



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107921096 A

(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201680047956.4

(22)申请日 2016.07.28

(30)优先权数据

15179043.3 2015.07.30 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/068007 2016.07.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/017187 EN 2017.02.02

(71)申请人 恩多技术公司

地址 西班牙巴塞罗那

(72)发明人 L·比韦罗·桑切斯

L·索布雷瓦尔斯·阿米耶瓦

R·米纳娜·普列托

J·森德拉·库达尔

J·克罗尔·萨斯特雷

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 庞东成 张培源

(51)Int.Cl.

A61K 38/19(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 7/06(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页 附图8页

(54)发明名称

用于胰腺癌或结肠癌治疗的集落刺激因子

(57)摘要

本发明提供了一种作为活性成分应用于通过增加嗜中性粒细胞而治疗结肠癌或胰腺癌的集落刺激因子(CSF),其中,所述集落刺激因子选自由粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)组成的组。这两种重组蛋白的新用途为两种最常见的癌症形式提供了新的治疗选择。

1. 一种作为活性成分用于通过增加嗜中性粒细胞而治疗结肠癌或胰腺癌的集落刺激因子(CSF), 其中, 所述集落刺激因子选自由粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF) 和粒细胞集落刺激因子(G-CSF) 组成的组。

2. 如权利要求1所述的集落刺激因子, 其中, 所述CSF作为唯一活性成分施用。

3. 如权利要求1至2中任一项所述的集落刺激因子, 其中, 所述集落刺激因子是可溶性集落刺激因子蛋白。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的集落刺激因子, 其中, 所述CSF通过注射施用。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的集落刺激因子, 其用于诱导嗜中性粒细胞。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的集落刺激因子, 其中, 所述结肠癌是结肠腺癌。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的集落刺激因子, 其中, 所述胰腺癌是外分泌型胰腺癌。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的集落刺激因子, 其中, 所述集落刺激因子是粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。

9. 如权利要求8所述的集落刺激因子, 其中, 所述GM-CSF是沙格司亭或莫拉司亭。

10. 如权利要求1至7中任一项所述的集落刺激因子, 其中, 所述集落刺激因子是粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。

11. 如权利要求10所述应用的集落刺激因子, 其中, 所述G-CSF是非格司亭、培非格司亭、来格司亭或利培非格司亭。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的集落刺激因子, 其中, 所述CSF的施用剂量为100 μ g/日至1000 μ g/日。

13. 如权利要求1至12中任一项所述的集落刺激因子, 其中, 所述施用剂量在4周至16周的时间内给予。

14. 如权利要求1至13中任一项所述的集落刺激因子, 其中, 所述施用是皮下、口服、肌肉或静脉内施用。

15. 如权利要求1至14中任一项所述的集落刺激因子, 其中, 在4周至16周的时间内皮下施用的剂量对于G-CSF而言为100 μ g/日至600 μ g/日, 对于GM-CSF而言为200 μ g/日至800 μ g/日。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的集落刺激因子, 其中, 所诱导的嗜中性粒细胞具有15,000单位/毫升至45,000单位/毫升的嗜中性粒细胞计数。

17. 如权利要求1至16中任一项所述的集落刺激因子, 其中, 所述G-CSF或GM-CSF作为组合化学抗肿瘤疗法施用。

18. 如权利要求17所述的集落刺激因子, 其中, G-CSF或GM-CSF与选自由下述物质组成的组中的化合物分别、同时或依次施用: 吉西他滨、紫杉醇、5-氟尿嘧啶、亚叶酸、依立替康、奥沙利铂、厄洛替尼、依维莫司、丝裂霉素C、舒尼替尼或其任意组合, 以用于治疗胰腺癌, 并且可选的是所述化合物与放射疗法组合施用。

19. 如权利要求17所述的集落刺激因子, 其中, G-CSF或GM-CSF与选自由下述物质组成的组中的化合物分别、同时或依次施用: 5-氟尿嘧啶、卡培他滨、亚叶酸、伊立替康、奥沙利铂、西妥昔单抗、贝伐单抗、帕尼单抗、ziv-阿柏西普、瑞格非尼、雷莫芦单抗或其任意组合, 以用于治疗结肠癌, 并且可选的是所述化合物与放射疗法组合施用。

用于胰腺癌或结肠癌治疗的集落刺激因子

[0001] 本发明提供用于治疗两种最广泛形式的恶性肿瘤(即胰腺癌和结肠癌)的粒细胞集落刺激因子和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子。这两种重组蛋白的用途为在临床上治疗这两种疾病提供了新的治疗选择。

背景技术

[0002] 癌症是第一世界的主要死因之一。与过去的观点相反,癌症现在被视为涵盖由无数变量引起的极多多样性情况的综合性术语,其中遗传、感染和生活方式相关因素尤为突出。

[0003] 由于可导致恶性肿瘤发展的病理过程数量庞大且多样化,现在广泛意识到,每种癌症对某些治疗性治疗有利地响应,而对其它则不然。值得注意的是,即使是相同类型的癌症,在不同的患者中也可以具有不同的治疗响应,这取决于所体现的致癌突变的详细模式。甚至更值得注意的是,来源于相同患者的相同肿瘤的细胞也可以根据其克隆起源而对疾病改进治疗响应不同。

[0004] 尽管生物医学的进步和社会、公共机构以及制药和生物技术行业为解决这一疾病所做的努力,许多恶性肿瘤仍然具有巨大的死亡率。对癌症的战争远没有胜利。该疾病的异质性阻碍通用治疗的开发,因此必须设计和开发用于不同形式的特定治疗方法。目前,据估计开发一种新的癌症生物疗法所涉及的总成本约为12亿美元(DiMasi JA, Grabowski HG. "Economics of new oncology drug development" J.Clin.Oncol.2007, vol.25, pp.209-216)。然而,尽管在过去几十年中取得了巨大的进步,但由于治疗分子在大多数情况下对癌细胞没有选择性,所以使用中的大部分治疗带来沉重的负担,因此总是随之发生一系列毒副作用。

[0005] 嗜中性粒细胞计数异常低的嗜中性粒细胞减少症是最严重和频繁的化疗法相关副作用之一。大多数癌症疗法具有细胞毒性,通过一系列分子机制来破坏癌细胞分裂。这导致癌细胞不能快速分裂,带来了治疗益处。然而,体内高频率分裂的许多正常细胞系(例如上皮细胞或白细胞)的分裂速率也受到非选择性治疗的损害,这导致严重的副作用。嗜中性粒细胞通常代表循环白血细胞的最大百分比,并且通过破坏血液中发现的细菌而作为抗感染的主要防御。因此,具有化疗法相关的嗜中性粒细胞减少症的癌症患者更容易受到细菌感染的影响,如果没有及时的医疗护理,这些疾病就会变得威胁生命和致命。

[0006] 为了补偿由于细胞毒性化疗法引起的嗜中性粒细胞的消耗,对采用化疗法方案的癌症患者同时用一系列嗜中性粒细胞增强疗法进行治疗。由化疗法引起的嗜中性粒细胞减少症的目前标准治疗是基于使用两种重组蛋白,即粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。它们都刺激嗜中性粒细胞前体和成熟嗜中性粒细胞的存活、增殖、分化和功能,从而补偿抗肿瘤疗法的嗜中性粒细胞消耗性质并避免不想要的感染。G-CSF和GM-CSF的一系列类似物已被批准用于治疗化疗法相关的嗜中性粒细胞减少症,例如非格司亭、培非格司亭、来格司亭、沙格司亭和莫拉司亭。

[0007] 鉴于上述的高开发成本,医药行业正在寻找创新的制剂来减少因耗损而造成的资

源总体浪费。在这方面,为了以有节制的成本找到新的疗法,目前的趋势之一就是所谓的药物用途改变或重新定位。该策略基于为已经开发的药物发现新的适应症。由于已批准的药物已经通过临床前和临床阶段,其ADME性质、生物利用度和毒性已知是可以接受的,因此与这些阻碍有关的大部分障碍原则上不是问题。因此,如果为已知的安全药物发现与已开发出的适应症不同的第二适应症,那么其开发应该比没有实验性的体内或人体试验的新发现的分子容易得多。

[0008] 重新定位策略可以用于任何给定的药物,无论其是小有有机分子还是重组蛋白。在癌症领域重新定位的蛋白质中,GM-CSF和G-CSF值得特别提及。它们已经在一系列癌症中作为化学疗法进行了测试,取得了不同程度的成功。GM-CSF在黑色素瘤患者手术切除后作为长期疗法皮下施用已被证实具有治疗效果(Spitler LE.等“Adjuvant therapy of stage III and IV malignant melanoma using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”*J.Clin.Oncol.*2000,vol.18,pp.1614-1621)。另外,已经证明其在前列腺癌患者中具有治疗益处(Rini BI等“Clinical and immunological characteristics of patients with serologic progression of prostate cancer achieving long-term disease control with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”*J.Urol.*2006,vol.175,pp.2087-2091)。然而,在其它类型的恶性肿瘤中,结果令人失望。例如,使用GM-CSF作为治疗肉瘤的单一疗法并没有显示治疗益处(Carson EJ.等“Phase II trial of sargramostim(yeast-derived recombinant human GM-CSF) as monotherapy for advanced sarcomas”*Proc.Am.Soc.Clin.Oncol.*2000,vol 18,Abstract 2219)。

[0009] 在结肠癌的情况下,GM-CSF和G-CSF的作用似乎是有害的,如现有技术的许多参考文献中所发现的。因此,已将GM-CSF与人类结直肠癌的疾病进展相关联(Demirci,U.等“Serum granulocyte macrophage-colony stimulating factor:a tumor marker in colorectal carcinoma?”,*Asian Pac.J.Cancer Prev.*2009,vol.10,pp.1021-1024; Mroczko B.“Serum macrophage-colony stimulating factor levels in colorectal cancer patients correlate with lymph node metastasis and poor prognosis”*Clin.Chim.Acta.*2007,vol.380,pp.208-12)。类似地,也将G-CSF与结肠癌的侵袭性和恶性相关联(Fujiwara Y.等“Granulocyte colony-stimulating factor-producing ascending colon cancer as indicated by histopathological findings:report of a case.”*Osaka City Med.J.*2011,vol.57,pp.79-84;Kim JS.等“Administration of granulocyte colony-stimulating factor with radiotherapy promotes tumor growth by stimulating vascularization in tumor-bearing mice”*Oncol Rep.*2015vol.34,pp.147-54;Morris KT.等“G-CSF and G-CSFR are highly expressed in human gastric and colon cancers and promote carcinoma cell proliferation and migration”*Br.J.Cancer* 2014,vol.110,pp.1211-20)。对于胰腺癌,GM-CSF和G-CSF在临床上的潜在作用仍有待确定(Groblewska M.“Serum levels of granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF) and macrophage colony-stimulating factor(M-CSF) in pancreatic cancer patients”*Clin.Chem.Lab.Med.*2007,vol.45,pp.30-4;Joshita S.“Granulocyte-colony stimulating factor-producing pancreatic adenosquamous carcinoma showing aggressive clinical course”*Intern.Med.*2009,vol.48,pp.687-91)。

[0010] 由于结肠癌和胰腺癌的发病率居前10位,2012年分别导致总计694000和33000例死亡,而且由于它们中相当的百分比或病例仍然具有不良预后,因此急需抗击它们的新型治疗。高度期望在目前药典中出现针对这两种疾病的新型治疗。

发明内容

[0011] 发明人令人惊奇地发现,通过注射施用的外源性G-CSF或GM-CSF作为可溶性活性药物成分在结肠癌和胰腺癌中具有强烈的化学疗效,即这两种已批准的重组蛋白药物能够减缓结肠癌和胰腺癌中的癌细胞的进展。值得注意的是,这种效力与目前正在使用的化疗性治疗如吉西他滨相当。

[0012] 由嗜中性粒细胞数量增加引起的G-CSF和GM-CSF对结肠癌和胰腺癌的显著抗肿瘤活性,开启了将这两种重组药物(目前用于治疗嗜中性粒细胞减少症)用途改变为针对这两种形式的癌症的两种新型抗肿瘤治疗选择的道路。

[0013] 发现施用G-CSF或GM-CSF以诱导患者嗜中性粒细胞,对于本文所要求保护的两种类型的癌症具有显著的治疗效果。值得注意的是,该治疗效果与受试者是否具有药理学诱导的嗜中性白细胞减少症无关。本发明基于在癌症患者中诱导嗜中性粒细胞,而不依赖于他们可能具有或可能不具有由任何其它药物治疗其疾病所引起的嗜中性粒细胞减少症的事实。

[0014] 因此,本发明的第一方面是作为活性成分用于通过增加嗜中性粒细胞而治疗结肠癌或胰腺癌的集落刺激因子(CSF),其中,所述集落刺激因子选自由粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)组成的组。

[0015] 值得注意的是,发明人用见于本文的实验数据证明了G-CSF和GM-CSF在各种结肠和胰腺癌体内模型中是有效的,这强调了它们作为这两种恶性肿瘤的治疗药物的通用性。

附图说明

[0016] 图1.G-CSF在Panc-1模型中的抗肿瘤功效。

[0017] 描述了G-CSF在人胰腺SC肿瘤中的抗肿瘤功效。在整个实验期间,对携带Panc-1 SC肿瘤的无胸腺nu/nu小鼠每天以剂量为10 μ g/Kg的皮下G-CSF注射进行治疗,而每周两次以80mg/Kg的剂量腹膜内注射GE。示出在盐水(实线)、G-CSF 10 μ g/Kg(短划线)和GE 80mg/kg(点)组中治疗48天的总肿瘤体积(mm³±SE)。

[0018] 图2.G-CSF在MiaPaca模型中的抗肿瘤功效。

[0019] 描述了G-CSF在人胰腺SC肿瘤中的抗肿瘤功效。在整个实验期间,对携带MiaPaca SC肿瘤的无胸腺nu/nu小鼠每天以剂量为10 μ g/kg的皮下G-CSF注射进行治疗,而每周两次以80mg/Kg的剂量腹膜内注射GE。示出在盐水(实线)、G-CSF 10 μ g/kg(短划线)和GE 80mg/kg(点)组中治疗37天的总肿瘤体积(mm³±SE)。

[0020] 图3.G-CSF在Panc02模型中的抗肿瘤功效。

[0021] 描述了G-CSF在鼠胰腺SC肿瘤中的抗肿瘤功效。对携带Panc02 SC肿瘤的C57BJL6小鼠每天以剂量为100 μ g/kg的皮下G-CSF注射进行治疗。示出在盐水(实线)、G-CSF 100 μ g/kg(短划线)组中治疗22天的总肿瘤体积(mm³±SE)。

[0022] 图4.G-CSF在Colon-26模型中的抗肿瘤功效。

[0023] 描述了G-CSF在小鼠结直肠SC肿瘤中的抗肿瘤功效。对携带结直肠SC肿瘤的BalbC小鼠每天以剂量为10 μ g/kg的皮下G-CSF注射进行治疗。示出在盐水(实线)和G-CSF 10 μ g/kg(短划线)组中治疗18天的总肿瘤体积(mm³±SE)。

[0024] 图5.Colon-26模型中的肿瘤粒细胞。

[0025] 描述了肿瘤粒细胞水平,其定义为CD45+CD11b+Ly6G++三重阳性群体,通过流式细胞术对在5天期间用10 μ g/kg G-CSF治疗的Colon-26肿瘤进行分析。来自肿瘤的粒细胞表示为阳性细胞的百分比±SE。

[0026] 图6.在Colon-26模型中Sephadex对G-CSF的抗肿瘤功效的影响。

[0027] 描述了G-CSF在结直肠SC肿瘤中的抗肿瘤功效。对携带Colon-26 SC肿瘤的BalbC小鼠(具有或不具有Sephadex丘疹),每天以剂量为50 μ g/kg的皮下G-CSF注射进行治疗。示出盐水(圆形)、G-CSF 50 μ g/kg(正方形,缩写为IT50)、Sephadex-盐水(三角形)和Sephadex+G-CSF 50 μ g/kg(叉,缩写为IT-Sephadex)治疗19天的总肿瘤体积(mm³±SE)。

[0028] 图7.在健康免疫活性和免疫缺陷小鼠中G-CSF对外周血粒细胞水平的影响。

[0029] 描述了在健康C57BJL6中皮下注射单剂量的G-CSF(10 μ g/kg),在无胸腺nu/nu小鼠中皮下注射10、25、50和100 μ g/kg G-CSF之后,在健康C57BJL6和无胸腺nu/nu小鼠中外周血粒细胞的水平。在不同的时间点采集血液样品,外周血粒细胞水平表示为粒细胞总数(GRA x10⁹/L)。

[0030] 图8.在MiaPaca模型中G-CSF对外周血粒细胞水平的影响。

[0031] 描述了在皮下注射G-CSF 10、25、50和100 μ g/kg之后,在携带MiaPaca SC肿瘤的小鼠中皮下注射G-CSF 10、25、50和100 μ g/kg之后,在携带MiaPaca SC肿瘤的小鼠中外周血粒细胞的水平。在1.5小时采集血液样品,外周血粒细胞水平表示为粒细胞总数(GRA x10⁹/L)。

具体实施方式

[0032] 为了理解起见,包括下面的定义并且预期其适用于整个说明书、权利要求和附图。

[0033] 本文使用的术语“抗肿瘤疗法”是指基于施用抗癌活性药物成分(API)的治疗,即以直接或间接阻滞、延迟或减缓癌细胞的不受控制的细胞生长和分裂为目的给予API的治疗。

[0034] 与用于治疗结肠癌或胰腺癌有关的术语“嗜中性粒细胞增加”是指效果基本上通过增加嗜中性粒细胞的数量而驱动的抗肿瘤疗法。

[0035] 本文使用的术语“嗜中性粒细胞”是指嗜中性的粒细胞,其是在哺乳动物的白细胞中最丰富(高达75%)的类型并且是先天免疫系统的核心部分。它们来源于骨髓中的干细胞。与嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞一起,它们形成多形核细胞家族(PMN)的一部分。

[0036] 本文使用的术语“集落刺激因子”(CSF)是指一系列糖蛋白,其结合造血细胞上的蛋白质受体,触发各种细胞内信号传导事件,所述事件最终导致不同造血细胞谱系的增殖和分化。该家族由巨噬细胞-集落刺激因子(M-CSF)、GM-CSF和G-CSF组成。当在本发明中使用CSF(是G-CSF,M-CSF或GM-CSF中的任一种)时,其涉及任何野生型哺乳动物、特别是人的糖蛋白,以及涉及衍生自这些蛋白质并包括氨基酸修饰的任何活性药物成分。这些氨基酸修饰包括基于重组技术的蛋白质生产工艺、聚乙二醇化和糖基化导致的氨基酸添加。

[0037] 本文使用的术语“可溶性集落刺激因子(CSF)蛋白质”是指以分离的可溶性蛋白的

形式肠胃外施用的CSF。当直接向患者施用该蛋白质时，该蛋白质不与任何其它大分子（例如抗体）或任何其它治疗性蛋白质共价缀合，也不以编码可溶性CSF蛋白质的核酸、载体或其它形式施用。

[0038] 也称为集落刺激因子3 (CSF3) 或C17orf33的蛋白质粒细胞-集落刺激因子 (G-CSF) 是刺激骨髓产生粒细胞的四螺旋束结构化糖蛋白。它是由内皮细胞和巨噬细胞产生的细胞因子家族的成员，并且控制两种相关的白细胞群，即粒细胞和单核细胞-巨噬细胞的产生、分化和功能。人类G-CSF蛋白可以在Uniprot数据库中以条目P09919找到（版本169，最后更新于2015年4月29日）。目前有几种与人类G-CSF非常相似的活性药物成分，即非格司亭、来格司亭、利培非格司亭和培非格司亭。非格司亭与天然蛋白质的不同之处在于已添加N-末端甲硫氨酸残基以允许其在细菌中表达，因为该产物是在大肠杆菌中产生的（因此其不是如在由真核细胞表达时那样被糖基化）。培非格司亭是非格司亭的PEG化版本，由于清除率较低，半衰期延长。这两种API目前都在临床中标准用于治疗接受化学疗法的癌症患者的化学疗法相关的嗜中性粒细胞减少症。

[0039] 也被称为集落刺激因子2 (CSF2) 的蛋白质粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子 (GM-CSF)，是四螺旋束结构化糖蛋白，其刺激骨髓产生粒细胞和巨噬细胞。它是细胞因子家族的成员，并且控制两个相关的白血球细胞群，即粒细胞和单核细胞-巨噬细胞的产生、分化和功能。人类GM-CSF蛋白可以在Uniprot数据库中以条目P04141找到（版本160，最后更新于2015年5月27日）。目前有两种基于人GM-CSF的活性药物成分，即沙格司亭和莫拉司亭。它们都处方用于治疗在接受化学疗法的癌症患者中化学疗法相关的嗜中性粒细胞减少症。

[0040] 本文使用的术语“胰腺癌”是指外分泌型和内分泌型肿瘤。

[0041] 本文使用的术语“结肠癌”是指起源于结肠或直肠的任何癌症，特别是腺癌，但也是胃肠道间质瘤 (gist)、鳞状细胞癌、神经内分泌和结肠肉瘤。

[0042] 本文使用的术语“增加嗜中性粒细胞的抗肿瘤疗法”是指效果主要通过增加嗜中性粒细胞的量来驱动的抗肿瘤疗法。

[0043] 本文使用的术语“诱导嗜中性粒细胞”是指为了使他/她的嗜中性粒细胞计数增加至高于标准水平并及时维持其的目的而给予受试者或患者的治疗，而不考虑其可能有任何先前或伴随的治疗诱导的嗜中性粒细胞减少症的事实。在人受试者中进行的治疗会导致嗜中性粒细胞计数增加600%至1000%。应该提及的是，当成年人的嗜中性粒细胞计数在大约2,000单位/微升至7,500单位/微升之间时被认为是正常的。“诱导的嗜中性粒细胞”可导致嗜中性粒细胞计数在20,000单位/微升至45,000单位/微升之间，因此当与其标准值相比时计数明显增加。

[0044] 本文使用的术语“治疗有效量”是指当施用足量具有治疗效果的CSF的量。根据本发明施用的特定剂量当然将由病例周围的具体情况确定，包括施用的CSF、确切的施用途径、被治疗的特定癌症、受体受试者和类似的考虑因素。

[0045] 如上所述，本发明的第一方面是作为活性成分用于通过增加嗜中性粒细胞而治疗结肠癌或胰腺癌的集落刺激因子 (CSF)，其中，所述集落刺激因子选自由粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 组成的组。

[0046] 作为增加嗜中性粒细胞的抗肿瘤疗法应用于治疗结肠癌或胰腺癌的集落刺激因子 (CSF)，其中，所述集落刺激因子选自由粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和粒细胞

集落刺激因子 (G-CSF) 组成的组,也被认为是本发明的一部分。

[0047] 本发明还可为集落刺激因子 (CSF) 在制造用于通过增加嗜中性粒细胞而治疗结肠癌或胰腺癌的药物中的应用,所述药物包含选自由粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 组成的组中的集落刺激因子作为活性成分。

[0048] 本发明还可为通过增加嗜中性粒细胞而治疗结肠癌或胰腺癌的方法,其包括:对有需要的受试者 (包括人类) 施用治疗有效量的作为活性成分的集落刺激因子,其中,所述集落刺激因子选自由粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 组成的组。

[0049] 在本发明第一方面的具体实施方式中,所述集落刺激因子 (CSF) 作为唯一活性成分施用。

[0050] 在本发明第一方面的具体实施方式中,所述集落刺激因子 (CSF) 是可溶性集落刺激因子蛋白。

[0051] 在本发明第一方面的具体实施方式中,所述集落刺激因子 (CSF) 通过注射施用。

[0052] 在本发明第一方面的具体实施方式中,所述集落刺激因子用于诱导嗜中性粒细胞。

[0053] 作为抗肿瘤疗法用于治疗结肠癌或胰腺癌的集落刺激因子 (CSF),也形成本发明的一部分。

[0054] 另外,作为增加嗜中性粒细胞的抗肿瘤疗法用于治疗结肠癌或胰腺癌的集落刺激因子 (CSF),也形成本发明的一部分。

[0055] 在本发明第一方面的具体实施方式中,所述嗜中性粒细胞持续4至20周的时间。

[0056] 在本发明第一方面的具体实施方式中,所述嗜中性粒细胞持续8至16周的时间。

[0057] 在本发明第一方面的具体实施方式中,所述可溶性集落刺激因子 (CSF) 用于诱导嗜中性粒细胞。

[0058] 在本发明第一方面的具体实施方式中,所述结肠癌是结肠腺癌。

[0059] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述胰腺癌是外分泌型胰腺癌。

[0060] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子是粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)。

[0061] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 是沙格司亭或莫拉司亭。

[0062] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述GM-CSF是哺乳动物特别是人的重组GM-CSF。

[0063] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子是粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)。

[0064] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 是非格司亭、培非格司亭、来格司亭或利培非格司亭。

[0065] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述G-CSF是哺乳动物特别是人的重组G-CSF。

[0066] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子的施用剂量为100 μ g/日至1000 μ g/日。

[0067] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子的施用剂量对于G-CSF而言为100至500 μ g/日,对于GM-CSF而言为200 μ g/日至800 μ g/日。

[0068] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子的施用剂量为290 μ g/日至310 μ g/日。

[0069] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子的施用剂量为300 μ g/日。

[0070] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述CSF的施用剂量为1 μ g/kg/日至50 μ g/kg/日。

[0071] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述CSF的施用剂量为5 μ g/kg/日、10 μ g/kg/日、15 μ g/kg/日、20 μ g/kg/日、25 μ g/kg/日、30 μ g/kg/日、35 μ g/kg/日、40 μ g/kg/日、45 μ g/kg/日或50 μ g/kg/日。

[0072] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子在6周至16周的时间内施用。

[0073] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子以一系列周期间歇施用,其中所述周期可以是1至5个,每个施用周期散布有休息期,其中每个休息期为1至12周,每个施用周期为4至16周。

[0074] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子在2.5月至3.5月的时间内施用。

[0075] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子在3月内施用。

[0076] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子皮下、口服、肌内或静脉内施用。这意味着施用途径选自皮下施用、口服施用、肌内施用和静脉内施用。

[0077] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子在4周至16周的时间内皮下施用,剂量对于G-CSF而言为100 μ g/日至500 μ g/日,对于GM-CSF而言为200 μ g/日至800 μ g/日。

[0078] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子在4周至16周的时间内皮下施用,剂量为1 μ g/kg/日至50 μ g/kg/日。

[0079] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子在3个月的时间内皮下施用的剂量为300 μ g/日。

[0080] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所诱导的嗜中性粒细胞具有15.000单位/毫升至60.000单位/毫升的嗜中性粒细胞计数。

[0081] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所诱导的嗜中性粒细胞具有15.000单位/毫升至50.000单位/毫升的嗜中性粒细胞计数。

[0082] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所诱导的嗜中性粒细胞具有15.000单位/毫升至45.000单位/毫升的嗜中性粒细胞计数。

[0083] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所诱导的嗜中性粒细胞具有20.000单位/毫升至40.000单位/毫升的嗜中性粒细胞计数。

[0084] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所诱导的嗜中性粒细胞具有25.000单位/毫升至35.000单位/毫升的嗜中性粒细胞计数。

[0085] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子作为唯一的化学抗

肿瘤疗法施用,可选地与放射疗法组合。

[0086] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子作为组合化学抗肿瘤疗法施用。

[0087] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述集落刺激因子与放射疗法同时或依次施用。

[0088] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述G-CSF或GM-CSF与选自由下述物质组成的组中的化合物分别、同时或依次施用:吉西他滨、紫杉醇、5-氟尿嘧啶、亚叶酸、依立替康、奥沙利铂、厄洛替尼、依维莫司、丝裂霉素C、舒尼替尼或其任意组合,以用于治疗胰腺癌。

[0089] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述G-CSF或GM-CSF与选自由下述物质组成的组中的化合物分别、同时或依次施用:吉西他滨、紫杉醇、5-氟尿嘧啶、亚叶酸、依立替康、奥沙利铂、厄洛替尼、依维莫司、丝裂霉素C、舒尼替尼或其任意组合,以用于治疗胰腺癌,并且可选的是所述化合物的施用与放射疗法组合。

[0090] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述G-CSF或GM-CSF与选自由下述物质组成的组中的化合物分别、同时或依次施用:5-氟尿嘧啶、卡培他滨、亚叶酸、伊立替康、奥沙利铂、西妥昔单抗、贝伐单抗、帕尼单抗、ziv-阿柏西普(ziv-aflibercept)、瑞格非尼、雷莫芦单抗或其任意组合,以用于治疗结肠癌。

[0091] 在本发明第一方面的另一具体实施方式中,所述G-CSF或GM-CSF与选自由下述物质组成的组中的化合物分别、同时或依次施用:5-氟尿嘧啶、卡培他滨、亚叶酸、伊立替康、奥沙利铂、西妥昔单抗、贝伐单抗、帕尼单抗、ziv-阿柏西普、瑞格非尼、雷莫芦单抗或其任意组合,以用于治疗结肠癌,并且可选的是所述化合物的施用与放射疗法组合。

[0092] 在整个说明书和权利要求中,词语“包括”以及该词语的变化不旨在排除其它技术特征、添加剂、组分或步骤。此外,词语“包括”及其变型涵盖术语“由.....组成”。本发明的其它目的、优点和特征对于本领域技术人员在检查说明书后将变得显而易见,或者可以通过实施本发明而了解。以下实施例是以说明的方式提供的,它们并不意在限制本发明。此外,本发明涵盖本文描述的特定和优选实施方式的所有可能组合。

[0093] 实施例

[0094] A) 材料和方法

[0095] 细胞系

[0096] 将人胰腺腺癌细胞系Panc-1和MiaPaca细胞和小鼠胰腺腺癌细胞Panc02用于胰腺癌功效研究。将鼠结直肠癌细胞系Colon-26细胞用于结肠癌功效研究。所有的细胞系常规培养于补充有10%胎牛血清(FBS)、100单位青霉素/ml,100μg链霉素/ml和另外的2mM谷氨酰胺(Lonza)的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)(Lonza,Verviers,Belgium)中,并保持在37℃、5%CO₂的加湿温育器中,每3-4天传代。

[0097] 小鼠模型和肿瘤生长研究

[0098] 动物步骤符合欧共体指令86/609/EEC的指导方针,并得到当地伦理委员会的批准。使用雌性无胸腺nu/nu小鼠(6周龄,Harlan Iberica)从Panc-1和MiaPaca细胞系产生皮下(SC)胰腺肿瘤。使用免疫活性模型C57BL/6雌性小鼠(6周龄,Harlan Iberica)和Balb/C(6周龄,Harlan Iberica)分别从Panc01和Colon-26细胞系产生SC肿瘤。所有细胞系以

6×10^6 /细胞/小鼠注射到小鼠的右侧肋腹中。将所有动物称重,并使用手动卡尺每周三次测量肿瘤。根据Attia和Weiss所述的公式(Attia MA等“Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice.V.Acquired tumor resistance and enhancement in strain A mice infected with mammary tumor virus”Cancer Res.1966,vol.26,pp, 1787-1800), $V(\text{mm}^3) = 0.4 \times (\text{较大直径} \times \text{较小直径}^2)$, 计算SC肿瘤体积。

[0099] 胰腺癌模型中的抗肿瘤功效研究

[0100] 为了评估G-CSF在免疫缺陷和免疫活性小鼠的不同胰腺癌模型中的抗肿瘤能力,当SC肿瘤达到 90mm^3 至 110mm^3 的肿瘤体积时开始治疗。对于G-CSF疗法,将具有Panc-1(图1)和MiaPaca(图2)的无胸腺nu/nu小鼠和具有Panc02(图3)的C57BL/6小鼠随机分成盐水、G-CSF(非格司亭-Amgen)和吉西他滨(GE)组。整个实验期间每天皮下应用G-CSF治疗,而整个实验期间每周2次腹膜内应用GE治疗。下表中描述了各治疗的细节:

[0101]	细胞系	施用剂量	
		G-CSF ($\mu\text{g/Kg}$)	GE (mg/Kg)
	MiaPaca	10	80
	Panc-1	10	80
	Panc02	100	

[0102] 结肠癌模型的抗肿瘤功效研究

[0103] 为了评估G-CSF在鼠结直肠癌中的抗肿瘤能力,当SC肿瘤达到 90mm^3 至 110mm^3 的肿瘤体积时治疗携带Colon-26肿瘤的免疫活性Balb/C小鼠。对于G-CSF疗法,将Balb/C小鼠随机分为盐水和G-CSF组。在整个实验期间每天皮下应用G-CSF治疗(非格司亭-Amgen)(图4)。在实验的第5天,将每种治疗的4只动物处死并收集肿瘤。通过FACS检测粒细胞(GRA)的细胞,分析这些细胞的标记:CD45+CD11b+Ly6G(图5)。下表中描述了各治疗的细节:

[0104]	细胞系	施用剂量
		G-CSF ($\mu\text{g/Kg}$)
	Colon-26	10

[0105] 如所描述的那样进行抗肿瘤研究,并根据对当地肿瘤学实验研究的伦理指导原则所规定的动物福利的体征和症状的分析处死动物。

[0106] Sephadex在Colon-26模型中的作用

[0107] 对用Sephadex治疗的免疫活性Balb/C携带肿瘤小鼠进行抗肿瘤实验。当SC Colon-26肿瘤达到 90mm^3 至 110mm^3 的肿瘤体积时,开始Sephadex治疗,并将0.5mL Sephadex 16%(Sephadex G-150,Pharmacia Fine Chemicals,Sweden)皮下注射到小鼠左侧肋腹中。对照动物包括盐水和Sephadex组。在该实验中,G-CSF组以 $50\mu\text{g/Kg}$ 非格司亭-Amgen)的剂量治疗。每组有4只动物,并且每天监测它们的存活(图6)。在该模型中,Sephadex将功能性粒细胞从血液转移到Sephadex丘疹中,从而消除G-CSF的抗肿瘤活性。

[0108] 外周血血象的评估

[0109] 由于外周血是小鼠常规可利用的唯一组织,还对外周血血象进行评估以提供皮下注射不同剂量G-CSF(非格司亭-Amgen)后血细胞群行为的信息。立即将在含有EDTA的真空采血管(Sarstedt Microvette^R CB 300)中利用肝素化注射器从右股动脉采集的外周血进行差分血细胞计数(红细胞(RBC),白细胞(WBC)和血小板(PLT)),并使用血细胞差分自动分

析仪 (ABACUS JUNIOR VET) 测量血液血红蛋白浓度。每个实验组的数据从三到五只小鼠获得。发明人特别将注意力集中在皮下注射初始剂量的G-CSF后1.5小时或2小时、6小时、10小时和24小时确定的外周血中粒细胞的分布。在健康小鼠 (图7) 和带瘤小鼠 (图8) 中分析外周血粒细胞水平。对C57BJL6健康小鼠注射10 μ g/kg的G-CSF, 并且对健康的无胸腺nu/nu小鼠注射不同剂量的G-CSF: 0 μ g/kg、10 μ g/kg、25 μ g/kg、50 μ g/kg和100 μ g/kg (图7)。对携带皮下MiaPaca肿瘤的无胸腺nu/nu小鼠注射10 μ g/kg、25 μ g/kg、50 μ g/kg、和100 μ g/kg的G-CSF, 并在1.5小时提取血液 (图8)。

[0110] B) 结果

[0111] 在一系列体内试验 (G-CSF) 中实验验证了人类集落刺激因子对结肠癌和胰腺癌的抗肿瘤作用。

[0112] 在评估G-CSF的抗肿瘤作用之前, 发明人分析了G-CSF对健康免疫活性和免疫缺陷小鼠中外周血粒细胞水平的影响。在健康动物中单次注射不同剂量的G-CSF (10 μ g/kg、25 μ g/kg、50 μ g/kg和100 μ g/kg) 后, 发明人观察到在两种动物模型中外周血粒细胞的显著增加, 在G-CSF注射后6小时达到最大水平。

[0113] 与未经治疗的动物相比, 在C57BJL6小鼠中在10 μ g/kg剂量时粒细胞水平的增加是2.5倍。另一方面, 在无胸腺nu/nu小鼠中粒细胞水平的增加与C57BJL6小鼠相似。与未经治疗的动物相比, 在10 μ g/Kg剂量的G-CSF时粒细胞水平的增加是2.5倍, 而25 μ g/kg、50 μ g/kg和100 μ g/kg剂量的粒细胞水平增加分别是3.5、3.7和3.5倍 (图7), 证实了高于25 μ g/Kg的剂量达到了生物饱和水平。

[0114] 为了评估G-CSF (非格司亭-Amgen) 的抗肿瘤活性, 发明人使用了三种胰腺肿瘤模型研究: 来自Panc-1、MiaPaca和Panc02细胞的异种移植物, 对其通过测量肿瘤体积而分析肿瘤进展。在48天治疗期间, 对来自Panc-1模型的动物皮下注射每日剂量为10 μ g/Kg的G-CSF和作为金标准治疗的每周两次80mg/Kg的吉西他滨 (GE)。用G-CSF治疗对肿瘤生长产生强抑制, 与盐水相比达到了90%的肿瘤抑制, 用吉西他滨获得了类似的结果 (图1)。此外, 在与Panc-1模型相同的条件下治疗的MiaPaca肿瘤在治疗后37天显示对肿瘤生长的显著抑制 (图2)。在该模型中, 与盐水相比, 肿瘤抑制能力达到了55%。在该模型中, 当以10 μ g/kg、25 μ g/kg、50 μ g/kg和100 μ g/kg第一次皮下注射G-CSF后分析外周血粒细胞水平时, 发明人观察到剂量应答方式的增加 (图8)。

[0115] 在20天治疗期间, 对来自Panc02模型的动物皮下注射每日剂量为100 μ g/Kg的G-CSF。由于该鼠肿瘤模型的侵袭性特征, 与其它人类胰腺肿瘤模型 (如Panc-1和MiaPaca) 相比, 用G-CSF治疗产生较低的抗肿瘤活性。与盐水相比, 治疗的抑制能力达到约50%的肿瘤抑制 (图3)。

[0116] 为了确定G-CSF在结肠癌中的治疗潜力, 发明人还评估了在鼠结肠癌模型中的抗肿瘤活性。在18天的治疗期间, 对携带Colon-26肿瘤的免疫活性动物皮下注射每日剂量为10 μ g/Kg的G-CSF。用G-CSF治疗达到至多60%的肿瘤抑制 (图4), 并且当在19天期间对携带Colon-26肿瘤的免疫活性动物皮下注射每日剂量为50 μ g/Kg G-CSF时, 达到至多70%的肿瘤抑制 (图6)。为了研究在G-CSF后在Colon-26肿瘤中免疫细胞 (主要是嗜中性粒细胞) 的浸润, 发明人进行流式细胞术研究, 其中分析了三种抗原CD45、Ly6G和CD11b的表达。与在Colon-26肿瘤中观察到的抗肿瘤作用相一致, 在该模型中皮下注射10 μ g/Kg的G-CSF显示肿

瘤浸润性粒细胞(定义为CD45+CD11b+Ly6G+三重阳性群体)显著增加(图5)。在所有研究的肿瘤模型中观察到长时间每日使用G-CSF介导的任何毒性证据表示为体重减轻。

[0117] 为了证明G-CSF作用是由嗜中性粒细胞诱导的促炎反应介导的,发明人通过同时注射15%的Sephadex溶液来挑战G-CSF在Colon-26模型中的抗肿瘤能力。在文献中已经将Sephadex模型充分描述为验证免疫系统在主要刺激嗜中性粒细胞的治疗响应中的含意的技术(Jaganjac M.等,“The involvement of granulocytes in spontaneous regression of Walker 256 carcinoma”*Cancer Lett.*2008,vol.260,pp.180-186)。本研究的目的是以间接方式证明:G-CSF的抗肿瘤作用主要受免疫系统刺激的制约。实际上,发明人施用单次高剂量的皮下Sephadex注射,引起持续的炎症位点(由此吸引免疫细胞,包括在每日注射G-CSF后被刺激的那些免疫细胞)。理论上,如果G-CSF针对肿瘤生长的治疗作用部分是由于免疫细胞的刺激,那么在Sephadex存在下G-CSF治疗的动物的抗肿瘤作用将有丧失。所获得的结果与该理论一致,证明了当在癌症疗法中施用G-CSF时,免疫系统刺激起关键作用(图6)。在19天期间对携带Colon-26肿瘤的免疫活性动物用每日剂量为50μg/Kg的G-CSF治疗,肿瘤抑制达到70%,而在19天期间对携带Colon-26肿瘤和Sephadex的免疫活性动物用每日剂量为50μg/Kg的G-CSF,肿瘤抑制率达到50%,此外皮下注射Sephadex引起外周血中的嗜中性粒细胞水平降低,其在G-CSF注射后平缓恢复。

[0118] 总之,这些结果表明,在这些模型中,每日皮下递送G-CSF诱导对胰腺肿瘤和结肠肿瘤的强抗肿瘤效应,该效应是由粒细胞特异性募集到肿瘤中介导的。

[0119] 本申请中引用的参考文献

[0120] Attia MA,Weiss DW.“Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice.V.Acquired tumor resistance and enhancement in strain A mice infected with mammary tumor virus”*Cancer Res.*1966,vol.26,pp.1787-1800

[0121] DiMasi JA,Grabowski HG.“Economics of new oncology drug development”*J.Clin.Oncol.*2007,vol.25,pp.209-216

[0122] Spitler LE.,等“Adjuvant therapy of stage III and IV malignant melanoma using granyocyte-macrophage colony-simulating factor”*J.Clin.Oncol.*2000,vol.18,pp.1614-1621

[0123] Rini BI,等“Clinical and immunological characteristics of patients with serologic progression of prostate cancer achieving long-term disease control with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”*J.Urol.*2006,vol.175,pp.2087-2091

[0124] Carson EJ.,等“Phase II trial of sargramostim(yeast-derived recombinant human GM-CSF)as monotherapy for advanced sarcomas”*Proc.Am.Soc.Clin.Oncol.*2000,vol 18,Abstract 2219

[0125] Demirci,U.,等“Serum granulocyte macrophage-colony stimulating factor: a tumor marker in colorectal carcinoma?”,*Asian Pac.J.Cancer Prev.*2009,vol.10,pp.1021-1024

[0126] Fujiwara Y.等“Granulocyte colony-stimulating factor-producing ascending colon cancer as indicated by histopathological findings:report of a

case.”Osaka City Med.J.2011,vol.57,pp.79-84

[0127] Jaganjac M.,et.al.“The involvement of granulocytes in spontaneous regression of Walker 256carcinoma”Cancer Lett.2008,vol.260,pp.180-186

[0128] Mroczko B.等“Serum macrophage-colony stimulating factor levels in colorectal cancer patients correlate with lymph node metastasis and poor prognosis”Clin Chim Acta.2007,vol.380,pp.208-12.

[0129] Kim JS.等“Administration of granulocyte colony-stimulating factor with radiotherapy promotes tumor growth by stimulating vascularization in tumor-bearing mice”Oncol Rep.2015,vol.34,pp.147-54

[0130] Morris KT.等“G-CSF and G-CSFR are highly expressed in human gastric and colon cancers and promote carcinoma cell proliferation and migration”Br.J.Cancer 2014,vol.110,pp.1211-20

[0131] Groblewska M.et.al.“Serum levels of granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF)and macrophage colony-stimulating factor(M-CSF)in pancreatic cancer patients”Clin.Chem.Lab.Med.2007,vol.45,pp.30-4

[0132] Joshita S.等“Granulocyte-colony stimulating factor-producing pancreatic adenosquamous carcinoma showing aggressive clinical course”Intern.Med.2009,vol.48,pp.687-91

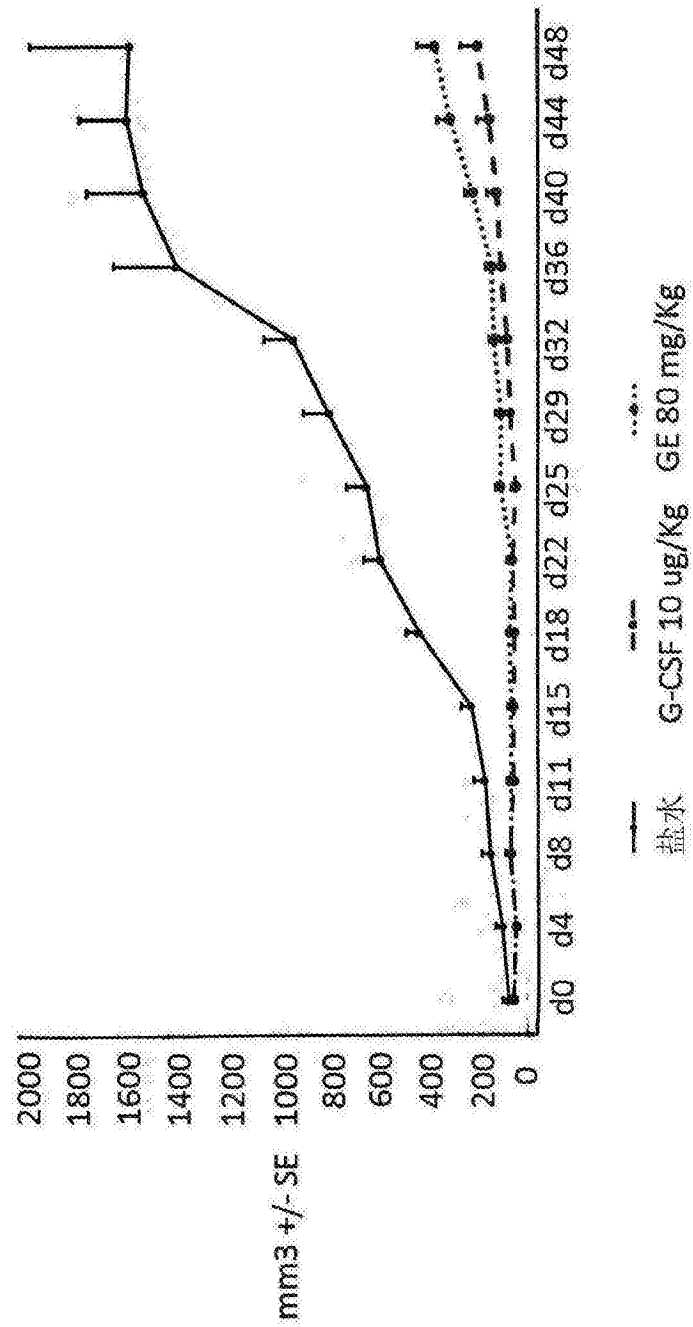


图1

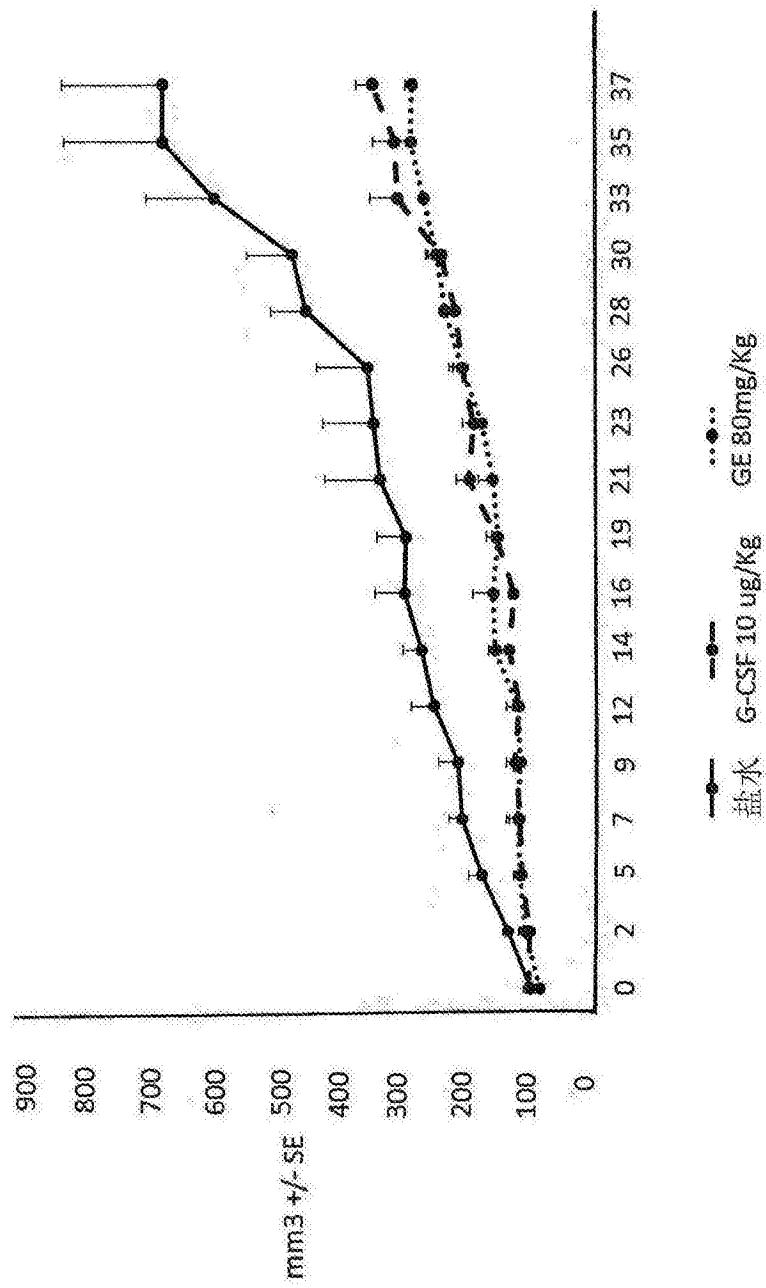


图2

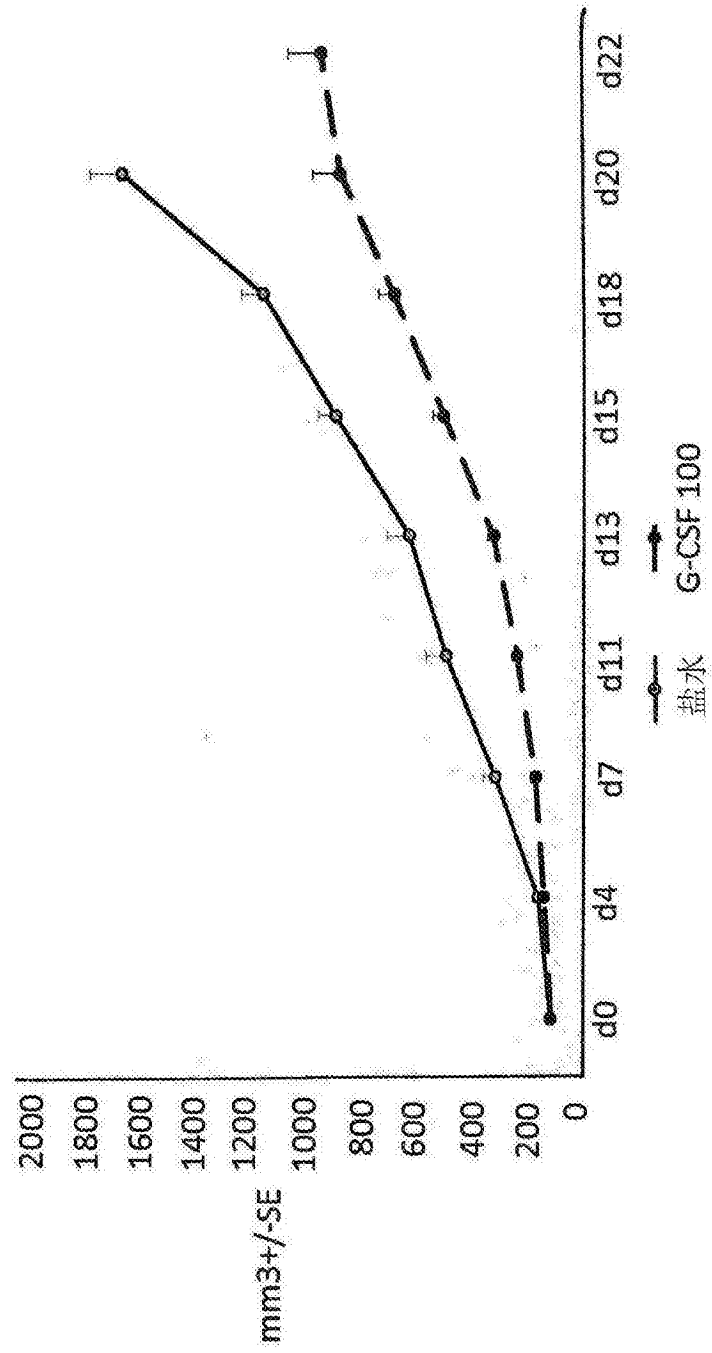


图3

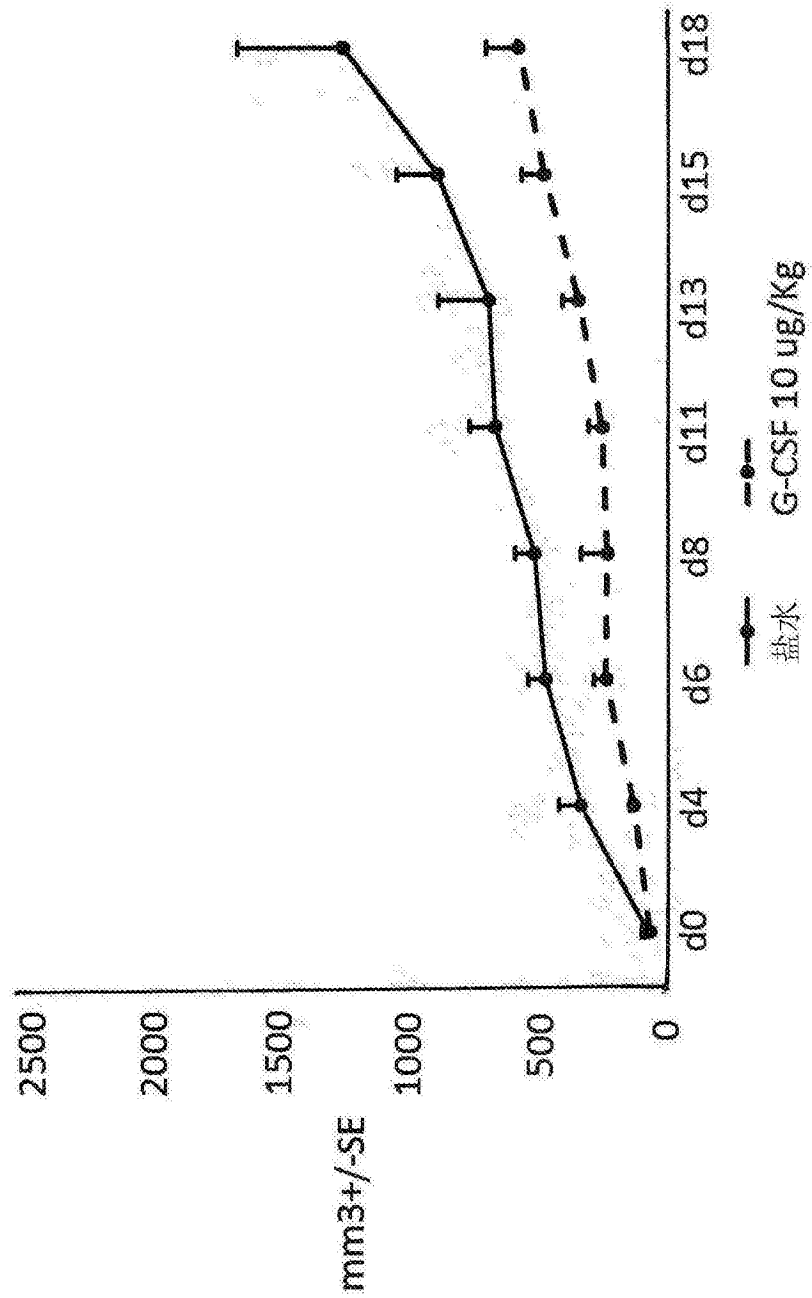


图4

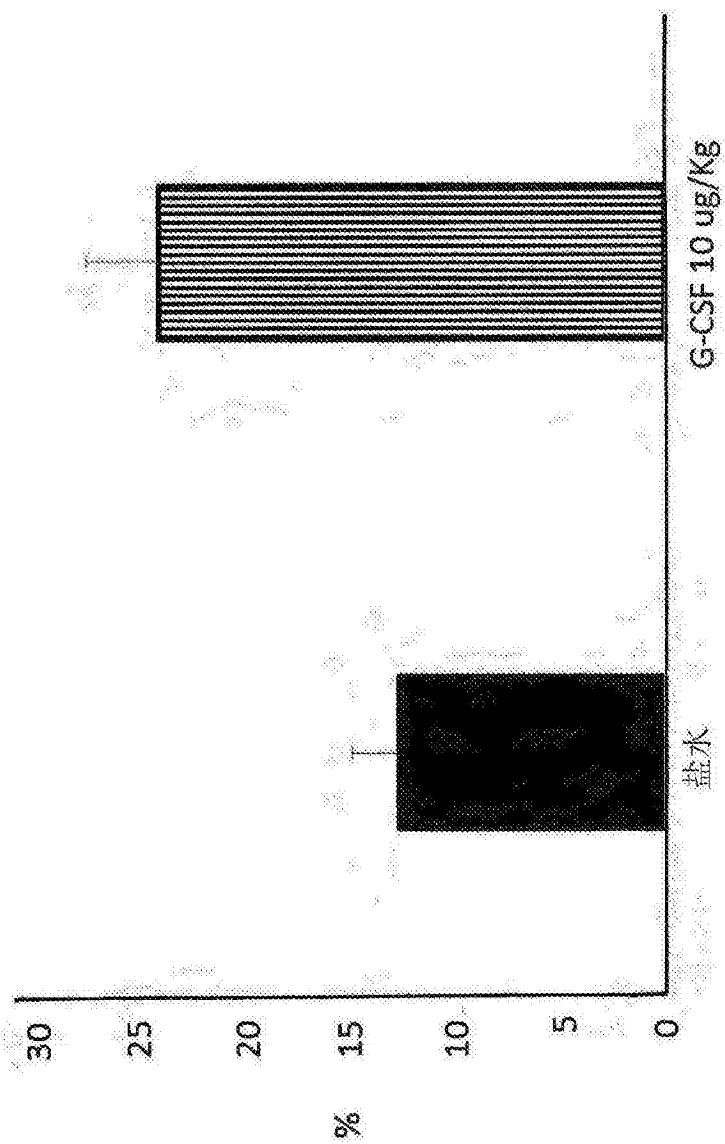


图5

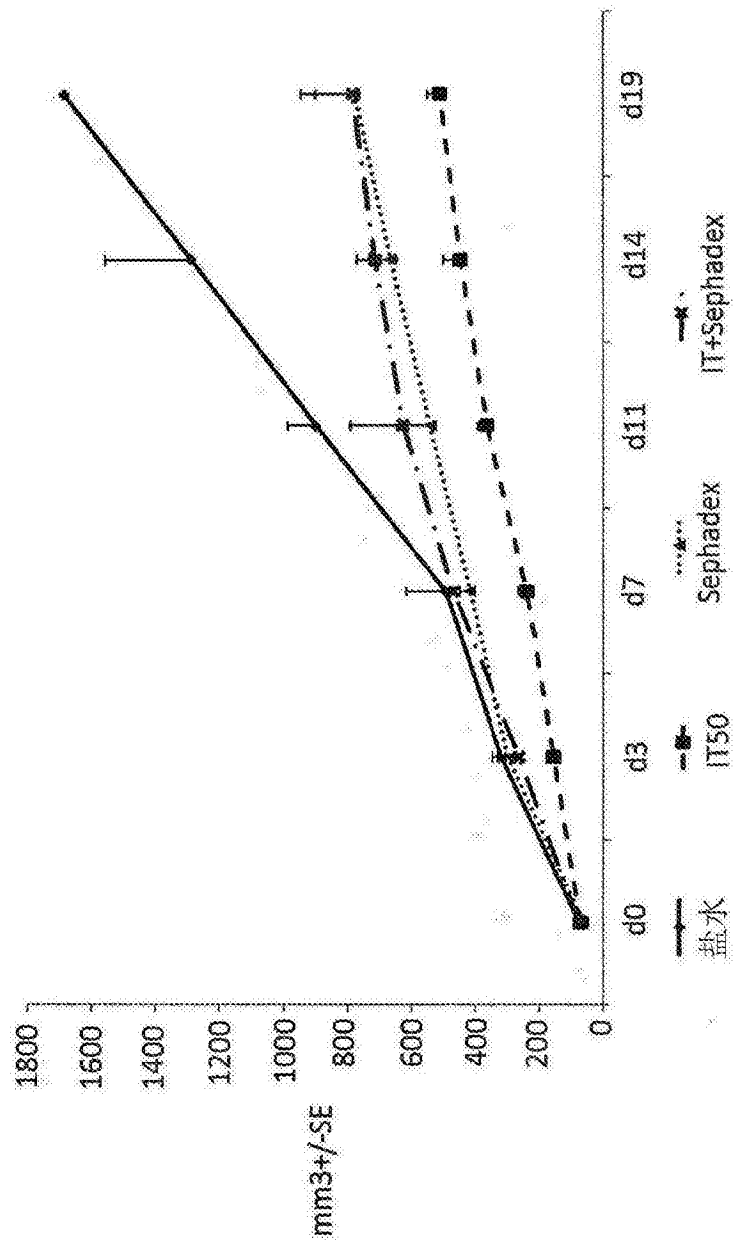


图6

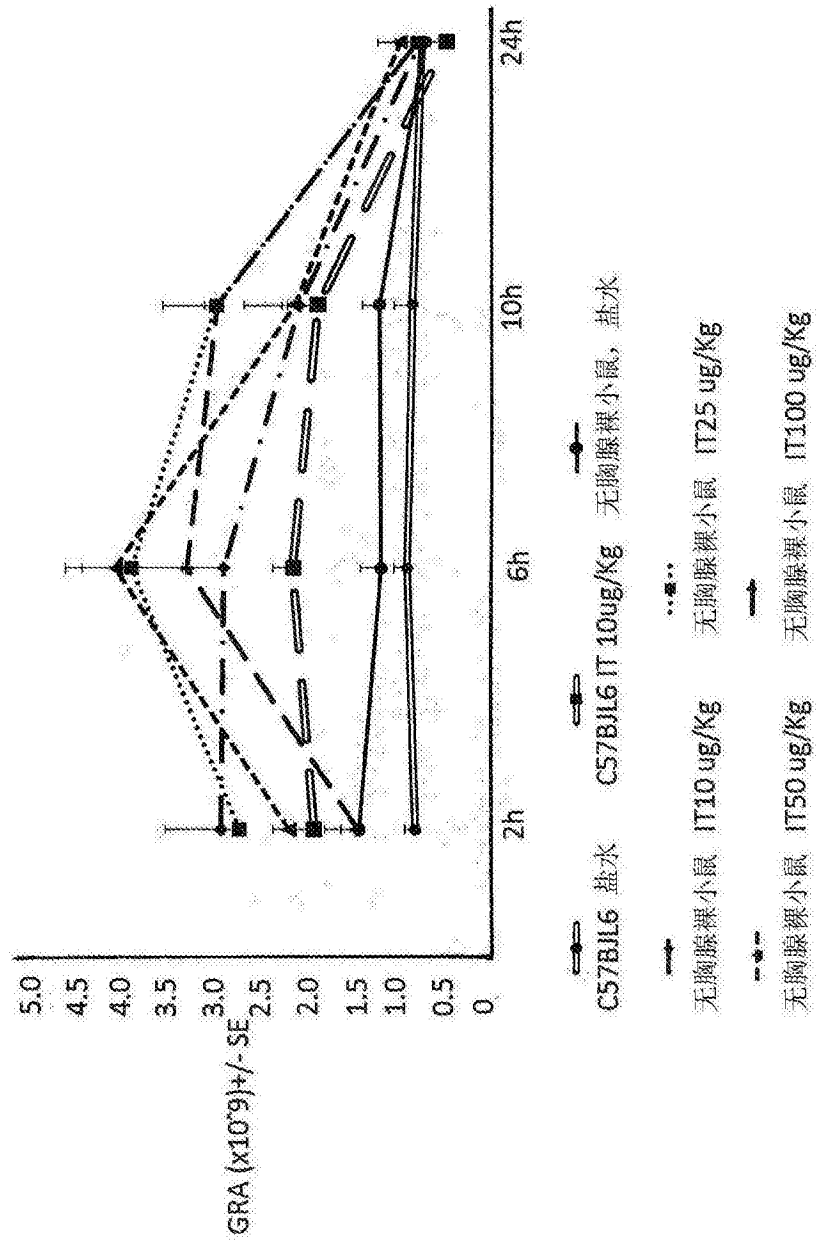


图7

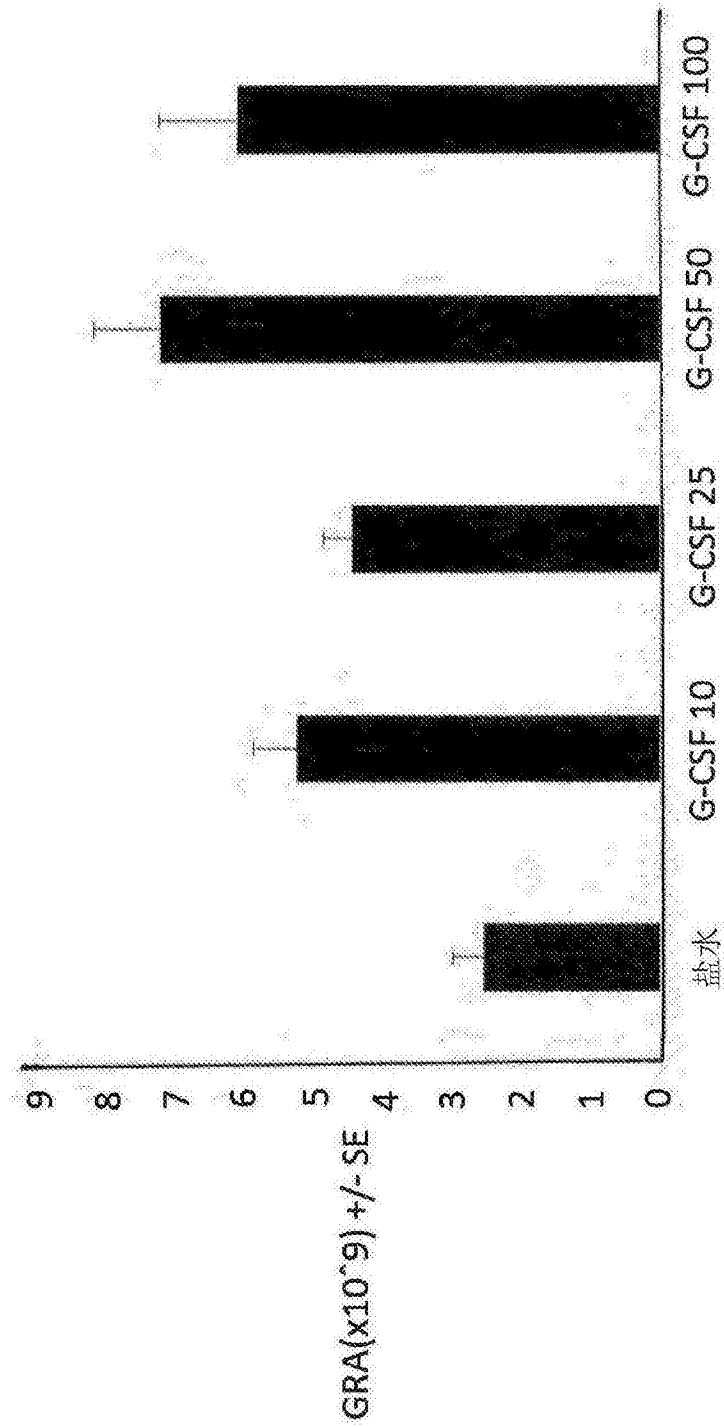


图8