



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113908253 A

(43) 申请公布日 2022.01.11

(21) 申请号 202111206782.0

(22) 申请日 2015.03.26

(30) 优先权数据

61/970,853 2014.03.26 US

(62) 分案原申请数据

201580021626.3 2015.03.26

(71) 申请人 儿童医学中心公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 伦道夫·S·瓦特尼克

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

代理人 彭鲲鹏 刘振佳

(51) Int.Cl.

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书28页

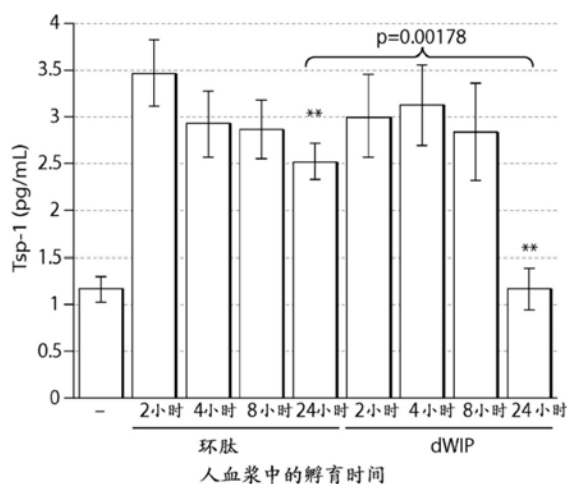
序列表9页 附图20页

(54) 发明名称

环状鞘脂激活蛋白原肽及其用途

(57) 摘要

本发明涉及环状鞘脂激活蛋白原肽及其用途。本文提供了环状鞘脂激活蛋白原肽及其组合物和用途。示例性用途包括在治疗癌症或治疗炎性疾病或病症中的用途。



1. 用于治疗患有癌症的对象的方法,所述方法包括:
对患有癌症的对象施用有效量的环肽以治疗所述癌症,其中所述环肽的氨基酸序列为
DWLPK (SEQ ID NO:1)。

环状鞘脂激活蛋白原肽及其用途

[0001] 本申请是申请号为201580021626.3的中国专利申请的分案申请,原申请是2015年3月26日提交的PCT国际申请PCT/US2015/022745于2016年10月31日进入中国国家阶段的申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请根据35 U.S.C.§119(e)要求于2014年3月26日提交的美国临时申请编号61/970,853的权益,其通过引用整体并入本文。

[0004] 政府资助

[0005] 本发明是在由美国国立卫生研究院授予的R01CA135417的政府支持下完成的。政府对本发明享有某些权利。

技术领域

[0006] 本发明涉及环状鞘脂激活蛋白原肽及其用途。

背景技术

[0007] 癌症仍然是主要的公共健康问题。例如,在2008年估计有760万由癌症导致的死亡发生。许多癌症仍然是无法治疗的或治疗不理想,仅部分有效或者具有如毒性的不期望的副作用。

[0008] 炎症疾病和病症也是主要的公共健康问题并且也具有与癌症相似的治疗问题。

发明内容

[0009] 本公开内容的一些方面部分地基于这样的发现,环状鞘脂激活蛋白原(prosaposin)肽(如具有序列DWLPK (SEQ ID NO:1)的环肽)对于治疗癌症的动物模型比线性鞘脂激活蛋白原肽更稳定也更有效。出人意料的是,相比于在3位具有甘氨酸替换的环肽(即DWGPK,SEQ ID NO:2),发现环状DWLPK (SEQ ID NO:1)肽在体外更有效地刺激血小板反应蛋白-1(thrombospondin-1,Tsp-1)。该数据是预料不到的,因为用线性鞘脂激活蛋白原肽获得了相反的结果,其中发现线性DWGPK (SEQ ID NO:2)具有比线性DWLPK (SEQ ID NO:1)更好的活性。另外,发现环状DWLPK (SEQ ID NO:1)肽不会引起对用所述肽处理的小鼠之肝或脾的毒性。

[0010] 本公开内容的另一些方面部分地基于这样的发现,环状DWLPK (SEQ ID NO:1)对于治疗克罗恩病的小鼠模型是有效的。

[0011] 因此,本公开内容的一些方面涉及环状鞘脂激活蛋白原肽(例如 DWLPK (SEQ ID NO:1)),以及组合物和利用该肽的方法。

[0012] 本公开内容的一些方面涉及用于治疗患有癌症的对象的方法,所述方法包括对患有癌症的对象施用有效量的环肽以治疗所述癌症,其中所述环肽的氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中,所述癌症是卵巢癌或黑素瘤。

[0013] 另一些方面涉及用于治疗癌症的组合物,所述组合物包含环肽,其中所述环肽的

氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中,所述癌症是卵巢癌或黑素瘤。

[0014] 本公开内容的另一些方面涉及用于治疗患有炎症性疾病或病症的对象的方法,所述方法包括对患有炎症性疾病或病症的对象施用有效量的环肽以治疗所述炎症性疾病或病症,其中所述环肽的氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中,所述炎症性疾病或病症是类风湿性关节炎、年龄相关的黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD)、克罗恩病、银屑病或动脉粥样硬化。在一些实施方案中,所述炎症性疾病或病症是克罗恩病。

[0015] 本公开内容的另一些方面涉及用于治疗炎症性疾病或病症的组合物,所述组合物包含环肽,其中所述环肽的氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中,所述炎症性疾病或病症是类风湿性关节炎、年龄相关的黄斑变性 (AMD)、克罗恩病、银屑病或动脉粥样硬化。在一些实施方案中,所述炎症性疾病或病症是克罗恩病。

[0016] 本公开内容的另一些方面涉及用于刺激血小板反应蛋白-1 (Tsp-1) 表达的方法,所述方法包括:对此需要的对象施用有效量的环肽以刺激 Tsp-1表达,其中所述环肽的氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)。

[0017] 本公开内容的另一些方面涉及环状Psap肽。在一些实施方案中,所述环状Psap肽包含氨基酸序列DWLPK (SEQ ID NO:1)、dWLPK (SEQ ID NO:3,小写的d表示D-氨基酸)、DWGPK (SEQ ID NO:2)或dWGPK (SEQ ID NO:4,小写的d表示D-氨基酸)。在一些实施方案中,所述环状Psap肽的氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)、dWLPK (SEQ ID NO:3,小写的d表示D-氨基酸)、DWGPK (SEQ ID NO:2)或dWGPK (SEQ ID NO:4,小写的d表示D-氨基酸)。在一些实施方案中,所述环状Psap肽包含氨基酸序列DWLPK (SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中,所述环状Psap肽的氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)。

[0018] 本公开内容的另一些方面涉及包含如本文中所描述的环状Psap肽的组合物。在一些实施方案中,所述组合物为药物组合物。在一些实施方案中,所述组合物包含如本文中所描述的环状Psap肽和可药用载体。

[0019] 本公开内容的一个或更多个实施方案的细节在下文的描述中示出。本公开内容的其他特征或优势将通过下文的附图和若干实施方案的详细描述并且还通过附加的权利要求而变得明显。

附图说明

[0020] 下文的附图构成本说明书的一部分并且将其包括以另外证明本公开内容的某些方面,可通过组合本文所示的具体实施方案的详细描述参照一个或更多个这些附图对其更好地理解。

[0021] 图1为环状DWLPK (SEQ ID NO:1)的示意图。

[0022] 图2为Western印迹的照片,其示出了在细胞中响应于不同环状或线性肽 (SEQ ID NO:1、3、2和4,分别为从上至下)的血小板反应蛋白-1 (Tsp-1)活化的水平。

[0023] 图3为示出了在人血浆中孵育后环状DWLPK (SEQ ID NO:1)或线性dWLP (SEQ ID NO:5)活化Tsp-1的能力的图。

[0024] 图4为示出了用环肽或线性肽处理的小鼠中的肿瘤体积的图。

[0025] 图5为示出了用环肽或线性肽处理的小鼠中的肿瘤体积的图。

[0026] 图6为示出了在用环肽或对照处理之后注射入小鼠的表达萤光素酶之肿瘤细胞的

总通量的图。

[0027] 图7为一系列照片,其示出了Tsp-1在表达F4/80的巨噬细胞中表达。

[0028] 图8为一系列照片,其示出了用对照或环状DWLPK (SEQ ID NO:1) 注射的小鼠中肝和脾样品的组织学。

[0029] 图9为示出了在用对照处理、无处理或用环状DWLPK (SEQ ID NO: 1) 处理的葡聚糖硫酸钠 (Dextran Sodium Sulfate, DSS) 诱导的克罗恩病小鼠模型中的MPO酶促活性 (嗜中性粒细胞浸润到结肠粘膜中的指标) 的图。

[0030] 图10为示出了在用对照处理、无处理或用环状DWLPK (SEQ ID NO: 1) 处理的克罗恩病小鼠模型中的百分比体重的图。

[0031] 图11为一系列照片,其示出了在用对照处理、无处理或用环状 DWLPK (SEQ ID NO: 1) 处理的克罗恩病小鼠模型中肠的组织学和巨噬细胞定位。

[0032] 图12A-12E示出了Tsp-1的刺激及其对卵巢癌细胞生长和存活的作用。图12A为在WI-38肺成纤维细胞中的Tsp-1和 β -肌动蛋白的western 印迹,对WI-38肺成纤维细胞无处理 (-) 或用天然DWLP (SEQ ID NO: 6)、L-氨基酸、鞘脂激活蛋白原肽 (WT)、dWLP (SEQ ID NO: 5, 小写d和l表示D-氨基酸) 鞘脂激活蛋白原肽 (d1, 3) 或DwLP (SEQ ID NO: 7, 小写w和p表示D-氨基酸) 鞘脂激活蛋白原肽 (d2, 4) 处理;图12B 为从如下处理的小鼠收获的小鼠肺组织中的Tsp-1和 β -肌动蛋白的 western印迹:用转移性前列腺癌细胞条件化培养基单独处理 (-) 或将其与10和30mg/kg/天剂量的DWLP (SEQ ID NO:6) 鞘脂激活蛋白原肽 (WT) 或dWLP (SEQ ID NO:5, 小写d和l表示D-氨基酸) 鞘脂激活蛋白原肽 (d1, 3肽) 组合地处理3天;图12C 为8个来源于患者的卵巢癌细胞系中CD36和 β -肌动蛋白的western印迹;图12D为通过用1 μ M重组人Tsp-1 (rhTsp-1) 处理24、48和72小时的来源于患者的卵巢癌细胞系的Wst-1测定测量的细胞数目的图;并且图12E为用1 μ M重组人 Tsp-1 (rhTsp-1) 处理48小时的来源于患者的卵巢癌细胞系的膜联蛋白V 和PI的FACS分析。

[0033] 图13A-13E示出了d-氨基酸鞘脂激活蛋白原对转移性卵巢癌的PDX 模型的作用。图13A为转移性PDX卵巢肿瘤的相对萤光素酶强度的图,用盐水 (对照)、4mg/kg/QOD的顺铂 (顺铂) 和dWLP (SEQ ID NO:5) 鞘脂激活蛋白原肽 (40mg/kg QD) 处理所述肿瘤;图13B示出了2个对照处理的小鼠和2个以dWLP (SEQ ID NO:5) 鞘脂激活蛋白原肽处理的小鼠在第17天 (处理第0天) 和第48天 (处理第31天) 的萤光素酶成像,每个图像在其右侧带有示出为 $\times 10^8$ 辐射单位 (p/秒/cm²/sr) 的发光标尺,该标尺上的最小值为0.05e6且该标尺上的最大值为1.00e8;图13C 示出了用盐水 (对照) 或dWLP (SEQ ID NO:5) 鞘脂激活蛋白原肽 (肽) 处理的具有转移性PDX卵巢肿瘤的小鼠的肝照片;图13D示出了用盐水 (对照) 或dWLP (SEQ ID NO: 5) 鞘脂激活蛋白原肽 (肽) 处理的具有转移性PDX卵巢肿瘤的小鼠肝的H&E染色。右图为5X放大且左图为 20X放大;并且图13E为小鼠对照和用dWLP (SEQ ID NO:5) 鞘脂激活蛋白原肽 (肽) 处理的具有转移性PDX卵巢肿瘤的小鼠48天后的腹膜液中GR1⁺/Cd11b⁺细胞的FACS分析。

[0034] 图14A-14F示出了环状鞘脂激活蛋白原肽对Tsp-1表达和转移性卵巢癌的PDX模型的作用。图14A为在WI-38肺成纤维细胞中的Tsp-1和 β -肌动蛋白的western印迹,对WI-38肺成纤维细胞无处理 (-)、用dWLP (SEQ ID NO:5) 鞘脂激活蛋白原肽 (d1, 3, “L”) 或用环状 DWLPK (SEQ ID NO:1) 鞘脂激活蛋白原肽 (“C”) 处理;图14B示出了在WI-38肺成纤维细胞中

Tsp-1表达的ELISA,在人血浆中在37℃下孵育达24小时后对WI-38肺成纤维细胞无处理(-)、用dW1P(SEQ ID NO:5)鞘脂激活蛋白原肽(d1,3)或用环状DWLPK(SEQ ID NO:1)鞘脂激活蛋白原肽处理;图14C为转移性PDX卵巢肿瘤的相对萤光素酶强度的图,用盐水(对照)或环状DWLPK(SEQ ID NO:1)鞘脂激活蛋白原肽(10mg/kg QD)处理所述肿瘤;图14D为在盐水(对照)处理的小鼠和环状DWLPK(SEQ ID NO:1)鞘脂激活蛋白原肽(肽)处理的小鼠中的平均转移性病灶的图;图14E为在对照处理的小鼠和环状DWLPK(SEQ ID NO:1)鞘脂激活蛋白原肽(肽)处理的小鼠的转移性病灶中Gr1和Tsp-1表达的免疫荧光染色;并且图14F示出了在对照和环状DWLPK(SEQ ID NO:1)鞘脂激活蛋白原肽(肽)处理的小鼠中转移性病灶的Tsp-1表达的免疫组化(最左图)和TUNEL与DAPI的免疫荧光染色。

[0035] 图15A-N示出了人卵巢癌患者的TMA中CD36和鞘脂激活蛋白原的表达。图15A-15C示出了正常人卵巢中的CD36表达(放大:A=5x,B=10x,C=20x);图15D-15F示出了原发性人卵巢肿瘤中的CD36表达(放大:A=5x,B=10x,C=20x);图15G-15I示出了人卵巢癌转移中的CD36表达(放大:A=5x,B=10x,C=20x);图15J-15L示出了人卵巢癌淋巴结转移中的CD36表达(放大:A=5x,B=10x,C=20x);图15M为正常人卵巢、原发性人卵巢肿瘤、人卵巢癌转移和人卵巢癌淋巴结转移的CD36染色指标的图;并且图15N为正常人卵巢、原发性人卵巢肿瘤、人卵巢癌转移和人卵巢癌淋巴结转移的鞘脂激活蛋白原(prosaposin,Psap)染色指标的图。

[0036] 图16示出psap肽对体重无影响。图17示出了表达Tsp-1受体的胰腺癌细胞。

[0037] 图18示出环状鞘脂激活蛋白原肽DWLPK(SEQ ID NO:1)具有相比于线性肽约2倍强度的活性。

[0038] 图19示出环状鞘脂激活蛋白原肽DWLPK(SEQ ID NO:1)具有显著的针对胰腺癌的抗肿瘤活性。

[0039] 图20示出环状Psap肽DWLPK(SEQ ID NO:1)使转移的胰腺癌消退并抑制转移。

具体实施方式

[0040] 原本来源于鞘脂激活蛋白A之片段的鞘脂激活蛋白原肽(本文中称为Psap肽)先前表现为当使用其线性形式时对治疗多种类型的癌症有效(见例如,PCT公开W02009002931、W0/2011/084685和 W0/2013/096868,以及美国专利申请12/640,788和13/516,511,其所有均通过引用整体并入本文)。

[0041] 如本文所描述的,已经发现环状Psap肽,特别是环状DWLPK(SEQ ID NO:1),出乎意料地比线性Psap肽更稳定且更有效。另外,发现环状 DWLPK(SEQ ID NO:1)对肝或脾不具有毒性作用。此外,发现环状 DWLPK(SEQ ID NO:1)具有比经氨基酸替换的肽的其他环状形式(例如,DWGPK,SEQ ID NO:2)更好的活性。该发现是出人意料的,因为曾发现经替换的肽的线性形式比DWLPK(SEQ ID NO:1)的线性形式更有活性。

[0042] 还如本文所描述的,已经发现环状Psap肽DWLPK(SEQ ID NO:1)在克罗恩病小鼠模型中有效。不希望受理论束缚,相信是该环状Psap肽活化或增强Tsp-1表达并且该Tsp-1表达减少了与克罗恩病相关的炎症。Tsp-1先前已表现出响应于炎症而分泌,促进炎症过程的消散并辅助受损细胞的吞噬作用(参见例如,Lopez-Dee等Thrombospondin-1: Multiple Paths to Inflammation.(2011) Mediators Of Inflammation; Vol.2011;文章

ID 296069)。因此,由于环状Psap肽在作为示例性炎症疾病的克罗恩病模型中展现了治疗效果,相信该环状Psap肽也将对治疗其他炎症疾病(如类风湿性关节炎和银屑病)以及其他涉及炎症的疾病例如炎症病症(如动脉粥样硬化和年龄相关的黄斑变性(AMD))有效。

[0043] 因此,本公开内容的一些方面涉及环状Psap肽,及其在用于治疗疾病(如癌症和炎症病症或疾病以及其他涉及炎症的疾病)的组合物和方法中的用途。

[0044] 环状Psap肽

[0045] 鞘脂激活蛋白原(Psap)是由约524-527个氨基酸构成的鞘脂激活蛋白前体蛋白,其包含16个氨基酸的信号肽。全长前体多肽进行共翻译的糖基化和在内质网与高尔基体系统中的修饰以产生70-72kDa的前体蛋白质。在转运至溶酶体后,组织蛋白酶D参与其蛋白水解过程以产生35至53kDa的中间分子形式并且之后产生13-kDa的糖蛋白并最终产生成熟的8-11kDa的部分糖基化形式的单一鞘脂激活蛋白分子(O'Brien J.S.,和 Kishimoto Y, The FASEB J.,5:301-8,1991;Kishimoto Y.等,J.Lipid Res. 33:1255-67,1992)。鞘脂激活蛋白原被加工为4个切割产物:鞘脂激活蛋白A、B、C和D。Psap前蛋白原(preproprotein)同工型A、B和C的氨基酸序列和切割产物鞘脂激活蛋白A的氨基酸序列如下:

[0046] Psap前蛋白同工型A

MYALFLLASLLGAALAGPVLGLKECTRGSAVWCQNVKTASDCGAVKHCLQTVWNK
PTVKSLPCDICKDVVTAAGDMLKDNATEEEILVYLEKTCDWLKPNMSASCKEIVDSY
LPVILDIKGECSRPGEVCSALNLCESLQKHLAELNHQKQLESNKIPELDMTEVVAPFM
ANIPLLLYPQDGPRSKPQPKDNGDVCQDCIQMVTDIQTAVRTNSTFVQALVEHVKEEC
DRLGPGMADICKNYISQYSEIAIQMMMHHMQPKEICALVGFCDEVKEMPMQTLVPAKV
[0047] ASKNVIPALELVEPIKKHEVPAKSDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDAFDKM
CSKLPKSLSEECQEVVDYTGSSILSILLEEVSPELVCSMLHLCSGTRLPALTVHVTQPKD
GGFCEVCKKLVGYLDRNLEKNSTKQEILAALEKGCSFLPDYPYQKQCDQFVAEYEPVLI
EILVEVMDPSFVCLKIGACPSAHKPLLGTCKIWGSPSYWCQNTETAAQCNAVEHCKR
HVWN (SEQ ID NO: 9)

[0048] Psap前蛋白同工型B

MYALFLLASLLGAALAGPVLGLKECTRGSAVWCQNVKTASDCGAVKHCLQTVWNK
PTVKSLPCDICKDVVTAAGDMLKDNATEEEILVYLEKTCDWLKPNMSASCKEIVDSY

[0049] LPVILDIKGECSRPGEVCSALNLCESLQKHLAELNHQKQLESNKIPELDMTEVVAPFM
ANIPLLLYPQDGPRSKPQPKDNGDVCQDCIQMVTDIQTAVRTNSTFVQALVEHVKEEC
DRLGPGMADICKNYISQYSEIAIQMMMHHMQDQQPKEICALVGFCDEVKEMPMQTLVPAKV
ASKNVIPALELVEPIKKHEVPAKSDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDAFD

[0050] KMCSKLPKSLSEECQEVVDYTGSSILSILLEEVSPELVCSMLHLCSGTRLPALTVHVTQ
PKDGGFCEVCKKLVGYLDRNLEKNSTKQEILAALEKGCSFLPDYPYQKQCDQFVAEYE
PVLIEILVEVMDPSFVCLKIGACPSAHKPLLGTCKIWGSPSYWCQNTETAAQCNAVEH
CKRHVWN (SEQ ID NO: 10)

[0051] Psap前蛋白同工型C

MYALFLLASLLGAALAGPVLGLKECTRGSAVWCQNVKTASDCGAVKHCLQTVWNK
PTVKSLPCDICKDVVTAAGDMLKDNATEEEILVYLEKTCDWLKPNMSASCKEIVDSY
LPVILDIKGEMSRPGEVCSALNLCESLQKHLAELNHQKQLESNKIPELDMTEVVAPFM
ANIPLLLYPQDGPGRSKPQPKDNGDVCQDCIQMVTDIQTAVRTNSTFVQALVEHVKEEC
[0052] DRLGPGMADICKNYISQYSEIAIQMMMMDQKPKEICALVGFCDEVKEMPMQTLVPA
KVASKNVIPALELVEPIKKHEVPAKSDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDAFDK
MCSKLPKSLSEECQEVVDITYGSSILSILLEEVSPELVCSMLHLCSGTRLPALTVHVTQP
KDGGFCEVCKKLVGYLDRNLEKNSTKQEILAALEKGCFLPDYPYQKQCDQFVAEYEP
VLIEILVEVMDPSFVCLKIGACPSAHKPLLGTCKIWGPSYWCQNTETAAQCNAVEHC
KRHVWN (SEQ ID NO: 11)

[0053] 鞘脂激活蛋白A

SLPCDICKDVVTAAGDMLKDNATEEEILVYLEKTCDWLKPNMSASCKEIVDSYLPVI
[0054] LDIKGEMSRPGEVCSALNLCES (SEQ ID NO: 12)

[0055] 本公开内容的一些方面涉及环状Psap肽、包含环状Psap肽的组合物及其用途。在一些实施方案中,所述环状Psap肽包含氨基酸序列 DWLPK (SEQ ID NO:1)、dWLPK (SEQ ID NO:3,小写d表示D-氨基酸)、DWGPK (SEQ ID NO:2)或dWGPK (SEQ ID NO:4,小写d表示D-氨基酸)。在一些实施方案中,所述环状Psap肽的氨基酸序列为 DWLPK (SEQ ID NO:1)、dWLPK (SEQ ID NO:3,小写d表示D-氨基酸)、DWGPK (SEQ ID NO:2)或dWGPK (SEQ ID NO:4,小写d表示D-氨基酸)。在一些实施方案中,所述环状Psap肽包含氨基酸序列 DWLPK (SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中,所述环状Psap肽的氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)。

[0056] 在一些实施方案中,所述环肽的长度少于10个、少于9个、少于8个、少于7个、少于6个或5个氨基酸。在一些实施方案中,所述环肽长度为5-10、5-9、5-8、5-7或5-6个氨基酸。在一些实施方案中,所述环肽长度为5个氨基酸。

[0057] 本文所描述的肽可为化学合成的并通过本领域公知的生化方法分离,如使用t-Boc (叔丁氧羰基)或FMOC (9-芴甲氧羰基)保护基团的固相肽合成,其描述于由John Howl编辑的Methods in molecular biology Vol. 298中“Peptide synthesis and applications”和N.Leo Benoiton,2005,CRC Press,(ISBN-13:978-1574444544)的“Chemistry of Peptide Synthesis”以及P.Lloyd-Williams等,1997,CRC-Press,(ISBN-13:978-0849391422)的“Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins”。固相肽合成,由R.B.Merrifield开发,1963,J.Am.Chem.Soc.85(14):2149-2154,是允许肽和小蛋白质的化学合成的重要突破。

[0058] 环状Psap肽可使用任何本领域已知的方法合成。示例性的合成方法包括,但不限于,重组合成、液相合成、固相合成或化学连接(参见例如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook,等编,第三版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor, New York, 2001;Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel等编,John Wiley&Sons,Inc.,New York;Schnolzer,M.A.,P.; Jones,A.;Alewood,D.; Kent,S.B.H.(2007).“In Situ Neutralization in Boc-chemistry Solid Phase Peptide Synthesis”.Int.J.Peptide Res.Therap.13(1-2):31-

44; Albericio, F. (2000). *Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide* (第1版). Boca Raton: CRC Press. p.848; 和 Nilsson BL, Soellner MB, Raines RT (2005). "Chemical Synthesis of Proteins". *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34:91-118; 和美国专利号 4,749,742, 4,794,150, 5,552,471, 5,637,719, 6,001,966, 7,038,103, 7,094,943, 7,176,282, 以及 7,645,858, 其通过引用整体并入本文)。Psap肽和制造Psap肽的方法也是本领域已知的(参见例如, PCT公开W02009002931, W0/2011/084685和W0/2013/096868, 其所有均通过引用整体并入本文)。环肽是以肽键或其他共价键连接在一起形成环状结构的多肽链。环肽的设计和合成方法是本领域公知的(参见例如描述于美国专利号5,596,078; 5,990,273; 7,589,170和美国专利申请No. 20080287649)并有市售(参见例如由Selleck Chemicals, Abbiotec, Abgent, AnaSpec Global Peptide Services, LLC., INVITROGENTM和rPeptide, LLC或GenScript提供的环肽合成服务)。环肽可被环化, 例如头与尾(C末端与N末端)、头与侧链、侧链与尾或侧链与侧链(参见例如White等, *Contemporary strategies for peptide macrocyclization. Nature Chemistry* (2011); 3:509-524)。在肽的合成中或肽合成后可使用环化试剂以诱导环化, 如PyBOP(苯并三唑-1-基-氧基三吡咯并膦六氟磷酸盐)、BOP(苯并三唑-1-基-氧基-三-(二甲基氨基)膦六氟磷酸盐)、DIPEA(N,N-二异丙基乙胺)、DMTMM BF₄(4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉鎓四氟硼酸盐)或FDPP(五氟苯基二苯基次膦酸盐)、或其组合。一种示例性方法涉及在环收缩策略中使用光不稳定助剂(例如HnB(2-羟基-6-硝基苄基)), 以使五肽环化。在将该助剂引至肽的N末端上后, 将所述肽与BIP和DIPEA接触, 从而产生分子内0至N的酰基转移, 这进而产生环状五肽。然后可将光不稳定的助剂移除。

[0059] 在一些实施方案中, Psap肽可被修饰, 例如, 通过寡聚化或多聚化(例如二聚体、三聚体、多聚体等)、氨基酸残基或肽骨架的修饰、交联、缀合、聚乙二醇化、糖基化、乙酰化、磷酸化、与其它异源氨基酸序列(例如, 抗体或抗体Fc结构域、血清转铁蛋白或其部分、白蛋白或转甲状腺蛋白)融合, 或者基本上改变肽的稳定性、溶解性或其它性质同时基本上保持或增强治疗活性的其它修饰。缀合可为例如与聚合物缀合。合适的聚合物包括, 例如, 聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚氨基酸、二乙烯基醚马来酸酐、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、葡聚糖、包括硫酸葡聚糖的葡聚糖衍生物、聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇、肝素、肝素片段、多糖、纤维素和纤维素衍生物(包括甲基纤维素和羧甲基纤维素)、淀粉和淀粉衍生物、聚亚烷基二醇及其衍生物、聚亚烷基二醇及其衍生物的共聚物、聚乙烯基乙基醚和 α, β -聚[(2-羟乙基)-DL-天冬酰胺等, 或其混合物。缀合可通过接头, 例如肽或化学接头进行。修饰肽的方法是本领域公知的(参见例如, 美国专利号: 5,180,816, 5,596,078, 5,990,273, 5,766,897, 5,856,456, 6,423,685, 6,884,780, 7,610,156, 7,256,258, 7,589,170和 7,022,673, 以及PCT公开W0 2010/014616, 其内容通过引用并入本文)。

[0060] 在一些实施方案中, 环状Psap肽经功能修饰以增强稳定性。在一些实施方案中, 对Psap肽的化学修饰包括但不限于所包括的烷基、烷氧基、羟基烷基、烷氧基烷基、烷氧基羰基、烯基、炔基、环烷基、氨基、烷基氨基、氨基烷基、二烷基氨基、氨基二烷基、卤素、杂原子、碳环(carbocycle)、碳环基、碳环(carbocyclo)、碳环的(carbocyclic)、芳基、芳烷基、芳烷氧基、芳氧基烷基、杂环(heterocycle)、杂环基、杂环的(heterocyclic)、杂芳基和/或脂族基团。

[0061] 在一些实施方案中,环肽与至少一个治疗分子融合/缀合。

[0062] 在一些实施方案中,本文考虑了由一个或更多个D-氨基酸替换类似的L-氨基酸得到的环状Psap肽的氨基酸替换变体。在一些实施方案中,存在一个D氨基酸替换。在一些实施方案中,存在2个或更多个D氨基酸替换。在一些实施方案中,存在3、4或5个D氨基酸替换。在一些实施方案中,D氨基酸替换均匀地间隔,例如每隔一个氨基酸。在一些实施方案中,D-氨基酸取代是对于天冬氨酸(D)。关于氨基酸构型的L和D 规定不是指氨基酸本身的旋光性,而是指理论上可合成该氨基酸的甘油醛异构体的旋光性(D-甘油醛是右旋的;L-甘油醛是左旋的)。示例性的D 氨基酸替换变体包括环状dWLPK (SEQ ID NO:3,小写d表示D氨基酸)和环状dWGPK (SEQ ID NO:4,小写d表示D氨基酸)。

[0063] 本文所描述的环肽可被进一步修饰或衍生化。修饰或衍生的多肽通常基本上保留碱基多肽(修饰前/衍生前)的活性。修饰和衍生的实例是聚乙二醇化、糖基化、乙酰化、酰胺化和磷酸化。乙酰化(例如N-末端乙酰化)和酰胺化(例如C-末端酰胺化)的方法是本领域技术人员公知的。修饰、衍生物和多肽衍生化的方法描述于公开的国际申请W0 2010/014616中,其内容通过引用并入本文。

[0064] 在一些实施方案中,本文所述的环肽可以与其它分子缀合或以其它方式共价连接(例如,使用化学接头)。一种这样的连接形式是通过非酰胺连接(例如,二硫键)。在一些实施方案中,环肽与增强血清半衰期的聚合物连接。在一些实施方案中,环肽与适于增强分子半衰期的抗体或其结构域(例如,Fc结构域中的一个或更多个恒定结构域)共价连接(例如,通过接头分子)。在一些实施方案中,多肽连接于Fc结构域(例如IgG、IgA、IgM、IgD或IgE)。

[0065] 在一些实施方案中,本文所述的环肽与非氨基酸聚合物连接。聚合物如聚乙二醇可用于增强血清半衰期的目的。合适的聚合物包括,例如,聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚氨基酸、二乙烯基醚马来酸酐、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、葡聚糖、包括硫酸葡聚糖的葡聚糖衍生物、聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇、肝素、肝素片段、多糖、纤维素和纤维素衍生物(包括甲基纤维素和羧甲基纤维素)、淀粉和淀粉衍生物、聚亚烷基二醇及其衍生物、聚亚烷基二醇及其衍生物的共聚物、聚乙烯基乙基醚和 α,β -聚[(2-羟乙基)-DL-天冬酰胺等,或其混合物。这样的聚合物可以具有或不具有其自身的生物学活性。聚合物可与环肽共价或非共价地缀合。缀合以提高血清半衰期的方法是本领域已知的,例如,在美国专利号:5,180,816,6,423,685,6,884,780和7,022,673中,其通过引用整体并入本文。

[0066] 在一些实施方案中,环肽与治疗性分子缀合。在一些实施方案中,所述治疗性分子是抗血管发生的治疗性分子、抗VEGF剂、化疗剂或抗炎剂。

[0067] 本公开内容所涵盖的本文所述的多种形式的环肽,例如经修饰的、缀合的或衍生的环肽,预期会保留环肽所展现的显著量的生物学活性(例如,如本文的实施例部分所报道的)。在一些实施方案中,在给定的测定中保留约100%的活性。在一些实施方案中,保留约90%、80%、70%、60%或50%的活性。一种这样的活性是刺激Tsp-1表达的能力。表达的刺激是当本文所述的环肽与适当的靶细胞接触时发生的,与相同或足够相似的未与该环肽接触的靶细胞(对照靶细胞)相比,以显著的、可再现的量增加的表达。用于确定Tsp-1表达诱导活性的方法描述于本文中并也为本领域技术人员所公知。

[0068] 氨基酸缩写如下所示。

[0069] 丙氨酸,Ala,A

- [0070] 异亮氨酸, Ile, J
- [0071] 亮氨酸, Leu, L
- [0072] 缬氨酸, Val, V
- [0073] 苯丙氨酸, Phe, F
- [0074] 色氨酸, Trp, W
- [0075] 酪氨酸, Tyr, Y
- [0076] 天冬酰胺, Asn, N
- [0077] 半胱氨酸, Cys, C
- [0078] 谷氨酰胺, Gln, Q
- [0079] 甲硫氨酸, Met, M
- [0080] 丝氨酸, Ser, S
- [0081] 苏氨酸, Thr, T
- [0082] 天冬氨酸, Asp, D
- [0083] 谷氨酸, Glu, E
- [0084] 精氨酸, Arg, R
- [0085] 组氨酸, His, H
- [0086] 赖氨酸, Lys, K
- [0087] 甘氨酸, Gly, G
- [0088] 脯氨酸, Pro, P。
- [0089] 另一些环肽修饰

[0090] 应理解的是, 本文所述的环肽的修饰形式涵盖于本公开内容中。对本文所述的环肽的修饰可如美国公开的申请20080090760和/或美国公开的申请20060286636所述地进行, 其均通用引用整体并入本文。下文提供了涵盖于本公开内容范围内的多种其他肽修饰的非限制性讨论。

[0091] 本公开内容涵盖本文所述环肽的化学衍生物, 只要其基本上保留非衍生化的环肽活性即可。“化学衍生物”是本文所述的肽衍生物的亚群, 并且指具有通过功能侧基的反应化学衍生化之一或多个残基的目标环肽。除了侧基衍生化之外, 化学衍生物可以具有一个或多个骨架修饰, 包括 α -氨基替换如N-甲基、N-乙基、N-丙基等, 以及 α -羰基替换如硫酯、硫代酰胺、胍基等。这样的衍生化分子包括例如其中游离氨基已被衍生化以形成胺盐酸盐、对甲苯磺酰基、苄氧羰基、叔丁氧羰基、氯乙酰基或甲酰基的那些分子。游离羧基可被衍生化以形成盐、甲基和乙基酯或其它类型的酯或酰肼。游离羟基可被衍生化以形成O-酰基或O-烷基衍生物。组氨酸的咪唑氮可被衍生化以形成N-im-苄基组氨酸。作为化学衍生物还包括那些含有20种标准氨基酸之一或更多种天然存在的氨基酸衍生物的肽。作为化学衍生物还包括那些含有一个或多个非限制性非天然氨基酸的肽, 实例包括可从商业供应商进行肽合成的那些肽(例如Bachem Catalog, 2004pp.1-276)。例如: 4-羟基脯氨酸可以替换脯氨酸; 5-羟赖氨酸可以替换赖氨酸; 3-甲基组氨酸可以替换组氨酸; 同丝氨酸可以替换丝氨酸; 鸟氨酸可以替换赖氨酸; β -丙氨酸可以替换丙氨酸; 正亮氨酸可以替换亮氨酸; 苯基甘氨酸可以替换苯丙氨酸, 并且L-1, 2, 3, 4-四氢去甲哈尔满-3-羧酸或H- β -(3-苯并噻吩基)-Ala-OH可以替换色氨酸。

[0092] 在某些实施方案中,对肽的化学修饰包括但不限于所包括的烷基、烷氧基、羟基烷基、烷氧基烷基、烷氧基羰基、烯基、炔基、环烷基、氨基、烷基氨基、氨基烷基、二烷基氨基、氨基二烷基、卤素、杂原子、碳环、碳环基、碳环、碳环的、芳基、芳烷基、芳烷氧基、芳氧基烷基、杂环、杂环基、杂环的、杂芳基和/或脂族基团。

[0093] 单独使用或作为较大部分的一部分使用的术语“烷基”、“烷氧基”、“羟基烷基”、“烷氧基烷基”和“烷氧基羰基”包括含有1至12个碳原子的直链和支链两者。单独使用或作为较大部分的一部分使用的术语“烯基”和“炔基”应包括含有2至12个碳原子的直链和支链两者。单独使用或作为较大部分的一部分使用的术语“环烷基”应包括完全饱和或含有一个或更多个不饱和单元但不是芳族的环状C3-C12烃。低级烷基指含有 1-6个碳原子的烷基。

[0094] 术语“氨基”指NH₂基团。术语“烷基氨基”或“氨基烷基”指其中一个氢原子被烷基代替的氨基。术语“二烷基氨基”或“氨基二烷基”是指其中氢原子被烷基取代的氨基,其中烷基可以相同或不同。术语“卤素”意指F、Cl、Br或I。术语“杂原子”是指具有碳环结构的氮,氧或硫,且包括氮和硫的任何氧化形式以及任何碱性氮的季铵化形式。术语“氮”还包括杂环的可取代的氮。作为一个实例,在具有0-3个选自氧,硫或氮的杂原子的饱和或部分不饱和的环中,氮可以是N(如在3,4-二氢-2H-吡咯基中)、NH(如在吡咯烷基中)或NR⁺(如在N-取代的吡咯烷基中)。本文所使用的术语“碳环”、“碳环基”、“碳环”或“碳环的”意指具有3至14个成员的脂族环系统。术语“碳环”、“碳环基”、“碳环”或“碳环的”无论饱和的或部分不饱和的,也指任选被取代的环。术语“碳环”、“碳环基”、“碳环”或“碳环的”还包括与一个或更多个芳族或非芳族环稠合的脂族环,例如在十氢萘基或四氢萘基中,其中连接基团或连接点在脂族环上。

[0095] 单独使用或作为较大部分如“芳烷基”、“芳烷氧基”或“芳氧基烷基”的一部分使用的术语“芳基”是指具有6至14个成员的芳族环基团,如苯基、苄基、苯乙基、1-萘基、2-萘基、1-蒎基和2-蒎基。术语“芳基”还指任选地被取代的环。术语“芳基”可以与术语“芳基环”互换使用。“芳基”还包括其中芳族环稠合至一个或更多个环的稠合多环芳族环系统。实例包括1-萘基、2-萘基、1-蒎基和2-蒎基。也包括在本文所用的术语“芳基”范围内的是其中芳族环与一个或更多个非芳族环稠合的基团,如在茚满基、菲啶基或四氢萘基中,其中连接基团或连接点在芳族环上。

[0096] 本文所用的术语“杂环”、“杂环基”或“杂环的”包括具有4至14个,优选5至10个成员的非芳族环系统,其中一个或更多个环碳,优选一至四个环碳各自被杂原子取代。杂环的实例包括3-1H-苯并咪唑-2-酮、(1-取代的)-2-氧代-苯并咪唑-3-基、2-四氢-呋喃基、3-四氢呋喃基、2-四氢吡喃基、3-四氢吡喃基、4-四氢吡喃基、[1,3]-二氧杂环戊基(dioxalanyl)、[1,3]-二硫杂环戊基(dithiolanyl)、[1,3]-二氧杂环己基(dioxanyl)、2-四氢硫苯基、3-四氢噻吩基、2-吗啉基、3-吗啉基、4-吗啉基、2-硫代吗啉基、3-硫代吗啉基、4-硫代吗啉基、1-吡咯烷基、2-吡咯烷基、3-吡咯烷基、1-哌嗪基、2-哌嗪基、1-哌啶基、2-哌啶基、3-哌啶基、4-哌啶基、4-噻唑烷基、重氮烷基(diazolonyl)、N-取代的重氮烷基、1-酞酰亚胺基、苯并噁唑基、苯并吡咯烷基、苯并哌啶基、苯并杂环戊烷基氧基、苯并硫杂环戊烷基和苯并噻唑基。也包括在本文所使用的术语“杂环基”或“杂环的”的范围内的是其中非芳族含杂原子的环与一个或更多个芳族或非芳族环稠合的基团,如在二氢吡啶基、苯并二氢吡喃基、菲啶基或四氢喹啉基中,其中连接基团或连接点在非芳族含杂原子的环上。术语

“杂环”，“杂环基”或“杂环的”无论是饱和的还是部分不饱和的，也指任选地被取代的环。

[0097] 单独使用或作为较大部分如“杂芳烷基”或“杂芳基烷氧基”的一部分使用的术语“杂芳基”是指具有5至14个成员的杂芳环基团。杂芳基环的实例包括2-呋喃基、3-呋喃基、3-呋喃基、N-咪唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、5-咪唑基、3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基、2-噁二唑基、5-噁二唑基、2-噁唑基、4-噁唑基、5-噁唑基、1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、1-吡唑基、2-吡唑基、3-吡唑基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基、3-哒嗪基、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、5-四唑基、2-三唑基、5-三唑基、2-噻吩基、3-噻吩基、呋唑基、苯并咪唑基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、吲哚基、喹啉基、苯并三唑基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、苯并咪唑基、异喹啉基、吲唑基、异吲哚基、吡啶基和苯并异噁唑基。也包括在本文所用的术语“杂芳基”范围内的是其中杂原子环与一个或更多个芳族或非芳族环稠合的基团，其中连接基团或连接点在杂芳族环上。实例包括四氢喹啉基、四氢异喹啉基和吡啶并[3,4-d]嘧啶基。术语“杂芳基”还指任选地被取代的环。术语“杂芳基”可与术语“杂芳基环”或术语“杂芳族”互换使用。

[0098] 芳基(包括芳烷基、芳烷氧基、芳氧基烷基等)或杂芳基(包括杂芳烷基和杂芳基烷氧基等)基团可以含有一个或更多个取代基。芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基的任何不饱和碳原子上的合适取代基的实例包括卤素、--R₀、--OR₀、--SR₀、1,2-亚甲基二氧基、1,2-亚乙基二氧基、受保护的OH(如酰氧基)、苯基(Ph)、经取代的Ph、--O(Ph)、经取代的--O(Ph)、--CH₂(Ph)、经取代的--CH₂(Ph)、CH₂CH₂(Ph)、经取代的CH₂CH₂(Ph)、--NO₂、--CN、--N(R₀)₂、--NR₀C(O)R₀、NR₀C(O)N(R₀)₂、NR₀CO₂R₀、--NR₀NR₀C(O)R₀、--NR₀NR₀C(O)N(R₀)₂、--NR₀NR₀CO₂R₀、C(O)C(O)R₀、C(O)CH₂C(O)R₀、--CO₂R₀、--C(O)R₀、--C(O)N(R₀)₂、--OC(O)N(R₀)₂、S(O)₂R₀、--SO₂N(R₀)₂、--S(O)R₀、--NR₀SO₂N(R₀)₂、--NR₀SO₂R₀、--C(=S)N(R₀)₂、C(=NH)N(R₀)₂、(CH₂)_yNHC(O)R₀和--(CH₂)_yNHC(O)CH(V--R₀)(R₀)；其中每个R₀独立地选自氢、经取代或未取代的脂族基团、未取代的杂芳基或杂环、苯基(Ph)、经取代的Ph、O(Ph)、经取代的--O(Ph)、-CH₂(Ph)、或经取代的-CH₂(Ph)；y为0-6；且V是接头基团。R₀的脂族基团或苯基环上的取代基的实例包括氨基、烷基氨基、二烷基氨基、氨基羰基、卤素、烷基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷基氨基羰氧基、二烷基氨基羰基基、烷氧基、硝基、氰基、羧基、烷氧基羰基、烷基羰基、羟基、卤代烷氧基和卤代烷基。

[0099] 脂族基团或非芳族杂环或者稠合的芳基或杂芳基环可以含有一个或更多个取代基。脂族基团或非芳族杂环或者稠合的芳基或杂芳基环的任何饱和碳上的合适取代基的实例包括上文关于芳基或杂芳基的不饱和碳所列举的那些和以下基团：=O、=S、=NNHR*、=NN(R*)₂、=N--、=NNHC(O)R*、=NNHCO₂(烷基)、=NNHSO₂(烷基)或=NR*，其中每个R*独立地选自氢、未取代的脂族基团或经取代的脂族基团。脂族基团上的取代基的实例包括氨基、烷基氨基、二烷基氨基、氨基羰基、卤素、烷基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷基氨基羰氧基、二烷基氨基羰氧基、烷氧基、硝基、氰基、羧基、烷氧基羰基、烷基羰基、羟基、卤代烷氧基和卤代烷基。

[0100] 非芳族杂环的氮上的合适取代基包括R⁺、--N(R⁺)₂、--C(O)R⁺、--CO₂R⁺、--C(O)C(O)R⁺、--C(O)CH₂C(O)R⁺、--SO₂R⁺、--SO₂N(R⁺)₂、C(=S)N(R⁺)₂、--C(=NH)--N(R⁺)₂和--NR⁺SO₂R⁺；其中每个R⁺独立地选自氢、脂族基团、经取代的脂族基团、苯基(Ph)、经取代的

Ph、--O(Ph)、经取代的--O(Ph)、--CH₂(Ph)、经取代的--CH₂(Ph)、或未取代的杂芳基或杂环。脂族基团或苯环上的取代基的实例包括氨基、烷基氨基、二烷基氨基、氨基羰基、卤素、烷基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷基氨基羰氧基、二烷基氨基羰氧基、烷氧基、硝基、氰基、羧基、烷氧基羰基、烷基羰基、羟基、卤代烷氧基和卤代烷基。

[0101] 在某些实施方案中,本文所述的肽单体通过共价连接至至少一个接头部分而二聚化或多聚化。接头部分优选(尽管不一定)是任选地被一个或两个--NH--键终止并任选地在一个或多个可用碳原子处被低级烷基取代基取代的C1-12连接部分。优选地接头包含--NH--R--NH--,其中R是用官能团(例如羧基或氨基)取代的低级(C1-6)亚烷基,所述官能团使得能够结合另一分子部分(例如,在肽合成期间可能存在于固体支持物的表面上或与药代动力学修饰剂如PEG结合)。在某些实施方案中,接头是赖氨酸残基。在某些其他实施方案中,接头通过同时连接到每个单体的C末端氨基酸来桥接两个肽单体的C末端。在另一些实施方案中,接头通过连接到不在C末端的氨基酸侧链来桥接肽。当接头连接到不在肽C末端的氨基酸的侧链时,所述侧链优选含有胺,例如在赖氨酸中发现的那些,并且该接头含有两个或更多个能够与肽形成酰胺键的羧基。

[0102] 本公开内容的肽单体可以使用生物素/链霉亲和素系统寡聚化。寡聚化可以增强如本文所述的肽的一种或更多种活性。肽单体的生物素化类似物可以通过本领域技术人员已知的标准技术合成。例如,肽单体可以是C-末端生物素化的。然后通过链霉亲和素孵育将这些生物素化的单体寡聚化(例如,在磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline, PBS)或HEPES缓冲的RPMI培养基(Invitrogen)中在室温下以4:1的摩尔比孵育1小时)。在该方法的变化中,可以通过与许多市售的抗生物素抗体中的任一种[例如,来自Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Washington, D.C.)的山羊抗生物素IgG]孵育来寡聚化生物素化的肽单体。

[0103] 在一些方面中,本文所述的环肽可以物理性地串联连接以形成聚合物。构成这种聚合物的环肽可以通过肽接头彼此间隔开。可用的接头肽的实例包括但不限于甘氨酸聚合物((G)_n),包括甘氨酸-丝氨酸和甘氨酸-丙氨酸聚合物(例如,(Gly₄Ser)_n重复,其中n=1-8 (SEQ ID NO:8),优选地,n=3、4、5或6)。本文所述的环肽还可以通过化学键连接,例如通过二硫键或通过化学桥连接。可以使用本领域技术人员公知的分子生物学技术来创建环肽的聚合物。本公开内容的肽序列也可以使用非肽交联剂(Pierce 2003-2004 Applications Handbook and Catalog,第6章)或其它骨架连接在一起,所述骨架如HPMA、聚葡聚糖、多糖、乙二醇、聚乙二醇、丙三醇、糖和糖醇(例如山梨醇、甘露醇)。

[0104] 在一些实施方案中,聚乙二醇(PEG)可以充当接头。在另一个实施方案中,接头部分可以包含含有两个羧酸并且任选在一个或多个可用原子处被另外的官能团取代的分子,所述官能团如能够与一个或多个PEG分子结合的胺。这样的分子可描绘为:--CO--(CH₂)_n-uX--(CH₂)_m-CO--,其中n为0至10之间的整数,m是1至10之间的整数,X选自O、S、N(CH₂)_pNR₁、NCO(CH₂)_pNR₁和CHNR₁,R₁选自H、Boc(叔丁氧羰基)、Cbz,并且p是1至10之间的整数。在某些实施方案中,每个肽的一个氨基与接头形成酰胺键。任选地,接头含有能够用适当活化的药代动力学(pharmacokinetic, PK)修饰剂衍生的一种或更多种反应性胺,所述修饰剂如脂肪酸、归巢肽、转运剂、细胞穿透剂、器官靶向剂或螯合剂。

[0105] 本文所述的环肽还可以包含一个或多个水溶性聚合物部分。在一些实施方案

中,这些聚合物共价连接到本公开内容的环肽。在一些实施方案中,对于终产物制剂的治疗用途,聚合物是可药用的。本领域技术人员将能够基于以下考虑因素选择所需的聚合物:聚合物-肽缀合物是否将治疗性地使用,并且如果是,则考虑所需的剂量、循环时间、对蛋白水解的抗性和其它考虑因素。水溶性聚合物可以是例如聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三氧杂环己烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物),聚(n-乙烯基-吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物和聚氧乙烯化多元醇。优选的水溶性聚合物为PEG。

[0106] 聚合物可以为任何分子量,并且可以是支链或非支链的。用于本公开内容的优选PEG是具有约5千道尔顿(kDa)至约60kDa分子量的线性、非支链PEG(术语“约”表示在PEG制剂中,一些分子将重于所述分子量,而一些轻于所述分子量)。更优选地,PEG具有约10kDa至约40kDa的分子量,甚至更优选地,PEG具有20至30kDa的分子量。可以使用其他尺寸,这取决于所需的治疗谱(例如所需的持续释放的时间;如果有的话,取决于生物学活性;易于处理;抗原性的程度或缺乏;以及本领域技术人员已知的PEG对治疗肽的其它作用)。

[0107] 所连接聚合物分子的数目可变化;例如,一个、两个、三个或更多个水溶性聚合物可以连接到本公开内容的肽。多个连接的聚合物可以是相同或不同的化学部分(例如,不同分子量的PEG)。

[0108] 本领域已知的用于稳定肽的方法可以与本文所述的方法和组合物一起使用。例如,使用D-氨基酸、使用还原的酰胺键作为肽骨架,并且使用非肽键连接侧链,包括但不限于可以各自提供稳定化的吡咯烷酮和糖模拟物。糖骨架肽模拟物的设计和合成由Hirschmann等描述(J. Med. Chem., 1996, 36, 2441-2448, 其通过引用整体并入本文)。此外,基于吡咯烷酮的肽模拟物在具有改善的生物利用度特征的稳定背景上存在肽药效团(参见例如Smith等, J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 11037-11038),其通过引用整体并入本文。

[0109] 本文包括本文所述的环状缀合物。这些肽可以与聚乙二醇(PEG)以外的其他聚合物缀合。聚合物可以具有或不具有其自身的生物学活性。聚合物缀合的其它实例包括但不限于聚合物如聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚氨基酸、二乙烯基醚马来酸酐、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、葡聚糖、包括硫酸葡聚糖的葡聚糖衍生物、聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇、肝素、肝素片段、多糖、纤维素和纤维素衍生物(包括甲基纤维素和羧甲基纤维素)、淀粉和淀粉衍生物、聚亚烷基二醇及其衍生物、聚亚烷基二醇及其衍生物的共聚物、聚乙烯基乙基醚和 α, β -聚[(2-羟乙基)-DL-天冬酰胺等,或其混合物。与聚合物的缀合可以改善血清半衰期,以及其它效果。多种螯合剂可用于缀合本文所述的肽。这些螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、乙二醇-0,0'-双(2-氨基乙基)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)、N,N'-双(羟基苄基)乙二胺-N,N'-二乙酸(HBED)、三亚乙基四胺六乙酸(TTHA)、1,4,7,10-四-氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA)、1,4,7,10-四氮杂环十三烷-1,4,7,10-四乙酸(TITRA)、1,4,8,11-四氮杂环十四烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(TETA)和1,4,8,11-四氮杂环十四烷(TETRA)。缀合方法为本领域所公知,例如P. E. Thorpe,等, 1978, Nature 271, 752-755; Harokopakis E.等, 1995, Journal of Immunological Methods, 185:31-42; S. F. Atkinson,等, 2001, J. Biol. Chem., 276:27930-27935; 和美国专利号:5,601,825, 5,180,816, 6,423,685, 6,706,252, 6,884,780, 和7,022,673, 其通过引

用整体并入本文。

[0110] 可以将遗传编码的氨基酸(或立体异构D氨基酸)的天然存在的侧链替换为其他侧链,例如用诸如烷基、低级(C1-6)烷基、环状4、5、6至7元烷基、酰胺、酰胺低级烷基酰胺二(低级烷基)、低级烷氧基、羟基、羧基及其低级酯衍生物,以及用4,5,6至7元杂环替换。特别地,可以使用脯氨酸类似物,其中脯氨酸残基的环尺寸从5元变为4、6或7元。环状基团可以是饱和的或不饱和的,并且如果不饱和的话,可以是芳族或非芳族的。杂环基团优选地含有一个或更多个氮、氧和/或硫杂原子。这种基团的实例包括咪唑基、咪唑基、咪唑烷基、咪唑基、咪唑啉基、异噻唑基、异噻唑基、吗啉基(例如吗啉代)、噻唑基、哌嗪基(例如1-哌嗪基)、哌啶基(例如1-哌啶基、哌啶并)、吡喃基、吡嗪基、吡唑烷基、吡唑啉基、吡唑基、哒嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡咯烷基(例如1-吡咯烷基)、吡咯啉基、吡咯基、噻二唑基、噻唑基、噻吩基、硫代吗啉基(例如硫代吗啉并)和三唑基。这些杂环基团可以是经取代的或未取代的。当基团被取代时,取代基可以是烷基、烷氧基、卤素、氧或者经取代或未取代的苯基。

[0111] 还可以通过磷酸化和其它方法(例如,如Hruby等(1990) Biochem J. 268:249-262 中所述)容易地修饰肽。

[0112] 治疗

[0113] 本公开内容的某些方面涉及用于治疗患有癌症的对象的方法。在一些实施方案中,所述方法包括向患有癌症的对象施用如本文所述的环状 Psap肽。在一些实施方案中,所述环肽包含氨基酸序列DWLPK (SEQ ID NO:1)、dWLPK (SEQ ID NO:3,小写的d表示D-氨基酸)、DWGPK (SEQ ID NO:2)或dWGPK (SEQ ID NO:4,小写的d表示D-氨基酸)。在一些实施方案中,所述环肽的氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)、dWLPK (SEQ ID NO:3,小写的d表示D-氨基酸)、DWGPK (SEQ ID NO:2)或dWGPK (SEQ ID NO:4,小写的d表示D-氨基酸)。在一些实施方案中,所述环肽包含氨基酸序列DWLPK (SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中,所述环肽的氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)。

[0114] 本公开内容的另一些方面涉及组合物和组合物在制造用于治疗患有癌症的对象之药物中的用途。在一些实施方案中,所述组合物包含如本文所述的环状Psap肽,例如具有氨基酸序列DWLPK (SEQ ID NO:1) 的环肽。

[0115] 如本文所使用,癌症的“治疗”包括但不限于预防、降低或停止癌症的发展、减少或消除癌症的症状、阻抑或抑制癌症的生长、预防或减少现有癌症的转移和/或侵袭、促进或诱导癌症消退、抑制或阻抑癌细胞的增殖、减少血管发生和/或增加凋亡癌细胞的量。

[0116] 本公开内容的另一些方面涉及治疗患有炎性疾病或病症的对象的方法。在一些实施方案中,炎性疾病或病症是炎性肠病(inflammatory bowel disease, IBD),例如克罗恩病。在一些实施方案中,所述方法包括向患有炎性疾病或病症(例如,克罗恩病)的对象施用如本文所述的环状Psap 肽。在一些实施方案中,所述环肽包含氨基酸序列DWLPK (SEQ ID NO: 1)、dWLPK (SEQ ID NO:3,小写的d表示D-氨基酸)、DWGPK (SEQ ID NO:2)或dWGPK (SEQ ID NO:4,小写的d表示D-氨基酸)。在一些实施方案中,所述环肽的氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)、dWLPK (SEQ ID NO:3,小写的d表示D-氨基酸)、DWGPK (SEQ ID NO:2)或dWGPK (SEQ ID NO:4,小写的d表示D-氨基酸)。在一些实施方案中,所述环肽包含氨基酸序列DWLPK (SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中,所述环肽的氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)。

[0117] 本公开内容的另一些方面涉及组合物和组合物在制造用于治疗患有炎性疾病或

病症(例如克罗恩病)的对象之药物的用途。在一些实施方案中,所述组合物包含如本文所述的环状Psap肽,例如具有氨基酸序列 DWLPK (SEQ ID NO:1)的环肽。

[0118] 如本文所使用,炎性疾病或病症的“治疗”包括但不限于预防、降低或停止炎性疾病或病症的发展或者减少或消除炎性疾病或病症的症状。

[0119] 有效量是足以提供医学上期望结果(如治疗癌症或者炎性疾病或病症)的环状Psap肽的剂量。有效量将随治疗的特定疾病或病症、治疗对象的年龄和身体状况、病症的严重程度、治疗持续时间、任何同时治疗的性质、具体施用途径和在健康从业者的知识和专业知识内的类似因素而改变。对于向对象(如人)施用,通常可以使用约0.001、0.01、0.1或1mg/kg 至达50、100、150或500mg/kg或更高的剂量。

[0120] 在一些实施方案中,有效量是不会对对象引起毒性的环状Psap肽的剂量。在一些实施方案中,有效量是环状Psap肽的剂量,与线性Psap 肽相比其对对象引起的毒性降低。如本文所使用的,术语“无毒性”或“降低的毒性”表示环状Psap肽不诱导或降低对象或对其施用的对象的细胞、组织或器官中一种或更多种不良响应的发生率或程度。例如,本文所述的环状Psap肽不引起器官或器官系统的功能障碍或者引起细胞死亡。例如,环状Psap肽不具有肾毒性、对脾无毒和/或不具有肝毒性。用于测量毒性的方法是本领域中公知的(例如,肝、脾和/或肾的活组织检查/组织学;丙氨酸转移酶、肝毒性的碱性磷酸酶和胆红素测定;和肾毒性的肌酐水平)。

[0121] 可以配制环状Psap肽及其组合物以用于多种施用模式,包括全身、表面或局部施用。有多种施用途径可用。所选择的特定模式将取决于所治疗的癌症类型和治疗功效所需的剂量。一般而言,本公开内容的方法可以使用可医用的任何施用模式来实施,所述模式意指产生有效水平的活性化合物而不引起临床上不可接受的不良作用的任何模式。这样的施用模式包括但不限于经口、直肠、表面、鼻、皮内或肠胃外途径。术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌内或输注。本文所述的药物组合物还适当地通过瘤内、瘤周、病灶内或病灶周围途径施用,以发挥局部以及全身作用。

[0122] 技术和制剂一般可在Remington:The Science and Practice of Pharmacy, Pharmaceutical Press;第22版及其他类似文献中找到。当施用时,Psap肽可以以可药用的量和可药用组合物施用。药物组合物和可药用载体也描述于本文中。这样的制剂可以常规地含有盐、缓冲剂、防腐剂、相容的载体和任选的其它治疗剂。当用于药物时,盐应当是可药用的,但是非可药用的盐可以方便地用于制备其可药用盐,并且不排除在本公开内容的范围之外。这种药理学和药学上可接受的盐包括但不限于由以下酸制备的那些:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。另外,可药用盐可以制备为碱金属或碱土金属盐,如钠、钾或钙盐。

[0123] 在一些实施方案中,用环状Psap肽的治疗可以与另外的治疗如化疗剂、放射、细胞生长抑制剂、抗VEGF剂、抗血管发生因子、p53再活化剂和/或癌症的手术或者炎性疾病或病症的抗炎剂组合。

[0124] 在一些实施方案中,环状Psap肽(例如,DWLPK (SEQ ID NO:1)) 可用于在有此需要的对象中刺激Tsp-1的表达。在一些实施方案中,方法包括向对象施用有效量的环状Psap肽以刺激Tsp-1的表达。

[0125] 组合物和可药用载体

[0126] 本公开内容的另一些方面涉及包含如本文所述的环状Psap肽的组合物。在一些实施方案中,所述组合物是药物组合物。在一些实施方案中,所述组合物包含如本文所述的环状Psap肽和可药用载体。在一些实施方案中,所述组合物用于治疗癌症或者炎症性疾病或病症。在一些实施方案中,所述组合物用于在有此需要的对象中刺激Tsp-1。在一些实施方案中,所述组合物包含额外的试剂,例如化疗剂、细胞生长抑制剂、抗VEGF剂、抗血管发生因子、p53再活化剂和/或抗炎剂。

[0127] 本文所用的术语“可药用载体”意指适于施用于对象(例如人)的一种或更多种相容的固体或液体填充剂、稀释剂或包封物质。可药用载体在与制剂的其他成分相容并且不伤害患者组织的意义上是“可接受的/可用的”(例如,生理上相容的、无菌的、生理pH等)。术语“载体”表示有机或无机成分,其为天然或合成的,活性成分与其组合以帮助施加。药物组合物的组分还能够与本公开内容的分子共混,并且彼此之间以使得无显著损害所需药物功效的相互作用的方式。可充当可药用载体的材料的一些实例包括:(1)糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素和纤维素乙酸盐;(4)粉末状黄蓍胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)润滑剂,如硬脂酸镁、月桂基硫酸钠和滑石;(8)赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;(9)油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇,如丙二醇;(11)多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇(PEG);(12)酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐;(22)填充剂,如多肽和氨基酸(23)血清组分,如血清白蛋白、HDL和LDL;(22)C2-C12醇,如乙醇;和(23)用于药物制剂中的其它无毒的相容性物质。润湿剂、着色剂、脱模剂(release agent)、包衣剂、甜味剂、矫味剂、芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可以存在于制剂中。

[0128] 药物组合物可以方便地以单位剂型存在,并且可以通过药学领域公知的任何方法制备。当用于指本公开内容的药物组合物时,术语“单位剂量”指适合作为对象的单位剂量的物理上分散的单位,每个单位含有经计算产生与所需稀释剂(即载体或载剂)相关的所需治疗效果的预定量的活性物质。

[0129] 药物组合物的制剂可以取决于施用途径。适于肠胃外施用或瘤内、瘤周、病灶内或病灶周围施用的可注射制剂包括例如无菌可注射的水性或油性混悬液,并且可根据已知技术使用合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂配制。无菌可注射制剂还可以是在无毒的肠胃外可接受稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液、混悬液或乳剂,例如作为在1,3-丙二醇或1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受载剂和溶剂是水、林格氏溶液、U.S.P.和等渗氯化钠溶液。此外,无菌的不挥发油通常用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以使用任何温和的不挥发油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸(如油酸)可用于制备可注射剂。可以将可注射制剂灭菌,例如通过细菌保留过滤器过滤,或通过以无菌固体组合物形式掺入灭菌剂,其可在使用前溶解或分散于无菌水或其它无菌可注射介质中。

[0130] 对于表面施用,药物组合物可以配制成本领域通常已知的软膏、药膏(salve)、凝胶或乳膏。表面施用可以使用本领域公知的经皮递送系统。一个实例是皮肤贴剂。

[0131] 适合于经口施用的组合物可以作为离散单元存在,例如胶囊、片剂、锭剂,其各自含有预定量的抗炎剂。其它组合物包括在水性液体或非水性液体中的混悬液,例如糖浆、酏

剂或乳剂。

[0132] 另一些递送系统可包括定时释放、延迟释放或持续释放递送系统。这样的系统可以避免抗炎剂的重复施用,增加对象和医生的方便性。许多类型的释放递送系统是可获得并且为本领域普通技术人员所知。它们包括基于聚合物的系统,如聚(丙交酯-乙交酯)、共聚草酸酯、聚己酸内酯、聚酯酰胺、聚原酸酯、聚羟基丁酸和聚酐。含有药物的前述聚合物的微胶囊描述于例如美国专利5,075,109中。递送系统还包括非聚合物系统,其为:脂质,包括固醇如胆固醇、胆固醇酯和脂肪酸或中性脂肪如单甘油酯、甘油二酯和甘油三酯;水凝胶释放系统;sylastic系统;基于肽的系统;蜡包衣;使用常规粘合剂和赋形剂的压制片剂;部分融合的植入物;等。具体实例包括但不限于:(a) 侵蚀系统,其中以基质内的形式包含抗炎剂,如美国专利号4,452,775、4,667,014、4,748,034和5,239,660中所述的那些,以及(b) 扩散系统,其中活性组分以受控的速率从聚合物渗透,如美国专利3,832,253和3,854,480中所述。此外,可以使用基于泵的硬件递送系统,其中一些适于植入。

[0133] 长效持续释放植入物的使用可特别适合于治疗慢性病症。本文中使用的长效释放意指构建和布置植入物以递送治疗水平的活性成分至少30 天,且优选60天。长效持续释放植入物是本领域普通技术人员公知的,并且包括一些上述的释放系统。

[0134] 在一些实施方案中,用于治疗性施用的药物组合物必须是无菌的。通过经无菌过滤膜(例如,0.2微米膜)过滤容易实现无菌。或者,可使用防腐剂以防止微生物的生长或作用。各种防腐剂是为人所熟知的,且包括例如苯酚和抗坏血酸。如果其对热和氧化变性高度稳定,则环状Psap肽和/或药物组合物通常以冻干形式或作为水溶液储存。制剂的pH通常为约 6至8,尽管在某些情况下更高或更低的pH值也是合适的。

[0135] 对象

[0136] 本公开内容的一些方面涉及患有癌症的对象,例如人对象,以及治疗这些对象的方法。癌症可以是良性的或恶性的,并且其可以已经或可以尚未转移。本文考虑任何类型的癌症,包括但不限于白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、癌、转移性癌、肉瘤、腺瘤,神经系统癌症和泌尿生殖器癌症。示例性的癌症类型包括但不限于成体和小儿急性成淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、肾上腺皮质癌、AIDS相关癌症、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、骨肉瘤、纤维组织细胞瘤、脑癌、脑干胶质瘤、小脑星形细胞瘤、恶性胶质瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、下丘脑胶质瘤、乳腺癌、男性乳腺癌、支气管腺瘤、伯基特淋巴瘤、类癌瘤、未知来源癌、中枢神经系统淋巴瘤、小脑星形细胞瘤、恶性胶质瘤、宫颈癌、儿童癌症、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性白血病、慢性骨髓增殖性疾病、结肠直肠癌、皮肤T-细胞淋巴瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食管癌、尤因家族肿瘤、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼内黑素瘤、视网膜母细胞瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道间质瘤、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、卵巢生殖细胞肿瘤、妊娠滋养细胞肿瘤、胶质瘤、毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、下咽癌、下丘脑和视觉通路胶质瘤、眼内黑素瘤、胰岛细胞肿瘤、卡波西肉瘤、肾癌、肾细胞癌、喉癌、唇和口腔癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、恶性纤维组织细胞瘤、成神经管细胞瘤、黑素瘤、梅克尔细胞癌、恶性间皮瘤、鳞状颈癌、多发性内分泌肿瘤综合征、多发性骨髓瘤、蕈样真菌病、骨髓增生异常综合征、骨髓增殖性疾病、慢性骨髓增殖性疾病、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细

胞瘤、口咽癌、卵巢癌、胰腺癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、成松果体细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体瘤、浆细胞瘤、胸膜肺母细胞瘤、前列腺癌、直肠癌、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、软组织肉瘤、子宫肉瘤、塞扎里综合征 (Sezary syndrome)、非黑素瘤皮肤癌、小肠癌、鳞状细胞癌、鳞状颈癌、幕上原始神经外胚层肿瘤、睾丸癌、咽喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、移行细胞癌、滋养细胞肿瘤、尿道癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、或维尔姆斯瘤。在一些实施方案中，癌症是黑素瘤或卵巢癌。

[0137] 可以使用本领域已知的任何方法 (例如血液测试、组织学、CT扫描、X射线、MRI、身体检查、细胞发生分析、尿分析或遗传测试) 来鉴定患有癌症的对象。怀疑患有癌症的对象可能示出该疾病的一种或更多种症状。癌症的体征和症状是本领域普通技术人员公知的。一些示例性实验室检测包括但不限于对癌症生物标志物的测试, 如用于乳腺癌的癌抗原 (CA) 15-3、癌胚抗原 (CEA) 和HER-2, 用于宫颈癌的人乳头瘤病毒 (HPV) E6和E7癌蛋白, 用于肝细胞癌 (HCC) 的甲胎蛋白 (AFP)、AFP级分L3、P4/5和+II带以及超声检查法, 用于前列腺癌的前列腺特异性抗原 (PSA), 以及用于卵巢癌和HCC的血清CA-125。

[0138] 本公开内容的另一些方面涉及患有炎性疾病或病症的对象, 例如人对象, 以及治疗这些对象的方法。示例性炎性疾病或病症包括但不限于, 类风湿性关节炎、黄斑变性 (例如年龄相关的黄斑变性、AMD)、炎性肠病 (IBD、例如克罗恩病或溃疡性结肠炎)、银屑病、动脉粥样硬化、全身性红斑狼疮、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳疾病、自身免疫性淋巴增殖性综合征 (ALPS)、自身免疫性血小板减少性紫癜 (ATP)、白塞病、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻-皮炎、慢性疲劳综合征免疫缺陷综合征 (CFIDS)、慢性炎性脱髓鞘性多神经病、瘢痕性类天疱疮、冷凝集素病、Crest综合征、德戈病 (Dego's disease)、皮炎、幼年型皮炎、盘状红斑狼疮、特发性混合性冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、格雷夫斯病、格林-巴利综合征、桥本甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA肾病、胰岛素依赖型糖尿病 (I型)、幼年型关节炎、梅尼埃病、混合性结缔组织病、多发性硬化、重症肌无力、寻常天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺性综合征 (polyglandular syndrome)、风湿性多肌痛、多肌炎和皮炎、原发性丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、雷诺氏现象 (Raynaud's phenomenon)、莱特尔综合征、风湿热、结节病 (sarcoidosis)、硬皮病、舍格伦综合征、僵人综合征、大动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、葡萄膜炎、血管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿病。在一些实施方案中, 炎性疾病或病症是类风湿性关节炎、黄斑变性 (例如年龄相关的黄斑变性, AMD)、炎性肠病 (IBD, 例如克罗恩病或溃疡性结肠炎), 银屑病或动脉粥样硬化。

[0139] 可以使用本领域已知的任何方法 (例如, 血液测试、身体检查、CT 扫描或MRI) 来鉴定患有炎性疾病或病症的对象。怀疑患有炎性疾病或病症的对象可能示出所述疾病或病症的一种或更多种症状。炎性疾病或病症的体征和症状是本领域普通技术人员公知的。

[0140] 在一些实施方案中, 炎性疾病或病症是炎性肠病 (IBD), 例如克罗恩病。可以使用本领域已知的任何方法 (例如血液测试、身体检查、粪便潜血测试、结肠镜检查、柔性乙状结肠镜检查、CT扫描、MRI、胶囊内窥镜检查、双气囊内窥镜检查、小肠成像或钡灌肠) 鉴定患有IBD (例如克罗恩病) 的对象。怀疑患有IBD的对象可能示出所述疾病的一种或更多种症状。IBD的体征和症状是本领域普通技术人员公知的。

[0141] 实施例

[0142] 实施例1

[0143] 根据本领域已知的方法合成肽DWLPK (SEQ ID NO:1)、dWLPK (SEQ ID NO:3)、DWGPK (SEQ ID NO:2) 和dWGPK (SEQ ID NO:4) 的环状形式(小写d表示D-氨基酸),并与线性肽dW1P (SEQ ID NO:5,小写d和l表示D-氨基酸)比较。

[0144] 培养细胞并将其与4μg/mL或10μg/mL的每种肽接触,并通过 Western印迹测量血小板反应蛋白-1 (Tsp-1) 活化的水平。Tsp-1先前已示出被鞘脂激活蛋白A蛋白活化。图2示出环肽DWLPK (SEQ ID NO:1) 在提高Tsp-1水平方面最有效,dWGPK (SEQ ID NO:4) 次最有效,并且dWLPK (SEQ ID NO:3) 和DWGPK (SEQ ID NO:2) 最无效。这是出人意料的,因为使用这些肽的线性形式的类似研究揭示线性 DWGPK (SEQ ID NO:2) 比线性DWLPK (SEQ ID NO:1) 更有效。

[0145] 与线性肽dW1P (SEQ ID NO:5) 相比,还测试了环肽DWLPK (SEQ ID NO:1) 在人血浆中的稳定性。将每个肽在37℃下在人血浆中孵育2、4、8或24小时。发现环肽甚至在血浆中孵育24小时后仍保留活化Tsp-1 的能力(图3)。线性肽在24小时具有显著更低的活性,尽管通过D-氨基酸替换对于降解稳定化。

[0146] 之后在黑素瘤的小鼠模型中测试环肽dWGPK (SEQ ID NO:4)。对于黑素瘤模型,将 5×10^5 个B16-B16黑素瘤细胞注射到同系C57B16小鼠中。然后用环肽或线性dW1P (SEQ ID NO:5) 或对照处理小鼠。在第一个实验中,在约第12天开始用肽处理,并且随时间测量肿瘤的体积,直到细胞注射后约20-25天(图4)。在第二个实验中,在第15天开始用肽处理,并且随时间测量肿瘤的体积,直到细胞注射后约27天(图5)。发现环肽的有效性是线性肽的四倍,因为10mg/kg环肽的剂量与40 mg/kg线性肽的剂量一样有效(图4)。这在第二实验中得到证实(图5)。

[0147] 接下来,在卵巢癌的小鼠模型中测试环肽DWLPK (SEQ ID NO:1)。对于卵巢癌小鼠模型,将100万个表达萤光素酶的患者来源的卵巢癌细胞经腹膜内注射到小鼠中。使用萤光素酶体内测量肿瘤负荷。在40天后开始用环肽处理,并以10mg/kg施用10天。处理10天后,对小鼠实施安乐死,并在组织学上分析肿瘤。如图6所示,用环肽处理的小鼠中的萤光素酶输出在处理的10天内下降,表明肿瘤消退。所有环肽处理的肿瘤表达Tsp-1,并且通过组织学观察时,为未处理肿瘤的大小的<25%。

[0148] 还示出环肽DWLPK (SEQ ID NO:1) 刺激小鼠巨噬细胞中的Tsp-1 (图7),表明环肽也可诱导Tsp-1在基质中的表达。

[0149] 最后,如使用组织学测量所示,用环肽DWLPK (SEQ ID NO:1) 给药不会对肝或脾产生任何毒性(图8)。

[0150] 总之,这些数据示出环状Psap肽比线性Psap肽更稳定且更有效。此外,环肽DWLPK (SEQ ID NO:1) 似乎在体外具有最好的活性,并且不诱导毒性。

[0151] 实施例2

[0152] 使用克罗恩病的模型来测试环肽DWLPK (SEQ ID NO:1) 用于治疗克罗恩病的功效。在葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的克罗恩病模型中测试环肽,其中在其饮用水 (3.5%重量:体积) 中给予小鼠DSS,持续7天。在一组中,同时用环肽和DSS处理小鼠,而另一组单独用DSS处理。在该模型中,环肽显著减少炎症(图9)。用环肽处理的小鼠也比仅用DSS 处理的小鼠体

重减轻得更少(图10)。最后,环肽示出刺激Tsp-1并抑制这些小鼠中的巨噬细胞浸润(图11)。这些数据表明环状Psap肽,特别是环状DWLPK (SEQ ID NO:1),对治疗克罗恩病是有效的。

[0153] 实施例3

[0154] (i) 使用AMD的模型来测试本文所述的环状Psap肽在治疗AMD 中的功效。使用激光在小鼠的视网膜上产生病灶。然后用如本文所述的环状Psap肽(例如10或40mg/kg的环状DWLPK (SEQ ID NO:1))或乱序的肽对照处理小鼠。全身性(例如通过静脉内或腹膜内注射)或者通过玻璃体内注射进行处理。随时间测量病灶的愈合速度。预期在用环状 Psap肽处理的小鼠中的病灶将比在用对照处理的小鼠中更快地愈合。

[0155] (ii) 使用胶原蛋白诱导关节炎(CIA)的啮齿类动物模型(一种类似于类风湿性关节炎的自身免疫模型)测试本文所述的环状Psap肽治疗类风湿性关节炎的功效。通过用弗氏完全佐剂中的异源或同源胶原蛋白 II(约50微克)经皮内致敏并在2周后用弗氏不完全佐剂中的相同量的胶原蛋白II加强,可在近交DBA/1雄性小鼠中诱导CIA。关节炎在致敏剂量后约3周发生,并且在致敏后8周内达到其最大值。小鼠具有高水平的胶原蛋白II特异性抗体,胶原蛋白II特异性T细胞以及全身性炎症的征兆(例如IL-6,TNF等的产生)。在关节局部,观察到强烈的炎性浸润(由T细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和成纤维细胞组成)以及软骨和软骨下骨的严重破坏。这些特征很好地模拟了在人类类风湿性关节炎中所见的过程(Myers等,Life Sciences 61,p 1861-1878,1997)。然后用如本文所述的环状Psap肽(例如10或40mg/kg的环状DWLPK (SEQ ID NO: 1))或乱序的肽对照处理小鼠。处理是全身性的(例如通过静脉内或腹膜内注射),或者通过局部施用。测量该疾病的若干参数(例如,临床体征和症状、发作、进展、严重程度和症状的缓解)。预期在用环状Psap肽处理的小鼠中,相比于用对照处理的小鼠,这些参数中的一个或多个将被改善(例如,临床体征和症状的减少、发作的延迟、进展的减缓、严重程度降低、和/或缓解)。

[0156] (iii) 将银屑病模型用于测试本文所述的环状Psap肽在治疗银屑病中的功效。将咪喹莫特(IMQ)施加于小鼠的皮肤以诱导银屑病样皮炎(参见例如van der Fits等Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. (2009) J. Immunol.;182(9):5836-45)。然后用如本文所述的环状Psap肽(例如10 或40mg/kg的环状DWLPK (SEQ ID NO:1))或乱序的肽对照处理小鼠。处理是全身性的(例如,通过静脉内或腹膜内注射)或者是表面的。随时间测量皮炎的愈合速度。还在实验结束时测量IL-23、IL-17A和 IL-17F的表皮表达。与用对照处理的小鼠相比,预期在用环状Psap肽处理的小鼠中皮炎将愈合得更快并且IL-23、IL17A和/或IL17F的水平将降低。

[0157] (iv) 使用动脉粥样硬化模型来测试本文所述的环状Psap肽在治疗动脉粥样硬化中的功效。将缺乏apoE或LDL受体(LDLR)基因的小鼠用作动脉粥样硬化的模型。对小鼠喂食高脂肪、高胆固醇西式饮食或常规食物8周或更长,优选至少15周。用如本文所述的环状Psap肽(例如 10或40mg/kg的环状DWLPK (SEQ ID NO:1))或乱序的肽对照处理小鼠。处理为全身性递送(例如通过静脉内或腹膜内注射)。在至少8周后,在小鼠中测量在主动脉根、无名动脉(头臂动脉)和主动脉的其他分支以及肺和颈动脉中所发生的病灶。预期在用环状Psap肽处理的小鼠中病灶将比在用对照处理的小鼠中更快地愈合。

[0158] 实施例4

[0159] 摘要

[0160] 几乎100%与卵巢癌相关的死亡是由原发性肿瘤的细胞转移性扩散引起的,其导致随后的器官衰竭。然而,尽管对涉及肿瘤转移的生理过程的理解增长了,但尚没有临床上获得批准的在治疗晚期、转移性卵巢癌方面显示出显著功效的药物。已确定Psap为通过在募集到转移部位的骨髓衍生细胞中刺激p53和抗肿瘤发生蛋白血小板反应蛋白-1 (Tsp-1)的肿瘤转移的有效抑制剂。证明约100%的人浆液性卵巢肿瘤表达CD36,其为介导Tsp-1的促凋亡活性的受体。研究了在治疗这种形式的卵巢癌中有效的源自Psap的肽。通过开发具有源自Psap的药物样特性的新环肽来研究该肽的活性和稳定性。环状Psap肽能够显著阻抑转移性卵巢癌的PDX 模型。

[0161] 介绍

[0162] 卵巢癌是最致命的妇科恶性肿瘤,也是妇女癌症死亡的第四大原因。在病理学上,卵巢癌被分为多个亚型,其中上皮卵巢癌(epithelial ovarian cancer,EOC)代表了90%的病例。尽管我们对控制EOC进展的生物学的理解增长了,但是IV期EOC患者的存活率仅为17%。因此,需要可以特异性治疗晚期、转移性卵巢癌的有效疗法。虽然许多患者表现出对作为一线疗法的铂剂的响应,但70%发生抗性(1,2)。目前对于这些患者,没有显著增加总体存活的获得批准的疗法。

[0163] 先前已报道,源自Psap的小肽的开发有力地抑制了多种类型肿瘤模型中的肿瘤转移(3,4)。具体来说,Psap和源自其的肽通过刺激在CD11b⁺/Gr1⁺/Lys6C^{hi}单核细胞中广泛起作用的抗肿瘤发生蛋白血小板反应蛋白-1 (Tsp-1)来抑制肿瘤转移(3)。这些单核细胞被募集到未来的转移性病灶的部位,其称为转移前小环境(premetastatic niche),其中它们在定植后存留并刺激肿瘤生长。然而,Psap肽的全身性施用刺激这些细胞中的Tsp-1的产生,其使得这些部位对未来的转移定植具有抵抗性(3)。这些结果证明Tsp-1在肿瘤微环境中的刺激可以预防未来的转移事件。许多卵巢癌患者在首次诊断中表现为具有转移性疾病。因此,需要可以消退或甚至稳定转移性病灶的治疗剂。

[0164] 证明在转移性、铂抗性的卵巢癌PDX模型的微环境中刺激Tsp-1可诱导已建立病灶的显著消退。这种惊人的效果是由于以下事实而实现的:浆液性卵巢癌细胞表达介导先前在内皮细胞中观察到的促凋亡作用之Tsp-1、CD36的受体(5)。

[0165] 结果

[0166] d-氨基酸的并入提高了Psap肽在体内的活性

[0167] 先前描述了源自Psap的鞘脂激活蛋白A结构域的4-和5-氨基酸肽两者的鉴定,当全身性施用时,其能够抑制Lewis肺癌转移的尾静脉模型和乳腺癌转移的佐剂模型两者(3)。肽的治疗功效通常受其稳定性或对蛋白酶降解的抗性的限制。提高肽在体内的稳定性的一种常用方法是将d-氨基酸并入序列中,因为d-氨基酸不并入天然存在的蛋白质中,蛋白酶不将它们识别为底物(6-10)。研究了通过在不同部分并入d-氨基酸的4-氨基酸Psap肽的稳定性。合成了在第一(天冬氨酸)和第三(亮氨酸)或第二(色氨酸)和第四(脯氨酸)残基处组合并入d-氨基酸的两种肽。通过测量它们在WI-38肺成纤维细胞中刺激血小板反应蛋白-1 (Tsp-1)的能力,测试这些肽与天然L-氨基酸肽在体外的活性。通过western印迹分析,发现在体外三种肽之间对Tsp-1的刺激没有差异(图12A)。

[0168] 在体内测试1,3-d-氨基酸Psap肽和天然Psap肽的活性。将肽全身性地施用于用来自PC3M-LN4 (LN4) 细胞的条件化培养基 (CM) 预处理的C57BL6/J小鼠,其先前通过抑制小鼠肺中Tsp-1的表达模拟转移性肿瘤的全身性质(3,4)。在单独用LN4 CM或与两种不同剂量(10mg/kg/天和30mg/kg/天)的d-和l-氨基酸肽(单独地)组合处理3天后,从每个处理组收获的肺制备蛋白质库。通过western印迹分析评估这些小鼠肺中Tsp-1表达的水平。与天然肽相比,观察到1,3-d-氨基酸肽对Tsp-1的刺激高3倍(图12B)。10mg/kg的天然肽的剂量不显著刺激Tsp-1(图12B)。相反地,10mg/kg剂量的d-氨基酸肽以与30mg/kg剂量的天然肽相同的程度刺激Tsp-1,并且与相同剂量的天然肽相比,30mg/kg剂量的d-氨基酸肽对Tsp-1的刺激大约高3倍。基于两种肽的体外活性实际上相同的观察,得出结论,体内活性的差异是由于稳定性的差异产生的。

[0169] 人浆液性卵巢癌细胞对Tsp-1介导的杀伤敏感

[0170] 为了测试d-氨基酸Psap肽的功效,确定了代表该肽的潜在临床应用的合适肿瘤模型。鉴于Psap及其衍生的肽刺激募集到转移部位的骨髓来源的细胞(表达介导其促凋亡活性的Tsp-1受体的特定类型的癌症)中的Tsp-1,寻求鉴定CD36(5)。已经报道浆液性卵巢上皮细胞和人卵巢癌细胞表达CD36(11-13)。调查了源自用于表达CD36的铂抗性卵巢癌患者腹水的14个原代人卵巢癌细胞系。所有患者来源的细胞表达的CD36水平大约相当于由人微血管内皮细胞表达的水平(图12C)。将这些细胞系中的三个用重组人Tsp-1处理达72小时,并测定其对细胞数目和凋亡的作用。RhTsp-1处理导致所有三种细胞系的总细胞数目减少达初始所铺板细胞数目的50%(图12D)。此外,通过FACS分析,Tsp-1处理后观察到30-60%的所处理细胞凋亡,如根据膜联蛋白V阳性所定义的(图12E)。相反,顺铂处理后,观察到百分比高得多的卵巢癌细胞经历坏死,如由低膜联蛋白V和高碘化丙啶(PI)染色所定义的(图12E)。这些发现表明,卵巢癌细胞可以有利地响应于用Psap肽的处理。

[0171] Psap肽抑制已建立的卵巢癌转移的PDX模型

[0172] 先前已证明Psap和Psap肽可以抑制转移的形成(3,4)。75%的卵巢癌患者在首次诊断时已经患有扩散性疾病(E.Lengyel, Ovarian cancer development and metastasis. Am J Pathol 177, 1053-1064 (2010))。对于这些患者抑制转移将具有有限的治疗益处。相反,这些患者需要可以消退或至少稳定现有转移的治疗剂。研究了d-氨基酸Psap肽在已建立的转移性扩散模型中是否具有治疗功效。将 1×10^6 个表达萤火虫萤光素酶的DF14细胞注射到SCID小鼠的腹膜腔中以模拟人卵巢癌的扩散途径。通过相对萤光素酶强度监测小鼠中转移性集落的实时生长,并且当萤光素酶信号的平均强度为 $0.5-1 \times 10^8$ RLU时,开始用载剂(盐水)、d-氨基酸肽(40mg/kg QD)或顺铂(4mg/kg QOD)处理。如通过萤光素酶强度所确定的,在处理的前20天,肽和顺铂两者均能够消退肿瘤体积(图13A和13B)。然而,在该20天期间,一半顺铂处理的小鼠死于药物的不良副作用,其由总体重降低了40%定义(图13C)。此外,在20天后,尽管继续用顺铂处理,但存活的顺铂处理小鼠组中的肿瘤开始生长,并且所有剩余的小鼠在10天内死亡(图13A)。

[0173] 相反,在肽处理的小鼠组中没有观察到体重减轻(图13C),并且肿瘤继续收缩,直到第48天,在任何小鼠中都没有可检测的萤光素酶信号(图13A和13B以及图16)。将这些小鼠另外处理35天(总共83天),直到对照处理组表现与发病有关的病症。在该处理时间期间,萤光素酶信号从未重新出现,并且小鼠的全面检查显示没有转移性病灶(图13A和13D)。组

织学 (H&E) 检查Psap肽处理的小鼠的肝和脾以确定是否存在任何微转移。鉴定不到Psap肽处理的小鼠中的转移病灶 (图13E)。

[0174] 研究了腹膜腔中所募集的Cd11b⁺/Gr1⁺骨髓来源的细胞中的转移,其类似于肺转移(3)。从具有DF14转移之对照处理的小鼠腹膜腔以及从没有示出转移征兆之Psap肽处理的小鼠腹膜腔的流体收集腹水。对来自这些小鼠的流体进行FACS分选以评估Cd11b⁺/Gr1⁺骨髓来源细胞群。FACS 分析显示对照处理的小鼠腹膜液中71-77%的细胞是Cd11b⁺/Gr1⁺ (图13E和图16),而来自肽处理的小鼠腹膜液中仅31.4%的细胞是Cd11b⁺/Gr1⁺ (图13E)。基于这些发现,得出结论,Psap肽能够明显地消退已建立的转移至没有发现可检测到的病灶的程度。

[0175] 环化进一步稳定了Psap肽,同时提高其活性

[0176] 虽然卵巢癌PDX模型之肽治疗的结果是非常有前景的,但是假定该肽的稳定性和活性可以甚至提高更多。源自Psap的肽位于蛋白质之含有通过二硫键稳定的两个螺旋之间的13个氨基酸环的区域中(3)。因此,合成了通过骨架(N-C)环化而环化的5-氨基酸肽(图14A,环状DWLPK (SEQ ID NO:1))。基于其刺激Tsp-1的能力测试该肽在体外的活性。与d-氨基酸线性肽相比,所述环肽对Tsp-1的刺激大3倍(图14B)。

[0177] 环化还具有通过迫使肽成为不被大多数天然存在的蛋白酶识别的构象来提高肽的稳定性的作用(9,10,14-18)。在人血浆中比较环肽与线性d-氨基酸肽的稳定性。将人血浆中的这两种肽均在37℃下孵育达24小时,然后测试血浆/肽混合物刺激WI-38成纤维细胞中的Tsp-1的能力。在用肽/血浆混合物处理后通过ELISA测量分泌的Tsp-1的水平,并发现在孵育达8小时后,这两种肽对Tsp-1的刺激大致相等(图14C)。然而,在人血浆中孵育24小时后,环肽保留大于70%的其Tsp-1刺激活性,而含有线性肽的血浆不再能够刺激Tsp-1(图14C)。因此,得出结论,环肽显著地比线性d-氨基酸肽更有活性且更稳定。

[0178] 基于这些发现,使用DF14模型测试了环肽的功效。为了更好地研究所述肽对转移性病灶的作用,向小鼠注射 1×10^7 个细胞,并使萤光素酶信号达到 9×10^9 RLU。用环肽处理小鼠仅10天以确保有足够的肿瘤组织进行分析。显著地,在仅10天的处理后,肽处理的小鼠中的平均萤光素酶信号降低至 4×10^8 (图14D)。通过H&E和针对Tsp-1、Gr1和TUNEL 的IHC分析肽和对照处理的小鼠两者的肝、脾和网膜。对照处理的小鼠中的转移性病灶平均比肽处理的小鼠中的转移性病变大2.3倍(图14E)。与Psap肽的作用机制(mechanism of action, MOA)一致,所有肽处理的肿瘤对Tsp-1(图14F)表达染色呈阳性。还与先前的观察一致,发现所有Tsp-1表达细胞也是Gr1阳性(数据未示出)(3)。此外,肽处理的小鼠中的所有病灶均含有显著百分比的TUNEL阳性细胞,平均40%的 TUNEL阳性细胞/病灶(数据未示出)。相反,对照处理的肿瘤平均仅含有1.4%的TUNEL阳性细胞/病灶(数据未示出)。

[0179] 转移性浆液性卵巢肿瘤相比于原发性肿瘤表达更低水平的Psap,但具有更高的CD36表达

[0180] 先前证明了Psap肽针对由来源于患者之表达CD36的卵巢癌细胞形成的肿瘤的活性。研究了人卵巢癌患者中CD36表达的流行以及因此如何广泛将潜在的基于Psap的治疗剂应用于该疾病。据推测,当肿瘤进展到转移期时,鞘脂激活蛋白原表达应该降低。因此,利用了包含139位转移性浆液性卵巢癌患者和来自46位患者的正常卵巢组织的肿瘤组织微阵列(tissue microarray, TMA)。对表达CD36和Psap的组织进行染色,之后使用染色指数(staining index, SI)方法对其强度进行评分(R. Catena 等, Bone marrow-derived Gr1+

cells can generate a metastasis-resistant microenvironment via induced secretion of thrombospondin-1. *Cancer Discov* 3,578-589 (2013)). 61%来自正常卵巢的组织表达CD36,平均SI 为2.39(可能的最大分数为9) (图15A-15C,15M和表1)。134个原发性卵巢肿瘤的分析显示,97% (130/134) 的肿瘤对CD36染色为阳性,平均SI为5.32 (图15D-15F,15M和表1)。检查了来自134位患者的121 个内脏转移。97% (117/121) 的转移性病灶对CD36染色为阳性,平均 SI为6.61 (图15G-15I,15M和表1)。最后,100%的淋巴结转移 (13/13) 对CD36染色为阳性,平均SI为6.69 (图15J-15L,15M和表1)。

[0181] 表1. 人卵巢癌患者TMA中的CD36表达

[0182]

	染色指数	%阳性样品	%样品>6
正常	2.39	62	28.3
原发性浆液性EOC	5.38	94	79.9
内脏转移	6.61	97	91.7
淋巴结转移	6.69	97	92.3

[0183] 研究了人卵巢癌患者中鞘脂激活蛋白原的表达,推测基于其作用机制,水平应随着肿瘤进展而降低。检查了卵巢癌TMA样品中的鞘脂激活蛋白原水平。正常卵巢表达相对低水平的鞘脂激活蛋白原,平均SI为4.29 (图15N和表2)。原发性卵巢肿瘤表达更高水平的鞘脂激活蛋白原,平均SI为5.17 (图15N和表2)。引人注目的是,在内脏和淋巴结转移中,鞘脂激活蛋白原水平显著下降,平均SI分别为4.14和4.07 (图15N和表 2)。因此,当结合在一起时,与正常卵巢相比,CD36表达在原发卵巢肿瘤中增加,并且与原发肿瘤相比,转移性病灶中的CD36表达进一步增加,而鞘脂激活蛋白原表达随肿瘤进展而减少。这些发现表明转移性卵巢肿瘤抑制鞘脂激活蛋白原表达但保留CD36,这可用于用源自鞘脂激活蛋白原的治疗有效地靶向卵巢癌。

[0184] 表2. 人卵巢癌患者TMA中的鞘脂激活蛋白原表达

[0185]

	Psap染色指数	P- 值
正常	4.3	N/A
原发性浆液性EOC	5.17	N/A
内脏转移	4.14	<0.001
淋巴结转移	4.07	0.017

[0186] 讨论

[0187] 先前证明了鞘脂激活蛋白原和源自其的短5-氨基酸肽可以有效抑制转移 (3,4)。阐述了衍生自鞘脂激活蛋白原的环肽的开发过程,其具有比天然肽显著更高的活性和稳定性。证明了在天然线性肽的第一和第三残基处并入d-氨基酸提高了体内活性。通过经由骨架N-C环化以环化5-氨基酸肽,进一步修饰该肽以使其更具类药性 (drug-like)。该环肽显示比d- 氨基酸线性肽甚至更强的体内活性。证明这两种经修饰的肽都可以有效地消退卵巢癌PDX模型中建立的转移。该PDX模型中使用的细胞来源于铂抗性者,其为卵巢癌患者的最常见一线治疗。

[0188] 通过对直接来源于患者腹水的人卵巢癌细胞系的分析,发现所有测试的细胞系均表达CD36、Tsp-1的受体、Psap的下游靶标和骨髓来源细胞中的肽。还证明重组Tsp-1在这些表达CD36的浆液性卵巢癌细胞中诱导凋亡。在卵巢癌PDX模型中概括出Tsp-1对卵巢癌细胞

的体外活性,其中环状Psap肽刺激被募集到具有转移的小鼠的腹膜腔之Cdsb⁺/Gr1⁺骨髓衍生细胞中Tsp-1的表达。Tsp-1在这些细胞中的诱导表达导致肿瘤细胞中显著诱导的凋亡和显著的消退。

[0189] 基于这些结果,据信Psap肽具有通过三种不同机制抑制卵巢癌进展的潜力,所有这些机制均由Tsp-1的诱导介导。第一,本文证明了由Tsp-1触发的CD36下游信号传导介导的直接细胞杀伤。第二是通过广泛建立的Tsp-1的抗血管发生活性(D.J.Good等,A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin.Proc Natl Acad Sci U S A 87,6624-6628(1990))。第三是通过Tsp-1结合其其它细胞表面受体CD47,并阻断由CD47与巨噬细胞上的SIRP α 结合介导的“不要吃我”信号(P.Burger,P.Hilarius-Stokman,D.de Korte,T.K.van den Berg,R.van Bruggen,CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis.Blood 119,5512-5521(2012); A.Saumet,M.B. Slimane,M.Lanotte,J.Lawler,V.Dubernard,Type 3 repeat/C-terminal domain of thrombospondin-1 triggers caspase-independent cell death through CD47/ α v β 3 in promyelocytic leukemia NB4 cells.Blood 106,658-667(2005))。

[0190] 最后,来自134位浆液性卵巢癌患者的肿瘤组织的分析显示97%表达CD36,并且该表达不仅在转移性病灶中维持,而且CD36表达的水平实际上随着肿瘤进展而提高。用于卵巢癌患者的最常见的一线治疗策略是基于铂的化疗(E.Lengyel,Ovarian cancer development and metastasis. Am J Pathol 177,1053-1064(2010))。70%的卵巢癌患者对该治疗产生抗性(E.Lengyel,Ovarian cancer development and metastasis.Am J Pathol 177,1053-1064(2010))。对于这些患者,没有有效的FDA批准的治疗剂,因此,存活率为约17%(E.Lengyel,Ovarian cancer development and metastasis.Am J Pathol 177,1053-1064(2010))。本文提出的发现表明基于 Psap的治疗剂可以基于其作用机制和这些患者肿瘤细胞中CD36表达的普遍性对绝大多数卵巢癌患者具有显著功效。

[0191] 参考文献:

[0192] 1.K.Matsuo,V.K.Bond,M.L.Eno,D.D.Im,N.B.Rosenshein,Low drug resistance to both platinum and taxane chemotherapy on an in vitro drug resistance assay predicts improved survival in patients with advanced epithelial ovarian, fallopian and peritoneal cancer.Int J Cancer 125,2721-2727(2009) .

[0193] 2.K.Matsuo,M.L.Eno,D.D.Im,N.B.Rosenshein,A.K.Sood,Clinical relevance of extent of extreme drug resistance in epithelial ovarian carcinoma.Gynecol Oncol 116,61-65 (2010) .

[0194] 3.R.Catena,N.Bhattacharya,T.El Rayes,S.Wang,H.Choi,D.Gao,S.Ryu,N.Joshi, D.Bielenberg,S.B.Lee,S.A.Haukaas,K.Gravdal,O.J.Halvorsen,L.A.Akslen,R.S. Watnick,V.Mittal,Bone marrow-derived Gr1⁺cells can generate a metastasis-resistant microenvironment via induced secretion of thrombospondin-1.Cancer discovery 3,578-589 (2013) .

[0195] 4.S.Y.Kang,O.J.Halvorsen,K.Gravdal,N.Bhattacharya,J.M.Lee,N.W.Liu,

B.T. Johnston,A.B.Johnston,S.A.Haukaas,K.Aamodt,S.Yoo,L.A.Akslen,R.S.Watnick, Prosapoin inhibits tumor metastasis via paracrine and endocrine stimulation of stromal p53 and Tsp-1.Proc Natl Acad Sci U S A 106,12115-12120 (2009) ; published online EpubJul 21 (10.1073/pnas.0903120106) .

[0196] 5.D.W.Dawson,S.F.Pearce,R.Zhong,R.L.Silverstein,W.A.Frazier, N.P.Bouck, CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells.Journal of Cell Biology 138,707-717 (1997) .

[0197] 6.V.Bobde,Y.U.Sasidhar,S.Durani,Harnessing D-amino acids for peptide motif designs.Synthesis and solution conformation of Boc-D-Glu-Ala-Gly-Lys-NHMe and Boc-L- Glu-Ala-Gly-Lys-NHMe.International journal of peptide and protein research 43,209-218 (1994) .

[0198] 7.M.Coltrera,M.Rosenblatt,J.T.Potts,Jr.,Analogues of parathyroid hormone containing D-amino acids:evaluation of biological activity and stability.Biochemistry 19, 4380-4385 (1980) .

[0199] 8.A.S.Dutta,M.B.Giles,Polypeptides.Part XIV.A comparative study of the stability towards enzymes of model tripeptides containing alpha-aza-amino-acids,L-amino-acids,and D-amino-acids.Journal of the Chemical Society.Perkin transactions 1,244-248 (1976) .

[0200] 9.A.G.Lamont,M.F.Powell,S.M.Colon,C.Miles,H.M.Grey,A.Sette,The use of peptide analogs with improved stability and MHC binding capacity to inhibit antigen presentation in vitro and in vivo.J Immunol 144,2493-2498 (1990) .

[0201] 10.M.F.Powell,T.Stewart,L.Otvos,Jr.,L.Urge,F.C.Gaeta,A.Sette, T.Arrhenius,D. Thomson,K.Soda,S.M.Colon,Peptide stability in drug development.II.Effect of single amino acid substitution and glycosylation on peptide reactivity in human serum. Pharmaceutical research 10,1268-1273 (1993);published online EpubSep(

[0202] 11.J.Greenaway,J.Henkin,J.Lawler,R.Moorehead,J.Petrik,ABT-510induces tumor cell apoptosis and inhibits ovarian tumor growth in an orthotopic, syngeneic model of epithelial ovarian cancer.Molecular cancer therapeutics 8, 64-74 (2009) ;published online EpubJan(10.1158/1535-7163.MCT-08-0864) .

[0203] 12.J.J.Petrik,P.A.Gentry,J.J.Feige,J.LaMarre,Expression and localization of thrombospondin-1 and-2 and their cell-surface receptor,CD36, during rat follicular development and formation of the corpus luteum.Biology of reproduction 67,1522-1531 (2002) .

[0204] 13.S.Russell,M.Duquette,J.Liu,R.Drapkin,J.Lawler,J.Petrik,Combined therapy with thrombospondin-1 type I repeats(3TSR) and chemotherapy induces regression and significantly improves survival in a preclinical model of advanced stage epithelial ovarian cancer.Faseb J, (2014) ;published online EpubNov 13 (10.1096/fj.14-261636) .

[0205] 14.S.J.Bogdanowich-Knipp,S.Chakrabarti,T.D.Williams,R.K.Dillman,T.J.Siahaan, Solution stability of linear vs.cyclic RGD peptides.The journal of peptide research:official journal of the American Peptide Society 53,530-541 (1999) .

[0206] 15.H.Iwai,A.Pluckthun,Circular beta-lactamase:stability enhancement by cyclizing the backbone.FEBS Lett 459,166-172 (1999);published online EpubOct 8(

[0207] 16.A.X.Ji,M.Bodanszky,Cyclization studies with a model pentapeptide.International journal of peptide and protein research 22,590-596 (1983) .

[0208] 17.J.Moss,H.Bundgaard,Kinetics and mechanism of the facile cyclization of histidyl- prolineamide to cyclo(His-Pro)in aqueous solution and the competitive influence of human plasma.The Journal of pharmacy and pharmacology 42,7-12 (1990) .

[0209] 18.J.Samanen,F.Ali,T.Romoff,R.Calvo,E.Sorenson,J.Vasko,B.Storer,D.Berry,D. Bennett,M.Strohsacker,et al.,Development of a small RGD peptide fibrinogen receptor antagonist with potent antiaggregatory activity in vitro.Journal of medicinal chemistry 34, 3114-3125(1991) .

[0210] 无需进一步阐述,相信本领域技术人员可以基于上述描述最大程度地利用本公开内容。因此,具体实施方案将被解释为仅仅是说明性的,而不以任何方式限制本公开内容的其余部分。本文引用的所有出版物通过引用并入以用于本文参考的目的或主题。

[0211] 除非清楚地相反指示,否则本文在说明书和权利要求中使用的不定冠词“一”和“一个/种”应当被理解为意指“至少一个/种”。

[0212] 从上述描述中,本领域技术人员可以容易地确定本公开内容的基本特征,并且在不脱离本公开内容的精神和范围的情况下,可以对本公开内容进行多种改变和修改以适应多种用途和条件。因此,其他实施方案也在本权利要求内。

[0213] 以下内容对应于母案申请中的原始权利要求书,现作为说明书的一部分并入此处:

[0214] 1.用于治疗患有癌症的对象的方法,所述方法包括:

[0215] 对患有癌症的对象施用有效量的环肽以治疗所述癌症,其中所述环肽的氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)。

[0216] 2.项1所述的方法,其中所述癌症是卵巢癌或黑素瘤。

[0217] 3.用于治疗癌症的组合物,所述组合物包含环肽,其中所述环肽的氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)。

[0218] 4.项3所述的组合物,其中所述癌症是卵巢癌或黑素瘤。

[0219] 5.用于治疗患有炎性疾病或病症的对象的方法,所述方法包括:

[0220] 对患有炎性疾病或病症的对象施用有效量的环肽以治疗所述炎性疾病或病症,其中所述环肽的氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)。

[0221] 6.项5所述的方法,其中所述炎性疾病或病症是类风湿性关节炎、年龄相关的黄斑

变性 (AMD)、克罗恩病、银屑病或动脉粥样硬化。

[0222] 7. 项6所述的方法, 其中所述炎性疾病或病症是克罗恩病。

[0223] 8. 用于治疗炎性疾病或病症的组合物, 所述组合物包含环肽, 其中所述环肽的氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)。

[0224] 9. 项8所述的组合物, 其中所述炎性疾病或病症是类风湿性关节炎、年龄相关的黄斑变性 (AMD)、克罗恩病、银屑病或动脉粥样硬化。

[0225] 10. 项9所述的组合物, 其中所述炎性疾病或病症是克罗恩病。

[0226] 11. 用于刺激血小板反应蛋白-1 (Tsp-1) 表达的方法, 所述方法包括: 对此需要的对象施用有效量的环肽以刺激Tsp-1表达, 其中所述环肽的氨基酸序列为DWLPK (SEQ ID NO:1)。

序列表

<110> 儿童医学中心公司
<120> 环状鞘脂激活蛋白原肽及其用途
<130> C1233.70077W000
<150> US 61/970,853
<151> 2014-03-26
<160> 12
<170> PatentIn 3.5版
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 1
Asp Trp Leu Pro Lys
1 5
<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 2
Asp Trp Gly Pro Lys
1 5
<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223> Asp为D-氨基酸
<400> 3
Asp Trp Leu Pro Lys

1 5
<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223> Asp是D-氨基酸
<400> 4
Asp Trp Gly Pro Lys
1 5
<210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223> Asp是D-氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (3) .. (3)
<223> Leu是D-氨基酸
<400> 5
Asp Trp Leu Pro
1
<210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 6
Asp Trp Leu Pro

1

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (2) .. (2)

<223> Trp是D-氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (4) .. (4)

<223> Pro是D-氨基酸

<400> 7

Asp Trp Leu Pro

1

<210> 8

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (6) .. (40)

<223> 这些氨基酸可以不存在

<400> 8

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

10

15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

20

25

30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

35

40

<210> 9

<211> 524

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 9

Met	Tyr	Ala	Leu	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala
1				5					10					15	
Gly	Pro	Val	Leu	Gly	Leu	Lys	Glu	Cys	Thr	Arg	Gly	Ser	Ala	Val	Trp
			20					25					30		
Cys	Gln	Asn	Val	Lys	Thr	Ala	Ser	Asp	Cys	Gly	Ala	Val	Lys	His	Cys
		35						40					45		
Leu	Gln	Thr	Val	Trp	Asn	Lys	Pro	Thr	Val	Lys	Ser	Leu	Pro	Cys	Asp
	50					55					60				
Ile	Cys	Lys	Asp	Val	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Asp	Met	Leu	Lys	Asp	Asn
65					70					75				80	
Ala	Thr	Glu	Glu	Glu	Ile	Leu	Val	Tyr	Leu	Glu	Lys	Thr	Cys	Asp	Trp
				85					90					95	
Leu	Pro	Lys	Pro	Asn	Met	Ser	Ala	Ser	Cys	Lys	Glu	Ile	Val	Asp	Ser
			100					105						110	
Tyr	Leu	Pro	Val	Ile	Leu	Asp	Ile	Ile	Lys	Gly	Glu	Met	Ser	Arg	Pro
	115						120					125			
Gly	Glu	Val	Cys	Ser	Ala	Leu	Asn	Leu	Cys	Glu	Ser	Leu	Gln	Lys	His
	130					135						140			
Leu	Ala	Glu	Leu	Asn	His	Gln	Lys	Gln	Leu	Glu	Ser	Asn	Lys	Ile	Pro
145					150					155				160	
Glu	Leu	Asp	Met	Thr	Glu	Val	Val	Ala	Pro	Phe	Met	Ala	Asn	Ile	Pro
				165					170					175	
Leu	Leu	Leu	Tyr	Pro	Gln	Asp	Gly	Pro	Arg	Ser	Lys	Pro	Gln	Pro	Lys
			180				185						190		
Asp	Asn	Gly	Asp	Val	Cys	Gln	Asp	Cys	Ile	Gln	Met	Val	Thr	Asp	Ile
	195						200					205			
Gln	Thr	Ala	Val	Arg	Thr	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Gln	Ala	Leu	Val	Glu
	210					215					220				
His	Val	Lys	Glu	Glu	Cys	Asp	Arg	Leu	Gly	Pro	Gly	Met	Ala	Asp	Ile
225					230					235				240	
Cys	Lys	Asn	Tyr	Ile	Ser	Gln	Tyr	Ser	Glu	Ile	Ala	Ile	Gln	Met	Met
				245					250					255	
Met	His	Met	Gln	Pro	Lys	Glu	Ile	Cys	Ala	Leu	Val	Gly	Phe	Cys	Asp
			260					265					270		
Glu	Val	Lys	Glu	Met	Pro	Met	Gln	Thr	Leu	Val	Pro	Ala	Lys	Val	Ala
	275						280						285		

Ser	Lys	Asn	Val	Ile	Pro	Ala	Leu	Glu	Leu	Val	Glu	Pro	Ile	Lys	Lys	
290						295					300					
His	Glu	Val	Pro	Ala	Lys	Ser	Asp	Val	Tyr	Cys	Glu	Val	Cys	Glu	Phe	
305					310					315					320	
Leu	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Lys	Leu	Ile	Asp	Asn	Asn	Lys	Thr	Glu	Lys	
					325					330					335	
Glu	Ile	Leu	Asp	Ala	Phe	Asp	Lys	Met	Cys	Ser	Lys	Leu	Pro	Lys	Ser	
				340					345					350		
Leu	Ser	Glu	Glu	Cys	Gln	Glu	Val	Val	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Ile	
		355						360					365			
Leu	Ser	Ile	Leu	Leu	Glu	Glu	Val	Ser	Pro	Glu	Leu	Val	Cys	Ser	Met	
		370						375					380			
Leu	His	Leu	Cys	Ser	Gly	Thr	Arg	Leu	Pro	Ala	Leu	Thr	Val	His	Val	
385					390					395					400	
Thr	Gln	Pro	Lys	Asp	Gly	Gly	Phe	Cys	Glu	Val	Cys	Lys	Lys	Leu	Val	
					405					410					415	
Gly	Tyr	Leu	Asp	Arg	Asn	Leu	Glu	Lys	Asn	Ser	Thr	Lys	Gln	Glu	Ile	
			420						425					430		
Leu	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Gly	Cys	Ser	Phe	Leu	Pro	Asp	Pro	Tyr	Gln	
		435							440					445		
Lys	Gln	Cys	Asp	Gln	Phe	Val	Ala	Glu	Tyr	Glu	Pro	Val	Leu	Ile	Glu	
		450							455					460		
Ile	Leu	Val	Glu	Val	Met	Asp	Pro	Ser	Phe	Val	Cys	Leu	Lys	Ile	Gly	
465					470					475					480	
Ala	Cys	Pro	Ser	Ala	His	Lys	Pro	Leu	Leu	Gly	Thr	Glu	Lys	Cys	Ile	
					485					490					495	
Trp	Gly	Pro	Ser	Tyr	Trp	Cys	Gln	Asn	Thr	Glu	Thr	Ala	Ala	Gln	Cys	
			500						505						510	
Asn	Ala	Val	Glu	His	Cys	Lys	Arg	His	Val	Trp	Asn					
		515							520							
<210>	10															
<211>	527															
<212>	PRT															
<213>	人工序列															
<220>																
<223>	合成多肽															
<400>	10															
Met	Tyr	Ala	Leu	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	
1				5					10					15		

Gly	Pro	Val	Leu	Gly	Leu	Lys	Glu	Cys	Thr	Arg	Gly	Ser	Ala	Val	Trp
20				25				30							
Cys	Gln	Asn	Val	Lys	Thr	Ala	Ser	Asp	Cys	Gly	Ala	Val	Lys	His	Cys
35				40				45							
Leu	Gln	Thr	Val	Trp	Asn	Lys	Pro	Thr	Val	Lys	Ser	Leu	Pro	Cys	Asp
50				55				60							
Ile	Cys	Lys	Asp	Val	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Asp	Met	Leu	Lys	Asp	Asn
65				70				75				80			
Ala	Thr	Glu	Glu	Glu	Ile	Leu	Val	Tyr	Leu	Glu	Lys	Thr	Cys	Asp	Trp
85				90				95							
Leu	Pro	Lys	Pro	Asn	Met	Ser	Ala	Ser	Cys	Lys	Glu	Ile	Val	Asp	Ser
100				105				110							
Tyr	Leu	Pro	Val	Ile	Leu	Asp	Ile	Ile	Lys	Gly	Glu	Met	Ser	Arg	Pro
115				120				125							
Gly	Glu	Val	Cys	Ser	Ala	Leu	Asn	Leu	Cys	Glu	Ser	Leu	Gln	Lys	His
130				135				140							
Leu	Ala	Glu	Leu	Asn	His	Gln	Lys	Gln	Leu	Glu	Ser	Asn	Lys	Ile	Pro
145				150				155				160			
Glu	Leu	Asp	Met	Thr	Glu	Val	Val	Ala	Pro	Phe	Met	Ala	Asn	Ile	Pro
165				170				175							
Leu	Leu	Leu	Tyr	Pro	Gln	Asp	Gly	Pro	Arg	Ser	Lys	Pro	Gln	Pro	Lys
180				185				190							
Asp	Asn	Gly	Asp	Val	Cys	Gln	Asp	Cys	Ile	Gln	Met	Val	Thr	Asp	Ile
195				200				205							
Gln	Thr	Ala	Val	Arg	Thr	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Gln	Ala	Leu	Val	Glu
210				215				220							
His	Val	Lys	Glu	Glu	Cys	Asp	Arg	Leu	Gly	Pro	Gly	Met	Ala	Asp	Ile
225				230				235				240			
Cys	Lys	Asn	Tyr	Ile	Ser	Gln	Tyr	Ser	Glu	Ile	Ala	Ile	Gln	Met	Met
245				250				255							
Met	His	Met	Gln	Asp	Gln	Gln	Pro	Lys	Glu	Ile	Cys	Ala	Leu	Val	Gly
260				265				270							
Phe	Cys	Asp	Glu	Val	Lys	Glu	Met	Pro	Met	Gln	Thr	Leu	Val	Pro	Ala
275				280				285							
Lys	Val	Ala	Ser	Lys	Asn	Val	Ile	Pro	Ala	Leu	Glu	Leu	Val	Glu	Pro
290				295				300							
Ile	Lys	Lys	His	Glu	Val	Pro	Ala	Lys	Ser	Asp	Val	Tyr	Cys	Glu	Val
305				310				315				320			
Cys	Glu	Phe	Leu	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Lys	Leu	Ile	Asp	Asn	Asn	Lys

				325						330						335		
Thr	Glu	Lys	Glu	Ile	Leu	Asp	Ala	Phe	Asp	Lys	Met	Cys	Ser	Lys	Leu			
			340						345						350			
Pro	Lys	Ser	Leu	Ser	Glu	Glu	Cys	Gln	Glu	Val	Val	Asp	Thr	Tyr	Gly			
		355						360						365				
Ser	Ser	Ile	Leu	Ser	Ile	Leu	Leu	Glu	Glu	Val	Ser	Pro	Glu	Leu	Val			
	370						375						380					
Cys	Ser	Met	Leu	His	Leu	Cys	Ser	Gly	Thr	Arg	Leu	Pro	Ala	Leu	Thr			
385				390						395						400		
Val	His	Val	Thr	Gln	Pro	Lys	Asp	Gly	Gly	Phe	Cys	Glu	Val	Cys	Lys			
			405						410						415			
Lys	Leu	Val	Gly	Tyr	Leu	Asp	Arg	Asn	Leu	Glu	Lys	Asn	Ser	Thr	Lys			
			420						425						430			
Gln	Glu	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Gly	Cys	Ser	Phe	Leu	Pro	Asp			
	435						440						445					
Pro	Tyr	Gln	Lys	Gln	Cys	Asp	Gln	Phe	Val	Ala	Glu	Tyr	Glu	Pro	Val			
	450						455						460					
Leu	Ile	Glu	Ile	Leu	Val	Glu	Val	Met	Asp	Pro	Ser	Phe	Val	Cys	Leu			
465				470						475						480		
Lys	Ile	Gly	Ala	Cys	Pro	Ser	Ala	His	Lys	Pro	Leu	Leu	Gly	Thr	Glu			
			485						490						495			
Lys	Cys	Ile	Trp	Gly	Pro	Ser	Tyr	Trp	Cys	Gln	Asn	Thr	Glu	Thr	Ala			
	500						505						510					
Ala	Gln	Cys	Asn	Ala	Val	Glu	His	Cys	Lys	Arg	His	Val	Trp	Asn				
	515						520						525					
<210>	11																	
<211>	526																	
<212>	PRT																	
<213>	人工序列																	
<220>																		
<223>	合成多肽																	
<400>	11																	
Met	Tyr	Ala	Leu	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala			
1			5						10					15				
Gly	Pro	Val	Leu	Gly	Leu	Lys	Glu	Cys	Thr	Arg	Gly	Ser	Ala	Val	Trp			
		20						25					30					
Cys	Gln	Asn	Val	Lys	Thr	Ala	Ser	Asp	Cys	Gly	Ala	Val	Lys	His	Cys			
	35						40					45						
Leu	Gln	Thr	Val	Trp	Asn	Lys	Pro	Thr	Val	Lys	Ser	Leu	Pro	Cys	Asp			

50	55	60
Ile Cys Lys Asp Val	Val Thr Ala Ala Gly Asp Met Leu Lys Asp Asn	
65	70	75
Ala Thr Glu Glu Glu Ile	Leu Val Tyr Leu Glu Lys Thr Cys Asp Trp	80
	85	90
Leu Pro Lys Pro Asn Met	Ser Ala Ser Cys Lys Glu Ile Val Asp Ser	95
	100	105
Tyr Leu Pro Val Ile Leu	Asp Ile Ile Lys Gly Glu Met Ser Arg Pro	110
	115	120
Gly Glu Val Cys Ser Ala	Leu Asn Leu Cys Glu Ser Leu Gln Lys His	125
	130	135
Leu Ala Glu Leu Asn His	Gln Lys Gln Leu Glu Ser Asn Lys Ile Pro	140
145	150	155
Glu Leu Asp Met Thr Glu	Val Val Ala Pro Phe Met Ala Asn Ile Pro	160
	165	170
Leu Leu Leu Tyr Pro Gln	Asp Gly Pro Arg Ser Lys Pro Gln Pro Lys	175
	180	185
Asp Asn Gly Asp Val Cys	Gln Asp Cys Ile Gln Met Val Thr Asp Ile	190
	195	200
Gln Thr Ala Val Arg Thr	Asn Ser Thr Phe Val Gln Ala Leu Val Glu	205
	210	215
His Val Lys Glu Glu Cys	Asp Arg Leu Gly Pro Gly Met Ala Asp Ile	220
225	230	235
Cys Lys Asn Tyr Ile Ser	Gln Tyr Ser Glu Ile Ala Ile Gln Met Met	240
	245	250
Met His Met Asp Gln Gln	Pro Lys Glu Ile Cys Ala Leu Val Gly Phe	255
	260	265
Cys Asp Glu Val Lys Glu	Met Pro Met Gln Thr Leu Val Pro Ala Lys	270
	275	280
Val Ala Ser Lys Asn Val	Ile Pro Ala Leu Glu Leu Val Glu Pro Ile	285
	290	295
Lys Lys His Glu Val Pro	Ala Lys Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val Cys	300
305	310	315
Glu Phe Leu Val Lys Glu	Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr	320
	325	330
Glu Lys Glu Ile Leu Asp	Ala Phe Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu Pro	335
	340	345
Lys Ser Leu Ser Glu Glu	Cys Gln Glu Val Val Asp Thr Tyr Gly Ser	350
	355	360
		365

Ser Ile Leu Ser Ile Leu Leu Glu Glu Val Ser Pro Glu Leu Val Cys
 370 375 380
 Ser Met Leu His Leu Cys Ser Gly Thr Arg Leu Pro Ala Leu Thr Val
 385 390 395 400
 His Val Thr Gln Pro Lys Asp Gly Gly Phe Cys Glu Val Cys Lys Lys
 405 410 415
 Leu Val Gly Tyr Leu Asp Arg Asn Leu Glu Lys Asn Ser Thr Lys Gln
 420 425 430
 Glu Ile Leu Ala Ala Leu Glu Lys Gly Cys Ser Phe Leu Pro Asp Pro
 435 440 445
 Tyr Gln Lys Gln Cys Asp Gln Phe Val Ala Glu Tyr Glu Pro Val Leu
 450 455 460
 Ile Glu Ile Leu Val Glu Val Met Asp Pro Ser Phe Val Cys Leu Lys
 465 470 475 480
 Ile Gly Ala Cys Pro Ser Ala His Lys Pro Leu Leu Gly Thr Glu Lys
 485 490 495
 Cys Ile Trp Gly Pro Ser Tyr Trp Cys Gln Asn Thr Glu Thr Ala Ala
 500 505 510
 Gln Cys Asn Ala Val Glu His Cys Lys Arg His Val Trp Asn
 515 520 525
 <210> 12
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 12
 Ser Leu Pro Cys Asp Ile Cys Lys Asp Val Val Thr Ala Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 Met Leu Lys Asp Asn Ala Thr Glu Glu Glu Ile Leu Val Tyr Leu Glu
 20 25 30
 Lys Thr Cys Asp Trp Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser Ala Ser Cys Lys
 35 40 45
 Glu Ile Val Asp Ser Tyr Leu Pro Val Ile Leu Asp Ile Ile Lys Gly
 50 55 60
 Glu Met Ser Arg Pro Gly Glu Val Cys Ser Ala Leu Asn Leu Cys Glu
 65 70 75 80
 Ser

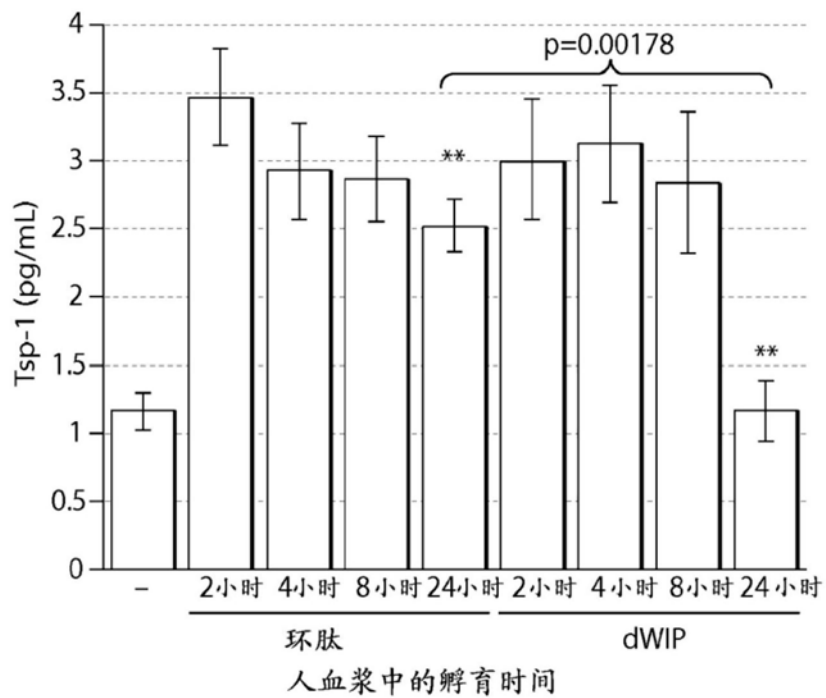


图3

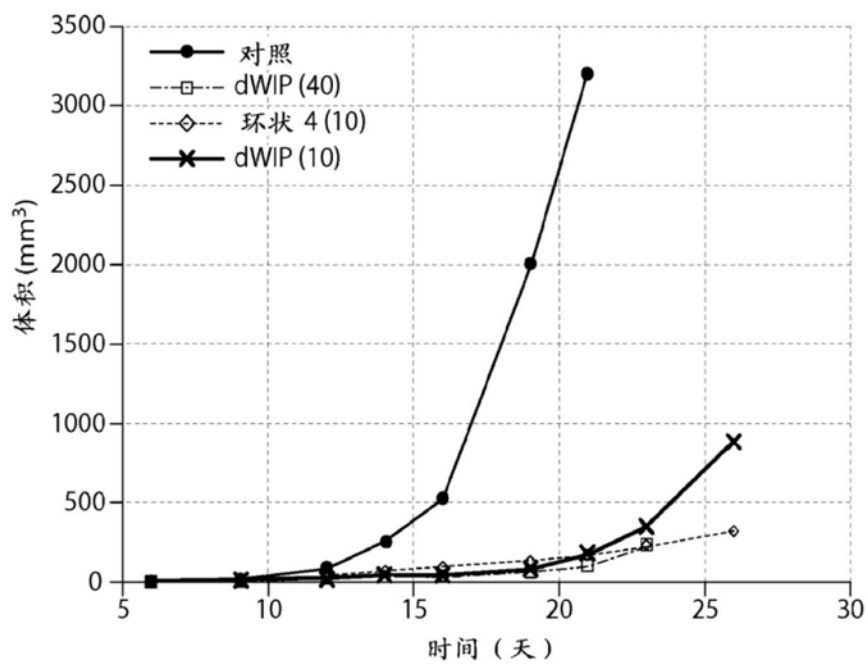


图4

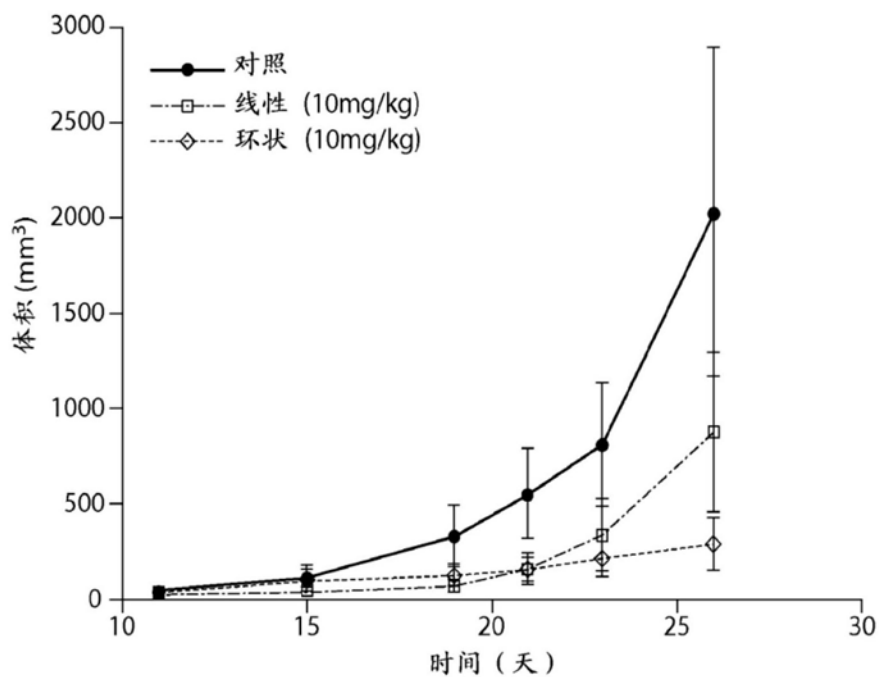


图5

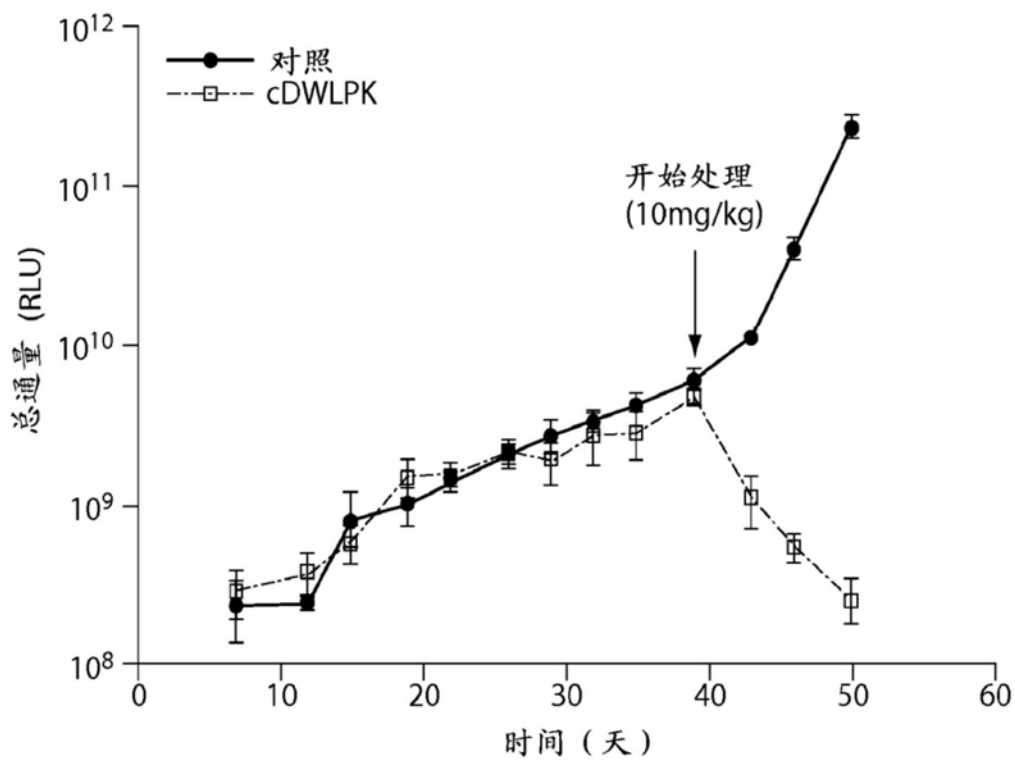


图6

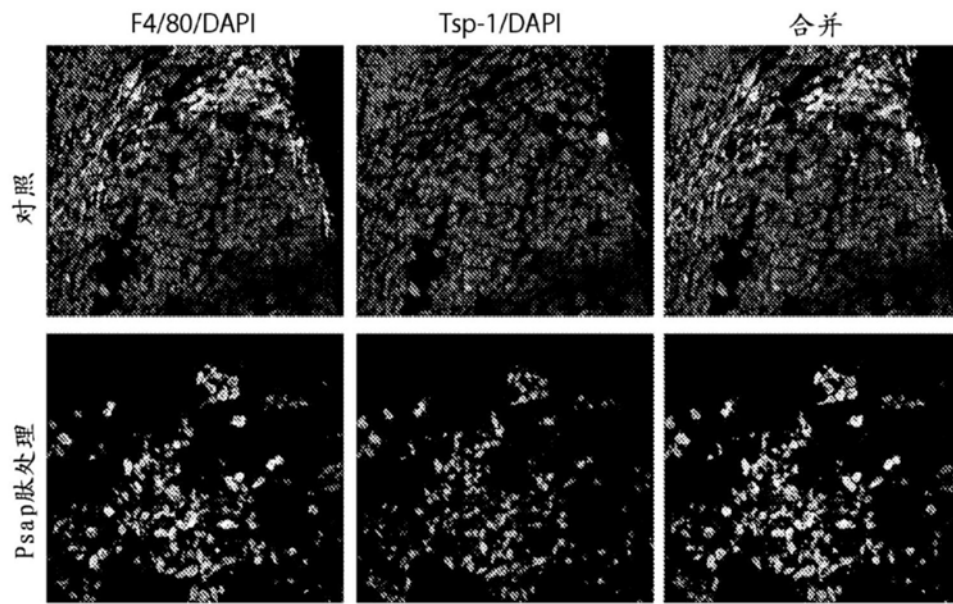


图7

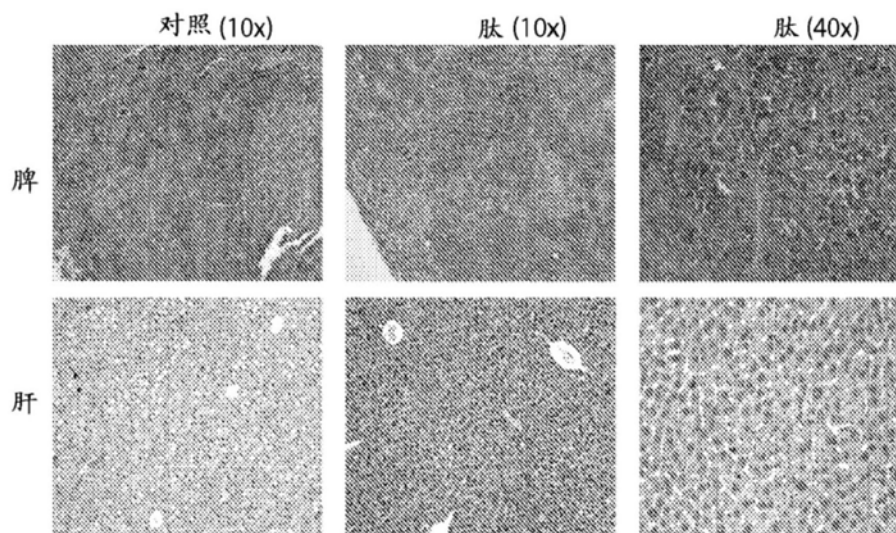


图8

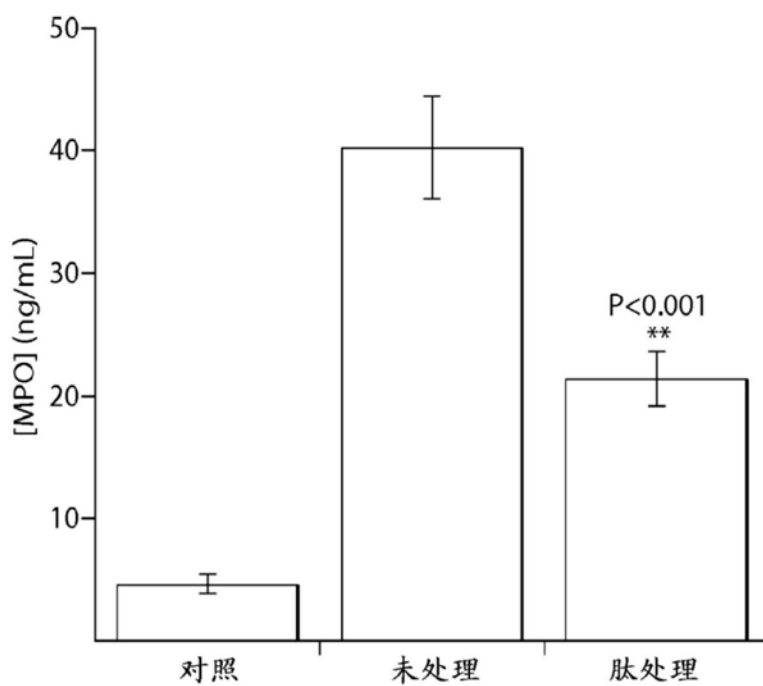


图9

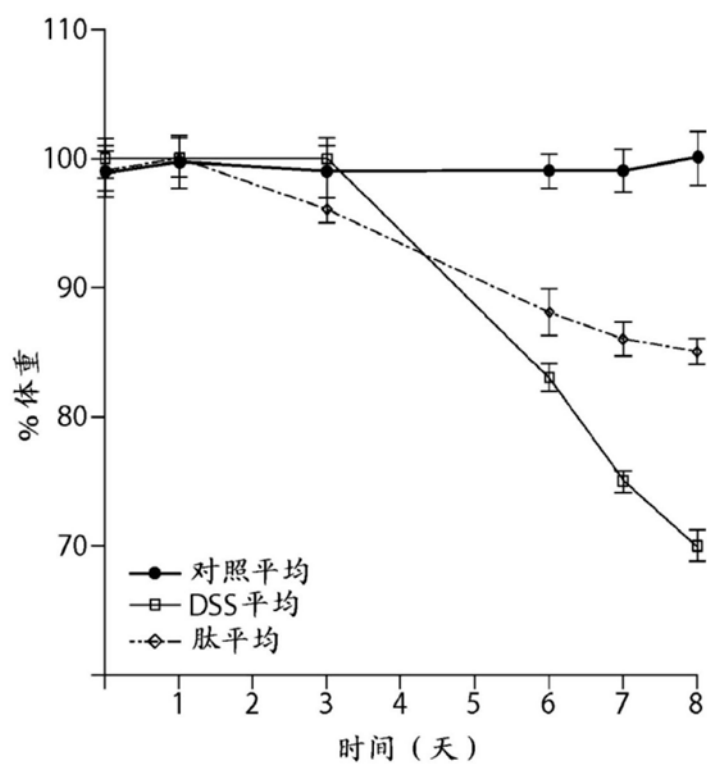


图10

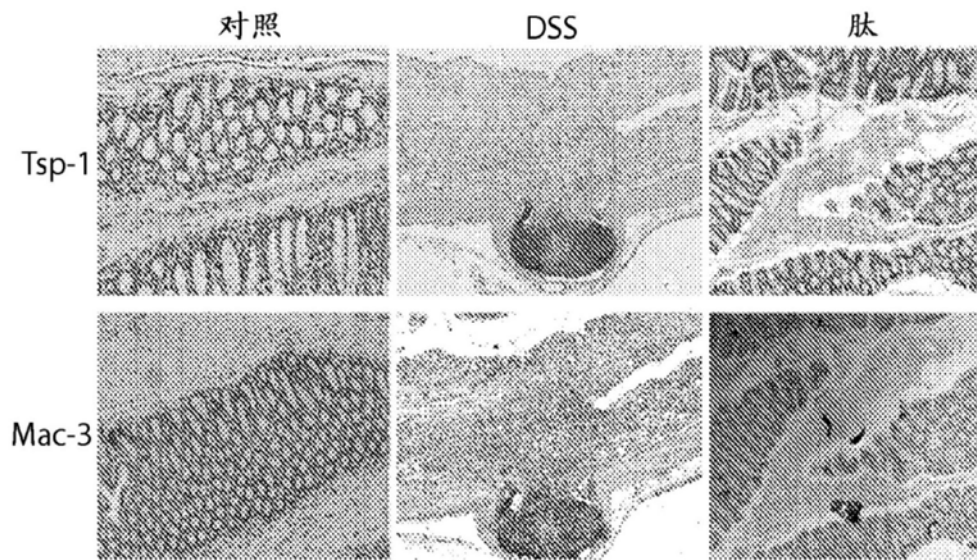


图11

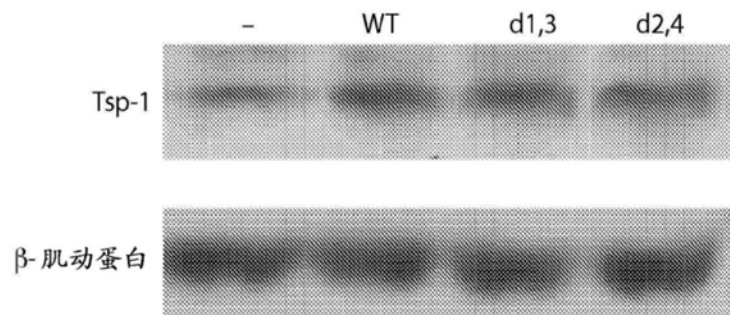


图12A

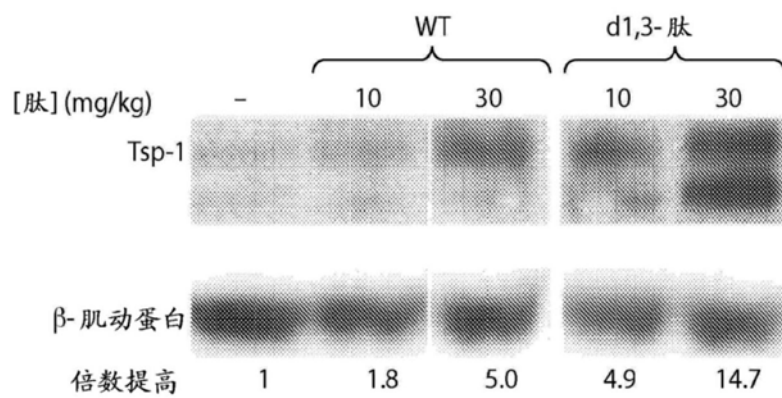


图12B

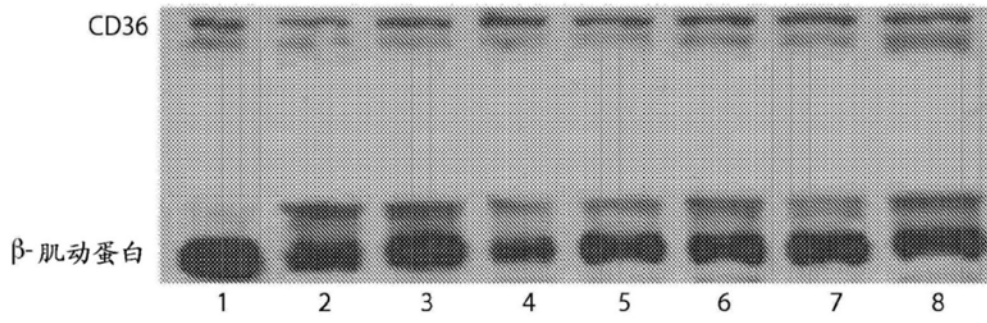


图12C

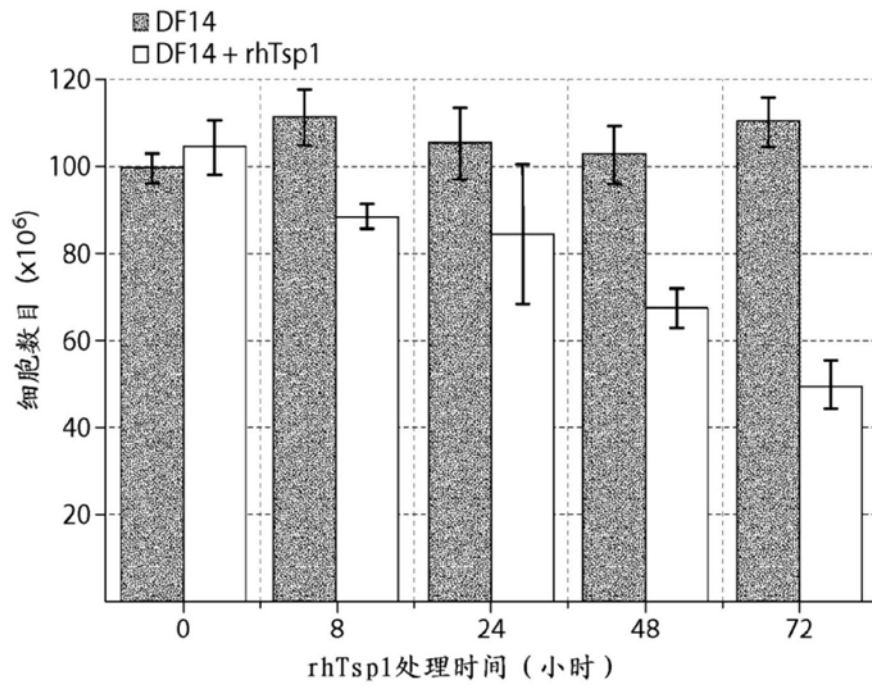


图12D

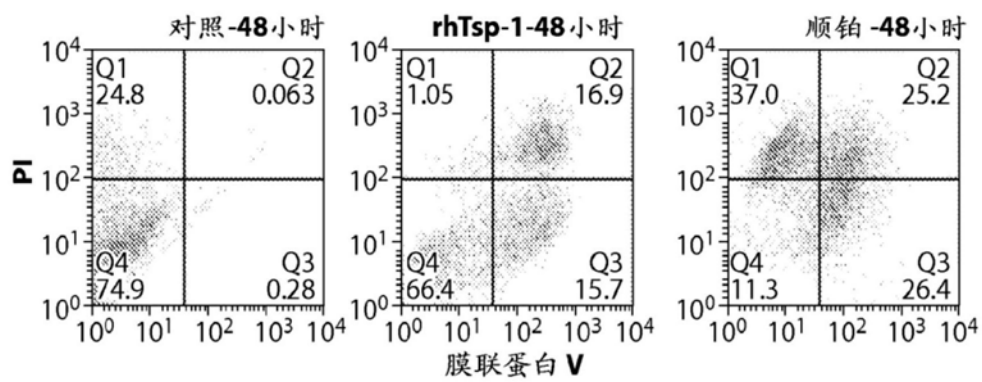


图12E

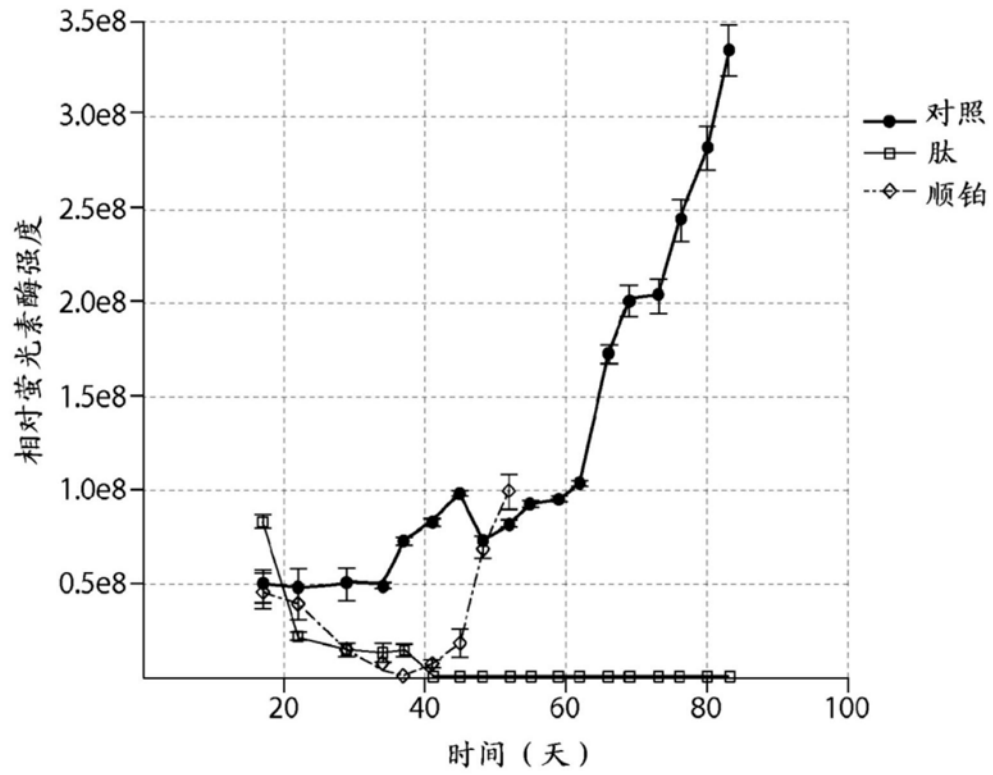


图13A

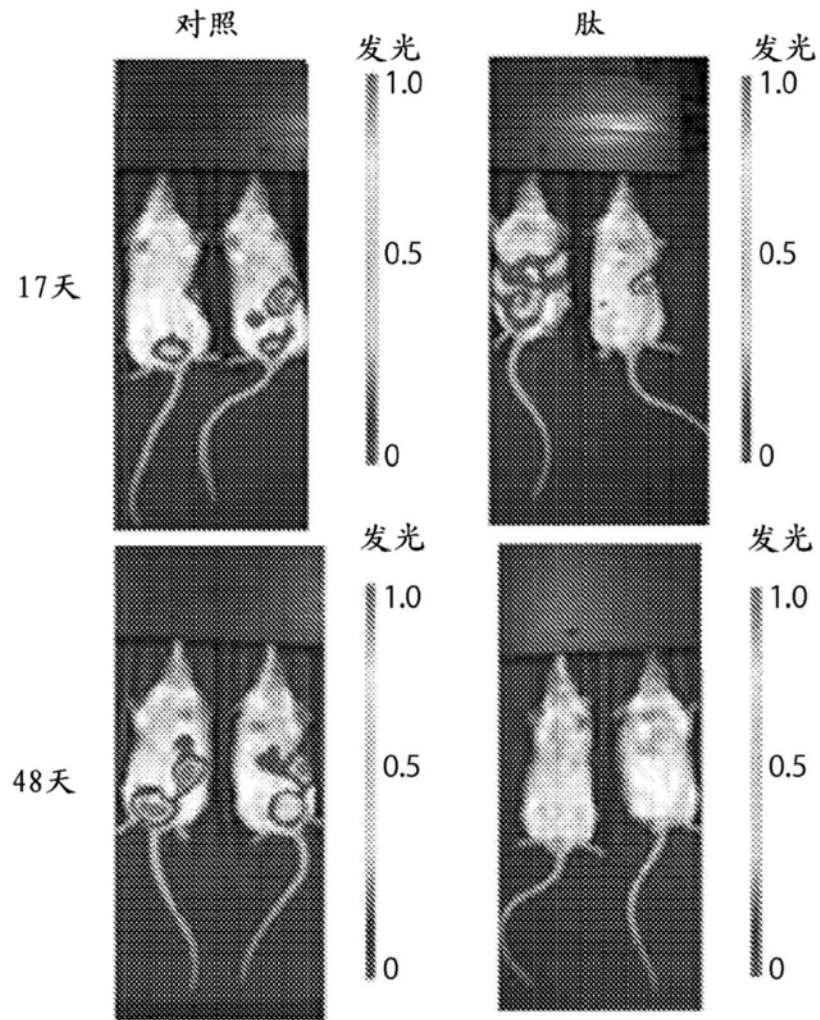


图13B

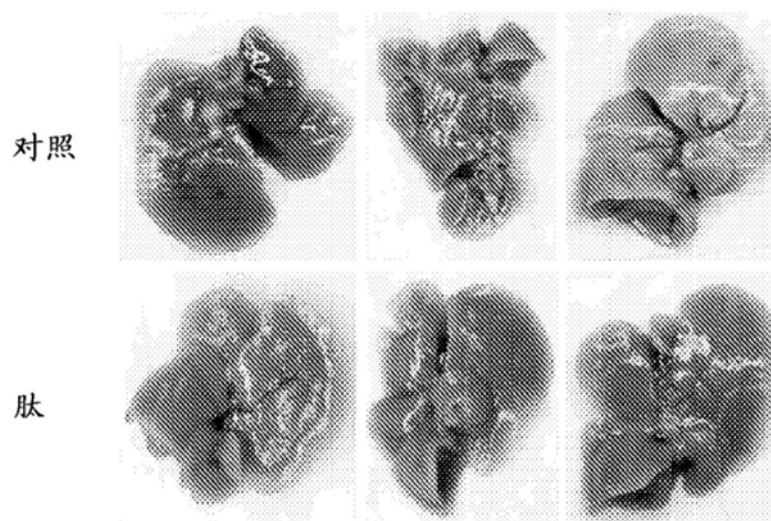


图13C

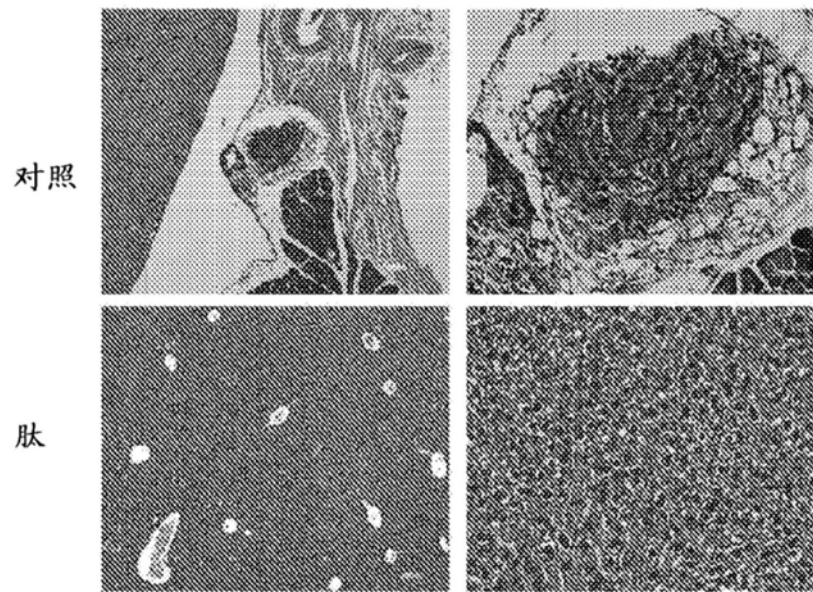


图13D

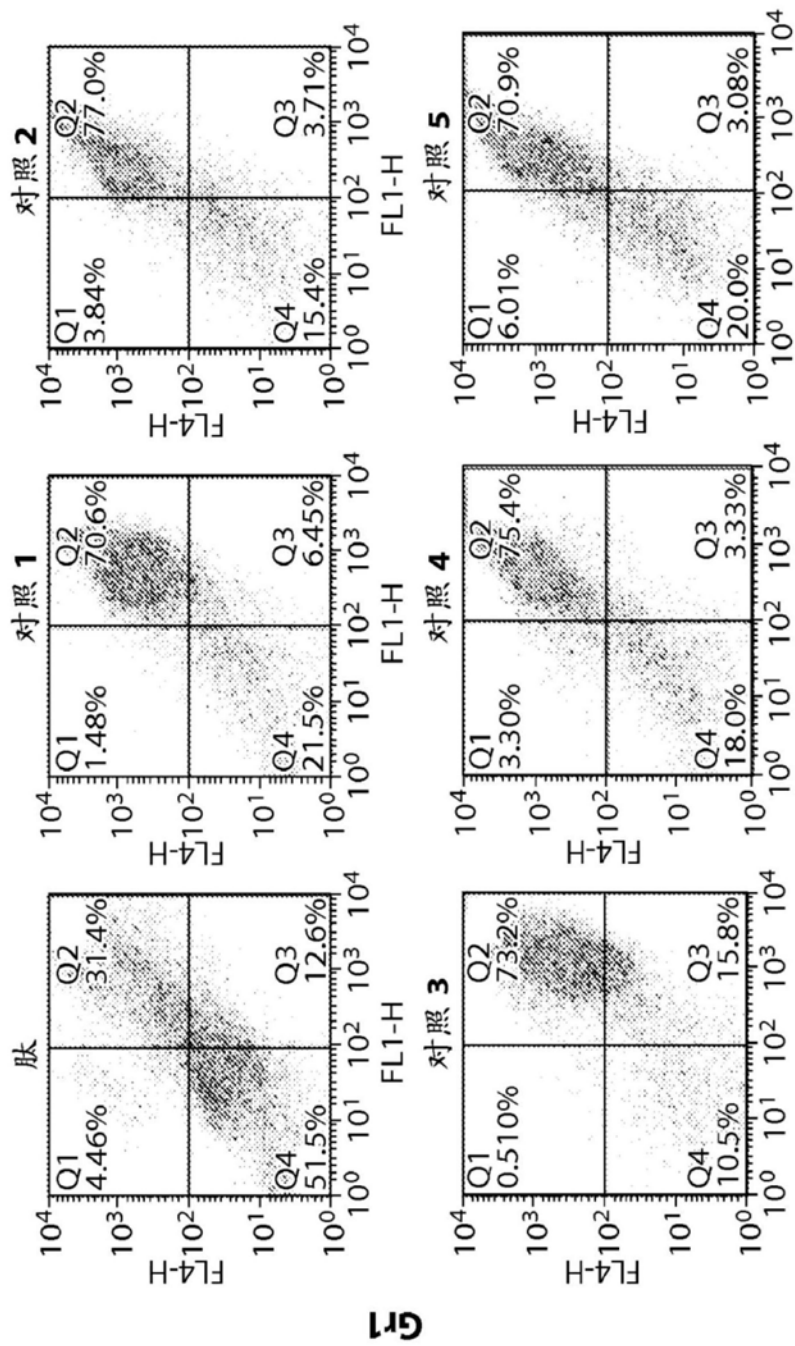


图13E

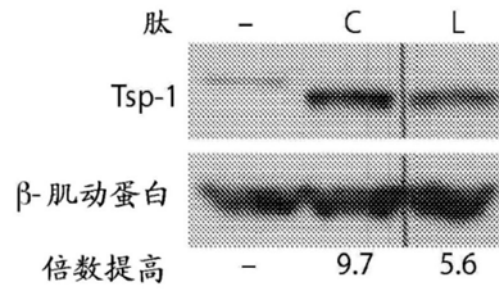


图14A

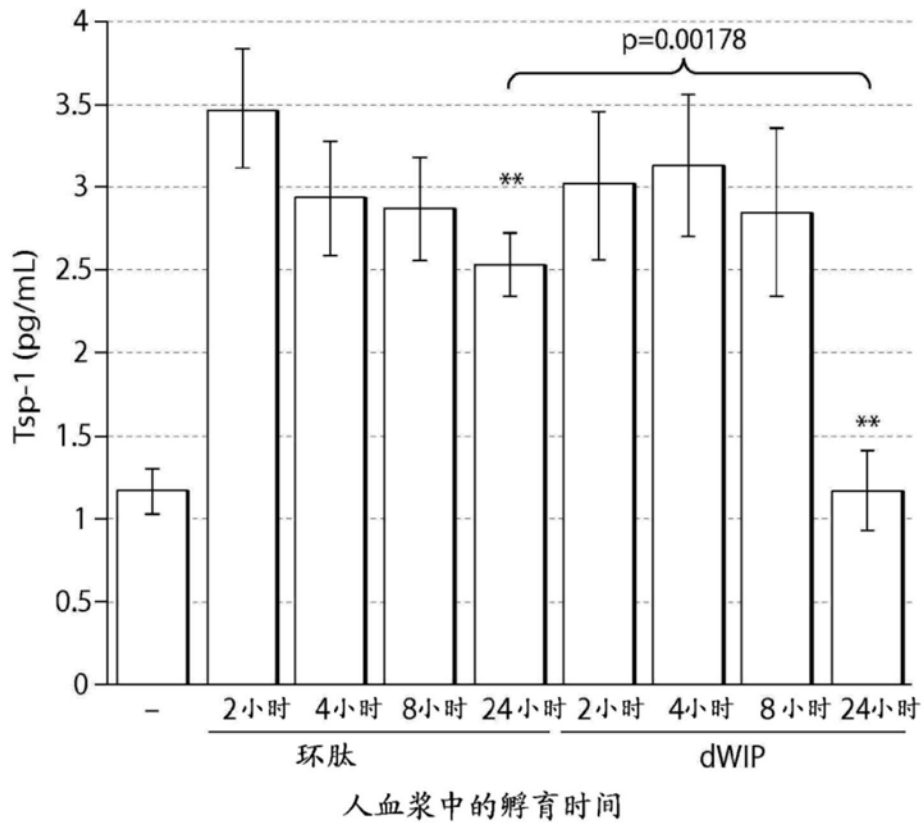


图14B

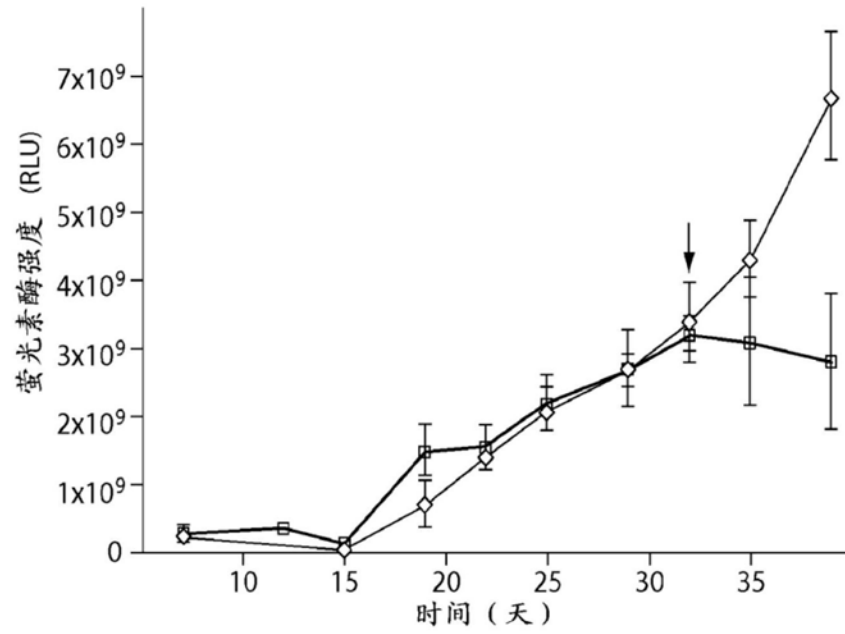


图14C

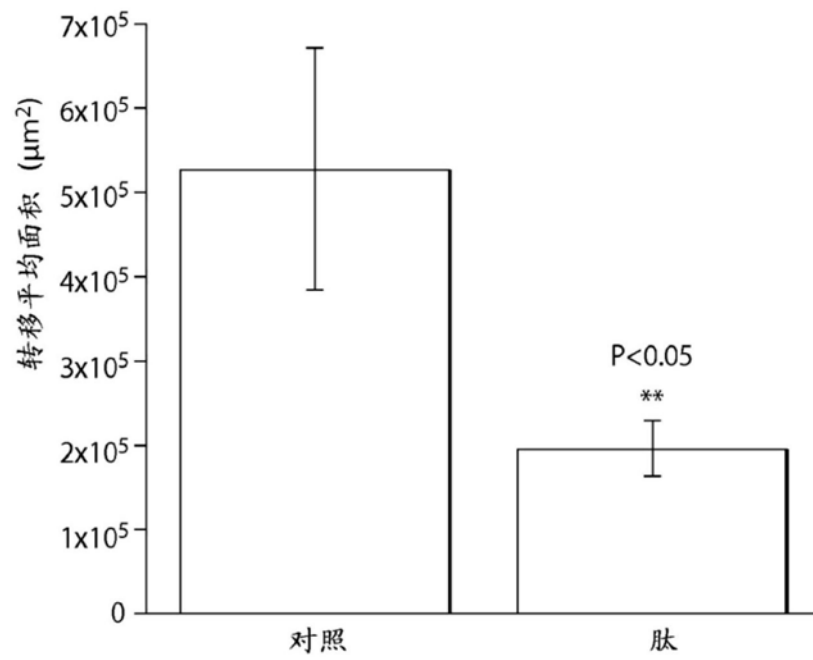


图14D

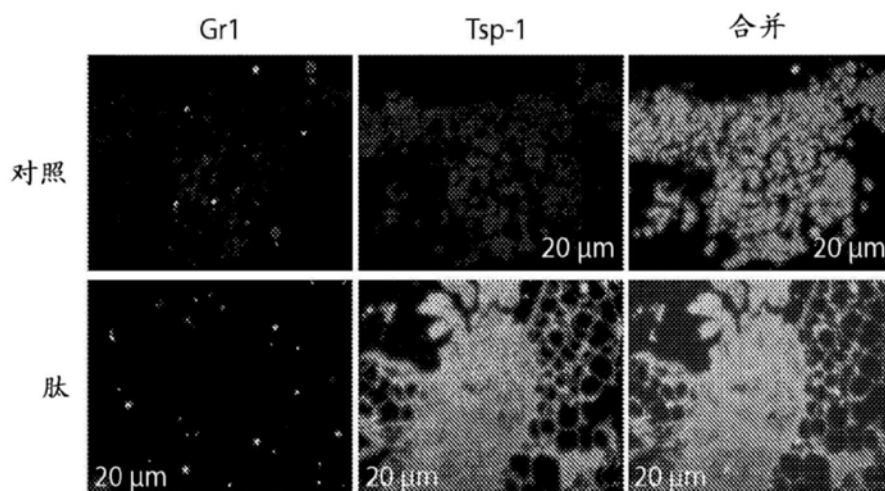


图14E

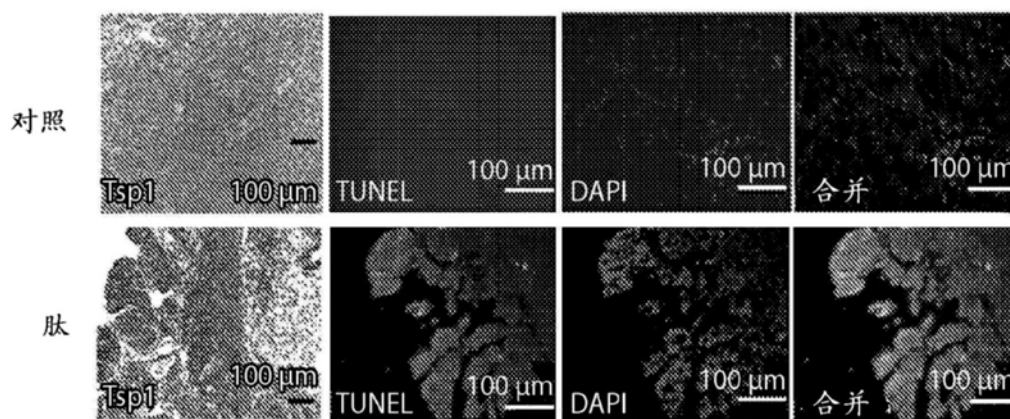


图14F



图15A

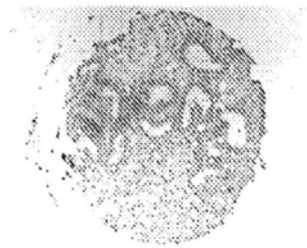


图15B



图15C

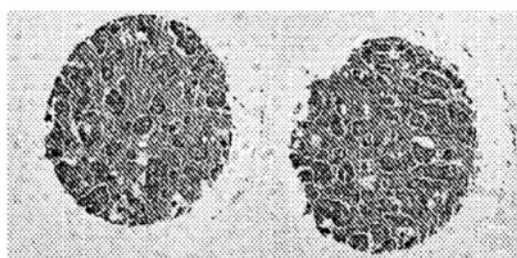


图15D



图15E



图15F

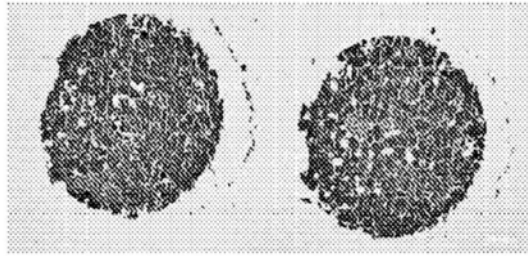


图15G



图15H

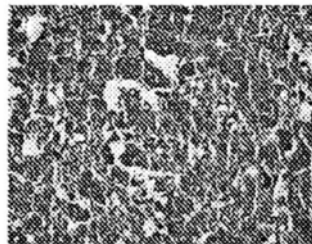


图15I

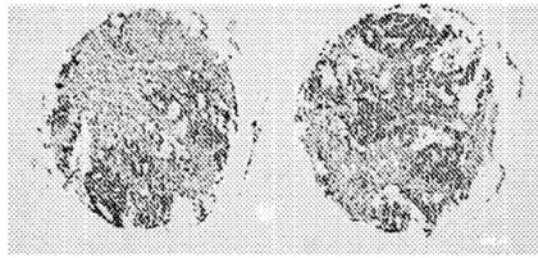


图15J



图15K



图15L

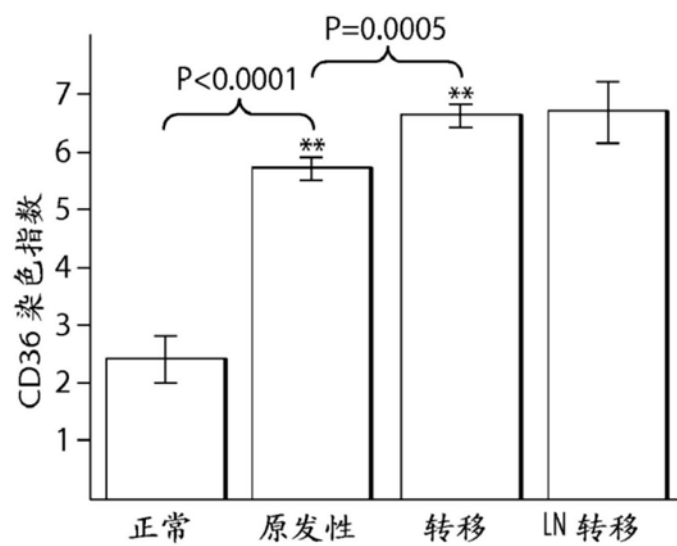


图15M

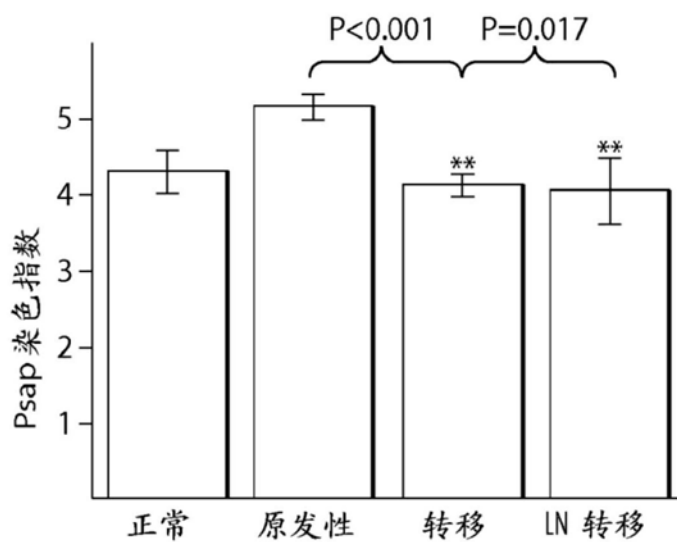


图15N

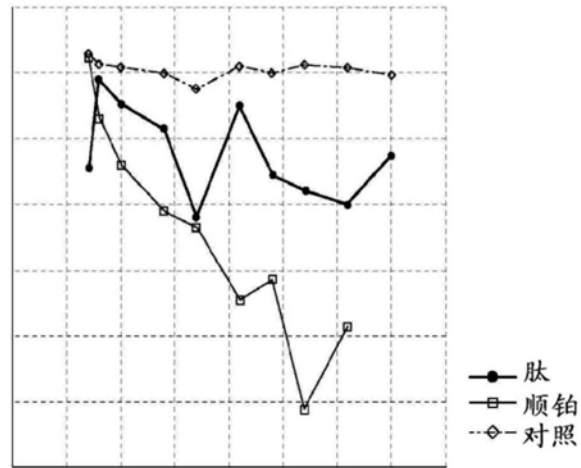


图16

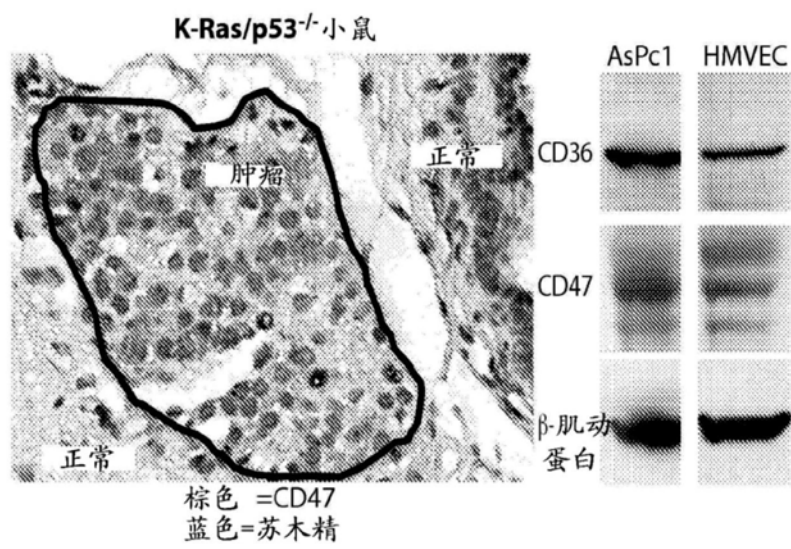


图17

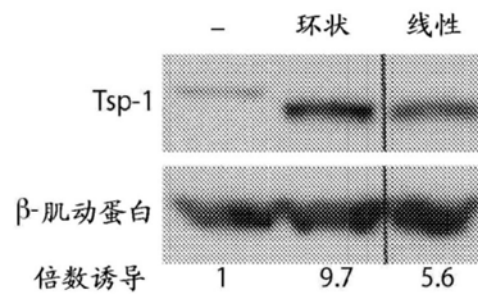


图18

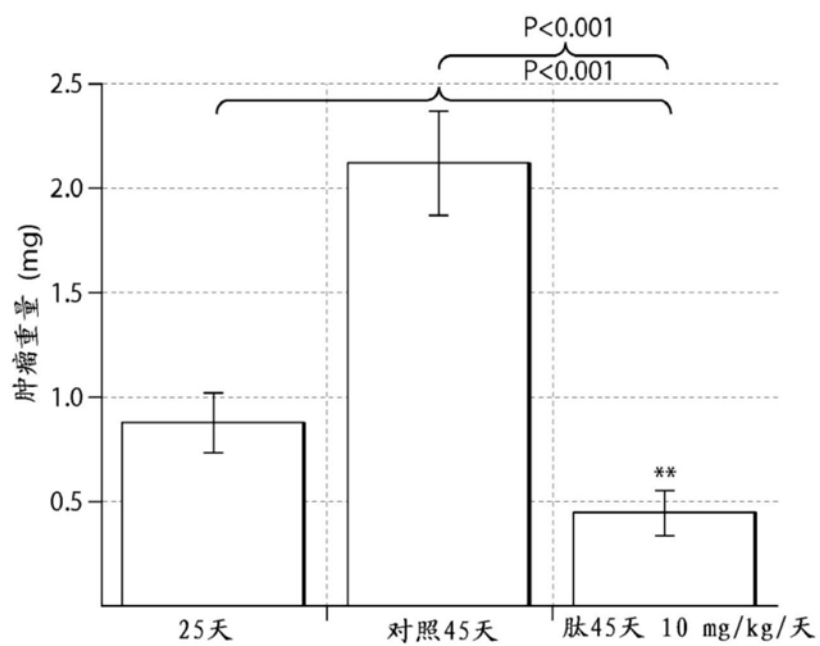


图19

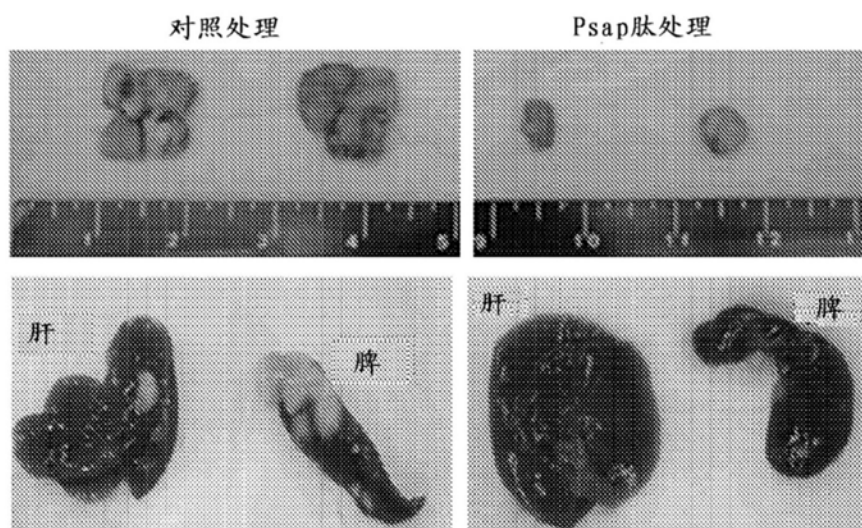


图20