

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A01N 43/04 (2006.01)

C08B 37/02 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880013441.8

[43] 公开日 2010年3月10日

[11] 公开号 CN 101668422A

[22] 申请日 2008.4.23

[21] 申请号 200880013441.8

[30] 优先权

[32] 2007.4.27 [33] US [31] 60/914,341

[32] 2008.4.22 [33] US [31] 12/107,098

[86] 国际申请 PCT/US2008/061200 2008.4.23

[87] 国际公布 WO2008/134329 英 2008.11.6

[85] 进入国家阶段日期 2009.10.26

[71] 申请人 阿费内基有限公司

地址 美国北卡罗来纳州

[72] 发明人 汉尼·格隆 大卫·达芬

道格·布奇特 埃利奥特·格鲁斯肯

迈克尔·莱米克

[74] 专利代理机构 中国商标专利事务所有限公司

代理人 万学堂

权利要求书 3 页 说明书 25 页 序列表 43 页

[54] 发明名称

用于促进药物活性剂在骨骼上定位的方法和组合物

[57] 摘要

提供了包含对骨骼具有结合特异性的一族肽的组合物，以及它们在制备包被组合物方面的用途。该包被组合物用于将药物活性剂递送至骨骼，并用于与骨移植、骨修复和骨相关疾病的方法。

1、一种包被组合物，包含：

至少一种结合至骨骼的结合功能区以及至少一种结合至药物活性剂的结合功能区，其中该至少一种结合至骨骼的结合功能区与该至少一种结合至药物活性剂的结合功能区连接；并且

其中该一种结合至骨骼的结合功能区包含一种肽，该肽：(i)包含约 5 个氨基酸至约 50 个氨基酸，(ii)还包含一种结合功能区或基序，该结合功能区或基序由在自该肽的 N 末端起头 5 个至头 10 个氨基酸范围内包含毗连氨基酸的序列内的 3 个或更多个大型芳香氨基酸残基构成；(iii)具有对骨骼的结合特异性；并且(iv)不具有以序列 Gly-Ile-Ala 为特征的结合胶原的功能区；并且

其中该至少一种特异结合至药物活性剂的结合功能区包含一种肽，该肽包含具有约 3 个氨基酸至约 50 个氨基酸的氨基酸序列，并且具有对药物活性剂的结合特异性。

2、权利要求 1 所述的包被组合物，还包含接头，该接头将该结合至药物活性剂的结合功能区与该结合至骨骼的结合功能区连接在一起。

3、权利要求 1 所述的包被组合物，其中该结合至骨骼的结合功能区包含具有氨基酸序列 SEQ ID NOs:1-45 的肽中的一条或多条肽。

4、权利要求 1 所述的包被组合物，其中该结合至骨骼的结合功能区包含 ZZXZZXXXXXXXXZ，其中 Z 是 F、W 或 Y，而 X 是任意氨基酸。

5、权利要求 1 所述的包被组合物，其中该结合至骨骼的结合功能区包含 ZXXZZXXXXXXXX，其中 Z 是 F、W 或 Y，而 X 是任意氨基酸。

6、权利要求 1 所述的包被组合物，其中该结合至药物活性剂的结合功能区包含具有氨基酸序列 SEQ ID NOs:48-125 的肽中的一条或多条肽。

7、权利要求 1 所述的包被组合物，还包含药物活性剂，该药物活性剂结合至该对药物活性剂具有结合特异性的结合功能区。

8、一种包含结合至骨骼的被覆层的组合物，该组合物为下式的组合物：

X_1 -J- X_2 -P

其中 X_1 包含一种肽，该肽：(i)包含约 5 个氨基酸至约 50 个氨基酸；(2)包含一种功能区或基序，该功能区或基序由在自该肽的 N 末端起头 5 个至头 10 个氨基酸范围内包含毗连氨基酸的序列内的从酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和它们的组合中选出的 3 个或更多大型芳香氨基酸残基构成；(iii)具有对骨骼的结合特异性；并且(iv)不具有以序列 Gly-Ile-Ala 为特征的结合胶原的功能区；

J 不存在，或为一接头。

X_2 不存在，或包含一种肽，该肽包含具有约 3 个氨基酸至约 50 个氨基酸的氨基酸序列，并且具有对药物活性剂的结合特异性；

P 不存在，或包含药物活性剂；

其中，如果 X₂ 和 P 中任一者或更多种不存在，则 X₁ 包含一种肽，该肽包含具有 SEQ ID NOs:1-47 中任一条序列的氨基酸序列，或者包含与 SEQ ID NOs:1-45 中任一条序列具有 95%同一性的氨基酸序列。

9、权利要求 8 所述的组合物，其中该接头存在，并且为同型双官能接头或异型双官能接头。

10、权利要求 8 所述的组合物，其中该接头存在，并且为合成聚合物或天然聚合物。

11、权利要求 8 所述的组合物，其中该结合至骨骼的肽包含具有氨基酸序列 SEQ ID NOs:1-45 的肽中的一条或多条肽，或者包含具有与 SEQ ID NOs:1-45 中任一条序列具有 95%同一性的氨基酸序列的肽中的一条或多条肽。

12、权利要求 8 所述的组合物，其中结合至骨骼的肽包含 ZZXZZXXXXXXXXXZ，其中 Z 是 F、W 或 Y，而 X 是任意氨基酸。

13、权利要求 8 所述的组合物，其中结合至骨骼的肽包含 ZXXZZXXXXXXXX，其中 Z 是 F、W 或 Y，而 X 是任意氨基酸。

14、权利要求 8 所述的组合物，其中结合至药物活性剂的肽包含具有氨基酸序列 SEQ ID NOs:48-125 的肽中的一条或多条肽。

15、权利要求 8 所述的组合物，还包含药物活性剂，该药物活性剂结合至与该药物活性剂结合的肽。

16、一种增强骨形成、骨修复和成骨作用中的一种或多种作用的方法，包括将权利要求 1 的包被组合物施敷至骨骼或骨植入物。

17、一种增强骨形成、骨修复和成骨作用中的一种或多种作用的方法，包括将权利要求 8 的组合物施敷至骨骼或骨植入物。

18、一种亲骨肽，包含约 5 个至约 50 个氨基酸；在该肽氨基酸序列的 N-末端半区中含五个毗连氨基酸的氨基酸序列中包含三个或更多个芳香氨基酸残基，包括 Phe、Try 和 Tyr 中的一种或多种；具有对骨骼的结合特异性；并且不具有用于结合胶原的由 Gly-Ile-Ala 构成的序列。

19、权利要求 18 所述的亲骨肽，其中该肽包括一种或多种修饰，所述修饰包括 N-末端基团、C-末端基团、保守性置换或它们的组合。

20、权利要求 18 所述的亲骨肽，其中该氨基酸序列包含 SEQ ID NOs:1-45 中的一条序列，或者包含与 SEQ ID NOs:1-45 中任一条序列具有 95%同一性的氨基酸序列。

21、一种核酸分子，包含编码从具有氨基酸序列 SEQ ID NOs:1-45 的一组肽中选出的肽的核苷酸序列。

22、一种载体，包含编码从具有氨基酸序列 SEQ ID NOs:1-45 的一组肽中选出的肽的核酸分子。

23、一种递送系统，用于将药物活性剂递送至骨骼，该递送系统包含一种组合物，该组合物由第一结合功能区、第二结合功能区和用于将该组合物施敷至骨骼的接触系统构成；其中该第一结合功能区包含一种肽，该肽：(i)包含约 5 个氨基酸至约 50 个氨基酸，

(ii)包含一种功能区或基序，该功能区或基序由在自该肽的 N 末端起头 5 个至头 10 个氨基酸范围内包含毗连氨基酸的序列内的从酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和它们的组合中选出的 3 个或更多大型芳香氨基酸残基构成；并且(iii)具有对骨骼的结合特异性；该第二结合功能区包含一种结合至药物活性剂的肽。

24、权利要求 23 所述的递送系统，其中骨骼包括骨植入物。

25、权利要求 23 所述的递送系统，其中该第二结合功能区结合至 BMP。

26、权利要求 23 所述的递送系统，其中该第二结合功能区结合至细胞。

27、权利要求 23 所述的递送系统，其中该第二结合功能区结合至维生素。

28、权利要求 23 所述的递送系统，其中该第二结合功能区结合至医疗药。

29、权利要求 23 所述的递送系统，其中该第二结合功能区结合至激素。

30、权利要求 23 所述的递送系统，其中该第二结合功能区结合至核酸分子。

31、权利要求 23 所述的递送系统，其中该接触系统包含一种含该组合物的液体，用于将骨骼表面或骨植入物表面浸渍在该液体中。

32、权利要求 23 所述的递送系统，其中该接触系统包含一种含该组合物的干粉料，用于制备与骨骼表面或骨植入物表面接触的固体、粉料、糊剂、填充物、粘合料、凝胶、多孔材料、植入物、移植物以及它们的组合。

33、施敷了权利要求 1 所述包被组合物的骨骼。

34、施敷了权利要求 7 所述包被组合物的骨骼。

35、施敷了权利要求 8 所述组合物的骨骼。

36、施敷了权利要求 15 所述组合物的骨骼。

37、施敷了权利要求 18 所述亲骨肽的骨骼。

38、权利要求 33 所述的骨骼，包含骨植入物。

39、权利要求 34 所述的骨骼，包含骨植入物。

40、权利要求 35 所述的骨骼，包含骨植入物。

41、权利要求 36 所述的骨骼，包含骨植入物。

42、权利要求 37 所述的骨骼，包含骨植入物。

用于促进药物活性剂在骨骼上定位的方法和组合物

技术领域

这里描述的发明主题涉及将药物活性剂在骨骼上定位的组合物和方法。具体而言，发明主题致力于在涉及骨移植、骨修复和骨相关疾病的组合物和方法中使用的亲骨肽(bone-tropic peptides)。

背景技术

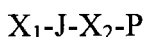
在脊椎动物身体中，骨骼是一种由嵌入到羟基磷灰石钙质晶体结构中的胶原纤维形成的结缔组织。创伤、感染、癌、变性疾病或者外科手术都会危及骨骼的完整性。

脱钙骨基质(DBM)作为骨移植材料已被广泛应用于临床实践。但是，DBM 要作为成骨材料其能力相对不足。DBM 诱导成骨能力的缺乏被看做是限制该材料成为骨骼代用品的因素。

发明内容

本发明的一个实施方案包括包被组合物。该包被组合物包括至少一种特异结合至骨骼的结合功能区以及至少一种特异结合至药物活性剂的结合功能区。该至少一种特异结合至骨骼的结合功能区与该至少一种特异结合至药物活性剂的结合功能区连接。一种特异结合至骨骼的结合功能区包含一种肽。该肽包含约 5 个氨基酸至约 50 个氨基酸，以及一种结合功能区或基序，该结合功能区或基序由在自该肽的 N 末端起头 5 个至头 10 个氨基酸范围内包含毗连氨基酸的序列内的 3 个或更多大型芳香氨基酸残基构成。该肽还具有对骨骼的结合特异性。该肽不具有以序列 Gly-Ile-Ala 为特征的结合胶原序列细胞的功能区。该至少一种特异结合至药物活性剂的结合功能区包含一种肽，该肽包含具有约 3 个氨基酸至约 50 个氨基酸的氨基酸序列，并且具有对药物活性剂的结合特异性。

本发明的另一个实施方案包括一种下式的组合物：



其中 X_1 包含一种肽，该肽(i)包含约 5 个氨基酸至约 50 个氨基酸；(ii)包含一种功能区或基序，该功能区或基序由在自该肽的 N 末端起头 5 个至头 10 个氨基酸范围内包含毗连氨基酸的序列内的从酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和它们的组合中选出的 3 个或更多大型芳香氨基酸残基构成；(iii)具有对骨骼的结合特异性；并且(iv)不具有以序列 Gly-Ile-Ala 为特征的结合胶原衍生细胞的功能区。

J 不存在，或为一接头。

X_2 不存在，或包含一种肽，该肽包含具有约 3 个氨基酸至约 50 个氨基酸的氨基酸序列，并且具有对药物活性剂的结合特异性。

P 不存在，或包含药物活性剂，其中，如果 X_2 和 P 中任一者或更多种不存在，则 X_1 包含一种肽，该肽包含具有 SEQ ID NOs:1-45 中任一条序列的氨基酸序列，或

者包含与 SEQ ID NOs:1-45 中任一条序列具有 95%同一性的氨基酸序列。

另一个实施方案包含一种亲骨肽。该亲骨肽在含五个毗连氨基酸的氨基酸序列中包含三个或更多个芳香氨基酸残基,包括 Phe、Try 和 Tyr 中的一种或多种,其中该亲骨肽具有对骨骼的结合特异性,并且不具有以序列 Gly-Ile-Ala 为特征的用于结合胶原的序列。

另一个实施方案包括一种递送系统,用于将药物活性剂递送至骨骼或骨植入物,该递送系统包括:肽和接触系统,该肽包含结合至骨骼的第一结合功能区和结合至药物活性剂的第二结合功能区,其中该第一结合功能区包含具有 SEQ ID NOs:1-45 的肽中的一条或多条肽,该接触系统用于使该肽与骨骼或含骨骼的植入物接触。

具体实施方式

本专利申请中描述了多个实施方案,它们仅为说明目的而提出。所描述的实施方案无论如何不用于也并不打算用于进行限制。由所公开的内容明显可知,以下所描述的发明可广泛适用于多个实施方案。本领域的技术人员将会认识到所公开发明的实施可以具有各种修饰或变化,例如结构上和化学上的修饰。尽管所公开的发明的特定特征以参考一种或多种特定实施方案和/或附图的方式描述,但应理解为,除非另有明确说明,这些特征并不限于在所述一种或多种特定实施方案或附图中以参考它们所描述的方式使用。

本公开既不是所有实施方案的文字描述,也不是必须存在于所有实施方案中的本发明特征的罗列。

在本专利申请首页的一开始描述的发明名称以及在本专利申请结尾描述的摘要无论如何都不能认为是限制所公开发明的范围。

发明的主题包括使用具有对骨骼具有结合特异性的一条或多条肽——在此还被命名为“亲骨肽”——定位于骨骼的方法和组合物。对于某些实施方案来说,结合特异性针对在骨骼中发现的 I 型胶原。出人意料的是这些肽中的一条或多条可自己结合至骨骼并作为药物活性剂促进骨形成、骨修复和/或成骨作用中的一种或多种。此外,某些肽的实例连接至一种或多种药物接受剂,形成本发明的包被组合物的实例,用于将该一种或多种药物活性剂递送或定位至骨骼。

在一个实施方案中,包被组合物包含肽。对于某些实施方案来说,包被组合物施敷至骨骼上,在骨表面上形成包被层。对于另外的实施方案来说,包被组合物施敷至骨植入物上。被覆的骨表面或植入物表面补充和/或促进自身产生的药物活性剂——例如由接受了包被骨骼或包被骨植入物的个体产生的那些——的附着。包被组合物的实例促进骨形成、骨修复和/或成骨作用中的一种或多种。

发明的主题还包括具有共有结构和功能的一族肽。这种肽包括富含大型芳香氨基酸残基——包括 Phe、Try 和 Tyr 中的一种或多种——的氨基酸序列。该肽具有对骨骼的结合特异性。这一族肽不具有另如美国第 6,818,620 号专利所描述的结合胶原序列细胞的功能区,例如 Gly-Ile-Ala。这一族肽的特征在于其自身独特的功能区(有助于对骨骼的结合性和亲骨性),其在包括该肽的氨基酸序列的 5 个毗连氨基酸的序列内包括 3 个或更多大型芳香氨基酸残基。在本发明的该实施方案中,还包括编码这些肽的核苷酸序列和载体。表 1 中示出了该族中肽的实例的列表以及它们的氨基酸序列。

表 1

SEQ ID NO:	亲骨肽 氨基酸序列 (单字母编码)
1	FYSIFFPQMGGSM
2	FSGWFLPWEGRSE
3	FYWPSFNNSGNSLW
4	FSWFYPSQLWME
5	IFSTWNPWSPYSV
6	FSWFGSHLLSGGS
7	FATFFGGSVVEKFW
8	WNYGDVGRWWDWQ
9	WWGFWNGSAAPVW
10	SLLYNWLDNTRQMFLPES
11	WCWVGLGSGCAGGA AVG
12	WSPDVL RWPWWASGSSE
13	FWSAD FSAEDASAWWGW
14	FGS W W W G S G A A S
15	FSPDFLSSWWQTHAGRF
16	SFFSPYSAFSSWVESAR
17	WSSFFPLGFSSWSGSVP
18	FSFSSLPAWSSFWPTST
19	FSFLSSAVERIYGA
20	TWQSYLDLWGWTPTPSL
21	WPGSGWWWSEGLQRREV
22	WPMPWWSEWASLHGGKW
23	WWPHVSGVYGSLPWGPG
24	LGTFWSSVWRGVDAGGE
25	VGWGDWWKSGSVWQGAL
26	FGHFEWPVLGQWK
27	FLSASMPYLQAWA
28	FSYFSSPSTWWQW
29	SSMFKDFDSL VKSWSGRFS
30	FDIDWSGMRSWWG
31	SFDLSAFGSLWDRW
32	FDRWGF GAGAWWDSVAA
33	VAVASV GAFWSGLSGWA
34	FSWSSLSDSFGWGSSFS
35	SLPALPWGFPSWQQGWL
36	FFTHFYPPYDVRPHPPA
37	WDFRSLRDWWPPAPSL S
38	WLSGWSAGWGSVA APEG
39	WSNGAWAKWWGV AEEVG
40	SIFSTWNPWSPYSVSRGSSGK

41	SWWGFWNGSAAPVWSRGSSGK
42	SFGSWWWGSGAASSRGSSGK
43	SLGTFWSSWVRGVDAGGESRGSSGK
44	SFDIDWSGMRSWWGSRGSSGK
45	SWDFRSLRDWWPPAPSLSSRGSSGK

本发明的另一个实施方案包括一种式 I 的组合物:

X_1 -J- X_2 -P

X_1 为一种肽, 对于某些实施方案, 该肽包含约 5 至约 50 个氨基酸的氨基酸序列, 对于另一些实施方案, 该肽包含约 10 个氨基酸至约 25 个氨基酸的氨基酸序列, 对于再一些实施方案, 该肽包含约 10 个氨基酸至约 15 个氨基酸的氨基酸序列。该肽富含 Phe、Trp 和 Tyr 中的一种或多种大型芳香氨基酸残基。对于某些实施方案, 该肽包括由 3 个或更多大型芳香氨基酸残基构成的功能区或基序, 这些氨基酸残基位于包括在自该肽的氨基酸序列的 N 末端起头 10 个毗连氨基酸的序列内。该肽的实例具有对骨骼的结合特异性, 并且不具有以序列 Gly-Ile-Ala 为特征的结合胶原序列细胞的功能区。

J 不存在, 或为一接头。

X_2 不存在, 或对于某些实施方案来说为一种肽, 对于某些实施方案来说, 该肽包含具有约 3 个氨基酸至约 50 个氨基酸的氨基酸序列, 对于另一些实施方案来说, 该肽包含具有约 10 个氨基酸至约 25 个氨基酸的氨基酸序列, 对于再一些实施方案来说, 该肽包含具有约 10 个氨基酸至约 15 个氨基酸的氨基酸序列。 X_2 的实例具有对药物活性剂的结合特异性。

P 不存在, 或为药物活性剂。

在 J 不存在而 X_2 存在的实施方案中, X_2 与 X_1 共价连接。在 J 和 X_2 都不存在的实施方案中, P 要么与 X_1 共价连接, 要么与 X_1 非共价连接。在 X_2 和 P 都存在的实施方案中, P 与 X_2 非共价连接。在一个实施方案中, X_1 包含从 SEQ ID NOs:1-45 中选出的氨基酸序列, 或包含与 SEQ ID NOs:1-45 有 1~3 个氨基酸差异但保留了对骨骼的结合特异性的序列。

本发明的其他实施方案包括用肽和/或组合物的实例包被骨骼表面的方法, 这样与不用该肽和/或组合物处理的骨骼相比, 骨形成、骨修复和/或成骨作用中的一种或多种会增强。还包括一种制备结合了肽和/或组合物实例的骨骼的方法。

描述于此的实施方案包括对骨骼具有结合特异性的肽。所述实施方案还包括一种包含肽的实例的包被组合物。所述实施方案还包括骨骼的被覆层、被覆骨骼的方法实例以及用这些组合物被覆的骨骼。

描述于此的实施方案包括递送系统的实例, 其具有对骨骼递送、定位、恢复和/或供养一种或多种药物活性剂中的一种或多种能力, 用于促进骨形成、骨修复和/或成骨作用中的一种或多种。这种递送系统实例例如对于期望具有增强骨形成的作用的疾病或状况是有用的。

定义部分

描述于此的与实施方案的生物分子有关的众多术语在说明书和权利要求书中

通篇使用。这些术语包括如下内容。

在此使用的术语“骨”、“骨骼”指的是一种或多种物质，包括：自身移植骨，同种异体移植骨，异种移植骨，皮层骨，松质骨，连续骨，脱钙骨，不连续骨，断骨片，骨碎片，粒状骨，环状骨，骨磨片，矿化骨，脱钙骨基质，含 I 型胶原的骨代用品，含 I 型胶原的骨复合物，含 I 型胶原的骨植入物，呈通常与骨结构相关的构象的或在用于供养骨生长的基质中的 I 型胶原纤维(后者为骨修复性的)，以及它们的组合。骨骼可为任意合适的形态，例如包括固体、粉料、糊剂、填充物、粘料、凝胶、多孔材料、植入物、移植物、骨粘固粉(例如用脱钙骨基质和/或无机骨浸渍的骨粘固粉)，以及它们的组合。一种优选类型的骨或其组合可根据本发明使用，排除优选类型的骨或其组合之外的类型的骨或其组合。

术语“一个实施方案/实例”、“实施方案/实例”、“一个或多个实施方案/实例”、“某些实施方案/实例”等表示“一个或多个(但非全部)所公开的实施方案/实例”，除非另有明确说明。

术语“该发明”、“本发明”等表示“本发明的一个或多个实施方案”。

在描述一个实施方案时提到的“另一个实施方案”并不意味着所提到的实施方案与另一个实施方案(例如在所提到的实施方案之前提到的一个实施方案)之间彼此独立，除非另有明确说明。

术语“包括”、“包含”及其时态变化表示“包括但不限于”，除非另有明确说明。

术语“一种”、“一个”和“该”表示“一个或多个”，除非另有明确说明。

术语“在此”表示“在本申请中，包括可以引用方式所包括的任何内容”，除非另有明确说明。

当词组“至少一个”修饰若干事物(例如事物的列表)时，表示这些事物中一个或更多的任意组合，除非另有明确说明。

在此使用的术语“有效量”指的是足以(a)介导包被组合物结合至骨骼的至少一个表面以形成被覆层的包被组合物实例的量，和足以(b)促进药物活性剂的附着的包被组合物实例的量。

在此使用的术语“个体”指的是人类或动物。

在此使用的术语“药物活性剂”指的是一组试剂中的一种或更多种试剂，该组试剂包括生长因子、细胞、医疗药、激素、维生素和编码前述物质中任一种的核酸实例。参与骨形成的激素包括但不限于甲状旁腺激素，即 PTH，包括例如 PTH 1 至 PTH 34，以及生长激素。用于治疗或预防骨骼疾病或病症的医疗药包括但不限于化学治疗剂，例如氨甲喋呤、环磷酰胺、红豆杉醇、阿霉素，或其他抗肿瘤药、抗微生物药，例如抗真菌剂和/或抗细菌剂，抗生素，类固醇或非类固醇类消炎药，糖皮质类固醇，以及能影响基因调控的核酸分子如 DNA，反义 RNA，干扰 RNA 如 RNAi、siRNA，以及其他 RNA 分子或 RNA 片段，如 miRNA。用于骨形成或预防骨骼疾病或病症的维生素包括但不限于维生素 D 以及维生素 D 衍生物，如 1,25-二羟基维生素 D₃、1 α -羟基维生素 D₂，维生素 A，维生素 C，以及维生素 K 如维生素 K₂。优选的药物活性剂可根据本发明使用，排除优选的药物活性剂之外的药物活性剂。

当术语“药物可接受载体”在此意图用于说明书和权利要求书时，指一种载体介质，其是用于给药和/或施用本发明的化合物或组合物的合适支持介质。药物可接

受载体包括添加它的肽或包被组合物实例。

在此使用的术语“细胞”指的是一种或多种用于在此描述的发明实施方案的细胞或细胞类型，并且可包括干细胞、软骨细胞、骨母干细胞、间充质干细胞、骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、骨膜干细胞、骨髓内皮细胞、基质细胞、脂肪组织前体细胞以及它们的组合。

在此使用的术语“生长因子”指的是一种或多种用于在此描述的实施方案的生长因子或细胞因子，并且可包括但不限于骨形态发生蛋白，即 BMP，包括 BMP 家族，例如 BMP-2、BMP-2A、BMP-2B、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9、BMP-10、BMP-11、BMP-12、BMP-13、BMP-14、BMP-15、BMP-16、BMP-17 和 BMP-18，转化生长因子 β ，即 TGF- β ，转化生长因子 α ，即 TGF- α ，血管内皮细胞生长因子，即 VEGF，包括其变体，表皮生长因子，即 EGF，成纤维细胞生长因子，如碱性成纤维细胞生长因子、酸性成纤维细胞生长因子、FGF-1 至 FGF-23，表皮生长因子，即 EGF，胰岛素样生长因子(I 或 II)，白细胞介素-I，干扰素，肿瘤坏死因子，神经生长因子，神经营养蛋白，血小板源性生长因子，即 PDGF，肝素结合生长因子，即 HBGF，肝细胞生长因子，角质形成细胞生长因子，巨噬细胞集落刺激因子，生长分化因子，如 GDF4 至 GDF8，它们的亚型，它们的生物活性类似物，以及它们的组合。通常，生物类似物的氨基酸序列与衍生出该类似物的肽生长因子的氨基酸序列相比，具有约 1%至约 25%的氨基酸置换。对于长度短于或等于 50 个氨基酸的肽来说，通常其生物活性类似物与衍生出该类似物的肽的氨基酸序列相比，具有 1~10 个氨基酸的变化。

术语“足以用于结合的时间”指的是足以与在此描述的结合功能区特异性结合的时间长短。

在此使用的术语“特异结合”或“结合特异性”等类似术语可互换使用，指的是一种肽具有结合亲和力的能力，该亲和力对于选择用来结合的目标分子——“目标表面材料”——来说大于对除了该目标分子或目标表面材料之外的另一分子或表面材料的亲和力。例如，结合特异性为对其他基质的异质性群体中一给定基质的亲和力，其大于例如可归因于非特异性吸附的亲和力。举例来说，当一种肽显示出对骨骼(包括骨骼的一成分，例如 I 型胶原)优先结合——与结合至未在骨骼中发现的另一生物成分相比，或与用作骨代用基质的材料如包括 β 磷酸三钙的材料相比——时，该肽具有对骨骼的结合特异性。这种优先结合取决于该肽和/或材料(对其具有结合特异性)上或之内的特定构象、结构和/或电荷。

术语“骨形成”指的是一种物质诱发骨生长的能力。具体而言，骨形成主要用于骨生长的细胞类型的生物介导的补充和分化。

术语“骨修复”指的是一种物质供给或引导骨生长的能力。

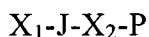
术语“成骨作用”指的是例如借助于成骨细胞活性的骨形成的过程。

在此使用的术语“肽”指的是一条氨基酸链，其长度不短于约 3 个氨基酸并且不长于约 100 个氨基酸残基，其中该氨基酸链包括天然氨基酸、合成氨基酸、遗传编码氨基酸、非遗传编码氨基酸以及它们的组合。但是，从此处“肽”的范围和定义中特别排除的是抗体。对于某些实施方案来说，该肽包括具有长度不短于 7 个氨基酸且不长于约 50 个氨基酸的毗连序列的结合功能区，以及该肽的多聚体，即，使用本领域已知的方法将多于一条的肽连接到支化的高分子接头。某些实施方案的

肽通过化学合成、重组表达、大分子的生化或酶促断裂、大分子的化学切割的方法或前述的组合方法制得，或通过本领域的其他方法制得，对于某些实施方案来说，还要进行分离。术语“分离”表示该肽基本上不含有未成为该肽本身完整结构的一部分的那些成分。当通过重组技术制备时，分离的肽基本上不含细胞材料或培养基，或者当通过化学合成或使用化学或生化方法制备时，分离的肽基本上不含化学前体或其他化学物质。优选的肽可根据本发明使用，排除优选的肽之外的肽。

在此使用的术语“接头”指的是一化合物或部分，其作为分子桥连接至少两个不同的分子，例如连接至少一条对骨骼具有结合特异性的肽与至少一条对药物活性剂具有结合特异性的肽。因此，例如，接头的一部分结合至至少一条对骨骼具有结合特异性的肽，而接头的另一部分结合至至少一条对药物活性剂具有结合特异性的肽。对于某些实施方案来说，两条肽以分步的方式连接到接头上，或同时连接到接头上，以形成在此描述的包被组合物的实例。对于接头的尺寸和含量没有特别的限制，只要其满足作为分子桥的目的，并且包被组合物中每一条肽的结合特异性基本保留即可。

在此使用的术语“包被组合物”指的是包含上面描述的式 I 的组合物：



在某些实施方案中，其中包被组合物包括对骨骼具有结合特异性的肽 X_1 ，其连接到对药物活性剂具有结合特异性的肽 X_2 ，这些肽通过物理、化学、合成或生物的方法，以每一条肽保留了结合各自分子(对于该分子，该肽具有结合特异性)的功能的方式连接在一起。这种连接包括形成多聚分子，其包括两条或更多条对骨骼具有结合特异性的肽，两条或更多条对药物活性剂具有结合特异性的肽，以及它们的组合。举例来说，使用肽化学的常规试剂和方法，可以通过支链-支链的键将两条肽连接在一起，在一个实施方案中，当所述肽中的每一条都具有支链胺如赖氨酸的 ϵ 胺时，支链-N 末端的键(例如将一条肽的 N 末端的胺与另一条肽的支链胺连接)，支链-C 末端的键(例如将一条肽的 C 末端化学部分(对于某些实例来说为羧基)与另一条肽的支链胺连接)，N 末端-N 末端的键，N 末端-C 末端的键，C 末端-C 末端的键或它们的组合。在合成或重组表达中，通过将两条肽合成或表达为一条单一肽，从而将对骨骼具有结合特异性的肽与对药物活性剂具有结合特异性的肽直接连接在一起。对于某些实施方案来说，两条或更多条肽的连接是通过接头形成包被组合物。

包被组合物的实例包括至少一条对骨骼具有结合特异性的肽，其量能有效介导该包被组合物至待被覆的骨骼表面的结合。因此，提供该组合物用来将药物活性剂瞄准并定位至骨骼。在一个实施方案中，包被组合物包括至少一条对骨骼具有结合特异性的肽以及至少一条对药物活性剂具有结合特异性的肽，其中该至少一条对骨骼具有结合特异性的肽以及该至少一条对药物活性剂具有结合特异性的肽连接在一起。在另一个实施方案中，包被组合物包括至少一条对骨骼具有结合特异性的肽以及至少一条对药物活性剂具有结合特异性的肽，其中该至少一条对骨骼具有结合特异性的肽以及该至少一条对药物活性剂具有结合特异性的肽连接在一起，并且其中该至少一条对药物活性剂具有结合特异性的肽与药物活性剂(该肽对其具有结合特异性)结合。在一个实施方案中，使用接头来连接该至少一条对骨骼具有结合特异性的肽和该至少一条对药物活性剂具有结合特异性的肽。

对于某些实施方案来说，该至少一条对骨骼具有结合特异性的肽包括一条或多

条对骨骼具有结合特异性的肽。对于一个实施方案来说，该肽包括一条氨基酸序列，例如 SEQ ID NO:43，或可包括由多支链接头连接的实例中的两条或更多条肽。在另一个实施方案中，每一条肽为该组合物的一个独立部分，其要么包括(a)相同的氨基酸序列，例如 SEQ ID NO:39，要么包括(b)两种或更多种氨基酸序列，例如一条肽包括氨基酸序列 SEQ ID NO:41，另一条肽包括氨基酸序列 SEQ ID NO:42 或其他 SEQ ID NO。对于某些实施方案来说，该至少一条对药物活性剂具有结合特异性的肽包括对单一类型药物活性剂具有结合特异性的肽，例如对于细胞具有结合特异性的肽，或包括两条或更多条肽，其要么包括(a)相同的例如对于 DBM 的结合特异性，例如含氨基酸序列 SEQ ID NO:91 的肽，以及包括氨基酸序列 SEQ ID NO:118 的肽，或其他 SEQ ID NO，要么包括(b)具有不同结合特异性的两条或更多条氨基酸序列，例如一条肽具有对生长因子的结合特异性，而另一条肽具有对激素或其他功能的结合特异性。

在描述于此的实施方案中使用的接头包括化学链、化学化合物如试剂等。该接头包括但不限于同型双官能接头和异型双官能接头。异型双官能接头含有一个具有第一反应官能性或化学部分以特异性连接第一分子的端部，以及一个具有第二反应官能性以特异性连接至第二分子的对向端部。根据在此描述的实施方案，可使用多种双官能或多官能试剂(同型双官能性或异型双官能性)作为接头，例如描述于目录 Pierce Chemical Co., Rockford, III. 中的那些、通常为 3~15 个氨基酸的短肽并且通常含有氨基酸如甘氨酸和/或丝氨酸的氨基酸接头、以及聚合物如聚乙二醇。在一个实施方案中，代表性的肽接头包括待与结合功能区，如聚赖氨酸、聚鸟氨酸、聚半胱氨酸、聚谷氨酸和聚天冬氨酸连接的多反应活性部位，或者包括基本上惰性的肽接头，如聚甘氨酸(lipolyglycine)、聚丝氨酸、聚脯氨酸、聚丙氨酸以及其他寡肽，包括丙氨酰、丝氨酰、脯氨酰或甘氨酰氨基酸残基。在氨基酸接头已被选定的某些实施方案中，包被组合物可与一条单一、毗邻的肽进行合成，包括对骨骼具有结合特异性的肽、接头以及对药物活性剂具有结合特异性的肽。因此，接头的附着是通过该单一、毗邻的肽的键进行的。

合适的高分子接头包括合成聚合物或天然聚合物。代表性的合成聚合物包括但不限于聚醚如聚乙二醇“PEG”，聚酯如聚乳酸 PLA 和聚羟基乙酸 PGA，聚胺，聚酰胺如尼龙，聚氨酯，聚甲基丙烯酸酯如聚甲基丙烯酸甲酯 PMMA，聚丙烯酸，聚苯乙烯，聚己酸，柔性螯合剂如 EDTA、EGTA，以及分子量为约 20 道尔顿至约 1000 千道尔顿的其他合成聚合物。代表性的天然聚合物包括但不限于透明质酸，藻酸盐，硫酸软骨素，血纤蛋白原，纤连蛋白，白蛋白，胶原，钙调蛋白，以及对某些实例来说组分单体的分子量为约 200 道尔顿至 20000 千道尔顿的其他天然聚合物。高分子接头包括二嵌段聚合物，多嵌段共聚物，梳形聚合物，星形聚合物，树枝状或支化聚合物，直链-树枝状混合型聚合物，由赖氨酸构成的支链，或无规共聚物。接头还包括巯基(酰胺)羧酸，丙烯酰胺羧酸，丙烯酰胺-酰胺三乙烯羟基乙酸，7-氨基苯甲酸，以及它们的衍生物。对于某些实施方案来说，接头还利用铜催化的叠氮炔环加成作用，如“点击化学”，或任意其他常规方法。接头包括能被裂开的接头，以及以交联的目的而被制成对其他分子部分或对它们本身具有反应性的接头。

取决于待连接分子的这些因素以及进行连接的条件，接头的长度和组分多种多样以优化这些特性，如保留生物功能、稳定性、对某些化学品的抗性和/或温度参数，

并保留足够的立体选择性或尺寸。例如，接头不能明显干扰包被组合物为达目的而以合适的亲和力充分结合至骨骼(根据描述于此的实施方案，该组合物对其具有特异性)的能力，或包被组合物为达目的而以合适的亲和力充分结合至药物活性剂(该组合物对其具有特异性)的能力。接头包括具有活性的一个或多个分子，该活性增强或补充描述于此的该包被组合物实例的效果。

在某些实施方案中，特异性结合至特定表面、材料或组合物的肽与结合至合适的对照物的肽相比，结合程度要高至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%或更高的百分比，所述对照物例如不同的材料或表面，或通常用于这种比较的蛋白质，例如牛血清白蛋白。结合特异性可通过对信号如荧光进行定量的分析确定，或者通过表示肽与骨骼之间结合的相对量的比色分析，与骨骼或 I 型胶原基质之外的肽和材料进行比较。在一个实施方案中，一条肽的结合特异性的特征在于通过 EC₅₀ 测定的相对结合亲和力为 10 μ M 或更低，对某些实施方案来说小于 1 μ M。EC₅₀ 使用本领域公知的任意数量的方法确定，例如通过结合分析产生浓度响应曲线，该分析中，肽的浓度用已知量的物质(该肽对该物质具有结合特异性)进行滴定。这样，EC₅₀ 表示分析中发现对肽产生 50%最大结合的肽的浓度。

在描述于此的实施方案中使用的肽包括 L 型氨基酸、D 型氨基酸或它们的组合。代表性的非遗传编码的氨基酸包括但不限于 2-氨基己二酸，3-氨基己二酸， β -氨基丙酸，2-氨基丁酸，4-氨基丁酸(哌啶酸)，6-氨基己酸，2-氨基庚酸，2-氨基异丁酸，3-氨基异丁酸，2-氨基庚二酸，2,4-二氨基丁酸，锁链素，2,2'-二氨基庚二酸，2,3-二氨基丙酸，N-乙基甘氨酸，N-乙基天冬酰胺，羟基赖氨酸，别羟基赖氨酸，3-羟基脯氨酸，4-羟基脯氨酸，异锁链素，别异亮氨酸，N-甲基甘氨酸(肌氨酸)，N-甲基异亮氨酸，N-甲基缬氨酸，正缬氨酸，正亮氨酸，鸟氨酸，以及 3-(3,4-二羟基苯基)-L-丙氨酸("DOPA")。代表性的衍生氨基酸包括例如其中游离氨基已衍生以形成胺盐酸盐、对甲苯磺酰基、苄氧羰基、叔丁氧羰基、氯乙酰基或甲酰基的那些分子。游离羧基可衍生以形成盐；甲基酯和乙基酯或其他类型的酯或酰肼。游离羟基可衍生以形成 O-酰基或 O-烷基衍生物。组氨酸和咪唑氮可衍生以形成 N-im-苄基组氨酸。在一个实施方案中，包被组合物包括至少一条对骨骼具有结合特异性的肽，并具有 N-末端氨基酸、C-末端氨基酸或它们的组合，其中这些氨基酸是非遗传编码的氨基酸，其提高了该肽对骨骼的结合亲和力，即结合相互作用的强度。这种氨基酸可通过用于固相和/或溶液相合成的常规方法并入到肽中。例如，在一个实施方案中，DOPA、羟基氨基酸如羟基赖氨酸、别羟基赖氨酸、羟基脯氨酸或它们的组合中的一种或多种的约一个至约三个残基可在合成过程中作为肽的氨基酸序列的末端氨基酸添加，其中该肽在描述于此的包被组合物实例中使用，用来通过包被组合物和待被覆的至少一个骨骼表面之间的静电或离子相互作用来增强结合相互作用的强度。

描述于此的肽实例包括修饰，例如通过添加化学部分，或者氨基酸的置换、插入和缺失进行的修饰，其中该修饰提供了其应用中的某些益处。因此，这里可使用的肽包括多种形式的肽衍生物中的任一种，包括例如酰胺、与蛋白质形成的共轭物、旋风肽(cyclone peptides)、聚合肽、保守性置换的变体、类似物、片段、化学修饰的肽以及模拟肽。可以使用具有想要的描述于此的实施方案的肽家族结合特征的任何

肽衍生物。例如，被添加到合成肽的 N-末端氨基酸以阻碍该肽的那一氨基末端化学反应性的化学基团包括 N-末端基团。这种用于保护肽的氨基末端的 N-末端基团包括但不限于低级烷酰基、酰基、磺酰基和形成氨基甲酸盐的基团。可用的 N-末端基团可包括乙酰基、芴甲氧羰基(Fmoc)和叔丁氧羰基(Boc)。被添加到合成肽的 C-末端氨基酸以阻碍该肽的那一羧基末端化学反应性的化学基团包括 C-末端基团。这种用于保护肽的羧基末端的 C-末端基团包括酯或酰胺基团。肽的末端修饰对于降低蛋白酶消化的敏感性，并且对于在生物流体(其中可存在蛋白酶)的存在下延长肽的半衰期通常是有用的。非强制选择地，描述于此的肽包含经修饰以含有一个或多个化学基团如反应性官能团如氟、溴或碘以便于将该肽与接头分子连接的一个或多个氨基酸。可用的肽还包括其中肽键中的一个或多个被假肽键取代的肽，所述假肽键包括但不限于卡巴(carba)键(CH₂-CH₂)、缩酚键(CO-O)、羟亚乙基键(CHOH-CH₂)、酮亚甲基键(CO-CH₂)、亚甲基氧键(CH₂-O)、还原键(CH₂-NH)、硫代亚甲基键(CH₂-S)、N-修饰键(-NRCO-)以及硫代肽键(CS-NH)。

在描述于此的实施方案的包被组合物中或在使用该包被组合物方法中可用的肽还包括与在此公开的表 1 和 SEQ ID NOs:1-45 中的示例性肽实例的序列相比具有一个或多个残基的置换、添加和/或缺失的肽，只要该原始示例性肽的结合特性基本上保留即可。因此，实施方案包括这样的肽，其与在此公开的示例性序列相比具有大约 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸的不同，这取决于在此公开的示例性肽的长度，并且所述肽与在此公开的示例性序列具有至少 70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。序列同一性可人工计算，或者可以使用计算机工具的数学程序，例如 GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA 和 TFASTA，或者使用本领域公知的其他程序或方法进行计算。使用这些程序的序列对比可通过使用默认参数进行。

与在此公开的示例性肽的序列具有基本上相同的氨基酸序列的肽可具有一个或多个不同的氨基酸残基；这是使用官能性相似的氨基酸残基对示例性肽的序列中的氨基酸残基进行置换的结果，即“保守性置换”，条件是含保守性置换的肽基本上保留了不含保守性置换的示例性肽的结合特异性。保守性置换的例子包括一个非极性(疏水性)残基如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸对另一个的置换；一个芳香残基如色氨酸、酪氨酸或苯丙氨酸对另一个的置换；一个极性(亲水性)残基对另一个的置换，例如在精氨酸和赖氨酸之间，谷氨酸和天冬酰胺之间，苏氨酸和丝氨酸之间的置换；一个碱性残基如赖氨酸、精氨酸或组氨酸对另一个的置换；或者一个酸性残基如天冬氨酸或谷氨酸对另一个的置换。

在又一个实施方案中，结合功能区包括具有至少 70%同一性(对某些实施方案来说具有至少 95%的同一性)以及在羧基和/或氨基末端的额外氨基酸的肽，约 1 个至约 20 个额外氨基酸在一个末端或在两末端的每一个上，其保持了该肽作为在此描述的结合功能区的主要活性。因此，作为非限制性例子，具有描述于 SEQ ID NOs:1-45 中任一氨基酸序列的肽具有在此规定的结合骨骼的活性和结合特异性，并且不具有构成一种材料的任何特征，所述材料转变成该肽的基本且新颖的特性以通过结合骨骼来起到结合功能区的作用。

药物可接受载体的离子包括水溶液、含水或不含水溶剂、悬浮液、乳化液、凝

胶、糊剂等。合适的药物可接受载体包括一种或多种物质，包括但不限于水、含缓冲剂的水、医药非肠道赋形剂、盐水、0.3%甘氨酸、含水醇、生理含水缓冲液；并且还可包括一种或多种物质，例如水溶性聚合物，甘油，聚乙二醇，丙三醇，油，盐如钠盐、钾盐、镁盐和铵盐，磷酸酯，碳酸酯，脂肪酸，糖，多糖，糖蛋白(用于增强稳定性)，赋形剂，以及防腐剂和/或稳定剂，用于提高保存期，或需要并适于制造并分配该组合物。

本发明的实施方案包括对骨骼具有结合特异性的肽，包被组合物(其包括对骨骼具有特异性的肽的实例)，用包被组合物被覆骨骼的方法的实例，以及用包被组合物(其包括至少一条对骨骼具有结合特异性的肽)被覆的骨骼。在一个实施方案中，包被组合物包括一条或多条对骨骼具有结合特异性的肽，并且对于某些实施方案来说，还包括药物可接受载体。示例性的肽包括具有从 SEQ ID NOs:1-45 中选出的氨基酸的肽。在另一个实施方案中，包被组合物包括至少一条对骨骼具有结合特异性的肽，该肽连接至至少一条对药物活性剂具有结合特异性的肽。在另一个实施方案中，包被组合物包括至少一条对骨骼具有结合特异性的肽，该至少一条肽连接至至少一条对药物活性剂具有结合特异性的肽(其上具有连接的药物活性剂)。某些包被组合物的实例还包括药物可接受载体。包被组合物以有效促进被覆的骨骼成为骨形成、骨修复和/或成骨作用中的一种或多种的能力的量(与未使用包被组合物实例被覆的骨骼相比)施敷在骨骼上。本发明的实施方案在下面的实施例中进行说明，这些实施例并非用于限制。

实施例 1

本实施例说明了利用噬菌体展示技术以产生本发明具有结合功能区实例的肽的各种方法的实例。尤其是所述肽分别包括对骨骼的结合特异性和对药物活性剂的结合特异性。

使用噬菌体展示技术以鉴别用作在此描述的组合物实例中的结合功能区的额外的肽。通常，使用噬菌体展示技术，给目标底物提供了多种肽的文库。可选择特异性结合至底物的肽作为结合功能区使用。可使用被称为“淘选”的多轮次选择方式。各种文库以及淘选方法中的任一种都可用来鉴别用于描述于此的包被组合物的结合功能区。淘选方法包括例如溶液相筛选、固相筛选或者基于细胞的筛选。一旦鉴别出候选结合功能区，则使用序列的定向诱变和非定向诱变以优化包括结合功能区的特异性和亲和力中的一种或多种在内的结合特性。

A. 筛选了各种不同的噬菌体展示文库以挑出结合至选定目标基底的肽。尤其是筛选了这样一种底物，其被选择用来寻找用于本发明实施方案的结合功能区。所述底物要么结合至容器，要么放在容器中，这取决于所选定的底物，所述容器例如为 96 孔微量滴定板的孔，或者为微量离心管。将该容器表面上的非特异性结合位点用含有范围为 1%~10%牛血清白蛋白(BSA)的缓冲液阻隔，然后用含有缓冲盐水和 TweenTM 20 的缓冲液“缓冲液 T”冲洗该容器 5 次。将每一文库稀释于缓冲液 T 中，并以 100 μ l 的总体积、 10^{10} pfu/ml 的浓度添加。在室温下以 50rpm 进行振荡保温 1~3 小时，通过使用缓冲液 T 进行多次冲洗而将未结合的噬菌体除去。将结合的噬菌体用于在生长培养基中感染大肠杆菌细胞。通过在 200rpm 的振荡器中于 37°C

保温过夜来培养含该细胞和噬菌体的培养基。在对培养物进行离心后从培养物中收获含噬菌体的上清液。以与第一轮选择相似的方式，并使用前一轮次得到的扩增的噬菌体作为进料来进行第二轮和第三轮选择。为了检测特异性结合至所选定底物的噬菌体，使用共轭结合至检测分子的抗噬菌体的抗体进行酶联免疫吸附(ELISA)测定，然后检测并定量在该测定中结合的检测分子的量。接下来确定编码来自噬菌体(其特异性结合至所选定的底物)的肽的 DNA 序列。举例来说，编码该肽的序列作为插入物位于噬菌体的基因组中，并可以进行测序以获得展示在噬菌体表面的相应氨基酸序列。

作为一个特定的说明性例子，使用脱钙骨基质“DBM”作为骨底物并使用几种不同的噬菌体文库来进行噬菌体选择。在 50mg 的 DBM 中，添加 1ml 的缓冲液 T，接下来混合 1 小时。然后将该混合物离心，并将缓冲液从离心管中抽出。在每一个管中添加 900 μ l 含 10%牛血清白蛋白的 TBS 缓冲液，并将这些管混合以使 DBM 再悬浮。然后将这些管在室温下旋转保温 30 分钟。在每一个管中添加 100 μ l 的待选定噬菌体文库，然后将这些管在室温下旋转保温 1 小时。接下来将这些管离心以将 DBM 粒化，接着抽出上清液。接下来用缓冲液 T 冲洗该含有结合噬菌体的 DBM 四次，接着将该含有结合噬菌体的 DBM 与 1ml 对数生长期大肠杆菌在生长培养基中混合，并于 37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟。然后让 DBM 在管中沉降，接着将含有感染了噬菌体的细胞的培养基移除，并置于一个新的管中。对感染的细胞进行一系列的稀释，以确定噬菌体的滴定率，从而进料给下一轮次的选择。以与第一轮选择相似的方式，并使用前一轮次得到的含扩增的噬菌体的上清液作为下一轮次的进料以及 20mg 的 DBM 来进行第二轮、第三轮和第四轮选择。

对于个体噬菌体，以 ELISA 的形式分析它们的结合特异性。微量滴定孔与其中所含的 DBM 的阻隔通过使用含 1%BSA 的缓冲液保温 1 小时而完成。在每个微量滴定孔中加入含噬菌体的上清液以及含 1%BSA 的缓冲液。1 小时的结合反应之后，使用缓冲液 T 对每一孔中的 DBM 冲洗三次。为了检测特异性结合至 DBM 的噬菌体，使用与辣根过氧化物酶共轭的抗 M13 噬菌体进行常规的 ELISA，接着添加显色剂 3,3',5,5'-四甲基联苯胺，并测定 650nm 处的读数。噬菌体的相对结合强度还可通过在 ELISA 中测试结合至 DBM 的噬菌体的一系列稀释液而得以确定。还测定了编码特异性结合 DBM 的肽的 DNA 序列。编码肽插入物的序列位于噬菌体的基因组中，并被翻译以产生显示在噬菌体表面上的相应氨基酸序列。

B. 结合功能区的表征和合成：

肽对骨骼的相对结合强度——还被用作结合特异性的量度——是通过测试用于结合至骨骼(以 DBM 为代表)的肽的一系列稀释液而得以确定。对在每一条肽序列的浓度范围内观察到的吸光度作图，获得肽对目标底物的结合曲线，由该曲线可确定 EC50。筛选和选择的目的是鉴别出一条或多条肽，所述肽以 EC50 小于或等于约 10 μ M(对于某些实施方案来说在毫微摩尔的范围内，即小于 1 μ M)的结合特异性结合至所选定的底物。因此，在一个实施方案中，结合功能区包括这样一条肽，该肽对所选定的底物(例如 DBM)显示出 EC50 小于或等于约 10 μ M，更优选在毫微摩尔的范围内(小于 1 μ M)的结合特异性。

作为一个特定的实施例，将 DBM 以每孔 3mg 当量的浓度置于微量滴定盘中，

而后在室温下用含 1% BSA 的缓冲液阻隔该孔 1 小时。然后从每个孔中抽出该含 1% BSA 的缓冲液，并在孔中添加生物素化(biotinylated)的肽的一系列稀释液。将该微量滴定板在室温下在板振动器上保温 1 小时。然后使 DBM 沉降，再从孔中将缓冲液抽出。用缓冲液 T 冲洗 DBM 三次，然后添加抗生素蛋白链菌素-碱性磷酸酶。将该微量滴定板在室温下在板振动器上保温 1 小时。然后使 DBM 沉降，再从孔中将缓冲液抽出。用缓冲液 T 冲洗 DBM 三次，使用 pNPP(磷酸对硝基苯酯)展开分析，记录 405nm 处的吸光度。通过确定在分析中给出最大信号的半峰值的肽的浓度，可以进行肽对骨骼的相对亲和力(结合特异性，EC50)的估算。

可通过任何用于肽合成的方法来合成肽，所述方法包括但不限于固相合成、溶液相合成和它们的组合。举例来说，在描述于此的实施方案中使用的包括结合功能区的肽是通过使用标准固相合成技术并使用标准 FMOC 肽化学在肽合成仪中合成的。在所有残基都被连接后，使用常规的方法和试剂同时进行切断和支链脱保护。在由树脂上切断后，沉淀出该肽，并将沉淀物冻干。接下来用反相高效液相色谱仪对肽进行纯化，然后用质谱确认肽的同一性。

实施例 2

使用描述于实施例 1 中的方法，研制出对骨骼具有结合特异性的示例性肽。肽实例的列表表示于表 2。通常这些伴随所展示的肽的噬菌体氨基酸对于肽的结合特异性没有突出的贡献，描述于此的肽的实例可在其氨基酸序列中包括在 N-末端和 C-末端伴随肽的这些噬菌体氨基酸(例如分别为 S 和 SR，见例如表 3)。

表 2

	亲骨肽
SEQ ID NO:	氨基酸序列 (单字母编码)
1	FYSIFFPQMGGSM
2	FSGWFLPWEGRSE
3	FYWPSFNSGNSLW
4	FSWFSYPSQLWME
5	IFSTWNPWSPYSV
6	FSWFGSHLLSGGS
7	FATFFGGSVEKFW
8	WNYGDVGRWWDWQ
9	WWGFWNGSAAPVW
10	SLLYNWLDNTRQMFLPES
11	WCVWGLGSGCAGGAAG
12	WSPDVL RWPWWASGSSE
13	FWSADFS AEDASAWWG
14	FGSWWWGSGAAS
15	FSPDFLSSWWQTHAGRF
16	SFFSPYSAFSSWVESAR
17	WSSFFPLGFSSWSGSVP
18	FSFSSLPAWSSFWPTST
19	FSFLSSAVERIYGA

20	TWQSYLDLWGWTPTPSL
21	WPGSGWWWSEGLQRREV
22	WPMPWWSEWASLHGGKW
23	WWPHVSGVYGSLPWGPG
24	LGTFWSSVWRGVDAGGE
25	VGWGDWWKSGSVWQGAL
26	FGHFEWPVLGQWK
27	FLSASMPYLQAWA
28	FSYFSSPSTWVQW
29	SSMFKDFDSLKSWSGRFS
30	FDIDWSGMRSWWG
31	SFDLSAFGSLWDRW
32	FDRWGFAGAWWDSVAA
33	VAVASVGAFWSGLSGWA
34	FSWSSLSDSFGWGSSFS
35	SLPALPWGFPSWQQGWL
36	FFTHFYPPYDVRPHPPA
37	WDFRSLRDWWPPAPSL
38	WLSGWSAGWGSVAPEG
39	WSNGAWAKWWGVAAEEVG

实施例 1 描述了肽对骨骼的相对结合强度的测定方法。如表 3 所示，合成出包括 SEQ ID NOs: 5、9、14、24、30 和 37 在内的六条肽以包括含甘氨酸、丝氨酸和赖氨酸的氨基接头从而方便进行这些肽的生物素化，用于测定对骨骼的相对结合强度。一个生物素分子连接到 C-末端的赖氨酸上。表 3 中还示出以 EC₅₀(μ M)表示的对于骨骼(以人类来源的 DBM 为代表)的相对结合强度。注意到当使用兔来源的 DBM 时，EC₅₀ 的值相同或基本相似。

表 3

SEQ ID NO:	对骨骼(例如 DBM)的结合特异性 氨基酸序列 (单字母编码)	EC ₅₀ (μ M)
40	SIFSTWNPWSPYSVSRGSSGK	<1
41	SWWGFWNGSAAPVWSRGSSGK	<0.1
42	SFGSWWWGSGAASSRGSSGK	<0.1
43	SLGTFWSSVWRGVDAGGESRGSSGK	<1
44	SFDIDWSGMRSWWGSRGSSGK	<1
45	SWDFRSLRDWWPPAPSLSSRGSSGK	<1

如表 2 和表 3 所示，肽的实例包括：

(a)对于骨骼的结合特异性，其特征为 EC₅₀ 小于或等于约 10 μ M，并且对于某些实施方案来说在毫微摩尔的范围内(小于 1 μ M)；(b)包含约 10 个氨基酸至约 25 个氨基酸，并且对于某些实施方案来说包含约 10 个氨基酸至约 15 个氨基酸；(c)氨基酸序列富含大型芳香氨基酸残基(Phe、Trp、Tyr 中的一种或多种)，并且对于某些实施方案来说，包含一种功能区或基序，该功能区或基序由在包括自该肽的 N 末端起

头 10 个毗连氨基酸的序列内的 3 个或更多大型芳香氨基酸残基构成；以及(d)不具有以序列 Gly-Ile-Ala 为特征的结合胶原序列细胞的功能区。

使用描述于实施例 1 中的方法，对于表 3 中所示的肽还测试了对脱钙皮层骨和对松质骨的相对结合强度，这是对骨骼结合特异性的额外证据。通过对比不同的分析以及如表 4 所示，使用脱钙皮层骨(“DCB”)或使用松质骨(“CNB”)时所获得的 EC50 值与使用脱钙骨基质(“DBM”)时所获得的 EC50 值相似，它们每一种都是代表性的骨骼。

表 4
对于不同形式骨骼的亲骨肽和结合特异性

SEQ ID NO:	对于 DBM 的 EC50 (μM)	对于 DCB 的 EC50 (μM)	对于 CNB 的 EC50 (μM)
40	<1	<1	<1
41	<0.1	<0.1	≤ 0.1
42	<0.1	<0.1	< 0.5
43	<1	<1	≤ 1
44	<1	<1	<1
45	<1	<1	<1

虽然这里公开了这些示例性的肽序列，本领域的技术人员将意识到，由这些序列赋予的结合特异性可归因于仅仅那些包括该序列的氨基酸。对此，结合迹象表明，一定浓度的大型芳香氨基酸残基(Phe、Trp、Tyr 中的一种或多种)，以及对于某些实施方案来说，由在包括自 N 末端起头 10 个氨基酸的序列内的 3 个或更多大型芳香氨基酸残基构成的功能区或基序，对于肽对骨骼的结合特异性作出了明显的贡献。对于某些实施方案来说，自该肽的 N 末端起的头 8 个氨基酸，以及对于某些实施方案来说，头 5 个毗连氨基酸对于肽对骨骼的结合特异性作出了明显的贡献。对于某些在 N 末端半区——例如在包括 10~20 个氨基酸的肽的氨基酸序列自 N 末端起向 C 末端数头 50% 的区域内——包括 6 个毗连氨基酸的实例对于肽对骨骼的结合特异性作出了明显的贡献，如下所示。举例来说，将包括在表 3 中鉴别出的氨基酸序列的肽实例作为 SEQ ID NOS: 41 和 42。这些肽分别以如下的基序为特征：

[_ _ _ _] \leftarrow N 末端半区

| \leftarrow 肽的 N 末端

SEQ ID NO: 46 ZZXZZXXXXXXZ;

SEQ ID NO: 47 ZXXZZZXXXXX;

其中 Z 是 F 苯丙氨酸、W 色氨酸或 Y 酪氨酸，而 X 是任意氨基酸。

示例性的肽实例在结合分析中测试对于已经普遍用作骨修复器械的胶原支架(例如 I 型胶原的交联基质)的结合特异性时，显示出结合特异性。这些结果和其他数据意味着肽实例(其包括功能区或基序，该功能区或基序在该肽的氨基酸序列的 N 末端半区中包括在 5~8 个毗连氨基酸的序列内的 3 个或更多大型芳香氨基酸残基)

似乎优先与骨自身环境中的 I 型胶原或与具有骨修复特性的支架相结合。

实施例 3

本实施例说明了包含结合功能区的肽，该结合功能区具有对药物活性剂的结合特异性，并连接到对骨骼具有结合特异性的肽，从而形成包被组合物。

在一个实施方案中，药物活性剂是生长因子。一种生长因子选自一种或多种骨形态发生蛋白(BMP)，即以在骨骼生长中的角色而著称的重排生长因子- β 家族的一个独特亚型。BMP 诱导一系列事件，其导致新骨骼的形成，包括间充质干细胞的迁移、骨修复基质的沉积、骨母细胞增生以及祖细胞至产骨细胞的分化。很多研究都致力于将 BMP 使用在骨植入物上或附近，以促进植入物的骨形成、骨修复和/或成骨作用中的一种或多种。但是，遗留未解决的关键问题之一在于如何将 BMP 在植入物的位点上定位。因此，一种包被组合物的实施方案包括至少一条对骨骼具有结合特异性的肽，其结合到至少一条对 BMP 具有结合特异性的肽。这种包被组合物还可包括 BMP，其结合至至少一条对 BMP 具有结合特异性的肽。

该结合 BMP 的肽属于两种肽家族，它们以其各自的结合基序(“基序 1”和“基序 2”)为区别，并且表 5 和表 6 说明了某些示例性的可作为结合功能区使用的肽，包括对包被组合物中的 BMP 具有结合特异性的肽。在某些实施方案中，一种示例性的结合功能区包括一条对 BMP 具有结合特异性的肽，其仅包括序列中以大写字母表示的部分，即，“ss”和“sr”为与所示出的肽毗连的噬菌体序列源的氨基酸。

对 BMP 具有结合特异性的肽的基序 1 (SEQ ID NO:48): Z-X-X-Phe-X-B-Leu, 其中 Z=Trp、Phe 或 Tyr, X=任意氨基酸, “B”=Ser、Thr、Ala 或 Gly。请注意 SEQ ID NO:91 包含一条共有序列。

表 5

序列	SEQ ID NO.
ssDWGVVASAWDAFEALDAsr	49
ssGADFGYGSWVSFSALSAsr	50
srGEASGWEAFSALEAAVVsrr	51
srSSDSAFSSFSALEGSVVsrr	52
srDGAGAAAWGAFSALASEsr	53
srGGEAAAGAWVSFSALESsr	54
srVSGVAAWEAFAGLSVSSsr	55
srDGGSFSAFSSLVWAADSsr	56
ssVAGDVGSSWAAFASLAAsr	57
ssWEVFSSLESGSVGAGAGsr	58
ssSSGAVSSFESLSGSVVsrr	59
srEGVAWEAFGALSSFAADsr	60
ssWGLASEASFFSFSALSSsr	61
srEGAAWDSFFALSGGSAAsr	62
ssAPLTESEAWRGFSKLEVsr	63
ssSMPVGWDSWRGLEWSDRsr	64
ssEGRGGWNSWEAFRELVVsrr	65
ssGGGGAWESWRGLSGVELsr	66

srNVEGSWESFAGLSHVREsr	67
srEDGGRWESFLGLSAVEVsr	68
ssVEGSAWSAFKSLSEGVsr	69
srVEGGAWQALAGLTVERVsr	70
ssPPKHAWGSFDALGGQVsr	71
ssERGVGWEVFLAMEGARMsr	72
ssSSSGTWQAFTGLSGERVsr	73
ssSPGGGSGGWDAFYSLVGsr	74
ssGGGGGGEGFSSLGNGRsr	75
ssTGGGSWEFEKAMTPSWTsr	76
ssEGSGLWDSFSSLVHEVsr	77
ssGVTQESASWSSFRTLAVsr	78
ssSKVAPSGEWRSFATLEVsr	79
ssEAGRGWEGFKALEGYQVsr	80
ssLGQTGWAEFESLSGTRGsr	81
ssVAWDAFTVFESLEGVATsr	82
ssEVVEPWEEWWWALERAGGsr	83
srVAAVSWEFFGSLSSAGVsr	84
ssADLGVSGSWEGFALMRGsr	85
ssVGQMGWEAEFESLSGTGGsr	86
ssGQGETWEWFAGMRGSVAsr	87
ssYFDVFSSMTGTRAAGSWsr	88
ssAYSVFSSLRADNSGGAVsr	89
ssGGIASLKYDVVKTWEsr	90
GGGAWEAFSSLSGSRV	91

对 BMP 具有结合特异性的肽的基序 2 (SEQ ID NO:92):

(Leu 或 Val)-X-Phe-Pro-Leu-(Lys 或 Arg)-Gly。注意 SEQ ID NO:118 包含一条共有序列。

表 6

序列	SEQ ID NO.
ssSVDLYFPLKGDVsr	93
ssFEPLRFPLKGVPVsr	94
ssEGVGGFPLKGIPQEAWAsr	95
ssPSGVWFPLRGELLGVXKsr	96
ssGGFVPFPLRGEVWDGVHsr	97
ssEGSLSFPLKGQVYSGWGsr	98
ssGKPLEFPLRGTLAEWPVsr	99
srGEALGFPLTGQLMEAAEsr	100
ssMWDVGFPLKGRWIDGADsr	101
ssSNSLWFPLRGSTVEVGAsr	102
ssGPALRLPLRGTVSDVPsr	103

ssADRVAVPLKGAPVWVKEsr	104
ssGLALGLPIKGWTVSGKDsr	105
ssGYTLGFPLSGQTIKDWPsr	106
ssEGWVHFPLKGDVMGGPFsr	107
ssGRYVSLPLKGEVWPQTAsr	108
ssEGGVGFPLKGIPQEAWAsr	109
srVDSVNFPLRGETVTSMVsr	110
ssEGVGGFPLKGIPQEAWAsr	111
ssPSGVVFPLRGELLGVXKsr	112
ssGGFVPFPLRGEVWDGVHsr	113
ssEGSLSFPLKGQVYSGWGsr	114
ssGKPLEFPLRGTLAEWPVsr	115
srGEALGFPLTGQLMEAAEsr	116
ssMWDVGFPLKGRWIDGADsr	117
GGALGFPLKGEVVEGWA	118

在 ELISA 形式的分析中对示例性肽测试了它们以特异性结合至 BMP 家族成员的能力。举例来说, 包括氨基酸序列如 SEQ ID NO:91 所示序列的肽显示出对于 BMP2、BMP4、BMP5、BMP7 和 BMP14 的结合特异性, 而包括氨基酸序列如 SEQ ID NOs:58、93 和 118 中任一条的肽显示出对于 BMP2、BMP4、BMP7 和 BMP14 的结合特异性。进而, 当固定化到表面上时, 这些肽表现出将 BMP 从与 BMP2 钉在一起的流体(血浆和骨髓穿刺液中的每一种)中提取出来的能力。肽的存在不会抑制 BMP2 的活性。举例来说, BMP2 介导从 C2C12 成肌细胞至成骨细胞的转分化, 并且当使用 BMP-2 处理时, 会诱导 C2C12 成肌细胞中的碱性磷酸酶活性。

在另一个实施方案中, 药物活性剂包含细胞。因此, 包被组合物的实例包括至少一条对骨骼具有结合特异性的肽, 该肽连接至至少一条对细胞具有结合特异性的肽。这种包被组合物还可包括细胞, 该细胞结合至该至少一条对该细胞具有结合特异性的肽。举例来说, RGD_X 肽——其中 X 为任意氨基酸——(SEQ ID NO:119)已被描述为结合干细胞、间充质干细胞和成骨细胞。具有序列 ALPSTSSQMPQL (SEQ ID NO:120)的肽已被描述为与干细胞结合。在又一个实施例中, 包括氨基酸序列 SSSCQHVSLLRPSAALGPDNCSR (SEQ ID NO:121)的肽具有对由人类脂肪衍生的干细胞的结合特异性, 这种细胞具有成骨能力以及在骨修复或置换中的功用。

在另一个实施方案中, 药物活性剂包含维生素。因此, 包被组合物的实例包括至少一条对骨骼具有结合特异性的肽, 该肽连接至至少一条对维生素(对于某些实施方案来说, 对维生素 D)具有结合特异性的肽。这种包被组合物还可包括维生素, 该维生素结合至该至少一条对该维生素具有结合特异性的肽。举例来说, 已发现衍生自人类维生素 D 结合蛋白并具有氨基酸序列 LERGRDYEKNKVCKEFSHLGKDDFEDF (SEQ ID NO: 122)的肽结合至维生素 D 甾醇。

在另一个实施方案中, 药物活性剂包含医疗药。因此, 包被组合物的实例包括至少一条对骨骼具有结合特异性的肽, 该肽连接至至少一条对医疗药具有结合特异性的肽。这种包被组合物还可包括医疗药, 该医疗药结合至该至少一条对该医疗药

具有结合特异性的肽。举例来说，使用噬菌体展示以筛选结合至紫杉醇(商品名 Taxol®)的肽的结果是一种具有氨基酸序列 HTPHPDASIQGV (SEQ ID NO: 123)的肽。在药物活性剂包括医疗药的另一个实施方案中，该医疗药包含抗微生物剂。因此，包被组合物的实例包括至少一条对骨骼具有结合特异性的肽，该肽连接至至少一条对包含抗微生物剂的医疗药具有结合特异性的肽。这种包被组合物还可包括医疗药，该医疗药结合至该至少一条对该医疗药具有结合特异性的肽。举例来说，已发现万古霉素和万古霉素类似物结合至以 D-Ala-D-Ala(两个 D-丙氨酸残基)结尾的细菌细胞壁肽。模拟结合至万古霉素的细菌细胞壁肽的肽包括氨基酸序列 Lys-Ala-Ala (L-Lys-D-Ala-D-Ala)。

在另一个实施方案中，药物活性剂包含激素。因此，包被组合物的实例包括至少一条对骨骼具有结合特异性的肽，该肽连接至至少一条对激素具有结合特异性的肽。这种包被组合物还可包括激素，该激素结合至该至少一条对该激素具有结合特异性的肽。举例来说，已发现具有核心氨基酸序列 VMNV (SEQ ID NO: 124)的肽结合至人类生长激素。

在另一个实施方案中，药物活性剂包含核酸分子，并且对某些实施方案来说，包含编码生长因子、医疗药、激素或维生素的核酸分子。因此，包被组合物的实例包括至少一条对骨骼具有结合特异性的肽实例，该肽连接至至少一条对核酸分子具有结合特异性的肽。这种包被组合物还可包括核酸分子，该核酸分子结合至该至少一条对该核酸分子具有结合特异性的肽。举例来说，具有氨基酸序列 AEDG (SEQ ID NO: 125)的肽与包含[poly(dA-dT): poly(dA-dT)]的双螺旋 DNA 络合。

通过使用描述于此的这些方法，例如对于某些实施方案来说，一个结合功能区(其包含对骨骼具有结合特异性的肽)连接至另一个结合功能区(其包括对选定的药物活性剂具有结合特异性的肽)，从而形成包被组合物。将接头分子连接至结合功能区的优选方法会根据每个分子上存在的反应性基团而变化。如前所述，通过使用常规的方法，两个结合功能区可通过接头连接在一起，以形成包被组合物实例，其通过使用单一毗连肽合成得到，该肽包括第一结合功能区、包含 3 个或更多个氨基酸(例如包括甘氨酸和丝氨酸中的一种或多种)的接头以及第二结合功能区。术语“第一”和“第二”仅出于便于描述的目的而使用，而并不意图解释为限制合成的顺序。换句话说，该第一结合功能区可包含对选定的药物活性剂具有结合特异性的肽，而该第二结合功能区可包括对骨骼具有结合特异性的肽；或者，第一结合功能区可包括对骨骼具有结合特异性的肽，而第二结合功能区包含对选定的药物活性剂具有结合特异性的肽。

实施例 4

在本实施例中描述了方法实例，其包括：(a)制造被覆的骨植入物的方法；(b)通过选自如下的步骤被覆骨骼表面的方法，所述步骤包括：将药物活性剂递送至被覆的骨骼表面，将药物活性剂定位至被覆的骨骼表面，将药物活性剂恢复到被覆的骨骼表面，以及它们的组合；(c)骨骼的递送系统，其包括包被组合物，该包被组合物当被施敷到骨骼上时，提供选自如下的益处，所述益处包括：将药物活性剂递送至被覆的骨骼表面，将药物活性剂定位至被覆的骨骼表面，将药物活性剂恢复到被覆的骨骼表面，以及它们的组合；(d)促进从骨形成、骨修复、成骨作用和它们的组

合中选出的过程的方法，其中该方法包括用包被组合物实例被覆骨骼表面的步骤。

这些方法和递送系统的实例包括在适于在表面上产生被覆层的条件下，用有效量的包被组合物实例接触骨骼的至少一个表面。该包被组合物包括从如下物质中选出的包被组合物：包括对骨骼具有结合特异性的肽的至少一个结合功能区；包括对骨骼具有结合特异性的肽的至少一个结合功能区和包括对药物活性剂具有结合特异性的肽的至少一个结合功能区，其中该包括对骨骼具有结合特异性的肽的至少一个结合功能区与该包括对药物活性剂具有结合特异性的肽的至少一个结合功能区连接在一起；在一个实施方案中，上述连接通过接头来完成；以及前述的组合。该包括对骨骼具有结合特异性的肽的至少一个结合功能区可包括通过多分支接头连接的两条或更多条肽，对于一个实施方案来说，这些肽包括相同的氨基酸序列，例如 SEQ ID NO:40，或者可包含两条或更多条肽，其每一条包括不同的氨基酸序列，例如一条肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO:41，而另一条肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO:42。

该包括对药物活性剂具有结合特异性的肽的至少一个结合功能区包含单一类型的例如两条或更多条肽，其每一条都对单一类型的药物活性剂(例如细胞)具有结合特异性，或者可包含多种类型的例如两条或更多条肽。每一类型与另一类型相比都包括对不同的药物活性剂具有结合特异性的肽，例如对包括细胞的药物活性剂具有结合特异性的第一肽，对生长因子具有结合特异性的第二肽，或者对第一生长因子具有结合特异性的第一肽，和对第二生长因子具有结合特异性的第二肽。

在这些方法中，当将包被组合物与待被覆的骨骼的至少一个表面接触时，要么(a)该对药物活性剂具有结合特异性的至少一条肽结合至药物活性剂(对于该药物活性剂，该肽具有结合特异性)(例如，通过肽捕捉外生源的药物活性剂)；要么(b)该对药物活性剂具有结合特异性的至少一条肽尚未结合至药物活性剂(对于该药物活性剂，该肽具有结合特异性)，例如在植入用包被组合物被覆了的骨骼时。对于后一种情况，在接下来的被覆步骤中，在药物活性剂适于结合至该至少一条肽的条件下，该被覆的骨骼与足够量的药物活性剂在体外或体内接触(对于该药物活性剂，该至少一条肽具有结合特异性)。在一个实施例中，被覆的骨骼可在体外与药物活性剂——细胞和/或生长因子——接触，对于药物活性剂(其可结合至包括骨骼的被覆表面的肽)来说，上述药物活性剂为自身的，或者来自供体、同种异体或异种，接下来将该骨骼植入。在另一个实施例中，可将被覆的骨骼植入，其中在体内，该被覆的骨骼接触并结合至药物活性剂，如细胞和/或生长因子，其为通过接受该被覆的骨骼的个体而内源产生的。通过将一种或多种药物活性剂结合至被覆的骨骼，促进了刺激骨形成、骨修复和成骨作用中的一种或多种的潜在能力。

可使用常规的方法以将包被组合物实例施敷至待被覆的骨骼的一个或多个表面，通过将该包被组合物与该一个或多个表面结合进行所述施敷。根据待被覆骨骼的类型，可用的方法包括但不限于混合、浸渍、刷、喷以及蒸气沉积。举例来说，可通过喷雾装置的喷嘴，产生被覆待被覆骨骼表面的液滴，从而施敷包含包被组合物的溶液或悬浮液。将被覆了的骨骼干燥，对于某些实施方案来说，接下来在使用之前通过水溶液或等渗缓冲液冲洗来进行进一步加工，除去过量的包被组合物，然后进行消毒。或者，在被覆操作之前将包被组合物实例和医疗设备实例均进行消毒，然后在无菌环境下进行所述被覆操作。

将包被组合物实例施敷至待被覆骨骼的一个或多个表面的另一种方法包括将待被覆骨骼的表面浸渍在含有有效被覆骨骼的量的包被组合物的液体中，该液体可以是溶液或是悬浮液，可以是含水的或是含溶剂的。举例来说，将表面浸渍或浸没在含包被组合物实例的浴中。被覆包被组合物的合适条件包括使待被覆表面保持与含该包被组合物的液体接触一段合适的时间，其范围自约 5 分钟至约 12 小时。在另一个实施方案中，时间范围为约 15 分钟至 60 分钟。合适的温度范围为 10℃ 至约 50℃，对于某些实施方案来说，其范围为自室温至另一些实施方案的 37℃。然后根据需要使用，通过冲洗或消毒对被覆的骨骼进行进一步处理。

将包被组合物施敷至待被覆骨骼的另一种方法实例包括通过风干或冻干该包被组合物实例将包被组合物实例调配成干粉料，然后与骨骼混合以制备骨骼调配物，其包括固体、粉料、糊剂、填充物、粘合料、凝胶、多孔材料、植入物、移植植物以及它们的组合。但是，这些用于将包被组合物实例施敷至骨骼的说明性方法并不是排他性的，其他的被覆和稳定化方法也可以使用。此外，在一个方法实例中，可以通过例如风干将含包被组合物的被覆层稳定化。但是，这些处理方法不是排他性的，其他的被覆和稳定化方法也可以使用。合适的被覆和稳定化方法包括例如可在被覆步骤之前对将使用包被组合物实例被覆的骨骼的至少一个表面进行预处理，从而提高下述作用中的一种或多种：对待被覆骨骼具有结合特异性的肽的结合性；以及被覆层的坚松度和均匀度。举例来说，这种预处理可包括对待被覆的骨骼表面进行蚀刻或酸处理，从而通过提高骨骼表面和肽的氨基酸之间的亲水相互作用或分子粘附性来提高对骨骼具有结合特异性的肽的结合性。

实施例 5

本实施例中说明的是组合物实例，其包括对骨骼具有结合特异性的至少一条肽实例，该肽实例结合至对药物活性剂具有结合特异性的至少一条肽实例；并且还包括与其连接的药物活性剂。本实施例包括多个组合物实例，它们使用公开于此的对骨骼具有结合特异性的肽实例，每种组合物包括式 I：

X_1 -J- X_2 -P，其中

X_1 为一种肽，(1)该肽包含约 5 个氨基酸至约 50 个氨基酸，对于另一些实施方案，该肽包含约 10 个氨基酸至约 25 个氨基酸，对于再一些实施方案，该肽包含约 10 个氨基酸至约 15 个氨基酸；(2)该肽包括含 3 个或更多大型芳香氨基酸残基(Phe、Trp 和 Tyr 中的一种或多种)的功能区或基序，这些氨基酸残基位于包括在自该肽的 N 末端起头 10 个毗连氨基酸的序列内，对于某些实施方案，位于包括在自该肽的氨基酸序列的 N 末端起头 8 个氨基酸(对于某些实施方案为头 5 个氨基酸)的序列内；(3)该肽具有对骨骼的结合特异性；并且(4)不具有以序列 Gly-Ile-Ala 为特征的具有结合细胞功能区的胶原衍生的序列；

J 包括一接头；

X_2 包括一种肽，(1)该肽包含具有约 3 个氨基酸至约 50 个氨基酸的氨基酸序列，对于某些实施方案，该肽包含具有约 10 个氨基酸至约 25 个氨基酸的氨基酸序列，对于再一些实施方案，该肽包含具有约 10 个氨基酸至约 15 个氨基酸的氨基酸序列；并且(2)具有对药物活性剂的结合特异性；并且

P 不存在，或包含药物活性剂。

使用合成肽的常规方法来合成组合物实例。该组合物实例包含氨基酸序列，包括 SEQ ID NOs:133-136 的组合物，以及相应的 SEQ ID NOs:137-140。SEQ ID NOs:137-140 在 C 末端包括额外的接头序列，其连接至描述于此的用于结合实验的生物素。还合成了包含 SEQ ID NOs:141 和 142 的本发明组合物。如表 7 所示，下划线标出的氨基酸序列包括表示出的 X₁ 和 X₂ 氨基酸序列，而 J 由与下划线序列连接的未用下划线标出的氨基酸序列表示。

表 7

SEQ ID NO:133

SWWGFWNGSAAPVWSRGSSSESAGAWAEAFSSLGSRVX₁ SEQ ID NO:41 J X₂ SEQ ID NO:91SWWGFWNGSAAPVWSRGSSSESAGAWAEAFSSLGSRVGSSGK

SEQ ID NO:137

SEQ ID NO:134

SWWGFWNGSAAPVWSRGSSGAGAWAEAFSSLGSRVX₁ SEQ ID NO:41 J X₂ SEQ ID NO:91SWWGFWNGSAAPVWSRGSSGAGAWAEAFSSLGSRVGSSGK

SEQ ID NO:138

SEQ ID NO:135

SWWGFWNGSAAPVWSRGSSGAGALGFPLKGEVVEGWAX₁ SEQ ID NO:41 J X₂ SEQ ID NO:118SWWGFWNGSAAPVWSRGSSGAGALGFPLKGEVVEGWAGSSGK

SEQ ID NO:139

SEQ ID NO:136

SFGSWWWGSGAASSRGSSGGGALGFPLKGEVVEGWAX₁ SEQ ID NO:42 J X₂ SEQ ID NO:118SFGSWWWGSGAASSRGSSGGGALGFPLKGEVVEGWAGSSGK

SEQ ID NO:140

SEQ ID NO:141

SFGSWWWGSGAASSRG-(PEG10)-GGGAWAEAFSSLGSRVGSSGKX₁ SEQ ID NO:42 J X₂ SEQ ID NO:91SFGSWWWGSGAASSRG-(PEG10)-AGAWAEAFSSLGSRVGSSGK

SEQ ID NO:142

组合物对骨骼的相对结合强度实例——还被用作结合特异性的量度——是通过对于结合至骨骼的组合物的一系列稀释液进行测试而确定的，如实施例 1 的 B 部分所描述的那样。对每一组合物浓度范围内的吸光度作图，得到组合物对骨骼的结合曲线和解离常数草图。与制备组合物的对骨骼具有结合特异性的肽类似，组合物实例的一种特性为，它们结合至骨骼的结合特异性由 EC₅₀ 度量为小于或等于约 10μM，对于某些实施方案来说在毫微摩尔的范围内(小于 1μM)。通过使用实施例 1B

中描述的方法，分析了四个说明性组合物实例的相对结合强度，它们包括 SEQ ID NOs: 137、138、139、140、141 和 142 所示的氨基酸序列，见表 7，并且通过合成以包括 C 末端氨基接头，其被生物素化以利于确定对骨骼的相对结合强度。表 8 示出了组合物实例对以 DBM 为代表的骨骼的相对结合强度，以 EC50 (单位 μM) 表示。

表 8——对骨骼的结合特异性

SEQ ID NO:	EC50 (μM)
137	<0.5
138	<0.1
139	<0.5
140	<0.5
141	<0.5
142	<0.5

如表 8 所示，组合物实例显示出毫微摩尔范围内(小于 $1\mu\text{M}$)的对骨骼的结合特异性。

描述于此的组合物实例在通过对骨骼具有结合特异性的肽连接至骨骼时，具有还能与药物活性剂结合的能力。在本实施例中，药物活性剂为生长因子，更具体地说为 BMP-2。使用 ELISA 进行结合的分析，通过用所获得的药物活性剂的浓度范围内观察到的吸光度得到组合物的结合曲线和解离常数草图，它们用于计算 EC50。分析中还使用不含该组合物的合适的对照组。

作为一个特定的实施例，将 DBM 以每孔 3mg 当量的浓度置于微量滴定盘中，然后在室温下用含 1% BSA 的缓冲液将孔和 DBM 阻隔 1 小时。然后从每个孔中抽出该含 1% BSA 的缓冲液，并在每个孔中添加含 $10\mu\text{M}$ 每种组合物实例的 $100\mu\text{l}$ 的缓冲液。将该微量滴定板在室温下在板振动器上保温 1 小时。然后使 DBM 沉降，再从孔中将缓冲液抽出。用缓冲液 T 冲洗 DBM 三次，然后在孔中添加于 $100\mu\text{l}$ 缓冲液中的一系列 BMP-2 稀释液。将该微量滴定板在室温下在板振动器上保温 1 小时。然后使结合了组合物的 DBM 沉降，再从孔中将缓冲液抽出。用缓冲液 T 冲洗该 DBM-组合物三次。将商购的鼠抗 BMP-2 抗体用含 1% BSA 的缓冲液以 1:1000 进行稀释，然后在每个孔中添加 $100\mu\text{l}$ 。将该板在室温下在板振动器上保温 30 分钟，然后重复冲洗步骤。将用碱性磷酸酶标记的商购抗鼠抗体在含 1% BSA 的缓冲液中以 1:1000 进行稀释，然后在每个孔中添加 $100\mu\text{l}$ 。将该板在室温下在板振动器上保温 30 分钟，然后重复冲洗步骤。在每个孔中添加 $200\mu\text{l}$ 的底物 pNPP，然后将该板在室温下在板振动器上保温展开分析。从每个孔中移出 $100\mu\text{l}$ 溶液，然后添加到一个新的微量滴定板的各个孔中，接着在分光光度计中读数，记录 405nm 处的吸光度。通过确定在分析中给出最大信号的半峰值的肽的浓度，可以进行肽对药物活性剂的相对亲和力(结合特异性，EC50)的估算。

表 9 示出了六种说明性组合物以 EC50(单位 nM)表示的结果，这些组合物包含如下的氨基酸序列：SEQ ID NOs: 133、134、135 和 136 示出的序列，并相应分别表示为 SEQ ID NOs: 137、138、139 和 140，以及 SEQ ID NOs: 141 和 142 示出的序列。每种组合物首先与骨骼结合，然后分析其与以 BMP-2 为代表的药物活性剂的结

合。

表 9——与骨骼结合的组合物对 BMP 的结合特异性

SEQ ID NO:	EC50 (nM)
137	<10
138	<10
139	<10
140	<10
141	<10
142	<10

因此，表 9 中的结果说明，当组合物实例通过 X₁ 与骨骼结合时，该组合物出乎意料地保持了通过 X₂ 以毫微摩尔范围的 EC50 特异性地与药物活性剂结合的能力。还说明了：(a)组合物包含与 X₂ 结合的 X₁；(b)组合物包含与 X₂ 结合的 X₁，还包含与 X₂ 结合的 P；(c)骨骼被覆了包含与 X₂ 结合的 X₁ 的组合物；以及(d)骨骼被覆了包含与 X₂ 结合的 X₁ 的组合物，该组合物还包含与 X₂ 结合的 P。

实施例 6

基于包含对骨骼具有结合特异性的结合功能区的肽实例的氨基酸序列，可合成或构建编码描述于此的肽或其变体的多核苷酸——核酸分子，并且这种肽可通过例如在培养物中以重组 DNA 技术作为制造方法来产生，和/或通过体内引入这种多核苷酸而体内产生。举例来说，多于一条多核苷酸序列可编码肽实例，并且这种多核苷酸可在已知能编码该肽的氨基酸的三联密码子——第三碱基简并性的基础上，并在选择被无细胞的表达体系或宿主细胞使用的三联密码子使用的基础上合成，所述宿主细胞通常为原核细胞或真核细胞，例如细菌细胞如大肠杆菌，酵母细胞，哺乳动物细胞，禽类细胞，两栖动物细胞，植物细胞，鱼细胞以及昆虫细胞，不管它们位于需要表达的体外或体内。

仅出于说明性的目的而不为了限制，提供了 SEQ ID NO:126-132，它们是编码氨基酸序列 SEQ ID NO:5、13、37、30、41、43 和 4 的多核苷酸，由此，密码子使用通常应用于编码对骨骼具有结合特异性的肽实例的多核苷酸。因此，举例来说，通过使用与 SEQ ID NO: 5 相关的 SEQ ID NO:126，本领域的技术人员可以容易地构建编码由 SEQ ID NO:5 示出的氨基酸序列的变体的多核苷酸，或者推导出编码由 SEQ ID NO:6 示出的氨基酸序列的多核苷酸序列。在根据本发明的一个实施方案中，编码对骨骼具有结合特异性的肽的氨基酸序列例如 SEQ ID NO:5 的多核苷酸包含核酸分子，该核酸分子编码由氨基酸序列例如 SEQ ID NO:5 构成的肽，或编码由与例如 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列具有至少 95%同一性，对于某些实施方案来说具有至少 90%同一性的氨基酸序列构成的肽，条件是被编码的肽基本保留了对骨骼的结合特异性。

一个说明性的实施方案包括重组载体，其包含编码结合功能区的多核苷酸，该结合功能区包括用于本发明实施方案的对骨骼具有结合特异性的肽，并且该重组载体用于对骨骼具有结合特异性的肽的重组体制造。在一个实施例中，可将该多核苷酸添加到本发明公知用于产生肽或多肽的无细胞表达体系中。在另一个实施例中，可将该多核苷酸放置于原核表达载体中，这样，当在细菌宿主细胞中产生肽时，其作为与有助于纯化该肽的其他氨基酸序列融合的融合蛋白而产生，或者重组结合至

表面结合功能区。举例来说，有一些序列——作为与希望表达的肽融合的融合蛋白的一部分——有助于用于表达的原核细胞胞质中发现的包涵体的制造，和/或有助于含该序列的融合蛋白的纯化。可通过本领域公知的包含变性剂的方法以及分级分离例如离心分离、柱层析等方法将包涵体与其他原核细胞成分分离。在另一个实施例中，在可商购的载体中可插入想要表达为蛋白质或肽的想要的核酸序列，这样在表达时，基因产物还包含多种端部组氨酸残基，即“组氨酸标记”，其可通过常规的方法在基因产物的纯化中使用。

可将编码包括对骨骼具有结合特异性的肽的结合功能区的核酸序列插入到包括质粒(或质粒之外的载体)的核酸分子中并成为其一部分，而其他可使用的表达体系包括但不限于：用细菌噬菌体或粘粒 DNA 转化的细菌，包含酵母载体的酵母，包含真菌载体的真菌，用病毒例如杆状病毒感染的昆虫细胞系，以及哺乳动物细胞系，其中引入(例如转染或电穿孔)了质粒或病毒表达载体，或者感染了重组病毒，如牛痘病毒、腺病毒、腺相关病毒和逆转录病毒。肽的成功表达要么需要重组核酸分子包括肽的编码序列，要么需要载体本身含有转录和翻译所需的控制元素，其与用于表达的特定宿主体系相容并由其识别。

通过使用包括如上所述方法的本领域公知的分子生物学方法，可将各种启动子和增强子插入到载体中，或插入到包括编码序列的重组核酸分子中，以增强肽的表达，条件是所增强的肽的表达要与所使用的特定宿主细胞体系相容，例如，对该体系没有毒性。启动子的选择取决于所使用的表达体系。启动子的强度，即有助于转录的能力各不相同。通常，出于表达被克隆基因的目的，有利的是使用强的启动子，从而获得高水平的基因转录并且表达到基因产品中。举例来说，可使用本领域公知的细菌、噬菌体或质粒启动子，以提供编码该人工合成肽的插入的核苷酸序列的转录，由这些启动子已在含大肠杆菌的宿主细胞体系中观察到高水平的转录，这些启动子包括 lac 启动子、trp 启动子、T7 启动子、recA 启动子、核糖体 RNA 启动子、pR 和 pL 启动子、lacUV5、ompF、bla、Ipp 等。在哺乳动物表达体系的表达载体中通常使用的哺乳动物启动子是来自于哺乳动物病毒基因的启动子。其例子包括 SV40 早期启动子、鼠乳房肿瘤病毒 LTR 启动子、腺病毒主要晚期启动子、单纯疱疹病毒启动子以及 CMV 启动子。

当肽的表达会对宿主细胞致命或有害时，应选择宿主细胞株/系和表达载体使得启动子的作用被抑制直到被特异性地诱导。举例来说，在某些操纵子中，添加特定的诱导物对于插入的 DNA 的有效转录来说是必需的，例如，lac 启动子通过添加乳糖或异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(“IPTG”)而被诱导；当生长介质中缺少色氨酸时，trp 启动子被诱导；而可被用在具有 tet 敏感的启动子的哺乳动物表达载体中。因此，肽的表达可通过在一定条件下培养转化或转染的细胞而得到控制，所述条件为，由编码序列控制表达的启动子未被诱导；而当生长介质中细胞达到合适的密度时，启动子可被诱导以通过编码序列进行表达。用于有效的基因转录或信息翻译的其他控制因素也是本领域公知的，其包括增强子、转录或翻译启动信号、转录终止和聚腺苷酸化序列等。

本发明特定实施方案的前述说明已出于说明性的目的而被描述。通过这些描述和说明，本领域的其他技术人员可以通过现有的知识，容易地对于各种应用改变和/或修改本发明而不偏离本发明的基本概念，并且因此这些改变和/或修改意味着处于后附的权利要求的含义和范围内。

- <110> 阿费内基有限公司
- <120> 用于促进药物活性剂在骨骼上定位的方法和组合物
- <130> AF-027
- <150> US 60/914341
- <151> 2007-04-27
- <160> 142
- <170> PatentIn version 3.4
- <210> 1
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的
- <400> 1

Phe Tyr Ser Ile Phe Phe Pro Gln Met Gly Gly Ser Met
 1 5 10

- <210> 2
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 2

Phe Ser Gly Trp Phe Leu Pro Trp Glu Gly Arg Ser Glu
 1 5 10

- <210> 3
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 3

Phe Tyr Trp Pro Ser Phe Asn Ser Gly Asn Ser Leu Trp
 1 5 10

- <210> 4
- <211> 13
- <212> PRT

<400> 8

Trp Asn Tyr Gly Asp Val Gly Arg Trp Trp Asp Trp Gln
1 5 10

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 9

Trp Trp Gly Phe Trp Asn Gly Ser Ala Ala Pro Val Trp
1 5 10

<210> 10

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 10

Ser Ser Leu Leu Tyr Asn Trp Leu Asp Asn Thr Arg Gln Met Phe Leu
1 5 10 15

Pro Glu Ser

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 11

Trp Cys Val Trp Gly Leu Gly Ser Gly Cys Ala Gly Gly Ala Ala Val
1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 12

Trp Ser Pro Asp Val Leu Arg Trp Pro Trp Trp Ala Ser Gly Ser Ser
1 5 10 15

Glu

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 13

Phe Trp Ser Ala Asp Phe Ser Ala Glu Asp Ala Ser Ala Trp Trp Gly
1 5 10 15

Trp

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 14

Phe Gly Ser Trp Trp Trp Gly Ser Gly Ala Ala Ser
1 5 10

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 15

Phe Ser Pro Asp Phe Leu Ser Ser Trp Trp Gln Thr His Ala Gly Arg
1 5 10 15

Phe

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 16

Ser Phe Phe Ser Pro Tyr Ser Ala Phe Ser Ser Trp Val Glu Ser Ala
 1 5 10 15

Arg

<210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 17

Trp Ser Ser Phe Phe Pro Leu Gly Phe Ser Ser Trp Ser Gly Ser Val
 1 5 10 15

Pro

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 18

Phe Ser Phe Ser Ser Leu Pro Ala Trp Ser Ser Phe Trp Pro Thr Ser
 1 5 10 15

Thr

<210> 19

<211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 19

Phe Ser Phe Leu Ser Ser Ala Val Glu Arg Ile Tyr Gly Ala
 1 5 10

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 20

Thr Trp Gln Ser Tyr Leu Asp Leu Trp Gly Trp Thr Pro Thr Pro Ser
 1 5 10 15

Leu

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 21

Trp Pro Gly Ser Gly Trp Trp Trp Ser Glu Gly Leu Gln Arg Arg Glu
 1 5 10 15

Val

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 22

Trp Pro Met Pro Trp Trp Ser Glu Trp Ala Ser Leu His Gly Gly Lys
 1 5 10 15

Trp

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 23

Trp Trp Pro His Val Ser Gly Val Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Gly Pro
 1 5 10 15

Gly

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 24

Leu Gly Thr Phe Trp Ser Ser Val Trp Arg Gly Val Asp Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Glu

<210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 25

Val Gly Trp Gly Asp Trp Trp Lys Ser Gly Ser Val Trp Gln Gly Ala
 1 5 10 15

Leu

<210> 26
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 26

Phe Gly His Phe Glu Trp Pro Val Leu Gly Gln Trp Lys
 1 5 10

<210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 27

Phe Leu Ser Ala Ser Met Pro Tyr Leu Gln Ala Trp Ala
 1 5 10

<210> 28
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 28

Phe Ser Tyr Phe Ser Ser Pro Ser Thr Trp Val Gln Trp
 1 5 10

<210> 29
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 29

Ser Ser Met Phe Lys Asp Phe Asp Ser Leu Val Lys Ser Trp Ser Gly
 1 5 10 15

Arg Phe Ser

<210> 30

<211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 30

Phe Asp Ile Asp Trp Ser Gly Met Arg Ser Trp Trp Gly
 1 5 10

<210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 31

Ser Phe Asp Leu Ser Ala Phe Gly Ser Leu Trp Asp Arg Trp
 1 5 10

<210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 32

Phe Asp Arg Trp Gly Phe Gly Ala Gly Ala Trp Trp Asp Ser Val Ala
 1 5 10 15

Ala

<210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 33

Val Ala Val Ala Ser Val Gly Ala Phe Trp Ser Gly Leu Ser Gly Trp
 1 5 10 15

Ala

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 37

Trp Asp Phe Arg Ser Leu Arg Asp Trp Trp Pro Pro Ala Pro Ser Leu
1 5 10 15

Ser

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 38

Trp Leu Ser Gly Trp Ser Ala Gly Trp Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 39

Trp Ser Asn Gly Ala Trp Ala Lys Trp Trp Gly Val Ala Glu Glu Val
1 5 10 15

Gly

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 40

Ser Ile Phe Ser Thr Trp Asn Pro Trp Ser Pro Tyr Ser Val Ser Arg
1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Lys
20

<210> 41
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 41

Ser Trp Trp Gly Phe Trp Asn Gly Ser Ala Ala Pro Val Trp Ser Arg
1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Lys
20

<210> 42
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 42

Ser Phe Gly Ser Trp Trp Trp Gly Ser Gly Ala Ala Ser Ser Arg Gly
1 5 10 15

Ser Ser Gly Lys
20

<210> 43
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 43

Ser Leu Gly Thr Phe Trp Ser Ser Val Trp Arg Gly Val Asp Ala Gly
1 5 10 15

Gly Glu Ser Arg Gly Ser Ser Gly Lys
20 25

<210> 44
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 44

Ser Phe Asp Ile Asp Trp Ser Gly Met Arg Ser Trp Trp Gly Ser Arg
 1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Lys
 20

<210> 45
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 45

Ser Trp Asp Phe Arg Ser Leu Arg Asp Trp Trp Pro Pro Ala Pro Ser
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Arg Gly Ser Ser Gly Lys
 20 25

<210> 46
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(2)
 <223> Xaa 包括 Phe, Trp, 或者 Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa 包括任意氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(5)
 <223> Xaa 包括 Phe, Trp, 或者 Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 包括 Phe, Trp, 或者 Tyr

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa 是任意氨基酸

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa 是任意氨基酸

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 包括 Ser, Thr, Ala, 或者 Gly

<400> 48

Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Leu
 1 5

<210> 49
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 49

Ser Ser Asp Trp Gly Val Val Ala Ser Ala Trp Asp Ala Phe Glu Ala
 1 5 10 15

Leu Asp Ala Ser Arg
 20

<210> 50
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 50

Ser Ser Gly Ala Asp Phe Gly Tyr Gly Ser Trp Val Ser Phe Ser Ala
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Ser Arg
 20

<210> 51
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的

<400> 51

Ser Arg Gly Glu Ala Ser Gly Trp Glu Ala Phe Ser Ala Leu Glu Ala
 1 5 10 15

Ala Val Val Ser Arg
 20

<210> 52
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 52

Ser Arg Ser Ser Asp Ser Ala Phe Ser Ser Phe Ser Ala Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Ser Val Val Ser Arg
 20

<210> 53
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 53

Ser Arg Asp Gly Ala Gly Ala Ala Ala Trp Gly Ala Phe Ser Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Ser Glu Ser Arg
 20

<210> 54
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 54

Ser Arg Gly Gly Glu Ala Ala Ala Gly Ala Trp Val Ser Phe Ser Ala
1 5 10 15

Leu Glu Ser Ser Arg
20

<210> 55

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 55

Ser Arg Val Ser Gly Val Ala Ala Trp Glu Ala Phe Ala Gly Leu Ser
1 5 10 15

Val Ser Ser Ser Arg
20

<210> 56

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 56

Ser Arg Asp Gly Gly Ser Phe Ser Ala Phe Ser Ser Leu Val Trp Ala
1 5 10 15

Ala Asp Ser Ser Arg
20

<210> 57

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 57

Ser Ser Val Ala Gly Asp Val Gly Ser Ser Trp Ala Ala Phe Ala Ser
1 5 10 15

Leu Ala Ala Ser Arg
20

<210> 58
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 58

Ser Ser Trp Glu Val Phe Ser Ser Leu Glu Ser Gly Ser Val Gly Ala
1 5 10 15

Gly Ala Gly Ser Arg
20

<210> 59
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 59

Ser Ser Ser Ser Gly Ala Val Ser Ser Phe Glu Ser Leu Ser Gly Ser
1 5 10 15

Val Val Ser Ser Arg
20

<210> 60
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 60

Ser Arg Glu Gly Val Ala Trp Glu Ala Phe Gly Ala Leu Ser Ser Phe
1 5 10 15

Ala Ala Asp Ser Arg
20

<223> 合成的

<400> 64

Ser Ser Ser Met Pro Val Gly Trp Asp Ser Trp Arg Gly Leu Glu Trp
1 5 10 15

Ser Asp Arg Ser Arg
20

<210> 65

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 65

Ser Ser Glu Gly Arg Gly Gly Trp Asn Ser Trp Glu Ala Phe Arg Glu
1 5 10 15

Leu Val Val Ser Arg
20

<210> 66

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 66

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ala Trp Glu Ser Trp Arg Gly Leu Ser Gly
1 5 10 15

Val Glu Leu Ser Arg
20

<210> 67

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 67

Ser Arg Asn Val Glu Gly Ser Trp Glu Ser Phe Ala Gly Leu Ser His
1 5 10 15

Val Arg Glu Ser Arg
20

<210> 68
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 68

Ser Arg Glu Asp Gly Gly Arg Trp Glu Ser Phe Leu Gly Leu Ser Ala
1 5 10 15

Val Glu Val Ser Arg
20

<210> 69
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 69

Ser Ser Val Glu Gly Ser Ala Trp Ser Ala Phe Lys Ser Leu Ser Ser
1 5 10 15

Glu Gly Val Ser Arg
20

<210> 70
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 70

Ser Arg Val Glu Gly Gly Ala Trp Gln Ala Leu Ala Gly Leu Thr Val
1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Arg
20

<210> 71
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 71

Ser Ser Pro Pro Lys His Ala Trp Gly Ser Phe Asp Ala Leu Gly Gly
 1 5 10 15

Gln Val Val Ser Arg
 20

<210> 72
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 72

Ser Ser Glu Arg Gly Val Gly Trp Glu Val Phe Leu Ala Met Glu Gly
 1 5 10 15

Ala Arg Met Ser Arg
 20

<210> 73
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 73

Ser Ser Ser Ser Ser Gly Thr Trp Gln Ala Phe Thr Gly Leu Ser Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Arg
 20

<210> 74
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 74

Ser Ser Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Trp Asp Ala Phe Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Val Gly Ser Arg
20

<210> 75

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 75

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Gly Phe Ser Ser Leu Ser Gly
1 5 10 15

Asn Gly Arg Ser Arg
20

<210> 76

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 76

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

Ser Trp Thr Ser Arg
20

<210> 77

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 77

Ser Ser Glu Gly Ser Gly Leu Trp Asp Ser Phe Ser Ser Leu Ser Val
1 5 10 15

His Glu Val Ser Arg
20

<210> 78
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 78

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

Leu Ala Val Ser Arg
20

<210> 79
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 79

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

Leu Glu Val Ser Arg
20

<210> 80
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 80

Ser Ser Glu Ala Gly Arg Gly Trp Glu Gly Phe Lys Ala Leu Glu Gly
1 5 10 15

Tyr Gln Val Ser Arg
20

<223> 合成的

<400> 84

Ser Arg Val Ala Ala Val Ser Trp Glu Phe Phe Gly Ser Leu Ser Ser
1 5 10 15

Ala Gly Val Ser Arg
 20

<210> 85

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 85

Ser Ser Ala Asp Leu Gly Val Ser Gly Ser Trp Glu Gly Phe Ala Leu
1 5 10 15

Met Arg Gly Ser Arg
 20

<210> 86

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 86

Ser Ser Val Gly Gln Met Gly Trp Glu Ala Phe Glu Ser Leu Ser Gly
1 5 10 15

Thr Gly Gly Ser Arg
 20

<210> 87

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 87

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

Ser Val Ala Ser Arg
20

<210> 88
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 88

Ser Ser Tyr Phe Asp Val Phe Ser Ser Met Thr Gly Thr Arg Ala Ala
1 5 10 15

Gly Ser Trp Ser Arg
20

<210> 89
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 89

Ser Ser Ala Tyr Ser Val Phe Ser Ser Leu Arg Ala Asp Asn Ser Gly
1 5 10 15

Gly Ala Val Ser Arg
20

<210> 90
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 90

Ser Ser Gly Gly Ile Ala Ser Leu Lys Tyr Asp Val Val Lys Thr Trp
1 5 10 15

Glu Ser Arg

<210> 91
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 91

Gly Gly Gly Ala Trp Glu Ala Phe Ser Ser Leu Ser Gly Ser Arg Val
 1 5 10 15

<210> 92
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 是 Leu 或者 Val

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa 是任意氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 是 Lys 或者 Arg

<400> 92

Xaa Xaa Phe Pro Leu Xaa Gly
 1 5

<210> 93
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 93

Ser Ser Ser Val Asp Leu Tyr Phe Pro Leu Lys Gly Asp Val Val Ser
 1 5 10 15

Arg

<210> 94
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 94

Ser Ser Phe Glu Pro Leu Arg Phe Pro Leu Lys Gly Val Pro Val Ser
 1 5 10 15

Arg

<210> 95
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 95

Ser Ser Glu Gly Val Gly Gly Phe Pro Leu Lys Gly Ile Pro Gln Glu
 1 5 10 15

Ala Trp Ala Ser Arg
 20

<210> 96
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa 是任意氨基酸

<400> 96

Ser Ser Pro Ser Gly Val Val Phe Pro Leu Arg Gly Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Val Xaa Lys Ser Arg
 20

<210> 97
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 97

Ser Ser Gly Gly Phe Val Pro Phe Pro Leu Arg Gly Glu Val Trp Asp
 1 5 10 15

Gly Val His Ser Arg
 20

<210> 98
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 98

Ser Ser Glu Gly Ser Leu Ser Phe Pro Leu Lys Gly Gln Val Tyr Ser
 1 5 10 15

Gly Trp Gly Ser Arg
 20

<210> 99
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 99

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

Trp Pro Val Ser Arg
 20

<210> 100
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 100

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

Ala	Ala	Glu	Ser	Arg
			20	

<210> 101

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 101

Ser	Ser	Met	Trp	Asp	Val	Gly	Phe	Pro	Leu	Lys	Gly	Arg	Trp	Ile	Asp
1				5					10					15	

Gly	Ala	Asp	Ser	Arg
			20	

<210> 102

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 102

Ser	Ser	Ser	Asn	Ser	Leu	Trp	Phe	Pro	Leu	Arg	Gly	Ser	Thr	Val	Glu
1				5					10					15	

Val	Gly	Ala	Ser	Arg
			20	

<210> 103

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 103

Ser Ser Gly Pro Ala Leu Arg Leu Pro Leu Arg Gly Thr Val Val Ser
1 5 10 15

Asp Val Pro Ser Arg
20

<210> 104
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 104

Ser Ser Ala Asp Arg Val Ala Trp Pro Leu Lys Gly Ala Pro Val Trp
1 5 10 15

Val Lys Glu Ser Arg
20

<210> 105
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 105

Ser Ser Gly Leu Ala Leu Gly Leu Pro Ile Lys Gly Trp Thr Val Ser
1 5 10 15

Gly Lys Asp Ser Arg
20

<210> 106
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 106

Ser Ser Gly Tyr Thr Leu Gly Phe Pro Leu Ser Gly Gln Thr Ile Lys
1 5 10 15

Asp Trp Pro Ser Arg
20

<210> 107
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 107

Ser Ser Glu Gly Trp Val His Phe Pro Leu Lys Gly Asp Val Met Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Phe Ser Arg
 20

<210> 108
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 108

Ser Ser Gly Arg Tyr Val Ser Leu Pro Leu Lys Gly Glu Val Val Pro
 1 5 10 15

Gln Thr Ala Ser Arg
 20

<210> 109
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 109

Ser Ser Glu Gly Gly Val Gly Phe Pro Leu Lys Gly Ile Pro Gln Glu
 1 5 10 15

Ala Trp Ala Ser Arg
 20

<210> 110
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 110

Ser Arg Val Asp Ser Val Asn Phe Pro Leu Arg Gly Glu Thr Val Thr
 1 5 10 15

Ser Met Val Ser Arg
 20

<210> 111

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 111

Ser Ser Glu Gly Val Gly Gly Phe Pro Leu Lys Gly Ile Pro Gln Glu
 1 5 10 15

Ala Trp Ala Ser Arg
 20

<210> 112

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa 是任意氨基酸

<400> 112

Ser Ser Pro Ser Gly Val Val Phe Pro Leu Arg Gly Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Val Xaa Lys Ser Arg
 20

<210> 113

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 113

Ser Ser Gly Gly Phe Val Pro Phe Pro Leu Arg Gly Glu Val Trp Asp
 1 5 10 15

Gly Val His Ser Arg
 20

<210> 114

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 114

Ser Ser Glu Gly Ser Leu Ser Phe Pro Leu Lys Gly Gln Val Tyr Ser
 1 5 10 15

Gly Trp Gly Ser Arg
 20

<210> 115

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 115

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

Trp Pro Val Ser Arg
 20

<210> 116

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 116

Arg Gly Asp Xaa
1

<210> 120
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 120

Ala Leu Pro Ser Thr Ser Ser Gln Met Pro Gln Leu
1 5 10

<210> 121
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 121

Ser Ser Ser Cys Gln His Val Ser Leu Leu Arg Pro Ser Ala Ala Leu
1 5 10 15

Gly Pro Asp Asn Cys Ser Arg
20

<210> 122
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 122

Leu Glu Arg Gly Arg Asp Tyr Glu Lys Asn Lys Val Cys Lys Glu Phe
1 5 10 15

Ser His Leu Gly Lys Asp Asp Phe Glu Asp Phe
20 25

<210> 123
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<210> 128	
<211> 60	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 128	
agttgggatt ttcgttcttt gcgtgactgg tggcctccgg ctcttcttt gtcgtctaga	60
<210> 129	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 129	
agctttgata ttgattggtc tggatgcgt tcgtgggtgg ggtctaga	48
<210> 130	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 130	
agctgggtggg gtttttggaa tggttcggcg gcgcctgtgt ggtctaga	48
<210> 131	
<211> 60	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 131	
agtcttggga cgttttggtc ttcggtgtgg cggggcgtgg atgcgggtgg tgagtctaga	60
<210> 132	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 132	
agcttttctt ggttttctta tccgtctcag ctgtggatgg agtctaga	48

<210> 133
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 133

Ser Trp Trp Gly Phe Trp Asn Gly Ser Ala Ala Pro Val Trp Ser Arg
 1 5 10 15

Gly Ser Ser Glu Ser Ala Gly Ala Trp Glu Ala Phe Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Gly Ser Arg Val
 35

<210> 134
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 134

Ser Trp Trp Gly Phe Trp Asn Gly Ser Ala Ala Pro Val Trp Ser Arg
 1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Ala Gly Ala Trp Glu Ala Phe Ser Ser Leu Ser Gly
 20 25 30

Ser Arg Val
 35

<210> 135
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 135

Ser Trp Trp Gly Phe Trp Asn Gly Ser Ala Ala Pro Val Trp Ser Arg
 1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Ala Gly Ala Leu Gly Phe Pro Leu Lys Gly Glu Val
 20 25 30

Val Glu Gly Trp Ala
35

<210> 136
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 136

Ser Phe Gly Ser Trp Trp Trp Gly Ser Gly Ala Ala Ser Ser Arg Gly
1 5 10 15

Ser Ser Gly Gly Gly Ala Leu Gly Phe Pro Leu Lys Gly Glu Val Val
20 25 30

Glu Gly Trp Ala
35

<210> 137
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 137

Ser Trp Trp Gly Phe Trp Asn Gly Ser Ala Ala Pro Val Trp Ser Arg
1 5 10 15

Gly Ser Ser Glu Ser Ala Gly Ala Trp Glu Ala Phe Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Gly Ser Arg Val Gly Ser Ser Gly Lys
35 40

<210> 138
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 138

Ser Trp Trp Gly Phe Trp Asn Gly Ser Ala Ala Pro Val Trp Ser Arg
1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Ala Gly Ala Trp Glu Ala Phe Ser Ser Leu Ser Gly
 20 25 30

Ser Arg Val Gly Ser Ser Gly Lys
 35 40

<210> 139
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 139

Ser Trp Trp Gly Phe Trp Asn Gly Ser Ala Ala Pro Val Trp Ser Arg
 1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Ala Gly Ala Leu Gly Phe Pro Leu Lys Gly Glu Val
 20 25 30

Val Glu Gly Trp Ala Gly Ser Ser Gly Lys
 35 40

<210> 140
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 140

Ser Phe Gly Ser Trp Trp Trp Gly Ser Gly Ala Ala Ser Ser Arg Gly
 1 5 10 15

Ser Ser Gly Gly Gly Ala Leu Gly Phe Pro Leu Lys Gly Glu Val Val
 20 25 30

Glu Gly Trp Ala Gly Ser Ser Gly Lys
 35 40

<210> 141
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

