



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104661672 B

(45)授权公告日 2017. 03. 08

(21)申请号 201380036882.0

(22)申请日 2013.05.10

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104661672 A

(43)申请公布日 2015.05.27

(30)优先权数据

10-2012-0050529 2012.05.11 KR

10-2012-0050533 2012.05.11 KR

10-2012-0071989 2012.07.02 KR

10-2012-0104207 2012.09.19 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.01.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2013/004145 2013.05.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/169060 KO 2013.11.14

(73)专利权人 珍白斯凯尔有限公司

地址 韩国大田广域市

专利权人 金商在

(72)发明人 金商在

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 庞东成 武肱

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

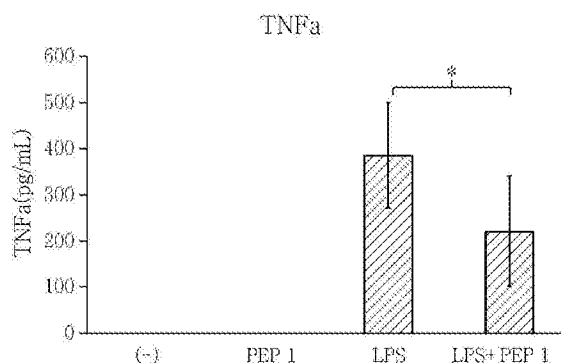
审查员 蔡放

(54)发明名称

用于预防或治疗败血症的组合物

(57)摘要

本发明提供了用于预防或治疗败血症的肽。所述肽能够通过抑制作为与败血症有关的细胞因子的TNF、IL-1和IL-6的产生而改善败血症的症状,或能够预防或治疗败血症。还公开了包含所述肽作为活性成分的药物组合物或食品组合物、所述肽用于预防或治疗败血症的应用以及包含所述肽和使用说明书的试剂盒。



1. 肽在制备用于治疗败血症的组合物中的应用,所述肽由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成。
2. 如权利要求1所述的应用,其中,所述肽源自人端粒酶。
3. 如权利要求1所述的应用,其中,所述组合物是治疗感染性休克的组合物。
4. 如权利要求1所述的应用,其中,所述组合物是注射制剂。
5. 如权利要求4所述的应用,其中,所述组合物是作为静脉内注射制剂的用于治疗败血症的组合物。
6. 如权利要求4所述的应用,其中,用于治疗败血症的所述注射制剂是溶解于盐水中的冷冻干燥的肽的溶液。
7. 如权利要求6所述的应用,其中,肽的溶液的浓度为0.5mg/ml~1.0mg/ml。
8. 如权利要求1所述的应用,其中,所述肽以0.5mg/kg~5.0mg/kg的单剂量施用。
9. 如权利要求1所述的应用,其中,所述肽以单剂量施用。
10. 如权利要求1所述的应用,其中,所述组合物是用于治疗败血症的药物组合物。
11. 如权利要求1所述的应用,其中,所述组合物是用于治疗败血症的食品组合物。
12. 肽在制备用于治疗败血症的试剂盒中的应用,所述试剂盒包含所述肽和使用说明书,其中,所述肽由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成;所述使用说明书包括所述肽的施用剂量、施用途径、施用频率和适应证中的至少一种。
13. 如权利要求12所述的应用,其中,所述肽被配制成注射剂组合物。
14. 如权利要求13所述的应用,其中,所述注射剂组合物经由静脉内注射来施用。
15. 如权利要求13所述的应用,其中,所述注射剂组合物是冷冻干燥的肽溶解于盐水中而成的溶液。
16. 如权利要求15所述的应用,其中,所述溶液中的肽浓度为0.5mg/ml~1.0mg/ml。
17. 如权利要求12所述的应用,其中,所述肽以0.5mg/kg~5.0mg/kg的单剂量施用。
18. 如权利要求12所述的应用,其中,所述肽施用一次。

用于预防或治疗败血症的组合物

技术领域

[0001] 本文公开的技术是用于预防或治疗败血症(sepsis)的组合物、预防或治疗败血症的方法、用于预防或治疗败血症的肽和肽在预防或治疗败血症中的应用。

背景技术

[0002] 败血症是细菌进入血液中、在其中繁殖并产生毒素从而显示出中毒症状或者可能引起胎儿全身感染的细菌疾病。败血症中的损伤的成因包括中耳炎、皮肤化脓症、褥疮、肺部疾病、龋齿、胆囊炎、肾盂炎、骨髓炎、子宫感染等。但是不确定是否存在化脓性杆菌入侵。病原体有链球菌属(*Streptococcus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌、肺炎双球菌(*Diplococcus pneumoniae*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和真菌等。症状包括：高烧、发冷和颤抖的突然发作，以及关节痛、头痛和不适(malaise)，脉搏数量降低、呼吸加速，严重时意识消失。当败血症导致肺功能障碍、血凝或其他血液障碍、尿量减少或器官功能障碍(例如精神状态改变)时，即发生了严重的败血症。

[0003] 严重败血症的器官功能障碍引起血压问题(低血压)或例如乳酸性酸中毒等疾病，其与血流不充分的一种或多种器官有关，这是感染性休克(septic shock)。

[0004] 韩国专利申请公开第1020040045400号公开了一种用于治疗败血症的组合物。

发明内容

[0005] 【技术问题】

[0006] 在一方面，本发明的目的是预防或治疗败血症。

[0007] 在一方面，本发明的目的是改善败血症的症状。

[0008] 在一方面，本发明的目的是预防或治疗感染性休克。

[0009] 在一方面，本发明的目的是降低与败血症相关的细胞因子的浓度。

[0010] 在一方面，本发明的目的是预防或治疗引起败血症的炎症或由败血症导致的炎症。

[0011] 【技术方案】

[0012] 在一方面，本发明涉及一种组合物，所述组合物可以包括下述肽作为活性成分：包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与所述肽具有至少80%的序列同源性的肽、或者其肽片段。

[0013] 在一方面，本发明涉及一种预防或治疗败血症的方法，所述方法包括向有需要的受试对象施用有效量的具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与所述肽序列具有至少80%的序列同源性的肽、或者其片段。

[0014] 在一方面，本发明涉及下述肽在预防或治疗败血症中的应用：包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与所述肽具有80%以上的序列同源性的肽、或者其片段。

[0015] 在一方面，本发明涉及一种用于预防或治疗败血症的肽，所述肽是包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与所述肽序列具有至少80%的序列同源性的肽、或者其肽片段。

[0016] 在一方面,本发明涉及一种试剂盒,所述试剂盒可以包括:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与所述肽序列具有至少80%的序列同源性的肽、或者其肽片段;和说明所述肽的施用剂量、施用途径、施用频率和适应证中的至少一种的使用说明书。

[0017] 在一方面,所述片段可以是由三个以上氨基酸组成的片段。

[0018] 在一方面,所述肽可以源自人端粒酶。

[0019] 在一方面,预防或治疗败血症可以是预防或治疗感染性休克。

[0020] 在一方面,所述肽可以以注射制剂的形式施用。

[0021] 在一方面,所述注射制剂可以被配制用于静脉内注射。

[0022] 在一方面,所述注射制剂可以是冷冻干燥的肽溶解于盐水中而成的溶液。

[0023] 在一方面,溶液中的所述肽的浓度可以为0.5mg/mL~1.0mg/mL。

[0024] 在一方面,所述肽可以以每次0.5mg/kg~5.0mg/kg的剂量施用。

[0025] 在一方面,所述肽可以以单剂量施用。

[0026] **【有益效果】**

[0027] 在一方面,本发明能够显著降低与败血症相关的细胞因子的浓度。

[0028] 在一方面,本发明能够有效地预防或治疗败血症。

[0029] 在一方面,本发明能够有效地改善败血症的症状。

[0030] 在一方面,本发明能够事先预防或治愈感染性休克。

附图说明

[0031] 图1显示了在根据表1向大鼠分别施用PEP 1、LPS以及LPS+PEP 1之后通过测量血液样品中的浓度来测量TNF- α 浓度的结果。

[0032] 图2显示了在根据表2向大鼠分别施用PEP 1、LPS以及LPS+PEP 1之后通过测量血液中的浓度来测量IL6浓度的结果。

[0033] 图3显示了在根据表2向大鼠分别施用PEP 1、LPS以及LPS+PEP 1之后通过测量血液中的浓度来测量IL1b浓度的结果。

[0034] 图4显示了HeLa细胞内的毒性测试的结果。

具体实施方式

[0035] 感染性休克是严重感染和败血症的结果,其能够引起多种器官功能障碍综合征(多器官功能障碍综合征(MODS)),并能够导致死亡。

[0036] 当败血症导致肺功能障碍、血凝或其他血液障碍、尿量减少或精神状态改变及器官功能障碍时,即发生了严重的败血症。

[0037] 引起血压问题(低血压)或诸如乳酸性酸中毒等疾病的严重败血症的器官功能障碍与血流不充分的一种或多种器官有关,这是感染性休克。

[0038] 败血症导致的器官功能障碍是由局部血流改变、败血症诱发的低血压(<90mmHg,或从基线下降了40mmHg以上)、大范围的血管内凝集引起的。

[0039] 促进败血症患者的MODS发展的因素之一看上去是细胞因子诱导的紊乱,其表现为小微循环血管血栓症。

[0040] 由细菌产生的内毒素和细胞因子,特别是TNF、IL-1和IL-6,通过在内皮处激活凝

集(促凝)因子而引起内皮损伤。

[0041] 这种损伤的内皮表面不仅可以阻害抗凝集特性,而且可以通过增加抗溶纤维蛋白性(抗纤维蛋白溶解)而引起血管内凝固、微细血管性血栓症和多器官衰竭。

[0042] 因此,能够抑制TNF、IL-1和IL-6等细胞因子的药物,对于改善败血症的症状或治疗或预防败血症而言是有效的。

[0043] 已知端粒为染色体末端的遗传物质重复序列,其防止染色体受损或与其它染色体融合。端粒的长度会在每次细胞分裂时缩短,在细胞分裂一定次数后,端粒的长度会缩得非常短以使细胞停止分裂并死亡。另一方面,已知端粒的延长可延长细胞的寿命。举例而言,癌细胞分泌一种称为端粒酶的酶,其防止端粒缩短,因而导致癌细胞增殖。

[0044] 在一方面,本发明涉及一种组合物,所述组合物可以包含:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与所述氨基酸序列具有80%以上的序列同源性的肽、或者其片段。

[0045] 在一方面,本发明涉及一种预防或治疗败血症的方法,所述方法包括向需要的受试对象施用有效量的下述肽:具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与所述肽序列具有80%以上的序列同源性的肽、或者其片段。

[0046] 在一方面,本发明涉及下述肽在预防或治疗败血症中的应用:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与所述肽序列具有80%以上的序列同源性的肽、或者其肽片段。

[0047] 在一方面,本发明涉及一种用于预防或治疗败血症的肽,所述肽是包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与所述肽序列具有80%以上的序列同源性的肽、或者其肽片段。

[0048] 在一方面,本发明涉及一种试剂盒,所述试剂盒可以包括:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与所述肽序列具有80%以上的序列同源性的肽、或者其肽片段;和说明所述肽的施用剂量、施用途径、施用频率和适应证中的至少一种的使用说明书。

[0049] 在一方面,所述片段可以是由三个以上氨基酸组成的片段。

[0050] 在另一方面,所述片段可以由至少4个、5个以上、6个以上、7个以上、8个以上、9个以上、10个以上、11个以上、12个以上、13个以上、14个以上或15个以上氨基酸组成。

[0051] 在一方面,所述肽可以源自人端粒酶。

[0052] 具体而言,SEQ ID NO:1的肽是指整个人端粒酶序列(1132个氨基酸,SEQ ID NO:2)中的611~626位的肽。

[0053] 在一方面,预防或治疗败血症可以是预防或治疗感染性休克。

[0054] 在一方面,所述肽可以以注射制剂的形式施用,但不限于此。

[0055] 在一方面,所述注射制剂可以是静脉内注射制剂。

[0056] 在一方面,所述注射制剂可以是溶解有冷冻干燥的肽的盐水溶液。

[0057] 在一方面,溶液中的所述肽的浓度可以为0.5mg/mL~1.0mg/mL。

[0058] 在另一方面,溶液中的所述肽的浓度为0.6mg/mL以上,或可以大于0.7mg/mL。

[0059] 在另一方面,溶液中的所述肽的浓度可以为0.9mg/mL以下或0.8mg/mL以下。例如,可以为0.75mg/mL。

[0060] 在一方面,所述肽可以以每次0.5mg/kg~5.0mg/kg的剂量施用。

[0061] 在一方面,单剂量可以为0.6mg/kg以上、0.7mg/kg以上、0.8mg/kg以上、0.9mg/kg以上、1.0mg/kg以上、1.1mg/kg以上、1.2mg/kg以上、1.3mg/kg以上、1.4mg/kg以上。

[0062] 该剂量可以为4.5mg/kg以下、4.0mg/kg以下、3.5mg/kg以下、3.0mg/kg以下、

2.5mg/kg以下、2.0mg/kg以下、1.8mg/kg以下。

[0063] 在一方面,所述肽可以以单剂量施用。

[0064] 由于急性炎症,对于败血症有必要以短间隔、以相对高的剂量施用。

[0065] 当剂量为0.5mg/kg~5.0mg/kg时,即使施用频率为一次,包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与所述肽序列具有80%以上序列同一性的肽或者其片段的效果也非常优异。

[0066] 但不必限于单次剂量。

[0067] 必要时,0.5mg/kg~5.0mg/kg的剂量可以两次或更多次施用。

[0068] 另外,在一些情况下,还可增加更低施用剂量的施用次数。

[0069] 例如,还可以将剂量降低至0.1mg/kg~1.0mg/kg,以2次以上、3次以上或4次以上的施用次数以及以30分钟以上、1小时以上、2小时以上或3小时以上的施用间隔进行施用。

[0070] 在一方面,所述组合物可以是药物组合物。

[0071] 在另一方面,所述组合物可以是食品组合物。

[0072] 本文使用的“实质上除去”败血症及相关症状是指减少至少96%的症状发生。

[0073] 如本文所用,“治疗”包括例如对病症、退化或引起停滞的抑制,或减少病症的严重性,阻碍、抑制和减少或除去病症的症状,或改善症状。

[0074] 如本文所用,对受试对象的疾病进展或疾病并发症的“抑制”是指预防或减少受试对象的疾病进展和/或疾病并发症。

[0075] 如本文所用,与败血症相关的“症状”包括与关节炎相关的任何临床或测试体征,并且不限于受试对象的感受或观察。

[0076] 炎症可以是败血症的症状。

[0077] 本发明的一方面提供编码下述肽的多核苷酸:包含SEQ ID NO:1的肽、与所述肽序列具有80%以上的序列同源性的肽、或者其片段。

[0078] 通过使用上述多核苷酸,可以大量生产包含序列SEQ ID NO:1的肽、与所述肽序列具有至少80%的同源性的肽、或者其片段。

[0079] 例如,将包含编码肽的多核苷酸的载体插入宿主细胞中,培养所述宿主细胞以大规模生产所述肽。

[0080] 本文公开的肽可以包括具有同源性高于80%、高于85%、高于90%、高于95%、高于96%、高于97%、高于98%或高于99%的氨基酸序列的肽。另外,本发明公开的肽可以包括:包含SEQ ID NO:1的肽或其片段,以及具有多于1个经转变/取代的氨基酸、多于2个经转变/取代的氨基酸、多于3个经转变/取代的氨基酸、多于4个经转变/取代的氨基酸、多于5个经转变/取代的氨基酸、多于6个经转变/取代的氨基酸或多于7个经转变/取代的氨基酸的肽。

[0081] 根据本发明的实施方式,氨基酸的改变包括对肽的物理和化学特性的修饰。例如,可以进行氨基酸修饰以改善肽的热稳定性、改变底物特异性和改变最佳pH。

[0082] 本文中术语“氨基酸”不仅包括天然整合成肽的22种标准氨基酸,还包括D-异构体和经修饰的氨基酸。因此,在本发明的特定实施方式中,本文的肽包括具有D-氨基酸的肽。另一方面,肽可以包括非标准氨基酸,例如,具有翻译后修饰的那些。翻译后修饰的实例包括磷酸化、糖基化、酰化(包括乙酰化、肉豆蔻酰化、棕榈酰化)、烷基化、羧基化、羟基化、糖化、生物素化、泛素化、化学性质的修饰(例如、 β -消除脱酰亚胺化和脱酰胺化)以及结构修

饰(例如形成二硫键)。另外,氨基酸的改变包括与用于形成肽缀合物的交联剂的结合过程中的化学反应所导致的氨基酸的改变,例如氨基、羧基或侧链的改变。

[0083] 本文公开的肽可以是天然来源鉴定和分离出的野生型肽。另一方面,当与SEQ ID NO:1或其片段比较时,本文公开的肽可以是包含一个或多个替换、缺失和/或插入的氨基酸的人工突变肽。不仅在人工突变肽中,在野生型肽中的氨基酸改变也包括不显著影响蛋白质折叠和/或活性的保守性氨基酸替换。保守性替换的实例可以在下述组内:碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水性氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸和甲硫氨酸)、芳香族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)以及小氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸)。通常不影响特定活性的氨基酸替换是本领域已知的。最常发生的改变是Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、Asp/Gly以及其相反的改变。保守性替换的其他实例示于以下表1中。

[0084] 【表1】

[0085]

最初的氨基酸	残基替换的实例	优选的残基替换
Ala(A)	val;leu;ile	Val
Arg(R)	lys;gln;asn	Lys
Asn(N)	gln;his;asp,lys;arg	Gln
Asp(D)	glu;asn	Glu
Cys(C)	ser;ala	Ser
Gln(Q)	asn;glu	Asn
Glu(E)	asp;gln	Asp
Gly(G)	ala	Ala
His(H)	asn;gln;lys;arg	Arg
Ile(I)	leu;val;met;ala;phe;正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸;ile;val;met;ala;phe	Ile
Lys(K)	arg;gln;asn	Arg
Met(M)	leu;phe;ile	Leu
Phe(F)	leu;val;ile;ala;tyr	Tyr
Pro(P)	ala	Ala
Ser(S)	thr	Thr
Thr(T)	ser	Ser
Trp(W)	tyr;phe	Tyr
Tyr(Y)	trp;phe;thr;ser	Phe
Val(V)	ile;leu;met;phe;ala;正亮氨酸	Leu

[0086] 通过选择在下列效果方面显著不同的替换来实现肽的生物性质的实质性转变:(a)在替换区域内保持多肽骨架的结构(例如折叠或螺旋三维结构)的效果;(b)保持目标区域中的分子的电荷或疏水性的效果,或(c)保持侧链的体积的效果。将天然残基按照侧链总

体性质分成下述组：

[0087] (1)疏水性：正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile；

[0088] (2)中性亲水性：cys、ser、thr；

[0089] (3)酸性：asp、glu；

[0090] (4)碱性：asn、gln、his、lys、arg；

[0091] (5)影响链取向的残基：gly、pro；和

[0092] (6)芳香性：Trp、tyr、phe。

[0093] 非保守性替换可以通过将以上类别中的成员更换为不同类别中的成员来进行。通常可以将不涉及维持肽的正确三维结构的任何半胱氨酸残基替换为丝氨酸，由此增加分子的氧化稳定性并防止错误的交联。反之，可以通过在肽中添加一个或多个半胱氨酸键来改善稳定性。

[0094] 肽的氨基酸变异的其他类型是抗体糖基化模式的改变。此处术语“改变”是指见于肽中的碳水化合物残基的缺失和/或肽中不存在的至少一个糖基化残基的增加。

[0095] 肽中的糖基化通常为N-连接型或O-连接型糖基化。本文的术语「N-连接型」是指碳水化合物残基接附至天冬酰胺残基的侧链上。作为三肽序列，天冬酰胺-X-丝氨酸及天冬酰胺-X-苏氨酸（其中X为除了脯氨酸之外的任何氨基酸）为碳水化合物残基经由酶作用而接附至天冬酰胺侧链的识别序列。因此，使一条这种三肽序列存在于多肽中，便产生了潜在的糖基化位置。「O-连接型糖基化」意指将糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种接附至羟基氨基酸上。最常见的羟基氨基酸为丝氨酸或苏氨酸，但也可使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。

[0096] 通过改变氨基酸序列以含有上述三肽序列来将糖基化位点方便地加入肽中（以获得N-连接型糖基化位点）。这些改变可以通过将至少一个丝氨酸或苏氨酸残基加入第一肽序列中或通过用这些残基进行替换来完成（以获得O-连接型糖基化位点）。

[0097] 本文实施方式的另一方面提供了编码以上肽的核酸分子，其核苷酸序列具有例如 GAA GCG CGC CCG GCG CTG CTG ACC AGC CGC CTG CGC TTT ATT CCG AAA(SEQ ID NO:3)。可以根据已知技术将核酸分子导入宿主细胞中。例如，通过磷酸钙法、脂质体、电穿孔、使病毒与细胞接触或通过微注射法直接导入细胞中等方法来转化细胞。宿主细胞可以是高等真核细胞（例如哺乳动物细胞）或低等真核细胞（例如酵母细胞），或者是原核细胞（例如细菌细胞）。合适的转化用原核宿主可以例举出大肠杆菌、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)微生物物种

[0098] 包含核酸分子的载体通常可以包括：允许使重组表达载体转化宿主细胞的复制起点和选择性标记（例如二氢叶酸还原酶或针对真核细胞培养基的新霉素抗性，或大肠杆菌中的四环素或氨苄青霉素抗性，或者酿酒酵母TRP1基因），以及用于控制蛋白编码序列的转录的启动子。

[0099] 可用的表达载体例如是SV40和pcDNA的衍生物以及E1、pCR1、pBR322、pMal-C2、pET、pGEX(Smith等, Gene 67:31-40(1988))，例如已知的细菌质粒pMB9和RP4及其衍生物等质粒、噬菌体DNA（例如噬菌体NM989I等多种衍生物，和M13及丝状噬菌体（例如噬菌体DNA、单链DNA））；酵母质粒，例如源自为了使用表达控制序列而修饰的质粒和噬菌体DNA的组合

的噬菌体DNA或载体。哺乳动物表达载体包括复制起点、合适的启动子和增强子。其也可以包括必需的核糖体结合位点、多聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点、转录终止序列和5'侧接序列。哺乳动物表达载体包括诱导型启动子,例如含有启动子的二氢叶酸还原酶载体,包含DHFR盒的任意表达载体,或pED(例如DHFR/甲氨蝶呤共扩增载体)(Randal J,Kaufman,1991,Randal J.Kaufman,Current Protocols in Molecular Biology,16,12(1991)),或者谷氨酰胺合成酶/甲硫氨酸亚砷胸腺嘧啶共扩增载体,例如pEE14(Celltech)。可以使用在Epstein-Barr病毒(EBV)或核抗原(EBNA)的控制下以附加体形式表达的载体,例如pREP4(Invitrogen)、pCEP4(Invitrogen)、pMEP4(Invitrogen)、pREP8(Invitrogen)、pREP9(Invitrogen)和pEBVHis(Invitrogen)。选择性哺乳动物表达载体是Rc/CMV(Invitrogen)和pRc/RSV(Invitrogen)等。本发明中可以使用的痘苗病毒哺乳动物表达载体是pSC11、pMJ601和pTKgptF1S等。

[0100] 本发明中可以使用的酵母表达系统包括非融合pYES2载体(Invitrogen)、融合pYESHisA、B、C(Invitrogen)和pRS载体等。

[0101] 可以将载体导入哺乳动物细胞(特别是源自人类的细胞)、细菌、酵母、真菌、昆虫、线虫和植物细胞中。合适的细胞的实例是VERO细胞、HELA细胞(例如ATCC No.CCL2)、CHO细胞系(例如CCL61)、COS细胞(例如COS-7细胞和ATCC No.CRL 1650细胞)、W138、BHK、HepG2、3T3(例如ATCC No.CRL6361)、A549、PC12、K562细胞、293细胞、Sf9细胞(例如ATCC No.CRL1711)和Cv1细胞(例如ATCC No.CCL70),等等。

[0102] 本发明中使用的任何其他合适的细胞是原核宿主细胞株,例如大肠杆菌(如DH5- α 株)、枯草杆菌、鼠伤寒沙门氏菌或假单胞菌属、链霉菌属的菌株。

[0103] 根据本发明的实施方式,提供了一种有效地将活性组分递送至细胞中的药物组合物或食品组合物,所述药物组合物或食品组合物包括:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽或其片段,包含与所述氨基酸序列具有80%以上的序列同一性的氨基酸序列的HSP结合肽,和活性组分的缀合物。

[0104] 根据本发明的实施方式,所述组合物可以含有0.1 μ g/mg~1mg/mg、特别是1 μ g/mg~0.5mg/mg、更特别是10 μ g/mg~0.1mg/mg的包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、包含与所述氨基酸序列具有80%以上的序列同一性的氨基酸序列的肽、或者其肽片段。当含有上述范围内的肽时,该组合物的所有安全性及稳定性均可得到满足,并且可以实现良好的经济效益。

[0105] 根据本发明的实施方式,所述组合物可以应用于所有动物,包括人、犬、鸡、猪、牛、羊、豚鼠和猴。

[0106] 根据本发明的实施方式,药物组合物可以通过口服、直肠、透皮、静脉内、肌肉内、腹膜内、骨髓内、硬膜外或皮下方式来施用。

[0107] 口服施用的形式可以是(但不限于)片剂、丸剂、软胶囊或硬胶囊、颗粒剂、粉末、溶液或乳液。非口服施用的形式可以是(但不限于)注射剂、滴剂、洗剂、软膏、凝胶剂、乳膏、悬浮液、乳液、栓剂、贴剂或喷雾剂。

[0108] 根据本发明的实施方式,必要时所述药物组合物可以含有添加剂,例如稀释剂、赋形剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂、缓冲剂、分散剂、表面活性剂、着色剂、芳香剂或甜味剂。根据本发明的实施方式,所述药物组合物可以通过本领域的常规工业方法来制造。

[0109] 根据本发明的实施方式,所述药物组合物的活性成分可以根据患者的年龄、性别、体重、疾病状态和严重性、施用途或处方医师的判断而不同。本领域普通技术人员可以基于上述因素决定剂量,并且每日剂量可以是(但不限于)约0.1 μ g/kg/天~约1g/kg/天,特别是约1 μ g/kg/天~约100mg/kg/天,更特别是约10 μ g/kg/天~约10mg/kg/天,更特别是约50 μ g/kg/天~约5mg/kg/天。根据本发明的实施方式,所述药物组合物可以每日施用1次~3次,但不限于此。

[0110] 根据本发明的实施方式,可以以所有剂型提供适于局部应用的化妆品组合物。例如,例如,提供形式可以为溶液、通过将油相分散到水中获得的乳液、通过将水分散到油相中获得的乳液、悬浮液、固体、凝胶、粉末、糊剂、泡沫或气溶胶。这些形式可以根据本领域的常规工业方法制造。

[0111] 根据本发明的实施方式,所述化妆品组合物可以在不损害主效果的范围内包含优选与主效果具有协同作用的其他成分。此外,根据本发明的实施方式,所述化妆品组合物可以包含保湿剂、润肤剂、表面活性剂、紫外吸收剂、防腐剂、杀真菌剂、抗氧化剂、pH调节剂、有机或无机颜料、香料、冷感剂或制限(制汗)剂。本发明的以上组分的量,可以在不损害目的和效果的范围内进行选择,并且以上组分的量可以为0.01重量%~5重量%,特别是0.01重量%~3重量%。

[0112] 根据本发明的实施方式,食品组合物的剂型不受限制,而可以是片剂、颗粒、粉末、液体制剂或固体制剂。除了活性成分之外,每种形式都可以用本领域技术人员合理选择的工业常用成分来制备,并且可以与其他成分一起增加制剂的效果。

[0113] 本领域普通技术人员可决定上述活性成分的剂量,并且每日剂量可以为约1 μ g/kg/天~10mg/kg/天,更特别是约10 μ g/kg/天~1mg/kg/天,更特别是约50 μ g/kg/天~100 μ g/kg/天,但是,每日剂量不限于这些数值,并且可以根据例如施用受试对象的年龄、健康状况和并发症等各种因素而变化。

[0114] 口服施用的形式可以是(但不限于)固体或液体剂量单元,例如粉末、消散剂、片剂、糖衣丸剂、胶囊、颗粒剂、悬浮液、溶液、糖浆剂、滴剂、舌下片剂和其他制剂。

[0115] 粉末形式通过将本发明的化合物粉碎至合适的粒径而制备。消散剂形式也通过将本发明的化合物粉碎并与粉碎至合适粒径的药物载剂(例如碳水化合物,如淀粉和甘露醇)混合而制备。必要时,粉末形式可以含有添加剂,例如赋形剂、防腐剂、分散剂、着色剂、芳香剂等。

[0116] 上述颗粒剂形式通过将粉末形式、消散剂形式或片剂形式填充到诸如明胶胶囊等胶囊壳中而制备。在将润滑剂或流动化剂(例如胶体二氧化硅、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸钙和固体聚乙二醇)的形式混合成粉末形式之后,可以进行填充操作。当采用胶囊剂形式时,添加崩解剂或增溶剂(例如羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钙、低取代羟丙基纤维素、交联羧甲基纤维素钠、羧甲基淀粉钠、碳酸钙、碳酸钠)可以增加药物的功效。

[0117] 另外,本发明的微粉形式可以通过在植物油、聚乙二醇、甘油和表面活性剂中分散并用明胶片包覆而制备的软胶囊。

[0118] 片剂形式可以通过添加赋形剂以产生粉末混合物、使之颗粒化或块化、并在添加润滑剂后压片而制备。

[0119] 必要时,用于口服施用的剂量处方药可以是微胶囊。该处方药还可以通过用鞘涂

布或浸入聚合物或蜡中等手段来实现延迟释放或持续释放。

[0120] 非口服施用形式可以使用注射剂和栓剂等。对于皮下、肌肉或静脉注射而言,可以使用采用溶液或悬浮液形式的单剂量单位。它们可以通过将部分化合物溶解在适于注射的无毒液体载体中并将该溶液或悬浮液灭菌来制备。为了制备等渗注射液,可以添加无毒的盐或盐溶液。另外,可以组合使用稳定剂、防腐剂、乳化剂。

[0121] 直肠施用可以使用以下述方法制备的栓剂:将本发明的化合物溶解在包含可溶于水或不溶于水的低熔点固体(例如聚乙二醇、可可脂、半合成脂质、聚酯(例如棕榈酸肉豆蔻酯))的混合物中。

[0122] 本发明的用于预防和治疗风湿性关节炎的组合物可以与其他药物(例如抗炎类固醇、非类固醇抗炎药、免疫抑制剂、疾病调节性抗风湿病药)混合或组合使用。

[0123] 本文使用的术语意在用于描述实施方式,而不是限制本发明。前面没有数值的术语并不限制数量,而是表示所用术语所指的事物可以多于1个。术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应解释为开放式(即,“包括但不限于”)。

[0124] 提及数值范围是用来代替陈述该范围内的单独的数字,因此,除非另外指出,该范围应该解释为等同于该范围内的所有数值都在本文中单独描述。所有范围的端值都包括在该范围内,并且可以独立地组合。

[0125] 除非另外指出或与上下文明显矛盾,本文提到的所有方法都可以以合适的顺序进行。除非包括在权利要求中,任何一个实施方式和所有实施方式或示例性语言(例如“例如”、“等”)的使用是为了更清楚地描述本发明,而不是限制本发明的范围。本文中,权利要求之外的任何语言不应该解释为本发明的必需要素。除非另外定义,本文使用的科技术语具有本发明所属领域技术人员所通常理解的含义。

[0126] 本发明的优选实施方式是本发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。在阅读之前的描述后,优选实施方式的变化形式对本领域技术人员而言将是清楚的。本发明人希望本领域技术人员可充分使用这些变化形式,且本发明可以以本文所列方式以外的其它方式来实施。因此,在专利法允许下,本发明包括所附权利要求中所述的发明的关键点的等价形式、修改及其变化形式。此外,除非另有明确陈述或与上下文矛盾,否则上述组成部分的任何组合情况中的所有可能的变化形式皆包括在本发明中。尽管通过示例性实施方式说明并示出了本发明,但本领域技术人员将充分理解,在不悖离权利要求所限定的本发明的精神及范围的情况下,在形式和细节上可以有多种变化。

[0127] 本发明的方式

[0128] 实施例1:肽的合成

[0129] 根据固相肽合成的常规已知方法合成SEQ ID NO:1的肽。更具体而言,利用ASP48S (Pepttron, Inc., Daejeon, Republic of Korea),通过Fmoc固相肽合成(SPSS)从C端偶联各氨基酸而合成所述肽。使用了以下肽(其C端的首个氨基酸附接到树脂上):

[0130] $\text{NH}_2\text{-Lys(Boc)-2-氯-三苯甲基树脂}$

[0131] $\text{NH}_2\text{-Ala-2-氯-三苯甲基树脂}$

[0132] $\text{NH}_2\text{-Arg(Pbf)-2-氯-三苯甲基树脂}$

[0133] 用于合成肽的所有氨基酸材料在N-端都受到Fmoc保护,且氨基酸残基受到可溶于酸中的Trt、Boc、t-Bu(叔丁酯)、Pbf(2,2,4,6,7-五甲基二氢-苯并呋喃-5-磺酰基)的保护。

例如:

[0134] Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Ahx-OH、Trt-巯基乙酸。

[0135] 使用HBTU[六氟磷酸2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基铵]/HOBt[N-羟基苯并三唑]/NMM[4-甲基吗啉]作为偶联剂。使用20%DMF中的哌啶来除去Fmoc。为了从残基除去保护或为了将合成的肽与树脂分离,使用切割混合剂[TFA(三氟乙酸)/TIS(三异丙基硅烷)/EDT(乙二硫醇)/H₂O=92.5/2.5/2.5/2.5]。

[0136] 通过使用固相支持体并重复以下过程来合成每种肽:氨基酸从氨基酸保护开始,使对应的氨基酸单独反应,用溶剂洗涤,并脱去保护。从树脂释放后,用HPLC进行纯化,并用MS验证合成状况,随后冷冻干燥。

[0137] 通过高效液相色谱发现所制备的肽的纯度为95%以上。

[0138] 基于SEQ ID:NO.1的PEP 1的合成过程如下描述具体的肽合成过程。

[0139] 1)偶联

[0140] 将受NH₂-Lys(Boc)-2-氯-三苯甲基树脂保护的氨基酸(8当量)与溶于DMF中的偶联剂HBTU(8当量)/HOBt(8当量)/NMM(16当量)混合在一起,在室温(RT)下温育2小时。温育后,用DMF、MeOH和DMF依次洗涤反应混合物。

[0141] 2)Fmoc脱保护

[0142] 添加在20%DMF中的哌啶,并在室温下温育5分钟两次,然后依次用DMF、MeOH和DMF进行洗涤。

[0143] 3)通过重复上述反应1)和2)制造肽的基本框架NH₂-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)-L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-氯-三苯甲基树脂。

[0144] 4)切割:向完全合成的肽中添加切割混合剂,然后将所合成的肽与树脂分离。

[0145] 5)向获得的混合物中添加预冷的乙醚,然后使用离心来沉淀出所收集的肽。

[0146] 6)用制备型HPLC纯化后,通过LC/MS确认分子量,并冻干来产生粉末形式。

[0147] 实施例2:制剂的制备

[0148] 1.PEP 1静脉内制剂的制备

[0149] 使用根据实施例1获得的冷冻干燥的粉末形式的PEP 1,并将其溶解于0.9%盐水中。进行PEP 1的纯度校正(纯度:97.3%,含量:85.3%),在即将施用前用0.9%氯化钠溶液作为赋形剂制备浓度为0.75mg/mL的注射液。

[0150] 2.LPS静脉内制剂的制备

[0151] 作为脂多糖(LPS),使用大肠杆菌0127:B8(ATCC 12740)(Sigma-Aldrich Co., St.Louis, MO, USA, L3129)的LPS。在即将施用前同样使用0.9%盐水通过溶解来制备0.25mg/mL的LPS。

[0152] 实施例3:动物实验

[0153] 在该实验中根据株式会社韩国动物科学研究所的动物实验伦理规定进行。另外,作为Non GLP试验,本实验参照Food and Drug Administration Announcement No.2009-183(2009年12月22日)“Non-standard clinical trial management和OECD Principles

of Good Laboratory Practice(1997)来实施。

[0154] 在该实验中,在Sprague-Dawley大鼠中引起与败血症相关的炎症之后,施用测试物PEP 1,随后测量血液一氧化氮(NO)和细胞因子。

[0155] 所使用的Sprague-Dawley大鼠是获自Orient Bio(Gyeonggi-do, Republic of Korea Gapyeong mokdongri Buk-myeon)的无特定病原体SPF大鼠(Cr1j:CD(SD))。8.5周龄的100只雄性大鼠中体重小于 $250\text{g} \pm 20\%$,观察7天后,96只健康雄性(平均9.5周龄,平均体重(g) $\pm 20\%$ 以下)成为所实施的实验的靶标。饲喂条件为:温度 $23^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $55\% \pm 15\%$,换气次数10~20次/小时,光照时间12小时(8:00am开灯~8:00pm关灯)和150~300Lux照度。

[0156] 将48只大鼠分成总共4组,每组施用PEP 1和/或LPS。

[0157] 所有施用途径均为静脉内施用。具体而言,通过静脉内注射来施用实施例2中制备的示例性制剂PEP 1或LPS。次数都为一次施用。根据施用前最后测量的体重,按照 2mL/kg 计算施用剂量。各组剂量如下表所示进行。

[0158] [表2]

编号	剂量 (mg/kg)		注射剂型剂量 (mL/kg)	动物数量
	PEP 1	LPS		
G1	-	-	2	12
G2	1.5	-	2	12
G3	-	0.5	2	12
G4	1.5	0.5	2	12

[0160] 首先,对于所有动物,在施用PEP 1和/或LPS的前一天每只采血0.8mL。在采血后的第二天对所有受试对象根据上表首次施用LPS,施用LPS后30分钟,对受试对象组施用PEP 1。剂量如表中所示。施用完成后,从LPS施用时起算在第75分钟和255分钟(即在施用PEP 1后45分钟和195分钟)各自取血样0.8mL。将取到的血样用于进行细胞因子分析。测量作为败血症中细胞因子的主要指标的TNF- α 、IL-1b和IL-6的浓度。对于表1中的G1~G4,测量TNF- α 、IL-1和IL-6的浓度。结果示于图1~3中。在图中显示的“*”表示 $p < 0.05$ 。

[0161] 图1是根据表1分别施用PEP 1、LPS和LPS+PEP 1后测量血液TNF- α 浓度的结果。如图1所示,用LPS诱导了败血症的大鼠的血液具有高浓度的TNF- α ,但是在施用LPS后进行PEP 1处理后仅过不到195分钟,就可以看到大鼠血液中的TNF- α 的浓度显著减少。

[0162] 图2是根据表2分别施用PEP 1、LPS和LPS+PEP 1后测量血液IL6的浓度的结果。如图2所示,用LPS诱导了败血症的大鼠的血液具高浓度的IL6,但是在施用LPS后进行PEP 1处理后仅过不到195分钟,就可以看到大鼠血液中的IL6的浓度显著减少。

[0163] 图3是根据表2分别施用PEP 1、LPS和LPS+PEP 1后测量血液IL1b的浓度的结果。如图3所示,以LPS诱导了败血症的大鼠的血液中IL1b的浓度较高,但是在施用LPS和PEP1后,仅过195分钟后大鼠血液中的IL1b的浓度就显著减少。

[0164] 另一方面,发现即使用 1.5mg/kg 的单剂量,所有大鼠都存活。

[0165] 实施例4:毒性测试

[0166] (1)细胞培养

[0167] HeLa细胞系购自ATCC。将HeLa细胞系保持在补充有10%胎牛血清(Invitrogen, USA)、Earle's盐、非必需氨基酸、丙酮酸钠、 $100\mu\text{g/ml}$ 青霉素和100单位/ml链霉素的MEM(最

低基础培养基)中,然后在37℃、5%CO₂下温育。

[0168] (2)细胞存活力和毒性分析

[0169] 将细胞接种至96孔板中,向各孔中添加补充有10%胎牛血清(Invitrogen,USA)、100μg/ml青霉素和100单位/ml链霉素的培养基。将细胞培养在37℃、5%CO₂的温育器中培养12小时。温育后,用PBS洗涤板,添加MEM(最低基础培养基)进行1小时的饥饿。向各孔中添加20μM PEP 1的100μl水溶液,然后将细胞在37℃下温育24小时。温育后,使用MTT测定来评价细胞存活力和毒性。结果示于图4中。

[0170] 【序列】(自由正文)

[0171] SEQ ID NO:1(PEP 1)EARPALLTSRLRFIPK

[0172] SEQ ID NO:2(人端粒酶)

[0173] MPAPRCRAVRSLRSHYREVLPATFVRRLLGPQGWRVLRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAP
SFRQVSKLKVLRVLRQLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGD
DVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARR
RGGASASRLPLPKRPRRGAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSAPPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVG
RQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGT
RLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGQSVAAPEEEDTDPRRLVQLLRQ
HSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPA
AEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSSFFYVTETTFQKNRLFFYRKS VWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQ
HREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFVNLNERARRPGLLGASVGLDD
IHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHRKAFKSH
VSTLTDLPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIQGSILST
LLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLKRTVVNFPVEDEALGG
TAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGLRLKCHSLFDLDQVNS
LQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAV
QWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGLSLRTAQTQLSRKLP GTTLTALEAAAANPALPSDFKTILD

[0174] SEQ ID NO:3(编码PEP1的核苷酸序列)

[0175] GAA GCG CGC CCG GCG CTG CTG ACC AGC CGC CTG CGC TTT ATT CCG AAA

<110> 凯尔杰姆维克斯有限公司
 金商在

<130> OF13P125/CN

<150> KR1020120050529
 <151> 2012-05-11

<150> KR1020120050533
 <151> 2012-05-11

<150> KR1020120071989
 <151> 2012-07-02

<150> KR1020120104207
 <151> 2012-09-19

<160> 3

[0001] <170> PatentIn version 3.2

<210> 1
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 1
 Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 1 5 10 15

<210> 2
 <211> 1132
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 180
 Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly

	20	25	30
	Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg		
	35	40	45
	Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro		
	50	55	60
	Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu		
	65	70	75
	Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val		
	85	90	95
	Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro		
	100	105	110
	Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr		
	115	120	125
[0002]	Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val		
	130	135	140
	Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val		
	145	150	155
	Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr		
	165	170	175
	Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly		
	180	185	190
	Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg		
	195	200	205
	Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg		
	210	215	220
	Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg		
	225	230	235
	Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp		
	245	250	255

	Ala	His	Pro	Gly	Arg	Thr	Arg	Gly	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Phe	Cys	Val	
				260					265							270	
	Val	Ser	Pro	Ala	Arg	Pro	Ala	Glu	Glu	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	Gly	Ala	
			275					280						285			
	Leu	Ser	Gly	Thr	Arg	His	Ser	His	Pro	Ser	Val	Gly	Arg	Gln	His	His	
		290					295					300					
	Ala	Gly	Pro	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Pro	Pro	Arg	Pro	Trp	Asp	Thr	Pro	
	305					310					315					320	
	Cys	Pro	Pro	Val	Tyr	Ala	Glu	Thr	Lys	His	Phe	Leu	Tyr	Ser	Ser	Gly	
				325						330						335	
	Asp	Lys	Glu	Gln	Leu	Arg	Pro	Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Pro	
			340						345						350		
	Ser	Leu	Thr	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Phe	Leu	Gly	Ser	
		355						360					365				
[0003]	Arg	Pro	Trp	Met	Pro	Gly	Thr	Pro	Arg	Arg	Leu	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln	
		370					375					380					
	Arg	Tyr	Trp	Gln	Met	Arg	Pro	Leu	Phe	Leu	Glu	Leu	Leu	Gly	Asn	His	
	385					390					395					400	
	Ala	Gln	Cys	Pro	Tyr	Gly	Val	Leu	Leu	Lys	Thr	His	Cys	Pro	Leu	Arg	
				405						410						415	
	Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Ala	Ala	Gly	Val	Cys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Gln	
			420						425						430		
	Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	Asp	Pro	Arg	Arg	Leu	
		435						440					445				
	Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Gln	His	Ser	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Tyr	Gly	Phe	
		450					455						460				
	Val	Arg	Ala	Cys	Leu	Arg	Arg	Leu	Val	Pro	Pro	Gly	Leu	Trp	Gly	Ser	
	465					470					475					480	
	Arg	His	Asn	Glu	Arg	Arg	Phe	Leu	Arg	Asn	Thr	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser	
				485						490						495	

	Leu	Gly	Lys	His	Ala	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Thr	Trp	Lys	Met	
						500				505						510	
	Ser	Val	Arg	Asp	Cys	Ala	Trp	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Gly	Val	Gly	Cys	
						515				520					525		
	Val	Pro	Ala	Ala	Glu	His	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys	Phe	
						530				535					540		
	Leu	His	Trp	Leu	Met	Ser	Val	Tyr	Val	Val	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Phe	
	545						550				555					560	
	Phe	Tyr	Val	Thr	Glu	Thr	Thr	Phe	Gln	Lys	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Tyr	
						565				570					575		
	Arg	Lys	Ser	Val	Trp	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Gly	Ile	Arg	Gln	His	
						580				585					590		
	Leu	Lys	Arg	Val	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Gln	
						595				600					605		
[0004]	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	
						610				615					620		
	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile	Val	Asn	Met	Asp	Tyr	Val	Val	
	625						630				635					640	
	Gly	Ala	Arg	Thr	Phe	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Glu	Arg	Leu	Thr	Ser	
						645				650					655		
	Arg	Val	Lys	Ala	Leu	Phe	Ser	Val	Leu	Asn	Tyr	Glu	Arg	Ala	Arg	Arg	
						660				665					670		
	Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	Gly	Leu	Asp	Asp	Ile	His	Arg	
						675				680					685		
	Ala	Trp	Arg	Thr	Phe	Val	Leu	Arg	Val	Arg	Ala	Gln	Asp	Pro	Pro	Pro	
						690				695					700		
	Glu	Leu	Tyr	Phe	Val	Lys	Val	Asp	Val	Thr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Thr	Ile	
	705						710				715					720	
	Pro	Gln	Asp	Arg	Leu	Thr	Glu	Val	Ile	Ala	Ser	Ile	Ile	Lys	Pro	Gln	

	725	730	735
	Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His		
	740	745	750
	Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp		
	755	760	765
	Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser		
	770	775	780
	Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu		
	785	790	795
	Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His		
	805	810	815
	Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro		
	820	825	830
[0005]	Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp		
	835	840	845
	Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu		
	850	855	860
	Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala		
	865	870	875
	Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys		
	885	890	895
	Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu		
	900	905	910
	Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe		
	915	920	925
	Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser		
	930	935	940
	Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe		
	945	950	955
			960

[0006]

Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly
 965 970 975

Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn
 980 985 990

Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln
 995 1000 1005

Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln
 1010 1015 1020

Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala
 1025 1030 1035 1040

Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu
 1045 1050 1055

Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp
 1060 1065 1070

Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr
 1075 1080 1085

Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser
 1090 1095 1100

Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn
 1105 1110 1115 1120

Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp
 1125 1130

<210> 3

<211> 48

<212> DNA

<213> 智人

<400> 181

gaagcgcgcc cggcgctgct gaccagecgc ctgcgcttta ttccgaaa

48

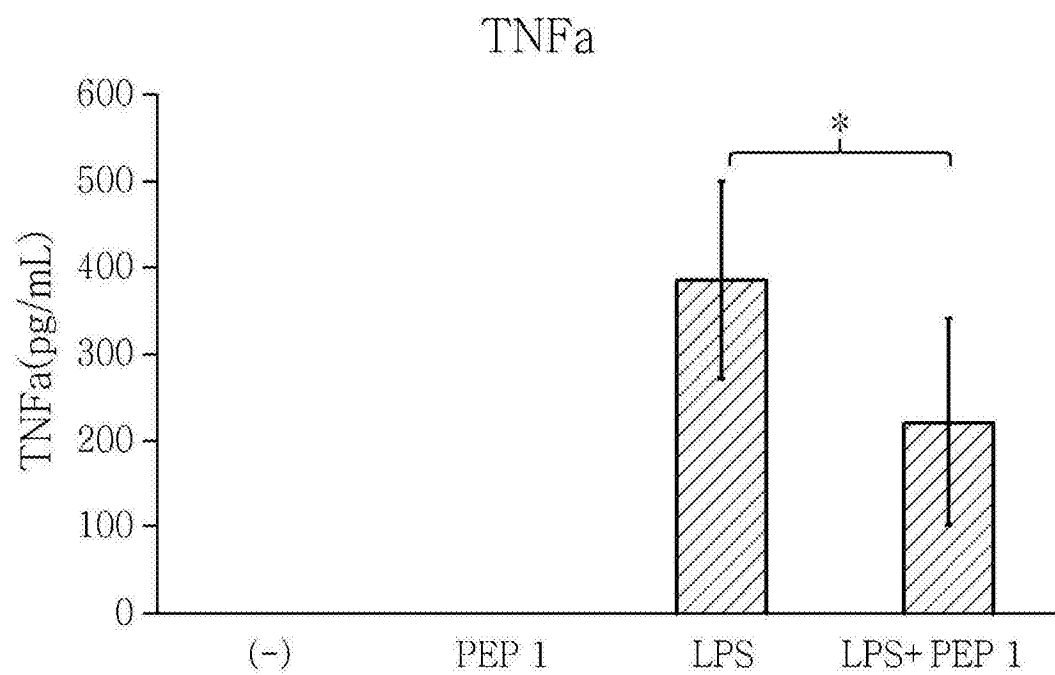


图1

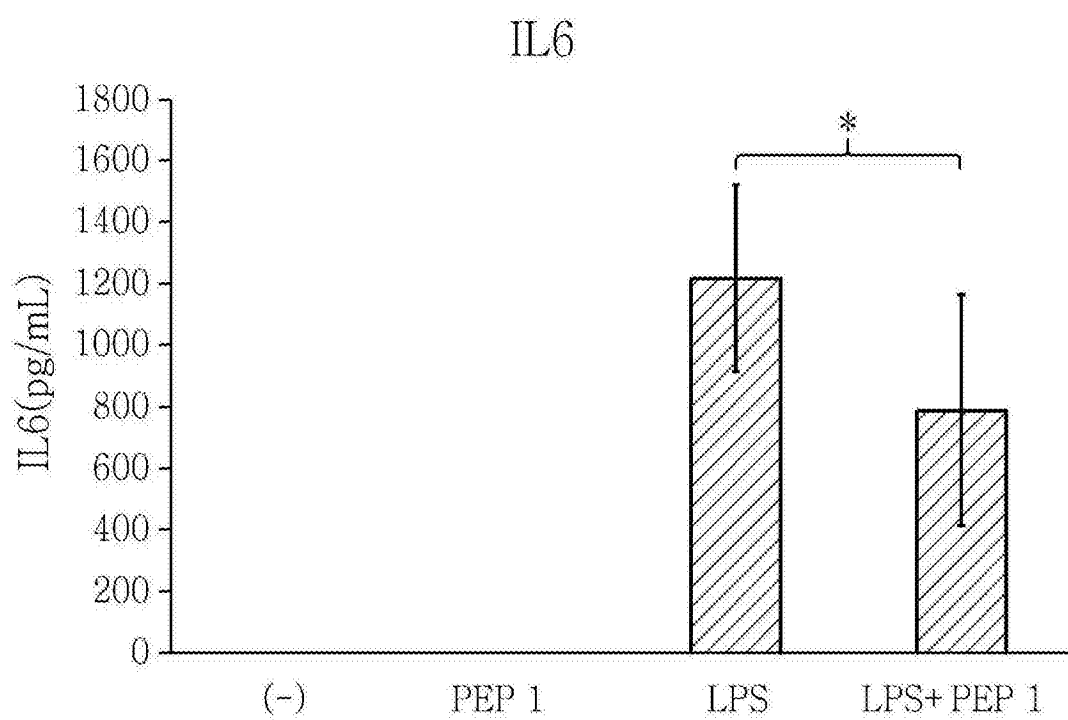


图2

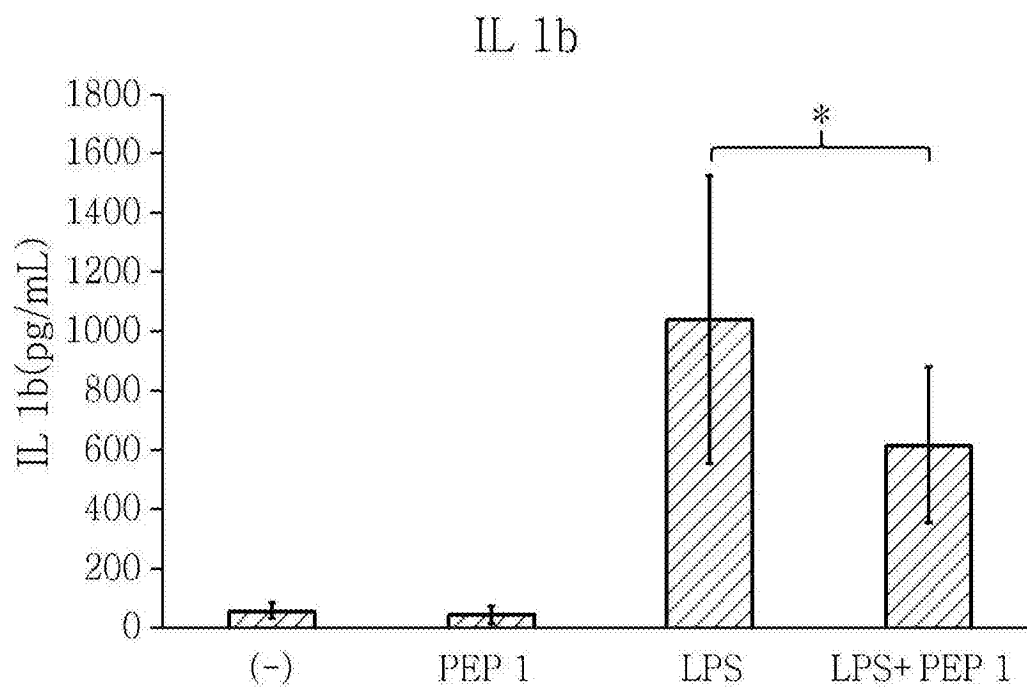


图3

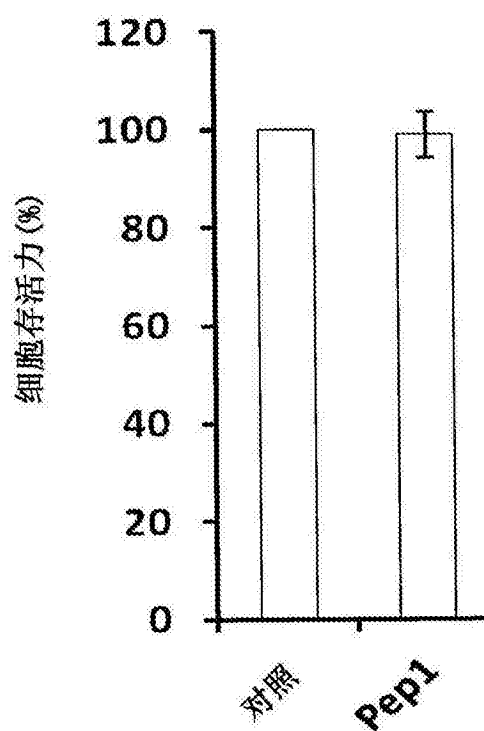


图4