



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105358708 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 16

(21) 申请号 201480014414.8

(22) 申请日 2014.03.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105358708 A

(43) 申请公布日 2016.02.24

(30) 优先权数据
61/782,850 2013.03.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2015.09.11

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/026546 2014.03.13

(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/151840 EN 2014.09.25

(73) 专利权人 儿童医学中心公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 伦道夫·S·瓦特尼克

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 郑斌 彭鲲鹏

(51) Int.Cl.
G01N 33/574 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2011084685 A2, 2011.07.14
US 2004229799 A1, 2004.11.18
US 2010144603 A1, 2010.06.10

审查员 奚静

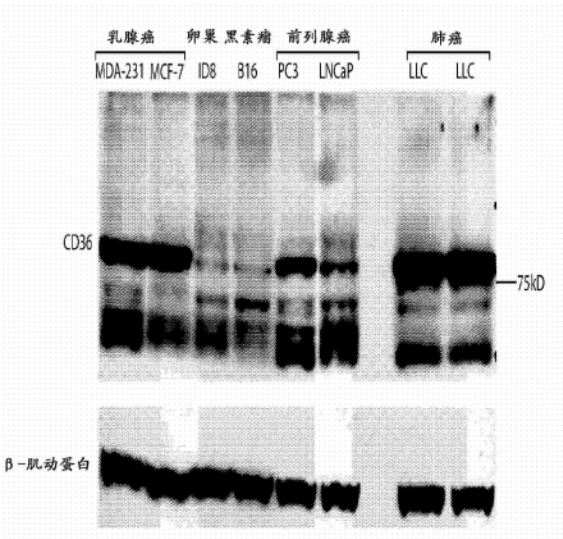
权利要求书1页 说明书24页
序列表22页 附图7页

(54) 发明名称

CD36鉴定癌症对象以用于治疗的用途

(57) 摘要

本文提供了用于鉴定患有癌症之对象以用Psap肽治疗的方法。基于CD36水平鉴定所述对象。本文还提供了用于基于CD36水平治疗患有癌症之对象的组合物和方法。



1. 用于确定从患有癌症之对象获得的样品中的CD36水平的试剂在制造用于评估对象对Psap肽治疗的响应性之诊断剂中的用途,其中与对照水平相比所述样品中升高的CD36水平指示所述对象对Psap肽治疗有响应或可能有响应。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中通过进行测定来确定所述样品中的CD36水平。

3. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述诊断剂还用于:

鉴定在所述样品中具有与对照水平相比升高的CD36水平的对象为对Psap肽治疗有响应或可能有响应。

4. 根据权利要求3所述的用途,其中有效量的Psap肽配制成用于向被鉴定为对Psap肽治疗有响应或可能有响应的所述对象施用以治疗癌症。

CD36鉴定癌症对象以用于治疗的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2013年3月14日提交的美国临时申请No.61/782,850之提交日的权益,其整个内容通过引用并入本文。

[0003] 联邦政府资助的研究和开发

[0004] 本发明是在美国国家癌症研究所授予的R01CA135417的美国政府支持下完成的。美国政府对本发明享有某些权益。

[0005] 发明背景

[0006] 癌症依然是一个主要的公众健康首要问题。例如,估计2008年有760万人死于癌症。对于癌症的治疗随着技术和科学的进步不断改善。遗憾的是,很明显许多癌症疗法仅对癌症患者的亚群有效,甚至仅对于具有相同类型癌症的患者亚群有效。因此,寻找鉴定可能响应于治疗之患者的方式变得越来越重要。

[0007] 发明概述

[0008] 本公开内容的一些方面部分地基于以下发现:肿瘤细胞中升高的CD36水平指示患者对Psap肽治疗有响应或可能有响应。因此,本公开内容的一些方面涉及通过确定样品(例如,肿瘤样品)中的CD36水平来评估患者对Psap肽治疗的响应性的方法。在一些实施方案中,本文所述方法涉及基于样品中的CD36水平来鉴定或选择用于Psap肽治疗的患者。本公开内容的另一些方面涉及用于治疗患有癌症的对象的组合物和方法,所述对象的特征在于升高的CD36水平。

[0009] 在一些方面,本公开内容涉及用于评估对象对Psap肽治疗的响应性的方法,所述方法包括确定从患有癌症之对象获得的样品中的CD36水平,其中与对照水平相比,所述样品中升高的CD36水平指示所述对象对Psap肽治疗有响应或可能有响应。在一些实施方案中,通过进行测定来确定样品中的CD36水平。在一些实施方案中,所述方法还包括鉴定在样品中具有与对照水平相比升高的CD36水平的对象为对Psap肽治疗有响应或可能有响应。在一些实施方案中,所述方法还包括向被鉴定为对Psap肽治疗有响应或可能有响应的对象施用有效量的Psap肽以治疗癌症。

[0010] 本公开内容的另一些方面涉及治疗患有癌症之对象的方法,所述方法包括向患有癌症的对象施用有效量的Psap肽以治疗癌症,所述对象的特征在于与对照水平样品相比样品中升高的CD36水平。在一些实施方案中,对照水平是从患有癌症的所述对象获得的非癌细胞或组织中的CD36水平。在一些实施方案中,对照水平是从健康对象或健康对象群体获得的细胞或组织中的CD36水平。在一些实施方案中,对照水平是预定的水平。在一些实施方案中,CD36水平是CD36蛋白水平。

[0011] 本公开内容的另一些方面涉及用于治疗患有癌症之对象的方法,所述方法包括:
(a) 基于已知对象在样品中具有与对照水平相比升高的CD36水平来选择患有癌症的对象;
以及 (b) 因为所述对象在样品中具有与对照水平相比升高的CD36水平,所以向所述对象施用有效量的Psap肽。在一些实施方案中,对照水平是从患有癌症的所述对象获得的非癌细胞或组织中的CD36水平。在一些实施方案中,对照水平是从健康对象或健康对象的群体获

得的细胞或组织中的CD36水平。在一些实施方案中,对照水平是预定的水平。在一些实施方案中,CD36水平是CD36蛋白水平。

[0012] 在本文提供的任意方法的一些实施方案中,癌症是前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、白血病、胰腺癌、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤或黑素瘤。

[0013] 在本发明提供的任意方法的在一些实施方案中,Psap肽包含氨基酸序列CDWLPK (SEQ ID NO:1)、DWLPK (SEQ ID NO:2) 或DWLP (SEQ ID NO:3),或者其氨基酸替换变体,其中所述氨基酸替换是:

[0014] a) 酪氨酸(Y) 替换色氨酸(W);

[0015] b) 选自缬氨酸(V)、丙氨酸(A) 或甘氨酸(G) 或者类似大小的非标准氨基酸(non-canonical amino acid) 或其衍生物的氨基酸替换亮氨酸(L);

[0016] c) 精氨酸(R) 替换赖氨酸(K);

[0017] d) 天冬氨酸(D) 的D-异构体替换天冬氨酸(D) 的L-异构体和/或亮氨酸(L) 的D-异构体替换亮氨酸(L) 的L-异构体;

[0018] e) 色氨酸(W) 的D-异构体替换色氨酸(W) 的L-异构体和/或脯氨酸(P) 的D-异构体替换脯氨酸(P) 的L-异构体;或其组合。在一些实施方案中,Psap肽的长度为50个氨基酸或更少。在一些实施方案中,Psap肽的长度为30个氨基酸或更少。在一些实施方案中,Psap肽的长度为15个氨基酸或更少。在一些实施方案中,Psap肽的长度为6个氨基酸或更少。在一些实施方案中,Psap肽为环肽。在一些实施方案中,类似大小的非标准氨基酸为甲基缬氨酸、甲基亮氨酸或肌氨酸。

[0019] 在另一个方面,本公开内容涉及用于治疗患有癌症的对象的组合物,所述对象的特征在于与对照水平相比样品中升高的CD36水平,所述组合物包含Psap肽。

[0020] 在另一个方面,本公开内容涉及组合物在制造用于治疗患有癌症之对象的药物中的用途,所述对象的特征在于与对照水平相比样品中升高的CD36水平,所述组合物包含Psap肽。

[0021] 在本文提供的用途或组合物的一些实施方案中,对照水平是从患有癌症的所述对象获得的非癌细胞或组织中的CD36水平。在本文提供的用途或组合物的一些实施方案中,对照水平是从健康对象或健康对象的群体获得的细胞或组织中的CD36水平。在本文提供的用途或组合物的一些实施方案中,对照水平是预定的水平。在本文提供的用途或组合物的一些实施方案中,CD36水平是CD36蛋白水平。

[0022] 在本文描述的用途或组合物的一些实施方案中,癌症是前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、白血病、胰腺癌、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤或黑素瘤。

[0023] 在本文描述的用途或组合物的一些实施方案中,Psap肽包含氨基酸序列CDWLPK (SEQ ID NO:1)、DWLPK (SEQ ID NO:2) 或DWLP (SEQ ID NO:3),或者其氨基酸替换变体,其中所述氨基酸替换是:

[0024] a) 酪氨酸(Y) 替换色氨酸(W);

[0025] b) 选自缬氨酸(V)、丙氨酸(A) 或甘氨酸(G) 或者类似大小的非标准氨基酸或其衍生物的氨基酸替换亮氨酸(L);

[0026] c) 精氨酸(R) 替换赖氨酸(K);

[0027] d) 天冬氨酸(D) 的D-异构体替换天冬氨酸(D) 的L-异构体和/或亮氨酸(L) 的D-异

构体替换亮氨酸(L)的L-异构体;

[0028] e) 色氨酸(W)的D-异构体替换色氨酸(W)的L-异构体和/或脯氨酸(P)的D-异构体替换脯氨酸(P)的L-异构体;或其组合。在一些实施方案中,Psap肽的长度为50个氨基酸或更少。在一些实施方案中,Psap肽的长度为30个氨基酸或更少。在一些实施方案中,Psap肽的长度为15个氨基酸或更少。在一些实施方案中,Psap肽的长度为6个氨基酸或更少。在一些实施方案中,Psap肽为环肽。在一些实施方案中,类似大小的非标准氨基酸为甲基缬氨酸、甲基亮氨酸或肌氨酸。

[0029] 在本文提供的方法、组合物或用途的一些实施方案中,样品是肿瘤样品。

[0030] 附图简述

[0031] 图1A是示出在添加系列稀释量的重组Tsp-1或DWLPK(SEQ ID NO:2)肽后48小时LLC细胞的增殖的图。

[0032] 图1B是western印迹的照片,其示出CD36蛋白在LLC细胞中表达。

[0033] 图2是western印迹的照片,其示出CD36蛋白在乳腺癌(MDA-231、MCF-7)、卵巢癌(ID8)、黑素瘤(B16)、前列腺癌(PC3和LNCaP)以及肺癌(LLC)细胞系中表达。

[0034] 图3是western印迹的照片,其示出CD36蛋白在来自患者腹水的原发性卵巢癌细胞(primary ovarian cancer cell)中表达。

[0035] 图4是western印迹的照片,其示出CD36蛋白在胰腺癌(AsPC1)、卵巢癌(DF-14和ID-8)、乳腺癌(MDA-MB231和LM2)、前列腺癌(PC3、PC3-M-LN4、LN-CAP和LN-CAP-LN3)、黑素瘤(B16-B16)和肺癌(LLC)细胞中表达。框中示出了示例性的高和低表达CD36的细胞系。

[0036] 图5是示出dW1P(SEQ ID NO:47)肽引起表达高水平CD36的癌症模型中癌症消退的图。

[0037] 图6是示出表达CD36的卵巢癌细胞对Tsp-1介导的细胞杀伤敏感的图。

[0038] 图7是示出用表达高水平的CD36的AsPC胰腺癌细胞注射然后用dW1P(SEQ ID NO:47)肽或对照处理的小鼠的原发性肿瘤块的图。通过肽处理抑制了原发性肿瘤块。

[0039] 图8是这样的图,其示出用dW1P(SEQ ID NO:47)肽对患有B16-B16黑素瘤(其表达低水平CD36)的小鼠的处理抑制了肿瘤生长,但是没有使肿瘤消退。

[0040] 发明详述

[0041] Psap肽是含有最初来源于Saposin A(一种已知的抗血管发生蛋白质)之片段的氨基酸序列的治疗性肽。Psap一般包含核心序列CDWLPK(SEQ ID NO:1)、DWLPK(SEQ ID NO:2)或DWLP(SEQ ID NO:3)或者其氨基酸替换变体,并且可以少至4个氨基酸的长度(例如,由DWLP(SEQ ID NO:3)或其氨基酸替换变体组成的肽)。之前已经表明,这样的Psap肽对治疗多种类型的癌症有效(参见,例如,PCT公开W02009002931和W0/2011/084685;PCT申请PCT/US2012/71424,其以PCT公开W0/2013/096868公开,以及美国专利申请12/640,788和13/516,511,其全部通过引用以其整体并入本文)。以前认为施用Psap肽刺激体内的血小板反应蛋白(Tsp-1),其继而作用于内皮细胞,引起抗血管发生作用而导致间接抑制癌症和/或转移瘤生长。

[0042] 如本文所述,已经发现来自多种不同类型的对Psap肽有响应的癌症的肿瘤细胞表达CD36。CD36是细胞表面蛋白的B类清道夫受体(scavenger receptor)家族的成员,并且具有许多配体,包括氧化的低密度脂蛋白、氧化的磷脂、长链脂肪酸、胶原蛋白和Tsp-1。不希

望受到任何理论或机制的约束,认为施用Psap肽刺激了Tsp-1,其然后通过与肿瘤细胞上的CD36相互作用而直接作用于肿瘤细胞。Tsp-1与肿瘤细胞上的CD36之间的相互作用可导致抑制肿瘤增殖和/或诱导肿瘤细胞凋亡。因此,Psap肽似乎通过两种不同的独立机制来治疗癌症,间接地通过抗血管发生作用和直接地通过Tsp-1与肿瘤细胞上的CD36相互作用。因此,患有癌症的对象对Psap肽治疗的响应性可能依赖于癌症所表达的CD36水平。

[0043] 因此,本公开内容的一些方面涉及用于通过确定样品(例如,肿瘤样品)中的CD36水平来评估对象对Psap肽治疗的响应性的方法。在一些实施方案中,本文所述方法涉及基于样品(例如,肿瘤样品)中的CD36水平来鉴定或选择用于Psap肽治疗的对象。本公开内容的另一些方面涉及用于治疗患有癌症之对象的组合物和方法,所述对象的特征在于升高的CD36水平(例如,基于癌症在样品中具有与对照水平相比升高的CD36水平选择或鉴定)。

[0044] 本文使用的“对Psap肽治疗有响应”包括但不限于响应于Psap肽治疗而防止或减少癌症的发生、降低癌症的症状、阻抑或抑制癌症的生长、防止现有癌症的转移和/或侵袭、促进或诱导癌症的消退、抑制或阻抑癌细胞的增殖、减少血管发生和/或增加凋亡癌细胞的量。

[0045] 本文使用的“对Psap肽治疗无响应”包括但不限于响应于Psap肽治疗未能防止或减少癌症的发生、未能降低癌症的症状、未能阻抑或抑制癌症的生长、未能防止现有癌症的转移和/或侵袭、未能促进或诱导癌症的消退、未能抑制或阻抑癌细胞的增殖、减少凋亡癌细胞的量和/或未能减少血管发生。

[0046] 诊断和治疗诊断性(theranostic)方法

[0047] 本公开内容的一些方面涉及可用于评估对象对Psap肽治疗的响应性的诊断和治疗诊断性方法。在一些实施方案中,所述方法包括确定从患有癌症之对象获得的样品中的CD36水平,其中与对照水平相比所述样品中升高的CD36水平指示所述对象对Psap肽治疗有响应或可能有响应(即,如果样品中的CD36水平与对照水平相比升高,则所述对象被鉴定为对Psap肽治疗有响应或可能有响应)。在一些实施方案中,所述方法还包括将在样品中具有与对照水平相比升高的CD36水平的对象鉴定为对Psap肽治疗有响应或可能有响应。在一些实施方案中,所述方法还包括向被鉴定为对Psap肽治疗有响应或可能有响应的对象施用有效量的本文所述Psap肽以治疗癌症。在一些实施方案中,从患有癌症之对象获得的样品是肿瘤样品。

[0048] 在一些实施方案中,与对照水平相比样品中升高的CD36水平指示响应于Psap肽治疗,癌症将消退或可能消退。在一些实施方案中,所述方法还包括将在样品中具有与对照水平相比升高的CD36水平的对象鉴定为患有响应于Psap肽治疗而将消退或可能消退的癌症。在一些实施方案中,所述方法还包括向被鉴定为患有响应于Psap肽治疗而将消退或可能消退的癌症的对象施用有效量的本文所述Psap肽以造成所述癌症的消退。

[0049] 本文使用的“升高的CD36水平”意指CD36水平高于对照水平,例如高于预定阈值或对照样品中的CD36水平。本文详细描述了对照水平。升高的CD36水平包括比对照水平高例如1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%或更高的CD36水平。升高的CD36水平还包括现象从零状态(例如,对照中无或不可检测的CD36表达)增加到非零状态(例如,样品中一些CD36表达或可检测的CD36表达)。

[0050] 本文使用的“Psap肽治疗”意指包括向对象施用Psap肽。本文描述了Psap肽。应理解的是,Psap肽治疗可包括仅用Psap肽治疗或可包括用多种药剂或疗法的治疗,例如Psap肽和另外的化疗剂和/或另外形式的疗法,例如手术、放射疗法或化学疗法。

[0051] 治疗

[0052] 本公开内容的另一些方面涉及治疗患有癌症之对象的方法。在一些实施方案中,所述方法包括向患有癌症的对象施用有效量的本文所述Psap肽以治疗癌症,所述对象的特征在于与对照水平相比,在从所述对象获得的样品中CD36水平升高。在一些实施方案中,所述方法包括:

[0053] (a) 基于已知对象在样品中具有与对照水平相比升高的CD36水平来选择患有癌症的对象;以及

[0054] (b) 因为所述患者在样品中具有与对照水平相比升高的CD36水平,所以向所述对象施用有效量的Psap肽。

[0055] 本公开内容的另一些方面涉及组合物以及组合物在制造用于治疗患有癌症之对象的药物中的用途,所述对象的特征在于在样品中具有升高的CD36水平。在一些实施方案中,组合物包含本文所述的Psap肽。在一些实施方案中,样品是肿瘤样品。

[0056] 本文使用的“治疗”包括但不限于防止或减少癌症的发生、降低癌症的症状、阻抑或抑制癌症的生长、防止现有癌症的转移和/或侵袭、促进或诱导癌症的消退、抑制或阻抑癌细胞的增殖、减少血管发生和/或增加凋亡癌细胞的量。在一些实施方案中,癌症的治疗直接抑制或阻抑癌细胞的增殖,并且不涉及对血管发生的抑制或阻抑(其间接地导致对癌细胞增殖的抑制或阻抑)。

[0057] 有效量是足以提供医学上期望结果(例如,对癌症的治疗)的Psap肽的剂量。有效量会随着被治疗的特定癌症、被治疗对象的年龄和身体状况、病症的严重程度、治疗的持续时间、任何并存治疗(concurrent therapy)的性质、特定施用途径等保健从业者知识和专业技术内的因素而变化。对于向对象(例如人)的施用,通常可使用约0.001、0.01、0.1或1mg/kg至50、100、150或500mg/kg或更大的剂量。

[0058] Psap肽及其组合物可配制用于多种施用模式,包括全身、表面(topical)或局部(localized)施用。技术和制剂通常可在Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 最新版中找到。当施用时,Psap肽可以以可药用的量并在可药用的组合物中应用。这样的制剂可常规地包含盐、缓冲剂、防腐剂、相容性载体和任选的其他治疗剂。当用于药物时,盐应该为可药用的,但是非可药用盐可方便地用于制备其可药用盐,并且不从本公开内容的范围内排除。这样的药理学上可用或可药用的盐包括但不限于由以下酸制备的那些:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。另外,可药用盐可制备为碱金属或碱土金属盐,例如钠盐、钾盐或钙盐。

[0059] Psap肽可任选地与可药用载体组合。本文使用的术语“可药用载体”意指适于向人施用的一种或更多种相容性固体或液体填料、稀释剂或封装物质。术语“载体”表示与活性成分组合以有利于应用的天然的或合成的有机或无机成分。药物组合物的组分还能够与本公开内容的分子共混,并且彼此以不明显损害期望的药物效力的相互作用的方式。可作为可药用载体的物质的一些实例包括:(1)糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、

微晶纤维素和乙酸纤维素；(4) 粉末状西黄蓍胶；(5) 麦芽；(6) 明胶；(7) 润滑剂，例如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石；(8) 赋形剂，例如可可脂和栓剂蜡；(9) 油，例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10) 二醇，例如丙二醇；(11) 多元醇，例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇 (PEG)；(12) 酯，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13) 琼脂；(14) 缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；(15) 藻酸；(16) 无热原水；(17) 等渗盐水；(18) 林格氏溶液 (Ringer's solution)；(19) 乙醇；(20) pH 缓冲溶液；(21) 聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐；(22) 填充剂，例如多肽和氨基酸；(23) 血清组分，例如血清白蛋白、HDL 和 LDL；(22) C2-C12 醇，例如乙醇；以及 (23) 在药物制剂中使用的其他无毒相容性物质。湿润剂、着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、矫味剂、芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可存在于制剂中。

[0060] 药物组合物可方便地存在于单位剂型中，并且可通过药学领域中任何公知的方法制备。当用于指本公开内容的药物组合物时，术语“单位剂量”是指适合作为同于对象的单一剂量的物理离散单位，每个单位含有与所需稀释剂（即，载体或载剂）联合时产生期望治疗效果的计算的预定量活性物质。

[0061] 可利用多种施用途。所选择的具体方式将根据被治疗癌症的类型和治疗效果所需剂量进行选择。一般来说，本公开内容的方法可使用任何医学上可用的施用方式来实现，意味着可使用任何产生有效水平的活性化合物而不引起临床上不可接受之不良反应的方式。这样的施用方式包括经口、直肠、表面、鼻、皮间 (interdermal) 或胃肠外途径。术语“胃肠外”包括皮下、静脉内、肌内或输注。

[0062] 在一些实施方案中，施用为胃肠外施用。适于胃肠外施用的可注射制剂包括例如无菌可注射水性或油性混悬剂，并且可使用合适的分散剂或湿润剂和助悬剂根据已知技术配制。无菌可注射制剂还可以是无毒胃肠外可用稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液、混悬剂或乳剂，例如 1,3 丙二醇或 1,3 丁二醇中的溶液。在可用的载剂和溶剂中，可使用的是水、林格氏溶液、U.S.P. 和等渗氯化钠溶液。此外，通常使用无菌固定油作为溶剂或混悬介质。为此，可使用任何温和的固定油，其包括合成的单甘油酯或二甘油酯。此外，脂肪酸（如油酸）可用于制备可注射制剂。可注射制剂可以是无菌的，例如通过截留细菌的滤器的过滤，或通过掺入可在使用前溶解或分散在无菌水或其他无菌可注射介质中的无菌固体组合物形式的灭菌剂。

[0063] 如本领域中通常已知的，对于表面施用，可以将药物组合物配制成软膏、油膏、凝胶或乳膏。表面施用可利用本领域中公知的经皮递送系统。一个实例是皮肤贴片。或者，可使用 biolistic 基因枪递送方法。基因枪是用于向细胞注射遗传信息的装置，通常被设计用于植物转化。Payload 是包被有质粒 DNA 的重金属的基本颗粒。这种技术通常简称为 biolistics。另一种使用 biolistics 技术的仪器是 PDS-1000/He 颗粒递送系统。本文所述组合物还可包被在微小金颗粒上，并且在高压下将这些经包被的颗粒“射”入生物组织，例如血管瘤和黑素瘤中。一种基于基因枪方法的实例由 Loehr B.I. 等, J. Virol. 2000, 74: 6077-86 对于基于 DNA 的牛疫苗接种进行描述。

[0064] 本文所述药物组合物还适合通过瘤内、瘤旁、病灶内或病灶旁途径施用以发挥局部和全身效果。预期腹膜内途径在例如治疗卵巢肿瘤中特别有用。对于这些用途，可能优先需要另外的常规药物制剂，例如片剂、颗粒剂、散剂、胶囊剂和喷雾剂。在这样的制剂中，可能还需要另外的常规添加剂，例如粘合剂、湿润剂、抛射剂、润滑剂和稳定剂。

[0065] 适于经口施用的组合物可作为离散单位(如胶囊剂、片剂、锭剂)存在,其各自含有预定量的抗炎剂。另一些组合物包含水性液体或非水性液体中的混悬剂,例如糖浆剂、酏剂或乳剂。

[0066] 另一些递送系统可包括时间释放、延迟释放或持续释放递送系统。这样的系统可避免重复施用抗炎剂,增加了对象和医生的便利性。许多类型的释放递送系统是可获得的,并且是本领域普通技术人员已知的。其包括基于聚合物的系统,例如聚(丙交酯-乙交酯)、共聚草酸酯、聚己酸内酯、聚酰胺酯、聚原酸酯、聚羟基丁酸和聚酐。含有药物的前述聚合物的微胶囊在例如美国专利5,075,109中描述。递送系统还包括非聚合物系统,它们是:脂质,包括固醇,例如胆固醇、胆固醇酯,以及脂肪酸或中性脂肪,例如单甘油酯、二甘油酯和三甘油酯;水凝胶释放系统;sylastic系统;基于肽的系统;蜡涂层;使用常规粘合剂和赋形剂的压缩片剂;部分融合的植入体等。具体实例包括但不限于:(a) 侵蚀系统,其中抗炎剂以一定形式包含在基质内,例如美国专利No.4,452,775、4,667,014、4,748,034和5,239,660中描述的那些,以及(b) 扩散系统,其中活性组分以受控速率从聚合物渗透,例如美国专利No.3,832,253和3,854,480中描述的。此外,可使用基于泵的硬件递送系统,其中一些适于植入。

[0067] 长期持续释放植入物的使用可特别适合于治疗慢性病症。本文使用的长期释放意指将植入物构建和布置以递送治疗水平的活性成分至少30天,优选60天。长期持续释放植入物是本领域普通技术人员公知的,并且包括上述释放系统中的一些。

[0068] 在一些实施方案中,用于治疗性施用的药物组合物必须是无菌的。通过无菌滤膜(例如,0.2微米膜)的过滤,容易实现无菌。或者,可使用防腐剂以防止微生物的生长或作用。多种防腐剂是公知的,包括例如苯酚和抗坏血酸。活性成分和/或药物组合物通常以冻干形式或水溶液(如果其对热和氧化变性高度稳定的话)储存。制剂的pH通常为约6至8,但是更高或更低的pH值在某些情况下也是合适的。

[0069] 在一些实施方案中,Psap肽的施用可与另外的疗法组合,例如化学疗法、放射和/或手术。

[0070] CD36

[0071] CD36(分化簇36)是发现于脊椎动物的许多细胞类型表面上的内在膜蛋白,也称为FAT、GP4、GP3B、GPIV、CHDS7、PASIV、SCARB3和BDPLT10。人CD36的Entrez Gene ID是948。示例性的人CD36转录物和蛋白质如下:

[0072] CD36转录物变体1

[0073] CTTTCAATTCTCTGGCAACAAACCACACACTGGGATCTGACACTGTAGAGTGCTTTCTCTTCTCTTT
TTTTGGGGGGGGGAGGGGGTGTGGTTGCATATTTAACTCTCACGCATTTATGTACTGAGGACTGCAGTGTAGGAC
TTTCCTGCAGAATACCATTTGATCCTATTAAGAATTGTCCAAATGTTGGAGCATTTGATTGAAAAATCCTTCTTAG
CCATTTTAAAGATAGCTTTCCAATGATTAGACGAATTGATTCTTTCTGTGACTCATCAGTTCATTTCTGTAAAT
TCATGTCTTGCTGTTGATTTGTGAATAAGAACCAGAGCTTGTAGAAACCACTTTAATCATATCCAGGAGTTTGCAA
GAAACAGGTGCTTAACACTAATTCACCTCCTGAACAAGAAAAATGGGCTGTGACCGGAACTGTGGGCTCATCGCTG
GGGCTGTCATTGGTGCTGTCCTGGCTGTGTTTGGAGGTATTCTAATGCCAGTTGGAGACCTGCTTATCCAGAAGAC
AATTA AAAAGCAAGTTGTCCTCGAAGAAGGTACAATTGCTTTTAAAAATTGGGTAAAAACAGGCACAGAAGTTTAC
AGACAGTTTTGGATCTTTGATGTGCAAAATCCACAGGAAGTGATGATGAACAGCAGCAACATTCAAGTTAAGCAAA
GAGGTCCTTATACGTACAGAGTTCGTTTTCTAGCCAAGGAAAATGTAACCCAGGACGCTGAGGACAACACAGTCTC

TTTCCTGCAGCCCAATGGTGCCATCTTCGAACCTTCACTATCAGTTGGAACAGAGGCTGACAACCTCACAGTTCTC
AATCTGGCTGTGGCAGCTGCATCCCATATCTATCAAAATCAATTTGTTCAAATGATCCTCAATTCATTATTAACA
AGTCAAAATCTTCTATGTTCCAAGTCAGAACTTTGAGAGAACTGTTATGGGGCTATAGGGATCCATTTTTGAGTTT
GGTTCCGTACCCTGTTACTACCACAGTTGGTCTGTTTTATCCTTACAACAATACTGCAGATGGAGTTTATAAAGTT
TTCAATGGAAGATAACATAAGTAAAGTTGCCATAATCGACACATATAAAGGTAAAAGGAATCTGTCTATTGGG
AAAGTCACTGCGACATGATTAATGGTACAGATGCAGCCTCATTTCCACCTTTTGTTGAGAAAAGCCAGGTATTGCA
GTTCTTTTCTTCTGATATTTGCAGGTCAATCTATGCTGTATTTGAATCCGACGTTAATCTGAAAGGAATCCCTGTG
TATAGATTTGTTCTTCCATCCAAGGCCTTTGCCTCTCCAGTTGAAAACCCAGACAACCTATTGTTTCTGCACAGAAA
AAATTATCTCAAAAAATTTGTACATCATATGGTGTGCTAGACATCAGCAAAATGCAAAGAAGGGAGACCTGTGTACAT
TTCATTCTCATTTTTCTGTATGCAAGTCCTGATGTTTCAGAACCTATTGATGGATTAAACCCAAATGAAGAAGAA
CATAGGACATACTTGGATATTGAACCTATAACTGGATTCACTTTACAATTTGCAAAACGGCTGCAGGTCAACCTAT
TGGTCAAGCCATCAGAAAAAATTCAAGTATTAAGAATCTGAAGAGGAACTATATTGTGCCTATTCTTTGGCTTAA
TGAGACTGGGACCATTGGTGTGAGAAAGGCAAACATGTTTCAGAACTCAAGTAACTGAAAAATAAACCTCCTTGGC
CTGATAGAAATGATCTTACTCAGTGTGGTGTGGTGTGTTTGTGCTTTTATGATTCATATTGTGCATGCAGAT
CGAAAACAATAAAATAAACCTGGCTCAAGCACAAACCAATTTGTGTTGTTCTGATTCAATAATTGGTTTCTGGGTG
GCCAATTCAGAAGAAGAGTGATGCTCAACAAATCCTAGGCCCTGCATTCTGTGCATCCTCATCCGGGGGAAAC
ACCATCATCCCAGTAGCTGCCCTATTCAACTGCAACAGTCTCCAGGACCATCAGTATACTGCATTTTCATGTGCACC
AAATATTTTGAAGACATTTATAAATAATTGGCTTATGACTCATATTTCTCTATGAATACCTTCATACAGCAGGTA
TAACTCTTTTCTTTATGGGCTTAAATATTTTGTCACTGATCCTGCAAAATGGACATCATTTTAGCACACTAGCGTT
TATATTTTAAGGACCTTCATTCTCTGTTCTGCACCTCTTCTGGAAATTGAGTAAATTTGCTTTTTTTTTTTTACT
CAGTTGCAACTTACGCTTGGCATCTTCAGAATGCTTTTCTAGCATTAAAGAGATGTAATGATAAAGGAATTATTGT
ATGAAATATTACAAAGCGTAGACTATGCATTGTTATTCAATTATAATATTTTTTGCTGTCATAATCGCCTCATAAAG
ACAGGTTTCAACCATTAAATATGTTCTTCCTTAAATTCCTGTGCTTTTCTAGTTCCTCTGTGTCATAAAATGT
TTATCCTAATTTTCTCTCTGAAGTATATTTTATCTGAATCCACATTTCTTTATAAATCCATAGTCCTTGCTGAAAT
ATGCTTTCTAAATTTCTACCACTTTGTTCTAGGCTAATTTTTTAAGCTAATTGGATGAAGAACAAAAGACATTTG
GTTTCATCCTTTACAGCAGTAGGACAATTGCAAAGGTTTTTCCTTTTTCATAAGGAGACACATTAATAGGTAACCTC
TGTTTCTTGAGCAGGGGTTCACTTATTCTGAGAGCATTAGTTCTCCTAAAAAGCTCCAGCATAGAAAGGGAAGATA
AACCAAAATTCTAGCTTGTGTTTTACCCACAGAAGGATACAGGACAAAGGAATAGTAACTGGCCTGTTTGGATACTA
AAATCGAAAATAACTTTTAGCCTCCTCCTTATGATAGCCGCCAGAGTAAATGTTGAGCATTACTACAGAAAAGCCA
CAAACCAAGAATCTACCTGTTTGGAAAGATCTTTTGCATCTCTGAAGGTGCTTAAAGCATACTTAGTGCCTTTCTCT
TTTAACTGGGAAGATAAAAAGAAGTATCTGTCCAAGATATTAATATGTAAGATAACATTGTAGACATGTTCTTCTGA
TAATACAAGGTTTATTCTATTTGCATTAGGATATTTGTGGACATGTCCATCTAATATAAAGGAAAGTTTTTTAATC
ATTGAGGCATGTAGGGCTGAGTTATATAATGTAGAACTTCTAAAGATAATTGGATGAGAATATACATATTGACCT
GTATATTATGACTAATCATGACTCAGATCTTAATACAGGGATGATCTCATAGCATTTAGATATCAGAAAAGGTTTT
GACCTATATGTCTTTAATATTGTTTGAATACATGTATAATCTTTATCATTCCTCAGTGTTTCATTTCTCAAATTCT
GTAAAAGGAATATAAGAGGAAAGACAATTCATATACAAAGACAACGAGATTAATAATATGCAGTAGGAAAAATAAT
TACTTAAGGGGAGATTTTTTTTACATGAAATCTGGGCTTTGGATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGC
ACATATGCACTGTGGTGGGAGTGGGGCAACTTGGGGAATATGTTACATGTGTGACTTTGTTTTGCCCTGGCGAAGT
TAATGTTGTTTCAGAAAGGGTAAATGTTTGGACACTTGCAATTGCTCATGGATGAATTTATATGTTTTAGTCATAGA

AAAATTGTACCCTTTGATAGAAGCACATTTTCTTTCCAAAGCTGGTTATTAACCACAGAATTATAGCAGGTATTCA
TAACTTAAGTTTGGAAATCAATAGCGTCTGCAAATGGATTAACAGATTAGAGAATCAACAGCATCGGAAATAGGT
TAATGCATATTGCTTCTAACAAGTGCATGAAGAAATAGAAGAAGCTATGTAGCTTTCAGTTCTGACAGAAAAGGT
GAAGGAGGTATCATTTCAGAAAAAAATAGCTATCACGCAATGGTTATCTCTGAAAATATTTGTATTAAGATGT
GTATACATGGCCAGGCATGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCAGGTGGATCACGAGGTCAGGA
GATCAAGACCATCCTGGCCAACATGGTGAAACCTCATCTCTACTAAAAATACAAAAATGAGCGGGGTGTGGTGGCC
CATGCCTGTAGTCCCAGCTGCTCGGGAGACTGAATCTCTTGAGCCTGGGAAGCAGAGGTTGCAGTGAAGTGAATC
GCGTCACTGCACTCCAGCCTGGTGACAGAGCGAGATTCCATCTCAAAAAAAAAAACAGTATGCACGTACAAATTT
CTTAACCTGTTATCAATGTCTGAGCTACATAATTATCTTTCTAGTTGGAGTTTGTTTTAGGTGTGTACCAACTGAC
ATTTCAAGTTTTCTGTTTGAAGTCCAATGTATTAGTGACTCTGTGGCTGCTCTCTCACCTGCCCCCTGTGGCCTG
TCTACAATTCTAAATGGATTTTGAAGTCAATGTCGTCGCTTCTGGTTTCTGCATATACCAATAGCATTACCTATG
ACTTTTTTTTTCTGAGCTATTTTCACTGAGCTGAGCTAATGAAGTAAAGTGAAGTTATGTTTAATATTTGTATCA
AATACATAAAGGAATACTGCTTTTCTTTTGTGGCTCAAAGGTAGCTGCATTTTAAATATTTGTGAAAATAAA
AACTTTTGTATTAGAAAAATGA (SEQ ID NO:4)

[0074] CD36转录物变体2

[0075] GAGGATGTCAATGGCTTTCAGATGTCAGGATAACCTTAAGGATAGATGAAGGGTTGAGAGCCTGTGCC
TCATTTCTGAGTTCTCAGCTGCTATGCCGTGGAAATCCTGTTTACTTTCTGCATCTGCTCCTGCAAGACTCTGGAG
CCAGTCTTGAGGTCTACATCTCCGAAAGCAAGCTCTTCTAGAAGTTGATAGCTTCCAATGATTAGACGAATTGA
TTCTTTCTGTGACTCATCAGTTCATTTCCCTGTAAAATTCATGTCTTGCTGTTGATTTGTGAATAAGAACCAGAGCT
TGTAAGAAACCACTTTAATCATATCCAGGAGTTTGCAAGAAACAGGTGCTTAACACTAATTCACCTCCTGAACAAGA
AAAATGGGCTGTGACCGGAACTGTGGGCTCATCGCTGGGGCTGTCATTGGTGCTGCTCCTGGCTGTGTTTGGAGGTA
TTCTAATGCCAGTTGGAGACCTGCTTATCCAGAAGACAATTAAGCAAGTTGTCCTCGAAGAAGGTACAATTGC
TTTTAAAAATTGGGTTAAAAACAGGCACAGAAGTTTACAGACAGTTTTGGATCTTTGATGTGCAAAATCCACAGGAA
GTGATGATGAACAGCAGCAACATTCAAGTTAAGCAAAGAGGTCCTTATACGTACAGAGTTCGTTTTCTAGCCAAGG
AAAATGTAACCCAGGACGCTGAGGACAACACAGTCTCTTTCCTGCAGCCCAATGGTGCCATCTTCGAACCTTCACT
ATCAGTTGGAACAGAGGCTGACAACCTCACAGTTCTCAATCTGGCTGTGGCAGCTGCATCCCATATCTATCAAAAT
CAATTTGTTCAAAATGATCCTCAATTCACCTATTAACAAGTCAAAATCTTCTATGTTCCAAGTCAGAACTTTGAGAG
AACTGTTATGGGGCTATAGGGATCCATTTTTGAGTTTGGTTCCGTACCCTGTTACTACCACAGTTGGTCTGTTTTA
TCCTTACAACAATACTGCAGATGGAGTTTATAAAGTTTTCAATGGAAAAGATAACATAAGTAAAGTTGCCATAATC
GACACATATAAAGGTAAAAGGAATCTGTCCTATTGGGAAAGTCACTGCGACATGATTAATGGTACAGATGCAGCCT
CATTTCCACCTTTTGTGAGAAAAGCCAGGTATTGCAGTTCTTTTCTTCTGATATTTGCAGGTCAATCTATGCTGT
ATTTGAATCCGACGTTAATCTGAAAGGAATCCCTGTGTATAGATTTGTTCTTCCATCCAAGGCCTTTGCCTCTCCA
GTTGAAAACCCAGACAACCTATTGTTTCTGCACAGAAAAAATTATCTCAAAAAATGTACATCATATGGTGTGCTAG
ACATCAGCAAAATGCAAGAAGGGAGACCTGTGTACATTTCACTTCTCATTTTCTGTATGCAAGTCCTGATGTTTC
AGAACCTATTGATGGATTAAACCCAAATGAAGAAGAACATAGGACATACTGGATATTGAACCTATAACTGGATTC
ACTTTACAATTTGCAAAACGGCTGCAGGTCAACCTATTGGTCAAGCCATCAGAAAAAATTCAAGTATTAAAGAATC
TGAAGAGGAACCTATATTGTGCCTATTCTTTGGCTTAATGAGACTGGGACCATTGGTGATGAGAAGGCAAACATGTT
CAGAAGTCAAGTAACTGAAAAAATAAACCTCCTTGGCCTGATAGAAATGATCTTACTCAGTGTGGTGTGGTGATG
TTTGTGCTTTTATGATTTTCATATTGTGCATGCAGATCGAAAACAATAAAATAAGTAAGTATGTACCAAAAAATAT

TGCTTCAATAATATTAGCTTATATATTACTTGTTTTCACTTTATCAAAGAGAAGTTACATATTAGGCCATATATAT
TTCTAGACATGTCTAGCCACTGATCATTTTTAAATATAGGTAAATAAACCTATAAATATTATCACGCAGATCACTA
AAGTATATCTTTAATTCTGGGAGAAATGAGATAAAAGATGTACTTGTGACCATTGTAACAATAGCACAAATAAAGC
ACTTGTGCCAAAGTTGTCCAAAAA (SEQ ID NO:5)

[0076] CD36转录物变体3

[0077] CTTTCAATTCCTCTGGCAACAAACCACACACTGGGATCTGACACTGTAGAGTGCTTTCTCTTCTCTTT
TTTTGGGGGGGGGAGGGGGTGTGGTTGCATATTTAACTCTCACGATTTATGTACTGAGGACTGCAGTGTAGGAC
TTTCTGCAGAATACCATTGATCCTATTAAGAATTGTCCAAATGTTGGAGCATTGATTGAAAAATCCTTCTTAG
CCATTTTAAAGATAGCTTTCCAATGATTAGACGAATTGATTCTTTCTGTGACTCATCAGTTCATTTCTGTAAAAT
TCATGTCTTGCTGTTGATTTGTGAATAAGAACCAGAGCTTGTAGAAACCACTTAAATCATATCCAGGAGTTTGCAA
GAAACAGGTGCTTAACACTAATTCACCTCCTGAACAAGAAAAATGGGCTGTGACCGGAACTGTGGGCTCATCGCTG
GGGCTGTCATTGGTGCTGTCCTGGCTGTGTTTGGAGGTATTCTAATGCCAGTTGGAGACCTGCTTATCCAGAAGAC
AATTAAGCAAGTTGTCCTCGAAGAAGGTACAATTGCTTTTAAAAATTGGGTAAAAACAGGCACAGAAGTTTAC
AGACAGTTTTGGATCTTTGATGTGCAAAATCCACAGGAAGTGATGATGAACAGCAGCAACATTCAAGTTAAGCAAA
GAGGTCTTATACGTACAGAGTTCGTTTTCTAGCCAAGGAAAAATGTAACCCAGGACGCTGAGGACAACACAGTCTC
TTTCTGCAGCCCAATGGTGCCATCTTCGAACCTTCACTATCAGTTGGAACAGAGGCTGACAACCTCACAGTTCTC
AATCTGGCTGTGGCAGCTGCATCCCATATCTATCAAAATCAATTTGTTCAAAATGATCCTCAATTCATTATTAACA
AGTCAAAATCTTCTATGTTCCAAGTCAGAACTTTGAGAGAACTGTTATGGGGCTATAGGGATCCATTTTGGAGTTT
GGTTCCGTACCCTGTTACTACCACAGTTGGTCTGTTTTATCCTTACAACAATACTGCAGATGGAGTTTATAAAGTT
TTCAATGGAAAAGATAACATAAGTAAAGTTGCCATAATCGACACATATAAAGGTAAAAGGAATCTGTCCTATTGGG
AAAGTCACTGCGACATGATTAATGGTACAGATGCAGCCTCATTTCCACCTTTTGTGAGAAAAGCCAGGTATTGCA
GTTCTTTTCTTCTGATATTTGCAGGTCAATCTATGCTGTATTTGAATCCGACGTTAATCTGAAAGGAATCCCTGTG
TATAGATTTGTTCTTCCATCCAAGGCCTTGCCTCTCCAGTTGAAAACCCAGACAACCTATTGTTTCTGCACAGAAA
AAATTATCTCAAAAAATTGTACATCATATGGTGTGCTAGACATCAGCAAAATGCAAAGAAGGGAGACCTGTGTACAT
TTCATTCTCATTTTCTGTATGCAAGTCCTGATGTTTCAGAACCTATTGATGGATTAACCCAAATGAAGAAGAA
CATAGGACATACTTGGATATTGAACCTATAACTGGATTCACTTTACAATTTGCAAAACGGCTGCAGGTCAACCTAT
TGGTCAAGCCATCAGAAAAAATTCAAGTATTAAAGAATCTGAAGAGGAACTATATTGTGCCTATTCTTTGGCTTAA
TGAGACTGGGACCATTGGTGATGAGAAGGCAAACATGTTTCAGAAAGTCAAGTAACTGGAAAAATAAACCTCCTTGGC
CTGATAGAAATGATCTTACTCAGTGTGGTGTGGTGTGTTTGTGCTTTTATGATTTTCATATTGTGCATGCAGAT
CGAAAACAATAAAATAAGTAAGTATGTACCAAAAAATATTGCTTCAATAATATTAGCTTATATATTACTTGTTTTT
ACTTTATCAAAGAGAAGTTACATATTAGGCCATATATATTTCTAGACATGTCTAGCCACTGATCATTTTTAAATAT
AGGTAAATAAACCTATAAATATTATCACGCAGATCACTAAAGTATATCTTTAATTCTGGGAGAAATGAGATAAAAG
ATGTACTTGTGACCATTGTAACAATAGCACAAATAAAGCACTTGTGCCAAAGTTGTCCAAAAA (SEQ ID NO:6)

[0078] CD36转录物变体4

[0079] AAGTTGCTGAGACAAGGGAAGAGAGATGAGGAACCAGAGCTTGTAGAAACCACTTTAATCATATCCAG
GAGTTTGCAAGAAACAGGTGCTTAACACTAATTCACCTCCTGAACAAGAAAAATGGGCTGTGACCGGAACTGTGGG
CTCATCGCTGGGGCTGTCATTGGTGCTGTCCTGGCTGTGTTTGGAGGTATTCTAATGCCAGTTGGAGACCTGCTTA
TCCAGAAGACAATTAAGCAAGTTGTCCTCGAAGAAGGTACAATTGCTTTTAAAAATTGGGTAAAAACAGGCAC
AGAAGTTTACAGACAGTTTTGGATCTTTGATGTGCAAAATCCACAGGAAGTGATGATGAACAGCAGCAACATTCAA

GTTAAGCAAAGAGGTCCTTATACGTACAGAGTTCGTTTTCTAGCCAAGGAAAATGTAACCCAGGACGCTGAGGACA
ACACAGTCTCTTTCTGCAGCCCAATGGTGCCATCTTCGAACCTTCACTATCAGTTGGAACAGAGGCTGACAACTT
CACAGTTCTCAATCTGGCTGTGGCAGCTGCATCCCATATCTATCAAAATCAATTTGTTCAAATGATCCTCAATTCA
CTTATTAACAAGTCAAAATCTTCTATGTTCCAAGTCAGAACTTTGAGAGAACTGTTATGGGGCTATAGGGATCCAT
TTTTGAGTTTGGTTCCGTACCCTGTTACTACCACAGTTGGTCTGTTTTATCCTTACAACAATACTGCAGATGGAGT
TTATAAAGTTTTCAATGGAAAAGATAACATAAGTAAAGTTGCCATAATCGACACATATAAAGGTAAAAGGAATCTG
TCCTATTGGGAAAGTCACTGCGACATGATTAATGGTACAGATGCAGCCTCATTTCACCTTTTGTGAGAAAAGCC
AGGTATTGCAGTTCTTTTCTTCTGATATTTGCAGGTCAATCTATGCTGTATTTGAATCCGACGTTAATCTGAAAGG
AATCCCTGTGTATAGATTTGTTCTTCCATCCAAGGCCTTTGCCTCTCCAGTTGAAAACCCAGACAACCTATTGTTTC
TGCACAGAAAAAATTATCTCAAAAAATTGTACATCATATGGTGTGCTAGACATCAGCAAATGCAAAGAAGGGAGAC
CTGTGTACATTTCACTTCCTCATTTTCTGTATGCAAGTCCTGATGTTTCAGAACCTATTGATGGATTAAACCCAAA
TGAAGAAGAACATAGGACATACTTGGATATTGAACCTATAACTGGATTCACTTTACAATTTGCAAACGGCTGCAG
GTCAACCTATTGGTCAAGCCATCAGAAAAAATTCAAGTATTAAAGAATCTGAAGAGGAACTATATTGTGCCTATTC
TTTGGCTTAATGAGACTGGGACCATTGGTGTGAGAAGGCAAACATGTTTCAGAAGTCAAGTAACTGGAAAAATAAA
CCTCCTTGGCCTGATAGAAATGATCTTACTCAGTGTTGGTGTGGTGTGTTTGTGCTTTTATGATTTTCATATTGT
GCATGCAGATCGAAAAACAATAAAATAAGTAAGTATGTACCAAAAAATATTGCTTCAATAATATTAGCTTATATATT
ACTTGTTTTCACTTTATCAAAGAGAAGTTACATATTAGGCCATATATATTTCTAGACATGTCTAGCCACTGATCAT
TTTTAAATATAGGTAAATAAACCTATAAATATTATCACGCAGATCACTAAAGTATATCTTTAATTCTGGGAGAAAT
GAGATAAAAGATGTACTTGTGACCATTGTAACAATAGCACAAATAAAGCACTTGTGCCAAAGTTGTCCAAAAAA
(SEQ ID NO:7)

[0080] CD36转录物变体5

[0081] ATGACATTATTAGTTCTGCCACTGGTAGGCATTAGAAGCAAGAAAAGGGAGACGGACCGAGGAAGCCA
CTTTGGTGAAACAAAAAGAAAAGCATTGTTTATTTAGAACGGGCAAAATGATACGTTTCAGTGGGTGTTTTCTTT
GTACTTTGATCTTTTTGTACTGATATTTAAGCTTCTGTTTTATGATCTCTTTCTAATGATAGAACCAGAGCTTGTA
GAAACCACTTTAATCATATCCAGGAGTTTGCAAGAAACAGGTGCTTAACACTAATTCACCTCCTGAACAAGAAAA
TGGGCTGTGACCGGAACGTGGGGCTCATCGCTGGGGCTGTCATTGGTGCTGTCTGGCTGTGTTTGGAGGTATTCT
AATGCCAGTTGGAGACCTGCTTATCCAGAAGACAATTAAGCAAGTTGTCCTCGAAGAAGGTACAATTGCTTTT
AAAAATTGGGTAAAAACAGGCACAGAAGTTACAGACAGTTTTGGATCTTTGATGTGCAAAATCCACAGGAAGTGA
TGATGAACAGCAGCAACATTCAAGTTAAGCAAAGAGGTCTTATACGTACAGAGTTCGTTTTCTAGCCAAGGAAAA
TGTAACCCAGGACGCTGAGGACAACACAGTCTCTTTCTGCAGCCCAATGGTGCCATCTTCGAACCTTCACTATCA
GTTGGAACAGAGGCTGACAACCTCACAGTTCTCAATCTGGCTGTGGCAGCTGCATCCCATATCTATCAAAATCAAT
TTGTTCAAATGATCCTCAATTCATTATTAACAAGTCAAAATCTTCTATGTTCCAAGTCAGAACTTTGAGAGAACT
GTTATGGGGCTATAGGGATCCATTTTTGAGTTTGGTTCCGTACCCTGTTACTACCACAGTTGGTCTGTTTTATCCT
TACAACAATACTGCAGATGGAGTTTATAAAGTTTTCAATGGAAAAGATAACATAAGTAAAGTTGCCATAATCGACA
CATATAAAGGTAAAAGGAATCTGTCCTATTGGGAAAGTCACTGCGACATGATTAATGGTACAGATGCAGCCTCATT
TCCACCTTTTGTGAGAAAAGCCAGGTATTGCAGTTCTTTTCTTCTGATATTTGCAGGTCAATCTATGCTGTATTT
GAATCCGACGTTAATCTGAAAGGAATCCCTGTGTATAGATTTGTTCTTCCATCCAAGGCCTTTGCCTCTCCAGTTG
AAAACCCAGACAACCTATTGTTTCTGCACAGAAAAAATTATCTCAAAAAATTGTACATCATATGGTGTGCTAGACAT
CAGCAAATGCAAAGAAGGGAGACCTGTGTACATTTCACTTCCTCATTTTCTGTATGCAAGTCCTGATGTTTCAGAA

CCTATTGATGGATTAAACCCAAATGAAGAAGAACATAGGACATACTTGGATATTGAACCTATAACTGGATTCACTT
TACAATTTGCAAAACGGCTGCAGGTCAACCTATTGGTCAAGCCATCAGAAAAAATTCAAGTATTAAAGAATCTGAA
GAGGAACATATATTGTGCCTATTCTTTGGCTTAATGAGACTGGGACCATTGGTGTGAGAAGGCAAACATGTTTCAGA
AGTCAAGTAACTGGAAAAATAAACCTCCTTGGCCTGATAGAAATGATCTTACTCAGTGTTGGTGTGGTGTGATGTTTG
TTGCTTTTATGATTTTCATATTGTGCATGCAGATCGAAAACAATAAAATAAGTAAGTATGTACCAAAAAATATTGCT
TCAATAATATTAGCTTATATATTACTTGTGTTTCACTTTATCAAAGAGAAGTTACATATTAGGCCATATATATTTCT
AGACATGTCTAGCCACTGATCATTTTTTAAATATAGGTAAATAAACCTATAAATATTATCACGCAGATCACTAAAGT
ATATCTTTAATTCTGGGAGAAATGAGATAAAAGATGTACTTGTGACCATTGTAACAATAGCACAAATAAAGCACTT
GTGCCAAAGTTGTCCAAAAAA (SEQ ID NO:8)

[0082] CD36蛋白

[0083] MGCDRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDLLIQKTIKKQVVLEEGTIAFKNWVKTGTEVYRQFWIF
DVQNPQEVMMNSSNIQVKQRGPYTYRVRFLAKENVTQDAEDNTVSFLQPNGAIFEPSLSVGTEADNFTVLNLAVAA
ASHIYQNQFVQMILNSLINKSSMFQVRTLRELLWGYRDPFLSLVPYPVTTTVGLFYPYNTADGVYKVFNGKDN
ISKVAIIDTYKGKRNLSYWESHCDMINGTDAASFPPFVEKSQVLQFFSSDICRSIYAVFESDVNLKGIPVYRFVLP
SKAFASPVENPDNYCFCTEKIISKNCTSYGVLDISKCKEGRPVYISLPFLYASPDVSEPIDGLNPNEEEHRTYLD
IEPITGFTLQFAKRLQVNLLVKPSEKIQVLKNLKRNYIVPILWLNETGTIGDEKANMFRSQVTGKINLLGLIEMIL
LSVGVMFVAFMISYCACRSKTIK (SEQ ID NO:9)

[0084] Psap肽

[0085] 鞘脂激活蛋白原 (Prosaposin, Psap) 是由约524-527个氨基酸构成的包含16个氨基酸信号肽的鞘脂激活蛋白 (Saposin) 前体蛋白。全长前体多肽在内质网和高尔基体系统中经受共翻译糖基化和修饰以产生70-72kDa的前体蛋白。在转运到溶酶体后,组织蛋白酶D参与其蛋白水解过程以产生35至53kDa的中间体分子形式,然后产生13-kDa的糖蛋白,并且最后成为成熟的8-11kDa部分糖基化形式的个体鞘脂激活蛋白分子 (O'Brien J.S., and Kishimoto Y, The FASEB J., 5:301-8, 1991; Kishimoto Y.等, J.Lipid Res. 33:1255-67, 1992)。鞘脂激活蛋白原被加工成4种裂解产物:鞘脂激活蛋白A、鞘脂激活蛋白B、鞘脂激活蛋白C和鞘脂激活蛋白D。Psap前蛋白原同种型A、B和C的氨基酸序列以及裂解产物鞘脂激活蛋白A的氨基酸序列如下:

[0086] Psap前蛋白原同种型A

[0087] MYALFLLASLLGAALAGPVLGLKECTRGSAVWCQNVKTASDCGAVKHCLQTVWNKPTVKSLPCDICKD
VVTAAGDMLKDNATEEEILVYLEKTCDWLPKPNMSASCKEIVDSYLPVILDIKGECSRPGEVCSALNLCESLQKH
LAELNHQKQLESNKIPELDMTEVVAPFMANIPLLLYPQDGPRSKPQPKDNGDVCQDCIQMVTDIQTAVRTNSTFVQ
ALVEHVKEECDRLGPGMADICKNYISQYSEIAIQMMHMQPKEICALVGFCDEVKEMPMQTLVPAKVASKNVIPAL
ELVEPIKKHEVPAKSDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDAFDKMC SKLPKSLSEECQEVVD TYGSSILSIL
LEEVSPELVCSMLHLCSGTRLPALTVHVTQPKDGGFCEVCKKLVGYLDRNLEKNSTKQEILAALEKGC SFLPDYQ
KQCDQFVAEYEPVLEILVEVMDPSFVCLKIGACPSAHKPLLGTCKI WGPSYWCQNTETAAQCN AVEHCKRHVWN
(SEQ ID NO:10)

[0088] Psap前蛋白原同工型B

[0089] MYALFLLASLLGAALAGPVLGLKECTRGSAVWCQNVKTASDCGAVKHCLQTVWNKPTVKSLPCDICKD
VVTAAGDMLKDNATEEEILVYLEKTCDWLPKPNMSASCKEIVDSYLPVILDIKGECSRPGEVCSALNLCESLQKH

LAELNHQKQLESNKIPELDMTEVVAPFMANIPLLLYPQDGPRSKPQPKDNGDVCQDCIQMVTDIQTAVRTNSTFVQ
ALVEHVKEECDRLGPGMADICKNYISQYSEIAIQMMMHMDQQPKEICALVGFCDEVKEMPMQTLVPAKVASKNVI
PALELVEPIKKHEVPAKSDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDAFDKMCSKLPKSLSEECQEVVDTYGSSIL
SILLEEVSPELVCSMLHLCSGTRLPALTVHVTQPKDGGFCEVCKKLVGYLDRNLEKNSTKQEILAALEKGCFLPD
PYQKQCDQFVAEYEPVLIEILVEVMDPSFVCLKIGACPSAHKPLLGTCKIWGPSYWCQNTETAAQCNAVEHCKRH
VWN (SEQ ID NO:11)

[0090] Psap前蛋白原同工型C

[0091] MYALFLLASLLGAALAGPVLGLKECTRGSAVWCQNVKTASDCGAVKHCLQTVWNKPTVKSLPCDICKD
VVTAAGDMLKDNATEEEILVYLEKTCDWLPKPNMSASCKEIVDSYLPVILDIIKGEMSRPGEVCSALNLCESLQKH
LAELNHQKQLESNKIPELDMTEVVAPFMANIPLLLYPQDGPRSKPQPKDNGDVCQDCIQMVTDIQTAVRTNSTFVQ
ALVEHVKEECDRLGPGMADICKNYISQYSEIAIQMMMHMDQQPKEICALVGFCDEVKEMPMQTLVPAKVASKNVI
ALELVEPIKKHEVPAKSDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDAFDKMCSKLPKSLSEECQEVVDTYGSSILS
ILLEEVSPELVCSMLHLCSGTRLPALTVHVTQPKDGGFCEVCKKLVGYLDRNLEKNSTKQEILAALEKGCFLPD
YQKQCDQFVAEYEPVLIEILVEVMDPSFVCLKIGACPSAHKPLLGTCKIWGPSYWCQNTETAAQCNAVEHCKRH
WN (SEQ ID NO:12)

[0092] 鞘脂激活蛋白A

[0093] SLPCDICKDVVTAAGDMLKDNATEEEILVYLEKTCDWLPKPNMSASCKEIVDSYLPVILDIIKGEMSR
PGEVCSALNLCES (SEQ ID NO:13)

[0094] 本公开内容的一些方面涉及Psap肽及其用途。Psap肽包含最初来源于鞘脂激活蛋白A片段的序列。以前已经表明由少至4个氨基酸组成的鞘脂激活蛋白A的片段以及这些片段的变体具有抗血管发生和抗癌活性。Psap肽和制备Psap肽的方法是本领域中已知的(参见,例如PCT公开W02009002931和W0/2011/084685;PCT申请PCT/US2012/71424,其以PCT公开W0/2013/096868公开,以及美国专利申请12/640,788和13/516,511,其全部通过引用以其整体并入本文)。

[0095] 在一些实施方案中,Psap肽包含氨基酸序列CDWLPK (SEQ ID NO:1)、DWLPK (SEQ ID NO:2) 或DWLP (SEQ ID NO:3),或者其氨基酸替换变体,其中所述氨基酸替换是:

[0096] a) 酪氨酸(Y) 替换色氨酸(W);

[0097] b) 选自缬氨酸(V)、丙氨酸(A) 或甘氨酸(G) 或者类似大小的非标准氨基酸或其衍生物的氨基酸替换亮氨酸(L);

[0098] c) 精氨酸(R) 替换赖氨酸(K);

[0099] d) 天冬氨酸(D) 的D-异构体替换天冬氨酸(D) 的L-异构体和/或亮氨酸(L) 的D-异构体替换亮氨酸(L) 的L-异构体;

[0100] e) 色氨酸(W) 的D-异构体替换色氨酸(W) 的L-异构体和/或脯氨酸(P) 的D-异构体替换脯氨酸(P) 的L-异构体;或其组合。在一些实施方案中,Psap肽包含氨基酸序列CDWLPK (SEQ ID NO:1)、DWLPK (SEQ ID NO:2) 或DWLP (SEQ ID NO:3)。

[0101] 应理解的是,Psap肽可以为任何长度。在一些实施方案中,Psap肽的长度为4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100或更多个氨基酸。在一些实施方案中,Psap肽的长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、

21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、300、400、500或更少个氨基酸。在一些实施方案中,Psap肽的长度为4-500、4-400、4-300、4-200、4-100、4-90、4-80、4-70、4-60、4-50、4-40、4-30、4-25、4-20、5-500、5-400、5-300、5-200、5-100、5-90、5-80、5-70、5-60、5-50、5-40、5-30、5-25、5-20、6-500、6-400、6-300、6-200、6-100、6-90、6-80、6-70、6-60、6-50、6-40、6-30、6-25或6-20个氨基酸。

[0102] 应理解的是,CDWLPK (SEQ ID NO:1)、DWLPK (SEQ ID NO:2) 或DWLP (SEQ ID NO:3) 侧翼的氨基酸可以是鞘脂激活蛋白A或鞘脂激活蛋白原中存在的天然侧翼氨基酸(例如,LEKTCDWLPKPNMS (SEQ ID NO:14), 有下划线的氨基酸是鞘脂激活蛋白A中DWLP (SEQ ID NO:3) 序列的天然侧翼氨基酸。因此,在一些实施方案中,Psap肽包含氨基酸序列DWLPKPNMS (SEQ ID NO:15)、CDWLPKPNM (SEQ ID NO:16)、TCDWLPKPN (SEQ ID NO:17)、KTCDWLPK (SEQ ID NO:18)、EKTCDWLPK (SEQ ID NO:19)、LEKTCDWLP (SEQ ID NO:20) 或其氨基酸替换变体,其中替换发生在CDWLPK (SEQ ID NO:1)、DWLPK (SEQ ID NO:2) 或DWLP (SEQ ID NO:3) 中。Psap肽的另一些实例包括但不限于DWLPKPNMS (SEQ ID NO:21)、CDWLPKPNM (SEQ ID NO:22)、TCDWLPKPN (SEQ ID NO:23)、KTCDWLPK (SEQ ID NO:24)、EKTCDWLPK (SEQ ID NO:25) 和LEKTCDWLP (SEQ ID NO:26)。另一些Psap肽的实例包括但不限于DWLPKPNM (SEQ ID NO:27)、CDWLPKPN (SEQ ID NO:28)、TCDWLPK (SEQ ID NO:29)、KTCDWLPK (SEQ ID NO:30)、EKTCDWLP (SEQ ID NO:31)、DWLPKPN (SEQ ID NO:32)、CDWLPK (SEQ ID NO:33)、TCDWLPK (SEQ ID NO:34)、KTCDWLP (SEQ ID NO:35)、DWLPK (SEQ ID NO:36)、CDWLPK (SEQ ID NO:1)、TCDWLP (SEQ ID NO:37)、DWLPK (SEQ ID NO:2)、CDWLP (SEQ ID NO:38) 和DWLP (SEQ ID NO:3)。

[0103] 还应理解的是CDWLPK (SEQ ID NO:1)、DWLPK (SEQ ID NO:2) 或DWLP (SEQ ID NO:3) 侧翼的氨基酸不一定是鞘脂激活蛋白A或鞘脂激活蛋白原中存在的天然侧翼氨基酸,反而可以是任何氨基酸。因此,Psap肽可包含任何数目和同一性的侧翼氨基酸。在一些实施方案中,侧翼氨基酸可包含抗体或抗体Fc结构域、血清转铁蛋白或其部分、白蛋白或运甲状腺素蛋白(参见,例如G.M.Subramanian, (2007), Nature Biotechnology 25,1411-141)。

[0104] 可使用本领域中任何已知方法合成Psap肽。示例性合成方法包括但不限于:重组合成、液相合成、固相合成、化学连接(参见,例如Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J.Sambrook等编辑,第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001; Current Protocols in Molecular Biology, F.M.Ausubel等编辑, John Wiley&Sons, Inc., New York; Schnolzer, M.A., P.; Jones, A.; Alewood, D.; Kent, S.B.H. (2007). "In Situ Neutralization in Boc-chemistry Solid Phase Peptide Synthesis". Int.J.Peptide Res.Therap.13(1-2):31-44; Albericio, F. (2000). Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide (1ed.). Boca Raton: CRC Press. 第848页; 和 Nilsson BL, Soellner MB, Raines RT (2005). "Chemical Synthesis of Proteins". Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.34:91-118; 以及美国专利No.4,749,742、4,794,150、5,552,471、5,637,719、6,001,966、7,038,103、7,094,943、7,176,282和7,645,858,其整个内容通过引用并入本文)。

[0105] 在一些实施方案中,Psap肽可以是经修饰的,例如,通过寡聚或聚合(例如,二聚体、三聚体、多聚体等)、氨基酸残基或肽骨架的修饰、交联、环化、缀合、聚乙二醇化

(pegylation)、糖基化、乙酰化、磷酸化、与另外的异源氨基酸序列(例如,抗体或抗体Fc结构域、血清转铁蛋白及其部分、白蛋白或运甲状腺素蛋白)融合,或者大幅改变肽的稳定性、溶解度或其他性质同时基本上保持或增强治疗活性的其他修饰。缀合可以是例如与聚合物缀合。合适的聚合物包括例如聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚氨基酸、二乙醚马来酸酐、N-(2-羟丙基)-甲基丙烯酰胺、葡聚糖、葡聚糖衍生物(包括硫酸葡聚糖)、聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇、肝素、肝素片段、多糖、纤维素和纤维素衍生物(包括甲基纤维素和羧甲基纤维素)、淀粉和淀粉衍生物、聚亚烷基二醇及其衍生物、聚亚烷基二醇及其衍生物的共聚物、聚乙烯醚和 α,β -聚[(2-羟乙基)-DL-天冬酰胺等,或者它们的混合物。缀合可通过接头(例如肽或化学接头)来进行。修饰肽的方法是本领域中公知的(参见,例如美国专利No.:5,180,816、5,596,078、5,990,273、5,766,897、5,856,456、6,423,685、6,884,780、7,610,156、7,256,258、7,589,170和7,022,673以及PCT公开W0 2010/014616,其内容通过引用并入本文)。

[0106] 在一些实施方案中,Psap肽是环肽。环肽是其氨基末端与羧基末端利用肽键或其他共价键连接在一起形成环状链的多肽链。在一个实施方案中,肽包含氨基和羧基末端半胱氨酸氨基酸残基。半胱氨酸有利于S-S二硫键形成。在一个实施方案中,肽包含另外的半胱氨酸氨基酸残基,其中所述半胱氨酸氨基酸残基在末端附近,但是未必在最末端。在一些实施方案中,半胱氨酸氨基酸残基在肽末端的五个氨基酸残基之内。设计和合成环肽的方法是本领域中公知的,例如,美国专利No.5,596,078、5,990,273、7,589,170和美国专利申请No.20080287649中所述。

[0107] 在一些实施方案中,对Psap肽进行功能修饰以增强稳定性。在一些实施方案中,Psap肽包含N末端乙酰基和/或C末端酰胺基。在一些实施方案中,Psap肽包含N末端乙酰基和C末端酰胺基。在一些实施方案中,Psap肽是Ac-dW1P-酰胺或Ac-DWLP-酰胺(Ac=乙酰基,小写字母D和L分别指D-氨基酸,SEQ ID NO:39和40)。在一些实施方案中,Psap肽的化学修饰包括但不限于包含烷基、烷氧基、羟烷基、烷氧基烷基、烷氧基羰基、烯基、炔基、环烷基、氨基、烷基氨基、氨基烷基、二烷基氨基、氨基二烷基、卤素、杂原子、碳环(carbocycle)、碳环基、碳环(carbocyclo)、碳环的(carbocyclic)、芳基、芳烷基、芳烷氧基、芳氧基烷基、杂环(heterocycle)、杂环基、杂环的(heterocyclic)、杂芳基和/或脂族基。

[0108] Psap肽还涵盖肽模拟物(peptidomimetic)(例如,D肽、 β 肽和拟肽(peptoid))。使用的肽模拟物可包含Psap肽的整个长度,或仅Psap肽的一部分。肽模拟物可包含例如D氨基酸、用于肽骨架的还原的酰胺键和连接侧链、吡咯啉酮和糖模拟物的非肽键。糖骨架肽模拟物(peptide mimeic)的设计和合成由Hirschmann等描述(J. Med. Chem., 1996, 36, 2441-2448, 其通过引用以其整体并入本文)。另外,还描述了基于吡咯啉酮的肽模拟物(参见,例如Smith等, J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 11037-11038, 其通过引用以其整体并入本文)。在一些实施方案中,Psap肽是拟肽的形式(美国专利No.5,811,387; Simon等. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, (1992), 89(20), 9367-9371)。在一些实施方案中,拟肽是聚-N替换的甘氨酸。在拟肽中,侧链与肽骨架的氮连接,而不是与肽中的 α 碳连接。在一些实施方案中,拟肽包含硝基芳族单体单元(Fowler等, J. Org. Chem. 2009 Feb 20; 74(4):1440-9)。在一些实施方案中,拟肽在一个或多个残基处具有 α 手性芳族侧链的N替换(Gorske等, J. Am. Chem. Soc. 2006 Nov 8; 128(44):14378-87)。在一些实施方案中,Psap肽

包含拟肽区(即,包含一个或更多个与肽骨架的氮连接的侧链)和肽区(即,包含一个或更多个与 α 碳连接的侧链)。

[0109] Psap氨基酸替换

[0110] 在一些实施方案中,Psap肽包含CDWLPK (SEQ ID NO:1)、DWLPK (SEQ ID NO:2) 或DWLP (SEQ ID NO:3) 的氨基酸替换变体,其中所述氨基酸替换是:

[0111] a) 酪氨酸(Y) 替换色氨酸(W);

[0112] b) 选自缬氨酸(V)、丙氨酸(A) 或甘氨酸(G) 或者类似大小的非标准氨基酸或其衍生物的氨基酸替换亮氨酸(L);

[0113] c) 精氨酸(R) 替换赖氨酸(K);

[0114] d) 天冬氨酸(D) 的D-异构体替换天冬氨酸(D) 的L-异构体和/或亮氨酸(L) 的D-异构体替换亮氨酸(L) 的L-异构体;

[0115] e) 色氨酸(W) 的D-异构体替换色氨酸(W) 的L-异构体和/或脯氨酸(P) 的D-异构体替换脯氨酸(P) 的L-异构体;或其组合。

[0116] 保守氨基酸替换可以是将一个氨基酸残基替换成具有类似电荷、尺寸、极性、疏水性或其组合之侧链的氨基酸。本领域中已经定义了具有类似电荷之侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 β -分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0117] 保守氨基酸替换通常不改变肽和/或可用于与结合伴侣形成范德华键之氨基酸类型的整体结构。在一些实施方案中,亮氨酸的保守替换是缬氨酸。在一些实施方案中,亮氨酸的保守替换是缬氨酸或丙氨酸。

[0118] 在一些实施方案中,预期亮氨酸的保守替换或非保守替换。在一些实施方案中,将亮氨酸替换为缬氨酸、甘氨酸或丙氨酸。在一些实施方案中,将亮氨酸替换为甘氨酸。在一些实施方案中,将亮氨酸替换为甘氨酸或缬氨酸。在一些实施方案中,氨基酸替换是用酪氨酸(Y) 替换色氨酸(W)。

[0119] 示例性氨基酸替换变体包括但不限于DWAP (SEQ ID NO:41)、DYLPK (SEQ ID NO:42)、DWVPK (SEQ ID NO:43)、DWLPR (SEQ ID NO:44)、DWAPK (SEQ ID NO:45) 和DYLP (SEQ ID NO:46)。

[0120] 本文还预期了非标准氨基酸的替换。在一些实施方案中,将亮氨酸替换为非标准氨基酸。在一些实施方案中,亮氨酸的非标准氨基酸替换物具有与亮氨酸、缬氨酸、精氨酸或甘氨酸类似的大小。非标准氨基酸的实例包括叠氮丙氨酸(azidoalanine)、叠氮高丙氨酸(azidohomoalanine)、叠氮正缬氨酸、叠氮正亮氨酸、叠氮正缬氨酸、高烯丙基甘氨酸(homoallyglycine)、高炔丙基甘氨酸(homoproparglycine)、正缬氨酸、正亮氨酸、顺式-巴豆基甘氨酸(cis-crotyglycine)、反式-巴豆基甘氨酸、2-氨基庚酸、2-丁炔基甘氨酸(butynyglycine)、烯丙基甘氨酸、3-(1-萘基)丙氨酸、3-(2-萘基)丙氨酸、对乙炔基-苯丙氨酸、对丙炔基-氧基-苯丙氨酸、间乙炔基-苯丙氨酸、3-(6-氯吡啶基)丙氨酸、3-(6-溴吡

咪基)丙氨酸、3-(5-溴咪咪基)丙氨酸、叠氮高丙氨酸、高炔丙基甘氨酸(homopropargylglycine)、对氯苯丙氨酸、 α -氨基辛酸、甲基缬氨酸、甲基亮氨酸或肌氨酸。在一些实施方案中,将亮氨酸替换为选自甲基缬氨酸、甲基亮氨酸或肌氨酸的非标准氨基酸。非标准氨基酸及其合成方法是本领域中公知的(参见,例如美国专利公开2010-0247433、2008-0214439、2004-0053390和2004-0058415;PCT公开W0 03/073238;以及美国专利No.6,586,207,其全部通过引用并入本文)。

[0121] 通过在合成过程中于适当的序列处添加期望的替换氨基酸,可在肽的化学合成过程中实现氨基酸替换。或者,可以使用分子生物学方法。在其基本上保持本文所述那些肽的活性的程度下,涵盖了非保守替换。

[0122] 如前所述,具有D-氨基酸替换的含CDWLPK(SEQ ID NO:1)、DWLPK(SEQ ID NO:2)或DWLP(SEQ ID NO:3)的Psap肽也表现为具有期望的治疗活性(参见PCT申请PCT/US2012/71424,以PCT公开W0/2013/096868公开)。因此,本文预期了用一个或更多个D-氨基酸替换类似的L-氨基酸得到的氨基酸替换变体。在一些实施方案中,存在1个D-氨基酸替换。在一些实施方案中,存在2个或更多个D-氨基酸替换。在一些实施方案中,存在3、4或5个D-氨基酸替换。在一些实施方案中,D氨基酸替换均匀地间隔,例如,每隔4-6mer的氨基酸。在一些实施方案中,D-氨基酸替换对于色氨酸(W)和/或脯氨酸(P)。在一些实施方案中,D-氨基酸替换对于天冬氨酸(D)和/或亮氨酸(L)。氨基酸构型的L和D约定(convention)不是指氨基酸本身的光学活性,而是指理论上可从其合成氨基酸的甘油醛异构体的光学活性(D-甘油醛是右旋,L-甘油醛是左旋)。示例性D氨基酸替换包括dW1P和DwLp(小写字母D和L分别指D-氨基酸,SEQ ID NO:47和48)。

[0123] 测定

[0124] 本公开内容的一些方面涉及进行测定以确定样品中的CD36水平。可使用本领域中已知的任何测定来测量CD36水平(参见,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual, J.Sambrook等编辑,第三版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,2001,Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel等编辑,John Wiley&Sons,Inc.,New York。微阵列技术描述于Microarray Methods and Protocols,R.Matson,CRC Press,2009或者Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel等编辑,John Wiley&Sons,Inc.,New York中)。CD36水平可以是mRNA水平和/或蛋白质水平。在一些实施方案中,CD36水平是蛋白质水平。用于检测CD36 mRNA的测定包括但不限于Northern印记分析、RT-PCR、测序技术、RNA原位杂交(使用例如DNA或RNA探针与样品中存在的RNA分子杂交)、原位RT-PCR(例如,Nuovo GJ等Am J Surg Pathol.1993,17:683-90;Komminoth P等Pathol Res Pract.1994,190:1017-25中所述)以及寡核苷酸微阵列(例如,通过来源于样品的多核苷酸序列与连接至具有可寻址位置(addressable location)的固体表面(例如玻璃晶片)的寡核苷酸杂交,例如Affymetrix微阵列(**Affymetrix®**, Santa Clara,CA))。用于设计核酸结合伴侣(如探针)的方法是本领域中公知的。在一些实施方案中,核酸结合伴侣与CD36核酸序列的一部分或整个核酸序列结合,本文提供了可被CD36序列鉴定的序列。

[0125] 用于检测CD36蛋白水平的测定包括但不限于:免疫测定(本文也称为基于免疫的测定或免疫基测定,例如Western印迹、免疫组织化学和ELISA测定)、质谱和基于多重珠的

测定。这些对于蛋白质水平检测的测定是本领域中公知的。可使用本领域中已知以及本文所述方法来设计用于蛋白质检测的结合伴侣。在一些实施方案中,CD36蛋白结合伴侣(例如,抗-CD36抗体)与CD36蛋白氨基酸序列的一部分或整个氨基酸序列结合。其他蛋白质检测和量化方法的实例包括描述在例如美国专利No.6939720和8148171以及公开的美国专利申请No.2008/0255766中的多重免疫测定以及描述在例如公开的美国专利申请No.2009/0088329中的蛋白质微阵列。

[0126] 在一些实施方案中,从对象获得的样品是肿瘤活检物(biopsy),而用于检测CD36蛋白质水平的测定是在肿瘤活检物上进行的基于免疫的测定。

[0127] 预期了CD36的任何合适的结合伴侣以用于检测CD36水平。在一些实施方案中,结合伴侣是与CD36蛋白特异性结合的任何分子。本文所述“与CD36蛋白特异性结合”意指与非CD36蛋白的一部分或整体相比,所述分子更可能与CD36蛋白的一部分或整体结合。在一些实施方案中,结合伴侣是抗体或其抗原结合片段,例如Fab、F(ab)2、Fv、单链抗体、Fab和sFab片段、F(ab')2、Fd片段、scFv或dAb片段。用于产生抗体及其抗原结合片段的方法是本领域中公知的(参见,例如Sambrook等,“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”(第二版),Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989);Lewin,“Genes IV”,Oxford University Press,New York,(1990),以及Roitt等,“Immunology”(第二版),Gower Medical Publishing,London,New York(1989)、W02006/040153、W02006/122786和W02003/002609)。结合伴侣还包括与CD36特异性结合的其他肽分子和适配体。用于产生肽分子和适配体的方法是本领域中公知的(参见,例如,公开的美国专利申请No.2009/0075834、美国专利No.7435542、7807351和7239742)。

[0128] 市售的CD36抗体包括例如来自Santa Cruz Biotechnology的N-15、**SMφ**、L-17、ME542、H300、185-1G2和V-19(目录号分别为sc-5522、sc-7309、sc-13572、sc-5523、sc-9154、sc-21772和sc-7641),来自Abcam的JC63.1、FA6-152和抗CD36(目录号分别为ab23680、ab17044和ab78054)。

[0129] 在一些实施方案中,结合伴侣是与CD36 mRNA特异性结合的任何分子。本文使用的“与CD36 mRNA特异性结合”意指与非CD36 mRNA或其他非CD36核酸的一部分或整体相比,所述分子更可能与CD36mRNA的一部分或整体结合(例如,通过互补碱基配对)。在一些实施方案中,与CD36 mRNA特异性结合的结合伴侣是核酸,例如探针。可使用本文提供的CD36的核苷酸序列和氨基酸序列设计结合伴侣。在一些实施方案中,CD36结合伴侣可包含可检测标签,例如酶促活性基团、荧光分子、发色团、发光分子、可特异性结合的配体或放射性同位素。在一些实施方案中,还预期了对于所述CD36结合伴侣有特异性的第二结合伴侣,例如二抗。

[0130] 样品

[0131] 本公开内容的一些方面涉及确定从对象获得的样品中的CD36水平。在一些实施方案中,从对象获得的样品是肿瘤样品。本文使用的肿瘤样品可包括例如肿瘤细胞、肿瘤细胞群、肿瘤碎片(例如,活检物)或整个肿瘤。在一些实施方案中,肿瘤样品是肿瘤活检物。在一些实施方案中,肿瘤样品包含循环肿瘤细胞。在一些实施方案中,肿瘤样品包含腹水(ascite)。在一些实施方案中,肿瘤样品包含胸液。肿瘤样品可包含非肿瘤细胞或非肿瘤组织(例如,包含肿瘤碎片周围的正常组织的活检物)。在一些实施方案中,样品可以是对象

获得的组织或流体样品。流体样品的实例是血液、血浆、血清和尿。

[0132] 对象

[0133] 本公开内容的一些方面涉及患有癌症的对象,例如人对象。本文预期了任何类型的癌症,包括但不限于白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、癌、转移癌、肉瘤、腺瘤、神经系统癌症和泌尿生殖系统癌症。示例性的癌症类型包括成人和儿科急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、肾上腺皮质癌、AIDS相关癌症、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、骨肉瘤、纤维组织细胞瘤、脑癌、脑干神经胶质瘤、小脑星形细胞瘤、恶性神经胶质瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、幕上原始神经外胚层瘤、下丘脑神经胶质瘤、乳腺癌、男性乳腺癌、支气管腺瘤、伯基特淋巴瘤、类癌瘤、未知来源的癌、中枢神经系统淋巴瘤、小脑星形细胞瘤、恶性神经胶质瘤、宫颈癌、儿童癌症、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、慢性骨髓增生性病症、结直肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食管癌、尤因家族肿瘤(Ewing family tumor)、颅外生殖细胞瘤、性腺外生殖细胞瘤、肝外胆管癌、眼内黑素瘤、视网膜母细胞瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道基质瘤、颅外生殖细胞瘤、性腺外生殖细胞瘤、卵巢生殖细胞瘤、妊娠滋养层肿瘤(gestational trophoblastic tumor)、神经胶质瘤、毛细细胞白血病、头颈癌、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、下咽骨癌、下丘脑和视通路神经胶质瘤、眼内黑素瘤、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌、肾细胞癌、喉癌、唇和口腔癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、恶性纤维组织细胞瘤、成神经管细胞瘤、黑素瘤、梅克尔细胞癌、恶性间皮瘤、鳞状颈癌、多发性内分泌腺瘤形成综合征、多发性骨髓瘤、蕈样真菌病(mycosis fungoides)、脊髓发育不良综合征、骨髓增生性病症、慢性骨髓增生性病症、鼻腔和鼻旁窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、口咽癌、卵巢癌、胰腺癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、成松果体细胞瘤和幕上原始神经外胚层瘤、垂体瘤、浆细胞瘤、胸膜肺母细胞瘤、前列腺癌、直肠癌、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、软组织肉瘤、子宫肉瘤、赛泽里综合征、非黑素瘤皮肤癌、小肠癌、鳞状细胞癌、鳞状颈癌、幕上原始神经外胚层瘤、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、移行细胞癌、滋养层肿瘤、尿道癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌或维尔姆斯瘤。

[0134] 在一些实施方案中,癌症是前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、白血病、胰腺癌、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤或黑素瘤。在一些实施方案中,癌症是前列腺癌、乳腺癌、肺癌、白血病、胰腺癌、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤或黑素瘤。在一些实施方案中,癌症是胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、黑素瘤或肺癌。

[0135] 对照和对照水平

[0136] 本公开内容的另一些方面涉及样品中CD36水平与对照水平的比较。在一些实施方案中,对照水平是从健康对象或健康对象群体获得的细胞、组织或流体中的CD36水平。本文使用的健康对象是明显没有疾病(例如,癌症)并且没有疾病史的对象。

[0137] 在一些实施方案中,由从患有癌症之对象获得的样品确定对照水平。因此,在一些实施方案中,对照水平从获得样品的同一对象获得。在一些实施方案中,对照水平是从患有癌症之对象获得的非癌细胞或组织中的CD36水平。

[0138] 在一些实施方案中,对照水平是不可检测的CD36水平或低于使用标准检测方法(例如,Western印迹或免疫组织化学)获得之背景/噪声水平的CD36水平。

[0139] 本公开内容还涉及将从对象获得的样品中的CD36水平与不需要每次测量的预定

水平或值(例如,对照水平)相比较。所述预定水平或值可以采用多种形式。其可以是单个的截止值,例如中值或平均值。其可基于比较的组建立,例如,其中已知一个确定组不响应于Psap肽治疗,并且已知另一个确定组响应于Psap肽治疗。其可以是范围,例如,将当测试群体均等地(或不均等地)分成组时,例如不响应于Psap肽治疗、稍微响应于Psap肽治疗和高度响应于Psap肽治疗,或者分成象限(quadrant),最低象限是对Psap肽治疗没有响应的对象,而最高象限是对Psap肽治疗具有最高响应的对象。

[0140] 预定值可取决于所选择的特定群体。例如,与成员患有癌症但是已知不响应Psap肽治疗的群体相比,明显健康群体(无可检测的癌症并且无之前的癌症史)将具有不同的“正常”的CD36范围。因此,所选择的预定值可考虑患者所落入的类别。本领域普通技术人员仅通过常规实验就可以选择适当的范围和类别。

实施例

[0141] 实施例1

[0142] 方法

[0143] 细胞系和原代细胞

[0144] 先前描述了细胞系PC3(Kang等PNAS.2009;106:12115-20)。将PC3细胞培养在具有10%FBS的RPMI中。先前描述了人乳腺癌细胞系MDA-MB-231和MCF-7(Ryu等PLOS one,6,2011)。将稳定表达RFP和萤火虫萤光素酶的鼠Lewis肺癌细胞系LLC(由Lea Eisenbach, Wiesmann Institute of Science, Rehovot, Israel提供)培养在补充有10%胎牛血清的DMEM中(Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. Cell. 2006; 127:679-95; Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. Science. 2008; 319:195-8; 以及Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. Nat Rev Cancer. 2009; 9:239-52)。先前描述了B16黑素瘤细胞、LNCaP前列腺癌细胞、AsPc1胰腺癌细胞和ID8卵巢癌细胞(Overwijk WW等B16 as a mouse model for human melanoma. Curr Protoc Immunol. 2001, May; Chapter 20: Unit 20.1; Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E等LNCaP model of human prostatic carcinoma. Cancer Res. 1983, Apr; 43(4):1809-18.; Chen WH等Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites. In Vitro 18:24-34, 1982; 以及Roby KF等Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer. Carcinogenesis. 2000, 21:585-591)。原发性卵巢癌细胞来源于卵巢癌患者腹水。

[0145] Western印迹分析

[0146] 将细胞在含有蛋白酶抑制剂(Roche Applied Science)的裂解缓冲液(BioRad)中均化。样品在1×SDS采样缓冲液中煮沸,并且上样到4-20%梯度Bis-Tris NuPAGE凝胶(Invitrogen)上。使用CD36的特异性抗体(AbCam, ab78054)或β-肌动蛋白(Sigma-Aldrich)进行Western印迹。

[0147] 体外细胞增殖测定

[0148] 使用MTT(3-{4,5-二甲基噻唑-2-基}-2,5-二苯基四唑溴盐, Sigma-Aldrich)测定

测量细胞增殖。将细胞接种到96孔培养板中的50 μ L生长培养基中,并且允许附着过夜。然后添加50 μ L生长培养基以及二倍浓度的处理试剂。在每个处理时间点之后,向每个孔添加10 μ L的5%MTT溶液(在PBS中缓冲)。将板在37 $^{\circ}$ C下再孵育4小时以使得MTT在细胞线粒体中代谢转化成甲臞(formazan)晶体。通过向每个微板的孔添加100 μ L50%N-N-二甲基甲酰胺中的10%十二烷基硫酸钠来使所述甲臞晶体最终溶解。使用比色法微板读取器测量550nm和680nm(分别对应于甲臞盐和参照波长)下的吸光度。使用仅含完全培养基的孔作为对照。每个实验进行两次,每个药物浓度使用6次重复。

[0149] 结果

[0150] 假设被Psap肽上调的Tsp-1可直接作用于癌细胞,而不是仅通过间接的抗血管发生机制。为了测试这个假设,用重组Tsp-1或DWLPK(SEQ ID NO:2)Psap肽处理LLC细胞,并且使用MTT测定测量细胞增殖。发现Tsp-1能够降低细胞增殖,而Psap肽不影响细胞增殖(图1A)。这支持了Tsp-1可直接作用于癌细胞的假设,因为该测定是在不存在任何血管的情况下体外进行的。这些结果还表明,单独Psap肽不表现出对癌细胞增殖的影响,支持了Psap肽可通过上调Tsp-1间接治疗癌症的假设。示出LLC细胞表达CD36(Tsp-1的受体),表明Tsp-1可通过CD36直接作用于癌细胞(图1B)。

[0151] 在另一些细胞系中测量CD36水平,以观察另外的癌症类型是否也表达CD36。通过western印迹分析测量乳腺癌(MDA-231、MCF-7)、卵巢癌(ID8)、黑素瘤(B16)、前列腺癌(PC3和LNCaP)以及肺癌(LLC)细胞系中的CD36水平。发现在所有测试细胞系中均可检测到CD36蛋白,其中在MDA-231、MCF-7、PC3和LLC细胞系中可检测到特别高的CD36水平(图2)。之前已示出MDA-231、ID8、B16、PC3和LLC细胞响应于体内Psap肽治疗。

[0152] 还检查了胰腺细胞系AsPc1,并且发现其表达CD36。

[0153] 还在来源于具有腹水之患者的原发性卵巢癌细胞中测量了CD36水平。在所有测试的原发性卵巢癌细胞中均可检测到CD36蛋白(图3)。

[0154] 实施例2

[0155] 方法

[0156] 小鼠和细胞系

[0157] 所有动物工作根据Institutional Animal Care and Use Committee批准的方案进行。野生型C57BL/6J和GFP转基因C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)10sb/J获自The Jackson Laboratory(Bar Harbor, Maine)。CB-17 SCID小鼠获自Charles River(Wilmington, MA)。

[0158] 先前描述了细胞系PC3和PC3M-LN4(14)。先前描述了人乳腺癌细胞系MDA-MB-231和MDA-MB-LM2(Ryu等PLOS one,6,2011)。将稳定表达RFP和萤火虫萤光素酶的鼠Lewis肺癌细胞系LLCs/D122(由Lea Eisenbach提供,Wiesmann Institute of Science, Rehovot, Israel)培养在补充有10%胎牛血清的DMEM中(Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. Cell. 2006;127:679-95; Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. Science. 2008;319:195-8; 以及Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. Nat Rev Cancer. 2009;9:239-52)。

[0159] 组织微阵列和免疫组织化学

[0160] 从Department of Pathology, The Gade Institute, Haukeland University Hospital的文件中取得存档试样(前列腺根除术试样或转移瘤的活检物)。将福尔马林固定的前列腺切除术试样用石蜡包埋并且以5mm间隔的整体封片步骤进行研究。在每种情况下,从最高肿瘤级别的区域选择三个组织核心(0.6mm直径)构建组织微阵列(TMA)。

[0161] 将来自TMA石蜡块的薄石蜡切片(5 μ m)用二甲苯/乙醇脱蜡,然后在柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中进行热诱导的微波表位恢复20分钟,与CD36抗体在室温下孵育60分钟。用EnVision链聚合物方法(Dako Cytomation, Copenhagen, Denmark)作为检测系统在DAKO自动染色机上进行免疫染色。使用DAB二氨基联苯胺过氧化物酶反应应用苏木精复染实现抗原定位。

[0162] 半定量地估计免疫染色,并且计算作为染色强度(0-3)与免疫阳性肿瘤细胞的比例($<10\% = 1$, $10-50\% = 2$, $>50\% = 3$)的乘积获得的染色指数(SI)。染色指数(范围0-9)是分类量表,其中预期了每个类别中的一些变化。

[0163] 肿瘤细胞中CD36的敲减

[0164] 使用编码靶向CD36的miRNA或shRNA的逆转录病毒或慢病毒载体使癌细胞系中的CD36水平降低。使用qPCR分析测试敲减效率。使用PicoPure RNA提取试剂盒(Arcturus)根据制造商的方案进行总RNA的提取。使用qScriptTM cDNA supermix(Quanta biosciences)将RNA转化成cDNA。用引物和iQTM SYBER Green master mix(Biorad, Hercules, CA)进行qPCR。在偶联有Bio-Rad-CFX Manager软件的BioRad CFX96Real Time System(BioRad)上进行以下标准方案:初始变性95 $^{\circ}$ C 10分钟,95 $^{\circ}$ C 10秒、60 $^{\circ}$ C 30秒和72 $^{\circ}$ C 30秒40个循环,然后是72 $^{\circ}$ C 5分钟的最终延伸,并且进行溶解曲线分析。使用 Δ -Ct法计算每一转录物与对照相比的相对丰度。

[0165] 体外细胞增殖测定

[0166] 使用MTT(3-{4,5-二甲基噻唑-2-基}-2,5-二苯基四唑溴盐,Sigma-Aldrich)测定测量细胞增殖。将细胞接种到96孔培养板中的50 μ L生长培养基中,并且允许附着过夜。然后添加50 μ L生长培养基以及二倍浓度的处理试剂。在每个处理时间点之后,向每个孔添加10 μ L的5%MTT溶液(在PBS中缓冲)。将板在37 $^{\circ}$ C下再孵育4小时以使得MTT在细胞线粒体中代谢转化成甲臞晶体。通过向每个微板的孔添加100 μ L 50%N-N-二甲基甲酰胺中的10%十二烷基硫酸钠来使所述甲臞晶体最终溶解。使用比色法微板读取器测量550nm和680nm(分别对应于甲臞盐和参照波长)下的吸光度。使用仅含完全培养基的孔作为对照。每个实验进行两次,每个药物浓度使用6次重复。

[0167] 转移瘤测定、生物法光成像和分析

[0168] 对于实验的转移瘤,通过尾静脉向7周大的C57BL/6小鼠注射 1×10^5 萤光素酶标记的LLC细胞。对于原位乳腺癌细胞注射,将 5×10^6 MDA-MB-231或其转移瘤变体MDA-MB-LM2细胞以0.1ml的体积注射到CB-17 SCID小鼠脂肪垫中。每周一次通过活动物生物发光成像(Xenogen)监测肿瘤生长和肺转移瘤(切除原发性肺癌后)。对于原位前列腺癌细胞注射,将 2×10^6 活的LN4或细胞注射到小鼠的前列腺中。

[0169] 对于体内确定转移瘤负荷,将小鼠麻醉并且腹膜内注射75mg/kg的D-萤光素(100 μ

L,在PBS中30mg/mL)。在D-荧光素注射后5分钟,在仰卧位的小鼠中用与Living Image acquisition和分析软件(Xenogen)偶联的Xenogen IVIS系统使用生物发光监测转移瘤随时间的生长。对于BLI图,通过使用包围小鼠胸的目的相同圆形区域计算每只小鼠的光子通量。

[0170] 施用Psap肽

[0171] 用在PBS中稀释的Psap肽(例如,DWLPK(SEQ ID NO:2)、DWLP(SEQ ID NO:3)或其修饰形式)通过腹膜内注射以30mg/kg/天的剂量处理8周大的小鼠达2周。

[0172] 结果

[0173] 测量来自患有癌症之人组织的组织样品中的CD36水平。

[0174] 将癌细胞系中的CD36水平敲减并且用这些具有降低的CD36的细胞系注射小鼠。然后向小鼠施用Psap肽。监测肿瘤生长和转移瘤负荷。预计敲减癌细胞中的CD36将降低体内Psap肽的抗癌活性。

[0175] 实施例3

[0176] 方法

[0177] 除非另有说明,否则实施例3中使用的方法与实施例1和2中使用的方法相同。测试CD36表达的细胞系是胰腺癌(AsPC1)、卵巢癌(DF-14和ID-8)、乳腺癌(MDA-MB231和LM2)、前列腺癌(PC3、PC3-M-LN4、LN-CAP和LN-CAP-LN3)、黑素瘤(B16-B16)和肺癌(LLC)细胞系。所有这些细胞系是本领域中已知的和/或市售的。

[0178] 用对照或血小板反应蛋白(Tsp-1,100ng、500ng或1000ng)处理表达CD36的卵巢癌细胞,并且在0小时或48小时测量存活细胞的百分比。

[0179] 对于卵巢癌小鼠模型,腹膜内注射1百万个表达荧光素酶的卵巢癌细胞。17天后开始用顺铂(4mg/kg QOD)、Psap肽dW1P(SEQ ID NO:47,40mg/kg QD)、顺铂和psap肽的组合或PBS QD处理。从约17天开始在数天测量荧光素酶强度,并且随时间测量。

[0180] 对于胰腺癌小鼠模型,将 1×10^6 AsPc1人胰腺细胞注射到SCID小鼠的胰腺中。用对照或用Psap肽dW1P(SEQ ID NO:47,20mg/kg/天或40/mg/kg/天)处理小鼠。在第25天开始处理并每天继续,持续21天。然后对小鼠进行安乐死,并且测量原发性肿瘤块。还测量腹水是否存在。

[0181] 对于黑素瘤小鼠模型,将B16-B16细胞注射到小鼠中。用psap肽dW1P(SEQ ID NO:47,10或40/mg/kg)或对照处理小鼠。随时间测量肿瘤体积,直到细胞注射后约20-25天。

[0182] 结果

[0183] 测试了多个癌细胞系的CD36表达。发现在所有测试的细胞系中均可检测到CD36蛋白,其中在AsPC1、DF-14、MDA-MB231和PC3细胞系中可检测到特别高的CD36水平(图5)。

[0184] 已示出表达CD36的卵巢细胞以剂量依赖的方式对Tsp-1介导的细胞杀伤敏感(图6)。

[0185] 将两个“高”CD36细胞系(卵巢癌细胞和AsPC胰腺癌细胞)和一个“低”CD36细胞系(B16-B6癌细胞)注射到小鼠中以研究psap肽对肿瘤生长和转移的影响。发现“高”CD36癌症模型响应于Psap肽治疗而消退(图5和7)。卵巢癌模型也示出转移性疾病的消退(图5)。胰腺癌模型也示出对转移的抑制,因为19只用psap肽处理的小鼠中只有1只形成了腹水,而10只用对照处理的小鼠中有4只形成了腹水。在“低”CD36黑素瘤模型中,发现Psap肽治疗抑制了

原发性肿瘤生长,但是不引起肿瘤消退(图8)。这些结果表明,“高”CD36癌症更可能强烈响应于Psap肽治疗(例如,原发性肿瘤和/或转移的消退),而“低”CD36癌症更可能具有较弱响应(例如,原发性肿瘤的抑制而非消退)。

[0186] 无需进一步详述,相信基于以上描述,本领域技术人员能够最大程度利用本公开内容。因此,具体实施方案应解释为仅是说明性的,而无论如何不以任何方式限制本公开内容的其余部分。为了本文所述目的或主题,本文引用的所有出版物均通过引用并入。

[0187] 本文在说明书和权利要求书中使用的未用数量词限定的名词应理解为意指“至少一个/种”,除非明确指出相反情况。

[0188] 通过以上描述,本领域技术人员可以容易地确定本公开内容的基本特征,并且在不脱离其精神和范围的情况下,可对本公开内容进行多种改变和修改以使其适用于多种用途和条件。因此,其他实施方案也在权利要求的范围内。

序列表

<110> Children's Medical Center Corporation

<120> CD36鉴定癌症对象以用于治疗用途

<130> C1233.70061W000

<140> N/A

<141> 同上

<150> US 61/782,850

<151> 2013-03-14

<160> 48

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Psap肽

<400> 1

Cys Asp Trp Leu Pro Lys
1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

[0001]

<220>

<223> Psap肽

<400> 2

Asp Trp Leu Pro Lys
1 5

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Psap肽

<400> 3

Asp Trp Leu Pro
1

<210> 4

<211> 4727

<212> DNA

<213> 智人 (H. sapiens)

<400> 4

ctttcaattc ctctggcaac aaaccacaca ctgggatctg acactgtaga gtgctttctc 60

ttctcttttt ttgggggggg gaggggggtg ggttgcatat ttaaactctc acgcatttat 120

gtactgagga ctgcagtga ggactttcct gcagaatacc attgacccct attaagaatt 180

gtccaaatgt tggagcatat gattgaaaaa tccttcttag ccattttaaa gatagctttc 240

caatgattag acgaattgat tctttctgtg actcatcagt tcatttcctg taaaattcat 300

	gtcttgcgtg tgatttgtga ataagaacca gagctttag aaaccacttt aatcatatcc	360
	aggagtttgc aagaacacagg tgcttaacac taattcacct cctgaacaag aaaaatgggc	420
	tgtgaccgga actgtgggct catcgctggg gctgtcattg gtgctgtcct ggctgtgttt	480
	ggaggtattc taatgccagt tggagacctg cttatccaga agacaattaa aaagcaagtt	540
	gtcctcgaag aaggtaacaat tgcttttaaa aattgggtta aaacaggcac agaagtttac	600
	agacagtttt ggatctttga tgtgcaaaat ccacaggaag tgatgatgaa cagcagcaac	660
	attcaagtta agcaaaggagg tccttatacg tacagagttc gttttctagc caaggaaaat	720
	gtaacccagg acgctgagga caacacagtc tctttcctgc agcccaatgg tgccatcttc	780
	gaaccttcac tatcagttgg aacagaggct gacaacttca cagtctcaca tctggctgtg	840
	gcagctgcat cccatatcta tcaaaatcaa ttgtttcaaa tgatcctcaa ttcacttatt	900
	aacaagtcaa aatcttctat gttccaagtc agaacttga gagaactgtt atggggctat	960
	agggatccat ttttgagttt ggttccgtac cctgttacta ccacagttgg tctgttttat	1020
	ccttacaaca atactgcaga tggagtattt aaagttttca atggaaaaga taacataagt	1080
	aaagtigcca taatcgacac atataaaggt aaaaggaatc tgtcctattg ggaaagtcac	1140
	tgcgacatga ttaatggtac agatgcagcc tcatttccac cttttgttga gaaaagccag	1200
	gtattgcagt tcttttcttc tgatatgtgc aggtcaatct atgctgtatt tgaatccgac	1260
	gttaatctga aaggaatccc tgtgtataga ttgtttcttc catccaagge ctttgctctc	1320
	ccagttgaaa acccagacaa ctattgtttc tgcacagaaa aaattatctc aaaaaattgt	1380
[0002]	acatcatatg gtgtgctaga catcagcaaa tgcaaagaag ggagacctgt gtacatttca	1440
	cttcctcatt ttctgtatgc aagtcctgat gtttcagaac ctattgatgg attaaacca	1500
	aatgaagaag aacataggac atacttggat attgaacctt taactggatt cactttacaa	1560
	tttgcaaaac ggctgcaggt caacctattg gtcaagccat cagaaaaaat tcaagtatta	1620
	aagaatctga agaggaacta tatttgtcct attctttggc ttaatgagac tgggaccatt	1680
	ggtgatgaga aggcaaacat gttcagaagt caagtaactg gaaaaataaa cctccttggc	1740
	ctgatagaaa tgatcttact cagtgttggg gtggtgatgt ttgttgcctt tatgatttca	1800
	tatttgtcat gcagatcgaa aacaataaaa taaacctggc tcaagcaca accaatattgt	1860
	gttgttctga ttcaataatt ggtttctggg tggccaattc agaagaagag tgtacatgct	1920
	caacaaatcc taggccctgc attcctgtca tcctcatccg ggggaaacac catcatcca	1980
	gtagctgccc tattcaactg caacagtctc caggaccatc agtatactgc atttcattgt	2040
	caccaaata tttgaaagac atttataaat aattggctta tgactcatat ttctctatga	2100
	ataccttcat acagcaggta taactctttt ctttatgggc ttaaataattt tgtcactgat	2160
	cctgcaaatg gacatcattt tagcacacta gcggtttata ttttaaggac cttcattctc	2220
	tgttctgcac ctcttctgga aattgagtaa attttgcctt ttttttttta ctacatttga	2280
	acttacgctt ggcatcttca gaatgccttt ctagcattaa gagatgtaaa tgataaagga	2340
	attattgtat gaaatattac aaagcgtaga ctatgcattg ttattcatta taatattttt	2400
	tgctgtcata atcgccctcat aaagacaggt ttcaaccatt aaaatatgtt cttccttaaa	2460
	ttcctgtgct ttttctagtt cctcttgtgt cataaaatgt ttatcctaatt tttctctctg	2520

	aagtataattt tatctgaatc cacatttctt tataaatcca tagtccttgc tgaatatatgc	2580
	tttctaaatt tctaccactt tgttctaggc taatttttta agctaattgg atgaagaaca	2640
	aaaagacatt tggtttcatc ctttacagca gtaggacaat tgcaaagggt tttccttttt	2700
	cataaggaga cacatttaata ggtaactctg tttcttgagc aggggttcac ttattctgag	2760
	agcattagtt ctcctaaaaa gctccagcat agaaaggga gataaaccaa attctagctt	2820
	gtgttttacc cacagaagga tacaggacaa aggaatagta actggcctgt ttggatacta	2880
	aaatcgaaaa taacttttag cctcctcctt atgatatccg ccagagtaaa tgttgagcat	2940
	tactacagaa aagccacaaa ccaagaatct acctgtttgg aaagatcttt tgcattctctg	3000
	aaggtgctta aagcatactt agtgcctttc cttttaactg ggaagataaa agaagtatct	3060
	gtccaagata ttaatatgta agataacatt gtagacatgt tcttctgata atacaagggt	3120
	tattctattt gcattaggat atttgtggac atgtccatct aatataaagg aaagtttttt	3180
	aatcattgag gcatgtaggg ctgagttata taatgtagaa acttctaaag ataattggat	3240
	gagaatatac atattgacct gtatatattg actaatcatg actcagatct taatacaggg	3300
	atgatctcat agcatttaga tatcagaaaa ggttttgacc tataatgtctt taatatgtt	3360
	tgaatacatg tataatcttt atcattcttc agtgtttcat ttctcaaatt ctgtaaaagg	3420
	aatataagag gaaagacaat tcatatacaa agacaacgag attaaaaata tgcagtagga	3480
	aaaataatta cttaagggga gatTTTTTTT acatgaaatc tgggctttgg atgtgtgtgt	3540
	gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgcacatat gcactgtggt gggagtggg ccaactgggg	3600
[0003]	aatatgttac atgtgtgact ttgttttgcc ctggcgaagt taatgttgtt cagaaagggt	3660
	aatgttttg acacttgcaa ttgctcatgg atgaatttat atgttttagt catagaaaaa	3720
	ttgtaccctt tgatagaagc acattttctt tccaaagctg gttattaacc acagaattat	3780
	agcaggtatt cataacttaa gtttgaaaat caatagcgtc tgcaaatgga ttaacagatt	3840
	agagaatcaa cagcatcgga aaataggtta atgcatattg cttctaacaa gtgcatgaag	3900
	aaatagaaga agctatgtag ctttcagttc tgacagaaaa gggtagaagg gggatcatt	3960
	tcaagaaaaa aaatagctat cagcgaatgg ttatctctga aaatatttgt attaagatgt	4020
	gtatacatgg ccaggcatgg tggctcatgc ctgtaatccc agcactttgg gaggcaggtg	4080
	gatcacgagg tcaggagatc aagaccatcc tggccaacat ggtgaaacct catctctact	4140
	aaaaatacaa aaatgagcgg ggtgtggtgg cccatgcctg tagtcccagc tgctcgggag	4200
	actgaatctc ttgagcctgg gaagcagagg ttgcagtga ctgagatcgc gtcactgcac	4260
	tccagcctgg tgacagagcg agattccatc tcaaaaaaaaa aaaacagtat gcacgtacaa	4320
	atttcttaac ctgttatcaa tgtctgagct acataattat ctttctagtt ggagtttgtt	4380
	ttagggtgtg accaactgac atttcagttt ttctgtttga agtccaatgt attagtgact	4440
	ctgtggctgc tctcttcacc tggcccttgt ggcctgtcta caattctaaa tggattttga	4500
	actcaatgtc gtcgtttctg gtttctgca tataccaata gcattaceta tgactttttt	4560
	tttcttgagc tatttttcaat gagctgagct aatgaactaa aactgagtta tgtttaatat	4620
	ttgtatcaaa tacataaaaag gaatactgct ttttctttt gtggctcaaa ggtagctgca	4680
	ttttaaaaaa ttgtgaaaaa taaaaacttt tgttattaga aaaatga	4727

<210>	5	
<211>	2069	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	5	
	gaggatgtca atggcittca gatgtcagga taaccttaag gatagatgaa gggttgagag	60
	cctgtgcctc atttctgagt tctcagctgc tatgccgtgg aaatcctgtt tactttctgc	120
	atctgtcctt gcaagactct ggagccagtc ttgaggctct acatctccga aagcaagctc	180
	ttctagaagt tgatagcttt ccaatgatta gacgaattga ttctttctgt gactcatcag	240
	ttcatttctt gtaaaattca tgtcttgctg ttgatttggt aataagaacc agagcttgta	300
	gaaaccactt taatcatatc caggagttag caagaaacag gtgcttaaca ctaattcacc	360
	tctgaacaa gaaaaatggg ctgtgaccgg aactgtgggc tcatcgctgg ggctgtcatt	420
	gggtgctgcc tggctgtgtt tggaggattt ctaatgccag ttggagacct gcttatccag	480
	aagacaatta aaaagcaagt tgtcctcgaa gaaggtaaca ttgcttttaa aaattgggtt	540
	aaaacaggca cagaagttaa cagacagttt tggatcttgg atgtgcaaaa tccacaggaa	600
	gtgatgatga acagcagcaa cattcaagtt aagcaaagag gtccttatac gtacagagtt	660
	cgttttctag ccaaggaaaa tgtaaccag gacgctgagg acaacacagt ctctttcctg	720
	cagcccaatg gtgccatctt cgaaccttca ctatcagttg gaacagagge tgacaacttc	780
	acagtcttca atctggctgt ggcagctgca tcccatatct atcaaaatca atttgttcaa	840
	atgatectca attcacttat taacaagtca aaatcttcta tgttccaagt cagaactttg	900
	agagaactgt tatggggcta tagggatcca ttttigagtt tggttccgta cctgttact	960
[0004]	accacagttg gtctgtttta tccttacaac aatactgcag atggagttaa taaagttttc	1020
	aatggaaaaa ataacataag taaagttgcc ataatcgaca catataaagg taaaaggaat	1080
	ctgtcctatt gggaaagtca ctgcgacatg attaatggtg cagatgcagc etcatattcca	1140
	ccttttgttg agaaaagcca ggtattgcag ttcttttctt ctgatatttg caggtcaatc	1200
	tatgtgtgat ttgaatccga cgtaatctg aaaggaatcc ctgtgtatag atttgttctt	1260
	ccatccaagg cctttgcctc tccagttgaa aaccagaca actattgttt ctgcacagaa	1320
	aaaattatct caaaaaattg tacatcatat ggtgtgctag acatcagcaa atgcaaagaa	1380
	gggagacctg tgtacatttc acttccatct tttctgtatg caagtcctga tgtttcagaa	1440
	cctattgatg gattaaacct aaatgaagaa gaacatagga catacttgga tattgaacct	1500
	ataactggat tcactttaca atttgcaaaa cggtgcaggg tcaacctatt ggtcaagcca	1560
	tcagaaaaaa ttcaagtatt aaagaatctg aagaggaact atattgtgcc tattcttttg	1620
	cttaatgaga ctgggacctt tggatgatg aaggcaaca tgttcagaag tcaagtaact	1680
	ggaaaaataa acctccttgg cctgatagaa atgatcttac tcagtgttgg tgtggtgatg	1740
	tttgttgctt ttatgatttc atattgtgca tgcagatcga aaacaataaa ataagtaagt	1800
	atgtaccaa aaatattgct tcaataatat tagcttatat attacttgtt ttcactttat	1860
	caaagagaag ttacatatat ggccatatat atttctagac atgtctagcc actgatcatt	1920
	tttaaatata ggtaaaaaa cctataaata ttatcacgca gatcactaaa gtatatcttt	1980
	aattctggga gaaatgagat aaaagatgta cttgtgacca ttgtaacaat agcacaaata	2040
	aagcacttgt gccaaagttg tccaaaaaa	2069

<210>	6	
<211>	2108	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	6	
	ctttcaattc ctctggcaac aaaccacaca ctgggatctg acactgtaga gtgctttctc	60
	ttctcttttt ttgggggggg gaggggggtgt ggttgcatat ttaaactctc acgcatttat	120
	gtactgagga ctgcagtgtt ggactttcct gcagaatacc atttgatcct attaagaatt	180
	gtccaaatgt tggagcattt gattgaaaaa tccttcttag ccattttaaa gatagctttc	240
	caatgattag acgaattgat tctttctgtg actcatcagt tcatttcctg taaaattcat	300
	gtcttgctgt tgatttgtga ataagaacca gagctttag aaaccacttt aatcatatcc	360
	aggagtttgc aagaacagg tgcttaacac taattcacct cctgaacaag aaaaatgggc	420
	tgtgaccgga actgtgggct catcgctggg gctgtcattg gtgctgtcct ggctgtgttt	480
	ggaggtatcc taatgccagt tggagacctg cttatccaga agacaattaa aaagcaagtt	540
	gtctcgaag aaggtacaat tgcctttaaa aattgggtta aaacaggcac agaagtttac	600
	agacagtttt ggatccttga tgtgcaaaat ccacaggaag tgatgatgaa cagcagcaac	660
	attcaagtta agcaaaggg tccttatacg tacagagttc gttttctagc caaggaaaat	720
	gtaaccagg acgctgagga caacacagtc tctttcctgc agcccaatgg tgccatcttc	780
	gaaccttcac tatcagttgg aacagaggct gacaacttca cagtctcaa tctggctgtg	840
	gcagctgcat cccatatcta tcaaaatcaa tttgttcaa tgatcctcaa ttcacttatt	900
[0005]	aaacagtcaa aatcttctat gttccaagtc agaacttga gagaactgtt atggggctat	960
	agggatccat ttttgagttt ggttccgtac cctgttacta ccacagttgg tctgttttat	1020
	ccttacaaca atactgcaga tggagtttat aaagttttca atggaaaaga taacataagt	1080
	aaagtggcca taatcgacac atataaaggt aaaaggaatc tgtcctattg ggaaagtcac	1140
	tgcgacatga ttaatggtac agatgcagcc tcatttccac cttttgttga gaaaagccag	1200
	gtattgcagt tcttttcttc tgatatgtgc aggtcaatct atgctgtatt tgaatccgac	1260
	gttaatctga aaggaatccc tgtgtataga tttgttcttc catccaaggc ctttgcctct	1320
	ccagttgaaa acccagacaa ctattgtttc tgcacagaaa aaattatctc aaaaaattgt	1380
	acatcatatg tgtgtctaga catcagcaaa tgcaagaag ggagacctgt gtacatttca	1440
	cttcctcatt ttctgtatgc aagtcctgat gtttcagaac ctattgatgg attaaacca	1500
	aatgaagaag aacataggac atacttggat attgaaccta taactggatt cactttacaa	1560
	tttgcaaaac ggctgcaggt caacctattg gtcaagccat cagaaaaaat tcaagtatta	1620
	aagaatctga agaggaacta tatttgccct attccttggc ttaatgagac tgggaccatt	1680
	ggtgatgaga aggcaacat gttcagaagt caagtaactg gaaaaataaa cctccttggc	1740
	ctgatagaaa tgatcttact cagtgttggg gtggtgatgt ttgttgcttt tatgatttca	1800
	tattgtgcat gcagatcgaa aacaataaaa taagtaagta tgtaccaaaa aatattgctt	1860
	caataatatt agcttatata ttacttgttt tcactttatc aaagagaagt tacatattag	1920
	gccatatata tttctagaca tgtctagcca ctgatcattt ttaaatatag gtaataaac	1980
	ctataaatat tatcacgcag atcactaaag tatatcttta attctgggag aaatgagata	2040

	aaagatgtac ttgtgacat tgtaacaata gcacaaataa agcacttgtg ccaaagttgt	2100
	ccaaaaaa	2108
	<210> 7	
	<211> 1814	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 7	
	aagttgctga gacaagggaa gagagatgag gaaccagagc ttgtagaaac cactttaatc	60
	atatccagga gtttgaaga aacaggtgct taacactaat tcacctcctg aacaagaaaa	120
	atgggctgtg accggaactg tgggctcatc gctggggctg tcattggtgc tgcctggct	180
	gtgtttggag gtattctaata gccagttgga gacctgctta tccagaagac aattaaaaag	240
	caagttgtcc tcgaagaagg tacaattgct tttaaaaatt gggttaaaac aggcacagaa	300
	gtttacagac agttttgcat ctttgatgtg caaaatccac aggaagtgat gatgaacagc	360
	agcaacattc aagttaagca aagaggtcct tatacgtaca gagttcgttt tctagccaag	420
	gaaaatgtaa cccaggagc tgaggacaac acagtctctt tcctgcagcc caatggtgcc	480
	atcttcgaac ctactatc agttggaaca gagctgaca acttcacagt tctcaatctg	540
	gctgtggcag ctgcatccca tatctatcaa aatcaatttg ttcaaatgat cctcaattca	600
	cttattaaca agtcaaaatc ttctatgttc caagtcagaa ctttgagaga actgttatgg	660
	ggctataggg atccattttt gagtttgggt ccgtaccctg ttactaccac agttggtctg	720
[0006]	ttttatcctt acaacaatac tgcagatgga gtttataaag ttttcaatgg aaaagataac	780
	ataagtaaaag ttgccataat cgacacatat aaaggtaaaa ggaatctgtc ctattgggaa	840
	agtcactgcg acatgattaa tggtagagat gcagcctcat ttccaccttt tgttgagaaa	900
	agccaggat tgcagttctt ttcttctgat atttgaggt caatctatgc tgtatttgaa	960
	tccgacgtta atctgaaagg aatccctgtg tatagatttg ttcttccatc caaggccttt	1020
	gcctctccag ttgaaaaccc agacaactat tgtttctgca cagaaaaaat tatctcaaaa	1080
	aattgtacat catatggtgt gctagacatc agcaaatgca aagaaggag acctgtgtac	1140
	atttcacttc ctcatcttct gtatgcaagt cctgatgttt cagaacctat tgatggatta	1200
	aacccaaatg aagaagaaca taggacatac ttggatattg aacctataac tggattcact	1260
	ttacaatttg caaaacggct gcaggtcaac ctattggtca agccatcaga aaaaattcaa	1320
	gtattaaaga atctgaagag gaactatatt gtgcctatc ttggtcttaa tgagactggg	1380
	accattggtg atgagaaggc aaacatgttc agaagtcaag taactggaaa aataaacctc	1440
	cttggcctga tagaaatgat ctactcagt gttggtgtgg tgatgtttgt tgcttttatg	1500
	atttcattat gtgcatgcag atcgaaaaca ataaaataag taagtatgta ccaaaaaata	1560
	ttgcttcaat aatattagct tatatattac ttgttttcac tttatcaaag agaagttaca	1620
	tattaggcca tatatatctc tagacatgtc tagccactga tcatttttaa atataggtaa	1680
	ataaacctat aaatattatc acgcagatca cttaaagtata tctttaattc tgggagaaat	1740
	gagataaaaag atgtacttgt gaccattgta acaatagcac aaataaagca cttgtgccaa	1800
	agttgtccaa aaaa	1814

<210>	8	
<211>	1989	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	8	
	atgacattat tagttctgcc actggttaggc attagaagca agaaaaggga gacggaccga	60
	ggaagccact ttggtgaaac aaaaagaaaa gcatTTgttt atttagaacg ggcaaaatga	120
	tacgtttcag tgggtgtttt ctttgtactt tgatcttttt gtactgatat ttaagcttct	180
	gttttatgat ctctttctaa tgatagaacc agagcttgta gaaaccactt taatcataic	240
	caggagtttg caagaaacag gtgcttaaca ctaattcacc tcctgaacaa gaaaaatggg	300
	ctgtgaccgg aactgtgggc tcatcgctgg ggctgtcatt ggtgctgtcc tggctgtgtt	360
	tggaggtatt ctaatgccag ttggagacct gcttatccag aagacaatta aaaagcaagt	420
	tgtcctcgaa gaaggtacaa ttgcttttaa aaatTgggtt aaaacaggca cagaagtta	480
	cagacagttt tggatctttg atgtgcaaaa tccacaggaa gtgatgatga acagcagcaa	540
	cattcaagtt aagcaaagag gtccttatac gtacagagtt cgttttctag ccaaggaaaa	600
	tgtaaaccag gacgtgagg acaacacagt ctctttcctg cagcccaatg gtgccatctt	660
	cgaaccttca ctatcagttg gaacagaggc tgacaacttc acagtTctca atctggctgt	720
	ggcagctgca tcccatatct atcaaaatca atttgTtcaa atgatectca attcacttat	780
	taacaagtca aaatcttcta tgttccaagt cagaactttg agagaactgt tatggggcta	840
	tagggatcca tttttgagtt tggttccgta cctgttact accacagttg gtctgtttta	900
[0007]	tccttacaaac aatactgcag atggagtTta taaagttttc aatggaaaag ataacataag	960
	taaagttgcc ataatcgaca catataaagg taaaaggaat ctgtcctatt gggaaagtca	1020
	ctgcgacatg attaatggta cagatgcagc ctcatTtcca ccttttgttg agaaaagcca	1080
	ggtattgcag ttcttttctt ctgatatttg caggTcaatc tatgctgtat ttgaatccga	1140
	cgttaatctg aaaggaatcc ctgtgtatag atttgTtctt ccattccaagg cctttgcctc	1200
	tccagttgaa aaccagaca actattgttt ctgcacagaa aaaattatct caaaaaattg	1260
	tacatcatat ggtgtgctag acatcagcaa atgcaaagaa gggagacctg tgtacatttc	1320
	acttctcat tttctgtatg caagTcctga tgtttcagaa cctattgatg gattaaaccc	1380
	aaatgaagaa gaacatagga catacttgga tattgaacct ataactggat tcactttaca	1440
	atttgcaaaa cggctgcagg tcaacctatt ggtcaagcca tcagaaaaaa ttcaagtatt	1500
	aaagaatctg aagaggaact atattgtgcc tattctttgg cttaatgaga ctgggaccat	1560
	tggTgatgag aaggcaaaca tgttcagaag tcaagtaact ggaaaaataa acctccttgg	1620
	cctgatagaa atgatcttac tcagtgttgg tTgggtgatg tttgttgctt ttatgatttc	1680
	atattgtgca tgcagatcga aaacaataaa ataagtaagt atgtaccaa aaatattgct	1740
	tcaataatat tagcttatat attactTgtt ttactttat caaagagaag ttacatatta	1800
	ggccatatat atttctagac atgtctagcc actgatcatt tttaaatata ggtaaataaa	1860
	cctataaata ttatcacgca gatcactaaa gtatatcttt aattctggga gaaatgagat	1920
	aaaagatgta cttgtgacca ttgtaacaat agcacaaaata aagcacttgt gccaaagttg	1980
	tccaaaaaa	1989

<210> 9
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 9

Met Gly Cys Asp Arg Asn Cys Gly Leu Ile Ala Gly Ala Val Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Val Leu Ala Val Phe Gly Gly Ile Leu Met Pro Val Gly Asp Leu
 20 25 30

Leu Ile Gln Lys Thr Ile Lys Lys Gln Val Val Leu Glu Glu Gly Thr
 35 40 45

Ile Ala Phe Lys Asn Trp Val Lys Thr Gly Thr Glu Val Tyr Arg Gln
 50 55 60

Phe Trp Ile Phe Asp Val Gln Asn Pro Gln Glu Val Met Met Asn Ser
 65 70 75 80

Ser Asn Ile Gln Val Lys Gln Arg Gly Pro Tyr Thr Tyr Arg Val Arg
 85 90 95

Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp Asn Thr Val
 100 105 110

[0008]

Ser Phe Leu Gln Pro Asn Gly Ala Ile Phe Glu Pro Ser Leu Ser Val
 115 120 125

Gly Thr Glu Ala Asp Asn Phe Thr Val Leu Asn Leu Ala Val Ala Ala
 130 135 140

Ala Ser His Ile Tyr Gln Asn Gln Phe Val Gln Met Ile Leu Asn Ser
 145 150 155 160

Leu Ile Asn Lys Ser Lys Ser Ser Met Phe Gln Val Arg Thr Leu Arg
 165 170 175

Glu Leu Leu Trp Gly Tyr Arg Asp Pro Phe Leu Ser Leu Val Pro Tyr
 180 185 190

Pro Val Thr Thr Thr Val Gly Leu Phe Tyr Pro Tyr Asn Asn Thr Ala
 195 200 205

Asp Gly Val Tyr Lys Val Phe Asn Gly Lys Asp Asn Ile Ser Lys Val
 210 215 220

Ala Ile Ile Asp Thr Tyr Lys Gly Lys Arg Asn Leu Ser Tyr Trp Glu
 225 230 235 240

Ser His Cys Asp Met Ile Asn Gly Thr Asp Ala Ala Ser Phe Pro Pro
 245 250 255

Phe Val Glu Lys Ser Gln Val Leu Gln Phe Phe Ser Ser Asp Ile Cys
 260 265 270

Arg Ser Ile Tyr Ala Val Phe Glu Ser Asp Val Asn Leu Lys Gly Ile
 275 280 285
 Pro Val Tyr Arg Phe Val Leu Pro Ser Lys Ala Phe Ala Ser Pro Val
 290 295 300
 Glu Asn Pro Asp Asn Tyr Cys Phe Cys Thr Glu Lys Ile Ile Ser Lys
 305 310 315 320
 Asn Cys Thr Ser Tyr Gly Val Leu Asp Ile Ser Lys Cys Lys Glu Gly
 325 330 335
 Arg Pro Val Tyr Ile Ser Leu Pro His Phe Leu Tyr Ala Ser Pro Asp
 340 345 350
 Val Ser Glu Pro Ile Asp Gly Leu Asn Pro Asn Glu Glu Glu His Arg
 355 360 365
 Thr Tyr Leu Asp Ile Glu Pro Ile Thr Gly Phe Thr Leu Gln Phe Ala
 370 375 380
 Lys Arg Leu Gln Val Asn Leu Leu Val Lys Pro Ser Glu Lys Ile Gln
 385 390 395 400
 Val Leu Lys Asn Leu Lys Arg Asn Tyr Ile Val Pro Ile Leu Trp Leu
 405 410 415
 [0009] Asn Glu Thr Gly Thr Ile Gly Asp Glu Lys Ala Asn Met Phe Arg Ser
 420 425 430
 Gln Val Thr Gly Lys Ile Asn Leu Leu Gly Leu Ile Glu Met Ile Leu
 435 440 445
 Leu Ser Val Gly Val Val Met Phe Val Ala Phe Met Ile Ser Tyr Cys
 450 455 460
 Ala Cys Arg Ser Lys Thr Ile Lys
 465 470
 <210> 10
 <211> 524
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 10
 Met Tyr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Gly Pro Val Leu Gly Leu Lys Glu Cys Thr Arg Gly Ser Ala Val Trp
 20 25 30
 Cys Gln Asn Val Lys Thr Ala Ser Asp Cys Gly Ala Val Lys His Cys
 35 40 45
 Leu Gln Thr Val Trp Asn Lys Pro Thr Val Lys Ser Leu Pro Cys Asp
 50 55 60

[0010]

Ile	Cys	Lys	Asp	Val	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Asp	Met	Leu	Lys	Asp	Asn	65	70	75	80
Ala	Thr	Glu	Glu	Glu	Ile	Leu	Val	Tyr	Leu	Glu	Lys	Thr	Cys	Asp	Trp	85	90	95	
Leu	Pro	Lys	Pro	Asn	Met	Ser	Ala	Ser	Cys	Lys	Glu	Ile	Val	Asp	Ser	100	105	110	
Tyr	Leu	Pro	Val	Ile	Leu	Asp	Ile	Ile	Lys	Gly	Glu	Met	Ser	Arg	Pro	115	120	125	
Gly	Glu	Val	Cys	Ser	Ala	Leu	Asn	Leu	Cys	Glu	Ser	Leu	Gln	Lys	His	130	135	140	
Leu	Ala	Glu	Leu	Asn	His	Gln	Lys	Gln	Leu	Glu	Ser	Asn	Lys	Ile	Pro	145	150	155	160
Glu	Leu	Asp	Met	Thr	Glu	Val	Val	Ala	Pro	Phe	Met	Ala	Asn	Ile	Pro	165	170	175	
Leu	Leu	Leu	Tyr	Pro	Gln	Asp	Gly	Pro	Arg	Ser	Lys	Pro	Gln	Pro	Lys	180	185	190	
Asp	Asn	Gly	Asp	Val	Cys	Gln	Asp	Cys	Ile	Gln	Met	Val	Thr	Asp	Ile	195	200	205	
Gln	Thr	Ala	Val	Arg	Thr	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Gln	Ala	Leu	Val	Glu	210	215	220	
His	Val	Lys	Glu	Glu	Cys	Asp	Arg	Leu	Gly	Pro	Gly	Met	Ala	Asp	Ile	225	230	235	240
Cys	Lys	Asn	Tyr	Ile	Ser	Gln	Tyr	Ser	Glu	Ile	Ala	Ile	Gln	Met	Met	245	250	255	
Met	His	Met	Gln	Pro	Lys	Glu	Ile	Cys	Ala	Leu	Val	Gly	Phe	Cys	Asp	260	265	270	
Glu	Val	Lys	Glu	Met	Pro	Met	Gln	Thr	Leu	Val	Pro	Ala	Lys	Val	Ala	275	280	285	
Ser	Lys	Asn	Val	Ile	Pro	Ala	Leu	Glu	Leu	Val	Glu	Pro	Ile	Lys	Lys	290	295	300	
His	Glu	Val	Pro	Ala	Lys	Ser	Asp	Val	Tyr	Cys	Glu	Val	Cys	Glu	Phe	305	310	315	320
Leu	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Lys	Leu	Ile	Asp	Asn	Asn	Lys	Thr	Glu	Lys	325	330	335	
Glu	Ile	Leu	Asp	Ala	Phe	Asp	Lys	Met	Cys	Ser	Lys	Leu	Pro	Lys	Ser	340	345	350	
Leu	Ser	Glu	Glu	Cys	Gln	Glu	Val	Val	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Ile	355	360	365	

Leu Ser Ile Leu Leu Glu Glu Val Ser Pro Glu Leu Val Cys Ser Met
 370 375 380
 Leu His Leu Cys Ser Gly Thr Arg Leu Pro Ala Leu Thr Val His Val
 385 390 395 400
 Thr Gln Pro Lys Asp Gly Gly Phe Cys Glu Val Cys Lys Lys Leu Val
 405 410 415
 Gly Tyr Leu Asp Arg Asn Leu Glu Lys Asn Ser Thr Lys Gln Glu Ile
 420 425 430
 Leu Ala Ala Leu Glu Lys Gly Cys Ser Phe Leu Pro Asp Pro Tyr Gln
 435 440 445
 Lys Gln Cys Asp Gln Phe Val Ala Glu Tyr Glu Pro Val Leu Ile Glu
 450 455 460
 Ile Leu Val Glu Val Met Asp Pro Ser Phe Val Cys Leu Lys Ile Gly
 465 470 475 480
 Ala Cys Pro Ser Ala His Lys Pro Leu Leu Gly Thr Glu Lys Cys Ile
 485 490 495
 Trp Gly Pro Ser Tyr Trp Cys Gln Asn Thr Glu Thr Ala Ala Gln Cys
 500 505 510

[0011] Asn Ala Val Glu His Cys Lys Arg His Val Trp Asn
 515 520

<210> 11
 <211> 527
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 11

Met Tyr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Gly Pro Val Leu Gly Leu Lys Glu Cys Thr Arg Gly Ser Ala Val Trp
 20 25 30
 Cys Gln Asn Val Lys Thr Ala Ser Asp Cys Gly Ala Val Lys His Cys
 35 40 45
 Leu Gln Thr Val Trp Asn Lys Pro Thr Val Lys Ser Leu Pro Cys Asp
 50 55 60
 Ile Cys Lys Asp Val Val Thr Ala Ala Gly Asp Met Leu Lys Asp Asn
 65 70 75 80
 Ala Thr Glu Glu Glu Ile Leu Val Tyr Leu Glu Lys Thr Cys Asp Trp
 85 90 95
 Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser Ala Ser Cys Lys Glu Ile Val Asp Ser
 100 105 110

	Tyr	Leu	Pro	Val	Ile	Leu	Asp	Ile	Ile	Lys	Gly	Glu	Met	Ser	Arg	Pro	
								120					125				
	Gly	Glu	Val	Cys	Ser	Ala	Leu	Asn	Leu	Cys	Glu	Ser	Leu	Gln	Lys	His	
		130					135					140					
	Leu	Ala	Glu	Leu	Asn	His	Gln	Lys	Gln	Leu	Glu	Ser	Asn	Lys	Ile	Pro	
	145					150					155					160	
	Glu	Leu	Asp	Met	Thr	Glu	Val	Val	Ala	Pro	Phe	Met	Ala	Asn	Ile	Pro	
					165					170					175		
	Leu	Leu	Leu	Tyr	Pro	Gln	Asp	Gly	Pro	Arg	Ser	Lys	Pro	Gln	Pro	Lys	
				180					185					190			
	Asp	Asn	Gly	Asp	Val	Cys	Gln	Asp	Cys	Ile	Gln	Met	Val	Thr	Asp	Ile	
			195					200					205				
	Gln	Thr	Ala	Val	Arg	Thr	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Gln	Ala	Leu	Val	Glu	
		210					215					220					
	His	Val	Lys	Glu	Glu	Cys	Asp	Arg	Leu	Gly	Pro	Gly	Met	Ala	Asp	Ile	
	225					230					235					240	
	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ile	Ser	Gln	Tyr	Ser	Glu	Ile	Ala	Ile	Gln	Met	Met	
				245						250					255		
[0012]	Met	His	Met	Gln	Asp	Gln	Gln	Pro	Lys	Glu	Ile	Cys	Ala	Leu	Val	Gly	
				260					265					270			
	Phe	Cys	Asp	Glu	Val	Lys	Glu	Met	Pro	Met	Gln	Thr	Leu	Val	Pro	Ala	
		275						280					285				
	Lys	Val	Ala	Ser	Lys	Asn	Val	Ile	Pro	Ala	Leu	Glu	Leu	Val	Glu	Pro	
		290				295						300					
	Ile	Lys	Lys	His	Glu	Val	Pro	Ala	Lys	Ser	Asp	Val	Tyr	Cys	Glu	Val	
	305				310						315				320		
	Cys	Glu	Phe	Leu	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Lys	Leu	Ile	Asp	Asn	Asn	Lys	
				325						330					335		
	Thr	Glu	Lys	Glu	Ile	Leu	Asp	Ala	Phe	Asp	Lys	Met	Cys	Ser	Lys	Leu	
			340						345					350			
	Pro	Lys	Ser	Leu	Ser	Glu	Glu	Cys	Gln	Glu	Val	Val	Asp	Thr	Tyr	Gly	
		355						360					365				
	Ser	Ser	Ile	Leu	Ser	Ile	Leu	Leu	Glu	Glu	Val	Ser	Pro	Glu	Leu	Val	
		370				375						380					
	Cys	Ser	Met	Leu	His	Leu	Cys	Ser	Gly	Thr	Arg	Leu	Pro	Ala	Leu	Thr	
	385				390					395						400	
	Val	His	Val	Thr	Gln	Pro	Lys	Asp	Gly	Gly	Phe	Cys	Glu	Val	Cys	Lys	
					405					410					415		

Lys Leu Val Gly Tyr Leu Asp Arg Asn Leu Glu Lys Asn Ser Thr Lys
 420 425 430
 Gln Glu Ile Leu Ala Ala Leu Glu Lys Gly Cys Ser Phe Leu Pro Asp
 435 440 445
 Pro Tyr Gln Lys Gln Cys Asp Gln Phe Val Ala Glu Tyr Glu Pro Val
 450 455 460
 Leu Ile Glu Ile Leu Val Glu Val Met Asp Pro Ser Phe Val Cys Leu
 465 470 475 480
 Lys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Ala His Lys Pro Leu Leu Gly Thr Glu
 485 490 495
 Lys Cys Ile Trp Gly Pro Ser Tyr Trp Cys Gln Asn Thr Glu Thr Ala
 500 505 510
 Ala Gln Cys Asn Ala Val Glu His Cys Lys Arg His Val Trp Asn
 515 520 525
 <210> 12
 <211> 526
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 12
 Met Tyr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Gly Pro Val Leu Gly Leu Lys Glu Cys Thr Arg Gly Ser Ala Val Trp
 20 25 30
 Cys Gln Asn Val Lys Thr Ala Ser Asp Cys Gly Ala Val Lys His Cys
 35 40 45
 Leu Gln Thr Val Trp Asn Lys Pro Thr Val Lys Ser Leu Pro Cys Asp
 50 55 60
 Ile Cys Lys Asp Val Val Thr Ala Ala Gly Asp Met Leu Lys Asp Asn
 65 70 75 80
 Ala Thr Glu Glu Glu Ile Leu Val Tyr Leu Glu Lys Thr Cys Asp Trp
 85 90 95
 Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser Ala Ser Cys Lys Glu Ile Val Asp Ser
 100 105 110
 Tyr Leu Pro Val Ile Leu Asp Ile Ile Lys Gly Glu Met Ser Arg Pro
 115 120 125
 Gly Glu Val Cys Ser Ala Leu Asn Leu Cys Glu Ser Leu Gln Lys His
 130 135 140
 Leu Ala Glu Leu Asn His Gln Lys Gln Leu Glu Ser Asn Lys Ile Pro
 145 150 155 160

[0013]

	Glu	Leu	Asp	Met	Thr	Glu	Val	Val	Ala	Pro	Phe	Met	Ala	Asn	Ile	Pro	
					165					170					175		
	Leu	Leu	Leu	Tyr	Pro	Gln	Asp	Gly	Pro	Arg	Ser	Lys	Pro	Gln	Pro	Lys	
				180					185					190			
	Asp	Asn	Gly	Asp	Val	Cys	Gln	Asp	Cys	Ile	Gln	Met	Val	Thr	Asp	Ile	
			195					200					205				
	Gln	Thr	Ala	Val	Arg	Thr	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Gln	Ala	Leu	Val	Glu	
		210					215					220					
	His	Val	Lys	Glu	Glu	Cys	Asp	Arg	Leu	Gly	Pro	Gly	Met	Ala	Asp	Ile	
	225					230				235						240	
	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ile	Ser	Gln	Tyr	Ser	Glu	Ile	Ala	Ile	Gln	Met	Met	
				245						250					255		
	Met	His	Met	Asp	Gln	Gln	Pro	Lys	Glu	Ile	Cys	Ala	Leu	Val	Gly	Phe	
				260					265					270			
	Cys	Asp	Glu	Val	Lys	Glu	Met	Pro	Met	Gln	Thr	Leu	Val	Pro	Ala	Lys	
			275					280					285				
	Val	Ala	Ser	Lys	Asn	Val	Ile	Pro	Ala	Leu	Glu	Leu	Val	Glu	Pro	Ile	
		290					295					300					
[0014]	Lys	Lys	His	Glu	Val	Pro	Ala	Lys	Ser	Asp	Val	Tyr	Cys	Glu	Val	Cys	
	305					310					315					320	
	Glu	Phe	Leu	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Lys	Leu	Ile	Asp	Asn	Asn	Lys	Thr	
				325						330					335		
	Glu	Lys	Glu	Ile	Leu	Asp	Ala	Phe	Asp	Lys	Met	Cys	Ser	Lys	Leu	Pro	
				340					345					350			
	Lys	Ser	Leu	Ser	Glu	Glu	Cys	Gln	Glu	Val	Val	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ser	
			355					360					365				
	Ser	Ile	Leu	Ser	Ile	Leu	Leu	Glu	Glu	Val	Ser	Pro	Glu	Leu	Val	Cys	
		370				375						380					
	Ser	Met	Leu	His	Leu	Cys	Ser	Gly	Thr	Arg	Leu	Pro	Ala	Leu	Thr	Val	
	385					390					395					400	
	His	Val	Thr	Gln	Pro	Lys	Asp	Gly	Gly	Phe	Cys	Glu	Val	Cys	Lys	Lys	
				405						410					415		
	Leu	Val	Gly	Tyr	Leu	Asp	Arg	Asn	Leu	Glu	Lys	Asn	Ser	Thr	Lys	Gln	
				420					425					430			
	Glu	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Gly	Cys	Ser	Phe	Leu	Pro	Asp	Pro	
		435						440					445				
	Tyr	Gln	Lys	Gln	Cys	Asp	Gln	Phe	Val	Ala	Glu	Tyr	Glu	Pro	Val	Leu	

450	455	460
Ile Glu Ile Leu Val Glu Val Met Asp Pro Ser Phe Val Cys Leu Lys 465	470	475 480
Ile Gly Ala Cys Pro Ser Ala His Lys Pro Leu Leu Gly Thr Glu Lys 485	490	495
Cys Ile Trp Gly Pro Ser Tyr Trp Cys Gln Asn Thr Glu Thr Ala Ala 500	505	510
Gln Cys Asn Ala Val Glu His Cys Lys Arg His Val Trp Asn 515	520	525
<210> 13 <211> 81 <212> PRT <213> 智人		
<400> 13		
Ser Leu Pro Cys Asp Ile Cys Lys Asp Val Val Thr Ala Ala Gly Asp 1	5	10 15
Met Leu Lys Asp Asn Ala Thr Glu Glu Glu Ile Leu Val Tyr Leu Glu 20	25	30
Lys Thr Cys Asp Trp Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser Ala Ser Cys Lys 35	40	45
[0015] Glu Ile Val Asp Ser Tyr Leu Pro Val Ile Leu Asp Ile Ile Lys Gly 50	55	60
Glu Met Ser Arg Pro Gly Glu Val Cys Ser Ala Leu Asn Leu Cys Glu 65	70	75 80
Ser		
<210> 14 <211> 14 <212> PRT <213> 人工序列		
<220> <223> Psap肽		
<400> 14		
Leu Glu Lys Thr Cys Asp Trp Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser 1	5	10
<210> 15 <211> 9 <212> PRT <213> 人工序列		
<220> <223> Psap肽		
<400> 15		
Asp Trp Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser		

	1	5
	<210>	16
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	Psap肽
	<400>	16
	Cys Asp Trp Leu Pro Lys Pro Asn Met	
	1	5
	<210>	17
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	Psap肽
	<400>	17
	Thr Cys Asp Trp Leu Pro Lys Pro Asn	
	1	5
	<210>	18
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
[0016]	<220>	
	<223>	Psap肽
	<400>	18
	Lys Thr Cys Asp Trp Leu Pro Lys Pro	
	1	5
	<210>	19
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	Psap肽
	<400>	19
	Glu Lys Thr Cys Asp Trp Leu Pro Lys	
	1	5
	<210>	20
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	Psap肽
	<400>	20
	Leu Glu Lys Thr Cys Asp Trp Leu Pro	
	1	5
	<210>	21
	<211>	9

[0017]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<400> 21
Asp Trp Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<400> 22
Cys Asp Trp Leu Pro Lys Pro Asn Met
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<400> 23
Thr Cys Asp Trp Leu Pro Lys Pro Asn
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<400> 24
Lys Thr Cys Asp Trp Leu Pro Lys Pro
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<400> 25
Glu Lys Thr Cys Asp Trp Leu Pro Lys
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

[0018]

<400> 26

Leu Glu Lys Thr Cys Asp Trp Leu Pro
1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Psap肽

<400> 27

Asp Trp Leu Pro Lys Pro Asn Met
1 5

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Psap肽

<400> 28

Cys Asp Trp Leu Pro Lys Pro Asn
1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Psap肽

<400> 29

Thr Cys Asp Trp Leu Pro Lys Pro
1 5

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Psap肽

<400> 30

Lys Thr Cys Asp Trp Leu Pro Lys
1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Psap肽

<400> 31

Glu Lys Thr Cys Asp Trp Leu Pro
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<400> 32

Asp Trp Leu Pro Lys Pro Asn
1 5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<400> 33

Cys Asp Trp Leu Pro Lys Pro
1 5

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

[0019] <400> 34

Thr Cys Asp Trp Leu Pro Lys
1 5

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<400> 35

Lys Thr Cys Asp Trp Leu Pro
1 5

<210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<400> 36

Asp Trp Leu Pro Lys Pro
1 5

<210> 37
<211> 6
<212> PRT

	<213> 人工序列
	<220>
	<223> Psap肽
	<400> 37
	Thr Cys Asp Trp Leu Pro 1 5
	<210> 38
	<211> 5
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> Psap肽
	<400> 38
	Cys Asp Trp Leu Pro 1 5
	<210> 39
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> Psap肽
[0020]	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (1), (1)
	<223> 乙酰化的D-氨基酸
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (3), (3)
	<223> D-氨基酸
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (4), (4)
	<223> 酰胺化的Pro
	<400> 39
	Asp Trp Leu Pro 1
	<210> 40
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> Psap肽
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (1), (1)
	<223> 乙酰化的Asp
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (4), (4)
	<223> 酰胺化的Pro
	<400> 40

[0021]

Asp Trp Leu Pro
1

<210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<400> 41

Asp Trp Ala Pro
1

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<400> 42

Asp Tyr Leu Pro Lys
1 5

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<400> 43

Asp Trp Val Pro Lys
1 5

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<400> 44

Asp Trp Leu Pro Arg
1 5

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<400> 45

Asp Trp Ala Pro Lys
1 5

[0022]

<210> 46
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<400> 46

Asp Tyr Leu Pro
1

<210> 47
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> D-氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> D-氨基酸

<400> 47

Asp Trp Leu Pro
1

<210> 48
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Psap肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> D-氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> D-氨基酸

<400> 48

Asp Trp Leu Pro
1

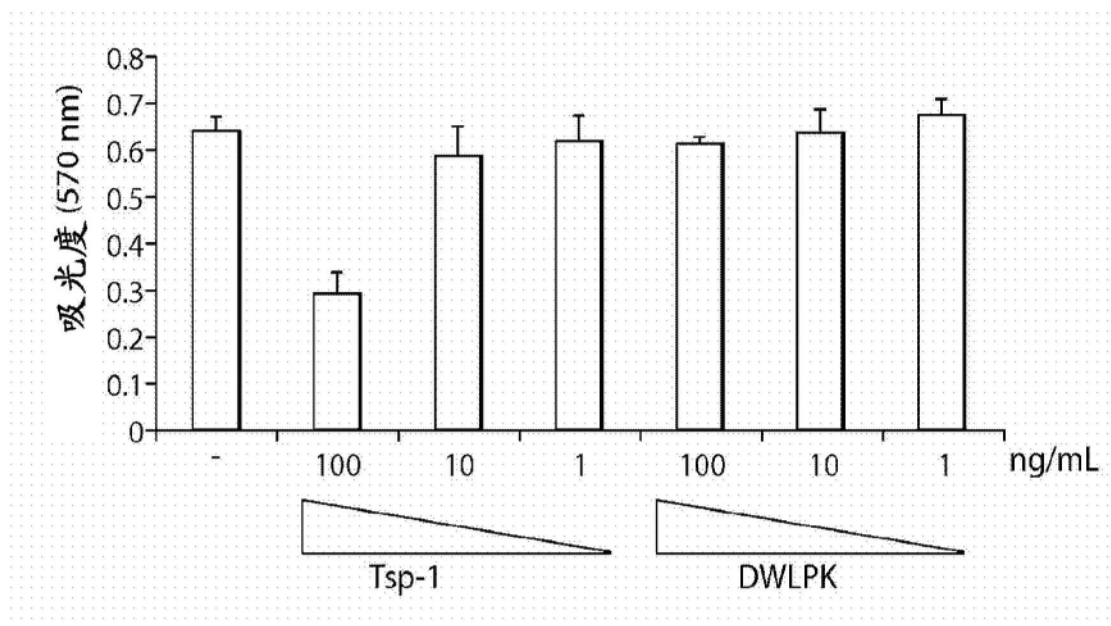


图1A

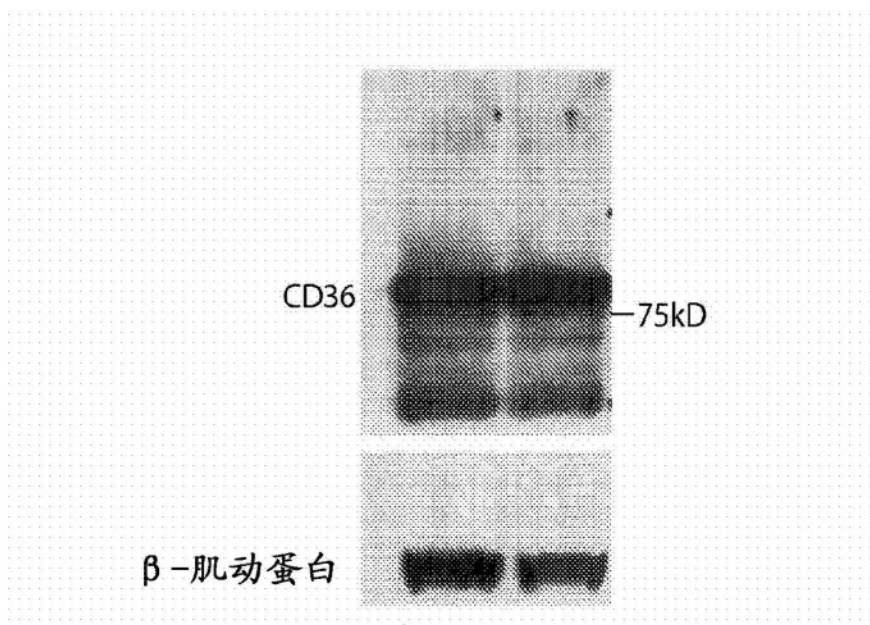


图1B

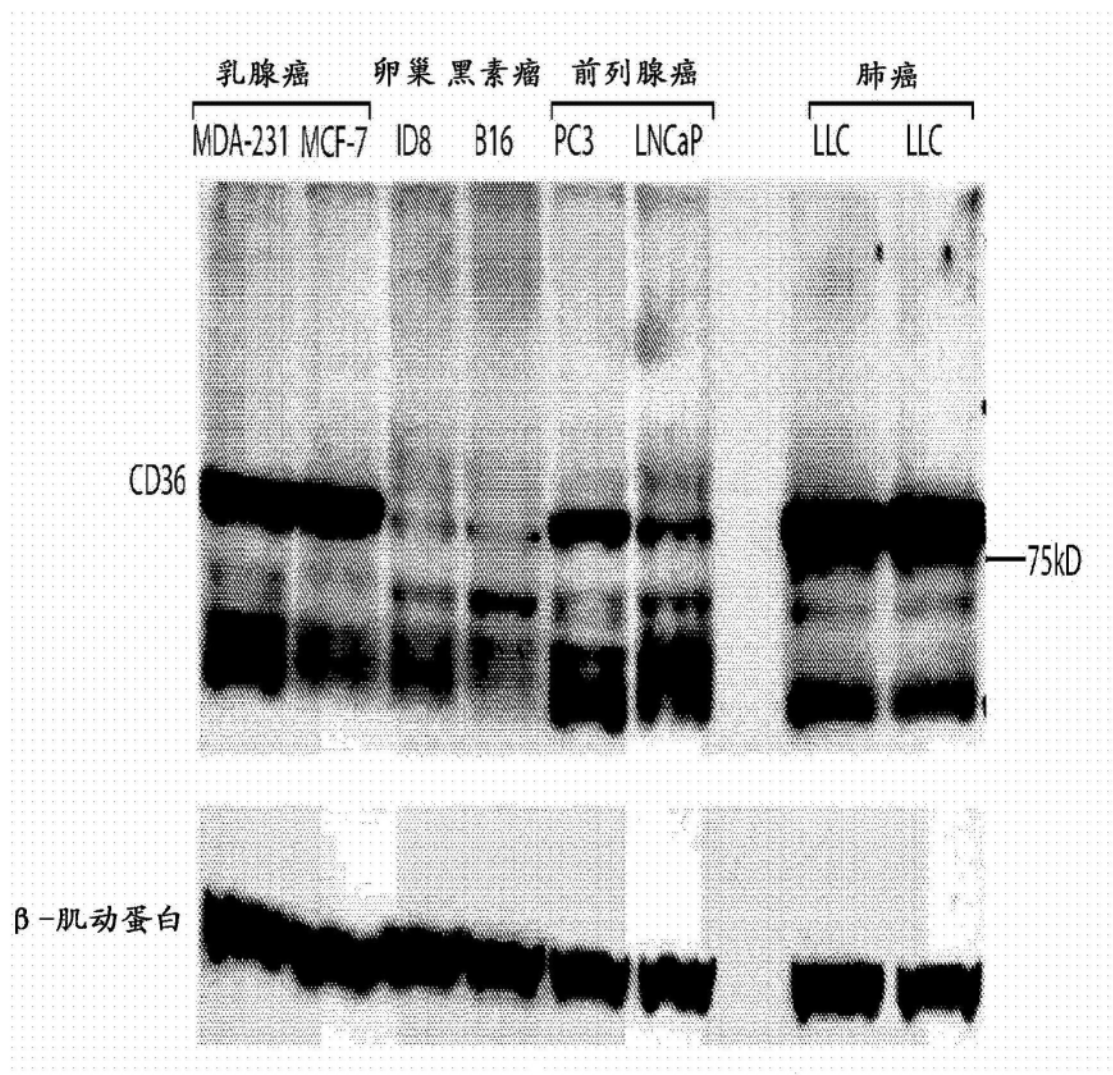


图2

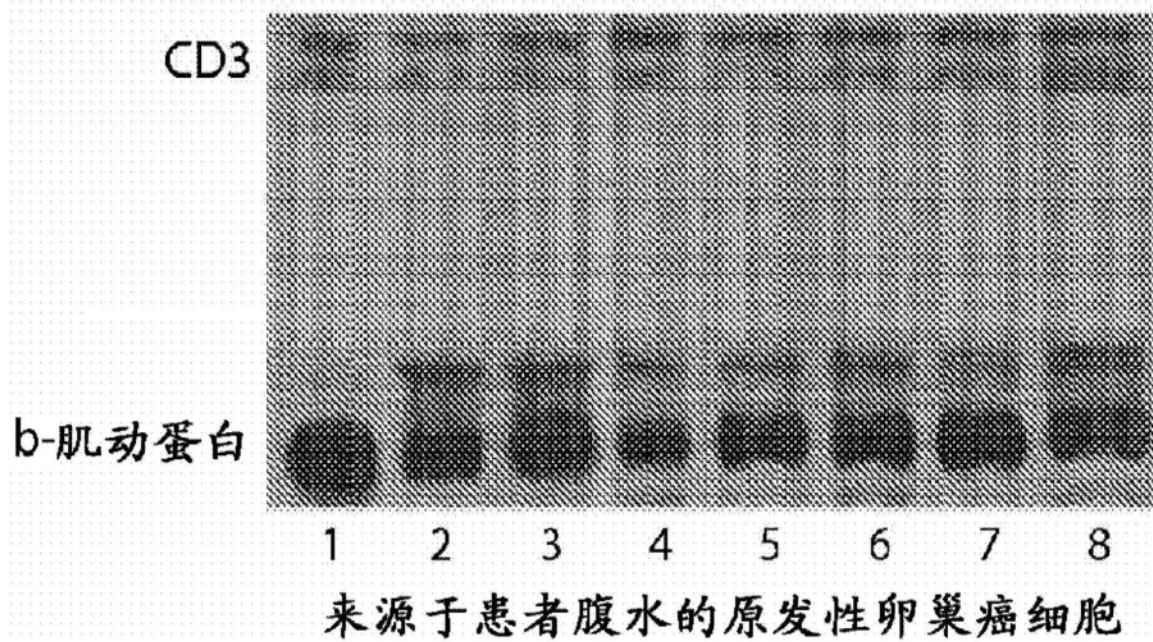


图3

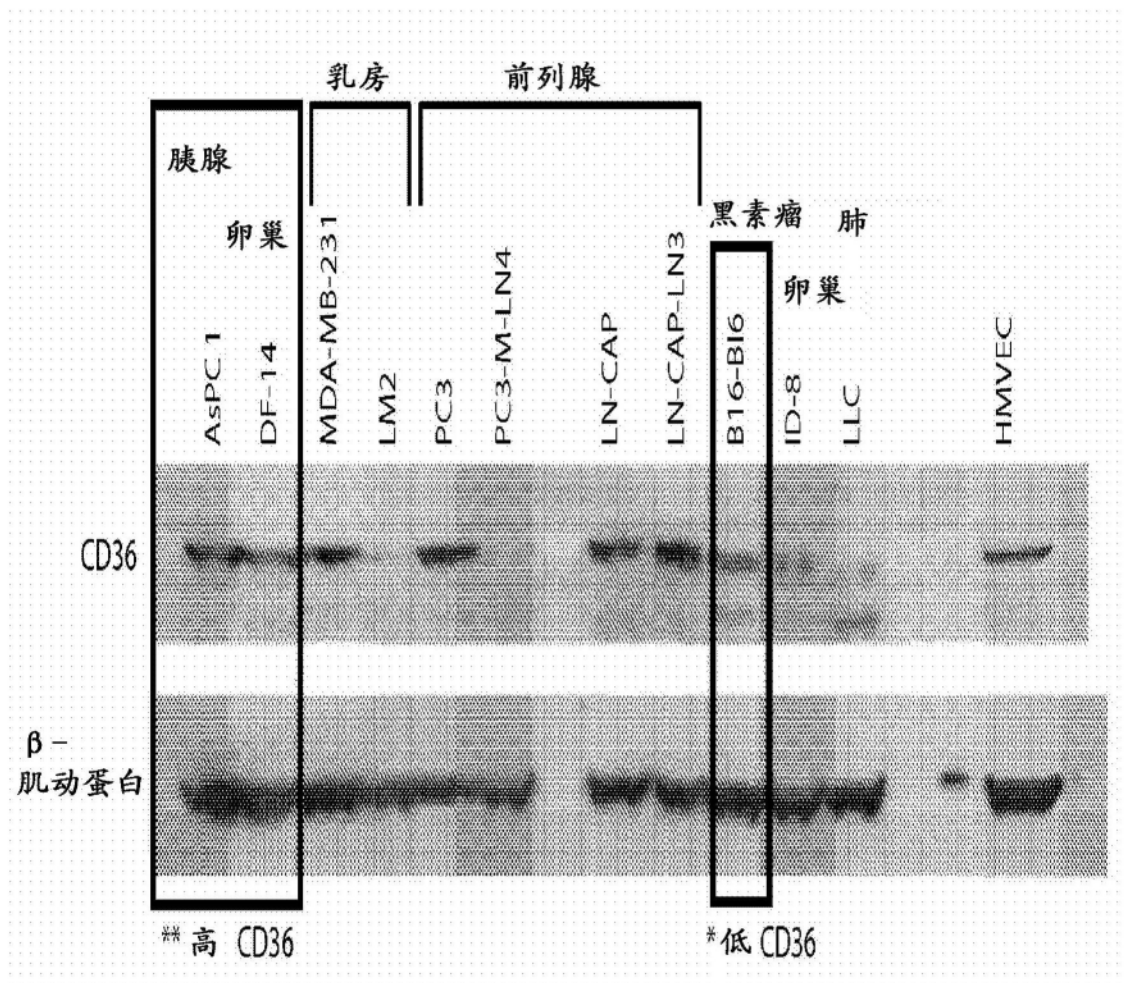


图4

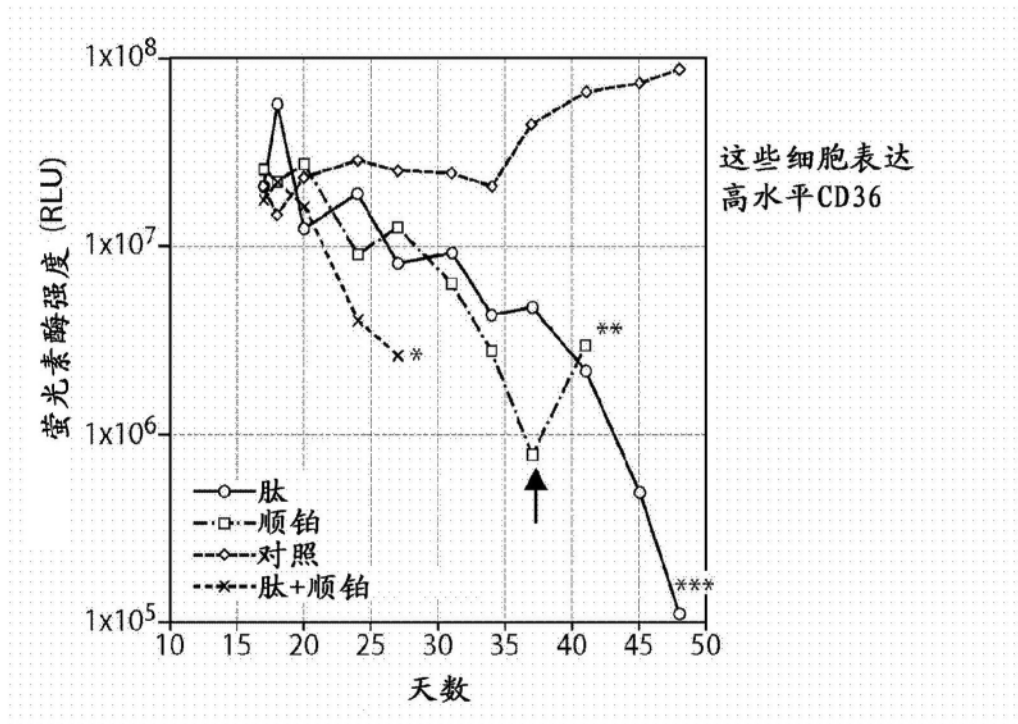


图5

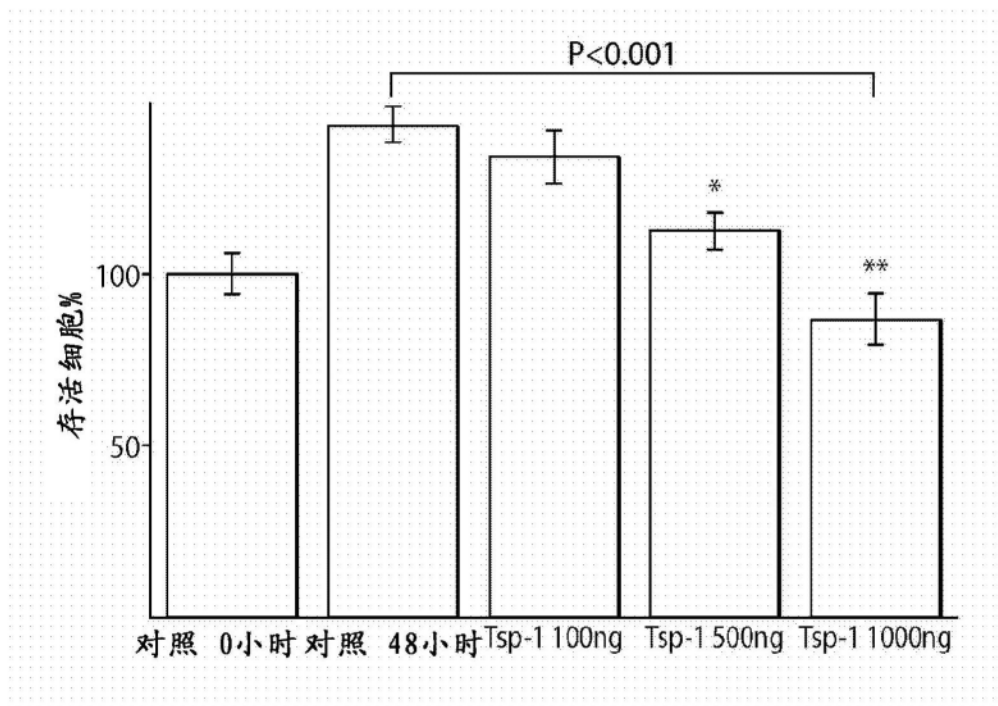


图6

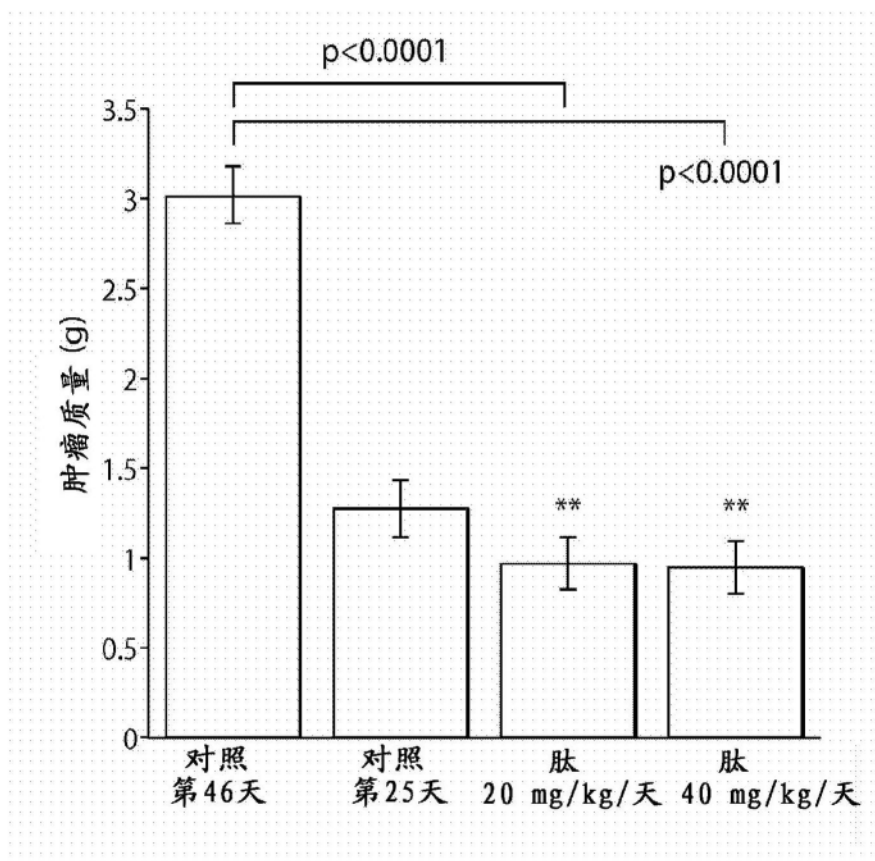


图7

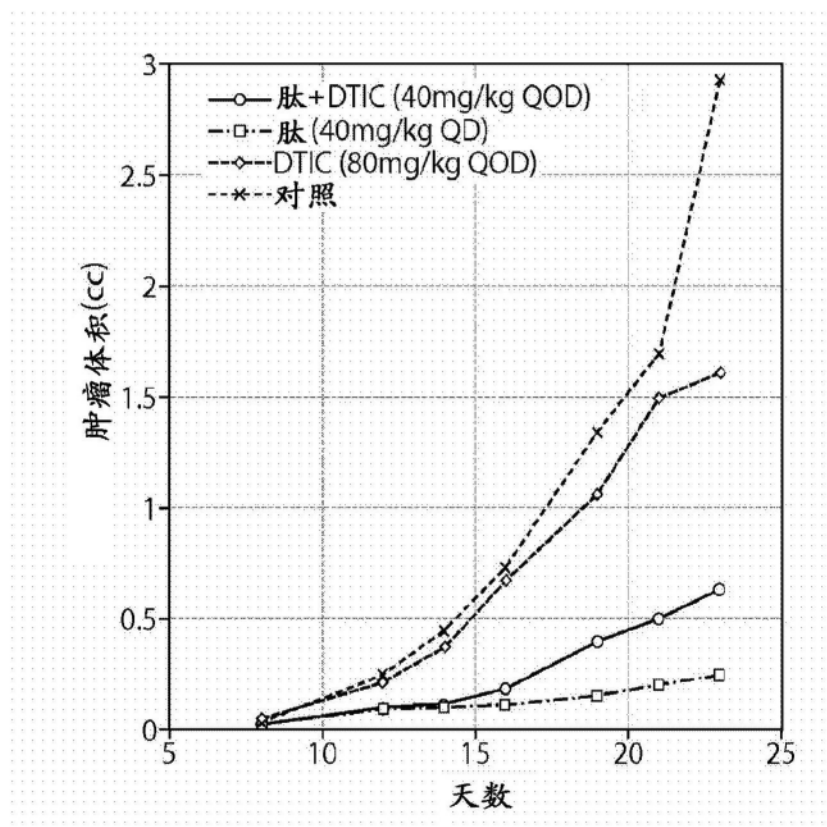


图8