



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102482334 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 30

(21) 申请号 201080018313. X

C07H 21/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 03. 11

C12P 21/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/159, 322 2009. 03. 11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 10. 26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/027041 2010. 03. 11

(87) PCT申请的公布数据

W02010/105097 EN 2010. 09. 16

(71) 申请人 阿布拉西斯生物科学有限责任公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 V·德留 D·瑙尔 N·德赛

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

(51) Int. Cl.

C07K 14/435 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 22 页

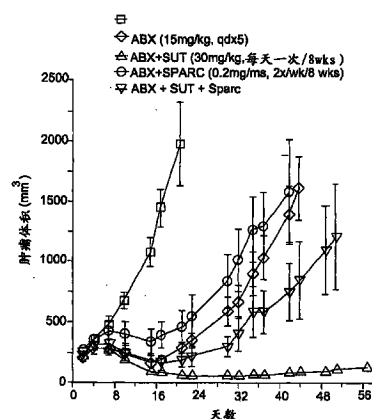
序列表 2 页 附图 4 页

(54) 发明名称

SPARC 血管发生结构域及使用方法

(57) 摘要

本发明提供了利用 SPARC 羧基末端血管发生结构域的发现的组合物和方法。



1. 一种分离的多肽,其包含 SEQ ID NO :1 的序列。
2. 权利要求 1 的分离的多肽,其具有额外的添加至羧基和 / 或氨基末端的至多 15 个氨基酸。
3. 权利要求 1 的分离的多肽,其有至多 5 个非保守氨基酸变化且保留 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的至少 60%。
4. 一种分离的多肽,其包含与 SEQ ID NO :1 有 90% 相同的序列且保留 SEQ ID NO :1 所示多肽的血管发生活性的至少 60%。
5. 一种分离的多核苷酸,其包含编码权利要求 1-4 任一多肽的核酸序列。
6. 一种表达载体,其用于表达权利要求 5 的核酸序列。
7. 一种转化的细胞,其包含权利要求 5 的多核苷酸且表达权利要求 1-4 任一多肽。
8. 一种用于在需要血管发生的动物中刺激血管发生的方法,包括施用治疗有效量的包含 SEQ ID NO :1 所示序列的纯化多肽。
9. 权利要求 8 的方法,其中所述多肽具有额外的添加至羧基和 / 或氨基末端的至多 15 个氨基酸。
10. 权利要求 8 的方法,其中所述纯化多肽有至多 5 个非保守氨基酸变化且保留 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的至少 60%。
11. 权利要求 8 的方法,其中所述纯化多肽包含与 SEQ ID NO :1 有 90% 相同的序列且保留 SEQ ID NO :1 所示多肽的血管发生活性的至少 60%。
12. 权利要求 8-11 任一项的方法,其中所述动物因局部缺血或灌注不足而需要血管发生。
13. 权利要求 12 的方法,其中所述局部缺血或灌注不足是心肌缺血、中风、TIA、四肢灌注不足、再狭窄或动脉粥样硬化。
14. 一种分离的 SPARC 多肽,其包含 SEQ ID NO :2。
15. 一种分离的、羧基末端截短的 SPARC 多肽,其是酶促消化全长 SPARC 多肽的羧基末端的产物,并且其保留 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的不超过 5%。
16. 一种分离的、带表位标签的、羧基末端截短的 SPARC 多肽,其是酶促消化全长 SPARC 多肽的羧基末端的产物,并且其保留 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的不超过 5%。
17. 权利要求 14 的分离的多肽,其具有额外的、添加至羧基和 / 或氨基末端的至多 15 个氨基酸。
18. 一种分离的多核苷酸,其包含编码包含 SEQ ID NO :2 的多肽的核酸序列。
19. 一种表达载体,其用于表达权利要求 18 的任一核酸序列。
20. 一种转化的细胞,其包含权利要求 18 的任一核酸序列。
21. 一种在动物中治疗肿瘤的方法,包括施用治疗有效量的权利要求 14-16 的任何一种或多种 SPARC 多肽。
22. 一种用于在动物中使肿瘤致敏的方法,包括施用治疗有效量的权利要求 14-16 的任何一种或多种 SPARC 多肽和非 SPARC 疗法。
23. 权利要求 21 或 22 的方法,其中所述肿瘤选自下组:口腔肿瘤,咽肿瘤,消化系统肿瘤,呼吸系统肿瘤,骨肿瘤,软骨肿瘤,骨转移,肉瘤,皮肤肿瘤,黑素瘤,乳腺肿瘤,生殖系统肿瘤,泌尿道肿瘤,眶肿瘤,脑和中枢神经系统肿瘤,胶质瘤,内分泌系统肿瘤,甲状腺肿瘤,

食管肿瘤,胃肿瘤,小肠肿瘤,结肠肿瘤,直肠肿瘤,肛门肿瘤,肝肿瘤,胆囊肿瘤,胰肿瘤,喉肿瘤,肺肿瘤,支气管肿瘤,非小细胞肺癌,小细胞肺癌,子宫颈肿瘤,子宫体肿瘤,卵巢肿瘤,外阴肿瘤,阴道肿瘤,前列腺肿瘤,前列腺癌,睾丸肿瘤,阴茎肿瘤,膀胱肿瘤,肾肿瘤,肾盂肿瘤,输尿管肿瘤,头颈肿瘤,甲状旁腺癌,何杰金氏病,非何杰金氏淋巴瘤,多发性骨髓瘤,白血病,急性淋巴细胞性白血病,慢性淋巴细胞性白血病,急性髓样白血病,慢性髓样白血病。

24. 权利要求 21 或 22 的方法,其中所述非 SPARC 疗法是化疗、辐射或生物学方案中的一种或多种。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述非 SPARC 疗法包含多西他赛、帕利他赛、紫杉烷、铂化合物、抗叶酸剂、抗代谢剂、抗有丝分裂剂、DNA 损害剂、促凋亡剂、分化诱导剂、抗血管发生剂、抗生素、激素、肽、抗体及其组合中的一种或多种。

26. 一种鉴定血管发生抑制剂的方法,包括:

- a. 对血管发生模型系统施用有效量的权利要求 1-4 任一项的组合物;
- b. 对血管发生模型系统分开地同时施用候选血管发生抑制剂和权利要求 1-4 任一项的组合物;
- c. 对 (a) 和 (b) 中产生的血管发生的量定量;和
- d. 如果 (b) 中的血管发生与 (a) 相比降低的话,则将该候选血管发生抑制剂鉴定为血管发生抑制剂。

27. 权利要求 3、4、10、15、16 或 26 中任一项的方法,其中所述血管发生模型系统是 HUVEC 管形成测定法。

28. 权利要求 8-13 和 21-25 中任一项的方法,其中所述动物是人。

29. 权利要求 1 的分离的多肽,其有至多 5 个保守氨基酸变化且保留 SEQ ID NO:1 的血管发生活性的至少 60%。

30. 权利要求 8 的方法,其中所述纯化多肽有至多 5 个保守氨基酸变化且保留 SEQ ID NO:1 的血管发生活性的至少 60%。

31. 权利要求 14 的分离的多肽,其有至多 5 个非保守氨基酸变化且保留 SEQ ID NO:1 的血管发生活性的不超过 5%。

32. 权利要求 14 的分离的多肽,其有至多 5 个保守氨基酸变化且保留 SEQ ID NO:1 的血管发生活性的不超过 5%。

SPARC 血管发生结构域及使用方法

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求 2009 年 3 月 11 日提交的美国临时专利申请号 61/159,322 的权益。

[0003] 发明背景

[0004] 酸性的富含半胱氨酸的分泌蛋白 (Secreted Protein, Acidic, Rich in Cysteines, SPARC) 也被称作骨粘连蛋白 (osteonectin), 是 286 个氨基酸的糖蛋白。SPARC 对多种配体具有亲和力, 包括阳离子 (例如 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+})、生长因子 (例如血小板衍生生长因子 (PDGF) 和血管内皮生长因子 (VEGF))、胞外基质 (ECM) 蛋白 (例如胶原 I-V 和胶原 IX、玻连蛋白、和血小板反应蛋白-1)、内皮细胞、血小板、白蛋白和羟基磷灰石。SPARC 表达在发育上受到调控, 主要在正常发育期间或响应于损伤而发生重塑的组织中表达 (参见例如 Lane 等人, FASEBJ., 8, 163-173 (1994))。在发育中的骨和牙齿中高水平表达 SPARC 蛋白。

[0005] SPARC 在几种侵袭性癌症中上调, 但是在绝大多数正常组织中缺失 (Porter 等人, J. Histochem. Cytochem., 43, 791 (1995) 及见下文)。SPARC 表达在多种肿瘤中受到诱导 (例如膀胱、肝、卵巢、肾、肠、和乳腺)。例如, 在膀胱癌中, SPARC 表达与晚期癌有关。显示了 T2 期或更晚期的侵入性膀胱肿瘤比 T1 期的膀胱肿瘤 (或不太浅表的肿瘤) 表达更高水平的 SPARC, 而且具有更差的预后 (参见例如 Yamanaka 等人, J. Urology, 166, 2495-2499 (2001))。在脑膜瘤中, SPARC 表达只与侵入性肿瘤有关 (参见例如 Rempel 等人, Clinical Cancer Res., 5, 237-241 (1999))。还在 74.5% 的原位侵入性乳腺癌损害 (参见例如 Bellahcene 等人, Am. J. Pathol., 146, 95-100 (1995)) 和 54.2% 的浸润性乳腺导管癌 (参见例如 Kim 等人, J. Korean Med. Sci., 13, 652-657 (1998)) 中检测出 SPARC 表达。SPARC 表达还与乳腺癌中频繁的微钙化有关 (参见例如 Bellahcene 等人, 见上文), 提示 SPARC 表达可能负责乳腺转移对骨的亲和力。还知道 SPARC 结合白蛋白 (参见例如 Schnitzer, J. Biol. Chem., 269, 6072 (1994))。

[0006] 因此, 需要利用 SPARC 在疾病中的作用, 例如 SPARC 在一些癌症中的作用的组合物和方法。特别地, 需要利用 SPARC 结构域特异性活性, 诸如 SPARC 羧基末端血管发生结构域的组合物和方法。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供了包含 SEQ ID NO:1 所示序列的分离的多肽, 其包含分离的 SPARC 血管发生结构域。另外, 本发明提供了分离的多肽, 其包含 SEQ ID NO:1 的序列, 其中有至多 5 个保守氨基酸变化或与 SEQ ID NO:1 有 90% 相同, 并且其中突变的分离的 SPARC 多肽保留 SEQ ID NO:1 的血管发生活性的至少 60%。

[0009] 本发明还提供了分离的多肽, 其包含 SEQ ID NO:1 的序列, 其中有至多 5 个非保守氨基酸变化, 并且其中所述突变的分离的 SPARC 多肽保留 SEQ ID NO:1 的血管发生活性的至少 60%。

[0010] 本发明还提供了用于在需要血管发生的动物中刺激血管发生的方法, 包括施用治

疗有效量的包含 SEQ ID NO :1 所示序列的纯化多肽和 / 或包含 SEQ ID NO :1 的突变序列的分离多肽,其中有至多 5 个保守氨基酸变化或与 SEQ ID NO :1 有 90% 相同,并且其中所述突变的分离的 SPARC 多肽保留 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的至少 60%。

[0011] 本发明还提供了用于在需要血管发生的动物中刺激血管发生的方法,包括施用治疗有效量的包含 SEQ ID NO :1 所示序列的纯化多肽和 / 或包含 SEQ ID NO :1 的突变序列的分离多肽,其中有至多 5 个非保守氨基酸变化,并且其中所述突变的分离的 SPARC 多肽保留 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的至少 60%。

[0012] 本发明提供了包含 SEQ ID NO :2 的分离的多肽,包括缺失 SEQ ID NO :1 的连续氨基酸的成熟 SPARC 多肽和分离的、羧基末端截短的 SPARC 多肽,其是酶促消化全长 SPARC 多肽的羧基末端的产物且保留 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的不超过 5%。

[0013] 本发明提供了在动物中治疗肿瘤的方法,包括施用治疗有效量的任何一种或多种缺失血管发生活性的 SPARC 多肽,包括例如分离的、羧基末端截短的 SPARC 多肽,其是酶促消化全长 SPARC 多肽的羧基末端的产物且保留本文中公开的 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的不超过 5%,特别是 SEQ ID NO :2。

[0014] 本发明还提供了用于在动物中使肿瘤致敏的方法,包括施用治疗有效量的任何一种或多种缺少血管发生活性的 SPARC 多肽和非 SPARC 疗法,该多肽包括分离的、羧基末端截短的 SPARC 多肽,其是酶促消化全长 SPARC 多肽的羧基末端的产物且保留本文中公开的 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的不超过 5%,特别是 SEQ ID NO :2。

[0015] 本发明还提供了鉴定血管发生抑制剂的方法,包括:(a) 对血管发生模型系统施用有效量的组合物,其包含 SEQ ID NO :1 的序列或包含 SEQ ID NO :1 的序列的突变形式,其中有至多 5 个保守氨基酸变化或与 SEQ ID NO :1 有 90% 相同,并且其中任一形式突变的分离多肽保留 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的至少 60%;(b) 对血管发生模型系统分开地同时施用候选血管发生抑制剂和 (a) 的组合物;(c) 对 (a) 和 (b) 中产生的血管发生的量定量;和 (d) 如果 (b) 中的血管发生与 (a) 相比降低的话,则将该候选血管发生抑制剂鉴定为血管发生抑制剂。

[0016] 本发明还提供了鉴定血管发生抑制剂的方法,包括:(a) 对血管发生模型系统施用有效量的组合物,其包含 SEQ ID NO :1 的序列或包含 SEQ ID NO :1 的序列的突变形式,其中有至多 5 个非保守氨基酸变化且其中任一形式突变的分离多肽保留 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的至少 60%;(b) 对血管发生模型系统分开地同时施用候选血管发生抑制剂和 (a) 的组合物;(c) 对 (a) 和 (b) 中产生的血管发生的量定量;并 (d) 如果 (b) 中的血管发生与 (a) 相比降低的话,则将该候选血管发生抑制剂鉴定为血管发生抑制剂。

附图说明

[0017] 图 1 描绘了数据的图示,证明在 PC3 模型中与 Abraxane 和 Sutent 一起施用外源 SPARC 的效果。

[0018] 图 2 描绘了来自 HUVEC 3-D 管形成测定法的结果,表征 SPARC 的血管发生活性。

[0019] 图 3 描绘了 SDS-PAGE 测定法的结果,其中在 SPARC-d(两种 C 端截短的 SPARC 蛋白的混合物)旁边走野生型 SPARC。

[0020] 图 4 描绘了自 HUVEC 3-D 管形成测定法获得的数据的图示,表征野生型 SPARC 和

SPARC-d。

[0021] 发明详述

[0022] 令人惊讶的是,确定了 SPARC 多肽的促血管发生活性位于成熟 SPARC 多肽的氨基酸 233-286 (SEQ ID NO :1)。先前报告此活性在 SPARC 的 N 端区中 (Sage H. Adv Dent Res. 19959 (3 Suppl) :5)。既然 SPARC 的促凋亡区更靠近氨基末端,那么此发现提示缺乏羧基末端血管发生结构域的 SPARC 多肽 (例如 SEQ ID NO :2) 可能具有比全长成熟 SPARC 多肽更高的对 SPARC 依赖性疾病诸如例如肿瘤的活性。另外,虽然不希望受任何特定理论束缚,既然血管发生是肿瘤生长所必需的,那么有可能没有末端血管发生结构域的 SPARC (SEQ ID NO :2) 可与全长野生型 SAPRC 竞争并消除其体内活性。

[0023] 本发明提供了分离的 SEQ ID NO :1 或 2 的多肽,其具有额外的、添加在羧基和 / 或氨基末端的至多 15 个氨基酸、优选至多 12 个氨基酸、更优选至多 10 个氨基酸、更优选至多 8 个氨基酸、更优选至多 5 个氨基酸、更优选至多 4 个氨基酸、更优选至多 3 个氨基酸、更优选至多 2 个氨基酸、和最优选 1 个氨基酸。

[0024] 本发明提供了分离的 SEQ ID NO :1 的多肽,其有至多 5 个保守氨基酸变化、优选至多 4 个保守氨基酸变化、更优选至多 3 个保守氨基酸变化、更优选至多 2 个保守氨基酸变化、更优选 1 个保守氨基酸变化,并且保留 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的至少 60%、优选至少 50%、更优选至少 40%、和最优选至少 30%。

[0025] 本发明还提供了分离的 SEQ ID NO :1 的多肽,其有至多 5 个非保守氨基酸变化、优选至多 4 个非保守氨基酸变化、更优选至多 3 个非保守氨基酸变化、更优选至多 2 个非保守氨基酸变化、更优选 1 个非保守氨基酸变化,并且保留 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的至少 60%、优选至少 50%、更优选至少 40%、和最优选至少 30%。

[0026] 本发明提供了分离的多肽,其与 SEQ ID NO :1 至少 90% 相同、优选与 SEQ ID NO :1 至少 85% 相同、更优选与 SEQ ID NO :1 至少 80% 相同、更优选与 SEQ ID NO :1 至少 75% 相同、更优选与 SEQ ID NO :1 至少 70% 相同,并且保留 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的至少 60%、优选至少 50%、更优选至少 40%、和最优选至少 30%。

[0027] 本发明包括分离的多核苷酸,其包含编码本文所述发明的任一 SPARC 多肽 (包括 SEQ ID NO :1 和 2 及其本文中公开的突变体) 的核酸序列;用于表达此类核酸序列的表达载体;和包含此类多核苷酸的转化细胞。

[0028] 本发明提供了用于在需要血管发生的动物中刺激血管发生的方法,包括施用治疗有效量的分离的多核苷酸,其编码包含 SEQ ID NO :1 的序列的多肽。本发明提供了用于在动物中治疗和预防 SPARC 依赖性疾病的方法,包括施用治疗有效量的分离的多核苷酸,其编码包含 SEQ ID NO :2 的序列的多肽。

[0029] 本发明提供了用于在需要血管发生的动物中刺激血管发生的方法,包括施用治疗有效量的纯化多肽,其包含 SEQ ID NO :1 的序列或其依照本发明和 / 或本文中描述的突变体。因而,本发明提供了治疗病理性灌注不足 (诸如再狭窄、动脉粥样硬化、和四肢灌注不足) 及缺血 (包括例如其中缺血为心肌缺血和中风) 的方法。

[0030] 本发明提供了分离的 SPARC 多肽,其包含 SEQ ID NO :2,即缺乏 SEQ ID NO :1 的连续氨基酸的成熟 SPARC 多肽。本发明提供了分离的 SPARC 多肽,包括带表位标签的多肽,其是羧基末端截短的,即作为酶促消化全长 SPARC 多肽羧基末端的产物且保留 SEQ ID NO :1

的血管发生活性的不超过5%、优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过3%、更优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过1%、最优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过1%的SPARC多肽。

[0031] 羧基末端消化可通过任何合适方法来进行,包括酶促和化学消化。例如,普通技术人员为此目的可常规采用丝氨酸羧肽酶、溶酶体Pro-X羧肽酶、羧肽酶c、羧肽酶D、半胱氨酸型羧肽酶、金属外肽酶等等。还可参见Nakazawa T等人, Terminal proteomics :N-and C-terminal analyses for high-fidelity identification of proteins using MS., Proteomics. 2008 Feb ;8(4) :673-85,通过引用方式并入本文。

[0032] 本发明提供了分离的SEQ ID NO:2的多肽,其有至多5个保守氨基酸变化、优选至多4个保守氨基酸变化、更优选至多3个保守氨基酸变化、更优选至多2个保守氨基酸变化、更优选1个保守氨基酸变化,并且保留SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过5%、优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过3%、更优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过1%、最优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过1%。

[0033] 本发明还提供了分离的SEQ ID NO:2的多肽,其有至多5个非保守氨基酸变化、优选至多4个非保守氨基酸变化、更优选至多3个非保守氨基酸变化、更优选至多2个非保守氨基酸变化、更优选1个非保守氨基酸变化,并且保留SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过5%、优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过3%、更优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过1%、最优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过1%。

[0034] 本发明提供了分离的多肽,其与SEQ ID NO:2至少90%相同、优选与SEQ ID NO:2至少85%相同、更优选与SEQ ID NO:2至少80%相同、更优选与SEQ ID NO:2至少75%相同、更优选与SEQ ID NO:2至少70%相同,并且保留SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过5%、优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过3%、更优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过1%、最优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过1%。

[0035] 本发明提供了在动物中治疗肿瘤的方法,包括施用治疗有效量的任何一种或多种分离的SEQ ID NO:2的多肽,其有至多5个保守氨基酸变化、优选至多4个保守氨基酸变化、更优选至多3个保守氨基酸变化、更优选至多2个保守氨基酸变化、更优选1个保守氨基酸变化,并且保留SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过5%、优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过3%、更优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过1%、最优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过1%。

[0036] 本发明提供了在动物中治疗肿瘤的方法,包括施用治疗有效量的任何一种或多种分离的SEQ ID NO:2的多肽,其有至多5个非保守氨基酸变化、优选至多4个非保守氨基酸变化、更优选至多3个非保守氨基酸变化、更优选至多2个非保守氨基酸变化、更优选1个非保守氨基酸变化,并且保留SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过5%、优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过3%、更优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过1%、最优选SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过1%。

[0037] 本发明提供了在动物中使肿瘤致敏的方法,包括施用治疗有效量的任何一种或多种分离的SEQ ID NO:2的多肽和非SPARC疗法,该多肽有至多5个保守氨基酸变化、优选至多4个保守氨基酸变化、更优选至多3个保守氨基酸变化、更优选至多2个保守氨基酸变化、更优选1个保守氨基酸变化,并且保留SEQ ID NO:1的血管发生活性的不超过5%、优

选 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的不超过 3%、更优选 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的不超过 1%、最优选 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的不超过 1%。

[0038] 本发明提供了在动物中使肿瘤致敏的方法,包括施用治疗有效量的任何一种或多种分离的 SEQ ID NO :2 的多肽和非 SPARC 疗法,该多肽有至多 5 个非保守氨基酸变化、优选至多 4 个非保守氨基酸变化、更优选至多 3 个非保守氨基酸变化、更优选至多 2 个非保守氨基酸变化、更优选 1 个非保守氨基酸变化,并且保留 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的不超过 5%、优选 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的不超过 3%、更优选 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的不超过 1%、最优选 SEQ ID NO :1 的血管发生活性的不超过 1%。

[0039] 本发明还提供了肿瘤或癌症以外的增殖性疾病的治疗或致敏,用治疗有效量的任何一种或多种分离的 SEQ ID NO :2 或其本文中描述的突变体的多肽进行。适合治疗的增殖性疾病有肥厚性瘢痕和瘢痕疙瘩、增殖性糖尿病性视网膜病、类风湿性关节炎、动静脉畸形、动脉粥样硬化斑、伤口愈合迟缓、血友病性关节、不连接的骨折、Osler-Weber 综合征、银屑病、脓性肉芽肿、硬皮病、tracoma、月经过多、血管粘连和再狭窄。

[0040] 本发明提供了在动物中治疗肿瘤或使肿瘤致敏的方法,其中所述肿瘤选自下组:口腔肿瘤,咽肿瘤,消化系统肿瘤,呼吸系统肿瘤,骨肿瘤,软骨肿瘤,骨转移,肉瘤,皮肤肿瘤,黑素瘤,乳腺肿瘤,生殖系统肿瘤,泌尿道肿瘤,眶肿瘤,脑和中枢神经系统肿瘤,胶质瘤,内分泌系统肿瘤,甲状腺肿瘤,食管肿瘤,胃肿瘤,小肠肿瘤,结肠肿瘤,直肠肿瘤,肛门肿瘤,肝肿瘤,胆囊肿瘤,胰肿瘤,喉肿瘤,肺肿瘤,支气管肿瘤,非小细胞肺癌,小细胞肺癌,子宫颈肿瘤,子宫体肿瘤,卵巢肿瘤,外阴肿瘤,阴道肿瘤,前列腺肿瘤,前列腺癌,睾丸肿瘤,阴茎肿瘤,膀胱肿瘤,肾肿瘤,肾盂肿瘤,输尿管肿瘤,头颈肿瘤,甲状旁腺癌,何杰金(Hodgkin) 氏病,非何杰金氏淋巴瘤,多发性骨髓瘤,白血病,急性淋巴细胞性白血病,慢性淋巴细胞性白血病,急性髓样白血病,慢性髓样白血病。

[0041] 本发明提供了在动物中使肿瘤致敏的方法,其中所述非 SPARC 疗法是化疗、辐射或生物学方案中的一种或多种,包括例如其中所述非 SPARC 疗法包含多西他赛、帕利他赛、紫杉烷、铂化合物、抗叶酸剂、抗代谢剂、抗有丝分裂剂、DNA 损害剂、促凋亡剂、分化诱导剂、抗血管发生剂、抗生素、激素、肽、抗体及其组合中的一种或多种。

[0042] 本发明提供了鉴定血管发生抑制剂的方法,包括:(a) 对血管发生模型系统施用有效量的 SEQ ID NO :1 或其突变体中任一者的组合物;(b) 对血管发生模型系统分开地同时施用候选血管发生抑制剂和权利要求 1-4 任一项的组合物;(c) 对 (a) 和 (b) 中产生的血管发生的量定量;并 (d) 如果 (b) 中的血管发生与 (a) 相比降低的话,则将该候选血管发生抑制剂鉴定为真实的血管发生抑制剂。任何合适的血管发生模型系统均可依照本发明使用,包括例如其中所述血管发生模型系统是 HUVEC 管形成测定法。

[0043] 如本文中使用的,“药物”为可以对患者或测试受试者施用,能够产生效果的组合物。所述效果可以是化学的、生物学的或物理的,而且所述患者或测试受试者可以是人或非人动物,诸如啮齿动物或转基因小鼠。所述组合物可以包括合成制备的、在自然界中找到的、或部分合成起源的,具有独特分子组成的有机或无机小分子。此组包括核苷酸、核酸、氨基酸、肽、多肽、蛋白质、肽核酸或包含这些实体中至少一种的复合物。所述药物可以由单独的或与药学可接受赋形剂组合的有效组合物构成。

[0044] 如本文中使用的,“药学可接受赋形剂”包括生理相容的任何和所有溶剂、分散介

质、涂层、抗菌剂、抗微生物剂或抗真菌剂、等张和吸收延迟剂等等。所述赋形剂可以适合于静脉内、腹膜内、肌肉内、鞘内或口服施用。所述赋形剂可以包括无菌水溶液或分散体，供临场制备无菌可注射溶液或分散体。使用此类介质制备药物是本领域已知的。

[0045] 如本文中使用的，药物的“药学有效量”或“有效量”指使用一定量的以如下浓度存在的药物，该浓度使得在使用药物的期限里递送了治疗水平的药物。这可取决于递送模式、给药的时间段、接受药物的受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食。确定什么剂量是“药学有效量”需要常规优化，这在本领域普通技术人员的能力之内。

[0046] 如本文中使用的，术语“癌症”或“肿瘤”指由对正常生长控制丧失了易感性的细胞的增殖引起或以其为特征的增殖性病症。如本申请中使用的，术语癌症包括肿瘤和任何其它增殖性病症。相同组织类型的癌症通常源自相同组织，而且可以根据它们的生物学特征分成不同亚型。癌症的四大类别是癌（上皮组织衍生的）、肉瘤（结缔组织或中胚层衍生的）、白血病（血液形成组织衍生的）和淋巴瘤（淋巴组织衍生的）。已知道超过 200 种不同类型的癌症，而且可以影响身体的每种器官和组织。癌症的具体例子（这不限制癌症的定义）可以包括黑素瘤、白血病、星形细胞瘤、成胶质细胞瘤、成视网膜细胞瘤、淋巴瘤、胶质瘤、何杰金氏淋巴瘤和慢性淋巴细胞性白血病。各种癌症可以影响的器官和组织的例子包括胰腺、乳腺、甲状腺、卵巢、子宫、睾丸、前列腺、甲状腺、脑垂体、肾上腺、肾、胃、食管、结肠或直肠、头和颈、骨、神经系统、皮肤、血液、鼻咽组织、肺、泌尿道、宫颈、阴道、外分泌腺和内分泌腺。或者，癌症可以是多中心的或原发位点未知的（CUPS）。

[0047] 如本文中使用的，“癌性细胞”指经历了转化事件且其生长不再以与所述转化事件之前相同的程度受调控的细胞。肿瘤指癌性细胞的集合，常常作为固态或半固态块在组织或患者或测试受试者中或上看到。

[0048] 具有病理性灌注不足的疾病或状况可以依照本发明来治疗，其中对动物诸如人施用有效量的一种或多种包含 SEQ ID NO:1 的多肽。适合于依照本发明治疗的灌注不足疾病或状况包括：心肌缺血，心肌梗死，糖尿病，神经病，ALS，口腔溃疡，胃溃疡，再狭窄，中风，TIA，先兆子痫等等（关于别的合适的疾病和状况还可参见 Carmeliet, Angiogenesis in health and disease, Nature Medicine 9,653-660(2003), 通过引用方式并入本文）。

[0049] 具有扩大的血管发生的疾病（特别是如果 SPARC 依赖性的话）可以依照本发明来治疗，其中对动物诸如人施用有效量的例如一种或多种靶向 SPARC 血管发生结构域的抗体或其它抗 SPARC 疗法。适合于依照本发明治疗的具有扩大的血管发生的疾病包括：癌症，肿瘤，血管瘤，子宫内膜异位，糖尿病性视网膜病，早产儿视网膜病，银屑病，关节炎，脓性肉芽肿，血管免疫母细胞性淋巴结病，牙周病，等等（关于别的合适的疾病和状况还可参见 Carmeliet, Angiogenesis in health and disease, Nature Medicine 9,653-660(2003), 通过引用方式并入本文）。

[0050] 具有扩大的伤口愈合和重塑的疾病（特别是若为 SPARC 依赖性的话）可以依照本发明来治疗，其中对动物诸如人施用有效量的一种或多种靶向 SPARC 血管发生结构域的抗体或其它抗 SPARC 疗法。适合于依照本发明治疗的具有扩大的伤口愈合和重塑的疾病包括：瘢痕疙瘩，肥厚性瘢痕，肺纤维化，等等（关于别的合适的疾病和状况还可参见 Carmeliet, Angiogenesis in health and disease, Nature Medicine 9,653-660(2003), 通过引用方式并入本文）。

[0051] 基于给定治疗方案或化疗剂杀死癌细胞或缩小肿瘤尺寸、降低总体癌症生长（即经由降低血管发生）、和 / 或抑制转移的能力，癌症或癌性细胞可以描述成对该给定治疗方案或化疗剂“敏感的”或“抗性的”。对治疗方案有抗性的癌细胞可对该方案没有响应，而且可继续增殖。对治疗方案敏感的癌细胞可对该方案有响应，导致细胞死亡、肿瘤尺寸缩小、总体生长（肿瘤负荷）降低或抑制转移。例如，这理想地可表现为肿瘤尺寸、总体生长 / 肿瘤负荷或转移发生率降低约 10% 或更多、例如约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、或更多、至约 2 倍、约 3 倍、约 4 倍、约 5 倍、约 10 倍、约 15 倍、约 20 倍或更多。监测响应可通过本文中描述的和本领域技术人员知道的众多病理、临床和成像方法来实现。

[0052] 化疗剂或药剂组合的一个共同主题是诱导癌性细胞死亡。例如，DNA 加合物诸如亚硝基脲、白消安、塞替派、苯丁酸氮芥、顺铂、丝裂霉素、丙卡巴肼、或达卡巴嗪通过迫使正在复制的细胞在细胞周期的 M 期之前修复受损的 DNA 来减缓癌性细胞的生长，或可自己引起足够的损伤来触发癌性细胞的凋亡。其它事件诸如例如基因表达或转录、蛋白质翻译、或复制 DNA 的甲基化也可用临床医生可用的不同化疗剂集成来干预并帮助触发癌性细胞内的凋亡过程。或者，化疗剂可使癌性细胞能够被患者或测试受试者的体液或获得性免疫系统的一些方面例如补体级联或淋巴细胞攻击杀死。

[0053] 虽然不希望受任何具体理论束缚，对化疗剂或药剂组合有抗性的癌性细胞可通过积极将药物转运出细胞外而为存活而战，例如通过过表达 ABC 转运蛋白 MDR1 p- 糖蛋白 (FORD 等人 1993. Cytotechnol. 12 :171-212) 或获取“对抗突变”来抵消药物。例如，DNA 修复酶中影响检测对细胞 DNA 之损害的能力的突变可使得受损 DNA 能够复制并容许癌性细胞继续复制，扩大肿瘤。随突变积累，会在正常细胞周期中以其它方式起作用的其它调控点停止发挥功能，而且失调生长周期继续。化疗抗性的另一个方面涉及肿瘤细胞对凋亡的规避。宿主生物体对失调细胞生长的正常响应是在进入失控复制的级联开始之前启动凋亡和清除缺陷细胞。然而，这可被癌性细胞破坏，例如通过破坏信号转导事件、丧失癌性细胞中的粘附依赖性 or 接触抑制、或丧失凋亡促进因子（常常认定为“肿瘤抑制基因”，例如 p53、BRCA1 或 RB）。这种对凋亡的敏感性在癌症治疗中的重要性得到了最新证据的支持，其指示化疗对仅仅通过药物就治愈的相对较少肿瘤的选择性在很大程度上依赖于它们容易经历凋亡的易感性 (Johnstone 等人, 2002. Cell. 108 (2) :153-64)。

[0054] 如本文中使用的，“治疗方案”或“疗法”指施用至少一种对癌性细胞有害的药剂。适合于依照本发明使用的治疗方案包括但不限于“化疗方案”、“放疗方案”、“备选治疗方案”及其组合。

[0055] 如本文中使用的，“化疗方案”或“化疗”指施用至少一种对癌性细胞有害，从而破坏癌性细胞的化疗剂。临床医生有无数的此类化疗剂可用。化疗剂可以以单次推注剂量施用于受试者，或者可以以更小剂量随时间施用。可使用单一化疗剂（单药疗法），或者可组合使用超过一种药剂（组合疗法）。可单独使用化疗来治疗一些类型的癌症。或者，化疗可以与其它类型的治疗组合使用，例如本文中描述的放疗或备选疗法（例如免疫疗法）。另外，可以与化疗剂一起施用化学致敏剂作为组合疗法。

[0056] 如本文中使用的，“化疗剂”指可用于治疗癌症，且一般具有直接杀死癌性细胞的能力的药物。化疗剂的例子包括烷化剂、抗代谢剂、天然产物、激素和拮抗剂、和各类药剂。别名的例子包括在括号中。烷化剂的例子包括氮芥诸如双氯乙基甲胺、环磷酰胺、异环磷酰胺

胺、美法仑 (L- 溶肉瘤素) 和苯丁酸氮芥;乙撑亚胺和甲基蜜胺诸如六甲蜜胺和塞替派;烃基磺酸酯诸如白消安;亚硝基脲诸如卡莫司汀 (BCNU)、司莫司汀 (甲基-CCNU)、洛莫司汀 (CCNU) 和链佐星 (链唑霉素);DNA 合成拮抗剂诸如磷酸雌莫司汀;和三嗪类诸如达卡巴嗪 (DTIC、二甲三氮咪唑酰胺) 和替莫唑胺。抗代谢剂的例子包括叶酸类似物诸如甲氨蝶呤 (氨甲蝶呤);嘧啶类似物诸如氟尿苷 (5- 氟尿嘧啶、5-FU、5FU)、去氧氟尿苷 (氟尿嘧啶脱氧核苷、FUDr)、赛得萨 (阿糖胞苷) 和吉西他滨;嘌呤类似物诸如巯基嘌呤 (6- 巯基嘌呤、6-MP)、硫鸟嘌呤 (6- 硫鸟嘌呤、TG) 和喷司他丁 (2' - 脱氧柯福霉素、脱氧柯福霉素)、克拉屈滨和氟达拉滨;和拓扑异构酶抑制剂诸如安吡啶。天然产物的例子包括长春花生物碱诸如长春碱 (VLB) 和长春新碱;紫杉烷诸如帕利他赛和多西他赛 (泰索帝);表鬼臼毒素诸如依托泊苷和替尼泊苷;喜树碱诸如托泊替康和伊立替康;抗生素诸如更生霉素 (放线菌素 D)、柔红霉素 (道诺霉素、红比霉素)、多柔比星、博来霉素、丝裂霉素 (丝裂霉素 C)、伊达比星、表柔比星;酶诸如 L- 天冬酰胺酶;和生物反应修饰剂诸如干扰素 α 和白介素 2。激素和拮抗剂的例子包括黄体化释放激素激动剂诸如布舍瑞林;肾上腺皮质类固醇诸如泼尼松及相关制剂;妊娠素诸如己酸羟孕酮、乙酸甲羟孕酮和乙酸甲地孕酮;雌激素诸如二乙基己烯雌酚和乙炔基雌二醇及相关制剂;雌激素拮抗剂诸如他莫昔芬和阿那曲唑;雄激素诸如丙酸睾酮和氟甲睾酮及相关制剂;雄激素拮抗剂诸如氟他胺和比卡鲁胺;及促性腺激素释放激素类似物诸如亮丙瑞林。各色药剂的例子包括沙利度胺;铂配位复合物诸如顺铂 (顺式-DDP)、奥沙利铂和卡铂;蒽二酮诸如米托蒽醌;取代的脲诸如羟基脲;甲胍衍生物诸如丙卡巴胍 (N- 甲基胍、MIH);肾上腺皮质抑制剂诸如米托坦 (o, p' -DDD) 和氨鲁米特;RXR 激动剂诸如贝沙罗汀;及酪氨酸激酶抑制剂诸如伊马替尼。化疗剂的这些和别的例子的别名和商品名及其使用方法 (包括剂量给药和施用方案) 会是本领域熟练技术人员知道的, 而且可在普通技术人员知道的任何合适参考书中找到。特别地, 适合于依照本发明使用的化疗剂包括但不限于纳米颗粒球蛋白结合的帕利他赛。

[0057] 如本文中使用的, 术语“放疗方案”或“放疗”指施用辐射来杀死癌性细胞。辐射与细胞内的各种分子相互作用, 但是导致细胞死亡的主要靶标是脱氧核糖核酸 (DNA)。然而, 放疗常常还导致对细胞膜和核膜和其它细胞器的损害。DNA 损害常常涉及糖-磷酸主链的单链和双链断裂。另外, 可以由 DNA 和蛋白质的交联, 这可破坏细胞功能。取决于辐射类型, DNA 损害的机制可随相对生物学效力而变化。例如, 重粒子 (即质子、中子) 直接损害 DNA 且具有较大的相对生物学效力。电磁辐射导致间接电离, 经由主要通过细胞水的电离生成的短命羟基自由基起作用。辐射的临床应用由外线束辐射 (来自外部源) 和近程放射疗法 (使用植入或插入患者中的辐射源) 组成。外线束辐射由 X- 射线和 / 或 γ - 射线组成, 而近程放射疗法采用衰变并发射 α 粒子, 或与 γ - 射线一起发射 β 粒子的放射性核。

[0058] 放疗可进一步与化疗组合使用, 其中化疗剂起放射致敏剂的作用。适合于患者个体的放疗的具体选择可由护理点的技术人员确定, 要考虑癌症的组织 and 分期。

[0059] 如本文中使用的, 术语“备选治疗方案”或“备选疗法”可以包括例如生物反应修饰剂 (包括多肽、碳水化合物、和脂质生物反应修饰剂)、毒素、凝集素、抗血管发生剂、受体酪氨酸激酶抑制剂 (例如 **Iressa®** (吉非替尼)、**Tarceva®** (厄洛替尼)、**Erbix®** (西妥昔单抗)、甲磺酸伊马替尼 (**Gleevec®**)、蛋白体抑制剂 (例如硼替佐米, Velcade); VEGFR2 抑制剂诸如 PTK787 (ZK222584), 极光激酶 (aurorakinase) 抑制

剂（例如 ZM447439）；雷帕霉素（mTOR）抑制剂、环加氧酶-2（COX-2）抑制剂、雷帕霉素抑制剂（例如西罗莫司，RapamuneTM）的哺乳动物靶标；法尼基转移酶抑制剂（例如替吡法尼，Zarnestra）；基质金属蛋白酶抑制剂（例如 BAY 12-9566；硫酸化多糖替可加兰）；血管发生抑制剂（例如 AvastinTM（贝伐单抗）；烟曲霉素的类似物诸如 TNP-4；羧基氨基三唑；BB-94 和 BB-2516；沙利度胺；白介素-12；利诺胺；肽片段；和针对血管生长因子和血管生长因子受体的抗体）；血小板衍生生长因子受体抑制剂，蛋白激酶 C 抑制剂，有丝分裂原活化的激酶抑制剂，有丝分裂原活化的蛋白激酶激酶抑制剂，劳氏肉瘤病毒转化癌基因（SRC）抑制剂，组蛋白脱乙酰基酶抑制剂，小缺氧诱导因子抑制剂，刺猬抑制剂（hedgehog inhibitors），和 TGF- β 信号传导抑制剂。另外，免疫治疗剂也会考虑作为备选治疗方案。例子包括趋化因子、化学吸引素、细胞因子、白介素、或组织因子。合适的免疫治疗剂还包括含有预形成抗体的血清或 γ -球蛋白；非特异性免疫刺激性佐剂；积极特异性免疫疗法；和继承性免疫疗法。另外，备选疗法可包括其它基于生物学的化学实体，诸如多核苷酸（包括反义分子）、多肽、抗体、基因疗法载体等等。此类备选治疗剂可单独地或组合地，或者与其它本文中描述的其它治疗方案组合地施用。备选治疗方案中使用的这些药剂的别名和商品名和备选治疗方案中使用的药剂的别的例子及其使用方法（包括剂量给药和施用方案）会是本领域熟练内科医师知道的。另外，联合疗法中的备选治疗方案中使用的化疗剂和其它药剂的使用方法（包括剂量给药和施用方案）也会是本领域熟练技术人员知道的。

[0060] 特别地，合适的备选治疗方案包括但不限于针对癌细胞表面上的分子的抗体诸如针对 Her2（例如曲妥单抗）、EGF 或 EGF 受体、VEGF（例如贝伐单抗）或 VEGF 受体、CD20 等等的抗体。治疗剂可以进一步包含介导补体激活、细胞介导的细胞毒性、诱导凋亡、诱导细胞死亡、和调理中一种或多种的任何抗体或抗体片段。例如，此类抗体片段可以是完整或部分 Fc 域。

[0061] “抗体”表示但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）。抗体可以是鼠的、人的、人源化的、嵌合的、或衍生自其它物种的。抗体是由免疫系统生成的，能够识别并结合特定抗原的蛋白质。靶抗原一般具有受到多种抗体上的 CDR 识别的众多结合位点，也称作表位。特异性结合不同表位的每种抗体具有不同结构。如此，一种抗原可以具有超过一种对应抗体。

[0062] 抗体包括全长免疫球蛋白分子或全长免疫球蛋白分子的免疫学活性部分，即含有免疫特异性结合感兴趣靶标的抗原或其部分的抗原结合位点的分子。靶标包括癌细胞或生成与自身免疫性疾病有关的自身免疫性抗体的其它细胞。

[0063] 本文中公开的免疫球蛋白可以是免疫球蛋白分子的任何类（例如 IgG、IgE、IgM、IgD、和 IgA）或亚类（例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2）的。免疫球蛋白可以衍生自任何物种。

[0064] “抗体片段”包含全长抗体的一部分，其维持期望的生物学活性。“抗体片段”一般是其抗原结合或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、和 Fv 片段；双抗体；线性抗体；免疫特异性结合癌细胞抗原、病毒抗原或微生物抗原的任何上述抗体的由 Fab 表达文库生成的片段、抗独特型（抗 Id）抗体、CDR（互补决定区）、和表位结合片段，单链抗体分子；和自抗体片段形成的多特异性抗体。

[0065] 本文所述单克隆抗体明确包括“嵌合”抗体，其中重链和 / 或轻链的一部分与自特

定物种衍生的或属于特定抗体类或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,而链的剩余部分与自另一物种衍生的或属于另一抗体类或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现期望的生物学活性(美国专利 No. 4, 816, 567)。本文中感兴趣的嵌合抗体包括“灵长类化”抗体,其包含自非人灵长类动物(例如旧世界猴或猿)衍生的可变域抗原结合序列和人恒定区序列。

[0066] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指细胞介导的反应,其中表达 Fc 受体 (FcR) 的非特异性细胞毒性细胞(例如天然杀伤 (NK) 细胞、嗜中性粒细胞、和巨噬细胞) 识别靶细胞上结合的抗体,并随后引起靶细胞裂解。介导 ADCC 的主要细胞, NK 细胞, 只表达 Fc γ RI, 而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。为了评估感兴趣分子的 ADCC 活性,可实施体外 ADCC 测定法(美国专利 No. 5, 003, 621 ;美国专利 No. 5, 821, 337)。对此类测定法有用的效应细胞包括外周血单个核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。或者 / 另外, 可在体内评估感兴趣分子的 ADCC 活性,例如在动物模型中,诸如 Clynes 等人 PNAS(USA), 95 :652-656(1998) 中披露的。

[0067] “诱导细胞死亡的”抗体为引起可存活细胞变得不可存活的抗体。可在补体和免疫效应细胞缺失下测定体外细胞死亡以区分由抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 或互补依赖性细胞毒性 (CDC) 诱导的细胞死亡。如此,用于细胞死亡的测定法可使用热灭活的血清(即在补体缺失下)和在免疫效应细胞缺失下实施。为了确定抗体是否能够诱导细胞死亡,可相对于未处理的细胞评估膜完整性的丧失,如通过对碘化丙啶 (PI)、台盼蓝或 7AAD 的摄取评估的。诱导细胞死亡的抗体为那些在 PI 摄取测定法中在 BT474 细胞中诱导 PI 摄取的。

[0068] “诱导凋亡的”抗体为诱导程序性细胞死亡的抗体,如通过膜联蛋白 V 的结合、DNA 的断裂、细胞收缩、内质网扩大、细胞碎裂、和 / 或膜囊(称作凋亡小体)形成确定的。

[0069] 如本文中使用的,“化学致敏剂”或“致敏剂”为可增强化疗剂、放疗处理或备选治疗方案的治疗效果的,并因此改进此类处理或药剂的功用的药物。肿瘤或癌性细胞对处理的敏感性或抗性也可在动物诸如人或啮齿类动物中测量,通过例如测量肿瘤尺寸、肿瘤负荷或一段时间里的转移发生率。例如,对于人为约 2、约 3、约 4 或约 6 个月,对于小鼠为约 2-4、约 3-5、或约 4-6 周。如果与此类组合物或方法缺失下的治疗敏感性或抗性相比治疗敏感性升高或抗性降低约 10% 或更多、例如约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%, 或更多、至约 2 倍、约 3 倍、约 4 倍、约 5 倍、约 10 倍、约 15 倍、约 20 倍或更多,则该组合物或治疗方法可使肿瘤或癌性细胞对治疗性处理的响应致敏。对治疗性处理的敏感性或抗性的确定是本领域常规的且在本领域熟练技术人员的技术之内。

[0070] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,而且指由通过肽键或修饰肽键(例如可给肽提供额外的期望特性,诸如延长的半衰期的肽电子等排体(修饰肽键))共价连接的至少两个氨基酸残基构成的化合物。肽可包含至少两个氨基酸。构成本文所述肽或蛋白质的氨基酸也可进行修饰,或是通过天然过程,诸如翻译后加工,或是通过本领域公知的化学修饰技术。修饰可发生于肽中的任何位置,包括肽主链、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。要理解,相同类型的修饰可以以相同或不同程度存在于给定肽中的几个位点。

[0071] 对肽的修饰的例子可包括 PEG 化、乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价附着、血红素部分的共价附着、核苷酸或核苷酸衍生物的共价附着、脂质或脂质衍生物的

共价附着、磷脂酰肌醇的共价附着、交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 γ -羧化、糖基化、GPI 锚形成、羟化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、转移-RNA 介导的添加氨基酸至蛋白质诸如精氨酸化、和遍在蛋白化。参见例如 *Proteins-Structure and Molecular Properties*, 第 2 版, T.E.Creighton, W H.Freeman and Company, New York, 1993 和 Wold F, *Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, pgs.1-12 in *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter 等人, *Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors*, *Meth. Enzymol.* (1990) 182 :626-646 和 Rattan 等人 (1992), *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, " *Ann NY Acad Sci* 663 :48-62。

[0072] 实质性相似的序列为与参照序列只相差一个或多个本文中讨论的保守取代的氨基酸序列。此类序列可以例如在功能上与另一实质性相似序列同源。本领域技术人员会领会本发明肽中可取代的氨基酸个体的方面。

[0073] 氨基酸序列相似性或同一性可通过例如使用采用 BLAST (基础局部比对搜索工具) 2.0 算法的 BLASTP 和 TBLASTN 程序来计算。用于计算氨基酸序列相似性或同一性的技术是本领域技术人员公知的, 而且 BLAST 算法的使用记载于 ALTSCHUL 等人 1990, *J Mol. Biol.* 215 :403-410 和 ALTSCHUL 等人 (1997), *Nucleic Acids Res.* 25 :3389-3402。

[0074] 要实施比对的序列可收集自众多数据库。蛋白质数据库的例子包括 SWISS-PROT (它也提供关于蛋白质的功能、它的域结构、翻译后修饰、变体的高水平注解) (Bairoch A. 和 Apweiler R. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1) :45-48; Bairoch A. 和 Apweiler R. (1997) *J. Mol. Med.* 75(5) :312-316; Junker V.L. 等人 (1999) *Bioinformatics* 15(12) :1066-1007)、TrEMBL (SWISS-PROT 的计算机注解补充, 它含有 EMBL 核苷酸序列条目的所有翻译) (Bairoch A. 和 Apweiler R. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1) :45-48) 和 nr 数据库 (它比较所有非冗余 GenBank CDS 翻译加来自其它数据库诸如 PDB、SwissProt、PIR 和 PRF 的蛋白质序列)。

[0075] 蛋白质序列的比对可使用现有算法对数据库搜索与检索序列相似的序列来进行。一种比对方法是 Smith-Waterman 算法 (Smith, T.F. 和 Waterman, M.S. 1981. *Journal of Molecular Biology* 147(1) :195-197), 它可用于确定如何能产生检索序列和数据库序列之间的最佳比对。此类比对是通过确定检索序列会需要进行什么转化来匹配数据库序列而获得的。转化包括用一种字符取代另一种和插入或删除一串字符。给每项字符对字符比较赋予得分 - 精确匹配和一些取代给正得分, 其它取代和插入 / 删除给负得分。自统计推导的打分矩阵获得得分。使用导致最高得分的转化组合来生成检索序列和数据库序列之间的比对。Needleman-Wunsch (Needleman, S.B. 和 Wunsch, C.D. 1970. *Journal of Molecular Biology* 48(3) :443-453) 算法与 Smith-Waterman 算法相似, 但是序列比较是全局的, 而非局部的。全局比较进行整个检索序列针对整个数据库序列的比对。虽然局部比对总是以匹配开始和结束, 但是全局比对可以插入或删除 (indel) 开始或结束。对于给定检索序列和数据库序列, 由于末端的插入删除, 全局得分会小于或等于局部得分。作为上述算法的一种替代, 可使用隐马尔可夫模型 (Hidden Markov Model, HMM) 搜索 (Eddy, S.R. 1996. *Current*

Opinion in Structural Biology 6(3):361-365) 来生成蛋白质序列比对。HMM 打分对匹配后面是插入 / 删除或反之亦然的概率加权。另外, HMM 容许插入变删除转变 (反之亦然) 和对开始和结束状态打分以控制全局地或局部地运行搜索。

[0076] 可以在比对程序中使用一种或多种上述算法以生成蛋白质序列比对。本领域技术人员有众多序列比对程序供选择, 它们掺入多种不同算法。比对程序的一个例子是 BLASTP (Altschul, S. F. 等人 (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402)。其它比对程序有 CLUSTAL W 和 PILEUP。来自 BLASTP 运行的标准输出含有足够信息来如下所述进行进一步的插入删除分析。

[0077] 氨基酸可描述成例如极性的、非极性的、酸性的、碱性的、芳香族的或中性的。极性氨基酸为在生物或近中性 pH 可通过成氢键而与水相互作用的氨基酸。氨基酸的极性是在生物或近中性 pH 成氢键的程度的指标。极性氨基酸的例子包括丝氨酸、脯氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、酪氨酸和谷氨酸。非极性氨基酸的例子包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸和色氨酸。酸性氨基酸在中性 pH 具有净负电荷。酸性氨基酸的例子包括天冬氨酸和谷氨酸。碱性氨基酸在中性 pH 具有净正电荷。碱性氨基酸的例子包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。芳香族氨基酸一般是非极性的, 而且可参与疏水相互作用。芳香族氨基酸的例子包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。酪氨酸也可经由芳香族侧链上的羟基而参与氢键键合。中性脂肪族氨基酸一般是非极性和疏水的。中性氨基酸的例子包括丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和甲硫氨酸。氨基酸可通过超过一种描述性范畴来描述。共享共同描述性范畴的氨基酸在肽中可互相取代。

[0078] 用于描述本发明肽化合物的命名法遵循常规实践, 其中氨基呈现在每种氨基酸残基的左边而羧基呈现在右边。在代表选定的本发明具体实施方式的序列中, 尽管没有明确显示, 但氨基和羧基末端基团应理解为处于它们在生理 pH 值会采取的形式, 除非另有说明。在氨基酸结构式中, 每个残基一般通过与氨基酸的俗名对应的单字母或三字母标志来代表。

[0079] 氨基酸的亲水指数是指示氨基酸搜寻含水环境 (负值) 或疏水环境 (正值) 的趋势的度量 (Kyte 和 Doolittle 1982. J Mol Biol 157:105-132)。标准氨基酸的亲水指数包括丙氨酸 (1.8)、精氨酸 (-4.5)、天冬酰胺 (-3.5)、天冬氨酸 (-3.5)、半胱氨酸 (2.5)、谷氨酰胺 (-3.5)、谷氨酸 (-3.5)、甘氨酸 (-0.4)、组氨酸 (-3.2)、异亮氨酸 (4.5)、亮氨酸 (3.8)、赖氨酸 (-3.9)、甲硫氨酸 (1.9)、苯丙氨酸 (2.8)、脯氨酸 (-1.6)、丝氨酸 (-0.8)、苏氨酸 (-0.7)、色氨酸 (-0.9)、酪氨酸 (-1.3) 和缬氨酸 (4.2)。具有相似亲水指数的氨基酸在肽中可互相取代。

[0080] 构成本文所述肽的氨基酸会理解为是 L- 或 D- 构型的。在本发明的肽和肽模拟物中, D- 氨基酸可取代 L- 氨基酸。

[0081] 本发明的肽内含有的氨基酸 (特别是在羧基或氨基末端处的) 可通过甲基化、酰胺化、乙酰化或用其它化学基团取代来修饰, 这可改变肽的循环半衰期而对它们的生物学活性没有不利影响。另外, 本发明的肽中可存在或缺乏二硫键。

[0082] 非标准氨基酸可以天然存在, 而且可以是或不是遗传编码的。遗传编码的非标准氨基酸的例子包括硒代半胱氨酸 (有时在正常情况下可以是终止密码子的 UGA 密码子处

掺入一些蛋白质)或吡咯赖氨酸(有时在正常情况下可以是终止密码子的 UAG 密码子处掺入一些蛋白质)。不是遗传编码的一些非标准氨基酸可源自对早已掺入肽的标准氨基酸的修饰,或者可以是例如代谢中间体或前体。非标准氨基酸的例子包括 4- 羟基脯氨酸、5- 羟基赖氨酸、6-N- 甲基赖氨酸、 γ - 羧基谷氨酸、锁链素、硒代半胱氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸、羊毛硫氨酸、1- 氨基环丙烷-1- 羧酸、 γ - 氨基丁酸、肉碱、肌氨酸、或 N- 甲酰基甲硫氨酸。标准和非标准氨基酸的合成变体也是有用的,而且可包括化学衍生的氨基酸、为鉴定或示踪而标记的氨基酸、或在 α 碳上有各种侧链的氨基酸。此类侧基的例子是本领域已知的,而且可包括脂肪族、单芳香族、多环芳香族、杂环、异核、氨基、烷基氨基、羧基、羧酰胺、羧基酯、胍、脒、羟基、烷氧基、巯基、烷基巯基、或其它含杂原子的侧链。其它合成氨基酸可包括 α - 亚氨基酸、非 α 氨基酸诸如 β - 氨基酸、脱羧基或脱- 氨基酸。氨基酸的合成变体可使用本领域已知的通用方法来合成,或者可以自商业供应商购买,例如 RSP Amino Acids LLC(Shirley, Mass.)。

[0083] 为了进一步例示“保守性”氨基酸取代的含义,以下列出了组 A-F。下列组中的一个成员被替换为同一个组中的另一个成员被认为是“保守性”取代。

[0084] 组 A 包括:亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、苏氨酸和具有下列侧链的修饰的氨基酸:乙基、异丁基、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$ 和 CH_2SCH_3 。

[0085] 组 B 包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、苏氨酸和具有乙基侧链的修饰的氨基酸。

[0086] 组 C 包括苯丙氨酸、苯基甘氨酸、酪氨酸、色氨酸、环己基甲基和具有取代的苄基或苯基侧链的修饰的氨基残基。

[0087] 组 D 包括谷氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或天冬氨酸的取代或非取代的脂肪族、芳香族或苄族酯(例如,甲酯、乙酯、正丙酯、异丙酯、环己酯、苄酯或取代的苄酯)、谷氨酰胺、天冬酰胺、 CO-NH- 烷基化的谷氨酰胺或天冬酰胺(例如,甲基、乙基、正丙基和异丙基),以及具有侧链 $-(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ 的修饰的氨基酸,其酯(取代的或非取代的脂肪族、芳香族或苄族酯),其酰胺,及其取代的或未取代的 N- 烷基化酰胺。

[0088] 组 E 包括组氨酸、赖氨酸、精氨酸、N- 硝基精氨酸、p- 环精氨酸、g- 羟基精氨酸、N- 脒基瓜氨酸(N-amidinocitruline)、2- 氨基胍基丁酸(2-amino guanidinobutanoic acid)、赖氨酸的同源物、精氨酸的同源物和鸟氨酸。

[0089] 组 F 包括丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸和具有被 $-\text{OH}$ 或 $-\text{SH}$ 取代的 C1-C5 直链或支链烷基侧链的修饰的氨基酸。

[0090] A-F 组是例示性的,并非意图限制本发明。

[0091] 肽模拟物为包含非肽结构元件的,模拟亲本肽的生物学作用的化合物。肽模拟物可以没有经典肽特征,诸如酶可切割肽键。亲本肽可最初鉴定为感兴趣蛋白质上的结合序列或磷酸化位点,或者可以是天然存在肽,例如肽激素。用于鉴定肽模拟物的测定法可包括亲本肽,在筛选文库诸如肽模拟物文库时作为用于比较目的的阳性对照。肽模拟物文库为可具有与亲本肽的生物学活性相似的生物学活性的化合物的文库。

[0092] 如本文中使用的,术语“多核苷酸”包括 RNA、cDNA、基因组 DNA、合成形式、和混合聚合物,有义链和反义链二者,而且可以是化学或生物化学修饰的,或者可以含有非天然或

衍生化核苷酸碱基,正如本领域技术人员会容易领会的。此类修饰包括例如标记物、甲基化、类似物对一种或多种天然存在核苷酸的取代、核苷酸间修饰诸如不带电荷的连接(例如磷酸甲酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、等)、带电荷的连接(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、等)、悬垂模块(例如多肽)、和经过修饰的连接(例如 α 端基异构多核苷酸、等)。还包括在经由成氢键和其它化学相互作用来结合指定序列的能力方面模拟多核苷酸的合成分子。

[0093] 如本文中使用的,“肽核酸”(PNA)指经过修饰的核酸,其中核酸的糖磷酸骨架转变成N-(2-氨基乙基)-甘氨酸骨架。虽然DNA/RNA的糖-磷酸骨架在中性条件下带有负电荷,导致互补链之间的静电排斥,但是PNA的主链结构并非内在地具有电荷。因此,没有静电排斥。因此,PNA具有与常规核酸相比更高的形成双链的能力,而且具有较高能力来识别碱基序列。另外,PNA一般比核酸更坚固。PNA也可用于阵列和其它杂交或其它反应,如上文和本文为寡核苷酸描述的。

[0094] 如本文中使用的,术语“载体”指用于将外源或内源多核苷酸导入宿主细胞的多核苷酸化合物。载体包含核苷酸序列,其可以编码一种或多种多肽分子。处于天然状态的或经历过重组工程的质粒、粘粒、病毒和噬菌体是常用载体的非限制例,用来提供包含至少一种期望的分离的多核苷酸分子的重组载体。

[0095] 如本文中使用的,“肿瘤抑制基因”为具有抑制失调的细胞生长的正常生物学作用的基因或基因产物。如果肿瘤抑制基因的功能丧失,那么发生失调的细胞生长。肿瘤抑制基因的功能性对应物是癌基因——促进正常细胞生长的基因可称作“原癌基因”。激活此类基因或基因产物的突变进一步将它转变成“癌基因”,其继续细胞生长活性,但是以失调的方式。肿瘤抑制基因和基因产物的例子是文献中公知的,而且可以包括PTC、BRCA1、BRCA2、p16、APC、RB、WT1、EXT1、p53、NF1、TSC2、NF2、VHL或SPARC。

[0096] 本发明进一步提供了核酸构建物,其包含控制元件和与控制元件(例如合适的启动子)可操作连接的本文所述核酸分子,用于表达多肽或本文所述多肽。蛋白表达取决于RNA转录的水平,RNA转录继而又由DNA信号调节。类似地,mRNA的翻译至少需要AUG起始密码子,其通常位于信使的5'末端的约10个至约100个核苷酸内。已经表明侧接AUG起始密码子的序列影响真核核糖体对它的识别,与完美Kozak共有序列的一致性引起最佳的翻译(见,例如,Kozak, J. Molec. Biol. 196 :947-950(1987))。同样,细胞中外源核酸的成功表达可能需要所得到的蛋白的翻译后修饰。因而,本发明提供了编码多肽的质粒,其中载体是例如pCDNA3.1或其衍生物。

[0097] 本文描述的核酸分子优选包含与合适的启动子可操作地连接的编码区,所述启动子优选是真核细胞中有功能性的启动子。病毒启动子,例如但不限于,RSV启动子和腺病毒主要晚期启动子,可用于本发明中。合适的非病毒启动子包括但不限于,磷酸甘油激酶(PGK)启动子和延伸因子1 α 启动子。非病毒启动子优选是人类启动子。另外的合适的遗传元件(很多是本领域已知的)也可以连接于、附着于或插入至本发明的核酸和构建体中以提供另外的功能、表达水平或表达模式。也可使用天然启动子来表达SPARC家族基因,在该情况中优选不在天然编码它们的染色体中使用它们,除非通过实质性改变该染色体的方法进行了修饰。此类实质性改变的染色体可包括通过逆转录病毒载体或类似方法转染和改变的染色体。或者,此类实质性改变的染色体可包含人工染色体,诸如HAC、YAC、或BAC。

[0098] 此外,本文描述的核酸分子可以与增强子可操作地连接以促进转录。增强子是DNA的顺式作用元件,其刺激相邻基因的转录。赋予所连接的基因在来自很多物种的多种不同细胞类型中的高水平转录的增强子的实例包括但不限于,来自SV40和RSV-LTR的增强子。此类增强子可以与具有细胞类型特异性效应的其它增强子组合,或者可以单独使用任意增强子。

[0099] 为了优化多肽产生,本发明的核酸分子还可以在核酸分子的编码区之后包含多腺苷酸化位点。同样地,优选所有的正确转录信号(以及翻译信号,如果适用)将正确地排列,以使外源核酸在其所被导入的细胞中正确表达。如果需要,外源核酸中还可以引入剪接位点(即,剪接受体和剪接供体位点)以促进mRNA产生并同时保持框内的全长转录本。此外,本发明的核酸还可以包含合适的序列以进行加工、分泌、细胞内定位等。

[0100] 可以将核酸分子插入至任何合适的载体中。合适的载体包括但不限于病毒载体。合适的病毒载体包括但不限于,逆转录病毒载体, α 病毒、痘苗病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒和禽痘病毒载体。载体优选具有天然或工程化的能力以转化真核细胞,例如CHO-K1细胞。另外,用于本发明上下文中的载体可以是“裸的”核酸载体(即具有极少或没有封装它们的蛋白、糖类和/或脂类的载体),例如质粒或游离体,或者载体可以与其它分子复合。可以与本发明的核酸适宜地组合的其它分子包括但不限于病毒包被、阳离子脂质、脂质体、聚胺、金颗粒和靶向部分,例如靶向细胞分子的配体、受体或抗体。

[0101] 可以从重组宿主细胞表达并纯化依照本发明的SPARC多肽。重组宿主细胞可以是原核或真核细胞,包括但不限于细菌,例如大肠杆菌;真菌细胞例如酵母;昆虫细胞,包括但不限于果蝇和蚕衍生的细胞系,以及哺乳动物细胞和细胞系。当体外或在体内在细胞例如人类细胞中表达依照本发明的SPARC多肽时,可以就给定的细胞类型(即物种)对选择用于编码Q3 SPARC的此类多核苷酸进行密码子优化。很多用于密码子优化的技术是本领域已知的(见,例如,Jayaraj等人,Nucleic Acids Res. 33(9):3011-6(2005);Fuglsang等人,Protein Expr. Purif. 31(2):247-9(2003);Wu等人,"The Synthetic Gene Designer: a Flexible Web Platform to Explore Sequence Space of Synthetic Genes for Heterologous Expression," csbw,2005 IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference-Workshops(CSBW' 05), pp. 258-259(2005))。

[0102] 在某些实施方式中,在表达和纯化SPARC多肽时,采用用于改善蛋白溶解性的技术来防止形成包涵体(其为不溶性级分),并因此获得大量的多肽。在包涵体中积累的SPARC常常是无活性类型的SPARC,没有保留它的生理活性。

[0103] 可以通过本领域已知的方法改善纯化的SPARC多肽的溶解性。例如,还可以通过表达功能性片段而非全长多肽来改善溶解性。另外,为了增强表达的蛋白(例如,在大肠杆菌中表达的)的溶解性,可以通过降低生长温度、使用较弱的启动子、使用低拷贝数的质粒、降低诱导剂浓度、改变生长培养基来降低蛋白合成速率,见Georgiou和Valax(Current Opinion Biotechnol. 7:190-197(1996))的描述。这会降低蛋白合成速率,通常会获得更可溶的蛋白。也可以添加正确折叠或蛋白稳定性必不可少的辅基或辅因子,或添加缓冲剂以控制生长过程中培养基中的pH波动,或添加1%的葡萄糖以阻止乳糖(在多数富集培养基例如LB、2xYT中存在乳糖)对lac启动子的诱导。也可以向培养基中添加多元醇(例如山梨醇)和蔗糖,因为这些添加物引起的渗透压的升高会导致细胞中渗透保护剂的积累,

渗透保护剂会稳定天然蛋白的结构。可以添加乙醇、低分子量的硫醇和二硫化物和 NaCl。此外,可以与需要的多肽共表达伴侣和 / 或折叠酶。分子伴侣通过与折叠中间体的瞬时相互作用而促进正确的异构化和细胞靶向。大肠杆菌伴侣系统包括但不限于 :GroES-GroEL、DnaK-DnaJ-GrpE、ClpB。

[0104] 折叠酶加速折叠途径中的限速步骤。有三种类型的折叠酶具有重要作用 :肽基脯氨酰顺式 / 反式异构酶 (PPI),二硫化物氧化还原酶 (DsbA) 和二硫化物异构酶 (DsbC),蛋白二硫化物异构酶 (PDI),后者是真核蛋白,其催化蛋白半胱氨酸氧化和二硫键异构化。这些蛋白中的一种或多种与靶蛋白的共表达可以产生更高水平的可溶性靶蛋白。

[0105] 可以以融合蛋白的形式产生 SPARC 多肽,以改善其溶解性和产量。所述融合蛋白包含 SPARC 多肽和在框内融合在一起的第二多肽。所述第二多肽可以是本领域已知的融合配对物以改善与其融合的多肽的溶解性,例如, NusA、细菌铁蛋白 (BFR)、GrpE、硫氧还蛋白 (TRX) 和谷胱甘肽 -S- 转移酶 (GST)。Novagen Inc. (Madison,Wis.) 提供了 pET43.1 载体系统,其允许形成 NusA- 靶标融合物。已经表明 :当用作融合配对物时, DsbA 和 DsbC 对表达水平具有积极影响,因此它们可用于与 SPARC 多肽融合以实现较高的溶解性。

[0106] 在一个实施方案中,SPARC 多肽是作为包含 Q3 SPARC 删除突变体多肽和融合配偶硫氧还蛋白的融合多肽生成的,如美国专利 No. 6, 387, 664 中记载的,通过引用方式全文并入本文。硫氧还蛋白 -SPARC 融合物可以作为容易配制的可溶性蛋白在大肠杆菌中大量生成,不丧失生理活性。虽然美国专利 No. 6, 387, 664 提供了一种融合 SPARC 蛋白,其中 SPARC 融合于硫氧还蛋白的 C- 末端,但是为了本发明的目的,应理解 SPARC 多肽可融合于第二多肽的 N- 末端或 C- 末端任一者处,只要它的致敏功能得到保留。

[0107] 本发明的多肽也可在体外合成,例如使用任何合适体外翻译系统,例如 **TNT®** 快速偶联转录 / 翻译系统 (Promega, Madison, WI)、家兔网织红细胞裂解物、麦胚提取物、等等。或者,依照本发明生成的多肽可通过任何合适固相或液相方案化学合成,包括例如平板印刷 (lithographic)、Fmoc 固相和 t-Boc 固相肽合成法。

[0108] 分离的或纯化的表示构成所存在的多肽或多核苷酸构成至少 75%、至少 90%、至少 95%、至少 99%。依照本发明的多核苷酸可通过任何合适手段来纯化。本发明的多肽可通过普通技术人员知道的任何合适方法来纯化,包括例如 Sage :Purification of SPARC/osteonectin,Curr. Protocols Cell Biol. 2003 Feb ;Chapter 10 :Unit 10.11 中讨论的方法,通过引用方式全文并入本文。或者,可使用使用任何合适抗体的亲和层析或沉淀、表位标签 (包括例如 myc、gfp、V5、FITC、HA、S- 标签、T7、等等) 或其它合适亲和系统 (包括例如生物素 / 亲合素、多组氨酸 / 镍、GST 等等)。

[0109] 本文中使用的核酸、肽或蛋白质针对上文所述核酸和蛋白质的“对应性”的一项度量是序列之间的相对“同一性”。在肽或蛋白质的情况中,或在依照所编码的肽或蛋白质来限定的核酸的情况中,对应性包括与指定肽或蛋白质具有至少约 50% 同一性、或者至少约 70% 同一性、或者至少约 90% 同一性、或甚至约 95% 和还可以是至少约 98-99% 同一性的肽。核酸之间的同一性的优选度量与上文对肽的规定相同,最优选至少约 90% 或至少约 98-99% 同一性。

[0110] 如本文中使用的,术语“同一性”指两种肽之间或两种核酸分子之间序列同一性的度量。同一性可通过比较每种序列中的位置来确定,为了比较的目的,其可以是线性的。如

果两种氨基酸或核酸序列共享至少约 75% 序列同一性、优选至少约 90% 序列同一性和甚至更优选至少 95% 序列同一性和最优选至少约 98-99% 同一性,那么认为它们是基本上相同的。

[0111] 序列同一性可通过当前使用的且最初记载于 Altschul 等人 (1990) J. Mol. Biol. 215 :403-410 的 BLAST 算法来确定。BLAST 算法可以以发表的缺省设置使用。当所比较的序列中的位置被相同碱基或氨基酸占据时,认为这些分子在该位置具有共享的同一性。序列之间的同一性程度是这些序列共享的匹配位置数的函数。

[0112] 核酸序列的同一性的一项替代度量是确定两种序列是否在低严格和优选高严格条件下彼此杂交。当此类序列会在高严格条件下杂交时,它们是基本上相同的。在低严格条件下对滤膜结合的序列的杂交可例如在 0.5M NaHPO₄、7% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、1mM EDTA 中在 65℃ 进行,并在 0.2xSSC/0.1% SDS 中在 42℃ 清洗 (参见 Ausubel 等人 (eds.) 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York, at p. 2.10.3)。或者,在高严格条件下对滤膜结合的序列的杂交可例如在 0.5M NaHPO₄、7% (SDS)、1mM EDTA 中在 65℃ 进行,并在 0.2xSSC/0.1% SDS 中在 68℃ 清洗 (参见 Ausubel 等人 (eds.) 1989, 见上文)。可依照已知方法根据感兴趣序列更改杂交条件 (参见 Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2 "Overview of Principles in Hybridization and the Strategy of Nucleic Acid Probe Assays", Elsevier, N.Y.)。一般地,严格条件选择为比具体序列在规定离子强度和 pH 的热解链温度低约 5℃。

[0113] 本领域技术人员会领会,序列内突变位置的数值标示是相对于具体序列的。还有,相同位置可指派不同数值标示,这取决于对序列编号的方式和选择的序列。另外,序列变异诸如插入或删除可改变相对位置和随后突变位点处和周围的特定核苷酸的数值标示。

[0114] 基因疗法是一种医学干预,涉及修饰活细胞的遗传材料来抗击疾病。基因疗法这在针对多种不同类型的癌症和其它疾病的临床试验 (人体研究) 进行研究。因而,本发明进一步提供了适合于在“基因疗法”中使用的分离的编码 SPARC 多肽的核酸分子 (参见例如 Patil 等人, AAPS J. 7(1) :E61-77 (2005))。

[0115] 一般地,使用“载体”诸如本文中公开的那些将基因投递至细胞。基因疗法中使用的最常见类型的载体是病毒。基因疗法中使用的病毒是遗传上不能的;它们不能复制它们自己。大多数基因疗法临床试验依赖于小鼠逆转录病毒来投递期望基因。用作载体的其它病毒包括腺病毒、腺伴随病毒、痘病毒、和疱疹病毒。合适的病毒基因疗法载体及其体内和离体施用方式是本领域已知的。

[0116] 基因疗法可离体和体内实施。典型地,在离体基因疗法临床试验中,自患者的血液或骨髓取出细胞,并在实验室中培养。将细胞暴露于携带期望基因的病毒。病毒进入细胞,而期望基因变成细胞 DNA 的一部分。在实验室中培养细胞,然后通过静脉注射将细胞返还给患者。使用体内基因疗法时,可使用载体诸如例如病毒或脂质体将期望基因投递至患者身体中的细胞。

[0117] 本领域普通技术人员会认识到,由于遗传密码的通用性,对任何给定氨基酸序列的知识可使得本领域普通技术人员容易地预见有限数目的能编码所述氨基酸序列的多肽

的具体多核苷酸序列。另外,经由“密码子优化”的方法,普通技术人员能容易地确定对于在任何给定物种中的表达最佳的编码所述氨基酸序列的多肽的多核苷酸序列,这是本领域公知的(参见例如 Villalobos 等人:Gene Designer:a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments.BMC Bioinformatics.2006 Jun.6;7:285)。

[0118] 如本文中使用的,“载体”指任何适合作为媒介将活性药物组分(API)投递至合适的体外或体内作用位点的物质。因此,载体可充当赋形剂来配制含有 API 的治疗或实验试剂。优选的载体能够维持 API 在能够与 T 细胞相互作用的形式。此类载体的例子包括但不限于水、磷酸盐缓冲盐水、盐水、林格式溶液、右旋糖溶液、含有血清的溶液、汉克氏溶液和其它含水生理平衡溶液或细胞培养培养基。含水载体还可含有接近接受者的生理条件、例如增强化学稳定性和等张性所需要的合适的辅助物质。合适的辅助物质包括例如乙酸钠、氯化钠、乳酸钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、和用于生成磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液、和碳酸氢盐缓冲液的其它物质。

[0119] 如本文中使用的,“抗癌疫苗”表示包含能发起免疫应答的肿瘤相关抗原或表位的组合物。

[0120] 在另一个实施方案中,本发明提供了抗癌疫苗,其包含具有 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的肽抗原;或具有相对于 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列包含一个或几个氨基酸的取代、删除、插入、和/或添加的氨基酸序列且还具有免疫刺激活性的肽抗原。在另一个方面,本发明提供了肽抗原,其包含上述 SEQ ID NO 1 的肽的一部分且具有免疫刺激活性。在又一个方面,本发明提供了肽抗原,其具有相对于 SEQ ID NO1 的肽抗原的上述部分包含一个或几个氨基酸的取代、删除、插入、和/或添加的氨基酸序列,且还具有免疫刺激活性。上文所述肽抗原优选能激活识别癌抗原蛋白的细胞毒性 T 淋巴细胞。

[0121] 在另一个方面,本发明提供了辅助 T 细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞、或包含这些细胞的免疫细胞群,它们是通过使用上述肽抗原或其混合物体外刺激而诱导的。

[0122] 在另一个方面,本发明提供了辅助 T 细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞、或包含这些细胞的免疫细胞群,它们是通过使用上述肽抗原或其混合物和免疫激活剂体外刺激而诱导的。免疫激活剂优选细胞生长因子或细胞因子。

[0123] 疫苗可优选进一步包含佐剂,诸如完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、明矾、卡介苗、粘附分子的激动剂和修饰剂、破伤风类毒素、咪喹莫特、montanide、MPL、和 QS21。

[0124] 在另一个方面,本发明提供了用于阻抑肿瘤的方法,其包括将上文所述辅助 T 细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞、或包含这些细胞的免疫细胞群导入身体中。上文所述方法优选用于预防和/或治疗癌症。

[0125] 在另一个方面,本发明提供了细胞培养溶液,其用于生成本发明的辅助 T 细胞或细胞毒性 T 淋巴细胞或包含这些细胞的免疫细胞群,其包含上述肽抗原或其混合物。

[0126] 在另一个方面,本发明提供了细胞培养试剂盒,其用于生成本发明的辅助 T 细胞或细胞毒性 T 淋巴细胞或包含这些细胞的免疫细胞群,其包含上文所述细胞培养溶液和细胞培养容器。

[0127] 在另一个方面,本发明提供了编码上述肽抗原的 DNA。在又一个方面,本发明提供了癌症疫苗,其包含上述本发明 DNA 或包含上述 DNA 的重组病毒或重组细菌。上文所述癌症疫苗优选进一步包含佐剂。

[0128] 疫苗可包含超过一种肽,而且所述多种肽可取决于要治疗的肿瘤。疫苗可进一步包含抗原呈递细胞(诸如树突细胞,和更特别地,经肽脉冲或加载的树突细胞)并用作细胞疫苗来刺激针对肽,并因此抗肿瘤的T细胞免疫。

[0129] 本发明的药物组合物的施用可以通过任意合适的途径完成,包括但不限于:静脉内、皮下、肌内、腹膜内、肿瘤内、经口、经直肠、经阴道、膀胱内和吸入施用,其中静脉内和肿瘤内施用是最优选的。组合物还可以包含任意其它合适的成分,尤其是用于增强组合物的稳定性和/或其终用途。因此,本发明的组合物有多种合适的制剂。以下制剂和方法仅仅是示例性的,绝不是限制。

[0130] 如果需要,药物组合物还可以包括另外的治疗剂或生物活性试剂。例如,可以存在可用于治疗特定适应症的治疗因子。控制炎症的因子例如布洛芬或类固醇可以是组合物的一部分,以减少与体内施用药物组合物相关的肿胀和炎症以及生理疼痛。

[0131] 载体通常是液体,但也可以是固体,或液体与固体成分的组合。载体优选为生理上可接受的(例如药学上可接受的或药理学上可接受的)载体(例如赋形剂或稀释剂)。生理上可接受的载体是本领域熟知的并且是可以容易获得的。载体的选择将至少部分由靶组织和/或细胞的位置以及用于施用组合物的特定方法决定。

[0132] 通常而言,此类组合物可以配制为可注射的液体溶液或悬浮液;也可以配制为适合用于在注射前通过添加液体来制备溶液或悬浮液的固体形式;制备物也可以是乳化的。适合于可注射用途的药物制剂包括无菌水性溶液或分散液;含有已知的蛋白稳定剂和冻干保护剂的制剂;含有芝麻油、花生油或水性丙二醇的制剂;以及用于即用即配的无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。在所有的情况下,制剂必须是无菌的并且其流动性必须达到容易注射的程度。其在生产和储存的条件下必须是稳定的,并且必须能抗微生物例如细菌和真菌的污染作用而保存。可以在水中通过适宜地与表面活性剂例如羟基纤维素混合来制备游离碱或药学上可接受盐形式的活性化合物的溶液。也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物以及在油中制备分散液。在通常的储存和使用条件下,这些制备物含有防腐剂以阻止微生物的生长。

[0133] 本发明的肽可以中性或盐形式配制为组合物。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白质的游离氨基形成)以及与无机酸例如盐酸或磷酸形成的盐,或者与有机酸例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成的盐。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,以及有机碱例如异丙胺、三甲基胺、组氨酸、普鲁卡因等。

[0134] 适合于非肠道施用的制剂包括水性和非水性等渗无菌注射溶液,其可以包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与目标接受体的血液等渗的溶质;水性和非水性的无菌悬浮液,其可以包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。制剂的形式可以是单元剂量或多剂的密封的容器,例如安瓿和小瓶,并且可以储存在冷冻干燥(冻干)的条件下,在临使用前,仅需要添加无菌的液体赋形剂例如用于注射的水。可以从无菌粉末、颗粒和之前描述的类型片剂来制备即用型的注射溶液和悬浮液。在本发明的一个优选实施方式中,将含有肽配体结构域的缀合物配制为用于注射(例如,非肠道施用)。在这个意义上,所述制剂优选适合于肿瘤内施用,但也可以配制为用于静脉内注射、腹膜内注射、皮下注射等。

[0135] 如果需要,本发明还提供了这样的实施方式:其中本发明的肽进一步缀合于聚乙

二醇 (PEG)。PEG 缀合能够增加这些多肽的循环半衰期,降低多肽的免疫原性和抗原性,并改善其生物活性。如果使用,则可以使用任意合适的 PEG 缀合方法,包括但不限于:使甲氧基-PEG 与肽的可供利用的氨基或其它活性反应位点例如组氨酸或半胱氨酸反应。此外,可以使用重组 DNA 技术将具有 PEG 反应活性基团的氨基酸添加到含有肽配体结构域的缀合物中。此外,根据本发明的这个方面,可以使用可释放的和杂合的聚乙二醇化策略,例如多肽的聚乙二醇化,其中,添加到含有肽配体结构域的缀合物分子上的某些位点的 PEG 分子在体内被释放。PEG 缀合方法的实例是本领域已知的。见,例如,Greenwald 等人, *Adv. Drug Delivery Rev.* 55 :217-250 (2003)。

[0136] 适合于通过吸入施用的制剂包括气溶胶制剂。可以将气溶胶制剂置于加压的可接受的推进剂中,例如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等。它们还可以被配制为非加压的制剂,用于从喷雾器或雾化器递送。

[0137] 可以通过将活性成分与多种基底例如乳化基底或水溶性基底混合而将适合用于肛门施用的制剂制备为栓剂。适合于阴道施用的制剂可以是阴道栓剂、棉塞、霜、凝胶、糊、泡沫或喷雾制剂的形式,其中除了活性成分之外,还含有例如本领域已知的这类载体。

[0138] 此外,本发明的组合物可以包括另外的治疗剂或生物活性试剂。例如,可以存在可用于治疗特定适应症的治疗因子。控制炎症的因子例如布洛芬或类固醇可以是组合物的一部分,以减少与体内施用药物组合物相关的肿胀和炎症以及生理疼痛。

[0139] 在吸入式治疗的情况下,本发明的药物组合物优选是气溶胶的形成。用于施用药剂(如果是固体形式)的气溶胶和喷雾发生器是可以获得的。这些发生器提供可呼吸的或可吸入的颗粒,并以适合于人类施用的速率产生一定体积的气溶胶,其中含有预先确定计量的剂量的药物。此类气溶胶和喷雾发生器的实例包括本领域已知的带计量的剂量吸入器和吹药器。如果是液体形式,则本发明的药物组合物可以通过任意合适的装置进行气雾化。

[0140] 当用于静脉内、腹膜内或肿瘤内施用时,本发明的药物组合物可以包含活性化合物的无菌的水性和非水性注射溶液、悬浮液或乳液,其中所述制剂优选与目标接受体的血液等渗。这些制剂可以包含下列一项或多项:抗氧化剂、缓冲剂、表面活性剂、助溶剂、抑菌剂、使组合物与目标接受体的血液等渗的溶质和本领域已知的其它制剂成分。水性和非水性的无菌悬浮液可以包含悬浮剂和增稠剂。组合物可以在单元剂量或多剂的容器,例如密封安瓿和小瓶中提供。

[0141] 本发明的方法还可以是组合治疗的一部分。术语“组合治疗”是指:按照顺次或同时的方式与另一种治疗组合物联合施用根据本发明的治疗剂,从而在接受治疗的哺乳动物中实现该组合的有益效果。任何本发明组合物的最佳剂量可通过本领域普通技术人员知道的常规方法来确定。

[0142] 实施例 1

[0143] 本实施例在 PC3 模型中证明了 SPARC 和 **Abraxane®** 与抗血管发生剂 **Sutent®** 的相互作用。测量了用单独的 Abraxane (每天 15mg/kg 计 5 天);Abraxane 和 Sutent (每天施用 30mg/kg Sutent 计 8 周);Abraxane 和外源 SPARC (每周两次施用 0.2mg/ms SPARC 计 8 周);及最后 Abraxane、Sutent 和 SPARC 一起处理的小鼠中的肿瘤体积。

[0144] 图 1 描绘了一幅图,为这些测试条件下肿瘤体积 (mm³) 对时间 (天) 绘图。由图可见,施用 **Abraxane®** 导致在实验过程里相对于对照显著更低的肿瘤体积。当

Abraxane®与 SPARC 一起施用,肿瘤体积略微更大,指示(如实施例 1 中所示)在此系统中外源施用的 SPARC 使**Abraxane®**减敏。当抗血管发生剂**Sutent®**与 SPARC 和**Abraxane®**起施用,SPARC/**Abraxane®**组合的功效得到显著改进。

[0145] 图 1 还展现了与抗血管发生剂**Sutent®**一起施用**Abraxane®**产生比单独施用**Abraxane®**远远更大的肿瘤体积缩小。令人惊讶的是,与**Abraxane®**和**Sutent®**一起施用外源 SPARC 消除了**Abraxane®**和**Sutent®**的一些协同效应。这提示 SPARC 拮抗**Sutent®**的抗血管发生活性。

[0146] 这些数据提示 SPARC 使这些特定抗肿瘤剂减敏的机制是经血管发生活性。

[0147] 实施例 2

[0148] 本实施例展现了 SPARC 的血管发生行为的表征。

[0149] 使用在中空纤维生物反应器中维持的 HEK 293 细胞表达并纯化重组人 SPARC 和遗传工程变体。使用 HUVEC 管形成测定法和 HUVEC 芽形成珠测定法评估 rhSPARC 及其变体的血管发生活性。

[0150] 在 HUVEC 管形成测定法中,rhSPARC 在 10 μ g/mL 是促血管发生的,在 100 μ g/mL 是抗血管发生。管形成测定法的结果可见图 2。在芽形成测定法中,添加 rhSPARC 导致得到周细胞较好支持的更多成熟血管,提示 SPARC 在初始刺激血管发生本身之外的作用。这些测定法中测试的具有删除和单一/双重氨基酸取代的其它 rhSPARC 变体包括:rhSPARC 的 Q3 删除(BI02),推定血管发生结构域的倒置(BI05),推定血管发生结构域中的双重 K > Q 取代(BI011),推定组织蛋白酶 K 识别位点的遗传消融(BI08),和蛋白水解降解产物。末端氨基酸分析指示血管发生活性位于 SEQ ID NO:1。

[0151] 实施例 3

[0152] 此实施例描绘了 SPARC 血管发生结构域的鉴定。

[0153] 制备了 SPARC 的蛋白水解降解产物,并命名为 SPARC-d。SPARC-d 是由 SPARC 的两种 C 端截短形式组成的混合物。图 3 描绘了 SDS-PAGE 测定法,其中在野生型 SPARC 旁边运行 SPARC-d。图 3 中凝胶上标示 B 的 SPARC-d 的主要形式缺少由氨基酸 233-286(SEQ ID NO. 2)组成的 C 端序列的部分。

[0154] 图 4 描绘了用野生型 SPARC 和 SPARC-D 进行的 HUVEC 3-D 管形成测定法的结果。在图中可看出野生型 SPARC 的血管发生行为,正如前一实施例中描述的;血管发生行为随浓度接近 10 μ g/mL 而升高,且随浓度接近 100 μ g/mL 而下降。然而,SPARC-d 的结果指示截短该蛋白质的 C 端可消除 SPARC 血管发生活性。

[0155] 基于此测定法的结果,有可能将 SPARC 血管发生结构域的位置鉴定为位于 C 末端 54 个氨基酸的序列(SEQ ID NO 1)内。

[0156] 在描述本发明的上下文中(尤其是以下权利要求的上下文中)术语“一种/个(a)”和“一种/个(an)”和“该/所述(the)”的使用应该被解释为涵盖了单数和复数,除非本文中另有指明或上下文明显矛盾。除非另有指明,否则术语“包含(comprising)”、“具有(having)”、“包括(including)”和“含有(containing)”应该被解释为开放式术语(即,意思是“包括但不限于”)。除非本文另有指明,否则本文中提及的数值范围仅仅是作为单独提及落在该范围内的每个单独数值的简便方式,并且每个单独数值并入本说明书中,如同在本文中单独提及一样。除非本文另有指明或者上下文明显

矛盾,否则本文描述的所有方法可以通过任意合适的顺序进行。除非另有要求,否则本文提供的任意和所有实施例或示例性语言(例如“例如”)仅仅意在更好地诠释本发明,而不对本发明的范围进行限制作用。本说明书中的任何语言不应被解释为指明未要求保护的要素对于本发明的实施是必不可少的。

[0157] 在本文中描述了本发明的优选实施方式,包括本发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。本领域普通技术人员在阅读了上述说明书之后,那些优选实施方式的变体会变得明显。本发明人预期技术人员视情况而应用此类变体,本发明人想到本发明可以按照除了本文特异性描述以外的方式来实现。因此,本发明包括适用法律所允许的随附的权利要求中提及的主题的所有修饰和等同物。此外,除非本文另有指明或上下文明显矛盾,否则本发明中包括上述要素的以其所有可能变体进行的任意组合。

[0001]

序列表

<110> 阿布拉西斯生物科学有限责任公司
 Trieu, Vuong
 Knauer, Daniel
 Desai, Neil

<120> SPARC血管发生结构域及使用方法

<130> 706127

<150> 61/159,322
 <151> 2009-03-11

<160> 2

<170> PatentIn 第3.5版

<210> 1
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 1

Thr Glu Leu Ala Pro Leu Arg Ala Pro Leu Ile Pro Met Glu His Cys
 1 5 10 15

Thr Thr Arg Phe Phe Glu Thr Cys Asp Leu Asp Asn Asp Lys Tyr Ile
 20 25 30

Ala Leu Asp Glu Trp Ala Gly Cys Phe Gly Ile Lys Gln Lys Asp Ile
 35 40 45

Asp Lys Asp Leu Val Ile
 50

<210> 2
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2

Ala Pro Gln Gln Glu Ala Leu Pro Asp Glu Thr Glu Val Val Glu Glu
 1 5 10 15

Thr Val Ala Glu Val Thr Glu Val Ser Val Gly Ala Asn Pro Val Gln
 20 25 30

Val Glu Val Gly Glu Phe Asp Asp Gly Ala Glu Glu Thr Glu Glu Glu
 35 40 45

Val Val Ala Glu Asn Pro Cys Gln Asn His His Cys Lys His Gly Lys
 50 55 60

Val Cys Glu Leu Asp Glu Asn Asn Thr Pro Met Cys Val Cys Gln Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Ser Cys Pro Ala Pro Ile Gly Glu Phe Glu Lys Val Cys Ser
 85 90 95

Asn Asp Asn Lys Thr Phe Asp Ser Ser Cys His Phe Phe Ala Thr Lys
 100 105 110

[0002]

Cys	Thr	Leu	Glu	Gly	Thr	Lys	Lys	Gly	His	Lys	Leu	His	Leu	Asp	Tyr
		115					120					125			
Ile	Gly	Pro	Cys	Lys	Tyr	Ile	Pro	Pro	Cys	Leu	Asp	Ser	Glu	Leu	Thr
	130					135					140				
Glu	Phe	Pro	Leu	Arg	Met	Arg	Asp	Trp	Leu	Lys	Asn	Val	Leu	Val	Thr
145					150					155					160
Leu	Tyr	Glu	Arg	Asp	Glu	Asp	Asn	Asn	Leu	Leu	Thr	Glu	Lys	Gln	Lys
				165					170					175	
Leu	Arg	Val	Lys	Lys	Ile	His	Glu	Asn	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Ala	Gly
			180					185					190		
Asp	His	Pro	Val	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Asp	Phe	Glu	Lys	Asn	Tyr	Asn
		195					200					205			
Met	Tyr	Ile	Phe	Pro	Val	His	Trp	Gln	Phe	Gly	Gln	Leu	Asp	Gln	His
	210					215					220				
Pro	Ile	Asp	Gly	Tyr	Leu	Ser	His								
225					230										

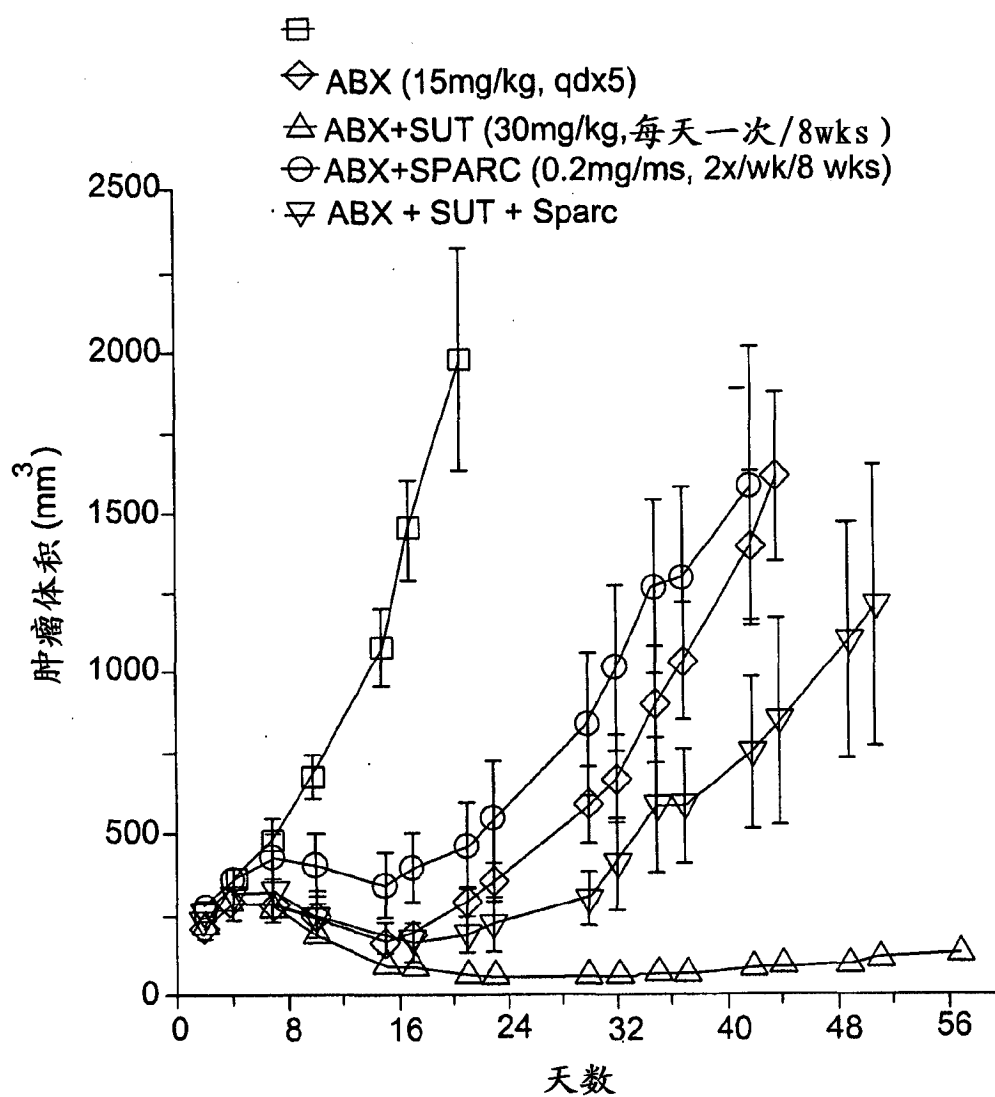


图 1

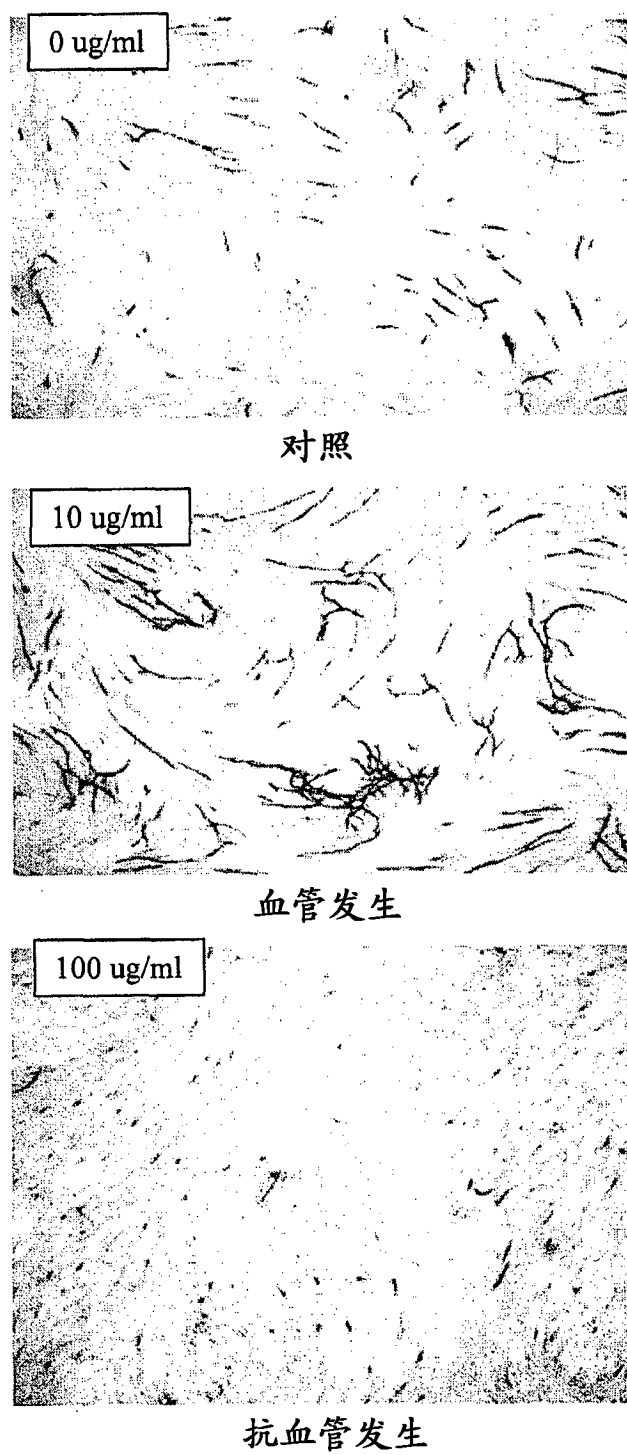


图 2

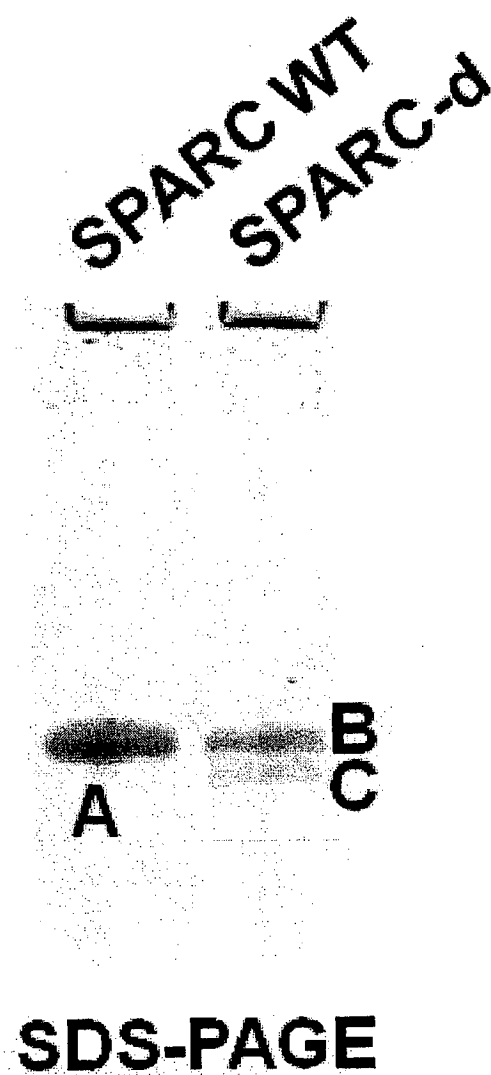


图 3

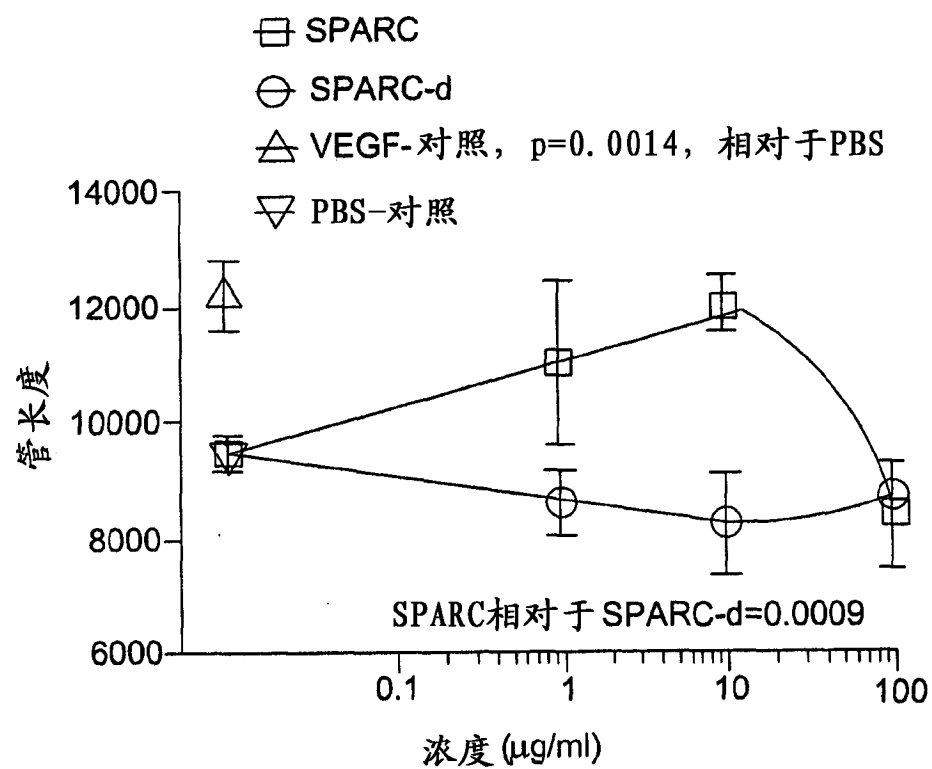


图 4