



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108324923 A

(43)申请公布日 2018.07.27

(21)申请号 201711202710.2

A61P 7/10(2006.01)

(22)申请日 2006.02.03

(30)优先权数据

60/650,075 2005.02.03 US

(62)分案原申请数据

200680010590.X 2006.02.03

(71)申请人 科达治疗有限公司

地址 新西兰奥克兰

(72)发明人 科林·R·格林 戴维·L·贝克尔

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 张英 沈敬亭

(51)Int.Cl.

A61K 38/10(2006.01)

A61P 9/10(2006.01)

权利要求书1页 说明书60页

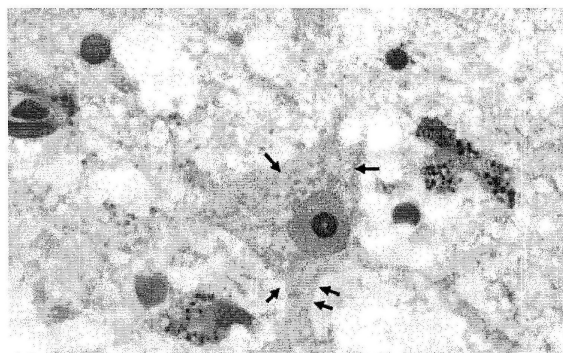
序列表56页 附图12页

(54)发明名称

抗-连接蛋白化合物及其治疗应用

(57)摘要

本发明涉及抗-连接蛋白化合物及其治疗应用。本发明提供了用于调节连接蛋白活性的方法和组合物,包括,例如,在治疗心血管、血管、神经学方面的应用,在创伤以及其它适应症方面的应用。这些化合物和方法可以在治疗上,例如用于降低与疾病和紊乱相关的不良作用的严重性,其中需要局部中断直接的细胞间通讯或者防止半通道打开。



1. 一种抗-连接蛋白43半通道调节拟肽化合物在制备用于治疗患有影响视网膜的血管紊乱的受治者的药物中的应用,其中所述化合物是包括SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36的氨基酸序列的肽。

2. 一种抗-连接蛋白43半通道调节拟肽化合物在制备用于治疗患有影响视网膜的血管紊乱的受治者的组织水肿的药物中的应用,其中所述化合物是包括SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36的氨基酸序列的肽。

3. 根据权利要求1或2所述的应用,其中所述影响视网膜的血管紊乱是糖尿病性视网膜病。

4. 根据权利要求1或2所述的应用,其中所述影响视网膜的血管紊乱是黄斑变性。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的应用,其中一次给予所述抗-连接蛋白43半通道调节拟肽化合物。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的应用,其中多于一次给予所述抗-连接蛋白43半通道调节拟肽化合物。

7. 根据权利要求1至4中任一项所述的应用,其中所述半通道的调节包括抑制胞外半通道通讯。

8. 根据权利要求1至4中任一项所述的应用,其中内皮细胞中的半通道的活性被抑制。

9. 根据权利要求1至4中任一项所述的应用,其中血管萎缩被改善。

10. 根据权利要求1至4中任一项所述的应用,其中血管破坏被改善。

11. 根据权利要求1至4中任一项所述的应用,其中来自具有所述半通道的细胞的细胞质的分子到胞外空间中的传递被抑制。

12. 根据权利要求1至4中任一项所述的应用,其中所述抗-连接蛋白43半通道调节拟肽化合物是全身性给予受治者的。

13. 根据权利要求1至4中任一项所述的应用,其中所述抗-连接蛋白43半通道调节拟肽化合物是静脉内给予受治者的。

14. 根据权利要求1至4中任一项所述的应用,其中所述抗-连接蛋白43半通道调节拟肽化合物直接给予到受治者的眼中。

15. 根据权利要求1至4中任一项所述的应用,其中所述抗-连接蛋白43半通道调节拟肽化合物以推注剂量给予。

16. 根据权利要求1至4中任一项所述的应用,其中所述抗-连接蛋白43半通道调节拟肽化合物通过持续递送加以给予。

抗-连接蛋白化合物及其治疗应用

[0001] 本申请为申请日为2006年2月3日,申请号为200680010590.X,发明名称为“抗-连接蛋白化合物及其治疗应用”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求由Colin R.Green和David L.Becker于2005年2月3日提交的标题为“抗-连接蛋白化合物及其使用方法”的临时申请U.S.S.N. 60/650,075的优先权,其全部内容以引用方式结合于此作为参考。

技术领域

[0004] 本披露内容涉及药物,包括试剂、化合物、组合物、制剂,以及用于调节间隙连接和半通道的方法,它们在例如预防和治疗各种疾病、紊乱(失调)以及病症,包括但不限于心血管、神经学和血管疾病、紊乱和病症中是有用的。

背景技术

[0005] 以下包括对理解本发明有用的信息。这并不是承认本文提供的任何信息是现有技术或与现在描述或要求保护的发明相关,或者任何明确或含蓄引用的出版物或文献是现有技术。

[0006] 在大多数西方国家,冠心病是死亡的主要原因。据报道,心血管疾病的死亡率在加拿大从每100,000人的29人(男性,女性为24人)到俄罗斯联邦每100,000人的213人(男性,女性为154人)。在其它西方国家,该死亡率为每100,000人的31-55(43~26)。约半数可归因于中风的死亡是医学并发症导致的,例如肺炎和败血症,而半数归因于神经性并发症,如新的脑梗死和脑水肿。Brott,T.and Bogousslavsky,J.,New Engl.J.Med. 343: 710-722 (2000)。

[0007] 在发达国家,中风是死亡的第三大主要原因并且对公众健康具有(全面)破坏性的影响。在美国每年大约有700,000例新增中风病例发生(美国中风协会(American Stroke Association))。大约25%的中风患者由于中风或其引起的并发症死亡。此外,大约50%的中风患者需要忍受严重的健康损害和长期的残疾。尽管缺血性中风(发作)的发病率在过去20年有所降低,但是人口的平均年龄增加,导致了中风的绝对数量持续增加。最近的预测表明,到2050年,美国每年会发生多于一百万的中风。中风通常是由多种潜在的降低大脑血流量的病症引起的,并且导致残疾或死亡。大约85%的中风实际上是缺血(血栓或血管阻塞)。Foulkes MR,et al., Stroke;19:547-54 (1988)。缺血性中风可以由形成于脑动脉内部的血栓引起(血栓形成性脑中风),或由在身体的其它处形成并移动到脑中的凝块引起(栓子性脑中风),血栓形成性脑中风占有缺血性中风的约52%。血栓形成性中风通常是动脉粥样硬化(血管随着脂肪的沉积、钙和血液凝固因子例如纤维蛋白原(fibrinogen)和胆固醇的累积被阻塞)的结果。

[0008] 炎症是一种多因子作用的过程,并表现在很多具有巨大的累积健康后果的疾病、紊乱和病症中。在世界范围内,包括风湿性关节炎、狼疮、牛皮癣、多发性硬化和哮喘的炎

性疾病仍然是死亡率和发病率的主要原因。自身免疫性疾病也与炎症相关,并且正在增长,据报道在美国影响多于50 百万人。在很多自身免疫性疾病中,细胞、组织、关节和器官的损伤都是由炎症通路上大量不可控的活化引起的。风湿性关节炎(RA)是一种这样的慢性炎性疾病,其特征为关节的炎症,导致肿胀、疼痛以及功能丧失。在美国RA影响至少约2.5百万人,并且RA是由包括初发感染或损伤、异常免疫应答和遗传因素的事件组合导致的。当免疫系统变得不受调节(无序)并攻击健康组织时,导致至少80种不同自身免疫性疾病中的任何一种。

[0009] 连接蛋白也称作间隙连接蛋白质,是一种具有细胞质C和N末端的四个跨膜蛋白。六个连接蛋白结合在一起形成一个称为“连接子”的半通道。

[0010] 间隙连接是提供直接细胞间通讯的结构。该间隙连接由两个相连的连接子组成,连接子通过相邻细胞彼此对接形成功能性间隙连接。

[0011] 由于连接蛋白是由核糖体翻译,连接蛋白插入到内质网膜内。Bennett MV,Zukin RS.Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain.Neuron.2004Feb 19;41(4) 495-511。

[0012] 它们在内质网膜内聚集形成半通道(连接子),然后在囊泡中被运输到细胞膜并且通过细胞膜扩散,直至遇到其它细胞的半通道,它们便能够与之对接形成通道。同样,连接蛋白上的分子允许其“识别”在它们的半通道内的其它连接蛋白和其它细胞半通道内的连接蛋白,并导致通道的正确排列和形成。Kandel ER,Schwartz JH,Jessell TM.Principles of Neural Science, 4th ed.,pp.178-180,McGraw-Hill,N.Y.(2000)。

[0013] 连接蛋白具有共有的跨膜拓补结构,具有四个 α -螺旋的跨膜结构域,两个胞外环,一个胞质环以及细胞质N-和C-末端结构域。跨膜和胞外结构域的序列最保守,而连接蛋白之间的许多关键功能差异都是由这些很大程度上保守的结构域中的氨基酸差异决定的。每个胞外环包括具有固定间距的三个半胱氨酸(形成一个同功异构型),其对于通道功能是必需的。连接(结合)通道由两个端对端的半通道组成,每个半通道都是连接蛋白亚单位的六聚体。在连接通道中,胞外环中的半胱氨酸在两个环之间形成单体内的二硫键,而不是单体间或半通道间的键。半通道之间的端对端的同嗜性结合(同类分子间结合, homophilic binding)是借助于非共价相互作用的。诱变研究表明对接区域包含 β 结构,并且可能在某种程度上与孔蛋白通道的 β -桶状结构相似。组成连接通道的两个半通道彼此相对旋转交错约30度,使得每个连接蛋白单体的 α 螺旋与并列半通道中的两个相邻单体的 α 螺旋轴向对齐。

[0014] 在正常情况下,膜上的每个连接子或半通道保持关闭,直到其与临近细胞的连接子对接。然而,本发明的发明人认为当表达半通道的细胞受到压力(如生理、机械等)时,半通道即使在未对接的情况下也能够打开。胞外半通道通讯的抑制包括抑制小分子流动通过打开的半通道到胞外或周质空间以及从胞外或周质空间流入。尽管不受任何机制的束缚或限制,但作用模式包括半通道的阻断(部分或全部)、触发连接子的内化作用然后从膜上除去连接子、诱导连接蛋白内的构象改变以使连接子闭合、以及掩蔽或结合至在触发通道打开中涉及的位点(如钙结合位点)。

[0015] 已经描述了连接蛋白的反义(AS)核苷酸及其应用。参见Becker等人于2000年1月27日提交的W000/44409,“Formulations Comprising Antisense Nucleotides to

Connexins”。

发明内容

[0016] 本文描述的并要求保护的发明具有许多特性和具体实施方式,包括但不限于在本发明内容部分列出的或描述的或提及的这些。本文描述的并要求保护的发明不限于本发明内容中限定的特点或具体实施方式或者被本发明内容中限定的特点或具体实施方式限制,使用这些特点和具体实施方式仅仅是为了说明的目的而非限制的目的。

[0017] 本文描述并要求保护的发明涉及抗-连接蛋白化合物,包括多肽(例如,拟肽和肽模拟物(peptidomimetics),抗体和抗体片段以及合成构建体)和多核苷酸(例如,反义多核苷酸),用于调节在所选组织、细胞和患者(例如患有心血管病症、炎性病症、神经性病症、血管病症、创伤以及其它的病症和紊乱,及其并发症的病人或者是这些疾病的危险人群)中的连接蛋白、半通道和间隙连接。

[0018] 本发明提供了抗-连接蛋白化合物和组合物,对于多种疾病、病症和紊乱的治疗有用,其中连接蛋白、半通道和间隙连接的调节对于治疗例如心血管、神经性、血管和其它病症或紊乱,包括创伤的治疗都是有益的。本发明还提供了例如使用这些化合物和组合物以及药物制剂、试剂盒和医疗设备的方法。

[0019] 一方面,提供了用于治疗患有血管紊乱的受治者的化合物、组合物以及方法。这样的方法包括给予受治者一种抗-连接蛋白化合物,例如反义化合物、拟肽或其它的抗-连接蛋白化合物(包括本文提供的那些),其能够抑制连接蛋白、半通道或间隙连接的表达、形成或活性。

[0020] 另一方面,提供了用于治疗患有炎性紊乱的受治者的抗-连接蛋白化合物、组合物以及方法。这样的方法包括给予受治者一种反义化合物、拟肽或其它抗-连接蛋白化合物(包括本文提供的那些),其能够抑制连接蛋白、半通道或间隙连接的表达、形成或活性。

[0021] 另一方面,提供了用于治疗患有创伤的受治者的抗-连接蛋白化合物、组合物以及方法。这样的方法包括给予患者一种反义化合物、拟肽或其它抗-连接蛋白化合物(包括本文提供的那些),其能够抑制连接蛋白、半通道或间隙连接的表达、形成或活性。

[0022] 另一方面,提供了联合移植或嫁接操作而用于治疗受治者的抗-连接蛋白化合物、组合物以及方法。这样的方法包括给予受治者一种反义化合物、拟肽或其它抗-连接蛋白化合物(包括本文提供的那些),其能够抑制连接蛋白、半通道或间隙连接的表达、形成或活性。这样的方法也能够抑制和/或预防与移植和嫁接操作相关的组织水肿。

[0023] 另一方面,提供了抗-连接蛋白结合蛋白质,包括拟肽、抗体、抗体片段等,其能够结合或调节连接蛋白半通道的表达、形成、作用或活性。结合蛋白质作为间隙连接和半通道的调节子是有用的。

[0024] 在某些非限制性具体实施方式中,抗-连接蛋白化合物包括包含对应于连接蛋白的跨膜区域的氨基酸序列的肽。这样的连接蛋白包括例如连接蛋白45、43、26、30、31.1和37。人连接蛋白是优选的种类。

[0025] 在非限制性但优选的具体实施方式中,抗-连接蛋白化合物包括包含对应于连接蛋白45的一部分跨膜区域的氨基酸序列的肽。在具体的非限制性具体实施方式中,例如,抗-连接蛋白化合物是一种具有包括SEQ ID NO:62的约3至约30个连续氨基酸的氨基酸序

列的肽,是一种具有包括 SEQ ID NO:62的约5至约20个连续氨基酸的氨基酸序列的肽,是一种 具有包括SEQ ID NO:62的约8至约15个连续氨基酸的氨基酸序列的肽,或者是一种具有包括SEQ ID NO:62的约11、12或13个连续氨基酸的 氨基酸序列的肽。其它非限制性具体实施方式包括一种抗-连接蛋白化合物,其是具有包括SEQ ID NO:62的至少约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25或30个连续氨基酸的氨基酸序列的肽。在 本文提供的某些抗-连接蛋白化合物中,拟肽是基于对应于SEQ ID NO:62 的在46-75和199-228位置的氨基酸的连接蛋白45的胞外结构域。因此,本文描述的某些肽具有对应于SEQ ID NO:62在46-75和199-228位置区 域的氨基酸序列。该肽不需要具有与SEQ ID NO:62的那些部分相同的氨 基酸序列,并且可以形成保守性氨基酸改变,以使肽在本文描述的和其它 本领域已知的化验中可保持结合活性或功能活性。在其它具体实施方式 中,拟肽是基于连接蛋白内的肽靶区域,而不是胞外结构域(例如SEQ ID NO:62的不对应于位置46-75和199-228的部分)。

[0026] 在另一个非限制性但优选的具体实施方式中,抗-连接蛋白化合物包 括包含对应于连接蛋白43的部分跨膜区域的氨基酸序列的肽。在具体的 非限制性具体实施方式中,抗-连接蛋白化合物是具有这样的氨基酸序列 的肽,包括具有以下氨基酸序列的肽,该氨基酸序列包括SEQ ID NO:63 的约3至约30个连续氨基酸,SEQ ID NO:63的约5至约20个连续氨基 酸;具有包括SEQ ID NO:63的约8至约15个连续氨基酸的氨基酸序列 的肽,或具有包括SEQ ID NO:63的约11、12或13个连续氨基酸的氨基 酸序列的肽。其它的非限制性具体实施方式包括一种抗-连接蛋白化合物, 其是具有包含SEQ ID NO:63的至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25或30个连续氨基酸的氨基酸序列的肽。在其它的抗-连接 蛋白化合物中,拟肽是基于连接蛋白43的对应于SEQ ID NO:63的位置 37-76和178-208的氨基酸的胞外结构域。因此,本文描述的某些肽具有 对应于SEQ ID NO:63的位置37-76和178-208的区域的氨基酸序列。这 些肽不需要具有与SEQ ID NO:63的那些部分相同的氨基酸序列,并且可 以形成保守性氨基酸改变,以使肽在本文中描述的和其它本领域已知的试 验中保持结合活性和功能活性。在其它具体实施方式中,拟肽是基于连接 蛋白内的肽靶向区域,而不是胞外结构域(例如SEQ ID NO:63的不与位 置37-76和178-208对应的部分)。

[0027] 本文更加详细地描述了其它具体化合物、制备这些化合物的方法以及 检测它们的活性的方法。

[0028] 可替换地,抗-连接蛋白化合物(包括在某些具体实施方式中提供和 使用的那些)包含一种或多种反义化合物。合适的反义化合物可以例如选 自由反义寡核苷酸、反义多核苷酸、脱氧核酶、吗啉代寡核苷酸、RNAi 分子、siRNA分子、PNA分子、DNA酶、以及5' 端突变的U1小核RNA, 以及前述物质的类似物组成的组。这些和其它化合物可以单独使用或者联 合一种或多种其它结合肽使用。

[0029] 诸如反义化合物或拟肽的抗-连接蛋白化合物可以靶向例如连接蛋白 45、43、26、37、30和/或31.1中的一种或多种。在某些非限制性但优选 的具体实施方式中,反义化合物或拟肽靶向连接蛋白45或连接蛋白43。在某些非限制性但优选的具体实施方式中,抗-连接蛋白化合物如反义化 合物靶向一个核酸分子的至少约8个核酸碱基,该核酸分子编码具有选自 SEQ ID NO:12-31的核酸碱基(nucleobase)序列的连接蛋白。反义化合 物可以包括例如靶向一个核酸分子的至少约12个核酸碱基的反义化合物, 该核酸分子编码具有选

自SEQ ID NO:12-31的核酸碱基序列的核酸碱基。在某些其它具体实施方式中,反义化合物包括选自SEQ ID NO:1-11的核酸碱基序列。反义化合物可以包括例如长度在约15至约35个核酸碱基之间,例如约25-30或约30个核酸碱基的反义寡核苷酸。

[0030] 反义化合物可以包括例如包含天然核酸碱基和未修饰的核苷间键(例如至少一种修饰的核苷间键)的反义寡核苷酸。该修饰的核苷间键可以包括硫代磷酸酯键。其它的反义化合物可以例如包括具有至少一个修饰糖部分的寡核苷酸。还是其它的反义化合物也可以包括例如具有至少一个修饰的核酸碱基的寡核苷酸。

[0031] 在某些具体实施方式中,抗-连接蛋白化合物如反义化合物或拟肽可以与对于减少组织损伤或促进愈合有用的第二化合物联合使用。第二化合物例如可以是生长因子或细胞因子等。合适的联合(辅助)给药化合物包括例如FGF、NGF、NT3、PDGF、TGF、VEGF、BDGF、EGF、KGF、整联蛋白、白细胞介素、纤溶酶和信号素(semaphorins)。对于人类疗法,上面列出的那些联合给药的化合物是人类起源或人类起源的。

[0032] 本发明提供了将抗-连接蛋白化合物给予患者、靶器官、靶组织或靶细胞的方法,其中对半通道调节是有利的。

[0033] 本发明提供了将抗-连接蛋白化合物给予患者、靶器官、靶组织或靶细胞的方法。因此,在某些非限制性具体实施方式中,通过给予抗-连接蛋白化合物来治疗受治者,该化合物能够结合于或调节以下一种或多种疾病的半通道:心血管疾病、冠心病、心力衰竭、心肌梗死、动脉粥样硬化、缺血性心脏病、心脏麻痹或其它器官移植或存储介质(storage medium)、再灌注损伤、呼吸或代谢酸中毒、肺水肿(包括暴露于如二氧化氮之类的毒性气体)、破坏内皮细胞的血管病理生理学(如由节食导致的高胆固醇血症病变)、血管疾病(微血管和大血管)、中风、脑血管疾病(大脑缺血)、血栓、由创伤导致的血管损伤(例如皮下创伤、支架植入、再狭窄(restenosis)或血管成形术)、由葡萄糖水平升高(糖尿病)导致的血管损伤、骨端血管疾病、器官缺血、视神经病变、发炎和风湿性关节炎(RA)、亚慢性或慢性炎症、癫痫(癫痫发作以及癫痫发作后损伤的扩散)、糖尿病性视网膜病、黄斑变性以及某些其它的症状,其在Harrison's, Principles of Internal Medicine 15th Edition (McGraw Hill, Inc., New York)中有更加详细的描述,以引用的方式结合于此。

[0034] 在某些其它的非限制性具体实施方式中,通过给予抗-连接蛋白化合物来治疗受治者,该化合物能够结合于或调节以下一种或多种病症的半通道,例如:(1)预防或治疗例如由缺血或创伤后或其导致的脊髓水肿;(2)预防或治疗例如由缺血或创伤(例如在大脑、视神经、脊髓和心脏中)后或其导致的组织中血管壁降解;(3)预防或治疗炎性关节炎和其它炎性疾病,其中,例如有水肿和/或炎症症状,或其中,例如持续发炎导致的血管萎缩;(4)预防或治疗亚急性或慢性创伤,例如眼角膜损伤,其中例如预防血管萎缩允许其从角膜缘缺血中恢复;(5)预防或治疗亚急性或慢性创伤,例如眼角膜创伤,作为一种例如触发上皮重新覆盖的方法;(6)治疗烧伤,例如眼睛的化学烧伤,例如为了触发上皮恢复并使其从亚急性角膜缘缺血中恢复;(7)预防或治疗亚急性或慢性皮肤损伤,包括例如糖尿病性溃疡,其中,例如预防持续性血管萎缩允许其从组织缺血中恢复;(8)治疗慢性损伤,包括例如糖尿病性溃疡,其中,例如连接蛋白43的持续表达,例如在其前缘处阻碍了上皮的重新覆盖;(9)利用连接蛋白拟肽来预防或治疗围产期缺血,其可以例如直接运送到脑室或通过脊柱和/或脊髓运送;(10)利用连接蛋白拟肽来抑制或预防由围产期缺血导致的水

肿,例如直接运送到脑室或通过脊柱和/或脊髓运送;(11)例如,利用系统递送连接蛋白拟肽来治疗围产期缺血;(12)例如,利用系统和/或直接递送到脑室或经过脊柱和/或脊髓递送连接蛋白拟肽来治疗中风或CNS缺血;(13)预防大脑中的癫痫样活动(例如癫痫),包括缺血后的癫痫样活动;和/或,(14)预防病变扩散、器官移植后的再灌注造成的水肿(和排斥反应)。提供了用于预防和/或治疗的所述方法和适应症中的能够结合或调节连接蛋白和间隙连接的抗-连接蛋白化合物。

[0035] 抗-连接蛋白化合物可以以各种预定次数给药。

[0036] 在某些非限制性具体实施方式中,内皮细胞中的连接蛋白半通道活性、活动、表达或形成被抑制。

[0037] 在某些非限制性具体实施方式中,上皮细胞中的连接蛋白半通道活性、活动、表达或形成被抑制。

[0038] 在某些非限制性具体实施方式中,可以治疗受治者的包括中风在内的血管紊乱。

[0039] 在某些非限制性具体实施方式中,可以治疗受治者的包括缺血在内的血管紊乱。该缺血可以为例如组织缺血、心肌缺血或大脑缺血。

[0040] 在某些非限制性具体实施方式中,本文中治疗的受治者处于由于缺血导致神经功能丧失的危险。

[0041] 在某些非限制性具体实施方式中,可以治疗受治者的血管紊乱,这包括治疗或改善可能由缺血引起的中枢或周围神经系统中的细胞死亡或变性。

[0042] 在某些非限制性具体实施方式中,可以治疗受治者的血管紊乱,其中抗-连接蛋白化合物,例如反义化合物、拟肽或其它的结合肽,连同对受治者进行的血管或冠脉操作(手术)加以给药。在其它非限制性具体实施方式中,抗-连接蛋白化合物例如反义化合物,拟肽或其它的结合肽是在所述血管或冠脉的操作过程中给药的。抗-连接蛋白化合物也可以在血管或冠脉操作之前或之后给药,或二者兼而有之。

[0043] 在某些非限制性具体实施方式中,抗-连接蛋白化合物,包括反义化合物、拟肽或其它结合肽是在进行血管或冠脉操作之后约1小时内给予,或者,例如在血管或冠脉操作之后约2小时内给予。在其它的具体实施方式中,抗-连接蛋白化合物是在约24之内给药。抗-连接蛋白化合物也可以根据需要或必要的情况超出这些时间范围加以给予。

[0044] 在某些非限制性具体实施方式中,抗-连接蛋白化合物,包括反义化合物、拟肽或其它结合肽可以连同心脏操作,例如在患者身上进行的心脏手术加以给药。

[0045] 在某些非限制性具体实施方式中,抗-连接蛋白化合物,包括反义化合物、拟肽或其它的结合肽可以连同为了进行血管或其它操作的医疗器械一起给药。

[0046] 另一方面,提供了一种用于为受治者给药的制剂,该制剂包括药用载体和能够调节连接蛋白半通道和随后的连接子形成(例如通过阻断或改善半通道表达、形成、活动和/或活性)的试剂。

附图说明

[0047] 图1A和图1B示出了在置于器官型培养基中24小时后的大鼠脊髓节段。在对照脊髓(图1A)中,在切口末端(虚线标记了原始的切口)观察到明显的肿胀。连接蛋白43特异性反义ODN治疗的节段(图1B)则几乎没有表现出肿胀或水肿。

[0048] 图2示出了在器官型培养基中24小时后,对照脊髓的树脂切片的考马斯蓝染色。神经元有空泡并且水肿,伴有沿半通道打开并允许细胞外液进入细胞(箭头)的膜的“起疱”现象。

[0049] 图3A-图3C示出了利用结合于胞外环(在图3A中用绿色表示的 Gap7M抗体)和结合于蛋白质的胞质羧基尾部的抗体(在图3A中用红色表示)的连接蛋白43的免疫组织化学标记。胞质抗体标记所有的连接蛋白43蛋白质(红色),而Gap7M只能标记暴露的半通道的胞外环(绿色),因为其在空间上受结合于在细胞间形成紧密通道的对接连接子阻碍。图3B示出了在压伤后24小时利用脊髓中的两个抗体的二元标记。大多数标记呈现黄色,在这里两种抗体共同定位,表明存在的蛋白质中很大部分没有与相邻细胞的连接子对接,并保持为半通道。连接蛋白43特异性反义ODN阻止蛋白质翻译并且在治疗后的脊髓中很少观察到半通道(图3C)。

[0050] 图4示出了来自己在器官型培养基中培养五天的脊髓的组织切片的异凝集素(Isolectin)B4标记。该凝集素与小神经胶质细胞和血管内皮细胞结合。在该连接蛋白43特异性反义ODN治疗的片段中的毛细血管在5天之后仍然是完整的(箭头)。而在对照脊髓中,2天后很少有血管仍然是完全完整的;5天后,对照中主要标记的为激活的巨噬细胞表型的神经胶质细胞。

[0051] 图5A和图5B示出了压伤的脊髓组织5mm喙侧的切片。在挤压该脊髓后4小时,FITC标记的BSA被注入动物的尾静脉,然后取出该组织并切片。在对照脊髓(图5A)中,染料大量地从血管中渗漏出来,达到距离损伤部位5mm,表明毛细血管壁破裂和血脑屏障破坏。在连接蛋白43特异性反义ODN治疗的脊髓(图5B)中,不包含在毛细管中的染料很少,表明血管完整性得以保持。

[0052] 图6A-图6C示出了在梗塞发生后24小时和在梗死中,在临近缺血梗死组织的羊心室壁中的羊心脏组织的三重标记。该组织用异凝集素B4标记,示出了血管内皮细胞(蓝色),用针对连接蛋白43的抗体标记(红色)以及用针对Gap7M的抗体标记(绿色)。Gap7M抗体识别连接蛋白的保守胞外环区域(不是连接蛋白同工型特异的),但可以标记半通道(在完整的通道中,它们受空间阻碍而不能进入其表位)。图6A是一组4个照片,其来自远离梗塞区域的组织,示出了毛细血管的异凝集素B4标记(蓝色—左上角)和在肌细胞闰盘中的连接蛋白43间隙连接(左下角—红色)。实际上没有GAP7M标记的半通道(右上角—绿色)。右下角的图像是其它三个图像的合并。血管仍然是完整的而且没有肌细胞本身损伤的迹象。图6B示出了一个仍然与梗塞部位分开但距离更近的部位。相同的三个标记与合并的图像都体现在这个四部分的图像中。大多数血管仍然是完整的,但血管壁某些区域被破坏。在这些区域,半通道标记与损伤的血管壁一起定位。四个图像(图6C)的最后一幅就在梗塞部位本身的内部。在大量半通道表达后,很少毛细血管仍然明显地保持完整。连接蛋白43标记变得分散而且在闰盘(intercalated disc)中不再含有,表明肌细胞现在已经严重损伤。在所有的情况下,Gap7M抗体标记都不与连接蛋白43标记共同定位(如在脊髓中一样),这表明它们是不同的连接蛋白同工型,最有可能是连接蛋白45。

[0053] 图7示出了在缺血后24小时的梗死中,异凝集素B4(绿色)标记的毛细血管内皮细胞与肌间球蛋白(myomesin)抗体标记(红色)的肌细胞肌节的M线共同定位。这个区域与图6C示出的区域相同。毛细血管完全破坏并且正常的肌细胞肌节带型(myocyte sarcomeric

banding pattern) 被破坏,这表明肌肉细胞的死亡与血管壁的分解同时发生。图片上方的图像示出了异凝集素B4标记,中间的图像表示肌间球蛋白(myomesin)标记,下方的图像是上面两幅图像的结合。

[0054] 图8示出了代表肿胀在总脊髓节段区域的百分数的柱状图。示出了对照(仅有培养基)节段,以用于阻断半通道的染料摄取试验(分别在图8中由肽4和肽5表示)示出的肽VDCFLSRPTEKT(SEQ ID NO:35)和SRPTEKTIFII(SEQ ID NO:36)处理的节段,以及以不阻断半通道的肽QQPGCENVCYDK(SEQ ID NO:39)(由图8中的肽8示出)处理的切片。肽SRPTEKTIFII(SEQ ID NO:36,图8中的肽5)(一种基于组织学研究的优良阻断剂)已用5种不同的浓度使用,其中最低浓度对减少水肿最有效。

[0055] 图9示出了利用识别连接蛋白胞外环区域的抗体的来自假对照(左侧)和大脑缺血30分钟后24小时(右侧)的近分娩期胎羊大脑中的连接蛋白半通道标记。在对照大脑中,没有观察到连接蛋白半通道标记,而在缺血后,存在大量上调的半通道。在细胞体(水平箭头)上和在内皮细胞中(垂直箭头)的半通道表达尤其高。缺血后上调的主要连接蛋白为连接蛋白43。

[0056] 图10示出了妊娠晚期胎羊大脑缺血30分钟后,开始用人造CSF脑室内(i.c.v.)灌注或肽灌注90分钟的实例。在这些动物中,灌注持续到缺血发生后的72小时。该赋形剂(人造CSF)灌注动物(左)表现出严重、持续发作的延迟发作(癫痫持续状态;一个例子示于插入盒中,上),随后皮层阻抗持续上升(底部,细胞肿胀的测定),在48小时之后达到最大。发作到约48小时被解决。肽模拟物(peptidomimetic)灌注(右)将持续的发作变成离散的、分开的推后发作。存在明显延迟和减弱的大脑阻抗上升。

[0057] 图11A和图11B示出了对照、以及使用2.5、5和10 μ M浓度的连接蛋白43特异性AS-ODN对视神经(图11A)组织肿胀和(图11B)细胞死亡的剂量响应曲线。图11A示出了在对照和三个AS-ODN浓度下ON肿胀的剂量反应曲线。图B示出了在对照和三个AS-ODN浓度下两个视神经区域中死亡细胞数量的剂量反应曲线。两个参数表现出随浓度的增长的下降趋势。在10 μ M处,组织的肿胀在处理最早6h减轻,与对照组相比,在24h时减小69%。用反义处理的情况下,视神经的前节段和中节段中的细胞死亡减少。

[0058] 图12示出了对照和AS-ODN处理的视神经中肿胀的百分数(所有时间点,n=6)。即在缺血诱导后的不同时间点,对照和AS-ODN处理的神 经的肿胀%。在对照组织中水肿更加明显,并且在研究的所有时间点具有显著的统计学差异。星号表示两组之间的统计显著性。

[0059] 图13:(上图)在缺血诱导后2、6和24小时,对对照(A、B、C)和AS-ODN处理的(D、E、F)视神经切片中间的死细胞进行碘化丙啶染色。在所有3个时间点与对照相比,连接蛋白43特异性AS-ODN处理组很少显示染色(下图)。对照组中的细胞死亡开始增加,在6小时达到峰值然后下降(认为反映了组织水肿,每单位面积留下的细胞更少)。AS-ODN处理的组织即使在培养基中24小时之后仅有很少量的细胞死亡增加。星号表示处理之间的统计学显著性。

[0060] 图14示出了对照组(绿色)和连接蛋白43特异性反义处理的视神经(蓝色)的平均血管节段的长度。在所有的时间点,经该反义处理的神经都具有较长的片段,表明由于连接蛋白的表达(可能是以半通道的形式或通过间隙连接介导的副作用)导致了血管崩解的

减少。

[0061] 本文提到的所有颜色是在相应的黑白图中的灰度上表示的。

具体实施方式

[0062] 本发明的实施可以包括或利用多种常规的分子生物学技术(包括重组 技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学、核酸化学和免疫学技术,这些都是本领域的现有技术。这些技术在文献中已详细解释,包括但不限于, 仅以举例的方式列出, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) 和 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition (Sambrook and Russel, 2001), 在本文中一起和分别称作“Sambrook”; Oligonucleotide Synthesis (M.J.Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Handbook of Experimental Immunology (D.M.Weir & C.C.Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller & M.P.Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M.Ausuble et al., eds., 1987, 包括2001年的附录); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E.Coligan et al., eds., 1991); The Immunoassay Handbook (D.Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); Bioconjugate Techniques (Greg T.Hermanson, ed., Academic Press, 1996); Methods of Immunological Analysis (R.Masseyeff, W.H.Albert, and N.A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993); Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York, and Harlow and Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (jointly and individually referred to herein as Harlow and Lane), Beaucage et al. eds, Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000); 和 Agrawal, ed., Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties Humana Press Inc., New Jersey, 1993)。

[0063] 定义:

[0064] 在进一步全面地描述本发明和各种非限制性具体实施方式之前, 阐明 描述本发明的上下文中使用的某些术语。除非另外指出, 下面的术语在本文和附加的权利要求中使用时具有下面的含义。没有在下面或说明书的其它部分限定的那些术语应采用其所在领域中公认的含义。

[0065] 本文提供的化合物(例如肽和蛋白质)中使用的氨基酸可以是遗传编码氨基酸、天然非遗传编码氨基酸或合成氨基酸。上述的任何L-和D-对映异构体都可以用于所述化合物中。本文中使用下面的缩写表示下面遗传编码氨基酸(及其残基): 丙氨酸(Ala, A)、精氨酸(Arg, R)、天冬酰胺(Asn, N)、天冬氨酸(Asp, D)、半胱氨酸(Cys, C)、甘氨酸(Gly, G)、谷氨酸(Glu, E)、谷氨酰胺(Gln, Q)、组氨酸(His, H)、异亮氨酸(Ile, I)、亮氨酸(Leu, L)、赖氨酸(Lys, K)、蛋氨酸(Met, M)、苯丙氨酸(Phe, F)、脯氨酸(Pro, P)、丝氨酸(Ser, S)、苏氨酸(Thr, T)、色氨酸(Trp, W)、酪氨酸(Tyr, Y)和缬氨酸(Val, V)。

[0066] 不是遗传编码的并且可以存在于本发明的化合物中某些常见氨基酸 包括但不限

于,β-丙氨酸(b-Ala)和其它ω-氨基酸如3-氨基丙酸(Dap)、2,3-二氨基丙酸(Dpr,Z)、4-氨基丁酸等;α-氨基异丁酸(Aib);ε-氨基己酸(Aha);δ-氨基戊酸(Ava);甲基甘氨酸(MeGly);鸟氨酸(Orn);瓜氨酸(Cit);叔丁基丙氨酸(t-BuA);叔丁基甘氨酸(t-BuG);N-甲基异亮氨酸(Melle);苯基甘氨酸(Phg);环己基丙氨酸(Cha);正亮氨酸(Nle,J);2-萘基丙氨酸(2-Nal);4-氯苯基丙氨酸(Phe(4-Cl));2-氟苯基丙氨酸(Phe(2-F));3-氟苯基丙氨酸(Phe(3-F));4-氟苯基丙氨酸(Phe(4-F));青霉胺(Pen);1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸(Tic);β-2-噻吩基丙氨酸(Thi);蛋氨酸亚砷(MSO);高精氨酸(hArg);N-乙酰基赖氨酸(AcLys);2,3-二氨基丁酸(Dab);2,3-二氨基丁酸(Dbu);对氨基苯丙氨酸(Phe(pNH2));N-甲基缬氨酸(MeVal);高半胱氨酸(hCys);3-苯并噻唑-2-基-丙氨酸(BztAla,B);以及高丝氨酸(hSer)。其它的氨基酸类似物包括:磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸、磷酸酪氨酸、羟脯氨酸、γ-羧基谷氨酸酯、马尿酸、八氢吡啶-2-羧酸、斯他汀(statine)、α-甲基-丙氨酸、对苯甲酰-苯丙氨酸、炔丙甘氨酸以及肌氨酸。无论是现在还是将来,包含于本发明范围内的肽可以具有任何前述的L-或D-构型的氨基酸,或任何本文描述的或本领域已知的其它氨基酸。

[0067] 可相互取代的氨基酸通常属于相似类或亚类。正如本领域的技术人员知道的,氨基酸可以根据其氨基酸侧链的化学和物理性质分成不同的种类。例如,某些氨基酸通常被认为是亲水或极性氨基酸,其它的被认为是疏水或非极性氨基酸。极性氨基酸包括具有酸性、碱性或亲水侧链的氨基酸,非极性氨基酸包括具有芳基或疏水侧链的氨基酸。非极性氨基酸可被进一步细分,其中,包括脂肪族氨基酸。本文使用的氨基酸分类的定义如下:

[0068] “非极性氨基酸”是指在生理pH下具有不带电荷的侧链的氨基酸,其不具有极性而且一般被水溶液排斥。遗传编码的疏水性氨基酸的实例包括Ala、Ile、Leu、Met、Trp、Tyr和Val。遗传编码的非极性氨基酸的实例包括t-BuA、Cha和Nle。

[0069] “芳香族氨基酸”是指侧链上包含至少一个具有共轭π-电子体系(芳香基团)的非极性氨基酸。芳香基团可以进一步被取代基如烷基、烯基、炔基、羟基、磺酰基、硝基和氨基基团及其它基团取代。遗传编码的芳香族氨基酸的实例包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。常见的非遗传编码的芳香族氨基酸包括苯基甘氨酸、2-萘基丙氨酸、β-2-噻吩基丙氨酸、3-苯并噻唑-2-基-丙氨酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、4-氯苯基丙氨酸、2-氟苯基丙氨酸、3-氟苯基丙氨酸和4-氟苯基丙氨酸。

[0070] “脂肪族氨基酸”是指具有饱和或不饱和直链、支链或环状烃侧链的非极性氨基酸。遗传编码的脂肪族氨基酸的实例包括Ala、Leu、Val和Ile。非编码的脂肪族氨基酸的实例包括Nle。

[0071] “极性氨基酸”是指在生理pH下具有带电荷侧链或不带电荷但通常具有一个键,其中两个原子共用一个电子对并且该电子对更靠近其中一个原子的侧链的疏水性氨基酸。极性氨基酸一般为亲水性的,是指其具有被水溶液吸引的侧链的氨基酸。遗传编码的极性氨基酸的实例包括天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸和丝氨酸。非遗传编码的极性氨基酸的实例包括瓜氨酸、高半胱氨酸、N-乙酰基赖氨酸和蛋氨酸亚砷。

[0072] “酸性氨基酸”是指具有小于7的侧链pK值的亲水性氨基酸。酸性氨基酸在生理pH下通常由于失去氢离子而具有带负电荷的侧链。遗传编码的酸性氨基酸的实例包括天冬氨酸(天冬氨酸盐)和谷氨酸(谷氨酸盐)。

[0073] “碱性氨基酸”是指具有大于7的侧链pK值的亲水性氨基酸。碱性氨基酸在生理pH下通常由于与水合氢离子结合而具有带正电荷的侧链。遗传编码的碱性氨基酸的实例包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。非遗传编码的碱性氨基酸的实例包括2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸和高精氨酸。

[0074] “可电离氨基酸”是指在生理pH下可以带电荷的氨基酸。该可电离的氨基酸包括酸性和碱性氨基酸,例如,D-天冬氨酸、D-谷氨酸、D-组氨酸、D-精氨酸、D-赖氨酸、D-羟赖氨酸、D-鸟氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、L-组氨酸、L-精氨酸、L-赖氨酸、L-羟赖氨酸和L-鸟氨酸。

[0075] 正如本领域技术人员理解的,上述的分类不是绝对的。某些氨基酸表现出多于一种的特性,因此其可能被包括在多于一种的分类中。例如,酪氨酸具有非极性芳香环又具有极性的羟基。因此,酪氨酸具有多个特性可以被描述为非极性的、芳香族的和极性的。然而,非极性环是占优势的,所以酪氨酸通常被认为是非极性的。相似地,除了能够形成二硫键之外,半胱氨酸也具有非极性的特征。因此,当半胱氨酸没有被严格分类为疏水或非极性氨基酸时,很多情况下半胱氨酸可以被用于对肽赋予疏水性或非极性。

[0076] 在某些具体实施方式中,本发明考虑到的极性氨基酸包括,例如精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、高半胱氨酸、赖氨酸、羟赖氨酸、鸟氨酸、丝氨酸、苏氨酸和结构上相关的氨基酸。在一个具体实施方式中,极性氨基酸是可电离的氨基酸,例如精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、组氨酸、羟赖氨酸、赖氨酸或鸟氨酸。

[0077] 可以使用的极性或非极性氨基酸残基的实例包括,例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸等。

[0078] “抗-连接蛋白化合物”包括影响或调控连接蛋白、连接蛋白半通道(连接子)或间隙连接的活性、表达或形成的那些化合物。抗-连接蛋白化合物包括但不限于反义化合物(例如,反义多核苷酸)、抗体及其结合片段,以及包括“肽模拟物”和“模拟”肽的肽和多肽。

[0079] “反义化合物”包括不同类型的能够抑制基因表达、翻译或发挥功能的分子,包括那些用于治疗应用的mRNA的通过序列特异性靶向起作用的分子。反义化合物包括反义DNA化合物和反义RNA化合物。虽然反义寡核苷酸是反义化合物的优选形式,但是本发明包括其它的寡聚反义化合物,包括但不限于寡核苷酸模拟物(oligonucleotide mimetics)。根据本发明的反义化合物优选含有约8至约50个核酸碱基(即约8至约50个连接的核苷)。尤其优选的反义化合物为反义寡核苷酸,甚至更优选含有约12至约30个核酸碱基的寡核苷酸。反义化合物包括核酶、外部引导序列(EGS)、寡核苷酸(寡酶(oligozyme))、及其它短的催化RNA或催化寡核苷酸,其与靶核酸杂交并调控其表达。它们还包括硫代磷酸寡脱氧核苷酸(S-ODN)。

[0080] 因此,反义化合物包括例如主要核酸基的基因沉默分子,例如化学修饰的反义寡脱氧核糖核酸(ODN)、核酶和siRNA(Scherer, L.J. and Rossi, J.J. Nature Biotechnol. 21:1457-1465 (2003))。反义化合物还可以包括反义分子,例如肽核酸(PNA)(Braasch, D.A. and Corey, D.R., Biochemistry 41, 4503-4510 (2002))、吗啉代磷酸二胺(Heasman, J., Dev. Biol., 243, 209-214 (2002))、DNA酶(Schubert, S. et al., Nucleic Acids Res. 31, 5982-5992 (2003))。Chakraborti, S. and Banerjee, A.C., Mol. Ther. 7, 817-826 (2003), Santoro, S.W. and Joyce, G.F. Proc. Natl Acad. Sci. USA 94, 4262-4266

(1997), 以及最近开发的5'-末端突变的U1小核RNA(Fortes, P. et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 100, 8264-8269 (2003))。

[0081] 术语“反义序列”是指具有反义化合物活性的多核苷酸,包括但不限于,例如与一个RNA序列互补或部分互补或对应的序列。因此,反义序列包括,例如与mRNA或其部分结合以阻断通过核糖体的mRNA转录的核酸序列。反义方法通常在本领域是熟知的。例如,参见PCT公开 W094/12633,和Nielsen等人,Science 254:1497 (1991); Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, edited by F. Eckstein, IRL Press at Oxford University Press (1991); Antisense Research and Applications (1993, CRC Press)。选择靶的反义序列可能会或也可能不会导致与非靶序列的非特异结合。优选与非靶序列以最少量、没有或不可检测到的非特异结合的反义序列。

[0082] 如本文使用的,“信使RNA”不仅包括用三联体基因密码来编码蛋白质的序列信息,还包括形成5'-非翻译区、3'-非翻译区和5'-帽状区的相关核糖核苷酸序列,以及形成各种二级结构的核糖核苷酸序列。寡核苷酸可以完全或部分靶向这些序列中的任何一个。

[0083] 通常,核酸(包括寡核苷酸)可以被描述为“DNA类”(即具有2'-脱氧糖基并且通常为T而不是U碱基)或“RNA类”(即具有2'-羟基或2'-修饰糖基并且通常为U而不是T碱基)。核酸螺旋结构可以采用多于一种类型的结构,最常见的是A型和B型。通常,认为具有B-型类结构的寡核苷酸是“DNA类”,而具有A-型类结构(A-form-like)的寡核苷酸是“RNA类”。

[0084] 术语“互补”通常是指通过碱基配对的多核苷酸的自然结合,例如在允许的盐和温度条件下。例如,序列“A-G-T”与互补序列“T-C-A”结合。两个单链分子之间的互补性可以是“部分的”,使得仅有部分核酸结合,或者可以是“完全的”,使得在这些单链分子之间存在完全的互补性。核酸分子之间的互补程度对于它们之间杂交效率和强度有重要影响。“可杂交的”和“互补的”是这样的术语,用来表示互补性的充分程度,以使结合(优选稳定结合)足以实现预期的例如发生在靶DNA或靶RNA与寡核苷酸之间的行为。可以理解,寡核苷酸不需要100%与其靶核酸序列互补才是可杂交的,而且也可以理解该结合可以是靶特异性的,或可以结合于其它非靶分子,只要该非特异性结合不严重或不期望地阻碍治疗或其它目的。寡核苷酸用来干扰靶分子的正常功能以使其活性丧失或降低,优选在期望特异结合的条件下,即在体内试验或治疗性处理的生理条件,或在体外试验该试验进行的条件下,具有足够的互补程度以避免非特异性的或不希望的与非靶标序列的结合。绝对的互补不是必需的。通常优选在生理条件下具有足够的互补性以形成具有熔解温度高于20℃、30℃或40℃的双链的多核苷酸。

[0085] “紊乱(障碍, disorder)”是可以从用本发明的分子或组合物的治疗中受益的任何病症,包括本文描述的或要求保护的那些。包括慢性和急性紊乱或疾病,包括那些正在讨论的哺乳动物易患的紊乱病理状态。

[0086] 本文使用的“受治者(患者, subject)”是指任何哺乳类的动物,包括人、家畜和农场养殖动物,以及动物园动物、运动动物或宠物,如狗、马、猫、羊、猪、牛等。优选的受治者为人类。

[0087] 将寡核苷酸“靶向”一种选定核酸靶可以是一个多步骤过程。该过程可以始于确定其功能待调控的核酸序列。这可以是例如细胞基因(或由基因形成的mRNA),其表达与特定的疾病状态相关。靶向过程也可以包括确定核酸序列中的一个或多个位点,用于寡核苷

酸相互作用,以产生期望 的效果,即抑制蛋白质表达、调节活性等。一旦一个或多个靶位点被鉴别,则选择与靶足够或期望程度互补的反义化合物,即充分杂交和具有适当或 其它期望的特性以获得期望活性(例如寡核苷酸)。在本发明中,靶包括 编码一个或多个连接蛋白的核酸分子。靶向过程也可以包括确定发生反义 相互作用以获得期望效果的一个或多个位点。优选的基因内位点为例如包 括基因的开放读框(ORF)的翻译起始或终止密码子的区域。翻译起始密 码子通常为5'-AUG(在转录mRNA中;在相应的DNA分子中的5'-ATG),也 可以称为“AUG密码子”、“起始密码子”或“AUG起始密码子”。少 数基因具有翻译起始密码子,其具有5'-GUG、5'-UUG或5'-CUG,以及 5'-AUA、5'-ACG和5'-CUG的RNA序列,在体内发挥作用。因此,术语“翻译起始密码子”和“起始密码子”可以包括许多密码子序列,即使每 种情况下引发氨基酸通常都是蛋氨酸(在真核生物中)或甲酰蛋氨酸(在 原核生物中)。在本领域中还已知原核基因和真核基因可以具有两个或两 个以上可替换的起始密码子,其中 任何一个起始密码子在特定的细胞类型 或组织、或特定的条件下都可以被优先用于起始 翻译。

[0088] 术语“寡核苷酸”包括由天然碱基、糖和糖间(intersugar)(骨架)键连接组成的核苷酸或核苷单体的寡聚体或聚合体。术语“寡核苷酸”还 包括功能相似的、包含非天然单体或其部分的寡聚体或聚合体。这样的修 饰或取代的寡核苷酸通常由于诸如细胞摄取增加、在核酶存在下稳定性增 强或靶向亲和力增强等的特性而比天然形式的更加优选。一些核苷酸或核 苷的变体已经表现出:使寡核苷酸比天然的寡脱氧核苷酸(ODN)对核酶 消化更加耐受。核酶耐受性通过以下的方法常规地检测:将寡核苷酸与细 胞提取物或分离的核酶溶液共孵育,并在一段时间后测定完整寡核苷酸剩 余的多少,通常是通过凝胶电泳的方法进行测定。经过修饰以增强核酶耐 受力的寡核苷酸比未经修饰的寡核苷酸能够更长时间地保持完整。某些变 体也表现出增强寡核苷酸与靶的结合(亲和力)。寡核苷酸与靶的亲 和力 常规通过例如测定寡核苷酸和靶之间的 T_m (熔融温度)加以确定, T_m 是 寡核苷酸和靶解离的温度。解离可以通过分光光度法检测。 T_m 越高,寡 核苷酸与靶的亲和力越大。在某些情况下,增强靶结合亲和力的寡核苷酸 修饰也能够增强核酶耐受性。

[0089] “多核苷酸”是指多个核苷酸。因此,术语“核苷酸序列”或“核酸”或“多核苷酸”或“寡核苷酸”或“寡脱氧核苷酸”都是指核酸杂聚物或 这些核酸序列。这些术语也指基因组或合成起源的DNA或RNA,其可以 是单链或双链的,并且可以代表肽核酸(PNA)或任何DNA类 或RNA类 物质的正义或反义链。

[0090] 编码连接蛋白、连接蛋白片段或连接蛋白变体的多核苷酸包括编码下 列物质的多核苷酸:在自然界中发现的连接蛋白的成熟形式(天然的及其 物种变体);在自然界中发现的连接蛋白的成熟形式和其它的编码序列,例如,前导序列或信号序列或前蛋白序列(天然的及其物种变体);前述 序列和非编码序列(例如,自然界中发现的成熟形式的多核苷酸编码序列 中的内含子或非编码序列的5'端和/或3'端);自然界中发现的连接蛋白成熟形式的片段;以及正如提到的自然界中发现的连接蛋白成熟形式的变 体。因此,“编码连接蛋白的多核苷酸”等具有仅编码期望连接蛋白、片 段或变体的序列的多核苷酸,以及包括其它的核苷酸例如附加的编码和/ 或非编码序列的多核苷酸。

[0091] 在本发明的上下文中,信使RNA不仅包括利用三联体遗传密码来编 码蛋白质的信息,也包括形成5'-非翻译区、3'-非翻译区、5'-帽状区以及 内含子/外显子连接核糖核苷

酸的相关核糖核苷酸。因此,根据本发明的寡核苷酸可以完全或部分靶向这些相关的核糖核苷酸以及信息核糖核苷酸。因此,寡核苷酸可以特异地与转录起始位点区、翻译起始密码子区、5'帽状区、内含子/外显子连接、编码序列、翻译终止密码子区或5'端或3'端非翻译区的序列进行杂交。少数基因具有翻译起始密码子,其具有已被证实在体内起作用的RNA序列5'-GUG、5'-UUG或5'-CUG,以及5'-AUA、5'-ACG和5'-CUG。因此,术语“翻译起始密码子”和“起始密码子”可以包括许多密码子序列,即使每种情况下的起始氨基酸通常都是蛋氨酸(在真核生物中)或甲酰蛋氨酸(在原核生物中)。在本领域中还已知真核和原核基因可以具有两个或两个以上可选替换的起始密码子,在特定的细胞类型或组织中、或在特定的条件下,对于翻译,其中的任何一个都可能被优先使用。在本发明的上下文中,“起始密码子”和“翻译起始密码子”是指在体内用于启动从编码连接蛋白的基因转录得到的mRNA分子的翻译的一个或多个密码子,而不管这些密码子的序列。在本领域中还已知,基因的翻译终止密码子(或“终止密码子”)可以具有三个序列即5'-UAA、5'-UAG和5'-UGA(相应DNA序列分别是5'-TAA、5'-TAG和5'-TGA)中的一个。术语“起始密码子区”、“AUG区”和“翻译起始密码子区”是指包括从翻译起始密码子在任一方向(即5'端或3'端)的约25至约50个连续核酸的mRNA或基因的一部分。这个区域是一个优选的靶区域。相似地,术语“终止密码子”和“翻译终止密码子区”是指包括从翻译终止密码子在任一方向(即5'端或3'端)的约25至约50个连续核苷酸的mRNA或基因的一部分。这个区域是优选的靶区域。本领域中公知的开放读框(ORF)或“编码区”是指在翻译起始密码子和翻译终止密码子之间的区域,也是一个有效的靶区域。其它优选的靶区域包括5'非翻译区(5'UTR),本领域中公知的是指翻译起始密码子的5'方向上的mRNA的部分,因此包括在5'端帽状位点和mRNA的翻译起始密码子之间的核苷酸或基因上相应的核苷酸和3'非翻译区域(3'UTR),本领域中公知的是指从翻译终止密码子在3'方向上的mRNA的部分,因此包括位于翻译终止密码子和mRNA的3'端之间的核苷酸或基因上相应的核苷酸。mRNA的5'帽结构包含通过5'-5'三磷酸酯键连接到mRNA的5'端-最大(most)残基的N7-甲基化鸟嘌呤核苷残基。mRNA的5'帽状区被认为包括5'帽状结构本身以及临近该帽状结构的开始50个核苷酸。5'-帽区也可以是优选的靶区域。

[0092] 尽管某些真核生物mRNA转录体是直接翻译的,许多都包含一个或多个被称为“内含子”的区域,其是从前-mRNA转录体中切割而产生一个或多个成熟的mRNA。保留区域(由此被翻译的区域)称为“外显子”,并被剪接在一起形成连续的mRNA序列。mRNA剪接位点,即外显子-外显子或内含子-外显子连接,也可以是优选的靶区域,尤其是在疾病中暗示有异常拼接或在疾病中暗示特定的mRNA拼接产物过量产生的情况下非常有用。由于基因重排或缺失,异常的融合结合处也是优选的靶标。在可选的拼接mRNA中靶向特定的外显子也可能是优选的。还发现内含子也是有效的,例如,对于DNA或前-mRNA,因此是优选的用于反义化合物靶向的靶区域。

[0093] 术语“拟肽(peptidomimetic)”和“肽模拟物(mimetic)”包括天然和合成的化合物,其可以与它们模拟的蛋白质区域具有基本上相同的结构和功能特性。对于它们可能模拟的连接蛋白,例如,相对连接蛋白的胞外环涉及连接子间的对接和细胞间通道的形成。

[0094] 具有与模板肽类似性质的肽类似物可以是非肽药物。“拟肽”或“肽模拟物”包括

肽基 (peptide-based) 化合物, 也包括这样的非肽基化合物 (Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger; TINS; 392 (1985); and Evans et al., J. Med. Chem. 30: 1229 (1987); Beeley N., Trends Biotechnol. Jun; 12 (6): 213-6 (1994); Kieber-Emmons T, et al; Curr Opin Biotechnol. Aug; 8 (4): 435-41 (1997)。在结构上与治疗上有用的肽相似的拟肽可用于产生同等或增强的治疗或预防效果。通常, 拟肽与范例多肽 (paradigm polypeptide) (即具有生物或药理功能或活性的多肽) 在结构上相同或相似, 但也可以是一个或多个肽键, 可选地被选自以下键组成的组中的键所取代: $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (顺式和反式)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 。该拟肽可以完全由天然氨基酸组成, 或由氨基酸的非天然类似物组成, 或是部分由天然的氨基酸和部分由氨基酸的非天然类似物组成的嵌合分子。该模拟物也可以包含任意量的天然氨基酸保守取代, 只要该取代基本上也不改变模拟物的活性。例如, 如果模拟组合物能够下调连接蛋白蛋白质或连接子的生物活动 (作用) 或活性, 例如, 防止连接子的对接以形成间隙连接介导的细胞间通讯, 或防止连接子打开而使细胞质暴露到细胞外周质 (milieu) 中, 则该模拟组合物落入本发明的范围内。肽模拟物、拟肽和连接蛋白调控肽包括本文列出的描述肽模拟物、拟肽和连接蛋白调控肽的那些, 以及本领域无论是现在已知或今后开发的那些。

[0095] 术语“组合物”涵盖包括一种或多种成分的产物。

[0096] 如本文以多种形式使用的, 术语连接蛋白活性的“调控子”和这样的调控子包括连接蛋白功能或表达的小分子拮抗剂、反义分子、核酶、三螺旋分子和RNAi多核苷酸、基因治疗方法等, 以及其它。

[0097] 术语“百分数 (%) 一致性”是指在两个或多个序列的比较中发现的序列相似性的百分数。百分数一致性可以通过电子学方法测定, 例如, 使用任何合适的软件。同样, 两个序列间 (或其中之一的一个或多个部分或二者的一个或多个部分) 的“相似性”可通过比较一个序列与第二个序列来确定。

[0098] “药学上可接受的或药用”化合物和其它化合物或制剂的成份, 例如载体、稀释液或赋形剂, 是适于对其接受者给予的。

[0099] 通常, 术语“蛋白质”是指任意两个或更多单个氨基酸 (天然或非天然) 通过肽键连接的聚合体, 当连接于一个氨基酸的 α -碳上的羧基碳原子的羧基碳原子共价结合于连接在相邻氨基酸的 α -碳上的氨基基团的氨基氮原子时形成肽键。这些肽键连接和包括它们的原子 (即 α -碳原子、羧基碳原子 (及其取代氧原子)) 以及氨基氮原子 (和它们的取代氢原子) 形成蛋白质的“多肽主链”。此外, 本文使用的术语“蛋白质”可以理解为包括术语“多肽”和“肽” (本文中它们可以替换使用)。相似地, 蛋白质片段、类似物、衍生物和变体在本文可能是指“蛋白质”, 而且除非另外声明, 应该被认为是“蛋白质”。术语蛋白质“片段”是指含有少于该蛋白质所有氨基酸残基的多肽。蛋白质的“结构域”也是一个片段, 包含赋予其活性或功能通常必需的蛋白质的氨基酸残基。

[0100] 术语“严格条件”是指允许多核苷酸之间杂交的条件。严格条件可以用盐浓度、有机溶剂的浓度 (例如甲酰胺)、温度和其它本领域中已知的条件来限定。降低盐浓度、提高有机溶剂浓度 (例如甲酰胺) 或升高杂交温度则严格度增加。例如, 严格的盐浓度通常小于约750mM NaCl和75 mM柠檬酸三钠, 优选小于约500mM NaCl和50mM柠檬酸三钠, 最优选小

于约250mM NaCl和25mM柠檬酸三钠。在没有有机溶剂例如甲酰胺的情况,可以得到低严格度的杂交,在有机溶剂存在的情况下可以得到高严格度的杂交(例如,至少约35%的甲酰胺,最优选至少约50%的甲酰胺)。严格的温度条件通常包括至少约30℃,更优选至少约37℃,最优选至少约42℃的温度。可变的其它参数,例如杂交时间、洗涤剂如十二烷基磺酸钠(SDS)浓度以及包括或不包括载体DNA,都是本领域技术人员熟知的。通过结合所需的多种条件以达到多种水平的严格性,是本领域的现有技术。严格的杂交条件也可以利用低于靶序列熔融温度(T_m),从约5℃到约20℃或约25℃的范围和对靶具有精确或几乎精确互补性的探针的条件来限定。本文中使用的熔解温度是多数双链核酸分子半解离成为单链时的温度。计算核酸 T_m 的方法是本领域中熟知的(例如,参见 Berger and Kimmel, *Methods In Enzymology*, Vol.152: *Guide To Molecular Cloning Techniques*, San Diego (1987): Academic Press, Inc. and Sambrook et al., *Molecular Cloning* (1989): A Laboratory Manual, 2nd Ed., Vols.1-3, Cold Spring Harbor Laboratory)。正如标准的参考文献指出的, T_m 值简单的估计可以通过以下公式计算: $T_m = 81.5 + 0.41 (\%G+C)$, 当核酸处于1M NaCl的水溶液中时(参见,例如, Anderson and Young, "Quantitative Filter Hybridization" in *Nucleic Acid Hybridization* (1985))。杂交的熔融温度(以及因此严格杂交的条件)受多种因素的影响,例如探针的长度和性质(DNA、RNA、碱基组成)和靶的性质(DNA、RNA、碱基组成、存在于溶液中的或固定的等),以及盐浓度和其它成分(例如甲酰胺、硫酸葡聚糖、聚乙二醇的存在或缺失)。这些因素的影响在本领域是熟知的并且在本领域的标准参考书中也有讨论,参见,例如 Sambrook, *supra*, and Ausubel, *supra*。通常,严格的杂交条件为小于约1.0M钠离子的盐浓度,通常在pH 7.0至8.3时为约0.01到1.0M的钠离子,对于短探针(例如,10至50个核苷酸)温度至少为约30℃,对于长探针(例如,大于50个核苷酸)温度至少为约60℃。正如提到的,也可以通过添加如甲酰胺等的不稳定试剂达到严格条件,在该情况下应采用较低的温度。在本发明中,多核苷酸可能是在高严格度的介质例如0.03M的氯化钠和0.03 M的柠檬酸钠的介质中,在约50℃到约60℃的条件下与连接蛋白的mRNA杂交的多核苷酸。

[0101] 术语“治疗上有效量”是指研究人员、兽医、内科医生和其它的临床医生寻找的会得到期望反应例如组织、系统、动物或人的生物或医学反应的目标化合物的量。

[0102] “治疗”是指治疗性治疗和预防性治疗。需要治疗的那些包括已患有紊乱(障碍)和那些需要预防紊乱的。

[0103] 术语“载体”是指为了将核酸传递到细胞内(在这里质粒、噬菌体、病毒可以与细菌、酵母、无脊椎动物和/或哺乳动物宿主细胞起作用),以质粒、噬菌体、病毒、或其它体系形式的核酸分子扩增、复制和/或表达载体(可是天然或合成的)。载体可以保持独立于宿主细胞的基因组DNA或可能全部或部分整合到基因组DNA中。载体通常不必包括全部必要的元件,使得在与其共存的任何宿主细胞中发挥功能。“表达载体”是在适当的条件下能够引导外源性多核苷酸表达,例如,编码融合蛋白结合结构域的多核苷酸。

[0104] 如本文所描述的,术语“同源物和同族体”包括可以是连接蛋白多核苷酸(例如mRNA)序列同源的多核苷酸。这样的多核苷酸通常具有与相关序列至少约70%的同源性,优选至少约80%、90%、95%、97%或99%的同源性,例如,覆盖至少约15、20、30、40、50、100或更多个连续的核苷酸(同源序列的)。

[0105] 同源性可以基于本领域的任何方法计算。例如UWGCG Package提供了可用来计算同源性的BESTFIT程序(例如在其默认设置使用)(Devereux et al., *Nucleic Acids Research* 12,p387-395(1984))。PILEUP 和BLAST算法可以用于计算同源性或对比序列(通常在其默认设置),例如Altschul S.F.; *J Mol Evol* 36:290-300(1993);Altschul, S.F.et al.; *J ol Biol* 215:403-10(1990) 中描述的。公众可以从National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/L>) 中得到用于执行BLAST分析的软件。该 算法包括首先通过,当其与数据库序列中相同长度的代码对准比较确定查询序列中的长度为W的短代码是否匹配或满足某些正值的阈值T,确定 高分序列对。T被称为相邻代码分数阈值(word score threshold)(Altschul et al.,supra)。这些初始的相邻代码取样点(hit)作为开始寻找包含它们的HSP的种子。代码取样点沿每个序列的两个方向延伸以尽可能 增加累积的对准比较分数。代码取样点在每个方向上的延伸,当遇到以下 情况时停止:累积对准比较分数通过数量X从其最大达到值下降;由于一 种或多种负分数残基对准比较的累积,累积分数达到0或更低;或达到每 一个序列的末端。BLAST算法的参数W、T和X确定对准比较的敏感度和 速度。BLAST程序默认字长度(W) 为11的代码、BLOSUM62 打分矩阵(参见Henikoff and Henikoff *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:10915-10919 (1992))、50的对准比较、10的期望值(E)、M=5、N=4,以及两条链的对比。

[0106] BLAST算法对两个序列的相似性进行统计学分析;(参见,例如 Karlin and Altschul *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:5873-5787(1993))。BLAST算法提供的一个分析相似性的方法是最小总值可能性(P(N)),该 方法提供了在两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的可能性指数。例如,如果与第一个序列相比,最小总值可能性小于约1,优选小于约0.1,更优选小于约0.01,以及最优选小于约0.001时,一个序列被认为与另一个序列相似。

[0107] 同源序列通常通过至少(或不大于)约1、2、5、10、15、20个或更 多的突变(可以是取代、缺失或插入)而与相关序列不同。关于计算同源性,这些突变可以通过上面提到的任何区域测定。同源性序列通常选择性地与原始序列杂交,其水平明显高于背景。选择性杂交通常在使用高严格 性介质(例如,0.03M氯化钠和0.03M柠檬酸钠,从约50℃到约60℃)的条件下达到。然而,该杂交也可以在任何本领域已知的适当条件下进行(参见Sambrook et al.,*Molecular Cloning:A Laboratory Manual* (1989))。例如,如果高严格性是必需的,适宜的条件包括60℃的0.2xSSC。如果低 严格性是必需的,适宜的条件包括60℃的2xSSC。

[0108] “细胞”是指适合期望应用的任何活细胞。细胞包括真核细胞和原核细 胞。

[0109] 术语“基因产物”是指从基因转录的RNA分子,或遗传编码的或从 RNA翻译的多肽。

[0110] 术语“重组”是指在体外合成或其它操作制得的多核苷酸(例如,“重 组多核苷酸”),指在细胞或其它生物体系中利用重组多核苷酸生产基因产 物的方法,或指由重组多核苷酸编码的多肽(“重组蛋白质”)。因此,“重 组”多核苷酸即可以通过其生产方法也可以通过其结构进行定义。关于其 生产方法,该过程是指使用重组核酸技术,例如,包括在核苷酸序列中的 人为干预,通常为选择和生产。可替换地,可以通过产生包含两个或更 多在天然情况下彼此不相邻片段的融合序列制得的多核苷酸。因此,例如, 包括用任何非天然的载体通过转化细胞制成的产物,正如多核苷酸包括使 用任何合成的寡核苷酸方法生成

的序列。类似地，“重组”多肽是一种重组多核苷酸的表达产物。

[0111] “重组宿主细胞”是包含载体的细胞，例如，克隆载体或表达载体，或者是已经经过重组技术处理以表达感兴趣的蛋白质的细胞。

[0112] 在已测序的人类基因组中，连接蛋白基因家族是多样化的，有20个以鉴别出的成员。不同的连接蛋白基因产物结合形成具有不同性质（包括孔转导性（pore conductance）、尺寸选择性、电荷选择性、电压门控性质和化学门控性质）的间隙连接，并且在发育的不同时期或疾病过程中，表达在不同的组织中。在最近的文献中，连接蛋白最常根据其分子量命名，例如Cx26是26Kd的连接蛋白。当比较不同物种来源的连接蛋白基因时可能导致混淆，例如人Cx36与斑马鱼Cx35是同源的。因此，本文中所使用的可以被理解为提到特定的连接蛋白就是指其所有物种的变体，即使它们的分子量不同。因此，例如，提到“连接蛋白43”不仅是指人连接蛋白43，也指每个其它物种中类似的连接蛋白，不论其分子量是否为43Kd。同样，提到非人类“连接蛋白43”是指连接蛋白43类似物或在该物种的变体。因此，例如，提到“马连接蛋白43”是指人连接蛋白43在马中的相关类似物或变体，尽管其不具有43Kd的分子量。

[0113] 化合物：

[0114] 本文描述的化合物对于改善、治疗或预防多种紊乱和病症，包括但不限于心血管疾病、炎症、神经学上和血管性病症，以及治疗创伤是有用的。该化合物在药物组合物以及医学设备和医学操作（包括，例如手术、移植过程以及器官或组织的移植）的联合应用中也是有用的。本文描述的某些优选的化合物能够调控或影响分子进出细胞的运输（例如阻断或抑制）。因此，本文描述的某些抗-连接蛋白化合物调控细胞通讯（例如细胞之间）。某些抗-连接蛋白化合物调控或影响细胞质和细胞周质或胞外空间之间的分子的传输。这些化合物通常靶向半通道（连接子），因为半通道独立地涉及细胞质与胞外空间或组织间小分子的交换。因此，本文提供的化合物可以直接或间接地减少细胞之间或细胞与胞外空间或组织之间的连接，以及调控分子从细胞内运输到胞外空间，也在本发明的某些化合物和具体实施方式的范围内。

[0115] 任何能够得到期望地抑制通过间隙连接或连接蛋白半通道分子通过（例如，运输）的分子都能够用于本发明的具体实施方式。在特定的具体实施方式中也提供了通过间隙连接或连接蛋白半通道调控分子通过的化合物（例如那些调控分子从细胞质到达胞外空间的分子）。这些化合物可以通过间隙连接或连接蛋白半通道解偶联或不解偶联（阻断通过间隙连接的分子运输）来调控分子的通过。这些化合物包括，例如蛋白质和多肽、多核苷酸以及任何其它的有机化合物，并且它们可以，例如全部或部分阻断间隙连接或半通道的功能或表达。某些间隙连接抑制剂的列表，参见，例如Evans, W.H. 和Boitano, S. *Biochem. Soc. Trans.* 29:606-612 (2001)。

[0116] 肽和多肽连接蛋白抑制剂

[0117] 结合蛋白质，包括肽、拟肽、抗体、抗体片段等在某些具体实施方式中都是间隙连接和半通道的合适调节分子以及间隙连接。结合蛋白质包括，例如，单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段（包括，例如，Fab、F(ab')₂ 和Fv片段；单链抗体；单链Fv；以及诸如那些包括例如结合结构域、铰链区、CH2和CH3结构域的单链结合分子，如Ledbetter等人在W002/056910中描述的，2002年7月25日公开）；能够与抗原决定簇（即部分分子，通常是指表位）

结合的重组抗体和抗体片段,该抗原决定簇与 特定的抗体或其它结合分子接触。这些结合蛋白质包括抗体、抗体片段等 等,可以是嵌合的或人源化的或其它处理使其在被给药的患者体内具有更 小的免疫原性,并且可以是合成的、重组产生的或产生或在表达文库中产生的。可以考虑任何本领域已知的或以后发现的结合分子,例如那些本文 提到的和/或本领域中详细描述。参见Harlow,E.,和Lane,D., "Antibodies:A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY,349(1988),以引用的方式结合于此。例如,结合蛋白质 不仅包括抗体等,还包括配体、受体、拟肽或其它与靶(例如,连接蛋白、半通道或相关的分子)结合的结合片段或分子(例如,通过噬菌体展示技 术产生的)。

[0118] 结合分子通常具有期望的特异性,包括但不限于结合特异性和期望的 亲和力。亲和力,例如,可能是 K_a 大于或等于约 $10^4 M^{-1}$ 、大于或等于 约 $10^6 M^{-1}$ 、大于或等于约 $10^7 M^{-1}$ 、大于或等于约 $10^8 M^{-1}$ 。甚至亲和力 大于约 $10^8 M^{-1}$ 也是适宜的,例如亲和力等于或大于约 $10^9 M^{-1}$ 、约 $10^{10} M^{-1}$ 、约 $10^{11} M^{-1}$ 和约 $10^{12} M^{-1}$ 。根据本发明的结合蛋白质的亲和力可 以通过常规技术容易地测定,例如那些在Scatchard et al.1949Ann.N.Y. Acad.Sci.51:660中描述的。

[0119] 在本文提供的某些具体实施方式中优选间隙连接和半通道的肽抑制 剂(例如拟肽)。参见,例如Berthoud,V.M.et al.Am J.Physiol.Lung Cell Mol.Physiol.279:L619-L622(2000);Evans,W.H.and Boitano,S.Biochem. Soc.Trans.29:606-612,and De Vriese A.S.,et al.Kidney Int. 61:177-185(2001)。

[0120] 通过使用亲水性分析(hydrophathy plots)得到的数据,提出连接蛋白 含有四个跨膜区域和两个短的细胞外环。Paul DL.J Cell Biol 103: 123-134(1996)。连接蛋白的第一个和第二个细胞外环区域的定位进一步的 特点是用于相应的分裂间隙连接的免疫定位的抗肽抗体报告生产。Goodenough D.A.J Cell Biol 107:1817-1824(1988);Meyer R.A.,J Cell Biol 119:179-189(1992)。

[0121] 半通道的胞外结构域通过两个相邻细胞相互“对接”形成完整的间隙 连接通道而起作用。阻碍这些胞外结构域相互作用的试剂会损害细胞之间 的通讯。对应于连接蛋白胞外环内的序列的短肽,据报道可以作为细胞之 间通讯的抑制剂。Boitano S.and Evans W.Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279:L623-L630(2000)。据报道已经有使用表达在成对的非洲蟾蜍 卵母细胞内的连接蛋白(Cx)32产生的肽作为细胞之间的通道形成的抑制剂。Dahl G,et al.,Biophys J 67:1816-1822(1994)。Berthoud,V.M.and Seul,K.H.总结了某些这样的结果 Am J.Pysiol.Lung Cell Mol.Physiol.279:L619-L622(2000)。Jensen等 人(US2004/0092429)已经报道了通过酪氨酸残基磷酸化调控半通道功能,其教导的内容不包括本文提供的抗-连接蛋白化合物和方法。

[0122] 另外一方面,抗-连接蛋白化合物包括含有对应于连接蛋白(例如连 接蛋白45、43、26、30、31.1和37)跨膜区域(例如第一个到第四个) 的氨基酸序列的肽。在某些具体实施方式中,抗-连接蛋白化合物包括含 有对应于连接蛋白45的部分跨膜区域的氨基酸序列的肽。在某些具体实 施方式中,抗-连接蛋白化合物是具有包含SEQ ID NO:62的5至20个相 邻氨基酸的氨基酸序列的肽、具有包含SEQ ID NO:62的8至15个连续 氨基酸的氨基酸序列的肽、或具有包含SEQ ID NO:62的11至13个连续 氨基酸的氨基酸序列的肽。其它具体实施

方式是抗-连接蛋白化合物,其是包含SEQ ID NO:62的至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25或30个连续氨基酸的氨基酸序列的肽。在某些本文提供的抗-连接蛋白化合物中,对应于SEQ ID NO:62在46-75和199-228位置的连接蛋白45的胞外结构域被用于开发特定的肽序列。因此,本文描述的某些肽具有对应于SEQ ID NO:62在46-75和199-228位置区域的氨基酸序列。该肽不需要具有与SEQ ID NO:62相同的部分,并且在本文描述的测定方法和本领域已知的其它方法中,可以进行保守的氨基酸变化使这些肽保持结合活性或功能活性。在其它具体实施方式中,连接蛋白的肽靶向区域不是胞外结构域(例如,不是对应于46-75和199-228位点的SEQ ID NO:62部分)。

[0123] 在其它的具体实施方式中,抗-连接蛋白化合物包括包含对应于连接蛋白43的跨膜区域部分的氨基酸序列的肽。在某些具体实施方式中,抗-连接蛋白化合物是具有包含SEQ ID NO:63的5至20个连续氨基酸的氨基酸序列的肽、具有包含SEQ ID NO:63的8至15个连续氨基酸的氨基酸序列的肽、具有包含SEQ ID NO:63的11至13个连续的氨基酸的氨基酸序列的肽。其它具体实施方式主要是具有包含SEQ ID NO:63至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25或30个连续氨基酸的氨基酸序列的肽的抗-连接蛋白化合物。在其它抗-连接蛋白化合物中,对应于SEQ ID NO:63在37-76和178-208位置上的氨基酸的连接蛋白43的胞外结构域被用于开发特定的肽序列。因此,本文描述的某些肽具有对应于SEQ ID NO:63的37-76和178-208位点区域的氨基酸序列。这些肽不需要与SEQ ID NO:63的那些部分相同的氨基酸序列,并且在本文描述的和在本领域已知的其它试验中,可以进行保守的氨基酸变化以使肽保持结合活性或功能活性。在其它具体实施方式中,连接蛋白的肽靶向区域不同于胞外结构域(例如SEQ ID NO:63不对应于37-76和178-208位置的部分)。

[0124] 在某些非限制性具体实施方式中,抗-连接蛋白肽包含对应于具有保守氨基酸取代的连接蛋白胞外结构域部分的序列,以使这些肽是功能性活化的抗-连接蛋白化合物。典型的保守氨基酸取代包括例如用另一个非极性氨基酸取代非极性氨基酸,用另一个芳香族氨基酸取代芳香族氨基酸,用另一个脂肪族氨基酸取代脂肪族氨基酸,用另一个极性氨基酸取代极性氨基酸,用另一个酸性氨基酸取代酸性氨基酸,用另一个碱性氨基酸取代碱性氨基酸,以及用另一个可电离的氨基酸取代可电离的氨基酸。

[0125] 下面表1中示出了靶向连接蛋白43的示例性肽。M1、2、3和4分别是指连接蛋白43蛋白质的第一至第四个跨膜区域。E2分别是指第一和第二个胞外环。

[0126] 表1:细胞间通讯的肽抑制剂(cx43)

[0127]	FEVAFLLIQWI	M3 & E2	(SEQ ID NO:32)
	LLIQWYIGFSL	E2	(SEQ ID NO:33)
	SLSAVYTCKRDPCPHQ	E2	(SEQ ID NO:34)
	VDCFLSRPTEKT	E2	(SEQ ID NO:35)
	SRPTEKTIFII	E2 & M4	(SEQ ID NO:36)
	LGTAVESAWGDEQ	M1 & E1	(SEQ ID NO:37)
	QSAFRCNTQQPG	E1	(SEQ ID NO:38)
	QQPGCENVCYDK	E1	(SEQ ID NO:39)
	VCYDKSFPISHVR	E1	(SEQ ID NO:40)

[0128] 表2提供了用于抑制半通道或间隙连接功能的另外的示例性连接蛋白肽。在其它的具体实施方式中,对这些肽或其片段形成保守氨基酸变化。

[0129] 表2:细胞间通讯的另外的肽抑制剂(cx32、cx43)

[0130] 连接蛋白位置AA'和序列

	Cx32	E1	39-7	AAESVWGDEIKSSFICNTLQPGCNSVCYDHFFPISHVR	(SEQ ID NO: 41)
	Cx32	E1	41-52	ESVWGDEKSSFI	(SEQ ID NO: 42)
	Cx32	E1	52-63	ICNTLQPGCNSV	(SEQ ID NO: 43)
	Cx32	E1	62-73	SVCYDHFFPISH	(SEQ ID NO: 44)
	Cx32	E2	164-188	RLVKCEAFPCPNTVDCFVSRPTEKT	(SEQ ID NO: 45)
	Cx32	E2	166-177	VKCEAFPCPNTV	(SEQ ID NO: 46)
	Cx32	E2	177-188	VDCFVSRPTEKT	(SEQ ID NO: 47)
	Cx32	E1	63-75	VCYDHFFPISHVR	(SEQ ID NO: 48)
	Cx32	E1	43-59	VWGDEKSSFICNTLQPGY	(SEQ ID NO: 49)
	Cx32	E1	46-59	DEKSSFICNTLQPGY	(SEQ ID NO: 50)
	Cx32	E2	182-192	SRPTEKTVFTV	(SEQ ID NO: 51)
[0131]	Cx32/Cx43	E2	182-188	SRPTEKT	(SEQ ID NO: 52)
			201-207		
	Cx43	E1	64-76	VCYDKSFPISHVR	(SEQ ID NO: 53)
	Cx43	E2	201-211	SRPTEKTIFII	(SEQ ID NO: 54)
	Cx32	E1	52-63	ICNTLQPGCNSV	(SEQ ID NO: 55)
	Cx40	E2	177-192	FLDTLHVCRRSPCPHP	(SEQ ID NO: 56)
	Cx43	E2	180-195	SLSAVYTCKRDPCPHQ	(SEQ ID NO: 57)
	Cx43	E1	64-76	VCYDKSFPISHVR	(SEQ ID NO: 58)
	Cx43	E2	201-211	SRPTEKTIFII	(SEQ ID NO: 59)
	Cx43	E2	188-205	KRDPCHQVDCFLSRPTEK	(SEQ ID NO: 60)

[0132] 表3提供了用于开发本文描述的肽抑制剂的连接蛋白家族成员的细胞 外环。表3中提供的肽、及其片段在某些非限制性具体实施方式中被用作 肽抑制剂。在其它非限制性具体实施方式中,本表中包含约8至约15个、约11至约13个连续氨基酸的肽是本发明的肽抑制剂。在其它具体实施方式中,保守的氨基酸变化形成肽或其片段。参见Boitano S.and Evans W.Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279:L623-630 (2000)。

[0133] 表3:各种连接蛋白家族成员的胞外环

E1

huCx26	KEVWGDEQADFVCNTLQPGCKNVCYDHYFPISHIR	(SEQ ID NO: 68)
huCx30	QEVWGDEQEDFVCNTLQPGCKNVCYDHFFPVSHIR	(SEQ ID NO: 69)
huCx30.3	EEVWDDEQKDFVCNTKQPGCPNVCYDEFFPVSHVR	(SEQ ID NO: 70)
huCx31	ERVWGDEQKDFDCNTKQPGCTNVCYDNYFPISNIR	(SEQ ID NO: 71)
huCx31.1	ERVWSDDHKDFDCNTRQPGCSNVCYDEFFPVSHVR	(SEQ ID NO: 72)
huCx32	ESVWGDEKSSFICNTLQPGCNSVCYDQFFPISHVR	(SEQ ID NO: 73)
huCx36	ESVWGDEQSDFECNTAQP GCTNVCYDQAFPISHIR	(SEQ ID NO: 74)
huCx37	ESVWGDEQSDFECNTAQP GCTNVCYDQAFPISHIR	(SEQ ID NO: 75)
huCx40.1	RPVYQDEQERFVCNTLQPGCANVCYDVFSVSHLR	(SEQ ID NO: 76)
huCx43	ESAWGDEQSAFRCNTQQPGCENVCYDKSFPISHVR	(SEQ ID NO: 77)
huCx46	EDVWGDEQSDFTCNTQQPGCENVCYDRAFPISHIR	(SEQ ID NO: 78)
huCx46.6	EAIYSDEQAKFTCNTRQPGCDNVCYDAFAPLSHVR	(SEQ ID NO: 79)
huCx40	ESSWGDEQADFRCDTIQPGCQNVCTDQAFPISHIR	(SEQ ID NO: 80)
huCx45	GESIYYDEQSKFVCNTEQPGCENVCYDAFAPLSHVR	(SEQ ID NO: 81)

[0134]

E2

huCx26	MYVFYVMYDGFMSQRLVKCNAWPCPNTVDCFVSRPTEKT	(SEQ ID NO: 82)
huCx30	MYVFYFLYNGYHLPWVLKCGIDPCPNLVDCFISRPEKT	(SEQ ID NO: 83)
huCx30.3	LYIFHRLYKDYDMPRVVACSVEPCPHTVDCYISRPEKK	(SEQ ID NO: 84)
huCx31	LYLLHTLWHGFNMPLRVQCANVAPCPNIVDCYIARPEKK	(SEQ ID NO: 85)
huCx31.1	LYVFHSFYPKYILPPVVKCHADPCPNIVDCFISKPSEKN	(SEQ ID NO: 86)
huCx32	MYVFYLLYPGYAMVRLVKCDVYPCPNTVDCFVSRPTEKT	(SEQ ID NO: 87)
huCx36	LYGWTMEPVFVCQRAPCPYLVDVDCFVSRPTEKT	(SEQ ID NO: 88)
huCx37	LYGWTMEPVFVCQRAPCPYLVDVDCFVSRPTEKT	(SEQ ID NO: 89)
huCx40.1	GALHYFLFGFLAPKKFPCTRPCTGVVDCYVSRPTEKS	(SEQ ID NO: 90)
huCx43	LLIQWYIYGFSLSAVYTCKRDPCPHQVDCFLSRPEKT	(SEQ ID NO: 91)
huCx46	IAGQYFLYGFELKPLYRCDRWPCPNTVDCFISRPEKT	(SEQ ID NO: 92)
huCx46.6	LVGQYLLYGFEVRPFFPCSRQPCPHVVDVCFVSRPTEKT	(SEQ ID NO: 93)
huCx40	IVGQYFIYGIFLTTTLHVCRRSPCPHPVNCYVSRPTEKN	(SEQ ID NO: 94)
huCx45	LIGQYFLYGFQVHPFYVCSRLPCHPKIDCFISRPEKT	(SEQ ID NO: 95)

[0135] 示出了不同连接蛋白同种型的E2结构域序列以及与SEQ ID NO:35 和SEQ ID NO:36同源的氨基酸(黑体示出)。注意到肽SEQ ID NO:36 的最后四个氨基酸是第四个跨膜结构域的一部分。

[0136] 表4提供了用于开发本文描述的肽抑制剂的连接蛋白家族成员的细胞 外结构域。在某些非限制性具体实施方式中,表4中提供的肽及其片段被 用作肽抑制剂。在其它非限制性具体实施方式中,本表中包含约8至约15 个,约11至约13个连续氨基酸的肽是本发明的肽抑制剂。在其它具体实施方式中,对这些肽或其片段形成保守的氨基酸变化。

[0137] 表4:胞外结构域

Peptide	VDCFLSRPTEKT	(SEQ ID NO: 35)
Peptide	SRPTEKTIFII	(SEQ ID NO: 36)
huCx43	LLIQWYIYGFSLSAVYTCKRDPCPHQVDCFLSRPTEKTIFII	(SEQ ID NO: 96)
huCx26	MYVFYVMYDGFMSQRLVKCNAWPCPNTVDCFVSRPTEKTVFTV	(SEQ ID NO: 97)
huCx30	YVFYFLYNGYHLPWVLKCGIDPCPNLVDCFISRPEKTVFTI	(SEQ ID NO: 98)
huCx30.3	LYLFHRLYKDYDMPRVVACSVPCPHTVDCYISRPEKKVFTY	(SEQ ID NO: 99)
huCx31	LYLLHTLWHGFNMPRLVQCANVAPCPNIVDCYIARPEKKTY	(SEQ ID NO: 100)
huCx31.1	LYVFHSFYPKYILPPVVKCHADPCPNIVDCFISKPSEKNIFTL	(SEQ ID NO: 101)
huCx32	MYVFYLLYPGYAMVRLVKCDVYPCPNTVDCFVSRPTEKTVFTV	(SEQ ID NO: 102)
huCx36	LYGWTMEPVFVCQRAPCPYLVDVCFVSRPTEKTIFII	(SEQ ID NO: 103)
huCx37	LYGWTMEPVFVCQRAPCPYLVDVCFVSRPTEKTIFII	(SEQ ID NO: 104)
huCx40.1	GALHYFLFGFLAPKKFPCTRPCTGVVDCYVSRPTEKSLML	(SEQ ID NO: 105)
huCx46	IAGQYFLYGFELKPLYRCDRWPCPNTVDCFISRPEKTIFII	(SEQ ID NO: 106)
huCx46.6	LVGQYLLYGFVVRPFPCSRQPCPHVVDVCFVSRPTEKTVFLL	(SEQ ID NO: 107)
huCx40	IVGQYFIYGIFLTTLHVCRRSPCPHPVNCYVSRPTEKNVFIV	(SEQ ID NO: 108)
huCx45	LIGQYFLYGFQVHPFYVCSRLPCHPKIDCFISRPEKTIFLL	(SEQ ID NO: 109)

[0139] 表5提供了对照连接蛋白40的胞外环(E1和E2)示出的连接蛋白40的肽抑制剂。黑体氨基酸是指连接蛋白40的跨膜区域。

[0140] 表5:Cx40肽抑制剂

E1	LGTA AESSWGDEQADFRCDTIQPGCQNVCTDQAFPISHIRFWVLQ	(SEQ ID NO: 110)
	LGTA AESSWGDEQA	(SEQ ID NO: 111)
	DEQADFRCDTIQ P	(SEQ ID NO: 112)
	TIQPGCQNVCTD Q	(SEQ ID NO: 113)
	VCTDQAFPISHIR	(SEQ ID NO: 114)
	AFPISHIRFWVL Q	(SEQ ID NO: 115)

[0141]

E2	MEVG FIVGQYFIYGIFLTTLHVCRRSPCPHPVNCYVSRPTEKNVFIV	(SEQ ID NO: 116)
	MEVG FIVGQYF	(SEQ ID NO: 117)
	IVGQYFIYGIFL	(SEQ ID NO: 118)
	GIFLTTLHVCRR SP	(SEQ ID NO: 119)
	RRSPCPHPVNCY	(SEQ ID NO: 120)
	VNCYVSRPTE KN	(SEQ ID NO: 35)
	SRPTEKNVFIV	(SEQ ID NO: 36)

[0142] 表6提供了参照连接蛋白45的胞外环(E1和E2)示出的连接蛋白45的肽抑制剂。黑体氨基酸是指连接蛋白45的跨膜区域。

[0143] 表6:Cx45肽

E1	LTAV GGESIYYDEQSKFVCNTEQPGCENVCYDAFAPLSHVRFWVFQ	(SEQ ID NO: 121)
	LTAV GGESIYYDEQS	(SEQ ID NO: 122)
	DEQSKFVCNTE Q P	(SEQ ID NO: 123)
	TEQPGCENVCY DA	(SEQ ID NO: 124)
	VCYDAFAPLSH VR	(SEQ ID NO: 125)
	APLSHVRFWVF Q	(SEQ ID NO: 126)

[0144]

E2	FEVG FLIGQYFLYGFQVHPFYVCSRLPCHPKIDCFISRPEKTIFLL	(SEQ ID NO: 127)
	FEVG FLIGQYF	(SEQ ID NO: 128)
	LIGQYFLYGFQ V	(SEQ ID NO: 129)
	GFQVHPFYVCSRL P	(SEQ ID NO: 130)
	SRLPCHPKID CF	(SEQ ID NO: 131)
	IDCFISRPE KT	(SEQ ID NO: 36)
	SRPTEKTIF LL	(SEQ ID NO: 37)

[0145] 在某些具体实施方式中,优选某些不阻断期望的间隙连接而阻断半通道的肽抑

制剂。同时不被任何特定的理论或机制所束缚,也认为某些拟肽(例如VCYDKSFPISHVR,SEQ ID NO:53)阻断半通道但并不导致间隙连接的解偶联(参见Leybeart et al. Cell Common Adhes 10:251-257 (2003))。肽SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:54)也可以使用,例如阻断半通道而不引起间隙连接解偶联。肽SRGGEKNVFIV (SEQ ID NO:61)可以用作对照序列(De Vriese et al., Kidney Internat. 61:177-185 (2002))。对于连接蛋白45肽抑制剂的例子有YVCSRLPCHP (SEQ ID NO:132)、QVHPFYVCSRL (SEQ ID NO:133)、FEVGFLIGQYFLY (SEQ ID NO:134)、GQYFLYGFQVHP (SEQ ID NO:135)、GFQVHPFYVCSR (SEQ ID NO:136)、AVGGESIYYDEQ (SEQ ID NO:137)、YDEQSKFVCNTE (SEQ ID NO:138)、NTEQPGCENVCY (SEQ ID NO:139)、CYDAFAPLSHVR (SEQ ID NO:140)、FAPLSHVRFWVF (SEQ ID NO:141)和LIGQY (SEQ ID NO:142)、QVHPF (SEQ ID NO:143)、YVCSR (SEQ ID NO:144)、SRLPC (SEQ ID NO:145)、LPCHP (SEQ ID NO:146)以及GESIY (SEQ ID NO:147)、YDEQSK (SEQ ID NO:148)、SKFVCN (SEQ ID NO:149)、TEQPGCEN (SEQ ID NO:150)、VCYDAFAP (SEQ ID NO:151)、LSHVRFWVFQ (SEQ ID NO:152)。这些肽可能仅为3个氨基酸长度,包括SRL、PCH、LCP、CHP、IYY、SKF、QPC、VCY、APL、HVR或更长,例如:LIQYFLYGFQVHPF (SEQ ID NO:153)、VHPFYCSRLPCHP (SEQ ID NO:154)、VGGESIYYDEQSKFVCNTEQPG (SEQ ID NO:155)、TEQPGCENVCYDAFAPLSHVR (SEQ ID NO:156)、AFAPLSHVRFWVFQ (SEQ ID NO:157)。

[0146] 在某些非限制性具体实施方式中,包含式1A中的肽约3至约30个,约8至约15个,约11至约13个连续氨基酸的肽是本发明的肽抑制剂。

[0147] 式1A

[0148] $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-Gly-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-Cys-X_{20}-X_{21}-X_{22}-X_{23}-Pro-Gly-X_{26}-X_{27}-X_{28}-X_{29}-Cys-X_{31}-X_{32}-X_{33}-X_{34}-X_{35}-Pro-X_{37}-X_{38}-X_{39}-X_{40}-X_{41}-X_{42}-X_{43}-X_{44}-X_{45}-X_{46}$ (式1A)

[0149] 其中X1和X37独立地选自由Leu、Ile、Met和Val组成的组;X2选自由Thr、Asn、Ser和Ala组成的组;X3选自由Ala、Ser、Gly和Thr组成的组;X4、X18、X29、X40和X44独立地选自由Val、Ile、Met和Leu组成的组;X5选自由Gly、Glu、Asp、Ser和Ala组成的组;X7、X13、X22和X27独立地选自由Glu、Asp、Gln和Lys组成的组;X8、X15和X38独立地选自由Ser、Ala、Asn和Thr组成的组;X9选自由Ile、Val、Leu和Met组成的组;X10、X11和X31独立地选自由Tyr、Phe、Trp和His组成的组;X12和X32独立地选自由Asp、Glu和Asn组成的组;X14和X23独立地选自由Gln、Glu、Arg和Lys组成的组;X16选自由Lys、Arg、Glu和Gln组成的组;X17和X34独立地选自由Phe、Tyr和Trp组成的组;X20和X28独立地选自由Asn、Ser、His和Asp组成的组;X21选自由Thr和Ser组成的组;X33和X35独立地选自由Ala和Ser组成的组;X39选自由His、Tyr和Asn组成的组。

[0150] X41选自由Arg、Lys和Gln组成的组;X42和X45独立地选自由Phe、Tyr、Cys、Leu和Tyr组成的组;X43选自由Trp、Tyr、Arg、Lys、Cys和Phe组成的组;并且X46选自由Gln、His、Glu、Lys、Arg、Asn和Asp组成的组。

[0151] 在某些非限制性具体实施方式中,包含式1B中的肽的约3至约30个,约8至约15个,约11至约13个连续氨基酸的肽是本发明的肽抑制剂。

[0152] 式1B

[0153] $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-Gly-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-Gly-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-Pro-X_{20}-X_{21}-$

X₂₂Cys- X₂₄-X₂₅-X₂₆-Pro-Cys-X₂₉-P-X₃₁-X₃₂-X₃₃-Cys-X₃₅-X₃₆-X₃₇-X₃₈-Pro-X₄₀-X₄₁-X₄₂-X₄₃-X₄₄-X₄₅- X₄₆-X₄₇-X₄₈ (式1B)

[0154] 而X₂₂独立地选自由Val、Ile、Met和Leu组成的组；X₄选自由Gly、Glu、Asp、Ser和Ala组成的组；X₆、X₁₂和X₂₆独立地选自由Leu、Ile、Met和Val组成的组；X₇、X₃₂、X₃₆、X₄₄和X₄₈独立地选自由Ile、Val、Leu和Met组成的组；X₉和X₁₆独立地选自由Gln、Glu、Arg和Lys组成的组；X₁₀、X₁₃和X₂₁独立地选自由Tyr、Phe、Trp和His组成的组；X₁₁、X₁₅、X₂₀和X₃₅独立地选自由Phe、Tyr和Trp组成的组；X₁₈和X₂₉独立地选自由His、Tyr和Asn组成的组；X₂₄和X₃₇独立地选自由Ser、Ala、Asn和Thr组成的组；X₂₅和X₃₈独立地选自由Arg、Lys和Gln组成的组；X₃₁和X₄₂独立地选自由Lys、Arg、Glu和Gln组成的组；X₃₃选自由Asp、Glu和Asn组成的组；X₄₀和X₄₃独立地选自由Thr和Ser组成的组；X₄₁选自由Glu、Asp、Gln和Lys组成的组；以及X₄₆和X₄₇独立地选自由Val、Ile、Met、Leu和Phe组成的组。

[0155] 在某些非限制性具体实施方式中，包含式2A中的肽的约3至约30个，约8至约15个，约11至约13个连续氨基酸的肽是本发明的肽抑制剂。

[0156] 式2A

[0157] X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-Gly-X₁₁-X₁₂-X₁₃X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇-Cys-X₁₉-X₂₀-X₂₁-X₂₂-Pro- Gly-Cs-X₂₆-X₂₇-X₂₈-Cys-X₃₀-X₃₁-X₃₂-X₃₃-X₃₄-Pro-X₃₆-X₃₇-X₃₈-X₃₉-X₄₀-X₄₁-X₄₂-X₄₃-X₄₄-X₄₅ (式2A)

[0158] 其中X₁和X₄₄独立地选自由Leu、Ile、Met、Val和Pro组成的组；X₂选自由Gly、Glu、Asp、Ser和Ala组成的组；X₃选自由Thr、Ser、Asn和Ala组成的组；X₄选自由Ala、Ser、Gly和Thr组成的组；X₅、X₂₈、X₃₉和X₄₃独立地选自由Val、Ile、Met和Leu组成的组；X₆、X₁₂和X₂₆独立地选自由Glu、Asp、Gln和Lys组成的组；X₇、X₁₄、X₃₃和X₃₇独立地选自由Ser、Ala、Asn和Thr组成的组；X₈和X₁₅独立地选自由Ala和Ser组成的组；X₉选自由Trp、Tyr和Phe组成的组；X₁₁和X₃₁独立地选自由Asp、Glu和Asn组成的组；X₁₃、X₂₁和X₂₂独立地选自由Gln、Glu、Arg和Lys组成的组；X₁₆和X₃₄独立地选自由Phe、Tyr和Trp组成的组；X₁₇和X₄₀独立地选自由Arg、Lys、和Gln组成的组；X₁₉和X₂₇独立地选自由Asn、Ser、His和Asp组成的组；X₂₀选自由Thr和Ser组成的组；X₃₀选自由Tyr、Phe、Trp和His组成的组；X₃₂选自由Lys、Arg、Glu和Gln组成的组；X₃₆选自由Ile、Val、Leu和Met组成的组；X₃₈选自由His、Tyr和Asn组成的组；X₄₁选自由Phe、Tyr、Cys、Leu和Trp组成的组；X₄₂选自由Trp、Tyr、Phe、Arg、Lys和Cys组成的组；X₄₅选自由Gln、His、Glu、Lys、Arg、Asn和Asp组成的组。

[0159] 在某些非限制性具体实施方式中，包含式2B的肽的约3至约30个，约8至约15个，约11至约13个连续氨基酸的肽是本发明的肽抑制剂。

[0160] 式2B

[0161] X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-Gly-X₁₅-X₁₆-X₁₇-X₁₈-X₁₉-X₂₀-X₂₁-X₂₂-Cya- X₂₄-X₂₅-X₂₆-Pro-Cys-Pro-X₃₀-X₃₁-X₃₂-X₃₃-Cys-X₃₅-X₃₆-X₃₇-X₃₈-Pro-X₄₀-X₄₁-X₄₂-X₄₃-X₄₄- X₄₅-X₄₆-X₄₇-X₄₈ (式2B)

[0162] 其中X₁、X₅和X₄₅独立地选自由Phe、Tyr、Cys、Trp和Leu组成的组；X₂选自由Glu、Asp、Gln、Gly、His、Arg、Asn和Lys组成的组；X₃、X₁₇和X₂₂独立地选自由Val、Ile、Met和Leu组成的组；X₄选自由Gly、Glu、Asp、Ser和Ala组成的组；X₆、X₁₂和X₂₆独立地选自由Leu、Ile、Met和Val组成的组；X₇、X₃₂、X₃₆、X₄₄和X₄₈独立地选自由Ile、Val、Leu和Met组成的

组;X9和X16独立地选自由Gln、Glu、Arg和Lys组成的组;X10、X13和X21独立地选自由Tyr、Phe、Trp和His组成的组;X11、X15、X20和X35独立地选自由Phe、Tyr和Trp组成的组;X18和X29独立地选自由His、Tyr和Asn组成的组;X24和X37独立地选自由Ser、Ala、Asn和Thr组成的组;X25和X38独立地选自由Arg、Lys和Gln组成的组;X31和/或X42选自由Lys、Arg、Glu和Gln组成的组;X33选自由Asp、Glu和Asn组成的组;X40和X43独立地选自由Thr和Ser组成的组;X41选自由Glu、Asp、Gln和Lys组成的组;并且X46和X47独立地选自由Val、Ile、Met、Leu和Phe组成的组。

[0163] 肽的亲合力结合测定

[0164] 牵出测定(pull-down assay)可以用于检验蛋白质和肽之间的相互作用。在这个试验中,肽可以用蛋白反应活性(protein-reactive)或融合标签即GST(谷胱甘肽转移酶)标记,其可以通过连接到纤维素、琼脂糖或镍珠捕获并“牵出”蛋白质结合伴侣。在用SDS-PAGE上加载缓冲液或可替换的竞争性分析物洗脱液洗脱复合物之后,该复合物通过跑SDS-PAGE凝胶和使用蛋白质分析检测方法显像。本领域已知的进行结合试验的方法描述在以下的文献中:Einarson,M.B.and Orlinick,J.R.,“Identification of Protein-Protein Interactions with Glutathione S-Transferase Fusion Proteins”In Protein-Protein Interactions:A Molecular Cloning Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,pp.37-57(2002),Einarson,M.B.Detection of Protein-Protein Interactions Using the GST Fusion Protein Pulldown Technique.In Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,pp.18.55-18.59(2001),and Vikis,H.G.and Guan,K.L.Glutathione-S-Transferase-Fusion Based Assays for Studying Protein-Protein Interactions.In Protein-Protein Interactions,Methods and Applications, Methods in Molecular Biology, 261,Fu,H.Ed.Humana Press,Totowa,N.J.,pp.175-186(2004),将以上的每一个的全部内容结合于此作为参考。

[0165] 蛋白质和肽的相互作用和亲和力可以使用表面等离子体共振技术测定,该技术能够实时测定这些相互作用(可通过BIAcore)。该方法在测定较低亲和力的蛋白质间相互作用时具有优势。表面等离子体共振依赖光学现象,其用于在生物特异性表面上测定溶液浓度的变化。在全内反射的条件下,在薄金属膜内产生信号。这个信号依赖于与表面接触的溶液的折射率。如果发生生物特异性反应,溶液中的分子表现出折射率的变化并因此产生可检测的信号。通常,蛋白质通过多种可能方法中的一种固定于羧甲基葡聚糖-金表面。感兴趣的作用肽被注射到表面上并实时检测结合动力学。本领域已知的进行结合测定的方法描述在下面文献中:Schuck,P.,“Reliable determination of binding affinity and kinetics using surface plasmon resonance biosensors”,Current Opinion in Biotechnology,8(4):498-502(1997),and Zhang,X.,Oglesbee,M.“Use of surface plasmon resonance for the measurement of low affinity binding interactions between HSP72 and measles virus nucleocapsid protein.”Biological Procedures Online.5(1):170-181(2003)。

[0166] 功能性测定

[0167] 功能性测定可以用于确定拟肽是否能够阻断半通道的开放。HeLa人宫颈癌细胞

系被Cx43、Cx45或其它感兴趣的特定连接蛋白稳定地转染。细胞培养在零钙液(zero calcium solution) (含有1mM EGTA的 HBSS-HEPES) 中,该溶液已经显示活化连接蛋白半通道(参见 Braet,K.,et al.,“Pharmacological sensitivity of ATP release triggered by photoliberation of inositol-1,4,5-trisphosphate and zero extracellular calcium in brain endothelial cells.Journal of Cellular Physiology”,197(2): p.205-213(2003),DeVries, S.H.and E.A.Schwartz,”Hemi-gap-junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina.”Journal of Physiology,445: p.201-230(1992),and Li,H.,et al.,Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells.Journal of Cell Biology,134(4):p.1019-1030(1996))。然后,细胞在含有1mM EGTA和2mM碘化丙啶的HBSS-HEPES溶液中培养30分钟。碘化丙啶 是一种不能透过膜的荧光染料,但由于其分子量小,能够通过半通道进入。可以用荧光显微镜测定碘化丙啶的摄取。在拟肽存在的条件下将细胞与碘 化丙啶一起培养以确定拟肽是否能够阻止染料的摄取。

[0168] 多核苷酸与核酸连接蛋白抑制剂

[0169] 反义化合物也可以用于某些具体实施方式中。反义化合物包括多核苷 酸,例如反义脱氧核苷酸、吗啉代核苷酸、RNAi和脱氧核酶,靶向特异 性连接蛋白同工型,这导致蛋白质异构型的翻译减少并干扰细胞间隙连接 的功能。这些反义化合物的给予会导致在连接蛋白表达被下调的位点,减 少间隙连接介导的细胞间通讯。

[0170] 反义化合物,例如,已经被用于调控涉及病毒、真菌和代谢性疾病的 基因的表达。美国专利申请第5,166,195号提出了HIV的寡核苷酸抑制剂。美国专利申请第5,004,810号提出了用于与单纯性疱疹病毒Vmw65mRNA 杂交并抑制复制的低聚物。

[0171] 提供了反义化合物,包括寡核苷酸,用于调控编码连接蛋白的核酸分 子的功能,最终调控生产的连接蛋白的量。通过提供例如与编码连接蛋白 的核酸,优选mRNA特异杂交的寡核苷酸可达到这一目的。

[0172] 反义寡核苷酸或多核苷酸可以例如与连接蛋白mRNA的全部或部分 杂交。通常反义多核苷酸与连接蛋白mRNA的核糖体结合区域或编码区 域杂交。多核苷酸可以与连接蛋白mRNA的全部或一个区域互补。例如, 多核苷酸可以与连接蛋白mRNA的全部或一部分精确互补。反义多核苷 酸可以抑制连接蛋白的转录和/或翻译。优选地,多核苷酸是连接蛋白基 因 转录和/或翻译的特异性抑制剂,并不抑制其它基因的转录和/或翻译。其 产物可以结合于连接蛋白基因或mRNA的(i) 编码序列的5' 端、和/或(ii) 编码序列、和/或(iii) 编码序列的3' 端。通常反义多核苷酸会引起细胞中 连接蛋白mRNA和/或蛋白质表达减少。反义多核苷酸通常是相对于连接 蛋白mRNA反义。该多核苷酸可以能够与连接蛋白mRNA杂交并且 能够 抑制连接蛋白的表达,通过干扰连接蛋白mRNA代谢的一个或多个方面, 包括转录、mRNA加工、mRNA从细胞核中运出、翻译或mRNA降解。反义多核苷酸通常与连接蛋白mRNA杂交形成双链(duplex),该双链导 致mRNA的翻译的直接抑制和/或失去稳定性。该双链可能 易被核酸酶降 解。

[0173] 反义寡核苷酸与mRNA杂交干扰mRNA的一种或多种正常功能。受 到干扰的mRNA功能包括所有的重要功能,例如RNA迁移到蛋白质翻译 位点,从RNA翻译成蛋白质,RNA剪接以产生一种或多种mRNA物种, 以及RNA可能具有的催化活性。特异性蛋白质与RNA的结合也可

以受到反义寡核苷酸与RNA杂交的干扰。

[0174] 干扰mRNA功能的全部效果是调节连接蛋白的表达。在本发明的上下文中,“调节”即包括抑制也包括刺激;即,可以减少表达或增加表达。该调节可以通过本领域常规的方法测定,例如,通过mRNA表达的RNA 印记分析或反转录酶PCR,正如在本申请的实施例中教导的或通过蛋白质 表达的蛋白质印记或ELISA测定或通过蛋白质表达的免疫沉淀试验测定。正如本申请的实施例所教导的,也能够测定对细胞增殖或肿瘤细胞生长的影响。

[0175] 一旦确定了一个或多个靶位点,选择与靶充分互补的,即充分杂交并具有足够特异性以产生期望的调节作用的寡核苷酸。可以用任何产生核酸的合适方法生成反义核酸(DNA、RNA、修饰的、类似物等等)。针对其它连接蛋白的寡脱氧核苷酸可以通过任何本领域认可的方法,例如计算机程序Mac Vector和OligoTech(from Oligos etc.Eugene, Oregon,USA)根据其核苷酸选择。用于该合成的设备可以通过包括Mac Vector和OligoTech(from Oligos etc.Eugene,Oregon,USA)的销售点购买得到。对于一般关于反义多核苷酸的方法,参见 Antisense RNA and DNA,D.A.Melton,Ed.,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY(1988)。也可参见 Dagle et al.,Nucleic Acids Research,19:1805(1991)。对于反义疗法,参见,例如Uhlmann et al.,Chem.Reviews,90:543-584(1990)。通常,核苷酸序列的至少一部分已知用于需要抑制其表达的连接蛋白。多核苷酸靶可能通过基因步移技术和步移PCR进一步确定。该用于确定与已知核苷酸序列毗邻的未知多核苷酸序列的方法在本领域中是熟知的。参见,例如 Parker J.D.,et al.Nucleic Acids Res 19:3055-60 (1991)for a description of walking PCR)。所有这些前述的参考文献,以及本文其它的参考文献,都以引用的方式将其全文结合于此。优选地,反义化合物靶向一种或多种特异性连接蛋白异构体。特定的连接蛋白异构体也可能被靶向,例如,基于其在时间上或空间上的表达。间隙连接在血管组织中表达,并且在某些具体实施方式中,表达在血管组织(例如,内皮细胞)中的连接蛋白同工型被靶向。参见 Camelliti P.et al.Cardiovasc.Res.62:414-425(2004)。内皮细胞、内皮祖细胞和平滑肌细胞被报道表达连接蛋白37、40、43和45。参见De Wit,(2004);Haefliger et al.,(2004),Sohl and Willecke,(2004),and Szmitko et al.,(2003)。还有报道称在临近创伤处的血管中的连接蛋白43被上调。Qiu C et al.,Current Biology,13:1967-1703(2003)。

[0176] 在其它具体实施方式中,靶向其它同工型。可能被反义化合物靶向的连接蛋白的特异同工型包括但不限于本文描述的45、43、37、31.1、26 和其它连接蛋白。在某些具体实施方式中,抗-连接蛋白化合物靶向连接蛋白43、45和/或40,在其它具体实施方式中,抗-连接蛋白化合物靶向连接蛋白7、32和/或26。可以靶向一种或多种连接蛋白。在某些具体实施方式中,一种抗-连接蛋白化合物靶向多于一种的连接蛋白(例如,连接蛋白43和连接蛋白45)。在其它具体实施方式中,制剂或组合物(例如,药物组合物)中包含多于一种的抗-连接蛋白化合物。本发明认为,任何连接蛋白都可能被本文描述的、本领域已知的或以后发现的一种或多于一种的抗-连接蛋白化合物所靶向。

[0177] 优选但不必需地,靶向的连接蛋白是人类的连接蛋白。连接蛋白可以例如具有选自SEQ ID NO:12-31的核酸碱基序列。在某些具体实施方式中,反义化合物靶向于编码连接蛋白的具有选自SEQ ID NO:12-31的核酸碱基序列的核酸分子中的至少8个核酸碱基。

[0178] 连接蛋白的靶根据设计或改造的组织类型而变化,本发明中使用的反义多核苷酸的精确序列会根据靶连接蛋白而变化。寡核苷酸靶向的一种或多种连接蛋白依赖于被下调的位点。根据连接蛋白亚单位组合物,这反映了间隙连接在全身不同部位的不均匀构成。然而,根据在组织中的分布,某些连接蛋白比其它的更加普遍,如本文所描述的。

[0179] 寡核苷酸单独使用或联合使用都可以靶向连接蛋白45、43、26、37、30和/或31.1(例如,参见SEQ ID NO:12-31),其适用于角膜工程或改造方面的应用。本发明的一方面,寡脱氧核苷酸可以是未修饰的磷酸二酯寡聚体。本发明的另一方面,聚核苷酸可以是单链或双链的。

[0180] 在某些非限制性实施例中,反义化合物靶向连接蛋白mRNA或mRNA前体分子的特定区域,包括外显子、内含子、mRNA剪接位点(外显子-外显子或内含子-外显子结合处)、5'端非翻译区域和3'端非翻译区域。

[0181] 也考虑,靶向独立的连接蛋白的寡核苷酸可以联合使用(例如,靶向一个、两个、三个、四个或更多个不同的连接蛋白)。例如,靶向连接蛋白45以及一种或多种连接蛋白家族的其它成员(例如连接蛋白43、26、30、31.1和43)的ODN可以联合使用。也考虑,单独的反义多核苷酸可以对特定的连接蛋白是特异的,或对1,2,3或更多的不同连接蛋白是特异的。特异性多核苷酸通常会靶向连接蛋白之间的连接蛋白基因或mRNA中不是保守的序列,而非特异性多核苷酸会靶向保守序列。因此,在某些具体实施方式中,反义化合物靶向编码人连接蛋白26、连接蛋白30、连接蛋白31.1、人连接蛋白37、连接蛋白43、连接蛋白45核酸分子的至少8个核酸碱基,其中所述反义化合物抑制与所述患者眼睛相关的细胞的人连接蛋白的表达。

[0182] 在某些具体实施方式中,对应于连接蛋白的核酸分子具有选自包括在本申请列出的序列中的SEQ ID NO:12-31的核酸碱基序列(相当于包括例如补体、cDNA、编码连接蛋白的部分等等)。在某些具体实施方式中,组合物靶向两种或更多人连接蛋白并抑制两种或更多种人连接蛋白的表达。在其它一些具体实施方式中,反义化合物是反义寡核苷酸。连接蛋白43的示例性反义寡核苷酸包括GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC (SEQ ID NO:1);GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC (SEQ ID NO:2);和GGC AAG AGACAC CAA AGA CAC TAC CAG CAT (SEQ ID NO:3)。连接蛋白26的反义寡核苷酸的实例具有序列TCC TGA GCA ATACCT AAC GAA CAA ATA (SEQ ID NO:4)。选择的连接蛋白37典型的反义寡核苷酸包括序列5' CAT CTC CTT GGT GCT CAA CC 3' (SEQ ID NO:5)和5' CTG AAG TCG ACT TGG CTT GG 3' (SEQ ID NO:6)。选择的连接蛋白30的示例性反义寡核苷酸包括序列5' CTC AGA TAG TGG CCA GAA TGC 3' (SEQ ID NO:7)和5' TTG TCC AGG TGA CTC CAA GG 3' (SEQ ID NO:8)。选择的连接蛋白31.1的示例性反义寡核苷酸包括序列5' CGT CCG AGC CCA GAA AGA TGA GGT C3' (SEQ ID NO:9);5' AGA GGC GCA CGT GAG ACA C 3' (SEQ ID NO:10)和5' TGA AGA CAA TGA AGA TGT T3' (SEQ ID NO:11)。

[0183] 在进一步的具体实施方式中,选自下列序列的寡脱氧核苷酸,尤其适合下调连接蛋白43的表达:

[0184] 5' GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC 3' (SEQ ID NO:1)

[0185] 5' GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC 3'; (SEQ ID NO:2)

[0186] 5' GGC AAG AGA CAC CAA AGA CAC TAC CAG CAT 3' (SEQ ID NO:3)。

[0187]

[0188] 在又一个具体实施方式中,选自下列序列的寡脱氧核苷酸,尤其适合 连接蛋白 26、37、30和31.1:

[0189] 5' TCC TGA GCA ATA CCT AAC GAA CAA ATA 3' (连接蛋白26) (SEQ ID NO:4) 5' CAT CTC CTT GGT GCT CAA CC 3' (连接蛋白37) (SEQ ID NO:5) 5' CTG AAG TCG ACT TGG CTT GG 3' (连接蛋白37) (SEQ ID NO:6) 5' CTC AGA TAG TGG CCA GAA TGC 3' (连接蛋白30) (SEQ ID NO:7) 5' TTG TCC AGG TGA CTC CAA GG 3' (连接蛋白30) (SEQ ID NO:8) 5' CGT CCG AGC CCA GAA AGA TGA GGT C3' (连接蛋白 31.1) (SEQ ID NO:9) 5' AGA GGC GCA CGT GAG ACA C3' (连接蛋白31.1) (SEQ ID NO:10) 5' TGA AGA CAA TGA AGA TGT T3' (连接蛋白31.1) (SEQ ID NO:11)。

[0190] 本文提供的反义化合物通常包括约8至约40个核酸碱基(即约8至 约40个相连接的核苷),更典型地包括约12至约40个核酸碱基,甚至更 典型地约30个核酸碱基。包含多核苷酸的反义化合物可以长达至少约40, 例如至少约60或至少约80个核苷酸并且达到100、200、300、400、500、1000、2000或3000或更多的核苷酸。合适的反义化合物包括,例如30碱基ODN。

[0191] 在某些具体实施方式中,反义化合物靶向编码连接蛋白的具有选自 SEQ ID NO: 12-31的核酸碱基序列的核酸分子的至少约8个核酸碱基。在某些具体实施方式中,反义化合物靶向编码连接蛋白的具有选自SEQ ID NO:12-31的核酸碱基序列的核酸分子的至少约10个、至少约12个、至少约14个、至少约16个、至少约18个、至少约20个、至少约25个、至少约30个以及至少约35个核酸碱基。反义化合物的大小,包括寡核苷酸靶向编码人连接蛋白的核酸分子的至少为约8至35个核酸碱基的寡核苷酸,可以是8个核酸碱基的长度或更长,在8和100个核酸碱基之间、在8和50个核酸碱基之间、在8和40个核酸碱基之间、在10和50个核酸碱基之间、在12和50个核酸碱基之间、在14和50个核酸碱基之间、在16和50个核酸碱基之间、在18和50个核酸碱基之间、在20和50个核酸碱基之间、在25和50个核酸碱基之间、在15和35个核酸碱基之间 等等。本发明的其它反义化合物可以具有这样或更小或更大的尺寸,例如 长度大于100个核酸碱基。

[0192] 反义化合物包括但不限于反义寡核苷酸(ODN)、反义多核苷酸、脱氧核酶、吗啉代寡核苷酸、RNAi分子或其类似物、siRNA分子或其类似物、PNA分子或其类似物、DNA酶或其类似物、5'端突变的U1小核RNA 及其类似物。

[0193] 如本文提供的反义化合物可以包括寡脱氧核苷酸(ODN)的应用。ODN通常长约20个核苷酸并与mRNA前体和mRNA杂交生成核糖核酸酶H(RNA酶H)的底物,核糖核酸酶H特异地降解已形成的RNA-DNA 双链的RNA链。如果以抑制RN酶H活动的方式修饰,ODN能够通过空间位阻或抑制mRNA前体的剪接抑制mRNA的翻译。ODN及其修饰物已经被用于靶向双链DNA以抑制通过形成三螺旋的转录。ODN可以通过本领域认可的自动化合成方法得到,并可相对直接地获得任何序列的ODN 以及通过反义碱基对阻断基因表达。

[0194] 在某些方面,为了阻断基因表达,ODN的磷酸二酯主链可以被修饰 以增加其作为靶特异性试剂的效率。这些主链修饰物被开发以改善ODN 的稳定性并增强其细胞摄取。最广泛使用的修饰物是其中非桥接氧被硫原子取代生成的硫代磷酸酯ODN。至少一种硫代磷酸酯ODN已经被FDA 批准,几种其它的硫代磷酸酯反义ODN正处于多种癌症和炎症疾病的早

期临床试验阶段。

[0195] 关于阻断基因功能的ODN的活动机制根据ODN主链变化 (Branch, A.D. *Hepatology* 24, 1517-1529 (1996); Dias, N. and Stein, C.A. *Mol. Cancer Ther.* 1, 347-355 (2002); Stein, C.A. and Cohen, J.S., *Cancer Res.* 48, 2659-2668 (1988); Zon, G. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 616, 161-172 (1990)。带净负电荷的ODN, 例如磷酸二酯和硫代磷酸酯, 引起RNA酶H介导的靶 mRNA的断裂。其它主链修饰物由于缺少电荷或与靶RNA形成的螺旋的类型 (可以归为空间位阻ODN) 不与RNA酶H结合。通常使用的后一组成员包括吗啉基、U-O-甲基、2'-O-烯丙基、锁核酸和肽核酸 (PNA)。在其它抑制的靶中, 这些ODN能够阻断剪接、翻译、细胞核-细胞质运输和翻译。

[0196] 另一方面, 连接蛋白表达的调节涉及核酶的使用。核酶是即使在完全没有蛋白质的情况下起到酶作用的RNA分子。其具有显著特异地破坏和/或形成共价键的催化活性, 因此多个数量级地加速靶向反应的自发速度。

[0197] 核酶与RNA通过Watson-Crick碱基配对结合并通过催化磷酸二酯主链的水解来降解靶RNA。有多种不同种类的核酶, 其中“锤头状”核酶是最被广泛研究的。正如其名称所暗示的, 当与其靶mRNA杂交时, 锤头状核酶形成独特的二级结构。核酶中对催化重要的残基与靶-互补序列相邻, 靶-互补序列又包围靶RNA的切割位点。核酶导致的切割需要二价离子, 例如镁, 同时也依赖于靶RNA的结构和可接近性。通过使用定位信号在细胞内共定位核酶和靶RNA很大程度上增强了其沉默效应。考虑到细胞中核酶的持续生产, 锤头状核酶足够短到可以被化学合成或通过载体转录, 允许在细胞内的连续生产。

[0198] RNA作为催化剂的能力在嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 和RNA酶的RNA部分自身剪接I类内含子中首次得到证实。发现这两种RNA酶之后, RNA介导的催化作用被发现与酵母、真菌和植物线粒体 (以及叶绿体) 单链植物类病毒和拟病毒RNA、丁型肝炎病毒和粗糙链孢霉中卫星RNA中的自身剪接II类内含子有关。核酶是天然的, 但也可以人工设计用于表达顺式 (在相同的核酸链上) 或反式 (非共价连接核酸) 地靶向特异的序列。利用体外选择实验开发了新的生物化学活性并产生新的作用于底物而不是RNA的核酶基序。

[0199] 嗜热四膜虫的I类内含子是第一个顺式剪接的核酶被转化成反式反应形式, 其被称为内含子/核酶, 在基因组研究和可能的治疗方面都是有用的。在反式剪接反应中, 靶mRNA有缺陷的外显子能够交换共价结合于内含子/核酶的正确外显子。这是通过连接到内含子的外显子通过碱基配对到靶mRNA上定位的, 使其可以在酯交换反应中共价结合到靶转录本的5'端。该反应被用于将野生型序列反式剪接到镰刀状细胞球蛋白转录本和突变p53转录本种, 并取代强直性肌营养不良等位基因上的蛋白质激酶转录本的3'-UTR内展开的三连体。

[0200] 核糖核酸内切酶RNA酶P可以在遍及整个自然界的生物体中找到。根据其分离自不同的机体, 该酶含有RNA和一种或多种蛋白质组分。从大肠埃希氏杆菌 (*Escherichia coli*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 酶中分离的RNA组分缺少蛋白质交换某种盐和离子的条件下, 可以作为位点特异性切割剂。对人和细菌酶要求的底物的研究表明, 任何一种酶的最小底物量类似于转运RNA分子的一个片段。该结构可以独特设计的反义RNA模仿, 其与靶RNA配对, 并在检测试管和细胞中用作RNA酶P介导的、位点特异性切割的底物。也表明反义成分可以共价结合于RNA酶P RNA, 从而使该酶仅指向感兴趣的靶RNA。研究

人员在设计反义RNA 中已经利用了这个性质,使其与感兴趣的靶RNA配对以刺激靶位点特异性切割以及用于细胞培养中单纯疱疹病毒和巨细胞病毒的靶向抑制。

[0201] 某些小的植物致病性RNA (类病毒、卫星RNA和拟病毒),来自粗糙链脉胞菌(*N.crassa*)线粒体DNA质粒和动物丁型肝炎病毒的转录本,在缺少体外蛋白质的条件下发生自身切割反应。该反应要求中性pH值和 Mg^{2+} 。该自身切割反应是体内复制的滚环机制的主要部分。这些自身剪切的RNA根据在剪切位点附近的序列和形成的二级结构可以细分为种群。小核酶来源于单链植物类病毒和拟病毒RNA中发现的基序。以共有的二级结构和保守的核苷酸系列为基础,术语“锤头状”被归入自身切割结构域的一组。锤头状核酶由30个核苷酸组成。锤头状催化结构域的简单性使其在反作用核酶设计中成为一个普遍的选择。使用Watson-Crick碱基配对,锤头状核酶可以被设计成切割任何靶RNA。切割位点的要求相对简单,并且事实上可以靶向任何UH序列基序(H为U、C或者A)。

[0202] 第二种植物来源的自我切割基序,最初在烟草环斑病卫星RNA的负链中被证实,被称为“发夹结构”或“纸夹结构”。发夹核酶在产生2'端的可逆反应中切割RNA底物,Y-循环磷酸盐和5'-氢氧化T1末端设计的催化基序的版本也切割并翻转多种反式靶标的多种拷贝。发夹结构的底物要求包括GUC,其中切割发生在G的直接上游。发夹结构的核酶也催化连接反应,尽管其更加常用于切割反应。

[0203] 在细胞中大量应用锤头状核酶和发夹状核酶下调特异性细胞和病毒的靶。Haseloff和Gerlach设计了锤头状基序 (Haseloff and Gerlach; *Nature*. Aug 18; 334 (6183): 585-91 (1988)),其可以被设计成通过修饰与正确靶碱基配对的臂来切割任何靶标。Ramezani等人使用工程设计为表达抗人类免疫缺陷病毒(HIV) gag核酶的细胞实际上完全抑制了病毒基因的表达和复制的研究中,证实该锤头状核酶基序具有潜在的治疗上的应用 (Ramezani A. et al., *Frontiers in Bioscience* 7:a, 29-36; (2002))。

[0204] 另一方面,连接蛋白表达的调节包括催化DNA (或DNA酶) 的使用。通过体外进化已经开发了能够位点特异地切割RNA靶的小DNA (因为没有发现天然DNA酶)。已经确定两种具有不同的切割位点特异性的不同催化基序。最常使用的10-20种酶通过Watson-Crick碱基配对结合到它们的RNA底物上,并位点特异性切割靶RNA,与锤头状核酶和发夹状核酶一样,产生了2,3'-环磷酸和5'-OH终点。靶mRNA的切割导致靶mRNA被破坏和DNA酶循环使用以及切割多种底物。催化DNA相对地合成便宜而且具有良好的催化性能,这使其在反义DNA或核酶中成为有用的替代品。

[0205] 已经公开了多种DNA酶在细胞培养中的应用,包括veg FmRNA的抑制作用并因此阻碍血管形成和抑制慢性骨髓性白血病特征的bcr/abl融合转录本的表达。催化DNA可以外源给药,其可以通过主链修饰在载体缺失的条件下优化系统转运。

[0206] 本发明的另一个方面,调节组成型连接蛋白基因包括使用具有吗啉代主链结构的寡核苷酸 Summerton, J.E. and Weller, D.D. U.S. Pat. No. 5,034,506。

[0207] 本发明的另一方面,反义多核苷酸可以被化学修饰以增强其对核酸酶的耐受能力并增加进入细胞的效率。例如,可以使用包含硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸片段和适当位置修饰的寡脱氧或寡核糖核苷酸片段的混合主链寡核苷酸(MBO)。MBO具有硫代磷酸酯键和其它修饰的寡核苷酸的其它片段,例如甲基磷酸酯、氨基磷酸酯、二硫代磷酸酯、N3' P5' -氨基磷酸酯和寡核糖核苷酸硫代磷酸酯及其2'-O-烷基类似物、以及2'-O-甲基核糖核苷

酸甲基磷酸酯,它们是非离子的并且具有耐受核酸酶或2'-O-烷基寡核糖核苷酸的能力。

[0208] 正如本领域已知的,核苷是一种碱基-糖化合物。核苷的碱基部分通常为杂环基。该杂环基的两种最常用的种类是嘌呤和嘧啶。核苷酸是核苷进一步包括共价结合于核苷的糖部分的磷酸基团。对于那些包括五呋喃糖的核苷,磷酸基团可以连接到糖的2'、3'或5'羟基。在形成寡核苷酸时,磷酸基团彼此共价连接到相邻的核苷以形成线性的多聚化合物。最后该线性多聚结构的各个末端进一步连结以形成环形结构,然而,通常优选开放的线性结构。在寡核苷酸结构中,磷酸基团通常被认为是形成寡核苷酸的中间核苷的主链。RNA和DNA的正常键和主链是3',5'-磷酸二酯键。

[0209] 本发明中有用的反义化合物可以包括含有修饰主链或非天然核苷间键的寡核苷酸。具有修饰主链的寡核苷酸包括那些主链上保留一个磷原子和那些主链上没有磷原子的寡核苷酸。在本发明的上下文中,在修饰寡核苷酸的核苷间的主链上没有磷原子也可以被认为是寡核苷。

[0210] 本发明中有用的具有修饰寡核苷酸主链的反义化合物包括,例如,硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和包括3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯的其它烷基磷酸酯、亚磷酸酯、包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯的氨基磷酸酯、硫代氨基磷酸酯、硫代烷基磷酸酯、硫代烷基磷酸三酯和具有正常3'-5'键、它们的2'-5'连接类似物和那些具有转化极性的硼酸亚磷酸酯,其中临近的核苷单元对将3'-5'连结至5'-3'或2'-5'至5'-2'。也包括多种盐、混合盐和游离酸形式。

[0211] 一方面,考虑的是,其中不包括磷原子的修饰寡核苷酸主链具有由短链烷基或环烷基核苷间键(internucleoside linkage)、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键,或一种或多种短链杂原子或杂环核苷间键形成的主链。这些包括具有吗啉键(部分由核苷的糖部分形成);硅氧烷主链;硫化物、亚砷和砷主链;甲酰基(formacetyl)和硫代甲酰基主链;亚甲基甲酰基和硫代甲酰基主链;含烯的主链;氨基磺酸盐主链;亚甲基亚胺(methyleneimino)和亚甲基胍主链;磺酸酯和磺酰胺主链;酰胺主链以及其它具有混合N、O、S和CH₂组分部分的主链。

[0212] 一个方面,考虑的是,拟寡核苷酸(寡核苷酸模拟物),糖和核苷间键全部即核苷酸单元主链被新的基团取代。碱基单元用于与合适的核酸靶化合物杂交。一种这样的寡聚化合物,表现出优异的杂交性能的拟寡核苷酸,称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,寡核苷酸的糖主链被含有酰胺的主链代替,尤其是氨基乙基甘氨酸主链。碱基被保留和直接或间接地结合于主链酰胺部分的杂氮原子上。PNA化合物进一步的教导在Nielsen et al. (Science, 254, 1497-1500 (1991)) 中可找到。

[0213] 一方面,考虑具有硫代磷酸酯主链的寡核苷酸和具有杂原子主链的寡核苷酸,尤其是-CH₂-NH-O-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-[称为甲基亚胺(methylimino)或MMI主链]、-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-以及-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- (其中天然磷酸二酯主链以-O-P-O-CH₂-表示)。

[0214] 另一方面,考虑修饰的寡核苷酸也可以含有一种或多种取代糖部分。例如,寡核苷酸在2'位置上含有下列基团之一:OH、F、O-、S-或N-烷基、O-烷基-O-烷基、O-、S-或N-烯基或O-、S-、或N-炔基,其中烷基、烯基和炔基可以被C₁至C₁₀烷基或C₂至C₁₀烯基和炔基取代或未取代的。尤其优选的是O[(CH₂)_n]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)₂₀N(CH₃)₂、O(CH₂)

$n\text{NH}_2$ 、 $0(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $0(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ 和 $0(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, 其中 n 和 m 为从1至约10。其它优选的寡核苷酸可能在2'位置上含有下列基团之一: C_1 至 C_{10} 低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、 0 -烷芳基或 0 -芳烷基、 SH 、 SCH_3 、 OCN 、 Cl 、 Br 、 CN 、 CF_3 、 OCF_3 、 SOCH_3 、 SO_2CH_3 、 ONO_2 、 NO_2 、 N_3 、 NH_2 、杂环烷基、杂环烷基芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报道子基团、嵌入剂(intercalator)、改善寡核苷酸药动学性质的基团、改善寡核苷酸药效的基团以及其它具有相似性质的取代基。优选的修饰包括2'-甲氧乙氧基(2'- $0\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, 也被称为2'- 0-(2-甲氧乙基) 或2'- MOE) (Martin et al. *Helv. Chim. Acta* 1995, 78, 486-504), 即, 烷氧烷氧基。其它修饰包括2'-二甲氨基氧乙氧基, 即, $0(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ 基团, 也称为2'- DMAOE , 以及2'-二甲氨基-乙氧乙氧基(2'- DMAEOE), 即, 2'- $0\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2)_2$ 。

[0215] 还可以考虑, 修饰可以包括2'-甲氧基(2'- 0-CH_3)、2'-氨基丙氧基(2'- $0\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$)和2'-氟(2'- F)。也可以在寡核苷酸的其它位置做相似的修饰, 尤其是在核苷酸3'末端上或2'-5'连接的寡核苷酸中糖的3'位置和核苷酸5'末端的5'位置上。寡核苷酸也可以具有糖模拟物, 例如环丁基部分, 代替五呋喃基糖。

[0216] 另一方面, 考虑寡核苷酸还可以包括核酸碱基(在本领域中通常简称为“碱基”)修饰或取代。本文使用的“未修饰的”或“天然的”核酸碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G), 和嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核酸碱基包括其它合成和天然的核酸碱基, 例如5-甲基胞嘧啶(5-me-C或 m_5c)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和胞嘧啶的6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和胞嘧啶的2-丙基和其它烷基衍生物、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶、5-卤尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫代尿嘧啶、8-卤素、8-氨基、8-硫羟基、8-硫代烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤, 5-卤素尤其是5-溴、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶, 7-甲基鸟嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-去氮鸟嘌呤和7-去氮腺嘌呤和3-去氮鸟嘌呤和3-去氮腺嘌呤。更多的核酸碱基包括披露在美国专利申请第3,687,808号中的, 那些披露在Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. John Wiley & Sons中的, 那些披露在Englisch et al. (*Angewandte Chemie, International Edition*, 30, 613-722 (1991))中的, 以及那些披露在Sanghvi, Y.S., Chapter 15, Antisense Research and Application, pages 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B., ed., CRC Press (1993)中的。这些碱基中的某些对于增加寡聚化合物的结合亲和力尤其有用。它们包括5-取代嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2, N-6和O-6取代的嘌呤, 包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶的取代已经表现出增加核酸双链的稳定性达 0.6 至 1.2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Application, CRC Press, Boca Raton, pages 276-278 (1993))是目前优选的碱基取代物, 当其与2'- 0 -甲氧乙基糖修饰物结合时甚至更加优选。

[0217] 另一方面, 考虑到的寡核苷酸修饰物涉及化学结合于寡核苷酸的一个或多个部分或结合物, 其增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取。这些部分包括但不限于脂质部分例如胆固醇部分(Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6553-6556 (1989))、胆酸(Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4, 1053-1059 (1994))、硫醚,

例如己基-S-三苯甲基硫醇 (hexyl-S-tritylthiol) (Manoharan et al., Ann.N.Y.Acad.Sci.660,306-309; Manoharan et al.,Bioorg(1992).Med.Chem.Let.3, 2765-2770(1993))、硫代胆固醇 (Oberhauser et al.,Nucl.Acids Res.,20,533-538 (1992))、脂肪链,例如十二元醇或十一烷残基 (Saison-Behmoaras et al.,EMBO J.10, 1111-1118(1991);Kabanov et al.,FEBS Lett.259,327-330(1990);Svinarchuk et al., Biochimie 75,49-54(1993))、磷脂,例如十六烷基外消旋甘油或三乙基胺1,2-二氧十六烷基-外消旋-甘油-3-氢-磷酸酯 (Manoharan et al.,Tetrahedron Lett.36,3651-3654 (1995);Shea et al.,Nucl.Acids Res. 18,3777-3783(1990))、多胺或聚乙烯乙二醇链 (Manoharan et al., Nucleosides&Nucleotides 14,969-973(1995)),或金刚烷乙酸 (Manoharan et al.,Tetrahedron Lett.36,3651-3654(1995)),或棕榈基部分 (Mishra et al., Biochim.Biophys.Acta 1264,229-237(1995)),或十八胺或己胺羰基羟胆固醇部分 (Crooke et al.,J.Pharmacol.Exp.Ther.277,923-937(1996))。

[0218] 还可以考虑到的是,使用嵌合寡核苷酸的寡核苷酸。在本发明的上下文中,“嵌合”寡核苷酸或“嵌合体”是含有两个或多个化学上不同的区域(每个由至少一种核苷酸组成)的寡核苷酸。这些寡核苷酸通常含有至少一个其中寡核苷酸被修饰的区域,使得寡核苷酸具备增强的抗核酸酶降解的能力、增强的细胞摄取和/或对靶核酸增强的结合亲和力。寡核苷酸的其他区域可以作为能够切割RNA:DNA或RNA:RNA杂交体的酶的底物。作为实施例,RNA酶H是一种切割RNA:DNA双链的RNA链的细胞核内切酶。因此,导致靶RNA的切割,从而在很大程度上增强了基因表达的反义抑制效率。靶RNA的切割可以用凝胶电泳方法常规检测,如果有必要,可结合本领域中已知的核酸杂交技术。该RNA酶H介导的靶RNA的切割与使用核酶切割核酸是有区别的。

[0219] 嵌合寡核苷酸的实例包括但不限于“结合体(gapmer)”,其中存在三个不同的区域,通常为一个中心区域和在其侧面的两个化学性质彼此相同但与间隙不同的区域。结合体(gapmer)优选的实施例为寡核苷酸的中心部分(“间隙”)作为RNA酶H的底物并优选由2'-脱氧核苷酸组成的寡核苷酸,而侧翼部分(5'和3'“翼”)被修饰以使其具有对靶RNA分子更强的亲和力但不能支持核酸酶的活性(例如氟-或2'-O-甲氧乙基取代基)。嵌合寡核苷酸不限于那些在糖上修饰的寡核苷酸,也可以包括具有修饰的主链的寡聚核苷或寡核苷酸,例如具有硫代磷酸酯(P=S)和磷酸二酯(P=O)主链连接区域,或具有MMI和P=S主链连接区域。其它嵌合体包括“wingmer(温格默)”,在本领域中也称为“hemimer(海默)”,即,具有两个不同区域的寡核苷酸。在wingmer优选的实施例中,寡核苷酸的5'部分作为RNA酶H的底物,并优选由2'-脱氧核苷酸组成,而3'部分被修饰以使其具有对靶RNA分子更强的亲和力但不能支持核酸酶的活性(例如2'-氟-或2'-O-甲氧乙基-取代的),反之亦然。在一个具体实施方式中,本发明的寡核苷酸在至少一个核苷酸的糖部分含有2'-O-甲氧乙基(2'-O-CH₂CH₂OCH₃)修饰。该修饰已经显示增强寡核苷酸对靶的亲合力和寡核苷酸的抗核酸酶能力。根据本发明,一个、多个或所有寡核苷酸的核苷酸亚单位可能具有2'-O-甲氧乙基(-O-CH₂CH₂OCH₃)修饰。含有多个具有2'-O-甲氧乙基修饰的核苷酸亚单位的寡核苷酸在寡核苷酸(也可能是嵌合寡核苷酸)内的任何核苷酸亚单位可以具有这样的修饰。除2'-O-甲氧乙基修饰以外,也考虑含有增强反义效率、效力或靶亲和力的其它修饰的寡核苷酸。

[0220] 本发明还提供了与双链或二倍体连接蛋白核酸(例如,在连接蛋白 RNA或连接蛋白基因的折叠区域)结合的多核苷酸(例如,DNA、RNA、PNA或其类似物),形成包含三股螺旋或“三倍体”核酸。三股螺旋结构通过例如阻止连接蛋白基因的转录而导致连接蛋白表达受抑制,因此降低或消除细胞中的活性。不被任何特殊的机制束缚,认为三股螺旋配对包括双螺旋充分开放以与聚合酶、转录因子或常规分子结合发生的能力。

[0221] 用三股螺旋结构的碱基配对规则(参见,例如 Cheng et al., J.Biol.Chem.263:15110(1988);Ferrin and Camerini-Otero, Science 354:1494(1991);Ramdas et al., J.Biol.Chem.264:17395 (1989);Strobel et al., Science 254:1639(1991); and Rigas et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.83:9591(1986))和连接蛋白mRNA和/或基因序列构造三倍体寡-和多核苷酸。通常,形成三倍体的寡核苷酸包含约10至约25个核苷酸或与连接蛋白RNA或基因更长的“互补”特异序列(即足够大以形成稳定的三股螺旋,但根据运送的模式确定足够小的程度,如果需要,可以体内给药)。在本文中,“互补的”是指能够形成稳定的三股螺旋。在一个具体实施方式中,寡核苷酸被设计成与连接蛋白基因的调控区域特异结合(例如,连接蛋白5'-侧翼序列、启动子和增强子)或特异结合转录起始位点(例如从翻译起始位点的-10到+10之间)。最新应用三倍体DNA治疗进展的综述,参见 Gee et al., in Huber and Carr,1994, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co, Mt Kisco NY and Rininsland et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:5854(1997)。

[0222] 本发明还提供对于抑制连接蛋白活性有用的核酶。该核酶结合并特异性切割和灭活连接蛋白mRNA的活性。有用的核酶可以包括与连接蛋白 mRNA的5'-和3'-末端序列互补并能够用基于连接蛋白mRNA序列的技术进行设计。考虑到的是,本文提供的核酶包括那些具有I类内含子核酶特性的核酶(Cech, Biotechnology 13:323(1995))和其它的锤头状核酶(Edgington, Biotechnology 10:256(1992))。

[0223] 核酶包括具有诸如GUA、GUU和GUC切割位点的核酶。长度在15至20个核糖核苷酸之间的短RNA寡核苷酸(对应于含有切割位点的靶连接蛋白基因区域)可以评价可以使寡核苷酸更理想的二级结构特征。可以通过使用核糖核酸酶保护测定或根据本领域已知的标准方法在体外对核酶活性的检测方法检测切割位点与互补寡核苷酸杂交的可接近性而评价切割位点的适合性。

[0224] 进一步考虑的是这样的翻译化合物,其中反义和核酶功能结合于同一寡核苷酸。此外,核酶可以含有一个或更多修饰的核苷酸或核苷酸之间经修饰的键,正如上述并结合本文提供的说明性反义寡核苷酸的描述。

[0225] 本发明还提供了通过象RNA干扰(RNAi)的方法对抑制连接蛋白活性有用的多核苷酸。这和其它抑制基因的技术在本领域是公知的。该技术的综述见Science 288:1370-1372(2000)。RNAi影响转录后水平并且是序列特异性的。该过程包括引入部分或全部双链特性的RNA,或该RNA前体或能够编码该RNA进入细胞或进入细胞外环境的RNA。

[0226] 正如Fire等人在美国专利申请第6,506,559号中描述的,该RNA可能含有一个或多个聚合的核糖核苷酸链。可以通过自身互补RNA单链和互补RNA双链形成双链结构。该RNA可能包括对磷酸-糖主链或核苷酸的修饰。RNA双链结构可能在细胞内或细胞外形成。

[0227] 研究表明,一种或多种核糖核苷酸特异性地与双链RNA结合并将双链RNA切割为

短的片段。核糖核酸酶仍然与这些片段结合,最终特异地结合于互补mRNA上,即,特异性结合于连接蛋白基因转录的mRNA链。连接蛋白基因的mRNA也被核糖核酸酶降解为短片段,从而排除了连接蛋白基因的翻译和表达,并因此抑制了连接蛋白的活性。此外,RNA聚合酶也能够促进大量小片段拷贝的合成,使系统效率呈指数增长。该基因抑制途径的独特特征在于沉默不限于细胞起始处。基因沉默的影响可能被传播到机体的其它部位甚至透过种系遗传至数代。

[0228] 一方面,双链(ds)RNA依赖的基因特异性转录后沉默方法涉及使用小干扰RNA(siRNA)。一般RNAi方法的使用受到某些限制,包括适应长dsRNA分子的活化的哺乳动物细胞中非特异的抗病毒防御机制((Gil J,Esteban M,“Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase(PKR):Mechanisms of action”.Apoptosis 2000,5:107-114)。本领域的最新进展表明21个核苷酸RNA的合成二倍体能够介导哺乳动物细胞中基因特异的RNAi而不引起种属抗病毒防御机制(Elbashir S,et al.,“Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells”.Nature,411:494-498(2001);Caplen N. et al.,Proc Natl Acad Sci, 98:9745-9747(2001))。因此,siRNA逐渐被认为是基因特异性调控的有力工具。

[0229] 如本文描述的,RNAi包括一组共用很多公用生化成分的相关基因沉默机制,其中末端效应器分子为,例如但不限于,小21-23核苷酸反义RNA。一种使用相对长的dsRNA触发器(trigger)的机制,dsRNA触发器被细胞酶Dicer处理变短,例如但不限于21-23核苷酸的dsRNA,被称为siRNA。与靶RNA互补的siRNA链并入被称为RNA诱导沉默复合体(RISC)的多蛋白复合体,其作为靶位点内mRNA链的内切核苷酸切割的向导(guide)。这导致完整mRNA的降解;反义siRNA可以被循环利用。在低等生物中,RNA依赖的RNA聚合酶也使用退火向导(guide)siRNA作为引物,生成更多面向靶的dsRNA,其最终作为Dicer的底物,生成更多的siRNA并放大siRNA信号。该途径通常用作植物病毒的防御机制。

[0230] 正如本文描述的,siRNA可能由两个分离的退火信号链组成,例如但不限于21-23核苷酸,其末端的两个3'-核苷酸是不配对的(3'突出)。可替换地,siRNA可能是单个茎环(stem-loop)形式,经常称为小发夹RNA(shRNA)。通常,但不总是,shRNA的反义链也与si/shRNA的正义配体链(partner strand)完全互补。

[0231] 在哺乳动物细胞中,长dsRNA(通常为长度大于30个核苷酸)触发干扰素途径(通路),激活蛋白激酶R和2',5'-寡腺苷酸(oligoadenylate)合成酶。干扰素途径的激活能够导致翻译的普遍下调和RNA普遍降解。然而,导入哺乳动物细胞的外源性较小的siRNA据报道可以绕过干扰素途径。

[0232] siRNA反义产物也可以来源于外源微小RNA。在人类细胞中,不管原始类型(siRNA和微小RNA)或处理途径,最终成熟的siRNA,例如但不限于与mRNA完全同源的21-23核苷酸的反义RNA,将引导mRNA切割。通常,siRNA与靶位点之间不匹配的效果与活性完全消除几乎相同,只了解其部分原因;然而,部分同源导致mRNA翻译的抑制。通常,与靶错配的siRNA被设计为模拟原型微小RNA-靶相互作用,根据特异性相互反应和mRNA中靶位点的数量可以介导不同程度的翻译抑制。RNAi可以通过前体siRNA的外源给予或通过siRNA或shRNA以启动子为基础的表达式激活。

[0233] 小干扰RNA(siRNA)可以化学合成或通过DNA为基础的载体系统产生。通常,这涉

及小发夹(sh)RNA的转录,其被有效地处理以在细胞中形成siRNA(Paddison P,Caudy A,Hannon G:Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells.Proc Natl Acad Sci U S A 99:1443-1448(2002);Paddison P,Caudy A,Bernstein E,Hannon G,Conklin D:Short hairpin RNAs(shRNAs)induce sequence-specific silencing in mammalian cells.Genes&Dev 16:948-958(2002);Sui G,et al.,Proc Natl Acad Sci 8:5515-5520(2002);Brummelkamp T,et al.,Science 296:550-553(2002))。因此,在上下文中,siRNA可以被用作一种有效的组织特异性靶向和基因表达调控的方法。

[0234] 根据本发明使用的寡核苷酸可以通过公知的固相合成技术方便且常规地得到。用于这样的合成的设备在本领域中已知在多个销售处出售。也可以使用这样的合成的任何其它方法;寡核苷酸实际的合成在本领域中被认可。已知使用类似的技术制备寡核苷酸,例如硫代磷酸酯和2'-烷氧基或2'-烷氧基烷氧基衍生物,包括2'-O-甲氧乙基寡核苷酸(Martin,P.Helv.Chim.Acta 78,486-504(1995))。已知使用类似的技术和可商购得到的修饰的amidite和可控孔玻璃(CPG)产物例如生物素、荧光素、吡啶或补骨脂素(psoralen)修饰的amidite和/或CPG(可从 Glen Research,Sterling,Va.获得)以合成荧光标记的、生物素化的或其它共轭寡核苷酸。

[0235] 方法

[0236] 另一方面,本发明包括通过给予本文提供的化合物来治疗受治者(例如,患者)、靶器官、靶组织或靶细胞。

[0237] 某些具体实施方式涉及治疗具有血管紊乱的受治者、靶器官、靶组织或靶细胞的方法,包括给予受治者本文提供的能够抑制连接蛋白半通道表达、形成或活性的反义化合物、拟肽或其它化合物。血管紊乱包括例如,任何与动脉、血管以及血管和/或心血管系统相关的紊乱或病症,包括与器官或组织相关的紊乱和病症。典型的实例包括但不限于动脉硬化症、微血管紊乱、大血管紊乱、中风、脑血管疾病(大脑缺血)、血栓、外伤导致的血管损伤(例如,皮下损伤、支架植入、再狭窄或血管成形术),由葡萄糖水平升高(糖尿病)导致的血管损伤、糖尿病性视网膜、下肢外周血管疾病、器官缺血以及内皮细胞破坏。

[0238] 其它的具体实施方式涉及治疗炎症性疾病的方法,包括给予受治者、靶器官、靶组织、或靶细胞本文提供的能够抑制连接蛋白半通道的表达、形成、或活性的反义化合物、拟肽、或其它化合物。

[0239] 其它具体实施方式涉及与移植或植入操作结合在一起治疗受治者、靶器官、靶组织、或靶细胞的方法,包括给予所述患者本文提供的能够抑制连接蛋白半通道的表达、形成、或活性并抑制或预防与所述移植或植入操作相关的组织水肿的反义化合物、拟肽、或其它化合物。

[0240] 其它的具体实施方式涉及治疗心肌梗死及与其相关的心脏疾病的方法,包括给予受治者本文提供的能够抑制连接蛋白半通道的表达、形成、或活性的反义化合物、拟肽、或其它化合物。

[0241] 另外其它的具体实施方式涉及治疗冠状动脉疾病的方法,包括给予受治者、靶器官、靶组织、或靶细胞本文提供的能够抑制连接蛋白半通道的表达、形成、或活性的反义化合物、拟肽、或其它化合物。

[0242] 其它的具体实施方式涉及治疗与缺血相关的损伤的方法,包括最初的缺血性损伤和随后的再灌注损伤。

[0243] 其它的具体实施方式涉及治疗心肌梗死及与其相关的心脏疾病的方法,包括共同给予受治者本文提供的能够抑制连接蛋白半通道的表达、形成、或活性的反义化合物、拟肽、或其它化合物和其它已知用于心脏缺血病症包括Baker D.W.等人描述的 ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult, 2001; American College of Cardiology and the American Heart Association,)的治疗方法或步骤。这些方法包括,例如,心脏移植、外科和机械方法、为了血液动力学和临床改善的二尖瓣膜修复或替换、用于循环支持的体外设备、左心室辅助设备、机械降压、左心室切除术(Batista方法)、用于治疗患者缺血性心肌症的心肌成形术和多种动脉瘤切除方法。

[0244] 植入物和其它外科或内科装置可以以不同的方式利用本发明的试剂(例如,抗-连接蛋白化合物和组合物)涂覆(或其它适合释放的方法),包括例如:(a)直接将抗-连接蛋白试剂和组合物粘附于植入物或装置上(例如,通过给植入物或装置喷一层聚合物/药物薄膜,或将植入物或装置在聚合物/药物溶液中浸泡,或通过其它共价或非共价的方法);(b)用一种物质涂覆植入物或装置,例如水凝胶,其然后吸收抗-连接蛋白组合物(或上述抗-连接蛋白因子);(c)将涂覆有抗-连接蛋白组合物的线(或该聚合物本身形成线)交织缠绕于植入物或装置上;(d)或将植入物或装置插入含有或涂有抗-连接蛋白组合物的套筒或网中;(e)用抗-连接蛋白试剂或组合物构造该植入物或装置本身;或(f)通过其它适合的植入物或装置释放抗-连接蛋白试剂。在本发明优选的具体实施方式中,该组合物在储存过程中和插入时应该牢固地粘附于植入物或装置上。该抗-连接蛋白试剂或组合物还应优选在储存过程中、插入之前或在插入身体后温暖至体温时不会降解(如果需要)。此外,应该优选平滑和均匀地涂布于植入物或装置上,抗-连接蛋白试剂的分布一致,而不改变其延展轮廓。在本发明优选的具体实施方式中,该抗-连接蛋白试剂或组合物应一旦被使用,就能向植入物或装置周围的组织中提供一致的、可预测的、延长的抗-连接蛋白因子释放。对于血管支架(stents),除上述特性外,该组合物不应导致支架血栓形成(导致血块的产生),或导致血流的严重紊乱(比支架本身如果未被涂覆应该导致的严重)。

[0245] 本文中提供的抗-连接蛋白化合物、组合物和方法可以用于多种利用植入物、内科和外科装置等的操作过程中。一方面,植入我、外科装置或支架被涂覆或使用其它方法构造,使其包含和/或释放本文提供的任何抗-连接蛋白试剂。典型的例子包括心血管装置(例如,可植入的静脉导管、静脉端口(port)、隧道式静脉导管、慢性静脉点滴线或端口,包括肝动脉注射导管、起搏器线路、可植入的去纤颤器);神经/神经外科装置(例如,脑室腹膜分流术、脑室心房分流术、神经刺激设备、硬脑膜修补和植入以预防椎板切除术后硬脑膜纤维变性、用于持续蛛网膜下滴注的装置);胃肠装置(例如,慢性留置导管、进食管和分流管);眼科植入物(例如,多重植入物和其它用于新生血管性青光眼的植入物、翼状胬肉的药物洗脱隐形眼镜、用于故障dacryocystorhinostomy、角膜新血管形成的药物洗脱隐形眼镜、糖尿病性视网膜病的植入物、高危角膜移植的药物洗脱隐形眼镜);耳鼻喉装置(例如,小骨植入、咽鼓管夹板或用于粘合耳的支架或作为transtympanic排出的替代方法的慢性耳炎支架);整形外科手术移植(例如,预防在胸大肌下或乳腺下的方法或乳房切除

术后植入凝胶或含盐的乳房填充物或下颚植入后的纤维挛缩,) ,以及整形外科植入物(例如,胶合的整形外科修补物)。

[0246] 本文提供的反义化合物、拟肽或其它化合物在某些具体实施方式中可以以预定时间给药。在某些具体实施方式中,反义连接蛋白半通道表达、形成或活性在内皮细胞中被抑制。在某些具体实施方式中,可以治疗受治者包括中风的血管紊乱。在某些具体实施方式中,可以治疗受治者包括缺血在内的血管紊乱。该缺血可以是例如组织缺血、心肌缺血或脑缺血。在某些具体实施方式中,本文治疗的受治者具有缺血导致神经功能丧失的风险。在其它具体实施方式中,可以治疗受治者血管紊乱,包括治疗或缓解由缺血导致的中枢或周围神经系统中的细胞死亡或降解。在某些具体实施方式中,可以治疗受治者血管紊乱,其中给予本文提供的反义化合物、拟肽或其它化合物结合对患者进行的血管或冠脉操作。在其它具体实施方式中,本文提供的反义化合物、拟肽或其它化合物在所述血管或冠状操作过程中给予。

[0247] 本文提供的化合物的给予可以在选择的时间点之前或之后。该“选择的时间点”可以为,例如,对应于紊乱或病症的发作,例如心血管紊乱、炎症、血管紊乱或缺血事件,或进行医学操作例如血管或冠脉操作。本文提供的化合物(例如反义化合物、拟肽等),例如,可以在选择的时间点之前、同时或之后给予。在某些具体实施方式中,化合物在选择的时间点立即给予或直到约24小时之后给予。在其它具体实施方式中,化合物在选择的时间点之后约1小时内给予,在选择的时间点之后约2小时内给予,在选择的时间点之后约3小时内给予,在选择的时间点之后约4小时内给予,在选择的时间点之后约5小时内给予,在选择的时间点之后约6小时内给予,在选择的时间点之后约8小时内给予,在选择的时间点之后约10小时内给予,在选择的时间点之后约12小时内给予,在选择的时间点之后约14小时内给予,在选择的时间点之后约16小时内给予,在选择的时间点之后约20小时内给予,或在选择的时间点之后约24小时内给予。在某些具体实施方式中,本文中提供的化合物的给予与对患者实施的心脏或其它外科手术结合。“选择的时间点”在本文中是指,包括损伤的时间、进行操作的时间,例如,心脏或血管操作等等。在某些具体实施方式中,本文中提供的化合物的给予与进行血管手术的医学装置结合。

[0248] 在某些具体实施方式中,待治疗的血管紊乱选自一种或多种缺血性中风、短暂性脑缺血发作、颅内出血、蛛网膜下腔出血、血栓性中风、静脉血栓、肺部栓塞、栓塞性中风、脑血管紊乱、外周动脉闭塞性疾病、动静脉畸形(arteriovenous malformation)以及动脉瘤(aneurysm)。

[0249] 在某些具体实施方式中,待治疗的血管紊乱与一种或多种冠心病、冠状血管紊乱、动脉粥样硬化血管疾病、动脉粥样硬化斑块破裂、和/或血栓栓塞相关,血管紊乱与高血压、心肌梗塞、心绞痛、缺血性心脏病、大动脉紊乱、下肢外周动脉病症、纤维肌性发育不良、烟雾病(也称为脑底异常血管网病,moyamo disease)和血栓性脉管炎(thromboangiitis)。

[0250] 在某些具体实施方式中,待治疗的炎症紊乱(失调)选自一种或多种关节炎、风湿性关节炎(RA)、炎症、关节破坏或损伤、炎症紊乱、Grave's病、桥本病(hashimoto's disease)、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、干燥综合征、免疫性血小板减少性紫癜、多发性硬化症、重症肌无力、硬皮病、牛皮癣、肠炎、克隆氏病(crohn's diseases)、溃疡性结肠

炎、脓毒症 和脓毒性休克,以及消化系统的自身免疫性疾病。

[0251] 在某些其它具体实施方式中,治疗受治者、靶器官、靶组织或靶细胞 与凝血、血栓形成、纤维蛋白溶解、心血管疾病、糖尿病、影响心脏的内 分泌紊乱、与怀孕相关的心血管疾病、风湿热、与HIV感染相关的心血管 紊乱、与心脏疾病相关的血液学和肿瘤学紊乱、与心脏疾病相关的神经性 紊乱,以及与心脏疾病相关的肾脏紊乱中的一种或多种相关的病症。

[0252] 在某些其它具体实施方式中,治疗与移植或植入操作相关的受治者、靶器官、靶组织、靶细胞,该移植或植入操作与心力衰竭、先天性心脏病、儿童后天性心脏病、瓣膜心脏病、感染性心内膜炎、心肌失效症 (cardiomyopathy)、心脏肿瘤、心包性心脏病、外伤性心脏病、肺部栓 塞、肺部高血压、肺源性心脏病、运动性心脏综合征、外周动脉循环紊乱、影响器官系统的血管紊乱、影响中枢神经系统的血管紊乱、影响大脑的血 管紊乱、影响视网膜的血管紊乱、影响肾的血管紊乱、影响神经的血管紊 乱、微血管紊乱,以及大血管紊 乱。可以治疗与移植或植入操作(手术) 相关的受治者,该移植或植入操作选自心脏移植、肾移植、肝移植、肺移 植、胰腺移植、肠移植或联合器官移植中的一种或多种。可以治疗与移植 或植入操作相关的受治者,该移植或植入操作包括眼部组织、皮肤、心脏 瓣膜、骨头、肌腱、静脉、韧带、骨髓移植、牙齿或齿龈组织植入、与整 形手术相关的移植或植入、与髋部或关节替换操作有关的移植或植入,以 及涉及干细胞的组织移植或植入中的一种或多种。

[0253] 不受特定机制约束或限制,在某些具体实施方式中,通过给予能够结 合于或调控连接子(半通道)的抗-连接蛋白化合物以达到预期效果的目的来治疗治疗受治者、靶器官、靶组织、或靶细胞,预期的效果,包括例 如以下的一种或多种:用于预防缺血或外伤后脊髓中的水肿、用于预防缺 血或外伤后的组织中血管壁降解(例如在脑、视神经、脊髓和心脏中)、 用于治疗炎性关节炎和具有水肿和炎症症状的或由持续炎症导致发生血 管萎缩的其它炎性紊乱、用于治疗亚急性或慢性眼角膜损伤(其中预防血 管萎缩允许从角膜缘缺血恢复)、作为一种再生上皮形成的方法用于治疗 亚急性或慢性的眼角膜损伤、用于治疗眼部化学烧伤以触发上皮恢复并使 从亚急性角膜缘缺血恢复、用于治疗亚急性或慢性皮肤损伤或糖尿病性溃 疡,其中预防持续性血管萎缩使组织从缺血中恢复、用于治疗慢性皮肤损 伤或糖尿病性溃疡其中连接蛋白43在前缘持续表达抑制了再生上皮的形 成、用于使用连接蛋白拟肽直接输送到脑室或通过脊柱/脊髓输送治疗外周 缺血、用于使用连接蛋白拟肽直接输送到脑室或通过脊柱/脊髓输送抑制或 预防周围缺血后的水肿、全身系统给予连接蛋白拟肽治疗外周缺血、将连 接蛋白拟肽直接输送到脑室或通过脊柱/脊髓输送连接蛋白拟肽治疗中风 或中枢神经系统缺血、全身系统给予连接蛋白拟肽治疗中风或中枢神 经系 统缺血、用于预防缺血后脑的癫痫样电活动、用于预防脑的癫痫样电活动 (epileptiform activity) (例如癫痫)、用于预防缺血引起的脑癫痫样活动、用于使用连 接子拟肽或连接蛋白特异性反义多核苷酸预防组织水肿,和/ 或用于预防器官移植后损伤扩散、再灌注水肿(和排异反应)。

[0254] 另一方面,本发明的化合物的给药量能够调控连接蛋白、半通道或间 隙连接的表达、形成或活性。

[0255] 不受任何机制约束或限制并且没有任何限制,在某些具体实施方式 中,认为靶连 接蛋白半通道被定位于细胞的细胞质膜上,而且其被期望产 生抑制不期望的分子从所述

细胞的细胞质输送到胞外空间的效果。而且,不被任何特定的机制限制,在某些具体实施方式中,给予本文提供的能够 通过维持血管上皮细胞完整性,抑制或预防心脏中进行性梗死和再灌注损伤,用增强细胞存活和/或组织修复的有效量以促进血液对损伤组织的再灌注,通过抑制由中风或中枢神经系统损伤后的上皮细胞破裂来维持血脑屏障,用于维持组织损伤后的血管完整性,或抑制或预防与移植或植入过程 相关的组织水肿。

[0256] 药物组合物

[0257] 另一方面,本发明包括含有本发明的化合物,包括反义化合物和拟肽的 药物组合物。

[0258] 本文提供的反义化合物还可以包括生物等价化合物,包括药学上可接 受的盐和药物前体。其包括任何药学上可接受的盐、酯、或这些酯的盐、或任何其它的一旦给予包括人类的动物该化合物就能够提供(直接或间 接)其生物活性代谢产物或残基。例如,肽能够被改造以增强其在体内的 稳定性。例如可以加入合成侧链,其相互连接形成了肽形成环。该环化也 可以通过将N-末端和C-末端连接在一起形成药物前体,其在进入身体之 后被蛋白酶作用变成线状。因此,例如,披露的内容也涉及药学上可接受 的核酸的盐和该酸的 药物前体。“药学上可接受的盐”是生理学和药学上 可接受的本文提供的核酸的盐:即,保留需要的亲代化合物生物活性并不 另外引入不期望的毒理学效果的盐(参见,例如,Berge et al.,J.of Pharma Sci.66,1-19(1977))。

[0259] 肽或其变体可以在体外合成,例如,通过固相肽合成方法或酶催化的 肽合成或借助于DNA重组技术合成。固相肽合成方法是一种已确定的和 广泛使用的方法,描述在以下的参考文献中: Stewart et al.,Solid Phase Peptide Synthesis,W.H.Freeman Co., San Francisco(1969); Merrifield,J.Am.Chem.Soc.852149(1963); Meienhofer in" Hormonal Proteins and Peptides,"ed.;C.H.Li,Vol.2(Academic Press,1973),pp.48-267;and Bavaay and Merrifield,"The Peptides,"eds.E.Gross and F. Meienhofer, Vol.2(Academic Press,1980) pp.3-285。这些肽可以进一步纯化,通过分馏或免疫亲和性或离子交换柱、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅 层析或诸如DEAE的阴离子交换树脂层析、色谱聚焦、SDS-PAGE、硫酸 铵沉淀、凝胶过滤,例如使用Sephadex G-75、配体亲和层析、或从非极 性溶剂或非极性/极性溶剂混合物中结晶或沉淀。优选通过结晶或沉淀纯 化。

[0260] 作为可选的成分,本发明的药物制剂可以包括,药学上可接受的载体、稀释剂、增溶或乳化剂以及本领域中能够得到的该类的盐。这些物质的实 例包括诸如生理学上缓冲盐溶液和水的正常盐溶液。在本发明的药物制剂 中有用的特异性非限制性载体和/或稀释剂的实例包括水和生理学上可接 受的缓冲盐溶液,例如pH 7.0-8.0的磷酸盐缓冲盐溶液。合适的药物载体 包括但不限于无菌水、盐溶液(例如Ringer' s溶液)、酒精、聚乙二醇、明胶、如乳糖、直链淀粉或淀粉之类的碳水化合物、硬脂酸镁、滑石、硅 酸、粘性石蜡、脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮等。药物制 剂可以为已灭菌的并且与期望的辅助试剂混合,例如,润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲液、着色剂和/或芳香族 物质以及对该活性化合物没有不良反应的物质。其也可以在需要时与其它 活性物质联合应用,例如酶抑制剂,以降低代谢降解作用。

[0261] 本发明的肽或肽变体的羧基盐可以通过将该肽与一种或多种期望碱 基的等价物例如金属氢氧化物碱,例如氢氧化钠;金属碳酸盐或碳酸氢盐, 例如碳酸钠或碳酸氢钠;或

胺碱,例如三乙胺、三乙醇胺等等接触,以常规的方式制备。

[0262] 肽或肽的变体氨基基团的N-酰基衍生物可以通过使用N-酰基保护的氨基酸进行最终缩合,或通过酰基化保护的或未保护的肽来制备。O-酰基衍生物可以通过,例如,游离羧基肽或肽树脂(peptide resin)的酰化来制备。使用标准的酰化试剂例如酰基卤、酐、酰基咪唑等等都可以实现酰化。如果需要,N-酰化和O-酰化可以一起进行。

[0263] 肽或肽的变体或肽或肽变体的氨基酸残基的酸加成盐可以通过将肽或胺与一种或多种期望的无机或有机酸例如盐酸的等价物接触来制备。肽的羧酸酯也可以通过任何本领域已知的常用方法来制备。

[0264] 对于寡核苷酸,药学上可接受的盐的实例包括但不限于(a)与阳离子例如钠、钾、铵、镁、钙,多胺例如精胺和亚精胺等形成的盐;(b)与无机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、柠檬酸等形成的酸加成盐;(c)与有机酸例如乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、葡糖酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、苯甲酸、鞣酸、棕榈酸、海藻酸、聚谷氨酸、萘磺酸、甲磺酸、p-苯甲磺酸、萘二磺酸、多聚半乳糖醛酸等形成的盐;(d)与基本阴离子例如氯、溴和碘形成的盐。

[0265] 本文提供的寡核苷酸可以另外或可替换地制备成“药物前体”的形式递送。术语“药物前体”是指一种治疗试剂,其可以制备成无活性的形式,该无活性形式在机体内或其细胞内通过内源酶或其它化学品和/或条件下可被转化为活性形式(即药物)。尤其,根据WO 93/24510 Gosselin et al.,published December 9,1993中公开的方法,寡核苷酸药物前体模型可以通过SATE[(S-乙酰-2-硫代乙基)磷酸]衍生物制备。

[0266] 本文提供的化合物可以按配方制成药物组合物,除了寡核苷酸,其可以包括药学上可接受的载体、增稠剂、稀释液、缓冲液、防腐剂、表面活性剂、中性或阳离子脂质、脂质复合物、脂质体、渗透增强剂、载体化合物和其它药学上可接受的载体或赋形剂等。

[0267] 药物组合物也可以包括一种或多种活性成分,例如干扰素、抗菌剂、抗炎剂、麻醉剂等等。不经肠的给药制剂可以包括无菌水溶液,其也含有缓冲液、脂质体、稀释剂和其它合适的添加剂。包括本文提供的寡核苷酸的药物组合物可以包括为了增强寡核苷酸营养输送的渗透增强剂。渗透增强剂可以分为五大类,即,脂肪酸、胆盐、螯合剂、表面活性剂和非表面活性剂(Lee et al.,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 8,91-192(1991);Muranishi,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 7,1-33(1990))。可以包括来自一种或多种这几大类中的一种或多种渗透增强剂。

[0268] 起渗透增强剂作用的多种脂肪酸及其衍生物包括油酸、月桂酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、甘油单油酸酯(1-单油酰-外消旋-甘油)、甘油桂酸酯、辛酸、花生四烯酸、甘油1-单癸酸酯、1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮、酰基肉毒碱、酰基胆碱、单-或二甘油酯及其生理上可接受的盐(即,油酸盐、月桂酸盐、肉豆蔻酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、亚油酸盐,等等)。Lee et al.,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems page 92(1991);Muranishi,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 7,1(1990);El-Hariri et al.,J.Pharm.Pharmacol.44,651-654(1992))。

[0269] 胆汁的生理学功能包括促进脂质和脂溶性维生素分散和吸收(Brunton,Chapter 38In:Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,9th Ed.,

Hardman et al. McGraw-Hill, New York, N.Y., pages 934-935 (1996))。各种天然的胆盐及其合成衍生物起到渗透增强剂的作用。因此,术语“胆盐”包括任何天然的胆汁成分以及其合成衍生物。

[0270] 可以使用含有一种或多种渗透增强剂的复合制剂。例如,胆盐可以与脂肪酸联合使用以形成复合制剂。螯合试剂包括但不限于乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸、水杨酸酯或酯(例如,水杨酸钠、5-甲氧基水杨酸酯和homovanilate)、胶原的N-酰基衍生物、 β -二酮(烯胺)的聚乙二醇月桂基醚-9和N-氨基酰基衍生物 [Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems page 92 (1991); Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 7, 1-33 (1990); Buur et al., J. Control Rel. 14, 43-51 (1990))。螯合试剂具有作为DNA酶抑制剂的额外优势。

[0271] 表面活性剂包括例如十二烷基硫酸钠、聚氧乙烯-9-月桂酰醚和聚氧乙 烯-20-十六烷基醚 (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems page 92 (1991)); 和全氟化碳乳剂例如FC-43 (Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol. 40, 252-257 (1988))。非表面活性剂包括,例如不饱和环状尿素,1-烷基-和1-烯基氮杂环丙烷-链烷酮衍生物 (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems page 92 (1991)); 并且非甾族的抗炎剂例如双氯酚酸钠、萘甲新以及苯基丁氮酮 (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol. 39, 621-626 (1987))。

[0272] 本文使用的“载体化合物”包括核酸或其类似物,其本身是惰性的(即本身没有生物学活性),但其在体内过程中被认为降低具有生物学活性的核酸的生物利用度,例如,降解生物学活性核酸或促进其从循环中排出。核酸和载体化合物共同给药,通常是后者过剩,能够导致肝脏、肾脏或其它循环系统外库(extracirculatory reservoirs)中核酸恢复量的显著降低,推测是由于载体化合物和核酸之间竞争共同受体的原因。与载体化合物相比,“药学上可接受的载体”(赋形剂)是药学上可接受的溶剂、悬浮剂或任何其它的用于将一种或多种核酸输送给动物的惰性载体。药学上可接受的载体可以是液体或固体,并在与一定药物组合物的核酸和其它组分联合使用时选择以有计划的方式给药以提供需要的量、连贯性等等。典型的药学上可接受的载体包括但不限于粘结剂(例如预胶化的玉米淀粉、聚乙烯 基吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等)、填料(例如乳糖和其它糖、微晶体纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯或磷酸氢钙等)、润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石、硅石、胶体的二氧化硅、硬脂酸、金属硬脂酸盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙烯乙二醇、苯甲酸钠、醋酸钠等)、崩解剂(例如淀粉、淀粉乙醇酸钠(sodium starch glycolate)等)、或润湿剂(例如,月桂酰硫酸钠)。

[0273] 本文提供的组合物还可以包含在药物组合物中常规存在的其它添加剂组分,以该领域中固定的使用水平使用。因此,例如,该组合物可以包含另外的适合的药学活性材料例如止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或可以包含对物理上形成本发明的组合物各种不同剂型有用的其它材料,例如染料、芳香剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。然而,当添加这些材料时,不应不适当地干扰本文提供的组合物中的组分的生物活性。

[0274] 不管化合物(例如,寡核苷酸、拟肽等)引入患者体内的方法,胶态分散体系可以被用作输送载体以增强寡核苷酸在体内的稳定性和/或将寡核苷酸靶向特定的器官、组织

或细胞种类。胶态分散体系包括但不限于高分子复合物、纳米胶囊、微球、微珠和脂基体系包括水包油乳液、胶束、混合胶束、脂质体和脂质：无特征结构的寡核苷酸复合物。优选的胶态分散体系是大量的脂质体。脂质体是具有由一种或多种脂质形成的外层围绕的水相核心的显微球，该外层排列成双层结构（参见，通常，Chonn et al., *Current Op. Biotech.* 6, 698-708 (1995)）。

[0275] 在某些具体实施方式中，反义化合物和拟肽可以引入生物分布引导基团或与生物分布引导基团结合使用，生物分布引导基团包括一种或多种聚合物，以引导本发明提供的反义化合物、拟肽或其它化合物到期望的靶的附近或允许其持续的释放。活性试剂包括，例如用于增强治疗效果、用于优化生物分布和生物利用度、用于减少组织损伤、用于促进愈合或用于增加病人舒适度的化合物；典型的活性试剂包括血管活性剂、麻醉剂、用于缺血治疗的试剂、生长因子和细胞因子。可替换地，本文提供的组合物可以使用微粒或纳米粒聚合珠剂型。本文提供的化合物可以与活性试剂联合使用并且与那里的一些配体或抗配体 (anti-ligand) 分子密封入微粒剂型。

[0276] 在该方法中，本文提供的拟肽、反义化合物和其它化合物单独或与其它活性试剂联合使用，在某位点持续释放一段时间，以提供持续的治疗效果。考虑到本发明实践中使用的其它活性试剂，例如生长因子、细胞因子等缓释剂型也是有用的。从本发明的微粒剂型中释放活性试剂可以是由扩散和微粒基质被蚀解造成的。生物降解率直接影响活性试剂的释放动力学。

[0277] 在某些具体实施方式中，本发明的拟肽组合物、反义化合物和化合物的可控释放的不经肠的制剂可以被制成植入、油性注射 (oily injection) 或微粒体系。微粒体系包括微球、微粒、微囊、纳米微囊、纳米珠或纳米微粒。微囊含有作为中心核的治疗用蛋白。在微珠中，治疗试剂被分散于整个粒子中。脂质体可以被用于控制释放以及包被药物 (entrapped drug) 的药物靶向作用。

[0278] 反义多核苷酸可以实质上以独立的形式存在。可以理解该产物可以与不会干扰产物预期目的的载体或稀释剂混合，并仍被认为实质上是独立的。产物也可以是基本上纯化的形式存在，在该情况下，其通常含有90%，例如至少约95%、98%或99%的多核苷酸或制剂干重。

[0279] 在某些具体实施方式中，本发明的药物组合物，包括反义化合物或拟肽，可以通过局部、鼻腔、口服、胃肠、支气管内、膀胱内、阴道内给药至子宫、皮下、肌肉内、关节周围、关节内部；脑脊液 (ICSF)；脑组织（例如，颅内给药）；脊髓；创伤处、腹膜内、胸膜内或全身系统给药，例如静脉内给药、动脉内给药、门脉内 (intrapotally) 给药或直接器官给药，例如心脏。静脉给药试剂比通过其它途径给药的试剂更快地被生物利用，因此，通常静脉给药试剂毒性更强。可替换地，本发明的反义化合物、拟肽和其它化合物的动脉内给药可以应用于供应到动脉能够达到的器官或组织中存在的疾病靶点。动脉递送的应用包括，例如通过肝动脉给药治疗与肝脏相关的病症，通过颈动脉给药治疗与大脑相关的病症，通过支气管动脉给药治疗与肺有关的病症，通过肾动脉给药治疗与肾脏有关的病症。因此，例如，在某些具体实施方式中，该化合物为用于系统给药的肽/多肽（例如拟肽），并且在其它具体实施方式中，该化合物用于直接递送（例如至脑室或脊髓中）的肽/多肽（例如拟肽）。

[0280] 例如，授予Hammond的美国专利第6,752,987号和美国公开的申请第 20030148968

号,以引用的方式结合与此,其描述了用于心脏病的体内输送,其可以通过将药物组合物注射入血管或其它导管中,直接供给心肌或组织。优选地,该注射可以通过给予冠状动脉或其它组织特异性动脉中的一个或二个进行(或通过弹丸式注射(又称为团注法)到外周组织中)。以说明的方式,为了递送到心肌,该注射液优选通过以下方式达到:通过导管充分地(通常至少约1cm)引入冠状动脉或者一个或多个隐静脉或者乳内动脉桥或者其它输送血液到达心肌的导管中的一种或两种的腔内。优选在左侧冠状动脉和在右侧冠状动脉进行注射以提供心脏的所有区域整体的分布。根据本发明,为了进一步扩大拟肽或拟肽与活性试剂联合的局部转运以增强转运效率,可以注入血管活性试剂,优选将组胺或组胺激动剂或血管内皮生长因子(VEGF)蛋白或一氧化氮供体(例如硝普钠)注入到待治疗的组织中,可以与拟肽或活性物质联合的拟肽同时,或者优选地在此之前几分钟给予。

[0281] 一方面,脊髓给药方法包括但不限于本领域中已知的脊髓注射技术。脊髓内注射或给药的一般方法包括,例如硬膜外注射(包括骶管阻滞、经腰和经椎间孔注射)、脊柱小面关节注射(包括关节间和神经阻滞注射)、硬件注射(hardware injection)、骶髂关节注射以及差异下肢注射(lower extremity injection)。对于大多数脊髓注射,局部麻醉(麻木给药)例如利多卡因(lidocaine)(或赛罗卡因(Xylocaine))或布比卡因(Bupivacaine)(麻卡因(Marcaine))共同注射到脊柱的特定区域内。

[0282] 某些方面,反义化合物或拟肽可以单独给药或与用于通常治疗中风和缺血的试剂联合给药。中风和缺血包括例如1)缺血性中风,其是通过移除阻塞物并恢复到脑的血流治疗的缺血,以及2)出血性中风,其是通过引入阻塞物以防止动脉瘤和动静脉畸形的破裂和出血。一方面,缺血性中风的治疗包括使用凝块融解剂(clot-busters),例如tPA。通常,tPA在症状发作后的三小时时间内给药。另一方面,治疗可以包括使用抗凝血剂/抗血小板剂的预防性方法。抗血小板剂例如阿司匹林和抗凝血剂例如华法林(warfarin)来干扰血液结块的能力并且可以被用来预防中风的发生。一方面,缺血性中风的治疗可以包括颈动脉内膜切除术(Carotid Endarterectomy),其是将血管阻滞从颈动脉中手术移除的外科操作。另一方面,缺血性中风的治疗可以包括血管成形术/支架,其包括使用球囊成型术(ballon angioplasty)和可植入的称为支架的钢筛治疗心血管疾病,其中机械装置用于补救脂肪积聚阻塞的血管。对于出血性中风,经常推荐外科治疗,可在动脉瘤的基部(base),即所谓的颈,安置一个金属夹,也可去除包括动静脉型血管畸形(AVM)的不正常血管。一个这样的例子是血管腔内的操作,例如线圈,其创伤小而且包括使用导管引入腿和手臂中的大动脉,引导到沉积机械物质(mechanical agent)例如线圈(coli)的动脉瘤或AVM处,以预防破裂。

[0283] 某些方面,反义化合物或拟肽可以与中风和缺血外科治疗结合来给药。用于治疗中风的外科干预包括但不限于用于治疗中风的常规外科方式,其可以用于在脑内和外周预防中风、治疗急性中风或修复血管损伤或畸形(例如,AVM)。它们包括,例如当颈动脉被阻塞时将动脉粥样硬化斑块从颈动脉中移除的颈动脉内膜切除术;以及颅外/颅内(EC/IC)搭桥手术,其是通过将头皮中的健康动脉改道到被堵塞动脉影响的脑组织区域从而恢复大脑组织中缺乏血液区域的血流。

[0284] 另一方面,治疗中风或缺血的外科方式包括,例如,夹闭技术(clipping),其在治疗导致蛛网膜下出血的脑动脉瘤中是有用的。夹闭包括将动脉瘤从血管夹闭以减少爆裂

或出血的机会。另一方面,外科方法可以包括用于治疗高危颅内动脉瘤的“可脱性线圈技术”。该技术通常包括 将一个小的铂线圈通过动脉插入大腿并穿过动脉到达动脉瘤的位置。然后 该线圈被释放到动脉瘤内,在该处线圈引起全身的免疫反应。机体在动脉 瘤内部产生血块,加强血管壁,并降低破裂的风险。一旦动脉瘤被稳定下 来,神经外科医生就可以夹闭动脉瘤同时减少病人出血和死亡的风险。还可以考虑中风的外科治疗包括最近发展的技术,例如用于AVM和动脉瘤 的立体定向显微外科手术(Stereotactic Microsurgery)。其使用先进的计算 机技术和几何原理以准确定位AVM的精确位置。在手术过程中,定做的合适框架被附着到病人的头部并通过CT或MRI建立三维参照点。该技术 使神经外科医生能够在一毫米或两毫米内定位AVM,使它们能够用显微 镜放大方法和精细的设备开展手术,而不影响正常的脑组织。其它方法包 括,例如用于AVM的立体定向放射外科手术,由于立体定向放射外科手 术准确定位AVM的精确位置,其使用相同的基础技术而具有最小的创伤,相对低的危险。一旦定位,AVM是通过聚焦放射线引起其结块然后消失 而去除的。由于该技术的精确,通常不会影响到正常的脑组织。其它方法 包括,例如,降温方法,其运用降温(冷却身体)在大的和复杂的动脉瘤 手术或难以处理的AVM外科手术治疗过程中预防中风。大脑温度的降低 使外科医生有必要的时间进行手术,使手术诱发中风的风险最低。称为心肺旁路机的专门设备有时被用于当机体处于深度低温时,从大脑中完全分 流血流。其它的方法包括,例如血管重建,其是用于治疗动脉瘤或堵塞的 脑动脉的外科技术。该技术通过将另一段血管移植到脑动脉或向大脑提供 一种新的血流来源而从本质上提供了一种新的血流通道。

[0285] 在某些具体实施方式中,可以单独使用反义化合物或拟肽或与其它活 性试剂,例如对增强药效、减少组织损伤、促进愈合或增加患者舒适度有 用的化合物结合使用进行靶向给药。美国公开专利申请第20040259768号 描述了用于靶向释放的方法和试剂,其内容以引用的方式结合于此。

[0286] 正如本领域中已知的,多种导管和运送途径可以用于输送到冠状动脉 内。例如,适于在本发明中使用的多种通用导管和改进的导管都可以商业 得到,例如Advanced Cardiovascular Systemms (ACS)、Target Therapeutics and Cordis。而且,通过直接注入冠状动脉(现在最 优选的)而达到向心肌递送,正如本领域中已知的,可以使用多种方法将 导管引入冠脉。以说明的方式,导管可以方便地引入股动脉并逆行穿过髂 动脉和腹主动脉并进入冠状动脉。可替换地,导管可以首先被引入上臂动 脉或颈动脉并逆向穿过冠状动脉。这些和其它技术的详细描述可以在本领 域中找到。(参见,例如,Topol,E J (ed.), The Textbook of Interventional Cardiology,2nd Ed. (W.B.Saunders Co.1994); Rutherford,R B,Vascular Surgery,3rd Ed. (W.B.Saunders Co.1989); Wyngaarden J B et al. (eds.),The Cecil Textbook of Medicine,19th Ed. (W.B.Saunders,1992); and Sabiston,D, The Textbook of Surgery,14th Ed. (W.B.Saunders Co.1991))。

[0287] 本文提供的化合物可以肠胃外给药。有时优选某些化合物与药学上可 接受的载体或稀释剂结合产生药物组合物。合适的载体或稀释剂包括等渗 盐溶液,例如磷酸盐缓冲液。该组合物可以配制成用于通过肠胃外、肌肉 内、大脑内、静脉内、皮下或经皮肤给药。通过多种已知的转染技术可以 增强哺乳动物细胞对核酸的摄取,例如,使用转染试剂。给药的制剂可能 包括这些试剂。这些试剂的实例包括阳离子试剂(例如磷酸钙和DEAE- 葡聚

糖)和脂质体(lipofectant)(例如lipofectamTM和transfectamTM)。

[0288] 局部给药剂型可以包括透皮贴剂、软膏、洗剂、乳剂、凝胶、滴液、栓剂、喷雾剂、液体和粉剂。常规的药物载体、含水的、粉末或油性成分(oily bases)、增稠剂等也是有用的。也可用涂覆的手套、避孕套等等。口服给药的组合物包括粉剂或颗粒剂、栓剂或水溶液或非水媒介的胶囊、带装剂或片剂。增稠剂、芳香剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂(dispersing aids)或粘合剂可以是理想的。肠胃外给药组合物可以包括可含有缓冲液、稀释剂以及其它合适的添加剂的无菌水溶液。在某些情况下,将寡核苷酸与其它传统治疗方法结合以增加治疗方案的效果会更有效地治疗病人。正如本文中使用的,术语“治疗方案”是指包括治疗的、缓和的和预防的方法。

[0289] 剂量依赖于多个因素,包括治疗的疾病状态的严重程度和响应度,治疗过程持续几天到几个月或直到治疗起效或直到疾病状态减轻。本文中提供的化合物的毒性和治疗效果可以通过细胞培养或实验动物的标准化药理学方法确定。例如,确定LD50(半数致死剂量)和ED50(半数有效量)。毒性和治疗效果的剂量比为治疗指数,其可以用LD50/ED50比表示。优选具有大治疗指数的化合物。虽然可以使用具有毒副作用的化合物,但需要注意设计一种转运系统,其将该化合物靶向受疾病侵袭的组织位点上,使对未受疾病侵袭的细胞的潜在损伤最小,因此减少副作用。

[0290] 从细胞培养试验和动物研究中获得的数据可以用于确定人使用的剂量范围。该化合物的剂量优选在循环浓度包括ED50而很少或没有毒性的范围内。剂量可以根据使用的剂型和采用的给药途径而在这个范围内变化。对于本发明的方法中使用的任何化合物,治疗有效剂量最初可以从细胞培养实验推测。在动物模型中确定剂量,以达到包括IC50(即,检测化合物的浓度达到最大程度地抑制症状的一半)的循环血浆浓度范围,如在细胞培养中确定的。这些信息可以用于更加精确地确定人类的有效量。可以测定血浆水平,例如,通过高效液相色谱。给药时间可以从对患者体内药物积累的测定来计算。剂量可以根据各种化合物,包括拟肽或寡核苷酸的相对效价变化,剂量通常可以基于在体外和动物模型体内发现的有效的EC50推测。

[0291] 合适的剂量可以例如根据给药途径在约0.1 μ g到总量约1克内变化。对于特定剂量和输送方法的指导说明提供在文献中并且通常可从本领域的从业人员获知。本领域的技术人员会使用与蛋白质或其抑制剂不同的剂型。相似地,本文提供的多核苷酸、多肽和化合物的转运对特定的细胞、病症和位置是特异的。通常,剂量为0.01mg/kg体重至100mg/kg体重,并且可以每日、每周、每月、或每年给药一次或多次,或者甚至每2至20年给药一次。在某些具体实施方式中,该剂量可以从术后立即给药至术后24小时给药,在另一具体实施方式中,该剂量可以在2小时至24小时给药。长效组合物依据特定制剂的半衰期和清除率可以为每3至4天、每周或双周给药。本领域的普通技术人员基于测定的体液或组织中药物的停留时间和浓度可以容易地估计给药的重复率。成功地治疗之后,需要让患者接受维持治疗以预防疾病状态的复发,其中给予维持剂量的拟肽,在0.01mg/kg体重至100mg/kg体重的范围内,每日一次或多次到每20年一次。在需要合适剂量水平连接蛋白调控的病症的治疗和预防中,通常为患 者每日0.001mg/kg体重至100mg/kg体重,其可以单次或多次给药。合适的剂量水平可以为每日约1至约40mg/kg。在某些具体实施方式中,本文提供的化合物,包括特异性反义化合物或拟肽,给药量在体内的浓度达到约1微摩尔至约1

毫摩尔,约10微摩尔至约500微摩尔,或约30微摩尔 至约300微摩尔,以及约25微摩尔至约300微摩尔在病变处的终浓度, 以及包括约25微摩尔、或约160微摩尔、或约300微摩尔在病变处的终 浓度,以及更加典型的在约1微摩尔至约10微摩尔之间。

[0292] 另一方面,给予肽抑制剂和拟肽可以达到约0.1mg/ml至约1mg/ml, 约10mg/ml至约500mg/ml,约100mg/ml至约500mg/ml,约250mg/ml 或约300mg/ml病变处的终浓度。

[0293] 采用的抗-连接蛋白化合物(例如,拟肽分子)有多个不同的浓度, 优选在 1×10^{-10} M至 1×10^{-4} M之间。一旦确定了可以足够调控连接蛋白(包 括控制基因表达)的最小浓度,最优化的量被转化为在体内合适的剂量。因此,抗-连接蛋白化合物可以给药,以在受 治者(例如哺乳动物)体内 特定的细胞、组织或器官内达到期望的浓度。例如,在某些具体 实施方式 中,拟肽或其它基于肽的抗-连接蛋白化合物给药(例如,全身性、口服 或肠胃 外,例如IV等)以达到在体内最终的肽浓度为约0.1微摩尔 (1×10^{-7} M)、约1微摩尔(1×10^{-6} M)、约2微摩尔(2×10^{-6} M)、约3微 摩尔(3×10^{-6} M)、约5微摩尔(5×10^{-6} M)、约10微摩尔(1×10^{-5} M)、约50微摩尔(5×10^{-5} M)、约250微摩尔(2.5×10^{-4} M)、约500微摩尔 (5×10^{-4} M)、约1毫摩尔(1×10^{-3} M),以及约5毫摩尔(5×10^{-3} M)或 更大。某些拟肽希望其体内浓度 在约1至10微摩尔(1×10^{-6} M至 1×10^{-5} M) 之间,包括约5微摩尔(5×10^{-6} M)。另一方面,基 于肽的抗-连接蛋白化 合物直接组织(例如哺乳动物脑室)给药,给药量为约0.1微摩尔/ kg、1 微摩尔/kg、10微摩尔/kg、50微摩尔/kg、250微摩尔/kg、500微摩尔/kg、1000微摩尔/ kg、5000微摩尔/kg。例如,对于某些化合物,培养基中 1×10^{-7} M的抑制浓度转化为约 0.6mg/kg体重的剂量。在测试实验室动物体内化 合物的毒性之后,抗-连接蛋白化合物(例 如反义化合物或拟肽分子)的 水平可能接近100mg/kg体重或更高。也可以考虑将脊椎动物 细胞取出,用拟肽治疗处理,并再导入到脊椎动物中。

[0294] 本文中描述的化合物可以用于诊断、治疗、预防以及作为研究试剂装 入试剂盒 中。由于本发明的寡核苷酸与编码连接蛋白的核酸杂交,可以容 易地构建夹芯、热量测试 法以及其它试验来发现这个事实。用于检测寡核 苷酸与连接蛋白基因或mRNA杂交的方法 的准备工作可以常规地完成。这些准备工作可以包括酶的结合、放射性标记或任何其它合 适的检测系 统。还可以制备用于检测连接蛋白存在或不存在的试剂盒。

[0295] 为了研究的目的,也可以使用本发明的化合物。因此,寡核苷酸表现 出的特异性 杂交可以用于测定、纯化制备的细胞产物及其它能够被本领域 的普通技术人员所认可的 方法中。

[0296] 以下的实验部分将描述本发明的不同方面,提供实验部分仅作为说 明,而并不构 成对本发明范围的限制。

[0297] 下列实施例用于说明而不是限制的目的。

[0298] 实施例1:中枢神经系统

[0299] 中枢神经系统的损伤可以说是毁灭性的,在病人护理上会给社会造成 巨大的长 期的代价。严重损伤的神经组织中发生的病理变化具有共同的特 征。在损伤后的24至48小 时内,该损伤明显扩散,使受影响区域的尺寸 增加。该扩散通过间隙连接介导的旁观效应 蔓延,通过间隙连接通道从损 伤部位向其它的健康组织扩散神经毒素和钙波(calcium wave)。Lin,J.H.et al. Nature Neurosci.1:431-432(1998)。然而,这还伴有24至48 小时 后导致胞外空间闭合以及细胞死亡的炎性肿胀。例如在胎儿大脑损伤 中的肿胀可以作

为估量毒性水肿的皮质电阻抗变化来追踪。Reddy,K.,et al.,Pediatric Research43: 674-682 (1998)。该新的损伤并不是原始损伤的直接结果而是继发的结果,其发生在损伤后的6和48小时之间,但 也可能早在2小时,这提供了预防损伤扩散治疗机会的时间窗。

[0300] 图1A和图1B示出了即使脊髓从动物离体时,发生水肿和肿胀(图 1A)。在两种情况下,水肿可以通过利用阻止连接蛋白质连接蛋白43翻译 的反义寡脱氧核苷酸(ODN)而被抑制。在离体的脊索横断面中,在治疗 和对照之间评估的肿胀体积是明显不同的(通过测量从顶部观察的肿胀的 面积评估的 $p=0.001$)。

[0301] 在CNS损伤后观察到肿胀并且利用连接蛋白特异性反义ODN阻断肿 胀,表明间隙连接半通道正在被表达并在病理状态下开放导致了细胞质和 胞外空间之间直接的通路。神经元接着死亡。在损伤后24小时进行细胞 检测显示空泡形成和由胞外液摄取引起的膜向内起泡(图2)。正如在图 3A对彩色照图的说明中描绘的,连接蛋白43的免疫组织化学标记物利用 结合于细胞外环的抗体(连接蛋白剖析图的左上部宽带且标记Gap7M) 和结合于蛋白质的细胞质羧基尾的抗体(连接蛋白剖析图右下部宽带和标 记GAP1A)。细胞质抗体标记所有的Connexin 43蛋白,并与红色荧光标 记的第二抗体结合使用。Gap7M抗体仅能标记半通道暴露的胞外环并与 绿色荧光标记的第二抗体结合使用。Gap7M由于空间的阻碍不能 结合到 形成细胞间完整通道的对接连接子,而且仅有以半通道存在的连接子可用 两种抗体标记(因此当红色和绿色第二抗体共定位在一处时会显示黄色)。图3B:如在图中对彩色 照片的说明中描绘的,该图表示将图3A中描述的 用两种抗体双重标记应用到挤压损伤后 24小时的脊髓横断面。该图像中 有小亮点是被标记的连接蛋白和大的浅色亮点是用DAPI 标记的细胞核。很大一部分连接蛋白标记显示复合的图像,即黄色表明该两种抗体 (Gap7M和GAP1A)被共同定位。这意味着连接蛋白胞外环是暴露的并 且存在的大多数连接子未与相邻细胞的连接子对接,仍然是半通道。图3C: 正如在图中对彩色照片的说明中描述的,该图像示出了将图3A中描述的 用两种连接蛋白抗体双重标记应用于挤压损伤后24 小时的脊髓。在这种情况下,连接蛋白43特异的反义ODN用于抑制蛋白质的翻译。半通道将会以 亮点的形式出现(绿色荧光标记的Gap7M和红色荧光标记的GAP1A 被共定位在一处,因此在彩色图像中显示黄色)。更大、更亮的点是用DAPI 标记的细胞核。在经过这样处理的脊髓中,很少有连接蛋白被标记,而且 很少有半通道被看见。

[0302] 另外,结合并标记连接蛋白胞外环的间隙连接抗体(Gap7M抗体-图 3A)显示在大鼠脊髓损伤后24小时(图3B)标记大量的蛋白质水平。这 些抗体仅结合于半通道的一部分,半通道一旦锚固,在膜内通道的这部分 可相互作用形成多体(multimer)。这些资料表明许多在CNS损伤后早期 见到的多数连接蛋白43上调仍然为半通道的形式。

[0303] 连接蛋白的表达和半通道的形成是通过在受伤时使用应用了连接蛋 白43特异性反义ODN的Pluronic F-127(泊洛沙姆(poloxamer))凝胶 而被阻断的(图3C)。

[0304] 该处理表明在外植体模型中ODN处理在应用后6-8小时对蛋白质水 平具有最大的影响(降低最多),在2小时内明显降低并且大约24小时后 蛋白质水平恢复(参见Qiu et al,2003;Becker et al,1999)。在大脑中,类似地,组织切片被置于培养孔中,但肿胀可以被抑制半通道形成(C绿色-数据 未显示)的连接蛋白43特异性反义ODN阻断。

[0305] 在损伤后,连接蛋白水平的上调导致引起细胞水肿和死亡的半通道形 成。然而,这不受神经种群的限制。在离体的脊髓横断面中,甚至在经反 义处理的组织中培养5天后,

异凝集素B4(Isolectin B4)标记(与血管的小神经胶质细胞和内皮细胞表面上的碳水化合物结合)显示出了毛细血管的轮廓(图5A和图5B)。在对照横断面中,两天后很少有毛细血管仍然存在(在5天后主要的异凝集素B4标记为活化的巨噬细胞表型的(泡沫)神经胶质细胞)。在经连接蛋白43反义处理的大脑切片中,毛细血管甚至在培养基中两周后仍然完整;而在对照切片中没有完整的毛细血管(数据未示出)。

[0306] 在大鼠体内脊髓损伤之后,用连接蛋白特异性反义ODN处理大鼠,并在24小时后将荧光化的牛血清白蛋白(FITC标记的BSA)注射入大鼠尾静脉中。对照动物表现出染料从血管系统大量渗漏到周围组织中,甚至损伤部位喙侧的5mm处(图5A)。形成强烈的对比,反义化合物处理的动物显示很少的染料渗漏的迹象,染料被限制在毛细血管床中(图5B)。表达连接蛋白43的毛细血管内皮细胞也形成半通道并且被破坏。重要的是,本文提供的连接蛋白43特异反义ODN处理抑制了血脑屏障的破坏、血管系统的破坏(这对再灌注和恢复是必要的)以及损伤的蔓延。结果表明,毛细血管/血管系统的破坏并不限于中枢神经系统,其具有更加广泛的应用,例如用于治疗血管病症,连接蛋白的调控对其是有益的。正如在图5A对彩色照片的说明中描述的,该图显示了缺血梗死后24小时羊心室壁的重标记。包含这个图像的四幅是来自远离梗死区域的组织。该组织用与血管内皮细胞结合的异凝集素B4(左上图)标记,并用与Gap7M(右上图)结合的抗体标记,以及用与连接蛋白43(左下图)结合的抗体标记。Gap7M抗体识别连接蛋白保守的细胞外环区域,因此不是连接蛋白异构

[0307] 实施例2:心血管系统

[0308] 这个实施例研究了间隙连接半通道在维持与缺血组织损伤相邻的毛细血管床中的血管完整性的调控和功能。无菌凝胶泡沫穿过左前降支或卷曲的动脉以诱导透壁心肌梗死。该凝胶基本上是根据 Devlin,G.,et al.,J.An ovine model of chronic stable heart failure.J.Card.Faul.6:140-143 (2000)中的方法被输送的。异凝集素B4标记的毛细血管内皮细胞显示与缺血组织相邻的毛细血管床被破坏。我们已经分析了在羊梗死模型中进行性的梗死(Camelliti et al.,Spatially and temporally distinct expression of fibroblast connexins after sheep infarction, Cardiovascular Research,62:415-425 (2004)),并且我们提出这是由间隙连接介导的旁观效应引起的。本文的数据表明与内皮细胞损伤相关并在间隙连接半通道表达之后,间隙连接介导的旁观效应的一个重要作用。在用异凝集素B4、连接蛋白43和半通道抗体对24小时缺血羊心脏进行三重标记的数据表明,在该情况下半通道不是连接蛋白43,而似乎是连接蛋白45(图6A、6B、6C)。注意到Gap7M抗体识别连接蛋白的第一个细胞外环的保守区域并且不是连接蛋白特异的;其与一定量的连接蛋白家族成员发生交叉反应。连接蛋白45是在缺血心脏损伤后第一个被上调的连接蛋白(Camelliti et al.2004)。这一系列图像(图6A、6B、6C)显示当血管壁的损伤不是明显远离梗死区域的位置(图6A),越靠近梗死区域其逐渐严重(图6B)并且与半通道的表达相关。在梗死区域本身中(图6C)半通道蛋白表达程度较高,毛细血管壁大量被破坏,并且肌细胞闰盘(连接蛋白43间隙连接位于此处)消失。正如图6A-图6C中对彩色照片的说明中描述的,该图像表示异凝集素B4(上图)标记的毛细血管内皮细胞和肌间球蛋白抗体(myomesin antibody)标记物(中间)标记的缺血24小时后羊心室梗死的肌细胞的肌小节中的M线。这个区域与图6C中所示的相同。毛细血管完全损伤并且

正常的肌细胞肌小节带的样式被破坏,表明肌肉细胞死亡与血管壁破坏同时发生。下图是上面两幅图的合并,表示损伤的毛细血管与异常的肌肉带标记的关系。

[0309] 图7示出了在梗死区域内被破坏血管的异凝集素B4标记与使用标记肌小节的M-带的肌间球蛋白抗体图示的肌小节破坏相关。正如在神经组织中,对血管壁继发的损伤似乎在半通道表达之后,而且通常细胞死亡严重,并且是半通道开放(打开)的结果。

[0310] 据报道,使心脏处于低含氧量中30分钟并再灌注(其中在培养基中有庚醇(一种非特异的间隙连接通道抑制剂))防止氧反常导致的过度收缩和肌细胞死亡。Garcia-Dorada et al.,Circulation 96:3579-3586 (1997)。这些作者报道过度收缩可能会通过间隙连接传递到相邻的肌细胞。我们的数据与这个观点一致,即在30分钟内半通道表达在过度收缩(hypercontracture)中发挥重要的作用。

[0311] 在病理状态下增加的连接蛋白表达和半通道开放导致在缺血损伤组织周围内皮细胞破坏和缺血心血管系统损坏。本文中第一次描述了这个发现,认为其对于治疗再灌注损伤是非常重要的,并且可能是进行性梗死的机制。Robbins,S.and Cotran,R.1979. Pathologic basis of disease.2ndEdition.WB Saunders Company,Philadelphia.。

[0312] 实施例3:拟肽设计

[0313] 拟肽设计

[0314] 在这个实施例中,9个重叠拟肽被设计成具有与被认为连接子对接过程涉及的连接蛋白43的细胞外环区域相同的氨基酸序列(Foote et al.,J Cell Biol 140(5):1187-97, (1998))。这些特定肽都被设计成11-13个残基长度。某些肽包含与 α 螺旋跨膜亚单位外部匹配的氨基酸,其可能表现出增强的功能性抑制。由于胞外环区域中连接蛋白序列的保守性,因此并不是所有都是连接蛋白43特异性的。

[0315] 靶向连接子43(半通道)的肽在下面显示。M1、M2、M3和M4分别是指连接子43蛋白的第一到第四个跨膜区域。E1和E2分别是指第一和第二胞外环:

	FEVAFLLIQWI (SEQ ID NO:32)	M3 & E2
	LLIQWYIGFSL (SEQ ID NO:33)	E2
	SLSAVYTCKRDPCPHQ (SEQ ID NO:34)	E2
	VDCFLSRPTEKT (SEQ ID NO:35)	E2
[0316]	SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36)	E2 & M4
	LGTAVESAWGDEQ (SEQ ID NO:37)	M1 & E1
	QSAFRCNTQQPG (SEQ ID NO:38)	E1
	QQPGCENVCYDK (SEQ ID NO:39)	E1
	VCYDKSFPISHVR (SEQ ID NO:40)	E1

[0317] 实施例5:拟肽的功能性测定

[0318] 使用肽进行两种功能性测定。这些功能型测定为(i)在脊髓切片中阻断细胞对染料(荧光黄(Lucifer Yellow))的摄取,以及(ii)抑制脊髓片段的水肿(用连接蛋白43特异性反义作为阳性对照)。使用的所有肽都是由Sigma-Genosys公司(澳大利亚)合成的。

[0319] 在脊髓切片中阻断细胞对染料(荧光黄)的摄取

[0320] 荧光黄(lucifer yellow)是一种小的、水溶性的、可固定的,能够通过间隙连接通道从细胞穿过细胞,但不能通过细胞膜。将荧光黄加入到细胞外基质中可以检查是否存在开放的间隙连接半通道。该染料将出现在表达开放通道细胞的细胞质中。

[0321] 用二氧化碳麻醉wister p7大鼠并立即将其斩首。切除脊髓并转移至pH值7.4的

冷冻Hank平衡盐溶液(HBSS)中。过多的分支神经和韧带 被移除,并将脊髓转移至人工组织切板上切成一系列500微米厚的切片。由切片引起的损伤诱导整个切片中连接蛋白43的上调(间隙连接介导的 旁观效应使其加剧),并导致连接蛋白半通道的表达。切片置于直径为3 厘米的微孔滤器(Millipore)中,置入24孔板并在有拟肽的培养基中培养。测定的所有9个肽的终浓度为500微摩尔。对照组为:不添加肽,或添加 1%的乙醇或1%的DMSO,使某些肽重新溶解于这些化合物中(肽由冻干 得到)。这时,某些切片也在30%的Pluronic F-127凝胶中用连接蛋白43 特异的反义寡脱氧核苷酸处理或仅用凝胶处理,作为对照实验。用反义寡 脱氧核苷酸处理的切片表明反义化合物抑制了连接蛋白表达以及随后的 染料摄取,因此这些充当阳性对照。

[0322] 切片在37℃下培养4小时,然后在每个孔中添加2.5mg/ml的荧光黄 并保持30分钟(在黑暗中)。然后将切片在PBS中漂洗两次,进一步洗涤 10分钟三次,并用4%的多聚甲醛固定该切片。然后用Leica TCS4D激光 扫描共焦显微镜进行观察,以测定染料是否被细胞吸收。

[0323] 结果显示仅用培养基培养的切片和仅用DMSO、乙醇和凝胶处理的切 片具有大量的染料摄取。用连接蛋白43处理的切片没有染料摄取。用肽 处理的切片表现出相当多的染料摄取,除了那些使用下列肽(具有重叠序 列)处理的:

[0324] VDCFLSRPTEKT (SEQ ID NO:35),和

[0325] SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36)

[0326] 用含有SEQ ID NOS:32-34、((FEVAFLLIQWI (SEQ ID NO:32)、LLIQWYIGFSL (SEQ ID NO:33)、SLSAVYTCKRDPCPHQ (SEQ ID NO:34)) 和 SEQ ID NOS:37-40 (LGTAVESAWGDEQ (SEQ ID NO:37)、QSAFRCNTQQPG (SEQ ID NO:38),QQPGCENVCYDK (SEQ ID NO:39) 和 VCYDKSFPISHVR (SEQ ID NO:40))的肽处理的切片,其染料摄取的水平与 对照切片的相当。

[0327] 总而言之,这些数据表明,脊髓切片表达半通道并在损伤的4小时内 打开。重要的是,该数据也表明,对应于SEQ ID NO:35和36的肽能够 预防和/或阻断和/或关闭半通道的打开并预防肿胀。

[0328] 脊髓水肿的预防

[0329] 在实施例1中描述的系统被用来检测肽 VDCFLSRPTEKT (SEQ ID NO:35) 和 SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36) 对培 养的脊髓段的效果,以检测其抑制肿胀的能力。

[0330] 肽QQPGCENVCYDK (SEQ ID NO:39) 用作阴性对照,由于在前述的 切片培养中允许染料摄取,因此其被认为在该片段中不能阻断水肿。DMSO又一次作为另外的对照。

[0331] 5mm长的脊髓片段置于24孔板独立孔的HBSS中。该片段用一小滴 强力胶(Superglue)使其紧贴在孔底部。去掉HBSS并向培养基(单独培 养基或DMSO对照中没有肽)中添加500微摩尔的肽(终浓度)。将该板 孵育24小时,去除培养基并用Bouin's固定剂将组织固定24小时。分析 上述脊髓片段的照片,包括用于计算与切割片段末端的肿胀对比脊髓 片段 总区域的Image J。计算(培养面积减去原始面积除以原始面积)肿胀(水 肿)以获得肿胀的百分率%。单因素方差分析用于确定统计学显著性,显 著性的临界水平为 $p=0.05$ 。

[0332] 结果为DMSO处理的脊髓片段肿胀最多(33%),所有对照的脊髓节 段肿胀21-23%。用肽QQPGCENVCYDK (SEQ ID NO:39) 处理的片段也 显示有23%的肿胀,但用肽 VDCFLSRPTEKT (SEQ ID NO:35) 和 SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36) 则显示分别减小15%和

17%的肿胀(图8)。用肽VDCFLSRPTEKT (SEQ ID NO:35)和SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36)处理的脊髓片段和对照之间的区别是显著的 ($p=0.43$)。随后对组织进行的组织学测试显示用肽SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36)处理的片段保持更好的形态学,因此进行该肽的剂量反应试验。确定用于在脊髓节段中阻断水肿的肽SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36)最有效的浓度使用同样的实验进行。在这个例子中,剂量反应是通过肽的终浓度为5、10、50、250和500微摩尔确定的。结果示于图8中。有趣的是,当与只有培养基的进行比较时,最低浓度的肽(5微摩尔)得到最好的结果(水肿最少) ($p=0.001$)。中间范围50微摩尔在重复实验中表现出较差的效果。

[0333] 免疫组织学分析显示用肽SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36)处理过的片段在培养基中24小时后星形细胞增多(GFAP表达)减少。尽管使用的浓度之间的差异没有在水肿实验中的明显,但5微摩尔对于抑制炎症反应仍是最有效的。所有的处理均显著降低胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达(用Image J分析的单位横断面积中的标记面积)(表7)。

[0334] 我们的实验表明选定拟肽(SEQ ID NO:36)的围产期羊实验(在这个胎龄为平均25g)中,使用5 $\mu\text{mol/kg}$ 脑重的剂量,其中一小时脑室内注射给予1ml人造CSF(仅CSF载体),随后再进一步每天给1ml灌注到大脑中,持续72小时,具有显著的效果。约5 $\mu\text{mol/kg}$ 脑、50 $\mu\text{mol/kg}$ 以及250 $\mu\text{mol/kg}$ 脑重的剂量也可以。对于静脉内注射(系统转运)对数级的影响在血浆浓度中增长可以用于确定合适的剂量,开始的负荷剂量达到0.5 $\mu\text{mol/L}$ (我们使用的这个年龄的围产期羊中的平均胎血体积为约350ml),然后为5、10、50、250、500和5000 μM 。

[0335] Image J是公开的Java脚本,公共领域的图像分析软件最初是由NIH(称为NIH Image)发展而来的。

[0336] 表7

[0337]

处理	GFAP标记面积(平方单位)
对照	2450
5微摩尔肽5	300
50微摩尔肽5	950
250微摩尔肽5	1000
500微摩尔肽5	750

[0338] 表7:图像中的GFAP标记区域是在脊髓切片后24小时取得的。对照脊髓具有高水平的GFAP,表明炎症反应和更强的处理片段的旁观效应。较低的肽浓度对于限制星形细胞增多最有效。

[0339] 对活化的小神经胶质细胞计数,如预料的,在24小时没有显示出差异。二次炎症过程(secondary inflammatory process)(检测小神经胶质细胞到巨噬细胞表型的分化和增值)通常发生在3至7天。

[0340] 实施例6:连接蛋白特异的拟肽抑制围产期羊模型中缺血和癫痫样脑活动的体内应用

[0341] 由脑缺血导致的脑损伤在生命的所有阶段都仍是一个严重的问题。在新生儿时期,中度至严重的损伤在出生时的每1000个存活的婴儿中发生2到3例。一个最显著的特征是损伤从最严重损伤的区域外侧扩散到以前未损伤的区域中。就在大脑缺血后,大脑的代

谢会有一个持续几小时的暂时恢复。而在这之后,会有进行性线粒体衰竭,同时有二次细胞肿胀,并在初始损伤后36至48小时达到最大。

[0342] 在神经胶质和神经元之间,间隙连接的活性偶联,介导了旁观效应,其中细胞死亡信号从死亡细胞转移到损伤不严重的细胞或健康的细胞中。早期研究表明,体内局部应用连接蛋白43特异的反义寡脱氧核苷酸可以限制损伤的扩散和创伤后的次级炎症。参见W02000/44409 to Becker,D.and Green.C.,题目为“Formulations Comprising Antisense Nucleotides to Connexins.”。

[0343] 在体内羊围产期缺血模型中使用肽SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36)。数据表明,连接蛋白特异拟肽在缺血围产期脑中或中风之后提供了一种有潜力的明显减少二次损伤的治疗。初步分析表明在妊娠晚期的新生羊大脑缺血24小时后,间隙连接半通道(即,未连接的连接子)的表达增加(图9)。

[0344] Romney-Suffolk杂交胎羊如其它地方(Gerrits et al, Pediatr Res 57(3):342-6, (2005);Guan et al.,Neuroscience 95(3):831-839, (1999);Guan et al.,J Cereb Blood Flow Metab 21(5):493-502, (2001);Gunn et al.,J Clin Invest 99(2):248-256, (1997),Gunn et al.,Pediatrics 102(5):1098-1106, (1998),Gunn et al.,Pediatr Res 46(3):274-280, (1999);Roelfsema et al.,J Cereb Blood Flow Metab 24(8):877-886, (2004)) 详细描述,在普通麻醉下,在妊娠(0.85期(0.85term))的117至124天安装监测装置。监测装置包括肱动脉和静脉导管、EKG电极、胎儿脑动脉周围的膨胀式限光器(inflatable occluder) (Gunn et al.,1997;Roelfsema et al.,2004)、前脑点(bregma)前5和15mm和侧面10mm的顶骨EED电极(parietal EEG electrodes)、置于它们侧面测定皮质阻抗的一对电极(测定细胞毒性水肿(Gunn et al.1997))以及在前脑点前侧4mm和左侧6mm处插入17mm长的套管。监测装置被从母体侧腹、子宫和封闭的腹壁中取出,并将胎儿血管导管肝素化。母体的伤口用一种长效的局部麻醉剂布比卡因浸润。

[0345] 在恢复5天之后,通过30分钟的双侧颈动脉闭塞可以诱发脑血流灌注不足(Gunn et al.,1997;Roelfsema et al.,2004;Tan et al.,Ann Neurol 32(5):677-682, (1992);Tan et al.,Pediatr Res 39(5):791-797, (1996))。连接蛋白拟肽5的脑室内注射开始于缺血后90分钟并持续72小时。拟肽5的5 μ mol/kg脑重(在这个胎龄,平均为25克)的剂量是在脑室内注射(i.c.v.)1ml的人造CSF(CSF仅作为载体)中超过1小时给予的,之后每天向脑内进一步灌注1ml并持续72小时。通过向母体静脉中注射戊巴比妥钠结束实验(30ml, 300mg/ml)。取出胎儿脑进行组织学和免疫组织化学分析。

[0346] 结果(图10)表明,早期注射肽可减轻二次延迟的发作活动和细胞毒性水肿。

[0347] 总之,这些数据表明靶向连接蛋白43半通道的胞外结构域的拟肽蛋白可以抑制大脑缺血后的二次(次级)水肿和炎症。在妊娠晚期的胎羊中,发现脑缺血与缺血后24小时内连接蛋白43和半通道的大量诱导相关,同时脑室内注射在再灌注之后90分钟给足月胎儿注射拟肽蛋白显示对二次发作(secondary seizure)和细胞毒性水肿的明显减弱作用。

[0348] 实施例7:在亚急性创伤中使用连接蛋白43特异反义物治疗人类患者-抑制血管萎缩能够使从边缘缺血中恢复

[0349] 在该研究中,患者患有眼亚急性未愈合创伤(化学烧伤)。8天后眼睛仍然发炎并且仍然存在前缘缺血(limbal ischaemia)(表明前缘血管分布较少)。前缘含有对于角膜

上皮恢复必需的干细胞。在用连接蛋白43特异反义物治疗后,该前缘缺血在20小时内消除并且开始重新形成上皮。结论是导致血管的持续萎缩的持续炎症因为前缘缺血加剧损伤。用连接蛋白43反义治疗眼睛能够减少炎症反应并触发上皮恢复(Qiu et al., Curr Biol 13:1697-1703, (2003))。然而,注意到这是一个亚急性损伤,意味着慢性损伤的治疗也是可能的一人类的这种损伤在上皮前缘保留了较高的连接蛋白43水平(Brandner et al., J Invest Dermatol 122:1310-1320, (2004))。此外,该治疗能够使血管恢复。我们提出有关的机制抑制血管壁内进一步的半通道表达,使血管重新生长。

[0350] 患者:患者为25岁男性。他在一次建筑工地高压混凝土管的事故发生后首次出现左眼碱性烧伤(眼中有混凝土/碱,并延误了第一次治疗)。该受伤的眼睛没有留下覆盖眼睛前部的上皮组织(包括全部角膜)。

[0351] 初步治疗:给患者使用10%抗坏血酸盐滴剂、10%柠檬酸盐滴剂、1%醋酸泼尼松(醋酸强的松prednisone acetate)滴剂、1%环戊丙甲胺(cyclopentalate)和氯霉素(chloramphenicol)、加上口服维生素C和脱氧土霉素(deoxycycline)。在最初的5天每小时使用泼尼松(prednisone)一次,之后给药减少为每天4次。

[0352] 第四天将羊膜覆盖在角膜上。

[0353] 连接蛋白43反义物治疗(第0天):在受伤后的第8天,患者仍具有严重的发炎、前缘缺血,而且没有上皮组织恢复的迹象。由于缺少任何可选择的、可行的可以挽救患者眼睛的治疗,因此取得了伦理许可(ethical permissions)。另一只眼睛具有圆锥形角膜的迹象因此并不适宜后期前缘移植。损伤的眼睛或者被手术摘除或者使成为“结膜眼(conjunctive eye)”(其中结膜以白鞘的形式存在,其生长覆盖眼睛,使病人变瞎)。

[0354] 用导管针将在30%F-127Pluronic凝胶中的连接蛋白43反义物注射进角膜每侧的两个位置的羊膜下。注射约100微升的2微摩尔的抗-连接蛋白43并用棉棒在羊膜上使其慢慢扩散到整个角膜。将冷的凝胶注入,其立即凝结为柔软的冻状物质。

[0355] 将患者的其它一切治疗均停止8小时以避免对治疗有任何潜在的副作用。然后再给患者使用甾类滴剂(每天3次)、环戊丙甲胺(环喷他明, cyclopentalate)、抗坏血酸盐、柠檬酸盐和氯霉素滴剂(每天4次)。

[0356] 连接蛋白43反义物治疗(第1天):在用连接蛋白43反义治疗后20小时以内眼睛已经相当稳定(炎症减轻),而且在三处已经重新长上上皮。前缘有好的血流呈现好的血管化现象,并且没有前缘缺血的现象,即,在治疗后20小时以内前缘重新有充足的血流。

[0357] 连接蛋白43反义物治疗(第3天):在用连接蛋白43反义物治疗后72小时以内,病人的状况持续改善。眼睛平静,前缘供血很好,而且上皮组织呈360度环绕生长。在一边出现了小的片层状蠕动(lamellapodial crawling)的区域,但角膜周围的其它区域很好甚至向内生长。

[0358] 连接蛋白43反义物治疗(第6天):在治疗后6天以内(受伤后14天),上皮组织完全恢复(完全生长覆盖),虽然某些地方出现轻微的颗粒状并可能在某些地方出现斑片或变薄(透过羊膜观察评价)。前缘区域具有充足的血流,维持了良好的血管化。

[0359] 治疗后40天,病人的化学烧伤恢复很好,表现为6/48肉眼(vision unaided)和6/15针孔。三分之二的上皮已经完全健康,三分之一的外围部分表现出某些粘连生长,但并不覆盖瞳孔而且也没有血管分布。前缘血管化非常好。

[0360] 视神经神经病变

[0361] 缺血视神经病变 (ION), 也被称为视神经中风, 是影响视神经血液供应疾病的总称。ION 可以基于位置和病因分类。前部 ION (AAION) 是指影响筛板前神经部分的疾病, 而对于后部 ION (PION) 反过来也是正确的 (Buono et al., Survey of Ophthalmology 50:15-26, (2005); Collignon et al., Ophthalmology 111:1663-1672, (2004))。通常 PION 更少见, 并认为是由视神经的眼窝内部分梗死导致的, 最可能是由于巨细胞动脉炎 (GCA) 或作为外科手术的次级并发症 (Buono and Foroozan, 2005; Ho et al., Journal of Neurosurgical Anesthesiology 17:38-44, (2005))。ION 也可以根据病因被分成动脉炎性 (动脉炎性 ION) 和非动脉炎性 (NAION)。动脉炎性 ION 总是由 GCA 引起的, 并通常导致睫状后动脉 (posterior ciliary artery) 的血栓闭塞, 其可以导致视神经中其它动脉的并发梗阻 (Galasso et al., Seminars in Ophthalmology 19:75-77, (2004))。NAION 是非青光眼 (non-glaucomic) 视神经病变的最常见形式, 其每年的发病率为 2.3/10,000 (Collignon-Robe et al., Ophthalmology 111:1663-1672, (2004))。GCA 是一种慢性大脑中的大血管和中等血管血管炎, 其特征为发炎的巨细胞数量增加 (Buono et al., Survey of Ophthalmology 50:15-26, (2005); Khosla et al., Journal of Postgraduate Medicine 50:219-221, (2004); Penn et al., Autoimmunity Reviews 2:199-203, (2003))。通常不会丧失视力, 但其可作为供应视神经的前血管梗塞的次级并发症, 并且常是不可逆的 (Khosla et al., 2004)。在西方国家, GCA 的发病率在 1~30/10,000 的范围, 50 岁以上的人群中的发病率提高 (Penn and Dasgupta, 2003)。

[0362] ION 的典型后果是伴有视力衰退或甚至失明的轴突神经束 (axon tract) 降解 (Buono et al., 2005; Khosla et al., 2004; Penn and Dasgupta, 2003)。

[0363] ION 的传统治疗方法包括给予皮质类固醇和抗血小板试剂 (Arnold et al., Seminars in Ophthalmology 17:39-46, (2002)), 但使用这些药物治疗的患者并没有表现出使这些疾病显著改善。

[0364] 在视神经中, 星形胶质细胞和少突胶质细胞都表达连接蛋白分子。连接蛋白 43 大量存在于星形胶质细胞中而且潜在地参与多种疾病过程。视神经的血管内皮细胞也表达连接蛋白 43。

[0365] 在这项研究中, 视神经缺血是在体外诱导的模型并且神经片段被置于用 30% F-127 Pluronic 凝胶递送的连接蛋白 43 特异性反义寡脱氧核苷酸处理的或用对照胶处理的器官型培养基中。

[0366] 组织制备:

[0367] 利用出生后 21 至 25 天 (p21 至 p25) 的 wistar 大鼠。给予过量二氧化碳将 wistar 大鼠处死, 在中央矢状位置 (midsagittal orientation) 处打开其颅骨, 并将大脑接近小脑的尾部区域剪除并丢弃。在低于嗅叶 (olfactory lobe) 处切开一口以暴露视神经的颅内区域。可以通过该方法得到约 0.3 至 0.5mm 的跨越视神经管的视神经交叉和终点的视神经。然后, 使该神经发生缺血, 如下。

[0368] Sundstrom et al. Drug Discovery Today 10:993-1000, (2005) 中提出了一种用于 CNS 缺血的可行的 ION 器官型培养模型实验方法。在实验进行前, 在猎鹰管 (falcon tube) 中制备 10ml 不含葡萄糖和谷氨酸盐的培养基, 用 95% N₂ 和 5% CO₂ 混合气体鼓泡 30 分

钟,以去除氧气。分离的视神经被转移到缺氧无糖(OGD)溶液中并用石蜡膜和玻璃纸密封。该视神经在37℃下缺血溶液中培养2小时,并随后回到器官型培养条件下根据需要培养一定长的时间。

[0369] 使用间期培养方法。在OGD溶液中培养之后,该视神经被置于半孔膜上并放入六孔板中,六孔板中含有1ml添加了B27、D-葡萄糖和L谷氨酰胺以及抗体的Neurobasal培养基(Gibco,USA)。对于反义物治疗,给予7μL的含有10μM的对连接蛋白43特异的翻译阻断的AS-ODN的Pluronic F-127凝胶(#P2443,Sigma,USA)以覆盖每个视神经。这个量已经足够覆盖整个部分而没有过度溢出该组织。对于仅有凝胶和对照组,在神经上分别使用相同量(7μL)的Pluronic F-127凝胶和培养基。然后将培养板置于37℃,5%CO₂的保温箱中。该培养技术的主要优势在于其确保了氧气从顶部持续的供应而营养物质可从底部扩散。

[0370] 培养之后,用1xPBS(#BR14,oxoid,England)漂洗该神经15分钟并在4%多聚甲醛(PFA)中固定约2小时,接着,通过在PBS中的20%、然后30%蔗糖冷冻保护。然后,该神经储存在PBS中的15%蔗糖中,直到为下一步处理做好准备。切割该组织,视神经被包埋入OCT(#4583, Tissue, Tek®, USA)中,在-20℃下冷冻并随后被切割成长14μm和厚18μm的片段。这些切片收集到Histobond载玻片(#0810001, Marienfeld, Germany)上并在-80℃下储存以为下一步处理。

[0371] 肿胀(水肿)通过从上方对视神经拍照并测定(培养的面积减去原始的面积再除以原始面积)得出肿胀百分数。使用碘化丙啶标记细胞膜破坏的细胞(或死细胞(compromised cell))的细胞核来评估细胞死亡。在神经切割末端和神经的中间区域估计细胞死亡。

[0372] 图11A和图11B示出了缺血损伤后用反义和对照治疗的视神经培养6小时和24小时的剂量效应曲线。图11A示出了肿胀百分数,图11B示出了在切割尾(前)端以及神经中部用碘化丙啶计数评价细胞死亡。用连接蛋白43反义物使神经水肿减小,尤其是在10微摩尔浓度下,在前面脊髓挤压损伤的研究中已经表明10微摩尔浓度是最优选的(未公开)。使用剂量依赖的方式在两个区域都导致死亡细胞计数的减少,在切口和神经中部的细胞死亡都有所降低。

[0373] 以下图12示出了肿胀(水肿)的减轻可以维持一段时间。图13示出了在缺血诱导之后2、6和24小时,在对照和连接蛋白43特异AS-ODN处理的视神经节段的中间,用碘化丙啶对死细胞进行染色。当与对照组在所有三个时间点进行比较时,连接蛋白43特异的AS-ODN处理组中很少有染色。图13中的线性图示出了对照和AS-ODN处理的视神经的神经中间区域每单位面积中的死亡细胞数。对照组的细胞死亡最初增加,在6小时达到峰值,然后轻微下降(可能是由于组织水肿使每个单位面积内剩余的细胞更少)。注意到在AS-ODN处理组织中,即使在培养24小时后,细胞死亡仅有很轻微的增加。

[0374] 血管段长度—血管性血友病因子染色:

[0375] 为了显示在对照和连接蛋白43特异反义物处理的视神经中被连接蛋白表达的血管所破坏的血管完整性,用血管性血友病因子(一种内皮细胞标记物)标记。由于血管破坏使可以计数的更小片段的数量增加并且所测量到的片段的长度也更小。研究从两个动物的每个时间点获得的六个独立切片中,多于六十个血管的每个切片血管的平均长度和数量。

[0376] 平均起来,除了在研究的最长时间点,对照组中血管片段的数目少于 连接蛋白43特异的AS-ODN处理的神经。条形图(图14)示出了连接蛋白43特异的AS-ODN处理的视神经在前三天维持相对恒定的长度,但到 第6天开始下降约30%。从对照组中也可以观察到类似的时间模式,但所有时间点的平均血管片段的长度都明显短于反义物处理组。

[0377] 表8

[0378]	每个横断面的片段数		
		反义	对照
	第 1 天	10.8	23.5
	第 2 天	13.3	19.2
	第 3 天	29.7	41
[0379]	第 6 天	18.2	13.8

[0380] 表8示出了对照组和处理组中血管片段计数的平均数目。在头三天, 与对照组相比,AS处理组平均比对照组少28~50%的血管片段。只有在 6天之后,在器官型培养基中,AS处理的神经比对照组中具有更多的片段 数,具有24%更多的血管。延长培养时间到有影响的时间。

[0381] 这个实施例表明,在视神经缺血之后抑制连接蛋白43的表达可以减少水肿(减少肿胀)、病变扩散(远离原始损伤区域的每单位面积中死细 胞的数量)、和血管降解。因此,其与实施例1—脊髓中相似。因为在体内 研究中已报道有相同的水肿和血管减少,因此其具有治疗上的应用 (Bernstein et al.,Invest Ophthalmol Vis Sci 44:4153-4162, (2003))。

[0382] 本文中提到的所有专利、出版物、科学文献、网站及其它的文件和参 考材料或材料都表示本发明所属技术领域技术人员的技术水平,因此每个 这样的参考文献和材料以引用方式引入,如同其各自以全文方式引用或以 全文方式列在本文中一样。申请人保留将任何和全部来自任何专利、出版 物、科学文献、网站、可得到的电子信息及其它相关材料或文档的材料和 信息完全结合于本说明书中的权利。

[0383] 本文描述的具体方法和组合物是优选具体实施方式的典型代表并且 是示范性的,并不作为对本发明范围的限制。只要本领域技术人员一旦理 解本说明书后就会想到的其它主题、方面和具体实施方式都包括在如权利 要求的范围所限定的本发明的精神范围内。对于本领域技术人员很容易明 显看出,在不偏离本发明的范围和精神的前提下,可以对本文公开的发明 进行多种不同的替换和修改。在本文中,示例性描述的本发明可以在缺乏 任何不是本文必要的专门批露的元素或限制的情况下进行。因此,例如, 本文中的每个例子,本发明的具体实施方式和实施例中的,术语“包含”、“主要由……组成”和“由……组成”中的任何一个,在本说明书中都可 由其它两个中的任何一个替代。而且,术语“包含”、“包括”和“含有” 等都可以广义地理解并且没有限制。在本文中,例证描述的方法和过程可以以不同的步骤顺序进行,并且其不一定局限于本文或权利要求中示出的 步骤的顺序。而且,本文和附带的权利要求使用的单数形式“一个”或“一 种”包括复数,除非上下文中清楚

地另外指出。本专利决不解释为限于本文中特别公开的特定具体实施例或具体实施方式或方法。本专利决不解释为受到任何审查员或任何其它官方或其它专利和商标局员工的意见的限制,除非这些陈述是明确的而且没有规定或保守表达地适用于发明人的答辩。

[0384] 本文中使用的术语和表达是用于描述而不是作为限制的术语,而且这些术语和表达的使用也不是倾向于排除其它任何表现或描述的等同特征或其部分,但在本发明要求保护的范围内的多种不同的修改都被认为是可能的。因此,可以理解,尽管本发明已经通过优选的具体实施方式和最优的特征明确地公开,但是本领域技术人员可以采用本文公开的构思的修改和变更,这些修改和变更被认为落入如所附权利要求限定的本发明范围内。

[0385] 本文已经宽泛且一般地描述了本发明。每个更窄的种类和落入批露类的亚类都构成本发明的一部分。这包括本发明的附带条件或消极限制的一般描述,其从属中去除了任何主题,而不论去除物质是否在本文中明确地列举出来。

[0386] 其它的具体实施方式落入在权利要求中。另外,在根据马库什类描述的本发明的特征或方面中,本领域的技术人员将认识到,本发明也能够根据任何马库什类的个别成员或亚组成员来加以描述。

序列表

<110> 科达治疗有限公司 (CODA THERAPEUTICS LTD)

<120> 抗-连接蛋白化合物及其治疗应用

<130> P14615DMS

<140> 待定

<141> 2006-02-03

<150> US 60/650075

<151> 2005-02-03

<160> 131

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

gtaattgcgg caagaagaat tgtttctgtc 30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

gtaattgcgg caggaggaat tgtttctgtc 30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

ggcaagagac accaaagaca ctaccagcat 30

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

tcttgagcaa tacctaacga acaaata 27

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 5
catctccttg gtgctcaacc 20
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 6
ctgaagtcga cttggcttgg 20
<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 7
ctcagatagt ggccagaatg c 21
<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 8
ttgtccaggt gactccaagg 20
<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 9
cgtccgagcc cagaaagatg aggtc 25
<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 10
agaggcgcac gtgagacac 19
<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 11
tgaagacaat gaagatgtt 19
<210> 12

<211> 3088

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 12

```

acaaaaaagc ttttacgagg tatcagcact tttctttcat tagggggaag gcgtgaggaa 60
agtaccaaac agcagcggag ttttaaactt taaatagaca ggtctgagtg cctgaacttg 120
ccttttcatt ttacttcac cccaaggag ttcaatcact tggcgtgact tcactacttt 180
taagcaaaaag agtggtgccc aggcaacatg ggtgactgga gcgccttagg caaactcctt 240
gacaagggtt aagcctactc aactgctgga gggaagggtg ggctgtcagt acttttcatt 300
ttccgaatcc tgctgctggg gacagcgggt gagtcagcct ggggagatga gcagtctgcc 360
tttcgttgta aactcagca acctggttgt gaaaatgtct gctatgacaa gtctttccca 420
atctctcatg tgcgttctg ggtcctgcag atcatatttg tgtctgtacc cacactcttg 480
tacctggctc atgtgttcta tgtgatgcga aaggaagaga aactgaacaa gaaagaggaa 540
gaactcaagg ttgccccaac tgatggtgtc aatgtggaca tgcacttgaa gcagattgag 600
ataaagaagt tcaagtacgg tattgaagag catggtaagg tgaaaatgcg aggggggttg 660
ctgcgaacct acatcatcag taccctcttc aagtctatct ttgaggtggc cttcttgctg 720
atccagtggg acatctatgg attcagcttg agtgcgtgtt acacttgcaa aagagatccc 780
tgcccacatc aggtggactg tttcctctct cgccccacgg agaaaacat cttcatcatc 840
ttcatgctgg tgggtgtcctt ggtgtccctg gccttgaata tcattgaact cttctatgtt 900
ttcttcaagg gcgttaagga tcgggttaag ggaaagagcg acccttacca tgcgaccagt 960
ggtgcgctga gccctgccaa agactgtggg tctcaaaaat atgcttattt caatggctgc 1020
tctcaccaca ccgctcccc ctcgcctatg tctcctcctg ggtacaagct ggttactggc 1080
gacagaaaca attcttcttg ccgcaattac aacaagcaag caagttagca aaactgggct 1140
aattacagtg cagaacaaaa tcgaatgggg caggcgggaa gcaccatctc taactcccat 1200
gcacagcctt ttgatttccc cgatgataac cagaattcta aaaaactagc tgctggacat 1260
gaattacagc cactagccat tgtggaccag cgacctcaa gcagagccag cagtcgtgcc 1320
agcagcagac ctcggcctga tgacctggag atctagatac aggcttgaaa gcatcaagat 1380
tccactcaat tgtggagaag aaaaaagggt ctgtagaaag tgcaccaggt gttaattttg 1440
atccggtgga ggtggtactc aacagcctta ttcatgaggc ttagaaaaca caaagacatt 1500
agaataccta ggttacttgg ggtgttatgg ggtagatggg tggagaggga ggggataaga 1560
gaggtgcatg ttggtattta aagtagtgga ttcaaagaac ttagattata aataagagtt 1620
ccattaggtg atacatagat aagggtttt tctccccga aacacccta agaattggtt 1680
tgtgtatgtg aatgagcggg tggtaattgt ggctaaatat tttgtttta ccaagaaact 1740
gaaataattc tggccaggaa taaatacttc ctgaacatct taggtctttt caacaagaaa 1800
aagacagagg attgtcctta agtccttgc aaaacattcc attgttaaaa tttgcacttt 1860
gaaggtaagc tttctaggcc tgacctcca ggtgtcaatg gacttgtgct actatatttt 1920
tttattcttg gtatcagttt aaaattcaga caagccccc agaataagat tttccatgca 1980
tttgcaaata cgtatatctt tttccatcc acttgcaaa tatcattacc atcacttttt 2040
catcattcct cagctactac tcacattcat ttaatggttt ctgtaaacad ttttaagaca 2100

```

gttgggatgt cacttaacat tttttttttt tgagctaaag tcagggaatc aagccatgct 2160
 taatatattaa caatcactta tatgtgtgtc gaagagtttg ttttgtttgt catgtattgg 2220
 tacaagcaga tacagtataa actcaciaaac acagatttga aaataatgca catatggtgt 2280
 tcaaatattga acctttctca tggatttttg tgggtgtgggc caatatggtg tttacattat 2340
 ataattcctg ctgtggcaag taaagcacac tttttttttc tcctaaaatg tttttccctg 2400
 tgtatcctat tatggatact ggttttggtta attatgattc tttattttct ctcctttttt 2460
 taggatatag cagtaatgct attactgaaa tgaatttcct ttttctgaaa tgtaatcatt 2520
 gatgcttgaa tgatagaatt ttagtactgt aaacaggctt tagtcattaa tgtgagagac 2580
 ttgaaaaaaa tgcttagagt ggactattaa atgtgcctaa atgaattttg cagtaactgg 2640
 tattcttggg ttttcctact taatacacag taattcagaa cttgtattct attatgagtt 2700
 tagcagtctt ttggagtgc cagcaacttt gatgtttgca ctaagatttt atttggaatg 2760
 caagagaggt tgaaagagga ttcagtagta cacatacaac taattttatt gaactatatg 2820
 ttgaagacat ctaccagttt ctccaaatgc ctttttttaa actcatcaca gaagattggt 2880
 gaaaatgctg agtatgacac ttttcttctt gcatgcatgt cagctacata aacagttttg 2940
 tacaatgaaa attactaatt tgtttgacat tccatgttaa actacggtca tgttcagctt 3000
 cattgcatgt aatgtagacc tagtccatca gatcatgtgt tctggagagt gttctttatt 3060
 caataaagtt ttaatttagt ataaacat 3088

<210> 13

<211> 1308

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 13

atgggcgact ggagctttct gggaagactc ttagaaaatg cacaggagca ctccacggctc 60
 atcggcaagg tttggctgac cgtgctgttc atcttccgca tcttggtgct gggggccgcg 120
 gcggaggacg tgtggggcga tgagcagtca gacttcacct gcaacacca gcagccgggc 180
 tgcgagaacg tctgctacga cagggccttc cccatctccc acatccgctt ctgggcgctg 240
 cagatcatct tcgtgtccac gcccaccctc atctacctgg gccacgtgct gcacatcgtg 300
 cgcatggaag agaagaagaa agagaggag gagaggagc agctgaagag agagagcccc 360
 agccccaagg agccaccgca ggacaatccc tcgtcgcggg acgaccgcg cagggtgcgc 420
 atggccgggg cgctgctgcg gacctacgtc ttcaacatca tcttcaagac gctgttcgag 480
 gtgggcttca tcgccggcca gtactttctg tacggcttcg agctgaagcc gctctaccgc 540
 tgcgaccgct ggccctgccc caacacggtg gactgcttca tctccaggcc caggagaag 600
 accatcttca tcatcttcat gctggcggtg gctgcgcgt cctgctgct caacatgctg 660
 gagatctacc acctgggctg gaagaagctc aagcaggcg tgaccagccg cctcgccccg 720
 gacgcctccg aggccccgct ggggacagcc gatccccgc cctgcccc cagctccccg 780
 ccgccccg cggtccatcg gttcccaccc tactatgcgc acaccgctgc gccctggga 840
 caggccccgc cgtgggcta ccccggggccc ccgccaccag ccgcggaact caaactgcta 900
 gccctgaccg aggcgcgcgg aaagggccag tccgccaagc tctacaacgg ccaccaccac 960
 ctgctgatga ctgagcagaa ctgggccaac caggcgccg agcggcagcc cccggcgctc 1020

aaggttacc cggcagcgtc cacgcctgca gccccagcc ccgtcggcag cagctccccg 1080
 ccactcgcgc acgaggctga ggcgggcgcg gcgccccctgc tgctggatgg gagcggcagc 1140
 agtctggagg ggagcggcct ggcagggacc cccgaggagg aggagcaggc cgtgaccacc 1200
 gcggccccaga tgcaccagcc gcccttgccc ctcgagacc caggtcgggc cagcaaggcc 1260
 agcagggcca gcagcgggcg ggccagaccg gaggacttgg ccatctag 1308

<210> 14

<211> 1601

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 14

ctccggccat cgtccccacc tccacctggg ccgcccgcga ggcagcggac ggaggccggg 60
 agccatgggt gactggggt tcttgagaa gttgctggac caggtccgag agcactcgac 120
 cgtggtgggt aagatctggc tgacggtgct cttcatcttc cgcatectca tcttgggctt 180
 ggccggcgag tcagtgtggg gtgacgagca gtcagatttc gagtgtaca cggcccagcc 240
 aggctgcacc aacgtctgct atgaccaggc cttccccatc tcccacatcc gctactgggt 300
 gctgcagttc ctcttcgtca gcacacccac cctggtctac ctgggcatg tcatttacct 360
 gtctcggcga gaagagcggc tggcgagaa ggagggggag ctgcgggcac tgccggccaa 420
 ggaccacag gtggagcggg cgctggccgg catagagctt cagatggcca agatctcgtt 480
 ggcagaagat ggtgcctgc gcattccgcg agcactgatg ggcacctatg tcgccagtgt 540
 gctctgcaag agtgtgctag aggcaggctt cctctatggc cagtggcgcc tgtacggctg 600
 gaccatggag ccgtgtttg tgtgccagcg agcacctgc ccctacctcg tggactgctt 660
 tgtctctcgc cccacggaga agaccatctt catcatcttc atgttggtgg ttggactcat 720
 ctccctgggtg cttaacctgc tggagtgggt gcacctgctg tgctcgctgcc tcagccgggg 780
 gatgagggca cggcaaggcc aagacgcacc cccgaccag ggcacctcct cagaccctta 840
 cacggaccag ggtcttcttc tacctccccg tggccagggg ccctcatccc caccatgccc 900
 cactacaat gggctctcat ccagttagca gaactgggac aacctgacca cagaggagag 960
 gctggcgctt tccaggcccc ctctcttcct ggaccaccc cctcagaatg gccaaaaacc 1020
 cccaagtcgt cccagcagct ctgcttctaa gaagcagtat gtatagaggc ctgtggctta 1080
 tgtcacccaa cagaggggtc ctgagaagtc tggtgcctg ggatgcccc tgccccctcc 1140
 tggaaggctc tgacagatg actgggctgg ggaagcagat gcttgctggc catggagcct 1200
 cattgcaagt tgttcttgaa cactgaggc cttctgtgg cccaccaggc actacggctt 1260
 cctctccaga tgtgctttgc ctgagcacag acagttagca tggaatgctc ttggccaagg 1320
 gtactggggc cctctggcct tttgcagctg atccagagga acccagagcc aacttaccac 1380
 aacctaccc tatggaacag tcacctgtgc gcaggttgct ctcaaaccct ctcttcacag 1440
 gaaaaggcgg attgaggctg ctgggtcagc cttgatcgca cagacagagc ttgtgccgga 1500
 tttggccctg tcaaggggac tgggtgcttg ttttcacac tccttcctag ttctactgtt 1560
 caagcttctg aaataaacag gacttgatca caaaaaaaaa a 1601

<210> 15

<211> 2574

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 15

```

gcaaaaagcg tgggcagttg gagaagaagc agccagagtg tgaagaagcc cacggaagga 60
aagtcaggagg aggaggaaaa gaagcagaag ttttggcatc tgttccctgg ctgtgccaaag 120
atgggcgatt ggagcttcct gggaaatttc ctggaggaag tacacaagca ctcgaccgtg 180
gtaggcaagg tctggctcac tgtcctcttc atattccgta tgctcgtgct gggcacagct 240
gctgagtctt cctgggggga tgagcaggct gatttccggt gtgatacgat tcagcctggc 300
tgccagaatg tctgctacga ccaggttttc cccatctccc acattcgcta ctgggtgctg 360
cagatcatct tcgtctccac gccctctctg gtgtacatgg gccacgcat gcacactgtg 420
cgcatgcagg agaagcgcaa gctacgggag gccgagaggg ccaaagaggt ccggggctct 480
ggctcttacg agtaccgggt ggacagagaag gcagaactgt cctgctggga ggaagggaat 540
ggaaggattg ccctccaggg cactctgctc aacacctatg tgtgcagcat cctgatccgc 600
accacatgg aggtgggctt cattgtgggc cagtacttca tctacggaat ctctctgacc 660
accctgcatg tctgccgcag gagtccctgt cccacccgg tcaactgtta cgtatcccg 720
cccacagaga agaattgtct cattgtcttt atgctggctg tggctgcact gtccctctc 780
cttagcctgg ctgaactcta ccacctgggc tggaagaaga tcagacagcg atttgtcaaa 840
ccgcggcagc acatggctaa gtgccagctt tctggccct ctgtgggcat agtccagagc 900
tgcacaccac ccccgactt taatcagtg cctggagaat gccctggggg aaaattcttc 960
aatcccttca gcaataatat ggccctccaa caaacacag acaacctgg caccgagcaa 1020
gtacgaggtc aggagcagac tcctggggaa ggtttcatcc aggttcgtta tggccagaag 1080
cctgagggtgc ccaatggagt ctaccagggt caccgccttc cccatggcta tcatagtac 1140
aagcgacgtc ttagtaaggc cagcagcaag gcaaggctag atgacctatc agtgtgacct 1200
tcctttatgg gaggatcagg accagggtggg aacaaaggag gctcagagaa gaaagacgtg 1260
tcccttctga actgatgctt tctactgtc atactgctt ggctcctttg agccccgggt 1320
ctcaatgacg ttgctcatta attctagaaa ctataaccag ggctctggga tagtaagaga 1380
ggtgacaacc caccagact gcagttccct cccaccctc taccagtat acgaagcctt 1440
tcagattact catgaaacag gtagaggga aagaaggga gcatggcaaa agctggcctg 1500
gaagggatag ccagagggat agaattgact tctctctaca taccagcagc ataccaaatg 1560
cgttctctaa gttcctacct ccttgacctg ataccctcc ctctccaag gaagagctca 1620
aagttcccag ccaatagaca gcatgaatca aggaacttgc attatatgtg ctcttgaatc 1680
tgttgtctcc atggaccatt cctcggagta gtggtgagat ggcttgggt tgcccttggc 1740
ttctcctccc tctactcagc cttaaaaagg gttcttggga actttaccag cagcctcagc 1800
tttacaatat ccttggtatg tacctctggc aatgcccc ccttggtgat gttgcaacct 1860
ttccttctgc tagggtgtac acctagcctg tgcagggtgc agcctgcta gggagtcact 1920
gtacacacaa actctactgg aattcctgcc aacatctgtc accctgcagc tcctttacag 1980
ttcaatccaa tgatagaaac catcccttc ctttctcct tggtgttca ccagccatt 2040
ccctgaaggc cttaccaaca ggaatatcca agaagctgtt gtccctctc gaacctgac 2100
cagatcatca gccactgagg ccagtggaa ttccccagg cttgttaaaa caaagaaagc 2160

```

attgtacctc tcagattccc cttgtggaaa aaaaaattct gctgtgaaga tgaaaataaa 2220
aatggagaga aaacactgga aaactatttt cccctcctat ttacttcctt tgctgactgc 2280
caacttagtg ccaagaggag gtgtgatgac agctatggag gccccagat ctctctctcc 2340
tggaggcttt agcaggggca aggaaatagt aggggaatct ccagctctct tggcagggcc 2400
tttattttaa gagcgcagag attcctatgt ctccctagt cccctaata gactgccaag 2460
tgggggctgt agaaaagcct tgccttcccc agggattggc ctggctctctg tattcactgg 2520
atccataatg gggtgctgtt gttttggatg aaggtaaacg atgcttggaa ttgg 2574

<210> 16

<211> 1191

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 16

atgagttgga gctttctgac tcgcctgcta gaggagattc acaaccattc cacatttgtg 60
gggaagatct ggctcactgt tctgattgtc ttccggatcg tccttacagc tgtaggagga 120
gaatccatct attacgatga gcaaagcaaa tttgtgtgca acacagaaca gccgggctgt 180
gagaatgtct gttatgatgc gtttgacact ctctcccatg tacgcttctg ggtgttccag 240
atcatcctgg tggcaactcc ctctgtgatg tacctgggct atgctatcca caagattgcc 300
aaaatggagc acggtgaagc agacaagaag gcagctcgga gcaagcccta tgcaatgcgc 360
tggaacaac accgggctct ggaagaaacg gaggaggaca acgaagagga tcctatgatg 420
tatccagaga tggagttaga aagtataag gaaaataaag agcagagcca acccaaact 480
aagcatgatg gccgacgacg gattcgggaa gatgggctca tgaaaatcta tgtgtgcag 540
ttgctggcaa ggaccgtgtt tgaggtgggt tttctgatag ggcagtattt tctgtatggc 600
ttccaagtcc acccggttta tgtgtgcagc agacttcctt gtcctcataa gatagactgc 660
tttatttcta gaccactga aaagaccatc ttccttctga taatgtatgg tgttacaggc 720
ctttgcctct tgcttaacat ttgggagatg cttcatttag gggttgggac cattcgagac 780
tcactaaaca gtaaaaggag ggaacttgag gatccgggtg cttataatta tcctttcact 840
tggaatacac catctgctcc ccctggctat aacattgctg tcaaaccaga tcaaatccag 900
tacaccgaac tgtccaatgc taagatcgcc tacaagcaaa acaaggccaa cacagcccag 960
gaacagcagt atggcagcca tgaggagaac ctcccagctg acctggaggc tctgcagcgg 1020
gagatcagga tggctcagga acgcttggat ctggcagttc aggcctacag tcacaaaaac 1080
aaccctcatg gtccccggga gaagaaggcc aaagtggggt ccaaagctgg gtccaacaaa 1140
agcactgcca gtagcaaatc aggggatggg aagaactctg tctggattta a 1191

<210> 17

<211> 1362

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 17

agcgccaaga gagaaagagc acatatttct ccgtgggaca ctcttgtat tgggtgggtga 60
gaaatgggag actggagttt cctggggaac atcttggagg aggtgaatga gcactccacc 120

gtcatcggca gagtctggct caccgtgctt ttcattcttc ggatcctcat ccttggcacg 180
 gccgcagagt tcgtgtgggg ggatgagcaa tccgacttcg tgtgcaacac ccagcagcct 240
 ggctgcgaga acgtctgcta cgacgaggcc tttcccatct cccacattcg cctctgggtg 300
 ctgcagatca tcttcgtctc caccctgtcc ctgatgtacg tggggcacgc ggtgcactac 360
 gtccgcatgg aggagaagcg caaaagccgc gacgaggagc tgggccagca ggcggggact 420
 aacggcgggc cggaccaggg cagcgtcaag aagagcagcg gcagcaaagg cactaagaag 480
 ttccggctgg aggggaccct gctgaggacc tacatctgcc acatcatctt caagaccctc 540
 tttgaagtgg gcttcatcgt gggccactac ttctgtacg ggttccggat cctgcctctg 600
 taccgctgca gccggtggcc ctgccccaat gtggtggact gcttcgtgtc ccggcccacg 660
 gagaaaacca tcttcatcct gttcatgttg tctgtggcct ctgtgtccct attcctcaac 720
 gtgatggagt tgagccacct gggcctgaag gggatccggt ctgccttgaa gaggcctgta 780
 gagcagcccc tgggggagat tcctgagaaa tcctccact ccattgtgt ctctccatc 840
 cagaaagcca agggctatca gcttctagaa gaagagaaaa tcgtttccca ctatttcccc 900
 ttgaccgagg ttgggatggg ggagaccagc ccaactgctg ccaagccttt caatcagttc 960
 gaggagaaga tcagcacagg acccctgggg gacttgtccc ggggctacca agagacactg 1020
 ccttcctacg ctgaggtggg ggacacaaga gtggagggcg aggggccgcc tgcagaggag 1080
 ggagccgaac ccgaggtggg agagaagaag gaggaagcag agaggctgac cacggaggag 1140
 caggagaagg tggccgtgcc agagggggag aaagtagaga cccccggagt ggataaggag 1200
 ggtgaaaaag aagagccgca gtcggagaag gtgtcaaagc aagggtgcc agctgagaag 1260
 acaccttcac tctgtccaga gctgacaaca gatgatgcca gaccctgag caggctaagc 1320
 aaagccagca gccgagccag gtcagacgat ctaaccgtat ga 1362

<210> 18

<211> 966

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 18

atgggggaat ggaccatctt ggagaggctg ctagaagccg cgggtgcagca gcactccact 60
 atgatcggaa ggatcctgtt gactgtgggt gtgatcttc ggatcctcat tgtggccatt 120
 gtgggggaga cgggtgtacg tgatgagcag accatgtttg tgtgcaacac cctgcagccc 180
 ggctgtaacc aggcctgcta tgaccgggcc ttcccatct cccacatacg ttactgggtc 240
 ttccagatca taatggtgtg taccctcagt ctttgcctta tcacctactc tgtgcaccag 300
 tccgccaagc agcgagaacg ccgtactct acagtcttc tagccctgga cagagacccc 360
 cctgagtcca taggaggtcc tggaggaact gggggtgggg gcagtgggtg gggcaaacga 420
 gaagataaga agttgcaaaa tgctattgtg aatggggtgc tgcagaacac agagaacacc 480
 agtaaggaga cagagccaga ttgttttagag gttaaggagc tgactccaca cccatcaggt 540
 ctacgcactg catcaaaaac caagctcaga aggcaggaag gcattctccg cttctacatt 600
 atccaagtgg tgttccgaaa tgccctggaa attgggttcc tggttggcca atattttctc 660
 tatggcttta gtgtcccagg gttgtatgag tgtaaccgct acccctgcat caaggaggtg 720
 gaatgttatg tgtcccggcc aactgagaag actgtctttc tagtgttcat gtttgctgta 780

agtggcatct gtgttgtgct caacctggct gaactcaacc acctgggatg gcgcaagatc 840
 aagctggctg tgcgaggggc tcaggccaag agaaagtcaa tctatgagat tcgtaacaag 900
 gacctgccaa gggtcagtgt tcccaatttt ggcaggactc agtccagtga ctctgcctat 960
 gtgtga 966

<210> 19

<211> 1901

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 19

cagggagttg tggttgcaac actgtactcc agcctgggca acagaggag actctgtctc 60
 aacaaacaaa caaacaaaaga aaaaaccca cagctatcta gggaaaaagt aaagcaacca 120
 gcatatagaa gtgacatatt gttatatatt caccataggt ttgctttaag aaatagtgtc 180
 cccttcagaa tggaagaatt tatctgcctc ttatttgatg tggatcagag ctaagatggc 240
 tgactaaata aacatggggg actggaatct ccttgagat actctggagg aagttcacat 300
 ccactccacc atgattggaa agatctggct caccatcctg ttcataattc gaatgcttgt 360
 tctgggtgta gcagctgaag atgtctggaa tgatgagcag tctggcttca tctgcaatac 420
 agaacaacca ggctgcagaa atgtatgcta cgaccaggcc tttcctatct ccctcattag 480
 atactgggtt ctgcagggtga tatttgtgtc ttcacatcc ctggtctaca tgggccatgc 540
 attgtaccga ctgagagttc ttgaggaaga gaggcaaagg atgaaagctc agttaagagt 600
 agaactggag gaggtagagt ttgaaatgcc tagggatcgg aggagattgg agcaagagct 660
 ttgtcagctg gagaaaagga aactaaataa agctccactc agaggaacct tgctttgcac 720
 ttatgtgata cacattttca ctgcctctgt ggttgaagtt ggattcatga ttggacagta 780
 ccttttatat ggatttcact tagagccgct atttaagtgc catggccacc cgtgtccaaa 840
 tataatcgac tgttttgtct caagaccaac agaaaagaca atattcctat tatttatgca 900
 atctatagcc actatttcac ttttcttaaa cattcttgaa atttccacc taggttttaa 960
 aaagattaaa agagggcttt ggggaaaata caagttgaag aaggaacata atgaattcca 1020
 tgcaaacaag gcaaaacaaa atgtagccaa ataccagagc acatctgcaa attcactgaa 1080
 gcgactccct tctgcccctg attataatct gttagtggaa aagcaaacac acactgcagt 1140
 gtaccctagt ttaaattcat cttctgtatt ccagccaaat cctgacaatc atagtgtaaa 1200
 tgatgagaaa tgcatttttg atgaacagga aactgtactt tctaatagaga tttccacact 1260
 tagtactagt ttagtgcatt ttcaacacat cagttcaaac aataacaaag acactcataa 1320
 aatattttgga aaagaactta atggtaacca gttaatggaa aaaagagaaa ctgaaggcaa 1380
 agacagcaaa aggaactact actctagagg tcaccgttct attccaggtg ttgctataga 1440
 tggagagaac aacatgaggc agtcaccca aacagtttct tccttgccag ctaactgcga 1500
 ttggaaaccg cgggtggctta gagctacatg gggttcctct acagaacatg aaaaccgggg 1560
 gtcacctcct aaaggttaacc tcaagggccca gttcagaaag ggcacagtca gaacccttcc 1620
 tccttcacaa ggagattctc aatcacttga cattccaaac actgctgatt ctttgggagg 1680
 gctgtccttt gagccagggt tggtcagaac ctgtaataat cctgtttgtc ctccaaatca 1740
 cgtagtgtcc ctaacgaaca atctcattgg taggcgggtt cccacagatc ttcagatcta 1800

aacagcgggtt ggcttttaga cattatatat attatcagag aagtagccta gtggtcgtgg 1860
ggcacagaaa aaatagatag gggcagctct aaagaccagc t 1901

<210> 20

<211> 1311

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 20

atgagctgga gcttcctgac gcggctgctg gaggagatcc acaaccactc caccttcgtg 60
ggcaaggtgt ggctcacggt gctggtggtc ttccgcatcg tgctgacggc tgtgggaggc 120
gaggccatct actcggacga gcaggccaag ttactttgca acacgaggca gccaggctgc 180
gacaacgtct gctatgacgc cttcgcgccc ctgtcgcacg tgcgtttctg ggtcttccag 240
attgtggtca tctccacgcc ctcggtcatg tacctgggct acgccgtgca ccgcctggcc 300
cgtgcgtctg agcaggagcg gcgcccgcgc ctccgcccgc gcccggggcc acgccgcgcg 360
ccccgagcgc acctgccgcc ccgcacgcc ggctggcctg agcccgccga cctgggcgag 420
gaggagccca tgctgggcct gggcgaggag gaggaggagg aggagacggg ggcagccgag 480
ggcgccggcg aggaagcgga ggaggcaggc gcggaggagg cgtgcactaa ggcggtcggc 540
gctgacggca aggcggcagg gacccccggc ccgaccgggc aacacgatgg gcggaggcgc 600
atccagcggg agggcctgat gcgcgtgtac gtggcccagc tgggtggccag ggcagctttc 660
gaggtggcct tcctggtggg ccagtacctg ctgtacggct tcgaggtgcg accgtttctt 720
ccctgcagcc gccagccctg ccgcacgtg gtggactgct tcgtgtcgcg ccctactgaa 780
aagacggtct tcctgctggt tatgtacgtg gtcagctgcc tgtgcctgct gctcaacctc 840
tgtgagatgg cccacctggg cttgggcagc gcgcaggacg cgggtgcgcg ccgccgcggc 900
cccccgccct ccgccccgc cccgcgcgcg cggccccgc cctgcgcctt ccctgcggcg 960
gccgctggct tggcctgccc gcccactac agcctggtgg tgccggcggc cgagcgcgct 1020
cgggcgcatg accagaacct ggcaaacctg gccctgcagg cgctgcgcga cggggcagcg 1080
gctggggacc gcgaccggga cagttcgccg tgcgtcggcc tccctgcggc ctcccggggg 1140
ccccccagag caggcgcccc cgcgtcccgg acgggcagtg ctacctctgc gggcactgtc 1200
ggggagcagg gccggccccg caccacagag cggccaggag ccaagcccag ggctggctcc 1260
gagaagggca gtgccagcag cagggacggg aagaccaccg tgtggatctg a 1311

<210> 21

<211> 1588

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 21

agacattctc tgggaaaggg cagcagcagc caggtgtggc agtgacaggg aggtgtgaat 60
gaggcaggat gaactggaca ggtttgtaca cttgtctcag tggcgtgaac cggcattcta 120
ctgccattgg ccgagtatgg ctctcggtea tcttcatctt cagaatcatg gtgctggtgg 180
tggtctcaga gagtgtgtgg ggtgatgaga aatcttcctt catctgcaac acactccagc 240
ctggctgcaa cagcgtttgc tatgaccaat tcttccccat ctcccatgtg cggctgtggt 300

ccctgcagct catcctagtt tccaccccag ctctcctcgt ggccatgcac gtggctcacc 360
 agcaacacat agagaagaaa atgctacggc ttgagggcca tggggacccc ctacacctgg 420
 aggaggtgaa gaggcacaag gtccacatct caggacact gtggtggacc tatgtcatca 480
 gcgtgggtgtt ccggctgttg tttgaggccg tcttcatgta tgtcttttat ctgctctacc 540
 ctggctatgc catgggtgcgg ctgggtcaagt gcgacgtcta cccctgcccc aacacagtgg 600
 actgcttcgt gtcccgcccc accgagaaaa ccgtcttcac cgtcttcatg ctagctgcct 660
 ctggcatctg catcatcctc aatgtggccg aggtgggtga cctcatcatc cgggcctgtg 720
 cccgccgagc ccagcgccgc tccaatccac ctccccgcaa gggctcgggc ttgggccacc 780
 gcctctcacc tgaatacaag cagaatgaga tcaacaagct gctgagttag caggatggct 840
 ccctgaaaga catactgcgc cgagccctg gcaccggggc tgggctggct gaaaagagcg 900
 accgctgctc ggctgtctga tgccacatac caggcaacct cccatccac ccccgacct 960
 gccctgggcg agccccctct tctccccctgc cgggtgcacag gcctctgcct gctggggatt 1020
 actcgatcaa aaccttcctt ccctggetac ttcccttctt cccggggcct tctttttgag 1080
 gagctggagg ggtggggagc tagaggccac ctatgccagt gctcaagggt actgggagt 1140
 tgggctgccc ttgttgctg cacccttccc tcttccctct cctctctctt gggaccactg 1200
 ggtacaagag atgggatgct ccgacagcgt ctccaattat gaaactaatc ttaaccctgt 1260
 gctgtcagat accctgtttc tggagtcaca tcagttagga gggatgtggg taagaggagc 1320
 agagggcagg ggtgctgtgg acatgtgggt ggagaaggga ggggtggccag cactagtaaa 1380
 ggaggaatag tgcttgctgg ccacaaggaa aaggaggagg tgtctggggt gagggagtta 1440
 gggagagaga agcaggcaga taagttggag caggggttgg tcaaggccac ctctgcctct 1500
 agtccccaag gcctctctct gcctgaaatg ttacacatta aacaggattt tacagcaaaa 1560
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 1588

<210> 22

<211> 2263

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 22

cggagccccct cggcggcgcc cggcccagga cccgcctagg agcgcaggag cccagcgca 60
 gagaccccaa cgccgagacc cccgccccgg ccccgccgcg ctctctcccg acgagagca 120
 aaccgcccag agtagaagat ggattggggc acgtgcaga cgatcctggg ggggtgtgaac 180
 aaacactcca ccagcattgg aaagatctgg ctaccgtcc tcttcatttt tcgcattatg 240
 atcctcgttg tggctgcaaa ggaggtgtgg ggagatgagc aggccgactt tgtctgcaac 300
 accctgcagc caggctgcaa gaacgtgtgc tacgatcact acttccccat ctcccacatc 360
 cggctatggg ccctgcagct gatcttcgtg tccacgccag cgctcctagt ggccatgcac 420
 gtggcctacc ggagacatga gaagaagagg aagttcatca agggggagat aaagagtga 480
 tttaaggaca tcgaggagat caaaaccag aaggtccgca tcgaaggctc cctgtgtgtg 540
 acctacacaa gcagcatctt ctccgggtc atcttcgaag ccgccttcat gtacgtcttc 600
 tatgtcatgt acgacggctt ctccatgcag cggctgttga agtgcaacgc ctggccttgt 660
 cccaacactg tggactgctt tgtgtcccg cccacggaga agactgtctt cacagtgttc 720

atgattgcag tgtctggaat ttgcatcctg ctgaatgtca ctgaattgtg ttatttgcta 780
 attagatatt gttctgggaa gtcaaaaaag ccagtttaac gcattgccca gttgttagat 840
 taagaaatag acagcatgag agggatgagg caaccctgtc tcagctgtca aggctcagtc 900
 gccagcattt cccaacacaa agattctgac cttaaagtca accatttgaa acccctgtag 960
 gcctcagggtg aaactccaga tgccacaatg gagctctgct cccctaaagc ctcaaaacaa 1020
 aggccctaatt ctatgcctgt cttaattttc tttcacttaa gttagtcca ctgagacccc 1080
 aggctgttag gggttattgg tgtaaggtag tttcatatct taaacagagg atatcgcat 1140
 ttgtttcttt ctctgaggac aagagaaaaa agccagggtc cacagaggac acagagaagg 1200
 tttgggtgtc ctctgggggt tctttttgcc aactttcccc acgttaaagg tgaacattgg 1260
 ttctttcatt tgctttggaa gttttaatct ctaacagtgg acaaagttag cagtgcctta 1320
 aactctgtta cactttttgg aagtgaatac tttgtagtat gataggttat tttgatgtaa 1380
 agatgttctg gataccatta tatgttcccc ctgtttcaga ggctcagatt gtaatatgta 1440
 aatggtagt cattcgctac tatgatttaa tttgaaatat ggtcttttgg ttatgaatac 1500
 tttgcagcac agctgagagg ctgtctgttg tattcattgt ggtcatagca cctaacaaca 1560
 ttgtagcctc aatcgagtga gacagactag aagttcctag tgatggctta tgatagcaaa 1620
 tggcctcatg tcaaataatt agatgtaatt ttgtgtaaga aatacagact ggatgtacca 1680
 ccaactacta cctgtaatga caggcctgtc caacacatct cccttttcca tgactgtgggt 1740
 agccagcatc ggaaagaacg ctgatttaaa gaggtcgctt gggaatttta ttgacacagt 1800
 accatttaaat ggggaggaca aaatggggca ggggaggag aagtttctgt cgttaaaaac 1860
 agatttgaa agactggact ctaaattctg ttgattaaag atgagctttg tctacttcaa 1920
 aagtttgttt gcttaccctc tcagcctcca attttttaag tgaaaatata actaataaca 1980
 tgtgaaaaga atagaagcta aggttttagat aaatattgag cagatctata ggaagattga 2040
 acctgaatat tgccattatg ctgacatgg tttccaaaaa atggtactcc acatacttca 2100
 gtgagggtaa gtattttcct gttgtcaaga atagcattgt aaaagcattt tgtaataata 2160
 aagaatagct ttaatgatat gcttgtaact aaaataattt tgtaatgtat caaatacatt 2220
 taaaacatta aaatataatc tctataataa aaaaaaaaaa aaa 2263

<210> 23

<211> 2220

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 23

gaactttcttt cctggcacag gactcactgt gccccttccc gctgtgggta caaggtctgc 60
 cccccacccc agctctccaa agcccaccgg cctccctgga ggccgaggtc gacggcccgt 120
 cgcaccggga ggggggggctc ccaggggtgc ccacgcacg gtcaaggtcc cgcgccaagc 180
 ggggaccggg ctgggccgga agcgggcacg gtactcgcgg caaactagcg tgggcgagtc 240
 ctgattgcag tcggacctgc cgccgcggca cttaacagtt tgcagagtgc tcccccccc 300
 tgatctcatt ggagccttcg gacagcccag cccatggcca ccgatgcccc catttcacgc 360
 ctgaggaagc ggaggctcag acgggccacc agcccctccg gaggtggcc cgggagcgcc 420
 tggcagcgtc ggggtctagga gccggctccc tcctgctccc tcctccgcgc cgcccggggt 480

gtgcccgcgcg tctgtgtgca ccactgctga gcccagctcc ggcgccctcg cctctgctgt 540
 gggccccggg gacgcgggggt caggccaccg cgttgccag gccgctgcag gtaggcacgg 600
 cccccaccag gcgccatgga ctggaagaca ctccaggccc tactgagcgg tgtgaacaag 660
 tactccacag cgttcgggcg catctggctg tccgtggtgt tcgtcttccg ggtgctggta 720
 tacgtgggtg ctgcagagcg cgtgtggggg gatgagcaga aggactttga ctgcaacacc 780
 aagcagccccg gctgcaccaa cgtctgctac gacaactact tccccatctc caacatccgc 840
 ctctgggccc tgcagctcat cttcgtcaca tgcccctcgc tgctgggtcat cctgcacgtg 900
 gcctaccgtg aggagcggga gcgccggcac cgccagaaac acggggacca gtgcgccaag 960
 ctgtacgaca acgcaggcaa gaagcacgga ggctgtggt ggacctacct gttcagcctc 1020
 atcttcaagc tcatcattga gttcctcttc ctctacctgc tgcacactct ctggcatggc 1080
 ttcaatatgc cgcgcctggt gcagtgtgcc aacgtggccc cctgccccaa catcgtggac 1140
 tgctacattg cccgacctac cgagaagaaa atcttcacct acttcatggt gggcgccctc 1200
 gccgtctgca tcgtactcac catctgtgag ctctgtctacc tcacttgcca cagggtcctg 1260
 cgaggcctgc acaaggacaa gcctcgaggg ggttgccagc cctcgtcctc cgccagccga 1320
 gcttccacct gccgctgcca ccacaagctg gtggaggctg gggagggtga tccagaccca 1380
 ggcaataaca agctgcaggc ttcagcacc aacctgacct ccatctgacc acagggcagg 1440
 ggtggggcaa catgcgggct gccaatggga catgcagggc ggtgtggcag gtggagaggt 1500
 cctacagggg ctgagtgacc ccactctgag ttcactaagt tatgcaactt tcgttttggc 1560
 agatatTTTT tgacactggg aactgggctg tctagccggg tataggtaac ccacaggccc 1620
 agtgccagcc ctcaaaggac atagactttg aaacaagcga attaactatc tacgtgcct 1680
 gcaaggggcc acttagggca ctgctagcag ggcttcaacc aggaaggat caaccagga 1740
 agggatgatc aggagaggct tccctgagga cataatgtgt aagagaggtg agaagtgctc 1800
 ccaagcagac acaacagcag cacagaggtc tggaggccac aaaaaagt atgctcgccc 1860
 tgggctagcc tcagcagacc taaggcatct ctactccctc cagaggagcc gccagattc 1920
 ctgcagtgga gaggaggctt tccagcagca gcaggctctgg agggctgaga atgaacctga 1980
 ctagaggttc tggagatacc cagaggctcc ccaggctatc acttggtcga gtggaagccc 2040
 tctttcccca aatcctactc cctcagcctc aggcagtggg gctcccatct tcctccccac 2100
 aactgtgctc aggtgtgtgc cagcctttca gacctgctc ccagggactt ggtgtgatgc 2160
 gctgatagaa catcctcaag acagtttctc tgaaatcaat aaatactgtg tttataaaa 2220

<210> 24

<211> 1243

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 24

caaggctccc aaggcctgag tgggcaggta gcaccaggt atagaccttc cacgtgcagc 60
 acccaggaca cagccagcat gaactgggca tttctgcagg gcctgctgag tggcgtgaac 120
 aagtactcca cagtgtgag ccgcatctgg ctgtctgtgg tgttcatctt tcgtgtgctg 180
 gtgtacgtgg tggcagcgga ggaggtgtgg gacgatgagc agaaggactt tgtctgcaac 240
 accaagcagc ccggctgccc caacgtctgc tatgacgagt tcttccccgt gtcccacgtg 300

cgccctctggg ccctacagct catcctggtc acgtgccct cactgctcgt ggtcatgcac 360
 gtggcctacc gcgaggaacg cgagcgcaag caccacctga aacacgggcc caatgccccg 420
 tccctgtacg acaacctgag caagaagcgg ggcgactgt ggtggacgta cttgctgagc 480
 ctcatcttca aggccgccgt ggatgctggc ttctctata tcttcaccg cctctacaag 540
 gattatgaca tgccccgcgt ggtggcctgc tccgtggagc cttgccccca cactgtggac 600
 tgttacatct cccggccccac ggagaagaag gtcttcacct acttcatggt gaccacagct 660
 gccatctgca tcctgctcaa cctcagtga gtcttctacc tgggtgggcaa gaggtgcatg 720
 gagatcttcg gccccaggca ccggcgccct cggtgccggg aatgcctacc cgatactgc 780
 ccaccatatg tcctctccca gggaggggcac cctgaggatg ggaactctgt cctaataag 840
 gctgggtcgg cccagtgga tgcaggtggg tatccataac ctgcgagatc agcagataag 900
 atcaacaggt cccccccaca tgaggccacc caggaaaaa ggcaggggca gtggcatcct 960
 tgccgtagca ggggtggtgag gaggtgggt gtgggggctc aggaagctcg cccaggggcc 1020
 aatgtgggag gttgggggta gtttggtccc tgggtcctga gcctcagggg agggaggttg 1080
 atagctactg gggattttgt atatggcaac agtatatgtc aaacctctta ttaaatatga 1140
 ttttcccagt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 1243

<210> 25

<211> 1299

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 25

atgaaattca agctgcttgc tgagtcctat tgccggctgc tgggagccag gagagccctg 60
 aggagtagtc actcagtagc agctgacgcg tgggtccacc atgaactgga gtatctttga 120
 gggactcctg agtgggggtca acaagtactc cacagccttt gggcgcatct ggctgtctct 180
 ggtcttcatc ttccgcgtgc tgggtgtacct ggtgacggcc gagcgtgtgt ggagtgatga 240
 ccacaaggac ttcgactgca atactcgcca gcccggtgc tccaacgtct gctttgatga 300
 gttcttccct gtgtcccatg tgcgcctctg ggccctgcag cttatcctgg tgacatgccc 360
 ctcaactgctc gtggatcatgc acgtggccta ccgggaggtt caggagaaga ggcaccgaga 420
 agcccatggg gagaacagtg ggcgcctcta cctgaacccc ggcaagaagc ggggtgggct 480
 ctggtggaca tatgtctgca gcctagtgtt caaggcgagc gtggacatcg cttttctcta 540
 tgtgttccac tcattctacc ccaaataat cctccctcct gtggtcaagt gccacgcaga 600
 tccatgtccc aatatagtgg actgcttcat ctccaagccc tcagagaaga acattttcac 660
 cctcttcatg gtggccacag ctgccatctg catcctgctc aacctcgtgg agctcatcta 720
 cctggtgagc aagagatgcc acgagtgcct ggcagcaagg aaagctcaag ccatgtgcac 780
 aggtcatcac cccacaggta ccacctcttc ctgcaaaaaa gacgacctcc tttcgggtga 840
 cctcatcttt ctgggctcag acagtcaccc tcctctctta ccagaccgcc cccgagacca 900
 tgtgaagaaa accatcttgt gaggggctgc ctggactggt ctggcaggtt gggcctggat 960
 ggggaggctc tagcatctct cataggtgca acctgagagt gggggagcta agccatgagg 1020
 taggggcagg caagagagag gattcagacg ctctgggagc cagttcctag tcctcaactc 1080

cagccacctg cccagctcg acggcactgg gccagttccc cctctgctct gcagctcgg 1140
 ttccttttct agaattgaaa tagtgagggc caatgccag ggttgaggagg aggaggcg 1200
 tcatagaaga acacacatgc gggcaccttc atcgtgtgtg gccactgtc agaacttaat 1260
 aaaagtcaac tcatttgcgtg gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1299

<210> 26

<211> 1805

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 26

ctgggaagac gctggtcagt tcacctgccc cactggttgt tttttaaca aattctgata 60
 caggcgacat cctcactgac cgagcaaaga ttgacattcg tatcatcact gtgcaccatt 120
 ggcttctagg cactccagtg gggtaggaga aggaggtctg aaacctcgc agagggatct 180
 tgccctcatt ctttgggtct gaaacactgg cagtcgttgg aaacaggact cagggataaa 240
 ccagcgcaat ggattggggg acgctgcaca ctttcacggg ggggtgtcaac aaacactcca 300
 ccagcatcgg gaaggtgtgg atcacagtca tctttatctt ccgagtcatt atcctcgtgg 360
 tggctgcccc ggaagtgtgg ggtgacgagc aagaggactt cgtctgcaac aactgcaac 420
 cgggatgcaa aaatgtgtgc tatgaccact ttttcccggt gtccacatc cggctgtggg 480
 ccctccagct gatcttcgtc tccacccag cgctgctggg ggccatgcat gtggcctact 540
 acaggcacga aaccactcgc aagttcaggc gaggagagaa gaggaatgat ttcaaagaca 600
 tagaggacat taaaaagcag aaggttcgga tagagggtc gctgtggtgg acgtacacca 660
 gcagcatctt tttccgaatc atctttgaag cagcctttat gtatgtgttt tacttcttt 720
 acaatgggta ccacctgccc tgggtgttga aatgtgggat tgaccctgc cccaacctg 780
 ttgactgctt tatttctagg ccaacagaga agaccgtgtt taccattttt atgatttctg 840
 cgtctgtgat ttgcatgctg cttaacgtgg cagagtgtg ctacctgctg ctgaaagtgt 900
 gttttaggag atcaaagaga gcacagacgc aaaaaaatca cccaatcat gccctaaagg 960
 agagtaagca gaatgaaatg aatgagctga tttcagatag tggtaaaaat gcaatcacag 1020
 gtttcccaag ctaaaccattt caaggtaaaa tgtagctgcg tcataaggag acttctgtct 1080
 tctccagaag gcaataccaa cctgaaagt cttctgttag cctgaagagt ttgtaaatga 1140
 ctttcataat aaatagacac ttgagttaac ttttgttagg atacttgctc cattcataca 1200
 caacgtaatc aaatatgtgg tccatctctg aaaacaagag actgcttgac aaaggagcat 1260
 tgcagtcact ttgacagggt ctttttaagt ggactctctg acaaagtggg tactttctga 1320
 aaatttataa aactgttgtt gataaggaac atttatccag gaattgatac ttttattagg 1380
 aaaagatatt tttataggct tggatgtttt tagttctgac tttgaattta tataaagtat 1440
 ttttataatg actggtcttc cttacctgga aaaacatgcg atgttagttt tagaattaca 1500
 ccacaagtat ctaaatttgg aacttacaaa gggctctatc tgtaaatatt gttttgcatt 1560
 gtctgttggc aaatttgtga actgtcatga tacgtttaag gtggaaagtg ttcatcgac 1620
 aatataatct tactgcttcc tgaatgtaga cggaacagtg tggaagcaga aggttttttt 1680
 aactcatccg tttgccaatc attgcaaaac actgaaatgt ggatgtgatt gcctcaataa 1740
 agctcgtccc cattgcttaa gccttcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800

aaaaa 1805

<210> 27

<211> 2094

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 27

```

aaatgaaaga gggagcagga ggcgccggtc ccagccacct cccaaggtcc ctggctcagc 60
tctgacacccc cagtcccggc cccaggggtga gtgggggttg gtggcggttt aggggcacca 120
ggggcgtgtg gggacctgtg taagtgtggg gtggggagga tctcaggaga tgtggaggct 180
ggaggcacag gaggccaggg aggagggaga agcctggtgc cgcactccca ccacgctggg 240
gtaggagggc agggacacct ccgacaaagg acctgtgag agttatgaaa gcggagtgtc 300
ctctgtacca gccccccacc ctgagaggag ttcactgcag taaaaatggt gagagaaatg 360
gtggggccaag aaaggagtgg tctcgtgcc tctgccactc cactcctcc catgggcacc 420
aaattgggtc tagcgtctcg ggttcgaggc tccactcttc ccacagcatc cttgacagct 480
aagggcaccg ctgggtttcc gttccgaaa ccaggcaagt caggggctgg tccagctgat 540
ctccaaggtc cttcctaaga atctgggatc tggaggatcc cagggtcgaa cggagacggc 600
tcaggggggtg cggctaaaaat gcaaatgggg gatcctcccc agcaccatc ggtcccaaag 660
agaaggtaac ccatagctga gcgtcgctg ctccccctcg gccctcccgt ggccctccgt 720
ttcatactgg tctcatcgct aaaccggggc ctctcctacc tcacgactca ccctgaagtc 780
agagaaggtc caacggaccc cccccgata ggcttgaag gggcaggggt ccctgacttg 840
ccccatcccc tgactccccg ccccgctcc ccagcgccat gggggagtgg gcgttccctg 900
gctcgtctgt ggacgccgtg cagctgcagt cgccgctcgt gggccgcctc tggctggtgg 960
tcatgtctgat cttccgcatc ctggtgctgg ccacgggtgg cggcgccgtg ttcgaggacg 1020
agcaagagga gttcgtgtgc aacacgtgc agccgggctg tcgccagacc tgctacgacc 1080
gcgccttccc ggtctccac taccgcttct ggctcttcca catcctgctg ctctcggcgc 1140
ccccgggtgt gttcgtcgtc tactccatgc accgggcagg caaggaggcg ggcggcgtg 1200
aggcggcggc gcagtgcgcc cccggactgc ccgaggccca gtgcgcgccg tgcgccctgc 1260
gcgcccgcgc cgcgcgccgc tgctacctgc tgagcgtggc gctgcgcctg ctggccgagc 1320
tgaccttcct gggcggccag gcgtgctct acggttccg cgtggccccg cacttcgcgt 1380
gcgccgttcc gccctgcccc cacacggtcg actgcttcgt gagccggccc accgagaaga 1440
ccgtcttcgt gctcttctat ttcgcggtgg ggctgctgtc ggcgctgctc agcgtagccg 1500
agctgggcca cctgctctgg aagggccgcc cgcgcgccgg ggagcgtgac aaccgctgca 1560
accgtgcaca cgaagaggcg cagaagctgc tcccgccgcc gccgcccca cctattgttg 1620
tcaactggga agaaaacaga caccttcaag gagagggctc ccctggtagc cccacccca 1680
agacagagct ggatgcccc cgttccgta gggaaagcac ttctcctgca ggatggcatt 1740
gctctctccc cttccatggc acgtagtatg tgctcagtaa atatgtgttg gatgagaaac 1800
tgaagggtgt cccaggccta caccactgcc atgcccgaac actatccatg ctatggtggg 1860
caccatctct ctgatgacag ttctgtgtcc acaaccaga cccctccaca caaaccaga 1920
tggggctgtg ccgctgtttt ccagatgtat tcattcaaca aatatttgta ggttacctac 1980

```

tgtgtgtcag aagatgttca agatcagcat catccgatgg aaatagcata tgagccatgt 2040
atgtagttttc aagttttttca ttagccgcat taaaaaagta aaaggaaaca atg 2094

<210> 28

<211> 840

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 28

atgtgtggca ggttcctgcg gcggctgctg gcggaggaga gccggcgctc cccccccgtg 60
gggcgcctct tgcttcccgt gtcctggga ttccgccttg tgctgctggc tgccagtggg 120
cctggagtct atggtgatga gcagagtga ttcgtgtgtc acaccagca gccgggctgc 180
aaggctgcct gcttcgatgc cttccacccc ctctccccgc tgcgtttctg ggtcttccag 240
gtcatcttgg tggtgtacc cagcgccctc tatatgggtt tcaactctgta tcacgtgatc 300
tggcactggg aattatcagg aaaggggaag gaggaggaga ccctgatcca gggacgggag 360
ggcaacacag atgtcccagg ggctggaagc ctcaggctgc tctgggctta tgtggctcag 420
ctgggggctc ggcttgcctt ggagggggca gccctggggt tgcagtacca cctgtatggg 480
ttccagatgc ccagctcctt tgcattgtgc cgagaacctt gccttggtag tataacctgc 540
aatctgtccc gcccctctga gaagaccatt ttctaaaga ccatgttttg agtcagcggg 600
ttctgtctct tgtttacttt tttggagctt gtgcttctgg gtttggggag atggtggagg 660
acctggaagc acaaactctc ctcttctaaa tacttcctaa cttcagagag caccagaaga 720
cacaagaaag caaccgatag cctcccagtg gtggaaacca aagagcaatt tcaagaagca 780
gttccaggaa gaagcttagc ccaggaaaaa caaagaccag ttggaccag agatgcctga 840

<210> 29

<211> 672

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 29

atgagttgga tgttcctcag agatctcctg agtggagtaa ataaatactc cactgggact 60
ggatggattt ggctggctgt cgtgtttgtc ttccgtttgc tggctacat ggtggcagca 120
gagcacatgt ggaaagatga gcagaaagag tttgagtga acagtagaca gcccggttgc 180
aaaaatgtgt gttttgatga cttcttcccc atttcccaag tcagactttg ggccttaca 240
ctgataatgg tctccacacc ttcacttctg gtggttttac atgtagccta tcatgagggt 300
agagagaaaa ggcacagaaa gaaactctat gtcagcccag gtacaatgga tgggggccta 360
tggtacgctt atcttatcag cctcattgtt aaaactgggt ttgaaattgg cttccttgtt 420
ttattttata agctatatga tggttttagt gttccctacc ttataaagtg tgatttgaag 480
ccttgtccca aactgtgga ctgcttcac tccaaaccca ctgagaagac gatcttcac 540
ctcttcttgg tcatcacctc atgcttgtgt attgtgttga atttcattga actgagtttt 600
ttggttctca agtgctttat taagtgtgt ctccaaaaat atttaaaaaa acctcaagtc 660
ctcagtgtgt ga 672

<210> 30

<211> 1113

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 30

```

atggaaggcg tggacttgct agggttttctc atcatcacat taaactgcaa cgtgaccatg 60
gtaggaaaagc tctggttcgt cctcacgatg ctgctgcgga tgctggtgat tgtcttggcg 120
gggcgaccccg tctaccagga cgagcaggag aggtttgtct gcaacacgct gcagccggga 180
tgcgccaatg tttgctacga cgtctttctc cccgtgtctc acctgcggtt ctggctgata 240
cagggcggtg gcgtcctcct cccctccgcc gtcttcagcg tctatgtcct gcaccgagga 300
gccacgctcg ccgcgctggg ccccgccgc tgccccgacc cccgggagcc ggcctccggg 360
cagagacgct gcccgcggcc attcggggag cgcggcgccc tccaggtgcc cgacttttcg 420
gccggctaca tcatccacct cctcctccgg acctgctgg aggcagcctt cggggccttg 480
cactactttc tctttggatt cctggccccg aagaagtcc cttgcacgcg cctccgtgc 540
acgggcgtgg tggactgcta cgtgtcgcgg cccacagaga agtccttgc gatgctgttc 600
ctctgggcgg tcagcgcgct gtctttttctg ctgggcctcg ccgacctggt ctgcagcctg 660
cggcggcgga tgcgcaggag gccgggaccc cccacaagcc cctccatccg gaagcagagc 720
ggagcctcag gccacgcgga gggacgccgg actgacgagg aggttgggcg ggaggaagag 780
ggggcacccg cgccccggg tgcacgcgcc ggaggggagg gggctggcag cccaggcgt 840
acatccaggg tgtcagggca cacgaagatt ccgatgagg atgagagtga ggtgacatcc 900
tccgccagcg aaaagctggg cagacagccc cggggcaggc cccaccgaga ggccgcccag 960
gacccagagg gctcaggatc cgaggagcag ccctcagcag ccccgagccg cctggccgcg 1020
cccccttcct gcagcagcct gcagccccct gaccgcctg ccagctccag tgggtgctccc 1080
cacctgagag ccaggaagtc tgagtgggtg tga 1113

```

<210> 31

<211> 1632

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 31

```

atgggggact ggaacttatt ggggtggcatc ctagaggaag ttcactccca ctcaaccata 60
gtggggaaaa tctggctgac catcctcttc atcttccgaa tgctggtact tcgtgtggct 120
gctgaggatg tctgggatga tgaacagtca gcatttgcct gcaacacccg gcagccaggt 180
tgcaacaata tctgttatga tgatgcattc cctatctctt tgatcagggt ctgggtttta 240
cagatcatct ttgtgtcttc tccttctttg gtctatatgg gccatgcact ttataggctc 300
agggcctttg agaaagacag gcagaggaaa aagtcacacc ttagagccca gatggagaat 360
ccagatcttg acttgaggga gcagcaaaga atagataggg aactgaggag gttagaggag 420
cagaagagga tccataaagt ccctctgaaa ggatgtctgc tgcgtactta tgtcttacac 480
atcttgacca gatctgtgct ggaagtagga ttcattgatg gccaatatat tctctatggg 540
tttcaaatgc acccccttta caaatgcact caacctcctt gcccgaatgc ggtggattgc 600
tttgtatcca ggcccactga gaagacaatt ttcattgctt ttatgcacag cattgcagcc 660

```

atttccttgt tactcaatat actggaaata tttcatctag gcatcagaaa aattatgagg 720
 acactttata agaaatccag cagtgagggc attgaggatg aaacaggccc tccattccat 780
 ttgaagaaat attctgtggc ccagcagtgt atgatttgct cttcattgcc tgaaagaatc 840
 tctccacttc aagctaacaa tcaacagcaa gtcattcgag ttaatgtgcc aaagtctaaa 900
 accatgtggc aaatcccaca gccaaggcaa cttgaagtag acccttccaa tgggaaaaag 960
 gactgggtctg agaaggatca gcatagcgga cagctccatg ttcacagccc gtgtccctgg 1020
 gctggcagtg ctggaaatca gcacctggga cagcaatcag accattcctc atttggcctg 1080
 cagaatacaa tgtctcagtc ctggctaggt acaactacgg ctccatagaaa ctgtccatcc 1140
 tttgcagtag gaacctggga gcagtcccag gaccagaac cctcagggtga gcctctcaca 1200
 gatcttcata gtcactgcag agacagtga ggcagcatga gagagagtgg ggtctggata 1260
 gacagatctc gcccaggcag tcgcaaggcc agctttctgt ccagattgtt gtctgaaaag 1320
 cgacatctgc acagtgactc aggaagctct ggttctcgga atagctcctg cttggatttt 1380
 cctcactggg aaaacagccc ctcacctctg cttcagtc ctgggcacag aacatcaatg 1440
 gtaagacagg cagccctacc gatcatggaa ctatcacaag agctgttcca ttctggatgc 1500
 tttctttttc ctttctttct tcctggggtg tgtatgtatg tttgtgttga cagagaggca 1560
 gatggagggg gagattattt atggagagat aaaattattc attcgataca ttcagttaaa 1620
 ttcaattcat aa 1632

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 32

Phe Glu Val Ala Phe Leu Leu Ile Gln Trp Ile

1 5 10

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 33

Leu Leu Ile Gln Trp Tyr Ile Gly Phe Ser Leu

1 5 10

<210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence
<400> 34
Ser Leu Ser Ala Val Tyr Thr Cys Lys Arg Asp Pro Cys Pro His Gln
1 5 10 15
<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence
<400> 35
Val Asp Cys Phe Leu Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr
1 5 10
<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence
<400> 36
Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Ile Ile
1 5 10
<210> 37
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 37

Leu Gly Thr Ala Val Glu Ser Ala Trp Gly Asp Glu Gln

1 5 10

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 38

Gln Ser Ala Phe Arg Cys Asn Thr Gln Gln Pro Gly

1 5 10

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 39

Gln Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val Cys Tyr Asp Lys

1 5 10

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 40

Val Cys Tyr Asp Lys Ser Phe Pro Ile Ser His Val Arg

1 5 10

<210> 41

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 41

Ala Ala Glu Ser Val Trp Gly Asp Glu Ile Lys Ser Ser Phe Ile Cys

1 5 10 15

Asn Thr Leu Gln Pro Gly Cys Asn Ser Val Cys Tyr Asp His Phe Phe

20 25 30

Pro Ile Ser His Val Arg

35

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 42

Glu Ser Val Trp Gly Asp Glu Lys Ser Ser Phe Ile

1 5 10

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 43

Ile Cys Asn Thr Leu Gln Pro Gly Cys Asn Ser Val

1 5 10

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 44

Ser Val Cys Tyr Asp His Phe Phe Pro Ile Ser His

1 5 10

<210> 45

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 45

Arg Leu Val Lys Cys Glu Ala Phe Pro Cys Pro Asn Thr Val Asp Cys

1 5 10 15

Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr

20 25

<210> 46

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 46

Val Lys Cys Glu Ala Phe Pro Cys Pro Asn Thr Val

1 5 10

<210> 47

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide

sequence

<400> 47

Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr

1 5 10

<210> 48

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide

sequence

<400> 48

Val Cys Tyr Asp His Phe Phe Pro Ile Ser His Val Arg

1 5 10

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide

sequence

<400> 49

Val Trp Gly Asp Glu Lys Ser Ser Phe Ile Cys Asn Thr Leu Gln Pro Gly Tyr

1 5 10 15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide

sequence

<400> 50

Asp Glu Lys Ser Ser Phe Ile Cys Asn Thr Leu Gln Pro Gly Tyr

1 5 10 15

<210> 51

<211> 11

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence
<400> 51
Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Val Phe Thr Val
1 5 10
<210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence
<400> 52
Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr
1 5
<210> 53
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence
<400> 53
Val Cys Tyr Asp Lys Ser Phe Pro Ile Ser His Val Arg
1 5 10
<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 54

Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Ile Ile

1 5 10

<210> 55

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 55

Ile Cys Asn Thr Leu Gln Pro Gly Cys Asn Ser Val

1 5 10

<210> 56

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 56

Phe Leu Asp Thr Leu His Val Cys Arg Arg Ser Pro Cys Pro His Pro

1 5 10 15

<210> 57

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 57

Ser Leu Ser Ala Val Tyr Thr Cys Lys Arg Asp Pro Cys Pro His Gln

1 5 10 15

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 58

Val Cys Tyr Asp Lys Ser Phe Pro Ile Ser His Val Arg

1 5 10

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 59

Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Ile Ile

1 5 10

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin peptide sequence

<400> 60

Lys Arg Asp Pro Cys His Gln Val Asp Cys Phe Leu Ser Arg Pro Thr Glu Lys

1 5 10 15

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin/anti-connexin control peptide sequence

<400> 61

Ser Arg Gly Gly Glu Lys Asn Val Phe Ile Val
 1 5 10
 <210> 62
 <211> 396
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <220>
 <221> CA__BIND
 <223> Connexin 45
 <400> 62
 Met Ser Trp Ser Phe Leu Thr Arg Leu Leu Glu Glu Ile His Asn His
 1 5 10 15
 Ser Thr Phe Val Gly Lys Ile Trp Leu Thr Val Leu Ile Val Phe Arg
 20 25 30
 Ile Val Leu Thr Ala Val Gly Gly Glu Ser Ile Tyr Tyr Asp Glu Gln
 35 40 45
 Ser Lys Phe Val Cys Asn Thr Glu Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val Cys
 50 55 60
 Tyr Asp Ala Phe Ala Pro Leu Ser His Val Arg Phe Trp Val Phe Gln
 65 70 75 80
 Ile Ile Leu Val Ala Thr Pro Ser Val Met Tyr Leu Gly Tyr Ala Ile
 85 90 95
 His Lys Ile Ala Lys Met Glu His Gly Glu Ala Asp Lys Lys Ala Ala
 100 105 110
 Arg Ser Lys Pro Tyr Ala Met Arg Trp Lys Gln His Arg Ala Leu Glu
 115 120 125
 Glu Thr Glu Glu Asp Asn Glu Glu Asp Pro Met Met Tyr Pro Glu Met
 130 135 140
 Glu Leu Glu Ser Asp Lys Glu Asn Lys Glu Gln Ser Gln Pro Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys His Asp Gly Arg Arg Arg Ile Arg Glu Asp Gly Leu Met Lys Ile
 165 170 175
 Tyr Val Leu Gln Leu Leu Ala Arg Thr Val Phe Glu Val Gly Phe Leu
 180 185 190
 Ile Gly Gln Tyr Phe Leu Tyr Gly Phe Gln Val His Pro Phe Tyr Val
 195 200 205
 Cys Ser Arg Leu Pro Cys Pro His Lys Ile Asp Cys Phe Ile Ser Arg
 210 215 220
 Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Leu Leu Ile Met Tyr Gly Val Thr Gly

225	230	235	240
Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ile Trp Glu Met Leu His Leu Gly Phe Gly			
	245	250	255
Thr Ile Arg Asp Ser Leu Asn Ser Lys Arg Arg Glu Leu Glu Asp Pro			
	260	265	270
Gly Ala Tyr Asn Tyr Pro Phe Thr Trp Asn Thr Pro Ser Ala Pro Pro			
	275	280	285
Gly Tyr Asn Ile Ala Val Lys Pro Asp Gln Ile Gln Tyr Thr Glu Leu			
	290	295	300
Ser Asn Ala Lys Ile Ala Tyr Lys Gln Asn Lys Ala Asn Thr Ala Gln			
305	310	315	320
Glu Gln Gln Tyr Gly Ser His Glu Glu Asn Leu Pro Ala Asp Leu Glu			
	325	330	335
Ala Leu Gln Arg Glu Ile Arg Met Ala Gln Glu Arg Leu Asp Leu Ala			
	340	345	350
Val Gln Ala Tyr Ser His Gln Asn Asn Pro His Gly Pro Arg Glu Lys			
	355	360	365
Lys Ala Lys Val Gly Ser Lys Ala Gly Ser Asn Lys Ser Thr Ala Ser			
	370	375	380
Ser Lys Ser Gly Asp Gly Lys Asn Ser Val Trp Ile			
385	390	395	
<210> 63			
<211> 382			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<220>			
<221> CA__BIND			
<223> Connexin 43			
<400> 63			
Met Gly Asp Trp Ser Ala Leu Gly Lys Leu Leu Asp Lys Val Gln Ala			
1	5	10	15
Tyr Ser Thr Ala Gly Gly Lys Val Trp Leu Ser Val Leu Phe Ile Phe			
	20	25	30
Arg Ile Leu Leu Leu Gly Thr Ala Val Glu Ser Ala Trp Gly Asp Glu			
	35	40	45
Gln Ser Ala Phe Arg Cys Asn Thr Gln Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val			
	50	55	60
Cys Tyr Asp Lys Ser Phe Pro Ile Ser His Val Arg Phe Trp Val Leu			
65	70	75	80

Gln Ile Ile Phe Val Ser Val Pro Thr Leu Leu Tyr Leu Ala His Val		
85	90	95
Phe Tyr Val Met Arg Lys Glu Glu Lys Leu Asn Lys Lys Glu Glu Glu		
100	105	110
Leu Lys Val Ala Gln Thr Asp Gly Val Asn Val Asp Met His Leu Lys		
115	120	125
Gln Ile Glu Ile Lys Lys Phe Lys Tyr Gly Ile Glu Glu His Gly Lys		
130	135	140
Val Lys Met Arg Gly Gly Leu Leu Arg Thr Tyr Ile Ile Ser Ile Leu		
145	150	155
Phe Lys Ser Ile Phe Glu Val Ala Phe Leu Leu Ile Gln Trp Tyr Ile		
165	170	175
Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Ala Val Tyr Thr Cys Lys Arg Asp Pro Cys		
180	185	190
Pro His Gln Val Asp Cys Phe Leu Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile		
195	200	205
Phe Ile Ile Phe Met Leu Val Val Ser Leu Val Ser Leu Ala Leu Asn		
210	215	220
Ile Ile Glu Leu Phe Tyr Val Phe Phe Lys Gly Val Lys Asp Arg Val		
225	230	235
Lys Gly Lys Ser Asp Pro Tyr His Ala Thr Ser Gly Ala Leu Ser Pro		
245	250	255
Ala Lys Asp Cys Gly Ser Gln Lys Tyr Ala Tyr Phe Asn Gly Cys Ser		
260	265	270
Ser Pro Thr Ala Pro Leu Ser Pro Met Ser Pro Pro Gly Tyr Lys Leu		
275	280	285
Val Thr Gly Asp Arg Asn Asn Ser Ser Cys Arg Asn Tyr Asn Lys Gln		
290	295	300
Ala Ser Glu Gln Asn Trp Ala Asn Tyr Ser Ala Glu Gln Asn Arg Met		
305	310	315
Gly Gln Ala Gly Ser Thr Ile Ser Asn Ser His Ala Gln Pro Phe Asp		
325	330	335
Phe Pro Asp Asp Asn Gln Asn Ser Lys Lys Leu Ala Ala Gly His Glu		
340	345	350
Leu Gln Pro Leu Ala Ile Val Asp Gln Arg Pro Ser Ser Arg Ala Ser		
355	360	365
Ser Arg Ala Ser Ser Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu Ile		
370	375	380

<210> 64

<211> 226
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <220>
 <221> CA__BIND
 <223> Connexin 26
 <400> 64
 Met Asp Trp Gly Thr Leu Gln Thr Ile Leu Gly Gly Val Asn Lys His
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Ile Gly Lys Ile Trp Leu Thr Val Leu Phe Ile Phe Arg
 20 25 30
 Ile Met Ile Leu Val Val Ala Ala Lys Glu Val Trp Gly Asp Glu Gln
 35 40 45
 Ala Asp Phe Val Cys Asn Thr Leu Gln Pro Gly Cys Lys Asn Val Cys
 50 55 60
 Tyr Asp His Tyr Phe Pro Ile Ser His Ile Arg Leu Trp Ala Leu Gln
 65 70 75 80
 Leu Ile Phe Val Ser Thr Pro Ala Leu Leu Val Ala Met His Val Ala
 85 90 95
 Tyr Arg Arg His Glu Lys Lys Arg Lys Phe Ile Lys Gly Glu Ile Lys
 100 105 110
 Ser Glu Phe Lys Asp Ile Glu Glu Ile Lys Thr Gln Lys Val Arg Ile
 115 120 125
 Glu Gly Ser Leu Trp Trp Thr Tyr Thr Ser Ser Ile Phe Phe Arg Val
 130 135 140
 Ile Phe Glu Ala Ala Phe Met Tyr Val Phe Tyr Val Met Tyr Asp Gly
 145 150 155 160
 Phe Ser Met Gln Arg Leu Val Lys Cys Asn Ala Trp Pro Cys Pro Asn
 165 170 175
 Thr Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Val Phe Thr
 180 185 190
 Val Phe Met Ile Ala Val Ser Gly Ile Cys Ile Leu Leu Asn Val Thr
 195 200 205
 Glu Leu Cys Tyr Leu Leu Ile Arg Tyr Cys Ser Gly Lys Ser Lys Lys
 210 215 220
 Pro Val
 225
 <210> 65
 <211> 266

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> CA__BIND

<223> Connexin 30

<400> 65

```

Met Asn Trp Ala Phe Leu Gln Gly Leu Leu Ser Gly Val Asn Lys Tyr
1           5           10           15
Ser Thr Val Leu Ser Arg Ile Trp Leu Ser Val Val Phe Ile Phe Arg
          20          25          30
Val Leu Val Tyr Val Val Ala Ala Glu Glu Val Trp Asp Asp Glu Gln
          35          40          45
Lys Asp Phe Val Cys Asn Thr Lys Gln Pro Gly Cys Pro Asn Val Cys
          50          55          60
Tyr Asp Glu Phe Phe Pro Val Ser His Val Arg Leu Trp Ala Leu Gln
65           70           75           80
Leu Ile Leu Val Thr Cys Pro Ser Leu Leu Val Val Met His Val Ala
          85          90          95
Tyr Arg Glu Glu Arg Glu Arg Lys His His Leu Lys His Gly Pro Asn
          100         105         110
Ala Pro Ser Leu Tyr Asp Asn Leu Ser Lys Lys Arg Gly Gly Leu Trp
          115         120         125
Trp Thr Tyr Leu Leu Ser Leu Ile Phe Lys Ala Ala Val Asp Ala Gly
          130         135         140
Phe Leu Tyr Ile Phe His Arg Leu Tyr Lys Asp Tyr Asp Met Pro Arg
145           150           155           160
Val Val Ala Cys Ser Val Glu Pro Cys Pro His Thr Val Asp Cys Tyr
          165         170         175
Ile Ser Arg Pro Thr Glu Lys Lys Val Phe Thr Tyr Phe Met Val Thr
          180         185         190
Thr Ala Ala Ile Cys Ile Leu Leu Asn Leu Ser Glu Val Phe Tyr Leu
          195         200         205
Val Gly Lys Arg Cys Met Glu Ile Phe Gly Pro Arg His Arg Arg Pro
          210         215         220
Arg Cys Arg Glu Cys Leu Pro Asp Thr Cys Pro Pro Tyr Val Leu Ser
225           230           235           240
Gln Gly Gly His Pro Glu Asp Gly Asn Ser Val Leu Met Lys Ala Gly
          245         250         255
Ser Ala Pro Val Asp Ala Gly Gly Tyr Pro

```

260	265
<210> 66	
<211> 273	
<212> PRT	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<220>	
<221> CA__BIND	
<223> Connexin 31.1	
<400> 66	
Met Asn Trp Ser Ile Phe Glu Gly Leu Leu Ser Gly Val Asn Lys Tyr	
1 5 10 15	
Ser Thr Ala Phe Gly Arg Ile Trp Leu Ser Leu Val Phe Ile Phe Arg	
20 25 30	
Val Leu Val Tyr Leu Val Thr Ala Glu Arg Val Trp Ser Asp Asp His	
35 40 45	
Lys Asp Phe Asp Cys Asn Thr Arg Gln Pro Gly Cys Ser Asn Val Cys	
50 55 60	
Phe Asp Glu Phe Phe Pro Val Ser His Val Arg Leu Trp Ala Leu Gln	
65 70 75 80	
Leu Ile Leu Val Thr Cys Pro Ser Leu Leu Val Val Met His Val Ala	
85 90 95	
Tyr Arg Glu Val Gln Glu Lys Arg His Arg Glu Ala His Gly Glu Asn	
100 105 110	
Ser Gly Arg Leu Tyr Leu Asn Pro Gly Lys Lys Arg Gly Gly Leu Trp	
115 120 125	
Trp Thr Tyr Val Cys Ser Leu Val Phe Lys Ala Ser Val Asp Ile Ala	
130 135 140	
Phe Leu Tyr Val Phe His Ser Phe Tyr Pro Lys Tyr Ile Leu Pro Pro	
145 150 155 160	
Val Val Lys Cys His Ala Asp Pro Cys Pro Asn Ile Val Asp Cys Phe	
165 170 175	
Ile Ser Lys Pro Ser Glu Lys Asn Ile Phe Thr Leu Phe Met Val Ala	
180 185 190	
Thr Ala Ala Ile Cys Ile Leu Leu Asn Leu Val Glu Leu Ile Tyr Leu	
195 200 205	
Val Ser Lys Arg Cys His Glu Cys Leu Ala Ala Arg Lys Ala Gln Ala	
210 215 220	
Met Cys Thr Gly His His Pro His Gly Thr Thr Ser Ser Cys Lys Gln	
225 230 235 240	

Asp Asp Leu Leu Ser Gly Asp Leu Ile Phe Leu Gly Ser Asp Ser His
 245 250 255
 Pro Pro Leu Leu Pro Asp Arg Pro Arg Asp His Val Lys Lys Thr Ile
 260 265 270
 Leu
 <210> 67
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <220>
 <221> CA__BIND
 <223> Connexin 37
 <400> 67
 Met Gly Asp Trp Gly Phe Leu Glu Lys Leu Leu Asp Gln Val Gln Glu
 1 5 10 15
 His Ser Thr Val Val Gly Lys Ile Trp Leu Thr Val Leu Phe Ile Phe
 20 25 30
 Arg Ile Leu Ile Leu Gly Leu Ala Gly Glu Ser Val Trp Gly Asp Glu
 35 40 45
 Gln Ser Asp Phe Glu Cys Asn Thr Ala Gln Pro Gly Cys Thr Asn Val
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Gln Ala Phe Pro Ile Ser His Ile Arg Tyr Trp Val Leu
 65 70 75 80
 Gln Phe Leu Phe Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Tyr Leu Gly His Val
 85 90 95
 Ile Tyr Leu Ser Arg Arg Glu Glu Arg Leu Arg Gln Lys Glu Gly Glu
 100 105 110
 Leu Arg Ala Leu Pro Ala Lys Asp Pro Gln Val Glu Arg Ala Leu Ala
 115 120 125
 Ala Val Glu Arg Gln Met Ala Lys Ile Ser Val Ala Glu Asp Gly Arg
 130 135 140
 Leu Arg Ile Arg Gly Ala Leu Met Gly Thr Tyr Val Ala Ser Val Leu
 145 150 155 160
 Cys Lys Ser Val Leu Glu Ala Gly Phe Leu Tyr Gly Gln Trp Arg Leu
 165 170 175
 Tyr Gly Trp Thr Met Glu Pro Val Phe Val Cys Gln Arg Ala Pro Cys
 180 185 190
 Pro Tyr Leu Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile
 195 200 205

Phe Ile Ile Phe Met Leu Val Val Gly Leu Ile Ser Leu Val Leu Asn
 210 215 220
 Leu Leu Glu Leu Val His Leu Leu Cys Arg Cys Leu Ser Arg Gly Met
 225 230 235 240
 Arg Ala Arg Gln Gly Gln Asp Ala Pro Pro Thr Gln Gly Thr Ser Ser
 245 250 255
 Asp Pro Tyr Thr Asp Gln Val Phe Phe Tyr Leu Pro Val Gly Gln Gly
 260 265 270
 Pro Ser Ser Pro Pro Cys Pro Thr Tyr Asn Gly Leu Ser Ser Ser Glu
 275 280 285
 Gln Asn Trp Ala Asn Leu Thr Thr Glu Glu Arg Leu Ala Ser Ser Arg
 290 295 300
 Pro Pro Leu Phe Leu Asp Pro Pro Pro Gln Asn Gly Gln Lys Pro Pro
 305 310 315 320
 Ser Arg Pro Ser Ser Ser Ala Ser Lys Lys Gln Tyr Val
 325 330

<210> 68

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA_BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 68

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

His Ile Arg

35

<210> 69

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA_BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 69

Gln Glu Val Trp Gly Asp Glu Gln Glu Asp Phe Val Cys Asn Thr Leu

1	5	10	15												
Gln	Pro	Gly	Cys	Lys	Asn	Val	Cys	Tyr	Asp	His	Phe	Phe	Pro	Val	Ser
		20						25					30		

His Ile Arg
35
<210> 70
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain
<400> 70
Glu Glu Val Trp Asp Asp Glu Gln Lys Asp Phe Val Cys Asn Thr Lys
1 5 10 15
Gln Pro Gly Cys Pro Asn Val Cys Tyr Asp Glu Phe Phe Pro Val Ser
20 25 30
His Val Arg
35
<210> 71
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain
<400> 71
Glu Arg Val Trp Gly Asp Glu Gln Lys Asp Phe Asp Cys Asn Thr Lys
1 5 10 15
Gln Pro Gly Cys Thr Asn Val Cys Tyr Asp Asn Tyr Phe Pro Ile Ser
20 25 30
Asn Ile Arg
35
<210> 72
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 72

Glu Arg Val Trp Ser Asp Asp His Lys Asp Phe Asp Cys Asn Thr Arg

1 5 10 15

Gln Pro Gly Cys Ser Asn Val Cys Phe Asp Glu Phe Phe Pro Val Ser

20 25 30

His Val Arg

35

<210> 73

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 73

Glu Ser Val Trp Gly Asp Glu Lys Ser Ser Phe Ile Cys Asn Thr Leu

1 5 10 15

Gln Pro Gly Cys Asn Ser Val Cys Tyr Asp Gln Phe Phe Pro Ile Ser

20 25 30

His Val Arg

35

<210> 74

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 74

Glu Ser Val Trp Gly Asp Glu Gln Ser Asp Phe Glu Cys Asn Thr Ala

1 5 10 15

Gln Pro Gly Cys Thr Asn Val Cys Tyr Asp Gln Ala Phe Pro Ile Ser

20 25 30

His Ile Arg

35

<210> 75

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 75

Glu Ser Val Trp Gly Asp Glu Gln Ser Asp Phe Glu Cys Asn Thr Ala

1 5 10 15

Gln Pro Gly Cys Thr Asn Val Cys Tyr Asp Gln Ala Phe Pro Ile Ser

20 25 30

His Ile Arg

35

<210> 76

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 76

Arg Pro Val Tyr Gln Asp Glu Gln Glu Arg Phe Val Cys Asn Thr Leu

1 5 10 15

Gln Pro Gly Cys Ala Asn Val Cys Tyr Asp Val Phe Ser Pro Val Ser

20 25 30

His Leu Arg

35

<210> 77

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 77

Glu Ser Ala Trp Gly Asp Glu Gln Ser Ala Phe Arg Cys Asn Thr Gln

1 5 10 15

Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val Cys Tyr Asp Lys Ser Phe Pro Ile Ser

20 25 30

His Val Arg

35

<210> 78
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain
<400> 78
Glu Asp Val Trp Gly Asp Glu Gln Ser Asp Phe Thr Cys Asn Thr Gln
1 5 10 15
Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val Cys Tyr Asp Arg Ala Phe Pro Ile Ser
 20 25 30
His Ile Arg
 35
<210> 79
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain
<400> 79
Glu Ala Ile Tyr Ser Asp Glu Gln Ala Lys Phe Thr Cys Asn Thr Arg
1 5 10 15
Gln Pro Gly Cys Asp Asn Val Cys Tyr Asp Ala Phe Ala Pro Leu Ser
 20 25 30
His Val Arg
 35
<210> 80
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain
<400> 80
Glu Ser Ser Trp Gly Asp Glu Gln Ala Asp Phe Arg Cys Asp Thr Ile
1 5 10 15
Gln Pro Gly Cys Gln Asn Val Cys Thr Asp Gln Ala Phe Pro Ile Ser

	20	25	30
His Ile Arg			
35			
<210> 81			
<211> 36			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<221> CA__BIND			
<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain			
<400> 81			
Gly Glu Ser Ile Tyr Tyr Asp Glu Gln Ser Lys Phe Val Cys Asn Thr			
1 5 10 15			
Glu Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val Cys Tyr Asp Ala Phe Ala Pro Leu			
20 25 30			
Ser His Val Arg			
35			
<210> 82			
<211> 39			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<221> CA__BIND			
<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain			
<400> 82			
Met Tyr Val Phe Tyr Val Met Tyr Asp Gly Phe Ser Met Gln Arg Leu			
1 5 10 15			
Val Lys Cys Asn Ala Trp Pro Cys Pro Asn Thr Val Asp Cys Phe Val			
20 25 30			
Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr			
35			
<210> 83			
<211> 39			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<221> CA__BIND			
<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain			
<400> 83			

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

<210> 84

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 84

Leu Tyr Ile Phe His Arg Leu Tyr Lys Asp Tyr Asp Met Pro Arg Val
1 5 10 15
Val Ala Cys Ser Val Glu Pro Cys Pro His Thr Val Asp Cys Tyr Ile
20 25 30
Ser Arg Pro Thr Glu Lys Lys
35

<210> 85

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 85

Leu Tyr Leu Leu His Thr Leu Trp His Gly Phe Asn Met Pro Arg Leu
1 5 10 15
Val Gln Cys Ala Asn Val Ala Pro Cys Pro Asn Ile Val Asp Cys Tyr
20 25 30
Ile Ala Arg Pro Thr Glu Lys Lys
35 40

<210> 86

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 86

Leu Tyr Val Phe His Ser Phe Tyr Pro Lys Tyr Ile Leu Pro Pro Val

1 5 10 15

Val Lys Cys His Ala Asp Pro Cys Pro Asn Ile Val Asp Cys Phe Ile

20 25 30

Ser Lys Pro Ser Glu Lys Asn

35

<210> 87

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 87

Met Tyr Val Phe Tyr Leu Leu Tyr Pro Gly Tyr Ala Met Val Arg Leu

1 5 10 15

Val Lys Cys Asp Val Tyr Pro Cys Pro Asn Thr Val Asp Cys Phe Val

20 25 30

Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr

35

<210> 88

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 88

Leu Tyr Gly Trp Thr Met Glu Pro Val Phe Val Cys Gln Arg Ala Pro

1 5 10 15

Cys Pro Tyr Leu Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr

20 25 30

<210> 89

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 89

Leu Tyr Gly Trp Thr Met Glu Pro Val Phe Val Cys Gln Arg Ala Pro

1 5 10 15

Cys Pro Tyr Leu Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr

20 25 30

<210> 90

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 90

Gly Ala Leu His Tyr Phe Leu Phe Gly Phe Leu Ala Pro Lys Lys Phe

1 5 10 15

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Cys Thr Gly Val Val Asp Cys Tyr Val Ser

20 25 30

Arg Pro Thr Glu Lys Ser

35

<210> 91

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 91

Leu Leu Ile Gln Trp Tyr Ile Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Ala Val Tyr

1 5 10 15

Thr Cys Lys Arg Asp Pro Cys Pro His Gln Val Asp Cys Phe Leu Ser

20 25 30

Arg Pro Thr Glu Lys Thr

35

<210> 92

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 92

Ile Ala Gly Gln Tyr Phe Leu Tyr Gly Phe Glu Leu Lys Pro Leu Tyr

1 5 10 15

Arg Cys Asp Arg Trp Pro Cys Pro Asn Thr Val Asp Cys Phe Ile Ser

20 25 30

Arg Pro Thr Glu Lys Thr

35

<210> 93

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Description of Artificial Sequence: connexin extracellular domain

<400> 93

Leu Val Gly Gln Tyr Leu Leu Tyr Gly Phe Glu Val Arg Pro Phe Phe

1 5 10 15

Pro Cys Ser Arg Gln Pro Cys Pro His Val Val Asp Cys Phe Val Ser

20 25 30

Arg Pro Thr Glu Lys Thr

35

<210> 94

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Connexin extracellular domain

<400> 94

Ile Val Gly Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly Ile Phe Leu Thr Thr Leu His

1 5 10 15

Val Cys Arg Arg Ser Pro Cys Pro His Pro Val Asn Cys Tyr Val Ser

20 25 30

Arg Pro Thr Glu Lys Asn

35

<210> 95
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Artificial Sequence: Connexin extracellular domain
<400> 95
Leu Ile Gly Gln Tyr Phe Leu Tyr Gly Phe Gln Val His Pro Phe Tyr
1 5 10 15
Val Cys Ser Arg Leu Pro Cys His Pro Lys Ile Asp Cys Phe Ile Ser
 20 25 30
Arg Pro Thr Glu Lys Thr
 35

<210> 96
<211> 42
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Artificial Sequence: Connexin extracellular domain
<400> 96
Leu Leu Ile Gln Trp Tyr Ile Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Ala Val Tyr
1 5 10 15
Thr Cys Lys Arg Asp Pro Cys Pro His Gln Val Asp Cys Phe Leu Ser
 20 25 30
Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Ile Ile
 35 40

<210> 97
<211> 43
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Artificial Sequence: Connexin extracellular domain
<400> 97
Met Tyr Val Phe Tyr Val Met Tyr Asp Gly Phe Ser Met Gln Arg Leu
1 5 10 15
Val Lys Cys Asn Ala Trp Pro Cys Pro Asn Thr Val Asp Cys Phe Val

	20		25		30										
Ser	Arg	Pro	Thr	Glu	Lys	Thr	Val	Phe	Thr	Val					
	35		40												
<210> 98															
<211> 43															
<212> PRT															
<213> Artificial Sequence															
<220>															
<221> CA__BIND															
<223> Artificial Sequence: Connexin extracellular domain															
<400> 98															
Met	Tyr	Val	Phe	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Asn	Gly	Tyr	His	Leu	Pro	Trp	Val
1			5				10					15			
Leu	Lys	Cys	Gly	Ile	Asp	Pro	Cys	Pro	Asn	Leu	Val	Asp	Cys	Phe	Ile
			20				25					30			
Ser	Arg	Pro	Thr	Glu	Lys	Thr	Val	Phe	Thr	Ile					
			35				40								
<210> 99															
<211> 43															
<212> PRT															
<213> Artificial Sequence															
<220>															
<221> CA__BIND															
<223> Artificial Sequence: Connexin extracellular domain															
<400> 99															
Leu	Tyr	Ile	Phe	His	Arg	Leu	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Asp	Met	Pro	Arg	Val
1			5				10					15			
Val	Ala	Cys	Ser	Val	Glu	Pro	Cys	Pro	His	Thr	Val	Asp	Cys	Tyr	Ile
			20				25					30			
Ser	Arg	Pro	Thr	Glu	Lys	Lys	Val	Phe	Thr	Tyr					
			35				40								
<210> 100															
<211> 44															
<212> PRT															
<213> Artificial Sequence															
<220>															
<221> CA__BIND															
<223> Artificial Sequence: Connexin extracellular domain															
<400> 100															

Leu Tyr Leu Leu His Thr Leu Trp His Gly Phe Asn Met Pro Arg Leu
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Ala Asn Val Ala Pro Cys Pro Asn Ile Val Asp Cys Tyr
 20 25 30
 Ile Ala Arg Pro Thr Glu Lys Lys Ile Phe Thr Tyr
 35 40

<210> 101

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin extracellular domain

<400> 101

Leu Tyr Val Phe His Ser Phe Tyr Pro Lys Tyr Ile Leu Pro Pro Val
 1 5 10 15
 Val Lys Cys His Ala Asp Pro Cys Pro Asn Ile Val Asp Cys Phe Ile
 20 25 30
 Ser Lys Pro Ser Glu Lys Asn Ile Phe Thr Leu
 35 40

<210> 102

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin extracellular domain

<400> 102

Met Tyr Val Phe Tyr Leu Leu Tyr Pro Gly Tyr Ala Met Val Arg Leu
 1 5 10 15
 Val Lys Cys Asp Val Tyr Pro Cys Pro Asn Thr Val Asp Cys Phe Val
 20 25 30
 Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Val Phe Thr Val
 35 40

<210> 103

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin extracellular domain

<400> 103

```

Leu Tyr Gly Trp Thr Met Glu Pro Val Phe Val Cys Gln Arg Ala Pro
1           5           10           15
Cys Pro Tyr Leu Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr
           20           25           30
Ile Phe Ile Ile
           35

```

<210> 104

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin extracellular domain

<400> 104

```

Leu Tyr Gly Trp Thr Met Glu Pro Val Phe Val Cys Gln Arg Ala Pro
1           5           10           15
Cys Pro Tyr Leu Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr
           20           25           30
Ile Phe Ile Ile
           35

```

<210> 105

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin extracellular domain

<400> 105

```

Gly Ala Leu His Tyr Phe Leu Phe Gly Phe Leu Ala Pro Lys Lys Phe
1           5           10           15
Pro Cys Thr Arg Pro Pro Cys Thr Gly Val Val Asp Cys Tyr Val Ser
           20           25           30
Arg Pro Thr Glu Lys Ser Leu Leu Met Leu
           35           40

```

<210> 106

<211> 42

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> CA__BIND
 <223> Artificial Sequence: Connexin extracellular domain
 <400> 106
 Ile Ala Gly Gln Tyr Phe Leu Tyr Gly Phe Glu Leu Lys Pro Leu Tyr
 1 5 10 15
 Arg Cys Asp Arg Trp Pro Cys Pro Asn Thr Val Asp Cys Phe Ile Ser
 20 25 30
 Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Ile Ile
 35 40
 <210> 107
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> CA__BIND
 <223> Artificial Sequence: Connexin extracellular domain
 <400> 107
 Leu Val Gly Gln Tyr Leu Leu Tyr Gly Phe Glu Val Arg Pro Phe Phe
 1 5 10 15
 Pro Cys Ser Arg Gln Pro Cys Pro His Val Val Asp Cys Phe Val Ser
 20 25 30
 Arg Pro Thr Glu Lys Thr Val Phe Leu Leu
 35 40
 <210> 108
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> CA__BIND
 <223> Artificial Sequence: Connexin extracellular domain
 <400> 108
 Ile Val Gly Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly Ile Phe Leu Thr Thr Leu His
 1 5 10 15
 Val Cys Arg Arg Ser Pro Cys Pro His Pro Val Asn Cys Tyr Val Ser
 20 25 30
 Arg Pro Thr Glu Lys Asn Val Phe Ile Val

35 40

<210> 109

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin extracellular domain

<400> 109

Leu Ile Gly Gln Tyr Phe Leu Tyr Gly Phe Gln Val His Pro Phe Tyr

1 5 10 15

Val Cys Ser Arg Leu Pro Cys His Pro Lys Ile Asp Cys Phe Ile Ser

20 25 30

Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Leu Leu

35 40

<210> 110

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin domain

<400> 110

Leu Gly Thr Ala Ala Glu Ser Ser Trp Gly Asp Glu Gln Ala Asp Phe

1 5 10 15

Arg Cys Asp Thr Ile Gln Pro Gly Cys Gln Asn Val Cys Thr Asp Gln

20 25 30

Ala Phe Pro Ile Ser His Ile Arg Phe Trp Val Leu Gln

35 40 45

<210> 111

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin domain

<400> 111

Leu Gly Thr Ala Ala Glu Ser Ser Trp Gly Asp Glu Gln Ala

1 5 10

<210> 112
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Artificial Sequence: Connexin domain
<400> 112
Asp Glu Gln Ala Asp Phe Arg Cys Asp Thr Ile Gln Pro
1 5 10
<210> 113
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Artificial Sequence: Connexin domain
<400> 113
Thr Ile Gln Pro Gly Cys Gln Asn Val Cys Thr Asp Gln
1 5 10
<210> 114
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Artificial Sequence: Connexin domain
<400> 114
Val Cys Thr Asp Gln Ala Phe Pro Ile Ser His Ile Arg
1 5 10
<210> 115
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Artificial Sequence: Connexin domain
<400> 115
Ala Phe Pro Ile Ser His Ile Arg Phe Trp Val Leu Gln

1 5 10
<210> 116
<211> 47
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Artificial Sequence: Connexin domain
<400> 116
Met Glu Val Gly Phe Ile Val Gly Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly Ile Phe
1 5 10 15
Leu Thr Thr Leu His Val Cys Arg Arg Ser Pro Cys Pro His Pro Val
20 25 30
Asn Cys Tyr Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Asn Val Phe Ile Val
35 40 45
<210> 117
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Artificial Sequence: Connexin domain
<400> 117
Met Glu Val Gly Phe Ile Val Gly Gln Tyr Phe
1 5 10
<210> 118
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CA__BIND
<223> Artificial Sequence: Connexin domain
<400> 118
Ile Val Gly Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly Ile Phe Leu
1 5 10
<210> 119
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin domain

<400> 119

Gly Ile Phe Leu Thr Thr Leu His Val Cys Arg Arg Ser Pro

1 5 10

<210> 120

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin domain

<400> 120

Arg Arg Ser Pro Cys Pro His Pro Val Asn Cys Tyr

1 5 10

<210> 121

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin domain

<400> 121

Leu Thr Ala Val Gly Gly Glu Ser Ile Tyr Tyr Asp Glu Gln Ser Lys

1 5 10 15

Phe Val Cys Asn Thr Glu Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val Cys Tyr Asp

20 25 30

Ala Phe Ala Pro Leu Ser His Val Arg Phe Trp Val Phe Gln

35 40 45

<210> 122

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin domain

<400> 122

Leu Thr Ala Val Gly Gly Glu Ser Ile Tyr Tyr Asp Glu Gln Ser

1	5	10	15
<210> 123			
<211> 13			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<221> CA__BIND			
<223> Artificial Sequence: Connexin domain			
<400> 123			
Asp Glu Gln Ser Lys Phe Val Cys Asn Thr Glu Gln Pro			
1	5	10	
<210> 124			
<211> 13			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<221> CA__BIND			
<223> Artificial Sequence: Connexin domain			
<400> 124			
Thr Glu Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val Cys Tyr Asp Ala			
1	5	10	
<210> 125			
<211> 13			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<221> CA__BIND			
<223> Artificial Sequence: Connexin domain			
<400> 125			
Val Cys Tyr Asp Ala Phe Ala Pro Leu Ser His Val Arg			
1	5	10	
<210> 126			
<211> 12			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<221> CA__BIND			
<223> Artificial Sequence: Connexin domain			
<400> 126			

Ala Pro Leu Ser His Val Arg Phe Trp Val Phe Gln

1 5 10

<210> 127

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin domain

<400> 127

Phe Glu Val Gly Phe Leu Ile Gly Gln Tyr Phe Leu Tyr Gly Phe Gln

1 5 10 15

Val His Pro Phe Tyr Val Cys Ser Arg Leu Pro Cys His Pro Lys Ile

20 25 30

Asp Cys Phe Ile Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Leu Leu

35 40 45

<210> 128

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin domain

<400> 128

Phe Glu Val Gly Phe Leu Ile Gly Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 129

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin domain

<400> 129

Leu Ile Gly Gln Tyr Phe Leu Tyr Gly Phe Gln Val

1 5 10

<210> 130

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin domain

<400> 130

Gly Phe Gln Val His Pro Phe Tyr Val Cys Ser Arg Leu Pro

1 5 10

<210> 131

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CA__BIND

<223> Artificial Sequence: Connexin domain

<400> 131

Ser Arg Leu Pro Cys His Pro Lys Ile Asp Cys Phe

1 5 10

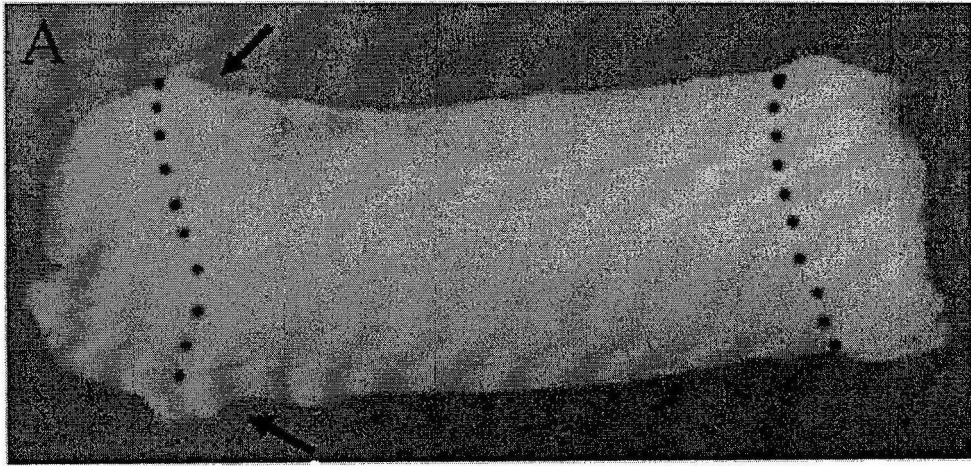


图1A

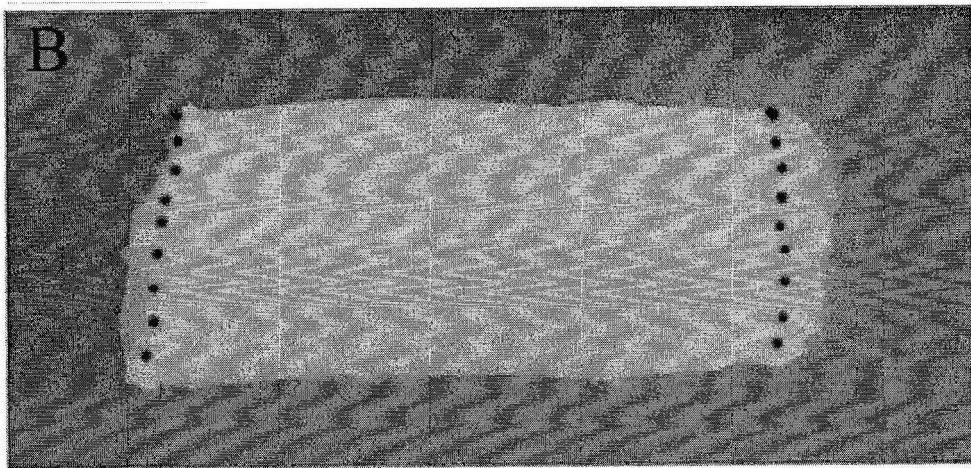


图1B

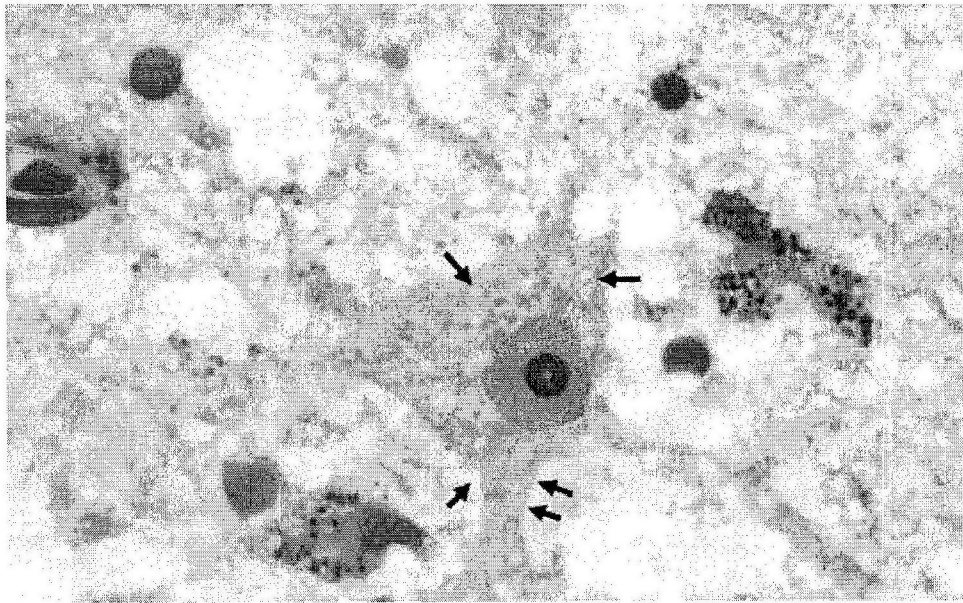


图2

图 3A

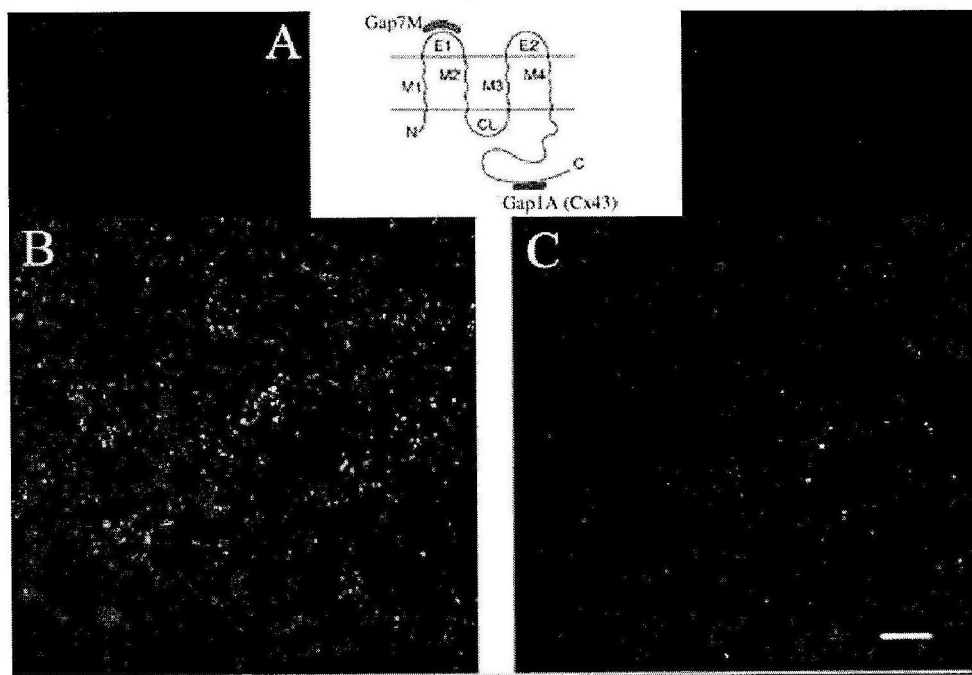


图 3B

图 3C

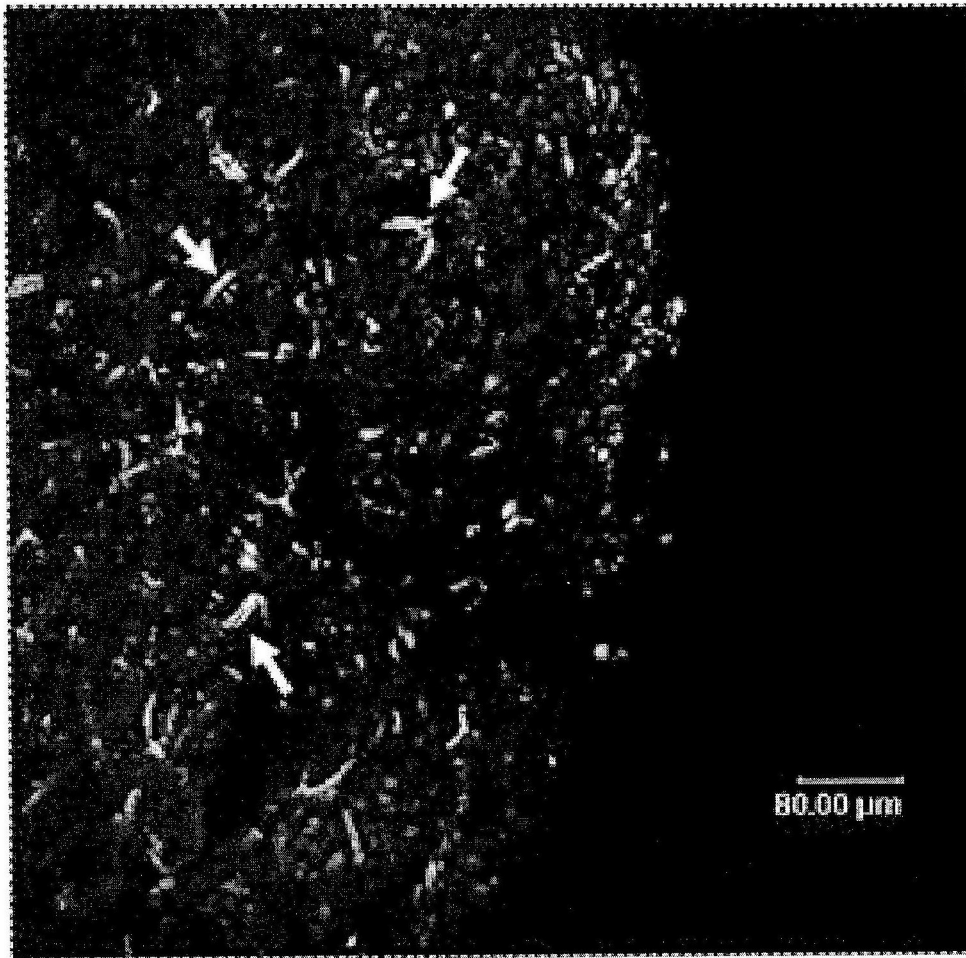


图4



图5A

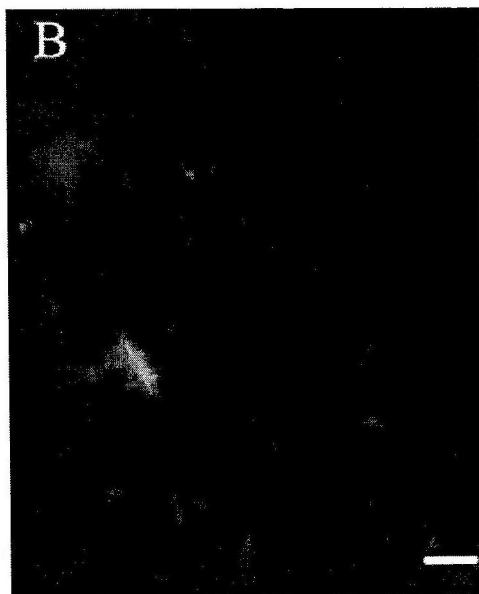


图5B

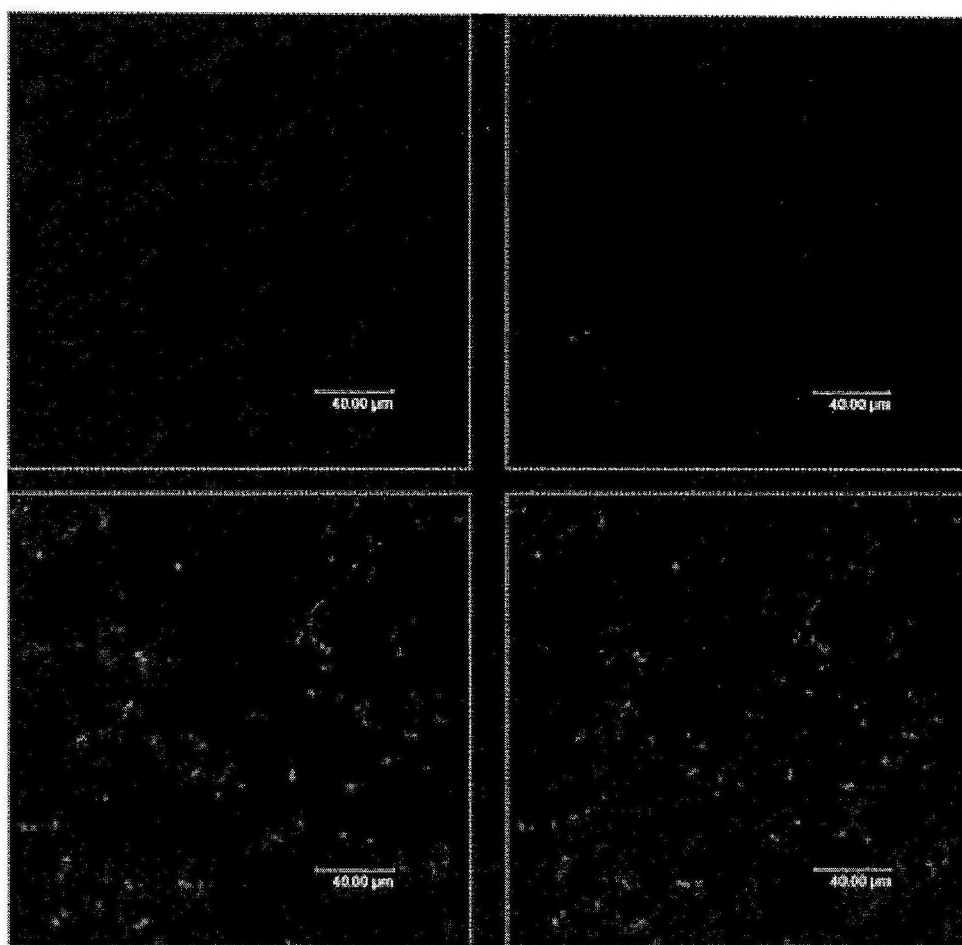


图6A

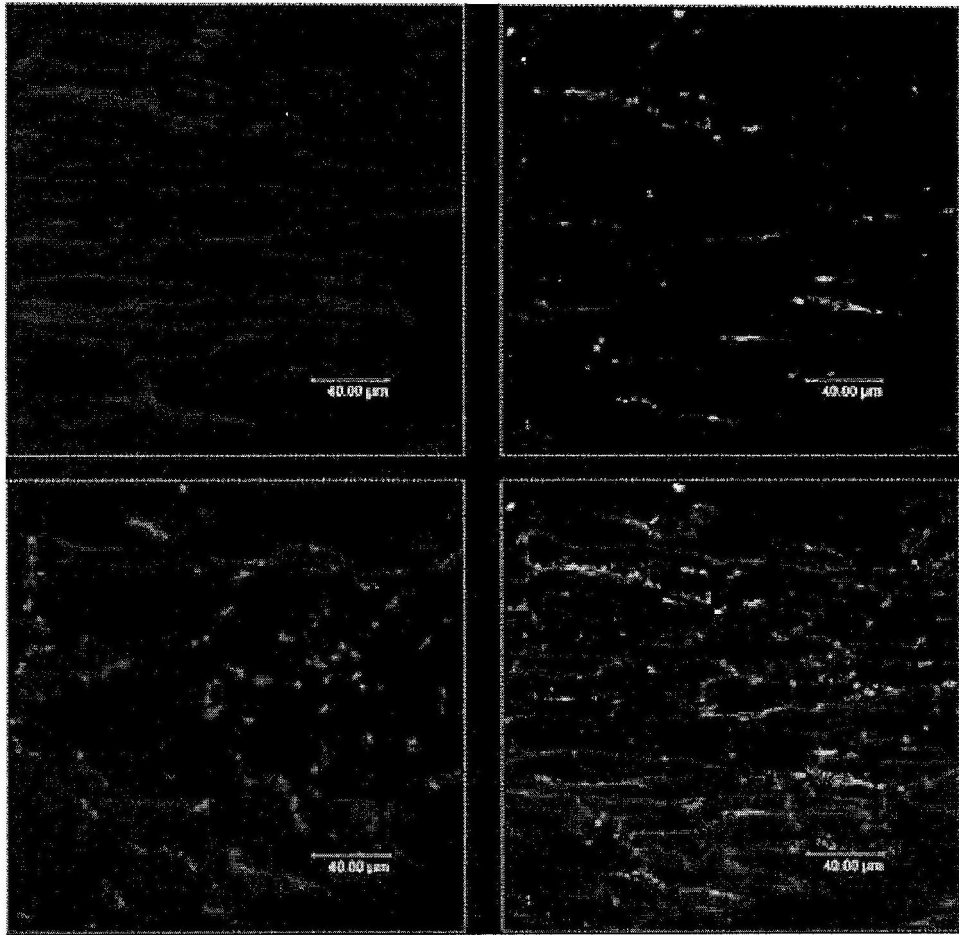


图6B

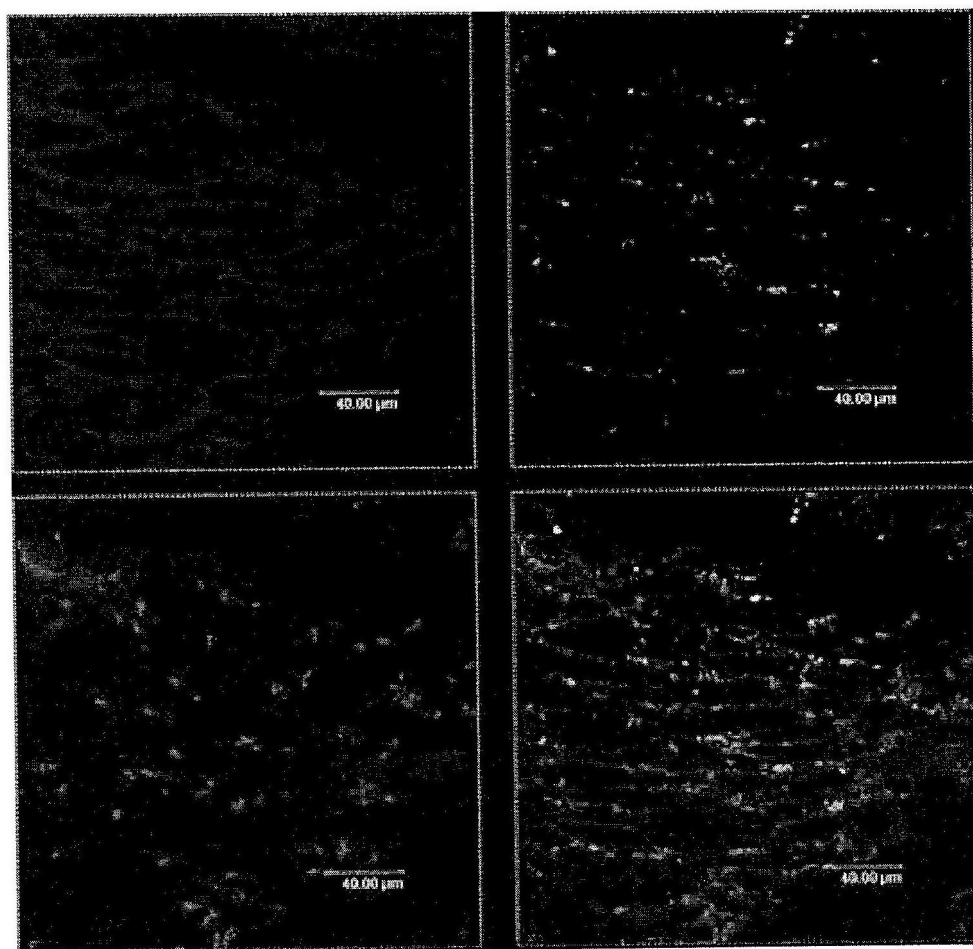


图6C



图7

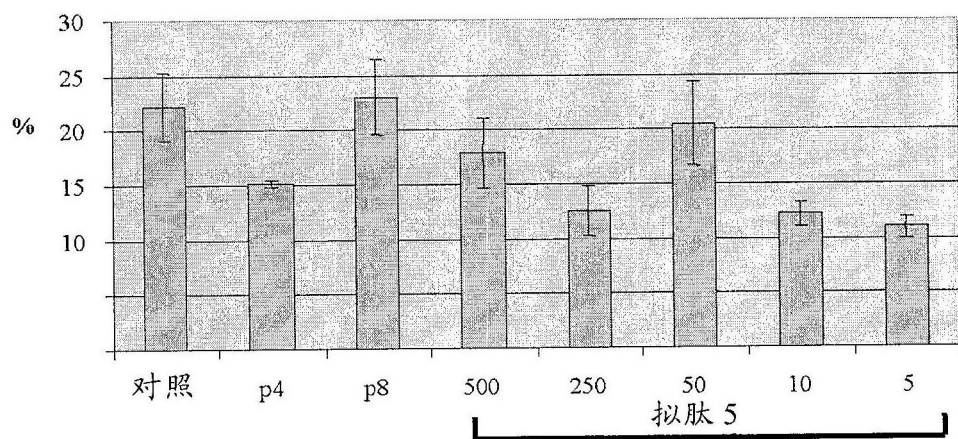


图8

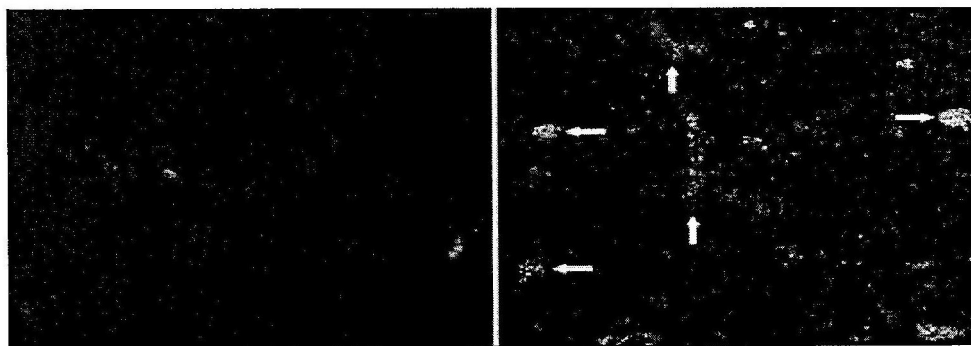


图9

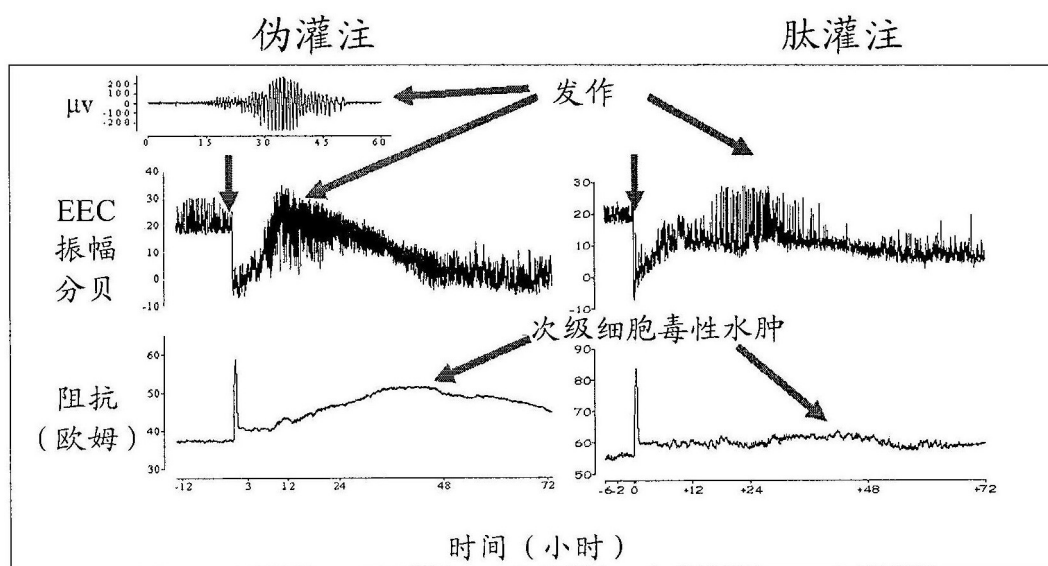


图10

A

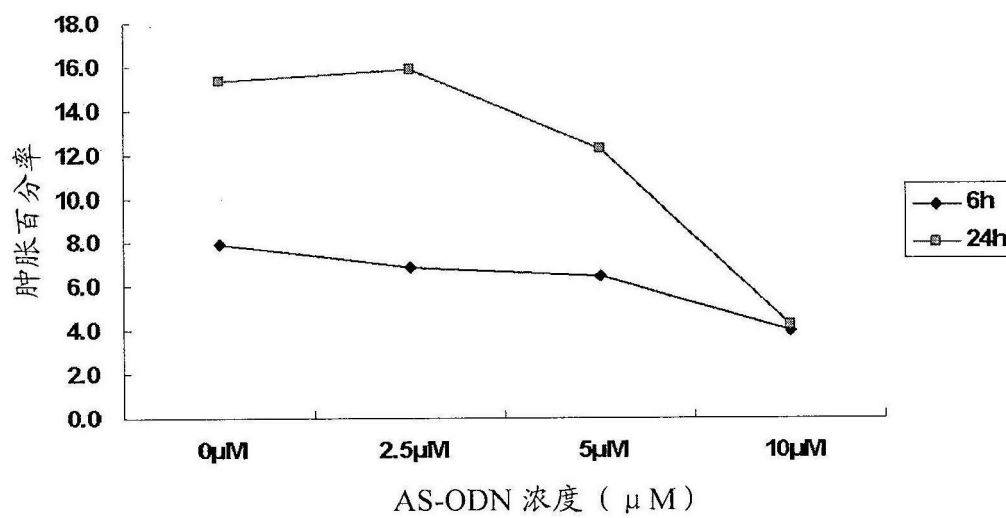


图11A

B

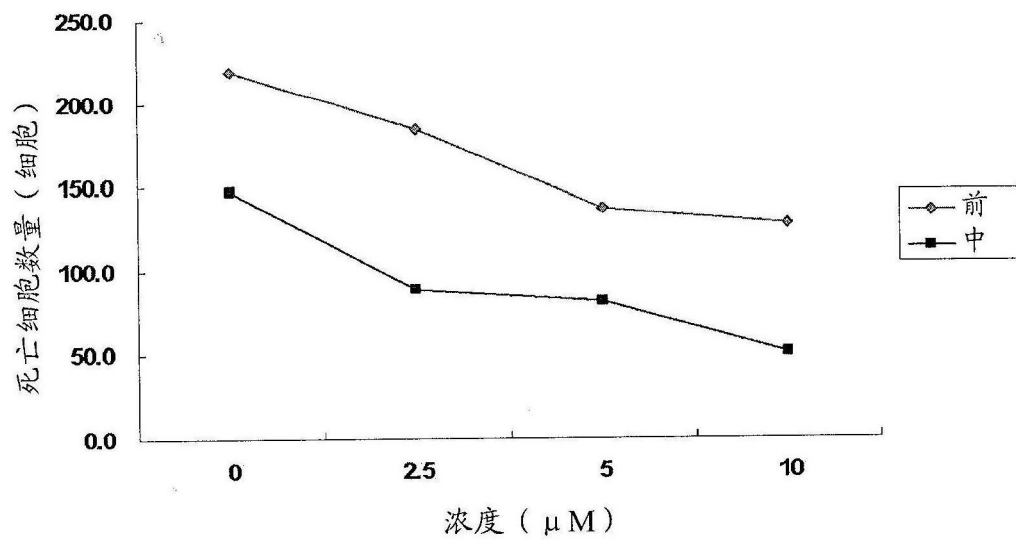


图11B

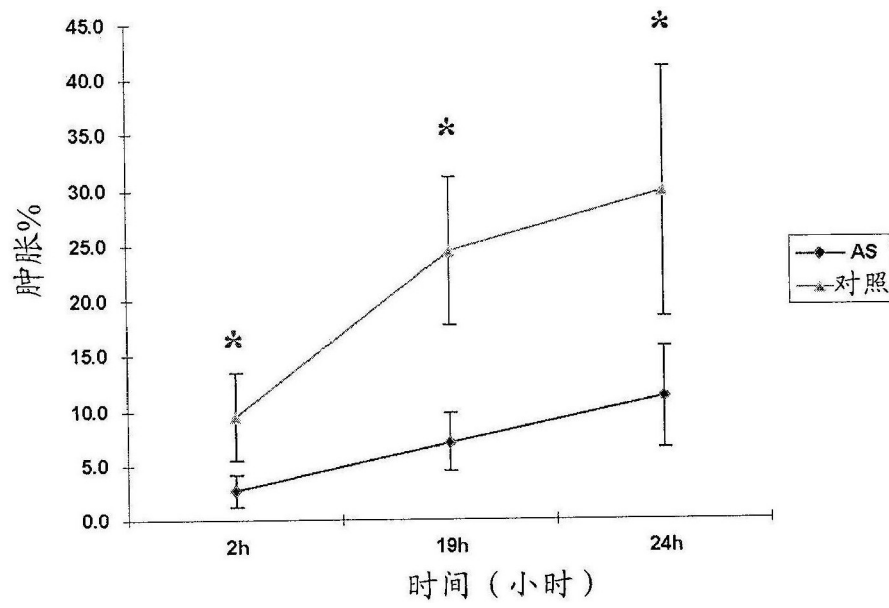


图12

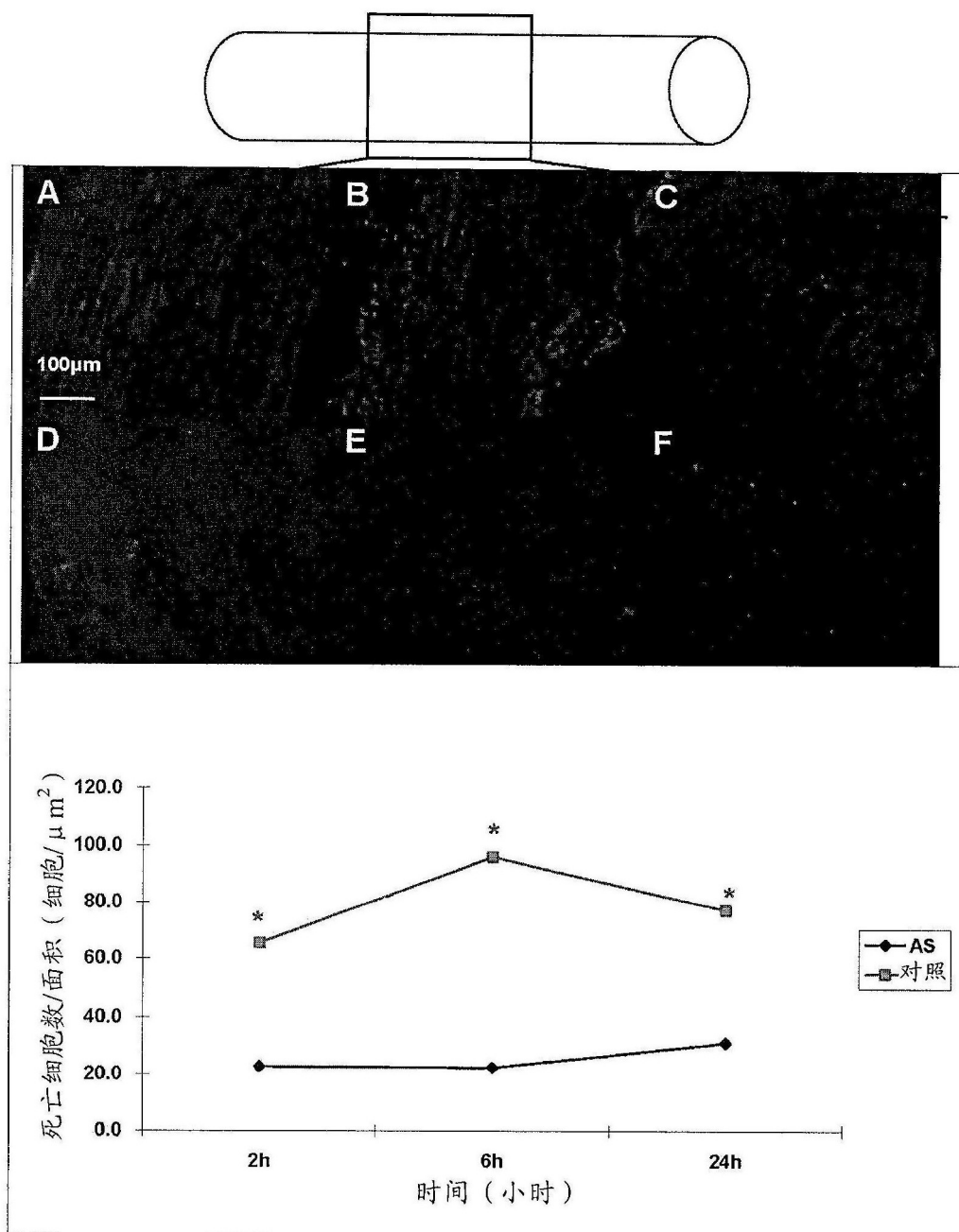


图13

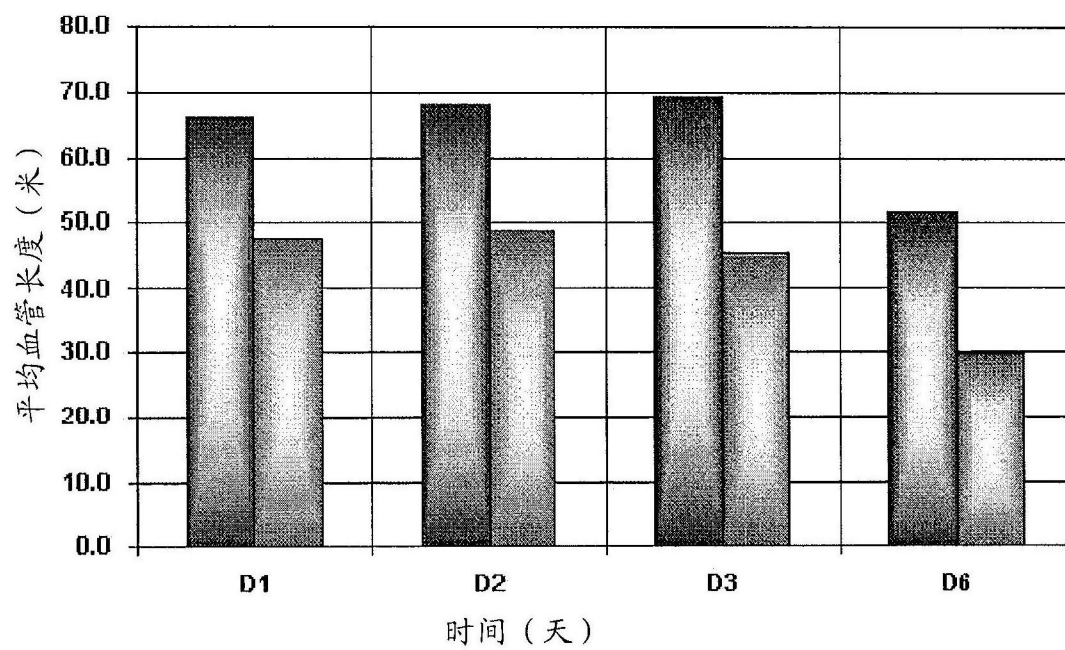


图14

Abstract

The present application relates to anti-connexin compounds and therapeutic uses thereof. Methods and compositions for modulating the activities of connexins are provided, including, for example, for use for treatment of cardiovascular, vascular, neurological, for wounds and for other indications. These compounds and methods can be used therapeutically, for example, to reduce the severity of adverse effects associated diseases and disorders where localized disruption in direct cell-cell communication or prevention of hemichannel opening is desirable.