



(12) 发明专利

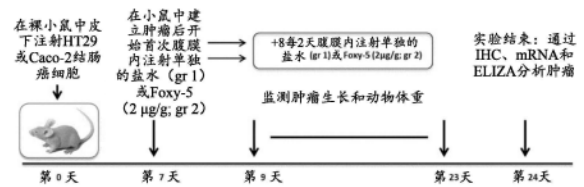
(10) 授权公告号 CN 111417403 B

(45) 授权公告日 2024. 06. 04

(21) 申请号 201880073571.4	(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
(22) 申请日 2018.10.25	专利代理师 张莹 张启程
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 111417403 A	(51) Int.Cl. A61K 38/17 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(43) 申请公布日 2020.07.14	(56) 对比文件 CN 101189258 A, 2008.05.28 CN 102056939 A, 2011.05.11 US 2014206623 A1, 2014.07.24 WO 2016092378 A1, 2016.06.16 Roya Tabatabai等.Targeting the Wnt Pathway in Cancer: A Review of Novel Therapeutics.Targ. Oncol..2017,第12卷(第5期),623-641.
(30) 优先权数据 17198369.5 2017.10.25 EP	
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.05.13	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/EP2018/079319 2018.10.25	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02019/081657 EN 2019.05.02	
(73) 专利权人 温特研究公司 地址 瑞典马尔默	审查员 张艳青
(72) 发明人 安尼塔·斯杰兰德	权利要求书1页 说明书9页 序列表6页 附图14页

(54) 发明名称
WNT5A肽在减少癌症干细胞中的作用

(57) 摘要
一种衍生自WNT5A蛋白的肽,所述肽用于在患者中预防癌症的再发或复发或者用于在诊断患有癌症的患者中减少或消除癌症干细胞。



1. 一种衍生自根据SEQ ID NO:1的WNT5A蛋白的肽在制备用于在诊断患有结肠癌的患者中减少癌症干细胞的药物中的用途,该肽为Foxy-5。

2. 一种衍生自根据SEQ ID NO:1的WNT5A蛋白的肽激动剂在制备用于在诊断患有结肠癌的患者中减少癌症干细胞的药物中的用途,该肽激动剂为Foxy-5。

3. 根据权利要求1或2所述的用途,其中癌细胞中WNT5A的表达为周围非癌细胞中的表达的35%或更低。

4. 根据权利要求1或2所述的用途,其中减少包括以下步骤:

a) 在诊断出癌症之后立即和/或在手术过程中和/或在通过手术去除肿瘤后施用有效量的该肽或肽激动剂,任选地,其中步骤a)一周重复至少3次,持续2周或更久。

5. 权利要求1中所述的肽或权利要求2中所述的肽激动剂与至少一种抑制肿瘤的化疗药物的组合在制备用于在诊断患有结肠癌的患者中减少癌症干细胞的药物中的用途,其中所述肽或肽激动剂与所述抑制肿瘤的化疗药物被组合或分开和/或被同时或顺序施用。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述至少一种抑制肿瘤的化疗药物是以下的组合:5-氟尿嘧啶(5-FU)、亚叶酸和奥沙利铂(FOLFOX)或蒽环霉素或紫杉烷。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中该蒽环霉素为表柔比星或多柔比星,或该紫杉烷为多西他赛或紫杉醇。

8. 根据权利要求6所述的用途,其中所述抑制肿瘤的化疗药物是以下的组合:5-氟尿嘧啶(5-FU)、亚叶酸和奥沙利铂(FOLFOX)。

9. 根据权利要求5所述的用途,其中减少包括以下步骤:

a) 施用有效量的抑制肿瘤的化疗药物;

b) 在用所述至少一种抑制肿瘤的化疗药物治疗之前、同时和/或之后,施用有效量的该肽或肽激动剂,任选地,其中

步骤b)一周重复至少3次,持续2周或更久。

WNT5A肽在减少癌症干细胞中的作用

[0001] 本发明涉及用于在患者中预防癌症的再发或复发或者用于在诊断患有癌症的患者中减少或消除癌症干细胞的WNT5A衍生肽。

背景技术

[0002] 原发性肿瘤很少是癌症患者死亡的原因。在大多数病例中,死亡是手术去除原发性肿瘤后不同的无再发生存期之后癌症复发的结果。当前对患有乳腺癌、结肠癌或前列腺癌的治疗包括手术、化疗药物、内分泌治疗和一些新颖的生物学治疗。后者的治疗方式主要靶向增殖性癌细胞,从而靶向癌症的生长。尽管这些治疗对原发性肿瘤本身和手术后剩余的大多数肿瘤细胞都有良好的效果,但很大一部分患者随后会再次发病。

[0003] 这种癌症复发的根本原因是存在具有‘干细胞样’特征的肿瘤细胞的子集。这些不同于非恶性干细胞的肿瘤起始细胞显示出低增殖率、高自我更新能力、多能性或全能性、分化为活跃增殖肿瘤细胞的能力,并且其进一步的特征还在于它们对化学疗法或放射的抗性。这些干细胞样细胞也称为癌症干细胞(Cancer Stem Cell,CSC)。据信消除CSC可能根除癌症疾病,从而杜绝该疾病的复发。因此,癌症研究中的一个基本问题是对导致复发性疾病的CSC的鉴定,特别是靶向。肿瘤标志物是在血液、尿液或身体组织中发现的生物标志物,可因一种或多种类型的癌症的存在而升高。有许多不同的肿瘤标志物,每种标志物都表明一种特定的癌症,并且它们用于诊断癌症的存在并指定特定的癌症类型。因此,肿瘤标志物水平的升高可能表明癌症。

[0004] 已经进行了许多不同的尝试来克服杀死CSC的问题,如治疗剂(即影响与自我更新和分化成CSC有关的胚胎信号传导途径的小分子、siRNA或抗体)的递送。然而,消除CSC的现有尝试存在许多缺点。首先,这些标志物因癌症彼此的类型不同而不同,并且没有可用于所有癌症的通用标志物。其次,正如从急性髓性白血病以及一些实体瘤中所得知的,某些肿瘤中可能存在生物学上不同的CSC。最后,将药物靶向CSC时,存在影响正常干细胞的风险,因为CSC具有与正常干细胞相同的表达谱。

[0005] 因此,在此背景下,本发明的目的是提供无毒且安全的治疗剂,以预防或显著延迟由于CSC的存活所致的癌症疾病的复发。

发明内容

[0006] 在本发明的第一个方面,预防或延迟癌症复发的目的是通过衍生自根据SEQ ID NO:1的WNT5A蛋白的肽来实现的,该肽的长度为20个氨基酸或更少,并且包含氨基酸序列XDGXEL(SEQ ID NO:2)或其甲酰化衍生物,其中X是任何氨基酸,所述肽用于在患者中预防癌症再发或复发或者用于在诊断患有癌症的患者中减少或消除癌症干细胞(CSC)。在本发明的背景中,再发或复发具有相同的含义。认为消除CSC可能会根除癌症疾病,从而杜绝上述这种疾病的复发。目前认为,疾病再发是由CSC引起的,因此预期CSC的减少或根除将延迟或预防癌症的再发。

[0007] 在一个实施方案中,根据本发明的肽用于在患者中预防癌症的再发或复发或者用

于在诊断患有癌症的患者中减少或消除CSC,所述癌症选自由前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、甲状腺癌、肝癌或血液系统恶性肿瘤组成的清单。

[0008] 在进一步的实施方案中,患者癌细胞中蛋白WNT5A的表达为周围非癌细胞中的表达的35%或更低。通过使用针对WNT5的特异性一抗组合二抗对其进行检测和定量,通过免疫组织化学(IHC)测量了癌细胞和非癌细胞中WNT5水平的表达。

[0009] WNT5A在乳腺癌、结肠癌和前列腺癌肿瘤中的低表达已经与疾病再发次数增加和患者生存时间缩短相关联。然而,WNT5A信号传导的这种作用不能归因于它对癌细胞增殖的作用,这种作用在 β -连环蛋白信号传导升高的肿瘤中常常是不存在或有限的(Dejmek等人, The Expression and Signaling Activity of Wnt-5a/DDR1 and Syk Play Distinct but Decisive Roles in Breast Cancer Patient Survival.[Wnt-5a/DDR1和Syk的表达和信号传导活性在乳腺癌患者的生存中起着不同但决定性的作用]Clinical Cancer Research.[临床癌症研究]11:520-528,2005, S  fholm 等人, The Wnt-5a-derived hexapeptide Foxy-5inhibits breast cancer metastasis in vivo by targeting cell motility.[Wnt-5a衍生的六肽Foxy-5通过靶向细胞运动来抑制体内乳腺癌的转移]Clinical Cancer Research[临床癌症研究]14(20):6556-6563,2008,Mehdawi等人, Non-canonical WNT5A signaling up-regulates the expression of the tumour suppressor 15-PGDH and induces differentiation of colon cancer cells[非经典WNT5A信号传导上调肿瘤抑制因子15-PGDH的表达并诱导结肠癌细胞的分化],Molecular Oncology[分子肿瘤学]10:1415-1429,2016,Canesi等人, Treatment with the Wnt5a-mimicking peptide Foxy5 effectively reduces the metastatic spread of Wnt5a-low prostate cancer cells in an orthotopic mouse model[在原位小鼠模型中使用Wnt5a模拟肽Foxy5的治疗有效地降低了低Wnt5a的前列腺癌细胞的转移扩散].PLoS ONE [公共科学图书馆期刊]doi.org/10.1371/journal.pone.084418,2017)

[0010] WNT5A蛋白和一种称为Foxy-5的已知WNT5A六肽在体外实验中显示降低结肠癌细胞中PGE2产生酶COX-2的表达并上调PGE2和脂蛋白降解酶15-PGDH(Mehdawi等人,2016)。在这项实验性体外研究中,作者还显示,重组WNT5A和Foxy-5肽均诱导 β -连环蛋白信号传导减少。出人意料的是,本发明的发明人未能在这种体外条件下检测到CSC数量的任何减少。

[0011] 技术人员知道如何诊断癌症或肿瘤、测量肿瘤生长、将肿瘤组织与正常组织区别或区分以及如何测量WNT5A的量。可以通过计算机断层扫描(CT)成像来诊断癌症。WNT5A蛋白的低表达可能是周围非癌细胞中WNT5A表达的35%、30%、20%、15%、10%、5%、2%或1%,或者没有WNT5A表达。

[0012] 由于药物要大规模生产,因此全长WNT5A蛋白作为候选药物有几个缺点。作为大蛋白,WNT5A蛋白需要复杂而漫长的合成才能产生正确的初级氨基酸序列和翻译后修饰,此外,WNT5A具有硫酸乙酰肝素结合结构域,这可能会限制其在体内的分布。因此,模拟WNT5A作用的更小的肽是更优选的。包含氨基酸序列XDGXEL的WNT5A肽还包含模拟WNT5A的作用。长度不同并且包含序列XDGXEL(SEQ ID NO:2)的肽可以合成产生,例如通过液相或固相肽合成产生。长度不同的肽具有20个氨基酸或更少,并且更优选地具有10个氨基酸或更少。最优选地,该肽是由6个氨基酸组成的六肽。在一个实施方案中,该氨基酸序列是XDGXEL,其中位置1的X是M或正亮氨酸,并且位置4的X是C或A。有利地,根据本发明的WNT5A肽是选自由以

下组成的组的肽：

- [0013] MDGCEL (SEQ. ID. NO. 3) ,
- [0014] GMDGCEL (SEQ. ID. NO. 4) ,
- [0015] EGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 5) ,
- [0016] SEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 6) ,
- [0017] TSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 7) ,
- [0018] KTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 8) ,
- [0019] NKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 9) ,
- [0020] CNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 10) ,
- [0021] LCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 11) ,
- [0022] RLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 12) ,
- [0023] GRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 13) ,
- [0024] QGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 14) ,
- [0025] TQGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 15) ,
- [0026] GTQGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 16) , 以及
- [0027] LGTQGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 17) ,
- [0028] 或其甲酰化衍生物。

[0029] 在优选的实施方案中,该WNT5A肽是MDGCEL (SEQ. ID. NO. 3)。在更优选的实施方案中,位置1的甲硫氨酸被衍生化为甲酰化甲硫氨酸(N-甲酰甲硫氨酸)。该甲酰化的六肽表示为Foxy-5。一种氨基酸的修饰/衍生化(甲酰化)改善了肽的作用,且使其更有效并且对体内降解具有抗性。

[0030] 在另一个实施方案中,预期活性 β -连环蛋白、增加的COX-2和减少的15-PGDH表达有利于CSC的生长或生态位(niche)。活性 β -连环蛋白信号传导以及COX-2的增加和15-PGDH的减少最容易通过IHC使用针对活性 β -连环蛋白、COX-2或15-PGDH的一抗和特异性抗体组合匹配的二抗对其进行检测和定量来测量。

[0031] 在进一步的实施方案中,靶向的癌细胞具有的 β -连环蛋白信号传导水平或COX-2表达与正常周围组织相比增加了超过35%、40%、50%、65%、70%、90%或超过100%,和/或具有降低的15-PGDH表达,与正常周围组织相比,降低了超过35%、40%、50%、65%、70%、90%或达到100%。正常周围组织要理解为由与癌细胞相同类型的正常细胞组成的紧邻的周围组织。

[0032] 在又一个实施方案中,预期根据本发明的肽用于在患者中预防癌症的再发或复发或者用于在诊断患有癌症的患者中减少或消除CSC,该预防、减少或消除包括以下步骤:在诊断出癌症之后立即和/或在手术过程中和/或在通过手术去除肿瘤后施用有效量的该肽,任选地,其中所述步骤一周重复至少3次,持续2周或更久。用所述肽治疗癌症干细胞的时间可以是4、6、8、12周或长达1、2或3个月或更多。由于Foxy-5不损害化学疗法的细胞毒性作用,因此所述肽也可以在治疗期间与抑制肿瘤的化疗药物一起施用。抑制肿瘤的化疗药物通常具有极高毒性,并且除肿瘤细胞外其还会破坏健康细胞。由于抑制肿瘤的化疗药物的毒性,它不能以足够长的时间施用,也不能以足够高以破坏或消除所有癌细胞或CSC的剂量施用,因为有害作用将超过任何积极作用。

[0033] 在用肿瘤抑制药物治疗后施用所述肽的优点是该肽对健康细胞无毒性,同时它消除或减少了在用肿瘤抑制化学疗法(CSC对其具有抗性)治疗后剩余CSC的数量。

[0034] 还预期可以同时施用抑制肿瘤的化疗药物和根据本发明的肽,或者可以在外科手术去除原发性肿瘤之前、期间和之后施用所述肽,直到开始化学疗法或在抑制肿瘤的化疗治疗结束之后。

[0035] 因此,这种组合治疗可以导致改善的癌症治疗而不增加副作用。

[0036] 组合施用可能有益于患者依从性,因为可以缩短正在进行治疗的时间。

[0037] 从费用的角度看,在抑制肿瘤的化疗药物之前或之后顺序施用(即这种肽)可能更有效,因为这种肽价格昂贵。

[0038] 在一个实施方案中,本发明提供了衍生自根据SEQ ID NO:1的WNT5A蛋白的肽,该肽的长度为20个氨基酸或更少,并且包含氨基酸序列XDGXEL(SEQ ID NO:2)或其甲酰化衍生物,其中X是任何氨基酸,所述肽用于在诊断患有癌症的患者中减少或消除CSC。

[0039] 在进一步的实施方案中,本发明提供以下编号的客体(object):

[0040] 1.一种衍生自根据SEQ ID NO:1的WNT5A蛋白的肽,该肽的长度为20个氨基酸或更少,并且包含氨基酸序列XDGXEL(SEQ ID NO:2)或其甲酰化衍生物,其中X是任何氨基酸,所述肽应用于在患者中预防癌症的再发或复发或者用于在诊断患有癌症的患者中减少或消除癌症干细胞。

[0041] 2.根据客体1所述的肽,应用于在患者中预防癌症的再发或复发或者用于在诊断患有癌症的患者中减少或消除癌症干细胞,所述癌症选自由前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、甲状腺癌、肝癌或血液系统恶性肿瘤组成的清单。

[0042] 3.根据客体1或2中任一项所述的肽,应用于在患者中预防癌症的再发或复发或者用于在诊断患有癌症的患者中减少或消除癌症干细胞,其中癌细胞中WNT5A的表达是周围非癌细胞中的表达的35%或更低。

[0043] 4.根据客体1至3中任一项所述的肽,应用于在患者中预防癌症的再发或复发或者用于在诊断患有癌症的患者中减少或消除癌症干细胞,其中位置1的X是M或正亮氨酸,并且位置4的X是C或A。

[0044] 5.根据客体1至4中任一项所述的肽,应用于在患者中预防癌症的再发或复发或者用于在诊断患有癌症的患者中减少或消除癌症干细胞,其中所述肽选自以下组成的组:

[0045] MDGCEL (SEQ. ID. NO. 3),

[0046] GMDGCEL (SEQ. ID. NO. 4),

[0047] EGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 5),

[0048] SEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 6),

[0049] TSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 7),

[0050] KTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 8),

[0051] NKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 9),

[0052] CNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 10),

[0053] LCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 11),

[0054] RLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 12),

[0055] GRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 13),

- [0056] QGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 14) ,
- [0057] TQGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 15) ,
- [0058] GTQGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 16) , 以及
- [0059] LGTQGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 17) ,
- [0060] 或其甲酰化衍生物。
- [0061] 6. 根据客体1至7中任一项所述的肽, 应用于在患者中预防癌症的再发或复发或者用于在诊断患有癌症的患者中减少或消除癌症干细胞, 其中所述肽是MDGCEL (SEQ. ID. NO. 3) 或其甲酰化衍生物。
- [0062] 9. 根据客体1至8中任一项所述的肽, 应用于在患者中预防癌症的再发或复发或者用于在诊断患有癌症的患者中减少或消除癌症干细胞, 其中该癌细胞展现出升高的 β -连环蛋白。
- [0063] 10. 根据客体1至9中任一项所述的肽, 应用于在患者中预防癌症的再发或复发或者用于在诊断患有癌症的患者中减少或消除癌症干细胞, 其中该 β -连环蛋白信号传导与周围非癌细胞中的 β -连环蛋白信号传导相比升高35%或更多。
- [0064] 11. 衍生自根据SEQ ID NO:1的WNT5A蛋白的肽与肿瘤抑制药物的组合, 该肽包含氨基酸序列XDGXEL (SEQ ID NO:2) 或其甲酰化衍生物, 其中X是任何氨基酸, 其中X是任何氨基酸, 该组合应用于在患者中预防癌症的再发或复发或者应用于在诊断患有癌症的患者中减少或消除癌症干细胞, 其中所述肽和所述肿瘤抑制药物被组合或分开和/或被同时或顺序施用。
- [0065] 12. 根据客体11所述的组合, 其中所述肿瘤抑制药物是以下项的组合: 5-氟尿嘧啶 (5-FU)、亚叶酸和奥沙利铂 (FOLFOLX)、蒽环霉素 (anthracycline) 如表柔比星 (epirubicin) 或多柔比星 (doxorubicin)、或者紫杉烷 (taxane) 如多西他赛 (docetaxel) 或紫杉醇 (paclitaxel)。
- [0066] 13. 根据客体11所述的组合, 其中所述肿瘤抑制药物是以下项的组合: 5-FU、亚叶酸和奥沙利铂 (oxaliplatin, FOLFOLX), 用于诊断患有结肠癌的治疗。
- [0067] 14. 根据客体11所述的组合, 其中所述肿瘤抑制药物治疗是以下项的组合: 蒽环霉素如表柔比星或多柔比星、或者紫杉烷如多西他赛或紫杉醇, 应用于诊断患有乳腺癌的治疗。

附图说明

- [0068] 以下描述的附图用于支持具体实施方式。将参考附图描述本发明, 其中:
- [0069] 图1是实施例1至3中所述的动物实验的概览图。
- [0070] 图2显示了如通过免疫组织化学 (IHC) 可视化的Foxy-5治疗对结肠癌组织中ALDH蛋白表达的体内影响。呈现了来自盐水和Foxy-5治疗动物的代表性照片。从每个这样的玻片上, 将4个框放在染色的组织之上, 并且对于它们中的每一个, ALDH染色评分是染色的细胞的百分比乘以染色强度。针对染色细胞百分比, 使用以下评分: 0为阳性染色细胞<5%, 1为阳性细胞5%-25%, 2为阳性细胞26%-50%, 3为阳性细胞51%-75%, 4为阳性细胞>75%。
- [0071] 对于染色强度, 将染色区域评分为: 1为弱染色, 2为中度染色, 3为强染色。对于每

个框,通过将阳性染色细胞的百分比评分乘以染色强度评分来获得最终评分。最后,对于每种肿瘤,从4个盒中获得平均值。然后将相同的评分方案用于本研究中呈现的所有IHC分析。

[0072] 图3显示了如通过IHC可视化的Foxy-5治疗对结肠癌组织中Dck1(也称为DCAMKL1)蛋白表达的体内影响。呈现了来自盐水和Foxy-5治疗动物的代表性照片。从每个这样的玻片上,将4个框放在染色的组织之上,并且对于它们中的每一个,Dck1(DCAMKL1)染色评分是染色细胞的百分比乘以染色强度,如图2所详细描述。

[0073] 图4显示了与媒介物治疗的对照小鼠的肿瘤相比,Foxy-5治疗对结肠癌异种组织(xenograph tissue)中ALDH和Dck1(DCAMKL1)mRNA表达的体内影响。

[0074] 图5显示了如通过IHC可视化的Foxy-5治疗对结肠癌组织中Cox-2和15-PGDH蛋白表达的体内影响。正如图1中IHC染色的详细描述一样,对IHC染色进行评分。

[0075] 图6显示了如通过IHC可视化的Foxy-5治疗对HT-29结肠癌组织中活性 β -连环蛋白表达的体内影响。正如图1中IHC染色的详细描述一样,对IHC染色进行评分。在右下图中,呈现了盐水和Foxy-5治疗动物的肿瘤大小。

[0076] 图7显示了如通过IHC可视化的Foxy-5治疗对Caco-2结肠癌组织中活性 β -连环蛋白表达的体内影响。正如图2中IHC染色的详细描述一样,对IHC染色进行评分。在右下图中,呈现了盐水和Foxy-5治疗的动物肿瘤的肿瘤大小。

[0077] 图6和7进一步分别显示了Foxy-5治疗对HT-29和Caco-2结肠癌异种组织中肿瘤体积的体内影响。结肠癌具有升高的 β -连环蛋白信号传导的这一知识使得可以通过确定其与肿瘤体积变化的关系来分别验证图6和7中概述的影响。这些图概述了与对照(媒介物治疗的)小鼠的情况相比,Foxy-5治疗对HT29和Caco-2衍生肿瘤的肿瘤体积的影响。

[0078] 图2B基于如图2中的重复和扩展的分析,并且显示了如通过免疫组织化学(IHC)可视化的Foxy-5治疗对结肠癌异种组织中ALDH蛋白表达的体内影响。呈现了来自媒介物(盐水)和Foxy-5治疗的动物的代表性图像。从每个这样的玻片上,将6个框随机放在染色的组织之上,并且对于它们中的每一个,ALDH染色评分是染色的细胞的百分比乘以染色强度。针对染色细胞百分比,使用以下评分:0为阳性染色细胞<5%,1为阳性细胞5%-25%,2为阳性细胞26%-50%,3为阳性细胞51%-75%,4为阳性细胞>75%。

[0079] 对于染色强度,将染色区域评分为:1为弱染色,2为中度染色,3为强染色。对于每个框,通过将阳性染色细胞的百分比评分乘以染色强度评分来获得最终评分。最后,对于每个肿瘤样品,从6个框中获得平均值。然后将相同的评分方案用于本研究中呈现的所有IHC分析。

[0080] 图3B基于如图3中的重复和扩展的分析,并且显示了如通过IHC可视化的Foxy-5治疗对结肠癌异种组织中Dck1(也称为DCAMKL1)蛋白表达的体内影响。呈现了来自媒介物和Foxy-5治疗的动物的代表性图像。从每个这样的玻片上,将6个框放在染色的组织之上,并且对于它们中的每一个,进行Dck1染色的染色强度评分,如图2所详细描述。

[0081] 图5B基于如图5中的重复和扩展的分析,并且显示了如通过IHC可视化的Foxy-5治疗对结肠癌异种组织中Cox-2蛋白表达的体内影响。呈现了来自媒介物和Foxy-5治疗的动物的代表性图像。从每个这样的玻片上,将6个框放在染色的组织之上,并且对于它们中的每一个,Cox-2染色评分是染色细胞的百分比乘以染色强度,如图2所详细描述。

[0082] 图5C基于如图5中的重复和扩展的分析,并且显示了如通过IHC可视化的Foxy-5治

疗对结肠癌异种组织中15-PGDH蛋白表达的体内影响。呈现了来自媒介物和Foxy-5治疗的动物的代表性图像。从每个这样的玻片上,将6个框放在染色的组织之上,并且对于它们中的每一个,15-PGDH染色评分是染色细胞的百分比乘以染色强度,如图2所详细描述。

[0083] 图8基于分别如图6和7中的重复和扩展的分析,并且显示了如通过IHC可视化的Foxy-5治疗对HT-29和Caco-2结肠癌异种组织中活性 β -连环蛋白核表达的体内影响。呈现了来自媒介物和Foxy-5治疗的动物的代表性图像。从每个这样的玻片上,将6个框放在染色的组织之上,并且对于它们中的每一个,活性 β -连环蛋白核染色评分是染色细胞的百分比乘以染色强度,如图2所详细描述。

[0084] 图9显示了如通过IHC可视化的Foxy-5治疗对HT-29和Caco-2结肠癌异种组织中Ascl2蛋白表达的体内影响。Ascl2蛋白是被 β -连环蛋白信号传导激活的转录因子,已显示促进CSC生态位。呈现了来自媒介物和Foxy-5治疗的动物的代表性图像。从每个这样的玻片上,将6个框放在染色的组织之上,并且对于它们中的每一个,Ascl2染色评分是染色细胞的百分比乘以染色强度,如图2所详细描述。

[0085] 图10显示了Foxy-5对FOLF0X诱导的细胞毒性不存在影响。用单独的FOLF0X (绿色三角形)、单独的5-FU (橙色三角形)、单独的奥沙利铂 (黑色正方形)、单独的Foxy-5 (红色正方形) 或FOLF0X+Foxy-5 (蓝色圆圈) 治疗结肠癌HT29细胞。通过CellTiter-Blue™ 荧光细胞活力测定评价了这些不同治疗的细胞毒性作用。图中概述了HT29中所有这些不同治疗的剂量反应曲线。数据经归一化并显示为平均值 $\pm$ SEM。

具体实施方式

[0086] Wnt (无翅型相关整合位点) 蛋白家族包含高度保守的蛋白,这些蛋白在胚胎发育 (如体轴成型、细胞增殖和迁移) 中起作用。Wnt信号传导途径是经典的或非经典的,它们主要通过经典的信号传导触发基因转录的调节和增加的增殖,或通过激活细胞中不同的非经典信号传导途径来调节几种非增殖性功能。Wnt蛋白进一步参与成年人骨髓、皮肤和肠道的组织再生。Wnt信号传导途径中的基因突变可能导致乳腺癌、前列腺癌、胶质母细胞瘤、II型糖尿病和其他疾病。

[0087] 经典的Wnt途径激活 β -连环蛋白,在调节正常干细胞的自我更新中是不可或缺的,并且经典的Wnt信号传导的破坏与肿瘤的发生有关。相反,非经典的Wnt信号传导的特征是 β -连环蛋白信号传导不存在增加,并且已经对其在胚胎成型、原肠胚形成和器官形成中的作用进行了研究。此外,有人提出非经典的Wnt会拮抗经典的信号传导。WNT5A是非经典Wnt配体的一个实例。WNT5A在急性骨髓性白血病 (AML)、结肠癌、乳腺癌和前列腺癌以及卵巢癌中具有肿瘤抑制作用。在Borcherding等人,Paracrine WNT5A signalling inhibits expansion of tumour-initiating cells[旁分泌WNT5A信号传导抑制肿瘤起始细胞的扩增],Cancer Research[癌症研究] 75:1972-1982,2015的研究中显示,WNT5A纯合小鼠模型中WNT5A的过表达与减少的乳腺CSC数量相关,表明WNT5A的杂合性缺失与乳腺癌患者的较短生存期相关。有趣的是,WNT5A在恶性黑色素瘤、胃癌以及其他几种癌症类型中具有相反的作用,如下这一事实可以例证:在原发性恶性黑色素瘤中WNT5A的高表达与缩短的生存时间相关。

[0088] WNT5A是体内许多正常细胞表达的蛋白质。WNT5A从细胞中分泌出来,并通过结合

并激活主要包括卷曲蛋白受体的受体复合物而对相同或邻近细胞发挥其作用。已知WNT5A蛋白会激活被称为卷曲5(Frizzled 5)的受体。该卷曲5受体激活后,细胞内部的一系列信号传导事件被激活,其中第一事件中的一个细胞内钙的短暂增加(所谓的钙信号)的产生。钙信号又触发一系列即将发生的信号传导事件,从而导致细胞功能的改变,如粘附和迁移。因此,激活这种卷曲受体会导致细胞内部发生信号传导事件,从而导致细胞与其邻近细胞的粘附增加,并且其粘附至周围的结缔组织,从而导致肿瘤细胞迁移到附近结构(如淋巴结和血管)的能力降低。例如,在健康的乳腺上皮细胞中,WNT5A高度表达并确保细胞之间以及与周围基底膜的牢固粘附,从而限制了细胞的迁移。

[0089] 为了在缺乏WNT5A内源性表达的癌症组织中重建WNT5A信号传导,已开发出一种小肽,即等于或少于20个源自WNT5A分子氨基酸序列的氨基酸,然后对其进行了附加修饰。此类肽的一个实例是Foxy-5,它是真正的WNT5A激动剂,因为它触发的信号传导事件和功能响应与WNT5A相同,并且与WNT5A相比,它是一种简单得多的分子,可以全身施用并且仍能到达肿瘤组织。因此,如本文所用,术语信号传导特性是指WNT5A或Foxy-5肽与主要为卷曲受体蛋白(Fz)的结合,随后是该细胞内的细胞内信号传导级联,最终导致CSC的减少或消除。

[0090] 如本文所用,术语周围非癌细胞是指形态学正常、与肿瘤起源的类型相同、包围或环绕肿瘤组织的细胞。

[0091] 实施例

[0092] 实施例1

[0093] 通过免疫组织化学(IHC)和mRNA检查了来自两种不同人结肠癌细胞类型HT29和Caco-2细胞的肿瘤(见图1)。

[0094] 在第0天:在裸鼠中皮下注射HT29或Caco-2结肠癌细胞。

[0095] 在小鼠体内建立肿瘤后的第7天,腹膜内(I.P)注射单独的媒介物(盐水)(gr 1)或Foxy-5(2 μ g/g;gr 2)。

[0096] 在第9-23天监测肿瘤生长和动物体重——然后+8I.P.每两天注射一次单独的媒介物(gr 1)或Foxy-5(2 μ g/g;gr 2)。

[0097] 在第24天,通过IHC分析了两种类型的肿瘤(Caco-2和HT29衍生的)(分为两部分,其中一部分被固定,另一部分在-80℃下冻结)的COX-2、15PGDH、 β -连环蛋白、Ascl2、ALDH和Dck11的蛋白表达以及其ALDH和Dck11的mRNA含量(ALDH是通用干细胞标志物,Dck11是结肠CSC的特异性标志物)。

[0098] Foxy-5显示在Caco-2和HT29衍生的结肠癌中均显著降低了两种干细胞生物标志物的表达(见图2至4)。

[0099] 实施例2

[0100] 为了进一步验证图2至4中概述的发现,我们分析了导致本实验中CSC数量减少的可能机制。在结肠癌中,环氧合酶2(COX-2)酶常常被上调。COX-2活性导致前列腺素E2(PGE2)的产生和释放。PGE2促进癌症进展,并显示出有利于结肠CSC的扩增。(Wang等人, Prostaglandin E2 promotes colorectal cancer stem cell expansion and metastasis in mice[前列腺素E2促进小鼠中结肠直肠癌干细胞的扩增和转移].Gastroenterology[胃肠病学]149:1884-1895,2015)。虽然经典的WNT信号传导途径的扰动被认为是结直肠癌的起因,但大多数结肠直肠癌中发生的环氧合酶2(COX-2)表达增

加被认为在结肠直肠癌发展过程中起着至关重要的作用。增加的COX-2表达导致其主要代谢产物前列腺素E2 (PGE2) 的丰度增加。在本研究中,用Foxy-5治疗动物不仅导致PGE2生成酶COX-2的表达减少(见图5和5B),而且还导致PGE2降解酶15-PGDH的表达增加(见图5和5C)。这些数据证明用Foxy-5肽进行的治疗可以通过独特的双重作用导致PGE2的肿瘤内水平降低,从而解释了观察到的CSC降低(图2至4和2B至3B)。

[0101] 实施例3

[0102] Foxy-5治疗对HT-29或Caco-2结肠癌组织中 β -连环蛋白信号传导的体内影响可能是观察到的CSC数量减少的另一种可能的解释。由于Foxy-5治疗,在Caco-2和HT29衍生的结肠癌肿瘤中均观察到了活性 β -连环蛋白核表达的量减少(见图7和8)。Foxy-5降低的 β -连环蛋白信号传导的观察结果通过肿瘤体积的减小得到验证(图6和7)。对本研究必不可少的是如下的事实,即还观察到Foxy-5诱导的 β -连环蛋白下游靶标Asc12(促进癌症干细胞生态位的转录因子)的减少,表明Foxy-5治疗降低CSC数量的能力还取决于减少的 β -连环蛋白/Asc12信号传导(见图6至9)。因此,Foxy-5肽展现出通过靶向三种不同元素(COX-2、15-PGDH和 β -连环蛋白)的能力来减少CSC数量的独特特性,从而导致促进CSC的两个独立信号传导途径的减少。

[0103] 实施例4

[0104] 本研究的目的是通过评价Foxy-5肽对FOLF0X的细胞毒性作用的体外影响来测试Foxy-5和FOLF0X的同时治疗的可能性。FOLF0X是由两种化疗药剂5-FU和奥沙利铂与叶醛酸的组合制成,后者也称为亚叶酸(leucovorin),不是化疗药剂,但用于加强5-FU对人HT29结肠癌细胞的作用。FOLF0X是结肠癌患者治疗中最常用的化学疗法。

[0105] 最初的实验是评价Foxy-5肽、奥沙利铂和5-FU作为单一疗法的细胞毒性作用(图10)。结果证实,作为叶醛酸,Foxy-5肽对细胞活力没有细胞毒性作用,因此无法确定 IC_{50} 值。而根据剂量反应曲线计算出的奥沙利铂和5-FU的 IC_{50} 值分别为3.4和6.8 μM 。

[0106] 组合结果表明,Foxy-5肽不会增强或降低FOLF0X对细胞活力的抑制作用。单独的FOLF0X治疗的 IC_{50} 值为1.5 μM ,用Foxy-5肽和FOLF0X进行的组合治疗展现出相同的 IC_{50} 值,从图10中重叠的剂量反应曲线也可明显看出。

[0107] 总之,添加Foxy-5不会改变FOLF0X治疗对人HT29结肠癌细胞活力的影响,因此预期没有相互作用。因此,没有迹象表明Foxy-5会减弱FOLF0X治疗的细胞抑制作用。

序列表

<110> 温特研究公司

<120> WNT5A肽在减少癌症干细胞中的作用

<130> PA201763

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 380

<212> PRT

<213> 智人WNT5A

<400> 1

[0001]

Met Lys Lys Ser Ile Gly Ile Leu Ser Pro Gly Val Ala Leu Gly Met Ala Gly Ser Ala
1 5 10 15 20

Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val Ala Leu Ala Ile Phe Phe Ser Phe Ala Gln Val Val
21 25 30 35 40

Ile Glu Ala Asn Ser Trp Trp Ser Leu Gly Met Asn Asn Pro Val Gln Met Ser Glu Val
41 45 50 55 60

Tyr Ile Ile Gly Ala Gln Pro Leu Cys Ser Gln Leu Ala Gly Leu Ser Gln Gly Gln Lys
61 65 70 75 80

Lys Leu Cys His Leu Tyr Gln Asp His Met Gln Tyr Ile Gly Glu Gly Ala Lys Thr Gly
81 85 90 95 100

Ile Lys Glu Cys Gln Tyr Gln Phe Arg His Arg Arg Trp Asn Cys Ser Thr Val Asp Asn
101 105 110 115 120

Thr Ser Val Phe Gly Arg Val Met Gln Ile Gly Ser Arg Glu Thr Ala Phe Thr Tyr Ala
121 125 130 135 140

Val Ser Ala Ala Gly Val Val Asn Ala Met Ser Arg Ala Cys Arg Glu Gly Glu Leu Ser
141 145 150 155 160

Thr Cys Gly Cys Ser Arg Ala Ala Arg Pro Lys Asp Leu Pro Arg Asp Trp Leu Trp Gly
161 165 170 175 180

Gly Cys Gly Asp Asn Ile Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe Ala Lys Glu Phe Val Asp Ala Arg
181 185 190 195 200

Glu Arg Glu Arg Ile His Ala Lys Gly Ser Tyr Glu Ser Ala Arg Ile Leu Met Asn Leu
201 205 210 215 220

His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Arg Thr Val Tyr Asn Leu Ala Asp Val Ala Cys Lys Cys

221	225	230	235	240
His Gly Val Ser	Gly Ser Cys Ser Leu	Lys Thr Cys Trp Leu	Gln Leu Ala Asp Phe	Arg
241	245	250	255	260
Lys Val Gly Asp	Ala Leu Lys Glu Lys	Tyr Asp Ser Ala Ala	Ala Met Arg Leu Asn	Ser
261	265	270	275	280
Arg Gly Lys Leu	Val Gln Val Asn Ser	Arg Phe Asn Ser Pro	Thr Thr Gln Asp Leu	Val
281	285	290	295	300
Tyr Ile Asp Pro	Ser Pro Asp Tyr Cys	Val Arg Asn Glu Ser	Thr Gly Ser Leu Gly	Thr
301	305	310	315	320
Gln Gly Arg Leu	Cys Asn Lys Thr Ser	Glu Gly Met Asp Gly	Cys Glu Leu Met Cys	Cys
321	325	330	335	340
Gly Arg Gly Tyr	Asp Gln Phe Lys Thr	Val Gln Thr Glu Arg	Cys His Cys Lys Phe	His
341	325	350	355	360
Trp Cys Cys Tyr	Val Lys Cys Lys Lys	Cys Thr Glu Ile Val	Asp Gln Phe Val Cys	Lys
361	365	370	375	380

[0002]

<210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> 位置1的Xaa是蛋氨酸或正亮氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> 位置4的Xaa是半胱氨酸或丙氨酸

<400> 2

Xaa Asp Gly Xaa Glu Leu
 1 5

<210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3

Met Asp Gly Cys Glu Leu

	1	5
	<210> 4	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 4	
	Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu	
	1	5
	<210> 5	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 5	
	Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu	
	1	5
[0003]	<210> 6	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 6	
	Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu	
	1	5
	<210> 7	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 7	
	Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu	
	1	5 10
	<210> 8	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 8	

Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
1 5 10

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
1 5 10

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
1 5 10

[0004]

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
1 5 10

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
1 5 10 15

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
1 5 10 15

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu
1 5 10 15

Leu

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

[0005] Thr Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys
1 5 10 15

Glu Leu

<210> 16

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

Gly Thr Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly
1 5 10 15

Cys Glu Leu

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

[0006]

Leu	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	Leu	Cys	Asn	Lys	Thr	Ser	Glu	Gly	Met	Asp	Gly	Cys	Glu	Leu
1				5					10					15					20

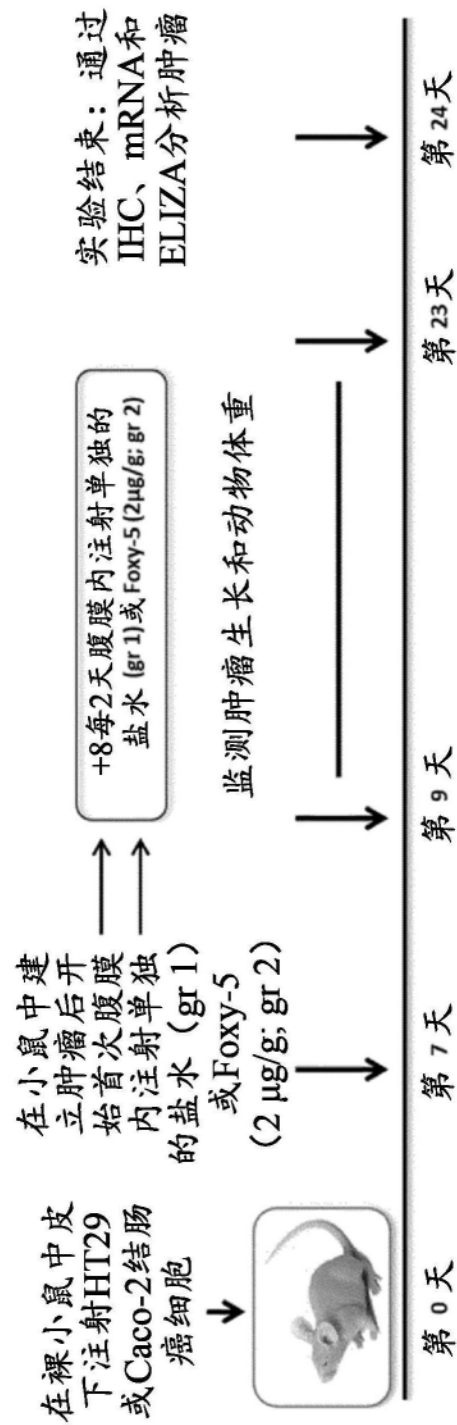


图1

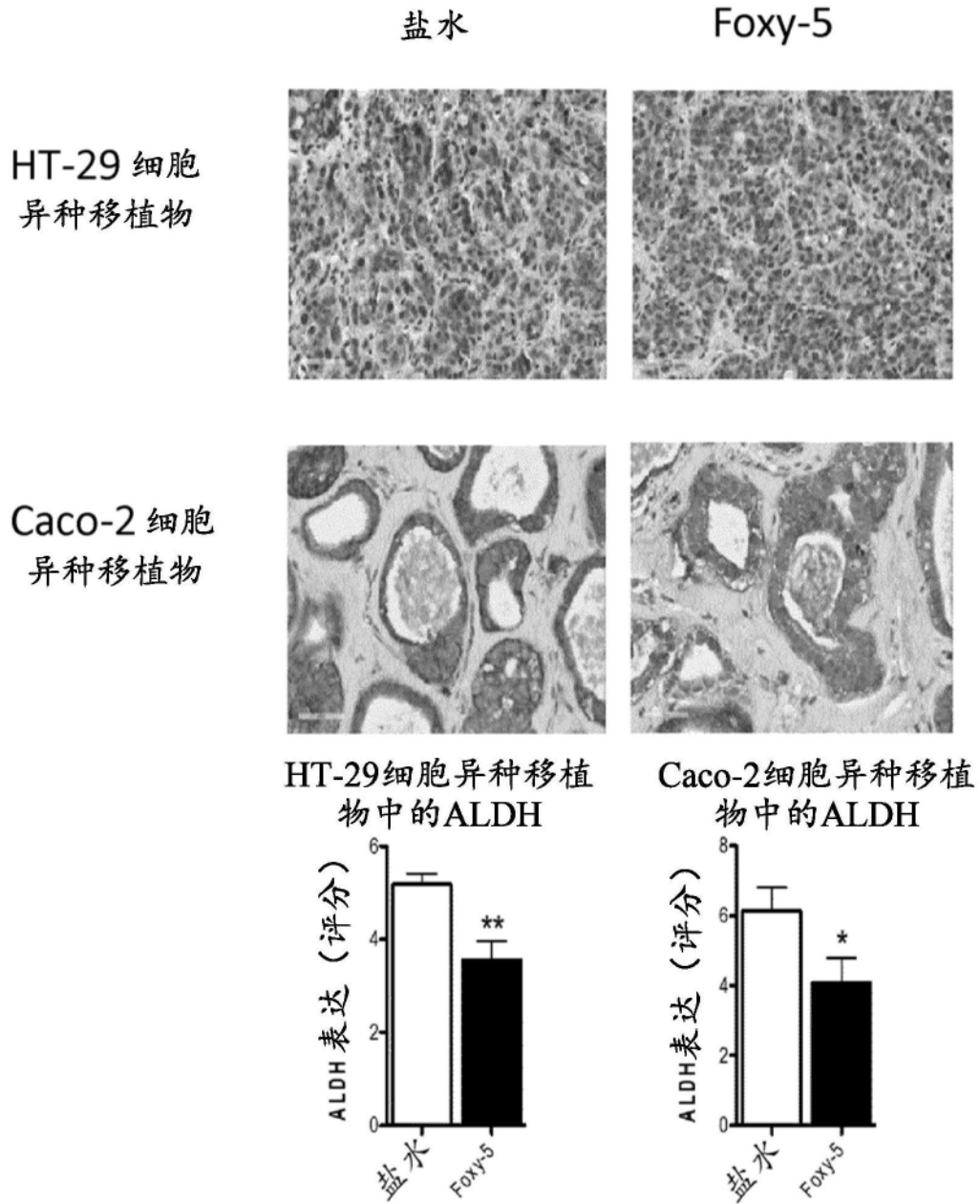


图2

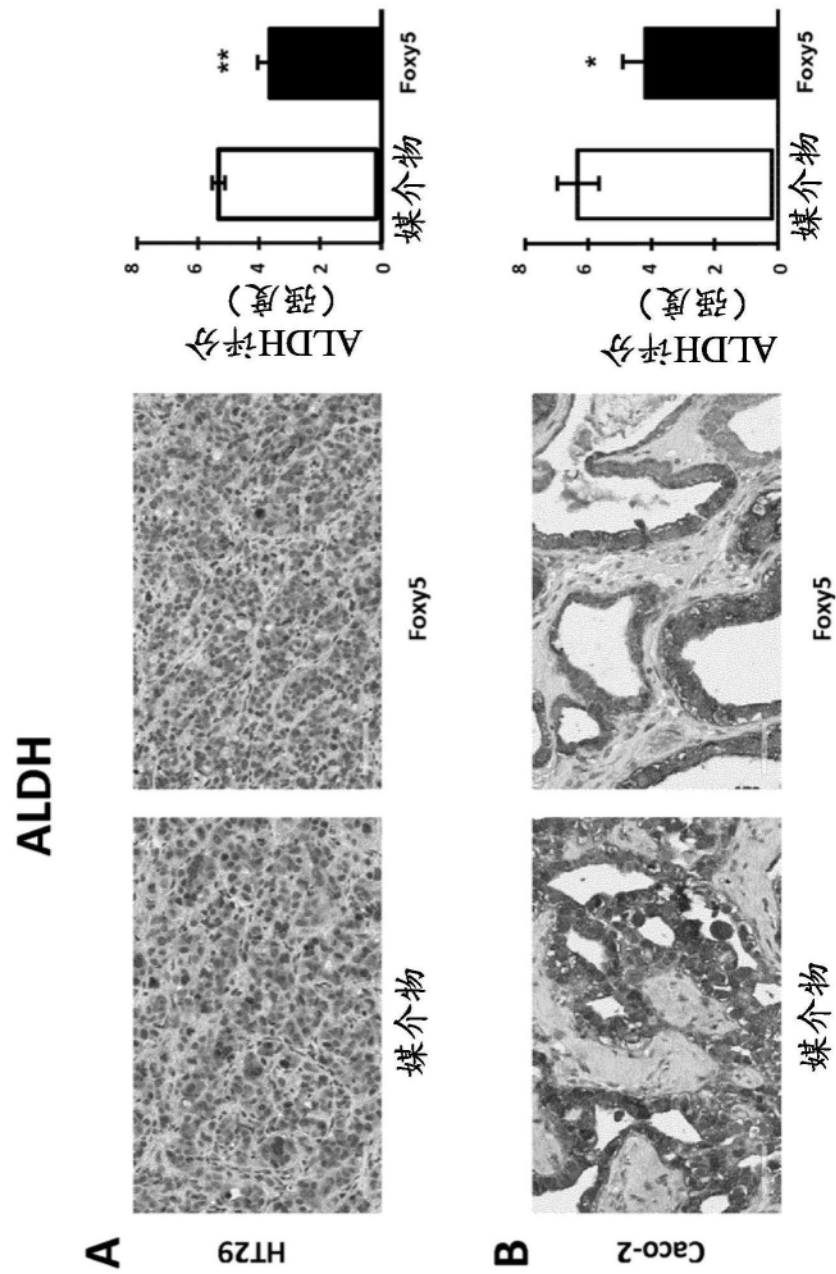


图2B

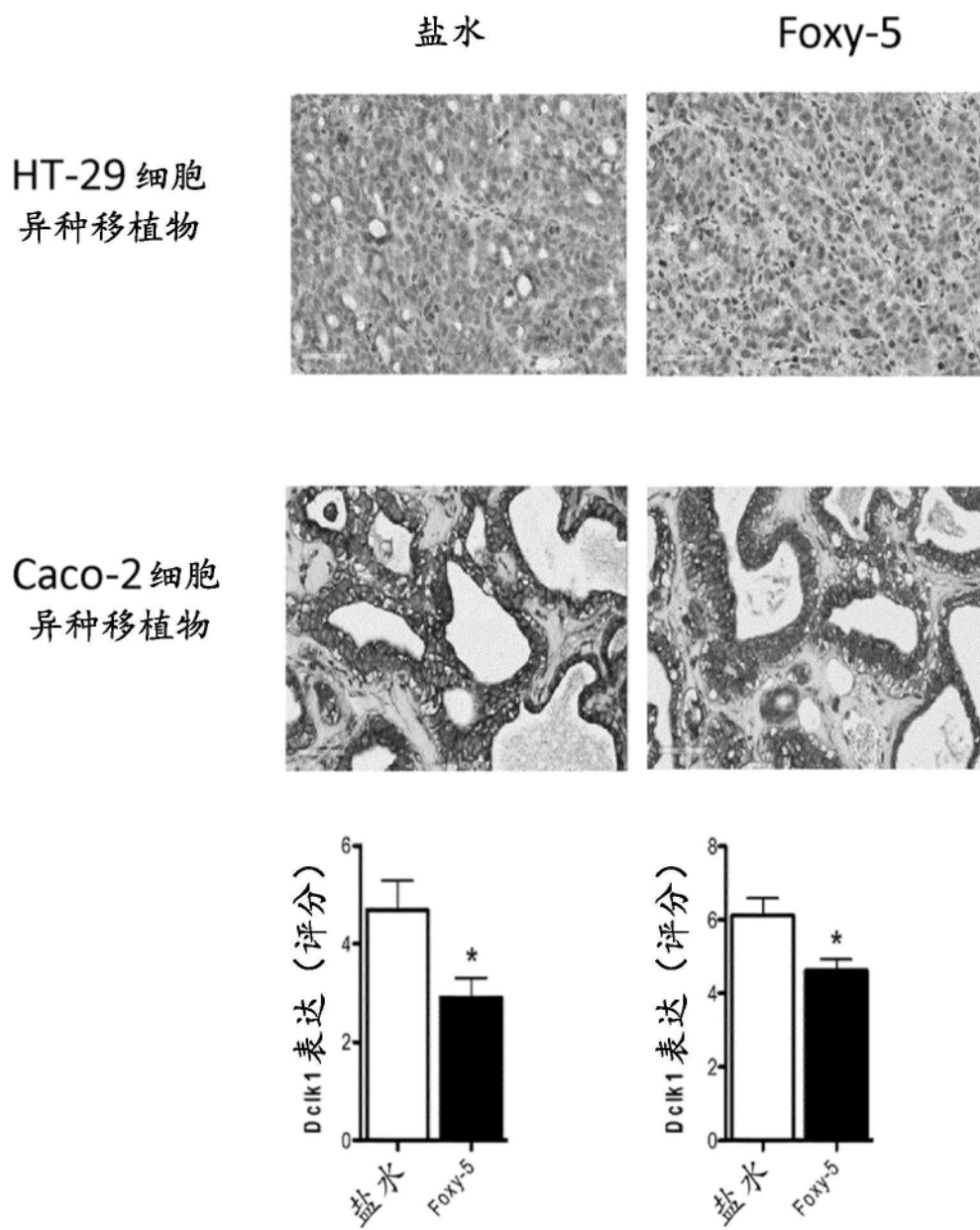


图3

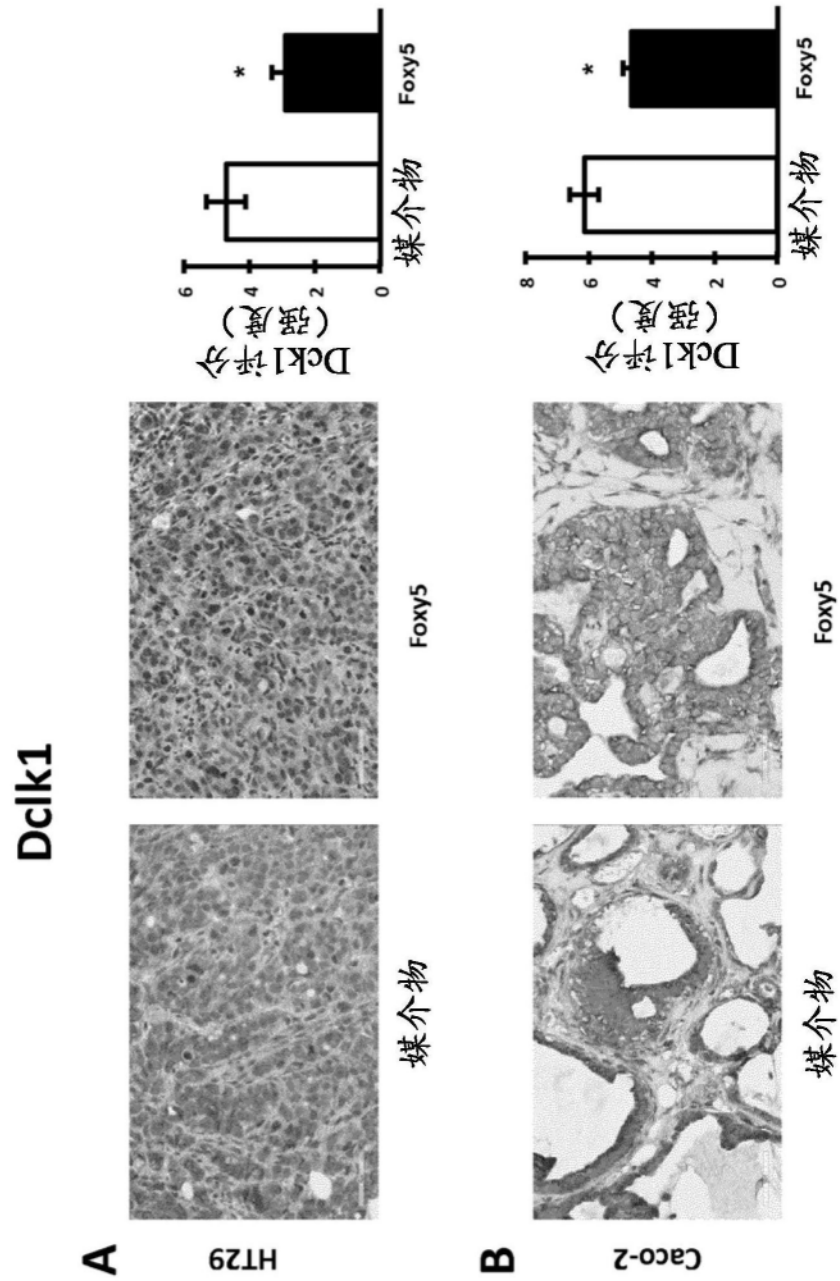


图3B

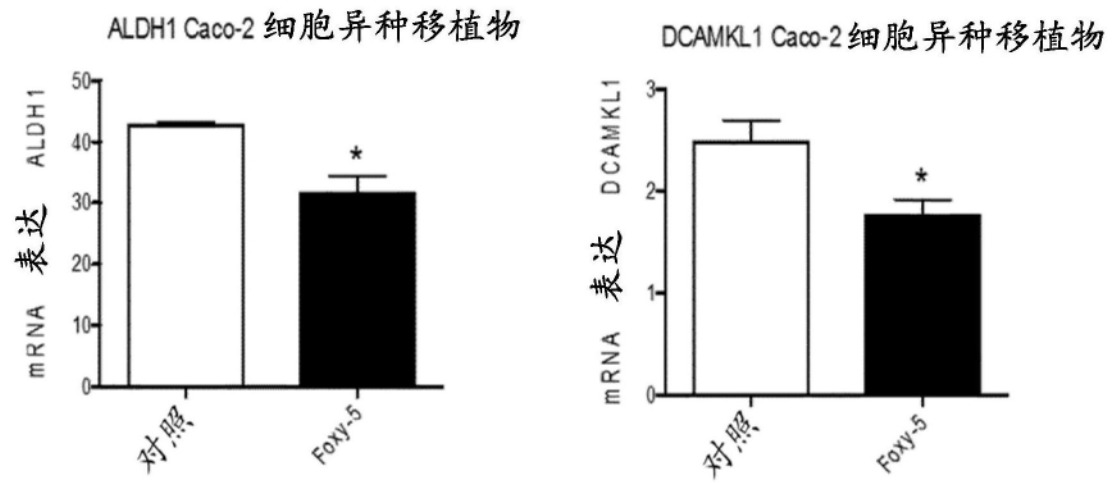


图4

HT-29 细胞

Caco-2 细胞

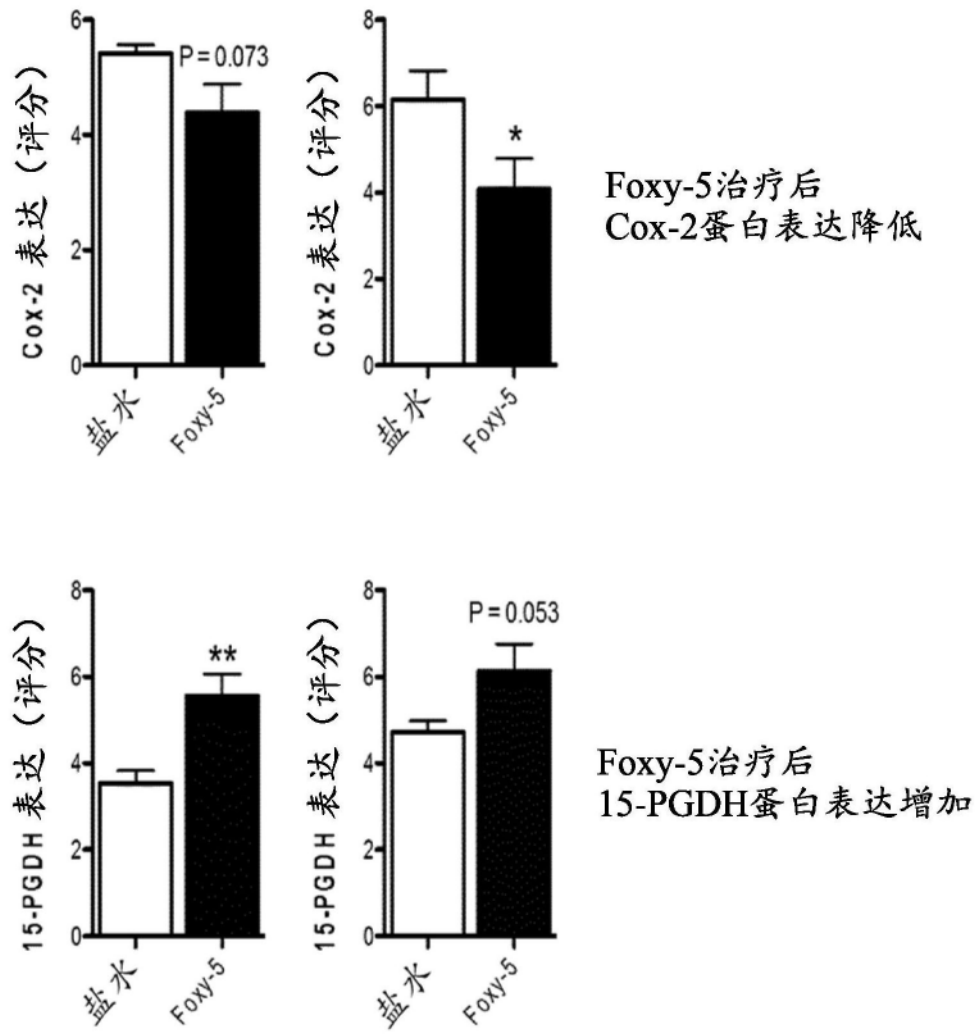


图5

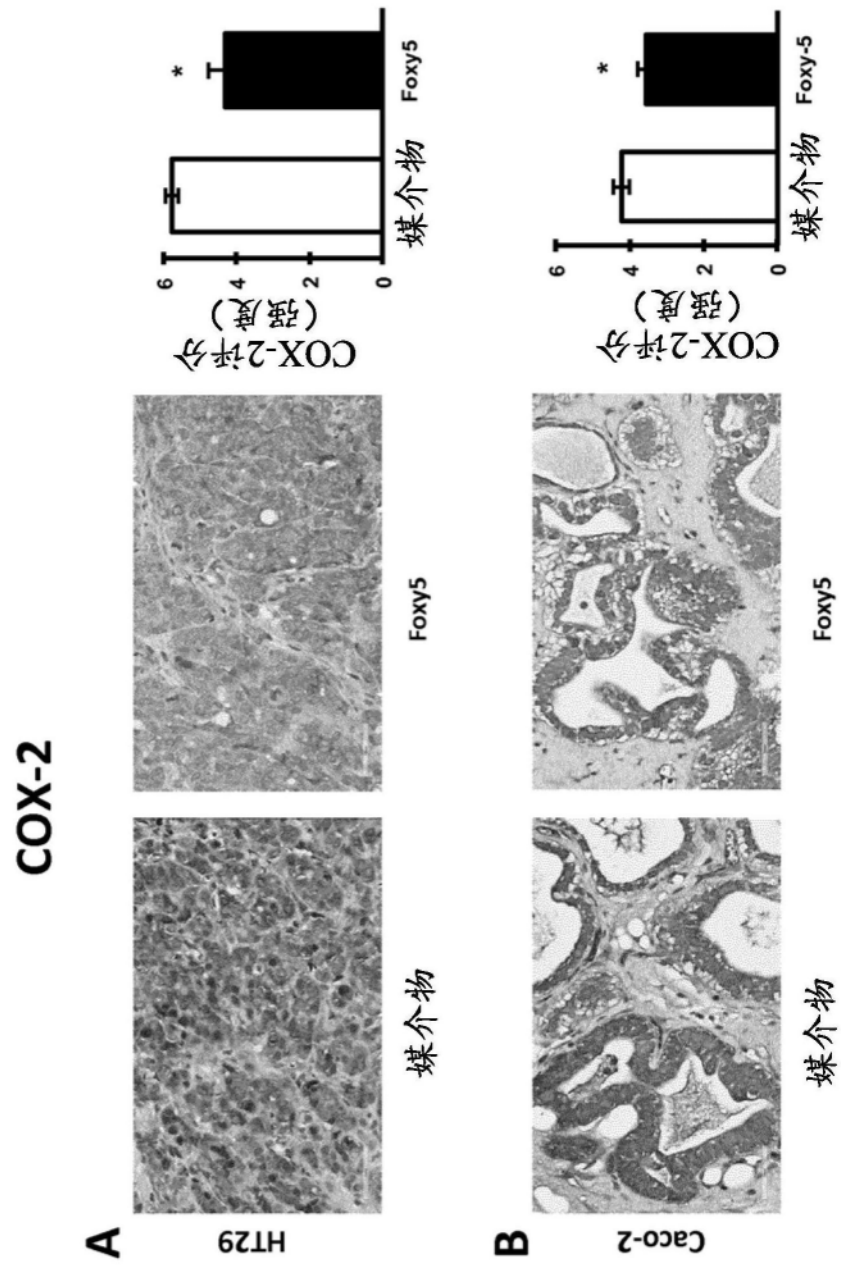


图5B

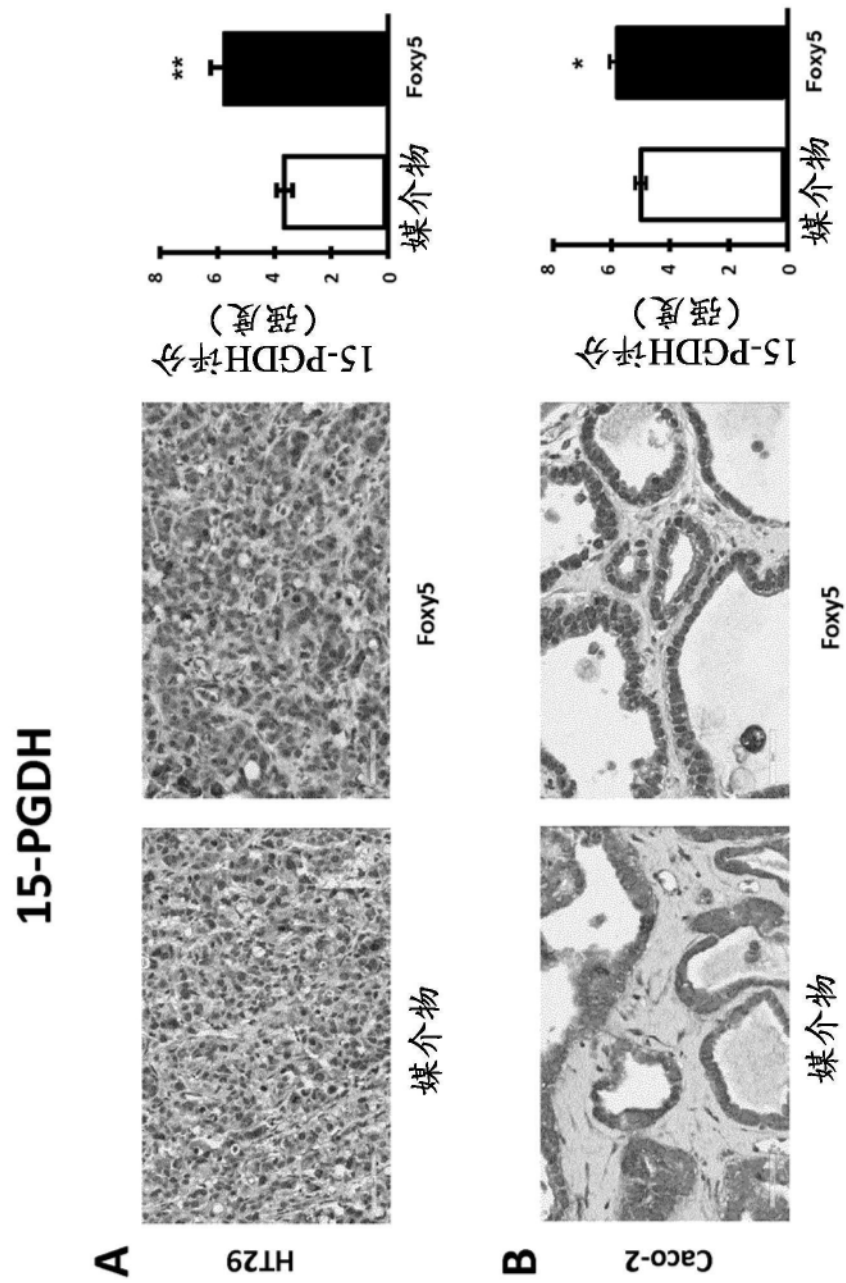


图5C

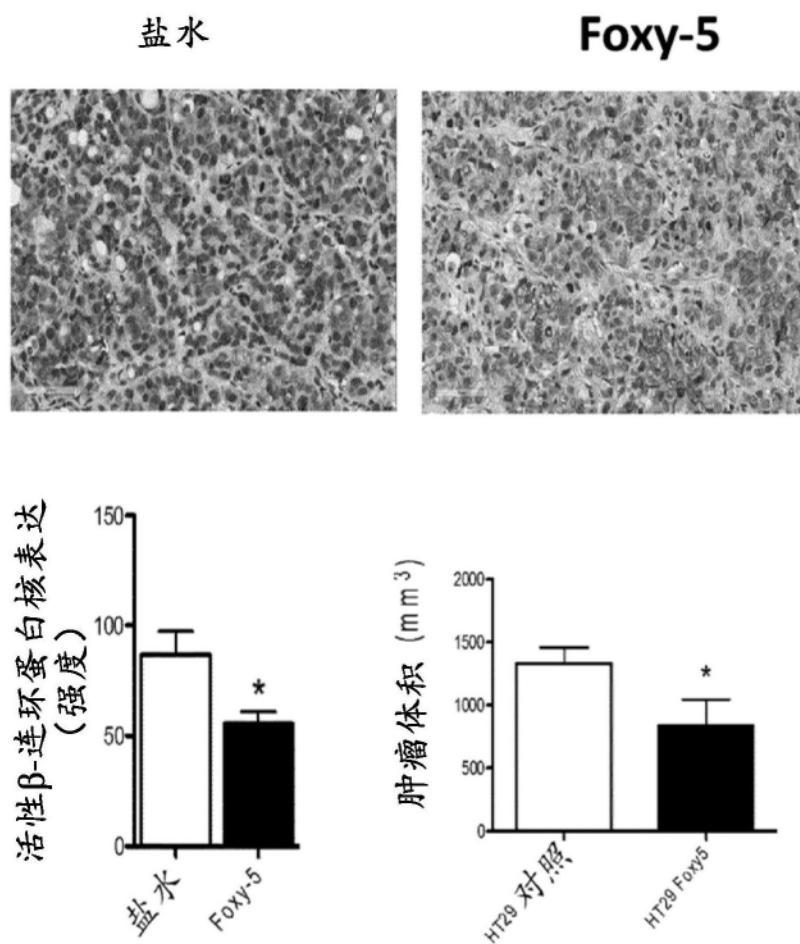


图6

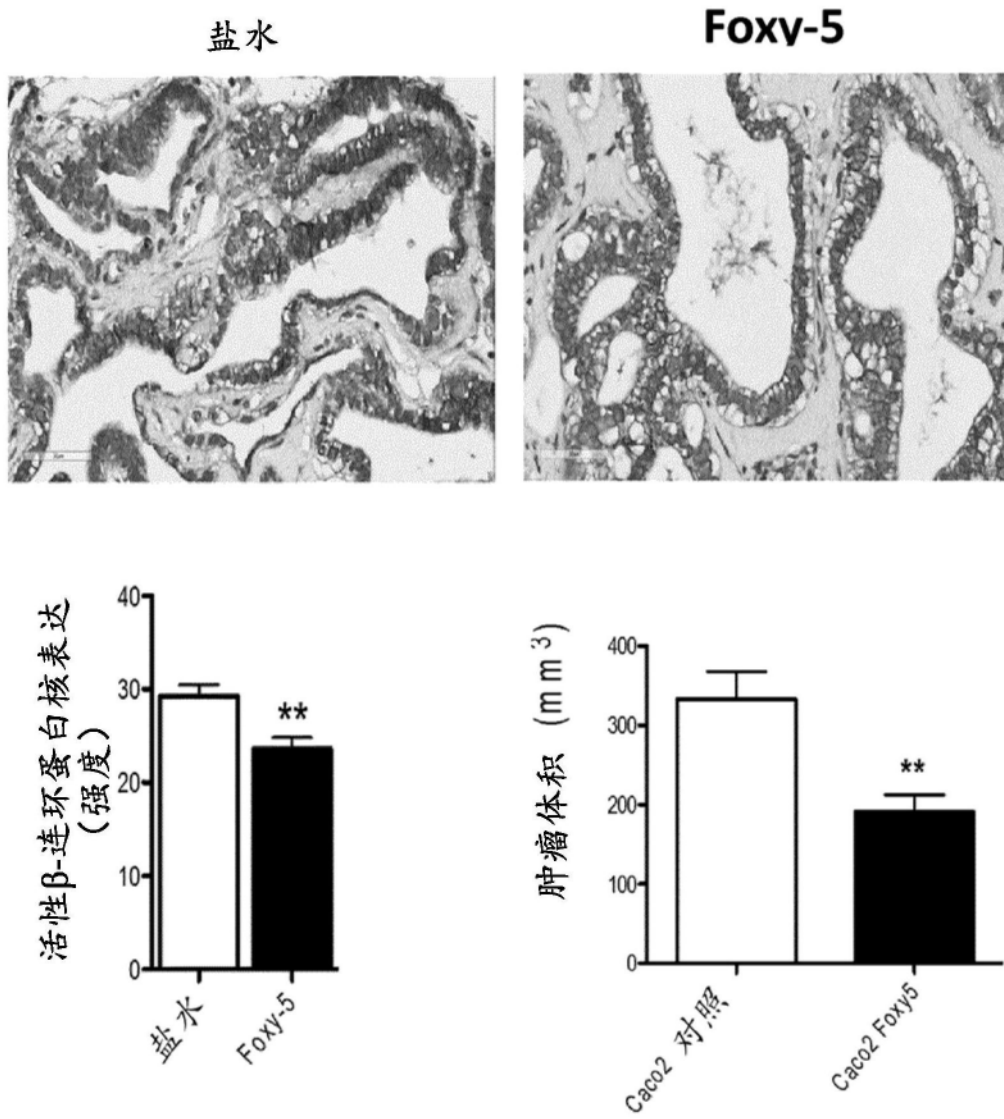


图7

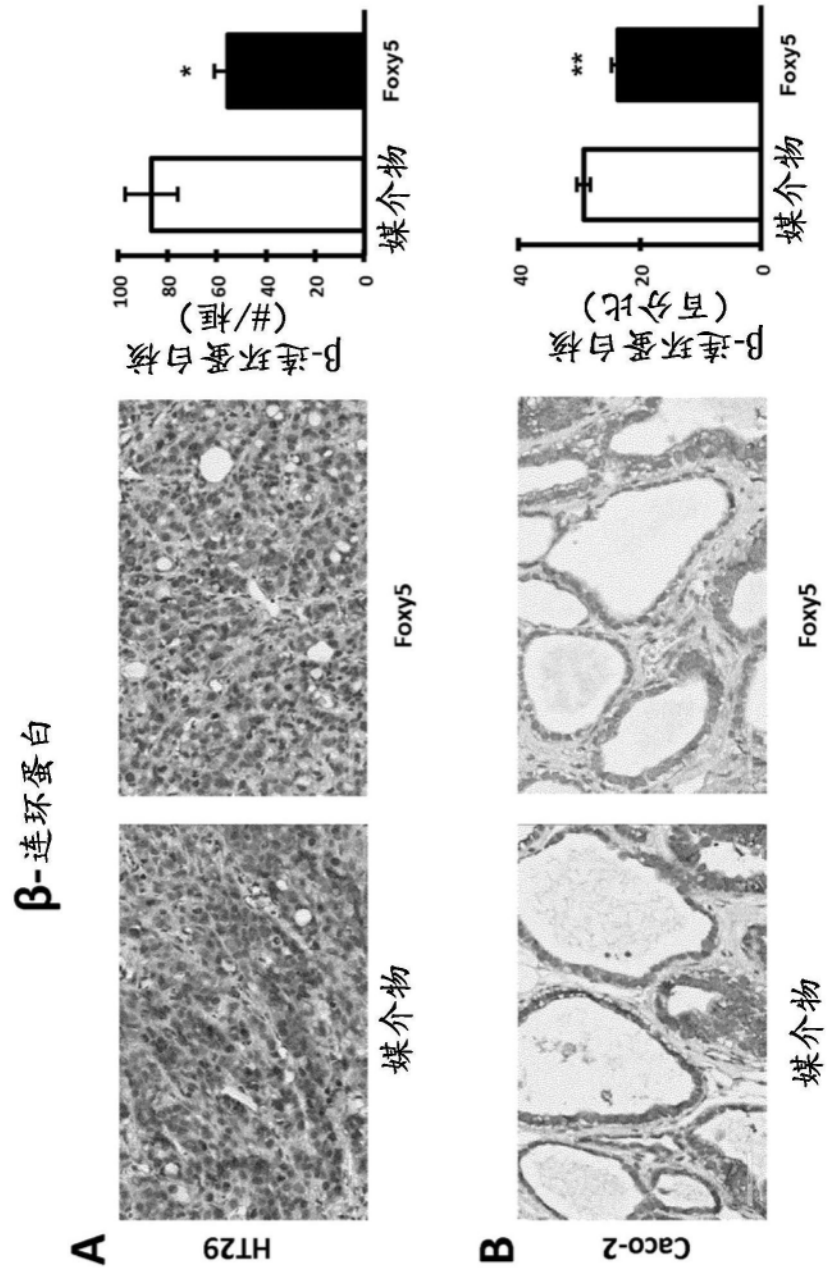


图8

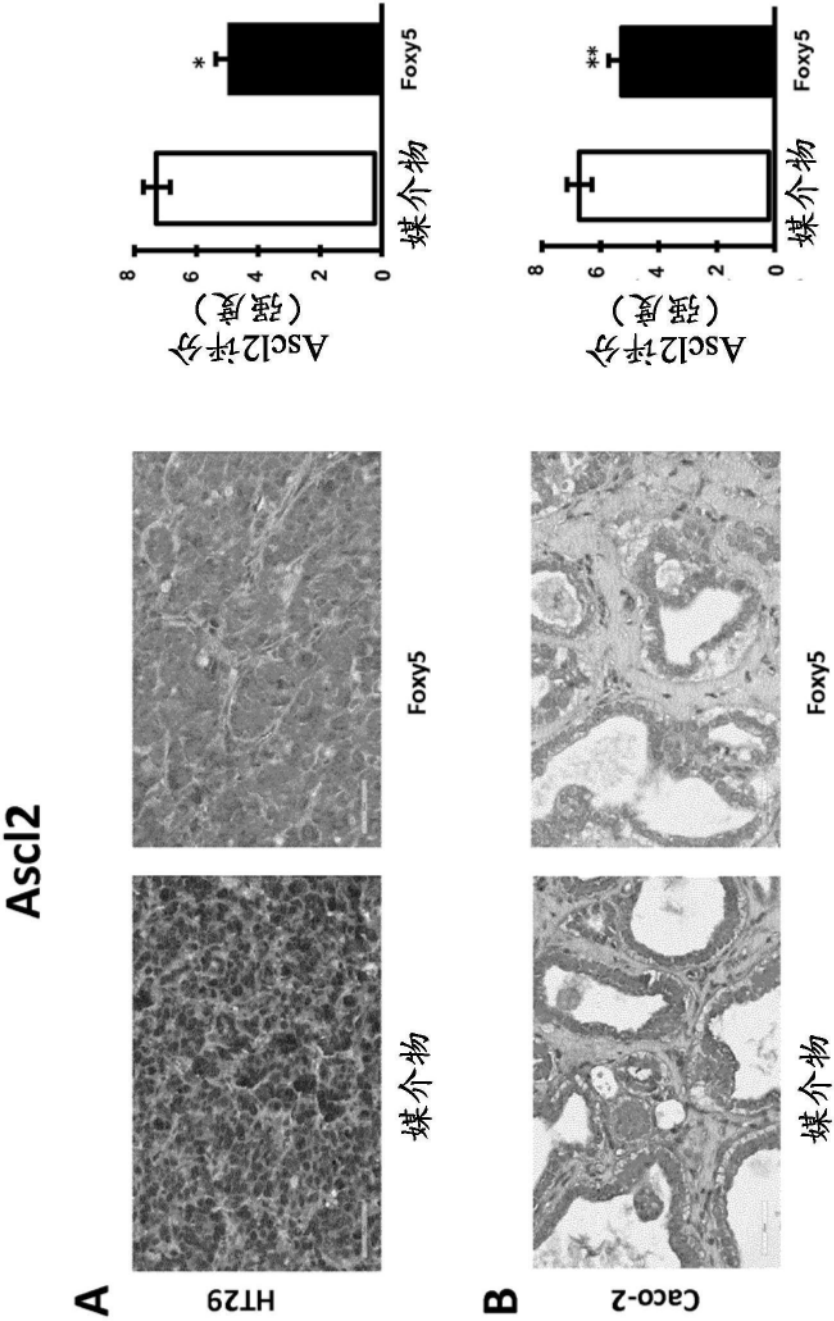


图9

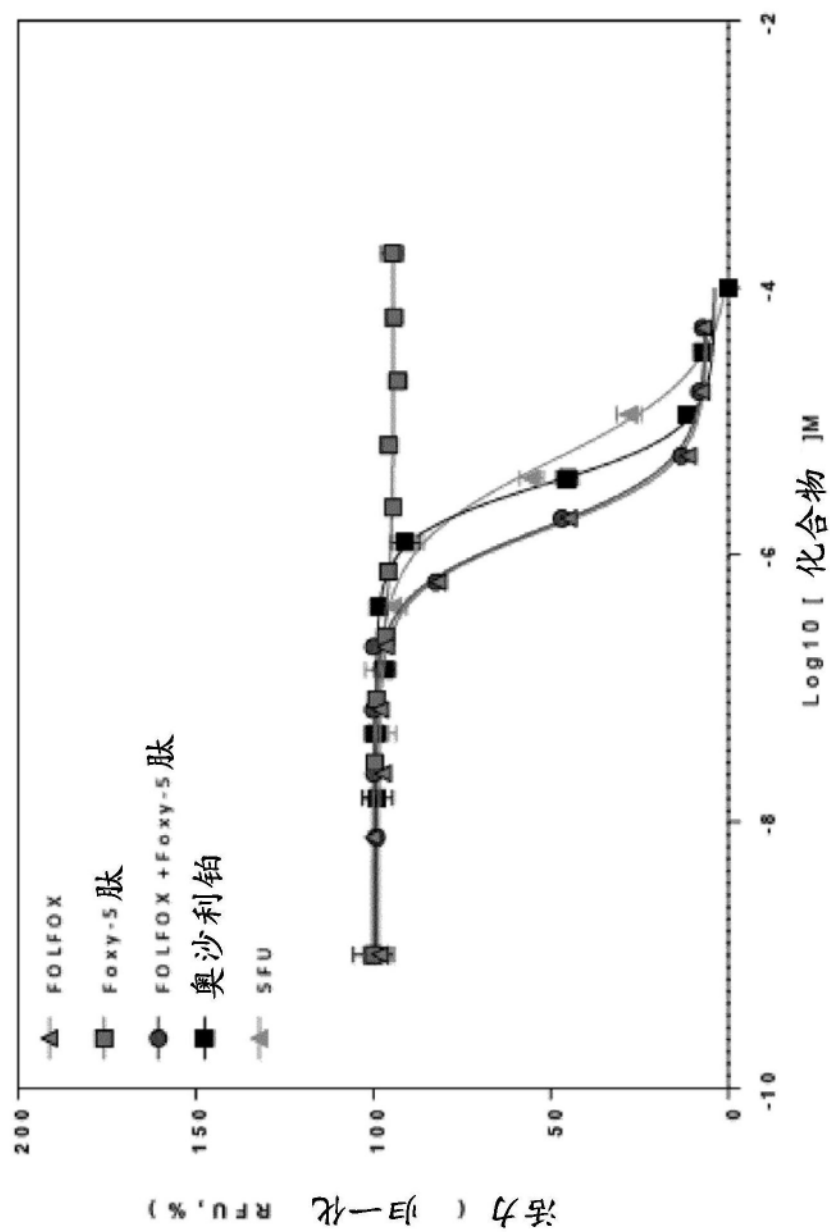


图10