



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114805527 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 29

(21) 申请号 202210193656.4

C07K 14/575 (2006.01)

(22) 申请日 2015.05.21

C12N 15/10 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 38/22 (2006.01)

62/001,587 2014.05.21 US

A61K 47/64 (2017.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 7/00 (2006.01)

201580038080.2 2015.05.21

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(71) 申请人 哈佛大学的校长及成员们

A61P 35/00 (2006.01)

地址 美国马萨诸塞州

A61P 43/00 (2006.01)

(72) 发明人 G.L. 韦尔丁 J.H. 麦吉

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 袁悦

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/82 (2006.01)

权利要求书9页 说明书85页

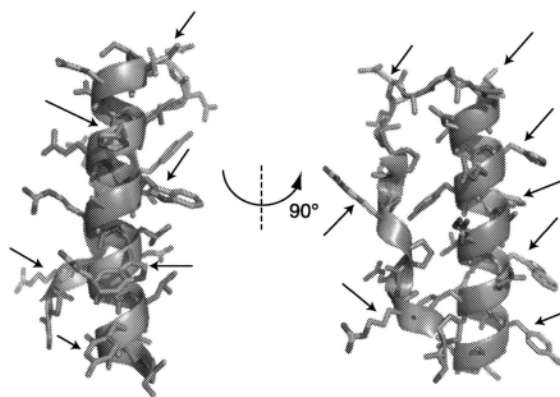
序列表39页 附图43页

(54) 发明名称

RAS抑制肽和其用途

(57) 摘要

本发明提供了包含以下序列的肽： $X_6-X_5-X_4-X_3-X_2-X_1-X_1PX_3X_4PX_6X_7PGX_{10}X_{11}AX_{13}X_{14}X_{15}X_{16}LX_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}LX_{25}X_{26}VLX_{29}X_{30}X_{31}X_{32}$ ，其中所述氨基酸 X_6 、 X_5 、 X_4 、 X_3 、 X_2 、 X_1 、 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_6 、 X_7 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{22} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{29} 、 X_{30} 、 X_{31} 、以及 X_{32} 如本文所定义。本发明还提供了包含所述肽的药物组合物以及使用所述肽的方法。还提供了使用肽二聚体展示技术筛选肽二聚体的文库的方法。



1. 肽, 所述肽包含以下序列:

$X_1PX_3X_4PX_6X_7PGX_{10}X_{11}AX_{13}X_{14}X_{15}DLX_{18}X_{19}YX_{21}X_{22}RLX_{25}X_{26}Y LX_{29}X_{30}VA$
(SEQ ID NO:1)

其中:

X_1 是Gly、Arg或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

X_3 、 X_4 以及 X_6 各自独立地是带电荷的氨基酸;

X_{10} 是带电荷的氨基酸;

X_7 是Tyr或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

X_{11} 是带电荷的氨基酸或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

X_{13} 是Ser或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

X_{14} 是Ile或Glu;

X_{15} 是Glu、Asp、Gln或Gly;

X_{18} 是芳族或疏水性氨基酸;

X_{19} 是Glu、Asp、Gln、Ala或Trp;

X_{21} 、 X_{25} 、 X_{29} 各自独立地是Tyr、Phe、Trp、His或具有环己基侧链的氨基酸, 其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链能够被一个或多个氟取代;

X_{22} 是Ala、Gly、Ser或Val;

X_{26} 是Asn、Leu、Ile或His;

X_{30} 是Ala或Arg;

其中所述肽包含能够使所述肽与另一个肽交联的一个至两个氨基酸。

2. 肽, 所述肽包含以下序列:

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}$
(SEQ ID NO:13), 其中

X_3 和 X_4 各自独立地是中性或带电荷的氨基酸;

X_6 是带电荷的氨基酸或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

X_7 是Tyr、His或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

X_{10} 是Pro、带电荷的氨基酸或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

X_{11} 是Ala、Ser、中性或带电荷的氨基酸或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

X_{13} 是Ser、Pro、Thr或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

X_{14} 是Ile、Glu、Val、Leu或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

X_{15} 是Glu、Lys、Arg、Ala、Ser、Asp、Gln或Gly;

X_{16} 是Asp、Glu、Gln、Ala或Ser;

X_{18} 是芳族或疏水性氨基酸;

X_{19} 是Glu、Lys、Leu、Met、His、Asp、Gln、Ala、Ser、Trp或Arg;

X_{20} 是Tyr或Phe;

X_{21} 是Gln、Tyr、Phe、Trp、His或具有环己基侧链的氨基酸, 其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链能够被一个或多个氟取代;

X_{22} 是Ala、Gln、Trp、Leu、Tyr、Gly、Ser、Val或Asn;

X_{23} 是Arg、Asp、Leu或Ala;

X₂₅是Gln、Tyr、Phe、Trp、His、Asp或具有环己基侧链的氨基酸,其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链能够被一个或多个氟取代;

X₂₆是Asn、Ala、Leu、Arg、Phe、Ile、His或Gln;

X₂₉是Ala、Leu、Glu、Asn、Gln、Tyr、Phe、Trp、His或具有环己基侧链的氨基酸,其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链能够被一个或多个氟取代;

X₃₀是Ala、Arg或Val;

X₃₁是V或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

X₃₂是V、Ala、Arg、Ser或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

X₋₆、X₋₅、X₋₄、X₋₃、X₋₂、X₋₁以及X₁是任选的;并且

其中所述肽包含能够使所述肽与另一个肽交联的一个至两个氨基酸。

3. 如权利要求2所述的肽,其中

如果X₋₆存在,则X₋₆是Gly并且X₋₅至X₁存在;

如果X₋₅存在,则X₋₅是Cys或Sec并且X₋₄至X₁存在;

如果X₋₄存在,则X₋₄是Gly并且X₋₃至X₁存在;

如果X₋₃存在,则X₋₃是Gly并且X₋₂至X₁存在;

如果X₋₂存在,则X₋₂是Pro、Cys、Sec或Gly并且X₋₁和X₁存在;

如果X₋₁存在,则X₋₁是Arg或Gly并且X₁存在;并且

如果X₁存在,那么X₁是Gly、Arg或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。

4. 如权利要求2所述的肽,其中

X₋₆至X₁不存在;X₁₁、X₁₅、X₁₆、X₁₉各自是Ala或Ser;X₁₈是His;X₂₀是Tyr,并且X₂₆是Asn。

5. 肽,所述肽包含以下序列:

X₁PX₃X₄PX₆⁷PGX₁₀AAX₁₃¹⁴AALHAYX₂₁AX₂₃LX₂₅NYLX₂₉³⁰VX₃₂(SEQ ID NO:48),其中

X₁任选地存在,并且在存在时,X₁是Gly、Arg或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

X₃、X₄以及X₆各自独立地是中性或带正电荷的氨基酸;

X₇是Tyr或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

X₁₀是Asp或中性氨基酸;

X₁₃是Ser、Thr或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

X₁₄是Ile或Leu;

X₂₁、X₂₅、X₂₉各自独立地是Tyr、Phe、Trp、His或具有环己基侧链的氨基酸,其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链能够被一个或多个氟取代;

X₂₃是Arg、Leu或Ala;

X₃₀是Ala或Arg;

X₃₂是Ala、Ser或Arg;并且

其中所述肽包含能够使所述肽与另一个肽交联的一个至两个氨基酸。

6. 肽二聚体,所述肽二聚体包含与第二肽缔合的第一肽,其中所述第一肽和所述第二肽各自独立地包含以下肽序列:

X₁PX₃X₄PX₆⁷PGDX₁₁AX₁₃¹⁴X₁₅DLX₁₈¹⁹YX₂₁X₂₂RLX₂₅²⁶YLX₂₉³⁰VA
(SEQ ID NO:1)

其中:

X₁是Gly、Arg或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；
X₃、X₄以及X₆各自独立地是带电荷的氨基酸；
X₁₀是带电荷的氨基酸；
X₇是Tyr或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；
X₁₁是带电荷的氨基酸或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；
X₁₃是Ser或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；
X₁₄是Ile或Glu；
X₁₅是Glu、Asp、Gln或Gly；
X₁₈是芳族或疏水性氨基酸；
X₁₉是Glu、Asp、Gln、Ala或Trp；
X₂₁、X₂₅、X₂₉各自独立地是Tyr、Phe、Trp、His或具有环己基侧链的氨基酸，其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链能够被一个或多个氟取代；
X₂₂是Ala、Gly、Ser或Val；
X₂₆是Asn、Leu、Ile或His；
X₃₀是Ala或Arg；

其中所述第一肽和所述第二肽各自包含使所述第一肽与所述第二肽交联的一个至两个氨基酸。

7. 肽二聚体，所述肽二聚体包含与第二肽缔合的第一肽，其中所述第一肽和所述第二肽各自独立地包含如权利要求2至4所述的SEQ ID NO:13的肽序列。

8. 肽二聚体，所述肽二聚体包含与第二肽缔合的第一肽，其中所述第一肽和所述第二肽各自独立地包含如权利要求5所述的SEQ ID NO:48的肽序列。

9. 肽二聚体，所述肽二聚体包含与第二肽缔合的第一肽，其中所述第一肽和所述第二肽各自独立地包含选自如权利要求1或2至5所述的SEQ ID NO:1、13或48的肽序列。

10. 如权利要求6至9中任一项所述的肽二聚体，其中所述二聚体是同二聚体。

11. 如权利要求6至9中任一项所述的肽二聚体，其中所述二聚体是异二聚体。

12. 如前述权利要求中任一项所述的肽，其中所述肽包含能够使所述肽与不同序列的另一个肽交联的一个至两个氨基酸。

13. 如前述权利要求中任一项所述的肽，其中所述能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸能够共价交联。

14. 如前述权利要求中任一项所述的肽，其中X₁是Cys、Sec、Phe、Trp或Tyr。

15. 如前述权利要求中任一项所述的肽，其中X₁是能够使所述肽与另一个肽交联的非天然氨基酸或是使所述第一肽与所述第二肽交联的非天然氨基酸。

16. 如前述权利要求中任一项所述的肽，其中X₃、X₄以及X₆中的每一个独立地是Arg、Lys或His。

17. 如前述权利要求中任一项所述的肽，其中X₃和X₄中的每一个独立地是Arg。

18. 如前述权利要求中任一项所述的肽，其中X₆是Arg、Lys、His或Cys。

19. 如前述权利要求中任一项所述的肽，其中X₇是Cys、Sec、Phe、Trp、Tyr或His。

20. 如前述权利要求中任一项所述的肽，其中X₇是Cys。

21. 如前述权利要求中任一项所述的肽，其中X₇是Sec。

22. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_7 是带正电荷或带负电荷的氨基酸。
23. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_7 是Phe、Trp或Tyr。
24. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_7 是能够使所述肽与另一个肽交联的非天然氨基酸。
25. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{10} 是Glu、Asp或Ala。
26. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{10} 是Asp、His、Pro或包含丙烯酰胺部分的氨基酸。
27. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{11} 是Glu、Asp、Cys、Sec、Phe、Trp或Tyr。
28. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{11} 是Asp、Gln、Asn、Ala或Ser。
29. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{11} 是能够使所述肽与另一个肽交联的非天然氨基酸。
30. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{13} 是Cys、Sec、Phe、Trp或Tyr。
31. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{13} 是Ser、Pro、Cys或Thr。
32. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{13} 是使所述肽与另一个肽交联的非天然氨基酸。
33. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{13} 是Cys或Sec并且 X_{14} 是Glu。
34. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{14} 是Ile、Val、Glu、Leu或使第一肽与第二肽交联的氨基酸。
35. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{14} 是Cys、Sec、Phe、Trp或Tyr。
36. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{15} 是Glu、Lys、Arg、Ser、Asp、Gln、Gly或Ala。
37. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{16} 是Asp、Glu、Gln、Ala或Ser。
38. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{18} 是His、Phe、Tyr、Trp、Ala、Val、Leu、Ile或Met。
39. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{18} 是His。
40. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{19} 是Glu、Asp、Gln、Ala、Ser、Trp、Arg、Lys、Leu、Met或His。
41. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{20} 是Tyr或Phe。
42. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{21} 是Trp、Tyr、Phe、His或Gln。
43. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{22} 是Ala、Gln、Trp、Leu、Tyr、Gly、Ser、Val或Asn。
44. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{23} 是Arg或Asp。
45. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{29} 是Tyr。
46. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{29} 是Tyr、Phe、Trp、His、Gln、Arg、Asp、Asn、Ala、Leu或Glu。
47. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{21} 和 X_{25} 是Trp。
48. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{25} 是Trp、Tyr、Gln、Arg或Asp。
49. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{25} 是Trp或Tyr。
50. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{26} 是Asn、Leu、Ile、His、Gln、Arg、Phe或

Ala。

51. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{22} 是Ala。
52. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{22} 是Gly、Ser或Val。
53. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{30} 是Arg。
54. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{30} 是Ala、Arg或Val。
55. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{31} 是Val、Dap缀合的丙烯酰胺或Dab缀合的丙烯酰胺。
56. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{32} 是Ala、Arg或Ser。
57. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中 X_{18} 是His并且 X_{25} 和 X_{21} 各自是Trp。
58. 如权利要求1至5和12至57中任一项所述的肽, 其中所述肽是第一肽, 所述第一肽与第二肽缔合以形成结合靶蛋白的肽二聚体。
59. 如权利要求6至57中任一项所述的肽, 其中所述肽二聚体结合靶蛋白。
60. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中所述靶蛋白是Ras、Ras突变体、Myc/Max、RafA、 β -连环蛋白、YAP/TEAD、以及NEMO/I κ B激酶。
61. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中所述靶蛋白是Ras或Ras突变体。
62. 如权利要求58至61中任一项所述的肽, 其中所述第二肽具有SEQ ID NO:1、12、13或48。
63. 如权利要求58至62中任一项所述的肽, 其中所述第二肽的 X_{21} 或 X_{25} 是Tyr、Phe、Trp、His或具有环己基侧链的氨基酸, 其中Tyr、Phe、Trp或环己基侧链是任选氟化的。
64. 如权利要求58至63中任一项所述的肽, 其中所述第二肽的 X_{21} 是Trp。
65. 如权利要求58至64中任一项所述的肽, 其中所述第二肽的 X_{25} 是Tyr。
66. 如权利要求58至65中任一项所述的肽, 其中所述第一肽的 X_{25} 是Trp。
67. 如权利要求58至66中任一项所述的肽, 其中所述第二肽的 X_{18} 是His, 并且 X_{21} 和 X_{25} 均是Trp。
68. 如权利要求58至67中任一项所述的肽, 其中所述第一肽和所述第二肽是经由二硫键、二硒键、碳-碳键、酰胺键、酯键、氢键、盐桥、 π 堆积相互作用或非极性疏水性相互作用缔合的。
69. 如权利要求58至68中任一项所述的肽, 其中所述第一肽和所述第二肽是经由二硫键或二硒键缔合的。
70. 如权利要求58至69中任一项所述的肽, 其中所述靶蛋白是Ras或Ras突变体。
71. 如权利要求58至69中任一项所述的肽, 其中所述靶蛋白是Myc/Max、RafA或Ras/RafA。
72. 如权利要求58至71中任一项所述的肽, 其中所述肽二聚体以小于150nM的解离常数(K_d)结合Ras。
73. 如权利要求58至72中任一项所述的肽, 其中所述肽在N末端处包含另外的氨基酸。
74. 如权利要求58至73中任一项所述的肽, 其中所述肽在C末端处包含另外的氨基酸。
75. 如权利要求58至74中任一项所述的肽, 其中所述另外的氨基酸是 X_2G , 其中G位于位置 X_{-1} ; 或GR, 其中R位于位置 X_{-1} 。
76. 如权利要求58至75中任一项所述的肽, 其中 X_2 是能够使所述肽与另一个肽交联的

氨基酸。

77. 如权利要求58至76中任一项所述的肽,其中X₂是Cys、Sec、Phe、Trp或Tyr。

78. 如权利要求58至77中任一项所述的肽,其中X₂是使所述肽与另一个肽交联的非天然氨基酸。

79. 如前述权利要求中任一项所述的肽,其中所述肽包含与所述SEQ ID NO:1、12、13或48的氨基酸序列约80%至约99%同源的序列。

80. 肽,所述肽包含低聚化结构域,所述低聚化结构域包含以下序列:

PX_aX_bPX_cX_dP (SEQ ID NO:2), 其中X_a、X_b、X_c是任何非脯氨酸氨基酸,并且X_d是能够使所述肽与第二肽交联的氨基酸。

81. 肽,所述肽包含低聚化结构域,所述低聚化结构域包含以下序列:

PX_aX_bPX_cX_dP (SEQ ID NO:2), 其中X_a、X_b是任何非脯氨酸氨基酸;并且X_c和X_d是能够使所述肽与第二肽交联的氨基酸。

82. 如权利要求80和81所述的肽,其中所述第二肽包含以下序列:

PX_aX_bPX_cX_dP (SEQ ID NO:2)。

83. 如权利要求80或81所述的肽,所述肽还包含α-螺旋结构域,所述α-螺旋结构域包含以下序列:

X₁₃X₁₄X₁₅DLX₁₈X₁₉YX₂₁X₂₂RLX₂₅X₂₆YLYX₂₉X₃₀VA (SEQ ID NO:3), 其中X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₈、X₁₉、X₂₁、X₂₂、X₂₅、X₂₆、X₂₉以及X₃₀如前述权利要求中的任一项中所定义。

84. 如权利要求83所述的肽,其中所述α-螺旋结构域与靶蛋白缔合。

85. 如权利要求80至84中任一项所述的肽,其中X_d是Cys、Sec、Phe、Trp或Tyr。

86. 如权利要求85所述的肽,其中X_d是能够使所述肽与另一个肽交联的天然或非天然氨基酸。

87. 肽,所述肽包含α-螺旋结构域,所述α-螺旋结构域包含以下序列:

X₁₃X₁₄X₁₅DLX₁₈X₁₉YX₂₁X₂₂RLX₂₅X₂₆YLYX₂₉X₃₀VA (SEQ ID NO:3), 其中X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₈、X₁₉、X₂₁、X₂₂、X₂₅、X₂₆、X₂₉以及X₃₀如前述权利要求中的任一项中所定义。

88. 如前述权利要求中任一项所述的肽,所述肽包含选自以下各项的序列:

GPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:4);

GPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:5);

GRRPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:6);

aPP-M:GPRRPRYPGDDAPVEDLIRFYNDLQQYLVVA (SEQ ID NO:7);

225-1:GCGGPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:8);

225-1S13C/I14E:GCGGPRRPRYPGDDACEEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:9);

225-1A30R:GCGGPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:10);

225-3:GCGGPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:11);

PRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:14);

PRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:15);

RRPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:16);

PRRPRYPGDDAPVEDLIRFYNDLQQYLVVA (SEQ ID NO:17);

PRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:18);

CGGPRRPRYPGDDACEEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:19) ;
PRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:20) ;
PRRPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ IDNO:21) ;
PRRPRCPGDDASLEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:22) ;
PRRPRCPGDQASLEELHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:23) ;
PRRPRCPGDNASIKQLHAYWNRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:24) ;
PRRPRCPGDDASIEDLHEYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:25) ;
PRRPRCPGDNASIKQLHAYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:26) ;
PRRPRCPGDNASIRQLHAYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:27) ;
GCGGPRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:28) ;
PRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:29) ;
225-H:PRRPKYPGDAASCAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:30) ;
225-I:PRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRXA (SEQ ID NO:31) ;
225-J:PRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRZA (SEQ ID NO:32) ;
225-K:PRRPCYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:33) ;
225-L:PRRPKCPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:34) ;
225-M:PRRPRYPGXAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:35) ;
225-N:PRRPRYPGZAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:36) ;
225-4s1:PRRPKYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO:37) ;
291-A:PRRPKHPGHAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO:38) ;
291-1:PRRPRHPGNATISQLHHYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO:39) ;
291-H:PRRPHHPGHAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO:40) ;
291-I:PRRPHYPGHAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO:41) ;
291-Q3:PRRPRCPGHAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO:42) ;
MY01:GPRRPRCPGDDASIRDLLKYWWRLRLYLLAVA (SEQ ID NO:43) ;
RL01:GPRRPRCPGDDASISDLLYWLRLDRYLWAVA (SEQ ID NO:44) ;
RR01:GPRRPRCPGDDASIRDLVWYRLYFYLEAVA (SEQ ID NO:45) ;
225-1c:PRRPKYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVS (SEQ ID NO:46) ;
225-4d:RPRRPKYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVS (SEQ ID NO:47) ;
291-T:PRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVS (SEQ ID NO:49) ;
Q:PRRPRCPGDNASIRQLHAYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:50) ;以及
R:PRRPRCPGDAASIAALHAYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:51) ;其中X是Dab缀合的丙烯酰胺
残基并且Z是Dap缀合的丙烯酰胺残基。

89. 如前述权利要求中任一项所述的肽,所述肽包含与所述SEQ ID NO:4至11或14至51的氨基酸序列约75%至约99%同源的序列。

90. 如前述权利要求中任一项所述的肽,所述肽还与细胞穿透肽或钉接肽缀合。

91. 如前述权利要求中任一项所述的肽,所述肽包含被小有机硫醇部分修饰的Cys或Sec。

92. 如权利要求91所述的肽,其中所述小有机硫醇部分是叔丁基硫醇或乙硫醇。

93. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 所述肽包含L-2,4-二氨基丁酸(Dab)或L-2,3-二氨基丙酸(Dap)残基。

94. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 所述肽包含被丙烯酸修饰以形成包含丙烯酰胺的侧链的L-2,4-二氨基丁酸(Dab)或L-2,3-二氨基丙酸(Dap)残基。

95. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 所述肽包含一个或多个His, 所述His被放置在氨基酸位置中以使得它们在空间上接近所述反向单体肽上的一个或多个阳离子残基或一个或多个His。

96. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 所述肽包含被放置在位置 X_6 、 X_7 和/或 X_{10} 处的一个或多个His。

97. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 所述肽包含通过与有机硫醇分子反应而被修饰的Cys或Sec。

98. 如权利要求97所述的肽, 其中所述有机硫醇分子是2,2'-二吡啶基二硫化物、4,4'-二吡啶基二硫化物或2,2'-二硫代双(5-硝基吡啶)。

99. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 所述肽与所述起始肽相比包含减少的负电荷数。

100. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 所述肽在位置 X_{11} 、 X_{15} 、 X_{16} 和/或 X_{19} 处包含至少一个、两个、三个或四个不带负电荷的氨基酸。

101. 如前述权利要求中任一项所述的肽, 其中所述不带负电荷的氨基酸是Ala或Ser。

102. 肽, 所述肽包含II型聚脯氨酸螺旋结构域、接头结构域和 α -螺旋结构域。

103. 如权利要求102所述的肽, 其中所述肽是或包含权利要求1-101中任一项的肽。

104. 两个肽的肽二聚体, 每个肽各自包含II型聚脯氨酸螺旋结构域、接头结构域和C末端 α -螺旋结构域, 其中每个肽包括能够与另一个肽单体共价或非共价交联的部分。

105. 如权利要求104所述的肽二聚体, 其中所述肽二聚体是同二聚体。

106. 如权利要求104所述的肽二聚体, 其中所述肽二聚体是异二聚体。

107. 如权利要求104-106中任一项的肽二聚体, 其中每个肽独立地是或包含权利要求1-101中任一项的肽。

108. 治疗有需要的受试者的与Ras相关的疾病或病况的方法, 所述方法包括向所述受试者施用如权利要求1至107中任一项的肽。

109. 如权利要求108所述的方法, 其中所述与Ras相关的疾病是增殖性疾病。

110. 如权利要求108所述的方法, 其中所述增殖性疾病是癌症。

111. 如权利要求108所述的方法, 其中所述与Ras相关的疾病是CFC综合征、毛细血管畸形-动静脉畸形综合征、克斯提洛氏综合征、莱吉斯氏综合征、1型神经纤维瘤病、努南氏综合征或伴有多发性色斑的努南氏综合征(以前的豹皮综合征)。

112. 筛选肽二聚体的文库的方法, 所述方法包括以下步骤:

用编码第一肽和第二肽的载体转化展示细胞, 其中所述第一肽和所述第二肽缔合形成与细胞壁蛋白融合的肽二聚体,

使所述展示细胞与第一标记接触, 其中所述第一标记包含靶蛋白并且与表达所述具有增强的与所述靶标的结合的肽二聚体的细胞缔合并且不与不表达所述具有增强的与所述靶标的结合的肽二聚体的细胞缔合;

分离所述与所述第一标记缔合的展示细胞;以及

鉴定所述表现出增强的与所述靶标的结合的第一肽和第二肽。

113. 如权利要求112所述的方法,其中所述肽二聚体是各自包含 α -螺旋结构的两个肽的肽同二聚体或肽异二聚体。

114. 如权利要求112或113所述的方法,其中所述两个肽共价结合。

115. 如权利要求112或113所述的方法,其中所述两个肽非共价结合。

116. 如权利要求112或113所述的方法,其中每一个肽独立地包含SEQ ID NO:1、12、13或48的序列。

117. 如权利要求112或116中任一项所述的方法,其中每一个肽包含作为能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸的部分。

118. 如权利要求112或117中任一项所述的方法,其中所述能够交联的部分是Cys或Sec。

119. 如权利要求112或118中任一项所述的方法,其中所述能够交联的部分是能够使所述第一肽与所述第二肽交联的非天然氨基酸。

120. 如权利要求112或119中任一项所述的方法,其中所述展示细胞是哺乳动物细胞、细菌细胞或噬菌体。

121. 如权利要求112或120中任一项所述的方法,其中所述展示细胞是酵母细胞。

122. 核酸,所述核酸编码如权利要求1至107中任一项所述的肽。

123. 宿主细胞,所述宿主细胞包含如权利要求122所述的核酸。

124. 宿主细胞,所述宿主细胞包含如权利要求1至107中任一项所述的肽,或如权利要求122所述的核酸。

RAS抑制肽和其用途

[0001] 本申请是国际申请日为2015年05月21日, 优先权日为2014年5月 21日的申请号为201580038080.2的中国发明专利申请“RAS抑制肽和其用途”的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请依照美国法典第35篇第119条(e)款要求2014年5月21日提交的 美国临时专利申请U.S.S.N.62/001,587的优先权, 该美国临时专利申请以引用的方式并入本文。

[0004]

[0005]

背景技术

[0006] 常规的治疗剂可以大致分为两类: 小分子和生物制剂。小分子通常具有 <1000Da 的质量并且以高亲和力结合蛋白质中的疏水口袋, 并且许多能够穿透细胞。生物制剂是生物分子, 通常是蛋白质(如抗体或激素), 它们可以 高的亲和力和特异性结合其它生物分子的表面, 但是不能有效地进入细胞。据估计, 人类蛋白质中只有约12%含有能够以高亲和力结合小分子的疏水口袋, 并且人类蛋白质中的不到10%是被分泌的(即被转运到细胞外)。由于 这两组不是相互排斥的, 因此人类蛋白质中有多于78%处在细胞内, 但是缺乏疏水结合口袋。这些蛋白质连同处在细胞内并且含有难处理的疏水口袋的 其它蛋白质一起常常被称为“无药可靶向的(undruggable)”。因此, 仍需 要对抑制蛋白质靶标相互作用的分子进行开发和表征。

发明内容

[0007] 虽然在了解人类疾病的分子病因方面已经取得了进展, 但是利用这些发现获得治疗益处的能力常常受到不能制备靶向作为根源的过程的药物的限制。许多疾病可能与蛋白质的异常活性相关联, 并且虽然开发酶和细胞外靶标的抑制剂常常是可行的, 但是这些蛋白质只占细胞中所有蛋白质的一小部分。在大多数情况下, 其余蛋白质被认为是在治疗上难处理的并且有时被称为“无药可靶向的”。本发明解决了所述问题, 这是通过提供如本文所述的 肽以抑制蛋白质靶标的相互作用以及应用于为了抑制蛋白质靶标的相互作用而筛选肽文库的方法和系统中来实现的。

[0008] 许多蛋白质, 特别是高等生物体中的蛋白质部分地经由与其它蛋白质和 生物分子相互作用来发挥它们的活性。能够特异性破坏这些相互作用可以具有很大的治疗益处, 这是因为它可以提供一种靶向原本难处理的过程的手段。因此, 需要对抑制蛋白质靶标, 如Ras的相互作用的分子进行开发和表征, 所述Ras与一系列广泛的人类癌症的发生和进展这两者相关联。其它蛋白质靶标包括但不限于Myc/Max异二聚体、Raf1A蛋白质、β连环蛋白、YAP/TEAD、以及NEMO/IκB激酶。经由高通量筛选, 联同定向进化和使用晶体结构进行的合理肽设计, 已经鉴定出结合各种蛋白质靶标并且阻断它们结合为它的致癌活性所必需的效应蛋白的能力的小蛋白质(有时被称作微型蛋白), 所述蛋白质靶标包括Ras、Myc/Max、Raf1A、β-连环蛋白、YAP/TEAD以及NEMO/IκB激酶。本文所述的肽可用于治疗诸如癌症

的增殖性疾病以及诸如RAS病的其它疾病。

[0009] 本文提供的肽基于胰多肽家族的突变体。在一个方面,本文提供了包含以下序列的肽:

[0010] $X_1PX_3X_4PX_6X_7PGDX_{11}AX_{13}X_{14}X_{15}DLX_{18}X_{19}YX_{21}X_{22}RLX_{25}X_{26}Y LX_{29}X_{30}VA$ (SEQ ID NO:1), 其中所述氨基酸 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_6 、 X_7 、 X_{11} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{21} 、 X_{22} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{29} 、以及 X_{30} 如本文所定义,以及与 SEQ ID NO:1至少93%同一的肽。

[0011] 在另一个方面,本文提供了肽二聚体,所述肽二聚体包含与第二肽缔合的第一肽,其中所述第一肽和所述第二肽各自独立地包含SEQ ID NO:1的肽。所述肽二聚体包含肽单体,所述肽单体以头对尾的排列二聚化。所述肽二聚体可以是同二聚体或异二聚体。

[0012] 在一个方面,本文提供了包含以下序列的肽:

[0013] $X_1PX_3X_4PX_6X_7PGX_{10}X_{11}AX_{13}X_{14}X_{15}DLX_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}LX_{25}X_{26}Y LX_{29}X_{30}VA$ (SEQ ID NO: 12), 其中所述氨基酸 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_6 、 X_7 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{22} 、 X_{23} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{29} 、以及 X_{30} 如本文所定义,以及与SEQ ID NO:12至少93%同一的肽。

[0014] 在另一个方面,本文提供了肽二聚体,所述肽二聚体包含与第二肽缔合的第一肽,其中所述第一肽和所述第二肽各自独立地包含SEQ ID NO:12的肽。所述肽二聚体包含肽单体,所述肽单体以头对尾的排列二聚化。所述肽二聚体可以是同二聚体或异二聚体。

[0015] 在一个方面,本文提供了包含以下序列的肽: $X_{-6}X_{-5}X_{-4}X_{-3}X_{-2}X_{-1}X_1PX_3X_4PX_6X_7PGX_{10}X_{11}AX_{13}X_{14}X_{15}X_{16}LX_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}LX_{25}X_{26}Y LX_{29}X_{30}X_{31}X_{32}$ (SEQ ID NO: 13), 其中所述氨基酸 X_{-6} 、 X_{-5} 、 X_{-4} 、 X_{-3} 、 X_{-2} 、 X_{-1} 、 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_6 、 X_7 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{22} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{29} 、 X_{30} 、 X_{31} 、以及 X_{32} 如本文所定义,以及与SEQ ID NO:13至少93%同一的肽。

[0016] 在另一个方面,本文提供了肽二聚体,所述肽二聚体包含与第二肽缔合的第一肽,其中所述第一肽和所述第二肽各自独立地包含SEQ ID NO:13的肽。所述肽二聚体包含肽单体,所述肽单体以头对尾的排列二聚化。所述肽二聚体可以是同二聚体或异二聚体。

[0017] 在一个方面,本文提供了包含以下序列的肽: $X_1PX_3X_4PX_6X_7PGX_{10}AAX_{13}X_{14}AALHAYX_{21}AX_{23}LX_{25}NYLX_{29}X_{30}VX_{32}$ (SEQ ID NO:48), 其中所述氨基酸 X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_6 、 X_7 、 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{21} 、 X_{23} 、 X_{25} 、 X_{29} 、 X_{30} 以及 X_{32} 如本文所定义,以及与SEQ ID NO:48至少93%同一的肽。

[0018] 在另一个方面,本文提供了肽二聚体,所述肽二聚体包含与第二肽缔合的第一肽,其中所述第一肽和所述第二肽各自独立地包含SEQ ID NO:48的肽。所述肽二聚体包含肽单体,所述肽单体以头对尾的排列二聚化。所述肽二聚体可以是同二聚体或异二聚体。

[0019] 在另一个方面,本文提供了包含低聚化结构域的肽,所述结构域包含以下序列: $PX_aX_bPX_cX_dP$ (SEQ ID NO:2), 其中 X_a 、 X_b 、以及 X_c 中的每一个独立地是任何非脯氨酸氨基酸,并且 X_d 是能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸(例如半胱氨酸、硒代半胱氨酸)。所述低聚化结构域允许所述肽与另一个肽缔合以形成二聚体。

[0020] 在某些实施方案中,本文提供了包含低聚化结构域的肽,所述结构域包含以下序列: $PX_aX_bPX_cX_dP$ (SEQ ID NO:2), 其中 X_a 和 X_b 中的每一个独立地是任何非脯氨酸氨基酸,并且 X_c 和 X_d 中的每一个独立地是任何非脯氨酸氨基酸或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸(例如半胱氨酸、硒代半胱氨酸、Phe、Trp、Tyr、或包含丙烯酰胺部分的氨基酸,如Dap缀合的丙烯酰胺残基和Dab缀合的丙烯酰胺残基)。

[0021] 所述肽还包含 α -螺旋结构域,所述结构域包含以下序列:

[0022] $X_{13}X_{14}X_{15}DLX_{18}X_{19}YX_{21}X_{22}RLX_{25}X_{26}YLYX_{29}X_{30}VA$ (SEQ ID NO:3),其中 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{21} 、 X_{22} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{29} 、以及 X_{30} 如本文所定义。 α -螺旋结构域涉及蛋白质-蛋白质相互作用并且与靶蛋白(例如Ras、Myc/Max、RafA、 β -连环蛋白、YAP/TEAD、以及NEMO/I κ B激酶)缔合。

[0023] 在另一个方面,本文提供了包含 α -螺旋结构域的肽,所述结构域包含以下序列:

$X_{13}X_{14}X_{15}DLX_{18}X_{19}YX_{21}X_{22}RLX_{25}X_{26}YLYX_{29}X_{30}VA$ (SEQ ID NO: 3),其中 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{21} 、 X_{22} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{29} 、以及 X_{30} 如本文所定义。

[0024] SEQ ID NO:1、12以及13的示例性肽包括但不限于

[0025] GPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:4);

[0026] GPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:5);

[0027] GRRPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:6);

[0028] GPRRPRYPGDDAPVEDLIRFYNDLQQYLNVA (SEQ ID NO:7);

[0029] GCGGPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:8);

[0030] GCGGPRRPRYPGDDACEEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:9);

[0031] GCGGPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:10);

[0032] 或GCGGPRRPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO: 11)。所述肽可以包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:4-11的氨基酸序列约80%至约99%同源的序列。所述肽可以包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO: 4-11的氨基酸序列约80%至约99%同一的序列。所述肽可以包含含有具有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个氨基酸变化(例如氨基酸缺失和/或添加)的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:4-11的氨基酸序列的序列。所述示例性肽以及与所述示例性肽至少80%同源或同一的肽中的任一个可以彼此形成异二聚体或同二聚体。

[0033] SEQ ID NO:12、13以及48的示例性肽包括但不限于

[0034] PRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:14);

[0035] PRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:15);

[0036] RRRPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO: 16);

[0037] PRRPRYPGDDAPVEDLIRFYNDLQQYLNVA (SEQ ID NO:17);

[0038] PRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:18);

[0039] CGGPRRPRYPGDDACEEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO: 19);

[0040] PRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:20);

[0041] PRRPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO: 21);

[0042] PRRPRCPGDDASLEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:22);

[0043] PRRPRCPGDQASLEELHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:23);

[0044] PRRPRCPGDNASIKQLHAYWNRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:24);

[0045] PRRPRCPGDDASIEDLHEYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:25);

[0046] PRRPRCPGDNASIKQLHAYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:26);

[0047] PRRPRCPGDNASIRQLHAYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:27);

[0048] GCGGPRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 28);

- [0049] PRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:29) ;
- [0050] 225-H:PRRPKYPGDAASCAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 30) ;
- [0051] 225-I:PRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRXA (SEQ ID NO: 31) ;
- [0052] 225-J:PRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRZA (SEQ ID NO: 32) ;
- [0053] 225-K:PRRPCYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 33) ;
- [0054] 225-L:PRRPKCPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 34) ;
- [0055] 225-M:PRRPRYPGXAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 35) ;
- [0056] 225-N:PRRPRYPGZAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 36) ;
- [0057] 225-4s1:PRRPKYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 37) ;
- [0058] 291-A:PRRPKHGHAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 38) ;
- [0059] 291-1:PRRPRHPGNATISQLHHYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 39) ;
- [0060] 291-H:PRRPHHPGHAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 40) ;
- [0061] 291-I:PRRPHYPGHAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 41) ;
- [0062] 291-Q3:PRRPRCPGHAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 42) ;
- [0063] MY01:GPRRPRCPGDDASIRDLLKYWWRLRLYLLAVA (SEQ ID NO: 43) ;
- [0064] RL01:GPRRPRCPGDDASISDLLYLRLDRYLWAVA (SEQ ID NO: 44) ;
- [0065] RR01:GPRRPRCPGDDASIRDLVYMYWRYLYFYLEAVA (SEQ ID NO: 45) ;
- [0066] 225-1c:PRRPKYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVS (SEQ ID NO: 46) ;
- [0067] 225-4d:RPRRPKYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVS (SEQ ID NO: 47) ;
- [0068] 291-T:PRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVS (SEQ ID NO: 49) ;
- [0069] Q:PRRPRCPGDNASIRQLHAYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO: 50) ;以及
- [0070] R:PRRPRCPGDAASIAALHAYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO: 51) 。

[0071] 所述肽可以包含与SEQ ID NO:12-51的氨基酸序列约80%至约99%同源 的序列。所述肽可以包含与SEQ ID NO:12-51的氨基酸序列约80%至约99% 同一的序列。所述肽可以包含含有具有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个氨基酸变化(例如氨基酸缺失和/或添加)的SEQ ID NO:12-51的氨基酸序列的序列。所述示例性肽以及与所述示例性肽至少 80%同源或同一的肽中的任一个可以彼此形成异二聚体或同二聚体。

[0072] 在某些实施方案中,异二聚化的肽包含选自SEQ ID NO:22、23以及49 的主要肽。在某些实施方案中,异二聚化的肽包含选自SEQ ID NO:24-27、50以及51的次要肽。在某些实施方案中,异二聚化的肽包含选自SEQ ID NO:22、23和49的主要肽以及选自SEQ ID NO:24-27、50和51的次要肽。

[0073] 在一个方面,提供了可以穿透细胞的肽。在某些实施方案中,所述肽包 含减少的负电荷数。在某些实施方案中,肽的负电荷数与起始肽相比减少了 1个、2个、3个、4个、5个、或6个负电荷。举例来说,引入中性或不带负 电荷的氨基酸,如Ala或Ser代替阴离子残基可以有助于提高细胞穿透。将 可用于提高细胞穿透的其它残基是已知减少蛋白质聚集的那些残基(一般不 大、没有高电荷、和/或不太疏水的残基)。在某些实施方案中,所公开的肽在位置 X_{11} 、 X_{15} 和/或 X_{16} 处包含至少一个、两个、或三个中性或不带负电荷 的氨基酸。在某些实施方案中,所公开的肽在位置 X_{11} 、 X_{15} 、 X_{16} 和/或 X_{19} 处 包含至少一个、两个、三个、或四个中性或不带负电荷的氨基酸。在某些实 施方案中,所述中性或不带负电荷的氨基酸是Ala或

Ser。在某些实施方案中,所述肽包含代替阴离子残基的Ala。在某些实施方案中,所述肽包含代替阴离子残基的Ser。在某些实施方案中,所公开的肽在本文所公开的肽中任一个的位置 X_{11} 、 X_{15} 、 X_{16} 和/或 X_{19} 处包含至少一个、两个、三个、或四个Ala或Ser。

[0074] 在一个方面,本文提供了被设计成在穿透细胞之前防止二聚化或使二聚化减到最低限度的肽。本文所公开的肽可以包含被小有机硫醇部分遮蔽以防止交联的Cys或Sec。在某些实施方案中,所述小有机硫醇部分是 $-SR^S$,其中 R^S 是取代或未取代的 C_{1-5} 烷基。在某些实施方案中,所述小有机硫醇部分是叔丁基硫醇或乙硫醇。在某些实施方案中,所述肽包含选自SEQ ID NO: 30、33以及34组成的组的序列,其中Cys是与小有机硫醇部分键合的二硫化物。在上述实施方案或本文包含Cys的实施方案中的任一个中,还设想Sec代替Cys。

[0075] 在另一个方面,本文提供了被设计成在肽已经穿透细胞之后与包含亲电子侧链的另一个肽交联的肽。在某些实施方案中,本文公开的肽包含被能够与Cys或Sec交联的部分修饰的残基。在某些实施方案中,所述肽包含含有丙烯酰胺部分的氨基酸。在某些实施方案中,所述肽包含L-2,4-二氨基丁酸(Dab)残基或L-2,3-二氨基丙酸(Dap)残基。在某些实施方案中,所述肽包含L-2,4-二氨基丁酸(Dab)残基或L-2,3-二氨基丙酸(Dap)残基,其中所述Dab和Dap被丙烯酸修饰以形成包含丙烯酰胺的侧链。在某些实施方案中,所述肽包含选自SEQ ID NO:31、32、35以及36组成的组的序列,其中X是与丙烯酰胺缀合的L-2,4-二氨基丁酸(Dab)残基并且Z是与丙烯酰胺缀合的L-2,3-二氨基丙酸(Dap)残基。与丙烯酰胺缀合的Dap残基和Dab残基进一步描述于本文中。肽二聚体可以由SEQ ID NO:30、33、以及34与SEQ ID NO:31、32、35、以及36的任何组合形成。应当了解的是,在本文所述的实施方案中的任一个中,Cys可以被Sec置换。在某些实施方案中,所公开的肽在本文所公开的肽中任一个的位置 X_6 、 X_7 和/或 X_{14} 处包含Cys或Sec。在某些实施方案中,所公开的肽在本文所公开的肽中任一个的位置 X_{10} 、 X_{31} 和/或 X_{32} 处包含含有丙烯酰胺部分的氨基酸。在某些实施方案中,所公开的肽在本文所公开的肽中任一个的位置 X_{10} 、 X_{31} 和/或 X_{32} 处包含Dap或Dab,其中所述Dap或Dab被丙烯酸修饰以形成包含丙烯酰胺的侧链。在某些实施方案中,提供了第一肽单体,所述第一肽单体在所述第一肽单体的位置 X_6 、 X_7 或 X_{14} 处包含Cys或Sec,其中所述Cys或Sec被如本文所提供的小有机硫醇部分遮蔽;以及第二肽单体,所述第二肽单体在所述第二肽的位置 X_{10} 、 X_{31} 或 X_{32} 处包含Dap或Dab,其中所述Dap或Dab被丙烯酸修饰以形成包含丙烯酰胺的侧链。

[0076] 在又另一个方面,本文提供了选择性二聚体去稳定策略以提高二聚体的内体逃逸和胞质进入。本文提供的策略包括pH值诱导的去稳定或大体积残基去稳定。在某些实施方案中,本文所述的肽包含被放置在氨基酸位置的一个或多个His以使得它们在空间上接近反向单体肽上的一个或多个阳离子残基或一个或多个His。在某些实施方案中,所述肽包含被放置在位置 X_6 、 X_7 和/或 X_{10} 处的His。被放置在这些位置中的一个、两个、或三个处的His适用于本文所述的肽中的任一个。在某些实施方案中,所述肽包含选自SEQ ID NO: 38至41组成的组的序列。

[0077] 在某些实施方案中,二聚体去稳定是使用在二聚体界面附近包含大体积部分的残基以防止二聚化而实现的。这样的大体积部分在细胞穿透之后被去除并且相应的残基自由二聚化。可用于遮蔽Cys或Sec的大体积部分的实例包括有机硫醇分子。在某些实施方

案中,本文所述的肽包含通过与有机硫醇 分子反应而受保护的Cys或Sec。在某些实施方案中,所述有机硫醇分子选自芳基硫醇、杂芳基硫醇、以及脂族硫醇。在某些实施方案中,所述有机硫醇分子是杂芳基硫醇。在某些实施方案中,本文所述的肽包含通过与2,2'-二吡啶基二硫化物、4,4'-二吡啶基二硫化物、或2,2'-二硫代双(5-硝基吡啶)反应 而受保护的Cys或Sec。在某些实施方案中,所述肽包含选自SEQ ID NO: 30、33、34以及42的序列,其中Cys由上述有机硫醇分子中的任一种保 护。应当了解的是,在本文所述的实施方案中的任一个中,Cys可以被Sec 置换。

[0078] 在某些实施方案中,本文所述的肽中的任一个包含处于 X_7 处的Cys或 Sec以及处于 X_{11} 、 X_{15} 、 X_{16} 和/或 X_{19} 中的一个或多个处的Ala或Ser。在某些实施方案中,本文所述的肽中的任一个包含处于 X_7 处的Tyr以及处于 X_{11} 、 X_{15} 、 X_{16} 和/或 X_{19} 中的一个或多个处的Ala或Ser。

[0079] 在某些实施方案中,本文所述的肽中的任一个包含处于 X_6 处的His以及 处于 X_7 处的Cys或Sec。在某些实施方案中,本文所述的肽中的任一个包含 处于 X_7 处的Cys或Sec以及处于 X_{10} 处的His。

[0080] 应当了解的是,本文所述的肽可以包含乙酰化的N末端和/或酰胺化的C 末端。

[0081] 在再另一个方面,本文提供了一种治疗有需要的受试者的与Ras、Myc/Max、RafA、 β -连环蛋白、YAP/TEAD、或NEMO/I κ B激酶相关的疾 病或病况的方法,所述方法包括向所述受试者施用如本文所述的肽。在某些 实施方案中,所述疾病或病况与Ras有关。本文还提供了一种治疗有需要的 受试者的增殖性疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用如本文所述的 肽。示例性疾病或病况包括各种癌症和RAS病。

[0082] 本文所述的肽还可用于筛选肽文库的方法和系统中。在一个方面,本文 提供了筛选肽二聚体的文库的方法和系统,所述方法包括以下步骤:用编码 第一肽和第二肽的载体转化展示细胞,其中所述第一肽和所述第二肽缔合形 成与细胞壁蛋白质融合的肽二聚体;使所述展示细胞与第一标记接触,其中 所述第一标记包含靶蛋白并且与表达具有增强的与所述靶标的结合的肽二聚 体的细胞缔合而不与不表达具有增强的与所述靶标的结合的肽二聚体的细胞 缔合;分离与所述第一标记缔合的展示细胞;以及鉴定表现出增强的与所 述 靶标的结合的第一肽和第二肽。或者,所述方法可以包括用编码第一肽的第 一载体和编码第二肽的第二载体转化展示细胞。

[0083] 在另一个方面,本文提供了试剂盒,所述试剂盒包括本文所述的肽和二 聚体。还提供了编码本文所述的肽和二聚体的核酸。此外,还涵盖了包含所 述核酸、肽、以及二聚体的宿主细胞。

附图说明

[0084] 附图并不意图按比例绘制。在附图中,为了清楚起见,并非每一个部件 在每一个附图中均被标记出。

[0085] 图1示出了与效应子结合的Ras的晶体结构。HRas • GppNHp示于右 侧,核苷酸以棍棒指示;RalGDS的Ras结合域(RBD)示于左侧。PDB: 1LFD。

[0086] 图2示出了酵母展示系统。将编码肽文库的DNA文库转化到酵母菌株 EBY100中,所述酵母菌株EBY100表达Aga2p-肽融合体并且将它分泌到细 胞表面。然后将酵母细胞与荧光标记的靶蛋白(在这种情况下,是Ras)和 针对表位标签中的一个的荧光标记的抗体(以

测量所展示的融合蛋白的丰度)一起孵育,然后使用荧光激活细胞分选(FACS)筛选。图改编自Chao, G.等,《使用酵母表面展示分离和工程化人类抗体(Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display)》,Nat Protoc 1,755-68 (2006)。

[0087] 图3示出了aPP-M比野生型aPP具有更高的热稳定性。图3A示出了aPP和aPP-M的CD谱。图3B示出了在222nm的热熔曲线。

[0088] 图4示出了文库支架和被选用于随机化的残基。aPP的结构见于图4A中,随机化的残基以箭头示出。图4B示出了文库的氨基酸序列(SEQ ID NO: XX-XX)。加下划线的X表示任何氨基酸。

[0089] 图5示出了用于制备文库片段的PCR策略。使具有足够重叠的一组引物退火并且延伸,从而用作彼此的模板。经由在每一个引物内使用多个简并密码子(位点饱和诱变)以引入突变,从而在所得的文库中提供高组合多样性。

[0090] 图6示出了用Sfp磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶对蛋白质进行位点特异性标记。使辅酶A的巯基部分与所选择的顺丁烯二酰亚胺官能化的标记(例如生物素)反应,然后通过Sfp将所得的缀合物转移到靶蛋白上的yBBr标签。

[0091] 图7示出了Ras蛋白质的纯化。图7A示出了在从钴树脂洗脱之后His₆标记(SEQ ID NO:XX)的KRas G12V的凝胶过滤曲线。图7B示出了GDP负载蛋白和GTP负载蛋白的Ras结合核苷酸的反相HPLC分析。GDP标准品和GTP标准品分别在12分钟和15分钟时洗脱。图7C示出了在通过Sfp进行酶促生物素化之前和之后Ras的MALDI-MS谱。

[0092] 图8示出了来自纯化步骤的Ras蛋白质样品的SDS-PAGE凝胶(考马斯染色(Coomassie stain))。

[0093] 图9示出了来自aPP支架文库的初始命中物的流式细胞术分析。将酵母细胞在不存在Ras、存在500nM KRas、500nM KRas和4μM B-Raf RBD或含10%v/v人类血清的500nM KRas的情况下孵育。在Raf和血清图中重叠500nM KRas样品以进行比较。

[0094] 图10示出了aPP支架肽的定向进化。通过易错PCR使每一轮的命中物多样化,然后通过磁激活细胞分选(MACS)和荧光激活细胞分选(FACS)在越来越严格的条件(更低的[KRas]和增加的阻断剂)下针对结合KRas的能力对所得的酵母文库进行选择。在突变出现的第一轮中,所述突变加下划线;在随后的几轮中,它们用斜体指示。

[0095] 图11示出了用于体外研究的肽。为了一致性,使用野生型aPP肽中的位置来报告残基编号。丙氨酸点突变加下划线。

[0096] 图12示出了225肽的纯化。在表达的融合构建体的钴亲和色谱和过夜TEV切割之后,通过反相HPLC纯化反应物(图12A)。收集含有225肽的所示的峰并且通过LC/MS分析(图12B和12C)。HPLC仪器和LC/MS仪器的不同柱尺寸解释了在A与B之间保留时间的差异。示出了225-1肽(GCGGPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA)的数据。

[0097] 图13示出了aPP-M和225肽的圆二色性谱。图13A示出了UV CD谱;图13B示出了在222nm的熔融曲线。在pH 8.0测量aPP-M和225-1;在pH 12和pH 4.5测量225-3,这是因为在pH 5-10范围内具有低溶解度。

[0098] 图14示出了Ras-肽相互作用的荧光偏振测量。将FITC标记的225-3肽与递增浓度的Ras或Ras家族蛋白质混合,然后对荧光偏振进行读数并且绘图。误差棒是平均值的标准

误差 (SEM)。

[0099] 图15示出了Ras-肽相互作用的表面等离子体共振测量。将生物素化的 KRas (与GppNHp结合 (图15A) 或与GDP结合 (图15B)) 固定在链霉亲和素捕捉芯片上,然后以递增的浓度注入游离的225-1肽。相互作用的高亲和力和容许在注入之间缺少再生步骤并且产生阶梯状结合曲线的“单循环”运行。使用两步结合模型拟合数据。

[0100] 图16示出了被选用于丙氨酸诱变的位置。将225肽的残基建模到aPP的晶体结构 (PDB:1PPT) 上。被选用于突变成丙氨酸的位置用箭头指示。晶体结构来自Blundell, T.L. 等,《禽胰多肽的X射线分析 (1.4-Å分辨率): 小球状蛋白激素 (X-ray analysis (1.4-Å resolution) of avian pancreatic polypeptide: Small globular protein hormone)》, Proc Natl Acad Sci U S A 78,4175-9 (1981)。

[0101] 图17示出了225-3肽的单丙氨酸突变体的特性。图17A示出了用所示的 225-3丙氨酸突变肽和KRas (G12V) • GppNHp进行的如上文所进行的荧光偏振实验。图17B示出了在25°C突变体的CD谱,图17C示出了在222nm的熔融曲线。所有的CD实验均是在pH 12进行的。误差棒是SEM。

[0102] 图18示出了225-3肽结合癌细胞裂解物中的内源性Ras并且阻断它与Raf的相互作用。将Capan-1腺癌细胞裂解并且与225-3肽和/或GST标记的Raf RBD一起孵育,然后用所示的珠粒使所述肽或Raf沉降。将结合的样品与SDS一起煮沸,在SDS-PAGE凝胶上进行电泳,转移到硝化纤维素膜,并且用泛Ras抗体进行蛋白质印迹法。

[0103] 图19示出了225肽干扰核苷酸从Ras的解离。将肽与负载mant-GppNHp的KRas (G12V) 混合,然后添加GppNHp达到625μM并且通过荧光的减少来跟踪mant标记的核苷酸的解离 (激发:370nm,发射:450nm)。通过将数据与具有 $RFU_{\infty}=0.37$ 的单相指数衰减拟合来计算解离常数。

[0104] 图20示出了在存在和不存在225-1的情况下Ras的 ^1H - ^{15}N HSQC (TROSY) NMR谱。图20A示出了 ^{15}N 标记的KRas (WT) GDP的TROSY;图20B示出了在存在未标记的225-1的情况下 ^{15}N 标记的KRas的TROSY;并且图20C示出了谱的重叠。

[0105] 图21示出了225肽结合位点与Ras效应子结构域重叠。效应子结构域中的残基是通过HRas与效应子的共晶体结构限定的,并且肽结合位点是通过图20中用225-1进行的TROSY实验限定的。残基用KRas (WT) • GppNHp的晶体结构 (PDB:3GFT) 上黑色的轮廓指示。

[0106] 图22示出了在存在和不存在Ras的情况下225-1的 ^1H - ^{15}N HSQC (TROSY) NMR谱。图22A示出了 ^{15}N 标记的225-1的TROSY;图22B示出了在存在未标记的KRas (G12V) GDP的情况下 ^{15}N 标记的225-1的TROSY;并且图22C示出了谱的重叠。

[0107] 图23示出了aPP肽的头对尾二聚化。aPP的晶体结构 (PDB:1PPT) 以卡通表示 (图23A)、棍棒 (图23B)、以及所示的Y7对 (图23C) 示出。

[0108] 图24示出了N26A突变体与225-1的异二聚体可以结合Ras。将展示 225-1或225-1 N26A的酵母与25μM的 (游离) 225-1或225-1 N26A肽一起预孵育,然后沉淀并且与500nM KRas一起孵育。

[0109] 图25示出了基于225-1的扫描诱变文库的设计。通过如用于原始天然文库的重叠延伸,使用用于每一个子文库的单个引物来制备文库。X由NNK密码子编码。

[0110] 图26示出了225-1 S13C/I14E突变体与225-1形成以提高的亲和力结合Ras的异

二聚体。图26A示出了将展示225-1或225-1 S13C/I14E的酵母与10 μ m的(游离)225-1、225-1 alk(烷基化的225-1)或225-1 N26A一起预孵育,然后沉淀并且与5nM KRas一起孵育,之后进行FACS。图26B示出了 碘乙酰胺对半胱氨酸侧链的烷基化。

[0111] 图27示出了图示了S13的位置和N末端半胱氨酸的模型。左侧的肽代表在N末端上具有未反应的半胱氨酸柄部的225-1,并且右侧的肽代表具有 所示的S13(其是S13C/I14E双重突变体中的半胱氨酸)的配偶体。

[0112] 图28示出了225-1 A30R突变体比225-1对KRas (GTP) 更具选择性。将展示225-1或225-1 A30R的酵母与500nM的生物素化的KRas (GTP) 和 500nM的Alexa647标记的KRas (GDP) 一起孵育,然后洗涤并且与链霉亲和素-藻红蛋白(SA-PE) 一起孵育,之后进行分选。

[0113] 图29示出了鉴定单体225衍生物的文库的设计。来自225肽的 α -螺旋 示于新文库中相应的螺旋上方;X4-6是随机化的环,X是NNK。加下划线的 A置换先前与PPII螺旋堆积的疏水性氨基酸。

[0114] 图30示出了通过荧光偏振(用于测量解离常数的标准测定)测量的结合 亲和力。 $RDA1:K_d=17nM$; $RDA2:K_d=8nM$; $RDA3:K_d=6nM$ 。

[0115] 图31示出了可以区分氧化(二硫键交联)的肽二聚体与还原(非交联) 的肽单体的HPLC测定。通过添加5mM或50mM的DTT(一种比细胞环境 强得多的还原剂),我们可以证实含有硒代半胱氨酸的肽二聚体不能被还原,这不同于它们的含有半胱氨酸的类似物。方法:将肽溶解在缓冲液中并且与0mM、5mM、或50mM的DTT一起孵育,之后通过反相HPLC分析。还原的肽比氧化的肽更早洗脱,如通过对样品进行LC/MS分析所确定。

[0116] 图32示出了Ras RDA1 (SEQ ID NO:4) 的结构。第一个示出了在2.2 $\text{\AA}$ 的分辨率下的总体结构。后两个示出了具有所鉴定的关键结合残基的主螺旋的特写。

[0117] 图33示出了Ras-肽相互作用的表面等离子体共振测量。将生物素化的 KRas(与GppNHp或GDP结合) 固定在链霉亲和素捕捉芯片上,然后以递增的浓度注入游离的二聚体肽。相互作用的高亲和力容许在注入之间缺少再生步骤并且产生阶梯状结合曲线的“单循环”运行。使用两步结合模型拟合 数据。图33A示出了使用包含SEQ ID NO:23和26的异二聚体肽的SPR测量。图33B示出了使用包含SEQ ID NO:4的同二聚体肽的SPR测量。

[0118] 图34示出了用标记肽进行的活细胞显微术,这是在补充有10%胎牛血清 的DMEM培养基中在H358肺腺癌细胞中以5 μ m的肽浓度进行的。图34A 示出了经过包含SEQ ID NO:10的肽同二聚体处理的细胞。图34B示出了经过包含SEQ ID NO:28的4残基突变肽同二聚体处理的细胞。这两种肽均用 荧光素标记。包含SEQ ID NO:28的4残基突变肽比包含SEQ ID NO:10的 肽更好地进入细胞。图34A中的聚集体在图34B中不存在,这是与SEQ ID NO:10相比,由SEQ ID NO:28中存在的突变所赋予的溶解度提高的结果。

[0119] 图35示出了来自在1mM或10mM谷胱甘肽存在下与SEQ ID NO:31的 肽混合的SEQ ID NO:30的肽的LC-MS分析的质量色谱图。

[0120] 图36示出了使用标记的肽二聚体进行的活细胞共聚焦显微术,这是在补充有10%胎牛血清的DMEM培养基中在H358肺腺癌细胞中以5 μ m浓度的 荧光素标记的肽下进行的。图36A示出了缺乏组氨酸的SEQ ID NO:37的 肽。图36B示出了SEQ ID NO:38的肽,所述肽含有每个单体两个组氨酸(每个二聚体四个组氨酸;“His四联体”)。

[0121] 图37示出了SEQ ID NO:42的291-Q3肽,其中Cys与2,2'-二吡啶基二 硫化物反应

以形成二硫化物保护的半胱氨酸。这一半胱氨酸在低谷胱甘肽水平存在下被解除封闭以形成二硫键键合的物质,所述物质是更好的Ras结合剂。附图数据证实在添加5mM还原型谷胱甘肽后Ras结合增加,所述谷胱甘肽引起共价二硫键键合的二聚体的形成,如通过质谱分析所验证。

[0122] 图38示出了SEQ ID NO:43至45的肽与相应的蛋白质靶标的酵母表面展示结合数据。图38A示出了SEQ ID NO:44的RL01肽对KRas和对Ra1A的结合数据。图38B示出了SEQ ID NO:45的RR01肽对KRas和对Ra1A的结合数据。图38C示出了SEQ ID NO:43的MY01肽对Myc/Max的结合数据。

[0123] 定义

[0124] “肽”包含由肽(酰胺)键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。术语肽在本文用于大体上指肽单体和肽二聚体这两者。如本文所用,所述术语指的是具有任何尺寸、结构或功能的蛋白质、微型蛋白、多肽、以及肽。所述术语还可以指的是肽的二聚体或低聚物。如本文所用,所述术语可以包括钉接(stapled)多肽、未钉接多肽、拼接多肽以及未拼接多肽。通常,肽将是至少三个氨基酸长的。肽可以指的是单个肽或肽的集合。本发明的肽优选地可以只包含天然氨基酸或还可以可选地使用如本领域已知的非天然氨基酸(即在自然界中不存在,但是可以被并入肽链中的化合物)和/或氨基酸类似物。肽中氨基酸中的一个或多个可以被修饰,例如通过添加化学实体来修饰,所述化学实体诸如碳水化合物基团、羟基、磷酸酯基、法呢基、异法呢基、棕榈酰基、香叶基香叶基、月桂基、脂肪酸基团、用于缀合、官能化、或其它修饰的接头。肽可以只是天然存在的蛋白质或肽的片段。肽或多肽可以是天然存在的、重组的、或合成的、或其任何组合。

[0125] 术语“氨基酸”指的是含有氨基和羧基这两者的分子。在某些实施方案中,氨基酸是 α -氨基酸。在某些实施方案中,氨基酸是天然氨基酸。在某些实施方案中,氨基酸是非氨基酸。存在许多已知的非天然氨基酸,它们中的任一种可以被包括在本发明的肽中。参见例如S.Hunt,《氨基酸的化学和生化(Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids)》中的《非蛋白质氨基酸(The Non-Protein Amino Acids)》,由G.C.Barrett编著,查普曼和霍尔出版社(Chapman and Hall),1985。

[0126] 示例性氨基酸包括但不限于天然 α -氨基酸,如肽中存在的20种常见的天然存在 α 氨基酸的D-异构体和L-异构体、除这20种常见的天然存在氨基酸以外的天然氨基酸、以及非天然 α -氨基酸。用于构建本发明的肽的氨基酸可以通过有机合成来制备,或通过其它途径,例如像天然来源的降解或从天然来源分离来获得。氨基酸可以是可商购获得的或可以是合成的。具有疏水性侧链的氨基酸包括Gly、Pro、Ala、Ile、Leu、Val、Phe、Met、Trp、以及Tyr。在某些实施方案中,具有疏水性侧链的氨基酸包括Ala、Ile、Leu、以及Val。具有极性中性侧链的氨基酸包括Asn、Cys、Gln、Met、Ser、以及Thr。具有芳族侧链的氨基酸包括Phe、Trp、Tyr、以及His。具有疏水性芳族侧链的氨基酸包括Phe、Tyr、以及Tyr。具有带电荷的侧链的氨基酸包括Asp、Glu、Arg、His、以及Lys。带负电荷的侧链包括Asp和Glu。带正电荷的侧链包括Arg、His以及Lys。不带负电荷的氨基酸选自以下各项组成的组:Ala、Ser、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Met、Gly、Thr、Cys、Tyr、Asn、以及Gln。

[0127] 如本文所用的“能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸”包括共价和非共价交联的氨基酸。举例来说,能够共价交联的残基包括但不限于Cys、Sec、包含丙烯酰胺部分的氨

基酸,如被丙烯酸修饰以形成具有丙烯酰胺的侧链的Dap和Dab。这样的Dab缀合的丙烯酰胺残基和Dap缀合的丙烯酰胺残基可以与Cys或Sec残基交联。能够使肽非共价交联的氨基酸残基包括但不限于His、Phe、Trp、Tyr。

[0128] 氨基酸可以经由二硫键、二硒键、硫-硒键、碳-碳键、酰胺键、酯键、氢键、盐桥、 π 堆积相互作用、或非极性疏水性相互作用来交联。在某些实施方案中,两个肽经由二硫键缔合。在某些实施方案中,两个肽经由二硒键缔合。在某些实施方案中,两个肽经由氢键、盐桥或非极性疏水性相互作用缔合。在某些实施方案中,两个肽经由 π 堆积相互作用缔合。举例来说,一个肽上的酪氨酸与另一个肽上的另一个酪氨酸经由 π 堆积相互作用。

[0129] 如本文所用的术语“同源”是本领域理解的术语,它指的是在核苷酸序列或氨基酸序列的水平上高度相关的核酸或蛋白质。彼此同源的核酸或蛋白质被称作具有同源性。同源可以指的是两个序列(即核苷酸序列或氨基酸)之间序列的相似度。本文所提到的同源性百分比数字反映了两个序列之间可能的最大同源性,即在这两个序列被如此比对以具有最大数目的匹配(同源)位置时的同源性百分比。同源性可以容易地通过已知的方法来计算,所述方法诸如以下文献中所述的那些:《计算分子生物学(Computational Molecular Biology)》,Lesk,A.M.编著,纽约牛津大学出版社(Oxford University Press, New York),1988;《生物计算:信息学和基因组计划(Biocomputing:Informatics and Genome Projects)》,Smith,D.W.编著,纽约的学术出版社(Academic Press,New York),1993;《分子生物学的序列分析(Sequence Analysis in Molecular Biology)》,von Heinje,G.,学术出版社,1987;《序列数据的计算机分析(Computer Analysis of Sequence Data)》,第I部分,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编著,新泽西州的休玛纳出版社(Humana Press, New Jersey),1994;以及《序列分析入门(Sequence Analysis Primer)》,Gribskov,M.和Devereux,J.编著,纽约的密斯托克顿出版社(M Stockton Press, New York),1991;这些文献中的每一篇以引用的方式并入本文。通常用于确定序列之间的同源性的方法包括但不限于Carillo,H.和Lipman,D.,SIAM J Applied Math., 48:1073 (1988)中所公开的那些;该文献以引用的方式并入本文。用于确定同源性的技术被编入可公开获得的计算机程序中。确定两个序列之间的同源性的示例性计算机软件包括但不限于GCG程序包(Devereux,J.等,Nucleic Acids Research,12(1),387(1984))、BLASTP、BLASTN、以及PASTA(Atschul,S.F.等,J Molec.Biol.,215,403(1990))。

[0130] 如本文所用的术语“同源”是本领域理解的术语,它指的是在核苷酸序列或氨基酸序列的水平上高度相关的核酸或多肽。彼此同源的核酸或多肽被称作“具有同源性”。

[0131] 术语“同源”指的是两个序列之间的比较。如果两个核苷酸序列编码的多肽对于至少一段至少20个氨基酸来说是至少约50%-60%同一的,优选地约70%同一的,那么这两个核苷酸序列被认为是同源的。优选地,同源的核苷酸序列的特征还在于能够编码一段至少4个-5个唯一指定的氨基酸。对于待被认为是同源的核苷酸序列来说,必须考虑这些氨基酸相对于彼此的同一性和近似间距这两者。对于长度少于60个核苷酸的核苷酸序列,通过编码一段至少4个-5个唯一指定的氨基酸的能力来确定同源性。

[0132] 如本文所用的术语“同一性”指的是聚合物分子之间,例如核酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的总体相关性。两个核酸序列的同一性百分比的计算例如可以通过将两个序列比对以实现最佳比较的目的来进行(例如可以将空位引

入到第一核酸序列和第二核酸序列 中的一个或这两者中以进行最佳比对并且为了实现比较目的,可以忽略不相同的序列)。在某些实施方案中,出于比较目的被比对的序列的长度是参考 序列的长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少 80%、至少90%、至少95%、或100%。然后对相应核苷酸位置处的核苷酸进 行比较。当第一序列中的位置由与第二序列中的相应位置相同的核苷酸占据 时,则所述分子在该位置处是同一的。两个序列之间的同一性百分比是随所述序列共有的相同位置的数目而变的,考虑到需要被引入以将这两个序列进 行最佳比对的空位数目以及每一个空位的长度。比较序列以及确定两个序列 之间的同一性百分比可以使用数学算法来实现。举例来说,两个核苷酸序列 之间的同一性百分比可以使用诸如以下文献中所述的那些的方法来确定:

[0133] 《计算分子生物学(Computational Molecular Biology)》,Lesk,A.M.编著,纽约牛津大学出版社,1988;《生物计算:信息学和基因组计划(Biocomputing: Informatics and Genome Projects)》,Smith,D.W.编著,纽约的学术出版社,1993;《分子生物学的序列分析(Sequence Analysis in Molecular Biology)》, von Heinje,G.,学术出版社,1987;《序列数据的计算机分析(Computer Analysis of Sequence Data)》,第I部分,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编著,新 泽西州的休玛纳出版社,1994;以及《序列分析入门(Sequence Analysis Primer)》,Gribskov,M.和Devereux,J.编著,纽约的米斯托克顿出版社,1991; 这些文献中的每一篇以引用的方式并入本文。举例来说,两个核苷酸序列之 间的同一性百分比可以使用Meyers和Miller(CABIOS,1989,4:11-17)的算 法,使用PAM120权重残基表、12的空位长度罚分以及4的空位罚分来确 定,所述算法已经被并入ALIGN程序(2.0版)中。两个核苷酸序列之间的 同一性百分比可以可选地使用GCG软件包中的GAP程序,使用NWSgapdna.CMP矩阵来确定。通常用于确定序列之间的同一性百分比的方 法包括但不限于Carillo,H.和Lipman,D.,SIAM J Applied Math.,48:1073(1988) 中所公开的那些,该文献以引用的方式并入本文。用于确定同一性的技术被 编入可公开获得的计算机程序中。确定两个序列之间的同源性的示例性计算 机软件包括但不限于GCG程序包(Devereux,J.等,Nucleic Acids Research, 12(1),387(1984))、BLASTP、BLASTN、以及FASTA(Atschul,S.F.等,J. Molec.Biol.,215,403(1990))。

[0134] 如本文所用的“使肽交联”指的是使肽共价交联或使肽非共价交联。在 某些实施方案中,肽共价缔合。共价相互作用是在两个肽经由诸如天然或非 天然氨基酸侧链的连接基团共价连接时。在其它实施方案中,肽非共价缔 合。非共价相互作用包括氢键键合、范德华相互作用、疏水性相互作用、磁 相互作用、以及静电相互作用。本文的肽包含能够使所述肽与另一个肽交联 的氨基酸(例如半胱氨酸、硒代半胱氨酸、包含丙烯酰胺部分的氨基酸、Dap缀合的丙烯酰胺、Dab缀合的丙烯酰胺)。在肽二聚体的情况下,所述 肽二聚体包含使第一肽与第二肽交联的氨基酸。所述肽还可以包含能够使所 述肽与另一个肽交联的天然或非天然氨基酸。所述肽二聚体可以包含使第一 肽与第二肽交联的天然或非天然氨基酸。

[0135] “肽钉接(peptide stapling)”是用于在一个肽内(肽内)或不同的肽之 间(肽间)交联的一种方法。肽钉接描述了一种合成方法,其中一个肽或不 同的肽中存在的两个含有烯炔的侧链使用闭环复分解(RCM)反应共价连接 (“钉接”)以形成交联(参见J.Org.Chem.(2001)第66卷,第16期的封 面,描述了 α -螺旋肽的基于复分解的交联;Blackwell等;Angew Chem.Int. Ed.(1994)37:3281;以及US 7,192,713)。“肽拼接”涉及单个多肽链中的多 个

“钉接”事件以提供多重钉接(也被称为“拼接”)多肽(参见例如 Walensky等, Science (2004) 305:1466-1470; 美国专利号7,192,713; 美国专利号7,786,072; 美国专利号8,592,377; 美国专利号7,192,713; 美国专利申请 公开号2006/0008848; 美国专利申请公开号2012/0270800; 国际公开号W0 2008/121767; 以及国际公开号W0 2011/008260)。使用全烃交联对肽进行 钉接已经被证实有助于维持它的天然构象和/或二级结构,特别是在生理相关病症下(参见Schafmiester等, J. Am. Chem. Soc. (2000) 122:5891-5892;

[0136] Walensky等, Science (2004) 305:1466-1470)。在某些实施方案中,本文所述的肽中存在的非天然氨基酸包含能够使用诸如闭环复分解(RCM)反应的交 联反应,使用烯烃部分共价连接(即“钉接在一起”)的侧链。相关的肽钉 接或肽拼接的另外的说明可以见于W02010/011313; W02012/040459; W02012/174423; 以及PCT/US2013/062004; U.S.S.N 61/478845; 61/478862; 61/705950; 61/789157; 和61/708371中,所有这些文献以引用的方式并入本文。

[0137] 术语“Ras”指的是Ras蛋白质家族或其突变体。Ras蛋白质是小的胞质 GTP酶,它在几个信号转导途径中起作用,并且可以通过经由Ras效应子结构域的结合来激活许多下游蛋白质(效应子)。Ras蛋白质通过上游因子在 鸟苷三磷酸(GTP,“开”)状态与鸟苷二磷酸(GDP,“关”)状态之间 转换。在人类中存在三种Ras同工型:KRas、HRas、以及NRas, KRas有两种剪接变体,即KRas4A和KRas4B。活性Ras蛋白质通过脂质(通常是法呢基或香叶基香叶基)的翻译后连接而定位到膜,并且通常通过结合效应蛋白的Ras结合域(RBD)来激活这些效应蛋白,并且从而将它们募集到膜,其中它们是经由多种机制激活的。

[0138] 如本文所用的术语“疾病”和“病症”可互换使用。

[0139] 预期接受施用的“受试者”包括但不限于人类(即任何年龄组的男性或女性,例如儿科受试者(例如婴儿、儿童、青少年)或成人受试者(例如年轻成人、中年成人或老年成人))和/或其它非人类动物,例如哺乳动物(例如灵长类动物(例如食蟹猴、恒河猴); 商业相关的哺乳动物,如牛、猪、马、绵羊、山羊、猫、和/或狗)、禽类(例如商业相关的禽类,如鸡、鸭、鹅、和/或火鸡)、爬行动物、两栖动物、以及鱼。在某些实施方案中,非人类动物是哺乳动物。非人类动物可以是雄性或雌性并且处于任何发育阶段。非人类动物可以是转基因动物。

[0140] 如本文所用并且除非另外说明,否则术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”以及“治疗(treatment)”涵盖了在受试者患有病症时发生的降低所述病症的严重程度或延缓或减缓所述病症的进展的作用(“治疗性治疗”),并且还涵盖了在受试者开始患所述病症之前发生的抑制所述病症或降低所述病症的严重程度的作用(“预防性治疗”)。

[0141] 一般来说,肽的“有效量”指的是足以引出所期望的生物反应,即治疗病症的量。如将由本领域普通技术人员所了解,本发明的肽的有效量可以根据诸如以下的因素而不同:所期望的生物学终点、化合物的药物代谢动力学、所治疗的病症、施用方式、以及年龄、健康情况、和受试者。有效量包括治疗性治疗和预防性治疗。

[0142] 如本文所用并且除非另外说明,否则肽的“治疗有效量”是足以在治疗病症中提供治疗益处或足以使与所述病症相关的一个或多个症状延缓或减到最低限度的量。肽的治疗有效量意指在治疗病症中提供治疗益处的单独或其它治疗组合的治疗剂的量。术语“治疗有效量”可以包括改善整体治疗、减少或避免所述病症的症状或病因、或提高另一

种治疗剂的治疗功效的量。

[0143] 如本文所用并且除非另外说明,否则肽的“预防有效量”是足以预防病症、或与所述病症相关的一个或多个症状或预防它复发的量。肽的预防有效量意指在预防病症中提供预防益处的单独或与其它药剂组合的治疗剂的量。术语“预防有效量”可以包括改善整体预防或提高另一种预防剂的预防功效的量。

[0144] 术语“RAS病(RASopathy)”或“RAS病(RASopathies)”是一组临床上确定的医学遗传综合征,所述综合征是由编码Ras/有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)途径的组分或调节因子的基因中的生殖系突变所引起。这些病症包括1型神经纤维瘤病、努南氏综合征(N Noonan syndrome)、伴有多发性色斑的努南氏综合征、毛细血管畸形-动静脉畸形综合征、克斯提洛氏综合征(C Costello syndrome)、心-面-皮肤(CFC)综合征、以及莱吉斯氏综合征(L Legius syndrome)。由于有共同的潜在Ras/MAPK途径失调,因此RAS病表现出许多重叠的表型特征。Ras/MAPK途径在调节细胞周期和细胞生长、分化、以及衰老中起必要的作用,所有这些方面对于正常发育来说均是关键的。因此,Ras/MAPK途径失调对于胚胎发育阶段和后期的发育阶段有深远的有害影响。Ras/MAPK途径已经在癌症中被研究并且是治疗各种恶性肿瘤的小分子抑制的靶标。

[0145] 术语“脂族”指的是烷基、烯基、炔基、以及碳环基。同样,术语“杂脂族”指的是杂烷基、杂烯基、杂炔基、以及杂环基。

[0146] 术语“烷基”指的是具有1个至10个碳原子的直链或支链饱和烃基的基团(“C₁₋₁₀烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1个至9个碳原子(“C₁₋₉烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1个至8个碳原子(“C₁₋₈烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1个至7个碳原子(“C₁₋₇烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1个至6个碳原子(“C₁₋₆烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1个至5个碳原子(“C₁₋₅烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1个至4个碳原子(“C₁₋₄烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1个至3个碳原子(“C₁₋₃烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1个至2个碳原子(“C₁₋₂烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1个碳原子(“C₁烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有2个至6个碳原子(“C₂₋₆烷基”)。C₁₋₆烷基的实例包括甲基(C₁)、乙基(C₂)、丙基(C₃) (例如正丙基、异丙基)、丁基(C₄) (例如正丁基、叔丁基、仲丁基、异丁基)、戊基(C₅) (例如正戊基、3-戊基、戊基、新戊基、3-甲基-2-丁基、叔戊基)、以及己基(C₆) (例如正己基)。烷基的另外的实例包括正庚基(C₇)、正辛基(C₈)等。除非另外说明,否则烷基的每一种情况独立地是未取代的(“未取代的烷基”)或被一个或多个取代基(例如卤素,如F)取代(“取代的烷基”)。在某些实施方案中,烷基是未取代的C₁₋₁₀烷基(如未取代的C₁₋₆烷基,例如-CH₃(Me)、未取代的乙基(Et)、未取代的丙基(Pr,例如未取代的正丙基(n-Pr)、未取代的异丙基(i-Pr))、未取代的丁基(Bu,例如未取代的正丁基(n-Bu)、未取代的叔丁基(tert-Bu或t-Bu)、未取代的仲丁基(sec-Bu)、未取代的异丁基(i-Bu))。在某些实施方案中,烷基是取代的C₁₋₁₀烷基(如取代的C₁₋₆烷基,例如-CF₃、Bn)。

[0147] 术语“芳基”指的是具有6个-14个环碳原子和芳环系中提供的零个杂原子的单环或多环(例如双环或三环)4n+2芳环系(例如具有在环系中共用的6个、10个、或14个π电子)的基团(“C₆₋₁₄芳基”)。在一些实施方案中,芳基具有6个环碳原子(“C₆芳基”;例如苯基)。在一些实施方案中,芳基具有10个环碳原子(“C₁₀芳基”;例如萘基,如1-萘基和2-萘基)。在一些实施方案中,芳基具有14个环碳原子(“C₁₄芳基”;例如蒽基)。“芳基”还包括环系,其中

如上文所定义的芳环与一个或多个碳环基或杂环基稠合,其中连接基团或连接点处于芳环上,并且在这些情况下,碳原子数继续表示芳环系中的碳原子数。除非另外说明,否则芳基的每一种情况独立地是未取代的(“未取代的芳基”)或被一个或多个取代基取代(“取代的芳基”)。在某些实施方案中,芳基是未取代的C₆₋₁₄芳基。在某些实施方案中,芳基是取代的C₆₋₁₄芳基。

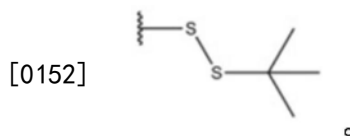
[0148] 术语“杂芳基”指的是具有环碳原子和芳环系中提供的1个-4个环杂原子的5元-14元单环或多环(例如双环、三环)4n+2芳环系(例如具有在环系中共用的6个、10个、或14个 π 电子)的基团,其中每一个杂原子独立地选自氮、氧、以及硫(“5元-14元杂芳基”)。在含有一个或多个氮原子的杂芳基中,在化合价容许时,连接点可以是碳原子或氮原子。杂芳基多环系可以在一个环或两个环中包括一个或多个杂原子。“杂芳基”包括环系,其中如上文所定义的杂芳环与一个或多个碳环基或杂环基稠合,其中连接点处于杂芳环上,并且在这些情况下,环成员数继续表示杂芳环系中的环成员数。“杂芳基”还包括环系,其中如上文所定义的杂芳环与一个或多个芳基稠合,其中连接点处于芳环或杂芳环上,并且在这些情况下,环成员数表示稠合多环(芳基/杂芳基)环系中的环成员数。在其中一个环不含杂原子的多环杂芳基(例如吡啶基、喹啉基、呋唑基等)中,连接点可以处于任何一个环上,即带有杂原子的环(例如2-吡啶基)或不含杂原子的环(例如5-吡啶基)。

[0149] 在一些实施方案中,杂芳基是具有环碳原子和芳环系中提供的1个-4个环杂原子的5元-10元芳环系,其中每一个杂原子独立地选自氮、氧以及硫(“5元-10元杂芳基”)。在一些实施方案中,杂芳基是具有环碳原子和芳环系中提供的1个-4个环杂原子的5元-8元芳环系,其中每一个杂原子独立地选自氮、氧以及硫(“5元-8元杂芳基”)。在一些实施方案中,杂芳基是具有环碳原子和芳环系中提供的1个-4个环杂原子的5元-6元芳环系,其中每一个杂原子独立地选自氮、氧以及硫(“5元-6元杂芳基”)。在一些实施方案中,5元-6元杂芳基具有选自氮、氧、以及硫的1个-3个环杂原子。在一些实施方案中,5元-6元杂芳基具有选自氮、氧、以及硫的1个-2个环杂原子。在一些实施方案中,5元-6元杂芳基具有选自氮、氧、以及硫的1个环杂原子。除非另外说明,否则杂芳基的每一种情况独立地是未取代的(“未取代的杂芳基”)或被一个或多个取代基取代(“取代的杂芳基”)。在某些实施方案中,杂芳基是未取代的5元-14元杂芳基。在某些实施方案中,杂芳基是取代的5元-14元杂芳基。

[0150] 示例性的含有1个杂原子的5元杂芳基包括但不限于吡咯基、呋喃基以及噻吩基。示例性的含有2个杂原子的5元杂芳基包括但不限于咪唑基、吡唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、以及异噻唑基。示例性的含有3个杂原子的5元杂芳基包括但不限于三唑基、噁二唑基以及噻二唑基。示例性的含有4个杂原子的5元杂芳基包括但不限于四唑基。示例性的含有1个杂原子的6元杂芳基包括但不限于吡啶基。示例性的含有2个杂原子的6元杂芳基包括但不限于哒嗪基、嘧啶基以及吡嗪基。示例性的含有3个或4个杂原子的6元杂芳基分别包括但不限于三嗪基和四嗪基。示例性的含有1个杂原子的7元杂芳基包括但不限于吡啶基、噻庚因基、噁庚因基、以及噻庚因基。示例性的5,6-双环杂芳基包括但不限于吡啶基、异吡啶基、吡唑基、苯并三唑基、苯并噻吩基、异苯并噻吩基、苯并呋喃基、苯并异呋喃基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、苯并异噁唑基、苯并噻二唑基、苯并噻唑基、苯并异噻唑基、苯并噻

二唑基、吡啶基、以及嘌呤基。示例性的6,6-双环杂芳基包括但不限于萘啶基、蝶啶基、喹啉基、异喹啉基、噌啉基、喹喔啉基、酞嗪基、以及喹唑啉基。示例性的三环杂芳基包括但不限于菲啶基、二苯并呋喃基、呋唑基、吡啶基、吩噻嗪基、吩恶嗪基以及吩嗪基。

[0151] 术语“硫醇”指的是基团-SH(例如存在于Cys侧链中)、-SR^S、或包含-S-S-部分的分子。举例来说,“有机硫醇分子”包括诸如以下各项的分子:2,2'-二吡啶基二硫化物、4,4'-二吡啶基二硫化物、或2,2'-二硫代双(5-硝基吡啶)。短语“小有机硫醇部分”包括包含硫的有机基团,如-SR^S,其中R^S是取代或未取代的C₁₋₅烷基。这样的部分能够分别经由二硫键键合或硒-硫键键合与其它硫醇部分或硒部分键合。举例来说,与叔丁基硫醇键合的Cys侧链具有以下结构:



[0153] 以下提供了本文所用的缩写的清单。

[0154]	Dab	L-2,4-二氨基丁酸
[0155]	Dap	L-2,3-二氨基丙酸
[0156]	PPI	蛋白质-蛋白质相互作用
[0157]	RBD	Ras结合域
[0158]	GAP	GTP酶激活蛋白
[0159]	GRP	鸟嘌呤核苷酸释放蛋白
[0160]	bHLHZip	碱性螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链
[0161]	PCR	聚合酶链反应
[0162]	FACS	荧光激活细胞分选
[0163]	NMR	核磁共振
[0164]	aPP	禽胰多肽
[0165]	PPII	II型聚脯氨酸
[0166]	T _m	熔融转变
[0167]	CD	圆二色性
[0168]	PI3K	磷脂酰肌醇3-激酶
[0169]	MACS	磁激活细胞分选
[0170]	NA-PE	中性亲和素-藻红蛋白
[0171]	SA-PE	链霉亲和素-别藻蓝蛋白
[0172]	IMAC	固定金属亲和色谱
[0173]	CoA	辅酶A
[0174]	GTP	鸟苷三磷酸
[0175]	GDP	鸟苷二磷酸
[0176]	GppNHp	鸟苷5'-[β,γ-亚氨基]三磷酸
[0177]	GppCp	β,γ-亚甲基鸟苷5'-三磷酸
[0178]	IPTG	异丙基β-D-1-硫代半乳糖糖苷
[0179]	LB	溶菌肉汤

[0180]	MALDI-MS	基质辅助激光解吸/电离质谱分析
[0181]	HPLC	高效液相色谱
[0182]	TEV	烟草蚀纹蛋白酶
[0183]	LC/MS	液相色谱-质谱分析
[0184]	DMSO	二甲亚砜
[0185]	TCEP	三(2-羧乙基)膦
[0186]	Kd	解离常数
[0187]	FP	荧光偏振
[0188]	FITC	异硫氰酸荧光素
[0189]	SPR	表面等离子体共振
[0190]	RU	共振单位
[0191]	SDS-PAGE	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
[0192]	GST	谷胱甘肽-S-转移酶
[0193]	mantGppNHp	GppNHp的N-甲基邻氨基苯甲酰酯
[0194]	HSQC	异核量子自旋相关光谱法
[0195]	NLS	核定位信号
[0196]	MBP	麦芽糖结合蛋白
[0197]	SEC	凝胶过滤层析

具体实施方式

[0198] 虽然在了解人类疾病的分子机制方面已经取得了进展,但是我们利用这些发现获得治疗益处的能力常常受到不能制备靶向导致所述疾病的过程的药物的限制。许多疾病可能与蛋白质的异常活性相关联,并且虽然开发酶和细胞外靶标的抑制剂常常是可行的,但是这些蛋白质只占有所有蛋白质的一小部分。在大多数情况下,其余蛋白质被认为是在治疗上难处理的并且有时被称为“无药可靶向的”。“无药可靶向的”蛋白质靶标的实例是Ras,它与一系列广泛的人类疾病,如癌症的发生和进展这两者相关联,但仍然在现代的治疗剂可及范围之外。这主要是Ras的细胞内定位(使得这种蛋白质难以由生物制剂接近)以及它们难以用通常能够进入细胞的小分子处理的结果。尝试靶向Ras的一个疏水口袋(核苷酸结合位点)没有成功,这主要是因为Ras蛋白质对鸟嘌呤核苷酸的极高(皮摩尔/升)亲和力以及这些核苷酸在细胞中相对高的丰度。许多肽治疗剂受到它们进入细胞的能力的限制。然而,某些小蛋白质(肽)能够在适当的化学修饰下进入细胞。肽常常大到足以结合蛋白质表面,并且如果被修饰以对它们的蛋白质靶标具有高亲和力和特异性,那么它们已经被证实用作体内蛋白质-蛋白质相互作用的有效抑制剂。

[0199] 本文提供了抑制目前不能通过常规治疗加以治疗的蛋白质靶标的蛋白质-蛋白质相互作用的肽。所述肽基于包括 α -螺旋结构域的支架。 α -螺旋是蛋白质中最常见的二级结构,并且 α -螺旋常常参与关键的蛋白质-蛋白质相互作用。 α -螺旋因此作为潜在的治疗剂是有吸引力的,特别是因为它们可能用来破坏导致疾病的蛋白质-蛋白质相互作用。

[0200] 在某些实施方案中,本文提供的肽包含II型聚脯氨酸螺旋结构域、接头结构域、以及 α -螺旋结构域。这些蛋白质可以结合蛋白质靶标并且从而破坏蛋白质-蛋白质相互作用。

用。本发明蛋白质的靶标的实例包括Ras致癌蛋白。所述肽结合它们的靶标的表面并且阻断与为所述靶标的活性(例如Ras的致癌活性)所需的配偶体分子的关键的相互作用。其它靶标包括Myc/Max异二聚体和RafA蛋白质。

[0201] 本文提供的肽基于胰多肽家族。在某些实施方案中,本文提供的肽基于禽胰多肽、人胰多肽、牛胰多肽、羊胰多肽、猪胰多肽、犬胰多肽、以及其突变体。在某些实施方案中,本文提供的肽基于禽胰多肽(aPP)、以及其衍生物和突变体。本文提供的肽包含II型聚脯氨酸螺旋结构域、接头结构域、以及C末端 α -螺旋结构域,并且所述肽包括能够使所述肽与另一个肽交联的部分。一般的肽二聚体的实例示于图23中。本文还提供了两个肽的肽二聚体,这两个肽各自包含II型聚脯氨酸螺旋结构域、接头结构域、以及C末端 α -螺旋结构域,其中每一个肽包括能够与另一个肽单体共价或非共价交联的部分。所述肽二聚体可以是同二聚体或异二聚体。

[0202] 术语“肽”在本文用于指的是肽单体和肽二聚体这两者。在某些实施方案中,所述肽是化学稳定化的和/或可渗透细胞的。化学稳定化的实例包括如本文所述的交联、肽钉接、肽拼接、或肽环化(例如N末端和C末端以酰胺键连接以形成连续的酰胺骨架,或N末端上的侧链与C末端上的侧链交联)。对蛋白水解的抗性可以使用各种方法实现,所述方法包括但不限于单个肽单体的D-氨基酸掺入、封端、或环化。在某些实施方案中,环化是通过头对尾环化。这利用了N末端和C末端在空间上接近的事实,如在我们的晶体结构中所看到。这可以通过使N末端和C末端偶联以形成酰胺键,或通过使两个残基的侧链偶联来实现,这两个残基是N末端和C末端或接近于它们。钉接肽或拼接肽已经描述于例如以下文献中:Walensky等,Science(2004) 305:1466-1470;美国专利号8,592,377;美国专利号7,192,713;美国专利申请公开号2006/0008848;美国专利申请公开号2012/0270800;国际公开号WO 2008/121767;以及国际公开号WO 2011/008260,这些文献中的每一篇以引用的方式并入本文。

[0203] 本文还提供了使用展示技术(例如酵母细胞展示、细菌细胞展示、或噬菌体展示)针对增强的与蛋白质靶标的结合来筛选肽二聚体文库的方法,所述蛋白质靶标诸如Ras、Myc/Max、RafA、或另一种靶标。本文还提供了可用作蛋白质-蛋白质相互作用的抑制剂的包含肽的药物组合物、方法、用途、以及试剂盒。在一些情况下,包含肽的药物组合物、方法、用途、以及试剂盒可用作目前不能由常规的治疗所靶向的蛋白质-蛋白质相互作用(如Ras致癌蛋白和它与效应分子的相互反应)的抑制剂。可以用本文所述的肽预防和/或治疗的示例性疾病包括增殖性疾病(例如癌症)和其它疾病、病症、或病况(例如RAS病)。

[0204] 肽

[0205] 所述肽基于aPP支架GPSQPTYPGDDAPVEDLIRFYNDLQQYLVVA (SEQ ID NO:49),并且结合蛋白质靶标。在某些实施方案中,所述肽结合Ras、Myc/Max、和/或RafA。在某些实施方案中,所述肽结合Ras。在某些实施方案中,所述肽结合Myc/Max。在某些实施方案中,所述肽结合RafA。在某些实施方案中,所述肽结合KRas和RafA这两者。

[0206] 在某些实施方案中,本文提供了包含以下序列的肽:

[0207] $X_1PX_3X_4PX_6X_7PGX_{10}X_{11}AX_{13}X_{14}X_{15}DLX_{18}X_{19}YX_{21}X_{22}RLX_{25}X_{26}YLX_{29}X_{30}VA$ (SEQ ID NO:1), 其中所述肽包含能够使所述肽与另一个肽交联的一个至两个氨基酸。在某些实施方案中,能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸能够共价交联。还提供了肽二聚体,所述肽二聚体

包含与第二肽缔合的第一肽,其中所述第一肽和所述第二肽各自独立地包含SEQ ID NO:1的肽,并且其中所述第一肽和所述第二肽各自包含使所述第一肽与所述第二肽交联的一个至两个氨基酸。在某些实施方案中,所述肽二聚体是共价交联的。 X_1 是Gly、Arg、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_1 不存在于SEQ ID NO:1中。 X_3 、 X_4 以及 X_6 各自独立地是带电荷的氨基酸。 X_{10} 是带电荷的氨基酸。 X_{11} 是带电荷的氨基酸或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_7 是Tyr或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_{13} 是Ser或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_{14} 是Ile或Glu。 X_{15} 是Glu、Asp、Gln、或Gly。 X_{18} 是芳族或疏水性氨基酸。 X_{19} 是Glu、Asp、Gln、Ala、或Trp。 X_{21} 、 X_{25} 、以及 X_{29} 各自独立地是Tyr、Phe、Trp、His、或具有环己基侧链的氨基酸,其中所述Tyr、Phe、Trp、或环己基侧链可以被一个或多个氟取代。 X_{22} 是Ala、Gly、Ser、或Val。 X_{26} 是Asn、Leu、Ile、或His。 X_{30} 是Ala或Arg。

[0208] 在某些实施方案中,本文提供了包含以下序列的肽:

[0209] $X_1PX_3X_4PX_6X_7PGX_{10}X_{11}AX_{13}X_{14}X_{15}DLX_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}LX_{25}X_{26}Y LX_{29}X_{30}VA$ (SEQ ID NO: 12),其中所述肽包含能够使所述肽与另一个肽交联的一个至两个氨基酸。在某些实施方案中,能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸能够共价交联。还提供了肽二聚体,所述肽二聚体包含与第二肽缔合的第一肽,其中所述第一肽和所述第二肽各自独立地包含SEQ ID NO:12的肽,其中所述第一肽和所述第二肽各自包含使所述第一肽与所述第二肽交联的一个至两个氨基酸。在某些实施方案中,所述肽二聚体是共价交联的。 X_1 是Gly、Arg、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_1 不存在于SEQ ID NO:12中。 X_3 、 X_4 、以及 X_6 各自独立地是带电荷的氨基酸。 X_{10} 是带电荷的氨基酸。 X_{11} 是带电荷的氨基酸或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_7 是Tyr或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_{13} 是Ser、Pro、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_{14} 是Ile、Glu、或Val。 X_{15} 是Glu、Asp、Gln、或Gly。 X_{18} 是芳族或疏水性氨基酸。 X_{19} 是Glu、Asp、Gln、Ala、Trp、或Arg。 X_{20} 是Tyr或Phe。 X_{21} 是Tyr、Phe、Trp、His、或具有环己基侧链的氨基酸,其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链可以被一个或多个氟取代。 X_{22} 是Ala、Gly、Ser、Val、或Asn。 X_{23} 是Arg或Asp。 X_{25} 是Tyr、Phe、Trp、His、Gln、或具有环己基侧链的氨基酸,其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链可以被一个或多个氟取代。 X_{26} 是Asn、Leu、Ile、His、或Gln。 X_{29} 是Tyr、Phe、Trp、His、Asn、或具有环己基侧链的氨基酸,其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链可以被一个或多个氟取代。 X_{30} 是Ala、Arg、或Val。

[0210] 在某些实施方案中,本文提供了包含以下序列的肽:

[0211] $X_6X_5X_4X_3X_2X_1X_1PX_3X_4PX_6X_7PGX_{10}X_{11}AX_{13}X_{14}X_{15}X_{16}LX_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}LX_{25}X_{26}Y LX_{29}X_{30}X_{31}X_{32}$ (SEQ ID NO:13),其中所述肽包含能够使所述肽与另一个肽交联的一个至两个氨基酸。在某些实施方案中,能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸能够共价交联。还提供了肽二聚体,所述肽二聚体包含与第二肽缔合的第一肽,其中所述第一肽和所述第二肽各自独立地包含SEQ ID NO:13的肽,其中所述第一肽和所述第二肽各自包含使所述第一肽与所述第二肽交联的一个至两个氨基酸。在某些实施方案中,所述肽二聚体是共价交联的。 X_3 和 X_4 各自独立地是中性或带电荷的氨基酸。 X_6 是带电荷的氨基酸或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_7 是Tyr、His、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_{10} 是Pro、带电荷的氨基酸、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_{11} 是Ala、Ser、中性或带

电荷的氨基酸、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_{13} 是Ser、Pro、Thr、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_{14} 是Ile、Glu、Val、Leu、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_{15} 是Glu、Lys、Arg、Ala、Ser、Asp、Gln、或Gly。 X_{16} 是Asp、Glu、Gln、Ala、或Ser。 X_{18} 是芳族或疏水性氨基酸。 X_{19} 是Glu、Lys、Leu、Met、His、Asp、Gln、Ala、Ser、Trp、或Arg。 X_{20} 是Tyr或Phe。 X_{21} 是Gln、Tyr、Phe、Trp、His、或具有环己基侧链的氨基酸，其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链可以被一个或多个氟取代。 X_{22} 是Ala、Gln、Trp、Leu、Tyr、Gly、Ser、Val、或Asn。 X_{23} 是Arg、Asp、Leu、或Ala。 X_{25} 是Gln、Tyr、Phe、Trp、His、Asp、或具有环己基侧链的氨基酸，其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链可以被一个或多个氟取代。 X_{26} 是Asn、Ala、Leu、Arg、Phe、Ile、His、或Gln。 X_{29} 是Ala、Leu、Glu、Asn、Gln、Tyr、Phe、Trp、His、或具有环己基侧链的氨基酸，其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链可以被一个或多个氟取代。 X_{30} 是Ala、Arg或Val。 X_{31} 是V或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_{32} 是V、Ala、Arg、Ser、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。

[0212] SEQ ID NO:13的任选残基是 X_{-6} 、 X_{-5} 、 X_{-4} 、 X_{-3} 、 X_{-2} 、 X_{-1} 、以及 X_1 。如果 X_{-6} 存在，则 X_{-6} 是Gly并且 X_{-5} 至 X_1 存在。如果 X_{-5} 存在，则 X_{-5} 是Cys或Sec并且 X_{-4} 至 X_1 存在。如果 X_{-4} 存在，则 X_{-4} 是Gly并且 X_{-3} 至 X_1 存在。如果 X_{-3} 存在，则 X_{-3} 是Gly并且 X_{-2} 至 X_1 存在。如果 X_{-2} 存在，则 X_{-2} 是Pro、Cys、Sec或Gly并且 X_{-1} 和 X_1 存在。如果 X_{-1} 存在，则 X_{-1} 是Arg或Gly并且 X_1 存在。在 X_1 存在时， X_1 是Gly、Arg、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_1 的另外的实施方案描述于本文中。

[0213] 在SEQ ID NO:13的某些实施方案中， X_{-6} 至 X_1 不存在， X_{11} 、 X_{15} 、 X_{16} 、 X_{19} 各自是Ala或Ser， X_{18} 是His， X_{20} 是Tyr，并且 X_{26} 是Asn。在SEQ ID NO:13的某些实施方案中， X_{-6} 至 X_1 不存在， X_{11} 、 X_{15} 、 X_{16} 、 X_{19} 各自是Ala， X_{18} 是His， X_{20} 是Tyr，并且 X_{26} 是Asn。

[0214] 在某些实施方案中，本文提供了包含以下序列的肽： $X_1PX_3X_4PX_6X_7PGX_{10}AAX_{13}X_{14}AA$ $LHAYX_{21}AX_{23}LX_{25}NYLX_{29}X_{30}VX_{32}$ (SEQ ID NO:48)，其中所述肽包含能够使所述肽与另一个肽交联的一个至两个氨基酸。在某些实施方案中，能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸能够共价交联。 X_1 任选地存在。在存在时， X_1 是Gly、Arg、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_3 、 X_4 、以及 X_6 各自独立地是中性或带正电荷的氨基酸。 X_7 是Tyr或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_{10} 是Asp或中性氨基酸。 X_{13} 是Ser、Thr或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。 X_{14} 是Ile或Leu。 X_{21} 、 X_{25} 、 X_{29} 各自独立地是Tyr、Phe、Trp、His、或具有环己基侧链的氨基酸，其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链可以被一个或多个氟取代。 X_{23} 是Arg、Leu或Ala。 X_{30} 是Ala或Arg。 X_{32} 是Ala、Ser、或Arg。

[0215] 在某些实施方案中，提供了包含SEQ ID NO:48的序列的肽，不同的是位置11、15、16以及19处的一个或多个Ala被Ser置换。

[0216] 在某些实施方案中，所述肽二聚体是同二聚体。在某些实施方案中，所述肽二聚体是异二聚体。在某些实施方案中，所述肽二聚体是经由共价交联所形成的二聚体。举例来说，Cys、Sec、被丙烯酸修饰的Dap或被丙烯酸修饰的Dab用作共价交联剂。包含丙烯酰胺、乙烯基磺酰胺、碘乙酰胺部分、或其它已知的迈克尔接受体(Michael acceptor)的其它氨基酸将可用于交联。在某些实施方案中，所述肽二聚体是经由非共价交联形成的二聚体。举例来说，His、Tyr、Phe或Trp用作非共价交联剂。

[0217] 在某些实施方案中，所述肽不包含SEQ ID NO:7的序列。在某些实施方案中，所述

肽单体不能与相同的肽单体同二聚化,但是可以与不同的肽单体 异二聚化。这可以例如借助于“凸起-凹洞(bump-hole)”系统来实现,由 此一个肽中的残基不能容纳于具有相同肽的二聚体中(例如由于空间或另外 的不利相互作用),但是可以容纳于具有第二肽的二聚体中。第二肽也将是 如此;以这种方式,这两个肽均不能形成同二聚体,但是能够异二聚化。

[0218] 示例性肽单体包括但不限于:

[0219] RDA1:GPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO: 4);

[0220] RDA2:GPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 5);

[0221] RDA3:GRRPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:6);

[0222] aPP-M:GPRRPRYPGDDAPVEDLIRFYNDLQQYLNVA (SEQ ID NO: 7);

[0223] 225-1:GCGGPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:8);

[0224] 225-1S13C/I14E;

[0225] GCGGPRRPRYPGDACEEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO: 9);

[0226] 225-1 A30R:GCGGPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:10);

[0227] 225-3:GCGGPRRPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:11);

[0228] PRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:14);

[0229] PRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:15);

[0230] RRRPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO: 16);

[0231] PRRPRYPGDDAPVEDLIRFYNDLQQYLNVA (SEQ ID NO:17);

[0232] PRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:18);

[0233] CGGPRRPRYPGDDACEEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO: 19);

[0234] PRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:20);

[0235] PRRPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO: 21);

[0236] PRRPRCPGDDASLEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:22);

[0237] PRRPRCPGDQASLEELHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:23);

[0238] PRRPRCPGDNASIKQLHAYWNRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:24);

[0239] PRRPRCPGDDASIEDLHEYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:25);

[0240] PRRPRCPGDNASIKQLHAYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:26);

[0241] PRRPRCPGDNASIRQLHAYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:27);

[0242] GCGGPRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 28);

[0243] PRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:29);

[0244] 225-H:PRRPKYPGDAASCAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 30);

[0245] 225-I:PRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRXA (SEQ ID NO: 31);

[0246] 225-J:PRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRZA (SEQ ID NO: 32);

[0247] 225-K:PRRPCYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 33);

[0248] 225-L:PRRPKCPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 34);

[0249] 225-M:PRRPRYPGXAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 35);

[0250] 225-N:PRRPRYPGZAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 36);

[0251] 225-4s1:PRRPKYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 37);

- [0252] 291-A:PRRPKHPGHAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 38);
- [0253] 291-1:PRRPRHPGNATISQLHHYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 39);
- [0254] 291-H:PRRPHHPGHAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 40);
- [0255] 291-I:PRRPHYPGHAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 41);
- [0256] 291-Q3:PRRPRCPGHAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 42);
- [0257] MY01:GPRRPRCPGDDASIRDLLKYWWRLRLYLlava (SEQ ID NO: 43);
- [0258] RL01:GPRRPRCPGDDASISDLLLLYLRLDRYLWAVA (SEQ ID NO: 44);
- [0259] RR01:GPRRPRCPGDDASIRDLVWYRLYFYLeAVA (SEQ ID NO: 45);
- [0260] 225-1c:PRRPKYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVS (SEQ ID NO: 46);
- [0261] 225-4d:RPRRPKYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVS (SEQ ID NO: 47);
- [0262] 291-T:PRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVS (SEQ ID NO: 49);
- [0263] Q:PRRPRCPGDNASIRQLHAYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO: 50);以及
- [0264] R:PRRPRCPGDAASIAALHAYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO: 51)。

[0265] 在某些实施方案中,所述肽包含单体间交联氨基酸以实现使所述二聚体 稳定的目的。所述单体间交联氨基酸可以处于SEQ ID NO:1、12、13或48 的任何位置处。在某些实施方案中,所述肽在SEQ ID NO:1、12、13或48 的位置1处包含单体间交联氨基酸。在某些实施方案中,所述肽在SEQ ID NO:1、12、13或48的位置6处包含单体间交联氨基酸。在某些实施方案 中,所述肽在SEQ ID NO:1、12、13或48的位置7处包含单体间交联氨基 酸。在某些实施方案中,所述肽在SEQ ID NO:1、12、13或48的位置10处 包含单体间交联氨基酸。在某些实施方案中,所述肽在SEQ ID NO:1、12、13或48的位置11处包含单体间交联氨基酸。在某些实施方案中,所述肽在 SEQ ID NO:1、12、13或48的位置13处包含单体间交联氨基酸。在某些实 施方案中,所述肽在SEQ ID NO:1、12、13或48的位置31处包含单体间交 联氨基酸。在某些实施方案中,所述肽在SEQ ID NO:1、12、13或48的位 置32处包含单体间交联氨基酸。

[0266] 在某些实施方案中,第一肽中SEQ ID NO:1、12、13或48的特定位置 处的交联氨基酸将与第二肽的相同位置处的交联氨基酸交联。在某些实施方 案中,第一肽中SEQ ID NO:1、12、13或48的特定位置处的交联氨基酸将 与第二肽的不同位置处的交联氨基酸交联。在某些实施方案中,第一肽中 SEQ ID NO:1、12、13或48的位置7处的交联氨基酸将与第二肽 的位置7处 的交联氨基酸交联。在某些实施方案中,第一肽中SEQ ID NO:1、12、13或 48的位置1处的交联氨基酸将与第二肽的位置11或13处的交联氨基酸交 联。

[0267] 在某些实施方案中,所述肽在SEQ ID NO:1、12、13或48的位置-2处 包含单体间交联氨基酸。在某些实施方案中,第一肽中SEQ ID NO:1、12、13或48的位置-2处的交联氨基酸 将与第二肽的位置11或13处的交联氨基酸 交联。

[0268] 在某些实施方案中,单体间交联氨基酸是半胱氨酸。在某些实施方案 中,单体间交联氨基酸是硒代半胱氨酸。在某些实施方案中,单体间交联氨 基酸是能够形成二硫键的氨基酸。在某些实施方案中,单体间交联氨基酸是 能够形成二硒键的氨基酸。在某些实施方案中,单体间交联氨基酸是能够与 Cys或Sec形成键的氨基酸。举例来说,亲电子部分,如 具有丙烯酰胺、乙 烯基磺酰胺、碘乙酰胺部分、或其它已知的迈克尔接受体的那些。

[0269] 待改进的肽特性包括结合亲和力、稳定性、以及细胞渗透性并且可以例 如通过使

一个或多个肽结构域中的一个或多个氨基酸残基突变来实现。可以通过与细胞穿透肽(如TAT、触角足肽(antennapedia)、转运素(transportan)、以及聚精氨酸)或与钉接肽缀合来使所述肽成为可渗透细胞的。改进肽特性的其它方法是本领域技术人员已知的,如使肽与其它药物连接,如药物-抗体缀合物,所述药物可用于例如实现组织特异性靶向的目的或提高效力;或使肽与聚乙二醇或类似的分子连接以延长半衰期以及减慢肾脏清除。在某些实施方案中,II型聚脯氨酸螺旋结构域已经被工程化以具有改进的特性。在某些实施方案中,环/接头结构域已经被工程化以具有改进的特性。在某些实施方案中,环/接头结构域是I型 β -转角。在某些实施方案中,C末端 α -螺旋结构域已经被工程化以具有改进的特性。在某些实施方案中,肽上的电荷已经被工程化以提高细胞渗透性。举例来说,带负电荷的残基(Asp、Glu)数将减少,带正电荷的残基(Arg、Lys、His)数将增加和/或疏水性残基(Tyr、Trp、Phe、Leu、Ile、Met)数。如本文进一步所公开,在某些实施方案中,所述肽的某些残基被突变成Ala和/或Ser。举例来说,选自 X_{11} 、 X_{15} 、 X_{16} 以及 X_{19} 的至少一个、两个、三个、或四个残基可以被突变成Ala和/或Ser。在某些实施方案中,带负电荷的残基被突变成Ala和/或Ser。在某些实施方案中,位置 X_{11} 、 X_{15} 、 X_{16} 、以及 X_{19} 处的至少一个、两个、三个、或四个带负电荷的残基被突变成Ala和/或Ser。在某些实施方案中,肽结合血清蛋白的能力已经被工程化以改进药物代谢动力学。在某些实施方案中,所述肽是使用纳米颗粒来递送。

[0270] 在某些实施方案中,所述肽结合第二靶标的能力已经被工程化以将第二靶标募集到Ras。肽或肽文库将具有在PPII螺旋、环、和/或 α 螺旋中不参与和第一靶标结合的一部分上突变或随机化的残基。突变或随机化的残基可以用于异二聚体的第一单体或第二单体这两者。在某些实施方案中,环/接头结构域是I型 β -转角。在某些实施方案中,本文所用的肽可用于选择性组织靶向。第二靶标的实例包括血清蛋白,如血清白蛋白和血清类视黄醇结合蛋白;作为ADC缀合的靶标的再循环受体,如CD-20、转铁蛋白受体和用于组织靶向的胰岛素受体、用于肝脏递送的肝脏GalNAc受体、以及新生儿Fc受体。

[0271] 第一肽和第二肽可以共价缔合。第一肽和第二肽还可以非共价缔合。任何共价键或非共价相互作用可以用于形成二聚体。在某些实施方案中,第一肽和第二肽可以经由二硫键、二硒键、碳-碳键、酰胺键、酯键、氢键、盐桥、 π 堆积相互作用、或非极性疏水性相互作用来缔合。在某些实施方案中,第一肽和第二肽经由二硫键缔合。在某些实施方案中,第一肽和第二肽经由二硒键缔合。在某些实施方案中,第一肽和第二肽经由碳-碳键、酰胺键、酯键、氢键、盐桥、 π 堆积相互作用、或非极性疏水性相互作用来缔合。

[0272] 所述肽可以各自包含能够使所述肽与另一个肽交联的一个氨基酸。所述肽可以各自包含能够使所述肽与另一个肽交联的两个氨基酸。所述肽二聚体可以包含第一肽和第二肽,所述第一肽和所述第二肽各自包含使所述第一肽与所述第二肽交联的一个氨基酸。所述肽二聚体可以包含第一肽和第二肽,所述第一肽和所述第二肽各自包含使所述第一肽与所述第二肽交联的两个氨基酸。在某些实施方案中,所述交联是共价的。在某些实施方案中,所述交联是非共价的。

[0273] 在某些实施方案中, X_1 是能够使所述第一肽与所述第二肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_1 是使第一肽与第二肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_1 是能够使所述肽与另一个肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_1 是使所述第一肽与所述第二肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_1 是Cys、Sec、Phe、Trp、或Tyr。在某

些实施方案中, X_1 是 Cys、Sec。在某些实施方案中, X_1 是 Cys。在某些实施方案中, X_1 是 Sec。在某些实施方案中, X_1 是 Phe、Trp、或 Tyr。

[0274] 在某些实施方案中, X_3 、 X_4 以及 X_6 中的每一个独立地是带电荷的氨基酸。在某些实施方案中, X_3 、 X_4 以及 X_6 中的每一个独立地是具有带电荷的侧链的碱性氨基酸。在某些实施方案中, X_3 、 X_4 以及 X_6 中的每一个独立地是带正电荷的氨基酸。在某些实施方案中, X_3 、 X_4 以及 X_6 中的每一个独立地是 Arg、Lys 或 His。在某些实施方案中, X_3 、 X_4 以及 X_6 中的每一个独立地是 Arg。在某些实施方案中, X_3 、 X_4 以及 X_6 中的每一个独立地是 Lys。在某些实施方案中, X_3 、 X_4 以及 X_6 中的每一个独立地是 His。在某些实施方案中, X_3 、 X_4 以及 X_6 中的每一个可以是相同或不同的氨基酸。在某些实施方案中, X_3 、 X_4 以及 X_6 中的每一个是相同的氨基酸。在某些实施方案中, X_3 、 X_4 、以及 X_6 中的每一个是不同的氨基酸。在某些实施方案中, X_3 、 X_4 以及 X_6 中的每一个是提供稳定性的氨基酸, 如经由与肽内的其它氨基酸或与另一个肽中的氨基酸的静电效应来提供稳定性。在某些实施方案中, X_3 、 X_4 以及 X_6 各自独立地是带负电荷的氨基酸。在某些实施方案中, X_3 、 X_4 以及 X_6 中的每一个独立地是 Asp 或 Glu。

[0275] 在某些实施方案中, X_6 是能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_6 是能够使所述肽与另一个肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_6 是使所述第一肽与所述第二肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_6 是 Cys、Sec、Phe、Trp、或 Tyr。在某些实施方案中, X_6 是 Cys 或 Sec。在某些实施方案中, X_6 是 Cys。在某些实施方案中, X_6 是 Sec。在某些实施方案中, X_6 是 Phe、Trp、或 Tyr。

[0276] 在某些实施方案中, X_6 是 Cys 或 Sec; 并且 X_7 是 Tyr。

[0277] 在某些实施方案中, X_7 是 Tyr 或能够使所述第一肽与所述第二肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_7 是 Tyr、His 或能够使所述第一肽与所述第二肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_7 是 Tyr。在某些实施方案中, X_7 是 His。在某些实施方案中, X_7 是使第一肽与第二肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_7 是能够使所述肽与另一个肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_7 是使所述第一肽与所述第二肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_7 是带正电荷或带负电荷的氨基酸。在某些实施方案中, X_7 是 Cys、Sec、Phe、Trp、或 Tyr。在某些实施方案中, X_7 是 Cys、Sec、Tyr、或 His。在某些实施方案中, X_7 是 Cys。在某些实施方案中, X_7 是 Sec。在某些实施方案中, X_7 是 Phe、Trp、或 Tyr。在某些实施方案中, X_7 是 Y 并且 X_6 是 Cys 或 Sec。

[0278] 在某些实施方案中, X_{10} 是具有带电荷的侧链的氨基酸。在某些实施方案中, X_{10} 是带负电荷的氨基酸。在某些实施方案中, X_{10} 是 Glu 或 Asp。在某些实施方案中, X_{10} 是 Glu、Asp、或 Ala。在某些实施方案中, X_{10} 是 Glu。在某些实施方案中, X_{10} 是 Asp。在某些实施方案中, X_{10} 是 Ala。在某些实施方案中, X_{10} 是带正电荷的氨基酸。在某些实施方案中, X_{10} 是 Arg、His、或 Lys。在某些实施方案中, X_{10} 是 Asp、His、或 Pro。在某些实施方案中, X_{10} 是 Asp、His、Pro、或包含丙烯酰胺部分的氨基酸。在某些实施方案中, X_{10} 是 Arg。在某些实施方案中, X_{10} 是 His。在某些实施方案中, X_{10} 是 Lys。在某些实施方案中, X_{10} 是 Pro。在某些实施方案中, X_{10} 是包含丙烯酰胺部分的氨基酸。在某些实施方案中, 包含丙烯酰胺部分的氨基酸是 Dab 缀合的丙烯酰胺残基和 Dap 缀合的丙烯酰胺残基。

[0279] 在某些实施方案中, X_{10} 是能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_{10} 是能够使所述肽与另一个肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_{10}

是使所述第一肽与所述第二肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_{10} 是 Cys、Sec、Phe、Trp、或 Tyr。在某些实施方案中, X_{10} 是 Cys。在某些实施方案中, X_{10} 是 Sec。在某些实施方案中, X_{10} 是 Phe、Trp、或 Tyr。在某些实施方案中, X_{10} 是与丙烯酰胺缀合的 L-2,4-二氨基丁酸 (Dab) 或与丙烯酰胺缀合的 L-2,3-二氨基丙酸 (Dap), 如本文进一步所述。

[0280] 在某些实施方案中, X_{11} 是具有带电荷的侧链的氨基酸。在某些实施方案中, X_{11} 是带负电荷的氨基酸。在某些实施方案中, X_{11} 是 Glu 或 Asp。在某些实施方案中, X_{11} 是 Glu。在某些实施方案中, X_{11} 是 Asp。在某些实施方案中, X_{11} 是带正电荷的氨基酸。在某些实施方案中, X_{11} 是 Arg、His、或 Lys。在某些实施方案中, X_{11} 是 Arg。在某些实施方案中, X_{11} 是 His。在某些实施方案中, X_{11} 是 Lys。在某些实施方案中, X_{11} 是中性氨基酸。在某些实施方案中, X_{11} 是具有疏水性侧链的氨基酸。在某些实施方案中, X_{11} 是 Asp、Gln、Asn、Ala、或 Ser。在某些实施方案中, X_{11} 是 Ala、Ile、Leu、Val。在某些实施方案中, X_{11} 是 Ala。在某些实施方案中, X_{11} 是 Ser。在某些实施方案中, X_{11} 是 Asp 或 Ala。在某些实施方案中, X_{11} 是 Asp 或能够使所述第一肽与所述第二肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_{11} 是 Asp。在某些实施方案中, X_{11} 是使第一肽与第二肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_{11} 是能够使所述肽与另一个肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_{11} 是使所述第一肽与所述第二肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_{11} 是 Cys、Sec、Phe、Trp、或 Tyr。在某些实施方案中, X_{11} 是 Cys。在某些实施方案中, X_{11} 是 Sec。在某些实施方案中, X_{11} 是 Phe、Trp、或 Tyr。

[0281] 在某些实施方案中, X_{13} 是 Ser、Pro、或 Thr。在某些实施方案中, X_{13} 是 Ser。在某些实施方案中, X_{13} 是 Pro。在某些实施方案中, X_{13} 是 Thr 或 Ala。在某些实施方案中, X_{13} 是能够使所述第一肽与所述第二肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_{13} 是使第一肽与第二肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_{13} 是能够使所述肽与另一个肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_{13} 是使所述第一肽与所述第二肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_{13} 是 Cys、Sec、Phe、Trp、或 Tyr。在某些实施方案中, X_{13} 是 Cys。在某些实施方案中, X_{13} 是 Sec。在某些实施方案中, X_{13} 是 Phe、Trp、或 Tyr。

[0282] 在某些实施方案中, X_{14} 是 Ile 或 Glu。在某些实施方案中, X_{14} 是 Ile。在某些实施方案中, X_{14} 是 Glu。在某些实施方案中, X_{14} 是 Leu 或 Asp。在某些实施方案中, X_{14} 是 Ile、Val、Glu、Leu、或使第一肽与第二肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_{14} 是 Cys。在某些实施方案中, X_{14} 是 Sec。

[0283] 在某些实施方案中, X_{15} 是 Glu、Asp、Gln、或 Gly。在某些实施方案中, X_{15} 是 Glu、Lys、Arg、Ser、Asp、Gln、Gly、或 Ala。在某些实施方案中, X_{15} 是 Glu。在某些实施方案中, X_{15} 是 Asp。在某些实施方案中, X_{15} 是 Gln。在某些实施方案中, X_{15} 是 Gly。在某些实施方案中, X_{15} 是 Ala。

[0284] 在某些实施方案中, X_{16} 是 Asp、Glu、Gln、Ala、或 Ser。在某些实施方案中, X_{16} 是 Asp。在某些实施方案中, X_{16} 是 Glu。在某些实施方案中, X_{16} 是 Gln。在某些实施方案中, X_{16} 是 Ala。在某些实施方案中, X_{16} 是 Ser。

[0285] 在某些实施方案中, X_{18} 是芳族氨基酸。在某些实施方案中, X_{18} 是疏水性氨基酸。在某些实施方案中, X_{18} 是 His、Phe、Tyr、Trp、Ala、Val、Leu、Ile、或 Met。在某些实施方案中, X_{18} 是 His。在某些实施方案中, X_{18} 是 Phe、Tyr、或 Trp。在某些实施方案中, X_{18} 是 Ala、Val、Leu、Ile、或 Met。在某些实施方案中, X_{18} 是 Ala、Val、Leu、或 Ile。在某些实施方案中, X_{18} 是 Met。

在某些实施方案中, X_{18} 是Ala。在某些实施方案中, X_{18} 是Val。在某些实施方案中, X_{18} 是Leu。在某些实施方案中, X_{18} 是Ile。

[0286] 在某些实施方案中, X_{19} 是Glu、Asp、Gln、Ala、或Trp。在某些实施方案中, X_{19} 是Glu、Asp、Gln、Ala、Ser、Trp、Arg、Lys、Leu、Met、或His。在某些实施方案中, X_{19} 是Glu、Asp、Gln、Ala、Trp、Arg、或His。

[0287] 在某些实施方案中, X_{19} 是Glu。在某些实施方案中, X_{19} 是Asp。在某些实施方案中, X_{19} 是Gln。在某些实施方案中, X_{19} 是Ala。在某些实施方案中, X_{19} 是Ser。在某些实施方案中, X_{19} 是Trp。在某些实施方案中, X_{19} 是Arg。

[0288] 在某些实施方案中, X_{19} 是Lys。在某些实施方案中, X_{19} 是Leu。在某些实施方案中, X_{19} 是Met。在某些实施方案中, X_{19} 是His。

[0289] 在某些实施方案中, X_{20} 是Tyr或Phe。在某些实施方案中, X_{20} 是Tyr。

[0290] 在某些实施方案中, X_{20} 是Phe。

[0291] 在某些实施方案中, X_{21} 、 X_{25} 、以及 X_{29} 各自是疏水性和/或大氨基酸。

[0292] 在某些实施方案中, X_{21} 是Trp。在某些实施方案中, X_{21} 是Tyr。在某些实施方案中, X_{21} 是Phe。在某些实施方案中, X_{21} 是His。在某些实施方案中, X_{21} 是Gln。在某些实施方案中, X_{25} 是Trp。在某些实施方案中, X_{25} 是Tyr。在某些实施方案中, X_{25} 是His。在某些实施方案中, X_{25} 是Phe。在某些实施方案中, X_{25} 是His。在某些实施方案中, X_{29} 是Tyr。在某些实施方案中, X_{29} 是Trp。在某些实施方案中, X_{29} 是Phe。在某些实施方案中, X_{29} 是His。在某些实施方案中, X_{21} 、 X_{25} 、 X_{29} 中的每一个可以独立地是Tyr、Trp、Phe、His、或具有环己基侧链的氨基酸, 其中Tyr、Phe、Trp、或环己基侧链是任选氟化的。在某些实施方案中, X_{25} 是Tyr、Phe、Trp、His、Gln、Arg、或Asp。在某些实施方案中, X_{29} 是Tyr、Phe、Trp、His、Gln、Arg、Asp、Asn、Ala、Leu、或Glu。

[0293] 在某些实施方案中, X_{22} 是小氨基酸。在某些实施方案中, X_{22} 是Ala。在某些实施方案中, X_{22} 是Gly、Ser、或Val。在某些实施方案中, X_{22} 是Gly、Ser、Val、或Asn。在某些实施方案中, X_{22} 是Gly。在某些实施方案中, X_{22} 是Ser。在某些实施方案中, X_{22} 是Val。在某些实施方案中, X_{22} 是Ala、Gly、Ser、Val、Asn、Gln、Trp、Leu、或Tyr。

[0294] 在某些实施方案中, X_{23} 是Arg或Asp。在某些实施方案中, X_{26} 是Asn、Leu、Ile、或His。在某些实施方案中, X_{26} 是Asn、Leu、Ile、His、Gln、Arg、Phe、或Ala。在某些实施方案中, X_{26} 是Asn。在某些实施方案中, X_{26} 是Leu。在某些实施方案中, X_{26} 是Ile。在某些实施方案中, X_{26} 是His。

[0295] 在某些实施方案中, X_{30} 是Ala或Arg。在某些实施方案中, X_{30} 是Ala、Arg、或Val。在某些实施方案中, X_{30} 是Arg。在某些实施方案中, X_{30} 是Ala。在某些实施方案中, X_{30} 是Val。

[0296] 在某些实施方案中, X_{31} 是能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_{31} 是能够使所述肽与另一个肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_{31} 是使所述第一肽与所述第二肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_{31} 是Val或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_{31} 是Cys、Sec、Phe、Trp、或Tyr。在某些实施方案中, X_{31} 是Cys。在某些实施方案中, X_{31} 是Sec。在某些实施方案中, X_{31} 是Phe、Trp、或Tyr。在某些实施方案中, X_{31} 是Dap缀合的丙烯酰胺。在某些实施方案中, X_{31} 是Dab缀合的丙烯酰胺。

[0297] 在某些实施方案中, X_{32} 是 Ala、Arg、Ser。在某些实施方案中, X_{32} 是 Ala。在某些实施方案中, X_{32} 是 Arg。在某些实施方案中, X_{32} 是 Ser。在某些实施方案中, X_{32} 是能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_{32} 是能够使所述肽与另一个肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_{32} 是使所述第一肽与所述第二肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_{32} 是 Cys、Sec、Phe、Trp、或 Tyr。在某些实施方案中, X_{32} 是 Cys。在某些实施方案中, X_{32} 是 Sec。在某些实施方案中, X_{32} 是 Phe、Trp、或 Tyr。在某些实施方案中, X_{32} 是 Arg 或 Ala。在某些实施方案中, X_{32} 是 Dab 缀合的丙烯酰胺或 Dap 缀合的丙烯酰胺。

[0298] 在某些实施方案中, 所述肽包含与本文所提供的氨基酸序列约 80% 至约 99% 同源的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与本文所提供的氨基酸序列约 84% 至约 99% 同源的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与本文所提供的氨基酸序列约 87% 至约 99% 同源的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与本文所提供的氨基酸序列约 90% 至约 99% 同源的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与本文所提供的氨基酸序列约 93% 至约 99% 同源的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与本文所提供的氨基酸序列至少约 80%、85%、90%、95%、98%、或 99% 同源的序列。

[0299] 在某些实施方案中, 所述肽包含与本文所提供的氨基酸序列约 80% 至约 99% 同一的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与本文所提供的氨基酸序列约 84% 至约 99% 同一的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与本文所提供的氨基酸序列约 87% 至约 99% 同一的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与本文所提供的氨基酸序列约 90% 至约 99% 同一的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与本文所提供的氨基酸序列约 93% 至约 99% 同一的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与本文所提供的氨基酸序列至少约 80%、85%、90%、95%、98%、或 99% 同一的序列。

[0300] 在某些实施方案中, 所述肽包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列约 80% 至约 99% 同源的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列约 85% 至约 99% 同源的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列约 90% 至约 99% 同源的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列约 95% 至约 99% 同源的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列约 97% 至约 99% 同源的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列约 98% 至约 99% 同源的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列至少约 80%、85%、90%、95%、98%、或 99% 同源的序列。上述值适用于 SEQ ID NO:12、13 以及 48。

[0301] 在某些实施方案中, 所述肽包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列约 80% 至约 99% 同一的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列约 84% 至约 99% 同一的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列约 87% 至约 99% 同一的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列约 90% 至约 99% 同一的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列约 93% 至约 99% 同一的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列约 96% 至约 99% 同一的序列。在某些实施方案中, 所述肽包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列至少约 80%、84%、87%、90%、93%、或 96% 同一的序列。上述值适用于 SEQ ID NO:12、13 以及

48。

[0302] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列有1个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列有2个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列有3个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列有4个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列有5个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列有6个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列有7个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列有8个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列有9个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列有10个氨基酸不同的序列。上述差异还适用于SEQ ID NO:12、13以及48。

[0303] 在某些实施方案中,所述肽包含序列

[0304] GPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:4)。在某些实施方案中,所述肽包含序列

[0305] GPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:5)。在某些实施方案中,所述肽包含序列

[0306] GRRRPRRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:6)。在某些实施方案中,所述肽包含序列

[0307] GPRRPRYPGDDAPVEDLIRFYNDLQQYLVVA (SEQ ID NO:7)。在某些实施方案中,所述肽包含序列

[0308] GCGGPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:8)。在某些实施方案中,所述肽包含序列

[0309] GCGGPRRPRYPGDDACEEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:9)。在某些实施方案中,所述肽包含序列

[0310] GCGGPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:10)。在某些实施方案中,所述肽包含序列

[0311] GCGGPRRPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:11)。在某些实施方案中,所述肽包含SEQ ID NO:14-51的序列。

[0312] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列约80%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列约85%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列约90%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列约95%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列约97%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列约98%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少约80%、85%、90%、95%、98%、或99%同源的序列。上述值适用于SEQ ID NO:14-51。

[0313] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列约80%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列约84%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列约87%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列约90%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列约93%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列约96%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少约80%、84%、87%、90%、93%、或96%同一的序列。上述值适用于SEQ ID NO:14-51。

[0314] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列有1个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列有2个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列有3个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列有4个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列有5个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列有6个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列有7个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列有8个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列有9个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列有10个氨基酸不同的序列。上述值适用于SEQ ID NO:14-51。

[0315] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列约80%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列约85%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列约90%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列约95%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列约97%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列约98%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少约80%、85%、90%、95%、98%、或99%同源的序列。

[0316] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列约80%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列约84%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列约87%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列约90%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列约93%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列约96%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少约80%、84%、87%、90%、93%、或96%同一的序列。

[0317] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列有1个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与

SEQ ID NO:5的氨基酸序列有2个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列有3个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列有4个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列有5个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列有6个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列有7个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列有8个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列有9个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列有10个氨基酸不同的序列。

[0318] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列约80%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列约85%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列约90%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列约95%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列约97%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列约98%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少约80%、85%、90%、95%、98%、或99%同源的序列。

[0319] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列约80%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列约84%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列约87%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列约90%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列约93%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列约96%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少约80%、84%、87%、90%、93%、或96%同一的序列。

[0320] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列有1个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列有2个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列有3个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列有4个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列有5个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列有6个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列有7个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列有8个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列有9个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列有10个氨基酸不同的序列。

[0321] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7至少约80%至99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列约85%至约99%同源的序

列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7 的氨基酸序列约90%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列约95%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列约97%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列约98%至约99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少约80%、85%、90%、95%、98%、或99%同源的序列。

[0322] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7至少约80%至99%同源 的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列约85%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7 的氨基酸序列约90%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列约95%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列约97%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列约98%至约99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少约80%、85%、90%、95%、98%、或99%同一的序列。

[0323] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有1个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有2个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有3个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有4个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有5个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有6个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有7个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7 的氨基酸序列有8个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有9个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有10个氨基酸不同的序列。

[0324] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:8至少约80%至99%同源 的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:8至少约90%至99% 同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:8至少约94%至99%同源的序列。

[0325] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:8至少约80%至99%同一 的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:8至少约90%至99% 同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:8至少约94%至99%同一的序列。

[0326] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列有1个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列有2个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列有3个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列有4个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列有5个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与

SEQ ID NO:8的氨基酸序列有6个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列有7个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列有8个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列有9个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列有10个氨基酸不同的序列。

[0327] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9至少约80%至99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9至少约90%至99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9至少约94%至99%同源的序列。

[0328] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9至少约80%至99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9至少约90%至99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9至少约94%至99%同一的序列。

[0329] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列有1个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列有2个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列有3个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列有4个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列有5个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列有6个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列有7个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列有8个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列有9个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列有10个氨基酸不同的序列。

[0330] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:10至少约80%至99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:10至少约90%至99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:10至少约94%至99%同源的序列。

[0331] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:10至少约80%至99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:10至少约90%至99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:10至少约94%至99%同一的序列。

[0332] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列有1个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列有2个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列有3个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列有4个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列有5个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列有6个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列有7个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列有8个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与

SEQ ID NO:10的氨基酸序列有9个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列有10个氨基酸不同的序列。

[0333] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11至少约80%至99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11至少约90%至99%同源的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11至少约94%至99%同源的序列。

[0334] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11至少约80%至99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11至少约90%至99%同一的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11至少约94%至99%同一的序列。

[0335] 在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列有1个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列有2个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列有3个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列有4个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列有5个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列有6个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列有7个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列有8个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列有9个氨基酸不同的序列。在某些实施方案中,所述肽包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列有10个氨基酸不同的序列。

[0336] 在某些实施方案中,所述肽包含如下序列,其中SEQ ID NO:1的位置9、10、12、16、17、20、23、24、27、28、31、或32处的氨基酸中的任一个是什么天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中,所述肽包含SEQ ID NO:1的序列,其中位置9、10、12、16、17、20、23、24、27、28、31、或32处的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、或12个氨基酸可以变化。

[0337] 在某些实施方案中,所述肽是第一肽,所述第一肽与第二肽缔合以形成结合靶蛋白的肽二聚体。在某些实施方案中,所述肽二聚体结合靶蛋白。在某些实施方案中,所述靶蛋白是Ras。Ras的实例包括NRas、HRas、以及KRas,所述KRas包括KRas4A和KRas4B。在某些实施方案中,所述靶蛋白是Ras突变体。在某些实施方案中,Ras突变体是具有以下突变中的一个或多个的NRas、HRas、或KRas:G12D、G12S、G12V、G12C、G12R、G12A、G12D、G13R、G13V、G13S、G13C、G13A、Q61L、Q61R、Q61K、或Q61H。在某些实施方案中,所述靶蛋白是Max/Myc。在某些实施方案中,所述靶蛋白是Raf1A。在某些实施方案中,所述靶蛋白是Ras和Raf1A。

[0338] 在某些实施方案中,第二肽包含与第一肽的序列相同的序列。在某些实施方案中,第二肽包含与第一肽的序列不同的序列。在某些实施方案中,第二肽包含SEQ ID NO:1的序列。在某些实施方案中,第二肽包含SEQ ID NO:1、12、13、或48的序列。在某些实施方案中,第二肽的X₂₁或X₂₅是Tyr、Phe、Trp、His或具有环己基侧链的氨基酸,其中Tyr、Phe、Trp、或环己基侧链是任选氟化的。在某些实施方案中,第二肽的X₂₁是Trp。在某些实施方案中,第二肽的X₂₅是Tyr。在某些实施方案中,第一肽的X₂₅是Trp。在某些实施方案中,第二

肽的 X_{25} 是Tyr并且第一肽的 X_{25} 是Trp。在某些实施方案中,第二肽的 X_{18} 是His,并且 X_{21} 和 X_{25} 中的每一个是Trp。在某些实施方案中,第一肽和第二肽经由二硫键、二硒键、碳-碳键、酰胺键、酯键、氢键、盐桥、 π 堆积相互作用、或非极性疏水性相互作用来缔合。在某些实施方案中,第一肽和第二肽经由二硫键或二硒键缔合。在某些实施方案中,两个肽经由 π 堆积相互作用缔合。举例来说,一个肽上的酪氨酸经由 π 堆积与另一个肽上的另一个酪氨酸相互作用。

[0339] 在某些实施方案中,所述肽以中到低的纳摩尔结合亲和力结合它们的靶标(例如Ras蛋白质)。不希望受理论束缚,所述肽直接结合Ras效应子结构域,并且阻断Ras结合为它的致癌活性所必需的效应蛋白。在某些实施方案中,所述肽作为头对尾二聚体结合Ras。在某些实施方案中,所述肽作为头对尾同二聚体结合Ras。在某些实施方案中,所述肽作为头对尾异二聚体结合Ras。

[0340] 本文所述的肽与靶标(例如Ras蛋白质)的结合亲和力可以使用本领域已知的方法(例如荧光偏振测量),通过本文所述的肽和靶标的解离常数(K_d)来测量。在某些实施方案中,所述肽二聚体以如下的解离常数(K_d)结合Ras:小于约500nM、200nM、150nM、140nM、130nM、120nM、110nM、100nM、90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30 nM、20nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、2nM、1nM、或0.5nM。在某些实施方案中,所述肽二聚体以如下的解离常数(K_d)结合Ras:小于约400pM、200pM、150pM、140pM、130pM、120pM、110 pM、100pM、90pM、80pM、70pM、60pM、50pM、40pM、30pM、20 pM、10pM、9pM、8pM、7nM、6nM、或5nM。上述 K_d 值适用于肽同二聚体和肽异二聚体这两者。

[0341] 在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约500nM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约150nM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约150nM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约60nM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约40 nM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约20nM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约10nM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约5nM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约10nM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约5nM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约1nM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约1nM的解离常数(K_d)结合Ras。

[0342] 在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约400pM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约200pM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约150pM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约100pM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约80 pM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约60pM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约40pM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约20pM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约10pM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约5pM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约

1pM的解离常数(K_d)结合Ras。在某些实施方案中,所述肽二聚体以小于约1pM的解离常数(K_d)结合Ras。

[0343] 在某些实施方案中,与对非致癌形式的结合亲和力相比,所述肽二聚体对靶蛋白的致癌形式具有更高的结合亲和力。在某些实施方案中,与对 Ras • GDP的结合亲和力相比,所述肽二聚体对Ras • GTP具有更高的结合亲和力。在某些实施方案中,所述肽二聚体对Ras • GTP的结合亲和力是对 Ras • GDP的结合亲和力的约1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、或10倍。

[0344] Ras抑制可以使用诸如以下各项的方法来测量:细胞活力测定(例如 MTT或CellTiterGlo)、胰天蛋白酶切割测定(例如通过定量蛋白质印迹或 胰天蛋白酶3/7Glo)、通过测量例如相对于总蛋白的磷酸化蛋白进行的Ras 途径激活(例如MAPK途径、PI3K/Akt途径、Ral途径的激活)的定量蛋白质印迹。

[0345] 在某些实施方案中,肽单体具有最少3,000Da和最多9,000Da。在某些实施方案中,肽单体具有最少3,000Da和最多6,000Da。在某些实施方案中,肽单体具有最少6,000Da和最多9,000Da。在某些实施方案中,肽二聚体具有最少6,000Da和最多18,000Da。在某些实施方案中,肽二聚体具有最少6,000Da和最多12,000Da。在某些实施方案中,肽二聚体具有最少12,000 Da和最多18,000Da。

[0346] 在某些实施方案中,所述肽在SEQ ID NO:1-11的N末端处包含另外的氨基酸。在某些实施方案中,所述肽在SEQ ID NO:1-11的C末端处包含另外的氨基酸。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:1-5和7的N末端处另外的氨基酸包含 X_2 G或GR。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:1-5和7的N末端处另外的氨基酸包含GCG。如本文所用,具有负数作为下标的X表示相对于SEQ ID NO:1的 X_1 位于N末端侧的氨基酸残基的位置。

[0347] 在某些实施方案中, X_2 是能够使所述第一肽与所述第二肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_2 是使第一肽与第二肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_2 是能够使所述肽与另一个肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_2 是使所述第一肽与所述第二肽交联的天然或非天然氨基酸。在某些实施方案中, X_2 是Cys、Sec、Phe、Trp、或Tyr。在某些实施方案中, X_2 是Cys。在某些实施方案中, X_2 是Sec。在某些实施方案中, X_2 是Phe、Trp、或Tyr。

[0348] 在某些实施方案中, X_{13} 是Cys或Sec,并且 X_{14} 是Glu。在某些实施方案中, X_{18} 是His,并且 X_{25} 和 X_{21} 中的每一个是Trp。

[0349] 在某些实施方案中, X_1 是Gly; X_3 、 X_4 以及 X_6 中的每一个是Arg;并且 X_7 是Cys。在某些实施方案中, X_1 是Gly; X_3 、 X_4 以及 X_6 中的每一个是Arg; X_7 是Cy;并且 X_{30} 是Ala。在某些实施方案中, X_1 是Gly; X_3 、 X_4 以及 X_6 中的每一个是Arg; X_7 是Cys;并且 X_{30} 是Arg。在某些实施方案中, X_2 是Gly; X_1 是Arg; X_1 是Arg; X_3 、 X_4 以及 X_6 中的每一个是Arg; X_7 是Cys;并且 X_{30} 是Ala。在上述实施方案中的每一个中,还设想使用Sec代替Cys。

[0350] 在某些实施方案中,异二聚化的肽包含主要肽和次要肽。主要肽形成与Ras的大部分接触。

[0351] 在某些实施方案中,异二聚化的肽包含选自SEQ ID NO:22、23以及49的主要肽。在某些实施方案中,异二聚化的肽包含选自SEQ ID NO:24-27、50以及51的次要肽。在某些实施方案中,异二聚化的肽包含SEQ ID NO:22的主要肽和SEQ ID NO:24的次要肽。在某些

实施方案中,异二聚化的肽包 含选自SEQ ID NO:22的主要肽和SEQ ID NO:25的次要肽。在某些实施方 案中,异二聚化的肽包含SEQ ID NO:22的主要肽和SEQ ID NO:26的次要 肽。在某些实施方案中,异二聚化的肽包含SEQ ID NO:22的主要肽和SEQ ID NO:27的次要肽。在某些实施方案中,异二聚化的肽包含SEQ ID NO:22 的主要肽和SEQ ID NO:50的次要肽。在某些实施方案中,异二聚化的肽包 含SEQ ID NO:22的主要肽和SEQ ID NO:51的次要肽。

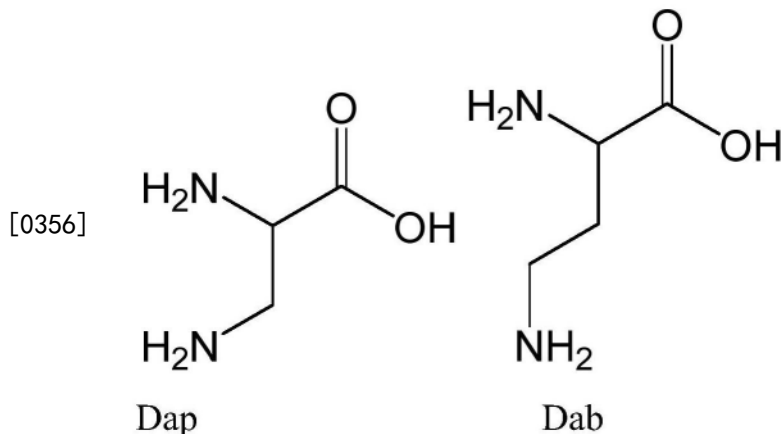
[0352] 在某些实施方案中,异二聚化的肽包含SEQ ID NO:23的主要肽和SEQ ID NO:24的次要肽。在某些实施方案中,异二聚化的肽包含SEQ ID NO:23 的主要肽和SEQ ID NO:25的次要肽。在某些实施方案中,异二聚化的肽包 含SEQ ID NO:23的主要肽和SEQ ID NO:26的次要肽。在某些实施方案 中,异二聚化的肽包含SEQ ID NO:23的主要肽和SEQ ID NO:27的次要 肽。在某些实施方案中,异二聚化的肽包含SEQ ID NO:23的主要肽和SEQ ID NO:50的次要肽。在某些实施方案中,异二聚化的肽包含SEQ ID NO:23 的主要肽和SEQ ID NO:51的次要肽。

[0353] 在某些实施方案中,异二聚化的肽包含SEQ ID NO:49的主要肽和SEQ ID NO:24的次要肽。在某些实施方案中,异二聚化的肽包含SEQ ID NO:49 的主要肽和SEQ ID NO:25的次要肽。在某些实施方案中,异二聚化的肽包 含SEQ ID NO:49的主要肽和SEQ ID NO:26的次要肽。在某些实施方案 中,异二聚化的肽包含SEQ ID NO:49的主要肽和SEQ ID NO:27的次要 肽。在某些实施方案中,异二聚化的肽包含SEQ ID NO:49的主要肽和SEQ ID NO:50的次要肽。在某些实施方案中,异二聚化的肽包含SEQ ID NO:49 的主要肽和SEQ ID NO:51的次要肽。

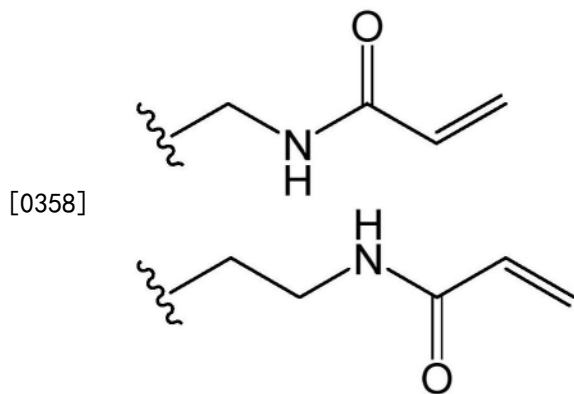
[0354] 在一个方面,本文提供了被设计成在穿透细胞之前防止二聚化或使二聚 化减到最低限度的肽。本文所公开的肽可以包含被遮蔽的Cys或Sec。在穿 透细胞之前,肽单体中的半胱氨酸或硒代半胱氨酸残基可以二硫键键合或硒- 硫键键合到小有机硫醇部分以防止交联,这是因为呈二硫化物形式或硒- 硫化 物形式的硫不是亲核的。在某些实施方案中,肽单体包含二硫键键合到小有 机硫醇部分的半胱氨酸。在某些实施方案中,肽单体包含 硒-硫键键合到小有 机硫醇部分的硒代半胱氨酸。在某些实施方案中,所述小有机硫醇部 分是脂 族硫醇部分。在某些实施方案中,所述脂族硫醇是烷基硫醇部分。在某些实 施方案中,所述烷基硫醇是C₁₋₅烷基硫醇。在某些实施方案中,所述小有机 硫醇部分是SR^S,其中R^S是取代或未取代的C₁₋₅烷基。在某些实施方案中, R^S是取代的C₁₋₅烷基。在某些实施方案中, R^S是未取代的C₁₋₅烷基。在某些 实施方案中,所述小有机硫醇部分是叔丁基硫醇。在某些实 施方案中,所述 小有机硫醇部分是乙硫醇。作为单体的本文所述的本发明的肽可以包含未 二 硫键键合的Cys或二硫键键合的Cys。在某些实施方案中,本发明的肽是包 含未二硫键 键合的Cys的单体。在某些实施方案中,本发明的肽是包含二硫 键键合的Cys的单体。在某些实施方案中,所述肽包含选自由SEQ ID NO: 30、33以及34组成的组的序列,其中Cys未二 硫键键合。在某些实施方案 中,所述肽包含选自由SEQ ID NO:30、33以及34组成的组的序 列,其中 Cys以二硫键键合到小有机硫醇部分。在上述实施方案中的任一个中,还设 想用 Sec代替Cys。

[0355] 在穿透细胞后,肽单体的二硫键键合的半胱氨酸在细胞质环境中被还 原,从而允 许半胱氨酸残基的游离硫醇与包含可以与硫醇亲核体反应的亲电 子侧链的第二肽单体交 联。这种策略还适用于包含硒代半胱氨酸的肽,所述 硒代半胱氨酸可以用作用于交联的亲

核体。举例来说,亲电子侧链包括具有 丙烯酰胺、乙烯基磺酰胺、碘乙酰胺部分的那些。能够与Cys或Sec反应的 其它迈克尔接受体也适用于使肽交联并且是本领域已知的。举例来说,所述 肽可以含有被能够与Cys或Sec交联的部分修饰的残基。举例来说,包含丙 烯酰胺部分的氨基酸侧链。在某些实施方案中,所述肽包含含有丙烯酰胺部 分的氨基酸侧链。在某些实施方案中,所述肽包含L-2,4-二氨基丁酸(Dab) 残基或L-2,3-二氨基丙酸(Dap) 残基。如本文所用,残基X是L-2,4-二氨基 丁酸(Dab) 残基并且残基Z是L-2,3-二氨基丙酸(Dap) 残基。



[0357] 在某些实施方案中,Dab残基或Dap残基具有与侧链氮偶联以形成具有 将丙烯酰胺与肽骨架 α 碳隔开的1个或2个碳的丙烯酰胺侧链的丙烯酸。与 丙烯酸偶联以形成具有丙 烯酰胺的侧链的Dap残基和Dab残基的侧链示于下 文。这样的Dap修饰的残基或Dab修饰的 残基被称为Dab缀合的丙烯酰胺残 基和Dap缀合的丙烯酰胺残基。



[0359] 在某些实施方案中,所述肽包含选自由SEQ ID NO:31、32、35以及36 组成的组的 序列,其中X是L-2,4-二氨基丁酸(Dab) 残基或其中Z是与丙 烯酰胺缀合的L-2,3-二氨基丙 酸(Dap) 残基。

[0360] 在某些实施方案中,包含L-2,4-二氨基丁酸(Dab) 残基或L-2,3-二氨基 丙酸(Dap) 残基的肽与丙烯酸在Dap或Dab的侧链氮偶联以形成包含丙烯 酰胺的侧链。

[0361] 肽二聚体可以由SEQ ID NO:30、33、以及34与SEQ ID NO:31、32、35、以及36的任 何组合形成。

[0362] 本文还提供了选择性二聚体去稳定策略。使内体中的二聚体不稳定可以 提高二 聚体的内体逃逸并且因此提高二聚体的胞质进入。单体被认为与二聚 体相比在从内体逃 逸方面是更有效的。二聚体去稳定可以是pH值诱导的或 用大体积残基诱导。pH值诱导的二

聚体去稳定涉及将组氨酸残基放入一个肽单体中以使得它们在空间上接近反向单体上的阳离子残基或其它组氨酸。在常规的胞质pH值(约7.4)下,这些组氨酸与在内体(pH约5-6)中相比带更少的正电荷,并且因此二聚体在内体中被选择性地稳定,从而引起更有效的逃逸。组氨酸的6.0-6.5的pKa使得它在胞质pH值(pH 7.2-7.4)下基本上是中性的,但是在内体中引起质子化,这通常在约pH 6.0开始并且随着内体转变成溶酶体而进展到pH 5.0或更低。将组氨酸残基放置在反向单体上的正电荷附近在进入内体中时引起两个肽单体之间的静电排斥,这使二聚体不稳定,从而有利于单体状态。

[0363] SEQ ID NO:38-41示出了这一组氨酸pH值诱导去稳定策略。在某些实施方案中,所述肽包含序列,其中His被放置在位置 X_6 、 X_7 和/或 X_{10} 处。被放置在这些位置中的一个、两个、或三个处的His适用于本文所述的肽中的任一个。在某些实施方案中,所述肽包含选自SEQ ID NO:38至41组成的组的序列。图36A和图36B使用活细胞显微术比较了含有相同浓度的不含组氨酸的SEQ ID NO:37和含有组氨酸的SEQ ID NO:38的细胞。

[0364] 二聚体去稳定还可以使用在二聚体界面附近包含大体积部分的残基以防止二聚化而实现。在进入细胞中时,残基的大体积部分被去除,从而容许二聚化和与诸如Ras、Myc/Max或RafA的蛋白质靶标结合。这种策略适用于包含Cys或Sec的本文所述的任何肽。在某些实施方案中,所述肽包含由硫醇分子保护的Cys或Sec。举例来说,本文所述的本发明的肽在某个位置(例如 X_7)处包含Cys或Sec,并且例如通过使还原的硫醇与2,2'-二吡啶基二硫化物、4,4'-二吡啶基二硫化物、2,2'-二硫代双(5-硝基吡啶)或类似的试剂反应以二硫键键合到有机硫醇而受到保护。在某些实施方案中,所述肽包含通过键合到有机硫醇分子而受保护的Cys或Sec。在某些实施方案中,所述有机硫醇分子是芳基硫醇、杂芳基硫醇、或脂族硫醇。在某些实施方案中,所述有机硫醇分子是杂芳基硫醇。在某些实施方案中,所述有机硫醇分子选自2,2'-二吡啶基二硫化物、4,4'-二吡啶基二硫化物、以及2,2'-二硫代双(5-硝基吡啶)。在某些实施方案中,所述肽包含用试剂2,2'-二硫代双(5-硝基吡啶)保护的Sec。在从内体逃逸到胞质中时,这一二硫键将由细胞环境还原并且二聚化将被容许。在某些实施方案中,所述肽包含通过二硫键键合到2,2'-二吡啶基二硫化物而受保护的Cys。在某些实施方案中,所述肽包含通过二硫键键合到4,4'-二吡啶基二硫化物而受保护的Cys。在某些实施方案中,所述肽包含通过二硫键键合到2,2'-二硫代双(5-硝基吡啶)而受保护的Cys。展示这一策略的序列包括SEQ ID NO:30、33、34以及42。应当了解的是,在本文所述的实施方案中的任一个中,Cys可以被Sec置换。

[0365] 如先前所论述,设想了除Ras之外的其它靶标。SEQ ID NO:43结合Myc/Max异二聚体。SEQ ID NO:44结合RafA蛋白质。SEQ ID NO:45结合RafA和KRas这两者。SEQ ID NO:43-45是在位置7处包含使用二硫键二聚化的Cys的肽。

[0366] 本文还提供了包含低聚化结构域的肽,所述低聚化结构域允许所述肽与另一个肽缔合以形成二聚体,其中所述低聚化结构域包含以下序列: $PX_aX_bPX_cX_dP$ (SEQ ID NO:2), 其中 X_a 、 X_b 以及 X_c 中的每一个是任何非脯氨酸氨基酸,并且 X_d 是能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_a 和 X_b 中的每一个独立地是任何非脯氨酸氨基酸,并且 X_c 和 X_d 中的每一个独立地是任何非脯氨酸氨基酸或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸(例如半胱氨酸、硒代半胱氨酸)。在某些实施方案中, X_c 和 X_d 中的每一个独立地是任何非脯氨酸氨基酸,但是各自不是能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。包含低聚化结构域

的肽可用作蛋白质-蛋白质相互作用的抑制剂。包含低聚化结构域的肽可用于结合和抑制靶蛋白,如Ras或Ras突变体。

[0367] 在某些实施方案中,二聚体的第一肽中的交联氨基酸与第二肽的 $PX_aX_bPX_cX_dP$ 基序中的附带的交联氨基酸形成交联。在某些实施方案中,第一肽和第二肽中的 $PX_aX_bPX_cX_dP$ 基序呈反向平行构型。在某些实施方案中, $PX_aX_bPX_cX_dP$ 基序采用PPII螺旋构型。在某些实施方案中, $PX_aX_bPX_cX_dP$ 基序将各自在它们的N末端或C末端处连接到 α 螺旋并且将以反向平行构型使 α 螺旋稳定。

[0368] 在某些实施方案中, X_c 是Cys、Sec、Phe、Trp、或Tyr。在某些实施方案中, X_c 是能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_c 是Cys或Sec。在某些实施方案中, X_c 是Cys。在某些实施方案中, X_c 是 Sec。

[0369] 在某些实施方案中, X_d 是Cys、Sec、Phe、Trp、或Tyr。在某些实施方案中, X_d 是能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。在某些实施方案中, X_d 是Cys或Sec。在某些实施方案中, X_d 是Cys。在某些实施方案中, X_d 是 Sec。

[0370] 在某些实施方案中,当 X_c 是能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸时, X_d 不是能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。在某些实施方案中,当 X_d 是能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸时, X_c 不是能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。

[0371] 在某些实施方案中,所述肽包含SEQ ID NO:2,其中 X_a 和 X_b 各自是 Arg。在某些实施方案中,所述肽包含SEQ ID NO:2,其中 X_c 是Arg,并且 X_d 是Cys。在某些实施方案中,所述肽包含SEQ ID NO:2,其中 X_c 是Arg,并且 X_d 是Tyr。在某些实施方案中,所述肽包含SEQ ID NO:2,其中 X_c 是 Lys,并且 X_d 是Tyr。在某些实施方案中,所述肽包含SEQ ID NO:2,其中 X_c 是Cys,并且 X_d 是Tyr。在某些实施方案中,所述肽包含SEQ ID NO:2,其中 X_c 是Lys,并且 X_d 是Cys。在某些实施方案中,所述肽包含SEQ ID NO:2,其中 X_c 是Lys,并且 X_d 是His。在某些实施方案中,所述肽包含SEQ ID NO:2,其中 X_c 是Arg,并且 X_d 是His。在某些实施方案中,所述肽包含SEQ ID NO:2,其中 X_c 是His,并且 X_d 是His。在某些实施方案中,所述肽包含SEQ ID NO:2,其中 X_c 是His,并且 X_d 是Tyr。在某些实施方案中,所述肽包含SEQ ID NO:2,其中 X_a 和 X_b 各自是Arg并且 X_c 和 X_d 中的每一个具有上述一般和具体实施方案中的任一个。

[0372] 在SEQ ID NO:2的实施方案中的任一个中, X_a 、 X_b 、 X_c 以及 X_d 分别对应于 X_3 、 X_4 、 X_6 以及 X_7 ,如本文所述。

[0373] 所述肽还包含 α -螺旋结构域,所述 α -螺旋结构域包含以下序列: $X_{13}X_{14}X_{15}DLX_{18}X_{19}YX_{21}X_{22}RLX_{25}X_{26}YLY_{29}X_{30}VA$ (SEQ ID NO:3),其中 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{21} 、 X_{22} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{29} 、以及 X_{30} 如本文所定义。

[0374] 本文还提供了包含 α -螺旋结构域的肽,所述 α -螺旋结构域包含以下序列: $X_{13}X_{14}X_{15}DLX_{18}X_{19}YX_{21}X_{22}RLX_{25}X_{26}YLY_{29}X_{30}VA$ (SEQ ID NO:3),其中 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{21} 、 X_{22} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{29} 以及 X_{30} 如本文所定义。

[0375] 在某些实施方案中,本发明的肽可溶于水性介质中。在某些实施方案中,本发明的肽可以穿透细胞。在某些实施方案中,所述肽包含减少的负电荷数。在某些实施方案中,肽的负电荷数与起始肽相比减少了1个、2个、3个、4个、5个、或6个负电荷。举例来说,引入Ala或Ser代替阴离子残基 可以有助于提高细胞穿透。在某些实施方案中,所公开的肽在位置 X_{11} 、 X_{15} 和/或 X_{16} 处包含至少一个、两个、或三个不带负电荷的氨基酸。在某些实施方案

中,所公开的肽在位置 X_{11} 、 X_{15} 、 X_{16} 和/或 X_{19} 处包含至少一个、两个、三个、或四个不带负电荷的氨基酸。在某些实施方案中,所公开的肽在位置 X_{11} 、 X_{15} 、 X_{16} 以及 X_{19} 处包含四个不带负电荷的氨基酸。在某些实施方案中,所述不带负电荷的氨基酸是中性氨基酸。在某些实施方案中,所述不带负电荷的氨基酸选自由以下各项组成的组:Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Met、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、以及Gln。在某些实施方案中,所述不带负电荷的氨基酸是带正电荷的氨基酸。在某些实施方案中,所述带正电荷的氨基酸选自由Lys、Arg以及His组成的组。在某些实施方案中,所述肽在氨基酸位置 X_{11} 、 X_{15} 、 X_{16} 以及 X_{19} 处包含Ala。

[0376] 在某些实施方案中,所公开的肽在位置 X_{11} 、 X_{15} 、 X_{16} 和/或 X_{19} 处包含至少一个、两个、三个、或四个Ala和/或Ser。在某些实施方案中,所公开的肽在位置 X_{11} 、 X_{15} 和/或 X_{16} 处包含至少一个、两个、或三个Ala。在某些实施方案中,所公开的肽在位置 X_{11} 、 X_{15} 、 X_{16} 和/或 X_{19} 处包含至少一个、两个、三个、或四个Ala。在某些实施方案中,所公开的肽在位置 X_{11} 、 X_{15} 、 X_{16} 以及 X_{19} 处包含Ala。处于位置 X_{11} 、 X_{15} 和/或 X_{16} 处的Ala的上述实施方案也适用于处于位置 X_{11} 、 X_{15} 和/或 X_{16} 处的Ser。

[0377] 制备本发明的肽的方法

[0378] 本发明的肽的合成首先涉及选择包括非天然氨基酸在内的氨基酸的所期望的序列和数目。一旦选择了氨基酸,本发明的肽的合成就可以使用标准的脱保护和偶联反应来实现。肽键的形成和多肽合成是本领域技术人员公知的技术,并且涵盖了固相方法和溶液相方法这两者;一般参见Bodanszky和Bodanszky,《肽合成实践(The Practice of Peptide Synthesis)》,柏林的施普林格出版社(Springer-Verlag, Berlin),1984; Atherton和Sheppard,《固相肽合成:实用方法(Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach)》,英国牛津的牛津大学出版社的IRL出版社(IRL Press, Oxford University Press Oxford, England),1989;以及Stewart和Young,《固相肽合成(Solid phase Peptide Synthesis)》,第2版,罗克福德的皮尔斯化学公司(Pierce Chemical Company, Rockford),1984,这些文献中的每一篇的全部内容以引用的方式并入本文。在溶液相技术和固相技术这两者中,保护基的选择以及待利用的特定偶联技术必须被考虑。关于用于溶液相和固相反应的肽合成技术的详细论述,参见Hecht,《生物有机化学:肽和蛋白质(Bioorganic chemistry:Peptides and Proteins)》,纽约牛津大学出版社:1998,该文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0379] 在某些实施方案中,所述方法包括通过遵循如美国公开号US 2012/0270800和国际申请号PCT/US2010/001952中所述的策略,使本发明的钉接肽与另一个多肽或蛋白质连接来使本发明的钉接肽缔合,这些文献也以引用的方式并入本文。在某些实施方案中,待连接的其它多肽是钉接或拼接的。

[0380] 在某些实施方案中,所述方法包括本发明的肽的溶液相合成。如上所述的溶液相合成是用于构建多肽的公知的技术。示例性的溶液相合成包括以下步骤:(1)提供在N末端处受氨基保护基保护的氨基酸;(2)提供在C末端处受氧保护基保护的氨基酸;(3)使N受保护的氨基酸与C受保护的氨基酸偶联;(4)使偶联反应的产物在N末端或C末端处脱保护;以及(5)重复步骤(3)至(4)直到获得所期望的多肽为止,其中在上述步骤中的任一个时偶联的氨基酸中的至少两个各自包含至少一个末端不饱和氨基酸侧链,和任选地,包含两个末端不饱和氨基酸侧链的氨基酸。在上述合成的过程中,可以改变各种参数,包括但不限于

于氨基酸的立体化学、以及所利用的氨基酸残基。

[0381] 在某些实施方案中,所述方法包括本发明的肽的固相合成。如上所述的固相合成是用于构建多肽的公知技术。示例性的固相合成包括以下步骤:

[0382] (1) 提供树脂结合的氨基酸;(2) 使所述树脂结合的氨基酸脱保护;(3) 使氨基酸与所述脱保护的树脂结合的氨基酸偶联;(4) 重复步骤(3)直到获得所期望的肽为止。

[0383] 在上述合成的过程中,可以改变各种参数,包括但不限于具有侧链的氨基酸的放置、氨基酸的立体化学、侧链长度和功能、以及所利用的氨基酸残基。

[0384] 在某些实施方案中,所合成的肽含有能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。举例来说,所述氨基酸可以使得所述肽在与特定的催化剂接触以促进钉接、或多重钉接时能够被钉接以提供所述肽的钉接型式来提供构象稳定化的肽。这样的氨基酸包括具有末端不饱和氨基酸侧链的那些。

[0385] 其它修饰可以包括使肽与细胞渗透剂、治疗活性剂、标记、或诊断剂在肽支架上的任何位置处缀合,所述位置例如像在所述肽的N末端处、所述肽的C末端处、所述肽的氨基酸侧链上。这样的修饰可用于将肽或治疗活性剂递送到细胞、组织或器官。在某些实施方案中,这样的修饰可以允许靶向特定类型的细胞或组织。

[0386] 在某些实施方案中,肽中氨基酸中的一个或多个可以被修饰,例如通过添加化学实体来修饰,所述化学实体诸如碳水化合物基团、羟基、磷酸酯基、法呢基、异法呢基、棕榈酰基、香叶基香叶基、月桂基、脂肪酸基团、用于缀合、官能化、或其它修饰的接头。使用脂质可以帮助肽定位到其中Ras定位的质膜。

[0387] 在某些实施方案中,本发明的肽包含D-氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含最多10%的D-氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含最多20%的D-氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含最多30%的D-氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含最多40%的D-氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含最多50%的D-氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含最多60%的D-氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含最多70%的D-氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含最多80%的D-氨基酸。在某些实施方案中,本发明的肽包含最多90%的D-氨基酸。

[0388] 在某些实施方案中,本发明的肽完全是D-氨基酸。这样的“镜像”蛋白可以折叠成相应的镜像构象并且预期与包含L-氨基酸的本发明的肽具有相同的PPII-环- α 螺旋构象以及二聚化(以及在上述位置处经由二硫键或二硒键交联)的能力。在某些实施方案中,使用计算方法发现靶标的结合剂。在某些实施方案中,将其中酵母、噬菌体等进行展示的“镜像展示”技术与D-氨基酸靶蛋白一起使用。在某些实施方案中,本文公开的Ras结合肽不包含D-氨基酸。

[0389] 肽与其它肽或钉接肽或拼接肽的缀合

[0390] 本文所述的肽可以与钉接或拼接的另一个肽缀合或与作为细胞穿透肽(例如TAT)的另一个肽缀合。钉接肽或拼接肽或细胞穿透肽允许本文提供的肽渗透细胞。钉接肽或拼接肽已经描述于例如以下文献中:Walensky等, Science (2004) 305:1466-1470;美国专利号8,592,377;美国专利号7,192,713;美国专利申请公开号2006/0008848;美国专利申请公开号2012/0270800;国际公开号W0 2008/121767;以及国际公开号W0 2011/008260,这些文献中的每一篇以引用的方式并入本文。细胞穿透肽描述于例如Margus等,

《作为寡核苷酸递送的通用运载体的细胞穿透肽 (Cell- penetrating peptides as versatile vehicles for oligonucleotide delivery)》, *Mol Ther.* (2012); 20 (3): 525-33 中。

[0391] 二聚体展示技术

[0392] 本文提供的筛选方法可以与各种体外展示方法一起使用。高通量筛选的方法可用于鉴定结合靶蛋白的肽。存在用于制备许多蛋白质(或肽)和评价它们的结合活性的许多方法,这些方法被统称为“展示”技术。这些技术中的大部分依靠生物合成机制(即核糖体,要么在细胞中,要么在体外)来基于编码蛋白质的序列的DNA模板合成这些蛋白质;以及以物理方式将所表达的蛋白质与编码它的DNA连接的一些手段。这后一特征提供了使用PCR和公认的DNA测序技术确定针对活性所选择的蛋白质的身份的现成手段,所述技术使得能够扩增和分析甚至单个DNA分子。一旦蛋白质被表达并且与它们的编码DNA连接,就可以使用多种技术将具有所期望的特性的那些蛋白质与其余蛋白质分离,所述技术一般是“筛选”(其中逐一评价每一种单独的物质)或“选择”(其中批量评价分子)。展示技术可以用于从天然文库中鉴定结合剂以及改进已经具有所期望的活性的蛋白质的特性。这后一种方法通常涉及制备原始蛋白的突变体文库、分离最好的变体、以及重复这些步骤,被称为“定向进化”。定向进化已经综述于例如Dougherty和Arnold,《定向进化:新的部分和优化的功能(Directed evolution: new parts and optimized function)》, *Curr Opin Biotechnol.* (2009); 20 (4): 486-91 中。

[0393] 一种示例性展示技术是噬菌体展示,它涉及将所关注的蛋白质表达成与来自M13噬菌体的外壳蛋白的融合体。可以通过将适当的文库DNA转化到大肠杆菌中来制备大噬菌体文库,并且一旦产生,就可以分离文库的活性成员,这通常是经由“淘选”选择来实现的,其中固定靶结合蛋白并且将噬菌体在表面上洗过以结合活性变体。噬菌体展示是最常用的展示技术并且已经被用于鉴定结合多种多样的生物靶标和非生物靶标的蛋白质和肽(Levin, A. M. 和 Weiss, G. A. 《用分子展示优化蛋白质的亲和力和特异性 (Optimizing the affinity and specificity of proteins with molecular display)》, *Mol Biosyst* 2, 49-57 (2006))。

[0394] 酵母表面展示还描述于Boder和Wittrup,《用于筛选组合多肽文库的酵母表面展示 (Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries)》, *Nat Biotechnol* 15, 553-7 (1997); 以及美国专利号6,300,065 中。一般来说,酵母表面展示方法涉及将DNA文库转化到细胞(如酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)) 中,其中所展示的蛋白质与酵母表面蛋白质Aga2p融合(图2)。酵母细胞大到足以能够通过荧光激活细胞分选(FACS)筛选,所述荧光激活细胞分选可以每小时评价 $>10^7$ 个细胞并且能够基于多个荧光信号分选细胞。这容许多参数分选,从而允许不是仅基于细胞的绝对结合(例如与荧光标记的靶蛋白),而是基于不同荧光团的比率来选择细胞。这使得在一些其它展示细胞,如噬菌体的情况下可能是不可能的细胞选择成为可能;例如,如果使用针对融合蛋白上的表位的标记抗体,那么可以将靶结合信号相对于表达水平归一化,或可以基于细胞相对于对不同标记的靶标对一种标记的靶蛋白的偏好来选择所述细胞。相对于表达的归一化是特别有用的,这是因为这在噬菌体的情况下是不可能的,所述噬菌体常常对于所展示的蛋白质具有强表达偏倚。

[0395] 酵母展示的另外的特征是所展示的蛋白质通过酵母分泌系统,这有助于二硫键的形成(以及一般折叠,相对于大肠杆菌来说)。这一特征对于需要正确形成的二硫键以具有活性的蛋白质来说是有利的;尽管一些含有二硫键的蛋白质和肽已经在噬菌体上成功展示,但是许多不能正确形成。

[0396] 除了酵母表面展示之外,类似的细菌系统也已经被开发,所述系统将蛋白质展示成与细胞表面蛋白的融合体。尽管这种方法具有酵母表面展示的一些优势,并且在原则上可以实现比酵母更高的文库尺寸(尽管小于噬菌体),但是它没有酵母系统的折叠和二硫键形成能力。最后,存在许多体外展示方法,这些方法涉及产生DNA模板以及在没有细胞翻译提取物中产生蛋白质。这些方法可以适应最高的理论文库尺寸,这是因为不需要转化,并且可以常常检测单个序列的活性,这是因为通常使用PCR来扩增分离的命中物。在某些实施方案中,mRNA展示或核糖体展示可以用于展示肽文库。

[0397] 本文提供了筛选肽二聚体的文库的方法。所述方法包括用编码第一肽和第二肽的载体转化展示细胞,其中所述第一肽和所述第二肽缔合以形成与细胞壁蛋白融合的肽二聚体;使所述展示细胞与第一标记接触,其中所述第一标记包含靶蛋白并且与表达具有增强的与所述靶标的结合的肽二聚体的细胞缔合而不与不表达具有增强的与所述靶标的结合的肽二聚体的细胞缔合;分离与所述第一标记缔合的展示细胞;以及鉴定表现出增强的与所述靶标的结合的第一肽和第二肽。或者,所述方法可以包括用编码第一肽的第一载体和编码第二肽的第二载体转化展示细胞。

[0398] 可以使用诸如PCR的方法产生肽文库(参见图5)。举例来说,可以使用模板序列的随机诱变(易错PCR)。使具有足够重叠的一组引物退火并结合到模板并且延伸,从而用作彼此的模板。经由在每一个引物内使用多个简并密码子(位点饱和诱变)以引入突变,从而在所得的文库中提供高组合多样性。产生文库的另一种方式是从许多密码子(每一个氨基酸一个密码子)的限定混合物开始,这些密码子在引物合成期间与三聚体亚磷酸胺的混合物一起被掺入引物中。

[0399] 肽文库可以从基于胰多肽家族的任何肽来设计。在某些实施方案中,用于设计文库的肽基于禽胰多肽、人胰多肽、牛胰多肽、羊胰多肽、猪胰多肽、犬胰多肽或其突变体。在某些实施方案中,用于设计文库的肽基于禽胰多肽(aPP)或其突变体。肽文库可以从包含胰多肽家族的支架的任何肽来设计。肽文库可以从包含PPII螺旋结构域和 α -螺旋结构域的任何肽来设计。肽文库可以从包含PPII螺旋结构域、环结构域、以及 α -螺旋结构域的任何肽来设计。在某些实施方案中,所述环结构域是I型 β -转角。在某些实施方案中,用于设计文库的肽基于SEQ ID NO:1或4-11。在某些实施方案中,用于设计文库的肽基于SEQ ID NO:1。在某些实施方案中,肽文库可以从与SED ID NO:1或4-11具有80%至99%同源性的任何肽设计。在某些实施方案中,肽文库可以从与SED ID NO:1或4-11具有80%至99%同一性的任何肽设计。在某些实施方案中,肽文库可以从包含SEQ ID NO:2的任何肽来设计。在某些实施方案中,肽文库可以从包含SEQ ID NO:3的任何肽来设计。

[0400] 在某些实施方案中,如本文所述的本发明的肽/二聚体是各自包含 α -螺旋结构的两个肽的肽同二聚体。在某些实施方案中,如本文所述的本发明的肽/二聚体是各自包含II型聚脯氨酸构象的两个肽的肽同二聚体。在某些实施方案中,如本文所述的本发明的肽/二聚体是各自包含通过环结构域与II型聚脯氨酸构象连接的 α -螺旋结构的两个肽的

肽同二聚体。在某些实施方案中,环/接头结构域是I型 β -转角。在某些实施方案中,如本文所述的本发明的肽/二聚体是各自包含 α -螺旋结构的两个肽的肽异二聚体。在某些实施方案中,如本文所述的本发明的肽/二聚体是各自包含II型聚脯氨酸构象的两个肽的肽异二聚体。在某些实施方案中,如本文所述的本发明的肽/二聚体是各自包含通过环与II型聚脯氨酸构象连接的 α -螺旋结构的两个肽的肽异二聚体。

[0401] 在某些实施方案中,这两个肽共价结合。在某些实施方案中,这两个肽非共价结合。在某些实施方案中,两个肽经由二硫键、二硒键、碳-碳键、酰胺键、酯键、氢键、盐桥、 π 堆积相互作用、或非极性疏水性相互作用来缔合。在某些实施方案中,两个肽经由二硫键缔合。在某些实施方案中,两个肽经由二硒键缔合。在某些实施方案中,两个肽经由氢键、盐桥、或非极性疏水性相互作用缔合。在某些实施方案中,两个肽经由 π 堆积相互作用缔合。举例来说,一个肽上的酪氨酸经由 π 堆积与另一个肽上的另一个酪氨酸相互作用。

[0402] 在某些实施方案中,这两个肽中的每一个独立地包含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:11的序列或与其至少约80%、85%、90%、95%、98%、或99%同源或同一的序列。在某些实施方案中,这两个肽中的每一个包含作为能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸的部分。在某些实施方案中,这两个肽中的每一个包含使这两个肽彼此交联的部分。在某些实施方案中,能够交联的氨基酸是Cys或Sec。

[0403] 在某些实施方案中,能够交联的部分是能够使所述第一肽与所述第二肽交联的非天然氨基酸。在某些实施方案中,所述展示细胞是哺乳动物细胞、细菌细胞、或噬菌体。在某些实施方案中,所述展示细胞是酵母细胞。在某些实施方案中,所述展示细胞是酿酒酵母。在某些实施方案中,肽二聚体与酵母表面蛋白融合。在某些实施方案中,所述酵母表面蛋白是Aga2p。

[0404] 在某些实施方案中,靶蛋白是不对称的。在某些实施方案中,所述靶蛋白是Ras或Ras突变体。在某些实施方案中,所述肽对Ras • GTP比对Ras • GDP具有更高的选择性。在某些实施方案中,所述肽对Ras • GTP的选择性是对Ras • GDP的选择性的至少约1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、或10倍。

[0405] 使用第一标记来标记靶蛋白,然后与展示细胞一起孵育。在某些实施方案中,第一标记是与靶蛋白结合的荧光标记。在某些实施方案中,第一标记是与Ras结合的生物素。可以使用其它荧光团来标记靶蛋白,如藻红蛋白、别藻蓝蛋白、Alexa647、Alexa488、以及FITC。

[0406] 可以使用任意的第二标记来测量展示细胞上所展示的融合蛋白的丰度。第二标记可以是荧光标记的抗体或能够结合第一标记的微珠。可用于分选含有结合的靶蛋白的展示细胞的示例性方法包括荧光激活细胞分选(FACS)和磁激活细胞分选(MACS)。

[0407] 使用 and 治疗方法

[0408] 本文提供了治疗有需要的受试者的与Ras相关的疾病或病况的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如本文所述的肽。本文提供了治疗有需要的受试者的与Ras相关的疾病或病况的方法,所述方法包括指导所述受试者以使所述受试者服用有效量的如本文所述的肽。本文还提供了用于治疗有需要的受试者的与Ras相关的疾病或病况的肽。

[0409] 在某些实施方案中,与Ras相关的疾病是增殖性疾病。如本文所用,增殖性疾病、

病况、或病症包括但不限于癌症、造血系统增生性病症、良性赘生物(即肿瘤)、糖尿病性视网膜病变、类风湿性关节炎、黄斑变性、肥胖症、以及动脉粥样硬化。在某些实施方案中,增殖性疾病是癌症。示例性癌症包括但不限于癌瘤、肉瘤、或转移性病症、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、纤维肉瘤、肌肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、胃癌、食道癌、直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫癌、头颈部癌、皮肤癌、脑癌、胃癌、鳞状细胞癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、肾母细胞瘤(Wilm's tumor)、宫颈癌、睾丸癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤、白血病、淋巴瘤、以及卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)。

[0410] 示例性造血系统增生性病症包括但不限于涉及造血系统来源,例如由骨髓、淋巴或红细胞谱系产生的增生性/增生性细胞或其前体细胞的病症。在某些实施方案中,所述病症起因于低分化的急性白血病,例如成红细胞性白血病和急性巨核细胞白血病。另外的示例性骨髓病症包括但不限于急性早幼粒细胞白血病(APML)、急性骨髓性白血病(AML)以及慢性骨髓性白血病(CML);淋巴恶性肿瘤包括但不限于急性成淋巴细胞性白血病(ALL),所述急性成淋巴细胞性白血病包括B-谱系ALL和T-谱系ALL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、幼淋巴细胞白血病(PLL)、毛细胞白血病(HLL)以及瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia, WM)。恶性淋巴瘤的另外的形式包括但不限于非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)和其变体、外周T细胞淋巴瘤、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、大颗粒淋巴细胞性白血病(LGF)、霍奇金氏病、以及里德-斯坦伯格病(Reed-Stenberg disease)。

[0411] 在某些实施方案中,与Ras相关的疾病是非增殖性疾病。在某些实施方案中,与Ras相关的疾病是RAS病。在某些实施方案中,与Ras相关的疾病是CFC综合征、毛细血管畸形-动静脉畸形综合征、克斯提洛氏综合征、莱吉斯氏综合征、1型神经纤维瘤病、努南氏综合征、或伴有多发性色斑的努南氏综合征(以前的豹皮综合征(LEOPARD syndrome))。

[0412] 药物组合物

[0413] 本文提供了药物组合物,所述药物组合物包含如本文所述的肽和药学上可接受的赋形剂。药物组合物包括用于治疗用途的组合物。这样的组合物可以任选地包含一种或多种另外的治疗活性剂。根据一些实施方案,提供了一种向有需要的受试者施用包含本发明的组合物的药物组合物的方法。在一些实施方案中,向人类施用本发明的组合物。出于本发明的目的,“活性成分”一般指如本文所述的肽。

[0414] 尽管对本文所提供的药物组合物的说明主要是针对用于向人类施用的药物组合物,但是本领域技术人员将了解的是,这些组合物一般适用于向各种各样的动物施用。对于向各种动物施用的药物组合物进行的改动是众所周知的,并且普通技术的兽医药理学家可以仅使用普通(如果有的话)实验来设计和/或进行这样的改动。

[0415] 本文所述的药物组合物可以通过药理学领域已知的或后来开发的任何方法来制备。一般来说,这些制备方法包括以下步骤:使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其它辅

助成分缔合,然后如果需要和/或期望的话,使产物成型 和/或包装成所期望的单剂量单位或多剂量单位。

[0416] 本发明的药物组合物可以作为单一单位剂量和/或作为多个单一单位剂量 被制备、包装、和/或批量出售。如本文所用的“单位剂量”是包含预定量的 活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量一般等于将向受试者施用的 活性成分的剂量和/或这种剂量的适宜部分,例如像这种剂量的一半或三分之一。

[0417] 本发明的药物组合物中活性成分、药学上可接受的赋形剂、和/或任何另 外的成分的相对量将根据所治疗的受试者的身份、体格大小、和/或病症并且 还根据施用所述组合物的途径而变化。举例来说,所述组合物可以包含0.1% 至100% (w/w)的活性成分。

[0418] 如本文所用的药学上可接受的赋形剂包括适合于所期望的特定剂型的任 何和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其它液体媒介物、分散助剂或悬浮助 剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂 等。Remington的《药物科学与实践(The Science and Practice of Pharmacy)》, 第21版,A.R.Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) 公开了用于配制药 物组合物的各种赋形剂以及用于制备其的已知技术。除非 任何常规的载体介质与物质或它的衍生物不相容,如通过产生任何不希望有 的生物效应或在其它方面以有害的方式与药物组合物的一种或多种任何其它 组分相互作用,否则它的使用被设想落入本发明的范围内。

[0419] 在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂是至少95%、96%、97%、98%、99%、或100%纯的。在一些实施方案中,所述赋形剂被批准用于人类 以及供兽医使用。在一些实施方案中,所述赋形剂是由美国食品和药物管理 局(United States Food and Drug Administration)批准的。在一些实施方案 中,所述赋形剂是药物级的。在一些实施方案 中,所述赋形剂符合美国药典 (United States Pharmacopoeia, USP)、欧洲药典 (European Pharmacopoeia, EP)、英国药典 (British Pharmacopoeia) 和/或国际药典 (International Pharmacopoeia)的标准。

[0420] 用于制造药物组合物的药学上可接受的赋形剂包括但不限于惰性稀释 剂、分散剂和/或成粒剂、表面活性剂和/或乳化剂、崩解剂、粘合剂、防腐 剂、缓冲剂、润滑剂、和/或油。这些赋形剂可以任选地被包括在本发明的制 剂中。根据配制人员的判断,诸如可可脂和栓剂蜡的赋形剂、着色剂、包衣 剂、甜味剂、调味剂、以及加香剂可以存在于组合物中。

[0421] 示例性稀释剂包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸二钙、硫酸 钙、磷酸氢钙、磷酸钠、乳糖、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、甘露 糖醇、山梨糖醇、肌醇、氯化钠、干淀粉、玉米淀粉、糖粉、以及其组合。

[0422] 示例性成粒剂和/或分散剂包括但不限于马铃薯淀粉、玉米淀粉、木薯淀 粉、羟基乙酸淀粉钠、粘土、藻酸、瓜尔胶、柑桔浆、琼脂、膨润土、纤维 素以及木制品、天然海绵、阳离子交换树脂、碳酸钙、硅酸盐、碳酸钠、交 联聚(乙烯基吡咯烷酮)(交联维酮)、羧甲基淀粉钠(羟基乙酸淀粉钠)、羧甲基纤维素、交联羧甲基纤维素钠(交联羧甲基纤维素)、甲基纤维素、预胶凝淀粉(淀粉1500)、微晶淀粉水不溶性淀粉、羧甲基纤维素钙、硅酸 镁铝(Veegum)、十二烷基硫酸钠、季铵化合物、以及其组合。

[0423] 示例性表面活性剂和/或乳化剂包括但不限于天然乳化剂(例如阿拉伯树 胶、琼脂、藻酸、藻酸钠、黄蓍胶、克罗珠克(chondrux)、胆固醇、黄原 胶、果胶、明胶、蛋黄、酪蛋

白、羊毛脂、胆固醇、蜡、以及卵磷脂)、胶体粘土(例如膨润土[硅酸铝]和Veegum[硅酸镁铝])、长链氨基酸衍生物、高分子量醇(例如硬脂醇、鲸蜡醇、油醇、三醋精单硬脂酸酯、乙二醇二硬脂酸酯、单硬脂酸甘油酯、以及单硬脂酸丙二醇酯、聚乙烯醇)、卡波姆(例如羧基聚亚甲基、聚丙烯酸、丙烯酸聚合物、以及羧乙烯基聚合物)、角叉菜胶、纤维素衍生物(例如羧甲基纤维素钠、粉状纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素)、脱水山梨糖醇脂肪酸酯(例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯[Tween 20]、聚氧乙烯脱水山梨糖醇[Tween 60]、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯[Tween 80]、脱水山梨糖醇单棕榈酸酯[Span 40]、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯[Span 60]、脱水山梨糖醇三硬脂酸酯[Span 65]、单油酸甘油酯、脱水山梨糖醇单油酸酯[Span 80])、聚氧乙烯酯(例如聚氧乙烯单硬脂酸酯[Myrj 45]、聚氧乙烯氢化蓖麻油、聚乙氧基化蓖麻油、聚氧化亚甲基硬脂酸酯、以及Solutol)、蔗糖脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯(例如克列莫佛(Cremophor))、聚氧乙烯醚(例如聚氧乙烯月桂基醚[Brij 30])、聚(乙烯基-吡咯烷酮)、单月桂酸二乙二醇酯、油酸三乙醇胺酯、油酸钠、油酸钾、油酸乙酯、油酸、月桂酸乙酯、十二烷基硫酸钠、普鲁兰尼克F 68(Pluronic F 68)、泊洛沙姆188(Poloxamer 188)、十六烷基三甲溴化铵、十六烷基氯化吡啶鎓、苯扎氯铵(benzalkonium chloride)、多库酯钠、和/或其组合。

[0424] 示例性粘合剂包括但不限于淀粉(例如玉米淀粉和淀粉糊);明胶;糖(例如蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糊精、糖蜜、乳糖、乳糖醇、甘露糖醇);天然树胶和合成树胶(例如阿拉伯树胶、藻酸钠、爱尔兰藓的提取物、潘沃胶(panwar gum)、茄替胶、车前子壳(isapol husk)胶浆、羧甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素、乙酸纤维素、聚(乙烯基-吡咯烷酮)、硅酸镁铝(Veegum)、以及落叶松阿拉伯半乳聚糖);藻酸盐;聚氧化乙烯;聚乙二醇;无机钙盐;硅酸;聚甲基丙烯酸酯;蜡;水;醇;以及其组合。

[0425] 示例性防腐剂可以包括抗氧化剂、螯合剂、抗微生物防腐剂、抗真菌防腐剂、醇防腐剂、酸性防腐剂、以及其它防腐剂。示例性抗氧化剂包括但不限于 α -生育酚、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基苯甲醚、丁基化羟基甲苯、一硫代甘油、焦亚硫酸钾、丙酸、没食子酸丙酯、抗坏血酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、以及亚硫酸钠。示例性螯合剂包括乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸一水合物、依地酸二钠、依地酸二钾、依地酸、反丁烯二酸、苹果酸、磷酸、依地酸钠、酒石酸、以及依地酸三钠。示例性抗微生物防腐剂包括但不限于苯扎氯铵、苄索氯铵(benzethonium chloride)、苯甲醇、溴硝醇(bronopol)、西曲溴铵(cetrimide)、十六烷基氯化吡啶鎓、氯己定(chlorhexidine)、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲苯酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶(hexetidine)、咪唑烷脒、苯酚、苯氧乙醇、苯乙醇、硝酸苯汞、丙二醇、以及硫柳汞。示例性抗真菌防腐剂包括但不限于对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸、羟基苯甲酸、苯甲酸钾、山梨酸钾、苯甲酸钠、丙酸钠、以及山梨酸。示例性醇防腐剂包括但不限于乙醇、聚乙二醇、苯酚、酚类化合物、双酚、氯丁醇、羟基苯甲酸酯、以及苯乙醇。示例性酸性防腐剂包括但不限于维生素A、维生素C、维生素E、 β -胡萝卜素、柠檬酸、乙酸、脱氢乙酸、抗坏血酸、山梨酸、以及植酸。其它防腐剂包括但不限于生育酚、醋酸生育酚、甲磺酸去铁胺、西曲溴铵、丁基

化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、乙二胺、十二烷基硫酸钠(SLS)、月桂基醚硫酸钠(SLES)、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钾、焦亚硫酸钾、Glydant Plus、Phenonip、对羟基苯甲酸甲酯、Germall 115、Germaben II、Neolone、Kathon、以及Euxyl。在某些实施方案中,防腐剂是抗氧化剂。在其它实施方案中,防腐剂是螯合剂。

[0426] 示例性缓冲剂包括但不限于柠檬酸盐缓冲溶液、乙酸盐缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、氯化铵、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、葡乳醛酸钙、葡庚糖酸钙、葡萄糖酸钙、D-葡萄糖酸、甘油磷酸钙、乳酸钙、丙酸、乙酰丙酸钙、戊酸、磷酸氢钙、磷酸、磷酸三钙、氢氧化钙磷酸盐、乙酸钾、氯化钾、葡萄糖酸钾、钾混合物、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸钾混合物、乙酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钠混合物、氨丁三醇、氢氧化镁、氢氧化铝、藻酸、无热原水、等渗盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、乙醇、以及其组合。

[0427] 示例性润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、二氧化硅、滑石粉、麦芽、山嵛酸甘油酯、氢化植物油、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、亮氨酸、十二烷基硫酸镁、十二烷基硫酸钠、以及其组合。

[0428] 示例性油包括但不限于苦杏仁油、杏仁油、鳄梨油、巴巴苏油、香柠檬油、黑醋栗籽油、琉璃苣油、杜松油、甘菊油、芥花油、葛缕子油、巴西棕榈油、蓖麻油、肉桂油、可可脂油、椰子油、鳕鱼肝油、咖啡油、玉米油、棉籽油、鸕鹚油、桉树油、月见草油、鱼油、亚麻籽油、香叶醇油、葫芦油、葡萄籽油、榛子油、海索草油、肉豆蔻酸异丙酯油、霍霍巴油、库奎坚果油、杂熏衣草油、熏衣草油、柠檬油、山苍子油、澳洲坚果油、锦葵油、芒果籽油、白芒花籽油、貂油、肉豆蔻油、橄榄油、橙油、橙棘鲷油、棕榈油、棕榈仁油、桃仁油、花生油、罂粟籽油、南瓜籽油、油菜籽油、米糠油、迷迭香油、红花油、檀香油、山茶花油、欧洲薄荷油、沙棘油、芝麻油、牛油树脂油、有机硅油、大豆油、向日葵油、茶树油、茴油、山茶油、香根草油、胡桃油、以及小麦胚芽油。示例性油包括但不限于硬脂酸丁酯、辛酸甘油三酯、癸酸甘油三酯、环聚甲基硅氧烷、癸二酸二乙酯、聚二甲基硅氧烷360、肉豆蔻酸异丙酯、矿物油、辛基十二烷醇、油醇、有机硅油、以及其组合。

[0429] 药剂的配制和/或制造中的一般考虑可以见于例如《雷明顿:药物科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)》,第21版,Lippincott Williams&Wilkins,2005中。

[0430] 本文提供的本发明的肽通常被配制成单位剂型以易于施用和保持剂量均匀。然而,将理解的是,本发明的组合物的总每日用量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。用于任何具体的受试者的具体治疗有效剂量水平将取决于包括以下各项的多种因素:所治疗的疾病、病症、或失调以及病症的严重程度;所使用的具体活性成分的活性;所使用的具体组合物;受试者的年龄、体重、一般健康情况、性别以及饮食;施用时间、施用途径、以及所使用的具体活性成分的排泄率;治疗持续时间;与所使用的具体活性成分组合或同时使用的药物;以及医学领域公知的类似因素。

[0431] 本文所提供的肽或其药物组合物可以通过任何途径来施用。在一些实施方案中,所述肽或其药物组合物是通过多种途径施用的,包括口服、静脉内、肌内、动脉内、髓内、鞘内、皮下、心室内、透皮、真皮内、经直肠、阴道内、腹膜内、局部(如通过粉剂、软膏剂、乳膏剂、和/或滴剂)、粘膜、经鼻、颊面、肠内、舌下;通过气管内滴注、支气管滴注、和/或吸入;

和/或以口腔喷雾剂、喷鼻剂、和/或气溶胶的形式。特别设想的途径是全身静脉内注射、经由血液供应和/或淋巴供应进行的区域性施用、和/或向受影响的部位直接施用。一般来说,最适当的施用途径将取决于多种因素,包括药剂的性质(例如它在胃肠道环境中的稳定性)、以及受试者的病症(例如受试者是否能够耐受口服施用)。目前,口腔喷雾剂和/或喷鼻剂和/或气溶胶途径最常被用于将治疗剂直接递送到肺和/或呼吸系统。然而,考虑到药物递送科学方面可能的进展,本发明涵盖了通过任何适当的途径递送本发明的药物组合物。

[0432] 在某些实施方案中,所述肽或其药物组合物可以足以递送以下量的剂量水平施用:每天每公斤受试者体重约0.001mg至约100mg、每天每公斤受试者体重约0.01mg至约50mg、每天每公斤受试者体重约0.1mg至约40mg、每天每公斤受试者体重约0.5mg至约30mg、每天每公斤受试者体重约0.01 mg至约10mg、每天每公斤受试者体重约0.1mg至约10mg、或每天每公斤受试者体重约1mg至约25mg,每天一次或多次,以获得所期望的治疗作用。所期望的剂量可以每天三次、每天两次、每天一次、每隔一天一次、每三天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、或每四周一次递送。在某些实施方案中,所期望的剂量可以使用多次施用(例如两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次、或更多次施用)来递送。

[0433] 应当了解的是,如本文所述的剂量范围提供了有关向成人施用所提供的药物组合物的指导。待向例如儿童或青少年施用的量可以由执业医师或本领域技术人员确定并且可以低于或等于向成人施用的量。实现有效量所需的本发明的肽的确切量将因受试者而异,这取决于例如受试者的物种、年龄、和一般病症、副作用或病症的严重程度、一种或多种具体化合物的特征、施用方式等。

[0434] 在一些实施方案中,本发明涵盖了包含本发明的肽的“治疗混合物”。在一些实施方案中,本发明的肽包含可以与多个靶标结合的单一物质。在一些实施方案中,不同的本发明的肽包含不同的靶向部分物质,并且所有这些不同的靶向部分物质可以与相同的靶标结合。在一些实施方案中,不同的本发明的肽包含不同的靶向部分物质,并且所有这些不同的靶向部分物质可以与不同的靶标结合。在一些实施方案中,这些不同的靶标可以与相同的细胞类型相关。在一些实施方案中,这些不同的靶标可以与不同的细胞类型相关。

[0435] 应当了解的是,本发明的肽和本发明的药物组合物可以用于联合治疗中。待用于联合方案中的治疗(治疗剂或程序)的特定组合将考虑到所期望的治疗剂和/或程序的相容性和待实现的所期望的治疗作用。应当了解的是,所使用的治疗可以为了相同的目的实现所期望的作用(例如可用于检测肿瘤的本发明的缀合物可以与可用于检测肿瘤的另一剂剂同时施用),或它们可以实现不同的作用(例如控制任何不良作用)。

[0436] 本发明的药物组合物可以单独或与一种或多种治疗活性剂组合施用。“与……组合”不意在表示所述药剂必须同时施用和/或被配制用于共同递送,尽管这些递送方法落入本发明的范围内。所述组合物可以在一种或多种其它所期望的治疗剂或医疗程序同时、之前或之后施用。一般来说,每一种药剂将按对于该药剂所确定的剂量和/或时间表来施用。此外,本发明涵盖了将本发明的药物组合物与可以提高它们的生物利用率、减少和/或改进它们的代谢、抑制它们的排泄、和/或改进它们在体内的分布的药剂组合递送。还应当了解的是,这一组合中所利用的治疗活性剂和本发明的肽可以在单一组合物中共同施

用或分别在不同的组合物中施用。

[0437] 用于联合方案中的特定组合将考虑到治疗活性剂和/或程序与本发明的肽的相容性和/或待实现的所期望的治疗作用。应当了解的是,所使用的组合可以对相同的病症实现所期望的作用(例如本发明的肽可以与用于治疗相同病症的另一种治疗活性剂同时施用)和/或它们可以实现不同的作用(例如控制任何不良作用)。

[0438] 如本文所用的“治疗活性剂”指的是作为药物用于治疗、预防、延缓、减轻或改善病症的任何物质,并且指的是可用于治疗,包括预防性治疗和/或治疗性治疗的物质。治疗活性剂还包括提高另一种化合物的作用或有效性,例如通过增强本发明的肽的效力或减少不良作用的化合物。

[0439] 在某些实施方案中,治疗活性剂是抗癌剂、抗生素、抗病毒剂、抗HIV剂、抗寄生虫剂、抗原生动物剂、麻醉剂、抗凝剂、酶抑制剂、类固醇剂、类固醇或非类固醇抗炎剂、抗组胺剂、免疫抑制剂、抗赘生剂、抗原、疫苗、抗体、减充血剂、镇静剂、阿片样物质、镇痛剂、退热剂、节育剂、激素、前列腺素、促孕剂、抗青光眼剂、眼科药剂、抗胆碱能药、镇痛剂、抗抑郁剂、抗精神病药、神经毒素、催眠药、镇定剂、抗惊厥剂、肌肉松弛剂、抗帕金森氏病剂、解痉剂、肌肉收缩剂、通道阻断剂、缩瞳剂、抗分泌剂、抗血栓形成剂、抗凝剂、抗胆碱能药、 β -肾上腺素能阻断剂、利尿剂、心血管活性剂、血管活性剂、血管舒张剂、抗高血压剂、血管生成剂、细胞-细胞外基质相互作用调节剂(例如细胞生长抑制剂和抗粘附分子)、或DNA、RNA、蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白质-受体相互作用的抑制剂/嵌入剂。

[0440] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物可以与可用于治疗、缓解、改善、减轻癌症的一个或多个症状或特征、延缓其发作、抑制其进展、降低其严重程度、和/或减少其发病的任何治疗活性剂或程序(例如手术、放疗)组合施用。

[0441] 试剂盒

[0442] 本文提供了包含本发明的肽中的一种或多种的多种试剂盒。举例来说,本发明提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含本发明的肽和使用说明书。试剂盒可以包含多重不同的肽。试剂盒可以包含任何组合中的许多另外的组分或试剂中的任一种。所有这些不同的组合没有明确阐述,但是每一种组合被包括在本发明的范围内。

[0443] 根据本发明的某些实施方案,试剂盒可以包括例如(i)一种或多种本发明的肽以及任选的待递送的一种或多种特定的治疗活性剂;(ii)有关向有需要的受试者施用的说明书。

[0444] 试剂盒通常包括说明书,所述说明书可以例如包含制备本发明的肽、向有需要的受试者施用本发明的肽、新型的本发明的肽的设计的方案和/或描述病症。试剂盒一般将包括一个或多个器皿或容器以使得单个组分和试剂中的一些或全部均可以被单独容纳。试剂盒还可以包括将单个容器相对封闭地封装以供商业销售的装置,例如塑料箱,其中说明书、诸如泡沫聚苯乙烯的包装材料可以被封装。标识符,例如条形码、射频识别(ID)标签可以存在于试剂盒中或存在于试剂盒上或存在于试剂盒中所包括的器皿或容器中的一个或多个中或其上。标识符可以用于例如唯一识别试剂盒以实现质量控制、库存控制、跟踪、工作站之间的移动的目的。

[0445] 为了可以更充分地了解本文所述的发明,阐述以下实施例。应当了解的是,这些实施例仅是用于说明性目的,而不应当被视为以任何方式限制本发明。

[0446] 实施例

[0447] 为了可以更充分地了解本文所述的发明,阐述以下实施例。应当了解的是,这些实施例仅是用于说明性目的,而不应当被视为以任何方式限制本发明。

[0448] 实验方法

[0449] 一般方法:寡核苷酸引物是从欧陆MWG操纵子公司(Eurofins MWG Operon)或集成DNA技术公司(Integrated DNA Technologies)定购的。含 有三聚体亚磷酰胺的引物是从耶鲁大学凯克寡核苷酸设施(Yale Keck Oligo facility)定购的,是用三聚体亚磷酰胺结构单元(格伦研究公司(Glen Research))合成的。用LongAmp Taq聚合酶(新英格兰生物实验室公司(New England Biolabs))进行PCR并且用PCR净化试剂盒(快而精公司(Qiagen))纯化。用标准方法在大肠杆菌中繁殖质粒并且使用微量制备试剂盒(快而精公司)纯化。用NanoDrop 2000C分光光度计(赛默科技公司(Thermo Scientific))进行吸光度的测量。用装备有Supelco 250mm×10 mm C18柱的Agilent 1200系列仪器进行HPLC。用与Agilent 1100系列四极MSD连接的装备有Agilent 150×2.1mm C18柱的Agilent 1260系列仪器进行LC/MS。在Akta FPLC(阿默舍姆公司/通用电气医疗公司(Amersham/GE Healthcare))上进行凝胶过滤和脱盐。

[0450] 肽合成:在固相上,通过标准的苄基甲氧羰基氯(Fmoc)方法,通常在 30μmol的规模上,使用Rink酰胺树脂来合成肽。通过用N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)中25%的哌啶进行两次10分钟处理,继而用NMP进行四次洗涤来去除树脂结合肽的N末端Fmoc保护基。将Fmoc保护的氨基酸(6当量,以0.19M的最终浓度)与PyClock(5.7当量)和N,N-二异丙基乙胺(DIEA,12当量)预混合,然后在氮气下与树脂一起鼓泡1小时。对于预期困难的偶联(例如在α,α-二取代的氨基酸、β-支链氨基酸、以及脯氨酸之后),进行两次连续的1小时偶联反应。在偶联之后,将树脂在NMP中洗涤四次并且如前所述脱保护。通过用1,2-二氯乙烷(DCE)中10mM的Grubbs I催化剂进行两次2小时处理来进行烯烃复分解。通过将树脂在于NMP中含 10%v/v DIEA的30mg/ml FITC中鼓泡过夜来将FITC添加到肽的N末端上。在合成后,将肽在95%三氟乙酸(TFA)、2.5%三异丙基硅烷(TIS)、以及2.5%H₂O中脱保护和切割,然后通过高效液相色谱(HPLC),使用 10%-100%的乙腈/H₂O(含0.1%TFA)梯度纯化。将收集的级分通过 speedvac和冻干来干燥。

[0451] 圆二色性光谱法:在装备有PTC-348W温度控制器的Jasco J-710分光光度计上进行CD测量。除非另作说明,否则将样品(约190μl)在50mM磷酸钠(pH 8)中以20μM-80μM放置在1mm石英比色皿(用石蜡膜密封)中。对于光谱,在25℃以20nm/min的扫描速度以0.1nm的增量从260 nm到190nm扫描CD。对于熔融曲线,以2℃/分钟的速率使温度从10℃升高到90℃,同时记录222nm的CD。使用Savitzky-Golay滤波器使原始曲线平滑。

[0452] 基质辅助激光解吸/电离:在Waters MALDI Micro MX上进行MALDI。将200pmol的蛋白质在含有0.1%TFA的水中升到20μl,然后与ZipTip μC18尖端结合,用水+0.1%TFA洗涤,然后用50%MeCN+0.1%TFA洗脱。将样品添加到已经用芥子酸于40%MeCN+0.1%TFA中的饱和溶液预点样的金属MALDI板中,然后空气干燥,之后进行分析。

[0453] 文库向酵母中的转化:大体上如由Wittrup和同事所述进行酵母展示方案^{1,2}。通过吸光度(1AU₆₀₀=10⁷个细胞/毫升)定量酵母密度,并且将细胞以 15,000×g沉淀约45秒(在1.5ml微量离心管中)或以2,500×g沉淀3分钟(对于更大的体积)。将线性化的pCTCON2

(1 μ g) 与PCR插入序列(4 μ g) 混合并且通过在水中升到100 μ l, 添加2 μ l的PelletPaint (Novagen 公司), 继而添加10 μ l的4M NH_4Ac , 混合, 然后添加200 μ l的乙醇并且 孵育5分钟来使其沉淀。使DNA沉淀, 用200 μ l的70%乙醇洗涤, 然后用 100%的乙醇洗涤并且空气干燥。将DNA重悬在2 μ l的水中并且储存在4 $^{\circ}\text{C}$ 直到转化为止。将酿酒酵母菌株EBY100(从麻省理工学院(Massachusetts Institute of Technology)的K.Dane Wittrup获得) 在30 $^{\circ}\text{C}$ 培养在YPD培养基 中, 同时以225rpm振荡。将细胞在转化之前传代两次以确保健康的培养物。在转化当天, 将细胞在110ml的YPD培养基中稀释到0.1的 OD_{600} 并且 培养直到 $\text{OD}_{600}=1.4$ 为止, 此时添加1ml的Tris-DTT缓冲液(于1M Tris (pH 8) 中2.5M的DTT)。在再振荡15分钟之后, 使细胞沉淀, 重悬在 50ml的10mM Tris、270mM蔗糖、1mM MgCl_2 (pH 7.5) 中, 再次沉淀, 并且用另外的25ml相同缓冲液洗涤。用缓冲液将细胞重悬到约600 μ l的最终体积, 然后与沉淀的文库DNA(每50 μ l的细胞1 μ g载体/4 μ g插入序列) 混合并且孵育10分钟, 之后在GenePulser II电穿孔仪(伯乐公司(Bio- Rad))中以0.54kV、25 μ F进行电穿孔。将细胞立即拯救到30ml预热的 30 $^{\circ}\text{C}$ YPD中, 转移到30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡器中, 持续60分钟, 然后沉淀并且重悬在补充有氨苄西林(ampicillin) 和卡那霉素(kanamycin)的SDCAA培养基中。将系列稀释液接种到SDCAA板上以确定文库转化效率。对于使用易错PCR 产生文库模板, 如Chao等¹中所述使用利用dPTP和8-氧代-dGTP的Zaccolo 等³的方法。

[0454] 通过MACS筛选酵母文库: 将酵母文库培养在SDCAA培养基中, 然后 在分选之前20小时-24小时传代到SGCAA培养基中。使酵母(最多 5×10^9 个细胞) 沉淀, 用MACS缓冲液(15mM磷酸钠(pH 7.4)、150mM NaCl、5mM KCl、0.5%w/v BSA) 洗涤, 然后在室温以 10^9 个细胞/毫升的密度与生物素化的Ras一起孵育45分钟-60分钟, 之后沉淀, 用缓冲液洗涤, 并且重悬在1ml缓冲液中。添加抗生素微珠(50 μ l, 美天旎公司 (Miltenyi)) 并且在4 $^{\circ}\text{C}$ 使细胞旋转30分钟, 然后在AutoMACS仪器(美 天旎公司) 上, 使用Posse1_s程序分离。将洗脱的细胞重悬在SDCAA中并 且将1/100的稀释液接种到SDCAA上以估算保留细胞的数目。

[0455] 通过FACS筛选酵母文库: 将酵母文库培养在SDCAA培养基中, 然后 在分选之前20小时-24小时传代到SGCAA培养基中。使酵母细胞沉淀, 用 FACS缓冲液(15mM磷酸钠(pH 7.4)、150mM NaCl、5mM KCl、0.1% w/v BSA) 洗涤, 然后在室温与生物素化的Ras一起孵育45分钟-60分钟, 之后沉淀, 用缓冲液洗涤, 并且重悬在每 10^7 个细胞100 μ l的缓冲液中。除非[Ras]的浓度低于100nM, 否则以 10^7 个细胞/毫升的密度进行Ras孵育; 在这种情况下, 选择结合体积以使得存在每个酵母细胞至少500,000个Ras分子(按照Chao等¹的准则)。然后添加二级试剂(抗HA Alexa488(1:200稀释)、以及SA-PE、SA-APC、或NA-PE(1:100稀释)) 并且在4 $^{\circ}\text{C}$ 在暗处 孵育10分钟, 之后沉淀, 洗涤, 并且重新沉淀。在即将分选之前, 将细胞在FACS缓冲液中重悬到 2×10^7 个细胞/毫升的近似密度。

[0456] Ras蛋白质的表达和纯化: 将Ras蛋白质与C末端His₆和yBBr标签一 起在大肠杆菌BL21 Rosetta I pLysS细胞中重组表达。质粒骨架的特征是未知的(亲本KRas载体最初是从Johannes Yeh获得的), 但是可能是pET衍生的, 具有氨苄西林抗性。将细胞培养到 $\text{OD}_{600}=0.7$, 在30 $^{\circ}\text{C}$ 用0.3mM IPTG 诱导5小时, 然后收集并且在4 $^{\circ}\text{C}$ 重悬在50mM Tris(pH 7.5)、300mM NaCl、10mM咪唑、5mM MgCl_2 中, 之后快速冷冻在液氮中。对于纯化, 将沉淀物解冻, 在相同的缓冲液中升到40ml, 并且与Roche Complete无 EDTA蛋白酶抑制剂片剂混合。将细胞用尖端超声波仪(VirSonic, 以6.5功率水平开10秒、关15秒的6次循环) 裂解, 然后以30,

000×g沉淀30分钟 并且经由1.2μM的Supor膜(颇尔公司(Pall Corporation))过滤。将澄清的裂解物添加到已经用裂解缓冲液平衡的2ml的HisPur钴树脂(赛默皮尔斯公司(Thermo Pierce))中并且通过重力排放。将柱用20ml缓冲液洗涤,然后用含有150mM咪唑的约5ml的缓冲液洗脱蛋白质。在从柱洗脱后立即添加DTT达到约1mM的最终浓度并且添加蛋白酶抑制剂的一小部分(从裂解步骤保留)。将蛋白质在Centriprep YM-10(密理博公司(Millipore))中浓缩到2ml并且通过在Superdex 75 10/300柱(通用电气医疗公司)上进行凝胶过滤到50mM Tris (pH 7.4)、100mM NaCl、5mM MgCl₂、1mM DTT 中来纯化。对于长期储存,将蛋白质浓缩到>100μM,与甘油混合到10%,并且快速冷冻在液氮中并且储存在-80℃。

[0457] 按照相同的方案使Rap1a、RalA、以及Rab25表达并且纯化。将Rap1a 和RalA克隆到与用于Ras蛋白质的载体相同(His₆/yBBr标记)的载体中;使His₆标记的Rab25由pET载体表达。

[0458] 用小牛肠碱性磷酸酶进行的核苷酸交换:对于酶促核苷酸交换,通过在 Superdex 75 10/300柱上凝胶过滤到32mM Tris (pH 8)、200mM (NH₄)₂SO₄、1mM DTT、0.5mM NaN₃、1μM ZnCl₂中来对Ras蛋白质进行缓冲液交换。将蛋白质浓缩到>100μM,然后与GppNHp或GppCp混合到0.5mM-1.0mM,继而与10单位-20单位的小牛肠碱性磷酸酶(新英格兰生物实验室公司)混合。将蛋白质在室温孵育30分钟,然后添加MgCl₂达到5 mM并且如前所述将蛋白质凝胶过滤到50mM Tris (pH 7.4)、100mM NaCl、5mM MgCl₂、1mM DTT中。对于随后GTP或GDP的交换,在室温将负载GppCp的Ras蛋白质在10mM EDTA存在下与50倍-100倍过量的所期望的核苷酸一起孵育30分钟,之后添加MgCl₂达到20mM并且照常通过凝胶过滤去除过量的核苷酸。

[0459] 通过HPLC定量核苷酸负载:将Ras蛋白质(约2nmol)用超纯水升到150μl,然后与150μl的100mM磷酸钾(pH 6.5)、10mM的四丁基溴化铵混合。通过反相HPLC(Supelco半制备型C18柱),在100mM磷酸钾(pH 6.5)、10mM四丁基溴化铵、7.5%乙腈中使用20分钟等度运行来分析样品。用纯的核苷酸(西格玛奥德里奇公司(Sigma Alrich))确定GDP、GTP、以及GppNHp的洗脱时间。

[0460] B-Raf RBD的纯化:使Raf RBD与N末端谷胱甘肽S-转移酶(GST)标签一起在大肠杆菌BL21 Rosetta I pLysS细胞中重组表达。将RBD的基因亚克隆到Johannes Yeh的pGEX-5X质粒(通用电气医疗公司)中。将细胞培养到OD₆₀₀=0.7,在30℃用0.3mM IPTG诱导5小时,然后收集并且重悬在裂解缓冲液(PBS+1mM DTT和0.5mM EDTA)中,之后快速冷冻在液氮中。对于纯化,将沉淀物解冻,在相同的缓冲液中升到40ml,并且与Roche Complete无EDTA蛋白酶抑制剂片剂混合。将细胞用尖端超声波仪(VirSonic,以6.5功率水平开10秒、关15秒的6次循环)裂解,然后以30,000×g沉淀30分钟并且经由1.2μM的Supor膜(颇尔公司)过滤。将澄清的裂解物添加到已经用裂解缓冲液平衡的2ml固定的谷胱甘肽树脂(赛默皮尔斯公司)中并且通过重力排放。将柱用20ml缓冲液洗涤,然后用50 mM Tris (pH 8.0)、10mM还原型谷胱甘肽、1mM DTT、0.5mM EDTA洗脱蛋白质。将样品在Centriprep YM-10(密理博公司)中浓缩到2ml并且通过在Superdex 200 10/300柱(通用电气医疗公司)上凝胶过滤到50mM Tris (pH 7.4)、100mM NaCl、5mM MgCl₂、1mM DTT中来纯化。对于长期储存,将蛋白质浓缩到>100μM,与甘油混合到10%,并且快速冷冻在液氮中并且储存在-80℃。

[0461] Sfp磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的纯化:将Sfp在大肠杆菌BL21细胞中 由从Christopher Walsh(哈佛医学院(Harvard Medical School))获得的 pET29-Sfp载体重组表达。将细胞培养到 $OD_{600}=0.7$,在25℃用1mM IPTG 诱导6小时,收集并且重悬在50mM磷酸钠(pH 7.5)、300mM NaCl、10 mM咪唑中,之后快速冷冻在液氮中。如上文对于Ras蛋白质所述,通过钴 亲和色谱法纯化蛋白质。将纯化的蛋白质在Superdex 75 10/300柱(通用电气医疗公司)上凝胶过滤到10mM Tris(pH 7.5)、1mM EDTA、10%甘油 中。将在约15ml时的峰的情况下洗脱的级分汇集,分成等分试样,快速冷 冻在液氮中,并且储存在-80℃。

[0462] 生物素-辅酶A(LK04)的合成:将辅酶A(西格玛-奥德里奇公司,于 杜氏磷酸盐缓冲盐水(Dulbecco's phosphate-buffered saline)中10mM)与1 当量的生物素-Peg₂-顺丁烯二酰亚胺(赛默皮尔斯公司,于50mM Tris(pH 7)中20mM)混合,继而与0.2当量的TCEP(西格玛-奥德里奇公司,于水 中0.5M)混合。将反应物在室温孵育2小时,然后通过HPLC,使用20分 钟的于含0.1%TFA的水中0%-40%的MeCN梯度纯化。

[0463] Alexa647-辅酶A(LK06)的合成:将辅酶A(西格玛-奥德里奇公司, 于杜氏磷酸盐缓冲盐水中10mM)在50mM Tris(pH 7)中稀释到5mM, 然后添加TCEP达到7.5mM(3μl的500mM原液)。在5分钟之后,将1 mg的Alexa647-C2-顺丁烯二酰亚胺(生命技术公司(Life Technologies)) 溶解在34μl的DMSO中并且添加到反应物中,并且在暗处在室温孵育45 分钟,之后用500μl的milliQ稀释反应物并且通过HPLC,使用20分钟的 于含0.1%TFA的水中0%-60%的MeCN梯度纯化。

[0464] 通过Sfp磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶进行的蛋白质标记:将纯化的Ras 在Superdex 75 10/300柱上凝胶过滤到64mM Tris(pH 7.5)、5mM MgCl₂、1mM DTT中。将Ras (50μM-150μM)与1.0当量-1.3当量的辅酶A接头 (LK04或LK06)混合,继而与Sfp混合到3μM-5μM。将反应物在室温孵 育1小时,然后如前所述凝胶过滤到50mM Tris(pH 7.4)、100mM NaCl、5mM MgCl₂、1mM DTT中。

[0465] 225肽的重组产生:将pET30a(Novagen公司)用NcoI-HF和XhoI(新 英格兰生物实验室公司)消化并且与含有具有5'NcoI位点和3'XhoI位点的 肽序列的PCR片段连接。为了将ORF穿梭到氨苄西林抗性质粒中(由于表 达菌株相容性原因),将这一质粒用XbaI和XhoI(新英格兰生物实验室公 司)消化并且将插入序列亚克隆到pET19b载体(Novagen公司)中。将所得 的质粒转化到含有pG-KJE8质粒(Clontech公司)的BL21细胞中,该pG- KJE8质粒带有处在阿拉伯糖诱导型启动子控制下的dnaK、dnaJ、grpE、GroEL、以及GroES分子伴侣。将细胞在37℃在LB培养基中培养到约0.7 的 OD_{600} ,然后在30℃用500μM的IPTG和200mg的阿拉伯糖诱导5小 时。使细胞以5,000×g沉淀15分钟,重悬在50mM磷酸钠(pH 7.5)、1000mM NaCl、10mM咪唑中,并且快速冷冻。在4℃进行所有后续步骤。将沉淀物解冻并且与无EDTA蛋白酶抑制剂(罗氏公司(Roche))混合,用尖端超声波仪(VirSonic,以6.5功率水平开10秒、关15秒的6次循环)裂解,然后以30,000×g沉淀30分钟并且经由1.2μM的过滤器过滤。将澄 清的裂解物与2ml的钴树脂(赛默皮尔斯公司)一起摇动30分钟,然后转 移到柱中并且通过重力排放。将树脂用约20ml的裂解缓冲液洗涤,然后用 含有350mM咪唑的裂解缓冲液洗脱融合蛋白。将DTT和EDTA连同蛋白酶 抑制剂(罗氏公司)一起分别添加到1mM和0.5mM的浓度。将洗脱的蛋白 质浓缩到2ml,使用两个串联的5ml HiTrap脱盐柱(通用电气医疗公 司)缓 冲液交换到50mM Tris(pH 8)、250mM NaCl、1mM DTT、0.5mM EDTA 中,然后在室温用

TEV蛋白酶切割过夜。使切割反应物通过两个串联的 SepPak经典型C18筒(沃特世公司(Waters))以结合肽,将筒用水+0.1% TFA洗涤,然后用75%MeCN+0.1%TFA洗脱肽。在通过speedvac浓缩之后,通过HPLC,使用于含0.1%TFA的H₂O中10%-100%的乙腈梯度纯化肽。将收集的级分通过speedvac和冻干来干燥。

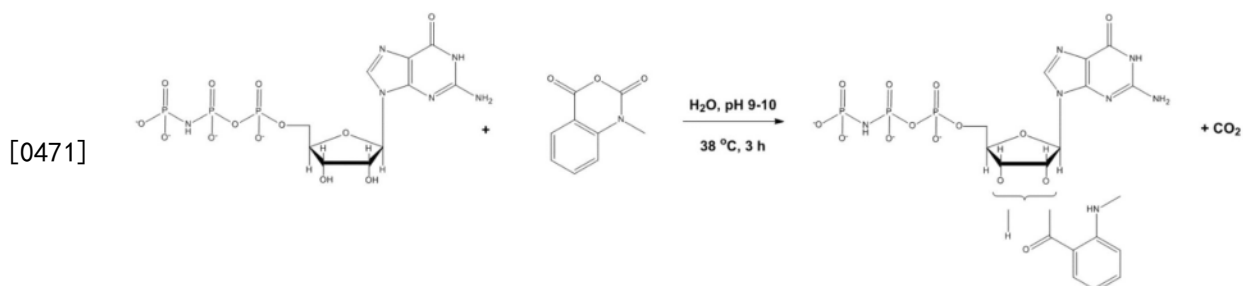
[0466] 用FITC标记肽:将HPLC纯化的肽在DMSO中稀释到250μM-500 μM,然后从于50mM Tris (pH 7) 中5mM的TCEP原液添加2当量的 TCEP。在室温孵育5分钟之后,从于DMSO中2.5mM的原液添加2当量的 N-(5-荧光素基) 顺丁烯二酰亚胺,并且在室温在暗处将反应物孵育30分钟。将样品通过添加50%MeCN+0.1%TFA淬灭,然后通过如用于未标记的肽的 HPLC纯化。

[0467] 用生物素标记肽:将HPLC纯化的肽在DMSO中稀释到250μM-500 μM,然后从于50mM Tris (pH 7) 中50mM的TCEP原液添加2当量的 TCEP。在室温孵育5分钟之后,从于50mM Tris (pH 7) 中20mM的原液 添加2当量的生物素-PEG₂-顺丁烯二酰亚胺(赛默皮尔斯公司),并且在暗处将反应物在室温孵育30分钟。将样品通过添加50%MeCN+0.1%TFA淬灭,然后通过如用于未标记的肽的HPLC纯化。

[0468] 荧光偏振:将FITC标记的肽在50mM Tris (pH 7.4)、100mM NaCl、5mM MgCl₂、1mM DTT中稀释到30nM,然后添加到被分配到384孔黑色 微孔板(康宁公司(Corning))中的40μl的2×蛋白质原液(于相同的缓冲液中)中。将板在室温静置45分钟,然后在SpectraMax M5(分子装置公司(Molecular Devices))上以485nm的激发波长、525nm的发射波长、515nm的截止波长、PMT高、100次读数、慢进板速度、以及500毫秒的建立稳定时间记录荧光各向异性。按一式三份制备每一个浓度点,并且将每一个孔读数两次(并且取平均值)。使用Prism(Graphpad公司)对数据进行作图并且与具有希尔系数(hill coefficient)的单位点特异性结合模型拟合。

[0469] mant核苷酸的合成:如由Hiratsuka⁴所述进行mGppNHp和mGDP的合成。在圆底烧瓶中将20μmol的鸟苷5'-[β,γ-亚氨基]三磷酸三钠盐合物(GppNHp)或鸟苷二磷酸(GDP)(西格玛公司)溶解在1000μl的超纯水中,并且用1M NaOH将pH值调节到约9.5。将溶液在水浴中加热到38℃,并且经过1小时分四份添加N-甲基靛红酸酐(65μmol,3.25当量,奥德里奇公司,压成细粉),同时搅拌并且用1M NaOH将pH值维持在9-10。在3小时之后,添加1M HCl以将pH值降低到约7并且终止反应,并且将管在冰上孵育以使过量的N-甲基靛红酸酐沉淀,然后以最大速度离心5分钟。去除上清液,然后通过HPLC,使用于含0.1%TFA的H₂O中0%-60%的乙腈梯度纯化粗产物。通过speedvac和冻干将收集的级分干燥,并且通过吸光度(在pH 7, ε₂₅₂=21500)定量。使用碱性磷酸酶将这些核苷酸负载到Ras蛋白质上,如上文对于它们的未标记的对应物所述。

[0470] 用于合成mantGppNHp的一般方案提供于下文中。将GppNHp在38℃溶解在超纯水中,并且使用NaOH将pH值调节到约9.5,然后分批添加N-甲基靛红酸酐(3当量),同时通过定期添加NaOH将pH值维持在9至10。在3小时之后,用HCl终止反应并且在冰上使产物沉淀,之后通过HPLC纯化。



[0472] mant核苷酸解离实验:向黑色96孔板(康宁公司)的孔中添加100 μ l 含有2 μ M Raf或肽的缓冲液(50mM Tris (pH 7.4)、100mM NaCl、5mM MgCl₂、1mM DTT),继而添加50 μ l的2 μ M负载mant核苷酸的Ras蛋白质。在暗处在室温孵育10分钟之后,添加50 μ l的2.6mM未标记的核苷酸的原液以达到500nM Ras、1 μ M Raf或肽、以及0.65mM未标记的核苷酸的最终浓度。使用多通道移液管对孔进行混合,然后在2小时的过程中用 SpectraMax M5(分子装置公司)跟踪mant荧光,每30秒记录六次读数(激发波长370nm、发射波长450nm、截止波长435nm)。

[0473] 表面等离子体共振:将生物素化的KRas (GppNHp或GDP)在Biacore 运行缓冲液(50mM Tris (pH 7.4)、100mM NaCl、5mM MgCl₂、2mM DTT+0.02%Triton X-100,经过过滤和脱气,对于含有GppNHp的蛋白质样品,含有1 μ M的GppNHp)中稀释到50nM并且用Biacore X100 SPR系统(通用电气医疗公司)固定在链霉亲和素CAPture芯片上,所述系统已经用缓冲液灌注三次并且通过用CAPture再生溶液处理3 $\times$ 60秒来调节。记录具有180秒结合和900秒稳定化的单循环运行,在分析步骤之前的每一个再生步骤之后用缓冲液洗涤。定制参数如下:捕捉1:300秒,以2 μ l/分钟,120秒稳定化;捕捉2:45秒,以5 μ l/分钟,180秒稳定化,样品:30 μ l/分钟,再生:120秒,以10 μ l/分钟,60秒稳定化。首先进行一个启动循环和两个空白循环以进行背景减除,然后以1.23nM、3.7nM、11nM、33 nM、以及100nM的225-3肽进行样品注入,所述肽是从225-3于5mM NaOH中新鲜溶解和定量的样品制备的。在无盖Biacore管(通用电气医疗公司)中制备所有样品。通过仪器软件,使用两步结合模型处理和分析数据。

[0474] Capan-1细胞裂解物中的沉降测定:从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)获得Capan-1腺癌细胞并且使用75cm²培养烧瓶(Falcon公司)将所述细胞在37 $^{\circ}$ C(在5%CO₂下加湿的气氛)培养在含有20%胎牛血清和1 $\times$ 抗生素/抗霉菌剂(anti-anti,Gibco公司)的伊氏改良杜氏培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium,IMDM)中。将两个烧瓶中的细胞培养到约90%汇合,在37 $^{\circ}$ C胰蛋白酶消化15分钟,沉淀,用冷PBS洗涤,然后通过50mM HEPES (pH 7.5)、100mM NaCl、10 mM MgCl₂、1mM EDTA、5mM DTT、1%v/v Triton X-100、以及5 $\times$ HALT 蛋白酶抑制剂(赛默公司)中孵育10分钟来裂解。在台式离心机中将细胞以 16,000 $\times$ g沉淀10分钟,然后将上清液快速冷冻并且储存在-80 $^{\circ}$ C。在沉降当天,将裂解物解冻并且在只含有0.01%v/v Triton X-100的裂解缓冲液中10倍稀释(高洗涤剂浓度会干扰Ras-肽相互作用)。在4 $^{\circ}$ C进行所有后续步骤。对于肽沉降,将裂解物与模拟物或Raf RBD(3 μ M)一起预孵育10分钟,之后添加生物素化的225-3(5 μ M)并且孵育45分钟,继而添加已经在室温用含有0.1mg/ml BSA的杜氏PBS封闭10分钟的50 μ l链霉亲和素 MyOne T1 Dynabeads(生命技术公司)。使样品旋转30分钟,然后用磁体收集珠粒,并且用3 $\times$ 400 μ l的含有0.1%v/v Triton X-100的裂解缓冲液洗涤。通过

在SDS上样缓冲液中煮沸5分钟,然后在台式离心机中以 $16,000 \times g$ 沉淀来从珠粒洗脱样品。对于Raf RBD沉降,将裂解物与模拟物或肽($10 \mu M$)一起预孵育10分钟,之后添加GST标记的Raf RBD ($5 \mu M$)和 $50 \mu l$ 的谷胱甘肽琼脂糖珠粒(赛默公司)并且旋转60分钟。通过经过过滤柱(赛默公司)旋转来去除上清液并且用含有 $0.1\% v/v$ Triton X-100的 $3 \times 400 \mu l$ 的裂解缓冲液洗涤珠粒。通过在SDS上样缓冲液中浸泡5分钟,然后在台式离心机中以 $16,000 \times g$ 沉淀并且煮沸5分钟来从珠粒洗脱样品。使样品在 10% SDS-PAGE凝胶上在 $150V$ 进行电泳45分钟,然后使用蛋白质印迹室(英杰公司(Invitrogen))在 $50V$ 在 $15mM$ Tris、 $192mM$ 甘氨酸、 20% 甲醇中转移到 $0.45 \mu m$ 的硝化纤维素膜(华特门公司(Whatman)),持续45分钟。将膜用含 5% 脱脂奶粉的含 $0.1\% v/v$ Tween-20的tris缓冲盐水(TBS/T)封闭1小时,用TBS/T洗涤,然后在 $4^\circ C$ 在含 5% BSA的TBS/T中与抗Ras兔 mAb(细胞信号转导公司(Cell Signaling),编号:3339)的 $1:1000$ 稀释液一起孵育过夜。第二天,将膜用TBS/T洗涤,在室温与抗兔HRP缀合物(细胞信号转导公司)一起孵育1小时,再次洗涤,然后用SuperSignal West Pico 化学发光成像试剂(赛默公司)和BioMax Light胶片(柯达公司/锐珂医疗公司(Kodak/Carestream Health))可视化。

[0475] 核磁共振:为了制备 ^{15}N 标记的KRas或肽,将细胞培养在含有 $1g/l$ 的 $^{15}NH_4Cl$ 的基本培养基中并且如对于未标记的蛋白质所述来使其表达。如上文所述将KRas和225-1纯化,然后缓冲液交换到NMR缓冲液($50mM$ HEPES (pH 7.4)、 $50mM$ NaCl、 $2mM$ $MgCl_2$ 、 $2mM$ TCEP、 $0.1mM$ EDTA、 0.02% NaN_3)中。将Ras和肽以 $<50 \mu M$ 混合以避免聚集,然后浓缩到 $100 \mu M$ - $200 \mu M$,与 $1/19$ 体积的 D_2O (5% 的最终浓度)混合,经由 $0.45 \mu m$ 膜过滤,然后添加到Shigemi BMS-3NMR样品管中。在 $700MHz$ Bruker(装备有冷冻探针)上,使用TROSY在 $298K$ 进行NMR实验。将数据使用NMRpipe处理并且使用NMRview可视化。

[0476] 还原测试:将肽溶解在缓冲液中并且与 $0mM$ 、 $5mM$ 、或 $50mM$ DTT一起孵育,之后通过反相HPLC分析。还原的肽比氧化的肽更早洗脱,如通过对样品进行LC/MS分析所确定。

[0477] 复合物形成、结晶以及数据收集:通过将K-Ras与 1.2 倍摩尔过量的RDA肽以 $25 \mu M$ K-Ras的浓度在 $20mM$ Tris (pH 8.0)、 $50mM$ NaCl、 $5mM$ $MgCl_2$ 中混合来形成K-Ras/RDA复合物。孵育1小时之后,通过尺寸排阻色谱法纯化复合物。在将 $0.5 \mu l$ 的复合物(于 $20mM$ Tris (pH 8.0)、 $50mM$ NaCl、 $5mM$ $MgCl_2$ 中 $9mg/ml$)和含有 $0.3M$ 氯化钙和 23% (w/v) PEG 3350的 $0.5 \mu l$ 的储液混合之后使K-Ras与RDA1和GMP-PNP的复合物的晶体生长。使用与含有 $0.1M$ - $0.2M$ 硫酸铵、 20% - 22% PEG 3350的 $1 \mu l$ 的储液混合的 $0.5 \mu l$ 复合物($11.5mg/ml$)使K-Ras/RDA2/GMP-PNP复合物结晶。在 $20^\circ C$ 通过坐滴蒸气扩散使所有晶体生长。对于冷冻保护,将所有所收集的晶体在补充有 20% 甘油的储液中短暂孵育,之后快速冷冻在液氮中。在先进光子源(Advanced Photon Source)处的24-ID光束线下收集所有的衍射数据,并且用XPD和HKL2000套件处理所述数据。

[0478] 结构确定和精修:K-Ras/RDA1/GMP-PNP复合物在P21的空间群中结晶,在不对称单位中具有四个分子。K-Ras/RDA2/GMP-PNP复合物也在P21的空间群中结晶,但是在不对称单位中具有单个分子。使用先前确定的K-Ras结构(PDB登录号:3GFT)作为搜索模型用PHASER进行分子置换来确定这两个结构。经由在Coot中的手动模型构建的迭代循环和使用REFMAC的结构精修来构建RDA肽模型。使用PHENIX分别以 $2.15 \text{ \AA}$ 和 $1.7 \text{ \AA}$ 精修最终模型,并且通过MolProbity验证。

[0479] 活细胞共聚焦显微术:将人类肿瘤细胞系(例如H358或HPAF-II)于补充有10%胎牛血清的DMEM培养基中接种到LabTek II培养室中并且在37℃ 在标准细胞培养条件下培养过夜。第二天,将培养基更换成含有5μM荧光素标记的肽的培养基并且在37℃孵育4小时。将细胞洗涤,用NucBlue Hoechst 33342和葡聚糖10k Alexa647染色,然后在共聚焦显微镜上成像。用488nm激光使荧光肽可视化并且以绿色示于图34A和图34B中。

[0480] 实施例1:Ras结合肽表征和Ras-肽晶体结构

[0481] 结合亲和力:通过荧光偏振实验测定肽对K-Ras的结合亲和力。以下是所使用的肽的序列以及所测量的它们的解离常数。

肽	肽序列	K _d
RDA1	GPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA	17nM
RDA2	GPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA	8nM
RDA3	GRRPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA	6nM

[0483] 还原测试:这是可以区分氧化(二硫键交联)的肽二聚体与还原(非交联)的肽单体的HPLC测定。通过添加5mM或50mM的DTT(一种比细胞环境强得多的还原剂),观测到含有硒代半胱氨酸的肽二聚体不能被还原,这不同于它们的含有半胱氨酸的类似物(参见图31)。

[0484] Ras-RDA结构:图32示出了在2.2埃的分辨率下的总体结构。图32还示出了所鉴定的主螺旋和关键结合残基。

[0485] 实施例2:用于Ras结合肽的酵母展示筛选

[0486] 我们采取两种策略来鉴定结合Ras效应子结构域的肽,这两者均涉及通过酵母表面展示筛选大的肽文库。我们的第一种方法是筛选基于没有已知的结合Ras的能力的小肽支架的天然文库。这些文库被设计成含有尽可能多的结构多样性,同时保持稳定的构象。我们的第二种方法是筛选基于已知结合Ras效应子结构域的蛋白质的结构域的文库。在这种情况下,筛选的目标是鉴定结构域的稳定化突变体,所述结构域能够在不存在由它的亲本蛋白提供的支架的情况下结合Ras。

[0487] 文库支架选择:为了鉴定天然文库的候选支架,我们搜索蛋白质数据库(Protein Data Bank)中具有1000Da至5000Da的质量的多肽,所述多肽的X射线或核磁共振(NMR)结构是可获得的。我们手动组织结果以基于结构稳定性选择肽,所述结构稳定性无论是由非共价相互作用还是由共价相互作用(例如二硫键)所提供。螺旋禽胰多肽(aPP,PDB:1PPT)被选用于初步的研究。

[0488] 禽胰多肽(aPP)是最初从鸡的胰腺中分离的一种具有32个氨基酸的微型蛋白。它的结构由N末端II型聚脯氨酸(PPII)螺旋、I型β-转角、以及C末端α-螺旋组成。aPP在溶液中形成头对尾同二聚体,所述同二聚体通过来自螺旋和环这两者的残基之间的分子间接触稳定化。PPII与α-螺旋之间的分子内疏水性相互作用使aPP单体稳定化成具有相对高的稳定性(熔融转变(T_m)约62℃)的明确限定的折叠,所述相对高的稳定性是对于支架来说一种有吸引力的特性,这是因为高的热稳定性已经被证实提高一些蛋白质的进化性。Schepartz和同事证实来自各种蛋白质的α-螺旋的残基可以被移植到aPP的α-螺旋的暴露面上以得到保留结合原始蛋白质的靶标的能力的嵌合蛋白。举例来说,Zondlo等将来自酵母转录因子GCN4的DNA结合域的残基移植到aPP支架上以产生能够以低纳摩尔亲和力结合

GCN4半位点的微型蛋白。在另一种情况下,Kritzer等将来自p53的hDM2结合域的残基移植到 aPP上,然后施加诱变和筛选以提高所得的肽的亲合力。

[0489] Schepartz和同事还证实可以通过将多个残基用精氨酸置换来赋予aPP以细胞穿透特性,所述精氨酸已知在一些背景下提高细胞摄取。在一种情况下,Daniels等将来自PPII螺旋和 β -转角的残基用精氨酸取代以得到以1 μ M的浓度穿透HeLa细胞并且不被隔离在内体中的肽。在一项独立的研究中,Smith等将来自 α -螺旋的残基用精氨酸置换以产生也以1 μ M穿透HeLa细胞的肽,尽管肽的显著部分仍定位到内体。这种细胞穿透的潜力、以及稳定的二级结构和确立的工程化实施例使得aPP成为用于Ras靶向文库的筛选和进化的有吸引力的支架。

[0490] 这些细胞穿透研究的一个重要的注意事项是虽然aPP突变体保留它们的aPP折叠,如通过圆二色性(CD)光谱法所确定,但是它们是通过精氨酸的引入而被去稳定。由于预测不太稳定的支架在丧失它的折叠之前容许更少的突变,因此所得文库的更小部分将具有限定的构象。我们因此试图鉴定包含被证实赋予细胞渗透性,但是不损害支架的稳定性的精氨酸取代中的一些的aPP突变体。由于我们的目的是使用 α -螺旋表面进行随机化,因此我们集中在含有六个精氨酸突变的来自PPII-展示的精氨酸系列的最具细胞穿透性的肽。对aPP晶体结构的检查表明所述突变残基中的三个与肽内其它氨基酸形成潜在稳定化接触。为了测试这些残基促成大部分的去稳定作用的假设,我们合成了aPP突变体aPP-M,它保持这些位置不变(野生型),而使其余三个突变成精氨酸(关于序列,参见图4)。为了评估这种肽的稳定性,我们将它的CD谱和熔融曲线与aPP的一起记录(图3)。我们将这两种肽在作为 α -螺旋的末端的第32个氨基酸之后截短。这两种肽在25 $^{\circ}$ C的CD谱几乎是相同的并且与文献中公开的那些相一致,这表明总体构象保持不变。出乎意料的是,aPP-M的 T_m 相对于aPP升高,从64.5 $^{\circ}$ C升高到>77 $^{\circ}$ C。这种额外的稳定性的来源不是完全明确的,尽管已知精氨酸可以在PPII螺旋的背景下具有稳定化作用。由于它的提高的稳定性和精氨酸含量,因此我们使用aPP-M突变体作为酵母展示文库的支架。

[0491] 应对细胞中二硫键的不稳定性的最实用的方式是将二硫键用更稳定的接头置换。一种可能将是并入二硒键,所述二硒键与二硫键是电子等排的,但是具有使得它对人类细胞的还原环境保持稳定的氧化还原电位。Craik和同事已经证实这些取代能够提高芋螺毒素的稳定性而不干扰它们的结构。第二个选择方案将是将二硫键用非天然接头置换,如用于“钉接肽”的全烃桥。这可以潜在地比二硫键或二硒键更稳定(因为它不能被还原),并且可以促进细胞穿透,但是不会是电子等排的。此外,没有公开的用这些接头使 β 结构稳定的先例,因此将可能需要方法的开发以优化合成、反应条件、接头长度和组成等。

[0492] 靶蛋白制备:靶蛋白必须被标记以用于酵母展示研究,以使得它们可以在细胞表面上被检测到。这通常是通过将靶蛋白生物素化并且使用用于磁激活细胞分选(MACS)的链霉亲和素珠粒或用于FACS的链霉亲和素-荧光团缀合物来实现的。这种方法的一个缺点是能够结合链霉亲和素的肽可能产生假阳性,如果它们的亲和力足够高的话,可能竞争过真正的靶标结合剂。对于这些次级结合序列的选择可以部分地通过利用不同的生物素结合剂来抑制,例如用与抗生物素抗体缀合的珠粒进行MACS,继而在中性亲和素-藻红蛋白(NA-PE)与链霉亲和素-别藻蓝蛋白(SA-PE)之间交替进行FACS。对于我们的初始文库筛选和定向进化工作,我们采用这种方法,尽管我们确实屡次遇到了次级结合剂的污染。对于

我们最近的酵母展示研究,我们已经 尝试通过用已经直接与小分子荧光团缀合的Ras蛋白质进行FACS而没有伴随的次级步骤来避免这个问题。

[0493] 为了制备靶蛋白,将人类KRas (G12V) 的残基1-177的基因亚克隆到 具有天然N末端和C末端His₆和yBBr标签的pET表达载体中。His₆标签使 得能够使用标准的固定金属亲和色谱 (IMAC) 法,用镍-NTA或钴树脂从细 胞裂解物中纯化融合蛋白。yBBr肽是Sfp磷酸泛酰硫基乙胺基转移酶的优化 的具有11个氨基酸的底物序列 (DSLEFIASKLA),所述Sfp磷酸泛酰硫基 乙胺基转移酶可以催化来自辅酶A (CoA) 的磷酸泛酰硫基乙胺基共价添加 到所述肽中位置2处丝氨酸残基的侧链羟基上。这种反应一般容许辅酶A的 硫基末端处的取代,并且因此可以用于以高选择性使融合蛋白连接到辅酶A 与生物素、荧光团等的缀合物(图6)。我们认为这一策略优于非特异性标 记,例如使用胺或硫醇反应性探针,这可能通过对位于效应子结构域内或附 近的赖氨酸残基和半胱氨酸残基进行修饰而潜在地干扰Ras的天然结构。我 们选择KRas的G12V突变体进行这些研究,这是因为它是人类癌症中存在的 最常见的致癌突变之一,并且与野生型相比具有更低的GTP水解的背景速 率。

[0494] 我们在含有T7溶菌酶和Rosetta I质粒的大肠杆菌 (DE3) 细胞中表达 KRas构建体,所述质粒带有六个tRNA,这些tRNA的密码子通常存在于人 类基因中,但是不存在于大肠杆菌中。pET表达系统通过使重组蛋白 (具有T7启动子) 和T7 RNA聚合酶处于lac操纵子的控制下来起作用,所述lac操 纵子受lac阻遏子组成性抑制。添加异丙基β-D-1-硫代半乳糖 (IPTG,异乳糖类似物) 减轻了对这两种蛋白质的阻遏,从而容许T7 RNA 聚合酶的表达以及因此容许重组蛋白的表达。我们将细胞在37℃培养在溶菌 肉汤 (LB) 培养基中直到它们达到约0.7的光密度 (OD) 为止,然后在 30℃用IPTG诱导融合蛋白的表达。将细胞通过超声处理裂解,通过离心澄 清,并且使用钴树脂纯化Ras。将粗制的蛋白质进一步通过凝胶过滤来纯化 (图7A),用所期望的鸟嘌呤核苷酸进行酶促负载(图7B),然后使用Sfp 用生物素或荧光团标记,如由Yin, J.等,《通过Sfp磷酸泛酰硫基乙胺基转移 酶的位点特异性蛋白质标记 (Site-specific protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase) 》,Nat Protoc 1,280-5 (2006) 所详述 (图6)。通过在Sfp反应之前和之后对蛋白质进行基质辅助激光解吸/电离质谱 (MALDI-MS) 分析来验证标记 (图7C)。

[0495] GTP酶通常以高亲和力结合鸟嘌呤核苷酸;在HRas的情况下,解离常 数(K_d)处在低皮摩尔范围内。这样的高亲和力意味着重组表达的Ras蛋白 质在整个纯化过程中通常以GDP结合状态和GTP结合状态的混合物的形式 保留它们的核苷酸。Ras的野生型形式甚至将在不存在GAP蛋白质的情况下 使GTP缓慢水解成GDP,但是诸如用于我们的研究中的G12V的突变体倾向 于非常缓慢地水解。这种异质混合物对于酵母展示或生化测定来说不是理想的,这是因为Ras的构象和结合特性在这两种核苷酸状态之间是显著不同 的。高核苷酸结合亲和力从操作的观点提出了挑战:不能简单地通过提供大 量过量的所期望的核苷酸对蛋白质进行负载,并且诸如碱性磷酸酶的酶不能 有效地降解核苷酸,这是因为它们以远低于酶 K_m 的浓度在溶液中游离。

[0496] 已经开发了两种策略来制备均质负载的Ras蛋白质。第一种策略涉及将 EDTA添加到纯化的蛋白质中,所述EDTA螯合 Mg^{2+} 离子并且将它们从核苷 酸结合口袋中去除。这降低了Ras-核苷酸相互作用的亲和力并且允许通过添 加大量过量(通常100倍)的所期望的核苷酸并且在室温孵育来交换核苷酸³⁴。在我们的经验中,这种方法可以将蛋白质负载达到

85%-90%的水平,并且被用于制备用于我们早期的酵母展示和生化实验的蛋白质。第二种方法是 将碱性磷酸酶和不可水解的GTP类似物,如鸟苷5'-[β,γ -亚氨基]三磷酸(GppNHp)或 β,γ -亚甲基鸟苷5'-三磷酸(GppCp)添加到已经被交换到无 Mg^{2+} 的缓冲液中的Ras蛋白质中。在这些条件下,Ras-核苷酸亲和力是足够 低的以容许初始核苷酸与不可水解的类似物交换,并且如果Ras被充分浓缩 ($>100\mu M$),那么可水解的核苷酸的浓度变得高到足以有效地由碱性磷酸 酶降解³³。如果使用GppCp,那么在磷酸酶去除后,GDP或GTP可以被有效 地负载回蛋白质上,这是因为GppCp具有天然核苷酸的1/100的亲和力并且 容易被过量的天然核苷酸竞争³⁵。这种方法可以用于实现向负载所期望的核 苷酸的Ras蛋白质的几乎定量的转化,并且被用于我们最近的研究。我们通 过将纯化的蛋白质注入到用含有7.5%乙腈和100mM四丁基溴化铵的磷酸盐 缓冲液平衡的反相(C18)高效液相色谱(HPLC)柱上来确定Ras核苷酸状 态。四丁基铵离子以与磷酸酯基数成正比的化学计量结合鸟嘌呤 核苷酸,以 使得与GDP相比,GTP与更多的亲脂性阳离子络合,并且因此表现为更疏水 的分子。在等度条件下冲洗柱使得GDP和GTP明确分离(图7B),它们的 保留时间可以使用纯化的核苷酸标准品来确定。

[0497] 酵母展示筛选:我们进行酵母展示方案,如由Chao,G.等,《使用酵母表 面展示分离和工程化人类抗体(Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display)》,Nat Protoc 1,755-68(2006)所述。我们首先使用生物 素化的KRas(G12V)-GTP作为靶标,用aPP文库进行初始实验性筛选。由 于所述文库的尺寸大于可以方便地由FACS评价的细胞数,因此我们开始用 MACS步骤进行筛选。我们以 $1\mu M$ 的Ras浓度筛选了 2×10^9 个细胞,并且 分离约190,000个细胞。我们通过FACS分选所得的文库,以 $1.8\mu M$ 进行一 轮,然后以550nM进行三轮。这五次分选得到了对550nM的Ras显示出强 结合的细胞群体(图9)。为了测试所展示的肽是否结合Ras效应子结构 域,我们将酵母与已经与大量过量的BRaf的RBD预混合的KRas一起孵 育。表观Ras结合减少,尽管一些仍似乎结合。我们对分离的群体进行测序 并且发现三个密切相关的肽序列(参见图10以及以下论述)。

[0498] aPP支架肽的定向进化:图10提供了经由进化过程鉴定的肽的清单。初 步研究集中在源自于aPP突变体文库的三个命中物,它们被命名为221-1、221-2以及221-3。所有这三个共有几个共同的随机化残基:H18、W21、W25、N26以及Y29(图10)。在其余位置处,没有强 烈的共有性(残基15 处的E/G、残基19处的A/E/W、以及残基23处的A/Q)。我们还在221-3中 观测到R6处自发突变成赖氨酸。我们注意到这些序列中存在相对高的疏水 性残基的普遍 性,这表明所观测到的结合可能是因为弱特异性疏水性相互作用。为了评估这种可能性, 我们在存在和不存在人类血清的情况下对aPP命 中物群体进行酵母表面结合测定,所述人 类血清含有蛋白质的异质混合物并 且被预测如果相互作用主要是由疏水性相互作用驱 动,那么将降低Ras-肽结 合。FACS图显示即使当添加血清达到10%v/v时,结合基本上无变 化(图 9),这表明Ras-肽相互作用对非特异性竞争剂是有韧性的。

[0499] 使用定向进化来提高aPP命中物的亲和力。如先前所述,使用初始的一 轮MACS,继 而以更低的KRas浓度进行FACS来进行酵母展示。此外,我 们决定在5%v/v人类血清和100 μ g/ml非特异性DNA(单链,来自鲑鱼精 子)存在下进行进化以维持针对非特异性结合的选择 压力。条件和它们的所 得序列的汇总示于图10中,进行颜色编码以指示突变首次出现时的 轮次。

[0500] 对于第二轮(得到223肽),我们通过易错PCR将来自第一轮三个 221命中物多样化,然后以100nM的KRas浓度进行MACS。我们通过以50 nM KRas进行FACS,经过五轮筛选,富集了所得的群体,从而得到了两个 独特序列,它们共有两个共同的突变(P13S和V30A)以及各自具有一个另 外的突变(223-1的X23R和223-2的VI4I)。通过检查核苷酸序列,我们发现223-1源自于221-2,并且223-2源自于221-1。重要的是要指出的是,不 能假定所有这些突变均是有益的;有可能存在中性或有害的突变,它们由于 它们与有利的突变处于遗传连锁而被选择。在这两个序列的情况下似乎合理 的是,得出以下结论:S13和A30是有利的,这是因为它们独立地源于不同 的亲本序列并且在后续数轮的进化中保持固定(有一个例外)。

[0501] 对于第三轮(得到224肽),我们通过易错PCR将来自第二轮的两个 223命中物多样化,然后以25nM的KRas浓度进行MACS。我们通过以25 nM KRas进行FACS将所得文库筛选两次,并且获得三个独特序列。核苷酸 分析表明224-1、224-2以及224-3源自于223-1,并且224-4源自于223-2。224-1肽、224-2肽以及224-3肽共有共同的Y7C突变(参见下文),224-1带有另外的F20Y突变并且224-2带有之前在223-2中所观测到的VI4I突 变。224-4的序列与223-2是相同的,除了在PPII螺旋的起点处插入的另外的 PRR以外。这个明显有利的突变最有可能是在PCR期间通过引物滑动而引入 文库中的,这或许是因为紧靠在aPP肽之前的序列是重复的($G_4SG_4SG_4$)。

[0502] 我们最初将224-1、224-2以及224-3中所存在的Y7C突变表征为假象,假定这个半胱氨酸(处于PPII螺旋中)是通过与KRas中的表面暴露半胱氨 酸残基之一形成二硫键来提高肽的表观亲和力。这一假定随后被证明是不正 确的(参见第2章),但是对于得到225肽的后一轮(第四轮),我们决定 从亲本文库模板中去除这一突变和PRR延伸这两者。我们通过由上文所述 的重叠延伸方法所制备的合成模板进行易错PCR来制备文库(图5)。所述 模板含有第三轮中所发现的所有突变,除了Y7C和PRR延伸以外,呈改组 (组合)形式。我们还将KRas的浓度增加到100nM,以避免可能富集含有 Y7C突变的稀有克隆的过度严格的条件。在以100nM进行的一轮MACS和 两轮FACS之后,11个克隆中有9个对应于225-1序列,单个克隆含有E19A 突变(225-5)并且单个克隆含有A30P突变(225-6)。应当指出的是,由于 记录保管错误,因此这一轮的编号是不按时间顺序的。这些克隆中没有 一个 含有Y7C突变。

[0503] 对于第五和最后一轮(得到226肽),我们如前所述通过命中物模板的 易错PCR制备文库。在以100nM KRas进行的一轮MACS之后,我们在使 KRas浓度递减的情况下进行三轮FACS,所述浓度从100nM开始,然后继 续到50nM并且最后到20nM。这一群体含有七个独特序列,其中五个含有 Y7C突变,包括与224-1相同的一个(226-4)在内。在其余两个中,一个与225-1相同(226-1)并且另一个除了I14V回复以外是相同的。基于这些序 列,我们得出结论,我们已经达到了其中亲和力的提高似乎需要获得半胱氨 酸的点,至少鉴于为我们的易错诱变方法所能达到的文库多样性。我们决定 将进化停止在这一点上并且在体外更充分地表征我们的肽。由于225-1序列 是225轮中最常见的克隆,并且在226轮中再次出现而没有半胱氨酸,因此 我们选择它作为用于这些研究的代表性肽。我们还决定测试225-1的含有224-4中所存在的PRR延伸的型式,理由是它可能提供提高的亲和力和潜在 的细胞穿透。我们将这一肽命名为225-3。

[0504] 实施例3:Ras结合肽的体外表征

[0505] 根据定向进化工作,我们选择了两个aPP衍生肽225-1和225-3用于进一步研究。这些肽在酵母展示系统中以纳摩尔浓度结合KRas,与Ras竞争结合 Raf,并且显著耐受阻断剂(DNA和血清)的存在。这一实施例描述了这些肽在大肠杆菌中的重组产生、它们的体外结合特性的表征、以及限定它们在 Ras表面上的结合位点的初始工作。

[0506] 225肽的表达和纯化:在定向进化实验的过程中,我们使用固相肽合成 制备了少量的aPP肽(主要来自223和224系列),如由Schepartz和同事对于他们的研究所进行的那样(参见Daniels,D.S.和Schepartz,A.《基于最小 阳离子PPII基序的本质细胞可渗透的微型蛋白质(Intrinsically cell-permeable miniature proteins based on a minimal cationic PPII motif)》,J Am Chem Soc 129, 14578-9(2007);Kritzer,J.A.等,《p53-hDM2相互作用的微型蛋白质抑制剂 (Miniature protein inhibitors of the p53-hDM2 interaction)》,ChemBiochem 7,29- 31(2006);Smith,B.A.等,《经由 α -螺旋精氨酸展示的最小阳离子细胞可渗透微型蛋白质(Minimally cationic cell-permeable miniature proteins via α -helical arginine display)》,J Am Chem Soc 130,2948-9(2008))。然而,由于这些序列的长度以及从偶联观点而具有挑战性的残基对(例如RP和RR)的普遍性,这些合成是繁重的和高成本的,并且有时难以获得清洁的样品,甚至是在多轮HPLC纯化之后。鉴于这些肽完全是由天然存在的氨基酸构成的,因此我们试图开发重组表达系统以在大肠杆菌中过量产生我们的aPP肽。这种方法对于这一长度的序列来说具有许多优势,前提条件是产量是足够的:蛋白质在细菌中的表达与固相合成相比一般是不太昂贵和耗时的,并且相对低的翻译错误率⁴使得密切相关的副产物不太普遍,尽管存在必须被纯化掉的许多无关细胞蛋白。我们将编码225-1肽和225-3肽的大肠杆菌密码子优化的片段(关于序列,参见图11)亚克隆到pET30a表达载体中,该载体含有 N末端His₆标签和S标签,并且放置烟草蚀纹蛋白酶(TEV)切割位点而紧靠在所述肽序列的起点之前。在肽的N末端处,我们添加GCG三肽以用作TEV位点与PPII螺旋的起点之间的柔性接头(以促进有效的蛋白水解)并且提供柄部(半胱氨酸-SH基团)以允许用荧光团和生物素标记肽以进行后续的实验。

[0507] 我们将这些构建体转化到BL21 Rosetta pLysS细胞中,将这些细胞培养在含有抗生素的LB中以维持质粒,并且在30℃使用IPTG诱导表达,如对于Ras蛋白质的纯化所述。在诱导后,我们通过离心收集细胞,将它们通过超声处理裂解,并且使用钴亲和色谱法纯化His标记的肽融合体。我们通过添加TEV切割洗脱的蛋白质,然后通过HPLC纯化所得的反应物。

[0508] 225-1肽的纯化的代表性数据示于图12中。225肽由于两个色氨酸和四个酪氨酸残基而在280nm强烈吸收,并且TEV反应物的HPLC曲线显示在11分钟时的强峰(图12A),在通过液相色谱-质谱分析(LC/MS)分析时,该强峰含有切割的肽而没有明显的污染(图12B和图12C)。在纯化后,将肽溶解在二甲亚砜(DMSO)中并且通过在50%DMSO和50%磷酸盐缓冲液(pH 7.5)的混合物中,使用由氨基酸序列预测的消光系数和对于这一特定的溶剂组合以实验方式确定的校正因子(0.91)测量 A_{280} 来确定它们的浓度。

[0509] 用这一表达系统获得的225-1和225-3的产量是不太大的,对于两升制备物来说,通常约为约50nmol(约220 μ g),这是对于初步研究来说足够的材料。然而,我们后续表达用于丙氨酸扫描的点突变体的工作(参见部分 III.E)被更差地表达,有时需要6+升的培养物

并且在一些突变体的情况下,根本不提供表达。由于序列的相对疏水性,因此我们假设与分子伴侣的共表达可能提高肽产量。我们因此在带有pG-KJE8质粒(Clontech公司)的修饰形式的BL21细胞中表达我们的构建体,该修饰形式带有处在阿拉伯糖诱导型启动子控制下的dnaK、dnaJ、grpE、GroEL、以及GroES分子伴侣。用伴有200mg/l的阿拉伯糖的IPTG诱导显著提高了所测试的大部分突变肽的产量,从而允许我们制备足量的所有丙氨酸点突变体以用于生化研究。与分子伴侣共表达还提高了225-1肽的产量(尽管更适度),并且这种方法被采用于产生所有后续的肽。

[0510] 对于需要官能化的肽的实验,我们在N末端附近用顺丁烯二酰亚胺缀合物(例如FITC-顺丁烯二酰亚胺或生物素-PEG₂-顺丁烯二酰亚胺)标记半胱氨酸。我们首先用三(2-羧乙基)膦(TCEP)(一种缺乏硫醇并且不太可能与诸如顺丁烯二酰亚胺的巯基反应性分子反应的还原剂)处理纯化的225肽。然后在室温用适当的顺丁烯二酰亚胺缀合物标记肽,继而通过HPLC纯化并且通过LC/MS表征,如对于未标记的肽所述的那样。我们通常在DMSO和pH 7缓冲液的混合物中进行这些反应以有助于反应物的溶解并且确保pH值有助于顺丁烯二酰亚胺基团由半胱氨酸选择性标记。

[0511] 在尝试将225-1肽和225-3肽溶解在缓冲液中时,我们发现225-1具有相对良好的溶解度(在中性pH值下高达约100μM-200μM),而225-3肽在中性pH值下是不可溶的,并且在低pH值(<5)或高pH值(>11)下只能以微摩尔浓度溶解。然而,初步测试表明225-3肽比225-1具有更强的结合亲和力,并且还在一定程度上是细胞可渗透的。我们因此使用225-3进行大部分的以下实验,并且只在需要中性pH值下的高浓度的情况下(例如NMR)使用225-1。由于这两个肽序列之间的差异相对较小,并且由于它们表现出类似的结合亲和力、CD谱、以及对核苷酸从Ras的解离的抑制,因此我们一般将它们称作225肽。

[0512] 通过圆二色性表征肽二级结构:225肽相对于aPP-M含有12个氨基酸取代,并且与aPP相比含有15个氨基酸取代。这些变化中的大部分发生在没有被预测会促进aPP折叠的残基中(基于对晶体结构的检查);然而,几乎一半的氨基酸从aPP突变成225肽,它们的构象将不是明显相同的。为了获得对225肽的二级结构的初步了解,我们记录225-1和225-3的CD谱。225-1肽在pH 8下易溶于缓冲磷酸盐中,但是225-3肽只能在pH值<5和pH值>11下以对于CD研究来说足够高的浓度制备(参见上文)。我们因此在pH 4.5和pH 12下记录225-3的CD。数据示于图13中。225肽具有类似于aPP-M的CD谱,尽管225肽的两个最小值(对于α-螺旋,通常在208nm和222 nm处)与aPP-M相比似乎略微红移。此外,最小值的相对强度是不同的:尽管aPP-M在208nm和222nm处具有几乎相同的CD,但是225肽在225 nm处具有比210nm处更强的CD。在α-螺旋的背景下,增加的 $[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$ 比率常常与从非卷曲螺旋结构向卷曲螺旋结构的转变相关⁵。这些数据表明225肽可以在溶液中形成类似类型的结构;一种可能性是它们比它们的aPP-M亲本更易于形成头对尾同二聚体(如已经对于aPP所报道)。

[0513] 为了获得对225肽的稳定性的了解,我们从10°C到90°C记录在222nm的CD。熔融曲线显示所测试的三个225肽样品的S形转变;对于225-3,pH 12(46.2°C的T_m)与pH 4.5(57°C的T_m)相比似乎使折叠不稳定,并且在中性pH值下,225-1具有66.6°C的T_m。225-1的这一T_m低于aPP-M亲本(T_m>77°C),但是仍高于野生型aPP(64.5°C的T_m)。这一相对高的熔融转变表明225肽具有热稳定性。尽管对肽构象的详细了解需要更直接的结构信息(例如来自NMR

或X射线晶体学),但是这些CD数据以及已知促进aPP 折叠的几乎所有的残基在我们的进化过程中均是保守的事实表明225肽可能 与它们的aPP亲本共有类似的结构。

[0514] 通过荧光偏振定量Ras-肽结合亲和力:酵母展示系统表明225肽能够以 中到低的纳摩尔浓度结合Ras蛋白质。为了获得Ras-肽结合亲和力的更定量 的量度,我们用已经用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的225肽进行荧光偏振 (FP) 测定。这一测定依靠于测量在平行于激发光的平面和垂直于它的平面 中的荧光,以使得在溶液中具有相对慢的翻滚的FITC标记的肽将比快速翻 滚的那些表现出更高的各向异性。由于225肽显著小于Ras蛋白质 (4.5kDa 相比于21kDa),因此预测从溶液中游离的肽向Ras结合肽的转变会表现出 荧光偏振的增加。我们在不同浓度的KRas (G12V) • GppNHp下测量225-3 肽的FP并且确定解离常数 (K_d) 是20nM(图14)。这一亲和力与HRas对 B-Raf RBD的亲和力相当,并且是KRas对B-Raf RBD的亲和力的两倍⁷。这 一结合曲线的希尔系数是1.0,这表明结合是非协同的。我们注意到这些FP 实验常规地产生杂乱的数据,并且需要许多平行测定来获得干净的曲线,尽 管亲和力可重现地落入我们在此所报告的范围。来自225-1系列的肽(即 缺乏N末端PRR延伸的那些,参见第I章)尤其如此。我们因此继续用225- 3和它的衍生物进行FP实验的其余部分。

[0515] 我们随后测量225-3肽和KRas (G12V) 的GDP形式以及KRas (WT) 的GppNHp和GDP形式的结合曲线。Ras的突变状态似乎对肽结合亲和力没 有强烈的影响,而对于这两种蛋白质,GppNHp核苷酸状态略优于GDP状 态。对于这些肽所观测到的核苷酸选择性显著低于天然存在的Ras结合蛋白 的核苷酸选择性,所述天然存在的Ras结合蛋白对于GTP状态通常表现 出>100倍的选择性。然而,这些蛋白质已经进化成具有这种特性,而我们在 我们初始的定向进化工作期间没有包括明确的选择性要求。在最近的酵母展 示实验中,我们已经尝试通过筛选与KRas • GTP比与KRas • GDP具有更高 的结合比的肽来提高核苷酸选择性(参见第3章)。

[0516] 这三种Ras蛋白质均能够结合大部分的Ras效应子,在对Raf RBD的亲 和力方面只有轻微的差异⁷。为了确定225-3肽的同工型选择性,我们用 KRas、HRas、以及NRas的GppNHp结合形式进行FP(图14)。225-3对 KRas的 K_d (20nM) 仅略高于对HRas和NRas的 K_d (45nM),这表 明所 有这三种Ras同工型以类似的亲和力结合225-3肽。

[0517] Ras蛋白质属于GTP酶的大家族,其中一些与Ras共有显著的结构和序 列相似性。由于这些蛋白质中有许多在许多细胞类型间涉及看家功能,因此 Ras抑制剂的重要特性在于区分Ras蛋白质与它们接近的家族成员的能力。为了确定225肽的选择性,我们使用 GppNHp结合的Rap1a、RalA以及 Rab25进行FP测定,它们均与Ras蛋白质共有相同的GTP酶折 叠。选择 Rap1a和RalA,这是因为它们是在一级序列上最接近Ras蛋白质的两种蛋白 质,而Rab25属于远缘Rab蛋白质家族,与Ras具有小于30%的序列同一性⁸。Rap1a是我们特别关注的,这是因为它能够结合一些Ras效应子,包括 Raf RBD在内,并且一些Rap效应蛋白进而能够结合Ras⁹。RalA和Rap25不 在明显的程度上结合225-3,对Rab25的 K_d 是约10 μ M并且对 RalA的 K_d 是>10 μ M(图14)。Rap1a似乎以略微更高的亲和力 (3.5 μ M) 结合225- 3,但是仍小于Ras的1/100。这些数据表明相对于对密切相关的家族成员, 225-3肽对Ras蛋白质具有显著的特异性,尽管在进化实验期间缺乏明确的针 对特异性的选择。

[0518] 通过SPR定量Ras-肽结合亲和力:为了获得Ras-肽结合亲和力的独立 量度,我们

使用表面等离子体共振 (SPR, 常常被称为Biacore) 进行结合测定。这一测定涉及将所关注的分子固定在金晶片的表面上, 并且将偏振光通过棱镜导向该晶片。这是在全内反射的条件下进行的, 其中从表面反射的光的强度取决于在金表面的任一侧上材料的折射率。表面上相对小的变化, 如生物分子与固定的配体的结合会改变折射率并且引起反射光的强度发生变化。SPR系统通过将所关注的分子固定在金晶片上, 然后使第二分子在芯片上流动, 同时连续记录反射光来工作。“固定”的分子与“游离”分子之间的结合事件被检测为共振单位 (RU) 数的增加并且可以用于测量结合事件的动力学参数和热力学参数这两者。这种方法的一个优势在于“游离”分子是单纯地通过它的质量被检测的, 并且因此不需要任何标记。固定的分子可以被共价 (例如通过氨基或硫醇基的非特异性偶联) 或非共价 (例如用生物素-链霉亲和素对) 捕捉在芯片上。

[0519] 我们初始的方法是将225肽固定在芯片表面上并且使游离的未标记的 Ras蛋白质在它上流动。这种设置的优势在于Ras蛋白质的质量是肽的约5倍, 并且因此预期在结合时会产生更强的信号, 这是因为由SPR系统检测的 RU信号大致与质量成正比。我们选择链霉亲和素官能化的金芯片并且将已经在半胱氨酸柄部处被生物素化的225-3肽 (参见上文) 固定。肽被成功地捕捉在芯片上, 如通过基线RU信号的增加所确定, 但是在添加未标记的 Ras蛋白质时, 没有观测到结合信号的明显增加。造成这种情况的原因并不是直接明显的; 我们初始的假定是生物素化在某种程度上使得肽不能结合Ras, 或Ras-肽结合与生物素-链霉亲和素结合不相容 (例如出于空间的原因)。然而, 这一解释与沉降测定不一致, 在所述沉降测定中, 相同的生物素化的 225-3肽被成功地用于使用链霉亲和素珠粒结合纯化的KRas和来自细胞裂解物的Ras这两者 (参见图18)。

[0520] 鉴于我们目前的知识, 我们可以用肽二聚体模型解释这些观测结果: 在将生物素化的肽引入到链霉亲和素芯片上时, 生物素-链霉亲和素相互作用的极高亲和力 (约50fM)¹⁰ 使得所有生物素部分被固定。链霉亲和素是具有四个生物素结合位点的同四聚体蛋白质, 并且通过对晶体结构的检查, 显而易见的是, 两个肽不能看似合理地结合相邻的生物素结合位点, 同时保持头对尾aPP样同二聚体结构。由于生物素-链霉亲和素相互作用在这些实验的时间尺度上是基本上不可逆的, 因此很可能同二聚体在被引入到链霉亲和素芯片上时被有效地分开, 并且因此以不能结合Ras蛋白质的状态被固定。我们注意到, 这一解释作出以下预测: 先固定生物素化的肽, 继而与未标记的肽一起孵育应当会使得能够结合Ras的二聚体在芯片表面上形成。

[0521] 在这些实验时, 这一现象的原因仍未解决, 并且我们继续使用替代的 SPR策略, 即将Ras蛋白质固定并且使游离肽在表面上流动。我们使用Sfp生物素化的Ras蛋白质, 如第I章中对于酵母展示所述, 从而测试GppNHp结合状态和GDP结合状态这两者。Ras蛋白质可以被稳定地捕捉在芯片上, 并且表现出与未标记的225-3肽的稳定结合 (图15)。SPR亲和力实验通常是按以下两种方式之一进行的: “多循环”运行, 其中将蛋白质固定, 使单次注入的配体在表面上流动, 并且随后使芯片再生以可以引入一批新的蛋白质和配体; 以及“单循环”运行, 其中将蛋白质固定并且连续地进行多次注入。单循环运行比多循环运行更快并且更具成本效益, 并且得到准确的数据, 前提条件是结合事件的解离速率相对于缔合速率较慢 (即当结合亲和力高时), 并且是我们用于我们的研究的方法。

[0522] GppNHp状态和GDP状态这两者均以高亲和力结合225-3, 从而分别得到2.5nM和

0.46nM的解离常数。通过目视检查曲线以及通过计算的动力学参数,显而易见的是Ras的GDP状态的解离慢于GTP,这是与我们已经使用酵母展示所进行的解离速率选择实验相一致的观测结果。我们发现这两条曲线由两步结合模型最佳拟合,这不符合我们的预期,并且这些实验的结果还与来自荧光偏振的结果略有不同:计算的亲和力比通过FP所发现的亲和力高一个数量级,并且核苷酸选择性是相反的。

[0523] 我们并不完全清楚这些差异的准确原因,尽管肽二聚体模型可以提供一些见解,这是因为它预测系统内应当存在多个相互依赖的平衡。由于肽是以不同的浓度(1nM-100nM)制备的并且被注入到固定的芯片上,因此更高浓度的肽将经历更强的对Ras的有效 K_d ,这是因为更大比例的肽将以二聚体(Ras结合)状态存在。这可能引起结合曲线和数据拟合的失真,这是因为所添加的肽的浓度可能并未准确地反映可供用于结合Ras的肽二聚体的有效浓度。在FP实验中,肽被保持在恒定的浓度并且因此可能不太易受这种效应的影响;然而,由于预期单体肽、二聚体肽、以及Ras-肽二聚体复合物的FP是不同的,因此也可能是多个状态促成了整体FP信号。这两个结合测定因此均具有制约了可以从它们当中得出的结论的注意事项,并且可能最安全的是,简单地断言肽-Ras相互作用处在中到低的纳摩尔范围内。

[0524] 225-3肽的丙氨酸扫描诱变:我们随后试图获得对Ras-肽相互作用的更详细的了解。如上文所述,我们的CD和进化结果表明225肽保留aPP的一般折叠,但是参与Ras结合的肽残基是不容易明显的。由于aPP文库在 α -螺旋的向外面上被多样化,并且由于在进化期间出现的基本上所有的突变均位于这一区域中,因此很容易推测225肽主要经由它的 α -螺旋上的残基结合Ras。为了测试这一假设,我们通过测试各自含有单丙氨酸点突变的225-3变体来进行丙氨酸扫描诱变。丙氨酸是用于这一类型的实验中的最常见的氨基酸,这是因为它小的,但模拟了大部分氨基酸的构象偏好。丙氨酸特别适用于这一肽,特别是因为它在PPII螺旋和 α -螺旋这两者中一般具有稳定化作用,这些螺旋可能构成了225肽二级结构的大部分。

[0525] 我们选择10个残基进行诱变:两个处于PPII螺旋中,两个处于环中,并且六个处于 α -螺旋中(参见图16)。用于这些突变体的质粒是使用定点诱变PCR构建的并且如上文所述表达和纯化。在这些当中,有九个可以被表达和纯化,尽管这些中的一些绝对依赖于与分子伴侣的共表达。只有一个突变体E15A甚至在分子伴侣存在下而仍不能被表达。这个残基处在 α -螺旋上并且被预测是向外的并且肽二聚体模型没有预测该残基与相邻肽上的残基之间的任何相互作用,因此这种差表达的原因目前尚不清楚。

[0526] 一旦被纯化,就用FITC标记丙氨酸突变体并且通过FP测试(图17)。丙氨酸扫描的典型预期是发现一些突变体影响所研究的特性,而其它突变体有很小的影响或没有影响。出乎意料的是,所测试的每一个突变体均使结合减少到至多1/4,并且最多使得所测量的亲和力降低到至多1/10。这些突变中的三个(I14A、W21A、以及W25A,全部均在 α -螺旋上)似乎对肽二级结构具有显著的去稳定作用,如通过CD所评估。我们最初对这些数据的解释是其它七个残基全部均参与和Ras的结合,这表明肽不仅仅经由 α -螺旋,而是通过呈现肽的具有来自PPII螺旋和 α -螺旋这两者的接触的一个“侧面”来结合Ras。鉴于肽二聚体模型,这些数据表明了一种替代的解释:即所测试的残基中的一些接触Ras,而其它参与使二聚体稳定。实际上,对aPP二聚体结构的检查(图23)证实所测试的残基中的几个可能参与

形成单体之间的接触:PPII螺旋(它含有似乎使结合稳定的两个精氨酸)紧邻反向肽上的一段酸性残基,并且W21残基对(它们是aPP中的Tyr)似乎彼此相距对于 π -堆积来说适当的距离。因此,对丙氨酸扫描的解释由于我们不能鉴于这些数据区分直接结合Ras的残基与使肽-肽二聚化稳定的残基而变得略微复杂。此外,应当指出的是,由于肽处于同二聚体中,因此丙氨酸扫描突变体不是研究单个残基的作用,而是一对残基的作用。

[0527] 当用生物活性分子进行测定时,有价值的是,具有尽可能类似于活性化合物,而缺乏靶活性中的一些或全部的阴性对照分子。在我们的研究的背景下,这理论上将是具有消除与Ras的结合,而不破坏肽结构的单个突变的225肽。在丙氨酸扫描系列中,三个肽具有超过 $5\mu\text{M}$ 的 K_d 值:W21A、W25A以及N26A。如上文所述,与225-3亲本相比,这两个色氨酸突变体似乎被去稳定,如通过CD所判断。然而,N26A突变体具有与225-3相比不变的CD谱,并且我们因此选择这一肽用作我们后续研究中的阴性对照。

[0528] 癌细胞裂解物中的沉降测定:到目前为止的数据表明225肽以纳摩尔亲和力和良好的特异性结合Ras蛋白质。然而,所有这些实验均是用重组表达的Ras蛋白质进行的,并且仍有可能这些蛋白质并未准确地反映活细胞中Ras的性质(由于翻译后修饰、折叠差异、配偶体蛋白质的参与等)。为了测试225肽是否能够结合癌细胞中的内源性Ras蛋白质以及它们是否可以破坏这些内源性蛋白质与效应子的结合,我们在Capan-1胰腺腺癌细胞系的裂解物中进行沉降测定,该细胞系带有Ras(G12V)的突变形式并且已经被证实依赖于Ras活性来存活。

[0529] 我们使用标准方法培养细胞并且将它们在非变性条件(含有1%v/v的非离子洗涤剂Triton X-100的缓冲液,关于另外的细节,参见方法)下裂解。我们将裂解物与生物素化的225-3肽、生物素化的225-3 N26A肽、或DMSO对照一起孵育,然后用磁性链霉亲和素包被的珠粒捕捉肽并且使样品在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶上进行电泳,继而转移到硝化纤维素膜并且针对Ras进行蛋白质印迹法。为了测试这些肽是否能够与Ras效应子竞争,我们平行地用已经与过量的Raf RBD一起预孵育的裂解物进行了同组实验。这一处理预期会使得几乎所有的Ras分子均与Raf结合(因为高Ras-Raf亲和力),并且如果Raf和225肽共用结合位点,那么预测通过肽沉降的Ras的量将减少。

[0530] 这个实验的结果示于图18A中。裂解物含有显著量的Ras,如通过输入泳道所判断,但是Ras没有由单独的珠粒所沉降,在225-3的N26A突变体存在下也没有由珠粒所沉降。225-3的活性形式使Ras沉降,但是在将裂解物与Raf RBD一起预孵育时则没有。这些数据证实225肽能够结合人类癌细胞系中的内源性Ras,并且所述肽似乎与Raf共用结合位点,这表明225肽可能能够在体内抑制Ras效应子结合。

[0531] 有可能的是,这一表观竞争不是Raf和225-3共用重叠结合位点的结果,而是因为Raf将Ras隔离在聚集体中、或阻断珠粒上的生物素结合位点的能力等。作为对照实验,我们逆转沉降策略,而是使用谷胱甘肽珠粒捕捉用谷胱甘肽-S-转移酶(GST)标记的Raf RBD。这一测定常常用于确定癌细胞中的Ras活性状态¹⁴,这是因为只有Ras的GTP结合形式能够以明显的亲和力结合Raf。Ras没有由单独的谷胱甘肽珠粒所沉降,但是在GST标记的Raf存在下沉降,并且与225-3的N26A突变体一起预孵育没有破坏这一沉降,而225-3将它完全消除(图18B)。这确认了II-9A的结果,表明225肽能够与典型的Ras效应子竞争结合内源性Ras。

[0532] 鉴定Ras上的225结合位点:上文所示的沉降数据表明225肽结合在 Ras效应子结构域处或附近,这是因为它们能够与Raf蛋白质竞争结合Ras。然而,还有可能的是,这种竞争是变构机制的结果,其中Raf和225肽结合 不重叠的位点,但是结合Ras的不同的构象,这些构象是足够不同的以防止 其它配体同时结合。我们因此试图限定Ras表面上准确的225肽结合位点。Ras效应蛋白的一个特征是它们能够干扰鸟嘌呤核苷酸从Ras上的核苷酸结合口袋解离。为了评估225肽是否共有这种特性,我们进行了Ras核苷酸解 离测定,该测定最初由John和同事¹⁵所报道,依靠鸟嘌呤核苷酸的荧光类似 物。我们合成了GppNHp的N-甲基邻氨基苯甲酰酯(mantGppNHp),已知 它的荧光在结合Ras时会增加。

[0533] 我们以类似于经典的³²P标记核苷酸实验的方式进行核苷酸解离抑制测定,这些实验涉及将“冷”核苷酸添加到与“热”核苷酸结合的蛋白质中。如对于Ras • GppNHp所述使用碱性磷酸酶使KRas负载mantGppNHp,然后 与肽、Raf RBD、或不与任何物质一起孵育,之后添加大量过量的 GppNHp。该过量的未标记的核苷酸有效地使得mantGppNHp的解离成为不可逆的,并且因此,解离速率常数可以通过使曲线与指数衰减拟合来测量 (图19)。

[0534] 在不存在另外的“冷”核苷酸的情况下,荧光水平相对稳定,这表明光 漂白、蛋白质展开等在实验的时间过程中没有引起信号的显著减少。在添加 过量的GppNHp时,荧光以指数方式减少,并且这由Raf RBD的引入所消除,如先前所报道¹⁵。添加225-1或225-3具有类似的作用,使表观核苷酸解 离速率减慢到与Raf RBD相当的水平,但是添加225-1 N26A或225-3 N26A 没有降低解离速率,这表明这一作用依赖于与Ras的结合。因此,225肽似乎抑制核苷酸从Ras解离,这表明它们的结合位点与核苷酸结合口袋重叠或 肽结合限制了蛋白质进入具有更低的核苷酸亲和力的构象。

[0535] 为了更为详细地了解Ras-肽相互作用,我们进行了溶液NMR实验以鉴定每一个分子上参与结合的残基。我们使用的方法是¹H-¹⁵N异核量子自旋相关(HSQC)光谱法,这是一种检测分子中在化学上不同的N-H键(在蛋白 质的情况下,主要是酰胺N-H键)并且产生交叉峰的二维图的NMR技术,所述交叉峰是根据N-H对中质子和氮原子的单独位移来定位的(参见例如图 20)。由于整个蛋白质的化学环境的可变性,因此大部分的N-H键在适当条件下可以彼此相区别,并且借助于几个另外的测量(如¹H-¹³C HSQC、HCCH TOCSY等),¹H-¹⁵N HSQC交叉峰可以被归属于蛋白质内特定的残 基。如果这些归属是已知的,那么在结合配体时蛋白质构象的变化可以通过 比较在存在和不存在配体的情况下的HSQC谱并且鉴定发生位移的交叉峰而 被定位到蛋白质内的特定位点。

[0536] 用于KRas (WT) GDP的归属在2012年被公开,这使得我们能够进行 HSQC研究而不用从头对Ras蛋白质进行归属。我们如前所述,但是使用含有¹⁵NH₄Cl作为唯一氮源的基本合成培养基使KRas蛋白质在大肠杆菌中表 达。将这一蛋白质纯化,交换到如对于NMR归属所报道的缓冲液中,然后 在装备有冷冻探针的Bruker 700MHz NMR光谱仪上进行¹H-¹⁵N HSQC测量。对于这些研究,我们使用横向弛豫优化光谱法(TROSY),这是标准 ¹H-¹⁵N HSQC实验的提高了来自相对大的蛋白质的HSQC信号的质量的变 体。

[0537] ¹⁵N标记的KRas的¹H-¹⁵N HSQC谱示于图20A中。这一测量得到了与先 前所报道的谱良好对应的清楚的不同的交叉峰。为了鉴定KRas上在肽结合 时经历化学环境变化的残基,我们在未标记的225-1肽存在下记录了相同的 测量,该肽缺乏¹⁵N并且因此在HSQC谱中是不可见的。如上文所述,我们 使用225-1进行这些实验,这是因为225-3在制备这些NMR样品所

需的浓度 ($>100\mu\text{M}$) 下是不可溶的。我们发现2当量至3当量的肽(根据我们基于吸光度的定量)是为实现饱和和所需的,这是在当时没有意义,但是现在可以通过肽二聚体模型解释的观测结果,该模型预测了1:2的Ras:肽的结合化学计量。Ras-肽复合物的HSQC谱示于图20B中,并且游离Ras和Ras-肽的谱在图20C中重叠。

[0538] 重叠显示显著数目的残基在与Ras结合时经历化学环境的变化,如由在“游离”谱与结合谱之间发生位移的大量交叉峰所证实。不可能在没有进行进一步测量(需要 ^{13}C 标记并且可能需要 ^2H 标记)的情况下已知Ras-肽谱中峰的特征,但是通过鉴定游离谱中发生位移的(归属)峰,可以产生哪些残基在肽结合时受到影响的初始图。我们手动地将游离谱中在与肽结合时发生位移的交叉峰制成表格,然后使用公开的归属将它们定位到Ras的晶体结构(图21)。我们发现这些残基位于Ras的一个面上的明确限定的簇中,该簇与Ras效应子结构域共有相当大的重叠,如通过与效应蛋白形成复合物的Ras的共晶结构所限定。Ras蛋白质上别处的残基似乎不受影响,这是因为它在HSQC谱中相应的交叉峰没有在明显的程度上发生位移。这些数据因此表明225肽结合Ras表面上的特异性结合位点,并且这个位点与效应子结构域重叠,这与225肽阻断效应子结合的能力是一致的。

[0539] 我们随后试图通过比较在存在或不存在未标记的Ras的情况下 ^{15}N 标记的225的HSQC谱来对225肽进行类似的NMR实验。用于这种蛋白质的交叉峰归属显然尚未确立,但是鉴于该肽的相对小的尺寸(225-1具有35个氨基酸),我们预期进行这些归属将是简单的。首先,我们在如对于KRas所述的含有 ^{15}N 的基本培养基中表达225-1肽,并且在与用于Ras实验相同的缓冲液中记录游离肽的HSQC谱。这得到相对清楚的谱,尽管有几个交叉峰似乎彼此重叠(图22A)。我们然后记录在KRas存在下 ^{15}N 标记的225-1肽的HSQC谱。出乎意料的是,该谱含有是单独肽样品的两倍数目的峰(图22B)。

[0540] 这一观测结果不能通过来自蛋白质的污染信号来解释,这是因为KRas是未标记的(^{15}N 的天然丰度小于总氮的0.5%)并且大部分新的交叉峰不与游离或肽结合的Ras谱重叠。这些数据也与部分饱和不一致,这是因为单独肽的谱中存在的峰中有许多不存在于Ras-肽谱中。另一个解释是所述肽能够以两种构象结合Ras。这在形式上是可能的,但是不太可能,考虑到在Ras-肽谱中所有交叉峰的强度看起来是相当均匀的。这只有在两种构象以大致相等的比例存在的条件下被观测到,从而要求它们具有相似的能量,这对于足够不同以产生不同的HSQC谱的两种状态来说是不可能的。

[0541] 一个替代的解释是Ras蛋白质含有用于225肽的可以被同时占据的两个不同的结合位点。这与每一个氨基酸存在两个交叉峰相一致,并且还可能需要至少两当量的肽来使Ras饱和的观测结果相容。我们最初认为这种模型不太可能,这是因为Ras HSQC实验表明了单个结合位点并且FP测定显示具有1.0的希尔系数的典型的S形结合曲线。然而,在回想到aPP和它的一些相关物能够在溶液中形成头对尾二聚体(图23)⁶时,我们考虑到225肽以二聚体形式结合Ras的可能性。这与 ^{15}N 标记的肽的HSQC谱相一致:头对尾同二聚体是对称的并且因此预测两个单体经历相同的化学环境,并且因此具有相同的 ^1H - ^{15}N 交叉峰。然而,Ras是不对称的,因此在结合Ras时,肽二聚体对称性被破坏并且这两个单体经历不同的环境,从而造成谱中的分离。

[0542] 作为二聚体结晶的aPP的晶体结构示于图23中。鉴于这一模型,许多先前混乱的观测结果有意义,如这一章的先前部分中所论述。特别有趣的是在定向进化工作期间Y7C

突变的重现:通过对aPP结构中相应的酪氨酸的检查(图23C),显而易见的是,反向单体上的Y7残基处于紧密接触的范围内(在aPP的情况下,是 π 堆积),并且似乎合理的是,该位置处半胱氨酸的存在引起使肽二聚体稳定并且从而提高它对Ras的亲力的二硫键形成。

[0543] 用于对蛋白质复合物进行结构表征的黄金标准是X射线晶体学,它能够以原子分辨率提供详细和完整的结构。与Verdine实验室的晶体学家(Seung-joo Lee和Rou-Jia Sung)合作,我们已经尝试使KRas-225和HRas-225复合物结晶,它们是如对于通过NMR所研究的KRas-225-1复合物所述来制备的。到目前为止,我们还没有成功,但是我们在这一领域的努力正在进行。

[0544] 肽二聚体模型的一个启示是225肽没有被完全优化用于与Ras结合。这是由肽同二聚体所施加的限制的结果:每一个残基(以及因此在进化期间测试的每一个突变)必须在Ras结合二聚体内的两个位置处出现,而Ras蛋白质是不对称的。因此,很可能在Ras-肽结合界面内存在多个位置,其中有利的氨基酸突变由于它与肽二聚体上相应位点的背景不相容而被禁止。这预测了肽异二聚体相对于225同二聚体可能能够提高亲和力。

[0545] 实施例4:提高225肽的亲和力和特异性

[0546] 在第II章中提出的肽二聚体假设表明225肽可能没有被完全优化用于与Ras结合,这是因为Ras是不对称的并且因此可能对接触残基有不同的偏好,所述接触残基在肽同二聚体中被限制为相同的氨基酸。这一章论述了我们使用酵母表面展示测试二聚体假设以及鉴定可以与225-1异二聚化并且以相对于225-1同二聚体提高的亲和力结合Ras的肽突变体的初步工作。我们还论述了我们鉴定相对于225肽对Ras • GTP比对Ras • GDP具有提高的选择性的肽突变体的工作。

[0547] 酵母表面上N26A突变体的互补:如果肽二聚体假设是正确的,那么一个预测是应当存在肽异二聚体,所述肽异二聚体由于在同二聚体中不可能的优化的接触而具有提高的Ras结合。举例来说,在225肽中可能存在许多残基,所述残基在Ras表面上一个肽结合半位点的背景下形成关键接触。如果这一接触具有足够的稳定化作用以使得该位点处的任何突变会消除结合,则配偶体肽上的相应残基将被限制成该相同的氨基酸,即使不同的氨基酸将是优选的。这一事实的结果是最强的肽同二聚体有可能是代表在每一个半位点处氨基酸偏好之间的最佳折衷的序列。如果是这种情况,则225肽可能由于作为同二聚体结合的限制而牺牲了潜在有利的相互作用。

[0548] 表达这一构思的替代方式是肽中有害的突变有可能在一个半位点的背景下比在另一个半位点的背景下具有更强的作用。举例来说,我们已经证实N26A突变使得与Ras的结合消除到至多1/100,但是不可能的是,同二聚体中的两个N26残基同等地促成这种作用,因为它们必须经历不同的环境并且结合不同的残基(因为Ras是不对称的)。前提条件是这一突变不破坏225肽的实际二聚化,更似乎合理的是,N26A突变在一个半位点处具有显著的去稳定作用并且在另一个半位点处具有弱的、中性的、或甚至积极的作用。如果是这种情况,那么预测225-1和225-1 N26A的异二聚体相对于N26A同二聚体应当具有显著提高的与Ras的结合。

[0549] 用于筛选肽异二聚体的文库的方法将大幅提高我们鉴定更强Ras结合剂的能力。尽管225同二聚化的动力学和热力学目前是未知的,但是我们想到如果单体交换是足够快的,那么可能有可能用225突变体(酵母表面上所展示)与225-1肽(以反式提供并且允许与

所展示的突变体交换成异二聚体) 之间的异二聚体进行酵母表面展示。鉴于225-1和225-1 N26A应当能够比 225-1 N26同二聚体更好地结合Ras的预测,我们试图使用表达225-1或225- 1 N26A的酵母细胞并且以反式提供游离的225-1或225-1 N26A肽来测试这一想法。在一定的优化之后,我们发现异二聚体形成似乎是可能的,通过将 酵母细胞与中等微摩尔浓度的游离肽一起预孵育,继而沉淀(以去除过量的 肽) 并且随后与Ras一起孵育(图24)。

[0550] KRas和这一结合似乎相对不受与游离225-1或225-1 N26A的预孵育的影响。表达225-1 N26A的酵母细胞不以可检测的水平结合Ras,这与体外数 据(第II章)相一致,在与游离225-1 N26A一起预孵育时它们也不结合。然 而,当与游离225-1一起预孵育时,这些细胞表现出与Ras的强结合,这与 225肽以二聚体的形式结合Ras的假设相一致。重要的是要注意,这些数据 仅显示225-1 N26A突变体结合Ras的能力的部分拯救,并且因此不能正式地 排除N26A突变体对这两个半位点同样有害的可能性。然而,很可能的是, 我们的二聚体交换技术不完全进行:由酵母展示的肽被限制到细胞表面,并 且因此这些肽的局部浓度是高的,这意味着展示的同二聚化相对于与溶 液中的游离肽的异二聚化应当被强烈地促进。由于我们不能确定表面展示的 肽的哪个部分以同二聚体形式或异二聚体形式存在,因此难以定量地解释在 将表面展示的225-1 N26A肽与游离的225-1一起孵育时所观测到的结合增 加。然而,当将表面展示的225-1肽与225-1 N26A一起预孵育时,结合没有 显著减少,在异二聚体显著弱于225-1同二聚体的情况下预期不会这样。仍 可能的是,在这一特定的情况下,异二聚体的形成特别低效,但是鉴于所述 肽与用于相反实验中的那些是相同的,这似乎不太可能。因此,这些实验说 明了在结合在异二聚体中时,225肽可以至少部分地补偿N26A突变的功能损 失。

[0551] 以提高的亲合力结合Ras的异二聚体的鉴定:由于观测到酵母表面展示 可以用于提供异二聚体,因此我们进行了互补筛选以鉴定以比225-1同二聚 体更高的亲合力结合Ras的突变体/225-1异二聚体。实验方法如对于N26A 互补研究所述,其中我们将酵母细胞与225-1一起预孵育并且使其沉淀,之 后添加Ras。我们选择5nM的Ras浓度,这提供对225-1的非常弱的结合 (图26)。对于这一实验,我们使用基于225-1肽的扫描诱变文库,该文库在整个序列中系统地改变相邻的残基对(图25)。该文库的论文库尺寸是 约12,400个成员(根据氨基酸的多样性),这相对于可以被转化到酵母中的 文库尺寸是较小的。然而,这一方法允许系统评价整个序列中的突变,而通 过易错PCR设计的文库倾向于偏向某些取代并且不可能覆盖每一个位点处的 每一个氨基酸突变¹,更不可能覆盖相邻位点处的每一个可能的氨基酸对。我 们因此认为这种策略是对于该实验来说优越的测试序列空间的方式。

[0552] 使用扫描诱变文库,以依赖于与游离225-1一起预孵育的方式,我们以5 nM KRas • GTP进行互补筛选,并且在三轮分选之后,分离似乎比225-1更 强地结合Ras的群体(图26A)。对这一群体进行测序揭示了它主要由具有 S13C/I14E双重突变的单个克隆构成。下文提供了相对于225-1具有改进的特 性的肽突变体。为了一致性,使用aPP肽中的位置来报告残基编号。突变加 下划线。

[0553]

肽	肽序列
225-1	GCGGPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO: 8)

[0554]	225-1 S13C/I14E	GCGGPRRPRYPGDDACEEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO: 9)
	225-1 A30R	GCGGPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 10)

[0555] 这个突变是有趣的,因为我们再次看到半胱氨酸残基的出现。鉴于我们 先前关于在我们初始的进化研究中所发现的Y7C突变的假设(我们假设它参 与形成单体之间的二硫键),我们想知道这一突变是否还可能通过使二聚体 稳定来提高Ras结合亲和力。当与225-1肽一起预孵育时,该突变体仅能结 合5nM的Ras;因此,不太可能的是,这个半胱氨酸参与和二聚体上相应的 半胱氨酸形成二硫键。实际上,对aPP二聚体的结构的检查证实这些残基离 得很远并且预期在形成的二聚体的背景下不会发生相互作用。然而,我们回 想到用于这些互补研究中的游离225-1肽在它的N末端处含有游离半胱氨酸 (为了标记的目的),并且aPP二聚体模型预测这个残基可能能够与所展示 的突变体中的C13残基相互作用(图27)。因此,对于提高的结合的一个解 释是S13C/I14E双重突变体形成了二硫键稳定化的异二聚体。

[0556] 如果这一假设是正确的,则阻断游离225-1肽上的半胱氨酸应当消除结 合的提高。为了对此进行测试,我们将225-1肽上的半胱氨酸用碘乙酰胺 (对硫醇具有良好选择性的小有机分子,参见图26B)烷基化,然后重复互 补实验。与我们的预测相一致,当与未标记的225-1相比时,这种肽几乎完 全消除了与Ras的结合的提高。这表明S13C/I14E双重突变体实际上可以通 过与225-1形成二硫键稳定化的异二聚体来显示出提高的与Ras的结合。 仍 可能的是,这一作用不是因为二硫键的形成,而是通过烷基化干扰了225-1 的结构的结果。然而,碘乙酰胺是相对小的分子并且225-1上的N末端半胱 氨酸先前被生物素和荧光团修饰而没有消除活性,因此我们认为这种解释不 太可能。

[0557] 提高225肽的核苷酸特异性:如先前所论述,我们发现225肽对 Ras • GTP的选择性相比于对Ras • GDP的选择性是相对较差的(并且是不同 的,这取决于所使用的结合测定)。由于Ras • GTP是具有生物相关性的靶 标,因此我们想知道是否存在对Ras • GTP表现出提高的选择性的225-1突 变体。酵母表面展示的一个优势是能够使用多个荧光通道,并且因此使用多 种结合剂,这使得能够进行多参数分选。我们因此进行了酵母展示筛选,其 中我们添加Ras • GTP和Ras • GDP,它们是用不同的荧光团标记的 (Ras • GTP被生物素化并且用SA-PE检测,Ras • GDP直接用Alexa647标 记)。在用500nM的Ras • GTP和Ras • GDP中的每一种标记展示225-1的 细胞时,我们观测到两个荧光通道之间的线性关系,这与225-1能够以相当 的亲和力结合这两种核苷酸状态的观测结果相一致(图28)。对于扫描诱变 文库观测到类似的谱。我们然后进行筛选,从而选择位于GTP选择性区域中 225-1群体的极限以上的细胞(参见所示的门)。在两轮分选之后,我们分离 似乎比225-1亲本更选择性地结合Ras • GTP的群体(图28)。对这个群体 进行测序揭示了A30R的单个保守突变,它位于肽的C末端附近。这一取代 的基本原理不明显并且将需要Ras-肽复合物的更详细的数据来了解,但是 由于Ras • GTP与Ras • GDP之间的一个明显的差异是在Ras • GTP中存 在另外的磷酸根,因此很容易推测精氨酸可能与这个阴离子基团形成静电相 互作用。

[0558] 改进225肽的手段:这个项目的最终目标是鉴定使Ras效应子结构域与 小肽结合的新的方式,以及在理论上开发能够抑制癌细胞中的Ras活性的分 子。我们已经使用酵母

展示和定向进化来鉴定以中到低的纳摩尔亲和力与 Ras 表面结合并且可能直接靶向效应子结构域的肽。目前, 225 (同二聚体) 肽在用于处理癌细胞时似乎没有 Ras 抑制活性, 并且对于为什么可能出现这种情况存在许多的可能性。尽管所述肽确实似乎具有弱的细胞渗透性, 但是 鉴于它们的亲和力和/或 Ras 蛋白质的细胞丰度, 它们可以实现的细胞内浓度可能过低, 因此可能的是, 可能需要提高肽的渗透性或亲和力以获得活性。还可能的是, 一旦处在细胞内部, 225 肽就被非 Ras 蛋白质隔离或远离质膜的内部小叶, 其中活性 Ras 位于所述内部小叶中。实际上, 用 FITC 标记的 225 肽获得的初步结果表明它们可能主要定位到核, 这或许是因为肽的一部分被认为是核定位信号 (NLS)。225 肽的 PPII 螺旋确实带有与在粟酒裂殖酵母 (*S. pombe*) 中所鉴定的富含脯氨酸和碱性氨基酸的 NLS 的一定的相似性, 尽管根据我们的知识, 人类细胞中等同的信号尚未被表征²。如果被证明是这种情况, 那么可能有可能通过测试去除了精氨酸残基 (例如通过使它们回复成 aPP 中所存在的氨基酸) 的 PPII 螺旋突变体来削弱这样的定位。最后, 有可能的是, 225 肽在进入人类细胞时被快速降解, 从而使得它们在它们可以对 Ras 信号转导发挥作用之前被清除。

[0559] 目前, 我们正在评价推定的二硫键稳定化的二聚体 (即 Y7C 同二聚体和 S13C/I14E-225-1 异二聚体) 的活性。原则上, 这些分子相对于 225-1 同二聚体可以具有更强的亲和力和提高的稳定性, 并且如果我们获得令人鼓舞的体外结果, 那么我们可以在活细胞中测试它们的活性。二硫键在人类细胞中一般是不稳定的, 然而可以促进肽-Ras 复合物的稳定性, 这是因为显而易见的是, 它们不是为二聚化和 Ras 结合严格所需的。还可以设想制备相应的硒代半胱氨酸肽以期望获得不可还原的变体, 如第 I 章中所述。

[0560] 提高 225 肽的生物活性的一个另外的策略是使它们靶向其中活性 Ras 蛋白质所位于的细胞区室; 即质膜的内部小叶。实现这一点的一种明显方式简单地是模拟 Ras 蛋白质并且使肽与诸如法呢基或十六烷基部分的亲脂性基团缀合。原则上, 这应当使得 Ras 蛋白质经历相对高的局部浓度的 225 肽, 这可以提高 225 肽与效应子竞争的能力, 所述效应子一般不被拴系到膜上。我们在发现 225 肽以二聚体的形式起作用之前用它们对这一策略进行了初始测试, 并且我们获得的阴性结果可能是在膜锚定时二聚体遭到破坏的结果 (这类类似于在被固定到链霉亲和素 SPR 芯片上时生物素化的肽不能结合 Ras)。如果二硫键稳定化的二聚体被证实是稳定的, 那么我们将尝试制备单脂化二聚体 (在脂化反应期间使用亚化学计量当量的标记) 来测试这样的肽是否能够抑制细胞中的 Ras 活性。

[0561] Ras 项目的未来方向: 如果肽二聚体假设是正确的, 则 Ras 结合 225 物质的尺寸是约 9 kDa。这与引言中所论述的细胞穿透活性肽相比是相当大的, 并且将优选的是, 分子量显著更低。我们目前不知道肽二聚体上的哪些残基参与结合 Ras 表面, 但是似乎很可能它们主要位于 α -螺旋上, 因为这是被随机化用于文库的肽面 (如果 225 肽经由对于所有文库成员来说均相同的 PPII 螺旋结合 Ras, 那么不会期望需要稀有的和特异性的 α -螺旋共有序列来进行结合)。此外, α -螺旋是在定向进化期间出现的几乎所有的突变的位点, 除了我们假设参与二聚体稳定化的半胱氨酸突变体以外。如果 α -螺旋确实实际上包含 225 肽二聚体的 Ras 相互作用区域, 则 PPII 螺旋可能是可有可无的, 前提条件是我们可鉴定使二聚体稳定的替代手段。二聚体模型的头对尾取向表明了实现这一点的可能的解决方案: 由于每一个 α -螺旋的 N 末端和 C 末端紧密相邻, 因此可能有可能使分子缩合成单体, 其中在一个 α -螺旋后面是环 (具有仍然未知的组成), 然后是第二个 α -螺旋 (图 29)。

[0562] 原则上,这种方法可以提供分子量是225二聚体的几乎一半的肽。然而,一个关键的问题是螺旋之间环的长度和组成。对aPP二聚体的检查表明 4个-6个氨基酸的环长度可能是理想的,但是最佳长度难以预测,特别是因为 我们没有225二聚体的实际结构。环组成同样难以预测。幸运的是,这个问题非常适合于酵母表面展示:通过用两个225 α -螺旋之间具有4个-6个氨基酸的随机化的环构建文库,应当有可能鉴定使这两个螺旋稳定化成Ras结合构象的环,前提条件是我们的Ras-肽相互作用的模型是基本上正确的。我们已经设计出这样的文库(图29),它具有在构建体的N末端和C末端处半胱氨酸残基的附加特征,以允许桥接螺旋的二硫键的可能性。由于预测这两个残基之间的最佳距离还具有挑战性,因此合成文库以允许每一个半胱氨酸的两个不同的位置(通过插入甘氨酸残基),总共有四个可能的组合。此外,由于225肽的“内部”上的几个疏水性 α -螺旋残基参与和PPII螺旋堆积,因此我们将它们用丙氨酸置换或使它们随机化。

[0563] 我们已经制备了这一文库和计划以很快开始对它进行筛选。如果它提供命中物,那么我们将进行与用于表征225肽相同的一组体外测定,以确定新的序列是否以合理的亲和力和特异性结合Ras效应子结构域。我们然后可以使用定向进化来改进肽的特性,并且最终将旨在测试它们在细胞中的活性。由于二硫键一般在人类细胞中是不稳定的,因此我们将需要开发使肽稳定的替代手段,如果我们的新肽被证实依赖于二硫键来发挥活性的话。一种可能性将是将半胱氨酸残基用硒代半胱氨酸置换。还可能的是,制备头对尾骨架环化肽,这是经由化学合成或内含肽策略来实现的³。最后,如果所述新肽基本上保留了 α -螺旋结合构象,那么它们可能是全烃钉接的合适的候选者。如果来自酵母展示筛选的命中物出现的话,我们意图采取这些途径。

[0564] 实施例5:共价肽二聚体形成

[0565] 将包含受叔丁基保护的半胱氨酸的肽单体(SEQ ID NO:30)和包含丙烯酰胺的肽单体(SEQ ID NO:31)在50mM Tris-Cl (pH 8)中以每一种肽5 μ M的最终浓度混合在一起。向这些样品中添加1mM或10mM还原型谷胱甘肽,并且将样品在室温孵育45分钟,之后将80 μ l的反应物添加到10 μ l的1%三氟乙酸中,并且通过LC-MS,使用C18柱和含0.1%三氟乙酸的水中10%-100%的乙腈梯度分析。

[0566] 图35示出了来自在低水平的谷胱甘肽(1mM)或更高水平的谷胱甘肽(10mM)存在下与SEQ ID NO:31肽单体混合的SEQ ID NO:30肽单体的LC-MS分析的质量色谱图,所述低水平的谷胱甘肽不能有效地还原叔丁基硫醚保护的半胱氨酸,所述更高水平的谷胱甘肽使得SEQ ID NO:30的肽与SEQ ID NO:31的肽之间发生共价交联,如通过所示离子的出现所看到的那样。

[0567] 实施例6:选择性二聚体去稳定

[0568] 使用标记的肽进行活细胞共聚焦显微术,这是在补充有10%胎牛血清的DMEM培养基中在H358肺腺癌细胞中在5 μ M浓度的荧光素标记的肽下进行的。图36A示出了缺乏组氨酸的SEQ ID NO:37的肽。图36B示出了SEQ ID NO:38的肽,所述肽含有每个单体两个组氨酸(每个二聚体四个组氨酸;“His四联体”)。

[0569] 实施例7:使用大体积部分的二聚体去稳定

[0570] 图37示出了SEQ ID NO:42的肽,其中Cys与2,2'-二吡啶基二硫化物反应以形成二硫化物保护的半胱氨酸。这一半胱氨酸在低谷胱甘肽水平存在下被解除封闭以形成二

硫键键合的物质,所述物质是更好的Ras结合剂。以下数据证实在添加5mM还原型谷胱甘肽后Ras结合增加,所述谷胱甘肽引起共价二硫键键合的二聚体的形成,如通过质谱分析所验证。实验与对于图19所述的那些相似。

[0571] 实施例8:肽与另外的靶标的结合

[0572] 图38A-C示出了SEQ ID NO:43至45的肽与它们相应的蛋白质靶标的酵母表面展示结合数据。用于酵母展示测定的实验类似于用于图9的那些。SEQ ID NO:43的MY01肽对应于图38C中所示的高结合群体。RalA蛋白质的纯化类似于如先前所述用于KRas构建体的方法。

[0573] Myc/Max蛋白质的纯化如下进行。将含有His₆-yBBr-TEV-Myc(残基353-434)和未标记的Max(残基22-102)的双顺反子pET载体转化到化学感受态BL21细胞中。将细胞培养到OD₆₀₀=0.7,在30℃用0.25mM IPTG诱导5小时,然后收集并且重悬在裂解缓冲液(20mM HEPES(pH 7.5)、500 mM KCl、5%甘油)中,之后快速冷冻在液氮中。对于纯化,将沉淀物解冻,在相同的缓冲液中升到40ml,并且与Roche Complete无EDTA蛋白酶抑制剂片剂混合。将细胞用尖端超声波仪(VirSonic,以6.5的功率水平开10秒、关15秒的6次循环)裂解,然后以30,000×g沉淀30分钟并且经由0.45 μm Tuffryn膜(颇尔公司)过滤。将澄清的裂解物添加到已经用相同缓冲液平衡的2ml的HisPur Ni-NTA树脂(赛默皮尔斯公司)中并且通过重力排放。将柱用20ml缓冲液洗涤,然后用含有150mM咪唑和一定的蛋白酶抑制剂的缓冲液洗脱蛋白质。在从柱洗脱之后立即添加EDTA达到0.5mM。将蛋白质在Centriprep YM-10(密理博公司)中浓缩到2ml并且使用Superdex 75柱凝胶过滤到20mM HEPES(pH 7.5)、150mM KCl、1mM EDTA、5%甘油中。如上文对于Ras蛋白质所述用Alexa647标记蛋白质。

[0574] 等同方案和范围

[0575] 在权利要求书中,除非有相反的指示或另外根据上下文显而易见,否则诸如“一个(种)(a/an)”和“所述”的冠词可以意指一个(种)或多于一个(种)。除非有相反的指示或以另外根据上下文显而易见,否则在一组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或说明在一个、多于一个、或所有组成员存在于、被用于给定的产品或方法中、或以其它方式与给定的产品或方法有关的情况下被认为是满足的。本发明包括其中该组中仅一个成员存在于、被用于给定的产品或方法中、或以其它方式与给定的产品或方法有关的实施方案。本发明包括其中多于一个、或所有的组成员存在于、被用于给定的产品或方法中、或以其它方式与给定的产品或方法有关的实施方案。

[0576] 此外,本发明涵盖了其中来自所列权利要求中的一项或多项的一个或多个限制条件、要素、条项、以及描述性术语被引入到另一项权利要求中的所有变化、组合以及排列。举例来说,从属于另一项权利要求的任何权利要求可以被修改以包括从属于同一项基础权利要求的任何其它权利要求中所存在的一个或多个限制条件。在要素以清单形式,例如以马库什组形式呈现的情况下,还公开了所述要素的每一个子组,并且任何一个或多个要素可以从该组中被去除。应当了解的是,一般来说,在本发明或本公开的方面被称为包含特定的要素和/或特征的情况下,本发明或本公开的各方面的某些实施方案由这些要素和/或特征组成、或基本上由这些要素和/或特征组成。为了简单起见,那些实施方案在本文没有被具体地这样阐述。还应当指出的是,术语“包含”和“含有”意图是开放性的并且容许包括另外的要素或步骤。在给出范围的情况下,端点被包括在内。此外,除非另外指明或

另外根据上下文 和本领域的普通技术人员的理解显而易见,否则被表示为范围的值可以在本 发明的不同实施方案中采用所述范围内的任何具体值或子范围,除非上下文 另外明确规定,否则直到所述范围的下限的单位的十分之一为止。

[0577] 本申请参考了各种授权专利、公开的专利申请、期刊文章、以及其它出 版物,它们全部均以引用的方式并入本文。如果在所并入的参考文献中的任 一篇与本说明书之间存在矛盾,那么应当以本说明书为准。此外,本发明的 落入现有技术内的任何具体实施方案可以明确地被排除在权利要求中的任一 项或多项以外。由于这些实施方案被认为是本领域的普通技术人员已知的, 因此它们可以被排除,即使所述排除没有在本文被明确阐述。本发明的任何 具体实施方案可以由于任何原因被排除在任何权利要求以外,无论与现有技 术的存在相关与否。

[0578] 本领域技术人员仅仅使用常规的实验就将认识到或能够确定本文所述的 具体实施方案的许多等同方案。本文所述的本发明的实施方案的范围不意图 限于上述说明,而是如所附权利要求书中所述。本领域的普通技术人员将了 解的是,可以对本说明作出各种变化和改动而不脱离本发明的精神或范围, 如以下权利要求书中所限定。

[0579] 具体地,本发明涉及以下方面:

[0580] 1. 一种肽,所述肽包含以下序列:

[0581] $X_1PX_3X_4PX_6X_7PGX_{10}X_{11}AX_{13}X_{14}X_{15}DLX_{18}X_{19}YX_{21}X_{22}RLX_{25}X_{26}Y LX_{29}X_{30}V A$

[0582] (SEQ ID NO:1)

[0583] 其中:

[0584] X_1 是Gly、Arg、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

[0585] X_3 、 X_4 、以及 X_6 各自独立地是带电荷的氨基酸;

[0586] X_{10} 是带电荷的氨基酸;

[0587] X_7 是Tyr或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

[0588] X_{11} 是带电荷的氨基酸或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

[0589] X_{13} 是Ser或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸;

[0590] X_{14} 是Ile或Glu;

[0591] X_{15} 是Glu、Asp、Gln、或Gly;

[0592] X_{18} 是芳族或疏水性氨基酸;

[0593] X_{19} 是Glu、Asp、Gln、Ala、或Trp;

[0594] X_{21} 、 X_{25} 、 X_{29} 各自独立地是Tyr、Phe、Trp、His、或具有环己基侧链的 氨基酸,其中 Tyr、Phe、Trp、环己基侧链能够被一个或多个氟取代;

[0595] X_{22} 是Ala、Gly、Ser、或Val;

[0596] X_{26} 是Asn、Leu、Ile、或His;

[0597] X_{30} 是Ala或Arg;

[0598] 其中所述肽包含能够使所述肽与另一个肽交联的一个至两个氨基酸。

[0599] 2. 一种肽,所述肽包含以下序列:

[0600] $X^-X^-X^-X^-X^-X^-X_1PX_3X_4PX_6X_7PGX_{10}X_{11}AX_{13}X_{14}X_{15}X_{16}LX_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}LX_{25}X_{26}Y LX_{29}X_{30}X_{31}X_{32}$ (SEQ ID NO:13), 其中

[0601] X_3 和 X_4 各自独立地是中性或带电荷的氨基酸;

- [0602] X_6 是带电荷的氨基酸或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；
- [0603] X_7 是Tyr、His、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；
- [0604] X_{10} 是Pro、带电荷的氨基酸、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；
- [0605] X_{11} 是Ala、Ser、中性或带电荷的氨基酸或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；
- [0606] X_{13} 是Ser、Pro、Thr、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；
- [0607] X_{14} 是Ile、Glu、Val、Leu、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；
- [0608] X_{15} 是Glu、Lys、Arg、Ala、Ser、Asp、Gln、或Gly；
- [0609] X_{16} 是Asp、Glu、Gln、Ala、或Ser；
- [0610] X_{18} 是芳族或疏水性氨基酸；
- [0611] X_{19} 是Glu、Lys、Leu、Met、His、Asp、Gln、Ala、Ser、Trp、或Arg；
- [0612] X_{20} 是Tyr或Phe；
- [0613] X_{21} 是Gln、Tyr、Phe、Trp、His、或具有环己基侧链的氨基酸，其中 Tyr、Phe、Trp、环己基侧链能够被一个或多个氟取代；
- [0614] X_{22} 是Ala、Gln、Trp、Leu、Tyr、Gly、Ser、Val、或Asn；
- [0615] X_{23} 是Arg、Asp、Leu、或Ala；
- [0616] X_{25} 是Gln、Tyr、Phe、Trp、His、Asp、或具有环己基侧链的氨基酸，其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链能够被一个或多个氟取代；
- [0617] X_{26} 是Asn、Ala、Leu、Arg、Phe、Ile、His、或Gln；
- [0618] X_{29} 是Ala、Leu、Glu、Asn、Gln、Tyr、Phe、Trp、His、或具有环己基侧链的氨基酸，其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链能够被一个或多个氟取代；
- [0619] X_{30} 是Ala、Arg或Val；
- [0620] X_{31} 是V或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；
- [0621] X_{32} 是V、Ala、Arg、Ser、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；
- [0622] X_6 、 X_5 、 X_4 、 X_3 、 X_2 、 X_1 、以及 X_1 是任选的；并且
- [0623] 其中所述肽包含能够使所述肽与另一个肽交联的一个至两个氨基酸。
- [0624] 3.如项2所述的肽，其中
- [0625] 如果 X_6 存在，则 X_6 是Gly并且 X_5 至 X_1 存在；
- [0626] 如果 X_5 存在，则 X_5 是Cys或Sec并且 X_4 至 X_1 存在；
- [0627] 如果 X_4 存在，则 X_4 是Gly并且 X_3 至 X_1 存在；
- [0628] 如果 X_3 存在，则 X_3 是Gly并且 X_2 至 X_1 存在；
- [0629] 如果 X_2 存在，则 X_2 是Pro、Cys、Sec或Gly并且 X_1 和 X_1 存在；
- [0630] 如果 X_1 存在，则 X_1 是Arg或Gly并且 X_1 存在；并且
- [0631] 如果 X_1 存在，那么 X_1 是Gly、Arg、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。
- [0632] 4.如项2所述的肽，其中
- [0633] X_6 至 X_1 不存在； X_{11} 、 X_{15} 、 X_{16} 、 X_{19} 各自是Ala或Ser； X_{18} 是His； X_{20} 是Tyr，并且 X_{26} 是Asn。
- [0634] 5.一种肽，所述肽包含以下序列：
- [0635] $X_1PX_3X_4PX_6X_7PGX_{10}AAX_{13}X_{14}AALHAYX_{21}AX_{23}LX_{25}NYLX_{29}X_{30}VX_{32}$ (SEQ ID NO:48)，其中
- [0636] X_1 任选地存在，并且在存在时， X_1 是Gly、Arg、或能够使所述肽与另一个肽交联的

氨基酸；

[0637] X_3 、 X_4 、以及 X_6 各自独立地是中性或带正电荷的氨基酸；

[0638] X_7 是Tyr或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；

[0639] X_{10} 是Asp或中性氨基酸；

[0640] X_{13} 是Ser、Thr或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；

[0641] X_{14} 是Ile或Leu；

[0642] X_{21} 、 X_{25} 、 X_{29} 各自独立地是Tyr、Phe、Trp、His、或具有环己基侧链的氨基酸，其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链能够被一个或多个氟取代；

[0643] X_{23} 是Arg、Leu或Ala；

[0644] X_{30} 是Ala或Arg；

[0645] X_{32} 是Ala、Ser、或Arg；并且

[0646] 其中所述肽包含能够使所述肽与另一个肽交联的一个至两个氨基酸。

[0647] 6. 一种肽二聚体，所述肽二聚体包含与第二肽缔合的第一肽，其中所述第一肽和所述第二肽各自独立地包含以下肽序列：

[0648] $X_1PX_3X_4PX_6X_7PGDX_{11}AX_{13}X_{14}X_{15}DLX_{18}X_{19}YX_{21}X_{22}RLX_{25}X_{26}Y LX_{29}X_{30}VA$

[0649] (SEQ ID NO:1)

[0650] 其中：

[0651] X_1 是Gly、Arg、或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；

[0652] X_3 、 X_4 、以及 X_6 各自独立地是带电荷的氨基酸；

[0653] X_{10} 是带电荷的氨基酸；

[0654] X_7 是Tyr或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；

[0655] X_{11} 是带电荷的氨基酸或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；

[0656] X_{13} 是Ser或能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸；

[0657] X_{14} 是Ile或Glu；

[0658] X_{15} 是Glu、Asp、Gln、或Gly；

[0659] X_{18} 是芳族或疏水性氨基酸；

[0660] X_{19} 是Glu、Asp、Gln、Ala、或Trp；

[0661] X_{21} 、 X_{25} 、 X_{29} 各自独立地是Tyr、Phe、Trp、His、或具有环己基侧链的氨基酸，其中Tyr、Phe、Trp、环己基侧链能够被一个或多个氟取代；

[0662] X_{22} 是Ala、Gly、Ser、或Val；

[0663] X_{26} 是Asn、Leu、Ile、或His；

[0664] X_{30} 是Ala或Arg；

[0665] 其中所述第一肽和所述第二肽各自包含使所述第一肽与所述第二肽交联的一个至两个氨基酸。

[0666] 7. 一种肽二聚体，所述肽二聚体包含与第二肽缔合的第一肽，其中所述第一肽和所述第二肽各自独立地包含如项2至4所述的SEQ ID NO:13的肽序列。

[0667] 8. 一种肽二聚体，所述肽二聚体包含与第二肽缔合的第一肽，其中所述第一肽和所述第二肽各自独立地包含如项5所述的SEQ ID NO:48的肽序列。

[0668] 9. 一种肽二聚体，所述肽二聚体包含与第二肽缔合的第一肽，其中所述第一肽和

所述第二肽各自独立地包含选自如项1或2至5所述的SEQ ID NO: 1、13或48的肽序列。

[0669] 10. 如项6至9中之一所述的肽二聚体,其中所述二聚体是同二聚体。

[0670] 11. 如项6至9中之一所述的肽二聚体,其中所述二聚体是异二聚体。

[0671] 12. 如前述项中之一所述的肽,其中所述肽包含能够使所述肽与不同序列的另一个肽交联的一个至两个氨基酸。

[0672] 13. 如前述项中之一所述的肽,其中所述能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸能够共价交联。

[0673] 14. 如前述项中之一所述的肽,其中X₁是Cys、Sec、Phe、Trp、或 Tyr。

[0674] 15. 如前述项中之一所述的肽,其中X₁是能够使所述肽与另一个肽交联的非天然氨基酸或是使所述第一肽与所述第二肽交联的非天然氨基酸。

[0675] 16. 如前述项中之一所述的肽,其中X₃、X₄以及X₆中的每一个独立地是 Arg、Lys或 His。

[0676] 17. 如前述项中之一所述的肽,其中X₃和X₄中的每一个独立地是Arg。

[0677] 18. 如前述项中之一所述的肽,其中X₆是Arg、Lys、His、或Cys。

[0678] 19. 如前述项中之一所述的肽,其中X₇是Cys、Sec、Phe、Trp、Tyr、或 His。

[0679] 20. 如前述项中之一所述的肽,其中X₇是Cys。

[0680] 21. 如前述项中之一所述的肽,其中X₇是Sec。

[0681] 22. 如前述项中之一所述的肽,其中X₇是带正电荷或带负电荷的氨基酸。

[0682] 23. 如前述项中之一所述的肽,其中X₇是Phe、Trp或Tyr。

[0683] 24. 如前述项中之一所述的肽,其中X₇是能够使所述肽与另一个肽交联的非天然氨基酸。

[0684] 25. 如前述项中之一所述的肽,其中X₁₀是Glu、Asp或Ala。

[0685] 26. 如前述项中之一所述的肽,其中X₁₀是Asp、His、Pro或包含丙烯酰胺部分的氨基酸。

[0686] 27. 如前述项中之一所述的肽,其中X₁₁是Glu、Asp、Cys、Sec、Phe、Trp、或Tyr。

[0687] 28. 如前述项中之一所述的肽,其中X₁₁是Asp、Gln、Asn、Ala、或 Ser。

[0688] 29. 如前述项中之一所述的肽,其中X₁₁是能够使所述肽与另一个肽交联的非天然氨基酸。

[0689] 30. 如前述项中之一所述的肽,其中X₁₃是Cys、Sec、Phe、Trp、或 Tyr。

[0690] 31. 如前述项中之一所述的肽,其中X₁₃是Ser、Pro、Cys、或Thr。

[0691] 32. 如前述项中之一所述的肽,其中X₁₃是使所述肽与另一个肽交联的非天然氨基酸。

[0692] 33. 如前述项中之一所述的肽,其中X₁₃是Cys或Sec并且X₁₄是Glu。

[0693] 34. 如前述项中之一所述的肽,其中X₁₄是Ile、Val、Glu、Leu、或使第一肽与第二肽交联的氨基酸。

[0694] 35. 如前述项中之一所述的肽,其中X₁₄是Cys、Sec、Phe、Trp、或 Tyr。

[0695] 36. 如前述项中之一所述的肽,其中X₁₅是Glu、Lys、Arg、Ser、Asp、Gln、Gly、或Ala。

[0696] 37. 如前述项中之一所述的肽,其中X₁₆是Asp、Glu、Gln、Ala、或 Ser。

[0697] 38. 如前述项中之一所述的肽,其中X₁₈是His、Phe、Tyr、Trp、Ala、Val、Leu、Ile、或

Met。

[0698] 38a. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₁₈是His。

[0699] 39. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₁₉是Glu、Asp、Gln、Ala、Ser、Trp、Arg、Lys、Leu、Met、或His。

[0700] 40. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₂₀是Tyr或Phe。

[0701] 41. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₂₁是Trp、Tyr、Phe、His、或Gln。

[0702] 42. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₂₂是Ala、Gln、Trp、Leu、Tyr、Gly、Ser、Val、或Asn。

[0703] 43. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₂₃是Arg或Asp。

[0704] 44. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₂₉是Tyr。

[0705] 45. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₂₉是Tyr、Phe、Trp、His、Gln、Arg、Asp、Asn、Ala、Leu、或Glu。

[0706] 46. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₂₁和X₂₅是Trp。

[0707] 47. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₂₅是Trp、Tyr、Gln、Arg、或Asp。

[0708] 48. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₂₅是Trp或Tyr。

[0709] 49. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₂₆是Asn、Leu、Ile、His、Gln、Arg、Phe、或Ala。

[0710] 50. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₂₂是Ala。

[0711] 51. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₂₂是Gly、Ser、或Val。

[0712] 52. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₃₀是Arg。

[0713] 53. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₃₀是Ala、Arg、或Val。

[0714] 54. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₃₁是Val、Dap缀合的丙烯酰胺、或Dab缀合的丙烯酰胺。

[0715] 55. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₃₂是Ala、Arg、或Ser。

[0716] 56. 如前述项中之一所述的肽, 其中X₁₈是His并且X₂₅和X₂₁各自是Trp。

[0717] 57. 如项1至5和12至56中之一所述的肽, 其中所述肽是第一肽, 所述第一肽与第二肽缔合以形成结合靶蛋白的肽二聚体。

[0718] 58. 如项6至56中之一所述的肽, 其中所述肽二聚体结合靶蛋白。

[0719] 59. 如前述项中之一所述的肽, 其中所述靶蛋白是Ras、Ras突变体、Myc/Max、RafA、β-连环蛋白、YAP/TEAD、以及NEMO/IκB激酶。

[0720] 60. 如前述项中之一所述的肽, 其中所述靶蛋白是Ras或Ras突变体。

[0721] 61. 如项57至60中之一所述的肽, 其中所述第二肽具有SEQ ID NO:1、12、13、或48。

[0722] 62. 如项57至61中之一所述的肽, 其中所述第二肽的X₂₁或X₂₅是Tyr、Phe、Trp、His、或具有环己基侧链的氨基酸, 其中Tyr、Phe、Trp、或环己基侧链是任选氟化的。

[0723] 63. 如项57至62中之一所述的肽, 其中所述第二肽的X₂₁是Trp。

[0724] 64. 如项57至63中之一所述的肽, 其中所述第二肽的X₂₅是Tyr。

[0725] 65. 如项57至64中之一所述的肽, 其中所述第一肽的X₂₅是Trp。

[0726] 66. 如项57至65中之一所述的肽, 其中所述第二肽的X₁₈是His, 并且X₂₁和X₂₅均是Trp。

[0727] 67.如项57至66中之一所述的肽,其中所述第一肽和所述第二肽是经由二硫键、二硒键、碳-碳键、酰胺键、酯键、氢键、盐桥、 π 堆积相互作用、或非极性疏水性相互作用缔合的。

[0728] 68.如项57至67中之一所述的肽,其中所述第一肽和所述第二肽是经由二硫键或二硒键缔合的。

[0729] 69.如项57至68中之一所述的肽,其中所述靶蛋白是Ras或Ras突变体。

[0730] 70.如项57至68中之一所述的肽,其中所述靶蛋白是Myc/Max、RalA或Ras/RalA。

[0731] 71.如项57至70中之一所述的肽,其中所述肽二聚体以小于150nM的解离常数(K_d)结合Ras。

[0732] 72.如项57至71中之一所述的肽,其中所述肽在N末端处包含另外的氨基酸。

[0733] 73.如项57至72中之一所述的肽,其中所述肽在C末端处包含另外的氨基酸。

[0734] 74.如项57至73中之一所述的肽,其中所述另外的氨基酸是 X_2G ,其中G位于位置 X_1 ;或GR,其中R位于位置 X_1 。

[0735] 75.如项57至74中之一所述的肽,其中 X_2 是能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸。

[0736] 76.如项57至75中之一所述的肽,其中 X_2 是Cys、Sec、Phe、Trp或Tyr。

[0737] 77.如项57至76中之一所述的肽,其中 X_2 是使所述肽与另一个肽交联的非天然氨基酸。

[0738] 78.如前述项中之一所述的肽,其中所述肽包含与所述SEQ ID NO:1、12、13、或48的氨基酸序列约80%至约99%同源的序列。

[0739] 79.一种肽,所述肽包含低聚化结构域,所述低聚化结构域包含以下序列:

[0740] $PX_aX_bPX_cX_dP$ (SEQ ID NO:2),其中 X_a 、 X_b 、 X_c 是任何非脯氨酸氨基酸,并且 X_d 是能够使所述肽与第二肽交联的氨基酸。

[0741] 80.一种肽,所述肽包含低聚化结构域,所述低聚化结构域包含以下序列:

[0742] $PX_aX_bPX_cX_dP$ (SEQ ID NO:2),其中 X_a 、 X_b 是任何非脯氨酸氨基酸;并且 X_c 和 X_d 是能够使所述肽与第二肽交联的氨基酸。

[0743] 81.如项79和80所述的肽,其中所述第二肽包含以下序列:

[0744] $PX_aX_bPX_cX_dP$ (SEQ ID NO:2)。

[0745] 82.如项79或80所述的肽,所述肽还包含 α -螺旋结构域,所述 α -螺旋结构域包含以下序列:

[0746] $X_{13}X_{14}X_{15}DLX_{18}X_{19}YX_{21}X_{22}RLX_{25}X_{26}YLYX_{29}X_{30}VA$ (SEQ ID NO:3),其中 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{21} 、 X_{22} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{29} 、以及 X_{30} 如前述项中的任一项中所定义。

[0747] 83.如项82所述的肽,其中所述 α -螺旋结构域与靶蛋白缔合。

[0748] 84.如项79至83中之一所述的肽,其中 X_d 是Cys、Sec、Phe、Trp、或Tyr。

[0749] 85.如项84所述的肽,其中 X_d 是能够使所述肽与另一个肽交联的天然或非天然氨基酸。

[0750] 86.一种肽,所述肽包含 α -螺旋结构域,所述 α -螺旋结构域包含以下序列:

[0751] $X_{13}X_{14}X_{15}DLX_{18}X_{19}YX_{21}X_{22}RLX_{25}X_{26}YLYX_{29}X_{30}VA$ (SEQ ID NO:3),其中 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{21} 、 X_{22} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{29} 、以及 X_{30} 如前述项中的任一项中所定义。

- [0752] 87.如前述项中之一所述的肽,所述肽包含选自以下各项的序列:
- [0753] GPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:4);
- [0754] GPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:5);
- [0755] GRRPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO: 6);
- [0756] aPP-M:GPRRPRYPGDDAPVEDLIRFYNDLQQYLVVA (SEQ ID NO: 7);
- [0757] 225-1:GCGGPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:8);
- [0758] 225-1 S13C/I14E:
- [0759] GCGGPRRPRYPGDDACEEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:9);
- [0760] 225-1 A30R:GCGGPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:10);
- [0761] 225-3:GCGGPRRPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:11);
- [0762] PRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:14);
- [0763] PRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:15);
- [0764] RRRPRRPRCPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO: 16);
- [0765] PRRPRYPGDDAPVEDLIRFYNDLQQYLVVA (SEQ ID NO:17);
- [0766] PRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO:18);
- [0767] CGGPRRPRYPGDDACEEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO: 19);
- [0768] PRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:20);
- [0769] PRRPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA (SEQ ID NO: 21);
- [0770] PRRPRCPGDDASLEDLHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:22);
- [0771] PRRPRCPGDQASLEELHEYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:23);
- [0772] PRRPRCPGDNASIKQLHAYWNRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:24);
- [0773] PRRPRCPGDDASIEDLHEYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:25);
- [0774] PRRPRCPGDNASIKQLHAYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:26);
- [0775] PRRPRCPGDNASIRQLHAYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO:27);
- [0776] GCGGPRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 28);
- [0777] PRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO:29);
- [0778] 225-H:PRRPKYPGDAASCAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 30);
- [0779] 225-I:PRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRXA (SEQ ID NO: 31);
- [0780] 225-J:PRRPRYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRZA (SEQ ID NO: 32);
- [0781] 225-K:PRRPCYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 33);
- [0782] 225-L:PRRPKCPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 34);
- [0783] 225-M:PRRPRYPGXAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 35);
- [0784] 225-N:PRRPRYPGZAASIAALHAYWARLWNYLYRVA (SEQ ID NO: 36);
- [0785] 225-4s1:PRRPKYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 37);
- [0786] 291-A:PRRPKHGHAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 38);
- [0787] 291-1:PRRPRHPGNATISQLHHYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 39);
- [0788] 291-H:PRRPHHPGHAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 40);
- [0789] 291-I:PRRPHYPGHAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 41);
- [0790] 291-Q3:PRRPRCPGHAASIAALHAYWARLWNYLYRVR (SEQ ID NO: 42);

- [0791] MY01:GPRRPRCPGDDASIRDLLKYWWRLRLYLLAVA (SEQ ID NO: 43);
- [0792] RL01:GPRRPRCPGDDASISDLLLYWLRLDRYLWAVA (SEQ ID NO: 44);
- [0793] RR01:GPRRPRCPGDDASIRDLVMYWYRLYFYLEAVA (SEQ ID NO: 45);
- [0794] 225-1c:PRRPKYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVS (SEQ ID NO: 46);
- [0795] 225-4d:RPRPKYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVS (SEQ ID NO: 47);
- [0796] 291-T:PRRPYPGDAASIAALHAYWARLWNYLYRVS (SEQ ID NO: 49);
- [0797] Q:PRRPRCPGDNASIRQLHAYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO: 50);以及
- [0798] R:PRRPRCPGDAASIAALHAYWQRLYAYLAAVA (SEQ ID NO: 51);其中X是Dab缀合的丙烯酰胺残基并且Z是Dap缀合的丙烯酰胺残基。
- [0799] 88.如前述项中之一所述的肽,所述肽包含与所述SEQ ID NO:4至11或 14-51的氨基酸序列约75%至约99%同源的序列。
- [0800] 89.如前述项中之一所述的肽,所述肽还与细胞穿透肽或钉接肽缀合。
- [0801] 90.如前述项中之一所述的肽,所述肽包含被小有机硫醇部分修饰的Cys 或Sec。
- [0802] 91.如项90所述的肽,其中所述小有机硫醇部分是叔丁基硫醇或乙硫醇。
- [0803] 92.如前述项中之一所述的肽,所述肽包含L-2,4-二氨基丁酸 (Dab) 或 L-2,3-二氨基丙酸 (Dap) 残基。
- [0804] 93.如前述项中之一所述的肽,所述肽包含被丙烯酸修饰以形成包含丙烯酰胺的侧链的L-2,4-二氨基丁酸 (Dab) 或L-2,3-二氨基丙酸 (Dap) 残基。
- [0805] 94.如前述项中之一所述的肽,所述肽包含一个或多个His,所述His被放置在氨基酸位置中以使得它们在空间上接近所述反向单体肽上的一个或多个阳离子残基或一个或多个His。
- [0806] 95.如前述项中之一所述的肽,所述肽包含被放置在位置X₆、X₇和/或 X₁₀处的一个或多个His。
- [0807] 96.如前述项中之一所述的肽,所述肽包含通过与有机硫醇分子反应而被修饰的Cys或Sec。
- [0808] 97.如项96所述的肽,其中所述有机硫醇分子是2,2'-二吡啶基二硫化物、4,4'-二吡啶基二硫化物、或2,2'-二硫代双(5-硝基吡啶)。
- [0809] 98.如前述项中之一所述的肽,所述肽与所述起始肽相比包含减少的负电荷数。
- [0810] 99.如前述项中之一所述的肽,所述肽在位置X₁₁、X₁₅、X₁₆和/或X₁₉处包含至少一个、两个、三个、或四个不带负电荷的氨基酸。
- [0811] 100.如前述项中之一所述的肽,其中所述不带负电荷的氨基酸是Ala或 Ser。
- [0812] 101.一种治疗有需要的受试者的与Ras相关的疾病或病况的方法,所述方法包括向所述受试者施用如项1至100所述的肽。
- [0813] 102.如项101所述的方法,其中所述与Ras相关的疾病是增殖性疾病。
- [0814] 103.如项101所述的方法,其中所述增殖性疾病是癌症。
- [0815] 104.如项101所述的方法,其中所述与Ras相关的疾病是CFC综合征、毛细血管畸形-动静脉畸形综合征、克斯提洛氏综合征、莱吉斯氏综合征、1型神经纤维瘤病、努南氏综合征、或伴有多发性色斑的努南氏综合征(以前的豹皮综合征)。
- [0816] 105.一种筛选肽二聚体的文库的方法,所述方法包括以下步骤:

- [0817] 用编码第一肽和第二肽的载体转化展示细胞,其中所述第一肽和所述第二肽缔合形成与细胞壁蛋白融合的肽二聚体,
- [0818] 使所述展示细胞与第一标记接触,其中所述第一标记包含靶蛋白并且与表达所述具有增强的与所述靶标的结合的肽二聚体的细胞缔合并且不与不表达所述具有增强的与所述靶标的结合的肽二聚体的细胞缔合;
- [0819] 分离所述与所述第一标记缔合的展示细胞;以及
- [0820] 鉴定所述表现出增强的与所述靶标的结合的第一肽和第二肽。
- [0821] 106.如项105所述的方法,其中所述肽二聚体是各自包含 α -螺旋结构的两个肽的肽同二聚体或肽异二聚体。
- [0822] 107.如项105或106所述的方法,其中所述两个肽共价结合。
- [0823] 108.如项105或106所述的方法,其中所述两个肽非共价结合。
- [0824] 109.如项105或106所述的方法,其中每一个肽独立地包含SEQ ID NO: 1、12、13、或48的序列。
- [0825] 110.如项105或109中之一所述的方法,其中每一个肽包含作为能够使所述肽与另一个肽交联的氨基酸的部分。
- [0826] 111.如项105或110中之一所述的方法,其中所述能够交联的部分是 Cys或Sec。
- [0827] 112.如项105或111中之一所述的方法,其中所述能够交联的部分是能够使所述第一肽与所述第二肽交联的非天然氨基酸。
- [0828] 113.如项105或112中之一所述的方法,其中所述展示细胞是哺乳动物细胞、细菌细胞或噬菌体。
- [0829] 114.如项105或113中之一所述的方法,其中所述展示细胞是酵母细胞。
- [0830] 115.一种核酸,所述核酸编码如项1至100中之一所述的肽。
- [0831] 116.一种宿主细胞,所述宿主细胞包含如项115所述的核酸。
- [0832] 117.一种宿主细胞,所述宿主细胞包含如项1至100中之一所述的肽。

序列表

- <110> 哈佛大学的校长及成员们
- <120> RAS抑制肽和其用途
- <130> H0824.70180W000
- <140> PCT/US2015/031961
- <141> 2015-05-21
- <150> US 62/001,587
- <151> 2014-05-21
- <160> 95
- <170> PatentIn版本 3.5
- <210> 1
- <211> 32
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成多肽
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1) .. (1)
- <223> Xaa是 Gly, Arg, 或是氨基酸,其能使肽与另一种肽交联
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (3) .. (4)
- <223> Xaa是各自独立的带电荷的氨基酸
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (6) .. (6)
- <223> Xaa 是带电荷的氨基酸
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (7) .. (7)
- <223> Xaa是Tyr或是氨基酸,其能够使肽与另一种肽交联
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (11) .. (11)
- <223> Xaa 是带电荷的氨基酸或是氨基酸,其能使肽与另一种肽交联
- <220>

<221> misc_feature
<222> (13) .. (13)
<223> Xaa是Ser 或是氨基酸,其能使肽与另一种肽交联
<220>
<221> misc_feature
<222> (14) .. (14)
<223> Xaa是 Ile或 Glu
<220>
<221> misc_feature
<222> (15) .. (15)
<223> Xaa是Glu, Asp, Gln,或Gly
<220>
<221> misc_feature
<222> (18) .. (18)
<223> Xaa是芳族或疏水性氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (19) .. (19)
<223> Xaa是 Glu, Asp, Gln, Ala, 或 Trp
<220>
<221> misc_feature
<222> (21) .. (21)
<223> Xaa是Tyr,Phe,Trp,His或氨基酸,其具有环己基侧链,其中Tyr,Phe,Trp,?环己基侧链可以被一个或多个氟取代
<220>
<221> misc_feature
<222> (22) .. (22)
<223> Xaa是Ala, Gly, Ser,或Val
<220>
<221> misc_feature
<222> (25) .. (25)
<223> Xaa是Tyr, Phe, Trp, His或氨基酸,其具有环己基侧链,其中Tyr,Phe,Trp,环己基侧链可以被一个或多个氟取代
<220>
<221> misc_feature
<222> (26) .. (26)
<223> Xaa是Asn, Leu, Ile,或His
<220>
<221> misc_feature

〈223〉 合成多肽

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223> Xaa是 Ser 或是氨基酸,其能使肽与另一种肽交联
<220>
<221> misc_feature
<222> (2) .. (2)
<223> Xaa是Ile或Glu
<220>
<221> misc_feature
<222> (3) .. (3)
<223> Xaa是Glu, Asp, Gln,或Gly
<220>
<221> misc_feature
<222> (6) .. (6)
<223> Xaa是芳族或疏水性氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (7) .. (7)
<223> Xaa是Glu, Asp, Gln, Ala,或Trp
<220>
<221> misc_feature
<222> (9) .. (9)
<223> Xaa是Tyr,Phe,Trp,His或氨基酸,其具有环己基侧链,其中Tyr,Phe,Trp,环己基侧链可以被一个或多个氟取代
<220>
<221> misc_feature
<222> (10) .. (10)
<223> Xaa是Ala,Gly,Ser或Val
<220>
<221> misc_feature
<222> (13) .. (13)
<223> Xaa是Tyr,Phe,Trp,His或氨基酸,其具有环己基侧链,其中Tyr,Phe,Trp,环己基侧链可以被一个或多个氟取代
<220>
<221> misc_feature
<222> (14) .. (14)
<223> Xaa是Asn,Leu,Ile或His
<220>

<221> misc_feature

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa是Tyr,Phe,Trp,His或氨基酸,其具有环己基侧链,其中Tyr,Phe,Trp,环己基侧链可以被一个或多个氟取代

<220>

<221> misc_feature

<222> (18) .. (18)

<223> Xaa是Ala或Arg

<400> 3

Xaa Xaa Xaa Asp Leu Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Arg Leu Xaa Xaa Tyr Leu

1 5 10 15

Xaa Xaa Val Ala

20

<210> 4

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 4

Gly Pro Arg Arg Pro Arg Cys Pro Gly Asp Asp Ala Ser Ile Glu Asp

1 5 10 15

Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Ala Val Ala

20 25 30

<210> 5

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 5

Gly Pro Arg Arg Pro Arg Cys Pro Gly Asp Asp Ala Ser Ile Glu Asp

1 5 10 15

Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Arg Val Ala

20 25 30

<210> 6

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 6

Gly	Arg	Arg	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Ile
1				5					10					15	
Glu	Asp	Leu	His	Glu	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Ala
			20					25					30		

Val Ala

<210> 7

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 7

Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Pro	Val	Glu	Asp
1				5					10					15	
Leu	Ile	Arg	Phe	Tyr	Asn	Asp	Leu	Gln	Gln	Tyr	Leu	Asn	Val	Val	Ala
			20					25					30		

<210> 8

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 8

Gly	Cys	Gly	Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser
1				5					10					15	
Ile	Glu	Asp	Leu	His	Glu	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr
			20					25					30		

Ala Val Ala

35

<210> 9

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 9

Gly Cys Gly Gly Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Cys
1 5 10 15
Glu Glu Asp Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr
 20 25 30
Ala Val Ala
 35

<210> 10

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 10

Gly Cys Gly Gly Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Ser
1 5 10 15
Ile Glu Asp Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr
 20 25 30
Arg Val Ala
 35

<210> 11

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 11

Gly Cys Gly Gly Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp
1 5 10 15
Asp Ala Ser Ile Glu Asp Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn
 20 25 30
Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
 35

<210> 12

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223> Xaa可以是任何氨基酸或不存在
<220>
<221> misc_feature
<222> (3) .. (4)
<223> Xaa是各自独立的带电荷的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (6) .. (6)
<223> Xaa 是带电荷的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (7) .. (7)
<223> Xaa是Tyr 或是氨基酸,其能使肽与另一种肽交联
<220>
<221> misc_feature
<222> (10) .. (10)
<223> Xaa 是带电荷的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (11) .. (11)
<223> Xaa 是带电荷的氨基酸 或是氨基酸,其能使肽与另一种肽交联
<220>
<221> misc_feature
<222> (13) .. (13)
<223> Xaa是 Ser, Pro 或是氨基酸,其能使肽与另一种肽交联
<220>
<221> misc_feature
<222> (14) .. (14)
<223> Xaa是Ile, Glu,或Val
<220>
<221> misc_feature
<222> (15) .. (15)
<223> Xaa是Glu, Asp, Gln,或Gly
<220>
<221> misc_feature
<222> (18) .. (18)

<223> Xaa是芳族或疏水性氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (19) .. (19)
<223> Xaa是Glu, Asp, Gln, Ala,或Trp
<220>
<221> misc_feature
<222> (20) .. (20)
<223> Xaa是Tyr或Phe
<220>
<221> misc_feature
<222> (21) .. (21)
<223> Xaa是Tyr,Phe,Trp,His或氨基酸,其具有环己基侧链,其中Tyr,Phe,Trp,环己基侧链可以被一个或多个氟取代
<220>
<221> misc_feature
<222> (22) .. (22)
<223> Xaa是Ala, Gly, Ser,或Val
<220>
<221> misc_feature
<222> (23) .. (23)
<223> Xaa是Arg或Asp
<220>
<221> misc_feature
<222> (25) .. (25)
<223> Xaa是Tyr,Phe,Trp,His或氨基酸,其具有环己基侧链,其中Tyr,Phe,Trp,环己基侧链可以被一个或多个氟取代
<220>
<221> misc_feature
<222> (26) .. (26)
<223> Xaa是Asn, Leu, Ile, His,或Gln
<220>
<221> misc_feature
<222> (29) .. (29)
<223> Xaa是Tyr,Phe,Trp,His或氨基酸,其具有环己基侧链,其中Tyr,Phe,Trp,环己基侧链可以被一个或多个氟取代
<220>
<221> misc_feature
<222> (30) .. (30)

<223> Xaa是Ala, Arg,或Val
<400> 12
Xaa Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Gly Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Asp
1 5 10 15
Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Tyr Leu Xaa Xaa Val Ala
 20 25 30
<210> 13
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (7)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸,并且其中多达7个可以不存在
<220>
<221> misc_feature
<222> (9) .. (10)
<223> Xaa可以独立地是中性或带电荷的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (12) .. (12)
<223> Xaa 是带电荷的氨基酸 或是氨基酸,其能使肽与另一种肽交联
<220>
<221> misc_feature
<222> (13) .. (13)
<223> Xaa是Tyr,His,或是氨基酸,其能使 肽与另一种肽交联
<220>
<221> misc_feature
<222> (16) .. (16)
<223> Xaa是Pro, 带电荷的氨基酸, 或是氨基酸,其能使 肽与另一种肽交联
<220>
<221> misc_feature
<222> (17) .. (17)
<223> Xaa是Ala, Ser, 中性的或 带电荷的氨基酸或是氨基酸,其能使肽与另一种肽
交联
<220>

- <221> misc_feature
<222> (19) .. (19)
<223> Xaa是Ser, Pro, Thr, 或是氨基酸,其能使肽与另一种肽交联
<220>
<221> misc_feature
<222> (20) .. (20)
<223> Xaa是Ile, Glu, Val, Leu,或是氨基酸,其能 使肽与另一种肽交联
<220>
<221> misc_feature
<222> (21) .. (21)
<223> Xaa Glu, Lys, Arg, Ala, Ser, Asp, Gln,或Gly
<220>
<221> misc_feature
<222> (22) .. (22)
<223> Xaa是Asp, Glu, Gln, Ala,或Ser
<220>
<221> misc_feature
<222> (24) .. (24)
<223> Xaa是芳族或疏水性氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (25) .. (25)
<223> Xaa是Glu, Lys, Leu, Met, His, Asp, Gln, Ala, Ser, Trp,或Arg
<220>
<221> misc_feature
<222> (26) .. (26)
<223> Xaa是Tyr或Phe
<220>
<221> misc_feature
<222> (27) .. (27)
<223> Xaa是Gln,Tyr,Phe,Trp,His或氨基酸,其具有环己基侧链,其中Tyr,Phe,Trp,
环己基侧链可以被一个或多个氟取代
<220>
<221> misc_feature
<222> (28) .. (28)
<223> Xaa是Ala, Gln, Trp, Leu, Tyr, Gly, Ser, Val,或Asn
<220>
<221> misc_feature
<222> (29) .. (29)

<223> Xaa是Arg, Asp, Leu,或Ala
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31) .. (31)
 <223> Xaa是Gln,Tyr,Phe,Trp,His或氨基酸,其具有环己基侧链,其中Tyr,Phe,Trp,环己基侧链可以被一个或多个氟取代
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32) .. (32)
 <223> Xaa是Asn, Ala, Leu, Arg, Phe, Ile, His,或Gln
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35) .. (35)
 <223> Xaa是Ala, Leu, Glu, Asn, Gln, Tyr, Phe, Trp, His, 或氨基酸,其具有环己基侧链, 其中 Tyr, Phe, Trp, 环己基侧链可以被一个或多个氟取代
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36) .. (36)
 <223> Xaa是Ala, Arg或Val
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (37) .. (37)
 <223> Xaa是Val 或是氨基酸,其能使肽与另一种肽交联
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38) .. (38)
 <223> Xaa是V, Ala, Arg, Ser, 或是氨基酸,其能使肽与另一种肽交联
 <400> 13
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Gly Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa
 20 25 30
 Tyr Leu Xaa Xaa Xaa Xaa
 35
 <210> 14
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 14

Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Ile	Glu	Asp	Leu
1				5				10					15		
His	Glu	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Val	Ala	
			20					25					30		

<210> 15

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 15

Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Ile	Glu	Asp	Leu
1				5				10					15		
His	Glu	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Val	Ala	
			20					25					30		

<210> 16

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 16

Arg	Arg	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Ile	Glu
1				5				10					15		
Asp	Leu	His	Glu	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Val
			20					25					30		

Ala

<210> 17

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 17

Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Pro	Val	Glu	Asp	Leu
1				5				10					15		

Ile Arg Phe Tyr Asn Asp Leu Gln Gln Tyr Leu Asn Val Val Ala
20 25 30

<210> 18

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 18

Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Ser Ile Glu Asp Leu
1 5 10 15
His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
20 25 30

<210> 19

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 19

Cys Gly Gly Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Cys Glu
1 5 10 15
Glu Asp Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Ala
20 25 30

Val Ala

<210> 20

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 20

Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Ser Ile Glu Asp Leu
1 5 10 15
His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Arg Val Ala
20 25 30

<210> 21

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 21

Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Ile
1				5				10					15		
Glu	Asp	Leu	His	Glu	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Ala
			20					25					30		

Val Ala

<210> 22

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 22

Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu
1				5				10					15		
His	Glu	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Val	Ala	
			20					25					30		

<210> 23

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 23

Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Gln	Ala	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu
1				5				10					15		
His	Glu	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Val	Ala	
			20					25					30		

<210> 24

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 24

Pro Arg Arg Pro Arg Cys Pro Gly Asp Asn Ala Ser Ile Lys Gln Leu

1	5	10	15											
His	Ala	Tyr	Trp	Asn	Arg	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Ala
20				25				30						

<210> 25

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 25

Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Ile	Glu	Asp	Leu
1				5				10					15		
His	Glu	Tyr	Trp	Gln	Arg	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Ala	
20				25				30							

<210> 26

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 26

Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Asn	Ala	Ser	Ile	Lys	Gln	Leu
1				5				10					15		
His	Ala	Tyr	Trp	Gln	Arg	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Ala	
20				25				30							

<210> 27

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 27

Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Asn	Ala	Ser	Ile	Arg	Gln	Leu
1				5				10					15		
His	Ala	Tyr	Trp	Gln	Arg	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Ala	
20				25				30							

<210> 28

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 28

Gly	Cys	Gly	Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ala	Ala	Ser
1				5					10					15	
Ile	Ala	Ala	Leu	His	Ala	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr
			20					25					30		
Arg	Val	Ala													
			35												

<210> 29

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 29

Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Leu
1				5					10					15	
His	Ala	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Val	Ala	
			20					25					30		

<210> 30

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 30

Pro	Arg	Arg	Pro	Lys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ala	Ala	Ser	Cys	Ala	Ala	Leu
1				5					10					15	
His	Ala	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Val	Ala	
			20					25					30		

<210> 31

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (30) .. (30)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 31

Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Leu
1				5				10					15		
His	Ala	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Xaa	Ala	
			20					25					30		

<210> 32

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 32

Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Leu
1				5				10					15		
His	Ala	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Glx	Ala	
			20					25					30		

<210> 33

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 33

Pro	Arg	Arg	Pro	Cys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Leu
1				5				10					15		
His	Ala	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Val	Ala	
			20					25					30		

<210> 34

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 34

Pro	Arg	Arg	Pro	Lys	Cys	Pro	Gly	Asp	Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Leu
1				5				10					15		

His Ala Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Arg Val Ala
20 25 30

<210> 35

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) .. (9)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 35

Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Xaa Ala Ala Ser Ile Ala Ala Leu
1 5 10 15

His Ala Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Arg Val Ala
20 25 30

<210> 36

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 36

Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Glx Ala Ala Ser Ile Ala Ala Leu
1 5 10 15

His Ala Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Arg Val Ala
20 25 30

<210> 37

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 37

Pro Arg Arg Pro Lys Tyr Pro Gly Asp Ala Ala Ser Ile Ala Ala Leu
1 5 10 15

His Ala Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Arg Val Arg
20 25 30

<210> 38

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 38

Pro Arg Arg Pro Lys His Pro Gly His Ala Ala Ser Ile Ala Ala Leu

1 5 10 15

His Ala Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Arg Val Arg

20 25 30

<210> 39

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 39

Pro Arg Arg Pro Arg His Pro Gly Pro Asn Ala Thr Ile Ser Gln Leu

1 5 10 15

His His Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Arg Val Arg

20 25 30

<210> 40

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 40

Pro Arg Arg Pro His His Pro Gly His Ala Ala Ser Ile Ala Ala Leu

1 5 10 15

His Ala Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Arg Val Arg

20 25 30

<210> 41

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 41

Pro	Arg	Arg	Pro	His	Tyr	Pro	Gly	His	Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Leu
1				5				10					15		
His	Ala	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Val	Arg	
			20				25					30			

<210> 42

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 42

Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	His	Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Leu
1				5				10					15		
His	Ala	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Val	Arg	
			20				25					30			

<210> 43

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 43

Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Ile	Arg	Asp
1				5				10					15		
Leu	Leu	Lys	Tyr	Trp	Trp	Arg	Leu	Arg	Leu	Tyr	Leu	Leu	Ala	Val	Ala
			20				25					30			

<210> 44

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 44

Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Ile	Ser	Asp
1				5				10					15		
Leu	Leu	Leu	Tyr	Trp	Leu	Arg	Leu	Asp	Arg	Tyr	Leu	Trp	Ala	Val	Ala
			20				25					30			

<210> 45

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 45

Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Ile	Arg	Asp
1				5				10					15		
Leu	Val	Met	Tyr	Trp	Tyr	Arg	Leu	Tyr	Phe	Tyr	Leu	Glu	Ala	Val	Ala
			20					25					30		

<210> 46

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 46

Pro	Arg	Arg	Pro	Lys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Leu
1				5				10					15		
His	Ala	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Val	Ser	
			20					25					30		

<210> 47

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 47

Arg	Pro	Arg	Arg	Pro	Lys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala
1				5				10					15		
Leu	His	Ala	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Val	Ser
			20					25					30		

<210> 48

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

- <221> misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223> Xaa任选地存在和存在时,是Gly, Arg,
或是氨基酸,其能使肽与另一种肽交联
<220>
<221> misc_feature
<222> (3) .. (4)
<223> Xaa各自独立地为中性的或带正电荷的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (6) .. (6)
<223> Xaa是中性的或 带正电荷的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (7) .. (7)
<223> Xaa是Tyr 或是氨基酸,其能使肽与另一种肽交联
<220>
<221> misc_feature
<222> (10) .. (10)
<223> Xaa是Asp 或中性的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (13) .. (13)
<223> Xaa是Ser, Thr, 或是氨基酸,其能
使肽与另一种肽交联
<220>
<221> misc_feature
<222> (14) .. (14)
<223> Xaa是Ile或Leu
<220>
<221> misc_feature
<222> (21) .. (21)
<223> Xaa是 Tyr, Phe, Trp, His, 或氨基酸,其具有环己基侧链, 其中 Tyr, Phe,
Trp环己基侧链可以被一个或多个氟取代
<220>
<221> misc_feature
<222> (23) .. (23)
<223> Xaa是Arg, Leu,或Ala
<220>

<221> misc_feature

<222> (25) .. (25)

<223> Xaa是 Tyr, Phe, Trp, His, 或氨基酸,其具有环己基侧链, 其中环己基侧链, 其中 Tyr, Phe, Trp,环己基侧链可以被一个或多个氟取代

<220>

<221> misc_feature

<222> (29) .. (29)

<223> Xaa是Tyr, Phe, Trp, His, 或氨基酸,其具有环己基侧链, 其中 Tyr, Phe, Trp 环己基侧链可以被一个或多个氟取代

<220>

<221> misc_feature

<222> (30) .. (30)

<223> Xaa是Ala或Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (32) .. (32)

<223> Xaa是Ala, Ser,或Arg

<400> 48

Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Pro	Gly	Xaa	Ala	Ala	Xaa	Xaa	Ala	Ala
1				5				10						15	
Leu	His	Ala	Tyr	Xaa	Ala	Xaa	Leu	Xaa	Asn	Tyr	Leu	Xaa	Xaa	Val	Xaa
				20				25						30	

<210> 49

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 49

Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Leu
1				5				10						15	
His	Ala	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Val	Ser	
				20				25						30	

<210> 50

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 50

Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Asn	Ala	Ser	Ile	Arg	Gln	Leu
1				5				10						15	
His	Ala	Tyr	Trp	Gln	Arg	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Ala	
			20					25					30		

<210> 51

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 51

Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Leu
1				5				10						15	
His	Ala	Tyr	Trp	Gln	Arg	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Ala	
			20					25					30		

<210> 52

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 52

Gly	Pro	Ser	Gln	Pro	Thr	Tyr	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Pro	Val	Glu	Asp
1				5				10						15	
Leu	Ile	Arg	Phe	Tyr	Asn	Asp	Leu	Gln	Gln	Tyr	Leu	Asn	Val	Val	Ala
			20					25					30		

<210> 53

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 53

Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Pro	Val	Glu	Asp
1				5				10						15	
Leu	Ile	Arg	Phe	Tyr	Asn	Asp	Leu	Gln	Gln	Tyr	Leu	Asn	Val	Val	Ala
			20					25					30		

<210> 54

<211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15) .. (15)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18) .. (19)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (21)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23) .. (23)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25) .. (26)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29) .. (29)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
 <400> 54
 Gly Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Pro Val Xaa Asp
 1 5 10 15
 Leu Xaa Xaa Phe Xaa Ala Xaa Leu Xaa Xaa Tyr Leu Xaa Val Val Ala
 20 25 30
 <210> 55
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 合成多肽

<400> 55

His His His His His His

1 5

<210> 56

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 56

Gly Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Pro Val Glu Asp

1 5 10 15

Leu His Ala Phe Trp Ala Ala Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Val Val Ala

20 25 30

<210> 57

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 57

Gly Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Pro Val Gly Asp

1 5 10 15

Leu His Glu Phe Trp Ala Gln Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Val Val Ala

20 25 30

<210> 58

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 58

Gly Pro Arg Arg Pro Lys Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Pro Val Glu Asp

1 5 10 15

Leu His Trp Phe Trp Ala Ala Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Val Val Ala

20 25 30

<210> 59

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 59

Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Val	Glu	Asp
1				5				10					15		
Leu	His	Glu	Phe	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Val	Ala
			20					25					30		

<210> 60

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 60

Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Ile	Glu	Asp
1				5				10					15		
Leu	His	Ala	Phe	Trp	Ala	Ala	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Val	Ala
			20					25					30		

<210> 61

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 61

Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Val	Glu	Asp
1				5				10					15		
Leu	His	Glu	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Val	Ala
			20					25					30		

<210> 62

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 62

Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Ile	Glu	Asp
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15
Leu His Glu Phe Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Ala Val Ala			
20	25	30	

<210> 63

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 63

Gly Pro Arg Arg Pro Arg Cys Pro Gly Asp Asp Ala Ser Val Glu Asp			
1	5	10	15
Leu His Glu Phe Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Ala Val Ala			
20	25	30	

<210> 64

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 64

Gly Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Ser			
1	5	10	15
Ile Glu Asp Leu His Ala Phe Trp Ala Ala Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr			
20	25	30	

Ala Val Ala

35

<210> 65

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 65

Gly Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Ser Ile Glu Asp			
1	5	10	15
Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Ala Val Ala			
20	25	30	

<210> 66

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 66

Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Ile	Glu	Asp
1				5				10					15		
Leu	His	Ala	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Val	Ala
			20					25					30		

<210> 67

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 67

Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Ile	Glu	Asp
1				5				10					15		
Leu	His	Glu	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Pro	Val	Ala
			20					25					30		

<210> 68

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 68

Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Val	Glu	Asp
1				5				10					15		
Leu	His	Glu	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Val	Ala
			20					25					30		

<210> 69

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 69

Gly Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Ser Ile Glu Asp
1 5 10 15
Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
 20 25 30

<210> 70

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 70

Gly Pro Arg Arg Pro Arg Cys Pro Gly Asp Asp Ala Ser Ile Glu Asp
1 5 10 15
Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
 20 25 30

<210> 71

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 71

Gly Pro Arg Arg Pro Arg Cys Pro Gly Asp Asp Ala Ser Val Glu Asp
1 5 10 15
Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
 20 25 30

<210> 72

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 72

Gly Pro Arg Arg Pro Arg Cys Pro Gly Asp Asp Ala Ser Thr Glu Asp
1 5 10 15
Leu His Ala Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
 20 25 30

<210> 73

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 73

Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Val	Glu	Asp
1				5				10					15		
Leu	His	Ala	Tyr	Trp	Ala	Lys	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Val	Ala
			20					25					30		

<210> 74

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 74

Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Thr	Glu	Asp
1				5				10					15		
Leu	His	Ala	Tyr	Trp	Ala	Lys	Leu	Trp	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Val	Ala
			20					25					30		

<210> 75

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 75

Gly	Cys	Gly	Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser
1				5				10					15		
Ile	Glu	Asp	Leu	His	Glu	Tyr	Trp	Ala	Arg	Leu	Trp	Ala	Tyr	Leu	Tyr
			20					25					30		

Ala Val Ala

35

<210> 76

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 76

Gly Cys Gly Gly Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp
1 5 10 15
Asp Ala Ser Ile Glu Asp Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn
 20 25 30
Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
 35

<210> 77

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 77

Gly Cys Gly Gly Pro Arg Arg Pro Ala Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp
1 5 10 15
Asp Ala Ser Ile Glu Asp Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn
 20 25 30
Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
 35

<210> 78

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 78

Gly Cys Gly Gly Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Ala Tyr Pro Gly Asp
1 5 10 15
Asp Ala Ser Ile Glu Asp Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn
 20 25 30
Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
 35

<210> 79

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 79

Gly Cys Gly Gly Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp
1 5 10 15
Ala Ala Ser Ile Glu Asp Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn
 20 25 30
Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
 35

<210> 80

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 80

Gly Cys Gly Gly Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp
1 5 10 15
Asp Ala Ser Ala Glu Asp Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn
 20 25 30
Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
 35

<210> 81

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 81

Gly Cys Gly Gly Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp
1 5 10 15
Asp Ala Ser Ile Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn
 20 25 30
Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
 35

<210> 82

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 82

Gly Cys Gly Gly Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp
1 5 10 15
Asp Ala Ser Ile Glu Asp Leu His Glu Tyr Ala Ala Arg Leu Trp Asn
 20 25 30
Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
 35

<210> 83

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 83

Gly Cys Gly Gly Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp
1 5 10 15
Asp Ala Ser Ile Glu Asp Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Ala Asn
 20 25 30
Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
 35

<210> 84

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 84

Gly Cys Gly Gly Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp
1 5 10 15
Asp Ala Ser Ile Glu Asp Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Ala
 20 25 30
Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
 35

<210> 85

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 85

Gly Cys Gly Gly Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp
1 5 10 15
Asp Ala Ser Ile Glu Asp Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn
 20 25 30
Tyr Leu Ala Ala Val Ala
 35

<210> 86

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (2)

<223> Xaa 由NNK密码子编码

<400> 86

Xaa Xaa Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Ser Ile Glu Asp
1 5 10 15
Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
 20 25 30

<210> 87

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (2) .. (3)

<223> Xaa 由NNK密码子编码

<400> 87

Gly Xaa Xaa Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Ser Ile Glu Asp
1 5 10 15
Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Ala Val Ala
 20 25 30

<210> 88

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (3) .. (4)

<223> Xaa 由NNK密码子编码

<400> 88

Gly Pro Xaa Xaa Pro Arg Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Ser Ile Glu Asp

1 5 10 15

Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Ala Val Ala

20 25 30

<210> 89

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (4) .. (5)

<223> Xaa 由NNK密码子编码

<400> 89

Gly Pro Arg Xaa Xaa Arg Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Ser Ile Glu Asp

1 5 10 15

Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Ala Val Ala

20 25 30

<210> 90

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (31) .. (32)

<223> Xaa 由NNK密码子编码

<400> 90

Gly Pro Arg Arg Pro Arg Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Ser Ile Glu Asp
 1 5 10 15
 Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Ala Xaa Xaa
 20 25 30

<210> 91

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 91

Ile Glu Asp Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

Ala

<210> 92

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 92

Glu Asp Leu His Glu Tyr Trp Ala Arg Leu Trp Asn Tyr Leu Tyr Ala
 1 5 10 15

Val

<210> 93

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa 是甘氨酸或可以不存在

<220>

<221> misc_feature

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (21) .. (26)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸并且最多两个氨基酸可以不存在

<220>

<221> misc_feature

<222> (29) .. (29)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (45) .. (45)

<223> Xaa 是甘氨酸或可以不存在

<400> 93

Cys Gly Xaa Ile Glu Asp Ala His Glu Ala Trp Ala Arg Leu Trp Asn

1 5 10 15

Xaa Leu Tyr Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Asp Xaa His Glu Ala

20 25 30

Trp Ala Arg Leu Trp Asn Ala Leu Tyr Ala Val Gly Xaa Cys

35 40 45

<210> 94

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 94

Asp Ser Leu Glu Phe Ile Ala Ser Lys Leu Ala

1 5 10

<210> 95

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 95

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10

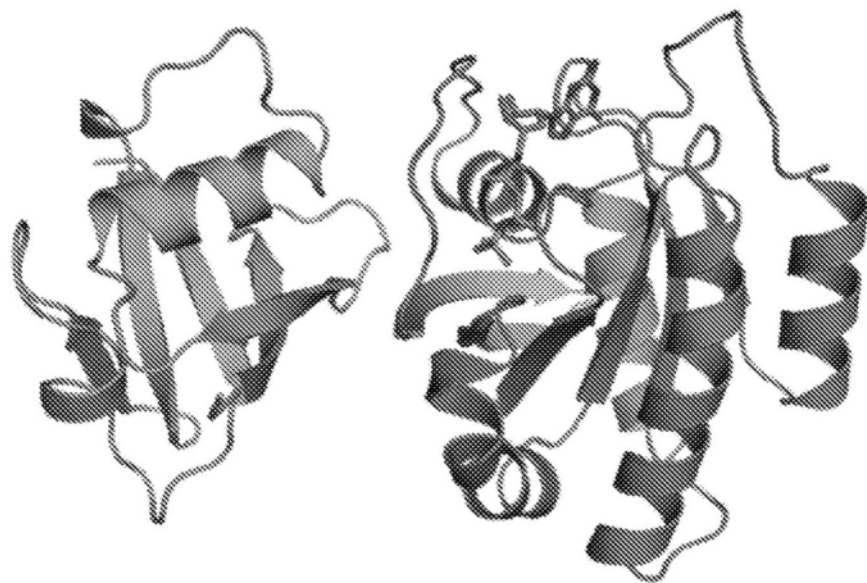


图1

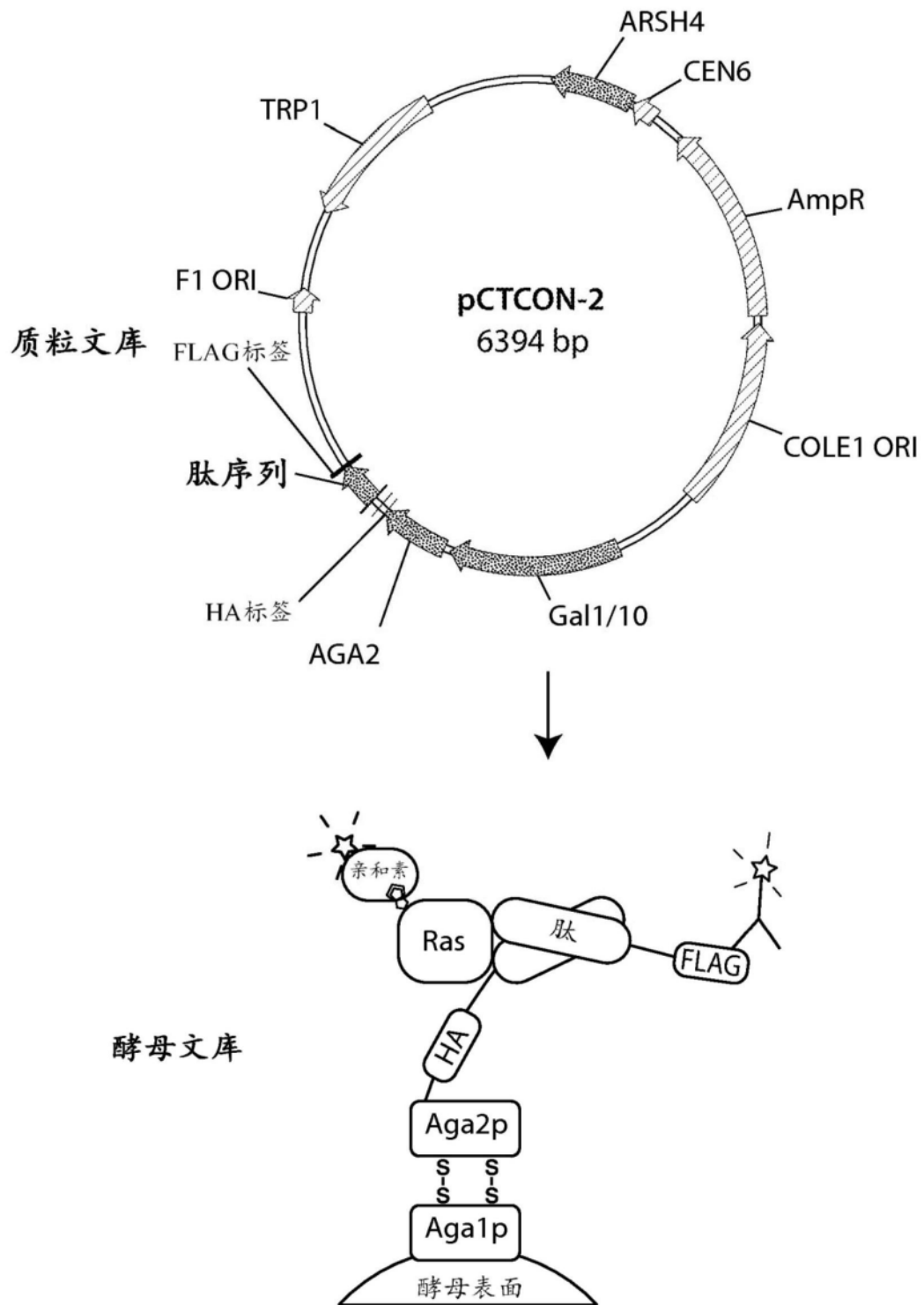


图2

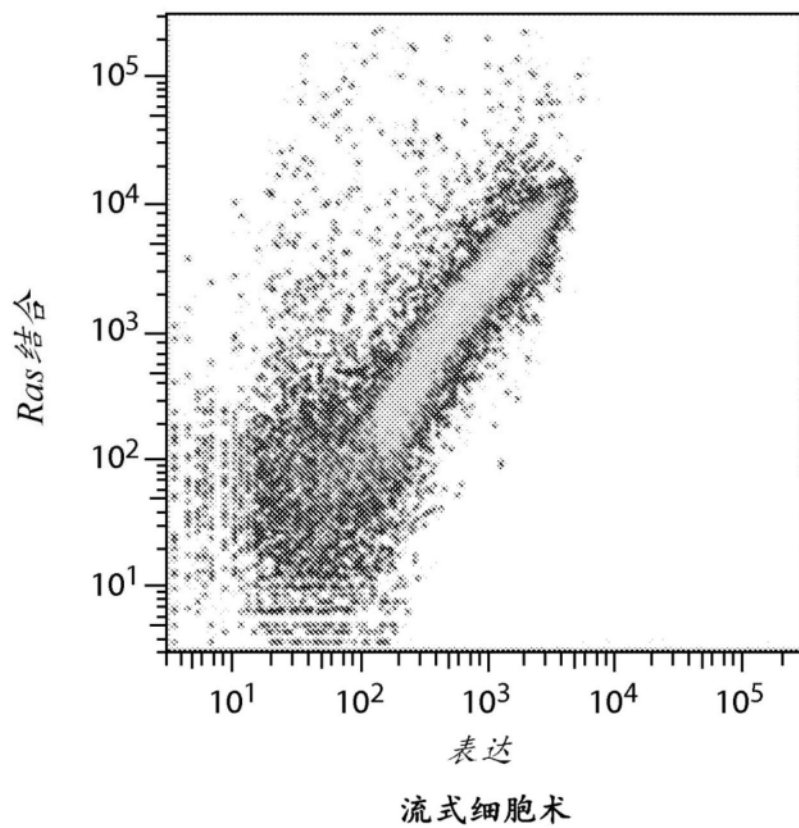


图2续

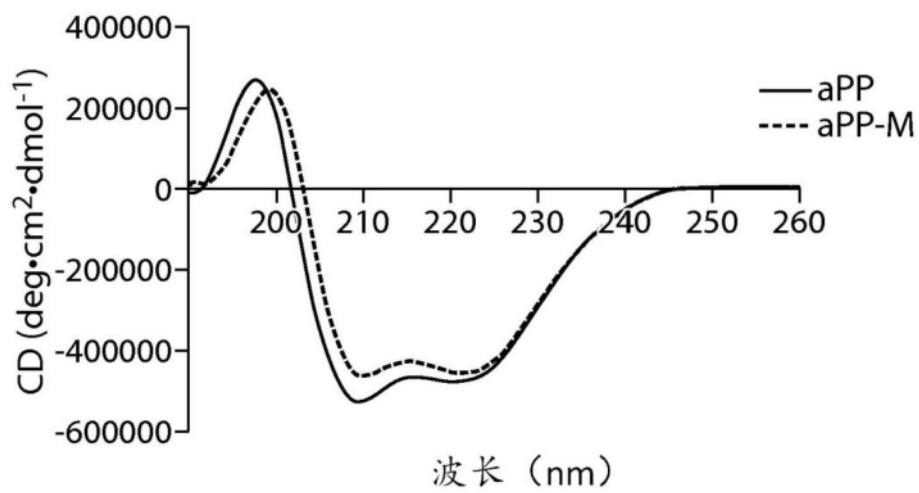


图3A

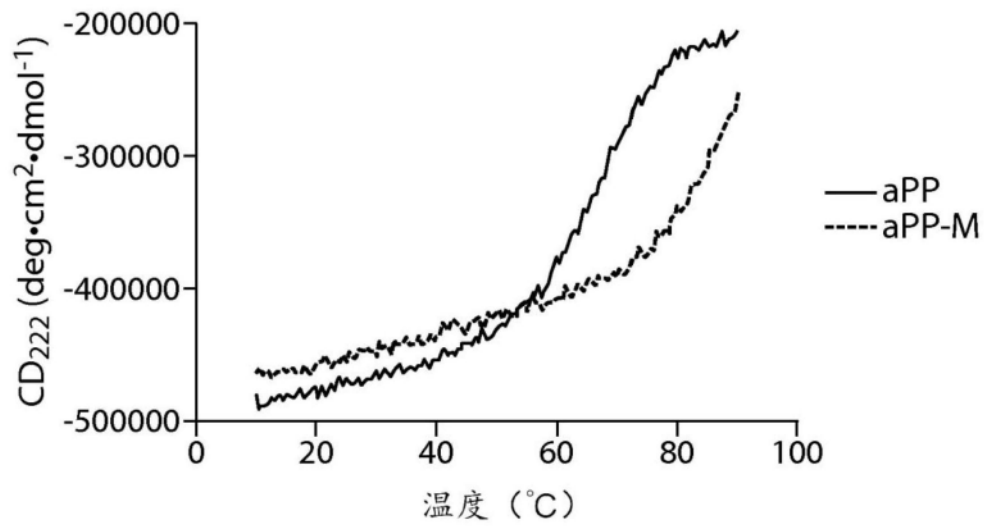


图3B

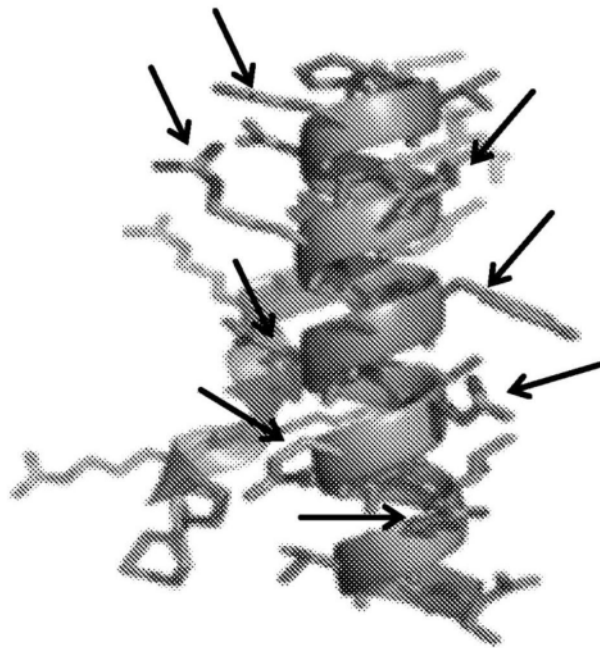


图4A

文库

序列

aPP

GPSQPTYPGDDAPVEDLIRFYNDLQQYLVVA

aPP-M

GPRRPRYPGDDAPVEDLIRFYNDLQQYLVVA

aPP 文库

GPRRPRYPGDDAPVDDLXXFXAXLXXYLXVVA

图4B

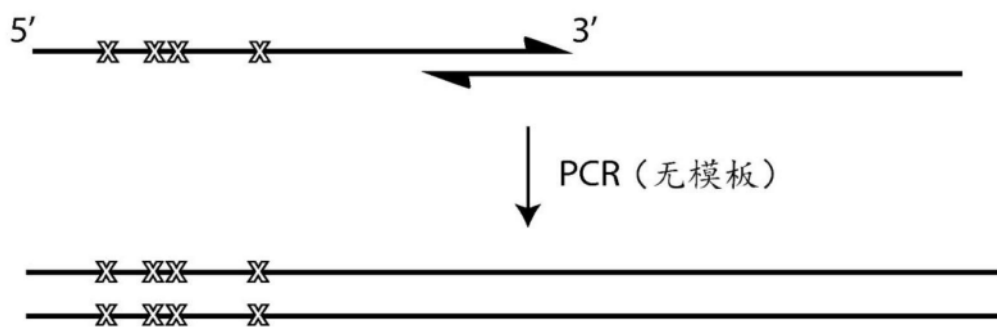


图5

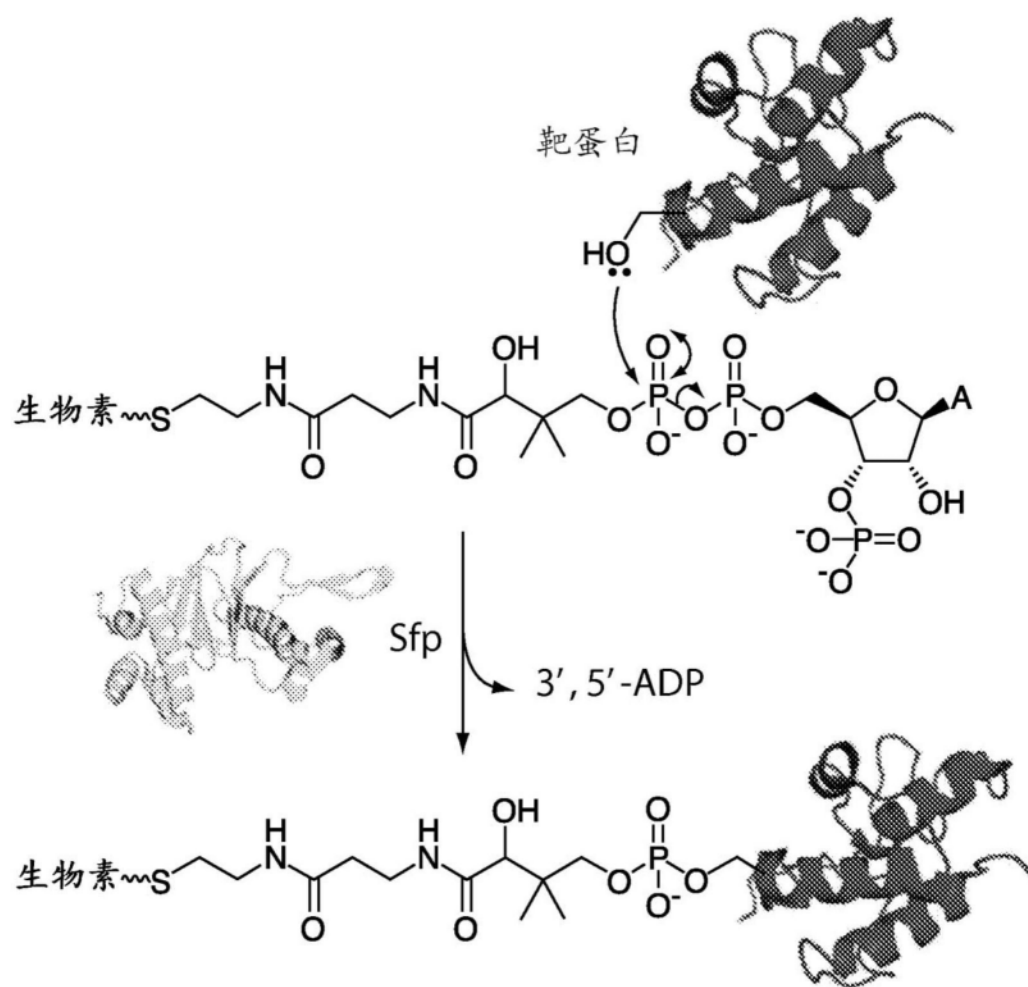


图6

凝胶过滤 (Superdex 75)

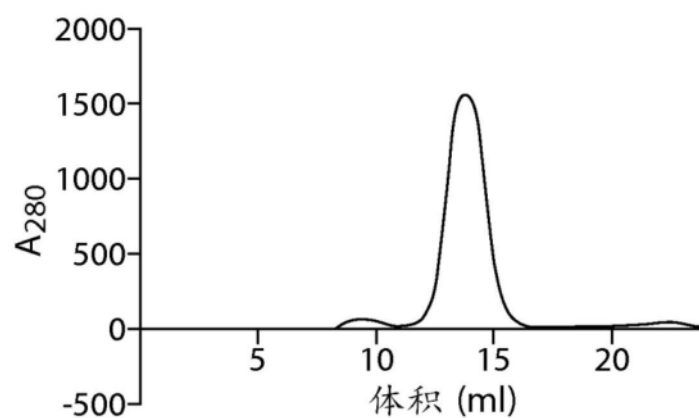


图7A

HPLC核苷酸分析

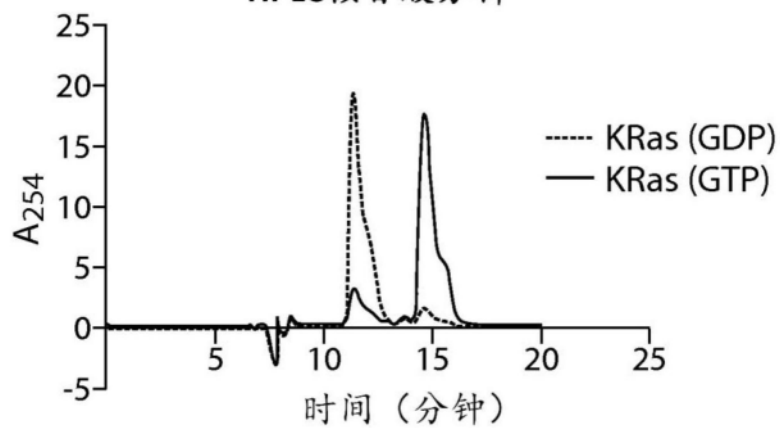


图7B

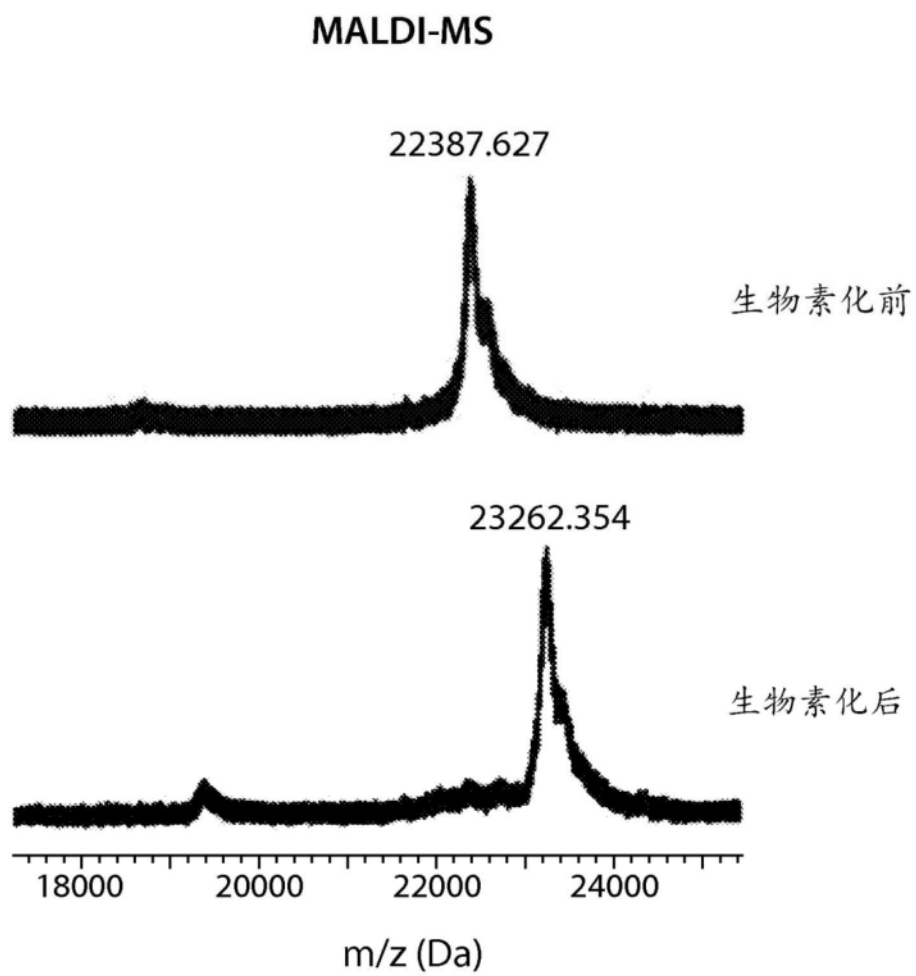


图7C

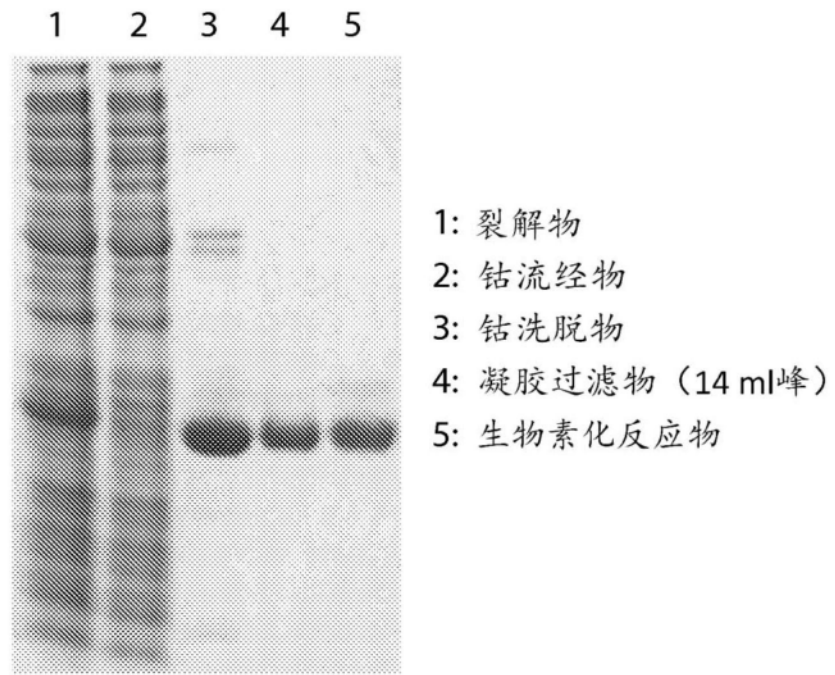


图8

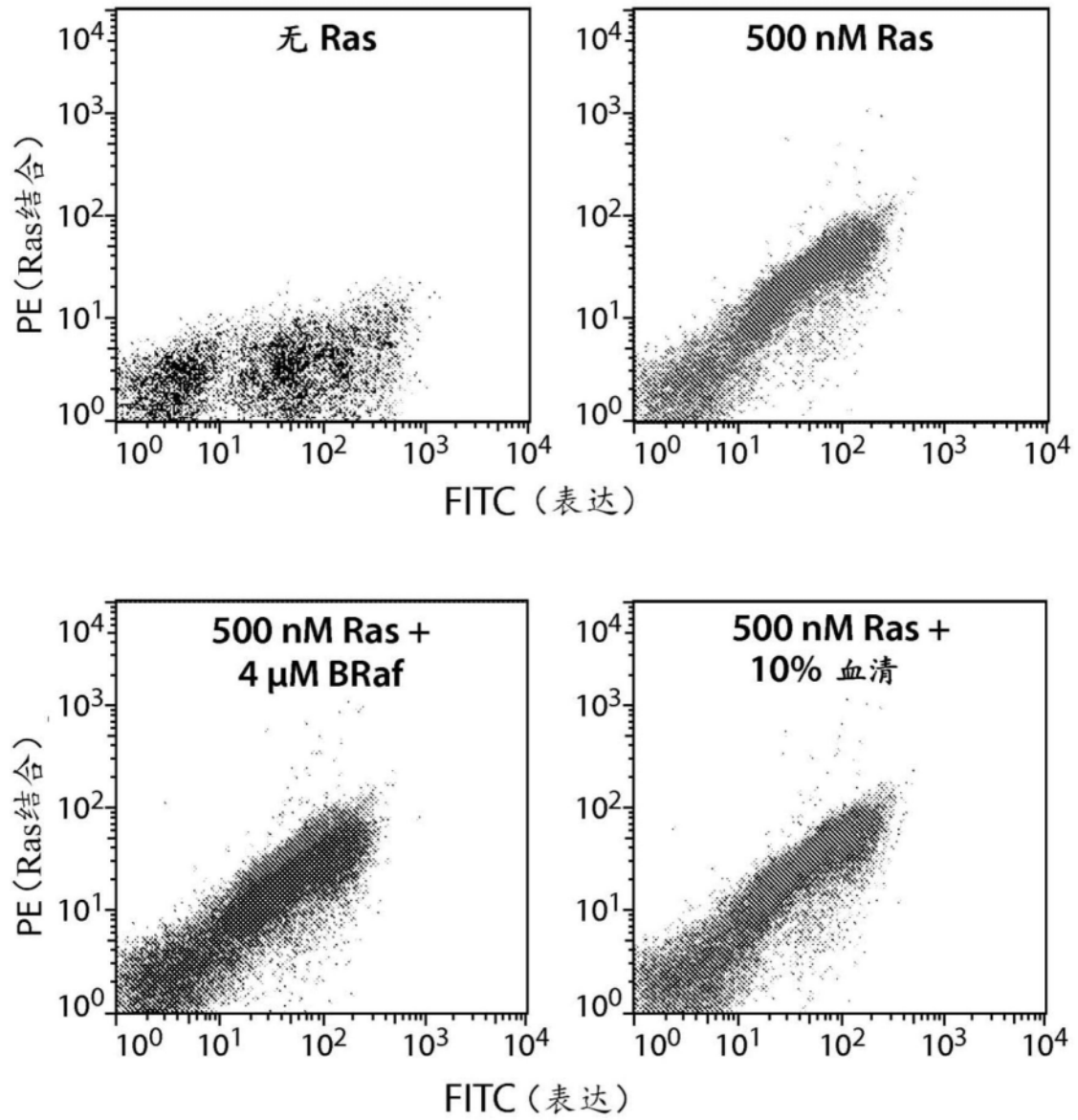


图9

aPP文库	GPRRPRYPGDDAPV <u>XDLXXFXAXLXXYLXVVA</u>
	以1 μ M, 然后1.8 μ M, 然后500 nM的KRas筛选:
221-1	GPRRPRYPGDDAPV <u>EDLHAFWAALWNYLYVVA</u>
221-2	GPRRPRYPGDDAPV <u>GDLEHFWAQLWNYLYVVA</u>
221-3	GPRR <u>P</u> KYPGDDAPV <u>EDLHFWAALWNYLYVVA</u>
	易错PCR: 以100 nM, 然后50 nM的KRas筛选:
223-1	GPRRPRYPGDDA <u>S</u> VEDL <u>HEFWARLWNYLYAVA</u>
223-2	GPRRPRYPGDDA <u>SIEDLHAFWAALWNYLYAVA</u>
	易错PCR: 以25 nM的KRas筛选:
224-1	GPRRPR <u>C</u> PGDDA <u>S</u> VEDL <u>HEYWARLWNYLYAVA</u>
224-2	GPRRPR <u>C</u> PGDDA <u>SIEDLHEFWARLWNYLYAVA</u>
224-3	GPRRPR <u>C</u> PGDDA <u>S</u> VEDL <u>HEFWARLWNYLYAVA</u>
224-4	G <u>PRRR</u> PRRPRYPGDDA <u>SIEDLHAFWAALWNYLYAVA</u>
	改组(Y7)模板的易错PCR: 以100 nM的KRas筛选:
225-1	GPRRPRYPGDDA <u>SIEDLHEYWARLWNYLYAVA</u>
225-5	GPRRPRYPGDDA <u>SIEDLHAYWARLWNYLYAVA</u>
225-6	GPRRPRYPGDDA <u>SIEDLHEYWARLWNYLYPVA</u>
	易错PCR: 以100 nM, 然后50 nM, 然后20 nM的KRas筛选:
226-1	GPRRPRYPGDDA <u>S</u> VEDL <u>HEYWARLWNYLYAVA</u>
226-2 (225-1)	GPRRPRYPGDDA <u>SIEDLHEYWARLWNYLYAVA</u>
226-3	GPRRPR <u>C</u> PGDDA <u>SIEDLHEYWARLWNYLYAVA</u>
226-4 (224-1)	GPRRPR <u>C</u> PGDDA <u>S</u> VEDL <u>HEYWARLWNYLYAVA</u>
226-5	GPRRPR <u>C</u> PGDDA <u>STEDLHAYWARLWNYLYAVA</u>
226-6	GPRRPR <u>C</u> PGDDA <u>S</u> VEDL <u>HAYWAKLWNYLYAVA</u>
226-7	GPRRPR <u>C</u> PGDDA <u>STEDLHAYWAKLWNYLYAVA</u>

图10

<u>肽</u>	<u>序列</u>
225-1	GCGGPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA
225-1 N26A	GCGGPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLW <u>A</u> YLYAVA
225-3	GCGGPRRPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA
225-3 R3A	GCGGPRRP <u>A</u> RPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA
225-3 R6A	GCGGPRRPRR <u>A</u> YPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA
225-3 D11A	GCGGPRRPRRPRYPGD <u>A</u> ASIEDLHEYWARLWNYLYAVA
225-3 I14A	GCGGPRRPRRPRYPGDDAS <u>A</u> EDLHEYWARLWNYLYAVA
225-3 H18A	GCGGPRRPRRPRYPGDDASIEDL <u>A</u> EYWARLWNYLYAVA
225-3 W21A	GCGGPRRPRRPRYPGDDASIEDLHEY <u>A</u> ARLWNYLYAVA
225-3 W25A	GCGGPRRPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARL <u>A</u> NYLYAVA
225-3 N26A	GCGGPRRPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLW <u>A</u> YLYAVA
225-3 Y29A	GCGGPRRPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYL <u>A</u> AVA

图11

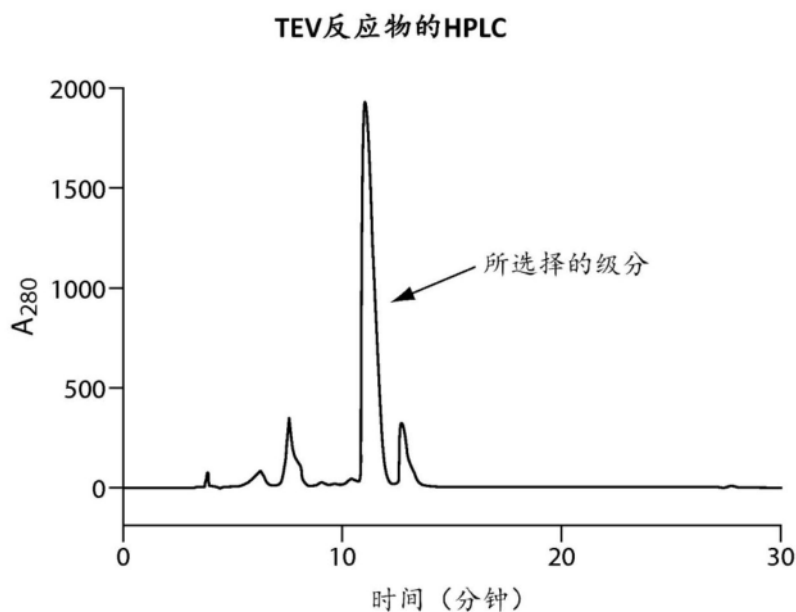


图12A

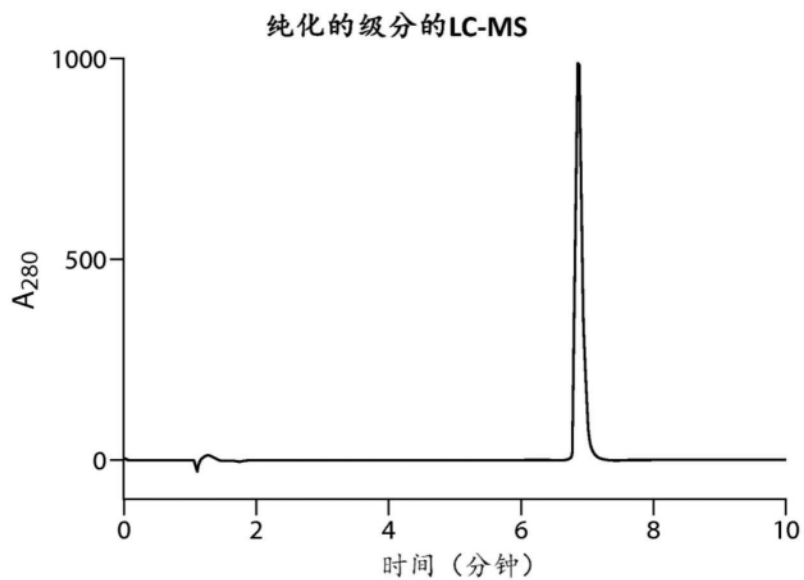


图12B

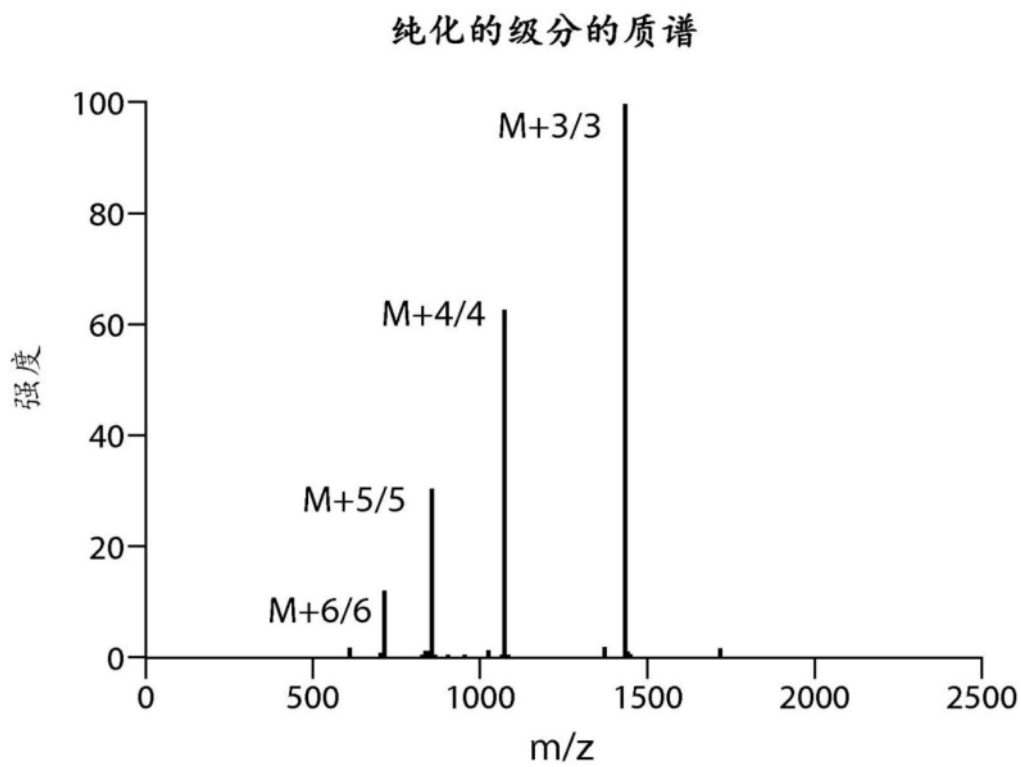


图12C

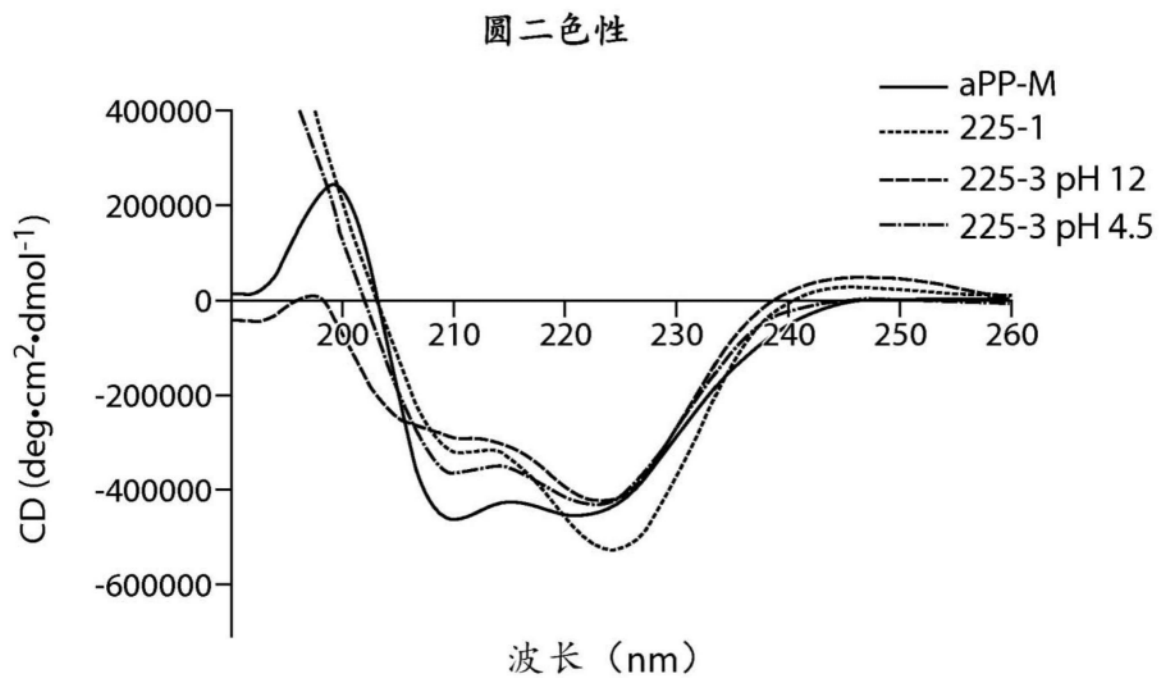


图13A

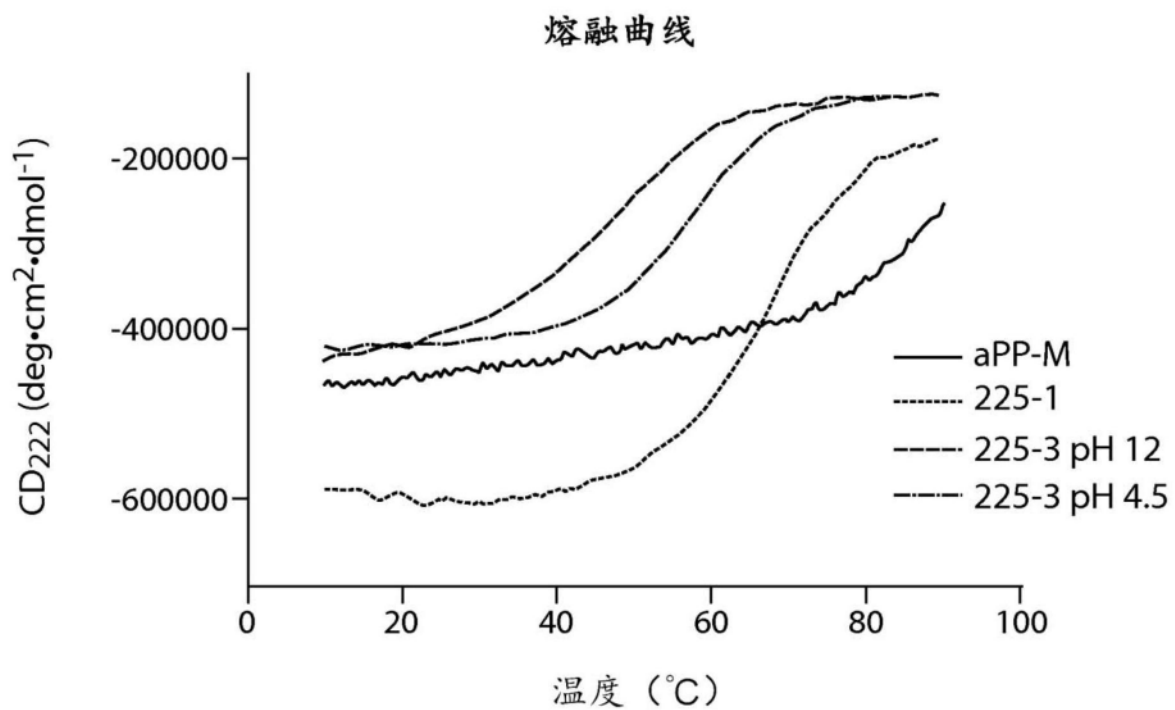


图13B

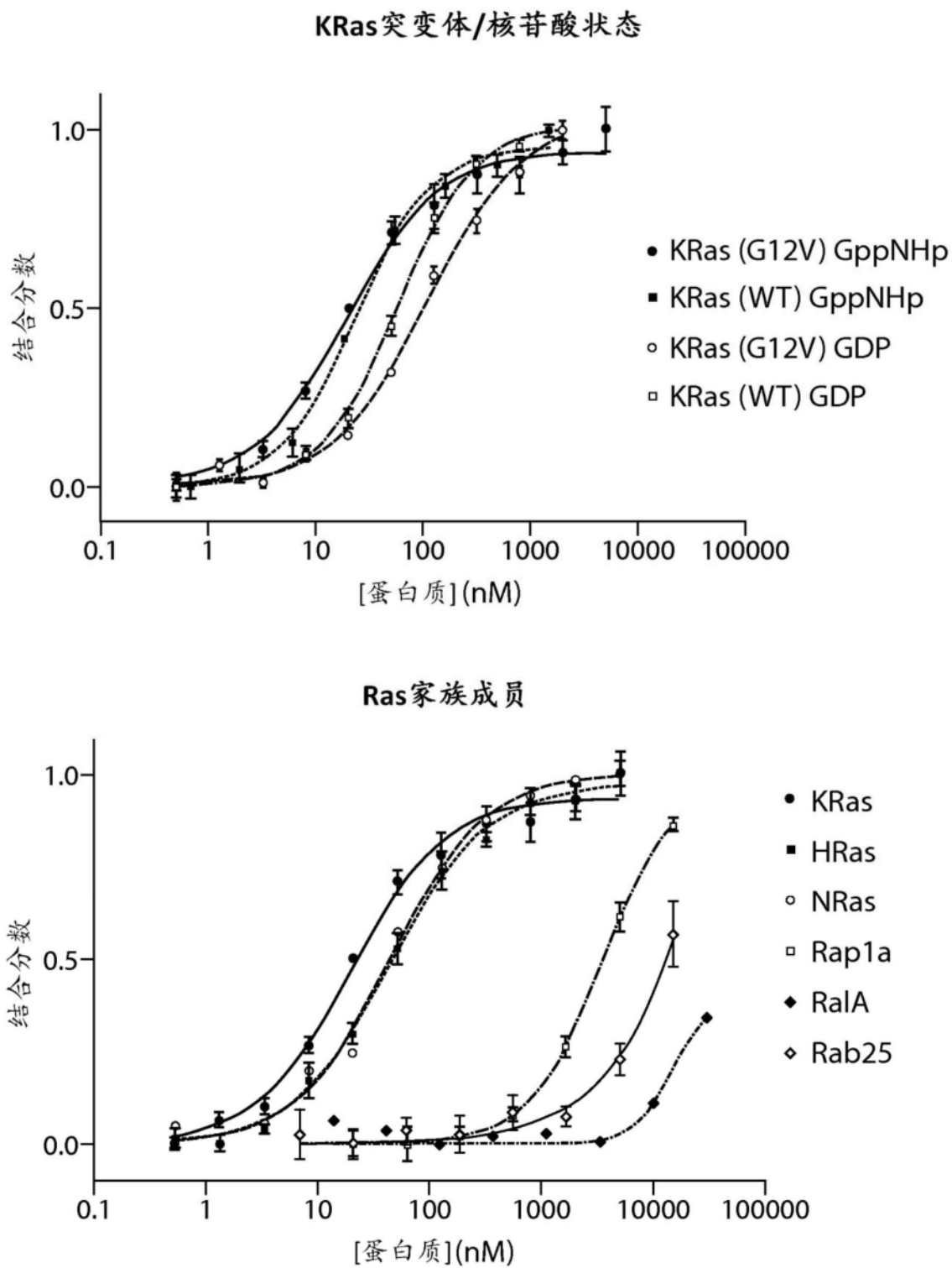


图14

蛋白质	Kd (nM)	希尔系数
KRas (G12V) GppNHp	20	1.0
KRas (WT) GppNHp	24	1.2
KRas (G12V) GDP	110	1.0
KRas (WT) GDP	38	1.0
HRas (G12V) GppNHp	45	1.0
NRas (G12V) GppNHp	45	1.0
Rap1a (G12V) GppNHp	3500	1.4
RalA (WT) GppNHp	>5000	n/a
Rab25 (WT) GppNHp	>5000	n/a

图14续

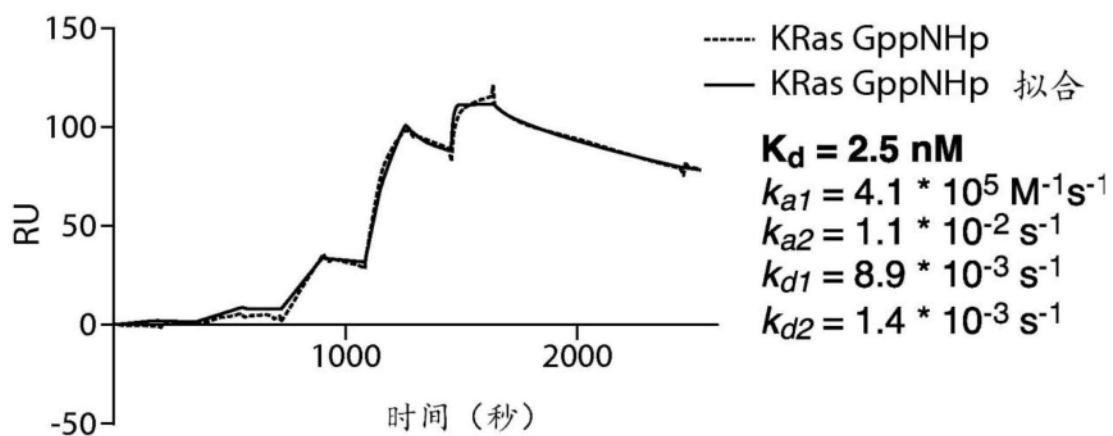


图15A

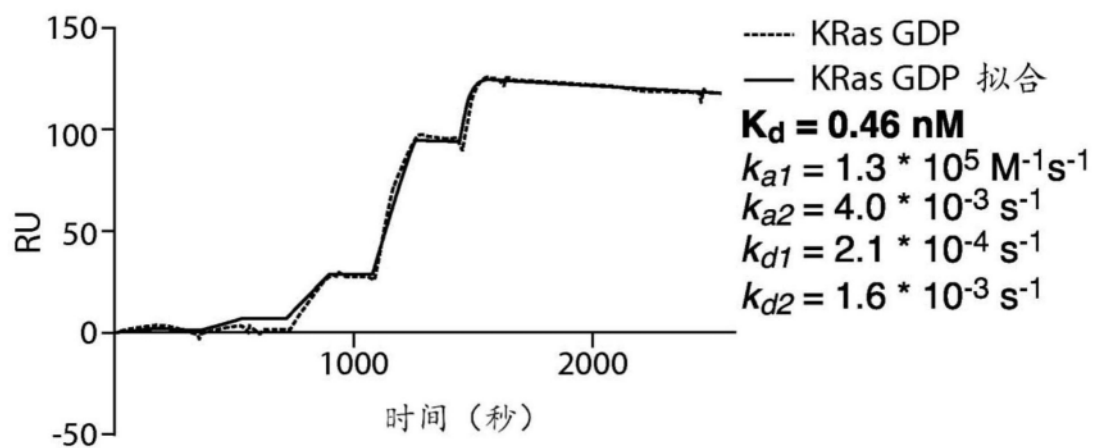


图15B

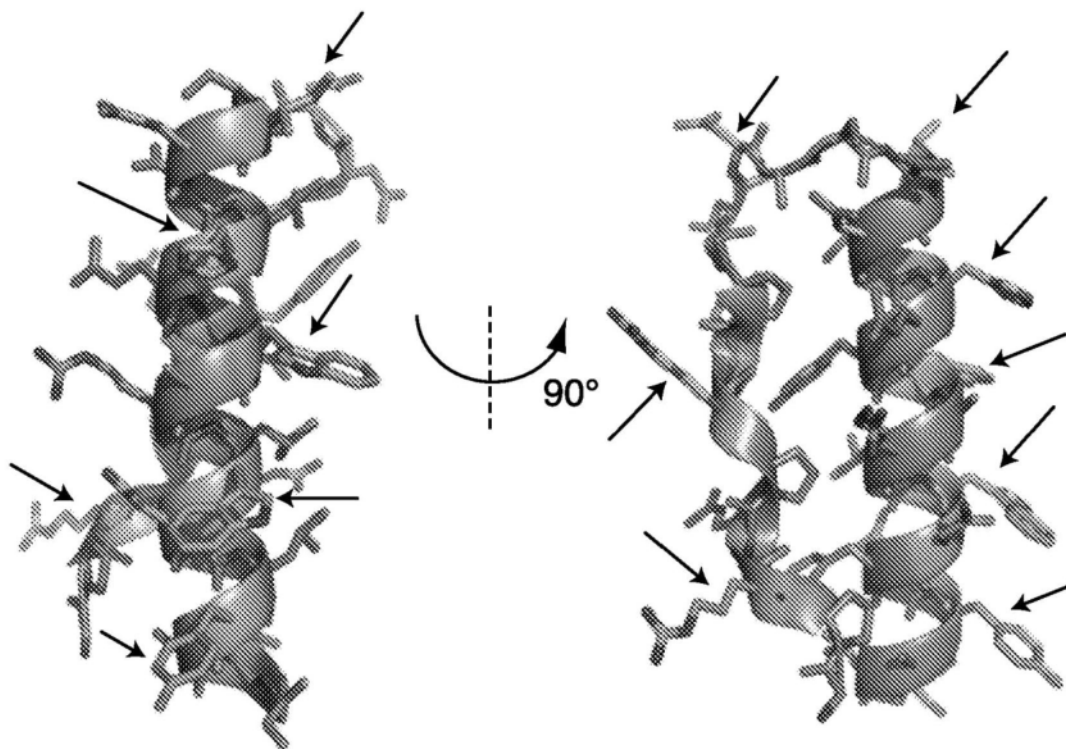


图16

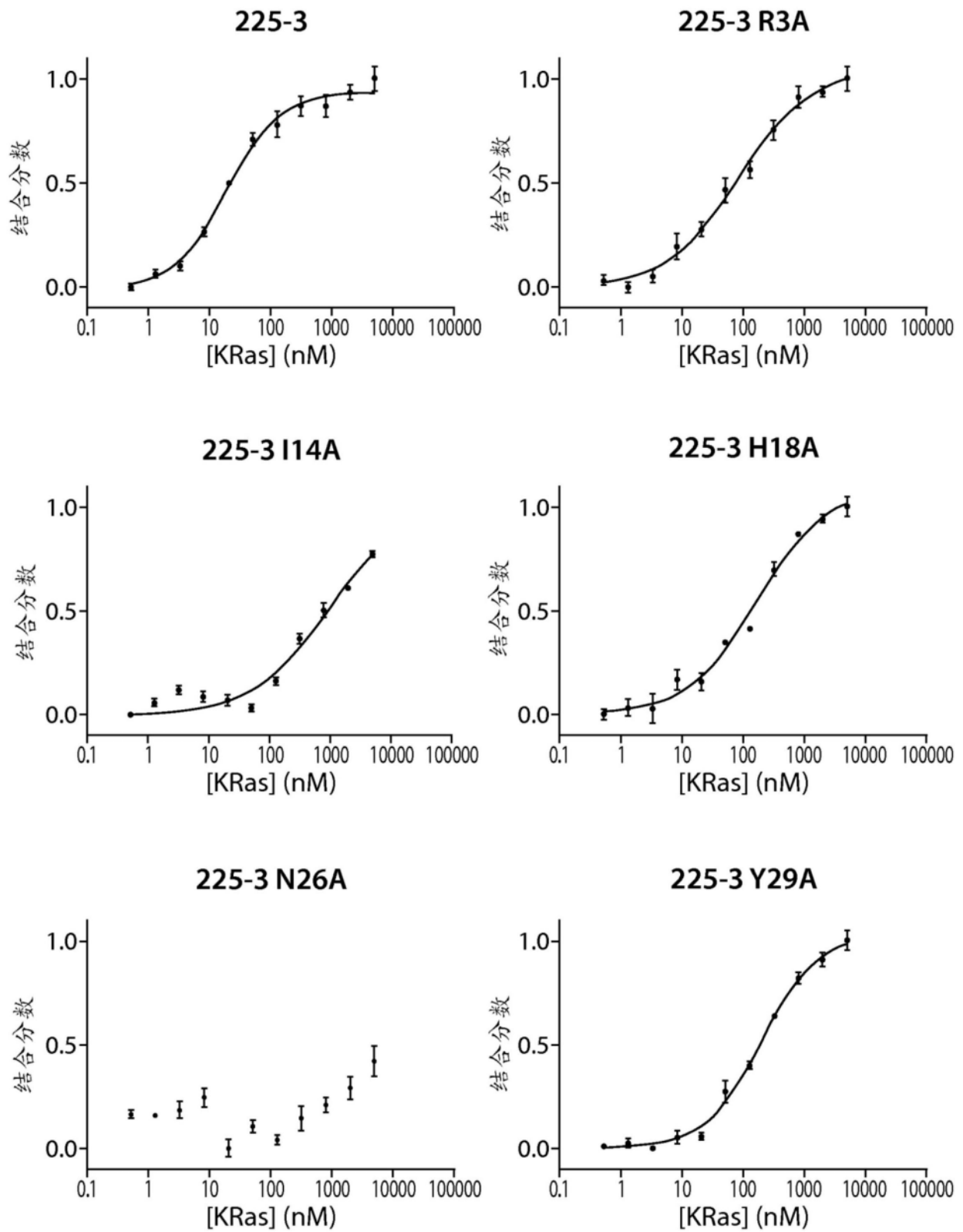


图17A

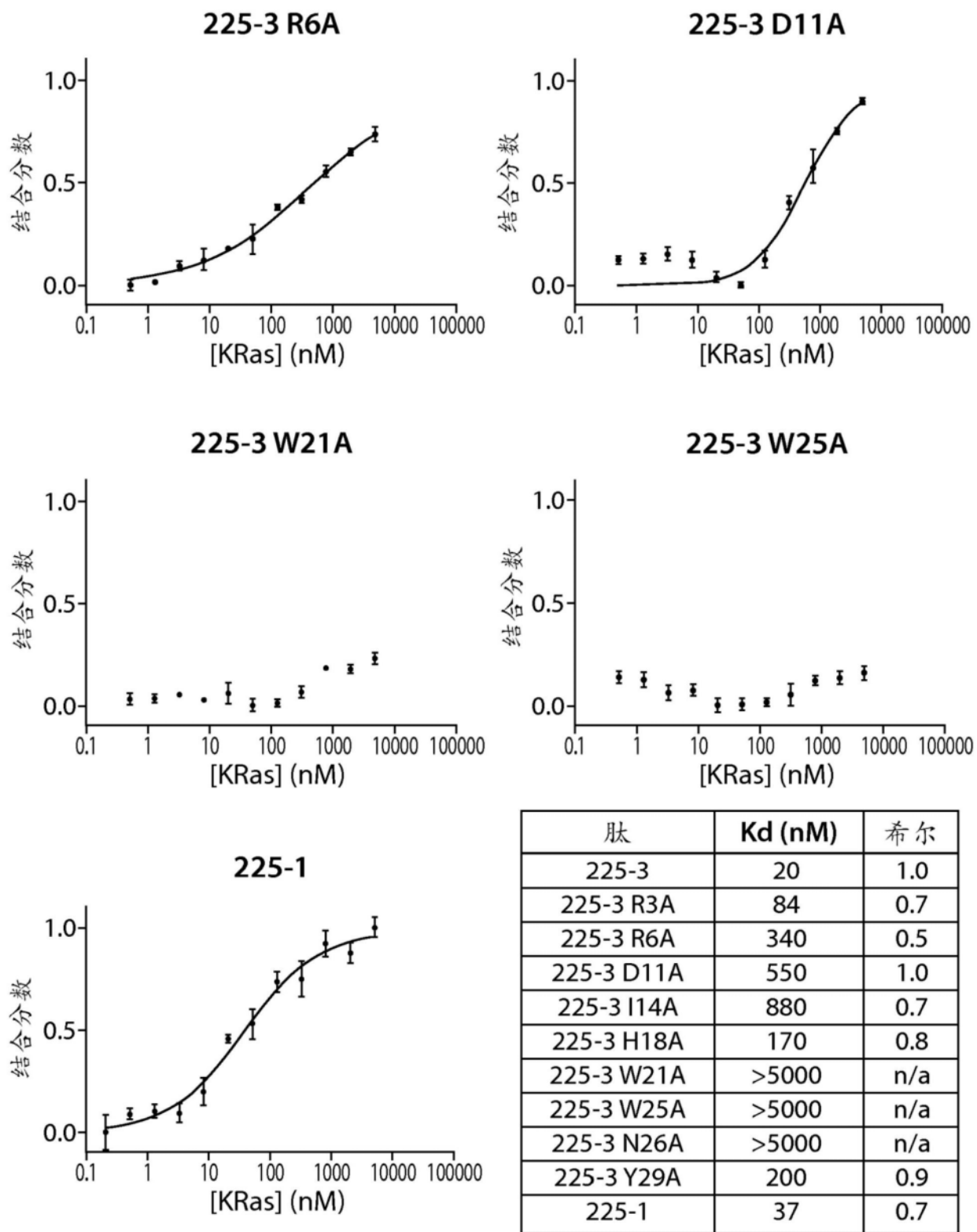


图17A续

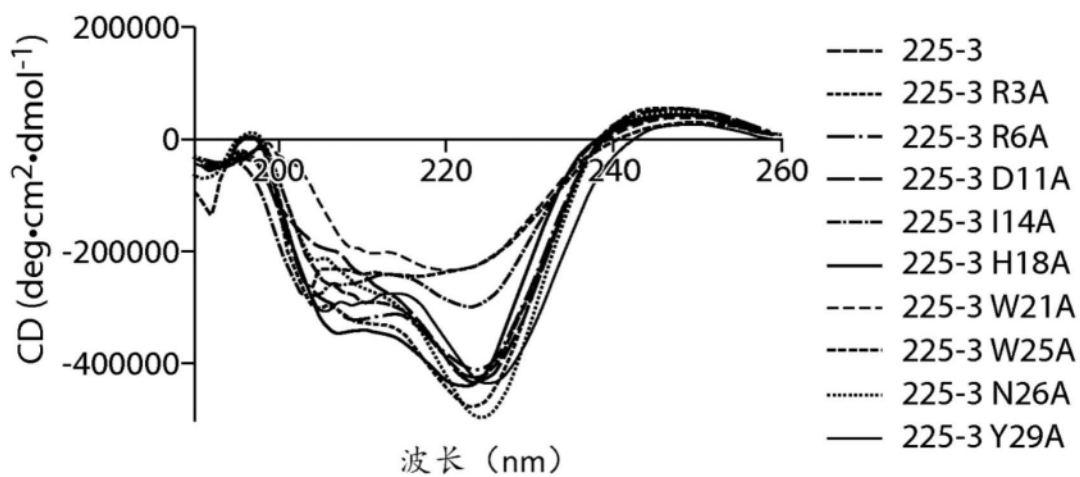


图17B

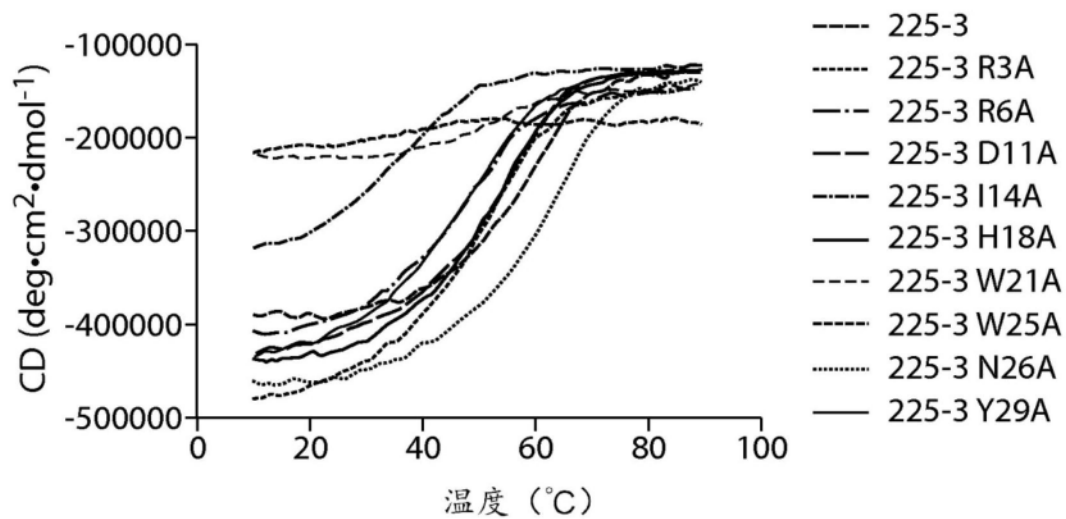


图17C

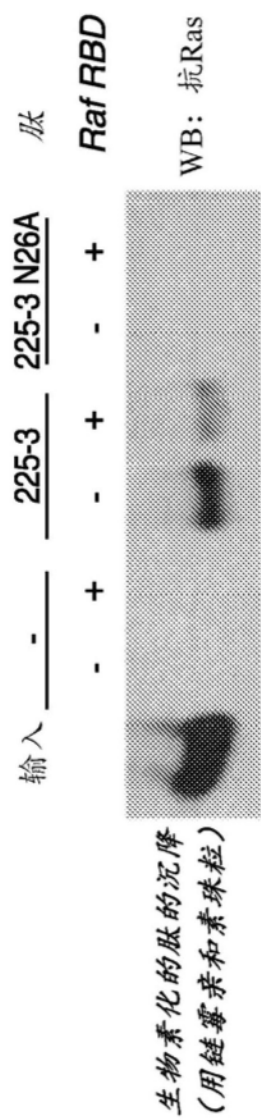


图18A

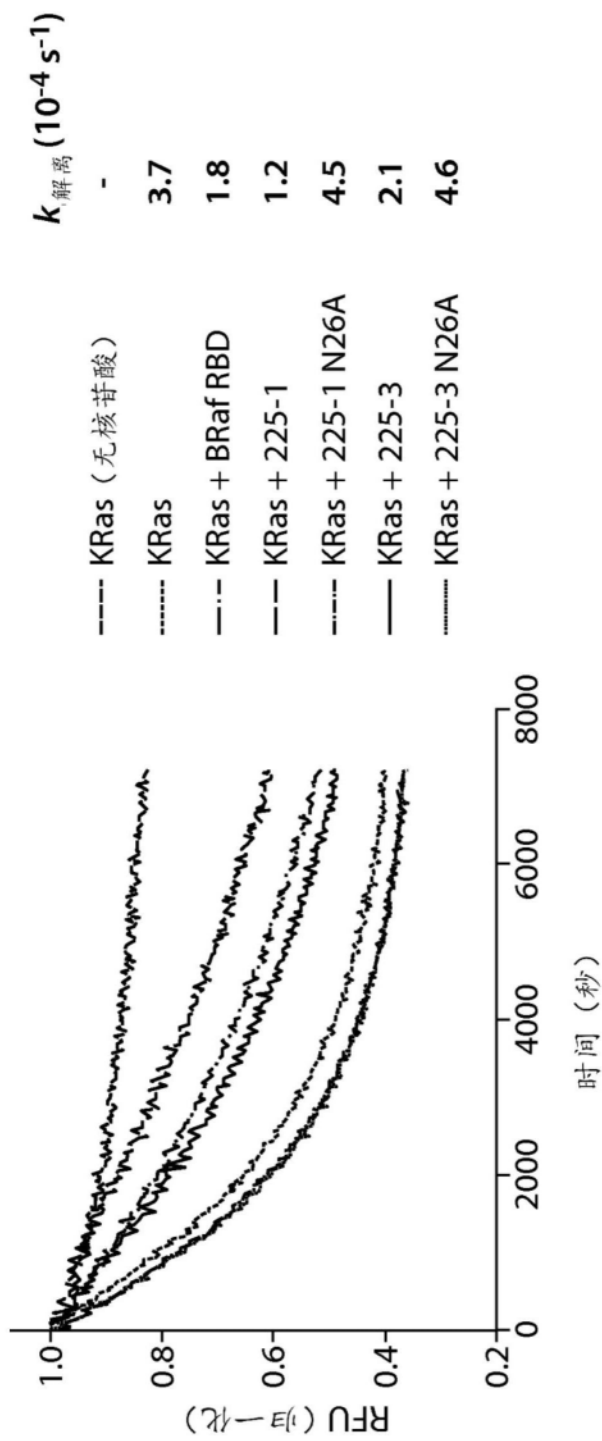


图19

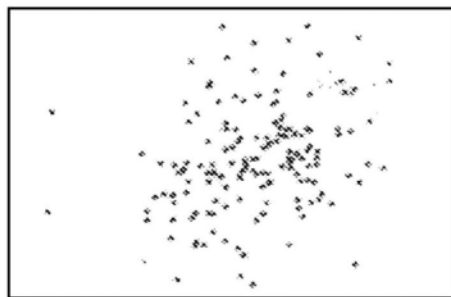


图20A

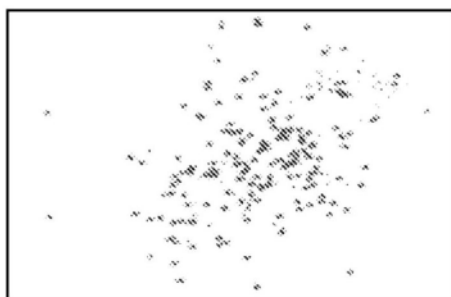


图20B

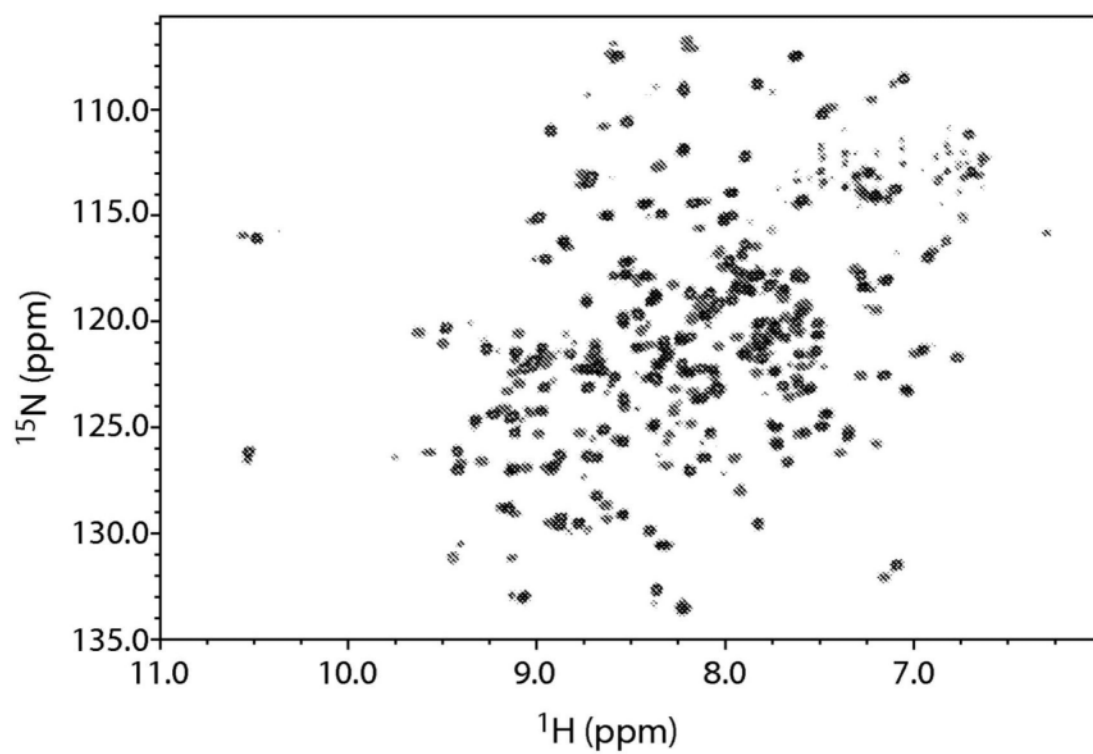


图20C

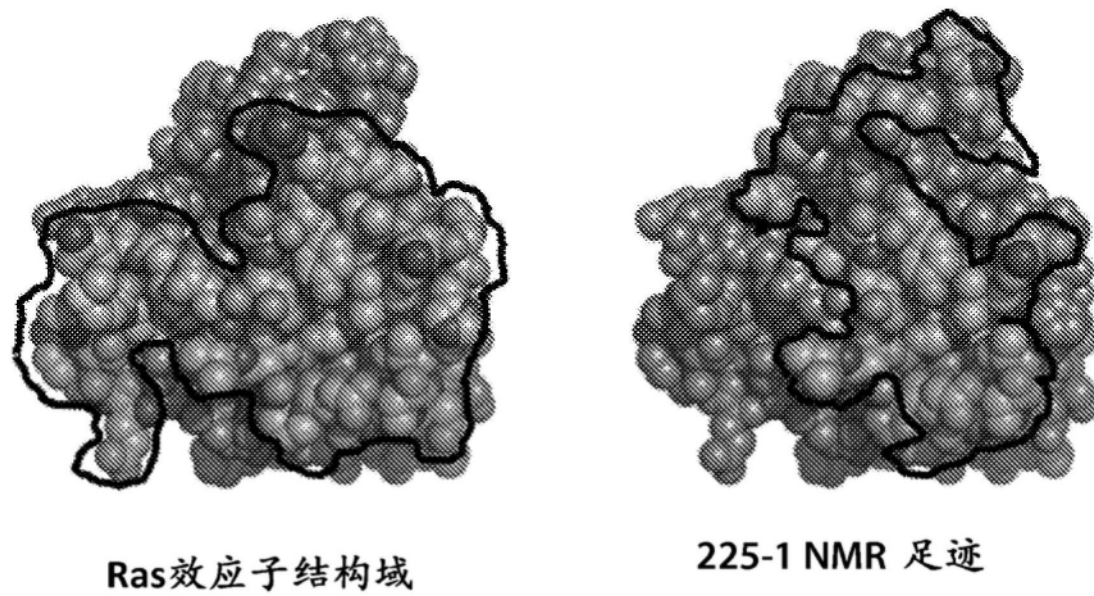


图21

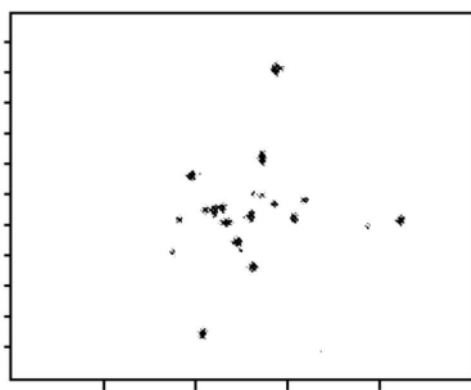


图22A

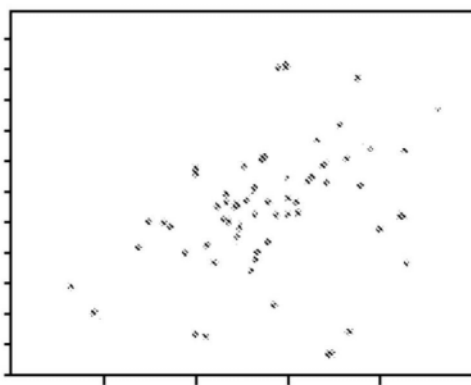


图22B

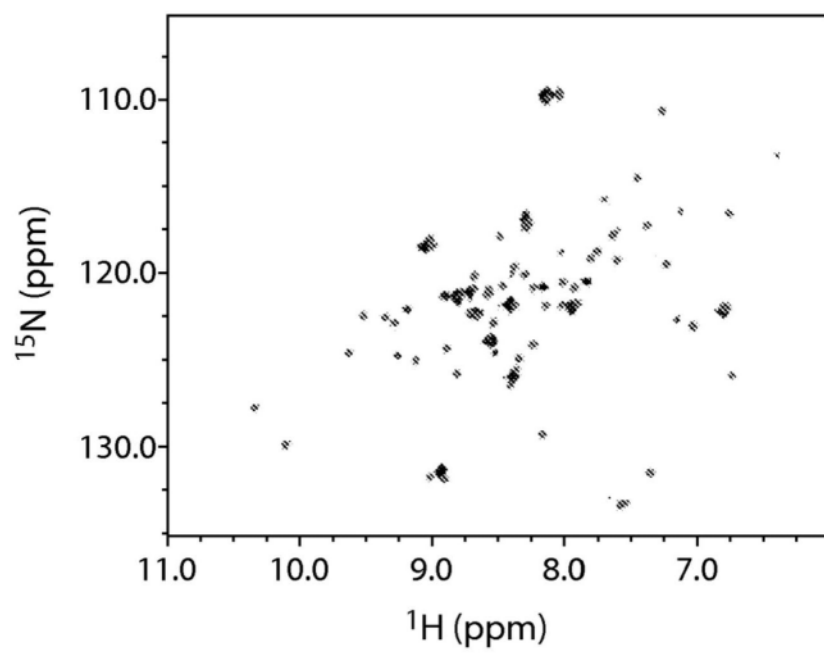


图22C

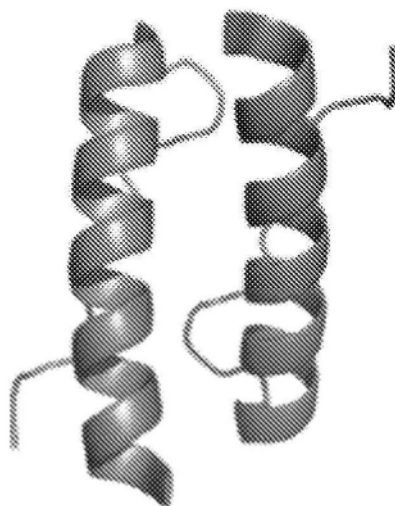


图23A

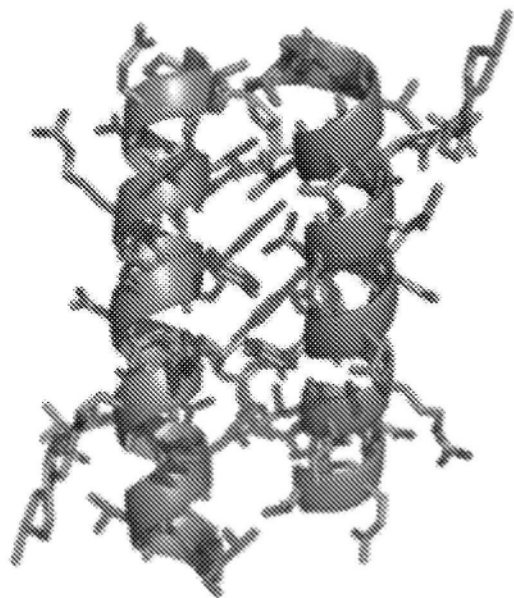


图 23B

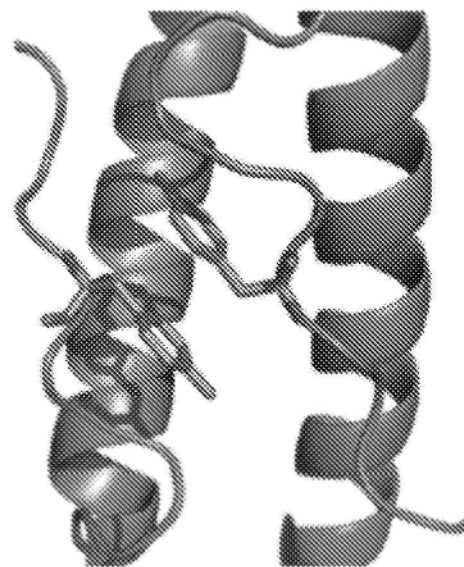


图 23C

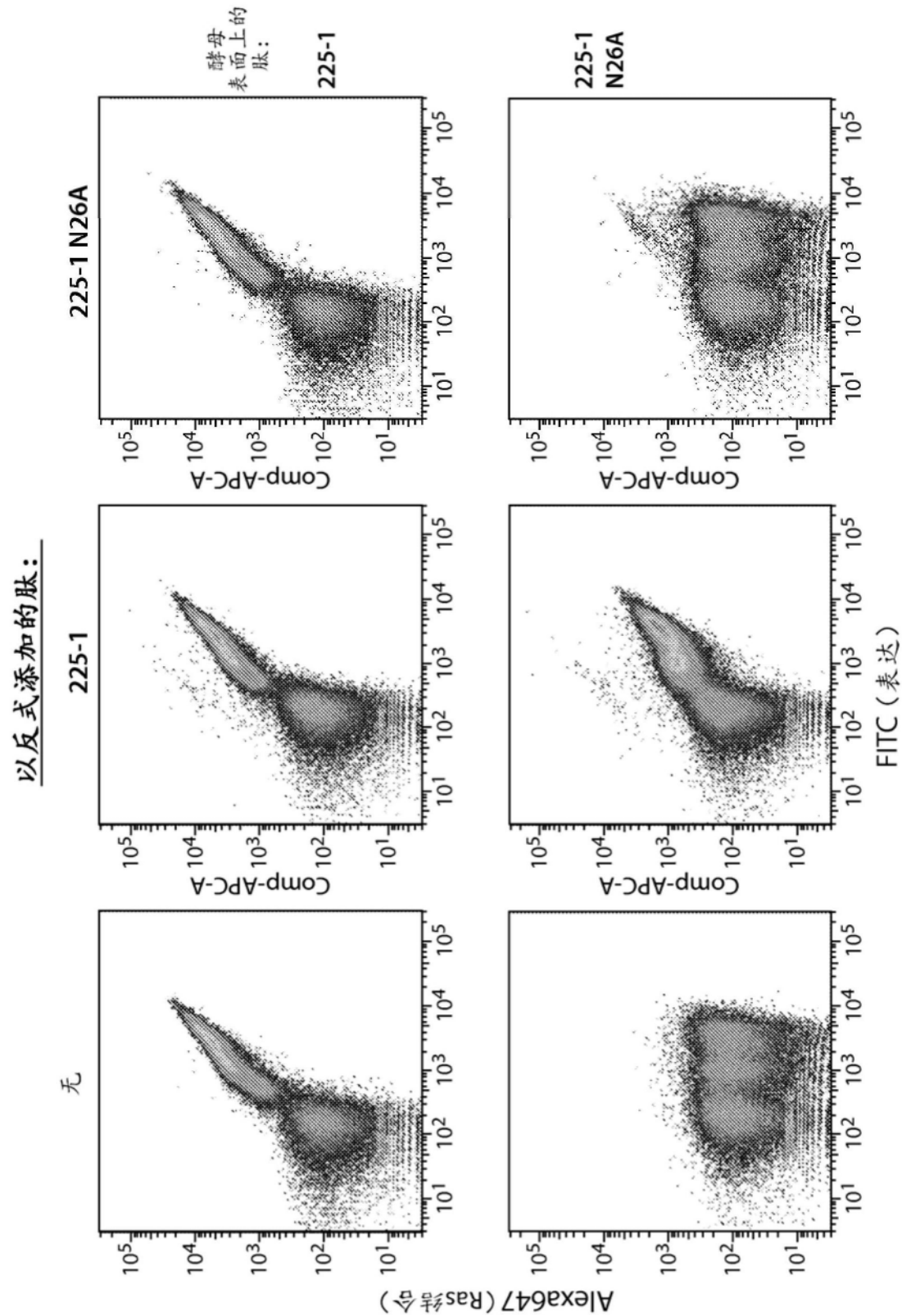


图24

225-1 GPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA
 XXRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA
 GXXRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA
 GPXXPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA
 GPRXXRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAVA
 ...
 GPRRPRYPGDDASIEDLHEYWARLWNYLYAXX

图25

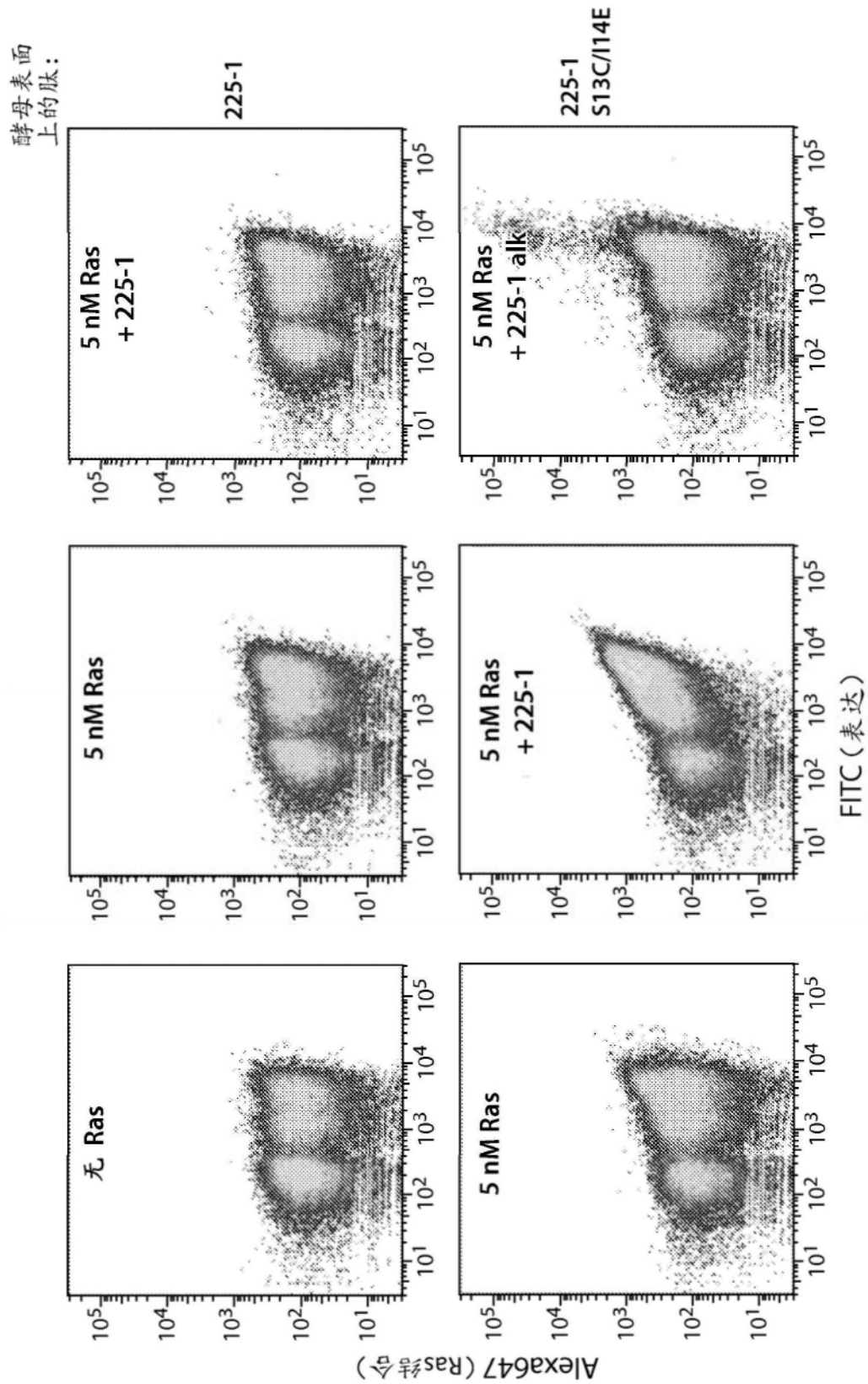


图26A

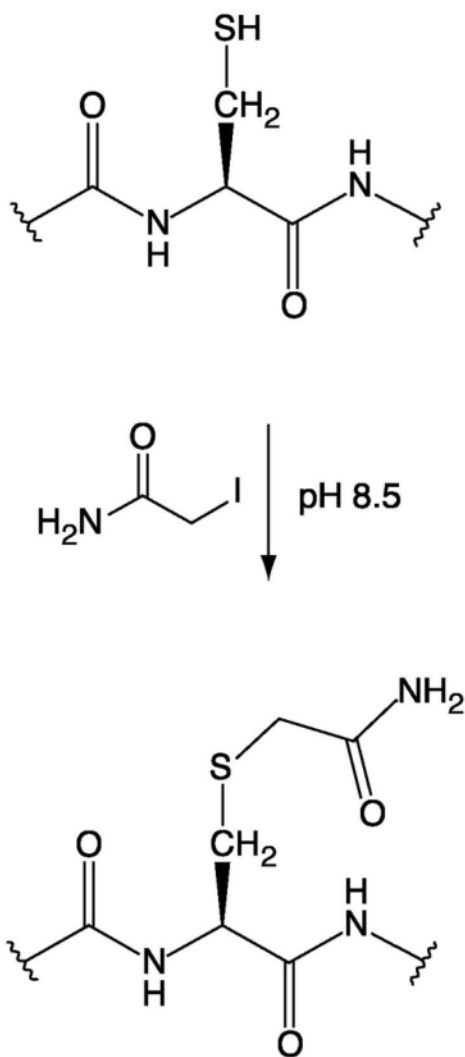


图26B

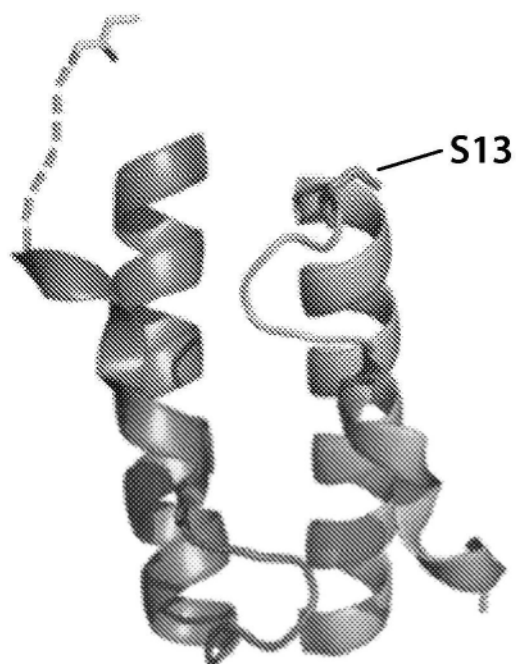


图27

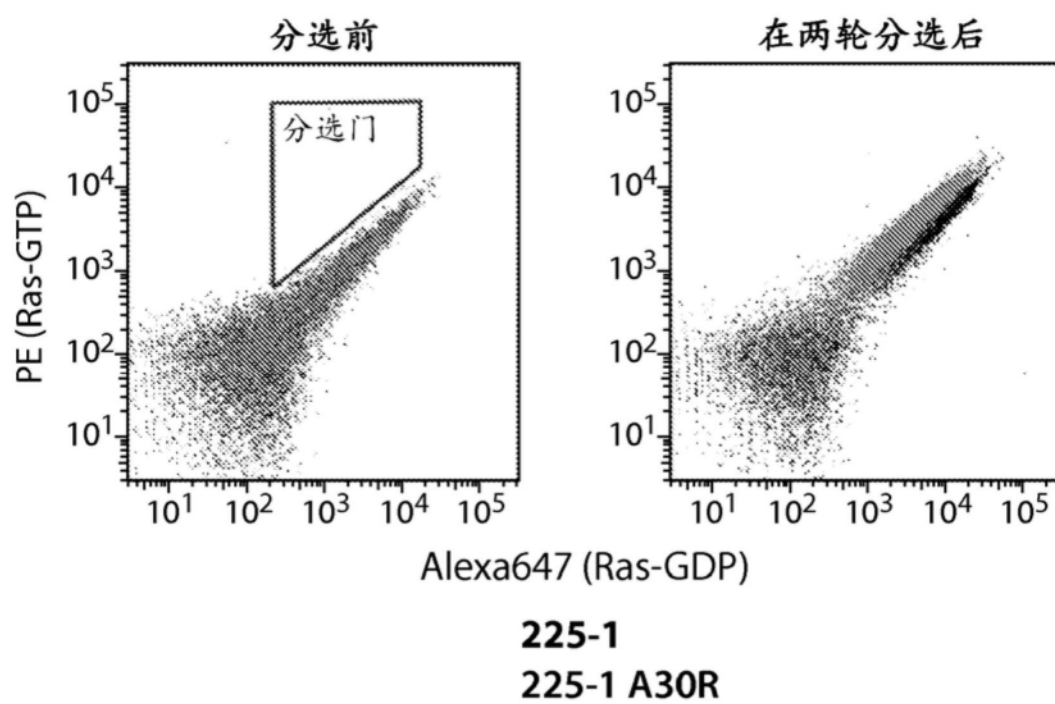


图28

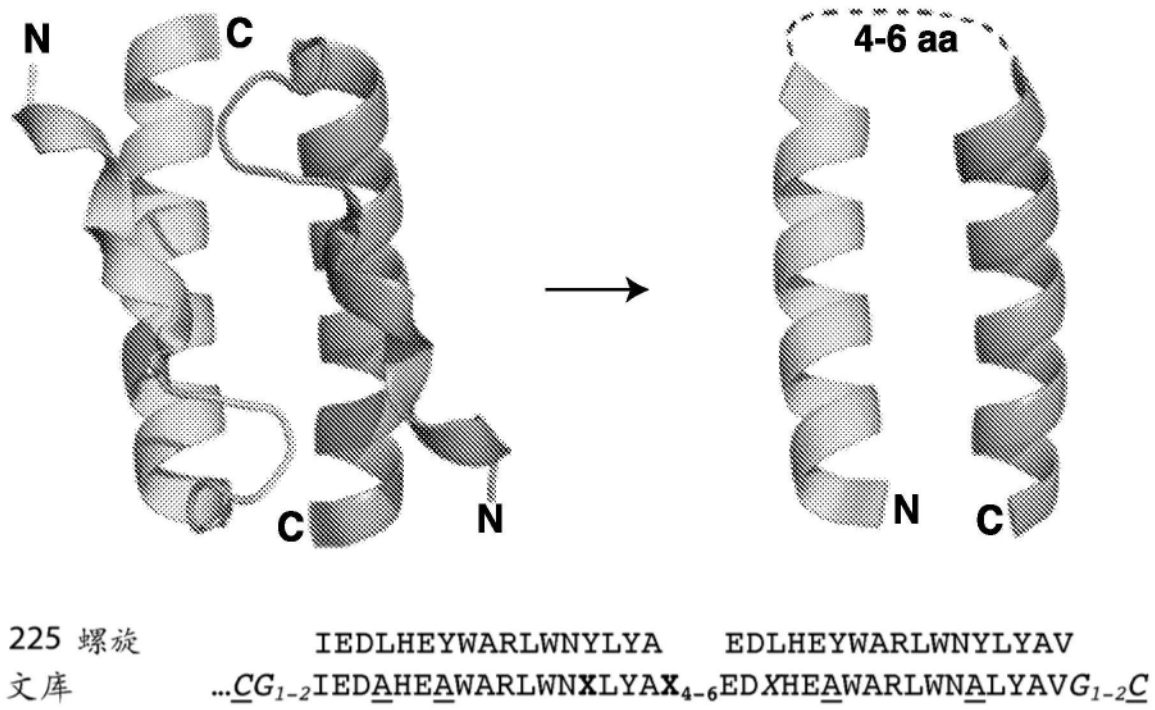


图29

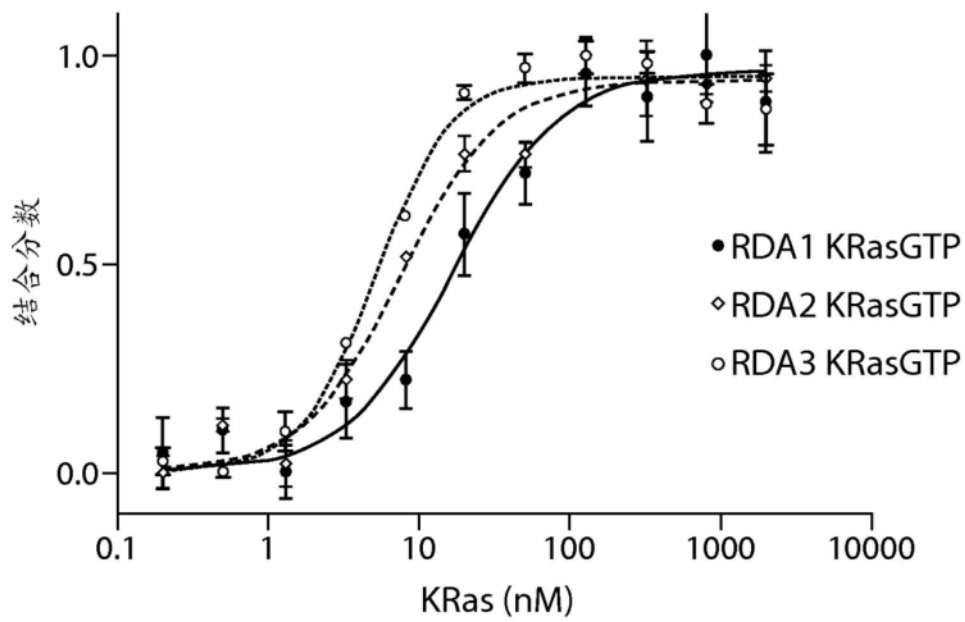


图30

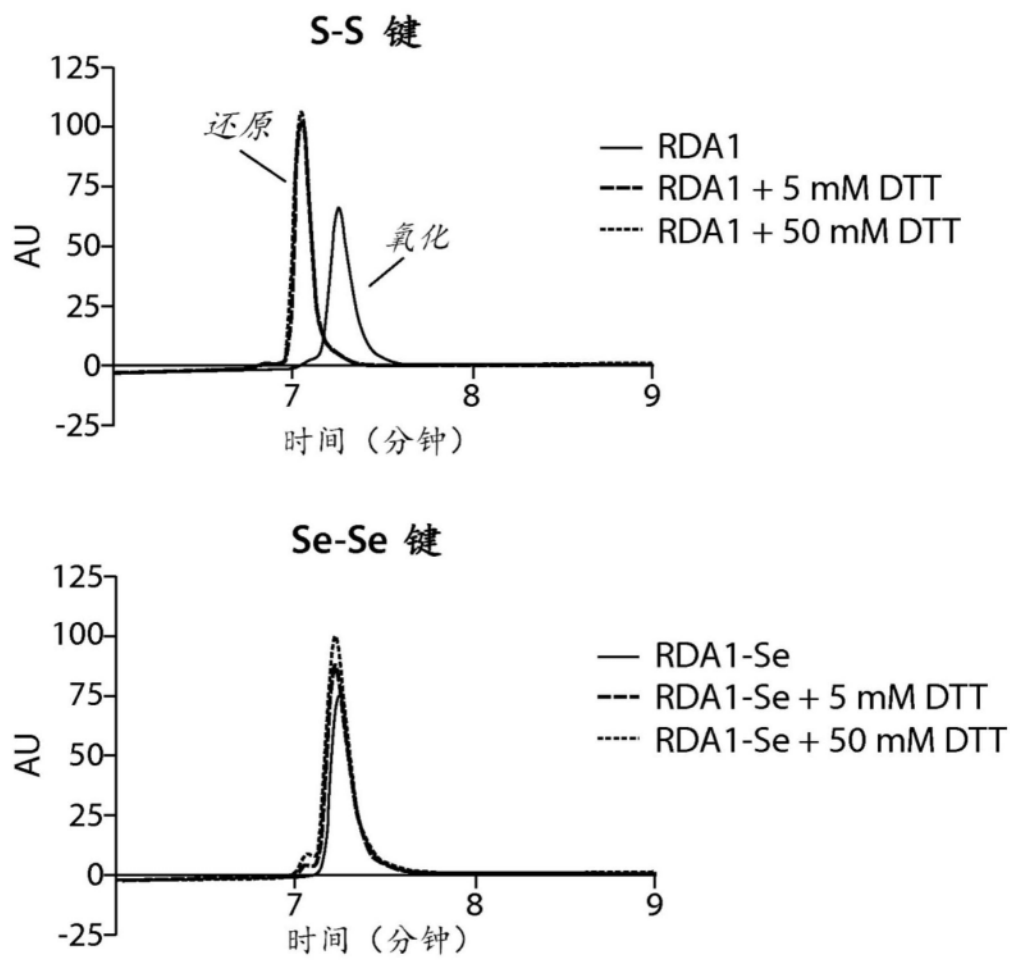


图31

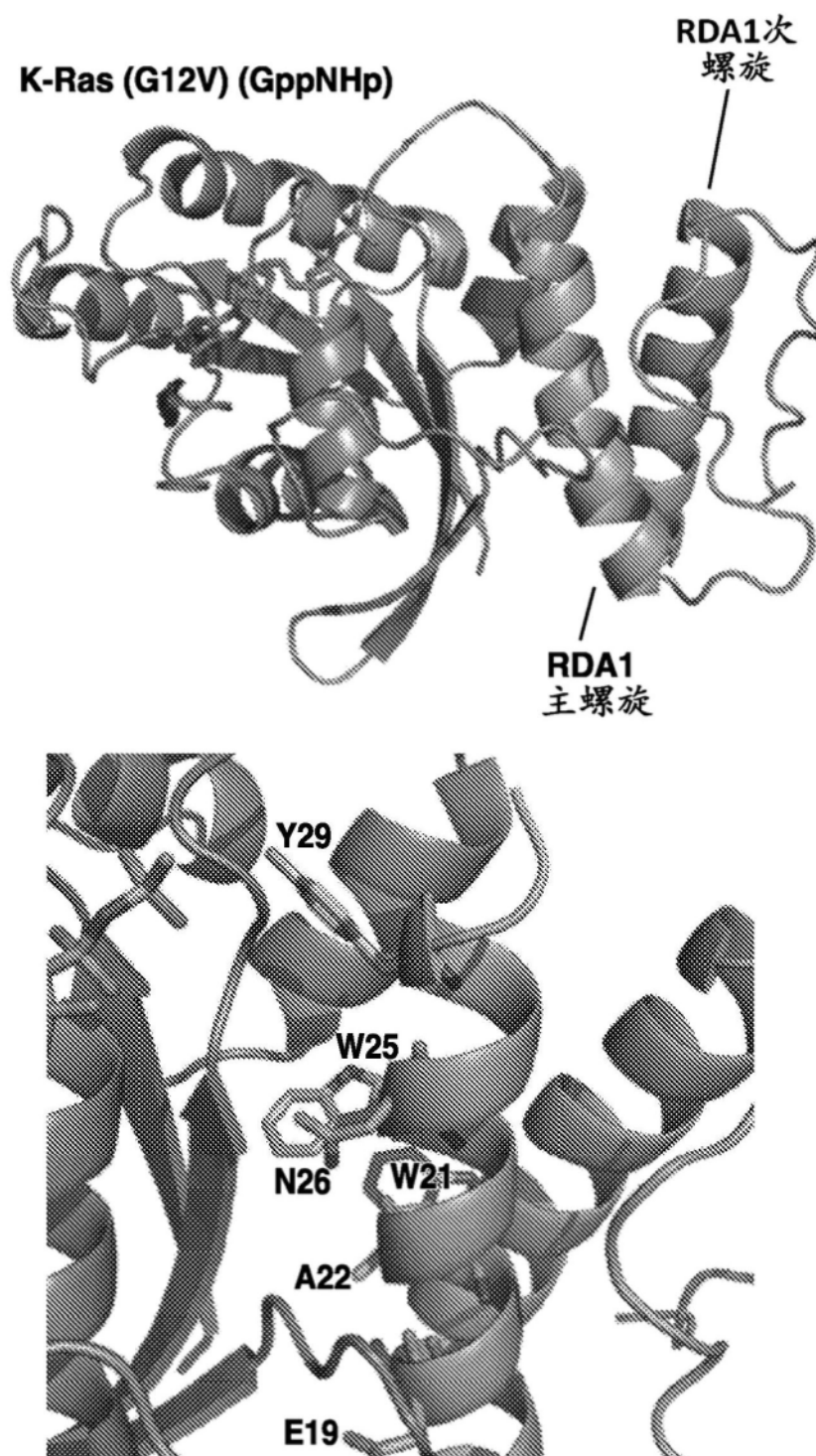


图32

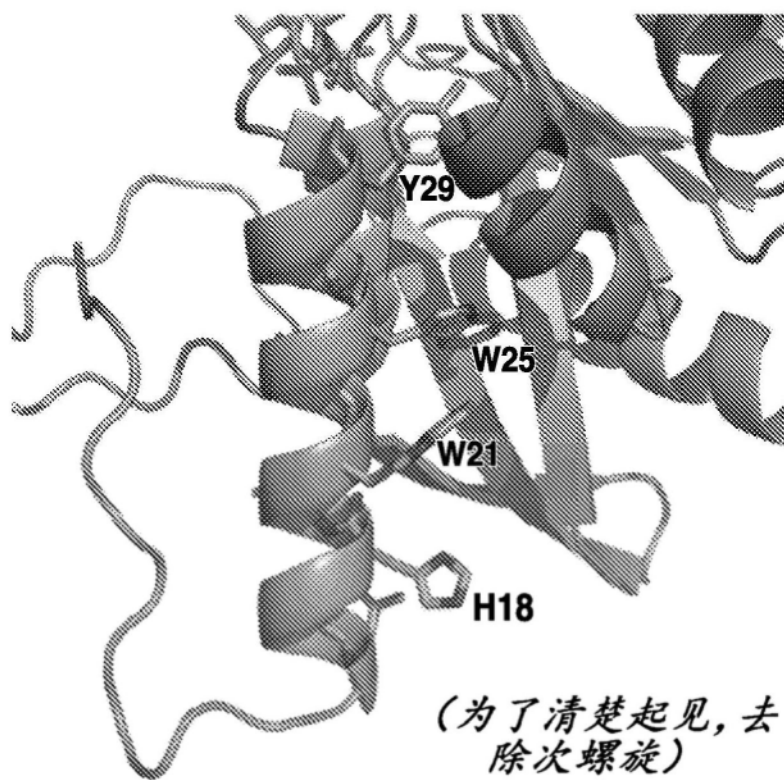


图32续

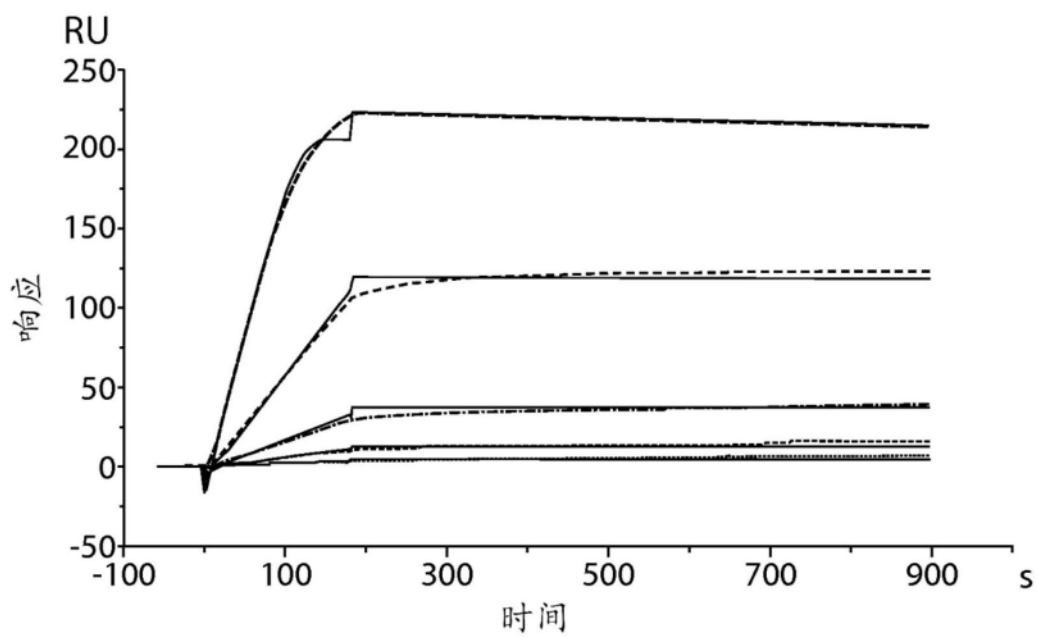


图33A

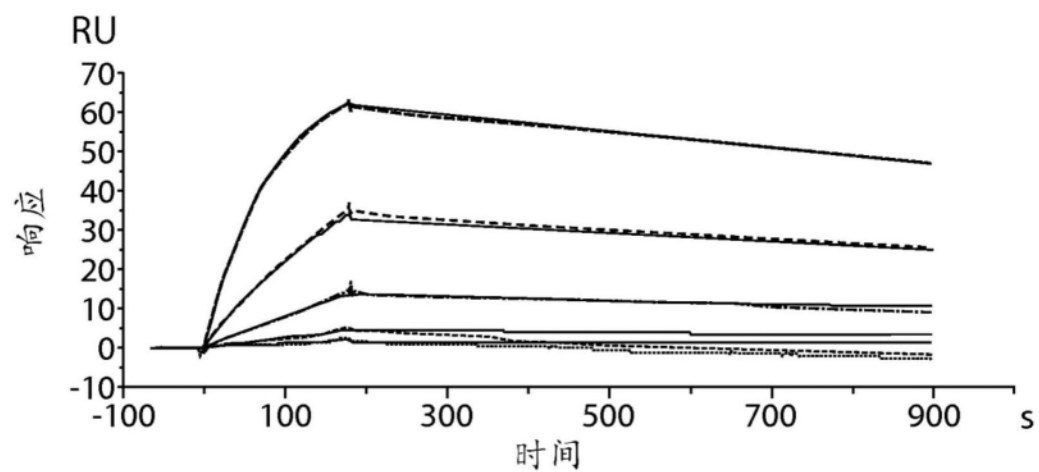


图33B

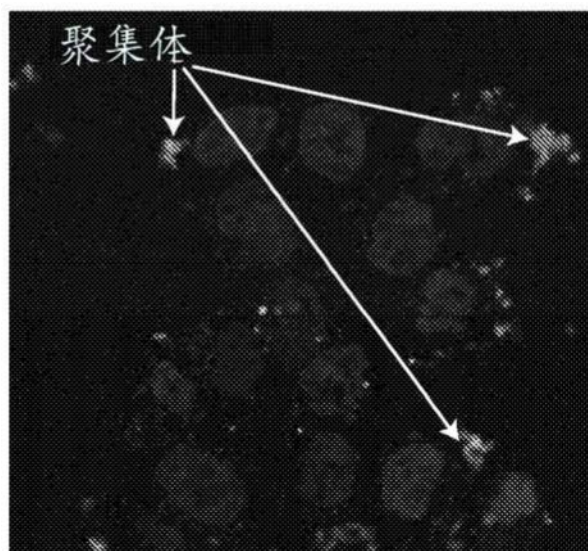


图34A

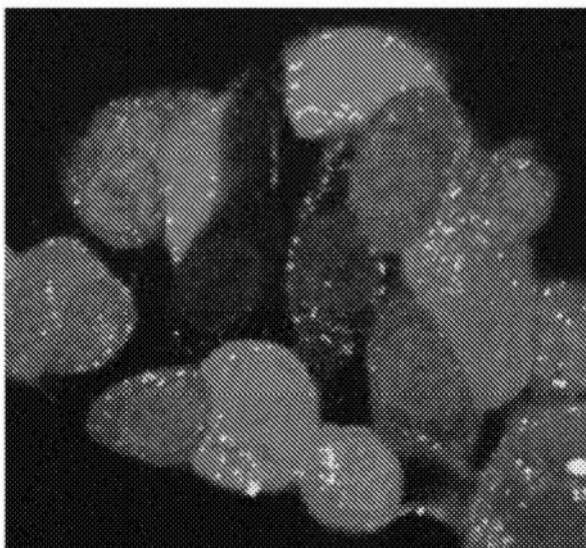


图34B

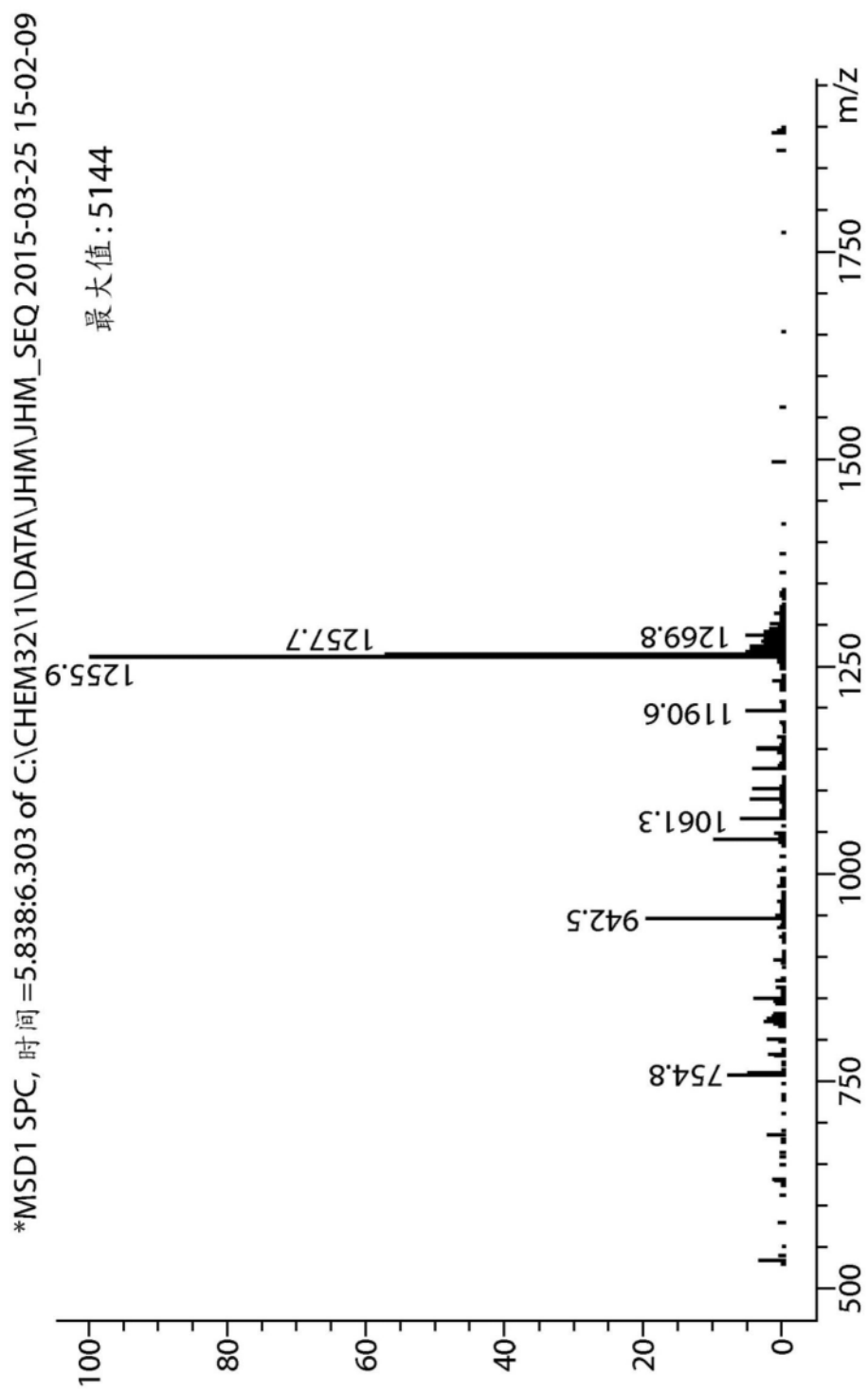


图35A

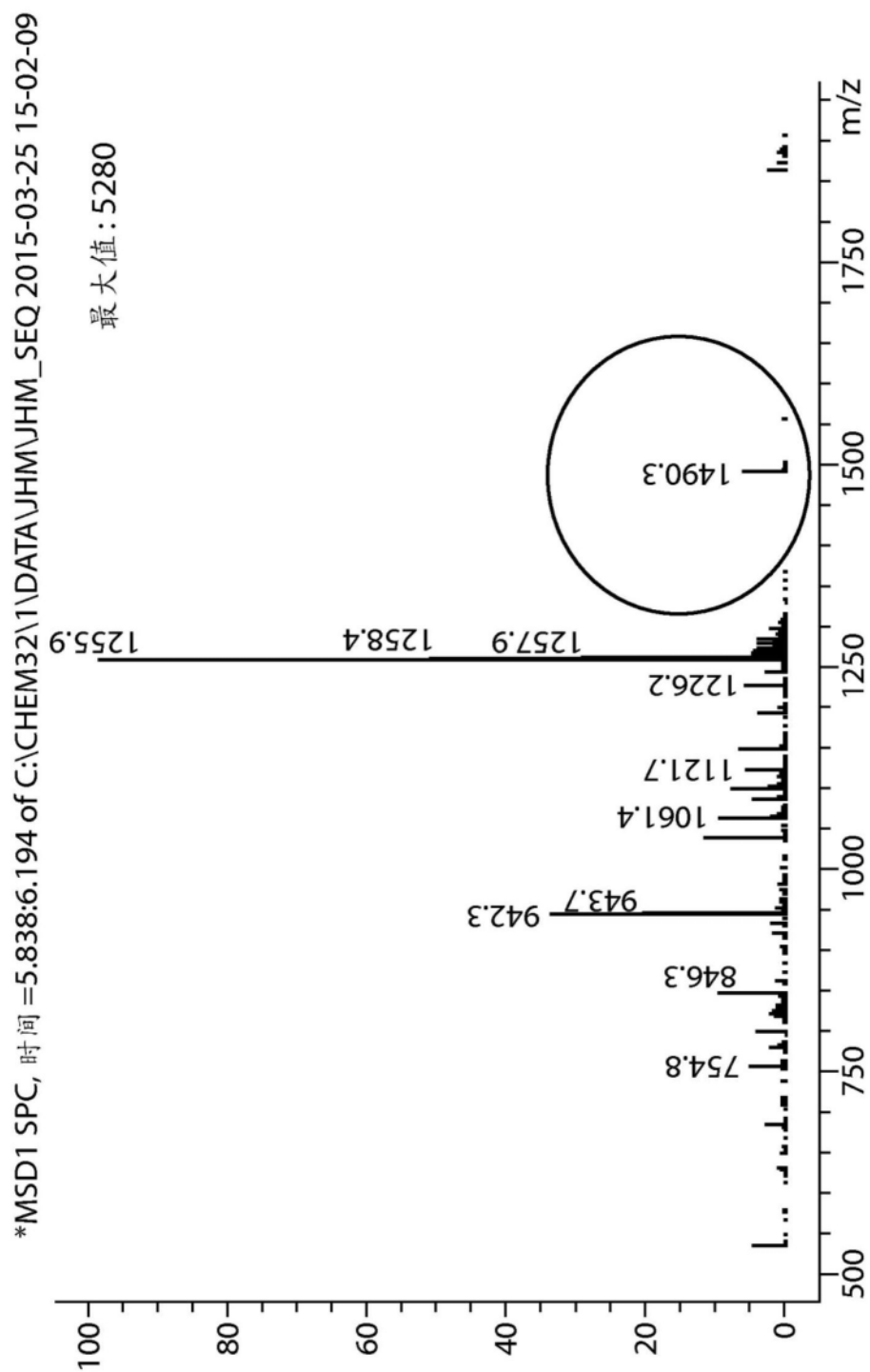


图35B

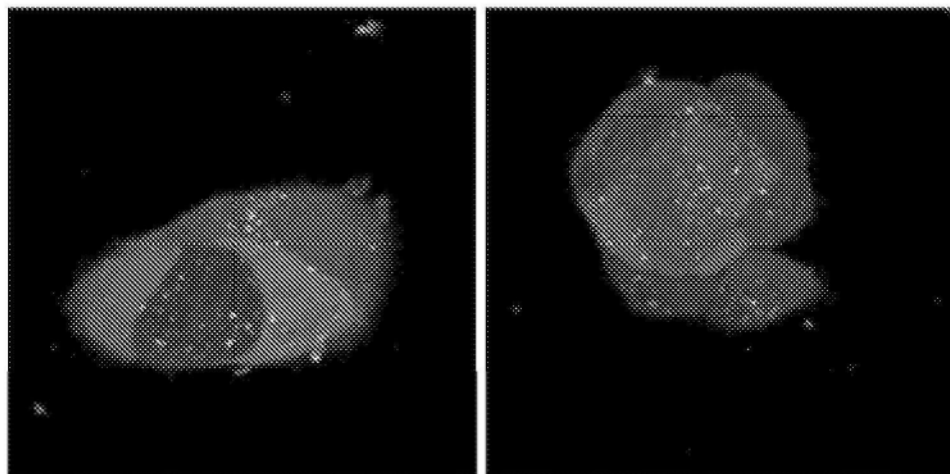


图36A

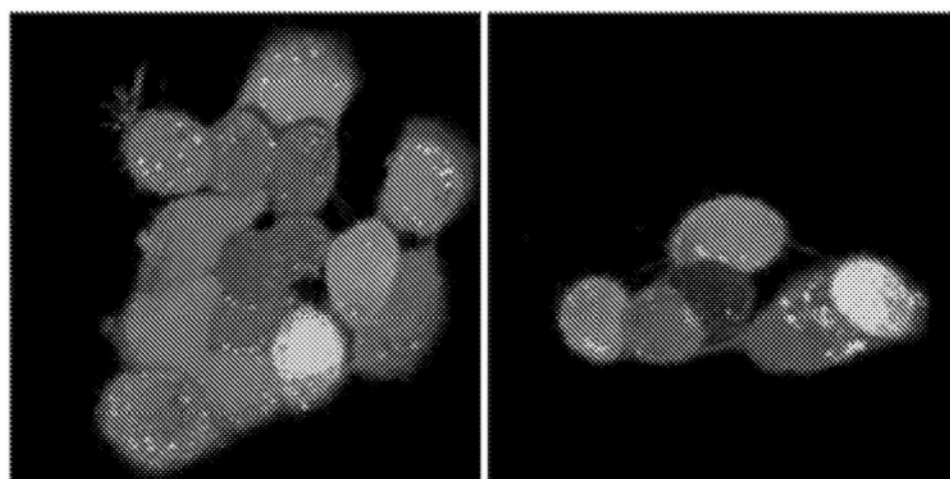


图36B

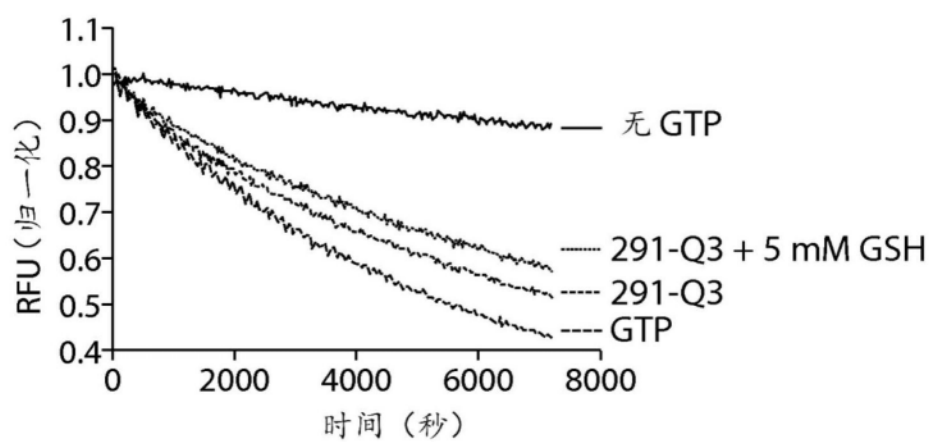


图37

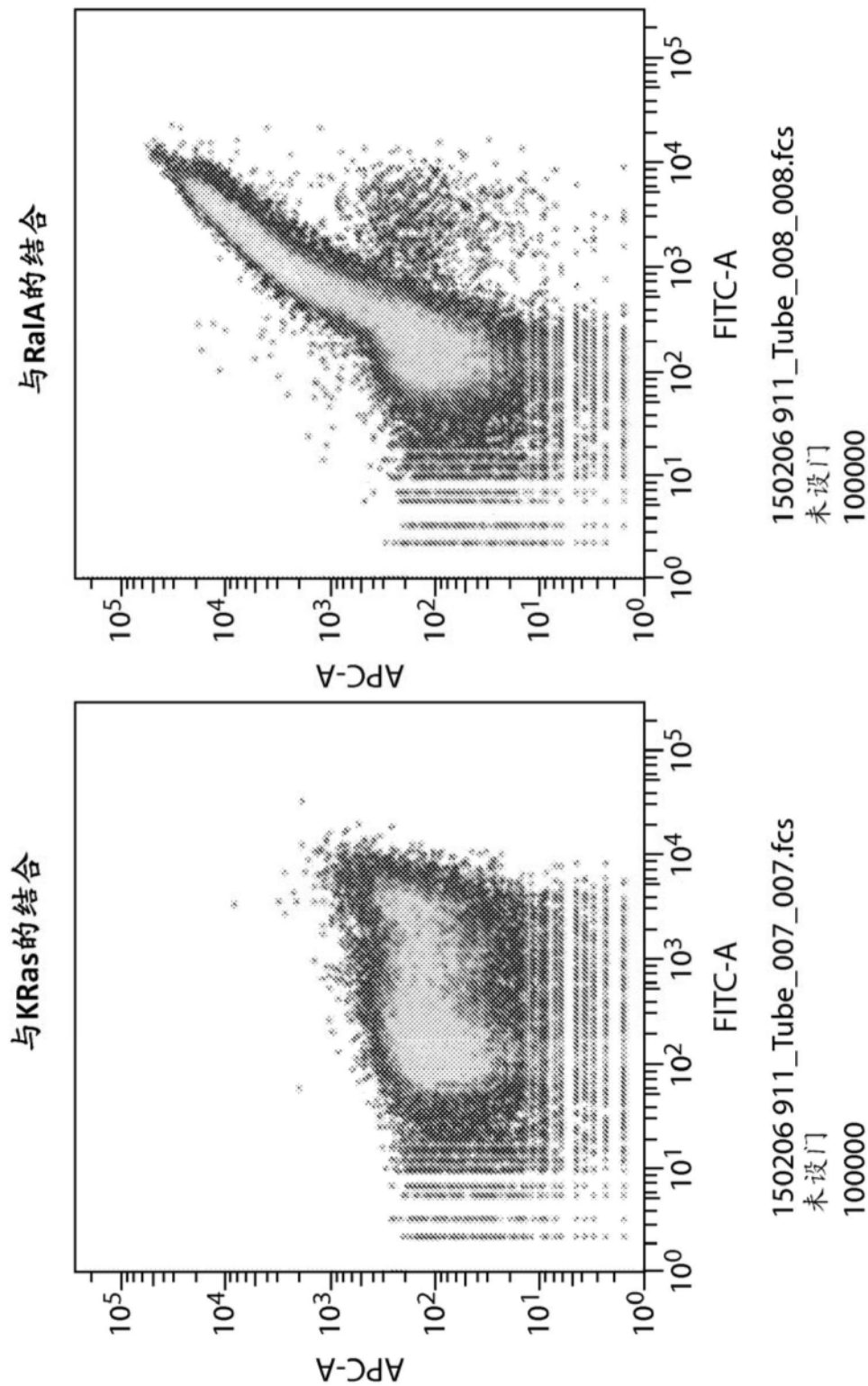


图38A

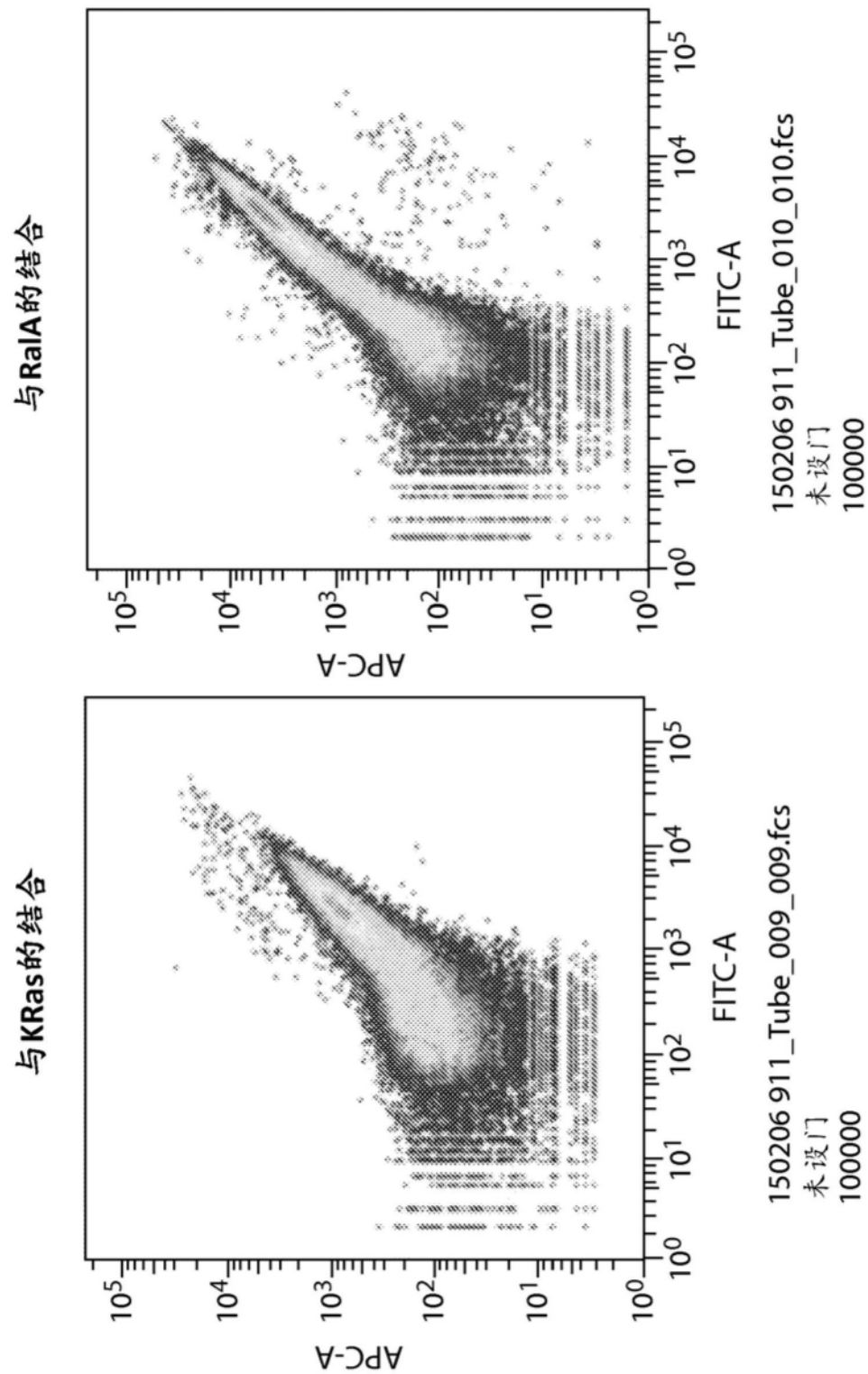


图38B

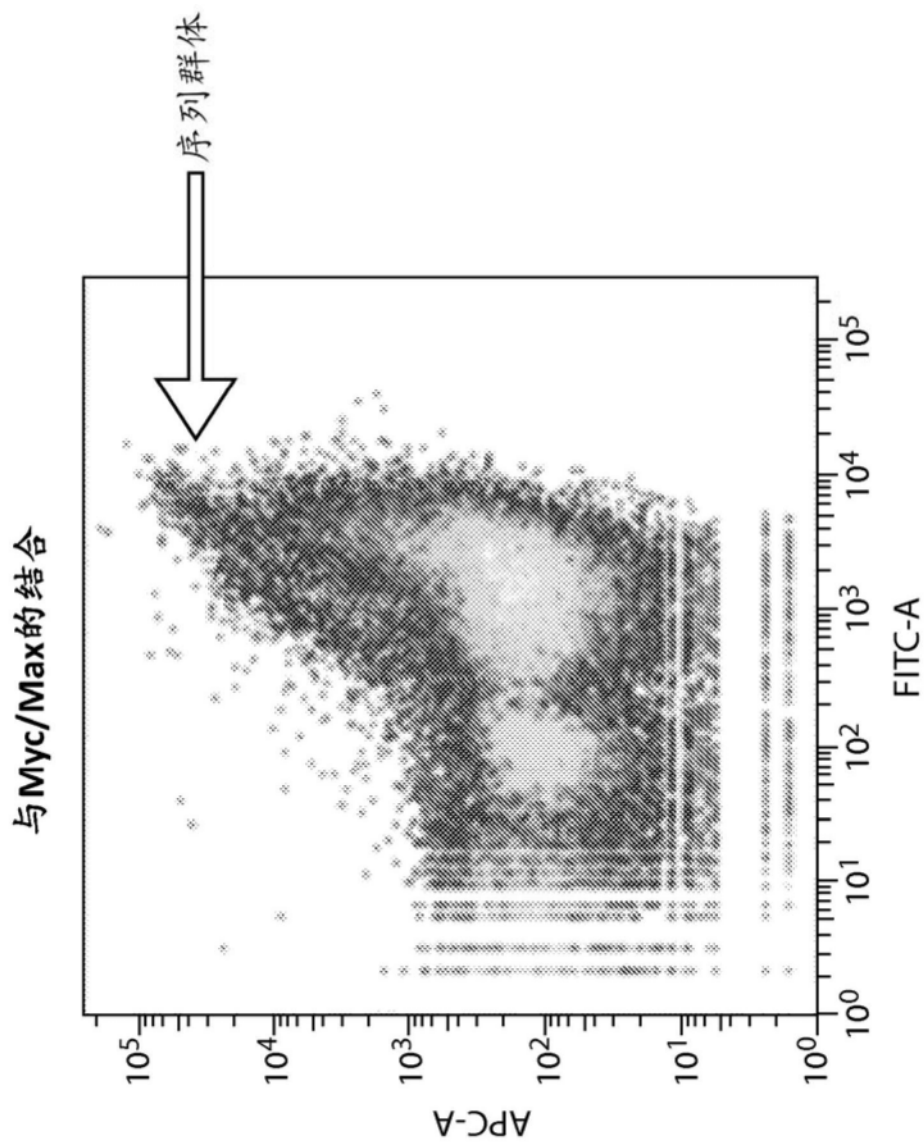


图38C