



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112384527 B

(45) 授权公告日 2023. 06. 27

(21) 申请号 201980021129.1

(22) 申请日 2019.03.22

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112384527 A

(43) 申请公布日 2021.02.19

(30) 优先权数据
18163777.8 2018.03.23 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.09.22

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/057243 2019.03.22

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/180204 EN 2019.09.26

(73) 专利权人 布鲁塞尔自由大学
地址 比利时,布鲁塞尔

(72) 发明人 B·范霍莱贝克

(74) 专利代理机构 北京威禾知识产权代理有限公司 11838

专利代理师 沈超

(51) Int.Cl.
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2012140274 A2,2012.10.18
Benoit Vanhollebeke et al..Tip cell-specific requirement for an atypical Gpr124-and Reck-dependent.《eLife》.2015,
Benoit Vanhollebeke et al..Tip cell-specific requirement for an atypical Gpr124-and Reck-dependent.《eLife》.2015,
NCBI.Accession No:NP_004616.2.
《GenBank》.2018,
NCBI.Accession No:NP_478679.1.
《GenBank》.2018,

审查员 马俊凯

权利要求书3页 说明书79页
序列表125页 附图36页

(54) 发明名称

Wnt信号传递激动剂分子

(57) 摘要

本申请涉及新型治疗剂,特别是涉及能够激活(GPR)124/RECK/Frizzled/脂蛋白受体相关蛋白(LRP)介导的Wnt信号传递的试剂,其中所述试剂在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递。本发明的试剂对于预防或治疗神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的中枢神经系统(CNS)疾病特别有用。

1. 一种试剂,其中所述试剂是Wnt7a多肽的变体,能够激活G蛋白偶联受体 (GPR) 124/RECK/Frizzled/脂蛋白受体相关蛋白 (LRP) 介导的Wnt信号转导,其中所述试剂在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活Frizzled/LRP介导的Wnt信号转导以及其中所述试剂为如SEQ ID NO: 51所示的序列的变体,其中:

-在对应于SEQ ID NO:51中位置17的位置处的谷氨酰胺(Q) 残基被丙氨酸(A) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置20的位置处的异亮氨酸(I) 残基被丙氨酸(A) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置25的位置处的脯氨酸(P) 残基被丙氨酸(A) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置27的位置处的丙氨酸(A) 残基被精氨酸(R) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置28的位置处的异亮氨酸(I) 残基被丙氨酸(A) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置33的位置处的谷氨酸(E) 残基被丙氨酸(A) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置37的位置处的甲硫氨酸(M) 残基被丙氨酸(A) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置39的位置处的亮氨酸(L) 残基被丙氨酸(A) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置41的位置处的谷氨酸(E) 残基被丙氨酸(A) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置44的位置处的苯丙氨酸(F) 残基被丙氨酸(A) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置50的位置处的精氨酸(R) 残基被丙氨酸(A) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置52的位置处的天冬酰胺(N) 残基被谷氨酰胺(Q) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置68的位置处的缬氨酸(V) 残基被丙氨酸(A) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置129的位置处的异亮氨酸(I) 残基被丙氨酸(A) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置131的位置处的苯丙氨酸(F) 残基被丙氨酸(A) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置133的位置处的赖氨酸(K) 残基被丙氨酸(A) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置135的位置处的苯丙氨酸(F) 残基被丙氨酸(A) 残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置141的位置处的异亮氨酸(I) 残基被丙氨酸(A) 残基取

代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置146的位置处的精氨酸(R)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置158的位置处的精氨酸(R)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置159的位置处的赖氨酸(K)残基被丙氨酸(A)、丝氨酸(S)或亮氨酸(L)残基取代;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置181的位置处的赖氨酸(K)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置191的位置处的精氨酸(R)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置198的位置处的赖氨酸(K)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置200的位置处的赖氨酸(K)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置205的位置处的缬氨酸(V)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置208的位置处的谷氨酸(E)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置214的位置处的精氨酸(R)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置216的位置处的赖氨酸(K)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置218的位置处的脯氨酸(P)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置222的位置处的赖氨酸(K)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置223的位置处的异亮氨酸(I)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者;或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置229的位置处的酪氨酸(Y)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置232的位置处的脯氨酸(P)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置235的位置处的苏氨酸(T)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置248的位置处的谷氨酸(E)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置289的位置处的精氨酸(R)残基被丙氨酸(A)残基取代;
或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置291的位置处的色氨酸(W)残基被丙氨酸(A)残基取代；或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置307的位置处的苏氨酸(T)残基被丙氨酸(A)残基取代；或者

-在对应于SEQ ID NO:51中位置318的位置处的赖氨酸(K)残基被丙氨酸(A)残基取代。

2. 根据权利要求1所述的试剂,其中在对应于SEQ ID NO:51中位置159的位置处的赖氨酸(K)残基被丙氨酸(A)残基取代。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂,其中所述试剂:

-在存在RECK和GPR124的情况下能够在细胞膜处诱导Frizzled和LRP多肽的异聚体化,但在不存在RECK和/或GPR124的情况下不能;并且在存在RECK和GPR124的情况下能够在细胞膜处同时结合Frizzled和LRP多肽,但在不存在RECK和/或GPR124的情况下不能;

-能够结合所述GPR124和/或RECK多肽;

-能够结合所述RECK多肽,并且能够结合RECK多肽的半胱氨酸结4(CK4)区、CK5区、或CK4区和CK5区;

-能够结合所述Frizzled多肽的富含半胱氨酸的结构域(CRD);和/或

-能够结合所述LRP多肽的DKK结合位点和/或Wnt结合位点。

4. 编码根据权利要求1至3中任一项所述的试剂的核酸。

5. 核酸表达盒,其包含根据权利要求4所述的核酸,可操作地连接至启动子和/或转录和翻译调控信号。

6. 载体,其包含根据权利要求4所述的核酸或根据权利要求5所述的核酸表达盒,所述载体是病毒载体。

7. 药物组合物,其包含根据权利要求1至3中任一项所述的试剂、根据权利要求4所述的核酸、根据权利要求5所述的核酸表达盒或根据权利要求6所述的载体、和药学上可接受的载体。

8. 根据权利要求1至3中任一项所述的试剂、根据权利要求4所述的核酸、根据权利要求5所述的核酸表达盒、根据权利要求6所述的载体或根据权利要求7所述的药物组合物用于制备预防或治疗神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的中枢神经系统(CNS)疾病的药物的用途;其中,所述神经血管疾病选自缺血性中风、出血性中风、缺血/再灌注损伤、脑动脉瘤、动静脉畸形(AVM)、海绵状畸形、脉管炎、脊柱血管畸形、颈动脉狭窄、烟雾病和颅内动脉粥样硬化及其组合,或所述CNS疾病选自多发性硬化、缺血性中风、脑癌、癫痫、痴呆、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化症、感染性脑病、脑外伤、偏头痛和慢性外伤性脑病及其组合。

9. 根据权利要求8所述的用途,其中,所述神经血管疾病引起的缺血性中风选自脑出血和/或蛛网膜下腔出血。

10. 根据权利要求8所述的用途,其中,所述痴呆选自血管性痴呆和/或HIV-1相关的痴呆。

Wnt信号传递激动剂分子

技术领域

[0001] 本发明广泛地涉及医学领域,并且更确切地涉及神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的中枢神经系统(CNS)疾病的治疗。本发明提供了可用于神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的CNS疾病的疗法(therapy),特别是可用于神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的CNS疾病的治疗(treatment)的新型Wnt信号传递(Wnt signaling)激动剂分子,以及相关的产品,方法和用途。

背景技术

[0002] Wnt蛋白构成了一个大的高度保守的分泌型脂质修饰的蛋白质家族,其在动物发育和成体组织内环境稳定中介导细胞间通讯。它们通过调节细胞增殖、分化、迁移、凋亡、极性和遗传稳定性来发挥多效功能。失调的Wnt信号传递水平与大范围的人类病理相关,包括癌症和中枢神经系统疾病如神经变性。

[0003] 卷曲蛋白(Frizzled)(Fz)家族的十个成员是七次跨膜蛋白,充当Wnt蛋白的受体。Wnt/Fz结合关系是混杂的,其中多个Wnt竞争与单个Fz的结合,而多个Fz能够响应给定的Wnt,这极大地造成了Wnt信号传递的复杂性。最近的晶体学研究证实,Wnt/Fz相互作用化学与明确的Wnt和Fz配对不相容,Wnt和Fz之间的两个接触位点均由严格或化学上保守的残基控制(dominated)(Janda等,Science 2012,第337卷,第59-64页)。这些观察提出了一个问题,即细胞如何解释来自多个Wnt配体的同时以及有时冲突的信号传递输入的混合表达模式。在一些生物学环境中,细胞可以无差别地整合所有信号输入并通过考虑它们总的净平衡以及功能上相互关联的细胞内信号传递级联的协调解译,触发适当的响应。然而,尽管Wnt/Fz表达环境(landscapes)复杂,其他生物学过程仍显示出令人惊讶的严格Wnt配体选择性。

[0004] 哺乳动物前脑和腹侧脊髓的脑血管发育在Wnt7a和Wnt7b的排他(exclusive)控制下运行,因此充当高度选择性Wnt响应过程的范例。为了响应神经祖细胞衍生的Wnt7并激活Wnt/ β -联蛋白(β -catenin)信号传递,脑内皮细胞必须表达Gpr124,Gpr124是G蛋白偶联受体和GPI锚定糖蛋白Reck的粘附类别的孤儿成员(Vanhollebeke等人,Elife,2015年,第4卷,第1-25页)。此外,当在培养的细胞中表达时,Gpr124和Reck物理上相互作用并协同刺激Wnt7特异性应答(同上)。

[0005] 重要的是,内皮Wnt/ β -联蛋白信号传递是血脑屏障(BBB)生理的重要调节,控制胚胎发生过程中CNS血管网络的扩张和成熟,并有助于成体BBB的维持。尽管BBB功能障碍长期以来与多种神经系统疾病有关,但最近的证据表明,在功能障碍的BBB处的Wnt/ β -联蛋白信号传递的纯粹刺激足以显著改善小鼠的缺血性中风和脑癌。因此,能够刺激脑内皮细胞中的Wnt/ β -联蛋白信号传递且基本上不与其他Frizzled途径交叉反应的疗法对于各种神经系统疾病的治疗将是非常有利的。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明至少部分地基于细胞用于选择性响应Wnt7配体的第一个“Wnt解码模块

(Wnt decoding module)”的发现和表征。特别地,在本文中表征的Wnt解码模块中,通过RECK赋予选择性,RECK以独立于Frizzled的方式介导Wnt7特异性结合。Frizzled信号传递对Wnt7的可获得性取决于GPR124,所述GPR124是一种RECK结合配偶体,其充当RECK结合的Wnt7和细胞内Disheveled (Dvl) 支架之间的信号传递缺陷的跨膜连接物(tether)。通过桥接Frizzled和GPR124,Dvl聚合物组装了配体特异性RECK/Gpr124/Frizzled/LRP信号体(signalosome)。因此,本发明人提出了这样的模型,其中通过使Dvl聚合物同时结合Frizzled和GPR124以及Wnt7与RECK的特异性结合,在配体特异性Wnt信号体内形成更高阶的RECK/GPR124/Frizzled/LRP受体复合物。

[0008] 在发现了这种新机制后,进一步的研究出乎意料地揭示,可以设计能够在表达RECK和GPR124的细胞中选择性激活Wnt信号传递的新型激动剂,这样的激动剂可用作治疗剂,例如特别用于治疗具有神经血管并发症(neurovascular implications)的CNS疾病,尤其包括中风、多发性硬化症、脑癌、癫痫和神经退行性疾病。

[0009] 因此,一方面提供了能够激活GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递的试剂,其中所述试剂在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递。

[0010] 在某些实施方式中,所述试剂可以是蛋白质、多肽或肽。因此,另一方面提供了编码所述试剂的核酸,其中所述试剂是蛋白质、多肽或肽。

[0011] 进一步的方面提供了核酸表达盒,其包含与启动子和/或转录和翻译调控信号可操作地连接的所述核酸。还提供了包含所述核酸或核酸表达盒的载体(vector)。

[0012] 另一方面提供了药物组合物,其包含所述试剂、所述核酸或核酸表达盒或所述载体以及药学上可接受的载体(carrier)。

[0013] 进一步的方面提供了用作药物的所述试剂、所述核酸或核酸表达盒、所述载体或所述药物组合物。

[0014] 还提供了用于预防或治疗神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的中枢神经系统(CNS)疾病的所述试剂、所述核酸或核酸表达盒、所述载体或所述药物组合物。

[0015] 另一个方面提供了用于鉴定可用作治疗剂的试剂的体外方法,所述治疗剂例如特别用于预防或治疗神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的CNS疾病,所述方法包括确定测试试剂是否激活GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递而在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递。

[0016] 在以下各节和所附权利要求中描述了本发明的这些和其他方面以及优选实施方式。所附权利要求的主题在此具体地并入本说明书中。

附图说明

[0017] 图1说明了(A)在未透化的WT、FZ₁₋₁₀^{-/-},LRP5^{-/-};LRP6^{-/-}和GPR124^{-/-};RECK^{-/-}细胞中瞬时表达的Wnt7a-V5或Wnt3a-V5的抗V5免疫染色。(B)在瞬时共表达Wnt7a-V5和所示(共)受体的GPR124^{-/-};RECK^{-/-}细胞中,结果与(A)相同。(C)三重(1:1:1)共培养物中的配体捕获测定。在转染有如所示的各种(共)-受体的FZ₁₋₁₀^{-/-}HEK293T竞争性细胞存在的情况下,通过共培养Wnt7a或Wnt3a发射细胞,用Fz5转染并以旁分泌方式刺激的HEK293-STF报告细胞的超顶闪(super top-flash)荧光素酶(STF)活性。(D)使用靶向在GPR124^{-/-};RECK^{-/-}细胞中共

表达的Wnt7a-V5和HA-Reck或其变体的抗V5和抗HA第一抗体定量原位PLA的PLA信号。(E)使用针对在GPR124^{-/-};RECK^{-/-}细胞中共表达的Wnt7a-V5和所示的HA标记的(共)受体的抗V5和抗HA第一抗体定量原位PLA的PLA信号。比例尺:10μm。(F)定量共转染有Wnt7a-V5或Wnt3a-V5和所示HA标记的Reck变体的GPR124^{-/-};RECK^{-/-}细胞的抗V5/抗HA PLA信号——具有(y轴)或没有Gpr124(x轴)。(G) Reck和其Gpr124以及Wnt7结合基序的示意图。*p<0.05,***P<0.001;数据代表平均值±SD。

[0018] 图2说明了(A) Wnt7a、V5-标记的Wnt7a变体和旁系同源物的示意图,(B)在共表达HA-Reck的GPR124^{-/-};RECK^{-/-}细胞中使用抗V5和抗HA第一抗体定量的PLA检查。(C) HEK293-STF细胞中Gpr124/Reck依赖的相对STF荧光素酶活性,Wnt7a的101个不同单残基变体的信号传递及其在Wnt7a结构上的位置(x轴和下面的结构模型)。相对荧光素酶活性相对于WT Wnt7a值归一化。所有Wnt7a残基都突变为丙氨酸,预期丙氨酸残基变为精氨酸。(D) 跨脊椎动物进化枝的Wnt7接头结构域(Wnt7 linker domain)的比对。Mm,小鼠(Mus musculus);Gg,红原鸡(Gallus gallus);Xl,非洲爪蟾(Xenopus laevis);Dr,斑马鱼(Danio rerio)。将Gpr124/Reck依赖性信号传递降低至小于10%的八个Wnt7a变异(落入氨基酸区域pWnt7a 238-266的范围)下划线。相应的单残基变体的活性及其活性类别在(C)中确定。Mm Wnt3a和四重Wnt7a变体(Wnt7^{4A})接头区域的序列在下部示出。(E) Wnt7a-V5或Wnt7a^{4A}-V5与HA-Reck之间的抗V5/HA PLA。通过对连续稀释的细胞上清液进行半定量抗V5点印迹分析来评估配体分泌。丽春红S染色用作加载对照。比例尺,10μm。*P<0.05,***P<0.001;数据代表平均值±SD,(F)使用等温滴定量热法(ITC)探测纯化的重组Reck-CK-Fc与合成的pWnt7a肽之间的相互作用。pWnt7a、pWnt7a^{4A}和pWnt3a在重组Reck-CK-Fc中的ITC(上部图)。Reck-CK-Fc、Reck-CK^{ΔCK1}-Fc、Reck-CK^{ΔCK2}-Fc、Reck-CK^{ΔCK3}-Fc、Reck-CK^{ΔCK4}-Fc和Reck-CK^{ΔCK5}-Fc与pWnt7b的ITC(中间和底部图)。(G)通过使用SMFS探测Reck-CK-Fc/pWnt7b相互作用。显示了基于力-距离曲线的原子力显微术(基于FD的AFM)的原理。用融合至pWnt7b肽的聚乙二醇(PEG)间隔区功能化的AFM尖端接近和撤回自包被有Reck-CK-Fc的表面。

[0019] 图3显示(A) Lrp5/6中CRISPR/Cas9原间隔区邻近基序(proto-spacer adjacent motif)(PAM)位点的示意图(左图),以及在使用STF报告质粒和所示的刺激Reck/Gpr124依赖性Wnt7a信号传递或Gpr124/Reck依赖性Wnt1信号传递的质粒组合转染后48小时,WT HEK293T细胞或LRP5^{-/-}、LRP6^{-/-}或双突变LRP5^{-/-};LRP6^{-/-}HEK293T细胞克隆中的荧光素酶活性。(B)在存在或不存在共表达的Dkk-1的情况下,WT HEK293T细胞中Gpr124/Reck依赖性和非依赖性信号传递的STF活性。(C)在使用STF报告质粒和所示的刺激Reck/Gpr124依赖性Wnt7a信号传递或Gpr124/Reck非依赖性Wnt1信号传递的表达质粒的组合转染后48小时,WT HEK293T细胞或FZ突变的HEK293T细胞克隆中的荧光素酶活性。(D) Fz CRD中CRISPR/Cas9 PAM位点的示意图。(E)在使用所示的Fz或Fz CRD变体共转染后,FZ1-10^{-/-}HEK293T中Gpr124/Reck依赖性信号传递的STF活性。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001;数据代表平均值±SD。

[0020] 图4显示(A) Gpr124及其结构域变体的示意图。(B)注射了100pg所示RNA的WT和gpr124突变体胚胎的60hpf脑血管系统的代表性3D线图。黑色管代表Gpr124/Reck依赖性脑内CtA,其从灰色的神经周围原始后脑通道(PHBC)长出。(C)在单细胞阶段注射有100pg所示RNA的60hpf gpr124吗啉寡核苷酸处理(morphant)胚胎的后脑中央动脉(CtA)。(D)用Reck、Fz1、Wnt7a和所示Gpr124变体共转染的HEK293-STF细胞的相对荧光素酶活性。***p<0.001;

数据代表平均值 $\pm$ SD。(E)在单细胞阶段注射有100pg所示mRNA的60hpf *gpr124*吗啉寡核苷酸处理胚胎的后脑CtA。*** $P<0.001$;数据代表平均值 $\pm$ SD。

[0021] 图5说明了(A)在共表达Dvl-GFP和N末端FLAG标签形式的Gpr124或其ICD变体的总细胞裂解物中的抗FLAG免疫共沉淀测定。(B)在用所示的质粒组合转染的FZ1-10-/-和WT HEK293T细胞的全细胞裂解物中,DVL2和p-DVL2(T224)的免疫印迹。在用所示的不同构建物组合转染后48小时之后获得的全细胞提取物中,用抗DVL2抗体(箭头)或通过识别磷酸苏氨酸224(p-DVL2)的磷酸特异性抗体可以将磷酸化DVL2(T224)检测为缓慢迁移带。(C)在斑马鱼囊胚深层(deep layer)(DEL)细胞中单独表达或在Dvl存在下表达的Fz4-GFP和Gpr124-tagRFP的细胞内分布。(D)在斑马鱼囊胚DEL细胞中与Fz4或Gpr124共表达的Dvl-GFP的细胞内分布。(E)在不存在或存在Dvl的情况下,在斑马鱼囊胚DEL细胞中共表达的Fz4-GFP和Gpr124-tagRFP的细胞内分布。在右图中,星号标注的细胞被放大,绿色和红色通道的像素强度沿着虚拟的顺时针路径沿从a到b的细胞皮层(cell cortex)被绘制在下面。(F)在EVL细胞中与(E)相同。(G)在存在或不存在Dvl过表达的情况下,表达Gpr124-VN155(I152L)和Fz1-VC155的斑马鱼DEL细胞中的BiFC信号。*** $P<0.001$;数据代表平均值 $\pm$ SD。

[0022] 图6表示用于Gpr124/Reck依赖性、Wnt7特异的Fz信号传递的示例性集成模型。

[0023] 图7显示(A)用不同的Wnt7变体刺激的Fz5依赖性途径(浅灰色,Fz5转染)或Gpr124/Reck依赖性途径(黑色,Gpr124、RECK和Fz1转染)的HEK293-STF细胞中的相对荧光素酶活性。(B)HEK293-STF细胞中Gpr124/Reck依赖性和Fzd5的相对STF荧光素酶活性,Wnt7a的101个不同单残基变体的信号传递及其在Wnt7a结构上的位置。相对荧光素酶活性相对于WT Wnt7a值归一化。Wnt7a的42个不同的单残基变体以野生型Wnt7a的Gpr124/Reck/Fz/LRP介导的Wnt信号传递活性的至少35%激活Gpr124/Reck/Fz/LRP介导的Wnt信号传递(矩形框)。(C)HEK293-STF细胞中Gpr124/Reck-依赖性和Fzd5的相对STF荧光素酶活性,Wnt7a的42个不同单残基变体的信号传递显示Gpr124/Reck途径的选择性激活。(D)在Wnt7a或Wnt7a¹⁻²⁷⁸或Wnt7a^{K190A}与所有10个Fz基因的共转染后HEK-STF中的相对荧光素酶活性。(E)在单细胞阶段以指定剂量注射wnt7a或wnt7a¹⁻²⁷⁸或wnt7a^{K190A} mRNA的3dpf幼体的侧视图。(F)(D)的3dpf幼体的表型评分。(G)以15pg的所示mRNA注射到4-细胞胚胎的一个腹卵裂球中的36期非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)胚胎的背视图。每种情况下都标明了次级轴形成的部分(箭头)。(H)在一细胞阶段用所示mRNA注射的72hpf wnt7aa吗啉寡核苷酸处理幼体的躯干DRG。Tg(neurog1:GFP)DRG的代表性图像显示在右侧。*** $P<0.001$;数据代表平均值 $\pm$ SD。

[0024] 图8显示了本文教导的人Wnt7a变体的氨基酸序列。相对于野生型Wnt7a NTD结构域或全长Wnt7a的氨基酸取代是粗体和带下划线的字体。

[0025] 图9显示了Wnt7a^{K190A}和Wnt7a¹⁻²⁷⁸的转基因内皮表达在Wnt7aa^{-/-}斑马鱼中触发了GPR124/RECK依赖性脑血管生成并恢复血脑屏障。(A)60hpf WT或Wnt7aa^{-/-}Tg(kdr1:EGFP)胚胎的脑脉管系统的背视图。在Wnt7a^{-/-}突变体中,缺乏脑内CtA。Wnt7、Wnt7a^{K190A}或Wnt7a¹⁻²⁷⁸在内皮特异性kdr1(血管内皮生长因子受体kdr样)启动子的控制下在Wnt7aa^{-/-}胚胎的内皮中瞬时表达。Wnt7配体表达为双顺反子构建体,其中BFP(蓝色荧光蛋白)用作转基因标记。与未注射的胚胎相反,Wnt7、Wnt7a^{K190A}或Wnt7a¹⁻²⁷⁸恢复了Wnt7aa^{-/-}突变体中后脑CtA的形成,如(B)中所定量。(C)在60hpf Wnt7aa^{-/-}胚胎中Wnt7、Wnt7a^{K190A}和Wnt7a¹⁻²⁷⁸的转基因

表达后, CtA的抗GLUT1染色。如(A)中那样实现转基因表达。这些数据一起证明发现的Wnt7a^{K190A}或Wnt7a¹⁻²⁷⁸激动剂在体内在Gpr124/Reck依赖性过程中具有活性。

[0026] 图10表示小鼠中风模型中基于GPR124/RECK的基因疗法。AVV-PHP.eB病毒用于将Wnt7a^{K190A}或相应的空AAV对照(Ctrl)递送至8周龄小鼠的脑。(A)使用编码GFP的AAV-PHP.eB(AAV-PHP.eB-CAG-EGFP)来证明在小鼠脑(注射后2周的8周龄小鼠)中广泛的转基因表达。CAG启动子是用于哺乳动物表达载体的强合成启动子。左图,完整分离的脑的背视图,右图矢状切面。切片用抗CD31染色以标记脉管系统。(B)在tMCAO之前两周静脉内注射 1.10^{11} AAV-PHP.eB-CAG-Wnt7a^{K190A}-p2A-EGFP病毒颗粒(短暂性大脑中动脉阻塞,中风模型)减小了中风体积(mm³),表明发现的激动剂改善临床前模型的中风。使用AAV-PHP.eB-CAG-EGFP病毒作为对照。

具体实施方式

[0027] 如本文所使用的,单数形式的“一个(a)”,“一种(an)”和“该(the)”包括单数和复数指代物,除非上下文另外明确指出。

[0028] 如本文所用,术语“包含(comprising)”,“包含(comprises)”和“包含(comprised of)”与“包括(including)”,“包括(includes)”或“包含(containing)”,“包含(contains)”同义,并且是包括性的或开放式的,并且不排除其他的未陈述的成员、元素或方法步骤。这些术语还涵盖“由...组成”和“基本上由...组成”,其在专利术语中享有公认的含义。

[0029] 端点对数值范围的叙述包括各个范围内的所有数字和分数,以及所列举的端点。

[0030] 当谈及诸如参数、量、持续时间等的可测量值时,本文所使用的术语“大约”或“近似”旨在涵盖指定值的变化和自指定值的变化,例如指定值的 $\pm 10\%$ 或更少、优选 $\pm 5\%$ 或更少、更优选 $\pm 1\%$ 或更少、以及还更优选 $\pm 0.1\%$ 或更少的变化和自指定值的 $\pm 10\%$ 或更少、优选 $\pm 5\%$ 或更少、更优选 $\pm 1\%$ 或更少、还更优选 $\pm 0.1\%$ 或更少的变化。就此而言,这样的变化适合于在所公开的发明中实施。应该理解的是,修饰语“约”所指的值本身也被具体地并且优选地被公开。

[0031] 尽管术语“一个或多个”或“至少一个”(例如一个或多个成员或一组成员中的至少一个成员)本身是清楚的,但通过进一步举例说明,该术语尤其包括指代所述成员中的任一个,或者指代所述成员中的任两个或更多个,例如,如所述成员的任何 ≥ 3 、 ≥ 4 、 ≥ 5 、 ≥ 6 或 ≥ 7 等,并且多至全部所述成员。在另一实例中,“一个或多个”或“至少一个”可以指1、2、3、4、5、6、7个或更多。

[0032] 在此包括对本发明背景的讨论以说明本发明的上下文。自任何权利要求的优先权日起,这不被视为承认所提及的任何材料在任何权利要求的优先权日时已在任何国家公布、已知或作为其常识的部分。

[0033] 在整个本公开中,各种出版物、专利和公开的专利说明书均通过引用方式提及。本说明书中引用的所有文献均通过引用以其全部并入本文作为参考。特别地,本文中具体提及的此类文献的教导或部分通过引用并入本文作为参考。

[0034] 除非另外说明,否则用于公开本发明的所有术语,包括技术和科学术语,均具有本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。通过进一步的指导,包括术语定义以更好地理解本发明的教导。当结合本发明的特定方面或本发明的特定实施例来定义特定术语

时,除非另外定义,否则这种含义旨在贯穿本说明书应用,即,也应用于本发明的其他方面或实施方式的上下文中。

[0035] 在以下段落中,更详细地定义本发明的不同方面或实施方式。如此定义的每个方面或实施方式可以与(一个或多个)任何其他方面或(一个或多个)实施方式组合,除非清楚地相反地指出。特别地,指示为优选或有利的任何特征可以与指示为优选或有利的任何其他一个或多个特征组合。

[0036] 在整个说明书中,提及“一个实施方式”是指结合该实施方式描述的特定特征、结构或特性包括在本发明的至少一个实施方式中。因此,在整个说明书中各处出现的短语“在一个实施方式中”不一定都指的是同一实施方式,但是可以指同一实施方式。此外,在一个或多个实施方式中,特定的特征、结构或特性可以以任何合适的方式组合,这对于本领域技术人员而言,根据本公开将是显而易见的。此外,尽管本文描述的一些实施方式包括其他实施方式中包括的一些特征但不包括其他特征,但是不同实施方式的特征的组合意在处于本发明的范围内,并且形成不同的实施方式,如本领域技术人员将理解的那样。例如,在所附权利要求中,任何要求保护的实施方式可以以任何组合使用。

[0037] 本发明人已经表征了第一个能够区分Wnt配体的“Wnt解码模块”,Wnt配体在其他方面在其结合Frizzled的能力上基本上是同义的,从而帮助细胞解释Wnt信号输入的复杂性以协调(orchestrate)组织发育和体内平衡。在本文中表征的Wnt解码模块中,选择性是由RECK赋予的,RECK以独立于Frizzled的方式介导Wnt7特异性结合。G蛋白偶联受体GPR124(RECK结合配偶体)充当信号传递缺陷的跨膜蛋白(signaling-deficient transmembrane protein),其能够募集细胞内的Disheveled(Dvl)。Dvl支架桥接GPR124和Frizzled,从而组装Wnt7配体特异性RECK/GPR124/Frizzled/脂蛋白受体相关蛋白(LRP)信号体。

[0038] 发明人进一步出乎意料地证明了能够在表达RECK和GPR124的细胞中选择性激活Wnt信号传递的新型激动剂的设计,这些激动剂可用作治疗剂,例如特别用于治疗神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的中枢神经系统(CNS)疾病,尤其包括中风、多发性硬化症和脑癌。因此,本发明允许提供尤其新颖的激动剂,其能够刺激脑内皮细胞中的Wnt/ β -联蛋白信号传递而基本上不具有与其他Frizzled途径的交叉反应性,并且可用作治疗剂,特别是用于神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的中枢神经系统(CNS)疾病。

[0039] 因此,一方面提供了能够激活由GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物介导的Wnt信号传递的试剂,其中所述试剂在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活由Frizzled/LRP受体复合物介导的Wnt信号传递。

[0040] 对任何肽、多肽、蛋白质或核酸的提及表示在本领域的各个名称下通常已知的各个肽、多肽、蛋白质或核酸。更具体地,提及“G蛋白偶联受体124”(GPR124),“具有Kazal基序的逆向诱导富半胱氨酸蛋白”(Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs,RECK),“Frizzled”(FZD)或“脂蛋白受体相关蛋白”(LRP)表示从上下文显而易见的各个肽、多肽、蛋白质或核酸,如在本领域所述名称下通常所知。

[0041] 当形成活生物体、器官、组织或细胞的一部分时,当形成生物样品的一部分时、以及当至少部分地从此类来源分离时,所述术语涵盖肽、多肽、蛋白质或核酸。当通过重组或合成方式产生时,该术语还涵盖肽、多肽、蛋白质或核酸。

[0042] 除非从上下文中另外显而易见,否则本文中提及的任何肽、多肽、蛋白质或核酸还

涵盖所述肽、多肽、蛋白质或核酸的修饰形式,例如带有表达后修饰的形式,包括例如磷酸化、糖基化、脂化、甲基化、半胱氨酸化、磺化、谷胱甘肽化、乙酰化,甲硫氨酸氧化为甲硫氨酸亚砷或甲硫氨酸砷等。

[0043] 通过另外的指导,G蛋白偶联受体124在本领域中也称为粘附G蛋白偶联受体A2(ADGRA2)或肿瘤内皮标记物5(TEM5)。举例来说,人GPR124基因以NCBI Genbank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)Gene ID 25960注释。人GPR124 mRNA以NCBI Genbank登录号NM_032777.9注释。NM_032777.9的核苷酸387(起始密码子)至4403(终止密码子)构成GPR124编码序列。人GPR124蛋白质序列以NCBI Genbank登录号NP_116166.9和Uniprot(www.uniprot.org)登录号Q96PE1-1注释,并在下面进一步再现(SEQ ID NO:1):

[0044] >NP_116166.9粘附G蛋白偶联受体A2前体[智人]

[0045] MGAGGRRMRGAPARLLLPLLPWLLLLLAPEARAPGCPLSIRCKCSGERPKGLSGGVPGPARRRVVCS
GGDLPEPPEPGLLPNGTVTLLSNNKITGLRNGSFLGLSLEKLDLRNNIISTVQPGAFLGLGELKRLDLSNNRIGC
LTSETFQGLPRLLRLNISGNIFSSSLQPGVFDELPAKVVLDLGTFLTCCHLRWLLPWAQNRSLQSEHTLCAYPSA
LHAQALGSLQEAQLCCEGALELHTHHLIPSLRQVVFQGDRLPFQCSASYLGNDTRIRWYHNRAPEVEQAGILLAE
SLIHDCTFITSELTLSHIGVWASGEWECTVSMAQGNASKKVEIVLETSASYCPAERVANNRGDFRWPRTLGITAY
QSCLQYPFTSVPLGGGAPGTRASRRCDRAGRWEFGDYSHCLYTNDITRVLYTFVLMPIINASNALTLAQRLRVYTAEA
ASFSDMMDVVVYVAQMIQKFLGYVDQIKELVEVMVDMASNLMLVDEHLLWLAQREDKACSRIVGALERIGGAALSPHA
QHISVNARNVALEYLIKPHSYVGLTCTAFQRREGGVPGTRPGSPGQNPPEPEPPADQQLRFRCTTGRPNVSLSSF
HIKNSVALASIQLPSSLFSSLPAAALAPPVPPDCTLQLLVFRNGRLFHSHSNTSRGAAGPGKRRGVATPVIFAGTSG
CGVGNLTEPVAVSLRHWAEGAEPVAAWWSQEGPGEAGGWTSEGCQLRSSQPNVSALHCHLGNVAVLMELSAFPREV
GGAGAGLHPVVYPCTALLLLCLFATITITYILNHSSIRVSRKGWHMLNLCHFHAMTSAVFAGGITLTNYQMVCQAVG
ITLHYSSLSTLLWMGVKARVLHKELTWRAPPPQEGDPALPTPSPMLRFYLIAGGIPLIICGITAAVNIHNYRDHSPY
CWLVRPSLGAFYIPVALILLITWIYFLCAGLRRLRGPLAQNPKAGNSRASLEAGEELRGSTRLRGSGPLSDSGSLL
ATGSARVGTGPPPEDGDSLSPGVQLGALVTTHFLYLAMWACGALAVSQRWLPRVVCSCLYGVAASALGLFVFTTHC
ARRRDVRASWRACPPASPAAPHAPPRALAAAEDGSPVFGEGPPSLKSSPSGSSGHPLALGPCKLTNLQLAQSQVC
EAGAAAGGEGEPEPAGTRGNLAHRHPNNVHHGRRRAHKSRAKGRHAGEACGNRLKALRGGAAGALELLSSESGSLHN
SPTDSYLGSRRNSPGAGLQLEGEPMLTPSEGSDTSAAPLSEAGRAGQRRSASRDSLKGGGALEKESHRRSYPLNAAS
LNGAPKGGKYDDVTLMGAEVASGGCMKTGLWKSETTV

[0046] 通过另外的指导,RECK(具有Kazal基序的逆向诱导富半胱氨酸的蛋白)在本领域中也称为致瘤性15蛋白的抑制物(ST15)。举例来说,人RECK基因以NCBI Genbank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)Gene ID 8434注释。人RECK mRNA(转录变体1)以NCBI Genbank登录号NM_021111.2注释。NM_021111.2的核苷酸87(起始密码子)至3002(终止密码子)构成RECK编码序列。人RECK蛋白序列以NCBI Genbank登录号NP_066934.1和Uniprot登录号O95980-1注释,并在下面进一步重现(SEQ ID NO:2):>NP_066934.1具有Kazal基序的逆向诱导富半胱氨酸蛋白同工型1前体[智人]

[0047] MATVRASLRGALLLLAVAGVAEVAGGLAPGSAGALCCNHSDNQMCRDVCEQIFSSKSESRLKHLQ
APDYCPETMVEIWNMNSSLPGVFKKSDGWVGLGCCELAIALECRQACKQASSKNDISKVCRKEYENALFSCISRNE
MGSVCCSYAGHHTNCREYCQAIFRTDSSPGPSQIKAVENYCASISPQLIHCVNNTQSYPMRNPDTSLYCCDRAEDH
ACQNACKRILMSKKTEMEIVDGLIEGCKTQPLPQDPLWQCFLESSQSVHPGVTVHPPSTGLDGAKLHCCSKANTST

CRELCTKLYSMWNTQSWQEFDRFCEYNPVEVSMLTCLADVREPCQLGCRNLTYCTNFNRRPTELFRSCNAQSDQG
AMNDMKLWEKGSIKMPFINIPVLDIKKCQPEMWKAIACSLQIKPCHSKSRGSIICKSDCVEILKKCGDQNKFPEDHT
AESICELLSPTDDLKNCIPLDTYLRPSTLGNIVEEVTHPCNPNPCANELCEVNRKGCPSGDPCLPYFCVQGCKLGE
ASDFIVRQGTLIQVPSSAGEVGCYKICSCGQSGLLENCMEMHCIDLQKSCIVGGKRKSHGTSFSIDCNVCSCFAGNL
VCSTRLLCLSEHSSDDRRTFTGLPCNCADQFVPVCGQNGRTYPSACIARCVGLQDHQFEFGSCMSKDPCNPNPCQKN
QRCIPKPQVCLTTFDKFGCSQYECVPRQLACDQVQDPVCDTDHMEHNNLCTLYQRGKSLSYKGPCQPFCRATEPVCG
HNGETYSSVCAAYS DRVAVDYGDCAVGVLSHSSVAECASVKCPSLLAAGCKPIIPPGACPLCAGMLRVLFDE
KLDTIKVTNKKPITVLEILQKIRMHVSVPCDVFYFSIESEIVILIIPVDHYPKALQIEACNKEAEKIESLINS
SPTLASHVPLSALIISQVQVSSSVSAGVRARPSCHSLLPLSLGLALHLLWTYN

[0048] 术语“Frizzled”或“FZD”或“FZ”涵盖Frizzled家族的任何和所有成员。通过额外的指导,表1列出了NCBI Genbank和Uniprot中注释的10个已知的人类Frizzled家族成员。

[0049] 表1

[0050]

	NCBI Genbank				Uniprot
	GeneID	mRNA	起始-终止 密码子	蛋白质	蛋白质
FZD1	8321	NM_003505.1	414-2357	NP_003496.1	Q9UP38-1
FZD2	2535	NM_001466.3	246-1943	NP_001457.1	Q14332-1
FZD3	7976	NM_017412.3 NM_145866.1	530-2530 484-2484	NP_059108.1 NP_665873.1	Q9NPG1-1
FZD4	8322	NM_012193.3	314-1927	NP_036325.2	Q9ULV1-1
FZD5	7855	NM_003468.3	411-2168	NP_003459.2	Q13467-1
FZD6	8323	NM_001164615.1 NM_001164616.1 NM_001317796.1 NM_003506.3	291-2411 299-2323 463-1668 318-2438	NP_001158087.1 NP_001158088.1 NP_001304725.1 NP_003497.2	O60353-1 O60353-2
FZD7	8324	NM_003507.1	62-1786	NP_003498.1	O75084-1
FZD8	8325	NM_031866.2	6-2090	NP_114072.1	Q9H461-1
FZD9	8326	NM_003508.2	230-2005	NP_003499.1	O00144-1
FZD10	11211	NM_007197.3	485-2230	NP_009128.1	Q9ULW2-1

[0051] 术语“脂蛋白受体相关蛋白”或“LRP”涵盖任何和所有脂蛋白受体相关蛋白,在本领域中也称为低密度脂蛋白受体相关蛋白(low density lipoprotein receptor-related proteins或prolow-density lipoprotein receptor-related proteins),特别是指参与Wnt信号传递的LRP蛋白。在某些特别优选的实施方式中,该术语表示LRP5 (GeneID:4041)、LRP6 (GeneID:4040)、或LRP5和LRP6 (LRP5/6)。

[0052] 因此,还公开了能够激活GPR124/RECK/Frizzled/LRP5/6介导的Wnt信号传递的试剂,其中所述试剂在没有RECK和/或GPR124的情况下不激活Frizzled/LRP5/6介导的Wnt信号传递。

[0053] 进一步公开了用于鉴定用作治疗剂——例如特别用于预防或治疗神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的CNS疾病——的试剂的体外方法,所述方法包括确定测试试剂是否激活GPR124/RECK/Frizzled/LRP5/6介导的Wnt信号传递,而不激活在没有RECK和/或GPR124的情况下的Frizzled/LRP5/6介导的Wnt信号传递。

[0054] 通过另外的指导,人LRP5 mRNA以NCBI Genbank登录号NM_002335.3 (转录变体1; NM_002335.3的核苷酸107 (起始密码子) 至4954 (终止密码子) 构成LRP5编码序列) 或NM_

001291902.1 (转录物变体2;NM_001291902.1的核苷酸1872(起始密码子)至4976(终止密码子)构成LRP5编码序列)进行注释。人LRP5蛋白序列以NCBI Genbank登录号NP_002326.2(同工型1前体)或NP_001278831.1(同工型2)和Uniprot登录号075197-1进行注释,LRP5蛋白序列注释为NP_002326.2,重现如下(SEQ ID NO:3):

[0055] >NP_002326.2低密度脂蛋白受体相关蛋白5同工型1前体[智人]

[0056] MEAAPPGPPWPLLLLLLLLLLALCGCPAPAAASPLLLFANRRDVRLVDAGGVKLESTIVVSGLEDAAAVD
FQFSKGAVYWTDVSEEAIAKQTYLNQTGAAVQNVVISGLVSPDGLACDWVGKKLYWTDSETNRIEVANLNGTSRKVL
WQDLDPRAIALDPAHGYMYWTDWGETPRIERAGMDGSTRKIIIVSDIYWPNGLTIDLEEKLYWADAKLSFIHRAN
LDGSFRQKVVEGSLTHPFALTLSGDTLYWTDWQTRS IHACNKR TGGKRKE ILSALYSPMDIQVLSQERQPFHTRCE
EDNGGCSHLCLLSPSEPFYTCACPTGVQLQDNGRTCKAGAEVLLARRTDLRRISLDTPDFTDIVLQVDDIRHAIA
IDYDPLEGYVYWTDDEVRAIRRAYLDGSGAQTIVNTEINDPDGIAVDWVARNLWYTDGTDRIEVTRLNGTSRKILV
SEDLDEPRAIALHPVMGLMYWTDWGENPKIECANLDGQERRVLVNASLGWPNGLALDLQEGKLYWGDAKTDKIEVIN
VDGTRKRTLLLEDKLP HIFGFTLLGDFIYWTDWQRRS IERVHVKV KASRDVI IDQLPDL MGLKAVNVAKVVG TNP CADR
NGGCSHL CFFTPHATRCGCP IGLELLSDMKTCIVPEAF LVFTSRAA IHRISLETNNNDVAIPLTGVKEASALDFDVS
NNHIYWTDVSLKTI SRAFMNGSSVEHVVEFGLDYPEGMAVDWMGKNLYWADTGTNRIEVARLDGQFRQVLVWRDLN
PRSLALDPTKGYIYWTEWGGKPRIVRAFMDGTNCMTLV D KVG RANDLT IDYADQRLYWTDLDTNMIESSNMLGQERV
VIADDLPHPFGLTQYSYDIYWTDWNLHSIERADKTSGRNRTLIQGHLD FVMDILVFHSSRQDGLNDCMHNNGQCQGL
CLAIPGGHRCGCASHYTLDPSSRNCSPPTTFLFSQKSAISRMIPDDQHSPDLILPLHGLRNVKAIDYDPLDKFIYW
VDGRQNIKRAKDDGTQPFVLTSLSQGNPDRQPHDLSIDIYSRTLFWTCEATNTINVHRLSGEAMGVVLRGDRDKPR
AIVVNAERGYLYFTNMQDRAAKIERAALDGTREVLFTTGLIRPVALVVDNTLGKLFWVDADLKRIESCDLSGANRL
TLEDANIVQPLGLTILGKHYWIDRQQQM IERVEKTTGDKRTRI QGRVAHLTG I HAVEEVSLEEFSAHPCARDNGGC
SHICIAKGDGTPRCSCP VHLVLLQNL LTCGEPTCSPDQFACATGEIDCIPGAWRCDGFPECDDQSDEEGCPVC SAA
QFPCARGQCVDLRLRCDGEADCQDRSDEADCDAICLPNQFRCASGQCVLIKQQCDSFPDCIDGSELMCEITKPPSD
DSPAHSSAIGPVIGIILSLFVMGGVYFVCQRVVCQRYAGANGPFPHEYVSGTPHVPLNFIAPGGSQHGPFTGIACGK
SMMSSVSLMGGRGVPLYDRNHVTGASSSSSSSTKATLYPPILNPPSPATDPSLYNMDMFYSSNIPATARPYPYI
IRGMAPPTTPCSTDVCDSDYSASRWKASKYYLDLNSDSDPYPPPPTPHSQYLSAEDSCPPSPATERSYFHLFPPPPS
PCTDSS

[0057] 通过另外的指导,人LRP6 mRNA以NCBI Genbank登录号为NM_002336.2注释。NM_002336.2的核苷酸143(起始密码子)至4984(终止密码子)构成LRP6编码序列。人LRP6蛋白序列以NCBI Genbank登录号NP_002327.2和Uniprot登录号075581-1注释,并在下面进一步重现(SEQ ID NO:4):

[0058] >NP_002327.2低密度脂蛋白受体相关蛋白6前体[智人]

[0059] MGAVLRSLACSFVLLRAAPLLLYANRRDLRLVDATNGKENATIVVGGLEDAAAVDFVFSHGLIYWS
VSEEAIAKRTFNKTESVQNVVVSGLLSPDGLACDWLGEKLYWTDSETNRIEVS NLDGSLRKVLFWQELDQPR
PSSGFMYWTDWGEVPKIERAGMDGSSRFIIINSEIYWPNGLTLDYEEKLYWADAKLNF I HKS NLDGTNRQAVVKGS
LPHPFALT LFEDILYWTDWSTHSILACNKYTGEGLREIHS DIFSPMDI HAFSQQRQPNATNPGIDNGGCSHLCLMS
PVKPFYQCACPTGVKLLENGKTCKDGATELLLLARRTDLRRISLDTPDFTDIVLQLEDIRHAIAIDYDPVEGYIYWT
DDEVRAIRRSFIDGSGSQFVVTAQIAHPDGIADVVARNLWYTDGTDRIEVTRLNGTMRKILISEDL EEPRAIVLD
PMVGYMYWTDWGEIPKIERAALDGSDRVVLVNTSLGWPNGLALDYDEGKIYWGDAKTDKIEVMNTDGTGRRVLVEDK

IPHIFGFTLLGDYVYWDWQRRSIERVHKRSAEREVIIDQLPDLMLKATNVHRVIGSNPCAENGCGSHLCLYRPQ
GLRCACPIGFELISDMKTCIVPEAFLLFSRRADIRRIISLETNNNNVAIPLTGVEASALDFDVTDNRIYWTDISLKT
ISRAFMNGSALEHVVEFGLDYPEGMAVDWLGNLYWADTGTNRIEVSKLDGQHRQVLVWKDLDSPRALALDPAEGFM
YWTEWGGKPKIDRAAMDGSERTTLVPNVGRANGLTIDYAKRRLYWTDLDTNLISSNMLGLNREVIADDLPHPFGLT
QYQDYIYWTDSRRSIERANKTSGQNRTIIQGHLDYVMDILVFHSSRQSGWNECASSNGHCSHLCLAVPVGGFVCGC
PAHYSLNADNRTCSAPTTFLFSQKSAINRMVIDEQQSPDIILPIHSLRNVRAIDYDPLDKQLYWIDSRQNMIRKAQ
EDGSQGFTVVVSSVPSQNLEIQPYDLSIDIYSRYIYWTCEATNVINVTDLGRSVGVVLKGEQDRPRAVVVNPEKGY
MYFTNLQERSPKIERAALDGTREVLFFSGLSKPIALALDSRLGKLFWADSDLRRIESSDLSGANRIVLEDSNILQP
VGLTVFENWLYWIDKQQMIEKIDMTGREGRTKVQARIAQLSDIHAVKELNLQEYRQHPCAQDNGGCSHICLVKGDG
TTRCSCPMHLVLLQDELSCGEPPTCSPQQFTCFTGEIDCIPVAWRCDGFTECEDHSDENCPVCSESQFQCASGQCI
DGALRCNGDANCQDKSDEKNCEVLCLIDQFRCANGQCIGKHKKCDHNVDKSDKDELDCYPTTEPAPQATNTVGSVI
GVIVTIFVSGTVYFICQRMCLPRMKGDGETMTNDYVVHGPASVPLGYVPHPSLSGSLPGMSRGKSMISLSIMGGS
SGPPYDRAHVTGASSSSSSSTKGTYFPAILNPPPSPATERSHYTMEFGYSSNSPSTHRSYSYRPSYRHFAPPTTPC
STDVCDSDYAPSRMTSVATAKGYTSDLYNDSEPVPPPPTPRSQYLSAENYESCPPSPYTERSYSHHLYPPPPSPC
TDSS

[0060] 技术人员可以理解,序列数据库或本说明书中表示的任何序列可以属于相应的肽、多肽、蛋白质或核酸的前体,并且可以包括从成熟分子中加工出来的部分。

[0061] 如贯穿说明书中使用的术语“蛋白质”通常涵盖包含一个或多个多肽链的大分子,所述多肽链即通过肽键连接的氨基酸残基的聚合链。该术语可以包括天然、重组、半合成或合成产生的蛋白质。术语还涵盖多肽链的携带一个或多个共表达或表达后类型的修饰的蛋白质,例如但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、碘化、甲基化、泛素化、信号肽去除,N端Met去除、酶原或前激素(pre-hormones)转化为活性形式等。该术语还包括相对于相应的天然蛋白质具有氨基酸序列变异(例如,例如氨基酸缺失、添加和/或取代)的蛋白质变体或突变体。该术语考虑全长蛋白质和蛋白质部分或片段,例如,由此类全长蛋白质的加工而产生的天然蛋白质部分。

[0062] 如贯穿说明书中使用的术语“多肽”通常涵盖通过肽键连接的氨基酸残基的聚合链。因此,特别是当蛋白质仅由单条多肽链构成时,术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用以表示这样的蛋白质。术语不限于任何最小长度的多肽链。术语可以包括天然、重组、半合成或合成产生的多肽。术语还包括携带多肽链的一个或多个共表达或表达后类型的修饰的多肽,例如但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、碘化、甲基化、泛素化、信号肽去除、N端Met去除、酶原或前激素转化为活性形式等。术语还包括携带相对于相应天然多肽的氨基酸序列变化(如例如氨基酸缺失、添加和/或替换)的多肽变体或突变体。术语考虑全长多肽和多肽部分或片段,例如由此类全长多肽的加工而产生的天然存在多肽的部分。

[0063] 如贯穿本说明书使用的术语“肽”优选是指本文所用的多肽,其基本上由50个氨基酸或更少,例如45个氨基酸或更少,优选40个氨基酸或更少,例如35个氨基酸或更少,更优选30个氨基酸或更少,例如25个或更少,20个或更少,15个或更少,10个或更少或5个或更少的氨基酸组成。

[0064] 肽、多肽或蛋白质可以是天然存在的,例如存在于自然界或从自然界分离,例如由细胞或组织天然或内源地产生或表达,并任选地从其分离。肽、多肽或蛋白质可以是重组

的,即通过重组DNA技术产生,和/或可以部分或全部地化学地或生物化学地合成。没有限制地,肽、多肽或蛋白质可以通过合适的宿主或宿主细胞表达系统重组地产生,并任选地从其分离(例如,合适的细菌、酵母、真菌、植物或动物宿主或宿主细胞表达系统),或通过无细胞翻译或无细胞转录和翻译重组地产生,或非生物肽、多肽或蛋白质合成。

[0065] 如贯穿本说明书中使用的术语“核酸”通常是指基本上由核苷单元组成的任何长度的聚合物(优选线性聚合物)。核苷单元通常包括杂环碱基和糖基。杂环碱基尤其可以包括嘌呤和嘧啶碱基,例如广泛存在于天然存在的核酸中的腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U),其他天然存在的碱基(例如黄嘌呤、肌苷、次黄嘌呤)以及化学或生物化学修饰的(例如甲基化)、非天然或衍生的碱基。示例性修饰的核酸碱基包括但不限于5-取代的嘧啶,6-氮杂嘧啶和N-2,N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤,5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。特别地,已经显示5-甲基胞嘧啶取代增加核酸双链体的稳定性,并且在例如反义试剂中,甚至更具体地在与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时可以是优选的碱基取代。糖基尤其可以包括戊糖(戊呋喃糖)基,例如优选天然存在的核酸中常见的核糖和/或2-脱氧核糖,或阿拉伯糖,2-脱氧阿拉伯糖,苏糖或己糖糖基,以及修饰或取代糖的基(例如但不限于2'-O-烷基化的糖,例如2'-O-甲基化的糖或2'-O-乙基化的糖,例如核糖;2'-O-烷氧基烷基化的,例如2'-O-甲氧基乙基化的糖,例如核糖;或2'-O,4'-C-亚烷基连接的糖,例如2'-O,4'-C-亚甲基连接的糖或2'-O,4'-C-亚乙基连接的糖,例如核糖;2'-氟-阿拉伯糖等)。包含至少一个核糖核苷单元的核酸分子通常可以称为核糖核酸或RNA。此类核糖核苷单元包含2'-OH部分,其中-H可以如本领域中已知的那样被核糖核苷取代(例如,被甲基、乙基、烷基或烷氧基烷基取代)。优选地,核糖核酸或RNA可以主要包含核糖核苷单元,例如构成核酸分子的核苷单元的 $\geq 80\%$ 、 $\geq 85\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$ 、或甚至100%(按数量)可以是核糖核苷单元。包含至少一个脱氧核糖核苷单元的核酸分子通常可以被称为脱氧核糖核酸或DNA。这样的脱氧核糖核苷单元包含2'-H。优选地,脱氧核糖核酸或DNA可以主要包含脱氧核糖核苷单元,例如构成核酸分子的核苷单元的 $\geq 80\%$ 、 $\geq 85\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$ 、甚至100%(按数量)可以是脱氧核糖核苷单元。核苷单元可以通过许多已知的核苷酸间键合中的任何一种彼此连接,包括尤其是天然存在的核酸中常见的磷酸二酯键,以及进一步修饰的基于磷酸酯或磷酸酯的键合,例如硫代磷酸酯,烷基硫代磷酸酯,例如硫代磷酸甲酯,二硫代磷酸酯,烷基磷酸酯(例如甲基磷酸酯),烷基硫代磷酸酯,磷酸三酯(例如烷基磷酸三酯),氨基磷酸酯(phosphoramidate),哌嗪磷酸酯(phosphoropiperazidate),磷酸吗啉酯(phosphoromorpholidate),桥连的氨基磷酸酯,桥连的亚甲基磷酸酯,桥连的硫代磷酸酯;以及另外的硅氧烷,碳酸酯,氨基磺酸酯,碳烷氧基(carboalkoxy),对乙酰氨基甲酸酯(acetamidate),氨基甲酸酯例如3'-N-氨基甲酸酯,吗啉寡核苷酸(morpholino),硼烷(borano),硫醚,3'-硫缩醛(3'-thioacetal)和砷核苷酸间键合。优选地,核苷酸间键合可以是基于磷酸酯的键合,包括经修饰的基于磷酸酯的键合,例如更优选磷酸二酯、硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯键或其组合。术语“核酸”还涵盖任何其他含核碱基的聚合物,例如核酸模拟物,包括但不限于肽核酸(PNA)、具有磷酸基的肽核酸(PHONA)、锁核酸(LNA)、吗啉代磷酸二酰胺酯主链核酸(morpholino phosphorodiamidate-backbone nucleic acid)(PMO)、环己烯核酸(CeNA)、三环DNA(tcDNA)和具有带烷基接头或氨基接头的主链部分的核酸(参

见例如, Kurreck 2003 (Eur J Biochem 270:1628-1644))。本文所用的“烷基”特别包括低级烃部分, 例如C1-C4直链或支链的、饱和或不饱和烃, 例如甲基、乙基、乙烯基、丙基、1-丙烯基、2-丙烯基和异丙基。如本文预期的, 核酸可包括天然存在的核苷、修饰的核苷或其混合物。修饰的核苷可包括修饰的杂环碱基、修饰的糖部分、修饰的核苷酸间键合或其组合。

[0066] 术语“核酸”进一步优选涵盖DNA、RNA和DNA/RNA杂合分子, 具体包括hnRNA、前-mRNA (pre-mRNA)、mRNA、cDNA、基因组DNA、扩增产物、寡核苷酸、和合成的 (例如化学合成的) DNA、RNA或DNA/RNA杂合体。RNA包括RNAi (抑制性RNA)、dsRNA (双链RNA)、siRNA (小干扰RNA)、mRNA (信使RNA)、miRNA (micro-RNA)、tRNA (转移RNA, 无论是否带有相应的酰化氨基酸电荷) 和cRNA (互补RNA)。核酸可以是天然存在的, 例如存在于自然界或从自然界分离, 例如, 由细胞或组织天然或内源地产生, 并任选地从细胞或组织中分离出。核酸可以是重组的, 即, 通过重组DNA技术产生, 和/或可以部分或全部地化学或生物化学合成。没有限制地, 核酸可以通过合适的宿主或宿主细胞表达系统重组产生并任选地从中分离 (例如, 合适的细菌、酵母、真菌、植物或动物宿主或宿主细胞表达系统), 或通过无细胞转录重组产生, 或非生物核酸合成来产生。核酸可以是双链、部分双链或单链的。在单链的情况下, 核酸可以有义链或反义链。另外, 核酸可以是环状的或线性的。

[0067] 对任何肽、多肽、蛋白质或核酸的提及包括发现的任何生物体的此类肽、多肽、蛋白质或核酸, 特别是动物, 优选温血动物, 更优选脊椎动物, 还更优选哺乳动物——包括人类和非人类哺乳动物, 还更优选人类——的肽、多肽、蛋白质或核酸。

[0068] 因此, 在某些实施方式中, 本文所用的GPR124、RECK、FZD和LRP中的一种或多种并且优选全部是动物来源, 优选为温血动物来源, 更优选为脊椎动物来源, 还更优选为哺乳动物来源——包括人类和非人类哺乳动物来源, 还更优选人类来源。

[0069] 对任何肽、多肽、蛋白质或核酸的提及特别地可以包括具有天然序列的此类肽、多肽、蛋白质或核酸, 即, 其一级序列与自然界发现或从自然界衍生的肽、多肽、蛋白质或核酸的一级序列相同的肽、多肽、蛋白质或核酸。技术人员理解, 由于物种之间的遗传趋异 (genetic divergence), 天然序列在不同物种之间可能不同。此外, 由于给定物种内的正常遗传多样性 (变异), 天然序列可能在同一物种的不同个体之间或之内不同。同样, 由于体细胞突变或转录后或翻译后修饰, 天然序列可能在同一物种的不同个体之间或甚至在同一物种的不同个体中不同。肽、多肽、蛋白质或核酸的任何此类变体或同工型均为本文中所期望的。因此, 在自然界中发现或衍生自自然界的肽、多肽、蛋白质或核酸的所有序列被认为是“天然的”。

[0070] 在某些实施方式中, 肽、多肽、蛋白质或核酸可以是人的, 即, 它们的一级序列可以与天然存在的人的肽、多肽、蛋白质或核酸的相应一级序列相同或存在于它们中。在某些实施方式中, 修饰语“人”涉及相应的肽、多肽、蛋白质或核酸的一级序列, 而不是其起源或来源。例如, 此类肽、多肽、蛋白质或核酸可以存在于人类受试者的样品中或从人类受试者的样品中分离, 或者可以通过其他方式获得 (例如, 通过重组表达、无细胞转录或翻译、或非生物核酸或肽合成)。

[0071] 在某些实施方式中, 肽、多肽、蛋白质或核酸可以是野生型的。虽然大多数天然肽、多肽、蛋白质或核酸可被认为是野生型, 但携带天然存在的导致部分或完全丧失功能的突变——其可能导致疾病表型或引起疾病表型——的那些通常被排除在术语“野生型”的范

围外。

[0072] 对任何肽、多肽、蛋白质或核酸的提及也可以涵盖这些肽、多肽、蛋白质或核酸的变体或片段,尤其是其天然存在的、天然的或野生型形式。

[0073] 贯穿整个说明书关于肽、多肽或蛋白质使用的术语“片段”通常表示肽、多肽或蛋白质的部分,例如通常是肽、多肽或蛋白质的N-和/或C-末端的截短形式。优选地,片段可包含所述肽、多肽或蛋白质的氨基酸序列长度的至少约30%,例如至少约50%或至少约70%,优选至少约80%,例如至少约85%,更优选至少约90%,和还更优选至少约95%或甚至约99%。例如,在不超过全长肽、多肽或蛋白质的长度的范围内,片段可包括相应的全长肽、多肽或蛋白质的 ≥ 5 个连续氨基酸、或 ≥ 10 个连续氨基酸、或 ≥ 20 个连续氨基酸、或 ≥ 30 个连续氨基酸的序列,例如 ≥ 40 个连续氨基酸,如例如 ≥ 50 个连续氨基酸,例如 ≥ 60 、 ≥ 70 、 ≥ 80 、 ≥ 90 、 ≥ 100 、 ≥ 200 、 ≥ 300 、 ≥ 400 、 ≥ 500 、 ≥ 600 、 ≥ 700 、 ≥ 800 、 ≥ 900 或 ≥ 1000 个连续氨基酸的序列。

[0074] 关于核酸(多核苷酸)的术语“片段”通常表示核酸的5' 和/或3' 截短形式。优选地,片段可包含所述核酸的核酸序列长度的至少约30%,例如至少约50%或至少约70%,优选至少约80%,例如至少约85%,更优选至少约90%,和还更优选至少约95%或甚至约99%。例如,在不超过全长核酸的长度的范围内,片段可包括相应全长核酸的 ≥ 5 个连续核苷酸、或 ≥ 10 个连续核苷酸、或 ≥ 20 个连续核苷酸、或 ≥ 30 个连续核苷酸的序列,例如 ≥ 40 个连续核苷酸,如例如 ≥ 50 个连续核苷酸,例如 ≥ 60 、 ≥ 70 、 ≥ 80 、 ≥ 90 、 ≥ 100 、 ≥ 200 、 ≥ 300 、 ≥ 400 、 ≥ 500 、 ≥ 600 、 ≥ 700 、 ≥ 800 、 ≥ 900 、 ≥ 1000 、 ≥ 1500 、 ≥ 2000 、 ≥ 2500 、 ≥ 3000 、 ≥ 3500 或 ≥ 4000 连续核苷酸的序列。

[0075] 该术语涵盖由体内和/或体外的任何机制产生的片段,例如但不限于通过可选的转录或翻译,外切蛋白酶解和/或内切蛋白酶解,外切核酸降解和/或内切核酸降解(exo-和/或endo-nucleolysis),或肽、多肽、蛋白质或核酸的降解,如例如通过物理、化学和/或酶促蛋白水解或核酸降解。

[0076] 术语蛋白质、多肽、肽或核酸的“变体”通常是指这样的蛋白质、多肽或肽,或核酸,所述蛋白质、多肽或肽的氨基酸序列,或所述核酸的核苷酸序列与所述蛋白质、多肽、肽或核酸的序列基本上同一(即,大部分地但不完全同一),例如与所列举的蛋白质、多肽、肽或核酸的序列至少约80%同一或至少约85%同一,例如优选至少约90%同一,例如至少91%同一,92%同一,更优选至少约93%同一,例如至少94%同一,甚至更优选至少约95%同一,例如至少96%同一,再更优选至少约97%同一,例如至少98%同一,并且最优选至少99%同一。优选地,当在序列比对中查询所列举的蛋白质、多肽、肽或核酸的整个序列时,变体可以显示与所列举的蛋白质、多肽、肽或核酸的同一性程度(即,整体序列同一性)。可以使用本身已知的用于执行序列比对和确定序列同一性的合适算法来确定序列同一性。示例性但非限制性的算法包括基于Altschul等人,1990(J Mol Biol 215:403-10)最初描述的基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool) (BLAST)的算法的那些,例如Tatusova和Madden 1999(FEMS Microbiol Lett 174:247-250)描述的“Blast 2序列”算法,例如使用发布的默认设置或其他合适的设置(如例如,对于BLASTN算法:打开缺口的成本(cost to open a gap)=5,扩展缺口的成本=2,错配的惩罚=-2,匹配的奖励=1,缺口x_dropoff=50,期望值=10.0,字长=28;或对于BLASTP算法:矩阵=Blosum62(Henikoff

等人,1992,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.),89:10915-10919),打开缺口的成本=11,扩展缺口的成本=1,期望值=10.0,字长=3)。

[0077] 确定特定氨基酸序列和查询多肽的氨基酸序列之间的同一性百分比的示例程序将需要使用Blast 2序列(Bl2seq)算法比对两个氨基酸序列,该算法可作为Web应用程序使用或作为使用合适的算法参数在NCBI网站(www.ncbi.nlm.nih.gov)上的独立可执行程序(BLAST2.2.31+版)可用。合适的算法参数的实例包括:矩阵=Blosum62,打开缺口的成本=11,扩展缺口的成本=1,期望值=10.0,字长=3)。如果两个比较的序列共享同源性,则输出将这些同源性区域呈现为比对序列。如果两个比较的序列不具有同源性,则输出将不会显示比对的序列。一旦比对,将通过计数两个序列中存在相同氨基酸残基的位置数来确定匹配数。通过将匹配数目除以查询多肽的长度,然后将结果值乘以100来确定同一性百分比。同一性百分比值可以但不必四舍五入到最接近的十分之一。例如,可以将78.11、78.12、78.13和78.14舍入为78.1,而可以将78.15、78.16、78.17、78.18和78.19舍入为78.2。还要注意的,由Bl2seq输出的每个比对片段的详细视图已经方便地包括同一性的百分比。

[0078] 蛋白质、多肽、肽或核酸的变体可以是所述蛋白质、多肽、肽或核酸的同源物(例如直向同源物或旁系同源物)。如本文所用,术语“同源性”通常表示来自相同或不同分类群的两个大分子之间的结构相似性,其中所述相似性归因于共同的祖先。

[0079] 蛋白质、多肽或肽的变体可包含相对于(即,与之相比)相应蛋白质或多肽的一个或多个氨基酸添加、缺失或取代。例如,蛋白质、多肽或肽的变体(取代变体)可包含相对于(即与之相比)相应蛋白质或多肽多达70个(例如,不超过一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、12个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、50个、60个或70个)保守氨基酸取代;和/或蛋白质、多肽或肽的变体(取代变体)可包含相对于(即,与之比较)相应蛋白质或多肽多达20个(例如,不超过一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个或19个)非保守氨基酸取代。

[0080] 保守氨基酸取代是一个氨基酸被另一个具有相似特征的氨基酸取代。保守氨基酸取代包括以下组中的取代:缬氨酸,丙氨酸和甘氨酸;亮氨酸,缬氨酸和异亮氨酸;天冬氨酸和谷氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;丝氨酸,半胱氨酸和苏氨酸;赖氨酸和精氨酸;以及苯丙氨酸和酪氨酸。非极性疏水氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电的(即碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电荷(即酸性)的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。上述极性、碱性或酸性组的一个成员被同一组中的另一成员的任何取代可被视为保守取代。相反,非保守取代是一个氨基酸被具有不相似特性的另一个氨基酸取代。

[0081] 可选地或另外地,例如,蛋白质、多肽或肽的变体(缺失变体)可相对于相应蛋白质或多肽(即,与之相比)缺少多达20个氨基酸区段(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个区段)。缺失区段可各自独立地由一个氨基酸、两个连续氨基酸或三个连续氨基酸组成。缺失区段可以是不连续的,或者两个或更多个或所有缺失区段可以是连续的。

[0082] 核酸的变体可以包含相对于相应核酸(即,与之相比)的一个或多个核苷酸添加、缺失或取代。

[0083] 对于任何肽、多肽、蛋白质或核酸的“片段或变体”或“变体或片段”的提及还涵盖此类肽、多肽、蛋白质或核酸的变体的片段,以及此类肽、多肽、蛋白质或核酸的片段的变体。

[0084] 特别设想的是所述肽、多肽或蛋白质的生物学活性片段和/或变体。术语“生物学活性的”可以与诸如“功能活性的”或“功能性的”的术语互换,表示片段和/或变体至少部分地保留了各自或相应的肽、多肽或蛋白质的生物学活性或预期的功能。对于肽、多肽或蛋白质的“活性”的提及通常可以涵盖肽、多肽或蛋白质的生物学活性的任何一个或多个方面,例如但不限于例如在细胞、组织、器官或生物体内的其生化活性、酶活性、信号传递活性、相互作用活性、配体活性和/或结构活性的任何一个或多个方面。

[0085] 优选地,与相应的肽、多肽或蛋白质相比,功能活性片段或变体可以保留预期生物学活性或功能性的至少约20%,例如,至少约25%,或至少30%,或至少约40%,或至少约50%,例如,至少60%,更优选至少约70%,例如至少80%,还更优选至少约85%,还更优选至少约90%,并且最优选至少约95%或甚至约100%。在某些实施方式中,与相应的肽、多肽或蛋白质相比,功能活性片段或变体甚至可以展示更高的生物学活性或功能性,例如与相应的肽、多肽或蛋白质相比,可以展示预期生物学活性或功能性的至少约100%、或至少约150%、或至少约200%、或至少约300%、或至少约400%、或至少约500%。举例来说,在给定肽、多肽或蛋白质的活性可以容易地在定量输出的测定法——例如酶促测定法或信号传递测定法或产生可定量信号的结合测定法——中进行测量的情况下,肽、多肽或蛋白质的功能活性片段或变体可以产生相应的肽、多肽或蛋白质所产生的信号的至少约20%、或至少约25%、或至少30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少60%、更优选至少约70%、或至少80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约100%、或至少约150%、或至少约200%、或至少约300%、或至少约400%、或至少约500%。

[0086] 通过实例而非限制,GPR124、RECK、FZD或LRP多肽或蛋白质的生物学活性片段或变体将分别至少部分保留相应的天然或野生型GPR124、RECK、FZD或LRP多肽或蛋白质的生物学活性的一个或多个方面。例如,对GPR124、RECK、FZD或LRP多肽或蛋白质的生物学活性的提及可以特别表示参与GPR124/RECK/FZD/LRP复合物的能力,例如,结合所述复合物的一种或多种其他成分的能力,和/或作为GPR124/RECK/FZD/LRP复合物的部分介导Wnt信号传递的能力。

[0087] 因此,该说明书特别公开了能够激活GPR124/RECK/FZD/LRP介导的Wnt信号传递的试剂,其中所述试剂在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活FZD/LRP介导的Wnt信号传递,其中GPR124、RECK、FZD或LRP的一个或多个或优选地全部是天然或野生型GPR124、RECK、FZD或LRP。

[0088] 说明书进一步特别公开了能够激活GPR124/RECK/FZD/LRP介导的Wnt信号传递的试剂,其中所述试剂在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活FZD/LRP介导的Wnt信号传递,其中GPR124、RECK、FZD或LRP中的一个或多个或优选地全部是天然或野生型人GPR124、RECK、FZD或LRP。

[0089] 说明书还特别公开了能够激活GPR124/RECK/FZD/LRP介导的Wnt信号传递的试剂,其中所述试剂在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活FZD/LRP介导的Wnt信号传递,其中GPR124、RECK、FZD或LRP中的一个或多个或优选地全部是或为天然或野生型人GPR124、

RECK、FZD或LRP,如在本说明书其他地方列出的Genbank或Uniprot条目下所注释。提醒读者的是,在Genbank或Uniprot条目提供前体多肽或蛋白质的序列的情况下,预期相应的成熟形式会参与GPR124/RECK/FZD/LRP复合物。

[0090] 说明书还特别公开了能够激活GPR124/RECK/FZD1/LRP5或LRP6介导的Wnt信号传递的试剂,其中所述试剂在没有RECK和/或GPR124的情况下不激活FZD5/LRP5或LRP6介导的Wnt信号传递,其中GPR124、RECK、FZD1、FZD5、LRP5或LRP6中的一个或多个或优选全部是或为天然或野生型人GPR124、RECK、FZD1、FZD5、LRP5或LRP6,如本说明书在其他地方列出的在Genbank或Uniprot条目下所注释的。

[0091] 说明书还特别公开了能够激活GPR124/RECK/FZD/LRP介导的Wnt信号传递的试剂,其中所述试剂在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活FZD/LRP介导的Wnt信号传递,其中GPR124、RECK、FZD或LRP中的一个或多个是或为天然或野生型GPR124、RECK、FZD或LRP的生物学活性片段或变体。

[0092] 说明书还特别公开了能够激活GPR124/RECK/FZD/LRP介导的Wnt信号传递的试剂,其中所述试剂在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活FZD/LRP介导的Wnt信号传递,其中GPR124、RECK、FZD或LRP中的一个或多个是或为天然或野生型人GPR124、RECK、FZD或LRP的生物学活性片段或变体。

[0093] 术语“复合物”、“蛋白质复合物”或“多肽复合物”在本领域中是众所周知的。通过进一步的指导而不是限制,该术语广泛地表示包含两个或更多个蛋白质或多肽的簇(cluster)。簇可以通过非共价键,更特别地非共价蛋白质-蛋白质相互作用来稳定,其中存在于簇内的全部或仅部分多肽物理相互作用。蛋白质复合物可以完全由肽、多肽或蛋白质组成,或者可以包括其他分子或大分子,例如碳水化合物、脂质、糖脂、核酸、寡核苷酸、核蛋白、核苷、核苷酸盐、酶辅因子、卟啉、金属离子等。术语包括但不限于这样的蛋白质复合物,其可以是专性(obligate)或非专性、瞬时或永久性、和/或同多聚体或异多聚体的。术语包括但不限于这样的蛋白质复合物,其可以位于细胞膜(质膜)、细胞外、细胞质内、细胞器内、或细胞器的膜上。位于细胞膜的复合物通常包含至少一种膜锚定的蛋白质或跨膜蛋白。术语还包括膜微区和膜相关的大分子细胞器样结构,称为“信号体”,其分区(compartmentalise)给定的信号途径。这样的高级蛋白质复合物可以被细胞内支架至少部分地稳定。因此,术语还可以表示某些蛋白质或多肽在细胞膜的给定位点处局部浓缩或积累的情况,以允许蛋白质或多肽介导的在所述位点处通过细胞膜进行信号转导。

[0094] GPR124/RECK/FZD/LRP受体复合物广义地表示蛋白质复合物,特别是膜相关的蛋白质复合物,更特别地是质膜相关的蛋白质复合物,其包含至少一种GPR124多肽、至少一种RECK多肽、至少一种FZD多肽和至少一种LRP多肽。当GPR124/RECK/FZD/LRP受体复合物位于包含Wnt/ β -联蛋白信号途径下游成员(例如Disheveled(Dvl))的细胞的质膜处时,其能够响应于细胞外提供的Wnt7配体在所述细胞中激活Wnt/ β -联蛋白信号传递。

[0095] FZD/LRP受体复合物广泛地表示蛋白质复合物,特别是膜相关的蛋白质复合物,更特别是质膜相关的蛋白质复合物,其包含至少一种FZD多肽和至少一种LRP多肽。当FZD/LRP受体复合物位于包含Wnt/ β -联蛋白信号途径的下游成员(例如,Dvl)的细胞的质膜上时,其能够响应细胞外提供的Wnt配体例如但不限于Wnt7配体,在所述细胞中激活Wnt/ β -联蛋白信号传递。

[0096] 如本文所用,术语“Wnt信号传递(Wnt signalling)”是指生物学活性的Wnt配体对细胞发挥其作用以调节所述细胞的活性和/或作用的机制。生物学活性的Wnt配体通过与Wnt受体例如FZD/LRP受体复合物结合来调节细胞活性和/或作用。一旦通过Wnt配体的结合被激活,则Wnt受体将激活一个或多个细胞内信号途径。典型地识别了三种Wnt信号途径:经典的(即,由 β -联蛋白激活作为转录共激活因子介导的)Wnt途径,非经典的平面细胞极性途径和非经典的Wnt/钙途径。通常通过Wnt配体与FZD受体的结合来激活所有三个途径。但是,LRP受体的募集似乎是诱导经典(或 β -联蛋白依赖的)Wnt信号传递的先决条件。如本领域中已知的,在不存在Wnt/FZD/LRP复合物(“非活性经典Wnt信号传递”)的情况下, β -联蛋白在细胞质中被酪蛋白激酶和糖原合酶激酶3(GSK-3)磷酸化。这些激酶和 β -联蛋白之间的相互作用通过支架蛋白Axin和腺瘤性息肉病相关蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)得以促进。这些蛋白质一起形成“降解复合物”,使磷酸化的 β -联蛋白被含 β -转导蛋白重复序列的蛋白质(β -TrCP)识别,靶向用以泛素化,并被蛋白酶体降解。具有活性的经典(或 β -联蛋白依赖的)Wnt信号传递涉及Wnt配体与细胞表面上FZD和LRP受体复合物的结合。在信号传递过程中,FZD与LRP协同作用,使得Wnt蛋白的结合导致这两个受体的二聚。从理论上讲,这种二聚作用导致FZD和LRP受体的构象变化。结果,LRP的胞质尾部募集并以磷酸化依赖的方式结合到支架蛋白Axin并且导致涉及DVL、Axin和GSK3的复合物的形成。受体结合的DVL和Axin分子的多聚体可能支持LRP-FZD二聚体的形成。GSK募集到细胞膜上的结果是, β -联蛋白磷酸化受到抑制,从降解复合物中释放出 β -联蛋白,并使 β -联蛋白在细胞质中积累。 β -联蛋白在细胞质中的积累使 β -联蛋白进入核并与TCF/LEF转录因子相互作用。

[0097] 本发明人已经鉴定出Wnt7特异性RECK/GPR124/Frizzled/LRP介导的信号传递,其中Wnt7以独立于FZD的方式与Reck特异性结合,RECK结合配偶体GPR124通过细胞内DVL支架将RECK结合的Wnt7桥接至FZD/LRP复合物,从而组装Wnt7-配体特异性RECK/GPR124/FZD/LRP信号体并激活经典Wnt信号传递。

[0098] 鉴于上述内容,技术人员将理解,如通常由FZD和LRP多肽介导的Wnt信号传递的情况一样,在缺乏或独立于能够通过所述FZD/LRP复合物激活Wnt信号传递的细胞外试剂的情况下,可能在细胞膜上不形成FZD/LRP复合物。换言之,试剂可以在将FZD和LRP多肽组装或组织成FZD/LRP复合物中发挥积极作用,例如借助于试剂与FZD和LRP各自之间的蛋白质-蛋白质相互作用。这导致FZD/LRP复合物的形成和由该复合物介导的Wnt信号传递的激活。

[0099] 同样地,在缺少或独立于能够通过所述GPR124/RECK/FZD/LRP复合物激活Wnt信号传递的细胞外试剂的情况下,可能在细胞膜上不形成GPR124/RECK/FZD/LRP受体复合物。换言之,试剂可以在将GPR124、RECK、FZD和LRP多肽中的两种或更多种组装或组织成GPR124/RECK/FZD/LRP复合物中发挥积极作用,例如借助于试剂与GPR124、RECK、FZD和LRP中的两种或更多种的每一种之间的蛋白质-蛋白质相互作用。这导致GPR124/RECK/FZD/LRP复合物的形成和由复合物介导的Wnt信号传递的激活。

[0100] 因此,短语“能够激活Gpr124/Reck/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递的试剂”是指该试剂通过Gpr124、Reck、Frizzled和LRP多肽诱导Wnt信号传递的能力。短语“能够激活Gpr124/Reck/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递的试剂”并不一定意味着在表达Gpr124、Reck、Frizzled和LRP的细胞接触试剂之前,存在Gpr124/Reck/Frizzled/LRP受体复合物。例如但不限于,试剂可有助于或促进Gpr124/Reck/Frizzled/LRP信号传递复合物的形成或

组装,从而激活由所述复合物介导的Wnt信号传递。类似地,短语“能够激活Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递的试剂”是指该试剂通过Frizzled和LRP多肽诱导Wnt信号传递的能力。短语“能够激活Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递的试剂”不一定意味着在将表达Frizzled和LRP的细胞与这种试剂接触之前存在Frizzled/LRP受体复合物。例如但不限于,此种试剂可有助于或促进Frizzled/LRP信号传递复合物的形成或组装,从而激活由所述复合物介导的Wnt信号传递。短语“在不存在Reck和/或Gpr124的情况下,所述试剂不激活Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递”并不一定意味着在表达Frizzled和LRP而不是Reck和/或Gpr124的细胞中存在Frizzled/LRP受体复合物。例如但不限于,试剂可能无法有助于或促进这种细胞中Frizzled/LRP信号传递复合物的形成或组装,从而无法激活由所述复合物介导的Wnt信号传递。

[0101] 技术人员将进一步理解,如本文所设想的,GPR124/RECK/FZD/LRP受体复合物可以包括其他组分,其可以或不需要在功能上调节该复合物。例如,复合物可以包括Disheveled (Dvl),形成能够桥接GPR124和Frizzled的细胞内支架。

[0102] 在特定的实施方式中,在其质膜上表达GPR124、RECK、FZD和LRP多肽并且包含Wnt/ β -联蛋白信号途径的下游成员的细胞是在其细胞表面天然表达所有GPR124、RECK、FZD和LRP多肽的细胞,如脑内皮细胞。在进一步的实施方式中,在其质膜上表达GPR124、RECK、FZD和LRP多肽并且包含Wnt/ β -联蛋白信号途径的下游成员的细胞是这样修饰的(例如,基因工程的)细胞,在其表面表达所有的GPR124、RECK、FZD和LRP多肽。例如,细胞可以是这样的培养细胞,其天然表达FZD和LRP但不天然表达GPR124和RECK,并且经基因工程改造以表达GPR124和RECK多肽(例如,用编码所述GPR124和RECK多肽的(一种或多种)可表达核酸稳定或瞬时转染)。优选地,细胞是哺乳动物细胞,更优选地人细胞。

[0103] 在特定实施方式中,试剂激活GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递但在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递的能力表示该试剂在存在RECK和GPR124的情况下而不是在不存在RECK和/或GPR124的情况下激活经典Wnt信号传递的能力。

[0104] 短语“RECK和GPR124的存在”是指RECK和GPR124多肽在细胞膜处或附近存在,优选与Frizzled和LRP多肽相互紧密接近。相互紧密接近可在有助于GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物的条件下,例如当将本文教导的试剂从外部提供给细胞时,促进GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物形成。另一方面,短语“不存在RECK和/或GPR124”是指在细胞膜上缺乏或不存在RECK和/或GPR124多肽。当细胞不表达、翻译或正确移位RECK和/或GPR124时,在细胞膜处或附近可能不存在RECK和/或GPR124。不存在RECK和/或GPR124多肽不必表示细胞膜上RECK和/或GPR124多肽的完全不存在,而可以例如是指一定量的RECK和/或GPR124多肽,所述一定量的RECK和/或GPR124多肽不能被本领域技术人员已知的常规蛋白质检测或定量测定法例如免疫印迹、免疫细胞化学或免疫荧光检测到或者低于其灵敏度范围。

[0105] 在特定实施方式中,试剂激活GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递,但在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递的能力表示该试剂对在能够通过GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物介导Wnt信号传递的细胞中激活Wnt信号传递,但在不表达GPR124和/或RECK的细胞中不能够激活Frizzled/LRP介导的

Wnt信号传递的能力。

[0106] 能够通过GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物介导Wnt信号传递的细胞可以是天然表达GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号所需的所有细胞成分的细胞,例如脑内皮细胞或细胞系。能够通过GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物介导Wnt信号传递的细胞也可以是天然不表达任一或者不表达GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递所需的所有细胞成分的细胞,其可以被修饰例如基因工程化,以补偿GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递所需的缺失细胞成分。这样的修饰在本领域中是已知的,并且在本文其他地方描述。

[0107] 能够通过GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物介导Wnt信号传递的细胞可以是脊椎动物细胞或细胞系。非限制性实例包括人胚胎肾293T (HEK293T)、人脐静脉内皮细胞(HUVEC)、人皮肤微血管内皮细胞(HDMVEC)、人冠状动脉内皮细胞(HCAEC)、人主动脉内皮细胞(HAEC)、人脑微血管内皮细胞(HBMEC)、Bend3细胞、Bend5细胞或hCMEC/D3细胞。可以从例如由美国典型培养物保藏中心(ATCC)(10801University Blvd.Manassas,Virginia 20110-2209,USA)维护的公共收藏中获得HEK293T细胞,包括但不限于ATCC登录号为CRL-3216的HEK293T。

[0108] 在特定实施方式中,试剂激活GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递,但在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递的能力表示该试剂在表达GPR124、RECK、FZ和LRP的细胞中激活Wnt信号传递,而在表达FZ和LRP但不表达GPR124和/或RECK的细胞中不激活Wnt信号传递的能力,其中表达GPR124、RECK、FZ和LRP的细胞以及表达FZ和LRP但不表达GPR124和/或RECK的细胞在其他方面基本上相同。

[0109] 在特定实施方式中,试剂激活GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递,但在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递的能力表示该试剂在小鼠或人脑血管内皮细胞或细胞系中激活Wnt信号传递,而在其中敲除RECK和/或GPR124基因的小鼠或人脑血管内皮细胞或细胞系中不激活Wnt信号传递的能力。Wnt信号传递激活的确定在本领域是已知的,并且可以如本文其他地方所述进行。合适的内皮细胞包括例如人脑微血管内皮细胞(HBMEC)、Bend3细胞、Bend5细胞或hCMEC/D3细胞。可以从例如由ATCC维护的公共收藏中获得HBMEC,包括但不限于ATCC登录号为CRL-3245的HBEC-5i。Bend3细胞可以从例如由ATCC维护的公共收藏中获得,包括但不限于ATCC登录号为CRL-2299的bEnd.3。

[0110] 在特定实施方式中,试剂激活GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递,但在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递的能力表示该试剂在Wnt7aa^{-/-}斑马鱼(Danio rerio)的内皮中转基因表达时可恢复所述斑马鱼的脑血管和/或血脑屏障的能力,而在野生型斑马鱼胚胎中显微注射编码该试剂的mRNA没有诱导出后化表型(posteriorization phenotype),优选其中mRNA以1pg至100pg的剂量注射,或在野生型非洲爪蟾胚胎中显微注射编码该试剂的mRNA没有诱导出轴重复(axis duplication)。

[0111] 试剂在Wnt7aa^{-/-}斑马鱼的内皮中转基因表达时恢复所述斑马鱼的脑血管和/或血脑屏障的能力可以通过本领域已知的任何方法来确定。例如,可以通过确定后脑中央动脉(CtAs)的量、总的脑毛细血管长度(aggregate cerebral capillary length)、平均血管大

小和/或平均毛细血管分支来评估脑血管和/或血脑屏障的恢复。确定Wnt7aa^{-/-}斑马鱼转基因表达如本文所教导的试剂的脑区域中的GLUT1的表达(例如使用原位杂交或免疫组织化学)可用于使所述斑马鱼中的脑脉管系统可视化。随后,可以将Wnt7aa^{-/-}斑马鱼转基因表达如本文所教导的试剂的脑区域中的GLUT1表达模式与对照例如野生型斑马鱼的脑区域中的GLUT1表达模式进行比较。

[0112] 在特定实施方式中,如果转基因表达本文所教导的试剂的Wnt7aa^{-/-}斑马鱼中的后脑CtAs的量为野生型斑马鱼中的后脑CtAs的量的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%,则转基因表达本文所教导的试剂的Wnt7aa^{-/-}斑马鱼的脑血管和血脑屏障被认为是被恢复。

[0113] 产生Wnt7aa^{-/-}斑马鱼并在斑马鱼的內皮中转基因表达试剂的方法是本领域熟知的,例如,使用CRISPR/Cas9指导的基因编辑,如Shankaran等,CRISPR/Cas9-directed gene editing for the generation of loss-of-function mutants in high-throughput zebrafish F₀ screens, Curr Protoc Mol Biol., 119:31.9.1-31.9.22(2017)中所述。

[0114] 在斑马鱼胚胎——优选一到四细胞阶段的斑马鱼胚胎——中显微注射mRNA,以及对斑马鱼中表型的发生或不存在的评估,在本领域中是熟知的,例如参见Rosen等人, Microinjection of zebrafish embryos to analyse gene function, J Vis Exp. (25): 1115(2009)。斑马鱼的后化表型(posteriorization phenotype)包括原肠胚形成过程中前神经外胚层的后化,斑马鱼中前脑的丧失和眼结构的丧失(van de Water等人, Ectopic Wnt signal determines the eyeless phenotype of zebrafish masterblind mutant. Development. 128(20):3877-3888(2001))。

[0115] 在非洲爪蟾胚胎中注射试剂后,对轴重复的发生或不存在的评估是本领域熟知的,例如参见Kühl等人, Dorsal axis duplication as a functional readout for Wnt activity. Methods Mol Biol. 469:467-476(2008)。

[0116] 如本文所用,术语“试剂(agent)”广泛地是指任何化学(例如,无机或有机)、生物化学或生物的物质、分子或大分子(例如,生物大分子),其组合或混合物,不确定组成的样品,或由诸如细菌、真菌、植物或动物细胞或组织的生物材料制成的提取物。优选但非限制性的“试剂”包括核酸、寡核苷酸、核酶、肽、多肽、蛋白质、拟肽(peptidomimetics)、抗体、抗体片段、抗体样蛋白质支架、适体、光适体、镜像异构体(spiegelmer)、化学物质,优选有机分子,更优选有机小分子、脂质、碳水化合物、多糖等、及其任意组合。取决于上下文,术语“试剂”可以表示可用于疾病的治疗、治愈、预防或诊断的“治疗剂”或“药物”或在疾病的治疗、治愈、预防或诊断中使用的“治疗剂”或“药物”。

[0117] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂包含或选自以下组成的组:化学物质、抗体、抗体片段、抗体样蛋白支架、蛋白质或多肽、肽、拟肽、适体、光适体、镜像异构体和核酸,优选其中所述试剂包括蛋白质或多肽。

[0118] 本文公开的试剂可以包含以下两个或更多个的组合:化学物质、抗体、抗体片段、抗体样蛋白支架、蛋白质或多肽、肽、拟肽、适体、光适体、镜像异构体和核酸。例如,本文公开的试剂可包括一个或多个多肽区域和一个或多个非多肽区域的组合。

[0119] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂包括或选自蛋白质、多肽或肽。

[0120] 如本文所用,术语“化学物质”以其最广泛的含义使用,并且通常是指具有恒定化

学组成和特征性质的任何基本上纯的物质。化学物质可以是有机分子,优选小的有机分子。术语“小分子”是指化合物,优选有机化合物,其大小可与药物中通常使用的那些有机分子相当。该术语不包括生物大分子(例如蛋白质,肽,核酸等)。优选的小的有机分子的大小范围为多达约5000Da,例如多达约4000Da,优选多达3000Da,更优选多达2000Da,甚至更优选多达约1000Da,例如多达约900、800、700、600或多达约500Da。

[0121] 术语“抗体”以其最广泛的含义在本文中使用时,并且通常指任何免疫结合剂,例如完整抗体,包括但不限于嵌合、人源化、人、重组、转基因、移植和单链抗体等,或含有一个或多个选择性结合目标抗原的结构域的其融合蛋白、缀合物、片段或衍生物。因此,术语抗体包括完整的免疫球蛋白分子、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体或任何这些的免疫学有效片段。因此,该术语特别涵盖完整的单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两个完整的抗体形成的多价(例如2、3-或更多价)和/或多特异性抗体(例如双或更多特异性抗体)、和在其表现出期望生物学活性(特别是特异性结合目标抗原的能力)的范围内的抗体片段,以及此类片段的多价和/或多特异性复合物。术语“抗体”不仅包括通过包括免疫的方法产生的抗体,而且包括任何多肽,例如重组表达的多肽,其被制成包含至少一个能够与目标抗原上的表位特异性结合的互补决定区(CDR)。因此,该术语适用于此类分子,无论它们是在体外、细胞培养中还是体内产生的。

[0122] 术语“免疫球蛋白序列”——无论本文中使用的是指重链抗体还是常规的4-链抗体——均用作通用术语,包括全尺寸抗体,其单个链,以及其所有的部分、结构域或片段(分别包括但不限于抗原结合结构域或片段,例如VHH结构域或VH/VL结构域)。另外,本文中所使用的术语“序列”(例如,诸如“免疫球蛋白序列”,“抗体序列”,“可变结构域序列”,“VHH序列”或“蛋白质序列”之类的术语)通常应理解为除非上下文需要更限制性的解释,否则包括相关的氨基酸序列以及编码该序列的核酸序列或核苷酸序列。

[0123] 术语“表位”包括能够特异性结合免疫球蛋白或T细胞受体的任何多肽决定簇。表位决定簇可以包括分子的化学活性表面基团,例如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,并且可以具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。表位是被抗体结合的抗原区域。当抗体优先识别蛋白质和/或大分子复杂混合物中的靶抗原时,可以说抗体特异性结合抗原。

[0124] 术语“结合区”、“结合位点”或“相互作用位点”在本文中应具有负责结合目标抗原的氨基酸残基的特定位点、部分、结构域或延伸部分的含义。此类结合区基本上由本文所述抗体的特定氨基酸残基组成,该残基与靶分子接触。

[0125] 术语“特异性”是指特定抗原结合分子或抗原结合蛋白(例如抗体)分子可以结合的不同类型的抗原或抗原决定簇的数量。抗原结合蛋白的特异性可以基于亲和力(affinity)和/或亲合力(avidity)来确定。以抗原与抗原结合蛋白的解离平衡常数(KD)表示的亲和力是抗原决定簇与抗原结合蛋白上抗原结合位点之间结合强度的量度:KD的值越小,抗原决定簇和抗原结合分子之间的结合强度越强(可选地,亲和力也可以表示为亲和常数(KA),为1/KD)。如技术人员将清楚的,亲和力可以以本身已知的方式确定,这取决于特定的目标抗原。亲合力是抗原结合分子(例如抗体)和相关抗原之间结合强度的量度。亲合力与抗原决定簇及其在抗原结合分子上的抗原结合位点之间的亲和力以及在抗原结合分子上存在的相关结合位点的数量有关。通常,抗原结合蛋白(例如抗体)将以 10^{-5} 至 10^{-12} 摩尔/升(M)或更小,优选 10^{-7} 至 10^{-12} 摩尔/升(M)或更小,更优选 10^{-8} 至 10^{-12} 摩尔/升的解离常数

(KD), 和/或以至少 10^7M^{-1} , 优选至少 10^8M^{-1} , 更优选至少 10^9M^{-1} , 例如至少 10^{12}M^{-1} 的缔合常数(KA)结合。通常认为任何大于 10^{-4}M 的KD值表示非特异性结合。优选地, 抗体将以小于500nM, 优选小于200nM, 更优选小于10nM, 例如小于500pM的KD结合至期望抗原。抗原结合蛋白与抗原或抗原决定簇的特异性结合可以以本身已知的任何合适方式来确定, 包括例如Scatchard分析和/或竞争性结合测定法, 例如放射免疫测定法(RIA)、酶免疫测定法(EIA)和夹心竞争测定法及它们在本领域中本身已知的不同变化方法。

[0126] 天然存在的全长抗体是这样的免疫球蛋白分子, 其包含通过二硫键互连的2条重(H)链和2条轻(L)链。每条链的氨基末端部分包括约100-110个氨基酸的可变区, 该可变区主要负责通过其中包含的互补决定区(CDR)进行抗原识别。每条链的羧基末端部分定义恒定区, 主要负责效应子功能。

[0127] CDR之间散布有更保守的区域, 称为框架区(FR)。每个轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR)由3个CDR和4个FR构成, 从氨基末端到羧基末端的排列顺序如下: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。轻链的3个CDR称为“LCDR1、LCDR2和LCDR3”, 重链的3个CDR称为“HCDR1、HCDR2和HCDR3”。CDR包含大多数与抗原形成特异性相互作用的残基。LCVR和HCVR区域内CDR氨基酸残基的编号和定位是按照众所周知的Kabat编号约定进行的, Kabat编号约定是指对抗体的重链和轻链区中比其他氨基酸残基更可变(即, 超变)的氨基酸残基进行编号的系统(Kabat等人, Ann.NYAcad.Sci.190:382-93(1971); Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S.Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242(1991)。CDR在抗体可变区中的定位遵循Kabat编号或简称为“Kabat”。

[0128] 轻链被分类为 κ 或 λ , 并且以本领域已知的特定恒定区为特征。重链被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ , 并且将抗体的同种型分别定义为IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。IgG抗体可以进一步分为亚类, 例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。每种重链类型的特征是具有本领域熟知的序列的特定恒定区。

[0129] 在某些实施方式中, 抗体可以是IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类别中的任何一种, 并且优选为IgG类别抗体。

[0130] 在某些实施方式中, 抗体可以是多克隆抗体, 例如, 从中纯化(例如, 亲和纯化)的抗血清或免疫球蛋白。

[0131] 在其他实施方式中, 抗体可以是单克隆抗体或单克隆抗体的混合物。单克隆抗体可以更高的选择性和可重复性靶向特定抗原或抗原中的特定表位。

[0132] 如本文所用, 术语“单克隆抗体”是指衍生自单个拷贝或克隆的抗体, 包括例如任何真核、原核或噬菌体克隆, 而不是其产生方法。单克隆抗体优选以均质或基本均质的群体存在。本发明的单克隆抗体及其抗原结合片段可以例如通过重组技术、噬菌体展示技术、合成技术例如CDR移植、或这些技术的组合或本领域已知的其他技术来产生。

[0133] 作为实例而非限制, 单克隆抗体可以通过首先由Kohler等人1975(Nature 256:495)首先描述的杂交瘤方法来制备, 或可以通过重组DNA方法(例如, 如US 4,816,567中所述)制备。单克隆抗体也可以使用噬菌体抗体文库利用如Clackson等人1991(Nature 352:624-628)和Marks等人1991(J Mol Biol 222:581-597)所述的技术来制备。

[0134] 后面这些技术基于噬菌体展示技术, 尤其如在US5837500、US5571698、US5223409、

US7118879、US7208293和US7413537中描述的。简而言之,在称为细菌噬菌体(或噬菌体)的小细菌病毒的表面上展示治疗候选分子,例如人抗体片段(例如,Fabs)、肽和小蛋白质。展示的分子的集合被称为一个文库。噬菌体展示使得能够搜索这些文库以鉴定优选地以高特异性和/或亲和性结合目标靶标例如治疗靶标的分子。噬菌体抗体文库的非限制性实例包括HuCAL®(人组合抗体库,Morphosys)、Ylanthia®(Morphosys)、W0200070023中所述的人Fab片段文库和W0 1996040878中所述的猕猴抗体库。如W0 199708320中所述使用合成的共有序列已经制备了人组合抗体库(Morphosys),所述合成的共有序列涵盖人基因组中编码抗体的结构性所有组成成分。

[0135] 术语“抗体片段”或“抗原结合部分”包括全长抗体的部分或区域,通常是其抗原结合或可变结构域。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab)2、Fv、scFv片段、单域(sd)Fv,例如V_H域,V_L域和V_{HH}域、双体抗体(diabodies)、线性抗体、单链抗体分子、特别是重链抗体;抗体片段(一个或多个)形成的多价和/或多特异性抗体,例如二价抗体(dibodies)、三价抗体(tribodies)和多价抗体(multibodies)。上述名称Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、scFv等旨在具有其本领域确定的含义。

[0136] 术语“抗原结合部分”或“抗原结合区”是指保留特异性结合抗原的能力的抗体的一个或多个片段。已经显示抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来执行。这些形式也可以是双特异的(bispecific)、双重特异性(dual specific)或多特异性形式;与两种或更多种不同抗原特异性结合。抗体的术语“抗原结合部分”所涵盖的结合片段的实例包括:(i)Fab片段,是由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii)F(ab')2片段,是包含两个在铰链区通过二硫桥连接的Fab片段的二价片段;(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v)dAb片段(Ward等人,Nature,341:544-546(1989);PCT公开W0 90/05144),其包含单个可变结构域;和(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码,但可以使用重组方法通过合成接头将它们连接起来,从而使它们制成为一条蛋白链,其中VL区域和VH区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv)(Bird等人,Science,242:423-426(1988);和Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,85:5879-5883(1988))。这样的单链抗体也意图包含在抗体的术语“抗原结合部分”内。也包括其他形式的单链抗体,例如双体抗体。

[0137] 双体抗体是二价双特异性抗体,其中VH和VL结构域在一条多肽链上表达,但使用的接头太短而不允许在同一条链上的两个结构域之间配对,从而迫使这些结构域与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点(Holliger等,Proc.Natl.Acad.Sci.,90:6444-6448(1993);Poljak等,Structure 2:1121-1123(1994))。这样的抗体结合部分是本领域已知的(Kontermann和Dubel编辑,Antibody Engineering(2001)Springer-Verlag.New York.790pp.(ISBN 3-540-41354-5))。

[0138] 更进一步,抗体或其抗原结合部分可以是较大的免疫粘附分子的部分,其通过抗体或抗体部分与一种或多种其他蛋白质或肽的共价或非共价结合形成。此类免疫粘附分子的实例包括使用链霉亲和素核心区域来制备四聚体scFv分子(Kipriyanov,S.M.等人,Human Antibodies and Hybridomas,6:93-101(1995))和使用半胱氨酸残基、标记肽和C端聚组氨酸标签,以制备二价和生物素化的scFv分子(Kipriyanov等人,Mol.Immunol.,31:1047-1058(1994))。抗体部分,例如Fab和F(ab')2片段,可以使用常规技术,例如分别用木

瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化完整抗体,由完整抗体制备。而且,可以使用标准重组DNA技术获得抗体、抗体部分和免疫粘附分子。

[0139] 在某些实施方式中,抗体片段可以是 Nanobody®。术语“Nanobody®”和“Nanobodies®”是Ablynx NV(比利时)的商标。术语“纳米抗体(Nanobody)”在本领域中是熟知的,并且如本文中所使用的以其最广义包括如下获得的免疫结合剂:(1)通过分离天然存在的重链抗体,优选地衍生自骆驼科(camelids)动物的重链抗体的VHH结构域;(2)通过表达编码天然存在的VHH结构域的核苷酸序列;(3)通过天然存在的VHH结构域的“人源化”或通过表达编码这种人源化的VHH结构域的核酸;(4)通过“骆驼化(camelization)”来自任何动物物种,特别是来自哺乳动物物种诸如人类的天然存在的VH结构域,或通过表达编码这种骆驼化VH结构域的核酸;(5)通过如本领域中描述的“结构域抗体”或“dAb”的“骆驼状(camelisation)”,或通过表达编码这种骆驼化dAb的核酸;(6)通过使用合成或半合成技术制备本身已知的蛋白质、多肽或其他氨基酸序列;(7)通过使用本身已知的核酸合成技术制备编码纳米抗体的核酸,然后表达由此获得的核酸;和/或(8)上述中的一个或多个的任意组合。如本文所用,“骆驼科动物”包括旧世界骆驼科动物(双峰骆驼(Camelus bactrianus)和单峰骆驼(Camelus dromaderius))和新世界骆驼科动物(例如羊驼(Lama paccos)、大羊驼(Lama glama)和骆马(Lama vicugna))。

[0140] 纳米抗体的氨基酸序列和结构可以被认为是,但不限于,包含四个框架区或“FR”,其在本领域和本文中分别被称为“框架区1”或“FR1”;“框架区2”或“FR2”;“框架区3”或“FR3”;和“框架区4”或“FR4”;这些框架区被三个互补决定区或“CDR”打断,三个互补决定区在本领域中分别被称为“互补决定区1”或“CDR1”;“互补决定区2”或“CDR2”;和“互补决定区3”或“CDR3”。纳米抗体中氨基酸残基的总数可以在110-120的范围内,优选在112-115的范围内。然而,应注意,纳米抗体的部分、片段、类似物或衍生物对其长度和/或大小没有特别限制,只要这些部分、片段、类似物或衍生物满足本文概述的其他要求并且优选是适合于本文所述的目的即可。

[0141] 对于重链抗体及其可变结合结构域的一般描述,尤其参考以下文献,作为一般背景技术提及:布鲁塞尔自由大学的WO 94/04678、WO 95/04079和WO 96/34103;联合利华的WO 94/25591、WO 99/37681、WO 00/40968、WO 00/43507、WO 00/65057、WO 01/40310、WO 01/44301、EP 1134231和WO 02/48193;Vlaams Instituut voor Biotechnologie(VIB)的WO 97/49805、WO 01/21817、WO 03/035694、WO 03/054016和WO 03/055527;Algonomics N.V.及其申请人的WO 03/050531;加拿大国家研究委员会的WO 01/90190;抗体研究所的WO 03/025020(=EP1 433 793);以及申请人的WO 04/041867、WO 04/041862、WO 04/041865、WO 04/041863、WO 04/062551以及申请人的进一步公开的专利申请;Hamers-Casterman等人,Nature 1993 June 3;363(6428):446-8;Davies和Riechmann,FEBS Lett.1994 Feb 21;339(3):285-90;Muyldermans等人,Protein Eng.1994 Sep;7(9):1129-3;Davies和Riechmann,Biotechnology(NY)1995May;13(5):475-9;Gharoudi等人,9th应用生物技术论坛,Med.Fac.Landbouw Univ.Gent.1995;60/4a part I:2097-2100;Davies和Riechmann,Protein Eng.1996Jun;9(6):531-7;Desmyter等人,Nat Struct Biol.1996 Sep;3(9):803-11;Sheriff等人,Nat Struct Biol.1996Sep;3(9):733-6;Spinelli等人,Nat Struct Biol.1996 Sep;3(9):752-7;Arbabi Ghahroudi等人,FEBS Lett.1997 Sep 15;414(3):

521-6;Vu等人,MoI Immunol.1997 Nov-Dec;34(16-17):1121-31;Atarhouch等人,Journal of Camel Practice and Research 1997;4:177-182;Nguyen等人,J.MoI.Biol.1998 Jan 23;275(3):413-8;Lauwereys等人,EMBO J.1998 JuI 1;17(13):3512-20;Frenken等人,Res Immunol.1998 Jul-Aug;149(6):589-99;Transue等人,Proteins 1998 Sep 1;32(4):515-22;Muyldermans和Lauwereys,J.MoI.Recognit.1999 Mar-Apr;12(2):131-40;van der Linden等人,Biochim.Biophys.Acta 1999 Apr 12;1431(1):37-46;Decanniere等人,Structure Fold.Des.1999 Apr 15;7(4):361-70;Ngyuen等人,MoI.Immunol.1999 Jun;36(8):515-24;Woolven等人,Immunogenetics 1999 Oct;50(1-2):98-101;Riechmann和Muyldermans,J.Immunol.Methods 1999 Dec 10;231(1-2):25-38;Spinelli等人,Biochemistry 2000 Feb 15;39(6):1217-22;Frenken等人,J.Biotechnol.2000 Feb 28;78(1):11-21;Nguyen等人,EMBO J.2000 Mar 1;19(5):921-30;van der Linden等人,J.Immunol.Methods 2000 Jun 23;240(1-2):185-95;Decanniere等人,J.MoI.Biol.2000 Jun 30;300(1):83-91;van der Linden等人,J.Biotechnol.2000 JuI 14;80(3):261-70;Harmsen等人,MoI.Immunol.2000 Aug;37(10):579-90;Perez等人,Biochemistry 2001 Jan 9;40(1):74-83;Conrath等人,J.Biol.Chem.2001 Mar 9;276(10):7346-50;Muyldermans等人,Trends Biochem Sci.2001 Apr;26(4):230-5;Muyldermans S.,J.Biotechnol.2001 Jun;74(4):277-302;Desmyter等人,J.Biol.Chem.2001 JuI 13;276(28):26285-90;Spinelli等人,J.MoI.Biol.2001 Aug 3;311(1):123-9;Conrath等人,Antimicrob Agents Chemother.2001 Oct;45(10):2807-12;Decanniere等人,J.MoI.Biol.2001 Oct 26;313(3):473-8;Nguyen等人,Adv Immunol.2001;79:261-96;Muruganandam等人,FASEB J.2002 Feb;16(2):240-2;Ewert等人,Biochemistry 2002 Mar 19;41(11):3628-36;Dumoulin等人,Protein Sci.2002 Mar;11(3):500-15;Cortez-Retamozo等人,Int.J.Cancer.2002 Mar 20;98(3):456-62;Su等人,MoI.Biol.Evol.2002 Mar;19(3):205-15;van der Vaart JM.,Methods MoI Biol.2002;178:359-66;Vranken等人,Biochemistry 2002 JuI 9;41(27):8570-9;Nguyen等人,Immunogenetics 2002 Apr;54(1):39-47;Renisio等人,Proteins 2002 Jun 1;47(4):546-55;Desmyter等人,J.Biol.Chem.2002 Jun 28;277(26):23645-50;Ledeboer等人,J.Dairy Sci.2002 Jun;85(6):1376-82;De Genst等人,J.Biol.Chem.2002 Aug 16;277(33):29897-907;Ferrat等人,Biochem.J.2002 Sep 1;366(Pt 2):415-22;Thomassen等人,Enzyme and Microbial Technol.2002;30:273-8;Harmsen等人,Appl.Microbiol.Biotechnol.2002 Dec;60(4):449-54;Jobling等人,Nat Biotechnol.2003 Jan;21(1):77-80;Conrath等人,Dev.Comp.Immunol.2003 Feb;27(2):87-103;Pleschberger等人,Bioconjug.Chem.2003 Mar-Apr;14(2):440-8;Lah等人,J.Biol.Chem.2003 Apr 18;278(16):14101-11;Nguyen等人,Immunology.2003 May;109(1):93-101;Joosten等人,Microb.Cell Fact.2003 Jan 30;2(1):1;Li等人,Proteins 2003 JuI 1;52(1):47-50;Loris等人,Biol Chem.2003 JuI 25;278(30):28252-7;van Koningsbruggen等人,J.Immunol.Methods.2003 Aug;279(1-2):149-61;Dumoulin等人,Nature.2003 Aug 14;424(6950):783-8;Bond等人,J.MoI.Biol.2003 Sep 19;332(3):643-55;Yau等人,J.Immunol.Methods.2003 Oct 1;281(1-2):161-75;Dekker等人,J.Virol.2003 Nov;77(22):12132-9;Meddeb-Mouelhi等人,

Toxicon.2003 Dec;42(7):785-91;Verheesen等人,Biochim.Biophys.Acta 2003 Dec 5;1624(1-3):21-8;Zhang等人,J MoI Biol.2004 Jan 2;335(1):49-56;Stijlemans等人,J Biol Chem.2004 Jan 9;279(2):1256-61;Cortez-Retamozo等人,Cancer Res.2004 Apr 15;64(8):2853-7;Spinelli等人,FEBS Lett.2004 Apr 23;564(1-2):35-40;Pleschberger等人,Bioconjug.Chem.2004 May-Jun;15(3):664-71;Nicaise等人,Protein Sci.2004 Jul;13(7):1882-91;Omidfar等人,Tumour Biol.2004 Jul-Aug;25(4):179-87;Omidfar等人,Tumour Biol.2004 Sep-Dec;25(5-6):296-305;Szynol等人,Antimicrob Agents Chemother.2004 Sep;48(9):3390-5;Saerens等人,J.Biol.Chem.2004 Dec 10;279(50):51965-72;De Genst等人,J.Biol.Chem.2004 Dec 17;279(51):53593-601;DoIk等人,Appl.Environ.Microbiol.2005 Jan;71(1):442-50;Joosten等人,Appl Microbiol Biotechnol.2005 Jan;66(4):384-92;Dumoulin等人,J.MoI.Biol.2005 Feb 25;346(3):773-88;Yau等人,J Immunol Methods.2005 Feb;297(1-2):213-24;De Genst等人,J.Biol.Chem.2005 Apr 8;280(14):14114-21;Huang等人,Eur.J.Hum.Genet.2005 Apr 13;DoIk等人,Proteins.2005May 15;59(3):555-64;Bond等人,J.MoI.Biol.2005 May 6;348(3):699-709;Zarebski等人,J.Mol.Biol.2005 Apr 21.

[0142] 根据上述参考文献中使用的术语,天然存在的重链抗体中存在的可变结构域也将称为“VHH结构域”,以便将它们与常规4链抗体中存在的重链可变结构域(在本文中称为“VH结构域”)和来自常规4链抗体中存在的轻链可变结构域(在本文中称为“VL结构域”)区分。如上文提到的现有技术中所述,VHH结构域具有许多独特的结构特征和功能特性,这些独特的结构特征和功能特性使分离的VHH结构域(以及基于其的纳米抗体,其与天然存在的VHH结构域共享这些结构特征和功能特性)和蛋白质包含相同的对于用作功能性抗原结合结构域或蛋白质高度有益的特征。特别地,但不限于此,VHH结构域(已被按照特征“设计”为在轻链可变结构域不存在的情况下功能上与抗原结合且不与轻链可变结构域发生任何相互作用)和纳米抗体可以作为单个相对较小的功能性抗原结合结构单元、结构域或蛋白质起作用。这将VHH结构域与常规4链抗体的VH和VL结构域区分开来,常规的4链抗体本身通常不适合作为单个抗原结合蛋白或结构域进行实际应用,但需要以某种形式或其他形式组合以提供功能性抗原结合单位(例如,在常规抗体片段如Fab片段中;在ScFv片段中,其由与VL结构域共价连接的VH结构域组成)。

[0143] 在某些实施方式中,抗体片段可以是结构域抗体(dAb)。对于术语“dAb”,例如参考Ward等人(Nature 1989Oct.12;341(6242):544-6),Holt等人,Trends Biotechnol.,2003,21(11):484-490;以及例如Domantis Ltd的W0 06/030220、W0 06/003388和其他已公开的专利申请。单域抗体或单可变结构域可以衍生自某些鲨鱼物种(例如,所谓的“IgNAR结构域”,例如参见W0 05/18629)。

[0144] 在进一步的实施方式中,抗体或抗体片段可以是多特异性的(例如双特异性、三特异性的等抗体),其包含至少两个(例如两个、三个等)结合位点,每个结合位点针对不同的抗原或抗原决定簇。

[0145] 在一些实施方式中,治疗剂可以是双可变结构域免疫球蛋白(DVD-IgTM)。

[0146] 术语抗体包括源自或包含衍生自任何动物物种,优选地脊椎动物物种,包括例如鸟类和哺乳动物的一个或多个部分的抗体。非限制地,抗体可以是鸡(chicken)、火鸡、鹅、

鸭、珍珠鸡、鹌鹑或野鸡。同样但不限于，抗体可以是人类、鼠类(例如小鼠、大鼠等)、猪、驴、兔、山羊、绵羊、豚鼠、猴(例如食蟹猴)、骆驼(例如双峰骆驼(*Camelus bactrianus*)和单峰骆驼(*Camelus dromaderius*)也包括骆驼重链抗体、美洲驼(例如，羊驼(*Lama paccos*)、大羊驼(*Lama glama*)和骆马(*Lama vicugna*))也包括美洲驼重链抗体、或马。

[0147] 本文所用的术语抗体还涵盖衍生自至少两种动物物种的“嵌合抗体”。更具体地，术语“嵌合抗体(chimeric antibody)”或“嵌合抗体(chimeric antibodies)”是指包含来自一个物种的重链可变区和轻链可变区序列和来自另一物种的恒定区序列的抗体，例如具有与人类、非人灵长类、犬、马或猫恒定区连接的鼠类重链可变区和轻链可变区的抗体。嵌合抗体包含重链和/或轻链的一部分，该部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体的相应序列同一或同源，而(一条或多条)所述链的其余部分与来自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列以及这些抗体的片段同一或同源，表现出期望的生物学活性(参见，例如，美国专利号4,816,567；和Morrison等人，*Proc Natl.Acad.Sci.USA* 81:6851-6855(1984))。嵌合抗体是通过合并编码来自一个物种(例如小鼠和猴)的单克隆抗体的一部分(例如Fv区)的DNA和来自另一物种例如人类的产生抗体的DNA而制成的。

[0148] 在某些实施方式中，治疗剂可以是“完全人抗体”。如本文所用，术语“完全人抗体”是指其编码遗传信息是人来源的抗体。因此，术语“完全人抗体”是指具有仅衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。因此，术语“完全人抗体”不包括其中衍生自其他哺乳动物物种(例如小鼠)的种系的CDR序列已移植到人框架序列上的抗体。完全人抗体可以如上所述从噬菌体人抗体文库中获得，或者它们可以通过对转基因小鼠进行免疫来获得，所述转基因小鼠已经被工程化以替换鼠免疫球蛋白编码区，如Lonberg和Husznar 1995 (*Int.Rev.Immunol.*13(1):65-93)中所述。使用噬菌体展示制备的完全人抗体优选通过在人细胞系中重组表达产生，从而产生具有人糖基化模式的抗体。完全人抗体的非限制性实例是HuCAL®抗体(Morphosys)。从HuCAL®抗体文库(Morphosys)中提取用于构建HuCAL®抗体的遗传信息，并以载体的形式导入(即转染)人PER.C6®细胞。转染的细胞将遗传信息翻译为蛋白质。蛋白质通过糖基化进一步修饰，最终得到的抗体分子被细胞分泌到培养基中。

[0149] 如本文所用，术语抗体还涵盖“人源化抗体”，其是衍生自蛋白质序列已被修饰以增加其与人类天然产生的抗体的相似性的非人类物种的抗体。更具体地，术语“人源化抗体”是指这样的抗体，其包含来自非人类物种(例如，小鼠)的重链可变区和轻链可变区序列，但其中至少一部分VH和/或VL序列已改变为更“人样”，即，更类似于人种系可变序列。一种类型的人源化抗体是CDR移植的抗体，其中将非人CDR序列引入人VH和VL序列中以取代相应的人CDR序列。

[0150] 人源化抗体是免疫特异性结合目标抗原的抗体或其变体、衍生物、类似物或片段，其包含基本上具有人抗体氨基酸序列的框架(FR)区和具有基本上非人抗体的氨基酸序列的互补决定区(CDR)。人源化抗体包含基本上所有、或至少一个，通常两个可变结构域(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv)，其中所有或基本上所有CDR区均对应于非人免疫球蛋白(即供体抗体)的那些CDR区，并且所有或基本上所有框架区是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分，通常是人免疫球蛋白的恒定区。人源

化抗体可同时包含轻链以及至少重链的可变结构域。抗体还可以包括重链的CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区。可选地,人源化抗体可以仅包含人源化轻链或人源化重链。示例性的人源化抗体包含轻链的人源化可变结构域和重链的人源化可变结构域。

[0151] 同样,例如,人源化抗体可以衍生自骆驼科——特别是衍生自美洲驼(例如,羊驼(Lama paccos)、大羊驼(Lama glama)和骆马(Lama vicugna)——的常规抗体(即包含通过二硫键互连的2条重(H)链和2条轻(L)链的免疫球蛋白分子),其可变结构域展示了与人类抗体的可变结构域的高度氨基酸序列同一性。用于产生这种人源化抗体的合适平台是如WO 2011080350中所述的SIMPLE Antibody™平台(ArGEN-X)。

[0152] 技术人员将理解,抗体可以包括一个或多个氨基酸缺失、添加和/或取代(例如,保守取代),只要这种改变保持其与各自抗原的结合即可。例如,如美国专利8,323,962中所述,可以将突变引入抗体中,特别是Fc区域中,以延长体内半衰期而不损害免疫原性。

[0153] 抗体还可包含其组成氨基酸残基的一种或多种天然或人工修饰(例如,糖基化等)。

[0154] 产生多克隆和单克隆抗体及其片段的方法以及产生重组抗体或其片段的方法是本领域熟知的(参见例如Harlow和Lane,“抗体:实验室手册”,冷泉港实验室,纽约,1988年(“Antibodies:A Laboratory Manual”,Cold Spring Harbour Laboratory,New York,1988);Harlow和Lane,“使用抗体:实验室手册”,冷泉港实验室,纽约,1999年,ISBN 0879695447(“Using Antibodies:A Laboratory Manual”,Cold Spring Harbour Laboratory,New York,1999,ISBN 0879695447);“单克隆抗体:技术手册”,由佐拉编辑,CRC出版社1987,ISBN 0849364760(“Monoclonal Antibodies:A Manual of Techniques”,by Zola,ed.,CRC Press 1987,ISBN 0849364760);“单克隆抗体:实用方法”,由Dean&Shepherd编辑,牛津大学出版社2000,ISBN 0199637229(“Monoclonal Antibodies:A Practical Approach”,by Dean&Shepherd,eds.,Oxford University Press 2000,ISBN 0199637229);《分子生物学方法》,第248卷:“抗体工程:方法和方案”,Lo编辑,Humana出版社,2004,ISBN 1588290921(Methods in Molecular Biology,vol.248:“Antibody Engineering:Methods and Protocols”,Lo,ed.,Humana Press 2004,ISBN 1588290921))。

[0155] 使用任选地融合或共价或非共价连接、结合或吸附到呈递载体上的免疫原来免疫动物,例如非人类动物,例如实验室或农场动物,以及从免疫血清制备抗体或细胞试剂的方法本身是众所周知的,并且在本说明书中其他地方提到的文档中进行了描述。待免疫的动物可包括任何动物物种,优选温血物种,更优选脊椎动物物种,包括例如鸟类和哺乳动物。非限制地,抗体可以是鸡、火鸡、鹅、鸭、珍珠鸡、鹌鹑或野鸡的抗体。同样但不限于,抗体可以是人类、鼠类(例如小鼠、大鼠等)、猪、驴、兔、山羊、绵羊、豚鼠、骆驼、美洲驼或马的抗体。术语“呈递载体(presenting carrier)”或“载体”通常表示免疫原性分子,其当与第二分子结合时,通常通过提供额外的T细胞表位来增强对第二分子的免疫应答。呈递载体可以是(多)肽结构或非肽结构,例如尤其是聚糖、聚乙二醇、肽模拟物、合成聚合物等。示例性非限制性载体包括人乙型肝炎病毒核心蛋白、多种C3d结构域、破伤风毒素片段C或酵母Ty颗粒。免疫后,可以使用本领域熟知的技术分离来自动物的产生抗体的细胞,并将其用于生成产生单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0156] 产生重组抗体或其片段的方法需要宿主生物或细胞。术语“宿主细胞”和“宿主生物”可以适当地指包括原核生物如细菌和真核生物如酵母、真菌、原生动物、植物和动物的细胞或生物体。考虑用于产生抗体的宿主生物体或细胞包括单细胞生物,例如细菌(例如大肠杆菌),和(培养的)动物细胞(例如哺乳动物细胞或人细胞)。在细菌中产生抗体的优点包括相对安全和直接地处理细菌细胞以及微生物的快速复制周期。细菌特别适合于生产具有简单结构的抗体片段。为了在原核细胞中产生全长免疫球蛋白或更复杂的抗体片段,细菌细胞可以用至少两个核酸进行转化,每个核酸编码抗体片段或免疫球蛋白的不同部分,例如重链或轻链。如WO 2009021548中所述,用于全长免疫球蛋白。在细菌细胞中,读取编码抗体的遗传信息并将其翻译成蛋白质。产生的抗体在周质空间中积累,并且可以在细菌细胞裂解后收获。可以进行进一步的分离步骤以纯化抗体。WO 2009021548描述了一种基于大肠杆菌的分泌系统,其中由于将信号序列引入编码抗体的构建体中,细菌将抗体释放在周围的培养基中。这使得能够容易且方便地从细胞培养基中纯化抗体。可用于产生抗体的示例性哺乳动物细胞系是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。适用于产生抗体的示例性人细胞系包括在ECAC No.96022940下保藏并且在WO 2000063403中描述的PER.C6®细胞系或其衍生物。人细胞系特别适合于产生完整的人抗体,因为它们产生具有人糖基化模式的抗体。

[0157] 除非另外指出,否则对于本领域技术人员将显而易见的是,可以以本身已知的方式来执行并且已经以本身已知的方式来执行未具体描述的所有方法、步骤、技术和操作。例如,再次参考标准手册以及本文所指的一般背景技术以及其中所引用的其他参考文献。

[0158] 激活Wnt信号传递的能力是指本文公开的试剂模仿、再现或近似于结合到FZD和LRP(例如结合到FZD/LRP复合物)的天然Wnt配体的信号转导作用和/或活性的能力。

[0159] 可以通过测量一种或多种Wnt靶基因的表达、TCF报告基因的表达、 β -联蛋白稳定化、LRP磷酸化和/或Axin从细胞质到细胞膜的转运来适当确定和/或定量Wnt信号传递的激活,如本领域已知的。例如,可以通过测量TCF基因的表达(例如,通过RT-PCR或任何其他转录物检测方法),Wnt信号传递的主要输出(Nature,1997,vol.385(6619),829-33)来适当地确定和/或定量Wnt信号传递的激活。例如,TCF报道分子测定法(也称为TOP/FOP或TOPflash)可用于评估TCF/LEF控制基因的转录变化。TCF报道分子测定法可以是荧光素酶报道分子测定法。进一步例如,可以通过测量c-myc(He等人,1998,Science,281(5382),1509-12)、n-myc(Ten Berge等人,2008,Development,135(19),3247-57)、LEF1(Hovanes等人,2001,Nat Genet,28(1),53-7,Filali等人,2002,J Biol Chem,277(36),33398-410)或c-jun(Mann等人,1999,Proc Natl Acad Sci USA,96(4),1603-8)的表达来适当地确定和/或定量Wnt信号传递的激活。

[0160] 可选地,可以通过测量 β -联蛋白的位置、水平和/或磷酸化状态来确定Wnt信号传递的激活。这种测定法的非限制性实例是“ β -联蛋白再分布测定法(β -Catenin Redistribution Assay)”(Thermo Scientific),其提供了稳定表达与增强绿色荧光蛋白(EGFP)的C端融合的人 β -联蛋白的重组U2OS细胞。该测定法允许可视化和监测GFP- β -联蛋白融合蛋白从膜到细胞核的易位。确定Wnt信号传递激活的另一种方法是可视化Axin易位,例如使用GFP-Axin融合蛋白。

[0161] 在特定的实施方式中,例如如在本文其他地方所述的测定法中测量的,如果本文所公开的试剂相比由中性物质或阴性对照诱导的Wnt/ β -联蛋白信号传递基线或背景,使

Wnt/ β -联蛋白信号传递增强至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍、至少250倍、至少500倍、至少750倍、至少1000倍、至少 1×10^4 倍、或至少 1×10^5 倍,则可以认为该试剂能够激活(经典)Wnt信号传递。

[0162] 在特定的实施方式中,例如如在本文其他地方所述的测定法中测量的,如果本文所公开的试剂相比由中性物质或阴性对照诱导的Wnt/ β -联蛋白信号传递基线或背景,使Wnt/ β -联蛋白信号传递增强少于10倍,如具体地至多5倍或至多2.5倍,或者如果所述试剂不增强或甚至降低(例如,少2倍或5倍或少10倍)Wnt/ β -联蛋白信号转导,则可以认为该试剂不激活(典型的)Wnt信号传递。

[0163] 在特定实施方式中,如果本文公开的试剂所诱导的GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递活性是该试剂在不存在RECK和/或GPR124的情况下诱导的Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递活性的至少3.5倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍、至少 1×10^4 倍、或至少 1×10^5 倍,优选至少50倍,则可以认为该试剂激活GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递,但在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活Frizzled/LRP介导的Wnt。在比较GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递活性(在本段中称为“活性1”)和在不存在RECK和/或GPR124的情况下的Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递活性(在本段中称为“活性2”)之前,可以将试剂诱导的活性1和活性2分别归一化为野生型Wnt7a诱导的活性1和活性2,例如将后者设置为代表100%活性。

[0164] 举例来说,在体外或体内细胞分析系统中,该系统包含:1)表达GPR124、RECK、FZ和LRP的细胞,以及分别2)表达FZ和LRP但不表达GPR124和/或RECK的细胞,其中1)和2)的细胞在其他方面基本相同,当在基本相同的条件下,相同量的所述试剂在1)的细胞中诱导的Wnt信号传递活性是2)的细胞中诱导的活性的至少3.5倍、5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍、至少 1×10^4 倍、或至少 1×10^5 倍时,可以认为该试剂激活GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递,但在没有RECK和/或GPR124的情况下不激活Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递。例如,1)和2)中的细胞可以来自相同的原代细胞来源,或者可以是相同的细胞系,并且可以被基因工程改造以在GPR124和/或RECK的表达方面不同。

[0165] Wnt信号途径的激活可通过促进Frizzled和LRP多肽在细胞膜处的紧密缔合或相互接近,从而形成包含Frizzled和LRP多肽的膜相关异源寡聚物而发生。在配体驱动的Frizzled-LRP异源寡聚物形成后,LRP多肽的细胞内部分变得易接近,用以例如通过CK1和GSK-3进行磷酸化,这大大增加了其对Axin的亲合力。第二,当与LRP多肽一起存在于异源寡聚物中时,Frizzled多肽的细胞内部分能够诱导DVL的磷酸化和募集。由此发生的活化LRP-FZD-DVL-Axin复合物的组装间接导致 β -联蛋白破坏复合物的解离,从而使 β -联蛋白在细胞质中累积并转移到细胞核中,在那里 β -联蛋白可以诱导基因转录。

[0166] 因此,在特定的实施方式中,本文公开的试剂在存在RECK和GPR124的情况下,能够在细胞膜处诱导Frizzled和LRP多肽的异聚体化(heteromerization)(例如,优选地,异源二聚体化),但是在不存在RECK和/或GPR124的情况下则不能。

[0167] 为了实现Frizzled和LRP多肽在细胞膜处的异聚体化或紧密缔合,可以使用能够同时结合Frizzled和LRP多肽——例如通过结合Frizzled和LRP多肽这两者的细胞外部

分——的试剂。

[0168] Frizzled和LRP多肽在细胞膜上的异聚体化可以通过本领域已知确定膜蛋白异聚体化的任何方法来确定,例如通过免疫荧光染色、荧光共振能量转移(FRET)可视化荧光标记膜蛋白的异聚体化,或者确定Frizzled和LRP多肽的异聚体化下游事件的发生,例如检测Dvl的存在和磷酸化。

[0169] 因此,在特定的实施方式中,本文公开的试剂能够在存在RECK和GPR124的情况下在细胞膜处同时结合Frizzled和LRP多肽,但是在不存在RECK和/或GPR124的情况下则不能结合Frizzled和LRP多肽。

[0170] 贯穿本说明书使用的术语“结合”、“相互作用”、“特异性结合”或“特异性相互作用”是指试剂与一种或多种期望分子或分析物结合或影响一种或多种期望分子或分析物,所述期望分子或分析物基本上排除了随机或无关的其它分子并且任选地基本上排除了结构上相关的其他分子。该术语不一定要求试剂唯一地结合其(一个或多个)意图的靶标。例如,如果试剂在结合条件下对这样的(一个或多个)意图靶标的亲和力大于其对非靶分子的亲和力的至少约2倍,优选至少约5倍,更优选至少约10倍,还更优选至少约25倍,还更优选至少约50倍,甚至更优选至少约100倍或更多倍、如例如,至少约1000倍或更多倍、至少约 1×10^4 倍或更多倍、或至少约 1×10^5 倍或更多倍,则可以说该试剂与(一个或多个)目标靶标特异性结合。

[0171] 试剂与其(一个或多个)意图靶标之间的结合或相互作用可以是共价的(即,由涉及原子间电子对共享的一个或多个化学键介导),或更通常地,是非共价的(即,由非共价力介导,如例如氢桥、偶极相互作用、范德华相互作用等)。优选地,试剂可以以这样的结合亲和常数(K_A)与其(一个或多个)意图的靶标结合或相互作用: $K_A \geq 1 \times 10^6 M^{-1}$,更优选 $K_A \geq 1 \times 10^7 M^{-1}$,再更优选 $K_A \geq 1 \times 10^8 M^{-1}$,甚至更优选 $K_A \geq 1 \times 10^9 M^{-1}$,以及仍更优选 $K_A \geq 1 \times 10^{10} M^{-1}$ 或 $K_A \geq 1 \times 10^{11} M^{-1}$,其中 $K_A = [A_T]/[A][T]$,A表示作用剂,T表示意图的靶标。 K_A 的测定可以通过本领域已知的方法进行,如例如使用平衡透析和Scatchard图分析。

[0172] 如本文所述的试剂与靶标的结合以及所述结合的亲和力和特异性可以通过本领域已知的任何方法来确定。其非限制性实例包括免疫共沉淀、双分子荧光互补、亲和电泳、标记转移、噬菌体展示、邻近连接测定(PLA)、串联亲和纯化(TAP)、预测的吉布斯结合能计算机内对接和计算以及竞争结合测定。

[0173] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂能够结合一种或多种不同的Frizzled多肽,例如选自Fzd 1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9和Fzd10的一种或多种Frizzled多肽。优选地,本文所公开的试剂可以能够与至少Fzd4特异性结合,并且任选地与一种或多种其他Fzd特异性结合;或可以能够特异性结合Fzd4,所述Fzd4基本上排除了其他Fzd。Fzd4被认为是中枢神经系统内皮细胞中的主要Fzd家族成员。更优选地,本文公开的试剂能够与人Fzd4特异性结合。本文公开的试剂可以对一种或多种优选的Frizzled多肽具有选择性,例如,对一种或多种优选的Frizzled多肽具有的特异性与其他非优选的Frizzled多肽相比为至少5倍、至少10倍、至少25倍、至少50倍、至少100倍、至少1000倍、至少 1×10^4 倍或至少 1×10^5 倍。

[0174] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂能够结合一种或多种参与Wnt信号转导的不同LRP多肽。优选地,本文公开的试剂能够结合LRP5和/或LRP6,例如LRP5和LRP6中的任何

一个或每个。更优选地,本文公开的试剂能够结合人LRP5和/或LRP6,例如人LRP5和人LRP6中的任何一个或每个。本文公开的试剂可以对一种或多种优选的LRP多肽具有选择性,例如对一种或多种优选的LRP多肽具有的特异性与其他非优选的LRP多肽相比为至少5倍、至少10倍、至少25倍、至少50倍、至少100倍、至少1000倍、至少 1×10^4 倍或至少 1×10^5 倍。

[0175] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂能够结合GPR124和/或RECK多肽。

[0176] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂除了结合GPR124和/或RECK多肽外,还能够同时结合Frizzled和LRP多肽。

[0177] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂能够结合RECK多肽。

[0178] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂能够同时结合Frizzled、LRP和RECK多肽。

[0179] RECK由五个N端半胱氨酸结(CK)基序或区域(即CK1、CK2、CK3、CK4和CK5)、一个富含半胱氨酸的结构域(CRD)和三个在糖基磷脂酰肌醇(GPI)-锚定位点之前的Kazal基序组成。CK基序、CRD和Kazal基序位于细胞外。因此,如本文所公开的能够结合RECK多肽的试剂可以结合RECK多肽的CK1基序、CK2基序、CK3基序、CK4基序、CK5基序、CRD和/或一个或多个Kazal基序。

[0180] 本发明人发现特别是如本文所公开的能够结合RECK多肽的试剂与RECK多肽的CK4区和/或CK5区的结合对于建立由GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物介导的Wnt信号传递的激活似乎是重要的。

[0181] 因此,在特定的实施方式中,本文公开的试剂能够结合RECK多肽的CK4区和/或CK5区。

[0182] CK4基序跨度为NCBI Genbank登录号NP_066934.1所注释的人RECK蛋白的氨基酸序列的氨基酸C216至C263,并且CK5基序跨度为氨基酸C292至C338,如本文其他地方所公开。因此,人RECK的CK4基序包含氨基酸序列CCDRAEDHACQNACKRILMSKKTEMEIVDGLIEGCKTQPLPQDPLWQC(SEQ ID NO:5),基本上由或由CCDRAEDHACQNACKRILMSKKTEMEIVDGLIEGCKTQPLPQDPLWQC(SEQ ID NO:5)组成,而人RECK的CK5基序包含CCSKANTSTCRELCTKLYSMSWGNTQSWQEFDRFCEYNPVEVSMLTC(SEQ ID NO:6),基本由或由CCSKANTSTCRELCTKLYSMSWGNTQSWQEFDRFC EYNPVEVSMLTC(SEQ ID NO:6)组成。

[0183] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂能够结合至SEQ ID NO:5的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0184] Frizzled受体是G蛋白偶联的受体蛋白,长度范围为约500至约700个氨基酸。N端被预测为在细胞外,并且包含约120个氨基酸的富含半胱氨酸的结构域(CRD),随后是约40-100个氨基酸的亲水性接头区。Frizzled受体还包含七个疏水结构域,预测其将形成跨膜的 α -螺旋。细胞内C端结构域的长度可变,尽管细胞内结构域在不同家族成员之间总体上并不十分保守,但它包含一个近端KTXXXW氨基酸基序(SEQ ID NO:7),其中X可以是任何氨基酸,其在Frizzled多肽中高度保守,是经典Wnt信号转导所必需的。

[0185] Frizzled CRD结构域包含10个不变间隔的半胱氨酸的基序,并且在已知的Frizzled家族成员之间大部分是保守的,但在其他几种蛋白质(例如RECK)、分泌的Frizzled相关蛋白(SFRP)、受体酪氨酸激酶(RTK)和胶原 $\alpha 1XVIII$ 也是如此。CRD结构域对于配体(例如Wnt)与Frizzled多肽的结合是重要的,例如通过识别和/或结合配体接触位点1中存在的顺式不饱和脂肪酰基或位于Wnt配体“食指(index)”接触位点2处的残基。

[0186] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂能够结合Frizzled多肽的富含半胱氨酸的结构域(CRD)。在某些实施方式中,本文公开的试剂能够结合位于Frizzled多肽的CRD结构域内的顺式-不饱和脂肪酰基结合结构域或CRD内的“食指”接触位点。

[0187] LRP的N端细胞外结构域由四个YWTD (SEQ ID NO:8) 重复结构域(或 β -螺旋桨(propeller)结构域)、四个表皮生长因子(EGF)样结构域和一个LDLR样结构域(LDLRLD)构成。单个YWTD重复结构域包含六个串联的YWTD序列。预计前两个最N端的YWPD重复结构域与Wnt配体结合,预计后两组YWPD重复结构域与Dickkopf (DKK)结合。N端胞外结构域后面是单次跨膜区段和在一个和三个NPXY基序(SEQ ID NO:9)之间的胞质尾,其中X可以是任何氨基酸(例如在LRP1、LRP2、LRP4、APOER2、LDLR、LRP9中)或在一到五个PPSP基序(SEQ ID NO:10)之间(例如,在LRP5和LRP6中)。

[0188] 术语“Dickkopf”或“DKK”涵盖DKK家族的任何成员和所有成员,例如但不限于已知的人类DKK蛋白,包括DKK1 (RefSeq蛋白:NP_036374.1;GeneID:22943)、DKK2 (RefSeq蛋白:NP_055236.1;GeneID:27123)、DKK3 (RefSeq蛋白:NP_001317149.1;GeneID:27122)和DKK4 (RefSeq蛋白:NP_055235.1;GeneID:27121)。在某些实施方式中,这些术语可以特别表示DKK1。

[0189] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂能够结合LRP多肽的细胞外结构域。

[0190] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂能够结合LRP多肽的DKK结合位点。在更具体的实施方式中,本文公开的试剂能够结合LRP5和/或LRP6多肽的DKK1结合位点。

[0191] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂能够结合LRP多肽的Wnt结合位点。在更具体的实施方式中,本文公开的试剂能够结合LRP5和/或LRP6多肽的Wnt结合位点。

[0192] 在进一步的特定实施方式中,本文公开的试剂能够结合LRP多肽的DKK结合位点和Wnt结合位点。

[0193] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂能够结合LRP多肽的 β -螺旋桨-EGF样结构域1和2(P1E1P2E2)和/或 β -螺旋桨-EGF样结构域3和4(P3E3P4E4)。

[0194] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂包含RECK结合结构域和Frizzled结合结构域,以及任选地LRP结合结构域。在更具体的实施方式中,本文公开的试剂包含RECK结合结构域、Frizzled结合结构域和LRP结合结构域。

[0195] 如本文所公开的试剂的RECK结合结构域可以是能够以高亲和力结合RECK多肽的任何结构域;例如以至少约 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、至少 1×10^{-8} M、至少 1×10^{-9} M、至少 1×10^{-10} M、至少 1×10^{-11} M、或至少 1×10^{-12} M的解离常数(KD)与RECK多肽结合。例如,KD至少为约 5×10^{-6} M。

[0196] 在特定的实施方式中,所述RECK结合结构域包含RECK特异性抗体或包含一种或多种RECK特异性抗体的RECK结合区,优选可变区序列或CDR。优选地,RECK特异性抗体针对RECK多肽的细胞外部分,诸如针对RECK多肽的CK4区和/或CK5区。RECK抗体的非限制性实例包括本领域已知且可商购的抗体,例如来自Abcam(例如,对人全长RECK特异的ab88249和ab89915)、Cell Signaling Technology(例如,对人、小鼠、大鼠、猴子RECK特异的#3433(D8C7)、圣克鲁斯(Santa Cruz)(例如,对人RECK C端特异的sc-373929)。

[0197] 在特定实施方式中,RECK结合结构域包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个CDR,每个CDR独立地具有与RECK特异性抗体的相应CDR至少70%、

至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%、优选100%的序列同一性。

[0198] 在特定实施方式中, RECK结合结构域是RECK特异性scFv, 例如包含RECK特异性抗体的一个或多个(优选全部6个)CDR的scFv。

[0199] 在特定实施方式中, RECK结合结构域是RECK特异性V_{HH}, 例如包含RECK特异性重链抗体的一个或多个(优选全部3个)CDR的V_{HH}。

[0200] 在特定的实施方式中, 本文公开的试剂的RECK结合结构域可以包含两个或更多个CDR, 每个CDR独立地具有与两种或更多种不同的RECK特异性抗体的相应CDR至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%, 优选100%的序列同一性。

[0201] 在特定的实施方式中, 本文公开的试剂的所述RECK结合结构域包含RECK结合多肽, 例如, Wnt配体或Wnt多肽; 基本上由其组成; 由其组成或由其衍生(例如, 是其的生物学活性片段和/或变体)。优选地, RECK结合结构域衍生自如本文其他地方所述的Wnt7多肽(例如, Wnt7a或Wnt7b), 更优选衍生自人或鼠Wnt7多肽, 甚至更优选衍生自人Wnt7多肽(例如, 人Wnt7a或人Wnt7b)。例如, 在某些实施方式中, RECK结合结构域可包含Wnt7(例如, Wnt7a或Wnt7b)的、优选人或小鼠Wnt7的、更优选人Wnt7(例如, 人Wnt7a或人Wnt7b)的RECK结合片段, 基本上由所述RECK结合片段组成, 或由所述RECK结合片段组成, 或其变体。在另一个实例中, 在某些实施方式中, RECK结合结构域可包含如下的氨基酸序列, 基本上由如下的氨基酸序列组成或由如下的氨基酸序列组成: 与氨基酸序列VEPVVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMdT (SEQ ID NO:18)或VEVVRASRLRQPTFLRIKQLRSYQKPMET (SEQ ID NO:19)具有至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%、优选100%的序列同一性的氨基酸序列。

[0202] 术语“Wnt”、“Wnt配体”或“Wnt多肽”涵盖Wnt家族的任何和所有成员。通过其他指导, 表2列出了19个已知人类Wnt家族成员, 如NCBI Genbank和Uniprot中注释的。

[0203] 表2

[0204]

	NCBI Genbank			Uniprot
	GeneID	mRNA	蛋白质	蛋白质
WNT1	7471	NM_005430.3	NP_005421.1	P04628.1
WNT2	7472	NM_003391.2	NP_003382.1	P095544.1
WNT2B	7482	NM_004185.4	NP_004176.2	Q93097.2
WNT3	7473	NM_030753.4	NP_110380.1	P56703.2
WNT3A	89780	NM_033131.3	NP_149122.1	P56704.1
WNT4	54361	NM_030761.4	NP_110388.2	P56705
WNT5A	7474	NM_003392.4	NP_003383.2	P41221.1
WNT5B	81029	NM_030775.2	NP_110402.2	Q9H1J7.2
WNT6	7475	NM_006522.3	NP_006513.1	Q9Y6F9
WNT7A	7476	NM_004625.3	NP_004616.2	O00755.2
WNT7B	7477	NM_058238.2	NP_478679.1	P56706.2
WNT8A	7478	NM_001300939.1	NP_001287868.1	Q9H1J5.1
WNT8B	7479	NM_003393.3	NP_003384.2	Q93098.3
WNT9A	7483	NM_003395.2	NP_003386.1	O14904.2
WNT9B	7484	NM_001320458.1	NP_001307387.1	E7EPC3
WNT10A	80326	NM_025216.2	NP_079492.2	Q9GZT5.1
WNT10B	7480	NM_003394.3	NP_003385.2	O00744.2
WNT11	7481	NM_004626.2	NP_004617.2	O96014.2
WNT16	51384	NM_016087.2	NP_057171.2	Q9UBV4.1

[0205] 在某些实施方式中,本文所用的Wnt多肽是动物起源的,优选温血动物起源的,更优选脊椎动物起源的,还更优选哺乳动物起源的,包括人类起源和非人类哺乳动物起源,还更优选人类起源。

[0206] 如本文所公开的试剂的Frizzled结合结构域可以是能够结合一种或多种Frizzled多肽的任何结构域。在不限于任何机制或理论的情况下,试剂的Frizzled结合结构域的亲和力可以足够高以激活GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递(即,当试剂与RECK、RECK与GPR124、和GPR124与Frizzled经由DVL网络结合时,确保了试剂并且尤其是其Frizzled结合结构域接近或呈递到Frizzled),但是足够低以在没有RECK和/或GPR124的情况下避免激活(例如,不激活或至多最少激活,例如生理学上无关紧要的激活程度的Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递。在没有限制的情况下,在某些实施方式中,Frizzled结合结构域可以能够以低于约 1×10^{-9} M、低于约 1×10^{-8} M、低于约 1×10^{-7} M、或低于约 1×10^{-6} M,如例如介于约 1×10^{-6} M和约 1×10^{-7} M之间,或介于约 1×10^{-6} M和约 5×10^{-6} M之间的KD与一种或多种Frizzled多肽结合。

[0207] 在特定的实施方式中,Frizzled结合结构域包含Frizzled特异性抗体或包含一种或多种Frizzled特异性抗体的Frizzled结合区域,优选可变区序列或CDR。优选地,Frizzled特异性抗体针对Frizzled受体的细胞外部分,例如针对Frizzled受体的CRD。Frizzled抗体的非限制性实例包括本领域已知且可商购的抗体,例如可从Biolegend(例如对人Frizzled 4特异的克隆CH3A4a7,对人Frizzled 9特异的克隆W3C4E11)和可从Abcam获得的抗体(例如,对Frizzled 7特异的ab64636、对人Frizzled 4特异的ab83042、对人Frizzled 7特异的ab77379、对人Frizzled 8特异的ab75235、对人Frizzled 9特异的ab102956)。例如,Frizzled结合结构域可以包含泛特异性(pan specific)frizzled抗体

OMP-18R5(万替妥单抗)的六个CDR区。

[0208] 在特定的实施方式中,Frizzled结合结构域包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个CDR,每个CDR独立地具有与Frizzled特异性抗体的相应CDR至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%,优选100%的序列同一性。

[0209] 在特定实施方式中,Frizzled结合结构域是Frizzled特异性scFv,例如包含Frizzled特异性抗体的一个或多个(优选全部6个)CDR的scFv。

[0210] 在特定实施方式中,Frizzled结合结构域是Frizzled特异性V_{HH},例如包含Frizzled特异性重链抗体的一个或多个(优选全部3个)CDR的V_{HH}。

[0211] 在特定的实施方式中,Frizzled结合结构域可包含两个或更多个CDR,每个CDR独立地具有与两种或更多种不同Frizzled特异性抗体的相应CDR至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%,优选100%的序列同一性。

[0212] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂的Frizzled结合结构域包含Frizzled结合多肽,例如Wnt配体或Wnt多肽;基本上由Frizzled结合多肽,例如Wnt配体或Wnt多肽组成;由Frizzled结合多肽,例如Wnt配体或Wnt多肽组成;或衍生自Frizzled结合多肽,例如Wnt配体或Wnt多肽(例如,是其生物学活性片段和/或变体)。优选地,Frizzled结合结构域衍生自如本文其他地方所述的Wnt7多肽(例如,Wnt7a或Wnt7b),更优选地衍生自人Wnt7多肽(例如,人Wnt7a或人Wnt7b)。

[0213] 可以通过基于爪蟾Wnt8a(Xenopus Wnt8a)晶体学分析(C.Y.Janda,D.Waghray,A.M.Levin,C.Thomas,K.C.Garcia,Science.337,59-64(2012))对Wnt多肽的三维结构建模来确定Wnt多肽的Frizzled结合区。

[0214] 已显示XWnt8结合到Frizzled的两个不连续位点。一个称为拇指(thumb)(位点1),另一个称为食指(index)(位点2)。XWnt8拇指的关键残基似乎是K182、I186、S187、G188和W196。S187具有棕榈油酸,这对于在位点1处的结合至关重要。位点2的接触似乎由F317、W319、C321、T322和V323主导。此外,XWnt8可以通过由P34、Y37、L38、S41、A42、A45、V46、T70、L71、A74、F147、G150、L151和T153组成的假位点3形成更高阶的Wnt/Fz多聚体。显示在不同的Wnt多肽之间,位点1(特别是K182、S187、G188和W196)和位点2(特别是W319、C321和V323)中的关键氨基酸残基高度保守,而假位点3的残基差异(divergent)较大。鉴于此,技术人员将理解,可以使用与XWnt8的序列比对来确定Wnt多肽的Frizzled结合区。

[0215] 在特定实施方式中,本文公开的试剂的Frizzled结合结构域包含Wnt配体的“拇指”(位点1),基本上由或由Wnt配体的“拇指”(位点1)组成,优选地,Frizzled结合结构域包含氨基酸序列XKXXXXSGXXXXXXW(SEQ ID NO:11),其中X可以是任何氨基酸,优选其中所述氨基酸序列显示出与CKCHGVSGSCTTKTCW(SEQ ID NO:12)至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%,优选100%的序列同一性。

[0216] 在优选的实施方式中,在SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸位置7处的丝氨酸与脂肪酸残基连接,优选其中所述在SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸位置7处的丝氨酸被棕榈酰化。

[0217] 在优选的实施方式中,本文公开的试剂的Frizzled结合结构域不包含Wnt配体的

“食指”(位点2)。更具体地,本文公开的试剂的Frizzled结合结构域优选不包含氨基酸序列WXCXV(SEQ ID NO:13),其中X可以是任何氨基酸。

[0218] 本文公开的试剂的LRP结合结构域可以是能够结合一种或多种LRP多肽的任何结构域。在不限于任何机制或理论的情况下,试剂的LRP结合结构域的亲和力可以足够高以激活GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递(即,当试剂与RECK、RECK与GPR124、和GPR124与Frizzled经由DVL网络的结合确保了试剂,更具体地其LRP结合结构域与LRP的接近或呈递时),但足够低以在没有RECK和/或GPR124的情况下避免激活(例如,不激活或至多最小激活,例如生理学上无关紧要的激活程度)Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递。非限制性地,在某些实施方式中,LRP结合结构域可以能够以低于约 1×10^{-9} M、或低于约 1×10^{-8} M、或低于约 1×10^{-7} M,例如在约 1×10^{-3} M和约 1×10^{-9} M之间、或在约 1×10^{-3} M和约 1×10^{-8} M之间、或约 1×10^{-3} M和约 1×10^{-7} M之间的KD与一种或多种LRP多肽结合。

[0219] 在特定的实施方式中,所述LRP结合结构域包含LRP特异性抗体或一种或多种LRP特异性抗体的LRP结合区,优选可变区序列或CDR。优选地,LRP特异性抗体是LRP5和/或LRP6特异性抗体。优选地,LRP特异性抗体针对LRP多肽的细胞外部分,诸如针对LRP5和/或LRP6的DKK结合结构域。LRP5特异性抗体的非限制性实例包括本领域已知且可商购的抗体,例如来自Abcam(例如对兔和人LRP5特异的ab36121)、或Santa Cruz(例如对人LRP5特异的sc-21390)。LRP6特异性抗体的非限制性实例包括可得自Abcam(例如对小鼠、大鼠和人LRP6特异的ab134146)、或Santa Cruz(例如,对人LRP6特异的sc-25317)的抗体。

[0220] 在特定实施方式中,LRP结合结构域包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个CDR、每个CDR独立地与LRP特异性抗体,优选LRP5或LRP6特异性抗体的相应CDR具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%、优选100%的序列同一性。

[0221] 在特定实施方式中,LRP结合结构域是LRP5或LRP6特异性scFv,例如包含LRP5或LRP6特异性抗体的一个或多个(优选全部6个)CDR的scFv。

[0222] 在特定实施方式中,LRP结合结构域是LRP5或LRP6特异性 V_{HH} ,例如包含LRP5或LRP6特异性重链抗体的一个或多个(优选全部3个)CDR的 V_{HH} 。

[0223] 在特定实施方式中,本文公开的试剂的LRP结合结构域可包含两个或更多个CDR,每个CDR独立地与两种或更多种不同的LRP特异性抗体,优选LRP5或LRP6特异性抗体的相应CDR具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%,优选100%的序列同一性。

[0224] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂的所述LRP结合结构域包含以下,基本上由以下组成,由以下组成和/或衍生自以下多肽(例如,是以下多肽的生物学活性片段和/或变体):LRP结合多肽,例如Wnt配体或Wnt多肽(例如Wnt7a或Wnt7b)、DKK多肽(例如DKK1、DKK2、DKK3、或DKK4)、硬化蛋白(Sclerostin)(或SOST)、或Wise(或SOSTDC1)、或其变体。

[0225] 举例来说,人SOST基因以NCBI Genbank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)基因ID 50964注释。人SOST mRNA以NCBI Genbank登录号NM_025237.2注释。NM_025237.2的核苷酸48(起始密码子)至689(终止密码子)构成了SOST编码序列。人SOST蛋白质序列以NCBI Genbank登录号NP_079513.1和Uniprot(www.uniprot.org)登录号Q9BQB4.1注释。

[0226] 举例来说,人WISE(或含硬化蛋白域1(SOSTDC1))基因以NCBI Genbank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

www.ncbi.nlm.nih.gov/) 基因ID 25928注释。人WISE mRNA以NCBI Genbank登录号NM_015464.2注释。NM_015464.2的核苷酸182(起始密码子)至802(终止密码子)构成WISE编码序列。人WISE蛋白质序列以NCBI Genbank登录号NP_056279.1和Uniprot (www.uniprot.org)登录号Q6X4U4.2注释。

[0227] 优选地,本文公开的试剂的LRP结合结构域衍生自Wnt7(例如,Wnt7a或Wnt7b)多肽,更优选地衍生自人Wnt7多肽(例如,人Wnt7a或人Wnt7b)或其变体。

[0228] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂的所述LRP结合结构域包含DKK多肽,优选DKK1多肽、或Wnt多肽,优选Wnt7多肽;基本上由DKK多肽,优选DKK1多肽、或Wnt多肽,优选Wnt7多肽组成;由DKK多肽,优选DKK1多肽、或Wnt多肽,优选Wnt7多肽组成或衍生。在优选的实施方式中,本文公开的试剂的所述LRP结合结构域衍生自Wnt7多肽。

[0229] Ahn V.E.等人(Ahn V.E.等人,Dev Cell.2011年11月15日;21(5):862-873)公开了DKK1的C端区域负责与LRP6结合。因此,在特定的实施方式中,本文公开的试剂的所述LRP结合结构域包含DKK1的C端结构域,基本上由DKK1的C端结构域组成,由DKK1的C端结构域组成或衍生。例如,人DKK1的C端结构域(人DKK1注释为NCBI Genbank登录号NP_036374.1和Uniprot登录号094907.1)包含氨基酸序列MYHTKGQEGSVCLRSSDCASGLCCARHFWSKICKPVLKEGQVCTKHRRKGSHGLEIFQRCYCGEGLSCRIQKDDHHQASNSSRLHTCQRH(SEQ ID NO:14)。

[0230] 另一方面,Bourhis E.等人(Bourhis,Eric等人,Structure,第19卷,第10期,1433-1442)鉴定了LRP5/6相互作用基序NXI/V,其中X可以是任何氨基酸,在DKK1的N端,但也在DKK2、DKK4、WISE和SOST中。鉴于此,LRP结合结构域可以包含NXI或NXV,其中X可以是任何氨基酸。

[0231] 在不限于任何机制或理论的情况下,试剂的Frizzled结合结构域和LRP结合结构域的亲和力可合起来足够高以激活GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递(即当试剂与RECK、RECK与GPR124、以及GPR124与Frizzled通过DVL网络的结合确保试剂更具体地确保试剂的LRP结合结构域与LRP的接近或呈递时),但合起来足够低以在没有RECK和/或GPR124的情况下避免激活(例如,不激活或至多最小结合,例如生理学上无关紧要激活程度)Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递。

[0232] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂是蛋白质缀合物。

[0233] 术语“融合蛋白”或“融合多肽”和“蛋白质缀合物”或“多肽缀合物”表示包含至少两种蛋白质或多肽的杂合或嵌合分子,所述至少两种蛋白质或多肽以通常未在自然界中发现的方式连接(linked)、连接(connected)或结合在一起。分子可以适当地表示为基于氨基酸的化合物,即,表示为主要包括但不一定唯一地包括氨基酸残基的物质或分子。涵盖任何重组地、半合成或合成产生的融合物或缀合物。如果需要,可以通过糖基化、磷酸化、磺化、甲基化、乙酰化、脂化、聚乙二醇化等修饰融合物或缀合物。

[0234] 更具体地,术语“融合蛋白”或“融合多肽”表示基因融合,其中通过编码融合产物的单个连续多核苷酸分子的基因表达,使两个或更多个蛋白质、多肽或其变体或片段经由其单独的多肽主链通过共线性的共价键而连接。通常,为了产生编码融合产物的连续多核苷酸分子,将两个或更多个各自编码给定多肽片段的开放阅读框(ORF)连接起来,从而以维持每个原始ORF的正确阅读框的方式形成连续的更长的ORF。在所得的重组融合多肽中,两个或更多个由原始ORF编码的多肽区段在同一多肽分子中连接,而它们通常在自然界中不

是如此连接的。因此,虽然阅读框在整个融合的基因区段上被制备成连续的,但是可以通过例如框内多肽或肽接头在物理上或空间上分离如此融合的多肽片段。

[0235] 更具体地,术语“蛋白质缀合物”或“多肽缀合物”表示其中两个或多个蛋白质、多肽或其变体或片段通过非遗传方式连接的物质或分子,而在自然界中它们通常不是如此连接的。多肽区段可以通过它们各自的多肽主链或通过它们各自的氨基酸侧链中的一个或多个连接,或者一个蛋白区段可以通过其多肽主链与另一多肽区段的氨基酸侧链连接。

[0236] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂的RECK结合结构域、Frizzled结合结构域和/或LRP结合结构域可以通过一个或多个接头偶联。

[0237] 在本发明的上下文中,本文所使用的术语“偶联”与“连接(connect)”、“结合”、“融合”、“结合(join)”同义,并且是指至少两个元件或组件之间的物理连接(link)。

[0238] 如本文所用,术语“接头(linker)”是指用于连接其他元件的连接元件。接头可以是刚性接头或柔性接头。在特定的实施方式中,接头是实现共价键的共价接头。术语“共价的”或“共价键”是指涉及两个原子之间共享一个或多个电子对的化学键。对于许多分子,共享电子使每个原子获得全外层电子壳层(full outer electron shell)的等效物,这与稳定的电子构型相对应。共价键包括不同类型的相互作用,包括 σ 键、 π 键、金属对金属键、抓氢键(agostic interaction)、弯键和三中心二电子键。

[0239] 在特定的实施方式中,接头是(聚)肽接头或非肽接头,例如非肽聚合物,例如非生物聚合物。优选地,RECK结合结构域、Frizzled结合结构域和/或LRP结合结构域之间的(一个或多个)键可以是(一个或多个)水解稳定的键,即,在有用的pH值下、尤其在生理条件下在水中基本稳定延长的时间段例如多天。在特定实施方式中,接头是一个或多个氨基酸的肽接头。

[0240] 术语“氨基酸”涵盖天然氨基酸、天然编码的氨基酸、非天然编码的氨基酸、非天然存在的氨基酸、以类似于天然氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物,均处于其D和L立体异构体,条件是只要它们的结构允许这样的立体异构形式。氨基酸在本文中以其名称(其公知的三个字母符号)或以IUPAC-IUB生化命名委员会推荐的一个字母符号来指代。术语“天然存在”通常是指在自然界中发现且未被人操作的材料。术语“非天然存在的”,“非天然的”等通常是指在未自然界中发现或已经被人进行结构修饰、半合成或合成的材料。“天然编码的氨基酸”是指这样的氨基酸,其为20种常见氨基酸或吡咯赖氨酸、吡咯啉-羧基赖氨酸或硒代半胱氨酸中的一种氨基酸。20种常见氨基酸是:丙氨酸(A或Ala)、半胱氨酸(C或Cys)、天冬氨酸(D或Asp)、谷氨酸(E或Glu)、苯丙氨酸(F或Phe)、甘氨酸(G或Gly)、组氨酸(H或His)、异亮氨酸(I或Ile)、赖氨酸(K或Lys)、亮氨酸(L或Leu)、甲硫氨酸(M或Met)、天冬酰胺(N或Asn)、脯氨酸(P或Pro)、谷氨酰胺(Q或Gln)、精氨酸(R或Arg)、丝氨酸(S或Ser)、苏氨酸(T或Thr)、缬氨酸(V或Val)、色氨酸(W或Trp)和酪氨酸(Y或Tyr)。“非天然编码的氨基酸”是指不是20种常见氨基酸或吡咯赖氨酸、吡咯啉-羧基赖氨酸或硒代半胱氨酸中的一种氨基酸。该术语包括但不限于这样的氨基酸,其通过天然编码的氨基酸的修饰(例如翻译后修饰)而出现,但是其自身不通过翻译复合物天然地掺入正在生长的多肽链中,如由以下非限制性示例的:N-乙酰基葡萄糖氨基(N-acetylglucosaminyl)-L-丝氨酸、N-乙酰基葡萄糖氨基-L-苏氨酸和O-磷酸酪氨酸。非天然编码、非天然或修饰的氨基酸的其他实例包括2-氨基己二酸、3-氨基己二酸、 β -丙氨酸、 β -氨基丙酸、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、哌

啖酸、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、地西蒙、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、高丝氨酸、高半胱氨酸、羟赖氨酸、异羟赖氨酸、3-羟脯氨酸、4-羟脯氨酸、异锁链素、别异亮氨酸、N-甲基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、6-N-甲基赖氨酸、N-甲基缬氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、或鸟氨酸。还包括氨基酸类似物,其中一个或多个单个原子已被不同原子、相同原子的同位素、或不同官能团取代。还包括Ellman等人,Methods Enzymol.1991,vol.202,301-36中描述的非天然氨基酸和氨基酸类似物。将非天然氨基酸以许多不同方式掺入蛋白质或多肽可能是有利的。例如,与含L-氨基酸的对应物相比,含D-氨基酸的多肽在体外或体内表现出增加的稳定性。更具体地,含D-氨基酸的多肽可以对内源肽酶和蛋白酶更具抗性,从而提供了试剂的改善的生物利用度并延长在体内的寿命。

[0241] 更具体地,肽接头可以是1至50个氨基酸长或2至50个氨基酸长或1至45个氨基酸长或2至45个氨基酸长,优选1至40个氨基酸长或2至40个氨基酸长或1至35个氨基酸长或2至35个氨基酸长,更优选1至30个氨基酸长或2至30个氨基酸长。进一步优选地,接头可以是5至25个氨基酸长或5至20个氨基酸长。特别优选地,接头可以是5至15个氨基酸长或7至15个氨基酸长。因此,在某些实施方式中,接头可以是1、2、3或4个氨基酸长。在其他实施方式中,接头可以是5、6、7、8或9个氨基酸长。在进一步的实施方式中,接头可以是10、11、12、13或14个氨基酸长。还在其他实施方式中,接头可以为15、16、17、18或19个氨基酸长。在进一步的实施方式中,接头可以是20、21、22、23、24或25个氨基酸长。在某些实施方式中,接头长度为4-10或5-9或6-8或7个氨基酸。在其他实施方式中,接头的长度为12-18或13-17或14-16或15个氨基酸。

[0242] 构成接头的氨基酸的性质没有特别的相关性,只要基本上不损害由此连接的多肽区段的生物学活性,并且接头提供试剂的RECK结合结构域、Frizzled结合结构域和/或LRP结合结构域的预期空间分离。优选的接头基本上是非免疫原性的和/或不易于蛋白水解切割。

[0243] 在某些优选的实施方式中,肽接头可以包含选自甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸、和其组合的氨基酸,基本上由选自甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸、和其组合的氨基酸组成或由选自甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸、和其组合的氨基酸组成。在甚至更优选的实施方式中,接头可以包括选自甘氨酸、丝氨酸和其组合的氨基酸,基本上由选自甘氨酸、丝氨酸和其组合的氨基酸组成或由选自甘氨酸、丝氨酸和其组合的氨基酸组成。此类接头提供了特别好的柔性。在某些实施方式中,接头可以仅由甘氨酸残基组成。在某些实施方式中,接头可以仅由丝氨酸残基组成。

[0244] 在特定的实施方式中,接头是非肽接头。在优选的实施方式中,非肽接头可以包含非肽聚合物,基本上由非肽聚合物组成或由非肽聚合物组成。如本文所用,术语“非肽聚合物”是指包括两个或更多个通过除肽键之外的共价键彼此连接的重复单元的生物相容性聚合物。例如,非肽聚合物可以是2至200个单元长或2至100个单元长或2至50个单元长或2至45个单元长或2至40个单元长或2至35个单元长或2至30个单元长或5至25个单元长或5至20个单元长或5至15个单元长。非肽聚合物可以选自聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚氧乙基化的多元醇、聚乙烯醇、多糖、右旋糖酐、聚乙烯基乙醚、可生物降解聚合物,例如PLA(聚乳酸),PLGA(聚乳酸-乙醇酸)(polylactic-glycolic acid),脂质聚合物,

几丁质,透明质酸,及其组合。特别优选聚乙二醇(PEG)。非肽聚合物的分子量优选范围可以为1至100kDa,并且优选为1至20kDa。非肽聚合物可以是一种聚合物或是不同类型聚合物的组合。非肽聚合物具有能够与将形成缀合物的RECK结合结构域、Frizzled结合结构域和/或LRP结合结构域结合的反应性基团。优选地,非肽聚合物在每个末端具有反应性基团。优选地,反应性基团选自反应性醛基、丙醛基、丁醛基、马来酰亚胺基和琥珀酰亚胺衍生物。琥珀酰亚胺衍生物可以是琥珀酰亚胺基丙酸酯、羟基琥珀酰亚胺基、琥珀酰亚胺基羧甲基或琥珀酰亚胺基碳酸酯。非肽聚合物两端的反应性基团可以相同或不同。在某些实施方式中,非肽聚合物在两端具有反应性醛基。例如,非肽聚合物可以在一端具有马来酰亚胺基团,并且在另一端具有醛基、丙醛基或丁醛基。当在其两端具有反应性羟基的聚乙二醇(PEG)用作非肽聚合物时,可以通过已知的化学反应将羟基活化成各种反应性基团,或者可以使用具有商业上可得的改性反应性基团的PEG活化成各种反应性基团以制备蛋白质缀合物。

[0245] 包含一个或多个接头增加了试剂的RECK结合结构域、Frizzled结合结构域和/或LRP结合结构域之间的空间分离,这可以有利地影响试剂的Wnt信号传递活性。

[0246] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂以单链或多聚体形式提供。为了获得多聚体形式,可将RECK结合结构域、Frizzled结合结构域和/或LRP结合结构域附接至包含例如树状聚体、抗体或聚-L-赖氨酸的支架或骨架。

[0247] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂包含RECK结合结构域、Frizzled结合结构域和LRP结合结构域,其中所述RECK结合结构域、所述Frizzled结合结构域和所述LRP结合结构域衍生自Wnt7多肽,例如衍生自Wnt7a或Wnt7b多肽,优选人Wnt多肽,例如衍生自人Wnt7a或Wnt7b多肽。

[0248] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂包含RECK结合结构域、Frizzled结合结构域和LRP结合结构域,其中至少一个、至少两个或全部三个结合结构域衍生自Wnt7多肽,例如衍生自Wnt7a或Wnt7b多肽,优选人Wnt多肽,例如衍生自人Wnt7a或Wnt7b多肽。

[0249] 举例来说,人类WNT7A基因以NCBI Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 基因ID7476注释。人WNT7A mRNA(转录本变体1)以NCBI Genbank登记号NM_004625.3注释。NM_004625.3的核苷酸306(起始密码子)至1355(终止密码子)构成WNT7A编码序列。人WNT7A蛋白质序列以NCBI Genbank登录号NP_004616.2和Uniprot登录号000755.2注释,并在下面进一步再现(SEQ ID NO:15)

[0250] >NP_004616.2蛋白质Wnt-7a前体[智人]

[0251] MNRKARRCLGHLFLSLGMVYLRIGGFSSVVALGASIIICNKIPGLAPRQRAICQSRPDIIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNCALGERTVFGKELKVGSRFAFTYAIIAAGVAHAITAACQTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKGGCSADIRYGIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQFRELGYVLKDKYNEAVHVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDDLVYIEKSPNYCEEDPVTGSGVTQGRACNK TAPQASGCDLMCCGRGYNTQYARVWQCNCCKFHWCCYVKCNTCSERTEMYTCK。

[0252] 举例而言,人Wnt7a蛋白的成熟形式(不包含信号肽)包含如下进一步再现的氨基酸序列(SEQ ID NO:51):

[0253] LGASIIICNKIPGLAPRQRAICQSRPDIIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNCALGERTVFGKELKVGSRFAFTYAIIAAGVAHAITAACQTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKGGCSADIRYGIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQFRELGYVLKDKYNEAVHVEPVRASRNKRPTF

LKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYCEEDPVTGSGVTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCK FHWCCYVKCNTCSERTEMYTCK。

[0254] 举例来说,人WNT7B基因以NCBI Genbank基因ID 7477注释。人WNT7B mRNA(转录变体1)以NCBI Genbank登录号NM_058238.2注释。NM_058238.2的核苷酸375(起始密码子)至1424(终止密码子)构成WNT7B编码序列。人WNT7B蛋白质序列以NCBI Genbank登录号NP_478679.1和Uniprot登录号P56706.2注释,并在下面进一步再现(SEQ ID NO:16):

[0255] >NP_478679.1蛋白质Wnt-7b前体[智人]

[0256] MHRNFRKWIFYVFLCFGLVYVKLGALSSVVALGANIICNKIPGLAPRQRAICQSRPD AIIIVIGEGAQMG INECQYQFRFRWNCSALGEKTVFGQELRVGSR EAAFTYAITAAGVAHAVTAAC SQGNLSNCGCDREKQGYNNQAEG WKWGGCSADVRYGIDFSRRFVDAREIKKNARRLMNLHNNEAGRKVLED RMQLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPKFRE VGHLLKEKYNAAVQVEVVRASRLRQPTFLRIKQLRSYQKPMETDLVYIEKSPNYCEEDAATGSGVTQGRLCNRTSPG ADGCDTMCCGRGYNTHQYTKVWQCNCCK FHWCCFVKCNTCSERTEVFTCK

[0257] 在特定实施方式中,所述RECK结合结构域包含以下所示的氨基酸序列,基本上由或由其组成:HVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYC(SEQ ID NO:17)、VEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYC(SEQ ID NO:18)或VEVVRASRLRQPTFLRIKQLRSYQKPMET(SEQ ID NO:19);或包含与SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、或SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%的序列同一性的氨基酸序列,基本上由与SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、或SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%的序列同一性的氨基酸序列,基本上由或由其组成。

[0258] 在特定的实施方式中,所述RECK结合结构域包含以下氨基酸序列,基本上由或由其组成:XXXVXAXRXXXXXFLXIXXXXXXKXXXX(SEQ ID NO:20)、VXAXRXXXXXFLXIXXXXXXK(SEQ ID NO:21)、XXXVXAXRXXXXXFLXXXXXXXKXXXX(SEQ ID NO:22)或VXAXRXXXXXFLXXXXXXXK(SEQ ID NO:23),其中X是任何氨基酸,优选其中氨基酸序列显示至少与SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19中的任何一个至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%,优选100%的序列同一性。

[0259] 在特定实施方式中,所述RECK结合结构域衍生自Wnt7多肽,并且Frizzled结合结构域和LRP结合结构域不衍生自Wnt7多肽。

[0260] 在特定实施方式中,所述RECK结合结构域衍生自Wnt7多肽,并且Frizzled结合结构域和LRP结合结构域衍生自选自以下组成的列表的Wnt多肽:Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt 11和Wnt16。

[0261] 在特定实施方式中,本文公开的试剂是Wnt7多肽的片段,例如Wnt7a或Wnt7b多肽的片段,优选人Wnt7多肽的片段,例如人Wnt7a或Wnt7a的片段,或基本上由其组成。

[0262] 在特定的实施方式中,Wnt7多肽的片段具有全长Wnt7多肽的GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递活性的至少30%,优选至少40%、至少50%、至少60%、至

少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%，优选100%。

[0263] 在特定的实施方式中，Wnt7多肽的片段具有的GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递活性比全长Wnt7多肽的GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递活性高(例如1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍或2倍或甚至更高)。

[0264] 本发明人已经证明，Wnt7a的N-端结构域能够结合RECK并激活由GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物介导的Wnt信号传递，而在不存在RECK和/或GPR124的情况下，不激活由Frizzled/LRP受体复合物介导的Wnt信号传递。

[0265] 因此，在特定实施方式中，在不存在RECK和/或GPR124的情况下，Wnt7多肽的片段具有的Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递活性至少10倍小于、或至少100倍小于、或至少1000倍小于、或至少 1×10^4 倍小于、或至少 1×10^5 倍小于、或至少 1×10^6 倍小于在不存在RECK和/或GPR124的情况下全长Wnt7的Frizzled/LRP介导的Wnt信号活性。

[0266] 在特定的实施方式中，Wnt7多肽的所述片段是Wnt7多肽的N端结构域(NTD)，例如Wnt7a或Wnt7b多肽的NTD，优选人Wnt7多肽例如人Wnt7a或Wnt7b的NTD，或基本上由其组成。人Wnt7a或Wnt7b多肽的N端结构域的范围通常从在与SEQ ID NO:24(Wnt7a)或SEQ ID NO:25(Wnt7b)的位置1对应的位置处的亮氨酸(L)残基到在与SEQ ID NO:24(Wnt7a)或SEQ ID NO:25(Wnt7b)的位置247对应的位置处的半胱氨酸(C)残基。

[0267] 在特定的实施方式中，Wnt7多肽的所述片段至少包含Wnt7多肽的NTD，并且不包含Wnt7多肽的C端结构域(CTD)。

[0268] 在特定的实施方式中，本文所公开的试剂包含人Wnt7a多肽NTD的至少50、至少75、至少100、至少125、至少150、至少175、至少200、至少225个连续氨基酸，基本上由其或由其组成，更具体地，本文公开的试剂包含下述氨基酸序列的至少50、至少75、至少100、至少125、至少150、至少175、至少200、至少225个连续氨基酸，基本上由其或由其组成：

[0269] LGASIIICNKIPGLAPRQRAICQSRPDIIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNCALGERTVFGKELKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRYGIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPPQFRELGYVLKDKYNEAVHVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDDLVYIEKSPNYC (SEQ ID NO:24) 或

[0270] LGANIICNKIPGLAPRQRAICQSRPDIIIVIGEGAQMGINECQYQFRFGRWNCALGEKTVFGQELRVGSREAAFTYAITAAGVAHAVTAACSQGNLSNCGCDREKQGYNNQAEGWKWGGCSADVRYGIDFSRRFVDAREIKKNARRLMNLHNNEAGRKVLEDRLQLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPPKFREVGHLLKEKYNAAVQVEVVRASRLRQPTFLRIKQLRSYQKPMETDLVYIEKSPNYC (SEQ ID NO:25)，优选SEQ ID NO:24。

[0271] 在特定实施方式中，本文公开的试剂包含如下序列，基本上由或由其组成：SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列，优选SEQ ID NO:24；或与氨基酸序列SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25(优选SEQ ID NO:24)具有至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%的序列同一性的氨基酸序列。

[0272] 技术人员将理解，如果设想通过宿主细胞表达和分泌如本文教导的试剂，则编码如本文教导的试剂的核酸优选编码包含N-端信号肽序列的试剂的前体形式。因此，核酸可以编码Wnt7的前体多肽(即包括信号肽)的片段，例如人Wnt7a或Wnt7b的前体多肽。在特定的实施方式中，核酸编码这样的试剂，该试剂包含以下氨基酸序列，基本上由或以下氨基

酸组成:SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25具有至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%的序列同一性的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列在N端之前的信号肽分别具有氨基酸序列MNRKARRCLGHLFLSLGMVYLRIGGFSSVVA(SEQ ID NO:26)或MHRNFRKWIFYVFLCFGVLYVKLGALSSVVA(SEQ ID NO:27)。可选地,编码本文所教导的试剂的核酸可以包含在提供信号肽的载体内。信号肽可以是同源或异源信号肽,这取决于用于产生本文所教导的试剂的宿主细胞。此外,对于如本文教导的试剂的原核表达,蛋白酶切割位点基序可以存在于所述信号肽的C-末端和如本文教导的试剂的N-末端。

[0273] 本发明人已经证明,分别与野生型人或鼠Wnt7a多肽相比,人或鼠Wnt7a多肽的某些变体在激活由GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物介导的Wnt信号转导中同样有效或更有效,而在不存在RECK和/或GPR124的情况下,不激活由Frizzled/LRP受体复合物介导的Wnt信号转导。

[0274] 因此,在特定的实施方式中,本文公开的试剂是Wnt7多肽的变体,例如Wnt7a或Wnt7b多肽的变体。在另外的特定实施方式中,本文公开的试剂是Wnt7a或Wnt7b多肽的NTD的变体。

[0275] 在某些实施方式中,在此类变体中,如下残基被一个或多个(优选不超过三个,优选不超过两个,更优选一个)其他氨基酸残基取代,例如优选但不限于被丙氨酸(A)残基、精氨酸(R)残基或谷氨酰胺(Q)残基,更优选被丙氨酸(A)残基取代:在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置17的位置处的谷氨酰胺(Q)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置20的位置处的异亮氨酸(I)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置25的位置处的脯氨酸(P)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置27的位置处的丙氨酸(A)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置28的位置处的异亮氨酸(I)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置33的位置处的谷氨酸(E)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置37的位置处的甲硫氨酸(M)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置39的位置处的亮氨酸(L)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置41的位置处的谷氨酸(E)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置44的位置处的苯丙氨酸(F)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置50的位置处的精氨酸(R)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置52的位置处的天冬酰胺(N)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置68的位置处的缬氨酸(V)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置129的位置处的异亮氨酸(I)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置131的位置处的苯丙氨酸(F)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置133的位置处的赖氨酸(K)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置135的位置处的苯丙氨酸(F)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51的141位的位置上的异亮氨酸(I)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置146的位置处的精氨酸(R)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置158的位置处的精氨酸(R)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置159的位置处的赖氨酸(K)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置181的位置处的赖氨酸(K)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中191位的位置处的精氨酸(R)残基;在对

应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置198的位置处的赖氨酸(K)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置200的位置处的赖氨酸(K)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置205的位置处的缬氨酸(V)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置208的位置处的谷氨酸(E)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置208的位置处的谷氨酸(E)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置214的位置处的精氨酸(R)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置216的位置处的赖氨酸(K)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置218的位置处的脯氨酸(P)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置222的位置处的赖氨酸(K)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置223的位置处的异亮氨酸(I)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置229的位置处的酪氨酸(Y)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置232的位置处的脯氨酸(P)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置235的位置处的苏氨酸(T)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置248的位置处的谷氨酸(E)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置289的位置处的精氨酸(R)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置291的位置处的色氨酸(W)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置307的位置处的苏氨酸(T)残基;和/或在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置318的位置处的赖氨酸(K)残基。在某些实施方式中,在这样的变体中,在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置17的位置处的谷氨酰胺(Q)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置20的位置处的异亮氨酸(I)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置25的位置处的脯氨酸(P)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置28的位置处的异亮氨酸(I)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置33的位置处的谷氨酸(E)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置37的位置处的甲硫氨酸(M)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置39的位置处的亮氨酸(L)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置41的位置处的谷氨酸(E)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置44的位置处的苯丙氨酸(F)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置50的位置处的精氨酸(R)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置68的位置处的缬氨酸(V)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置129的位置处的异亮氨酸(I)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置131的位置处的苯丙氨酸(F)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置133的位置处的赖氨酸(K)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置135的位置处的苯丙氨酸(F)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置141的位置处的异亮氨酸(I)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置146的位置处的精氨酸(R)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置158的位置处的精氨酸(R)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置181的位置处的赖氨酸(K)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置191的位置处的精氨酸(R)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置198的位置处的赖氨酸(K)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置200的位置处的赖氨酸(K)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置205的位置处的缬氨酸(V)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置208的位置处的谷氨酸(E)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置208的位置处的谷氨酸(E)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置214的位置处的精氨酸(R)残

基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置216的位置处的赖氨酸(K)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置218的位置处的脯氨酸(P)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置222的位置处的赖氨酸(K)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置223的位置处的异亮氨酸(I)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置229的位置处的酪氨酸(Y)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置232的位置处的脯氨酸(P)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置235的位置处的苏氨酸(T)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置248的位置处的谷氨酸(E)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置289的位置处的精氨酸(R)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置291的位置处的色氨酸(W)残基;在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置307的位置处的苏氨酸(T)残基;和/或在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置318的位置处的赖氨酸(K)残基被丙氨酸(A)残基取代;和/或在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置27的位置处的丙氨酸(A)残基被精氨酸(R)残基取代;和/或在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置52的位置处的天冬酰胺(N)残基被谷氨酰胺(Q)残基取代;和/或在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置159的位置处的赖氨酸(K)残基被丙氨酸(A)、丝氨酸(S)或亮氨酸(L)残基取代。

[0276] 在某些实施方式中,Wnt7多肽的变体包含两个或更多个(例如,优选两个,优选三个,更优选四个)以上列出的氨基酸取代。

[0277] 在更具体的实施方式中,Wnt7a或Wnt7b多肽的NTD包含两个或更多个(例如,优选两个,优选三个,更优选四个)上述列出的氨基酸取代。

[0278] 因此,在特定的实施方式中,本文公开的试剂包含如下氨基酸序列,基本上由或由其如下氨基酸序列组成:与SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%的序列同一性的氨基酸序列,其中第17位残基不是谷氨酰胺,第20位残基不是异亮氨酸,第25位残基不是脯氨酸,第27位残基不是丙氨酸,第28位残基不是异亮氨酸,第33位不是谷氨酸,第37位残基不是甲硫氨酸,第39位残基不是亮氨酸,第41位残基不是谷氨酸,第44位残基不是苯丙氨酸,第50位残基不是精氨酸,第52位残基不是天冬酰胺,第68位残基不是缬氨酸,第129位残基不是异亮氨酸,第131位残基不是苯丙氨酸,第133位残基不是赖氨酸,第135位残基不是苯丙氨酸,第141位残基不是异亮氨酸,第146位残基不是精氨酸,第158位残基不是精氨酸,第159位残基不是赖氨酸,第181位残基不是赖氨酸,第191位残基不是精氨酸,第198位残基不是赖氨酸,第200位残基不是赖氨酸,第205位残基不是缬氨酸,第208位残基不是谷氨酸,第214位残基不是精氨酸,第216位残基不是赖氨酸,第218位残基不是脯氨酸,第222位残基不是赖氨酸,第223位残基不是异亮氨酸,第229位残基不是酪氨酸,第232位残基不是脯氨酸,第235位残基不是苏氨酸,第248位残基不是谷氨酸,第289位残基不是精氨酸,第291位残基不是色氨酸,第307位残基不是苏氨酸,和/或第318位残基不是赖氨酸;优选地,其中第27位残基是精氨酸,第28位残基是丙氨酸,第33位残基是丙氨酸,第41位残基是丙氨酸,第44位残基是丙氨酸,第50位残基是丙氨酸,第52位残基是谷氨酰胺,第68位残基是丙氨酸,第129位残基是丙氨酸,第131位残基是丙氨酸,第133位残基是丙氨酸,第135位残基是丙氨酸,第141位残基是丙氨酸,第146位残基是丙氨酸,第158位残基是丙氨酸,第159位残基是丙氨酸,第181位残基是丙氨酸,第191位残

基是丙氨酸,第198位残基是丙氨酸,第200位残基是丙氨酸,第205位残基是丙氨酸,第208位残基是丙氨酸,第214位残基是丙氨酸,第216位残基是丙氨酸,第218位残基是丙氨酸,第222位残基是丙氨酸,第223位残基是丙氨酸,第229位残基是丙氨酸,第232位残基是丙氨酸,第235位残基是丙氨酸,第248位残基是丙氨酸,第289位残基是丙氨酸,第291位残基是丙氨酸,第307位残基是丙氨酸,和/或第318位残基是丙氨酸。

[0279] 在优选的实施方式中,本文公开的试剂是人Wnt7a的NTD的变体,其包含如下氨基酸序列,基本上由或由如下氨基酸序列组成:与SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%的序列同一性的氨基酸序列,其中第17位残基不是谷氨酰胺,第20位残基不是异亮氨酸,第25位残基不是脯氨酸,第27位残基不是丙氨酸,第28位残基不是异亮氨酸,第33位残基不是谷氨酸,第37位残基不是甲硫氨酸,第39位残基不是亮氨酸,第41位残基不是谷氨酸,第44位残基不是苯丙氨酸,第50位残基不是精氨酸,第52位残基不是天冬酰胺,第68位残基不是缬氨酸,第129位残基不是异亮氨酸,第131位残基不是苯丙氨酸,第133位残基不是赖氨酸,第135位残基不是苯丙氨酸,第141位残基不是异亮氨酸,第146位残基不是精氨酸,第158位残基不是精氨酸,第159位残基不是赖氨酸,第181位残基不是赖氨酸,第191位残基不是精氨酸,第198位残基不是赖氨酸,第200位残基不是赖氨酸,第205位残基不是缬氨酸,第208位残基不是谷氨酸,第214位残基不是精氨酸,第216位残基不是赖氨酸,第218位残基不是脯氨酸,第222位残基不是赖氨酸,第223位残基不是异亮氨酸,第229位残基不是酪氨酸,第232位残基不是脯氨酸和/或235位残基不是苏氨酸。

[0280] 在特定实施方式中,本文公开的试剂包含以下序列所示的氨基酸序列,基本上由或由以下序列所示的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、52、53、54、68、69、70、71、72、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120或121,优选SEQ ID NO:28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、47、48、49、53、54、68、69、70、71、72、74、76、80、81、83、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、104、105、106、107、108、109、110、111、112、114、118、119或121,更优选SEQ ID NO:28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、47、48、49、53、54、68、69、70、71、72、74、76、80、81或83(图8)。

[0281] 在优选的实施方式中,在这种变体中,在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置159的位置处的赖氨酸(K)残基被一个或多个(优选不超过三个,优选不超过两个,更优选一个)其他氨基酸残基取代,例如优选但不限于被丙氨酸(A)残基、丝氨酸(S)或亮氨酸(L)残基取代。在更优选的实施方式中,本文公开的试剂包含SEQ ID NO:28、80、81、85、118或119,优选SEQ ID NO:28或85,更优选SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列,基本上由或由其组成。

[0282] 在特定的实施方式中,Wnt7多肽的变体具有全长野生型Wnt7多肽的GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递活性的至少35%,优选至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%,优选100%。在优选的实施方式中,Wnt7多肽的变体具有全长野生型Wnt7多肽的GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号转导活

性的至少70%。在具体的实施方式中,Wnt7多肽的变体具有的GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递活性比全长野生型Wnt7多肽的GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递活性高(例如高1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍或2倍或甚至更高)。

[0283] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂可溶于水。例如,可以通过使用Frizzled特异性抗体或其片段代替Wnt多肽的棕榈酰化Frizzled结合结构域来增加试剂的溶解度。

[0284] 进一步的方面涉及编码本文所公开的试剂的核酸,其中试剂是蛋白质、多肽或肽。

[0285] “编码”是指核酸序列或其部分借助于所讨论生物体的遗传密码对应于特定的氨基酸序列,例如,一种或多种期望蛋白质或多肽的氨基酸序列,或者对应于处于模板转录产物(例如RNA或RNA类似物)关系的另一核酸序列。

[0286] 为了允许表达编码本文所公开的试剂的核酸,其中试剂是蛋白质、多肽或肽,可以将核酸插入核酸表达盒和/或载体中,如本领域熟知的。

[0287] 因此,进一步的方面涉及核酸表达盒,其包含与启动子和/或转录和翻译调节信号可操作连接的编码本文所公开的试剂的核酸。

[0288] 如本文所用,术语“核酸表达盒”是指这样的核酸分子,通常为DNA,可将核酸片段,优选如本文所定义的重组核酸分子,插入以表达,其中所述核酸分子包含一个或多个控制核酸片段表达的核酸序列。控制核酸片段表达的此类更多核酸序列的非限制性实例包括启动子序列、开放阅读框和转录终止子。

[0289] 优选地,核酸表达盒可以包含一个或多个编码所述一种或多种蛋白质、多肽或肽的开放阅读框(ORF)。“开放阅读框”或“ORF”是指以翻译起始密码子开始并以本身已知的翻译终止密码子结束并且不包含任何内部框内翻译终止密码子的一系列编码核苷酸三联体(密码子),并且潜在地能够编码蛋白质、多肽或肽。因此,该术语可以与本领域中使用的“编码序列”同义。

[0290] “可操作的连接”是这样的连接,其中调节序列和试图表达的序列以允许所述表达的方式连接。例如,如果序列之间的连接的性质:(1)不导致引入移码突变,(2)不干扰启动子指导ORF转录的能力,(3)不干扰ORF从启动子序列转录的能力,则该序列如例如启动子和ORF可以说是可操作连接的。因此,“可操作地连接”可以意指掺入遗传构建体中,以便表达控制序列(例如启动子)有效地控制目标序列的转录/表达。

[0291] 表达所需的转录和翻译调控序列或元件的确切性质在表达环境之间可能不同,但通常包括转录终止子和任选的增强子。

[0292] 提及“启动子”将在其最广泛的上下文中进行,并且包括精确转录起始以及在可应用情况下对基因表达或其对例如内部或外部(例如,外源性)刺激反应的精确空间和/或时间控制所需要的转录调控序列。更具体地,“启动子”可以描述RNA聚合酶结合并起始转录的核酸分子(优选DNA分子)上的区域。启动子优选但非必须位于其控制的转录序列的上游,即5'。通常,在原核生物中,启动子区可以既包含启动子本身,又包含这样的序列,当转录为RNA时,该序列将发出蛋白质合成开始的信号(例如,SD序列)。启动子序列也可以包括“增强子区”,其是DNA的一个或多个区域,可以与蛋白质(即反式作用因子)结合以增强基因簇中基因的转录水平。增强子虽然通常在编码区的5'端,但也可以与启动子序列分开,例如,可以在基因的内含子区内或在基因的编码区的3'。

[0293] 在实施方式中,本文考虑的启动子可以是组成型或诱导型的。应理解组成型启动子是在标准培养条件下其表达恒定的启动子。诱导型启动子是对一种或多种诱导信号(cue)有反应的启动子。例如,诱导型启动子可以被化学调节(例如,其转录活性受化学诱导剂例如醇、四环素、类固醇、金属或其他小分子的存在或不存在而调节的启动子)或被物理调节(例如,其转录活性受物理诱导物例如光或高温或低温的存在或不存在而调节的启动子)。诱导型启动子还可以由一种或多种转录因子间接调节,所述转录因子本身直接由化学或物理信号调节。启动子的非限制性实例包括T7、U6、H1、逆转录病毒劳斯肉瘤病毒(RSV) LTR启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、 β -肌动蛋白启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子和EF1 α 启动子。

[0294] 术语“终止子”或“转录终止子”通常是指在转录单元末端的序列元件,其发出终止转录信号。例如,终止子通常位于编码目标多肽的ORF的下游,即,3'。例如,当重组核酸含有两个或多个ORF时,例如相继排序并一起形成多顺反子转录单位,则转录终止子可以有利地位于最下游ORF的3'。

[0295] 在特定实施方式中,核酸表达盒包含编码如本文所公开的试剂的核酸,其可操作地连接至一个或多个启动子、增强子、ORF和/或转录终止子。

[0296] 进一步的方面涉及包含编码如本文公开的试剂的核酸或如本文公开的核酸表达盒的载体,例如病毒载体。

[0297] 如本文所用,术语“表达载体”或“载体”是指这样的核酸分子,通常为DNA,可以将核酸片段,优选如本文所定义的重组核酸分子,插入和克隆,即繁殖。因此,载体通常将包含一个或多个独特的限制性位点,并且可能能够在限定的细胞或媒介有机体(vehicle organism)中自主复制,使得克隆的序列是可复制的。载体还可以优选地包含选择标记,如例如抗生素抗性基因,以允许选择包含该载体的接受细胞。载体可以没有限制地包括质粒、噬菌粒、噬菌体、噬菌体衍生的载体、PAC、BAC、线性核酸例如线性DNA、转座子、病毒载体等,视情况而定(参见,例如,Sambrook等人,1989;Ausubel 1992)。病毒载体尤其可以包括逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或腺相关病毒载体,例如基于HIV、SV40、EBV、HSV或BPV的载体。通常将表达载体配置成允许和/或实现在目的表达系统中例如在体外、在细胞、器官和/或有机体中的引入载体的核酸或开放阅读框的表达。例如,表达载体可以有利地包含合适的调控序列。

[0298] 选择特定载体的重要因素尤其包括:接受细胞的选择,容易识别包含载体的接受细胞并从不包含载体的那些接受细胞选择出;在特定接受细胞中需要的载体拷贝数;是否需要载体整合到染色体中或在接受细胞中保持(在)染色体外;以及是否期望能够在不同物种的接受细胞之间“穿梭”载体。

[0299] 表达载体可以是自主的或整合的。可以以表达载体如质粒、噬菌体、转座子、粘粒或病毒颗粒的形式将核酸引入细胞。重组核酸可以保持在染色体外,或者其可以整合到细胞染色体DNA中。表达载体可以包含选择标记基因,该选择标记基因编码在选定条件下细胞活力所需的蛋白质(例如,URA3,其编码尿嘧啶生物合成所必需的酶,或LEU2,其编码亮氨酸生物合成所必需的酶,或TRP1,其编码色氨酸生物合成所需的酶),以允许检测和/或选择转化有目的核酸的那些细胞。表达载体还可以包括自主复制序列(ARS)。ARS可以包括着丝粒(CEN)和复制起点(ORI)。例如,ARS可以是ARS18或ARS68。

[0300] 整合载体通常包括至少第一可插入DNA片段、选择标记基因和第二可插入DNA片段的连续排列的序列。第一和第二可插入DNA片段的长度各自为约200个(例如,约250个、约300个、约350个、约400个、约450个、约500个、或约1000个或更多)核苷酸,并具有与待转化细胞物种的基因组DNA的部分同源的核苷酸序列。含有表达目标核酸的核苷酸序列被插入该载体中第一和第二可插入DNA片段之间,无论是在标记基因之前还是之后。整合载体可以在转化之前被线性化以促进目标核苷酸序列整合到细胞基因组中。

[0301] 在将载体引入目标细胞之前,可以使载体在细菌细胞例如大肠杆菌(E.coli)中生长(例如,扩增)。可以通过本领域已知的任何方法从细菌细胞分离载体DNA,其导致载体DNA从细菌环境中纯化。纯化的载体DNA可以用酚、氯仿和醚广泛萃取,以确保质粒DNA制备物中不存在大肠杆菌蛋白,因为这些蛋白可能对哺乳动物细胞有毒。

[0302] 如其他地方所述,试剂可以包括蛋白质、多肽或肽。通过宿主细胞或宿主生物体的表达,然后纯化蛋白质、多肽或肽,可以适当地获得这些蛋白质、多肽或肽,所述宿主细胞或宿主生物体用编码所述蛋白质、多肽或肽并被配置成在所述宿主细胞或宿主生物体中表达所述蛋白质、多肽或肽的表达构建体转化。

[0303] 因此,进一步的方面提供了包含本文所教导的核酸、核酸表达盒或载体的宿主细胞。

[0304] 在某些实施方式中,宿主细胞可以是细菌细胞、酵母细胞、动物细胞或哺乳动物细胞。

[0305] 术语“宿主细胞”和“宿主生物体”可以适当地指包括原核生物如细菌,和真核生物如酵母、真菌、原生动物、植物和动物的细胞或生物体。考虑作为宿主细胞的尤其是单细胞生物体,例如细菌(例如,大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌或枯草芽孢杆菌)、酵母(例如,酿酒酵母或毕赤酵母)、(培养的)植物细胞(例如,来自拟南芥或红花烟草(*Nicotiana tabacum*))和(培养的)动物细胞(例如,脊椎动物细胞、哺乳动物细胞、灵长类细胞、人细胞或昆虫细胞)。考虑作为宿主生物体的尤其是多细胞生物体,例如植物和动物,优选动物,更优选温血动物,甚至更优选脊椎动物,还更优选哺乳动物,再更优选灵长类动物。特别考虑的是非人类的这些动物和动物类别。

[0306] 这样的蛋白质、多肽或肽可以适当地分离。关于特定成分(例如核酸、蛋白质、多肽或肽)的术语“分离的”通常表示该成分与自然环境的一个或多个其他成分分离而存在——例如,已从自然环境的一个或多个其他成分分离或从其制备和/或在其中保持分离。例如,分离的人或动物蛋白或复合物可以与其天然存在的人或动物体分离存在。如本文所用,术语“分离的”可优选还涵盖修饰词“纯化的”。如本文所用,关于肽、多肽、蛋白质或核酸的术语“纯化的”不需要绝对的纯度。相反,它表示此类肽、多肽、蛋白质或核酸处于离散的环境中,其中它们的丰度(方便地表示为质量或重量或浓度)相对于其他分析物比在起始组合物或样品中的丰度大。离散环境表示单一介质,例如单一溶液、凝胶、沉淀、冻干物等。纯化的核酸、蛋白质、多肽或肽可以通过已知方法获得,所述方法包括例如,实验室或重组合成、色谱法、制备型电泳、离心、沉淀、亲和纯化等。纯化的肽、多肽或蛋白质的重量优选地构成离散环境的蛋白质含量的 $\geq 10\%$,更优选 $\geq 50\%$,例如 $\geq 60\%$,还更优选 $\geq 70\%$,例如 $\geq 80\%$,还更优选 $\geq 90\%$,例如 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 99\%$ 或甚至100%(按重量计)。蛋白质含量可以例如通过Lowry方法(Lowry等人1951.J Biol Chem 193:265)来确定,任选地

如Hartree 1972(Anal Biochem 48:422-427)所述。肽、多肽或蛋白质的纯度可使用考马斯蓝或优选银染在还原或非还原条件下通过SDS-PAGE测定。核酸的量可以通过测量吸光度A260来确定。核酸的纯度可以通过测量吸光度A260/A280或通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳和溴化乙锭或类似的染色来确定。

[0307] 此外,还有几种其他众所周知的将核酸引入动物细胞的方法,在本文中可以使用任何一种方法。最简单地,可以将核酸直接注射到靶细胞/靶组织中。其他方法包括将接受细胞与含有核酸的细菌原生质体融合,使用如氯化钙、氯化铷、氯化锂、磷酸钙、DEAE葡聚糖、阳离子脂质或脂质体等组合物,或如受体介导的内吞作用、生物粒子轰击(“基因枪”方法)、用病毒载体(即衍生自慢病毒、腺相关病毒(AAV)、腺病毒、逆转录病毒或抗病毒)感染、电穿孔等方法。适合于将核酸分子递送至靶细胞的其他技术或方法包括从聚(乳酸-共-乙醇酸)聚合物微球体连续递送NA分子或将被保护的(稳定的)NA分子直接注入微型泵中递送产品。另一种可能性是使用可植入的释放药物的可生物降解微球。还设想将NA包封在各种类型的脂质体(免疫脂质体、聚乙二醇化(免疫)脂质体)、阳离子脂质和聚合物、纳米颗粒或树状聚合物、聚(乳酸-共-乙醇酸共聚物)聚合物微球、可植入的释放药物的可生物降解微球等;和将NA与保护剂(如核酸酶抑制剂金精三羧酸)共同注入。应当清楚的是,也可以使用不同的上述递送模式或方法的组合。

[0308] 在特定的实施方式中,包含本文所述核酸的载体是病毒载体,优选特异地针对中枢和/或外周神经系统的病毒载体(例如,脑特异性病毒载体)。在进一步的具体实施方式中,病毒载体是中枢神经系统(CNS)神经元特异性腺相关病毒血清型9(AAV9)突变体。例如,病毒载体是展示肽SAQTLAVPFKA(SEQ ID NO:55)或SDGTLAVPFKA(SEQ ID NO:56)的CNS细胞特异性AAV-PHP.B或AAV-PHP.eB病毒载体,如Deverman等人(Deverman等人,Nat Biotechnol,34:204-209(2016)和Chan等人(Chan等人,Nat Neurosci,20(8):1172-1179(2017))所述的。

[0309] 在优选的实施方式中,病毒载体是血脑屏障内皮细胞特异性病毒载体。在进一步的优选实施方式中,病毒载体是血脑屏障内皮细胞特异性衣壳腺相关病毒血清型2(AAV2)突变体。例如,病毒载体是展示肽NRGTEWD(SEQ ID NO:57)的血脑屏障内皮细胞特异性AAV-BR1病毒载体,如Körbelin等人(Körbelin等人,EMBO Molecular Medicine,8,609-625(2016)所述。

[0310] 进一步的方面涉及药物组合物,其包含本文公开的试剂、编码本文公开的试剂的核酸、本文公开的核酸表达盒或本文公开的载体,以及药学上可接受的载体。这样的药物制剂或组合物可以以试剂盒的部分被包含。

[0311] 如本文所用,术语“药学上可接受的”与本领域一致,并且意指与药物组合物的其他成分相容并且对其接受者无害。

[0312] 如本文所用,“载体(carrier)”或“赋形剂”包括任何和所有的溶剂、稀释剂、缓冲剂(如例如,中性缓冲盐水或磷酸盐缓冲盐水)、增溶剂、胶体、分散介质、媒介物、填充剂、螯合剂(如例如,EDTA或谷胱甘肽)、氨基酸(如例如,甘氨酸)、蛋白质、崩解剂、粘合剂、润滑剂、湿润剂、乳化剂、甜味剂、着色剂、调味剂、芳香剂、增稠剂、实现储存效应(depot effect)的试剂、涂料、抗真菌剂、防腐剂、抗氧化剂、张力控制剂、吸收延迟剂等。这种介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性物

质不相容,否则可以考虑将其用于治疗组合物中。

[0313] 用于配制药物流组合物的说明性非限制性载体包括,例如,水包油或油包水乳液、含有或不含有适用于静脉内(IV)用途的有机助溶剂的水性组合物、脂质体或含表面活性剂的囊泡、微球、微珠和微粒体、粉剂、片剂、胶囊剂、栓剂、水性悬浮液、气雾剂和其他本领域普通技术人员显而易见的载体。

[0314] 本文所预期的药物组合物可被配制用于基本上任何给予途径,例如但不限于,口服给予(如例如,口服或吸入)、鼻内给予(如例如,鼻内吸入或鼻内粘膜施用)、肠胃外给予(如例如,皮下、静脉内(IV)、肌内、腹膜内或胸骨内注射或输注)、经皮或经粘膜(如例如,口、舌下、鼻内)给予、局部给予、直肠、阴道或气管内注入等。以这种方式,取决于给定应用的特定需要,通过所述方法和组合物可获得的治疗效果可以是,例如全身的、局部的、组织特异性的等。

[0315] 例如,对于口服给予,药物组合物可以丸剂、片剂、漆片(lacquered tablet)、包衣(例如,糖衣)片剂、颗粒剂、明胶硬胶囊和软胶囊、水性、醇性或油性溶液、糖浆、乳液或悬浮液的形式配制。在一个实例中,不限制地,口服剂型的制备可以通过如下适当地完成:将合适量粉末形式的本文所公开的试剂均匀地且紧密地共混在一起,任选地还包括细分的一种或多种固体载体,并将共混物配制成丸剂、片剂或胶囊剂。示例性但非限制性的固体载体包括磷酸钙、硬脂酸镁、滑石粉、糖类(如例如,葡萄糖、甘露糖、乳糖或蔗糖)、糖醇类(如例如,甘露糖醇)、糊精、淀粉、明胶、纤维素、聚乙烯吡咯烷、低熔点蜡和离子交换树脂。包含药物组合物的压制片剂可以通过将本文所公开的试剂与如上所述的固体载体均匀且紧密地混合以提供具有必要的压制性质的混合物,然后在合适的机器中将混合物压制成期望形状和尺寸来制备。模制片剂可以通过在合适的机器中对用惰性液体稀释剂润湿的粉末状化合物的混合物进行模制来制备。用于软明胶胶囊和栓剂的合适载体是例如,脂肪、蜡、半固体和液体多元醇、天然或硬化油等。

[0316] 例如,对于口服或鼻用气雾剂或吸入给予,可以将药物组合物与示例性载体一起配制,如例如,在具有盐水、聚乙二醇或乙二醇、DPPC、甲基纤维素的溶液中,或在具有粉状分散剂的混合物中,进一步使用苯甲醇或其他合适的防腐剂、增强生物利用度的吸收促进剂、碳氟化合物、和/或本领域已知的其他增溶剂或分散剂。以气雾剂或喷雾剂形式给予的合适药物制剂是例如本文所教导的试剂或其生理上可耐受的盐在药学上可接受的溶剂(例如乙醇或水)或此类溶剂的混合物中的溶液、悬浮液或乳剂。如果需要,制剂还可以另外包含其他药用辅料(pharmaceutical auxiliaries),例如表面活性剂、乳化剂和稳定剂以及推进剂。示例性地,可以通过使用一次性使用的递送装置、喷雾器(mist nebuliser)、呼吸激活的粉末吸入器、气雾计量吸入器(MDI)或本领域中可获得的众多喷雾器递送装置中的任何其他装置来进行递送。另外,也可以使用喷雾帐篷(mist tents)或通过气管内导管直接给予。

[0317] 经由粘膜表面给予的载体的实例取决于特定途径,例如,口、舌下、鼻内等。当口服给予时,示例性的实例包括药用级的甘露糖醇、淀粉、乳糖、硬脂酸镁、糖钠、纤维素、碳酸镁等,其中甘露糖醇是优选的。当经鼻内施用时,示例性实例包括聚乙二醇、磷脂、二元醇和糖脂、蔗糖和/或甲基纤维素、具有或不具有填充剂例如乳糖和防腐剂例如苯扎氯铵,EDTA的粉末悬浮液。在一个特别示例性的实施方式中,磷脂1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱

(DPPC)以约0.01-0.2%用作等渗水性载体,用于鼻内给予浓度为约0.1至3.0mg/ml的本发明化合物。

[0318] 例如,对于肠胃外给药,可以将药物组合物有利地配制成具有合适的溶剂、稀释剂、增溶剂或乳化剂等的溶液、悬浮液或乳剂。合适的溶剂是但不限于水、生理盐水溶液或醇,例如乙醇、丙醇、甘油,此外还有糖溶液,例如葡萄糖、转化糖、蔗糖或甘露糖醇溶液,或可选地上述各种溶剂的混合物。可以根据已知技术,使用合适的无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂,例如甘露糖醇、1,3-丁二醇、水、林格氏溶液或等渗氯化钠溶液,或合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂,例如无菌温和的固定油(fixed oil)(包括合成的甘油单酯或甘油二酯)和脂肪酸(包括油酸)配制可注射溶液或悬浮液。也可以将本发明的试剂和其药学上可接受的盐冻干,并将所得的冻干物用于例如注射或输注制剂的生产。例如,用于静脉内使用的载体的一个示例性实例包括10%USP乙醇、40%USP丙二醇或聚乙二醇600和余量的USP注射用水(WFI)的混合物。静脉使用的其他示例性载体包括10%USP乙醇和USP WFI;USP WFI中的0.01-0.1%三乙醇胺;或USP WFI中的0.01-0.2%二棕榈酰二磷脂酰胆碱;和1-10%的角鲨烯或肠胃外水包植物油乳液。用于皮下或肌肉内使用的载体的示例性实例包括磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液,WFI中的5%葡萄糖和5%葡萄糖中的0.01-0.1%三乙醇胺或USP WFI中的0.9%氯化钠,或1至2或1至4的10%USP乙醇、40%丙二醇和余量的可接受等渗溶液的混合物,所述可接受等渗溶液是例如5%葡萄糖或0.9%氯化钠;或USP WFI中的0.01-0.2%二棕榈酰二磷脂酰胆碱和1至10%的角鲨烯或肠胃外水包植物油乳剂。

[0319] 当优选水性制剂时,其可以包含一种或多种表面活性剂。例如,组合物可以是包含至少一种合适的表面活性剂,例如磷脂表面活性剂的胶束分散体形式。磷脂的示例性实例包括二酰基磷脂酰甘油,例如二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油(DPMG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)和二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG),二酰基磷脂酰胆碱,如二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DPMC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、和二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC);二酰基磷脂酸,例如二肉豆蔻酰基磷脂酸(DPMA)、二苯甲酰基磷脂酸(dipahnitoyl phosphatidic acid)(DPPA)和二硬脂酰基磷脂酸(DSPA);和二酰基磷脂酰乙醇胺,如二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(DPME)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)。通常,水性制剂中的表面活性剂:活性物质的摩尔比为约10:1至约1:10,更通常为约5:1至约1:5,但是任何有效量的表面活性剂可用于水性制剂中以最适合所关注的特定目标。

[0320] 当以栓剂形式经直肠给予时,这些制剂可以通过将根据本发明的化合物与合适的无刺激性赋形剂如可可脂、合成甘油酯或聚乙二醇混合而制备,所述制剂在常温下为固体,但是在直肠腔内液化和/或溶解以释放药物。

[0321] 用于微胶囊、植入物或棒的合适载体是例如乙醇酸和乳酸的共聚物。

[0322] 本领域技术人员将认识到,以上描述是示例性的而不是穷尽的。实际上,许多另外的制剂技术和药学上可接受的赋形剂和载体溶液是本领域技术人员所周知的,如同开发适合的剂量和治疗方案以在多种治疗方案中使用本文所述的特定组合物一样。

[0323] 在优选的实施方式中,本文所教导的试剂、编码该试剂的核酸、包含该核酸的核酸表达盒、包含核酸或核酸表达盒的载体、宿主细胞或药物组合物被肠胃外施用。更优选地,本文所教导的试剂、编码试剂的核酸、包含核酸的核酸表达盒、或包含核酸、核酸表达盒的载体、宿主细胞或药物组合物被静脉内施用,例如通过输注。

[0324] 在特定的实施方式中,本文所教导的试剂、编码试剂的核酸、或包含核酸的核酸表达盒被用于基因治疗。在另外的特定实施方式中,本文所教导的试剂、编码所述试剂的核酸、或包含核酸的核酸表达盒被用于中枢和/或外周神经系统定向的基因治疗,例如脑定向的基因治疗,更具体地是血脑屏障内皮细胞定向的基因治疗。

[0325] 因此,本文还提供了用于在需要基因治疗的受试者中的基因治疗,特别是中枢和/或外周神经系统定向的基因治疗的方法,包括:在受试者中——特别是在受试者的中枢和/或外周神经系统中——引入本文所述的核酸表达盒或载体;并在受试者中——特别是在受试者的中枢和/或外周神经系统中——表达治疗有效量的由本文所教导的核酸编码的试剂。

[0326] 如本文所用,术语“基因疗法(gene therapy)”是指出于治疗或预防目的将外源多核苷酸引入宿主细胞,而与该引入所使用的方法无关。这样的方法包括多种众所周知的技术,如本文其他地方所述的载体介导的基因转移(通过例如病毒感染/转染,或多种其他基于蛋白质或基于脂质的基因递送复合物)。所引入的多核苷酸可以在宿主细胞中稳定或瞬时维持。稳定的维持通常要求所引入的多核苷酸包含与宿主细胞相容的复制起点或整合到宿主细胞的复制子中,例如染色体外复制子(例如质粒)或整合到核或线粒体染色体中。如本领域中已知的,已知许多载体能够介导基因向哺乳动物细胞的转移。例如,如本文其他地方所述,可以使用专门针对中枢和/或外周神经系统的病毒载体(如AAV-PHP.B和AAV-PHP.eB病毒载体)或对血脑屏障内皮细胞特异的病毒载体(如AAV-BR1病毒载体)来进行本文所教导的试剂、编码试剂的核酸、包含核酸的核酸表达盒的载体介导的基因转移。

[0327] 在特定实施方式中,通过向受试者注射(例如,静脉内注射)或用包含本文所教导的核酸或核酸表达盒的载体转化的同种异体细胞移植来给予本文所教导的编码试剂的核酸、包含所述核酸的核酸表达盒、包含所述核酸或所述核酸表达盒的载体或药物组合物。当给予时,注射或移植的同种异体细胞将在体内转录并翻译编码本文所教导的试剂的核酸。本文所教导的试剂的剂量或量,任选地与一种或多种其他待给予的活性化合物组合,取决于个体情况,并且通常按惯例针对个体情况进行调整以达到最佳效果。因此,单位剂量和方案取决于要治疗的病症的性质和严重程度,还取决于多种因素诸如受试者的物种,要治疗的人或动物的性别、年龄、体重、总体健康、饮食、给予方式和时间、免疫状态、和个体反应性,所用化合物的功效、代谢稳定性和作用持续时间,治疗是急性还是慢性或预防性,或除了本发明的试剂之外是否还给予其他活性化合物。为了优化治疗功效,可以首先以不同的给予方案施用本文所教导的试剂。通常,可以使用适当的筛选试验作为临床测试程序的一部分来监测组织中试剂的水平,例如以确定给定治疗方案的功效。给药频率在医务工作者(例如,医生、兽医或护士)的技能和临床判断之内。通常,通过临床试验建立给予方案,该临床试验可以建立最佳给予参数。但是,从业人员可以根据一个或多个上述因素(例如受试者的年龄、健康、体重、性别和医疗状况)来变动此类给予方式。给药频率可以根据治疗是预防性还是治疗性而变化。

[0328] 如本文所述的试剂或包含该试剂的药物组合物的毒性和治疗功效可以通过已知的药学程序例如在细胞培养物或实验动物中确定。这些程序可用于例如,确定LD₅₀(对50%的群体致死的剂量)和ED₅₀(对50%的群体治疗有效的剂量)。毒性效果和治疗效果之间的剂量比(dose ratio)是治疗指数,其可以表示为比率LD₅₀/ED₅₀。表现出高治疗指数的药物

组合物是优选的。虽然可以使用表现出毒副作用的药物组合物,但应注意设计将这类化合物靶向到受影响组织部位的递送系统,以最小化对正常细胞(例如非靶细胞)的潜在损害,并且从而减少副作用。

[0329] 从细胞培养测定和动物研究中获得的数据可用于制定适用于适当受试者的剂量范围。这样的药物组合物的剂量通常在包括很少或没有毒性的ED₅₀的循环浓度范围内。剂量可以在此范围内变化,这取决于所采用的剂型和所利用的给予途径。对于如本文所述使用的药物组合物,治疗有效剂量可以首先从细胞培养测定中估计。可以在动物模型中制定剂量,以实现包括细胞培养中确定的包括IC₅₀(即,实现症状的最大抑制一半的药物组合物的浓度)在内的循环血浆浓度范围。此类信息可用于更准确地确定对人体有用的剂量。血浆中的水平可以例如通过高效液相色谱法测量。

[0330] 没有限制地,取决于疾病的类型和严重程度,本文所教导的试剂的典型剂量(例如,典型的每日剂量或典型的间歇剂量,例如,每两天、每三天、每四天、每五天、每六天、每周、每1.5周、每两周、每三周、每月或其他的典型剂量)的范围可为每剂量约10 μ g/kg至约500 μ g/kg受试者体重,这取决于上述因素,例如,20-400 μ g/kg或20-200 μ g/kg或20-100 μ g/kg或40-80 μ g/kg受试者体重。

[0331] 举例但不限于,本文所教导的试剂可以每剂量约5 μ g/kg、或约10 μ g/kg、或约15 μ g/kg、或约20 μ g/kg、或约25 μ g/kg、或约30 μ g/kg、或约35 μ g/kg、或约40 μ g/kg、或约45 μ g/kg、或约50 μ g/kg、或约60 μ g/kg、或约70 μ g/kg、或约80 μ g/kg、或约90 μ g/kg、或约100 μ g/kg、或约200 μ g/kg、或约300 μ g/kg、或约400 μ g/kg、或约500 μ g/kg给予。

[0332] 在特定实施方式中,使用持续递送系统,例如(部分)植入的持续递送系统,来给予本文所教导的试剂。技术人员将理解,这样的持续递送系统可以包括用于容纳如本文所教导的试剂的储器(reservoir)、泵和输注装置(例如,管道系统)。例如,持续递送系统可以是植入脑中的微渗透泵系统。

[0333] 在特定的实施方式中,本文公开的试剂是药物组合物的主要或唯一活性成分。

[0334] 进一步的方面涉及用作药物的本文公开的试剂、编码本文公开的试剂的核酸、本文公开的核酸表达盒、本文公开的载体或本文公开的药物组合物。

[0335] 进一步的方面涉及本文公开的试剂、编码公本文开的试剂的核酸、本文公开的核酸表达盒、本文公开的载体或本文公开的药物组合物,其用于预防或治疗神经血管疾病或中枢神经系统(CNS)疾病,包括神经血管功能障碍。

[0336] 术语“治疗”涵盖已经发展的疾病或病状的治疗性治疗,例如已经发展的神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的中枢神经系统(CNS)疾病的治疗,以及预防措施或防止措施,其中目的是预防或减少不期望痛苦的发生机会,例如以预防神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的CNS疾病的发生、发展和进展。有益或期望的临床结果可包括但不限于减轻一种或多种症状或一种或多种生物标志物、疾病程度的减轻、疾病状态的稳定(即,不恶化)、疾病进展的延迟或减慢、疾病状态改善或减轻等。“治疗”还可意指生存期与未接受治疗的预期生存期相比延长。

[0337] 如本文所用,术语“神经血管病症”或“神经血管疾病”是指影响脑血管系统和/或供应脊髓的血管系统的疾病或病理改变或状况。该术语涵盖脑和/或脊柱内或供应脑和/或脊柱的血管的任何异常。异常可以是但不限于(i)动脉狭窄,其减少到脑的血流,可导致缺

氧、局部缺血或中风,和/或(ii)动脉衰弱,其可导致脑动脉瘤并增加颅内出血的风险。神经血管疾病的非限制性实例是缺血性中风、出血性中风、局部缺血/再灌注损伤、脑动脉瘤、动静脉畸形(AVM)、海绵状畸形、脉管炎、脑出血、蛛网膜下腔出血、脊髓血管畸形、颈动脉狭窄、烟雾病(Moyamoya disease)和颅内动脉粥样硬化。

[0338] 本文所用的短语“包括神经血管功能障碍的中枢神经系统(CNS)疾病”或“包括神经血管功能障碍的CNS疾病”是指影响脑和/或脊髓(其共同形成中枢神经系统)的结构和/或功能的一组神经系统疾病,其由神经血管功能障碍引起,促成神经血管功能障碍或以神经血管功能障碍为特征,或者其导致脑和/或脊柱内或供应脑和/或脊柱的血管结构和/或功能异常。包括神经血管功能障碍的中枢神经系统(CNS)疾病的非限制性实例是多发性硬化症、缺血性中风、脑癌、癫痫、痴呆、血管性痴呆、HIV-1相关性痴呆、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化、感染性脑疾病、脑外伤、偏头痛和慢性外伤性脑病。

[0339] 除非另有说明,否则术语“受试者”或“患者”可以互换使用,是指动物,优选温血动物,更优选脊椎动物,甚至更优选哺乳动物,还更优选灵长类动物,并且特别包括人类患者和非人类哺乳动物和灵长类动物。优选的受试者是人类受试者。术语“受试者”或“患者”包括需要治疗的受试者,更特别地,将从给定疾病——特别是神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的中枢神经系统(CNS)疾病——的治疗中受益的受试者。这样的受试者可以包括但不限于已经被诊断患有所述疾病的那些受试者,易于发展所述疾病的那些受试者和/或处于待预防的所述疾病的那些受试者。

[0340] 本文所教导的产品和方法允许将治疗和/或预防有效量的本文所教导的试剂、编码本文所公开的试剂的核酸、本文所公开的核酸表达盒、本文所公开的载体或本文所述的药物组合物给予患有神经血管疾病或CNS疾病、将受益于此类治疗中的受试者。如本文所用,术语“治疗有效量”是指外科医生、研究人员、兽医、医生或其他临床医生所寻求的在对象中引起生物或医学反应的活性化合物或药剂的量,尤其可包括减轻所治疗的疾病或病状的症状。术语“预防有效量”是指研究者、兽医、医生或其他临床医生所寻求的在受试者中抑制或延迟疾病发作的活性化合物或药剂的量。用于确定如本文所教导的试剂、编码该试剂的核酸、核酸表达盒或药物组合物的治疗和/或预防有效剂量的方法是本领域已知的。

[0341] 如本文所用,术语“治疗有效剂量”是指如本文所教导的试剂、编码该试剂的核酸、核酸表达盒或药物组合物在治疗患有神经血管疾病或CNS疾病的患者而给予时引起阳性治疗反应的量。

[0342] 如本文所教导的试剂、编码试剂的核酸、核酸表达盒、或药物组合物的适当治疗有效剂量可以由合格的医师根据疾病状况的性质和严重性,以及患者的年龄、尺寸和状况来确定。

[0343] 进一步的方面提供了在需要治疗的受试者中治疗神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的CNS疾病的方法,包括向受试者给予治疗有效量的本文所公开的试剂、编码本文所公开的试剂的核酸、本文公开的核酸表达盒、本文公开的载体或本文公开的药物组合物。

[0344] 进一步的方面提供了本文所公开的试剂、编码本文所公开的试剂的核酸、本文所公开的核酸表达盒、本文所公开的载体或本文所公开的药物组合物的用于制备治疗神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的CNS疾病的药物的用途。

[0345] 在特定实施方式中,所述神经血管疾病选自缺血性中风、出血性中风、局部缺血/

再灌注损伤、脑动脉瘤、动静脉畸形 (AVM)、海绵状畸形、脉管炎、脑出血、蛛网膜下腔出血、脊髓血管畸形、颈动脉狭窄、烟雾病和颅内动脉粥样硬化及其组合。

[0346] 在特定的实施方式中,所述包含神经血管功能障碍的CNS疾病选自多发性硬化症、缺血性中风、脑癌、癫痫、痴呆、血管性痴呆、HIV-1相关痴呆、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化症、感染性脑疾病、脑外伤、偏头痛、慢性外伤性脑病、及其组合。

[0347] 进一步的方面涉及用于鉴定用作治疗剂的试剂的体外方法,所述治疗剂例如可用于预防或治疗神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的CNS疾病,所述方法包括确定测试试剂是否激活由GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物介导的Wnt信号传递而不激活在没有RECK和/或GPR124的情况下由Frizzled/LRP受体复合物介导的Wnt信号传递。术语“体外 (in vitro)”通常表示例如动物或人的身体的外部或在其外部。该术语还涵盖“离体 (ex vivo)”。“体外”的一个实例是在组织细胞培养中。

[0348] 如本文所用,术语“测试试剂”是指任何化学物质(例如,无机或有机),生物化学或生物物质,分子或大分子(例如,生物大分子),其组合或混合物,未确定组成的样品,或由生物材料例如细菌、真菌、植物、或动物细胞或组织制成的提取物,需要确定其是否激活GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递,而不激活在没有RECK和/或GPR124的情况下的Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递。

[0349] 如本文其他地方所述,可以确定由GPR124/RECK Frizzled/LRP受体复合物介导的Wnt信号传递和由Frizzled/LRP受体复合物介导的Wnt信号传递的活化与否。例如,用Super TOPFlash质粒(例如,Super 8×TOPFlash质粒、Addgene质粒#12456)瞬时转染的细胞或稳定转染的Super Top Flash报告细胞系(例如,HEK293 STF细胞系)可以用编码Frizzled、LRP、GPR124和/或Reck多肽的质粒(共)转染,并用于确定响应于加入测试试剂的细胞的荧光素酶活性,作为所述细胞中Wnt信号传递活性的指示。

[0350] 在特定的实施方式中,如本文所公开的用于鉴定用作治疗剂的试剂的体外方法包括使测试试剂与能够通过GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物介导的Wnt信号传递的细胞接触并测量所述Wnt信号传递,以及使测试试剂与能够通过Frizzled/LRP受体复合物但不通过GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物介导的Wnt信号传递的细胞接触,并测量所述Wnt信号传递。

[0351] 本文所用的术语“接触”意指使一种或多种第一组分(例如一种或多种分子、生物实体、细胞或材料)与一种或多种第二组分(例如一种或多种分子、生物实体、细胞或材料)以使得第一组分如果其能够——结合或调控第二组分,或者第二组分——如果其能够——结合或调控第一组分的方式在一起。这种调控可以直接发生,即,通过第一和第二组分之间的直接相互作用发生;或间接发生,例如,当第一组分与一个或多个其他组分相互作用或调控一个或多个其他组分时,其中一个或多个其他组分接下来与第二组分相互作用或调节第二组分,反之亦然。取决于上下文,术语“接触”可以与“暴露”、“孵育”、“混合”、“反应”、“处理”等同义。

[0352] 在特定的实施方式中,可以通过用编码试剂的核酸、包含核酸的核酸表达盒或包含本文所述的核酸或核酸表达盒的载体转染细胞使测试试剂与能够进行GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递的细胞和/或与能够进行Frizzled/LRP介导的Wnt信号传

递但不能进行GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递的细胞接触。测量Wnt信号转导通常表示确定Wnt信号转导的激活,优选地,如本文其他地方所述,确定经典或 β -联蛋白依赖的Wnt信号转导的激活,例如通过检测Wnt响应基因的增加或 β -联蛋白的核定位。确定Frizzled/LRP介导的Wnt信号转导的激活的另一种方法是如本领域已知的研究在将测试试剂显微注射到四细胞阶段胚胎的一个腹卵裂球中之后,在爪蟾胚胎发育过程中背轴复制(dorsal axis duplication)的建立。确定Frizzled/LRP介导的Wnt信号激活的还另一种方法是如本领域已知研究在将测试试剂显微注射到一至四细胞阶段胚胎中之后斑马鱼胚胎发育过程中前脑和眼睛结构的建立。可以将Wnt信号传递活性的水平与基线值进行比较。基线值可以是对照样品(例如未刺激的细胞群体或与对照试剂接触的细胞群体的样品)的值。

[0353] 能够通过GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物介导Wnt信号转导的细胞通常是在其质膜上包含GPR124、RECK、Frizzled和LRP并包含Wnt/ β -联蛋白信号转导通路下游成员的细胞。能够通过Frizzled/LRP受体复合物介导但不通过GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物介导的Wnt信号传递的细胞通常是在其质膜上包含Frizzled和LRP并包含Wnt/ β -联蛋白信号途径下游成员但在其质膜上不包含GPR124多肽和/或RECK多肽的细胞。

[0354] 能够通过GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物介导Wnt信号传递的细胞可以是天然表达GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递所需的所有细胞组分的细胞,例如脑内皮细胞或细胞系。能够通过GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物介导Wnt信号传递的细胞也可以是天然不表达或并非全部表达GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递所需的细胞成分的细胞,其可以被修饰例如基因工程化,以补偿GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号转导所需的缺失细胞成分,例如人胚胎肾293(HEK293)细胞。这样的修饰是本领域已知的,包括用编码例如GPR124和/或RECK多肽的核酸转染细胞。

[0355] 如本文其他地方所述,在上下文中,不存在或不包含或不含有受体多肽本身并不指代在细胞膜上完全不存在所述受体多肽,而是可以指通过本领域技术人员已知的蛋白质测定法不能检测到或低于其灵敏度范围的受体多肽的量。

[0356] 可以通过筛选测试试剂与RECK多肽、Frizzled和/或LRP多肽结合的能力来进行初步筛选。

[0357] 在特定的实施方式中,如本文所公开的用于鉴定可用作治疗剂的试剂的体外方法包括确定测试试剂是否能够结合RECK多肽,以及任选地确定测试试剂是否能够结合Frizzled多肽和/或LRP多肽。

[0358] 结合测定可包括使RECK多肽、Frizzled和/或LRP多肽与测试试剂接触,并留出足够的时间使测试试剂和RECK多肽、Frizzled和/或LRP多肽形成结合复合物。可以使用如本文其他地方所述的用于确定蛋白质-蛋白质结合的任何已建立的分析技术来检测结合复合物的形成,例如共免疫沉淀、双分子荧光互补、标记转移、串联亲和纯化、化学交联和荧光共振能量转移。如本文其他地方所述,可以在无细胞系统中或在细胞裂解物中或在分离或培养的细胞中或在分离或培养的组织中进行蛋白结合测定。

[0359] 在结合测定中,试剂、RECK多肽、Frizzled多肽和/或LRP多肽中的一种或多种可以与标记连接,其中标记可以直接或间接提供可检测的信号。这样的标记物或信号的非限制性实例包括放射性同位素、荧光标记或信号、化学发光标记或信号、酶、特异性结合分子或颗粒(例如磁性颗粒)。

[0360] 在特定的实施方式中,如本文公开的用于鉴定可用作治疗剂的试剂的体外方法可以进一步包括使用一种或多种试剂,所述试剂改善测定的效率,促进最佳的蛋白质-蛋白质结合和/或减少非特异性或背景相互作用。此类试剂的非限制性实例是盐、中性蛋白质(例如白蛋白)、去污剂、蛋白酶抑制剂、核酸酶抑制剂和抗微生物剂。

[0361] 在特定实施方式中,如本文公开的用于鉴定可用作治疗剂的试剂的体外方法包括使测试试剂与细胞接触1小时至48小时、6小时至36小时、12小时至24小时、0.5至120分钟、1至90分钟、5至60分钟、或10至30分钟。

[0362] 在特定的实施方式中,如本文所公开的用于鉴定可用作治疗剂的试剂的体外方法包括在4℃至40℃的温度下使测试试剂与细胞接触。

[0363] 在某些实施方式中,可以在分离的或培养的细胞或分离的或培养的组织中进行接触。贯穿本说明书关于特定组分使用的术语“分离的”通常表示该组分与其自然环境的一种或多种其他组分分离存在——例如已经与之分离或与之分离而制备和/或与之保持分离。更具体地,如本文所用,关于细胞或组织的术语“分离的”表示这样的细胞或组织不形成动物或人体的部分。分离的细胞或组织可以适当地在体外培养或培育。术语“培养”或“细胞培养”在本领域中是常见的,并且广泛地指在体外细胞的维持以及细胞的潜在扩展(增殖、繁殖)。通常,通过在适合于该目的的容器(例如96-、24-或6-孔板,T-25,T-75,T-150或T-225瓶或细胞工厂)中将动物细胞(例如哺乳动物细胞,如人细胞)暴露于合适的细胞培养基(即,使细胞与细胞培养基接触)在本领域已知有利于体外细胞培养的条件下(例如温度为37℃,5%v/v CO₂和>95%湿度)培养这些细胞。

[0364] 如本文所用,术语“培养基”广泛地包括有利于细胞维持,优选有利于细胞增殖的任何细胞培养基。通常,培养基将是液体培养基,这有助于对培养基容易操作(例如倾析、移液、离心、过滤等)。

[0365] 通常,培养基将包含本领域已知的基础培养基制剂。可以使用许多基础培养基制剂(例如,可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得;或从Invitrogen,Carlsbad,California获得),包括但不限于Eagle氏最低基本培养基(Eagle's Minimum Essential Medium)(MEM)、Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)、 α 改良的最低基本培养基(α -MEM)、基础培养基(BME),Iscove改良的Dulbecco培养基(IMDM)、BGJb培养基、F-12营养混合物(Ham)、Liebovitz L-15、DMEM/F-12、基本改良的Eagle培养基(EMEM)、RPMI-1640、199培养基、Waymouth MB 752/1或Williams Medium E、以及其改良和/或组合。基础培养基的组成是本领域公知的,并且根据培养的细胞的需要,改变或调节培养基和/或培养基补充物的浓度在本领域技术人员的能力范围内。

[0366] 这样的基础培养基制剂含有本身已知的哺乳动物细胞发育所必需的成分。出于说明而非限制的目的,这些成分可以包括无机盐(特别是含有Na、K、Mg、Ca、Cl、P以及可能的Cu、Fe、Se和Zn的盐)、生理缓冲液(例如,HEPES、碳酸氢盐)、核苷酸、核苷和/或核酸碱基、核糖、脱氧核糖、氨基酸、维生素、抗氧化剂(例如,谷胱甘肽)和碳源(例如,葡萄糖、丙酮酸钠、乙酸钠)等。

[0367] 为了用于培养,可以向基础培养基提供一种或多种其他成分。例如,可以使用额外的补充物为细胞提供必要的痕量元素和物质,以实现最佳的生长和扩增。此外,可以添加抗氧化剂补充物,例如 β -巯基乙醇。尽管许多基础培养基已经含有氨基酸,但随后可以补充一

些氨基酸,例如,L-谷氨酰胺,L-谷氨酰胺已知在溶液中较不稳定。可以进一步向培养基提供抗生素和/或抗霉菌化合物,例如,典型地青霉素和链霉素的混合物,和/或其他化合物,例如但不限于,两性霉素、氨苄青霉素、庆大霉素、博来霉素、潮霉素、卡那霉素、丝裂霉素、霉酚酸、茶啉酸、新霉素、制霉菌素、巴龙霉素、多粘菌素、嘌呤霉素、利福平、壮观霉素、四环素、泰乐菌素和争光霉素(zeocin)。

[0368] 脂质和脂质载体也可以用于补充细胞培养基。这样的脂质和载体可以包括但不限于,环糊精、胆固醇、与白蛋白结合缀合的亚油酸、与白蛋白缀合的亚油酸和油酸、未缀合的亚油酸、与白蛋白缀合的亚油酸-油酸-花生四烯酸、未缀合和缀合至白蛋白的油酸等等。白蛋白可类似地用于不含脂肪酸的制剂中。

[0369] 还考虑了用哺乳动物血浆或血清补充细胞培养基。血浆或血清通常含有有助于细胞存活和扩增的细胞因子和成分。任选地,血浆或血清可以被热灭活。热灭活在本领域中主要用于去除补体。热灭活通常涉及将血浆或血清在56℃下温育30至60分钟,例如30分钟,并进行持续混合,然后使血浆或血清逐渐冷却至环境温度。技术人员将意识到上述过程的任何普通修改和要求。任选地,可以在储存或使用之前对血浆或血清进行灭菌。通常的灭菌方法可包括例如,通过一个或多个如下孔径的过滤器过滤:小于1μm,优选小于0.5μm、例如小于0.45μm、0.40μm、0.35μm、0.30μm或0.25μm,更优选0.2μm或更小,例如0.15μm或更小、0.10μm或更小。用于如本文所教导的培养基的合适血清或血浆可以包括人血清或血浆,或来自非人动物,优选地非人哺乳动物,例如非人灵长类动物(例如,狐猴、猴子、猿)、胎儿或成年牛、马、猪、羔羊、山羊、狗、兔、小鼠或大鼠的血清或血浆等,或它们的任何组合。在某些优选的实施方式中,本文教导的培养基可包含牛血清或血浆,优选胎牛(小牛)血清或血浆,更优选胎牛(小牛)血清(FCS或FBS)。当培养人细胞时,培养基可优选包含人血清或血浆,例如自体或异源人血清或血浆,优选人血清,例如自体或同种异体人血清,更优选自体人血清或血浆,甚至更优选自体人血清。

[0370] 在某些优选的实施方式中,血清或血浆可以在培养基中被血清替代物代替,以提供无血清培养基(即,化学定义的培养基)。提供无血清培养基可能是有利的,特别是对受试者,尤其是对人类受试者施用所述培养基或其级分(例如,改善的生物安全性)。术语“血清替代物”广义上是指可用于替代细胞培养基中动物血清的功能(例如,细胞维持和生长支持功能)的任何组合物。常规的血清替代物通常可包含维生素、白蛋白、脂质、氨基酸、转铁蛋白、抗氧化剂、胰岛素和痕量元素。许多商业化的血清替代添加剂,例如敲除血清替代品(KnockOut Serum Replacement)(KOSR)、N2/B27、胰岛素-转铁蛋白-硒补充剂(ITS)和G5,是本领域技术人员众所周知的并且容易获得的。

[0371] 血浆或血清或血清替代物可以以约0.5%v/v和约40.0%v/v之间,优选约5%v/v和约20.0%v/v之间,例如在约5.0%v/v和约15.0%v/v之间,更优选在约8.0%v/v和约12.0%v/v之间,例如约10.0%v/v的比例(血浆或血清或血清替代物体积/培养基体积)包含在本文所教导的培养基中。

[0372] 合适的分离或培养的细胞可以是但不限于细菌细胞,真菌细胞,包括酵母细胞、植物细胞、动物细胞、哺乳动物细胞、人细胞或非人哺乳动物细胞。优选动物细胞,例如哺乳动物细胞、人类细胞或非人类哺乳动物细胞。细胞可以包括原代细胞、次级细胞(secondary cell)、三级细胞(tertiary cells)等,或者可以包括永生化细胞系,包括克隆细胞系。细菌

细胞的非限制性实例包括大肠杆菌、耶尔森氏肠炎菌(*Yersinia enterocolitica*)、布鲁氏杆菌(*Brucella* sp.)、伤寒沙门氏菌、粘质沙雷氏菌或枯草芽孢杆菌。真菌细胞的非限制性实例包括耶氏解脂酵母(*Yarrowia lipolytica*)、腺病毒阿克期菌(*Arxula adeninivorans*)、毕赤酵母、多形汉逊酵母、酿酒酵母或粟酒裂殖酵母。昆虫细胞的非限制性实例包括衍生自黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的细胞,例如Schneider 2细胞;衍生自蠕虫夜蛾(草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*))的细胞系,例如Sf9和Sf21细胞;或衍生自粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)的细胞,例如High Five细胞。人类细胞的非限制性实例包括人类HeLa(宫颈癌)细胞系。组织培养实践中常见的其他人类细胞系尤其包括人类胚胎肾293细胞(HEK细胞)、DU145(前列腺癌)、Lncap(前列腺癌)、MCF-7(乳腺癌)、MDA-MB-438(乳腺癌)、PC3(前列腺癌)、T47D(乳腺癌)、THP-1(急性骨髓性白血病)、U87(胶质母细胞瘤)、SHSY5Y(神经母细胞瘤)或Saos-2细胞(骨癌)。灵长类细胞的非限制性实例是Vero(非洲绿猴*Chlorocebus*肾上皮细胞系)细胞和COS细胞。啮齿动物细胞的非限制性实例是大鼠GH3(垂体瘤)、CHO(中国仓鼠卵巢)、PC12(嗜铬细胞瘤)细胞系、或小鼠MC3T3(胚胎颅盖细胞)细胞系。这样的细胞可以从各种商业来源和研究资源设施中获得,例如美国典型培养物保藏中心(Rockville,MD)。

[0373] 在某些实施方式中,细胞可以具有完整的细胞膜。在其他实施方式中,细胞膜可以被(瞬时或永久地)透化以允许没有穿过完整细胞膜转运或转运效率较低的成分扩散穿过细胞膜。用于细胞膜透化的合适的去污剂包括但不限于皂苷类(例如,洋地黄皂苷)、Triton™ X-100或聚山梨酯20。细胞可以是活的或能存活的,或可以是非存活的。

[0374] 将多肽和/或核酸引入活细胞的方法是本领域技术人员已知的,并且可以包括磷酸钙共沉淀、电穿孔、显微注射、原生质体融合、脂质转染、外来体介导的转染、采用多胺转染试剂的转染、核酸包覆钨微弹丸(nucleic acid-coated tungsten micro projectile)轰击细胞、病毒颗粒递送等。这种引入也可称为递送、转染或转化。细胞穿透肽(CPP)也可以用于将多肽或核酸递送到细胞中。CPP易位可分为三种主要进入机制:直接穿透膜、内吞作用介导的进入、和通过形成暂时结构而易位。CPP通常具有这样的氨基酸组成,该氨基酸组成包含相对较高丰度的带正电荷的氨基酸(如赖氨酸或精氨酸),或者具有包含极性/带电氨基酸和非极性疏水性氨基酸交替模式的序列。这两种类型的结构分别称为聚阳离子或两亲的。第三类CPP是疏水性肽,仅包含非极性残基,具有低净电荷或具有对细胞摄取至关重要的疏水性氨基酸基团。最初发现的CPP之一是来自人类免疫缺陷病毒1(HIV-1)的反式激活转录激活因子(Tat),发现其被多种培养细胞类型有效地从周围培养基中吸收。从那时起,已知CPP的数量已大大增加,并已生成具有更有效蛋白质转导特性的小分子合成类似物。CPP包括但不限于透皮素(Penetratin)、Tat(48-60)、Transportan和(R-Ahx-R4)(Ahx=氨基己酰基)。US 8,372,951提供了衍生自嗜酸性细胞阳离子蛋白(ECP)的CPP,其表现出高的细胞穿透效率和低毒性。还提供了将CPP及其载货递送到脊椎动物对象中的方面。CPP及其递送的进一步的方面在美国专利8,575,305;US 8,614,194和US 8,044,019中描述。如本领域中已知的,CPP可以与载货缀合或复合,例如,通过硫醚键或通过形成颗粒。

[0375] 如本领域通常已知的,可提供可表达的核酸分子,如例如编码目标多肽或RNA的表达盒或表达载体。可表达的核酸分子通常可以包括编码目标多肽的核酸分子和/或编码目标RNA分子的核酸分子以及与所述核酸分子可操作地连接的启动子。可以选择启动子或将

其配置为实现在目标细胞中表达目标多肽和/或RNA,所述目标细胞例如细菌细胞、真菌细胞、酵母细胞、植物细胞、动物细胞、哺乳动物细胞、人细胞或非人类哺乳动物细胞。

[0376] 通过将测试试剂添加到其中正在培养细胞的培养基中,可以使细胞与测试试剂接触。可以在本领域技术人员已知的并且如本文其他地方所述的条件下,将编码测试试剂的核酸提供给包含有载体的细胞。可选地,可以通过病毒载体将编码测试试剂的核酸提供给细胞,即,使细胞与包含编码测试试剂的核酸的病毒颗粒接触。通常病毒载体已经被修饰以缺乏产生生产性感染所需的病毒蛋白的能力。在特定的实施方式中,例如如在本文其他地方所述的测定法中测量的,如果与由中性物质或阴性对照诱导的GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt/ β -联蛋白信号传递基线或背景相比,如本文所公开的测试试剂增强由GPR124/RECK/Frizzled/LRP受体复合物介导的Wnt/ β -联蛋白信号传递多至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍、至少250倍、至少500倍、至少750倍、至少1000倍、至少 1×10^4 倍、或至少 1×10^5 倍,则所述测试试剂可以被鉴定为可用作治疗剂的试剂。

[0377] 在特定实施方式中,如果测试试剂诱导的GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递活性高于在不存在RECK和/或GPR124的情况下所述试剂诱导的Frizzled/LRP介导的Wnt信号转导活性的至少3.5倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍、至少 1×10^4 倍或至少 1×10^5 倍,则所述测试试剂可以被鉴定为可用作如本文公开的治疗剂的试剂。

[0378] 通过上述任何筛选方法最初被鉴定为可用作如本文公开的治疗剂的测试试剂,可通过适用于模拟人类中的神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的中枢神经系统疾病(CNS)的任何动物模型进一步测试,以验证体外、体内或离体的表现活性。

[0379] 本申请还提供了以下陈述中阐述的方面和实施方式:

[0380] 陈述1.能够激活G蛋白偶联受体(GPR)124/RECK/Frizzled/脂蛋白受体相关蛋白(LRP)介导的Wnt信号转导的试剂,其中所述试剂在不存在RECK和/或GPR124的情况下不激活Frizzled/LRP介导的Wnt信号转导。

[0381] 陈述2.根据陈述1所述的试剂,其中所述试剂在存在RECK和GPR124的情况下能够在细胞膜处诱导Frizzled和LRP多肽的异聚体化,但在不存在RECK和/或GPR124的情况下不能。

[0382] 陈述3.根据陈述2的试剂,其中所述试剂在存在RECK和GPR124的情况下能够同时在细胞膜处结合Frizzled和LRP多肽,但在不存在RECK和/或GPR124的情况下不能。

[0383] 陈述4.根据陈述1至3中任一项的试剂,其中所述试剂能够结合GPR124和/或RECK多肽。

[0384] 陈述5.根据陈述1-4中任一项的试剂,其中所述试剂能够结合RECK多肽。

[0385] 陈述6.根据陈述5的试剂,其中所述试剂能够结合RECK多肽的半胱氨酸结4(CK4)区、CK5区、或CK4区和CK5区。

[0386] 陈述7.根据陈述1至6中任一项的试剂,其中所述试剂能够结合Frizzled多肽的富含半胱氨酸的结构域(CRD)。

[0387] 陈述8.根据陈述1至7中任一项的试剂,其中所述试剂能够结合LRP多肽的DKK结合位点和/或Wnt结合位点。

[0388] 陈述9.根据陈述1至8中任一项的试剂,其中所述试剂包含或选自化学物质、抗体、抗体片段、抗体样蛋白支架、蛋白质或多肽、肽、拟肽、适体、光适体、镜像异构体和核酸,优选其中所述试剂包含或是蛋白质或多肽。

[0389] 陈述10.根据陈述1至9中任一项的试剂,其中所述试剂包含RECK结合结构域、Frizzled结合结构域和LRP结合结构域,其中所述RECK结合结构域、所述Frizzled结合结构域,和所述LRP结合结构域衍生自Wnt7多肽,例如衍生自Wnt7a或Wnt7b多肽。

[0390] 陈述11.根据陈述10的试剂,其中所述RECK结合结构域包括:

[0391] -与氨基酸序列HVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYC(SEQ ID NO:17)具有至少25%序列同一性的氨基酸序列;或

[0392] -与氨基酸序列VEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDT(SEQ ID NO:18)具有至少25%序列同一性的氨基酸序列;或

[0393] -与氨基酸序列VEVVRASRLRQPTFLRIKQLRSYQKPMET(SEQ ID NO:19)具有至少25%序列同一性的氨基酸序列;或

[0394] -氨基酸序列XXXVXAXRXXXXXFLXIXXXXXYXKXXXX(SEQ ID NO:20)、VXAXRXXXXXFLXIXXXXXYXK(SEQ ID NO:21)、XXXVXAXRXXXXXFLXXXXXXXXKXXXX(SEQ ID NO:22)或VXAXRXXXXXFLXXXXXXXXK(SEQ ID NO:23),其中X是任何氨基酸,优选地其中所述氨基酸序列显示与SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19中的任一个至少50%的序列同一性。

[0395] 陈述12.根据陈述1至11中任一项的试剂,其中所述试剂是Wnt7多肽的片段,例如Wnt7a或Wnt7b多肽的片段,或基本上由其组成。

[0396] 陈述13.根据陈述12的试剂,其中所述片段是Wnt7多肽的N端结构域(NTD)或基本上由其组成。

[0397] 陈述14.根据陈述1至13中任一项的试剂,其中所述试剂是Wnt7多肽的变体,例如Wnt7a或Wnt7b多肽的变体。

[0398] 陈述15.根据陈述14的试剂,其中

[0399] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置17的位置处的谷氨酰胺(Q)残基被除谷氨酰胺(Q)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0400] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置20的位置处的异亮氨酸(I)残基被除异亮氨酸(I)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0401] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置25的位置处的脯氨酸(P)残基被除脯氨酸(P)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0402] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置27的位置处的丙氨酸(A)残基被除丙氨酸(A)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被精氨酸(R)残基取代;

[0403] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置28的位置处的异亮氨酸(I)残基被除异亮氨酸(I)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0404] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置33的位置处的谷氨酸(E)残基被除谷氨酸(E)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0405] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置37的位置处的甲硫氨酸(M)残基被除甲硫氨酸(M)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0406] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置39的位置处的亮氨酸(L)残基被

除亮氨酸(L)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0407] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置41的位置处的谷氨酸(E)残基被除谷氨酸(E)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0408] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置44的位置处的苯丙氨酸(F)残基被除苯丙氨酸(F)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0409] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置50的位置处的精氨酸(R)残基被除精氨酸(R)以外的一个或多个的氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0410] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置52的位置处的天冬酰胺(N)残基被除天冬酰胺(N)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被谷氨酰胺(Q)残基取代;

[0411] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置68的位置处的缬氨酸(V)残基被除缬氨酸(V)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0412] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置129的位置处的异亮氨酸(I)残基被除异亮氨酸(I)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0413] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置131的位置处的苯丙氨酸(F)残基被除苯丙氨酸(F)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0414] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置133的位置处的赖氨酸(K)残基被除赖氨酸(K)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0415] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置135的位置处的苯丙氨酸(F)残基被除苯丙氨酸(F)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0416] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置141的位置处的异亮氨酸(I)残基被除异亮氨酸(I)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0417] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置146的位置处的精氨酸(R)残基被除精氨酸(R)以外的一个或多个的氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0418] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置158的位置处的精氨酸(R)残基被除精氨酸(R)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0419] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置159的位置处的赖氨酸(K)残基被除赖氨酸(K)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)、丝氨酸(S)或亮氨酸(L)残基取代;

[0420] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置181的位置处的赖氨酸(K)残基被除赖氨酸(K)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0421] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置191的位置处的精氨酸(R)残基被除精氨酸(R)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0422] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置198的位置处赖氨酸(K)残基被除赖氨酸(K)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0423] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置200的位置处的赖氨酸(K)残基被除赖氨酸(K)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0424] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置205的位置处的缬氨酸(V)残基被除缬氨酸(V)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0425] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置208的位置处的谷氨酸(E)残基被

除谷氨酸(E)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0426] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置214的位置处的精氨酸(R)残基被除精氨酸(R)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0427] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置216的位置处的赖氨酸(K)残基被除赖氨酸(K)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0428] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置218的位置处的脯氨酸(P)残基被除脯氨酸(P)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0429] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置222的位置处的赖氨酸(K)残基被除赖氨酸(K)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0430] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置223的位置处的异亮氨酸(I)残基被除异亮氨酸(I)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0431] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置229的位置处的酪氨酸(Y)残基被除酪氨酸(Y)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0432] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置232的位置处的脯氨酸(P)残基被除脯氨酸(P)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0433] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置235的位置处的苏氨酸(T)残基被除苏氨酸(T)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0434] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置248的位置处的谷氨酸(E)残基被除谷氨酸(E)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0435] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置289的位置处的精氨酸(R)残基被除精氨酸(R)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0436] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置291的位置处的色氨酸(W)残基被除色氨酸(W)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;

[0437] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置307的位置处的苏氨酸(T)残基被除苏氨酸(T)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代;和/或

[0438] -在对应于SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:51中位置318的位置处的赖氨酸(K)残基被除赖氨酸(K)以外的一个或多个氨基酸残基取代,优选被丙氨酸(A)残基取代。

[0439] 陈述16. 编码根据陈述1至15中任一项所述的试剂的核酸,其中所述试剂是蛋白质、多肽或肽。

[0440] 陈述17. 核酸表达盒,其包含根据陈述16的核酸,可操作地连接至启动子和/或转录和翻译调控信号。

[0441] 陈述18. 载体,其包含根据陈述16的核酸或根据陈述17的核酸表达盒,例如病毒载体。

[0442] 陈述19. 宿主细胞,其包含根据陈述16的核酸、根据陈述17的核酸表达盒或根据陈述18的载体。

[0443] 陈述20. 药物组合物,其包含根据陈述1至15中任一项的试剂、根据陈述16的核酸、根据陈述17的核酸表达盒、根据陈述18的载体、或根据陈述19的宿主细胞和药学上可接受的载体。

[0444] 陈述21. 根据陈述1至15中任一项的试剂、根据陈述16的核酸、根据陈述17的核酸

表达盒、根据陈述18的载体、根据陈述19的宿主细胞、或根据陈述20的药物组合物,用作药物。

[0445] 陈述22.根据陈述1至15中任一项的试剂、根据陈述16的核酸、根据陈述17的核酸表达盒、根据陈述18的载体、根据陈述19的宿主细胞、或根据陈述20的药物组合物,用于预防或治疗神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的中枢神经系统(CNS)疾病。

[0446] 陈述23.根据陈述22的用途的试剂,其中,所述神经血管疾病选自缺血性中风、出血性中风、缺血/再灌注损伤、脑动脉瘤、动静脉畸形(AVM)、海绵状畸形、脉管炎、脑出血、蛛网膜下腔出血、脊柱血管畸形、颈动脉狭窄、烟雾病和颅内动脉粥样硬化及其组合,或所述CNS疾病选自多发性硬化、缺血性中风、脑癌、癫痫、痴呆、血管性痴呆、HIV-1相关的痴呆、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化症、感染性脑病、脑外伤、偏头痛和慢性外伤性脑病及其组合。

[0447] 陈述24.用于鉴定用作治疗剂的试剂的体外方法,例如可用于预防或治疗神经血管疾病或包括神经血管功能障碍的CNS疾病,所述方法包括确定测试试剂是否激活GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递,而不激活在没有RECK和/或GPR124的情况下的Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递。

[0448] 陈述25.根据陈述24的体外方法,包括:

[0449] -使测试试剂与能够发生GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递的细胞接触并测量所述Wnt信号传递,和

[0450] -使测试试剂与能够发生Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递但不能发生GPR124/RECK/Frizzled/LRP介导的Wnt信号传递的细胞接触,并测量所述Wnt信号传递。陈述26.根据陈述24或25的体外方法,其中该方法进一步包括确定测试试剂是否能够结合RECK多肽。

[0451] 虽然已经结合本发明的特定实施方式描述了本发明,但是显然,根据前述描述,许多替代,修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。因此,在所附权利要求书的精神和广泛范围内,旨在包含如下所有这些替代、修改和变化。

[0452] 以下非限制性实施例进一步支持本文公开的方面和本发明的实施方式。

[0453] 实施例

[0454] 实施例1.Wnt配体特异性信号传递的分子机制

[0455] 1.材料和方法

[0456] 1.1.斑马鱼品系

[0457] 斑马鱼(Danio rerio)以14h光照/10h黑暗周期维持在28℃。根据欧洲和国家道德与动物福利准则(协议批准书编号:CEBEA-IBMM-2017-22:65),在标准条件下获得并饲养胚胎。根据Kimmel等人(C.B.Kimmel,W.W.Ballard,S.R.Kimmel,B.Ullmann,T.F.Schilling,Dev.Dyn.203,253-310(1995))进行分期。在这项研究中使用了表征的转基因和突变体品系Tg(kdrl:GFP)s843,Tg(kdrl:ras-mCherry)s896和gpr124s984(Danio rerio)品系(B.Vanhollebeke等人,Elife.4,1-25)(2015);S.-W.Jin,D.Beis,T.Mitchell,J.-N.Chen,D.Y.R. Stainier,Development.132,5199-209(2005);NC Chi等人,Genes Dev.22,734-739(2008))。

[0458] 1.2.吗啉寡核苷酸(Morpholinos)、RNA构建体和显微注射

[0459] 针对gpr124的剪接阻断吗啉寡核苷酸(Splice-blocking morpholino)(5' -

ACTGATATTGATTAACTCACCACA-3') (B.Vanhollebeke等人, Elife.4,1-25(2015)) 得自Gene Tools (Eugene,OR),并在单细胞期注射2ng。使用mMessage mMachine SP6试剂盒(Ambion, Carlsbad,CA)在NotI消化后,从pCS2质粒转录合成的mRNA,并将其注入单细胞期的斑马鱼胚胎中。

[0460] 1.4.表达质粒构建体

[0461] 使用融合(In-Fusion)克隆(Takara,Mountain View,CA)从重组后的pCS2载体的CMV启动子表达所有Wnt信号组分和其他构建体,除了Fz1(addgene#42253)和Fz5(addgene#42267)。使用融合(In-Fusion)克隆和串联重叠的PCR产物生成单点突变变体、缺失和嵌合体。通过Sanger测序确认所有构建体。Reck变体的缺失对应于以下氨基酸:Reck Δ CK1:46-93;Reck Δ CK2:113-150;Reck Δ CK3:160-206;Reck Δ CK4:225-272;Reck Δ CK5:301-347;Reck Δ CK1-5:46-347;Reck Δ CRD:352-484和Reck Δ KAZAL:636-798。将HA标签插入Reck中的残基22、Gpr124中的残基49和Fz5中的残基22之后。将FLAG标签插入Gpr124中的残基49之后。

[0462] 1.5.细胞培养和HEK293(T)突变体细胞系

[0463] HEK293T细胞获自ATCC(CRL-3216),HEK293 STF细胞系由Jeremy Nathans(John Hopkins)友情提供。将WT和突变细胞在补充有10%胎牛血清的DMEM/F12培养基(Lonza, Basel,Switzerland)中培养,并保持在用5%CO₂平衡的潮湿培养箱中。使用CRISPR/Cas9方法在HEK293 STF细胞中使GPR124和RECK遗传无效,并在HEK293T细胞中使LRP5、LRP6和FZ同样无效。使用<http://crispr.mit.edu/>网站设计了CRISPR/Cas9导向序列,并将其克隆到pSpCas9(BB)-2AGFP(F.A.Ran等人,Nat.Protoc.8,2281-308(2013))。转染后48小时,通过FACS(AriaIII,BD Biosciences, San Jose,CA)分离最上面的GFP+细胞的1%,并分配到96孔板中进行克隆扩增。为了促进突变细胞系的遗传学表征,在高分辨率熔解分析中对产生多峰导数熔解曲线的克隆进行了反向选择(counter-selected)。对于每个靶位点,通过对集中在原间隔区相邻基序(protospacer adjacent motif)(PAM)位点上的~1000bp PCR产物以及在pCRTM-BluntII-TOPO®(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)中的PCR产物的至少8个亚克隆进行Sanger测序来鉴定突变。突变细胞系是通过CRISPR/Cas9介导的迭代诱变获得的。

[0464] 1.6.STF双荧光素酶测定法

[0465] 将细胞铺板到96孔板中,并在24小时后用Lipofectamine 2000(Life Technologies,Carlsbad,CA)一式三份转染。针对每个表达载体优化了每孔中转染的质粒DNA的量:除非另有说明,海肾(Renilla)荧光素酶(0.5ng)(由Jeremy Nathans(John Hopkins)友情提供)、Wnt配体(20ng),Fz受体(5ng),Lrp(2.5ng),Gpr124(10ng)、Reck(5ng)和Dkk-1(10ng)。用空的pCS2载体将DNA总量调整为每孔100ng。使用STF细胞系或通过共转染20ng的M50 Super 8×TOPFlash质粒(Addgene质粒#12456)进行双荧光素酶测定。转染后48小时,在被动裂解缓冲液(passive lysis buffer)(E1960,Promega,WI)中收获细胞,并使用Dual-Luciferase Reporter Assay系统(E1960,Promega,Madison,WI)顺序地测量萤火虫和海肾荧光素酶的活性。图1C的竞争性测定是通过在转染后24小时以90%融合度将细胞以1:1:1混合物的形式铺板在96孔板上进行的。共培养后24小时测量荧光素酶活性。

[0466] 1.7.免疫荧光和邻近连接测定法

[0467] 细胞在玻璃涂层室 (IBIDI, Martinsried, Germany) 中生长, 并在24小时后用 Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA) 转染。转染后48小时, 将细胞在室温 (RT) 下用4%多聚甲醛固定10分钟。对于免疫荧光染色 (IF), 将细胞在1%BSA-PBS中封闭30分钟, 然后在室温下暴露于第一抗体1h。PBS洗涤3次后, 将细胞与第二抗体在室温下孵育1小时。为了对Wnt配体进行抗V5染色, 在与第二抗体溶液孵育之前, 将细胞在PBS 0.1% Tween 20中另外洗涤10分钟。对于邻近连接测定 (PLA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 使用制造商提供的封闭溶液在37℃将细胞封闭30分钟, 然后在室温下与第一抗体孵育1小时。将细胞洗涤3次, 并将抗兔PLUS和抗小鼠MINUS与PLA探针在37℃孵育1小时。两次PBS洗涤后, 将细胞与Duolink Ligation溶液在37℃孵育30分钟。两次PBS洗涤后, 将细胞与Duolink Amplification溶液在37℃孵育100分钟。使用了以下抗体: 针对IF和PLA的1:500的小鼠单克隆抗V5 (R96025, Life Technologies, Carlsbad, CA), 针对IF和PLA的1:400的纯化多克隆兔抗HA (H6908, St. Louis, MO) 和1:5000的抗小鼠Alexa488缀合的第二抗体 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)。用在PBS中稀释至 $10\mu\text{gml}^{-1}$ 的Hoechst将细胞染色2分钟。

[0468] 1.8. 蛋白质印迹、斑点印迹和共免疫沉淀

[0469] 使用了以下抗体: 兔抗DVL2 (1:1000, 3216, Cell Signaling Technology, Leiden, Netherlands), 兔抗DVL2-磷酸T224 (1:1000, ab124941, Abcam, Cambridge, UK) 和抗小鼠 β -肌动蛋白 (1:50,000, A5441, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 鸡抗GFP (1:5000, GFP-1010, Aves, Tigard, OR) 和小鼠单克隆抗FLAG M2 (1:1000, F1804, Sigma-Aldrich, Louis, MO)。使用BioDot SF仪器 (Bio-Rad, Munich, Germany) 根据标准程序进行斑点印迹分析。将上清液的系列稀释液点样到硝酸纤维素膜上 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)。干燥后, 将膜与上述抗体温育用于蛋白质印迹。对于共免疫沉淀, 将来自6孔板的转染的HEK293T细胞洗涤两次, 并用PBS从板上分离。离心沉淀细胞, 并在含有蛋白质抑制剂 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) 的裂解缓冲液 (150mM NaCl, 25mM Tris (pH 7.5), 1%NP40) 中于4℃裂解30分钟。离心后, 将上清液与抗FLAG M2亲和力凝胶 (A2220, Sigma, St. Louis, MO) 于4℃孵育3小时。珠子用裂解缓冲液洗涤五次, 并在等量的2×Laemmli样品缓冲液中煮沸。

[0470] 1.9. 显微术和图像处理

[0471] 用LSM710共聚焦显微镜对细胞和斑马鱼的胚胎成像, 并在ImageJ中处理图像。在Leica M165 FC上拍摄眼睛融合表型的图像。使用Imaris软件 (BitPlane, Zurich, Switzerland) 生成脑血管的表示。使用ImageJ在包含约50至100个细胞的图像上计算PLA阳性 (PLA+) 面积和DAPI阳性 (DAPI+) 面积的百分比。手动施加固定阈值后, 测量PLA+面积。在ImageJ中应用“默认”阈值方法后, 测量DAPI+面积。

[0472] 1.10. 结构建模

[0473] 爪蟾Wnt8a (PDB ID: 4F0A) 的结构 (C.Y. Janda, D. Waghay, A.M. Levin, C. Thomas, K.C. Garcia, Science. 337 59-64 (2012)) 被用作Wnt7a的起始模型。使用程序Modeller (B. Webb, A. Sali, Current Protocols in Bioinformatics (John Wiley&Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2016), 第54卷, 第5.6.1-5.6.37页), 对丢失的残基和取代进行建模。建模策略包括考虑Wnt8中观察到的现有二硫桥。最初的最佳模型在真空下进行共轭梯度能量最小化, 同时约束C α , 然后在第二个最小化步骤中将其释放。然后将这些模型嵌入水箱中, 并通过添加150mM的Na⁺反荷离子实现电中性。整个系统又以3000步进行能量最小化。使用

NAMD 2.7程序以恒定温度(310K)和恒定压力(1atm),使用周期性边界,并使用CHARMM36作为力场,进行0.5ns的分子动力学模拟(JC Phillips等人,J.Comput.Chem.26,1781-1802(2005)。使用2fs的时间步长来积分运动方程,在12Å处剪切短程相互作用,并使用光滑粒子网格Ewald方法(smooth-particle mesh Ewald method)计算静电相互作用。使用SHAKE算法约束氢原子。得到的模型是稳定模拟的平均表示。

[0474] 1.11.重组蛋白质和合成肽

[0475] 在用Lipofectamine 2000(Life Technologies,Carlsbad,CA)转染后72小时,从HEK293T细胞培养物上清液中,在无血清的FreeStyle 293表达培养基(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)中回收Reck-CK-Fc融合蛋白。收集后,将上清液通过离心(GE Healthcare, Little Chalfont,英国)浓缩50倍,或进行蛋白G亲和纯化(蛋白G Sepharose 4Fast Flow,Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)。PAGE后使用考马斯蓝染色评估蛋白质纯度。合成的Wnt接头肽从Chinapeptide Co.,Ltd获得,纯度超过90%。

[0476] 1.12.等温滴定量热法

[0477] 在Affinity ITC(TA Instruments)上进行ITC滴定。在测量之前,将Reck-CK-Fc和所有的Reck-CK-Fc融合物透析到Tris-NaCl缓冲液(50mM Tris pH8,300mM NaCl)中。在每种情况下,Wnt衍生肽都用蛋白质透析最后一步的缓冲液制备。将样品过滤并脱气,然后在量热计中进行检查,并在25℃进行滴定。所有实验都包括以75rpm的搅拌速率将恒定体积的2μL滴定剂注入到池中(200μL)。池中的标称样品浓度为20μM至40μM之间,注射器中标称样品浓度为400μM至1.0mM。透析或更换缓冲液后,通过测量它们在280nm处的吸收或BCA方法确定实际样品浓度。使用MicroCal Origin ITC 7.0和NanoAnalyze软件包对所有数据进行分析。

[0478] 1.13.原子力显微术

[0479] 将涂有薄金层的玻璃盖玻片在紫外线辐射和臭氧(UV-O)清洁剂(Jetlight)中清洁15分钟,然后将其浸入含有体积比为1:99的1mM 16-巯基十二碳己酸(16-mercaptododecahexanoic acid)和1-巯基-1-十一烷醇(1-mercapto-1-undecanol)的乙醇溶液中过夜。然后将基底用乙醇漂洗,用N₂干燥,并添加到包含等体积的20mg ml⁻¹N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和50mg ml⁻¹1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)的溶液中30分钟。将获得的NHS活化的表面用超纯水漂洗,并与100μl的10μg ml⁻¹蛋白G溶液在室温下孵育1小时。然后将样品用洗涤缓冲液洗涤(3×5分钟),并在100μl封闭缓冲液中于室温下进一步孵育1小时。最后,将50μl的0.2μg ml⁻¹Reck-CK-Fc溶液添加至基底中1小时,用洗涤缓冲液漂洗,然后用于AFM实验。使用Nanoscope VIII Multimode AFM(Bruker)在室温在PBS缓冲液中进行单分子力谱(SMFS)测量。使用具有氮化硅尖端的三角形AFM悬臂(MSCT,Bruker)和在0.01-0.06N m⁻¹之间的标称弹簧常数。悬臂在每个实验结束时使用如Butt等人,Calculation of thermal noise in atomic force microscopy.Nanotechnology 6,1-7(1995)所述的热噪声方法进行校准。遵循Wildling等人,Probing binding pocket of serotonin transporter by single molecular force spectroscopy on living cells.J.Biol.Chem.287,105-113(2012)中所述的方案,使用NHS-PEG27-马来酰亚胺接头将功能化的尖端衍生化,以共价附接Pep7b,连接在C端处添加的半胱氨酸残基。功能化后,悬臂用PBS洗涤(3×5分钟),并在4℃下储存在每孔含2ml PBS的多壁培养皿的各个孔中,直

到用于AFM实验。使用250pN的施加力,0.25s的接触时间以及 $1\mu\text{m s}^{-1}$ 的恒定进退速度,力-距离曲线记录为 $1\times 1\mu\text{m}^2$ 区域上的 32×32 像素阵列。对于动态力谱测量,悬臂的回缩速度变化如下: 20nm s^{-1} 、 100nm s^{-1} 、 200nm s^{-1} 、 $1\mu\text{m s}^{-1}$ 、 $2\mu\text{m s}^{-1}$ 、 $10\mu\text{m s}^{-1}$ 和 $20\mu\text{m s}^{-1}$ 。通常,以特定的回缩速度对每个悬臂执行至少2000条力-距离曲线。使用Nanoscope Analysis软件(Bruker)分析收集的数据。分析每条曲线的回缩区段,如果未结合事件发生在距接触点5-50nm的距离处,则认为未结合事件是特异的。最小粘附力还用于计算结合概率和建立力分布直方图。为了重建所测量的相互作用的能量图景(energy landscape),根据力与时间的曲线计算了加载速率,为尖端悬臂跳到表面之前的粘附事件的斜率。然后在动态力谱图中绘制了力与加载速率的依赖性。

[0480] 1.14. 统计学分析

[0481] 使用GraphPad软件进行统计分析。数据代表平均值 $\pm$ SD。P值通过单因素ANOVA(事后Dunnett检验)和学生t检验针对正态分布数据的多次和一次比较(STF和PLA分析),和通过Kruskal-Wallis(事后Dunn检验)针对非正态分布数据多次比较(CtA量化)进行计算;* $p<0.05$;** $p<0.01$ *** $p<0.001$ 。

[0482] 2. 结果

[0483] 2.1. Reck是不依赖于Frizzled的Wnt7特异性受体

[0484] Wnt/Fz结合关系是混杂的,其中多个Wnt竞争与各Fz的结合,而几个Fz能够响应单个Wnt。最近的晶体学研究证实,Wnt/Fz相互作用化学与明确的Wnt和Fz配对不相容,其中Wnt/Fz接触以保守残基或相同的化学修饰为主(C.Y. Janda, D. Waghray, A.M. Levin, C. Thomas, K.C. Garcia, Science. 337, 59-64 (2012))。这些发现提出了细胞如何解释有时具有相反生物学功能的多个Wnt配体的空间和时间重叠表达模式的问题。

[0485] 一个相关的例子是Wnt7a和Wnt7b对哺乳动物前脑和腹侧脊髓血管发育的排他性控制(J.M. Stenman等人, Science. 322, 1247-1250 (2008); R. Daneman等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 641-646 (2009); S. Liebner等人, J. Cell Biol. 183, 409-417 (2008))。具体地,为了响应神经祖细胞衍生的Wnt7并激活Wnt/ β -联蛋白信号传递,脑内皮细胞(EC)必须表达Gpr124(其是G蛋白偶联受体的粘附类型的孤儿成员)(M. Cullen等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 5759-5764 (2011); F. Kuhnert等人, Science. 330, 985-989 (2010); K.D. Anderson等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 2807-2812 (2011); Y. Zhou, J. Nathans, Dev. Cell. 31, 248-256 (2014); E. Posokhova等人, Cell Rep. 10, 123-130 (2015); B. Vanhollebeke等人, Elife. 4, 1-25 (2015))以及GPI-锚定的糖蛋白Reck(B. Vanhollebeke等人, 2015; F. Ulrich等人, Development. 143, 147-159 (2015))。Gpr124和Reck物理相互作用并协同刺激Wnt7特异性反应(B. Vanhollebeke等人, 2015; C. Cho, P.M. Smallwood, J. Nathans, Neuron. 95, 1056-1073 (2017))但尚不清楚该信号传递模块如何将Wnt7与其他局部表达的Wnt配体区分开。

[0486] 已经确定了如何在该信号传递模块中特异性识别Wnt7,该问题由于在脊椎动物细胞中普遍表达的Frizzled受体及它们的Lrp5/6共同受体而固有地复杂。因此,通过靶向(i)所有十个FZ基因($FZ_{1-10}^{-/-}$), (ii) LRP5和LRP6 ($LRP5^{-/-}$; $LRP6^{-/-}$)或(iii) GPR124和RECK ($GPR124^{-/-}$; $RECK^{-/-}$),通过HEK293细胞中的多重CRISPR/Cas9诱变生成在定义结点处在遗传上耗尽受体复合物组分的第一组细胞系。为了鉴定Wnt7结合的决定因素,在这些细胞系中

瞬时表达V5标记的Wnt配体。可以在WT、FZ₁₋₁₀^{-/-}和LRP5^{-/-}；LRP6^{-/-}细胞的质膜处免疫检测到Wnt7a-V5而非Wnt3a-V5，而在GPR124^{-/-}；RECK^{-/-}细胞的质膜处不能检测到Wnt7a-V5(图1A)。单独或与Gpr124组合地，异位恢复Reck表达足以在这些细胞中特异性恢复Wnt7a-V5膜标记，而单独的Gpr124表达则不能(图1B)。如预期的，Fz5有能力结合Wnt7a-V5，反映了该Frizzled受体介导基线Wnt7信号传递的能力。

[0487] 使用细胞竞争实验发现，在不存在Fz的情况下，Reck募集Wnt7a，因为异位表达Reck但不表达Gpr124^{ΔICD}的FZ₁₋₁₀^{-/-}细胞的共培养可以显著减少邻近GPR124^{-/-}；RECK^{-/-} Super Top Flash(STF)报告细胞中的Wnt7a-Fz5信号传递(图1C)。值得注意的是，在该配体捕获测定中，Gpr124缺少其C端ICD域，以将分析限制在Gpr124/Reck复合物的表面暴露部分。接下来，使用PLA映射(map) Wnt7a结合所需的Reck结构域。Reck由五个N端半胱氨酸结(CK)基序、一个富含半胱氨酸的结构域(CRD)和三个Kazal基序组成，其在GPI锚定点之前散布有EGF样基序。对于Reck的每个结构域，生成HA表位标记的缺失变体的集合，并对PLA信号进行定量。这项分析表明，结合需要N端半胱氨酸结结构域，尤其是CK4和CK5(图1D)。与这些结果一致，Reck^{ΔCK4}表达在竞争测定中也没有活性(图1C)。

[0488] 尽管Reck似乎是主要的Wnt7结合决定因素，但已知其在Wnt信号传递中的功能依赖于其通过其N端CK结构域与Gpr124形成复合物的能力(Y.Zhou, J.Nathans, Dev.Cell.31, 248-256(2014); B.Vanhollebeke等人, Elife.4, 1-25(2015))，此处显示的一个结构域还与Wnt7a结合有关。与HA-Reck和HA-Fz5相反，HA-Gpr124在与Wnt7a-V5一起表达时不生成PLA信号(图1E)。然而，在未标记的Gpr124共表达时，检测到Wnt7a-V5/HA-Reck PLAs信号4倍增加(图1F)。Gpr124的这种结合刺激依赖于Reck CK1和CK2，这与N端CK1基序在Gpr124/Reck复合体形成中的作用相一致(C.Cho, PM Smallwood, J.Nathans, Neuron.95, 1056-1073(2017))。

[0489] 总之，在默认假定PLA充当可扩散细胞外配体与其膜受体之间直接相互作用的有有效代替物(proxy)的情况下，这些结果表明，Reck构成了第一个报道的不依赖Fz的Wnt配体特异性受体，其与Wnt7的结合被CK结构域内的Gpr124的近端结合所增强(图1G)。

[0490] 2.2.Wnt7识别涉及Wnt配体的高度趋异且内在无序的接头区

[0491] 众所周知，Wnt配体对于高水平的重组生产是难控制的(refractory)，从而阻止了全长重组Wnt7和Reck之间无细胞的生化或生物物理相互作用研究。

[0492] Wnt配体采用两个结构域的结构，这让人想起通过配体N端结构域(NTD)的棕榈酰化“拇指”和“食指”C-端结构域(CTD)的疏水残基捏住球形Fz富半胱氨酸结构域(CRD)的人手。Fz结合涉及的结构主要位于“拇指”端和“食指”端。这两个结构域通过NTD的柔性域间接头区域连接。

[0493] 生成了缺失特定结构域或残基或经工程改造以携带来自其他Wnt配体的选定结构域的Wnt7变体的集合(图2A)。这些嵌合配体各自应用于PLA，揭示了Reck结合排他地在Wnt7a NTD中发生。令人惊讶的是，单独的Wnt7a^{NTD}与全长的Wnt7a一样有效地与Reck结合，而Wnt7a^{CTD}则没有(图2B)。与Fz结合有关的棕榈油酸不参与Reck相互作用，因为突变体Wnt7a^{S206A}不能在结合Reck的丝氨酸206处被有效地棕榈酰化。Reck对Wnt7a的NTD识别模式通过嵌合Wnt7a配体确认，其中CTD与爪蟾Wnt8a(XWnt8a)和鼠Wnt4和Wnt16的等效结构域交换。这些结合测定揭示了Reck通过识别Wnt7a NTD中嵌入的基序在不同于Fz参与的位点处

区分Wnt配体。

[0494] 缺少接头区的较小NTD变体Wnt7a¹⁻²¹²和Wnt7¹⁻²³⁷不结合Reck。这种突变分析与远离Fz结合位点的Wnt7a接头区的空间隔离(segregation)相结合,表明Reck至少部分地通过该接头基序对Wnt7a进行解码。接头区是整个Wnt配体家族中最可变的基序,显示在整个脊椎动物进化支中,在Wnt7直向同源物之间强大的进化保守性(图2D)。为了精确描绘相互作用位点,本发明人分析了Wnt7a的101个单残基变体的集合的Gpr124/Reck依赖性STF信号传递(图2C)。突变的残基对应于在Wnt7a和Wnt7b之间严格或化学保守的表面暴露NTD残基,但在XWnt8a或任何其他Wnt配体中未发现。如图2C所示,虽然约80%的受检查变体与WT Wnt7a一样有活性,但只有8个Wnt7a变体(带下划线)将Gpr124/Reck依赖性信号传递降低至小于10%。除一个(I37)关键残基外,所有关键残基均聚集在预测的Wnt7a结构的顶部或背面,其中六个进一步定位在接头结构域。从人到鱼,所有关键残基在Wnt7直向同源物中都严格保守,并且在包括Wnt3a在内的任何其他Wnt中均不存在(图2D)。本发明人进一步研究了Wnt7接头变体的失活是否可能是由于与LRP5/6、Reck、或两者的结合缺陷所致。与Reck结合的功能一致,Wnt7a^{4A}是在接头区内的Wnt7a的四残基变体(V241A、F251A、L252A、K262A;其中取代表示mWnt7a前体多肽中的氨基酸位置),与WT Wnt7a相比,显示出降低的Reck PLA信号。尽管分泌率略有提高,但仍发生了这种较低的活性(图2E)。

[0495] 为了研究无细胞系统中的Reck-Wnt7结合,将高纯度的Reck-CK-Fc融合蛋白(及其变体,即HA-Reck-CK^{ΔCK1}-Fc、HA-Reck-CK^{ΔCK2}-Fc;HA-Reck-CK^{ΔCK3}-Fc;HA-Reck-CK^{ΔCK4}-Fc;和HA-Reck-CK^{ΔCK5}-Fc)从HEK293T细胞上清液中回收,并通过等温滴定热量法(ITC)用纯化的29个氨基酸长的合成Wnt7a和Wnt7b接头肽(pWnt7a和pWnt7b)来滴定。ITC证实pWnt7a和pWnt7b分别以7μM和1.2μM的亲和力直接结合Reck(图2F)。作为对照,与Wnt7a^{4A}对应的合成肽(pWnt7a^{4A})以及Wnt3a的等效接头肽(pWnt3a)显示没有结合Reck-CK-Fc。pWnt7b结合需要Reck CK4和CK5,但不需要CK1、CK2和CK3,这可以显著反映培养细胞中的PLA结果。为了证实ITC分析提供的结果,本发明人使用单分子力谱(SMFS)来测量单分子水平的结合亲和力(图2G)。pWnt7b与Reck-CK-Fc的结合可检测到,其中测量的解离常数(K_d)为5μM。尽管这两种技术之间存在根本差异,但ITC和SMFS因此提供了所测量的结合亲和力值之间的紧密匹配。

[0496] 总而言之,这些数据表明Reck至少部分地通过其“特征性”接头基序识别Wnt7。但是,Reck结合的Wnt7必须在功能上整合到有效的信号激活和转导机制中,以使细胞显示出增强的Wnt7特异性细胞应答。

[0497] 2.3.Gpr124在Wnt7信号传递和脑血管生成过程中不充当经典的信号转导GPCR

[0498] Reck自身由于其到质膜唯一外部小叶的GPI锚定模式而具有有限的跨膜双层转导Wnt7信号的潜力,并且因此信号转导必须依赖受体复合物的其他组分,即Gpr124和/或Fz/Lrp5/6。

[0499] 为了揭示这种信号转导机制,在培养细胞中评估了Gpr124和Fz/Lrp5/6复合物之间的功能关系。使用“不含Fz”和“不含Lrp5/6”的细胞,在基因上确定Gpr124/Reck的功能严格依赖于Fz和Lrp5/6的功能(图3A-E)。进一步确定,它们各自的CRD和DKK1敏感的Wnt配体结合结构域对于信号传递是必需的,这暗示Wnt7以经典方式结合并激活Fz/Lrp5/6。

[0500] 已显示斑马鱼CNS血管结构的发育在血管生成芽出的过程中完全依赖于Reck/Gpr124信号传递,其可以很容易地定量。因此,它构成了在体内响应生理性Wnt7输入水平进

行结构功能分析的基本环境(prime setting)(B.Vanhollebeke等人,Elife.4,1-25(2015);N.Bostaille,A.Gauquier,L.Twyffels,B.Vanhollebeke,Biol.Open.5,1874-1881(2016))。利用在单细胞期WT或gpr124^{-/-}胚胎中注射合成的mRNA,本发明人开始评估缺少N端胞外部分(Gpr124^{ΔECD})、缺少七次跨膜部分(Gpr124^{ΔTM2-7})或缺少C端胞质延伸(Gpr124^{ΔICD})的三个Gpr124变体的活性(图4A)。尽管Gpr124^{ΔECD}和Gpr124^{ΔICD}的异位表达不能恢复gpr124突变体中的脑血生成,但Gpr124^{ΔTM2-7}的活性足以触发体内脑血管生成(图4B,C)和在体外STF分析测定中触发Wnt活性(图4D)。

[0501] Gpr124^{ΔTM2-7}的这种保留的能力是出乎意料的:Gpr124是一种GPCR,GPCR是通过配体诱导的七次跨膜的构象重塑在细胞内经典地中继细胞外刺激的受体超家族,其在工程化的Gpr124^{ΔTM2-7}突变蛋白中是不存在的。基于这些结果,似乎当促进Wnt7信号传递时,Gpr124可能不充当经典的GPCR,因为它不需要跨膜的信号转导。

[0502] 相反,Gpr124似乎在该模块中充当信号传递缺陷的跨膜蛋白,其活性依赖于Reck结合的胞外结构域(ECD)和构象解偶联的细胞内结构域(ICD)。本发明人假设Gpr124 ICD可以通过Dishevelled(Wnt信号传递与Fz相互作用的关键效应子)起作用。这种“Dvl假说”基于以下发现:Gpr125(一种与Gpr124密切相关的粘附性GPCR)被显示通过其C端ICD结构域与Dvl发生物理相互作用(X.Li等人,Development.140,3028-3039(2013)),并且其中Gpr124的ICD被Gpr125的ICD取代的Gpr124/125杂合物能够促进斑马鱼的脑血管生成(B.Vanhollebeke等人,Elife.4,1-25(2015))(还参见图4E)。类似地,其中用已知结合Dvl的Fz2 ICD代替Gpr124 ICD的Gpr124/Fz2杂合物(Gpr124^{ICDFz2})是有效的。相反地,全长Fz2不是。值得注意的是,Gpr124^{ICDFz2}的活性取决于Fz2 ICD中的KTxxW和ETTV基序Dvl结合位点(图4E)。

[0503] 2.4.Dvl聚合物通过连接Fz和Gpr124来组装配体特异性Wnt信号体

[0504] 在FZ₁₋₁₀^{-/-}HEK293T细胞中进行的N端带有FLAG标签的Gpr124与Dvl-GFP之间的免疫共沉淀实验证实了即使在不存在C端ETTV的情况下,Gpr124与Dvl之间的相互作用(图5A)。与Fz不同,Gpr124未产生可检测的磷酸化Dvl水平升高,这是β-联蛋白稳定化上游Wnt信号激活的早期指示物(SI Yanagawa,F.Van Leeuwen,A.Wodarz,J.Klingensmith,R.Nusse,Genes Dev.9,1087-1095(1995);X.Huang等人,Science.339,1441-1445(2013))(图5B)。Gpr124诱导的Dvl激活的这种缺乏与图4的实验一致,该实验将Gpr124鉴定为信号传递缺陷蛋白。总而言之,这些实验将Dvl鉴定为可介导其Wnt7信号传递活性的组成型Gpr124结合配偶体。

[0505] Gpr124、Reck和Fz/Lrp5/6已被提议在培养细胞中形成更高阶的受体复合物(C.Cho,P.M.Smallwood,J.Nathans,Neuron.95,1056-1073(2017))。本发明人认为Gpr124 ICD可以通过Dvl组装该复合物。Dvl分子确实通过其N端Dix结构域的从头到尾的自组装,通过动态聚合组装了信号体。这些自缔合使各种胞质Wnt信号传递调节蛋白(包括激酶和内吞机制的成分)局部集中(M.Gammons,M.Bienz,Curr.Opin.Cell Biol.51,42-49(2018),M.Bienz,Trends Biochem.Sci.39,487-495(2014)。由于Dvl与Gpr124和Fz这两者的物理相互作用,因此Gpr124和相关的Reck结合的Wnt7可能因此陷入(trapped)动态的Wnt信号体(signalosome)中,从而增加可用于Fz信号传递的Wnt7配体的局部浓度。

[0506] Wnt信号体通过光学显微镜容易地被检测为在质膜处或其下方形成的富含Dvl的

大的点状结构 (M.Bienz, Trends Biochem.Sci.39,487-495 (2014); J.Bilic 等人, 316, 1619-1622 (2007); MV Gammons, M.Renko, CM Johnson, TJ Rutherford, M.Bienz, Mol.Cell.64,92-104 (2016))。为了确定Fz和Gpr124是否以Dvl依赖性方式在Wnt信号体中共同分布,首先在囊胚深层 (DEL) 细胞中检查了单独表达的Fz-GFP和Gpr124-tagRFP的定位。Fz4点缀了整个质膜外围,而相反地,Gpr124-tagRFP则积累在细胞接触处。这种差异的膜定位在Dvl表达后仍保留 (图5C)。与它们的Dvl结合能力一致,两种受体都将Dvl募集到它们各自的膜区室 (图5D)。然而,当共表达Gpr124-tagRFP和Fz4-GFP时,Gpr124-tagRFP仍然锚定在细胞间连接处,但是Fz4-GFP以Dvl依赖性方式定量重新定位到Gpr124膜亚结构域 (图5E),其中蛋白质共定位在Wnt信号体-怀旧式 (reminiscent) 点状结构中,在EVL细胞膜处特别明显 (图5F)。本发明人使用双分子荧光互补作为测试DEL细胞中Dvl依赖性Fz/Gpr124相互作用的测定法。Gpr124-VN₁₅₅ (I152L) 和Fz1-VC₁₅₅的共注射确实以Dvl依赖性方式生成了亮的连接信号 (图5G),表明Fz和Gpr124通过Dvl支架蛋白间接相互作用。这提供了Fz/Lrp5/6和Gpr124以及相关Reck结合的Wnt7在具有Wnt配体识别潜能的Wnt信号体内空间聚集的分子机制,从而解释了Gpr124/Reck阳性细胞的Wnt7特异性反应 (参见最终模型,图6)。

[0507] 总而言之,这项工作提供了对于脊椎动物细胞的Wnt解码能力的第一个结构和机制见解。其还表明,受进化限制的Wnt结构保留了足够的多样性和内在可塑性,以允许配体特异的细胞应答,迄今为止,该特性被认为需要与结构无关的Frizzled配体,如Norrin (MB Lai 等人, Cell Rep.19,2809-2822 (2017))。这些关于Wnt进化和功能的结构见解立即表明存在另外的Wnt解码模块,从而能够响应其他Wnt或Fz家族成员而对细胞行为进行微调。

[0508] 实施例2:Reck对Wnt7的分子识别最小化Wnt/Fz相互作用的要求

[0509] 1.材料和方法

[0510] 1.1.斑马鱼品系

[0511] 斑马鱼 (Danio rerio) 在遵循比利时国规定的标准条件下饲养和处理 (协议批准号:CEBEA-IBMM-2017-22:65)。使用了以下品系:Tg (-17.0neurog1:EGFP)^{w61} (McGraw 等人, J.Neurosci 28(47):12558-69 (2008))。

[0512] 1.2.吗啉寡核苷酸、RNA构建体和显微注射

[0513] 将以下剪接阻断吗啉寡核苷酸 (MO) (GeneTools, Eugene, OR) 注入处于单细胞阶段的胚胎:wnt7aa (TTCCATTGACCCTACTTACCCAAT, 6ng)。使用mMessage mMachine SP6试剂盒 (Ambion, Carlsbad, CA) 进行NotI消化后,从pCS2质粒转录合成的mRNA,并将其注入单细胞期斑马鱼胚胎中。对于非洲爪蟾显微注射,将15pg的wnt7a或wnt7a^{K190A}或wnt7a¹⁻²⁷⁸mRNA注射到四细胞阶段胚胎的一个腹侧卵裂球中。

[0514] 1.3.表达质粒构建体

[0515] 使用融合 (In-fusion) 克隆 (Takara, Mountain View, CA) 从重组后的pCS2载体的CMV启动子表达所有Wnt信号组分和其他表达构建体,除了Fz1 (addgene#42253) 和Fz5 (addgene#42267) 之外。使用融合 (In-fusion) 克隆和串联重叠PCR产物生成单点突变变体和缺失。通过测序确认所有构建体。

[0516] 1.4.细胞培养和HEK293突变细胞系

[0517] HEK293T细胞获自ATCC (CRL-3216), HEK293 STF细胞系由Jeremy Nathans (John

Hopkins) 友情提供。将细胞在补充有10%胎牛血清的DMEM/F12培养基 (Lonza, Basel, Switzerland) 中培养, 并保持在用5%CO₂平衡的潮湿培养箱中。7B。

[0518] 1.5. STF双荧光素酶测定法

[0519] 将细胞铺板到96孔板中, 并在24小时后用Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 一式三份转染。针对每个表达载体优化每个孔转染的质粒DNA的量: 海肾荧光素酶 (0.5ng)、Wnt (20ng)、Fz (5ng)、LRP (2.5ng)、Gpr124 (10ng)、Reck (10ng), 除非另有说明。用空的pCS2载体将DNA总量调整为每孔100ng。转染后48小时, 在被动裂解缓冲液 (E1960, Promega, Wisconsin) 中收获细胞, 并使用双荧光素酶报告测定 (Dual-Luciferase Reporter Assay) 系统 (E1960, Promega, Madison, Wisconsin) 依次测量萤火虫和海肾荧光素酶的活性。

[0520] 1.6. 显微术和图像处理

[0521] 用LSM710共聚焦显微镜对斑马鱼胚胎进行成像, 然后在ImageJ中对图像进行处理。斑马鱼发育表型的图像是在Leica M165 FC上拍摄的。爪蟾幼体用Olympus SZX16成像。

[0522] 1.7. 统计学分析

[0523] 使用GraphPad软件进行统计学分析。数据代表平均值±SD。通过单因素ANOVA (事后Dunnett检验) 和学生t检验针对正态分布数据的多次和一次比较 (STF分析), 和通过Kruskal-Wallis (事后Dunn检验) 针对非正态分布数据的多次比较 (DRG量化) 进行p值计算; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001。

[0524] 2. 结果

[0525] 本发明人在实验1中确定, Reck通过识别Wnt7a内与Fz参与的位点不同的位点处的接头来区分Wnt配体。因此, 结合机制似乎与通过细胞内支架保持在一起的高阶Wnt7/Reck/Gpr124/Fz/LRP5/6复合物的形成相容, 其中Wnt7同时被Fz、Reck和LRP5/6结合。本发明人进一步揭示, Wnt7a的N端结构域 (Wnt7a¹⁻²⁷⁸) 仍结合Reck。

[0526] 接下来, 评估了Wnt7a的这些截短变体对Fz5和Gpr124/Reck/Fz/LRP信号转导的STF活性 (图7A)。通过Fz5的Wnt信号传递需要同时保留两个Wnt/Fz接触位点, 并且缺失任何一个Wnt/Fz接触位点 (通过截短或通过不存在棕榈油酸) 的所有Wnt7a变体都不能刺激Fz5信号传递 (图7A)。Gpr124/Reck/Fz1信号传递对Wnt7a截短或突变同样敏感, 但有一个明显的例外: 单结构域Wnt7a¹⁻²⁷⁸通过Gpr124/Reck/Fz1保持~40%的信号传递能力 (图7A, 箭头)。本发明人提出, 在由Wnt7、Fz、LRP5/6和Reck形成的复合物中, 由Reck提供的额外的接触点补偿在配体食指处缺失的Wnt/Fz相互作用。

[0527] 为了区分Wnt7a中对Gpr124/Reck/Fz/LRP信号与Fz5信号转导必不可少的残基, 分析了Wnt7a单个残基变体集合的Gpr124/Reck/Fz/LRP或Fz5依赖性STF信号转导 (图7B, 7C)。鉴定出42个全长mWnt7a变体 (在7B中的方框中), 这些变体对Fz5信号传递无活性, 但仍激活Gpr124/Reck/Fz/LRP介导的Wnt信号传递, 更具体地激活Gpr124/Reck/Fz/LRP介导的Wnt信号传递, 为野生型成熟全长Wnt7a的Gpr124/Reck/Fz/LRP介导的Wnt信号转导活性的至少35% (图7B-7C, 参见表3)。这些变体中的31个, 更具体地, Wnt7a变体Q48A (Q17A), I51A (I20A), P56A (P25A), A58R (A27R); I59A (I28A); E64A (E33A); M68A (M37A), L70A (L39A), E72A (E41A); F75A (F44A); V99A (V68A); I160A (I129A); F162A (F131A); K164A (K133A); I172A (I141A); R189A (R158A); K190A (K159A); K190L (K159L); K212A (K181A); R222A (R191A);

K229A (K198A) ; K231A (K200A) ; V236A (V205A) ; E239A (E208A) ; P249A (P218A) ; Y260A (Y229A) ; P263A (P232A) ; T266A (T235A) ; W322A (W291A) ; T338A (T307A) 和 N83Q (N52Q) (其中取代表示mWnt7a前体多肽中的氨基酸位置(并且其中括号之间的取代表示mWnt7a成熟多肽中的氨基酸位置,参见表3))能够激活Gpr124/Reck/Fz/LRP介导的Wnt信号传递,为野生型成熟全长Wnt7a的Gpr124/Reck/Fz/LRP介导的Wnt信号传递活性的至少70% (图7B-C)。

[0528] 在体外,在不存在Gpr124/Reck的情况下,Wnt7a¹⁻²⁷⁸和Wnt7a^{K190A} (Gpr124/Reck Fz/LRP信号传递的三十一一种选择性变体之一)不通过任何Fz发信号(图7D)。因此,在斑马鱼受精卵中注射mRNA时,Wnt7a¹⁻²⁷⁸和Wnt7a^{K190A}的耐受性良好,并且分别在高达1ng和100pg时未显示后化(posteriorizing)或大体解剖变化(图7D-E)。相反地,3pg的wnt7a mRNA通过异位激活Wnt信号传递诱导前脑和眼结构的丧失(Kim等人,Nature 407 (6806) : 913-6 (2000)),并且在高于10pg的剂量导致畸形胚胎(图7E-F)。

[0529] 类似地,当注射到爪蟾胚胎中时,Wnt7a引起轴重复,这是经典Wnt/ β -联蛋白信号转导结果,而Wnt7a¹⁻²⁷⁸和Wnt7a^{K190A}却没有(图7G)。缺乏Wnt7a¹⁻²⁷⁸和Wnt7a^{K190A}诱导的任何可辨别的发育缺陷允许注射100pg mRNA后wnt7a吗啉寡核苷酸处理中明显的DRG挽救,而以其最高耐受剂量10pg注射的wnt7a mRNA则仅显示了DRG神经元的有限恢复(图7H)。总之,这些实验将Wnt7a¹⁻²⁷⁸和Wnt7a^{K190A}鉴定为Gpr124/Reck/Fz/LRP选择性激动剂,其在体内引发Gpr124/Reck/Fz/LRP依赖性反应,而未证明其在替代Fz途径上的脱靶活性,从而提供了可以对配体特异性Fz信号传递通路进行改变以开发具有极大提高的选择性的新型Wnt激动剂的概念的证据。关于Wnt7a前体多肽(即包括信号肽)的氨基酸序列,指示了实验部分中Wnt7a多肽变体中的氨基酸取代的位置。表3显示了氨基酸取代在Wnt7a前体多肽的氨基酸序列中的位置以及它们在成熟Wnt7a多肽的氨基酸序列中的相应位置。

[0530] 小鼠Wnt7a^{K190A}或Wnt7a¹⁻²⁷⁸的转基因内皮表达触发了Wnt7a^{-/-}突变斑马鱼中的GPR124/RECK依赖性脑血管生成并恢复了血脑屏障(如通过GLUT1表达评估的)(图9A-C)。在内皮特异性kdr1(血管内皮生长因子受体kdr样)启动子的控制下,将小鼠Wnt7、Wnt7a^{K190A}和Wnt7a¹⁻²⁷⁸在Wnt7a^{-/-}胚胎的内皮中瞬时表达。Wnt7配体表达为具有BFP(蓝色荧光蛋白)作为转基因标记的双顺反子构建物。与未注射的胚胎相反地,所有三个配体都恢复了CtA形成。在60个hpf Wnt7a^{-/-}胚胎中Wnt7、Wnt7a^{K190A}和Wnt7a¹⁻²⁷⁸转基因表达后,CtA的抗GLUT1免疫荧光染色显示血脑屏障成熟。

[0531] 鉴于以上所述,Wnt7a变体是GPR124/RECK选择性激动剂,其在体内引起GPR124/RECK依赖性反应,且不显示在替代Fz途径上的脱靶活性。

[0532] 表3

[0533]

在 mWnt7a 前体多肽中的氨基酸位置	在 mWnt7a 成熟多肽中的氨基酸位置
Q48A	Q17A
I51A	I20A
P56A	P25A
A58R	A27R
I59A	I28A
E64A	E33A
M68A	M37A
L70A	L39A
E72A	E41A
F75A	F44A
V99A	V68A
R81A	R50A
N83Q	N52Q
I160A	I129A
F162A	F131A
K164A	K133A
F166A	F135A
I172A	I141A
R177A	R146A
R189A	R158A

[0534]

K190A	K159A
K190L	K159L
K190S	K159S
K212A	K181A
R222A	R191A
K229A	K198A
K231A	K200A
V236A	V205A
E239A	E208A
R245A	R214A
K247A	K216A
P249A	P218A
K253A	K222A
I254A	I223A
Y260A	Y229A
P263A	P232A
T266A	T235A
E279A	E248A
R320A	R289A
W322A	W291A
T338A	T307A
K349A	K318A

[0535] 注意,小鼠和人野生型全长成熟Wnt7a的一级氨基酸序列是相同的。

[0536] 实施例3:在中风模型(短暂性大脑中动脉闭塞(tMCAO))的小鼠中病毒载体递送小鼠Wnt7a^{K190A}

[0537] 1.材料和方法

[0538] 1.1.生成AAV质粒构建体(AAV-PHP.eB-CAG-mWnt7a^{K190A}-p2A-EGFP)

[0539] 将全长mWnt7a^{K190A}变体克隆到在pCAG启动子的调控元件下包含侧翼ITR序列的pAAV转基因载体中。Wnt7变体通过自动切割p2A肽的中间体表达为与EGFP的融合体。按照Körbelin等人(2016)的描述,通过用pAAV转基因质粒、辅助质粒(编码AAV-PHP.eB衣壳变体+rep+插入序列)和腺病毒辅助质粒对HEK293细胞进行三重共转染来生产和纯化AAV载体。

[0540] 注意,“Wnt7a^{K190A}”的K190A表示mWnt7a前体多肽中的氨基酸位置。

[0541] 1.2.动物研究

[0542] 将50μl含AAV-PHP.eB-CAG-mWnt7a^{K190A}-p2A-EGFP的浓缩载体(1×10^{11} vg/小鼠)或AAV-PHP.eB对照载体(1×10^{11} vg/小鼠)静脉注射到十只C57BL/6小鼠的眶周静脉。感染后两周,在CNS内皮细胞中评估EGFP信号,以确认转基因表达。

[0543] 对小鼠进行tMCAO 1小时,并在tMCAO后5天通过TTC(2,3,5-三苯基四唑鎓氯化物)染色测量梗塞面积。再灌注后1小时,通过测量内源性血浆蛋白质泄漏(免疫球蛋白和纤维

蛋白原),进行血脑屏障(BBB)水平的泄漏测定。在tMCAO后灌注后5天,评估小鼠的存活。

[0544] 2.结果

[0545] 使用GFP编码构建体来显示在小鼠脑中广泛的转基因表达(图10A)。

[0546] 为了评估小鼠Wnt7a^{K190A}对体内中风的作用,生成了表达小鼠Wnt7a^{K190A}的脑特异性腺相关载体。

[0547] 注射有包含小鼠Wnt7a^{K190A}的载体的所有小鼠均显示减小的中风体积(图10B)。

[0548] 实施例4:在小鼠中风模型(短暂性大脑中动脉闭塞(tMCAO))的小鼠中病毒载体递送Wnt7a^{K190S}或Wnt7a^{K190L}

[0549] 1.材料和方法

[0550] 1.1.生成AAV质粒构建体(AAV-PHP.eB-CAG-mWnt7a^{K190S}-p2A-EGFP和AAV-PHP.eB-CAG-mWnt7a^{K190L}-p2A-EGFP)

[0551] 如实施例3的1.1节中所述生成AAV质粒构建体。

[0552] 注意,“Wnt7a^{K190S}”的K190S和“Wnt7a^{K190L}”中的K190L表示mWnt7a前体多肽中的氨基酸位置。

[0553] 1.2.动物研究

[0554] 按照实施例3的1.1节中所述进行动物研究。

[0555] 2.结果

[0556] 在注射有包含小鼠Wnt7a^{K190S}或Wnt7a^{K190L}的载体的小鼠中测量到中风体积减少。

[0557] 实施例5:在小鼠中风模型(短暂性大脑中动脉闭塞(tMCAO))的小鼠中病毒载体递送Wnt7a变体激动剂

[0558] 1.材料和方法

[0559] 如实施例3第1.1节所述生成AAV质粒构建体,并如实施例3第1.1节所述进行动物研究。

[0560] 2.结果

[0561] 在注射有包含如下的载体的小鼠中测量到中风体积减少:小鼠Wnt7a^{Q48A}、Wnt7a^{I51A}、Wnt7a^{P56A}、Wnt7a^{A58R}、Wnt7a^{I59A}、Wnt7a^{E64A}、Wnt7a^{M68A}、Wnt7a^{L70A}、Wnt7a^{E72A}、Wnt7a^{F75A}、Wnt7a^{R81A}、Wnt7a^{N83Q}、Wnt7a^{V99A}、Wnt7a^{I160A}、Wnt7a^{F162A}、Wnt7a^{K164A}、Wnt7a^{F166A}、Wnt7a^{I172A}、Wnt7a^{R177A}、Wnt7a^{R189A}、Wnt7a^{K212A}、Wnt7a^{R222A}、Wnt7a^{K229A}、Wnt7a^{K231A}、Wnt7a^{V236A}、Wnt7a^{E239A}、Wnt7a^{R245A}、Wnt7a^{K247A}、Wnt7a^{P249A}、Wnt7a^{K253A}、Wnt7a^{I254A}、Wnt7a^{Y260A}、Wnt7a^{P263A}、Wnt7a^{T266A}、Wnt7a^{E279A}、Wnt7a^{R320A}、Wnt7a^{W322A}、Wnt7a^{T338A}或Wnt7a^{K349A}。

[0562] 作为阴性对照,在注射有包含小鼠Wnt7a^{R49A}、Wnt7a^{E103A}或Wnt7a^{L192A}的载体的小鼠中测量中风体积减少。

[0563] 注意,取代是指mWnt7a前体多肽中的氨基酸位置。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 布鲁塞尔自由大学
 [0003] <120> Wnt信号传递激动剂分子
 [0004] <130> ULB-100-PCT
 [0005] <150> 18163777.8
 [0006] <151> 2018-03-23
 [0007] <160> 121
 [0008] <170> PatentIn版本3.5
 [0009] <210> 1
 [0010] <211> 1338
 [0011] <212> PRT
 [0012] <213> 智人(homo sapiens)
 [0013] <400> 1
 [0014] Met Gly Ala Gly Gly Arg Arg Met Arg Gly Ala Pro Ala Arg Leu Leu
 [0015] 1 5 10 15
 [0016] Leu Pro Leu Leu Pro Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Pro Glu Ala Arg
 [0017] 20 25 30
 [0018] Gly Ala Pro Gly Cys Pro Leu Ser Ile Arg Ser Cys Lys Cys Ser Gly
 [0019] 35 40 45
 [0020] Glu Arg Pro Lys Gly Leu Ser Gly Gly Val Pro Gly Pro Ala Arg Arg
 [0021] 50 55 60
 [0022] Arg Val Val Cys Ser Gly Gly Asp Leu Pro Glu Pro Pro Glu Pro Gly
 [0023] 65 70 75 80
 [0024] Leu Leu Pro Asn Gly Thr Val Thr Leu Leu Leu Ser Asn Asn Lys Ile
 [0025] 85 90 95
 [0026] Thr Gly Leu Arg Asn Gly Ser Phe Leu Gly Leu Ser Leu Leu Glu Lys
 [0027] 100 105 110
 [0028] Leu Asp Leu Arg Asn Asn Ile Ile Ser Thr Val Gln Pro Gly Ala Phe
 [0029] 115 120 125
 [0030] Leu Gly Leu Gly Glu Leu Lys Arg Leu Asp Leu Ser Asn Asn Arg Ile
 [0031] 130 135 140
 [0032] Gly Cys Leu Thr Ser Glu Thr Phe Gln Gly Leu Pro Arg Leu Leu Arg
 [0033] 145 150 155 160
 [0034] Leu Asn Ile Ser Gly Asn Ile Phe Ser Ser Leu Gln Pro Gly Val Phe
 [0035] 165 170 175
 [0036] Asp Glu Leu Pro Ala Leu Lys Val Val Asp Leu Gly Thr Glu Phe Leu
 [0037] 180 185 190
 [0038] Thr Cys Asp Cys His Leu Arg Trp Leu Leu Pro Trp Ala Gln Asn Arg

[0039]	195	200	205
[0040]	Ser Leu Gln Leu Ser Glu His Thr Leu Cys Ala Tyr Pro Ser Ala Leu		
[0041]	210	215	220
[0042]	His Ala Gln Ala Leu Gly Ser Leu Gln Glu Ala Gln Leu Cys Cys Glu		
[0043]	225	230	235
[0044]	Gly Ala Leu Glu Leu His Thr His His Leu Ile Pro Ser Leu Arg Gln		
[0045]	245	250	255
[0046]	Val Val Phe Gln Gly Asp Arg Leu Pro Phe Gln Cys Ser Ala Ser Tyr		
[0047]	260	265	270
[0048]	Leu Gly Asn Asp Thr Arg Ile Arg Trp Tyr His Asn Arg Ala Pro Val		
[0049]	275	280	285
[0050]	Glu Gly Asp Glu Gln Ala Gly Ile Leu Leu Ala Glu Ser Leu Ile His		
[0051]	290	295	300
[0052]	Asp Cys Thr Phe Ile Thr Ser Glu Leu Thr Leu Ser His Ile Gly Val		
[0053]	305	310	315
[0054]	Trp Ala Ser Gly Glu Trp Glu Cys Thr Val Ser Met Ala Gln Gly Asn		
[0055]	325	330	335
[0056]	Ala Ser Lys Lys Val Glu Ile Val Val Leu Glu Thr Ser Ala Ser Tyr		
[0057]	340	345	350
[0058]	Cys Pro Ala Glu Arg Val Ala Asn Asn Arg Gly Asp Phe Arg Trp Pro		
[0059]	355	360	365
[0060]	Arg Thr Leu Ala Gly Ile Thr Ala Tyr Gln Ser Cys Leu Gln Tyr Pro		
[0061]	370	375	380
[0062]	Phe Thr Ser Val Pro Leu Gly Gly Gly Ala Pro Gly Thr Arg Ala Ser		
[0063]	385	390	395
[0064]	Arg Arg Cys Asp Arg Ala Gly Arg Trp Glu Pro Gly Asp Tyr Ser His		
[0065]	405	410	415
[0066]	Cys Leu Tyr Thr Asn Asp Ile Thr Arg Val Leu Tyr Thr Phe Val Leu		
[0067]	420	425	430
[0068]	Met Pro Ile Asn Ala Ser Asn Ala Leu Thr Leu Ala His Gln Leu Arg		
[0069]	435	440	445
[0070]	Val Tyr Thr Ala Glu Ala Ala Ser Phe Ser Asp Met Met Asp Val Val		
[0071]	450	455	460
[0072]	Tyr Val Ala Gln Met Ile Gln Lys Phe Leu Gly Tyr Val Asp Gln Ile		
[0073]	465	470	475
[0074]	Lys Glu Leu Val Glu Val Met Val Asp Met Ala Ser Asn Leu Met Leu		
[0075]	485	490	495
[0076]	Val Asp Glu His Leu Leu Trp Leu Ala Gln Arg Glu Asp Lys Ala Cys		
[0077]	500	505	510

[0078]	Ser	Arg	Ile	Val	Gly	Ala	Leu	Glu	Arg	Ile	Gly	Gly	Ala	Ala	Leu	Ser
[0079]				515				520					525			
[0080]	Pro	His	Ala	Gln	His	Ile	Ser	Val	Asn	Ala	Arg	Asn	Val	Ala	Leu	Glu
[0081]				530				535					540			
[0082]	Ala	Tyr	Leu	Ile	Lys	Pro	His	Ser	Tyr	Val	Gly	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala
[0083]				545				550					555			560
[0084]	Phe	Gln	Arg	Arg	Glu	Gly	Gly	Val	Pro	Gly	Thr	Arg	Pro	Gly	Ser	Pro
[0085]					565					570					575	
[0086]	Gly	Gln	Asn	Pro	Pro	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro	Pro	Ala	Asp	Gln	Gln	Leu
[0087]				580					585					590		
[0088]	Arg	Phe	Arg	Cys	Thr	Thr	Gly	Arg	Pro	Asn	Val	Ser	Leu	Ser	Ser	Phe
[0089]				595					600					605		
[0090]	His	Ile	Lys	Asn	Ser	Val	Ala	Leu	Ala	Ser	Ile	Gln	Leu	Pro	Pro	Ser
[0091]				610					615				620			
[0092]	Leu	Phe	Ser	Ser	Leu	Pro	Ala	Ala	Leu	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Asp
[0093]				625				630					635			640
[0094]	Cys	Thr	Leu	Gln	Leu	Leu	Val	Phe	Arg	Asn	Gly	Arg	Leu	Phe	His	Ser
[0095]					645					650					655	
[0096]	His	Ser	Asn	Thr	Ser	Arg	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Lys	Arg	Arg
[0097]				660					665					670		
[0098]	Gly	Val	Ala	Thr	Pro	Val	Ile	Phe	Ala	Gly	Thr	Ser	Gly	Cys	Gly	Val
[0099]				675					680					685		
[0100]	Gly	Asn	Leu	Thr	Glu	Pro	Val	Ala	Val	Ser	Leu	Arg	His	Trp	Ala	Glu
[0101]				690					695				700			
[0102]	Gly	Ala	Glu	Pro	Val	Ala	Ala	Trp	Trp	Ser	Gln	Glu	Gly	Pro	Gly	Glu
[0103]				705					710				715			720
[0104]	Ala	Gly	Gly	Trp	Thr	Ser	Glu	Gly	Cys	Gln	Leu	Arg	Ser	Ser	Gln	Pro
[0105]					725					730					735	
[0106]	Asn	Val	Ser	Ala	Leu	His	Cys	Gln	His	Leu	Gly	Asn	Val	Ala	Val	Leu
[0107]				740					745					750		
[0108]	Met	Glu	Leu	Ser	Ala	Phe	Pro	Arg	Glu	Val	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly
[0109]				755					760					765		
[0110]	Leu	His	Pro	Val	Val	Tyr	Pro	Cys	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu
[0111]				770					775					780		
[0112]	Phe	Ala	Thr	Ile	Ile	Thr	Tyr	Ile	Leu	Asn	His	Ser	Ser	Ile	Arg	Val
[0113]				785					790					795		800
[0114]	Ser	Arg	Lys	Gly	Trp	His	Met	Leu	Leu	Asn	Leu	Cys	Phe	His	Ile	Ala
[0115]					805					810					815	
[0116]	Met	Thr	Ser	Ala	Val	Phe	Ala	Gly	Gly	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Tyr	Gln

[0117]		820		825		830
[0118]	Met Val Cys Gln Ala Val Gly Ile Thr Leu His Tyr Ser Ser Leu Ser					
[0119]		835		840		845
[0120]	Thr Leu Leu Trp Met Gly Val Lys Ala Arg Val Leu His Lys Glu Leu					
[0121]		850		855		860
[0122]	Thr Trp Arg Ala Pro Pro Pro Gln Glu Gly Asp Pro Ala Leu Pro Thr					
[0123]	865		870		875	880
[0124]	Pro Ser Pro Met Leu Arg Phe Tyr Leu Ile Ala Gly Gly Ile Pro Leu					
[0125]		885		890		895
[0126]	Ile Ile Cys Gly Ile Thr Ala Ala Val Asn Ile His Asn Tyr Arg Asp					
[0127]		900		905		910
[0128]	His Ser Pro Tyr Cys Trp Leu Val Trp Arg Pro Ser Leu Gly Ala Phe					
[0129]		915		920		925
[0130]	Tyr Ile Pro Val Ala Leu Ile Leu Leu Ile Thr Trp Ile Tyr Phe Leu					
[0131]		930		935		940
[0132]	Cys Ala Gly Leu Arg Leu Arg Gly Pro Leu Ala Gln Asn Pro Lys Ala					
[0133]	945		950		955	960
[0134]	Gly Asn Ser Arg Ala Ser Leu Glu Ala Gly Glu Glu Leu Arg Gly Ser					
[0135]		965		970		975
[0136]	Thr Arg Leu Arg Gly Ser Gly Pro Leu Leu Ser Asp Ser Gly Ser Leu					
[0137]		980		985		990
[0138]	Leu Ala Thr Gly Ser Ala Arg Val Gly Thr Pro Gly Pro Pro Glu Asp					
[0139]		995		1000		1005
[0140]	Gly Asp Ser Leu Tyr Ser Pro Gly Val Gln Leu Gly Ala Leu Val					
[0141]		1010		1015		1020
[0142]	Thr Thr His Phe Leu Tyr Leu Ala Met Trp Ala Cys Gly Ala Leu					
[0143]		1025		1030		1035
[0144]	Ala Val Ser Gln Arg Trp Leu Pro Arg Val Val Cys Ser Cys Leu					
[0145]		1040		1045		1050
[0146]	Tyr Gly Val Ala Ala Ser Ala Leu Gly Leu Phe Val Phe Thr His					
[0147]		1055		1060		1065
[0148]	His Cys Ala Arg Arg Arg Asp Val Arg Ala Ser Trp Arg Ala Cys					
[0149]		1070		1075		1080
[0150]	Cys Pro Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro His Ala Pro Pro Arg Ala					
[0151]		1085		1090		1095
[0152]	Leu Pro Ala Ala Ala Glu Asp Gly Ser Pro Val Phe Gly Glu Gly					
[0153]		1100		1105		1110
[0154]	Pro Pro Ser Leu Lys Ser Ser Pro Ser Gly Ser Ser Gly His Pro					
[0155]		1115		1120		1125

[0156]	Leu	Ala	Leu	Gly	Pro	Cys	Lys	Leu	Thr	Asn	Leu	Gln	Leu	Ala	Gln
[0157]	1130						1135					1140			
[0158]	Ser	Gln	Val	Cys	Glu	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Glu	Gly	Glu
[0159]	1145						1150					1155			
[0160]	Pro	Glu	Pro	Ala	Gly	Thr	Arg	Gly	Asn	Leu	Ala	His	Arg	His	Pro
[0161]	1160						1165					1170			
[0162]	Asn	Asn	Val	His	His	Gly	Arg	Arg	Ala	His	Lys	Ser	Arg	Ala	Lys
[0163]	1175						1180					1185			
[0164]	Gly	His	Arg	Ala	Gly	Glu	Ala	Cys	Gly	Lys	Asn	Arg	Leu	Lys	Ala
[0165]	1190						1195					1200			
[0166]	Leu	Arg	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Ser	Ser	Glu
[0167]	1205						1210					1215			
[0168]	Ser	Gly	Ser	Leu	His	Asn	Ser	Pro	Thr	Asp	Ser	Tyr	Leu	Gly	Ser
[0169]	1220						1225					1230			
[0170]	Ser	Arg	Asn	Ser	Pro	Gly	Ala	Gly	Leu	Gln	Leu	Glu	Gly	Glu	Pro
[0171]	1235						1240					1245			
[0172]	Met	Leu	Thr	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Asp	Thr	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu
[0173]	1250						1255					1260			
[0174]	Ser	Glu	Ala	Gly	Arg	Ala	Gly	Gln	Arg	Arg	Ser	Ala	Ser	Arg	Asp
[0175]	1265						1270					1275			
[0176]	Ser	Leu	Lys	Gly	Gly	Gly	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Ser	His	Arg	Arg
[0177]	1280						1285					1290			
[0178]	Ser	Tyr	Pro	Leu	Asn	Ala	Ala	Ser	Leu	Asn	Gly	Ala	Pro	Lys	Gly
[0179]	1295						1300					1305			
[0180]	Gly	Lys	Tyr	Asp	Asp	Val	Thr	Leu	Met	Gly	Ala	Glu	Val	Ala	Ser
[0181]	1310						1315					1320			
[0182]	Gly	Gly	Cys	Met	Lys	Thr	Gly	Leu	Trp	Lys	Ser	Glu	Thr	Thr	Val
[0183]	1325						1330					1335			
[0184]	<210>	2													
[0185]	<211>	971													
[0186]	<212>	PRT													
[0187]	<213>	智人													
[0188]	<400>	2													
[0189]	Met	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Ser	Leu	Arg	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu
[0190]	1				5					10				15	
[0191]	Ala	Val	Ala	Gly	Val	Ala	Glu	Val	Ala	Gly	Gly	Leu	Ala	Pro	Gly
[0192]					20					25				30	
[0193]	Ala	Gly	Ala	Leu	Cys	Cys	Asn	His	Ser	Lys	Asp	Asn	Gln	Met	Cys
[0194]					35					40				45	

[0195]	Asp	Val	Cys	Glu	Gln	Ile	Phe	Ser	Ser	Lys	Ser	Glu	Ser	Arg	Leu	Lys
[0196]	50						55					60				
[0197]	His	Leu	Leu	Gln	Arg	Ala	Pro	Asp	Tyr	Cys	Pro	Glu	Thr	Met	Val	Glu
[0198]	65					70					75					80
[0199]	Ile	Trp	Asn	Cys	Met	Asn	Ser	Ser	Leu	Pro	Gly	Val	Phe	Lys	Lys	Ser
[0200]					85					90					95	
[0201]	Asp	Gly	Trp	Val	Gly	Leu	Gly	Cys	Cys	Glu	Leu	Ala	Ile	Ala	Leu	Glu
[0202]				100					105					110		
[0203]	Cys	Arg	Gln	Ala	Cys	Lys	Gln	Ala	Ser	Ser	Lys	Asn	Asp	Ile	Ser	Lys
[0204]			115					120						125		
[0205]	Val	Cys	Arg	Lys	Glu	Tyr	Glu	Asn	Ala	Leu	Phe	Ser	Cys	Ile	Ser	Arg
[0206]		130					135					140				
[0207]	Asn	Glu	Met	Gly	Ser	Val	Cys	Cys	Ser	Tyr	Ala	Gly	His	His	Thr	Asn
[0208]	145					150					155					160
[0209]	Cys	Arg	Glu	Tyr	Cys	Gln	Ala	Ile	Phe	Arg	Thr	Asp	Ser	Ser	Pro	Gly
[0210]					165					170					175	
[0211]	Pro	Ser	Gln	Ile	Lys	Ala	Val	Glu	Asn	Tyr	Cys	Ala	Ser	Ile	Ser	Pro
[0212]				180					185					190		
[0213]	Gln	Leu	Ile	His	Cys	Val	Asn	Asn	Tyr	Thr	Gln	Ser	Tyr	Pro	Met	Arg
[0214]			195					200					205			
[0215]	Asn	Pro	Thr	Asp	Ser	Leu	Tyr	Cys	Cys	Asp	Arg	Ala	Glu	Asp	His	Ala
[0216]		210					215					220				
[0217]	Cys	Gln	Asn	Ala	Cys	Lys	Arg	Ile	Leu	Met	Ser	Lys	Lys	Thr	Glu	Met
[0218]	225					230					235					240
[0219]	Glu	Ile	Val	Asp	Gly	Leu	Ile	Glu	Gly	Cys	Lys	Thr	Gln	Pro	Leu	Pro
[0220]					245					250					255	
[0221]	Gln	Asp	Pro	Leu	Trp	Gln	Cys	Phe	Leu	Glu	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	His
[0222]				260					265					270		
[0223]	Pro	Gly	Val	Thr	Val	His	Pro	Pro	Pro	Ser	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Ala
[0224]			275						280					285		
[0225]	Lys	Leu	His	Cys	Cys	Ser	Lys	Ala	Asn	Thr	Ser	Thr	Cys	Arg	Glu	Leu
[0226]		290					295					300				
[0227]	Cys	Thr	Lys	Leu	Tyr	Ser	Met	Ser	Trp	Gly	Asn	Thr	Gln	Ser	Trp	Gln
[0228]	305					310					315					320
[0229]	Glu	Phe	Asp	Arg	Phe	Cys	Glu	Tyr	Asn	Pro	Val	Glu	Val	Ser	Met	Leu
[0230]					325					330					335	
[0231]	Thr	Cys	Leu	Ala	Asp	Val	Arg	Glu	Pro	Cys	Gln	Leu	Gly	Cys	Arg	Asn
[0232]				340					345					350		
[0233]	Leu	Thr	Tyr	Cys	Thr	Asn	Phe	Asn	Asn	Arg	Pro	Thr	Glu	Leu	Phe	Arg

[0234]	355	360	365
[0235]	Ser Cys Asn Ala Gln Ser Asp Gln Gly Ala Met Asn Asp Met Lys Leu		
[0236]	370	375	380
[0237]	Trp Glu Lys Gly Ser Ile Lys Met Pro Phe Ile Asn Ile Pro Val Leu		
[0238]	385	390	395
[0239]	Asp Ile Lys Lys Cys Gln Pro Glu Met Trp Lys Ala Ile Ala Cys Ser		
[0240]	405	410	415
[0241]	Leu Gln Ile Lys Pro Cys His Ser Lys Ser Arg Gly Ser Ile Ile Cys		
[0242]	420	425	430
[0243]	Lys Ser Asp Cys Val Glu Ile Leu Lys Lys Cys Gly Asp Gln Asn Lys		
[0244]	435	440	445
[0245]	Phe Pro Glu Asp His Thr Ala Glu Ser Ile Cys Glu Leu Leu Ser Pro		
[0246]	450	455	460
[0247]	Thr Asp Asp Leu Lys Asn Cys Ile Pro Leu Asp Thr Tyr Leu Arg Pro		
[0248]	465	470	475
[0249]	Ser Thr Leu Gly Asn Ile Val Glu Glu Val Thr His Pro Cys Asn Pro		
[0250]	485	490	495
[0251]	Asn Pro Cys Pro Ala Asn Glu Leu Cys Glu Val Asn Arg Lys Gly Cys		
[0252]	500	505	510
[0253]	Pro Ser Gly Asp Pro Cys Leu Pro Tyr Phe Cys Val Gln Gly Cys Lys		
[0254]	515	520	525
[0255]	Leu Gly Glu Ala Ser Asp Phe Ile Val Arg Gln Gly Thr Leu Ile Gln		
[0256]	530	535	540
[0257]	Val Pro Ser Ser Ala Gly Glu Val Gly Cys Tyr Lys Ile Cys Ser Cys		
[0258]	545	550	555
[0259]	Gly Gln Ser Gly Leu Leu Glu Asn Cys Met Glu Met His Cys Ile Asp		
[0260]	565	570	575
[0261]	Leu Gln Lys Ser Cys Ile Val Gly Gly Lys Arg Lys Ser His Gly Thr		
[0262]	580	585	590
[0263]	Ser Phe Ser Ile Asp Cys Asn Val Cys Ser Cys Phe Ala Gly Asn Leu		
[0264]	595	600	605
[0265]	Val Cys Ser Thr Arg Leu Cys Leu Ser Glu His Ser Ser Glu Asp Asp		
[0266]	610	615	620
[0267]	Arg Arg Thr Phe Thr Gly Leu Pro Cys Asn Cys Ala Asp Gln Phe Val		
[0268]	625	630	635
[0269]	Pro Val Cys Gly Gln Asn Gly Arg Thr Tyr Pro Ser Ala Cys Ile Ala		
[0270]	645	650	655
[0271]	Arg Cys Val Gly Leu Gln Asp His Gln Phe Glu Phe Gly Ser Cys Met		
[0272]	660	665	670

[0273]	Ser	Lys	Asp	Pro	Cys	Asn	Pro	Asn	Pro	Cys	Gln	Lys	Asn	Gln	Arg	Cys
[0274]			675					680					685			
[0275]	Ile	Pro	Lys	Pro	Gln	Val	Cys	Leu	Thr	Thr	Phe	Asp	Lys	Phe	Gly	Cys
[0276]			690					695					700			
[0277]	Ser	Gln	Tyr	Glu	Cys	Val	Pro	Arg	Gln	Leu	Ala	Cys	Asp	Gln	Val	Gln
[0278]	705						710					715				720
[0279]	Asp	Pro	Val	Cys	Asp	Thr	Asp	His	Met	Glu	His	Asn	Asn	Leu	Cys	Thr
[0280]					725					730					735	
[0281]	Leu	Tyr	Gln	Arg	Gly	Lys	Ser	Leu	Ser	Tyr	Lys	Gly	Pro	Cys	Gln	Pro
[0282]				740					745					750		
[0283]	Phe	Cys	Arg	Ala	Thr	Glu	Pro	Val	Cys	Gly	His	Asn	Gly	Glu	Thr	Tyr
[0284]			755					760						765		
[0285]	Ser	Ser	Val	Cys	Ala	Ala	Tyr	Ser	Asp	Arg	Val	Ala	Val	Asp	Tyr	Tyr
[0286]			770					775						780		
[0287]	Gly	Asp	Cys	Gln	Ala	Val	Gly	Val	Leu	Ser	Glu	His	Ser	Ser	Val	Ala
[0288]	785						790					795				800
[0289]	Glu	Cys	Ala	Ser	Val	Lys	Cys	Pro	Ser	Leu	Leu	Ala	Ala	Gly	Cys	Lys
[0290]					805					810					815	
[0291]	Pro	Ile	Ile	Pro	Pro	Gly	Ala	Cys	Cys	Pro	Leu	Cys	Ala	Gly	Met	Leu
[0292]				820						825					830	
[0293]	Arg	Val	Leu	Phe	Asp	Lys	Glu	Lys	Leu	Asp	Thr	Ile	Ala	Lys	Val	Thr
[0294]			835						840					845		
[0295]	Asn	Lys	Lys	Pro	Ile	Thr	Val	Leu	Glu	Ile	Leu	Gln	Lys	Ile	Arg	Met
[0296]			850					855					860			
[0297]	His	Val	Ser	Val	Pro	Gln	Cys	Asp	Val	Phe	Gly	Tyr	Phe	Ser	Ile	Glu
[0298]	865					870					875					880
[0299]	Ser	Glu	Ile	Val	Ile	Leu	Ile	Ile	Pro	Val	Asp	His	Tyr	Pro	Lys	Ala
[0300]					885					890					895	
[0301]	Leu	Gln	Ile	Glu	Ala	Cys	Asn	Lys	Glu	Ala	Glu	Lys	Ile	Glu	Ser	Leu
[0302]				900						905				910		
[0303]	Ile	Asn	Ser	Asp	Ser	Pro	Thr	Leu	Ala	Ser	His	Val	Pro	Leu	Ser	Ala
[0304]			915						920					925		
[0305]	Leu	Ile	Ile	Ser	Gln	Val	Gln	Val	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Ser	Ala	Gly
[0306]			930					935					940			
[0307]	Val	Arg	Ala	Arg	Pro	Ser	Cys	His	Ser	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ser	Leu
[0308]	945					950					955					960
[0309]	Gly	Leu	Ala	Leu	His	Leu	Leu	Trp	Thr	Tyr	Asn					
[0310]					965					970						
[0311]	<210> 3															

[0312]	<211>	1615
[0313]	<212>	PRT
[0314]	<213>	智人
[0315]	<400>	3
[0316]	Met Glu Ala Ala Pro Pro Gly Pro Pro Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu	
[0317]	1 5 10 15	
[0318]	Leu Leu Leu Leu Ala Leu Cys Gly Cys Pro Ala Pro Ala Ala Ala Ser	
[0319]	20 25 30	
[0320]	Pro Leu Leu Leu Phe Ala Asn Arg Arg Asp Val Arg Leu Val Asp Ala	
[0321]	35 40 45	
[0322]	Gly Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Ile Val Val Ser Gly Leu Glu Asp	
[0323]	50 55 60	
[0324]	Ala Ala Ala Val Asp Phe Gln Phe Ser Lys Gly Ala Val Tyr Trp Thr	
[0325]	65 70 75 80	
[0326]	Asp Val Ser Glu Glu Ala Ile Lys Gln Thr Tyr Leu Asn Gln Thr Gly	
[0327]	85 90 95	
[0328]	Ala Ala Val Gln Asn Val Val Ile Ser Gly Leu Val Ser Pro Asp Gly	
[0329]	100 105 110	
[0330]	Leu Ala Cys Asp Trp Val Gly Lys Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Ser Glu	
[0331]	115 120 125	
[0332]	Thr Asn Arg Ile Glu Val Ala Asn Leu Asn Gly Thr Ser Arg Lys Val	
[0333]	130 135 140	
[0334]	Leu Phe Trp Gln Asp Leu Asp Gln Pro Arg Ala Ile Ala Leu Asp Pro	
[0335]	145 150 155 160	
[0336]	Ala His Gly Tyr Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Glu Thr Pro Arg Ile	
[0337]	165 170 175	
[0338]	Glu Arg Ala Gly Met Asp Gly Ser Thr Arg Lys Ile Ile Val Asp Ser	
[0339]	180 185 190	
[0340]	Asp Ile Tyr Trp Pro Asn Gly Leu Thr Ile Asp Leu Glu Glu Gln Lys	
[0341]	195 200 205	
[0342]	Leu Tyr Trp Ala Asp Ala Lys Leu Ser Phe Ile His Arg Ala Asn Leu	
[0343]	210 215 220	
[0344]	Asp Gly Ser Phe Arg Gln Lys Val Val Glu Gly Ser Leu Thr His Pro	
[0345]	225 230 235 240	
[0346]	Phe Ala Leu Thr Leu Ser Gly Asp Thr Leu Tyr Trp Thr Asp Trp Gln	
[0347]	245 250 255	
[0348]	Thr Arg Ser Ile His Ala Cys Asn Lys Arg Thr Gly Gly Lys Arg Lys	
[0349]	260 265 270	
[0350]	Glu Ile Leu Ser Ala Leu Tyr Ser Pro Met Asp Ile Gln Val Leu Ser	

[0351]	275	280	285
[0352]	Gln Glu Arg Gln Pro Phe Phe His Thr Arg Cys Glu Glu Asp Asn Gly		
[0353]	290	295	300
[0354]	Gly Cys Ser His Leu Cys Leu Leu Ser Pro Ser Glu Pro Phe Tyr Thr		
[0355]	305	310	315
[0356]	Cys Ala Cys Pro Thr Gly Val Gln Leu Gln Asp Asn Gly Arg Thr Cys		
[0357]	325	330	335
[0358]	Lys Ala Gly Ala Glu Glu Val Leu Leu Leu Ala Arg Arg Thr Asp Leu		
[0359]	340	345	350
[0360]	Arg Arg Ile Ser Leu Asp Thr Pro Asp Phe Thr Asp Ile Val Leu Gln		
[0361]	355	360	365
[0362]	Val Asp Asp Ile Arg His Ala Ile Ala Ile Asp Tyr Asp Pro Leu Glu		
[0363]	370	375	380
[0364]	Gly Tyr Val Tyr Trp Thr Asp Asp Glu Val Arg Ala Ile Arg Arg Ala		
[0365]	385	390	395
[0366]	Tyr Leu Asp Gly Ser Gly Ala Gln Thr Leu Val Asn Thr Glu Ile Asn		
[0367]	405	410	415
[0368]	Asp Pro Asp Gly Ile Ala Val Asp Trp Val Ala Arg Asn Leu Tyr Trp		
[0369]	420	425	430
[0370]	Thr Asp Thr Gly Thr Asp Arg Ile Glu Val Thr Arg Leu Asn Gly Thr		
[0371]	435	440	445
[0372]	Ser Arg Lys Ile Leu Val Ser Glu Asp Leu Asp Glu Pro Arg Ala Ile		
[0373]	450	455	460
[0374]	Ala Leu His Pro Val Met Gly Leu Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Glu		
[0375]	465	470	475
[0376]	Asn Pro Lys Ile Glu Cys Ala Asn Leu Asp Gly Gln Glu Arg Arg Val		
[0377]	485	490	495
[0378]	Leu Val Asn Ala Ser Leu Gly Trp Pro Asn Gly Leu Ala Leu Asp Leu		
[0379]	500	505	510
[0380]	Gln Glu Gly Lys Leu Tyr Trp Gly Asp Ala Lys Thr Asp Lys Ile Glu		
[0381]	515	520	525
[0382]	Val Ile Asn Val Asp Gly Thr Lys Arg Arg Thr Leu Leu Glu Asp Lys		
[0383]	530	535	540
[0384]	Leu Pro His Ile Phe Gly Phe Thr Leu Leu Gly Asp Phe Ile Tyr Trp		
[0385]	545	550	555
[0386]	Thr Asp Trp Gln Arg Arg Ser Ile Glu Arg Val His Lys Val Lys Ala		
[0387]	565	570	575
[0388]	Ser Arg Asp Val Ile Ile Asp Gln Leu Pro Asp Leu Met Gly Leu Lys		
[0389]	580	585	590

[0390]	Ala	Val	Asn	Val	Ala	Lys	Val	Val	Gly	Thr	Asn	Pro	Cys	Ala	Asp	Arg
[0391]			595						600					605		
[0392]	Asn	Gly	Gly	Cys	Ser	His	Leu	Cys	Phe	Phe	Thr	Pro	His	Ala	Thr	Arg
[0393]		610						615					620			
[0394]	Cys	Gly	Cys	Pro	Ile	Gly	Leu	Glu	Leu	Leu	Ser	Asp	Met	Lys	Thr	Cys
[0395]	625						630					635				640
[0396]	Ile	Val	Pro	Glu	Ala	Phe	Leu	Val	Phe	Thr	Ser	Arg	Ala	Ala	Ile	His
[0397]					645					650					655	
[0398]	Arg	Ile	Ser	Leu	Glu	Thr	Asn	Asn	Asn	Asp	Val	Ala	Ile	Pro	Leu	Thr
[0399]				660					665					670		
[0400]	Gly	Val	Lys	Glu	Ala	Ser	Ala	Leu	Asp	Phe	Asp	Val	Ser	Asn	Asn	His
[0401]			675					680					685			
[0402]	Ile	Tyr	Trp	Thr	Asp	Val	Ser	Leu	Lys	Thr	Ile	Ser	Arg	Ala	Phe	Met
[0403]		690						695					700			
[0404]	Asn	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	His	Val	Val	Glu	Phe	Gly	Leu	Asp	Tyr	Pro
[0405]	705					710					715					720
[0406]	Glu	Gly	Met	Ala	Val	Asp	Trp	Met	Gly	Lys	Asn	Leu	Tyr	Trp	Ala	Asp
[0407]					725					730					735	
[0408]	Thr	Gly	Thr	Asn	Arg	Ile	Glu	Val	Ala	Arg	Leu	Asp	Gly	Gln	Phe	Arg
[0409]				740						745				750		
[0410]	Gln	Val	Leu	Val	Trp	Arg	Asp	Leu	Asp	Asn	Pro	Arg	Ser	Leu	Ala	Leu
[0411]			755					760						765		
[0412]	Asp	Pro	Thr	Lys	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Trp	Thr	Glu	Trp	Gly	Gly	Lys	Pro
[0413]		770					775						780			
[0414]	Arg	Ile	Val	Arg	Ala	Phe	Met	Asp	Gly	Thr	Asn	Cys	Met	Thr	Leu	Val
[0415]	785					790					795					800
[0416]	Asp	Lys	Val	Gly	Arg	Ala	Asn	Asp	Leu	Thr	Ile	Asp	Tyr	Ala	Asp	Gln
[0417]				805						810					815	
[0418]	Arg	Leu	Tyr	Trp	Thr	Asp	Leu	Asp	Thr	Asn	Met	Ile	Glu	Ser	Ser	Asn
[0419]				820						825				830		
[0420]	Met	Leu	Gly	Gln	Glu	Arg	Val	Val	Ile	Ala	Asp	Asp	Leu	Pro	His	Pro
[0421]			835						840				845			
[0422]	Phe	Gly	Leu	Thr	Gln	Tyr	Ser	Asp	Tyr	Ile	Tyr	Trp	Thr	Asp	Trp	Asn
[0423]		850						855					860			
[0424]	Leu	His	Ser	Ile	Glu	Arg	Ala	Asp	Lys	Thr	Ser	Gly	Arg	Asn	Arg	Thr
[0425]	865					870					875					880
[0426]	Leu	Ile	Gln	Gly	His	Leu	Asp	Phe	Val	Met	Asp	Ile	Leu	Val	Phe	His
[0427]					885					890					895	
[0428]	Ser	Ser	Arg	Gln	Asp	Gly	Leu	Asn	Asp	Cys	Met	His	Asn	Asn	Gly	Gln

[0429]	900	905	910
[0430]	Cys Gly Gln Leu Cys Leu Ala Ile Pro Gly Gly His Arg Cys Gly Cys		
[0431]	915	920	925
[0432]	Ala Ser His Tyr Thr Leu Asp Pro Ser Ser Arg Asn Cys Ser Pro Pro		
[0433]	930	935	940
[0434]	Thr Thr Phe Leu Leu Phe Ser Gln Lys Ser Ala Ile Ser Arg Met Ile		
[0435]	945	950	955
[0436]	Pro Asp Asp Gln His Ser Pro Asp Leu Ile Leu Pro Leu His Gly Leu		
[0437]	965	970	975
[0438]	Arg Asn Val Lys Ala Ile Asp Tyr Asp Pro Leu Asp Lys Phe Ile Tyr		
[0439]	980	985	990
[0440]	Trp Val Asp Gly Arg Gln Asn Ile Lys Arg Ala Lys Asp Asp Gly Thr		
[0441]	995	1000	1005
[0442]	Gln Pro Phe Val Leu Thr Ser Leu Ser Gln Gly Gln Asn Pro Asp		
[0443]	1010	1015	1020
[0444]	Arg Gln Pro His Asp Leu Ser Ile Asp Ile Tyr Ser Arg Thr Leu		
[0445]	1025	1030	1035
[0446]	Phe Trp Thr Cys Glu Ala Thr Asn Thr Ile Asn Val His Arg Leu		
[0447]	1040	1045	1050
[0448]	Ser Gly Glu Ala Met Gly Val Val Leu Arg Gly Asp Arg Asp Lys		
[0449]	1055	1060	1065
[0450]	Pro Arg Ala Ile Val Val Asn Ala Glu Arg Gly Tyr Leu Tyr Phe		
[0451]	1070	1075	1080
[0452]	Thr Asn Met Gln Asp Arg Ala Ala Lys Ile Glu Arg Ala Ala Leu		
[0453]	1085	1090	1095
[0454]	Asp Gly Thr Glu Arg Glu Val Leu Phe Thr Thr Gly Leu Ile Arg		
[0455]	1100	1105	1110
[0456]	Pro Val Ala Leu Val Val Asp Asn Thr Leu Gly Lys Leu Phe Trp		
[0457]	1115	1120	1125
[0458]	Val Asp Ala Asp Leu Lys Arg Ile Glu Ser Cys Asp Leu Ser Gly		
[0459]	1130	1135	1140
[0460]	Ala Asn Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ala Asn Ile Val Gln Pro Leu		
[0461]	1145	1150	1155
[0462]	Gly Leu Thr Ile Leu Gly Lys His Leu Tyr Trp Ile Asp Arg Gln		
[0463]	1160	1165	1170
[0464]	Gln Gln Met Ile Glu Arg Val Glu Lys Thr Thr Gly Asp Lys Arg		
[0465]	1175	1180	1185
[0466]	Thr Arg Ile Gln Gly Arg Val Ala His Leu Thr Gly Ile His Ala		
[0467]	1190	1195	1200

[0468]	Val	Glu	Glu	Val	Ser	Leu	Glu	Glu	Phe	Ser	Ala	His	Pro	Cys	Ala
[0469]	1205						1210					1215			
[0470]	Arg	Asp	Asn	Gly	Gly	Cys	Ser	His	Ile	Cys	Ile	Ala	Lys	Gly	Asp
[0471]	1220						1225					1230			
[0472]	Gly	Thr	Pro	Arg	Cys	Ser	Cys	Pro	Val	His	Leu	Val	Leu	Leu	Gln
[0473]	1235						1240					1245			
[0474]	Asn	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Glu	Pro	Pro	Thr	Cys	Ser	Pro	Asp	Gln
[0475]	1250						1255					1260			
[0476]	Phe	Ala	Cys	Ala	Thr	Gly	Glu	Ile	Asp	Cys	Ile	Pro	Gly	Ala	Trp
[0477]	1265						1270					1275			
[0478]	Arg	Cys	Asp	Gly	Phe	Pro	Glu	Cys	Asp	Asp	Gln	Ser	Asp	Glu	Glu
[0479]	1280						1285					1290			
[0480]	Gly	Cys	Pro	Val	Cys	Ser	Ala	Ala	Gln	Phe	Pro	Cys	Ala	Arg	Gly
[0481]	1295						1300					1305			
[0482]	Gln	Cys	Val	Asp	Leu	Arg	Leu	Arg	Cys	Asp	Gly	Glu	Ala	Asp	Cys
[0483]	1310						1315					1320			
[0484]	Gln	Asp	Arg	Ser	Asp	Glu	Ala	Asp	Cys	Asp	Ala	Ile	Cys	Leu	Pro
[0485]	1325						1330					1335			
[0486]	Asn	Gln	Phe	Arg	Cys	Ala	Ser	Gly	Gln	Cys	Val	Leu	Ile	Lys	Gln
[0487]	1340						1345					1350			
[0488]	Gln	Cys	Asp	Ser	Phe	Pro	Asp	Cys	Ile	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Leu
[0489]	1355						1360					1365			
[0490]	Met	Cys	Glu	Ile	Thr	Lys	Pro	Pro	Ser	Asp	Asp	Ser	Pro	Ala	His
[0491]	1370						1375					1380			
[0492]	Ser	Ser	Ala	Ile	Gly	Pro	Val	Ile	Gly	Ile	Ile	Leu	Ser	Leu	Phe
[0493]	1385						1390					1395			
[0494]	Val	Met	Gly	Gly	Val	Tyr	Phe	Val	Cys	Gln	Arg	Val	Val	Cys	Gln
[0495]	1400						1405					1410			
[0496]	Arg	Tyr	Ala	Gly	Ala	Asn	Gly	Pro	Phe	Pro	His	Glu	Tyr	Val	Ser
[0497]	1415						1420					1425			
[0498]	Gly	Thr	Pro	His	Val	Pro	Leu	Asn	Phe	Ile	Ala	Pro	Gly	Gly	Ser
[0499]	1430						1435					1440			
[0500]	Gln	His	Gly	Pro	Phe	Thr	Gly	Ile	Ala	Cys	Gly	Lys	Ser	Met	Met
[0501]	1445						1450					1455			
[0502]	Ser	Ser	Val	Ser	Leu	Met	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly	Val	Pro	Leu	Tyr
[0503]	1460						1465					1470			
[0504]	Asp	Arg	Asn	His	Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
[0505]	1475						1480					1485			
[0506]	Thr	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Pro	Pro	Ile	Leu	Asn	Pro	Pro	Pro	Ser

[0507]	1490	1495	1500
[0508]	Pro Ala Thr Asp Pro Ser Leu Tyr Asn Met Asp Met Phe Tyr Ser		
[0509]	1505	1510	1515
[0510]	Ser Asn Ile Pro Ala Thr Ala Arg Pro Tyr Arg Pro Tyr Ile Ile		
[0511]	1520	1525	1530
[0512]	Arg Gly Met Ala Pro Pro Thr Thr Pro Cys Ser Thr Asp Val Cys		
[0513]	1535	1540	1545
[0514]	Asp Ser Asp Tyr Ser Ala Ser Arg Trp Lys Ala Ser Lys Tyr Tyr		
[0515]	1550	1555	1560
[0516]	Leu Asp Leu Asn Ser Asp Ser Asp Pro Tyr Pro Pro Pro Pro Thr		
[0517]	1565	1570	1575
[0518]	Pro His Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Glu Asp Ser Cys Pro Pro Ser		
[0519]	1580	1585	1590
[0520]	Pro Ala Thr Glu Arg Ser Tyr Phe His Leu Phe Pro Pro Pro Pro		
[0521]	1595	1600	1605
[0522]	Ser Pro Cys Thr Asp Ser Ser		
[0523]	1610	1615	
[0524]	<210> 4		
[0525]	<211> 1613		
[0526]	<212> PRT		
[0527]	<213> 智人		
[0528]	<400> 4		
[0529]	Met Gly Ala Val Leu Arg Ser Leu Leu Ala Cys Ser Phe Cys Val Leu		
[0530]	1 5 10 15		
[0531]	Leu Arg Ala Ala Pro Leu Leu Leu Tyr Ala Asn Arg Arg Asp Leu Arg		
[0532]	20 25 30		
[0533]	Leu Val Asp Ala Thr Asn Gly Lys Glu Asn Ala Thr Ile Val Val Gly		
[0534]	35 40 45		
[0535]	Gly Leu Glu Asp Ala Ala Ala Val Asp Phe Val Phe Ser His Gly Leu		
[0536]	50 55 60		
[0537]	Ile Tyr Trp Ser Asp Val Ser Glu Glu Ala Ile Lys Arg Thr Glu Phe		
[0538]	65 70 75 80		
[0539]	Asn Lys Thr Glu Ser Val Gln Asn Val Val Val Ser Gly Leu Leu Ser		
[0540]	85 90 95		
[0541]	Pro Asp Gly Leu Ala Cys Asp Trp Leu Gly Glu Lys Leu Tyr Trp Thr		
[0542]	100 105 110		
[0543]	Asp Ser Glu Thr Asn Arg Ile Glu Val Ser Asn Leu Asp Gly Ser Leu		
[0544]	115 120 125		
[0545]	Arg Lys Val Leu Phe Trp Gln Glu Leu Asp Gln Pro Arg Ala Ile Ala		

[0546]	130	135	140
[0547]	Leu Asp Pro Ser Ser Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Glu Val		
[0548]	145	150	155
[0549]	Pro Lys Ile Glu Arg Ala Gly Met Asp Gly Ser Ser Arg Phe Ile Ile		
[0550]	165	170	175
[0551]	Ile Asn Ser Glu Ile Tyr Trp Pro Asn Gly Leu Thr Leu Asp Tyr Glu		
[0552]	180	185	190
[0553]	Glu Gln Lys Leu Tyr Trp Ala Asp Ala Lys Leu Asn Phe Ile His Lys		
[0554]	195	200	205
[0555]	Ser Asn Leu Asp Gly Thr Asn Arg Gln Ala Val Val Lys Gly Ser Leu		
[0556]	210	215	220
[0557]	Pro His Pro Phe Ala Leu Thr Leu Phe Glu Asp Ile Leu Tyr Trp Thr		
[0558]	225	230	235
[0559]	Asp Trp Ser Thr His Ser Ile Leu Ala Cys Asn Lys Tyr Thr Gly Glu		
[0560]	245	250	255
[0561]	Gly Leu Arg Glu Ile His Ser Asp Ile Phe Ser Pro Met Asp Ile His		
[0562]	260	265	270
[0563]	Ala Phe Ser Gln Gln Arg Gln Pro Asn Ala Thr Asn Pro Cys Gly Ile		
[0564]	275	280	285
[0565]	Asp Asn Gly Gly Cys Ser His Leu Cys Leu Met Ser Pro Val Lys Pro		
[0566]	290	295	300
[0567]	Phe Tyr Gln Cys Ala Cys Pro Thr Gly Val Lys Leu Leu Glu Asn Gly		
[0568]	305	310	315
[0569]	Lys Thr Cys Lys Asp Gly Ala Thr Glu Leu Leu Leu Leu Ala Arg Arg		
[0570]	325	330	335
[0571]	Thr Asp Leu Arg Arg Ile Ser Leu Asp Thr Pro Asp Phe Thr Asp Ile		
[0572]	340	345	350
[0573]	Val Leu Gln Leu Glu Asp Ile Arg His Ala Ile Ala Ile Asp Tyr Asp		
[0574]	355	360	365
[0575]	Pro Val Glu Gly Tyr Ile Tyr Trp Thr Asp Asp Glu Val Arg Ala Ile		
[0576]	370	375	380
[0577]	Arg Arg Ser Phe Ile Asp Gly Ser Gly Ser Gln Phe Val Val Thr Ala		
[0578]	385	390	395
[0579]	Gln Ile Ala His Pro Asp Gly Ile Ala Val Asp Trp Val Ala Arg Asn		
[0580]	405	410	415
[0581]	Leu Tyr Trp Thr Asp Thr Gly Thr Asp Arg Ile Glu Val Thr Arg Leu		
[0582]	420	425	430
[0583]	Asn Gly Thr Met Arg Lys Ile Leu Ile Ser Glu Asp Leu Glu Glu Pro		
[0584]	435	440	445

[0585]	Arg	Ala	Ile	Val	Leu	Asp	Pro	Met	Val	Gly	Tyr	Met	Tyr	Trp	Thr	Asp
[0586]	450							455					460			
[0587]	Trp	Gly	Glu	Ile	Pro	Lys	Ile	Glu	Arg	Ala	Ala	Leu	Asp	Gly	Ser	Asp
[0588]	465						470					475				480
[0589]	Arg	Val	Val	Leu	Val	Asn	Thr	Ser	Leu	Gly	Trp	Pro	Asn	Gly	Leu	Ala
[0590]						485					490					495
[0591]	Leu	Asp	Tyr	Asp	Glu	Gly	Lys	Ile	Tyr	Trp	Gly	Asp	Ala	Lys	Thr	Asp
[0592]						500					505				510	
[0593]	Lys	Ile	Glu	Val	Met	Asn	Thr	Asp	Gly	Thr	Gly	Arg	Arg	Val	Leu	Val
[0594]						515					520				525	
[0595]	Glu	Asp	Lys	Ile	Pro	His	Ile	Phe	Gly	Phe	Thr	Leu	Leu	Gly	Asp	Tyr
[0596]						530					535				540	
[0597]	Val	Tyr	Trp	Thr	Asp	Trp	Gln	Arg	Arg	Ser	Ile	Glu	Arg	Val	His	Lys
[0598]	545						550					555				560
[0599]	Arg	Ser	Ala	Glu	Arg	Glu	Val	Ile	Ile	Asp	Gln	Leu	Pro	Asp	Leu	Met
[0600]						565					570					575
[0601]	Gly	Leu	Lys	Ala	Thr	Asn	Val	His	Arg	Val	Ile	Gly	Ser	Asn	Pro	Cys
[0602]						580					585				590	
[0603]	Ala	Glu	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Ser	His	Leu	Cys	Leu	Tyr	Arg	Pro	Gln
[0604]						595					600				605	
[0605]	Gly	Leu	Arg	Cys	Ala	Cys	Pro	Ile	Gly	Phe	Glu	Leu	Ile	Ser	Asp	Met
[0606]						610					615				620	
[0607]	Lys	Thr	Cys	Ile	Val	Pro	Glu	Ala	Phe	Leu	Leu	Phe	Ser	Arg	Arg	Ala
[0608]	625						630					635				640
[0609]	Asp	Ile	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Glu	Thr	Asn	Asn	Asn	Asn	Val	Ala	Ile
[0610]						645					650					655
[0611]	Pro	Leu	Thr	Gly	Val	Lys	Glu	Ala	Ser	Ala	Leu	Asp	Phe	Asp	Val	Thr
[0612]						660					665				670	
[0613]	Asp	Asn	Arg	Ile	Tyr	Trp	Thr	Asp	Ile	Ser	Leu	Lys	Thr	Ile	Ser	Arg
[0614]						675					680				685	
[0615]	Ala	Phe	Met	Asn	Gly	Ser	Ala	Leu	Glu	His	Val	Val	Glu	Phe	Gly	Leu
[0616]						690					695				700	
[0617]	Asp	Tyr	Pro	Glu	Gly	Met	Ala	Val	Asp	Trp	Leu	Gly	Lys	Asn	Leu	Tyr
[0618]	705						710					715				720
[0619]	Trp	Ala	Asp	Thr	Gly	Thr	Asn	Arg	Ile	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Gly
[0620]						725					730					735
[0621]	Gln	His	Arg	Gln	Val	Leu	Val	Trp	Lys	Asp	Leu	Asp	Ser	Pro	Arg	Ala
[0622]						740					745				750	
[0623]	Leu	Ala	Leu	Asp	Pro	Ala	Glu	Gly	Phe	Met	Tyr	Trp	Thr	Glu	Trp	Gly

[0624]	755	760	765
[0625]	Gly Lys Pro Lys Ile Asp Arg Ala Ala Met Asp Gly Ser Glu Arg Thr		
[0626]	770	775	780
[0627]	Thr Leu Val Pro Asn Val Gly Arg Ala Asn Gly Leu Thr Ile Asp Tyr		
[0628]	785	790	795
[0629]	Ala Lys Arg Arg Leu Tyr Trp Thr Asp Leu Asp Thr Asn Leu Ile Glu		
[0630]	805	810	815
[0631]	Ser Ser Asn Met Leu Gly Leu Asn Arg Glu Val Ile Ala Asp Asp Leu		
[0632]	820	825	830
[0633]	Pro His Pro Phe Gly Leu Thr Gln Tyr Gln Asp Tyr Ile Tyr Trp Thr		
[0634]	835	840	845
[0635]	Asp Trp Ser Arg Arg Ser Ile Glu Arg Ala Asn Lys Thr Ser Gly Gln		
[0636]	850	855	860
[0637]	Asn Arg Thr Ile Ile Gln Gly His Leu Asp Tyr Val Met Asp Ile Leu		
[0638]	865	870	875
[0639]	Val Phe His Ser Ser Arg Gln Ser Gly Trp Asn Glu Cys Ala Ser Ser		
[0640]	885	890	895
[0641]	Asn Gly His Cys Ser His Leu Cys Leu Ala Val Pro Val Gly Gly Phe		
[0642]	900	905	910
[0643]	Val Cys Gly Cys Pro Ala His Tyr Ser Leu Asn Ala Asp Asn Arg Thr		
[0644]	915	920	925
[0645]	Cys Ser Ala Pro Thr Thr Phe Leu Leu Phe Ser Gln Lys Ser Ala Ile		
[0646]	930	935	940
[0647]	Asn Arg Met Val Ile Asp Glu Gln Gln Ser Pro Asp Ile Ile Leu Pro		
[0648]	945	950	955
[0649]	Ile His Ser Leu Arg Asn Val Arg Ala Ile Asp Tyr Asp Pro Leu Asp		
[0650]	965	970	975
[0651]	Lys Gln Leu Tyr Trp Ile Asp Ser Arg Gln Asn Met Ile Arg Lys Ala		
[0652]	980	985	990
[0653]	Gln Glu Asp Gly Ser Gln Gly Phe Thr Val Val Val Ser Ser Val Pro		
[0654]	995	1000	1005
[0655]	Ser Gln Asn Leu Glu Ile Gln Pro Tyr Asp Leu Ser Ile Asp Ile		
[0656]	1010	1015	1020
[0657]	Tyr Ser Arg Tyr Ile Tyr Trp Thr Cys Glu Ala Thr Asn Val Ile		
[0658]	1025	1030	1035
[0659]	Asn Val Thr Arg Leu Asp Gly Arg Ser Val Gly Val Val Leu Lys		
[0660]	1040	1045	1050
[0661]	Gly Glu Gln Asp Arg Pro Arg Ala Val Val Val Asn Pro Glu Lys		
[0662]	1055	1060	1065

[0663]	Gly Tyr Met Tyr Phe Thr Asn Leu Gln Glu Arg Ser Pro Lys Ile
[0664]	1070 1075 1080
[0665]	Glu Arg Ala Ala Leu Asp Gly Thr Glu Arg Glu Val Leu Phe Phe
[0666]	1085 1090 1095
[0667]	Ser Gly Leu Ser Lys Pro Ile Ala Leu Ala Leu Asp Ser Arg Leu
[0668]	1100 1105 1110
[0669]	Gly Lys Leu Phe Trp Ala Asp Ser Asp Leu Arg Arg Ile Glu Ser
[0670]	1115 1120 1125
[0671]	Ser Asp Leu Ser Gly Ala Asn Arg Ile Val Leu Glu Asp Ser Asn
[0672]	1130 1135 1140
[0673]	Ile Leu Gln Pro Val Gly Leu Thr Val Phe Glu Asn Trp Leu Tyr
[0674]	1145 1150 1155
[0675]	Trp Ile Asp Lys Gln Gln Gln Met Ile Glu Lys Ile Asp Met Thr
[0676]	1160 1165 1170
[0677]	Gly Arg Glu Gly Arg Thr Lys Val Gln Ala Arg Ile Ala Gln Leu
[0678]	1175 1180 1185
[0679]	Ser Asp Ile His Ala Val Lys Glu Leu Asn Leu Gln Glu Tyr Arg
[0680]	1190 1195 1200
[0681]	Gln His Pro Cys Ala Gln Asp Asn Gly Gly Cys Ser His Ile Cys
[0682]	1205 1210 1215
[0683]	Leu Val Lys Gly Asp Gly Thr Thr Arg Cys Ser Cys Pro Met His
[0684]	1220 1225 1230
[0685]	Leu Val Leu Leu Gln Asp Glu Leu Ser Cys Gly Glu Pro Pro Thr
[0686]	1235 1240 1245
[0687]	Cys Ser Pro Gln Gln Phe Thr Cys Phe Thr Gly Glu Ile Asp Cys
[0688]	1250 1255 1260
[0689]	Ile Pro Val Ala Trp Arg Cys Asp Gly Phe Thr Glu Cys Glu Asp
[0690]	1265 1270 1275
[0691]	His Ser Asp Glu Leu Asn Cys Pro Val Cys Ser Glu Ser Gln Phe
[0692]	1280 1285 1290
[0693]	Gln Cys Ala Ser Gly Gln Cys Ile Asp Gly Ala Leu Arg Cys Asn
[0694]	1295 1300 1305
[0695]	Gly Asp Ala Asn Cys Gln Asp Lys Ser Asp Glu Lys Asn Cys Glu
[0696]	1310 1315 1320
[0697]	Val Leu Cys Leu Ile Asp Gln Phe Arg Cys Ala Asn Gly Gln Cys
[0698]	1325 1330 1335
[0699]	Ile Gly Lys His Lys Lys Cys Asp His Asn Val Asp Cys Ser Asp
[0700]	1340 1345 1350
[0701]	Lys Ser Asp Glu Leu Asp Cys Tyr Pro Thr Glu Glu Pro Ala Pro

[0702]	1355	1360	1365
[0703]	Gln Ala Thr Asn Thr Val Gly Ser Val Ile Gly Val Ile Val Thr		
[0704]	1370	1375	1380
[0705]	Ile Phe Val Ser Gly Thr Val Tyr Phe Ile Cys Gln Arg Met Leu		
[0706]	1385	1390	1395
[0707]	Cys Pro Arg Met Lys Gly Asp Gly Glu Thr Met Thr Asn Asp Tyr		
[0708]	1400	1405	1410
[0709]	Val Val His Gly Pro Ala Ser Val Pro Leu Gly Tyr Val Pro His		
[0710]	1415	1420	1425
[0711]	Pro Ser Ser Leu Ser Gly Ser Leu Pro Gly Met Ser Arg Gly Lys		
[0712]	1430	1435	1440
[0713]	Ser Met Ile Ser Ser Leu Ser Ile Met Gly Gly Ser Ser Gly Pro		
[0714]	1445	1450	1455
[0715]	Pro Tyr Asp Arg Ala His Val Thr Gly Ala Ser Ser Ser Ser Ser		
[0716]	1460	1465	1470
[0717]	Ser Ser Thr Lys Gly Thr Tyr Phe Pro Ala Ile Leu Asn Pro Pro		
[0718]	1475	1480	1485
[0719]	Pro Ser Pro Ala Thr Glu Arg Ser His Tyr Thr Met Glu Phe Gly		
[0720]	1490	1495	1500
[0721]	Tyr Ser Ser Asn Ser Pro Ser Thr His Arg Ser Tyr Ser Tyr Arg		
[0722]	1505	1510	1515
[0723]	Pro Tyr Ser Tyr Arg His Phe Ala Pro Pro Thr Thr Pro Cys Ser		
[0724]	1520	1525	1530
[0725]	Thr Asp Val Cys Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Ser Arg Arg Met Thr		
[0726]	1535	1540	1545
[0727]	Ser Val Ala Thr Ala Lys Gly Tyr Thr Ser Asp Leu Asn Tyr Asp		
[0728]	1550	1555	1560
[0729]	Ser Glu Pro Val Pro Pro Pro Pro Thr Pro Arg Ser Gln Tyr Leu		
[0730]	1565	1570	1575
[0731]	Ser Ala Glu Glu Asn Tyr Glu Ser Cys Pro Pro Ser Pro Tyr Thr		
[0732]	1580	1585	1590
[0733]	Glu Arg Ser Tyr Ser His His Leu Tyr Pro Pro Pro Pro Ser Pro		
[0734]	1595	1600	1605
[0735]	Cys Thr Asp Ser Ser		
[0736]	1610		
[0737]	<210> 5		
[0738]	<211> 48		
[0739]	<212> PRT		
[0740]	<213> 智人		

[0741]	<400> 5
[0742]	Cys Cys Asp Arg Ala Glu Asp His Ala Cys Gln Asn Ala Cys Lys Arg
[0743]	1 5 10 15
[0744]	Ile Leu Met Ser Lys Lys Thr Glu Met Glu Ile Val Asp Gly Leu Ile
[0745]	20 25 30
[0746]	Glu Gly Cys Lys Thr Gln Pro Leu Pro Gln Asp Pro Leu Trp Gln Cys
[0747]	35 40 45
[0748]	<210> 6
[0749]	<211> 47
[0750]	<212> PRT
[0751]	<213> 智人
[0752]	<400> 6
[0753]	Cys Cys Ser Lys Ala Asn Thr Ser Thr Cys Arg Glu Leu Cys Thr Lys
[0754]	1 5 10 15
[0755]	Leu Tyr Ser Met Ser Trp Gly Asn Thr Gln Ser Trp Gln Glu Phe Asp
[0756]	20 25 30
[0757]	Arg Phe Cys Glu Tyr Asn Pro Val Glu Val Ser Met Leu Thr Cys
[0758]	35 40 45
[0759]	<210> 7
[0760]	<211> 6
[0761]	<212> PRT
[0762]	<213> 人工序列
[0763]	<220>
[0764]	<223> Frizzled受体的片段
[0765]	<220>
[0766]	<221> 位点
[0767]	<222> (3) .. (5)
[0768]	<223> 任意氨基酸
[0769]	<400> 7
[0770]	Lys Thr Xaa Xaa Xaa Trp
[0771]	1 5
[0772]	<210> 8
[0773]	<211> 4
[0774]	<212> PRT
[0775]	<213> 人工序列
[0776]	<220>
[0777]	<223> LRP重复结构域
[0778]	<400> 8
[0779]	Tyr Trp Thr Asp

[0780]	1
[0781]	<210> 9
[0782]	<211> 4
[0783]	<212> PRT
[0784]	<213> 人工序列
[0785]	<220>
[0786]	<223> LRP基序
[0787]	<220>
[0788]	<221> 位点
[0789]	<222> (3) .. (3)
[0790]	<223> 任意氨基酸
[0791]	<400> 9
[0792]	Asn Pro Xaa Tyr
[0793]	1
[0794]	<210> 10
[0795]	<211> 5
[0796]	<212> PRT
[0797]	<213> 人工序列
[0798]	<220>
[0799]	<223> LRP基序
[0800]	<400> 10
[0801]	Pro Pro Pro Ser Pro
[0802]	1 5
[0803]	<210> 11
[0804]	<211> 16
[0805]	<212> PRT
[0806]	<213> 人工序列
[0807]	<220>
[0808]	<223> Frizzled结合结构域
[0809]	<220>
[0810]	<221> 位点
[0811]	<222> (1) .. (1)
[0812]	<223> 任意氨基酸
[0813]	<220>
[0814]	<221> 位点
[0815]	<222> (3) .. (6)
[0816]	<223> 任意氨基酸
[0817]	<220>
[0818]	<221> 位点

[0819]	<222> (9) .. (15)
[0820]	<223> 任意氨基酸
[0821]	<400> 11
[0822]	Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp
[0823]	1 5 10 15
[0824]	<210> 12
[0825]	<211> 16
[0826]	<212> PRT
[0827]	<213> 智人
[0828]	<400> 12
[0829]	Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp
[0830]	1 5 10 15
[0831]	<210> 13
[0832]	<211> 5
[0833]	<212> PRT
[0834]	<213> 人工序列
[0835]	<220>
[0836]	<223> Frizzled结合结构域
[0837]	<220>
[0838]	<221> 位点
[0839]	<222> (2) .. (2)
[0840]	<223> 任意氨基酸
[0841]	<220>
[0842]	<221> 位点
[0843]	<222> (4) .. (4)
[0844]	<223> 任意氨基酸
[0845]	<400> 13
[0846]	Trp Xaa Cys Xaa Val
[0847]	1 5
[0848]	<210> 14
[0849]	<211> 89
[0850]	<212> PRT
[0851]	<213> 智人
[0852]	<400> 14
[0853]	Met Tyr His Thr Lys Gly Gln Glu Gly Ser Val Cys Leu Arg Ser Ser
[0854]	1 5 10 15
[0855]	Asp Cys Ala Ser Gly Leu Cys Cys Ala Arg His Phe Trp Ser Lys Ile
[0856]	20 25 30
[0857]	Cys Lys Pro Val Leu Lys Glu Gly Gln Val Cys Thr Lys His Arg Arg

[0858]	35	40	45
[0859]	Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe Gln Arg Cys Tyr Cys Gly Glu		
[0860]	50	55	60
[0861]	Gly Leu Ser Cys Arg Ile Gln Lys Asp His His Gln Ala Ser Asn Ser		
[0862]	65	70	75
[0863]	Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His		80
[0864]	85		
[0865]	<210> 15		
[0866]	<211> 349		
[0867]	<212> PRT		
[0868]	<213> 智人		
[0869]	<400> 15		
[0870]	Met Asn Arg Lys Ala Arg Arg Cys Leu Gly His Leu Phe Leu Ser Leu		
[0871]	1	5	10
[0872]	Gly Met Val Tyr Leu Arg Ile Gly Gly Phe Ser Ser Val Val Ala Leu		15
[0873]	20	25	30
[0874]	Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg Gln		
[0875]	35	40	45
[0876]	Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly Glu		
[0877]	50	55	60
[0878]	Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn Gly		
[0879]	65	70	75
[0880]	Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys Glu		80
[0881]	85	90	95
[0882]	Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile Ala		
[0883]	100	105	110
[0884]	Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn Leu		
[0885]	115	120	125
[0886]	Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg Asp		
[0887]	130	135	140
[0888]	Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly Ile		
[0889]	145	150	155
[0890]	Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn Ala		160
[0891]	165	170	175
[0892]	Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile Leu		
[0893]	180	185	190
[0894]	Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly Ser		
[0895]	195	200	205
[0896]	Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu Leu		

[0897]	210	215	220
[0898]	Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu Pro		
[0899]	225	230	235 240
[0900]	Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys Lys		
[0901]	245	250	255
[0902]	Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile Glu		
[0903]	260	265	270
[0904]	Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val Gly		
[0905]	275	280	285
[0906]	Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly Cys		
[0907]	290	295	300
[0908]	Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala Arg		
[0909]	305	310	315 320
[0910]	Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys		
[0911]	325	330	335
[0912]	Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys		
[0913]	340	345	
[0914]	<210> 16		
[0915]	<211> 349		
[0916]	<212> PRT		
[0917]	<213> 智人		
[0918]	<400> 16		
[0919]	Met His Arg Asn Phe Arg Lys Trp Ile Phe Tyr Val Phe Leu Cys Phe		
[0920]	1	5	10 15
[0921]	Gly Val Leu Tyr Val Lys Leu Gly Ala Leu Ser Ser Val Val Ala Leu		
[0922]	20	25	30
[0923]	Gly Ala Asn Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg Gln		
[0924]	35	40	45
[0925]	Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly Glu		
[0926]	50	55	60
[0927]	Gly Ala Gln Met Gly Ile Asn Glu Cys Gln Tyr Gln Phe Arg Phe Gly		
[0928]	65	70	75 80
[0929]	Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Lys Thr Val Phe Gly Gln Glu		
[0930]	85	90	95
[0931]	Leu Arg Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Thr Ala		
[0932]	100	105	110
[0933]	Ala Gly Val Ala His Ala Val Thr Ala Ala Cys Ser Gln Gly Asn Leu		
[0934]	115	120	125
[0935]	Ser Asn Cys Gly Cys Asp Arg Glu Lys Gln Gly Tyr Tyr Asn Gln Ala		

[0936]	130	135	140
[0937]	Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Val Arg Tyr Gly Ile		
[0938]	145	150	155
[0939]	Asp Phe Ser Arg Arg Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Lys Asn Ala		
[0940]	165	170	175
[0941]	Arg Arg Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Val Leu		
[0942]	180	185	190
[0943]	Glu Asp Arg Met Gln Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly Ser		
[0944]	195	200	205
[0945]	Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Lys Phe Arg Glu Val		
[0946]	210	215	220
[0947]	Gly His Leu Leu Lys Glu Lys Tyr Asn Ala Ala Val Gln Val Glu Val		
[0948]	225	230	235
[0949]	Val Arg Ala Ser Arg Leu Arg Gln Pro Thr Phe Leu Arg Ile Lys Gln		
[0950]	245	250	255
[0951]	Leu Arg Ser Tyr Gln Lys Pro Met Glu Thr Asp Leu Val Tyr Ile Glu		
[0952]	260	265	270
[0953]	Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Ala Ala Thr Gly Ser Val Gly		
[0954]	275	280	285
[0955]	Thr Gln Gly Arg Leu Cys Asn Arg Thr Ser Pro Gly Ala Asp Gly Cys		
[0956]	290	295	300
[0957]	Asp Thr Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Thr Lys		
[0958]	305	310	315
[0959]	Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Phe Val Lys Cys		
[0960]	325	330	335
[0961]	Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Val Phe Thr Cys Lys		
[0962]	340	345	
[0963]	<210> 17		
[0964]	<211> 42		
[0965]	<212> PRT		
[0966]	<213> 智人		
[0967]	<400> 17		
[0968]	His Val Glu Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu		
[0969]	1	5	10
[0970]	Lys Ile Lys Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu		
[0971]	20	25	30
[0972]	Val Tyr Ile Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys		
[0973]	35	40	
[0974]	<210> 18		

[0975]	<211>	29
[0976]	<212>	PRT
[0977]	<213>	智人
[0978]	<400>	18
[0979]	Val Glu Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys	
[0980]	1	5 10 15
[0981]	Ile Lys Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr	
[0982]	20	25
[0983]	<210>	19
[0984]	<211>	29
[0985]	<212>	PRT
[0986]	<213>	智人
[0987]	<400>	19
[0988]	Val Glu Val Val Arg Ala Ser Arg Leu Arg Gln Pro Thr Phe Leu Arg	
[0989]	1	5 10 15
[0990]	Ile Lys Gln Leu Arg Ser Tyr Gln Lys Pro Met Glu Thr	
[0991]	20	25
[0992]	<210>	20
[0993]	<211>	29
[0994]	<212>	PRT
[0995]	<213>	人工序列
[0996]	<220>	
[0997]	<223>	RECK结合结构域
[0998]	<220>	
[0999]	<221>	位点
[1000]	<222>	(1) .. (3)
[1001]	<223>	任意氨基酸
[1002]	<220>	
[1003]	<221>	位点
[1004]	<222>	(5) .. (5)
[1005]	<223>	任意氨基酸
[1006]	<220>	
[1007]	<221>	位点
[1008]	<222>	(7) .. (7)
[1009]	<223>	任意氨基酸
[1010]	<220>	
[1011]	<221>	位点
[1012]	<222>	(9) .. (13)
[1013]	<223>	任意氨基酸

[1014]	<220>
[1015]	<221> 位点
[1016]	<222> (16) .. (16)
[1017]	<223> 任意氨基酸
[1018]	<220>
[1019]	<221> 位点
[1020]	<222> (18) .. (22)
[1021]	<223> 任意氨基酸
[1022]	<220>
[1023]	<221> 位点
[1024]	<222> (24) .. (24)
[1025]	<223> 任意氨基酸
[1026]	<220>
[1027]	<221> 位点
[1028]	<222> (26) .. (29)
[1029]	<223> 任意氨基酸
[1030]	<400> 20
[1031]	Xaa Xaa Xaa Val Xaa Ala Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Leu Xaa
[1032]	1 5 10 15
[1033]	Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa
[1034]	20 25
[1035]	<210> 21
[1036]	<211> 22
[1037]	<212> PRT
[1038]	<213> 人工序列
[1039]	<220>
[1040]	<223> RECK结合结构域
[1041]	<220>
[1042]	<221> 位点
[1043]	<222> (2) .. (2)
[1044]	<223> 任意氨基酸
[1045]	<220>
[1046]	<221> 位点
[1047]	<222> (4) .. (4)
[1048]	<223> 任意氨基酸
[1049]	<220>
[1050]	<221> 位点
[1051]	<222> (6) .. (10)
[1052]	<223> 任意氨基酸

[1053]	<220>
[1054]	<221> 位点
[1055]	<222> (13) .. (13)
[1056]	<223> 任意氨基酸
[1057]	<220>
[1058]	<221> 位点
[1059]	<222> (15) .. (19)
[1060]	<223> 任意氨基酸
[1061]	<220>
[1062]	<221> 位点
[1063]	<222> (21) .. (21)
[1064]	<223> 任意氨基酸
[1065]	<400> 21
[1066]	Val Xaa Ala Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Leu Xaa Ile Xaa Xaa
[1067]	1 5 10 15
[1068]	Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Lys
[1069]	20
[1070]	<210> 22
[1071]	<211> 29
[1072]	<212> PRT
[1073]	<213> 人工序列
[1074]	<220>
[1075]	<223> RECK结合结构域
[1076]	<220>
[1077]	<221> 位点
[1078]	<222> (1) .. (3)
[1079]	<223> 任意氨基酸
[1080]	<220>
[1081]	<221> 位点
[1082]	<222> (5) .. (5)
[1083]	<223> 任意氨基酸
[1084]	<220>
[1085]	<221> 位点
[1086]	<222> (7) .. (7)
[1087]	<223> 任意氨基酸
[1088]	<220>
[1089]	<221> 位点
[1090]	<222> (9) .. (13)
[1091]	<223> 任意氨基酸

[1092]	<220>
[1093]	<221> 位点
[1094]	<222> (16) .. (24)
[1095]	<223> 任意氨基酸
[1096]	<220>
[1097]	<221> 位点
[1098]	<222> (26) .. (29)
[1099]	<223> 任意氨基酸
[1100]	<400> 22
[1101]	Xaa Xaa Xaa Val Xaa Ala Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Leu Xaa
[1102]	1 5 10 15
[1103]	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa
[1104]	20 25
[1105]	<210> 23
[1106]	<211> 22
[1107]	<212> PRT
[1108]	<213> 人工序列
[1109]	<220>
[1110]	<223> RECK结合结构域
[1111]	<220>
[1112]	<221> 位点
[1113]	<222> (2) .. (2)
[1114]	<223> 任意氨基酸
[1115]	<220>
[1116]	<221> 位点
[1117]	<222> (4) .. (4)
[1118]	<223> 任意氨基酸
[1119]	<220>
[1120]	<221> 位点
[1121]	<222> (6) .. (10)
[1122]	<223> 任意氨基酸
[1123]	<220>
[1124]	<221> 位点
[1125]	<222> (13) .. (21)
[1126]	<223> 任意氨基酸
[1127]	<400> 23
[1128]	Val Xaa Ala Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Leu Xaa Xaa Xaa Xaa
[1129]	1 5 10 15
[1130]	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys

[1170]	245
[1171]	<210> 25
[1172]	<211> 247
[1173]	<212> PRT
[1174]	<213> 人工序列
[1175]	<220>
[1176]	<223> 人Wnt7b多肽的N端结构域(NTD)
[1177]	<400> 25
[1178]	Leu Gly Ala Asn Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg
[1179]	1 5 10 15
[1180]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly
[1181]	20 25 30
[1182]	Glu Gly Ala Gln Met Gly Ile Asn Glu Cys Gln Tyr Gln Phe Arg Phe
[1183]	35 40 45
[1184]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Lys Thr Val Phe Gly Gln
[1185]	50 55 60
[1186]	Glu Leu Arg Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Thr
[1187]	65 70 75 80
[1188]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Val Thr Ala Ala Cys Ser Gln Gly Asn
[1189]	85 90 95
[1190]	Leu Ser Asn Cys Gly Cys Asp Arg Glu Lys Gln Gly Tyr Tyr Asn Gln
[1191]	100 105 110
[1192]	Ala Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Val Arg Tyr Gly
[1193]	115 120 125
[1194]	Ile Asp Phe Ser Arg Arg Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Lys Asn
[1195]	130 135 140
[1196]	Ala Arg Arg Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Val
[1197]	145 150 155 160
[1198]	Leu Glu Asp Arg Met Gln Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly
[1199]	165 170 175
[1200]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Lys Phe Arg Glu
[1201]	180 185 190
[1202]	Val Gly His Leu Leu Lys Glu Lys Tyr Asn Ala Ala Val Gln Val Glu
[1203]	195 200 205
[1204]	Val Val Arg Ala Ser Arg Leu Arg Gln Pro Thr Phe Leu Arg Ile Lys
[1205]	210 215 220
[1206]	Gln Leu Arg Ser Tyr Gln Lys Pro Met Glu Thr Asp Leu Val Tyr Ile
[1207]	225 230 235 240
[1208]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys

[1209]	245
[1210]	<210> 26
[1211]	<211> 31
[1212]	<212> PRT
[1213]	<213> 人工序列
[1214]	<220>
[1215]	<223> 信号肽人Wnt7a多肽
[1216]	<400> 26
[1217]	Met Asn Arg Lys Ala Arg Arg Cys Leu Gly His Leu Phe Leu Ser Leu
[1218]	1 5 10 15
[1219]	Gly Met Val Tyr Leu Arg Ile Gly Gly Phe Ser Ser Val Val Ala
[1220]	20 25 30
[1221]	<210> 27
[1222]	<211> 31
[1223]	<212> PRT
[1224]	<213> 人工序列
[1225]	<220>
[1226]	<223> 信号肽人Wnt7b多肽
[1227]	<400> 27
[1228]	Met His Arg Asn Phe Arg Lys Trp Ile Phe Tyr Val Phe Leu Cys Phe
[1229]	1 5 10 15
[1230]	Gly Val Leu Tyr Val Lys Leu Gly Ala Leu Ser Ser Val Val Ala
[1231]	20 25 30
[1232]	<210> 28
[1233]	<211> 247
[1234]	<212> PRT
[1235]	<213> 人工序列
[1236]	<220>
[1237]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体K159A
[1238]	<400> 28
[1239]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg
[1240]	1 5 10 15
[1241]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly
[1242]	20 25 30
[1243]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn
[1244]	35 40 45
[1245]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys
[1246]	50 55 60
[1247]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile

[1248]	65	70	75	80
[1249]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr	Ala Ala Cys Thr Gln Gly	Asn
[1250]		85	90	95
[1251]	Leu Ser Asp Cys Gly	Cys Asp Lys Glu Lys	Gln Gly Gln Tyr His	Arg
[1252]		100	105	110
[1253]	Asp Glu Gly Trp Lys	Trp Gly Gly Cys Ser	Ala Asp Ile Arg Tyr	Gly
[1254]		115	120	125
[1255]	Ile Gly Phe Ala Lys	Val Phe Val Asp Ala	Arg Glu Ile Lys Gln	Asn
[1256]		130	135	140
[1257]	Ala Arg Thr Leu Met	Asn Leu His Asn Asn	Glu Ala Gly Arg Ala	Ile
[1258]	145	150	155	160
[1259]	Leu Glu Glu Asn Met	Lys Leu Glu Cys Lys	Cys His Gly Val Ser	Gly
[1260]		165	170	175
[1261]	Ser Cys Thr Thr Lys	Thr Cys Trp Thr Thr	Leu Pro Gln Phe Arg	Glu
[1262]		180	185	190
[1263]	Leu Gly Tyr Val Leu	Lys Asp Lys Tyr Asn	Glu Ala Val His Val	Glu
[1264]		195	200	205
[1265]	Pro Val Arg Ala Ser	Arg Asn Lys Arg Pro	Thr Phe Leu Lys Ile	Lys
[1266]		210	215	220
[1267]	Lys Pro Leu Ser Tyr	Arg Lys Pro Met Asp	Thr Asp Leu Val Tyr	Ile
[1268]	225	230	235	240
[1269]	Glu Lys Ser Pro Asn	Tyr Cys		
[1270]		245		
[1271]	<210> 29			
[1272]	<211> 247			
[1273]	<212> PRT			
[1274]	<213> 人工序列			
[1275]	<220>			
[1276]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体A27R			
[1277]	<400> 29			
[1278]	Leu Gly Ala Ser Ile	Ile Cys Asn Lys Ile	Pro Gly Leu Ala Pro	Arg
[1279]	1	5	10	15
[1280]	Gln Arg Ala Ile Cys	Gln Ser Arg Pro Asp	Arg Ile Ile Val Ile	Gly
[1281]		20	25	30
[1282]	Glu Gly Ser Gln Met	Gly Leu Asp Glu Cys	Gln Phe Gln Phe Arg	Asn
[1283]		35	40	45
[1284]	Gly Arg Trp Asn Cys	Ser Ala Leu Gly Glu	Arg Thr Val Phe Gly	Lys
[1285]		50	55	60
[1286]	Glu Leu Lys Val Gly	Ser Arg Glu Ala Ala	Phe Thr Tyr Ala Ile	Ile

[1287]	65	70	75	80
[1288]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr	Ala Ala Cys Thr	Gln Gly Asn
[1289]		85	90	95
[1290]	Leu Ser Asp Cys Gly	Cys Asp Lys Glu	Lys Gln Gly Gln	Tyr His Arg
[1291]		100	105	110
[1292]	Asp Glu Gly Trp Lys	Trp Gly Gly Cys	Ser Ala Asp Ile	Arg Tyr Gly
[1293]		115	120	125
[1294]	Ile Gly Phe Ala Lys	Val Phe Val Asp	Ala Arg Glu Ile	Lys Gln Asn
[1295]		130	135	140
[1296]	Ala Arg Thr Leu Met	Asn Leu His Asn	Asn Glu Ala Gly	Arg Lys Ile
[1297]	145	150	155	160
[1298]	Leu Glu Glu Asn Met	Lys Leu Glu Cys	Lys Cys His Gly	Val Ser Gly
[1299]		165	170	175
[1300]	Ser Cys Thr Thr Lys	Thr Cys Trp Thr	Thr Leu Pro Gln	Phe Arg Glu
[1301]		180	185	190
[1302]	Leu Gly Tyr Val Leu	Lys Asp Lys Tyr	Asn Glu Ala Val	His Val Glu
[1303]		195	200	205
[1304]	Pro Val Arg Ala Ser	Arg Asn Lys Arg	Pro Thr Phe Leu	Lys Ile Lys
[1305]		210	215	220
[1306]	Lys Pro Leu Ser Tyr	Arg Lys Pro Met	Asp Thr Asp Leu	Val Tyr Ile
[1307]	225	230	235	240
[1308]	Glu Lys Ser Pro Asn	Tyr Cys		
[1309]		245		
[1310]	<210> 30			
[1311]	<211> 247			
[1312]	<212> PRT			
[1313]	<213> 人工序列			
[1314]	<220>			
[1315]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体E33A			
[1316]	<400> 30			
[1317]	Leu Gly Ala Ser Ile	Ile Cys Asn Lys	Ile Pro Gly Leu	Ala Pro Arg
[1318]	1	5	10	15
[1319]	Gln Arg Ala Ile Cys	Gln Ser Arg Pro	Asp Ala Ile Ile	Val Ile Gly
[1320]		20	25	30
[1321]	Ala Gly Ser Gln Met	Gly Leu Asp Glu	Cys Gln Phe Gln	Phe Arg Asn
[1322]		35	40	45
[1323]	Gly Arg Trp Asn Cys	Ser Ala Leu Gly	Glu Arg Thr Val	Phe Gly Lys
[1324]		50	55	60
[1325]	Glu Leu Lys Val Gly	Ser Arg Glu Ala	Ala Phe Thr Tyr	Ala Ile Ile

[1326]	65	70	75	80
[1327]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr	Ala Ala Cys Thr	Gln Gly Asn
[1328]		85	90	95
[1329]	Leu Ser Asp Cys Gly	Cys Asp Lys Glu	Lys Gln Gly Gln	Tyr His Arg
[1330]		100	105	110
[1331]	Asp Glu Gly Trp Lys	Trp Gly Gly Cys	Ser Ala Asp Ile	Arg Tyr Gly
[1332]		115	120	125
[1333]	Ile Gly Phe Ala Lys	Val Phe Val Asp	Ala Arg Glu Ile	Lys Gln Asn
[1334]		130	135	140
[1335]	Ala Arg Thr Leu Met	Asn Leu His Asn	Asn Glu Ala Gly	Arg Lys Ile
[1336]	145	150	155	160
[1337]	Leu Glu Glu Asn Met	Lys Leu Glu Cys	Lys Cys His Gly	Val Ser Gly
[1338]		165	170	175
[1339]	Ser Cys Thr Thr Lys	Thr Cys Trp Thr	Thr Leu Pro Gln	Phe Arg Glu
[1340]		180	185	190
[1341]	Leu Gly Tyr Val Leu	Lys Asp Lys Tyr	Asn Glu Ala Val	His Val Glu
[1342]		195	200	205
[1343]	Pro Val Arg Ala Ser	Arg Asn Lys Arg	Pro Thr Phe Leu	Lys Ile Lys
[1344]		210	215	220
[1345]	Lys Pro Leu Ser Tyr	Arg Lys Pro Met	Asp Thr Asp Leu	Val Tyr Ile
[1346]	225	230	235	240
[1347]	Glu Lys Ser Pro Asn	Tyr Cys		
[1348]		245		
[1349]	<210>	31		
[1350]	<211>	247		
[1351]	<212>	PRT		
[1352]	<213>	人工序列		
[1353]	<220>			
[1354]	<223>	人N端结构域(NTD)Wnt7a变体E41A		
[1355]	<400>	31		
[1356]	Leu Gly Ala Ser Ile	Ile Cys Asn Lys	Ile Pro Gly Leu	Ala Pro Arg
[1357]	1	5	10	15
[1358]	Gln Arg Ala Ile Cys	Gln Ser Arg Pro	Asp Ala Ile Ile	Val Ile Gly
[1359]		20	25	30
[1360]	Glu Gly Ser Gln Met	Gly Leu Asp Ala	Cys Gln Phe Gln	Phe Arg Asn
[1361]		35	40	45
[1362]	Gly Arg Trp Asn Cys	Ser Ala Leu Gly	Glu Arg Thr Val	Phe Gly Lys
[1363]		50	55	60
[1364]	Glu Leu Lys Val Gly	Ser Arg Glu Ala	Ala Phe Thr Tyr	Ala Ile Ile

[1365]	65	70	75	80
[1366]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr	Ala Ala Cys Thr Gln Gly	Asn
[1367]		85	90	95
[1368]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[1369]		100	105	110
[1370]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[1371]		115	120	125
[1372]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[1373]		130	135	140
[1374]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[1375]	145	150	155	160
[1376]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[1377]		165	170	175
[1378]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[1379]		180	185	190
[1380]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[1381]		195	200	205
[1382]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[1383]		210	215	220
[1384]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			
[1385]	225	230	235	240
[1386]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys			
[1387]		245		
[1388]	<210>	32		
[1389]	<211>	247		
[1390]	<212>	PRT		
[1391]	<213>	人工序列		
[1392]	<220>			
[1393]	<223>	人N端结构域(NTD)Wnt7a变体F44A		
[1394]	<400>	32		
[1395]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[1396]	1	5	10	15
[1397]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[1398]		20	25	30
[1399]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Ala Gln Phe Arg Asn			
[1400]		35	40	45
[1401]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[1402]		50	55	60
[1403]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			

[1404]	65	70	75	80
[1405]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr	Ala Ala Cys Thr	Gln Gly Asn
[1406]		85	90	95
[1407]	Leu Ser Asp Cys Gly	Cys Asp Lys Glu	Lys Gln Gly Gln	Tyr His Arg
[1408]		100	105	110
[1409]	Asp Glu Gly Trp Lys	Trp Gly Gly Cys	Ser Ala Asp Ile	Arg Tyr Gly
[1410]		115	120	125
[1411]	Ile Gly Phe Ala Lys	Val Phe Val Asp	Ala Arg Glu Ile	Lys Gln Asn
[1412]		130	135	140
[1413]	Ala Arg Thr Leu Met	Asn Leu His Asn	Asn Glu Ala Gly	Arg Lys Ile
[1414]	145	150	155	160
[1415]	Leu Glu Glu Asn Met	Lys Leu Glu Cys	Lys Cys His Gly	Val Ser Gly
[1416]		165	170	175
[1417]	Ser Cys Thr Thr Lys	Thr Cys Trp Thr	Thr Leu Pro Gln	Phe Arg Glu
[1418]		180	185	190
[1419]	Leu Gly Tyr Val Leu	Lys Asp Lys Tyr	Asn Glu Ala Val	His Val Glu
[1420]		195	200	205
[1421]	Pro Val Arg Ala Ser	Arg Asn Lys Arg	Pro Thr Phe Leu	Lys Ile Lys
[1422]		210	215	220
[1423]	Lys Pro Leu Ser Tyr	Arg Lys Pro Met	Asp Thr Asp Leu	Val Tyr Ile
[1424]	225	230	235	240
[1425]	Glu Lys Ser Pro Asn	Tyr Cys		
[1426]		245		
[1427]	<210>	33		
[1428]	<211>	247		
[1429]	<212>	PRT		
[1430]	<213>	人工序列		
[1431]	<220>			
[1432]	<223>	人N端结构域(NTD)Wnt7a变体N52Q		
[1433]	<400>	33		
[1434]	Leu Gly Ala Ser Ile	Ile Cys Asn Lys	Ile Pro Gly Leu	Ala Pro Arg
[1435]	1	5	10	15
[1436]	Gln Arg Ala Ile Cys	Gln Ser Arg Pro	Asp Ala Ile Ile	Val Ile Gly
[1437]		20	25	30
[1438]	Glu Gly Ser Gln Met	Gly Leu Asp Glu	Cys Gln Phe Gln	Phe Arg Asn
[1439]		35	40	45
[1440]	Gly Arg Trp Gln Cys	Ser Ala Leu Gly	Glu Arg Thr Val	Phe Gly Lys
[1441]		50	55	60
[1442]	Glu Leu Lys Val Gly	Ser Arg Glu Ala	Ala Phe Thr Tyr	Ala Ile Ile

[1443]	65	70	75	80
[1444]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[1445]		85	90	95
[1446]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[1447]		100	105	110
[1448]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[1449]		115	120	125
[1450]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[1451]		130	135	140
[1452]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[1453]	145	150	155	160
[1454]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[1455]		165	170	175
[1456]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[1457]		180	185	190
[1458]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[1459]		195	200	205
[1460]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[1461]		210	215	220
[1462]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			
[1463]	225	230	235	240
[1464]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys			
[1465]		245		
[1466]	<210>	34		
[1467]	<211>	247		
[1468]	<212>	PRT		
[1469]	<213>	人工序列		
[1470]	<220>			
[1471]	<223>	人N端结构域(NTD)Wnt7a变体I129A		
[1472]	<400>	34		
[1473]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[1474]	1	5	10	15
[1475]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[1476]		20	25	30
[1477]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[1478]		35	40	45
[1479]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[1480]		50	55	60
[1481]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			

[1482]	65	70	75	80
[1483]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr	Ala Ala Cys Thr	Gln Gly Asn
[1484]		85	90	95
[1485]	Leu Ser Asp Cys Gly	Cys Asp Lys Glu	Lys Gln Gly Gln	Tyr His Arg
[1486]		100	105	110
[1487]	Asp Glu Gly Trp Lys	Trp Gly Gly Cys Ser	Ala Asp Ile Arg	Tyr Gly
[1488]		115	120	125
[1489]	Ala Gly Phe Ala Lys	Val Phe Val Asp	Ala Arg Glu Ile	Lys Gln Asn
[1490]		130	135	140
[1491]	Ala Arg Thr Leu Met	Asn Leu His Asn	Asn Glu Ala Gly	Arg Lys Ile
[1492]	145	150	155	160
[1493]	Leu Glu Glu Asn Met	Lys Leu Glu Cys	Lys Cys His Gly	Val Ser Gly
[1494]		165	170	175
[1495]	Ser Cys Thr Thr Lys	Thr Cys Trp Thr	Thr Leu Pro Gln	Phe Arg Glu
[1496]		180	185	190
[1497]	Leu Gly Tyr Val Leu	Lys Asp Lys Tyr	Asn Glu Ala Val	His Val Glu
[1498]		195	200	205
[1499]	Pro Val Arg Ala Ser	Arg Asn Lys Arg	Pro Thr Phe Leu	Lys Ile Lys
[1500]		210	215	220
[1501]	Lys Pro Leu Ser Tyr	Arg Lys Pro Met	Asp Thr Asp Leu	Val Tyr Ile
[1502]	225	230	235	240
[1503]	Glu Lys Ser Pro Asn	Tyr Cys		
[1504]		245		
[1505]	<210>	35		
[1506]	<211>	247		
[1507]	<212>	PRT		
[1508]	<213>	人工序列		
[1509]	<220>			
[1510]	<223>	人N端结构域(NTD)Wnt7a变体F131A		
[1511]	<400>	35		
[1512]	Leu Gly Ala Ser Ile	Ile Cys Asn Lys	Ile Pro Gly Leu	Ala Pro Arg
[1513]	1	5	10	15
[1514]	Gln Arg Ala Ile Cys	Gln Ser Arg Pro	Asp Ala Ile Ile	Val Ile Gly
[1515]		20	25	30
[1516]	Glu Gly Ser Gln Met	Gly Leu Asp Glu	Cys Gln Phe Gln	Phe Arg Asn
[1517]		35	40	45
[1518]	Gly Arg Trp Asn Cys	Ser Ala Leu Gly	Glu Arg Thr Val	Phe Gly Lys
[1519]		50	55	60
[1520]	Glu Leu Lys Val Gly	Ser Arg Glu Ala	Ala Phe Thr Tyr	Ala Ile Ile

[1521]	65	70	75	80
[1522]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[1523]		85	90	95
[1524]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[1525]		100	105	110
[1526]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[1527]		115	120	125
[1528]	Ile Gly Ala Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[1529]		130	135	140
[1530]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[1531]	145	150	155	160
[1532]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[1533]		165	170	175
[1534]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[1535]		180	185	190
[1536]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[1537]		195	200	205
[1538]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[1539]		210	215	220
[1540]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			
[1541]	225	230	235	240
[1542]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys			
[1543]		245		
[1544]	<210>	36		
[1545]	<211>	247		
[1546]	<212>	PRT		
[1547]	<213>	人工序列		
[1548]	<220>			
[1549]	<223>	人N端结构域(NTD)Wnt7a变体K133A		
[1550]	<400>	36		
[1551]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[1552]	1	5	10	15
[1553]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[1554]		20	25	30
[1555]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[1556]		35	40	45
[1557]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[1558]		50	55	60
[1559]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			

[1560]	65	70	75	80
[1561]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[1562]		85	90	95
[1563]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[1564]		100	105	110
[1565]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[1566]		115	120	125
[1567]	Ile Gly Phe Ala Ala Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[1568]		130	135	140
[1569]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[1570]	145	150	155	160
[1571]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[1572]		165	170	175
[1573]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[1574]		180	185	190
[1575]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[1576]		195	200	205
[1577]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[1578]		210	215	220
[1579]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			
[1580]	225	230	235	240
[1581]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys			
[1582]		245		
[1583]	<210> 37			
[1584]	<211> 247			
[1585]	<212> PRT			
[1586]	<213> 人工序列			
[1587]	<220>			
[1588]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体I141A			
[1589]	<400> 37			
[1590]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[1591]	1	5	10	15
[1592]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[1593]		20	25	30
[1594]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[1595]		35	40	45
[1596]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[1597]		50	55	60
[1598]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			

[1599]	65	70	75	80
[1600]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[1601]		85	90	95
[1602]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[1603]		100	105	110
[1604]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[1605]		115	120	125
[1606]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ala Lys Gln Asn			
[1607]		130	135	140
[1608]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[1609]	145	150	155	160
[1610]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[1611]		165	170	175
[1612]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[1613]		180	185	190
[1614]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[1615]		195	200	205
[1616]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[1617]		210	215	220
[1618]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			
[1619]	225	230	235	240
[1620]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys			
[1621]		245		
[1622]	<210>	38		
[1623]	<211>	247		
[1624]	<212>	PRT		
[1625]	<213>	人工序列		
[1626]	<220>			
[1627]	<223>	人N端结构域(NTD)Wnt7a变体R158A		
[1628]	<400>	38		
[1629]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[1630]	1	5	10	15
[1631]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[1632]		20	25	30
[1633]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[1634]		35	40	45
[1635]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[1636]		50	55	60
[1637]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			

[1638]	65	70	75	80
[1639]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr	Ala Ala Cys Thr Gln Gly	Asn
[1640]		85	90	95
[1641]	Leu Ser Asp Cys Gly	Cys Asp Lys Glu Lys	Gln Gly Gln Tyr His	Arg
[1642]		100	105	110
[1643]	Asp Glu Gly Trp Lys	Trp Gly Gly Cys Ser	Ala Asp Ile Arg Tyr	Gly
[1644]		115	120	125
[1645]	Ile Gly Phe Ala Lys	Val Phe Val Asp Ala	Arg Glu Ile Lys Gln	Asn
[1646]		130	135	140
[1647]	Ala Arg Thr Leu Met	Asn Leu His Asn Asn	Glu Ala Gly Ala Lys	Ile
[1648]	145	150	155	160
[1649]	Leu Glu Glu Asn Met	Lys Leu Glu Cys Lys	Cys His Gly Val Ser	Gly
[1650]		165	170	175
[1651]	Ser Cys Thr Thr Lys	Thr Cys Trp Thr Thr	Leu Pro Gln Phe Arg	Glu
[1652]		180	185	190
[1653]	Leu Gly Tyr Val Leu	Lys Asp Lys Tyr Asn	Glu Ala Val His Val	Glu
[1654]		195	200	205
[1655]	Pro Val Arg Ala Ser	Arg Asn Lys Arg Pro	Thr Phe Leu Lys Ile	Lys
[1656]		210	215	220
[1657]	Lys Pro Leu Ser Tyr	Arg Lys Pro Met Asp	Thr Asp Leu Val Tyr	Ile
[1658]	225	230	235	240
[1659]	Glu Lys Ser Pro Asn	Tyr Cys		
[1660]		245		
[1661]	<210> 39			
[1662]	<211> 247			
[1663]	<212> PRT			
[1664]	<213> 人工序列			
[1665]	<220>			
[1666]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体K181A			
[1667]	<400> 39			
[1668]	Leu Gly Ala Ser Ile	Ile Cys Asn Lys Ile	Pro Gly Leu Ala Pro	Arg
[1669]	1	5	10	15
[1670]	Gln Arg Ala Ile Cys	Gln Ser Arg Pro Asp	Ala Ile Ile Val Ile	Gly
[1671]		20	25	30
[1672]	Glu Gly Ser Gln Met	Gly Leu Asp Glu Cys	Gln Phe Gln Phe Arg	Asn
[1673]		35	40	45
[1674]	Gly Arg Trp Asn Cys	Ser Ala Leu Gly Glu	Arg Thr Val Phe Gly	Lys
[1675]		50	55	60
[1676]	Glu Leu Lys Val Gly	Ser Arg Glu Ala Ala	Phe Thr Tyr Ala Ile	Ile

[1677]	65	70	75	80
[1678]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[1679]		85	90	95
[1680]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[1681]		100	105	110
[1682]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[1683]		115	120	125
[1684]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[1685]		130	135	140
[1686]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[1687]	145	150	155	160
[1688]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[1689]		165	170	175
[1690]	Ser Cys Thr Thr Ala Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[1691]		180	185	190
[1692]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[1693]		195	200	205
[1694]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[1695]		210	215	220
[1696]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			
[1697]	225	230	235	240
[1698]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys			
[1699]		245		
[1700]	<210> 40			
[1701]	<211> 247			
[1702]	<212> PRT			
[1703]	<213> 人工序列			
[1704]	<220>			
[1705]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体R191A			
[1706]	<400> 40			
[1707]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[1708]	1	5	10	15
[1709]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[1710]		20	25	30
[1711]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[1712]		35	40	45
[1713]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[1714]		50	55	60
[1715]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			

[1716]	65	70	75	80
[1717]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr	Ala Ala Cys Thr	Gln Gly Asn
[1718]		85	90	95
[1719]	Leu Ser Asp Cys Gly	Cys Asp Lys Glu	Lys Gln Gly Gln	Tyr His Arg
[1720]		100	105	110
[1721]	Asp Glu Gly Trp Lys	Trp Gly Gly Cys Ser	Ala Asp Ile Arg	Tyr Gly
[1722]		115	120	125
[1723]	Ile Gly Phe Ala Lys	Val Phe Val Asp	Ala Arg Glu Ile	Lys Gln Asn
[1724]		130	135	140
[1725]	Ala Arg Thr Leu Met	Asn Leu His Asn	Asn Glu Ala Gly	Arg Lys Ile
[1726]	145	150	155	160
[1727]	Leu Glu Glu Asn Met	Lys Leu Glu Cys	Lys Cys His Gly	Val Ser Gly
[1728]		165	170	175
[1729]	Ser Cys Thr Thr Lys	Thr Cys Trp Thr	Thr Leu Pro Gln	Phe Ala Glu
[1730]		180	185	190
[1731]	Leu Gly Tyr Val Leu	Lys Asp Lys Tyr	Asn Glu Ala Val	His Val Glu
[1732]		195	200	205
[1733]	Pro Val Arg Ala Ser	Arg Asn Lys Arg	Pro Thr Phe Leu	Lys Ile Lys
[1734]		210	215	220
[1735]	Lys Pro Leu Ser Tyr	Arg Lys Pro Met	Asp Thr Asp Leu	Val Tyr Ile
[1736]	225	230	235	240
[1737]	Glu Lys Ser Pro Asn	Tyr Cys		
[1738]		245		
[1739]	<210>	41		
[1740]	<211>	247		
[1741]	<212>	PRT		
[1742]	<213>	人工序列		
[1743]	<220>			
[1744]	<223>	人N端结构域(NTD)Wnt7a变体K198A		
[1745]	<400>	41		
[1746]	Leu Gly Ala Ser Ile	Ile Cys Asn Lys	Ile Pro Gly Leu	Ala Pro Arg
[1747]	1	5	10	15
[1748]	Gln Arg Ala Ile Cys	Gln Ser Arg Pro	Asp Ala Ile Ile	Val Ile Gly
[1749]		20	25	30
[1750]	Glu Gly Ser Gln Met	Gly Leu Asp Glu	Cys Gln Phe Gln	Phe Arg Asn
[1751]		35	40	45
[1752]	Gly Arg Trp Asn Cys	Ser Ala Leu Gly	Glu Arg Thr Val	Phe Gly Lys
[1753]		50	55	60
[1754]	Glu Leu Lys Val Gly	Ser Arg Glu Ala	Ala Phe Thr Tyr	Ala Ile Ile

[1755]	65	70	75	80
[1756]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr	Ala Ala Cys Thr Gln Gly	Asn
[1757]		85	90	95
[1758]	Leu Ser Asp Cys Gly	Cys Asp Lys Glu Lys	Gln Gly Gln Tyr His	Arg
[1759]		100	105	110
[1760]	Asp Glu Gly Trp Lys	Trp Gly Gly Cys Ser	Ala Asp Ile Arg Tyr	Gly
[1761]		115	120	125
[1762]	Ile Gly Phe Ala Lys	Val Phe Val Asp Ala	Arg Glu Ile Lys Gln	Asn
[1763]		130	135	140
[1764]	Ala Arg Thr Leu Met	Asn Leu His Asn Asn	Glu Ala Gly Arg Lys	Ile
[1765]	145	150	155	160
[1766]	Leu Glu Glu Asn Met	Lys Leu Glu Cys Lys	Cys His Gly Val Ser	Gly
[1767]		165	170	175
[1768]	Ser Cys Thr Thr Lys	Thr Cys Trp Thr Thr	Leu Pro Gln Phe Arg	Glu
[1769]		180	185	190
[1770]	Leu Gly Tyr Val Leu	Ala Asp Lys Tyr Asn	Glu Ala Val His Val	Glu
[1771]		195	200	205
[1772]	Pro Val Arg Ala Ser	Arg Asn Lys Arg Pro	Thr Phe Leu Lys Ile	Lys
[1773]		210	215	220
[1774]	Lys Pro Leu Ser Tyr	Arg Lys Pro Met Asp	Thr Asp Leu Val Tyr	Ile
[1775]	225	230	235	240
[1776]	Glu Lys Ser Pro Asn	Tyr Cys		
[1777]		245		
[1778]	<210> 42			
[1779]	<211> 247			
[1780]	<212> PRT			
[1781]	<213> 人工序列			
[1782]	<220>			
[1783]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体V205A			
[1784]	<400> 42			
[1785]	Leu Gly Ala Ser Ile	Ile Cys Asn Lys Ile	Pro Gly Leu Ala Pro	Arg
[1786]	1	5	10	15
[1787]	Gln Arg Ala Ile Cys	Gln Ser Arg Pro Asp	Ala Ile Ile Val Ile	Gly
[1788]		20	25	30
[1789]	Glu Gly Ser Gln Met	Gly Leu Asp Glu Cys	Gln Phe Gln Phe Arg	Asn
[1790]		35	40	45
[1791]	Gly Arg Trp Asn Cys	Ser Ala Leu Gly Glu	Arg Thr Val Phe Gly	Lys
[1792]		50	55	60
[1793]	Glu Leu Lys Val Gly	Ser Arg Glu Ala Ala	Phe Thr Tyr Ala Ile	Ile

[1794]	65	70	75	80
[1795]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[1796]		85	90	95
[1797]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[1798]		100	105	110
[1799]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[1800]		115	120	125
[1801]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[1802]		130	135	140
[1803]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[1804]	145	150	155	160
[1805]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[1806]		165	170	175
[1807]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[1808]		180	185	190
[1809]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Ala His Val Glu			
[1810]		195	200	205
[1811]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[1812]		210	215	220
[1813]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			
[1814]	225	230	235	240
[1815]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys			
[1816]		245		
[1817]	<210> 43			
[1818]	<211> 247			
[1819]	<212> PRT			
[1820]	<213> 人工序列			
[1821]	<220>			
[1822]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体E208A			
[1823]	<400> 43			
[1824]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[1825]	1	5	10	15
[1826]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[1827]		20	25	30
[1828]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[1829]		35	40	45
[1830]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[1831]		50	55	60
[1832]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			

[1833]	65	70	75	80
[1834]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[1835]		85	90	95
[1836]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[1837]		100	105	110
[1838]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[1839]		115	120	125
[1840]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[1841]		130	135	140
[1842]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[1843]	145	150	155	160
[1844]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[1845]		165	170	175
[1846]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[1847]		180	185	190
[1848]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Ala			
[1849]		195	200	205
[1850]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[1851]		210	215	220
[1852]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			
[1853]	225	230	235	240
[1854]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys			
[1855]		245		
[1856]	<210> 44			
[1857]	<211> 247			
[1858]	<212> PRT			
[1859]	<213> 人工序列			
[1860]	<220>			
[1861]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体K216A			
[1862]	<400> 44			
[1863]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[1864]	1	5	10	15
[1865]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[1866]		20	25	30
[1867]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[1868]		35	40	45
[1869]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[1870]		50	55	60
[1871]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			

[1872]	65	70	75	80
[1873]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr	Ala Ala Cys Thr	Gln Gly Asn
[1874]		85	90	95
[1875]	Leu Ser Asp Cys Gly	Cys Asp Lys Glu	Lys Gln Gly Gln	Tyr His Arg
[1876]		100	105	110
[1877]	Asp Glu Gly Trp Lys	Trp Gly Gly Cys Ser	Ala Asp Ile Arg	Tyr Gly
[1878]		115	120	125
[1879]	Ile Gly Phe Ala Lys	Val Phe Val Asp	Ala Arg Glu Ile	Lys Gln Asn
[1880]		130	135	140
[1881]	Ala Arg Thr Leu Met	Asn Leu His Asn	Asn Glu Ala Gly	Arg Lys Ile
[1882]	145	150	155	160
[1883]	Leu Glu Glu Asn Met	Lys Leu Glu Cys	Lys Cys His Gly	Val Ser Gly
[1884]		165	170	175
[1885]	Ser Cys Thr Thr Lys	Thr Cys Trp Thr	Thr Leu Pro Gln	Phe Arg Glu
[1886]		180	185	190
[1887]	Leu Gly Tyr Val Leu	Lys Asp Lys Tyr	Asn Glu Ala Val	His Val Glu
[1888]		195	200	205
[1889]	Pro Val Arg Ala Ser	Arg Asn Ala Arg	Pro Thr Phe Leu	Lys Ile Lys
[1890]		210	215	220
[1891]	Lys Pro Leu Ser Tyr	Arg Lys Pro Met	Asp Thr Asp Leu	Val Tyr Ile
[1892]	225	230	235	240
[1893]	Glu Lys Ser Pro Asn	Tyr Cys		
[1894]		245		
[1895]	<210>	45		
[1896]	<211>	247		
[1897]	<212>	PRT		
[1898]	<213>	人工序列		
[1899]	<220>			
[1900]	<223>	人N端结构域(NTD)Wnt7a变体K222A		
[1901]	<400>	45		
[1902]	Leu Gly Ala Ser Ile	Ile Cys Asn Lys	Ile Pro Gly Leu	Ala Pro Arg
[1903]	1	5	10	15
[1904]	Gln Arg Ala Ile Cys	Gln Ser Arg Pro	Asp Ala Ile Ile	Val Ile Gly
[1905]		20	25	30
[1906]	Glu Gly Ser Gln Met	Gly Leu Asp Glu	Cys Gln Phe Gln	Phe Arg Asn
[1907]		35	40	45
[1908]	Gly Arg Trp Asn Cys	Ser Ala Leu Gly	Glu Arg Thr Val	Phe Gly Lys
[1909]		50	55	60
[1910]	Glu Leu Lys Val Gly	Ser Arg Glu Ala	Ala Phe Thr Tyr	Ala Ile Ile

[1911]	65	70	75	80
[1912]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[1913]		85	90	95
[1914]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[1915]		100	105	110
[1916]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[1917]		115	120	125
[1918]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[1919]		130	135	140
[1920]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[1921]	145	150	155	160
[1922]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[1923]		165	170	175
[1924]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[1925]		180	185	190
[1926]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[1927]		195	200	205
[1928]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Ala Ile Lys			
[1929]		210	215	220
[1930]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			
[1931]	225	230	235	240
[1932]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys			
[1933]		245		
[1934]	<210>	46		
[1935]	<211>	247		
[1936]	<212>	PRT		
[1937]	<213>	人工序列		
[1938]	<220>			
[1939]	<223>	人N端结构域(NTD)Wnt7a变体I223A		
[1940]	<400>	46		
[1941]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[1942]	1	5	10	15
[1943]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[1944]		20	25	30
[1945]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[1946]		35	40	45
[1947]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[1948]		50	55	60
[1949]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			

[1950]	65	70	75	80
[1951]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr	Ala Ala Cys Thr Gln Gly	Asn
[1952]		85	90	95
[1953]	Leu Ser Asp Cys Gly	Cys Asp Lys Glu Lys	Gln Gly Gln Tyr His	Arg
[1954]		100	105	110
[1955]	Asp Glu Gly Trp Lys	Trp Gly Gly Cys Ser Ala	Asp Ile Arg Tyr	Gly
[1956]		115	120	125
[1957]	Ile Gly Phe Ala Lys	Val Phe Val Asp Ala	Arg Glu Ile Lys	Gln Asn
[1958]		130	135	140
[1959]	Ala Arg Thr Leu Met	Asn Leu His Asn Asn	Glu Ala Gly Arg	Lys Ile
[1960]	145	150	155	160
[1961]	Leu Glu Glu Asn Met	Lys Leu Glu Cys Lys	Cys His Gly Val	Ser Gly
[1962]		165	170	175
[1963]	Ser Cys Thr Thr Lys	Thr Cys Trp Thr Thr	Leu Pro Gln Phe	Arg Glu
[1964]		180	185	190
[1965]	Leu Gly Tyr Val Leu	Lys Asp Lys Tyr Asn	Glu Ala Val His	Val Glu
[1966]		195	200	205
[1967]	Pro Val Arg Ala Ser	Arg Asn Lys Arg Pro	Thr Phe Leu Lys	Ala Lys
[1968]		210	215	220
[1969]	Lys Pro Leu Ser Tyr	Arg Lys Pro Met Asp	Thr Asp Leu Val	Tyr Ile
[1970]	225	230	235	240
[1971]	Glu Lys Ser Pro Asn	Tyr Cys		
[1972]		245		
[1973]	<210> 47			
[1974]	<211> 247			
[1975]	<212> PRT			
[1976]	<213> 人工序列			
[1977]	<220>			
[1978]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体Y229A			
[1979]	<400> 47			
[1980]	Leu Gly Ala Ser Ile	Ile Cys Asn Lys Ile	Pro Gly Leu Ala	Pro Arg
[1981]	1	5	10	15
[1982]	Gln Arg Ala Ile Cys	Gln Ser Arg Pro Asp	Ala Ile Ile Val	Ile Gly
[1983]		20	25	30
[1984]	Glu Gly Ser Gln Met	Gly Leu Asp Glu Cys	Gln Phe Gln Phe	Arg Asn
[1985]		35	40	45
[1986]	Gly Arg Trp Asn Cys	Ser Ala Leu Gly Glu	Arg Thr Val Phe	Gly Lys
[1987]		50	55	60
[1988]	Glu Leu Lys Val Gly	Ser Arg Glu Ala Ala	Phe Thr Tyr Ala	Ile Ile

[1989]	65	70	75	80
[1990]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[1991]		85	90	95
[1992]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[1993]		100	105	110
[1994]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[1995]		115	120	125
[1996]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[1997]		130	135	140
[1998]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[1999]	145	150	155	160
[2000]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[2001]		165	170	175
[2002]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[2003]		180	185	190
[2004]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[2005]		195	200	205
[2006]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[2007]		210	215	220
[2008]	Lys Pro Leu Ser Ala Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			
[2009]	225	230	235	240
[2010]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys			
[2011]		245		
[2012]	<210> 48			
[2013]	<211> 247			
[2014]	<212> PRT			
[2015]	<213> 人工序列			
[2016]	<220>			
[2017]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体P232A			
[2018]	<400> 48			
[2019]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[2020]	1	5	10	15
[2021]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[2022]		20	25	30
[2023]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[2024]		35	40	45
[2025]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[2026]		50	55	60
[2027]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			

[2028]	65	70	75	80
[2029]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr	Ala Ala Cys Thr	Gln Gly Asn
[2030]		85	90	95
[2031]	Leu Ser Asp Cys Gly	Cys Asp Lys Glu	Lys Gln Gly Gln	Tyr His Arg
[2032]		100	105	110
[2033]	Asp Glu Gly Trp Lys	Trp Gly Gly Cys	Ser Ala Asp Ile	Arg Tyr Gly
[2034]		115	120	125
[2035]	Ile Gly Phe Ala Lys	Val Phe Val Asp	Ala Arg Glu Ile	Lys Gln Asn
[2036]		130	135	140
[2037]	Ala Arg Thr Leu Met	Asn Leu His Asn	Asn Glu Ala Gly	Arg Lys Ile
[2038]	145	150	155	160
[2039]	Leu Glu Glu Asn Met	Lys Leu Glu Cys	Lys Cys His Gly	Val Ser Gly
[2040]		165	170	175
[2041]	Ser Cys Thr Thr Lys	Thr Cys Trp Thr	Thr Leu Pro Gln	Phe Arg Glu
[2042]		180	185	190
[2043]	Leu Gly Tyr Val Leu	Lys Asp Lys Tyr	Asn Glu Ala Val	His Val Glu
[2044]		195	200	205
[2045]	Pro Val Arg Ala Ser	Arg Asn Lys Arg	Pro Thr Phe Leu	Lys Ile Lys
[2046]		210	215	220
[2047]	Lys Pro Leu Ser Tyr	Arg Lys Ala Met	Asp Thr Asp Leu	Val Tyr Ile
[2048]	225	230	235	240
[2049]	Glu Lys Ser Pro Asn	Tyr Cys		
[2050]		245		
[2051]	<210> 49			
[2052]	<211> 247			
[2053]	<212> PRT			
[2054]	<213> 人工序列			
[2055]	<220>			
[2056]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体T235A			
[2057]	<400> 49			
[2058]	Leu Gly Ala Ser Ile	Ile Cys Asn Lys	Ile Pro Gly Leu	Ala Pro Arg
[2059]	1	5	10	15
[2060]	Gln Arg Ala Ile Cys	Gln Ser Arg Pro	Asp Ala Ile Ile	Val Ile Gly
[2061]		20	25	30
[2062]	Glu Gly Ser Gln Met	Gly Leu Asp Glu	Cys Gln Phe Gln	Phe Arg Asn
[2063]		35	40	45
[2064]	Gly Arg Trp Asn Cys	Ser Ala Leu Gly	Glu Arg Thr Val	Phe Gly Lys
[2065]		50	55	60
[2066]	Glu Leu Lys Val Gly	Ser Arg Glu Ala	Ala Phe Thr Tyr	Ala Ile Ile

[2067]	65	70	75	80
[2068]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr	Ala Ala Cys Thr	Gln Gly Asn
[2069]		85	90	95
[2070]	Leu Ser Asp Cys Gly	Cys Asp Lys Glu	Lys Gln Gly Gln	Tyr His Arg
[2071]		100	105	110
[2072]	Asp Glu Gly Trp Lys	Trp Gly Gly Cys	Ser Ala Asp Ile	Arg Tyr Gly
[2073]		115	120	125
[2074]	Ile Gly Phe Ala Lys	Val Phe Val Asp	Ala Arg Glu Ile	Lys Gln Asn
[2075]		130	135	140
[2076]	Ala Arg Thr Leu Met	Asn Leu His Asn	Asn Glu Ala Gly	Arg Lys Ile
[2077]	145	150	155	160
[2078]	Leu Glu Glu Asn Met	Lys Leu Glu Cys	Lys Cys His Gly	Val Ser Gly
[2079]		165	170	175
[2080]	Ser Cys Thr Thr Lys	Thr Cys Trp Thr	Thr Leu Pro Gln	Phe Arg Glu
[2081]		180	185	190
[2082]	Leu Gly Tyr Val Leu	Lys Asp Lys Tyr	Asn Glu Ala Val	His Val Glu
[2083]		195	200	205
[2084]	Pro Val Arg Ala Ser	Arg Asn Lys Arg	Pro Thr Phe Leu	Lys Ile Lys
[2085]		210	215	220
[2086]	Lys Pro Leu Ser Tyr	Arg Lys Pro Met	Asp Ala Asp Leu	Val Tyr Ile
[2087]	225	230	235	240
[2088]	Glu Lys Ser Pro Asn	Tyr Cys		
[2089]		245		
[2090]	<210>	50		
[2091]	<211>	318		
[2092]	<212>	PRT		
[2093]	<213>	人工序列		
[2094]	<220>			
[2095]	<223>	人全长Wnt7a变体E248A		
[2096]	<400>	50		
[2097]	Leu Gly Ala Ser Ile	Ile Cys Asn Lys	Ile Pro Gly Leu	Ala Pro Arg
[2098]	1	5	10	15
[2099]	Gln Arg Ala Ile Cys	Gln Ser Arg Pro	Asp Ala Ile Ile	Val Ile Gly
[2100]		20	25	30
[2101]	Glu Gly Ser Gln Met	Gly Leu Asp Glu	Cys Gln Phe Gln	Phe Arg Asn
[2102]		35	40	45
[2103]	Gly Arg Trp Asn Cys	Ser Ala Leu Gly	Glu Arg Thr Val	Phe Gly Lys
[2104]		50	55	60
[2105]	Glu Leu Lys Val Gly	Ser Arg Glu Ala	Ala Phe Thr Tyr	Ala Ile Ile

[2106]	65	70	75	80
[2107]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[2108]		85	90	95
[2109]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[2110]		100	105	110
[2111]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[2112]		115	120	125
[2113]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[2114]		130	135	140
[2115]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[2116]	145	150	155	160
[2117]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[2118]		165	170	175
[2119]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[2120]		180	185	190
[2121]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[2122]		195	200	205
[2123]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[2124]		210	215	220
[2125]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			
[2126]	225	230	235	240
[2127]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Ala Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val			
[2128]		245	250	255
[2129]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly			
[2130]		260	265	270
[2131]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala			
[2132]		275	280	285
[2133]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys			
[2134]		290	295	300
[2135]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys			
[2136]	305	310	315	
[2137]	<210> 51			
[2138]	<211> 318			
[2139]	<212> PRT			
[2140]	<213> 智人			
[2141]	<400> 51			
[2142]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[2143]	1	5	10	15
[2144]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			

[2145]	20	25	30
[2146]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn		
[2147]	35	40	45
[2148]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys		
[2149]	50	55	60
[2150]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile		
[2151]	65	70	75
[2152]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[2153]	85	90	95
[2154]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg		
[2155]	100	105	110
[2156]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly		
[2157]	115	120	125
[2158]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn		
[2159]	130	135	140
[2160]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile		
[2161]	145	150	155
[2162]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly		
[2163]	165	170	175
[2164]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu		
[2165]	180	185	190
[2166]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu		
[2167]	195	200	205
[2168]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys		
[2169]	210	215	220
[2170]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile		
[2171]	225	230	235
[2172]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val		
[2173]	245	250	255
[2174]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly		
[2175]	260	265	270
[2176]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala		
[2177]	275	280	285
[2178]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys		
[2179]	290	295	300
[2180]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys		
[2181]	305	310	315
[2182]	<210> 52		
[2183]	<211> 318		

[2184]	<212>	PRT
[2185]	<213>	人工序列
[2186]	<220>	
[2187]	<223>	人全长Wnt7a变体R289A
[2188]	<400>	52
[2189]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg	
[2190]	1	5 10 15
[2191]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly	
[2192]	20	25 30
[2193]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn	
[2194]	35	40 45
[2195]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys	
[2196]	50	55 60
[2197]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile	
[2198]	65	70 75 80
[2199]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn	
[2200]	85	90 95
[2201]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg	
[2202]	100	105 110
[2203]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly	
[2204]	115	120 125
[2205]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn	
[2206]	130	135 140
[2207]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile	
[2208]	145	150 155 160
[2209]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly	
[2210]	165	170 175
[2211]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu	
[2212]	180	185 190
[2213]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu	
[2214]	195	200 205
[2215]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys	
[2216]	210	215 220
[2217]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile	
[2218]	225	230 235 240
[2219]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val	
[2220]	245	250 255
[2221]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly	
[2222]	260	265 270

[2223]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala
[2224]	275 280 285
[2225]	Ala Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys
[2226]	290 295 300
[2227]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[2228]	305 310 315
[2229]	<210> 53
[2230]	<211> 318
[2231]	<212> PRT
[2232]	<213> 人工序列
[2233]	<220>
[2234]	<223> 人全长Wnt7a变体W291A
[2235]	<400> 53
[2236]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg
[2237]	1 5 10 15
[2238]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly
[2239]	20 25 30
[2240]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn
[2241]	35 40 45
[2242]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys
[2243]	50 55 60
[2244]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile
[2245]	65 70 75 80
[2246]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn
[2247]	85 90 95
[2248]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg
[2249]	100 105 110
[2250]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly
[2251]	115 120 125
[2252]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn
[2253]	130 135 140
[2254]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile
[2255]	145 150 155 160
[2256]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly
[2257]	165 170 175
[2258]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu
[2259]	180 185 190
[2260]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu
[2261]	195 200 205

[2262]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys
[2263]	210 215 220
[2264]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile
[2265]	225 230 235 240
[2266]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val
[2267]	245 250 255
[2268]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly
[2269]	260 265 270
[2270]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala
[2271]	275 280 285
[2272]	Arg Val Ala Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys
[2273]	290 295 300
[2274]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[2275]	305 310 315
[2276]	<210> 54
[2277]	<211> 318
[2278]	<212> PRT
[2279]	<213> 人工序列
[2280]	<220>
[2281]	<223> 人全长Wnt7a变体T307A
[2282]	<400> 54
[2283]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg
[2284]	1 5 10 15
[2285]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly
[2286]	20 25 30
[2287]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn
[2288]	35 40 45
[2289]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys
[2290]	50 55 60
[2291]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile
[2292]	65 70 75 80
[2293]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn
[2294]	85 90 95
[2295]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg
[2296]	100 105 110
[2297]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly
[2298]	115 120 125
[2299]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn
[2300]	130 135 140

[2301]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile
[2302]	145 150 155 160
[2303]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly
[2304]	165 170 175
[2305]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu
[2306]	180 185 190
[2307]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu
[2308]	195 200 205
[2309]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys
[2310]	210 215 220
[2311]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile
[2312]	225 230 235 240
[2313]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val
[2314]	245 250 255
[2315]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly
[2316]	260 265 270
[2317]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala
[2318]	275 280 285
[2319]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys
[2320]	290 295 300
[2321]	Cys Asn Ala Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[2322]	305 310 315
[2323]	<210> 55
[2324]	<211> 11
[2325]	<212> PRT
[2326]	<213> 人工序列
[2327]	<220>
[2328]	<223> 展示在AAV-PHP.B上的肽
[2329]	<400> 55
[2330]	Ser Ala Gln Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala
[2331]	1 5 10
[2332]	<210> 56
[2333]	<211> 11
[2334]	<212> PRT
[2335]	<213> 人工序列
[2336]	<220>
[2337]	<223> 展示在AAV-PHP.eB上的肽
[2338]	<400> 56
[2339]	Ser Asp Gly Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala

[2340]	1	5	10
[2341]	<210> 57		
[2342]	<211> 7		
[2343]	<212> PRT		
[2344]	<213> 人工序列		
[2345]	<220>		
[2346]	<223> 展示在AAV-BR1上的肽		
[2347]	<400> 57		
[2348]	Asn Arg Gly Thr Glu Trp Asp		
[2349]	1	5	
[2350]	<210> 58		
[2351]	<211> 27		
[2352]	<212> PRT		
[2353]	<213> 人工序列		
[2354]	<220>		
[2355]	<223> 非洲爪蟾(xenopus Levis)		
[2356]	<400> 58		
[2357]	Val Glu Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys		
[2358]	1	5	10 15
[2359]	Ile Lys Asn Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr		
[2360]	20	25	
[2361]	<210> 59		
[2362]	<211> 29		
[2363]	<212> PRT		
[2364]	<213> 人工序列		
[2365]	<220>		
[2366]	<223> 斑马鱼(danio rerio)		
[2367]	<400> 59		
[2368]	Val Glu Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Ala Phe Leu Lys		
[2369]	1	5	10 15
[2370]	Val Lys Lys Pro Tyr Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr		
[2371]	20	25	
[2372]	<210> 60		
[2373]	<211> 29		
[2374]	<212> PRT		
[2375]	<213> 人工序列		
[2376]	<220>		
[2377]	<223> 斑马鱼		
[2378]	<400> 60		

[2379]	Val Glu Pro Val Lys Ala Thr Arg His Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys
[2380]	1 5 10 15
[2381]	Ile Lys Lys Pro Tyr Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr
[2382]	20 25
[2383]	<210> 61
[2384]	<211> 29
[2385]	<212> PRT
[2386]	<213> 人工序列
[2387]	<220>
[2388]	<223> 小鼠 (mus musculus)
[2389]	<400> 61
[2390]	Val Glu Val Val Arg Ala Ser Arg Leu Arg Gln Pro Thr Phe Leu Arg
[2391]	1 5 10 15
[2392]	Ile Lys Gln Leu Arg Ser Tyr Gln Lys Pro Met Glu Thr
[2393]	20 25
[2394]	<210> 62
[2395]	<211> 29
[2396]	<212> PRT
[2397]	<213> 人工序列
[2398]	<220>
[2399]	<223> 红原鸡 (gallus gallus)
[2400]	<400> 62
[2401]	Val Glu Val Val Arg Ala Ser Arg Leu Arg Gln Pro Thr Phe Leu Lys
[2402]	1 5 10 15
[2403]	Ile Lys Gln Ile Lys Ser Tyr Gln Lys Pro Met Glu Thr
[2404]	20 25
[2405]	<210> 63
[2406]	<211> 29
[2407]	<212> PRT
[2408]	<213> 人工序列
[2409]	<220>
[2410]	<223> 非洲爪蟾
[2411]	<400> 63
[2412]	Val Glu Val Val Arg Ala Asn Arg Leu Arg Gln Pro Thr Phe Leu Lys
[2413]	1 5 10 15
[2414]	Ile Lys Lys Val Arg Ser Tyr Gln Lys Pro Met Glu Thr
[2415]	20 25
[2416]	<210> 64
[2417]	<211> 28

[2418]	<212>	PRT
[2419]	<213>	人工序列
[2420]	<220>	
[2421]	<223>	斑马鱼
[2422]	<400>	64
[2423]	Val Glu Val Val Arg Ala Ser Arg Leu Arg Gln Pro Thr Phe Leu Lys	
[2424]	1 5 10 15	
[2425]	Val Lys Arg Thr Arg His Gln Lys Pro Leu Glu Thr	
[2426]	20 25	
[2427]	<210>	65
[2428]	<211>	29
[2429]	<212>	PRT
[2430]	<213>	人工序列
[2431]	<220>	
[2432]	<223>	斑马鱼
[2433]	<400>	65
[2434]	Val Glu Ala Val Arg Ala Thr Arg Phe Arg Gln Pro Ser Phe Leu Arg	
[2435]	1 5 10 15	
[2436]	Leu Lys Gln Ser Arg Gly Tyr Ile Lys Pro Thr Asp Thr	
[2437]	20 25	
[2438]	<210>	66
[2439]	<211>	29
[2440]	<212>	PRT
[2441]	<213>	人工序列
[2442]	<220>	
[2443]	<223>	小鼠
[2444]	<400>	66
[2445]	Met Val Val Glu Lys His Arg Glu Ser Arg Gly Trp Val Glu Thr Leu	
[2446]	1 5 10 15	
[2447]	Arg Pro Arg Tyr Thr Tyr Phe Lys Val Pro Thr Glu Arg	
[2448]	20 25	
[2449]	<210>	67
[2450]	<211>	29
[2451]	<212>	PRT
[2452]	<213>	人工序列
[2453]	<220>	
[2454]	<223>	四重pWnt7a4A变体
[2455]	<400>	67
[2456]	Val Glu Pro Ala Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Ala Ala Lys	

[2457]	1	5	10	15
[2458]	Ile Lys Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Ala Pro Met Asp Thr			
[2459]	20	25		
[2460]	<210> 68			
[2461]	<211> 247			
[2462]	<212> PRT			
[2463]	<213> 人工序列			
[2464]	<220>			
[2465]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体Q17A			
[2466]	<400> 68			
[2467]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[2468]	1	5	10	15
[2469]	Ala Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[2470]	20	25	30	
[2471]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[2472]	35	40	45	
[2473]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[2474]	50	55	60	
[2475]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			
[2476]	65	70	75	80
[2477]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn			
[2478]	85	90	95	
[2479]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[2480]	100	105	110	
[2481]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[2482]	115	120	125	
[2483]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[2484]	130	135	140	
[2485]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[2486]	145	150	155	160
[2487]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[2488]	165	170	175	
[2489]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[2490]	180	185	190	
[2491]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[2492]	195	200	205	
[2493]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[2494]	210	215	220	
[2495]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			

[2496]	225	230	235	240
[2497]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys			
[2498]	245			
[2499]	<210> 69			
[2500]	<211> 247			
[2501]	<212> PRT			
[2502]	<213> 人工序列			
[2503]	<220>			
[2504]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体I20A			
[2505]	<400> 69			
[2506]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[2507]	1	5	10	15
[2508]	Gln Arg Ala Ala Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[2509]	20 25 30			
[2510]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[2511]	35 40 45			
[2512]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[2513]	50 55 60			
[2514]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			
[2515]	65 70 75 80			
[2516]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn			
[2517]	85 90 95			
[2518]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[2519]	100 105 110			
[2520]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[2521]	115 120 125			
[2522]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[2523]	130 135 140			
[2524]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[2525]	145 150 155 160			
[2526]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[2527]	165 170 175			
[2528]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[2529]	180 185 190			
[2530]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[2531]	195 200 205			
[2532]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[2533]	210 215 220			
[2534]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			

[2535]	225	230	235	240
[2536]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys			
[2537]	245			
[2538]	<210> 70			
[2539]	<211> 247			
[2540]	<212> PRT			
[2541]	<213> 人工序列			
[2542]	<220>			
[2543]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体P25A			
[2544]	<400> 70			
[2545]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[2546]	1	5	10	15
[2547]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Ala Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[2548]	20 25 30			
[2549]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[2550]	35 40 45			
[2551]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[2552]	50 55 60			
[2553]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			
[2554]	65 70 75 80			
[2555]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn			
[2556]	85 90 95			
[2557]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[2558]	100 105 110			
[2559]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[2560]	115 120 125			
[2561]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[2562]	130 135 140			
[2563]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[2564]	145 150 155 160			
[2565]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[2566]	165 170 175			
[2567]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[2568]	180 185 190			
[2569]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[2570]	195 200 205			
[2571]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[2572]	210 215 220			
[2573]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			

[2574]	225	230	235	240
[2575]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys			
[2576]	245			
[2577]	<210> 71			
[2578]	<211> 247			
[2579]	<212> PRT			
[2580]	<213> 人工序列			
[2581]	<220>			
[2582]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体M37A			
[2583]	<400> 71			
[2584]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[2585]	1	5	10	15
[2586]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[2587]	20	25	30	
[2588]	Glu Gly Ser Gln Ala Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[2589]	35	40	45	
[2590]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[2591]	50	55	60	
[2592]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			
[2593]	65	70	75	80
[2594]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn			
[2595]	85	90	95	
[2596]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[2597]	100	105	110	
[2598]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[2599]	115	120	125	
[2600]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[2601]	130	135	140	
[2602]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[2603]	145	150	155	160
[2604]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[2605]	165	170	175	
[2606]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[2607]	180	185	190	
[2608]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[2609]	195	200	205	
[2610]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[2611]	210	215	220	
[2612]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			

[2613]	225	230	235	240
[2614]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys			
[2615]	245			
[2616]	<210> 72			
[2617]	<211> 247			
[2618]	<212> PRT			
[2619]	<213> 人工序列			
[2620]	<220>			
[2621]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体L39A			
[2622]	<400> 72			
[2623]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[2624]	1	5	10	15
[2625]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[2626]	20 25 30			
[2627]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Ala Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[2628]	35 40 45			
[2629]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[2630]	50 55 60			
[2631]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			
[2632]	65 70 75 80			
[2633]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn			
[2634]	85 90 95			
[2635]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[2636]	100 105 110			
[2637]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[2638]	115 120 125			
[2639]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[2640]	130 135 140			
[2641]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[2642]	145 150 155 160			
[2643]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[2644]	165 170 175			
[2645]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[2646]	180 185 190			
[2647]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[2648]	195 200 205			
[2649]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[2650]	210 215 220			
[2651]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			

[2652]	225	230	235	240
[2653]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys			
[2654]	245			
[2655]	<210> 73			
[2656]	<211> 25			
[2657]	<212> DNA			
[2658]	<213> 人工序列			
[2659]	<220>			
[2660]	<223> wnt7aa吗啉寡核苷酸			
[2661]	<400> 73			
[2662]	ttccatttga ccctacttac ccaat 25			
[2663]	<210> 74			
[2664]	<211> 247			
[2665]	<212> PRT			
[2666]	<213> 人工序列			
[2667]	<220>			
[2668]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体I28A			
[2669]	<400> 74			
[2670]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[2671]	1	5	10	15
[2672]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ala Ile Val Ile Gly			
[2673]	20	25	30	
[2674]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[2675]	35	40	45	
[2676]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[2677]	50	55	60	
[2678]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			
[2679]	65	70	75	80
[2680]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn			
[2681]	85	90	95	
[2682]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[2683]	100	105	110	
[2684]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[2685]	115	120	125	
[2686]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[2687]	130	135	140	
[2688]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[2689]	145	150	155	160
[2690]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			

[2691]					165					170						175
[2692]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[2693]					180					185						190
[2694]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[2695]					195					200						205
[2696]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[2697]					210					215						220
[2698]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[2699]	225						230				235					240
[2700]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys									
[2701]							245									
[2702]	<210> 75															
[2703]	<211> 247															
[2704]	<212> PRT															
[2705]	<213> 人工序列															
[2706]	<220>															
[2707]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体R50A															
[2708]	<400> 75															
[2709]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg
[2710]	1				5					10					15	
[2711]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly
[2712]					20					25				30		
[2713]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn
[2714]					35					40				45		
[2715]	Gly	Ala	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys
[2716]					50					55				60		
[2717]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile
[2718]	65						70				75					80
[2719]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn
[2720]					85					90				95		
[2721]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg
[2722]					100					105				110		
[2723]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly
[2724]					115					120				125		
[2725]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn
[2726]					130					135				140		
[2727]	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile
[2728]	145						150				155					160
[2729]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly

[2730]					165					170						175
[2731]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[2732]					180					185						190
[2733]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[2734]					195					200						205
[2735]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[2736]					210					215						220
[2737]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[2738]	225						230				235					240
[2739]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys									
[2740]							245									
[2741]	<210> 76															
[2742]	<211> 247															
[2743]	<212> PRT															
[2744]	<213> 人工序列															
[2745]	<220>															
[2746]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体V68A															
[2747]	<400> 76															
[2748]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg
[2749]	1				5					10					15	
[2750]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly
[2751]					20					25					30	
[2752]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn
[2753]					35					40					45	
[2754]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys
[2755]					50					55					60	
[2756]	Glu	Leu	Lys	Ala	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile
[2757]	65						70				75					80
[2758]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn
[2759]					85					90						95
[2760]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg
[2761]					100					105						110
[2762]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly
[2763]					115					120						125
[2764]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn
[2765]					130					135						140
[2766]	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile
[2767]	145						150				155					160
[2768]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly

[2769]					165					170						175
[2770]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[2771]					180					185						190
[2772]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[2773]					195					200						205
[2774]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[2775]					210					215						220
[2776]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[2777]	225						230				235					240
[2778]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys									
[2779]							245									
[2780]	<210> 77															
[2781]	<211> 247															
[2782]	<212> PRT															
[2783]	<213> 人工序列															
[2784]	<220>															
[2785]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体F135A															
[2786]	<400> 77															
[2787]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg
[2788]	1				5					10					15	
[2789]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly
[2790]					20					25					30	
[2791]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn
[2792]					35					40					45	
[2793]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys
[2794]					50					55					60	
[2795]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile
[2796]	65						70				75					80
[2797]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn
[2798]					85					90						95
[2799]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg
[2800]					100					105						110
[2801]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly
[2802]					115					120						125
[2803]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Ala	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn
[2804]					130					135						140
[2805]	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile
[2806]	145						150				155					160
[2807]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly

[2808]					165					170						175
[2809]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[2810]					180					185						190
[2811]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[2812]					195					200						205
[2813]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[2814]					210					215						220
[2815]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[2816]	225						230				235					240
[2817]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys									
[2818]							245									
[2819]	<210>	78														
[2820]	<211>	247														
[2821]	<212>	PRT														
[2822]	<213>	人工序列														
[2823]	<220>															
[2824]	<223>	人N端结构域(NTD)Wnt7a变体R146A														
[2825]	<400>	78														
[2826]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg
[2827]	1				5					10					15	
[2828]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly
[2829]					20					25				30		
[2830]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn
[2831]					35					40				45		
[2832]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys
[2833]					50					55				60		
[2834]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile
[2835]	65						70				75					80
[2836]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn
[2837]					85					90				95		
[2838]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg
[2839]					100					105				110		
[2840]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly
[2841]					115					120				125		
[2842]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn
[2843]					130					135				140		
[2844]	Ala	Ala	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile
[2845]	145						150				155					160
[2846]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly

[2847]					165					170						175
[2848]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[2849]					180					185						190
[2850]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[2851]					195					200						205
[2852]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[2853]					210					215						220
[2854]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[2855]	225						230				235					240
[2856]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys									
[2857]							245									
[2858]	<210> 79															
[2859]	<211> 247															
[2860]	<212> PRT															
[2861]	<213> 人工序列															
[2862]	<220>															
[2863]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体K159S															
[2864]	<400> 79															
[2865]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg
[2866]	1				5					10					15	
[2867]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly
[2868]					20					25				30		
[2869]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn
[2870]					35					40				45		
[2871]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys
[2872]					50					55				60		
[2873]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile
[2874]	65						70				75					80
[2875]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn
[2876]					85					90				95		
[2877]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg
[2878]					100					105				110		
[2879]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly
[2880]					115					120				125		
[2881]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn
[2882]					130					135				140		
[2883]	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Ser	Ile
[2884]	145						150				155					160
[2885]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly

[2886]					165					170						175
[2887]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[2888]					180					185						190
[2889]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[2890]					195					200						205
[2891]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[2892]					210					215						220
[2893]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[2894]	225						230				235					240
[2895]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys									
[2896]							245									
[2897]	<210>	80														
[2898]	<211>	247														
[2899]	<212>	PRT														
[2900]	<213>	人工序列														
[2901]	<220>															
[2902]	<223>	人N端结构域(NTD)Wnt7a变体K159L														
[2903]	<400>	80														
[2904]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg
[2905]	1				5					10					15	
[2906]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly
[2907]					20					25				30		
[2908]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn
[2909]					35					40				45		
[2910]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys
[2911]					50					55				60		
[2912]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile
[2913]	65						70				75					80
[2914]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn
[2915]					85					90						95
[2916]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg
[2917]					100					105				110		
[2918]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly
[2919]					115					120				125		
[2920]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn
[2921]					130					135				140		
[2922]	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Leu	Ile
[2923]	145						150				155					160
[2924]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly

[2925]					165					170						175
[2926]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[2927]					180					185						190
[2928]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[2929]					195					200						205
[2930]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[2931]					210					215						220
[2932]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[2933]	225						230				235					240
[2934]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys									
[2935]							245									
[2936]	<210> 81															
[2937]	<211> 247															
[2938]	<212> PRT															
[2939]	<213> 人工序列															
[2940]	<220>															
[2941]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体K200A															
[2942]	<400> 81															
[2943]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg
[2944]	1				5					10					15	
[2945]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly
[2946]					20					25					30	
[2947]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn
[2948]					35					40					45	
[2949]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys
[2950]					50					55					60	
[2951]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile
[2952]	65						70				75					80
[2953]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn
[2954]						85					90					95
[2955]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg
[2956]					100					105					110	
[2957]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly
[2958]					115					120					125	
[2959]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn
[2960]					130					135					140	
[2961]	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile
[2962]	145						150				155					160
[2963]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly

[2964]					165					170						175
[2965]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[2966]					180					185						190
[2967]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Ala	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[2968]					195					200						205
[2969]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[2970]					210					215						220
[2971]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[2972]					225					230						240
[2973]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys									
[2974]																
[2975]	<210>	82														
[2976]	<211>	247														
[2977]	<212>	PRT														
[2978]	<213>	人工序列														
[2979]	<220>															
[2980]	<223>	人N端结构域(NTD)Wnt7a变体R214A														
[2981]	<400>	82														
[2982]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg
[2983]	1				5					10					15	
[2984]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly
[2985]					20					25					30	
[2986]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn
[2987]					35					40					45	
[2988]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys
[2989]					50					55					60	
[2990]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile
[2991]	65									70					75	80
[2992]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn
[2993]					85					90					95	
[2994]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg
[2995]					100					105					110	
[2996]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly
[2997]					115					120					125	
[2998]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn
[2999]					130					135					140	
[3000]	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile
[3001]	145									150					155	160
[3002]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly

[3003]					165					170						175
[3004]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[3005]					180					185						190
[3006]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[3007]					195					200						205
[3008]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[3009]					210					215						220
[3010]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[3011]	225						230				235					240
[3012]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys									
[3013]							245									
[3014]	<210> 83															
[3015]	<211> 247															
[3016]	<212> PRT															
[3017]	<213> 人工序列															
[3018]	<220>															
[3019]	<223> 人N端结构域(NTD)Wnt7a变体P218A															
[3020]	<400> 83															
[3021]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg
[3022]	1				5					10					15	
[3023]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly
[3024]					20					25					30	
[3025]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn
[3026]					35					40					45	
[3027]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys
[3028]					50					55					60	
[3029]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile
[3030]	65						70				75					80
[3031]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn
[3032]					85					90						95
[3033]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg
[3034]					100					105						110
[3035]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly
[3036]					115					120						125
[3037]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn
[3038]					130					135						140
[3039]	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile
[3040]	145						150				155					160
[3041]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly

[3042]					165					170						175
[3043]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[3044]					180					185						190
[3045]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[3046]					195					200						205
[3047]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[3048]					210					215						220
[3049]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[3050]	225						230				235					240
[3051]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys									
[3052]							245									
[3053]	<210>	84														
[3054]	<211>	318														
[3055]	<212>	PRT														
[3056]	<213>	人工序列														
[3057]	<220>															
[3058]	<223>	人Wnt7a变体K318A														
[3059]	<400>	84														
[3060]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg
[3061]	1				5					10					15	
[3062]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly
[3063]					20					25					30	
[3064]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn
[3065]					35					40					45	
[3066]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys
[3067]					50					55					60	
[3068]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile
[3069]	65						70				75					80
[3070]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn
[3071]						85					90					95
[3072]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg
[3073]					100						105				110	
[3074]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly
[3075]					115						120				125	
[3076]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn
[3077]					130						135				140	
[3078]	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile
[3079]	145						150				155					160
[3080]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly

[3081]					165					170						175
[3082]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[3083]					180					185						190
[3084]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[3085]					195					200						205
[3086]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[3087]					210					215						220
[3088]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[3089]					225					230						240
[3090]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Ser	Val
[3091]					245					250						255
[3092]	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	Ala	Cys	Asn	Lys	Thr	Ala	Pro	Gln	Ala	Ser	Gly
[3093]					260					265						270
[3094]	Cys	Asp	Leu	Met	Cys	Cys	Gly	Arg	Gly	Tyr	Asn	Thr	His	Gln	Tyr	Ala
[3095]					275					280						285
[3096]	Arg	Val	Trp	Gln	Cys	Asn	Cys	Lys	Phe	His	Trp	Cys	Cys	Tyr	Val	Lys
[3097]					290					295						300
[3098]	Cys	Asn	Thr	Cys	Ser	Glu	Arg	Thr	Glu	Met	Tyr	Thr	Cys	Ala		
[3099]					305					310						315
[3100]	<210> 85															
[3101]	<211> 318															
[3102]	<212> PRT															
[3103]	<213> 人工序列															
[3104]	<220>															
[3105]	<223> 人Wnt7a变体K159A															
[3106]	<400> 85															
[3107]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg
[3108]	1				5					10					15	
[3109]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly
[3110]					20					25					30	
[3111]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn
[3112]					35					40					45	
[3113]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys
[3114]					50					55					60	
[3115]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile
[3116]	65				70					75					80	
[3117]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn
[3118]					85					90					95	
[3119]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg

[3120]	100	105	110
[3121]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly		
[3122]	115	120	125
[3123]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn		
[3124]	130	135	140
[3125]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Ala Ile		
[3126]	145	150	155
[3127]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly		
[3128]	165	170	175
[3129]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu		
[3130]	180	185	190
[3131]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu		
[3132]	195	200	205
[3133]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys		
[3134]	210	215	220
[3135]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile		
[3136]	225	230	235
[3137]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val		
[3138]	245	250	255
[3139]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly		
[3140]	260	265	270
[3141]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala		
[3142]	275	280	285
[3143]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys		
[3144]	290	295	300
[3145]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys		
[3146]	305	310	315
[3147]	<210> 86		
[3148]	<211> 318		
[3149]	<212> PRT		
[3150]	<213> 人工序列		
[3151]	<220>		
[3152]	<223> 人Wnt7a变体A27R		
[3153]	<400> 86		
[3154]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg		
[3155]	1	5	10
[3156]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Arg Ile Ile Val Ile Gly		
[3157]	20	25	30
[3158]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn		

[3159]	35	40	45
[3160]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys		
[3161]	50	55	60
[3162]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile		
[3163]	65	70	75
[3164]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[3165]	85	90	95
[3166]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg		
[3167]	100	105	110
[3168]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly		
[3169]	115	120	125
[3170]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn		
[3171]	130	135	140
[3172]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile		
[3173]	145	150	155
[3174]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly		
[3175]	165	170	175
[3176]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu		
[3177]	180	185	190
[3178]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu		
[3179]	195	200	205
[3180]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys		
[3181]	210	215	220
[3182]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile		
[3183]	225	230	235
[3184]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val		
[3185]	245	250	255
[3186]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly		
[3187]	260	265	270
[3188]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala		
[3189]	275	280	285
[3190]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys		
[3191]	290	295	300
[3192]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys		
[3193]	305	310	315
[3194]	<210> 87		
[3195]	<211> 318		
[3196]	<212> PRT		
[3197]	<213> 人工序列		

[3198]	<220>	
[3199]	<223>	人Wnt7a变体E33A
[3200]	<400>	87
[3201]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg	
[3202]	1	5 10 15
[3203]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly	
[3204]	20	25 30
[3205]	Ala Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn	
[3206]	35	40 45
[3207]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys	
[3208]	50	55 60
[3209]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile	
[3210]	65	70 75 80
[3211]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn	
[3212]	85	90 95
[3213]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg	
[3214]	100	105 110
[3215]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly	
[3216]	115	120 125
[3217]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn	
[3218]	130	135 140
[3219]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile	
[3220]	145	150 155 160
[3221]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly	
[3222]	165	170 175
[3223]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu	
[3224]	180	185 190
[3225]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu	
[3226]	195	200 205
[3227]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys	
[3228]	210	215 220
[3229]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile	
[3230]	225	230 235 240
[3231]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val	
[3232]	245	250 255
[3233]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly	
[3234]	260	265 270
[3235]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala	
[3236]	275	280 285

[3237]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys
[3238]	290 295 300
[3239]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[3240]	305 310 315
[3241]	<210> 88
[3242]	<211> 318
[3243]	<212> PRT
[3244]	<213> 人工序列
[3245]	<220>
[3246]	<223> 人Wnt7a 变体E41A
[3247]	<400> 88
[3248]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg
[3249]	1 5 10 15
[3250]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly
[3251]	20 25 30
[3252]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Ala Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn
[3253]	35 40 45
[3254]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys
[3255]	50 55 60
[3256]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile
[3257]	65 70 75 80
[3258]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn
[3259]	85 90 95
[3260]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg
[3261]	100 105 110
[3262]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly
[3263]	115 120 125
[3264]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn
[3265]	130 135 140
[3266]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile
[3267]	145 150 155 160
[3268]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly
[3269]	165 170 175
[3270]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu
[3271]	180 185 190
[3272]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu
[3273]	195 200 205
[3274]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys
[3275]	210 215 220

[3276]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile
[3277]	225 230 235 240
[3278]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val
[3279]	245 250 255
[3280]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly
[3281]	260 265 270
[3282]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala
[3283]	275 280 285
[3284]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys
[3285]	290 295 300
[3286]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[3287]	305 310 315
[3288]	<210> 89
[3289]	<211> 318
[3290]	<212> PRT
[3291]	<213> 人工序列
[3292]	<220>
[3293]	<223> 人Wnt7a变体F44A
[3294]	<400> 89
[3295]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg
[3296]	1 5 10 15
[3297]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly
[3298]	20 25 30
[3299]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Ala Gln Phe Arg Asn
[3300]	35 40 45
[3301]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys
[3302]	50 55 60
[3303]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile
[3304]	65 70 75 80
[3305]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn
[3306]	85 90 95
[3307]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg
[3308]	100 105 110
[3309]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly
[3310]	115 120 125
[3311]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn
[3312]	130 135 140
[3313]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile
[3314]	145 150 155 160

[3315]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly
[3316]					165					170					175	
[3317]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[3318]					180					185					190	
[3319]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[3320]					195					200					205	
[3321]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[3322]			210						215				220			
[3323]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[3324]	225					230					235					240
[3325]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Ser	Val
[3326]					245						250					255
[3327]	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	Ala	Cys	Asn	Lys	Thr	Ala	Pro	Gln	Ala	Ser	Gly
[3328]					260						265					270
[3329]	Cys	Asp	Leu	Met	Cys	Cys	Gly	Arg	Gly	Tyr	Asn	Thr	His	Gln	Tyr	Ala
[3330]			275						280					285		
[3331]	Arg	Val	Trp	Gln	Cys	Asn	Cys	Lys	Phe	His	Trp	Cys	Cys	Tyr	Val	Lys
[3332]			290						295				300			
[3333]	Cys	Asn	Thr	Cys	Ser	Glu	Arg	Thr	Glu	Met	Tyr	Thr	Cys	Lys		
[3334]	305					310							315			
[3335]	<210> 90															
[3336]	<211> 318															
[3337]	<212> PRT															
[3338]	<213> 人工序列															
[3339]	<220>															
[3340]	<223> 人Wnt7a 变体N52Q															
[3341]	<400> 90															
[3342]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg
[3343]	1				5					10					15	
[3344]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly
[3345]					20					25					30	
[3346]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn
[3347]					35					40					45	
[3348]	Gly	Arg	Trp	Gln	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys
[3349]					50					55					60	
[3350]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile
[3351]	65					70					75					80
[3352]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn
[3353]					85						90					95

[3354]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg		
[3355]	100	105	110
[3356]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly		
[3357]	115	120	125
[3358]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn		
[3359]	130	135	140
[3360]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile		
[3361]	145	150	155
[3362]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly		
[3363]	165	170	175
[3364]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu		
[3365]	180	185	190
[3366]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu		
[3367]	195	200	205
[3368]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys		
[3369]	210	215	220
[3370]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile		
[3371]	225	230	235
[3372]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val		
[3373]	245	250	255
[3374]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly		
[3375]	260	265	270
[3376]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala		
[3377]	275	280	285
[3378]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys		
[3379]	290	295	300
[3380]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys		
[3381]	305	310	315
[3382]	<210> 91		
[3383]	<211> 318		
[3384]	<212> PRT		
[3385]	<213> 人工序列		
[3386]	<220>		
[3387]	<223> 人Wnt7a 变体I129A		
[3388]	<400> 91		
[3389]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg		
[3390]	1	5	10
[3391]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly		
[3392]	20	25	30

[3393]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn
[3394]	35 40 45
[3395]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys
[3396]	50 55 60
[3397]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile
[3398]	65 70 75 80
[3399]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn
[3400]	85 90 95
[3401]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg
[3402]	100 105 110
[3403]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly
[3404]	115 120 125
[3405]	Ala Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn
[3406]	130 135 140
[3407]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile
[3408]	145 150 155 160
[3409]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly
[3410]	165 170 175
[3411]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu
[3412]	180 185 190
[3413]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu
[3414]	195 200 205
[3415]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys
[3416]	210 215 220
[3417]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile
[3418]	225 230 235 240
[3419]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val
[3420]	245 250 255
[3421]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly
[3422]	260 265 270
[3423]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala
[3424]	275 280 285
[3425]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys
[3426]	290 295 300
[3427]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[3428]	305 310 315
[3429]	<210> 92
[3430]	<211> 318
[3431]	<212> PRT

[3432]	<213> 人工序列															
[3433]	<220>															
[3434]	<223> 人Wnt7a变体 F131A															
[3435]	<400> 92															
[3436]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg
[3437]	1				5					10					15	
[3438]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly
[3439]					20					25					30	
[3440]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn
[3441]					35					40					45	
[3442]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys
[3443]					50					55					60	
[3444]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile
[3445]	65					70					75					80
[3446]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn
[3447]						85					90					95
[3448]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg
[3449]						100					105					110
[3450]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly
[3451]						115					120					125
[3452]	Ile	Gly	Ala	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn
[3453]						130					135					140
[3454]	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile
[3455]	145						150					155				160
[3456]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly
[3457]						165					170					175
[3458]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[3459]						180					185					190
[3460]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[3461]						195					200					205
[3462]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[3463]						210					215					220
[3464]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[3465]	225						230					235				240
[3466]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Ser	Val
[3467]						245					250					255
[3468]	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	Ala	Cys	Asn	Lys	Thr	Ala	Pro	Gln	Ala	Ser	Gly
[3469]						260					265					270
[3470]	Cys	Asp	Leu	Met	Cys	Cys	Gly	Arg	Gly	Tyr	Asn	Thr	His	Gln	Tyr	Ala

[3471]	275	280	285
[3472]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys		
[3473]	290	295	300
[3474]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys		
[3475]	305	310	315
[3476]	<210> 93		
[3477]	<211> 318		
[3478]	<212> PRT		
[3479]	<213> 人工序列		
[3480]	<220>		
[3481]	<223> 人Wnt7a变体 K133A		
[3482]	<400> 93		
[3483]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg		
[3484]	1	5	10
[3485]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly		
[3486]	20	25	30
[3487]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn		
[3488]	35	40	45
[3489]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys		
[3490]	50	55	60
[3491]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile		
[3492]	65	70	75
[3493]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[3494]	85	90	95
[3495]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg		
[3496]	100	105	110
[3497]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly		
[3498]	115	120	125
[3499]	Ile Gly Phe Ala Ala Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn		
[3500]	130	135	140
[3501]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile		
[3502]	145	150	155
[3503]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly		
[3504]	165	170	175
[3505]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu		
[3506]	180	185	190
[3507]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu		
[3508]	195	200	205
[3509]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys		

[3510]	210	215	220
[3511]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg	Lys Pro Met Asp Thr Asp	Leu Val Tyr Ile
[3512]	225	230	235 240
[3513]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr	Cys Glu Glu Asp Pro Val	Thr Gly Ser Val
[3514]	245	250	255
[3515]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala	Cys Asn Lys Thr Ala Pro	Gln Ala Ser Gly
[3516]	260	265	270
[3517]	Cys Asp Leu Met Cys Cys	Gly Arg Gly Tyr Asn Thr	His Gln Tyr Ala
[3518]	275	280	285
[3519]	Arg Val Trp Gln Cys Asn	Cys Lys Phe His Trp Cys	Cys Tyr Val Lys
[3520]	290	295	300
[3521]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu	Arg Thr Glu Met Tyr Thr	Cys Lys
[3522]	305	310	315
[3523]	<210> 94		
[3524]	<211> 318		
[3525]	<212> PRT		
[3526]	<213> 人工序列		
[3527]	<220>		
[3528]	<223> 人Wnt7a变体 I141A		
[3529]	<400> 94		
[3530]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile	Cys Asn Lys Ile Pro Gly	Leu Ala Pro Arg
[3531]	1	5	10 15
[3532]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln	Ser Arg Pro Asp Ala Ile	Ile Val Ile Gly
[3533]	20	25	30
[3534]	Glu Gly Ser Gln Met Gly	Leu Asp Glu Cys Gln Phe	Gln Phe Arg Asn
[3535]	35	40	45
[3536]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser	Ala Leu Gly Glu Arg Thr	Val Phe Gly Lys
[3537]	50	55	60
[3538]	Glu Leu Lys Val Gly Ser	Arg Glu Ala Ala Phe Thr	Tyr Ala Ile Ile
[3539]	65	70	75 80
[3540]	Ala Ala Gly Val Ala His	Ala Ile Thr Ala Ala Cys	Thr Gln Gly Asn
[3541]	85	90	95
[3542]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys	Asp Lys Glu Lys Gln Gly	Gln Tyr His Arg
[3543]	100	105	110
[3544]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp	Gly Gly Cys Ser Ala Asp	Ile Arg Tyr Gly
[3545]	115	120	125
[3546]	Ile Gly Phe Ala Lys Val	Phe Val Asp Ala Arg Glu	Ala Lys Gln Asn
[3547]	130	135	140
[3548]	Ala Arg Thr Leu Met Asn	Leu His Asn Asn Glu Ala	Gly Arg Lys Ile

[3549]	145	150	155	160
[3550]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[3551]		165	170	175
[3552]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[3553]		180	185	190
[3554]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[3555]		195	200	205
[3556]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[3557]		210	215	220
[3558]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			
[3559]	225	230	235	240
[3560]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val			
[3561]		245	250	255
[3562]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly			
[3563]		260	265	270
[3564]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala			
[3565]		275	280	285
[3566]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys			
[3567]		290	295	300
[3568]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys			
[3569]	305	310	315	
[3570]	<210> 95			
[3571]	<211> 318			
[3572]	<212> PRT			
[3573]	<213> 人工序列			
[3574]	<220>			
[3575]	<223> 人Wnt7a变体 R158A			
[3576]	<400> 95			
[3577]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			
[3578]	1	5	10	15
[3579]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[3580]		20	25	30
[3581]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[3582]		35	40	45
[3583]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[3584]		50	55	60
[3585]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			
[3586]	65	70	75	80
[3587]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn			

[3588]	85																90				95			
[3589]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg								
[3590]	100								105				110											
[3591]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly								
[3592]	115						120				125													
[3593]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn								
[3594]	130					135					140													
[3595]	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Ala	Lys	Ile								
[3596]	145				150					155					160									
[3597]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly								
[3598]	165							170				175												
[3599]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu								
[3600]	180						185				190													
[3601]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu								
[3602]	195						200				205													
[3603]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys								
[3604]	210					215					220													
[3605]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile								
[3606]	225				230					235					240									
[3607]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Ser	Val								
[3608]	245							250				255												
[3609]	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	Ala	Cys	Asn	Lys	Thr	Ala	Pro	Gln	Ala	Ser	Gly								
[3610]	260						265				270													
[3611]	Cys	Asp	Leu	Met	Cys	Cys	Gly	Arg	Gly	Tyr	Asn	Thr	His	Gln	Tyr	Ala								
[3612]	275					280					285													
[3613]	Arg	Val	Trp	Gln	Cys	Asn	Cys	Lys	Phe	His	Trp	Cys	Cys	Tyr	Val	Lys								
[3614]	290				295					300														
[3615]	Cys	Asn	Thr	Cys	Ser	Glu	Arg	Thr	Glu	Met	Tyr	Thr	Cys	Lys										
[3616]	305				310					315														
[3617]	<210> 96																							
[3618]	<211> 318																							
[3619]	<212> PRT																							
[3620]	<213> 人工序列																							
[3621]	<220>																							
[3622]	<223> 人Wnt7a变体 K181A																							
[3623]	<400> 96																							
[3624]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg								
[3625]	1		5					10					15											
[3626]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly								

[3627]	20	25	30
[3628]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn		
[3629]	35	40	45
[3630]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys		
[3631]	50	55	60
[3632]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile		
[3633]	65	70	75
[3634]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[3635]	85	90	95
[3636]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg		
[3637]	100	105	110
[3638]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly		
[3639]	115	120	125
[3640]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn		
[3641]	130	135	140
[3642]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile		
[3643]	145	150	155
[3644]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly		
[3645]	165	170	175
[3646]	Ser Cys Thr Thr Ala Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu		
[3647]	180	185	190
[3648]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu		
[3649]	195	200	205
[3650]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys		
[3651]	210	215	220
[3652]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile		
[3653]	225	230	235
[3654]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val		
[3655]	245	250	255
[3656]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly		
[3657]	260	265	270
[3658]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala		
[3659]	275	280	285
[3660]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys		
[3661]	290	295	300
[3662]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys		
[3663]	305	310	315
[3664]	<210> 97		
[3665]	<211> 318		

[3666]	<212>	PRT
[3667]	<213>	人工序列
[3668]	<220>	
[3669]	<223>	人Wnt7a变体 R191A
[3670]	<400>	97
[3671]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg	
[3672]	1 5 10 15	
[3673]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly	
[3674]	20 25 30	
[3675]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn	
[3676]	35 40 45	
[3677]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys	
[3678]	50 55 60	
[3679]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile	
[3680]	65 70 75 80	
[3681]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn	
[3682]	85 90 95	
[3683]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg	
[3684]	100 105 110	
[3685]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly	
[3686]	115 120 125	
[3687]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn	
[3688]	130 135 140	
[3689]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile	
[3690]	145 150 155 160	
[3691]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly	
[3692]	165 170 175	
[3693]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Ala Glu	
[3694]	180 185 190	
[3695]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu	
[3696]	195 200 205	
[3697]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys	
[3698]	210 215 220	
[3699]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile	
[3700]	225 230 235 240	
[3701]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val	
[3702]	245 250 255	
[3703]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly	
[3704]	260 265 270	

[3705]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala
[3706]	275 280 285
[3707]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys
[3708]	290 295 300
[3709]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[3710]	305 310 315
[3711]	<210> 98
[3712]	<211> 318
[3713]	<212> PRT
[3714]	<213> 人工序列
[3715]	<220>
[3716]	<223> 人Wnt7a变体 K198A
[3717]	<400> 98
[3718]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg
[3719]	1 5 10 15
[3720]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly
[3721]	20 25 30
[3722]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn
[3723]	35 40 45
[3724]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys
[3725]	50 55 60
[3726]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile
[3727]	65 70 75 80
[3728]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn
[3729]	85 90 95
[3730]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg
[3731]	100 105 110
[3732]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly
[3733]	115 120 125
[3734]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn
[3735]	130 135 140
[3736]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile
[3737]	145 150 155 160
[3738]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly
[3739]	165 170 175
[3740]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu
[3741]	180 185 190
[3742]	Leu Gly Tyr Val Leu Ala Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu
[3743]	195 200 205

[3744]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys
[3745]	210 215 220
[3746]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile
[3747]	225 230 235 240
[3748]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val
[3749]	245 250 255
[3750]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly
[3751]	260 265 270
[3752]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala
[3753]	275 280 285
[3754]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys
[3755]	290 295 300
[3756]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[3757]	305 310 315
[3758]	<210> 99
[3759]	<211> 317
[3760]	<212> PRT
[3761]	<213> 人工序列
[3762]	<220>
[3763]	<223> 人Wnt7a变体 V205A
[3764]	<400> 99
[3765]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg
[3766]	1 5 10 15
[3767]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly
[3768]	20 25 30
[3769]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn
[3770]	35 40 45
[3771]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys
[3772]	50 55 60
[3773]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile
[3774]	65 70 75 80
[3775]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn
[3776]	85 90 95
[3777]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg
[3778]	100 105 110
[3779]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly
[3780]	115 120 125
[3781]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn
[3782]	130 135 140

[3783]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile
[3784]	145 150 155 160
[3785]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly
[3786]	165 170 175
[3787]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu
[3788]	180 185 190
[3789]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Ala His Val Glu
[3790]	195 200 205
[3791]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys
[3792]	210 215 220
[3793]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile
[3794]	225 230 235 240
[3795]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val Gly
[3796]	245 250 255
[3797]	Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly Cys
[3798]	260 265 270
[3799]	Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala Arg
[3800]	275 280 285
[3801]	Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys
[3802]	290 295 300
[3803]	Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[3804]	305 310 315
[3805]	<210> 100
[3806]	<211> 318
[3807]	<212> PRT
[3808]	<213> 人工序列
[3809]	<220>
[3810]	<223> 人Wnt7a变体 E208A
[3811]	<400> 100
[3812]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg
[3813]	1 5 10 15
[3814]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly
[3815]	20 25 30
[3816]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn
[3817]	35 40 45
[3818]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys
[3819]	50 55 60
[3820]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile
[3821]	65 70 75 80

[3822]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn
[3823]	85 90 95
[3824]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg
[3825]	100 105 110
[3826]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly
[3827]	115 120 125
[3828]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn
[3829]	130 135 140
[3830]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile
[3831]	145 150 155 160
[3832]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly
[3833]	165 170 175
[3834]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu
[3835]	180 185 190
[3836]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Ala
[3837]	195 200 205
[3838]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys
[3839]	210 215 220
[3840]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile
[3841]	225 230 235 240
[3842]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val
[3843]	245 250 255
[3844]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly
[3845]	260 265 270
[3846]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala
[3847]	275 280 285
[3848]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys
[3849]	290 295 300
[3850]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[3851]	305 310 315
[3852]	<210> 101
[3853]	<211> 318
[3854]	<212> PRT
[3855]	<213> 人工序列
[3856]	<220>
[3857]	<223> 人Wnt7a变体 K216A
[3858]	<400> 101
[3859]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg
[3860]	1 5 10 15

[3861]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly
[3862]	20 25 30
[3863]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn
[3864]	35 40 45
[3865]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys
[3866]	50 55 60
[3867]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile
[3868]	65 70 75 80
[3869]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn
[3870]	85 90 95
[3871]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg
[3872]	100 105 110
[3873]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly
[3874]	115 120 125
[3875]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn
[3876]	130 135 140
[3877]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile
[3878]	145 150 155 160
[3879]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly
[3880]	165 170 175
[3881]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu
[3882]	180 185 190
[3883]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu
[3884]	195 200 205
[3885]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Ala Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys
[3886]	210 215 220
[3887]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile
[3888]	225 230 235 240
[3889]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val
[3890]	245 250 255
[3891]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly
[3892]	260 265 270
[3893]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala
[3894]	275 280 285
[3895]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys
[3896]	290 295 300
[3897]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[3898]	305 310 315
[3899]	<210> 102

[3900]	<211>	318
[3901]	<212>	PRT
[3902]	<213>	人工序列
[3903]	<220>	
[3904]	<223>	人Wnt7a变体 K222A
[3905]	<400>	102
[3906]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg	
[3907]	1 5 10 15	
[3908]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly	
[3909]	20 25 30	
[3910]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn	
[3911]	35 40 45	
[3912]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys	
[3913]	50 55 60	
[3914]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile	
[3915]	65 70 75 80	
[3916]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn	
[3917]	85 90 95	
[3918]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg	
[3919]	100 105 110	
[3920]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly	
[3921]	115 120 125	
[3922]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn	
[3923]	130 135 140	
[3924]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile	
[3925]	145 150 155 160	
[3926]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly	
[3927]	165 170 175	
[3928]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu	
[3929]	180 185 190	
[3930]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu	
[3931]	195 200 205	
[3932]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Ala Ile Lys	
[3933]	210 215 220	
[3934]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile	
[3935]	225 230 235 240	
[3936]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val	
[3937]	245 250 255	
[3938]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly	

[3939]	260	265	270
[3940]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala		
[3941]	275	280	285
[3942]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys		
[3943]	290	295	300
[3944]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys		
[3945]	305	310	315
[3946]	<210> 103		
[3947]	<211> 318		
[3948]	<212> PRT		
[3949]	<213> 人工序列		
[3950]	<220>		
[3951]	<223> 人Wnt7a变体 I223A		
[3952]	<400> 103		
[3953]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg		
[3954]	1 5 10 15		
[3955]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly		
[3956]	20 25 30		
[3957]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn		
[3958]	35 40 45		
[3959]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys		
[3960]	50 55 60		
[3961]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile		
[3962]	65 70 75 80		
[3963]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[3964]	85 90 95		
[3965]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg		
[3966]	100 105 110		
[3967]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly		
[3968]	115 120 125		
[3969]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn		
[3970]	130 135 140		
[3971]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile		
[3972]	145 150 155 160		
[3973]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly		
[3974]	165 170 175		
[3975]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu		
[3976]	180 185 190		
[3977]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu		

[3978]	195	200	205
[3979]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ala Lys		
[3980]	210	215	220
[3981]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile		
[3982]	225	230	235
[3983]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val		
[3984]	245	250	255
[3985]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly		
[3986]	260	265	270
[3987]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala		
[3988]	275	280	285
[3989]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys		
[3990]	290	295	300
[3991]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys		
[3992]	305	310	315
[3993]	<210> 104		
[3994]	<211> 318		
[3995]	<212> PRT		
[3996]	<213> 人工序列		
[3997]	<220>		
[3998]	<223> 人Wnt7a变体 Y229A		
[3999]	<400> 104		
[4000]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg		
[4001]	1	5	10
[4002]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly		
[4003]	20	25	30
[4004]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn		
[4005]	35	40	45
[4006]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys		
[4007]	50	55	60
[4008]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile		
[4009]	65	70	75
[4010]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[4011]	85	90	95
[4012]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg		
[4013]	100	105	110
[4014]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly		
[4015]	115	120	125
[4016]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn		

[4017]	130	135	140
[4018]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile		
[4019]	145	150	155
[4020]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly		
[4021]	165	170	175
[4022]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu		
[4023]	180	185	190
[4024]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu		
[4025]	195	200	205
[4026]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys		
[4027]	210	215	220
[4028]	Lys Pro Leu Ser Ala Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile		
[4029]	225	230	235
[4030]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val		
[4031]	245	250	255
[4032]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly		
[4033]	260	265	270
[4034]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala		
[4035]	275	280	285
[4036]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys		
[4037]	290	295	300
[4038]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys		
[4039]	305	310	315
[4040]	<210> 105		
[4041]	<211> 318		
[4042]	<212> PRT		
[4043]	<213> 人工序列		
[4044]	<220>		
[4045]	<223> 人Wnt7a变体 P232A		
[4046]	<400> 105		
[4047]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg		
[4048]	1	5	10
[4049]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly		
[4050]	20	25	30
[4051]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn		
[4052]	35	40	45
[4053]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys		
[4054]	50	55	60
[4055]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile		

[4056]	65	70	75	80
[4057]	Ala Ala Gly Val	Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[4058]		85	90	95
[4059]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[4060]		100	105	110
[4061]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[4062]		115	120	125
[4063]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[4064]		130	135	140
[4065]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[4066]	145	150	155	160
[4067]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[4068]		165	170	175
[4069]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[4070]		180	185	190
[4071]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[4072]		195	200	205
[4073]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[4074]		210	215	220
[4075]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Ala Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile			
[4076]	225	230	235	240
[4077]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val			
[4078]		245	250	255
[4079]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly			
[4080]		260	265	270
[4081]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala			
[4082]		275	280	285
[4083]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys			
[4084]		290	295	300
[4085]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys			
[4086]	305	310	315	
[4087]	<210> 106			
[4088]	<211> 318			
[4089]	<212> PRT			
[4090]	<213> 人工序列			
[4091]	<220>			
[4092]	<223> 人Wnt7a变体 T235A			
[4093]	<400> 106			
[4094]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg			

[4095]	1	5	10	15
[4096]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly			
[4097]	20	25	30	
[4098]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn			
[4099]	35	40	45	
[4100]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys			
[4101]	50	55	60	
[4102]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile			
[4103]	65	70	75	80
[4104]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn			
[4105]	85	90	95	
[4106]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg			
[4107]	100	105	110	
[4108]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly			
[4109]	115	120	125	
[4110]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn			
[4111]	130	135	140	
[4112]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile			
[4113]	145	150	155	160
[4114]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly			
[4115]	165	170	175	
[4116]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu			
[4117]	180	185	190	
[4118]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu			
[4119]	195	200	205	
[4120]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys			
[4121]	210	215	220	
[4122]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Ala Asp Leu Val Tyr Ile			
[4123]	225	230	235	240
[4124]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val			
[4125]	245	250	255	
[4126]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly			
[4127]	260	265	270	
[4128]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala			
[4129]	275	280	285	
[4130]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys			
[4131]	290	295	300	
[4132]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys			
[4133]	305	310	315	

[4134]	<210> 107															
[4135]	<211> 318															
[4136]	<212> PRT															
[4137]	<213> 人工序列															
[4138]	<220>															
[4139]	<223> 人Wnt7a变体 Q17A															
[4140]	<400> 107															
[4141]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg
[4142]	1				5					10					15	
[4143]	Ala	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly
[4144]				20					25					30		
[4145]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn
[4146]			35					40					45			
[4147]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys
[4148]		50					55					60				
[4149]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile
[4150]	65					70				75						80
[4151]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn
[4152]					85					90					95	
[4153]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg
[4154]				100					105					110		
[4155]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly
[4156]			115					120					125			
[4157]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn
[4158]		130					135					140				
[4159]	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile
[4160]	145					150					155					160
[4161]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly
[4162]					165					170					175	
[4163]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[4164]				180					185					190		
[4165]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[4166]			195					200					205			
[4167]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[4168]		210					215					220				
[4169]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[4170]	225					230					235					240
[4171]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Ser	Val
[4172]					245					250					255	

[4173]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly
[4174]	260 265 270
[4175]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala
[4176]	275 280 285
[4177]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys
[4178]	290 295 300
[4179]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[4180]	305 310 315
[4181]	<210> 108
[4182]	<211> 318
[4183]	<212> PRT
[4184]	<213> 人工序列
[4185]	<220>
[4186]	<223> 人Wnt7a变体 I20A
[4187]	<400> 108
[4188]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg
[4189]	1 5 10 15
[4190]	Gln Arg Ala Ala Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly
[4191]	20 25 30
[4192]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn
[4193]	35 40 45
[4194]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys
[4195]	50 55 60
[4196]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile
[4197]	65 70 75 80
[4198]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn
[4199]	85 90 95
[4200]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg
[4201]	100 105 110
[4202]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly
[4203]	115 120 125
[4204]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn
[4205]	130 135 140
[4206]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile
[4207]	145 150 155 160
[4208]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly
[4209]	165 170 175
[4210]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu
[4211]	180 185 190

[4212]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu		
[4213]	195	200	205
[4214]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys		
[4215]	210	215	220
[4216]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile		
[4217]	225	230	235 240
[4218]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val		
[4219]	245	250	255
[4220]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly		
[4221]	260	265	270
[4222]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala		
[4223]	275	280	285
[4224]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys		
[4225]	290	295	300
[4226]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys		
[4227]	305	310	315
[4228]	<210> 109		
[4229]	<211> 318		
[4230]	<212> PRT		
[4231]	<213> 人工序列		
[4232]	<220>		
[4233]	<223> 人Wnt7a变体 P25A		
[4234]	<400> 109		
[4235]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg		
[4236]	1 5 10 15		
[4237]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Ala Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly		
[4238]	20 25 30		
[4239]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn		
[4240]	35 40 45		
[4241]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys		
[4242]	50 55 60		
[4243]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile		
[4244]	65 70 75 80		
[4245]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[4246]	85 90 95		
[4247]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg		
[4248]	100 105 110		
[4249]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly		
[4250]	115 120 125		

[4251]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn
[4252]	130 135 140
[4253]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile
[4254]	145 150 155 160
[4255]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly
[4256]	165 170 175
[4257]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu
[4258]	180 185 190
[4259]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu
[4260]	195 200 205
[4261]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys
[4262]	210 215 220
[4263]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile
[4264]	225 230 235 240
[4265]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val
[4266]	245 250 255
[4267]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly
[4268]	260 265 270
[4269]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala
[4270]	275 280 285
[4271]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys
[4272]	290 295 300
[4273]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[4274]	305 310 315
[4275]	<210> 110
[4276]	<211> 318
[4277]	<212> PRT
[4278]	<213> 人工序列
[4279]	<220>
[4280]	<223> 人Wnt7a变体 M37A
[4281]	<400> 110
[4282]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg
[4283]	1 5 10 15
[4284]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly
[4285]	20 25 30
[4286]	Glu Gly Ser Gln Ala Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn
[4287]	35 40 45
[4288]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys
[4289]	50 55 60

[4290]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile
[4291]	65 70 75 80
[4292]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn
[4293]	85 90 95
[4294]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg
[4295]	100 105 110
[4296]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly
[4297]	115 120 125
[4298]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn
[4299]	130 135 140
[4300]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile
[4301]	145 150 155 160
[4302]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly
[4303]	165 170 175
[4304]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu
[4305]	180 185 190
[4306]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu
[4307]	195 200 205
[4308]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys
[4309]	210 215 220
[4310]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile
[4311]	225 230 235 240
[4312]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val
[4313]	245 250 255
[4314]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly
[4315]	260 265 270
[4316]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala
[4317]	275 280 285
[4318]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys
[4319]	290 295 300
[4320]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[4321]	305 310 315
[4322]	<210> 111
[4323]	<211> 318
[4324]	<212> PRT
[4325]	<213> 人工序列
[4326]	<220>
[4327]	<223> 人Wnt7a变体 L39A
[4328]	<400> 111

[4329]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg
[4330]	1				5					10					15	
[4331]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly
[4332]				20					25					30		
[4333]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Ala	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn
[4334]			35					40					45			
[4335]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys
[4336]		50					55					60				
[4337]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile
[4338]	65					70					75				80	
[4339]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn
[4340]					85					90					95	
[4341]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg
[4342]				100					105					110		
[4343]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly
[4344]			115					120					125			
[4345]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn
[4346]		130					135						140			
[4347]	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile
[4348]	145					150					155				160	
[4349]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly
[4350]				165					170					175		
[4351]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[4352]				180					185					190		
[4353]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[4354]			195					200					205			
[4355]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[4356]		210					215					220				
[4357]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[4358]	225					230					235				240	
[4359]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Ser	Val
[4360]				245						250				255		
[4361]	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	Ala	Cys	Asn	Lys	Thr	Ala	Pro	Gln	Ala	Ser	Gly
[4362]				260					265					270		
[4363]	Cys	Asp	Leu	Met	Cys	Cys	Gly	Arg	Gly	Tyr	Asn	Thr	His	Gln	Tyr	Ala
[4364]			275					280					285			
[4365]	Arg	Val	Trp	Gln	Cys	Asn	Cys	Lys	Phe	His	Trp	Cys	Cys	Tyr	Val	Lys
[4366]		290						295				300				
[4367]	Cys	Asn	Thr	Cys	Ser	Glu	Arg	Thr	Glu	Met	Tyr	Thr	Cys	Lys		

[4368]	305	310	315
[4369]	<210> 112		
[4370]	<211> 318		
[4371]	<212> PRT		
[4372]	<213> 人工序列		
[4373]	<220>		
[4374]	<223> 人Wnt7a变体 I28A		
[4375]	<400> 112		
[4376]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg		
[4377]	1 5 10 15		
[4378]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ala Ile Val Ile Gly		
[4379]	20 25 30		
[4380]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn		
[4381]	35 40 45		
[4382]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys		
[4383]	50 55 60		
[4384]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile		
[4385]	65 70 75 80		
[4386]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[4387]	85 90 95		
[4388]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg		
[4389]	100 105 110		
[4390]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly		
[4391]	115 120 125		
[4392]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn		
[4393]	130 135 140		
[4394]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile		
[4395]	145 150 155 160		
[4396]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly		
[4397]	165 170 175		
[4398]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu		
[4399]	180 185 190		
[4400]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu		
[4401]	195 200 205		
[4402]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys		
[4403]	210 215 220		
[4404]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile		
[4405]	225 230 235 240		
[4406]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val		

[4407]		245		250		255
[4408]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly					
[4409]		260		265		270
[4410]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala					
[4411]		275		280		285
[4412]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys					
[4413]		290		295		300
[4414]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys					
[4415]	305		310		315	
[4416]	<210> 113					
[4417]	<211> 318					
[4418]	<212> PRT					
[4419]	<213> 人工序列					
[4420]	<220>					
[4421]	<223> 人Wnt7a变体 R50A					
[4422]	<400> 113					
[4423]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg					
[4424]	1	5		10		15
[4425]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly					
[4426]		20		25		30
[4427]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn					
[4428]		35		40		45
[4429]	Gly Ala Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys					
[4430]		50		55		60
[4431]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile					
[4432]	65		70		75	80
[4433]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn					
[4434]		85		90		95
[4435]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg					
[4436]		100		105		110
[4437]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly					
[4438]		115		120		125
[4439]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn					
[4440]		130		135		140
[4441]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile					
[4442]	145		150		155	160
[4443]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly					
[4444]		165		170		175
[4445]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu					

[4446]	180							185							190													
[4447]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu												
[4448]	195							200							205													
[4449]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys												
[4450]	210							215							220													
[4451]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile												
[4452]	225							230							235							240						
[4453]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Ser	Val												
[4454]	245							250							255													
[4455]	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	Ala	Cys	Asn	Lys	Thr	Ala	Pro	Gln	Ala	Ser	Gly												
[4456]	260							265							270													
[4457]	Cys	Asp	Leu	Met	Cys	Cys	Gly	Arg	Gly	Tyr	Asn	Thr	His	Gln	Tyr	Ala												
[4458]	275							280							285													
[4459]	Arg	Val	Trp	Gln	Cys	Asn	Cys	Lys	Phe	His	Trp	Cys	Cys	Tyr	Val	Lys												
[4460]	290							295							300													
[4461]	Cys	Asn	Thr	Cys	Ser	Glu	Arg	Thr	Glu	Met	Tyr	Thr	Cys	Lys														
[4462]	305							310							315													
[4463]	<210> 114																											
[4464]	<211> 318																											
[4465]	<212> PRT																											
[4466]	<213> 人工序列																											
[4467]	<220>																											
[4468]	<223> 人Wnt7a变体 V68A																											
[4469]	<400> 114																											
[4470]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg												
[4471]	1			5				10				15																
[4472]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly												
[4473]	20							25							30													
[4474]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn												
[4475]	35							40							45													
[4476]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys												
[4477]	50							55							60													
[4478]	Glu	Leu	Lys	Ala	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile												
[4479]	65			70				75				80																
[4480]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn												
[4481]	85							90							95													
[4482]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg												
[4483]	100							105							110													
[4484]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly												

[4485]	115	120	125
[4486]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn		
[4487]	130	135	140
[4488]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile		
[4489]	145	150	155
[4490]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly		
[4491]	165	170	175
[4492]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu		
[4493]	180	185	190
[4494]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu		
[4495]	195	200	205
[4496]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys		
[4497]	210	215	220
[4498]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile		
[4499]	225	230	235
[4500]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val		
[4501]	245	250	255
[4502]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly		
[4503]	260	265	270
[4504]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala		
[4505]	275	280	285
[4506]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys		
[4507]	290	295	300
[4508]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys		
[4509]	305	310	315
[4510]	<210> 115		
[4511]	<211> 318		
[4512]	<212> PRT		
[4513]	<213> 人工序列		
[4514]	<220>		
[4515]	<223> 人Wnt7a变体 F135A		
[4516]	<400> 115		
[4517]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg		
[4518]	1	5	10
[4519]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly		
[4520]	20	25	30
[4521]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn		
[4522]	35	40	45
[4523]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys		

[4524]	50	55	60
[4525]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile		
[4526]	65	70	75
[4527]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn		
[4528]	85	90	95
[4529]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg		
[4530]	100	105	110
[4531]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly		
[4532]	115	120	125
[4533]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Ala Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn		
[4534]	130	135	140
[4535]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Lys Ile		
[4536]	145	150	155
[4537]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly		
[4538]	165	170	175
[4539]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu		
[4540]	180	185	190
[4541]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu		
[4542]	195	200	205
[4543]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys		
[4544]	210	215	220
[4545]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile		
[4546]	225	230	235
[4547]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val		
[4548]	245	250	255
[4549]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly		
[4550]	260	265	270
[4551]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala		
[4552]	275	280	285
[4553]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys		
[4554]	290	295	300
[4555]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys		
[4556]	305	310	315
[4557]	<210> 116		
[4558]	<211> 318		
[4559]	<212> PRT		
[4560]	<213> 人工序列		
[4561]	<220>		
[4562]	<223> 人Wnt7a变体 R146A		

[4563]	<400> 116																
[4564]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg	
[4565]	1			5			10			15							
[4566]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly	
[4567]	20				25				30								
[4568]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn	
[4569]	35				40				45								
[4570]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys	
[4571]	50			55			60										
[4572]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile	
[4573]	65			70			75			80							
[4574]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn	
[4575]	85				90				95								
[4576]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg	
[4577]	100				105				110								
[4578]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly	
[4579]	115				120				125								
[4580]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn	
[4581]	130			135			140										
[4582]	Ala	Ala	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile	
[4583]	145			150			155			160							
[4584]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly	
[4585]	165				170				175								
[4586]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu	
[4587]	180				185				190								
[4588]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu	
[4589]	195			200			205										
[4590]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys	
[4591]	210			215			220										
[4592]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile	
[4593]	225			230			235			240							
[4594]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Ser	Val	
[4595]	245				250				255								
[4596]	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	Ala	Cys	Asn	Lys	Thr	Ala	Pro	Gln	Ala	Ser	Gly	
[4597]	260				265				270								
[4598]	Cys	Asp	Leu	Met	Cys	Cys	Gly	Arg	Gly	Tyr	Asn	Thr	His	Gln	Tyr	Ala	
[4599]	275			280			285										
[4600]	Arg	Val	Trp	Gln	Cys	Asn	Cys	Lys	Phe	His	Trp	Cys	Cys	Tyr	Val	Lys	
[4601]	290			295			300										

[4602]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[4603]	305 310 315
[4604]	<210> 117
[4605]	<211> 318
[4606]	<212> PRT
[4607]	<213> 人工序列
[4608]	<220>
[4609]	<223> 人Wnt7a变体 K159S
[4610]	<400> 117
[4611]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg
[4612]	1 5 10 15
[4613]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly
[4614]	20 25 30
[4615]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn
[4616]	35 40 45
[4617]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys
[4618]	50 55 60
[4619]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile
[4620]	65 70 75 80
[4621]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn
[4622]	85 90 95
[4623]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg
[4624]	100 105 110
[4625]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly
[4626]	115 120 125
[4627]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn
[4628]	130 135 140
[4629]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Ser Ile
[4630]	145 150 155 160
[4631]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly
[4632]	165 170 175
[4633]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu
[4634]	180 185 190
[4635]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu
[4636]	195 200 205
[4637]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys
[4638]	210 215 220
[4639]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile
[4640]	225 230 235 240

[4641]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val
[4642]	245 250 255
[4643]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly
[4644]	260 265 270
[4645]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala
[4646]	275 280 285
[4647]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys
[4648]	290 295 300
[4649]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[4650]	305 310 315
[4651]	<210> 118
[4652]	<211> 318
[4653]	<212> PRT
[4654]	<213> 人工序列
[4655]	<220>
[4656]	<223> 人Wnt7a变体 K159L
[4657]	<400> 118
[4658]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg
[4659]	1 5 10 15
[4660]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly
[4661]	20 25 30
[4662]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn
[4663]	35 40 45
[4664]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys
[4665]	50 55 60
[4666]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile
[4667]	65 70 75 80
[4668]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn
[4669]	85 90 95
[4670]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg
[4671]	100 105 110
[4672]	Asp Glu Gly Trp Lys Trp Gly Gly Cys Ser Ala Asp Ile Arg Tyr Gly
[4673]	115 120 125
[4674]	Ile Gly Phe Ala Lys Val Phe Val Asp Ala Arg Glu Ile Lys Gln Asn
[4675]	130 135 140
[4676]	Ala Arg Thr Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala Gly Arg Leu Ile
[4677]	145 150 155 160
[4678]	Leu Glu Glu Asn Met Lys Leu Glu Cys Lys Cys His Gly Val Ser Gly
[4679]	165 170 175

[4680]	Ser Cys Thr Thr Lys Thr Cys Trp Thr Thr Leu Pro Gln Phe Arg Glu
[4681]	180 185 190
[4682]	Leu Gly Tyr Val Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Glu Ala Val His Val Glu
[4683]	195 200 205
[4684]	Pro Val Arg Ala Ser Arg Asn Lys Arg Pro Thr Phe Leu Lys Ile Lys
[4685]	210 215 220
[4686]	Lys Pro Leu Ser Tyr Arg Lys Pro Met Asp Thr Asp Leu Val Tyr Ile
[4687]	225 230 235 240
[4688]	Glu Lys Ser Pro Asn Tyr Cys Glu Glu Asp Pro Val Thr Gly Ser Val
[4689]	245 250 255
[4690]	Gly Thr Gln Gly Arg Ala Cys Asn Lys Thr Ala Pro Gln Ala Ser Gly
[4691]	260 265 270
[4692]	Cys Asp Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asn Thr His Gln Tyr Ala
[4693]	275 280 285
[4694]	Arg Val Trp Gln Cys Asn Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Tyr Val Lys
[4695]	290 295 300
[4696]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys
[4697]	305 310 315
[4698]	<210> 119
[4699]	<211> 318
[4700]	<212> PRT
[4701]	<213> 人工序列
[4702]	<220>
[4703]	<223> 人Wnt7a变体 K200A
[4704]	<400> 119
[4705]	Leu Gly Ala Ser Ile Ile Cys Asn Lys Ile Pro Gly Leu Ala Pro Arg
[4706]	1 5 10 15
[4707]	Gln Arg Ala Ile Cys Gln Ser Arg Pro Asp Ala Ile Ile Val Ile Gly
[4708]	20 25 30
[4709]	Glu Gly Ser Gln Met Gly Leu Asp Glu Cys Gln Phe Gln Phe Arg Asn
[4710]	35 40 45
[4711]	Gly Arg Trp Asn Cys Ser Ala Leu Gly Glu Arg Thr Val Phe Gly Lys
[4712]	50 55 60
[4713]	Glu Leu Lys Val Gly Ser Arg Glu Ala Ala Phe Thr Tyr Ala Ile Ile
[4714]	65 70 75 80
[4715]	Ala Ala Gly Val Ala His Ala Ile Thr Ala Ala Cys Thr Gln Gly Asn
[4716]	85 90 95
[4717]	Leu Ser Asp Cys Gly Cys Asp Lys Glu Lys Gln Gly Gln Tyr His Arg
[4718]	100 105 110

[4719]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly
[4720]			115					120					125			
[4721]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn
[4722]			130					135					140			
[4723]	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile
[4724]	145						150					155				160
[4725]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly
[4726]						165					170					175
[4727]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[4728]						180					185				190	
[4729]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Ala	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[4730]						195					200				205	
[4731]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[4732]						210									220	
[4733]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[4734]	225						230					235				240
[4735]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Ser	Val
[4736]						245					250					255
[4737]	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	Ala	Cys	Asn	Lys	Thr	Ala	Pro	Gln	Ala	Ser	Gly
[4738]						260									270	
[4739]	Cys	Asp	Leu	Met	Cys	Cys	Gly	Arg	Gly	Tyr	Asn	Thr	His	Gln	Tyr	Ala
[4740]						275									285	
[4741]	Arg	Val	Trp	Gln	Cys	Asn	Cys	Lys	Phe	His	Trp	Cys	Cys	Tyr	Val	Lys
[4742]						290									300	
[4743]	Cys	Asn	Thr	Cys	Ser	Glu	Arg	Thr	Glu	Met	Tyr	Thr	Cys	Lys		
[4744]	305						310								315	
[4745]	<210>	120														
[4746]	<211>	318														
[4747]	<212>	PRT														
[4748]	<213>	人工序列														
[4749]	<220>															
[4750]	<223>	人Wnt7a变体 R214A														
[4751]	<400>	120														
[4752]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg
[4753]	1				5					10					15	
[4754]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly
[4755]					20					25					30	
[4756]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn
[4757]					35					40					45	

[4758]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys
[4759]	50						55					60				
[4760]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile
[4761]	65					70					75					80
[4762]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn
[4763]					85					90					95	
[4764]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg
[4765]				100					105					110		
[4766]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly
[4767]			115					120					125			
[4768]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn
[4769]	130						135					140				
[4770]	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile
[4771]	145					150					155					160
[4772]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly
[4773]					165					170					175	
[4774]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu
[4775]				180					185					190		
[4776]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu
[4777]			195					200					205			
[4778]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys
[4779]	210						215					220				
[4780]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
[4781]	225					230					235					240
[4782]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Ser	Val
[4783]					245					250					255	
[4784]	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	Ala	Cys	Asn	Lys	Thr	Ala	Pro	Gln	Ala	Ser	Gly
[4785]				260					265					270		
[4786]	Cys	Asp	Leu	Met	Cys	Cys	Gly	Arg	Gly	Tyr	Asn	Thr	His	Gln	Tyr	Ala
[4787]			275					280					285			
[4788]	Arg	Val	Trp	Gln	Cys	Asn	Cys	Lys	Phe	His	Trp	Cys	Cys	Tyr	Val	Lys
[4789]	290						295					300				
[4790]	Cys	Asn	Thr	Cys	Ser	Glu	Arg	Thr	Glu	Met	Tyr	Thr	Cys	Lys		
[4791]	305					310					315					
[4792]	<210>	121														
[4793]	<211>	318														
[4794]	<212>	PRT														
[4795]	<213>	人工序列														
[4796]	<220>															

[4797]	<223> 人Wnt7a变体 P218A																		
[4798]	<400> 121																		
[4799]	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Cys	Asn	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Arg			
[4800]	1				5					10					15				
[4801]	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Gln	Ser	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Ile	Gly			
[4802]				20					25					30					
[4803]	Glu	Gly	Ser	Gln	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Cys	Gln	Phe	Gln	Phe	Arg	Asn			
[4804]			35					40					45						
[4805]	Gly	Arg	Trp	Asn	Cys	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Lys			
[4806]		50					55					60							
[4807]	Glu	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ile			
[4808]	65				70					75					80				
[4809]	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	His	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Asn			
[4810]				85					90					95					
[4811]	Leu	Ser	Asp	Cys	Gly	Cys	Asp	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Gln	Tyr	His	Arg			
[4812]			100						105					110					
[4813]	Asp	Glu	Gly	Trp	Lys	Trp	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly			
[4814]			115					120					125						
[4815]	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Val	Phe	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Ile	Lys	Gln	Asn			
[4816]		130					135					140							
[4817]	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	His	Asn	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile			
[4818]	145				150						155				160				
[4819]	Leu	Glu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu	Glu	Cys	Lys	Cys	His	Gly	Val	Ser	Gly			
[4820]			165						170				175						
[4821]	Ser	Cys	Thr	Thr	Lys	Thr	Cys	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu			
[4822]			180						185				190						
[4823]	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Val	Glu			
[4824]		195						200					205						
[4825]	Pro	Val	Arg	Ala	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Leu	Lys	Ile	Lys			
[4826]		210					215					220							
[4827]	Lys	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile			
[4828]	225				230						235				240				
[4829]	Glu	Lys	Ser	Pro	Asn	Tyr	Cys	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Ser	Val			
[4830]			245						250				255						
[4831]	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	Ala	Cys	Asn	Lys	Thr	Ala	Pro	Gln	Ala	Ser	Gly			
[4832]			260						265				270						
[4833]	Cys	Asp	Leu	Met	Cys	Cys	Gly	Arg	Gly	Tyr	Asn	Thr	His	Gln	Tyr	Ala			
[4834]		275						280					285						
[4835]	Arg	Val	Trp	Gln	Cys	Asn	Cys	Lys	Phe	His	Trp	Cys	Cys	Tyr	Val	Lys			

[4836]	290	295	300
[4837]	Cys Asn Thr Cys Ser Glu Arg Thr Glu Met Tyr Thr Cys Lys		
[4838]	305	310	315

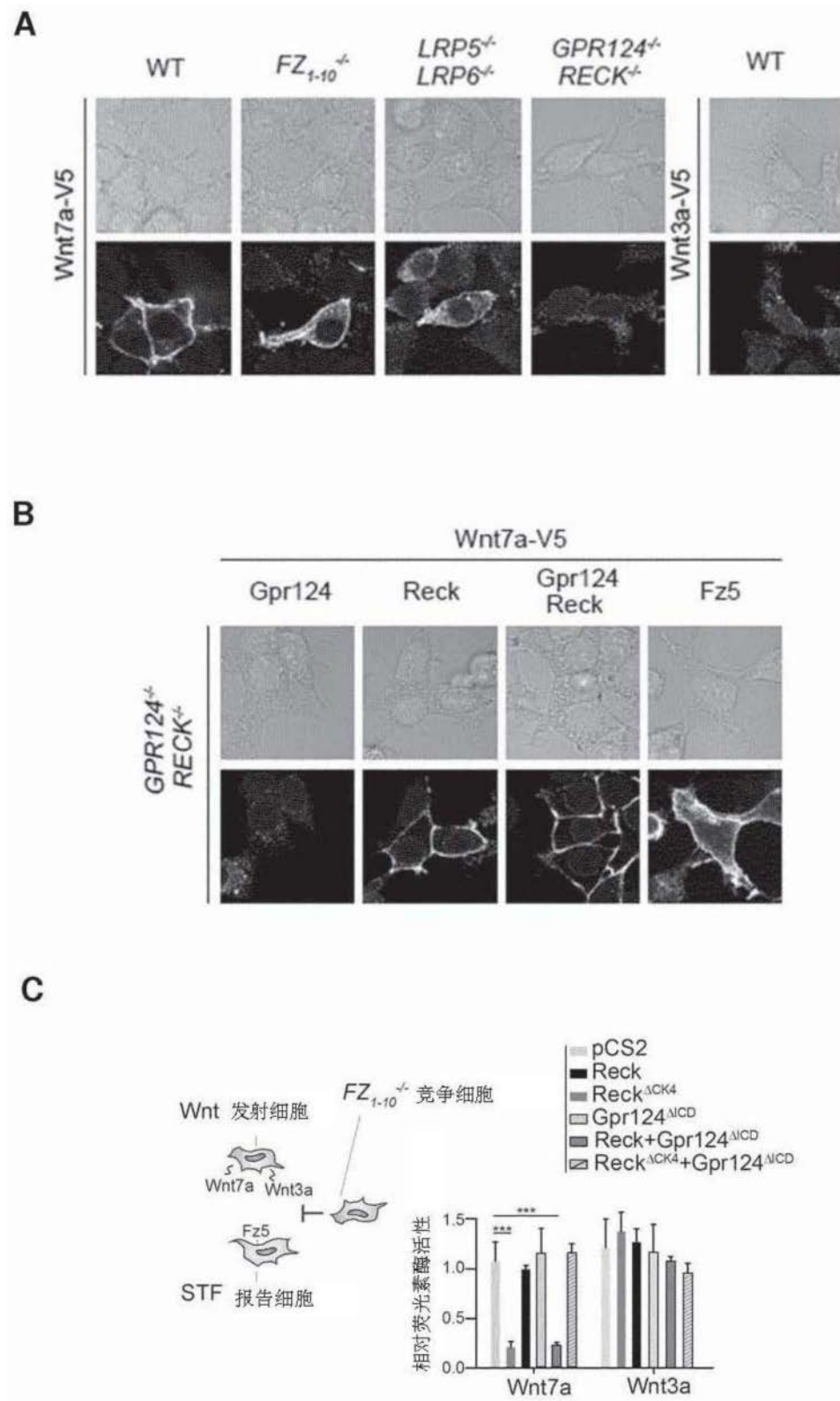


图1

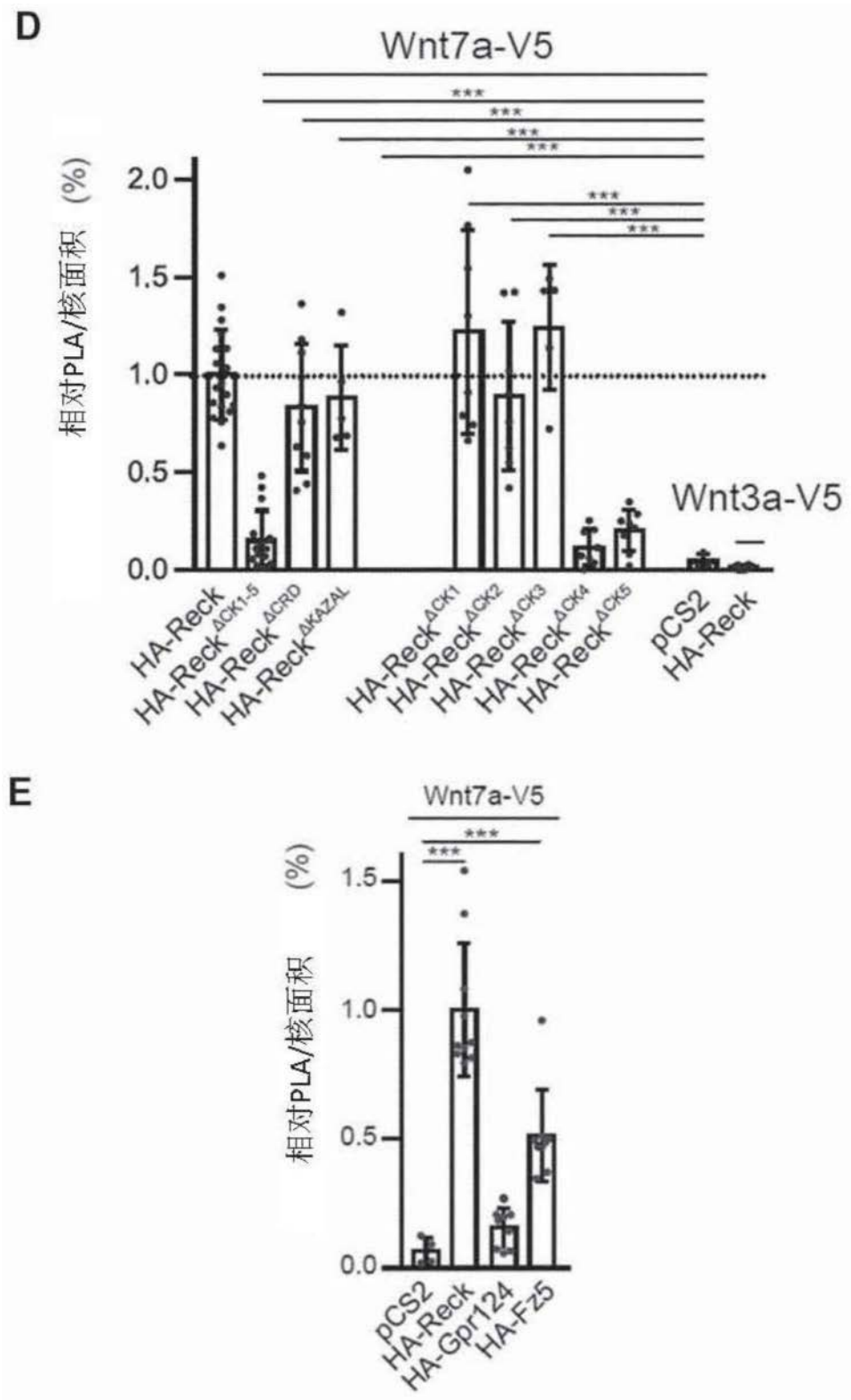


图1(续)

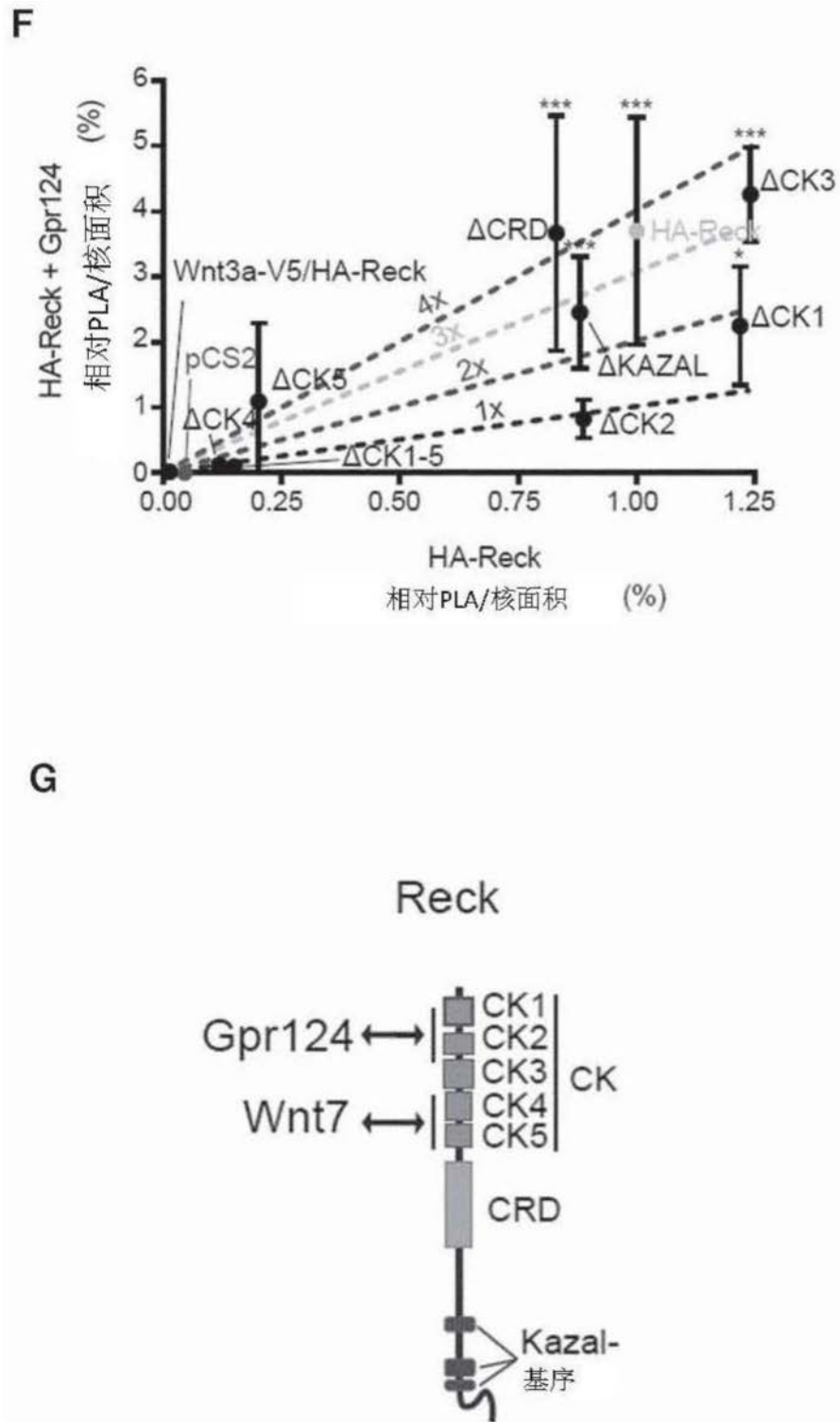


图1(续)

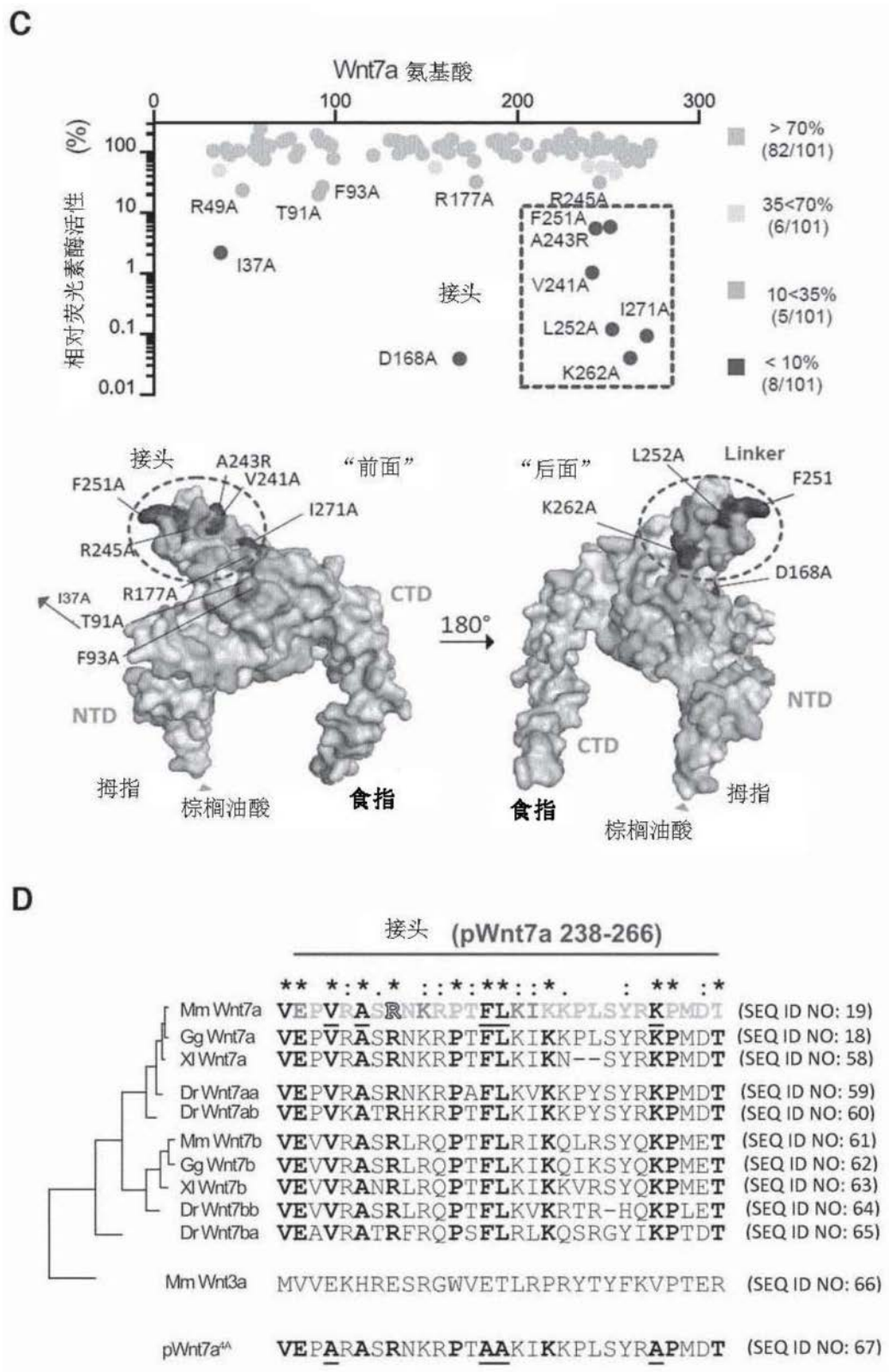


图2(续)

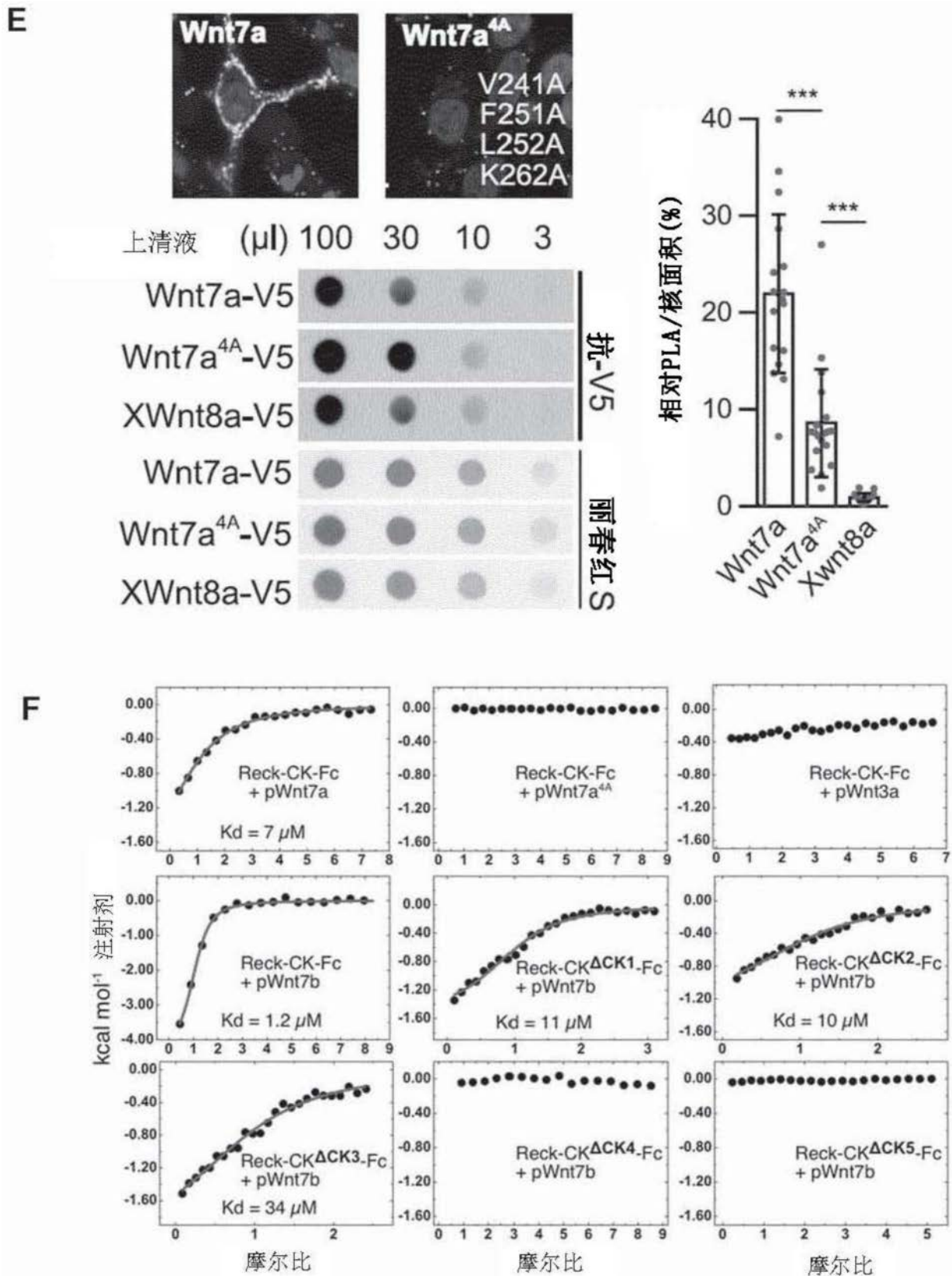


图2(续)

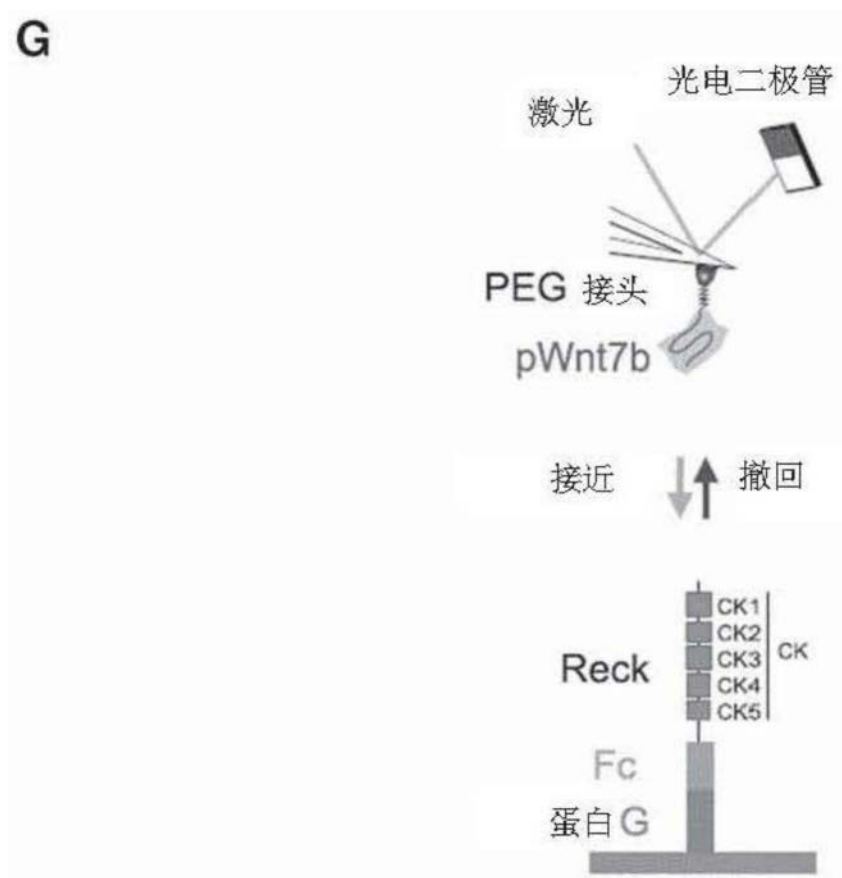


图2(续)

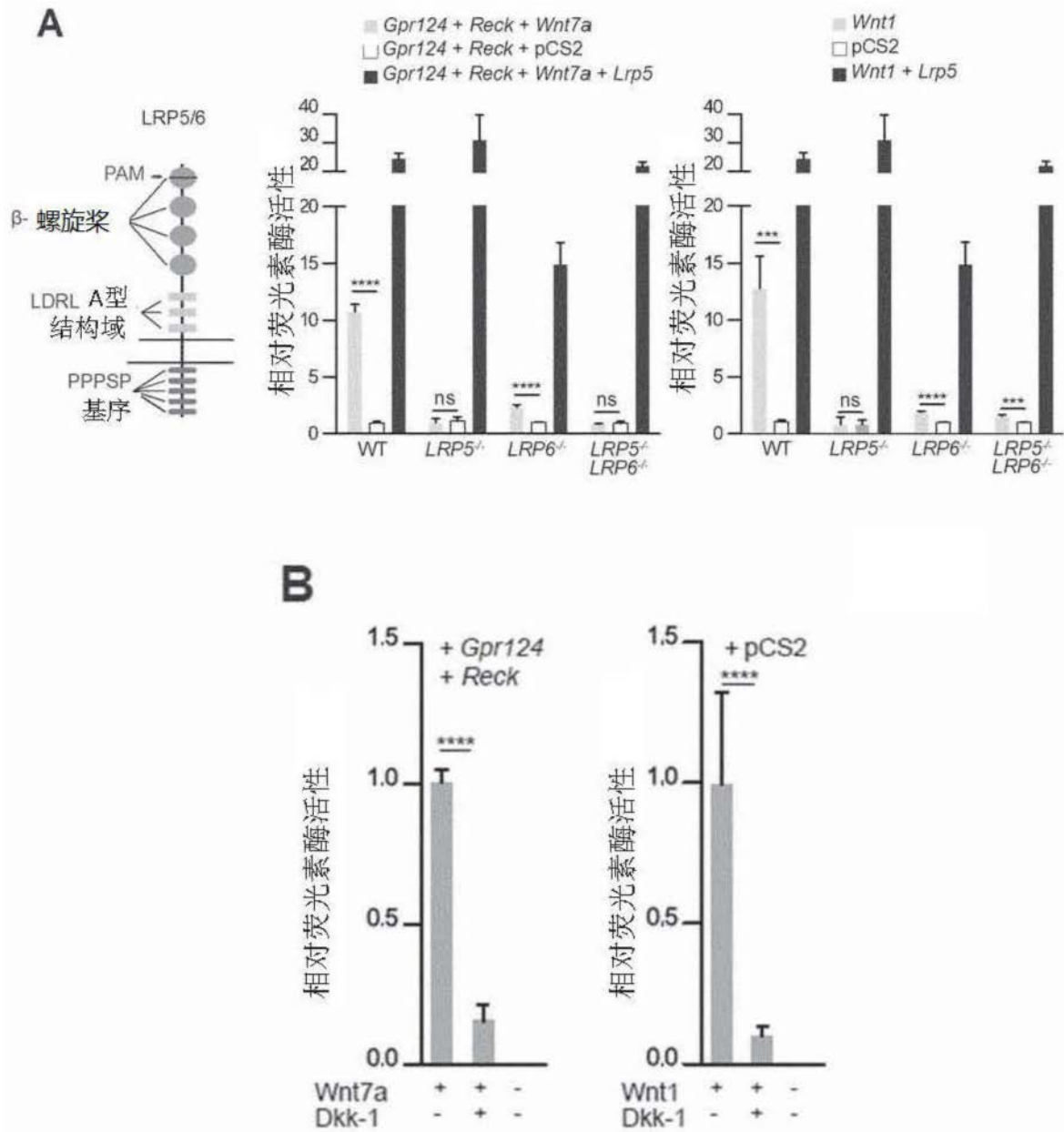


图3

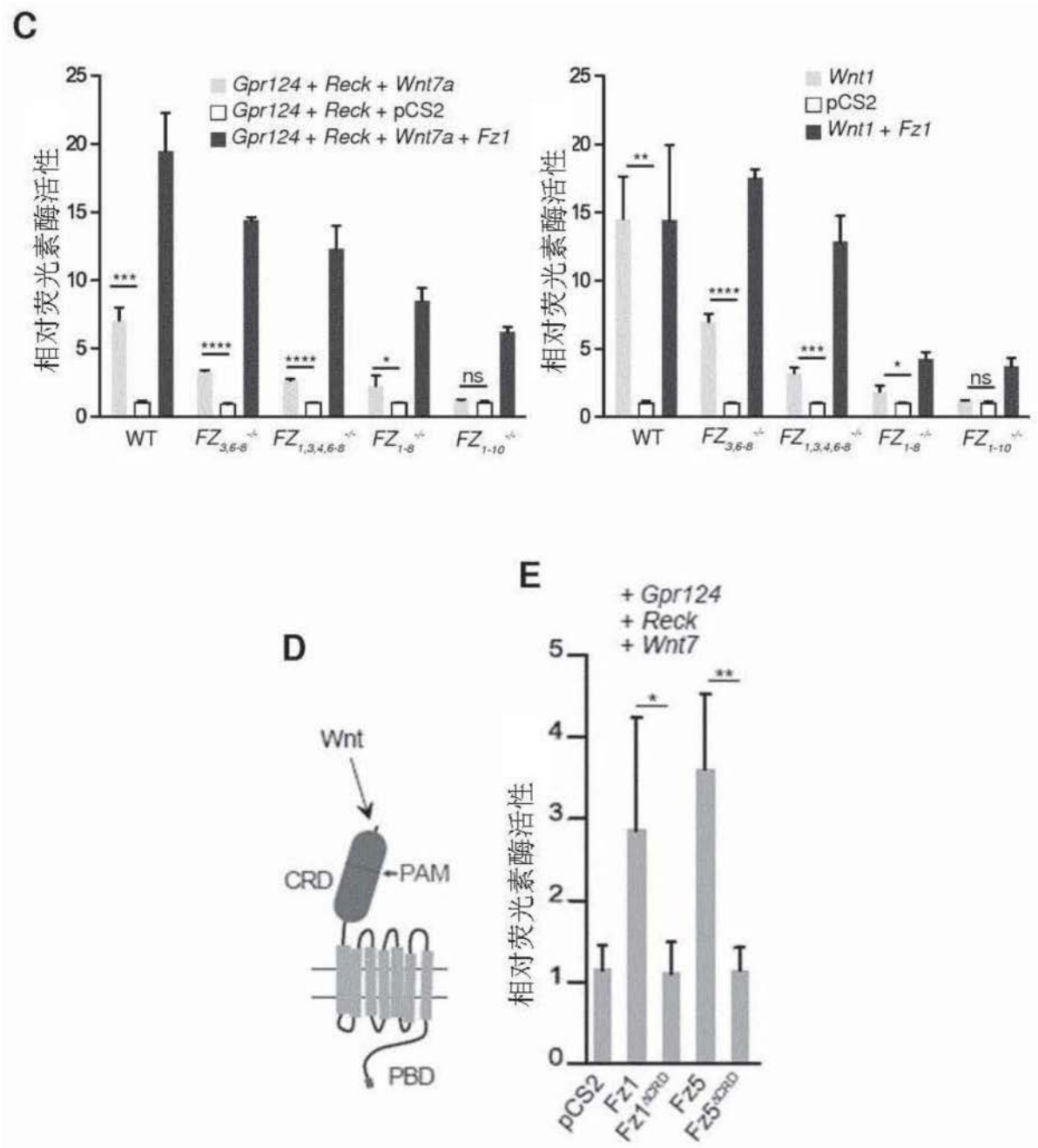


图3(续)

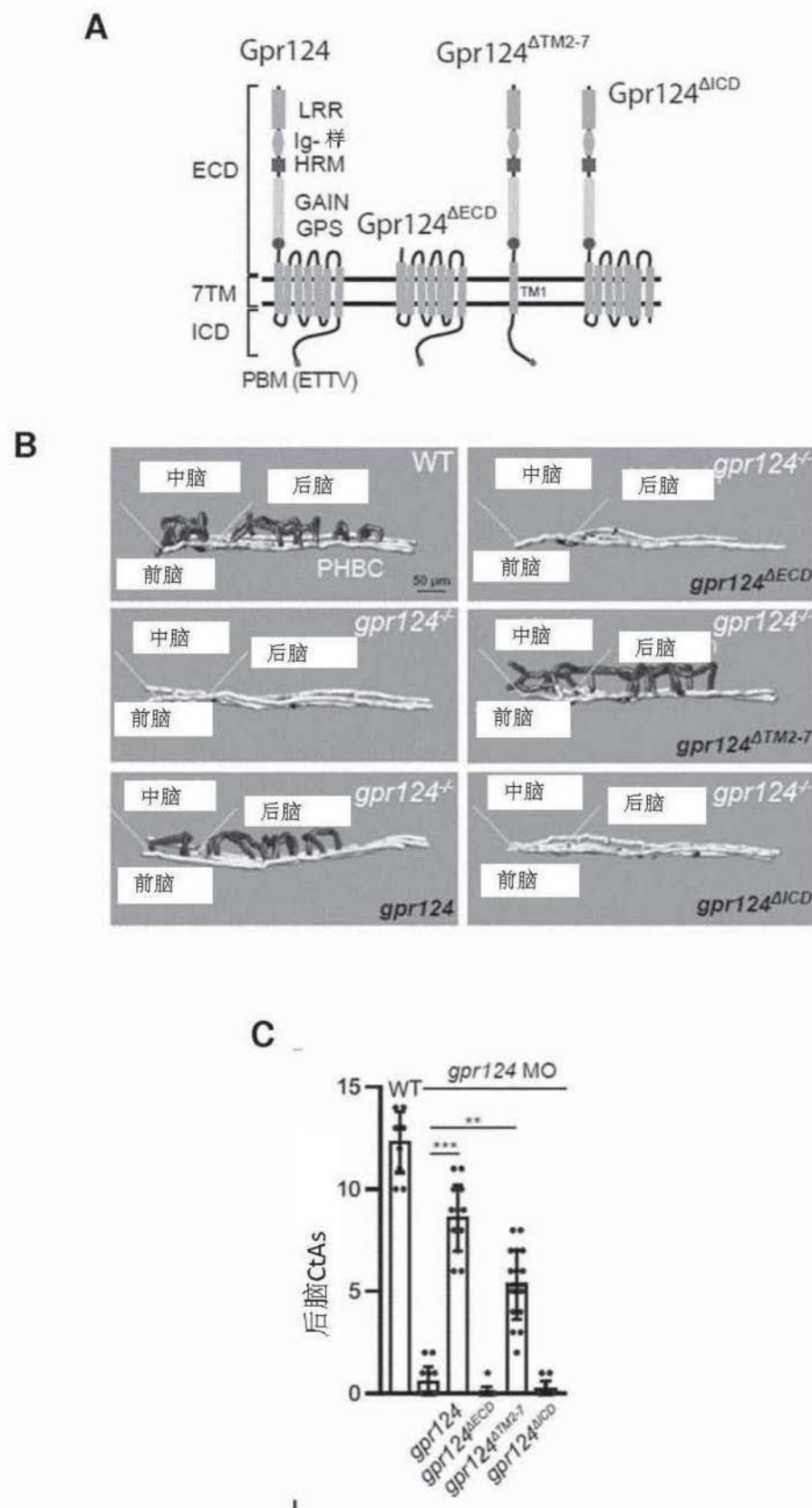


图4

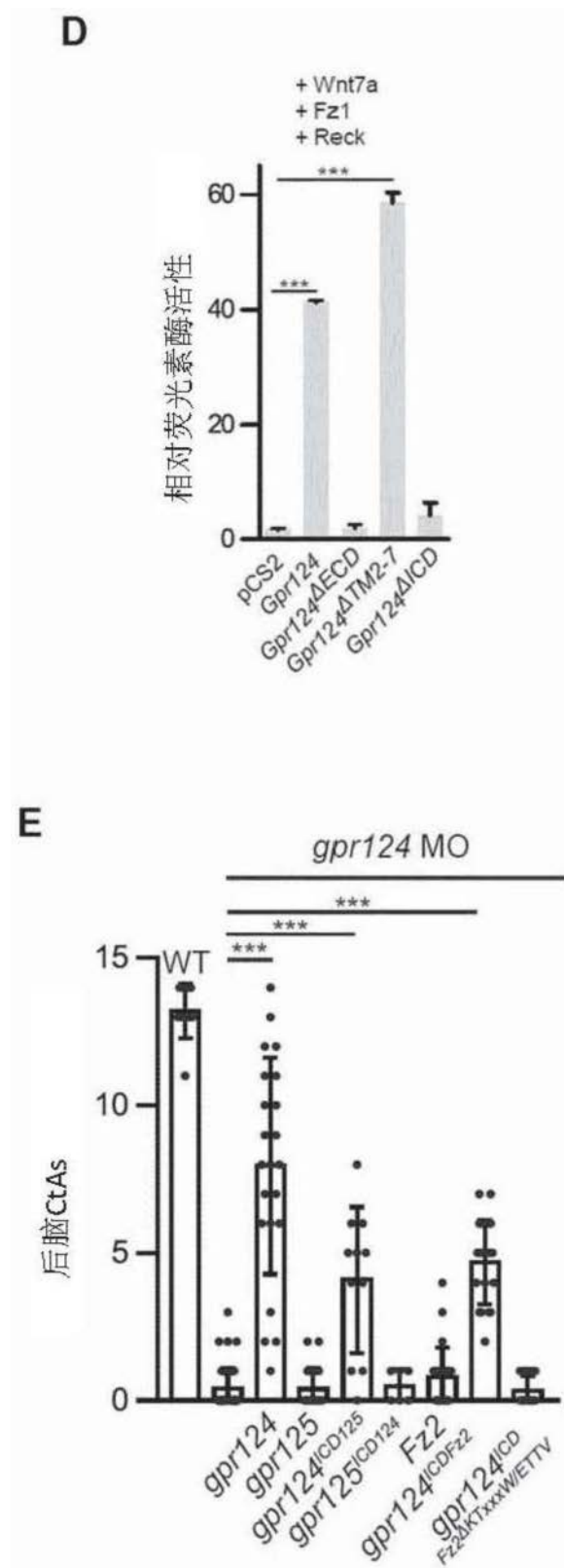


图4(续)

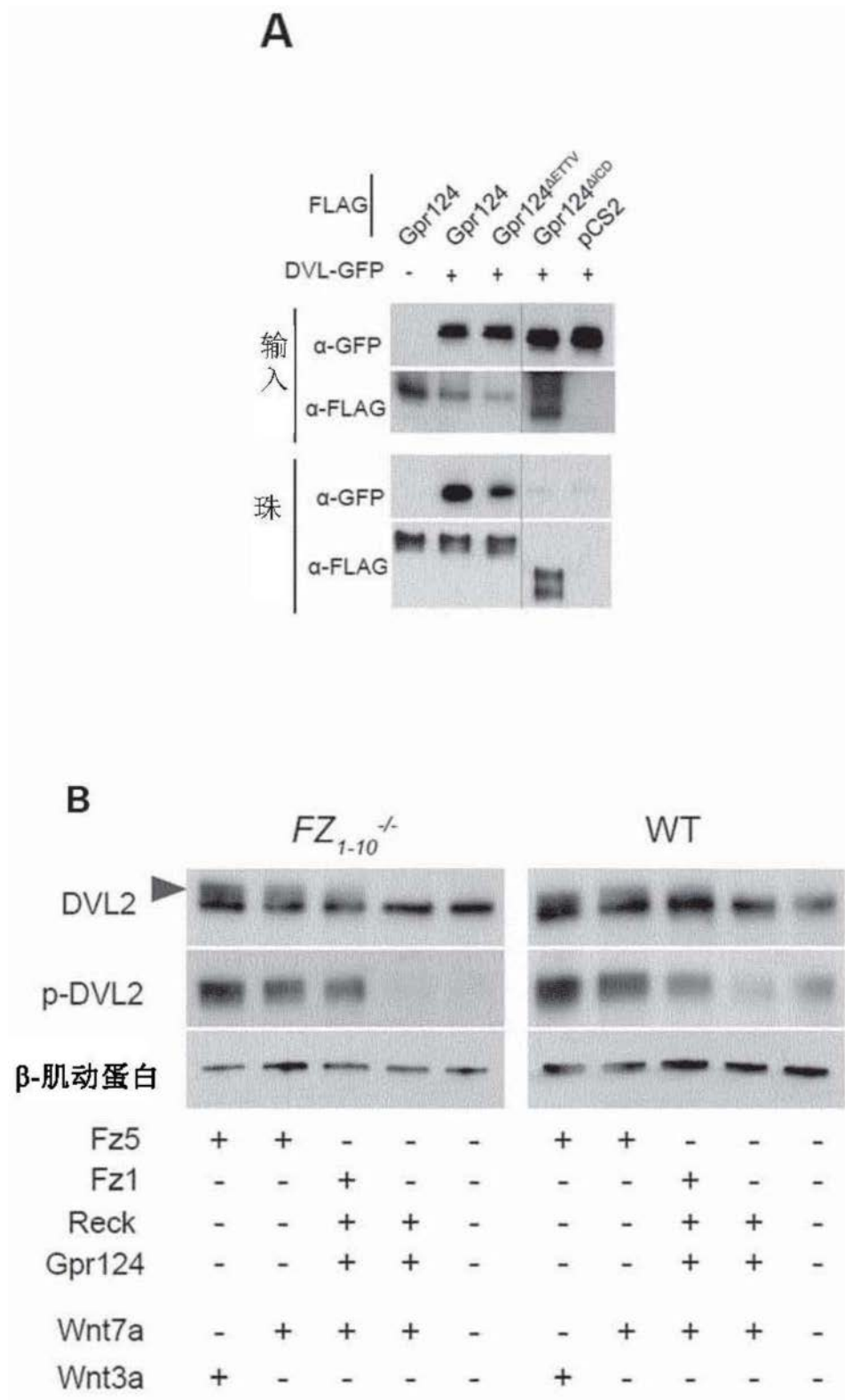


图5

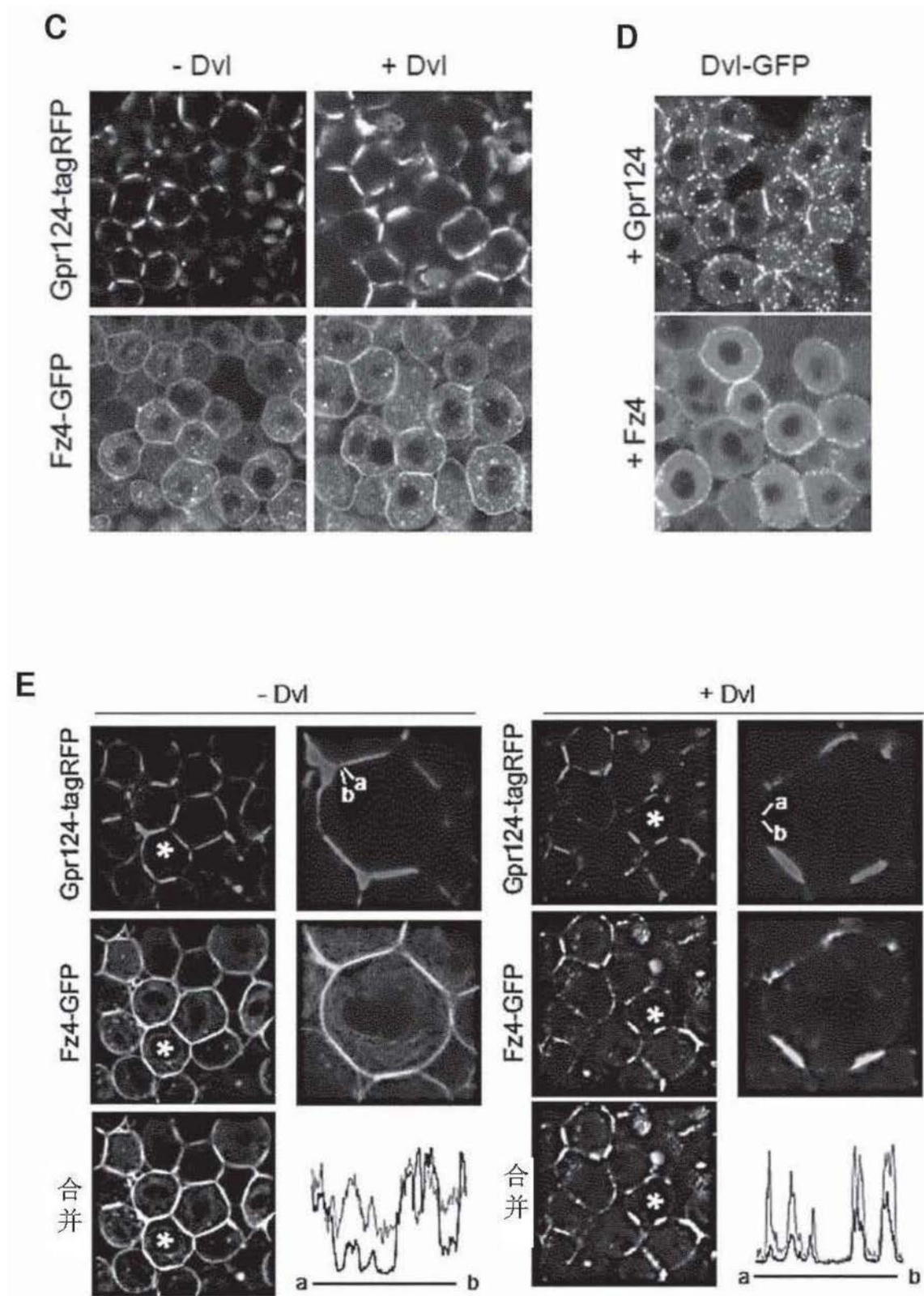


图5(续)

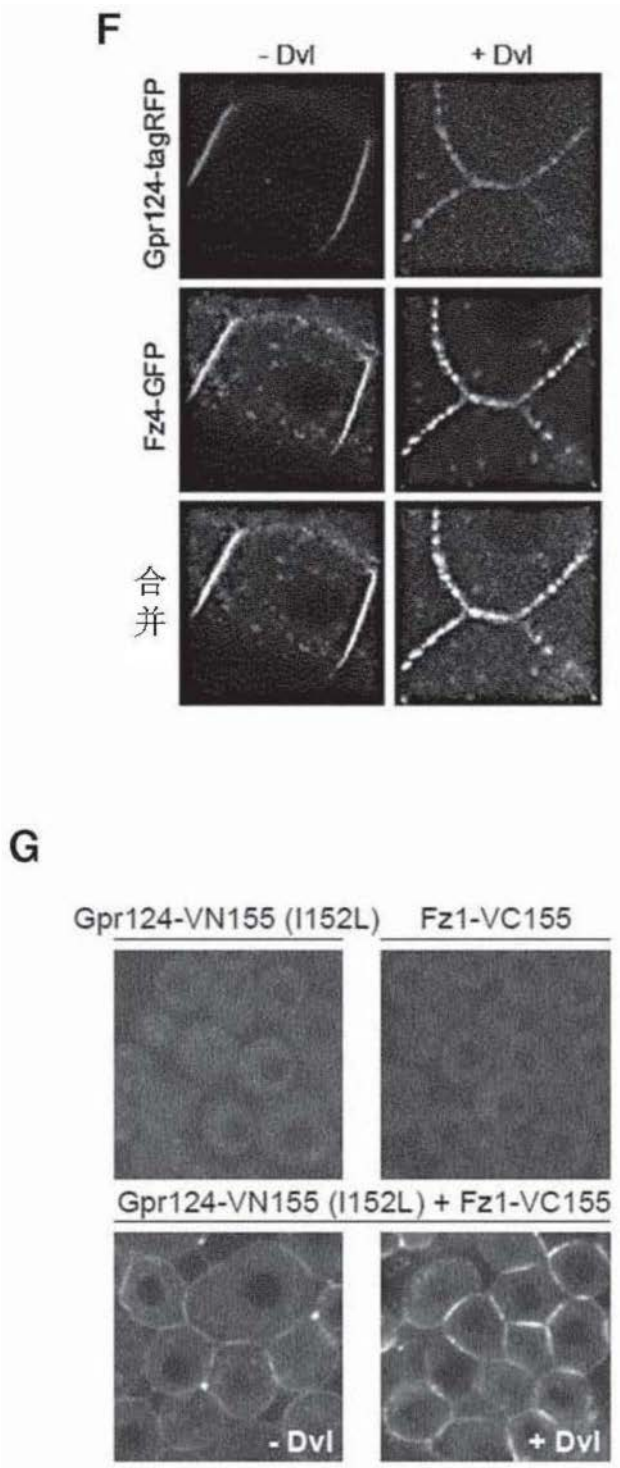


图5(续)

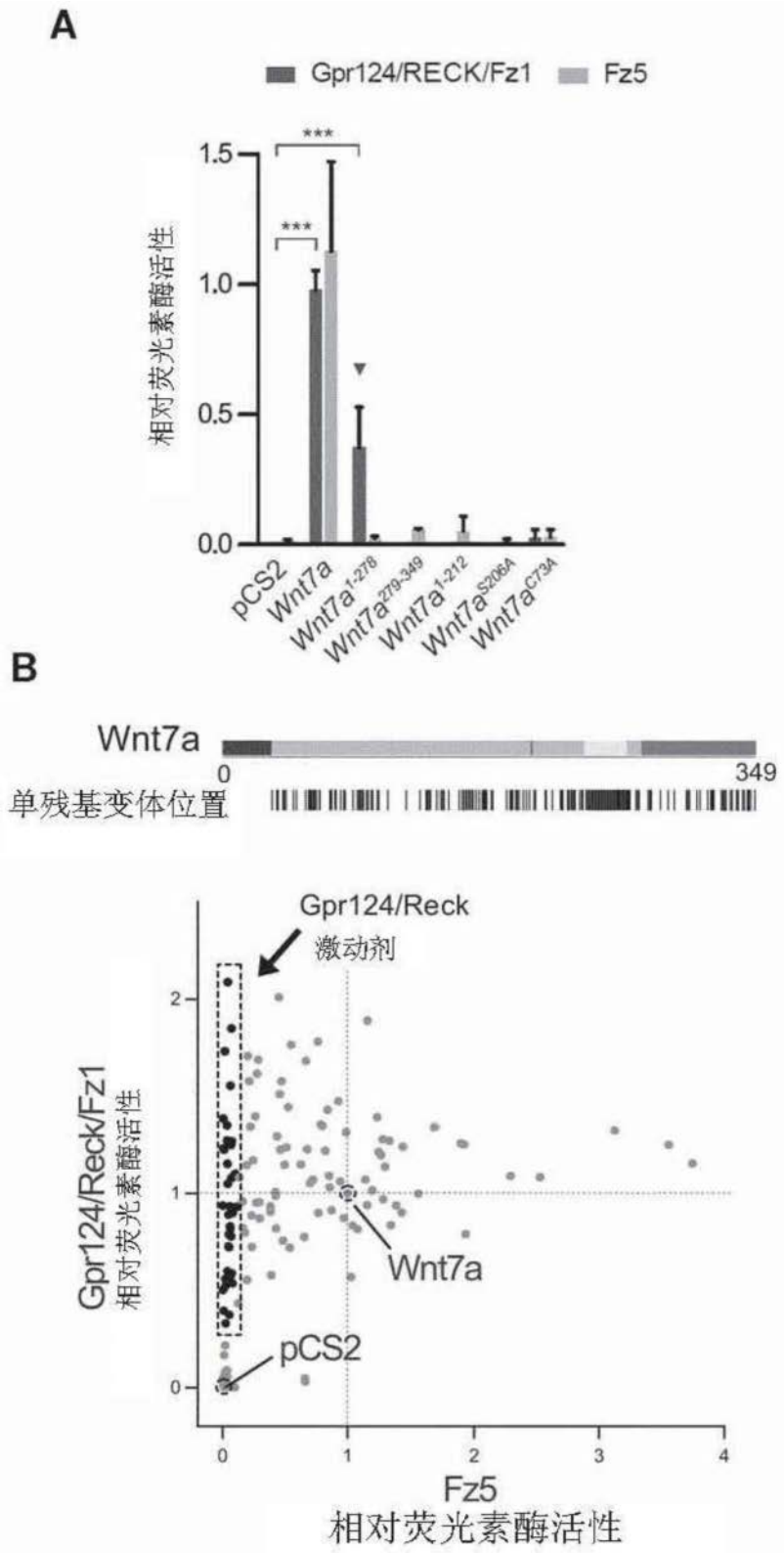


图7

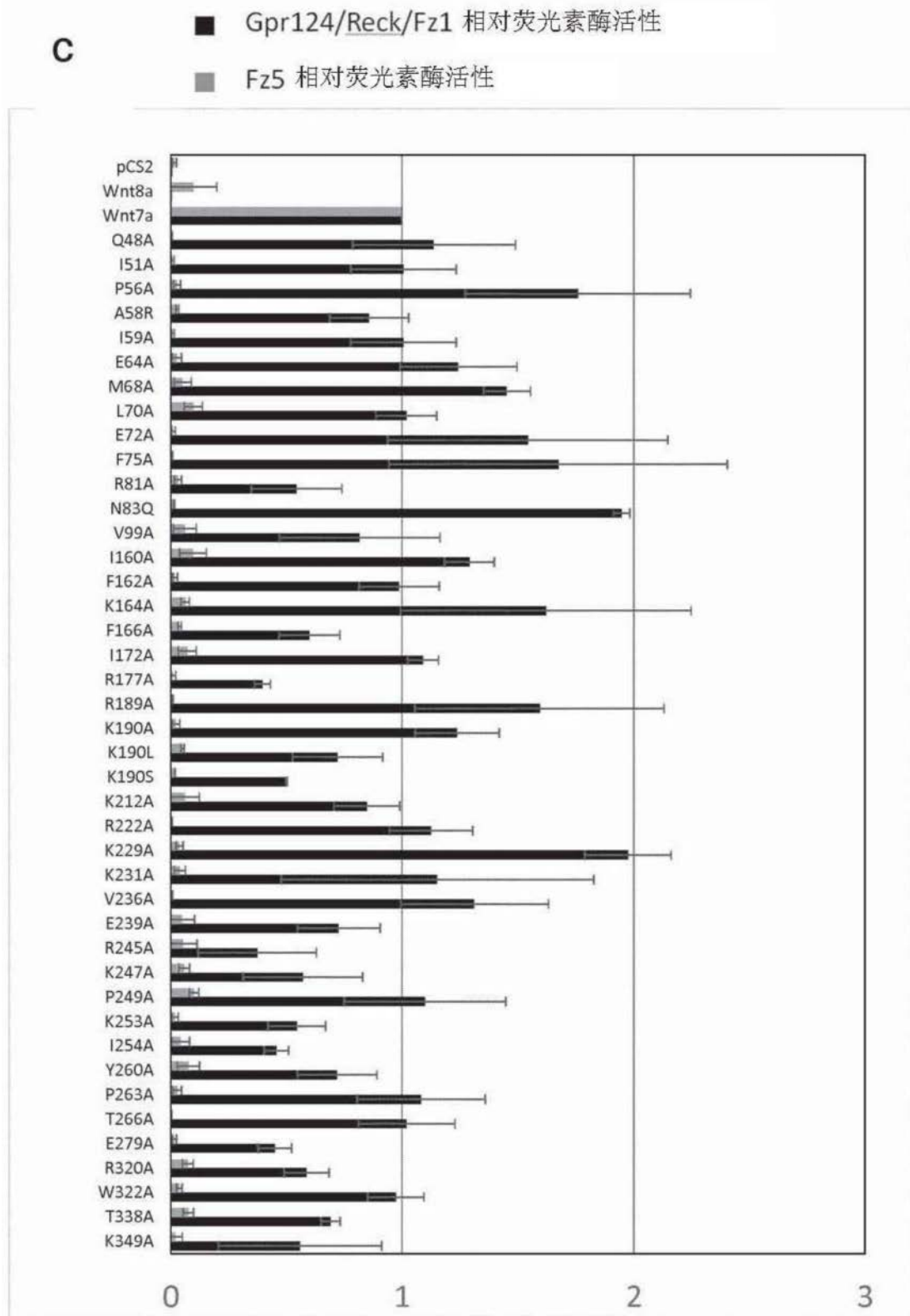


图7(续)

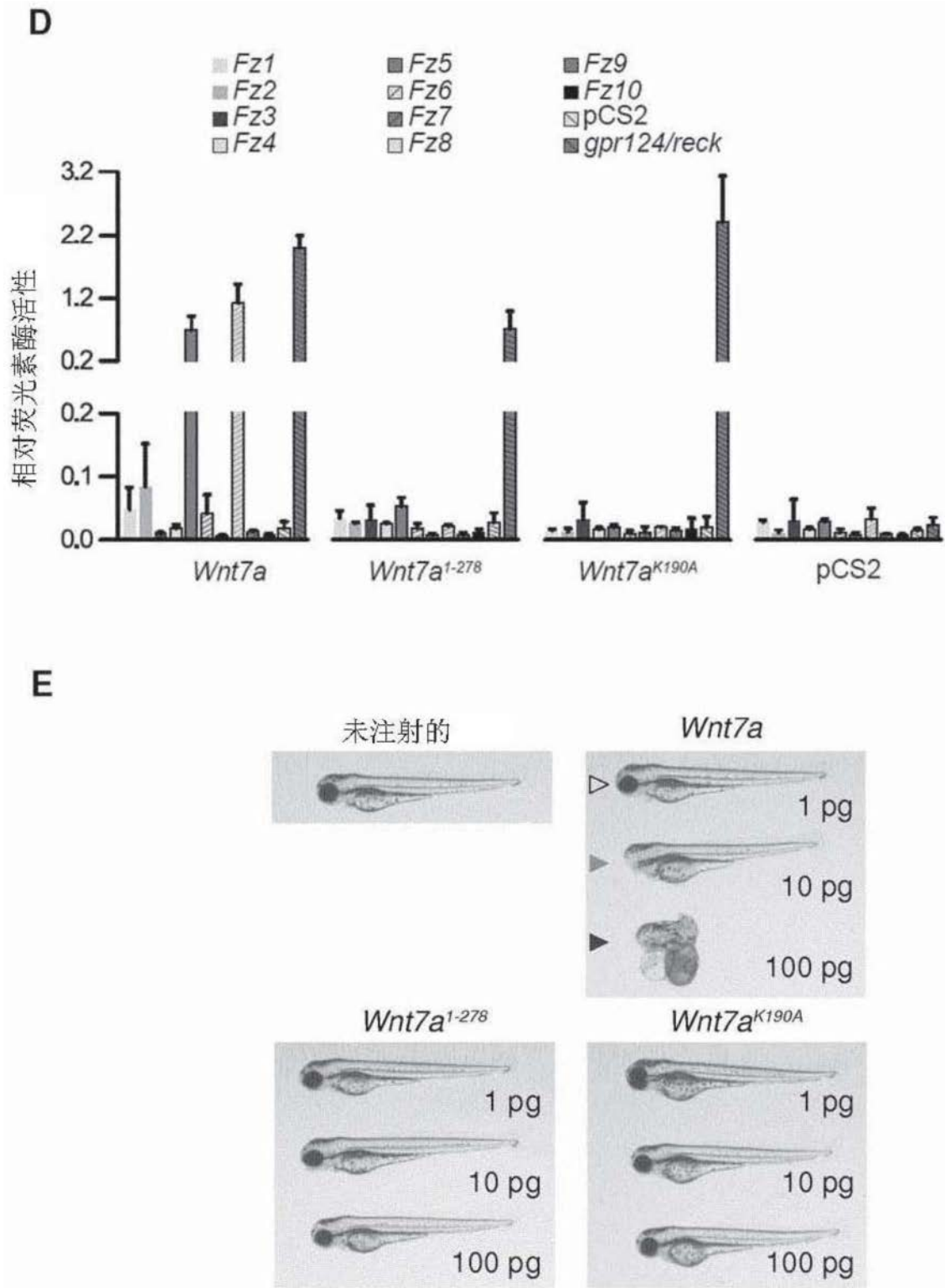


图7(续)

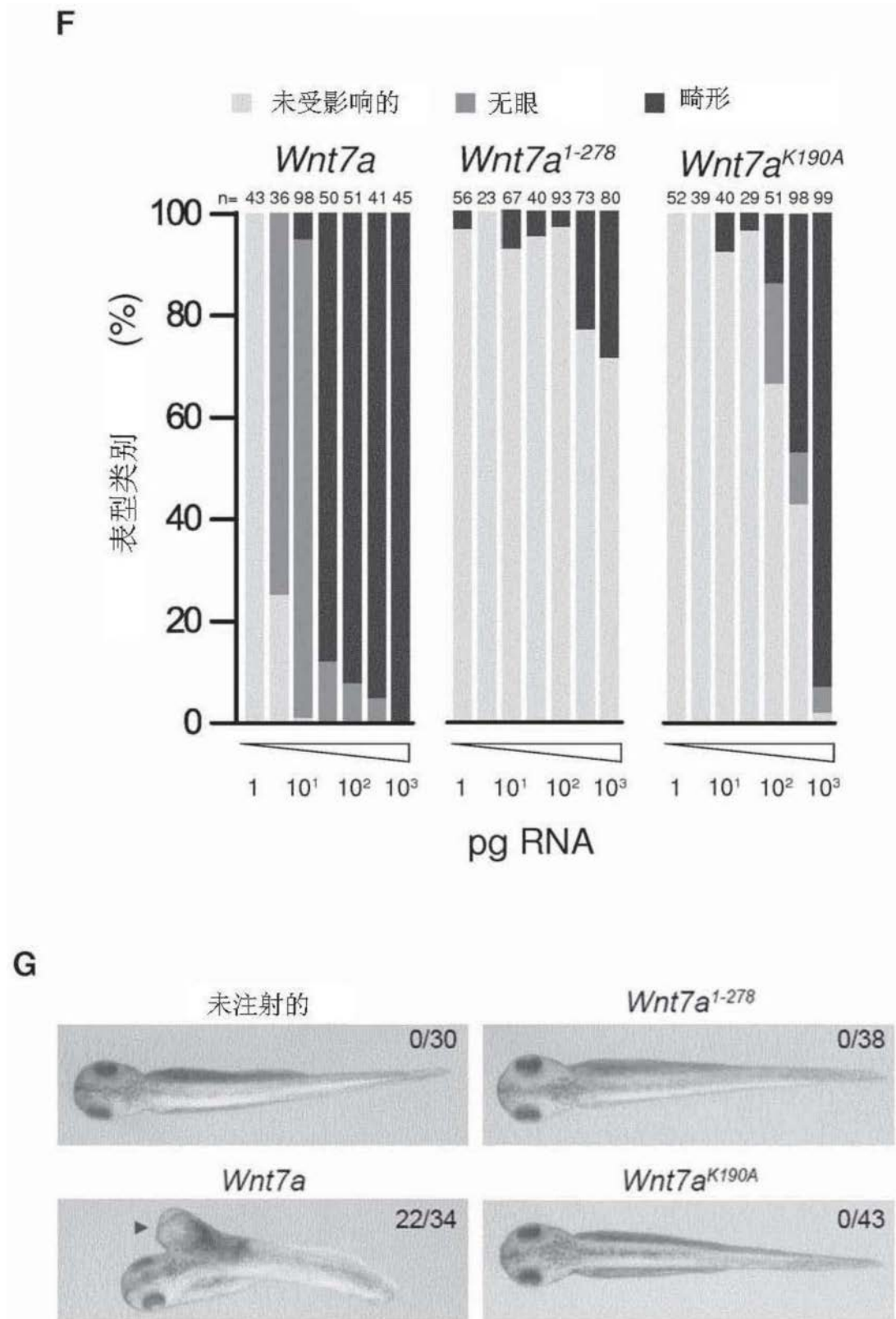


图7(续)

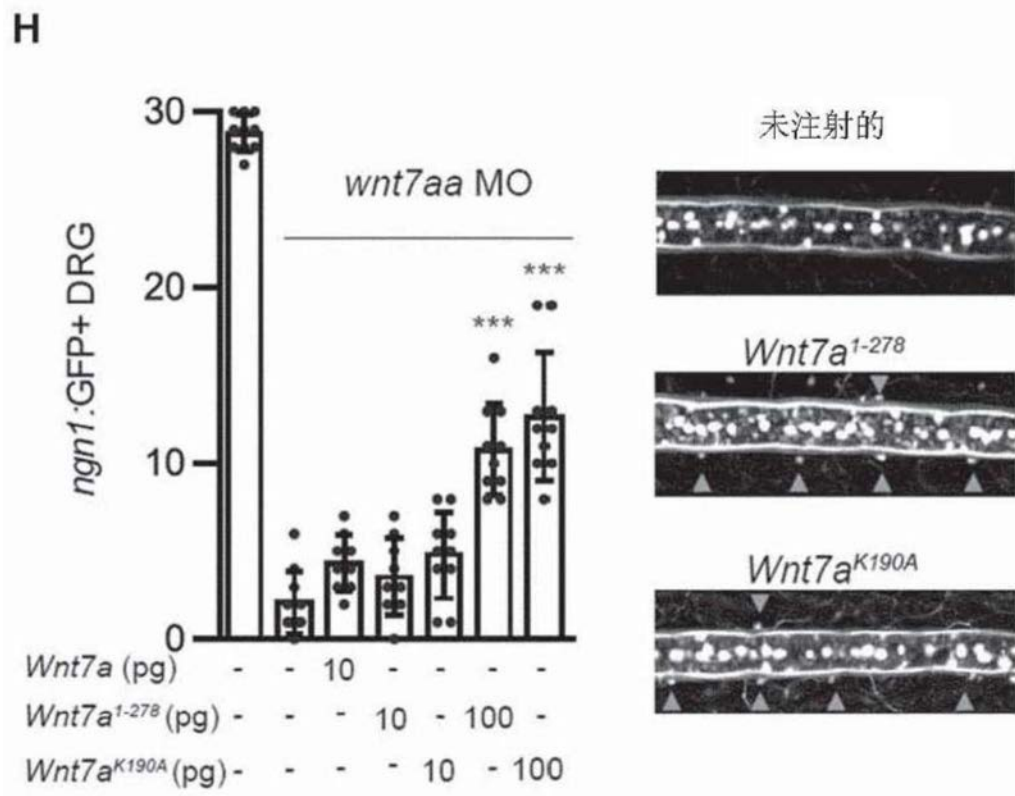


图7(续)

hWnt7a^{NTD-K159A}:

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRAILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPVRA SRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 28)

hWnt7a^{K159A}:

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRAILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPVRA SRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNK TAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC KFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 85)

图8

hWnt7a^{NTD-A27R};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDRIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 29)

hWnt7a^{A27R};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDRIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC KFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 86)

hWnt7a^{NTD-E33A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDRIIVIGAGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 30)

hWnt7a^{E33A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDRIIVIGAGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC KFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 87)

hWnt7a^{NTD-E41A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDRIIVIGEGSQMGLD A CQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 31)

hWnt7a^{E41A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDRIIVIGEGSQMGLD A CQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC KFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 88)

图8(续)

hWnt7a^{NTD-F44A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEGSQMGLDECQAQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVPEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 32)

hWnt7a^{F44A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEGSQMGLDECQAQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVPEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFWCCYVKNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 89)

hWnt7a^{NTD-N52Q};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWQCSALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVPEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 33)

hWnt7a^{N52Q};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWQCSALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVPEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFWCCYVKNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 90)

hWnt7a^{NTD-I129A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GA~~G~~FAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQ
FRELGYVLKDKYNEAVHVPEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDDLVYIEKSPNYC (SEQ
ID NO: 34)

hWnt7a^{I129A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GA~~G~~FAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQ
FRELGYVLKDKYNEAVHVPEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDDLVYIEKSPNYCEEDPV
TGSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFWCCYVKNTCSERT
EMYTCK (SEQ ID NO: 91)

图8(续)

hWnt7a^{NTD-F131A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGAAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQ
FRELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYC (SEQ
ID NO: 35)

hWnt7a^{F131A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGAAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQ
FRELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPV
TGSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC FHWCCYVKCNTCSERT
EMYTCK (SEQ ID NO: 92)

hWnt7a^{NTD-K133A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAAVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 36)

hWnt7a^{K133A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAAVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPV
TGSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC FHWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 93)

hWnt7a^{NTD-I141A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREAKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQ
FRELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYC (SEQ
ID NO: 37)

hWnt7a^{I141A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREAKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQ
FRELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPV
TGSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC FHWCCYVKCNTCSERT
EMYTCK (SEQ ID NO: 94)

图8(续)

hWnt7a^{NTD-R158A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGAKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 38)

hWnt7a^{R158A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGAKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCKFHWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 95)

hWnt7a^{NTD-K181A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTATCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 39)

hWnt7a^{K181A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTATCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCKFHWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 96)

hWnt7a^{NTD-R191A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
AELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 40)

hWnt7a^{R191A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
AELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCKFHWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 97)

图8(续)

hWnt7a^{NTD-K198A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTL PQF
RELGYVLADKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 41)

hWnt7a^{K198A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTL PQF
RELGYVLADKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC KFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 98)

hWnt7a^{NTD-V205A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTL PQF
RELGYVLKDKYNEAAHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 42)

hWnt7a^{V205A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTL PQF
RELGYVLKDKYNEAAHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYEEDPVTG
SVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC KFWCCYVKCNTCSERTEM
YTCK (SEQ ID NO: 99)

hWnt7a^{NTD-E208A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTL PQF
RELGYVLKDKYNEAVHVAPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 43)

hWnt7a^{E208A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTL PQF
RELGYVLKDKYNEAVHVAPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC KFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 100)

图8(续)

hWnt7a^{NTD-K216A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNARPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 44)

hWnt7a^{K216A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNARPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFHWCCYVKNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 101)

hWnt7a^{NTD-K222A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLAIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 45)

hWnt7a^{K222A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLAIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFHWCCYVKNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 102)

hWnt7a^{NTD-I223A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKAKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 46)

hWnt7a^{I223A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKAKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFHWCCYVKNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 103)

图8(续)

hWnt7a^{NTD-Y229A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSARKPMDTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 47)

hWnt7a^{Y229A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSARKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 104)

hWnt7a^{NTD-P232A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKAMD TDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 48)

hWnt7a^{P232A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKAMD TDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 105)

hWnt7a^{NTD-T235A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DADLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 49)

hWnt7a^{T235A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DADLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 106)

图8(续)

hWnt7a^{E248A};

LGASHCNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCAEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC KFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 50)

hWnt7a^{R289A};

LGASHCNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYA^AVWQCNC KFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 52)

hWnt7a^{W291A};

LGASHCNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARV^AQCNC KFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 53)

hWnt7a^{T307A};

LGASHCNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC KFWCCYVKCN^ACSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 54)

hWnt7a^{NTD-Q17A};

LGASHCNKIPGLAPR^ARAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 68)

hWnt7a^{Q17A};

LGASHCNKIPGLAPR^ARAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC KFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 107)

图8(续)

hWnt7a^{NTD-I20A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAAACQSRPD AII VIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 69)

hWnt7a^{I20A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAAACQSRPD AII VIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC KFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 108)

hWnt7a^{NTD-P25A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRADAII VIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 70)

hWnt7a^{P25A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRADAII VIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC KFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 109)

hWnt7a^{NTD-M37A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEGSQAGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 71)

hWnt7a^{M37A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEGSQAGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC KFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 110)

图8(续)

hWnt7a^{NTD-L39A}:

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMG^ADECQFQFRNGRWNC^SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA^ACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV^RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM^DTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 72)

hWnt7a^{L39A}:

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMG^ADECQFQFRNGRWNC^SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA^ACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV^RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM^DTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC^KFHWCCYVKNC^TCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 111)

hWnt7a^{NTD-I28A}:

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDA^IIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC^SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA^ACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV^RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM^DTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 74)

hWnt7a^{I28A}:

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDA^IIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC^SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA^ACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV^RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM^DTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC^KFHWCCYVKNC^TCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 112)

hWnt7a^{NTD-R50A}:

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNG^AWNC^SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA^ACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV^RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM^DTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 75)

hWnt7a^{R50A}:

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNG^AWNC^SALGERTVFGKE
LKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA^ACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV^RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM^DTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNC^KFHWCCYVKNC^TCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 113)

图8(续)

hWnt7a^{NTD-V68A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEG SQMGLDECQFQFRNGRWNC S ALGERTVFGKE
LK AGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 76)

hWnt7a^{V68A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEG SQMGLDECQFQFRNGRWNC S ALGERTVFGKE
LK AGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFHWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 114)

hWnt7a^{NTD-F135A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEG SQMGLDECQFQFRNGRWNC S ALGERTVFGKE
LK VGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAK V AVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQ
FRELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYC (SEQ
ID NO: 77)

hWnt7a^{F135A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEG SQMGLDECQFQFRNGRWNC S ALGERTVFGKE
LK VGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAK V AVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQ
FRELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYCEEDPV
TGSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFHWCCYVKCNTCSERT
EMYTCK (SEQ ID NO: 115)

hWnt7a^{NTD-R146A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEG SQMGLDECQFQFRNGRWNC S ALGERTVFGKE
LK VGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNA ATL MNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 78)

hWnt7a^{R146A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEG SQMGLDECQFQFRNGRWNC S ALGERTVFGKE
LK VGSREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNA ATL MNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFHWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 116)

图8(续)

hWnt7a^{NTD-K159S};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEG SQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVG SREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGR SILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 79)

hWnt7a^{K159S};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEG SQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVG SREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGR SILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCKFHWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 117)

hWnt7a^{NTD-K159L};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEG SQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVG SREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGR LILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 80)

hWnt7a^{K159L};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEG SQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVG SREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGR LILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCKFHWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 118)

hWnt7a^{NTD-K200A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEG SQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVG SREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGR KILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKD AYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 81)

hWnt7a^{K200A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPD AII VIGEG SQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVG SREAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKV FVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGR KILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKD AYNEAVHVEPV RASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYC
EEDPVTGSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCKFHWCCYVKCNT
CSERTE MYTCK (SEQ ID NO: 119)

图8(续)

hWnt7a^{NTD-R214A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGR KILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPVRA SA NKRP TFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 82)

hWnt7a^{R214A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGR KILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPVRA SA NKRP TFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCKFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 120)

hWnt7a^{NTD-P218A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGR KILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPVRA SRNKR P TFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYC (SEQ ID
NO: 83)

hWnt7a^{P218A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGR KILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPVRA SRNKR P TFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCKFWCCYVKCNTCSERTE
MYTCK (SEQ ID NO: 121)

hWnt7a^{K318A};

LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITA AACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRY
GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGR KILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
RELGYVLKDKYNEAVHVEPVRA SRNKR P TFLKIKKPLSYRKPM DTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
GSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCKFWCCYVKCNTCSERTE
MYTC A (SEQ ID NO: 84)

图8(续)

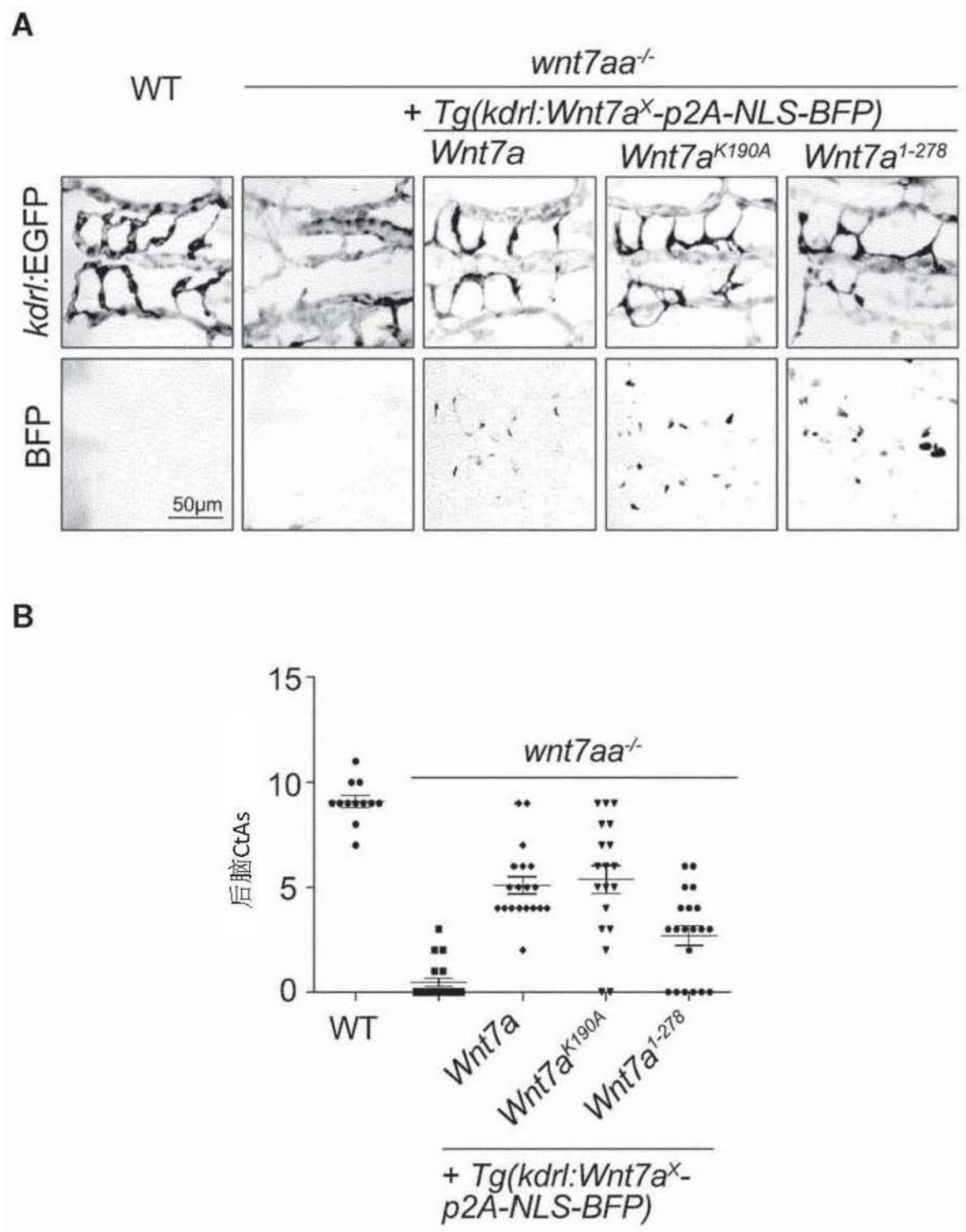


图9

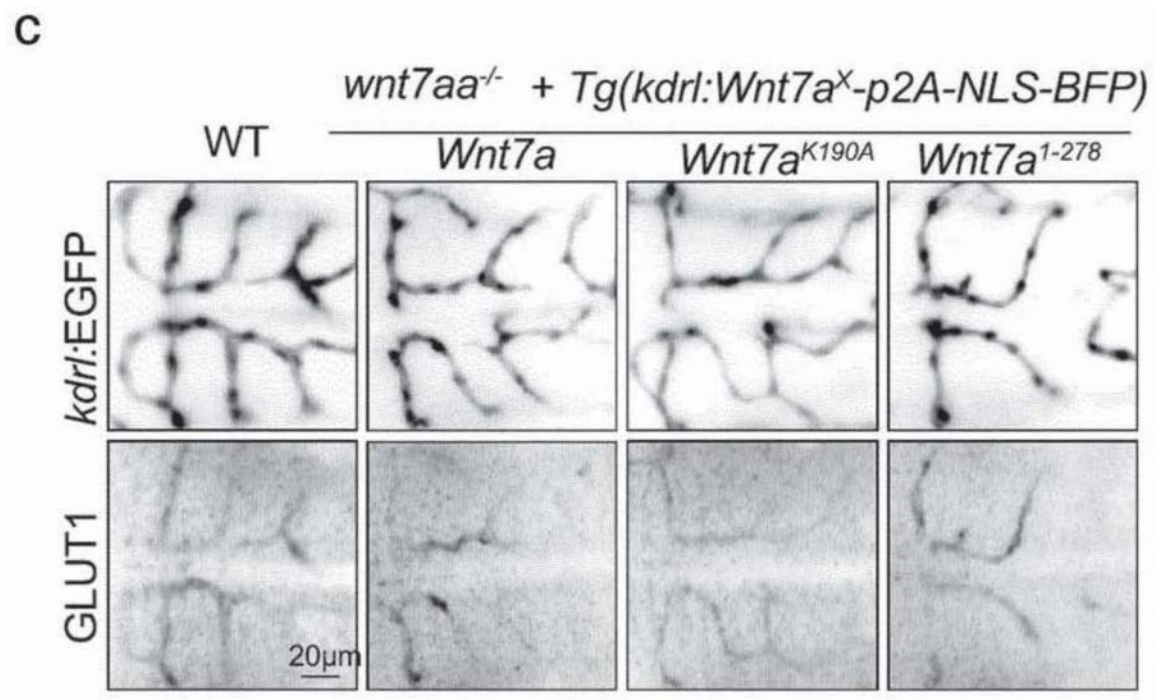


图9(续)

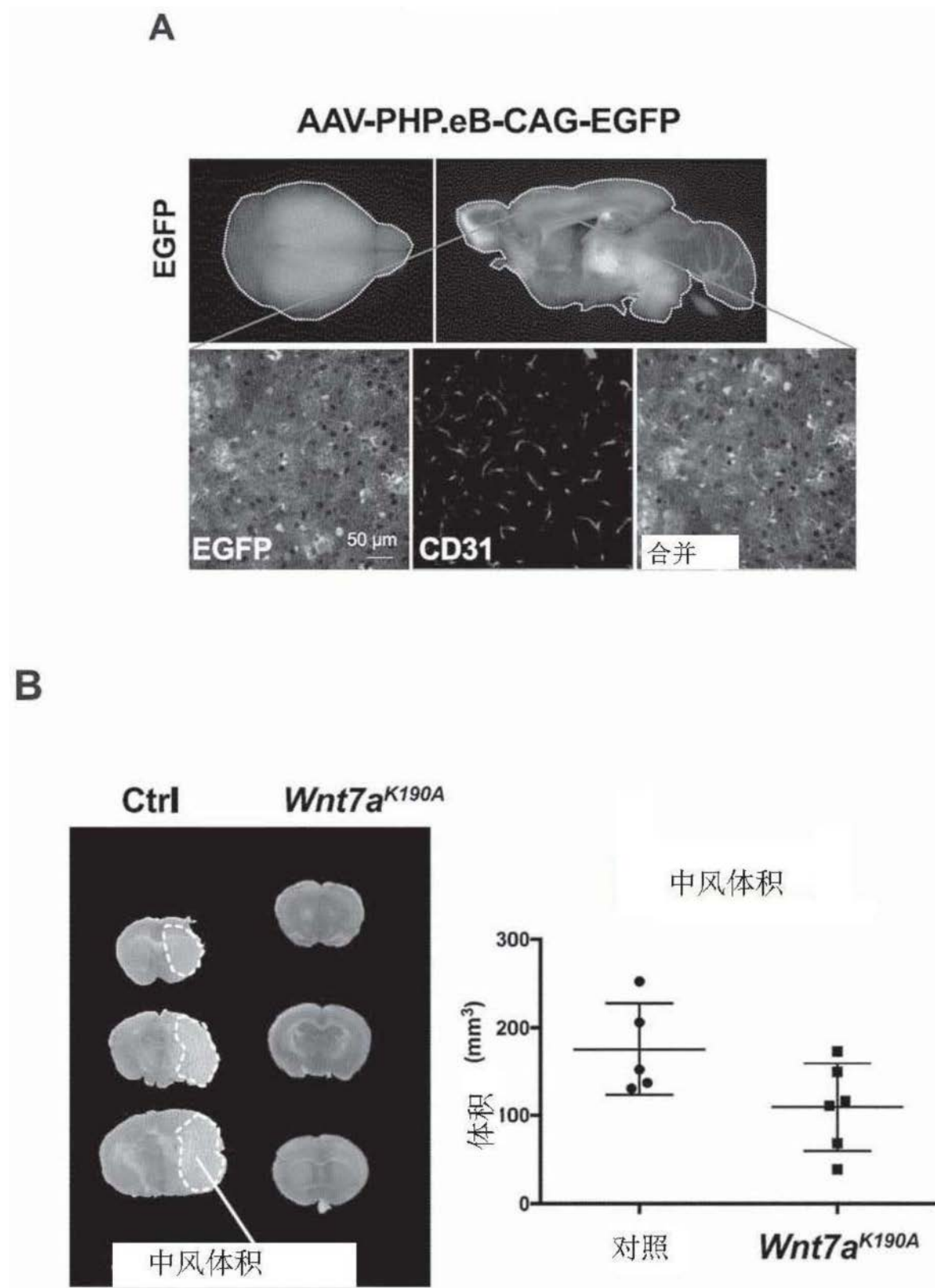


图10