



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110520144 A

(43)申请公布日 2019.11.29

(21)申请号 201880025482.2

埃斯蒂·耶格-洛坦

(22)申请日 2018.02.19

伊兰·斯莫利 阿萨夫·本阿里

(30)优先权数据

62/460,810 2017.02.19 US

(74)专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理有限公司 51258

代理人 王晖 许洪洁

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.10.16

(51)Int.Cl.

A61K 38/16(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2018/050182 2018.02.19

C07K 14/47(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/150430 EN 2018.08.23

(71)申请人 国家生物技术研究所公司

地址 以色列比尔舒华

申请人 本-古里安大学B.G.内盖夫技术和应用公司

权利要求书2页 说明书17页

序列表9页 附图13页

(72)发明人 埃塔·利夫内 西加尔·弗罗斯特

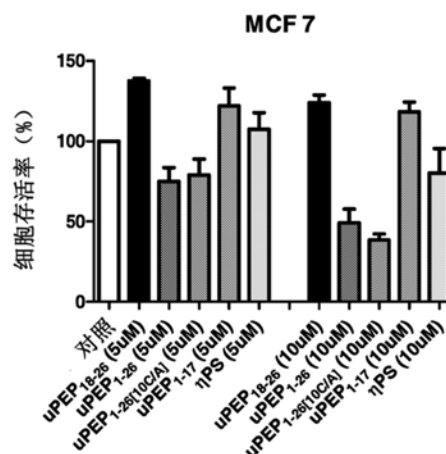
(54)发明名称

肽激酶抑制剂及其使用方法

(57)摘要

本文描述了蛋白质激酶C的分离调节肽、其嵌合肽及它们的变体。还描述了所述肽在用于治疗细胞增殖病状的组合物和方法中的用途。

6A



1. 一种分离多肽, 包含示为SEQ ID NO:32的氨基酸序列。
2. 根据权利要求1所述的分离多肽, 其中, 在位置10处的氨基酸是丙氨酸, 如本文SEQ ID NO:5所示。
3. 根据权利要求1所述的分离多肽, 其中, 在位置10处的氨基酸是半胱氨酸, 如本文SEQ ID NO:1所示。
4. 一种分离多肽, 包含与序列SEQ ID NO:1或5具有至少70%同一性的氨基酸序列。
5. 一种分离多肽, 包含与本文SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的分离多肽, 其中, 所述氨基酸序列包含肉豆蔻酰基。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的分离多肽, 进一步包含至少一种细胞穿透肽(CPP)。
8. 根据权利要求7所述的分离多肽, 其中, 所述细胞穿透肽是穿透肽。
9. 根据权利要求7或权利要求8所述的分离多肽, 其中, 所述氨基酸序列是SEQ ID NO:2所示的序列。
10. 根据权利要求1所述的分离多肽, 其中, 所述氨基酸序列与SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列具有至少70%同一性。
11. 一种分离核酸, 包含编码权利要求1-10中任一项所述的分离多肽的核酸序列。
12. 一种表达载体, 包含权利要求11所述的分离核酸。
13. 一种药物组合物, 包含权利要求1-10中任一项所述的分离多肽和药学上可接受的载体或赋形剂。
14. 根据权利要求1-10中任一项所述的分离多肽, 用于治疗或抑制与异常细胞增殖有关的疾病或病症。
15. 根据权利要求14所述的分离多肽, 其中, 所述疾病或病症导致良性异常的细胞生长或良性肿瘤。
16. 根据权利要求14所述的分离多肽, 其中, 所述疾病或病症是癌症。
17. 根据权利要求14所述的分离多肽, 其中, 所述多肽与化学治疗剂、手术或放疗一起施用。
18. 根据权利要求17所述的分离多肽, 其中, 所述化学治疗剂是DNA损伤剂。
19. 根据权利要求18所述的分离多肽, 其中, 所述DNA损伤剂是依托泊苷。
20. 一种用于治疗与异常细胞增殖有关的疾病或病症的方法, 包括:
向有此需要的受试者给药治疗有效量的权利要求1-10中任一项所述的分离肽, 从而治疗所述疾病或病症。
21. 根据权利要求20所述的方法, 其中, 将所述分离肽向所述受试者提供成能够表达所述分离肽的核酸。
22. 根据权利要求20或21所述的方法, 其中, 所述疾病或病症导致良性异常的细胞生长或良性肿瘤。
23. 根据权利要求20或21所述的方法, 其中, 所述疾病是癌症。
24. 一种抑制受试者中细胞增殖和/或癌症转移的方法, 包括:

向有此需要的受试者给药治疗有效量的权利要求1-10中任一项所述的分离肽,并且可选地

向所述受试者给药化学治疗剂;

从而抑制所述细胞增殖和/或癌症转移。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中,将所述分离肽向所述受试者提供成能够表达所述分离肽的核酸。

肽激酶抑制剂及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 要求于2017年2月19日提交的美国临时专利申请号62/460,810的权益,其内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及uORF的蛋白质激酶C的分离调节肽、其嵌合肽以及它们的变体。还描述了所述肽在用于治疗细胞增殖病状的组合物和方法中的用途。

背景技术

[0004] 翻译调节元件在细胞中起作用以响应于内部或外部刺激而快速改变蛋白质表达景观图(landscape)。在这些元件中是位于mRNA 5'的非翻译区的上游开放阅读框(uORF)。生物信息学研究表明,在约40%的人类mRNA中存在uORF。uORF通常与蛋白质表达水平降低相关,因为它们会降低下游ORF的翻译起始的效率。先前,我们报道了蛋白质激酶C异形体PKCeta的表达是经由两个uORF调节的,并示出了它们被翻译成短肽的潜力。

[0005] 蛋白质激酶,包括各种PKC异形体,被公认为它们在上万生物学过程中起调节作用,并且异常的PKC表达被理解成是包括那些涉及细胞增殖的因素在内的若干病状中的一个因素。因此,持续存在调节PKC表达的需要。

发明内容

[0006] 本文描述了分离的和合成的、源自PKCeta异形体的uORF的肽,并且特别地,分离多肽包括与SEQ ID NO:32所示氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列。

[0007] 本文另外描述了SEQ ID NO:32的分离多肽,其中,在位置10处的氨基酸是丙氨酸,如本文SEQ ID NO:5所示。另外,本文描述了SEQ ID NO:32的分离多肽,其中,在位置10处的氨基酸是半胱氨酸,如本文SEQ ID NO:1所示。

[0008] 本文另外描述了如本文SEQ ID No:1-9所示的合成肽的组合,以及用于治疗异常细胞增殖(例如癌症)的化学治疗剂,诸如治疗方法中的和在制备用于治疗癌症的药物中使用的化学治疗剂。

[0009] 此外,本文描述了源自PKCzeta异形体的uORF的分离的、合成的和嵌合的肽,并且特别地分离多肽包括与SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列。还提供了编码所述肽的核酸。

[0010] 本文另外描述了包括所述肽和/或编码肽的核酸的组合物,其用于治疗与异常细胞增殖有关的疾病或病症,包括用于制备治疗所述疾病或病症的药物。

[0011] 还提供了在与异常细胞增殖有关的疾病或病症的治疗中使用所述肽和/或核酸的方法。

[0012] 通过以下参考附图进行的详细描述,前述和其他目的、特征和优点将变得更加明显。

附图说明

[0013] 图1A至图1C是人PKC η (PKC η)的mRNA、其两个uORF和假底物(PS)序列以及它们与其他物种的其他PKC的同源性的示意性表示。图1A:PKC η 的氨基酸序列uORF2 (SEQ ID NO:1)和假底物(PS)序列(SEQ ID NO:19)用单字母代码表示。图1B:uORF2的氨基酸序列显示出高度保守性。将由人uORF2编码的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)与由其他哺乳动物物种(SEQ ID NO:20-24,分别为恒河猴、大象、犬和大鼠)中的同源PKC η 编码的uORF进行了比对。图1C:将PKC η (η PS)的假底物的氨基酸序列(SEQ ID NO:19)与所有其他人PKC的PS序列(SEQ ID NO:25-31,分别为PKC α 、PKC β 、PKC γ 、PKC δ 、PKC ϵ 、PKC ζ 和PKC λ/ι)以及与由uORF2编码的序列(SEQ ID NO:3)进行了比对。所有序列均以单字母代码表示;经由HHpred工具包进行了多序列比对。

[0014] 图2A至图2D示出了源自PKC η 的肽的示意性表示,并表明了uORF2编码的肽(uPEP $_{21-26}$)抑制PKC激酶活性的能力。图2A是源自PKC η 并且在本文描述的实施例中使用的肽的示意图。uPEP $_{1-26}$ 指由uORF2编码的完整肽;uPEP $_{9-26}$ 和uPEP $_{18-26}$ 指缺少PS基序的对照肽; η PS指包含PKC η 的内部PS结构域的肽。图2B示出了测试不同肽对PKC η 的激酶活性的影响的结果。使用髓磷脂碱性蛋白(p-MBP)作为底物以及 γ - 32 P放射性激酶测定法测量了PKC η 的激酶活性。将所有值均归一化为不含肽的对照样品(Cont.)。示出的数据是三个单独实验的平均值,并且也正如图2C中以凝胶形式所表示的。图2D:如在图2B中描述的进行了激酶测定法,描绘了使用2 μ M浓度的uPEP $_{1-26}$ 。所有值均归一化为对照样品(不含肽)。示出的数据是三个单独实验的平均值。

[0015] 图3A至图3D表明了由uORF2编码的肽(uPEP $_{21-26}$)的抑制乳腺癌细胞的细胞迁移的能力。图3A是从对MDA-MB-231细胞进行的划痕测定中拍摄的照片。将细胞接种在24孔板中,并与指定肽一起在无血清培养基中孵育4小时。4小时后,用200 μ l移液器尖端进行划痕。在指定的时间点拍摄每个划痕的选定区域的照片。通过ImageJ软件进行面积测量。图3B至图3D是表示如图4A中所述的分别对细胞系MDA-MB-231、MCF-7和MCF10A进行的划痕测定的分析的图。将所有值均归一化为每个孔的0时刻,并以百分比表示。

[0016] 图4A至图4D示出了由uORF2编码的肽(uPEP $_{21-26}$)降低乳腺癌细胞和成胶质细胞瘤细胞的存活率的能力。图4A:将MCF-7细胞接种到48孔板上。24小时后,细胞与指定肽一起孵育了24小时。孵育后,从每个孔中轻轻吸出带有被测肽的培养基,并将25 μ L的PrestoBlue试剂添加到48孔板的每个孔中,并根据建议在37 $^{\circ}$ C在5%CO $_2$ 中孵育15min。通过“Infinite M200 PRO”读取器检测了吸光度。图4B至图4D是与由图4A所述的相同的实验结果,但是分别在细胞系U251MG(成胶质细胞瘤细胞系)、MDA-MB-231和MCF10A上进行的。

[0017] 图5示出了由uORF2编码的肽(uPEP $_{21-26}$)与依托泊苷的组合引起的对细胞死亡诱导的协同作用。将MCF-7细胞接种在96孔板中24小时。加入指定肽(5 μ M),持续4小时。然后,将依托泊苷(50 μ M)加入孔中,持续48小时。根据制造商的说明,使用XTT试剂盒(Biological Industries, Israel)分析了该板。

[0018] 图6A至图6C示出了uORF2编码的在位置10处突变的肽(uPEP $_{1-26}$ [c/a])在降低各种细胞系上的细胞存活率方面的效力。图6A:将MCF-7细胞接种在96孔板中,并与指定肽一起孵育了24小时。24小时后,根据制造商的说明,使用XTT试剂盒(Biological Industries, Israel)监测了增殖速率。图6B:如图6A所示测试了MDA-MB-231细胞系。图6C:如图6A所示测

试了HeLa细胞。)

[0019] 图7A至图7B示出了PKC η -敲除降低了乳腺4T1小鼠模型中的肿瘤侵袭性和转移形成。图7A:将表达sh-PKC η (SEQ ID NO:33)的4T1细胞或加扰对照注射入8周龄雌性BALB/c小鼠的乳腺脂肪垫中。每周用游标卡尺测量了肿瘤直径。图7B:8周后处死小鼠,并使用布恩氏溶液(Bouin's solution)计数了在肺中形成的转移数。误差棒表示平均值 \pm 标准误差(s.e.m),统计分析表明两尾未配对样品t检验统计显著性。

[0020] 图8A至图8B是含有uORF和PS基序的另外PKC的5'UTR的示意性表示。图8A:生物信息学揭示了PKC ϵ 和PKC ζ 中存在uORF。5'帽结构显示为菱形,5'UTR显示为直线,CDS显示为黑色箭头,并且uORF显示为方框。uORF是通过ORF-finder软件(NCBI)找到的。图8B:描绘了含有PS基序的PKC ζ 的uORF的氨基酸序列(SEQ ID NO:11)。

[0021] 所描述序列的简要说明

[0022] 如37C.F.R.1.822中限定的,本文所提供的核酸和/或氨基酸序列使用核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三字母代码而显示。每个核酸序列仅示出一条链,但是互补链应理解为被包括在对显示链的任何引用中。在所附的序列表中:

[0023] SEQ ID NO:1是PKC ϵ 源的uORF编码肽。

[0024] SEQ ID NO:2是PKC ϵ 源的uORF编码肽,其具有C末端添加的CPP穿透肽。

[0025] SEQ ID NO:3是含有假底物片段的PKC ϵ 源的uORF。

[0026] SEQ ID NO:4是含有假底物片段的PKC ϵ 源的uORF,其含有Cys-10处的丙氨酸取代。

[0027] SEQ ID NO:5是全长PKC ϵ 源的uORF,其含有Cys-10处的丙氨酸取代。

[0028] SEQ ID NO:6是含有假底物片段的PKC ϵ 源的uORF,其含有Ala-6处的丝氨酸取代。

[0029] SEQ ID NO:7是含有假底物片段的PKC ϵ 源的uORF,其含有Ala-6处的苏氨酸取代。

[0030] SEQ ID NO:8是全长PKC ϵ 源的uORF,其含有Ala-6处的丝氨酸取代。

[0031] SEQ ID NO:9是全长PKC ϵ 源的uORF,其含有Ala-6处的苏氨酸取代。

[0032] SEQ ID NO:10是CPP。

[0033] SEQ ID NO:11是PKC ζ uORF。

[0034] SEQ ID NO:12是PKC ζ uORF而不具有两个C末端氨基酸。

[0035] SEQ ID NO:13是CPP精氨酸(R)重复。

[0036] SEQ ID NOs:14-18是说明性的核定位信号(NLS)。

[0037] SEQ ID NO:19是新型PKC η 异形体(η PC)的假底物序列的编码肽序列。

[0038] SEQ ID NO:20是恒河猴来自PKC η 的uORF2的编码肽序列。

[0039] SEQ ID NO:21是大象来自PKC η 的uORF2的编码肽序列。

[0040] SEQ ID NO:22是犬来自PKC η 的uORF2的编码肽序列。

[0041] SEQ ID NO:23是小鼠来自PKC η 的uORF2的编码肽序列。

[0042] SEQ ID NO:24是大鼠来自PKC η 的uORF2的编码肽序列。

[0043] SEQ ID NO:25是类似于PKC η 的假底物序列的常规PKC α uORF2编码的肽序列。

[0044] SEQ ID NO:26是类似于PKC η 的假底物序列的常规PKC β uORF2编码的肽序列。

- [0045] SEQ ID NO:27是类似于PKC η 的假底物序列的常规PKC γ uORF2编码的肽序列。
- [0046] SEQ ID NO:28是类似于PKC η 的假底物序列的新型PKC δ uORF2编码的肽序列。
- [0047] SEQ ID NO:29是类似于PKC η 的假底物序列的新型PKC ϵ uORF2编码的肽序列。
- [0048] SEQ ID NO:30是类似于PKC η 的假底物序列的非典型PKC ζ uORF2编码的肽序列。
- [0049] SEQ ID NO:31是类似于PKC η 的假底物序列的非典型PKC λ/ι uORF2编码的肽序列。
- [0050] SEQ ID NO:32是变体PKCeta源的uORF编码的肽的总序列。
- [0051] SEQ ID NOs:33-35是用于靶向PKC η 表达的shRNA序列。

具体实施方式

[0052] I. 缩写

[0053] CPP细胞穿透肽

[0054] PKC蛋白质激酶C

[0055] PS假底物

[0056] uORF上游开放阅读框

[0057] II. 术语

[0058] 除非另有说明,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的不同含义。除非上下文另外明确地指出,否则单数术语“(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指代物。类似地,除非上下文另外明确地指出,否则单词“或”旨在包括“和”。还应理解的是,针对核酸或多肽给出的所有碱基大小或氨基酸大小以及所有分子量或分子量值均为近似值,并提供以用于描述。尽管类似于或等同于本文描述的那些的方法和材料可以用于本公开的实践或测试中,但是下面描述了合适的方法和材料。术语“包含(comprise)”是指“包括(include)”。缩写“例如(e.g.)”源自拉丁语例如,并在本文中用于指示非限制性实例。缩写“例如(e.g.)”是术语“例如(for example)”的同义词。在有冲突的情况下,以本说明书(包括术语解释)为准。另外,所有材料、方法和实施例都是说明性的,并不旨在限制。

[0059] 异常:异常的。如本文所用,异常细胞增殖或细胞分裂表示过度增殖或过度增生,如可能在诊断出患有癌症或过度增殖性疾病的受试者中发生的那样。

[0060] 给药:通过选定途径将组合物引入至受试者中。可以通过本领域技术人员已知的任何途径来给药活性化合物或组合物。给药可以是局部的或全身的。局部给药的实施例包括但不限于局部给药、皮下给药、肌肉内给药、鞘内给药、心包内给药、眼内给药或局部眼科给药。此外,局部给药包括通常用于全身给药的给药途径,例如,通过将血管内的给药引导至供应特定器官的动脉。因此,在特定实施方式中,当这种给药是针对供应特定器官的脉管系统时,局部给药包括动脉内给药和静脉内给药。局部给药还包括将活性化合物和活性剂掺入可植入装置或结构中,诸如血管支架或其他腔器(reservoir, 储器),以及递送装置(诸如可生物降解的植入物),其在延长的时间间隔内释放活性剂和化合物用于持续的和/或局部的治疗效果。

[0061] 全身给药包括设计成经由循环系统将活性化合物或组合物广泛地分布到全身的任何给药途径。因此,全身给药包括但不限于动脉内和静脉内给药。当这种给药用于通过循环系统在全身吸收和分布时,全身给药还包括但不限于局部给药、皮下给药、肌肉内给药或通

过吸入给药。

[0062] 拮抗剂:一种分子或化合物,其倾向于使其他种分子或化合物的作用(诸如磷酸酶活性)无效,或者在一些情况下会阻止给定化学物质与其受体或其他相互作用分子结合的能力,从而阻止生物学响应。拮抗剂不限于特定类型的化合物,并且在各种实施方式中可以包括肽、抗体及其片段,以及其他有机或无机化合物(例如,拟肽和小分子)。如本文所用,“抑制剂”与“拮抗剂”同义。

[0063] 反义抑制剂:指寡聚化合物,该寡聚化合物至少部分互补于与它杂交的靶核酸分子的区域。如本文所用,对靶核酸分子“特异性”的反义抑制剂(也称为“反义化合物”)是与靶核酸分子特异性杂交并调节靶核酸分子表达的抑制剂。如本文所用,“靶”核酸是反义化合物被设计成与之特异性杂交和调节其表达的核酸分子。反义化合物的非限制性实例包括引物、探针、反义寡核苷酸、siRNA、miRNA、shRNA和核酶。因此,这些化合物可以作为单链、双链、环状、支链或发夹状化合物的形式被引入,并且可以包含结构元件,诸如内部的或末端的凸起或环。双链反义化合物可以是杂交以形成双链化合物的两条链,或者也可以是具有充分的自互补性以允许杂交并形成完全或部分双链的化合物的单链。

[0064] 癌症:瘤形成的产物是瘤(肿瘤或癌症),是由于过度的细胞分裂导致的组织的异常的生长。不转移的肿瘤称为“良性”。侵入周围组织和/或可以转移的肿瘤被称为“恶性”。瘤形成是增生性疾患的一种实例。“癌细胞”是瘤形成细胞,例如从肿瘤分离的细胞或细胞系。

[0065] 血液肿瘤的实例包括白血病,包括急性白血病(诸如急性淋巴细胞白血病、急性粒细胞性白血病、急性髓系白血病和成髓细胞、早幼粒细胞性、粒单核细胞性、单核细胞性和红血球性白血病)、慢性白血病(诸如慢性粒细胞性(粒细胞性)白血病、慢性髓系白血病和慢性淋巴细胞性白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(惰性和高级别形式)、多发性骨髓瘤、沃尔登斯特罗姆(Waldenstrom's)巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病和骨髓增生异常。

[0066] 实体瘤(诸如肉瘤和癌)的实施例包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏(Ewing's)肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴组织恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌(诸如小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、甲状腺乳头状癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、威尔姆斯(Wilms')肿瘤、子宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌、黑色素瘤和CNS肿瘤(诸如胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、血管瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)。

[0067] 细胞穿透肽(CPP):一种短多肽,通常小于或等于40个氨基酸长,具有和与CPP连接的任何分子一起跨细胞膜易位并进入细胞质的能力。如本文所用,CPP同义于涵盖本领域已知的的肽和序列,如“蛋白质转导域(PTD)”、“特洛伊木马蛋白”和“膜易位序列(MTS)”。典型的CPP带正电荷,具有在它们的序列中占主导地位的氨基酸,诸如精氨酸和赖氨酸。CPP的特定的非限制性实例包括例如但不限于3至20个氨基酸之间的聚赖氨酸或聚精氨酸肽、穿透肽、TAT、SynB1、SynB3、PTD-4、PTD-5、FHV-Coat(35-49)、BMV Gag(7-25)、HTLV-II Rex(4-16)、D-Tat、R9-Tat、Transportan、MAP、SBP、NLS、FBP、MPG、Pep-1和Pep-2。

[0068] 核定位信号(NLS):本文所述的术语“核定位信号”和“NLS”序列互换使用,并且指下述氨基酸序列,该氨基酸序列能够诱导包含这种一个或多个序列或与这种序列连接的分子进入细胞核的转运。例如,NLS可以直接从细胞的细胞质穿过核被膜屏障转运与之结合的蛋白质。NLS旨在不仅涵盖特定肽的核定位序列,而且涵盖能够指导细胞质多肽穿过核被膜屏障易位的衍生物。当与多肽的N-末端、C-末端或N-末端和C-末端两者连接时,NLS能够指导多肽的核易位。

[0069] 化学治疗剂:在有异常的细胞生长特征的疾病的治疗中具有治疗作用的任何化学试剂。这些疾病包括肿瘤、瘤和癌症以及以增生性生长为特征的疾病,诸如牛皮癣。在一种实施方式中,化学治疗剂是用于治疗乳腺癌、卵巢癌或其他肿瘤的剂,诸如抗瘤剂。在一种实施方式中,化学治疗剂是放射性化合物。本领域技术人员可以容易地确定所使用的化学治疗剂(例如,参见Slapak和Kufe的Principles of Cancer Therapy)。化学治疗剂的非限制性实例包括依托泊苷、顺铂、紫杉醇、多西紫杉醇、阿霉素、表柔比星、托泊替康、伊立替康、吉西他滨、阿佐夫尿(iazofurine)、吉西他滨、依托泊苷、长春瑞滨、他莫昔芬、伐斯波达、环磷酰胺、甲氨蝶呤、氟尿嘧啶、米托蒽醌和长春瑞滨。组合化学疗法是给药不止一种试剂以治疗癌症,包括本文所述的肽和一种或多种化学治疗剂(例如靶向肿瘤DNA的化学治疗剂,例如诱导链断裂或序列错误的化学治疗剂)的组合。

[0070] 可以在各种制剂和治疗方案中向受试者提供化学治疗剂。在一些实施方式中,可以以与本文所述的其他治疗剂诸如肽或核酸剂分开的一种或多种制剂的形式提供化学治疗剂。在其他实施方式中,化学治疗剂连接或缀合至本文所述的肽和/或核酸。用于将分子连接至肽的各种方法是本领域已知的。所使用的一个非限制性实例是将非经典氨基酸引入肽中,然后进行化学反应将感兴趣的分子连接至所掺入的非经典氨基酸的R基团上(参见Kubyskin等人,Biotechnology Journal,3July 2017)。

[0071] 嵌合体:核酸序列,氨基酸序列,或包含来自两种或更多种来源的核酸序列、氨基酸序列或蛋白质的蛋白质,例如来自两个或更多个不同物种的氨基酸序列或来自相同物种的两种或更多种多肽。通常,嵌合序列是基因工程的结果。融合至本文描述的至少一种CPP的PKCeta uORF2衍生的肽是多肽嵌合体的实例。

[0072] 接触:放置在直接的物理联系中。包括固体和液体两种形式。接触可以在体外与分离的细胞发生,或在体内通过向受试者给药而发生。

[0073] 有效量的组合物:足以在被治疗的受试者中实现所需效果的一定量的组合物,包括本文所述的分离的肽。在治疗过程期间,有效量的组合物可以以单剂量给药或以若干剂量给药,例如每天给药。然而,组合物的有效量将取决于所施用的组合物、被治疗的受试者、患病的严重程度和类型以及组合物的给药方式。

[0074] 编码:如果多核苷酸被称为“编码”多肽,该多核苷酸以其天然状态或当通过本领域技术人员熟知的方法操作时,该多核苷酸可以被转录和/或被翻译以产生mRNA用于和/或该多肽或其片段。

[0075] 表达控制序列:下述核酸序列,该核苷酸序列调节与其可操作连接的异源核酸序列的表达,例如所述PKCeta uORF2源的多肽的表达可以可操作地连接至表达控制序列。当表达控制序列控制和调节转录并且作为核酸序列的适当翻译时,将表达控制序列可操作地连接至核酸序列。因此,表达控制序列可以包括适当的启动子、增强子、转录终止子、蛋白质

编码基因前面的起始密码子(ATG)、内含子的剪接信号、该基因的正确阅读框的维持以允许mRNA的正确翻译以及终止密码子。术语“控制序列”旨在至少包括其存在会影响表达的部分,并且还可以包括其存在是有利的其他部分,例如,前导序列和融合伴侣序列。表达控制序列可以包括启动子。

[0076] 多肽的功能片段和变体:包括所述PKCeta/PKCzeta uORF2源的多肽的那些片段和变体,这些多肽和变体维持亲本多肽的一种或多种功能。公认的是,编码多肽的基因或cDNA可以显著地突变而不会实质性地改变一种或多种多肽的功能。第一,众所周知,遗传代码是简并的,因此不同的密码子编码相同的氨基酸。第二,即使引入了氨基酸取代,该突变也可能是保守的并且对蛋白质的基本功能没有实质性影响。第三,可以删除多肽链的一部分而不会损害或消除其所有功能。第四,可以在多肽链中进行插入或添加(例如,添加表位标签)而不会损害或消除其功能。在不实质上损害多肽的一种或多种功能的情况下可以进行的其他修饰包括,例如,体内或体外化学和生物化学修饰或不常见氨基酸的并入。如本领域技术人员将容易理解的,这样的修饰包括例如乙酰化、羧化、肉豆蔻酰基化、磷酸化、糖基化、泛素化、标记(例如,用放射性核素)以及各种酶修饰。标记多肽和用于该目的的标记的多种方法是本领域众所周知的,并且包括放射性同位素诸如³²P、配体(结合至标记的特异性结合伴侣(例如,抗体)或者被其结合)、荧光团、化学发光剂、酶和抗配体。功能片段和变体的长度可以变化。

[0077] 异源:通常(即在野生型序列中)的序列类型。在一种实施方式中,该序列与第二序列不同的遗传来源,诸如病毒或生物体。嵌合多肽,诸如本文所述的那些,通常由异源序列组成。

[0078] 过度增殖性疾病:以细胞不受控制的增殖为特征的疾病或疾患。过度增殖性疾病包括但不限于恶性和非恶性肿瘤和牛皮癣,并且可以通过可以抑制细胞增殖的活性剂(诸如本文所述的PKCeta uORF2衍生的肽)治疗。

[0079] 分离的:生物组分(诸如核酸、蛋白质或细胞器)已经基本上与生物体(该组分天然存在于其中)的细胞中的其他生物组分(即,其他染色体和染色体外DNA和RNA、蛋白质和细胞器)分离或纯化。已经分离的核酸和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。该术语还涵盖通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸和蛋白质,以及化学合成的核酸和蛋白质,诸如本文所述的PKCeta uORF2源的肽。

[0080] 瘤形成、恶性肿瘤、癌症和肿瘤:瘤是由于过度的细胞分裂(细胞增殖)导致的组织或细胞的异常的生长。瘤形成生长可以产生肿瘤。个体中肿瘤的量是“肿瘤负担”,其可以以肿瘤的数量、体积或重量来测量。不转移的肿瘤称为“良性”。侵入(或迁移至)周围组织和/或可以转移的肿瘤称为“恶性”。恶性肿瘤也称为“癌症”。

[0081] 可操作地连接:当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则该启动子可操作地连接至编码序列。通常,可操作地连接的DNA序列是连续的,并且在需要连接两个蛋白质编码区的情况下它们在同一阅读框中。

[0082] 药学上可接受的载体:在本公开中有用的药学上可接受的载体是常规的。Remington's Pharmaceutical Sciences, by Lloyd V. Allen, Jr. (ed.), 22nd Edition (2012) 描述了适用于药物递送本文公开的化合物的组合物和制剂。通常,载体的性质将取

决于所采用的特定给药模式。例如，肠胃外制剂通常包括注射液，该注射液包括药学上和生理学上可接受的作为溶媒的流体诸如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等。除了生物中性载体外，待给药的药物组合物可以含有少量的无毒辅助物质，诸如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等，例如乙酸钠或失水山梨醇单月桂酸酯。

[0083] 药剂：当适当地给药至受试者或细胞时能够诱导期望的治疗或预防效果的化学化合物或组合物。孵育包括将靶标暴露于剂持续足够的时间以使剂与细胞相互作用。接触包括将固体或液体形式的剂与细胞一起孵育。

[0084] 蛋白质激酶C (PKC)：是蛋白质激酶酶的家族，被认为在细胞信号转导级联中起关键作用，并与介导免疫应答、细胞生长和细胞分裂调节以及学习和记忆有关。PKC家族分为三个子家族：常规的、新型的和非典型的。每个子家族可以另外分为多种异形体。常规的异形体的特定实例包括 α 、 β 和 γ 。新型的异形体包括 δ 、 ϵ 和 η ；以及非典型的异形体包括 ζ 和 λ 。

[0085] 多肽：一种聚合物，在其中单体是通过酰胺键连接在一起的氨基酸残基。如本文所用的术语多肽、蛋白质或肽涵盖任何氨基酸序列，并包括修饰的序列，诸如糖蛋白。术语多肽特别旨在涉及天然存在的蛋白质以及重组或合成产生的那些蛋白质。

[0086] 术语多肽片段指表现出至少一个有用的表位的多肽的部分。短语“多肽的功能性片段或变体”指保留多肽（片段来源于该多肽）的活性或活性的可测量部分的所有多肽片段。

[0087] 保守的氨基酸取代表提供功能上类似的氨基酸是本领域普通技术人员熟知的。以下六组是被认为彼此保守取代的氨基酸的实例：

[0088] 1) 丙氨酸 (A)，丝氨酸 (S)，苏氨酸 (T)；

[0089] 2) 天冬氨酸 (D)，谷氨酸 (E)；

[0090] 3) 天冬酰胺 (N)，谷氨酰胺 (Q)；

[0091] 4) 精氨酸 (R)，赖氨酸 (K)；

[0092] 5) 异亮氨酸 (I)，亮氨酸 (L)，蛋氨酸 (M)，缬氨酸 (V)；以及

[0093] 6) 苯丙氨酸 (F)，酪氨酸 (Y)，色氨酸 (W)。

[0094] 预防或治疗疾病：预防疾病指抑制疾病的全面发展，例如抑制患有冠状动脉疾病的人的心肌梗塞的发展或抑制患有肿瘤的受试者的肿瘤的进展或转移。治疗指在疾病或病理状况已经开始发展后减轻其体征或症状的治疗干预。

[0095] 纯化的：术语纯化的不需要绝对的纯度；相反，它旨在作为一个相对的术语。因此，例如，纯化的蛋白质制品是在该制品中所指的蛋白质比该蛋白质在细胞内天然环境中更纯的蛋白质制品。

[0096] 放射疗法 (放疗)：通过将受试者或其组织暴露于放射性物质的疾病 (例如，癌症或其他过度增殖性疾病或病症) 治疗。作为控制恶性细胞的癌症治疗的一部分，放射疗法是电离放射的医学用途。放疗可用于治愈性或辅助性癌症治疗。在无法治愈的情况下它被用作姑息治疗，并且旨在局部疾病控制或症状缓解。

[0097] 重组体：一种核酸，该核酸具有非天然存在的序列或具有的序列是通过人工组合序列的两个其他分离片段制成的。这种人工组合可以通过化学合成或更普遍地通过人工操作分离的核酸片段 (例如，通过基因工程技术) 来完成。本文所述的表达PKCeta uORF2源的

肽的表达载体是示例性重组核酸。

[0098] 序列同一性:两个核酸序列或两个氨基酸序列之间的类似性以序列之间的类似性表示,也称为序列同一性。序列同一性经常用同一性(或类似性或同源性)百分比来测定;百分比越高,两个序列越类似。用于比较的序列比对方法是本领域熟知的,例如NCBI基本局部比对搜索工具(BLAST),其可以从多种来源获得,用于与序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn以及tblastx结合使用。可以在NCBI网站上访问它,以及有关如何使用此程序确定序列同一性的说明。

[0099] 受试者:活的多细胞生物体,包括脊椎动物生物体,包括人类和非人类哺乳动物两者的纲。

[0100] 治疗有效量:足以在被治疗的受试者中实现所需效果的化合物的量。在治疗过程期间,有效量的化合物可以以单剂量给药或以若干剂量给药,例如每天给药。然而,有效量将取决于所施用的化合物、所治疗的受试者、患病的严重程度和类型以及该化合物的给药方式。例如,可以将活性组分的治疗有效量测定为产生作用的血液(体内)或缓冲液(体外)中活性组分(诸如小分子、肽、蛋白质或抗体)的浓度(摩尔每升或摩尔-M)。

[0101] 载体:核酸分子被引入至宿主细胞中从而产生转染的宿主细胞。重组DNA载体是具有重组DNA的载体。载体可以包括允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,诸如复制起点。载体还可以包括一种或多种可选择的标志基因和本领域已知的其他遗传元件。病毒载体是具有源自一种或多种病毒的至少一些核酸序列的重组DNA载体。

[0102] III. 几种实施方式的概述

[0103] 本文提供了源自PKCeta异形体的uORF的分离的、合成的和嵌合的肽,并且特别地,分离多肽包含与SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列。

[0104] 本文另外描述了SEQ ID NO:32的分离多肽,其中,在位置10处的氨基酸是丙氨酸,如本文SEQ ID NO:5所示。另外,本文描述了SEQ ID NO:32的分离多肽,其中,在位置10处的氨基酸是半胱氨酸,如本文SEQ ID NO:1所示。

[0105] 在特定实施方式中,分离多肽包括下述肽,该肽具有与SEQ ID NO:5、11或19至少70%同一性的氨基酸序列。

[0106] 在特定实施方式中,所描述的分离多肽包括肉豆蔻酰基。

[0107] 在一些实施方式中,所描述的分离多肽包括至少一种细胞穿透肽(CPP),例如穿透肽CPP序列。在特定实施方式中,所述多肽是具有SEQ ID NO:2所示序列的嵌合氨基酸序列。

[0108] 另外,本文描述了编码所提供的分离多肽的核酸。在特定实施方式中,编码多肽的核酸是表达载体的一部分并可操作地连接至表达载体。

[0109] 本文另外描述了包括所述分离多肽或核酸以及药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。

[0110] 在一些实施方式中,所描述的分离多肽或核酸用于治疗与异常细胞增殖有关的疾病或病症,诸如导致良性异常的细胞生长或良性肿瘤的疾病或病症。在其他实例中,该疾病或病症是癌症。在特定实施方式中,这样的用途包括制备用于治疗与异常细胞增殖有关的疾病或病症的药物。

[0111] 在一些实施方式中,将所述分离多肽或核酸与化学治疗剂、手术或放疗(其本身可以以单独的制剂施用或与所述多肽或核酸缀合施用)一起施用。在特定实施方式中,化学治

疗剂是DNA损伤剂。在另外的特定实施方式中，DNA损伤化学治疗剂是依托泊苷。

[0112] 还描述了用于治疗与异常细胞增殖有关的疾病或病症的方法，该方法包括向有此需要的受试者给药治疗有效量的所述分离肽，从而治疗该疾病或病症。在一些实施方式中，将分离肽作为能够表达分离肽的核酸向受试者提供。在特定实施方式中，疾病或病症导致良性异常的细胞生长或良性肿瘤。在其他实施方式中，该疾病是癌症。

[0113] 所提供的治疗方法还包括通过向有此需要的受试者给药治疗有效量的所述分离肽和化学治疗剂(单独地或与所述肽缀合)来抑制受试者的细胞增殖或癌症转移的方法；从而抑制细胞增殖或癌症转移。这种方法的特定实施方式利用能够表达分离肽的核酸。

[0114] IV. 蛋白质激酶C肽抑制剂

[0115] 本文提供的是发现了，在蛋白质激酶C (PKC) 异形体 η (eta) 的5'-非翻译区 (5'-UTR) 中鉴定出的上游开放阅读框 (uORF) 编码了26个氨基酸肽，该肽可以抑制PKC激酶活性、细胞迁移和细胞增殖，特别是在癌细胞中。在这个肽内，鉴定出含有与PKC假底物同源的17个氨基酸亚肽。将这些肽以及由此描述的那些统称为PKCeta uORF源的肽。

[0116] 因此，本文描述了具有至少17个氨基酸的分离肽，该肽包括与本文SEQ ID NO:3所示的序列具有至少70%同一性的氨基酸序列。可以是合成产生的所述分离肽包括功能性变体，以及与SEQ ID NO:3具有至少70-99%同一性的具有至少17个氨基酸的序列变体，包括与SEQ ID NO:3具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或更高同一性的肽。

[0117] 所述肽的特定实施方式包括至少26个氨基酸长的肽序列，并且具有由PKCeta uORF2产生的肽的氨基酸序列，并且其在本文中为SEQ ID NO:1。所述肽的特定实施方式包括与SEQ ID NO:1具有至少70-99%同一性的肽，包括与SEQ ID NO:1具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或更高同一性的肽。

[0118] 所述肽的特定实施方式包括至少26个氨基酸长的肽序列，该肽序列类似于uPEP₁₋₂₆ (SEQ ID NO:1)，包括至少一个丙氨酸取代，特别是在Cys-10处。所述肽的特定实施方式包括与SEQ ID NO:5具有至少70-99%同一性的肽，包括与SEQ ID NO:5具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或更高同一性的肽。

[0119] 本文还描述了PKCeta源的uORF编码的肽的序列，如本文表示为SEQ ID NO:32 (MASRGALRRXLSPGLPRLHLSRGLA)；其中X是C (SEQ ID NO:1) 或A (SEQ ID NO:5)。

[0120] 本文另外描述了与源自PKCzeta uORF并在本文中为SEQ ID NO:11的肽具有至少70-99%同一性的分离多肽，包括与SEQ ID NO:11具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或更高同一性的肽。

[0121] 所述分离的合成多肽的特定的非限制性实施方式包括具有本文如SEQ ID NO:2、4-9和12所示的序列的多肽。

[0122] 在特定实施方式中，可以通过表达载体合成产生的或通过表达载体产生的以及通过标准手段从细胞培养物中纯化的所述多肽与至少一种细胞穿透肽 (CPP) 融合，该细胞穿透肽可以促进分离多肽 (诸如PKCeta uORF源的肽) 从外部环境通过并进入细胞内部。如本文所述，存在CPP的许多实例，并且其与PKCeta uORF源的肽融合可以用于产生诸如本文所述的嵌合的PKCeta (或PKCzeta) uORF源的肽。PKCeta uORF源的肽嵌合体可以包括来自相同或多个来源的一种、两种、三种或更多种CPP，它们可以在多肽的C-末端和/或N-末端融合到PKCeta uORF源的肽。在所述嵌合肽中使用的CPP的特定实例包括穿透肽CPP (本文包括为

SEQ ID NO:10)和精氨酸重复CPP(本文包括为SEQ ID NO:13),并且其包括3-20个精氨酸残基的多精氨酸序列。在一些实施方式中,至少一种CPP是直接融合至PKCeta uORF源的肽和/或多肽嵌合体中的其他CPP。在其他实施方式中,至少一种CPP通过肽接头融合至PKCeta uORF源的肽和/或至多肽嵌合体中的其他CPP,该肽接头可以是连接一种或多种CPP和/或PKCeta uORF源的肽的一个或多个氨基酸。

[0123] 在一些实施方式中, CPP包含如SEQ ID NO:13(RRRX)中所示的精氨酸重复,其中R是精氨酸并且X是从0至17的整数。在一些实施方式中,X是下述范围内的整数,从3至17、从3到16、从3到15、从3到14、从3到13、从3到14、从3到13、从3到12、从3到11、从3到10、从4到17、从4到16、从4到15、从4到14、从4到13、从4到12、从4到11、从4到10、从4到9、从4到8、从5到17、从5到16、从5到15、从5到14、从5到13、从5到12、从5到11、从5到10、从5到9、从5到8、从6到17、从6到15、从6到14、从6到13、从6到12、从6到11、从6到10、从6到9或从6到8。每种可能性都代表了本发明的单独的实施方式。

[0124] 在一些实施方式中,本发明的肽另外包含融合至羧基或氨基末端的核定位(NLS),其中,所述NLS序列包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14(KKKRR)、SEQ ID NO:15(PKKKRRV)、SEQ ID NO:16(KRRMKWKK)、SEQ ID NO:17(KKKRK)和SEQ ID NO:18(KKKRK)。

[0125] 所述多肽可以通过本领域已知的任何方法产生。在特定实施方式中,多肽是化学合成的。在其他实施方式中,多肽是由合适的原核、真菌、植物或动物细胞宿主产生的并且从合适的原核、真菌、植物或动物细胞宿主中纯化的,在宿主中导入了合适的多肽表达载体。蛋白质分离和纯化的方法也是标准的(例如亲和色谱法、尺寸排阻色谱法等)。

[0126] 如上所述,所述多肽的变体、片段和类似物包括在本公开中。这些多肽包括与所述PKCeta或PKCzeta uORF源的肽以及嵌合体具有约60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%的序列同一性的多肽。其他示例性变体包括与本文所述氨基酸仅一个、两个或三个氨基酸不同的肽。在特定实施方式中,来自本文明确描述的那些序列的变体可以是技术人员不期望显著改变多肽的形状或电荷的保守取代。

[0127] 所述多肽还包括与那些指定多肽具有100%序列同一性但是在翻译后或合成后的修饰中与天然序列不同的那些多肽。例如,所述合成多肽可以在多肽的N-末端或C-末端被乙酰化。其他实例包括棕榈酸基团在肽末端的缀合或多肽合成领域中常见的其他修饰,诸如肉豆蔻酰化(同样参见例如sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/peptide-modifications-n-terminal-internal-and-c-terminal.html)。

[0128] 在特定的实施方式中,所述PKCeta或PKCzeta uORF源的肽、肽和嵌合肽作为离散的生物分子提供。在其他实施方式中,所述多肽是较大多肽的结构域,诸如独立折叠的结构域或环境可接近的功能域。

[0129] 本文还提供了编码所述PKCeta或PKCzeta uORF源的多肽和嵌合多肽的核酸,包括由于密码子简并以及对细菌、动物和植物细胞的密码子偏好而优化的特定核酸序列所引起的变异。

[0130] 在特定实施方式中,所述核酸序列包含在DNA克隆和/或表达质粒内,如本领域的标准。应当理解,如本文所讨论的,任何标准表达质粒均可以用于表达编码所述多肽和嵌合多肽的核酸的一种或多种。这种质粒将最低限度地包含复制起点、选择序列(诸如但不限于

抗生素抗性基因)和下述表达控制序列,该表达控制序列可操作地连接至编码PKCeta或PKCzeta uORF源的肽或嵌合肽的核酸。在特定实施方式中,表达质粒包括翻译后序列(例如指导多肽加工和输出的信号序列),其在具有编码PKCeta或PKCzeta uORF源的多肽或嵌合多肽的核酸的整码内被编码。

[0131] 细菌表达质粒的特定的非限制性实例包括IPTG诱导型质粒、阿拉伯糖诱导型质粒等。表达诱导的其他非限制性实例包括光诱导、温度诱导、营养物诱导和自体诱导,以及哺乳动物特异性DNA表达质粒。定制的表达质粒可以从供应商商购,诸如New England Biolabs(Ipswich,MA)和DNA 2.0(Menlo Park,CA)。在特定实施方式中,可以设计PKCeta或PKCzeta uORF源的多肽或嵌合多肽的表达质粒,以响应于局部细胞微环境(诸如特定癌症类型的局部环境)进行特异性的局部诱导。

[0132] V. 用于治疗与细胞异常增殖有关的疾病的组合物

[0133] 另外,本文提供的组合物包括所述分离的PKCeta或PKCzeta uORF源的多肽、嵌合多肽和编码核酸,用于治疗或预防以异常细胞增殖为特征的疾病或病症。示例性用途包括制备用于所述治疗或预防的药物,以及通过以治疗有效量向有此需要的受试者给药所述组合物的治疗方法。

[0134] 除了用于降低PKCeta的表达和活性的肽(合成的或由转染的核酸体内产生的)剂外,本文还描述了利用RNA靶向方法(诸如使用siRNA和shRNA剂)来治疗与异常细胞增殖有关的疾病和/或病症的组合物和方法。RNA治疗剂(包括本文中表示为SEQ ID NO:33-35的那些)可以通过将核酸剂递送至治疗靶标的本领域的任何标准手段被提供。非限制性实例包括基于脂质的转染剂、固体聚合物递送系统以及其他系统的和局部的递送方法以及本文所述的制剂。

[0135] 以异常的细胞增殖为特征的疾病和病症最常见与良性和癌性瘤形成有关。在疾病或病症为癌症的特定实施例中,所述肽及其使用方法允许用于治疗特别地与异常或失调的PKC(特别是PKCeta或PKCzeta)功能相关的癌症。这样的癌症包括乳腺癌、肺癌、结肠癌、胶质瘤、头颈癌、卵巢癌、胃癌和胰腺癌。

[0136] 在一些实例中,所述的PKCeta或PKCzeta uORF源的多肽、嵌合多肽和编码核酸、RNA靶向剂(RNA干扰(RNAi)剂)在治疗细胞增殖性疾病的特定特征性症状的方法中使用。在特定实例,可以将所述肽或RNAi剂给药至受试者以抑制细胞增殖,从而减少和/或预防癌细胞或肿瘤生长。如本文所述,所述PKCeta uORF源的肽或RNAi剂可以抑制细胞迁移,正如细胞迁移是受试者中肿瘤转移所必需的。因此,除了抑制增殖之外,所述肽还可以在抑制或减少癌症转移的组合物和方法中使用,从而减少或甚至消除癌症在其起源肿瘤之外的扩散。

[0137] 除了用于抑制细胞增殖和转移的方法外,所述PKCeta uORF源的多肽、嵌合多肽和编码核酸以及RNAi剂还可以在用于治疗脑梗死、类风湿性关节炎、阿尔茨海默病和疼痛的方法中使用。同样,所述PKCzeta uORF源的多肽、嵌合多肽和编码核酸可以在用于治疗记忆和学习障碍、慢性阻塞性肺疾病和2型糖尿病的方法中使用。

[0138] 在特定实施方式中,本文所述的治疗组合物可以在任何药学上可接受的组合物中被供应。在这样的实施方式中,一种或多种PKCeta或PKCzeta uORF源的多肽或表达嵌合多肽的核酸和RNAi剂在药物制剂中被提供,该药物制剂具有治疗有效剂量的如本文所述的每种治疗剂,并且包括标准的药学上可接受的盐、赋形剂、填充剂等。

[0139] 各种递送系统是已知的,并且可以用于给药作为治疗剂的多肽和核酸。这样的系统包括例如在脂质体、微粒、微胶囊、能够表达一种或多种治疗性分子的重组细胞、作为逆转录病毒或其他载体的一部分的治疗性核酸的构建等中的封装。引入方法包括但不限于鞘内、皮内、肌内、腹腔内(ip)、静脉内(iv)、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。可以将治疗剂配制以通过任何方便的途径给药,包括例如输注或弹丸注射、局部、透过上皮或粘膜内膜(例如,口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)的吸收、眼部、鼻和透皮,并且可以与其他生物活性剂一起给药。也可以使用肺部给药(例如,通过吸入器或雾化器),例如使用含有雾化剂的制剂。

[0140] 在特定的实施方式中,可能期望通过注射、导管、栓剂或植入物(例如,由多孔、无孔或凝胶材料形成的植入物,包括膜,诸如硅橡胶膜或纤维)等来施用所述药物治疗。在另一实施方式中,治疗剂在囊泡中特别地在脂质体中递送。

[0141] 在特定实施方式中,所述多肽和核酸可以被配制成立即释放,由此它们立即被周围环境接近,从而在向受试者给药之后,并且直到给药的剂量被受试者代谢之前提供有效量的一种或多种活性剂。

[0142] 在另一实施方式中,所述多肽和核酸可以被配制在缓释制剂或系统中。在这样的制剂中,提供的治疗剂具有延长的持续时间,诸如1、2、3、4或更多天,包括1-72小时,24-48小时,16-36小时,12-24小时,以及之间的任何时间长度。在特定实施方式中,缓释制剂在给药后立即可用,并提供有效剂量的治疗组合物,并在延长的时间段内保持在有效剂量处可用。在其他实施方式中,缓释制剂在受试者体内不是立即可用的,并且仅在制剂被代谢或降解以将一种或多种活性化合物释放至周围环境后以提供治疗有效量的一种或多种活性化合物才变得可用。缓释制剂的说明性的非限制性实例包括水凝胶和纳米颗粒(例如,Raza等人,Pharmaceutics 10,2018;和Rivzi等人,Saud Pharm.J.26,2018)。

[0143] 在一种实施方式中,可以使用泵。在另一种实施方式中,缓释制剂包括本领域常用的聚合物材料,诸如植入物、凝胶、胶囊等。

[0144] 在特定实施方式中,使用本领域技术人员熟知的方法配制所述的多肽和核酸。例如,在一些实施方式中,将化合物与药学上可接受的载体一起配制。术语“药学上可接受的”指经联邦或州政府的监管机构批准或在美国药典或世界范围内其他公认的药典中列出的用于动物,并且特别是用于人类。术语“载体”是指与治疗剂一起给药的稀释剂、佐剂、赋形剂或溶媒。这样的药物载体可以是无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。盐溶液、血浆介质、葡萄糖水溶液和甘油溶液也可以用作液体载体,特别是用于可注射溶液。介质还可以包括常规的药物辅助材料,诸如例如调节渗透压的药学上可接受的盐、脂质载体(诸如环糊精)、蛋白质(诸如血清白蛋白)、亲水剂(诸如甲基纤维素)、去污剂、缓冲剂、防腐剂等。

[0145] 药物赋形剂的实例包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂乳、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,所述组合物还可以含有少量的湿润剂或乳化剂或pH缓冲剂。所述组合物可以采取溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂的形式,所有立即释放和缓释形式的制剂均为本领域理解的。可以将治疗剂与传统的粘合剂和载体(诸如甘油三酸酯)一起配制成栓剂。口服制剂可以包括标准载体,诸如药用级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0146] 治疗制剂将含有治疗有效量的至少一种优选纯化形式的活性原料,以及适量的载体,以向患者提供适当的给药。该制剂应适合于给药模式。

[0147] 所述制剂的原料可以单独供应或以单位剂型混合在一起供应,例如以固体、半固体和液体剂型诸如片剂、丸剂、粉剂、液体溶液或悬浮液,或作为密闭容器(诸如指示活性剂的量的安瓿瓶或小药囊(sachette))中干燥冻干粉剂或无水浓缩物的形式。因此,本文也考虑了包括所述PKCeta或PKCzeta uORF源的多肽或嵌合多肽或编码核酸的试剂盒。

[0148] 在所述药物组合物及其使用方法的特定实施方式中,将所述PKCeta或PKCzeta uORF源的多肽或嵌合多肽或编码核酸作为多肽给药至受试者。在其他实施方式中,借助于包含所述核酸的表达载体将其给药至受试者。应当理解,在这样的实施方式中,如本领域熟知的,多肽的表达可以是构成型的或诱导型的。在一些实施方式中,诱导型表达系统可以允许特异性靶向区域,诸如含有诱导信号的局部肿瘤环境。

[0149] 在一些实施方式中,将所述PKCeta或PKCzeta uORF源的多肽或嵌合多肽或其编码核酸与其他药剂组合给药至受试者,以治疗所治疗的疾病或病症。例如,在用于治疗乳腺癌的方法中,可以将所述多肽或核酸与曲妥单抗(赫赛汀)疗法组合。在癌症疗法的其他实施方式中,可以将所述肽或核酸与DNA损伤化学治疗剂组合。这样的剂的非限制性实例包括顺铂、阿霉素、5-氟尿嘧啶、依托泊苷和吉西他滨(另请参见Cheung-Ong等人,Chem and Biol.20,2013)。在癌症治疗的其他实例中,所述组合物可以与手术和/或放射疗法组合。当作为治疗方案或与其他疗法组合的治疗方法的一部分提供时,可以将所述PKCeta或PKCzeta uORF源的多肽或嵌合多肽或编码核酸按顺序(在此之前或之后)或与所述组合物同时给药至受试者。在适用的情况下,在特定实施方式中,可以将活性原料的组合以单一或多种制剂的形式并且通过单一或多种给药途径给药至受试者。

[0150] 在特定实施方式中,化学治疗剂与所述的肽和核酸剂一起作为单独的分子或制剂提供。在化学治疗剂与所述肽或核酸治疗剂“一起”给药的其他实施方式中,化学治疗剂与肽或核酸缀合。缀合方法是本领域已知的。在特定的非限制性实例中,化学治疗和肽(或核酸)组分可以经由生物可释放的键(诸如可选择性切割的接头或氨基酸序列)连接。例如,考虑了包括酶切割位点的肽接头。此类肽接头的示例性形式是被尿激酶、纤溶酶、凝血酶、因子IXa、因子Xa或金属蛋白酶(诸如胶原酶、明胶酶或基质酶)切割的那些。另外,本领域技术人员已知的任何其他连接/偶联剂和/或机制可以用于组合本文所述的治疗剂,诸如,例如抗体-抗原相互作用、生物素-亲和素键、酰胺键、酯键、硫酯键、醚键、硫醚键、磷酸酯键、磷酸酰胺键、酸酐键、二硫键、离子和疏水相互作用、双特异性抗体和抗体片段或其组合。在特定实施方式中,将非经典氨基酸掺入到所述肽序列中或其末端。用诸如所描述的那些方法对这类非经典氨基酸的R基进行修饰并与之反应可以用于将化学治疗剂缀合至所描述的肽。

[0151] 在所述的组合物和方法中使用的并且将会是有效的每种治疗剂的量将取决于待治疗的疾患或病症的性质,以及疾患或病症的阶段。治疗有效量可以通过标准临床技术来确定。治疗组合物中使用的精确剂量还将取决于与组合物一起使用的给药途径,并且应该根据医疗保健从业者的判断和每个患者的情况来决定。对于任何特定受试者,特定的剂量水平和剂量频率可以改变,并且将取决于多种因素,包括特定化合物的活性、该化合物的代谢稳定性和作用时间、年龄、体重、一般健康、性别、饮食、给药方式和时间、排泄率、药物组合以及接受治疗的宿主的病症严重程度。

[0152] 本公开的治疗化合物和组合物可以在整个治疗期间在递增的剂量方案或在负荷剂量方案(例如,其中负荷剂量是维持剂量的约二至五倍)中以大约相同的剂量配制或给药。在一些实施方式中,剂量在治疗过程中基于所治疗的受试者的状况、疾病或病症的严重程度、对治疗的表观响应和/或其他由本领域普通技术人员判断的因素而变化。在一些实施方式中,考虑了使用该药物的长期治疗。

[0153] 提供以下实施例以说明某些特定特征和/或实施方式。这些实施例不应被解释为将本公开限制为所描述的特定特征或实施方式。

[0154] 实施例

[0155] 实施例1:方法

[0156] 肽

[0157] 肽由GL Biochem(中国)合成产生的。

[0158] 免疫沉淀和体外激酶测定

[0159] 通过在室温下使用预吸附的mAb在蛋白质A/G-琼脂糖珠上进行免疫沉淀1h。通过在冷的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤3次来去除过量的Ab,并将Ab包被的珠子与细胞裂解液在4°C孵育过夜。通过离心沉淀免疫复合物,然后用不含SDS的RIPA缓冲液(10mM Tris-HCl pH 8.0、100mM NaCl, 5mM EGTA, 1%NP-40、45mMβ-巯基乙醇和50mM NaF)充分洗涤。同样将免疫沉淀物样品分配到Eppendorf管中进行激酶测定。加入5μg髓鞘碱性蛋白(MBP, Sigma# M1891)作为底物,并加入所示的肽(2或10μM)。制备了激酶反应混合物:MgCl₂ 5mM, HEPES 1M, CaCl₂ 300μM, TRIS-HCl pH 7.4 20mM, PMA1μM, 磷脂酰丝氨酸40μg/ml, “冷”ATP和γ-ATP 5mM(PerkinElmer)。所有制备均在0-4°C的冰中进行。将含有与100μl激酶测定混合物混合的20μl珠子的Eppendorf管在30°C孵育30min。用25μl样品缓冲液*5终止了反应,并在95°C变性5min,然后旋转下降(spin down)。所有样品均在SDS-PAGE10%上进行电泳并转移至硝酸纤维素膜(Sigma-Aldrich, USA)上。用暴光剂对激酶活性进行了评估。在检测到磷酸化底物(p-MBP)后,将膜暴光于抗-HA(Bio-legend#901513)作为负载对照。

[0160] 损伤愈合测定

[0161] 将MCF-7和MDA-MB-231细胞接种到24孔板中,并且生长至完全融合。随后,将含有肽的低血清培养基(MCF-7为2%, MDA-MB-231为0.1%)添加至孔中4h。然后,用200μl无菌移液器尖端(Eppendorf)在孔的中间设置划痕。用PBS洗涤一次后,返回各自的处理。用IX70 Olympus光学显微镜(Tokyo, 日本)以4倍的总放大倍率对孔进行拍照。每24h为每个孔拍摄3张图像。

[0162] 细胞存活率测定

[0163] Presto Blue测定

[0164] 将MCF-7和MDA-MB-231细胞以 2×10^4 细胞/孔接种在48孔板中。24h后,将含有肽的无血清培养基加入孔中4h。然后,加入具有血清的培养基,并将板在培养箱中(37°C的5% CO₂湿润气氛)孵育24h。孵育后,从每个孔中轻轻吸出带有测试肽的培养基,并将25uL PrestoBlue™剂(Thermo#A13261)加入48孔板的每个孔中,并在37°C于5%CO₂中孵育15min,如被建议的。在570nm处记录吸光度,并由“Infinite M200 PRO”读取器检测。

[0165] XTT测定

[0166] 将细胞以20,000个细胞/孔的细胞密度接种在96孔板上,并生长48小时。按指示将

细胞处理48小时。制备XTT (#20-300-1000, Biological Industries) 反应溶液(含有XTT和活化溶液),并在37°C (50 μ l/孔) 加入到细胞培养基中2-4小时。将该板立即在ELISA板读取器中在450-500nm处进行了读数。在630nm处进行了背景读数,并且将结果计算为数值之间的差异。

[0167] 小鼠细胞移植程序

[0168] 用10ml/mg氯胺酮和1.17ml/mg甲苯噻嗪在盐水中的溶液对小鼠进行了麻醉。用70%乙醇溶液对小鼠的接种区域进行了消毒后,腹腔内(IP)注射麻醉。使用27号针头,将4T1对照和shPE η 敲除的细胞(用SEQ ID N033-35转染的或加扰的对照(从ATCC获得))注射到离乳头几毫米的皮肤下方(50 μ l中120,000个细胞,每个小鼠)。

[0169] 在研究期间对动物的分析:每周,对小鼠进行肿瘤检测,并通过卡尺检查原发肿瘤。10周后,对小鼠实施了安乐死并检查在肺、肝和脾中的转移,并制备样品用于免疫染色。

[0170] 实施例2:PKC ζ uORF源的激酶抑制剂的鉴定和表征

[0171] 先前有报道称蛋白质激酶C异形体PKC ζ 的翻译部分地经由两个uORF调控。人和哺乳动物PKC ζ uORF2序列的序列比对令人惊讶地证明了物种内的序列保守性(图1A和图1B)。高度保守性支持其潜在的功能作用。此外,还发现了uORF2含有类似于PKC的PS基序的序列基序,因此各种PKC PS序列与uORF2之间的相似性支持了uORF2中PS基序的存在(图1C)。

[0172] 为了测试翻译的uORF2肽可以调节PKC的激酶活性的可能性,产生了全长人PKC ζ uORF2肽(本文也称为MA-26和/或uPEP2₁₋₂₆, SEQ ID NO:1)。缺少PS基序的肽,uPEP₉₋₂₆和uPEP₁₈₋₂₆用作对照(图2A)。如在图2B和图2C中可以看出,当与对照肽uPEP₉₋₂₆和与 η PS相比时,uPEP₁₋₂₆是最强的抑制剂。如上所述测试了uPEP2₁₋₂₆对PKC子家族的激酶活性的影响。如图2D所示,uPEP2强烈抑制了来自新型PKC子家族的PKC的激酶活性。

[0173] 如上所述,通过标准的划痕试验测定法在体内测试了PKC ζ uORF2对癌细胞迁移的体外作用。用uPEP₁₋₂₆、uPEP₉₋₂₆、uPEP₁₈₋₂₆和 η PS对细胞进行了处理,然后对融合的乳腺癌细胞系MCF7(乳腺癌)、MDA-MB-231(乳腺癌)和MCF10A(未转化的乳腺细胞)的一器皿进行划痕。已经表明uPEP₁₋₂₆抑制乳腺癌MCF7和MDA-MB-231的迁移,但不抑制未转化的MCF10A(图3)。

[0174] 类似地测试了PKC ζ uORF2对细胞系MCF7、MDA-MB-231、U251MG和MCF10A增殖的体外作用。在各种肽之外,uPEP₁₋₂₆、uPEP₉₋₂₆、uPEP₁₈₋₂₆和 η PS中,观察到,uPEP₁₋₂₆对转化的细胞系中细胞增殖的抑制最大而非未转化的细胞MCF10A(图4)。

[0175] 若干PKC变体的5'非翻译区的进一步序列比较揭示了uORF和类似于PKC ζ 假底物的序列的存在(图8A)。如图8B所示,成功测序了含有PS基序的PKC ζ 的uORF(SEQ ID No.11)。

[0176] 这些结果表明了在PKC ζ uORF2中鉴定出类似于PKC假底物(PS)序列的短序列,uPEP₁₋₂₆。PKC PS是所有PKC异形体的骨架的一部分,并充当PKC激酶活性的内部抑制剂。

[0177] 我们的结果示出,uPEP₁₋₂₆肽是PKC激酶活性的有效抑制剂。我们还示出了,它抑制乳腺癌细胞的细胞增殖和迁移以及胶质母细胞瘤细胞的细胞增殖。此外,我们在其他PKC异形体PKC ζ 的uORF中发现了PS基序。我们的研究首次表明uORF中存在功能性特征基序。我们的研究将uORF作为新参与者引入至蛋白质网络调控中,从而为蛋白质控制和信号传导级

联的复杂性增加了新的层次,这是以前没有探讨过的。

[0178] 实施例3:PKCeta敲除抑制肿瘤形成

[0179] 实施例2表明,抑制PKCeta的活性对乳腺癌细胞的增殖和迁移具有抑制作用。为了测试PKCeta对肿瘤形成的体内作用,比较了具有(4T1对照细胞)和不具有PKCeta(PKCeta敲除4T1细胞)的乳腺癌细胞的建立和生长。随时间肿瘤体积的比较表明PKCeta敲除细胞对肿瘤尺寸有明显的抑制作用(图7A)。PKCeta敲除还抑制了肿瘤转移的形成(图7B)。此处显示的结果是SEQ ID NO:33的表达的敲除效应,但是使用本文以SEQ ID NO:34和35所示的那些所代表的shRNA观察到了相似的结果。诸如与MA-26或由源自其的活性亚肽一样,这些结果一起表明PKCeta的抑制可以抑制肿瘤的生长和转移。

[0180] 实施例4:uPEP1-26和化学治疗剂在诱导细胞死亡中的协同作用

[0181] 用指定肽(图5)在有或没有DNA靶向化疗剂依托泊苷的情况下对乳腺癌细胞系MCF-7进行了处理。在由依托泊苷或uPEP₁₋₂₆引起的细胞死亡仅10-30%的条件下对细胞进行处理时,两种剂的存在使细胞死亡增加至约95-100%,这表明了协同作用。单独用依托泊苷治疗会引起一些细胞死亡,但是,当依托泊苷与uPEP₁₋₂₆一起给药时,观察到了协同作用,使得细胞凋亡接近100%(参见图5,箭头)。这些结果有力地表明成功靶向双重癌症疗法的潜力。

[0182] 实施例5:PKCeta uORF2肽突变体有效降低细胞存活率

[0183] 合成了PKCeta uORF2肽(SEQ ID NO:1)的uPEP₂₁₋₂₆^[10C/A]突变,该突变含有在Cys-10处的丙氨酸取代,在此称为SEQ ID No 5。使用uPEP₂₁₈₋₂₆、uPEP₂₁₋₂₆、uPEP₂₁₋₂₆^[10C/A]、UPEP₂₁₋₁₇和ηPS,以5μM和10μM的剂量对细胞系MCF-7(图6A)、MDA-MB-231(图6B)和HeLa(图6C)进行了处理以测定细胞增殖。如图所示,与其他肽相比,突变体uPEP₂₁₋₂₆^[10C/A]有效降低了细胞存活率。

[0184] 实施例6:PKCeta uORF2肽突变体

[0185] 合成了PKCeta uORF2肽(SEQ ID NO:1)的其他突变体,并如实施例1和实施例2中所述,在激酶、细胞增殖和细胞迁移测定中测定了其活性。用于测定的变体包括本文SEQ ID NO 2、8和9所示的序列变体。还测定了肉豆蔻酰化的PKC uORF2肽。

[0186] 还测定了SEQ ID NO:1的具有17个氨基酸的亚肽片段,其仅限于假定的PKC假底物(在本文中表示为SEQ ID NO:3),及其变体(在本文中表示为SEQ ID NO 4、6和7)。还测试了C-末端或N-末端添加的穿透肽CPP(SEQ ID NO:10)或肉豆蔻酰化的作用。

[0187] 还测试了上述肽对细胞增殖、肿瘤生长和转移的体内作用。

[0188] 实施例7:PKCzeta uORF肽

[0189] 实施例2中讨论的序列比对描述了PKCzeta中的假定的uORF肽,在本文中也表示为SEQ ID NO:11。如所述对该肽及其变体(包括列出为SEQ ID NO:12的肽)的激酶活性进行了测试,作为该肽对细胞增殖和迁移的体外作用,以及其对肿瘤形成、记忆和学习的体内作用。

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽

<400> 4

Met Ala Ser Arg Gly Ala Leu Arg Arg Ala Leu Ser Pro Gly Leu Pro
1 5 10 15

Arg

<210> 5

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽

<400> 5

Met Ala Ser Arg Gly Ala Leu Arg Arg Ala Leu Ser Pro Gly Leu Pro
1 5 10 15

Arg Leu Leu His Leu Ser Arg Gly Leu Ala
 20 25

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽

<400> 6

Met Ala Ser Arg Gly Ser Leu Arg Arg Cys Leu Ser Pro Gly Leu Pro
1 5 10 15

Arg

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽

<400> 7

Met Ala Ser Arg Gly Thr Leu Arg Arg Cys Leu Ser Pro Gly Leu Pro

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg
 <210> 8
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多肽
 <400> 8
 Met Ala Ser Arg Gly Ser Leu Arg Arg Cys Leu Ser Pro Gly Leu Pro
 1 5 10 15
 Arg Leu Leu His Leu Ser Arg Gly Leu Ala
 20 25
 <210> 9
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多肽
 <400> 9
 Met Ala Ser Arg Gly Thr Leu Arg Arg Cys Leu Ser Pro Gly Leu Pro
 1 5 10 15
 Arg Leu Leu His Leu Ser Arg Gly Leu Ala
 20 25
 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多肽
 <400> 10
 Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5
 <210> 11
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 11
 Met Gly Pro Arg Glu Ala Arg Leu Gln Val His Gln Leu Gln Thr Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly Pro
 <210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多肽
 <400> 12

Met Gly Pro Arg Glu Ala Arg Leu Gln Val His Gln Leu Gln Thr Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 13
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多肽
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4) .. (4)
 <223> X是Rn, 其中n=0至17
 <400> 13

Arg Arg Arg Xaa

1			
---	--	--	--

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 14

Lys Lys Lys Arg Arg

1	5		
---	---	--	--

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 15

Pro Lys Lys Lys Arg Arg Val

1	5		
---	---	--	--

<210> 16

<212> PRT

<213> 亚洲象

<400> 21

Met Ala Gly Arg Gly Gly Leu Gly Arg Cys Phe Ser Pro Glu Leu Pro
 1 5 10 15
 Pro Leu Leu Arg Leu Pro Arg Gly Leu Ala
 20 25

<210> 22

<211> 26

<212> PRT

<213> 家畜狗

<400> 22

Met Thr Ser Gly Gly Gly Leu Gly Arg Cys Phe Ser Pro Glu Leu Arg
 1 5 10 15
 Pro Leu Arg Arg Leu Pro Arg Gly Leu Ala
 20 25

<210> 23

<211> 26

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 23

Met Ala Gly Arg Arg Gly Leu Gly Arg Cys Phe Phe Pro Glu Leu Pro
 1 5 10 15
 Pro Arg Pro Trp Gln Arg Arg Gly Leu Pro
 20 25

<210> 24

<211> 26

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 24

Met Ala Gly Arg Arg Gly Leu Gly Cys Cys Phe Ser Arg Glu Leu Pro
 1 5 10 15
 Pro Arg Ala Trp Leu Arg Arg Gly Leu Pro
 20 25

<210> 25

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 25

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val His Glu Val
 1 5 10 15

Lys Asp

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 26

Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val His Glu Val
 1 5 10 15

Lys Asn

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 27

Leu Phe Cys Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Val Val His Glu Val
 1 5 10 15

Lys Ser

<210> 28

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 28

Thr Met Asn Arg Arg Gly Ala Ile Lys Gln Ala Lys Ile His Tyr Ile
 1 5 10 15

Lys Asn

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 29

Pro Arg Lys Arg Gln Gly Ala Val Arg Arg Arg Val His His Gln Val
 1 5 10 15

Asn

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 34

gatccccggg ggtctccaac ccgaaatat ctcttctctg tcagagagat atttccgggt 60

tggagaccct ttttg 75

<210> 35

<211> 69

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 35

gatccccggc catcaagtga acggacataa ctctctgtca gattatgtcc gttcacttga 60

tggtttttg 69



图1A

1B

人类
恒河猴
大象
犬
小鼠
大鼠

```

MASRGALRKCLSPGLPRLHL SRGLA
MASRGALGRCLSPGLPRLQLSRGLA
MAGRGLGRCFSPGLPRLRLPRGLA
MTSGGLGRCFSPGLPRLRLPRGLA
MAGRGLGRCFSPGLPRLPRQRGLP
MAGRGLGCCFSRELPPRAWLRGLP

```

1C

常规的
新型的
非典型的

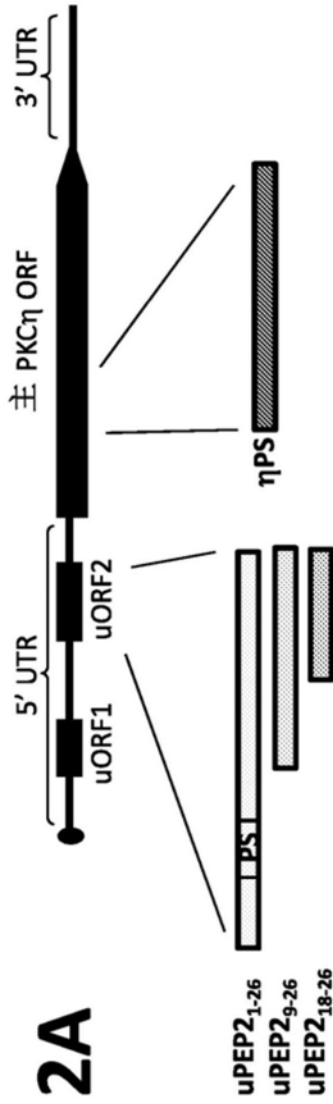
```

PKC α RFARKGALRQKNVHEVKD
PKC β RFARKGALRQKNVHEVKN
PKC γ LFCRKGALRQKNVHEVKS
PKC δ TMNRGAIKQAKIHYIKN
PKC ε PRKRGQAVRRVHHQVN-
PKC η TRKRQRAMRRVHHQIN-
PKC ζ SIYRRGARVWFKLYRAN-
PKC λ1 LHQRGAIKQAKVHHVKC

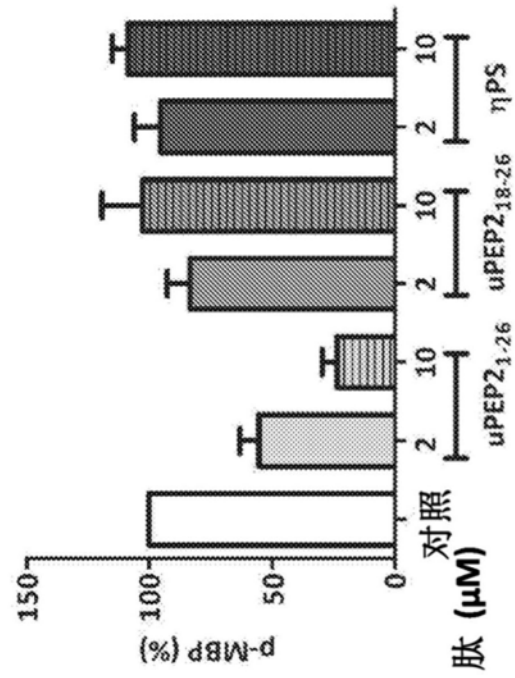
```

uORF2 - MASRGALRCLSPGLPR

图1B-1C



2C



# 样品	1	2	3	4	5
uPEP2(1-26) (μ M)	-	2	10	-	-
对照肽 (μ M)	-	-	-	2	10

p-MBP

HA

2B

图2A-2C

2D

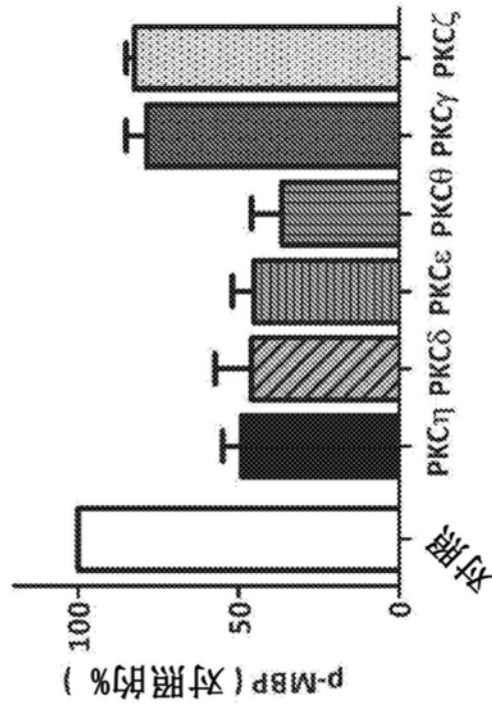


图2D

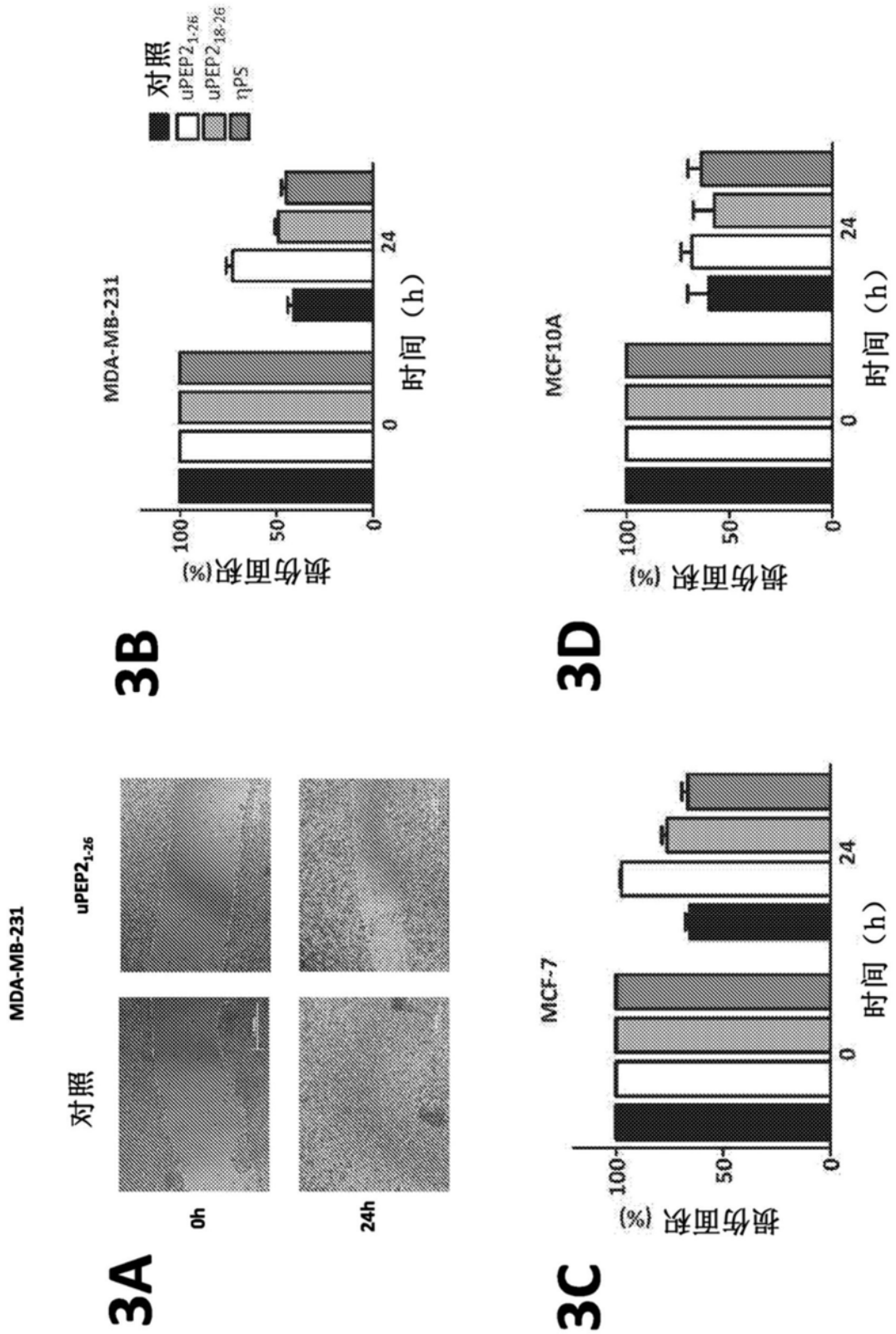


图3A-3D

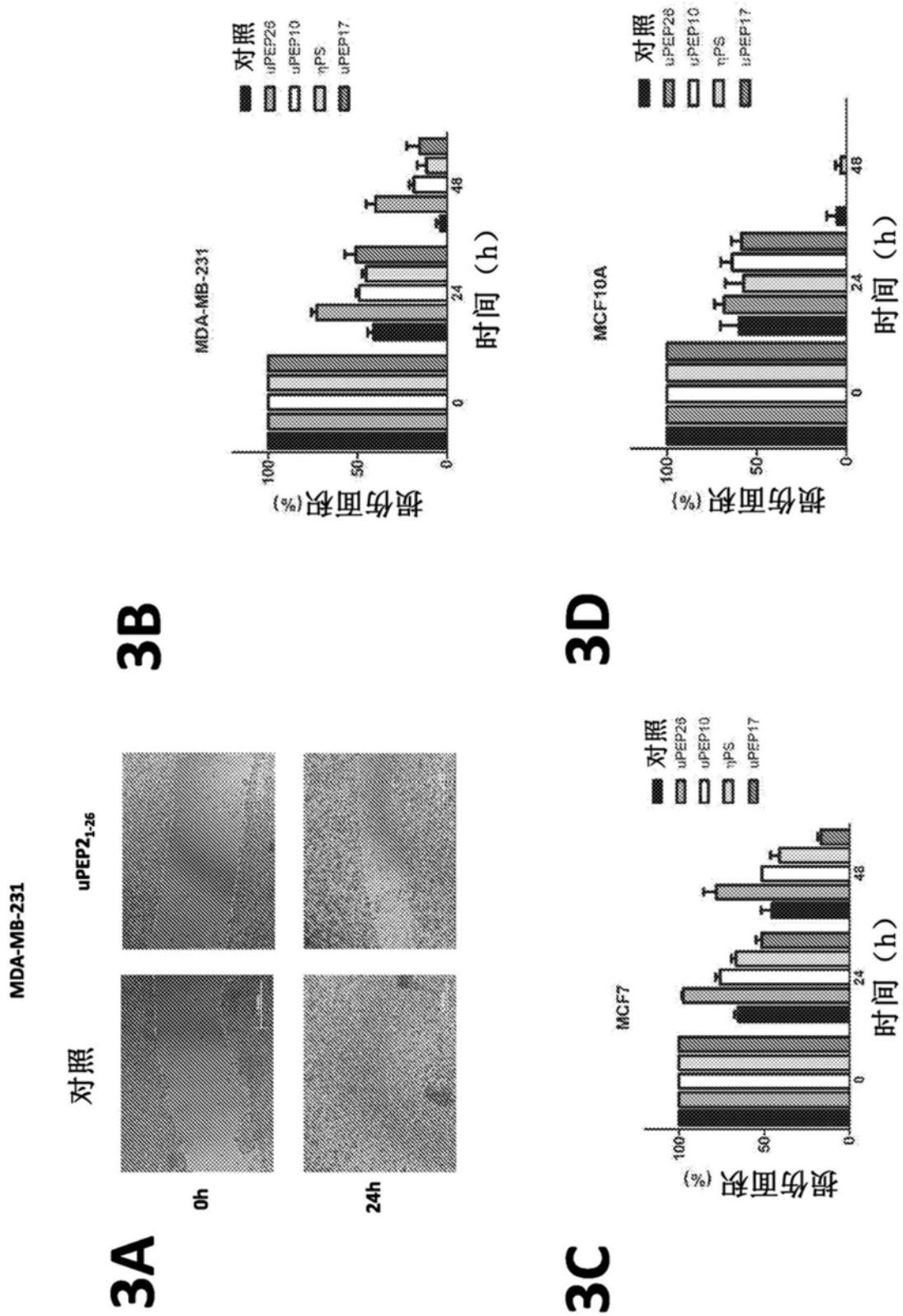


图3A-3D

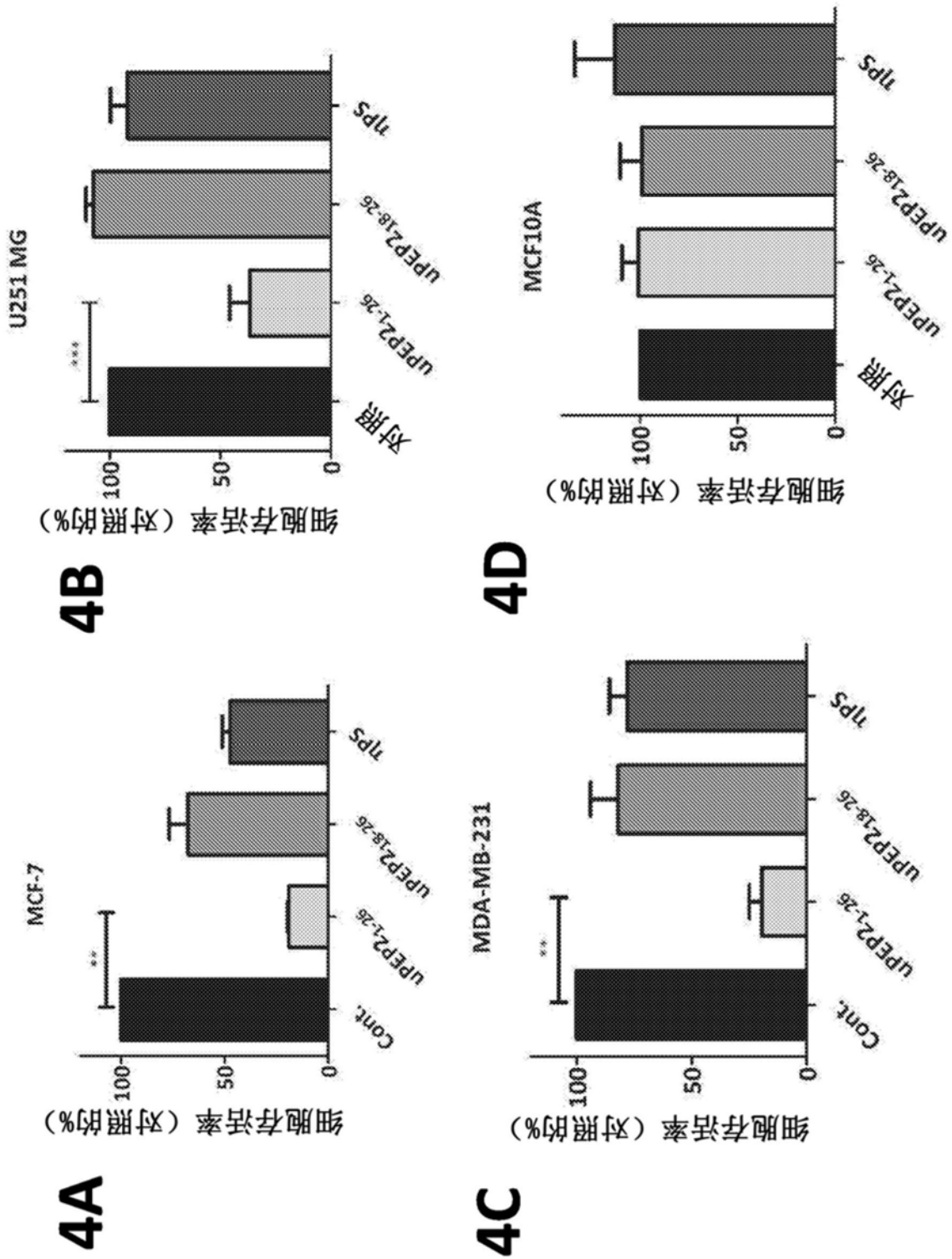


图4A-4D

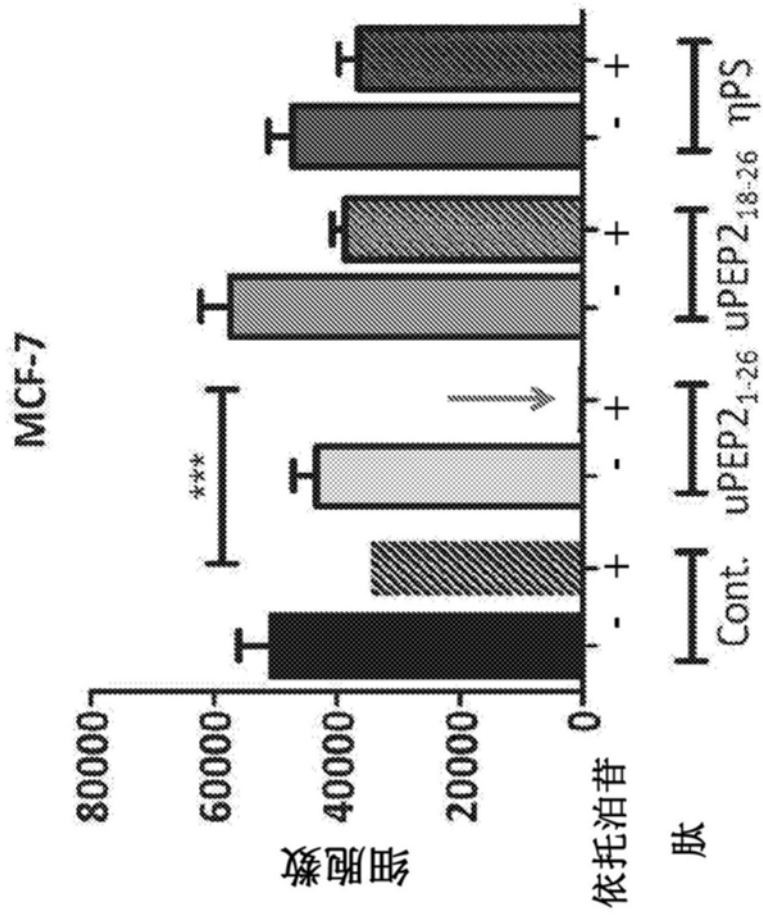


图5

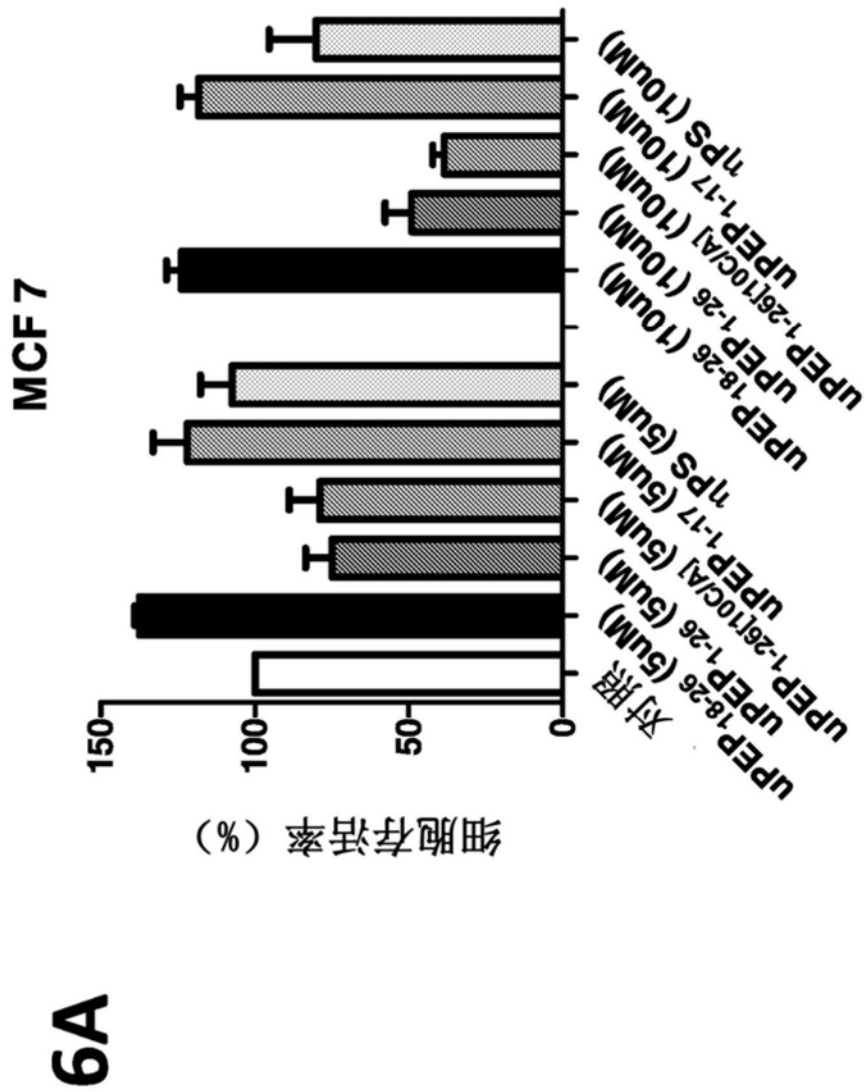


图6A

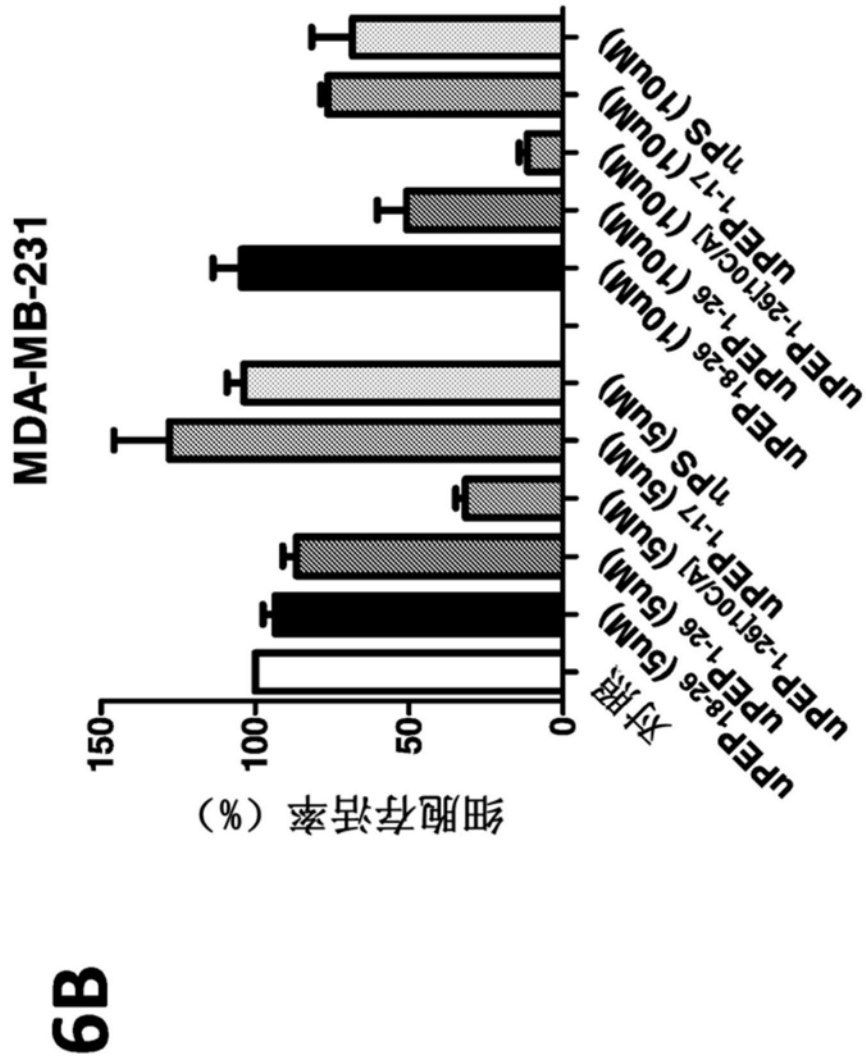
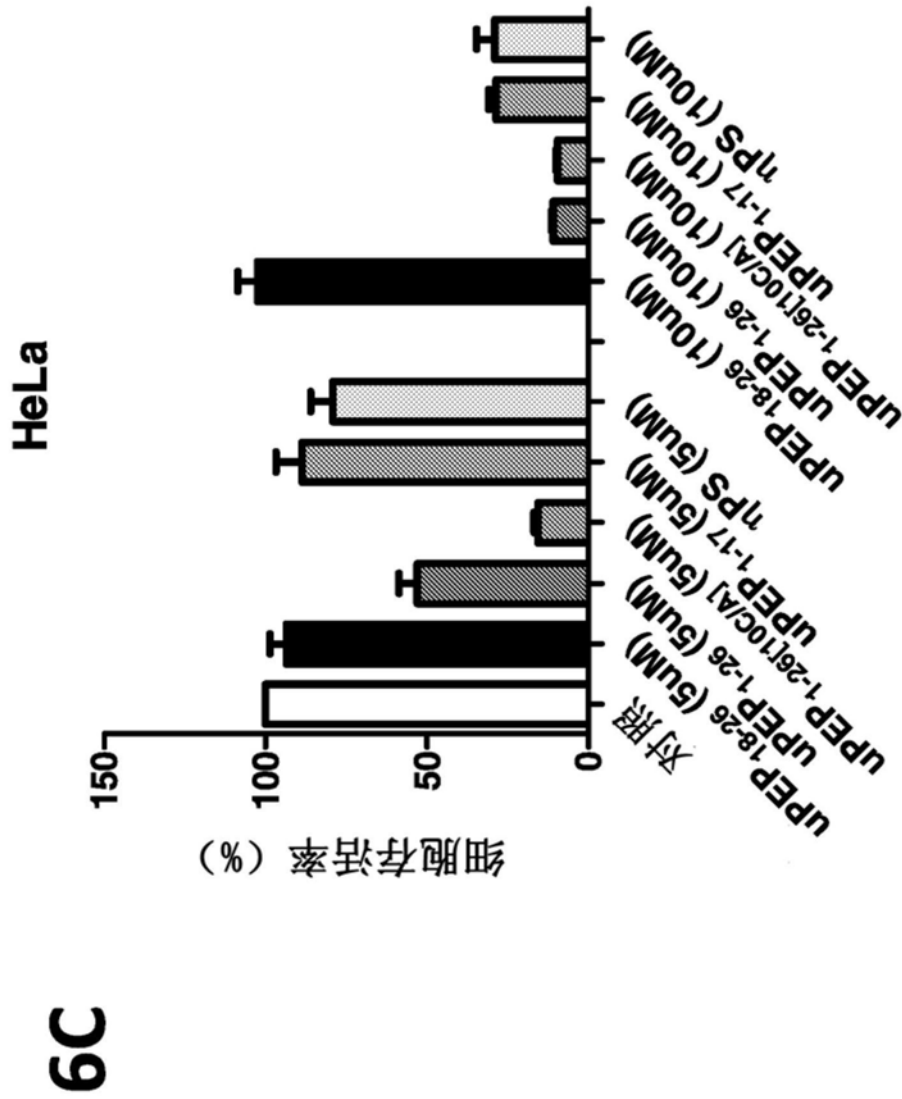


图6B



6C

图6C

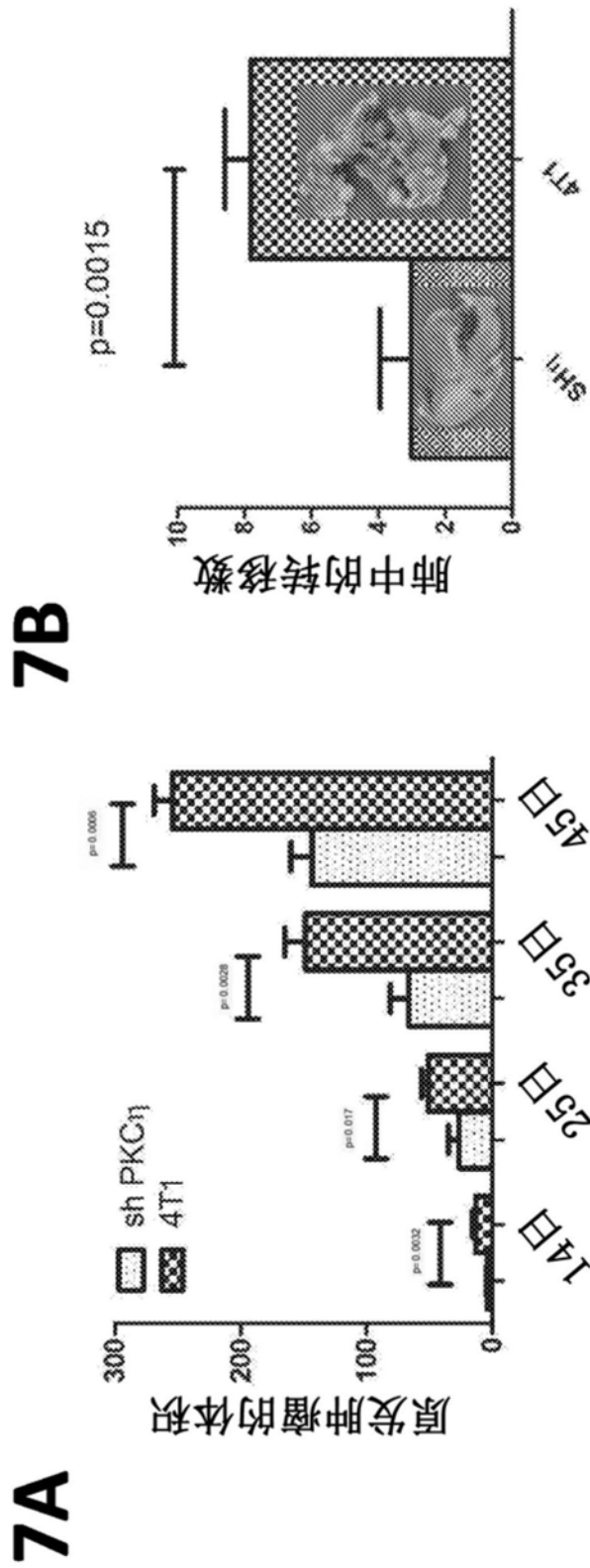


图7A-7B

8A

8B

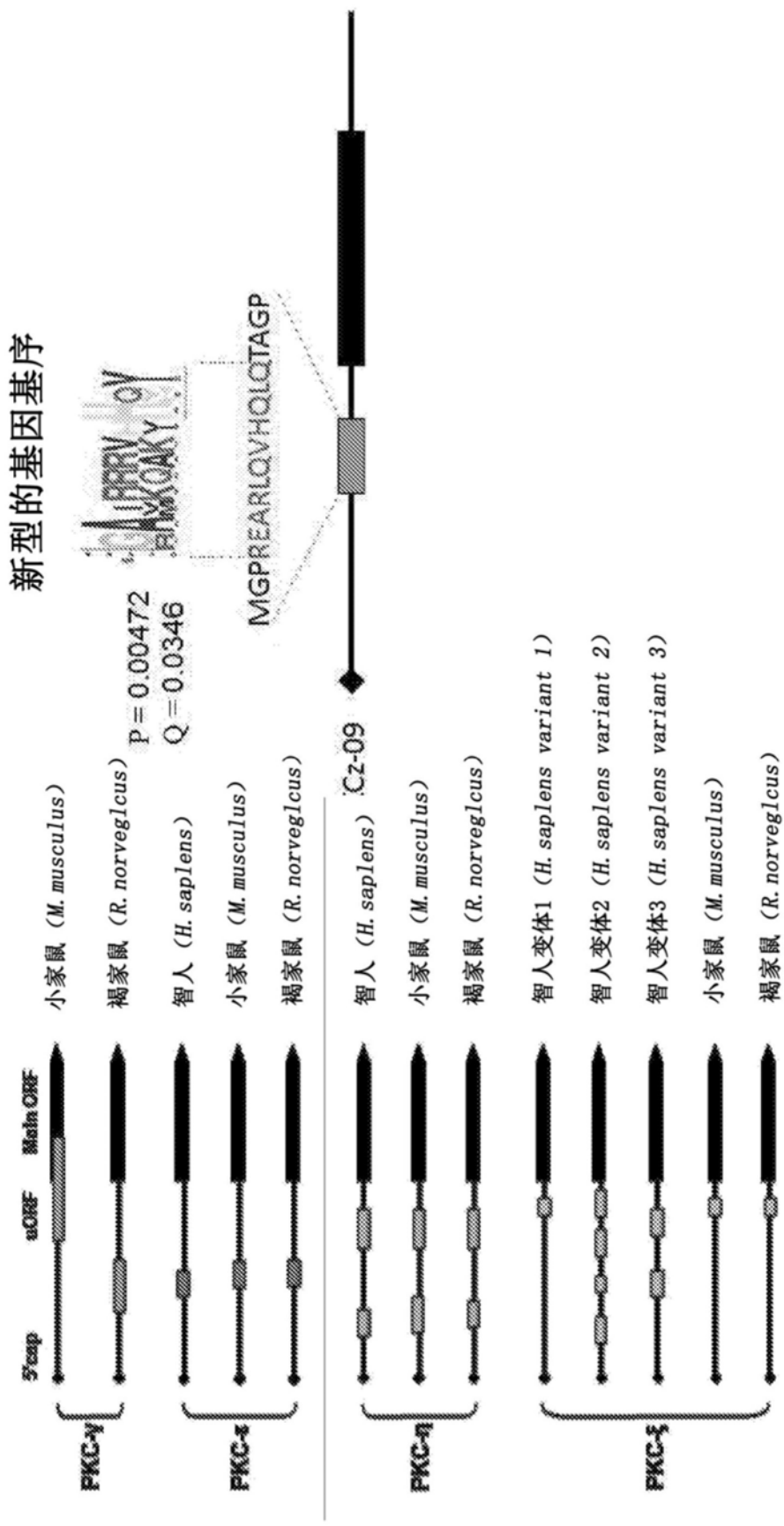


图8A-8B