



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103435694 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 11

(21) 申请号 201310334389. 9

C12N 15/12(2006. 01)

(22) 申请日 2007. 10. 30

A61K 38/17(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 35/00(2006. 01)

60/855, 422 2006. 10. 31 US

A61P 17/06(2006. 01)

(62) 分案原申请数据

200780046085. 5 2007. 10. 30

(71) 申请人 美国政府卫生与公共服务部

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 娜佳·塔拉索瓦 迈克尔·迪安

楼宏

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 吴小明

(51) Int. Cl.

C07K 14/47(2006. 01)

权利要求书2页 说明书25页

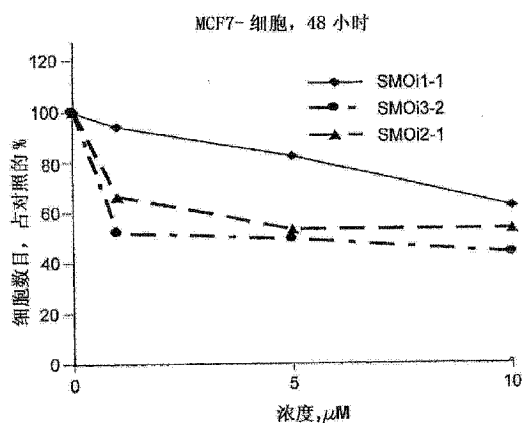
序列表39页 附图7页

(54) 发明名称

SMOOTHENED 多肽及使用方法

(57) 摘要

本发明公开一种分离的或纯化的多肽或肽模拟物,或其脂肪酸衍生物,所述多肽或肽模拟物包括 Smoothened(SMO) 蛋白一部分、其功能片段、或所述部分或所述功能片段的功能变体的氨基酸序列,其中所述部分包括 SMO 蛋白任一胞内环的氨基酸序列,其中所述功能片段包括所述胞内环的至少 7 个连续氨基酸,并且其中所述功能片段或功能变体抑制患病细胞的增殖。还提供了相关缀合物、核酸、重组表达载体、宿主细胞、和药物组合物。本发明还提供抑制患病细胞增殖、治疗或预防癌症、治疗肿瘤或银屑病、和抑制参与 Hedgehog 信号传导途径的基因表达由此抑制 Hedgehog 信号传导途径的方法。



1. 分离的或纯化的多肽、肽模拟物,或所述多肽或肽模拟物的脂肪酸衍生物,所述多肽或肽模拟物包括 Smoothened (SMO) 蛋白 (SEQ ID NO:1) 的一部分、其功能片段、或者所述部分或所述功能片段的功能变体的氨基酸序列,其中所述部分包括 SEQ ID NO:2 至 4 中的任一氨基酸序列,其中所述功能变体包括与 SEQ ID NO:2、3、或 4 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列,其中所述多肽或肽模拟物长度小于或等于 50 个氨基酸,其中所述功能片段包括 SEQ ID NO:2、3、或 4 的至少 7 个连续氨基酸,并且其中所述功能片段或功能变体抑制患病细胞的增殖。

2. 权利要求 1 的分离的或纯化的多肽或肽模拟物或脂肪酸衍生物, 其中所述肽模拟物是拟肽。

3. 权利要求 1 或 2 的分离的或纯化的多肽或肽模拟物或脂肪酸衍生物, 其中所述功能片段包括 SEQ ID NO:5 至 8 中的任一氨基酸序列。

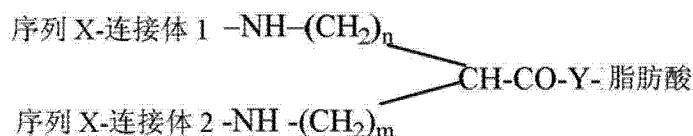
4. 权利要求 1 或 2 中任一项的分离的或纯化的多肽或肽模拟物或脂肪酸衍生物,其中所述功能片段包括选自 SEQ ID NO:9 至 33 组成的组中的一个氨基酸序列。

5. 权利要求 1 或 2 的分离的或纯化的多肽或肽模拟物或脂肪酸衍生物,其中所述功能变体包括 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列,其中在 SEQ ID NO:23 的位置 1-7、9、11 和 12 中的任一位置具有一个氨基酸置换,其中在所述位置的氨基酸被 Ala 置换。

6. 权利要求 1 或 2 的分离的或纯化的多肽或肽模拟物或脂肪酸衍生物,其中所述功能变体包括 SEQ ID NO:23、26、或 33 的逆反类似物。

7. 权利要求 6 的分离的或纯化的多肽或肽模拟物或脂肪酸衍生物,其中所述逆反类似物包括 SEQ ID NO:34-37、84、和 92-94 中的任一氨基酸序列。

8. 权利要求6的分离的或纯化的多肽或肽模拟物,其包括下式通用结构:



其中序列X选自由以下组成的组:Ac-LAKFSTHWAYTL(全是-D)(SEQ ID NO:85); Ac-AKFSTHWAYTL(全是-D)(SEQ ID NO:86);和Ac-KFSTHWAYTL(全是-D)(SEQ ID NO:87);其中连接体1和连接体2每一个是任选地存在,并且每一个独立地是Gly、 β -Ala、氨基丙酸、 γ -氨基丁酸、氨基己酸(aminocaproic acid)、或氨基己酸(aminohexanoic acid);其中n和m为0-6;其中Y是K、C、高Cys、Orn、二氨基丙酸(DPA)、二氨基丁酸(DBA);并且其中所述脂肪酸是硬脂酸、棕榈酸、肉豆蔻酸、月桂酸、癸酸或辛酸。

9. 权利要求 1 或 2 的分离的或纯化的多肽或肽模拟物或脂肪酸衍生物,其中所述功能变体包括 SEQ ID NO:38 至 59 中的任一氨基酸序列。

10. 权利要求1或2的分离的或纯化的多肽或肽模拟物或脂肪酸衍生物,其中所述脂肪酸衍生物在氨基(N-)端,羧基(C-)端,或N-和C-端两端包括脂肪酸分子,所述脂肪酸分子任选地包含至少一个氨基基团。

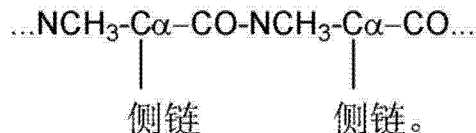
11. 权利要求 10 的分离的或纯化的多肽或肽模拟物或脂肪酸衍生物, 其中, 当脂肪酸分子位于 C 端时, 所述脂肪酸分子通过选自自由以下组成的组的一个氨基酸附着到所述多肽或肽模拟物上: Lys、Cys、高半胱氨酸、Orn、 α 、 γ -二氨基丁酸、和 α 、 β -二氨基丙酸。

12. 权利要求 11 的分离的或纯化的多肽或肽模拟物或脂肪酸衍生物,其中所述氨基酸是 Lys。

13. 权利要求 10 的分离的或纯化的多肽或肽模拟物或脂肪酸衍生物,其中,当脂肪酸分子位于 C 端时,所述脂肪酸分子是式 I 或式 II 的分子,其中式 I 是 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, 并且式 II 是 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$, 其中每一个 n 和 m 是 1-24。

14. 权利要求 1 或 2 的分离的或纯化的多肽或肽模拟物或脂肪酸衍生物,其还包括细胞-穿透肽(CPP)。

15. 权利要求 1 或 2 的分离的或纯化的多肽或肽模拟物或脂肪酸衍生物,其中所述肽模拟物包括具有下式结构的甲基化肽主链:



16. 一种缀合物,其包括(i)多肽或肽模拟物,或其脂肪酸衍生物,所述多肽或肽模拟物包括 Smoothened(SMO) 蛋白 (SEQ ID NO:1) 的一部分、其功能片段、或者所述部分或所述功能片段的功能变体的氨基酸序列,其中所述部分包括 SEQ ID NO:2 至 4 中的任一氨基酸序列,其中所述功能片段包括 SEQ ID NO:2、3、或 4 的至少 7 个连续氨基酸,并且其中所述功能片段或功能变体抑制患病细胞的增殖,和(ii)靶向部分。

17. 编码多肽的分离的或纯化的核酸,所述多肽包括 Smoothened(SMO) 蛋白 (SEQ ID NO:1) 的一部分、其功能片段、或者所述部分或所述功能片段的功能变体的氨基酸序列,其中所述部分包括 SEQ ID NO:2 至 4 中的任一氨基酸序列,其中所述功能片段包括 SEQ ID NO:2、3、或 4 的至少 7 个连续氨基酸,并且其中所述功能片段或功能变体抑制患病细胞的增殖。

18. 药物组合物,其包括:权利要求 1 或 2 的多肽或肽模拟物或脂肪酸衍生物、权利要求 16 的缀合物、或权利要求 17 的核酸,以及任选地脂质,和药用载体。

19. 分离的或纯化的多肽或肽模拟物,其包括 Smoothened(SMO) 蛋白 (SEQ ID NO:1) 的一部分或其功能变体的氨基酸序列,其中所述部分包括 SEQ ID NO:5 至 8 中的任一氨基酸序列,其中所述多肽或肽模拟物长度小于约 50 个氨基酸,其中所述功能变体包括 SEQ ID NO:80 的氨基酸序列。

20. 权利要求 1、2 或 19 的多肽或肽模拟物或脂肪酸衍生物,其用于在宿主中治疗或预防癌症、治疗银屑病或治疗肿瘤。

SMOOTHENED 多肽及使用方法

[0001] 本申请是申请日为 2007 年 10 月 30 日、题为“SMOOTHENED 多肽及使用方法”的中国专利申请 No. 200780046085.5 的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本专利申请要求于 2006 年 10 月 31 日提交的美国临时专利申请号 60/855,422 的利益,其通过引用结合于此。

[0004] 通过引用结合的以电子形式提交的材料

[0005] 计算机可读的核苷酸 / 氨基酸序列表通过引用完全结合于此,其与本申请同时提交,并且标识如下:一个于 2007 年 10 月 24 日生成的名为“701943Sequence_ST25.TXT”的 53,510 字节 ASCII(文本)文件。

[0006] 发明背景

[0007] 癌症是由信号转导途径的调控不良引起的。一种这样的途径是 Hedgehog(HH) 信号转导途径,其包括 Patch(Ptch) 和 Smoothened(SMO) 蛋白。HH 途径是胚胎细胞生长必需的 (Beachy 等, 自然 (Nature), 432:324-331(2004)), 并且发现其在一些癌症中调控不良,所述癌症包括乳腺癌 (Katano 等, 癌症通信 (Cancer Lett.), 227:99-104(2005))、前列腺癌 (Sanchez 等, 美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.), 101:12561-12566(2004))、胃癌 (Berman 等, 自然 (Nature), 425:846-851(2003))、结肠癌 (Douard 等, 手术 (Surgery), 139:665-670(2006))、肝癌 (Sicklick 等, 癌发生 (Carcinogenesis), 27:748-757(2006))、黑素瘤 (Pons 等, Clin. Transl. Oncol., 8:466-474(2006))、基细胞癌 (Lam 等, 癌基因 (Oncogene), 18, 833-836(1999))、和成神经管细胞瘤 (Berman 等, 科学 (Science), 297, 1559-1561(2002) 和 Romer 等, 癌症研究 (Cancer Res.), 65, 4975-4978(2005))。存在对在癌症治疗中使用的 HH 途径的抑制剂的需求。

[0008] 发明简述

[0009] 本发明提供分离的或纯化的多肽或肽模拟物 (peptidomimetic), 及其脂肪酸衍生物。所述多肽或肽模拟物包括与 SMO 蛋白的一部分相对应的氨基酸序列, 其中所述部分包括 SEQ ID NOs:2-4 中的任一氨基酸序列, 其中每个序列通常与 SMO 蛋白的胞内环相对应。所述多肽或肽模拟物可以是所述部分的功能片段, 所述功能片段包括 SEQ ID NO:2、3、或 4 的至少 7 个连续氨基酸。所述多肽或肽模拟物可以是所述部分或所述功能片段的功能变体。本发明的多肽和肽模拟物 (包括其脂肪酸衍生物, 功能片段和功能变体) 抑制 HH 途径和 / 或患病细胞的增殖。

[0010] 本发明还提供包括任意本发明的多肽或肽模拟物、或其脂肪酸衍生物的缀合物。本发明还提供编码本发明多肽的核酸, 以及相关的重组表达载体和宿主细胞。此外, 本发明提供包括任意本发明的多肽、肽模拟物、脂肪酸衍生物、缀合物、核酸、和重组表达载体的药物组合物。

[0011] 本发明的药物组合物有效用于抑制患病细胞增殖, 以致本发明还提供一种抑制患病细胞增殖的方法。所述方法包括使所述患病细胞与有效抑制患病细胞增殖的量的本发明药物组合物接触。

[0012] 本发明提供本发明药物组合物的其它应用方法, 包括在患者中治疗或预防癌症的

方法,在患者中治疗银屑病的方法,在患者中治疗肿瘤的方法,以及在患病细胞中抑制选自 Gli-1、Gli-2、Gli-3、Ptch、Shh、Smo、或 NES 的基因的表达的方法。

[0013] 数副附图简述

[0014] 图 1 描述按照本发明的一个实施方案,作为 SM0i1-1、SM0i2-1、和 SM0i3-1 脂化多肽浓度的函数的,在 48 小时处理时存活的 MCF-7 乳腺癌细胞(相对于对照)的 %。

[0015] 图 2 描述在用 0、5、或 10 μ M(分别为白色、黑色、线条)环杷明(cyclopamine)、SM0i3-1、或 SM0i2-1 处理时,胃腺癌细胞的存活细胞量。

[0016] 图 3 描述按照本发明的一个实施方案,在用包括基于 SM0 蛋白第三个胞内环的氨基酸序列的多肽处理 48 小时时,存活的 MCF-7 细胞(相对于对照)的 %。

[0017] 图 4 描述按照本发明的一个实施方案,在用 SM0i2-8 或逆反(retroinverso)类似物即 SM0i2-16 和 SM0i2-17 处理 48 小时时,存活的 SK-Mel2 细胞的 %。

[0018] 图 5 描述按照本发明的一个实施方案,在用环杷明、SM0i3-1、或 SM0i2-1 多肽处理 48 小时时,DU145 细胞中 HH 途径的基因的相对表达。

[0019] 图 6 描述按照本发明的一个实施方案,在用 SM0i2-8 或在 SM0i2-8 位置 5 处代替 Trp 残基包含苯甲酰苯丙氨酸(BPA)残基的多肽模拟物处理 60 小时时,存活的 SK-Mel2 细胞的 %。

[0020] 图 7 描述按照本发明的一个实施方案,在暴露于肽化合物 48 小时后,在 SK-Mel2 黑素瘤细胞中通过 MTT 测定法确定的第二胞内环衍生物(SM0i2-12(圆形)和 SM0i2-17(方形))的毒性。

[0021] 图 8 描述按照本发明的一个实施方案,随着增高 SM0i2-8/WMC-77 比对探针测量的荧光发射强度。

[0022] 图 9 描述按照本发明的一个实施方案,在暴露于 SM0i2-12(菱形)或 SM0i2-20(方形)时,对乳腺癌、黑素瘤、肝细胞瘤(heptaoma)、和胰腺癌细胞的生长抑制。

[0023] 图 10 描述 SM0i2-8(菱形)和 SM0i2-16(三角形)肽的圆二色性光谱。

[0024] 发明详述

[0025] SM0 蛋白是在 Hedgehog(HH)信号转导途径中起作用的跨膜蛋白(参见,例如, Huangfu 和 Anderson, 发育学(Development)133:3-14(2006)),如讨论地,其与一些癌症相关,例如,乳腺癌、前列腺癌、胃癌等。这些蛋白包括一个胞外结构域、7 个跨膜结构域、3 个胞内环、和一个胞内结构域。SM0 蛋白在一般拓扑学方面与 G 蛋白偶联受体(GPCR)相似,但是似乎以与 GPCRs 不同的方式进行信号传导。SM0 蛋白的实例包括人 SM0 蛋白(例如, GenBank 登记号 NP_005622(SEQ ID NO:1)),及其直向同源物,诸如小鼠 SM0 蛋白(例如, GenBank 登记号 NP_795970)、大鼠 SM0 蛋白(例如, GenBank 登记号 NP_036939)、果蝇 SM0 蛋白(例如, GenBank 登记号 NP_523443)、斑马鱼 SM0 蛋白(例如, GenBank 登记号 NP_571102)、鸡 SM0 蛋白、(例如, GenBank 登记号 AAB84389)、非洲爪蟾 SM0 蛋白(例如, GenBank 登记号 AAK15464)。

[0026] 本发明提供分离的或纯化的多肽,其包括与 SM0 蛋白的一部分相对应的氨基酸序列,其中所述部分包括 SEQ ID NOs:2-4 中的任一氨基酸序列,所述每一条序列与 SM0 蛋白的胞内环相同或基本相同。例如,SEQ ID NO:2 在 SM0 第二胞内环的 N-端包含一个额外的氨基酸(Leu)。

[0027] 当用于本文时,术语“多肽”是指通过一个或多个肽键连接的单链氨基酸。在这点上,该术语包括任何长度的肽、寡肽、和多肽,条件是存在至少一个肽键。为了本发明的目的,本发明的多肽包括至少 6 个肽键,例如,10 个或更多个肽键。

[0028] 本发明多肽包括 SMO 蛋白的一部分的氨基酸序列。即,本发明的多肽不包括任何全长的、野生型 SMO 蛋白,例如,SEQ ID NO:1。在这一方面,本发明多肽包括野生型 SMO 蛋白的少于约 780 个氨基酸。例如,本发明多肽包括野生型 SMO 蛋白的少于约 500 个氨基酸。最优选地,本发明多肽包括野生型 SMO 蛋白的少于约 75 个,例如,约 50 个氨基酸。本发明的多肽包括约 10- 约 12 个氨基酸(排除任何 CPP,如本文所讨论)也是优选的。

[0029] 按照本发明的一个实施方案,SMO 蛋白的所述部分包括 SEQ ID NOs:2-4 中的任一氨基酸序列。在这一点上,本发明的多肽可以包括、基本由、或由 SEQ ID NO:2、3、或 4 的氨基酸序列组成。

[0030] 备选地,SMO 蛋白的所述部分包括 SEQ ID NOs:5-8 中的任一氨基酸序列。在这一点上,本发明的多肽可以包括、基本由、或由 SEQ ID NO:5、6、7、或 8 的氨基酸序列组成。

[0031] 本文所述的本发明多肽的功能片段包含在本发明范围之内。当参照本发明的多肽使用时,术语“功能片段”是指本发明多肽的任何部分(part)或部分(portion),所述部分(part)或部分(portion)保留其作为一部分的多肽(亲本多肽)的生物学活性。所述功能片段可以是包括其作为一部分的多肽的连续氨基酸的任何片段,条件是所述功能片段抑制患病细胞的增殖。功能片段包括,例如,本发明多肽的那些部分,所述那些部分保留与亲本多肽以相似程度、相同程度、或更高程度抑制增殖、或治疗或预防疾病(例如,癌症、肿瘤、银屑病)的能力。参照亲本多肽,所述功能片段可以包括,例如,亲本多肽的约 10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%、或更多。

[0032] 所述功能片段可以在氨基或羧基端、或两端包括额外的氨基酸,例如,在亲本多肽的氨基酸序列中不存在的氨基酸。理想地,所述额外的氨基酸不妨碍所述功能片段的生物学功能,例如,抑制增殖、或治疗或预防疾病(例如,癌症,肿瘤,银屑病)。更理想地,当与所述亲本多肽的生物学活性相比较时,所述额外的氨基酸增强生物学活性。

[0033] 在本发明的一个优选实施方案中,所述功能片段包括 SEQ ID NO:2、3、或 4 的至少 5 个连续的氨基酸,并且抑制患病细胞的增殖。在本发明的一个更优选实施方案中,所述功能片段包括 SEQ ID NO:2、3、或 4 的至少 7 个连续的氨基酸。在本发明的另一个优选实施方案中,所述功能片段包括 SEQ ID NO:2、3、或 4 的至少 4 个连续的氨基酸并且抑制患病细胞的增殖。所述功能片段可以,例如,包括选自 SEQ ID NOs:5-8 组成的组的一个氨基酸序列。例如,所述功能片段可以包括选自 SEQ ID NOs:9-33 组成的组的一个氨基酸序列。此外,本发明的功能片段可以基本由或由 SEQ ID NOs:9-33 中任一氨基酸序列组成。

[0034] 本发明多肽的功能变体、以及本文所述的本发明功能片段的功能变体也包括在本发明范围之内。当用于本文时,术语“功能变体”是指与亲本多肽或亲本功能片段具有基本的或显著的序列同一性或相似性的多肽,所述功能变体保留其作为变体的多肽或功能片段的生物学活性。功能变体包括,例如,本文所述的本发明多肽(亲本多肽)的那些变体和本文所述的功能片段(亲本功能片段)的那些变体,所述变体保留以与所述亲本多肽或亲本功能片段相似的程度、相同的程度、或更高的程度抑制患病细胞增殖的能力。参照所述亲本多肽或亲本功能片段,所述功能变体可以,例如,与所述亲本多肽或亲本功能片段的氨

氨基酸序列有至少约 30%、50%、75%、80%、90%、98% 或更多的同一性。

[0035] 所述功能变体可以,例如,包括具有至少一个保守氨基酸置换的亲本多肽或亲本功能片段氨基酸序列。在这一点上,所述功能变体可以包括具有 2 个、3 个、4 个、5 个、或更多个保守氨基酸置换的亲本多肽或亲本功能片段的氨基酸序列。备选地或另外地,所述功能变体可以包括具有至少一个非保守氨基酸置换的亲本多肽或亲本功能片段的氨基酸序列。在这一点上,所述功能变体可以包括具有 2 个、3 个、4 个、5 个、或更多个非保守氨基酸置换的亲本多肽或亲本功能片段的氨基酸序列。在这种情形中,对于所述非保守氨基酸置换,优选不妨碍或抑制所述功能变体的生物学活性。优选地,所述非保守氨基酸置换提高所述功能变体的生物学活性,以致当与所述亲本多肽或亲本功能片段相比较时,所述功能变体的生物学活性提高。

[0036] 所述功能变体优选地包括一个或多个保守氨基酸置换。在本领域内,保守氨基酸置换是已知的,并且包括这样的氨基酸置换,即,其中一个具有某种物理和/或化学特性的氨基酸被换为另一个具有相同化学或物理特性的氨基酸。例如,保守氨基酸置换可以用酸性氨基酸置换另一个酸性氨基酸(例如,Asp 或 Glu),用具有非极性侧链的氨基酸置换另一个具有非极性侧链的氨基酸(例如,Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val, 等),用碱性氨基酸置换另一个碱性氨基酸(Lys, Arg, 等),用具有极性侧链的氨基酸置换另一个具有极性侧链的氨基酸(Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr, 等),用芳香氨基酸(Trp, Phe, Tyr, 等)置换另一个芳香氨基酸,等。

[0037] 理想地,本发明的功能变体包括 SEQ ID NO:2、3、或 4 的至少 4 个连续氨基酸,与所述亲本多肽或亲本功能片段具有至少 75% 的序列同一性(例如,80%, 85%, 90%, 95% 的序列同一性),并且抑制患病细胞增殖。

[0038] 例如,所述功能变体可以是 SEQ ID NOs:17-21 和 23-33 中任一序列的功能变体。在这一点上,所述功能变体可以包括 SEQ ID NOs:38-54 和 57-59 中任一氨基酸序列,其中 Xaa 选自 Tyr、Phe、或 BPA 组成的组。

[0039] 此外,例如,所述功能变体可以是 SM0i2-8(SEQ ID NO:23)的功能变体,其包括在位置 1-7、9、11、和 12 处的氨基酸之一被 Ala 置换的 SM0i2-8 氨基酸序列。

[0040] 备选地,所述功能变体可以包括本文所述的任意本发明多肽或功能片段的逆反类似物。术语“逆反类似物”是指包括反转的亲本多肽氨基酸序列的多肽,以致所述逆反类似物的氨基酸序列(当从 N 端向 C 端读取时)与当从 C 端向 N 端读取时的亲本多肽的氨基酸序列相同。此外,关于逆反类似物,每一个氨基酸是该氨基酸的 D 异构体,D 异构体与 L 异构体相反。例如,三肽 Val-Ala-Gly 的逆反类似物具有氨基酸序列 Gly-Ala-Val, 其中每个氨基酸是 D 异构体。关于本发明,所述功能变体优选包括 SEQ ID NO:23、26、或 33 的逆反类似物。在这一点上,所述功能变体包括 SEQ ID NOs:34-37 中的任一氨基酸序列。

[0041] 本发明的多肽(包括功能片段和功能变体)可以通过本领域已知的方法获得。合适的从头合成多肽的方法记述在参考文献中,诸如 Chan 等, Fmoc 固相肽合成(Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis), 牛津大学出版社(Oxford University Press), 牛津, 英国, 2005; 肽和蛋白药物分析(Peptide and Protein Drug Analysis), Reid, R. 编, Marcel Dekker 公司, 2000; 表位绘图(Epitope Mapping), Westwood 等编, 牛津大学出版社(Oxford University Press), 牛津, 英国, 2000; 和美国专利号 5, 449, 752。此

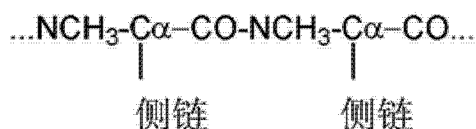
外,可以使用本文所述的核酸用标准重组方法重组生产多肽。参见,例如, Sambrook 等, 分子克隆:实验室手册 (Molecular Cloning:A Laboratory Manual), 第 3 版., 冷泉港出版社 (Cold Spring Harbor Press), 冷泉港, 纽约 2001; 和 Ausubel 等, 现代分子生物学方法 (Current Protocols in Molecular Biology), 格林和 John Wiley & Sons 出版协会 (Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons), 纽约, 1994。此外,本发明的一些多肽(包括其功能片段和功能变体)可以从这样的来源如植物、细菌、昆虫、哺乳动物如大鼠、人等分离和/或纯化。分离和纯化的方法在本领域内是公知的。备选地,本文所述的多肽(包括其功能片段和功能变体)可以合成或从公司如 Synpep (Dublin, CA), 肽技术公司 (Peptide Technologies Corp.) (Gaithersburg, MD), 和多肽系统 (Multiple Peptide Systems) (圣地亚哥, CA) 商购获得。在这一方面,本发明多肽可以是合成的、重组的、分离的、和/或纯化的。

[0042] 本发明还提供任意本文所述本发明多肽(包括功能片段和功能变体)的肽模拟物。当用于本文时,术语“肽模拟物”是指具有与相对应多肽基本相同的通用结构具有增加其稳定性或生物学功能的修饰的化合物。肽模拟物包括,例如,包括相对应多肽的相同氨基酸序列的那些化合物,所述相对应多肽在两个或更多个氨基酸之间具有改变的主链。另外,所述肽模拟物可以包括合成的或非天然存在的氨基酸来代替天然存在的氨基酸。

[0043] 在一个优选的实施方案中,所述肽模拟物是拟肽。当用于本文时,术语“拟肽”是指这样的肽模拟物,其中每个氨基酸的侧链粘附在氨基酸的氮原子上而不是 α 碳上。例如,拟肽可以被视为 N- 置换的甘氨酸,其具有 NRCH_2CO 通用结构的重复单位,并且其具有与相对应的多肽相同或基本相同的氨基酸序列。

[0044] 在另一个优选的实施方案中,所述肽模拟物包括改变的主链,其中在每个氨基酸之间的键是甲基化的。在这一点上,所述肽模拟物可以包括下述结构的甲基化肽主链:

[0045]



[0046] 本发明的多肽(包括功能片段和功能变体)以及肽模拟物可以是任意长度的,即,可以包括任意数目的氨基酸,条件是所述多肽(或其功能片段或功能变体)或肽模拟物保留它们的生物学活性,例如,在宿主中抑制患病细胞增殖、治疗或预防疾病(例如,癌症、肿瘤、银屑病)的能力,等。例如,本发明的多肽或肽模拟物可以是 50-5000 个氨基酸长,如长度为 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 或更多个氨基酸。优选地,本发明的多肽长度为 5-50 个氨基酸。

[0047] 本发明的多肽(包括功能片段和功能变体)和肽模拟可以包括合成的氨基酸来代替一个或多个天然存在的氨基酸。所述合成的氨基酸在本领域内是已知的,并且包括,例如,氨基环己烷羧酸、正亮氨酸、 α -氨基正癸酸、高丝氨酸、S-乙酰氨基甲基-半胱氨酸、反式-3-和反式-4-羟脯氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-苯甲酰苯丙氨酸、4-硝基苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、4-羧基苯丙氨酸、 β -苯基丝氨酸、 β -羟基苯丙氨酸、苯基甘氨酸、 α -萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、二氢吡啶-2-羧酸、1, 2, 3, 4-四氢异喹啉-3-羧酸、

氨基丙二酸、氨基丙二酸单酰胺、N' - 苄基 - N' - 甲基 - 赖氨酸、N' , N' - 二苄基 - 赖氨酸、6- 羟基赖氨酸、鸟氨酸、 α - 氨基环戊烷羧酸、 α - 氨基环己烷羧酸、 α - 氨基环庚烷羧酸、 α - (2- 氨基 - 2- 降冰片烷) - 羧酸、 α , γ - 二氨基丁酸、 α , β - 二氨基丙酸、高苯丙氨酸、和 α - 叔 - 丁基甘氨酸。

[0048] 本发明的多肽（包括功能片段和功能变体）和肽模拟物可以通过例如，二硫键，被脂化（例如，脂肪酸化）、糖基化、酰胺化、羧酸化、磷酸化、酯化、N- 酰化、环化、或被转化成酸加成盐和 / 或任选地被二聚体化或多聚体化、或缀合化。

[0049] 在这一点上，本发明还提供任意本发明多肽（包括功能片段和功能变体）和肽模拟物的脂化衍生物。本发明的脂化衍生物包括含有脂质分子的本文所述的任何多肽和肽模拟物。当用于本文时，术语“脂质分子”是指任何包括这样的疏水部分的分子，所述疏水部分促进所述多肽（包括功能片段和功能变体）或肽模拟物穿过细胞膜并且进入到细胞内。所述脂质可以是本领域已知的任何脂质，诸如，例如，脂肪酸，法呢基基团（例如，二磷酸法呢酯），香叶基香叶基基团（例如，二磷酸香叶基香叶酯），磷脂基团，糖磷脂酰肌醇，磷脂酰丝氨酸，磷脂酰乙醇胺，鞘磷脂，磷脂酰胆碱，心磷脂，磷脂酰肌醇，磷脂酸，溶血磷酸甘油酯，和胆固醇基团。

[0050] 优选地，所述脂化衍生物是脂肪酸衍生物，其中本文所述的多肽或肽模拟物包括脂肪酸分子。所述脂肪酸分子可以是任何 C_8 - C_{20} 脂肪酸。所述脂肪酸分子可以是，例如，月桂酸、棕榈酸、肉豆蔻酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、 α - 亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸 (docosahexenoic acid)、芥酸、花生酸、或山萮酸。所述脂肪酸可以在任意碳原子上任选地包含其他官能团，例如，一个或多个氨基。在一个优选的实施方案中，所述脂肪酸分子是 C_8 - C_{16} 脂肪酸，例如， C_{16} 脂肪酸。在更优选的实施方案中，所述脂肪酸是棕榈酸。

[0051] 正如对于脂质分子是真实的，所述脂肪酸分子可以附着在本发明多肽（包括功能片段和功能变体）或肽模拟物的任何适当的部分。在本发明的一个优选实施方案中，本发明多肽（包括功能片段和功能变体）或肽模拟物的脂肪酸衍生物在氨基 (N-) 端、在羧基 (C-) 端、或在 N- 和 C- 两端包括脂肪酸分子。

[0052] 脂肪酸分子可以直接或通过连接体附着到本发明多肽（包括功能片段和功能变体）或肽模拟物上。在本发明的一个实施方案中，当所述脂肪酸分子位于本发明多肽或肽模拟物的 C 端时，所述脂肪酸分子通过选自由下列各项组成的组的氨基酸连接体附着：Lys、Cys、高半胱氨酸（高 Cys）、Orn、 α , γ - 二氨基丁酸、和 α , β - 二氨基丙酸。在本发明的一个优选实施方案中，脂肪酸分子通过 Lys 附着。在本发明的一个更优选实施方案中，脂肪酸分子通过 Lys 的 ϵ 碳附着。

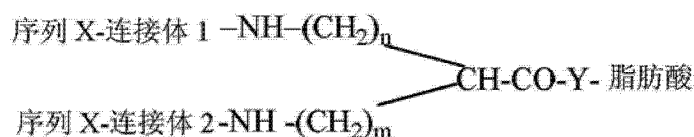
[0053] 在另一个优选的实施方案中，当脂肪酸分子位于本发明多肽或肽模拟物的 C- 端时，所述脂肪酸分子被修饰，例如，以在诸如式 I 或式 II 的修饰的分子中包括氨基，其中式 I 是 $NH_2(CH_2)_nCOOH$ ，式 II 是 $CH_3(CH_2)_mCH(NH_2)COOH$ ，其中每个 n 和 m 为 1-24。在这一点上，所述脂肪酸分子附着在所述多肽或肽模拟物 C 端氨基酸的羧基上。优选地，n 或 m 是 8-16。更优选地，n 或 m 是 16。

[0054] 备选地，本文所述的本发明多肽（包括功能片段和功能变体）或肽模拟物可以包括细胞 - 穿透肽 (CPP)。所述 CPP 促进本发明多肽或肽模拟物穿过细胞膜并且进

入细胞内。CPPs 在本领域中是已知的。参见,例如, Deshayes 等, 细胞分子生命科学 (Cell.Mol.Life Sci.)62:1839-1849(2005); El-Andaloussi 等, 现代药物设计 (Curr. Pharm. Design) 11:3597-3611(2005); 以及 Mäe 和 Langel, 现代药学观点 (Curr. Opin. Pharmacol.) 6:509-514(2006))。所述 CPP 可以是本领域已知的那些中的任一种, 例如, Transportan, VP22, Pep1, 等。优选地, 所述 CPP 包括 SEQ ID NO:78 或 79 的氨基酸序列, 其分别对应 penetratin 和 Tat(48-60) 的氨基酸序列。

[0055] 本发明的多肽（包括功能片段和功能变体）和肽模拟物，包括其脂肪酸衍生物，可以是单体肽，或可以是二聚体或多聚体肽。例如，所述多肽可以是下述通用结构的二聚体：

[0056]



[0057] 其中序列X选自由下列各项组成的组:Ac-LAKFSTHWAYTL(全是-D)(SEQ ID NO:85);Ac-AKFSTHWAYTL(全是-D)(SEQ ID NO:86);和Ac-KFSTHWAYTL(全是-D)(SEQ ID NO:87);其中连接体1和连接体2每一个是任选地存在,并且每一个独立地是Gly、 β -Ala、氨基丙酸、 γ -氨基丁酸、氨基己酸(aminocaproic acid)、或氨基己酸(aminohexanoic acid);其中n和m为0-6;其中Y是K、C、高Cys、Orn、二氨基丙酸(DPA)、二氨基丁酸(DBA);并且其中所述脂肪酸是硬脂酸、棕榈酸、肉豆蔻酸、月桂酸、癸酸或辛酸。在一个优选的实施方案中,序列X是SEQ ID NO:87,n是4,m是0,连接体1和连接体2的每一个是 β -Ala,并且所述脂肪酸是棕榈酸。制备二聚体和多聚体多肽的方法在本领域中是已知的。参见,例如,Wrighton等,自然生物技术(Nature Biotechnology)15:1261-1265(1997)。制备二聚体多肽的一种优选方法也记述在本文的实施例1中。

[0058] 当本发明的多肽（包括功能片段和功能变体）和肽模拟物，包括其脂肪酸衍生物，是以盐的形式存在时，优选地，所述多肽或肽模拟物以药用盐的形式存在。合适的药用酸加成盐包括衍生自矿物酸如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、硝酸、和硫酸的那些，和衍生自有机酸如酒石酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、延胡索酸、苯甲酸、乙醇酸、葡萄糖酸、琥珀酸、和芳基磺酸例如对-甲苯磺酸的那些。

[0059] 本发明还提供编码本文所述的任一种本发明多肽,包括功能片段和功能变体的核酸。当用于本文时,术语“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”,并且通常是指 DNA 或 RNA 的聚合物,其可以是单链的或双链的,合成的或从天然来源获得(例如,分离和/或纯化),其可以包含天然的、非天然的或改变的核苷酸,并且其可以包含天然的、非天然的或改变的核苷酸之间键,诸如氨基磷酸酯(phosphoroamidate)键或硫代磷酸酯键,代替在未修饰寡核苷酸的核苷酸之间存在的磷酸二酯。通常优选所述核酸不包括任何插入、删除、倒位、和/或置换。然而,在一些情形中,如本文所讨论的,核酸包括一个或多个插入、删除、倒位、和/或置换可以是适当的。

[0060] 优选地,本发明的核酸是重组的。当用于本文时,术语“重组”是指(i)通过使天然或合成的核酸片段与能够在活细胞内复制的核酸分子连接而在活细胞外构建的分子,或(ii)由以上(i)中所述的那些的复制形成的分子。为了本文的目的,复制可以是体外复

制或体内复制。

[0061] 核酸可以基于化学合成 / 或酶连接反应使用本领域已知的方法构建。参见, 例如, Sambrook 等, 同上所述, 和 Ausubel 等, 同上所述。例如, 核酸可以使用天然存在的核苷酸或不同修饰的核苷酸化学合成, 所述不同修饰的核苷酸设计成增加分子的生物学稳定性或增加在杂交时形成的双链体的物理稳定性 (例如, 硫代磷酸衍生物和吡啶置换的核苷酸)。可以用来生成所述核酸的修饰的核苷酸的实例包括, 但不限于, 5- 氟尿嘧啶、5- 溴尿嘧啶、5- 氯尿嘧啶、5- 碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4- 乙酰胞嘧啶、5- (羧基羟甲基) 尿嘧啶、5- 羧甲基氨基甲基 -2- 硫尿苷、5- 羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D-galactosylqueosine、肌苷、 N^6 - 异戊烯基腺嘌呤、1- 甲基鸟嘌呤、1- 甲基肌苷、2, 2- 二甲基鸟嘌呤、2- 甲基腺嘌呤、2- 甲基鸟嘌呤、3- 甲基胞嘧啶、5- 甲基胞嘧啶、 N^6 - 置换的腺嘌呤、7- 甲基鸟嘌呤、5- 甲基氨基甲基尿嘧啶、5- 甲氧基氨基甲基 -2- 硫尿嘧啶、 β -D-mannosylqueosine、5' - 甲氧基羧甲基尿嘧啶、5- 甲氧基尿嘧啶、2- 甲基硫代 - N^6 - 异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶 -5- 羟基乙酸 (v)、wybutoxosine、假尿嘧啶、queosine、2- 硫胞嘧啶、5- 甲基 -2- 硫尿嘧啶、2- 硫尿嘧啶、4- 硫尿嘧啶、5- 甲基尿嘧啶、尿嘧啶 -5- 羟基乙酸甲基酯、3- (3- 氨基 -3-N-2- 羧丙基) 尿嘧啶、和 2, 6- 二氨基嘌呤。备选地, 本发明的一种或多种核酸可以购自公司, 如大分子资源 (Macromolecular Resources) (Fort Collins, CO) 和 Synthegen (休斯顿 (Houston), TX)。

[0062] 所述核酸可以包括编码任一种本发明多肽, 包括功能片段和功能变体的任意核苷酸序列。例如, 所述核酸可以包括编码 SEQ ID NOs: 2-29, 32, 33, 38-48, 53-56, 59-66, 70-72, 76, 和 80 中任一种的核苷酸序列。所述核酸备选地可以包括与这些序列中的任一种简并的核苷酸序列或简并序列的组合。本发明还提供包括这样的核苷酸序列的分离的或纯化的核酸, 所述核苷酸序列与本文所述的任一种核酸的核苷酸序列互补或在严格条件下与本文所述的任一种核酸的核苷酸序列杂交。

[0063] 本发明的核酸可以结合到重组表达载体中。在这一点上, 本发明提供包括任一种本发明核酸的重组表达载体。为了本文的目的, 术语 "重组表达载体" 意指遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体, 其在该构建体包括编码 mRNA、蛋白、多肽、或肽的核苷酸序列, 并且载体在足以使所述 mRNA、蛋白、多肽或肽在宿主细胞内表达的条件下与所述细胞接触时, 允许宿主细胞表达 mRNA、蛋白、多肽、或肽。本发明的载体作为一个整体不是天然存在的。然而, 载体的部分可以是天然存在的。本发明的重组表达载体可以包括任意类型的核苷酸, 包括但不限于, DNA 和 RNA, 其可以是单链的或双链的, 合成的或部分获自天然来源, 并且其可以包括天然的、非天然的或改变的核苷酸。所述重组表达载体可以包括天然存在的、非天然存在的核苷酸间键, 或两种类型的键。优选地, 所述非天然存在的或改变的核苷酸或核苷酸间键不阻碍该载体的转录或复制。

[0064] 本发明的重组表达载体可以是任何适当的重组表达载体, 并且可以用于转化或转染任何适当的宿主。适当的载体包括设计用于繁殖和扩增或用于表达或用于二者的那些, 诸如质粒或病毒。所述载体可以选自由下列各项组成的组: pUC 系列 (Fermentas 生命科学 (Fermentas Life Sciences))、pBluescript 系列 (Stratagene, LaJolla, CA)、pET 系列 (Novagen, Madison, WI)、pGEX 系列 (法玛西亚生物技术 (Pharmacia Biotech), Uppsala, Sweden)、和 pEX 系列 (Clontech, Palo Alto, CA)。还可以使用噬菌体载

体,诸如 λ GT10、 λ GT11、 λ ZapII (Stratagene)、 λ EMBL4、和 λ NM1149。植物表达载体的实例包括 pBI01、pBI101. 2、pBI101. 3、pBI121 和 pBIN19 (Clontech)。动物表达载体的实例包括 pEUK-C1、pMAM 和 pMAMneo (Clontech)。优选地,所述重组表达载体是病毒载体,例如,反转录病毒载体。

[0065] 可以使用记述在例如, Sambrook 等, 同上所述, 和 Ausubel 等, 同上所述中的标准重组 DNA 技术制备本发明的重组表达载体。可以制备环形的或线性的表达载体构建体,以包含在原核或真核宿主细胞中起作用的复制系统。例如,复制系统可以源自,例如, ColE1、2 μ 质粒、 λ 、SV40、牛乳头状瘤病毒等。

[0066] 理想地,所述重组表达载体包括调控序列,诸如转录和翻译起始与终止密码子,当合适并且考虑载体是基于 DNA 的还是基于 RNA 的时候,所述调控序列对于所述载体所引入的宿主类型(例如,细菌、真菌、植物、或动物)是特异性的。

[0067] 所述重组表达载体可以包括一种或多种标记基因,其允许选择转化的或转染的宿主。标记基因包括杀生物剂抗性,例如,对抗生素、重金属等的抗性,在营养缺陷型宿主中互补以提供原养型,等等。对于本发明表达载体合适的标记基因包括,例如,新霉素/G418 抗性基因、潮霉素抗性基因、组氨醇抗性基因、四环素抗性基因、和氨苄青霉素抗性基因。

[0068] 所述重组表达载体可以包括天然的或非天然的启动子,所述启动子同编码修饰的 TCR、多肽、或蛋白(包括其功能部分和功能变体)的核苷酸可操作性连接,或同与编码修饰的 TCR、多肽、或蛋白的核苷酸序列互补或与之杂交的核苷酸序列可操作性连接。启动子的选择,例如,强、弱、诱导型、组织特异型和发育特异型的,在技术人员的普通技能之内。相似地,核苷酸序列与启动子的组合也在技术人员的技能之内。启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,例如,巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40 启动子、RSV 启动子、以及在鼠干细胞病毒长末端重复中存在的启动子。

[0069] 本发明的重组表达载体可以设计用于瞬时表达、用于稳定表达、或用于二者。此外,所述重组表达载体可以制备成用于组成型表达或用于诱导型表达。

[0070] 此外,所述重组表达载体可以制备成包括自杀基因。当用于本文时,术语“自杀基因”是指引起表达所述自杀基因的细胞死亡的基因。所述自杀基因可以是这样的基因,其对其中表达所述基因的细胞赋予针对某种试剂如药物的敏感性,并且在所述细胞与所述试剂接触或暴露于所述试剂时,引起所述细胞死亡。自杀基因在本领域内是已知的(参见,例如,自杀基因治疗:方法和综述(Suicide Gene Therapy:Methods and Reviews),Springer, Caroline J. (英国萨里萨顿癌症研究所的癌症治疗癌症研究英国中心(Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana 出版社, 2004), 并且包括,例如,单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因、cytosine daminase、嘌呤核苷磷酸酶、以及硝基还原酶。

[0071] 本发明还提供包括本文所述的任何一种重组表达载体的宿主细胞。当用于本文时,术语“宿主细胞”是指可以包含本发明重组表达载体的任何类型的细胞。宿主细胞可以是真核细胞,例如,植物、动物、真菌、或藻类,或者可以是原核细胞,例如,细菌或原生动物。宿主细胞可以是培养的细胞或原代细胞,即,直接从生物体如人分离的原代细胞。宿主细胞可以是贴壁细胞或悬浮的细胞,即,在混悬液中生长的细胞。适当的宿主细胞在本领域内是已知的,并且包括,例如, DH5 α 大肠杆菌(E. coli)细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴

VERO 细胞、COS 细胞、HEK293 细胞，等等。为了扩增或复制所述重组表达载体的目的，所述宿主细胞优选是原核细胞，例如，DH5 α 细胞。为了产生重组修饰的 TCR、多肽、或蛋白的目的，宿主细胞优选是哺乳动物细胞。更优选地，宿主细胞是人细胞。宿主细胞可以是任何细胞类型，可以来自任何类型的组织，并且可以是任何发育阶段的。

[0072] 本发明还提供包括至少一种本文所述的宿主细胞的细胞群体。所述细胞群体可以是异种群体，包括包含任一种所述重组表达载体的宿主细胞，以及至少一种其它细胞，例如，不包含任何所述重组表达载体的宿主细胞（例如，T 细胞），或除 T 细胞之外的细胞，例如，B 细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、红细胞、肝细胞、内皮细胞、上皮细胞、肌细胞、脑细胞，等。备选地，所述细胞群体可以是基本同种群体，其中所述群体主要包括包含所述重组表达载体的宿主细胞（例如，主要由包含所述重组表达载体的宿主细胞组成）。所述群体还可以是细胞的克隆群体，其中所述群体的所有细胞是包含重组表达载体的单一宿主细胞的克隆，以致该群体的所有细胞包含所述重组表达载体。在本发明的一个实施方案中，所述细胞群体是包括包含本文所述的重组表达载体的宿主细胞的克隆群体。

[0073] 在本发明范围内包括缀合物，例如，生物缀合物，其包括本发明多肽（包括任一种功能片段或功能变体）或肽模拟物、核酸、重组表达载体、或宿主细胞中的任一种。缀合物，以及通常合成缀合物的方法在本领域内也是已知的（参见，例如，Hudecz, F., 分子生物学方法 (Methods Mol. Biol.) 298:209-223(2005) 和 Kirin 等，无机化学 (Inorg Chem.) 44(15):5405-5415(2005)）。

[0074] 本发明多肽（包括功能片段和功能变体）、肽模拟物、脂肪酸衍生物、核酸、重组表达载体、以及宿主细胞（包括其群体）可以是分离的、纯化的、合成的、和 / 或重组的。当用于本文时，术语“分离的”意指已经从其天然环境脱离的。当用于本文时，术语“纯化的”意指已经在纯度上提高的，其中“纯度”是相对术语，并不必要地解释为绝对纯度。例如，纯度可以是至少约 50%，可以是大于 60%、70%、80%、或 90%、或可以是 100%。

[0075] 本发明多肽（包括功能片段和功能变体）、肽模拟物、脂肪酸衍生物、缀合物、核酸、重组表达载体、和宿主细胞（包括其群体），以下全部笼统称为“本发明物质”，可以配制成组合物，诸如药物组合物。在这一点上，本发明提供包括任意所述多肽（包括功能片段和功能变体）、肽模拟物、脂肪酸衍生物、缀合物、核酸、重组表达载体、和宿主细胞（包括其群体），以及药用载体的药物组合物。包含任意本发明物质的本发明药物组合物可以包括多于一种本发明物质，例如，多肽和核酸，或两种或更多不同的多肽。备选地，所述药物组合物可以包括与另一种药物活性试剂或药物组合的发明物质，所述另一种药物活性试剂或药物诸如化疗剂，例如，天冬酰胺酶，白消安，卡铂，顺铂，柔红霉素，多柔比星，氟尿嘧啶，吉西他滨，羟基脲，甲氨蝶呤，紫杉醇，利妥昔单抗，长春碱，长春新碱，等等。

[0076] 在本发明的一个优选实施方案中，所述药物组合物包括与脂质组合的本发明物质。所述脂质可以是任何脂质，包括，例如，脂肪酸、磷脂、固醇、鞘脂、萜、甘油酯、甘油磷酸酯、异戊烯醇酯、糖脂、聚酮化合物。所述脂在本领域内是已知的。参见，例如，Fahy 等，脂质研究杂志 (J. Lipid Res.) 46:839-861(2005)。优选地，所述脂质是胆固醇。

[0077] 关于药物组合物，药用载体可以是任意常规所用的那些，并且仅通过化学 - 物理考虑因素，诸如溶解性和缺乏与活性化合物的反应性，以及通过施用的途径限定。本文所述的药用载体，例如，媒介物 (vehicles)、佐剂、赋形剂、和稀释剂，是本领域技术人员公知

的,并且容易为公众获得。优选地,所述药用载体对活性试剂是化学惰性的和在使用条件下不具有有害副作用或毒性。

[0078] 载体的选择应该部分由特定的本发明物质、以及由用于施用本发明物质的特定方法决定。因此,存在本发明药物组合物的多种适当制剂。下述用于口服、气雾剂、肠胃外、皮下、静脉内、肌内、动脉内、鞘内、腹膜内、直肠、和阴道施用的制剂是示例性的,并且不以任何方式限制。可以使用多于一种途径施用本发明物质,并且在特定情形中,特定的途径可以提供比另一种途径更直接和更有效的响应。在本发明的一个优选实施方案中,所述药物组合物是局部制剂、静脉内制剂、或皮下制剂。

[0079] 在本发明的一个优选实施方案中,所述药物组合是局部制剂。局部制剂是本领域技术人员公知的。在本发明施用到皮肤的情形中,所述制剂特别适合。本发明的局部制剂可以是,例如,膏剂、洗液、油膏、贴片、油、糊剂、喷雾剂例如气雾剂喷雾剂、凝胶、慕思(mousse)、滚抹式的液体、固体棒等。优选地,本发明的局部制剂是膏剂、洗液、油膏、或贴片。当所述局部制剂是洗液时,优选地,所述洗液还包括紫外(UV)光阻隔剂,诸如生育酚(tocopheryl)、氨基苯甲酸、阿伏苯宗、西诺沙酯、二羟苯宗、胡莫柳酯、邻氨基苯甲酸甲酯、奥克立林、辛基甲氧基肉桂酸酯、辛水杨酯、羟苯甲酮、帕地马酯 O、苯基苯并咪唑、磺酸、舒利苯酮、二氧化钛、三乙醇胺水杨酸酯(trolamine salicylate)、和氧化锌。

[0080] 适于口服施用的制剂可以由下列各项组成:(a) 液体溶液,诸如溶解在稀释剂如水、盐水、或橙汁中的有效量的本发明物质;(b) 胶囊、香囊(sachet)、片剂、锭剂(lozenge)、和锭剂(troch),每一种包含预先确定量的作为固体或颗粒的活性成分;(c) 粉剂;(d) 在适当液体中的混悬液;和(e) 适当的乳剂。液体制剂可以包括稀释剂,诸如水和醇,例如,乙醇、苯甲醇、和聚乙二醇,添加或不添加药用表面活性剂。胶囊形式可以是普通的硬-或软-壳明胶型,其包含,例如,表面活性剂、润滑剂、和惰性填充剂诸如乳糖、蔗糖、磷酸钙、和玉米淀粉。片剂形式可以包括下列各项中的一种或多种:乳糖、蔗糖、甘露醇、玉米淀粉、马铃薯淀粉、褐藻酸、微晶纤维素、阿拉伯树胶、明胶、瓜耳胶、胶状二氧化硅、croscarmellose sodium、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸锌、硬脂酸、和其它赋形剂、着色剂、稀释剂、缓冲剂、崩解剂、润湿剂、防腐剂、调味剂、和其它药物相容的赋形剂。锭剂(lozenge)形式可以包括处在调味剂通常是在蔗糖和阿拉伯树胶或黄蓍胶中的本发明物质,以及包括处在惰性基质诸如明胶和甘油、或蔗糖和阿拉伯树胶中的本发明物质的软锭剂,另外包含本领域已知的赋形剂的乳剂、凝胶等。

[0081] 本发明物质,单独的或与其它适宜的成分组合,可以制成通过吸入施用的气雾剂制剂。这些气雾剂制剂可以放置在加压可用的推进物中,诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮等。它们还可以配制成非加压的制剂,如在喷雾器或雾化器中。所述喷雾制剂还可以用于向粘膜喷雾。

[0082] 适于肠胃外施用的制剂包括水性和非水性、等渗无菌注射液,其可以包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、和使得所述制剂与预期接收者的血液等渗的溶质,以及水性和非水性无菌混悬液,其可以包括混悬剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂、和防腐剂。本发明物质可以处在药用载体中的生理用稀释剂中施用,诸如无菌液体或液体混合物,包括水、盐水、水性葡萄糖和相关的糖溶液、醇如乙醇或十六醇、二醇如丙二醇或聚乙二醇、二甲亚砜、甘油、缩酮如 2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-甲醇、醚、聚(乙二醇)400、油、脂肪酸、脂肪酸酯或甘油酯,

或乙酰化的脂肪酸甘油酯,添加或不添加药用表面活性剂诸如皂或去污剂,混悬剂如果胶、carbomers、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、或羧甲基纤维素,或乳化剂和其它药用佐剂。

[0083] 可以用在肠胃外制剂中的油包括石油、动物油、植物油、或合成油。油的具体实例包括花生油、大豆油、芝麻油、棉籽油、玉米油、橄榄油、石油和矿物油。用在肠胃外制剂中的适当的脂肪酸包括油酸、硬脂酸、和异硬脂酸。油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯是适当的脂肪酸酯的实例。

[0084] 用在肠胃外制剂中的适当的皂包括脂肪碱金属、铵、和三乙醇胺盐,并且适当的去污剂包括 (a) 阳离子去污剂,诸如,例如,二甲基二烷基卤化铵、和烷基卤化吡啶,(b) 阴离子去污剂,诸如,例如,烷基、芳基、和烯属磺酸酯,烷基、烯烴、醚、和单甘油硫酸酯,和磺基琥珀酸酯,(c) 非离子去污剂,诸如,例如,脂肪胺氧化物、脂肪酸链烷醇酰胺、和聚氧乙烯聚丙烯共聚物,(d) 两性去污剂,诸如,例如,烷基- β -氨基丙酸酯、和 2-烷基-咪唑啉季铵盐,和 (e) 它们的混合物。

[0085] 所述肠胃外制剂典型地包含处在溶液中的约 0.5 重量%-约 25 重量%的本发明物质。可以使用防腐剂和缓冲剂。为了最小化或消除在注射部位的刺激性,所述组合物可以包含一种或多种具有约 12-约 17 的亲水性-亲脂性平衡 (HLB) 的非离子表面活性剂。在所述制剂中表面活性剂的量典型地在约 5 重量%-约 15 重量%范围内。适当的表面活性剂包括聚乙二醇失水山梨糖醇脂肪酸酯,诸如失水山梨糖醇单油酸酯,和环氧乙烷与疏水基的高分子量加合物,所述加合物是通过缩合环氧丙烷和丙二醇而形成的。所述肠胃外制剂可以存在于单位剂量或多剂量密封容器中,诸如安瓿和小瓶中,并且可以保存在冷冻干燥(冻干)的条件下,仅需要在即将使用之前加入无菌液体赋形剂如水用于注射。可以由先前所述种类的无菌粉剂、颗粒剂、和片剂制备临时的注射溶液和混悬液。

[0086] 可注射制剂与本发明一致。可注射组合物对有效的药用载体的需要是本领域普通技术人员公知的(参见,例如,制药和制药实践 (Pharmaceutics and Pharmacy Practice), J. B. Lippincott 公司,费城,PA, Banker 和 Chalmers, 编,第 238-250 页 (1982), 和关于可注射药物的 ASHP 手册 (ASHP Handbook on Injectable Drugs), Toissel, 第 4 版,第 622-630 页 (1986))。优选地,当施用于细胞例如树突细胞时,所述细胞通过注射施用。

[0087] 另外,本发明物质,或包括所述本发明物质的组合物,可以通过与各种基质如乳化基质或水溶性基质混合而制备成栓剂。适于阴道施用的制剂可以以阴道栓剂 (pessaries)、卫生棉条、膏剂、凝胶、糊剂、泡沫剂、或喷雾制剂存在,其除了活性成分之外包含本领域中已知合适的那些载体。

[0088] 本领域技术人员应该理解,除了上述药物组合物之外,本发明的发明物质可以配制为包含复合物,诸如环糊精包含复合物,或脂质体。

[0089] 为了本发明的目的,施用的本发明物质的量或剂量应该在合理时间范围内在受试者或动物内产生例如治疗或预防响应。例如,本发明物质的剂量应该足以在从施用时刻起约 2 小时以上如 12-24 小时或更长的时间期间内,抑制患病细胞的增殖,或治疗或预防疾病(例如,癌症,肿瘤,或银屑病)。在某些实施方案中,所述时间期间甚至可以更长。剂量应该由特定的本发明物质的功效和待治疗的动物(例如,人)的状况、以及动物(例如,人)的体重所确定。

[0090] 确定施用剂量的许多测定方法是本领域内已知的。为了本发明的目的,可以使用这样的测定方法来确定施用给哺乳动物的起始剂量,所述测定方法包括在分别给与不同剂量的本发明物质的一组哺乳动物中,当施用给定剂量的本发明物质时,比较患病细胞增殖受抑制的程度。在施用特定剂量时患病细胞增殖受抑制的程度可以通过本领域已知的方法测定,所述方法包括,例如,在本文实施例 2 中所述的方法。

[0091] 本发明物质的剂量还将通过施用特定的本发明物质可能伴随的任何副作用的存在、性质和程度而确定。典型地,主治医师将考虑各种因素,诸如年龄、体重、综合健康、日常饮食、性别、待施用的本发明物质、施用途径、和被治疗的病症的严重性,而决定用于治疗每个个体患者的本发明物质的剂量。通过举例而不限本发明的方式,本发明物质的剂量可以是约 0.001- 约 1000mg/kg 被治疗受试者的体重 / 天, 约 0.01- 约 10mg/kg 体重 / 天, 约 0.01mg- 约 1mg/kg 体重 / 天。

[0092] 本领域普通技术人员应该容易理解,本发明的发明物质可以以任何方式修饰,以致通过修饰提高本发明物质的治疗或预防功效。例如,本发明物质可以直接或通过连接体间接与靶向部分缀合。使化合物,例如,本发明物质与靶向部分缀合的实践,在本领域内是公知的。参见,例如, Wadwa 等, 药物靶向杂志 (J. Drug Targeting) 3:111 (1995) 和美国专利号 5,087,616。当用于本文时,术语“靶向部分”是指特异性识别并结合细胞表面受体的任何分子或试剂,以使所述靶向部分指导本发明物质递送至在其表面上表达所述受体的细胞群体。靶向部分包括,但不限于,抗体,或其片段,肽,激素,生长因子,细胞因子,以及任何其它与细胞表面受体(例如,表皮生长因子受体(EGFR)、T-细胞受体(TCR)、B-细胞受体(BCR)、CD28、血小板来源的生长因子受体(PDGF)、烟碱性乙酰胆碱受体(nAChR),等)结合的天然或非天然配体。当用于本文时,术语“连接体”是指桥连本发明物质和所述靶向部分的任何试剂或分子。本领域普通技术人员承认在本发明物质上的位点,所述位点不是本发明物质功能必需的,是附着连接体和/或靶向部分的理想位点,条件是所述连接体和/或靶向部分一旦附着到本发明物质上,不干扰本发明物质的功能,即抑制患病细胞增殖、或治疗或预防疾病(例如,癌症、肿瘤、银屑病)的能力。

[0093] 备选地,本发明物质可以修饰成贮存库形式,以便使本发明物质释放到其所施用的体内的方式在时间和体内部位方面受到控制(参见,例如,美国专利号 4,450,150)。本发明物质的贮存库形式可以是,例如,包括本发明物质和多孔或非多孔物质如聚合物的可植入组合物,其中本发明物质通过所述物质和/或所述非多孔物质的降解而包封或扩散 (wherein the inventive materials is encapsulated by or diffused throughout the material and/or degradation of the non-porous material)。然后,将贮存库植入体内的理想部位,并且本发明物质以预先确定的速率从所述植入物释放。

[0094] 预计本发明的药物组合物、多肽(包括功能片段和功能变体)、肽模拟物、脂肪酸衍生物、核酸、重组表达载体、宿主细胞、或细胞群体可以用在抑制患病细胞增殖的方法中。在这一点上,本发明提供抑制患病细胞增殖的方法。所述方法包括使患病细胞与有效抑制患病细胞增殖的量的本文所述的任意药物组合物接触。

[0095] 在宿主的一个优选的实施方案中,所述患病细胞存在于宿主内。本文所指的宿主可以是任何宿主。优选地,所述宿主是哺乳动物。当用于本文时,术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物,包括但不限于,啮齿目(Rodentia)的哺乳动物,诸如小鼠和仓鼠,以及兔

形目 (Logomorpha) 的哺乳动物, 诸如兔。优选所述哺乳动物是来自食肉目 (Carnivora), 包括猫科 (猫) 和犬科 (狗)。更优选所述哺乳动物来自偶蹄目 (Artiodactyla), 包括牛 (Bovines) (牛 (cows)) 和猪 (Swines) (猪 (pigs)), 或是奇蹄目 (Perissodactyla), 包括马 (Equines) (马 (horses))。最优选所述哺乳动物是灵长目 (Primates)、新世界猴 (Ceboids)、或 Simioids (猴), 或是类人猿目 (Anthropoids) (人和猿)。特别优选的哺乳动物是人。

[0096] 所述患病细胞可以是任何疾病特有的细胞或任何疾病造成的细胞。所述疾病可以是任何疾病、病症、或混乱, 特别是由细胞增殖引起或参与细胞增殖的那些中的任一种。所述疾病可以是, 例如, 癌症或非癌性肿瘤, 例如, 囊肿、肿瘤 (neoplasm), 纤维瘤等。

[0097] 所述癌症可以是任何癌症, 包括下列各项的任一种: 急性淋巴细胞癌, 急性骨髓白血病、肉瘤例如小泡横纹肌肉瘤 (alveolar rhabdomyosarcoma)、骨癌、脑癌、乳腺癌、肛门癌、肛管癌、或肛门直肠癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、神经胶质瘤、颈癌、胆囊癌、或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌、或中耳癌、口腔癌、外阴癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓癌、结肠癌、食道癌、宫颈癌、胃肠类癌。霍奇金淋巴瘤、喉咽癌、肾癌、喉癌、肝癌、肺癌、恶性间皮瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌、和肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌 (例如, 肾细胞癌 (RCC))、小肠癌、软组织癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、输尿管癌、和膀胱癌。优选地, 所述癌症是乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胃癌 (例如, 胃腺癌)、结肠癌、肝癌、黑色素瘤、基细胞癌、横纹肌肉瘤、成神经管细胞瘤、胰腺癌、肺癌、甲状腺癌、骨髓瘤、淋巴瘤、神经胶质瘤、或肉瘤。

[0098] 由于细胞增殖可能引起许多疾病, 所以进一步预期本文所述的本发明物质可以在治疗或预防这些疾病的方法中。在这一点上, 本发明提供治疗或预防宿主中的癌症或肿瘤 (例如, 眼瘤) 的方法。所述方法包括给所述宿主施用有效治疗所述癌症或肿瘤的量的任何本文所述的药物组合物。

[0099] 术语“治疗,” 和“预防”以及由它们派生的词语, 当用于本文时, 不必然意味着是 100% 或完全的治疗或预防。相反, 存在本领域普通技术人员认为具有潜在的益处或治疗效果的不同的治疗或预防程度。在这一方面, 本发明方法可以提供治疗或预防哺乳动物中的癌症或肿瘤的任何水平任何量。此外, 本发明方法所提供的治疗或预防可以包括治疗或预防被治疗或预防的疾病例如癌症的一种或多种病症或症状。此外, 为了本文的目的, “预防”可以包括延迟疾病、或其症状或病症的发作。

[0100] 在本发明方法的一个优选的实施方案中, 将所述药物组合物局部施用给宿主。在另一个优选的实施方案中, 所述药物组合物直接施用到肿瘤, 例如, 肿瘤内递送。

[0101] 本发明还提供治疗宿主中的银屑病的的方法, 所述方法包括以有效治疗该宿主中的银屑病的量给该宿主施用任意本文所述的药物组合物。银屑病是一种常见皮肤病, 其特征在于发炎的增厚斑点, 由厚的、银色鳞片覆盖的红色皮肤。所述银屑病可以是任何形式的银屑病, 包括, 例如, 噬斑状银屑病, 或普通银屑病 (psoriasis vulgaris), 脓疱性银屑病, 滴状银屑病, 和反转银屑病 (inverse psoriasis)。

[0102] 本发明还提供抑制 Hedgehog 信号转导途径的方法。所述方法包括使患病细胞与有效抑制 Hedgehog 信号转导途径的量的任意本文所述的药物组合物接触。由于在激活 Hedgehog 信号转导途径时, 某些基因的表达被激活进行转录, 所以本发明还提供抑制这

些基因在患病细胞中表达的方法。所述基因可以是下列各项中的一种或组合:Gli-1(例如,GenBank 登记号 NM_005269)、Gli-2(例如,GenBank 登记号 NM_005270)、Gli-3(例如,GenBank 登记号 NM_001034190)、Ptch(例如,GenBank 登记号 NM_0000264)、Shh(例如,GenBank 登记号 NM_000193)、Smo(例如,GenBank 登记号 NM_005631)、或 NES(例如,GenBank 登记号 NM_016701),所述基因在本领域内是已知的。抑制这些基因表达的方法包括使患病细胞与有效抑制所述基因表达的量的任意本文所述的药物组合物接触。

[0103] 为了本文的目的,当细胞,例如,患病细胞与包括核酸或重组表达载体的药物组合物接触时,所述方法包括所述核酸的表达,以使所编码的多肽(或功能片段或功能变体)在细胞内表达。当细胞,例如,患病细胞与包括宿主细胞(或其群体)的药物组合物接触时,所述方法包括所述核酸在所述宿主细胞内的表达,和所编码的多肽(或功能片段或功能变体)在所述宿主细胞外分泌,然后,在所述宿主细胞外,所述多肽易于与患病细胞接触。

[0104] 下述实施例进一步举例说明本发明,但是当然不应该解释为以任何方式限制其范围。

[0105] 实施例 1

[0106] 本实施例论述按照本发明的一个实施方案的制备多肽(包括功能片段和功能变体)的方法。

[0107] 使用 Fmoc 氨基酸衍生物(AnaSpec, San Jose, CA),在 433A 肽合成仪(应用生物系统(Applied Biosystems),Foster City, CA)上,通过固相肽合成法合成具有表 1 所列氨基酸序列的多肽,所述 433A 肽合成仪装配有导电性监测部件。使用乙酸酐条件性封端未反应的氨基基团进行所述合成,以更容易地纯化所生成的肽。将肽用含有 5% 水、5% 茴香硫醚(thioanisol)和 2.5% 三异丙基-硅烷的 87.5% 三氟乙酸从树脂上分解,用冷二乙醚沉淀,用醚洗涤 5 次,并且在真空中干燥过夜。溶解在二甲基甲酰胺中的肽通过 HPLC 在制备级(25x250mm)Atlantis C18 反相柱(安捷伦(Agilent),Palo Alto, CA)上,以在水中 0.05% 三氟乙酸和包含 0.05% 三氟乙酸的乙腈的梯度进行纯化。使用 Zorbax300SB-C18Poroshell1 柱和在水中 5% 乙酸与乙腈的梯度,在安捷伦(Agilent)1100 系列装置(安捷伦技术(Agilent Technologies),Palo Alto, CA)上通过电喷雾 LC/MS 分析级分。仅将包含大于 95% 纯度的产物的级分组合,并且冷冻干燥。将肽从 5% 乙酸中干燥,以确保转化成乙酸盐。通过在 Zorbax300SB-C18 分析柱上分离,由 LC/MS 进一步证实纯度和结构。

[0108] 表 1

[0109]

肽名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
SMO-i3-1	PalRGVMTLFSIKSNHPGLLSEKAASKINETMLR	4
SMO-i3-2	PalRGVMTLFSIKSNHPGLLSEKA	9
SMO-i3-4	PalLFSIKSNHPGLLSEKAASKINETMLR	10
SMO-i3-5	RGVMTLFSIKSNHPGLLSEKAASKINETMLRK- ϵ -Pal	60
SMO-i3-6	LLSEKAASKINETMLRK- ϵ -Pal	61
SMO-i3-7	LFSIKSNHPGLLSEKAASKINETMLRK- ϵ -Pal	62
SMO-i3-8	PalRGVMTLFSIKSNHPGLLS	14
SMO-i3-9	PalHseARGVMTLFSIKSNHPGLLS	77
SMO-i3-10	PalRGVMTLFSIKSNH	15
SMO-i3-12	SEKAASKINETMLRK- ϵ -Pal	63
SMO-i2-1	PalLTYAWHTSFKALGTTYQPLSGKYSY	3
SMO-i2-2	PalLTYAWHTSFKALGTTYQPLSGKTSY	17
SMO-i2-3	PalLTYAWHTSFKALGTTYQPLSG	18
SMO-i2-4	AcLTYAWHTSFKALGTTYQPLSGKTSYK- ϵ -Pal	64
SMO-i2-5	AcYAWHTSFKALGTTYQPLSGKTSYK- ϵ -Pal	65
SMO-i2-6	PalLTYAWHTSFKALGTTYQP	21
SMO-i2-7	GTTYQPLSGKTSYK- ϵ -Pal	66
SMO-i2-8	PalLTYAWHTSFKAL	23
SMO-i2-9	AcLTYAWHTSFKAL	24
SMO-i2-10	PalTYAWHTSFKAL	25
SMO-i2-11	PalLTYAWHTSFKA	26
SMO-i2-12	PalLTYAWHTSFK	27
SMO-i2-13	AcTYAWHTSFKA	28
SMO-i2-14	VWFVVLTYAWHTSFKAL	55
SMO-i2-15	WFVVLTYAWHTSFKAL	56
SMO-i2-16	AcLAKFSTHWAYTLK(ϵ -Pal)-All-D	67
SMO-i2-17	AcAKFSTHWAYTLK(ϵ -Pal)-All-D	68
SMO-i2-18	PalLTYABpaHTSFKAL	54
SMO-i2-20	AcKFSTHWAYTLK(ϵ -Pal)All-D	69
SMO-i2-21	Pal-LTYABpaHTSFKAL-Hcy-生物素	81
SMO-i2-22	AKFSTHWAYTL (All-D)	37
SMO-i2-23	PalLTYAWHTSFKALGTTYQPLSGKTSYK(ϵ -Pal)	70
SMO-i2-24	PalLTYAWHTSFKAL (All-D)	30
SMO-i2-25	AcLTYAWHTSFKAL (All-D)	31
SMO-i2-26	MyrLTYAWHTSFKAL	32
SMO-i2-29	Ac-LTYAWHTSFKAL-Penetratin	82
SMO-i2-30	Penetratin-LTYAWHTSFKAL	83
SMO-i2-56	AKFSTHWAYTL- β -Ala- α -NH $\swarrow$ K-K-ϵ-Pal $\searrow$ AKFSTHWAYTL-β-Ala-γ-NH	84
SMO-i2-57	D-(LAKFSTHWAYTL)-K-(ϵ -Pal)-LTYAWHTSFKAL	92
SMO-i2-58	D-(AKFSTHWAYTL)-K-(ϵ -Pal)-LTYAWHTSFKAL	93
SMO-i2-59	D-(AKFSTHWAYTL)-K-(ϵ -Pal)-LTYAWHTSFKA	94

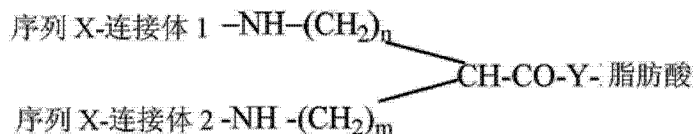
[0110]

[0111] Pal = 棕榈酸酯；“ All-D ” = 多肽的每一个氨基酸均为 D 异构体；Ac = 乙酸酯；Myr = 肉豆蔻酸酯；PalHse = 高丝氨酸棕榈酸酯；Bpa = 4- 苯甲酰苯丙氨酸；并且

HCy-生物素，即高半胱氨酸-生物素，其中生物素附着在高半胱氨酸的SH上。

[0112] 本文所述的肽可以制成具有下述通用结构的二聚体形式：

[0113]



[0114] 其中序列X选自由下列各项组成的组:Ac-LAKFSTHWAYTL(全是-D)(SEQ ID NO:85);Ac-AKFSTHWAYTL(全是-D)(SEQ ID NO:86);和Ac-KFSTHWAYTL(全是-D)(SEQ ID NO:87);其中连接体1和连接体2每一个是任选地存在,并且每一个独立地是Gly、 β -Ala、氨基丙酸、 γ -氨基丁酸、氨基己酸(aminocaproic acid)、或氨基己酸(aminohexanoic acid);其中n和m为0-6;其中Y是K、C、高Cys、Orn、二氨基丙酸(DPA)、二氨基丁酸(DBA);并且其中所述脂肪酸是硬脂酸、棕榈酸、肉豆蔻酸、月桂酸、癸酸或辛酸。在一个优选的实施
方案中,序列X是SEQ ID NO:87,n是4,m是0,连接体1和连接体2的每一个是 β -Ala,并且所述脂肪酸是棕榈酸。

[0115] 为了合成这样的二聚体抑制剂,其中 Y 是 Lys,预先上样在 ϵ -氨基上附着脂肪酸的 Fmoc-Lys 的树脂与相对应的二氨基酸(例如,Orn、Lys、二氨基丁酸(DBA)、或二氨基丙酸(DPA))反应,所述二氨基酸在一个氨基基团上具有 Fmoc 保护基团,并且在另一个氨基酸基团上具有 DDE 保护基团。使用在 DMF 中的羟胺和咪唑混合物选择性去除 DDE 基团。在 ABI433 肽合成仪上,将得到的树脂与连接体氨基酸(例如,Fmoc-Gly、 β -Ala、氨基丙酸、 γ -氨基丁酸、氨基己酸(aminocaproic acid)、或氨基己酸(aminohexanoic acid))偶联。同时使用标准合成流程在肽合成仪上构建每个序列 X 的其余部分。如使用标准合成流程,分解、去保护并纯化二聚体产物。以这种方式制成 SM0i2-56,即 SM0i2-17 的二聚体形式。

[0116] SMOi2-29 和 SMOi2-30 是基于与 penetratin 融合的 SMOi2-9 的肽,所述 penetratin 是来自触足 (Antennapedia) 的肽,用于将各种生物活性分子如 DNA、肽、或蛋白引入到细胞内 (Granier 等, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 279:50904-50914 (2004))。Penetratin 具有氨基酸序列 RQIKIWFPNRR-Nle-KWKK (SEQ ID NO:78)。使用标准肽合成方法将含有 Penetratin 的肽制成单一肽链。

[0117] 将多肽按下述脂化:对于在C端包含 ϵ -棕榈酰基-Lys的L-肽,使用商购的Fmoc- ϵ -棕榈酰基-L-Lys(AnaSpec, San Jose, CA)。Fmoc- ϵ -棕榈酰基-D-Lys不是商购获得的。它是使用正交保护的Fmoc-D-Lys(ivDDE)(N- α -Fmoc-N- ϵ -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己-1-基)-3-甲基丁基-D-赖氨酸)(Novabiochem, 圣地亚哥, CA)在树脂上合成的。在氨基酸附着到Rink-酰胺树脂上后,通过用在NMP中的胍/咪唑混合物处理而去除ivDDE保护基团。树脂用NMP洗涤,并且与10倍过量的处在NMP中的棕榈酸/HBTU/HOBt反应2小时。在用NMP洗涤树脂后,在肽合成仪上使用标准流程继续合成。对于在N端包括肉豆蔻酸或乙酸的肽,将相对应的脂肪酸(10-倍过量)溶解在NMP或NMP/DCM混合物中,用HBTU/HOBt混合物激活,并且与在树脂上的肽反应。随后如对于用棕榈酸脂化所进行的那样进行分解和去保护。

[0118] 使用安捷伦 1100LC/MS 系统 (安捷伦 (Agilent), Santa Clara, CA), 通过离子-喷雾质谱法确定每种肽的分子量, 并且显示在表 2 和 3 中。

[0119] 表 2

[0120]

化合物	质量 (计算的)	质量 (发现的)	t_R^a (min)	纯度
SMO i2-1	3121.7	3121.0	16.67	95%
SMO i2-2	3059.6	3059.0	16.51	95%
SMO i2-3	2580.0	2580.0	17.13	96%
SMO i2-4	3015.5	3015.0	16.12	95%
SMO i2-5	3229.8	3230.0	16.34	95%
SMO i2-6	2225.6	2225.5	17.13	96%
SMO i2-7	1646.9	1647.0	18.48	98%
SMO i2-8	1675.1	1675.0	17.59	96%
SMO i2-9	1478.6	1478.0	14.64	100%
SMO i2-10	1561.9	1562.0	18.65	98%
SMO i2-11	1561.9	1562.0	18.99	98%
SMO i2-12	1490.8	1491.0	19.04	97%
SMO i2-13	1294.4	1294.0	13.97	99%
SMO i2-14	2109.4	2109.0	18.46	96%
SMO i2-15	2010.3	2010.0	17.86	96%
SMO i2-16	1845.2	1845.0	18.96	97%
SMO i2-17	1732.1	1732.0	18.63	97%
SMO i2-18	1740.1	1740.0	17.75	96%
SMO i2-20	1661.0	1661.0	17.11	98%
SMO i2-21	2292.3	2292.0	17.08	96%
SMO i2-23	3426.2	3426.0	18.00	95%
SMO i2-24	1675.1	1674.9	17.01	96%
SMO i2-25	1477.9	1477.9	13.85	98%
SMO i2-29	3689.4	3689.0	13.95	95%

[0121] ^a 对于 Zorbax300SB-C3 柱 (安捷伦 (Agilent), Santa Clara, CA), 以在水中 0.5% 乙酸和在乙腈中 0.5% 乙酸的 0-100%25 分钟梯度, 流速 0.3mL/ 分钟, 确定保持时间。

[0122] 表 3

[0123]

化合物	质量 (计算的)	质量 (发现的)	t_R^a (min)	纯度
SMOi3-1	3630.9	3630.9	16.08	95%
SMOi3-2	2504.1	2504.4	16.42	96%
SMOi3-4	3104.8	3104.4	16.69	95%
SMOi3-5	3801.0	3801.0	15.87	95%
SMOi3-6	2193.4	2193.4	15.26	96%
SMOi3-7	3274.9	3274.5	16.08	95%
SMOi3-8	2176.7	2176.2	17.05	96%
SMOi3-10	1709.1	1708.8	17.23	97%
SMOi3-12	1967.4	1967.2	16.09	97%

[0124] ^a 对于 Zorbax300SB-C3 柱 (安捷伦 (Agilent), Santa Clara, CA), 以在水中 0.5% 乙酸和在乙腈中 0.5% 乙酸的 0-100%25 分钟梯度, 流速 0.3mL/ 分钟, 确定保持时间。

[0125] 在 Microsorb-MW300A C8 柱 (Varian, Palo Alto, CA) 上, 以在水中 0.1% 三氟乙酸 / 包含 0.1% 三氟乙酸的乙腈的 0-100%20 分钟梯度, 流速 1ml/ 分钟, 进行肽的 HPLC。通过在 225、256、和 280nm 的 UV 监测检测肽。数据未显示。

[0126] 实施例 2

[0127] 本实施例论述检测本发明多肽毒性的方法。

[0128] 在 96 孔平板中, 以 200-400 个细胞 / 孔的密度, 在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中接种 DU145 前列腺癌细胞、PC3 前列腺癌细胞、MCF7 乳腺癌细胞、或 Me1-SK-2 黑素瘤细胞 (美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection), Manassas, VA), 并且允许贴壁 24 小时。对于每个孔, 使用 100 μ l 细胞悬浮液。次日, 加入以 2X 浓度处在 100 μ l 培养基中的多肽, 并且在 CO₂ 培养箱中保持 48 小时。在以 1nM-10 μ M 的终浓度加入多肽的同时, 在另外的参照平板上进行测定, 以确定在 0 时刻 (T₀) 的细胞群体密度。使用普洛麦格非放射性细胞增殖测定试剂盒 (Promega Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit) (MTT), 按照供应商的流程, 染色细胞。通过 FLUOstar/POLARstar® Galaxy 微量平板读数仪 (BMG 实验室技术 GmbH (BMG Labtechnologies GmbH), 德国), 在 544nm 确定孔的吸光度。对于对照 (C) 和检测 (T) 细胞进行该测定。使用下式由数据计算细胞的响应: 对于 T > T₀, $100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$ 和对于 T < T₀, $100 \times [(T-T_0)/T_0]$ 。

[0129] 实施例 3

[0130] 本实施例论述按照本发明实施方案的多肽能够抑制患病细胞的增殖。

[0131] 如实施例 1 所述, 构建与具有 N 端棕榈酰基残基的 SMO 的所有三个胞内环 (SMOi1-1, SMOi2-1, SMOi3-1) 全长相对应的多肽。然后, 如实施例 2 所述, 使用 MCF-7 乳腺癌细胞和胃腺癌细胞检测所述多肽毒性 (生长抑制)。比较 SMOi2-1 和 SMOi3-1 的活性和环杷明 (5 μ M) 的活性, 环杷明是从玉米百合 (corn lily) 加州藜芦 (Veratrum californicum) 中分离的致畸剂。

[0132] 如在图 1 中所示,所有三种肽均抑制 MCF-7 细胞的生长。SMOi3-1 多肽对细胞生长具有最显著的作用,其次是 SMOi2-1,而 SMOi1-1 表现出最小量的抑制活性。如在图 2 中所示,SMOi3-1 和 SMOi2-1 多肽能够如环杷明一样或者比环杷明更好地抑制胃腺癌细胞生长。

[0133] 实施例 4

[0134] 本实施例论述按照本发明的一个实施方案具有基于 SMO 蛋白的第二个和第三个胞内环的氨基酸序列的功能片段和功能变体能够抑制患病细胞的增殖。

[0135] 如在实施例 1 中所述,合成基于 SMO 的第二个或第三个胞内环的多肽 (SMOi2 或 i3 多肽) (如在表 1 中所示),并且如在实施例 2 中所述,使用 MCF-7 乳腺癌细胞或 SK-Mel2 黑素瘤细胞进行检测。在暴露于所述肽 48 小时后在 SK-Mel2 黑素瘤细胞中通过 MTT 测定法确定的每种肽的 IC_{50} 显示在表 4 和 5 中。

[0136] 表 4

[0137]

化合物	结构	IC ₅₀ , μ M
SMO i2-1	Pal-LTYAWHTSFKALGTTYQPLSGKYSY	0.45 $\pm$ 0.05
SMO i2-2	Pal-LTYAWHTSFKALGTTYQPLSGKTSY	0.45 $\pm$ 0.05
SMO i2-3	Pal-LTYAWHTSFKALGTTYQPLSG	1.4 $\pm$ 0.4
SMO i2-4	Ac-LTYAWHTSFKALGTTYQPLSGKTSYK- ϵ -Pal	1.0 $\pm$ 0.1
SMO i2-5	Ac-YAWHTSFKALGTTYQPLSGKTSYK- ϵ Pal	1.0 $\pm$ 0.1
SMO i2-6	Pal-LTYAWHTSFKALGTTYQP	0.3 $\pm$ 0.05
SMO i2-7	Ac-GTTYQPLSGKTSYK- ϵ Pal	2.7 $\pm$ 0.4
SMO i2-8	Pal-LTYAWHTSFKAL	0.08 $\pm$ 0.02
SMO i2-9	Ac-LTYAWHTSFKAL	>10
SMO i2-10	Pal-TYAWHTSFKAL	0.7 $\pm$ 0.1
SMO i2-11	Pal-LTYAWHTSFKA	0.09 $\pm$ 0.007
SMO i2-12	Pal-LTYAWHTSFK	0.06 $\pm$ 0.007
SMO i2-13	Ac-TYAWHTSFKA	2.8 $\pm$ 0.3
SMO i2-14	VWVVLTYAWHTSFKAL	>5
SMO i2-15	WFVVLTYAWHTSFKAL	>5
SMO i2-16	Ac-LAKFSTHWAYTLK- ϵ -Pal(all D-)	0.006 $\pm$ 0.0005
SMO i2-17	Ac-AKFSTHWAYTLK- ϵ Pal(all D-)	0.0004 $\pm$ 0.0001
SMO i2-18	Pal-LTYABpaHTSFKAL	0.1 $\pm$ 0.05
SMO i2-20	Ac-KFSTHWAYTLK- ϵ Pal(all D-)	0.0003 $\pm$ 0.0001
SMO i2-21	Pal-LTYABpaHTSFKAL-Hcy-生物素	>15
SMO i2-23	Pal-LTYAWHTSFKALGTTYQPLSGKTSYK- ϵ -Pal	0.05 $\pm$ 0.02
SMO i2-24	PalLTYAWHTSFKAL (All D)	0.039 $\pm$ 0.004
SMO i2-25	AcLTYAWHTSFKAL (All D)	>10
SMO i2-26	Myr-LTYAWHTSFKAL	0.2 $\pm$ 0.05
SMO i2-29	Ac-LTYAWHTSFKAL-Penetratin	>15
SMO i2-30	Penetratin-LTYAWHTSFKAL	>15
SMO i2-56	AKFSTHWAYTL- β -Ala- α -NH AKFSTHWAYTL- β -Ala- γ -NH K-K- ϵ -Pal	4.0 nm

Pal, 棕榈酸酯; Ac, 乙酸酯; (All D), 所述多肽的每一个氨基酸均是 D 异构体;

Myr, 肉豆蔻酸; ϵ -Pal, 在 Lys 的 ϵ 碳上添加的棕榈酸酯; (Bpa), 4-苯甲酰苯丙氨酸。

[0138] 表 5

[0139]

化合物	结构	IC ₅₀ , μ M
SMO i3-1	PalRGVMTLFSIKSNHPGLLSEKAASKINETML	0.64 $\pm$ 0.1
SMO i3-2	PalRGVMTLFSIKSNHPGLLSEKA	0.50 $\pm$ 0.1
SMO i3-4	PalLFSIKSNHPGLLSEKAASKINETMLR	1.5 $\pm$ 0.2
SMO i3-5	AcRGVMTLFSIKSNHPGLLSEKAASKINETMLRK- ϵ -Pal	0.9 $\pm$ 0.2
SMO i3-6	Ac-LLSEKAASKINETMLRK- ϵ -Pal	0.8 $\pm$ 0.1
SMO i3-7	Ac-LFSIKSNHPGLLSEKAASKINETMLRK- ϵ -Pal	0.95 $\pm$ 0.2
SMO i3-8	PalRGVMTLFSIKSNHPGLLS	0.5 $\pm$ 0.1
SMO i3-10	PalRGVMTLFSIKSNH	0.95 $\pm$ 0.2
SMO i3-12	Ac-LLSEKAASKINETMLRK- ϵ -Pal	1.33 $\pm$ 0.2

[0140] 如在表 5 和图 3 中所示,基于 SMO 第三个胞内环的多肽表现出抑制 MCF-7 细胞生长的能力。此外,与第三胞内环片段相对应的肽具有与全长环 (SMOi3-1) 相当的或低于其的活性。

[0141] 如在表 4 中所示,基于 SMO 第二胞内环的一些多肽 (SMOi2 多肽) 能够在暴露于所述多肽 48 小时后,抑制 SK-Mel2 黑素瘤细胞生长。其中最有效的抑制剂是 SMOi2-16、SMOi2-17、SMOi2-8、SMOi2-23、SMOi2-24、SMOi2-20、SMOi2-26、SMOi2-11、和 SMOi2-12。此外,SMOi2-6、SMOi2-7、SMOi2-2-SMOi2-5、SMOi2-10、和 SMOi2-13 是有效的抑制剂。第二胞内环的 C-端剪截产生比全长环 (SMOi2-1) 对癌细胞显著更加有毒性的多肽。两个半环在位于环末端的氨基酸 (在野生型 SMO 蛋白中所述末端邻近膜) 被棕榈酰化时均有活性。然而,N 端一半的 C-端延伸减小了最有效的 12-残基长多肽的活性 (将肽 SMOi2-8 同 SMOi2-6 和 SMOi2-3 进行比较)。

[0142] 由于用乙酰残基置换棕榈酸酯显著减小抑制活性 (比较 SMOi2-9 和 SMOi2-13),多肽的棕榈酸脂化对于活性似乎是重要的。这可能归因于所述多肽极差的细胞穿透性。由于将棕榈酰基定位在环内部产生活性显著更低的肽 (表 5 的 SMOi3-4),在环的末端发生棕榈酰化似乎是必要的 (在野生型 SMO 蛋白中所述末端邻近膜)。这些多肽的生长抑制曲线在较高浓度出现平台或弯曲向上,表明抑制活性实际在较高浓度处降低。检测的最有效多肽包括 SMOi3-1、SMOi3-8、SMOi3-2、SMOi3-6、和 SMOi3-12。

[0143] 与 SMOi3 多肽不同,所有第二个环衍生物具有“正常的”浓度-依赖型生长抑制活性模式。

[0144] 作为肽在细胞内的备选递送,将 SMOi2-9 与 penetratin 融合。C 端和 N 端融合均不辅助恢复活性,这表明棕榈酰化不仅仅提供细胞穿透性。此外,用 SMO 蛋白的跨膜结构域序列替代棕榈酰基残基没有克服活性损失 (SMOi2-14 和 SMOi2-15)。活性的缺失可能是由于这些多肽具有极差的溶解性的事实所导致。用略短的肉豆蔻酰基置换棕榈酰基残基导致功效低 2.5 倍的化合物 (SMOi2-26)。为了研究细胞内的肽定位和相互作用的蛋白分子的特征,尝试合成用生物素标记的可交联衍生物。将 SMOi2-8 的 Trp 残基用可以与蛋白配体 UV 交联的对-苯甲酰-苯丙氨酸置换产生具有相当活性的化合物 (SMOi2-18, 表 4)。然而,添

加通过 C 端高半胱氨酸的 SH- 基团偶联的马来酰亚胺 - 生物素 (SMOi2-21) 完全消除了活性, 因此显示其不适合用于受体鉴定。

[0145] SMOi2 多肽的逆反类似物表现出抑制活性。SMOi2-16, 即 SMOi2-8 的逆反类似物, 及其剪截版本 SMOi2-17, 即 SMOi2-11 (和 SMOi2-12) 的逆反类似物, 均比它们全是 -L 的亲本多肽更有效地抑制和杀死黑素瘤细胞 (图 4 和 7)。

[0146] 实施例 5

[0147] 本实施例论述按照本发明的一个实施方案抑制细胞内 Hedgehog 信号传导途径蛋白的基因表达的方法。

[0148] 进行下列已知为 Hedgehog 信号传导途径的标记的基因表达的分析: Gli-1、Gli-2、Gli3、Ptch、Shh、Smo 和 NES。将 DU145 前列腺癌细胞暴露于 SMOi3-1 (5 或 10 μ M)、SMOi2-1 (5 或 10 μ M) 或环杷明 (5 μ M) 达 48 小时。通过定量 PCR 测定基因表达。对于基因表达测定, 将 DU145 前列腺癌细胞分别暴露于 5 μ M SMOi3-1 达 24 小时, 以及 5 μ M 和 10 μ M SMOi3-1 达 48 小时。DU145 细胞仅用 5 μ M 和 10 μ M SMOi2-1 处理 24 小时。对照是未经化合物处理的 DU145 细胞。在所有实验中, 总是使用 5 μ M 的环杷明作为阳性对照。

[0149] 分离总细胞 RNA, 并且通过 **RNeasy®** 柱 (QIAGEN, Valencia, CA) 按照供应商的使用说明进一步纯化。使用安捷伦 (Agilent) RNA6000 纳米芯片 (安捷伦技术公司 (Agilent Technologies, Inc.), CA) 确定 RNA 质量和数量。使用随机六聚体 (Random Hexamer) 引物, **TaqMan®** 反转录试剂试剂盒 (应用生物系统 (Applied Biosystems), Foster, CA) 进行 cDNA 合成。

[0150] 使用 **Taqman®** 基因表达测定引物和探针 (FAM- 标记的) 组 (应用生物系统 (Applied Biosystems), Foster, CA) 进行 PTCH (测定 ID=Hs00181117_ml)、GLI1 (Hs00171790_ml)、GLI2 (Hs00257977_ml)、GLI3 (Hs00609233_ml)、SMO (Hs00170665_ml)、SHH (Hs00179843_ml) 和 NES (Hs00707120_s1) 的实时定量 PCR 分析。使用 18S rRNA 的引物和探针 (VIC- 标记的) 的 **TaqMan®** 基因表达测定混合物作为内源对照。每种样品一式三份运行。使用如供应商 (应用生物系统 (Applied Biosystems), Foster, CA) 所述的比较 Ct ($\Delta \Delta$ Ct) 方法分析一式三份 Ct 值。通过相对于内源参照 (18S rRNA) 标准化而获得目标的相对值 ($2^{-\Delta \Delta$ Ct})。

[0151] 如在图 5 中所示, 基因表达中的改变比 SMO 拮抗剂环杷明的变化更显著。这与所述多肽具有比环杷明高得多的功效的事实一致。

[0152] 实施例 6

[0153] 本实施例论述按照本发明实施方案的本发明肽模拟物抑制患病细胞的增殖。

[0154] 肽 SMOi2-18 和 SMOi2-21 基本按照实施例 1 中所述制备, 并且按照实施例 2 所述使用 SK-Mel2 细胞检测。将细胞暴露于多肽或肽模拟物达 60 小时。

[0155] 如在图 6 中所示, 肽模拟物 SMOi2-18 和 SMOi2-21, 各自包含合成的氨基酸, 即 BPA, 表现出抑制 SK-Mel2 细胞增殖的能力。抑制活性甚至比多肽负体 SMOi2-8 的抑制活性更强, 所述多肽负体 SMOi2-8 仅包含天然存在的氨基酸。

[0156] 实施例 7

[0157] 本实施例论述 SM0i2-8 的临界胶束浓度。

[0158] 为了监测疏水性纳米颗粒的形成,使用发荧光的咪唑并吡啶酮化合物 WMC-77 (5-{3-[4-(氨基丙基)-哌嗪-1-基]-丙基氨基}-2,10b-二氮杂-醋蒽烯-6-酮) (Tarasov 等,光化学和光生物学(Photochem.Photobiol.) 78:313-322(2003))。化合物,如 WMC-77 在进入生物大分子如 DNA 的两亲性环境 (Tarasova 等,2003,同上所述) 或典型胶束的疏水性核心 (Tarasov 等,光化学和光生物学(Photochem.Photobiol.) 70:568-578(1999)) 时,倾向于显著提高它们固有的荧光性。由于咪唑并吡啶酮由水性溶液中吸附到石英上,所以将来自西格玛-奥德里奇(Sigma-Aldrich)(St. Louis, MO) 的塑料聚甲基丙烯酸酯 10x10mm 单元用于大部分检测。发现大气氧猝灭是不重要的,原因在于在氮气净化之前和之后从 BIAs 获得相似的荧光强度值。在去离子水中制备溶液。在 25℃ 在单光子计数分光荧光计 **FLUOROMAX®-2** (Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ) 上获得未校正的荧光发射光谱。分别将激发和发射单色仪裂缝调整为 1.5 和 3.5nm 带宽。使用 430nm 激发单色仪设置,在 450-700nm 范围内收集发射光谱(增量 1nm,整合时间 0.2 秒)。对于预先混合的肽和咪唑并吡啶酮溶液等分试样进行荧光光度测量。在所有探测中发荧光剂 WMC-77 的浓度是 0.4 μ M。

[0159] 荧光数据描述在图 8 中。肽/荧光团比例增加引起 WMC-77 荧光发射强度的持久增加,处于 $\sim 2 \mu$ M 的水平。荧光信号中的变化与在将咪唑并吡啶酮由水性介质转移到非极性介质如有机溶剂中 (Tarasov 等,1999,同上所述)、转移到经典表面活性剂胶束核心 (Tarasov 等,1999,同上所述) 或当与 DNA 结合 (Tarasov 等,2003,同上所述) 的过程中观察到的那些变化相似。临界胶束浓度,如在 (Tanford, 疏水作用:胶束和生物膜的形成 (The Hydrophobic Effect:Formation of Micelles and Biological Membranes), John Wiley & Sons, 纽约 (1980)) 中所述估算,确定为 0.5 - 1 μ M SM0i2-8。

[0160] 按上述检测本研究中的所有其它肽的临界胶束浓度,并且发现每种肽的临界胶束浓度约为 1 μ M。胶束化作用可能负责减小溶液中游离肽的有效浓度,以及随后明显降低功效。大部分肽还在高于 10 μ M 浓度时从介质中沉淀出来。

[0161] 实施例 8

[0162] 本实施例论述本发明的肽针对不同细胞系表现出不同敏感性。

[0163] 在包含浓度为 0.001、0.01、0.1、1.0、或 5 μ M 的 SM0i2-12 或 SM0i2-20 的培养基中,培养乳腺癌 (T47D)、黑素瘤 (SK-MEL-2)、肝细胞瘤 (HepG2, PLC, JM-1)、胰腺癌 (Panc10.05, HS766T)、结肠癌 (Colo205, HCT15)、和肺癌 (A549) 的癌细胞。细胞按照实施例 2 中所述进行测定。如在图 9 中所示,SM0i2-12 和 SM0i2-20 根据受到处理的细胞表现出不同敏感性。表现出 $GI_{50} > 5$ 的细胞系包括 PLC、JM-1、HS766T、Colo205、HCT15、和 A549。

[0164] 实施例 9

[0165] 本实施例论述本发明的肽具有二级结构。

[0166] 通过圆二色性 (CD) 光谱法测量所述肽。通过将化合物溶解在含有 50mM 十二烷基胆碱磷酸 (Avanti 极性脂质 (Avanti Polar Lipids), Alabaster, AL) 的 PBS 中而制备肽溶液 (1 μ M)。通过 AVIV mod. 202CD- 光谱仪 (Aviv 仪器, Lakewood, NJ), 使用 0.1cm 径长石英杯在 22-24℃ 记录 CD 光谱。扫描范围为 180-260nm, 并且从化合物的光谱中减去缓冲液的光谱。

[0167] SM0i2-8 和 SM0i2-16 的 CD 光谱 (图 10) 表明,所述肽主要采取 β -链构象。逆反 (retro-inverso) 肽似乎比亲本全是 -L 负体更加结构化和刚性。

[0168] 实施例 10

[0169] 本实施例论述本发明多肽的丙氨酸扫描研究。

[0170] 通过创建 SM0i2-8 肽的突变体集合,探测 SM0i2-8 序列 (PaILTYAWHTSFKAL) 中不同残基的重要性,其中所述集合的每个突变体具有被 Ala 置换的氨基酸残基,并且 SM0i2-8 的每个残基被该集合中的至少一个突变体靶向突变。

[0171] 在 SM0i2-8 第 10 位置处的 Lys 残基对于 SM0i2-8 肽的活性是关键的。当在 SM0i2-8 位置 8 的 Ser 被置换时,也观察到活性的显著损失。当在位置 1 的 Leu 被 Ala 替代时,活性增加。可以在不显著改变活性的条件下,用 Ala 置换位置 9 的 Phe, 位置 3 的 Tyr, 和位置 5 的 Trp。其余置换 (2、4、6、7、11、和 12) 导致 GI₅₀ 的略微 (40-60%) 增加。

[0172] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请、和专利,通过引用以如同每篇参考文献单独且特别指明通过引用结合相同的程度结合于此,并且完全结合于此。

[0173] 术语 "a(一个)" 和 "an(一个)" 以及 "the(这个)" 以及在描述本发明的上下文中 (特别是在下述权利要求的上下文中) 的相似引用语,应该解释为涵盖单数和复数,除非另外在本文中指明或明显同上下文相抵触。术语 "comprising(包括)", "having(具有)", "including(包括)", 以及 "containing(包含)" 应该解释为开放术语 (即,意指 "包括但不限于"), 除非另外指明。本文数值范围的引用仅意欲作为独立引用落入该范围内的每个单独的数值的简略表述方法,除非在本文中另外指明,并且每个独立的数值如同其单独在本文中引用一样结合在本说明书中。本文所述的所有方法可以以任何适当的顺序实施,除非在本文中另外指明或另外明显与上下文相抵触。本文提供的任何以及所有实施例,或示例性语言 ((例如, "诸如") 的应用仅意欲更好地阐述本发明,并不形成对本发明范围的限制,除非另外要求。本说明书中的任何语言不应该解释为指示任何不要求的要素是对实施本发明重要的。

[0174] 在本文描述了本发明的优选实施方案,包括本发明人已知实施本发明的最佳模式。在阅读了前述描述时,这些优选实施方案的变化对本领域普通技术人员可以变得清楚。本发明人预计熟练的技术人员适当地利用所述变化,并且本发明人意欲以与本文具体描述不同的方式实施本发明。因此,如适用法律所允许地,本发明包括在所附权利要求中引用的主题的所有修改和等价物。此外,本发明包括在其所有可能的变化中的上述要素任何组合中,除非本文另外指明,或另外明显与上下文相抵触。

[0001]

IA136024序列表

序列表

<110> 娜佳·塔拉索瓦
迈克尔·迪安
楼宏

<120> SMOOTHENED多肽及使用方法

<130> 701943

<150> 60/855,422

<151> 2006-10-31

<160> 94

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 787

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> misc_feature

<223> Genbank NP_005622

<400> 1

Met Ala Ala Ala Arg Pro Ala Arg Gly Pro Glu Leu Pro Leu Leu Gly
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Asp Pro Gly Arg Gly Ala Ala Ser
20 25 30

Ser Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly Pro Arg Ser Ala Gly Gly Ser Ala
35 40 45

Arg Arg Ser Ala Ala Val Thr Gly Pro Pro Pro Pro Leu Ser His Cys
50 55 60

Gly Arg Ala Ala Pro Cys Glu Pro Leu Arg Tyr Asn Val Cys Leu Gly
65 70 75 80

Ser Val Leu Pro Tyr Gly Ala Thr Ser Thr Leu Leu Ala Gly Asp Ser
85 90 95

Asp Ser Gln Glu Glu Ala His Gly Lys Leu Val Leu Trp Ser Gly Leu
100 105 110

Arg Asn Ala Pro Arg Cys Trp Ala Val Ile Gln Pro Leu Leu Cys Ala
115 120 125

Val Tyr Met Pro Lys Cys Glu Asn Asp Arg Val Glu Leu Pro Ser Arg
130 135 140

Thr Leu Cys Gln Ala Thr Arg Gly Pro Cys Ala Ile Val Glu Arg Glu
145 150 155 160

Arg Gly Trp Pro Asp Phe Leu Arg Cys Thr Pro Asp Arg Phe Pro Glu
165 170 175

Gly Cys Thr Asn Glu Val Gln Asn Ile Lys Phe Asn Ser Ser Gly Gln
180 185 190

[0002]

IA136024序列表

Cys Glu Val Pro Leu Val Arg Thr Asp Asn Pro Lys Ser Trp Tyr Glu
 195 200 205
 Asp Val Glu Gly Cys Gly Ile Gln Cys Gln Asn Pro Leu Phe Thr Glu
 210 215 220
 Ala Glu His Gln Asp Met His Ser Tyr Ile Ala Ala Phe Gly Ala Val
 225 230 235 240
 Thr Gly Leu Cys Thr Leu Phe Thr Leu Ala Thr Phe Val Ala Asp Trp
 245 250 255
 Arg Asn Ser Asn Arg Tyr Pro Ala Val Ile Leu Phe Tyr Val Asn Ala
 260 265 270
 Cys Phe Phe Val Gly Ser Ile Gly Trp Leu Ala Gln Phe Met Asp Gly
 275 280 285
 Ala Arg Arg Glu Ile Val Cys Arg Ala Asp Gly Thr Met Arg Leu Gly
 290 295 300
 Glu Pro Thr Ser Asn Glu Thr Leu Ser Cys Val Ile Ile Phe Val Ile
 305 310 315 320
 Val Tyr Tyr Ala Leu Met Ala Gly Val Val Trp Phe Val Val Leu Thr
 325 330 335
 Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr Gln Pro
 340 345 350
 Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr Phe His Leu Leu Thr Trp Ser Leu Pro
 355 360 365
 Phe Val Leu Thr Val Ala Ile Leu Ala Val Ala Gln Val Asp Gly Asp
 370 375 380
 Ser Val Ser Gly Ile Cys Phe Val Gly Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr Arg
 385 390 395 400
 Ala Gly Phe Val Leu Ala Pro Ile Gly Leu Val Leu Ile Val Gly Gly
 405 410 415
 Tyr Phe Leu Ile Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn
 420 425 430
 His Pro Gly Leu Leu Ser Glu Lys Ala Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr
 435 440 445
 Met Leu Arg Leu Gly Ile Phe Gly Phe Leu Ala Phe Gly Phe Val Leu
 450 455 460
 Ile Thr Phe Ser Cys His Phe Tyr Asp Phe Phe Asn Gln Ala Glu Trp
 465 470 475 480
 Glu Arg Ser Phe Arg Asp Tyr Val Leu Cys Gln Ala Asn Val Thr Ile
 485 490 495

[0003]

IA136024序列表

Gly Leu Pro Thr Lys Gln Pro Ile Pro Asp Cys Glu Ile Lys Asn Arg
 500 505 510
 Pro Ser Leu Leu Val Glu Lys Ile Asn Leu Phe Ala Met Phe Gly Thr
 515 520 525
 Gly Ile Ala Met Ser Thr Trp Val Trp Thr Lys Ala Thr Leu Leu Ile
 530 535 540
 Trp Arg Arg Thr Trp Cys Arg Leu Thr Gly Gln Ser Asp Asp Glu Pro
 545 550 555 560
 Lys Arg Ile Lys Lys Ser Lys Met Ile Ala Lys Ala Phe Ser Lys Arg
 565 570 575
 His Glu Leu Leu Gln Asn Pro Gly Gln Glu Leu Ser Phe Ser Met His
 580 585 590
 Thr Val Ser His Asp Gly Pro Val Ala Gly Leu Ala Phe Asp Leu Asn
 595 600 605
 Glu Pro Ser Ala Asp Val Ser Ser Ala Trp Ala Gln His Val Thr Lys
 610 615 620
 Met Val Ala Arg Arg Gly Ala Ile Leu Pro Gln Asp Ile Ser Val Thr
 625 630 635 640
 Pro Val Ala Thr Pro Val Pro Pro Gln Gln Gln Ala Asn Leu Trp Leu
 645 650 655
 Val Glu Ala Glu Ile Ser Pro Glu Leu Gln Lys Arg Leu Gly Arg Lys
 660 665 670
 Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Lys Glu Val Cys Pro Leu Ala Pro Pro
 675 680 685
 Pro Glu Leu His Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ser Thr Ile Pro Arg Leu
 690 695 700
 Pro Gln Leu Pro Arg Gln Lys Cys Leu Val Ala Ala Gly Ala Trp Gly
 705 710 715 720
 Ala Gly Asp Ser Cys Arg Gln Gly Ala Trp Thr Leu Val Ser Asn Pro
 725 730 735
 Phe Cys Pro Glu Pro Ser Pro Pro Gln Asp Pro Phe Leu Pro Ser Ala
 740 745 750
 Pro Ala Pro Val Ala Trp Ala His Gly Arg Arg Gln Gly Leu Gly Pro
 755 760 765
 Ile His Ser Arg Thr Asn Leu Met Asp Thr Glu Leu Met Asp Ala Asp
 770 775 780
 Ser Asp Phe
 785

[0004]

IA136024序列表

<210> 2
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i1-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的THR任选地被棕榈酰化

<400> 2

Thr Phe Val Ala Asp Trp Arg Asn Ser Asn Arg Tyr Pro
1 5 10

<210> 3
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i2-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

<400> 3

Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr
1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Gly Lys Tyr Ser Tyr
20 25

<210> 4
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i3-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的ARG任选地被棕榈酰化

<400> 4

Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly Leu
1 5 10 15

[0005]

IA136024序列表

Leu Ser Glu Lys Ala Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg
20 25 30

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> i3的C-端

<400> 5

Leu Leu Ser Glu Lys Ala
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> i3的N-端

<400> 6

Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> i2的C-端

<400> 7

Gly Thr Thr Tyr Gln Pro
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> i2的N-端

[0006]

IA136024序列表

<400> 8

Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala
1 5

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> SM0-i3-2

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 其中在位置1的ARG任选地被棕榈酰化

<400> 9

Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly Leu
1 5 10 15Leu Ser Glu Lys Ala
20

<210> 10

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> SM0i3-4

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

<400> 10

Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly Leu Leu Ser Glu Lys Ala
1 5 10 15Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg
20 25

<210> 11

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> SM0i3-5-K

<400> 11

[0007]

IA136024序列表

Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly Leu
1 5 10 15

Leu Ser Glu Lys Ala Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg
20 25 30

<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0-i3-6-K

<400> 12

Leu Leu Ser Glu Lys Ala Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg
1 5 10 15

<210> 13
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i3-7-K

<400> 13

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

Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg
20 25

<210> 14
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0-i3-8

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的ARG任选地被棕榈酰化

<400> 14

Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly Leu
1 5 10 15

Leu Ser

[0008]

IA136024序列表

<210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0-i3-10

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的ARG任选地被棕榈酰化

<400> 15

Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His
1 5 10

<210> 16
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i3-12-K

<400> 16

Ser Glu Lys Ala Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg
1 5 10

<210> 17
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0 i2-2

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

<400> 17

Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr
1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr
20 25

<210> 18
<211> 21

[0009]

IA136024序列表

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0 i2-3

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

<400> 18

Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr
1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Gly
20

<210> 19
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i2-4-K

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU任选地被乙酰化

<400> 19

Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr
1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr
20 25

<210> 20
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0 i2-5-K

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的Y任选地被乙酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的TYR任选地被乙酰化

[0010]

IA136024序列表

<400> 20

Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr Gln Pro
1 5 10 15

Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr
20

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc feature

<223> SMO i2-6

<220>

<221> misc feature

<222> (1), (1)

<223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

<400> 21

Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr
1 5 10 15

Gln Pro

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc feature

<223> SMO i2-7-K

<400> 22

Gly Thr Thr Tyr Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr
1 5 10

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc feature

<223> SMO i2-8

<220>

<221> misc feature

<222> (1), (1)

<223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

[0011]

IA136024序列表

<400> 23

Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
1 5 10

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> SMO i2-9

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 其中在位置1的LEU任选地被乙酰化

<400> 24

Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
1 5 10

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> SMO i2-10

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 其中在位置1的THR任选地被棕榈酰化

<400> 25

Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> SMO i2-11

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

<400> 26

Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala
1 5 10

[0012]

IA136024序列表

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的

<220>
 <221> misc_feature
 <223> SM0 i2-12

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 其中在位置1的THR任选地被棕榈酰化

<400> 27

Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys
 1 5 10

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的

<220>
 <221> misc_feature
 <223> SM0 i2-13

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 其中在位置1的THR任选地被乙酰化

<400> 28

Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala
 1 5 10

<210> 29
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的

<220>
 <221> misc_feature
 <223> SM0i2-23-K (i2-2双棕榈酰化)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

<400> 29

Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr
 1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr
 20 25

[0013]

IA136024序列表

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i2-24

<220>
<221> misc_feature
<223> 其中每个氨基酸是D异构体

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

<400> 30
Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
1 5 10

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i2-25

<220>
<221> misc_feature
<223> 其中每个氨基酸是D异构体

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU任选地被乙酰化

<400> 31
Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
1 5 10

<210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i2-26

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU任选地包括肉豆蔻酸酯

[0014]

IA136024序列表

<400> 32

Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
1 5 10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> i2-20的正向序列

<400> 33

Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys
1 5 10

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> SMO i2-16-K

SMOi2-8的逆反体

<220>

<221> misc_feature

<223> 其中每一个氨基酸均为D异构体

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 其中在位置1的LEU任选地被乙酰化

<400> 34

Leu Ala Lys Phe Ser Thr His Trp Ala Tyr Thr Leu
1 5 10

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> SMO i2-17-K SMOi2-11的逆反体

<220>

<221> misc_feature

<223> 其中每一个氨基酸均为D异构体

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 其中在位置1的ALA任选地被乙酰化

[0015]

IA136024序列表

<400> 35

Ala Lys Phe Ser Thr His Trp Ala Tyr Thr Leu
1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> SM0i2-20-K

<220>

<221> misc_feature

<223> 其中每一个氨基酸均为D异构体

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 其中在位置1的K任选地被乙酰化

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 其中在位置1的LYS任选地被乙酰化

<400> 36

Lys Phe Ser Thr His Trp Ala Tyr Thr Leu
1 5 10

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> SM0i2-22

<220>

<221> misc_feature

<223> 其中每一个氨基酸均为D异构体

<400> 37

Ala Lys Phe Ser Thr His Trp Ala Tyr Thr Leu
1 5 10

<210> 38

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> SM0i2-1

[0016]

IA136024序列表

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的THR任选地被棕榈酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 其中在位置4的X为Y, F, 或苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 38

Thr Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr Gln
1 5 10 15

Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser
20

<210> 39
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> Generic SM0i2-2

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 其中在位置5的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 39

Leu Thr Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr
1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr
20 25

<210> 40
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> Generic SM0i2-3

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 其中在位置5的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

[0017]

IA136024序列表

<400> 40

Leu	Thr	Tyr	Ala	Xaa	His	Thr	Ser	Phe	Lys	Ala	Leu	Gly	Thr	Thr	Tyr
1				5					10					15	

Gln	Pro	Leu	Ser	Gly
			20	

<210> 41

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> Generic SM0i2-4

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 其中在位置1的LEU任选地包括乙酰基残基

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> 其中在位置5的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 41

Leu	Thr	Tyr	Ala	Xaa	His	Thr	Ser	Phe	Lys	Ala	Leu	Gly	Thr	Thr	Tyr
1				5					10					15	

Gln	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Thr	Ser	Tyr
			20				25	

<210> 42

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> Generic SM0i2-5

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 其中在位置1的Y任选地被乙酰化

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 其中在位置1的TYR任选地被乙酰化

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> 其中在位置3的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 42

Tyr	Ala	Xaa	His	Thr	Ser	Phe	Lys	Ala	Leu	Gly	Thr	Thr	Tyr	Gln	Pro
1				5					10					15	

[0018]

IA136024序列表

Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr
20

<210> 43
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> Generic SM0i2-6

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU被棕榈酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 其中在位置5的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 43

Leu Thr Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr
1 5 10 15

Gln Pro

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> Generic SM0i2-8

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU被棕榈酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 其中在位置5的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 44

Leu Thr Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
1 5 10

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

[0019]

IA136024序列表

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Generic SM0i2-10

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 其中在位置1的T任选地被棕榈酰化

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 其中在位置4的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

 <400> 45

Thr Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
 1 5 10

<210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Generic SM0i2-11

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> 其中在位置5的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 46

Leu Thr Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala
 1 5 10

<210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Generic SM0i2-12

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 其中在位置1的THR任选地被棕榈酰化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 其中在位置4的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 47

Thr Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala
 1 5 10

[0020]

IA136024序列表

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> Generic SM0i2-13

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的THR任选地被乙酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 其中在位置4的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 48

Thr Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala
1 5 10

<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> Generic SM0i2-16

<220>
<221> misc_feature
<223> 其中每一个氨基酸均为D异构体

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 其中在位置8的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 49

Leu Ala Lys Phe Ser Thr His Xaa Ala Tyr Thr Leu
1 5 10

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> Generic SM0i2-17

<220>
<221> misc_feature
<223> 其中每一个氨基酸均为D异构体

[0021]

IA136024序列表

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的ALA任选地被乙酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 其中在位置7的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 50

Ala Lys Phe Ser Thr His Xaa Ala Tyr Thr Leu
1 5 10

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> Generic SM0i2-20

<220>
<221> misc_feature
<223> 其中每一个氨基酸均为D异构体

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的K任选地被乙酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LYS任选地被乙酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 其中在位置6的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 51

Lys Phe Ser Thr His Xaa Ala Tyr Thr Leu
1 5 10

<210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> Generic SM0i2-22

<220>
<221> misc_feature
<223> 其中每一个氨基酸均为D异构体

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 其中在位置7的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

[0022]

IA136024序列表

<400> 52

Ala Lys Phe Ser Thr His Xaa Ala Tyr Thr Leu
1 5 10

<210> 53

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> Generic SM0i2-23

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> 其中在位置5的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 53

Leu Thr Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr
1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr
20 25

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> SM0i2-18

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> 其中在位置5的X是BPA

<400> 54

Leu Thr Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
1 5 10

<210> 55

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

[0023]

IA136024序列表

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i2-14

<400> 55
Val Trp Phe Val Val Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
1 5 10 15

<210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i2-15

<400> 56
Trp Phe Val Val Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
1 5 10 15

<210> 57
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i2-24

<220>
<221> misc_feature
<223> 其中每个氨基酸是D异构体

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 其中在位置5的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 57
Leu Thr Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
1 5 10

<210> 58
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i2-25

[0024]

IA136024序列表

<220>
<221> misc_feature
<223> 其中每一个氨基酸均为D异构体

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU任选地被乙酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 其中在位置5的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 58

Leu Thr Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
1 5 10

<210> 59
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i2-26

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU任选地被肉豆蔻酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 其中在位置5的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 59

Leu Thr Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
1 5 10

<210> 60
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> Generic SM0i3-5

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> 其中在位置32的X为K, C, 高Cys, Orn, 二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> 其中在位置32的X任选地被棕榈酰化

<400> 60

Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly Leu
1 5 10 15

[0025]

IA136024序列表

Leu Ser Glu Lys Ala Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg Xaa
20 25 30

<210> 61
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> Generic SM0i3-6

<220>
<221> misc_feature
<222> (17).. (17)
<223> 其中在位置17的X为K, C, 高Cys, Orn, 二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (17).. (17)
<223> 其中在位置17的X任选地被棕榈酰化

<400> 61

Leu Leu Ser Glu Lys Ala Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg
1 5 10 15

Xaa

<210> 62
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> Generic SM0i3-7

<220>
<221> misc_feature
<222> (27).. (27)
<223> 其中在位置27的X为K, C, 高Cys, Orn, 二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (27).. (27)
<223> 其中在位置27的X任选地被棕榈酰化

<400> 62

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

Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg Xaa
20 25

<210> 63
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

[0026]

IA136024序列表

<220>
 <223> 合成的

<220>
 <221> misc_feature
 <223> SMOi3-12 -

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> 其中在位置15的X为K, C, 高Cys, Orn, 二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA), 其中在位置15的X任选地被棕榈酰化

<400> 63
 Ser Glu Lys Ala Ala Ser Lys Ile Asn Glu Thr Met Leu Arg Xaa
 1 5 10 15

<210> 64
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的

<220>
 <221> misc_feature
 <223> SMOi2-4

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 其中在位置1的LEU包括乙酰胺

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> 其中在位置26的X为K, C, 高Cys, Orn, 二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> 其中在位置26的X任选地被棕榈酰化

<400> 64
 Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr
 1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr Xaa
 20 25

<210> 65
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的

<220>
 <221> misc_feature
 <223> SMOi2-5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 其中在位置1的Y包括乙酰胺

[0027]

IA136024序列表

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的TYR包括乙酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> 其中在位置24的X为K, C, 高Cys, Orn, 二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> 其中在位置24的X任选地被棕榈酰化

<400> 65

Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr Gln Pro
1 5 10 15

Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr Xaa
20

<210> 66
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i2-7

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 其中在位置14的X为K, C, 高Cys, Orn, 或二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA); 其中在位置14的X任选地被棕榈酰化

<400> 66

Gly Thr Thr Tyr Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr Xaa
1 5 10

<210> 67
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i2-16

<220>
<221> misc_feature
<223> 其中每一个氨基酸均为D异构体

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU任选地被乙酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)

[0028]

IA136024序列表

<223> 其中在位置13的X为K, C, 高Cys, Orn, 二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA)

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> 其中在位置13的X任选地被棕榈酰化

<400> 67

Leu Ala Lys Phe Ser Thr His Trp Ala Tyr Thr Leu Xaa
1 5 10

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> SMOi2-17

<220>

<221> misc_feature

<223> 其中每一个氨基酸均为D异构体

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 其中在位置1的ARG任选地被乙酰化

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> 其中在位置12的X为K, C, 高Cys, Orn, 二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA)

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> 其中在位置12的X任选地被棕榈酰化

<400> 68

Ala Lys Phe Ser Thr His Trp Ala Tyr Thr Leu Xaa
1 5 10

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> SMOi2-20 -

<220>

<221> misc_feature

<223> 其中每一个氨基酸均为D异构体

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 其中在位置1的K任选地被乙酰化

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

[0029]

IA136024序列表

<223> 其中在位置1的LYS任选地被乙酰化
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 其中在位置11的X任选地被棕榈酰化
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 其中在位置12的X为K, C, 高Cys, Orn, 二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA)
 <400> 69
 Lys Phe Ser Thr His Trp Ala Tyr Thr Leu Xaa
 1 5 10
 <210> 70
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> SMOi2-23
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 其中在位置1的L和在位置26的X中的每一个任选地被棕榈酰化
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> 其中在位置26的X为K, C, 高Cys, Orn, 二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA)
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> 其中在位置1的L和在位置26的X中的每一个任选地被棕榈酰化
 <400> 70
 Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr
 1 5 10 15
 Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr Xaa
 20 25
 <210> 71
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Generic SMOi2-4
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 其中在位置1的LEU任选地被乙酰化
 <220>
 <221> misc_feature

[0030]

IA136024序列表

<22> (5)..(5)
 <223> 其中在位置5的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> 其中在位置26的X为K, C, 高Cys, Orn, 二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA)
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> 其中在位置26的X任选地被棕榈酰化
 <400> 71

Leu Thr Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr
 1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr Xaa
 20 25

<210> 72
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成的

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Generic SM0i2-5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 其中在位置1的Y任选地被乙酰化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 其中在位置1的TYR任选地被乙酰化

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 其中在位置3的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> 其中在位置24的X为K, C, 高Cys, Orn, 二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> 其中在位置24的X任选地被棕榈酰化

<400> 72

Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr Gln Pro
 1 5 10 15

Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr Xaa
 20

<210> 73
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工的

[0031]

IA136024序列表

- <220>
 <223> 合成的
- <220>
 <221> misc_feature
 <223> Generic SMOi2-16
- <220>
 <221> misc_feature
 <223> 其中每一个氨基酸均为D异构体
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 其中在位置1的LEU任选地被乙酰化
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> 其中在位置8的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> 其中在位置13的X为K, C, 高Cys, Orn, 二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA)
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> 其中在位置13的X任选地被棕榈酰化
- <400> 73
 Leu Ala Lys Phe Ser Thr His Xaa Ala Tyr Thr Leu Xaa
 1 5 10
- <210> 74
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工的
- <220>
 <223> 合成的
- <220>
 <221> misc_feature
 <223> Generic SMOi2-17
- <220>
 <221> misc_feature
 <223> 其中每一个氨基酸均为D异构体
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 其中在位置1的ARG任选地被乙酰化
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 其中在位置7的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 其中在位置12的X为K, C, 高Cys, Orn, 二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA)
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 其中在位置12的X任选地被棕榈酰化
- <400> 74

[0032]

IA136024序列表

Ala Lys Phe Ser Thr His Xaa Ala Tyr Thr Leu Xaa
1 5 10

<210> 75
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> Generic SM0i2-20

<220>
<221> misc_feature
<223> 其中每一个氨基酸均为D异构体

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的K任选地被乙酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LYS任选地被乙酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 其中在位置6的X是Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 其中在位置11的X为K, C, 高Cys, Orn, 二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 其中在位置11的X任选地被棕榈酰化

<400> 75

Lys Phe Ser Thr His Xaa Ala Tyr Thr Leu Xaa
1 5 10

<210> 76
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> Generic SM0i2-23

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 其中在位置5的X为Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

[0033]

IA136024序列表

<220>
<221> misc_feature
<222> (26).. (26)
<223> 其中在位置26的X为K, C, 高Cys, Orn, 二氨基丁酸(DBA), 或二氨基丙酸(DPA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (26).. (26)
<223> 其中在位置26的X任选地被棕榈酰化

<400> 76

Leu Thr Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr
1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr Xaa
20 25

<210> 77
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0-i3-9

<220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (1)
<223> 其中在位置1的ALA任选地包括高Cys-棕榈酸酯

<400> 77

Ala Arg Gly Val Met Thr Leu Phe Ser Ile Lys Ser Asn His Pro Gly
1 5 10 15

Leu Leu Ser

<210> 78
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> Penetratin

<400> 78

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

<210> 79
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

[0034]

IA136024序列表

<220>
<221> misc_feature
<223> Tat (48-60)

<400> 79

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> 具有X的i2的N-端

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 其中在位置3的X为 W, Y, F, 或4-苯甲酰苯丙氨酸(BPA)

<400> 80

Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala
1 5

<210> 81
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i2-21

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 其中在位置5的X是BPA

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 其中在位置12的LEU任选地包括高半胱氨酸-生物素

<400> 81

Leu Thr Tyr Ala Xaa His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
1 5 10

<210> 82
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>

[0035]

IA136024序列表

<221> misc_feature
 <223> SM0i2-29

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 其中在位置1的LEU任选地被乙酰化

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> 其中在位置24的X是正亮氨酸

 <400> 82
 Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Arg Gln Ile Lys
 1 5 10 15

 Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Xaa Lys Trp Lys Lys
 20 25

 <210> 83
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 合成的

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> SM0i2-30

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 其中在位置12的X是正亮氨酸

 <400> 83
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Xaa Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

 Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
 20 25

 <210> 84
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 合成的

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> SM0i2-56

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 其中在位置12的X是β-Ala

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> 其中在位置13的K包括附着在其γ氨基基团上的AKFSTHWAYTL-β-Ala

 <220>
 <221> misc_feature

[0036]

IA136024序列表

<222> (1)..(14)
<223> 其中在位置14的X是K, C, 高Cys或DBA并且任选地被棕榈酰化

<400> 84

Ala Lys Phe Ser Thr His Trp Ala Tyr Thr Leu Xaa Lys Xaa
1 5 10

<210> 85
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> 二聚体1的序列X

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU任选地被乙酰化

<220>
<221> misc_feature
<223> 其中每个氨基酸是D异构体

<400> 85

Leu Ala Lys Phe Ser Thr His Trp Ala Tyr Thr Leu
1 5 10

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> 二聚体2的序列X

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的ALA任选地被乙酰化

<220>
<221> misc_feature
<223> 其中每个氨基酸是D异构体

<400> 86

Ala Lys Phe Ser Thr His Trp Ala Tyr Thr Leu
1 5 10

<210> 87
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature

[0037]

IA136024序列表

<223> 二聚体3的序列X

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LYS任选地被乙酰化

<220>
<221> misc_feature
<223> 其中每个氨基酸是D异构体

<400> 87

Lys Phe Ser Thr His Trp Ala Tyr Thr Leu
1 5 10

<210> 88
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0i2-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的LEU任选地被棕榈酰化

<400> 88

Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu Gly Thr Thr Tyr
1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Gly Lys Thr Ser Tyr
20 25

<210> 89
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<223> SM0 i2-12

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1的THR任选地被棕榈酰化

<400> 89

Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala
1 5 10

<210> 90
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

[0038]

IA136024序列表

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> SM0i2-14

<400> 90

Val Trp Phe Val Val Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
1 5 10 15

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> SM0i2-15

<400> 91

Trp Phe Val Val Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
1 5 10 15

<210> 92

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的<220>

<221> misc_feature

<223> SM0i2-57

<220>

<221> misc_feature

<222> (1-12).. (1-12)

<223> 其中在位置1-12的每一个氨基酸均为D异构体

<220>

<221> misc_feature

<222> (13).. (13)

<223> 其中在位置13的LYS任选地在ε碳上被棕榈酰化并且任选地是D异构体

<400> 92

Asp Leu Ala Lys Phe Ser Thr His Trp Ala Tyr Thr Leu Lys Pro Ala
1 5 10 15

Leu Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
20 25

<210> 93

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<221> misc_feature

<223> SM0i2-58

[0039]

IA136024序列表

<220>
<221> misc_feature
<222> (1-12).. (1-12)
<223> 其中在位置1-12的每一个氨基酸均为D异构体

<220>
<221> misc_feature
<222> (13).. (13)
<223> 其中在位置13的LYS任选地在 ϵ 碳上被棕榈酰化并且任选地是D异构体

<400> 93

Asp Ala Lys Phe Ser Thr His Trp Ala Tyr Thr Leu Lys Pro Ala Leu
1 5 10 15

Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala Leu
20 25

<210> 94
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<221> misc_feature
<223> SM0i2-59

<220>
<221> misc_feature
<222> (1-12).. (1-12)
<223> 其中在位置1-12的每一个氨基酸均为D异构体

<220>
<221> misc_feature
<222> (13).. (13)
<223> 其中在位置13的LYS任选地在 ϵ 碳上被棕榈酰化并且任选地是D异构体

<400> 94

Asp Ala Lys Phe Ser Thr His Trp Ala Tyr Thr Leu Lys Pro Ala Leu
1 5 10 15

Leu Thr Tyr Ala Trp His Thr Ser Phe Lys Ala

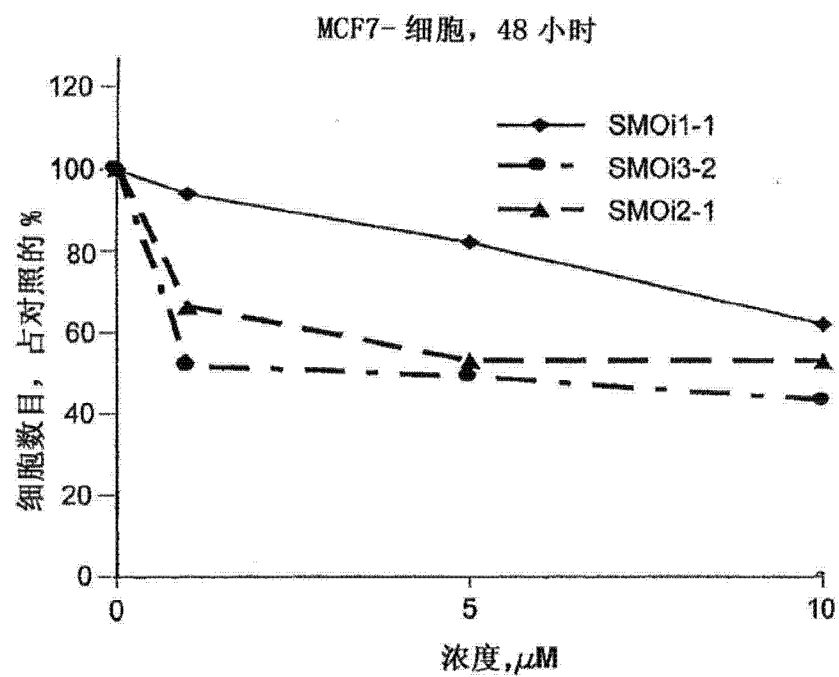


图 1

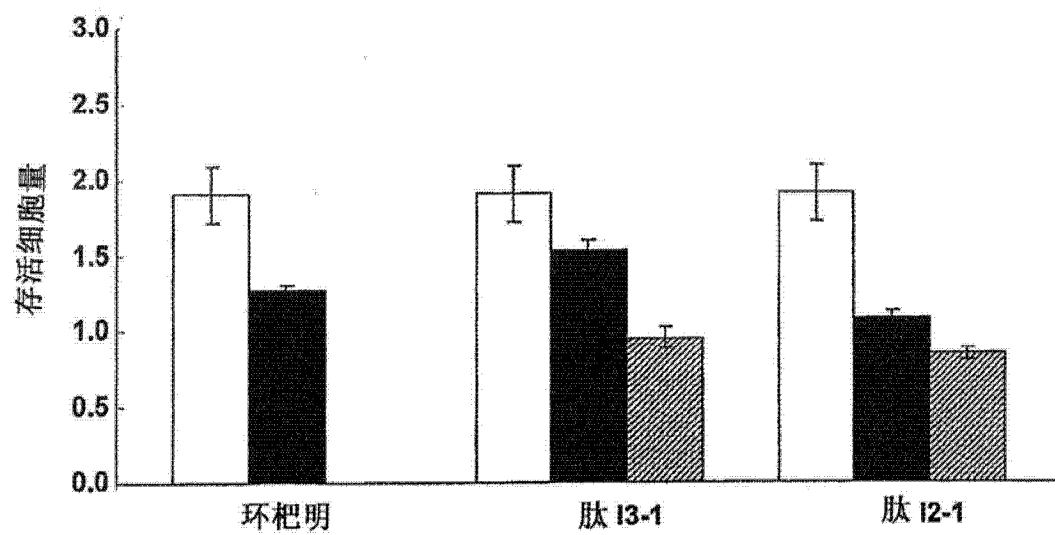


图 2

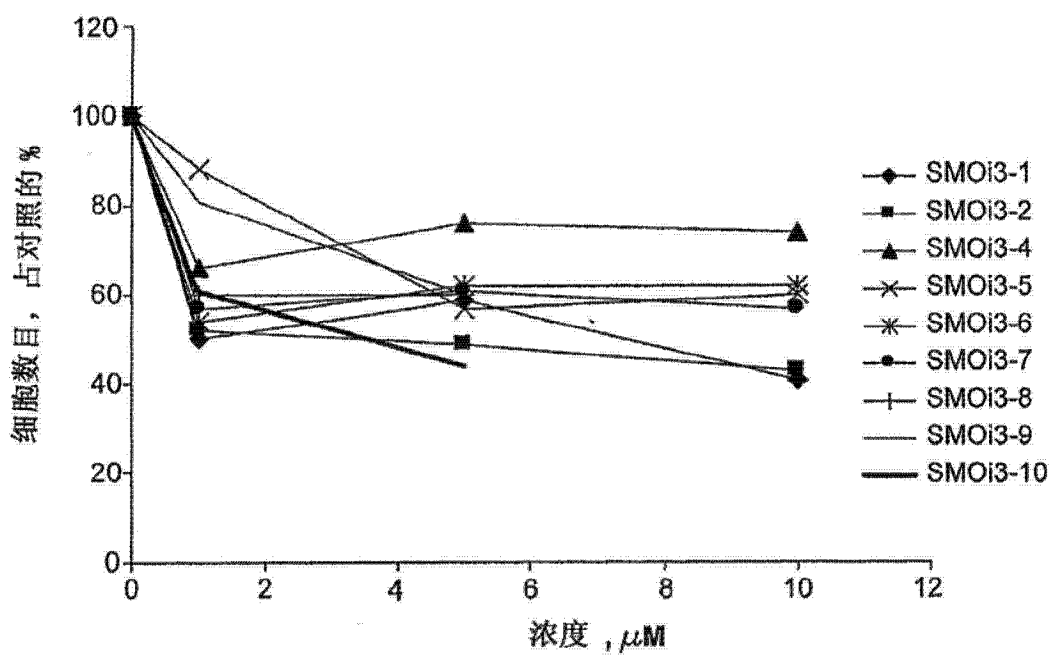


图 3

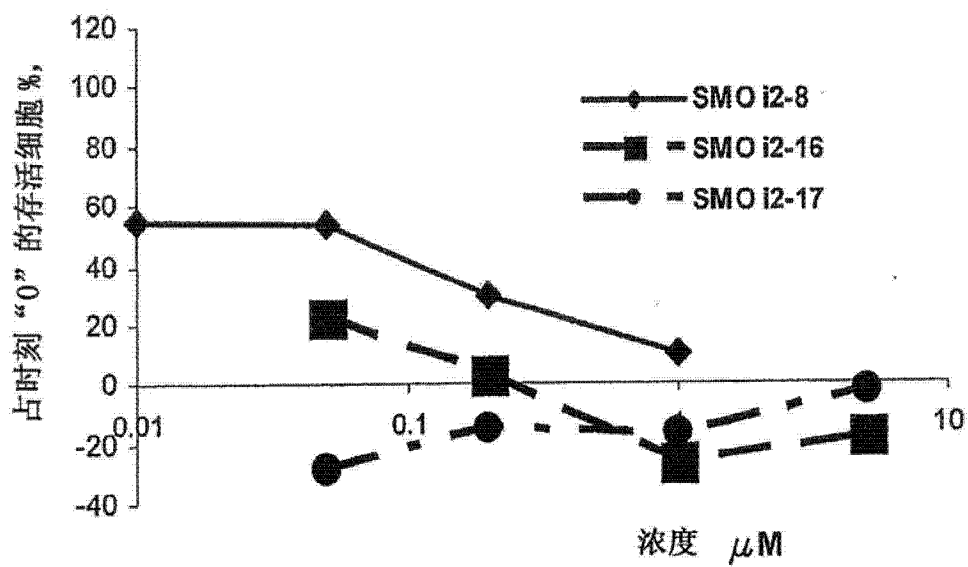


图 4

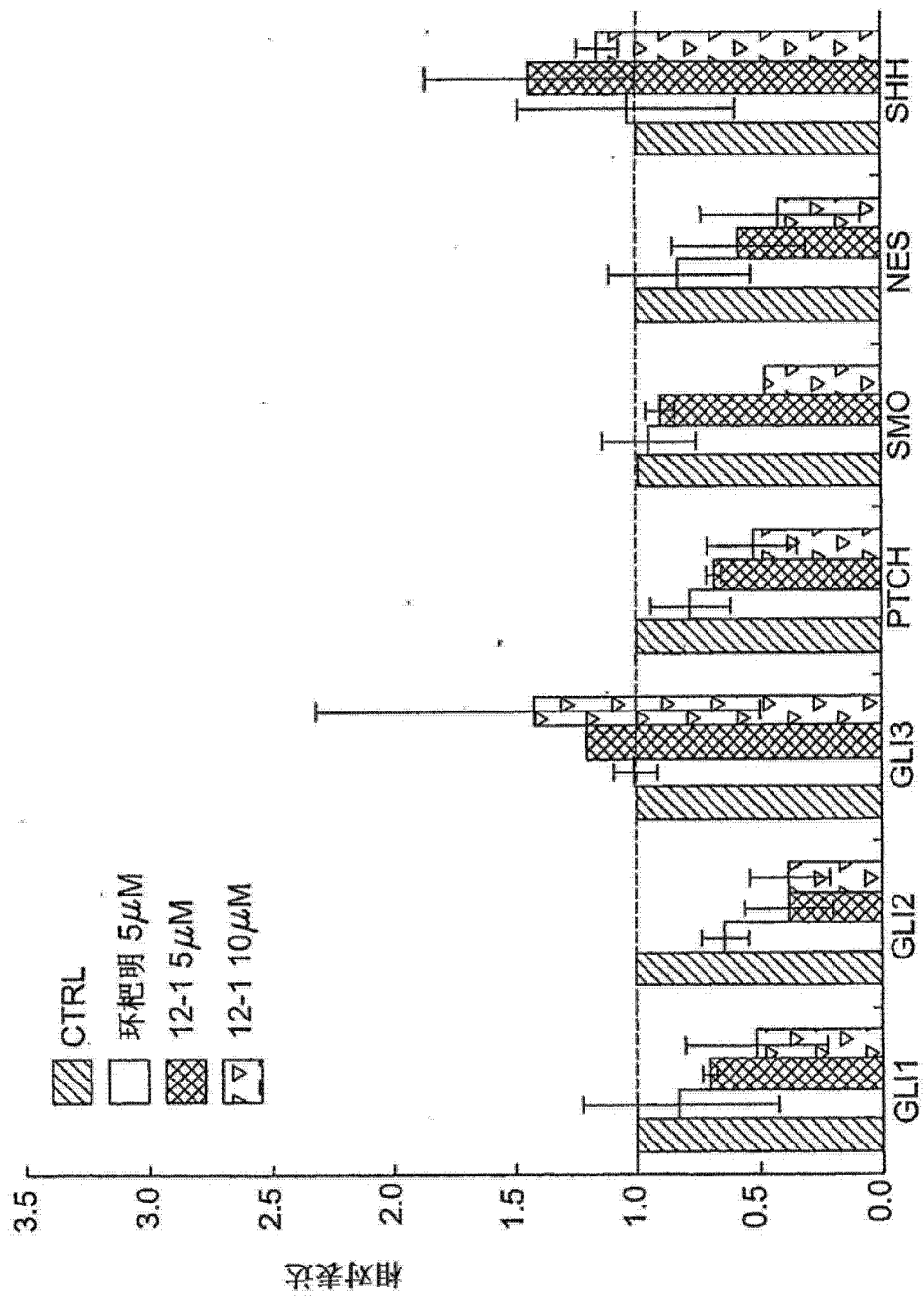


图 5

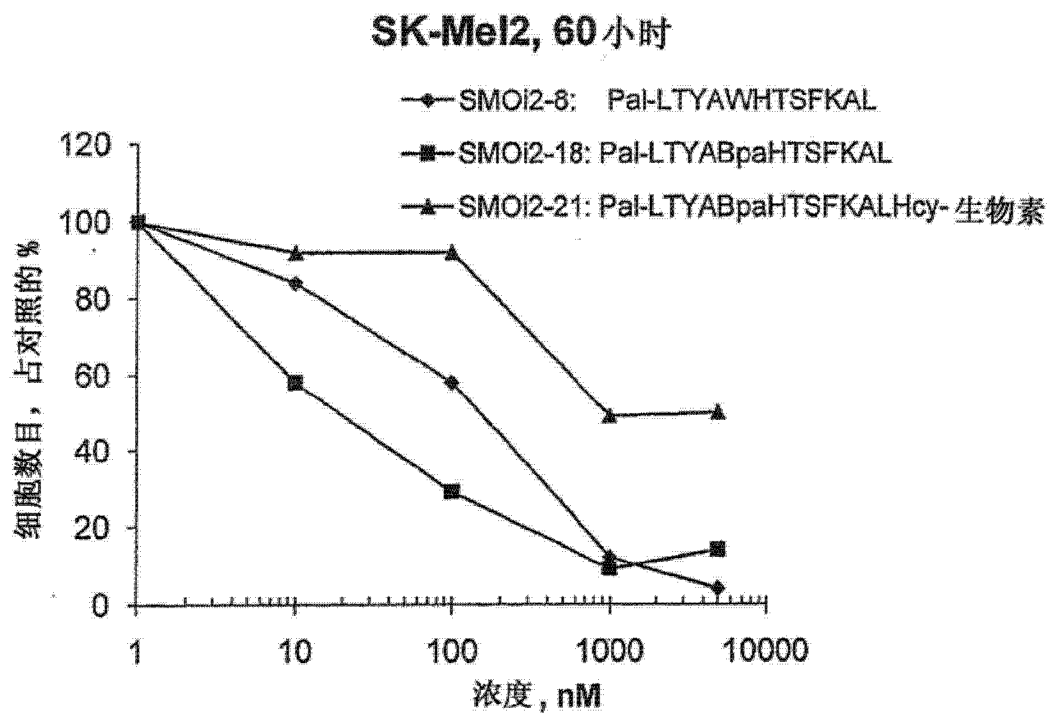


图 6

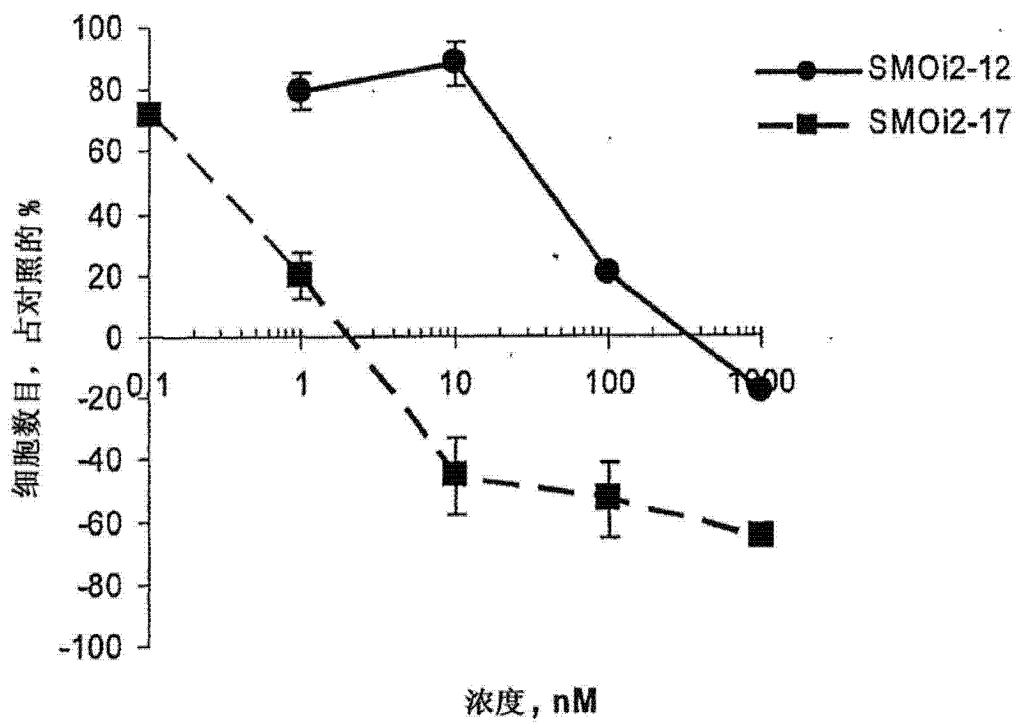


图 7

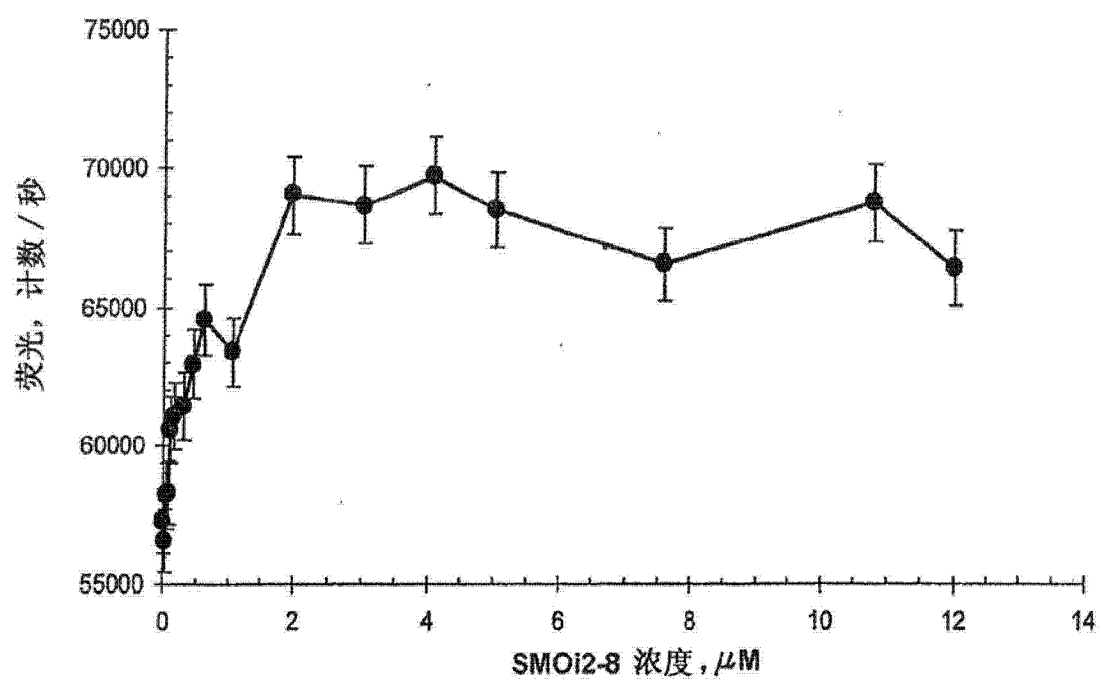


图 8

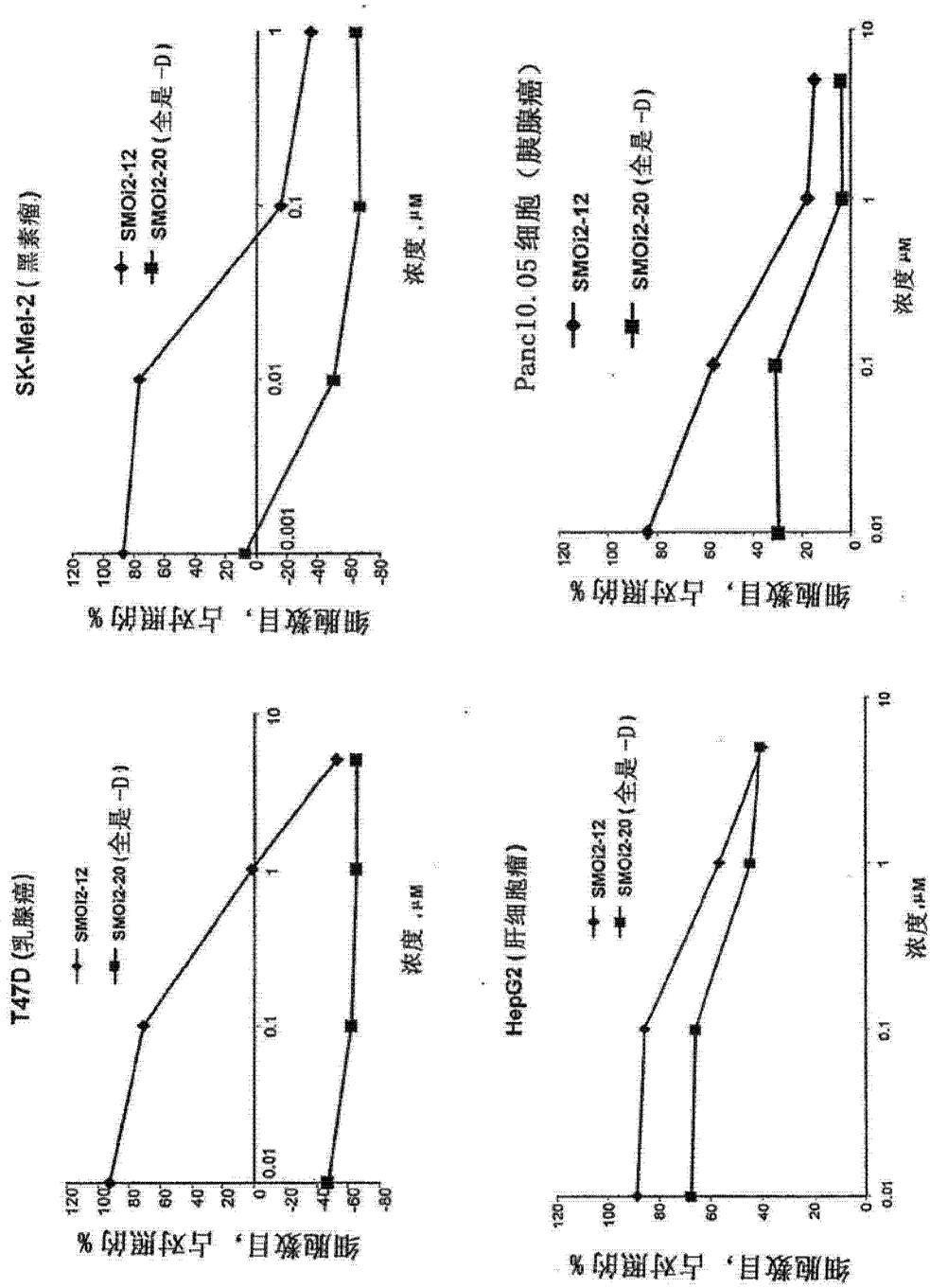


图 9

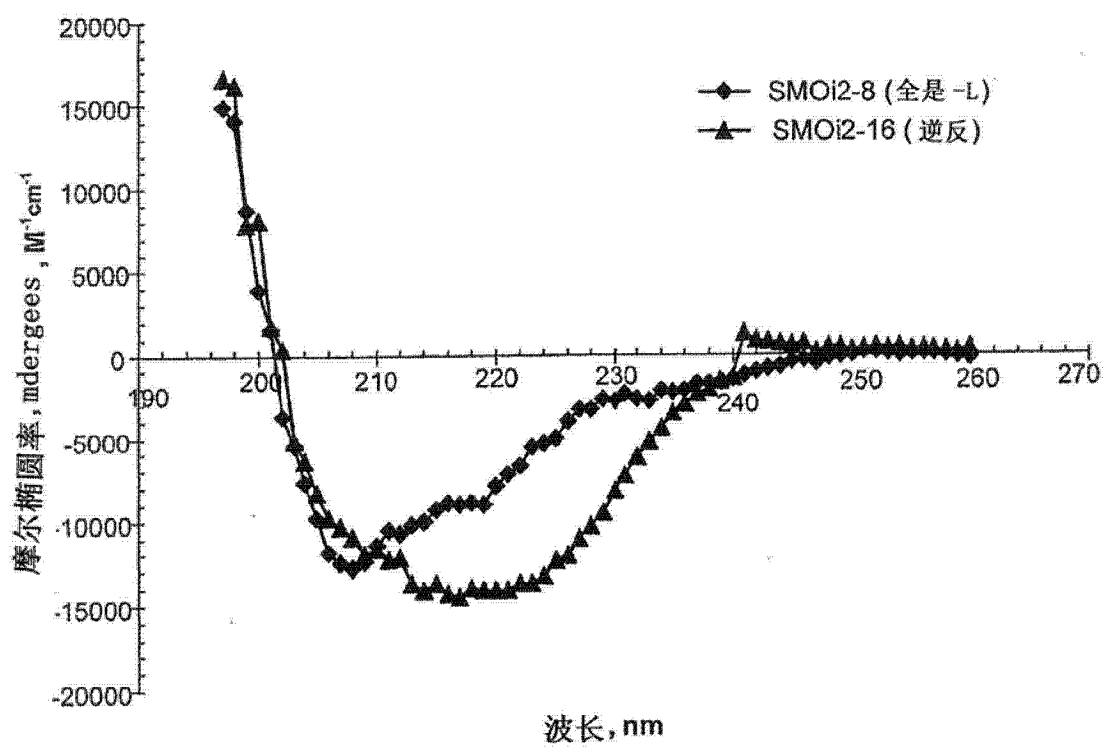


图 10