



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 103501803 B

(45) 授权公告日 2015.12.02

(21) 申请号 201180051033.3

(22) 申请日 2011.09.21

(30) 优先权数据

61/385,445 2010.09.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.04.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/052499 2011.09.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/040295 EN 2012.03.29

(73) 专利权人 科罗拉多大学董事会

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 王晓京 优素福·里法利 张庆红

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 彭鲲鹏 郑斌

(51) Int. Cl.

A61K 38/17(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101316602 A, 2008.12.03, 说明书第 81 页.

US 6605443 B1, 2003.08.12,

US 20090155193 A1, 2009.06.18,

US 2007178439 A1, 2007.08.02,

Suntaek Hong 等. Smad7 binds to the

adaptors TAB2 and TAB3 to block recruitment of the kinase TAK1 to the adaptor TRAF2. 《NATURE IMMUNOLOGY》. 2007, 第 8 卷 (第 5 期), 504-513.

Suntaek Hong 等. Smad7 binds to the adaptors TAB2 and TAB3 to block recruitment of the kinase TAK1 to the adaptor TRAF2. 《NATURE IMMUNOLOGY》. 2007, 第 8 卷 (第 5 期), 504-513.

Gangwen Han 等. Preventive and therapeutic effects of Smad7 on radiation-induced oral mucositis. 《nature medicine》. 2013, 第 19 卷 (第 4 期), 421-428.

王宁 等. NF- κ B 及其在肿瘤发生发展中的作用. 《解剖学研究》. 2008, 第 30 卷 (第 2 期), 141-144.

Margaret M. Cawley 等. Current Trends in Managing Oral Mucositis. 《CLINICAL JOURNAL OF ONCOLOGY NURSING》. 2005, 第 9 卷 (第 5 期), 584-592.

审查员 韦炜

权利要求书1页 说明书21页
序列表11页 附图6页

(54) 发明名称

SMAD7 的治疗应用

(57) 摘要

本发明提供了用于治疗炎性和 / 或组织损伤病症的方法和组合物。特别地, 描述了局部地或全身地递送到炎症和 / 或组织损伤部位的 Smad7 组合物的用途。另一些具体的实施方案涉及由放射和 / 或化学治疗引起的副作用 (包括但不限于粘膜炎症) 的治疗或预防。

1. 包含融合蛋白或编码其的核酸的组合物在制备用于治疗或预防口腔粘膜炎症或银屑病的药物中的用途,其中所述融合蛋白包含与蛋白质转导结构域(PTD)融合的Smad7蛋白,并且其中所述融合蛋白易位至核。
2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述核酸为编码所述融合蛋白的表达载体。
3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述核酸包含防止融合蛋白在不存在活化剂时表达的调节结构域。
4. 根据权利要求2所述的用途,其中所述表达载体是病毒载体。
5. 根据权利要求2所述的用途,其中所述表达载体是非病毒载体。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的用途,其中所述药物在贴剂上、在凝胶组合物中、在微球中、在微珠中或在其组合中配制。
7. 根据权利要求1所述的用途,其中所述PTD是Tat。
8. 根据权利要求1至5或7中任一项所述的用途,其中所述药物被配制为全身施用。
9. 根据权利要求1至5或7中任一项所述的用途,其中所述药物包含所述融合蛋白并且被配制为局部施用。
10. 根据权利要求1至5或7中任一项所述的用途,其中所述口腔粘膜炎症与使用上半身放射或重复的化学治疗周期来治疗的癌症相关。
11. 组合物,其包含融合蛋白,其中所述融合蛋白包含与蛋白质转导结构域(PTD)融合的Smad7蛋白,其中所述PTD是Tat,并且其中所述融合蛋白能够易位至核。
12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述组合物与一种或更多种可药用赋形剂一起配制。
13. 根据权利要求12所述的组合物,其中选择所述一种或更多种可药用赋形剂以用于局部施用。
14. 根据权利要求12所述的组合物,其中选择所述一种或更多种可药用赋形剂以用于全身施用。

SMAD7 的治疗应用

[0001] 本申请要求 2010 年 9 月 22 日提交的美国临时申请序列号 61/385,445 的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0002] I. 联邦资助研究

[0003] 本发明的实施方案的一部分由美国国立卫生研究院授予的资助号 GM70966 支持。美国政府享有本发明的某些权利。

II. 技术领域

[0004] 本发明一般地涉及肿瘤和癌症治疗、炎性疾病及慢性伤口愈合领域。更特别地,本发明涉及用于治疗炎性疾病、慢性伤口愈合 / 溃疡和由化学治疗和放射治疗以及军人 / 工人 / 安全员 / 救援人员过度暴露于放射所引起的副作用的方法和组合物。在某些实施方案中,副作用可包括口腔粘膜炎、肠粘膜炎和骨髓衰竭。在一些具体的实施方案中,提供了 Smad7 (mothers against decapentaplegic-7) 蛋白组合物预防或治疗上述适应症的用途。

III. 背景技术

[0005] 炎症是生物体去除损伤性刺激和起始愈合过程的保护性尝试。没有炎症,伤口和感染永远不会愈合。类似地,组织的进展性破坏将危害生物体的存活。但是,慢性炎症也可引起多种疾病,例如花粉热、动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、银屑病甚至癌症(例如,胆囊癌),而急性炎症可通过对急性刺激的过度应答而引起损伤。因此,炎症通常受到机体的密切调节。

[0006] 如上所述,炎症可分为急性或慢性。急性炎症是机体对有害刺激的初始应答,并且是通过血浆和白细胞(特别是粒细胞)从血液到受损组织增加的移动实现的。一系列生物化学事件传播炎症性应答并使其成熟,涉及局部血管系统、免疫系统和受损组织内的多种细胞。持久的炎症(称为慢性炎症)引起存在于炎症部位的细胞类型的进展性改变,并且特征在于组织在炎症过程中同时破坏和愈合。

[0007] 急性炎症在组织损伤后数秒至数分钟之内开始。损伤可以是纯物理损伤,或者其可涉及免疫应答的活化。发生 3 个主要过程:(a) 由血管(小动脉)扩张引起增加的血流供应该区域;(b) 毛细血管增加的渗透性使得流体和血液蛋白质移动进入间质空间;以及(c) 嗜中性粒细胞(以及可能少许巨噬细胞)迁移出小静脉并进入间质空间。

[0008] 一种特定类型的炎症性损伤源于治疗剂的使用,许多治疗剂旨在患病组织或器官中产生炎症,但不幸的是,它们很少能够特异性地靶向那些区域。例如,超过 80% 的口腔癌患者采用放射治疗来治疗,而这些个体中的至少 75% 将发生口腔粘膜炎。口腔粘膜炎还发生于接受造血干细胞移植的患者和需要放射治疗和 / 或化学治疗的其它癌症患者中,并且通常是放射治疗最严重的并发症。严重的口腔粘膜炎极其疼痛,并且不利于经口摄取。患有口腔粘膜炎的对象通常需要长期疼痛药物治疗以缓解该病症的症状。除炎症之外,化学和放射诱导的 DNA 损伤和细胞死亡二者也引起骨髓衰竭,导致死亡。这只是两个实例,如果更好地调节,不仅可以显著节省医疗保健花费,还可以在相当大程度上防止痛苦、患者的功

能丧失、死亡。

[0009] 发明概述

[0010] 因此,根据本发明,提供了用于在对象中治疗炎症病症和 / 或组织损伤病症的方法,其包括向所述对象提供治疗有效量的 Smad7 (mothers against decapentaplegic homolog7)。Smad7 可作为蛋白质、编码 Smad7 蛋白的表达载体 (例如病毒载体或非病毒载体) 提供。组合物可包含与蛋白质转导结构域 (PTD) 融合的 Smad7 蛋白,并且所述 Smad7 蛋白融合物还可包含防止 Smad7 在不存在活化剂时发挥功能的调节结构域,所述方法还包括提供所述活化剂。Smad7 可于贴剂 (patch) 上的制剂中、凝胶状组合物中、在微球中、在微珠中或在其组合中提供。所述贴剂可包括生物可降解贴剂,例如藻酸聚合物 (alginate)。

[0011] Smad7 可局部提供到受影响的区域或者全身提供。所述方法还可包括向所述对象施用第二粘膜炎治疗,例如粘性 2% 利多卡因、小苏打溶液 (baking soda solution)、盐水溶液、BAX 溶液 (利多卡因、苯海拉明、山梨醇和胃能达 (Mylanta))、 β 胡萝卜素、生育酚、激光照射、硝酸银、米索前列醇 (misoprostol)、甲酰四氢叶酸 (leucovorin)、全身性角质形成细胞生长因子、己酮可可碱 (pentoxifylline)、别嘌呤醇、全身性硫糖铝、葡萄糖酸氯己定或冷冻治疗。所述组合物可包含可检测标志物。所述炎症病症选自:粘膜炎、银屑病、自身免疫病、慢性伤口、创伤 (trauma)、化学治疗、放射治疗或细胞因子治疗。所述方法还可包括再次向所述对象施用所述组合物。

[0012] 在另一实施方案中,提供了用于在进行放射治疗和 / 或化学治疗的对象中治疗或预防口腔粘膜炎的方法,其包括向所述对象提供治疗有效量的 Smad7 (mothers against decapentaplegic homolog7)。Smad7 可作为蛋白质、编码 Smad7 蛋白的表达载体 (例如病毒载体或非病毒载体) 提供。组合物可包含与蛋白质转导结构域 (PTD) 融合的 Smad7 蛋白,并且所述 Smad7 蛋白融合物还可包含防止 Smad7 在不存在活化剂时发挥功能的调节结构域,所述方法还包括提供所述活化剂。Smad7 可于贴剂上的制剂中、在凝胶组合物中、在微球中、在微珠中或在其组合中提供。贴剂可包括生物可降解贴剂,例如藻酸聚合物。

[0013] Smad7 可局部提供到受影响的区域或者全身提供。所述方法还可包括向所述对象施用第二粘膜炎治疗,例如粘性 2% 利多卡因、小苏打溶液、盐水溶液、BAX 溶液 (利多卡因、苯海拉明、山梨醇和胃能达)、 β 胡萝卜素、生育酚、激光照射、硝酸银、米索前列醇、甲酰四氢叶酸、全身性角质形成细胞生长因子、己酮可可碱、别嘌呤醇、全身性硫糖铝、葡萄糖酸氯己定或冷冻治疗。所述对象可包括具有移植物的对象、患癌症的对象或患需要放射治疗之病症的对象,所述对象患癌症时所述癌症选自:口腔癌、结肠癌、乳腺癌、头颈癌、胰腺癌和用上半身放射或重复的化学治疗周期治疗的其它癌症。所述对象可以已接受上半身放射。该方法还可包括再次向所述对象施用所述组合物。

[0014] 在又一实施方案中,提供了用于在对象中治疗口腔粘膜炎的药盒,其包含:(a) Smad7 试剂组合物;和 (b) 递送系统。所述试剂可包括 Smad7 蛋白,其任选地与蛋白质转导结构域 (PTD) 融合,和 / 或任选地与防止 Smad7 在不存在活化剂时发挥功能的调节结构域融合,并且所述药盒还包含所述活化剂。所述试剂可以是 Smad7 表达载体,例如病毒表达载体或非病毒表达载体。所述递送系统可包括凝胶、油膏或贴剂递送系统。所述组合物可以是冻干的。所述药盒还可包含可药用缓冲剂、溶剂或稀释剂。

[0015] 一些实施方案涉及在患有或被怀疑发生口腔粘膜炎或银屑病的对象中上调

TGF- β 和 / 或 NF- κ B 抑制分子。在某些实施方案中,本文的组合物和方法涉及对对象诱导 Smad7 (mothers against decapentaplegic homolog 7) 基因或蛋白水平或者引入 Smad7 组合物以治疗患有本文所公开之病症的对象。另一些实施方案涉及在有此治疗需要的对象中过表达 Smad7 (mothers against decapentaplegic homolog7) 基因和 / 或诱导 Smad7 蛋白水平。一些实施方案涉及使用 Smad7 重组形式的组合物在对象中表达 Smad7。

[0016] 本文的另一些实施方案涉及在接受或将接受放射治疗或化学治疗的对象中治疗或预防口腔粘膜炎。在某些实施方案中,这些对象正接受癌症治疗,所述癌症包括但不限于口腔癌、头颈癌和使用重复的化学治疗周期治疗的其它癌症,包括但不限于结肠癌、乳腺癌、胰腺癌和其它癌症。

[0017] 附图简述

[0018] 以下附图构成本说明书的一部分并且用来进一步说明本发明的某些实施方案。通过参考这些附图中的一个或更多个并联合本文给出的一些具体实施方案的详细描述可以更好的理解实施方案。

[0019] 图 1. Smad7 转基因小鼠对放射诱导的口腔粘膜炎的抗性。H&E 中的虚线突出上皮-基质边界。Smad7 小鼠有完整的口腔上皮层,但野生型 (wt) 小鼠有口腔溃疡。pH2AX (DNA 损伤的标志物 (绿色)) 在口腔粘膜炎的 wt 上皮 (K14, 红色) 中明显,但在 Smad7 转基因病变中显著减少。针对总白细胞 (棕色) 染色的 CD45 在野生型病变中示出严重炎症,但在 Smad7 转基因病变中显著减少。CD45 免疫染色在角质层中具有非特异性染色。就免疫染色而言,取邻近溃疡的野生型上皮图像,并且从大多数白细胞接近基膜的区域取 Smad7 图像。

[0020] 图 2. Smad7 转基因表达逆转 K5. TGF β 1^{wt} 小鼠的银屑病。上图:3 周龄 K5. TGF β 1^{wt}/K5. Smad7 小鼠 (光滑皮肤) 及其 K5. TGF β 1^{wt} 同胞小鼠 (发炎的皮肤,眼睛和耳朵) 的总体外观。下图:K5. TGF β 1^{wt} 皮肤示出表皮增生和皮肤炎症,但 K5. Smad7 皮肤和 K5. Smad7/TGF β 1^{wt} 皮肤与正常野生型 (WT) 皮肤类似。

[0021] 图 3. Tat-Smad7 蛋白转导入角质形成细胞。左图和中图:经转导细胞的 Tat-Smad7 染色 (绿色),由角蛋白 K14 抗体 (红色) 复染。右:pSmad2 (绿色) 对经载体处理的 (对照) 角质形成细胞有染色,但对转导有 Tat-Smad7 的细胞没有。使用 V5 抗体的 Tat-Smad7 染色示出经转导细胞的核和 / 或胞质染色,但对照细胞并非如此。

[0022] 图 4. Tat-Smad7 蛋白到口腔粘膜的局部递送。左:经 PBS 缓冲剂处理的颊粘膜。右:经口 Tat-Smad7 处理后 24 小时的颊粘膜。使用 V5 抗体对 Tat-Smad7 进行染色 (由 K14 抗体复染)。

[0023] 图 5. 由 Tat-Smad7 蛋白引起的皮肤的炎症消除。上:处理前, K5. TGF β 1 小鼠的总体照片及其皮肤活检的切片,由于严重炎症而具有加厚 (起皱) 的皮肤和皮疹。下:相同的小鼠处理后 27 天示出显著的改善,具有减少的 pSmad2 和 NF κ B p50。经载体处理的小鼠显示效果 (未显示)。虚线突出了表皮。

[0024] 图 6. 20Gy 照射后,由 Tat-Smad7 蛋白的经口处理引起的加速的体重恢复。在照射后第 5 天开始每日的 Tat-Smad7 处理。用 16Gy 照射给出类似的结果 (未示出)。* :p < 0.05。

[0025] 图 7. 经口 Tat-Smad7 处理加速口腔粘膜炎的愈合。上图中的黑色虚线突出受损区域的中心,白色虚线突出上皮-基质边界。注意在 20Gy 照射后第 9 天 (D9),经载体对照

处理的口腔粘膜发生口腔粘膜炎症,上皮层完全损失,而经 Tat-Smad7 处理的粘膜保留了口腔上皮薄层和大量浸润白细胞。到第 14 天,对照粘膜完成了再上皮化,基质中具有薄的未分化上皮和大量白细胞,而经 Tat-Smad7 处理的粘膜具有几乎完全恢复的形态和分化。用 16Gy 照射在第 9 天诱导对照小鼠的口腔上皮变薄,但经 Tat-Smad7 处理的口腔上皮并非如此。

[0026] 图 8. Tat-Smad7 消除了放射诱导的口腔粘膜炎症的损伤。所有切片来自紧邻 20Gy 照射后第 14 天的受损区域中心的口腔粘膜,CD45 染色除外,其选自照射后第 9 天损伤最严重的区域。使用 K14 抗体来复染上皮层(除了在 TUNEL 测定中)。

[0027] 说明性实施方案详述

[0028] 如上所述,超过 80% 的口腔癌患者使用放射来治疗,并且这些个体中的至少 80% 发生口腔粘膜炎症。此外,使用标准化学治疗方案或上半身放射来治疗的个体中至少 40% 和多至 70% 发生口腔粘膜炎症。例如,由于反复化学治疗,约 70% 的结肠癌患者发生严重的口腔粘膜炎症。因此,口腔粘膜炎症的治疗仅在美国就与数百万患者相关。目前,仍然没有用于癌症患者口腔粘膜炎症的真正有效的疗法。其它炎症性疾病状态对改良疗法有类似的需要。

[0029] 在下文中公开的 Smad7 疗法将对口腔粘膜炎症及其它慢性、急性或周期性/间歇性炎症状态具有显著的治疗作用。因为与现有疗法(例如, **Kepivance®**) 相比,该蛋白质对炎症具有强得多的作用,并且更好地促进伤口愈合,因为局部治疗可以是使用者友好的(例如,由患者施用口服溶液、凝胶或贴剂),所以这些疗法代表了相当大的进步。的确,因为严重口腔粘膜炎症患者通常需要延长的住院时间以应付进食管、脱水和施用阿片类以控制疼痛感,所以本文所述的实施方案代表改善患者的生活质量并显著减轻医疗花费负担的重大机会。

[0030] 使用 Smad7 作为口腔粘膜炎症治疗剂的该方法是完全独特的。特别地,本发明人提出 Smad7 蛋白可容易地重组产生并直接使用或者包封进转导靶细胞的递送载体(例如贴剂、溶液和凝胶)中使用并发挥生物活性。此外,该类型的 Smad7 递送因而应显示出几乎没有副作用的治疗效力。但是,也涵盖 Smad7 的病毒载体递送以及体内诱导和活化。

[0031] 根据本发明的多种实施方案,可以采用本领域技术中的常规分子生物学、微生物学和重组 DNA 技术。在文献中充分地解释了这些技术。参见,例如, Sambrook 等 (1990)。

[0032] A. Smad7 组合物

[0033] mothers against decapentaplegic homolog7 (Smad7) 在之前被鉴定为通过若干机制拮抗 TGF- β 信号转导的拮抗剂,所述机制包括:(a) 阻断 TGF- β 受体介导的磷酸化和 Smad 信号的核易位;(b) 通过特异性泛素-蛋白酶体通路增加 TGF- β 受体和 Smad 信号的降解,以及(c) 抑制 Smad 信号与 Smad 结合元件(SBE)的结合。Smad7 还拮抗其它信号通路,例如 NF- κ B 通路。

[0034] Smad7 蛋白由 SMAD7 基因 (SEQ ID NO:1 和 2) 编码。如同许多其它 TGF- β 家族成员,Smad7 参与细胞信号转导。它是 TGF- β 1 型受体拮抗剂。它阻断 TGF- β 1 和与受体相关的激活因子,阻断对 Smad2 接近。它是抑制性 Smad (I-SMAD),并且由 SMURF2 增强。Smad7 还增强肌分化。

[0035] 在一个实施方案中,本发明涉及 Smad 蛋白质组合物。除完整 Smad7 分子之外,本发明还涉及保持抗炎性活性的多肽片段。片段可以通过对编码区(下文中讨论)内的翻译终

止位点的基因改造来产生。或者,用蛋白水解酶(称为蛋白酶)处理 Smad7 分子可产生多种 N 端、C 端和内部片段。可以根据已知方法来纯化这些片段,例如沉淀(例如,硫酸铵)、HPLC、离子交换色谱、亲和色谱(包括免疫亲和色谱)或多种大小分离(沉降、凝胶电泳、凝胶过滤)。

[0036] 还涵盖 Smad7 的变体 – 它们可以是替换、插入或缺失变体。缺失变体缺少对于活性而言非必需的天然蛋白质的一个或多个残基,包括上述截短突变体。替换变体通常包含蛋白质一个或多个位点处的一个氨基酸替换为另一氨基酸,并且可以设计为调节多肽的一个或多个特性(例如对抗蛋白质水解切割的稳定性),而不损失其它功能或特性。该类替换优选为保守的,即一个氨基酸被一个具有类似形状和电荷的氨基酸所替换。保守替换在本领域中是公知的,并且包括例如,每个氨基酸可以被不同的氨基酸改变或替换。在产生替换变体时,通常考虑亲疏水指数、亲水性、电荷和大小。

[0037] 一种特定类型的变体是融合蛋白。一般而言,该分子为天然分子的全部或大部分在 N 或 C 端与第二多肽的全部或部分相连。例如,融合可采用来自其它物种的前导序列从而允许蛋白质在异种宿主中重组表达。另一有用的融合包括添加功能活性结构域例如抗体表位,以有助于融合蛋白的纯化。另一类型的融合包括连接可充当活化或失活配体之靶标的结构域,从而使得一旦递送到对象即控制融合蛋白的功能。这样的结构域包括,例如,类固醇配体结合结构域(例如,ER、PR、GR),其可被能够独一地活化这些类固醇配体结合结构域和 / 或天然不存在的小分子(例如,4- 羟基他莫昔芬或 RU486) 活化,因此将使得能够通过这些小分子的存在来完全控制 Smad7 的功能。

[0038] 在本发明中特别有用的另一特定形式的融合蛋白是包含蛋白质转导结构域(PTD)的融合蛋白,所述蛋白质转导结构域也称为细胞递送结构域或细胞转导结构域。在本领域中已描述了这样的结构域,并且其一般表征为短的两性肽或阳离子肽和肽衍生物,其通常包含多个赖氨酸和精氨酸残基(Fischer, 2007)。可能最为周知的 PTD 是 HIV 的 TAT 蛋白,及 HSVVP16。另一些实例示于下表 1 中。

表 1 - 蛋白质转导结构域

			SEQ ID NO:	
[0039]	GALFLGWLGAAGSTMGAKKKRKV	1	QAATATRGRSAASRPTERPRAPARS ASRPRRPVE	23
	RQIKIWFQNRMRKWKK	2	MGLGLHLVLAAALQGAJSKRKV	24
	RRMKWKK	3	AAVALLPAVLLALLAPAAANYKKP KL	25
	RRWRRWWRRWWRRWRR	4	MANLGYWLLALFVTMWTDVGLC KKRPPK	26
	RGGRLSYSSRRRFSTSTGR	5	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	27
	YGRKKRRQRRR	6	DPKGDPKGVTVTVTVTGKGDPX PD	28
	RKKRRQRRR	7	PPPPPPPPPPPP	29
	YARAAARQARA	8	VRLPPVRLPPPVRLLPPP	30
	RRRRRRRR	9	PRPLPPRPG	31
	KKKKKKKK	10	SVRRRPRPPYLPRPRPPFFPRLPP RIPP	32
	GWTLSAGYLLGKINLKALAALAK XIL	11	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	33
	LLLLRRRRIRKQANAHSK	12	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	34
	SRRHHCRSKAKRSRHH	13	KWKLEKKIEKVGQNIRDGIKAGPA VAVVGQATQIAK	35
	NRARRNRRRV	14	ALWMTLLKKVLKAAAKAALNAVL VGANA	36
	RQLRIAGRRLRGRSR	15	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQ Q	37
	KLIKGRTPIKFGK	16	INLKALAALAKKIL	38
	RRIPNRRPRR	17	GFFALIPKIISPLPKTLLSAVGSALG GSGGQE	39
	KLALKLALKALKAAKLKLA	18	LAKWALKQGFAKLKS	40
	KLAKLAKKLAKLAK	19	SMAQDIISTIGDLVKWIIQTVNXFTK K	41
	GALFLGFLGAAGSTNGAWSQPKKK RKV	20	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIK QRIKDFLANLVPRTES	42
	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	21	PAWRKAFRWAWRMLKKA	43
	LKKLLKLLKLLKLLKLLKLL	22	KLKLKLKLKLKLKLKLKL	44

[0040] B. 核酸、载体和重组表达

[0041] 在另一个实施方案中,本发明还提供了编码 Smad7 的基因。除鉴定的 SMAD7 基因以外,应清楚,本发明不限于本文所公开的特定核酸。如在下文中所讨论的,“Smad7 基因”可包含多种不同碱基,但仍然产生与本文所公开的人基因在功能上无法区分并且在一些情况下结构相同的相应多肽。

[0042] 1. 编码 Smad7 的核酸

[0043] 根据本发明的核酸可表示整个 Smad7 基因、表达肿瘤抑制功能的 Smad7 结构域,或在本文中给出的 Smad7 序列的任意其它片段。所述核酸可衍生自基因组 DNA,即,从特定生物体的基因组直接克隆。但是,在一些优选的实施方案中,所述核酸包括互补 DNA (cDNA)。还涵盖的是 cDNA 加上天然内含子或来自另一基因的内含子;这样的经改造分子有时称为“微小基因 (mini-gene)”。本发明的这些和其它核酸至少可以在例如凝胶电泳中用作分子量标准。

[0044] 术语“cDNA”意指使用信使 RNA (mRNA) 作为模板制备的 DNA。与基因组 DNA 或由基

基因组 RNA、未加工 RNA 或部分加工 RNA 模板聚合的 DNA 相比,使用 cDNA 的优点是 cDNA 主要包含相应蛋白质的编码序列。有时可优选全部或部分基因组序列,例如在最佳表达需要非编码区时或者在反义策略中靶向非编码区例如内含子时。

[0045] 如本申请中所使用的,术语“编码 Smad7 的核酸”指所分离的不含总细胞核酸的核酸分子。本文所使用的术语“功能等同密码子”指编码相同氨基酸的密码子,例如用于精氨酸或丝氨酸的六个密码子,也指编码生物上等同的氨基酸的密码子,如在下文中所讨论的。

[0046] 考虑到遗传密码的简并性,所述序列的至少约 50%、通常至少约 60%、更通常约 70%、最通常约 80%、优选至少约 90% 以及最优选约 95% 的核苷酸与 Smad7 序列具有同一性。与 Smad7 基本相同的序列在功能上还可限定为能够在标准条件下与包含 Smad7 的互补序列的核酸区段杂交的序列。

[0047] 本发明的 DNA 区段包括编码如上所述的生物功能等同的 Smad7 蛋白和肽的那些。这样的序列可因已知在核酸序列和所编码蛋白质中自然发生的密码子冗余和氨基酸功能等同而产生。或者,可以通过应用重组 DNA 技术来产生功能等同蛋白质或肽,其中可以基于被更换氨基酸的特性来进行蛋白质结构的变化。由人设计的变化可以通过应用定点诱变技术来引入或者可以随机引入并如下文所述在之后针对期望功能进行筛选。

[0048] 2. 用于克隆、基因转移和表达的载体

[0049] 在某些实施方案中,使用表达载体来表达 Smad7 多肽产物,然后可将其纯化用于多种用途。在另一些实施方案中,表达载体用于基因治疗中。表达要求载体提供合适的信号,其包括多种调节元件,例如驱动宿主细胞中目的基因表达的来自病毒和哺乳动物来源二者的增强子/启动子。还限定了设计为优化信使 RNA 稳定性和宿主细胞中翻译能力的元件。还提供了使用许多显性药物选择标志物来建立表达产物之持久、稳定细胞克隆的条件,如将药物选择标志物的表达与多肽的表达相关连的元件。

[0050] 在本申请全文中,术语“表达构建体”意在包括任意类型的包含编码基因产物的其中部分或全部核酸编码序列能够被转录的核酸的遗传构建体。转录物可以被翻译为蛋白质,但其不是必需如此。在某些实施方案中,表达包括基因的转录和 mRNA 翻译为基因产物二者。在另一些实施方案中,表达只包括编码目的基因的核酸的转录。

[0051] 使用术语“载体”指核酸序列可插入其中以被引入其可被复制的细胞中的载体核酸分子。核酸序列可以是“外源的”,其意指核酸序列对于载体被引入其中的细胞而言是外源的,或者所述序列与在细胞中的序列同源但位于其中通常不存在所述序列的宿主细胞核酸内的位置。载体包括质粒、粘粒、病毒(噬菌体、动物病毒和植物病毒)和人工染色体(例如, YAC)。本领域技术人员能够通过标准重组技术来构建载体,所述标准重组技术描述于 Sambrook 等.(1989) 和 Ausubel 等.(1994) 中,二者通过引用并入本文。

[0052] 术语“表达载体”指包含编码至少部分基因产物的能够被转录的核酸序列的载体。在一些情况下, RNA 分子之后被翻译为蛋白质、多肽或肽。在另一些情况下,这些序列不被翻译,例如,在产生反义分子或核糖酶时。表达载体可包含多种“控制序列”,所述“控制序列”指在特定宿主生物体中有效连接的编码序列的转录和可能的翻译所须的核酸序列,包括启动子和增强子。除控制转录和翻译的控制序列以外,载体和表达载体可包含提供其他功能的核酸序列例如转录终止信号和聚腺苷酸化位点。

[0053] 某些病毒载体有效地感染或进入细胞以整合入宿主细胞基因组并稳定表达病毒

基因的能力导致许多不同病毒载体系统的开发和应用 (Robbins 等,1998)。病毒系统目前被开发用作离体和体内基因转移的载体。例如,目前,正针对疾病例如癌症、囊性纤维化、戈谢病、肾病和关节炎的治疗,对腺病毒、单纯疱疹病毒、慢病毒、逆转录病毒和腺相关病毒进行评估 (Robbins 和 Ghivizzani,1998;Imai 等,1998;美国专利 5,670,488)。取决于特定基因治疗应用,多种病毒载体示出特定优点和缺点。

[0054] 认为用于与本发明一起使用的用于转化器官、细胞、组织或生物体的核酸递送的合适非病毒方法事实上包括如本文所述或如本领域普通技术人员已知的可以将核酸(例如,DNA)引入器官、细胞、组织或生物体的任何方法。这样的方法包括但不限于 DNA 的直接递送,例如通过注射(美国专利 5,994,624、5,981,274、5,945,100、5,780,448、5,736,524、5,702,932、5,656,610、5,589,466 和 5,580,859,均通过引用并入本文),包括显微注射(Harland 和 Weintraub,1985;美国专利 5,789,215,其通过引用并入本文);通过电穿孔(美国专利 5,384,253,其通过引用并入本文);通过磷酸钙沉淀(Graham 和 Van Der Eb,1973;Chen 和 Okayama,1987;Rippe 等,1990);通过使用 DEAE-葡聚糖,然后聚乙二醇(Gopal,1985);通过直接声载荷(Fechheimer 等,1987);通过脂质体介导的转染(Nicolau 和 Sene,1982;Fraley 等,1979;Nicolau 等,1987;Wong 等,1980;Kaneda 等,1989;Kato 等,1991);通过微弹轰击(PCT 申请号 W094/09699 和 95/06128;美国专利 5,610,042、5,322,783、5,563,055、5,550,318、5,538,877 和 5,538,880,均通过引用并入本文);通过用碳化硅纤维搅拌(Kaeppler 等,1990;美国专利 5,302,523 和 5,464,765,均通过引用并入本文);或者通过 PEG 介导的原生质体转化(Omirulleh 等,1993;美国专利 4,684,611 和 4,952,500,均通过引用并入本文);通过干燥/抑制介导的 DNA 摄取(Potrykus 等,1985)。通过应用例如这些技术,器官、细胞、组织或生物体可以被稳定地或暂时地转化。

[0055] 5. 表达系统

[0056] 存在许多包含上述组合物的至少一部分或全部的表达系统。可以采用基于原核生物和/或真核生物的系统用于与本发明一起使用以产生核酸序列或其同源多肽、蛋白质和肽。许多这样的系统是市售的并且广泛可得。

[0057] 昆虫细胞/杆状病毒系统可产生异源核酸区段的高水平蛋白质表达,例如在美国专利 5,871,986 和 4,879,236 中所述(二者通过引用并入本文),其可以例如以名称 **MaxBac[®] 2.0** 购自 **Invitrogen[®]** 和 BacPack[™]Baculovirus Expression System From **Clontech[®]**。

[0058] 表达系统的另一些实例包括 **Stratagene[®]** 的 Complete Control[™]可诱导哺乳动物表达系统,其包括合成蜕化素-可诱导受体,或其 pET 表达系统(大肠杆菌表达系统)。可诱导表达系统的另一实例可得自 **Invitrogen[®]**,其携带 T-Rex[™](四环素调节表达)系统,使用全长 CMV 启动子的可诱导哺乳动物表达系统。**Invitrogen[®]** 还提供称为 Pichia methanolica 表达系统的酵母表达系统,其设计用于在甲基营养型酵母 Pichia methanolica 中产生高水平重组蛋白。本领域技术人员会知道如何表达载体(例如表达构建体)以产生核酸序列或其同源多肽、蛋白质或肽。

[0059] 原代哺乳动物细胞培养物可以多种方法制备。为了使细胞在体外以及与表达构建体接触时存活,有必要确保细胞保持与正确比例的氧和二氧化碳及营养物接触但保护其不

受微生物污染。细胞培养技术有很多记载。

[0060] 前述的一个实施方案涉及采用基因转移来使细胞永生化以生产蛋白质。可以按照如上所述将目的蛋白的基因转入合适的宿主细胞中,然后在合适的条件下进行细胞培养。以该方式可以采用事实上任何多肽的基因。在上文中讨论了重组表达载体的产生和其中所包括的元件。或者,待产生的蛋白质可以是正常情况下由所述细胞合成的内源蛋白质。

[0061] 有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是 Vero 和 HeLa 细胞和中国仓鼠卵巢细胞系、W138、BHK、COS-7、293、HepG2、NIH3T3、RIN 和 MDCK 细胞。此外,可以选择以期望方式调节插入序列的表达,或者修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物这样的修饰(例如,糖基化)和加工(例如,切割)对于蛋白质的功能而言可以是重要的。就蛋白质的翻译后加工和修饰而言,不同宿主细胞具有特有和特定机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统以确保所表达的外源蛋白正确修饰和加工。

[0062] 可以使用许多选择系统,包括但不限于分别在 tk⁻、hgprt⁻ 或 aprt⁻ 细胞中的 HSV 胸苷激酶、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶和腺嘌呤磷酸核糖转移酶基因。此外,可以采用抗代谢物抗性作为选择的基础:dhfr,其赋予抗性;gpt,其赋予对霉酚酸的抗性;neo,其赋予对氨基糖苷 G418 的抗性;以及 hyg^r,其赋予对潮霉素的抗性。

[0063] 如本文所使用的,术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可以互换使用。所有这些术语还包括其子代,其为任意和全部后代。应理解,由于有意突变或非有意突变,所有子代可以是不相同的。在表达异源核酸序列的上下文中,“宿主细胞”指原核或真核细胞,并且其包括任何能够复制载体和/或表达由载体编码的异源基因的可转化生物体。宿主细胞可被用作并且已被用作载体的接受体。宿主细胞可以是“转染的”或“转化的”,其指外源核酸被转移入或引入宿主细胞的过程。经转化细胞包括原代对象细胞及其子代。

[0064] 宿主细胞可来自原核生物或真核生物,这取决于期望结果是载体的复制还是编码载体的核酸序列的部分或全部的表达。许多细胞系和培养物可用作宿主细胞,并且他们可获自美国模式菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC), ATCC 是作为活培养物和遗传材料的收藏所的组织(atcc.org)。本领域技术人员可根据载体骨架和期望结果来确定合适的宿主。例如,可以将质粒或粘粒引入原核宿主细胞用于许多载体的复制。用于载体复制和/或表达的用作宿主细胞的细菌细胞包括 DH5 α 、JM109 和 KC8,以及许多市售细菌宿主例如 **SURE**[®] Competent Cells 和 Solopack[™] Gold Cells(**Stratagene**[®], La Jolla)。或者,可以将细菌细胞例如大肠杆菌 LE392 用作噬菌体病毒的宿主细胞。

[0065] 用于载体的复制和/或表达的真核宿主细胞的实例包括 HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、Cos、CHO、Saos 和 PC12。来自多种细胞类型和生物体的许多宿主细胞是可得的并且为本领域技术人员所已知。类似地,病毒载体可与真核宿主细胞或原核宿主细胞(特别是允许载体复制或表达的那些)联合使用。

[0066] 一些载体可以采用使其在原核细胞和真核细胞二者中复制和/或表达的控制序列。本领域技术人员还会理解繁育所有上述宿主细胞以维持它们并使得载体复制的条件。还理解和已知的是使得大规模生产载体以及生产由载体编码的核酸及其同源多肽、蛋白质或肽的技术和条件。

[0067] C. 炎症疾病状态

[0068] 1. 慢性伤口

[0069] 慢性伤口是在大多数伤口愈合的一系列阶段和可预测量的时间内不愈合的伤口；通常认为在 3 个月内不愈合的伤口是慢性的。慢性伤口似乎停留在伤口愈合阶段中的一个或更多个。例如，慢性伤口通常在炎性阶段停留太长时间。在急性伤口中，分子（例如胶原）的产生和降解之间有精确的平衡；在慢性伤口中，失去了该平衡，并且降解起到太大的作用。

[0070] 慢性伤口可永远不会愈合或者可需要数年来愈合。这些伤口对患者造成严重的精神压力和生理压力以及对患者和整个医疗保健系统造成重大经济负担。急性伤口和慢性伤口在伤口愈合类型谱的相对端，它们以不同速率向愈合进展。大多数慢性伤口可分为 3 类：静脉溃疡、糖尿病性溃疡和压力溃疡。未落在这些类别中的一小部分伤口可以是由于例如放射中毒或局部缺血的原因。

[0071] 静脉和动脉溃疡。静脉溃疡，其通常发生于腿中，占慢性伤口的约 70% 至 90%，并且主要影响年长者。认为他们是由于由存在于静脉中用以防止血液回流的瓣膜功能不当引起静脉高压。由功能障碍引起的局部缺血与再灌注损伤的组合引起导致伤口的组织损伤。

[0072] 糖尿病性溃疡。慢性伤口的另一主要原因糖尿病日益流行。由于慢性溃疡，糖尿病患者具有比一般人群高出 15% 的截肢风险。糖尿病引起神经病，其抑制伤害感受和疼痛感知。因此，开始时患者可能未注意到腿和足的小伤口，并可能因此未能防止感染和重复损伤。此外，糖尿病引起免疫损害和对小血管的损伤，阻止组织的充分充氧，其可以造成慢性伤口。压力也在糖尿病性溃疡的形成中起作用。

[0073] 压力溃疡。另一主要类型的慢性伤口是压力溃疡，其通常发生在抑制通常经受压力的身体部分（例如脚跟、肩胛和骶骨）运动的病症（例如麻痹）的患者中。压力溃疡是由在对组织的压力大于毛细血管中的压力因而限制血液流进所述区域时的局部缺血引起的。与皮肤相比需要更多氧和营养物的肌组织示出对长时间压力的最差影响。如在其他慢性溃疡中的一样，再灌注损伤伤害组织。

[0074] 慢性伤口可以只影响表皮和真皮，或者他们可影响组织直至筋膜。起初，它们可以由与引起急性伤口相同的事件（例如手术或意外创伤）形成，或者他们可以因全身感染、血管、免疫或神经机能不全、或合病例如瘤形成或代谢紊乱而形成。损伤变为慢性的原因是例如反复创伤、连续压力、局部缺血或疾病的因素超出机体处理损伤的能力。

[0075] 虽然最近在慢性伤口的研究方面实现了很大进步，但其愈合的研究进展慢于预期。这部分地因为动物研究是困难的，因为动物不获得慢性伤口，这是因为他们通常具有快速收缩的疏松皮肤，并且他们通常不会变得足够老或者患相关疾病例如神经病或慢性衰弱疾病。但是，现在目前的研究了解了引起慢性伤口的一些主要因素，其中为局部缺血、再灌注损伤和细菌定植。

[0076] 局部缺血。局部缺血是伤口形成和持续的重要因素，尤其是当其反复发生时（其经常如此）或者当与患者的老龄组合时。局部缺血使组织变得发炎以及细胞释放吸引嗜中性粒细胞的因子例如白细胞介素、趋化因子、白三烯和补体因子。

[0077] 在其对抗病原体时，嗜中性粒细胞也释放损伤细胞的炎性细胞因子和酶。它们的重要工作之一是产生活性氧簇（ROS）以杀伤细菌，对于此它们使用称为髓过氧化物酶的酶。由嗜中性粒细胞和其它白细胞产生的酶和 ROS 通过损伤 DNA、脂质、蛋白质、ECM 和加速愈合的细胞因子来损伤细胞并阻止细胞增殖和伤口闭合。嗜中性粒细胞在慢性伤口中停留的时

间比在急性伤口中长,并且促成了这样的事实:慢性伤口具有较高水平的炎性细胞因子和 ROS。因为来自慢性伤口的伤口流体具有过多的蛋白酶和 ROS,所以流体本身可以通过抑制细胞生长和分解 ECM 中的生长因子和蛋白质来抑制愈合。

[0078] 细菌定植。因为伤口环境中较多的氧使得白细胞产生 ROS 以杀伤细菌,所以组织充氧不足的患者(例如在手术过程中经历体温降低的那些)有较高的感染风险。宿主对细菌存在的免疫应答延长炎症时间,推迟愈合并损伤组织。感染不仅可引起慢性伤口,还可引起坏疽、失去受感染肢体以及患者死亡。

[0079] 如同局部缺血,细菌定植和感染通过使较大数目的嗜中性粒细胞进入伤口部位来损伤组织。在有慢性伤口的患者中,可能有时间产生对抗生素有抗性的细菌。此外,携带抗药性细菌菌株例如抗甲氧西林金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, MRSA)的患者有更多慢性伤口。

[0080] 生长因子和蛋白质水解酶。慢性伤口与急性伤口相比的不同之处还在于其蛋白质水解酶(例如弹性蛋白酶)和基质金属蛋白酶(MMP)水平较高,但其生长因子(例如血小板衍生生长因子和角质形成细胞生长因子)的浓度较低。

[0081] 因为生长因子(GF)在及时伤口愈合中是必要的,所以不充足的 GF 水平可以是慢性伤口形成中的重要因素。在慢性伤口中,生长因子的形成和释放可以被阻止,所述因子可以被螯合并无法进行其代谢作用,或者被细胞或细菌蛋白酶过度降解。

[0082] 慢性伤口(例如糖尿病性溃疡和静脉溃疡)还由成纤维细胞未能产生充足的 ECM 蛋白质以及由角质形成细胞未能使伤口上皮化引起。慢性伤口中成纤维细胞基因表达不同于急性伤口。

[0083] 虽然所有伤口都需要一定水平的弹性蛋白酶和蛋白酶以正确愈合,但浓度太高是有害的。伤口区域的白细胞释放弹性蛋白酶,其增加炎症,破坏组织、蛋白聚糖和胶原,并损伤生长因子、纤连蛋白和抑制蛋白酶的因子。弹性蛋白酶的活性由人血清白蛋白增加,人血清白蛋白是见于慢性伤口中的最丰富的蛋白质。但是,白蛋白不足的慢性伤口尤其不太可能愈合,因此在未来,调节伤口的该蛋白质水平可证实有助于愈合慢性伤口。

[0084] 由白细胞释放的过量基质金属蛋白酶也可使伤口变为慢性。MMP 分解 ECM 分子、生长因子和蛋白酶抑制因子,因而增加降解同时减少构建,使生产和降解之间的精密折衷失衡。

[0085] 2. 急性伤口 / 创伤

[0086] 生理创伤是严重的和改变机体的生理损伤,例如除去肢体。钝力创伤是通过由或用钝物施加的影响或其他力引起的一类生理创伤,而穿透性创伤是其中皮肤或组织被对象穿过的一类生理创伤。创伤还可描述为未计划的(例如事故)或者计划的(在手术的情况下)二者。二者均可表征为中度至严重的组织损伤、血液损失和 / 或休克,并且二者均可引起后续感染,包括脓毒症。本发明用以处理创伤,包括预处理(在医疗过程的情况下)和创伤发生后进行的处理二者。

[0087] 手术。手术对患者采用可操作的人工和仪器技术来研究和 / 或治疗病理学病症例如疾病或损伤,以帮助提高机体功能或外观,或者有时出于一些其它原因。本发明可解决由手术引起的创伤,如在下文中进一步限定的。

[0088] 一般而言,当一个过程涉及切患者的组织或者闭合之前持续的伤口时,认为该过

程是手术。如果不必然落在该范畴内的其它过程例如血管成形术或内镜检查涉及常规手术过程或设置的话（所述常规手术过程或设置例如使用灭菌环境、麻醉、杀菌条件、典型手术器具及缝合或吻合），则它们可被认为是手术。认为所有形式的手术都是侵入过程；所谓的无创手术通常指不穿透所针对结构的切除术（例如，角膜的激光消融）或者放射手术过程（例如，肿瘤的照射）。手术可持续数分钟至数小时。

[0089] 手术过程通常通过紧急性、过程的类型、所涉及的机体系统、侵袭的程度和特殊器具来分类。进行任选手术以纠正不危及生命的病症，并且任选手术在患者的要求下根据外科医生和手术机构的可获得性而实施。紧急手术是必须快速进行以挽救生命、肢体或功能性能力的手术。进行探索性手术以辅助或确认诊断。治疗性手术治疗在之前经诊断的病症。

[0090] 截肢涉及切去身体部分，通常是肢体或趾。再植涉及重新连接切断的身体部分。重建手术涉及重建机体受损的、切断的或者畸形的身体部分。进行整容手术以改善在其它方面正常的结构的外观。切除术是从患者切除器官、组织或其他身体部分。移植手术是通过将来自其它人（或动物）另一器官或身体部分插入患者来替换器官或身体部分。从活人或动物除去器官或身体部分用于移植也是一种手术类型。

[0091] 当手术在一个器官系统或结构上进行时，可通过所涉及的器官、器官系统或组织来进行分类。实例包括心脏手术（在心脏上进行）、胃肠手术（在消化道及其附属器官内进行）和整形外科手术（在骨和 / 或肌肉上进行）。

[0092] 微创手术涉及将小型化器具插入体腔或结构中的较小外切口，如在腹腔镜手术或血管成形术中。相反，开放手术过程需要大切口以到达目的区域。激光手术涉及使用激光代替解剖刀或类似的手术器具来切割组织。显微手术涉及外科医生使用手术显微镜来观察小结构。机器人手术采用手术机器人（例如 Da Vinci 或 Zeus 手术系统）来在外科医生的指导下控制器具。

[0093] 3. 自身免疫 / 炎性疾病

[0094] 本发明涵盖治疗多种自身免疫和 / 或炎性疾病状态，例如脊椎关节病、强直性脊椎炎、银屑病性关节炎、反应性关节炎、肠病性关节炎、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、肠易激疾病、炎性肠病、类风湿性关节炎、幼年型类风湿关节炎、家族性地中海热、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、舍格伦综合征、早期关节炎、病毒性关节炎、多发性硬化症或银屑病。这些疾病的诊断和治疗在文献中有很多记录。

[0095] 4. 化学治疗、放射治疗和细胞因子治疗毒性

[0096] 多种形式的癌症治疗（包括化学治疗、放射治疗和细胞因子）与癌症患者中的毒性（有时为严重毒性）相关。在毒性至少部分是由组蛋白的胞外作用引起的程度下，本发明寻求使用本发明的药物组合物来降低该毒性，从而减轻或缓解患者部分的不适以及允许更高剂量的治疗。

[0097] 口腔癌（世界范围内第 6 常见的癌症）是头颈癌的亚型，它是位于口腔中的任何癌性组织生长。它可以作为在任何口腔组织中发生的原发性病变产生，通过从远端发源部位转移或者通过从相邻解剖学结构（例如鼻腔）扩展，或者口腔癌可以在口的任意组织中发生，并且可以为多种组织学类型：畸胎瘤、产生自大或小唾液腺的腺癌、产生自扁桃体或其他淋巴组织的淋巴瘤，或来自口腔粘膜的产色素细胞的黑素瘤。有数种类型的口腔癌，但约 90% 是鳞状细胞癌，发生在构成口和唇的组织中。口腔癌最常涉及舌。其还可发生在口

底、颊衬、牙龈（齿龈）、唇或上颚（口腔顶部）。在显微镜下大多数口腔癌看起来非常相似，并且被称为鳞状细胞癌。它们是恶性的并且倾向于快速扩散。

[0098] 超过 80% 的口腔癌患者用放射治疗来治疗，而这些个体中的至少 75% 将产生口腔粘膜炎症。口腔粘膜炎症是慢性口腔溃疡。该疾病常常发生于所有癌症类型的放射治疗患者、因器官移植进行放射治疗的患者（以消除移植物的排斥）和经历常规放射治疗的患者。严重的口腔粘膜炎症极其疼痛，并且不利于食物 / 液体摄取，因此通常是癌症治疗最严重的并发症。口腔粘膜炎症是确定头颈区放射治疗和化学治疗的最大可行剂量的主要因素；其可显著地使癌症治疗复杂化，延长住院时间，降低生活质量和增加花费。目前，没有确立有效治疗严重口腔粘膜炎症的疗法。迄今为止，**Kepivance®**（人角质形成细胞生长因子（KGF）的重组蛋白）是唯一的 FDA 批准通过静脉内注射在骨髓移植患者中用于严重口腔粘膜炎症的药物，其在癌症患者中的用途有待确定。因此，该药物仅可用于 4% 的风险群体。由于静脉内途径，其的不利之处还在于有对医疗服务提供者的需要。另一些潜在的治疗剂包括局部冲洗剂，例如粘性 2% 利多卡因冲洗剂或小苏打和盐水溶液，或混和物溶液，例如 BAX（利多卡因、苯海拉明、山梨醇和胃能达）。另一些研究性或粘膜保护（mucoprotective）辅药治疗剂包括但不限于 β -胡萝卜素、生育酚、激光照射、用硝酸银预防性刷口腔粘膜、米索前列醇、甲酰四氢叶酸、系统性 KGF、己酮可可碱、别嘌呤醇漱口剂、全身性蔗糖铝、葡萄糖酸氯己定和冷冻治疗。

[0099] 化学治疗和放射诱导的肠粘膜炎症是因快速分裂的肠上皮细胞的急性死亡而产生的炎性病症。单独、与药物组合或者与放射组合用于治疗实体肿瘤的大多数化学治疗药物将导致大量肠上皮细胞死亡。随之而来的粘膜炎症的临床表现包括消化症状例如恶心和呕吐、严重腹泻、急性体重减轻和消瘦。这迅速成为许多癌症患者实施化学治疗的限制性因素之一。Tat-Smad7 保护肠上皮细胞免于化学治疗剂、放射或其组合的能力将显著降低癌症治疗的非期望副作用，并且使得能够用现有工具以更积极的方式治疗疾病。

[0100] 骨髓衰竭综合征是在造血干细胞区被损伤且无法产生正常细胞类型的时发生的一系列病症。骨髓衰竭作为遗传性基因异常、暴露于有害物质（例如毒素、化学品或病毒）的结果而发生。虽然仍未完全地理解可导致产生获得性骨髓衰竭的环境因素的性质和特征，但是已将几种因素与军人的获得性骨髓衰竭的产生相关联，包括暴露于芥子气、电离放射和感染原，例如内脏利什曼病或非洲锥虫病。处理骨髓衰竭综合征的最佳方法仍然是 HSC 的移植，除非在这些压力下可以留下充足数量的剩余残留 BM HSC 并且刺激其重新产生造血区。如本文所述，Smad7 的调节应能够使得在显示出与骨髓衰竭相一致的临床标志的患者中对剩余残留 HSC 进行有意的保护。

[0101] 5. 联合抗炎性治疗

[0102] 在医学的许多领域中常见的是使用多种治疗形式来治疗疾病，通常称为“联合治疗”。炎性疾病也不例外。为了使用本发明的方法和组合物治疗炎性病症，一般使靶细胞、器官或对象与 Smad7 蛋白、表达构建体或活化剂和至少一种其它治疗接触。这些治疗将以有效实现一个或更多个疾病参数的降低的组合物量提供。该方法可涉及使细胞 / 对象与两种试剂 / 治疗同时接触，例如，使用包含两种试剂的单一组合物或药物制剂，或者通过使细胞 / 对象与两种不同的组合物或制剂同时接触，其中一种组合物包含 Smad7 试剂而另一组合物包含其他试剂。

[0103] 或者, Smad 试剂可以在其他治疗之前或之后间隔几分钟到几周。一般要确保每次递送之间的时间不超过很大的时间段, 使得治疗仍然能够对细胞 / 对象发挥有益的组合作用。在这样的情况中, 涵盖使细胞与两种形式 (modalities) 在彼此之间约 12 至 24 小时内, 在彼此之间约 6 至 12 小时内, 或者以仅约 12 小时的延时接触。在一些情况下, 可以期望显著地延长治疗时间; 但是, 各施用之间的间隔为几天 (2、3、4、5、6 或 7) 到几周 (1、2、3、4、5、6、7 或 8)。

[0104] 可以设想的是, Smad7 试剂或其他治疗的超过一次的施用将是期望的。可以采用多种组合, 其中 Smad7 试剂是“A”, 另外的治疗是“B”, 如以下所示例:

[0105] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

[0106] A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

[0107] A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

[0108] 也涵盖其他组合。适用于对抗炎性病症的联合治疗剂中的其它试剂包括类固醇、糖皮质激素、非类固醇性抗炎性药物 (NSAIDS; 包括 COX-1 和 COX-2 抑制剂)、阿司匹林、布洛芬和萘普生。止痛剂通常与抗炎性药物联合, 但其不具有抗炎作用。一个实例是扑热息痛, 在美国称为醋氨酚, 并且以商品名 Tylenol 出售。与通过抑制 COX 酶减轻疼痛和炎症的 NSAIDS 相反, 扑热息痛最近被证实阻断内源性大麻素的再摄取, 其仅减轻疼痛, 可能解释了为何它对炎症具有程度最低的作用。用于组合使用的一个特定试剂是抗 TGF- β 抗体。

[0109] 技术人员参见“Remington's Pharmaceutical Sciences”第 15 版, 第 33 章, 特别是第 624 至 652 页, 1990。将根据被治疗对象的情况必要地在剂量上发生一些变化。无论如何, 负责施用的人将确定对于个体对象而言合适的剂量。此外, 为了人的施用, 制剂应满足 FDA 生物制品标准局 (Office of Biologics standards) 所要求的灭菌、热原、一般安全和纯度标准。

[0110] 还应指出, 前述任意治疗剂可被证实本身就在治疗炎症中 useful。

[0111] 6. 与癌症治疗联合

[0112] 如上所述, 本发明与由某些抗癌治疗引起的 DNA 损伤和 / 或炎症具有特殊相关性。因此, 特别地, 本发明可与癌症治疗联合应用。虽然癌症治疗针对癌症, 但不幸的是他们造成严重副作用。因此, 本发明的 Smad7 试剂可以有利地与这样的癌症治疗联合使用。该方法可涉及使细胞、器官或患者与试剂 / 治疗同时接触, 包括通过使细胞、器官或患者与包含两种试剂的单一组合物或者药物制剂接触, 或者与两种不同的组合物或制剂同时接触, 其中一种组合物包含 Smad7 试剂而另一组合物包含其他试剂。或者, 与上文中给出的表类似, 组合物可以在不同时间递送, 包括重复剂量的一种或两种试剂。

[0113] 适用于联合治疗的试剂或因素包括任何当施用于细胞时诱导 DNA 损伤的化合物或治疗方法。这样的试剂和因素包括诱导 DNA 损伤的放射和波, 例如照射、微波、电子发射等。多种化合物 (也描述为“化学治疗剂”或“基因毒剂”) 旨在用于本文所公开的联合治疗方法中。在根据本发明治疗癌症时, 使肿瘤细胞与试剂及表达构建体接触。这可以通过照射局部肿瘤部位来实现; 或者, 可以通过向对象施用治疗有效量的药物组合物来使肿瘤细胞与试剂接触。

[0114] 涵盖多种用于与本发明的肽联合使用的化学治疗剂。例如, 选择性雌激素受体拮抗剂 (“SERM”), 例如它莫西芬、4-羟基它莫西芬 (Afimoxfene)、Falsodex、雷洛昔芬、巴多

昔芬、氟米芬、Femarelle、拉索昔芬、奥美昔芬和托瑞米芬。

[0115] 所涵盖的有用化学治疗剂包括例如喜树碱、放射菌素-D、丝裂霉素 C。本发明还涵盖使用一种或更多种 DNA 损伤剂（无论是基于放射的还是实际的化合物）的组合，例如使用 X-射线与顺铂，或者使用顺铂与依托泊苷。如上所述，可以通过将试剂与 MUC1 肽组合来制备试剂并用作组合的治疗组合物或药盒。

[0116] 热休克蛋白 90 是见于许多真核细胞中的调节蛋白。HSP90 抑制剂示出可用于治疗癌症。这样的抑制剂包括格尔德霉素、17-(烯丙基氨基)-17-去甲氧格尔德霉素、PU-H71 和利福布汀。

[0117] 还设想了直接交联 DNA 或形成加成物的试剂。可以使用试剂例如顺铂，和其他 DNA 烷化剂。顺铂广泛用于治疗癌症，用于临床应用中的有效剂量为每 3 周 20mg/m² 5 天，总计 3 个疗程。顺铂不经口吸收，并且因此必须通过静脉内、皮下、瘤内或腹膜内注射来递送。

[0118] 损伤 DNA 的试剂还包括干扰 DNA 复制、有丝分裂和染色体分离的化合物。这样的化学治疗化合物包括亚德里亚霉素，也称为多柔比星、依托泊苷、维拉帕米、足叶草毒素等。在临床背景下广泛用于治疗瘤时，这些化合物这样施用，对于多柔比星，以 21 天的间隔通过静脉内团注施用 25 至 75mg/m² 的剂量，对于依托泊苷，静脉内注射 35 至 50mg/m²，或者经口施用加倍的静脉内剂量。还涵盖微管抑制剂，例如紫杉烷。这些分子是由紫杉 (Taxus) 属的植物产生的二萜，并且包括紫杉醇和多烯紫杉醇。

[0119] 上皮生长因子受体抑制剂（例如 Iressa、mTOR（哺乳动物的雷帕霉素靶标，也称为 FK506 结合蛋白 12-雷帕霉素相关蛋白 1 (FRAP1)）是调节细胞生长、细胞增殖、细胞运动、细胞存活、蛋白质合成和转录的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。因此，涵盖雷帕霉素及其类似物（“rapalogs”）用于根据本发明的癌症联合治疗。

[0120] 与本文所要求保护的肽组合的另一可能的治疗剂是 TNF- α （肿瘤坏死因子- α ），它是参与全身炎症的细胞因子和刺激急性期反应的一组细胞因子的成员。TNF 的主要作用在于调节免疫细胞。TNF 还可以诱导凋亡性细胞死亡，诱导炎症以及抑制肿瘤发生和病毒复制。

[0121] 破坏核酸前体和亚单位的合成和保真度的试剂也引起 DNA 损伤。因此，开发了许多核酸前体。特别有用的是经历深入测试并且已可获得的试剂。因此，瘤性组织优先使用试剂例如 5-氟尿嘧啶 (5-FU)，使得该试剂特别可用于靶向瘤性细胞。虽然毒性很强，但 5-FU 可用于多种载体（包括局部的），但是，通常使用剂量范围为 3 至 15mg/kg/天的静脉内施用。

[0122] 引起 DNA 损伤并且已被广泛使用的另一些因素包括通常称为 γ -射线、x-射线的那些，和 / 或放射性同位素到肿瘤细胞的直接递送。还涵盖其他形式的 DNA 损伤因素例如微波和 UV 照射。最有可能的是所有这些因素对 DNA 前体、DNA 的复制和修复及染色体的组装和维持产生广泛范围的损伤 DNA。x-射线范围的剂量范围从每日 50 至 200 伦琴保持延长的时间段（3 周至 4 周）至 2000 至 6000 伦琴的单次剂量。放射性同位素的剂量范围变化广泛，并且取决于同位素的半衰期、所发射的放射的强度和类型以及瘤性细胞的摄取。

[0123] 技术人员参见“Remington's Pharmaceutical Sciences”第 15 版，第 33 章，特别是第 624 至 652 页。将根据被治疗对象的情况必要地在剂量上发生一些变化。无论如何，负责施用的人将确定对于个体对象而言合适的剂量。此外，为了人的施用，制剂应满足 FDA

生物制品标准局 (Office of Biologics standards) 所要求的灭菌、热原、一般安全和纯度标准。

[0124] 除了将 Smad7 治疗剂与化学治疗和放射治疗组合以外,还涵盖与免疫治疗、激素治疗、毒素治疗和手术组合。特别地,可采用靶向治疗剂,例如阿瓦斯汀、爱必妥、格列卫、赫赛汀和瑞图宣 (Rituxan)。

[0125] 在另一些实施方案中,为了评价在口腔粘膜炎症背景下 Smad7 的作用和机制,开发了“基因-转换”(gene-switch) 转基因小鼠模型以使得控制特别是口腔上皮中 Smad7 转基因表达的水平 and 持续时间。根据这些实施方案,这些模型可用于测试其它基因或下游分子对口腔上皮和口腔粘膜的作用。因此,这些模型可用于,但不限于进一步分析口腔伤口愈合生物学和测试口腔伤口愈合的治疗方法。在这些研究中鉴定的分子 Smad7 靶标可以为患有口腔粘膜炎症的对象提供另外的治疗靶标。本文开发的模型和资源可以为用以鉴定与 Smad7 过表达和控制相关之生物标志物和治疗靶标的分析研究提供独特工具,例如,可以将由 Smad7 启动或结合的下游分子鉴定为另外的治疗靶标,例如用以治疗口腔粘膜炎症、银屑病和因 TGF- β 活性和 NF κ B 活性恶化的其他病症。

[0126] D. 制剂和递送途径

[0127] 考虑临床应用时,将需要以适于目的应用的形式制备药物组合物-蛋白质、表达载体、病毒储库、蛋白质和药物。一般而言,必需使制备的组合物基本上没有热原,以及其它可能对人或动物有害的杂质。

[0128] 一般期望采用合适的盐和缓冲剂来使递送载体稳定并使得被靶细胞摄取。当重组细胞引入患者时,也将使用缓冲剂。本发明的水性组合物包含溶解或分散于可药用载体或水性介质中的有效量的载体至细胞。这样的组合物还指接种物。短语“可药用”指当施用于动物或人时不产生副作用、过敏反应或其他不利反应的分子实体和组合物。如本文所使用的,“可药用载体”包括任何和全部溶剂、分散介质、包衣剂、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。对于药物活性物质而言,这样的介质和试剂的使用在本领域中是公知的。除了目前不与本发明的载体或细胞相容的任何常规介质或试剂之外,还涵盖它们在治疗组合物中的应用。补充的活性成分也可掺入组合物中。

[0129] 本发明的活性组合物可以包括典型的药物制剂。根据本发明的这些组合物的施用将经由任何常规途径进行,只要靶组织通过那种途径可及即可。这包括经口、鼻、颊、直肠或局部施用。或者,施用可以通过原位、皮内、皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射。如上所述,这样的组合物通常作为可药用组合物正常施用。特别令人感兴趣的是直接瘤内施用、肿瘤灌注、或局部或区域性地施用于肿瘤,例如,在局部或区域性的脉管系统或淋巴系统中,或在经过切除的肿瘤床中。

[0130] 作为游离碱或可药用盐的活性化合物的溶液可以在适当地混有表面活性剂(如羟丙基纤维素)的水中进行制备。分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇、和其混合物中以及在油中制备。在平常的保存和应用条件下,这些制剂包含防腐剂以防止微生物生长。

[0131] 适合用于注射使用的药物形式包括,灭菌水溶液或分散体和用于即时制备灭菌注射液或分散体的灭菌粉末。在所有情况下,所述形式必须是灭菌的并且在必须以足够易于注射的流体形式存在。制剂在制造和保存的条件下必须是稳定的并且必须以抵抗微生物(例如细菌和真菌)的污染作用而被保存。载体可以是含有以下的溶剂或分散介质:例如,

水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇、和液体聚乙二醇等）、它们的合适的混合物，和植物油。可以例如通过使用包衣（例如卵磷脂），在分散体的情况下通过维持所需颗粒大小和通过应用表面活性剂来维持适当的流动性。可以通过多种抗细菌和抗真菌剂（例如，对羟基苯甲酸脂类、氯丁醇、酚、山梨酸、硫柳汞等）来防止微生物的作用。在许多的情况下，将优选包括等渗剂，例如，糖或氯化钠。可以通过在组合物中应用延迟吸收剂（例如，单硬脂酸铝和明胶）来延长可注射组合物的吸收。

[0132] 通过将所需量的活性化合物掺入含有在上文中列举的多种其它成分的合适溶剂中然后根据需要进行过滤除菌来制备灭菌注射溶液。一般而言，通过将多种灭菌活性成分掺入含有基本分散介质和上述所列举的所需其它成分的灭菌载剂中来制备分散体。在用于制备灭菌可注射溶液的灭菌粉末的情况下，一些优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术，其产生来自其之前过滤灭菌溶液的活性成分和任意其它期望成分的粉末。

[0133] 如本文所使用的，“可药用载体”包括任何和全部溶剂、分散介质、包衣剂、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。对于药物活性物质而言，这样的介质和试剂的使用在本领域中是公知的。除了已知不与所述活性成分相容的任何常规介质或试剂之外，还涵盖它们在治疗组合物中的应用。补充的活性成分也可掺入组合物中。

[0134] 本发明的组合物可以配制为中性或盐形式。可药用盐包括与无机酸（例如，盐酸或磷酸）或有机酸（例如，乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等）形成的酸加成盐（与蛋白质的游离氨基形成）。也可以从无机碱（例如，氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁），及有机碱（例如，异丙胺，三甲胺，组氨酸，普鲁卡因等）衍生与游离羧基形成的盐。

[0135] 制剂易于以多种剂型施用。将根据被治疗对象的情况必要地在剂量上发生一些变化。无论如何，负责施用的人将确定对于个体对象而言合适的剂量。此外，为了人的施用，制剂应满足FDA生物制品标准局(Office of Biologics standards)所要求的灭菌、热原、一般安全和纯度的标准。

[0136] 为了经口施用，本发明的多肽可以掺有赋形剂并以非可摄取的漱口剂和洁齿剂的形式使用。可以通过将所需量将活性成分掺入合适的溶剂（例如硼酸钠溶液(Dobell's 溶液)）中来制备漱口剂。或者，可以将活性成分掺入包含硼酸钠、甘油和碳酸氢钾的防腐洗液中。还可将活性成分分散于洁齿剂中，所述洁齿剂包括：凝胶、糊、粉末和浆。可以以治疗有效量将活性成分加入糊样洁齿剂中，所述洁齿剂可包含水、粘合剂、研磨剂、调味剂、泡沫剂和湿润剂。

[0137] 根据这些实施方案，经口递送材料还可包括乳膏、油膏、软膏、贴剂、脂质体、纳米颗粒、微颗粒、延时释放制剂和在本领域中已知用于递送到对象的口腔和/或皮肤以治疗和/或与预防本文所公开的病症的其它材料。某些实施方案涉及使用生物可降解的口腔贴剂递送系统或凝胶状材料。这些组合物可以是液体制剂或用这些组合物的制剂处理的可药用递送系统，并且还可包括活化剂/诱导剂。

[0138] 在某些实施方案中，本文所涵盖的贴剂可以是缓慢溶解或延迟释放的贴剂。根据这些实施方案，缓慢溶解的贴剂可以是藻酸盐贴剂。在某些实例中，贴剂可包含可检测指示染料或试剂例如荧光剂。在另一些实施方案中，可以将标签（例如，可检测标签例如生物素或荧光标签剂）与治疗分子相连以在递送到对象之后检测分子。在某些实施方案中，根据由健康专家所评价的对象需要，本文所涵盖的一种或更多种经口递送贴剂或其他治疗剂可

以向对象每天施用 3 次、每天 2 次、每天 1 次、隔天 1 次、每周 1 次等。本文所涵盖的贴剂可以是经口生物可降解的贴剂或用于外用的贴剂,其可降解或不可降解。本文所涵盖的贴片的大小可以为 1mm、2mm、3mm、4mm 至 5mm 或者根据需要更大。此外,本文涵盖皮肤贴剂用于患有银屑病的对象中。在治疗银屑病和慢性伤口时,可以使用载剂(例如甘油、羧甲基纤维素)局部递送 Smad7。还可使用透皮系统(例如,市购自 3M)来递送。也可使用皮下注射入病变(在正常盐水或 PBS 中)。

[0139] 预期可使用在本领域中已知的任何分子生物学、细胞生物学或生物化学技术来产生和/或测试本文所涵盖的治疗。此外,涵盖蛋白质化学技术来评价治疗在本文所开发的模型系统(例如,小鼠模型系统)中的使用。

[0140] E. 药盒

[0141] 在某些实施方案中,本文所涵盖的药盒可包含在上文中讨论的组合物用于治疗有本文所涵盖之病症(例如,口腔粘膜炎症或银屑病)的对象。药盒可包含含有治疗组合物的一个或更多个容器。任何药盒将一般包括至少一个小瓶、测试管、烧瓶、瓶、注射器或其他容器,可以优选地和/或合适地将组合物在其中等分。本文的药盒还可包括用于评价与本文所涵盖之病症有关的生物靶标的试剂盒。

[0142] F. 实施例

[0143] 包括以下实施例来说明多个实施方案。本领域技术人员应理解,在以下实施例中公开的技术代表在所要求保护的方法、组合物和装置的实践中发现的功能良好的技术。然而,根据本发明的公开内容,本领域的技术人员应理解可以在所公开的具体实施方案中做出许多变化,并且仍然获得相同或类似的结果而不脱离本发明的精神和范围。

[0144] 以 Smad7 的多种功能描述了 Smad7 转基因小鼠。该小鼠模型对于理解 Smad7 在口腔粘膜炎症中的强作用而言是关键的。Smad7 促进口腔伤口愈合。基于这些发现,可以评价 Smad7 是否能够提供针对口腔粘膜炎症的保护。将 Smad7 转基因小鼠及其同胞小鼠暴露于放射。由于经口摄入缺失相关的脱水和饥饿,非转基因同胞小鼠在 10 天内全部死于口腔粘膜炎症。相反,Smad7 转基因小鼠均未形成口腔粘膜炎症(图 1)。根据该数据,Smad7 的局部药理学递送可用于治疗口腔粘膜炎症。在另一些实施方案中,具有无复制子病毒载体或非病毒载体的 Smad7 表达质粒可用于治疗口腔粘膜炎症。

[0145] 初步数据示出,Smad7 主要通过促进上皮细胞迁移入伤口并使细胞免受 DNA 损伤来促进伤口愈合(图 1),后者是肿瘤抑制性的。Smad7 示出抑制癌症转移,并且未公开的数据示出小鼠中 Smad7 过表达不增加对癌症的易感性。假设未解决的炎症是口腔粘膜炎症无法愈合的主要原因之一,那么 Smad7 的强作用可以显著地促进口腔粘膜炎症愈合。在一个示例性实施例中,使转基因小鼠产生严重的皮肤银屑病,并且由于严重的瘙痒相关消耗综合征,这些小鼠在 6 个月内死亡。当将这些银屑病小鼠与 Smad7 转基因小鼠(在图 1 中示出对放射诱导的口腔粘膜炎症的抗性的相同的小鼠)杂交时,皮肤炎症消失,并且小鼠以正常寿命生存(图 2)。令人感兴趣的是,在两种情况下(图 1 至 2),Smad7 转基因表达水平仅为内源 Smad7 的 2 倍,表明低剂量的 Smad7 对于治疗作用而言足够。Smad7 经口贴剂/凝胶可以给患者施用且具有最小的全身作用。

[0146] 本发明人生成了具有 N 端 Tat- 标签(Tat-Smad7)的重组人 Smad7(与小鼠 Smad7 具有 98% 的同源性),其使得蛋白质在约数秒内透过细胞膜并到达核(Cardarelli 等,

2008 ;Kalvala 等,2010 ;Brooks 等,2005)。为了在细菌中生产蛋白,改变人 Smad7cDNA 核苷酸序列以优化密码子,并加入 5' Tat 标签 (9aa)。为了大肠杆菌中的蛋白质产生,将 Tat-Smad7 克隆入 pET101 蛋白质表达载体 (Invitrogen) 中。该载体在 Tat-Smad7 蛋白的 3' 处包含用于使用 V5 抗体进行蛋白质鉴定的 V5 表位和用于蛋白质纯化的 6XHis 标签。本发明人测试了以 7.5 μ g/ml 的浓度转导的经纯化 Tat-Smad7 蛋白。在暴露于 Tat-Smad7 小于 5 分钟内,接近 100% 的细胞示出核 Tat-Smad7 (图 3),其在转导后保持至少前 2 小时。之后,在胞质中也检测到了 Tat-Smad7 (图 3),这与其在核与胞质之间移动的能力相一致 (Zhang 等,2007)。参照之前胞质 Smad7 阻断 TGF β 受体介导的 Smad 磷酸化和 / 或增加 Smad 降解的报道 (Massague 等,2005),转导有 Tat-Smad7 的角质形成细胞消除了 Smad2 磷酸化 (图 3),表明其功能完整。与其长半衰期相一致,在取消 5 分钟 Tat-Smad7 处理之后 36 小时, Tat-Smad7 在细胞中仍可检测到 (未示出)。为了确定 Tat-Smad7 是否足够迅速地在体内穿透口腔粘膜,本发明人用在 10 μ l 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的 10 μ gTat-Smad7 经口处理 5 只小鼠一次,在处理后的 1 小时,在处理后的 24 小时,切取口腔粘膜用于 Tat-Smad7 检测。在口腔粘膜的上皮细胞和基质细胞中一致地检测 Tat-Smad7 (图 4)。这些数据表明局部 Tat-Smad7 递送迅速得到细胞摄取并且应无需多于每日施用。

[0147] 虽然本发明在纯化过程中设置了内毒素去除步骤,但他们进一步评价了 Tat-Smad7 是否在体内行使功能,以及是否因细菌中产生潜在的内毒素污染引起毒性风险。本发明人将 Tat-Smad7 (10 μ g/ 小鼠,3 次/周) s. c. 注射入示出严重皮肤炎症的 K5. TGF β 1 小鼠 (Li 等,2004)。在该预实验中的全部三只 K5. TGF β 1 小鼠中, Tat-Smad7 处理显著地减轻了皮肤炎症 (图 5),并且未观察到明显的副作用。使用 V5 抗体进行的免疫荧光染色示出 s. c. 注射的 Tat-Smad7 蛋白在真皮中并遍布表皮地积累 (图 5)。转导有 Tat-Smad7 的 K5. TGF β 1 皮肤在表皮和基质二者中示出减少的 pSmad2 和 NF κ B p50 (图 5)。

[0148] 为了测试 Tat-Smad7 是否可以通过经口递送治疗放射诱导的口腔粘膜炎症,本发明人放射了小鼠颌面部区域,并且随后用 Tat-Smad7 处理小鼠。麻醉七至九周龄的老年 C3H 雌性小鼠,用 RS2000X- 射线放射器暴露于 16Gy、20Gy 或 25Gy 头部放射。放射之后 5 天,从放射后第 5 天开始在口腔粘膜中发生组织损伤时,每天用 10 μ gTat-Smad7 (溶解于 50% 甘油 /PBS) 或 50% 甘油 /PBS (对照) 处理小鼠,每组含 4 只小鼠。大体地,与用 16Gy 或 20Gy 放射的对照小鼠相比,经 Tat-Smad7 处理的小鼠体重恢复得更快 (图 6);出于人道对所有用 25Gy 放射的对照小鼠进行了安乐死,因此无法监测其体重恢复情况。组织学示出 20Gy 或 25Gy 放射后第 9 天,对照小鼠产生口腔粘膜炎症 (开放性溃疡,图 7)。相反,经 Tat-Smad7 处理的小鼠具有损伤的口腔粘膜,上皮层变薄,但未形成溃疡 (图 7)。用 Tat-Smad7 连续处理经 20Gy 放射的小鼠直至第 13 天加速了修复。到第 14 天,当对照小鼠中口腔粘膜炎症溃疡刚完成再上皮化时,经 Tat-Smad7 处理的小鼠中口腔上皮几乎完全恢复至正常形态,只有很少的受损上皮细胞和一些浸润白细胞 (图 7)。就 16Gy 放射而言,在对照小鼠中,第 9 天组织损伤在最严重,上皮层变薄并且去组织化 (图 7),但该剂量的放射不足以引起口腔粘膜炎症,并且从第 5 天至第 8 天用 Tat-Smad7 进行经口处理的小鼠基本上保持正常的上皮 (图 7)。

[0149] 使用抗 Tat-Smad7 之 V5 标签的抗体进行的免疫染色示出 Tat-Smad7 蛋白主要递送到口腔上皮细胞 (图 8)。在经 Tat-Smad7 处理的口腔粘膜中,pH2AX (一种 DNA 损伤标志

物)呈阳性的细胞显著减少(图8)。如通过TUNEL测定确定的,与所观察到的DNA损伤相一致,经Tat-Smad7处理的口腔粘膜中凋亡细胞显著减少(图8)。通过CD45染色鉴定的浸润白细胞在经载体对照处理的经放射口腔粘膜中显著,但在经Tat-Smad7处理的粘膜中显著减少(图8)。用以突出血管的CD31染色在经载体对照处理的经放射口腔粘膜中示出扩大的血管,但在经Tat-Smad7处理的口腔粘膜中示出正常血管大小(图8)。

[0150] 总而言之,这些数据表明,Tat-Smad7局部递送可通过预防组织损伤、促进上皮愈合和减轻炎症以及基质中的血管损伤来治疗严重口腔粘膜炎症。

[0151] * * * * *

[0152] 出于说明和描述的目的示出了本发明的前述讨论。前述并不旨在将本发明限于本文所公开的一种或多种形式。虽然本发明的描述包括一个或更多个实施方案和某些变化和修改的描述,但其他变化和修改也在本发明的范围内,例如,如在理解本发明公开内容之后可在本领域技术人员能力和知识范围内的。旨在获得包括被允许程度的替选实施方案的权利,包括所要求保护的那些实施方案的替选的、可互换的和/或等同的结构、功能、范围或步骤,无论这些替选的、可互换的和/或等同的结构、功能、范围或步骤是否公开于本文中均如此,并且不旨在公开地致力于任何可申请专利的主题。

[0153] G. 参考文献

[0154] 以下参考文献以为本文所给出的内容提供示例性过程或其它细节上的补充的程度通过引用而具体地并入本文。

[0155] 美国专利 4,684,611

[0156] 美国专利 4,879,236

[0157] 美国专利 4,952,500

[0158] 美国专利 5,302,523

[0159] 美国专利 5,322,783

[0160] 美国专利 5,384,253

[0161] 美国专利 5,464,765

[0162] 美国专利 5,538,877

[0163] 美国专利 5,538,880

[0164] 美国专利 5,550,318

[0165] 美国专利 5,563,055

[0166] 美国专利 5,580,859

[0167] 美国专利 5,589,466

[0168] 美国专利 5,610,042

[0169] 美国专利 5,656,610

[0170] 美国专利 5,670,488

[0171] 美国专利 5,702,932

[0172] 美国专利 5,736,524

[0173] 美国专利 5,780,448

[0174] 美国专利 5,789,215

[0175] 美国专利 5,871,986

- [0176] 美国专利 5,945,100
- [0177] 美国专利 5,981,274
- [0178] 美国专利 5,994,624
- [0179] Ausubel et al., Curr. Protocols in Mol. Biol., Greene Pub. Assoc., Wiley Interscience, NY, 1994.
- [0180] Brooks et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 57(4) :559-577, 2005.
- [0181] Cardarelli et al., Traffic., 9(4) :528-539, 2008.
- [0182] Chen and Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8) :2745-2752, 1987.
- [0183] Fechheimer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 :8463-8467, 1987.
- [0184] Fischer, Med. Res. Rev., 27(6) :755-796, 2007.
- [0185] Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 :3348-3352, 1979.
- [0186] Gopal, Mol. Cell Biol., 5 :1188-1190, 1985.
- [0187] Graham and Van Der Eb, Virology, 52 :456-467, 1973.
- [0188] Harland and Weintraub, J. Cell Biol., 101(3) :1094-1099, 1985.
- [0189] Imai et al., Nephrologie, 19(7) :397-402, 1998.
- [0190] Kaeppler et al., Plant Cell Rep., 9 :415-418, 1990.
- [0191] Kalvala et al., Nucleic Acids Res., 38(14) :e149, 2010.
- [0192] Kaneda et al., Science, 243 :375-378, 1989.
- [0193] Kato et al., J. Biol. Chem., 266 :3361-3364, 1991.
- [0194] Li et al., EMBO J., 23(8) :1770-1781, 2004.
- [0195] Massague et al., Genes Dev., 19(23) :2783-2810, 2005.
- [0196] Nicolau and Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721 :185-190, 1982.
- [0197] Nicolau et al., Methods Enzymol., 149 :157-176, 1987.
- [0198] Omirulleh et al., Plant Mol. Biol., 21(3) :415-428, 1993.
- [0199] PCT Appln. W094/09699
- [0200] PCT Appln. W095/06128
- [0201] Potrykus et al., Mol. Gen. Genet., 199(2) :169-177, 1985.
- [0202] Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., 33 :624-652, 1990.
- [0203] Rippe, et al., Mol. Cell Biol., 10 :689-695, 1990.
- [0204] Robbins and Ghivizzani, Pharmacol Ther, 80(1) :35-47, 1998.
- [0205] Robbins et al., Trends Biotechnol., 16(1) :35-40, 1998.
- [0206] Sambrook&Russell, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1990.
- [0207] Sambrook et al., In :Molecular cloning :a laboratory manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [0208] Wong et al., Gene, 10 :87-94, 1980.
- [0209] Zhang et al., Mol. Cell Biol., 27(12) :4488-4499, 2007.

[0001]

IP1347410P. 序列表可读载体. TXT

序列表

<110> WANG, XIAO-JING
REFAELI, YOSEF
ZHANG, QINGHONG

<120> SMAD7的治疗应用

<130> UTEC. P0032W0

<140> PCT/US2011/052499
<141> 2011-09-21

<150> 61/385,445
<151> 2010-09-22

<160> 44

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽

<400> 1

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15

Ala Lys Lys Lys Arg Lys Val
20

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽

<400> 2

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

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽

<400> 3

Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

[0002]

IP1347410P. 序列表可读载体. TXT

<220>

<223> 合成的肽

<400> 4

Arg	Arg	Trp	Arg	Arg	Trp	Trp	Arg	Arg	Trp	Trp	Arg	Arg	Trp	Arg	Arg
1			5						10					15	

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 5

Arg	Gly	Gly	Arg	Leu	Ser	Tyr	Ser	Arg	Arg	Arg	Phe	Ser	Thr	Ser	Thr
1				5					10					15	

Gly Arg

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 6

Tyr	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg
1			5					10		

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 7

Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg
1				5				

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 8

Tyr	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Gln	Ala	Arg	Ala
1				5				10		

<210> 9

<211> 8

[0003]

IP1347410P. 序列表可读载体. TXT

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽

<400> 9

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽

<400> 10

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5

<210> 11
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽

<220>
<221> misc_feature
<222> (25).. (25)
<223> Xaa可以为任何天然氨基酸

<400> 11

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Xaa Ile Leu
20 25

<210> 12
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽

<400> 12

Leu Leu Ile Leu Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala Asn Ala His
1 5 10 15

Ser Lys

<210> 13
<211> 16
<212> PRT

[0004]

IP1347410P. 序列表可读载体. TXT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 13

Ser Arg Arg His His Cys Arg Ser Lys Ala Lys Arg Ser Arg His His
1 5 10 15

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 14

Asn Arg Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Val Arg
1 5 10

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 15

Arg Gln Leu Arg Ile Ala Gly Arg Arg Leu Arg Gly Arg Ser Arg
1 5 10 15

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 16

Lys Leu Ile Lys Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys
1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 17

Arg Arg Ile Pro Asn Arg Arg Pro Arg Arg
1 5 10

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

[0005]

IP1347410P. 序列表可读载体. TXT

<220>

<223> 合成的肽

<400> 18

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 19

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys
1 5 10

<210> 20

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 20

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Asn Gly
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20 25

<210> 21

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 21

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
20

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

[0006]

IP1347410P. 序列表可读载体. TXT

<400> 22

Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Leu
 1 5 10 15

Leu Lys Lys Leu
 20

<210> 23

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 23

Gln Ala Ala Thr Ala Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr
 1 5 10 15

Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Pro
 20 25 30

Val Glu

<210> 24

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 24

Met Gly Leu Gly Leu His Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala Leu Gln Gly
 1 5 10 15

Ala Lys Ser Lys Arg Lys Val
 20

<210> 25

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 25

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu
 20 25

<210> 26

<211> 28

[0007]

IP1347410P. 序列表可读载体. TXT

<212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的肽

<400> 26

Met Ala Asn Leu Gly Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr Met Trp
 1 5 10 15

Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro
 20 25

<210> 27
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的肽

<400> 27

Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
 20

<210> 28
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的肽

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa可以为任何天然氨基酸

<400> 28

Asp Pro Lys Gly Asp Pro Lys Gly Val Thr Val Thr Val Thr Val Thr
 1 5 10 15

Val Thr Gly Lys Gly Asp Pro Xaa Pro Asp
 20 25

<210> 29
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的肽

<400> 29

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
 1 5 10

[0008]

IP1347410P. 序列表可读载体. TXT

<210> 30
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的肽

<400> 30

Val Arg Leu Pro Pro Pro Val Arg Leu Pro Pro Pro Val Arg Leu Pro
 1 5 10 15

Pro Pro

<210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的肽

<400> 31

Pro Arg Pro Leu Pro Pro Pro Arg Pro Gly
 1 5 10

<210> 32
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的肽

<400> 32

Ser Val Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro
 1 5 10 15

Pro Pro Phe Phe Pro Pro Arg Leu Pro Pro Arg Ile Pro Pro
 20 25 30

<210> 33
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的肽

<400> 33

Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His
 1 5 10 15

Arg Leu Leu Arg Lys
 20

<210> 34
 <211> 23

[0009]

IP1347410P. 序列表可读载体. TXT

<212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的肽

<400> 34

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe
 1 5 10 15

Val Gly Glu Ile Met Asn Ser
 20

<210> 35
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的肽

<400> 35

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Glu Lys Val Gly Gln Asn Ile Arg
 1 5 10 15

Asp Gly Ile Ile Lys Ala Gly Pro Ala Val Ala Val Val Gly Gln Ala
 20 25 30

Thr Gln Ile Ala Lys
 35

<210> 36
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的肽

<400> 36

Ala Leu Trp Met Thr Leu Leu Lys Lys Val Leu Lys Ala Ala Ala Lys
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Asn Ala Val Leu Val Gly Ala Asn Ala
 20 25

<210> 37
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的肽

<400> 37

Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu
 1 5 10 15

Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln

[0010]

IP1347410P. 序列表可读载体. TXT

20

25

<210> 38
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽

<400> 38

Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
1 5 10

<210> 39
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽

<400> 39

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Pro Lys
1 5 10 15

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

Glu

<210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽

<400> 40

Leu Ala Lys Trp Ala Leu Lys Gln Gly Phe Ala Lys Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 41
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> Xaa可以为任何天然氨基酸

<400> 41

Ser Met Ala Gln Asp Ile Ile Ser Thr Ile Gly Asp Leu Val Lys Trp
1 5 10 15

[0011]

IP1347410P. 序列表可读载体. TXT

Ile Ile Gln Thr Val Asn Xaa Phe Thr Lys Lys
20 25

<210> 42
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽

<400> 42

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Gln Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu
20 25 30

Ala Asn Leu Val Pro Arg Thr Glu Ser
35 40

<210> 43
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽

<400> 43

Pro Ala Trp Arg Lys Ala Phe Arg Trp Ala Trp Arg Met Leu Lys Lys
1 5 10 15

Ala Ala

<210> 44
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽

<400> 44

Lys Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu Lys Leu
1 5 10 15

Lys Leu

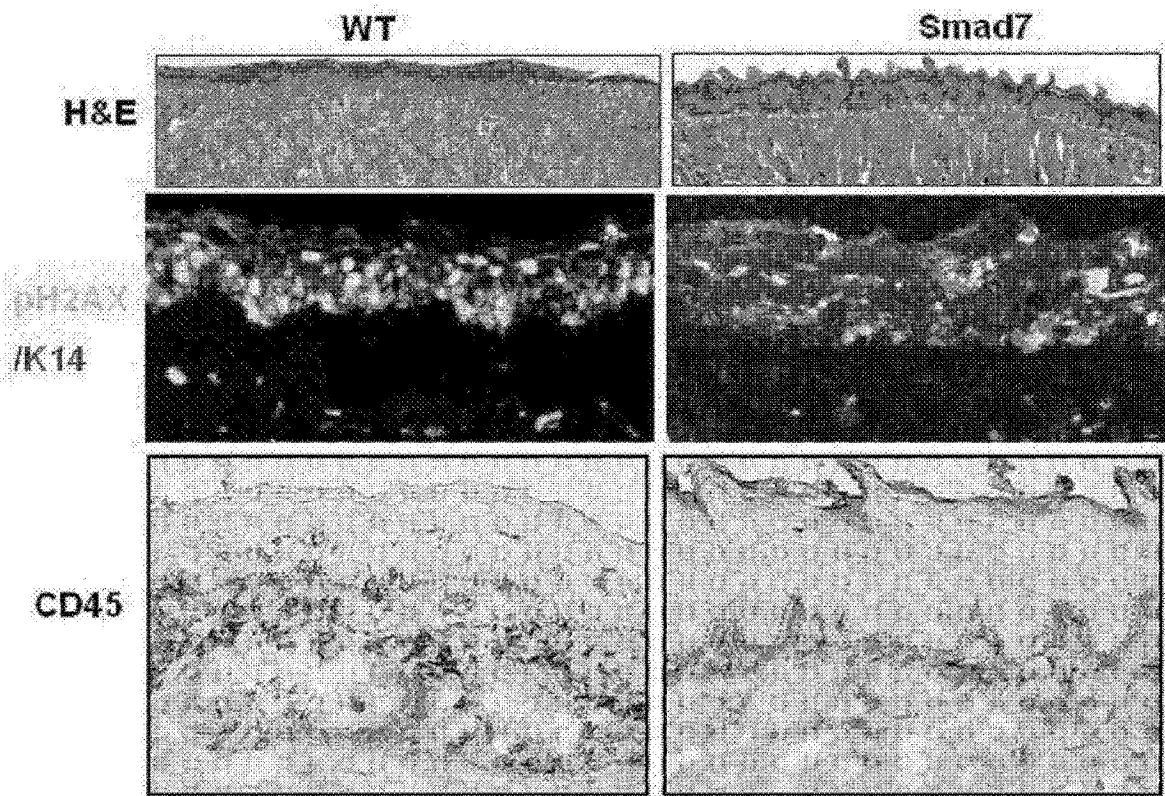


图 1

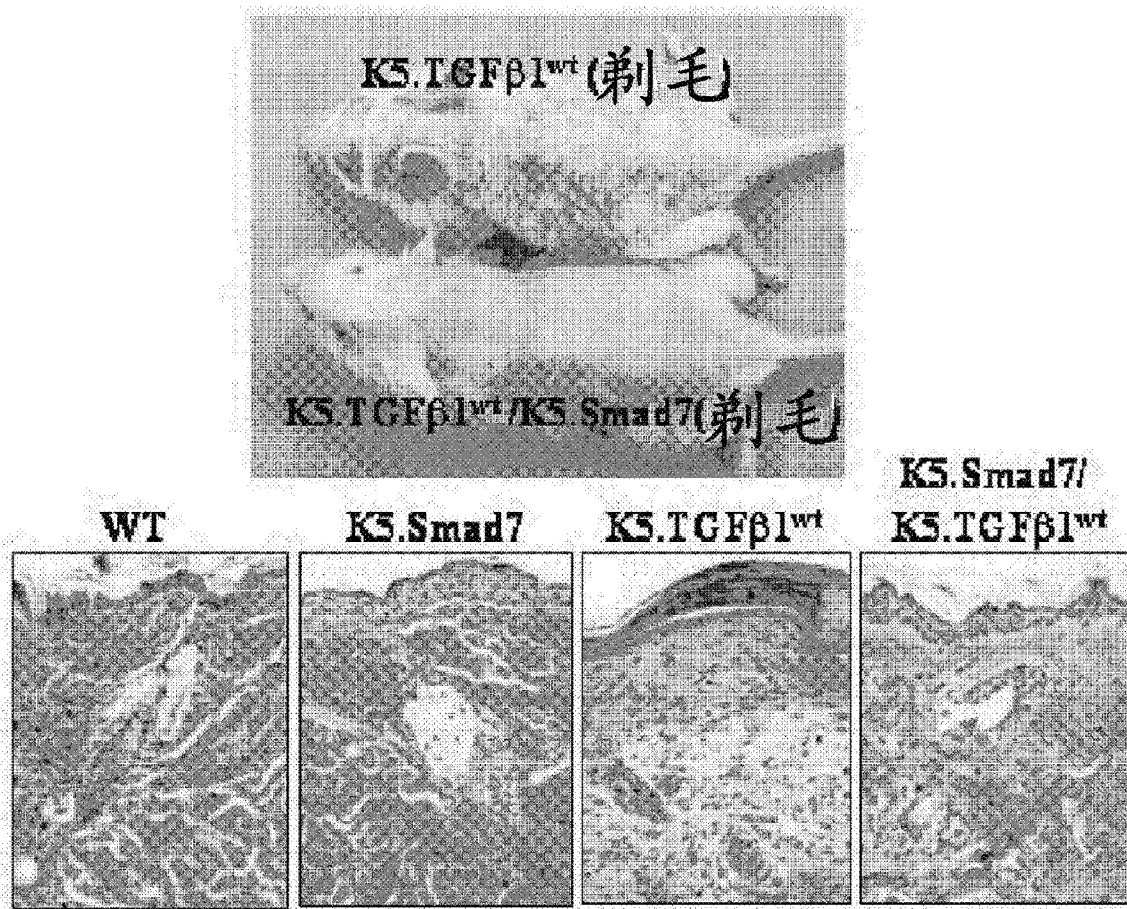


图 2

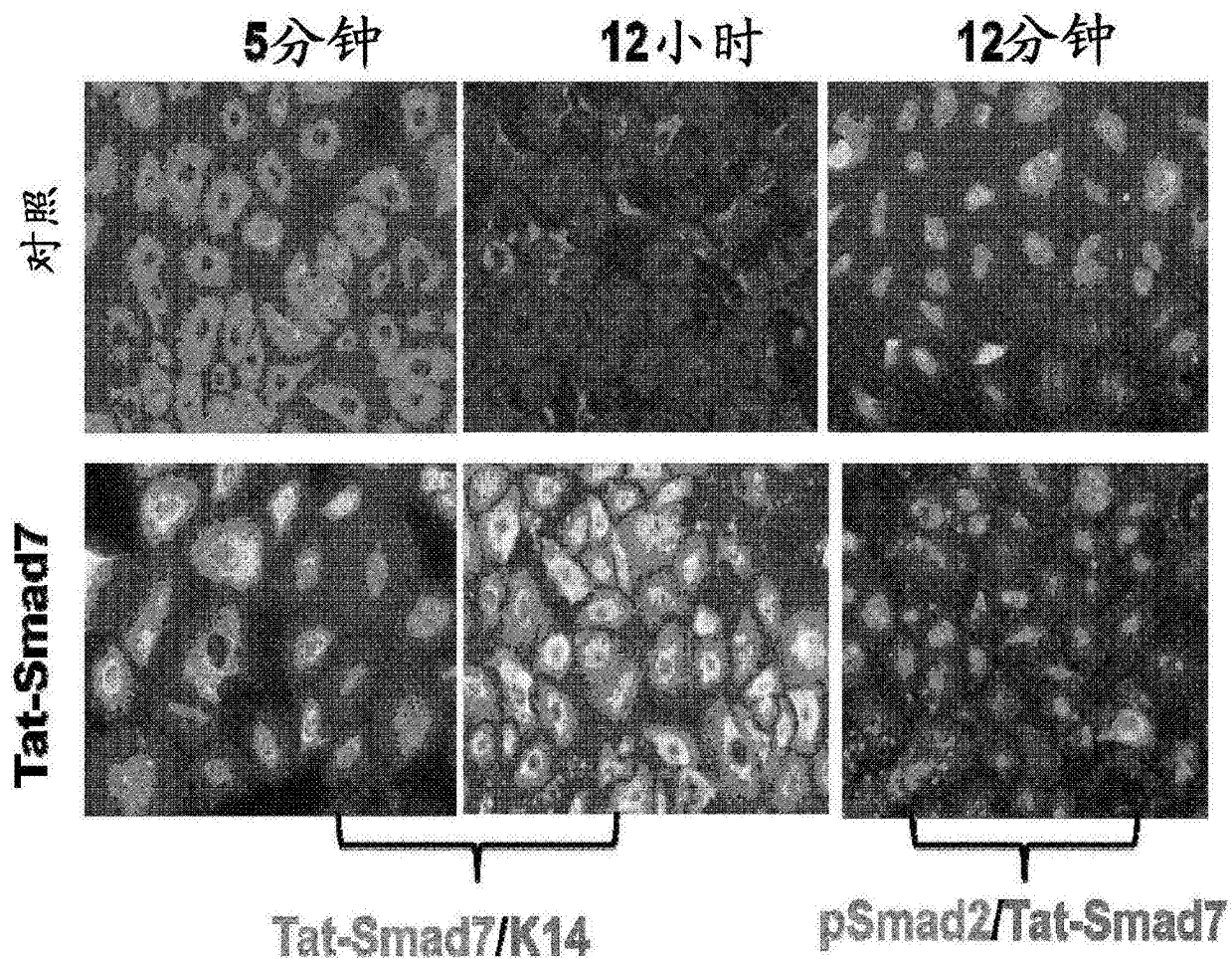


图 3

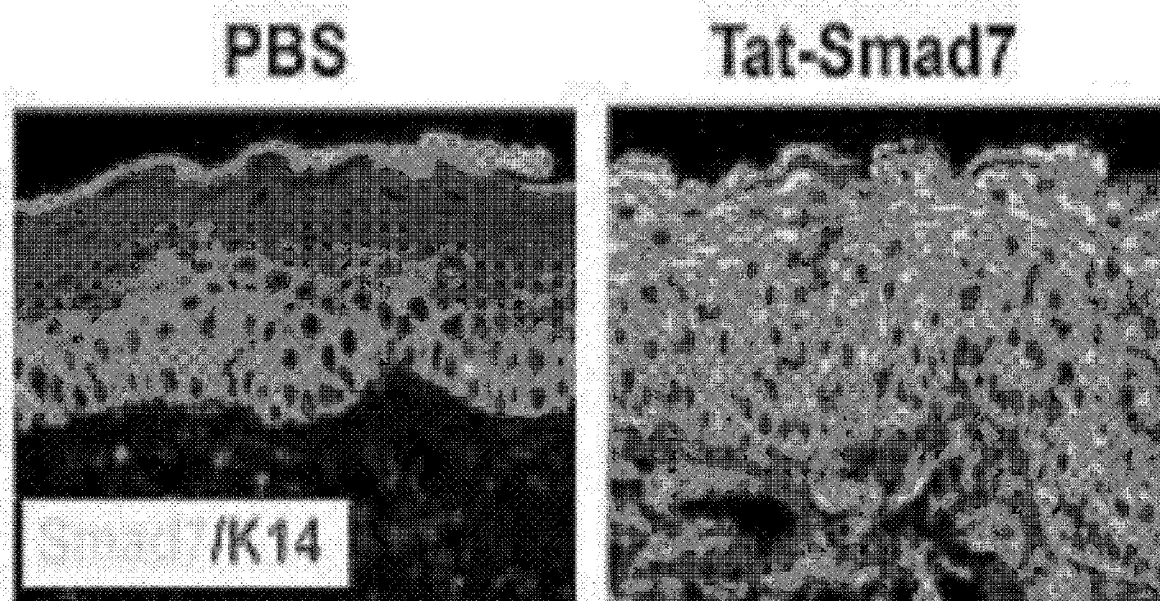


图 4

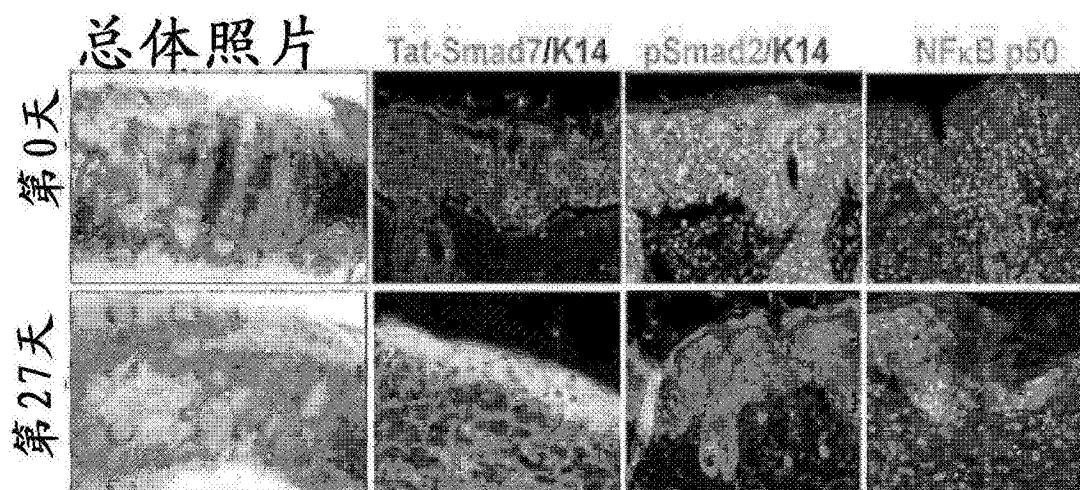


图 5

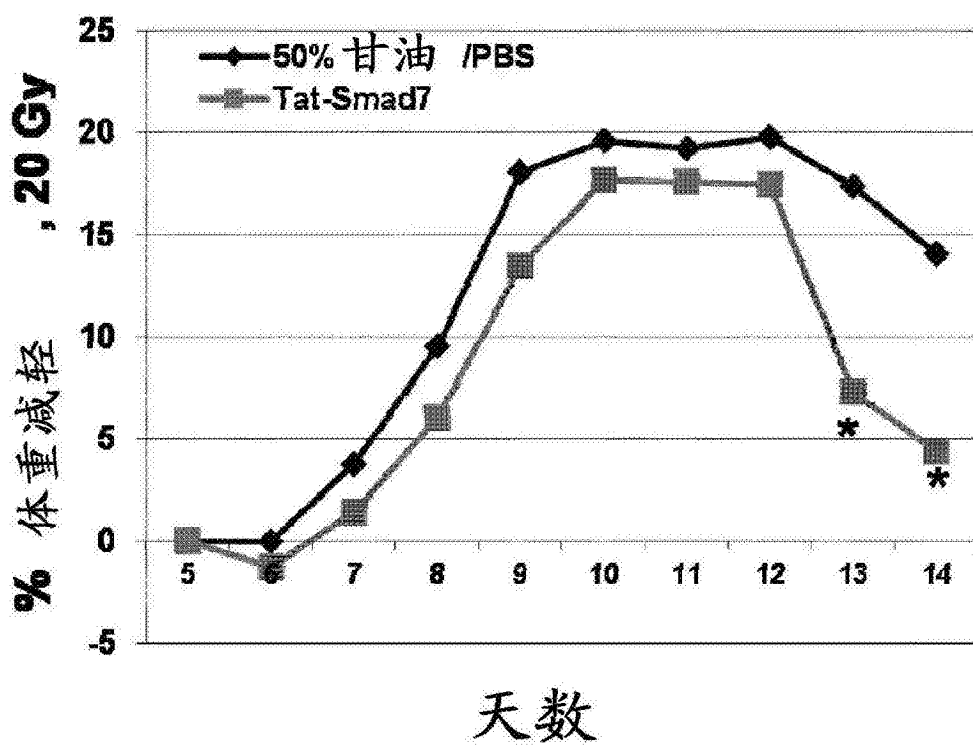


图 6

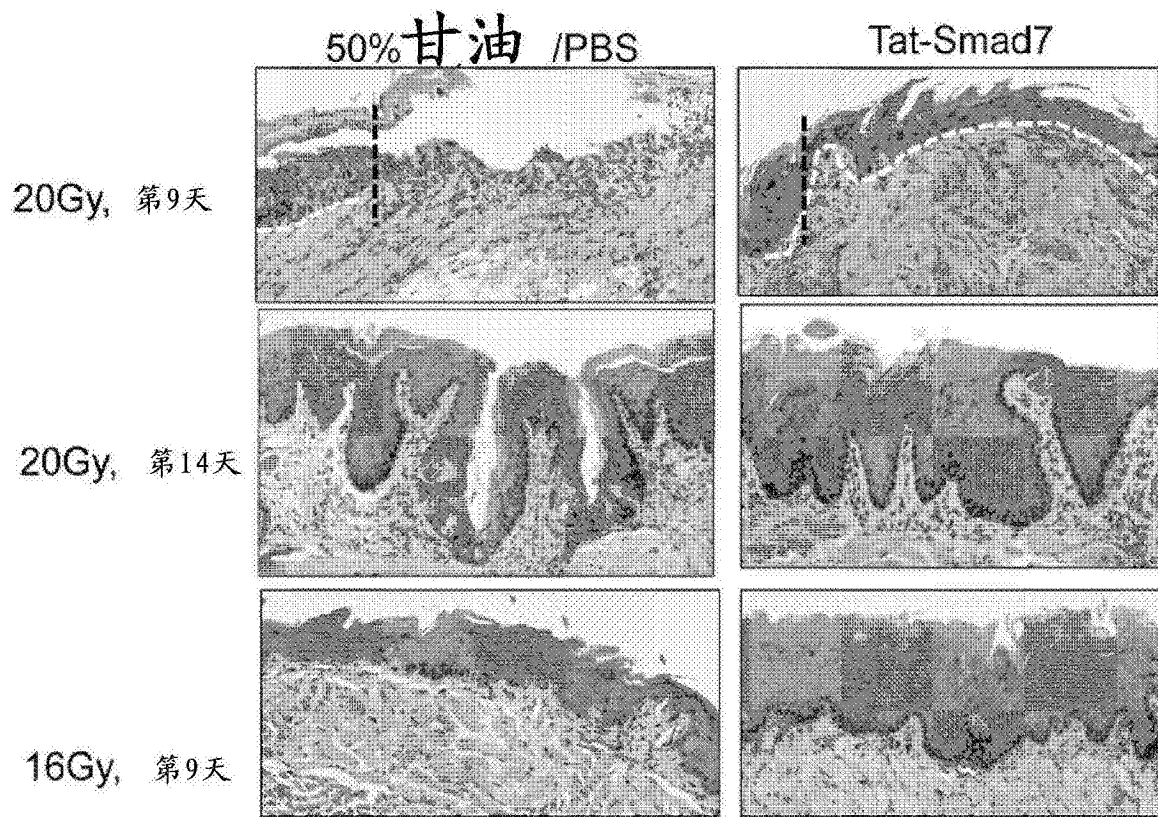


图 7

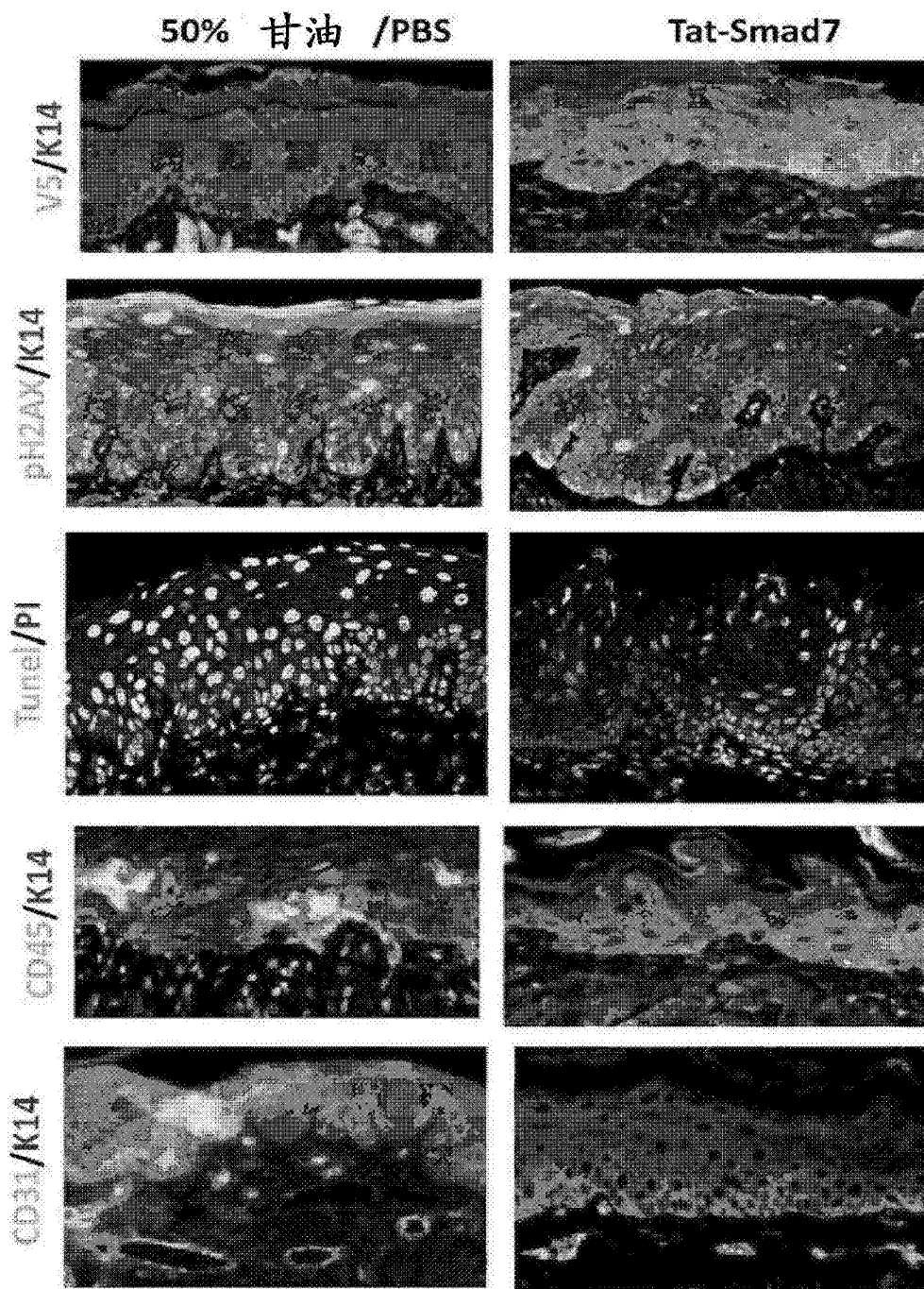


图 8