



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 114699528 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 05

(21) 申请号 202210036941.5

(22) 申请日 2016.08.12

(30) 优先权数据

62/204,875 2015.08.13 US

(62) 分案原申请数据

201680059256.7 2016.08.12

(71) 申请人 布罗德研究所股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

申请人 达纳-法伯癌症研究所股份有限公司

拜耳医药股份公司

(72) 发明人 L.德瓦尔 M.迈耶森

H.格罗伊利希 M.舍诺恩 A.伯金

X.吴 U.萨克

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 秦剑

(51) Int.Cl.

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 31/50 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

权利要求书1页 说明书58页

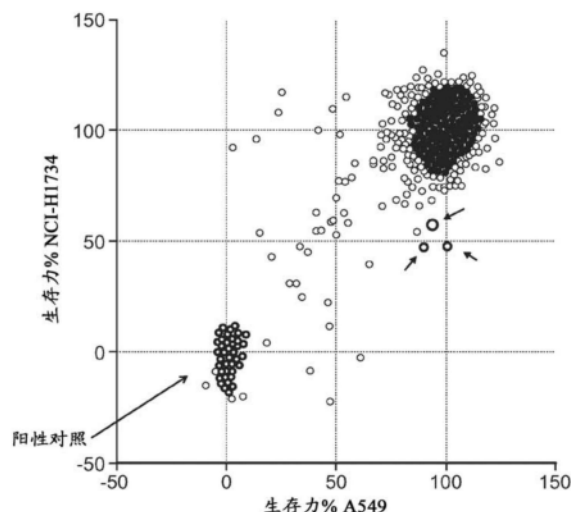
序列表12页 附图34页

(54) 发明名称

用于表达PDE3A或SLFN12的癌症的组合物和方法

(57) 摘要

本发明的特征在于使用与药物敏感性相关的生物标记(例如,PDE3A、SLFN12)鉴别患有癌症(例如,黑色素瘤、腺癌、肺癌、宫颈癌、肝癌或者乳腺癌)的患者并因此用本发明药剂(例如,DNMDP、扎达维林,和阿那格雷)治疗分层的患者群体的改善的方法。



1. 磷酸二酯酶3A (PDE3A) 调节剂在制备用于杀灭癌细胞或降低癌细胞存活的药物中的用途,所述癌细胞相对于参考具有增加水平的PDE3A和Schlafen 12 (SLFN12) 多肽或者多核苷酸。

2. PDE3A调节剂在制备用于杀灭癌细胞或降低癌细胞存活的药物中的用途,所述癌细胞是由于对PDE3A调节剂应答而选出,且相对于参考具有增加水平的PDE3A和SLFN12多肽或者多核苷酸。

3. PDE3A调节剂在制备用于在受试者中减少癌细胞增殖的药物中的用途,其中所述受试者相对于参考具有增加水平的PDE3A和SLFN12多肽或者多核苷酸。

4. PDE3A调节剂在制备用于在受试者中减少癌细胞增殖的药物中的用途,其中所述受试者由于患有对PDE3A调节剂应答的癌症而预先选出,且相对于参考具有增加水平的PDE3A和SLFN12多肽或者多核苷酸。

5. 权利要求1至4中任一项的用途,其中所述PDE3A调节剂选自6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)、扎达维林和阿那格雷,或其药学上可接受的盐。

6. 权利要求1至4中的任一项的用途,其中所述PDE3A或者SLFN12多肽的水平通过选自以下的方法检测:免疫印迹、质谱和免疫沉淀。

7. 权利要求1至4中的任一项的用途,其中所述PDE3A或者SLFN12多核苷酸的水平通过选自以下的方法检测:定量PCR、蛋白印迹、微阵列、质谱和原位杂交。

8. 权利要求1至4中的任一项的用途,其中所述癌细胞为黑色素瘤、子宫内膜癌、肺癌、造血/淋巴样癌、卵巢癌、宫颈癌、软组织肉瘤、平滑肌肉瘤、泌尿道癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、胶质母细胞瘤、或者乳腺癌的细胞。

9. 权利要求1至4中的任一项的用途,其中所述癌细胞不是B-细胞增殖型癌症。

10. 权利要求1至4中的任一项的用途,其中所述癌细胞不是多发性骨髓瘤。

11. 权利要求1至4中的任一项的用途,其中所述PDE3A调节剂减少PDE3A活性。

12. 权利要求3或4的用途,其中所述PDE3A调节剂口服给药。

13. 权利要求3或4的用途,其中所述PDE3A调节剂通过静脉内注射给药。

14. 用于在由于对PDE3A调节剂应答而预先选出的受试者中减少癌细胞增殖的试剂盒,其中所述癌细胞相对于参考具有增加水平的PDE3A和SLFN12多肽或者多核苷酸,所述试剂盒包含有效量的DNMDP、扎达维林和/或阿那格雷,或其药学上可接受的盐。

15. PDE3A调节剂用于制造用于治疗癌症的药物的用途,其中所述PDE3A调节剂选自6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)、扎达维林和阿那格雷,或其药学上可接受的盐,其中所述癌症的癌细胞相对于参考具有增加水平的PDE3A和SLFN12多肽或者多核苷酸。

16. 权利要求15的用途,其中所述癌症为黑色素瘤、子宫内膜癌、肺癌、造血/淋巴样癌、卵巢癌、宫颈癌、软组织肉瘤、平滑肌肉瘤、泌尿道癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、胶质母细胞瘤或者乳腺癌。

用于表达PDE3A或SLFN12的癌症的组合物和方法

[0001] 本申请是基于申请日为2016年8月12日,申请号为201680059256.7,发明名称为:“用于表达PDE3A或SLFN12的癌症的组合物和方法”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2015年8月13日提交的美国临时申请62/204,875的优先权和权益,将其全部公开内容以引用的方式并入本申请。

[0004] 对在联邦政府资助的研究下做出的发明的权利声明

[0005] 本发明是在国立卫生研究院授予的基金号3U54HG005032的资助下完成的。政府对本发明享有一定的权利。

背景技术

[0006] 美国每年有超过550,000人、全世界每年有超过800万人死于癌症。已经证明包括小分子,影响特异组织生长需求的分子,以及免疫调节剂在内的新药物有益于其癌症具有独特基因组突变或其他特征的患者亚组。不幸的是,许多癌症患者仍然没有有效的治疗选择。

[0007] 一种鉴定新的抗癌剂的方法是通过表型筛选来发现在癌细胞系之间显示出高选择性的新的小分子,然后通过化学基因组学来鉴定与药物反应相关的细胞特征。在20世纪90年代,Weinstein及其同事证明了化合物的细胞毒性性质可用于鉴定细胞特征,例如与药物敏感性相关的基因表达性质和DNA拷贝数。近年来,随着大组细胞系的自动化高通量化学敏感性测试以及细胞系的全面基因组和表型表征,鉴定癌细胞系的特征(介导其对小分子的应答)的能力显著增加。小分子敏感性的表型观察可以与表达模式或体细胞改变相关联,例如在对伊立替康治疗敏感的癌细胞系中的SLFN11表达和对PARP抑制剂敏感的癌细胞系中的EWS-FLI1重排的情况。

[0008] 在分子水平表征恶性肿瘤的方法对于分层病人是有用的,由此可以快速指导他们进行有效的治疗。迫切需要改进的表征癌症受试者应答性的方法。

发明内容

[0009] 如下所述,本发明的特征在于通过在来源于患者的癌细胞中检测PDE3A和Schlafen 12 (SLFN12) 多核苷酸或者多肽的共表达,来鉴别患有对于磷酸二酯酶3A (PDE3A) 调节剂(例如,6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮、扎达维林,和阿那格雷)治疗敏感的癌症(例如,黑色素瘤、腺癌、肺癌、宫颈癌、肝癌、子宫内膜癌、肺癌、造血/淋巴样癌、卵巢癌、宫颈癌、软组织肉瘤、平滑肌肉瘤、泌尿道癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、胶质母细胞瘤,或者乳腺癌)的患者的方法。

[0010] 在一个实施方案中,本发明提供了杀灭由于对磷酸二酯酶3A (PDE3A) 调节剂应答而选择的癌细胞或者减少其存活的方法。所述方法包括使所述细胞与PDE3A调节剂接触的步骤,从而减少所述癌细胞的存活,其中相对于参考具有PDE3A和/或Schlafen 12 (SLFN12) 多肽或者多核苷酸的增加选择所述细胞。在另一实施方案中,本发明提供了在患有对PDE3A

调节剂应答的癌症而预先选出的受试者中减少癌细胞增殖的方法。所述方法包括向所述受试者给药PDE3A调节剂,从而在受试者中减少癌细胞增殖,其中所述受试者通过检测相对于参考的PDE3A和/或SLFN12多肽或者多核苷酸水平的增加来预先选择。在一个实施方案中,所述受试者通过检测PDE3A和/或SLFN12多肽或者多核苷酸水平的增加来预先选出。在一些实施方案中,所述PDE3A调节剂选自6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)、扎达维林,和阿那格雷。

[0011] 在另一实施方案中,本发明提供鉴别患有对PDE3A调节应答的癌症的受试者的方法。所述方法包括以下步骤:在受试者的生物样品中检测相对于参考的PDE3A和/或SLFN12多肽或者多核苷酸的水平的增加,由此将受试者鉴别为应答于PDE3A调节。在一个实施方案中,检测PDE3A和SLFN12多肽或者多核苷酸的水平的增加。

[0012] 在一些实施方案中,所述PDE3A和/或SLFN12多肽的水平的增加通过选自以下的方法检测:免疫印迹、质谱,和免疫沉淀。在一些其它实施方案中,所述PDE3A和/或SLFN12多核苷酸的水平的增加通过选自以下的方法检测:定量PCR、蛋白印迹、微阵列、质谱,和原位杂交。在一些实施方案中,所述PDE3A的活性降低。PDE3A调节剂可口服给药。PDE3A调节剂可通过静脉内注射给药。

[0013] 在一些实施方案中,所述癌细胞为黑色素瘤、子宫内膜癌、肺癌、造血/淋巴样癌、卵巢癌、宫颈癌、软组织肉瘤、平滑肌肉瘤、泌尿道癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、胶质母细胞瘤,或者乳腺癌。在一些其它实施方案中,所述癌细胞不为B-细胞增殖型癌症。在一些实施方案中,所述癌细胞不为多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,所述生物样品为组织样品。

[0014] 在另一方面,本发明提供了用于鉴别患有对PDE3A调节应答的癌症的受试者的试剂盒,所述试剂盒包含结合PDE3A的捕获试剂和/或结合SLFN12的捕获试剂。在一个实施方案中,所述试剂盒包含结合PDE3A的捕获试剂和结合SLFN12的捕获试剂。

[0015] 在又一方面,本发明提供了用于在由于对PDE3A调节剂应答而预先选出的受试者中减少癌细胞增殖的试剂盒,所述试剂盒包含DNMDP、扎达维林和/或阿那格雷。

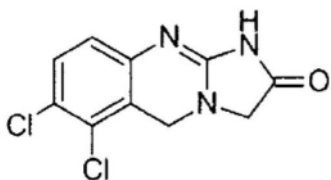
[0016] 本发明提供了用于治疗患有对PDE3A调节剂治疗应答的癌症的受试者的方法,其中癌症通过检测在所述癌症中PDE3A和/或Schlafen 12 (SLFN12) 多核苷酸或者多肽的共表达而鉴别。结合下面提供的实例,将本发明限定的组合物和制品分离或以其它方式制造。根据详细描述和权利要求,本发明的其他特征和优点将显而易见。

[0017] 定义

[0018] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。以下参考文献为技术人员提供了本发明中使用的许多术语的一般定义:Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology(2nd ed.1994);The Cambridge Dictionary of Science and Technology(Walker ed.,1988);The Glossary of Genetics,5th Ed.,R.Rieger等人(eds.),Springer Verlag(1991);和Hale&Marham,The Harper Collins Dictionary of Biology(1991)。除非另有说明,本文使用的下列术语具有下文给出的含义。

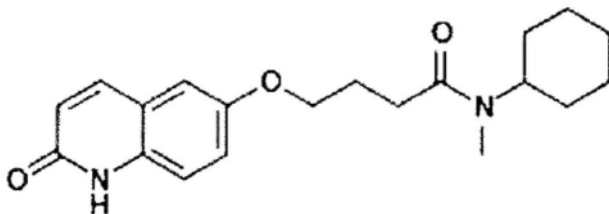
[0019] “阿那格雷”(IUPAC名称6,7-二氯-1,5-二氢咪唑并(2,1-b)噻唑啉-2(3H)-酮)是指具有以下结构的小分子磷酸二酯酶抑制剂:

[0020]



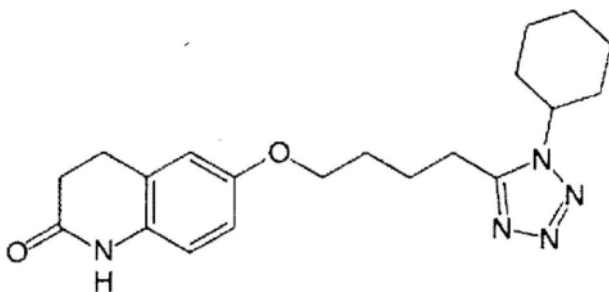
[0021] “西洛酰胺” (IUPAC名称N-环己基-N-甲基-4-[(2-氧代-1H-喹啉-6-基)氧基]丁酰胺) 是指具有以下结构的小分子抑制剂:

[0022]



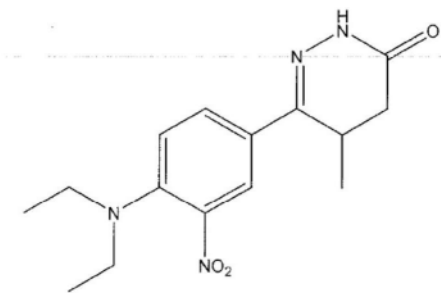
[0023] “西洛他唑” (IUPAC名称6-[4-(1-环己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氢-2(1H)-喹啉酮) 是指具有以下结构的小分子抑制剂:

[0024]



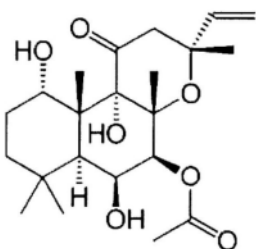
[0025] “DNDMP” (IUPAC名称6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮) 是指具有以下结构的小分子抑制剂:

[0026]



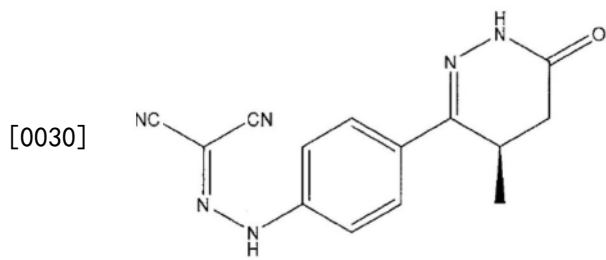
[0027] “福司柯林” (IUPAC名称乙酸(3R,4aR,5S,6S,6aS,10S,10aR,10bS)-6,10,10b-三羟基-3,4a,7,7,10a-五甲基-1-氧代-3-乙烯基十二氢-1H-苯并[f]色烯-5-基酯) 是指具有以下结构的小分子抑制剂:

[0028]

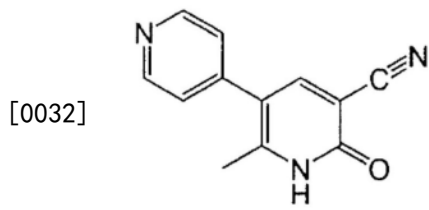


[0029] “左西孟旦” (IUPAC名称(E)-2-氰基-1-甲基-3-(4-(4-甲基-6-氧代-1,4,5,6-四

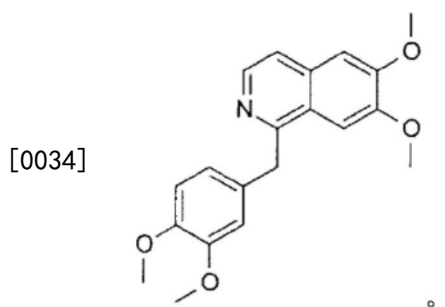
氢哒嗪-3-基) 苯基) 胍) 是指具有以下结构的小分子抑制剂:



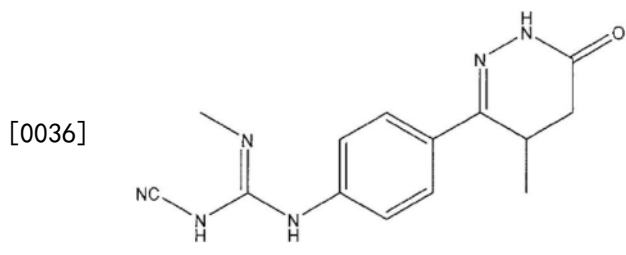
[0031] “米力农” (IUPAC名称2-甲基-6-氧代-1,6-二氢-3,4'-联吡啶-5-腈) 是指具有以下结构的小分子抑制剂:



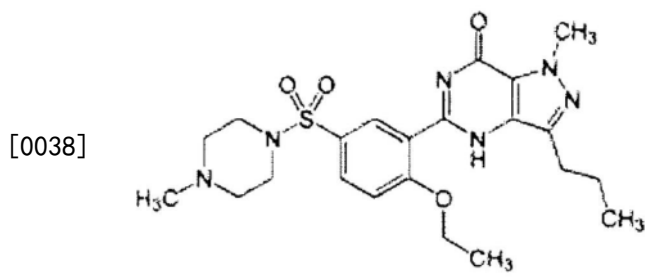
[0033] “罂粟碱” (IUPAC名称1-(3,4-二甲氧基苄基)-6,7-二甲氧基异喹啉) 是指具有以下结构的小分子抑制剂:



[0035] “氰胍佐旦” (IUPAC名称(E)-2-氰基-1-甲基-3-(4-(4-甲基-6-氧代-1,4,5,6-四氢哒嗪-3-基) 苯基) 胍) 是指具有以下结构的小分子抑制剂:



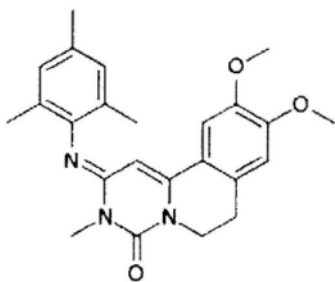
[0037] “西地那非” (IUPAC名称1-[4-乙氧基-3-(6,7-二氢-1-甲基-7-氧代-3-丙基-1H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-5-基) 苯基磺酰基]-4-甲基哌嗪) 是指具有以下结构的小分子抑制剂:



[0039] “曲唑辛” (IUPAC名称9,10-二甲氧基-3-甲基-2-(2,4,6-三甲基苯基) 亚氨基-6,

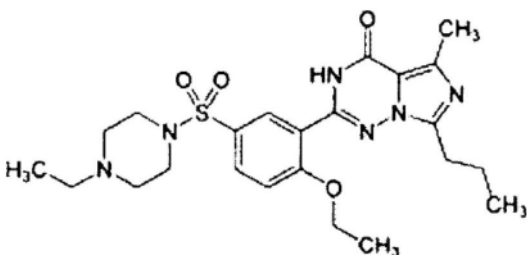
7-二氢嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮)是指具有以下结构的小分子抑制剂:

[0040]



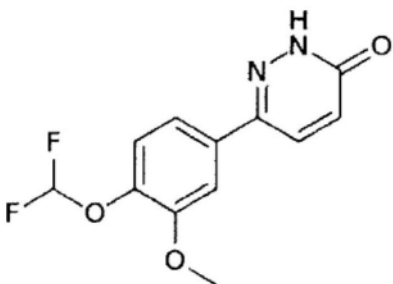
[0041] “伐地那非”(IUPAC名称4-[2-乙氧基-5-(4-乙基哌嗪-1-基)磺酰基-苯基]-9-甲基-7-丙基-3,5,6,8-四氮杂二环[4.3.0]壬-3,7,9-三烯-2-酮)是指具有以下结构的小分子抑制剂:

[0042]



[0043] “扎达维林”(IUPAC名称3-[4-(二氟甲氧基)-3-甲氧基苯基]-1H-吡嗪-6-酮)是指具有以下结构的小分子抑制剂:

[0044]



[0045] 在一些其它实施方案中,化合物西洛酰胺、西洛他唑、DNDMP、左西孟旦、米力农、罂粟碱、氰胍佐旦、西地那非、曲唑辛、伐地那非,和扎达维林中的任意一个为小分子磷酸二酯酶抑制剂。在另一实施方案中,福司柯林可用于本发明方法中。

[0046] “PDE3A多肽”是指与以NCBI Ref No.NP_000912.3提供的催化环腺苷酸(cAMP)和环鸟苷酸(cGMP)的水解的序列具有至少85%氨基酸序列同一性的蛋白或其片段。示例性人全长PDE3A氨基酸序列在下面提供:

[0047]

MAVPGDAARVRDKPVHSGVSQAPTAGRDCCHRADPASPRDSGCRGCWGDVLVLQPLRSSRKLSSALCAGSLSFLLA
 LLVRLVRGEVGCLEQCKEAAAAEEEEAAPGAEGGVFPGRGGAPGGGARLSPWLQPSALLFSLCAFFWMGLYL
 LRAGVRLPLAVALLAACCGGEALVQIGLVGEDHLLSLPAAGVVLSCLAATWLVRLRLGLVLMIALTSVRTVS
 LISLERFKVAWRPYLAYLAGVLGILLARYVEQILPQSAEAAAPREHLGSQLIAGTKEDI PVFKRRRRSSSVSAEM
 SGCSSKSHRRTSLPCI PREQLMGHSEWDHKGPRGSQSSGTSITVDIAVMGEAHGLITDLLADPSLPPNVCTSLR
 AVSNLLSTQLTFQAIHKPRVNPVTSLSENYTCSDSEESSEKDKLAI PKRLRSLPGLLRVSSTWTTTTSATGL
 PTLEPAPVRDRSTSIKLQEAPSSSPDSWNNPVMMTLTKRSFTSSYAISAANHVKAKKQSRPGALAKISPLSSP
 CSSPLQGTTPASSLVSKISAVQFPESADTTAKQSLGSHRALTYTQSAPDLSPQILTPPVICSSCGRPYSQGNPADE
 PLERSGVATRTPSRDDTAQVTSYETNNNSDSSDIVQNEDETECLREPLRKASACSTYAPETMMFLDKPILAPE
 PLVMDNLD SIMEQLNTWNFPIDFLENIGRKCGRILSQVSYRLFEDMGLFEAFKIP IREFMNYFHALEIGYRDIP
 YHNRIHATDVLHAVWYLTTQPI PGLSTVINDHGSTSDSDSDSGFTHGHMGVVF SKTYNVTDDKYGCLSGNIPALE
 LMALYVAAAMHDYDHPGRTNAPFLVATSAPQAVLYNDRSVLENHHAAAWNLFMSRPEYNFLINLDHVEFKHFRFL
 VIEAILATDLKKHFDVFAKFNKGVNDVDVGIDWTNENDRLLVLCMCIKLADINGPAKCKELHLQWTDGIVNEFYEQ
 GDEEASLGLPISPFMDRSAPQLANLQESFISHIVGPLCNSYDSAGLMPGKWVEDSDSDSGD TDDPEEEEEAPAPN
 EETCENNESPKKKTFFKRRKIYCQITQHLLQNHKMWKVI EEEQRLAGIENQSLDQTPQSHSSEIQAIKEEEEE
 KGKPRGEEIPTQKPDQ (SEQ ID NO.: 3)

[0048] 已知三种PDE3A亚型：PDE3A1、PDE3A2，和PDE3A3。PDE3A1包含氨基酸146-1141，
 PDE3A2亚型2包含氨基酸299-1141，和PDE3A3包含全长PDE3A氨基酸序列的氨基酸483-
 1141。

[0049] “PDE3A多核苷酸”是指编码PDE3A多肽或其片段的任何核酸分子，包括DNA和RNA。
 示例性PDE3A核酸序列以NCBI Ref:NM_000921.4提供：

[0050]

1 gggggccact gggaattcag tgaagagggc accctatacc atggcagtgc
 ccggcgacgc
 61 tgcacgagtc agggacaagc ccgtccacag tggggtgagt caagccccc
 cggcgggccg
 121 ggactgccac catcgtgcgg accccgcac gccgcgggac tgggctgcc gtggctgctg
 181 gggagacctg gtgctgcagc cgctccggag ctctcgaaa ctttctccg cgtgtgcgc
 241 gggctccctg tcctttctgc tggcgtgct ggtgaggctg gtccgcggg aggtcggtg
 301 tgacctggag cagtgtagg aggcggcgcc ggcggaggag gaggaagcag ccccgggagc
 361 agaagggggc gtcttcccgg ggcctcgggg aggtgctccc gggggcggg cgcggctcag
 421 cccctggctg cagccctcgg cgctgctctt cagtctcctg tgtgcctct tctggatggg
 481 cttgtacctc ctgcgcgcc gggtgcgcct gcctctggct gtgcgcgtgc tggccgcctg
 541 ctgcgggggg gaagcgctc tccagattgg gctgggcgtc ggggaggatc acttactctc
 601 actccccgcc gcgggggtgg tgctcagctg cttggccgcc gcgacatggc tgggtgctgag
 661 gctgaggctg ggcgtcctca tgatcgctt gactagcgc gtcaggaccg tgtccctcat
 721 ttccttagag aggttcaagg tcgcctggag acctacctg gcgtacctg ccggcgtgct
 781 ggggatcctc ttggccaggt acgtggaaca aatcttgccg cagtccgcgg aggcggctcc
 841 aaggagcat ttgggggtccc agctgattgc tgggaccaag gaagatatcc cgggtgttaa
 901 gaggaggagg cggctccagc ccgtcgtgct cgcggagatg tccggctgca gcagcaagtc
 961 ccatcgagg accctccctgc cctgtatacc gaggaacag ctcattgggc attcagaatg
 1021 ggaccacaaa cgagggccaa gaggatcaca gtcttcagga accagtatta ctgtggacat
 1081 cgccgtcatg ggcgaggccc acggcctcat taccgacctc ctggcagacc cttctcttcc

[0051]

```
1141 accaaacgtg tgcacatcct tgagagccgt gagcaacttg ctcagcacac agctcacctt
1201 ccaggccatt cacaagccca gagtgaatcc cgtcacttcg ctcagtgaac actatacctg
1261 ttctgactct gaagagagct ctgaaaaaga caagcttgct attccaaagc gcctgagaag
1321 gagtttgcct cctggcttgt tgagacgagt ttcttccact tggaccacca ccacctcggc
1381 cacaggtcta cccaccttgg agcctgcacc agtacggaga gaccgcagca ccagcatcaa
1441 actgcaggaa gcaccttcac ccagtcctga ttcttggaa atccagtgat tgatgacctt
1501 caccaaaagc agatccttta cttcatccta tgctatttct gcagctaacc atgtaaaggc
1561 taaaaagcaa agtcgaccag gtgccttcgc taaaatttca cctctttcat cgccctgctc
1621 ctcacctctc caagggactc ctgccagcag cctggtcagc aaaatttctg cagtgcagtt
1681 tccagaatct gctgacacaa ctgccaacaa aagcctaggt tctcacaggg ccttaactta
1741 cactcagagt gccccagacc tatccctca aatcctgact ccacctgtta tatgtagcag
1801 ctgtggcaga ccatattccc aagggaatcc tgctgatgag cccctggaga gaagtgggtt
1861 agccactcgg acaccaagta gaacagatga cactgctcaa gttacctctg attatgaaac
1921 agataacaac agtgacagca gtgacattgt acagaatgaa gatgaaacag agtgcctgag
1981 agagcctctg aggaaagcat cggcttgacg cacctatgct cctgagacca tgatgtttct
2041 ggacaaacca attcttgctc ccgaacctct tgtcatggat aacctggact caattatgga
2101 gcagctaaat acttggaaat ttccaatttt tgatttagtg gaaaatatag gaagaaaatg
2161 tggccgtatt cttagtcagg tatcttacag actttttgaa gacatggggc tctttgaagc
2221 ttttaaaatt ccaattaggg aatttatgaa ttattttcat gctttggaga ttggatatag
2281 ggatattcct tatcataaca gaatccatgc cactgatgtt ttacatgctg tttggtatct
2341 tactacacag cctattccag gcctctcaac tgtgattaat gatcatgggt caaccagtga
2401 ttcagattct gacagtggat ttacacatgg acatatggga tatgtattct caaaaacgta
2461 taatgtgaca gatgataaat acggatgtct gtctgggaat atccctggct tggagttgat
2521 ggcgctgtat gtggctgcag ccatgcacga ttatgatcat ccaggaagga ctaatgcttt
2581 cctggttgca actagtgtct ctcaggcggt gctatataac gatcgttcag ttttgagaa
2641 tcatcacgca gctgctgcat ggaatctttt catgtccgg ccagagtata acttcttaat
2701 taaccttgac catgtggaat ttaagcattt ccgtttcctt gtcattgaag caattttggc
2761 cactgacctg aagaaacact ttgacttcgt agccaaattt aatggcaagg taaatgatga
2821 tgttggaaata gattggacca atgaaaatga tcgtctactg gtttgcataa tgtgtataaa
2881 gttggctgat atcaatggtc cagctaaatg taaagaactc catcttcagt ggacagatgg
2941 tattgtcaat gaattttatg aacagggtga tgaagaggcc agccttggat taccataag
3001 ccccttcatg gatcgttctg ctctcagct ggccaaacct caggaatcct tcatctctca
3061 cattgtgggg cctctgtgca actcctatga ttcagcagga ctaatgcctg gaaaatgggt
3121 ggaagacagc gatgagtcag gagatactga tgaccagaa gaagaggagg aagaagcacc
3181 agcaccaaat gaagaggaaa cctgtgaaaa taatgaatct ccaaaaaaga agactttcaa
3241 aaggagaaaa atctactgcc aaataactca gcacctotta cagaaccaca agatgtggaa
3301 gaaagtcatt gaagaggagc aacggttggc aggcatagaa aatcaatccc tggaccagac
3361 cctcagtcg cactcttcag aacagatcca ggctatcaag gaagaagaag aagagaaagg
3421 gaaaccaaga ggcgaggaga taccaccca aaagccagac cagtgcacaa ggtatgaatg
3481 ggctgtgttt ccaaacagat tgacttgtca aagactctct tcaagccagc acaacattta
3541 gacacaacac tgtagaaatt tgagatgggc aaatggctat tgcatttttg gattcttcgc
3601 attttgtgtg tatattttta cagtgaggta cattgttaaa aactttttgc tcaaagaagc
3661 tttcacattg caacaccagc ttctaaggat tttttaagga gggaatatat atgtgtgtgt
3721 gtatataagc tcccacatag atacatgtaa aacatattca caccatgca cgcacacaca
3781 tacacactga aggccacgat tgctggctcc acaatttagt aacatttata ttaagatata
3841 tatatagtgg tcaactgtat ataataaatc ataaaggaaa ccaaatcaca aaggagatgg
3901 tgtggcttag caaggaaaca gtgcaggaaa tgtaggttac caactaagca gcttttgcct
3961 ttagtactga gggatgaaag ttccagagca ttatttgaat tctgatacat cctgccaaca
4021 ctgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgaaaga gagacagaag
4081 ggaatggttt gagaggggtg ttgtgtgcat gtgtgtgcat atgtaaagag atttttgtgg
4141 ttttaagtaac tcagaatagc tgtagcaaat gactgaatac atgtgaacaa acagaaggaa
4201 gttcactctg gagtgtcttt gggaggcagc cattccaaat gccctcctcc atttagcttc
4261 aataaagggc cttttgctga tggagggcac tcaagggctg ggtgagagg ccactgtttt
4321 ggtattacat tactgctatg caccacttga aggagctcta tcaccagctt caaaccgaa
4381 agactgaggc attttccagt ctacttgctt aatgaatgta taggaactgt ctatgagtat
4441 ggatgtcact caactaagat caaatcacca ttttaagggga tggcattctt tatacctaaa
4501 cacctaagag ctgaagtcag gtcttttaat caggttagaa ttctaaatga tgccagagaa
4561 ggcttgggaa attgtacttc agcgtgatag cctgtgtctt cttaatttgc tgcaaaatat
4621 gtggtagaga aagaaaagga aacagaaaaa tcactctggg ttatatagca agagatgaag
4681 gagaatattt caacacaggg tttttgtgtt gacataggaa aagcctgatt cttggcaact
```

[0052]

```

4741 gttgtagttt gtctttcagg ggtgaaggtc ccactgacaa cccctgttgt ggtgttccac
4801 acgctgtttg ttggggtagc ttccatcggc agtctggccc attgtcagtc atgcttcttc
4861 tggccgggga gattatagag agattgtttg aagattgggt tattattgaa agtctttttt
4921 tttgttttgt ttgttttgtt ttgttttgtt atctacactt gtttatgctg tgagccaaac
4981 ctctatttta aaagttgata ctcaacttca atattttatt tcatattatt atatatgtca
5041 tgatagttat cttgatgtaa atatgaagat ttttttgttt ctgtagatag taaactcttt
5101 ttttaaaaaa ggaaaaggga aacattttta taaagttata ttttaatcac catttttata
5161 cattgtagtt ctctccaagc ccagtaagag aatgatgatt catttgcagtg gaggtcgatg
5221 gacaaccaat catctacett ttctaattta aatgataatc tgatatagtt ttattgccag
5281 ttaaatgagg atgctgcaaa gcatgttttt tcaactagtaa cttttgctaa ctgaatgaat
5341 tctgggtcca tatctcccag atgaaaaact gttaaccaat accatatttt atagttgggtg
5401 tccattttct tccaacactg tttgttatga ttcttccttg agtacttata tacagacctg
5461 ctcatattct aaacaatctt accttctaag taaaccttga ttgtgatttc cagtttttat
5521 tttctctgac gtagtagaaa ggaatgttta cattaanaat acttttgttt ctcataaatg
5581 gatattgtac tcccccttt caaagcatta tttacaata tttcaggga ttttaaaaaa
5641 taaggcaaaag ataatacgac aaaaaatata catggtttca aggcataatt tccaataagt
5701 tggaaaatgt aaaaaggatc aagtggatgc agcctctacc taaataatta aaatatattt
5761 cagtatatatt ctgaattaac accaggtctt cattatttag aacttactaa attgttttca
5821 ttttcttagt ttacctgtg tatctccatg tttgcaaaaa ttactataag tcaaattttg
5881 ccagtgaatt taactatttt tctttccttg caattaaggg gaaaaaagca tttatcttat
5941 cttctcatac cccttgcatc taagtactta gcaaagtcaa tattttccca ttttccaaat
6001 ggcctcatct ctaacataaa tattaattga acatagagct atgtttggag tgagtggact
6061 ggcaggacag ttggaagtc atcacagtct attgacagtt tcatcaaagc tgtatagctc
6121 aactagtggg gcagcttggc tactatgggt gaagtctcag caaactgcct ggttttgttt
6181 gtttgttttg ttttaaggta caggaaataa gaggaataat agtggccaaa gcaattagaa
6241 catcttcatt ccagaactgt gttcagcaat ccaggcagat tgatacattt tcttttaaaa
6301 ataaattgct attacagcta gacgtcaatt gggataaata aagggatgaa gatccactaa
6361 gtttgtgact ttcatacaca cccagtacat ctcaaaggat gctaagggac attttctgcc
6421 agtagagttc tccccctttt tggtagacgc aatattatta tgttcacatc taactccaga
6481 gcttacttcc tgtggtgcca atgtatttgt tgcaatttac tacatttata tatgagccta
6541 tttatagggt ccattaaact caggtctttc aaatgaaaga gtttctagct cacttaggga
6601 aaaagataat tgtttagaaa accataaaat caatggtagg aaaagttgga actggttacc
6661 tggatgccat ggttctctgt taaataaagt aagagaccag gtgtattctg agtgtcatca
6721 gtgttatttt cagcatgcta ataaatgtct ttccggttat atatctatct aaattaacct
6781 ttaaaatatt ggtttccttg ataaaagcac cacttttgct tttgttagct gtaatatatt
6841 ttgtcattta gataagacct ggtttggtc tcaataaaaag atgaagacag tagctctgta
6901 cagggatata tctatattag tcttcatctg atgaatgaag aaattttctc atattatggt
6961 caagaaagta tttacttctt aaaaatagaa ttcccgattc tgtctatttt ggttgaatac
7021 cagaacaaat ctttccggtg caatcccagt aaaacgaaaag aaaaggaata tcttacagac
7081 tgttcataat agatgtatgt agactgttaa tttgcaattt ccccatattt cctgcctatc
7141 ttaccacgat aactttcttt gaaggtaaaa gctgtgcaaa aggcattgaga ctcaggccta
7201 ctctttgttt aaatgatgga aaaaataaaa ttattttcta agtaataaaa gtataaaaat
7261 tatcattata aataaagtct aaagtttgaa attattaatt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

(SEQ ID NO.: 4)

[0053] “Schlafen 12 (SLFN12) 多肽”是指与以NCBI Ref No.NP_060512.3提供的与PDE3A相互作用的序列(当结合至阿那格雷、扎达维林或者DNMDP和相关化合物时)具有至少85%氨基酸序列同一性的蛋白或其片段。示例性人SLFN12氨基酸序列在下面提供:

[0054]

```

MNISVDLETNYAELVLDVGRVTLGENSRKKMKDCKLRKKQNESVSRAMCALLNSGGGVKAEIENEDYSYTKDGI
GLDLENSFSNILLFVPEYLDQMONGNYFLIFVKSWSLNTSGLRITTLSSNLYKRDITSKVMNATAALEFLKDMK
KTRGRLYLRPELLAKRPCVDIQEENNMKALAGVFFDRTELDRKEKLTFTSTHVEIKNFSTEKLLQRIKEILPQY
VSAFANTDGGYLFIFGLNEDKEIIGFKAEMSDLLDERIEKSIRKMPVHHFCMEKKKINYSCKFLGVYDKGSLCG
YVICALRVERFCCAVFAKEPDSWHVKDNRVMQLTRKEWIQFMVEAPKPFSSSYEEVISQINTSLPAPHSWPLEWQ
RQRHHCPLSGRITYTPENLCRKLFLQHEGLKQLICEEMDSVRKGSILFERSWSVDLGLQENHKVLCDALLISQD
SPPVLYTFHMQDEEFKGYSTQTALTLKQKLAKIGGYTKKVCVMTKIFYLSPEGMTSCQYDLRSQVIYPESYYFT
RRKYLKALFKALKRLKSLRDQFSFAENLYQIIGIDCFQKNDKMKFSCRRLT (SEQ ID NO.: 5)

```

[0056] “Schlafen 12 (SLFN12) 多核苷酸”是指编码SLFN12多肽或其片段的任何核酸分子,包括DNA和RNA。示例性SLFN12核酸序列以NCBI Ref:NM_018042.4提供:

1 tttgtaaactt cacttcagcc tcccattgat cgctttctgc aaccattcag actgatctcg
61 ggctcctatt tcattttacat tgtgtgcaca ccaagtaacc agtgggaaaa ctttagaggg
121 tacttaaacc ccagaaaatt ctgaaaccgg gctcttgagc cgctatcctc gggcctgctc
181 ccaccctgtg gagtgcactt tcgttttcaa taaatctctg cttttgttgc ttcattcttt
241 ccttgctttg tttgtgtgtt tgtccagttc tttgttcaac acgccaagaa cctggacact
301 cttcactggg aacatatttt ggcaagccaa ccaggagaaa agaatttctg cttggacact
361 gcatagctgc tgggaaaatg aacatcagtg ttgatttgga aacgaattat gccgagttgg
421 ttctagatgt gggaagagtc actcttgagg agaacagtag gaaaaaatg aaggattgta
481 aactgagaaa aaagcagaat gaaagtgtct cagcagctat gtgtgctctg ctcaattctg
541 gagggggagt gatcaaggct gaaattgaga atgaagacta tagttatata aaagatggaa
601 taggactaga tttggaaaat tcttttagta acattctgtt atttgttctt gagtacttag
661 acttcatgca gaatggtaac tactttctga tttttgtgaa gtcattggagc ttgaacacct
721 ctggtctgcg gattaccacc ttgagctcca atttgtacaa aagagatata acatctgcaa
781 aagtcattgaa tgccactgct gcaactggag tctcaaaga catgaaaaag actagagggg
841 gattgtattt aagaccagaa ttgctggcaa agaggccctg tgttgatata caagaagaaa
901 ataacatgaa ggccctggcc ggggtttttt ttgatagaac agaacttgat cggaaagaaa
961 aattgacctt tactgaatcc acacatgttg aaattaaaaa cttctcgaca gaaaagttgt
[0057] 1021 tacaacgaat taaagagatt ctccctcaat atgtttctgc atttgcaaat actgatggag
1081 gatatttgtt cattggttta aatgaagata aagaaataat tggctttaa gacagatga
1141 gtgacctga tgacttagaa agagaaatcg aaaagtccat taggaagatg cctgtgcatc
1201 acttctgtat ggagaagaag aagataaatt attcatgcaa attccttgga gtatatgata
1261 aaggaagtct ttgtggatat gtctgtgcac tcagagtgga gcgcttctgc tgtgcagtgt
1321 ttgctaaaga gctgattcc tggcatgtga aagataaccg tgtgatgcag ttgaccagga
1381 aggaatggat ccagttcatg gtggaggctg aaccaaaatt ttccagttca tatgaagagg
1441 tgatctctca aataaatacg tcattacctg ctccccacag ttggcctctt ttggaatggc
1501 aacggcagag acatcactgt ccagggctat caggaaggat aacgtatact ccagaaaacc
1561 tttgcagaaa actgttctta caacatgaag gacttaagca attaatatgt gaagaaatgg
1621 actctgtcag aaagggctca ctgatcttct ctaggagctg gtctgtggat ctgggcttgc
1681 aagagaacca caaagtcctc tgtgatgctc ttctgatttc ccaggacagt cctccagtcc
1741 tatacacctt ccacatggta caggatgagg agtttaaagg ctattctaca caaactgccc
1801 taaccttaaa gcagaagctg gcaaaaattg gtggttacac taaaaaagtg tgtgtcatga
1861 caaagatctt ctacttgagc cctgaaggca tgacaagctg ccagtatgat ttaaggctgc
1921 aagtaattta ccctgaatcc tactatttta caagaaggaa atacttgctg aaagcccttt
1981 ttaaagcctt aaagagactc aagtctctga gagaccagtt ttcccttgca gaaaatctat
2041 accagataat cggatatgat tgctttcaga agaataataa aaagatgttt aaatcttgtc
2101 gaaggctcac ctgatggaaa atggactggg ctactgagat atttttcatt atatatttga
2161 taacattctc taattctgtg aaaatatttc tttgaaaact ttgcaagtta agcaacttaa
2221 tgtgatgttg gataattggg ttttgtctat ttccacttct ccctaaataa tcttcacaga
2281 tattgtttga gggatattag gaaaattaat ttgttaactc gtctgtgcac agtattattt
[0058] 2341 actctgtctg tagttcctga ataaattttc ttccatgctt gaactgggaa aattgcaaca
2401 cttttattct taatgacaac agtgaaaatc tcccagcata tacctagaaa acaattataa
2461 cttacaaaag attatccttg atgaaactca gaatttcac agtggggaatg aataagaagg
2521 caaaactcat (SEQ ID NO.: 6)

[0059] 在一些方面,所述化合物为异构体。“异构体”是具有相同的分子式的不同化合

物。”立体异构体”是区别仅为原子的空间排列方式的异构体。本文使用的术语”异构体”包括任何和所有几何异构体和立体异构体。例如, ”异构体”包括落在本发明范围内的几何双键顺式-和反式-异构体, 也被称为E-和Z-异构体; R-和S-对映异构体; 非对映异构体, (d)-异构体和 (l)-异构体、其外消旋混合物; 及其其它混合物。

[0060] 几何异构体可通过符号 --- 表示, 该符号表示键, 其可为单键、双键或者三键, 如本文中所述。本文提供由碳-碳双键周围的取代基的排列或碳环周围的取代基排列而得到的各种几何异构体及其混合物。碳-碳双键周围的取代基被指定为“Z”或“E”构型, 其中根据IUPAC标准使用术语“Z”和“E”。除非另有说明, 具有双键的结构包括E异构体和Z异构体。

[0061] 或者, 碳-碳双键周围的取代基可被称为“顺式”或“反式”, 其中“顺式”表示取代基在双键的同一侧, “反式”表示取代基在双键的相对侧上。碳环上的取代基的排列可被称为“顺式”或“反式”。该术语“顺式”表示取代基在环平面的同一侧, 和术语“反式”表示取代基在环平面的相对侧。其中取代基位于环平面的相同侧的化合物和位于相对侧上的化合物的混合物称为“顺式/反式”。

[0062] 术语“对映异构体”是指一对彼此不可重叠镜像的立体异构体。具有不对称取代基的原子可以产生对映异构体。任何比例的一对对映异构体的混合物可以称为“外消旋”混合物。术语“(±)”在适当时用于指定外消旋混合物。“非对映异构体”是具有至少两个不对称原子的立体异构体, 但它们不是彼此的镜像。绝对立体化学根据Cahn-Ingold-Prelog R-S系统来确定。当化合物是对映体时, 每个手性碳处的立体化学可以由R或S指定。取决于在钠D线波长处旋转平面偏振光的方向(右旋或左旋), 可以将绝对构型未知的拆分的化合物指定为(+)或(-)。本文所述的某些化合物含有一个或多个不对称中心, 因此可产生对映异构体, 非对映异构体和其它立体异构形式, 其可根据每个不对称原子处的绝对立体化学定义为(R)-或(S)-。本发明的化学实体, 药物组合物和方法意在包括所有这些可能的异构体, 包括外消旋混合物, 光学上基本上纯的形式和中间体混合物。

[0063] 光学活性(R)-和(S)-异构体可以例如使用手性合成子或手性试剂来制备, 或者使用常规技术拆分。可通过本领域技术人员已知的任何方法(包括手性高压液相色谱法(HPLC), 手性盐的形成和结晶)从外消旋混合物中分离对映异构体或通过不对称合成制备。

[0064] 光学异构体可通过根据常规方法拆分外消旋混合物(例如通过用光学活性酸或碱处理来形成非对映异构体盐)来获得。合适的酸的例子是酒石酸, 二乙酰基酒石酸, 二苯甲酰基酒石酸, 二甲苯甲酰基酒石酸和樟脑磺酸。通过结晶分离非对映异构体的混合物, 然后从这些盐中游离旋光碱实现异构体的分离。另一种方法包括通过使所公开的化合物与活化形式的光学纯酸或光学纯的异氰酸酯反应来合成共价非对映异构体分子。合成的非对映异构体可通过常规方法如色谱法, 蒸馏, 结晶或升华分离, 然后水解以提供对映体富集的化合物。光学活性化合物也可以通过使用活性起始原料来获得。在一些实施方案中, 这些异构体可以是游离酸, 游离碱, 酯或盐的形式。

[0065] 在一些实施方案中, 本发明化合物可为互变异构体。如本文所用, 术语“互变异构体”是一种异构体, 其包括由至少一种氢原子的正式迁移和至少一种化合价变化(例如, 单键变成双键, 三键变成单键, 反之亦然)产生的两种或更多种相互转化的化合物。“互变异构化”包括质子异变互变异构或质子转移互变异构, 其被认为是酸碱化学的子集。“质子异变互变异构”或“质子转移互变异构”涉及伴随着键级变化的质子迁移。互变异构体的确切比

率取决于数个因素,包括温度、溶剂和pH。在可能进行互变异构化的情况下(例如在溶液中),可达到互变异构体的化学平衡。互变异构化(即,该反应提供了互变异构对)可被酸或碱催化,或者可以在没有外部试剂的作用或存在的情况下发生。示例性互变异构化包括但不限于,酮-至-烯醇、酰胺-至-酰亚胺、内酰胺-至-内酰亚胺、烯胺-至-亚胺和烯胺-至-(不同的)烯胺互变异构化。酮-烯醇互变异构化的具体实例是戊烷-2,4-二酮和4-羟基戊-3-烯-2-酮互变异构体的相互转化。互变异构化的另一个实例是酚-酮互变异构化。酚-酮互变异构化的具体实例为吡啶-4-酚和吡啶-4(1H)-酮互变异构体的相互转化。

[0066] 除非特别指明具体的立体化学或异构体形式,否则既定包括所有手性,非对映异构体,外消旋体和几何异构体形式。所有用于制备本发明化合物和其中制备的中间体的方法被认为是本发明的一部分。所示或所述化合物的所有互变异构体也被认为是本发明的一部分。

[0067] “试剂”是指任何小分子化学化合物、抗体、核酸分子,或者多肽,或其片段。

[0068] “改善”是指降低,抑制,减弱,减少,阻止或稳定疾病的发展或进展。

[0069] “改变”是指通过本领域已知方法(如本文所述的方法)检测到的基因或多肽表达水平或活性的改变(增加或减少)。如本文所用,改变包括表达水平的约10%变化,优选约25%变化,更优选约40%变化,最优选约50%或更大变化。

[0070] “类似物”是指不相同但具有类似功能或结构特征的分子。例如,多肽类似物保留相应的天然存在的多肽的生物学活性,同时具有相对于天然存在的多肽增强类似物功能的某些生物化学修饰。这种生物化学修饰可以提高类似物的蛋白酶抗性,膜渗透性或半衰期,而不会改变例如配体结合。类似物可以包含非天然氨基酸。

[0071] 在本公开中,“包含(comprise)”,“包括”,“含有”和“具有”等可以具有美国专利法中赋予它们的含义,并且可以表示“包括(include)”,“包含”等;“基本上由.....组成(consisting essentially of或consist essentially)”同样具有美国专利法中所赋予的含义,并且该术语是开放式的,允许存在多于所叙述的含义,只要所述含义的基本或新颖特征不会因存在多于所引用的而改变,但排除现有技术实施例。

[0072] “检测”是指鉴别待检测分析物的存在,不存在或含量。在具体的实施方案中,分析物是PDE3A或SLFN12多肽。

[0073] “疾病”是指损害或干扰细胞、组织或器官的正常功能的任何病症或障碍。疾病的例子包括黑素瘤,腺癌,肺癌,宫颈癌,肝癌和乳腺癌。

[0074] “有效量”是指相对于未治疗患者,本文所述的化合物改善疾病症状所需的量。用于实施本发明用于治疗疾病的活性化合物的有效量取决于给药方式,受试者的年龄,体重和一般健康状况而变化。最终,主治医师或兽医将决定适当的剂量和剂量方案。这一数额被称为“有效”量。在一个实施方案中,该化合物是DNMDP、扎达维林或阿那格雷。

[0075] 本发明提供了许多用于研发高度特异性药物以治疗以本文描述的方法为特征的病症的靶标。另外,本发明的方法提供了一种简便的手段来鉴定在受试者中安全使用的疗法。另外,本发明的方法提供了一种途径,用于以高通量,高灵敏度和低复杂度分析用于影响本文所述疾病的几乎任何数量的化合物。

[0076] “片段”是指多肽或者核酸分子的一部分。优选地,这种部分含有参考核酸分子或者多肽的全部长度的至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约

80%，或者约90%。片段可含有约10、约20、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90、约100、约200、约300、约400、约500、约600、约700、约800、约900，或者约1000个核苷酸或者氨基酸。

[0077] “杂交”是指互补核碱基之间的氢键，其可以是Watson-Crick, Hoogsteen或反Hoogsteen氢键。例如，腺嘌呤和胸腺嘧啶是通过形成氢键配对的互补核碱基。

[0078] “标记”或“生物标记”是指具有与疾病或病症相关的表达水平或活性（例如，在蛋白或mRNA水平）改变的任何蛋白或多核苷酸。在具体的实施方案中，本发明的标记是PDE3A或SLFN12。

[0079] “调节剂”是指结合多肽并改变多肽的生物学功能或活性的任何试剂。调节剂包括但不限于降低或消除多肽的生物学功能或活性的试剂（例如“抑制剂”）。例如，调节剂可以抑制多肽的催化活性。调节剂包括但不限于增加或减少多肽与另一种试剂结合的试剂。例如，调节剂可以促进多肽与另一种多肽结合。在一些实施方案中，PDE3A多肽的调节剂是DNMDP。在一些其他实施方案中，PDE3A多肽的调节剂是阿那格雷或扎达维林。

[0080] “参考”是指标准或对照条件。

[0081] 可用于本发明方法中的核酸分子包括编码本发明多肽或其片段的任何核酸分子。此类核酸分子不需要与内源核酸序列100%相同，但通常会表现出实质的同一性。与内源序列具有“基本同一性”的多核苷酸通常能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。可用于本发明方法中的核酸分子包括编码本发明多肽或其片段的任何核酸分子。此类核酸分子不需要与内源核酸序列100%相同，但通常会表现出实质的同一性。与内源序列具有“基本同一性”的多核苷酸通常能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。“杂交”意指在各种严格条件下配对以在互补多核苷酸序列（例如，本文所述的基因）或其部分之间形成双链分子。（参见例如，Wahl, G.M. 和 S.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507)。

[0082] 例如，严格的盐浓度通常将小于约750mM NaCl和75mM柠檬酸三钠，优选小于约500mM NaCl和50mM柠檬酸三钠，并且更优选小于约250mM NaCl和25mM柠檬酸三钠。在不存在有机溶剂（例如甲酰胺）的情况下可以获得低严格杂交，而在至少约35%甲酰胺，更优选至少约50%甲酰胺存在下可以获得高度严格杂交。严格的温度条件通常将包括至少约30℃，更优选至少约37℃，最优选至少约42℃的温度。改变附加参数是本领域技术人员所熟知的，例如杂交时间，去污剂（例如十二烷基硫酸钠(SDS)）浓度，和包含或排除载体DNA。通过根据需要组合这些各种条件来实现各种严格度水平。在优选的实施方案中，杂交将在30℃在750mM NaCl, 75mM柠檬酸三钠和1%SDS中发生。在更优选的实施方案中，杂交将在37℃在500mM NaCl, 50mM柠檬酸三钠, 1%SDS, 35%甲酰胺和100μg/ml变性鲑鱼精子DNA(ssDNA)中发生。在最优选的实施方案中，杂交将在42℃在250mM NaCl, 25mM柠檬酸三钠, 1%SDS, 50%甲酰胺和200μg/ml ssDNA中发生。这些条件的有用变化对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0083] 对于大多数应用，杂交后的洗涤步骤在严格度上也会有所不同。洗涤严格条件可以通过盐浓度和温度来定义。如上所述，可通过降低盐浓度或通过增加温度来增加洗涤严格性。例如，洗涤步骤的严格盐浓度优选小于约30mM NaCl和3mM柠檬酸三钠，并且最优选小于约15mM NaCl和1.5mM柠檬酸三钠。洗涤步骤的严格温度条件通常包括至少约25℃，更优选至少约42℃，甚至更优选至少约68℃的温度。在优选实施方案中，洗涤步骤将在30mM

NaCl, 3mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中于25℃发生。在更优选的实施方案中,洗涤步骤将在42℃在15mM NaCl, 1.5mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中发生。在更优选的实施方案中,洗涤步骤将在68℃在15mM NaCl, 1.5mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中发生。这些条件的其他变化对于本领域技术人员来说将是显而易见的。杂交技术对于本领域技术人员来说是熟知的并且描述于例如Benton和Davis (Science 196:180, 1977); Grunstein和Hogness (Proc.Natl.Acad.Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel等人 (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger和Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); 和Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York中。

[0084] “基本上相同”是指与参考氨基酸序列(例如,本文所述的任何一种氨基酸序列)或核酸序列(例如,本文所述的任何一种核酸序列)显示至少50%同一性的多肽或核酸分子。优选地,这样的序列在氨基酸水平或核酸水平处与用于比较的序列相比至少60%,更优选80%或85%,并且更优选90%, 95%或甚至99%相同。

[0085] 序列同一性通常使用序列分析软件测得(例如, Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705的Sequence Analysis Software Package、BLAST、BESTFIT、GAP, 或者PILEUP/PRETTYBOX程序)。这样的软件通过为各种取代, 删除和/或其他修饰指定同源性程度来匹配相同或相似的序列。保守取代通常包括以下组内的取代: 甘氨酸, 丙氨酸; 缬氨酸, 异亮氨酸, 亮氨酸; 天冬氨酸, 谷氨酸, 天冬酰胺, 谷氨酰胺; 丝氨酸, 苏氨酸; 赖氨酸, 精氨酸; 和苯丙氨酸, 酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中, 可以使用BLAST程序, 其中 e^{-3} 与 e^{-100} 之间的概率分数指示密切相关的序列。

[0086] “受试者”是指哺乳动物, 包括但不限于人类或非人类哺乳动物, 例如牛, 马, 犬, 绵羊或猫科动物。

[0087] 本文提供的范围被理解为范围内的所有值的简写。例如, 1至50的范围被理解为包括来自下组的任何数量、数值组合或子范围: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49, 或者50。

[0088] 如本文所用, 术语“治疗”等涉及减轻或改善障碍和/或与其相关的症状。应该理解, 虽然不排除, 但治疗障碍或病症并不需要障碍, 病症或与其相关的症状完全消除。

[0089] 除非特别说明或从上下文中明显看出, 否则如本文所用, 术语“或”应理解为包含性的。除非特别声明或从上下文明显看出, 否则如本文所使用的, 术语“一”, “一个”和“该”被理解为单数或复数。

[0090] 除非特别说明或从上下文中明显看出, 否则如本文所用, 术语“约”应理解为在本领域的正常容差范围内, 例如在平均值的2个标准偏差内。约可以理解为在指定值的10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%或0.01%内。除非上下文另有明确说明, 否则本文提供的所有数值均由术语“约”修饰。

[0091] 在本文的变量的任何定义中列出的化学基团列表包括该变量作为任何单个基团或所列基团组合的定义。本文针对变量或方面的实施例的叙述包括作为任何单个实施例的

实施例或与其它实施例或其部分的组合。

[0092] 本文提供的任何组合物或方法可以与本文提供的任何其他组合物和方法中的一种或多种组合。

[0093] 1. 杀灭由于对磷酸二酯酶3A (PDE3A) 调节剂应答而选出的癌细胞或者减少其存活的方法, 所述方法包括使所述细胞与PDE3A调节剂接触从而减少所述癌细胞的存活, 其中选出由于相对于参考具有PDE3A和/或Schlafen12 (SLFN12) 多肽或者多核苷酸的水平增加的细胞。

[0094] 2. 在患有由于对PDE3A调节剂应答的癌症而预先选出的受试者中减少癌细胞增殖的方法, 所述方法包括向所述受试者给药PDE3A调节剂, 从而减少癌细胞增殖, 其中所述受试者通过检测相对于参考的PDE3A和/或SLFN12多肽或者多核苷酸的水平增加而预先选出。

[0095] 3. 项1或者2的方法, 其中所述PDE3A调节剂选自6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)、扎达维林, 和阿那格雷, 或其药学上可接受的盐。

[0096] 4. 鉴别具有对PDE3A调节应答的癌细胞的受试者的方法, 所述方法包括在受试者的生物样品中检测相对于参考的PDE3A和/或SLFN12多肽或者多核苷酸的水平增加, 由此将所述受试者鉴别为具有对PDE3A调节应答的癌症。

[0097] 5. 鉴别患有对PDE3A调节耐受的癌症的受试者的方法, 所述方法包括在受试者的生物样品中检测相对于参考的SLFN12多肽或者多核苷酸水平的减少, 由此将所述受试者鉴别为患有耐受PDE3A调节的癌症。

[0098] 6. 项1、2、4和5中的任一项的方法, 其中所述PDE3A或者SLFN12的水平通过选自以下的方法检测: 免疫印迹、质谱, 和免疫沉淀。

[0099] 7. 项1、2、4和5中的任一项的方法, 其中所述PDE3A或者SLFN12多核苷酸的水平通过选自以下的方法检测: 定量PCR、蛋白印迹、微阵列、质谱, 和原位杂交。

[0100] 8. 项1、2、4和5中的任一项的方法, 其中所述癌细胞为黑色素瘤、子宫内膜癌、肺癌、造血/淋巴样癌、卵巢癌、宫颈癌、软组织肉瘤、平滑肌肉瘤、泌尿道癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、胶质母细胞瘤, 或者乳腺癌细胞。

[0101] 9. 项1、2、4和5中的任一项的方法, 其中所述癌细胞不是B-细胞增殖型癌症。

[0102] 10. 项1、2、4和5中的任一项的方法, 其中所述癌细胞不是多发性骨髓瘤。

[0103] 11. 项1或者2的方法, 其中所述PDE3A调节剂减少PDE3A活性。

[0104] 12. 项2的方法, 其中所述PDE3A调节剂口服给药。

[0105] 13. 项2的方法, 其中所述PDE3A调节剂通过静脉内注射给药。

[0106] 14. 项4的方法, 其中所述生物样品为包含癌细胞的组织样品。

[0107] 15. 用于鉴别患有对PDE3A调节应答的癌症的受试者的试剂盒, 所述试剂盒包含结合PDE3A多肽或者多核苷酸的第一捕获试剂和结合SLFN12多肽或者多核苷酸的第二捕获试剂。

[0108] 16. 用于在由于对PDE3A调节剂应答而预先选出的受试者中减少癌细胞增殖的试剂盒, 所述试剂盒包含有效量的DNMDP、扎达维林和/或阿那格雷, 或其药学上可接受的盐。

[0109] 17. PDE3A调节剂用于制造用于治疗癌症的药物的用途, 其中所述PDE3A调节剂选自6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)、扎达维林,

和阿那格雷,或其药学上可接受的盐。

[0110] 18. 项18的用途,其中所述癌症为黑色素瘤、子宫内膜癌、肺癌、造血/淋巴样癌、卵巢癌、宫颈癌、软组织肉瘤、平滑肌肉瘤、泌尿道癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、胶质母细胞瘤,或者乳腺癌。

附图说明

[0111] 图1A-1D显示6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)(一种有效和选择性的癌细胞细胞毒剂)的鉴别和表征。图1A是1924个化合物的散点图,显示了TP53突变体NCI-H1734细胞(其是非小细胞肺癌细胞系)和TP53野生型A549细胞(另一种肺癌细胞系)在以10 μ M的浓度处理48小时后的平均生存力。DNMDP用大箭头表示。用小箭头表示选择性杀灭NCI-H1734细胞的其他化合物。阳性对照星状孢子素用长箭头表示。图1B是线性图,显示用所示浓度的DNMDP处理48小时的一组细胞系。图1C是线性图,显示用指定浓度的DNMDP的分离的对映体处理48小时的HeLa细胞系。与(S)-对映异构体相比,(R)-对映异构体的EC₅₀更有效500倍。图1D是(R)-DNMDP的结构。

[0112] 图2显示DNMDP选择性杀死NCI-H1734并且不影响A549中的细胞生存力。将NCI-H1734和A549细胞系用指定的化合物和浓度处理48小时。

[0113] 图3显示(R)-6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮((R)-DNMDP)和类似物的合成方案。反应条件如下:(a) Ac₂O, (91%); (b) 90% HNO₃, H₂SO₄, (19%); (c) NaOH, MeOH/H₂O, (100%), 然后CH₃CHO, NaBH(OAc)₃, (7%); (d) (BrCH₂CH₂)₂O, K₂CO₃, DMF, (46%); (e) CH₃CHO, NaBH₃CN, MeOH, (82%)。

[0114] 图4A-4C显示6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)的超临界流体(SCF)色谱(顶部至底部:ES+、二极管阵列、ES-迹线)。图4A是显示峰1的三个色谱(CR0分离);图4B是显示峰2的三个色谱(CR0分离);图4C是显示合成的(R)-DNMDP的三个色谱(通过uv测定,峰1:2的比率为5:95)。

[0115] 图5A-5C显示,磷酸二酯酶3A(PDE3A)表达与对6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)的敏感性相关,但是抑制PDE3A介导的cAMP水解与细胞毒性不相关。图5A是显示在766个基因组表征的细胞系中的DNMDP敏感性与18,988个基因的表达之间的相关性的散点图。将细胞系以2倍连续稀释的66.4 μ M-2nM的浓度处理72小时。在PDE3A表达与DNMDP敏感性之间的Pearson相关性的Z评分为8.5。图5B是显示用480个化合物处理的来自A组的细胞系的结果的散点图。DNMDP显示出在PDE3A表达与敏感性之间的最佳相关性。图5C是散点图,其显示用至多10 μ M的指定化合物处理48小时的HeLa细胞的公布的PDE3抑制剂IC₅₀值和EC₅₀值。PDE3A抑制的DNMDP IC₅₀浓度在图7B中测定。

[0116] 图6A-6C分别显示6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)、氰胍佐旦和左西孟旦的化学结构。

[0117] 图7A和7B是显示6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)的磷酸二酯酶3A(PDE3A)体外IC₅₀的测定的图。图7A显示用指定浓度的阳性对照曲喹辛的PDE3A体外抑制(IC₅₀曲线通过Caliper实施)。图7B显示用指定浓度的DNMDP的PDE3A体外抑制(IC₅₀曲线通过Caliper实施)。

[0118] 图8A和8B是显示cAMP信号传输的诱导没有表型模拟由6-(4-(二乙基氨基)-3-硝

基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)诱导的细胞毒性的图。福司柯林:FSK。图8A显示在HeLa细胞中的在用指定化合物和浓度处理1小时之后测得的cAMP浓度。图8B显示用指定化合物和浓度处理48小时的HeLa细胞的生存力。

[0119] 图9A-9C显示,非致死的磷酸二酯酶3(PDE3)抑制剂通过竞争结合PDE3A拯救由6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)诱导的细胞死亡。图9A是显示用浓度为20 μ M的1600个生物活性化合物与30nM(EC70)的DNMDP处理48小时的HeLa细胞的生存力的散点图。将生存力计算为未处理的DMSO对照的百分比。图9B是显示用DNMDP联合指定浓度的非致死PDE3和泛PDE抑制剂处理48小时的HeLa细胞的生存力的线性图。图9C显示了SDS-PAGE凝胶,其描绘了使用与非致死性PDE3抑制剂具有相同拯救特性的固定至固相的DNMDP连接基类似物对200 μ g HeLa细胞裂解物进行亲和纯化的结果。将示出的化合物与所述连接基类似物共同孵育。将亲和纯化的级份在SDS-PAGE凝胶上电泳并探测PDE3A。

[0120] 图10A和10B显示连接基化合物(R)-(2-(2-(2-(乙基(4-(4-甲基-6-氧代-1,4,5,6-四氢吡嗪-3-基)苯基)氨基)乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁基酯(DNMDP)-2L的结构和拯救表型。图10A显示DNMDP-2L的结构。图10B是显示用指定化合物和浓度处理48小时的HeLa细胞的生存力的图。

[0121] 图11A-11C显示磷酸二酯酶3A(PDE3A)在敏感细胞系中不是必不可少的,但是是传递细胞毒性信号所必需的。图11A是蛋白印迹。用Cas9感染HeLa细胞并显示针对PDE3A的引导RNA(sgRNA)。在指定的时间点针对PDE3A探测蛋白印迹。图11B是条形图,其显示用指定sgRNA感染2周并用1 μ M的6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)处理48小时的HeLa细胞的拯救百分比。将拯救百分比标准化为仅Cas9对照。图11C是显示用指定的sgRNA感染并用各种浓度的6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)处理的细胞的生存力的图。

[0122] 图12A和12B是蛋白印迹和图表,其显示磷酸二酯酶3A(PDE3A)蛋白水平的降低导致对6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)的抗性。在图12A中,用混杂的对照siRNA或靶向PDE3A的四种不同siRNA的组合处理HeLa细胞。在指定的时间点裂解细胞并免疫印迹其中的PDE3A和肌动蛋白。图12B是显示用指定浓度的DNMDP类似物3处理48小时的HeLa细胞的生存力的线性图。

[0123] 图13A-13C显示在6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)存在下的磷酸二酯酶3A(PDE3A)免疫沉淀揭示新的SIRT7和SLFN12相互作用。图13A显示了在HeLa细胞中进行的PDE3A的亲和富集和随后的定量蛋白组学的示意图。所有细胞在裂解之前用10 μ M指定化合物处理4小时。整个实验过程中都保持了所有化合物的存在,包括洗涤步骤。图13B是散点图,其显示与对PDE3A抗体特异性的封闭肽存在下的抗-PDE3A免疫沉淀物相比,在DMSO处理的HeLa细胞中的抗-PDE3A免疫沉淀物中富集的蛋白的log₂比率;每个点代表一种蛋白。图13C是显示在DNMDP与曲喹辛存在下,与PDE3A结合的蛋白的变化的Log₂比率的散点图。每个点表示单个蛋白的每个条件的两个重复(replicate)的平均值。在所有情况下,绘制的数据的重现性通过了置信区间为95%的Bland-Altman检验。

[0124] 图14A-14C显示了在不同条件下使用PDE3A作为诱饵的重复PDE3A-蛋白相互作用

研究的结果。每个散点图显示了在阻断肽存在下,通过PDE3A富集在不同条件下由PDE3A富集的两个蛋白重复的 \log_2 比率。每个点代表该特定蛋白的 \log_2 比率,中灰点对应于Benjamini-Hochberg调整的 p 值 <0.01 ,浅灰点代表在95%置信区间内重现性落在Blandt-Altman检验外面的蛋白。在图14A中,通过使用抗PDE3A的免疫沉淀完成蛋白富集。在图14B中,通过在DNMDP存在下使用抗PDE3A的免疫沉淀完成蛋白富集。在图14C中,蛋白富集在曲喹辛的存在下通过使用抗-PDE3A免疫沉淀完成。

[0125] 图15A-15E显示具有双重表达SLFN12和PDE3A的细胞系显著富集DNMDP敏感性细胞系。图15A是散点图,其显示来自具有所示敏感细胞系的癌细胞系百科全书(CCLE)数据库(一大组人类癌细胞系的详细遗传特征)的PDE3A和SLFN12的mRNA稳健多芯片平均(robust multichip average)(RMA)表达值(Barretina等人,Nature 483,603-607,2012)。根据曲线下面积(AUC)等级,将21个敏感细胞系分为三组,每组7个。图15B是显示与其他细胞系相比,具有高表达SLFN12和PDE3A二者(RMA $\log_2 > 5$)的细胞系的DNMDP敏感性的Fisher精确检验结果的条形图。右边的条的上半部分表示黑素瘤细胞系。图15C是显示来自RNA测序数据的PDE3A和SLFN12的mRNA RPKM+1表达值的散点图。图15D是显示用shSLFN12转导的HeLa细胞中SLFN12的qPCR表达变化归一化为GAPDH的条形图。图15E是显示用指定的shRNA试剂转导并用指定浓度的DNMDP处理72小时的HeLa细胞的生存力的图。

[0126] 图16A和16B是散点图,其显示SLFN12表达是与DNMDP敏感性相关的最相关基因。图16A显示了在766个基因组表征的细胞系中DNMDP敏感性与18,988个基因的表达之间的相关性。将细胞系以2倍连续稀释的66.4 μ M-2nM的浓度处理72小时。图16B是显示766个基因组表征的细胞系中DNMDP敏感性与18,988个基因表达之间相关性的散点图。如前所述,对PDE3A表达校正表达水平(Kim等人,Genetica 131,151-156,2007)。将细胞系以2倍连续稀释的66.4 μ M-2nM的浓度处理72小时。

[0127] 图17A-17B显示DNMDP诱导HeLa细胞凋亡。图17A是显示用指示浓度的DNMDP处理48小时的HeLa细胞的生存力的图。半胱天冬酶-Glo代表半胱天冬酶3/7活性,从而表明诱导细胞凋亡。CellTiter-Glo反映生存力。图17B是免疫印迹。用指定的化合物和浓度处理HeLa细胞36小时。收获HeLa细胞并对PARP裂解产物进行免疫印迹,指示细胞凋亡。

[0128] 图18是766个癌细胞系的PDE3A mRNA表达和对DNMDP的敏感性的散点图。

[0129] 图19是显示DNMDP在HeLa细胞中诱导PDE3A与SIRT7和SLFN12之间的相互作用的免疫印迹。用指定的质粒转染HeLa细胞,并用终浓度为10 μ M的指定化合物处理4小时。将内源性PDE3A免疫沉淀并对V5进行免疫印迹以鉴定与SIRT7和SLFN12的新的相互作用(上面两幅图)。免疫印迹免疫沉淀输入其中PDE3A和V5(下两个图)。V5-SLFN12在全细胞裂解物中检测不到。

[0130] 图20是显示使用亲和试剂证实本文质谱结果的免疫印迹。图20显示,DNMDP和阿那格雷(但不是曲喹辛)诱导PDE3A和SFLN12复合物形成(阿那格雷较弱)。

[0131] 图21是一组表格,其显示SLFN12在已获得对DNMDP的抗性的细胞中不存在。

[0132] 图22是显示通过SLFN12的表达或SFLN12和PDE3A的表达使DNMDP抗性细胞系敏化的图。

[0133] 图23是显示基于SLFN12表达水平的平滑肌肉瘤(LMS)对PDE3A调节的敏感性的散点图。

[0134] 表1显示用DNMDP处理的766个癌细胞系的敏感性数据。将细胞系用2倍连续稀释的66.4 μ M-2nM的浓度处理72小时。

[0135] 表2显示了通过Caliper实施的19个磷酸二酯酶抑制反应的结果。DNMDP浓度是100nM。

[0136] 表3显示了多种健康组织类型中SLFN12和PDE3A表达的RPKM值。

[0137] 表4显示平滑肌肉瘤对DNMDP的敏感性。

[0138] 表5显示了DNMDP与PDE3A (677-1141) 的结合。

[0139] 结合下面提供的实施例,将由本发明限定的组合物和物品分离或另外制造。根据详细描述和权利要求,本发明的其他特征和优点将显而易见。

具体实施方式

[0140] 如下所述,本发明的特征在于通过在来源于患者的癌细胞中检测PDE3A和Schlafen 12 (SLFN12) 多肽或者多核苷酸的共表达来鉴别患有对磷酸二酯酶3A (PDE3A) 调节剂治疗敏感的癌症(例如,黑色素瘤、子宫内膜、肺癌、造血/淋巴样癌、卵巢癌、宫颈癌、软组织肉瘤、平滑肌肉瘤、泌尿道癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、胶质母细胞瘤,或者乳腺癌)的患者的改善的方法。本发明至少部分地基于以下发现:在766个癌细胞系中对于磷酸二酯酶3A调节剂如6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮或者DNMDP的敏感性与磷酸二酯酶3A基因PDE3A的表达相关。像DNMDP一样,PDE3A抑制剂的一个子集杀死选定的癌细胞,而另一些则没有杀死选定的癌细胞;这些保留细胞的PDE3A抑制剂反而阻断DNMDP诱导的细胞毒性。此外,PDE3A消耗导致DNMDP抗性。DNMDP与PDE3A的结合促进PDE3A与Sirtuin 7 (SIRT7) 和Schlafen 12 (SLFN12) 之间的相互作用,表明具有一种新形态活性,并且SLFN12和PDE3A共表达与DNMDP敏感性相关。这些结果表明,PDE3A调节剂是有希望的癌症治疗剂,并证明了小分子发现和靶标鉴定中化学基因组学的作用。

[0141] 因此,本发明提供了选择患有对PDE3A调节剂应答的癌症的受试者的方法,其中所述选择方法涉及在来源于这种受试者的癌细胞中检测PDE3A和Schlafen 12 (SLFN12) 多肽或多核苷酸的共表达。

[0142] PDE3A调节剂

[0143] PDE3A调节剂的鉴定是与设计用于鉴定突变tp53背景中的细胞毒性小分子的表型筛选相关联的。化学基因组学方法补充了靶标驱动的药物研发计划,其由广泛的体外和体内靶标验证组成,并且也可以被称为逆向化学基因组学(Zheng等人,Curr Issues Mol Biol 4,33-43,2002)。许多美国食品和药物管理局(FDA)批准的靶向疗法已经以此方式研发,其中包括靶向致癌体细胞驱动突变的小分子激酶抑制剂(Moffat等人,Nat Rev Drug Discov 13,588-602,2014)。然而,靶向疗法的发现和研发往往受到靶标生物学功能知识的局限性、其作用机制和选择性抑制靶标的可用化学物质的限制。

[0144] 表型筛选可以发现癌症治疗的新靶点,其特定分子机制通常由未来研究阐明(Swinney等人,Nat Rev Drug Discov 10,507-519,2011)。近年来,通过无偏的表型筛选努力发现的两类抗癌药物已经被FDA批准。发现来那度胺和泊马度胺是E3-连接酶的调节剂,其改变了其靶标的亲和力,导致谱系特异性转录因子的降解(Krönke等人,Science 343,301-305,2014;Lu等人,Science 343,305-309,2014),而罗米地辛和伏立诺他后来被确定

为组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂 (Moffat 等人, Nat Rev Drug Discov 13, 588-602, 2014; Nakajima 等人, Exp. Cell Res. 241, 126-133, 1998; Marks 等人, Nat Biotechnol 25, 84-90, 2007)。

[0145] 肿瘤抑制基因的改变是表型筛选的合适目标, 因为它们不能用小分子直接靶向, 尽管合成致死方法如奥拉帕尼治疗 BRCA1/BRCA2 突变型癌症已被证明是有效的。根据目前的知识, tp53 肿瘤抑制基因是人类癌症中发生频率最高的突变, 在进行整个外显子组测序的 4742 例癌症中有 36% 检测到体细胞突变。尽管进行了许多尝试, 但没有发现选择性杀死 tp53 突变细胞的化合物。

[0146] 研发用于鉴定在 tp53 突变体癌细胞中引起合成致死性的小分子的表型筛选能够偶然发现一类用作磷酸二酯酶 3A (PDE3A) 调节剂的癌症选择性细胞毒性剂, 如下文所述。环核苷酸磷酸二酯酶催化第二信使分子环状腺苷一磷酸 (cAMP) 和环状鸟苷一磷酸 (cGMP) 的水解, 并且在许多生理过程中很重要。几种磷酸二酯酶抑制剂已被批准用于临床治疗, 包括用于心血管适应症和血小板凝固抑制的 PDE3 抑制剂米力农, 西洛他唑和左西孟旦, 以及用于血小板增多症的 PDE3 抑制剂阿那格雷。PDE5 抑制剂如瓦地那非用于包括勃起功能障碍和肺动脉高压在内的平滑肌障碍, 以及 PDE4 抑制剂罗氟司特减少慢性阻塞性肺病 (COPD) 的恶化。

[0147] 磷酸二酯酶抑制剂通过直接抑制其靶标或通过变构调节起作用; 例如, PDE4 的结构分析导致设计 PDE4D 和 PDE4B 变构调节剂 (Burgin 等人, Nat Biotechnol 28, 63-70, 2010; Gurney 等人, Neurotherapeutics 12, 49-56, 2015)。下文提供的数据表明癌症细胞毒性磷酸二酯酶调节剂 DNMDP 可能通过类似的变构机制起作用。

[0148] 因此, 本发明提供了用于基于包含癌细胞的受试生物样品中的 PDE3A 和 SLFN12 表达水平来鉴定具有可能对 PDE3A 调节剂治疗有应答的恶性肿瘤的受试者的方法。在一些实施方案中, 所述 PDE3A 调节剂为 DNMDP。在一些其它实施方案中, PDE3A 调节剂为阿那格雷或者扎达维林。

[0149] 化合物形式和盐

[0150] 如果适用的话, 本发明的化合物包括化合物本身以及它们的盐和它们的前药。例如, 盐可以在阴离子和本文所述化合物上的带正电荷的取代基 (例如氨基) 之间形成。合适的阴离子包括氯, 溴, 碘, 硫酸根, 硝酸根, 磷酸根, 柠檬酸根, 甲磺酸根, 三氟乙酸根和乙酸根。同样, 在阳离子和本文所述的化合物上的带负电的取代基 (例如羧酸根) 之间也可以形成盐。合适的阳离子包括钠离子, 钾离子, 镁离子, 钙离子和铵阳离子如四甲基铵离子。前药的实例包括羧酸基团的 C₁₋₆ 烷基酯, 其在给药于受试者后能够提供活性化合物。

[0151] 本公开化合物的药学上可接受的盐包括衍生自药学上可接受的无机和有机的酸和碱的那些。如本文所用, 术语“药学上可接受的盐”是指通过添加药学上可接受的酸或碱至本文公开的化合物而形成的盐。如本文所用, 短语“药学上可接受的”是指从毒理学角度可接受用于药物应用并且不与活性成分发生不利相互作用的物质。

[0152] 适合的酸盐的实例包括乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙烷磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡萄糖庚酸盐、羟乙酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙烷磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲烷磺酸盐、2-萘磺

酸盐、吡啶-3-羧酸盐、硝酸盐、棕榈酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐和十一酸盐。其它酸如草酸虽然本身不是药学上可接受的,但可用于制备可用作获得本发明化合物及其药学上可接受的酸加成盐的中间体的盐。衍生自适当碱的盐包括碱金属(例如钠),碱土金属(例如镁),铵和N-(烷基)₄⁺盐。本发明还包括本文公开的化合物的任何碱性含氮基团的季铵化。水或油溶性或分散性产品可以通过这种季铵化获得。本文任何通式化合物的盐形式可以是羧基的氨基酸盐(例如L-精氨酸,-赖氨酸,-组氨酸盐)。

[0153] 适合的盐的名单可参见以下文献:Remington's Pharmaceutical Sciences,17th ed.,Mack Publishing Company,Easton,Pa.,1985,p.1418;Journal of Pharmaceutical Science,66,2(1977);和"Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use A Handbook;Wermuth,C.G.and Stahl,P.H.(eds.)Verlag Helvetica Chimica Acta,Zurich,2002[ISBN 3-906390-26-8],将其中的每个文献的全部内容通过引用并入本文中。

[0154] 化合物的中性形式可通过使盐与碱或酸接触并以常规方式分离母体化合物而再生。化合物的母体形式在某些物理性质方面不同于各种盐形式,例如在极性溶剂中的溶解性,但是对于本发明目的而言,在其他方面盐等同于化合物的母体形式。

[0155] 除了盐形式之外,本发明提供了呈前药形式的化合物。本文所述化合物的前药是那些在生理条件下经历化学变化以提供本发明化合物的化合物。另外,前药可以在离体环境中通过化学或生物化学方法转化成本发明的化合物。例如,当将前药放入具有合适的酶或化学试剂的透皮贴剂储库中时,可以将前药缓慢转化为本发明的化合物。前药通常是有用的,因为在某些情况下,它们可能比母体药物更容易给药。例如,他们可能比母体药物更具口服生物利用度。前药在药物组合物中的溶解度也可以相对于母体药物提高。本领域已知各种各样的前药衍生物,例如那些依赖于前药的水解裂解或氧化活化的衍生物。前药的一个非限制性例子是本发明化合物,其以酯("前药")的形式给药,但随后代谢水解为羧酸即活性实体。另外的例子包括本发明化合物的肽基衍生物。

[0156] 本发明还包括化合物的各种水合物和溶剂合物形式。

[0157] 本发明的化合物还可以在构成这些化合物的一个或多个原子处含有非天然比例的原子同位素。例如,可用放射性同位素例如氚(³H),碘-125(¹²⁵I)或碳-14(¹⁴C)放射性标记化合物。本发明化合物的所有同位素变体,无论是否是放射性的,均旨在包括在本发明的范围内。

[0158] 诊断

[0159] 本发明的特征是用于表征癌症的诊断测定。在一个实施方案中,在受试者样品中测量PDE3A和/或Schlafen 12(SLFN12)多核苷酸或多肽的水平,并用作对用PDE3A调节剂治疗有应答的癌症指标。PDE3A和/或Schlafen 12多核苷酸的水平可通过标准方法如定量PCR、蛋白印迹、微阵列、质谱,和原位杂交测得。标准方法可用于测量来源于肿瘤的生物样品中的PDE3A和/或Schlafen 12多肽的水平。这些方法包括免疫测定法,ELISA,使用结合PDE3A和/或Schlafen 12的抗体的蛋白印迹和放射免疫测定法。相对于参考,PDE3A和Schlafen 12多核苷酸或多肽的水平升高被认为是对用PDE3A调节剂治疗有应答的癌症的阳性指标。

[0160] 生物样品的类型

[0161] 在表征受试者中恶性肿瘤对PDE3A调节剂治疗的应答性时,在不同类型的生物样品中测量PDE3A和/或SLFN12表达水平。在一个实施方案中,生物样品是肿瘤样品。

[0162] 从对PDE3A调节剂治疗有应答的受试者获得的样品中的PDE3A和/或SLFN12表达高于非应答性受试者中的表达水平。在另一个实施方案中,PDE3A和/或SLFN12在患有恶性肿瘤的受试者中比在健康对照中高至少约5、10、20或30倍。倍数改变值使用本领域已知的任何方法来确定。在一个实施方案中,通过计算癌细胞中PDE3A和/或SLFN12的表达与非应答癌细胞中存在的水平或存在于相应健康对照细胞中的水平的差异来确定改变。

[0163] 治疗方法的选择

[0164] 如下文所述,可以在选择治疗方法的过程中测试患有恶性肿瘤的受试者的PDE3A和/或SLFN12表达。被表征为相对于参考水平具有增加的PDE3A和/或SLFN12的患者被鉴定为对PDE3A调节剂治疗有应答。

[0165] 试剂盒

[0166] 本发明提供了用于表征受试者对PDE3A调节剂治疗的应答性或抗性的试剂盒。

[0167] 本文还提供了可包含含有有效量的例如单位剂型的PDE3A调节剂的治疗组合物的试剂盒。

[0168] 在一个实施方案中,本发明的诊断试剂盒提供用于测量PDE3A和SLFN12的相对表达的试剂。此类试剂包括捕获分子(例如识别PDE3A和SLFN12多肽的抗体或与PDE3A和SLFN12多核苷酸杂交的核酸探针)。

[0169] 在一些实施方案中,试剂盒包含无菌容器,其包含治疗或诊断组合物;这种容器可以是盒子,安瓿瓶,瓶子,小瓶,管子,袋子,小袋,泡罩包装或本领域已知的其他合适的容器形式。这样的容器可以由塑料,玻璃,层压纸,金属箔或其他适于容纳药物的材料制成。

[0170] 在一个实施方案中,本发明的试剂盒包含用于测量PDE3A和/或SLFN12水平的试剂。如果需要,所述试剂盒还包含用于测量PDE3A和/或SLFN12的说明书和/或用于将PDE3A调节剂给予患有恶性肿瘤(例如由于对PDE3A调节剂治疗有应答而选择的恶性肿瘤)的受试者的说明书。在具体的实施方案中,说明书包括以下至少一种:治疗剂的描述;用于治疗或预防恶性肿瘤或其症状的剂量方案和给药;注意事项;警告;适应症;禁忌症;过量剂量信息;不良反应;动物药理学;临床研究;和/或参考。说明书可以直接打印在容器上(如果有的话),或者作为标签贴在容器上,或者作为在容器内或与容器一起提供的单独的纸张,小册子,卡片或文件夹打印。

[0171] 除非另有说明,否则本发明的实践采用了在本领域技术人员范围内的分子生物学(包括重组技术),微生物学,细胞生物学,生物化学和免疫学的常规技术。这些技术在文献中有充分的解释,例如,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,second edition (Sambrook,1989);“Oligonucleotide Synthesis”(Gait,1984);“Animal Cell Culture”(Freshney,1987);“Methods in Enzymology”“Handbook of Experimental Immunology”(Weir,1996);“Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells”(Miller and Calos,1987);“Current Protocols in Molecular Biology”(Ausubel,1987);“PCR:The Polymerase Chain Reaction”,(Mullis,1994);“Current Protocols in Immunology”(Coligan,1991)。这些技术适用于生产本发明的多核苷酸和多肽,并且因此在制造和实践本发明中可以考虑。下面的部分将讨论具体实施例的特别有用的技术。

[0172] 提出以下实施例是为了向本领域普通技术人员提供关于如何制造和使用本发明的测定、筛选和治疗方法的完整公开和描述,并且不旨在限制本发明的范围。

[0173] 实施例

[0174] 实施例1.细胞选择性细胞毒性小分子的鉴别

[0175] 为了鉴定具有细胞选择性细胞毒性活性的抗癌化合物,在两种肺腺癌细胞系A549和NCI-H1734中进行了无偏差的化学筛选,两种肺腺癌细胞系均带有致癌KRAS突变体和截短STK11突变体,并且分别是TP53野生型和突变体(R273L)。在A549和NCI-H1734细胞系中以单一10 μ M浓度以384孔形式一式两份地筛选了Molecular Libraries Small-Molecule Repository验证组中的1,924个化合物。在化合物处理48小时后测量ATP含量作为细胞生存力的代表(proxy)。

[0176] 与A549细胞系相比,三个化合物对于NCI-H1734细胞系显示出细胞生存力的选择性降低,在NCI-H1734细胞系中减少约50%,与A549细胞系中从中位数的中位数绝对偏差<1的微小变化相比,其从中位数向负方向上的中位数绝对偏差>4(图1A)。在剂量-应答分析中重新测试了三个化合物,证实一个化合物(6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮或者DNMDP)对于NCI-H1734细胞系具有特异性毒性(图2)。

[0177] 用DNMDP测试其他细胞系显示出明显的细胞选择性细胞毒性,对于另外两种肺腺癌细胞系NCI-H1563和NCI-H2122以及HeLa宫颈癌细胞,其EC₅₀在10至100nM之间,但是对于A549、MCF7和PC3细胞,其EC₅₀大于1 μ M(图1B;图1C)。在经DNMDP处理的HeLa细胞中,通过半胱天冬酶敏感的荧光素酶和通过聚ADP核糖聚合酶(PARP)裂解来测定半胱天冬酶活性,从而表明敏感细胞在DNMDP暴露后经历凋亡(图17A-17B)。为了进一步表征对DNMDP的细胞敏感性,以2倍连续稀释的66.4 μ M至2nM的浓度筛选766个基因组表征的癌细胞系的DNMDP敏感性,历时72小时。从这些细胞系中,22个细胞系被归类为具有低于-4的稳健Z评分的敏感性,其代表包括多种黑色素瘤细胞系等的多种谱系(表1)。

[0178] 接下来,通过手性超临界流体(SCF)色谱分离DNMDP对映异构体。一种对映异构体在HeLa细胞中的有效性比另一种对映异构体高500倍(图1C和D)。(R)-对映异构体由可商购的起始原料合成(图3)。该合成的对映体具有与更有效的分离物质相似的活性,并且通过手性SCF色谱鉴定是相同的,从而证实了活性对映体的立体化学(图4A-4C)。合成了DNMDP的两个(R)-去-硝基类似物,两者都与(R)-DNMDP类似地进行测试(图3)。图4A-4C显示了6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)的超临界流体(SCF)色谱(顶部至底部:ES+、二极管阵列、ES-迹线)。图4A显示峰1(CR0分离);图4B显示峰2(CR0分离);和图4C显示合成的(R)-DNMDP(通过uv测定,峰1:2的比率为5:95)。

[0179] 表1:用DNMDP处理的766个癌细胞系的敏感性数据

| | 细胞系 | 谱系 | DNMDP AUC | 稳健 Z 评分 |
|--------|-----------------|----------|--------------|--------------|
| [0180] | COV318 | 卵巢 | 0.095838 | -6.863450362 |
| | IGR37 | 皮肤 | 0.41146 | -6.532158389 |
| | JHUEM1 | 子宫内膜 | 0.53468 | -6.402820773 |
| | HEL | 造血和淋巴样组织 | 0.57955 | -6.355723071 |
| | CORL51 | 肺 | 0.59436 | -6.340177786 |
| | HEL9217 | 造血和淋巴样组织 | 0.75005 | -6.176758102 |
| | NCIH1563 | 肺 | 1.0887 | -5.821294837 |
| | SKMEL3 | 皮肤 | 1.2215 | -5.681901594 |
| | NCIH2122 | 肺 | 1.3105 | -5.58848293 |
| | RVH421 | 皮肤 | 1.4556 | -5.436179018 |
| | HUT78 | 造血和淋巴样组织 | 1.5307 | -5.35735046 |
| | DKMG | 中枢神经系统 | 1.7217 | -5.156867709 |
| | GB1 | 中枢神经系统 | 1.8269 | -5.046444748 |
| | G292CLONEA141B1 | 骨 | 1.9664 | -4.900018865 |
| | HMCB | 皮肤 | 1.9762 | -4.889732315 |
| | A2058 | 皮肤 | 2.0833 | -4.777315024 |
| | NCIH1734 | 肺 | 2.2179 | -4.636032415 |

| | | | | |
|--------|-----------|----------|--------|--------------|
| | NCIH196 | 肺 | 2.5263 | -4.312320999 |
| | LI7 | 肝 | 2.5414 | -4.296471315 |
| | JHOM1 | 卵巢 | 2.7006 | -4.129367368 |
| | COLO741 | 皮肤 | 2.7231 | -4.10575029 |
| | HS578T | 乳腺 | 2.8012 | -4.023772788 |
| | K029AX | 皮肤 | 2.9362 | -3.88207032 |
| | MONOMAC1 | 造血和淋巴样组织 | 2.9692 | -3.847431939 |
| | HT1197 | 泌尿道 | 3.0929 | -3.717590492 |
| | NCIH520 | 肺 | 3.1351 | -3.67329535 |
| | CAL78 | 骨 | 3.1711 | -3.635508025 |
| | NCIH647 | 肺 | 3.2187 | -3.585544785 |
| | CGTHW1 | 甲状腺 | 3.4296 | -3.36417404 |
| | NCIH1666 | 肺 | 3.6097 | -3.175132451 |
| | L33 | 胰腺 | 3.625 | -3.159072838 |
| | UACC62 | 皮肤 | 3.9116 | -2.858243747 |
| | CAS1 | 中枢神经系统 | 3.9993 | -2.766189625 |
| | CAL51 | 乳腺 | 4.0017 | -2.76367047 |
| | OSRC2 | 肾 | 4.326 | -2.423269652 |
| | X8505C | 甲状腺 | 4.3418 | -2.406685215 |
| | SH4 | 皮肤 | 4.3672 | -2.380024158 |
| | NCIH1395 | 肺 | 4.4473 | -2.29594736 |
| | SNU503 | 大肠 | 4.5692 | -2.16799528 |
| [0181] | HS729 | 软组织 | 4.6518 | -2.081294362 |
| | SW579 | 甲状腺 | 4.697 | -2.033850277 |
| | YH13 | 中枢神经系统 | 4.7007 | -2.029966579 |
| | DBTRG05MG | 中枢神经系统 | 4.7415 | -1.987140944 |
| | SEM | 造血和淋巴样组织 | 4.7433 | -1.985251578 |
| | HS852T | 皮肤 | 4.7511 | -1.977064324 |
| | SNU449 | 肝 | 4.752 | -1.976119641 |
| | NCIH2286 | 肺 | 4.7782 | -1.948618866 |
| | JHOS2 | 卵巢 | 4.8254 | -1.899075485 |
| | BICR31 | 上呼吸消化道 | 4.8356 | -1.888369076 |
| | IGR1 | 皮肤 | 4.8613 | -1.861393125 |
| | JHUEM3 | 子宫内膜 | 4.93 | -1.789282313 |
| | SNU387 | 肝 | 4.9639 | -1.753699249 |
| | UMUC1 | 泌尿道 | 4.9933 | -1.7228396 |
| | X8305C | 甲状腺 | 5.0004 | -1.7153871 |
| | NCIH1915 | 肺 | 5.0031 | -1.712553051 |
| | P31FUJ | 造血和淋巴样组织 | 5.0106 | -1.704680691 |
| | COLO678 | 大肠 | 5.0245 | -1.690090585 |
| | EOL1 | 造血和淋巴样组织 | 5.0478 | -1.665633789 |
| | KNS42 | 中枢神经系统 | 5.0791 | -1.632779809 |
| | SW1783 | 中枢神经系统 | 5.1161 | -1.593942837 |
| | HS940T | 皮肤 | 5.1573 | -1.550697343 |
| | SNU685 | 子宫内膜 | 5.206 | -1.499579489 |

| | | | | |
|--------|---------------|----------|--------|--------------|
| | BCPAP | 甲状腺 | 5.2336 | -1.470609207 |
| | COLO829 | 皮肤 | 5.2432 | -1.460532587 |
| | DM3 | 胸膜 | 5.2635 | -1.439224734 |
| | OCUM1 | 胃 | 5.2843 | -1.417392058 |
| | M059K | 中枢神经系统 | 5.3059 | -1.394719663 |
| | MG63 | 骨 | 5.3943 | -1.301930788 |
| | NCIH2172 | 肺 | 5.4245 | -1.270231421 |
| | CAOV3 | 卵巢 | 5.4646 | -1.228140539 |
| | PEER | 造血和淋巴样组织 | 5.4754 | -1.216804342 |
| | HS839T | 皮肤 | 5.5232 | -1.166631172 |
| | CORL105 | 肺 | 5.5442 | -1.144588566 |
| | SNU5 | 胃 | 5.5498 | -1.138710537 |
| | MFE296 | 子宫内膜 | 5.5618 | -1.126114762 |
| | NCIH854 | 肺 | 5.576 | -1.111209762 |
| | NCIH146 | 肺 | 5.5773 | -1.10984522 |
| | NCIH2081 | 肺 | 5.5811 | -1.105856558 |
| | COV644 | 卵巢 | 5.5849 | -1.101867896 |
| | VCAP | 前列腺 | 5.5863 | -1.100398388 |
| | BICR18 | 上呼吸消化道 | 5.6 | -1.086018212 |
| | RH18 | 软组织 | 5.6283 | -1.056313176 |
| | KPNYN | 自主神经节 | 5.6717 | -1.010758457 |
| | KPNSI9S | 自主神经节 | 5.6827 | -0.99921233 |
| [0182] | SKCO1 | 大肠 | 5.688 | -0.993649196 |
| | MV411 | 造血和淋巴样组织 | 5.6905 | -0.991025076 |
| | COV362 | 卵巢 | 5.6913 | -0.990185358 |
| | NCO2 | 造血和淋巴样组织 | 5.7088 | -0.971816519 |
| | JHH4 | 肝 | 5.71 | -0.970556942 |
| | NCIH2141 | 肺 | 5.7218 | -0.958171096 |
| | LXF289 | 肺 | 5.734 | -0.945365392 |
| | MEWO | 皮肤 | 5.738 | -0.9411668 |
| | TE125T | 软组织 | 5.744 | -0.934868913 |
| | SNU869 | 胆道 | 5.7543 | -0.924057539 |
| | LNCAPCLONEFGC | 前列腺 | 5.7557 | -0.922588032 |
| | NCIH2009 | 肺 | 5.7594 | -0.918704335 |
| | SKNBE2 | 自主神经节 | 5.7717 | -0.905793666 |
| | IALM | 肺 | 5.775 | -0.902329827 |
| | DU145 | 前列腺 | 5.7825 | -0.894457468 |
| | HCC1419 | 乳腺 | 5.7835 | -0.89340782 |
| | NALM6 | 造血和淋巴样组织 | 5.7872 | -0.889524123 |
| | PECAPJ15 | 上呼吸消化道 | 5.789 | -0.887634757 |
| | LU99 | 肺 | 5.8016 | -0.874409193 |
| | LAMA84 | 造血和淋巴样组织 | 5.8201 | -0.854990707 |
| | ONCODG1 | 卵巢 | 5.8296 | -0.845019051 |
| | HS888T | 骨 | 5.8353 | -0.839036058 |
| | SKNSH | 自主神经节 | 5.8424 | -0.831583558 |

| | | | | |
|--------|-----------|----------|--------|--------------|
| | TUHR14TKB | 肾 | 5.8451 | -0.828749509 |
| | PF382 | 造血和淋巴样组织 | 5.8519 | -0.821611903 |
| | ALLSIL | 造血和淋巴样组织 | 5.8724 | -0.800094121 |
| | KMS34 | 造血和淋巴样组织 | 5.8799 | -0.792221762 |
| | BICR6 | 上呼吸消化道 | 5.8837 | -0.788233099 |
| | GRANTA519 | 造血和淋巴样组织 | 5.8937 | -0.77773662 |
| | OCIAML2 | 造血和淋巴样组织 | 5.8945 | -0.776896902 |
| | SUIT2 | 胰腺 | 5.8956 | -0.775742289 |
| | BT549 | 乳腺 | 5.9226 | -0.747401796 |
| | KMS28BM | 造血和淋巴样组织 | 5.9369 | -0.732391831 |
| | HCC1428 | 乳腺 | 5.9402 | -0.728927992 |
| | HCC1500 | 乳腺 | 5.9451 | -0.723784718 |
| | A549 | 肺 | 5.9509 | -0.71769676 |
| | KCL22 | 造血和淋巴样组织 | 5.9598 | -0.708354893 |
| | COLO679 | 皮肤 | 5.9634 | -0.704576161 |
| | SKMEL5 | 皮肤 | 5.9639 | -0.704051337 |
| | HCC1395 | 乳腺 | 5.9716 | -0.695969048 |
| | NCIH1435 | 肺 | 5.9756 | -0.691770456 |
| | LOUNH91 | 肺 | 5.9793 | -0.687886759 |
| | RPMI8402 | 造血和淋巴样组织 | 5.9827 | -0.684317956 |
| | COLO668 | 肺 | 5.9969 | -0.669412956 |
| | SKLU1 | 肺 | 6.0109 | -0.654717885 |
| [0183] | KMS12BM | 造血和淋巴样组织 | 6.0135 | -0.6519888 |
| | SNU1272 | 肾 | 6.0226 | -0.642437004 |
| | MOLM6 | 造血和淋巴样组织 | 6.0447 | -0.619239786 |
| | EPLC272H | 肺 | 6.0469 | -0.61693056 |
| | SCC4 | 上呼吸消化道 | 6.0502 | -0.613466722 |
| | LMSU | 胃 | 6.0528 | -0.610737638 |
| | KMS20 | 造血和淋巴样组织 | 6.0542 | -0.60926813 |
| | G402 | 软组织 | 6.0606 | -0.602550384 |
| | KYSE410 | 食道 | 6.0741 | -0.588380137 |
| | L540 | 造血和淋巴样组织 | 6.0807 | -0.581452461 |
| | MOLT13 | 造血和淋巴样组织 | 6.084 | -0.577988623 |
| | L1236 | 造血和淋巴样组织 | 6.0853 | -0.57662408 |
| | LP1 | 造血和淋巴样组织 | 6.1029 | -0.558150277 |
| | SNU620 | 胃 | 6.1039 | -0.557100629 |
| | MALME3M | 皮肤 | 6.112 | -0.548598481 |
| | GSU | 胃 | 6.1172 | -0.543140312 |
| | MCF7 | 乳腺 | 6.1256 | -0.53432327 |
| | COLO800 | 皮肤 | 6.1272 | -0.532643833 |
| | MKN7 | 胃 | 6.1453 | -0.513645206 |
| | SNU119 | 卵巢 | 6.1473 | -0.51154591 |
| | U118MG | 中枢神经系统 | 6.1481 | -0.510706192 |
| | OCILY19 | 造血和淋巴样组织 | 6.1512 | -0.507452283 |
| | RKN | 软组织 | 6.1579 | -0.500419642 |

| | | | | |
|--------|-----------|----------|--------|--------------|
| | DV90 | 肺 | 6.1676 | -0.490238057 |
| | NCIH1355 | 肺 | 6.171 | -0.486669254 |
| | KMM1 | 造血和淋巴样组织 | 6.1723 | -0.485304712 |
| | NCIH1184 | 肺 | 6.1776 | -0.479741578 |
| | U937 | 造血和淋巴样组织 | 6.1777 | -0.479636613 |
| | EJM | 造血和淋巴样组织 | 6.1782 | -0.479111789 |
| | C32 | 皮肤 | 6.1786 | -0.47869193 |
| | NCIH23 | 肺 | 6.1854 | -0.471554324 |
| | RERFLCAD1 | 肺 | 6.1862 | -0.470714606 |
| | T3M10 | 肺 | 6.1867 | -0.470189782 |
| | U266B1 | 造血和淋巴样组织 | 6.1906 | -0.466096155 |
| | CAL54 | 肾 | 6.1949 | -0.461582669 |
| | DND41 | 造血和淋巴样组织 | 6.1979 | -0.458433726 |
| | PC14 | 肺 | 6.2003 | -0.455914571 |
| | KMS11 | 造血和淋巴样组织 | 6.2008 | -0.455389747 |
| | DMS53 | 肺 | 6.2061 | -0.449826613 |
| | SNU1214 | 上呼吸消化道 | 6.2071 | -0.448776965 |
| | GOS3 | 中枢神经系统 | 6.2076 | -0.448252141 |
| | TE8 | 食道 | 6.2119 | -0.443738655 |
| | ECGI10 | 食道 | 6.2151 | -0.440379781 |
| | KO52 | 造血和淋巴样组织 | 6.2174 | -0.437965591 |
| | NCIH1793 | 肺 | 6.2189 | -0.436391119 |
| [0184] | NB4 | 造血和淋巴样组织 | 6.219 | -0.436286155 |
| | NCIH1105 | 肺 | 6.2191 | -0.43618119 |
| | OCILY10 | 造血和淋巴样组织 | 6.222 | -0.433137211 |
| | NCIH69 | 肺 | 6.2243 | -0.430723021 |
| | A673 | 骨 | 6.2304 | -0.424320168 |
| | HCC4006 | 肺 | 6.2335 | -0.42106626 |
| | SCC9 | 上呼吸消化道 | 6.2351 | -0.419386823 |
| | OAW28 | 卵巢 | 6.2381 | -0.416237879 |
| | BXPC3 | 胰腺 | 6.2387 | -0.415608091 |
| | ISTMES1 | 胸膜 | 6.2389 | -0.415398161 |
| | SKMM2 | 造血和淋巴样组织 | 6.2396 | -0.414663408 |
| | NCIN87 | 胃 | 6.24 | -0.414243548 |
| | T98G | 中枢神经系统 | 6.2412 | -0.412983971 |
| | GP2D | 大肠 | 6.2536 | -0.399968337 |
| | FTC238 | 甲状腺 | 6.2564 | -0.397029323 |
| | KMS27 | 造血和淋巴样组织 | 6.2607 | -0.392515837 |
| | SNU201 | 中枢神经系统 | 6.2618 | -0.391361224 |
| | BC3C | 泌尿道 | 6.266 | -0.386952703 |
| | RS411 | 造血和淋巴样组织 | 6.2689 | -0.383908724 |
| | TALL1 | 造血和淋巴样组织 | 6.2742 | -0.37834559 |
| | RT4 | 泌尿道 | 6.2742 | -0.37834559 |
| | SKOV3 | 卵巢 | 6.2773 | -0.375091681 |
| | RERFLCAD2 | 肺 | 6.2783 | -0.374042033 |

| | | | | |
|--------|-------------|----------|--------|--------------|
| | KHM1B | 造血和淋巴样组织 | 6.2859 | -0.366064709 |
| | KASUMI2 | 造血和淋巴样组织 | 6.2904 | -0.361341294 |
| | MOLT16 | 造血和淋巴样组织 | 6.2966 | -0.354833477 |
| | NUDUL1 | 造血和淋巴样组织 | 6.2966 | -0.354833477 |
| | KMS18 | 造血和淋巴样组织 | 6.2973 | -0.354098723 |
| | MDAMB175VII | 乳腺 | 6.2981 | -0.353259005 |
| | RMGI | 卵巢 | 6.3019 | -0.349270343 |
| | KIJK | 造血和淋巴样组织 | 6.305 | -0.346016434 |
| | OCIAML5 | 造血和淋巴样组织 | 6.3062 | -0.344756857 |
| | KMRC20 | 肾 | 6.3063 | -0.344651892 |
| | LU65 | 肺 | 6.3082 | -0.342657561 |
| | JIMT1 | 乳腺 | 6.3087 | -0.342132737 |
| | SNU8 | 卵巢 | 6.3089 | -0.341922807 |
| | KALS1 | 中枢神经系统 | 6.3098 | -0.340978124 |
| | SCABER | 泌尿道 | 6.322 | -0.32817242 |
| | OVMANA | 卵巢 | 6.3268 | -0.32313411 |
| | TUHR10TKB | 肾 | 6.3302 | -0.319565307 |
| | SUPM2 | 造血和淋巴样组织 | 6.3314 | -0.318305729 |
| | JMSU1 | 泌尿道 | 6.3317 | -0.317990835 |
| | NCIH446 | 肺 | 6.3331 | -0.316521328 |
| | COV434 | 卵巢 | 6.3341 | -0.31547168 |
| | HCC38 | 乳腺 | 6.3361 | -0.313372384 |
| [0185] | KMRC2 | 肾 | 6.3393 | -0.310013511 |
| | SNU478 | 胆道 | 6.3432 | -0.305919884 |
| | SUDHL1 | 造血和淋巴样组织 | 6.3444 | -0.304660306 |
| | CMLT1 | 造血和淋巴样组织 | 6.3494 | -0.299412067 |
| | UACC257 | 皮肤 | 6.3508 | -0.29794256 |
| | NCIH1339 | 肺 | 6.3509 | -0.297837595 |
| | M07E | 造血和淋巴样组织 | 6.3511 | -0.297627665 |
| | KMRC3 | 肾 | 6.3514 | -0.297312771 |
| | NCIH1693 | 肺 | 6.3603 | -0.287970905 |
| | MM1S | 造血和淋巴样组织 | 6.3604 | -0.28786594 |
| | HCC1143 | 乳腺 | 6.3611 | -0.287131186 |
| | KATOIII | 胃 | 6.3642 | -0.283877278 |
| | MDAMB453 | 乳腺 | 6.3691 | -0.278734003 |
| | J82 | 泌尿道 | 6.3718 | -0.275899954 |
| | CAL27 | 上呼吸消化道 | 6.3725 | -0.2751652 |
| | HS766T | 胰腺 | 6.3727 | -0.274955271 |
| | HCT8 | 大肠 | 6.3733 | -0.274325482 |
| | NCIH1581 | 肺 | 6.3747 | -0.272855975 |
| | REH | 造血和淋巴样组织 | 6.3759 | -0.271596397 |
| | MPP89 | 胸膜 | 6.3817 | -0.265508439 |
| | SNU761 | 肝 | 6.3819 | -0.26529851 |
| | RH30 | 软组织 | 6.3841 | -0.262989284 |
| | KURAMOCHI | 卵巢 | 6.3842 | -0.26288432 |

| | | | | |
|--------|-----------|----------|--------|--------------|
| | HS936T | 皮肤 | 6.385 | -0.262044601 |
| | HCC15 | 肺 | 6.3861 | -0.260889989 |
| | F36P | 造血和淋巴样组织 | 6.388 | -0.258895657 |
| | PANC0504 | 胰腺 | 6.3894 | -0.25742615 |
| | NOMO1 | 造血和淋巴样组织 | 6.3925 | -0.254172242 |
| | SKUT1 | 软组织 | 6.3987 | -0.247664425 |
| | CCK81 | 大肠 | 6.4043 | -0.241786397 |
| | NCIH211 | 肺 | 6.4058 | -0.240211925 |
| | NH6 | 自主神经节 | 6.4066 | -0.239372206 |
| | BECKER | 中枢神经系统 | 6.4161 | -0.229400551 |
| | NCIH1869 | 肺 | 6.4177 | -0.227721114 |
| | ASPC1 | 胰腺 | 6.4186 | -0.226776431 |
| | VMCUB1 | 泌尿道 | 6.4199 | -0.225411889 |
| | SNU398 | 肝 | 6.4206 | -0.224677136 |
| | THP1 | 造血和淋巴样组织 | 6.4214 | -0.223837417 |
| | HS611T | 造血和淋巴样组织 | 6.4224 | -0.222787769 |
| | ONS76 | 中枢神经系统 | 6.4253 | -0.21974379 |
| | LOVO | 大肠 | 6.4266 | -0.218379248 |
| | GMS10 | 中枢神经系统 | 6.4313 | -0.213445903 |
| | RKO | 大肠 | 6.4316 | -0.213131009 |
| | ZR7530 | 乳腺 | 6.4339 | -0.210716818 |
| | FU97 | 胃 | 6.4421 | -0.202109705 |
| [0186] | OCILY3 | 造血和淋巴样组织 | 6.4442 | -0.199905445 |
| | BV173 | 造血和淋巴样组织 | 6.4448 | -0.199275656 |
| | NCIH1568 | 肺 | 6.4489 | -0.1949721 |
| | NCIH1155 | 肺 | 6.4497 | -0.194132381 |
| | JURKAT | 造血和淋巴样组织 | 6.4524 | -0.191298332 |
| | CW2 | 大肠 | 6.4567 | -0.186784846 |
| | RD | 软组织 | 6.4567 | -0.186784846 |
| | RERFLCAI | 肺 | 6.4571 | -0.186364987 |
| | YD10B | 上呼吸消化道 | 6.4579 | -0.185525268 |
| | SF295 | 中枢神经系统 | 6.4581 | -0.185315339 |
| | JJN3 | 造血和淋巴样组织 | 6.4585 | -0.18489548 |
| | EB1 | 造血和淋巴样组织 | 6.4633 | -0.17985717 |
| | KNS60 | 中枢神经系统 | 6.4642 | -0.178912487 |
| | X697 | 造血和淋巴样组织 | 6.4674 | -0.175553613 |
| | TOV21G | 卵巢 | 6.4695 | -0.173349353 |
| | JHH5 | 肝 | 6.4703 | -0.172509634 |
| | OVTOKO | 卵巢 | 6.4718 | -0.170935162 |
| | WM1799 | 皮肤 | 6.4744 | -0.168206078 |
| | PL21 | 造血和淋巴样组织 | 6.4754 | -0.16715643 |
| | CA46 | 造血和淋巴样组织 | 6.4772 | -0.165267064 |
| | PATU8988S | 胰腺 | 6.479 | -0.163377697 |
| | HCC44 | 肺 | 6.4794 | -0.162957838 |
| | KARPAS299 | 造血和淋巴样组织 | 6.4827 | -0.159494 |

| | | | | |
|--------|----------|----------|--------|--------------|
| | PANC0327 | 胰腺 | 6.4856 | -0.156450021 |
| | YD8 | 上呼吸消化道 | 6.4856 | -0.156450021 |
| | GDM1 | 造血和淋巴样组织 | 6.4875 | -0.15445569 |
| | IM95 | 胃 | 6.4877 | -0.154245761 |
| | HCT15 | 大肠 | 6.4918 | -0.149942204 |
| | WM793 | 皮肤 | 6.4939 | -0.147737944 |
| | SHP77 | 肺 | 6.5008 | -0.140495373 |
| | X8MGBA | 中枢神经系统 | 6.5012 | -0.140075514 |
| | OUMS23 | 大肠 | 6.5015 | -0.139760619 |
| | SW1116 | 大肠 | 6.5032 | -0.137976218 |
| | NCIH1703 | 肺 | 6.5035 | -0.137661324 |
| | HLF | 肝 | 6.5042 | -0.13692657 |
| | REC1 | 造血和淋巴样组织 | 6.5051 | -0.135981887 |
| | ML1 | 甲状腺 | 6.5066 | -0.134407415 |
| | HOS | 骨 | 6.5069 | -0.134092521 |
| | SW837 | 大肠 | 6.5072 | -0.133777626 |
| | EHEB | 造血和淋巴样组织 | 6.5124 | -0.128319457 |
| | HUH28 | 胆道 | 6.5145 | -0.126115197 |
| | MDAMB157 | 乳腺 | 6.5173 | -0.123176182 |
| | CHP212 | 自主神经节 | 6.5178 | -0.122651359 |
| | RMUGS | 卵巢 | 6.52 | -0.120342133 |
| | NCIH2106 | 肺 | 6.5249 | -0.115198858 |
| [0187] | SKLMS1 | 软组织 | 6.5254 | -0.114674034 |
| | X647V | 泌尿道 | 6.5257 | -0.11435914 |
| | HS294T | 皮肤 | 6.5258 | -0.114254175 |
| | CHAGOK1 | 肺 | 6.5292 | -0.110685372 |
| | NCIH2228 | 肺 | 6.5304 | -0.109425795 |
| | MHHCALL3 | 造血和淋巴样组织 | 6.5324 | -0.107326499 |
| | TE6 | 食道 | 6.5328 | -0.10690664 |
| | MHHES1 | 骨 | 6.5353 | -0.10428252 |
| | X42MGBA | 中枢神经系统 | 6.5397 | -0.099664069 |
| | SH10TC | 胃 | 6.5448 | -0.094310865 |
| | HCC202 | 乳腺 | 6.5484 | -0.090532132 |
| | ACHN | 肾 | 6.5518 | -0.08696333 |
| | SCC25 | 上呼吸消化道 | 6.5527 | -0.086018646 |
| | PANC0403 | 胰腺 | 6.5578 | -0.080665442 |
| | A2780 | 卵巢 | 6.5613 | -0.076991674 |
| | EBC1 | 肺 | 6.5617 | -0.076571815 |
| | SW620 | 大肠 | 6.5658 | -0.072268259 |
| | SKMEL31 | 皮肤 | 6.5659 | -0.072163294 |
| | PK45H | 胰腺 | 6.5666 | -0.07142854 |
| | NCIH2030 | 肺 | 6.5688 | -0.069119315 |
| | SKMES1 | 肺 | 6.5724 | -0.065340583 |
| | NAMALWA | 造血和淋巴样组织 | 6.5738 | -0.063871075 |
| | CAL12T | 肺 | 6.5741 | -0.063556181 |

| | | | | |
|--------|-----------|----------|--------|--------------|
| | HPBALL | 造血和淋巴样组织 | 6.5743 | -0.063346251 |
| | HT1080 | 软组织 | 6.5745 | -0.063136322 |
| | OE33 | 食道 | 6.5749 | -0.062716463 |
| | SR786 | 造血和淋巴样组织 | 6.5751 | -0.062506533 |
| | NCIH929 | 造血和淋巴样组织 | 6.5755 | -0.062086674 |
| | OVCAR4 | 卵巢 | 6.5755 | -0.062086674 |
| | T47D | 乳腺 | 6.5764 | -0.061141991 |
| | HCC1937 | 乳腺 | 6.5773 | -0.060197308 |
| | SKHEP1 | 肝 | 6.5773 | -0.060197308 |
| | KMS26 | 造血和淋巴样组织 | 6.5778 | -0.059672484 |
| | SNU1066 | 上呼吸道 | 6.5779 | -0.059567519 |
| | SUPHD1 | 造血和淋巴样组织 | 6.5802 | -0.057153329 |
| | L428 | 造血和淋巴样组织 | 6.5828 | -0.054424244 |
| | PLCPRF5 | 肝 | 6.584 | -0.053164667 |
| | MSTO211H | 胸膜 | 6.5871 | -0.049910758 |
| | GA10 | 造血和淋巴样组织 | 6.59 | -0.046866779 |
| | HSC2 | 上呼吸道 | 6.59 | -0.046866779 |
| | MKN74 | 胃 | 6.5911 | -0.045712167 |
| | TOLEDO | 造血和淋巴样组织 | 6.5926 | -0.044137695 |
| | KARPAS620 | 造血和淋巴样组织 | 6.5931 | -0.043612871 |
| | CALU6 | 肺 | 6.5932 | -0.043507906 |
| | SNU1196 | 胆道 | 6.5947 | -0.041933434 |
| [0188] | HGC27 | 胃 | 6.595 | -0.04161854 |
| | NCIH716 | 大肠 | 6.5964 | -0.040149033 |
| | HDMYZ | 造血和淋巴样组织 | 6.5974 | -0.039099385 |
| | A3KAW | 造血和淋巴样组织 | 6.6031 | -0.033116392 |
| | SNGM | 子宫内膜 | 6.6038 | -0.032381638 |
| | CAL851 | 乳腺 | 6.6074 | -0.028602906 |
| | JHUEM2 | 子宫内膜 | 6.608 | -0.027973117 |
| | LN18 | 中枢神经系统 | 6.6106 | -0.025244032 |
| | VMRCRCZ | 肾 | 6.6107 | -0.025139067 |
| | TE10 | 食道 | 6.6127 | -0.023039772 |
| | CAKI2 | 肾 | 6.614 | -0.021675229 |
| | PK1 | 胰腺 | 6.6156 | -0.019995793 |
| | TE1 | 食道 | 6.6158 | -0.019785863 |
| | IGR39 | 皮肤 | 6.6163 | -0.019261039 |
| | NCIH1781 | 肺 | 6.6169 | -0.01863125 |
| | A253 | 唾液腺 | 6.6238 | -0.01138868 |
| | NCIH727 | 肺 | 6.6253 | -0.009814208 |
| | G361 | 皮肤 | 6.6284 | -0.006560299 |
| | TYKNU | 卵巢 | 6.6296 | -0.005300722 |
| | SNU1041 | 上呼吸道 | 6.6307 | -0.004146109 |
| | JL1 | 胸膜 | 6.6309 | -0.00393618 |
| | SNU283 | 大肠 | 6.6315 | -0.003306391 |
| | HCT116 | 大肠 | 6.632 | -0.002781567 |

| | | | | |
|--------|-----------|----------|--------|--------------|
| | LS1034 | 大肠 | 6.6323 | -0.002466673 |
| | EFO21 | 卵巢 | 6.633 | -0.001731919 |
| | DMS114 | 肺 | 6.6335 | -0.001207095 |
| | SNU1077 | 子宫内膜 | 6.6342 | -0.000472342 |
| | DAOY | 中枢神经系统 | 6.6343 | -0.000367377 |
| | NCIH2342 | 肺 | 6.6346 | -5.24824E-05 |
| | MOLP8 | 造血和淋巴样组织 | 6.6347 | 5.24824E-05 |
| | BHT101 | 甲状腺 | 6.6351 | 0.000472342 |
| | TE5 | 食道 | 6.6355 | 0.000892201 |
| | PSN1 | 胰腺 | 6.6403 | 0.005930511 |
| | NCIH2170 | 肺 | 6.6424 | 0.008134771 |
| | RCHACV | 造血和淋巴样组织 | 6.6426 | 0.008344701 |
| | HUH6 | 肝 | 6.6437 | 0.009499314 |
| | NCIH838 | 肺 | 6.6448 | 0.010653926 |
| | YAPC | 胰腺 | 6.6485 | 0.014537624 |
| | KYSE450 | 食道 | 6.6505 | 0.016636919 |
| | RERFLCMS | 肺 | 6.6512 | 0.017371673 |
| | OVISE | 卵巢 | 6.6514 | 0.017581603 |
| | HT55 | 大肠 | 6.6554 | 0.021780194 |
| | SNU899 | 上呼吸消化道 | 6.662 | 0.02870787 |
| | NCIH226 | 肺 | 6.6624 | 0.02912773 |
| | X639V | 泌尿道 | 6.6635 | 0.030282342 |
| [0189] | TE14 | 食道 | 6.6652 | 0.032066744 |
| | MKN45 | 胃 | 6.6662 | 0.033116392 |
| | UMUC3 | 泌尿道 | 6.6662 | 0.033116392 |
| | HEC6 | 子宫内膜 | 6.6667 | 0.033641216 |
| | X253JBV | 泌尿道 | 6.6694 | 0.036475265 |
| | SKMEL24 | 皮肤 | 6.6712 | 0.038364631 |
| | VMRCLCD | 肺 | 6.6718 | 0.03899442 |
| | DLD1 | 大肠 | 6.6751 | 0.042458258 |
| | ECC12 | 胃 | 6.6785 | 0.046027061 |
| | WSUDLCL2 | 造血和淋巴样组织 | 6.6801 | 0.047706498 |
| | PFEIFFER | 造血和淋巴样组织 | 6.6804 | 0.048021392 |
| | NCIH2087 | 肺 | 6.6806 | 0.048231322 |
| | NCIH2029 | 肺 | 6.6826 | 0.050330617 |
| | SJSA1 | 骨 | 6.6844 | 0.052219984 |
| | A172 | 中枢神经系统 | 6.6858 | 0.053689491 |
| | SNU1033 | 大肠 | 6.6873 | 0.055263963 |
| | TM31 | 中枢神经系统 | 6.6885 | 0.05652354 |
| | X2313287 | 胃 | 6.6886 | 0.056628505 |
| | SQ1 | 肺 | 6.6945 | 0.062821428 |
| | SUPT11 | 造血和淋巴样组织 | 6.695 | 0.063346251 |
| | NCIH2023 | 肺 | 6.6954 | 0.063766111 |
| | HCC1569 | 乳腺 | 6.6976 | 0.066075336 |
| | TT2609C02 | 甲状腺 | 6.7014 | 0.070063998 |

| | | | | |
|--------|------------|----------|--------|-------------|
| | SW1990 | 胰腺 | 6.7019 | 0.070588822 |
| | OVSAHO | 卵巢 | 6.7028 | 0.071533505 |
| | NCIH841 | 肺 | 6.7036 | 0.072373224 |
| | ME1 | 造血和淋巴样组织 | 6.7039 | 0.072688118 |
| | COLO205 | 大肠 | 6.7052 | 0.07405266 |
| | TCCSUP | 泌尿道 | 6.7056 | 0.074472519 |
| | TE11 | 食道 | 6.7063 | 0.075207273 |
| | TE4 | 食道 | 6.707 | 0.075942026 |
| | NCIH1694 | 肺 | 6.7095 | 0.078566146 |
| | KP4 | 胰腺 | 6.7102 | 0.0793009 |
| | CL11 | 大肠 | 6.711 | 0.080140618 |
| | NCIH596 | 肺 | 6.7123 | 0.08150516 |
| | OCIAML3 | 造血和淋巴样组织 | 6.7152 | 0.084549139 |
| | KMH2 | 造血和淋巴样组织 | 6.7155 | 0.084864034 |
| | PK59 | 胰腺 | 6.7163 | 0.085703752 |
| | HDLM2 | 造血和淋巴样组织 | 6.7172 | 0.086648435 |
| | ES2 | 卵巢 | 6.7183 | 0.087803048 |
| | SKNDZ | 自主神经节 | 6.7192 | 0.088747731 |
| | NCIH650 | 肺 | 6.7194 | 0.088957661 |
| | CAL62 | 甲状腺 | 6.721 | 0.090637097 |
| | MDAMB231 | 乳腺 | 6.7222 | 0.091896675 |
| | HARA | 肺 | 6.7238 | 0.093576111 |
| [0190] | MFE319 | 子宫内膜 | 6.7242 | 0.093995971 |
| | LCLC103H | 肺 | 6.7269 | 0.09683002 |
| | OE19 | 食道 | 6.7273 | 0.097249879 |
| | HT144 | 皮肤 | 6.7297 | 0.099769034 |
| | HEC251 | 子宫内膜 | 6.7301 | 0.100188893 |
| | A4FUK | 造血和淋巴样组织 | 6.7317 | 0.10186833 |
| | K562 | 造血和淋巴样组织 | 6.7319 | 0.102078259 |
| | HEC59 | 子宫内膜 | 6.7321 | 0.102288189 |
| | NCIH1341 | 肺 | 6.7337 | 0.103967626 |
| | A204 | 软组织 | 6.7338 | 0.10407259 |
| | OV7 | 卵巢 | 6.7346 | 0.104912309 |
| | OV90 | 卵巢 | 6.7381 | 0.108586076 |
| | HCC827 | 肺 | 6.7384 | 0.108900971 |
| | DU4475 | 乳腺 | 6.742 | 0.112679703 |
| | SKMEL1 | 皮肤 | 6.742 | 0.112679703 |
| | KYSE70 | 食道 | 6.7428 | 0.113519422 |
| | CHP126 | 自主神经节 | 6.7459 | 0.11677333 |
| | DETROIT562 | 上呼吸道 | 6.7465 | 0.117403119 |
| | CMK | 造血和淋巴样组织 | 6.7483 | 0.119292485 |
| | X769P | 肾 | 6.7486 | 0.11960738 |
| | DEL | 造血和淋巴样组织 | 6.7494 | 0.120447098 |
| | PANC0813 | 胰腺 | 6.751 | 0.122126535 |
| | COLO201 | 大肠 | 6.752 | 0.123176182 |

| | | | | |
|--------|-----------|----------|--------|-------------|
| | SKNMC | 骨 | 6.7533 | 0.124540725 |
| | CALU3 | 肺 | 6.7536 | 0.124855619 |
| | SNU1076 | 上呼吸消化道 | 6.7574 | 0.128844281 |
| | HCC78 | 肺 | 6.7625 | 0.134197486 |
| | ESS1 | 子宫内膜 | 6.7626 | 0.13430245 |
| | NCIH1755 | 肺 | 6.771 | 0.143119493 |
| | HPAFII | 胰腺 | 6.7751 | 0.147423049 |
| | CAKII | 肾 | 6.7755 | 0.147842908 |
| | COLO783 | 皮肤 | 6.778 | 0.150467028 |
| | NCIH2405 | 肺 | 6.7785 | 0.150991852 |
| | KNS81 | 中枢神经系统 | 6.7793 | 0.15183157 |
| | HCC95 | 肺 | 6.7794 | 0.151936535 |
| | HL60 | 造血和淋巴样组织 | 6.7796 | 0.152146465 |
| | FADU | 上呼吸消化道 | 6.7809 | 0.153511007 |
| | TE617T | 软组织 | 6.782 | 0.15466562 |
| | KMBC2 | 泌尿道 | 6.7837 | 0.156450021 |
| | HCC1171 | 肺 | 6.7838 | 0.156554986 |
| | CAPAN1 | 胰腺 | 6.786 | 0.158864211 |
| | CORL88 | 肺 | 6.7915 | 0.164637275 |
| | PECAPJ49 | 上呼吸消化道 | 6.7927 | 0.165896852 |
| | SF126 | 中枢神经系统 | 6.7933 | 0.166526641 |
| | GSS | 胃 | 6.794 | 0.167261395 |
| [0191] | U87MG | 中枢神经系统 | 6.7949 | 0.168206078 |
| | HEYA8 | 卵巢 | 6.7972 | 0.170620268 |
| | HT1376 | 泌尿道 | 6.7994 | 0.172929493 |
| | COLO792 | 皮肤 | 6.7997 | 0.173244388 |
| | SKMEL2 | 皮肤 | 6.8019 | 0.175553613 |
| | NCIH460 | 肺 | 6.8048 | 0.178597592 |
| | KU1919 | 泌尿道 | 6.8061 | 0.179962134 |
| | SNU407 | 大肠 | 6.8062 | 0.180067099 |
| | KU812 | 造血和淋巴样组织 | 6.8063 | 0.180172064 |
| | NCIH747 | 大肠 | 6.8075 | 0.181431642 |
| | A101D | 皮肤 | 6.8089 | 0.182901149 |
| | PATU8988T | 胰腺 | 6.8099 | 0.183950797 |
| | HS895T | 皮肤 | 6.8118 | 0.185945128 |
| | HMC18 | 乳腺 | 6.8147 | 0.188989107 |
| | X253J | 泌尿道 | 6.8153 | 0.189618895 |
| | TE9 | 食道 | 6.8154 | 0.18972386 |
| | LS123 | 大肠 | 6.8175 | 0.191928121 |
| | MCAS | 卵巢 | 6.8199 | 0.194447276 |
| | SW403 | 大肠 | 6.8208 | 0.195391959 |
| | MDST8 | 大肠 | 6.8209 | 0.195496924 |
| | RCM1 | 大肠 | 6.8231 | 0.197806149 |
| | NCIH1650 | 肺 | 6.825 | 0.19980048 |
| | RPMI8226 | 造血和淋巴样组织 | 6.8256 | 0.200430269 |

| | | | | |
|--------|----------------------|----------|--------|-------------|
| | SUDHL8 | 造血和淋巴样组织 | 6.8258 | 0.200640198 |
| | HEPG2 | 肝 | 6.8274 | 0.202319635 |
| | HT115 | 大肠 | 6.8303 | 0.205363614 |
| | KYSE520 | 食道 | 6.8305 | 0.205573544 |
| | ISHIKAWAHERAKLIO02ER | 子宫内膜 | 6.8313 | 0.206413262 |
| | RT112 | 泌尿道 | 6.8313 | 0.206413262 |
| | SNU308 | 胆道 | 6.8314 | 0.206518227 |
| | HCC1806 | 乳腺 | 6.8314 | 0.206518227 |
| | NCIH2085 | 肺 | 6.8317 | 0.206833121 |
| | EFO27 | 卵巢 | 6.832 | 0.207148015 |
| | NCIH2052 | 胸膜 | 6.8321 | 0.20725298 |
| | HSC4 | 上呼吸消化道 | 6.8327 | 0.207882769 |
| | KYSE140 | 食道 | 6.836 | 0.211346607 |
| | LC1SQSF | 肺 | 6.8361 | 0.211451572 |
| | KMRC1 | 肾 | 6.8362 | 0.211556537 |
| | HUPT3 | 胰腺 | 6.837 | 0.212396255 |
| | NCIH1838 | 肺 | 6.8375 | 0.212921079 |
| | T24 | 泌尿道 | 6.8383 | 0.213760797 |
| | WM115 | 皮肤 | 6.8396 | 0.21512534 |
| | KASUMI1 | 造血和淋巴样组织 | 6.8439 | 0.219638826 |
| | GAMG | 中枢神经系统 | 6.8471 | 0.222997699 |
| | SBC5 | 肺 | 6.8494 | 0.225411889 |
| [0192] | WM2664 | 皮肤 | 6.8521 | 0.228245938 |
| | D283MED | 中枢神经系统 | 6.857 | 0.233389213 |
| | MIAPACA2 | 胰腺 | 6.8607 | 0.23727291 |
| | BL70 | 造血和淋巴样组织 | 6.8619 | 0.238532488 |
| | NCIH1623 | 肺 | 6.862 | 0.238637453 |
| | BHY | 上呼吸消化道 | 6.8627 | 0.239372206 |
| | OVCAR8 | 卵巢 | 6.8637 | 0.240421854 |
| | SNU840 | 卵巢 | 6.8651 | 0.241891361 |
| | CFPAC1 | 胰腺 | 6.8671 | 0.243990657 |
| | HS944T | 皮肤 | 6.8697 | 0.246719742 |
| | LK2 | 肺 | 6.8724 | 0.249553791 |
| | JHH1 | 肝 | 6.8737 | 0.250918333 |
| | OVKATE | 卵巢 | 6.8742 | 0.251443157 |
| | T84 | 大肠 | 6.8791 | 0.256586432 |
| | SW1573 | 肺 | 6.8813 | 0.258895657 |
| | KYSE30 | 食道 | 6.8825 | 0.260155235 |
| | DANG | 胰腺 | 6.8825 | 0.260155235 |
| | SU8686 | 胰腺 | 6.8851 | 0.26288432 |
| | YD15 | 唾液腺 | 6.8858 | 0.263619073 |
| | COLO680N | 食道 | 6.8864 | 0.264248862 |
| | SUDHL6 | 造血和淋巴样组织 | 6.887 | 0.264878651 |
| | SNU626 | 中枢神经系统 | 6.8886 | 0.266558087 |
| | SNU1105 | 中枢神经系统 | 6.8918 | 0.269916961 |

| | | | | |
|--------|-------------|----------|--------|-------------|
| | BT20 | 乳腺 | 6.8931 | 0.271281503 |
| | FTC133 | 甲状腺 | 6.8949 | 0.273170869 |
| | P121CHIKAWA | 造血和淋巴样组织 | 6.8951 | 0.273380799 |
| | NCIH292 | 肺 | 6.8954 | 0.273695693 |
| | JHH2 | 肝 | 6.9004 | 0.278943933 |
| | RCC10RGB | 肾 | 6.9009 | 0.279468757 |
| | JHOC5 | 卵巢 | 6.9036 | 0.282302806 |
| | X786O | 肾 | 6.9057 | 0.284507067 |
| | AN3CA | 子宫内膜 | 6.9081 | 0.287026222 |
| | KP3 | 胰腺 | 6.909 | 0.287970905 |
| | HEC151 | 子宫内膜 | 6.9099 | 0.288915588 |
| | KE39 | 胃 | 6.9103 | 0.289335447 |
| | HS822T | 骨 | 6.9115 | 0.290595024 |
| | A375 | 皮肤 | 6.9117 | 0.290804954 |
| | MORCPR | 肺 | 6.9126 | 0.291749637 |
| | C2BBE1 | 大肠 | 6.9144 | 0.293639003 |
| | NCIH2452 | 胸膜 | 6.9169 | 0.296263123 |
| | TCCPAN2 | 胰腺 | 6.9184 | 0.297837595 |
| | VMRCRCW | 肾 | 6.9222 | 0.301826257 |
| | NCIH810 | 肺 | 6.9222 | 0.301826257 |
| | PC3 | 前列腺 | 6.9226 | 0.302246116 |
| | MDAMB435S | 皮肤 | 6.9227 | 0.302351081 |
| [0193] | NCIH322 | 肺 | 6.9254 | 0.30518513 |
| | MOLP2 | 造血和淋巴样组织 | 6.928 | 0.307914215 |
| | HCC366 | 肺 | 6.9295 | 0.309488687 |
| | KELLY | 自主神经节 | 6.9352 | 0.31547168 |
| | AGS | 胃 | 6.9378 | 0.318200764 |
| | MDAMB468 | 乳腺 | 6.9388 | 0.319250412 |
| | SNUC5 | 大肠 | 6.939 | 0.319460342 |
| | HCC1195 | 肺 | 6.941 | 0.321559638 |
| | NB1 | 自主神经节 | 6.9466 | 0.327437666 |
| | NCIH2126 | 肺 | 6.9473 | 0.32817242 |
| | HT | 造血和淋巴样组织 | 6.9476 | 0.328487314 |
| | SW48 | 大肠 | 6.9505 | 0.331531293 |
| | QGP1 | 胰腺 | 6.9517 | 0.33279087 |
| | NUGC3 | 胃 | 6.9527 | 0.333840518 |
| | SNU719 | 胃 | 6.9544 | 0.33562492 |
| | SKES1 | 骨 | 6.9576 | 0.338983793 |
| | OVK18 | 卵巢 | 6.9579 | 0.339298688 |
| | HEC1B | 子宫内膜 | 6.9583 | 0.339718547 |
| | KLE | 子宫内膜 | 6.9584 | 0.339823511 |
| | HEC50B | 子宫内膜 | 6.9622 | 0.343812174 |
| | TF1 | 造血和淋巴样组织 | 6.9682 | 0.350110061 |
| | AM38 | 中枢神经系统 | 6.9715 | 0.353573899 |
| | HCC1954 | 乳腺 | 6.9728 | 0.354938441 |

| | | | | |
|--------|----------|----------|--------|-------------|
| | MELHO | 皮肤 | 6.9769 | 0.359241998 |
| | EN | 子宫内膜 | 6.9773 | 0.359661857 |
| | HCC2108 | 肺 | 6.9789 | 0.361341294 |
| | X22RV1 | 前列腺 | 6.9813 | 0.363860449 |
| | PATU8902 | 胰腺 | 6.9874 | 0.370263301 |
| | LN229 | 中枢神经系统 | 6.9883 | 0.371207984 |
| | GI1 | 中枢神经系统 | 6.9897 | 0.372677491 |
| | SNU213 | 胰腺 | 6.9923 | 0.375406576 |
| | COLO684 | 子宫内膜 | 6.993 | 0.376141329 |
| | SNU738 | 中枢神经系统 | 6.9945 | 0.377715801 |
| | JK1 | 造血和淋巴样组织 | 6.9966 | 0.379920062 |
| | KYSE510 | 食道 | 6.9987 | 0.382124322 |
| | NCIH1299 | 肺 | 6.9991 | 0.382544181 |
| | IGROV1 | 卵巢 | 7.0026 | 0.386217949 |
| | ACCMESO1 | 胸膜 | 7.0033 | 0.386952703 |
| | BICR16 | 上呼吸消化道 | 7.0071 | 0.390941365 |
| | HCC2279 | 肺 | 7.0072 | 0.39104633 |
| | PANC1 | 胰腺 | 7.0096 | 0.393565485 |
| | CCFSTTG1 | 中枢神经系统 | 7.0119 | 0.395979675 |
| | SNU668 | 胃 | 7.0126 | 0.396714428 |
| | SW1271 | 肺 | 7.0143 | 0.39849883 |
| | SUDHL4 | 造血和淋巴样组织 | 7.0162 | 0.400493161 |
| [0194] | GCT | 软组织 | 7.0174 | 0.401752738 |
| | TT | 甲状腺 | 7.0183 | 0.402697421 |
| | DMS454 | 肺 | 7.019 | 0.403432175 |
| | LS180 | 大肠 | 7.0225 | 0.407105943 |
| | SNU182 | 肝 | 7.0252 | 0.409939992 |
| | KNS62 | 肺 | 7.0253 | 0.410044957 |
| | OC314 | 卵巢 | 7.0273 | 0.412144253 |
| | RH41 | 软组织 | 7.0285 | 0.41340383 |
| | NCIH1373 | 肺 | 7.0318 | 0.416867668 |
| | BEN | 肺 | 7.0341 | 0.419281858 |
| | MESSA | 软组织 | 7.0401 | 0.425579746 |
| | HEC1A | 子宫内膜 | 7.0465 | 0.432297493 |
| | L363 | 造血和淋巴样组织 | 7.0473 | 0.433137211 |
| | CAL29 | 泌尿道 | 7.0497 | 0.435656366 |
| | RAJI | 造血和淋巴样组织 | 7.0524 | 0.438490415 |
| | ZR751 | 乳腺 | 7.054 | 0.440169852 |
| | KYSE180 | 食道 | 7.0541 | 0.440274817 |
| | LOXIMVI | 皮肤 | 7.058 | 0.444368444 |
| | YD38 | 上呼吸消化道 | 7.06 | 0.446467739 |
| | SNU410 | 胰腺 | 7.0646 | 0.45129612 |
| | NCIH2291 | 肺 | 7.0654 | 0.452135838 |
| | PANC0203 | 胰腺 | 7.0662 | 0.452975556 |
| | NCIH1792 | 肺 | 7.0701 | 0.457069183 |

| | | | | |
|--------|-----------|----------|--------|-------------|
| | SW1088 | 中枢神经系统 | 7.0786 | 0.46599119 |
| | SKMEL30 | 皮肤 | 7.079 | 0.46641105 |
| | KM12 | 大肠 | 7.0792 | 0.466620979 |
| | HEC108 | 子宫内膜 | 7.0804 | 0.467880557 |
| | NCIH526 | 肺 | 7.0825 | 0.470084817 |
| | NCIH661 | 肺 | 7.0832 | 0.470819571 |
| | KYSE150 | 食道 | 7.0859 | 0.47365362 |
| | TUHR4TKB | 肾 | 7.0861 | 0.47386355 |
| | U251MG | 中枢神经系统 | 7.091 | 0.479006825 |
| | MKN1 | 胃 | 7.0915 | 0.479531649 |
| | DMS273 | 肺 | 7.0958 | 0.484045135 |
| | HS683 | 中枢神经系统 | 7.0975 | 0.485829536 |
| | HS746T | 胃 | 7.1012 | 0.489713233 |
| | OAW42 | 卵巢 | 7.1038 | 0.492442318 |
| | KYO1 | 造血和淋巴样组织 | 7.1048 | 0.493491966 |
| | HS688AT | 皮肤 | 7.1049 | 0.493596931 |
| | SIGM5 | 造血和淋巴样组织 | 7.1077 | 0.496535945 |
| | HUCCT1 | 胆道 | 7.1094 | 0.498320346 |
| | HS819T | 骨 | 7.1097 | 0.498635241 |
| | HCC1588 | 肺 | 7.1149 | 0.50409341 |
| | KPL1 | 乳腺 | 7.1178 | 0.507137389 |
| | KE97 | 造血和淋巴样组织 | 7.1187 | 0.508082072 |
| [0195] | HCC2218 | 乳腺 | 7.1208 | 0.510286332 |
| | OCIM1 | 造血和淋巴样组织 | 7.1253 | 0.515009748 |
| | NCIH441 | 肺 | 7.1284 | 0.518263657 |
| | NCIH1092 | 肺 | 7.139 | 0.529389924 |
| | SKMEL28 | 皮肤 | 7.1392 | 0.529599854 |
| | HPAC | 胰腺 | 7.1394 | 0.529809784 |
| | SAOS2 | 骨 | 7.1406 | 0.531069361 |
| | RL952 | 子宫内膜 | 7.1432 | 0.533798446 |
| | SKNAS | 自主神经节 | 7.145 | 0.535687812 |
| | CAL148 | 乳腺 | 7.1477 | 0.538521861 |
| | DMS79 | 肺 | 7.1572 | 0.548493516 |
| | EFE184 | 子宫内膜 | 7.1614 | 0.552902038 |
| | SUPT1 | 造血和淋巴样组织 | 7.167 | 0.558780066 |
| | NMCG1 | 中枢神经系统 | 7.1746 | 0.56675739 |
| | NCIH358 | 肺 | 7.1753 | 0.567492144 |
| | TE441T | 软组织 | 7.1772 | 0.569486475 |
| | MELJUSO | 皮肤 | 7.1877 | 0.580507778 |
| | IPC298 | 皮肤 | 7.1984 | 0.59173901 |
| | SW1353 | 骨 | 7.1985 | 0.591843975 |
| | CAL33 | 上呼吸消化道 | 7.2038 | 0.597407109 |
| | SNU489 | 中枢神经系统 | 7.2056 | 0.599296475 |
| | LCLC97TM1 | 肺 | 7.2086 | 0.602445419 |
| | BICR56 | 上呼吸消化道 | 7.2108 | 0.604754644 |

| | | | | |
|--------|-----------|----------|--------|-------------|
| | NCIH508 | 大肠 | 7.2176 | 0.61189225 |
| | HSC3 | 上呼吸消化道 | 7.2237 | 0.618295103 |
| | SNU878 | 肝 | 7.2238 | 0.618400067 |
| | CAMA1 | 乳腺 | 7.2254 | 0.620079504 |
| | LS411N | 大肠 | 7.2279 | 0.622703624 |
| | YKG1 | 中枢神经系统 | 7.2376 | 0.632885208 |
| | JHH6 | 肝 | 7.2377 | 0.632990173 |
| | KG1C | 中枢神经系统 | 7.238 | 0.633305068 |
| | BT474 | 乳腺 | 7.2422 | 0.637713589 |
| | SNU1079 | 胆道 | 7.2463 | 0.642017145 |
| | KARPAS422 | 造血和淋巴样组织 | 7.2487 | 0.6445363 |
| | HEC265 | 子宫内膜 | 7.2509 | 0.646845526 |
| | NCIH2444 | 肺 | 7.2606 | 0.65702711 |
| | NUDHL1 | 造血和淋巴样组织 | 7.2677 | 0.664479611 |
| | AMO1 | 造血和淋巴样组织 | 7.2764 | 0.673611547 |
| | HCC1833 | 肺 | 7.2887 | 0.686522217 |
| | SNUC4 | 大肠 | 7.2927 | 0.690720808 |
| | HDQP1 | 乳腺 | 7.2935 | 0.691560527 |
| | OV56 | 卵巢 | 7.2957 | 0.693869752 |
| | P3HR1 | 造血和淋巴样组织 | 7.2973 | 0.695549189 |
| | NUGC4 | 胃 | 7.2991 | 0.697438555 |
| | U2OS | 骨 | 7.3013 | 0.69974778 |
| [0196] | SNU886 | 肝 | 7.3032 | 0.701742112 |
| | NCIH28 | 胸膜 | 7.3081 | 0.706885386 |
| | SNU601 | 胃 | 7.3091 | 0.707935034 |
| | ECC10 | 胃 | 7.3182 | 0.71748683 |
| | LS513 | 大肠 | 7.3199 | 0.719271232 |
| | CAL120 | 乳腺 | 7.32 | 0.719376196 |
| | SNU1040 | 大肠 | 7.3288 | 0.728613098 |
| | NCIH2171 | 肺 | 7.3416 | 0.742048591 |
| | SUDHL5 | 造血和淋巴样组织 | 7.3508 | 0.751705352 |
| | BFTC905 | 泌尿道 | 7.3514 | 0.752335141 |
| | HT29 | 大肠 | 7.364 | 0.765560705 |
| | RPMI7951 | 皮肤 | 7.375 | 0.777106832 |
| | AML193 | 造血和淋巴样组织 | 7.3753 | 0.777421726 |
| | MEC1 | 造血和淋巴样组织 | 7.376 | 0.778156479 |
| | HEP3B217 | 肝 | 7.4062 | 0.809855846 |
| | SNU475 | 肝 | 7.4091 | 0.812899825 |
| | HUH1 | 肝 | 7.4298 | 0.834627537 |
| | HUPT4 | 胰腺 | 7.4555 | 0.861603488 |
| | IMR32 | 自主神经节 | 7.4593 | 0.865592151 |
| | NCIH889 | 肺 | 7.4952 | 0.903274511 |
| | HCC2935 | 肺 | 7.5084 | 0.917129863 |
| | MC116 | 造血和淋巴样组织 | 7.5146 | 0.92363768 |
| | X5637 | 泌尿道 | 7.5183 | 0.927521377 |

| | | | | |
|--------|----------|----------|--------|-------------|
| | SKM1 | 造血和淋巴样组织 | 7.5234 | 0.932874582 |
| | SKBR3 | 乳腺 | 7.5494 | 0.960165427 |
| | EM2 | 造血和淋巴样组织 | 7.5755 | 0.987561238 |
| | RI1 | 造血和淋巴样组织 | 7.5915 | 1.004355605 |
| | SIMA | 自主神经节 | 7.6032 | 1.016636485 |
| | FUOV1 | 卵巢 | 7.6122 | 1.026083316 |
| | SNUC2A | 大肠 | 7.6165 | 1.030596802 |
| | SNU61 | 大肠 | 7.6228 | 1.037209584 |
| | CAPAN2 | 胰腺 | 7.6273 | 1.041933 |
| | SNU216 | 胃 | 7.6319 | 1.04676138 |
| | MOLM13 | 造血和淋巴样组织 | 7.646 | 1.061561416 |
| | HUNS1 | 造血和淋巴样组织 | 7.6648 | 1.081294796 |
| | HCC1438 | 肺 | 7.7264 | 1.145953108 |
| | NCIH2196 | 肺 | 7.7386 | 1.158758812 |
| [0197] | SNU466 | 中枢神经系统 | 7.7589 | 1.180066665 |
| | SUDHL10 | 造血和淋巴样组织 | 7.7977 | 1.220793004 |
| | SNU46 | 上呼吸道消化道 | 7.8035 | 1.226880962 |
| | CALU1 | 肺 | 7.8185 | 1.242625681 |
| | BFTC909 | 肾 | 7.9189 | 1.348010331 |
| | JVM3 | 造血和淋巴样组织 | 7.961 | 1.392200508 |
| | MHHCALL4 | 造血和淋巴样组织 | 8.031 | 1.465675862 |
| | JURLMK1 | 造血和淋巴样组织 | 8.1126 | 1.551327131 |
| | KE37 | 造血和淋巴样组织 | 8.1163 | 1.555210829 |
| | S117 | 软组织 | 8.2668 | 1.713182839 |
| | KMS21BM | 造血和淋巴样组织 | 8.3309 | 1.780465271 |
| | KYM1 | 软组织 | 8.4417 | 1.896766259 |
| | CORL95 | 肺 | 8.5762 | 2.037943903 |
| | MHHNB11 | 自主神经节 | 8.8255 | 2.299621128 |
| | MDAMB361 | 乳腺 | 9.2909 | 2.788127266 |

[0198] 实施例2.PDE3A作为DNMDP的推定靶标PDE3A的鉴定

[0199] 鉴于6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)的有效的细胞选择性生长抑制,对其作用机制进行了更详细的研究。为了确定DNMDP的分子靶标,对先前表征了突变、拷贝数和基因表达特征作为癌细胞系百科全书(CCLE, Barretina等人, 2012)的一部分的766个测试细胞系进行了化学基因组分析,以寻找这些基因组特征与DNMDP敏感性之间的相关性。在整个细胞系集合中在DNMDP敏感性与单个基因的表达之间的Pearson相关性的分析显示出与编码磷酸二酯酶3A的PDE3A基因的表达强烈相关(图5A)。DNMDP敏感性与PDE3A表达之间的相关性并不完美(图18),可能一些误差是由于细胞系敏感性表征的高通量性质引入的,因为对所有766个细胞系进行手动验证在实践中是不可行的。相反,突变和拷贝数特征与DNMDP敏感性不相关。相反,在测试的480个化合物中,DNMDP敏感性与PDE3A表达最密切相关(图5B),表明具有高PDE3A表达的癌细胞系对DNMDP比任何其他测试化合物更明显敏感。与初始筛选的动机相反,TP53突变或其他p53功能测量与DNMDP敏感性之间没有相关性。

[0200] 鉴于这些结果以及DNMDP与已知PDE3抑制剂(例如左西孟旦和氰胍佐旦(图6A-6C))的明显结构相似性,进行了DNMDP针对代表11个PDE超级家族的19种磷酸二酯酶的生化分析。在浓度为100nM时,DNMDP特异性抑制PDE3A和PDE3B,弱抑制PDE10,并且对其他磷酸二

酯酶几乎没有或没有可检测的作用(表2)。

[0201] 由于PDE3A表达与DNMDP敏感性之间的细胞相关性、DNMDP对PDE3A和PDE3B的体外抑制以及DNMDP与已知PDE3抑制剂的结构相似性,分析了是否所有PDE3抑制剂会表现出与DNMDP相似的细胞毒性性质。令人惊讶的是,在一系列测试化合物中,在体外酶促PDE3A抑制的 IC_{50} 和HeLa细胞的细胞毒性之间几乎没有相关性(图5C和图7A和7B)。实际上,以任何可检测的方式,有效的PDE3抑制剂曲喹辛(PDE3 $IC_{50}=0.25nM$,Ruppert等人,Life Sci.31, 2037-2043,1982)不影响HeLa细胞生存力。尽管它们对HeLa细胞生存力具有不同作用,但是非细胞毒性PDE3抑制剂曲喹辛和强效细胞毒性化合物DNMDP对福司柯林处理的HeLa细胞中的细胞内cAMP水平具有相似的作用(图8A和8B)。该结果表明,抑制PDE3A的cAMP和cGMP水解功能对于DNMDP的细胞毒性活性是不充分的。

[0202] 表2:磷酸二酯酶抑制反应的结果

| | PDE | %抑制 #1 | %抑制 #2 | %抑制 |
|--------|---------|--------|--------|-----|
| [0203] | PDE1A1 | 3 | 7 | 5 |
| | PDE1B | -5 | 0 | -2 |
| | PDE1C | 2 | 9 | 5 |
| | PDE2A | 6 | 10 | 8 |
| | PDE3A | 95 | 95 | 95 |
| | PDE3B | 98 | 97 | 97 |
| | PDE4A1A | 14 | 18 | 16 |
| | PDE4B1 | 21 | 20 | 21 |
| | PDE4C1 | 10 | 14 | 12 |
| | PDE4D3 | 14 | 16 | 15 |
| | PDE4D7 | 19 | 20 | 20 |
| | PDE5A1 | 16 | 16 | 16 |
| | PDE7A | 24 | 20 | 22 |
| | PDE7B | 5 | 11 | 8 |
| [0204] | PDE8A1 | 10 | 12 | 11 |
| | PDE9A2 | 0 | 5 | 2 |
| | PDE10A1 | 61 | 65 | 63 |
| | PDE10A2 | 67 | 70 | 68 |
| | PDE11A | 14 | 18 | 16 |

[0205] 实施例3.PDE3A的靶标验证

[0206] 在磷酸二酯酶3A (PDE3A) 抑制和细胞杀伤之间具有复杂关系,其中6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮(DNMDP)和一些PDE3抑制剂杀死HeLa和其他DNMDP敏感细胞,而其它PDE3抑制剂不影响细胞生存力,这表明几种可能的解释,包括:1)细胞毒活性可能不依赖于PDE3并且是由于作用于不同的蛋白,尽管通过筛选234种激酶蛋白没有发现 $10\mu M$ DNMDP抑制的激酶;2)细胞毒性和非细胞毒性的PDE3抑制剂可以结合蛋白内的不同位点并发挥不同的活性;或3)细胞毒性和非细胞毒性PDE3抑制剂可以结合PDE3活性位点,但对蛋白的构象和活性具有不同的作用。第三种可能性可能是意料不到的,但PDE4变构调节剂已显示结合PDE4活性位点并与上游(UCR2)和下游(CR3)调节结构域相互

作用,从而稳定特定的非活性构象 (Burgin等人, Nat Biotechnol 28,63-70,2010)。最重要的是,在体外对cAMP水解具有相似 IC_{50} 的PDE4竞争性抑制剂和PDE4变构调节剂在动物研究中具有不同的细胞活性和安全性特征 (Burgin等人, Nat Biotechnol 28,63-70,2010)。为了评估PDE抑制剂或其他小分子是否与DNMDP竞争,筛选了1600个生物活性化合物的PHARMAKON 1600集合 (PHARMAKON 1600是来自美国和国际药典的1600个已知药物的独特集合) 以鉴定能够拯救由DNMDP诱导的细胞死亡的化合物。用30nM DNMDP (EC_{70} 浓度) 和20 μ M每个生物活性化合物共同处理HeLa细胞。如前所述通过ATP消耗评估48小时处理后的细胞生存力。拯救由DNMDP诱导的细胞死亡的五五个最有效的化合物都是PDE抑制剂,并且三个最有效的化合物左西孟旦、米力农和西洛他唑都是选择性PDE3抑制剂 (图9A)。

[0207] 在后续实验中,证实西洛酰胺、左西孟旦、米力农和几种其他非细胞毒性选择性PDE3抑制剂能够以剂量依赖性方式拯救DNMDP细胞毒性 (图9B)。最有效的DNMDP竞争者是曲喹辛,具有<1nM的“ RC_{50} ” (达到50%拯救的浓度);相反,PDE5抑制剂如西地那非和伐地那非以及泛PDE抑制剂idubulast和双嘧达莫在该测定中直至10 μ M浓度也不是有效竞争物 (图9B)。这表明非细胞毒性PDE3抑制剂和DNMDP竞争结合至介导细胞毒性表型的相同分子靶标。

[0208] 为了鉴定DNMDP的分子靶标,使用与HeLa细胞裂解物一起孵育的(R)-去-硝基-DNMDP的固相固定连接基类似物 (图10A) 进行亲和纯化。该连接基类似物具有与上述非细胞毒性PDE3抑制剂相同的DNMDP细胞毒性拯救表型 (图10B),表明它也与相同的分子靶标结合。通过添加过量的曲喹辛或单独的DNMDP对映体 (其中只有(R)-对映体具有细胞毒性),从而竞争分子靶标。亲和纯化材料的PDE3A的免疫印迹显示PDE3A确实结合连接基类似物。PDE3A与连接基类似物的结合被曲喹辛和(R)-DNMDP阻断,而不被非细胞毒性对映异构体(S)-DNMDP阻断 (图9C)。因此,曲喹辛和(R)-DNMDP都阻止PDE3A与固定的DNMDP类似物的结合,并且推断两个分子都直接结合PDE3A。

[0209] 基于DNMDP敏感细胞表达高水平PDE3A并且DNMDP与非细胞毒性抑制剂竞争PDE3A结合的观察结果,假设DNMDP通过与PDE3A的相互作用介导其细胞毒性表型,并且PDE3A丰度是DNMDP敏感性的直接细胞决定因素。为验证这一假设,测试了降低PDE3A水平对DNMDP应答的影响。用靶向PDE3A基因座中三个不同位点的三个向导RNA (sgRNA) 靶向成簇的规则间隔的短回文 (CRISPR) 相关的CAS9酶导致PDE3A表达的完全丧失 (Cong等人, Science 339,819-823,2013), sgRNA2和sgRNA3几乎完全降低PDE3A蛋白水平,而sgRNA1对PDE3A表达具有中等影响 (图11A)。重要的是,sgRNA2和sgRNA3均导致有活性的细胞毒性DNMDP类似物3的毒性的显著拯救 (图11A和11B和图5A-5C)。sgRNA2和sgRNA3均导致DNMDP毒性的显著拯救 (图11C)。未观察到PDE3A表达降低的HeLa细胞中增殖速率或形态的变化,表明PDE3A不是细胞存活所需的。在使用含有靶向PDE3A的四种不同siRNA的siRNA智能池 (siRNA smart-pool) 的独立方法中,在HeLa细胞系中PDE3A表达在转染后24至72小时之间较低,最大有效性为下降70%。与对照siRNA条件相比,用siPDE3A处理的HeLa细胞对DNMDP类似物具有更高的 EC_{50} (图12A和12B)。不受理论束缚,得出结论:DNMDP细胞毒性需要PDE3A,并且DNMDP可能调节PDE3A的功能。

[0210] 实施例4. DNMDP的作用机制的确定

[0211] 6-(4-(二乙基氨基)-3-硝基苯基)-5-甲基-4,5-二氢吡嗪-3(2H)-酮 (DNMDP) 细胞

毒性对磷酸二酯酶3A (PDE3A) 蛋白丰度的依赖性表明了其机制可能类似于最近针对来那度胺观察到的机制,其通过稳定cereblon与IKAROS家族锌指1 (IKZF1) 和IKZF3之间的相互作用通过新形态或超形态机制起作用(Krönke 等人,Science 343,301-305,2014;Lu等人,Science 343,305-309,2014)。另外,已显示PDE4变构调节剂(而不是竞争性抑制剂)结合和稳定已独立显示独特地结合PDE4-配偶体蛋白DISC1的“封闭”蛋白构象(Millar等人,Science 310,1187-1191,2005)。在正常条件下表征了PDE3A所在的蛋白复合物,并且研究了当PDE3A与DNMDP或非细胞毒性PDE3抑制剂曲喹辛结合时这些复合物如何改变。在DNMDP和曲喹辛存在下,将来自HeLa细胞的PDE3A和相互作用蛋白免疫沉淀,随后用等量稳定同位素标记物标记相对丰度并通过质谱定量(iTRAQ/MS,图13A)。来自HeLa细胞的PDE3A免疫沉淀物富含多种蛋白磷酸酶亚基,包括蛋白磷酸酶2亚基(PPP2CA、PPP2R1A、PPP2R1B、PPP2R2A、PPP2R2D)、钙神经素(PPP3R1、PPP3CA,Beca等人,Circ.Res.112,289-297,2013)、14-3-3(YWHAB、YWHAQ、YWHAG、YWHAZ,Pozuelo Rubio等人,Biochem.J.392,163-172,2005)和微管蛋白(TUBA1C、TUBA1B)家族成员(图13B和图14A)。此外,发现PDE3A和PDE3B存在于先前已报道的相同蛋白复合物中(Malovannaya等人,Cell145,787-799,2011)。

[0212] DNMDP的结合改变了与PDE3A共免疫沉淀的相互作用蛋白的组成。在用DNMDP处理后在PDE3A免疫沉淀物中特异性富集的蛋白包括Sirtuin7 (SIRT7) 和Schlafen 12 (SLFN12) (图13C和图14B)。这些蛋白在DNMDP存在下特异性地与PDE3A相互作用,但是在曲喹辛处理的对照中未观察到,而已知的PDE3B相互作用物(含有水解酶结构域的蛋白15 (ABHD15, Chavez等人,Biochem.Biophys.Res.Commun.342,1218-1222,2006))在来自曲喹辛处理的细胞的免疫沉淀物中富集(图13C和图14C)。用亲和试剂验证了由DNMDP促进的在PDE3A与SIRT7和SLFN12之间的相互作用。通过共免疫沉淀证明,在用DNMDP而不是DMSO或曲喹辛处理的HeLa细胞中,内源性PDE3A的免疫沉淀增强了异位表达的V5标记的SIRT7和SLFN12与PDE3A的复合物形成(图19)。图20进一步显示,DNMDP和阿那格雷(而不是曲喹辛)诱导PDE3A和SLFN12复合物形成(阿那格雷较弱)。

[0213] 与PDE3A类似,SLFN12的过表达似乎对DNMDP敏感细胞系具有细胞毒性作用,这增加了在全细胞裂解物中检测SLFN12的难度。

[0214] PDE3A与SIRT7和SLFN12增强的相互作用表明这些相互作用蛋白中的一种或多种可能有助于DNMDP敏感性。在所有测试的细胞中,SIRT7 mRNA表达相对恒定,但SLFN12和PDE3A mRNA的共表达显示与DNMDP敏感性强相关;几乎所有的DNMDP敏感的细胞系均表达高水平的SLFN12(图15A-15C)。重要的是,发现几乎一半表达高水平SLFN12和PDE3A的敏感细胞系是黑素瘤细胞系(图15B)。单独的SLFN12表达也是与DNMDP敏感性相关的最相关基因之一,这证实了SLFN12可能在功能上参与DNMDP诱导的细胞毒性的假设(图16A)。此外,当校正PDE3A表达时,SLFN12表达是具有DNMDP敏感性的最高相关基因(图16B)。为了评估SLFN12是否是DNMDP的细胞毒性表型所需要的,我们通过在HeLa细胞中用两种shRNA敲低将SLFN12 mRNA表达减少60% (图15D)。类似于PDE3A表达的减少,SLFN12表达的减少不导致细胞毒性,并且事实上对DNMDP的敏感性降低(图15E)。这些结果显示SLFN12如同PDE3A一样对于DNMDP的细胞毒性表型是必需的。GTEx聚生体对SLFN12和PDE3A的正常表达的表征(Pierson,E.等人,PLoS Comput.Biol.11,e1004220 (2015))显示正常组织中SLFN12的表达低,而很少观察到PDE3A和SLFN12的高共表达(表3)。这可能表明DNMDP和相关化合物的所需毒性可能受到

潜在限制。

[0215] 表3:多种健康组织类型中SLFN12和PDE3A表达的RPKM值

| | SLFN12 (RPKM) | | PDE3A (RPKM) | | n |
|--------------|---------------|------|--------------|------|-----|
| | 均值 | SD | 均值 | SD | |
| [0216] 脂肪-皮下 | 2.14 | 0.70 | 4.76 | 2.03 | 128 |
| 脂肪-内脏(网膜) | 2.43 | 1.03 | 4.26 | 1.94 | 31 |

[0217]

| | | | | | |
|----------------|------|------|-------|-------|-----|
| 肾上腺 | 3.01 | 0.83 | 0.34 | 0.21 | 52 |
| 动脉-主动脉 | 2.10 | 0.71 | 16.15 | 5.12 | 82 |
| 动脉-冠状动脉 | 1.80 | 0.80 | 17.73 | 6.52 | 44 |
| 动脉-胫动脉 | 1.09 | 0.49 | 22.97 | 6.35 | 137 |
| 膀胱 | 1.38 | 0.57 | 1.33 | 0.40 | 11 |
| 脑-扁桃体 | 0.37 | 0.23 | 0.96 | 0.34 | 26 |
| 脑-前扣带回皮质(BA24) | 0.28 | 0.16 | 0.77 | 0.45 | 22 |
| 脑-尾(基底神经节) | 0.40 | 0.23 | 1.27 | 0.37 | 36 |
| 脑-小脑半球 | 0.11 | 0.07 | 2.73 | 1.49 | 29 |
| 脑-小脑 | 0.19 | 0.10 | 2.40 | 0.98 | 31 |
| 脑-皮质 | 0.25 | 0.12 | 0.56 | 0.59 | 25 |
| 脑-额皮质(BA9) | 0.26 | 0.15 | 0.54 | 0.33 | 28 |
| 脑-海马 | 0.39 | 0.31 | 0.82 | 0.38 | 28 |
| 脑-下丘脑 | 0.46 | 0.29 | 0.93 | 0.48 | 30 |
| 脑-伏核(基底神经节) | 0.28 | 0.16 | 1.11 | 0.41 | 32 |
| 脑-壳(基底神经节) | 0.29 | 0.18 | 0.91 | 0.33 | 24 |
| 脑-脊髓(宫颈 c-1) | 0.50 | 0.32 | 0.65 | 0.55 | 19 |
| 脑-黑质 | 0.62 | 0.50 | 0.82 | 0.47 | 27 |
| 乳腺-乳腺组织 | 2.48 | 0.74 | 3.19 | 2.35 | 66 |
| 细胞-EBV-转化的淋巴细胞 | 4.70 | 1.57 | 0.02 | 0.01 | 54 |
| 细胞-转化的成纤维细胞 | 5.34 | 2.27 | 0.58 | 0.60 | 155 |
| 结肠-乙状结肠 | 1.58 | 0.50 | 10.27 | 3.45 | 13 |
| 结肠-横结肠 | 0.99 | 0.47 | 11.24 | 4.32 | 45 |
| 食管-食管胃连接 | 1.14 | 0.31 | 16.87 | 5.53 | 22 |
| 食管-粘膜层 | 1.01 | 0.45 | 0.82 | 1.32 | 106 |
| 食管-肌层 | 1.29 | 0.35 | 15.71 | 6.02 | 99 |
| 输卵管 | 2.32 | 0.86 | 3.80 | 1.86 | 6 |
| 心脏-心耳 | 1.05 | 0.38 | 15.65 | 6.31 | 38 |
| 心脏-左心室 | 0.81 | 0.38 | 26.55 | 13.43 | 95 |
| 肾-皮质 | 1.21 | 1.07 | 1.40 | 0.84 | 8 |
| 肝 | 0.29 | 0.16 | 0.49 | 0.28 | 34 |
| 肺 | 2.83 | 1.12 | 2.78 | 1.48 | 133 |

| | | | | | | |
|--------|--------------------|------|------|------|------|-----|
| [0218] | 小唾液腺 | 1.75 | 0.61 | 0.62 | 0.44 | 5 |
| | 肌肉-骨骼肌 | 0.25 | 0.18 | 0.84 | 0.42 | 157 |
| | 神经-胫神经 | 2.82 | 0.87 | 3.39 | 1.71 | 114 |
| | 卵巢 | 1.92 | 0.57 | 2.17 | 1.13 | 35 |
| | 胰腺 | 0.52 | 0.27 | 2.65 | 0.86 | 65 |
| | 垂体 | 0.47 | 0.23 | 1.04 | 0.47 | 22 |
| | 前列腺 | 1.41 | 0.57 | 4.04 | 3.74 | 42 |
| | 皮肤-未暴露于阳光 (阴阜上) | 0.76 | 0.37 | 0.66 | 0.34 | 41 |
| | 皮肤-暴露于阳光(小腿) | 0.63 | 0.31 | 1.00 | 0.69 | 126 |
| | 小肠-回肠末端 | 1.61 | 0.72 | 7.34 | 4.83 | 17 |
| | 脾 | 3.46 | 0.92 | 1.18 | 0.46 | 34 |
| | 胃 | 1.10 | 0.40 | 3.93 | 5.35 | 81 |
| | 睾丸 | 0.49 | 0.19 | 0.43 | 0.20 | 60 |
| | 甲状腺 | 3.19 | 0.96 | 2.59 | 1.34 | 120 |
| | 子宫 | 1.99 | 0.56 | 3.29 | 1.55 | 32 |
| | 阴道 | 1.39 | 1.39 | 2.49 | 2.49 | 34 |
| | 全血 | 1.40 | 1.10 | 0.06 | 0.05 | 191 |

[0219] 图21显示在获得对DNMDP抗性的细胞中不存在SLFN12。最初对DNMDP敏感的细胞系通过持续暴露于DNMDP并随后通过RNA-seq分析而产生抗性。一个基因(SLFN12)在HeLa和H2122两者中均下调。因此,SLFN12水平的降低表明细胞已经对DNMDP和其他PDE3A调节剂产生抗性。

[0220] 图22显示了通过表达SLFN12或表达SLFN12和PDE3A对DNMDP抗性细胞系的敏化作用。SLFN12的表达足以对A549细胞赋予DNMDP敏感性。添加PDE3A表达导致进一步致敏。

[0221] 平滑肌肉瘤是恶性平滑肌瘤。分析来自平滑肌肉瘤的患者肿瘤样品的PDE3A和SLFN12表达以表征平滑肌肉瘤(LMS)对DNMDP的敏感性。由于在表达升高的PDE3A和SLFN12水平的高纯度TCGA样品中的流行(图23,表4),认为平滑肌肉瘤对DNMDP敏感。生物标志物表达与平滑肌肉瘤谱系关联的P值:0.0001。

[0222] 表4.平滑肌肉瘤表征

| [0223] | | 标志物表达表明 DNMDP 敏感 | 标志物表达表明 DNMDP 不敏感 |
|--------|-------|---------------------|----------------------|
| | LMS | 17 | 31 |
| | 非 LMS | 38 | 1516 |

[0224] 差示扫描荧光测定法(DSF)用于证明DNMDP与纯化的PDE3A催化结构域PDE3A(677-

1141)的结合。在该实验中,如表5中所示,将5 μ M hsPDE3A (640-1141) 在不存在或存在100 μ M 化合物的情况下孵育。结合缓冲液:20mM Hepes pH 7.4、100 μ M TCEP、1mM MgCl₂、150mM NaCl。

[0225] 表5.DNMDP与PDE3A (677-1141) 的结合

| [0226] | | T _m (°C) | ΔT_m (°C) |
|--------|----------------------------------|---------------------|-------------------|
| | PDE3A ₆₇₇₋₁₁₄₁ | 52.4 \pm 0.0 | |
| | PDE3A ₆₇₇₋₁₁₄₁ +DNMDP | 58.4 \pm 0.0 | 6.0 |
| | PDE3A ₆₇₇₋₁₁₄₁ +阿那格雷 | 56.6 \pm 0.0 | 4.2 |
| | PDE3A ₆₇₇₋₁₁₄₁ +曲唑辛 | 66.2 \pm 0.0 | 14.2 |

[0227] 使用化学基因组学,发现了一类化合物,例如DNMDP,其通过小分子调节PDE3A靶向新的癌症依赖性。这些化合物以与非细胞毒性PDE3抑制剂相互排斥的方式结合PDE3A,并且对PDE3A的功能产生新形态或超形态效应,导致其蛋白-蛋白相互作用的改变。一种独特的蛋白相互作用配偶体SLFN12在DNMDP敏感的细胞系中高表达,表明细胞毒性信号传递途径中的功能性作用。因此,DNMDP在一大组癌细胞系中具有选择性和有效性。

[0228] 在这里,鉴定出一种新的细胞毒性化合物,其对多种谱系的癌细胞系具有很高的选择性和低nM效力。使用基因表达与化学基因组学相关联,PDE3A被鉴定为该小分子DNMDP的推定靶标。有趣的是,PDE3A表达的丧失导致对DNMDP的抗性。此外,PDE3A免疫沉淀和随后的对相对丰度的等量稳定同位素标记和质谱定量(iTRAQ/MS) 确定SLFN12和SIRT7是DNMDP结合后PDE3A的新蛋白-蛋白相互作用配偶体,这可能是由于PDE3A功能的变构调节。重要的是,当校正PDE3A表达时,SLFN12表达是具有DNMDP敏感性的最高相关基因。单基因或多基因表达相关性已经显示有助于阐明小分子的作用机制和相关信号传导途径。一种新的癌症治疗生物化学靶标被发现,靶标识别方法(例如功能丧失筛选或基因组分析) 不太可能找到这种靶标。

[0229] PDE3A属于磷酸二酯酶超家族,并与PDE3B一起形成PDE3家族。PDE3家族具有双重底物亲和力并水解cAMP和cGMP。PDE3A在心血管系统、血小板、肾脏和卵母细胞中的表达最高(Ahmad等人,Horm Metab Res 44,776-785,2012)。由于血小板中的PDE3A抑制会损害活化和血小板凝固(Bedenis等人,Cochrane Database Syst Rev 10,CD003748,2014),因此已研发临床PDE3抑制剂西洛他唑以治疗间歇性跛行。其它PDE3抑制剂,例如米力农、氨力农和左西孟旦适用于治疗充血性心力衰竭,其中血管舒张和升高的心脏cAMP水平的组合增加心脏收缩性(Movsesian等人,Curr Opin Pharmacol 11,707-713,2011)。这些临床抑制剂都不能重复DNMDP的细胞毒性表型,表明环状核苷酸水解不足以在DNMDP敏感的细胞系中诱导细胞死亡。

[0230] 然而有趣的是,其他PDE3抑制剂如扎达维林、阿那格雷和喹齐酮先前已报道在一定数量的癌细胞系中具有细胞毒性特征(Sun等人,PLoS ONE 9,e90627,2014; Fryknäs 等人,J Biomol Screen 11,457-468,2006)。根据目前的发现,发现其他PDE3和PDE4抑制剂不重复扎达维林的细胞毒性表型,其中据报道视网膜母细胞瘤蛋白视网膜母细胞瘤1(RB1) 表达将扎达维林敏感性细胞系与非敏感性细胞系分开(Sun等人,PLoS ONE 9,e90627,2014)。这一发现与目前的数据相反,其中在DNMDP的细胞毒活性与RB1的拷贝数或mRNA表达之间的

相关性未被鉴定。另一种PDE3抑制剂阿那格雷独特地抑制巨核细胞分化,从而导致细胞凋亡。其他被测试的PDE3抑制剂不具有这种活性(Wang等人,Br.J.Pharmacol.146,324-332,2005;Espasandin,Y.等人,J.Thromb.Haemost.n/a-n/a,2015,doi:10.1111/jth.12850)。据推测,报道的扎达维林对细胞生存力和阿那格雷对巨核细胞分化的作用是通过本研究中所述的相同的PDE3A调节介导的。

[0231] 多种PDE3抑制剂是竞争性抑制剂并且已显示其占据cAMP和cGMP的催化结合位点(Card等人,Structure 12,2233-2247,2004;Zhan等人,Mol.Pharmacol.62,514-520,2002)。另外,扎达维林已经与PDE4D在复合物中共结晶,其中它占据了cAMP结合位点,并且已经以类似的方式模拟了结合PDE3B(Lee等人,FEBS Lett.530,53-58,2002)。鉴于DNMDP与扎达维林的结构相似性,并且DNMDP抑制PDE3A和PDE3B二者,推测DNMDP的结合模式与扎达维林的结合模式非常相似。这表明除了充当cAMP/cGMP竞争性抑制剂之外,DNMDP变构诱导了产生其细胞毒性表型的构象。先前已经描述了PDE4的磷酸二酯酶的变构调节,其中小分子结合在活性位点中并且同时与跨越PDE4活性位点的调节结构域相互作用。结果,变构调节剂稳定了蛋白构象,该蛋白构象已经显示差异结合不同PDE4配偶体蛋白(Burgin等人,Nat Biotechnol 28,63-70,2010)。

[0232] 对与PDE3A相关的蛋白的研究可能阐明PDE3A调节剂如DNMDP杀死癌细胞的正常功能以及方式。PDE3A与蛋白磷酸酶2亚单位相互作用,其涉及致癌病毒转化并且在人类癌症中突变(Nagao等人,Int.Symp.Princess Takamatsu Cancer Res.Fund 20,177-184,1989;Imielinski等人,Cell 150,1107-1120,2012;Lawrence等人,Nature 499,214-218,2013),从而表明PDE3A在癌细胞信号传导中的作用。尽管这些相互作用不是由DNMDP结合诱导的,但蛋白磷酸酶在癌症生物学中的重要性值得进一步研究。

[0233] 通过DNMDP与PDE3A结合促进的PDE3A和SLFN12之间的增强的相互作用以及在对DNMDP的敏感性和SLFN12表达之间的相关性强烈表明有必要了解PDE3A-SLFN12相互作用的功能影响。然而,目前对SLFN12在人体生理学和癌症生物学中的功能作用知之甚少。SLFN12是Schlafen基因家族的一部分,其在人类和啮齿动物之间变化很大。这种巨大的差异是由于快速的基因进化和正选择(Bustos等人,Gene 447,1-11,2009)。因此,SLFN12没有鼠类的蛋白直系同源性,妨碍了在充分了解的模型生物体中对SLFN12进行研究。关于SLFN12的唯一出版物显示SLFN12异位表达后对前列腺癌细胞系的调节(Kovalenko等人,J.Surg.Res.190,177-184,2014)。对SLFN12功能及其与PDE3A相互作用的进一步研究可阐明DNMDP细胞毒性的机制。两个观察结果表明,DNMDP对PDE3A功能起到了新形态或超形态的作用:1) DNMDP敏感的癌细胞系的存活不依赖于PDE3A表达,然而,PDE3A敲低导致DNMDP抗性;和2) DNMDP在与PDE3A结合后诱导或增强蛋白-蛋白相互作用。来那度胺是小分子作为一个新形态或超形态起作用而不是酶抑制剂的一个例子。来那度胺调节cereblon泛素连接酶和Ikaros转录因子之间的特异性蛋白-蛋白相互作用,然后将其靶向降解(Krönke等人,Science 343,301-305,2014;Lu等人,Science 343,305-309,2014)。类似地,DNMDP可以直接稳定PDE3A-SLFN12相互作用,或者DNMDP可以变构稳定结合SLFN12的PDE3构象。这些机制都可能导致新或超形态表型。由DNMDP诱导的新形态表型的进一步表征可以促进合成不通过PDE3A抑制环核苷酸水解的小分子。此类小分子的毒性特征应与用于心血管适应症的PDE3抑制剂不同。

[0234] 这项研究揭示了以前未知的PDE3A在癌症维持中的作用,其中PDE3抑制剂的一部分可以修饰其功能,导致对一部分癌细胞系的毒性。这些数据表明,DNMDP及其类似物对PDE3A具有超形态或新形态的作用,从而导致细胞毒性,这由随着细胞PDE3A水平降低后细胞对DNMDP变得不敏感所证实。这些观察结果与磷酸二酯酶变构调节的其他报道吻合(Burgin等人,Nat Biotechnol 28,63-70,2010),表明DNMDP和类似物可能对PDE3A具有相似的作用。细胞选择性细胞毒性的确切机制目前尚不清楚;然而,进一步研究与SLFN12和可能的SIRT7的新的相互作用可能是有益的。

[0235] 总之,本文的研究使用差异细胞毒性筛选来发现癌细胞细胞毒性小分子DNMDP。DNMDP在766个基因组表征的癌细胞系中的性质分析揭示了在约3%的测试细胞系中的立体特异性纳摩尔有效性。对表明敏感性的基因组特征的搜索显示PDE3A表达升高与DNMDP应答强烈相关。DNMDP抑制PDE3A和PDE3B,对其他PDE几乎没有或没有活性。然而,出人意料的是,大多数其他测试的PDE3A抑制剂不表型模拟DNMDP,包括有效的和选择性的PDE3A抑制剂曲喹辛。用曲喹辛共同处理DNMDP敏感细胞竞争掉DNMDP的癌细胞细胞毒性活性,并且敲除PDE3A拯救了敏感细胞免于DNMDP诱导的细胞毒性,这导致我们推测PDE3A是DNMDP杀死癌细胞所需的,其诱导PDE3A的新形态改变。单独或在DNMDP或曲喹辛存在下PDE3A免疫沉淀物的质谱分析揭示了仅在DNMDP存在下SLFN12和SIRT7的差异结合。与PDE3A类似,在DNMDP敏感的细胞系中SLFN12表达水平升高,并且用shRNA敲低SLFN12降低了细胞对DNMDP的敏感性,这表明DNMDP诱导的PDE3A与SLFN12的复合物形成对于癌细胞细胞毒性表型是关键的。因此,本文的结果暗示PDE3A调节剂作为候选的癌症治疗剂并且证明了小分子发现中化学基因组学的作用。

[0236] 上述实验用以下方法和材料进行。

[0237] 在NCI-H1734和A549细胞系中的化合物库筛选

[0238] 将1500个NCI-H1734或1000个A549细胞在384孔板中在40 μ l补充有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的RPMI中铺板。在铺板24小时后,以10 μ M的浓度添加1924个小分子的化合物库。使用浓度为10 μ M的星状孢子素作为细胞毒性的阳性对照,并且使用浓度为1%的DMSO作为阴性对照。所有化合物与指定的小分子一起孵育48小时。在48小时后,从培养箱中取出384孔板并冷却至室温20分钟。细胞生存力通过以下方法评估:用THERMO COMBI™或多通道移液管加入40 μ l 25% **CELLTITERGLO®** (Promega) 的PBS溶液并孵育10分钟。使用Perkin-Elmer EnVision读取发光信号。通过归一化至DMSO对照计算生存力百分比。

[0239] 在细胞系中的化合物敏感性测试

[0240] 将1000个HeLa (DMEM)、1000个A549 (RPMI)、500个MCF-7 (DMEM)、4000个PC3 (F12-K)、1000个NCI-H2122 (RPMI) 或者1500个NCI-H1563 (RPMI) 细胞在384孔板中在40 μ l补充有10%胎牛血清的相应的生长培养基中铺板。铺板24小时后,以指定浓度加入指定的化合物并孵育48小时。如在NCI-H1734和A549细胞系中的化合物库筛选中所述评估细胞生存力。

[0241] 在HeLa细胞中的半胱天冬酶活性

[0242] 将1000个HeLa细胞在384孔板中在40 μ l补充有10%胎牛血清的相应的生长培养基中铺板。铺板24小时后,以指定浓度加入指定的化合物并孵育48小时。根据制造商建议添加来自Promega的半胱天冬酶-Glo,并如在NCI-H1734和A549细胞系中的化合物库筛选中所述测定发光。

[0243] 大规模的细胞系生存力测量

[0244] 从23种不同的谱系中测量777种癌细胞系(CCL)对DNMDP的敏感性。每个细胞系以500个细胞/孔的密度在白色不透明1536板中在优选培养基中铺板。在孵育过夜之后,通过声传递(acoustic transfer)以2倍连续稀释的66.4 μ M-2nM的16个浓度以一式两份添加DNMDP(Labcyte Echo 555, Labcyte Inc., Sunnyvale, CA)。在处理72小时后,使用ViewLux微孔板成像仪(PerkinElmer, Waltham, MA)根据制造商的方案测量细胞ATP水平作为生存力的代表(CELLTITERGLO[®], Promega Corporation, Madison, WI),并且归一化至背景(仅培养基)和媒介物(DMSO)处理的对照孔。

[0245] 通过非线性拟合将浓度响应曲线为覆盖所有16个浓度的2-或3-参数S形函数,且低浓度渐近线设置为DMSO标准化的值,并确定跨越化合物敏感性范围的最佳8点剂量曲线。通过数值积分计算8点剂量曲线下面积(AUC)作为进一步分析的敏感性度量。已经获得了480个其他化合物的集合的类似的敏感性测量结果,从而能够分析鉴定对DNMDP唯一应答的细胞系(参见Broad Institute Cancer Therapeutics Response Portal,该数据集用于全面鉴定在人癌细胞系的遗传和谱系特征和全部化合物列表的小分子敏感性之间的关系)。

[0246] 敏感度测量与基础基因表达的相关性

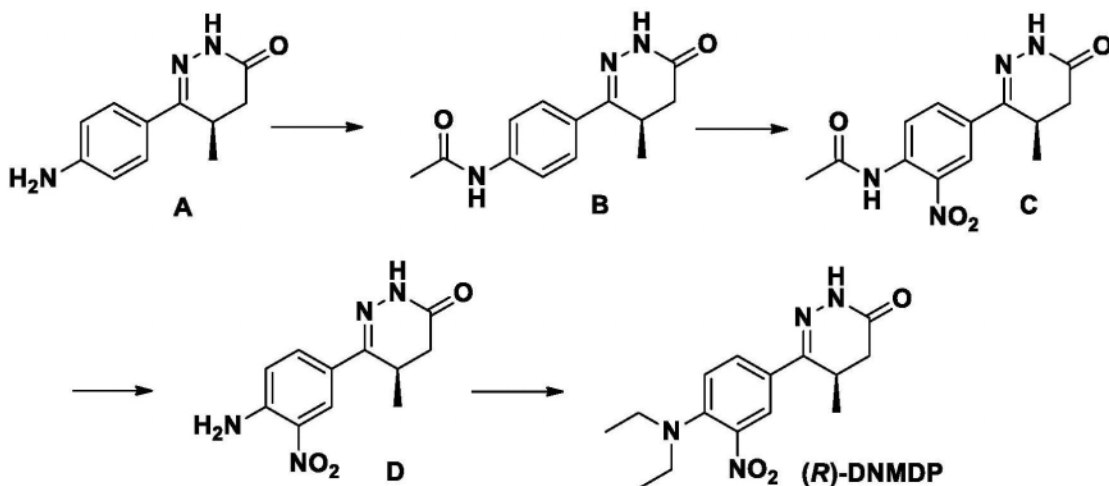
[0247] 从癌细胞系百科全书(CCLE, 一大组人类癌细胞系的详细遗传特征; Barretina等人, Nature 483, 603-607, 2012)下载了在Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0阵列上测量的以基因为中心的稳健多芯片平均(RMA)-标准化的基础mRNA基因表达数据。在760个重叠CCL上计算基因表达(18,988个转录物)和曲线下面积(AUC)之间的Pearson相关系数。为了比较暴露于不同数量CCL的小分子,使用Fisher变换来转换相关系数。

[0248] 化学实验方法

[0249] 一般细节

[0250] 所有反应均在氮气(N₂)气氛下进行。所有的试剂和溶剂都是从商业供应商处购买的,并按原样使用。在Bruker (300或400MHz ¹H, 75或101MHz ¹³C)波谱仪上记录核磁共振(NMR)波谱。质子和碳化学位移以相对于NMR溶剂的ppm(δ)报告。数据报道如下:化学位移,多重性(br=宽, s=单峰, d=双峰, t=三重峰, q=四重峰, m=多重峰; 偶合常数(Hz))。在Teledyne Isco Combiflash Rf上使用40-60 μ m硅胶(60 Å 目)进行快速色谱法。串联液相色谱/质谱(LC/MS)在Waters 2795分离模块和3100质谱检测器上进行,使用Waters Symmetry C18柱(3.5 μ m, 4.6 X 100mm),梯度为0-100%CH₃CN的水溶液,历时2.5分钟,含有恒定的0.1%甲酸。在EM Reagent 0.25mm硅胶60-F板上进行分析薄层色谱(TLC)。元素分析由Robertson Microlit Laboratories, Ledgewood NJ进行。

[0251] (R)-DNMDP的合成



[0252]

[0253] 在5mL乙酸酐中,将2.00g (9.84mmol) (R)-6-(4-氨基苯基)-5-甲基-4,5-二氢咪嗪-3(2H)-酮(A,Toronto Research Chemicals)搅拌1小时,然后添加30mL水,过滤,用水洗涤固体并干燥,得到2.20g产物B(91%)。 ^1H NMR (300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.92 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 7.74 (d, $J=8.9$, 2H), 7.65 (d, $J=8.8$, 2H), 3.41-3.33 (m, 1H), 2.68 (dd, $J=6.8, 16.8$, 1H), 2.23 (d, $J=16.7$, 1H), 2.08 (s, 3H), 1.07 (d, $J=7.3$, 3H)。 ^{13}C NMR (75MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 168.50, 166.27, 152.25, 140.27, 129.24, 126.24, 118.70, 33.47, 26.91, 24.02, 15.87。HPLC: R_t 0.72min, 纯度>95%。MS: 246 (M+1)。

[0254] 经加料漏斗向溶解在30mL硫酸中并在冰浴中冷却的3.09g B(15.3mmol)中添加在8mL硫酸中的0.72mL 90%硝酸(15mmol),历时10分钟。在搅拌1小时之后,将混合物倾倒在冰上。滤出黄色固体,并将水用EtOAc冲洗数次,然后干燥并与黄色固体合并。用40-60% EtOAc的己烷溶液色谱纯化,得到1.12g (25%)黄色固体产物,将其从EtOAc中重结晶。 ^1H NMR (300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.13 (s, 1H), 10.41 (s, 1H), 8.25 (d, $J=1.8$, 1H), 8.07 (dd, $J=1.8, 8.6$, 1H), 7.71 (d, $J=8.6$, 1H), 3.55-3.40 (m, 1H), 2.74 (dd, $J=6.9, 16.8$, 1H), 2.27 (d, $J=16.8$, 1H), 2.09 (s, 3H), 1.08 (d, $J=7.2$, 3H)。 ^{13}C NMR (75MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 168.57, 166.31, 150.37, 142.19, 131.69, 131.32, 130.60, 125.07, 121.70, 33.30, 26.81, 23.44, 15.64。TLC: R_f 0.25 (1:1EtOAc:己烷)。HPLC: R_t 0.87min, 纯度>95%。MS: 291 (M+1)。HRMS准确质量 (M+1): 291.1088。实测值: 291.1091

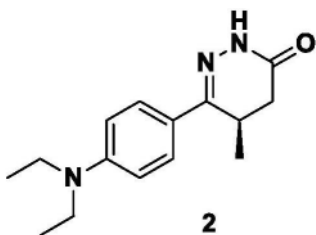
[0255] 向溶解在10mL MeOH中的58mg C(0.20mmol)中添加48mg NaOH(1.2mmol)在0.5mL水中的溶液。在1小时之后,将反应浓缩,添加水并用EtOAc洗涤,将EtOAc干燥并浓缩,得到48mg (93%)产物D。 ^1H NMR (300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.92 (s, 1H), 8.28 (d, $J=2.0$, 1H), 7.87 (dd, $J=2.1, 9.0$, 1H), 7.76 (s, 2H), 7.06 (d, $J=9.0$, 1H), 3.33 (s, 1H), 2.67 (dd, $J=6.8, 16.8$, 1H), 2.22 (d, $J=16.6$, 1H), 1.06 (d, $J=7.3$, 3H)。 ^{13}C NMR (75MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 166.25, 151.12, 146.69, 132.72, 129.80, 122.57, 122.19, 119.80, 33.43, 26.70, 15.77。MS: 249 (M+1)。

[0256] 向溶解在0.5mL二甲基甲酰胺(DMF)中的35mg胺D(0.14mmol)中添加70mg乙醛(1.6mmol)和170mg $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (0.80mmol)和10 μL (0.2mmol) HOAc。在搅拌3小时之后,添加水和EtOAc,分离EtOAc,干燥,浓缩并用30-50%EtOAc的己烷溶液色谱纯化,分离3mg (R)-DNMDP(7%)。合成的物质与购买的外消旋物质在TLC、HPLC和 ^1H NMR方面相同。 ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 8.58 (s, 1H), 8.04 (d, $J=2.3$, 1H), 7.84 (dd, $J=2.3, 9.0$, 1H), 7.11 (d, $J=$

9.0, 1H), 3.30-3.36 (m, 1H), 3.26 (q, $J=7.1$, 4H), 2.71 (dd, $J=6.8, 16.9$, 1H), 2.48 (d, $J=17.0$, 1H), 1.25 (d, $J=7.4$, 3H), 1.16 (t, $J=7.1$, 6H)。TLC: R_f 0.25 (1:1 EtOAc:己烷)。HPLC: R_t 1.27min, 纯度>95%。MS: 305 (M+1)。准确质量 (M+1): 305.1608 实测值: 305.1616。 ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3 , 购买的物质) δ 166.28, 152.02, 145.24, 141.21, 129.77, 124.94, 123.94, 121.00, 46.10, 33.80, 27.81, 16.24, 12.56。

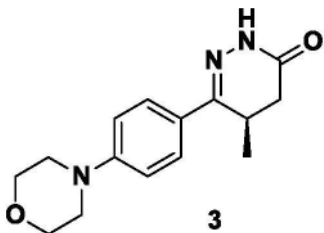
[0257] (R) -DNMDP 的光学纯度使用手性 SCF 色谱法和与可商购的外消旋物质的比较来确定: 柱: ChiralPak AS-H, 250 x 4.6mm, 5 μm , 流动相改性剂: 100% 甲醇, 梯度: 5至50% 甲醇, 历时10分钟, 流速: 4mL/min, 反压: 100bar, 柱温: 40C。UV 检测为 200-400nm。分离的异构体的保留时间: 5.36, 6.64 分钟; (R) -DNMDP 的保留时间, 6.60 分钟, 检测的对映异构体比率为 1:19。

[0258]



[0259] 2. 向溶解在 5mL MeOH 中的 200mg (0.98mmol) A 中添加 87mg 乙醛 (2.0mmol)、113 μL HOAc (2.0mmol) 和 124mg (2.0mmol) NaBH_3CN , 并将反应在室温搅拌过夜。第二天, 添加相同量的试剂, 并将反应再搅拌 24 小时。将混合物浓缩并在 CH_2Cl_2 和水之间分配, 将 CH_2Cl_2 分离, 干燥, 并浓缩, 然后用 20-40% EtOAc 的己烷溶液色谱纯化, 分离 210mg 产物, 其为白色固体 (82%)。 ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 8.95 (s, 1H), 7.64 (d, $J=8.7$, 2H), 6.66 (d, $J=8.7$, 2H), 3.37 (dd, $J=9.6, 16.4$, 5H), 2.67 (dd, $J=6.5, 16.8$, 1H), 2.43 (d, $J=16.8$, 1H), 1.41-1.02 (m, 10H)。 ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 166.82, 154.55, 148.79, 127.32, 120.81, 111.08, 44.32, 33.92, 27.74, 16.37, 12.50。TLC: R_f 0.25 (1:1 EtOAc:己烷)。HPLC: R_t 1.05min, 纯度>95%。MS: 260 (M+1)。HRMS 准确质量 (M+1): 260.1757。实测值: 260.1764

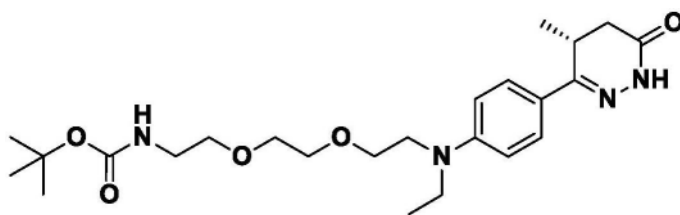
[0260]



[0261] 3. 向溶解在 1mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中的 200mg (0.984mmol) A 中添加 250 μL (2.00mmol) 二 (2-溴乙基) 醚和 400mg K_2CO_3 , 并将混合物在 60 $^\circ\text{C}$ 搅拌过夜。第二天, 添加另外 250 μL 二 (2-溴乙基) 醚和 170mg K_2CO_3 。在 3 小时之后, 添加 EtOAc 和水, 将水用 EtOAc 洗涤, 将合并的 EtOAc 洗涤液干燥并浓缩。用 0-4% MeOH 的 CH_2Cl_2 溶液色谱纯化, 得到 125mg 产物 (46%)。 ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 8.61 (s, 1H), 7.68 (d, $J=8.8$, 2H), 6.92 (d, $J=8.8$, 2H), 3.99-3.76 (m, 4H), 3.44-3.31 (m, 1H), 3.29-3.22 (m, 4H), 2.70 (dd, $J=6.7, 16.8$, 1H), 2.46 (d, $J=16.7$, 1H), 1.24 (d, $J=7.3$, 3H)。 ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 166.64, 154.05, 152.18, 127.10, 125.33, 114.73, 66.69, 48.33, 33.93, 27.94, 16.36。TLC: R_f 0.1 (1:50 MeOH: CH_2Cl_2)。HPLC: R_t 1.05 分钟, 纯度>95%。MS: 274 (M+1)。HRMS: 计算值 274.1556 (M+1); 实测值

274.1552。 $C_{15}H_{19}N_3O_2$ 的分析计算值：C, 65.91; H, 7.01; N, 15.37; 实测值：65.81, H, 6.66, N, 15.26。

[0262]



[0263] DNMDP-2L. 向溶解在0.4mL二甲基甲酰胺(DMF)中的130mg A (0.64mmol) 中添加100mg 2-(2-(2-溴乙氧基)乙氧基)-乙基氨基甲酸叔丁基酯(Toronto Research Chemical, 0.32mmol) 和90mg K_2CO_3 (64mmol), 并将混合物在60℃搅拌过夜。在冷却之后, 添加水并用EtOAc洗涤数次。将合并的EtOAc层干燥, 浓缩, 并用50-70%EtOAc色谱纯化, 得到81mg产物(58%)。 1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ 9.06 (s, 1H), 7.59 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.62 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 5.15 (s, 1H), 4.53 (s, 1H), 3.72 (t, $J=5.2$ Hz, 2H), 3.65 (s, 4H), 3.55 (t, $J=5.2$ Hz, 2H), 3.32 (m, 5H), 2.67 (dd, $J=16.8, 6.7$ Hz, 1H), 2.42 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.22 (d, $J=7.4$ Hz, 3H)。 ^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$) δ 166.83, 155.99, 154.45, 149.64, 127.33, 123.24, 112.58, 79.28, 70.30, 70.26, 70.22, 69.45, 43.14, 40.39, 33.96, 28.43, 27.89, 16.40; HPLC: R_t 2.50min (7.5分钟运行), 纯度>95%。MS: 435 (M+1)。将该产物(0.19mmol)溶解在1mL MeOH中, 并向溶液添加乙醛(50uL, 0.89mmol)、10uL HOAc (0.2mmol) 和12mg $NaBH_3CN$ (0.19mmol)。在1小时之后, 添加 $NaHCO_3$ (水溶液) 和 CH_2Cl_2 , 分离 CH_2Cl_2 并将水用 CH_2Cl_2 洗涤两次。将合并的 CH_2Cl_2 干燥, 浓缩, 并用60-70%EtOAc的己烷溶液色谱纯化, 得到71mg产物, 其为澄清油状物(82%)。 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 8.91 (s, 1H), 7.63 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 6.69 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 5.07 (s, 1H), 3.65 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.61 (s, 4H), 3.55 (dt, $J=9.9, 5.5$ Hz, 4H), 3.46 (q, $J=7.0$ Hz, 2H), 3.38-3.22 (m, 3H), 2.67 (dd, $J=16.8, 6.7$ Hz, 1H), 2.43 (d, $J=16.7$ Hz, 1H), 1.45 (s, 10H), 1.23 (d, $J=7.3$ Hz, 3H), 1.18 (t, $J=7.0$ Hz, 3H)。 ^{13}C NMR (101MHz, $CDCl_3$) δ 166.84, 155.96, 154.46, 148.89, 127.35, 121.38, 111.28, 79.22, 70.68, 70.27, 70.24, 68.74, 49.95, 45.49, 40.32, 33.97, 28.43, 27.80, 16.43, 12.14。 R_t 2.99min (7.5分钟运行), 纯度>95%。MS: 463 (M+1)。

[0264] 连接至树脂

[0265] 向18毫克DNMDP-2L (0.04毫摩尔) 在0.8毫升 CH_2Cl_2 中的溶液中加入0.2毫升三氟乙酸(TFA), 将该溶液搅拌2小时, 然后浓缩并溶解于0.5毫升DMSO中。向其中加入10uL Et_3N (0.07mmol) 和12mg碳酸N,N'-二琥珀酰亚胺基酯(DSC) (0.05mmol), 并将溶液搅拌过夜。LC分析表明反应未完成, 加入另外25mg的碳酸N,N'-二琥珀酰亚胺基酯(0.1mmol)。2小时后的LC分析显示约5:1比率的DSC产物:胺。将1mL Affi-Gel 102树脂样品用离心机用DMSO冲洗5次, 然后悬浮在0.5mL DMSO中。向树脂中加入30uL DSC产物溶液和25uL Et_3N 并将混合物涡旋。在2天后, DMSO溶液的LC分析显示DCS加合物完全消失; 未衍生的胺仍然存在。通过离心除去DMSO并透析, 并用DMSO冲洗树脂数次并保存在PBS缓冲液中。

[0266] 拯救DNMDP诱导的细胞毒性的生物活性剂筛选

[0267] 将1000个HeLa细胞在384孔板中在40uL补充有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM中铺板。在铺板24小时之后, 以20uM的浓度添加1600个生物活性分子(Pharmacon) 的

化合物库。平行于生物活性化合物孵育,加入DNMDP至30nM的最终浓度并孵育48小时。如在NCI-H1734和A549细胞系中的化合物库筛选中所述评估细胞生存力。

[0268] DNMDP分子靶标的连接基亲和纯化和免疫印迹

[0269] 将HeLa细胞用冰冷PBS洗涤,然后用补充有无EDTA的蛋白酶抑制剂(Roche)和磷酸酶抑制剂混合物I和II(Calbiochem)的NP-40裂解缓冲液(150mM NaCl,10%甘油,50mM Tris-Cl pH 8.0,50mM MgCl₂,1%NP-40)裂解。将细胞裂解物在冰上孵育至少2分钟,随后在4℃以15,700x g离心10分钟,之后使用BCA蛋白测定试剂盒(Pierce)定量上清液。将200μg总HeLa细胞裂解物与结合至亲和连接基DNMDP-2L的3μl Affi-Gel 102树脂(BioRad)以400μl的总体积孵育4小时。在孵育之前,将指定的化合物加入到亲和纯化中,终浓度为10μM。将样品用含有10μM相应化合物浓度的裂解缓冲液洗涤三次。将与Affi-Gel 102树脂结合的蛋白还原、变性和用Tris-甘氨酸凝胶(Novex)分离,并使用iBlot转移系统(Novex)转移至硝酸纤维素膜。将膜在4℃与抗PDE3A的一抗(1:1000,Bethyl)孵育过夜。根据制造商的建议在室温与二抗(1:20,000,LI-COR Biosciences)孵育2小时并随后检测(Odyssey Imaging System,LI-COR Biosciences)。

[0270] PARP裂解免疫印迹

[0271] 将HeLa细胞用指定浓度的DNMDP和星状孢子素处理36小时。如在DNMDP分子靶标的连接基亲和纯化和免疫印迹中所述将HeLa细胞裂解并处理。将膜与抗PARP的抗体(1:1000,Cell Signaling#9532)和肌动蛋白孵育,并随后如在DNMDP分子靶标的连接基亲和纯化和免疫印迹中所述成像。

[0272] 使用CRISPR靶向PDE3A基因座

[0273] 使用MIT CRISPR设计工具(在线MIT CRISPR设计入口)确定CRISPR靶标位点。为了克隆sgRNA,将正向和反向寡核苷酸退火,磷酸化并连接到BsmBI消化的pXPR_BRD001中。寡核苷酸序列如下:

| [0274] | sgRNA | 正向寡核苷酸 | 反向寡核苷酸 |
|--------|-----------|--|--|
| | PDE3A_sg1 | CACCGTTTTCACTGAGCGAAGTGA (SEQ ID NO.: 7) | AAACTCACTTCGCTCAGTGA AAAC (SEQ ID NO.: 8) |
| | PDE3A_sg2 | CACCGAGACAAGCTTGCTATTCCAA (SEQ ID NO.: 9) | AAACTTGGAATAGCAAGCTT GTCTC (SEQ ID NO.: 10) |
| | PDE3A_sg3 | CACCGGCACTCTGAGTGTAAGTTA (SEQ ID NO.: 11) | AAACTAACTTACACTCAGAG TGCC (SEQ ID NO.: 12) |

[0275] 为了产生慢病毒,使用磷酸钙将293T细胞与pXPR_BRD001、psPAX2和pMD2.G共转染。用2ug/ml嘌呤霉素选择感染的HeLa细胞。

[0276] 使用siRNA减少PDE3A表达

[0277] 将HeLa细胞铺在96孔板中,并在24小时后根据制造商的建议用PDE3A和非靶向siRNA smartpools(On Target Plus,Thermo Scientific)转染。在转染后24小时和72小时获得HeLa细胞裂解物,并如在DNMDP分子靶标的连接基亲和纯化和免疫印迹中所述对PDE3A和肌动蛋白(1:20,000,Cell Signaling)进行免疫印迹。将HeLa细胞用指定浓度的化合物3处理48小时。如在NCI-H1734和A549细胞系中的化合物库筛选中所述评估细胞生存力。

[0278] 测量HeLa细胞中的细胞cAMP浓度

[0279] 将5000个HeLa细胞铺在96孔板中。在铺板后24小时,将HeLa细胞与指定浓度的指

定化合物孵育1小时。根据制造商的推荐,用CAMP-GLO™测定法(Promega)测定cAMP水平。根据制造商建议通过归一化至产生的标准曲线来确定cAMP的细胞浓度。

[0280] 用于PDE3A-蛋白相互作用研究的扩展的蛋白质组学方法

[0281] 在HeLa细胞中PDE3A的免疫沉淀

[0282] 将HeLa细胞用10 μ M指定化合物处理四个小时,然后裂解:DMSO、DNMDP和曲喹辛。将HeLa细胞用ModRipa裂解缓冲液(1%NP-40:50mM Tris-HCl,pH 7.8,150mM NaCl,0.1%脱氧胆酸钠,1mM EDTA)裂解,所述ModRipa裂解缓冲液补充有如DNMDP分子靶标的连接基亲亲和纯化和免疫印迹中所述的蛋白酶和磷酸酶抑制剂和如上所述最终浓度为10 μ M的指定化合物。将13mg HeLa总细胞裂解物与0.5%PDE3A抗体(Bethyl)孵育,并孵育过夜。在相应的条件下,与PDE3A抗体同时加入针对PDE3A抗体的阻断肽(Bethyl)。然后将全细胞裂解物和抗体混合物与10 μ l蛋白A加琼脂糖(Protein A Plus Agarose)(Fisher Scientific)在4 $^{\circ}$ C孵育30分钟。然后用含有浓度为10 μ M的指定化合物的裂解缓冲液洗涤蛋白A加琼脂糖两次。最后,将蛋白A加琼脂糖用不含NP-40和含浓度为10 μ M的指定化合物的裂解缓冲液洗涤一次。

[0283] 珠上消化

[0284] 将来自免疫纯化的珠子用IP裂解缓冲液洗涤一次,然后用PBS洗涤三次,将每个重复的三种不同裂解物重悬于90 μ L消化缓冲液(2M尿素,50mM Tris HCl)中,加入2 μ g测序级胰蛋白酶,以700rpm摇动1小时。取出上清液并置于新鲜管中。然后用50 μ L消化缓冲液将珠子洗涤两次并与上清液合并。将合并的上清液还原(2 μ L 500mM DTT,30分钟,室温),烷基化(4 μ L 500mM IAA,45分钟,黑暗)并进行更长的过夜消化:2 μ g(4 μ L)胰蛋白酶,摇动过夜。然后用20 μ L 10%叶酸(FA)淬灭样品并在10mg SEP-PAK®柱上脱盐。

[0285] iTRAQ标记肽和强阳离子交换(scx)分级

[0286] 根据制造商的说明书(AB Sciex,Foster City,CA),用相对和绝对定量的同位素标签(iTRAQ)试剂标记脱盐的肽。将肽溶于30 μ l 0.5M TEAB pH8.5溶液中,并将标记试剂加入70 μ l乙醇中。在孵育1小时后,用50mM Tris/HCl pH 7.5终止反应。将差异标记的肽混合并随后在10mg SEP-PAK®柱上脱盐。

| | iTRAQ 标记 | | | |
|-------------|----------|-----|-------|-----|
| | 114 | 115 | 116 | 117 |
| [0287] Rep1 | 阻断肽 | 未添加 | DNMDP | 曲喹辛 |
| Rep2 | 阻断肽 | 未添加 | DNMDP | 曲喹辛 |

[0288] 如Rappsilber等人所述进行差异标记和组合的肽的SCX分级。(Rappsilber等人,Nat Protoc 2,1896-1906,2007),其具有如下的6个pH步骤(缓冲液全部含有25%乙腈):

[0289] 1:乙酸铵50mM pH 4.5,

[0290] 2:乙酸铵50mM pH 5.5,

[0291] 3:乙酸铵50mM pH 6.5,

[0292] 4:碳酸氢铵50mM pH 8,

[0293] 5:氢氧化铵0.1%pH 9,

[0294] 6:氢氧化铵0.1%pH 11。

[0295] Empore SCX盘用于制作停止-并-进行-提取-提示(stop-and-go-extraction-tips) (阶段提示),如论文中所述。

[0296] MS分析

[0297] 将重建的肽在在线纳流(nanoflow) EASY-NLC™ 1000 UHPLC系统(Thermo Fisher Scientific)上分离,并在台式Orbitrap Q EXACTIVE™质谱仪(Thermo Fisher Scientific)上进行分析。将肽样品进样到内部用20cm C18二氧化硅材料(1.9μm REPROSIL-PUR® C18-AQ介质,Dr.Maisch GmbH,r119.aq)填充的毛细管柱(具有10μm顶部开口/75μm直径的PICOFRIT®,New Objective,PF360-75-10-N-5)上。将UHPLC装置与定制微型适配器三通(custom-fit microadapting tee) (360μm, IDEX Health&Science, UH-753)连接,并将毛细管柱在柱加热器套筒(Phoenix-ST)中加热到50℃以减少UHPLC分离过程中的反压。将进样的肽以200nL/min的流速用从100%溶剂A(3%乙腈,0.1%甲酸)至30%溶剂B(90%乙腈,0.1%甲酸)的线性80分钟梯度和随后的从30%溶剂B至90%溶剂B的线性6分钟梯度分离。每个样品运行120分钟,包括样品加载和柱平衡时间。Q EXACTIVE™仪器在数据相关模式下运行,采用3x10⁶离子的MS1离子靶和5x10⁴离子的MS2靶,在12个最高丰度离子的每个MS1扫描(R=70,000)后获取高能碰撞解离(HCD)MS/MS扫描(R=17,500)。用于MS/MS扫描的最大离子时间为120ms;HCD归一化碰撞能量设为27;动态排除时间被设定为20s,并且肽匹配和同位素排除功能被启用。

[0298] 肽和蛋白的定量和鉴定

[0299] 所有质谱都使用Spectrum Mill软件包v4.1 beta(Agilent Technologies)进行处理,其中包括由申请人为基于相对和绝对定量的同位素标签(iTRAQ)的定量研发的模块。使用每种前体离子的提取离子色谱(XIC's)进行前体离子定量。通过Spectrum Mill软件在液相色谱(LC)-MS/MS运行的干预高分辨率MS1扫描中使用围绕同位素簇的每个单独成员的窄窗口自动计算经受MS/MS的每种前体离子的XIC的峰面积。基于MS扫描分辨率、前体电荷和m/z,根据同位素簇中的峰相对于理论值的相对分布的质量度量,动态确定时域和m/z域中的峰宽。合并并在+/-60秒内以相同解离模式在相同前体m/z上获得的类似MS/MS谱图。前体电荷>7和MS/MS质谱质量差的MS/MS质谱图被排除在搜索之外,因其不具有序列标签长度>1(即,由氨基酸的链内质量分开的3个质量的最小值)而未通过质量过滤器。

[0300] 对于肽鉴定,针对的人类通用蛋白资源(Uniprot)数据库(附加了常见的实验室污染物蛋白)搜索MS/MS谱图。搜索参数包括:ESI-QEXACTIVE™-HCD评分参数、具有最多两次缺失裂解的胰蛋白酶特异性、40%最小匹配峰强度、+/-20ppm前体质量容差、+/-20ppm产品质量容差、半胱氨酸的氨基甲酰甲基化和作为固定修饰的赖氨酸和肽n端的iTRAQ标记。允许的可变修饰是甲硫氨酸的氧化、N-末端乙酰化、焦谷氨酸(N-termQ)脱酰胺化(N)、Pyro Carbamidomethyl Cys(N-termC),其前体MH+位移范围为-18至64Da。通过针对每个液相色谱(LC)-MS/MS中的每个前体电荷状态分别优化分数和δ秩1-秩2分数阈值,同时在频谱级别允许基于目标诱饵的最大错误发现率(FDR)为1.0%,为各个光谱解释的身份被自动指定为有效。

[0301] 在计算蛋白水平的分数并报告鉴定的蛋白时,以下列方式解决冗余:蛋白分数是

不同肽的分数的总和。一种独特的肽是通过MS/MS谱检测到的肽的单个最高得分实例。特定肽的MS/MS谱可能已被多次记录(即,作为不同的前体电荷状态,从邻近的SCX组分分离,通过Met的氧化修饰),但仍计为单一不同的肽。当序列数据库中的多个蛋白条目中含有长度>8个残基的肽序列时,将蛋白分组在一起,并报道最高得分的一个及其登录号。在一些情况下,当蛋白序列以这种方式分组时,存在独特的肽,其独特地代表该组的较低评分成员(同种型或家族成员)。这些实例中的每一个都会产生一个亚组,并报告多个亚组,并计入蛋白总数。iTRAQ比率是从Spectrum Mill的蛋白比较输出表中获得的。为了获得iTRAQ蛋白比率,计算在每个重复中分配给蛋白亚组的所有不同肽的中位数。为了分配相互作用的蛋白,如前所述使用R环境中的Limma包来计算缓和的t检验p,并添加Blandt-Altman检验以筛选出CI重现性低于95%的蛋白(Udeshi等人,Mol Cell Proteomics 11,148-159,2012)。

[0302] 使用免疫沉淀和免疫印迹验证DNMDP诱导的PDE3A蛋白相互作用

[0303] HeLa细胞用表达V5标记的SIRT7,V5标记的SLFN12或V5标记的GFP的ORF过表达构建体转染。从TRC获得ORF表达构建体(克隆ID:TRCN0000468231,TRCN0000476272,ccsbBroad304_99997)。在转染后72小时,将细胞用10 μ M DNMDP或曲喹辛处理4小时,随后使用ModRipa裂解缓冲液裂解并且免疫沉淀PDE3A。对于每种条件,将2mg总蛋白裂解物与1 μ g抗PDE3A抗体在4 $^{\circ}$ C孵育过夜,然后分别加入7.5 μ l蛋白A-和蛋白G-Dynabeads(Life Technologies 10001D和10003D),并再孵育1小时。洗涤珠子并用30 μ l LDS PAGE凝胶上样缓冲液洗脱结合的蛋白。输入(\sim 60 μ g总蛋白裂解物)和IP产物在4-12%Tris-甘氨酸PAGE凝胶上拆分并用抗V5抗体(Life Technologies R96205,1:5000)、Bethyl抗-PDE3A抗体(1:1000)和来自LiCOR Biosciences的二级抗体(目录号926-32210和926068021,各自为1:10,000)进行免疫印迹。使用LiCOR Odyssey红外成像仪清洗印迹并成像。

[0304] 使用shRNA敲低SLFN12表达并测试药物敏感性

[0305] 表达靶向SLFN12的shRNA的构建体或对照载体被包装入慢病毒并通过病毒转导递送到HeLa细胞中。使用了三种SLFN12靶向shRNA,所有这些都是从TRC获得的(克隆ID:TRCN0000152141和TRCN0000153520)。用1 μ g/ml嘌呤霉素选择感染的细胞3天,然后在非选择性培养基中再生长3天。然后将细胞铺板到384孔测定板中并如上所述测试药物敏感性。通过qPCR验证SLFN12的敲低。使用试剂盒试剂(RNeasy Mini Kit(Qiagen#74104)和QIAschredder(Qiagen#79656))提取总RNA。cDNA使用试剂盒试剂(SuperScript III First-Strand Synthesis System(Life Technologies#18080-051))产生。根据制造商的建议对GAPDH和SLFN12(Life Technologies Hs00430118_m1)进行qPCR。将SLFN12表达归一化为相应的样品GAPDH ct值。

[0306] 其它实施方案

[0307] 从前面的描述中,显而易见的是,可以对本文描述的发明进行变化和修改,以将其用于各种用法和条件。这些实施例也在以下权利要求的范围内。

[0308] 本文的变量的任何定义中的元素列表的叙述包括将该变量定义为所列元素的任何单个元素或组合(或子组合)。本文中的实施方案的叙述包括作为任何单个实施方案的实施方案或与任何其他实施方案或其部分的组合。

[0309] 通过引用合并

[0310] 通过EFS-Web在2016年8月[[TBD]]创建的标题为“167741_011202.txt”的ASCII文

本文件具有[[TBD]]字节的大小,其全部内容通过引用合并于此。

[0311] 本说明书中提及的所有专利和出版物均以引用的方式并入本文,其程度如同每个独立专利和出版物被具体且单独地指出通过引用并入。具体而言,Lewis等人,“用于治疗癌症的化合物和组合物”,PCT/US2014/023263 (WO 2014/164704) 通过引用整体并入。

序列表

<110> 布罗德研究所股份有限公司

达纳-法伯癌症研究所股份有限公司

拜耳医药股份公司

<120> 用于表达PDE3A或SLFN12的癌症的组合物和方法

<130> 167741.011202/PCT

<140> US 15/752,130

<141> 2018-02-12

<150> PCT/US2016/046912

<151> 2016-08-12

<150> 62/204,875

<151> 2015-08-13

<160> 10

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 1141

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

```

Met Ala Val Pro Gly Asp Ala Ala Arg Val Arg Asp Lys Pro Val His
1           5           10           15
Ser Gly Val Ser Gln Ala Pro Thr Ala Gly Arg Asp Cys His His Arg
          20           25           30
Ala Asp Pro Ala Ser Pro Arg Asp Ser Gly Cys Arg Gly Cys Trp Gly
          35           40           45
Asp Leu Val Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ser Arg Lys Leu Ser Ser Ala
          50           55           60
Leu Cys Ala Gly Ser Leu Ser Phe Leu Leu Ala Leu Leu Val Arg Leu
65           70           75           80
Val Arg Gly Glu Val Gly Cys Asp Leu Glu Gln Cys Lys Glu Ala Ala
          85           90           95
Ala Ala Glu Glu Glu Glu Ala Ala Pro Gly Ala Glu Gly Gly Val Phe
          100          105          110
Pro Gly Pro Arg Gly Gly Ala Pro Gly Gly Gly Ala Arg Leu Ser Pro
          115          120          125
Trp Leu Gln Pro Ser Ala Leu Leu Phe Ser Leu Leu Cys Ala Phe Phe
          130          135          140
Trp Met Gly Leu Tyr Leu Leu Arg Ala Gly Val Arg Leu Pro Leu Ala

```

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Val Ala Leu Leu Ala Ala Cys Cys Gly Gly Glu Ala Leu Val Gln Ile | | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| Gly Leu Gly Val Gly Glu Asp His Leu Leu Ser Leu Pro Ala Ala Gly | | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| Val Val Leu Ser Cys Leu Ala Ala Ala Thr Trp Leu Val Leu Arg Leu | | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| Arg Leu Gly Val Leu Met Ile Ala Leu Thr Ser Ala Val Arg Thr Val | | | |
| | 210 | 215 | 220 |
| Ser Leu Ile Ser Leu Glu Arg Phe Lys Val Ala Trp Arg Pro Tyr Leu | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Ala Tyr Leu Ala Gly Val Leu Gly Ile Leu Leu Ala Arg Tyr Val Glu | | | |
| | 245 | 250 | 255 |
| Gln Ile Leu Pro Gln Ser Ala Glu Ala Ala Pro Arg Glu His Leu Gly | | | |
| | 260 | 265 | 270 |
| Ser Gln Leu Ile Ala Gly Thr Lys Glu Asp Ile Pro Val Phe Lys Arg | | | |
| | 275 | 280 | 285 |
| Arg Arg Arg Ser Ser Ser Val Val Ser Ala Glu Met Ser Gly Cys Ser | | | |
| | 290 | 295 | 300 |
| Ser Lys Ser His Arg Arg Thr Ser Leu Pro Cys Ile Pro Arg Glu Gln | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Leu Met Gly His Ser Glu Trp Asp His Lys Arg Gly Pro Arg Gly Ser | | | |
| | 325 | 330 | 335 |
| Gln Ser Ser Gly Thr Ser Ile Thr Val Asp Ile Ala Val Met Gly Glu | | | |
| | 340 | 345 | 350 |
| Ala His Gly Leu Ile Thr Asp Leu Leu Ala Asp Pro Ser Leu Pro Pro | | | |
| | 355 | 360 | 365 |
| Asn Val Cys Thr Ser Leu Arg Ala Val Ser Asn Leu Leu Ser Thr Gln | | | |
| | 370 | 375 | 380 |
| Leu Thr Phe Gln Ala Ile His Lys Pro Arg Val Asn Pro Val Thr Ser | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| Leu Ser Glu Asn Tyr Thr Cys Ser Asp Ser Glu Glu Ser Ser Glu Lys | | | |
| | 405 | 410 | 415 |
| Asp Lys Leu Ala Ile Pro Lys Arg Leu Arg Arg Ser Leu Pro Pro Gly | | | |
| | 420 | 425 | 430 |
| Leu Leu Arg Arg Val Ser Ser Thr Trp Thr Thr Thr Thr Ser Ala Thr | | | |
| | 435 | 440 | 445 |
| Gly Leu Pro Thr Leu Glu Pro Ala Pro Val Arg Arg Asp Arg Ser Thr | | | |
| 450 | 455 | 460 | |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| Ser Ile Lys Leu Gln Glu Ala Pro Ser Ser Ser Pro Asp Ser Trp Asn | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| Asn Pro Val Met Met Thr Leu Thr Lys Ser Arg Ser Phe Thr Ser Ser | | | |
| | 485 | 490 | 495 |
| Tyr Ala Ile Ser Ala Ala Asn His Val Lys Ala Lys Lys Gln Ser Arg | | | |
| | 500 | 505 | 510 |
| Pro Gly Ala Leu Ala Lys Ile Ser Pro Leu Ser Ser Pro Cys Ser Ser | | | |
| | 515 | 520 | 525 |
| Pro Leu Gln Gly Thr Pro Ala Ser Ser Leu Val Ser Lys Ile Ser Ala | | | |
| | 530 | 535 | 540 |
| Val Gln Phe Pro Glu Ser Ala Asp Thr Thr Ala Lys Gln Ser Leu Gly | | | |
| 545 | 550 | 555 | 560 |
| Ser His Arg Ala Leu Thr Tyr Thr Gln Ser Ala Pro Asp Leu Ser Pro | | | |
| | 565 | 570 | 575 |
| Gln Ile Leu Thr Pro Pro Val Ile Cys Ser Ser Cys Gly Arg Pro Tyr | | | |
| | 580 | 585 | 590 |
| Ser Gln Gly Asn Pro Ala Asp Glu Pro Leu Glu Arg Ser Gly Val Ala | | | |
| | 595 | 600 | 605 |
| Thr Arg Thr Pro Ser Arg Thr Asp Asp Thr Ala Gln Val Thr Ser Asp | | | |
| | 610 | 615 | 620 |
| Tyr Glu Thr Asn Asn Asn Ser Asp Ser Ser Asp Ile Val Gln Asn Glu | | | |
| 625 | 630 | 635 | 640 |
| Asp Glu Thr Glu Cys Leu Arg Glu Pro Leu Arg Lys Ala Ser Ala Cys | | | |
| | 645 | 650 | 655 |
| Ser Thr Tyr Ala Pro Glu Thr Met Met Phe Leu Asp Lys Pro Ile Leu | | | |
| | 660 | 665 | 670 |
| Ala Pro Glu Pro Leu Val Met Asp Asn Leu Asp Ser Ile Met Glu Gln | | | |
| | 675 | 680 | 685 |
| Leu Asn Thr Trp Asn Phe Pro Ile Phe Asp Leu Val Glu Asn Ile Gly | | | |
| | 690 | 695 | 700 |
| Arg Lys Cys Gly Arg Ile Leu Ser Gln Val Ser Tyr Arg Leu Phe Glu | | | |
| 705 | 710 | 715 | 720 |
| Asp Met Gly Leu Phe Glu Ala Phe Lys Ile Pro Ile Arg Glu Phe Met | | | |
| | 725 | 730 | 735 |
| Asn Tyr Phe His Ala Leu Glu Ile Gly Tyr Arg Asp Ile Pro Tyr His | | | |
| | 740 | 745 | 750 |
| Asn Arg Ile His Ala Thr Asp Val Leu His Ala Val Trp Tyr Leu Thr | | | |
| | 755 | 760 | 765 |
| Thr Gln Pro Ile Pro Gly Leu Ser Thr Val Ile Asn Asp His Gly Ser | | | |

| | | |
|---|------|------|
| 770 | 775 | 780 |
| Thr Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Gly Phe Thr His Gly His Met Gly | | |
| 785 | 790 | 795 |
| Tyr Val Phe Ser Lys Thr Tyr Asn Val Thr Asp Asp Lys Tyr Gly Cys | | 800 |
| | 805 | 810 |
| Leu Ser Gly Asn Ile Pro Ala Leu Glu Leu Met Ala Leu Tyr Val Ala | | 815 |
| | 820 | 825 |
| Ala Ala Met His Asp Tyr Asp His Pro Gly Arg Thr Asn Ala Phe Leu | | 830 |
| | 835 | 840 |
| Val Ala Thr Ser Ala Pro Gln Ala Val Leu Tyr Asn Asp Arg Ser Val | | 845 |
| | 850 | 855 |
| Leu Glu Asn His His Ala Ala Ala Ala Trp Asn Leu Phe Met Ser Arg | | 860 |
| 865 | 870 | 875 |
| Pro Glu Tyr Asn Phe Leu Ile Asn Leu Asp His Val Glu Phe Lys His | | 880 |
| | 885 | 890 |
| Phe Arg Phe Leu Val Ile Glu Ala Ile Leu Ala Thr Asp Leu Lys Lys | | 895 |
| | 900 | 905 |
| His Phe Asp Phe Val Ala Lys Phe Asn Gly Lys Val Asn Asp Asp Val | | 910 |
| | 915 | 920 |
| Gly Ile Asp Trp Thr Asn Glu Asn Asp Arg Leu Leu Val Cys Gln Met | | 925 |
| | 930 | 935 |
| Cys Ile Lys Leu Ala Asp Ile Asn Gly Pro Ala Lys Cys Lys Glu Leu | | 940 |
| 945 | 950 | 955 |
| His Leu Gln Trp Thr Asp Gly Ile Val Asn Glu Phe Tyr Glu Gln Gly | | 960 |
| | 965 | 970 |
| Asp Glu Glu Ala Ser Leu Gly Leu Pro Ile Ser Pro Phe Met Asp Arg | | 975 |
| | 980 | 985 |
| Ser Ala Pro Gln Leu Ala Asn Leu Gln Glu Ser Phe Ile Ser His Ile | | 990 |
| | 995 | 1000 |
| Val Gly Pro Leu Cys Asn Ser Tyr Asp Ser Ala Gly Leu Met Pro | | 1005 |
| | 1010 | 1015 |
| Gly Lys Trp Val Glu Asp Ser Asp Glu Ser Gly Asp Thr Asp Asp | | 1020 |
| | 1025 | 1030 |
| Pro Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Pro Ala Pro Asn Glu Glu Glu | | 1035 |
| | 1040 | 1045 |
| Thr Cys Glu Asn Asn Glu Ser Pro Lys Lys Lys Thr Phe Lys Arg | | 1050 |
| | 1055 | 1060 |
| Arg Lys Ile Tyr Cys Gln Ile Thr Gln His Leu Leu Gln Asn His | | 1065 |
| | 1070 | 1075 |
| | | 1080 |

| | | |
|---|------|------|
| Lys Met Trp Lys Lys Val Ile Glu Glu Glu Gln Arg Leu Ala Gly | | |
| 1085 | 1090 | 1095 |
| Ile Glu Asn Gln Ser Leu Asp Gln Thr Pro Gln Ser His Ser Ser | | |
| 1100 | 1105 | 1110 |
| Glu Gln Ile Gln Ala Ile Lys Glu Glu Glu Glu Glu Lys Gly Lys | | |
| 1115 | 1120 | 1125 |
| Pro Arg Gly Glu Glu Ile Pro Thr Gln Lys Pro Asp Gln | | |
| 1130 | 1135 | 1140 |

<210> 2

<211> 7319

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

```

ggggggccact gggaattcag tgaagagggc accctatacc atggcagtgc cgggcgacgc 60
tgcacgagtc agggacaagc ccggtccacag tggggtgagt caagccccca cggcggggccg 120
ggactgccac catcgtgcgg accccgcacg gccgcgggac tcgggctgcc gtggctgctg 180
gggagacctg gtgctgcagc cgctccggag ctctcggaag ctttcctccg cgctgtgcgc 240
gggctccctg tcctttctgc tggcgctgct ggtgaggctg gtccgcgggg aggtcggctg 300
tgacctggag cagtgttaagg aggcggcggc ggcggaggag gaggaagcag ccccgaggagc 360
agaagggggc gtcttcccgg ggcctcgggg aggtgctccc gggggcggtg cgcggctcag 420
cccctggctg cagccctcgg cgctgctctt cagtctcctg tgtgccttct tctggatggg 480
cttgtacctc ctgcgcgccg ggggtgcgct gcctctggct gtcgcgctgc tggccgcctg 540
ctgcgggggg gaagcgctcg tccagattgg gctgggcgct ggggaggatc attactctc 600
actccccgcc gcgggggttg tgctcagctg cttggccgcc gcgacatggc tgggtgctgag 660
gctgaggctg ggcgctccta tgatgcctt gactagcgcg gtcaggaccg tgtccctcat 720
ttccttagag aggttcaagg tcgcctggag acctacctg gcgtacctgg ccggcgtgct 780
ggggatcctc ttggccaggt acgtggaaca aatcttgccg cagtccgcgg aggcggctcc 840
aaggagcat ttgggggtccc agctgattgc tgggaccaag gaagatatcc cgggtgtttaa 900
gaggaggagg cgggtccagct ccgtcgtgtc cgccgagatg tccggctgca gcagcaagtc 960
ccatcgaggg acctccctgc cctgtatacc gagggaacag ctcattggggc attcagaatg 1020
ggaccacaaa cgagggccaa gaggatcaca gtcttcagga accagtatta ctgtggacat 1080
cgccgtcatg ggcgaggccc acggcctcat taccgacctc ctggcagacc cttctcttcc 1140
accaaactg tgcacatcct tgagagccgt gagcaacttg ctcagcacac agctcacctt 1200
ccaggccatt cacaagccca gactgaatcc cgtcacttcg ctcagtgaag actatacctg 1260
ttctgactct gaagagagct ctgaaaaaga caagcttgct attccaaagc gcctgagaag 1320
gagtttgct cctggcttgt tgagacgagt ttcttccact tggaccacca ccacctcggc 1380
cacaggctta cccaccttg agcctgcacc agtacggaga gaccgcagca ccagcatcaa 1440
actgcaggaa gcaccttcat ccagtctga ttcttggaat aatccagtga tgatgacctt 1500
caccaaaagc agatccttta cttcatccta tgctatttct gcagctaacc atgtaaaggc 1560

```

```

taaaaagcaa agtcgaccag gtgccctcgc taaaatttca cctctttcat cgccctgctc 1620
ctcacctctc caagggactc ctgccagcag cctggtcagc aaaatttctg cagtgcagtt 1680
tccagaatct gctgacacaa ctgccaaaca aagcctaggt tctcacaggg ccttaactta 1740
cactcagagt gccccagacc tatccctca aatcctgact ccacctgtta tatgtagcag 1800
ctgtggcaga ccatattccc aagggaatcc tgctgatgag cccctggaga gaagtggggt 1860
agccactcgg acaccaagta gaacagatga cactgctcaa gttacctctg attatgaaac 1920
caataacaac agtgacagca gtgacattgt acagaatgaa gatgaaacag agtgcctgag 1980
agagcctctg aggaaaagcat cggcttgacg cacctatgct cctgagacca tgatgtttct 2040
ggacaaaacca attcttgctc ccgaacctct tgtcatggat aacctggact caattatgga 2100
gcagctaaat acttggattt ttccaatttt tgatttagtg gaaaatatag gaagaaaatg 2160
tggccgtatt cttagtcagg tatcttacag actttttgaa gacatgggcc tctttgaagc 2220
ttttaaaatt ccaattaggg aatttatgaa ttattttcat gctttggaga ttggatatag 2280
ggatattcct tatcataaca gaatccatgc cactgatgtt ttacatgctg tttggtatct 2340
tactacacag cctattccag gcctctcaac tgtgattaat gatcatggtt caaccagtga 2400
ttcagattct gacagtggat ttacacatgg acatatggga tatgtattct caaaaacgta 2460
taatgtgaca gatgataaat acggatgtct gtctgggaat atccctgcct tggagttgat 2520
ggcgtgtat gtggctgcag ccatgcacga ttatgatcat ccaggaagga ctaatgcttt 2580
cctggttgca actagtgtc ctcaggcggg gctatataac gatcgttcag ttttgagaa 2640
tcatcacgca gctgctgcat ggaatctttt catgtcccg ccagagtata acttcttaat 2700
taacctgac catgtggaat ttaagcattt ccgtttcctt gtcattgaag caattttggc 2760
cactgacctg aagaaacact ttgacttcgt agccaaattt aatggcaagg taaatgatga 2820
tgttggataa gattggacca atgaaaatga tcgtctactg gtttgtcaaa tgtgtataaa 2880
gttggctgat atcaatggtc cagctaaatg taaagaactc catcttcagt ggacagatgg 2940
tattgtcaat gaattttatg aacagggtga tgaagaggcc agccttgat taccataag 3000
ccccttcag gatcgttctg ctctcagct ggccaacctt caggaatcct tcatctctca 3060
cattgtgggg cctctgtgca actcctatga ttcagcagga ctaatgcctg gaaaatgggt 3120
ggaagacagc gatgagtcag gagatactga tgaccagaa gaagaggagg aagaagcacc 3180
agcaccaaat gaagaggaaa cctgtgaaaa taatgaatct ccaaaaaaga agactttcaa 3240
aaggagaaaa atctactgcc aaataactca gcacctetta cagaaccaca agatgtggaa 3300
gaaagtcatt gaagaggagc aacggttggc aggcatagaa aatcaatccc tggaccagac 3360
ccctcagtcg cactcttcag aacagatcca ggctatcaag gaagaagaag aagagaaagg 3420
gaaaccaaga ggcgaggaga taccaacca aaagccagac cagtgacaat ggatagaatg 3480
ggctgtgttt ccaaacagat tgacttgtca aagactctct tcaagccagc acaacattta 3540
gacacaacac tgtagaaatt tgagatgggc aatggctat tgcattttgg gattcttcgc 3600
atthtgtgtg tataatttta cagtgaggtt cattgttaaa aactttttgc tcaaagaagc 3660
tttcacattg caacaccagc ttctaaggat tttttaagga gggaatatat atgtgtgtgt 3720
gtatataagc tcccacatag atacatgtaa aacatattca cacccatgca cgcacacaca 3780
tacacactga aggccacgat tgctggctcc acaatttagt aacatttata ttaagatata 3840
tatatagtg tcaactgtgat ataataaatc ataaaggaaa ccaaatcaca aaggagatgg 3900

```

```

tgtggccttag caaggaaaca gtgcaggaaa tgtaggttac caactaagca gcttttgctc 3960
ttagtactga gggatgaaag ttccagagca ttatttgaat tctgatacat cctgccaaaca 4020
ctgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgaaaga gagacagaag 4080
ggaatggttt gagagggtgc ttgtgtgcat gtgtgtgcat atgtaaagag atttttgtgg 4140
ttaaagtaac tcagaatagc tgtagcaaat gactgaatac atgtgaacaa acagaaggaa 4200
gttcaactctg gagtgtcttt gggaggcagc cattccaaat gccctcctcc atttagcttc 4260
aataaagggc cttttgctga tggagggcac tcaagggctg ggtgagaggg ccacgtgttt 4320
ggtattacat tactgctatg caccacttga aggagctcta tcaccagcct caaacccgaa 4380
agactgaggc attttccagt ctacttgctt aatgaatgta taggaactgt ctatgagtat 4440
ggatgtcact caactaagat caaatcacca ttaagggga tggcattctt tatacctaaa 4500
cacctaagag ctgaagtcag gtcttttaat caggttagaa ttctaaatga tgccagagaa 4560
ggcttgggaa attgtacttc agcgtgatag cctgtgtctt ctttaatttg tgcaaaatat 4620
gtggtagaga aagaaaagga aacagaaaaa tcactctggg ttatatagca agagatgaag 4680
gagaatatat caacacaggg tttttgtgtt gacataggaa aagcctgatt cttggcaact 4740
gtttagtatt gtctttcagg ggtgaaggtc ccactgacaa cccctgttgt ggtgttccac 4800
acgctgtttg ttggggtagc ttccatcggc agtctggccc attgtcagtc atgcttcttc 4860
tggccgggga gattatagag agattgtttg aagattgggt tattattgaa agtctttttt 4920
tttgtttgtt ttgttttggt ttgtttgttt atctacactt gtttatgctg tgagccaaac 4980
ctctatttaa aaagttgata ctcaacttca atattttatt tcatattatt atatatgtca 5040
tgatagtatt ctgatgtaa atatgaagat tttttgttt ctgtagatag taaactcttt 5100
ttttaaaaaa ggaaaaggga aacattttta taaagttata ttttaatcac catttttata 5160
cattgtagtt ctctccaagc ccagtaagag aatgatgatt catttgcatg gaggtcgatg 5220
gacaaccaat catctacctt ttctaattta aatgataatc tgatatagtt ttattgccag 5280
ttaaatgagg atgctgcaaa gcatgttttt tcactagtaa cttttgctaa ctgaatgaat 5340
tctgggtcca tatctcccag atgaaaaact gtaaccaat accatatttt atagtgtgtg 5400
tccatttctt tccaacactg tttgttatga ttcttccttg agtacttata tacagacctg 5460
ctcattatct aaacaatctt accttctaag taaacctga ttgtgatttc cagtttttat 5520
tttctctgac gtagtagaaa ggaatgttta cattaaaaat acttttgttt ctcataaatg 5580
gatattgtac tcccccttt caaagcatta ttttacaata attcatggca ttttaaaaaa 5640
taaggcaaag ataatacgac aaaaaatata catggtttca aggcaaattc tccaataagt 5700
tggaanaatgt aaaaaggatc aagtggatgc agcctctacc taaataatta aaatatattt 5760
cagtatatat ctgaattaac accaggtctt cattatttag aacttactaa attgttttca 5820
ttttcttagt ttacctgtg tatctccatg tttgcaaaaa ttactataag tcaaattttg 5880
ccagtgaatt taactatttt tctttccttg caattaaggg gaaaaaagca tttatcttat 5940
cttctcatac cccttgcatc taagtactta gcaaagtcaa tttttccca ttttccaaat 6000
gcgtccatct ctaacataaa tattaattga acatagagct atgtttggag tgagtggact 6060
ggcaggacag ttggaagtcc atcacagtct attgacagtt tcatcaaagc tgtatagtcc 6120
aactagtggg gcagcttggc tactatggtg gaagtctcag caaactgcct ggttttgttt 6180
gtttgttttg ttttaaggta caggaaataa gaggaataat agtggccaaa gcaattagaa 6240

```

catcttcatt ccagaactgt gttcagcaat ccaggcagat tgatacattt ttcttttaaaa 6300
 ataaattgct attacagcta gacgtcaatt gggataaata aagggatgaa gatccactaa 6360
 gtttgtgact ttcatacaca cccagtacat ctcaaaggat gctaaggac attttctgcc 6420
 agtagagttc tccccctttt tggtagacagc aatattatta tgttcacatc taactccaga 6480
 gcttacttcc tgtggtgcc aatgtattgt tgcaatttac tacattttta tatgagccta 6540
 tttataggtg ccattaaact caggtctttc aaatgaaaga gtttctagcc cacttagga 6600
 aaaagataat tgttttagaaa accataaaat caatggtagg aaaagttgga actggttacc 6660
 tggatgccat ggttctctgt taaataaagt aagagaccag gtgtattctg agtgtcatca 6720
 gtgttatttt cagcatgcta ataaatgtct ttccggttat atatctatct aaattaacct 6780
 ttaaaatatt ggtttccttg ataaaagcac cacttttgct tttgttagct gtaatatttt 6840
 ttgtcattta gataagacct ggtttggtc tcaataaaag atgaagacag tagctctgta 6900
 cagggatata tctatattag tcttcactctg atgaatgaag aaattttctc atattatgtt 6960
 caagaaagta ttacttcct aaaaatagaa ttcccgattc tgtctatttt ggttgaatac 7020
 cagaacaaat ctttccgttg caatcccagt aaaacgaaag aaaaggaata tcttacagac 7080
 tgttcatatt agatgtatgt agactgttaa tttgcaattt ccccatattt cctgcctatc 7140
 ttaccagat aactttcttt gaaggtaaaa gctgtgcaaa aggcagaga ctcaggccta 7200
 ctctttgttt aaatgatgga aaaatataaa ttattttcta agtaataaaa gtataaaaat 7260
 tatcattata aataaagtct aaagtttgaa attattaatt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa 7319

<210> 3

<211> 578

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Asn | Ile | Ser | Val | Asp | Leu | Glu | Thr | Asn | Tyr | Ala | Glu | Leu | Val | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Asp | Val | Gly | Arg | Val | Thr | Leu | Gly | Glu | Asn | Ser | Arg | Lys | Lys | Met | Lys |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | |
| Asp | Cys | Lys | Leu | Arg | Lys | Lys | Gln | Asn | Glu | Ser | Val | Ser | Arg | Ala | Met |
| | | | | 35 | | | | 40 | | | | | | 45 | |
| Cys | Ala | Leu | Leu | Asn | Ser | Gly | Gly | Gly | Val | Ile | Lys | Ala | Glu | Ile | Glu |
| | | | | 50 | | | | 55 | | | | | | 60 | |
| Asn | Glu | Asp | Tyr | Ser | Tyr | Thr | Lys | Asp | Gly | Ile | Gly | Leu | Asp | Leu | Glu |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Asn | Ser | Phe | Ser | Asn | Ile | Leu | Leu | Phe | Val | Pro | Glu | Tyr | Leu | Asp | Phe |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Met | Gln | Asn | Gly | Asn | Tyr | Phe | Leu | Ile | Phe | Val | Lys | Ser | Trp | Ser | Leu |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | |
| Asn | Thr | Ser | Gly | Leu | Arg | Ile | Thr | Thr | Leu | Ser | Ser | Asn | Leu | Tyr | Lys |
| | | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | |

| | | |
|---|-----|---------|
| Arg Asp Ile Thr Ser Ala Lys Val Met Asn Ala Thr Ala Ala Leu Glu | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Phe Leu Lys Asp Met Lys Lys Thr Arg Gly Arg Leu Tyr Leu Arg Pro | | |
| 145 | 150 | 155 160 |
| Glu Leu Leu Ala Lys Arg Pro Cys Val Asp Ile Gln Glu Glu Asn Asn | | |
| | 165 | 170 175 |
| Met Lys Ala Leu Ala Gly Val Phe Phe Asp Arg Thr Glu Leu Asp Arg | | |
| | 180 | 185 190 |
| Lys Glu Lys Leu Thr Phe Thr Glu Ser Thr His Val Glu Ile Lys Asn | | |
| | 195 | 200 205 |
| Phe Ser Thr Glu Lys Leu Leu Gln Arg Ile Lys Glu Ile Leu Pro Gln | | |
| | 210 | 215 220 |
| Tyr Val Ser Ala Phe Ala Asn Thr Asp Gly Gly Tyr Leu Phe Ile Gly | | |
| 225 | 230 | 235 240 |
| Leu Asn Glu Asp Lys Glu Ile Ile Gly Phe Lys Ala Glu Met Ser Asp | | |
| | 245 | 250 255 |
| Leu Asp Asp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Lys Ser Ile Arg Lys Met Pro | | |
| | 260 | 265 270 |
| Val His His Phe Cys Met Glu Lys Lys Lys Ile Asn Tyr Ser Cys Lys | | |
| | 275 | 280 285 |
| Phe Leu Gly Val Tyr Asp Lys Gly Ser Leu Cys Gly Tyr Val Cys Ala | | |
| | 290 | 295 300 |
| Leu Arg Val Glu Arg Phe Cys Cys Ala Val Phe Ala Lys Glu Pro Asp | | |
| 305 | 310 | 315 320 |
| Ser Trp His Val Lys Asp Asn Arg Val Met Gln Leu Thr Arg Lys Glu | | |
| | 325 | 330 335 |
| Trp Ile Gln Phe Met Val Glu Ala Glu Pro Lys Phe Ser Ser Ser Tyr | | |
| | 340 | 345 350 |
| Glu Glu Val Ile Ser Gln Ile Asn Thr Ser Leu Pro Ala Pro His Ser | | |
| | 355 | 360 365 |
| Trp Pro Leu Leu Glu Trp Gln Arg Gln Arg His His Cys Pro Gly Leu | | |
| | 370 | 375 380 |
| Ser Gly Arg Ile Thr Tyr Thr Pro Glu Asn Leu Cys Arg Lys Leu Phe | | |
| 385 | 390 | 395 400 |
| Leu Gln His Glu Gly Leu Lys Gln Leu Ile Cys Glu Glu Met Asp Ser | | |
| | 405 | 410 415 |
| Val Arg Lys Gly Ser Leu Ile Phe Ser Arg Ser Trp Ser Val Asp Leu | | |
| | 420 | 425 430 |
| Gly Leu Gln Glu Asn His Lys Val Leu Cys Asp Ala Leu Leu Ile Ser | | |

| | | |
|---|-----|-----|
| 435 | 440 | 445 |
| Gln Asp Ser Pro Pro Val Leu Tyr Thr Phe His Met Val Gln Asp Glu | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Glu Phe Lys Gly Tyr Ser Thr Gln Thr Ala Leu Thr Leu Lys Gln Lys | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Leu Ala Lys Ile Gly Gly Tyr Thr Lys Lys Val Cys Val Met Thr Lys | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Ile Phe Tyr Leu Ser Pro Glu Gly Met Thr Ser Cys Gln Tyr Asp Leu | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Arg Ser Gln Val Ile Tyr Pro Glu Ser Tyr Tyr Phe Thr Arg Arg Lys | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Tyr Leu Leu Lys Ala Leu Phe Lys Ala Leu Lys Arg Leu Lys Ser Leu | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Arg Asp Gln Phe Ser Phe Ala Glu Asn Leu Tyr Gln Ile Ile Gly Ile | | |
| 545 | 550 | 555 |
| Asp Cys Phe Gln Lys Asn Asp Lys Lys Met Phe Lys Ser Cys Arg Arg | | |
| 565 | 570 | 575 |

Leu Thr

<210> 4

<211> 2530

<212> DNA

<213> 智人

<400> 4

```

tttghtaactt cacttcagcc tcccattgat cgctttctgc aaccattcag actgatctcg 60
ggctcctatt tcattttacat tgtgtgcaca ccaagtaacc agtgggaaaa ctttagaggg 120
tacttaaacc ccagaaaatt ctgaaaccgg gctcttgagc cgctatcctc gggcctgctc 180
ccaccctgtg gagtgcactt tcgttttcaa taaatctctg cttttgttgc ttcattcttt 240
ccttgctttg tttgtgtgtt tgtccagttc tttgttcaac acgccaagaa cctggacact 300
cttcaactggg aacatatattt ggcaagccaa ccaggagaaa agaatttctg cttggacact 360
gcatagctgc tgggaaaaatg aacatcagtg ttgatttgga aacgaattat gccgagttgg 420
ttctagatgt gggaagagtc actcttgagg agaacagtag gaaaaaatg aaggattgta 480
aactgagaaa aaagcagaat gaaagtgtct cacgagctat gtgtgctctg ctcaattctg 540
gagggggagt gatcaaggct gaaattgaga atgaagacta tagttataca aaagatggaa 600
taggactaga tttggaaaaat tcttttagta acattctgtt atttgttcct gactacttag 660
acttcatgca gaatggtaac tactttctga tttttgtgaa gtcattggagc ttgaacacct 720
ctgggtctgcg gattaccacc ttgagctcca atttgtaaaa aagagatata acattctgcaa 780
aagtcattgaa tgccactgct gcactggagt tcctcaaaga catgaaaaag actagaggga 840
gattgtatatt aagaccagaa ttgctggcaa agaggccctg tgttgatata caagaagaaa 900
ataacatgaa ggccttggcc ggggtttttt ttgatagaac agaacttgat cggaagaaaa 960

```

aattgacctt tactgaatcc acacatgttg aaattaaaaa cttctcgaca gaaaagttgt 1020
tacaacgaat taaagagatt ctccctcaat atgtttctgc atttgcaaact actgatggag 1080
gatatttggt cattggttta aatgaagata aagaaataat tggctttaa gcagagatga 1140
gtgacctcga tgacttagaa agagaaatcg aaaagtccat taggaagatg cctgtgcatc 1200
acttctgtat ggagaagaag aagataaatt attcatgcaa attccttgga gtatatgata 1260
aaggaagtct ttgtggatat gtctgtgcac tcagagtggg gcgcttctgc tgtgcagtgt 1320
ttgctaaaga gcctgattcc tggcatgtga aagataaccg tgtgatgcag ttgaccagga 1380
aggaatggat ccagttcatg gtggaggctg aaccaaatt ttccagttca tatgaagagg 1440
tgatctctca aataaatacg tcattacctg ctccccacag ttggcctctt ttggaatggc 1500
aacggcagag acatcactgt ccagggtat caggaaggat aacgtatact ccagaaaacc 1560
tttgcagaaa actgttctta caacatgaag gacttaagca attaatatgt gaagaaatgg 1620
actctgtcag aaagggtca ctgatcttct ctaggagctg gtctgtggat ctgggcttgc 1680
aagagaacca caaagtcctc tgtgatgtc ttctgatttc ccaggacagt cctccagtcc 1740
tatacacctt ccacatggta caggatgagg agtttaaagg ctattctaca caaactgccc 1800
taaccttaaa gcagaagctg gcaaaaattg gtggttacac taaaaaagtg tgtgtcatga 1860
caaagatctt ctacttgagc cctgaaggca tgacaagctg ccagtatgat ttaaggtcgc 1920
aagtaattta ccctgaatcc tactatttta caagaaggaa atacttgctg aaagcccttt 1980
ttaaagcctt aaagagactc aagtctctga gagaccagtt ttcctttgca gaaaatctat 2040
accagataat cggtatagat tgctttcaga agaataataa aaagatgttt aaatcttgct 2100
gaaggctcac ctgatggaaa atggactggg ctactgagat atttttcatt atatatttga 2160
taacattctc taattctgtg aaaatatttc ttgaaaact ttgcaagtta agcaacttaa 2220
tgtgatgttg gataattggg tttgtctat tttcattct ccctaaataa tcttcacaga 2280
tattgtttga gggatattag gaaaattaat ttgttaactc gtctgtgcac agtattattt 2340
actctgtctg tagttcctga ataaattttc ttccatgctt gaactgggaa aattgcaaca 2400
cttttattct taatgacaac agtgaaaatc tcccagcata tacctagaaa acaattataa 2460
cttacaaaag attatccttg atgaaactca gaatttcac agtggggaatg aataagaagg 2520
caaaactcat 2530

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 5

caccgttttc actgagcgaa gtga 24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 6

aaactcactt cgctcagtga aaac 24

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 7

caccgagaca agcttgctat tccaa 25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 8

aaacttggaa tagcaagctt gtctc 25

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 9

caccggcact ctgagtgtaa gtta 24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 10

aaactaactt acactcagag tgcc 24

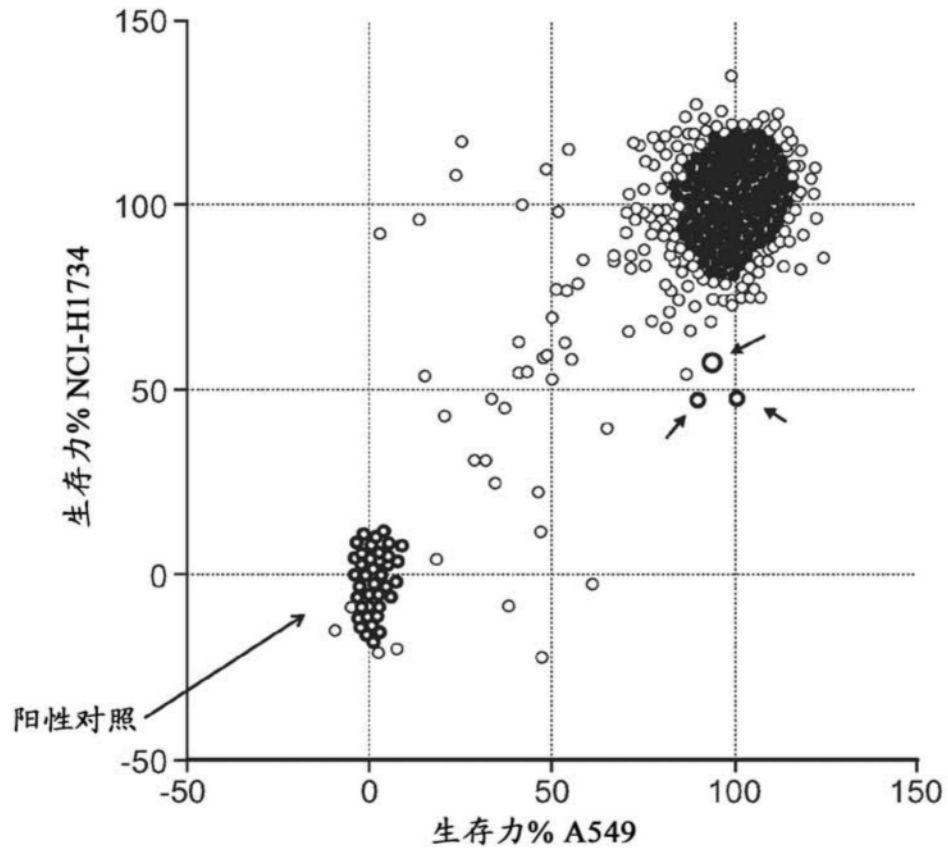


图1A

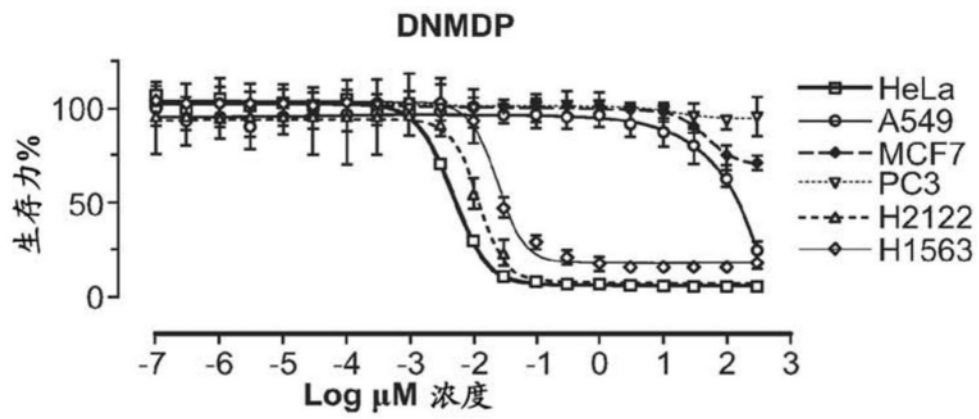


图1B

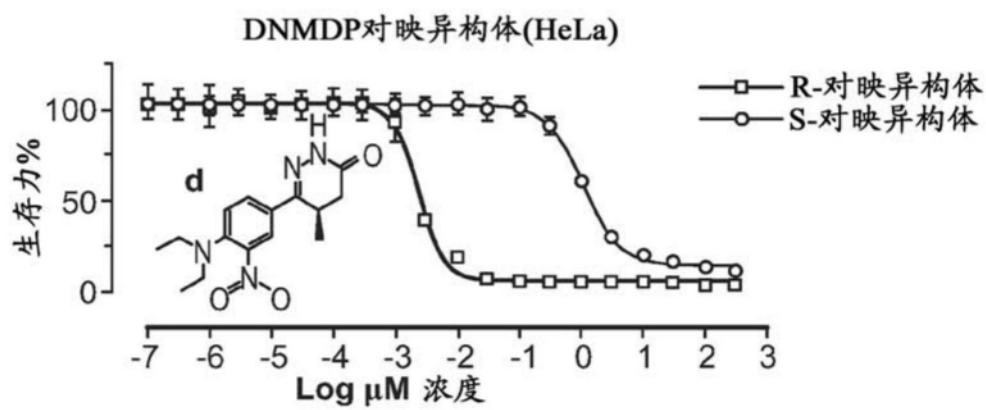


图1C

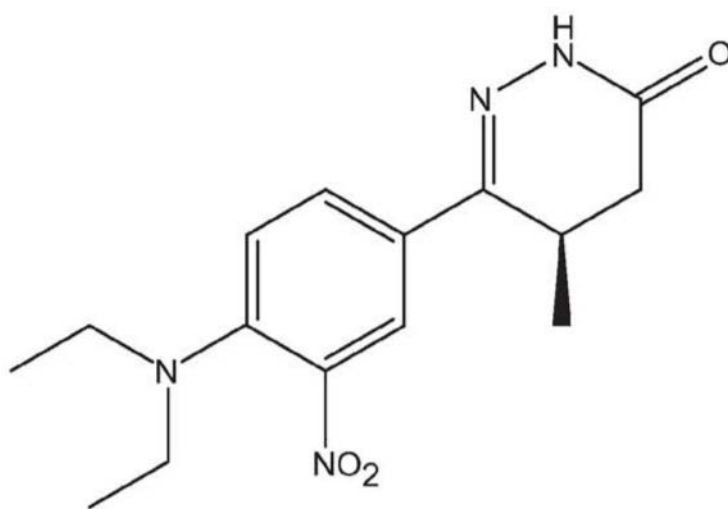


图1D

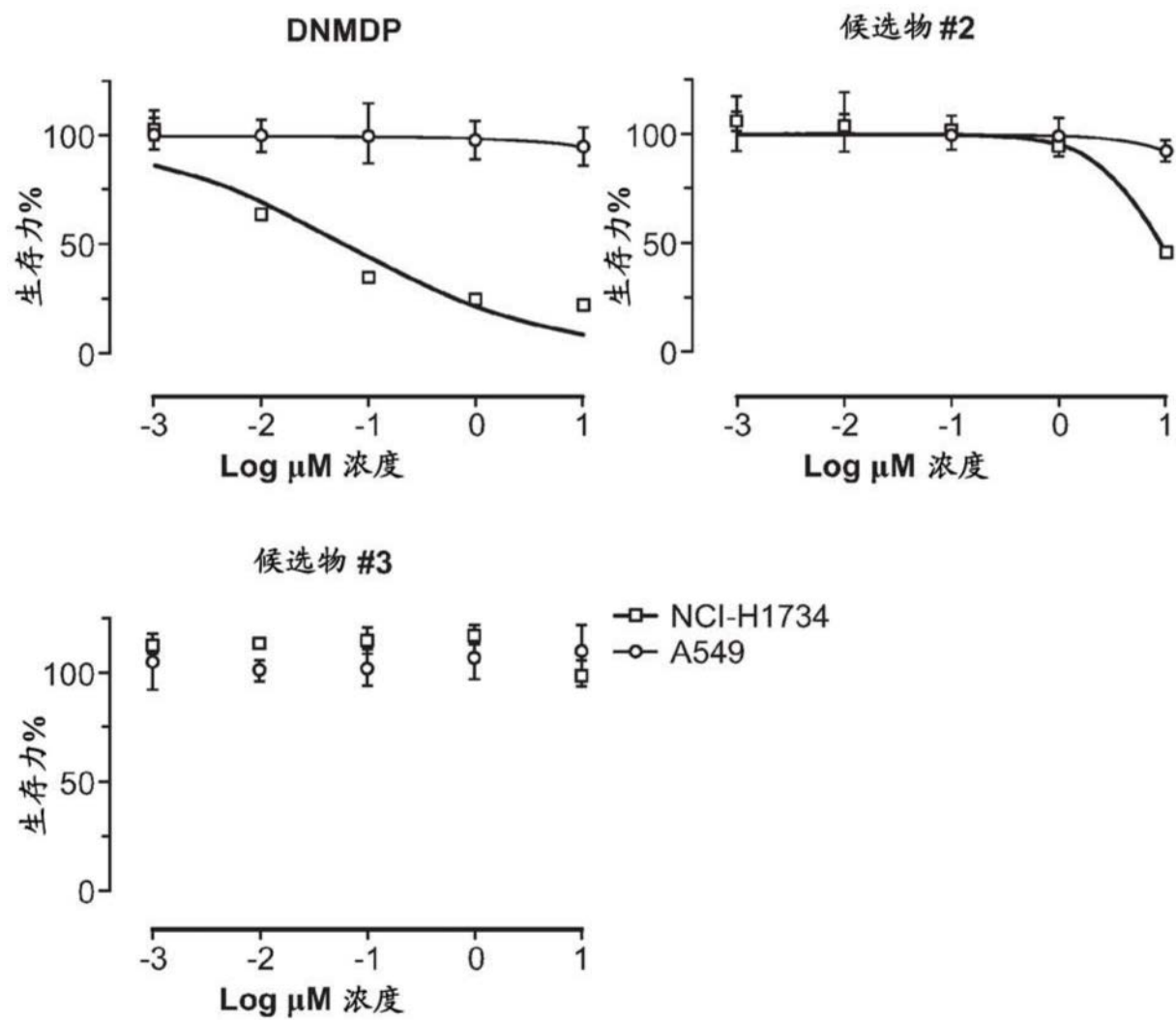


图2

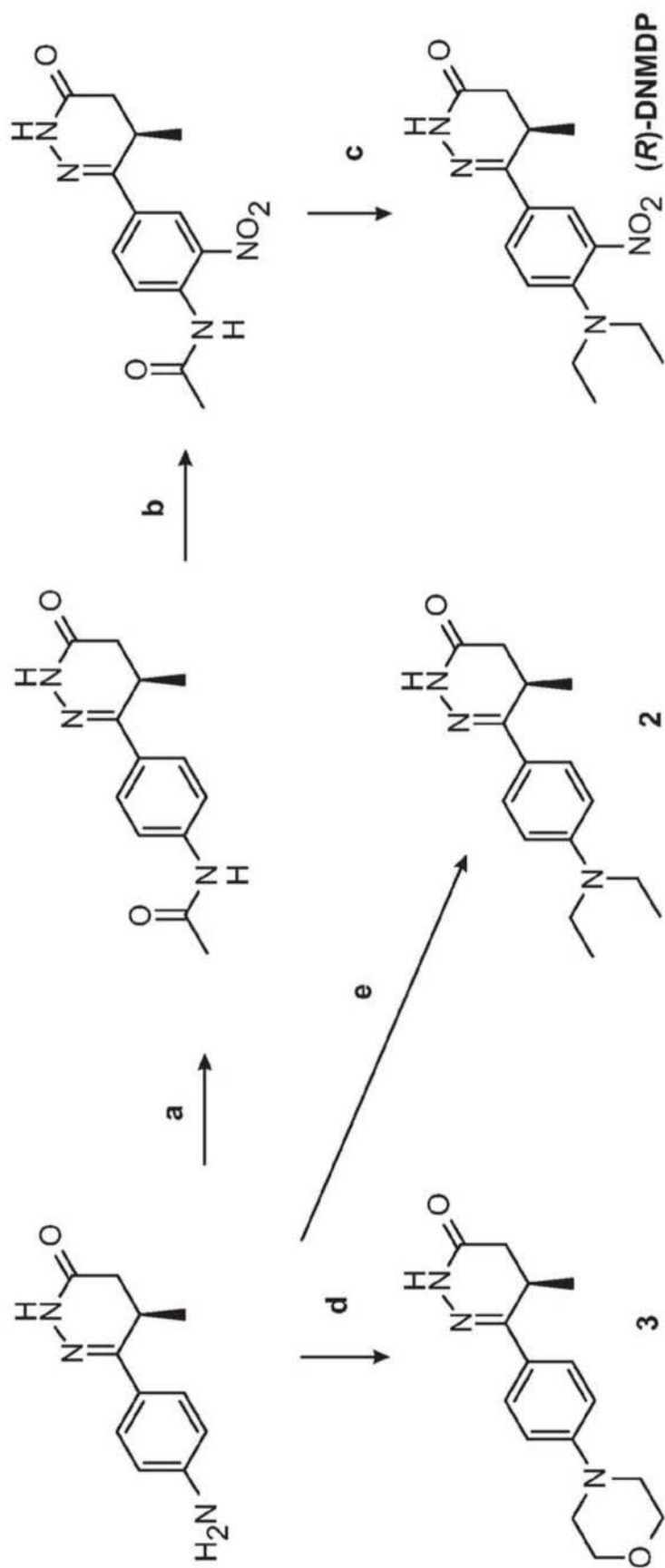


图3

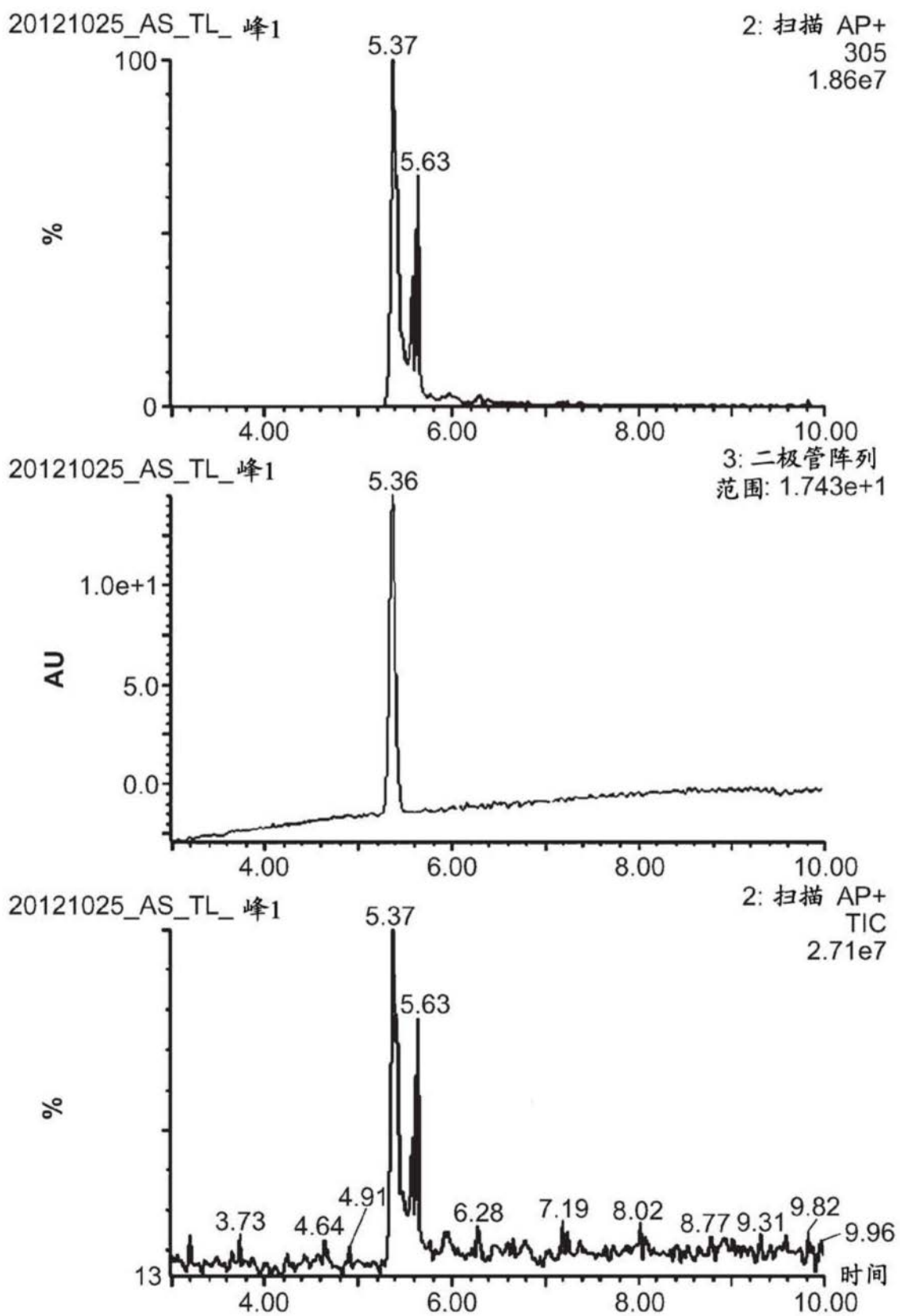


图4A

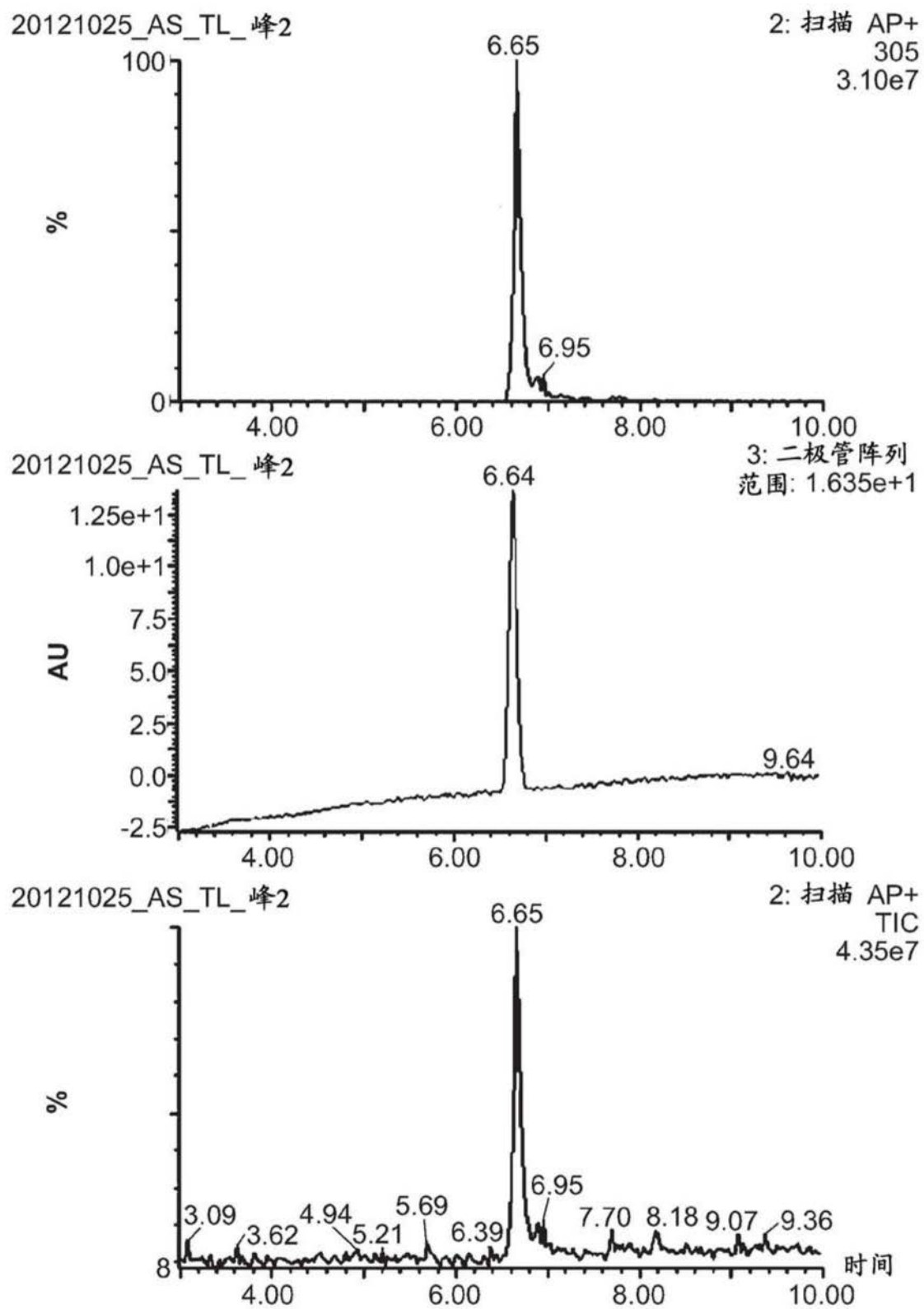


图4B

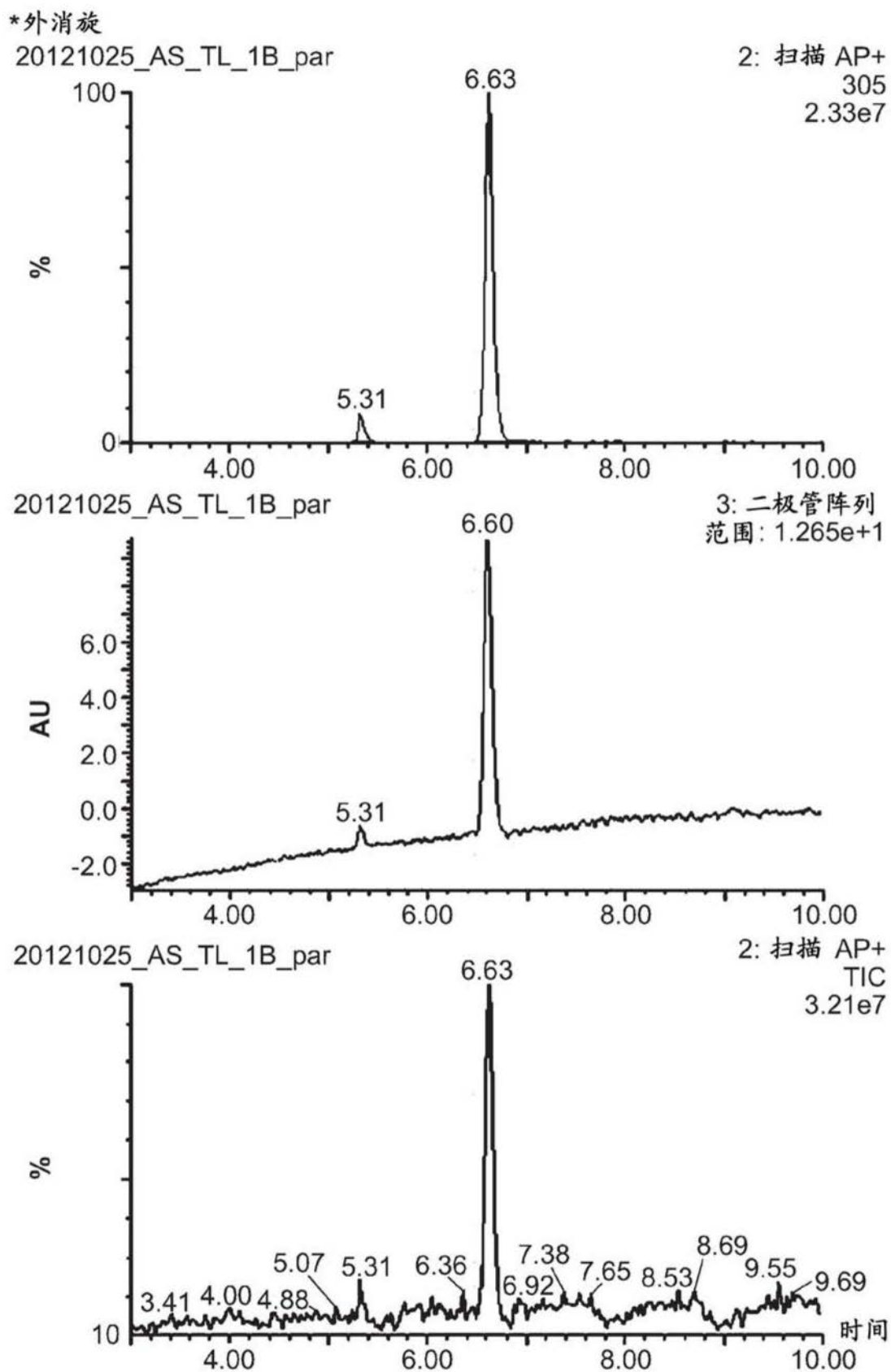


图4C

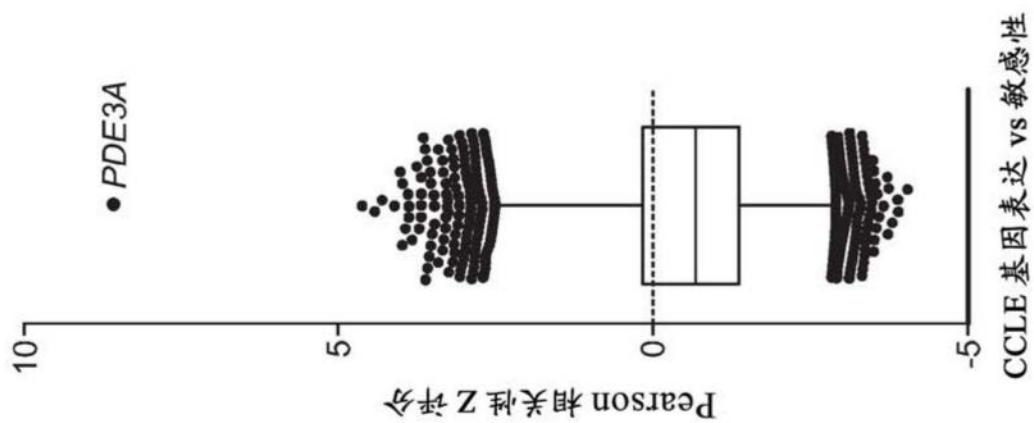


图5A

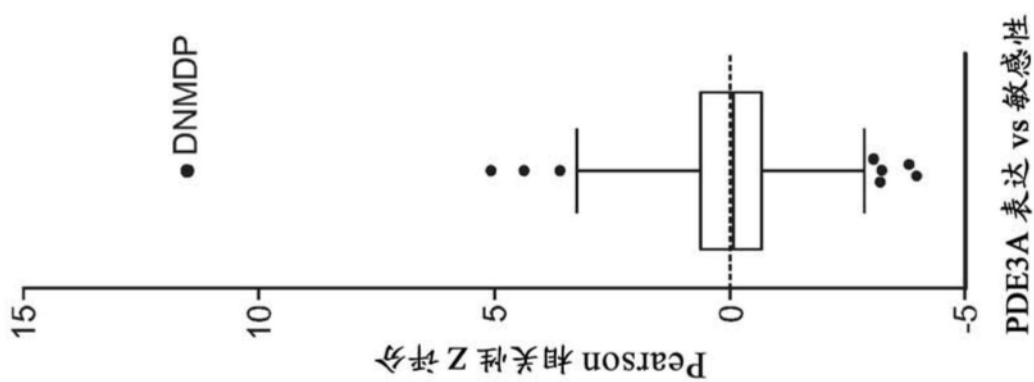


图5B

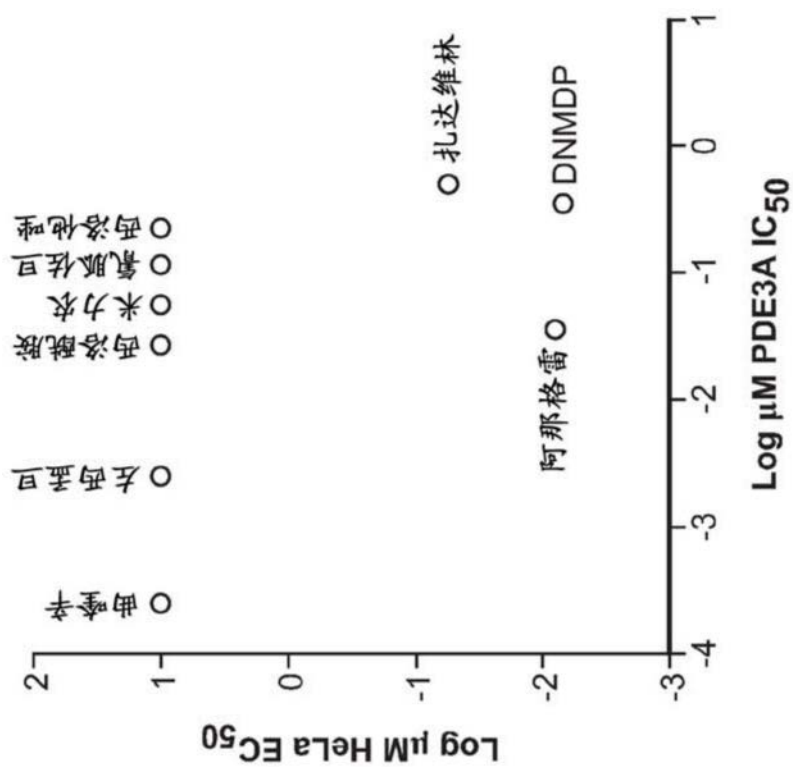


图5C

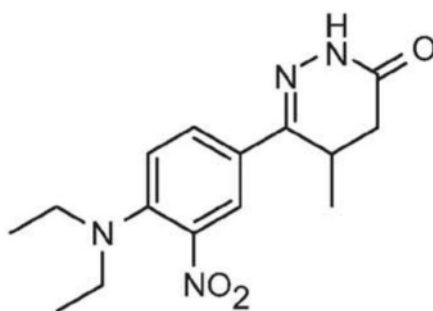


图6A

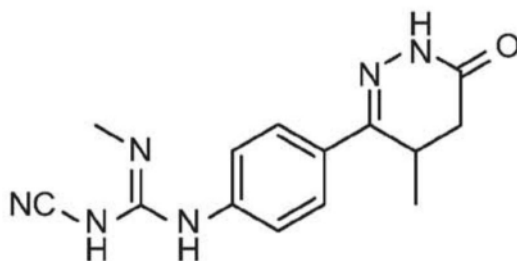


图6B

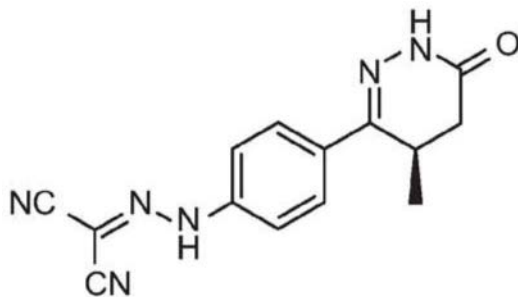


图6C

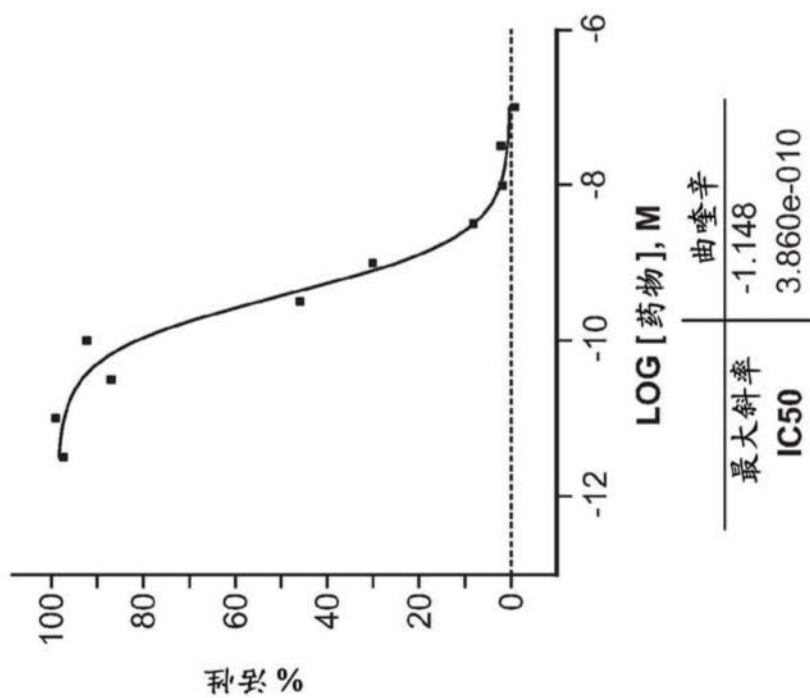


图7A

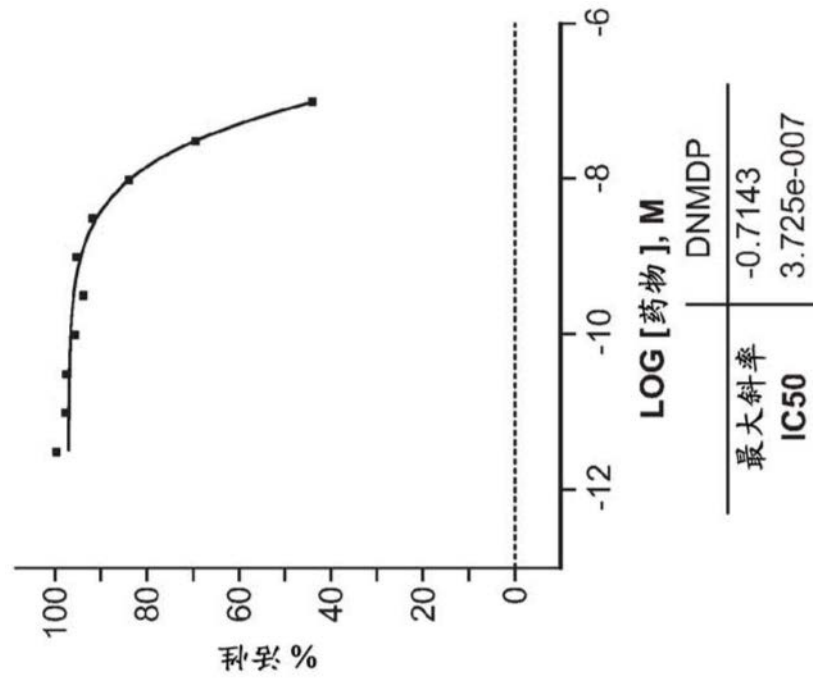


图7B

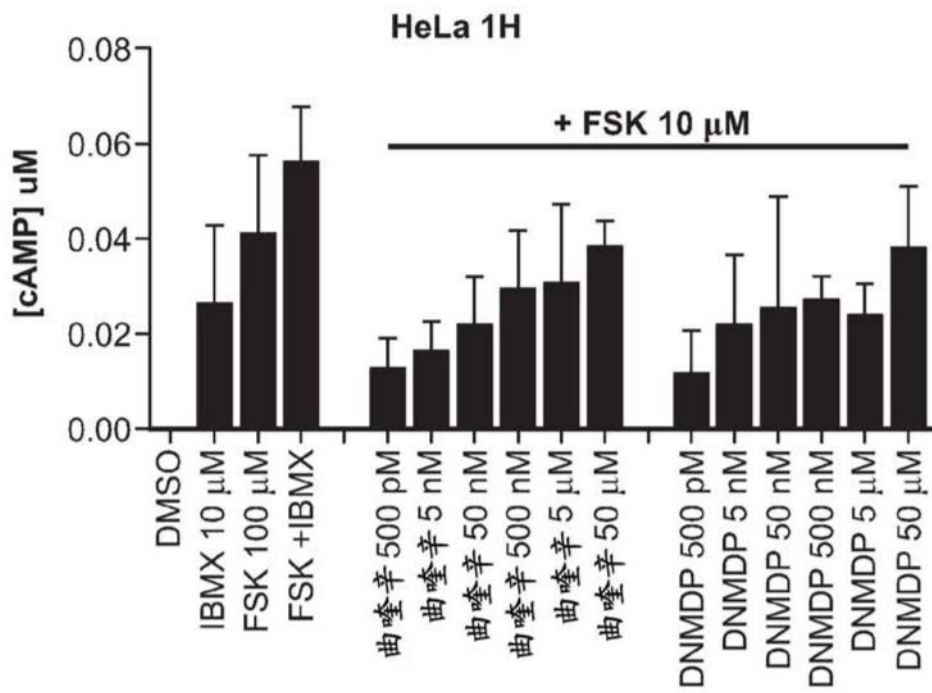


图8A

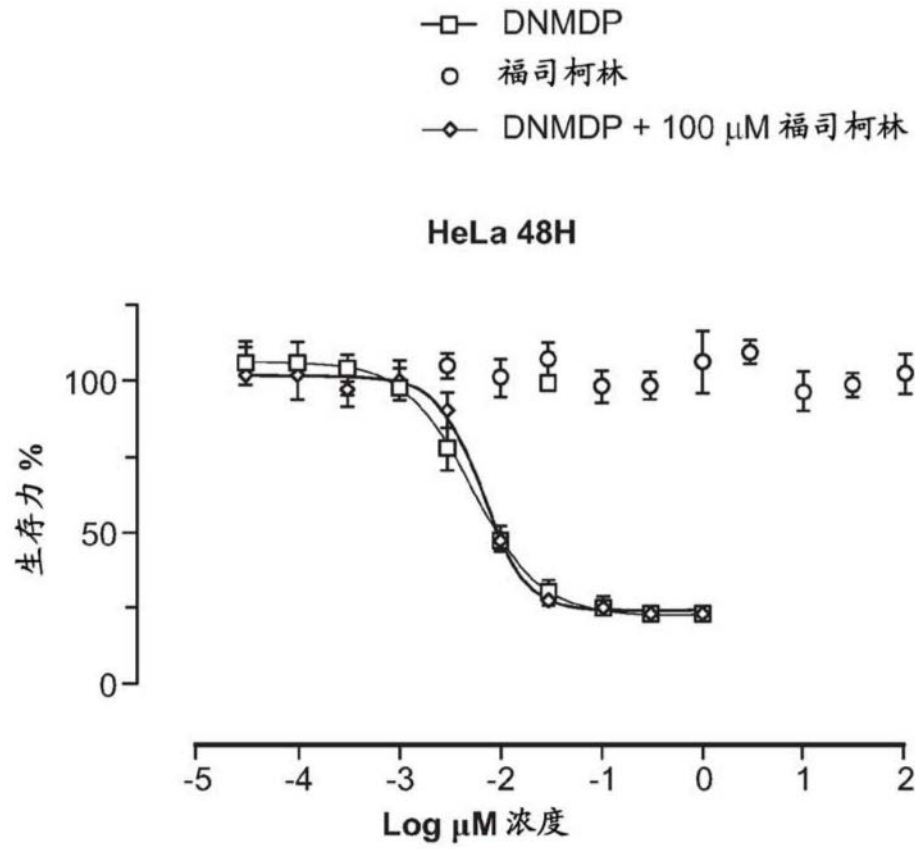


图8B

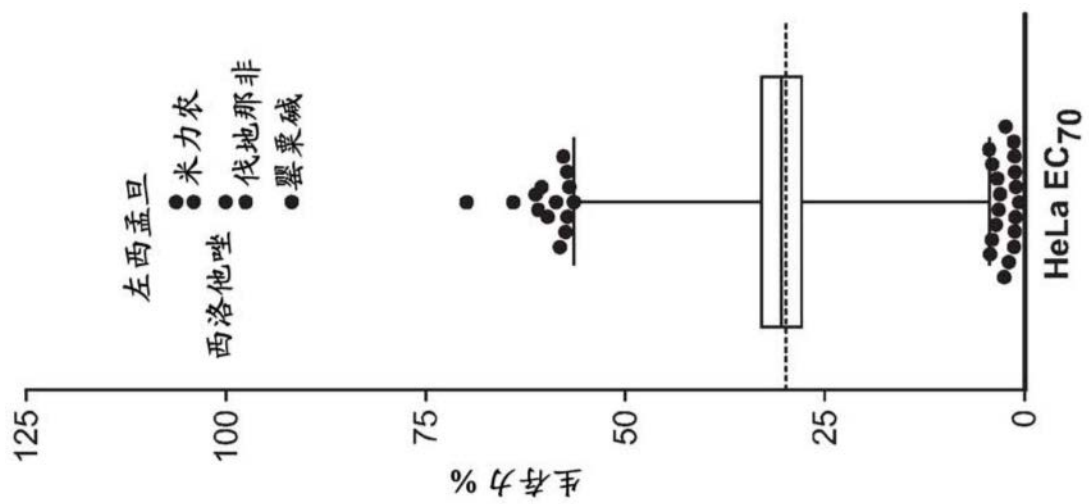


图9A

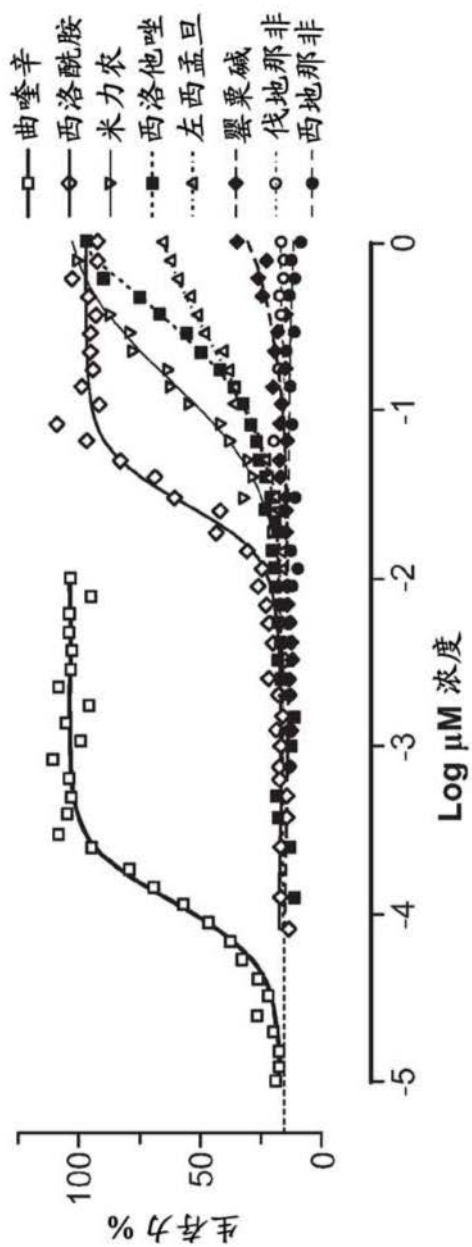


图9B

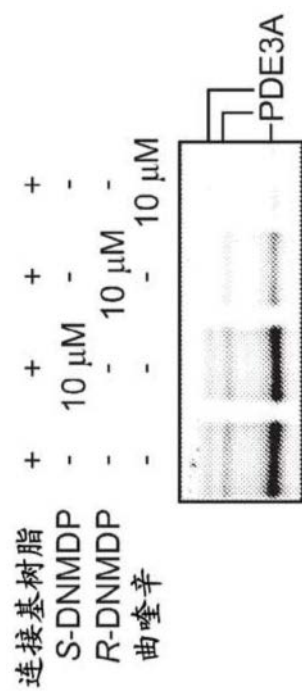


图9C

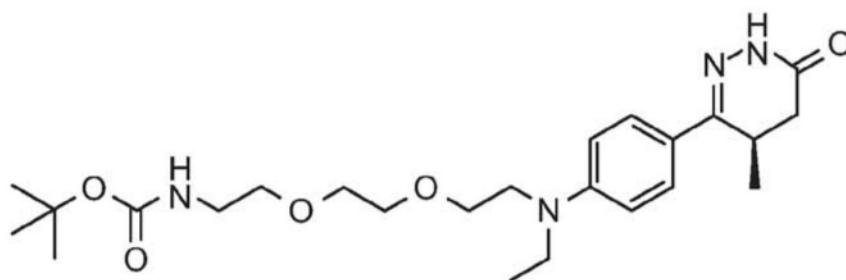


图10A

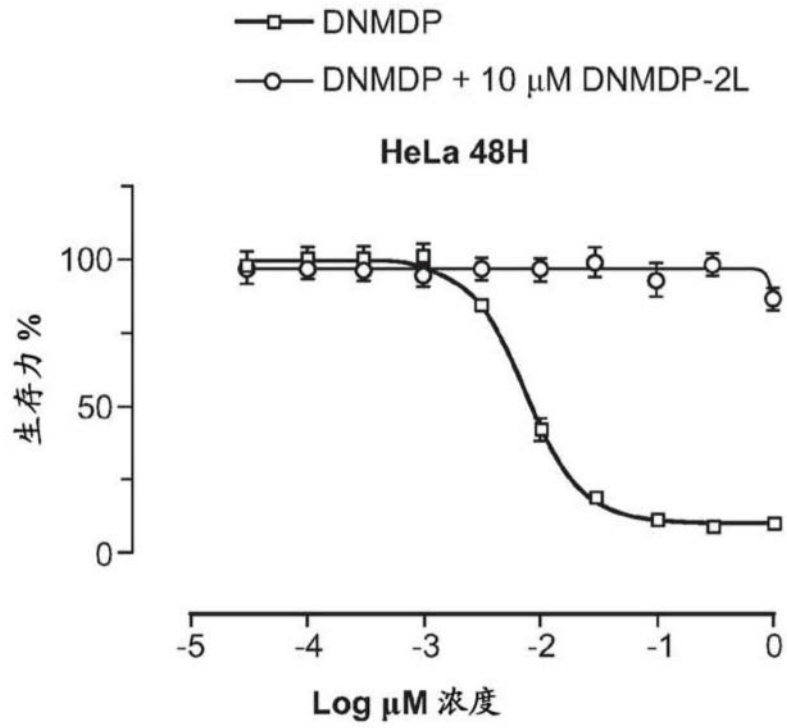


图10B

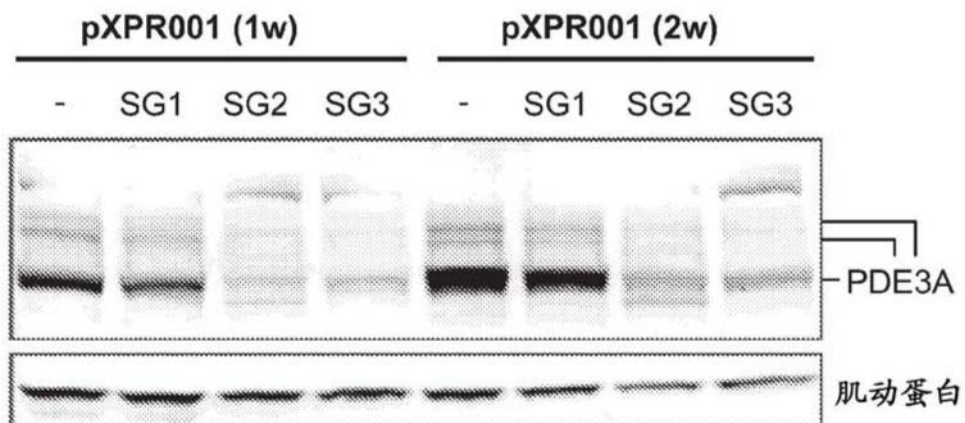


图11A

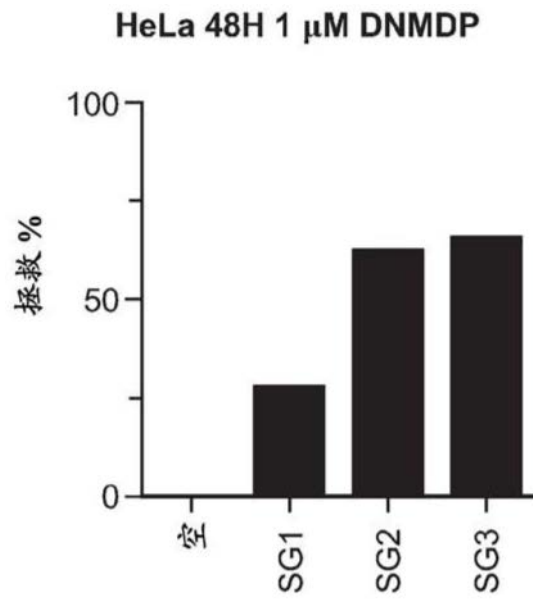


图11B

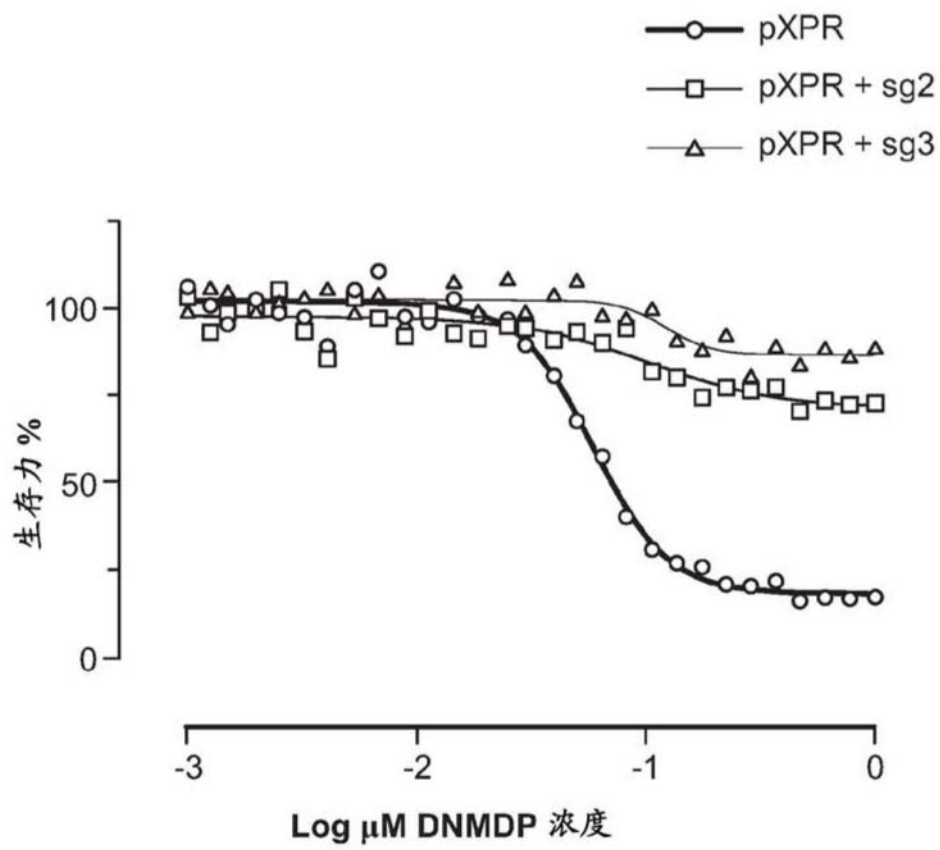


图11C

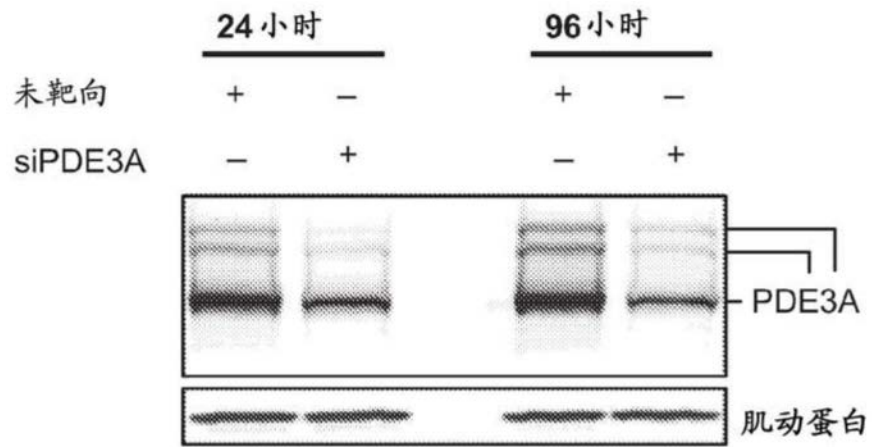


图12A

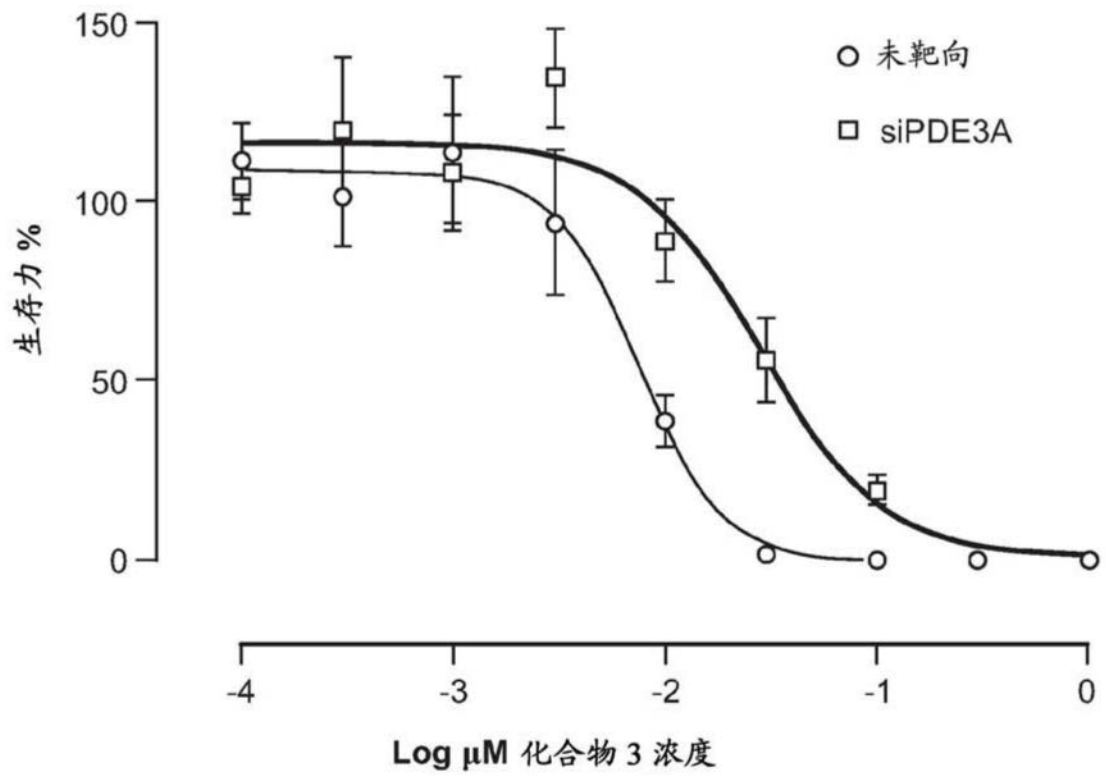


图12B

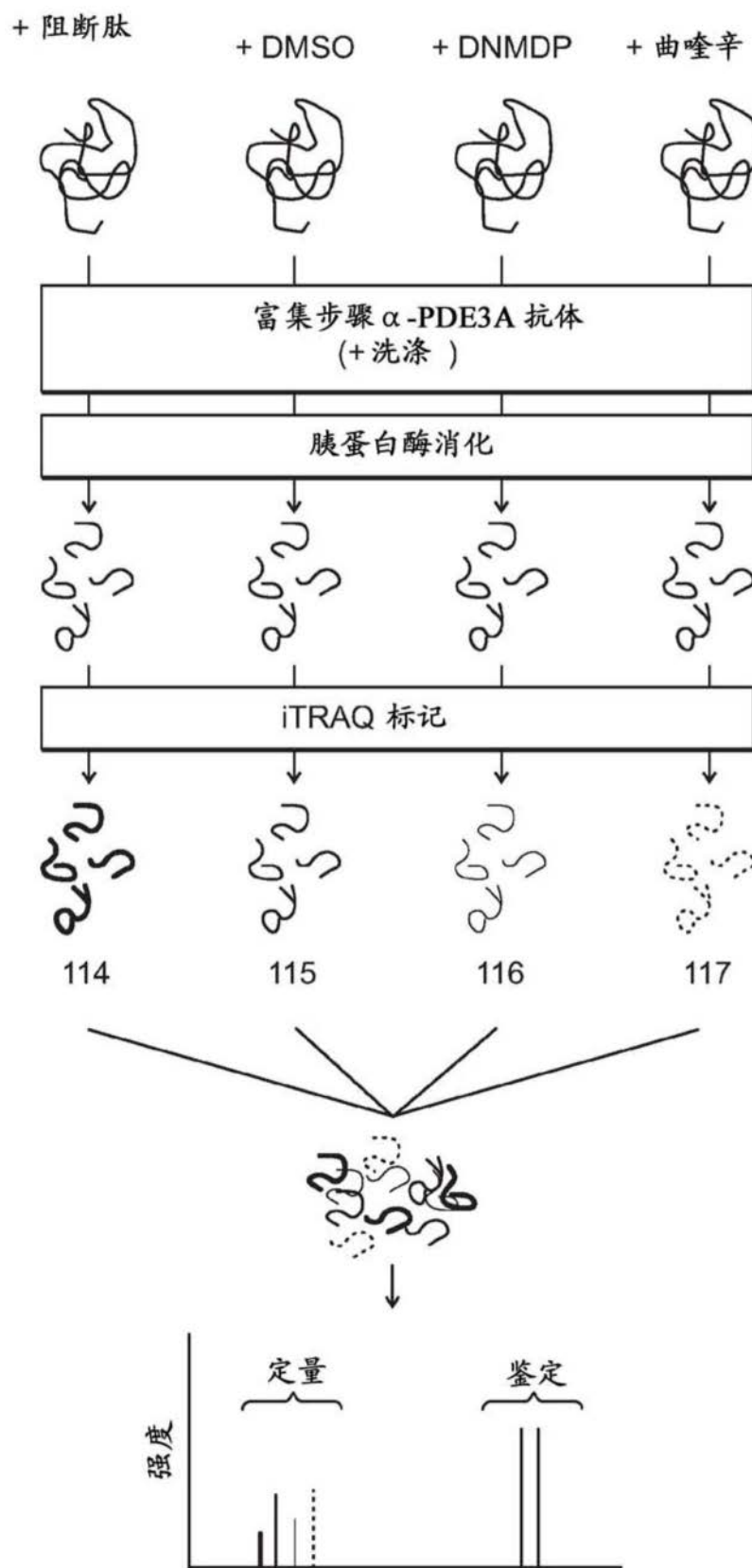


图13A

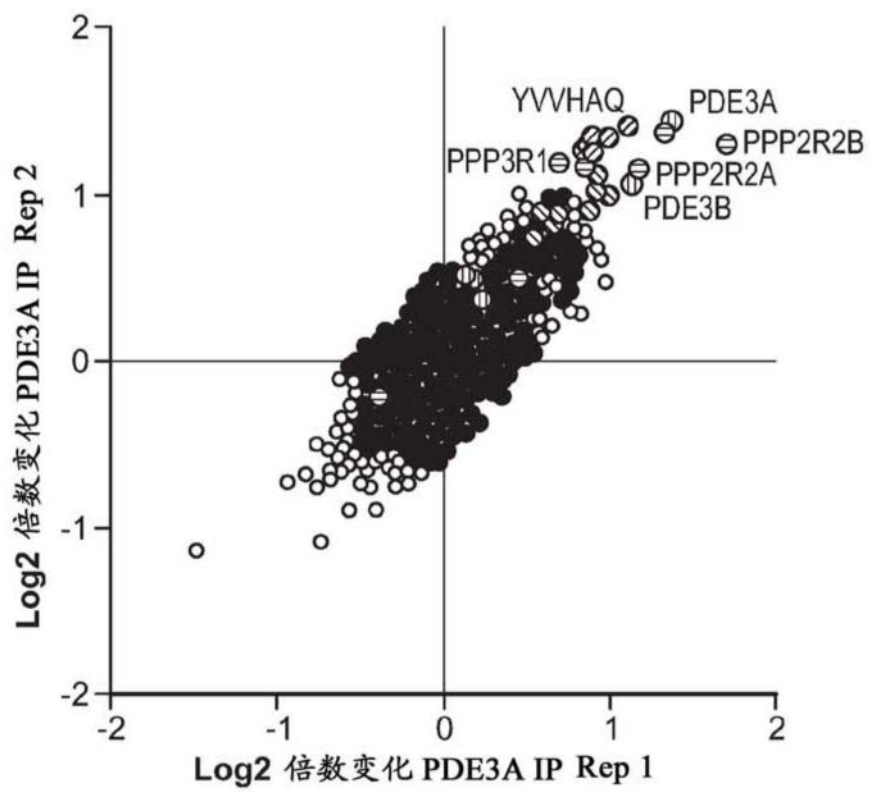


图13B

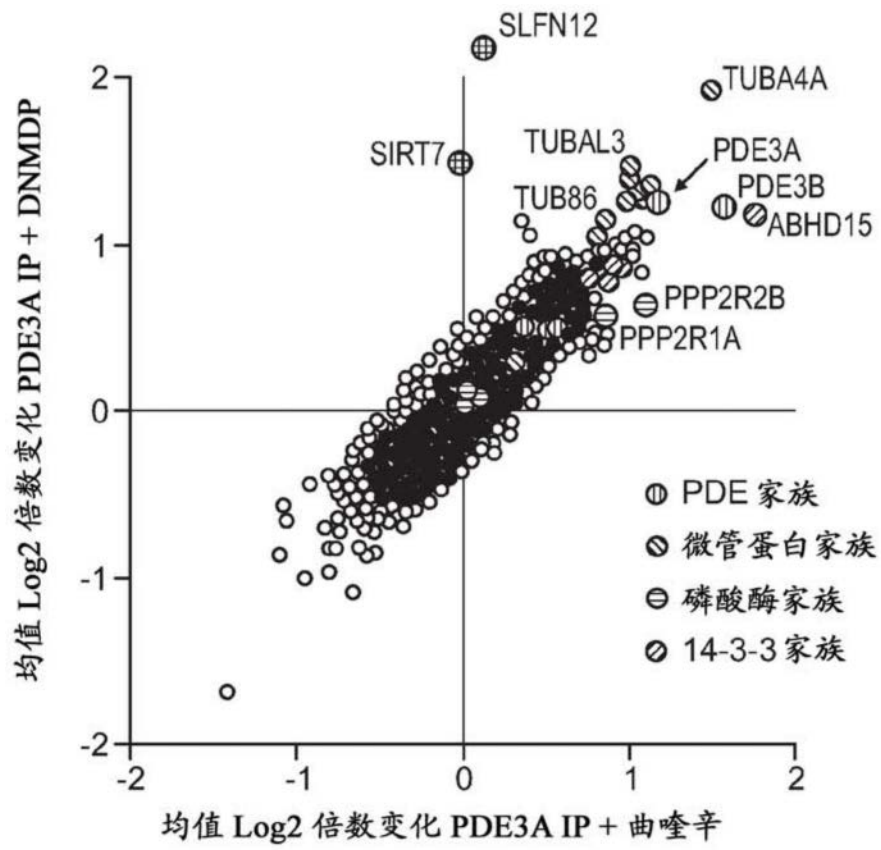


图13C

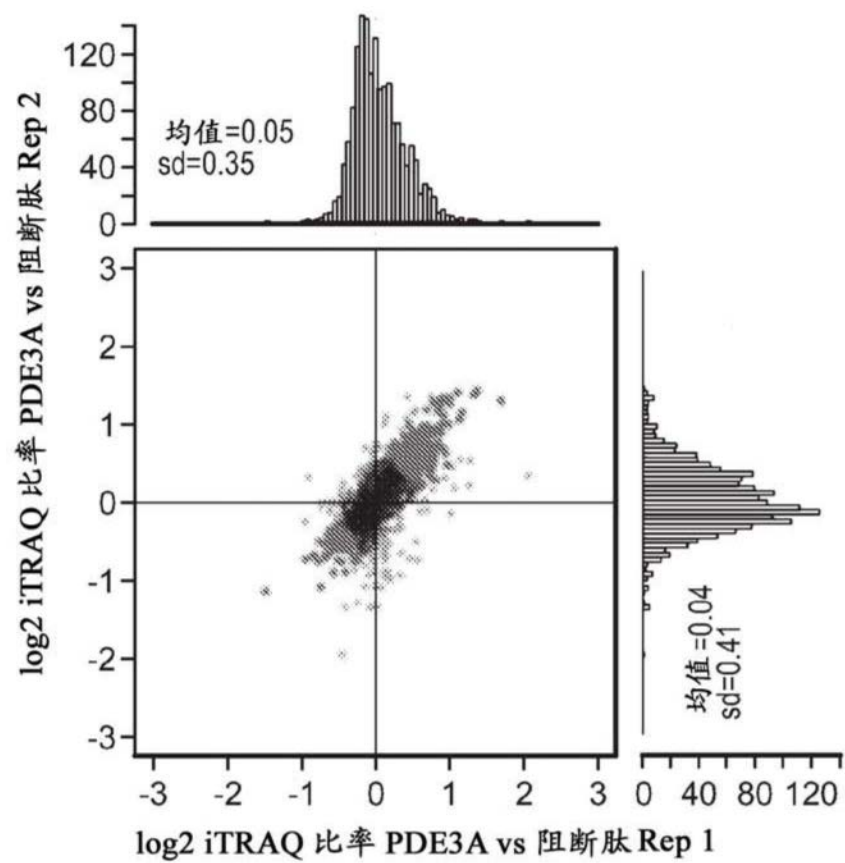


图14A

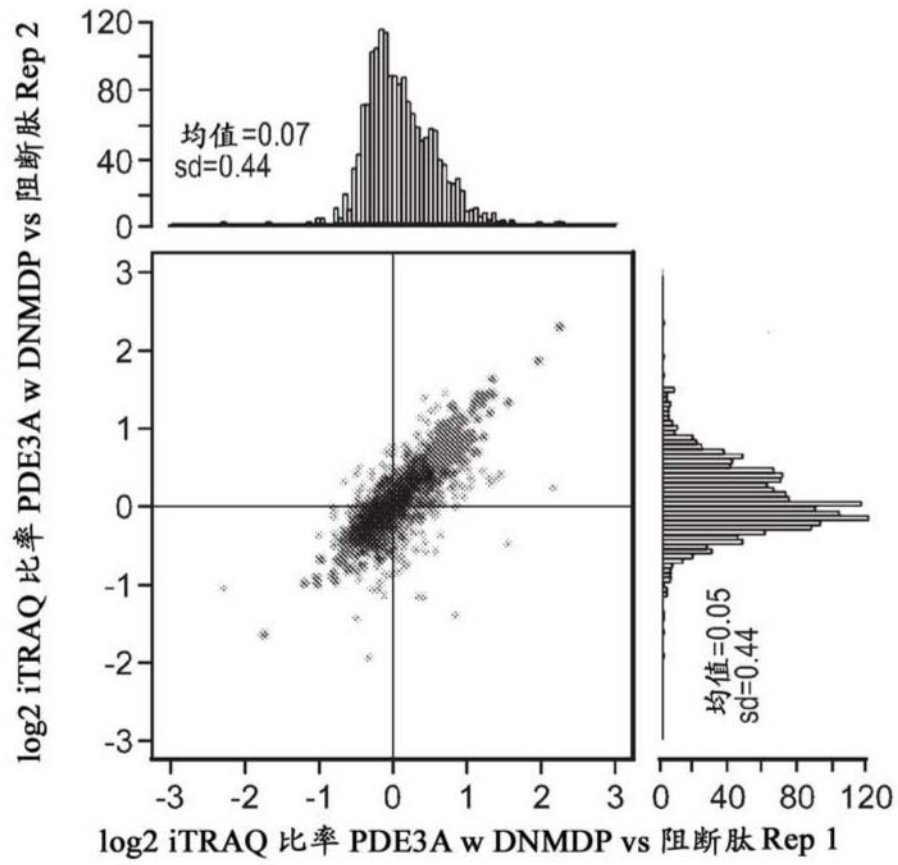


图14B

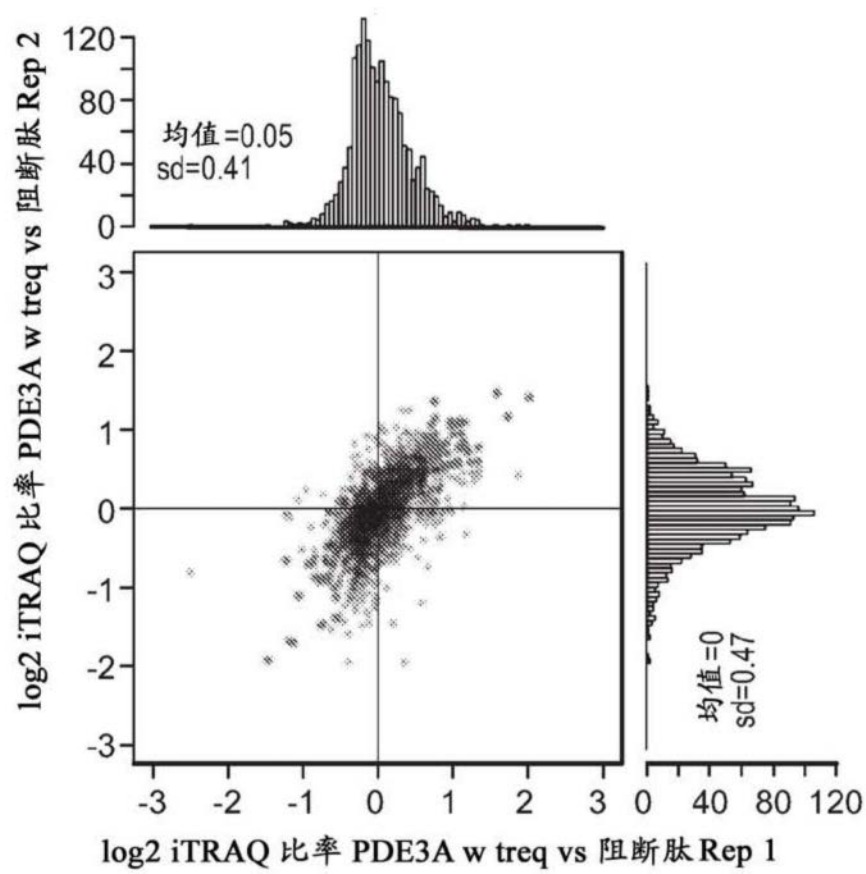


图14C

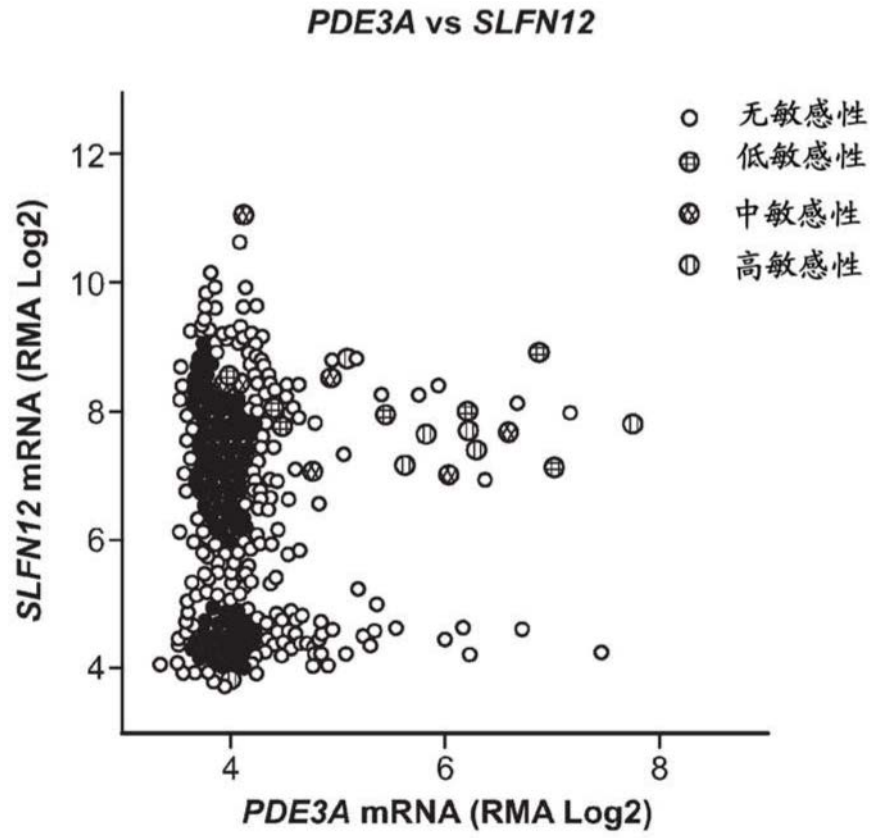


图15A

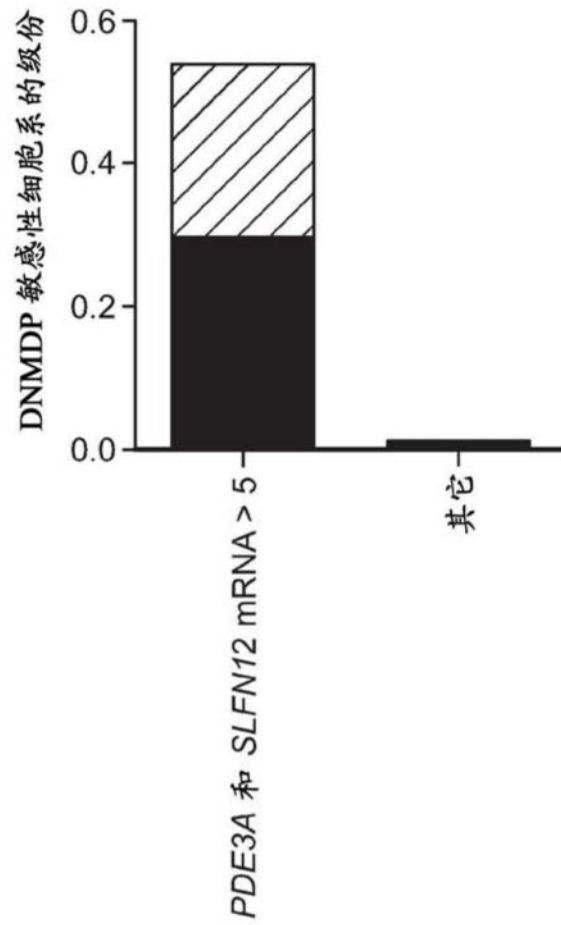


图15B

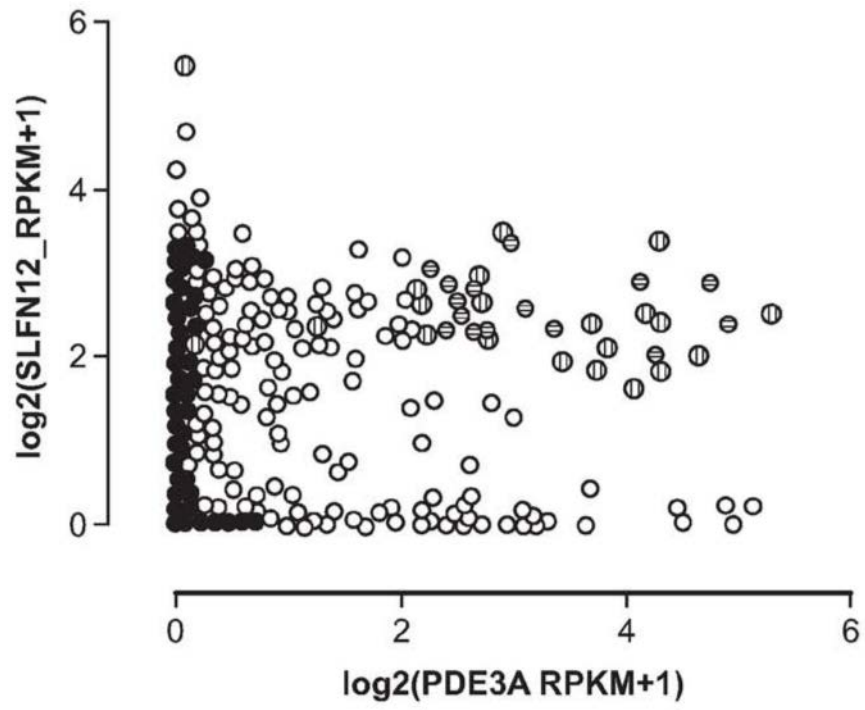


图15C

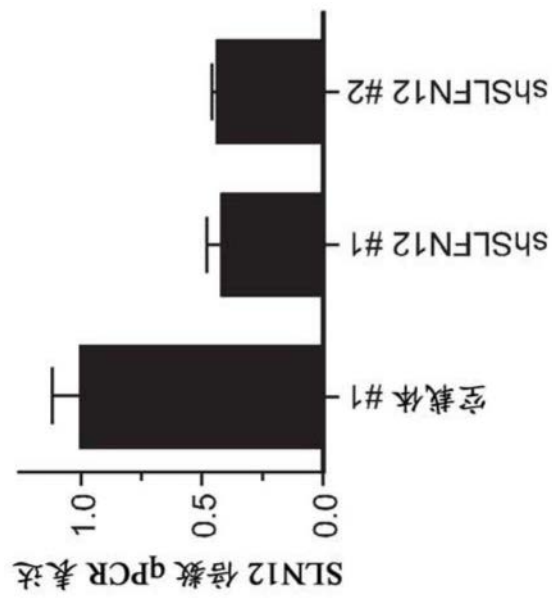


图15D

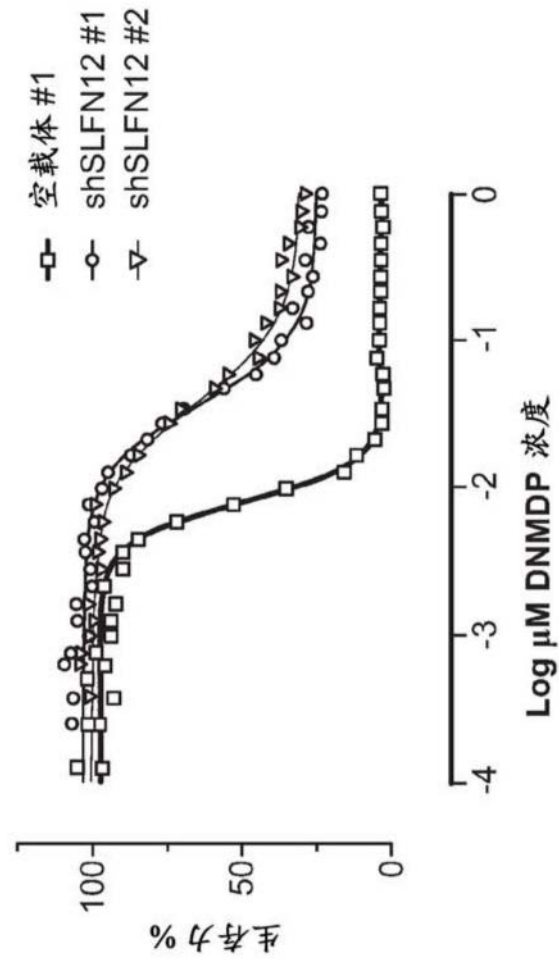


图15E

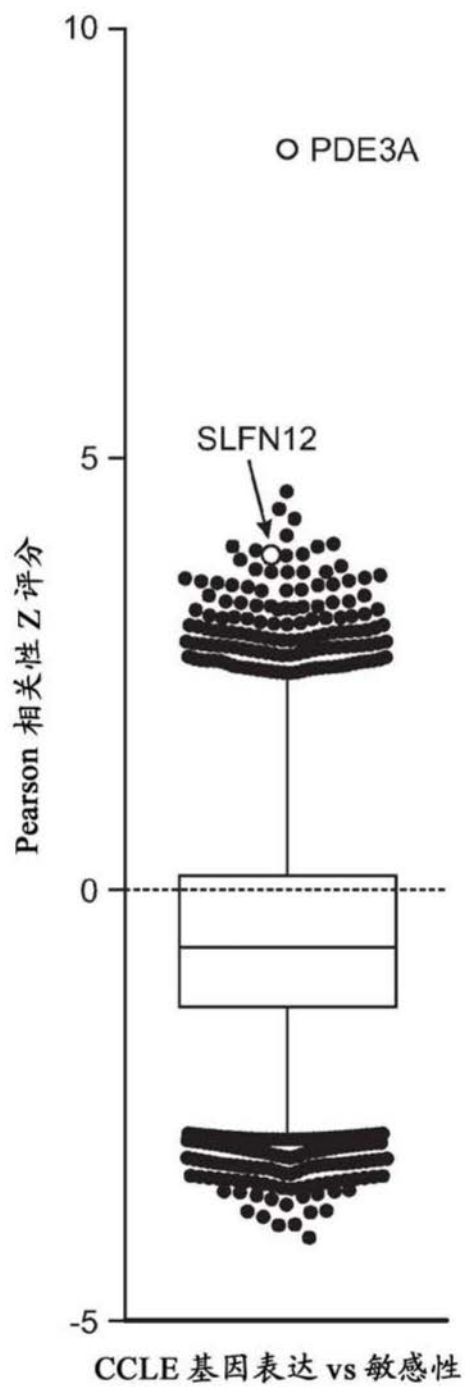


图16A

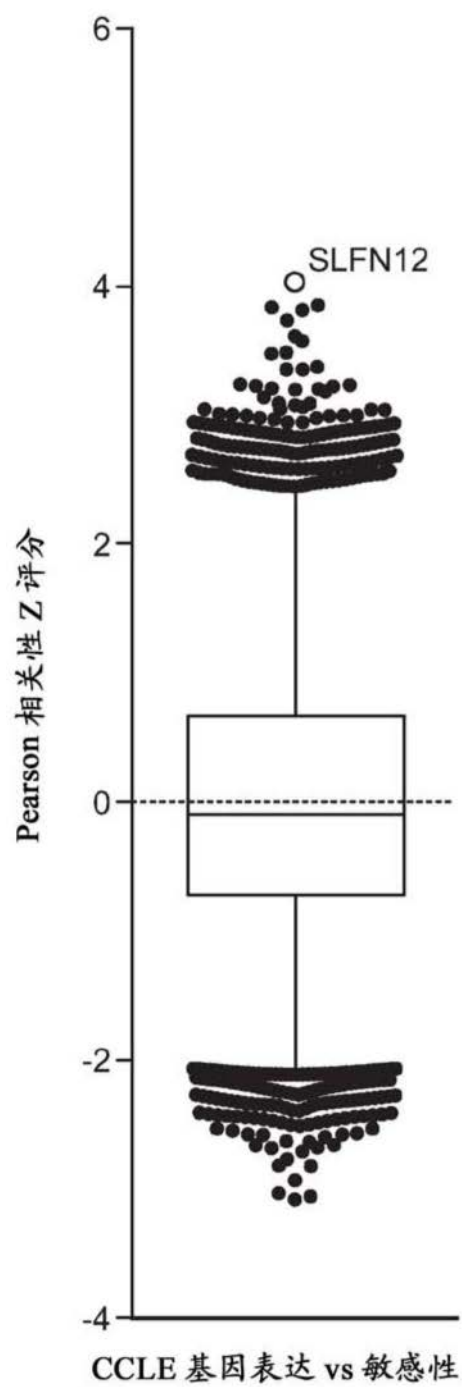


图16B

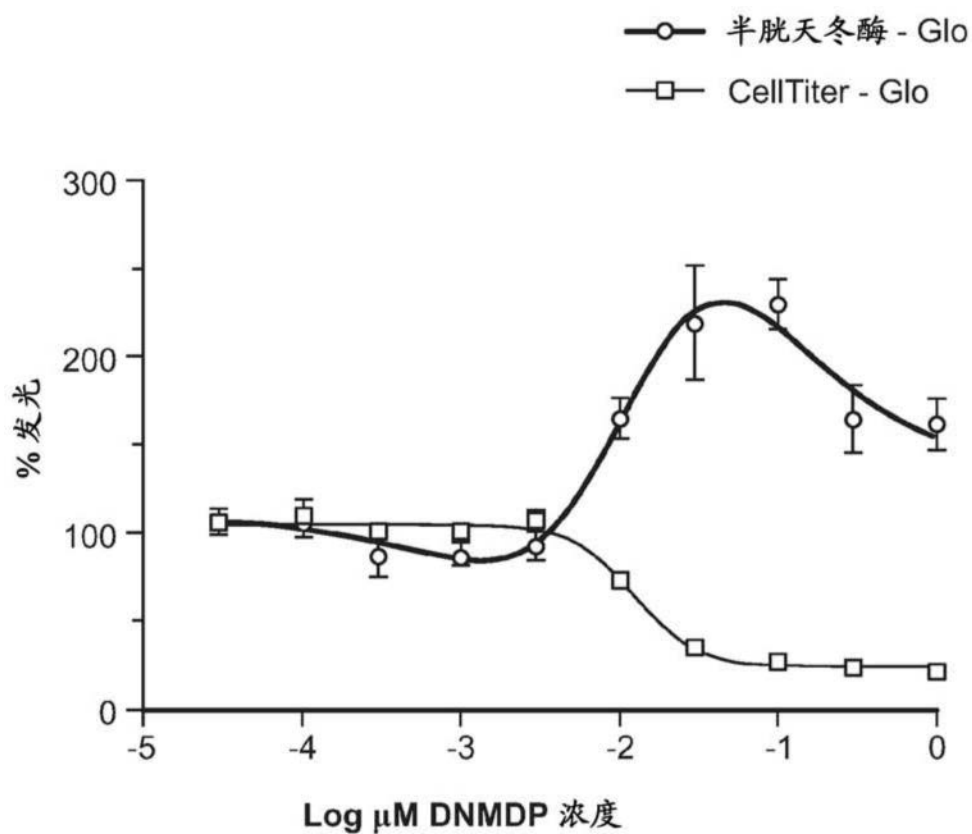


图17A

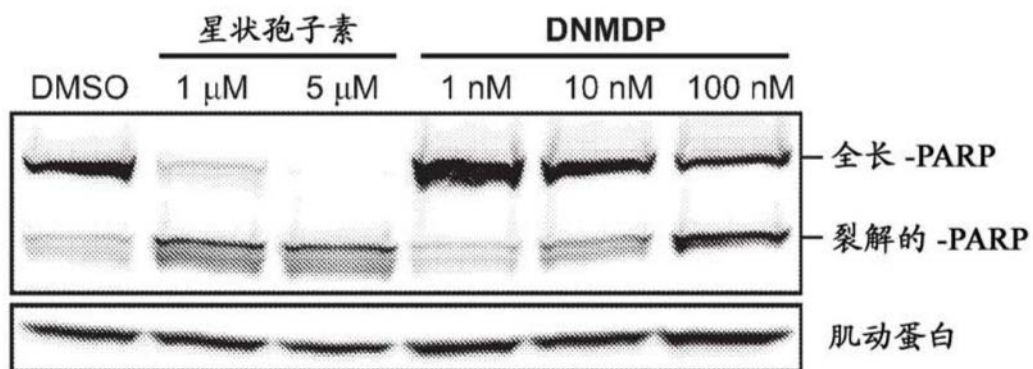


图17B

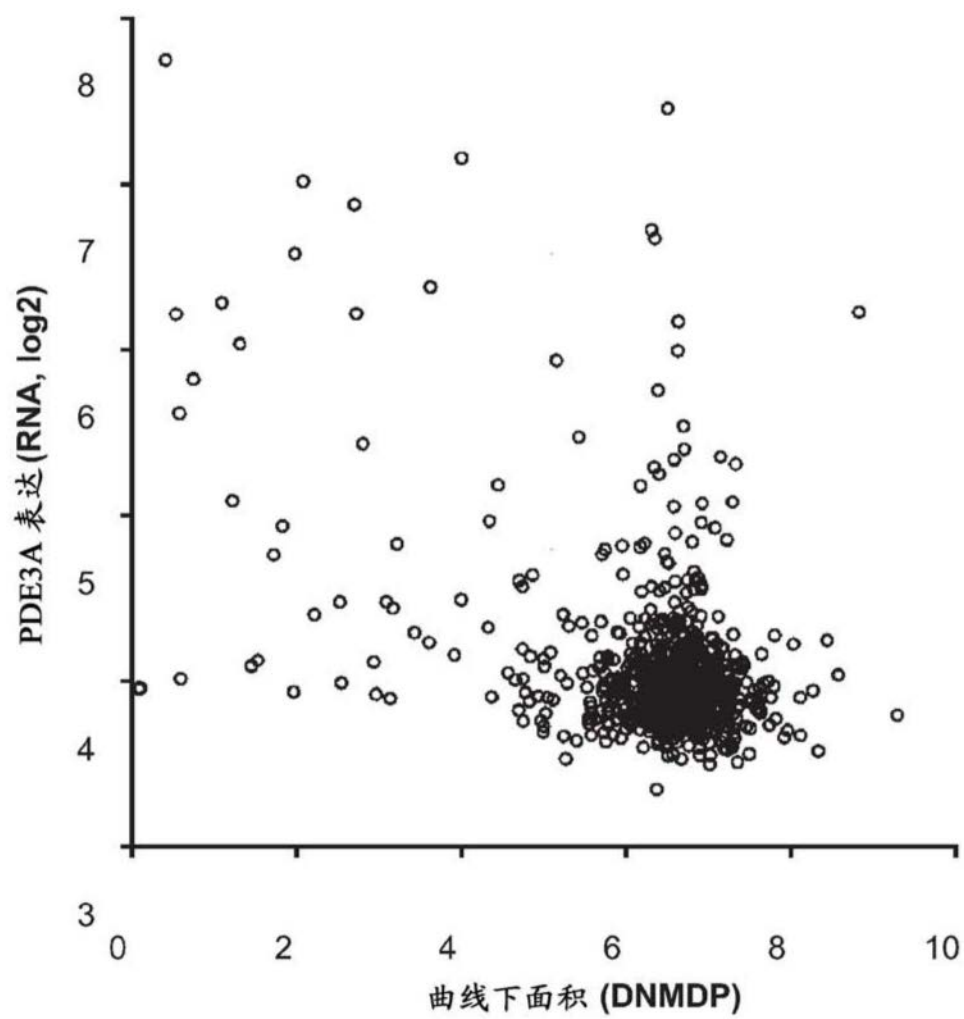


图18

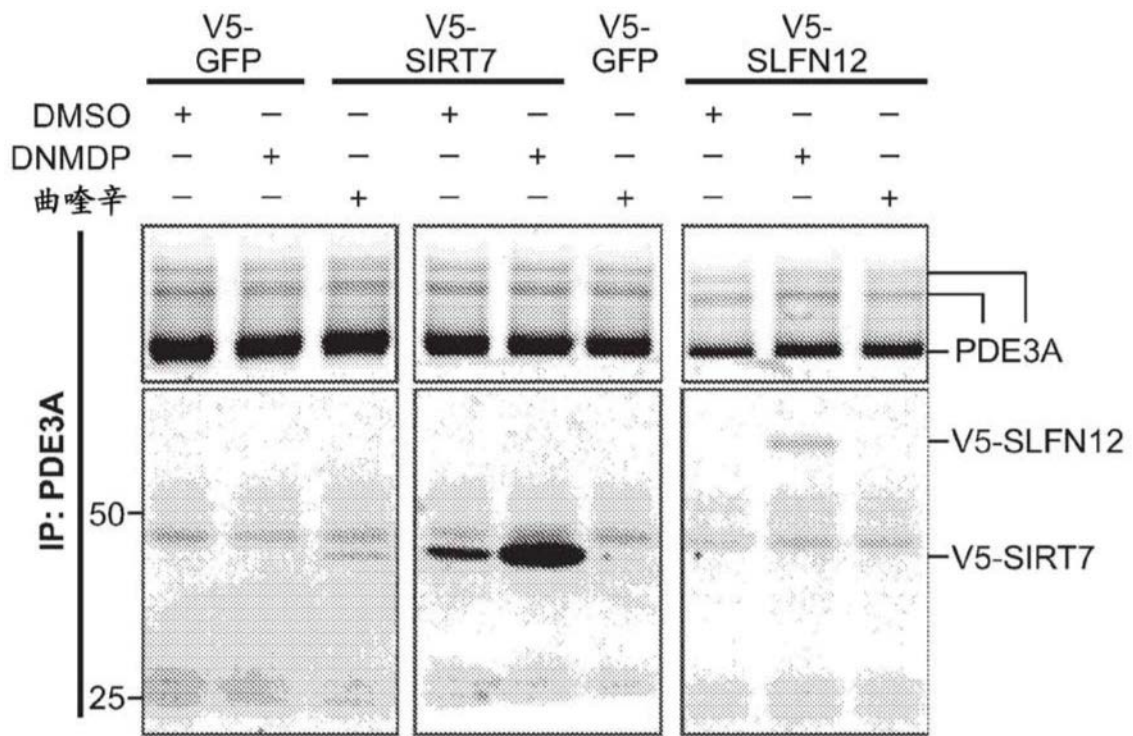


图19

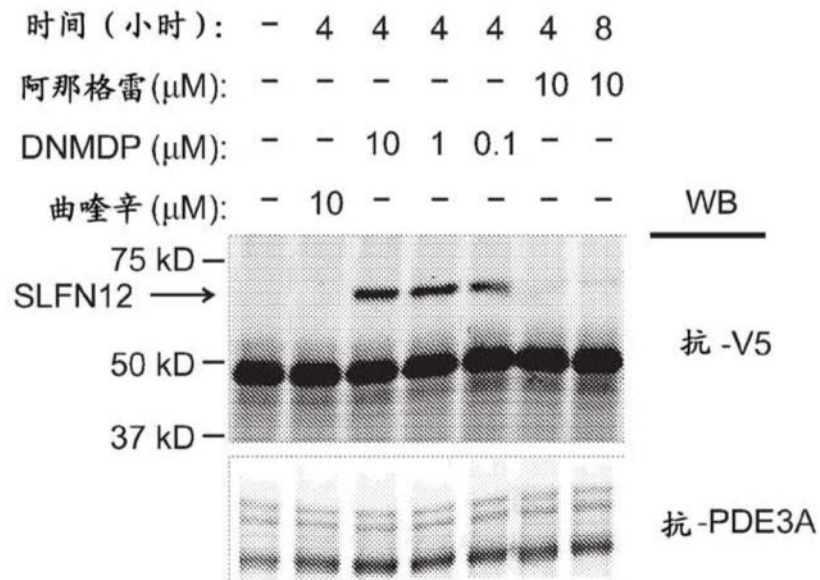


图20

| HeLa 亲本品系 | | | HeLa 抗性品系 | |
|------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|
| 基因_名称 | Hela_FPKM | Hela-P2_FPKM | Hela-Res1_FPKM | Hela-Res2_FPKM |
| SLFN12 | 12.51 | 12.63 | 0.15 | 0 |
| PDE3A | 56.24 | 62.15 | 53.46 | 54.91 |
| H2122 亲本品系 | | | H2122 抗性品系 | |
| 基因_名称 | H2122-P1_FPKM | H2122-P2_FPKM | H2122-Res1_FPKM | H2122-Res2_FPKM |
| SLFN12 | 4.69 | 5.15 | 0.33 | 0.46 |
| PDE3A | 25.52 | 25.24 | 15.82 | 15.13 |

图21

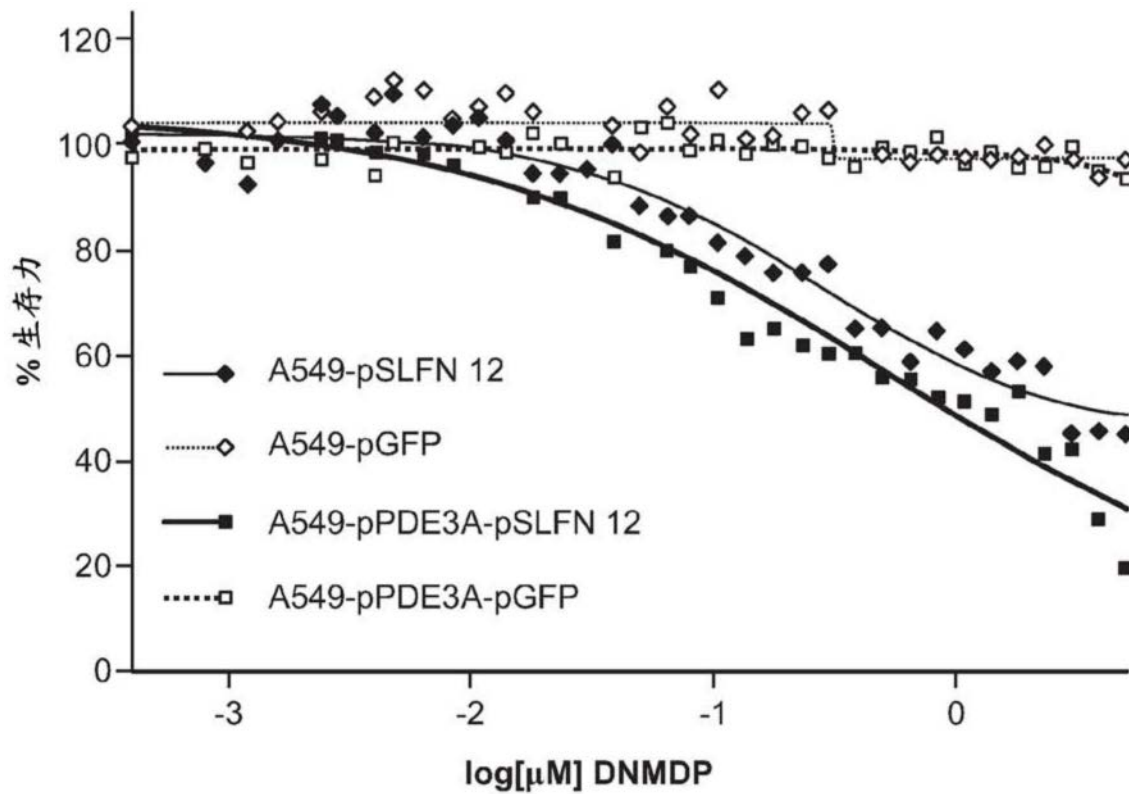


图22

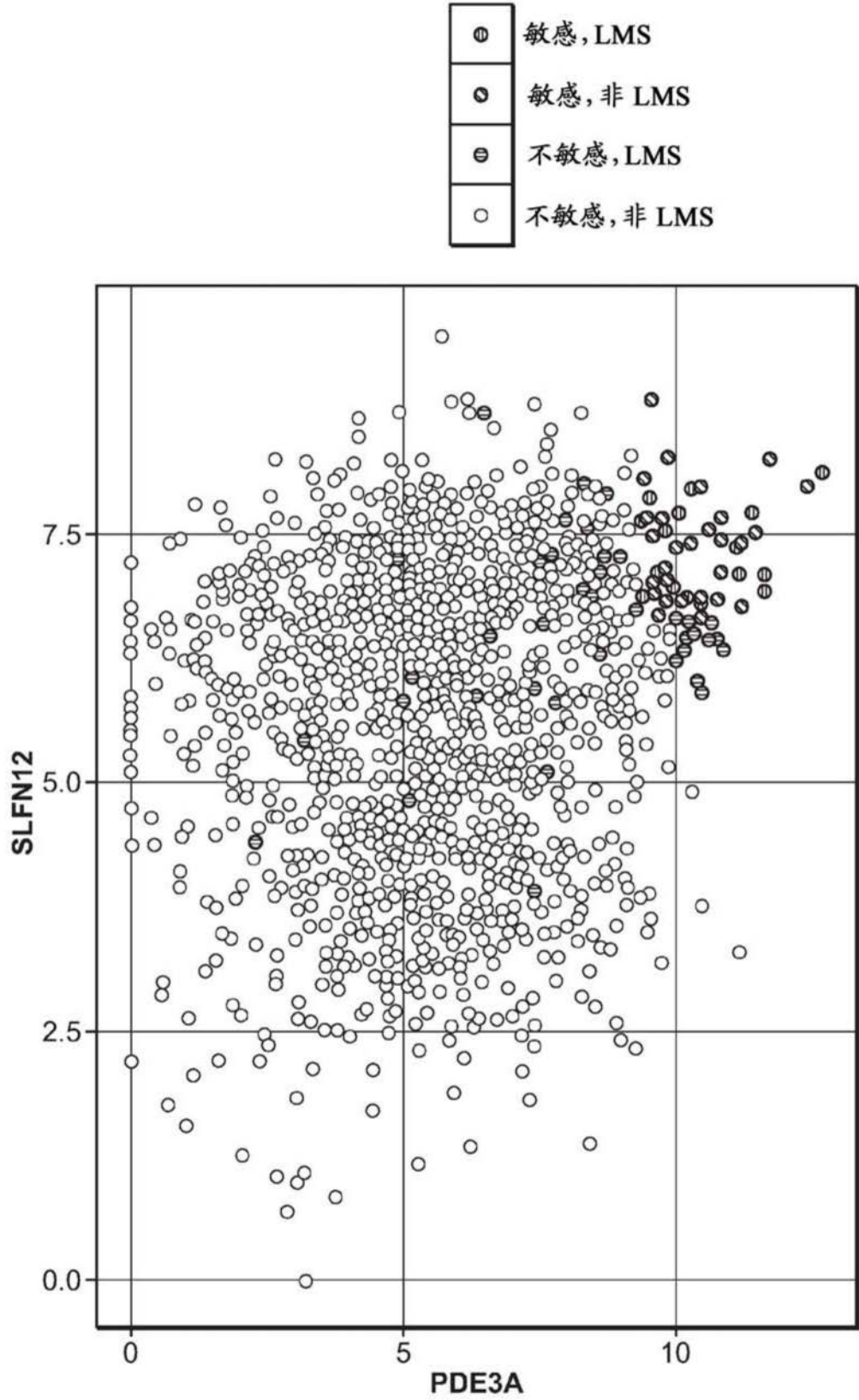


图23