



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105079784 B

(45)授权公告日 2018.05.18

(21)申请号 201510400952.7

(22)申请日 2004.01.28

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105079784 A

(43)申请公布日 2015.11.25

(30)优先权数据

0300207-8 2003.01.29 SE

60/444,964 2003.02.05 US

(62)分案原申请数据

200480003209.8 2004.01.28

(73)专利权人 普罗莫制药公司

地址 瑞典索尔纳

(72)发明人 莫娜.斯塔尔-巴克达尔

约翰.海尔博恩 安德斯.卡尔森

康尼.博根托夫特

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 张文辉

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61P 17/02(2006.01)

审查员 刘东吉

权利要求书1页 说明书25页
序列表8页 附图4页

(54)发明名称

CATHELICIDIN LL-37及其衍生物在伤口愈合中的用途

(57)摘要

本发明涉及抗微生物的cathelicidin肽LL-37,LL-37的N-末端片段,或在C-末端具有1-3个氨基酸的LL-37的延伸序列的用途,所述用途用于刺激上皮和基质细胞的增殖,从而使伤口如慢性溃疡愈合。通过在药物组合物及包含LL-37的生长培养基中包括成双层性极性脂质,具体为双半乳糖基甘油二酯,可降低LL-37的细胞毒性作用。

1. SEQ ID NO 1所示的肽LL-37或其可药用盐在制备用于治疗由于静脉功能不全造成的慢性溃疡的药物中的用途。
2. 权利要求1的用途,其中所述慢性溃疡是腿溃疡。
3. 权利要求1所述的用途,其中所述肽LL-37是乙酸盐形式。
4. 权利要求2所述的用途,其中所述肽LL-37是乙酸盐形式。

CATHELICIDIN LL-37及其衍生物在伤口愈合中的用途

[0001] 本申请是申请日为2004年01月28日,发明名称为“CATHELICIDIN LL-37及其衍生物在伤口愈合中的用途”的中国专利申请201010150582.3的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及肽LL-37和N-末端片段,及其功能性衍生物,其中所述肽可用于细胞增殖,上皮修复和伤口愈合。本发明也涉及包含一种或一种以上所述肽的药物组合物。

背景技术

[0003] 上皮构成了宿主和可能的有害环境之间的第一道屏障,因此该界面的保护是至关重要的。伤口表明屏障破损并立即启动一系列紧密协调的事件,其目的是为了迅速恢复此屏障的完整性。在较高等生物中紧急伤口闭合已经得到进化,这不同于在较低等物种见到的组织完全再生的费时过程。伤口愈合受损是临床医学的一个主要难题,它的范围从随年龄增长见到的“正常”愈合相对迟缓到病理性的非愈合性(non-healing)溃疡。

[0004] 慢性溃疡是临床的主要问题,尽管我们对生理损伤过程的理解在过去数十年逐渐增加,但仅仅获得了微小的治疗上的进步。独特的病因学可能导致溃疡在不同临床状况发展,但无论原因如何,非愈合性溃疡都以上皮细胞不能迁移,增殖并闭合屏障缺陷为特征。慢性皮肤溃疡最常见的种类是由于静脉功能不全导致的腿溃疡。这些患者出现外周静脉水肿随后是皮肤溃疡,但是动脉循环是完好的。由于动脉硬化缺陷导致的腿和脚溃疡较不常见。

[0005] 另外,皮肤溃疡的发展与免疫疾病如坏疽性脓皮病(pyoderma gangrenosum)和脉管炎(vasculitis)相关。现在的治疗包括长期的全身性免疫抑制法,它并不总是有效。在口腔、生殖器和胃肠粘膜的上皮缺陷和溃疡是常见的,并会导致很多痛苦。根本的病理机制不清楚,例如口疮(aphtae)和侵蚀性苔藓(erosive lichen),且治疗方法贫乏。

[0006] 传统伤口护理包括通过机械或酶去除坏死残渣来形成肉芽组织。细菌密集定居的伤口可能需要抗菌治疗来避免侵入性感染(invasive infection)。使用多种局部抗微生物试剂,如碘酒(iodine),氯己定(chlorhexidine),双氧水(hydrogen peroxide),银和抗生素,但必须考虑这些试剂对基质和新生表皮(neoepidermis)的有毒作用的风险。一旦从伤口清除了坏死组织,应用敷料来促进肉芽组织形成。可以得到很多种这样的敷料,并且多项动物研究和临床试验已经证明了它们对伤口愈合的有益效果。

[0007] 某些部分的伤口仍是治疗抵抗性的,所以需要附加的治疗。在过去的十年中生长因子在加快伤口修复中的潜在用途引起了很多关注。生长因子是控制对组织修复关键的细胞过程(cellular process)的分子,包括细胞迁移,增殖,血管生成和细胞外基质从头(de novo)合成。已经在很多实验中显示出了这些生长因子的有益效果(Scharffetter-Kochanek等,Basic Res Cardiol 93:1-3,1999)。然而,至今在临床实践中用生长因子治疗慢性溃疡都很令人失望。现在在美国和欧洲(瑞典除外)被许可的becaplermin(Regranex®)是唯一,优选在糖尿病的足溃疡中使用的生长因子。用生长因子治疗慢性溃

疡的临床失败的原因被认为涉及传递问题和迅速降解。

[0008] 与此同步,使用生物工程化的人皮肤类似物中的自体 and 同种异体材料的组织疗法已经有了进展。培养的上皮角质形成细胞构成了用于覆盖(例如烧伤病人的)大面积损伤的皮肤的功能疗法,但该治疗昂贵,费时并且需要实验室设备。为提供表皮基底(dermal substrate)已经使用了多种策略,如无细胞的人尸体和有细胞或无细胞的牛胶原蛋白。所有可行的方法都具有相当多的不足,如可能传染疾病,费用高,以及几乎不适合基础伤口护理。

[0009] 抗微生物肽是先天免疫系统的效应分子,其作用是保护宿主抵御可能的有害微生物。进化中它们是保守的,并在自然界分布广泛。人类的抗微生物肽,目前只有少数进行了鉴定;其中防卫素(defensin)和人cathelicidin抗微生物肽hCAP18已涉及在上皮防护中起作用(Selsted等,J Biol Chem258:14485-14489,1983)。

[0010] WO 96/08508涉及人多肽FALL-39,以及包含所述肽并具有抗细菌的抗微生物活性的药物组合物。所述肽由开始的四个氨基酸残基被命名为FALL-39,并由被三个分别的小组同时鉴定的前体蛋白的39个氨基酸的C-末端部分组成(Cowland等,FEBS,1995;Agerberth等,Proc Natl Acad Sci USA 1995;Larriek等,FEBS Letters 1996)。所述肽显示具有抗革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌的有效抗微生物活性。进一步定性C-末端肽显示去除了开始的两个(FA)得到LL-37,包含37个氨基酸的较短序列,它是现在可接受 的名称(Gudmundsson等,Eur J Biochem 238:325-332,1996)。

[0011] 该前体蛋白命名为hCAP18,它是人阳离子抗微生物蛋白,还是包含cathelin的cathelicidin蛋白家族的成员之一,其中cathelin在进化中保守并且C-末端部分在不同物种可变。在人类中,hCAP18是此蛋白家族的唯一成员,而在其它物种中,如小鼠和猪,则有此蛋白家族的若干成员。所述C-末端肽LL-37被认为在细胞外起作用,并且没有证据证明此前体蛋白在细胞内被切割。hCAP18/LL-37存在于白细胞以及屏障器官(barrier organ)如皮肤,粘膜,呼吸道上皮和生殖器官。hCAP18/LL-37定位于屏障上皮(barrier epithelia)似乎与该肽在预防局部感染和全身性微生物侵入中的保护性作用是一致的。LL-37被描述为无半胱氨酸的肽,它能容纳(adopt)两亲性的(amphiphatic),或换言之两亲性的(amphiphilic), α -螺旋构象。高阳离子性(cationicity)与稳定化的两亲性的 α -螺旋结构似乎是此肽抗革兰氏阳性细菌和真菌的抗微生物作用所需要的,这已经通过实验予以证明(Gianga-spero等,Eur J Biochem268:5589-5600,2001)。两亲性的和 α -螺旋的结构似乎对于杀死革兰氏阴性细菌不太重要。与炎症相关,hCAP18/LL-37在皮肤上皮(Frohm等,J Biol Chem272:15258-15263,1997)及粘膜(Frohm Nilsson等,Infect Immun67:2561-2566,1999)上调。

[0012] 现有技术

[0013] Dorschner等,J Invest Dermatol 117:91-97,2001,显示切割后cathelicidin的表达量在人和鼠皮肤中增加,并且缺乏鼠同系物cathelicidin基因不能保护这些小鼠抵御A族(Group)链球菌侵入。

[0014] WO 96/09322,儿童医疗中心公司(Children's Medical Center Corporation)公开了抗菌肽PR-39具有多配体蛋白聚糖(syndecan)-1和-4的诱导活性,因此能同时减少感染,并且作为synducin,影响参与组织修复的生长因子,基质组分及其它细胞效应物

(effector)的作用。所述synducin可在药物载体如常用的脂质体中给药。

[0015] EP 0 935 965 A1, Toray Industries, Inc., 涉及抗幽门螺杆菌制剂 (antipylori agent), 其包含作为活性剂的抗微生物肽, 如猪的肽PR-39。其结论是PR-39的外源性 (exogeneous) 给药有抗幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 的抗微生物活性, 并加快小鼠胃溃疡的愈合。FALL39被提到是cathelin家族的成员之一。

[0016] US 6,255,282, Helix Biomedix, Inc., 公开了新合成的裂解肽 (lytic peptide), 所述的裂解肽共享已知的不同裂解肽的结构和功能特性。具体描述了具有 α -螺旋构象的18个到约40个氨基酸的肽。但没有提到裂解cathelicidin肽。

[0017] Frohm Nilsson, Thesis, Karolinska Institutet, Stockholm 2001, 同时阐述了人cathelicidin抗微生物蛋白hCAP18在人皮肤伤口被高水平诱导, 并在生理性愈合而不是慢性非愈合性溃疡中释放活性的C-末端肽LL-37。hCAP18在伤口床 (bed) 和正常伤口愈合过程中的上皮中可被检测到, 但它在慢性腿溃疡的上皮中不存在, 它只在伤口床和基质中被检测到。据推测慢性溃疡上皮中hCAP18的低水平及其缺乏造成了愈合受损。

[0018] Zasloff, Nature 415:389-395, 2002在抗微生物肽的综述中讨论了多项应用, 其中已经阐述所述肽为抗感染剂, 并且描述了抗微生物肽用于药物开发。

[0019] EP 1 358 888 A1, Bals等, 其公开日2003年11月5日, 涉及所述肽LL-37在预防或治疗由血流减少和动脉硬化造成的疾病和治疗由动脉血供给减少造成的伤口中的用途。显示了LL-37诱导新血管形成和刺激内皮细胞增殖的能力。本发明完全涉及血管生成效应, 并没提到上皮。

[0020] 虽然抗微生物肽, 具体是LL-37, 已经显示出治疗用途, 但至今仍未实现。肽LL-37在高浓度时表现出细胞毒性效应。然而, 血清存在时LL-37表现出的潜在的细胞毒性效应被抑制, 但药物制剂应避免包含血清, 因为它有传播疾病的风险、得到的途径有限且成本高。

[0021] 发明概述

[0022] 作为对损伤的正常反应, 人的抗微生物肽hCAP18在皮肤上皮中被正向调节。但在慢性非愈合性腿溃疡中发现了低水平的hCAP18。明显地, 在慢性腿溃疡中hCAP18和LL-37在上皮完全不存在但在伤口床的炎性渗出物 (infiltrate) 和基质中存在。我们现已发现hCAP18在器官培养的皮肤伤口的上皮再形成中被诱导, 并且此上皮再形成被抗LL-37的抗体以浓度依赖方式抑制。这些发现提示LL-37像生长因子一样发挥功能, 在伤口闭合中起决定性作用。本发明涉及LL-37或衍生自LL-37的新合成的肽或其功能性衍生物用途, 以补偿体内产生的天然LL-37的缺乏。

[0023] 也显示hCAP18的上调和/或加入LL-37肽会刺激正常上皮和基质细胞的增殖, 显示正常伤口的愈合和上皮再生也可得到增强。

[0024] 也发现LL-37的细胞毒性可在包含某些脂质的组合物中降低。

[0025] 附图简述

[0026] 图1是18kDa的hCAP18蛋白的示意图, 该蛋白包含信号肽S.P., 保守的cathelin部分, 及抗微生物肽LL-37 (它在体内被酶截断)。

[0027] 图2是cathelicidin蛋白家族的示意图, 其中说明了不同物种中C-末端肽的多样性。

[0028] 图3A, 3B和3C显示了pIRES2-EGFP载体的cDNA序列, 该载体包括hCAP18的编码序

列,该序列用于转基因表达hCAP18。

发明内容

[0029] 本发明涉及肽和它的可药用盐及其衍生物,所述肽具有LL-37的N-末端片段的至少20个氨基酸的序列,前提是所述肽不包括LL-37。LL-37具有氨基酸序列SEQ ID NO:1:

[0030] H-Leu-Leu-Gly-Asp-Phe-Phe-Arg-Lys-Ser-Lys-Glu-Lys-Ile-Gly-Lys-Glu-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-Asn-Leu-Val-Pro-Arg-Thr-Glu-Ser-OH。

[0031] LL-37的N-末端序列指从氨基酸残基编号1的亮氨酸(Leu)开始的序列。

[0032] 可药用盐包含,例如抗衡离子的乙酸盐,碳酸盐,磷酸盐,硫酸盐,三氟乙酸盐和氯化物。优选的盐是乙酸盐。酯和酰胺是可药用衍生物的例子。

[0033] 本发明的肽应具有不超过40个氨基酸的氨基酸链。本发明涉及具有在LL-37的C-末端已添加了1-3个氨基酸的序列的肽。可添加选自Ala,Arg,Asn,Asp,Cys,Gln,Glu,Gly,His,Ile,Leu,Lys,Met,Phe,Pro,Ser,Thr,Trp,Tyr,Val的任何氨基酸及其衍生物。具有38个氨基酸的肽的例子LL-38,SEQ ID NO:19,具有在LL-37的C-末端已经添加了丝氨酸的序列。

[0034] 本发明具体涉及具有至少20个氨基酸的序列的肽,其选自LL-36,LL-35,LL-34,LL-33,LL-32,LL-31,LL-30,LL-29,LL-28,LL-27,LL-26,LL-25,LL-24,LL-23,LL-22,LL-21或LL-20,上述肽分别具有序列SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18。

[0035] 优选的肽选自LL-36,LL-35,LL-34,LL-33,LL-32,LL-31,LL-30,LL-29,LL-28,LL-27,LL-26或LL-25。

[0036] 本发明的肽的氨基酸序列见下表。

[0037]

SEQ ID NO	肽	氨基酸序列
1	LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES
2	LL-36	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLP RTE
3	LL-35	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRT
4	LL-34	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLP R
5	LL-33	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVP
6	LL-32	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLV
7	LL-31	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNL
8	LL-30	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRN
9	LL-29	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLR
10	LL-28	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFL
11	LL-27	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDF
12	LL-26	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKD
13	LL-25	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIK
14	LL-24	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRI
15	LL-23	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQR
16	LL-22	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQ
17	LL-21	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIV
18	LL-20	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRI
19	LL-38	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRT ESS

[0038] 可用新的肽作为用于细胞增殖,上皮再生,正常或慢性伤口愈合的药物,并作为抗微生物剂。

[0039] 相信新的肽具有在生理条件下形成 α -螺旋结构的潜力。

[0040] 本发明其它方面涉及肽及它的可药用盐及其衍生物在制备用于上皮再生及上皮和基质伤口的愈合的药物中的用途,所述肽具有选自以下序列之一的氨基酸序列:

[0041] a) SEQ ID NO:1;

[0042] b) 包含SEQ ID NO:1的N-末端片段的至少20个氨基酸的序列;

[0043] 其中该肽通过非裂解机制来增强上皮细胞和/或基质细胞的增殖。

[0044] 本发明具体涉及具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的肽LL-37的用途,所述肽呈盐的形式,优选乙酸盐形式。

[0045] 本发明也涉及肽的用途,所述肽选自上述的LL-20到LL-36。

[0046] 由于初级结构中的阳离子氨基酸残基赖氨酸和精氨酸,LL-37以及LL-25到LL-36在中性pH具有净正电荷(+5到+7)。具体是LL-34和LL-35具有7个净正电荷。其它的氨基酸残基是非极性的/疏水的或极性和中性的,或者在较小的程度上是极性的并带负电荷的,这使得整个肽分子为两亲性的。这种肽与疏水面插入双层的带负电荷的磷脂微生物细胞壁发生静电相互作用。疏水性和/或电荷中任一个减少都降低所述肽的抗微生物效应。通常用溶血活性来评估肽对宿主细胞表现出的细胞毒性效应,该效应显示与肽的抗微生物效应相关(Chen等,FEBS Lett 236:462-466,1988)。多项研究已确认对于其它两亲性的, α -螺旋的抗微生物肽这也是正确的。

[0047] 对具有37个氨基酸长度的兔CAP18 (Cap18₁₀₆₋₁₄₂) C-末端肽的研究显示广谱抗菌活性在高度基础的20个残基的N-末端序列中保留,但如果N-末端被截短,就不会保留该活性(Larrick等,Antimicrob Agents Chemother 37:2534-2539,1993)。

[0048] LL-37以及新的LL-20到LL-36肽可用自动肽合成仪并用合成肽的标准方法来合成。

[0049] 本发明具体涉及所述LL-37肽或肽LL-20到LL-36的任一在制备用于治疗慢性溃疡的药物中的用途。所述慢性溃疡可由于静脉功能不全,如腿溃疡,代谢功能异常,如糖尿病,或免疫疾病,如脉管炎和坏疽性脓皮病造成。本发明的肽也可用于治疗由于外伤或烧伤导致的伤口。所述肽具体可被用于上皮组织再生,并增强微型皮肤磨削术(microdermabrasion)后的上皮再生。

[0050] 除了对细胞有毒性,LL-37在伤口环境迅速降解。近来显示丝氨酸蛋白酶3负责hCAP18的细胞外切割(Sørensen等,Blood 97:3951-3959,2001)。

[0051] 为预防所述肽的沉积也为减少内部细胞毒性,所述肽可用极性脂质载体配制。所述制剂应便于将所述肽给药到伤口并另外提供给药后所述肽的延迟释放。这会在体内和体外提高所述肽的稳定性。

[0052] 本发明的另一目的是药物组合物,其包含呈可药用盐或其衍生物形式的抗微生物cathelicidin肽,与由成双层性极性脂质和水溶液组成的载体。

[0053] 所述cathelicidin肽除了人的LL-37外,还可衍生自不同动物物种,例如绵羊的SC5,母牛Bac5,猪的PR-39,小鼠的CRAMP,及兔的p15,见图2。

[0054] 双层一般指极性脂质在水中的片层排列。酰基链形成了内部的疏水部分并且极性头部-基团形成双层的亲水部分。极性的成双层性的脂质的例子,无论来源是天然的还是合成的,可以提到的有磷脂酰胆碱,磷脂酰甘油,双半乳糖基甘油二酯(digalactosyldiacylglycerol),鞘磷脂等。依赖于所述极性脂质在极性溶剂如水中的浓度,可形成脂质体或片层液晶类的粘性凝胶。

[0055] 所述药物组合物具体包含具有选自如下序列之一的氨基酸序列:

[0056] a) SEQ ID NO:1;

[0057] b) 包含SEQ ID NO:1的N-末端片段的至少20个氨基酸的序列;

[0058] 呈可药用盐或其衍生物的形式,以及由成双层性极性脂质和水溶液组成的载体。

[0059] 优选的与所述肽混合或配制的成双层性极性脂质是那些电荷中性的。特别有用的

是双半乳糖基甘油二酯,及其它糖脂,如糖基神经酰胺(glycosyl ceramide),无论是天然的还是合成的,其中非离子性的糖部分(moiety)构成极性头部-基团。较不优选但仍有用的是那些在生理环境是两性离子的和中性的极性脂质,如磷脂酰胆碱,磷脂酰乙醇胺和鞘磷脂。最不优选的是那些带负电荷的极性脂质,因此与带正电荷的肽形成强的复合物。

[0060] 根据本发明所述的成双层性极性脂质载体优选选自磷脂,半乳糖脂或鞘脂。

[0061] 特别优选的成双层性极性脂质是双半乳糖基甘油二酯或富含双半乳糖基甘油二酯的极性脂质混合物,这是由于这类极性脂质的极好的皮肤耐受性。双半乳糖基甘油二酯是一类属于糖脂家族的脂质,是植物细胞膜的公知成分。丰度最大的类之一包含两个半乳糖单位,并且它的常用命名和缩写是双半乳糖基甘油二酯,DGDG,有时称为半乳糖脂。半乳糖脂,首先是DGDG和富含DGDG的物质,已经调查并发现它是工业应用如食品、化妆品和药剂中有用的表面活性物质。WO 95/20944描述了富含DGDG的物质“半乳糖脂物质”的用途,它作为成双层性的物质在极性溶剂中用于制药、营养和化妆品用途。这些应用没公开半乳糖脂以及通常的肽和蛋白的用途,具体没公开本发明的肽的用途。

[0062] 本发明优选方面涉及药物组合物,其中成双层性极性脂质载体是富含双半乳糖基甘油二酯的极性脂质混合物。

[0063] 本发明另一优选方面是药物组合物,其中所述肽为乙酸盐形式。优选的肽为乙酸盐形式的LL-37。特别优选的是药物组合物包含LL-37的乙酸盐与作为成双层性的脂质载体的CPL-半乳糖脂。CPL-半乳糖脂是包含重量百分比为50-70%的双半乳糖基甘油二酯和30-50%或其它极性脂质的半乳糖脂组分的商标。

[0064] 所述药物组合物中盐形式的所述肽和糖脂载体的比例应优选为重量比1:5到1:50,特别优选是1:10-1:25。

[0065] 除了所述成双层性的脂质,所述载体也包含水溶液。水溶液指具有关于pH,离子强度,等渗性等的生理学或可药用特性的溶液。作为例子可提及的水和其它生物相容性溶剂的等渗溶液有水溶液,如生理盐水和葡萄糖溶液,以及形成水凝胶的物质。所述水溶液可以是缓冲的,如磷酸盐缓冲盐水PBS。

[0066] 此药物组合物可还包含可药用赋形剂,如防腐剂来预防微生物在组合物中生长,抗氧化剂,等渗剂,着色剂等。在水的悬浮液中所述组合物可以与悬浮剂和稳定剂组合。

[0067] 组合物的胶体性质使其能通过使用最终的过滤除菌步骤来制备无菌的组合物。

[0068] 为形成凝胶,所述肽优选形成水凝胶的物质配制。形成水凝胶的物质的例子是合成的聚合物,如聚乙烯醇,聚乙烯吡咯烷酮,聚丙烯酸,聚乙二醇,泊洛沙姆(poloxamer)嵌段共聚物等;半合成聚合物,如纤维素酯,包括羧甲基纤维素,羟乙基纤维素,羟丙基纤维素,甲基纤维素,甲基羟丙基纤维素和乙基羟乙基纤维素等;天然的胶,如阿拉伯树胶(acacia),角叉藻聚糖(carragenan),壳聚糖(chitosan),果胶,淀粉,黄原胶等。

[0069] 使用粘膜附着性(muco-adhesive)的水凝胶是有利的。该方面特别有用的是使用透明质酸及其衍生物,卡波姆(carbomer)和聚卡波菲(polycarbophil)类的交联的聚丙烯酸,已知会强有力地附着到粘膜的从凝胶容易得到的聚合物。

[0070] 用泊洛沙姆类的嵌段共聚物也是有利的,即为包含聚乙二醇和聚丙二醇嵌段的聚合物。分散在水中的某些泊洛沙姆是热致可逆的(thermoreversible):在室温它们是低粘性的,但随温度升高显示出明显的粘性增加,导致在体温形成凝胶。因此将药物制剂向相对

温暖的伤口给药的接触时间可能会延长,因此可提高所掺入的肽的有效性。

[0071] 本发明药物组合物可被配制用来局部或肠道,也就是口腔,颊,舌下,粘膜,鼻腔,支气管,直肠,和阴道给药。

[0072] 局部给药的药物组合物的非限制性例子是溶液,喷雾,悬浮液,乳状液,凝胶和膜。如需要,可用添加了药物组合物的绷带或急救绷带(band aid)或膏剂(plaster)。片剂,胶囊,溶液或悬浮液可用于肠道给药。

[0073] 本发明另一方面涉及肽通过非裂解机制在体外使上皮细胞和/或基质细胞增殖的用途,所述肽呈可药用盐或其衍生物的形式,具有选自如下序列之一的氨基酸序列:

[0074] a) SEQ ID NO:1;

[0075] b) 包含SEQ ID NO:1的N-末端片段的至少20个氨基酸的序列;

[0076] 所述的增殖能具体用于人的自体上皮细胞和基质细胞的体外增殖。

[0077] 本发明也涉及培养真核细胞,如上皮细胞和/或基质细胞的生长培养基,其包含LL-37或所述肽与基础培养基的组合。可加入细胞毒性降低试剂如血清。已经发现载脂蛋白A-I (apoA-I) 是人血浆中主要的结合LL-37的蛋白并作为LL-37的清除剂(scavenger) (Wang等, J Biol Chem 273:33115-33118, 1998; Sørensen et al, J Biol Chem 274:22445-22451, 1999), 这提示了调控cathelicidin肽所涉及的机制。细胞毒性降低试剂也可以是成双层极性脂质,如选自上述磷脂,半乳糖脂或鞘脂的脂质。

[0078] 本发明生长培养基的基础培养基基于双蒸馏水(double-distilled water),及若干如下成分:无机盐,酚红,葡萄糖,胸苷(thymidine),次黄嘌呤核苷酸(hypoxanthine), HEPES,丙酮酸钠,氨基嘌呤,氨基酸和维生素。为了在体外培养上皮细胞,如例如角质形成细胞,生长培养基可包含基础培养基和促进生长的试剂盒,该试剂盒包括a) 盐溶液中的LL-37肽,b) 青霉素+链霉素,c) 胰岛素,d) 转铁蛋白,e) 三碘甲腺原氨酸(triiodotyronine), f) 氢化可的松,g) 霍乱毒素,可选的细胞毒性降低试剂,如血清或极性脂质。为了在体外培养基质细胞,例如成纤维细胞,生长培养基可包含基础培养基和促进生长的试剂盒,该试剂盒包括a) 盐溶液中的LL-37肽,b) 青霉素+链霉素,及可选的细胞毒性降低试剂,如血清或极性脂质。

[0079] 本发明其它目的是增强人的自体上皮细胞和基质细胞的体外扩展(expansion) 用于体内细胞移植的方法,其中所述细胞分离自健康皮肤的切片(excised piece),所分离的细胞在本发明的生长培养基中体外培养,之后收获所培养的细胞并用于伤口治疗,如烧伤和溃疡。

[0080] 本发明也涉及促进生长的试剂盒,其包含肽LL-37或所述肽,和细胞毒性降低的成双层极性脂质,并可选包含在单独容器中的抗生素,基础培养基,及其它常用添加物。

[0081] 本发明又一方面涉及将全长hCAP18cDNA构建体转染到自体的人角质形成细胞用于溃疡和烧伤的细胞移植。所述cDNA构建体被设计为能够通过开关机制调节hCAP18基因的表达(Resnitzky等, Mol Cell Biol 14:1669-1679, 1994)。自体的人角质形成细胞得自患者的健康皮肤切片。所述角质形成细胞如所述在细胞培养物中分离并扩展。所述cDNA构建体转染到角质形成细胞。然后将所转染的角质形成细胞进一步在体外扩展并送回患者。

[0082] 本发明具体涉及包含具有序列SEQ ID NO:20的hCAP18完整cDNA序列的基因构建体的用途,所述用途是为了转染上皮和/或基质细胞来增强所述细胞的增殖。

[0083] 1. 肽和它的可药用盐及其衍生物,所述肽具有LL-37的SEQ ID NO:1的N-末端片段的至少20个氨基酸的序列,前提是所述肽不包括LL-37。

[0084] 2. 项1的肽,其中LL-37序列SEQ ID NO:1的C-末端已添加了1-3个氨基酸。

[0085] 3. 项1的肽,其选自LL-36,LL-35,LL-34,LL-33,LL-32,LL-31,LL-30,LL-29,LL-28,LL-27,LL-26,LL-25,LL-24,LL-23,LL-22,LL-21或LL-20,上述肽分别具有序列SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18。

[0086] 4. 项1-3任一的肽,其用作药物。

[0087] 5. 项1-3任一的肽在制备促使伤口愈合、细胞增殖、上皮再生并用作抗微生物剂的药物中的用途。

[0088] 6. 肽及它的可药用盐及其衍生物在制备用于使上皮再生、上皮伤口及基质伤口愈合的药物中的用途,所述肽具有选自以下序列之一的氨基酸序列:

[0089] a) SEQ ID NO:1;

[0090] b) 包含SEQ ID NO:1的N-末端片段的至少20个氨基酸的序列;

[0091] 其中该肽通过非裂解机制来增强上皮细胞和/或基质细胞的增殖。

[0092] 7. 项6的用途,所述肽为呈乙酸盐形式的LL-37,SEQ ID NO:1。

[0093] 8. 项6的用途,所述肽选自:LL-36,LL-35,LL-34,LL-33,LL-32,LL-31,LL-30,LL-29,LL-28,LL-27,LL-26,LL-25,LL-24,LL-23,LL-22,LL-21或LL-20,上述肽分别具有序列SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18。

[0094] 9. 项6-8任一的肽用途,该用途是制备用于治疗由于静脉功能不全,代谢功能异常,或免疫调节异常造成的慢性溃疡的药物。

[0095] 10. 项6-8任一的肽用途,该用途是制备用于治疗由于外伤或烧伤导致的伤口的药物。

[0096] 11. 药物组合物,其包含呈可药用盐或其衍生物形式的抗微生物cathelicidin肽,以及由成双层性极性脂质和水溶液组成的载体。

[0097] 12. 药物组合物,其包含呈可药用盐或其衍生物形式的肽与由成双层性极性脂质和水溶液组成的载体,其中所述肽具有选自以下序列之一的氨基酸序列:

[0098] a) SEQ ID NO:1;

[0099] b) 包含SEQ ID NO:1的N-末端片段的至少20个氨基酸的序列。

[0100] 13. 项11或12的药物组合物,其中所述成双层性极性脂质选自磷脂,半乳糖脂或鞘脂。

[0101] 14. 项11-13任一的药物组合物,其中所述肽为乙酸盐形式。

[0102] 15. 项11-14任一的药物组合物,其中所述成双层性极性脂质包含至少50% (w/w) 的双半乳糖基甘油二酯。

[0103] 16. 项12-15任一的药物组合物,其中所述肽为乙酸盐形式的LL-37。

[0104] 17. 项11-16任一的药物组合物,其包含LL-37的乙酸盐与CPL-半乳糖酯的复合物。

- [0105] 18. 项11-17任一的药物组合物,其中成盐的肽和半乳糖脂载体的重量比为1:10-1:50。
- [0106] 19. 肽通过非裂解机制使上皮细胞和/或基质细胞在体外增殖的用途,所述肽具有选自以下序列之一的氨基酸序列:
- [0107] a) SEQ ID NO:1;
- [0108] b) 包含SEQ ID NO:1的N-末端片段的至少20个氨基酸的序列;
- [0109] 其中所述肽呈可药用盐或其衍生物的形式。
- [0110] 20. 项19的用途,该用途是使人的自体上皮细胞和基质细胞在体外增殖。
- [0111] 21. 培养上皮细胞和/或基质细胞的生长培养基,其包含LL-37或项1-3任一所述的肽以及基础培养基。
- [0112] 22. 培养上皮细胞和/或基质细胞的生长培养基,其包含LL-37或项1-3任一所述的肽以及基础培养基中的成双层性极性脂质。
- [0113] 23. 项22的培养基,其中所述极性脂质选自磷脂,半乳糖脂或鞘脂。
- [0114] 24. 在体外增强用于体内细胞移植的人自体上皮细胞和基质细胞的扩展的方法,其中所述细胞分离自健康皮肤的切割片,所分离的细胞在项21-23任一的生长培养基中在体外培养,之后收获所培养的细胞并用于伤口诸如烧伤损伤和溃疡等的治疗。
- [0115] 25. 培养上皮细胞和/或基质细胞的试剂盒,所述试剂盒包含LL-37或项1-3任一所述的肽及可降低细胞毒性的成双层性极性脂质,并可选包含抗生素,基础培养基,及其它常用添加物。
- [0116] 26. 包含hCAP18的cDNA序列SEQ ID NO:20的基因构建体的用途,所述用途是为了进行上皮细胞和/或基质细胞的转染和转基因表达来增强所述细胞的增殖。

实施例

[0117] 实施例1制备合成肽

[0118] 根据固相合成用9-芴甲氧羰基/叔丁基策略(9-fluorenylmethoxycarbonyl/tert-butyl strategy)来合成LL-37肽。未经加工的肽,作为三氟乙酸盐,用HPLC纯化并最后用冷冻干燥分离(批号971/26,来自Polypeptide Laboratories A/S, Hillerød, Denmark)。通过HPLC和面积积分(integration)来确定纯度,并发现其为99%。用质谱法分析分子量,并对应于游离碱(free base)形式的理论值4493g/mol。分析氨基酸组成显示每个氨基酸的相对量对应于LL-37理论值。从氨基酸分析结果计算肽含量,发现其为73%,剩余物为平衡离子及残余溶剂。

[0119] 合成多批LL-37,用于如下实施例2和5的LL-37肽呈乙酸盐形式。

[0120] 以乙酸盐形式相应合成肽LL-36和LL-38。

[0121] 在如下实施例和实验使用的不同肽见下表。

[0122]

肽	平衡离子	批号	纯度范围-%	肽含量 % (w/w)	所用实验	生产年代
LL-37	三氟乙酸根	YS 5253	98		实施例 3, 4, 6, 7; 实验 3	1997
LL-37	三氟乙酸根	971/26	99	73	实验 5	2002
LL-37	乙酸根	990/37/A	99	83	实施例 2, 5; 实验 4	2003
LL-38	乙酸根	990/38			实验 4	2003
LL-36	乙酸根	990/39			实验 4	2003

[0123] 实施例2制备包含LL-37肽和脂质载体的混合物的药物组合物

[0124] 用如下成分制备药物组合物:

[0125]

成分	浓度
LL-37	100ppm*

[0126]

CPL-半乳糖酯	0.20%
2.6%甘油的无菌水	ad 100%

[0127] *ppm=百万分之几(重量比)

[0128] 将作为乙酸盐的肽LL-37(批号990/37/A),及得自Lipocore Holding AB的脂质载体CPL-半乳糖酯(其为富含双半乳糖基甘油二酯的脂质物质并从燕麦制备),在50ml玻璃烧瓶中称重。轻轻混合此两种成分然后加入甘油溶液。剧烈混合混合物120分钟然后静置1小时。所得组合物为细致(fine)、均质的分散体(dispersion)。将其冷藏直至使用。

[0129] 实施例3制备包含肽LL-37及脂质载体的含水混合物

[0130] LL-37的三氟乙酸盐(批号971/26)和极性的成双层性脂质载体的混合物,用如下成分(重量百分比)来制备:

[0131] 表1.

[0132]

成分	A1	A2	B1	B2	C1	C2
LL-37	100 ppm	-	90	-	92	-
CPL-半乳糖酯	0.19 %	0.20 %	-	-	-	-
Epikuron 200	-	-	0.19 %	0.19 %	-	-
CPL-Sphingomyelin	-	-	-	-	0.19 %	0.19 %
DMEM	ad 100 %	ad 100 %	ad 100 %	ad 100 %	ad 100 %	ad 100 %

[0133] 得自Lipocore Holding AB的CPL-半乳糖酯(CPL-Galactolipid)是来自燕麦的层析纯化的半乳糖脂级分,得自Lucas Meyer GmbH的Epikuron 200是来自大豆的磷脂酰胆碱,并且来自Lipocore Holding AB的CPL-鞘磷脂(CPL-Sphingomyelin)是来自牛奶的层析纯化的鞘磷脂。来自Invitrogen Corp.的DMEM,Dulbecco改进的Eagle培养基是包含无机盐、葡萄糖、酚红、氨基酸和维生素的水溶液。

[0134] 在玻璃烧瓶中称重肽LL-37及脂质载体然后加入DMEM。用Heidolph Promax混合器以频率200/min剧烈震摇所得的分散体1.5小时,然后在室温令其平衡并静置约3小时。进行视觉估计,获得如下结果:所有样本为混浊分散体,在任意样本B1,B2,C1和C2之间无混浊度的差别。唯一可见不同是在样本A1和A2之间:包含所述肽的A1明显不如不包含所述肽的A2混浊。样本A2的混浊度依次低于样本B1,B2,C1和C2的混浊度。这些观察表明样本A1的两个组分之间存在较强的相互作用,从而与无所述肽的样本A2以及其余的对应样本相比,其分散体的平均颗粒较小。在室温储存一天后,样本A1和A2不变,即两者都是均质分散体并且A1不如A2混浊,而其它四个样本在玻璃烧瓶底部都具有可观的沉淀。

[0135] 肽和极性脂质载体的所有三种混合物可用于各种目的,例如作为传递系统,并且用于细胞培养物中的实验;然而,因为肽和半乳糖脂的混合物的储存期限(shelf-life)比其他的那些相对较长(无沉淀),所述混合物对于实际应用是最优选的。

[0136] 实施例4制备包含LL-37肽和脂质载体的混合物的水混合物

[0137] LL-37的三氟乙酸盐样本(批号971/26)和极性的成双层性脂质载体用如下成分(用重量百分比表示)制备:

[0138] 表2.

[0139]

成分	样本 D	样本 E	样本 F	样本 G	样本 H	样本 I	样本 J
LL-37	96 ppm	100 ppm	100 ppm	103 ppm	100 ppm	100 ppm	100 ppm
CPL-半乳糖酯	0.21 %	-	-	-	0.20 %	-	-
来自大豆的 PC, 40 %	-	0.21 %	-	-	-	-	-
来自蛋黄的 PC, 60 %	-	-	0.21 %	-	-	-	-
DOPC, 99 %	-	-	-	0.20 %	-	-	-
来自大豆的 PC, 70 %	-	-	-	-	-	0.20 %	-
来自大豆的 PC, 94 %	-	-	-	-	-	-	0.20 %

[0140]

PBS	ad 100 %	ad 100 %	ad 100 %	ad 100 %	ad 100 %	ad 100 %	ad 100 %
-----	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

[0141] LTP Lipid Technologies Provider AB生产的CPL-半乳糖酯是来自燕麦的层析纯化的半乳糖脂级分。所用的多种磷脂是来自大豆的磷脂酰胆碱(PC), 大约40% (Sigma; P-3644); 来自蛋黄的PC, 大约60% (Sigma; P-5394); 合成的二油醇磷脂酰胆碱(dioleoylphosphatidylcholine) (DOPC), 大约99% (Sigma; P-6354); 来自大豆的PC, 大约70% (Lipoid S75); 及来自大豆的PC, 大约94% (Lipoid S100)。PBS是来自Invitrogen Corp.的磷酸盐缓冲盐水(Dulbecco's; 批号14190-094)。

[0142] 所有被研究的极性脂质具有恰好低于(well below) 0℃的链熔融相变(chain melting transition)温度, 即在完全水化时, 在-10到-15℃的范围。

[0143] 在100ml玻璃烧瓶中称重肽LL-37及脂质载体然后加入PBS。总体积约为30ml。将ST混合器(B1型, E.Büchler, Tübingen) 设置为5.5 (相当于频率约150/min) 剧烈震荡所述样本2小时, 然后在室温令其平衡并静置约30分钟。用Shimadzu UV-VIS Spectrophotometer UV-160A在400-800nm记录所得分散体的混浊度。在室温用10mm比色池(cuvette cell) 对比纯水作测量。表3的混浊度数据以在600nm的透射%表示。也用视觉估计分散体。在室温储存所述分散体一到两天后重复混浊度测量。

[0144] 表3. 混浊度数据

[0145]

混浊度 ($\lambda=600\text{ nm}$)	样本 D	样本 E	样本 F	样本 G	样本 H	样本 I	样本 J
30 分钟	64.1 %	70.9 %	5.1 %	1.7 %	68.6 %	18.6 %	1.4 %
1 天	57.3 %	65.6 %	-	-	67.0 %	19.8 %	-
2 天	57.2 %	65.5 %	-	-	66.9 %	20.5 %	-

[0146] 由视觉估计得出结论所有混合物或多或少地形成混浊分散体;样本D,E,H及I形成最不混浊的分散体,由表3中的最高透光可见,而样本F,G和J形成最混浊的分散体,结果使得分光光度计检测的透光最低。在室温储存一天后,具有初始高混浊度(低透射性)的样本F,G和J都沉淀并且不可测。样本D,E,H和I都是稳定的分散体,所以制备后一天到两天混浊度数据可重复。

[0147] 样本D和H是一式两份,都包含CPL-半乳糖酯,但样本H具有的肽重量与半乳糖脂重量相比稍高。这使得样本H中的混浊度稍低(透射较高),这提示此样本中肽和脂质的相互作用比样本D中的强,从而导致较小的复合体/聚集体,它们使混浊度较低。

[0148] 进一步在2-8℃监测样本D,E,H和I的胶体稳定性2个月。

[0149] 表4. 稳定性数据

[0150]

样本	外观	稳定性
D	细致的混浊分散体,少量沉淀,易于再分散沉淀	可接受
E	混浊分散体,少量沉淀;微生物生长	不可接受
H	细致的混浊分散体,少量沉淀,易于再分散沉淀	可接受
I	混浊分散体,少量沉淀;微生物生长	不可接受

[0151] 这些数据和观察显示肽和极性脂质载体的两个混合物优于其余被测的混合物。包含CPL-半乳糖酯(样本D和H)和来自大豆的PC,ca 40%(样本E)的载体使得分散系统最细致,并且胶体稳定性最长;然而,药物应用中只接受CPL-半乳糖酯,因为仅有具有仅40%磷脂酰胆碱的磷脂物质能用于技术应用。这些数据再次表明半乳糖脂物质在多种药物应用中的有用性,例如作为肽的载体系统。

[0152] 实施例5. 制备包含不同含量的LL-37肽和不同含量的半乳糖脂的水混合物

[0153] 制备LL-37肽在PBS中的995ppm的母液(stock solution)(乙酸盐;批号990/37/A)和CPL-半乳糖酯在PBS中的1.00%的母液。在20ml的带橡皮塞和铝帽的玻璃小瓶(vial)中混合等分母液加另外的PBS。所述混合物的组分见表5所示。在室温平衡1小时后,将ST混合器(B1型,E.Büchler,Tübingen)设置为7.5(相当于频率大约为190/min),以水平位置震摇小瓶1小时。然后在室温过夜平衡并静置所述混合物。评价所述混合物在4℃、一天和五天后的外观为:澄清胶体,轻度混浊,混浊,乳状,结果总结见表5。

[0154] 表5.

[0155]

样本号	LL-37 (ppm)	半乳糖 脂(%)	肽: 脂质 (w/w)	1 天后外观	5 天后外观
01	247	0.135	1:5.5	混浊分散体, 沉淀	混浊分散体, 沉淀

[0156]

02	181	0.133	1:7.4	澄清胶体溶液	澄清胶体溶液, 少量沉淀
03	116	0.133	1:11	澄清胶体溶液	澄清胶体溶液
04	50.5	0.135	1:27	澄清胶体溶液	澄清胶体溶液
05	16.5	0.133	1:81	轻度混浊分散体, 均质	轻度混浊分散体, 均质
06	8.2	0.135	1:165	混浊分散体, 均质	混浊分散体, 均质
07	-	0.133	-	混浊分散体, 均质	混浊分散体, 均质
08	248	0.266	1:11	澄清胶体溶液	澄清胶体溶液, 少量沉淀
09	182	0.267	1:15	澄清胶体溶液	澄清胶体溶液
10	116	0.266	1:23	澄清胶体溶液	澄清胶体溶液
11	49.8	0.268	1:54	轻度混浊分散体, 均质	轻度混浊分散体, 均质
12	17.1	0.266	1:156	轻度混浊分散体, 均质	轻度混浊分散体, 均质
13	8.9	0.265	1:298	轻度混浊分散体, 均质	轻度混浊分散体, 均质
14	-	0.265	-	轻度混浊分散体, 均质	轻度混浊分散体, 均质
15	247	0.532	1:22	澄清胶体溶液	澄清胶体溶液
16	182	0.532	1:29	轻度混浊分散体, 均质	轻度混浊分散体, 均质
17	116	0.533	1:46	混浊分散体, 均质	混浊分散体, 均质
18	49.2	0.533	1:108	混浊分散体, 均质	混浊分散体, 均质
19	16.5	0.534	1:324	混浊分散体, 均质	混浊分散体, 均质
20	8.2	0.532	1:649	混浊分散体, 均质	混浊分散体, 均质
21	-	0.533	-	混浊分散体, 均质	混浊分散体, 均质

[0157]	22	248	0.799	1:32	混浊分散体, 均质	混浊分散体, 少量沉淀
	23	182	0.802	1:44	乳状分散体, 均质	乳状分散体, 少量沉淀
	24	115	0.801	1:70	乳状分散体, 均质	乳状分散体, 少量沉淀
	25	50.1	0.799	1:159	乳状分散体, 均质	乳状分散体, 少量沉淀
	26	16.8	0.799	1:476	乳状分散体, 均质	乳状分散体, 少量沉淀
	27	8.6	0.798	1:928	乳状分散体, 均质	乳状分散体, 少量沉淀
	28	-	0.798	-	乳状分散体, 均质	乳状分散体, 少量沉淀

[0158] 很明显某些LL-37肽和半乳糖脂的比例导致了溶液外观,这表明存在大小比无LL-37的对应样本的颗粒大小要小的小复合物。澄清溶液表明了胶体稳定性优异。

[0159] 实施例6构象测量

[0160] 测量LL-37在溶液中的圆二色性(CD)会揭示关于构象变化的信息。LL-37的抗菌活性依赖于构象:螺旋含量高使得抗菌作用强并且细胞毒性活性高(Johansson等,J Biol Chem 273:3718-3724,1998)。已经发现LL-37的 α -螺旋构象依赖于平衡离子,pH和肽浓度(Johansson等,J Biol Chem 273:3718-3724,1998)。也已知所述肽的某些级分在水溶液中具有 α -螺旋结构,并且由于添加剂如脂质的存在会促进此结构,将它由无规卷曲转化为 α -螺旋(Turner等,Antimicrob Agents Chemother 42:2206-2214,1998)。

[0161] 制备用于圆二色性(CD)测量的样本是在10mM磷酸盐缓冲的水溶液,pH 7.0中,该溶液包含200ppm LL-37(作为三氟乙酸盐,批号971/26),有或无0.40%的CPL-半乳糖酯。将ST混合器(B1型,E.Büchler,Tübingen),其设置为7.5(相当于频率大约为220/min)剧烈震荡50ml玻璃烧瓶中的20ml样本2小时。在2-8℃过夜平衡并静置所述样品。

[0162] 在Jasco J-720(Jasco Inc.)分光光度计记录CD光谱。将比色池(1mm径长(path length))置于光电倍增管邻近,来降低光从分散体散射的效果。在室温测量所述样本并从280到200nm以速率20nm/min扫描,其分辨率为1nm,每轮3次累积(accumulations per run)。结果表示为平均残基椭圆率(mean residue ellipticity), $[\theta]$,并用如下公式估计在222nm的 α -螺旋构象的百分率: $([\theta]_{222}+3900) \cdot 100/41900$ 。

[0163] 对于200ppm LL-37在10mM磷酸盐缓冲溶液,pH 7.0中的CD测定,208和222nm的双二色性最小值(double dichroic minima)显示 α -螺旋二级结构。用在222nm的最小值来计算 α -螺旋结构的百分率,发现它为约63%。当在相同缓冲溶液中加入的半乳糖脂浓度为0.40%(w/w)时,LL-37的 α -螺旋结构实际上不受影响, α -螺旋结构约为64%。

[0164] 加强的螺旋构象与抗菌活性增加有关。推测二级结构也与LL-37的促伤口愈合能力有关,其中 α -螺旋结构的高百分率表示活性加强。在缓冲水溶液中这也指高细胞毒性,但在存在半乳糖脂时,二级结构被保留,因此活性不受影响但细胞毒性却降低。

[0165] 将阴离子的合成磷脂,棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG;Sigma-Aldrich,P6956)作为参照物(reference)用如上述的相同实验条件来进行实验。当存在此脂质时,发现 α -螺旋结构的百分率较低,为58%,这表明LL-37的构象以至于活性更多地被负电荷的磷脂而不是被中性的半乳糖脂影响。但更重要的是,在4℃储藏一个月后所述样本已部分分离,沉淀在容器底部。轻轻摇动会得到粗制的分散体。在同一时间点,在相应样本中也观察到基于半乳糖

脂的沉淀,但程度较轻,它可通过轻轻搅拌再分散为细致的分散体。

[0166] 实施例7细胞毒实验

[0167] 对于评价与活组织紧密接触的物质的细胞毒性,体外细胞毒性分析是有价值的。

[0168] 在培养的哺乳动物细胞(L 929小鼠成纤维细胞)中对所选择的制剂进行体外细胞毒性实验。试验设计是基于US Pharmacopeia 26th edition, Method<87>及ISO 10993-5标准。

[0169] 制剂D和E(见实施例4,表2)与完全细胞培养基(HAM F12培养基,10%的胎牛血清)以浓度10,2,0.4和0.08% (v/v)混合。用这些被试溶液来一式三份处理细胞培养物24小时。也包括一式三份未处理的培养物,阴性对照(用聚丙烯提取物处理)和阳性对照(用锡稳定化的聚氯乙烯提取物处理)。

[0170] 该两种制剂在10% (v/v)时试验显示无到轻微的毒性(细胞毒性级别0-1),在2%,0.4%和0.08% (v/v)时显示无毒性(细胞毒性级别0)。

[0171] 用包含100ppm LL-37的PBS的阳性对照溶液进行细胞毒性实验,在所有被试的四个浓度(所述溶液与细胞培养基的10,2,0.4和0.08%的混合物)产生中等的毒性(细胞毒性级别2)。定义这个水平的毒性为20-50%的细胞死亡或显示了毒性的形态学症状。等级范围为0到4,当对医疗设备的被试提取物进行实验时,级别3和4未通过实验。认为此阳性对照溶液比显示无或仅有轻微毒性的制剂D和E毒性高很多。

[0172] 生物实验

[0173] 基于我们现在的发现

[0174] -hCAP18/LL-37在与炎症和伤口相关的皮肤和粘膜中被诱导,和

[0175] -尽管炎症范围较广(massive),hCAP18/LL-37在慢性溃疡上皮缺乏,

[0176] 我们假设hCAP18/LL-37与皮肤上皮的再生能力有关。为验证此假设进行如下实验。

[0177] 实验1.研究在非炎性人伤口愈合中hCAP18/LL-37的表达类型

[0178] 组织样本

[0179] 从常规腹部或乳房修复手术(reduction surgery)获得人的皮肤。在无菌条件,用3-mm的活组织检查钻孔器(punch)在上皮侧作全厚度(full-thickness)伤口。用6-mm活组织检查钻孔器切割这些活体外伤口,然后转移到24-孔板并用2ml培养基覆盖。这些伤口重复性地在4-7天内再形成上皮(Kratz等Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 28:107-112,1994;Inoue等,J Invest Dermatol 104:479-483,1995;Kratz等,Microsc Res Tech 42:345-350,1998)。每三天更换培养基,该培养基是包含10%胎牛血清(FCS)和抗生素(PEST=青霉素50U/ml和链霉素50mg/ml)的DMEM(Dulbecco改进的Eagle培养基,GIBCO)。在不同时间点,创伤后2,4和7天收获并速冻伤口。总共重复试验四次。利用四个不同的供者,并在每个试验对每种情况作一式三个伤口。每个试验只使用来自一个供者的皮肤。

[0180] 制备RNA探针

[0181] 为检测hCAP18基因的mRNA及对hCAP18/LL-37的免疫反应性,我们对伤口样本进行了原位杂交和免疫组织化学,所述伤口样本代表所有的时间点的顺序上皮再形成。我们在原位杂交使用了³⁵S-标记的反义和有义的RNA探针,如(Frohm Nilsson等,Infect Immun 67:2561-2566,1999)所述进行试验。

[0182] 制备LL-37抗体

[0183] 为免疫组织化学,我们如下产生并制备了多克隆LL-37抗体:根据利用固相合成的Fmoc策略 (Fields and Noble,1990) 制备LL-37肽 (批号YS 5253,EuroDiagnostica AB, Malmö, Sweden) 为三氟乙酸盐,并用HPLC纯化到纯度为98%。在抗菌分析中确认所述肽的生物活性。用标准方案将所述肽用于免疫三只兔子 (AgriSera, Vännäs, Sweden)。用合成的LL-37肽通过亲和纯化得到多克隆抗血清,并用ELISA估计纯化的抗血清。免疫血清的IgG浓度被稀释到0.5mg/ml。从每只兔子收集预免疫血清,IgG浓度是2mg/ml。

[0184] 免疫组织化学

[0185] 速冻并等同处理所有的活组织检查物。简言之,将6-7 μ m厚的冷冻切片与稀释度1:1000和1:2000的LL-37抗体温育,并用间接过氧化物酶法用Vectastain试剂盒 (Vector Laboratories,Burlingame,USA) 根据生产者说明来染色。用Mayer苏木素溶液复染切片。所有实验最少重复三次来确保可重复性。作为对照,不加入第一抗体,而用预免疫的兔IgG (DAKO,Glostrup,Denmark) 作为第一抗体,来同步加工系列组织切片。

[0186] 结果

[0187] 在0小时时间点,有hCAP18mRNA的中度表达,并且整个组织中上皮基底层中的LL-37蛋白与我们以前发现的基层上皮中有hCAP18的组成型表达是一致的。上皮再形成中在不同时间点收获的伤口显示了hCAP18mRNA的独特信号,并且上皮中的LL-37蛋白迁移来覆盖受伤的表面。下面的真皮基质中没有细胞是hCAP18/LL-37阳性的。这些结果表明在无感染的上皮再形成中角质细胞中出现了hCAP18的再合成,也支持了我们关于hCAP18可与上皮再生有关的假设。

[0188] 实验2.用LL-37抗体活体外抑制人皮肤伤口的上皮再形成。

[0189] 将实验1中制备的LL-37抗体加入每孔2ml的培养基 (DMEM,+10%FCS和PEST) 至最终抗体稀释度1:10,1:100和1:1000。我们使用最终IgG浓度等于LL-37抗血清的1:10稀释度的对应预免疫血清作为对照,并且一组伤口只用培养基处理。每种实验条件作一式三份并重复两次。每三天更换培养基并如上述加入LL-37抗体或预免疫血清。创伤后2,4和7天收获离体伤口。用苏木素-伊红染色前,所有样本都速冻,完整切片并固定到Superfrost Plus玻片上。选择代表在伤口中心的最大上皮再形成的切片来作评价。通过在代表所有治疗条件的伤口上用增殖标记物Ki67 (小鼠单克隆Ki67抗血清 (DAKO,Glostrup,Denmark) 在1:25的稀释度) 作免疫组织化学来研究角质细胞的增殖能力。

[0190] 结果

[0191] 用LL-37抗体处理产生上皮再形成的浓度-依赖性抑制。所有用最高的LL-37抗体浓度 (1:10) 处理的伤口无上皮再形成。在这些伤口中只有单个带有脆弱的扁平外观的角质细胞从每个伤口的边缘迁移。用中等浓度 (1:100) 的LL-37处理的伤口显示了延迟的上皮再形成,这些伤口大多到第7天而不是到第4天愈合。并且上皮更薄以及角质细胞外观更脆弱。用最低浓度 (1:1000) 的LL-37抗体处理的伤口与对照伤口无不同,它们到第4天都愈合了并有2-3层坚固上皮。仅用中等和对照IgG抗体处理的对照伤口同等愈合。对照伤口中绝大部分在再上皮化性舌中的细胞为增殖标记物Ki67阳性的,而在用LL-37以1:10处理的伤口无Ki67阳性细胞。我们从此实验得出结论:LL-37可参与皮肤上皮再形成,并且增殖能力似乎优选被影响,因为用LL-37抗体封闭会允许原来单个细胞从伤口边缘的迁移,但会有效预防

角质细胞的进一步增殖。

[0192] 实验3.联用合成型生物活性LL-37肽自身及极性脂质载体处理HaCat细胞的增殖。

[0193] 将HaCat细胞用于三个实验。HaCat细胞是无限增殖的人角质细胞系(Boukamp等,J Cell Biol 106:761-771,1988),它适合试验角质细胞的研究。在培养基(DMEM+10%FCS和PEST)中培养HaCat细胞。两种细胞培养物都用合成型生物活性LL-37(批号YS 5253)处理。另外,加入含2或10%血清的培养基中的LL-37(114 μ g/ml)与CPL-半乳糖酯(0.2%)混合物,来评估其提高增殖并抑制细胞毒性的能力。在不同时间点(24小时,48小时,72小时和96小时)收获细胞并用流式细胞仪(Becton-Dickinson)计数,再用锥虫蓝染色评价生存力。锥虫蓝阳性表示细胞膜已经被破坏。也通过测定线粒体活性来确定增殖和生存力(WST-1, Roche, Cook等Anal Biochem 179:1-7,1989)。

[0194] 表6.用流式细胞仪估计在96小时的HaCat细胞增殖。

[0195]

EGF (nM)	LL-37 (μ g/ml)	血清浓度(%)	细胞数 (均值)	锥虫蓝 +(%)	增殖增加(%)
-------------	------------------------	---------	-------------	-------------	---------

[0196]

-	-	10	32270	< 1	0
1.7	-	10	42000	< 1	30
-	25	10	36470	< 1	13
-	50	10	40950	< 1	27
-	100	10	66430	< 1	100
-	25	2	32130	< 1	0
-	50	2	53620	30-50	无相关细胞毒性作用
-	100	2	15120	100	无相关细胞毒性作用

[0197] 与基线(-EGF)相比计算细胞增殖增加。给出三个分开的实验中一式三份样本/条件的均值。

[0198] 表7.通过线粒体活性(WST-1)测定HaCat细胞在48小时的增殖和生存力。

[0199]

EGF (nM)	LL-37 (μ g/ml)	血清浓度 (%)	吸光度	锥虫蓝 +(%)	增殖增加(%)
-	-	10	0.622	< 1	0
1.7	-	10	1.107	< 1	77
-	100	10	1.110	< 1	78

[0200] 与基线(-EGF)相比计算细胞增殖增加。给出一个实验中6个样本/条件的均值。

[0201] 表8.用流式细胞仪估计在72小时的HaCat细胞增殖。

[0202]

EGF (nM)	LL-37 ($\mu\text{g/ml}$)	脂质 (0.2%)	血清浓 度(%)	细胞数 (均值)	锥虫蓝 +(%)	增殖增加(%)
-	-	-	10	55207	< 1	0
1.7	-	-	10	85050	< 1	54
1.7	-	+	10	87640	< 1	58
-	100	-	10	88853	< 1	61
-	100	+	10	91980	< 1	66
-	100	-	2	150500	100	无相关细胞毒性作用
-	100	+	2	87360	< 1	58

[0203] 与基线(-EGF)相比计算增殖增加。给出一个实验中一式三份样本/条件的均值。

[0204] 结果

[0205] 用LL-37肽处理HaCat细胞导致增殖的浓度-依赖性方式增加。这表明LL-37肽具有刺激角质细胞增殖到等于或超过EGF的增殖水平(上皮细胞增殖的金标准)的能力。我们采用1.7nM的EGF,因为这已经是刺激所培养的角质细胞增殖的最适条件,并已经是标准的培养条件(Cohen等,Dev Biol 12:394-407,1965)。HaCat细胞是高度增殖的上皮细胞,有趣的是LL-37能更进一步增加这些细胞的增殖。当脂质被加入混合物时,2%血清中的100 $\mu\text{g/ml}$ 的LL-37诱导的细胞毒性作用在被完全消除,这表明所述脂质能够在这个实验条件取代血清。

[0206] 此实验已经显示:加入在含有10%胎牛血清(FCS)的培养基中的HaCat细胞培养物的合成型生物活性LL-37(25-100 $\mu\text{g/ml}$)使增殖以浓度-依赖性方式增加。然而如果将所述肽(100 $\mu\text{g/ml}$)加入在包含2%FCS的培养基中的角质细胞培养物,那么所有角质细胞都变为锥虫蓝染色阳性的,这表明对这些细胞的细胞毒性作用。

[0207] 血清的存在抑制了cathelicidin的细胞毒性活性,这机制被认为保护宿主细胞不会受到潜在的有害作用。我们的数据证实血清的存在(10%)抑制了LL-37的细胞毒性作用。另外,在包含较低血清浓度(2%FCS)的培养基中,LL-37(25 μM)和极性脂质载体(0.2%)的混合物抑制了细胞毒性作用并促进了增殖。这些数据提示所述极性脂质载体具有与血清类似的保护能力,不干扰LL-37的生物活性。

[0208] 原始数据显示人角质细胞以与HaCat细胞相同的方式增殖。

[0209] 实验4通过用合成肽LL-36,LL-37和LL-38处理来增殖HaCat细胞

[0210] 在培养基(DMEM+10%FCS和PEST)中培养HaCat细胞。将HaCat细胞以每孔2000个细胞的浓度种于96孔板(Falcon,USA)。在-48小时用细胞铺板,并用不同浓度的合成肽LL-37,LL-36和LL-38在第0小时并在第48小时后刺激细胞。

[0211] 在一个实验中、每一种条件下,对6个孔来进行实验。将1Ci/mmol的³H-胸腺嘧啶(THYMIDINE, [METHYL-³H]-740.0GBq/mmol (20.00Ci/mmol), 1.0ml的乙醇:水, 7:3, Perkin

Elmer Life Sciences Inc.Boston MA.,USA) 加到每个孔,并温育12-17小时。72和96小时后通过³H-胸腺嘧啶掺入由液体闪烁计数器(liquid scintillator)来估计增殖(MicroBeta Perkin Elmer Life Sciences Inc.Boston MA.,USA)。

[0212] 表9.72和96小时后通过³H-胸腺嘧啶掺入来估计在96小时由于LL-37的HaCat细胞增殖。

[0213]

LL-37 ($\mu\text{g/ml}$)	血清浓度 (%)	每分钟计数 (均值)	标准偏差 (+/-)	增殖增加 (%)
0	10	52774	11639	0
1.00	10	75445	32827	43
5.00	10	102353	33808	94
10.00	10	73548	8424	39
25.00	10	76510	10550	45
50.00	10	65119	8565	23

[0214] 与基线相比(对照=0 $\mu\text{g/ml}$)计算细胞增殖增加(增殖系数)。给出一个实验中每种条件下的四个样本的平均值。

[0215] 表10.LL-36肽刺激的HaCat细胞。96小时后由³H-胸腺嘧啶掺入来评估增殖。

[0216]

LL-36 ($\mu\text{g/ml}$)	血清浓度 (%)	每分钟计数 (均值)	标准偏差 (+/-)	增殖增加 (%)
0	10	69323	7511	0
1.00	10	86253	10770	24
5.00	10	116381	14570	68
10.00	10	70157	3660	1
25.00	10	72674	7965	5
50.00	10	68560	11699	-1

[0217] 与基线相比(对照=0 $\mu\text{g/ml}$)计算细胞增殖增加(增殖系数)。给出一个实验中每种条件下的四个样本的平均值。

[0218] 表11.LL-38肽刺激的HaCat细胞。96小时后由³H-胸腺嘧啶掺入来评估增殖。

[0219]

LL-38 ($\mu\text{g/ml}$)	血清浓度 (%)	每分钟计数 (均值)	标准偏差 (+/-)	增殖增加 (%)
0	10	79191	15277	0
1.00	10	82008	7911	4
5.00	10	68694	16599	-13
10.00	10	57293	8512	-28
25.00	10	54294	14335	-31
50.00	10	48701	6080	-39

[0220] 与基线相比(对照=0 $\mu\text{g/ml}$)计算细胞增殖增加(增殖系数)。给出一个实验中每种情况四个样本的平均值。

[0221] 实验5.用LL-37肽处理的人成纤维细胞的增殖

[0222] 本实验和如下实验所用的肽LL-37如实施例1(批号971/26)所述。成纤维细胞是一种基质细胞,它得自患有由静脉功能不全导致的慢性腿溃疡患者的受伤和未受伤的皮肤。从伤口周边取钻孔-活组织检查物(4-mm),其包括50%上皮化的区域,并从膝盖区域取未受伤的皮肤。排除有糖尿病,动脉功能不全或慢性炎性病史的个体。也排除在溃疡周边有湿疹症状,有感染的临床症状,或在活组织检查时正进行全身或局部抗生素治疗的患者。用惰性的局部敷料和标准的压迫绷带来处理包括的患者。

[0223] 用外植体技术(explant technique)(Hehenberger等,Cell Biochem Funct 15: 197-201,1997)将成纤维细胞置于培养物中。将成纤维细胞以每孔2000个细胞的浓度种于96孔板(Falcon,USA)。在-48小时种细胞,并用不同浓度的合成LL-37肽来刺激细胞指导第0小时。对一个实验中、每种条件下的6个孔来进行实验。通过24小时和48小时后测定线粒体活性(WST-1,Roche)来确定增殖和生存力。见下表12和表13。与基线(对照=0 $\mu\text{g/ml}$)相比计算细胞增殖增加(增殖系数)。可见一个实验中每种条件下的六个样本的均值。

[0224] 表12.LL-37刺激的人伤口成纤维细胞。在第48小时由线粒体活性(WST-1)测定的人成纤维细胞的增殖和生存力。

[0225]

LL-37 ($\mu\text{g/ml}$)	脂质 (0.2%)	血清浓度(%)	吸光度	标准偏差 (+/-)	增殖增加 (%)
-	-	10	0.785	0.020	0
25	-	10	1.171	0.242	49
50	-	10	1.073	0.199	37
100	-	10	0.955	0.187	22
100	+	2	0.960	0.122	22

[0226] 表13. LL-37肽刺激的人正常成纤维细胞。在第48小时由线粒体活性 (WST-1) 测定的人成纤维细胞的增殖和生存力。

LL-37 ($\mu\text{g/ml}$)	血清浓度(%)	吸光度	标准偏差 (+/-)	增殖增加 (%)
-	10	0.560	0.019	0
25	10	0.597	0.067	7
50	10	0.626	0.076	12
100	10	0.669	0.051	19

[0228] 实验6. hCAP18在HEK293细胞的转基因表达及HEK293-hCAP18细胞的增殖

[0229] 包含hCAP18完整编码序列的Image克隆3057931 (ref) 的Bfa1片段, 其包括5'-未翻译区的16bp, 该片段亚克隆到双顺反子 (bicistronic) 载体pIRES2-EGFP (BD Biosciences, Bedford, MA) 的Sma1-位点。人胚胎肾细胞HEK293用Fugene (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) 在标准条件下转染, 并用400ng/ml G418 antibioticum (Invitrogen, Paisley, UK) 选择两周。用MoFlo®高速细胞分选流式细胞计数器 (DakoCytomation, Fort Collins, CO) 分选表达EGFP的细胞, 使用Summit™软件来进行数据分析, 所述细胞的CAP18表达用免疫印迹来定量。通过用仅表达EGFP的载体转染来类似建立对照细胞系。

[0230] 为了增殖分析, 70%满底时收获细胞并接种在24-孔板。24小时后更换培养基, 于2ml补充了5%FCS和PEST的培养基 (OPTIMEM, Gibco BRL, Life Technologies, Scotland) 中培养细胞。所有条件都一式三份进行。每隔一天更换培养基。然后在第6天收获细胞系并用流式细胞仪计数。用锥虫蓝测定细胞生存力; 在所有条件下<5%的细胞为锥虫蓝阳性的。与基线 (HEK293-EGFP) 相比来计算细胞增殖的增加 (增殖系数)。可见一个实验中每种条件下的一式三份样本的平均值。

[0231] 表14. 用流式细胞仪估计的HEK293-hCAP-18细胞在144小时的增殖。

[0232]

细胞种类	血清浓度(%)	细胞数 (均值)	标准偏差 (+/-)	增殖增加(%)
HEK293-EGFP	5	169063	63726	0
HEK293-hCAP18	5	485884	88168	187

[0233] 所述HEK293-hCAP18细胞的增殖也用³H-胸腺嘧啶掺入来评估,所得结果见下表15。与基线(HEK293-EGFP)相比来计算细胞增殖增加(增殖系数)。可见一个实验中每种条件下的四个样本的平均值。

[0234] 表15.96小时后用³H-胸腺嘧啶掺入来评估HEK293-hCAP-18细胞在144小时的增殖。

[0235]

细胞种类	血清浓度 (%)	每分钟计数 (均值)	标准偏差 (+/-)	增殖增加(%)
HEK293-EGFP	0.1	364	118	0
HEK293-hCAP18	0.1	796	206	111
HEK293-EGFP	0.5	811	459	0
HEK293-hCAP18	0.5	2271	792	180
HEK293-EGFP	1	744	433	0
HEK293-hCAP18	1	2303	359	209

[0236]

HEK293-EGFP	2	767	334	0
HEK293-hCAP18	2	3483	771	354
HEK293-EGFP	5	958	414	0
HEK293-hCAP18	5	6088	1783	534
HEK293-EGFP	10	1806	664	0
HEK293-hCAP18	10	6541	2827	262

[0237] 实验7.在不同生长培养基中培养用于移植的人细胞

[0238] 培养上皮细胞

[0239] 从患者的健康皮肤切割1×1cm的一片皮肤。切碎该皮肤并用胰蛋白酶/EDTA(0.05/0.01%)处理,而且将2-5×10⁶的募集的(recruited)角质细胞加入在75cm²培养烧瓶中的1.5×10⁶丝裂霉素-预处理的(4μg/ml,2小时)3T3细胞。加入包含LL-37肽的生长培养基A。通过胰酶消化收获薄片状细胞并移植到患者。

[0240] 生长培养基A用于上皮细胞如例如角质细胞的体外培养,它由基础培养基和促进生长的试剂盒(GPK)组成,其包括a) 盐溶液中的LL-37肽,b) 青霉素+链霉素,c) 胰岛素,d) 转铁蛋白(transferring),e) 三碘甲腺原氨酸(triiodotyronine),f) 氢化可的松,g) 霍乱毒素和选出的细胞毒性降低制剂,如血清或极性脂质。

[0241] 基质细胞培养

[0242] 基质细胞得自4mm的皮肤活组织检查物,清理皮下组织,并用外植技术种于细胞培养皿来获得原代成纤维细胞。生长培养基B用于活组织检查物的培养。用胰酶消化收获细胞并送回患者。

[0243] 生长培养基B用于基质细胞如例如成纤维细胞的体外培养,它由基础培养基和促进生长的试剂盒组成,其包括a) 盐溶液中的LL-37肽,b) 青霉素+链霉素和选出的细胞毒性降低制剂,如血清或极性脂质。

[0244] 基础培养基是基于包含无机盐,酚红,葡萄糖,胸腺嘧啶,次黄嘌呤,HEPES,丙酮酸钠,氨基嘌呤,氨基酸和维生素的重蒸馏水。

[0245] 实验总结

[0246] 总言之,已经阐述了正常伤口愈合过程中皮肤上皮中产生LL-37,并且出现上皮再形成需要LL-37。已经显示慢性溃疡上皮缺乏内源性LL-37。因此我们认为,利用LL-37、以及所述肽的N-末端片段、及其功能性衍生物的治疗,提供了促进所述溃疡愈合的合理策略。另外加入LL-37和hCAP18/LL-37的转基因表达也刺激健康皮肤的增殖,这表明LL-37可用来增强正常和有缺陷上皮的体内修复以及上皮细胞的体外增殖使其用于自体细胞移植。我们也鉴定了合适的载体和转运系统,其降低细胞毒性并具有保护LL-37及其它cathelicidin肽不在体内被迅速降解的潜力。

序列表

<110> 利波佩普泰德公司 (Lipopeptide AB)
 <120> CATHELICIDIN LL-37 及其衍生物在伤口愈合中的用途
 <130> 52144
 <160> 20
 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)
 <220>
 <221> 肽
 <222> (1).. (37)
 <223> LL-37
 <400> 1

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val
 20 25 30

[0001] Pro Arg Thr Glu Ser
 35

<210> 2
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <221> 肽
 <222> (1).. (36)
 <223> LL-36
 <400> 2

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val
 20 25 30

Pro Arg Thr Glu
 35

<210> 3
 <211> 35
 <212> PRT

<213> 人工的

<220>

<221> 肽

<222> (1).. (35)

<223> LL-35

<400> 3

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val
20 25 30

Pro Arg Thr
35

<210> 4

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<221> 肽

[0002] <222> (1).. (34)

<223> LL-34

<400> 4

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val
20 25 30

Pro Arg

<210> 5

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<221> 肽

<222> (1).. (33)

<223> LL-33

<400> 5

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu

1 5 10 15
Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val
20 25 30

Pro

<210> 6
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<221> 肽
<222> (1)... (32)
<223> LL-32
<400> 6

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15
Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val
20 25 30

[0003] <210> 7
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<221> 肽
<222> (1)... (31)
<223> LL-31
<400> 7

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15
Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu
20 25 30

<210> 8
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<221> 肽
<222> (1)... (30)

<223> LL-30

<400> 8

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn
20 25 30

<210> 9

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<221> 肽

<222> (1).. (29)

<223> LL-29

<400> 9

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

[0004]

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg
20 25

<210> 10

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<221> 肽

<222> (1).. (28)

<223> LL-28

<400> 10

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu
20 25

<210> 11

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<221> 肽

<222> (1).. (27)

<223> LL-27

<400> 11

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu

1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe

20 25

<210> 12

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<221> 肽

<222> (1).. (26)

<223> LL-26

<400> 12

[0005] Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu

1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp

20 25

<210> 13

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<221> 肽

<222> (1).. (25)

<223> LL-25

<400> 13

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu

1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys

20 25

<210> 14

<211> 24

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(24)
<223> LL-24
<400> 14

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile
20

<210> 15
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(23)
<223> LL-23
<400> 15

[0006]

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg
20

<210> 16
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(22)
<223> LL-22
<400> 16

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln
20

<210> 17
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<221> 肽
<222> (1)... (21)
<223> LL-21
<400> 17

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val
20

<210> 18
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

[0007] <220>
<221> 肽
<222> (1)... (20)
<223> LL-20
<400> 18

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile
20

<210> 19
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<221> 肽
<222> (1)... (38)
<223> LL-38
<400> 19

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val
20 25 30

Pro Arg Thr Glu Ser Ser
35

<210> 20

<211> 536

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> cDNA

<222> (1).. (536)

<223> hCAP18 基因插入 pIRES2-EGFP 载体的部分的 cDNA 序列

<400> 20

tagaggagg cagacatggg gaccatgaag acccaaaggg atggccactc cctggggcgg 60

[0008] tggtcactgg tgcctcgtct gctggggcctg gtgatgcctc tggccatcat tgcccaggtc 120

ctcagctaca aggaagctgt gcttcgtgct atagatggca tcaaccagcg gtccctcgat 180

gctaacctct accgcctcct ggacctggac cccaggccca cgatggaagg ggaccagac 240

acgccaaagc ctgtgagctt cacagtgaag gagacagtgt gccccaggac gacacagcag 300

tcaccagagg attgtgactt caagaaggac gggctggatg agcgggtgtat ggggacagtg 360

acctcaacc aggccagggg ctcccttgac atcagttgtg ataaggataa caagagattt 420

gcccgtctgg gtgatttctt ccggaaatct aaagagaaga ttggcaaaga gttiaaaaga 480

attgtccaga gaatcaagga ttttttgcgg aatcttgtac ccaggacaga gtccta 536

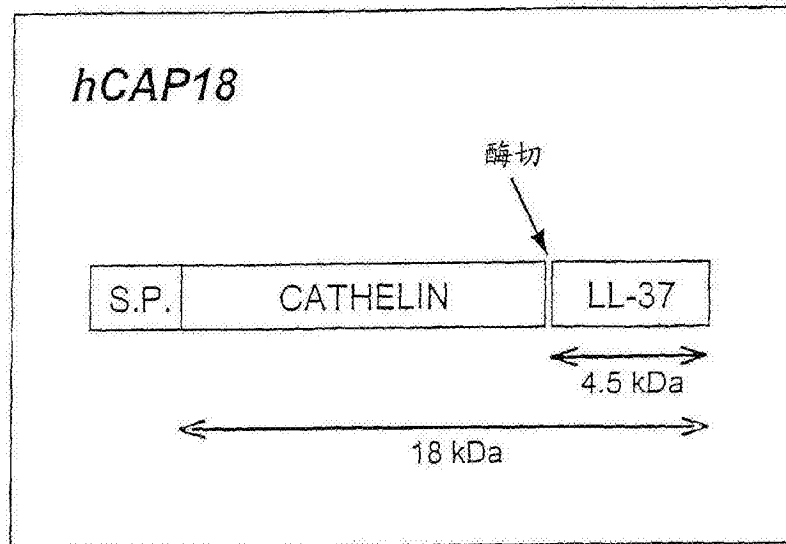


图1

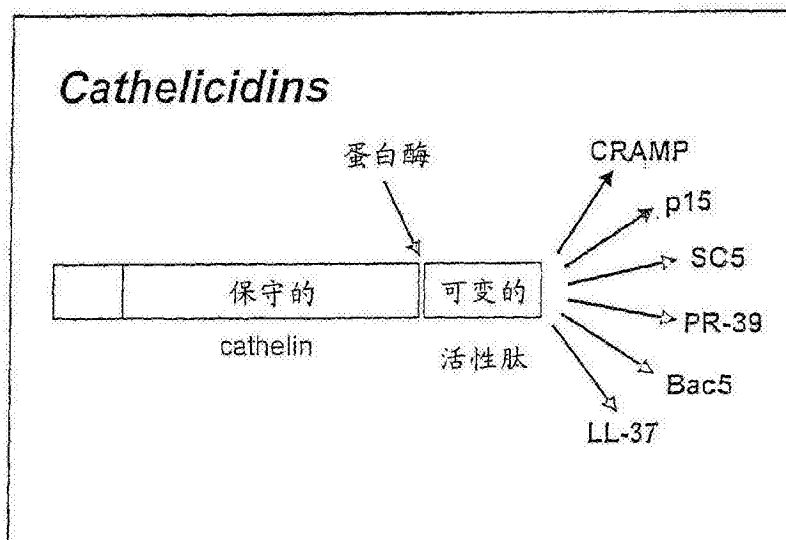


图2

包括 hCAP18 编码序列的载体 pIRES2-EGFP

```

TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
TGGAGTTCCTG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG
CCCAACGACC CCCGCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT
AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT
AAACTGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC AAGTACGCCC
CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT ATGCCAGTA
CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA
TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA
TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA
ACAACCTCCG CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
GTCTATATAA GCAGAGCTGG TTTAGTGAAC CGTCAGATCC GCTAGCGCTA
CCGGACTCAG ATCTCGAGCT CAAGCTTCGA ATTCTGCAGT CGACGGTACC
GCGGGCCCTA GAGGGAGGCA GACATGGGGA CCATGAAGAC CCAAAGGGAT
GGCCACTCCC TGGGGCGGTG GTCACTGGTG CTCCTGCTGC TGGGCCTGGT
GATGCCTCTG GCCATCATTG CCCAGGTCCT CAGCTACAAG GAAGCTGTGC
TTCGTGCTAT AGATGGCATC AACCAGCGGT CCTCGGATGC TAACCTCTAC
CGCCTCCTGG ACCTGGACCC CAGGCCCACG ATGGATGGNG ACCCAGACAC
GCCAAAGCCT GTGAGCTTCA CAGTGAAGGA GACAGTGTGC CCCAGGACGA
CACAGCAGTC ACCAGAGGAT TGTGACTTCA AGAAGGACGG GCTGGTGAAG
CGGTGTATGG GGACAGTGAC CCTCAACCAG GCCAGGGGCT CCTTTGACAT
CAGTTGTGAT AAGGATAACA AGAGATTTGC CCTGCTGGGT GATTTCTTCC
GGAAATCTAA AGAGAAGATT GGCAAAGAGT TTAAGAAGAT TGTCCAGAGA
ATCAAGGATT TTTTGCAGAA TCTTGTACCC AGGACAGAGT CCTAGGGATC
CGCCCTCTC CCTCCCCCCC CCTAACGTT ACTGGCCGAA GCCGCTTGGA
ATAAGGCCGG TGTGCGTTTG TCTATATGTT ATTTTCCACC ATATTGCCGT
CTTTTGGCAA TGTGAGGGCC CGGAAACCTG GCCCTGTCTT CTTGACGAGC
ATTCTAGGG GTCTTTCCCC TCTCGCCAAA GGAATGCAAG GTCTGTTGAA
TGTGCTGAAG GAAGCAGTTC CTCTGGAAGC TTCTTGAAGA CAAACAACGT
CTGTAGCGAC CCTTTGCAGG CAGCGGAACC CCCACCTGG CGACAGGTGC
CTCTGCGGCC AAAAGCCACG TGTATAAGAT ACACCTGCAA AGGCGGCACA
ACCCAGTGTC CACGTTGTGA GTTGGATAGT TGTGGAAAGA GTCAAATGGC
TCTCCTCAAG CGTATTCAAC AAGGGGCTGA AGGATGCCCA GAAGGTACCC
CATTGTATGG GATCTGATCT GGGGCCTCGG TGCACATGCT TTACATGTGT
TTAGTCGAGG TTAAAAAACC GTCTAGGCC CCCGAACCAC GGGGACGTGG
TTTTCTTTTG AAAAACACGA TGATAATATG GCCACAACCA TGGTGAGCAA
GGGCGAGGAG CTGTTTACCG GGGTGGTGCC CATCCTGGTC GAGCTGGACG
GCGACGTAAA CGGCCACAAG TTCAGCGTGT CCGGCGAGGG CGAGGGCGAT
GCCACCTACG GCAAGCTGAC CCTGAAGTTC ATCTGCACCA CCGGCAAGCT
GCCCGTGCCC TGGCCACCC TCGTGACCAC CCTGACCTAC GGCGTGCACT
GCTTCAGCCG CTACCCCGAC CACATGAAGC AGCACGACTT CTTCAAGTCC
GCCATGCCCG AAGGCTACGT CCAGGAGCGC ACCATCTTCT TCAAGGACGA
CGGCAACTAC AAGACCCGCG CCGAGGTGAA GTTCGAGGGC GACACCCTGG
TGAACCGCAT CGAGCTGAAG GGCATCGACT TCAAGGAGGA CGGCAACATC

```

(续. 图 3B)

图3A

(续. 图 3A)

CTGGGGCACA	AGCTGGAGTA	CAACTACAAC	AGCCACAACG	TCTATATCAT
GGCCGACAAG	CAGAAGAACG	GCATCAAGGT	GAACCTCAAG	ATCCGCCACA
ACATCGAGGA	CGGCAGCGTG	CAGCTCGCCG	ACCACTACCA	GCAGAACACC
CCCATCGGCG	ACGGCCCCGT	GCTGCTGCCC	GACAACCACT	ACCTGAGCAC
CCAGTCCGCC	CTGAGCAAAG	ACCCCAACGA	GAAGCGCGAT	CACATGGTCC
TGCTGGAGTT	CGTGACCGCC	GCCGGGATCA	CTCTCGGCAT	GGACGAGCTG
TACAAGTAAA	GCGGCCGCGA	CTCTAGATCA	TAATCAGCCA	TACCACATTT
GTAGAGGTTT	TACTTGCTTT	AAAAAACCTC	CCACACCTCC	CCCTGAACCT
GAAACATAAA	ATGAATGCAA	TTGTTGTTGT	TAACCTGTTT	ATTGCAGCTT
ATAATGGTTA	CAAATAAAGC	AATAGCATCA	CAAATTTTAC	AAATAAAGCA
TTTTTTTTCAC	TGCATTCTAG	TTGTGGTTTG	TCCAAACTCA	TCAATGTATC
TTAAGGCGTA	AATTGTAAGC	GTTAATATTT	TGTTAAAATT	CGCGTTAAAT
TTTTGTATAA	TCAGCTCATT	TTTTAACCAA	TAGGCCGAAA	TCGSCAAAAT
CCCTTATAAA	TCAAAAGAAT	AGACCGAGAT	AGGGTTGAGT	GTTGTTCAG
TTTGGAACAA	GAGTCCACTA	TTAAAGAACG	TGGACTCCAA	CGTCAAAGGG
CGAAAAACCG	TCTATCAGGG	CGATGGCCCA	CTACGTGAAC	CATCACCCCTA
ATCAAGTTTT	TTGGGGTCGA	GGTGCCGTAA	AGCACTAAAT	CGGAACCCCTA
AAGGGAGCCC	CCGATTTAGA	GCTTGACGGG	GAAAGCCGGC	GAACGTGGCG
AGAAAGGAAG	GGAAGAAAGC	GAAAGGAGCG	GGCGCTAGGG	CGCTGGCAAG
TGTAGCGGTC	ACGCTGCGCG	TAACCACCAC	ACCCGCCGCG	CTTAATGCGC
CGCTACAGGG	CGCGTCAGGT	GGCACTTTTC	GGGGAAATGT	GCGCGGAACC
CCTATTTGTT	TATTTTCTA	AATACATTCA	AATATGTATC	CGCTCATGAG
ACAATAACCC	TGATAAATGC	TTCAATAATA	TTGAAAAAGG	AAGAGTCCTG
AGGCGGAAAG	AACCAGCTGT	GGAATGTGTG	TCAGTTAGGG	TGTGGAAAGT
CCCCAGGCTC	CCCAGCAGGC	AGAAGTATGC	AAAGCATGCA	TCTCAATTAG
TCAGCAACCA	GGTGTGGAAA	GTCCCCAGGC	TCCCCAGCAG	GCAGAAGTAT
GCAAAGCATG	CATCTCAATT	AGTCAGCAAC	CATAGTCCCG	CCCCTAACTC
CGCCCATCCC	GCCCCTAACCT	CCGCCCAGTT	CCGCCCATTC	TCCGCCCCAT
GGCTGACTAA	TTTTTTTTTAT	TTATGCAGAG	GCCGAGGCCG	CCTCGGCCCTC
TGAGCTATTC	CAGAAGTAGT	GAGGAGGCTT	TTTTGGAGGC	CTAGGCTTTT
GCAAAGATCG	ATCAAGAGAC	AGGATGAGGA	TCGTTTCGCA	TGATTGAACA
AGATGGATTG	CACGCAGGTT	CTCCGGCCGC	TTGGGTGGAG	AGGCTATTCCG
GCTATGACTG	GGCACAACAG	ACAATCGGCT	GCTCTGATGC	CGCCGTGTTC
CGGCTGTCAG	CGCAGGGGCG	CCCGGTTCTT	TTTGTCAAGA	CCGACCTGTC
CGGTGCCCTG	AATGAACTGC	AAGACGAGGC	AGCGCGGCTA	TCGTGGCTGG
CCACGACGGG	CGTTCCTTGC	GCAGCTGTGC	TCGACGTTGT	CACTGAAGCG
GGAAGGGACT	GGCTGCTATT	GGGCGAAGTG	CCGGGGCAGG	ATCTCCTGTC
ATCTCACCTT	GCTCCTGCCG	AGAAAGTATC	CATCATGGCT	GATGCAATGC
GGCGGCTGCA	TACGCTTGAT	CCGGCTACCT	GCCCATTCGA	CCACCAAGCG
AAACATCGCA	TCGAGCGAGC	ACGTACTCGG	ATGGAAGCCG	GTCTTGTCGA
TCAGGATGAT	CTGGACGAAG	AGCATCAGGG	GCTCGCGCCA	GCCGAACGTG
TCGCCAGGCT	CAAGGCGAGC	ATGCCCGACG	GCGAGGATCT	CGTCGTGACC
CATGGCGATG	CCTGCTTGCC	GAATATCATG	GTGGAAAATG	GCCGCTTTTC
TGGATTTCATC	GACTGTGGCC	GGCTGGGTGT	GGCGGACCGC	TATCAGGACA
TAGCGTTGGC	TACCCGTGAT	ATTGCTGAAG	AGCTTGCGCG	CGAATGGGCT

(续. 图 3C)

图3B

(续. 图 3B)

GACCGCTTCC	TCGTGCTTTA	CGGTATCGCC	GCTCCCGATT	CGCAGCGCAT
CGCCTTCTAT	CGCCTTCTTG	ACGAGTTCTT	CTGAGCGGGA	CTCTGGGGTT
CGAAATGACC	GACCAAGCGA	CGCCCAACCT	GCCATCACGA	GATTTTCGATT
CCACCGCCGC	CTTCTATGAA	AGGTTGGGCT	TCGGAATCGT	TTTCCGGGAC
GCCGGCTGGA	TGATCCTCCA	GCGCGGGGAT	CTCATGCTGG	AGTTCTTCGC
CCACCCTAGG	GGGAGGCTAA	CTGAAACACG	GAAGGAGACA	ATACCGGAAG
GAACCCGCGC	TATGACGGCA	ATAAAAAGAC	AGAATAAAAC	GCACGGTGTT
GGGTCGTTTG	TTCATAAACG	CGGGGTTCGG	TCCCAGGGCT	GGCACTCTGT
CGATACCCCA	CCGAGACCCC	ATTGGGGCCA	ATACGCCCGC	GTTTCTTCCT
TTTCCCCACC	CCACCCCCCA	AGTTCGGGTG	AAGGCCCAGG	GCTCGCAGCC
AACGTCGGGG	CGGCAGGCCC	TGCCATAGCC	TCAGGTACT	CATATATACT
TTAGATTGAT	TTAAAACTTC	ATTTTTAATT	TAAAAGGATC	TAGGTGAAGA
TCCTTTTTGA	TAATCTCATG	ACCAAAATCC	CTTAACGTGA	GTTTTTCGTC
CACTGAGCGT	CAGACCCCGT	AGAAAAGATC	AAAGGATCTT	CTTGAGATCC
TTTTTTTCTG	CGCGTAATCT	GCTGCTTGCA	AACAAAAAAA	CCACCGCTAC
CAGCGGTGGT	TTGTTTGCCG	GATCAAGAGC	TACCAACTCT	TTTTCCGAAG
GTAAGTGGCT	TCAGCAGAGC	GCAGATACCA	AATACTGTCC	TTCTAGTGTA
GCCGTAGTTA	GGCCACCACT	TCAAGAACTC	TGTAGCACCG	CCTACATACC
TCGCTCTGCT	AATCCTGTTA	CCAGTGGCTG	CTGCCAGTGG	CGATAAGTCG
TGTCTTACCG	GGTTGGACTC	AAGACGATAG	TTACCGGATA	AGGCGCAGCG
GTCGGGCTGA	ACGGGGGGTT	CGTGCACACA	GCCCAGCTTG	GAGCGAACGA
CCTACACCGA	ACTGAGATAC	CTACAGCGTG	AGCTATGAGA	AAGCGCCACG
CTTCCCGAAG	GGAGAAAGGC	GGACAGGTAT	CCGGTAAGCG	GCAGGGTCCG
AACAGGAGAG	CGCACGAGGG	AGCTTCCAGG	GGGAAACGCC	TGGTATCTTT
ATAGTCCTGT	CGGGTTTCGC	CACCTCTGAC	TTGAGCGTCG	ATTTTTGTGA
TGCTCGTCAG	GGGGGCGGAG	CCTATGGAAA	AACGCCAGCA	ACGCGGCCTT
TTTACGGTTC	CTGGCCTTTT	GCTGGCCTTT	TGCTCACATG	TTCTTTCCTG
CGTTATCCCC	TGATTCTGTG	GATAACCGTA	TTACCGCCAT	GCAT

图3C