵌合的细胞穿透肽,例如运输蛋白(transportan)或模型两亲性肽(Lindgren等人,2000,TiPS,21,p99-103和Derossi等人,1998,Trends C.Biol.8,第84-87页)。也可以使用非肽分子或能够进入细胞的物质。适当地,细胞穿透部分通过受体非依赖性机制起作用。可以使用任何可以允许或帮助分子(例如本发明的肽)进入细胞的物质。该部分可以是能够进入多种细胞类型的通常作用的物质,或者可以是对待处理的特定细胞类型特异的或靶向它的。

[0175] 细胞穿透部分可以直接与肽X¹至X⁷连接,或者可以通过一个或多个氨基酸的接头序列连接。接头序列可包含位置X⁷处的氨基酸。或者,细胞穿透部分可以与肽X¹至X⁷结合,例如,可以用所述肽包封或与其形成复合物,例如,通过使用用于脂转染的脂质体或聚阳离子或阳离子脂质。

[0176] 如本文所用的“与...结合”是指该部分以某种方式附着到或连接至肽。

[0177] 在一个实施方案中,Y³和/或Y⁴可以包含如上所述的碱性氨基酸的阳离子聚合物或由其组成。上文所述的任何这种阳离子聚合物都可以用于本发明的这个实施方案中。例如,Y³和/或Y⁴可包含聚精氨酸序列如(Arg)₉或由其组成。

[0178] 在备选实施方案中,所述细胞穿透部分包含基于具有以下通式(SEQ ID NO:30)的穿透肽序列的肽或由其组成:

[0179] X⁹Q X¹⁰X¹¹X¹²W F Q N X¹³X¹⁴M X¹⁵W X¹⁶X¹⁷

- [0180] 其中，
- [0181] X^9 是R或Q或不存在；
- [0182] X^{10} 、 X^{12} 各自独立地为I或L；和
- [0183] X^{11} 、 X^{13} 、 X^{14} 、 X^{15} 、 X^{16} 和 X^{17} 各自独立地为K或R。
- [0184] 适当地，穿透肽序列具有以下形式：
- [0185] QIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:70)；
- [0186] QIRIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:71)；
- [0187] QIKIWFQNKRMKWKK (SEQ ID NO:72)；
- [0188] QIKIWFQNKKMKWKK (SEQ ID NO:73)；
- [0189] QIRIWFQNRKMKWKK (SEQ ID NO:74)；
- [0190] QIRIWFQNRRMRWKK (SEQ ID NO:75)；
- [0191] QIRIWFQNRRMKWRK (SEQ ID NO:76)；
- [0192] QIRIWFQNRRMKWKR (SEQ ID NO:77)；
- [0193] QIRIWFQNRRMKWRR (SEQ ID NO:78)；
- [0194] QIRIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:79)；
- [0195] QIKIWFQNRRMKWRK (SEQ ID NO:80)；
- [0196] QIRIWFQNKRMKWRK (SEQ ID NO:81)；
- [0197] QIKLWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:82)；
- [0198] QLKLWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:83)；或
- [0199] QLRIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:84)。
- [0200] 特别适当的肽具有序列
- [0201] WYKWMKKHHRQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:31)
- [0202] 或其功能等同的衍生物、变体或片段。
- [0203] 备选的肽具有序列WYKWMKKHHRQIKIWFQNRRMKWK (SEQ ID NO:34)。
- [0204] 特别适当的肽具有序列
- [0205] WYKWMKKAARQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:32)
- [0206] 备选的肽具有序列WYKWMKKAARQIKIWFQNRRMKWK (SEQ ID NO:35)。
- [0207] 特别适当的肽具有序列
- [0208] WYKWMKKRQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:33)
- [0209] 备选的肽具有序列WYKWMKKRQIKIWFQNRRMKWK (SEQ ID NO:36)。
- [0210] 在式(II)的肽中，两个或更多个氨基酸以D构象存在。至少N-端和C-端氨基酸以D-构象存在。一个、两个、三个、四个、五个或更多个其他氨基酸也可以是D-氨基酸。例如，位置 X^7 处或位置 X^7 相邻的氨基酸可以是或包含D-氨基酸。肽中的所有氨基酸可以是D-构象。在一个实施方案中，N-和C-端氨基酸是D-氨基酸，其余氨基酸是L-氨基酸。任选地，位置 X^2 至 X^3 的氨基酸处于L构象。在一个实施方案中，至少N端和C端氨基酸是D-氨基酸，并且位置 X^2 至 X^3 处的氨基酸是L氨基酸。
- [0211] “功能等同的”衍生物、变体或其片段是指与本发明的肽相关的、或由其衍生的肽，其中氨基酸序列已被修饰，例如使用修饰的氨基酸或通过单个或多个氨基酸(例如1至10，例如1至5，特别是1或2个残基)取代、添加和/或缺失，但仍保留功能活性。例如，SEQ ID NO:

6、7、8、31、32和33的特定肽的功能等同的衍生物可以保留充当HOX模拟物的能力并因此拮抗HOX蛋白和PBX蛋白(特别是PBX1或PBX2)的相互作用。这种相互作用可以用普通的实验室技术进行评估。一种这样的方法在2007年1月4日公布为W02007/00601的国际专利申请PCT/GB2006/002390中提出,出于所有目的将其内容全部并入。(Arg)_x序列或穿透肽序列的功能等同的衍生物可以保留作为细胞穿透部分的活性,例如通过允许所附着的肽进入细胞。这种能力也可以通过公知的技术来评估,例如实施例1中所述的技术。

[0212] SEQ ID NO:6、7或8的肽的适当的功能等同的衍生物、变体或片段将落入SEQ ID NO:1的序列的范围内或包括它。(Arg)₉的适当的功能等同的衍生物、变体或片段将落入如上所述的Y¹和/或Y²的范围内。

[0213] SEQ ID NO:31、32或33的肽的适当的功能等同的衍生物、变体或片段将落入SEQ ID NO:2的序列范围内或包括它。穿透肽序列的适当的功能等同的衍生物、变体或片段将落入SEQ ID NO:30的序列范围内或包括它。

[0214] 在“添加”的含义内,包括氨基和/或羧基末端融合蛋白或多肽的变体,其包含与肽序列融合的另外的蛋白质或多肽。

[0215] 如上所述,肽可以优选在N-或C-端被另一部分取代。这些部分可以被添加以帮助肽的功能,其靶向或其合成、捕获或鉴定,例如,标签(例如生物素)或脂质分子。或者可以在肽本身内发现这样的部分。例如,诸如标签的部分可以连接到位于肽内部的氨基酸。例如,X⁷可以包含全部或部分这样的部分,或者所述部分可以形成Y¹、Y²、Y³和/或Y⁴的一部分或位于Y¹、Y²、Y³和/或Y⁴内。

[0216] “取代”变体优选涉及用相同数量的氨基酸代替一个或多个氨基酸并进行保守性氨基酸取代。例如,氨基酸可以被具有相似性质的备选氨基酸取代,所述备选氨基酸例如另一种碱性氨基酸、另一种带电氨基酸、另一种亲水性氨基酸或另一种脂肪族氨基酸。主要氨基酸的一些性质如下表1所示:

[0217] 表1:20种主要氨基酸的性质

[0218]	Ala (A)	脂肪族、疏水性、中性	Met (M)	疏水性、中性
	Cys (C)	极性、疏水性、中性	Asn (N)	极性、亲水性、中性
	Asp (D)	极性、亲水性、带电(-)	Pro (P)	疏水性、中性
	Glu (E)	极性、亲水性、带电 (-)	Gln (Q)	极性、亲水性、中性
	Phe (F)	芳香族、疏水性、中性	Arg (R)	极性、亲水性、带电(+)

[0219]	Gly (G)	脂肪族、中性	Ser (S)	极性、亲水性、中性
	His (H)	芳香族、极性、亲水带 电(+)	Thr (T)	极性、亲水性、中性
	Ile (I)	脂肪族、疏水性、中性	Val (V)	脂肪族、疏水性、中性
	Lys (K)	极性、亲水性、带电(+)	Trp (W)	芳香族、疏水性、中性
	Leu (L)	脂肪族、疏水性、中性	Tyr (Y)	芳香族、极性、疏水性

[0220] 适当地，“衍生物”或“变体”包括其中序列中出现的代替天然存在的氨基酸的氨基酸是其结构类似物的那些。序列中使用的氨基酸也可以被衍生或修饰，例如，标记，只要肽的功能没有显著不利影响。

[0221] 如上所述的衍生物和变体可在肽的合成过程中或通过后期生产修饰，或者当肽是重组形式时，使用定点诱变、随机诱变或酶切割和/或核酸连接的已知技术来制备。

[0222] 根据本发明的功能等同“片段”可以通过截短（例如，通过从N和/或C末端去除一个或多个氨基酸）来进行。这样的片段可以来源于SEQ ID NO:1或2的序列，或者可以来源于如上所述的功能等同肽。适当地，这样的片段的长度在6至30个残基之间，例如，6至25或10至15个残基。

[0223] 适当地，根据本发明的功能变体具有氨基酸序列，其与例如SEQ ID NO:6、7、8、31、32或33（根据下文所述的测试）具有多于70%，例如75或80%，优选大于85%，例如大于90或95%的同源性。

[0224] 关于氨基酸序列，“序列同一性”是指当使用ClustalW (Thompson等人, 1994, 同上) 评估时具有所述值的序列，该ClustalW具有以下参数：

[0225] 成对比对参数-方法：准确，矩阵：PAM，空位开放罚分：10.00，空位延伸罚分：0.10；

[0226] 多重比对参数-Matrix：PAM，空位开放罚分：10.00，延迟的同一性百分比：30，罚分末端空位：开，空位分开距离：0，负矩阵：否，空位延伸罚分：0.20，残留特异性空位罚分：开，亲水空位罚分：开，亲水残基：GPSNDQEK R。特定残基的序列同一性旨在包括简单衍生的相同残基。

[0227] 如本文所定义的本发明的肽可以被化学修饰，例如翻译后修饰。例如它们可以是糖基化的或包含修饰的氨基酸残基。它们可以是多种形式的多肽衍生物，包括酰胺和与多肽的缀合物。

[0228] 化学修饰的肽还包括具有通过功能性侧基的反应进行化学衍生的一个或多个残基的肽。这种衍生化的侧基包括被衍生化以形成胺盐酸盐、对甲苯磺酰基、苄氧羰基、叔丁氧羰基、氯乙酰基和甲酰基的那些基团。游离羧基可被衍生化以形成盐、甲酯和乙酯或其他类型的酯或酰胺。游离羟基可被衍生化以形成O-酰基或O-烷基衍生物。组氨酸的咪唑氮可被衍生化以形成N-im-苄基组氨酸。

[0229] 作为化学修饰的肽还包括环化肽，即本发明的肽，其通过共价键连接以产生环。典型地，氨基末端和羧基末端（所谓的头-尾环化），氨基末端和侧链（所谓的头对侧链环化），

羧基末端和侧链(所谓的侧链-尾环化)或侧链和侧链(所谓的侧链-侧链环化)可以通过共价键连接以形成环肽。头-尾环肽通常可以通过酰胺键形成来形成。侧链-侧链环通常可以通过环肽内的Cys-Cys二硫键桥形成或酰胺键形成而形成。或者,氨基末端、羧基末端或侧链可以通过共价键连接至肽主链以形成环肽。

[0230] 作为化学修饰的肽还包括那些含有20种标准氨基酸的一种或多种天然存在的氨基酸衍生物的肽。

[0231] 例如,4-羟脯氨酸可以取代脯氨酸,或者高丝氨酸可以取代丝氨酸。

[0232] 本发明的肽可以携带显示标记。适当的标记包括放射性同位素、荧光标记、酶标记或其他蛋白质标记如生物素。

[0233] 本文给出的任何式也旨在表示肽的未标记形式以及同位素标记形式。同位素标记的肽具有由本文给出的式描述的结构,除了一个或多个原子被具有选定的原子质量或质量数的原子代替。可以掺入本发明肽中的同位素的例子包括氢、碳、氮、氧、磷、氟和氯的同位素,如分别为 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}F 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{125}I 。本发明包括如本文所定义的各种同位素标记的肽,例如其中存在放射性同位素如 ^3H 和 ^{14}C 的那些肽。这些同位素标记的肽可用于代谢研究(用 ^{14}C),反应动力学研究(用例如 ^2H 或 ^3H),检测或成像技术如正电子发射断层成像术(PET)或单光子发射计算机断层成像术(SPECT),其包括药物或底物组织分布测定,或用于患者的放射性治疗。特别地,对于PET或SPECT研究, ^{18}F 或标记的肽可能是特别理想的。本发明的同位素标记的肽及其前药通常可以通过实施下面描述的方案或实施例和制备中公开的方法,通过用容易获得的同位素标记的试剂取代非同位素标记的试剂来制备。

[0234] 本发明的同位素标记的肽通常可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过本文所述的那些类似的方法,使用合适的同位素标记的试剂代替先前使用的未标记的试剂来制备。

[0235] 根据本发明的药学上可接受的溶剂化物包括其中结晶溶剂可以被同位素取代的那些,例如 D_2O 、 d_6 -丙酮、 d_6 -DMSO。

[0236] 根据本发明使用的上述肽可以通过包括遗传或化学手段的常规合成方式来制备。

[0237] 出于纯度、抗原特异性、免于不希望的副产物和易于生产的原因,合成技术(例如固相Merrifield型合成)可能是优选的。用于固相肽合成的合适技术为本领域技术人员所熟知(参见例如Merrifield等人,1969,Adv.Enzymol 32,221-96和Fields等人,1990,Int.J.Phaptide Protein Res,35,161-214)。化学合成可以通过本领域熟知的方法进行,包括末端氨基酸的官能团的选择性脱保护和选择性保护的氨基酸残基的偶联的反应的循环组,接着最后是所有官能团的完全去保护。

[0238] 合成可以使用本领域已知的合适固相在溶液中或在固体载体上进行。

[0239] 因为本发明的肽旨在用于药物组合物中,所以很容易理解它们各自优选以基本上纯的形式提供,例如至少60%纯,更适当地至少75%纯,以及优选至少85%,尤其是至少98%纯(%以基于重量的重量计)。化合物的不纯制品可用于制备药物组合物中使用的更纯的形式;这些不太纯的化合物制品应含有至少1%,更适当地至少5%,优选10-59%的本发明化合物。

[0240] 在替代实施方案中,本发明的肽可以以编码并能够表达它的多核苷酸的形式产生或递送。这种多核苷酸可以根据本领域熟知的方法合成,如例如Sambrook等人(1989,

Molecular Cloning—a laboratory manual; Cold Spring Harbor Press) 中所述。这样的多核苷酸可以在体外或体内用于生产本发明的肽。这样的多核苷酸因此可以被施用或用于治疗本文所述的癌症或另一种疾病/病况。

[0241] 本发明还包括包含这种多核苷酸序列的表达载体。此类表达载体通常在分子生物学领域中构建并且可以例如涉及使用质粒DNA和合适的引发剂、启动子、增强子和可能必需并且其位于正确的方向的其他元件,例如聚腺苷酸化信号,以便允许本发明肽的表达。其他适当的载体对于本领域技术人员来说是显而易见的。就此而言的进一步实例,参考 Sambrook 等人(同上)。

[0242] 因此,可以通过将这种载体递送至细胞并允许发生从载体转录来提供肽。适当地,本发明的多核苷酸或在载体中用于本发明的多核苷酸有效连接至能够提供使宿主细胞表达编码序列的控制序列,即载体是表达载体。术语“有效连接”是指并置,其中所描述的组件处于允许它们以其预期方式发挥功能的关系。与编码序列“有效连接”的调控序列(例如启动子)以这种方式定位,其使得编码序列的表达在与调控序列相容的条件下实现。

[0243] 载体可以是例如提供有复制起点的质粒、病毒或噬菌体载体,任选地用于表达所述多核苷酸的启动子和任选地该启动子的调控子。载体可以含有一种或多种选择性标记基因,例如在细菌质粒的情况下为氨苄青霉素抗性基因或真菌载体的抗性基因。载体可以在体外使用,例如用于生产DNA或RNA或用于转染或转化宿主细胞,例如哺乳动物宿主细胞。载体也可以适合体内使用,例如允许多肽的体内表达。

[0244] 启动子和其他表达调控信号可以选择为与设计表达的宿主细胞相容。例如,酵母启动子包括酿酒酵母(*S. cerevisiae*) GAL4和ADH启动子,粟酒裂殖酵母(*S. pombe*) nmt1和adh启动子。可以使用哺乳动物启动子,例如 β -肌动蛋白启动子。组织特异性启动子是尤其优选的。哺乳动物启动子包括金属硫蛋白启动子,其可以响应于诸如镉的重金属而被诱导。也可以使用病毒启动子,例如SV40大T抗原启动子、腺病毒启动子、莫洛尼鼠白血病病毒长末端重复序列(MMLV LTR)、劳斯肉瘤病毒(RSV) LTR启动子、SV40启动子、人巨细胞病毒CMV) IE启动子、腺病毒、HSV启动子(如HSV IE启动子)或HPV启动子,特别是HPV上游调控区(URR)。所有这些启动子都是现有技术中容易获得的。

[0245] 本发明还包括已经被修饰以表达本发明的肽的细胞。这种细胞包括瞬时或优选稳定的高等真核细胞系,如哺乳动物细胞或昆虫细胞、低等真核细胞如酵母或原核细胞如细菌细胞。可以通过插入编码本发明肽的载体进行修饰的细胞的具体实例包括哺乳动物 HEK293T、CHO、HeLa 和 COS 细胞。适当地,选择的细胞系应该是不仅稳定,而且还允许多肽的成熟糖基化和细胞表面表达的细胞系。可以在转化的卵母细胞中实现表达。适当的肽可以在转基因非人类动物(特别是小鼠)的细胞中表达。表达本发明肽的转基因非人动物包括在本发明的范围内。本发明的肽也可以在光滑爪蟾(*Xenopus laevis*) 卵母细胞或黑色素细胞中表达。

[0246] 本发明还延伸至针对上文所定义的肽的抗体(单克隆或多克隆)及其抗原结合片段(例如F(ab)2、Fab和Fv片段,即包含抗原结合位点的抗体“可变”区域的片段),即其与肽上存在的表位结合并因此选择性地且特异性地与这些肽结合,并且其可用于本发明的方法中。

[0247] 如上所述,本发明的肽能够特异性阻断PBX和HOX之间的相互作用。本发明的肽可

以消除或减少一系列癌细胞类型的增殖。伴随这些变化,可以观察到许多已知的HOX靶标的下调。如下文更详细描述,本发明的肽因此可作为其他癌症疗法期间或在干细胞培养物的离体保护中的细胞保护剂,在其中Hox基因被表达的癌症的治疗中具有治疗用途。

[0248] 上述肽可用于阻断PBX与其结合配偶体(例如,HOX)的相互作用,并且优选由此防止HOX与其靶DNA的结合。因此,在另一方面,本发明提供了本文所述的肽用于减少或抑制PBX与结合配偶体,特别是HOX的结合的用途或使用这些肽减少或抑制HOX与其靶DNA的结合的用途。

[0249] “PBX”是指前B细胞转化相关基因家族的蛋白质产物,并包括编码外小齿(extradenticle)同源异型蛋白蛋白质的基因以及果蝇外小齿基因的同源物,如脊椎动物中的基因。脊椎动物PBX蛋白是含有同源异型结构域的转录因子(Mann等人,1996)。

[0250] “HOX”是指同源异型框基因的蛋白质产物,其包含编码约60个氨基酸的同源异型结构域的序列和编码同源异型结构域N-端的六肽序列的序列(Morgan等人,2000,TIG,16(2),p66-67和Krumlauf,1994,Cell,78(2),p191-201)。HOX蛋白是转录因子,其在早期发育中限定前-后发育。如本文所述的此类PBX或HOX基因或蛋白质包括存在于任何多细胞动物中的同源物,但适当地来自脊椎动物,例如来自哺乳动物,特别是来自人类。

[0251] 如本文所提到的,“结合”是指至少两个部分在可逆或不可逆反应中的相互作用或缔合,其中所述结合是适当地特异性和选择性的。

[0252] 如本文所用,“结合配偶体”是指特异性识别并结合其结合配偶体(即优先于结合其他分子)的分子。这些结合对结合在一起时形成复合体。

[0253] “结合减少”是指结合的减少,例如,如通过实现结合所需的结合对之一的浓度增加来证明的。减少包括特异性结合的轻微减少以及绝对废除。认为特异性结合的总减少等同于结合阻止。

[0254] “抑制”是指结合配偶体与肽结合的竞争性干扰,其起到减少配偶体结合的作用。

[0255] 已经发现阻止或减少PBX依赖性转录调控的活性剂对异常细胞分裂具有有利作用(2004年7月1日公开为W02004/055049的国际专利申请PCT/GB2003/005425和2007年1月4日公开为W02007/00601的国际专利申请PCT/GB2006/002390,出于所有目的其内容全部并入)。

[0256] 这样的活性剂通常是那些阻止、减少或抑制PBX与其结合配偶体的结合,特别是PBX与HOX之间的结合的那些(例如HOX和PBX之间的相互作用的拮抗剂,例如上文所述的肽)。然而,适当的活性剂还包括影响转录因子与靶DNA结合的那些,例如,其阻断PBX或其结合配偶体如HOX与靶DNA的相互作用。适当地,这样的活性剂可以阻止HOX依赖性转录调控。

[0257] 不希望受理论束缚,据信HOX:PBX结合的拮抗剂阻止多个重要的HOX:PBX蛋白结合配偶体之间的相互作用,并且HOX蛋白因此不能作为它们所结合的基因上的转录因子。调控这些基因表达的失败可能对细胞有许多影响,例如减少或防止过度细胞分裂和诱导细胞死亡。类似地,阻止或减少PBX依赖性转录调控(例如阻断HOX与其靶DNA的相互作用)的任何部分,可能预期具有相似的作用。

[0258] 适用于该目的的活性剂包括HOX和/或PBX与它们结合的DNA靶标之间相互作用的拮抗剂,PBX与其结合配偶体(通常为HOX蛋白)之间相互作用的拮抗剂,或者损害HOX/PBX或靶DNA的结合能力的活性剂,例如其阻断相关位点或引起HOX/PBX或靶DNA上相关位点的结

构改变或减少可用于结合的分子数目(其可通过例如修饰PBX/HOX的表达产物实现)。然而适当地,使用拮抗剂。适当的活性剂是如上所述的本发明的肽。

[0259] 因此,在另一方面,本发明提供了减少异常细胞分裂的方法,其中所述细胞被施用本发明的肽,在下文中可备选地被称为“本发明的活性剂”,其防止或减少PBX依赖性转录调控,其适当地减少或防止PBX与结合配偶体,优选HOX(适当地HOXB4、HOXB8或HOXA9)结合或减少或防止HOX与其靶DNA结合,适当地拮抗剂,适当地HOX和PBX之间相互作用的拮抗剂并且其适当地抑制HOX依赖性转录调控。

[0260] 如本文所述,“异常细胞分裂”是指在存在其的条件下认为合适的正常水平以上的细胞分裂(即异常细胞分裂)。异常细胞分裂的标记是本领域技术人员公知的,并且可以用于确定特定细胞是否已经受到影响。例如,经历异常细胞分裂的细胞可能显示非典型细胞学,例如细胞多形性、细胞核多形性、核着色过多或核细胞质比率增加。经历异常细胞分裂的细胞可能显示细胞分化失败。更特别地,这样的异常细胞分裂可以存在于如下文所述的某些病况或疾病/病症中,例如癌症。

[0261] “减少”细胞分裂是指降低细胞生长速度。适当地,在相同时间段(其中对照生长=1),相对于对照生长(没有活性剂),细胞生长降低至小于0.5,特别是小于0.25,例如小于0.1。适当地,减少的细胞分裂包括可能另外发生的细胞死亡/活力缺乏,或者作为细胞生长减少的替代。当细胞死亡发生时,适当地,超过50%的现有细胞,特别是超过75%的细胞被破坏。

[0262] 通过调整使用的活性剂的剂量,也可能完全消除一些恶性肿瘤。因此,本发明的肽可用于减缓癌细胞的生长或完全破坏癌细胞。如下面更详细地解释的,适当的剂量将取决于许多因素并且可以由熟练的从业者确定。

[0263] 如本文所述,“PBX依赖性转录调控”是指通过其中PBX起关键作用的过程来激活或抑制基因的转录,例如,在转录调控复合物中充当辅助因子。

[0264] 阻止或减少是指转录程度的可测量变化。

[0265] 阻止等同于将转录减少到不可检测的水平。

[0266] “靶DNA”是指包含PBX、HOX或含有这些蛋白质的转录调控复合物的任何成员结合的调控区的基因。

[0267] 如本文所提及的,“拮抗剂”是分子或分子复合物,其凭借与结合对的一个分子的结构相似性而与该分子竞争结合该结合对的另一个分子。

[0268] 如本文具体提及的,本发明的拮抗剂是HOX和PBX之间相互作用的拮抗剂,其阻止或减少这些实体之间的结合。适当的拮抗剂与HOX或PBX上的结合位点结合或竞争。通常,拮抗剂通过模拟HOX上的PBX结合位点而竞争,即与PBX结合。

[0269] 这样的方法可以在体外、体内或离体进行。

[0270] 考虑到它们特异性阻断PBX与HOX之间的相互作用并抑制异常细胞分裂的能力,本发明的肽(下文中备选地称为“本发明的活性剂”)可用于治疗或预防发生异常细胞分裂的病况或病症,特别是癌症。

[0271] 根据本发明的治疗可以是症状性或预防性的。

[0272] 因此,在另一方面,本发明包括用作药物的本发明的活性剂。

[0273] 因此,根据另一方面,本发明提供了用于治疗或预防发生异常细胞分裂的病况或

病症的本发明的活性剂。

[0274] 因此,根据另一方面,本发明提供了本发明的活性剂在制备用于预防或治疗发生异常细胞分裂的病况或病症的药物中的用途。

[0275] 因此,根据另一方面,本发明提供了用于预防或治疗其中异常细胞分裂的病况或病症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明活性剂。

[0276] 根据前述内容,作为另一方面,本发明还提供了用于预防或治疗其中发生异常细胞分裂的病况或病症,特别是癌症的方法,其包括向有需要的受试者,特别是人类受试者施用治疗有效量的本发明的活性剂。

[0277] 另一方面,本发明提供了用于预防或治疗其中发生异常细胞分裂的病况或病症,特别是癌症的本发明的活性剂。

[0278] 另一方面,本发明提供了本发明的活性剂在制备用于预防或治疗发生异常细胞分裂的病况或病症,特别是癌症的药物中的用途。

[0279] 如本文所提到的,“病症”或“疾病”是指症状性或无症状生物体相对于正常生物体的潜在病理性障碍,其可能由例如感染或获得性或先天性遗传缺陷导致。

[0280] “病况”是指未通过疾病发生的生物体的精神状态或身体状态,例如,在体内部分如毒素、药物或污染物的存在。

[0281] 如本文所用,任何疾病/病况的术语“治疗(动词)”、“治疗(动名词)”或“治疗(名词)”在一个实施方案中指改善疾病或病症(即,减缓或阻挡或减少疾病或其至少一种临床症状的发展)。在另一个实施方案中,“治疗(动词)”、“治疗(动名词)”或“治疗(名词)”是指减轻或改善至少一个身体参数,包括患者可能无法辨别的那些。在另一个实施方案中,“治疗(动词)”、“治疗(动名词)”或“治疗(名词)”是指在身体上(例如,稳定可辨别的症状),生理上(例如稳定身体参数)或从两者调控疾病或病症。在又一个实施方案中,“治疗(动词)”、“治疗(动名词)”或“治疗(名词)”是指预防或延迟疾病或病症的发作或发展或进展。例如,可能受影响的症状包括给定样品中的肿瘤大小或癌细胞数目(或如下文所述的减少的干细胞数量)。

[0282] “预防”病况或病症是指根据病况或病症的一种或多种症状的外观或程度来评估,延缓或预防所述病况或病症的发作或降低其严重程度。

[0283] 如本文所用,术语“受试者”是指动物。通常动物是哺乳动物。受试者还指例如灵长类(例如人)、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、大鼠、小鼠、鱼、鸟等。在某些实施方案中,受试者是灵长类动物。在其他实施方案中,该受试者是人。

[0284] 如本文所用,如果这样的受试者将在生物学、医学或生活质量方面从这种治疗中获益,则受试者“需要”治疗。

[0285] 本发明活性剂的术语“治疗有效量”是指将引发受试者的生物学或医学反应的本发明活性剂的量,例如减少或抑制酶或蛋白质活性,或改善症状、缓解病况、减缓或延缓疾病进展,或预防疾病等。在一个非限制性实施方案中,术语“治疗有效量”是指本发明的活性剂当施用于受试者时对于至少部分减轻、抑制、预防和/或改善发生异常细胞分裂的病况或病症是有效的。在另一个非限制性实施方案中,术语“治疗有效量”是指当施用于细胞或组织或非细胞生物材料或介质时,本发明活性剂的量对于至少部分减少异常细胞分裂是有效的。

[0286] 作为体内执行该方法的备选方法,这些方法可以例如在体外进行以减少样品中细胞分裂或消除经历异常细胞生长的细胞。合适的培养条件如下文所述的本发明其他方法所述。

[0287] 这在含有正常细胞和异常细胞(其中异常细胞可以被控制/去除)的细胞样品、以及含有用于随后的过程(例如,返回供体身体)的正常细胞的样品中特别有用。这对于例如消除患者血液样品中的异常造血细胞例如,白血病细胞,可以是有用的,并且剩余的细胞然后可以返回到该患者的身体。

[0288] 因此,在又另一方面,本发明提供了减少样品中细胞异常细胞分裂(特别是减少癌细胞生长,更特别是涉及癌细胞死亡并因此减少癌细胞数量)的方法,其中将如上所述的本发明的活性剂施用于所述样品。在用于治疗患有以异常细胞分裂为代表的病症或病况(或预防它)的患者的方法中,可从所述患者收集所述样品,然后如下文所述将其返回给患者。在此上下文中,“样品”是指从人类或非人类动物(包括所述动物的胚胎、胎儿、未成熟和成人阶段)获得的任何材料,其包含经历异常细胞分裂并且包括组织和体液的细胞。

[0289] 在这种情况下,“体液”特别包括血液、脊髓液和淋巴液,“组织”包括通过手术或其他手段获得的组织。

[0290] 适当地,异常细胞分裂发生在来自真核生物的细胞中,真核生物可以是任何真核生物如人类、其他哺乳动物和动物、鸟类、昆虫和鱼类。

[0291] 可以从中获得细胞或可以在进行本发明的方法的非人动物包括但不限于哺乳动物,特别是灵长类动物、家养动物、家畜和实验室动物。因此,动物包括小鼠、大鼠、鸡、蛙、豚鼠、猫、狗、猪、牛、山羊、绵羊、马。适当地,细胞来源于人类,并且该方法用于人类的治疗或预防。

[0292] 特别是,经历异常细胞分裂的细胞是癌细胞、待治疗或预防的病症是癌症。可以以这种方式治疗的癌症是那些涉及HOX和PBX基因表达的癌症,其中HOX/PBX二聚体表达由于本发明的肽的活性而降低,因此阻断了癌细胞的生长、减少其增殖或直接导致其死亡。

[0293] 在另一个实施方案中,本发明的肽可以作用于癌细胞以将它们从静止状态转移到细胞周期中,并因此使它们更容易易感于其它(例如)细胞毒性,抗癌治疗。

[0294] 适当地,所述待治疗的细胞表达一种或多种Hox基因。例如,所述细胞可以表达HOXA1、HOXA3、HOXA4、HOXA5、HOXA7、HOXA9、HOXB1、HOXB2、HOXB3、HOXB4、HOXB8、HOXB9、HOXC4、HOXC6、HOXC8、HOXD3、HOXD4、HOXD8、和HOXD9中的一种或多种。所述细胞可以表达HOXB4、HOXB8和HOXA9中的一种或多种。Hox基因在细胞中的表达水平可能直接与细胞对本发明的肽的敏感性有关。因此,本发明的肽在治疗显示出高水平HOX基因表达的细胞(例如比周围组织更高水平的HOX基因表达或细胞是癌细胞时比其他癌症类型更高水平的HOX基因表达)时更有效。因此,本发明的方法可以在待治疗的细胞显示出HOX基因表达增加或更高的水平时是特别适当的。

[0295] 适当地,所述癌症是恶性或恶变前或良性肿瘤,并且包括癌、肉瘤、神经胶质瘤、黑色素瘤和淋巴瘤,包括膀胱癌、肾癌、胰腺癌、脑癌、头颈癌、乳腺癌、肠癌、前列腺癌、肺癌和卵巢癌和白血病和淋巴瘤。特别是结肠直肠、胰腺、膀胱、前列腺、宫颈、卵巢、胃和非小细胞肺癌。

[0296] 以异常细胞分裂为特征的病况或病症是癌症,包括但不限于间皮瘤、肝胆管(肝和

胆管)的、原发性或继发性CNS肿瘤、原发性或继发性脑肿瘤、肺癌(NSCLC和SCLC)、骨癌、胰腺癌、黑素瘤和非黑素瘤皮肤癌、头或颈癌、皮肤或眼内黑素瘤、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肛门区癌、胃癌、胃肠道(胃、结肠直肠癌和十二指肠)的、胃肠道间质瘤、乳腺癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、软骨或骨的、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、睾丸癌、睾丸淋巴瘤、慢性或急性白血病、慢性髓样白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、脊柱轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、肾上腺皮质癌、胆囊癌、多发性骨髓瘤、胆管癌、纤维肉瘤、神经母细胞瘤、成视网膜细胞瘤或一种或多种前述癌症的组合。

[0297] 在本发明的一个实施方案中,癌症是肺癌(NSCLC和SCLC)、黑素瘤、头或颈癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肛门区癌、胃癌、乳腺癌、肾脏或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、胰腺癌、前列腺癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤或脊柱肿瘤、或一种或多种前述癌症的组合。

[0298] 在一个具体的实施方案中,癌症是肺癌(NSCLC和SCLC)、黑素瘤、头或颈癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌或肾细胞癌。

[0299] 在另一个实施方案中,发生异常细胞分裂的所述病况或病症是良性增生性疾病,包括但不限于银屑病、良性前列腺肥大或再狭窄。

[0300] 在一个实施方案中,发生异常细胞分裂的所述病况或病症是骨髓发育不良(MDS)。

[0301] 在一些癌症,例如某些形式的人类前B细胞白血病中,PBX可充当致癌基因。PBX在这些癌症中的作用将不同于PBX不是致癌基因的其他癌症中的作用。因此本发明的肽的作用也可以不同。

[0302] 因此,在一个实施方案中,本发明不适用于这样的癌症,因为本发明的肽的作用将通过与上文所述的PBX:HOX效应不同的机制。因此,在该实施方案中,本发明的肽可用于治疗或预防发生异常细胞分裂并且其中PBX不充当致癌基因的癌症或其他病症。

[0303] 适当地,癌细胞表达一种或多种Hox基因。例如,通过本发明方法治疗的适当的癌症可以是除人前B细胞白血病以外的白血病。

[0304] 在一些癌症例如急性髓样白血病(AML)中,本发明的肽可阻断癌细胞的增殖,但也可刺激那些细胞离开G0/G₁静止状态并进入细胞周期。这两种效应在相同条件下的相同细胞中可见。这可能是由于细胞被肽引发离开G0/G₁(即进入细胞周期),但随后不能分裂,而是分化或经历细胞凋亡。本发明的肽可用于治疗原发性AML和成熟性髓样性白血病两者。这提示了本发明的肽在急性髓样和淋巴样白血病中的特定用途。因此使用本发明的肽阻断这些细胞中的PBX/HOX相互作用可以形成用于预防体内白血病细胞生长的有效治疗。另外,通过增加进入细胞周期的白血病细胞的比例,本发明的肽也可以增加对其他癌症治疗如化学疗法的敏感性。因此,本发明的肽可以与下文进一步描述的另一种癌症治疗联合使用。

[0305] 已经发现阻止或降低PBX依赖性转录调控的活性剂对干细胞具有有益作用。

[0306] 如本文所提及的“干细胞”是能够分化成各种细胞的未分化细胞,例如,各种血细胞类型,并且包括造血(例如在骨髓中发现的)和神经和肝干细胞、胚胎干细胞和胚胎生殖细胞,并且包括多能和全能细胞。胚胎细胞被认为是源自胚泡内细胞团的那些细胞,并且胚胎生殖细胞是那些从5至10周龄胎儿的生殖腺脊的原生殖细胞分离的细胞。适当地,细胞来

源于如前所述的真核生物。

[0307] PBX介导的转录调控的阻止导致减少但持续的细胞分裂和分化分子标志物(例如CD38)的出现。然而,在去除阻断转录调控的活性剂时,通过分子标志物(例如HOXB4、HOXB8、HOXA9、AC133)的出现评估,细胞回复到干细胞,从而反映细胞的多能性(2007年1月4日公开为W02007/00601的国际专利申请PCT/GB2006/002390,出于所有目的其内容全部并入)。虽然不希望受理论束缚,但认为尽管出现分化/成熟标志物,但没有发生表型分化症状改变,并且在施用活性剂时细胞反而具有显著降低的细胞周期速率。去除活性剂后,细胞回复干细胞。

[0308] 还认为用本发明的肽处理多能造血干细胞和祖细胞(HSPC)可阻断它们的增殖并增加细胞周期的G0-G1期中细胞的比例。培养物的寿命证实了假定的干细胞以及更多分化的祖群的作用。这种对这些基因靶标的抑制作用的特异性通过其可逆性加以强调,基因转录和细胞生长在肽去除时重新开始。

[0309] 这些结果具有许多应用,包括维持或扩增干细胞(例如在培养中),例如用于临时储存所述细胞,在该储存期间可能扩增。这样的细胞然后可以例如用于需要向例如,由于例如年龄、疾病(例如癌症或自身免疫性疾病)、先天因素、环境影响或污染物和/或施用的化学物质而具有减少的干细胞数量和/或产生某些分化细胞类型的能力的患者添加干细胞的临床应用。特别地,干细胞可以在化疗或放疗之前从患者收获,并且在化学疗法或放疗之后维持和/或扩增并返回给患者。

[0310] 作为备选的实例,干细胞可以用于提供可以形成特定分化细胞的细胞,例如神经元细胞,特别是在其中不存在或仅存在低水平的此类适当的干细胞成人接受者中。适当地,干细胞的接受者也是供体,但也可以是不同的个体。因此,本发明的肽可用于在体外或离体培养期间保护含有干细胞(例如骨髓细胞)的外植组织。

[0311] 细胞还可以离体或体内维持,例如以维持在可能正常影响其生存力的治疗期间的活力,例如,在化疗或放射治疗期间。

[0312] 如本文所述的活性剂(即本发明的肽)可以用于通过暂时停止或减缓干细胞的细胞周期而通过这类治疗来降低干细胞对损害的易感性。例如,本发明的肽可以用于减少由其它癌症治疗引起的副作用,例如,与许多化疗方案相关的细胞毒性休克。本发明的肽对体内干细胞的细胞保护作用还可以允许将使用的更高水平或剂量的此类癌症治疗,因为所产生的副作用减少。例如,更高剂量的化疗或放疗会是可能的。

[0313] 因此,在另一方面,本发明提供维持或扩增干细胞的方法,其中所述方法至少包括使所述细胞与如上文所述本发明活性剂,适当地拮抗剂,适当地为HOX和PBX之间的相互作用的拮抗剂接触的步骤。该方法可用于维持干细胞的多能性或全能性。

[0314] 适当地,该方法在体外或离体培养中进行,在这种情况下,该方法可以包含从供体收获干细胞的初始步骤。然而,该方法还可以体内使用以维持或改善个体中干细胞的数量,特别是在暴露于可能引起干细胞损伤的活性剂或治疗过程中。在这种情况下,本发明提供了一种维持或扩增患者干细胞的方法,其中对所述患者施用本发明的活性剂,适当地是拮抗剂,适当地是HOX和PBX之间相互作用的拮抗剂。

[0315] “维持”细胞是指在处理或培养过程期间保持大部分起始,例如,收获的具有最小细胞分裂的细胞的活力。

[0316] “扩增”细胞是指在治疗过程或培养过程期间至少一些细胞分裂,适当地显著的细胞分裂,以增加细胞的数量。

[0317] 如本文所提及的“培养”是指细胞在受控人造环境中,即离体中的生长或维持。细胞培养的标准技术是众所周知的。适当地,细胞在37℃,5%CO₂的湿润气氛下在标准培养基中培养。适当地,所述培养进行至少2小时,适当地超过24小时;例如介于24小时和8周之间。

[0318] 如本文所用,“接触”是指任何适当的技术,其允许活性剂接近样品中的细胞并因此与之结合的可能性,例如,通过施用于培养基。

[0319] 细胞维持或扩增后,可将活性剂移除以恢复多能或全能性。当该方法在体内进行时,可以通过停止给药并让身体清除活性剂来实现。在体外或离体时,将活性剂从培养基中除去,例如,通过洗涤并用新鲜培养基替换。或者,可以通过使活性剂自然降解来去除活性剂。

[0320] 因此,本发明提供了一种在培养物中,维持或扩增干细胞和/或获得多能或全能干细胞,适当地所述细胞的扩增群体,的方法,其中所述方法至少包括以下步骤:

[0321] a) 将培养中的所述细胞与本发明活性剂接触,所述活性剂减少或防止如上文所述的PBX依赖性转录调控,适当地为拮抗剂,适当地为HOX和PBX之间相互作用的拮抗剂;

[0322] b) 在不存在所述活性剂的情况下培养所述细胞。

[0323] 应该指出的是,肽在培养过程中几天内降解,因此活性肽被耗尽。因此,如果足够的时间经过以发生降解,则可以在没有任何预先洗涤的情况下执行步骤b)。如前所述,培养时间至少为2小时,适当地超过24小时,例如介于24小时和8周之间。

[0324] 该方法可含有从供体收集干细胞的初始步骤。

[0325] 通过本发明的这种以及其他方法获得的细胞与其用作药物一样包含本发明的其他方面。

[0326] 然后,通过上述体外或离体方法如此制备的细胞可以施用于需要这种干细胞的个体。任选地,可以在移植之前修饰细胞,例如在培养过程中或即将移植之前,例如通过遗传修饰,例如用于基因转移或导入先前不存在于所述细胞中的功能,例如,以弥补遗传缺陷,例如通过提供缺失因子,例如腺苷脱氨酶(ADA)。

[0327] 因此,在再一方面,本发明提供了治疗需要干细胞的个体的方法,其中将根据上述方法制备的干细胞施用于所述个体。

[0328] 适当地,需要所述干细胞的所述个体是具有(或将具有)低于正常或理想水平的此类细胞的个体,该状况可能正常存在,例如,通过年龄或由于外部因素例如通过化疗或放疗。适当地,所述干细胞来源于受体个体。

[0329] 因此,本发明提供了一种改善受体个体中干细胞数量的方法,其中所述方法至少包括以下步骤:

[0330] a) 从供体收获干细胞,

[0331] b) 根据上文所述的方法培养所述干细胞;

[0332] c) 将所述培养的干细胞施用于所述受体个体。

[0333] 适当地,该方法是改善化疗或放疗患者中干细胞数量的方法,其中所述方法至少包括以下步骤:

[0334] a) 在化疗或放疗之前从所述患者收获干细胞,

[0335] b) 根据上文所述的方法培养所述干细胞；

[0336] c) 在化疗或放疗完成后将所述培养的干细胞施用于所述患者。

[0337] 或者,上述方法中的收获步骤a)可以不存在,并且步骤b)可以包括根据上文所述的方法培养从供体收获的干细胞。所述细胞可以通过从所述供体获得细胞、组织或体液样品并任选从其中提取细胞来收获。

[0338] 如本文所用,“样品”是指从供体获得的任何材料,例如,包括所述动物的胚胎、胎儿、未成熟和成人阶段的人或非人动物,其含有干细胞并且包括组织和体液。

[0339] “体液”包括血液和脊髓液。

[0340] “组织样品”包括通过手术干预(例如骨髓或肝脏)或通过其它方式例如胎盘和脐带获得的组织。细胞从其来源或应用该方法的动物优选如上文关于减少异常细胞分裂的方法所述。

[0341] 如本文中所使用的,提及“改善干细胞的数量”是指相对于当将发生给药时在个体中存在的数量,增加待添加的干细胞的数量(适当地,待添加的特定类型,例如造血干细胞的数量)。因此,在经历化疗或放疗的患者(的情况下),所观察到的改善是患者化疗后或放疗后的干细胞数量。一种改善还可以由以下组成:添加先前不存在或以极低数量存在的某些干细胞,例如神经元干细胞。

[0342] 或者,本发明提供了本发明的活性剂用于治疗或预防以干细胞需求为代表的病况或病症,适当地用于治疗或预防干细胞数量低于正常的病况或病症,例如,由于化学疗法或放射疗法,或者在提供干细胞可能允许产生一个或多个特定分化细胞的条件下,所述特定分化细胞在目的位点处不存在或以异常低的数量或比预期更低的数量存在。

[0343] 干细胞数量低于正常的病况或病症包括自身免疫性疾病、放疗、化疗和某些病毒感染。

[0344] 通过移植使用干细胞可提供不存在或以低于正常或低于期望水平存在的合适的分化细胞的病况包括阿尔茨海默氏病、帕金森氏病和其他年龄相关的病症或病况(包括美容治疗)、多发性硬化、脊髓损伤、糖尿病、慢性心脏病、终末期肾病、肝衰竭,并且其中使用干细胞替代被破坏的或功能失调的细胞。通过使用本发明的活性剂将干细胞维持在受保护状态可以实现对这些病况或病症的预防。

[0345] 如上所述,本发明进一步提供了通过上述方法制备的细胞用于治疗以干细胞为代表的病况或病症。

[0346] 应该指出的是,由于前述活性剂对异常细胞分裂的影响,甚至可以使用含有这种异常细胞的干细胞样品,并且可以实现在扩增干细胞的同时减少异常分裂的双重作用。因此,上述活性剂可用于体外、离体或体内以保护正常的干/祖细胞,同时消除经历异常细胞生长的细胞。这特别适用于造血细胞,例如在治疗白血病/淋巴瘤时。

[0347] 因此,在特定方面,本发明提供了治疗或预防人或非人受试者中发生异常细胞分裂的病况或病症(例如癌症)的方法,其中所述方法包括施用本发明活性剂,其中所述活性剂既能够减少所述异常细胞分裂又能够维持或扩增所述受试者的干细胞。

[0348] 如上所述,减少或预防PBX依赖性转录调控的本发明活性剂,特别是HOX:PBX拮抗剂具有各种临床应用,并且因此本发明的另一方面提供了含有本发明活性剂的药物组合物。这些活性剂作为药物的用途构成了本发明的另一个方面。

[0349] 因此,在另一方面,本发明提供了药物组合物,其包含减少或防止如上文所述的PBX依赖性转录调控的本发明的活性剂,适当地拮抗剂,适当地HOX和PBX之间相互作用的拮抗剂,或能够表达这种肽的多核苷酸或载体,以及药学上可接受的运载体。

[0350] 以下形成了本发明的其它方面:如本文所述的药物组合物,其用作药物,特别是用于治疗或预防以异常细胞分裂为代表的病症或病况或以需要干细胞为代表的病症或病况,例如本文所述的病况,以及使用这种组合物的治疗或预防的方法,以及所述活性剂用于制备治疗或预防此类病症或病况的药物中的用途。

[0351] 本文所指的“药学上可接受的”是指与组合物的其它成分相容并且对接受者生理上可接受的成分。

[0352] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如抗菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料等及其组合,如本领域技术人员将所知的(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Printing Company,1990,第1289-1329页)。在治疗或药物组合物中考虑使用任何常规运载体,但如与活性成分不相容则属例外。

[0353] 根据本发明的药物组合物可以使用容易获得的成分以常规手段配制。因此,可以将活性成分(即肽),任选地与其它活性物质一起,与一种或多种常规运载体、稀释剂和/或赋形剂混合以产生常规的盖伦制品,例如片剂、丸剂、散剂、锭剂、小药囊、扁囊剂、酏剂、混悬剂、乳剂、溶液剂、糖浆剂、气雾剂(作为固体或在液体介质中)、软膏剂、软和硬明胶胶囊、栓剂、无菌注射溶液、无菌包装散剂等。

[0354] 可以配制药物组合物用于特定的给药途径,例如口服给药、胃肠外给药和直肠给药等。此外,本发明的药物组合物可以以固体形式(包括但不限于胶囊、片剂、丸剂、颗粒剂、散剂或栓剂)或液体形式(包括但不限于溶液剂、混悬剂或乳剂)制备。药物组合物可以进行常规的药物操作,例如灭菌和/或可以含有常规的惰性稀释剂、润滑剂或缓冲剂,以及佐剂,例如防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂和缓冲剂等。

[0355] 典型地,药物组合物是包含活性成分以及下述成分的片剂或明胶胶囊

[0356] a) 稀释剂,例如乳糖、聚内酯、右旋糖、蔗糖、甘露醇、山梨糖醇、纤维素和/或甘氨酸;

[0357] b) 润滑剂,例如二氧化硅、滑石、硬脂酸、其镁或钙盐和/或聚乙二醇;也用于片剂

[0358] c) 粘合剂,例如硅酸镁铝、淀粉糊、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮;如果需要

[0359] d) 崩解剂,例如淀粉、琼脂、海藻酸或其钠盐或泡腾混合物;和/或

[0360] e) 吸收剂、着色剂、香料和甜味剂。

[0361] 片剂可以根据本领域已知的方法进行膜包衣或肠溶包衣。

[0362] 用于口服给药的合适组合物包括有效量的片剂、锭剂、水性或油性混悬剂、可分散散剂或颗粒剂、乳剂、硬胶囊剂或软胶囊剂或糖浆剂或酏剂形式的本发明化合物。旨在用于口服使用的组合物根据本领域已知用于制备药物组合物的任何方法来制备,并且此类组合物可以含有一种或多种选自甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂的物质以便提供药学上优雅且可口的制品。片剂可含有与适用于制备片剂的无毒药学上可接受的赋形剂混合的活性成

分。这些赋形剂是例如惰性稀释剂,如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;造粒剂和崩解剂,例如玉米淀粉或海藻酸;粘合剂,例如淀粉、明胶或阿拉伯胶;和润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。片剂未经包衣或通过已知技术包衣以延迟在胃肠道中的崩解和吸收,从而提供在较长时期的持续作用。例如,可以使用延时材料,例如甘油单硬脂酸酯或甘油二硬脂酸酯。口服使用的制剂可以作为硬明胶胶囊呈现,其中活性成分与惰性固体稀释剂例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土混合,或者作为软明胶胶囊呈现,其中活性成分与水或油介质,例如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

[0363] 某些可注射组合物是水性等渗溶液或悬浮液,并且栓剂有利地由脂肪乳剂或混悬剂制备。所述组合物可以是灭菌的和/或含有佐剂,如防腐剂、稳定剂、润湿剂或乳化剂、溶液促进剂、调控渗透压的盐和/或缓冲剂。另外,它们也可含有其他有治疗价值的物质。所述组合物分别根据常规的混合、制粒或包衣方法制备,并且含有约0.1-75%或含有约1-50%的活性成分。

[0364] 用于透皮应用的适当的组合物包含有效量的本发明的活性剂和适当的运载体。适于透皮递送的运载体包括辅助穿过宿主皮肤的可吸收的药学上可接受的溶剂。例如,透皮装置是绷带形式,其包含背衬层,含有该化合物及任选运载体的储库,任选地以受控且预定速率在延长的时间向宿主皮肤递送化合物的速率控制屏障,以及将该装置固定到皮肤的工具。

[0365] 用于局部应用(例如皮肤和眼睛)的适当的组合物包括水溶液、悬浮液、软膏、乳膏、凝胶或可喷雾制剂,例如用于通过气雾剂等递送。这种局部递送系统对于皮肤应用是特别合适的,例如对于治疗皮肤癌,例如对于在防晒霜、乳液、喷雾剂等中的预防性应用。因此它们特别适用于本领域公知的局部制剂,包括化妆品制剂。这可含有增溶剂、稳定剂、张力增强剂、缓冲剂和防腐剂。

[0366] 如本文所用,局部应用还可以涉及吸入或鼻内应用。它们可以方便地从干粉吸入器以干粉形式(单独地,作为混合物,例如与乳糖的干混物,或混合组分颗粒,例如与磷脂)递送或从加压容器、泵、喷雾器、雾化器(atomizer)或雾化吸入器(nebuliser),使用或不使用适当的推进剂以气雾剂喷雾制品形式递送。

[0367] 实施本发明所采用的本发明的活性剂的剂量当然会根据例如待治疗的特定病况、所需效果和给药模式而变化。通常,通过吸入给药的适当日剂量为每个患者0.0001至30mg/kg量级,典型地为0.01至10mg,而对于口服给药,适当的每日剂量为0.01至100mg/kg量级。

[0368] 本发明进一步提供了包含本发明活性剂作为活性成分的无水药物组合物和剂量形式,因为水可以促进某些化合物的降解。

[0369] 本发明的无水药物组合物和剂量形式可以使用无水或低含水量成分和低水分或低湿度条件来制备。可以制备和储存无水药物组合物,使其维持其无水性质。因此,使用已知防止暴露于水的材料来包装无水组合物,使得它们可以包含在适当的配方试剂盒中。适当的包装的实例包括但不限于密封了的箔、塑料、单位剂量容器(例如小瓶)、泡罩包装和条形包装。

[0370] 本发明进一步提供了包含一种或多种降低作为活性成分的本发明化合物分解速率的物质的药物组合物和剂量形式。这种在本文中称为“稳定剂”的物质包括但不限于抗氧化剂如抗坏血酸、pH缓冲剂或盐缓冲剂等。

[0371] 本发明的活性剂可以与一种或多种其他治疗剂同时或在其之前或之后施用。本发明的活性剂可以通过相同或不同的给药途径分开给药,或者与其他活性剂一起在相同的药物组合物中给药。

[0372] 在一个实施方案中,本发明提供了包含本发明的活性剂和至少一种其他治疗剂的产品,作为组合制品用于在疗法中同时、分开或顺序使用。在一个实施方案中,该疗法是其中发生异常细胞分裂的病况或病症的治疗。作为组合制品提供的产品包括在相同的药物组合物中包含本发明活性剂和其他治疗剂的组合物,或者以分开形式(例如,以试剂盒的形式)的本发明活性剂和其他治疗剂。

[0373] 在一个实施方案中,本发明提供了包含本发明活性剂和另一种治疗剂的药物组合物。任选地,药物组合物可以包含如上所述的药学上可接受的赋形剂。

[0374] 本领域技术人员将会理解,本发明的活性剂可以施用于受试者,特别是人类受试者,其中该受试者正在用手术或放射疗法治疗其中发生异常细胞分裂的病况或病症。本发明的化合物还可以施用于受试者,特别是人受试者,其中受试者先前(例如24小时内)已经用手术或放疗对发生异常细胞分裂的病况或病症进行治疗。受试者,特别是人受试者也可以用手术或放疗对其中发生异常细胞分裂的病况或病症进行治疗,其中本发明化合物先前(例如24小时内)已经施用于受试者。

[0375] 在一个实施方案中,本发明提供了包含两种或更多种分开的药物组合物的试剂盒,其中至少一种含有本发明的活性剂。在一个实施方案中,试剂盒包含用于分开保存所述组合物的装置,例如容器、分开的瓶子或分开的箔包装。这种试剂盒的例子是通常用于包装片剂、胶囊等的泡罩包装。

[0376] 本发明的试剂盒可以用于施用不同的剂型,例如口服和肠胃外,用于以不同剂量间隔施用分开的组合物,或用于将分开的组合物相互滴定。为了辅助依从性,本发明的试剂盒通常包含给药指导。

[0377] 在本发明的联合疗法中,本发明的活性剂和其他治疗剂可以由相同或不同的制造商制造和/或配制。此外,本发明的活性剂和其他治疗剂可以一起被引入联合疗法中:(i) 在将组合产品发放给医师之前(例如,在包含本发明的活性剂和另一种治疗剂的试剂盒的情况下);(ii) 在给药前不久由医师自己(或在医师的指导下);(iii) 患者本身,例如在依次给药本发明的活性剂和其他治疗剂的过程中。

[0378] 因此,本发明提供了本发明的活性剂用于治疗其中发生异常细胞分裂的病况或病症的用途,其中所述药物被制备用于与另一种治疗剂一起给药。本发明还提供另一种治疗剂用于治疗其中发生异常细胞分裂的病况或病症的用途,其中所述药物与本发明的活性剂一起给药。

[0379] 本发明还提供了用于治疗其中发生异常细胞分裂的病况或病症的方法中的本发明的活性剂,其中本发明的活性剂被制备用于与另一种治疗剂一起给药。本发明还提供了用于治疗其中出现异常细胞分裂的病况或病症的方法中的另一种治疗剂,其中所述另一种治疗剂被制备用于与本发明的活性剂一起给药。本发明还提供了用于治疗其中发生异常细胞分裂的病况或病症的方法中的本发明的活性剂,其中本发明的活性剂与另一种治疗剂一起给药。本发明还提供了用于治疗其中发生异常细胞分裂的病况或病症的方法中的另一种治疗剂,其中所述另一种治疗剂与本发明的活性剂一起给药。

[0380] 本发明还提供了本发明的活性剂用于治疗其中发生异常细胞分裂的病况或病症的用途,其中所述受试者先前(例如24小时内)已经用另一种治疗剂治疗。本发明还提供了另一种治疗剂用于治疗其中发生异常细胞分裂的病况或病症的用途,其中所述受试者先前(例如24小时内)已用本发明的活性剂治疗。

[0381] 组合物可以另外包含辅助或增强本发明活性剂作用的分子,例如,细胞毒性剂如抗代谢物、烷化剂、细胞毒性抗生素、拓扑异构酶I和/或II抑制剂、长春花生物碱和单克隆抗体。

[0382] 如果需要,组合物还可以含有附着于活性成分的靶向部分,例如,特异性且选择性地结合内源性受体以允许靶向特定细胞类型或位置的配体,例如靶向淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞、血细胞、红细胞、血小板、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、天然杀伤细胞、树突细胞、脑细胞、心脏细胞、肺细胞、胰岛细胞、肾细胞、癌细胞、激素腺细胞、皮肤、骨骼、关节、骨髓、胃粘膜、淋巴结、Peyer斑、网膜和其他合适的组织。

[0383] 本发明的肽可以用于辅助或增强用于常规治疗的活性剂例如,细胞毒性剂的作用,以减少它们的副作用,例如,通过在治疗期间保护干细胞。

[0384] 在一个实施方案中,本发明的肽与一种或多种其他治疗活性剂一起给药。例如,本发明的肽可以用作组合化学治疗剂。本发明的肽可以诱导一些癌细胞,例如,AML细胞,进入细胞周期。以这种方式刺激的细胞因此可变得对传统抗癌药物更加易感。因此,本发明的肽可以与其他抗癌剂例如细胞毒性药物联合使用,以靶向癌症例如白血病例如AML。

[0385] 本发明的肽也可以与其他抗癌疗法联合使用以保护内源性干细胞群体。本发明的肽可维持G0/G1静止状态的正常干/祖细胞。这种细胞保护能力因此可以保护这些干细胞免受任何抗癌治疗的影响。当本发明的肽与靶向分裂细胞的细胞毒剂组合使用时,这可能是特别有用的。通过在这种治疗过程中将患者的正常干细胞维持在静止状态,可以使抗癌治疗对内源性干细胞群体的副作用最小化。

[0386] 这种潜在副作用的降低还可以允许使患者待使用的常规治疗的剂量或水平高于本来可能或安全的水平。

[0387] 在一个实施方案中,另一种治疗剂是抗肿瘤剂,其选自抗增殖剂、激酶抑制剂、血管生成抑制剂、生长因子抑制剂、cox-I抑制剂、cox-II抑制剂、有丝分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢物、嵌入式抗生素、生长因子抑制剂、辐射、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、生物应答调节剂、抗体、细胞毒性剂、抗激素、他汀类药物、抗雄激素药和光化学治疗剂组成的组。

[0388] 因此,作为另一方面,本发明包括本发明活性剂与抗肿瘤剂的组合,所述抗肿瘤剂选自抗增殖剂、激酶抑制剂、血管生成抑制剂、生长因子抑制剂、cox-I抑制剂、cox-II抑制剂、有丝分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢物、嵌入式抗生素、生长因子抑制剂、辐射、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、生物应答调节剂、抗体、细胞毒性剂、抗激素、他汀类药物、抗雄激素药和光化学治疗剂组成的组。

[0389] 在本发明的一个实施方案中,与本发明组合物联合使用的抗肿瘤剂是抗血管生成剂、激酶抑制剂、pan激酶抑制剂或生长因子抑制剂。

[0390] 适当的pan激酶抑制剂包括美国专利号6,573,293(Pfizer Inc)中所述的SU-11248(苹果酸舒尼替尼(sutinib malate))。

[0391] 抗血管生成剂包括但不限于以下活性剂,例如EGF抑制剂、EGFR抑制剂、VEGF抑制剂、VEGFR抑制剂、TIE2抑制剂、IGF1R抑制剂、COX-II (环加氧酶II) 抑制剂、MMP-2 (基质-金属蛋白酶2) 抑制剂和MMP-9 (基质金属蛋白酶9) 抑制剂。适当的VEGF抑制剂包括例如阿瓦斯丁(贝伐单抗)、Genentech, Inc. of South San Francisco, California的抗VEGF单克隆抗体。

[0392] 其他VEGF抑制剂包括CP-547,632 (Pfizer Inc.)、AG13736 (axitinib, Pfizer Inc.)、ZD-6474 (AstraZeneca)、AEE788 (Novartis)、AZD-2171、VEGF Trap (Regeneron/Aventis)、伐他拉尼(也称为PTK-787、ZK-222584; Novartis & Schering AG)、Macugen (pegaptanib octasodium, NX-1838, EYE-001, Pfizer Inc./Gilead Eye Tech)、IM862 (Cytran Inc. of Kirkland, Washington, USA); 和来自Ribozyme (Boulder, Colorado) 和Chiron (Emeryville, California) 的合成核酶Angiozyme及其组合。可用于实施本发明的VEGF抑制剂公开于美国专利号6,534,524和6,235,764中,出于所有目的将其内容全部并入。特别适当的VEGF抑制剂包括CP-547,632、axitinib、伐他拉尼、Macugen及其组合。

[0393] 可与本发明组合物一起使用的其它抗增殖剂包括酶法尼基蛋白转移酶的抑制剂和受体酪氨酸激酶PDGFR的抑制剂。PDGFR抑制剂包括但不限于在2001年7月7日公开的国际专利申请公开号W001/40217和2004年3月11日公开的国际专利申请公开号W02004/020431中公开的那些,出于所有目的将其内容全部并入。适当的PDGFR抑制剂包括Pfizer的CP-673,451和CP-868,596及其药学上可接受的盐。

[0394] 适当的GARF抑制剂包括Pfizer的AG-2037 (pelitrexol及其药学上可接受的盐)。可用于实施本发明的GARF抑制剂公开于美国专利号5,608,082中,出于所有目的将其内容全部并入。

[0395] 可以与本文描述的本发明化合物联合使用的有用的COX-II抑制剂的实例包括CELEBREX (塞来考昔)、帕瑞考昔、地拉考昔、ABT-963、MK-663 (艾托考昔)、COX-189 (鲁米考昔)、BMS 347070、RS 57067、NS-398、Bextra (伐地考昔)、paracoxib、Vioxx (罗非考昔)、SD-8381、4-甲基-2-(3,4-二甲苯基)-1-(4-氨磺酰苯基)-1H-吡咯、2-(4-乙氧苯基)-4-甲基-1-(4-氨磺酰苯基)-1H-吡咯、T-614、JTE-522、S-2474、SVT-2016、CT-3、SC-58125和Arcoxia (艾托考昔)。此外,COX-II抑制剂公开于美国专利申请10/801,446和10/801,429,出于各种目的,其内容以完整引用的方式并入本文中。

[0396] 作为与本发明的组合物联合使用的抗肿瘤剂的其他有用的抑制剂包括阿司匹林和抑制使前列腺素(环加氧酶I和II)产生的酶从而导致较低水平的前列腺素的非甾体抗炎药(NSAID),包括但不限于以下:双水杨酯(Amigesic)、二氟尼柳(Dolobid)、布洛芬(Motrin)、酮洛芬(Orudis)、萘丁美酮(Relafen)、吡罗昔康(Feldene)、甲氧萘丙烯酸(Aleve)、萘普生、双氯芬酸(Voltaren)、吲哚美辛(Indocin)、舒林酸(Clinoril)、托美丁(Tolectin)、依托度酸(Lodine)、酮咯酸(Toradol)、奥沙普秦(Daypro)及其组合。

[0397] 适当的COX-1抑制剂包括布洛芬(Motrin)、磺胺二甲噁唑、甲氧萘丙烯酸(Aleve)、吲哚美辛(Indocin)、萘丁美酮(Relafen)及其组合。

[0398] 与本发明组合物联合使用的靶向药物包括EGFR抑制剂,例如Iressa (吉非替尼、AstraZeneca)、Tarceva (埃罗替尼或OSI-774, OSI Pharmaceuticals Inc.)、Erbix (西妥昔单抗, Immune Pharmaceuticals, Inc.)、EMD-7200 (Merck AG)、ABX-EGF (Amgen Inc. 和

AbgeniX Inc.)、HR3 (古巴政府)、IgA 抗体 (Erlangen-Nuremberg 大学)、TP-38 (IVAX)、EGFR 融合蛋白、EGF-疫苗、抗EGFr免疫脂质体 (Hermes Biosciences Inc.) 及其组合。适当的EGFr 抑制剂包括Iressa、Erbix、Tarceva及其组合。其他抗肿瘤剂包括选自pan erb受体抑制剂或ErbB2受体抑制剂的那些,如CP-724,714 (Pfizer, Inc.)、CM 033 (canertinib, Pfizer, Inc.)、赫赛汀 (曲妥单抗、Genentech Inc.)、Omitarg (2C4、帕妥珠单抗、Genentech Inc.)、TAK-165 (Takeda)、GW-572016 (lonafamib、GlaxoSmithKline)、GW-282974 (GlaxoSmithKline)、EKB-569 (Wyeth)、PKM 66 (Novartis)、dHER2 (HER2疫苗、Corixa和 GlaxoSmithKline)、APC8024 (HER2疫苗、Dendreon)、抗-HER2/neu双特异性抗体 (Decof Cancer Center)、B7.her2.1gG3 (Agensys)、AS HER2 (Radiology&Research Institute for Rad Biology&Medicine)、三功能双特异性抗体 (University of Munich) 和mAB AR-209 (AroneX Pharmaceuticals Inc) 和mAB 2B-1 (Chiron) 及其组合。特定的erb选择性抗肿瘤剂包括赫赛汀、TAK-165、CP-724,714、ABX-EGF、HER3及其组合。适当的pan erb受体抑制剂包括GW572016、CM 033、EKB-569和Omitarg及其组合。

[0399] 此外,其他抗肿瘤剂可选自以下活性剂,BAY-43-9006 (Onyx Pharmaceuticals Inc.)、Genasense (augmerosen, Genta)、帕尼单抗 (Abgenix/Amgen)、Zevalin (Schering)、Bexxar (Corixa/GlaxoSmithKline)、阿巴瑞克 (Abarelix)、Alimta、EPO 906 (Novartis)、浙皮海绵内酯 (discodermolide) (XAA-296)、ABT-510 (Abbott)、新伐司他 (Neovastat) (Aeterna)、恩扎妥林 (enzastaurin) (Eli Lilly)、Combrestatin A4P (Oxigene)、ZD-6126 (AstraZeneca)、flavopiridol (Aventis)、CYC-202 (Cyclacel)、AVE-8062 (Aventis)、DMXAA (Roche/Antisoma)、Thymitaq (Eximias)、Temodar (temozolomide, Schering Plough) 和 Revilimd (Cellegene) 及其组合。

[0400] 其他抗肿瘤剂可以选自下列药物: CyPat (醋酸环丙孕酮)、Histerelin (醋酸组氨瑞林)、Plenaixis (阿巴瑞克储库制剂 (abarelix depot))、Atrasentan (ABT-627)、沙铂 (Satraplatin) (JM-216)、thalomid (沙立度胺 (Thalidomide))、Theratope、Temilifene (DPPE) IABI-007 (紫杉醇)、Evista (雷洛昔芬)、阿他美坦 (Atamestane) (Biomed-777)、Xyotax (polyglutamate paclitaxel)、Targetin (bexarotene) 及其组合。

[0401] 另外,其他抗肿瘤剂也可以选自以下活性剂: 替拉扎明 (Trizaone, 替拉扎明)、Aposyn (依昔舒林)、Nevastat (AE-941)、赛普林 (Ceplene, 二盐酸组胺 (histamine dihydrochloride))、Orathecin (卢比替康)、维鲁利素、Gastrimmune (G17DT)、DX_8951f (依沙替康甲磺酸盐)、Onconase (ranpimase)、BEC2 (mitumoab)、Xcytrin (motexafin gadolinium) 及其组合物。其他抗肿瘤剂可以选自以下活性剂: CeaVac (CEA)、NeuTrexin (trimetresate glucuronate) 及其组合。其它抗肿瘤剂可选自以下活性剂: OvaRex (oregovomab)、Osidem (IDM-I) 及其组合。

[0402] 另外的抗肿瘤剂可以选自下列活性剂: Advexin (Advexin, ING 201)、Tirazone (替拉扎明) 及其组合。另外的抗肿瘤剂可以选自下列活性剂, RSR13 (乙法昔罗)、Cotara (131I chTNT 1/b)、NBI-3001 (IL-4) 及其组合。另外的抗肿瘤剂可以选自以下活性剂: Canvaxin, GMK vaccine, PEG Interon A, Taxoprexin (DHA/paciltaxel) 及其组合。。

[0403] 其他抗肿瘤剂包括Pfizer的MEK1/2抑制剂PD325901, Array Biopharm的MEK抑制剂ARRY-142886, Bristol Myers的CDK2抑制剂BMS-387,032, Pfizer的CDK抑制剂PD0332991

和AstraZeneca的AXD-5438及其组合。

[0404] 此外,还可以使用mTOR抑制剂,例如CCI-779 (Wyeth) 和雷帕霉素衍生物RAD001 (Novartis) 和AP-23573 (Ariad),HDAC抑制剂SAHA (Merck Inc/Aton Pharmaceuticals) 及其组合。另外的抗肿瘤剂包括aurora 2抑制剂VX-680 (Vertex)、Chk1/2抑制剂XL844 (Exilixis)。

[0405] 以下细胞毒剂,例如选自表柔比星 (Ellence)、多西他赛 (Taxotere)、紫杉醇、右雷佐生 (Zinecard、右丙亚胺)、利妥昔单抗 (Rituxan)、甲磺酸伊马替尼 (Glivec) 及其组合的一种或多种可以与本文所述的本发明组合物联合使用。

[0406] 本发明还考虑与激素疗法一起使用的本发明的组合物,包括但不限于依西美坦 (阿诺新,Pfizer Inc.)、亮丙瑞林 (Lupron或Leuplin、TAP/Abbott/Takeda)、阿纳托唑 (瑞宁得,Astrazeneca)、gosrelin (诺雷德,AstraZeneca)、度骨化醇、法倔唑、福美司坦、枸橼酸他莫昔芬 (他莫昔芬,Nolvadex,AstraZeneca)、卡索地司 (AstraZeneca)、阿巴瑞克 (Praecis)、Trelstar及其组合。

[0407] 本发明还涉及激素治疗剂,例如抗雌激素药,包括但不限于氟维司群、托瑞米芬、雷洛昔芬、拉索昔芬、来曲唑 (Femara,Novartis)、抗雄激素药如比卡鲁胺、氟他胺、米非司酮、尼鲁米特、卡索地司 (R) (4'-氰基-3-(4-氟苯磺酰基)-2-羟基-2-甲基-3'-(三氟甲基)propionanilide、比卡鲁胺) 及其组合。

[0408] 此外,本发明提供单独使用或与一种或多种支持性护理产品组合的本发明的组合物,例如产物选自非格司亭 (Neupogen)、昂丹司琼 (Zofran)、法安明、Procrit、Aloxi、Emend或其组合。

[0409] 特别适当的细胞毒性剂包括Camptosar、爱必妥、易瑞沙、格列卫、泰索帝及其组合。

[0410] 以下拓扑异构酶I抑制剂可用作抗肿瘤剂:喜树碱;盐酸伊立替康 (Camptosar); edotecarin; orathecin (Supergen); 依沙替康 (Daiichi); BN-80915 (Roche); 以及它们的组合。特别优选拓扑异构酶II抑制剂包括表柔比星 (Ellence)。

[0411] 烷化剂包括但不限于氮芥N-氧化物、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑、白消安、二溴甘露醇、卡波醌、塞替派、雷莫司汀、尼莫司汀、替莫唑胺、AMD-473、六甲密胺、AP-5280、阿帕奇魁酮 (apaziquone)、布如斯利辛 (brostallicin)、苯达莫司汀、卡氮芥、磷雌氮芥、福莫司汀、葡磷酰胺、异环磷酰胺、KW-2170,马磷酰胺和二溴卫矛醇; 铂配位的烷化物包括但不限于顺铂、伯尔定 (卡铂)、依他铂、洛铂、奈达铂、依罗他新 (Eloxatin, 奥沙利铂, Sanofi) 或 satrplatin及其组合。特别优选的烷化剂包括依罗他新 (奥沙利铂)。

[0412] 抗代谢物包括但不限于甲氨喋呤、6-巯基嘌呤核苷、巯嘌呤、5-氟脲嘧啶 (5-FU) 单独使用或与亚叶酸联合、喃氟啶、LIFT、脱氧氟尿苷、氟脲己胺、阿糖胞苷 (cytarabine)、阿糖胞苷十八烷基磷酸钠 (cytarabine ocfosfate)、依诺他滨、S-1、力比泰 (premetrexed disodium, LY231514, MTA)、健择 (吉西他滨, Eli Lilly)、氟达拉滨、5-阿扎胞苷、卡培他滨、克拉屈滨、克罗拉滨、地西他滨、依洛尼塞、乙炔替定 (ethynylcytidine)、阿糖胞苷 (cytosine arabinoside)、轻基脲、TS-1、美法仑、奈拉滨、诺拉曲塞、奥氟酯 (ocfosfate)、disodium premetrexed、喷司他汀、喷立他索 (pelitrexol)、雷替曲塞、三阿平 (triapine)、曲美沙特、阿糖腺苷、长春新碱、长春瑞滨; 或者例如, 欧洲专利申请239362公开的优选的抗

代谢物之一,例如N-(5-[N-(3,4_二氢-2-甲基-4-氧代喹唑啉-6-基甲基)-N-甲氨基]-2-噻吩甲酰)-L-谷氨酸及其组合。

[0413] 抗生素包括嵌入抗生素但不限于:阿柔比星、放线菌素D、氨柔比星、安那霉素、阿霉素、博来霉素、柔红霉素、多柔比星、依沙芦星、表柔比星、加柔比星、伊达比星、丝裂霉素C、奈莫柔比星、新制癌菌素、培洛霉素、吡柔比星、rebeccamycin、丝酯(stimalamer)、链佐星、戊柔比星、净司他丁(zinostatin)及其组合。

[0414] 植物来源的抗肿瘤物质包括例如选自有丝分裂抑制剂的那些,例如长春碱、多西他赛(泰索帝)、紫杉醇及其组合。

[0415] 细胞毒性拓扑异构酶抑制剂包括一种或多种活性剂,选自aclarubicin、氨茶非特、贝洛替康、喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、二氟替康、盐酸伊立替康(Camptosar)、edotecarin、表柔比星(Eilence)、依托泊苷、依沙替康、吉马替康、勒托替康、米托蒽醌、吡柔比星、pixantrone、卢比替康、索布佐生、SN-38、tafluposide、拓扑替康及其组合。优选的细胞毒性拓扑异构酶抑制剂包括一种或多种活性剂,选自喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氨基安替非、盐酸伊立替康(Camptosar)、edotecarin、表柔比星(Eilence)、依托泊苷、SN-38、拓扑替康及其组合。

[0416] 免疫学包括干扰素和许多其他免疫增强剂。干扰素包括干扰素 α 、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 β 、干扰素 γ -1a、干扰素 γ -1b(Actimmune)或干扰素 γ -n1及其组合。其他活性剂包括非格司亭、lentinan、裂裯多糖、热胱(TheraCys)、乌苯美司、WF-10、阿地白介素、阿仑珠单抗、BAM-002、达卡巴嗪、达克珠单抗、地尼白介素、吉妥珠单抗奥佐米星、ibritumomab、咪喹莫特、来格司亭、lentinan、黑瘤疫苗(Corixa)、莫拉司亭、OncoVAX-CL、沙格司亭、他索纳明、tecleukin、thymalasin、托西莫单抗、维鲁利秦、2-100、依帕珠单抗、米妥莫单抗、oregovomab、派土莫单抗(pemtumomab、Y-muHMFg1)、Provenge(Dendreon)及其组合。

[0417] 生物反应改良剂是改变活生物体的防御机制或生物反应(例如组织细胞的存活、生长或分化)以指导其具有抗肿瘤活性的活性剂。这样的活性剂包括云芝多糖、lentinan、西佐喃、溶血性链球菌制剂(Picibanil)、乌苯美司及其组合。

[0418] 其他抗癌剂包括阿利维A酸、聚肌胞、阿曲生坦、贝沙罗汀、硼替佐米、波生坦、骨化三醇、exisuiind、非那雄胺、福莫司汀、伊班膦酸、米替福新、米托蒽醌、1-天冬酰胺酶、甲基苄肼、达卡巴嗪、羟基脲、培门冬酶、喷司他汀、他佐罗汀、Telcyta(TLK-286, Telik Inc.)、Velcade(bortezomib, Millenium)、维甲酸及其组合。

[0419] 其他抗血管生成化合物包括阿曲汀(acitretin)、维甲酰酚胺、沙利度胺、zoledronic acid、血管抑素、aplidine、昔兰昔(cilengtide)、考布他汀A-4、内皮抑素、halofuginone、rebimastat、removab、角鲨胺、乌克兰(ukrain)、维他新(Vitaxin)及其组合。铂配位化合物包括但不限于顺铂、卡铂、奈达铂、奥沙利铂及其组合。

[0420] 喜树碱衍生物包括但不限于喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、伊立替康、SN-38、edotecarin、托泊替康及其组合。其他抗肿瘤剂包括米托蒽醌、1-天冬酰胺酶、甲基苄肼、达卡巴嗪、羟基脲、喷司他丁、维甲酸及其组合。

[0421] 也可以使用能够增强抗肿瘤免疫应答的抗肿瘤剂,例如CTLA4(细胞毒性淋巴细胞抗原4)抗体和其它能够阻断CTLA4的活性剂,例如美国专利No.6,682,736公开的MDX-010

(Medarex) 和CTLA-4化合物;以及抗增殖剂例如其他法尼基蛋白转移酶抑制剂,例如法尼基蛋白转移酶抑制剂。此外,可用于本发明的特异性CTLA4抗体包括在美国临时申请60/113,647 (1998年12月23日提交),美国专利号6,682,736中描述的那些抗体,其全部内容都通过引用并入本文。

[0422] 可用于本发明的特定IGF1R抗体包括描述于国际专利申请W02002/053596中的那些,其通过引用全部并入本文。可以在本发明中使用的特定CD40抗体包括在国际专利申请No. 2003/040170中描述的那些,其全部内容通过引用并入本文。

[0423] 基因治疗剂也可用作抗肿瘤剂,例如TNFerade (GeneVec),其响应于放疗而表达TNF α 。

[0424] 在本发明的一个实施方案中,他汀类药物可以与本发明的组合物联合使用。他汀类药物(HMG-CoA还原酶抑制剂)可以选自阿托伐他汀(立普妥,Pfizer Inc.)、普伐他汀(普拉固,Bristol-Myers Squibb)、洛伐他汀(Mevacor,Merck Inc.)、辛伐他汀(Zocor,Merck Inc)、氟伐他汀(来适可,Novartis)、西立伐他汀(拜可,Bayer)、罗苏伐他汀(Crestor,AstraZeneca)、Lovostatin和Niacin (Advicor,Kos Pharmaceuticals) 及其衍生物和组合。在一个优选的实施方案中,他汀类选自阿托伐他汀和洛伐他汀、其衍生物和组合。其他可用作抗肿瘤剂的活性剂包括卡度特(Caduet)。

[0425] 在本发明的一个实施方案中,本发明的组合物可以与用于局部产生活性氧物种的光化学治疗剂联合使用。光化学治疗剂的实例包括用于光动力治疗的palladium bacteriophephorbide (TOOKAD);用于PUVA(Psoralen Ultra Violet A light)中的补骨脂素(psoralen)、8-甲氧基补骨脂素/甲氧沙林(**Oxsoralen-Ultra®**、**8-MOP®**、**Oxsoralen®**、**Uvadex®**)、4,5,8-三甲基补骨脂素/三甲沙林(**Trisoralen®**);UVAR或**UVAR®**XTS™Photopheresis System (Therakos, Inc., Exton, PA); **TheraflexECP®** (Macopharma); CobeSpectra+ Photo Immune System UVA PIT (Med Tech Solution); 光敏剂如卡泊三烯、他佐罗汀、柯桠素(chrysarobin)及其合成衍生物蒽林/1,8-二羟基-9-蒽酮/地蒽酚(**Drithocrema®**); (BioLuminescence Activated Destruction (BLADE)) 中使用的萤火虫(Photinus pyralis) 萤光素酶;藻红B (EB);四碘荧光素钠(erythrosine sodium);间-四(羟基苯基)二氢卟吩(m-THPC)/替莫泊芬(**Foscan®**, Biolitec AG);卟啉类如d-氨基乙酰丙酸(d-ALA) (Levulan**Kerastick®**; DUSA Pharmaceuticals, Inc.)、5-ALA methylesther (MLA/M-ALA) (**Metvix®**; PhotoCure ASA)、5-ALA benzylesther(**Benzvix®**); 5-ALA hexylesther (**Hexvix®**)、tin ethyl etiopurpurin (SnET2)/Sn etiopurpurin/罗培泊芬(rostoporfin) (**Photrex®**、**Purlytin®**); Miravant Medical Technologies、硼化原卟啉(**BOPP®**)、2-(1-己氧基乙基)-2-二乙烯基焦脱镁叶绿酸-a (HPPH) (**Photochlor®**; Rosewell Park Cancer Institute)、泰克萨菲瑞(Texaphyrin)、包括铈泰克萨菲瑞(Eu-Tex)、镱泰克萨菲瑞(Dy-Tex)、镉泰克萨菲瑞(Mn-Tex)、镱泰克萨菲瑞/PCI-0123 (Luu**Tex®**、**Lutex®**、**Lutrin®**)、莫特沙芬镱(MLu)/镱(III)泰克萨菲瑞(Lu-Tex) (**Antrin®**、**Lutrin®**、**Optrin®**; Pharmacyclics Inc.)、莫沙沙芬钆

(MGd)/PCI-0120 (**Xcytrin®**; 来源:Pharmacyclics Inc.) 酞菁-4 (Pc 4)、taporfin sodium/NPe6/单-L-天冬氨酰二氢卟吩e6/taporfin钠/LS11 (**Talaporfin®**; Light Science Corporation)、苯并卟啉衍生物-一元酸环A (BPD-MA)/维替泊芬 (**Visudyne®**, Novartis Pharmaceuticals)、部分纯化的血卟啉衍生物 (HpD)、卟吩姆钠 (**Photofrin®**; Axcan Pharma, Inc.)、二血卟啉醚 (DHE)、photosan-3 (PS-3)、光敏素-II、内消旋四苯基卟啉 (TPP) 和四苯基卟啉磺酸盐 (TPPS4)。

[0426] 以下实施例说明了本发明:

[0427] 实施例1:肽对体外细胞活力的影响

[0428] 在该实施例中,将本发明的肽用于体外测定以确定它们对各种细胞系中的细胞死亡和细胞增殖的作用。

[0429] 方法

[0430] 1. 肽设计

[0431] 构建了以下肽:

[0432] 已知在体外和小鼠模型中HXR9 (SEQ ID NO.86)阻止PBX和HOX蛋白之间的相互作用以抑制许多不同癌症的生长 (Morgan, R., Pirard, P. M., Shears, L., Sohal, J., Pettengell, R. & Pandha, H. S. (2007) Antagonism of HOX/PBX dimer formation blocks the in vivo proliferation of melanoma. *Cancer Res*, 67, 5806-5813; Shears, L., Plowright, L., Harrington, K., Pandha, H. S. & Morgan, R. (2008) Disrupting the interaction between HOX and PBX causes necrotic and apoptotic cell death in the renal cancer lines CaKi-2 and 769-P. *J Urol*, 180, 2196-2201; Plowright, L., Harrington, K. J., Pandha, H. S. & Morgan, R. (2009) HOX transcription factors are potential therapeutic targets in non-small-cell lung cancer (targeting HOX genes in lung cancer). *Br J Cancer*, 100, 470-475; Daniels, T. R., Neacato, II, Rodriguez, J. A., Pandha, H. S., Morgan, R. & Penichet, M. L. (2010) Disruption of HOX activity leads to cell death that can be enhanced by the interference of iron uptake in malignant B cells. *Leukemia*, 24, 1555-1565; Morgan, R., Plowright, L., Harrington, K. J., Michael, A. & Pandha, H. S. (2010) Targeting HOX and PBX transcription factors in ovarian cancer. *BMC Cancer*, 10, 89; Morgan, R., Boxall, A., Harrington, K. J., Simpson, G. R., Gillett, C., Michael, A. & Pandha, H. S. (2012) Targeting the HOX/PBX dimer in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 136, 389-398; Errico, M. C., Felicetti, F., Bottero, L., Mattia, G., Boe, A., Felli, N., Petrini, M., Bellenghi, M., Pandha, H. S., Calvaruso, M., Tripodo, C., Colombo, M. P., Morgan, R. & Care, A. (2013) The abrogation of the HOXB7/PBX2 complex induces apoptosis in melanoma through the miR-221&222-c-FOS pathway. *Int J Cancer*, 133, 879-892; Morgan, R., Boxall, A., Harrington, K. J., Simpson, G. R., Michael, A. & Pandha, H. S. (2014) Targeting HOX transcription factors in prostate cancer. *BMC Urol*, 14, 17)。

[0433] HXR9 (SEQ ID NO:86) 含有已知介导该过程的高度保守的HOX六肽序列WYPWMKK (SEQ ID NO:85), 其与先前显示出介导蛋白质跨细胞膜有效运动的聚精氨酸肽相连接。

[0434] CXR9 (SEQ ID NO:87) 作为对照肽是基于HXArg9序列产生,但在HOX/PBX干扰肽序列中具有氨基酸取代并且在上述癌症模型中无活性。

[0435] HXR9AS7 (SEQ ID NO:88) 基于HXArg9序列,其中HOX六肽序列WYPWMKK (SEQ ID NO:50) 是保守的。

[0436] HXR9noH (SEQ ID NO:89) 基于HXArg9序列,其中HOX六肽序列WYPWMKK (SEQ ID NO:50) 是保守的。

[0437] HXR9KS3 (SEQ ID NO:6) 基于HXArg9序列但在HOX/PBX干扰肽序列中具有氨基酸取代。

[0438] HXR9KS3/7 (SEQ ID NO:7) 基于HXArg9AS7序列但在HOX/PBX干扰肽序列中具有氨基酸取代。

[0439] HXR9KS3noH (SEQ ID NO:8) 基于HXArg9noH序列但在HOX/PBX干扰肽序列中具有氨基酸取代。

[0440] 这些肽的序列如下。所有肽均通过常规化学合成来制备。这些肽由Sigma-Aldrich以90%纯度合成并提供为冻干粉末。将其溶解于水中,得到各肽100mM的储液浓度。

[0441] HXR9 (SEQ ID NO:86) :WYPWMKKHHRRRRRRRRR

[0442] CXR9 (SEQ ID NO:87) :WYPAMKKHHRRRRRRRRR

[0443] HXR9AS7 (SEQ ID NO:88) :WYPWMKKAARRRRRRRRR

[0444] HXR9noH (SEQ ID NO:89) :WYPWMKKRRRRRRRRR

[0445] HXR9KS3 (SEQ ID NO:6) :WYKWMKKHHRRRRRRRRR

[0446] HXR9KS3/7 (SEQ ID NO:7) :WYKWMKKAARRRRRRRRR (以下称为‘HTL001’)

[0447] HXR9KS3noH (SEQ ID NO:8) :WYKWMKKRRRRRRRRR

[0448] 2. 测定

[0449] 如先前所述 (Morgan等人,2014,同上),使用用于代谢活性的MTT测定法测试肽对前列腺癌来源的细胞系DU145和PC3的细胞毒性。包括细胞毒性药物多西他赛 (一种标准的化学治疗药物) 作为阳性对照。测定重复3次,结果以细胞杀伤的平均IC₅₀±标准差给出。

[0450] 结果

[0451] 在2和96小时后杀死50%细胞所需的剂量 (IC₅₀) 显示在下表1中。剂量为μM (微摩尔),并且3次实验的平均值与标准差一起给出。IC₅₀相对于HXR9的倍数差异也以斜体显示。

[0452] 表1:体外肽对PC3细胞活力的影响

[0453]

肽	PC3 2hr IC50 ($\pm$ SD) (相对于 HXR9 的变化)	PC3 96hr IC50 ($\pm$ SD) (相对于 HXR9 的变化)
CXR9	>80	>80
HXR9KS3/7 (HTL001)	13 ($\pm$ 5) (2.23)	11 ($\pm$ 4) (3.91)
HXR9AS7	45 ($\pm$ 19) (0.64)	40 ($\pm$ 30) (1.08)
HXR9KS3	19 ($\pm$ 10) (1.53)	17 ($\pm$ 1) (2.53)
HXR9	29 ($\pm$ 20) (1)	43 ($\pm$ 22) (1)
HXR9KS3noH	22 ($\pm$ 6) (1.32)	21 ($\pm$ 11) (2.05)
HXR9noH	60 ($\pm$ 13) (0.48)	54 ($\pm$ 18) (0.80)
多西他赛	4 ($\pm$ 6)	0 ($\pm$ 0)

[0454] 实施例2:体外肽对细胞活力的影响

[0455] 方法

[0456] 肽

[0457] HXR9 (SEQ ID NO:86):WYPWMKKHHRRRRRRRRR

[0458] CXR9 (SEQ ID NO:87):WYPAMKKHHRRRRRRRRR

[0459] HXR9KS3/7 (SEQ ID NO:7):WYKWMKKAARRRRRRRRR (以下称'HTL001')

[0460] 这些肽由Sigma-Aldrich以90%纯度合成并提供为冻干粉末。将其溶解于水中,得到各肽100mM的储液浓度。

[0461] 测定

[0462] 用于细胞杀伤的体外测定

[0463] 如前所述(Morgan等人,2014),使用用于代谢活性的MTT测定法测试肽对前列腺癌来源的细胞系DU145、LnCaP和PC3以及乳腺癌来源的细胞系MDA-MB-231的细胞毒性。取决于细胞系,将7000-16000个细胞接种到96孔细胞板上并用5、10、20、40和80 μ M的CXR9、HXR9和HTL001处理2h。处理后,加入终浓度为0.5mg/ml的MTT。孵育4h后,将形成的甲臯晶体溶于DMSO中,并用分光荧光计在540nm处测量光密度(OD)。计算细胞存活百分比作为处理的与未处理的细胞的平均OD值的比率。重复实验3次,使用Student's t-检验进行统计分析。将所有细胞系在添加了10%FBS,1%丙酮酸钠和1%L-谷氨酰胺的RPMI培养基中培养。将它们全部在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂的培养箱中培养。重复测定3次,结果以细胞杀伤的平均IC₅₀ $\pm$ 标准差给出。

[0464] 结果

[0465] 如图1所示,HTL001 (HXR9KS3/7) 在杀死测试的每种细胞类型方面比HXR9显著更有

效:

[0466] 实施例3:HTL001在PC3细胞中的定位

[0467] 方法

[0468] 为了评估HTL001在整个细胞中与PBX蛋白的结合程度,用FAM5标记的肽 (HTL001/7FAM5) 处理PC3细胞,固定并用带有Dapi (Vector Laboratories) 的Vectashield HardSet Antifade Mounting Medium安装。然后在莱卡荧光显微镜下观察它们。

[0469] 将 1.5×10^5 个PC3细胞接种在6孔板内的 22×22 mm盖玻片上。孵育24-48h后,用HTL001/7FAM5处理细胞2小时。孵育期后,取出培养基并用PBS洗涤3次。加入冷却的甲醇并将盖玻片孵育10分钟。然后除去甲醇并在黑暗中风干20分钟。然后用PBS洗涤盖玻片两次,并使用带有DAPI的Vectashield HardSet AntifadeMounting Medium将其安装到载玻片上。

[0470] 结果

[0471] 如图2所示,HTL001被PC3细胞摄取并被发现存在于细胞质和细胞核中。

[0472] 实施例4:HTL001处理后PC3细胞中的cFOS表达

[0473] 方法

[0474] 将PC3细胞接种在 25cm^2 培养板中,并在80%汇合时用 $33\mu\text{M}$ 的CXR9,HXR9和HTL001处理2h。使用RNeasy Mini Kit-QIAGEN根据制造商的说明分离RNA并用NanoDrop ND-1000定量。根据制造商方案,使用High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit以 $25\mu\text{l}$ 最终反应体积从 $1\mu\text{g}$ 总RNA产生cDNA。通过qRT-PCR定量cFOS的表达。使用添加至TaqMan Universal PCR Master Mix和TaqMan Gene Expression Assay Hs00170630_m1 FOS的每种cDNA的1:10稀释液($5\mu\text{l}$ /孔)进行实时PCR反应。作为内源性对照进行甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)探针的扩增。使用比较Ct方法($\Delta\Delta\text{Ct}$ 算法)进行分析。独立实验一式三份进行并重复三次。统计分析采用Student's t检验进行。

[0475] 结果

[0476] 如图3所示,与未处理的PC3细胞相比,HXR9和HTL001处理均导致cFos表达的显著增加。与用HXR9处理的细胞相比,HTL001处理的细胞中的cFos表达也显著更高。

[0477] 这些结果表明cFos可以充当对本发明肽的肿瘤应答的生物标志物,并且因此其升高的表达是潜在的替代临床试验终点。

[0478] 实施例5:膜联蛋白V-FITC测定

[0479] 使用膜联蛋白V测定评估HTL001对细胞凋亡的影响。膜联蛋白V结合磷脂酰丝氨酸,在启动细胞凋亡后不久从内质膜转运至细胞表面。通过加入碘化丙啶(PI)进行细胞凋亡和坏死之间的区分。

[0480] 方法

[0481] 将PC3细胞接种在 25cm^2 培养板中并在80%汇合时用 $33\mu\text{M}$ 的CXR9,HXR9和HTL001处理2h。在暴露结束时,通过胰蛋白酶消化收集浮动和贴壁细胞,用PBS洗涤并将 $4-5 \times 10^5$ 个细胞重悬于 $100\mu\text{l}$ 结合缓冲液中。加入 $5\mu\text{l}$ 膜联蛋白V-FITC和 $0.5\mu\text{l}$ 的PI,混合并在室温暗孵育15min。孵育后,加入 $400\mu\text{l}$ 结合缓冲液并通过流式细胞术分析样品。用 $2\mu\text{M}$ 的STS处理8h的阳性对照分别用仅膜联蛋白V(通道FL-1)、仅PI(通道FL-2)和两者进行染色,用于两种信号的补偿设置。在每个样品中评估 10^4 个细胞,并在CellQuest Pro软件中进行分析。产生点图

(FL-1H/FL-2H), 并将细胞分为活的、早期凋亡的、晚期凋亡的和坏死的。重复实验3次, 并使用Student's *t*检验进行统计分析。

[0482] 结果

[0483] 如图4所示, 与未处理的PC3细胞相比, HXR9和HTL001处理均导致膜联蛋白染色的显著增加。与用HXR9处理的细胞相比, HTL001处理的细胞中的膜联蛋白染色显著更高。

[0484] 实施例6: HTL001对PC3细胞肿瘤异种移植物的影响

[0485] 方法

[0486] 将PC3细胞皮下注射到6至12周龄的雌性或雄性Balb-c裸鼠 (Harlan, UK) 中。当肿瘤大小达到100mm³时, 用PBS、HXR9或HTL001以图3所示的间隔在肿瘤内注射小鼠。当肿瘤大小达到1000mm³时或在实验结束时 (36天) 将小鼠处死。切除肿瘤并浸入10%福尔马林24h并处理用于石蜡包埋。使用切片机制作石蜡块中的5μm异种移植物切片, 并通过免疫组织化学检测不同的蛋白质。

[0487] 将PC3细胞系异种移植物的石蜡切片脱石蜡并再水合, 使用柠檬酸盐缓冲液回收抗原并使用H₂O₂进行内源性过氧化物酶猝灭。然后用合适的封闭血清封闭载玻片, 并在室温下在封闭血清中用一抗孵育1h。用PBS洗涤DUSP1的一抗, 并将载玻片在二抗中孵育30min。根据制造商的说明书使用ABC试剂盒将过氧化物酶H与二抗结合。DAB过氧化物酶底物用于可视化并用苏木素染色细胞核。切片在酸性酒精中复染, 在Scott的自来水中发蓝, 脱水, 清除并用DPX固定。

[0488] 结果

[0489] 如表2和图5、6和7所示, HTL001导致小鼠中PC3肿瘤的显著生长迟缓。

[0490] 表2: HTL001对PC3细胞肿瘤异种移植物的作用

[0491]

组	到 RTV2 的平均 时间 (天)	到 RTV2 的平均 时间 (天)	生长延迟 (天)	显著性	减 重 最 大 %
PBS 对 照	9.2	10.5	-	-	0
HXR9	17.8	18.4	7.9	p>0.05 ns	0
HTL001	21.0	17.2	6.7	p<0.05	0
组	到 RTV3 的平均 时间 (天)	到 RTV3 的平均 时间 (天)	生长延迟 (天)	显著性	减 重 最 大 %
PBS 对 照	12.1	13.6	-	-	0

[0492]

HXR9	20.8	20.8	7.2	p>0.05 ns	0
HTL001	26.5	25.1	11.5	p<0.01	0

[0493] 图5示出相对于注射PBS的小鼠,用HTL001处理的平均相对肿瘤体积作为时间的函数。

[0494] 图6示出相对于注射PBS的小鼠,用HTL001处理的荷瘤小鼠的平均相对%体重作为时间的函数。

[0495] 图7示出相对于注射PBS的小鼠,肿瘤加倍或增至3倍的时间。

[0496] 实施例7:用于HOX/PBX结合的基于细胞的测定

[0497] 下文描述了用于确定本发明的肽与HOX和PBX之间的相互作用有关的拮抗活性的合适测定法。

[0498] 方法

[0499] 为了直接评估每种肽破坏HOX/PBX结合的能力,开发了可以允许HOX/PBX/DNA二聚体形成的基于细胞的测定系统。将培养的MDA-MB-231细胞用10 μ M的每种肽处理4小时,然后使用如下所述的标准制备方法用于产生细胞裂解物。然后使用基于ELISA的系统测量HOXB4/PBX2二聚体,如下表所详述。来自该测定的值表示为与阴性对照(DMSO)相比二聚体形成的抑制%。

[0500] 裂解液制备:

- [0501] 1.通过在RT下低速离心5min收集约 5.0×10^7 个细胞。小心取出培养基。
- [0502] 2.在RT下用PBS洗涤细胞碎片(沉淀),并通过低速离心收集。小心去除上清液(总蛋白质)。
- [0503] 3.加入具有新鲜加入的(蛋白酶抑制剂)和/或(磷酸酶抑制剂)的1.0ml预冷的RIPA缓冲液(或其他合适的缓冲液)。用移液管轻轻地将细胞重悬于RIPA缓冲液中并在冰上孵育30min。
- [0504] 4.通过穿过21号针头,杜恩斯均质化或超声处理进一步破坏并均质化细胞,注意不要升高裂解物的温度。(可选:添加10 μ L的10mg/ml PMSF储液)
- [0505] 在冰上孵育30min。
- [0506] 5.转移到离心管中,并在4℃10,000 $\times$ g离心10min。上清液是总细胞裂解液。将上清液转移至新的微量离心管中并丢弃沉淀。
- [0507] 测定方法:
- [0508] 除非另有说明,所有体积为0.1ml;RT。通过浸没洗涤板。

[0509]

步骤	过程	时 间 (mins)	来源
1	包被板	60	0.2mg/ml 链霉抗生物素蛋白 (Sigma 85878 1mg, 溶解于 ml PBST)
2	洗涤	$\times 4$	PBST
3	抗小鼠 Ab 生物素	30	驴抗小鼠生物素, ab7060, 以 1:1000 使用
4	洗涤	$\times 4$	PBST
5	抗-PBX2	30	PBX2 的 mAb, ab55498, 以 1:500 使用
6	洗涤	$\times 4$	PBST
7	封闭	60	T20
8	洗涤	$\times 4$	PBST
7	细胞裂解液	30	在 PBST 中稀释至 100 μ g/ml
8	洗涤	$\times 4$	PBST
9	抗-HOXB4	30	兔抗 HOXB4, ab56049, 以 1:10,000 使用
10	洗涤	$\times 4$	PBST
11	抗兔 AP	30	山羊抗兔 AP, ab6722, 以 1:3000 使用
12	洗涤	$\times 4$	PBST
13	洗涤	$\times 1$	TBS
14	显色	30	pNpp 溶液

- [0510] 图8中示出HOXB4/PBX2二聚体测定的示意图。

[0511] 结果

[0512] HTL001显示出HOXB4/PBX2二聚体形成的28.2 (SEM4.4) %抑制。

[0513] 实施例8:在HTL001 (HXR9KS3/7) 处理的PC3细胞系肿瘤异种移植物中的DUSP1蛋白表达

[0514] 在用单独的PBS、HXR9或HTL001进行肿瘤内处理后,在从小鼠中取出的PC3肿瘤中检查先前鉴定为HXR9靶标 (Morgan等人, 2007, 同上) 的DUSP1蛋白的表达。如图9所示, HTL001处理后DUSP1表达 (褐色染色) 显著增加。

[0515] 这些结果表明DUSP1蛋白可以充当对本发明的肽的肿瘤反应的生物标记,并且因此其升高的表达是潜在的替代临床试验终点。

[0001]

<110> HOX治疗有限公司(HOX THERAPEUTICS LIMITED)
 <120> 肽
 <130> P215.001GB
 <180> 96
 <170> PatentIn版本3.3
 <210> 1
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 式(I)的合成肽。序列在N端与Y1连接,并且在C端与Y2连接。Y1和Y2各自不存在,或者是包含碱性氨基酸的阳离子聚合物的肽,条件是Y1和Y2至少一个存在。
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(3)
 <223> 式(I)中的X1。任何Xaa可以存在或不存在——表示0-3个氨基酸的范围。如果存在,X1选自W, I, FE, KQI, VV, PQT, H, 和RI。
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> 式(I)中的X2。Xaa是芳香族侧链的氨基酸或半胱氨酸
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 <223> 式(I)中的X3。Xaa是疏水性氨基酸
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> 式(I)中的X4。Xaa是具有带电侧链的氨基酸。
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (9)..(9)
 <223> 式(I)中的X5。Xaa是具有碱性侧链的氨基酸。
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (10)..(10)
 <223> 式(I)中的X6。Xaa是氨基酸或不存在。
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (11)..(11)
 <223> 式(I)中的X7。Xaa是一个氨基酸或不存在。如果存在,连接至Y2(如果存在),或者直接连接,或者通过一个或多个氨基酸。(Y2是包含碱性氨基酸的阳离子聚合物的肽)。
 <400> 1
 Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 式(II)的合成肽。序列在N端连接至Y3,并且在C端连接至Y4。Y3和Y4各自不存在或是包含含有细胞穿透部分的肽,条件是存在Y3和Y4中的至少一个。
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(11)
 <223> 式(II)的合成肽的至少N端和C端氨基酸,其为Y3和Y4至少一个存在的SEQ ID NO:2,并且处于D 构象。
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(3)
 <223> 式(II)中的X1。任何Xaa可以存在或不存在——表示0-3个氨基酸的范围。如果存在,X1选自W, I, FE, KQI, VV, PQT, H, 和RI。
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> 式(II)中的X2。Xaa是具有芳香族侧链的氨基酸或半胱氨酸
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 <223> 式(II)中的X3。Xaa是疏水性氨基酸
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> 式(II)中的X4。Xaa是具有带电侧链的氨基酸。
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (9)..(9)
 <223> 式(II)中的X5。Xaa是具有碱性侧链的氨基酸。

[0002]

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)... (10)
<223> 式 (II) 中的 X6。 Xaa 是氨基酸或不存在。

<220>
<221> VARIANT
<222> (11)... (11)
<223> 式 (II) 中的 X7。 Xaa 是 个氨基酸或不存在、如果存在, 连接至 Y4(如果存在), 或者直接连接, 或者通过一个或多个氨基酸。(Y4 是包含细胞穿透部分的肽)。

<400> 2
Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 3
<211> 9
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 式 (I) 的合成肽。 序列在 N 端与 Y1 连接, 并且在 C 端与 Y2 连接。 Y1 和 Y2 各自不存在, 或者是包含碱性氨基酸的阳离子聚合物的肽, 条件是 Y1 和 Y2 至少一个存在。

<400> 3
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys His His
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 式 (I) 的合成肽。 序列在 N 端与 Y1 连接, 并且在 C 端与 Y2 连接。 Y1 和 Y2 各自不存在, 或者是包含碱性氨基酸的阳离子聚合物的肽, 条件是 Y1 和 Y2 至少一个存在。

<400> 4
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys Ala Ala
1 5

<210> 5
<211> 7
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 式 (I) 的合成肽。 序列在 N 端与 Y1 连接, 并且在 C 端与 Y2 连接。 Y1 和 Y2 各自不存在, 或者是包含碱性氨基酸的阳离子聚合物的肽, 条件是 Y1 和 Y2 至少一个存在。

<400> 5
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys
1 5

<210> 6
<211> 18
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 6
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys His His Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15
Arg Arg

<210> 7
<211> 18
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 7
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys Ala Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15
Arg Arg

<210> 8
<211> 16
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0003]

<400> 8
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 9
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 10
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys His His
1 5

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 11
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys His His Arg
1 5 10

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 12
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys Ala Ala
1 5

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 13
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys Ala Ala Arg
1 5 10

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 14
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys
1 5

<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 15
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys Arg
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 式(II)中的合成肽。序列在N端连接至Y3,并且在C端连接至Y4。Y3和Y4各自不存在或是包含含有细胞穿透部分的肽,条件是存在Y3和Y4中的至少一个。

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(9)
<223> 式(II)的合成肽的至少N端和C端氨基酸,其为Y3和Y4至少一个存在的SEQ ID NO:16,并且处于D-构象。

<400> 16

Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys His His
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 式(II)中的合成肽。序列在N端连接至Y3,并且在C端连接至Y4。Y3和Y4各自不存在或是包含含有细胞穿透部分的肽,条件是存在Y3和Y4中的至少一个。

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(9)
<223> 式(II)的合成肽的至少N端和C端氨基酸,其为Y3和Y4至少一个存在的SEQ ID NO:17,并且处于D-构象。

<400> 17

Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys Ala Ala
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 式(II)中的合成肽。序列在N端连接至Y3,并且在C端连接至Y4。Y3和Y4各自不存在或是包含含有细胞穿透部分的肽,条件是存在Y3和Y4中的至少一个。

[0004]

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(7)
<223> 式(II)的合成肽的至少N端和C端氨基酸,其为Y3和Y4至少一个存在的SEQ ID NO:18,并且处于D-构象。

<400> 18

Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 19

Trp Cys Lys Trp Leu Asp Arg His Gly
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 20

Trp Tyr Lys Trp Val Lys Lys His His
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 21

Trp Tyr Lys Trp Ile Lys Lys His His
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 22

Trp Tyr Lys Trp Met Arg Lys His His
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 23

Trp Tyr Lys Trp Met Lys Arg His His
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 24

Trp Tyr Lys Trp Met Arg Arg His His
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 25

Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys Thr His
1 5

[0005]

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 26

Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys His Thr
1 9

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 27

Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys Thr Thr
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 28

Trp Cys Lys Trp Met Lys Lys His His
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 29

Trp Cys Lys Trp Met Arg Lys His His

1	5
<210> 30	
<211> 16	
<212> FRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成肽	
<220>	
<221> VARIANT	
<222> (1), (1)	
<223> Xaa可以存在或不存在。如果存在, Xaa是 Arg或Gln,	
<220>	
<221> VARIANT	
<222> (3), (3)	
<223> Xaa是Ile或Leu	
<220>	
<221> VARIANT	
<222> (4), (4)	
<223> Xaa是Lys或Arg	
<220>	
<221> VARIANT	
<222> (5), (5)	
<223> Xaa是Ile或Leu	
<220>	
<221> VARIANT	
<222> (10), (10)	
<223> Xaa是Lys或Arg	
<220>	
<221> VARIANT	
<222> (11), (11)	
<223> Xaa是Lys或Arg	
<220>	
<221> VARIANT	
<222> (13), (13)	
<223> Xaa是Lys或Arg	
<220>	
<221> VARIANT	
<222> (15), (16)	
<223> Xaa是Lys或Arg	
<400> 30	
[0006]	
Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Trp Phe Gln Asn Xaa Xaa Met Xaa Trp Xaa Xaa	
1 5 10 15	
<210> 31	
<211> 25	
<212> FRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成肽	
<400> 31	
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys His His Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe	
1 5 10 15	
Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys	
20 25	
<210> 32	
<211> 25	
<212> FRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成肽	
<400> 32	
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys Ala Ala Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe	
1 5 10 15	
Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys	
20 25	
<210> 33	
<211> 23	
<212> FRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成肽	
<400> 33	
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn	
1 5 10 15	
Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys	

20

<210> 34
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 34

Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys His His Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe
1 5 10 15

Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys
20

<210> 35
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 35

Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys Ala Ala Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe
1 5 10 15

Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys
20

<210> 36
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 36

Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn
1 5 10 15

[0007]

Arg Arg Met Lys Trp Lys
20

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 37

Trp Cys Lys Trp Met Lys Arg His His
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 38

Trp Cys Lys Trp Met Arg Arg His His
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 39

Trp Tyr Lys Trp Met Lys Arg Thr His
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 40

[0008]

Trp Tyr Lys Trp Met Arg Lys Thr His
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 41

Trp Tyr Lys Trp Met Arg Arg Thr His
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 42

Trp Tyr Lys Trp Met Arg Lys His Thr
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 43

Trp Tyr Lys Trp Met Lys Arg His Thr
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 44

Trp Tyr Lys Trp Met Arg Arg His Thr
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 45

Trp Tyr Lys Trp Met Arg Arg Thr Thr
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 46

Trp Tyr Lys Trp Leu Arg Lys His His
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 47

Trp Tyr Lys Trp Leu Lys Arg His His
1 5

<210> 48
<211> 8
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0009]

<400> 48

Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys His
1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 49

Trp Cys Lys Trp Leu Asp Arg Ala Gly
1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 50

Trp Tyr Lys Trp Val Lys Lys Ala Ala
1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 51

Trp Tyr Lys Trp Ile Lys Lys Ala Ala
1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 52

Trp Tyr Lys Trp Met Arg Lys Ala Ala
1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 53

Trp Tyr Lys Trp Met Lys Arg Ala Ala
1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 54

Trp Tyr Lys Trp Met Arg Arg Ala Ala
1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 55

Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys Thr Ala
1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

[0010]

<220>
<223> 合成肽
<400> 56
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys Ala Thr
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽
<400> 57
Trp Cys Lys Trp Met Lys Lys Ala Ala
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽
<400> 58
Trp Cys Lys Trp Met Arg Lys Ala Ala
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽
<400> 59
Trp Cys Lys Trp Met Lys Arg Ala Ala
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽
<400> 60
Trp Cys Lys Trp Met Arg Arg Ala Ala
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽
<400> 61
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Arg Thr Ala
1 5

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽
<400> 62
Trp Tyr Lys Trp Met Arg Lys Thr Ala
1 5

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽
<400> 63
Trp Tyr Lys Trp Met Arg Arg Thr Ala
1 5

<210> 64

[0011]

<210> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 64
Trp Tyr Lys Trp Met Arg Lys Ala Thr
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 65
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Arg Ala Thr
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 66
Trp Tyr Lys Trp Met Arg Arg Ala Thr
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 67
Trp Tyr Lys Trp Leu Arg Lys Ala Ala
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 68
Trp Tyr Lys Trp Leu Lys Arg Ala Ala
1 5

<210> 69
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 69
Trp Tyr Lys Trp Met Lys Lys Ala
1 5

<210> 70
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 70
Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 71
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 71
Gln Ile Arg Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 72
<211> 15
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 72

G L I I e L y s I I e T r p P h e G l n A s c L y s A r g M e t L y s T r p L y s L y s
1 5 10 15

<210> 73
<211> 15
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 73

G L I I e L y s I I e T r p P h e G l n A s c L y s L y s M e t L y s T r p L y s L y s
1 5 10 15

<210> 74
<211> 15
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 74

G L I I e A r g I I e T r p P h e G l n A s c A r g L y s M e t L y s T r p L y s L y s
1 5 10 15

<210> 75
<211> 15
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 75

[0012]

G L I I e A r g I I e T r p P h e G l n A s c A r g A r g M e t A r g T r p L y s L y s
1 5 10 15

<210> 76
<211> 15
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 76

G L I I e A r g I I e T r p P h e G l n A s c A r g A r g M e t L y s T r p A r g L y s
1 5 10 15

<210> 77
<211> 15
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 77

G L I I e A r g I I e T r p P h e G l n A s c A r g A r g M e t L y s T r p L y s A r g
1 5 10 15

<210> 78
<211> 15
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 78

G L I I e A r g I I e T r p P h e G l n A s c A r g A r g M e t L y s T r p A r g A r g
1 5 10 15

<210> 79
<211> 15
<212> FRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 79

Gln Ile Arg Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 80
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 80

Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Arg Lys
1 5 10 15

<210> 81
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 81

Gln Ile Arg Ile Trp Phe Gln Asn Lys Arg Met Lys Trp Arg Lys
1 5 10 15

<210> 82
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 82

Gln Ile Lys Leu Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 83
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 83

Gln Leu Lys Leu Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 84
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 84

Gln Leu Arg Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 85
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽 (HOX hexapeptide sequence)

<400> 85

Trp Tyr Pro Trp Met Lys Lys
1 5

<210> 86
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Control 合成肽 HMR9

<400> 86

Trp Tyr Pro Trp Met Lys Lys His His Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg

<210> 87
<211> 18

[0013]

[0014]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Control 合成肽 CXR9

<400> 87
Trp Tyr Pro Ala Met Lys Lys His His Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15
Arg Arg

<210> 88
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Control 合成肽 HXR9AS7

<400> 88
Trp Tyr Pro Trp Met Lys Lys Ala Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15
Arg Arg

<210> 89
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Control 合成肽 HXR9a3B

<400> 89
Trp Tyr Pro Trp Met Lys Lys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

<210> 90
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 90
Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 91
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 92
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 92
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 93
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 93
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 94
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

[0015]

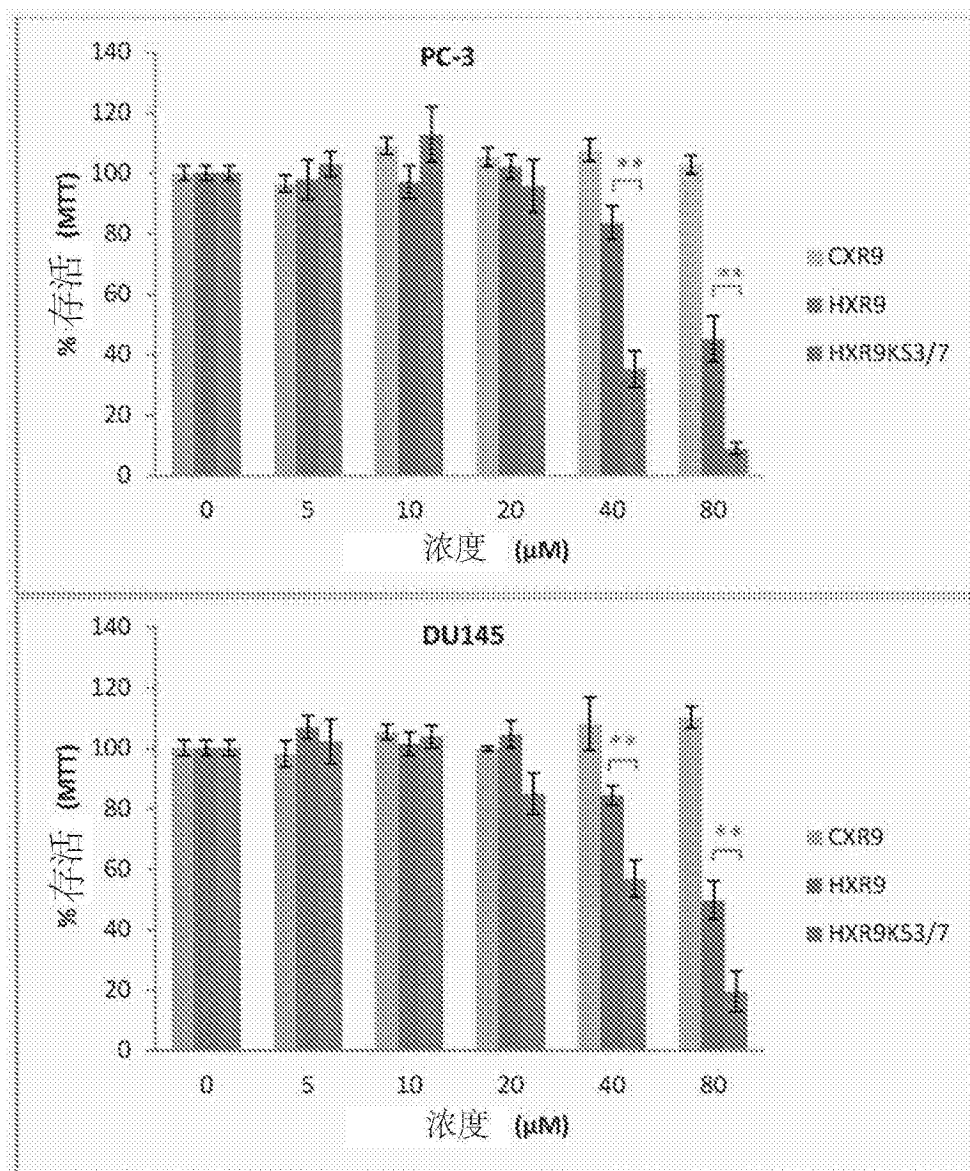
<220>
<223> 合成肽

<400> 94
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 95
<211> 12
<212> PKT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 95
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10



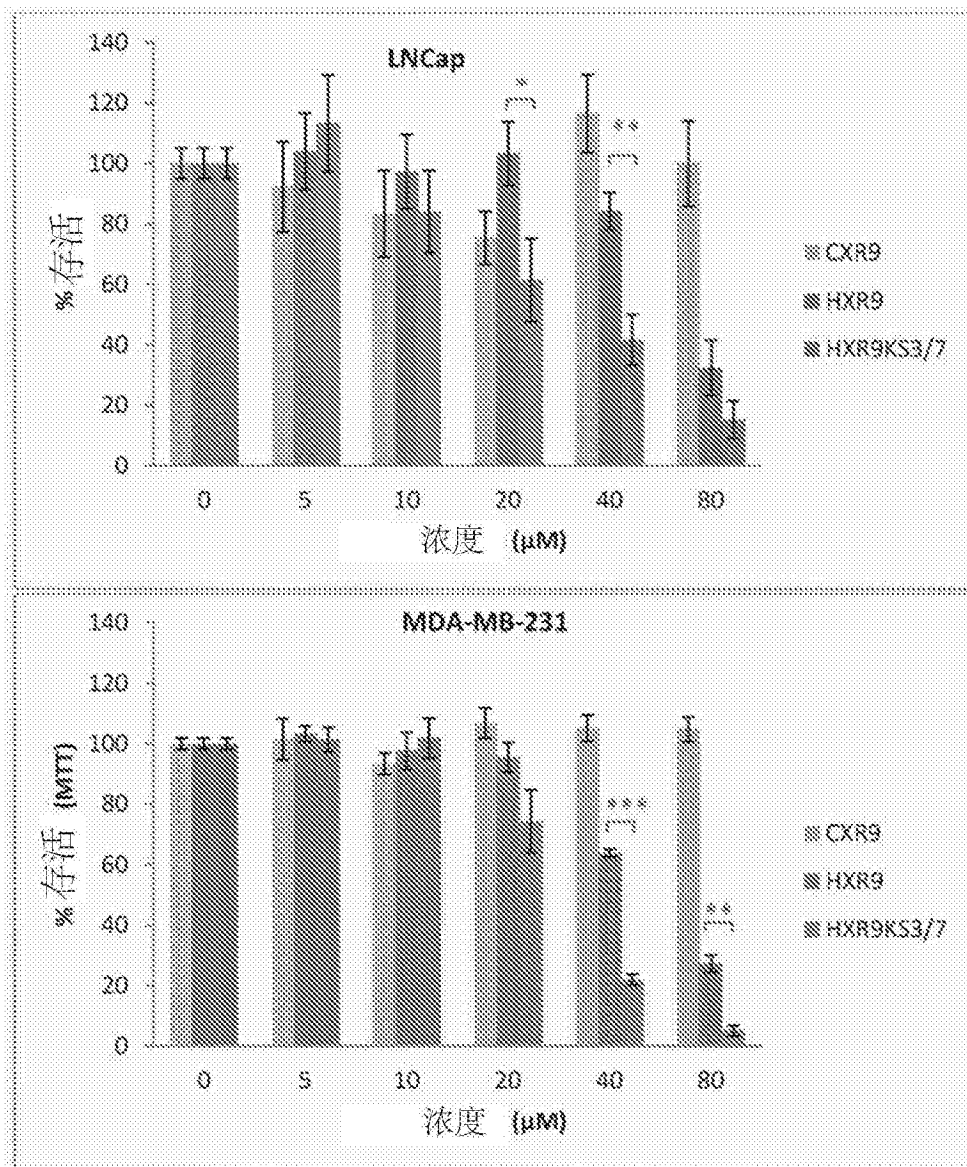


图1:体外肽对细胞活力的作用

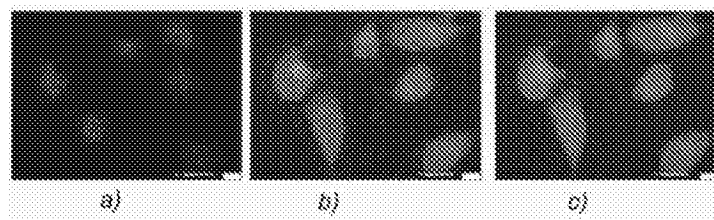


图2:用DAPI染色的细胞(a);与HTL001-FITC孵育的细胞(b);和得到的合成图像(c)。与1.3μM FAM5标记的HTL001(绿色)孵育2小时后,HTL001/7FAM5体外进入PC3细胞的细胞质和细胞核。细胞核用DAPI(蓝色)染色。放大倍数x40

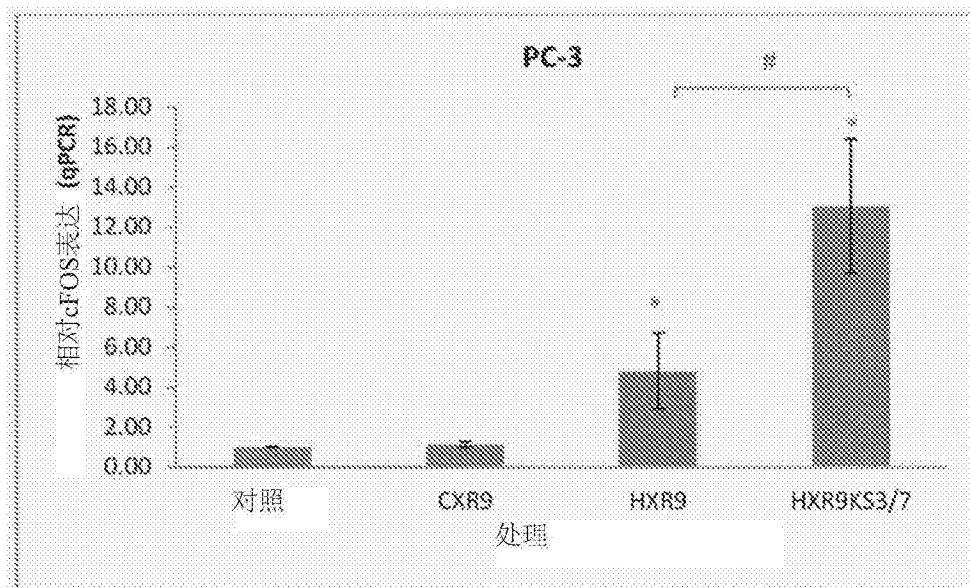


图3:HTL001处理后PC3细胞中cFOS表达

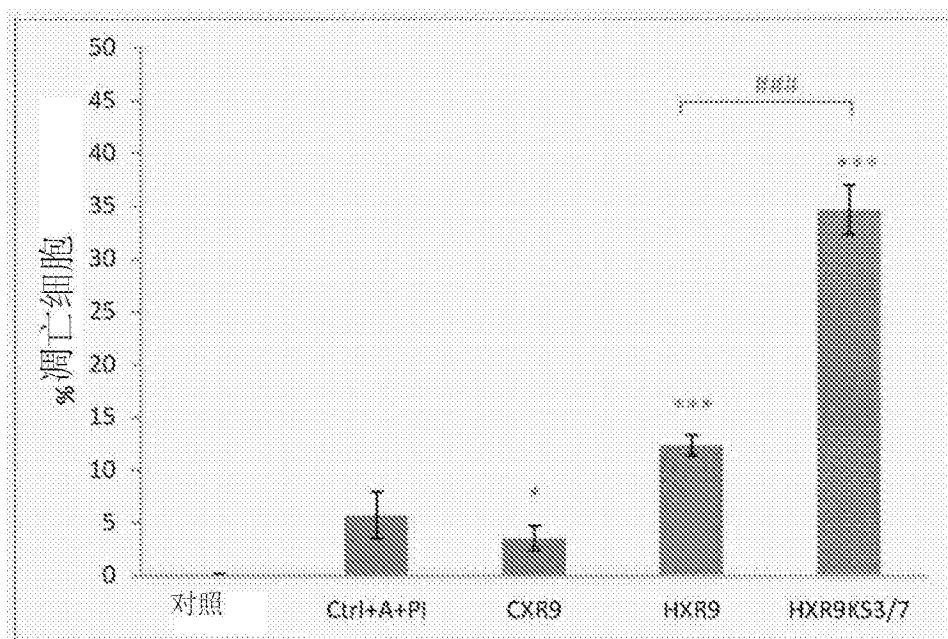


图4:膜联蛋白V-FITC测定 (用于凋亡)

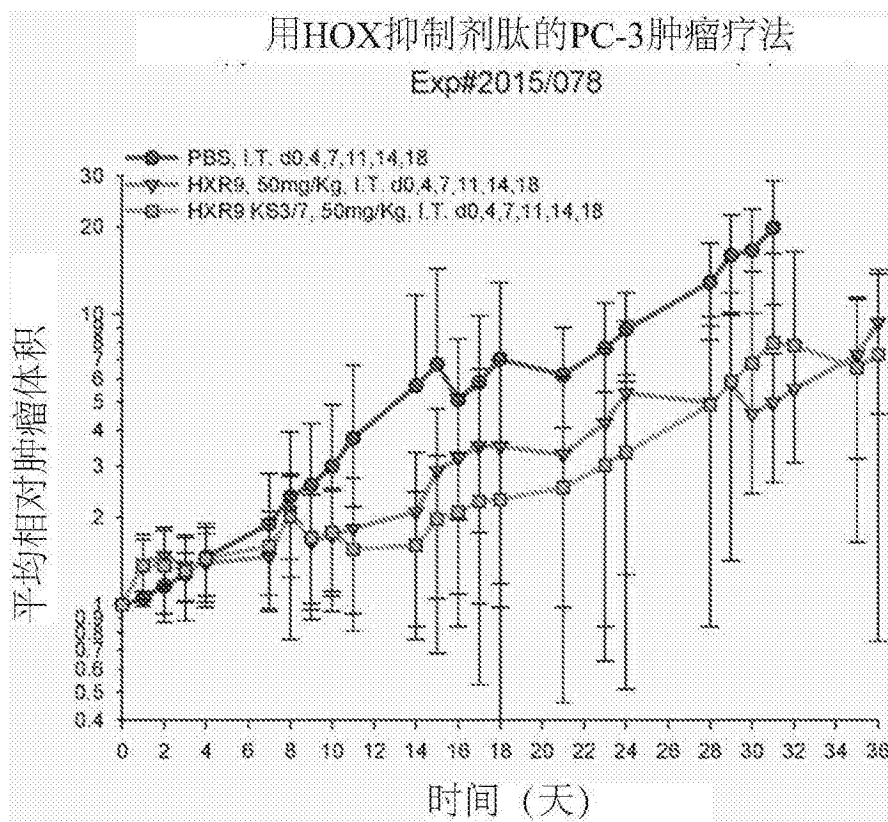


图5:相对于注射PBS的小鼠,用HXR9KS3/7 (HTL001) 处理的平均相对肿瘤体积,作为时间函数

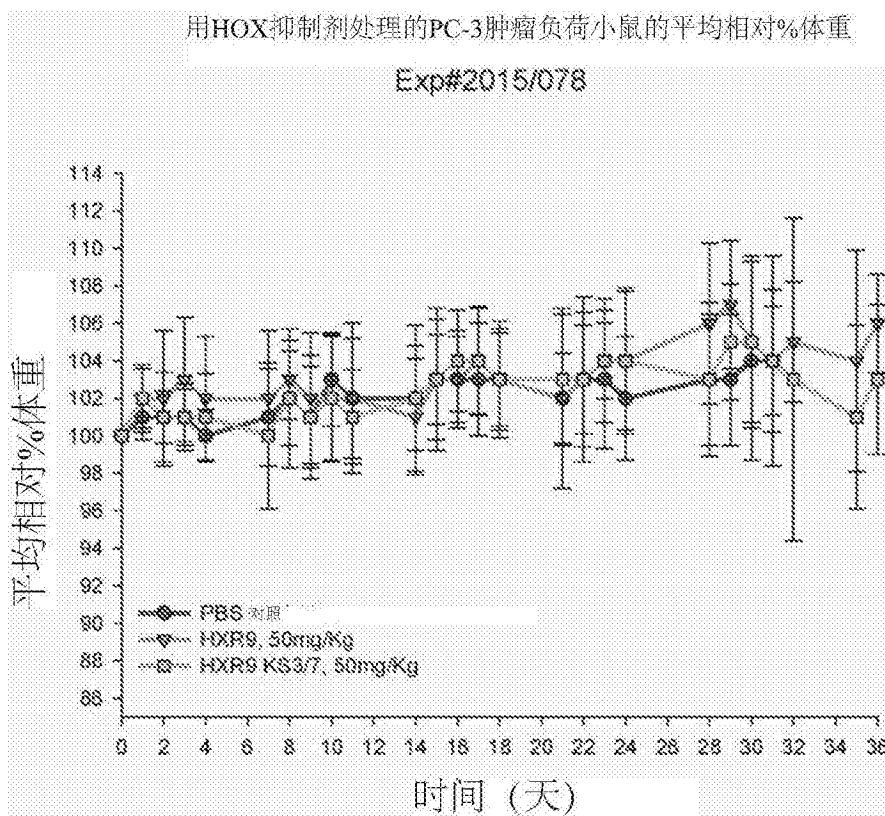


图6: 相对于注射PBS的小鼠, 用HXR9KS3/7 (HTL001) 处理的肿瘤负荷小鼠的平均相对%体重, 作为时间函数

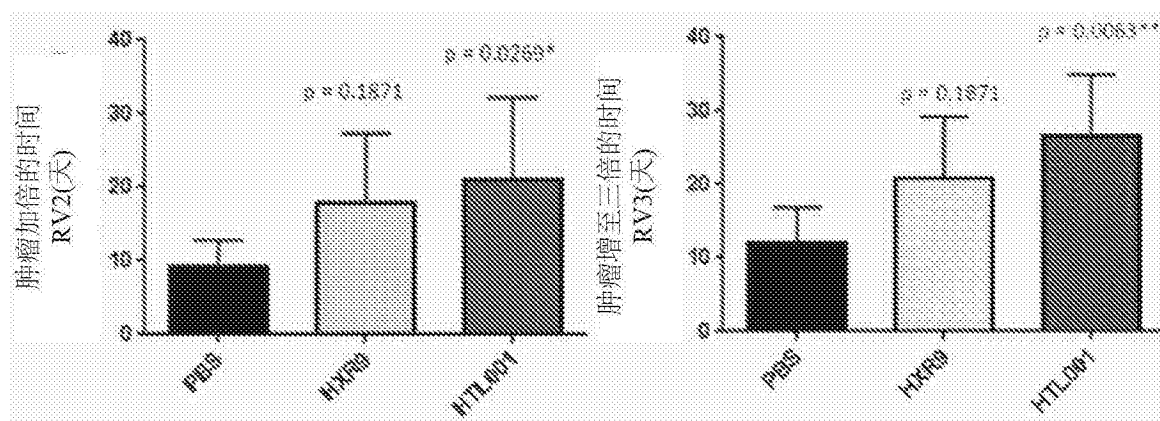


图7: 相对于注射PBS的小鼠, 肿瘤加倍或增至三倍的时间

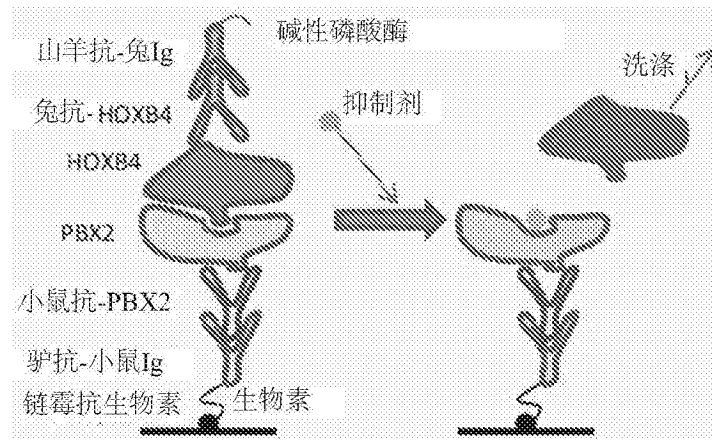


图8:HOXB4/PBX2二聚体测定的图表

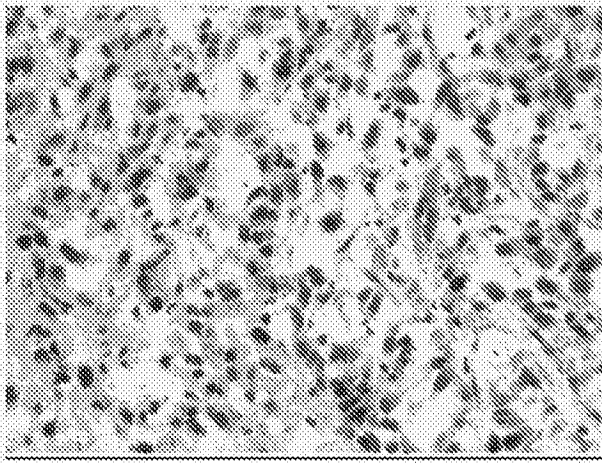


图9a: 在注射PBS的PC3细胞系肿瘤异种移植植物中DUSP1蛋白质的表达

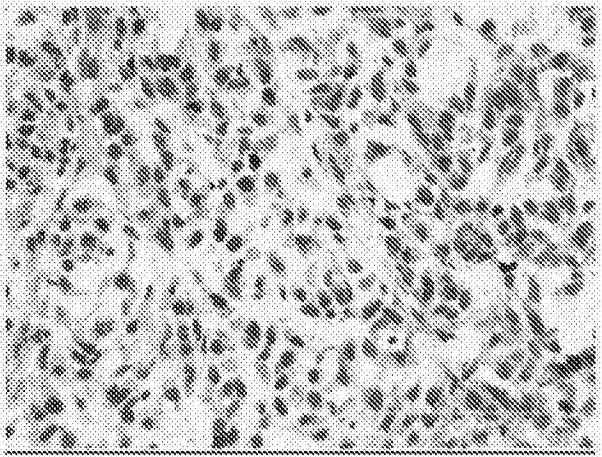


图9b: 在HXR9c处理的PC3细胞系肿瘤异种移植植物中DUSP1蛋白质的表达

图9: 在PC3细胞系肿瘤异种移植植物中的DUSP1蛋白质的表达

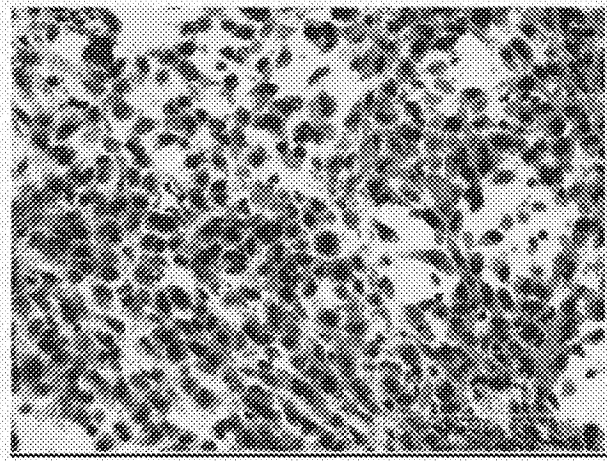


图9c:在HTL001处理的PC3细胞系肿瘤异种移植物中DUSP1蛋白质的表达