



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105517562 B

(45)授权公告日 2018.12.28

(21)申请号 201480031461.3

(22)申请日 2014.04.07

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105517562 A

(43)申请公布日 2016.04.20

(30)优先权数据

61/808,966 2013.04.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.12.01

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/033206 2014.04.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/165853 EN 2014.10.09

(73)专利权人 拜欧马可医药公司

地址 美国北卡罗来纳州

专利权人 北卡罗莱纳州立大学

(72)发明人 I·帕里克 K·B·阿德勒

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 史悦

(51)Int.Cl.

A61K 38/16(2006.01)

A61K 38/04(2006.01)

(56)对比文件

CN 101516190 A,2009.08.26,

CN 1564696 A,2005.01.12,

Krista Rombouts et al.Myristoylated Alanine-Rich protein Kinase C Substrate (MARCKS) expression modulates the metastatic phenotype in human and murine colon carcinoma in vitro and in vivo.《Cancer Letters》.2013,第333卷(第2期),

审查员 张全红

权利要求书2页 说明书27页

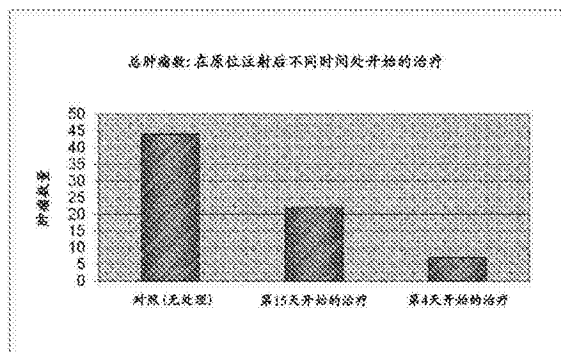
序列表43页 附图21页

(54)发明名称

转移抑制剂

(57)摘要

本发明涉及用于治疗或预防癌症的方法和化合物。提供的方法和组合物包括抑制或遏制癌症的发育、维持和增殖,包括阻遏和抑制癌细胞转移。



1. 肉豆蔻酰化的富丙氨酸C激酶底物 (MARCKS)-抑制性化合物在制造用于治疗或预防癌症的药物中的用途,其中所述MARCKS-抑制性化合物是化学修饰的肽且所述肽选自下组: Ac-GAQFSKTA AK-OH (SEQ ID NO:106)、Ma-GAQFSKTA AK-OH (SEQ ID NO:106)、MA-GAQFSKTA AK-NH₂ (SEQ ID NO:106)、Ac-RGAQFSKTA AK-NH₂ (SEQ ID NO:234)、Ac-GAQFSKTA AK-OH (SEQ ID NO:121)、Ma-RGAQFSKTA AK-NH₂ (SEQ ID NO:234)、Ma-AKGE-OH (SEQ ID NO:219)。

2. 权利要求1的用途,其中所述用于治疗或预防癌症的用途包括用于治疗、预防、或抑制转移、癌细胞增殖、肿瘤生长、或血管生成的用途。

3. 权利要求1的用途,其中所述肽通过吸入所述肽的液体溶液或悬液进行,或是通过吸入所述肽的干粉制剂施用。

4. 权利要求1的用途,其中所述肽通过注射所述肽的液体制剂施用。

5. 权利要求1的用途,其中所述肽通过静脉内、肌肉内、或腹膜内注射或通过口服或栓剂施用而施用于受试者。

6. 权利要求5的用途,其中所述注射进入含有癌细胞的肿瘤中。

7. 权利要求5的用途,其中所述注射是全身性的。

8. 权利要求1-7任一项的用途,其中所述癌症是实体瘤。

9. 权利要求1-7任一项的用途,其中所述癌症是非实体瘤。

10. 权利要求1的用途,其中所述肽以0.01mg/kg/天至10mg/kg/天的剂量施用。

11. 权利要求10的用途,其中所述肽以0.5mg/kg/天至2.5mg/kg/天的剂量施用。

12. 肽的制剂在制造用于抑制癌细胞转移的药物中的用途,所述肽选自下组: Ac-GAQFSKTA AK-OH (SEQ ID NO:106)、Ma-GAQFSKTA AK-OH (SEQ ID NO:106)、MA-GAQFSKTA AK-NH₂ (SEQ ID NO:106)、Ac-RGAQFSKTA AK-NH₂ (SEQ ID NO:234)、Ac-GAQFSKTA AK-OH (SEQ ID NO:121)、Ma-RGAQFSKTA AK-NH₂ (SEQ ID NO:234)、Ma-AKGE-OH (SEQ ID NO:219) 及其组合。

13. 权利要求12的用途,其中所述制剂包含对治疗癌症有用的额外的药物。

14. 权利要求13的用途,其中所述额外的药物是化疗药物。

15. 权利要求14的用途,其中所述化疗药物选自下组: 卡铂 (carboplatin)、顺铂 (cisplatin)、奥沙利铂 (oxaliplatin)、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、达卡巴嗪 (dacarbazine)、替莫唑胺 (temozolomide)、吉西他滨 (gemcitabine)、卡培他滨 (capecitabine)、克拉屈滨 (cladribine)、氯法拉滨 (clofarabine)、阿糖胞苷 (cytarabine)、氟尿苷 (floxuridine)、氟达拉滨 (fludarabine)、羟基脲 (hydroxyurea)、氨甲蝶呤 (methotrexate)、培美曲塞 (pemetrexed)、喷司他丁 (pentostatin)、thioguanadine、柔红霉素 (daunorubicin)、多柔比星 (doxorubicin)、表柔比星 (epirubicin)、伊达比星 (idarubicin)、托泊替康 (topotecan)、伊立替康 (irinotecan)、依托泊苷 (etoposide)、eniposide、秋水仙素 (colchicine)、长春新碱 (vincristine)、长春碱 (vinblastine)、长春瑞滨 (vinorelbine)、帕利他赛 (paclitaxel) 和多西他赛 (docetaxel)。

16. 权利要求15的用途,其中所述化疗药物是顺铂或卡铂。

17. 肽在制造用于抑制哺乳动物中癌细胞转移的药物中的用途,其中所述肽在以50μmol浓度的所述肽预处理非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞及12小时的迁移期后展现出至少1.5的

迁移指数,其中所述肽选自下组:Ac-GAQFSKTAAC-OH (SEQ ID NO:106)、Ma-GAQFSKTAAC-OH (SEQ ID NO:106)、MA-GAQFSKTAAC-NH₂ (SEQ ID NO:106)、Ac-RGAQFSKTAAC-NH₂ (SEQ ID NO:234)、Ac-GAQFSKTAA-OH (SEQ ID NO:121)、Ma-RGAQFSKTAAC-NH₂ (SEQ ID NO:234)、Ma-AKGE-OH (SEQ ID NO:219)。

18. 肽在制造用于抑制哺乳动物中癌细胞转移的药物中的用途,其中所述肽在以100μmol浓度的所述肽预处理非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞及12小时的迁移期后展现出至少2.0的迁移指数,其中所述肽选自下组:Ac-GAQFSKTAAC-OH (SEQ ID NO:106)、Ma-GAQFSKTAAC-OH (SEQ ID NO:106)、MA-GAQFSKTAAC-NH₂ (SEQ ID NO:106)、Ac-RGAQFSKTAAC-NH₂ (SEQ ID NO:234)、Ac-GAQFSKTAA-OH (SEQ ID NO:121)、Ma-RGAQFSKTAAC-NH₂ (SEQ ID NO:234)、Ma-AKGE-OH (SEQ ID NO:219)。

19. 肉豆蔻酰化的富丙氨酸C激酶底物 (MARCKS)-抑制性化合物和化疗药物的组合在制造用于治疗或预防癌症的药物中的用途,其中所述MARCKS-抑制性化合物是化学修饰的肽且所述肽选自下组:Ac-GAQFSKTAAC-OH (SEQ ID NO:106)、Ma-GAQFSKTAAC-OH (SEQ ID NO:106)、MA-GAQFSKTAAC-NH₂ (SEQ ID NO:106)、Ac-RGAQFSKTAAC-NH₂ (SEQ ID NO:234)、Ac-GAQFSKTAA-OH (SEQ ID NO:121)、Ma-RGAQFSKTAAC-NH₂ (SEQ ID NO:234)、Ma-AKGE-OH (SEQ ID NO:219)。

20. 权利要求19的用途,其中所述化疗药物选自下组:卡铂、顺铂、奥沙利铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、替莫唑胺、吉西他滨、卡培他滨、克拉屈滨、氟达拉滨、阿糖胞苷、氟尿苷、氟达拉滨、羟基脲、氨甲蝶呤、培美曲塞、喷司他丁、thioguanadine、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、托泊替康、伊立替康、依托泊苷、eniposide、秋水仙素、长春新碱、长春碱、长春瑞滨、帕利他赛和多西他赛。

21. 权利要求20的用途,其中所述化疗药物是顺铂或卡铂。

转移抑制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利要求申请日为2013年4月5日的美国临时申请号61/808,966的优先权,其在此通过提述以其整体并入。

发明领域

[0003] 本专利涉及包含抗体、核酸分子、多核苷酸和肽的组合物和制剂,以及它们用于预防和治疗转移性癌症,特别是用于降低、阻遏、或抑制癌细胞增殖、转移和/或血管生成的方法。

[0004] 对电子提交文本的说明

[0005] 随此一道电子提交的文本文件内容再次通过提述以其整体并入:序列表的计算机可读形式拷贝(文件名:BMRK_006_01WO_SubSeqList_ST25.txt,数据记录于2014年4月4日,文件大小:58千字节)。

[0006] 发明背景

[0007] MARCKS蛋白(肉豆蔻酰化的富丙氨酸C激酶底物)是蛋白激酶C(PKC)的普遍存在的磷酸化靶标(Li等,Journal of Biological Chemistry 276:40982(2002))。MARCKS具有三个进化保守区(Aderem等,Nature 1988;332:362-364;Thelen等,Nature 1991;351:320-322;Hartwig等,Nature 1992;356:618-622;Seykora等,J Biol Chem 1996;271:18797-18802):N末端、磷酸化位点域(或PSD,也称为效应器域)、和多同源性2(MH2)域。N末端是包含24个氨基酸具有经酰胺键连接至N末端甘氨酸残基的肉豆蔻酸部分的 α -氨基酸序列,其涉及MARCKS对细胞中的膜的结合(Seykora等,J Biol Chem 1996;271:18797-18802)并且可能与钙调蛋白结合(Matsubara等,J Biol Chem 2003;278:48898-48902)。此24个氨基酸的序列称为MANS肽。MANS肽和相关肽公开于美国专利号7,265,088;7,529,926;7,544,772;8,492,518;8,501,911;7,918,293,870;和8,563,689中,各文件的全部内容通过提述以其整体并入。

[0008] 本领域中需要新的安全的治疗方法来预防、治疗和抑制癌症,包括抑制癌细胞转移、癌细胞增殖、肿瘤生长、和/或血管生成。本发明解决了这些和其他的需求。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明涉及对于预防或治疗癌症有用的方法和组合物。在一个实施方案中,提供了用于抑制癌细胞转移、癌细胞增殖、肿瘤生长、或血管生成的方法和组合物。在一个实施方案中,提供了用于抑制癌细胞转移、癌细胞增殖、肿瘤生长、或血管生成的方法和组合物,包括对肉豆蔻酰化的富丙氨酸C激酶底物(MARCKS)的抑制。在一个实施方案中,组合物包含MARCKS-抑制性化合物,包括肽、多肽、抗体或其片段、以及核酸分子如反义多核苷酸、适配体(apramer)、小干扰RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)、和短发夹RNA(shRNA)。本申请所用的“MARCKS-抑制性核酸分子”指的是降低MARCKS的表达和/或功能的多核苷酸或核酸分子如siRNA、miRNA、shRNA、或反义多核苷酸。在一个实施方案中,所述组合物包含一个或多个MARCKS相关的肽。在另一个实施方案中,所述MARCKS相关的肽对应于MARCKS的MH2域。在另

一个实施方案中,所述肽是肉豆蔻酰化的N末端序列(MANS肽,其是MARCKS的24个氨基酸的片段)相关的肽(即“MANS相关的肽”)。在又一个实施方案中,MANS相关的肽选自下组:MANS肽;未取代的MANS片段,其含有四个或更多氨基酸且包含与MANS肽中N末端氨基酸序列中所发现的相同的序列;包含与MANS肽或MANS肽片段中所发现的序列基本上相同的序列的肽;MANS肽或MANS肽的片段,其具有与MANS肽完全相同或基本上相同的氨基酸序列,其进行了N末端肉豆蔻酰化或例如以乙酰基进行了N末端乙酰化;和MANS肽或MANS肽的片段,其具有与MANS肽完全相同或基本上相同的氨基酸序列,其C末端经化学修饰。在一个实施方案中,MANS相关的肽是N末端和C末端都被化学修饰的。在一个实施方案中,本申请提供的MARCKS-抑制性化合物是抗体或其片段。在一个实施方案中,所述抗体或其片段抑制MARCKS蛋白的功能。在另一个实施方案中,所述抗体或其片段结合至MARCKS蛋白的N末端或MARCKS蛋白的MH2序列。我们令人惊讶地发现,使用不同类型的MARCKS-抑制性化合物显示出对癌细胞体外迁移的抑制效果,并抑制体内转移。在一个实施方案中,MARCKS-抑制性化合物展示出对侵袭性癌细胞系的迁移的抑制效果。在一个实施方案中,本申请提供的MARCKS-抑制化合物抑制哺乳动物的肿瘤中癌细胞的转移。在又一个实施方案中,所述肿瘤是实体瘤。在另一个实施方案中,所述肿瘤是非实体瘤。在一个实施方案中,本申请提供的MARCKS-抑制化合物抑制与淋巴瘤或白血病相关的癌细胞的转移。

[0011] 在一个实施方案中,MARCKS-抑制性化合物包括MARCKS-抑制性多核苷酸或MARCKS-抑制性核酸分子。在进一步的实施方案中,所述MARCKS-抑制性化合物是抑制MARCKS表达和/或功能的反义RNA、siRNA、shRNA、或微小RNA多核苷酸。在一个实施方案中,MARCKS-抑制性化合物是调节MARCKS表达的蛋白或多核苷酸的模拟物,例如miR21的模拟物。

[0012] 在一个实施方案中,MARCKS-抑制性化合物是MARCKS相关的或MANS相关的肽。在另一个实施方案中,MARCKS相关的肽对应于MARCKS的N末端肉豆蔻酰化的域。因此,在一个实施方案中,MARCKS相关的肽是MANS相关的肽。在一个实施方案中,MANS相关的肽和一些经化学修饰的MANS相关的肽阻遏侵袭性癌细胞系的迁移。在一个实施方案中,MANS相关的肽用于对癌细胞的转移发挥抑制性效果。在一个实施方案中,MARCKS-抑制性化合物展现出对癌细胞体内转移的阻遏效果。抑制转移性疾病的体内位点包括至少肺组织、心脏组织、脾组织、肠组织、和隔膜组织。在一个实施方案中,MANS相关的肽用于治疗或预防癌细胞转移、癌细胞增殖、肿瘤细胞生长、或血管生成。

[0013] 在一个方面,提供了用于治疗或预防癌症的组合物和方法,包括将MARCKS-抑制性化合物施用于癌细胞或在癌细胞的发育、维持、增殖或转移中起作用的细胞。在一个实施方案中,提供了用于抑制癌细胞转移的方法,包括对癌细胞施用转移抑制量的MARCKS-抑制性化合物。在一个实施方案中,提供了用于抑制癌细胞转移的方法,包括对癌细胞施用转移抑制量的MANS相关的肽。在另一个实施方案中,提供了用于在肿瘤中抑制癌细胞转移的方法,包括对癌细胞施用转移抑制量的肽,所述肽具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:231(含)、SEQ ID NO:234、和SEQ ID NO:235;其中所述肽序列的N末端和/或C末端氨基酸任选地经化学修饰。在另一个实施方案中,提供了用于在对其有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括对所述受试者施用治疗有效量的MANS相关的肽。在另一个实施方案中,提供了用于在对其有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括对所述

受试者施用治疗有效量的肽,所述肽具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:231(含)、SEQ ID NO:234、和SEQ ID NO:235;其中所述肽序列的N末端和/或C末端氨基酸任选地经化学修饰。

[0014] 在一个实施方案中,所述肽的N末端氨基酸通过肽的N末端氨基酸酰化而被化学修饰,所述酰化呈选自下组的酰胺的形式:

[0015] • C₂(乙酰基)至C₂₄脂肪族羧酸的酰胺,所述脂肪族羧酸可以是线性的、分枝的、饱和的、或不饱和的,

[0016] • 三氟乙酸的酰胺,

[0017] • 苯甲酸的酰胺,和

[0018] • C₁至C₂₄脂肪族烷基磺酸的酰胺;或者

[0019] • 所述肽的N末端氨基酸的N末端胺基可用选自下组的基团烷基化:

[0020] • C₁至C₂₄脂肪族烷基基团,

[0021] • 线性2-(C₁至C₂₄脂肪族烷基)氧乙基基团,

[0022] • ω -甲氧基-聚(乙烯氧基)_n-乙基基团,其中n为0至10。

[0023] 在进一步的实施方案中,所述N末端酰胺选自乙酰基和肉豆蔻酰基。

[0024] 在另一个实施方案中,所述肽的C末端氨基酸是经化学修饰的,所述化学修饰通过在肽的C末端氨基酸的C末端羧酸基团处形成酰胺而进行,所述酰胺呈选自下组的酰胺形式:

[0025] • 氨的酰胺,

[0026] • C₁至C₂₄脂肪族烷基胺的酰胺,

[0027] • 羟基取代的C₂至C₂₄脂肪族烷基胺的酰胺,

[0028] • 线性2-(C₁至C₂₄脂肪族烷基)氧乙基胺基团的酰胺,和

[0029] • ω -甲氧基-聚(乙烯氧基)_n-乙胺基团的酰胺,其中n为0至10。

[0030] 在一个实施方案中,分别提供了用于抑制癌细胞转移的方法,或用于治疗癌症的方法,包括对癌细胞或受试者施用MANS相关的肽。在一个实施方案中,所述肽选自下组:N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA (SEQ ID NO:1);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAV (SEQ ID NO:2);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAA (SEQ ID NO:4);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAERPGEA (SEQ ID NO:7);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAERPGE (SEQ ID NO:11);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAERPGE (SEQ ID NO:16);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAERP (SEQ ID NO:22);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAER (SEQ ID NO:29);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAEE (SEQ ID NO:37);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAA (SEQ ID NO:46);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAA (SEQ ID NO:56);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEA (SEQ ID NO:67);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGE (SEQ ID NO:79);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKG (SEQ ID NO:92);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAK (SEQ ID NO:106);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAA (SEQ ID NO:121);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTA (SEQ ID NO:137);N-肉豆蔻酰-GAQFSKT (SEQ ID NO:154);N-肉豆蔻酰-GAQFSK (SEQ ID NO:172);N-肉豆蔻酰-GAQFS (SEQ ID NO:191);N-肉豆蔻酰-GAQF (SEQ ID NO:211);N-乙酰-RGAQFSKTAAK (SEQ ID NO:234);N-乙酰-RGAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID NO:234);N-乙酰-RAKGE (SEQ ID NO:235),及其组合。

[0031] 在一个实施方案中,所述肽选自下组:N-乙酰-GAQFSKTAAK (SEQ ID NO:106);BIO-

11006);N-肉豆蔻酰-AKGE (SEQ ID No:219;BIO-91200);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAK-NH2 (SEQ ID No:106;BIO-11002);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAK (SEQ ID No:106;BIO-11000);N-乙酰-GAQFSKTAA (SEQ ID No:121;BIO-10901);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAK (SEQ ID No:121;BIO-10900);和N-乙酰-GAQFSKTAAK-NH2 (SEQ ID No:106)。在一个实施方案中,一些氨基酸以d-构象存在。例如,在一个实施方案中,所述肽是N-乙酰-GAQFS(d)KTAA(d)K (SEQ ID NO:106;BIO-11037),其中在所述肽的位置6和10处的赖氨酸(K)是d-构象的。

[0032] 在一些实施方案中,MANS相关的肽展示出能使其适于在治疗应用中,例如在癌症的治疗中使用的特性。例如,在一个实施方案中,本申请公开的一些MANS相关的肽展示出相对于(除MANS相关的肽以外的)一种或多种MANS肽增强的溶解性。在另一个实施方案中,本申请提供的一些MANS相关的肽在血浆中展现出比(除MANS相关的肽以外的)一种或多种MANS肽更长的半衰期。

[0033] 在一个实施方案中,MARCKS相关的肽展现出降低的癌细胞迁移。例如,在一个实施方案中,用MANS相关的肽(例如BIO-11006、BIO11002、BIO10901、BIO10900、BIO11000、或BIO-91200)预处理癌细胞,在以约10 μ m肽至约200 μ m肽预处理细胞;或以约20 μ m至约200 μ m预处理细胞;或以约25 μ m肽至约75 μ m肽预处理细胞时,降低癌细胞的迁移。在一个实施方案中,当以约1 μ M至约500 μ M、约5 μ M至约250 μ M、或约10 μ M至约200 μ M的浓度施用,所述MARCKS相关的肽展示出降低的癌细胞迁移。在一个实施方案中,当以约1 μ M、约5 μ M、约10 μ M、约25 μ M、约50 μ M、约100 μ M、约150 μ M、约200 μ M、或约500 μ M的浓度施用,所述MARCKS相关的肽展示出降低的癌细胞迁移。在一个实施方案中,在体外用所述肽处理癌细胞以确定肽的效果。在一个实施方案中,癌细胞来源于患者。在进一步的实施方案中,在体外用所述肽处理癌细胞以确定患者是否很可能响应于肽的治疗。

[0034] 在一个实施方案中,当以约0.01mg/kg/天至约10mg/kg/天的浓度施用于患者时,MARCKS相关的肽展现出降低的癌细胞转移。在进一步的实施方案中,当以约0.1mg/kg/天至约5.0mg/kg/天的浓度施用于患者时,MARCKS相关的肽展现出降低的癌细胞转移。在更进一步的实施方案中,当以约0.5mg/kg/天至约2.5mg/kg/天的浓度施用于患者时,MARCKS相关的肽展现出降低的癌细胞转移。例如,当以约0.01、约0.05、约0.1、约0.5、约0.75、约1.0、约1.25、约1.5、约1.75、约2.0、约2.25、约2.5、约2.75、约3.0、约3.5、约4.0、约5.0、约6.0、约7.0、约8.0、约9.0、约10.0mg/kg/天或更高的浓度施用于患者时,MARCKS相关的肽展现出降低的癌细胞迁移。

[0035] 在一个实施方案中,所述肽通过吸入肽的液体溶液或悬液,或是通过吸入肽的干粉制剂来施用。在另一个实施方案中,所述肽通过注射肽的液体制剂或悬液来施用。在进一步的实施方案中,所述注射进入原发肿瘤区中,其中所述区含有癌细胞。在进一步的实施方案中,所述癌细胞留驻在哺乳动物中的肿瘤中。在一个实施方案中,所述肿瘤是实体瘤。在另一个实施方案中,所述肿瘤是非实体瘤。在一个实施方案中,本申请提供的MARCKS-抑制化合物抑制与淋巴瘤或白血病相关的癌细胞的转移。在另一个实施方案中,所述液体制剂是等渗的。在另一个实施方案中,所述液体制剂是经缓冲的。

[0036] 在一个实施方案中,所述转移抑制量的肽的范围是约0.1至约100微摩尔每毫升。在进一步的实施方案中,所述转移抑制量的肽的范围是约1至约10微摩尔每毫升。在另一个实施方案中,所述肽在这样的制剂中,所述制剂包含对治疗癌症有用的额外的药物,或是经

配制用于与额外的药物一起施用。

[0037] 在一个方面,提供了用于在哺乳动物中治疗或预防癌症或抑制癌细胞转移的方法,其中所述方法包括对所述哺乳动物施用MARCKS-抑制性化合物。在一个实施方案中,所述MARCKS-抑制性化合物是降低MARCKS表达或活性的多核苷酸或核酸分子。在进一步的实施方案中,所述MARCKS-抑制性多核苷酸是反义RNA、siRNA、shRNA、或miRNA。在一个实施方案中,所述MARCKS-抑制性多核苷酸以约10nM至10 μ M,或约20nM至约500nM,或约30nM至约300nM,或约40nM至约200nM,或约50nM至约100nM的量施用。在一个实施方案中,所述MARCKS-抑制性多核苷酸是调节MARCKS表达的miRNA的模拟物。例如,在一个实施方案中,所述MARCKS-抑制性多核苷酸是miR21的模拟物。在一个实施方案中,所述多核苷酸和核酸分子与递送剂一起施用,所述递送剂如肽、蛋白质、脂质、甾醇、聚合物、转染试剂、或本领域已知的任何多核苷酸或核酸分子递送剂。

[0038] 在一个方面,提供了用于在哺乳动物中治疗或预防癌症或抑制癌细胞转移的方法,其中所述方法包括对所述哺乳动物施用MANS相关的肽,其中在对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞进行预处理后,所述肽展示出至少约1.5,至少约1.6,至少约1.7,至少约1.8,至少约1.9,至少约2.0,至少约2.1,至少约2.2,至少约2.3,至少约2.4,至少约2.5,至少约2.6,至少约2.7,至少约2.8,至少约2.9,至少约3.0或更多的迁移指数。在进一步的实施方案中,MANS相关的肽以约5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,60,70,80,90,100,125,150,175,或200微摩尔(μ molar)所述肽的浓度存在。在另一个实施方案中,迁移期是3,4,5,6,7,8,12,15,20,21,22,23,或24小时。在一个实施方案中,在用50微摩尔浓度的MANS相关的肽预处理NSCLC细胞以及约12小时的迁移期后,所述肽展示出至少约1.5的迁移指数。在另一个实施方案中,在用至少约100微摩尔浓度的MANS相关的肽预处理NSCLC细胞以及约12小时的迁移期后,所述肽展示出至少约2.0的迁移指数。

[0039] 在一个方面,提供了用于在对其有需要的患者中治疗或预防癌症(包括癌转移)的方法,所述方法包括对受试者以约0.01mg/kg/天至约10mg/kg/天的剂量施用MANS相关的肽。在进一步的实施方案中,所述MANS相关的肽以约0.1mg/kg/天至约5.0mg/kg/天的浓度施用。在更进一步的实施方案中,MANS相关的肽以约0.5mg/kg/天至约2.5mg/kg/天的浓度施用。例如,MANS相关的肽以约0.01、约0.05、约0.1、约0.5、约0.75、约1.0、约1.25、约1.5、约1.75、约2.0、约2.25、约2.5、约2.75、约3.0、约3.5、约4.0、约5.0、约6.0、约7.0、约8.0、约9.0、约10.0mg/kg/天或更高的剂量施用以治疗或预防癌症。

[0040] 附图简述

[0041] 图1显示了12小时迁移期后阴性对照的细胞计数视野。

[0042] 图2A显示了用50微摩尔的MANS肽预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0043] 图2B显示了用100微摩尔的MANS肽预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0044] 图3A显示了用50微摩尔的RNS肽预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0045] 图3B显示了用100微摩尔的RNS肽预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0046] 图4A显示了用50微摩尔的MANS相关的肽BIO-11002预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0047] 图4B显示了用100微摩尔的MANS相关的肽BIO-11002预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0048] 图5A显示了用50微摩尔的MANS相关的肽BIO-10901预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0049] 图5B显示了用100微摩尔的MANS相关的肽BIO-10901预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0050] 图6A显示了用50微摩尔的MANS相关的肽BIO-91200预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0051] 图6B显示了用100微摩尔的MANS相关的肽BIO-91200预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0052] 图7A图示显示了用50微摩尔的MANS肽、BIO11002、BIO10901、BIO91200、或RNS肽预处理,或无肽(对照)预处理后12小时得到的迁移细胞数。

[0053] 图7B图示显示了用100微摩尔的MANS肽、BIO11002、BIO10901、BIO91200、或RNS肽预处理,或无肽(对照)预处理后12小时得到的迁移细胞数。

[0054] 图8A图示显示了侵袭性人NSCLC细胞系细胞的迁移指数,其中在用50微摩尔的本发明的肽预处理接着是根据实验方案的12小时处理之后迁移指数值越高表示迁移越少。

[0055] 图8B图示显示了侵袭性人NSCLC细胞系细胞的迁移指数,其中在用100微摩尔的本发明的肽预处理接着是根据实验方案的12小时处理之后迁移指数值越高表示迁移越少。

[0056] 图9图示显示了用50微摩尔指定的肽和侵袭性人NSCLC细胞系进行的实验中MANS、RNS、BIO-11000、或BIO-11006、或对照(无肽)各自的细胞数(左图面)和迁移指数数值(右图面)。

[0057] 图10图示显示了用100微摩尔指定的肽和侵袭性人NSCLC细胞系进行的实验中MANS、RNS、BIO-11000、或BIO-11006、BIO-91200、或对照(无肽)各自的细胞数(左图面)和迁移指数数值(右图面)。

[0058] 图11显示了不用肽或用指定的测试肽(MANS、RNS、BIO-11006、BIO-11000、BIO-11002、BIO-91200、或BIO-10901)以10微摩尔(左上图面)、25微摩尔(右上图面)或50微摩尔(下图面)的肽预处理A549细胞后12小时迁移的细胞数。

[0059] 图12显示了在用BIO-11006处理的动物中,每只小鼠左肺、右肺、心脏、和隔膜中的平均肿瘤数。BIO-11006(PBS中100 μ M)开始于癌细胞接种后第3天每日1次施用22天,所述施用经腹膜内注射(50 μ L)或吸入(30分钟,喷雾器递送系统(Nebulizer Delivery System), Aeroneb Lab)。

[0060] 图13显示了通过用喷雾器递送系统(Aeroneb Lab)在30天吸入施用BIO-11006(PBS中100 μ M)的小鼠中,每只小鼠左肺、右肺、心脏、和隔膜中的平均肿瘤数,所述施用在相对于注射人腺癌细胞(PC-9)第15天或第4天开始每日一次进行。

[0061] 图14显示了通过用喷雾器递送系统(Aeroneb Lab)在30天吸入施用BIO-11006(PBS中100 μ M)的小鼠中的肿瘤总数,所述施用在相对于注射PC-9细胞第15天或第4天开始每日一次进行。

[0062] 图15描述了在小鼠中发现的转移性结节的数目,所述小鼠从相对于A549癌细胞注射第-1天或第+3天开始每隔一天用介质对照、雾化的BIO-11006处理,或从相对于A549癌细胞注射第-1天或第+3天开始用雾化的MANS处理。通过用喷雾器递送系统(Aeroneb Lab)吸入来施用雾化的肽(PBS中100 μ M)。*, $p<0.05$,与对照组相比统计学上显著;a,在各组比较中统计学上不显著。

[0063] 图16显示了在PC9细胞中施用100nM MARCKS siRNA或对照siRNA后的MARCKS蛋白的水平。

[0064] 图17显示了在A549细胞中施用100nM MARCKS siRNA或对照siRNA后的MARCKS蛋白的水平。

[0065] 图18显示了用100nM MARCKS siRNA或对照siRNA处理后PC9癌细胞的迁移。

[0066] 图19显示了用100nM MARCKS siRNA或对照siRNA处理后A549癌细胞的迁移。

[0067] 图20通过Western印迹显示了用50nM阴性对照(HiPerfect介质;泳道A)或50nM miR21抑制剂(泳道B)处理后PC9细胞中MARCKS的表达。

[0068] 图21显示了miR21抑制(50nM或100nM mir-21抑制剂)或miR21激活(50nM或100nM miR-21模拟物)后PC9癌细胞的迁移。

[0069] 发明详述

[0070] 先前已显示肉豆蔻酰化的富丙氨酸蛋白激酶C底物(MARCKS)蛋白涉及多种细胞过程。例如,已显示MARCKS蛋白整体涉及细胞分泌、脱粒、迁移和基因表达。这些研究是基于当在刺激之前用MANS肽预处理细胞时,与MARCKS蛋白的肉豆蔻酰化的N末端序列相同的肽(即MANS肽)影响不同的细胞类型中的过程的能力。在所有这些实例中,错义对照肽(由MANS肽的氨基酸的随机氨基酸序列组成,其本文称为RNS肽)相对于MANS肽展示出的活性而言是没有效果的。

[0071] 在一个实施方案中,组合物包含MARCKS-抑制性化合物如本领域已知的任何类型的抑制性化合物,包括肽、多肽、抗体或其片段、和多核苷酸或核酸分子,如反义多核苷酸、适配体、小干扰RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)、和短发夹RNA(shRNA)。在一个实施方案中,所述组合物包含一个或多个肉豆蔻酰化的富丙氨酸C激酶底物(MARCKS)相关的肽。在另一个实施方案中,MARCKS相关的肽对应于MARCKS的MH2域。在另一个实施方案中,组合物包含MARCKS-抑制性肽,包括对应于N末端序列的肽。

[0072] 在一个实施方案中,本申请提供的MARCKS-抑制性化合物是抗体。如本文所用的,术语“抗体”指具有至少一个抗原结合域的结合蛋白,并且包括单克隆抗体、多克隆抗体、和抗体片段和/或变体,包括重组多肽、融合蛋白、和免疫缀合物。本发明的抗体片段的例子包括但不限于Fab片段、Fc片段、Fv片段、dAb片段、分离的CDR区、F(ab')₂、包含两个连接的Fab片段的二价片段、和单链Fv分子(scFv)。技术人员会认识到,本申请提供的抗体或片段可以从任何物种产生,包括但不限于小鼠、大鼠、兔、灵长类、美洲驼(1lama)和人。技术人员会进一步认识到,本申请提供的抗体或片段可以是嵌合的、人源化的、或完全人的。

[0073] 在一个方面,提供了用于治疗或预防癌症的组合物和方法。本申请公开的用于治疗或预防癌症的方法包括治疗或预防癌症的所有方面,包括但不限于转移、肿瘤生长、癌细胞增殖、和血管生成。在一个实施方案中,提供了用于治疗或预防癌症的组合物和方法,包括对癌细胞或对在癌细胞的发育、维持、增殖或转移中起作用的细胞(例如内皮细胞)施用

MARCKS-抑制性化合物。

[0074] 在一个方面,提供了用于抑制癌细胞转移的组合物和方法,其中所述方法包括施用MARCKS-抑制性化合物。在一个实施方案中,MARCKS-抑制性化合物是MARCKS-抑制性的肽、结合至MARCKS或MARCKS肽的抗体或其片段、或抑制MARCKS蛋白功能的多核苷酸或核酸分子,包括反义多核苷酸、适配体、siRNA、miRNA、和shRNA。在进一步的实施方案中,所述肽是MANS相关的肽,其中所述肽抑制癌细胞的转移。在一个实施方案中,提供了MARCKS-抑制性的肽,其抑制癌细胞的转移。在另一个方面,提供了用本文公开的组合物治疗癌症的方法。在一个实施方案中,提供的方法包括使癌细胞与MARCKS-抑制性肽接触。在进一步的实施方案中,所述癌细胞存在于肿瘤中。在一个实施方案中,所述MARCKS-抑制性肽是MANS相关的肽。如本文所用的,术语“MANS相关的肽”意指MANS肽或与MANS基本上相同的肽;或含有MANS肽中的至少四个连续氨基酸的MANS肽片段,或是与含有MANS肽中发现的至少四个连续氨基酸的肽基本上相同。因此,MANS相关的肽长度为4至24个氨基酸。如本文所用的,术语“基本上相同”意指就两个肽的氨基酸序列的比较或两个肽段的氨基酸序列的比较而言,肽或肽段的氨基酸序列具有至少约75%序列同一性、至少约80%序列同一性、至少约90%序列同一性、或至少约95%序列同一性。优选地,所述肽的氨基酸序列与MANS肽或MANS肽片段具有至少约80%序列同一性。在一个实施方案中,MANS相关的肽可以包含长度为4至24个氨基酸的肽,其与MANS肽相同或基本上相同,且还可以包含一个或多个额外的氨基酸。例如,在一个实施方案中,MANS相关的肽包含与MANS肽相同或基本上相同的4至24个连续氨基酸,且进一步包含至少一个MANS肽中不存在的N末端氨基酸,例如精氨酸。

[0075] 在一个实施方案中,MARCKS-抑制性肽是经化学修饰的。在一个实施方案中,MARCKS-抑制性肽是MANS相关的肽,其于N末端位置处酰化。在进一步的实施方案中,MANS相关的肽在N末端位置处以酰基基团酰化。在另一个实施方案中,MANS相关的肽是在N末端位置处肉豆蔻酰化。在另一个实施方案中,MANS相关的肽在C末端位置处经化学修饰。在进一步的实施方案中,MANS相关的肽在C末端位置处通过与胺(例如氨)形成酰胺而进行化学修饰。在另一个实施方案中,MANS相关的肽在N末端和C末端位置处都经化学修饰。表1列出了与本发明相关的肽,其在它们的N末端位置处肉豆蔻酰化但在它们的C末端位置未被取代。表1和2中列出了一些对照肽(RNS肽),其是肉豆蔻酰化的。然而,所述RNS肽不视为在本发明范围之内。

[0076] 表1. 本发明的MANS相关的肽,其N末端经肉豆蔻酰化且在C末端处可以进行进一步的化学修饰,如本文所述

[0077]

肽编号	N-肉豆蔻酰基氨基酸序列	SEQ ID No:	
肽1	GAQFSKTAAKGEGAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO:1	MANS
肽2	GAQFSKTAAKGEGAAAERPGEAAV	SEQ ID NO:2	
肽4	GAQFSKTAAKGEGAAAERPGEAA	SEQ ID NO:4	
肽7	GAQFSKTAAKGEGAAAERPGEA	SEQ ID NO:7	
肽11	GAQFSKTAAKGEGAAAERPGE	SEQ ID NO:11	
肽16	GAQFSKTAAKGEGAAAERPG	SEQ ID NO:16	
肽22	GAQFSKTAAKGEGAAAERP	SEQ ID NO:22	

肽29	GAQFSKTAAKGEEAAER	SEQ ID NO:29	
肽37	GAQFSKTAAKGEEAAE	SEQ ID NO:37	
肽46	GAQFSKTAAKGEEAA	SEQ ID NO:46	
肽56	GAQFSKTAAKGEAA	SEQ ID NO:56	
肽67	GAQFSKTAAKGEA	SEQ ID NO:67	
肽79	GAQFSKTAAKGE	SEQ ID NO:79	
肽92	GAQFSKTAAKG	SEQ ID NO:92	
肽106	GAQFSKTAAK	SEQ ID NO:106	
肽121	GAQFSKTA	SEQ ID NO:121	
肽137	GAQFSKTA	SEQ ID NO:137	
肽154	GAQFSKT	SEQ ID NO:154	
肽172	GAQFSK	SEQ ID NO:172	
肽191	GAQFS	SEQ ID NO:191	
肽211	GAQF	SEQ ID NO:211	
肽232	GTAPAAEGAGAEVKRASAEAKQAF	SEQ ID NO:232	RNS

[0078] 表2列出了本发明的MANS相关的肽片段,其能在N末端和/或C末端位置进行取代或化学修饰。在一个实施方案中,MANS肽的这些活性片段可以在N末端位置处肉豆蔻酰化,如表1中那些那样。在另一个实施方案中,C末端位置处的化学修饰包括酰胺化,例如与胺(例如氨)形成酰胺。肽234 (SEQ ID NO:234) 是肽106 (SEQ ID NO:106; RGAQFSKTAAK) 的N末端精氨酸取代的肽同源物,所述肽106可以在N末端进行化学修饰(例如N末端乙酰基类似物,Ac-RGAQFSKTAAK),并且还可在其N末端和其C末端进行化学修饰(例如N末端乙酰基-,与氨类似物的-C末端酰胺,Ac-RGAQFSKTAAK-NH₂)。肽235 (SEQ ID NO:235) 是肽219 (SEQ ID NO:219; RAKGE) 的N末端精氨酸取代的肽同源物,所述肽219在N末端可以在N末端进行化学修饰(例如N末端乙酰基类似物,Ac-RAKGE),并且还可在其N末端和其C末端进行化学修饰(例如N末端乙酰基-,与氨类似物的-C末端酰胺,Ac-RAKGE-NH₂)。优选的N末端修饰或取代包括肉豆蔻酰基和乙酰基基团,以及N末端精氨酸基团、N末端乙酰-精氨酸基团、和N末端肉豆蔻酰-精氨酸基团。优选的C末端修饰包括来自氨的酰胺基团。

[0079] 表2. 可以在N末端和/或C末端位置处进行化学修饰的MARCKS相关的肽序列,如本文所述

[0080]

表2	MANS肽和活性的MANS相关的肽片段		
肽编号	氨基酸序列	SEQ ID No:	
肽1	GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO:1	MANS
肽2	GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO:2	
肽3	AQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO:3	
肽4	GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAA	SEQ ID NO:4	
肽5	AQFSKTAAKGEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO:5	
肽6	QFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO:6	
肽7	GAQFSKTAAKGEEAAERPGEA	SEQ ID NO:7	

肽8	AQFSKTAAKGEEAAAERPGEAA	SEQ ID NO:8	
肽9	QFSKTAAKGEEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO:9	
肽10	FSKTAAKGEEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO:10	
肽11	GAQFSKTAAKGEEAAAERPGE	SEQ ID NO:11	
肽12	AQFSKTAAKGEEAAAERPGEA	SEQ ID NO:12	
肽13	QFSKTAAKGEEAAAERPGEAA	SEQ ID NO:13	
肽14	FSKTAAKGEEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO:14	
肽15	SKTAAKGEEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO:15	

[0081]

肽16	GAQFSKTAAKGEEAAAERPG	SEQ ID NO:16	
肽17	AQFSKTAAKGEEAAAERPGE	SEQ ID NO:17	
肽18	QFSKTAAKGEEAAAERPGEA	SEQ ID NO:18	
肽19	FSKTAAKGEEAAAERPGEAA	SEQ ID NO:19	
肽20	SKTAAKGEEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO:20	
肽21	KTAAKGEEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO:21	
肽22	GAQFSKTAAKGEEAAAERP	SEQ ID NO:22	
肽23	AQFSKTAAKGEEAAAERPG	SEQ ID NO:23	
肽24	QFSKTAAKGEEAAAERPGE	SEQ ID NO:24	
肽25	FSKTAAKGEEAAAERPGEA	SEQ ID NO:25	
肽26	SKTAAKGEEAAAERPGEAA	SEQ ID NO:26	
肽27	KTAAKGEEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO:27	
肽28	TAAKGEEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO:28	
肽29	GAQFSKTAAKGEEAAAER	SEQ ID NO:29	
肽30	AQFSKTAAKGEEAAAERP	SEQ ID NO:30	
肽31	QFSKTAAKGEEAAAERPG	SEQ ID NO:31	
肽32	FSKTAAKGEEAAAERPGE	SEQ ID NO:32	
肽33	SKTAAKGEEAAAERPGEA	SEQ ID NO:33	
肽34	KTAAKGEEAAAERPGEAA	SEQ ID NO:34	
肽35	TAAKGEEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO:35	
肽36	AAKGEEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO:36	
肽37	GAQFSKTAAKGEEAAAEE	SEQ ID NO:37	
肽38	AQFSKTAAKGEEAAAER	SEQ ID NO:38	
肽39	QFSKTAAKGEEAAAERP	SEQ ID NO:39	
肽40	FSKTAAKGEEAAAERPG	SEQ ID NO:40	
肽41	SKTAAKGEEAAAERPGE	SEQ ID NO:41	
肽42	KTAAKGEEAAAERPGEA	SEQ ID NO:42	
肽43	TAAKGEEAAAERPGEAA	SEQ ID NO:43	
肽44	AAKGEEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO:44	
肽45	AKGEEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO:45	

肽46	GAQFSKTAAKGEGAAA	SEQ ID NO:46	
肽47	AQFSKTAAKGEGAAAE	SEQ ID NO:47	
肽48	QFSKTAAKGEGAAAER	SEQ ID NO:48	
肽49	FSKTAAKGEGAAAERP	SEQ ID NO:49	
肽50	SKTAAKGEGAAAERPG	SEQ ID NO:50	
肽51	KTAAKGEGAAAERPGE	SEQ ID NO:51	
肽52	TAAKGEGAAAERPGEA	SEQ ID NO:52	
肽53	AAKGEGAAAERPGEAA	SEQ ID NO:53	

[0082]

肽54	AKGEGAAAERPGEAAV	SEQ ID NO:54	
肽55	KGEGAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO:55	
肽56	GAQFSKTAAKGEGAA	SEQ ID NO:56	
肽57	AQFSKTAAKGEGAAA	SEQ ID NO:57	
肽58	QFSKTAAKGEGAAAE	SEQ ID NO:58	
肽59	FSKTAAKGEGAAAER	SEQ ID NO:59	
肽60	SKTAAKGEGAAAERP	SEQ ID NO:60	
肽61	KTAAKGEGAAAERPG	SEQ ID NO:61	
肽62	TAAKGEGAAAERPGE	SEQ ID NO:62	
肽63	AAKGEGAAAERPGEA	SEQ ID NO:63	
肽64	AKGEGAAAERPGEAA	SEQ ID NO:64	
肽65	KGEGAAAERPGEAAV	SEQ ID NO:65	
肽66	GEGAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO:66	
肽67	GAQFSKTAAKGEGA	SEQ ID NO:67	
肽68	AQFSKTAAKGEGAA	SEQ ID NO:68	
肽69	QFSKTAAKGEGAAA	SEQ ID NO:69	
肽70	FSKTAAKGEGAAAE	SEQ ID NO:70	
肽71	SKTAAKGEGAAAER	SEQ ID NO:71	
肽72	KTAAKGEGAAAERP	SEQ ID NO:72	
肽73	TAAKGEGAAAERPG	SEQ ID NO:73	
肽74	AAKGEGAAAERPGE	SEQ ID NO:74	
肽75	AKGEGAAAERPGEA	SEQ ID NO:75	
肽76	KGEGAAAERPGEAA	SEQ ID NO:76	
肽77	GEGAAAERPGEAAV	SEQ ID NO:77	
肽78	EAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO:78	
肽79	GAQFSKTAAKGE	SEQ ID NO:79	
肽80	AQFSKTAAKGEGA	SEQ ID NO:80	
肽81	QFSKTAAKGEGAA	SEQ ID NO:81	
肽82	FSKTAAKGEGAAA	SEQ ID NO:82	
肽83	SKTAAKGEGAAAE	SEQ ID NO:83	

肽84	KTAAKGAAAER	SEQ ID NO:84	
肽85	TAAKGAAAERP	SEQ ID NO:85	
肽86	AAKGAAAERPG	SEQ ID NO:86	
肽87	AKGAAAERPGE	SEQ ID NO:87	
肽88	KGAAAERPGEA	SEQ ID NO:88	
肽89	GEAAAERPGEAA	SEQ ID NO:89	
肽90	EAAAERPGEAAV	SEQ ID NO:90	
肽91	AAAERPGEAAVA	SEQ ID NO:91	

[0083]

肽92	GAQFSKTAAKG	SEQ ID NO:92	
肽93	AQFSKTAAKGE	SEQ ID NO:93	
肽94	QFSKTAAKGEA	SEQ ID NO:94	
肽95	FSKTAAKGEAA	SEQ ID NO:95	
肽96	SKTAAKGEAAA	SEQ ID NO:96	
肽97	KTAAKGAAAEE	SEQ ID NO:97	
肽98	TAAKGAAAER	SEQ ID NO:98	
肽99	AAKGAAAERP	SEQ ID NO:99	
肽100	AKGAAAERPG	SEQ ID NO:100	
肽101	KGAAAERPGE	SEQ ID NO:101	
肽102	GEAAAERPGEA	SEQ ID NO:102	
肽103	EAAAERPGEAA	SEQ ID NO:103	
肽104	AAAERPGEAAV	SEQ ID NO:104	
肽105	AAERPGEAAVA	SEQ ID NO:105	
肽106	GAQFSKTAAK	SEQ ID NO:106	
肽107	AQFSKTAAKG	SEQ ID NO:107	
肽108	QFSKTAAKGE	SEQ ID NO:108	
肽109	FSKTAAKGEA	SEQ ID NO:109	
肽110	SKTAAKGEAA	SEQ ID NO:110	
肽111	KTAAKGEEAAA	SEQ ID NO:111	
肽112	TAAKGEEAAE	SEQ ID NO:112	
肽113	AAKGEEAAER	SEQ ID NO:113	
肽114	AKGEEAAERP	SEQ ID NO:114	
肽115	KGEEAAERPG	SEQ ID NO:115	
肽116	GEEEAERPGE	SEQ ID NO:116	
肽117	EAAAERPGEA	SEQ ID NO:117	
肽118	AAAERPGEAA	SEQ ID NO:118	
肽119	AAERPGEAAV	SEQ ID NO:119	
肽120	AERPGEAAVA	SEQ ID NO:120	
肽121	GAQFSKTAA	SEQ ID NO:121	

肽122	AQFSKTAAK	SEQ ID NO:122	
肽123	QFSKTAAKG	SEQ ID NO:123	
肽124	FSKTAAKGE	SEQ ID NO:124	
肽125	SKTAAKGEA	SEQ ID NO:125	
肽126	KTAAKGEAA	SEQ ID NO:126	
肽127	TAAKGEAAA	SEQ ID NO:127	
肽128	AAKGEAAAE	SEQ ID NO:128	
肽129	AKGEAAAER	SEQ ID NO:129	

[0084]

肽130	KGEAAAERP	SEQ ID NO:130	
肽131	GEAAAERPG	SEQ ID NO:131	
肽132	EAAAERPGE	SEQ ID NO:132	
肽133	AAAERPGEA	SEQ ID NO:133	
肽134	AAERPGEAA	SEQ ID NO:134	
肽135	AERPGEAAV	SEQ ID NO:135	
肽136	ERPGEAAVA	SEQ ID NO:136	
肽137	GAQFSKTA	SEQ ID NO:137	
肽138	AQFSKTAA	SEQ ID NO:138	
肽139	QFSKTAAK	SEQ ID NO:139	
肽140	FSKTAAKG	SEQ ID NO:140	
肽141	SKTAAKGE	SEQ ID NO:141	
肽142	KTAAKGEA	SEQ ID NO:142	
肽143	TAAKGEAA	SEQ ID NO:143	
肽144	AAKGEAAA	SEQ ID NO:144	
肽145	AKGEAAAE	SEQ ID NO:145	
肽146	KGEAAAER	SEQ ID NO:146	
肽147	GEAAAERP	SEQ ID NO:147	
肽148	EAAAERPG	SEQ ID NO:148	
肽149	AAAERPGE	SEQ ID NO:149	
肽150	AAERPGEA	SEQ ID NO:150	
肽151	AERPGEAA	SEQ ID NO:151	
肽152	ERPGEAAV	SEQ ID NO:152	
肽153	RPGEAAVA	SEQ ID NO:153	
肽154	GAQFSKT	SEQ ID NO:154	
肽155	AQFSKTA	SEQ ID NO:155	
肽156	QFSKTAA	SEQ ID NO:156	
肽157	FSKTAAK	SEQ ID NO:157	
肽158	SKTAAKG	SEQ ID NO:158	
肽159	KTAAKGE	SEQ ID NO:159	

肽160	TAAKGEA	SEQ ID NO:160	
肽161	AAKGEEA	SEQ ID NO:161	
肽162	AKGEAAA	SEQ ID NO:162	
肽163	KGEAAAE	SEQ ID NO:163	
肽164	GEAAAEER	SEQ ID NO:164	
肽165	EAAAERP	SEQ ID NO:165	
肽166	AAAERPG	SEQ ID NO:166	
肽167	AAERPGE	SEQ ID NO:167	

[0085]

肽168	AERPGEA	SEQ ID NO:168	
肽169	ERPGEAA	SEQ ID NO:169	
肽170	RPGEAAV	SEQ ID NO:170	
肽171	PGEAAVA	SEQ ID NO:171	
肽172	GAQFSK	SEQ ID NO:172	
肽173	AQFSKT	SEQ ID NO:173	
肽174	QFSKTA	SEQ ID NO:174	
肽175	FSKTAA	SEQ ID NO:175	
肽176	SKTAAK	SEQ ID NO:176	
肽177	KTAAKG	SEQ ID NO:177	
肽178	TAAKGE	SEQ ID NO:178	
肽179	AAKGEA	SEQ ID NO:179	
肽180	AKGEAA	SEQ ID NO:180	
肽181	KGEAAA	SEQ ID NO:181	
肽182	GEAAAE	SEQ ID NO:182	
肽183	EAAAER	SEQ ID NO:183	
肽184	AAAERP	SEQ ID NO:184	
肽185	AAERPG	SEQ ID NO:185	
肽186	AERPGE	SEQ ID NO:186	
肽187	ERPGEA	SEQ ID NO:187	
肽188	RPGEAA	SEQ ID NO:188	
肽189	PGEAAV	SEQ ID NO:189	
肽190	GEAAVA	SEQ ID NO:190	
肽191	GAQFS	SEQ ID NO:191	
肽192	AQFSK	SEQ ID NO:192	
肽193	QFSKT	SEQ ID NO:193	
肽194	FSKTA	SEQ ID NO:194	
肽195	SKTAA	SEQ ID NO:195	
肽196	KTAAK	SEQ ID NO:196	
肽197	TAAKG	SEQ ID NO:197	

肽198	AAKGE	SEQ ID NO:198	
肽199	AKGEA	SEQ ID NO:199	
肽200	KGEAA	SEQ ID NO:200	
肽201	GEAAA	SEQ ID NO:201	
肽202	EAAAE	SEQ ID NO:202	
肽203	AAAER	SEQ ID NO:203	
肽204	AAERP	SEQ ID NO:204	
肽205	AERPG	SEQ ID NO:205	

[0086]

肽206	ERPGE	SEQ ID NO:206	
肽207	RPGEA	SEQ ID NO:207	
肽208	PGEAA	SEQ ID NO:208	
肽209	GEAAV	SEQ ID NO:209	
肽210	EAAVA	SEQ ID NO:210	
肽211	GAQF	SEQ ID NO:211	
肽212	AQFS	SEQ ID NO:212	
肽213	QFSK	SEQ ID NO:213	
肽214	FSKT	SEQ ID NO:214	
肽215	SKTA	SEQ ID NO:215	
肽216	KTAA	SEQ ID NO:216	
肽217	TAAK	SEQ ID NO:217	
肽218	AAKG	SEQ ID NO:218	
肽219	AKGE	SEQ ID NO:219	
肽220	KGEA	SEQ ID NO:220	
肽221	GEAA	SEQ ID NO:221	
肽222	EAAA	SEQ ID NO:222	
肽223	AAAE	SEQ ID NO:223	
肽224	AAER	SEQ ID NO:224	
肽225	AERP	SEQ ID NO:225	
肽226	ERPG	SEQ ID NO:226	
肽227	RPGE	SEQ ID NO:227	
肽228	PGEA	SEQ ID NO:228	
肽229	GEAA	SEQ ID NO:229	
肽230	EAAV	SEQ ID NO:230	
肽231	AAVA	SEQ ID NO:231	
肽232	GTAPAAEGAGAEVKRASAEAKQAF	SEQ ID NO:232	RNS
肽233	GKASQFAKTA	SEQ ID NO:233	RNS2
肽234	RGAQFSKTAAK	SEQ ID NO:234	
肽235	RAKGE	SEQ ID NO:235	

[0087] MANS肽是经肉豆蔻酰化的(记为MA),并且含有24个氨基酸的序列MA-GAQFSKTAACKGEAAARPGEAAVA。不期望受理论束缚,推理认为所述肽干扰全长MARCKS蛋白对细胞膜的天然附着,并干扰蛋白激酶C(PKC)对MARCKS蛋白的磷酸化。

[0088] 已经显示MANS肽提供了体内和体外杯状细胞脱粒的显著减少。MANS还影响中性粒细胞和间充质干细胞的迁移率。人白细胞的脱粒也受MANS抑制。在本发明的一个方面,用MANS相关的肽来处理某些癌细胞系降低了这些癌细胞系的迁移。在一个实施方案中,MANS相关的肽展示出对癌细胞转移的抑制。因此,在一个实施方案中,提供的MANS相关的肽可以用于在对其有需要的受试者中治疗或预防转移性癌症。在一些实施方案中,MANS相关的肽展示出使其适用于治疗应用,例如癌症治疗的特性。例如,在一个实施方案中,MANS相关的肽展示出相对于MANS肽增强的溶解性。在另一个实施方案中,一些MANS相关的肽在血浆中展示出比MANS肽更长或相对于除MANS相关的肽之外的肽更长的半衰期。在一个实施方案中,MANS相关的肽可用于治疗癌细胞增殖。例如,在一个实施方案中,MANS相关的肽可以抑制癌细胞的增殖或迁移。在另一个实施方案中,与MANS肽或比其他MANS相关的肽相比,一些MANS相关的肽可以在更低的浓度提供对癌细胞增殖和/或迁移的更大的抑制。

[0089] 在一个方面,MANS相关的肽选自下组:

[0090] N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAACK (SEQ ID No:106;BIO-11000)

[0091] N-乙酰-GAQFSKTAACK (SEQ ID No:106;BIO-11006);

[0092] N-肉豆蔻酰-AKGE (SEQ ID No:219;BIO-91200);

[0093] N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAACK-NH₂ (SEQ ID No:106;BIO-11002);

[0094] N-乙酰-GAQFSKTAA (SEQ ID No.121;BIO-10901);

[0095] N-乙酰-GAQFSKTAACK-NH₂ (SEQ ID No:106;BIO-11026);

[0096] N-乙酰-GAQFS(d)KTAA(d)K (SEQ ID No:106;BIO-11037) (在肽的位置6和10处的Lys是d-构象的);

[0097] N-乙酰-RGAQFSKTAACK (SEQ ID No:234;BIO-11027);

[0098] N-乙酰-RGAQFSKTAACK-NH₂ (SEQ ID No:234;BIO-11028);和

[0099] N-乙酰-RAKGE (SEQ ID NO:235;BIO-91204)。

[0100] 在一个方面,具有4至24个氨基酸且具有与MANS肽中发现的氨基酸序列相同或基本上相同的氨基酸序列的肽能用于本发明的一个或多个方面。这些肽在本文中称为MANS相关的肽,而示例性的MANS相关的肽在表2中列出,为SEQ ID NO:1至231、234、和235。表2还包括了随机序列(RNS)肽No.232 (SEQ ID NO:232)的氨基酸序列,其用作对照并用于证明氨基酸序列的顺序与本发明中的功效相关,以及第二个随机序列对照肽233 (RNS2;SEQ ID NO:233)。肽234和235 (SEQ ID NO:234和235)分别是肽106和219的N末端精氨酸取代的肽同源物。精氨酸可以用例如乙酰基团或肉豆蔻酰基团酰化。

[0101] 在一个实施方案中,在本发明中有用的肽可以选自由具有表2中列出的氨基酸序列的合成肽(排除随机序列肽232和233)组成的组。

[0102] 在另一个实施方案中,可用于本发明的肽可以选自如表2中列出的氨基酸序列的肽 (SEQ ID NO:1至231(含)、234、和235),而且其任选地经N末端和/或C末端化学修饰。

[0103] 表2中列出的肽的优选的独立N末端化学修饰包括通过所述肽的N末端氨基酸酰化而进行的N末端胺基修饰,所述酰化呈选自下组的酰胺的形式:

[0104] • C₂ (乙酰基) 至C₂₄脂肪族羧酸的酰胺, 所述脂肪族羧酸可以是线性的、分枝的、饱和的、或不饱和的,

[0105] • 三氟乙酸的酰胺,

[0106] • 苯甲酸的酰胺, 和

[0107] • C₁至C₂₄脂肪族烷基磺酸的酰胺; 或者

[0108] • 所述肽的N末端氨基酸的N末端胺基可用选自下组的基团烷基化:

[0109] • C₁ (甲基) 至C₂₄脂肪族烷基基团,

[0110] • 线性2-(C₁至C₂₄脂肪族烷基) 氧乙基 (oxyethyl) 基团,

[0111] • ω -甲氧基-聚(乙烯氧基)_n-乙基基团, 其中n为0至10。

[0112] 表2中列出的肽的优选的独立C末端化学修饰包括在所述肽的C末端氨基酸的C末端羧酸基团处形成酰胺, 所述酰胺呈选自下组的酰胺形式:

[0113] • 氨的酰胺,

[0114] • C₁至C₂₄脂肪族烷基胺的酰胺,

[0115] • 羟基取代的C₂至C₂₄脂肪族烷基胺的酰胺,

[0116] • 线性2-(C₁至C₂₄脂肪族烷基) 氧乙基胺基团的酰胺, 和

[0117] • ω -甲氧基-聚(乙烯氧基)_n-乙胺基团的酰胺, 其中n为0至10。

[0118] 此外, 所述肽的C末端氨基酸的C末端羧酸基团任选地呈选自下组的酯形式:

[0119] • C₁至C₂₄脂肪族烷基醇的酯,

[0120] • 2-(ω -甲氧基-聚(乙烯氧基)_n)-乙醇基团的酯, 其中n为0至10, 和

[0121] • 线性PEG-胺的酯, PEG组分的分子量为1,000-25,000道尔顿。

[0122] 在一个实施方案中, 基团的脂肪族部分如羧酸基和磺酸基和醇和氨基基团可以包含至少C₃的环(即至少环丙基环)。

[0123] 在一个实施方案中, 所述肽可以经N末端修饰, 例如经乙酰基或肉豆蔻酰基修饰, 成为N末端酰胺, 如分别为乙酰-GAQFSKTAAK (N末端乙酰SEQ ID No:106) 和肉豆蔻酰-GAQFSKTAAK (N末端肉豆蔻酰SEQ ID No:106)。在另一个实施方案中, 所述肽可以经C末端末端修饰(例如用氨通过酰胺修饰), 如GAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No:106C末端酰胺)。在另一个实施方案中, 所述肽可以经N末端和C末端修饰, 例如N-乙酰-肽-C-酰胺(用氨) 如乙酰-GAQFSKTAAK-NH₂ (N末端乙酰SEQ ID No:106C-末端酰胺) 和肉豆蔻酰-GAQFSKTAAK-NH₂ (N末端肉豆蔻酰SEQ ID No:106C-末端酰胺)。这些肽能用于本发明的方法中并确定其抑制癌细胞转移的能力。

[0124] 在一个实施方案中, 可用于本发明中的肽可以选自下组: 含有氨基酸序列AKGE (SEQ ID No:219) 的肽。此类肽包括SEQ ID No:1至SEQ ID No:54、SEQ ID No:56至SEQ ID No:64、SEQ ID No:67至SEQ ID No:75、SEQ ID No:79至SEQ ID No:87、SEQ ID No:93至SEQ ID No:100、SEQ ID No:108至SEQ ID No:114、SEQ ID No:124至SEQ ID No:129、SEQ ID No:141至SEQ ID No:145、SEQ ID No:159至SEQ ID No:162、SEQ ID No:178至SEQ ID No:180、SEQ ID No:198、SEQ ID No:199、SEQ ID No:219和SEQ ID No:235。在一个当前优选的实施方案中, 这些肽是在N末端氨基处经肉豆蔻酰化或乙酰化。

[0125] 在一个实施方案中, 本发明公开了减弱癌细胞转移的方法, 其趋于流体或组织中趋化因子(chemotactic agent)的浓度梯度的增加, 所述方法包括用迁移抑制量的迁移调

节肽来处理所述癌细胞并将所述细胞与所述肽一起温育以形成迁移抑制的癌细胞,其中所述肽是MANS相关的肽。

[0126] 在一个方面,迁移调节肽选自由MANS相关的肽组成的组。另一方面,MANS相关的肽包含氨基酸序列GAQFSKTAAK (SEQ ID No:106)。

[0127] 在一个方面,MANS相关的肽选自下组:N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA (SEQ ID No:1);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAV (SEQ ID No:2);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAA (SEQ ID No:4);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAERPGEA (SEQ ID No:7);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAERPGE (SEQ ID No:11);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAERPG (SEQ ID No:16);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAERP (SEQ ID No:22);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAER (SEQ ID No:29);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAEE (SEQ ID No:37);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAA (SEQ ID No:46);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAA (SEQ ID No:56);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEA (SEQ ID No:67);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGE (SEQ ID No:79);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKG (SEQ ID No:92);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAK (SEQ ID No:106);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAA (SEQ ID No:121);N-肉豆蔻酰-GAQFSKTA (SEQ ID No:137);N-肉豆蔻酰-GAQFSKT (SEQ ID No:154);N-肉豆蔻酰-GAQFSK (SEQ ID No:172),N-肉豆蔻酰-GAQFS (SEQ ID No:191),N-肉豆蔻酰-GAQF (SEQ ID No:211),N-乙酰-RGAQFSKTAAK (SEQ ID No:234),N-乙酰-RGAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No:234),N-乙酰-RAKGE (SEQ ID NO:235),及其组合。

[0128] 在一个方面,MANS相关的肽选自下组:

- [0129] • N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA (SEQ ID No:1;MANS肽);
- [0130] • N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAK (SEQ ID No:106;BIO-11000);
- [0131] • N-乙酰-GAQFSKTAAK (SEQ ID No:106;BIO-11006);
- [0132] • N-乙酰-GAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No:106;BIO-11026);
- [0133] • N-肉豆蔻酰-AKGE (SEQ ID No:219;BIO-91200);
- [0134] • N-肉豆蔻酰-GAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No:106;BIO-11002);
- [0135] • N-乙酰-GAQFSKTAA (SEQ ID No.121;BIO-10901)
- [0136] • N-乙酰-RGAQFSKTAAK (SEQ ID No:234;BIO-11027)
- [0137] • N-乙酰-RGAQFSKTAAK-NH₂ (SEQ ID No:234;BIO-11028),和
- [0138] • N-乙酰-RAKGE (SEQ ID NO:235;BIO-91204)。

[0139] 在一个方面,本发明的肽的转移抑制剂量范围可以为约0.01mg/kg/天至约10mg/kg/天。在进一步的实施方案中,本发明的肽的转移抑制剂量是约0.1mg/kg/天至约5.0mg/kg/天。在更进一步的实施方案中,本发明的肽的转移抑制剂量是约0.5mg/kg/天至约2.5mg/kg/天。例如,本发明的肽的转移抑制剂量是约0.01、约0.05、约0.1、约0.5、约0.75、约1.0、约1.25、约1.5、约1.75、约2.0、约2.25、约2.5、约2.75、约3.0、约3.5、约4.0、约5.0、约6.0、约7.0、约8.0、约9.0、约10.0mg/kg/天或更多。

[0140] 在一个实施方案中,本发明提供用于抑制癌细胞转移的方法,其中所述施用通过口服、静脉内、腹膜内、肌内、吸入、或栓剂路径。在另一个实施方案中,本发明公开了用于抑制癌细胞转移的方法,其中所述施用通过吸入MARCKS-抑制性化合物的液体溶液或悬液或干粉制剂。在一个实施方案中,提供了用于治疗癌症的方法,其中将MARCKS-抑制性化合物

施用于其有需要的受试者,所述施用通过吸入MARCKS-抑制性化合物的液体溶液或悬液或干粉制剂进行。例如,在一个实施方案中,将MANS相关的肽施用于其有需要的受试者,所述施用通过吸入MANS相关的肽的液体溶液或悬液或干粉制剂进行。在另一个实施方案中,MANS相关的肽通过静脉内、腹膜内、或肌内注射,或通过口服或施用栓剂来施用。

[0141] 在另一个方面,本发明公开了抑制癌细胞转移的方法,或在对其有需要的受试者中治疗癌症的方法,其中通过注射MANS相关的肽的液体制剂来施用所述肽,并且其中所述液体制剂是等渗的,且其中所述液体或悬液制剂是经缓冲的,且其中所述注射是全身性进入受试者体内。在另一个实施方案中,所述注射进入肿瘤区。在另一个实施方案中,所述注射进入肿瘤。

[0142] 在另一个方面,所述发明公开了用于抑制癌细胞转移的方法,其中所述癌细胞留驻在哺乳动物中。在一个实施方案中,提供了用于治疗癌症的方法,其中将MANS相关的肽施用于对其有需要的受试者,且其中所述受试者患有肿瘤。本发明的肽可以用一种或多种药学上可接受的赋形剂或成分来配制,以提供对于施用于癌细胞(如原发性肿瘤中的癌细胞)有用的药物组合物。当通过注射或通过吸入的施用有用时,此类组合物可以作为液体中的溶液或悬液,特别是经缓冲的溶液,其中磷酸盐缓冲液是有用的。等渗的溶液或悬浮液是优选的实施方案。

[0143] 可以预期,如果通过注射入哺乳动物的原发性肿瘤区(例如直接进入原发性肿瘤、或进入原发性肿瘤的边缘、或进入供养原发性肿瘤的血管)来施用,则在哺乳动物如犬类、猫类、和人患者中施用本发明的抗体、多核苷酸、核酸分子、或肽组合物可为有效的,其中所述注射以规律间隔(例如每1至每72小时)任选地与一种或多种其他或额外的化疗药物组合或分开地进行。

[0144] 除了MARCKS-抑制性抗体、多核苷酸、核酸分子、或肽制剂以外,可以在施用所述肽之前、过程中或之后施用一种或多种额外的治疗剂,包括化疗药物和癌症特异性抗体。例示性的化疗药物包括但不限于卡铂(carboplatin)、顺铂(cisplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、达卡巴嗪(dacarbazine)、替莫唑胺(temozolomide)、吉西他滨(gemcitabine)、卡培他滨(capecitabine)、克拉屈滨(cladribine)、氯法拉滨(clofarabine)、阿糖胞苷(cytarabine)、氟尿苷(floxuridine)、氟达拉滨(fludarabine)、羟基脲(hydroxyurea)、氨甲蝶呤(methotrexate)、培美曲塞(pemetrexed)、喷司他丁(pentostatin)、thioguanadine、柔红霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、伊达比星(idarubicin)、托泊替康(topotecan)、伊立替康(irinotecan)、依托泊苷(etoposide)、eniposide、秋水仙素(colchicine)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、长春瑞滨(vinorelbine)、帕利他赛(paclitaxel)、和多西他赛(docetaxel)。例示性的癌症特异性制剂和抗体包括但不限于,阿法替尼(Afatinib)、阿地白介素(Aldesleukin)、阿伦单抗(Alemtuzumab)、阿西替尼(Axitinib)、贝利单抗(Belimumab)、贝伐珠单抗(Bevacizumab)、硼替佐米(Bortezomib)、伯舒替尼(Bosutinib)、Brentuximab vedotin、卡博替尼(Cabozantinib)、卡纳单抗(Canakinumab)、卡非佐米(Carfilzomib)、西妥昔单抗(Cetuximab)、克唑替尼(Crizotinib)、达拉菲尼(Dabrafenib)、达沙替尼(Dasatinib)、地诺单抗(Denosumab)、厄洛替尼(Erlotinib)、依维莫司(Everolimus)、吉非替尼(Gefitinib)、替伊莫单抗

(Ibritumomab tiuxetan)、依鲁替尼(Ibrutinib)、伊马替尼(Imatinib)、伊匹单抗(Ipilimumab)、拉帕替尼(Lapatinib)、尼罗替尼(Nilotinib)、Obinutuzumab、奥法木单抗(Ofatumumab)、帕尼单抗(Panitumumab)、帕唑帕尼(Pazopanib)、帕妥珠单抗(Pertuzumab)、泊那替尼(Ponatinib)、瑞格非尼(Regorafenib)、利妥昔单抗(Rituximab)、罗米地辛(Romidepsin)、鲁索替尼(Ruxolitinib)、Sipuleucel-T、索拉非尼(Sorafenib)、坦西莫司(Temsirolimus)、托珠单抗(Tocilizumab)、托法替尼(Tofacitinib)、托西莫单抗(Tositumomab)、曲美替尼(Trametinib)、曲妥珠单抗(Trastuzumab)、凡德他尼(Vandetanib)、维罗非尼(Vemurafenib)、维莫德吉(Vismodegib)、伏立诺他(Vorinostat)、和Ziv-阿柏西普(Ziv-aflibercept)。

[0145] 例如,施用可以通过作为液体或干粉气雾或喷雾吸入来进行,例如进入到癌症患者的气道中,其中喷雾可以在含有癌细胞的组织上形成覆层(coating),或是作为液体用于注射入含有转移前的癌细胞或与转移前的癌细胞接触的流体或组织中。预期使用温和的表面活性剂如磷脂来帮助增溶和对MANS相关的肽的跨膜吸收。例如,施用可以通过干粉来进行,优选为纳米颗粒或微粒粉末,其可通过喷雾于含有癌细胞的组织上来应用。将微粒糖类载体添加至肽制备物会促进纳米颗粒肽吸入递送入气道和上皮组织区。

[0146] 施用MARCKS-抑制性抗体、多核苷酸、核酸分子、或肽组合物的优选的方法包括注射入肿瘤内或肿瘤附近的组织,所述肿瘤含有转移前的癌细胞。

[0147] 如本文所用,短语“有效量”或“治疗有效量”意指无毒但足够量的本发明中使用的组合物,所述组合物有效达到所需的效果,即抑制癌细胞的转移和/或增殖,和/或在对其有需要的受试者中抑制、治疗、或预防癌症。因此,本发明方法涵盖的活性包括医疗治疗和/或预防性治疗,例如适当地包括减少和/或缓和癌症的病征、症状、或病因。治疗有效量的本发明化合物通常是这样的量,当其在生理学上可耐受的赋形剂组合物中施用,其足以达到有效的细胞内浓度和组织内局部浓度。

[0148] “癌症”在此处意指或描述哺乳动物中的生理状况,所述生理状况通常特征为失调的细胞生长。癌的例子包括但不限于癌瘤,淋巴瘤,母细胞瘤,肉瘤(包括脂肉瘤,成骨肉瘤,血管肉瘤,内皮肉瘤,淋巴管肉瘤,淋巴管内皮肉瘤,平滑肌肉瘤,横纹肌肉瘤,纤维肉瘤,粘液肉瘤,软骨肉瘤),破骨细胞瘤,神经内分泌肿瘤,间皮瘤,脊索瘤,滑膜瘤,神经鞘瘤,脑膜瘤,腺癌,黑素瘤和白血病或淋巴恶性肿瘤。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌),肺癌,包括小细胞肺癌,非小细胞肺癌,肺的腺癌和肺的鳞状癌,小细胞肺癌,腹膜癌,肝细胞癌,胃癌或胃癌症,包括胃肠癌,胰腺癌,成胶质细胞瘤,子宫颈癌,卵巢癌,肝癌,膀胱癌,肝细胞瘤,乳腺癌,结肠癌,直肠癌,结肠直肠癌,子宫内膜或子宫癌,唾液腺癌,肾癌或肾脏癌,前列腺癌,外阴癌,甲状腺癌,肝癌,肛门癌,阴茎癌,睾丸癌,食道癌,胆道肿瘤,尤因氏瘤(Ewing's tumor),基底细胞癌,腺癌,汗腺癌,皮脂腺癌,乳头状癌,乳头状腺癌,囊腺癌,髓样癌,支气管癌,肾细胞癌,肝细胞瘤,胆管癌,绒毛膜癌,精原细胞瘤,胚胎性癌,肾母细胞瘤,睾丸肿瘤,肺癌,膀胱癌,上皮癌,神经胶质瘤,星形细胞瘤,髓母细胞瘤,颅咽管瘤,室管膜瘤,松果体瘤,血管母细胞瘤,听神经瘤,少突神经胶质瘤,脑膜瘤,黑素瘤,神经母细胞瘤,视网膜母细胞瘤,白血病,淋巴瘤,多发性骨髓瘤,Waldenstrom's巨球蛋白血症,骨髓增生异常疾病,重链病,神经内分泌肿瘤,神经鞘瘤,以及其他癌,头颈部癌,骨髓瘤如急性骨髓性白血病,包括伴随成熟(maturation)的AML和不分化的AML,急性

早幼粒细胞性白血病,急性骨髓性白血病,和急性单核细胞白血病,骨髓增生异常综合征,慢性骨髓增生性疾病,包括慢性髓细胞性白血病,中枢神经系统的肿瘤,例如,脑肿瘤(神经胶质瘤,神经母细胞瘤,星形细胞瘤,髓母细胞瘤,室管膜瘤,和视网膜母细胞瘤),实体瘤(鼻咽癌,基底细胞癌,胰腺癌,直肠癌的胆管,卡波济氏肉瘤(Kaposi's sarcoma),睾丸癌,子宫癌、阴道或宫颈癌,卵巢癌,原发性肝癌或子宫内膜癌,血管系统的肿瘤(血管肉瘤和血管外皮细胞瘤),血液瘤形成和肿瘤样的条件,例如,霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma);非霍奇金淋巴瘤(伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma),小淋巴细胞淋巴瘤/慢性淋巴细胞性白血病,蕈样肉芽肿病,外套细胞淋巴瘤,滤泡性淋巴瘤,弥漫性大B细胞淋巴瘤,边缘区淋巴瘤,毛细胞性白血病和淋巴浆细胞性白血病),淋巴细胞前体细胞的肿瘤,包括B细胞急性淋巴细胞白血病/淋巴瘤,和T细胞急性淋巴细胞白血病/淋巴瘤,胸腺瘤,成熟T和NK细胞的肿瘤,包括外周T细胞白血病,成人T细胞白血病/T细胞淋巴瘤和大颗粒淋巴细胞白血病,溶骨性骨癌和骨转移。

[0149] 通过提述如下实施例进一步描述本发明。但是应当注意,这些实施例如上文所述的实施方案一样是描述性的,而非意在以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0150] 实施例1.肽对癌细胞系迁移的影响

[0151] 迁移测定的实验方案

[0152] CL1-5细胞是来源于人腺癌的侵袭性转移性细胞系,将CL1-5细胞在37℃、95%氧/5%CO₂培养于含有10%FBS的RPMI 1640培养基中直至准备使用。使用Transwell平板(24孔,8-μm孔径;Costar,Cambridge,MA,USA)来进行迁移测定。Transwell平板的下方小室(lower chambers)盛有600μl的含有10%FBS的基础培养基。将细胞(1×10^5)用50或100μM的指定的测试肽预处理30分钟,然后悬于100μl的含有1%BSA的基础培养基中并添加至上方的小室(upper chamber),然后在37℃将细胞温育12小时。用棉签去除滤器上表面上的细胞,并将迁移至滤器下表面的细胞进行洗涤、固定、并用苏木素(hematoxylin)染色并在显微镜下计数。通过统计迁移至滤器下表面的细胞数来确定迁移的百分比变化。针对每个滤膜($n=4$)对至少3个不同的显微视野进行计数。

[0153] 供选择的transwell方法

[0154] 原发性CL1-5细胞来源于人腺癌肺癌。使用24孔、8-μm孔径的Transwell平板(Costar,Cambridge,MA,USA)来进行迁移测定。Transwell平板的下方小室盛有600μl的含有10%FBS的基础培养基。将细胞($1-2 \times 10^5$)悬于100μL的含1%BSA的基础培养基中。将所需浓度的测试肽直接添加至上腔室或在与癌细胞预温育之后添加。然后在37℃温育平板12小时。用棉签去除滤器上表面上的细胞。将迁移至滤器下表面的细胞进行洗涤、固定、并用苏木素染色并在显微镜下计数。针对每个滤膜($n=3$)对至少5个不同的显微视野进行计数。通过统计迁移至滤器下表面的细胞数来确定迁移的百分比变化。

[0155] 计数指的是迁移至下腔室并通过光学显微镜以40x放大倍数计数的细胞的实际数目,每个处理以10个随机选择的视野中的平均细胞数来呈现。

[0156] “指数”通过用肽存在时迁移的细胞数除以随机情况下迁移的细胞数(对照组)而算出。指数=对照细胞计数/处理的细胞计数。这个计算能反映用MANS相关的肽预处理30分

钟所阻遏的细胞迁移的程度。

[0157] 图1显示了12小时迁移期后阴性对照的细胞计数视野。

[0158] 图2A显示了用50微摩尔的MANS肽预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0159] 图2B显示了用100微摩尔的MANS肽预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0160] 图3A显示了用50微摩尔的RNS肽预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0161] 图3B显示了用100微摩尔的RNS肽预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0162] 图4A显示了用50微摩尔的MANS相关的肽BIO-11002 (N-肉豆蔻酰-SEQ ID NO:106-NH₂) 预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0163] 图4B显示了用100微摩尔的MANS相关的肽BIO-11002预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0164] 图5A显示了用50微摩尔的MANS相关的肽BIO-10901 (N-乙酰-SEQ ID NO:121) 预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0165] 图5B显示了用100微摩尔的MANS相关的肽BIO-10901预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0166] 图6A显示了用50微摩尔的MANS相关的肽BIO-91200 (N-肉豆蔻酰-SEQ ID NO:219) 预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0167] 图6B显示了用100微摩尔的MANS相关的肽BIO-91200预处理接着是12小时的迁移时间后,所得到的细胞计数视野。

[0168] 图7A显示了用50微摩尔的MANS肽、RNS肽、和MANS相关的测试肽BIO11002 (SEQ ID NO:106)、BIO10901 (SEQ ID NO:121)、BIO91200 (SEQ ID NO:219) 预处理,或对照(无肽)预处理后12小时得到的迁移细胞数。对于MANS肽,细胞数为约40;对于RNS肽,细胞数为约95;对于BIO-11002 (SEQ ID NO:6),细胞数为约50;对于BIO-10901 (SEQ ID NO:121),细胞数为约60;而对于BIO-91200 (SEQ ID NO:219),细胞数为约65。MANS相关的肽MANS、BIO-11002、BIO-10901、和BIO-91200的每一个相对于对照和相对于RNS随机序列肽,显示出侵袭性人NSCLC细胞系(CL1-5)的迁移细胞数的显著减少。

[0169] 图7B显示了用100微摩尔的MANS肽、RNS肽、和MANS相关的测试肽BIO11002 (SEQ ID NO:106)、BIO10901 (SEQ ID NO:121)、BIO91200 (SEQ ID NO:219) 预处理,或对照(无肽)预处理后12小时得到的迁移细胞。对于MANS肽,细胞数为约20;对于RNS肽,细胞数为约90;对于BIO-11002 (SEQ ID NO:6),细胞数为约25;对于BIO-10901 (SEQ ID NO:121),细胞数为约35;而对于BIO-91200 (SEQ ID NO:219),细胞数为约40;对于对照(无肽),细胞数为约90。MANS相关的肽MANS、BIO-11002、BIO-10901、和BIO-91200的每一个相对于对照和相对于RNS随机序列肽,显示出侵袭性人NSCLC细胞系(CL1-5)的迁移细胞数的显著减少。

[0170] 图8A图示了侵袭性人NSCLC细胞系细胞的迁移指数,其中在用50微摩尔的本发明的肽或肽组合物预处理接着是根据实验方案的12小时处理之后迁移指数值越高表示迁移越少。下文是迁移指数值:对照=1;MANS肽=约2.5;RNS肽=约1.1;BIO-11002=约2.7;

BIO-10901=约1.75;以及BIO-91200=约1.7。MANS相关的肽MANS、BIO-11002、BIO-10901、和BIO-91200的每一个相对于对照和相对于RNS肽显示出增加的迁移指数。

[0171] 图8B图示了侵袭性人NSCLC细胞系细胞的迁移指数,其中在用100微摩尔的本发明的肽或肽组合物预处理接着是根据实验方案的12小时处理之后迁移指数值越高表示迁移越少。下文是迁移指数值:对照=1;MANS肽=约4.3;RNS肽=约1;BIO-11002=约3.8;BIO-10901=约2.7;以及BIO-91200=约2.4。MANS相关的肽MANS、BIO-11002、BIO-10901、和BIO-91200的每一个相对于对照和相对于RNS肽显示出增加的迁移指数。

[0172] 图9图示显示了在用侵袭性人NSCLC细胞系 (CL1-5) 进行的实验中用50微摩尔肽预处理的并排式 (side-by-side) 各自细胞数和迁移指数结果。不用肽预处理的对照给出约105的细胞数;而迁移指数数值=1.0。用50微摩尔MANS肽预处理然后通过实验方案处理12小时后的结果给出约45的细胞数;而迁移指数为约2.5。用50微摩尔RNS肽预处理给出约90的细胞数;而迁移指数为约1.3。用50微摩尔BIO-11000预处理给出约70的细胞数;而迁移指数为约1.5。用50微摩尔BIO-11006预处理给出约50的细胞数;而迁移指数为约2。结果证明较高的迁移指数值与较少的迁移相关,而较少的迁移与较高的迁移指数值相关。MANS相关的肽MANS、BIO-11000、和BIO-11006的每一个相对于对照和相对于RNS肽显示出减少的迁移细胞数和增加的迁移指数。

[0173] 图10图示显示了在用侵袭性人NSCLC细胞系 (CL1-5) 进行的实验中用100微摩尔肽预处理的并排式各自细胞数和迁移指数结果。不用肽预处理的对照给出约105的细胞数;而迁移指数数值=1.0。用100微摩尔MANS肽预处理然后通过实验方案处理12小时后的结果给出约35的细胞数;而迁移指数为约3.5。用100微摩尔RNS肽预处理给出约95的细胞数;而迁移指数为约1.2。用100微摩尔BIO-11000预处理给出约50的细胞数;而迁移指数为约2.3。用100微摩尔BIO-11006预处理给出约50的细胞数;而迁移指数为约2.1。用100微摩尔BIO-91200预处理给出约55的细胞数;而迁移指数为约2.1。结果证明较高的迁移指数值与较少的迁移相关,而较少的迁移与较高的迁移指数值相关。MANS相关的肽MANS、BIO-11000、BIO-11006、和BIO-91200的每一个相对于对照和相对于RNS肽显示出减少的迁移细胞数和增加的迁移指数。

[0174] 实施例2.采用原位肺注射异体移植模型,通过MANS肽或BIO-11006抑制肺癌转移

[0175] 在原位肺注射异体移植模型中评估了用MANS肽或BIO-11006处理后癌细胞的体内转移活性。在用PBS、或PBS+MANS、BIO-11006 (SEQ ID NO:106)、或对照RNS肽以100 μ M预处理4小时后,将PC-9细胞注射至裸小鼠的肺左叶中。7天后,对这些小鼠给予仅PBS (对照)、RNS (额外的对照肽)、MANS或BIO-11006全身性处理,每3天一次以每次腹膜内注射50纳摩尔 (nmole)。在接种这些肿瘤细胞后25天 (6次注射),处死小鼠,并计数对侧肺和其他组织中的转移的肿瘤结节数。如下表3中所示,MANS、RNS或BIO-11006处理的组在注射部位处与PBS处理组相比或互相之间相比未显示出肿瘤平均大小的差异,这表明这些处理没有影响肿瘤生成。然而,在MANS和BIO-11006处理的小鼠中发现,与PBS或RNS处理的组相比,其对侧肺和其他器官中的转移性结节有显著减少;实际上,用MANS或BIO-11006肽基本完全地阻断了从肿瘤到其他肺部位以及其他器官的转移。

[0176] 表3. MARCKS相关的肽对体内癌症转移的抑制作用

[0177]

组	肿瘤大小 (mm)	转移性肺肿瘤的数目	转移(受影响的小鼠/总的小鼠)			
	平均值±SE	平均值±SE (L't; R't)	心脏	脾脏	肠	隔膜
PBS (n=3)	1.50±0.26	1.67±0.29; 5.67±0.77	1/1	2/3	1/3	2/3
RNS (n=4)	1.72±0.41	1.00±0.40; 5.75±2.01	3/4	2/4	1/4	3/4
MANS (n=4)	1.48±0.54	0;0	0/4	0/4	0/4	0/4
BIO-11006 (n=2)	1.61±0.37	0;0	0/2	0/2	0/2	0/2

[0178] 这些体内结果支持了通过MANS相关的肽抑制MARCKS功能可以降低肺癌细胞在体内转移扩散的观点。

[0179] 实施例3.肽对癌症A549细胞系迁移的影响

[0180] 人腺癌来源的肺泡上皮细胞系A549(一种侵袭性细胞系)获取自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)并于75cm²组织培养瓶中在补充以10%胎牛血清和100U/ml青霉素/链霉素的RPMI-1640中培养。细胞在37℃、95%大气和5%CO₂的氛围中培养第3天达到汇合(confluence),并通过连续传代维持。

[0181] 在pH 7.0处将测试肽(MANS、RNS、BIO-11006、BIO-11000、BIO-11002、BIO-91200、和BIO-10901)溶解于PBS中;慢速涡旋混合约2小时以辅助溶解(aided solubility)。

[0182] 用Transwell平板(24孔,8-μm孔径;Costar,Cambridge,MA,USA)来进行迁移测定。Transwell平板的下方小室盛有600μl的含有10%FBS的基础培养基。将细胞(1x10⁵)悬于100μl的含有1%BSA的基础培养基中并添加至上方小室,并在37℃用5%CO₂在PBS中将平板温育12小时(对照),或用指定的测试肽以10、25或50μM进行温育。用棉签去除滤器上表面上的细胞。将迁移至滤器下表面的细胞进行洗涤、固定、并用苏木素染色并在显微镜下计数。通过统计迁移至滤器下表面的细胞数来确定迁移的百分比变化。针对每个滤膜至少对4个不同的显微视野进行计数,每个浓度进行总共三次重复试验。将统计学软件“Prizm”用于数据分析。

[0183] 如图11中所示,用每种测试肽处理导致相对于对照(无肽)或RNS肽在处理后的细胞数。在50μm,MANS相关的肽MANS、BIO-11006、BIO-11000、BIO-11002、BIO-91200、和BIO-10901的每一个都证明了相对于对照和相对于RNS肽减少的迁移细胞数和增加的迁移指数。在较低浓度处,一些MANS相关的肽的效果甚至与MANS肽相比都是显著不同的。具体而言,在25μm处,用BIO-11006、BIO-11002、或BIO-91200处理导致与对照(无肽)或对照RNS肽相比、以及与MANS肽相比显著减少的细胞数(图11)。

[0184] 总的来看,这些研究的结果显示MANS相关的肽能阻遏侵袭性癌细胞系的迁移,并且一些不同的MANS相关的肽展示出对至少三种不同的癌细胞系的迁移的影响。研究的结果还显示至少2种不同的MANS相关的肽能阻遏或抑制注射至哺乳动物(即小鼠)中的癌细胞的

转移。

[0185] 实施例4. 肽BIO-11006在肺癌植入中的效果

[0186] 在这项研究中,在SCID小鼠的原位肺癌移植模型中评估了肽BIO-11006对肺癌转移的抑制。将人腺癌细胞(PC-9) ($1-2 \times 10^5$) 悬于pH 7.4的、含有0.5mg/mL Matrigel™ (BD Bioscience) 的40μL PBS中,并用29号(gauge)针的注射器注射至SCID小鼠(n=3)的左肺中。通过(a)腹膜内注射(50μL),从接种癌细胞后3天起每日1次注射22天,或通过(b)用喷雾器递送系统(Aeroneb Lab)雾化在30分钟吸入,从接种癌细胞后3天起每日1次吸入22天,而施用BIO-11006(PBS中100μM)。研究结果描绘于图12中,其图示显示了右肺、心脏和隔膜中肿瘤的平均数,作为测试化合物的使用路径的函数(腹膜内注射对比吸入)。腹膜内和气雾剂施用BIO-11006都在右肺和心脏中将癌细胞转移降低了超过50%,而在隔膜中降低了100%。因此,两施用路径都对癌细胞转移有显著的抑制作用。

[0187] 实施例5. 对肺癌转移的抑制

[0188] 在本研究中,在SCID小鼠的原位肺癌移植模型中调查了BIO-11006对肺癌转移的抑制。将人腺癌细胞(PC-9) ($1-2 \times 10^5$) 悬于40μL含有0.5mg/mL Matrigel™ (BD Bioscience) 的PBS中,并用29号针注射至SCID小鼠(n=3)的左肺中。从接种癌细胞后4天或15天起施用BIO-11006,所述施用通过用PBS中的100μM溶液的气雾剂通过喷雾器递送系统(Aeroneb Lab)在30分钟进行,在接种癌细胞后每日1次进行25天。在实验结束时处死小鼠,并收集肺、心脏、和隔膜组织并测量每个组织中的肿瘤结节数。这项实验的结果在图13和14中图示。图13显示了当在接种癌细胞后4天开始处理时,左肺、心脏和隔膜中的肿瘤转移被抑制了60-90%,而右肺中被100%抑制。当在接种癌细胞后15天开始处理时,左肺、心脏和隔膜中的肿瘤转移的抑制为约50%。图14图示了当在接种癌细胞后4天或在接种癌细胞后15天开始肽处理时,所有组织中发现的肿瘤结节的总数。如图14中所示,在接种癌细胞后15天开始肽处理导致肿瘤结节减少,而在接种后4天开始肽处理甚至导致肿瘤结节的进一步减少。

[0189] 实施例6. 肽的抗转移功效

[0190] 本实施例证明了本发明的测试化合物在带有人肺腺癌细胞的SCID小鼠中的抗转移功效。在通风笼中单独饲养的雌性NOD.CB17-Prkdcscid/NCrHsd, Mus musculus小鼠(Harlan, The Netherlands)随机化至6组中,每组8只小鼠。将A549细胞(2.5×10^6)经尾部静脉注射至小鼠中。对照组接受雾化的介质PBS;而第2和3组从注射癌细胞前第-1天(第2组)或从注射癌细胞后第+3天(第3组)每隔一天经喷雾器(Aeroneb Lab)接受雾化的测试化合物BIO-11006七周。第4和5组从注射癌细胞系前第-1天(第4组)或从注射癌细胞系后第+3天(第5组)每隔一天经喷雾器(Aeroneb Lab)接受雾化的测试化合物MANS肽七周。对于气雾剂递送,每种测试化合物的溶液(100μM)制备于PBS中,pH 7.0。对于每个处理,在30分钟将5mL的测试化合物溶液喷雾至同时有4只小鼠的小室内。在七周中每隔一天监测小鼠的体重。

[0191] 一组小鼠(n=7)充当正常对照。这些是未处理过的(naïve)小鼠,其用于监测小鼠在研究期间的健康状况。在第53天处死来自所有组的所有动物。结果自表4和图15中提供。图15比较了在A549细胞注射后第53天施用BIO-11006和MANS肽的各自肺中转移性结节的数目。表4显示了肺中转移性结节的数目,以及具有病灶肿瘤结节和/或远端转移的动物的数

目。总的来看,在相对于A549细胞注射第-1天或第+3天起施用了BIO-11006或MANS肽的动物中,测试肽显示出对于肿瘤转移的显著抑制(70-80%) (图15)。而且,经处理的小鼠中转移性结节的数目相对于介质对照接受者显著减少,并且经处理的小鼠无一表现出远端转移的迹象(表4)。在相对于A549细胞注射第-1天或第+3天起用BIO-11006肽处理的小鼠的7/8中病灶肿瘤结节极少。

[0192] 表4. 用BIO-11006或MANS处理的小鼠中的转移性结节和远端转移

[0193]

组	肺中转移性结节的数目 平均值± SEM	备注
介质对照	97±21	所有动物中均有多病灶肿瘤结节(8/8) 隔膜和胸骨中有远端转移迹象(2/8)
BIO-11006 肽 (第-1 天处理组)	34±14	7/8 的动物中基本没有病灶肿瘤结节 无远端转移
BIO-11006 肽 (第+3 天处理组)	21±6	7/8 的动物中基本没有病灶肿瘤结节 无远端转移
MANS 肽 (第-1 天处理组)	22±7	4/8 的动物中基本没有病灶肿瘤结节 无远端转移
MANS 肽 (第+3 天处理组)	13±4	7/8 的动物中基本没有病灶肿瘤结节 无远端转移

[0194] 实施例7. 鼠黑色素瘤中的MANS相关的肽的抗转移性活性

[0195] 在这项研究中,用同基因小鼠模型确定了通过四种不同路径施用的MANS相关的肽的相对抗转移活性。将200μl的DMEM培养基中的细胞悬液中鼠黑色素瘤细胞系B16F102X10⁶细胞注射至脚掌(footpad)中或是耳背侧上的皮肤与软骨之间;或是通过静脉内、肌肉内、或腹膜内注射。

[0196] 细胞接种后2天,将动物随机化并分入各组,这些组由每组n=10组成。向不同组中的动物通过腹膜内(ip)、静脉内(iv)、或肌肉内(im)路径分别施用约6.25mg/kg的剂量的MANS相关的肽。在一些组中,采用临床前喷雾器(Aeroneb Lab;Aerogen)通过吸入路径(5ml的PBS中的0.1mM MANS相关的肽)来处理动物。一组小鼠充当介质对照并用PBS通过im路径进行处理。将肽每隔1天施用6周。

[0197] 每周对肿瘤进行打分。在6周的处理后,处死所有动物并收集淋巴结和其他组织样品,固定于福尔马林中,并进行组织病理学分析以评估转移性黑色素瘤细胞的存在。评估6周施用期间的临床毒性迹象和症状。在研究期结束时评估肿瘤负荷和死亡率。研究结果会显示MANS相关的肽在鼠黑色素瘤模型中抑制肿瘤转移。

[0198] 实施例8:癌细胞中MARCKS的siRNA敲低

[0199] 进行本研究来确定对MARCKS表达的siRNA敲低对于癌细胞迁移的影响。将PC-9或A-549人肺癌细胞接种于塑料孔中并培养至细胞达到70%汇合。然后通过DharmaFECT Duo转染试剂(Dharmacon,Lafayette,CO),用100nM的MARCKS siRNA或来自Ambion(Austin,TX)的对照siRNA(100nM)转染细胞。72小时后,收获细胞和通过SDS/PAGE分离的等量的蛋白,用

于采用MARKS特异性抗体的免疫印迹分析。进行Western印迹分析来验证内源MARCKS的siRNA-诱导的下调。如图16和17中所示,与对照siRNA处理的细胞相比,PC9细胞中的MARCKS蛋白敲低约60% (图16),而在A549细胞中敲低约50%。

[0200] 用transwell测定来确定通过siRNA敲低MARCKS对细胞迁移的影响。在siRNA敲低之后,将PC-9或A549细胞在37℃和5%CO₂培养于含有10%FBS的RPMI 1640培养基中。

Transwell[®]平板(24孔,8-μm孔径)用于迁移测定。下方小室盛有600μl的基础培养基+10%FBS。将细胞(1×10^5)悬于100μl的基础培养基+1%BSA中并添加至上方小室,将平板温育12小时。将迁移至滤器下表面的细胞用苏木素进行染色并计数。针对每个滤膜对至少3个不同的显微视野进行计数。

[0201] 研究结果在图18和19中显示。用MARCKS siRNA处理显著抑制了PC-9和A549细胞的迁移。对MARCKS的siRNA敲低导致PC9细胞系的细胞迁移减少90% (图18),并导致A549细胞系的细胞迁移减少50%。因此,对MARCKS表达的抑制导致癌细胞迁移的显著降低。

[0202] 实施例9.微小RNA21抑制增加MARCKS且增强癌细胞迁移

[0203] 微小RNA 21(miR21)调节细胞中MARCKS的水平。在这些研究中,用50纳摩尔(nM)或100纳摩尔的miR21抑制剂或mir21模拟物、或仅介质的阴性对照来转染PC9人肺癌细胞。48小时后用Western印迹测量MARCKS的水平。用miR21抑制剂(50nM)处理使细胞中MARCKS的水平增加了2.5倍(图20)。当细胞置于迁移室内12小时的时段时,这些值与细胞的迁移能力相关。用50或100nM的miR21抑制剂处理的细胞显示出增强的迁移,这与增强的MARCKS水平相关,而用miR21模拟物处理的细胞显示出降低的迁移,这与降低的MARCKS水平相关(图21)。用HiPerfect介质对照处理的细胞显示出与未处理的PC9细胞相同水平的迁移(图21)。研究结果显示,通过miR21抑制所致的MARCKS表达增加使癌细胞迁移增加。而且,miR21的激活导致降低的PC9细胞迁移。

[0204] 总的来看,本研究显示,能用一些不同方式的MARCKS抑制(包括MANS相关的肽和抑制性的微小RNA,即miR21模拟物),通过靶向MARCKS来抑制癌细胞迁移和癌细胞的转移。

[0205] 除另有限定外,本文所有的科技术语具有与本发明所属领域普通技术人员所普遍理解的相同的含义。尽管本文描述了优选的方法和材料,但与本文描述的那些等同或相似的任何方法和材料都可以用于实施或测试本发明。本文引用的所有出版物在此通过提述并入,用于公开和描述引用该出版物的发明的具体方面的目的。

[0206] 虽然本发明已经结合其具体实施方案进行了描述,但应当理解,其能够进行进一步修改,并且本申请意在涵盖总体遵循本发明的原理的本发明的所有变型、用途或适应性更改,且包括在本发明所属领域中已知的或常规实践范围内的、且可能应用于上文所列以及所附权利要求的范围中的本质特征的对于本公开内容的偏离。

序列表

<110> 拜欧马可医药公司(Biomarek Pharmaceuticals, Ltd.)
北卡罗莱纳州立大学(North Carolina State University)
I·帕里克(Parikh, Indu)
K·B·阿德勒(Adler, Kenneth B.)

<120> 转移抑制剂

<130> BMRE-006/01W0

<150> US 61/808,966

<151> 2013-04-05

<160> 240

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
20

<210> 2

<211> 23

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 2

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
20

<210> 3

<211> 23

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 3

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
20

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 4

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu Ala Ala
20

[0001]

<210> 5
<211> 22
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 5

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

Pro Gly Glu Ala Ala Val
20

<210> 6
<211> 22
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 6

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10 15

Gly Glu Ala Ala Val Ala
20

<210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 7

[0002]

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu Ala
20

<210> 8
<211> 21
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 8

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

Pro Gly Glu Ala Ala
20

<210> 9
<211> 21
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 9

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10 15

Gly Glu Ala Ala Val
20

<210> 10
<211> 21
<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 10

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ala Ala Val Ala
20

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 11

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu
20

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 12

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

Pro Gly Glu Ala
20

[0003]

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 13

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10 15

Gly Glu Ala Ala
20

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 14

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ala Ala Val
20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 15

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ala Ala Val Ala
20

<210> 16
<211> 19
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 16

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Arg Pro Gly

<210> 17
<211> 19
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 17

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

Pro Gly Glu

[0004]

<210> 18
<211> 19
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 18

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10 15

Gly Glu Ala

<210> 19
<211> 19
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 19

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ala Ala

<210> 20
<211> 19
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 20

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ala Ala Val

<210> 21
<211> 19
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 21

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10 15

Ala Val Ala

<210> 22
<211> 18
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 22

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Arg Pro

[0005]

<210> 23
<211> 18
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 23

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

Pro Gly

<210> 24
<211> 18
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 24

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10 15

Gly Glu

<210> 25
<211> 18
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 25

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ala

<210> 26
<211> 18
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 26

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ala Ala

<210> 27
<211> 18
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 27

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10 15

Ala Val

<210> 28
<211> 18
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 28

[0006] Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5 10 15

Val Ala

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 29

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Arg

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 30

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

Pro

<210> 31

<211> 17
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 31

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10 15

Gly

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 32

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10 15

Glu

<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 33

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10 15

[0007]

Ala

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 34

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10 15

Ala

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 35

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5 10 15

Val

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 36

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5 10 15

Ala

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 37

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

<210> 38

<211> 16

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 38

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

[0008]

<400> 39

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10 15

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 40

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10 15

<210> 41

<211> 16

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 41

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10 15

<210> 42

<211> 16

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 42

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala

1 5 10 15
<210> 43
<211> 16
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 43
Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5 10 15

<210> 44
<211> 16
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 44
Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5 10 15

<210> 45
<211> 16
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 45
Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5 10 15

[0009]

<210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 46
Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 47
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 47
Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

<210> 48
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 48
Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10 15

<210> 49
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 49

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10 15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 50

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10 15

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 51

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10 15

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 52

[0010]

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10 15

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 53

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5 10 15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 54

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5 10 15

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 55

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5 10 15

<210> 56
<211> 14
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 56

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
1 5 10

<210> 57
<211> 14
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 57

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 58
<211> 14
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 58

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10

[0011]

<210> 59
<211> 14
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 59

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10

<210> 60
<211> 14
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 60

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10

<210> 61
<211> 14
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 61

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10

<210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 62

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10

<210> 63
<211> 14
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 63

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10

<210> 64
<211> 14
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 64

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5 10

<210> 65
<211> 14
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 65

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5 10

[0012]

<210> 66
<211> 14
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 66

Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5 10

<210> 67
<211> 13
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 67

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5 10

<210> 68
<211> 13
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 68

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
1 5 10

<210> 69
<211> 13
<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 69

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 70

<211> 13

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 70

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10

<210> 71

<211> 13

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 71

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10

<210> 72

<211> 13

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

[0013]

<400> 72

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10

<210> 73

<211> 13

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 73

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10

<210> 74

<211> 13

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 74

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10

<210> 75

<211> 13

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 75

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10

[0014]

<210> 76
<211> 13
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 76

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5 10

<210> 77
<211> 13
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 77

Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5 10

<210> 78
<211> 13
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 78

Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5 10

<210> 79
<211> 12
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 79

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5 10

<210> 80
<211> 12
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 80

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5 10

<210> 81
<211> 12
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 81

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
1 5 10

<210> 82
<211> 12
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 82

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 83
<211> 12
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 83

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10

<210> 84
<211> 12
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 84

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10

<210> 85
<211> 12
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 85

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10

[0015]

<210> 86
<211> 12
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 86

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10

<210> 87
<211> 12
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 87

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10

<210> 88
<211> 12
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 88

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10

<210> 89
<211> 12

<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 89
Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5 10

<210> 90
<211> 12
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 90
Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5 10

<210> 91
<211> 12
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 91
Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5 10

<210> 92
<211> 11
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

[0016] <400> 92
Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5 10

<210> 93
<211> 11
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 93
Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5 10

<210> 94
<211> 11
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 94
Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5 10

<210> 95
<211> 11
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 95
Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
1 5 10

[0017]

<210> 96
<211> 11
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 96

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 97
<211> 11
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 97

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10

<210> 98
<211> 11
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 98

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10

<210> 99
<211> 11
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 99

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10

<210> 100
<211> 11
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 100

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5 10

<210> 101
<211> 11
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 101

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10

<210> 102
<211> 11
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 102

Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10

<210> 103

<211> 11

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 103

Glu Ala Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5 10

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 104

Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5 10

<210> 105

<211> 11

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 105

[0018]

Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5 10

<210> 106

<211> 10

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 106

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5 10

<210> 107

<211> 10

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 107

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5 10

<210> 108

<211> 10

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 108

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5 10

<210> 109

<211> 10
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 109

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5 10

<210> 110
<211> 10
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 110

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
1 5 10

<210> 111
<211> 10
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 111

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 112
<211> 10
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

[0019]

<400> 112

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10

<210> 113
<211> 10
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 113

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5 10

<210> 114
<211> 10
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 114

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5 10

<210> 115
<211> 10
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 115

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly

1 5 10
<210> 116
<211> 10
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 116
Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10

<210> 117
<211> 10
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 117
Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10

<210> 118
<211> 10
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 118
Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5 10

[0020] <210> 119
<211> 10
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 119
Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5 10

<210> 120
<211> 10
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 120
Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5 10

<210> 121
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 121
Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala
1 5

<210> 122
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 122

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 123

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 124

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 125

[0021]

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 126

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 127

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 128

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5

[0022]

<210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 129

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5

<210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 130

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 131

Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 132

Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5

<210> 133
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 133

Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5

<210> 134
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 134

Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 135
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 135

Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5

<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 136

Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5

<210> 137
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 137

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala
1 5

<210> 138
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 138

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala
1 5

[0023]

<210> 139
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 139

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5

<210> 140
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 140

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5

<210> 141
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 141

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5

<210> 142
<211> 8
<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)
<400> 142
Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5

<210> 143
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 143
Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 144
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 144
Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5

[0024] <210> 145
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 145
Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5

<210> 146
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 146
Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5

<210> 147
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 147
Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5

<210> 148
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 148
Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5

[0025]

<210> 149
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 149

Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5

<210> 150
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 150

Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5

<210> 151
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 151

Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 152
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 152

Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5

<210> 153
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 153

Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5

<210> 154
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 154

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr
1 5

<210> 155
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 155

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala
1 5

<210> 156
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 156

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala
1 5

<210> 157
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 157

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5

<210> 158
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 158

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5

[0026]

<210> 159
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 159

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5

<210> 160
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 160

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5

<210> 161
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 161

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 162
<211> 7

<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 162
Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5

<210> 163
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 163
Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5

<210> 164
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 164
Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5

<210> 165
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

[0027] <400> 165
Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5

<210> 166
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 166
Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5

<210> 167
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 167
Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5

<210> 168
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 168
Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5

[0028]

<210> 169
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 169

Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 170
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 170

Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5

<210> 171
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 171

Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5

<210> 172
<211> 6
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 172

Gly Ala Gln Phe Ser Lys
1 5

<210> 173
<211> 6
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 173

Ala Gln Phe Ser Lys Thr
1 5

<210> 174
<211> 6
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 174

Gln Phe Ser Lys Thr Ala
1 5

<210> 175
<211> 6
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 175

Phe Ser Lys Thr Ala Ala
1 5

<210> 176

<211> 6

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 176

Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5

<210> 177

<211> 6

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 177

Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5

<210> 178

<211> 6

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 178

[0029]

Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5

<210> 179

<211> 6

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 179

Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5

<210> 180

<211> 6

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 180

Ala Lys Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 181

<211> 6

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 181

Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5

<210> 182

[0030]

<211> 6
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 182

Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5

<210> 183
<211> 6
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 183

Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5

<210> 184
<211> 6
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 184

Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5

<210> 185
<211> 6
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 185

Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5

<210> 186
<211> 6
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 186

Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5

<210> 187
<211> 6
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 187

Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5

<210> 188
<211> 6
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 188

Arg Pro Gly Glu Ala Ala

1 5

<210> 189
<211> 6
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 189

Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5

<210> 190
<211> 6
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 190

Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5

<210> 191
<211> 5
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 191

Gly Ala Gln Phe Ser
1 5

[0031]

<210> 192
<211> 5
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 192

Ala Gln Phe Ser Lys
1 5

<210> 193
<211> 5
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 193

Gln Phe Ser Lys Thr
1 5

<210> 194
<211> 5
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 194

Phe Ser Lys Thr Ala
1 5

<210> 195
<211> 5
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

[0032]

<400> 195

Ser Lys Thr Ala Ala
1 5

<210> 196

<211> 5

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 196

Lys Thr Ala Ala Lys
1 5

<210> 197

<211> 5

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 197

Thr Ala Ala Lys Gly
1 5

<210> 198

<211> 5

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 198

Ala Ala Lys Gly Glu
1 5

<210> 199

<211> 5

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 199

Ala Lys Gly Glu Ala
1 5

<210> 200

<211> 5

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 200

Lys Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 201

<211> 5

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 201

Gly Glu Ala Ala Ala
1 5

[0033]

<210> 202
<211> 5
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 202

Glu Ala Ala Ala Glu
1 5

<210> 203
<211> 5
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 203

Ala Ala Ala Glu Arg
1 5

<210> 204
<211> 5
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 204

Ala Ala Glu Arg Pro
1 5

<210> 205
<211> 5
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 205

Ala Glu Arg Pro Gly
1 5

<210> 206
<211> 5
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 206

Glu Arg Pro Gly Glu
1 5

<210> 207
<211> 5
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 207

Arg Pro Gly Glu Ala
1 5

<210> 208
<211> 5
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 208

Pro Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 209
<211> 5
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 209

Gly Glu Ala Ala Val
1 5

<210> 210
<211> 5
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 210

Glu Ala Ala Val Ala
1 5

<210> 211
<211> 4
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 211

Gly Ala Gln Phe
1

[0034]

<210> 212
<211> 4
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 212

Ala Gln Phe Ser
1

<210> 213
<211> 4
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 213

Gln Phe Ser Lys
1

<210> 214
<211> 4
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 214

Phe Ser Lys Thr
1

<210> 215
<211> 4
<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 215

Ser Lys Thr Ala
I

<210> 216

<211> 4

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 216

Lys Thr Ala Ala
I

<210> 217

<211> 4

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 217

Thr Ala Ala Lys
I

<210> 218

<211> 4

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

[0035]

<400> 218

Ala Ala Lys Gly
I

<210> 219

<211> 4

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 219

Ala Lys Gly Glu
I

<210> 220

<211> 4

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 220

Lys Gly Glu Ala
I

<210> 221

<211> 4

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 221

Gly Glu Ala Ala
I

[0036]

<210> 222
<211> 4
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 222

Glu Ala Ala Ala
1

<210> 223
<211> 4
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 223

Ala Ala Ala Glu
1

<210> 224
<211> 4
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 224

Ala Ala Glu Arg
1

<210> 225
<211> 4
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 225

Ala Glu Arg Pro
1

<210> 226
<211> 4
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 226

Glu Arg Pro Gly
1

<210> 227
<211> 4
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 227

Arg Pro Gly Glu
1

<210> 228
<211> 4
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 228

Pro Gly Glu Ala
1

<210> 229
<211> 4
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 229

Gly Glu Ala Ala
1

<210> 230
<211> 4
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 230

Glu Ala Ala Val
1

<210> 231
<211> 4
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 231

Ala Ala Val Ala
1

[0037]

<210> 232
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> RNS 错义控制肽

<400> 232

Gly Thr Ala Pro Ala Ala Glu Gly Ala Gly Ala Glu Val Lys Arg Ala
1 5 10 15

Ser Ala Glu Ala Lys Gln Ala Phe
20

<210> 233
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> RNS2 错义控制肽

<400> 233

Gly Lys Ala Ser Gln Phe Ala Lys Thr Ala
1 5 10

<210> 234
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
 <223> 突变的 MANS 肽片段
 <400> 234

Arg Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
 1 5 10

<210> 235
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变的 MANS 肽片段
 <400> 235

Arg Ala Lys Gly Glu
 1 5

<210> 236
 <211> 1885
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (309)..(1307)

<400> 236
 ttattattt cttttttttt cgaactacac ttgggtcct tttttgtgc tegacttttc 60
 cacccttttt cctccctccc tgigtgtg ctttttgatc tcttcgacta aaattttttt 120
 atccggagtg tatttaatcg gttegtttct gtctctcca ccaacccccc cccctccct 180
 ccggtgtgtg tgccgtgcc gcgtgtgcg ccgccgtgc tctgtctgct cgccecgteg 240
 ttacaccaac ccgaggtctt ttgtttccc tcttggtat gttgagtttc tttgtgaag 300
 aagccagc atg ggt gcc cag ttc tcc aag acc gca gcg aag gga gaa gcc 350
 Met Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
 1 5 10
 gcc gcg gag agg cct ggg gag gcg gct gtg gcc tcg tcg cct tcc aaa 398
 Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala Ser Ser Pro Ser Lys
 15 20 25 30
 gcg aac gga cag gag aat ggc cac gtg aag gta aac ggc gac gct tcg 446
 Ala Asn Gly Gln Glu Asn Gly His Val Lys Val Asn Gly Asp Ala Ser
 35 40 45
 ccc gcg gcc gcc gag tcg ggc gcc aag gag gag ctg cag gcc aac ggc 494
 Pro Ala Ala Ala Glu Ser Gly Ala Lys Glu Glu Leu Gln Ala Asn Gly
 50 55 60
 agc gcc ccg gcc gcc gac aag gag gag ccc gcg gcc gcc ggg agc ggg 542
 Ser Ala Pro Ala Ala Asp Lys Glu Glu Pro Ala Ala Ala Gly Ser Gly
 65 70 75
 gcg gcg tcg ccc tcc gcg gcc gag aaa ggt gag ccg gcc gcc gcc gct 590
 Ala Ala Ser Pro Ser Ala Ala Glu Lys Gly Glu Pro Ala Ala Ala Ala
 80 85 90
 gcc ccc gag gcc ggg gcc agc ccg gta gag aag gag gcc ccc gcg gaa 638
 Ala Pro Glu Ala Gly Ala Ser Pro Val Glu Lys Glu Ala Pro Ala Glu
 95 100 105 110
 ggc gag gct gcc gag ccc ggc tcg ccc acg gcc gcg gag gga gag gcc 686

[0038]

	Gly Glu Ala Ala Glu Pro Gly Ser Pro Thr Ala Ala Glu Gly Glu Ala	
	115 120 125	
	gcg tcg gcc gcc tcc tcg act tct tcg ccc aag gcc gag gac ggg gcc	734
	Ala Ser Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ser Pro Lys Ala Glu Asp Gly Ala	
	130 135 140	
	acg ccc tcg ccc agc aac gag acc cgg aaa aaa aaa aag aag cge ttt	782
	Thr Pro Ser Pro Ser Asn Glu Thr Pro Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe	
	145 150 155	
	tcc ttc aag aag tct ttc aag ctg agc ggc ttc tcc ttc aag aag aac	830
	Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser Gly Phe Ser Phe Lys Lys Asn	
	160 165 170	
	aag aag gag gct gga gaa ggc ggt gag gct gag gcg ccc gct gcc gaa	878
	Lys Lys Glu Ala Glu Gly Glu Gly Glu Ala Glu Ala Pro Ala Ala Glu	
	175 180 185 190	
	ggc ggc aag gac gag gcc gcc ggg ggc gca gct gcg gcc gcc gcc gag	926
	Gly Gly Lys Asp Glu Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Glu	
	195 200 205	
	gcg ggc gcg gcc tcc ggg gag cag gca gcg gcg ccg ggc gag gag gca	974
	Ala Gly Ala Ala Ser Gly Glu Gln Ala Ala Ala Pro Gly Glu Glu Ala	
	210 215 220	
	gca gcg ggc gag gag ggg gcg gcg ggt ggc gac tcg cag gag gcc aag	1022
	Ala Ala Gly Glu Glu Gly Ala Ala Gly Gly Asp Ser Gln Glu Ala Lys	
	225 230 235	
	ccc cag gag gcc gct gtc gcg cca gag aag ccg ccc gcc agc gac gag	1070
	Pro Gln Glu Ala Ala Val Ala Pro Glu Lys Pro Pro Ala Ser Asp Glu	
	240 245 250	
[0039]	acc aag gcc gcc gag gag ccc agc aag gtg gag gag aaa aag gcc gag	1118
	Thr Lys Ala Ala Glu Glu Pro Ser Lys Val Glu Glu Lys Lys Ala Glu	
	255 260 265 270	
	gag gcc ggg gcc agc gcc gcc gcc tgc gag gcc ccc tcc gcc gcc ggg	1166
	Glu Ala Gly Ala Ser Ala Ala Ala Cys Glu Ala Pro Ser Ala Ala Gly	
	275 280 285	
	ctg gtg tgc ccc cgg aga gga ggc agc ccc cgc gga gga gcc cgc ggc	1214
	Leu Val Cys Pro Arg Arg Gly Gly Ser Pro Arg Gly Gly Ala Arg Gly	
	290 295 300	
	cgc cgc agc ctc aat caa gcc tgc gca gcc ccc tca cag gag gcc cag	1262
	Arg Arg Ser Leu Asn Gln Ala Cys Ala Ala Pro Ser Gln Glu Ala Gln	
	305 310 315	
	ccc gag tgc agt cca gaa gcc ccc cca gcg gag gcg gca gag taa	1307
	Pro Glu Cys Ser Pro Glu Ala Pro Pro Ala Glu Ala Glu	
	320 325 330	
	aagagcaagc ttttgtagaga taatcgaaga acattttctc ccccgtttgt ttggttgag	1367
	tggtgccagg tactggattt tggagaactt gtctacaacc agggatigat tttaaagatg	1427
	tcttttttta ttttactttt tttaagcac caaattttgt tgtttttttt ttctccctc	1487
	cccacagatc ccattcctaaa tcattctgtt aaccaccatt ccaacagtc gaggagagct	1547
	taaacacctt ctctctctgg ccttgtttct cttttatttt ttatttttgc gcatcagtat	1607
	taatgttttt gcatactttg catcttttatt caaaagtgt aactttcttt gtcaatctat	1667
	ggacatgcc atataatgaag gagatgggtg ggtcaaaaag ggatatcaaa tgaagtata	1727
	ggggtcaca tggggaaatt gaagtgggtc ataacattgc caaaatagtg tgccactaga	1787
	aatgtgttaa agctgtcttt tttttttttt tttaagaaa agttattacc atgtattttg	1847

tgaggcaggt ttacaacact acaactcgtg ccgaattc

1885

<210> 237

<211> 332

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 237

Met Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5 10 15

Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala Ser Ser Pro Ser Lys Ala Asn
20 25 30

Gly Gln Glu Asn Gly His Val Lys Val Asn Gly Asp Ala Ser Pro Ala
35 40 45

Ala Ala Glu Ser Gly Ala Lys Glu Glu Leu Gln Ala Asn Gly Ser Ala
50 55 60

Pro Ala Ala Asp Lys Glu Glu Pro Ala Ala Ala Gly Ser Gly Ala Ala
65 70 75 80

Ser Pro Ser Ala Ala Glu Lys Gly Glu Pro Ala Ala Ala Ala Pro
85 90 95

Glu Ala Gly Ala Ser Pro Val Glu Lys Glu Ala Pro Ala Glu Gly Glu
100 105 110

Ala Ala Glu Pro Gly Ser Pro Thr Ala Ala Glu Gly Glu Ala Ala Ser
115 120 125

Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ser Pro Lys Ala Glu Asp Gly Ala Thr Pro
130 135 140

[0040]

Ser Pro Ser Asn Glu Thr Pro Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe
145 150 155 160

Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser Gly Phe Ser Phe Lys Lys Asn Lys Lys
165 170 175

Glu Ala Gly Glu Gly Gly Glu Ala Glu Ala Pro Ala Ala Glu Gly Gly
180 185 190

Lys Asp Glu Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Glu Ala Gly
195 200 205

Ala Ala Ser Gly Glu Gln Ala Ala Ala Pro Gly Glu Glu Ala Ala Ala
210 215 220

Gly Glu Glu Gly Ala Ala Gly Gly Asp Ser Glu Glu Ala Lys Pro Gln
225 230 235 240

Glu Ala Ala Val Ala Pro Glu Lys Pro Pro Ala Ser Asp Glu Thr Lys
245 250 255

Ala Ala Glu Glu Pro Ser Lys Val Glu Glu Lys Lys Ala Glu Glu Ala
260 265 270

Gly Ala Ser Ala Ala Ala Cys Glu Ala Pro Ser Ala Ala Gly Leu Val
275 280 285

Cys Pro Arg Arg Gly Gly Ser Pro Arg Gly Gly Ala Arg Gly Arg Arg
290 295 300

Ser Leu Asn Gln Ala Cys Ala Ala Pro Ser Gln Glu Ala Gln Pro Glu
305 310 315 320

Cys Ser Pro Glu Ala Pro Pro Ala Glu Ala Ala Glu
325 330

<210>	238	
<211>	2589	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo sapiens)	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(370)..(1368)	
<400>	238	
	caaccaggga gatttctcca ttttctcttt gtetacagtg cggetacaaa tctgggattt	60
	ttttattact teittttttt tcgaactaca ctgggctcc tttttttgtg ctgcatttt	120
	ecaccctttt tccctccctc ctgtctctgt gctttttgat ctcttegact aaaatttttt	180
	tatccggagt gtatttaate ggttctgttc tgtctctctc accaccccca ccccccctcc	240
	tccgggtgtg gtgccgtgc cgtgtttgcc gccgcctgtg ctgctgtctg tcgccccgtc	300
	gttacaccaa cccgaggctc ttgttttccc ctcttgatc tgttgagttt ctttggtgaa	360
	gaagccagc atg ggt gcc cag ttc tcc aag acc gca gcg aag gga gaa gcc	411
	Met Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala	
	1 5 10	
	gcc gcg gag agg cct ggg gag gcg gct gtg gcc tcg tcg cct tcc aaa	459
	Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala Ser Ser Pro Ser Lys	
	15 20 25 30	
	gcg aac gga cag gag aat ggc cac gtg aag gta aac ggc gac gct tcg	507
	Ala Asn Gly Gln Glu Asn Gly His Val Lys Val Asn Gly Asp Ala Ser	
	35 40 45	
[0041]	ccc gcg gcc gcc gag tcg ggc gcc aag gag gag ctg cag gcc aac ggc	555
	Pro Ala Ala Ala Glu Ser Gly Ala Lys Glu Glu Leu Gln Ala Asn Gly	
	50 55 60	
	agc gcc ccg gcc gcc gac aag gag gag ccc gcg gcc gcc ggg agc ggg	603
	Ser Ala Pro Ala Ala Asp Lys Glu Glu Pro Ala Ala Ala Gly Ser Gly	
	65 70 75	
	gcg gcg tcg ccc tcc tcg gcc gag aaa ggt gag ccg gcc gcc gcc gct	651
	Ala Ala Ser Pro Ser Ser Ala Glu Lys Gly Glu Pro Ala Ala Ala Ala	
	80 85 90	
	gcc ccc gag gcc ggg gcc agc ccg gta gag aag gag gcc ccc gcg gaa	699
	Ala Pro Glu Ala Gly Ala Ser Pro Val Glu Lys Glu Ala Pro Ala Glu	
	95 100 105 110	
	ggc gag gct gcc gag cac ggc tcg gcc acg gcc gcg gag gga gag gcc	747
	Gly Glu Ala Ala Glu Pro Gly Ser Ala Thr Ala Ala Glu Gly Glu Ala	
	115 120 125	
	gcg tcg gcc gcc tcc tcg act tct tcg ccc aag gcc gag gac ggg gcc	795
	Ala Ser Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ser Pro Lys Ala Glu Asp Gly Ala	
	130 135 140	
	acg ccc tcg ccc agc aac gag acc ccg aaa aaa aaa aag aag cgc ttt	843
	Thr Pro Ser Pro Ser Asn Glu Thr Pro Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe	
	145 150 155	
	tcc ttc aag aag tct ttc aag ctg agc ggc ttc tcc ttc aag aag aac	891
	Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser Gly Phe Ser Phe Lys Lys Asn	
	160 165 170	
	aag aag gag gct gga gaa ggc ggt gag gct gag gcg ccc gct gcc gaa	939
	Lys Lys Glu Ala Gly Glu Gly Gly Glu Ala Glu Ala Pro Ala Ala Glu	
	175 180 185 190	
	ggc gcc aag gac gag gcc gcc ggg gcc gca gct gcg gcc gcc gcc gag	987
	Gly Gly Lys Asp Glu Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Glu	

	195	200	205	
	gcg ggc gcg gcc tcc ggg gag cag gca gcg gcg ccg ggc gag gag gcg Ala Gly Ala Ala Ser Gly Glu Gln Ala Ala Ala Pro Gly Glu Glu Ala 210 215 220			1035
	gca gcg ggc gag gag ggg gcg gcg ggt ggc gac ccg cag gag gcc aag Ala Ala Gly Glu Glu Gly Ala Ala Gly Gly Asp Pro Gln Glu Ala Lys 225 230 235			1083
	ccc cag gag gcc gct gtc gcg cca gag aag ccg ccc gcc agc gac gag Pro Gln Glu Ala Ala Val Ala Pro Glu Lys Pro Pro Ala Ser Asp Glu 240 245 250			1131
	acc aag gcc gcc gag gag ccc agc aag gtg gag gag aaa aag gcc gag Thr Lys Ala Ala Glu Glu Pro Ser Lys Val Glu Lys Lys Ala Glu 255 260 265 270			1179
	gag gcc ggg gcc agc gcc gcc gcc tgc gag gcc ccc tcc gcc gcc ggg Glu Ala Gly Ala Ser Ala Ala Ala Cys Glu Ala Pro Ser Ala Ala Gly 275 280 285			1227
	ccc ggc gcg ccc ccg gag cag gag gca gcc ccc gcg gag gag ccc gcg Pro Gly Ala Pro Pro Glu Gln Glu Ala Ala Pro Ala Glu Glu Pro Ala 290 295 300			1275
	gcc gcc gca gcc tgc tca gcc tgc gca gcc ccc tca cag gag gcc cag Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Cys Ala Ala Pro Ser Gln Glu Ala Gln 305 310 315			1323
	ccc gag tgc agt cca gaa gcc ccc cca gcg gag gcg gca gag taa Pro Glu Cys Ser Pro Glu Ala Pro Pro Ala Glu Ala Ala Glu 320 325 330			1368
[0042]	aagagcaagc ttttgtgaga taatcgaaga actttctcc cccgtttgtt tgttggagtg			1428
	gtgccaggta ctgttttggg gaacttgtct acaaccaggg attgatttta aagatgtctt			1488
	tttttatttt actttttttt aagcaccaaa tttgtttggt tttttttttt tcccctcccc			1548
	acagatccca tctcaaatca ttctgttaac caccattcca acaggtcag gagagcttaa			1608
	acaccttett cctctgectt gttctctttt ttttttttat ttttctgeat cagtattaat			1668
	gtttttgcat actttgcate ttatttcaaa agtgtaaact ttctttgtca atctatggac			1728
	atgcccatat atgaaggaga tgggtgggtc aaaaagggat atcaaatgaa gtgatagggg			1788
	tcacaatggg gaaatgaag tgggtcataa cattgceaaa atagtgtgcc actagaaatg			1848
	gigttaaagg tgtctttttt ttttttttta aagaaaagtt attaccaatgt attttgtgag			1908
	gcaggtttac aacactacaa gtcttgagtt aagaaggaaa gaggaaaaaa gaaaaaacac			1968
	caataccag atttaaaaaa aaaaaaacga tcatagtctt aggagttcat ttaaacata			2028
	ggaacttttc acttatctca ttttagctgt accagtcagt gattaagtag aactacaagt			2088
	tgtataggct ttattgttta ttgctgggtt atgaccttaa taaagtgiaa ttatgtatta			2148
	ccagcagggt gtttttaact gtgactatig tataaaaaca aatcttgata tccagaagca			2208
	catgaagttt gcaactttcc accctgecca tttttgtaaa actgcagica tcttgacct			2268
	tttaaacac aaatttttaa ctcaaccaag ctgtgataag tggaaatggt actgtttata			2328
	ctgttgatag tttttgatta cagcagataa tgcittcttt tccagtcgtc tttgagaata			2388
	aaggaaaaaa aatcttcaga tgcaatggtt ttgtgtagea tcttgtctat catgttttgt			2448
	aaatactgga gaagctttga ccaatttgac tttagatggg aatgtaactt tgettacaaa			2508
	aattgctatt aaactcctgc ttaagggtgt ctaattttct gtgagcacac taaaagcgaa			2568

aaataaatgt gaataaatg t

2589

<210> 239

<211> 332

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 239

Met Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5 10 15

Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala Ser Ser Pro Ser Lys Ala Asn
20 25 30

Gly Gln Glu Asn Gly His Val Lys Val Asn Gly Asp Ala Ser Pro Ala
35 40 45

Ala Ala Glu Ser Gly Ala Lys Glu Glu Leu Gln Ala Asn Gly Ser Ala
50 55 60

Pro Ala Ala Asp Lys Glu Glu Pro Ala Ala Ala Gly Ser Gly Ala Ala
65 70 75 80

Ser Pro Ser Ser Ala Glu Lys Gly Glu Pro Ala Ala Ala Ala Pro
85 90 95

Glu Ala Gly Ala Ser Pro Val Glu Lys Glu Ala Pro Ala Glu Gly Glu
100 105 110

Ala Ala Glu Pro Gly Ser Ala Thr Ala Ala Glu Gly Glu Ala Ala Ser
115 120 125

Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ser Pro Lys Ala Glu Asp Gly Ala Thr Pro
130 135 140

[0043]

Ser Pro Ser Asn Glu Thr Pro Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe
145 150 155 160

Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser Gly Phe Ser Phe Lys Lys Asn Lys Lys
165 170 175

Glu Ala Gly Glu Gly Gly Glu Ala Glu Ala Pro Ala Ala Glu Gly Gly
180 185 190

Lys Asp Glu Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Glu Ala Gly
195 200 205

Ala Ala Ser Gly Glu Gln Ala Ala Ala Pro Gly Glu Glu Ala Ala Ala
210 215 220

Gly Glu Glu Gly Ala Ala Gly Gly Asp Pro Gln Glu Ala Lys Pro Gln
225 230 235 240

Glu Ala Ala Val Ala Pro Glu Lys Pro Pro Ala Ser Asp Glu Thr Lys
245 250 255

Ala Ala Glu Glu Pro Ser Lys Val Glu Glu Lys Lys Ala Glu Glu Ala
260 265 270

Gly Ala Ser Ala Ala Ala Cys Glu Ala Pro Ser Ala Ala Gly Pro Gly
275 280 285

Ala Pro Pro Glu Gln Glu Ala Ala Pro Ala Glu Glu Pro Ala Ala Ala
290 295 300

Ala Ala Ser Ser Ala Cys Ala Ala Pro Ser Gln Glu Ala Gln Pro Glu
305 310 315 320

Cys Ser Pro Glu Ala Pro Pro Ala Glu Ala Ala Glu
325 330

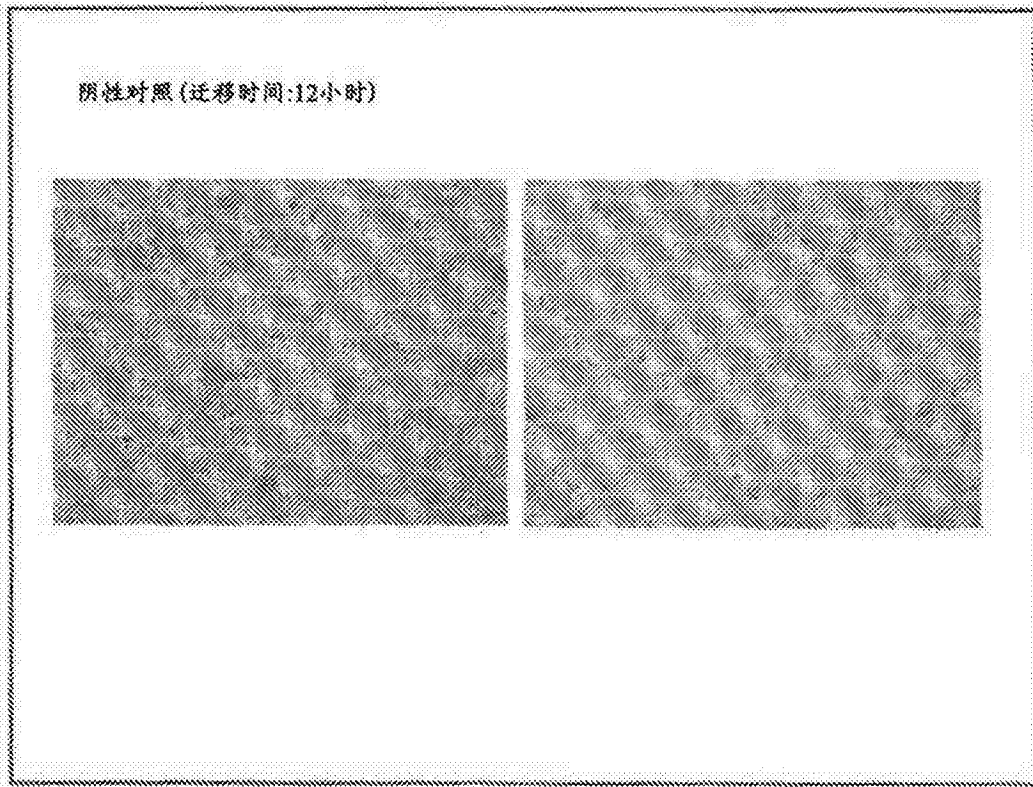


图1

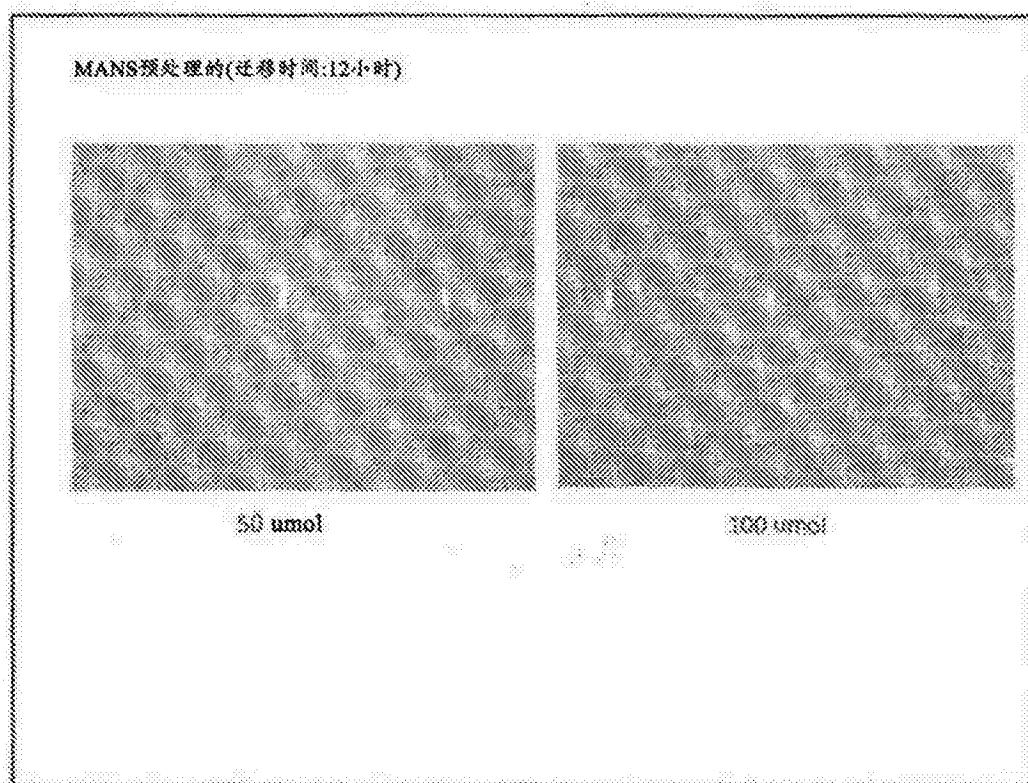


图 2A

图 2B

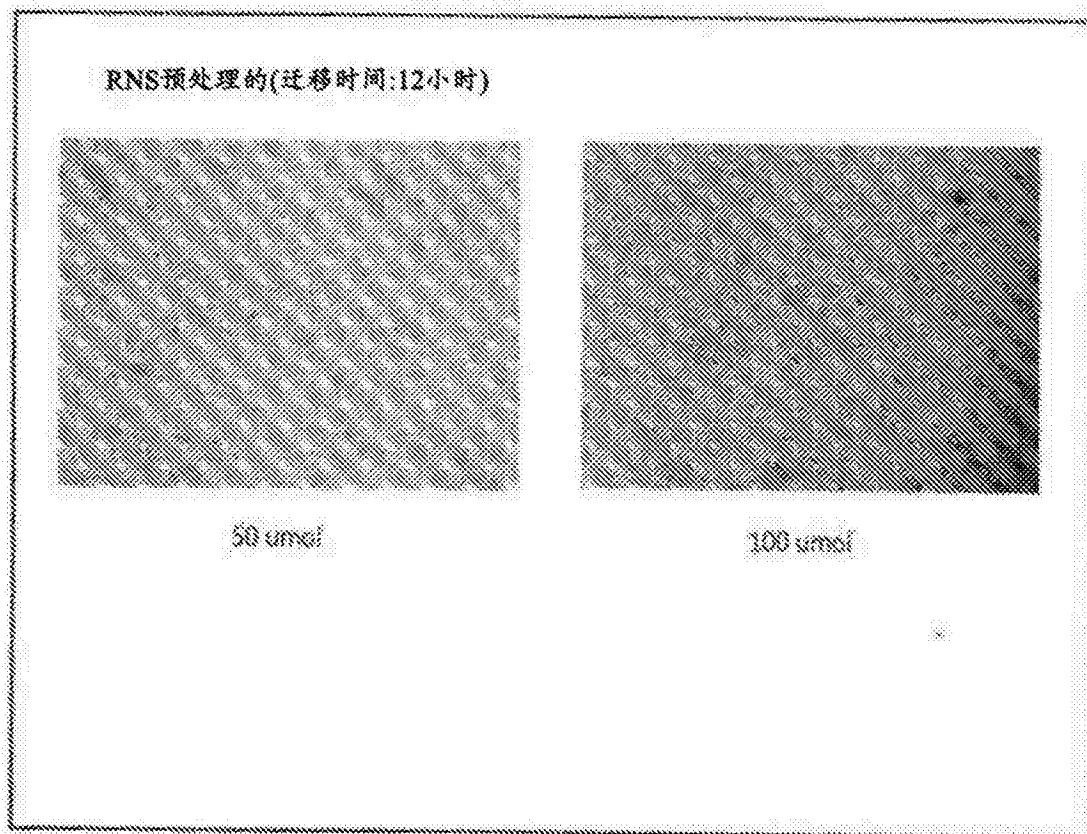


图 3A

图 3B

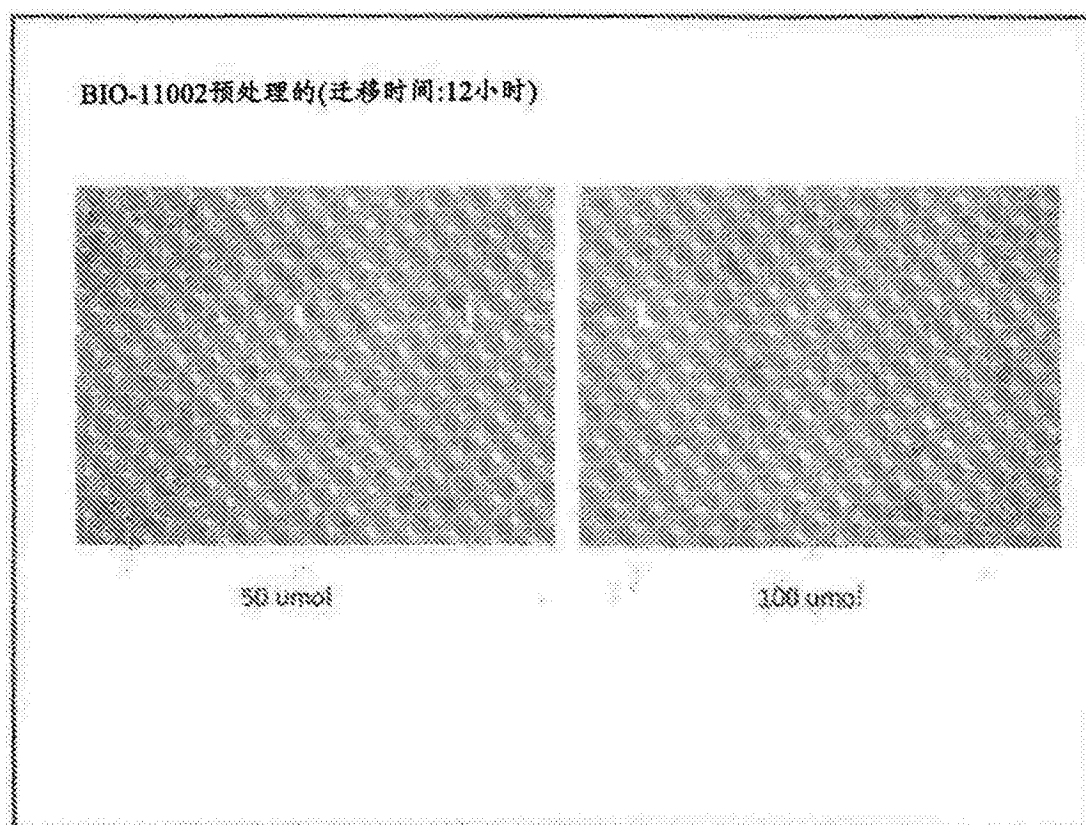


图 4A

图 4B

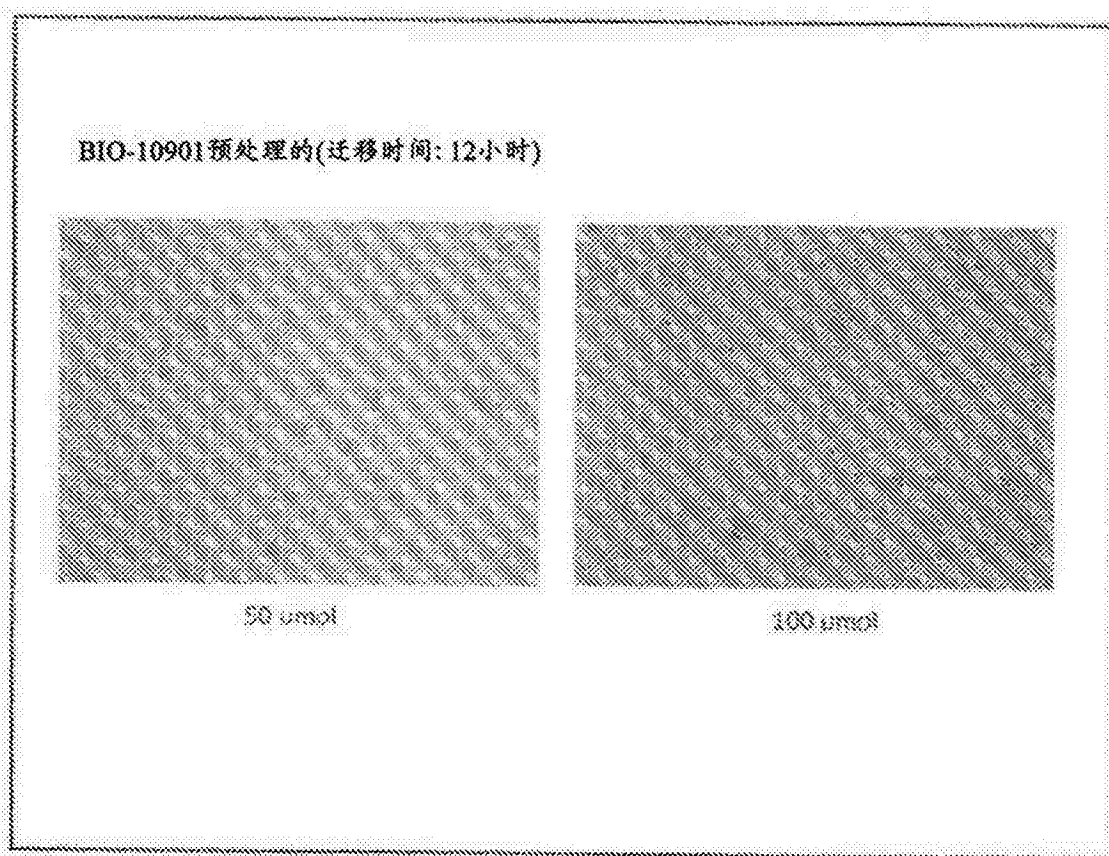


图 5A

图 5B

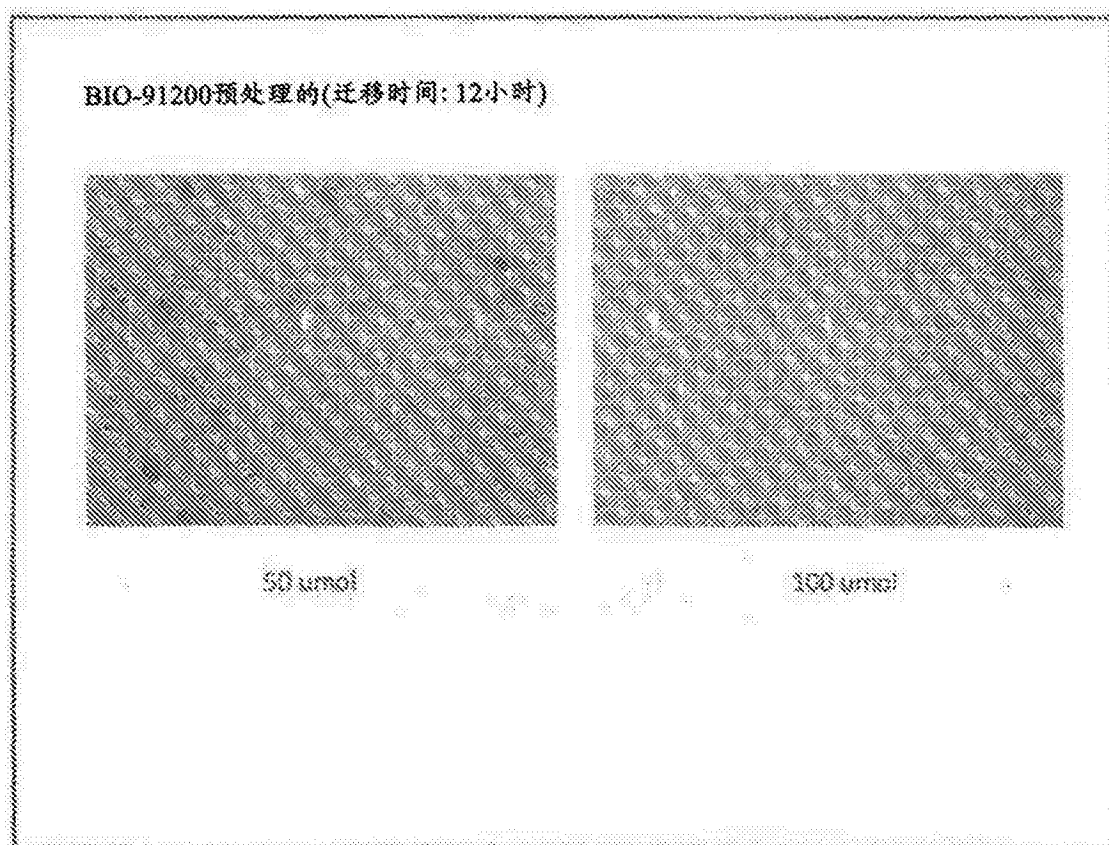


图 6A

图 6B

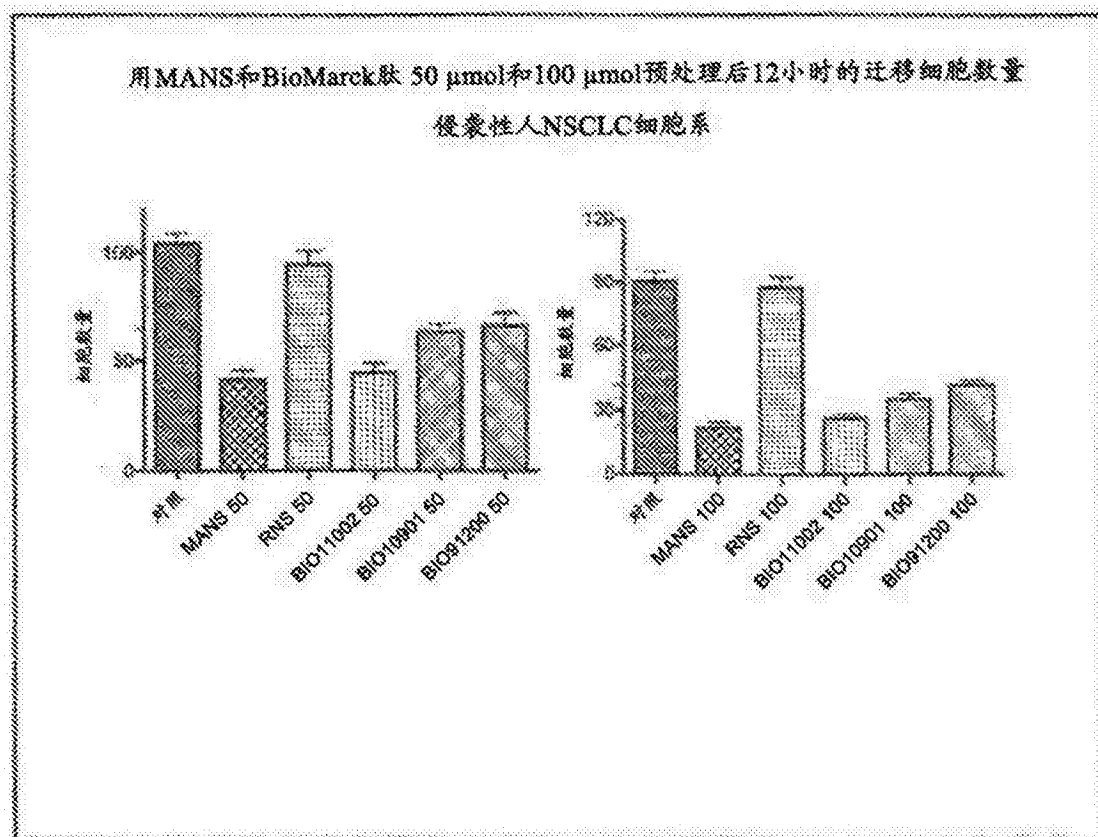


图 7A

图 7B

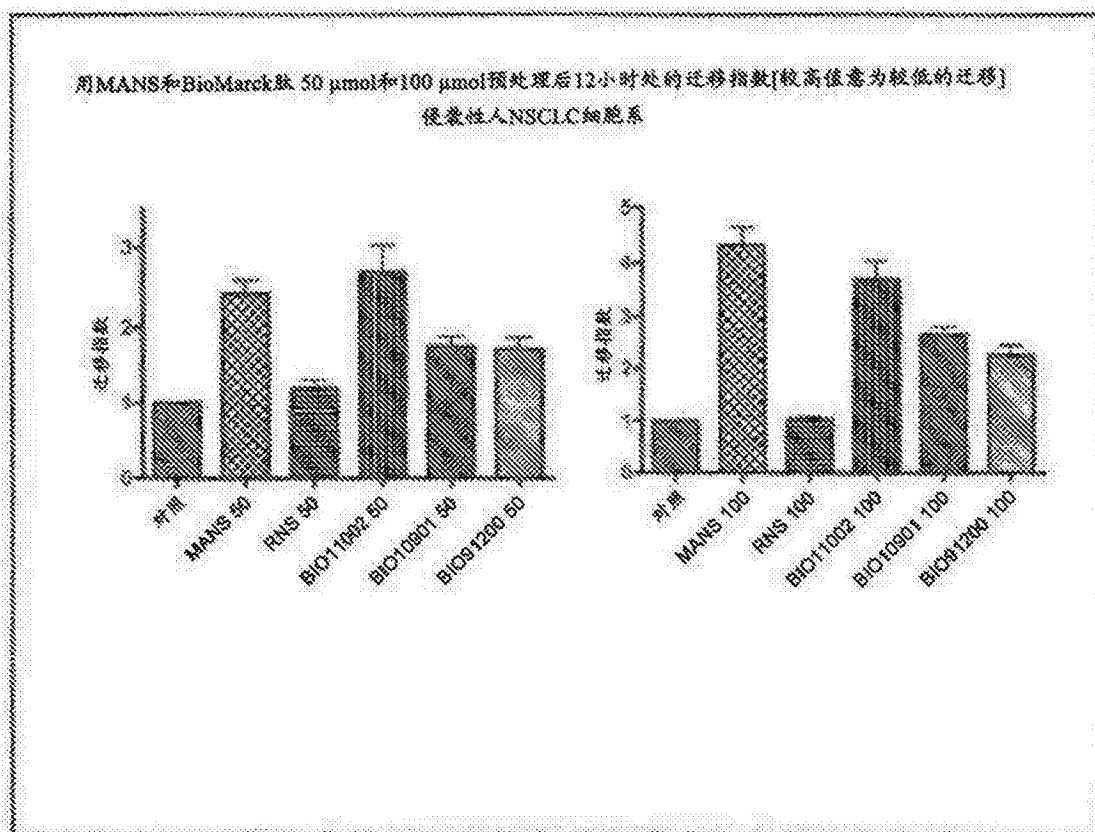


图 8A

图 8B

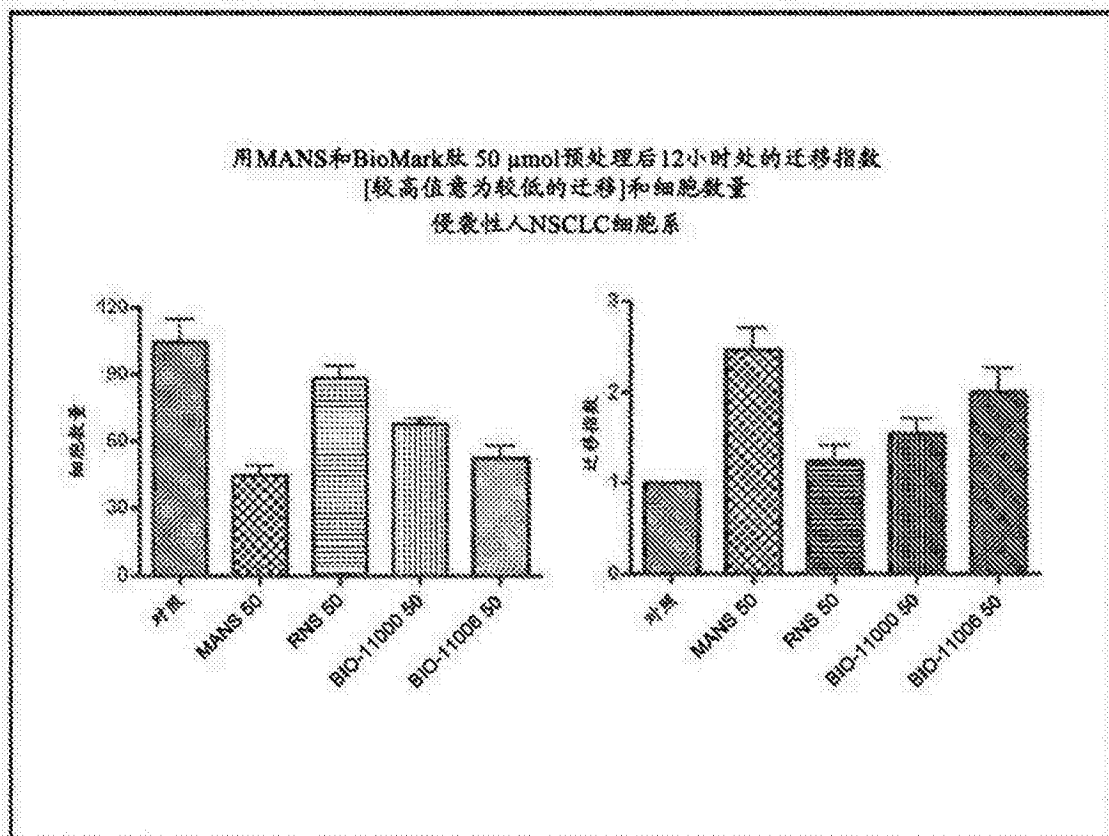


图9

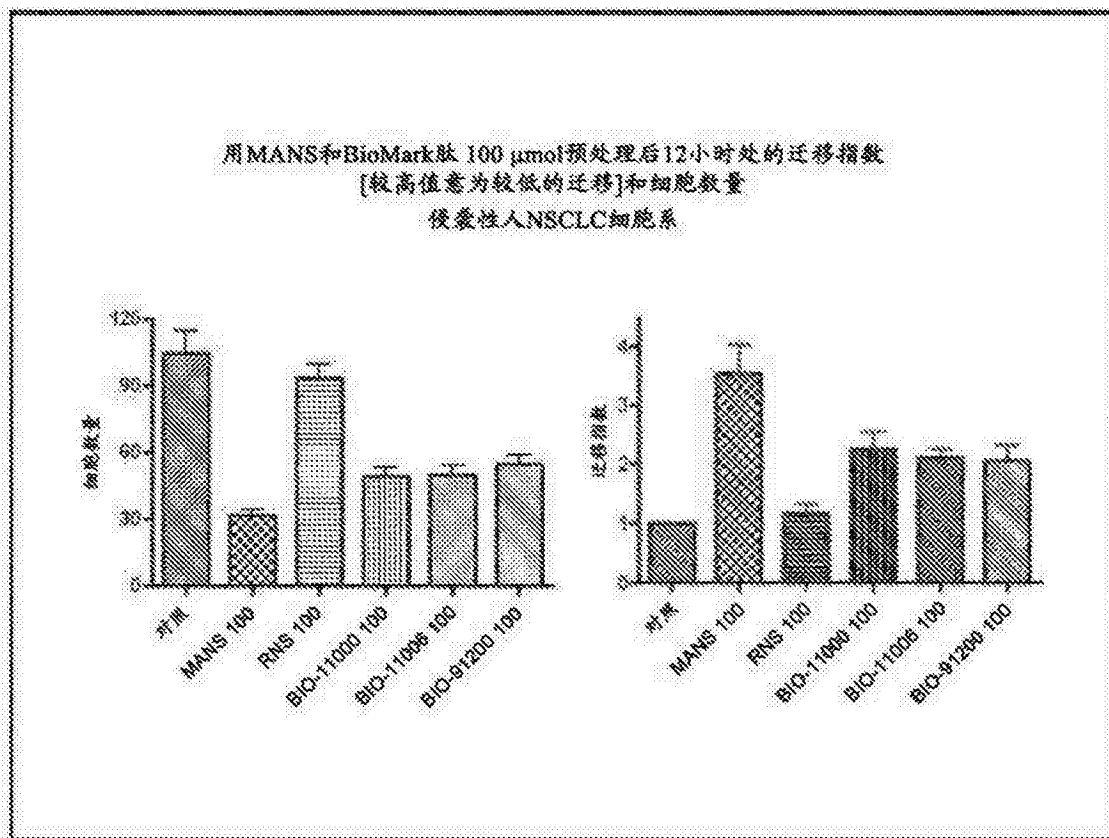


图10

用测试肽预处理12小时处的迁移细胞数量、A549细胞系

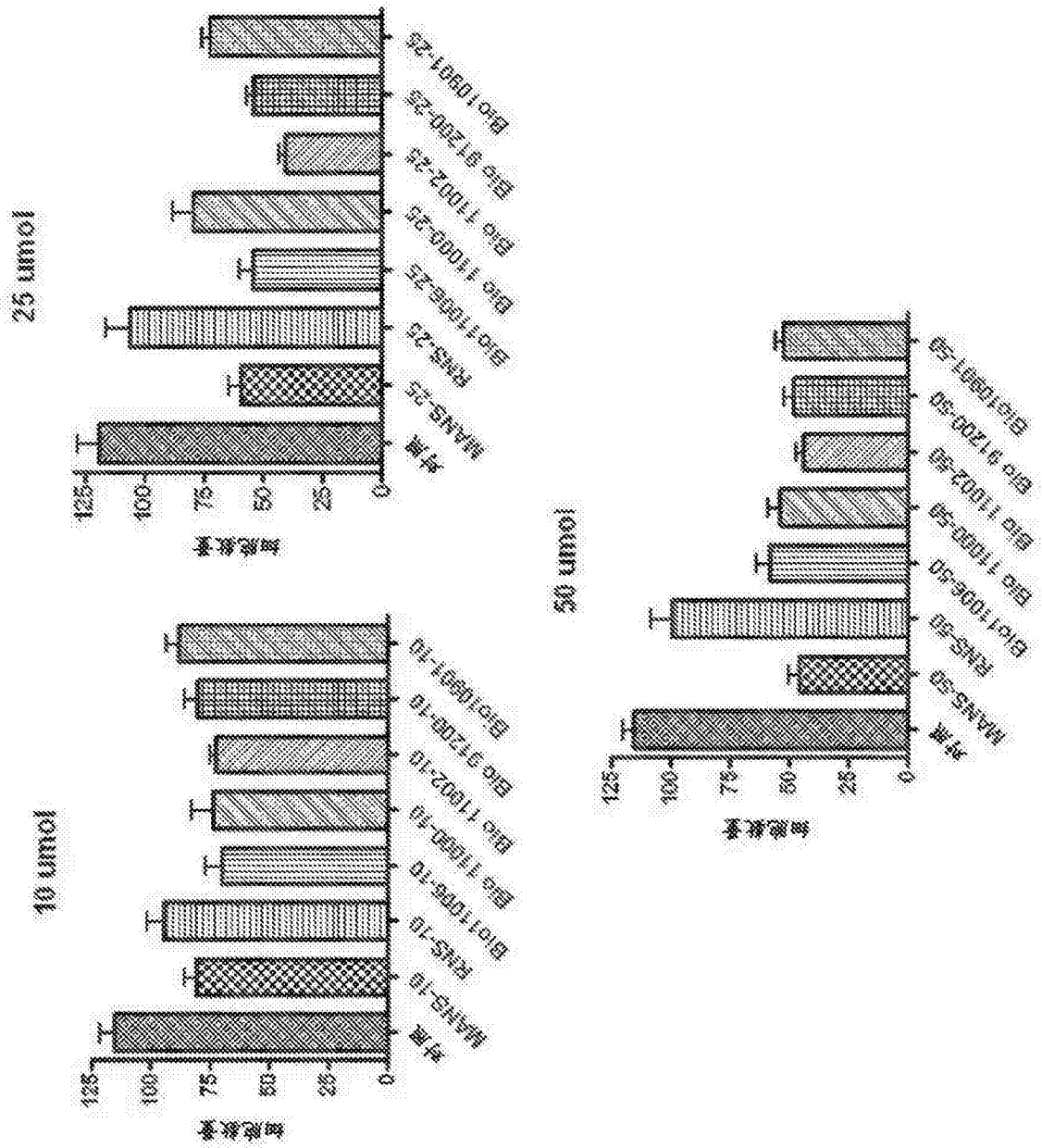


图11

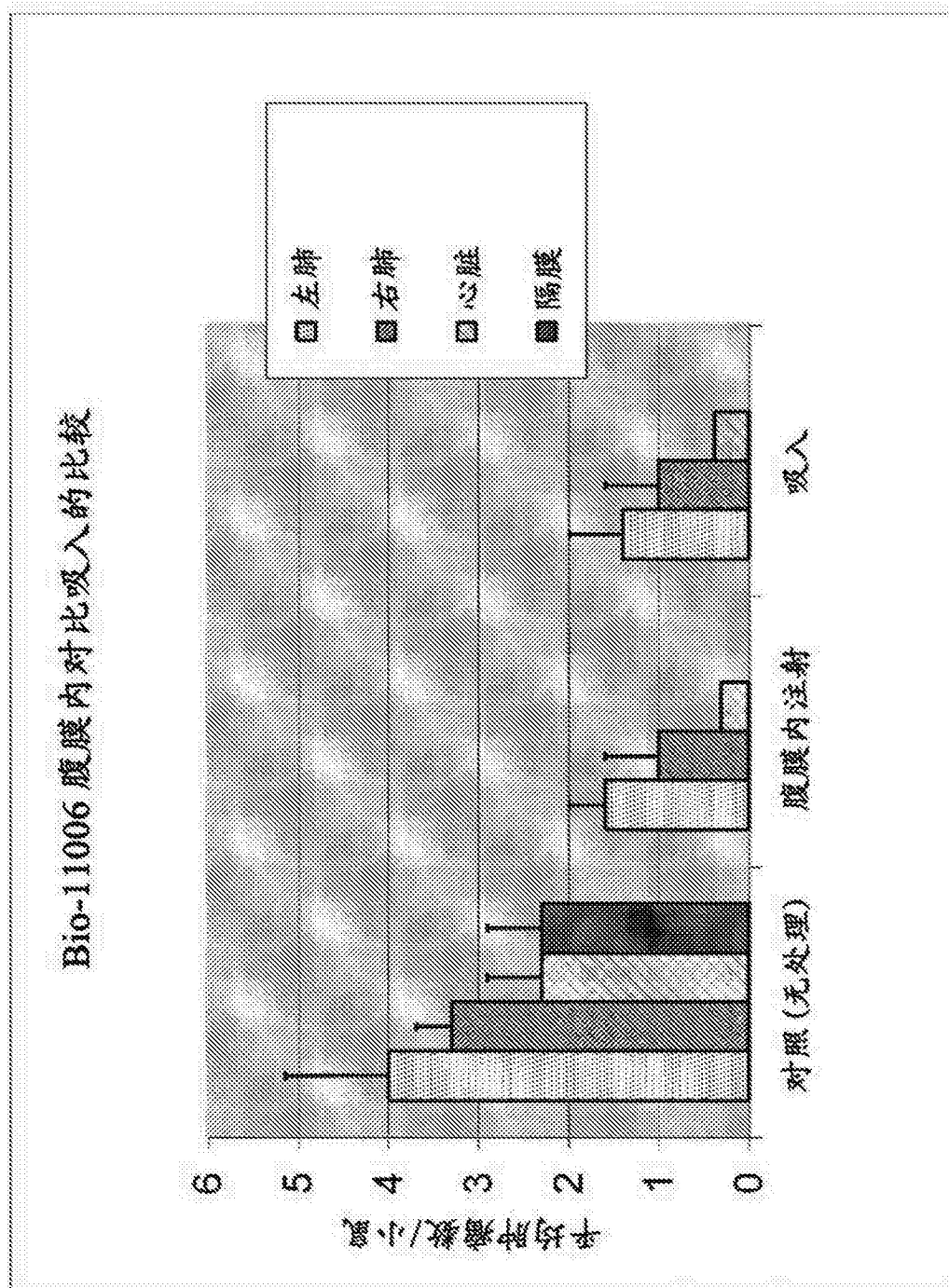


图12

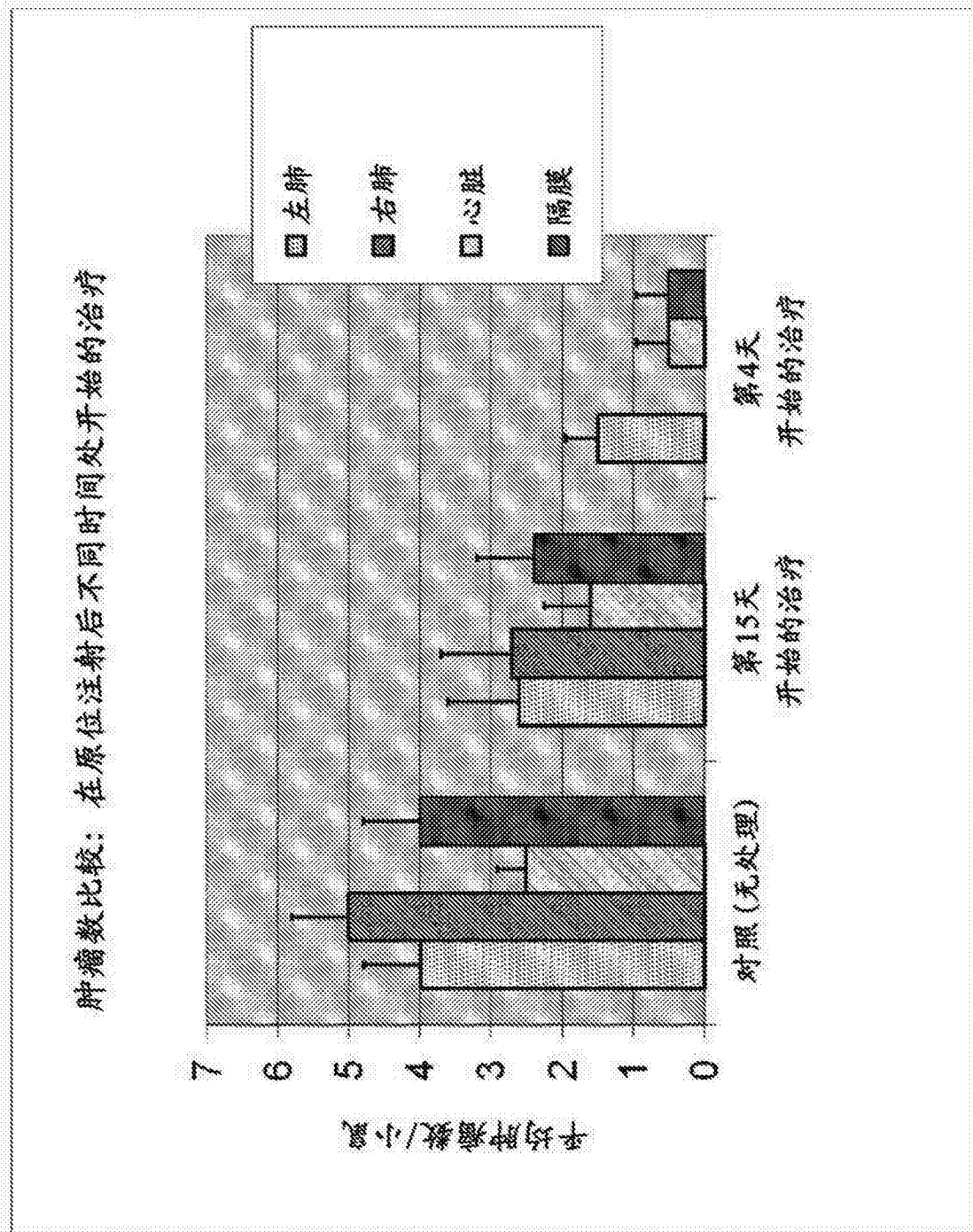


图13

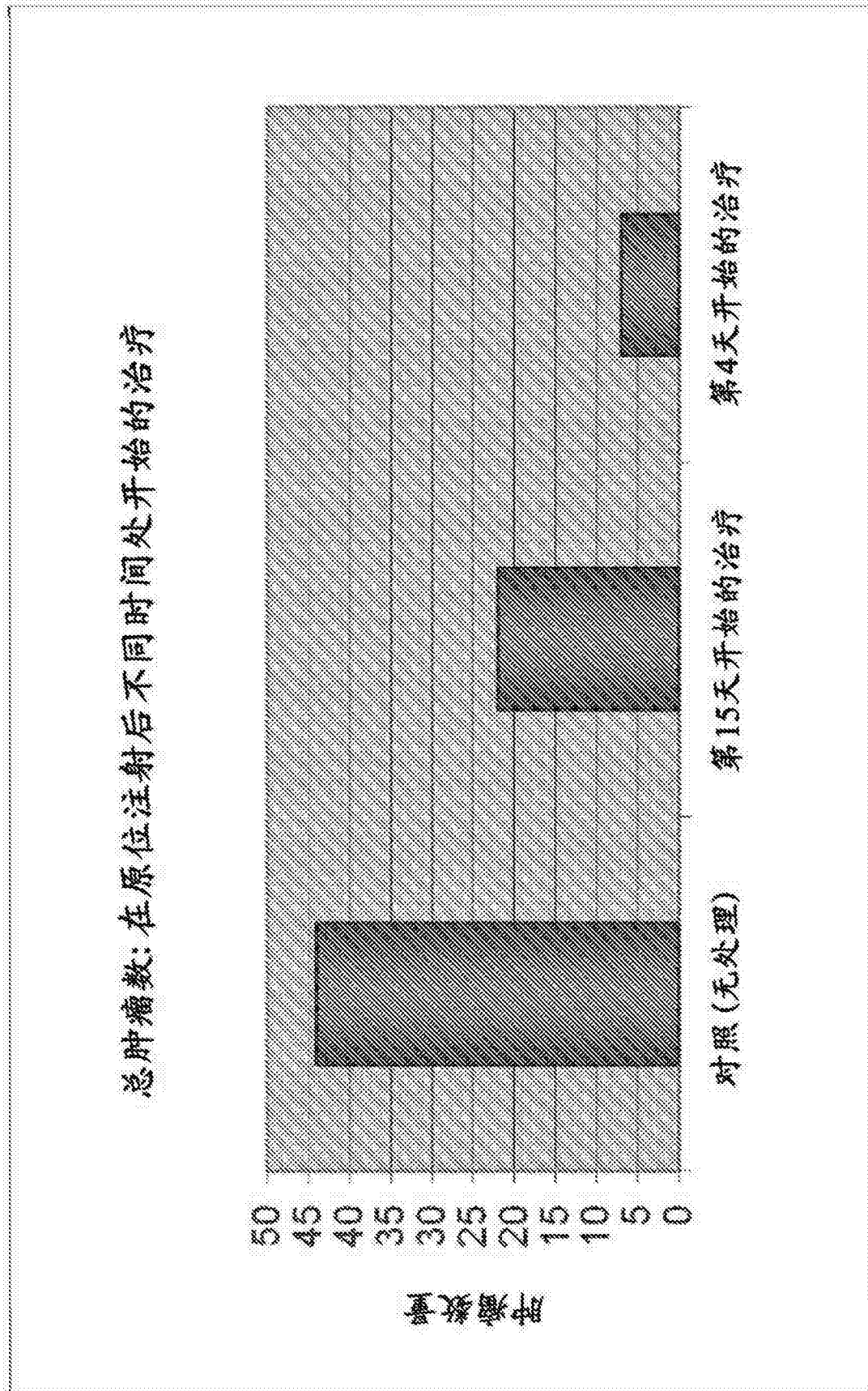
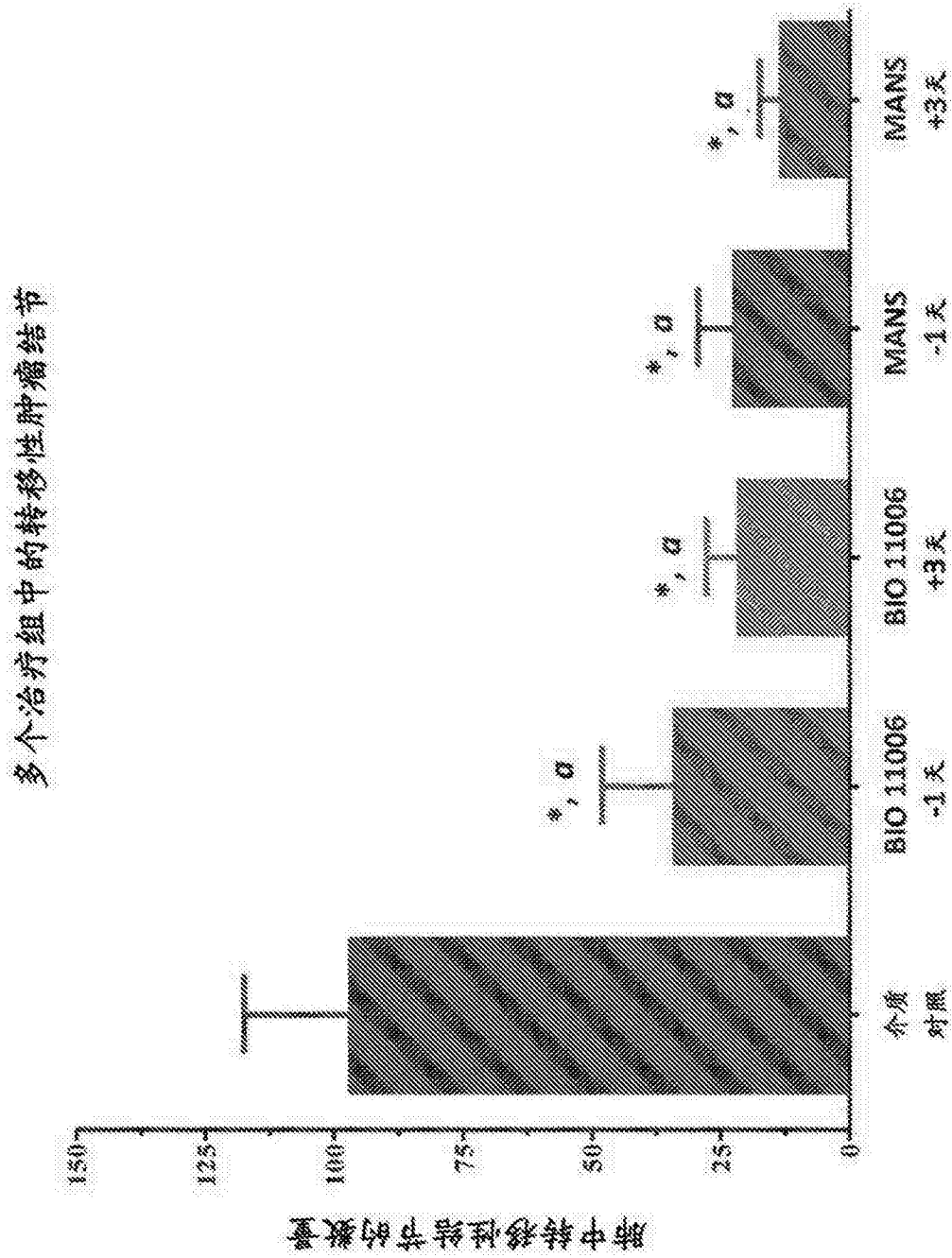


图14



* $p < 0.05$, 与对照组相比在统计学上显著; a: 在多个组之中统计学不显著

图15

在siRNA-M处理后PC-9细胞中的MARCKS蛋白表达(Y轴)减少了~60%。MARCKS蛋白的水平通过Western印迹评估

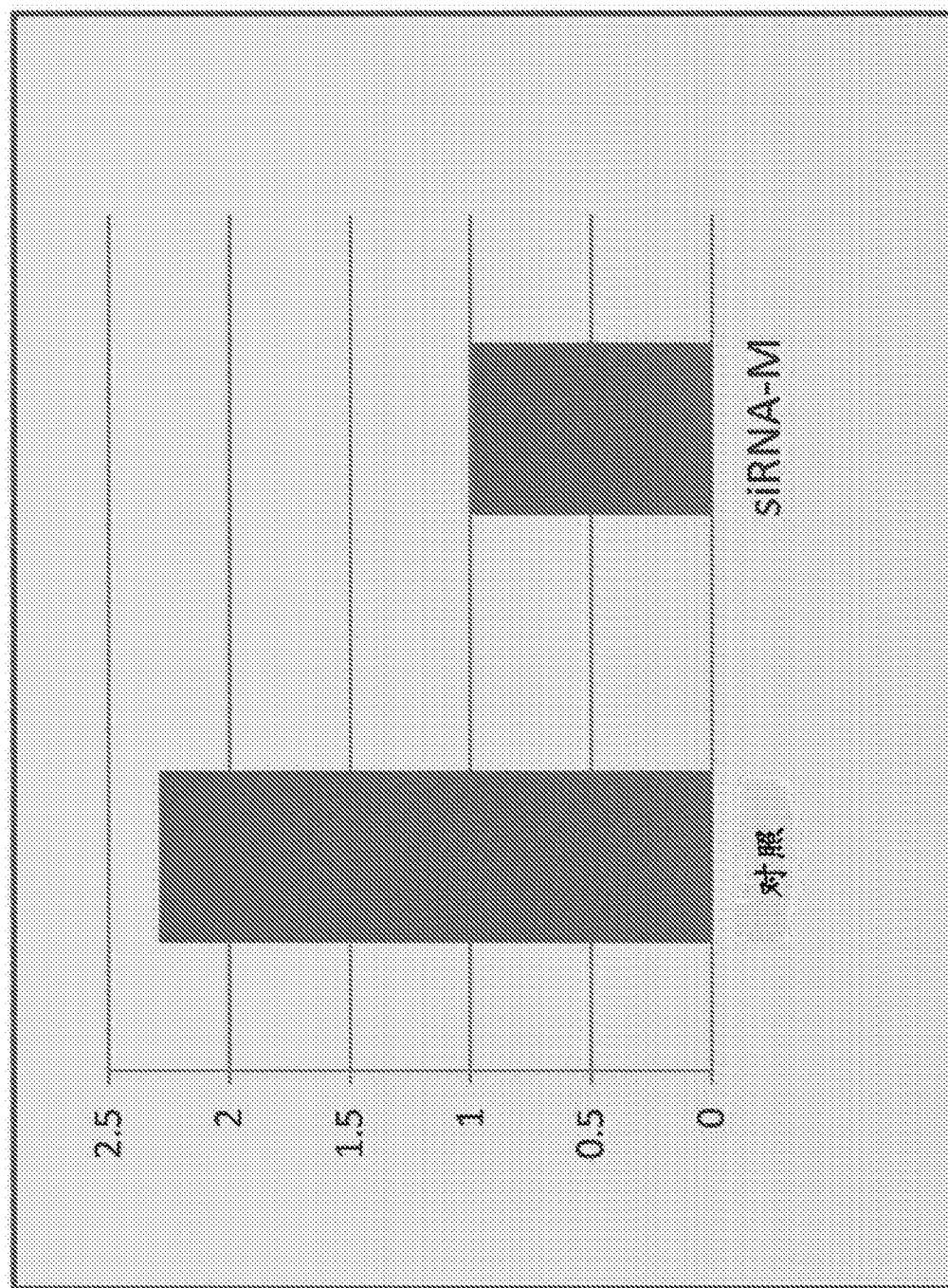


图16

在siRNA-M处理后A549细胞中的MARCKS蛋白表达(Y轴)减少了~50%。MARCKS

蛋白的水平通过Western印迹评估

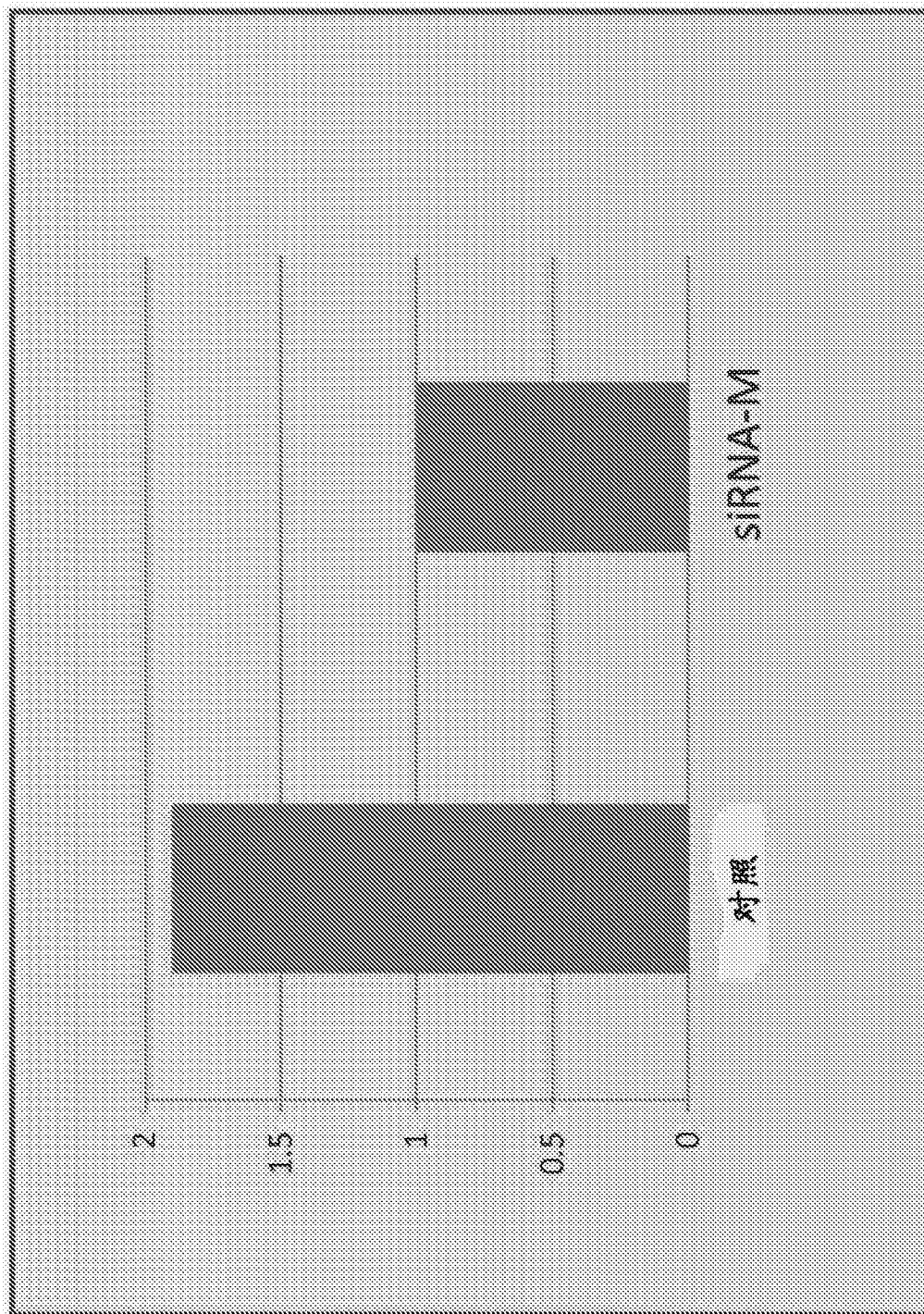


图17

通过MARCKS siRNA在PC-9细胞中敲低MARCKS导致~90%的细胞迁移减少

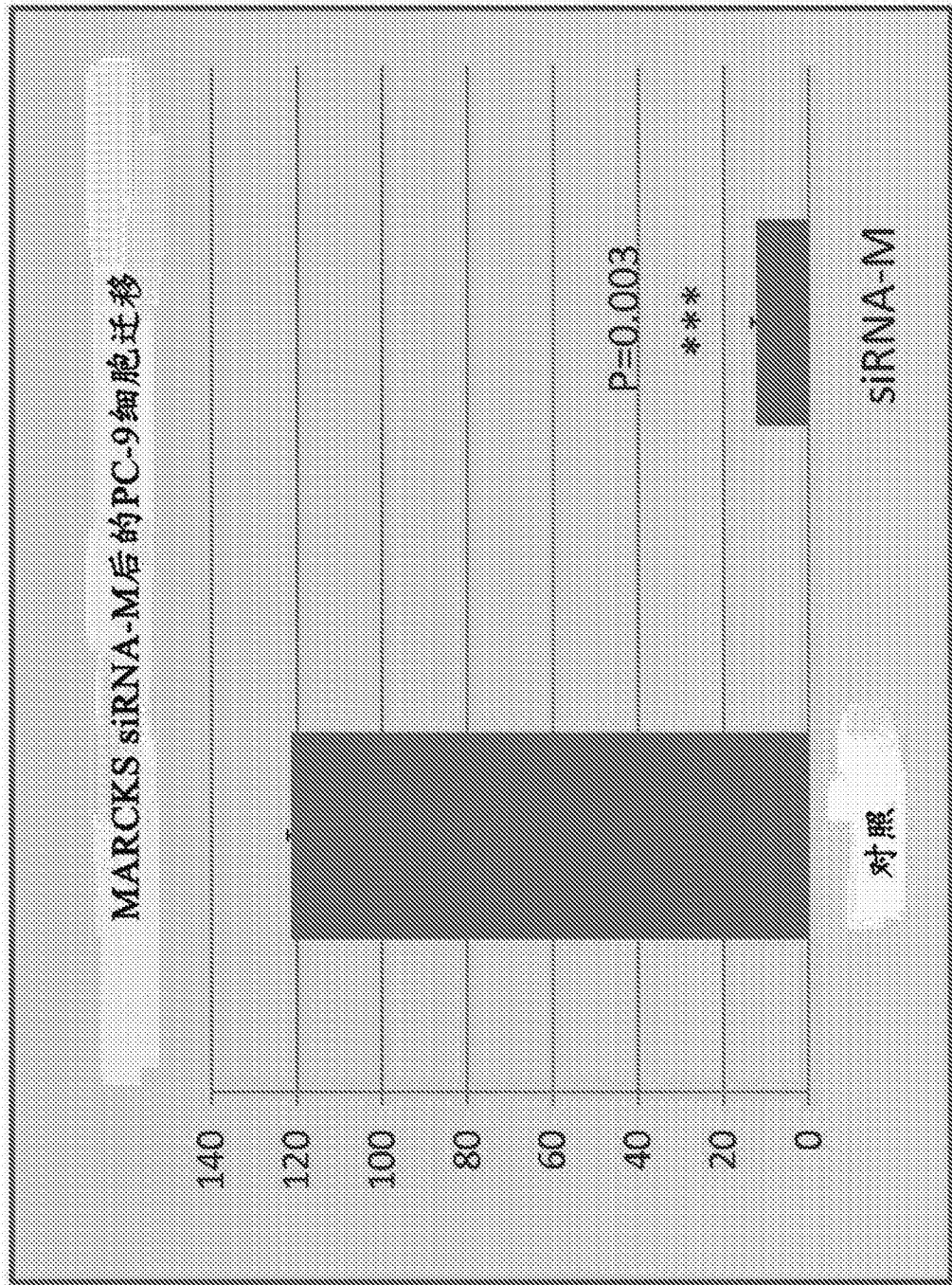


图18

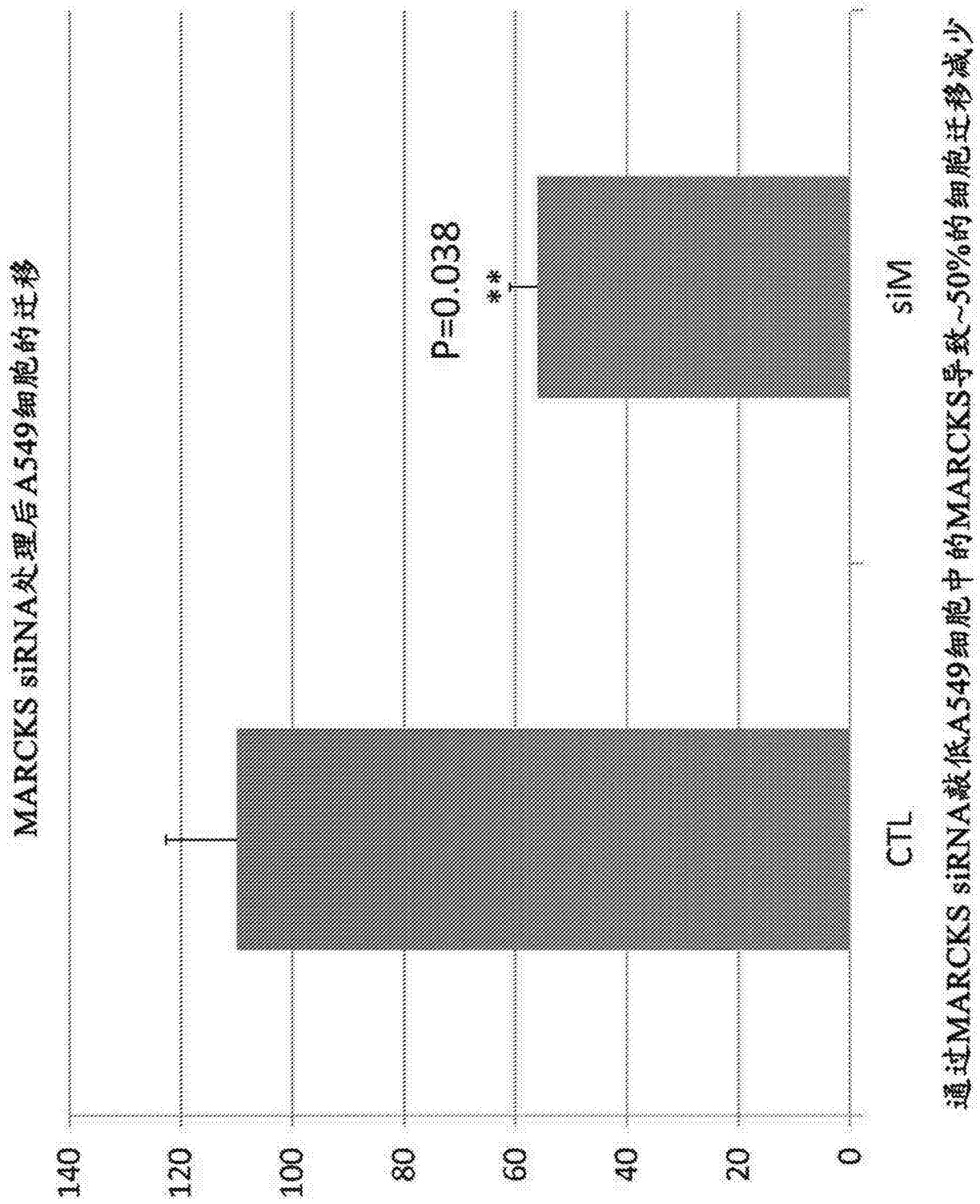
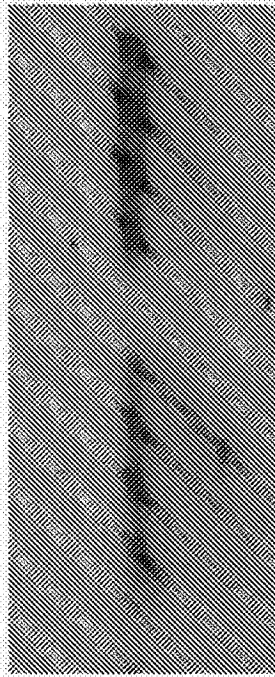


图19



A B

A: miR-21 阴性对照 50nM
B: miR-21 抑制剂 50nM

用 50nM 的阴性对照 (HiPerfect 介质) 或 miR-21 抑制剂转染 PC9 (PI5) 细胞。48 小时后, 收获细胞并通过 Western 印迹用 MARCKS 抗体来分析蛋白。

miR-21 抑制剂在 PC-9 细胞中使 MARCKS 蛋白表达增加了 ~2.5 倍

图 20

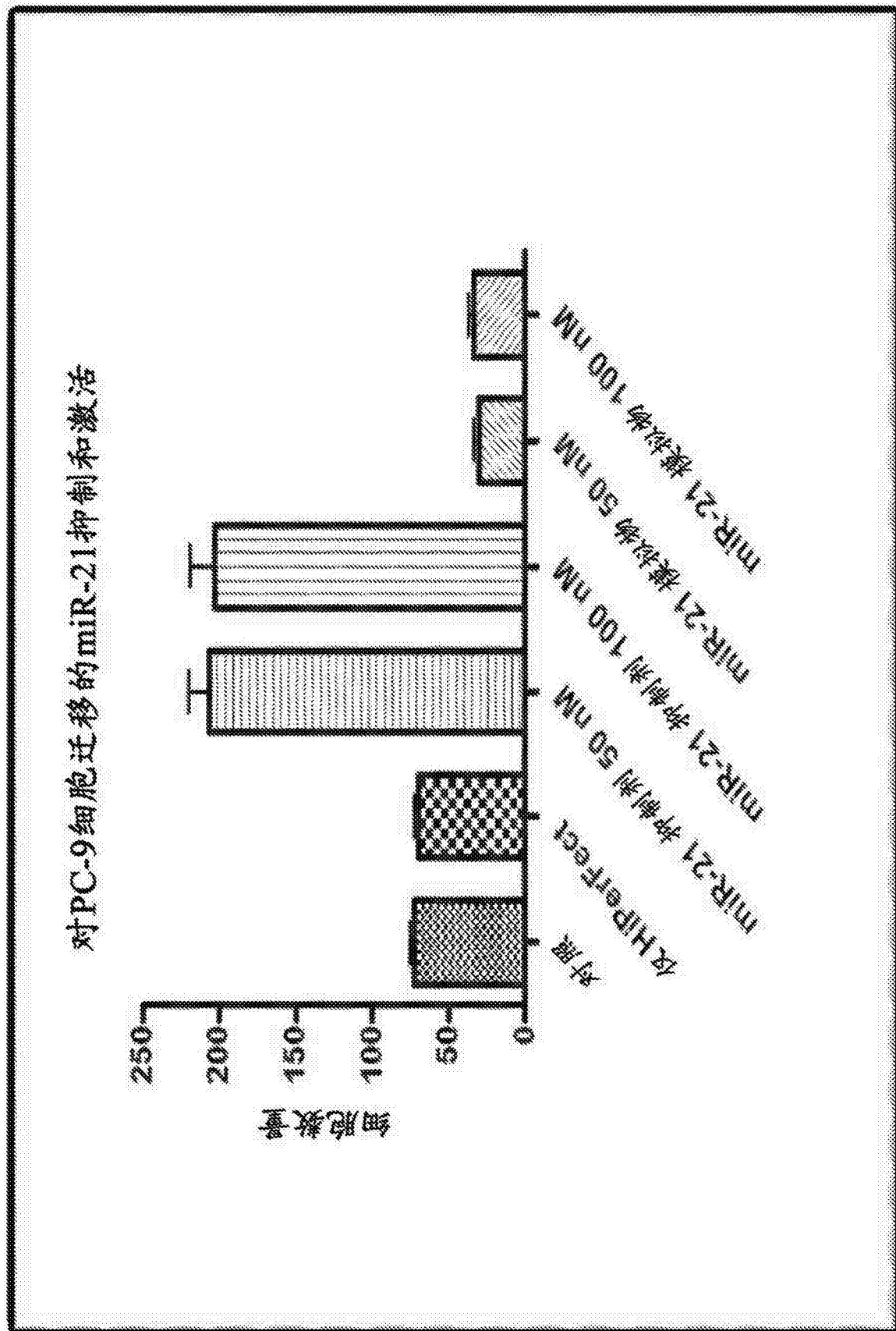


图21