



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101052408 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 27

(21) 申请号 200580037515. 8

(22) 申请日 2005. 09. 07

(30) 优先权数据

10/936, 027 2004. 09. 07 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 04. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/032205 2005. 09. 07

(87) PCT申请的公布数据

W02006/029343 EN 2006. 03. 16

(73) 专利权人 伯纳姆研究院

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 张良林 贾森·A·霍夫曼

埃尔基·罗斯拉赫蒂

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

代理人 王允方 刘国伟

(51) Int. Cl.

A61K 38/00 (2006. 01)

C07K 7/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 6303573 B1, 2001. 10. 16, 全文.

Lianglin Zhang 等. Molecular Profiling of Heart Endothelial Cells. Circulation 112. 2005, 112 第 1601 页摘要, 第 1604 页右栏倒数第 3 段, 第 1605 页图 2, 第 1607 页右栏倒数第 1 段, 第 1608 页左栏第 1 和 2 段.

审查员 张颖

权利要求书 1 页 说明书 39 页

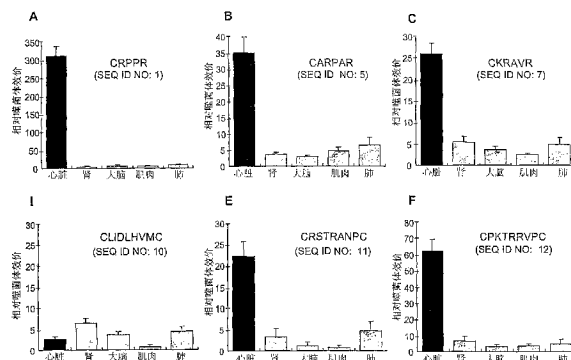
序列表 20 页 附图 14 页

(54) 发明名称

选择性锚定到心脏脉管系统上的肽和相关结合物和方法

(57) 摘要

本发明提供多种分离肽和肽模拟物, 其例如可用于构建本发明的结合物 (conjugate), 或者当肽自身具有生物活性时, 其可以未结合形式用作治疗如下所述的多种心血管疾病中的任一种的治疗剂。因此, 本发明提供一种分离肽或肽模拟物, 其具有少于 60 个残基的长度且包括氨基酸序列 CRPPR (SEQ ID NO: 1) 或其肽模拟物。本发明进一步提供一种分离肽或肽模拟物, 其具有少于 60 个残基的长度且包括氨基酸序列 CARPAR (SEQ ID NO: 5) 或其肽模拟物, 或氨基酸序列 CPKRPR (SEQ ID NO: 6) 或其肽模拟物。



1. 一种分离肽,其选择性地锚定到心脏脉管系统,所述分离肽由氨基酸序列CRPPR(SEQ ID NO:1) 组成。

选择性锚定到心脏脉管系统上的肽和相关结合物和方法

技术领域

[0001] 无

背景技术

[0002] 动脉粥样硬化和其后遗症构成西方世界中疾病和死亡的最常见且最重要的起因，这在西方所有的死亡中占到 50%。如下文进一步描述，动脉粥样硬化为由于动脉粥样化而引起的血管壁或动脉增厚和无弹性所导致的病症。

[0003] 在正常心脏中，血管壁是由与具有结缔组织上覆层的血管平滑肌细胞中间层紧密并置的内皮细胞内层组成。内皮细胞内层理想地位于血液与血管壁之间的界面上以转导信号，同时内皮细胞经由产生调控诸如血管紧张性、凝结状态、细胞生长、细胞死亡和白细胞通行的过程的因子来控制血管的稳态平衡。血管平滑肌细胞维持血管回应于血管活性剂之收缩紧张性且释放细胞因子和其它生长因子。平滑肌细胞与成纤维细胞结合产生决定血管结构的胞外基质蛋白和蛋白酶。动脉粥样硬化的最常见形式阻塞性血管疾病的特征在于脂质、炎性细胞、血管平滑肌细胞和胞外基质蛋白在内皮内层与中间层之间的内膜空间中的异常积累（空斑形成）。

[0004] 动脉粥样硬化的疗法通常预防、遏制或逆转空斑形成过程或刺激新血管形成。然而，用于治疗动脉粥样硬化的药物或其它药剂仅以冠状血管为目标很罕见。更常见的是，全身投与会导致不需的副作用，这是（例如）归因于遍布于全身的全身性毒性作用。举例而言，刺激内皮细胞增殖的血管生成的关键调控因子血管内皮生长因子（VEGF）会促进新血管形成，从而增加通往缺血组织的血流并缓解血管疾病。然而，VEGF 也可促进非特异性有丝分裂发生且增强血管生成驱动的疾病（诸如糖尿病性视网膜病）和某些肿瘤。类似地，全身投与血管生成刺激物成纤维细胞生长因子可引起严重的副作用，这是归因于其缺乏对心脏组织的特异性。不幸的是，包括高血压反复发作的这些副作用会限制用于治疗动脉粥样硬化的现有促血管生成疗法的效用。

[0005] 作为组成血管内层的细胞，内皮细胞是循环药物或其它物质所遇到的最先细胞类型。内皮细胞因此提供用于将治疗物质选择性导向到心脏组织的目标。药物或其它治疗物质对心脏脉管系统的所述选择性靶向将降低或消除诸如全身毒性或恶性转化的不当副作用的风险。治疗物质对心脏脉管系统的选择性靶向也将实现所述物质的高局部浓度，从而降低有效治疗所需的剂量。

[0006] 因此，需要鉴定活体内选择性结合到心脏脉管系统上的分子。所述分子尤其适用于将治疗剂选择性靶向到心脏以治疗心脏病和诸如动脉粥样硬化的心血管疾病。本发明满足这一需要且提供相关优势。

发明内容

[0007] 本发明提供多种分离肽和肽模拟物，其（例如）可用于构建本发明的结合物，或者当肽自身具有生物活性时，可以未结合形式用作治疗如下文所述的多种心血管疾病中的任

一种的治疗剂。因此,本发明提供具有少于 60 个残基的长度且包括氨基酸序列 CRPPR(SEQ ID NO :1) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。本发明进一步提供具有少于 60 个残基的长度且包括氨基酸序列 CARPAR(SEQ ID NO :5) 或其肽模拟物或氨基酸序列 CPKRPR(SEQ ID NO :6) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。

[0008] 本发明进一步提供包括氨基酸序列 GRKSKTV(SEQ ID NO :14) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。在一实施例中,本发明提供包括氨基酸序列 CXGRKSKTVZC(SEQ ID NO :15) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物,其中 X = 0 到 20 个独立选择的残基且 Z = 0 到 20 个独立选择的残基。

[0009] 本发明另外提供具有少于 150 个残基的长度且包括氨基酸序列 CARPAR(SEQ ID NO :5) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。

[0010] 本文还提供具有少于 50 个残基的长度且包括氨基酸序列 CPKRPR(SEQ ID NO :6) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。

[0011] 本发明另外提供具有少于 400 个残基的长度且包括氨基酸序列 CKRAVR(SEQ ID NO :7) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。

[0012] 本发明进一步提供包括氨基酸序列 RNSWKPN(SEQ ID NO :16) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。在一实施例中,本发明提供包括氨基酸序列 CXRNSWKPNZC(SEQ ID NO :17) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物,其中 X = 0 到 20 个独立选择的残基且 Z = 0 到 20 个独立选择的残基。

[0013] 本文进一步提供包括氨基酸序列 RGSSS(SEQ ID NO :9) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。

[0014] 本发明还提供具有少于 400 个残基的长度且包括氨基酸序列 RSTRANP(SEQ ID NO :18) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。在一实施例中,本发明的分离肽或肽模拟物包括氨基酸序列 CXRSTRANPZC(SEQ ID NO :19) 或其肽模拟物,其中 X = 0 到 20 个独立选择的残基且 Z = 0 到 20 个独立选择的残基。

[0015] 本发明另外提供具有少于 400 个残基的长度且包括氨基酸序列 PKTRRVP(SEQ ID NO :20) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。在一实施例中,分离肽或肽模拟物包括氨基酸序列 CXPKTRRVPZC(SEQ ID NO :21) 或其肽模拟物,其中 X = 0 到 20 个独立选择的残基且 Z = 0 到 20 个独立选择的残基。

[0016] 本文进一步提供具有少于 400 个残基的长度且包括氨基酸序列 SGMARTK(SEQ ID NO :22) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。在一实施例中,本发明提供包括氨基酸序列 CXSGMARTKZC(SEQ ID NO :23) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物,其中 X = 0 到 20 个独立选择的残基且 Z = 0 到 20 个独立选择的残基。

[0017] 本文还提供分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统的锚定分子的方法,其是通过下列步骤实现的:使 HLP/CRIP2 或其片段与分子文库在适于使分子与 HLP/CRIP2 特异性结合的条件下接触;检定特异性结合;并从文库中分离一种或一种以上 HLP/CRIP2 结合分子,从而分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2 的锚定分子。

[0018] 本发明进一步提供分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统的锚定分子的方法,其是通过下列步骤实现的:使受体克隆 9 或其片段与分子文库在适于使分子与受

体克隆 9 特异性结合的条件下接触 ; 检定特异性结合 ; 并从文库中分离一种或一种以上受体克隆 9 结合分子, 从而分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合受体克隆 9 的锚定分子

[0019] 本发明还提供分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统的锚定分子的方法, 其是通过下列步骤实现的 : 使 Sigirr/TIR8 或其片段与分子文库在适于使分子与 Sigirr/TIR8 特异性结合的条件下接触 ; 检定特异性结合 ; 并从文库中分离一种或一种以上 Sigirr/TIR8 结合分子, 从而分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 Sigirr/TIR8 的锚定分子

[0020] 本文进一步提供分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统的锚定分子的方法, 其是通过下列步骤实现的 : 使 MpcII-3 相关蛋白或其片段与分子文库在适于使分子与 MpcII-3 相关蛋白特异性结合的条件下接触 ; 检定特异性结合 ; 并从文库中分离一种或一种以上 MpcII-3 相关蛋白结合分子, 从而分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 MpcII-3 相关蛋白的锚定分子

[0021] 本发明进一步提供分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统的锚定分子的方法, 其是通过下列步骤实现的 : 使 bc10 或其片段与分子文库在适于使分子与 bc10 特异性结合的条件下接触 ; 检定特异性结合 ; 并从文库中分离一种或一种以上 bc10 结合分子, 从而分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 bc10 的锚定分子

[0022] 本文也提供在个体中将成分 (moiety) 导向到心脏脉管系统的方法, 其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2 (SEQ ID NO : 25) 的抗体或其抗原结合片段连接的成分的结合物, 从而将所述成分导向到心脏脉管系统。

[0023] 本发明进一步提供在个体中将成分导向到心脏脉管系统的方法, 其中对个体投与结合物, 所述结合物含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO : 27 的抗体或其抗原结合片段连接的成分, 从而将所述成分导向到心脏脉管系统。

[0024] 本文还提供在个体中将成分导向到心脏脉管系统的方法, 其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 Sigirr/TIR8 (SEQ ID NO : 29) 的抗体或其抗原结合片段连接的成分的结合物, 从而将所述成分导向到心脏脉管系统。

[0025] 本文进一步提供在个体中将成分导向到心脏脉管系统的方法, 其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO : 33 的抗体或其抗原结合片段连接的成分的结合物, 从而将所述成分导向到心脏脉管系统。

[0026] 本发明另外提供在个体中将成分导向到心脏脉管系统的方法, 其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 bc10 (SEQ ID NO : 35) 的抗体或其抗原结合片段连接的成分的结合物, 从而将所述成分导向到心脏脉管系统。

[0027] 本发明还提供含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合富半胱氨酸蛋白 2 (HLP/CRIP2 ; SEQ ID NO : 25) 的锚定分子连接的治疗剂的结合物。本文还提供在个体中将成分导向到心脏脉管系统的方法, 其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2 (SEQ ID NO : 25) 的锚定分子连接的成分的结合物, 从而将所述成分导向到心脏脉管系统。

[0028] 本发明进一步提供含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合受体克隆 9 (SEQ ID NO : 27) 的锚定分子连接的治疗剂的结合物。本文还提供在个体中将成分导向到

心脏脉管系统的方法,其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合受体克隆 9 (SEQ ID NO :27) 的锚定分子连接的成分的结合物,从而将所述成分导向到心脏脉管系统。

[0029] 本文进一步提供含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合单一 Ig IL-2 受体相关蛋白 (Sigirr/TIR8 ;SEQ ID NO :29) 的锚定分子连接的治疗剂的结合物。举例而言,所述结合物可用于在个体中将成分导向到心脏脉管系统的本发明方法中,所述方法是通过个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 Sigirr/TIR8 (SEQ ID NO :29) 的锚定分子连接的成分的结合物,从而将所述成分导向到心脏脉管系统。

[0030] 本发明还提供含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO :33 (与内在膜蛋白 (integral membrane protein) CII-3 (MpcII-3) 具有假定类似性的蛋白产物) 的锚定分子连接的治疗剂的结合物。本发明另外提供在个体中将成分导向到心脏脉管系统的方法,其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO :33 的锚定分子连接的成分的结合物,从而将所述成分导向到心脏脉管系统。

[0031] 本文还提供含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合鼠科膀胱癌相关蛋白同系物 (bc10 ;SEQ ID NO :35) 的锚定分子连接的治疗剂的结合物。本发明另外提供在个体中将成分导向到心脏脉管系统的方法,其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 bc10 (SEQ ID NO :35) 的锚定分子连接的成分的结合物,从而将所述成分导向到心脏脉管系统。

附图说明

[0032] 本专利或申请案文件含有至少一个以彩色绘制的图示。具有彩图的本专利或专利申请公开案的副本将由官方在得到请求和必要费用的支付后提供。

[0033] 图 1 绘示用结合细菌双杂交分析的活体外和活体内噬菌体展示技术 (phage display) 鉴定锚定肽 / 受体对。(A) 平行的锚定肽分离和受体鉴定的原则。将噬菌体展示的肽文库注入小鼠并使其循环,采集组织且接着使其破碎为结合有噬菌体的单细胞。洗除未结合的噬菌体并回收结合的噬菌体,使其在细菌中生长并重复所述过程或通过 PCR 扩增编码肽的插入物且使其穿入细菌双杂交系统的诱饵载体组份中。在细菌中,富含锚定到所选组织的能力的集合可与可能受体相互作用,从而产生耐羧苄青霉素性 (carbenicillin-resistance)。将抗性克隆涂在含 X-gal 的琼脂上以进行二次筛检,扩增靶和诱饵插入物并从耐羧苄青霉素的 LacZ 表达细胞测序。(B) 通过用抗 CD31 磁珠进行第三轮活体外选择,经选择的集合比非重组 T7 噬菌体高出约 230 倍地活体外结合心脏细胞。(C) 当针对活体内锚定到心脏而进一步选择时,活体外 / 活体内所选集合在心脏脉管系统中比非重组对照噬菌体多积累约 190 倍。(D) 将来自最终集合的编码肽的插入物亚克隆入诱饵载体中,且用肽 - 诱饵载体和靶载体中的心脏 cDNA 文库转化细菌。选择经转化细菌以在 500 μ g/ml 羧苄青霉素上生长。(E) 一些克隆对二级标记物 LacZ 也呈阳性,这是由在含 X-gal 的平板上产生蓝色而证实。

[0034] 图 2 绘示选择性锚定到心脏的个别噬菌体展示的肽。将从心脏内皮锚定的结合筛检所鉴别的指定肽在 T7 噬菌体中重新构建并通过静脉内注入小鼠来个别投与。除 SEQ ID NO :10 外,展示心脏锚定肽的噬菌体相对于非重组噬菌体显著锚定到心脏 ;此外,在所测

试的主要器官中对心脏的锚定具特异性。对展示 CRPPR(SEQ ID NO:1) 的噬菌体记录到最高的特异性(超过 300 倍)。(A)CRPPR(SEQ ID NO:1) 噬菌体锚定到心脏、肾、大脑、肌肉和肺。(B)CARPAR(SEQ ID NO:5) 噬菌体锚定到心脏、肾、大脑、肌肉和肺。(C)CKRAVR(SEQ ID NO:7) 噬菌体锚定到心脏、肾、大脑、肌肉和肺。(D)CLIDLHVMC(SEQ ID NO:10) 噬菌体锚定到心脏、肾、大脑、肌肉和肺。(E)CRSTRANPC(SEQ ID NO:11) 噬菌体锚定到心脏、肾、大脑、肌肉和肺。(F)CPKTRRVPC(SEQ ID NO:12) 噬菌体锚定到心脏、肾、大脑、肌肉和肺。

[0035] 图 3 绘示展示心脏锚定肽的噬菌体与血管内皮细胞标记物在心脏中协同定位。将噬菌体与荧光素结合番茄凝集素(fluorescein-conjugated tomato lectin)(绿色)一起静脉内注入小鼠,且用兔抗 T7 抗体和抗兔 Alexa594(红色)对心脏组织切片染色。(A)CRPPR(SEQ ID NO:1) 噬菌体染色。(B)CARPAR(SEQ ID NO:5) 噬菌体染色。(C)CKRAVR(SEQ ID NO:7) 噬菌体染色。(D)CLIDLHVMC(SEQ ID NO:10) 噬菌体染色。(E)CRSTRANPC(SEQ ID NO:11) 噬菌体染色。(F)CPKTRRVPC(SEQ ID NO:12) 噬菌体染色。箭头表示一些代表性双阳性血管(黄色)。放大率 200 倍。

[0036] 图 4 绘示展示心脏锚定肽的噬菌体特异性结合到经同源受体转染的细胞。在双杂交检定(表 1)中鉴定的心脏锚定肽的假定受体在 293T 细胞中由经转染 cDNA 表达,使用经转染细胞测试在缓冲液中或在代表对应肽中每一者的合成肽(100mg/ml)存在下展示相关心脏锚定肽的同源噬菌体的结合。各噬菌体与表达其假定同源受体的细胞的结合(汽提柱)比与经空白载体对照物转染的细胞的结合(灰柱)多 300 至 500 倍。在所有情况下,通过与过量同源肽(黑柱)竞争但不与无关心脏锚定肽(白柱)竞争来抑制噬菌体与经转染细胞的结合。用游离肽 CRPPR(SEQ ID NO:1)、CKRAVR(SEQ ID NO:7)、CRSTRANPC(SEQ ID NO:11) 和 CPKTRRVPC(SEQ ID NO:12) 检定四种经转染细胞系中的每一者。(A)表达同源肽 CRPPR(SEQ ID NO:1) 的噬菌体与经 CRIP2 转染的细胞的结合。(B)表达同源肽 CKRAVR(SEQ ID NO:7) 的噬菌体与经 Sigirr 转染的细胞的结合。(C)表达同源肽 CRSTRANPC(SEQ ID NO:11) 的噬菌体与经 MpcII-3 相关蛋白 SEQ ID NO:33 转染的细胞的结合。(D)表达同源肽 CPKTRRVPC(SEQ ID NO:12) 的噬菌体与经 bc10 转染的细胞的结合。

[0037] 图 5 绘示心脏锚定肽的受体在心脏中于 mRNA 水平上高度表达且定位于内皮细胞。(A)四种受体 mRNA 于不同小鼠心脏、肺、脾、肾、大脑和肌肉中的实时 PCR 结果,其是表达为心脏中相同 mRNA 含量的百分比(两个单独实验的平均值)。(B)在分析结束时回收实时 PCR 产物并通过琼脂糖凝胶电泳进行分析。ST = 100bp 梯状 DNA。(C)通过原位杂交(红色)定位受体。HLP/CRIP2、Sigirr/TIR8、MpcII-3 相关蛋白和 bc10 在心脏中的内皮细胞中都高度表达。HLP/CRIP2、MpcII-3 相关蛋白和 bc10mRNA 也在心脏实质细胞中高度表达。肺毛细管另外对 Sigirr/TIR8 和 MpcII-3 相关蛋白明显呈阳性,同时观察到 HLP/CRIP2 和 bc10 的一些信号。偶尔在其它组织中发现阳性染色的痕迹。放大率 200 倍。

[0038] 图 6 绘示 CRPPR(SEQ ID NO:1) 肽和同源受体 CRIP2 与 CD31 在心血管的内皮细胞中协同定位。将荧光素结合 CRPPR(SEQ ID NO:1) 肽静脉内注入小鼠,并在两小时后收集组织以用抗内皮标记物 CD31 的抗体染色。荧光肽以绿色显示,而 CD31 标记物以红色显示。(A)SEQ ID NO:1 与 CD31 于心血管中的协同定位。(B)SEQ ID NO:1 与 CD31 于心内膜中的协同定位。(C)在心脏中未观察到对照肽。(D)抗 CRIP2 抗体染色与 CD31 协同定位的心脏内皮细胞(红色)。(E)抗 CRIP2 抗体与所注射的 CRPPR(SEQ ID NO:1) 肽在心血管中协同

定位。(F) 抗 CRIP2 抗体与所注射的 CRPPR(SEQ ID NO:1) 肽在心内膜中协同定位。

[0039] 图 7 绘示展示 CRPPR(SEQ ID NO:1) 的噬菌体结合到心脏细胞且展示 SEQ ID NO:1 的噬菌体的锚定被抗 CRIP2 抗体阻断。将展示 CRPPR(SEQ ID NO:1) 的噬菌体与从心脏制备的细胞悬浮液一起培育,在有和无各种浓度的指定抗体或肽的存在下测量噬菌体结合。(A) 鸡抗 CRIP2 抗体阻断展示 SEQ ID NO:1 的噬菌体与心脏细胞的结合,使用正常 IgY 作为阴性对照。(B) 游离 CRPPR(SEQ ID NO:1) 肽对展示 SEQ ID NO:1 的噬菌体结合的剂量依赖抑制和两种无关心脏锚定肽不进行抑制可证实活体外噬菌体结合系统的特异性。(C) 展示 CRPPR(SEQ ID NO:1) 的噬菌体与心脏的活体内锚定受协同注射的抗 CRIP2 抗体抑制。显示三个独立实验的平均和标准偏差。

[0040] 图 8 绘示鼠科富半胱氨酸蛋白 2(HLP/CRIP2) 的 (A) 核苷酸 (SEQ ID NO:24) 序列和 (B) 氨基酸 (SEQ ID NO:25) 序列。Genbank 登记号 NM_024223。

[0041] 图 9 绘示被鉴定为受体克隆 9 的鼠科 RIKEN EST 的 (A) 核苷酸 (SEQ ID NO:26) 序列和 (B) 氨基酸 (SEQ ID NO:27) 序列。Genbank 登记号 BC026536。

[0042] 图 10 绘示鼠科单一 Ig IL-2 受体相关蛋白 (Sigirr/TIR8) 的 (A) 核苷酸 (SEQ ID NO:28) 序列和 (B) 氨基酸 (SEQ ID NO:29) 序列。Genbank 登记号 BC010806。

[0043] 图 11 绘示鼠科嗅觉 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:30),所述嗅觉 cDNA 为经鉴别为受体克隆 27 的含有富谷氨酰胺区域的蛋白。Genbank 登记号 AK032239。

[0044] 图 12 绘示与内在膜蛋白 CII-3(MpcII-3) 具有假定类似性的鼠科多肽的 (A) 核苷酸 (SEQ ID NO:32) 序列和 (B) 氨基酸 (SEQ ID NO:33) 序列。Genbank 登记号 AK032458。

[0045] 图 13 绘示鼠科膀胱癌相关蛋白同系物 (bc10) 的 (A) 核苷酸 (SEQ ID NO:34) 序列和 (B) 氨基酸 (SEQ ID NO:35) 序列。Genbank 登记号 BC026935。

具体实施方式

[0046] 本发明涉及鉴定高选择性地锚定到心脏脉管系统且可以结合物形式用于将全身性投与的治疗剂或显影剂选择性靶向心脏脉管系统的分子。所述治疗剂的选择性靶向会增加传递到心脏脉管系统的药剂的有效量,同时降低药剂对其它器官具有不利作用的可能性。本发明进一步涉及鉴定用于本发明的锚定分子的同源受体。如下文进一步公开,这些受体在心脏内皮上表达且可用于针对优化选择性锚定到心脏脉管系统的肽或其它分子的特征而筛选。

[0047] 如本文实例 I 中所公开,使用活体外和活体内噬菌体选择与细菌双杂交分析的新颖组合来鉴定选择性锚定到心脏脉管系统的肽且鉴定用作这些肽的受体的内皮分子。在用鼠科心脏细胞悬浮液和抗 CD31 磁珠进行活体外噬菌体选择后,针对与心脏的锚定进行活体内选择,从而导致锚定到心脏的噬菌体集合相对于非重组噬菌体增加近 200 倍 (图 1A 和 1B)。此外,如图 1C 所示,经活体外 / 活体内选择的噬菌体与其它组织相比优先定位到心脏上,在心脏中的富集比在大脑、肾、皮肤和骨骼肌中的积累要大 20 到 50 倍。

[0048] 在由细菌双杂交分析用心脏锚定噬菌体集合鉴定的 25 个假定受体克隆中,大部分为在心肌中大量表达的蛋白。如表 1 所总结,剩余的 6 个克隆代表膜或细胞表面蛋白且为锚定肽的假定受体。被表示为受体克隆 5 的第一个克隆代表心脏 LIM- 蛋白 (HLP) (也称为富半胱氨酸蛋白 2(CRIP2)) 的羧基端 92 个氨基酸 (残基 117 至 208)。全长鼠科 HLP/

CRIP2 核酸和氨基酸序列在本文中分别作为 SEQ ID NO :24 和 25(参看 Genbank 登记号 NM_024223) 提供。双杂交分析产生若干结合这一受体的潜在心脏锚定肽。当个别检定时, 展示 CRPPR(SEQ ID NO :1) 的噬菌体相对于非重组噬菌体以高出 300 倍的选择性锚定到心脏 (图 2A), 且 CGRKSTVC(SEQ ID NO :2) 噬菌体相对于非重组噬菌体在心脏锚定中展示约 50 倍的选择性。这些结果表示肽 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2 为心脏锚定肽且进一步表明 HLP/CRIP2 是用作锚定这些肽的受体。

[0049] 如本文进一步公开, 未注释的 RIKEN EST(受体克隆 9) 也被鉴定为与一种或一种以上心脏锚定肽结合的在膜或细胞表面上表达的肽。由受体克隆 9 代表的 RIKEN EST 的全长鼠科核酸和氨基酸序列在本文中分别作为 SEQ ID NO :26 和 27(参看 Genbank 登记号 BC026536) 提供。在经由双杂交分析鉴定的三种不同肽中, 两种肽 CARPAR(SEQ ID NO :5) 和 CPKRPR(SEQ ID NO :6) 在于噬菌体上展示时呈现与心脏的选择性锚定 (图 2B)。

[0050] 本文所公开的结果进一步鉴定作为心脏锚定肽的受体的单一 Ig IL-1 受体相关蛋白, 其被称为 Sigirr 或 TIR8(受体克隆 15)。全长鼠科 Sigirr/TIR8 核酸和氨基酸序列在本文中分别作为 SEQ ID NO :28 和 29(参看 Genbank 登记号 BC010806) 提供。如表 1 所总结, 经由双杂交分析通过结合 Sigirr/TIR8 而鉴定的三种肽 CKRAVR(SEQ ID NO :7)、CRNSWKPN(SEQ ID NO :8) 和 RGSSS(SEQ ID NO :9) 当在噬菌体上展示且活体内检定时显示 20 至 30 倍的心脏锚定选择性 (参看表 1 和图 2C)。

[0051] 也如本文所公开的心脏锚定受体为受体克隆 36, 其代表来自与内在膜蛋白 CII-3(MpcII-3) 具有假定类似性的 RIKEN Fantom 系列的未命名的蛋白产物, MpcII-3 作为琥珀酸脱氢酶复合体的一部分的线粒体膜蛋白。这种 MpcII-3 相关蛋白的核酸和氨基酸序列在本文中分别作为 SEQ ID NO :32 和 33(参看 Genbank 登记号 26328274) 提供。经由双杂交分析, 鉴定肽 CRSTRANPC(SEQ ID NO :11) 与这种受体结合, 展示 SEQ ID NO :11 的噬菌体在活体内个别检定时以约 20 倍的选择性锚定到心脏 (表 1 和图 2E)。本文所公开的其它结果表示鼠科膀胱癌相关蛋白同系物 10(bc10) (其为在由膀胱中的前恶性病变发展癌症时受到下调的小膜蛋白) 可用作心脏锚定受体。所鉴定的受体克隆 46 代表 bc10 的小鼠同系物的一部分。全长鼠科 bc10 核酸和氨基酸序列在本文中分别作为 SEQ ID NO :34 和 35(参看 Genbank 登记号 20072483) 提供。如表 1 和图 2F 所示, 表达结合克隆 46 的两种肽 CPKTRRVPC(SEQ ID NO :12) 和 CSGMARTKC(SEQ ID NO :13) 的噬菌体分别在心脏锚定中展现约 60 和 10 倍的选择性。

[0052] 如本文中另外公开, 分析若干心脏锚定肽在活体内结合心脏内皮的能力和与其假定受体的特异性结合。将展示心脏锚定肽 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :12 的噬菌体与荧光素结合番茄凝集素 (一种血管标记物) 个别地注入小鼠, 且用抗 T7 抗体观察噬菌体的定位。如图 3A 至 C、E 和 F 所示, 展示 SEQ ID NO :1、5、7、11 或 12 的噬菌体存在于心脏内皮中且不存在于其它组织中, 而展示肽 SEQ ID NO :10 的阴性对照噬菌体不存在于心脏和其它组织中。这些结果证实展示肽 CRPPR(SEQ ID NO :1)、CARPAR(SEQ ID NO :5)、CKRAVR(SEQ ID NO :7)、CRSTRANPC(SEQ ID NO :11) 或 CPKTRRVPC(SEQ ID NO :12) 的噬菌体在活体内定位到心脏脉管系统。另外, 实时 (RT)PCR 和原位杂交分析显示心脏锚定肽的四种同源受体 HLP/CRIP2、Sigirr/TIR8、MpcII-3 相关蛋白和 bc10 在心脏内皮中表达。与所检定的其它组织相比, 这些受体也优先在心脏中表达

(参看图 5)。虽然心脏内皮受体 HLP/CRIP2、Sigirr/TIR8、MpcII-3 相关蛋白和 bc10 不是仅在心脏中表达,但是其在心脏中的优先表达产生在心脏中以约 20 至 300 倍的选择性聚集测试噬菌体的锚定肽。与先前用其它分子观察到的心脏锚定相比,所述在心脏锚定中 20 至 300 倍的选择性显著增加。

[0053] 如本文进一步公开,检定展示同源肽的噬菌体与经全长同源受体转染的细胞结合的能力。如图 4 所示,表达心脏锚定肽的噬菌体比对照噬菌体高出 300 至 500 倍地与经对应同源受体转染的细胞结合,且噬菌体结合在 100 μ g/ml 同源肽存在下受到抑制但不受无关锚定肽抑制。这些结果证实心脏锚定肽 CRPPR(SEQ ID NO:1) 特异性结合受体 HLP/CRIP2;心脏锚定肽 CKRAVR(SEQ ID NO:7) 特异性结合受体 Sigirr/TIR8;心脏锚定肽 CRSTRANPC(SEQ ID NO:11) 特异性结合 MpcII-3 相关蛋白受体;且心脏锚定肽 CPKTRRVPC(SEQ ID NO:12) 特异性结合受体 bc10。

[0054] 本文所公开的其它结果证实肽 CRPPR(SEQ ID NO:1) 与同源受体 HLP/CRIP2 的协同定位。如本文图 6 所示,来自经静脉内注射的 CRPPR(SEQ ID NO:1) 肽的荧光与血管标记物 CD31 在心血管和心内膜中大范围协同定位,而在心脏中未检测到经荧光素标记的对照肽。抗 HLP/CRIP2 抗体染色也与血管标记物(图 6D)和肽 CRPPR(SEQ ID NO:1;图 6E 和 6F)在心血管和心脏心内膜中协同定位。使用游离 CRPPR(SEQ ID NO:1) 肽进行竞争检定以证明 CRPPR(SEQ ID NO:1)-噬菌体与具有 HLP/CRIP2 的心血管的结合的特异性,所述游离 CRPPR(SEQ ID NO:1) 肽以剂量依赖方式阻断展示 CRPPR(SEQ ID NO:1) 的噬菌体与心脏来源的细胞悬浮液的结合。另外,抗 HLP/CRIP2 抗体在与噬菌体共同注射时会抑制 CRPPR(SEQ ID NO:1) 噬菌体锚定(图 7C)。这些结果证明肽 CRPPR(SEQ ID NO:1) 经由特异性结合到 HLP/CRIP2 上而选择性锚定到心脏脉管系统。

[0055] 基于上述发现,本发明提供含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合富半胱氨酸蛋白 2(HLP/CRIP2;SEQ ID NO:25) 的锚定分子连接的治疗剂的结合物。在所述结合物中,锚定分子可以(例如)相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏,且其例如可为肽或肽模拟物。在一实施例中,本发明的结合物包括含有氨基酸序列 CRPPR(SEQ ID NO:1) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物。在另一实施例中,本发明的结合物包括含有氨基酸序列 CGRKSKTVC(SEQ ID NO:2) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物。所述锚定肽或肽模拟物视情况可在构形上受限。

[0056] 多种治疗剂适用于本发明的结合物中,所述结合物并有选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2(SEQ ID NO:25) 的锚定分子。适用的治疗剂包括(但不限于)血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。在一实施例中,本发明提供含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2(SEQ ID NO:25) 的锚定分子连接的血管生成剂的结合物。在另一实施例中,本发明提供含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2(SEQ ID NO:25) 的锚定分子连接的抗血栓形成剂的结合物。

[0057] 本发明另外提供含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合受体克隆 9(SEQ ID NO:27) 的锚定分子连接的治疗剂的结合物。在一实施例中,本发明的结合物包括含有氨基酸序列 CARPAR(SEQ ID NO:5) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物。

在另一实施例中,本发明的结合物包括含有氨基酸序列 CPKRPR (SEQ ID NO :6) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物。多种治疗剂中任一种都适用于本发明的结合物中,所述结合物并有选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合受体克隆 9 (SEQ ID NO :27) 的锚定分子。适用的治疗剂包括 (但不限于) 血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。在一实施例中,本发明提供含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合受体克隆 9 (SEQ ID NO :27) 的锚定分子连接的血管生成剂的结合物。在另一实施例中,本发明提供含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合受体克隆 9 (SEQ ID NO :27) 的锚定分子连接的抗血栓形成剂的结合物。

[0058] 本文进一步提供含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合单一 Ig IL-2 受体相关蛋白 (Sigirr/TIR8 ;SEQ ID NO :29) 的锚定分子连接的治疗剂的结合物。作为非限制性实例,适用于所述结合物中的锚定分子可以相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏。作为另一非限制性实例,特异性结合 Sigirr/TIR8 的锚定分子可为锚定肽或肽模拟物。

[0059] 多种特异性结合 Sigirr/TIR8 (SEQ ID NO :29) 的锚定肽和肽模拟物适用于本发明的结合物中,所述结合物包括 (但不限于) 含有氨基酸序列 CKRAVR (SEQ ID NO :7) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物。适用于本发明的锚定肽和肽模拟物进一步包括 (但不限于) 含有氨基酸序列 CRNSWKPN (SEQ ID NO :8) 或其保守变异体或肽模拟物的肽和肽模拟物,所述肽和肽模拟物可能在构形上受限或可能不在构形上受限。其它适用于本发明的锚定肽和肽模拟物包括 (但不限于) 那些含有氨基酸序列 RGSSS (SEQ ID NO :9) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物。

[0060] 多种治疗剂中的任一种都适用于含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 Sigirr/TIR8 (SEQ ID NO :29) 的锚定分子连接的治疗剂的结合物。适用于本发明的治疗剂包括 (但不限于) 血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。在一实施例中,本发明提供含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 Sigirr/TIR8 (SEQ ID NO :29) 的锚定分子连接的血管生成剂的结合物。在另一实施例中,本发明提供含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 Sigirr/TIR8 (SEQ ID NO :29) 的锚定分子连接的抗血栓形成剂的结合物。

[0061] 本文还提供含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO :33 的锚定分子连接的治疗剂的结合物。在一实施例中,本发明的结合物包括以相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏的锚定分子。在另一实施例中,本发明的结合物包括为锚定肽或肽模拟物的锚定分子。在其它实施例中,本发明的结合物包括含有氨基酸序列 CRSTRANPC (SEQ ID NO :11) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物。所述锚定分子可视情况在构形上受限。应了解多种治疗剂中的任一种都可用于本发明的结合物中,所述治疗剂包括 (但不限于) 血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。作为一实例,本发明的结合物可含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO :33 的锚定分子连接的血管生成剂。作为另一实例,本发明的

结合物可含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO :33 的锚定分子连接的抗血栓生成剂。

[0062] 本文还提供含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合鼠科膀胱癌相关蛋白同系物 (bc10 ;SEQ ID NO :35) 的锚定分子连接的治疗剂的结合物。在所述结合物中, 锚定分子可以 (例如) 相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏。锚定分子可为 (但不限于) 肽或肽模拟物。多种特异性结合 bc10 (SEQ ID NO :35) 的锚定分子中的任一种都可用于本发明的结合物中, 所述结合物包括 (但不限于) 含有氨基酸序列 CPKTRRVPC (SEQ ID NO :12) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物。特异性结合 bc10 (SEQ ID NO :35) 的适用锚定分子进一步包括 (但不限于) 含有氨基酸序列 CSGMARTKC (SEQ ID NO :13) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物。适用的锚定分子进一步包括 (但不限于) 包括氨基酸序列 SEQ ID NO :12 或 SEQ ID NO :13 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物的构形受限形式。

[0063] 熟习此项技术者了解多种治疗剂中的任一种都可用于本发明的结合物中, 所述治疗剂包括 (但不限于) 血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。在一实施例中, 本发明的结合物含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 bc10 (SEQ ID NO :35) 的锚定分子连接的血管生成剂。在另一实施例中, 本发明的结合物含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 bc10 (SEQ ID NO :35) 的锚定分子连接的抗血栓生成剂。

[0064] 在特定实施例中, 本发明的结合物的肽或肽模拟物部分具有限定长度。结合物的肽或肽模拟物部分可具有 (但不限于) 至多 10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000 或 2000 个残基的长度。在其它实施例中, 结合物的肽或肽模拟物成分可具有至少 5、10、20、30、50、100、150、200、250 或 300 个残基的长度。应了解, 术语“结合物的肽或肽模拟物部分”意谓锚定肽或肽模拟物 and 任何连续蛋白、肽或肽模拟物 (例如治疗蛋白或促细胞凋亡肽) 中的残基总数。

[0065] 如本文所公开, 肽 SEQ ID NO :1 和 2 识别在心脏内皮上表达且在其它组织中不会表达达到相同程度的靶“受体”。所述靶受体 (本文鉴别为 HLP/CRIP2) 的内皮和组织选择性表达会形成肽 SEQ ID NO :1 和 2 和相关肽和肽模拟物以及其它具有类似结合特异性的分子的选择性锚定活性的基础。基于这些发现, 显然在结构上与 SEQ ID NO :1 和 2 无关但具有特异性 HLP/CRIP2 结合活性的分子也将共有选择性锚定到心脏脉管系统的特征。举例而言, 可鉴定所述分子与 SEQ ID NO :1 或 2 特异性结合或与 SEQ ID NO :1 或 2 竞争结合到 HLP/CRIP2 表达细胞 (诸如经本文所公开的 HLP/CRIP2 转染的 293T 细胞) 的能力。举例而言, 如本文实例 II 中所述, 可容易地证实与心脏脉管系统的选择性锚定。

[0066] 因此, 本发明提供选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合富半胱氨酸蛋白 2 (HLP/CRIP2 ;SEQ ID NO :25) 的锚定分子。在一实施例中, 特异性结合 HLP/CRIP2 (SEQ ID NO :25) 的锚定分子为除抗体或其抗原结合片段外的分子。在另一实施例中, 特异性结合 HLP/CRIP2 (SEQ ID NO :25) 的锚定分子为肽或肽模拟物。除本文所公开的 HLP/CRIP2 (SEQ ID NO :25) 结合分子 CRPPR (SEQ ID NO :1) 和 CGRKSKTVC (SEQ ID NO :2) 外, 下文也提供用于鉴定其它在结构上相关或无关的锚定分子的筛检方法。

[0067] 本文也已鉴定选择性锚定到心脏脉管系统的分子的其它靶受体。受体克隆 9(SEQ ID NO:27) 已被鉴定为特异性结合心脏锚定肽 SEQ ID NO:5 和 6 的受体,且其形成这些肽和其它具有类似结合活性的肽、肽模拟物和其它分子选择性锚定到心脏脉管系统的能力的基础。根据上文,显然在结构上与 SEQ ID NO:5 或 6 无关但具有特异性受体克隆 9(SEQ ID NO:27) 结合活性的分子也共有选择性锚定到心脏脉管系统的特征。可鉴定所述锚定分子与 SEQ ID NO:5 或 6 特异性结合或与 SEQ ID NO:5 或 6 竞争结合到受体克隆 9(SEQ ID NO:27) 的能力。可使用经纯化 SEQ ID NO:27 或(例如)经编码 SEQ ID NO:27 的核酸分子(SEQ ID NO:26)转染的细胞检定特异性结合。

[0068] 根据上文,本发明提供选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合受体克隆 9(SEQ ID NO:27) 的锚定分子。在一实施例中,特异性结合受体克隆 9(SEQ ID NO:27) 的锚定分子为除抗体或其抗原结合片段外的分子。在另一实施例中,特异性结合受体克隆 9(SEQ ID NO:27) 的锚定分子为肽或肽模拟物。本文公开特异性结合受体克隆 9(SEQ ID NO:27) 的示范性肽和肽模拟物,且下文提供适用于鉴定选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合受体克隆 9(SEQ ID NO:27) 的其它锚定分子的筛检方法。

[0069] 如本文进一步公开, Sigirr/TIR8(一种特异性结合 SEQ ID NO:7、8 和 9 的多肽)的内皮和心脏选择性表达形成这些肽和其它具有类似结合活性的肽、肽模拟物和其它分子选择性锚定到心脏脉管系统的能力的基础。根据上文,显然在结构上与 SEQ ID NO:7、8 或 9 无关但具有特异性 Sigirr/TIR8 结合活性的分子也共有选择性锚定到心脏脉管系统的特征。可鉴定所述锚定分子与 SEQ ID NO:7、8 或 9 特异性结合或与 SEQ ID NO:7、8 或 9 竞争结合到 Sigirr/TIR8 的能力。可使用经纯化 Sigirr/TIR8 或(例如)细胞(诸如在以下实例中所公开的经 Sigirr/TIR8 转染的 293T 细胞)检定特异性结合。

[0070] 基于鉴定作为心脏锚定受体的 Sigirr/TIR8,本发明提供选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 Sigirr/TIR8(SEQ ID NO:29) 的锚定分子。在一实施例中,特异性结合 Sigirr/TIR8(SEQ ID NO:29) 的锚定分子为除抗体或其抗原结合片段外的分子。在另一实施例中,特异性结合 Sigirr/TIR8(SEQ ID NO:29) 的锚定分子为肽或肽模拟物。本文公开特异性结合 Sigirr/TIR8(SEQ ID NO:29) 的示范性肽和肽模拟物。此外,下文提供适用于常规鉴定选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 Sigirr/TIR8(SEQ ID NO:29) 的其它锚定分子的筛检方法。

[0071] 肽 CRSTRANPC(SEQ ID NO:11) 识别在心脏内皮上选择性表达的另一靶“受体”。归因于 MpcII-3 相关蛋白 SEQ ID NO:33 的内皮和组织选择性表达,肽 SEQ ID NO:11 以及具有类似结合特异性的相关肽、肽模拟物和其它分子可选择性锚定到心脏脉管系统。所述锚定分子包括那些在结构上与 SEQ ID NO:11 无关但也与 MpcII-3 相关蛋白 SEQ ID NO:33 特异性结合的锚定分子。鉴于上文,显然选择性锚定到心脏脉管系统的其它分子可根据其与 SEQ ID NO:11 特异性结合或与 SEQ ID NO:11 竞争结合到 MpcII-3 相关蛋白(包括经纯化的 MpcII-3 相关蛋白或在细胞表面表达 MpcII-3 相关蛋白的细胞)的能力加以鉴定。

[0072] 根据 MpcII-3 相关蛋白(SEQ ID NO:33) 为心脏锚定受体的发现,本发明提供选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO:33 的锚定分子。在一实施例中,特异性结合 SEQ ID NO:33 的锚定分子为除抗体或其抗原结合片段外的分子。在另一实施例中,特异性结合 SEQ ID NO:33 的锚定分子为肽或肽模拟物。本文公开特异性结合 SEQ ID NO:33 的

示范性肽和肽模拟物,和适用于鉴定选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO : 33 的其它锚定分子的筛检方法。

[0073] 本文经由 SEQ ID NO :12 和 13 的特异性结合活性进一步鉴定另一靶受体 bc10。所述受体的内皮和心脏选择性表达形成肽 SEQ ID NO :12 和 13 以及相关肽、肽模拟物和其它具有类似结合特异性的分子的选择性锚定活性的基础。基于本文所公开的发现,熟习此项技术者了解在结构上与 SEQ ID NO :12 和 13 无关的分子在其共有特异性结合 bc10 的特征时也可选择性锚定到心脏脉管系统。因此,其它锚定分子(例如)可根据其与 SEQ ID NO :12 或 13 特异性结合或与 SEQ ID NO :12 或 13 竞争结合到靶受体 bc10 的能力加以鉴定,所述靶受体 bc10 例如可以经纯化 bc10 或表达 bc10 的细胞(诸如经 bc10 转染的 293T 细胞)的形式提供。举例而言,如本文实例 II 中所述,可容易地证实与心脏脉管系统的选择性锚定。

[0074] 基于 bc10 为肽 SEQ ID NO :12 和 13 的同源受体的发现,本发明提供选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 bc10 (SEQ ID NO :35) 的锚定分子。在一实施例中,本发明提供特异性结合 bc10 (SEQ ID NO :35) 且为除抗体或其抗原结合片段外的分子的锚定分子。在另一实施例中,本发明提供特异性结合 bc10 (SEQ ID NO :35) 且为肽或肽模拟物的锚定分子。肽 SEQ ID NO :12 和 13 和其保守变异体在本文中是作为特异性结合 bc10 (SEQ ID NO :35) 的分子而公开的。另外,下文进一步公开的筛检方法适用于鉴定其它锚定分子,其包括(但不限于)锚定肽和肽模拟物。

[0075] 为方便起见,本文鉴定的 5 个靶受体 HLP/CRIP2、受体克隆 9、Sigirr/TIR8、MpcII-3 相关蛋白和 bc10 被统称为“心脏锚定受体”。

[0076] 如上所述,本发明提供多种选择性锚定到心脏脉管系统的锚定分子。如本文所用,术语“分子”广泛用于意谓聚合或非聚合有机化学物,诸如小分子药物;核酸分子,诸如 RNA、cDNA 或寡核苷酸;肽或肽模拟物;或蛋白,诸如抗体或生长因子受体或其片段,诸如抗体的含抗原结合域的 Fv、Fd 或 Fab 片段。在一实施例中,分子为除抗体或其抗原结合片段外的有机化学物。在另一实施例中,分子为肽或肽模拟物。

[0077] 如本文所用的术语“锚定分子”(homing molecule) 意谓在活体内优先于大部分其它组织和脉管系统而选择性定位到心脏脉管系统的任何分子。类似地,术语“锚定肽”或“锚定肽模拟物”意谓在活体内优先于大部分其它组织和脉管系统而选择性定位到心脏脉管系统的肽或肽模拟物。

[0078] 如本文关于分子所用的术语“选择性锚定”意谓在活体内与大部分其它组织或脉管系统相比优先定位到心脏脉管系统的锚定分子。选择性锚定的特征一般为与诸如大脑、肺、肾和肌肉的其它组织相比,心脏脉管系统中的定位至少高出两倍。锚定分子的特征可为与许多或大部分非肿瘤组织相比,与心脏脉管系统的优先定位是 5 倍、10 倍、20 倍或更多倍。应了解锚定分子除选择性锚定到心脏脉管系统外,还可部分地锚定到心脏外部的脉管系统或组织或锚定到心脏外部的小细胞群体。

[0079] 如上所述,本发明的锚定分子特异性结合本发明的心脏锚定受体中的一种。如本文所用,术语“特异性结合”意谓经测量不同于非特异性相互作用的结合。举例而言,可通过测定与对照分子结合相比的分子结合来测量特异性结合,所述对照分子一般为不具有结合活性的具有类似结构的分子。如果锚定分子经测量对于经同源心脏锚定受体 (HLP/CRIP2、

受体克隆 9、Sigirr/TIR8、MpcII-3 相关蛋白或 bc10) 转染的细胞具有比对于不表达同源受体的细胞更高的亲和力,那么也可表示特异性结合。举例而言,经测量更高的亲和力可为与对照细胞相比对于经同源受体转染的细胞的亲和力增加至少 100 倍、200 倍、300 倍、500 倍或更多倍。举例而言,也可通过用已知受体结合分子进行的竞争抑制来证实结合特异性。

[0080] 此外,如本文所用的术语特异性结合涵盖低和高亲和力特异性结合。举例而言,特异性结合可由具有至少约 10^{-4} M 的 Kd 的低亲和力锚定分子呈现。举例而言,如果心脏锚定受体具有一个以上的结合位点,那么具有低亲和力的锚定分子可用于靶向心脏脉管系统。特异性结合也可由高亲和力锚定分子(例如具有至少约 10^{-5} M 的 Kd 的锚定分子)呈现。举例而言,所述分子可具有至少约 10^{-6} M、至少约 10^{-7} M、至少约 10^{-8} M、至少约 10^{-9} M、至少约 10^{-10} M 的 Kd,或者可具有至少约 10^{-11} M 或 10^{-12} M 或更大的 Kd。低和高亲和力锚定分子都适用且为本发明所涵盖。低亲和力锚定分子可用于靶向(但不限于)包括病毒和其它粒子的多价结合物。高亲和力锚定分子可用于靶向(但不限于)多价和单价结合物。

[0081] 本文还提供并有至少两个各自选择性锚定到心脏脉管系统的锚定分子的多价结合物。在特定实施例中,本发明的多价结合物包括至少 10 个或至少 100 个所述锚定分子。多种治疗剂适用于本发明的多价结合物,其包括(但不限于)噬菌体和下文进一步描述的其它治疗剂。在一实施例中,本发明提供多价结合物,其含有至少两个各自选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2 (SEQ ID NO:25)、受体克隆 9 (SEQ ID NO:27)、Sigirr/TIR8 (SEQ ID NO:29)、MpcII-3 相关蛋白 (SEQ ID NO:33) 或 bc10 (SEQ ID NO:35) 的锚定肽或肽模拟物。在另一实施例中,所述结合物含有至少 10 个各自选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2 (SEQ ID NO:25)、受体克隆 9 (SEQ ID NO:27)、Sigirr/TIR8 (SEQ ID NO:29)、MpcII-3 相关蛋白 (SEQ ID NO:33) 或 bc10 (SEQ ID NO:35) 的锚定肽或肽模拟物。在另一实施例中,本发明的结合物含有至少 100 个各自选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2 (SEQ ID NO:25)、受体克隆 9 (SEQ ID NO:27)、Sigirr/TIR8 (SEQ ID NO:29)、MpcII-3 相关蛋白 (SEQ ID NO:33) 或 bc10 (SEQ ID NO:35) 的锚定肽或肽模拟物。

[0082] 在特定实施例中,本发明的多价结合物包括 2 个或 2 个以上、3 个或 3 个以上、5 个或 5 个以上、10 个或 10 个以上、20 个或 20 个以上、30 个或 30 个以上、40 个或 40 个以上、50 个或 50 个以上、100 个或 100 个以上、200 个或 200 个以上、300 个或 300 个以上、400 个或 400 个以上、500 个或 500 个以上或 100 个或 100 个以上选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2 (SEQ ID NO:25)、受体克隆 9 (SEQ ID NO:27)、Sigirr/TIR8 (SEQ ID NO:29)、MpcII-3 相关蛋白 (SEQ ID NO:33) 或 bc10 (SEQ ID NO:35) 的锚定分子。在一实施例中,锚定分子特异性结合同一心脏锚定受体。在另一实施例中,锚定分子具有相同的氨基酸序列。在另一实施例中,多价结合物包括具有不相同氨基酸序列的锚定分子。适用于并有多锚定分子的本发明多价结合物中的部分包括(但不限于)噬菌体、反转录病毒、腺病毒、腺相关病毒和其它病毒、细胞、脂质体、聚合基质、非聚合基质或粒子(诸如金粒子)、微型装置、毫微装置(nanodevice)和毫微级半导体材料。

[0083] 举例而言,本发明的多价结合物可含有与至少两个各自选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2 (SEQ ID NO:25)、受体克隆 9 (SEQ ID NO:27)、Sigirr/TIR8 (SEQ ID NO:29)、MpcII-3 相关蛋白 (SEQ ID NO:33) 或 bc10 (SEQ ID NO:35) 的锚定分子连接的脂质体或其它聚合基质。必要时,脂质体或其它聚合基质可与所述锚定分子中的至少 10 个

或至少 100 个连接。举例而言,适用于所述多价结合物中的锚定分子可独立地包括氨基酸序列 SEQ ID NO :1、2、7、8、9、11、12 或 13 或所述序列的保守变异体或肽模拟物。例如,由磷脂或其它脂质组成的脂质体无毒、可为生理学上所接受并且是相对易于制造和投药的可代谢载体 (Gregoriadis, Liposome Technology, 第 1 卷 (CRC Press, Boca Raton, FL (1984))。所属领域技术人员应了解,在本发明的多价结合物中,脂质体或其它聚合基质在必要时另外可包括另一组份,诸如 (但不限于) 治疗剂、抗血管生成剂、消炎剂或免疫抑制剂。

[0084] 本发明提供治疗个体的心血管疾病的方法,其是通过对个体投与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2 (SEQ ID NO :25) 的抗体或其抗原结合片段。本发明进一步提供在个体中将成分导向到心脏脉管系统的方法,其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2 (SEQ ID NO :25) 的抗体或其抗原结合片段连接的成分的结合物,从而将所述成分导向到心脏脉管系统。适用于本发明方法的抗体包括 (但不限于) 单克隆抗体和具有生物活性的抗体。当使用本发明方法将成分导向到心脏脉管系统时,成分可为 (但不限于) 可检测成分或治疗剂,诸如 (但不限于) 血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂或病毒载体。下文进一步描述成分和心血管疾病。

[0085] 本发明也提供治疗个体的心血管疾病的方法,其是通过对个体投与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO :27 的抗体或其抗原结合片段来实现的。本发明另外提供在个体中将成分导向到心脏脉管系统的方法,其中对个体投与结合物,所述结合物含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO :27 的抗体或其抗原结合片段连接的成分,从而将所述成分导向到心脏脉管系统。在本发明的所述方法中,抗体可为 (但不限于) 单克隆抗体或具有生物活性的抗体。当使用本发明方法将成分导向到心脏脉管系统时,成分可为 (但不限于) 可检测成分或治疗剂,诸如 (但不限于) 血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂或病毒载体。

[0086] 本发明也提供治疗个体的心血管疾病的方法,其是通过对个体投与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 Sigirr/TIR8 (SEQ ID NO :29) 的抗体或其抗原结合片段来实现的。另外,本文还提供在个体中将成分导向到心脏脉管系统的方法,其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 Sigirr/TIR8 (SEQ ID NO :29) 的抗体或其抗原结合片段连接的成分的结合物,从而将所述成分导向到心脏脉管系统。在本发明方法中,抗体可为 (但不限于) 单克隆抗体或具有生物活性的抗体。如上所述,当使用本发明方法将成分导向到心脏脉管系统时,成分可为 (但不限于) 可检测成分或治疗剂,诸如 (但不限于) 血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂或病毒载体。

[0087] 本文进一步提供治疗个体的心血管疾病的方法,其是通过对个体投与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO :33 的抗体或其抗原结合片段来实现的。本发明也提供在个体中将成分导向到心脏脉管系统的方法,其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO :33 的抗体或其抗原结合片段连接的成分的结

合物,从而将所述成分导向到心脏脉管系统。适用于本发明方法的抗体包括(但不限于)单克隆抗体以及具有生物活性的抗体。在用于将成分导向到心脏脉管系统的本发明方法中,成分可为(但不限于)可检测成分或治疗剂,诸如(但不限于)血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂或病毒载体。

[0088] 本发明另外提供治疗个体的心血管疾病的方法,其是通过对个体投与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 bc10 (SEQ ID NO :35) 的抗体或其抗原结合片段来实现的。本发明也提供将成分导向到个体的心脏脉管系统的方法,其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 bc10 (SEQ ID NO :35) 的抗体或其抗原结合片段连接的成分的结合物,从而将所述成分导向到心脏脉管系统。举例而言,可用单克隆抗体或具有生物活性的抗体实施本发明方法。在用于将成分导向到心脏脉管系统的本发明方法中,可使多种成分中的任一种与特异性结合 bc10 (SEQ ID NO :35) 的抗体连接。所述成分包括(但不限于)可检测成分和治疗剂,诸如血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。

[0089] 如本文所用,术语“抗体”是以其最广泛的意义使用以包括多克隆和单克隆抗体,以及保留至少 $1 \times 10^5 M^{-1}$ 的对心脏锚定受体的结合活性的抗体多肽片段。所属领域技术人员应了解,选择性锚定到心脏脉管系统的抗体(包括(但不限于)Fab、F(ab')₂ 和 Fv 片段)可保留对心脏锚定受体的结合活性且因此包括于抗体定义中。另外,如本文所用的术语“抗体”涵盖特异性结合心脏锚定受体的非天然存在的通常至少含有一个 VH 和一个 VL 结构域的抗体和片段,诸如嵌合抗体、人源化抗体和单链 Fv 片段(scFv)。所述非天然存在的抗体可使用固相肽合成来构建、可重组产生或可(例如)通过使用(例如)下文所述的检定筛选噬菌体展示的文库或其它组合文库来获得,诸如那些由 Borrebaeck(编辑),Antibody Engineering(第2版)New York:Oxford University Press(1995)所述的可变重链和轻链组成的组合文库。

[0090] 举例而言,也可使用 HLP/CRIP2、受体克隆 9、Sigirr/TIR8、MpcII-3 相关蛋白或 bc10 融合蛋白或编码一部分 HLP/CRIP2、受体克隆 9、Sigirr/TIR8、MpcII-3 相关蛋白或 bc10 的合成肽作为免疫原来制备选择性锚定到心脏脉管系统的抗体。所属领域技术人员应了解,可(例如)使用本文中作为 SEQ ID NO :24、26、28、32 和 34 所公开的核酸序列以重组方式产生的经纯化的人类、鼠科或其它 HLP/CRIP2、受体克隆 9、Sigirr/TIR8、MpcII-3 相关蛋白或 bc10 以及 HLP/CRIP2、受体克隆 9、Sigirr/TIR8、MpcII-3 相关蛋白或 bc10 的片段和肽部分可用作提高选择性锚定到心脏脉管系统的抗 HLP/CRIP2、抗 Sigirr/TIR8、抗 MpcII-3 相关蛋白或抗 bc10 抗体的免疫原。应了解适用于作为免疫原的 HLP/CRIP2、受体克隆 9、Sigirr/TIR8、MpcII-3 相关蛋白或 bc10 的片段包括(但不限于)用于产生抗体的片段。所属领域技术人员进一步了解,可通过使半抗原与诸如牛血清白蛋白(BSA)或钥孔血蓝蛋白(KLH)的载体分子偶合而使心脏锚定受体的非免疫原性片段或合成肽具有免疫原性。另外,举例而言,如 Harlow 和 Lane,Antibodies :A Laboratory Manual(ColdSpring Harbor Laboratory Press,1988)所述,多种其它载体分子和使半抗原与载体分子偶合的方法在所属领域中是众所周知的。

[0091] 基于鉴别选择性锚定到心脏脉管系统的分子和其将经连接的治疗剂靶向心脏脉管系统的能力,本发明提供将成分靶向心脏脉管系统的方法和治疗心血管疾病的方法。举例而言,本发明提供在个体中将成分导向到心脏脉管系统的方法,其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2(SEQ ID NO:25) 的锚定分子连接的成分的结合物,从而将所述成分导向到心脏脉管系统。在本发明方法中,锚定分子可以(例如)相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏,且其例如可为锚定肽或肽模拟物。在一实施例中,将成分靶向心脏脉管系统的本发明方法依赖含有氨基酸序列 CRPPR(SEQ ID NO:1) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物。在另一实施例中,本发明方法依赖含有氨基酸序列 CGRKSKTVC(SEQ ID NO:2) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物。适用于本发明中的锚定肽或肽模拟物可视情况在构形上受限。此外,多种成分中的任一种都可用于本发明方法中,所述成分包括(但不限于)可检测成分,诸如放射性核素和荧光分子。适用于本发明的成分进一步涵盖(但不限于)治疗剂,诸如血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。

[0092] 本发明进一步提供在个体中将成分导向到心脏脉管系统的方法,其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO:27 的锚定分子连接的成分的结合物,从而将所述成分导向到心脏脉管系统。适用于本发明中的锚定分子可以相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏,且其可为锚定肽或肽模拟物。应了解特异性结合 SEQ ID NO:27 的多种锚定分子中的任一种都可用于将成分靶向心脏脉管系统。所述锚定分子包括(但不限于)含有氨基酸序列 CARPAR(SEQ ID NO:5) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物;和含有氨基酸序列 CPKRPR(SEQ ID NO:6) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物。适用于本发明的成分包括(但不限于)可检测成分,诸如放射性核素和荧光分子;以及治疗剂,诸如血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。

[0093] 本文进一步提供在个体中将成分导向到心脏脉管系统的方法,其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 Sigirr/TIR8(SEQ ID NO:29) 的锚定分子连接的成分的结合物,从而将所述成分导向到心脏脉管系统。作为非限制性实例,适用于本发明方法中的锚定分子可以相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏。作为另一非限制性实例,适用于本发明方法中的锚定分子可为锚定肽或肽模拟物。

[0094] 多种特异性结合 Sigirr/TIR8(SEQ ID NO:29) 的锚定分子中的任一种都适用于本发明方法中,所述锚定分子包括(但不限于)含有氨基酸序列 CKRAVR(SEQ ID NO:7) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物;含有氨基酸序列 CRNSWKPN(SEQ ID NO:8) 或其保守变异体或肽模拟物的肽和肽模拟物;和含有氨基酸序列 RGSSS(SEQ ID NO:9) 或其保守变异体或肽模拟物的肽和肽模拟物。所述锚定肽和肽模拟物可为(但不限于)线性、环状或在构形上受限。此外,多种成分中的任一种都可用于依赖特异性结合 Sigirr/TIR8(SEQ ID NO:29) 的锚定分子的本发明方法中。所述成分包括(但不限于)可检测成分,诸如放射性核素和荧光分子;和治疗剂,诸如血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗

生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。

[0095] 本发明进一步提供在个体中将成分导向到心脏脉管系统的方法,其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO:33 的锚定分子连接的成分的结合物,从而将所述成分导向到心脏脉管系统。作为非限制性实例,可用以相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏的锚定分子或者用为肽或肽模拟物的锚定分子实施本发明方法。在一实施例中,用含有包括氨基酸序列 CRSTRANPC(SEQ ID NO:11)或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物的结合物实施本发明方法。在所述方法中,含有氨基酸序列 CRSTRANPC(SEQ ID NO:11)的锚定肽或肽模拟物可视情况在构形上受限。多种成分中的任一种都可用于本发明方法中,所述成分包括(但不限于)可检测成分,诸如放射性核素和荧光分子;和治疗剂,诸如血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。

[0096] 本文进一步提供在个体中将成分导向到心脏脉管系统的方法,其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 bc10(SEQ ID NO:35)的锚定分子连接的成分的结合物,从而将所述成分导向到心脏脉管系统。适用于本发明中的锚定分子可以(例如)相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏,且其可为肽或肽模拟物。特异性结合 bc10(SEQ ID NO:35)的多种锚定分子中的任一种都可用于本发明方法中。所述锚定分子包括(但不限于)含有氨基酸序列 CPKTRRVPC(SEQ ID NO:12)或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物;和含有氨基酸序列 CSGMARTKC(SEQ ID NO:13)或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物。所述锚定肽和肽模拟物可用作线性、环状或以其它方式在构形上受限的结构。可用多种成分中的任一种来实施依赖于并入有特异性结合 bc10(SEQ ID NO:35)的锚定分子的结合物的本发明方法。适用成分包括(但不限于)可检测成分,诸如放射性核素和荧光分子;以及治疗剂,诸如血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。

[0097] 本发明也提供治疗个体的心血管疾病的方法,其是通过对个体投与含有治疗剂的结合物来实现的,所述治疗剂与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2(SEQ ID NO:25)的锚定分子连接结合物。在本发明的所述方法中,锚定分子可以(例如)相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏,且其例如可为锚定肽或肽模拟物。特异性结合 HLP/CRIP2(SEQ ID NO:25)的多种锚定分子中的任一种都可用于本发明方法中,所述锚定分子包括(但不限于)含有氨基酸序列 CRPPR(SEQ ID NO:1)或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物;和含有氨基酸序列 CGRKSKTV(SEQ ID NO:2)或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物。适用于本发明中的锚定肽或肽模拟物可视情况在构形上受限。多种治疗剂中的任一种都可用于根据本发明方法治疗心血管疾病,所述治疗剂包括(但不限于)血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。

[0098] 本文进一步提供治疗个体的心血管疾病的方法,其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO:27 的锚定分子连接的治疗剂的结合

物来实现的。适用于治疗心血管疾病的锚定分子可以（例如）相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏。特异性结合 SEQ ID NO:27 的多种锚定分子中的任一种都可用于本发明方法中,所述锚定分子包括锚定肽或肽模拟物,诸如含有氨基酸序列 CARPAR(SEQ ID NO:5) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物;和含有氨基酸序列 CPKRPR(SEQ ID NO:6) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物。多种治疗剂中的任一种都可用于根据本发明方法治疗心血管疾病。所述治疗剂包括（但不限于）血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。

[0099] 本文也提供治疗个体的心血管疾病的方法,其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 Sigirr/TIR8(SEQ ID NO:29) 的锚定分子连接的治疗剂的结合物来实现的。在本发明方法中,锚定分子可以（例如）相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏。特异性结合 Sigirr/TIR8(SEQ ID NO:29) 的多种锚定分子中的任一种都适用于本发明方法中,所述锚定分子包括（但不限于）锚定肽和肽模拟物。举例而言,所述锚定肽或肽模拟物可为具有氨基酸序列 CKRAVR(SEQ ID NO:7) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物;具有氨基酸序列 CRNSWKPN(C) (SEQ ID NO:8) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物;或具有氨基酸序列 RGSSS(SEQ ID NO:9) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物。举例而言,适用于治疗心血管疾病的本发明方法中的锚定肽和肽模拟物可为线性、环状或在构形上受限。多种治疗剂中的任一种都可与本发明方法中特异性结合 Sigirr/TIR8(SEQ ID NO:29) 的锚定分子连接,所述治疗剂包括（但不限于）血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。

[0100] 本发明进一步提供治疗个体的心血管疾病的方法,其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO:33 的锚定分子连接的治疗剂的结合物来实现的。作为非限制性实例,可用以相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏的锚定分子或者用为肽或肽模拟物的锚定分子实施所述方法。在特定实施例中,使用包括氨基酸序列 CRSTRANPC(SEQ ID NO:11) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物实施用于治疗心血管疾病的本发明方法。适用于本发明方法中的治疗剂包括（但不限于）血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。

[0101] 本发明进一步提供治疗个体的心血管疾病的方法,其是通过对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合鼠科膀胱癌相关蛋白同系物 (bc10;SEQ ID NO:35) 的锚定分子连接的治疗剂的结合物来实现的。适用于本发明中的锚定分子包括（但不限于）可以相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏的锚定分子,例如（但不限于）锚定肽和肽模拟物。特异性结合 bc10(SEQ ID NO:35) 的多种锚定分子中的任一种都可用于根据本发明方法治疗心血管疾病。所述锚定分子包括（但不限于）含有氨基酸序列 CPKTRRVPC(SEQ ID NO:12) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物;和含有氨基酸序列 CSGMARTKC(SEQ ID NO:13) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟

物。如上所述,所述锚定肽和肽模拟物视情况可在构形上受限。适用于本发明方法中的治疗剂包括(但不限于)血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。

[0102] 如下文进一步论述,本发明的结合物和方法可用于治疗多种心脏病和心血管疾病中的任一种。所述心脏病和心血管疾病包括(但不限于)冠状动脉病(CAD);动脉粥样硬化;血栓形成;再狭窄;血管炎,其包括自体免疫性血管炎和病毒性血管炎,诸如多发性结节性动脉炎、变应性肉芽肿性血管炎(Churg-Strass syndrome)、高安动脉炎(Takayasu's arteritis)、川崎病(Kawasaki Disease)和立克次体血管炎(Rickettsial vasculitis);动脉粥样硬化性动脉瘤(atherosclerotic aneurism);心肌肥大;先天性心脏病(CHD);缺血性心脏病和绞痛;后天瓣膜疾病/心内膜疾病;原发性心肌病,包括心肌炎;心律不齐;和移植排斥反应。欲根据本发明方法治疗的心脏病和心血管疾病进一步包括(但不限于)代谢性心肌病(诸如充血性、肥大性和限制性心肌病)和心脏移植。与本发明的锚定分子连接的治疗剂将集中在心血管中且可进一步在心肌中积累。因此,本发明的结合物和方法适用于治疗这些和其它心血管或心肌病症。

[0103] 使用刺激新血管形成(血管生成)的治疗剂的以血管生成为基础的疗法可用于根据本发明方法治疗心血管疾病。血管生成剂可用于治疗(但不限于)缺血性心脏病,其包括慢性心肌缺血和急性心肌梗塞(Ware 和 Simons, Nature Med. 3:158-164(1997))。患有严重血管疾病的许多并非机械血管再造的候选者的患者可受益于以血管生成为基础的疗法,包括那些因血管阻塞而难以旁通的患者、不具有导管的患者和由于并发疾病而并非外科手术候选者的患者。已计算出在美国有 314,000,000 例病例,且欧盟可能会受益于以血管生成为基础的疗法(Miller 和 Abrams, Gen. Engin. News 18:1(1998))。因此,选择性锚定到心脏脉管系统的分子可与血管生成剂连接并传递给患者,从而刺激血管生成并缓解心血管疾病。

[0104] 适用于本发明中的血管生成剂也可天然存在的血管生成生长因子或细胞因子,其通过刺激内皮细胞生长或迁移而诱导或促进血管生成。适用于本发明中的血管生成剂涵盖(但不限于)血管内皮生长因子(VEGF)的异型体(isoform),诸如 VEGF-A,包括 VEGF₁₂₁和 VEGF₁₆₅;和成纤维细胞生长因子形式,包括(但不限于)FGF-1 和 FGF-2 形式(Ruel 和 Sellke, Sem. Thor. Cardiovasc. Surg. 15:222-235(2003))。如下文进一步论述,本发明的血管生成剂和其它治疗剂可以蛋白治疗剂形式或核酸治疗剂形式经由基因疗法载体传递。

[0105] 另外被称为血管渗透因子(VPF)的 VEGF-A 也可用于本发明(Dvorak 等人, Am. J. Pathol. 146:1029-1039(1995); Thomas 等人, J. Biol. Chem. 271:603-606(1996); Olofsson 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93:2576-2581(1996); Joukov 等人, EMBO J. 15:290-298(1996); 和 Harada 等人, Am. J. Physiol. 270:H1791-H1802(1996))。其它 VEGF(B、C 和 D)具有血管生成活性但不能实现内皮渗透。编码 VEGF 的质粒 DNA 的转移已显示出会导致在支架植入之后血栓形成和内膜增厚的显著降低(J. Am. Coll. Cardiol. 29:1371-1379(1997))。适用于本发明的血管生成剂包括(但不限于)VEGF 的重组 165kDa 异型体,称为 rhVEGF,其是由 Genentech 开发的;编码 VEGF 的 121 氨基酸异型体的核酸分子(BioByPass™; GenVec/Parke Davis);和编码 VEGF-B、VEGF-C 和 VEGF-D 的核酸。例如参看

Miller 和 Abrams, 上文, 1998。

[0106] 适用于本发明的血管生成剂也可作为成纤维细胞生长因子 (FGF) 家族的成员, 诸如 FGF-1 (酸性)、FGF-2 (碱性)、FGF-4 或 FGF-5 (Slavin 等人, Cell Biol. Int. 19:431-444 (1995); Folkman 和 Shing, J. Biol. Chem. 267:10931-10934 (1992))。举例而言, 欲与本发明的结合物或方法中选择性锚定到心脏脉管系统的分子连接的 FGF 可为 FIBLAST® (曲弗明 (trafermin), Scios, Inc. (Mountain View, CA) 和 Wyeth Ayerst Laboratories (Radnor, PA) 正在开发的 FGF-2 的重组形式) 或 GENERXTM (由 Collateral Therapeutics (San Diego, CA) 和 Schering AG 开发的编码 FGF-4 的腺病毒基因疗法载体) (Miller 和 Abrams, 上文, 1998)。

[0107] 适用于本发明的血管生成剂也可作为血管生成素-1 (angiopoietin-1), 即通过内皮细胞特异性 Tie2 受体酪氨酸激酶转导信号的血管生成因子 (Davis 等人, Cell 87:1161-1169 (1996))。同 VEGF 一样, 血管生成素-1 是正常血管发育所必需的, 且其过度表达导致血管生成增加 (Suri 等人, Cell 87:1171-1180 (1996))。

[0108] 适用于本发明的结合物或方法中的治疗剂也可作为预防血栓形成的抗血栓形成剂, 血栓是在细胞基本组份的捕集下血液因子、主要是血小板和血纤维蛋白的积聚物。通过存在粥样空斑来刺激血栓形成, 且血栓形成是急性缺血性心脏病发作的主要原因。适用于本发明的抗血栓形成剂可为 (但不限于) IIb/IIIa 整合素 (integrin) 的抑制剂 (Coller, Circulation 92:2373 (1995)); 组织因子抑制剂; 血纤维蛋白溶酶原活化因子或抗凝血酶剂。

[0109] 免疫抑制剂也可适用于本发明的结合物和方法中, 例如用于治疗心脏移植接受者。应了解免疫抑制剂可用于器官移植接受者通常需要全部寿命的慢性预防性治疗中, 或者用于治疗展现一种或一种以上与移植排斥反应一致的症状的患者, 或者用作严重排斥反应中的救援药剂 (rescue agent)。适用于本发明的结合物和方法中的免疫抑制剂涵盖 (但不限于): 类固醇, 其包括皮质类固醇和泼尼松龙 (prednisolone); 钙调蛋白 (calcineurin) 抑制剂, 诸如 Prograf、Neoral®、Rapamune、环孢霉素 A (cyclosporine A) 和其它环孢霉素; 抗增殖剂, 其包括 Cellcept、Imuran (硫唑嘌呤 (azathioprine)) 和 Certican™ (艾罗莫司 (everolimus)); 和治疗性单克隆抗体, 诸如 OKT3、ATGAM、抗胸腺细胞球蛋白 (thymoglobulin/anti-thymocyte globulin)、地路奇单抗 (dcluzimab) 和巴利昔单抗 (basiliximab)。这些和其它免疫抑制剂都可单独地或以与另一免疫抑制剂或其它治疗剂的组合形式用于本发明的结合物和方法中。

[0110] 作为减少一种或一种以上炎症症状的分子的消炎剂也可用于本发明的结合物和方法中。所述消炎剂包括 (但不限于) 类固醇 (包括皮质类固醇) 和免疫球蛋白以及环氧化酶抑制剂和其它非类固醇消炎药物。在一实施例中, 消炎剂为 AGI-1067, 即胆固醇降低性消炎剂 (AtheroGenics; Atlanta, AL)。

[0111] 抗心律不齐剂也可用于本发明的结合物和方法中, 例如用于治疗心律失常, 其为心脏的正常周期性和规律机电活性被破坏的病症。因此, 在本发明的结合物或方法中, 治疗剂可为抗心律不齐剂, 诸如局部麻醉剂 (I 类药剂)、交感拮抗剂 (II 类药剂)、抗纤颤药剂 (III 类药剂)、钙通道药剂 (IV 类药剂) 或阴离子拮抗剂 (V 类药剂), 例如, 如 Vukmir, Am. J. Emer. Med. 13:459-470 (1995); Grant, PACE 20:432-444 (1997); Mann, Curr. Med.

Res. Opin. 13 :325-343(1995) ;或 Lipka 等人, Am. Heart J. 130 :632-640(1995) 中所述。作为局部麻醉剂的抗心律不齐剂充当快速钠通道拮抗剂,诸如,抗心律不齐剂可为(但不限于)普鲁卡因胺(procainamide)、奎尼定(quinidine)或丙吡胺(disopyramide);利多卡因(lidocaine)、苯妥英(phenytoin)、妥卡尼(tocainide)或美西律(mexiletine);或恩卡胺(encainide);氟卡尼(flecainide);劳卡尼(lorainide);普萘洛尔(III)(propafenone(III))或莫雷西嗪(moricizine)(Vukmir, 上文,1995)。抗心律不齐剂也可作为交感拮抗剂(P- 肾上腺素拮抗剂),诸如(但不限于)心得安(propranolol)、艾司洛尔(esmolol)、美托洛尔(metoprolol)、阿替奈尔(atenolol)、醋丁洛尔(acebutolol);或通过延长作用电位时程(action potential duration, APD)起作用的抗纤颤药剂,例如溴苄铵(bretylum)、胺碘酮(amiodarone)、索他洛尔(II)(sotalol(II))或N- 乙酰普鲁卡因胺(N-acetylprocainamide)(Vukmir, 上文,1995)。可用作本发明结合物或方法中的治疗剂的其它抗心律不齐剂包括(但不限于)钙通道药剂(诸如维拉帕米(verapamil)、地尔硫卓(diltiazem)和苄普地尔(bepridil))和阴离子拮抗剂(诸如烯丙尼定(alinidine))(Vukmir, 上文,1995)。所属领域技术人员应了解,所属领域中已知的这些和其它抗心律不齐剂可为适用于在本发明的结合物或方法中治疗心律失常的治疗剂。

[0112] 也被称为钙通道阻断剂(CCB)的钙拮抗剂在许多心血管疾病中具有有益作用,其充当平滑肌细胞增殖和迁移的有效抑制剂。使得这些治疗剂适用于治疗动脉粥样硬化和其它心血管疾病的其它特性包括其抑制钙流入血管壁的能力;减少胞外基质合成的能力;促进低密度脂蛋白的摄取和裂解的能力;保护脂蛋白免受氧化修饰的能力;维持内皮细胞功能的能力;和抑制血小板活化的能力。在钙拮抗剂中,氨氯地平(amlodipine)为具有血管选择性的治疗剂(Marche 等人, Int. J. Cardiol. 62(Suppl) :S17-S22(1997); Schachter, Int. J. Cardiol. 62(Suppl.) :S85-S90(1997))。可用作适用于本发明的治疗剂的其它钙拮抗剂包括(但不限于)尼卡地平(nicardipine)、硝苯地平(nifedipine)、心得安(propranolol)、硝酸异山梨酯(isosorbide dinitrate)、地尔硫卓(diltiazem)和伊拉地平(isradipine)(Nayler(编辑)Calcium Antagonists, 第 157-260 页, London : Academic Press(1988); Schachter, Int. J. Cardiol. 62(增刊) :S9-S15(1997))。提高 cAMP 或 cGMP 含量的治疗剂会降低血管平滑肌细胞反应性或增殖,并且在与选择性锚定到心脏脉管系统的分子连接时也是适用的。所述治疗剂包括(但不限于)cAMP 磷酸二酯酶抑制剂西洛他索(cilostazol)和来源于内皮的一氧化氮(NO)或一氧化氮产生性血管扩张剂。例如,参看 Takahashi 等人, J. Cardiovas. Pharm. 20 :900-906(1992);和 Cornwell 等人, Am. J. Physiol. 267 :C1405-1413(1994)。

[0113] 适用于本发明中的治疗剂也可作为抗病毒剂或抗生素药剂。许多研究已报导心内膜炎、动脉粥样硬化和再狭窄与特定细菌和病毒感染、尤其是巨细胞病毒和肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)的联系(Cheng 和 Rivera, Annals of Pharmacotherapy 32 :1310-1316(1998))。为预防性用于心脏移植或具有发展动脉粥样硬化的高风险的其它患者中,可对患者投与含有与抗病毒剂(诸如更昔洛韦(ganciclovir))连接的选择性锚定到心脏脉管系统的分子的结合物。可包括在本发明的结合物或方法中的其它抗病毒剂包括(但不限于)利巴韦林(Ribavirin)(病毒唑(Virazole), 1-(3-D- 呋喃核糖基 -1, 2,4- 三唑 -3- 甲酰胺)和重组人类白细胞 IFN- α A/D(Matsumori 等人, Circulation 71 :

834-839(1985);Matsumori 等人, J. Am. Coll. Cardiol. 9 :1320-1325(1987))。

[0114] 所述结合物和方法也可用于治疗动脉粥样硬化,动脉粥样硬化与其后果结合组成西方世界疾病和死亡的最常见和最重要的起因。同其它阻塞性血管疾病一样,动脉粥样硬化的特征在于脂质、炎性细胞、血管平滑肌细胞和胞外基质蛋白在内皮内层与中间层之间的内膜空间中的异常积累(空斑形成)。特定而言,对内皮的损伤允许富含胆固醇的低密度脂蛋白(LDL)进入内膜。脂质被噬菌体摄入内膜中,同时经由摄取氧化 LDL 的受体无关性路径在内膜噬菌体中积累过量的脂质。噬菌体将脂质释放到内膜中并分泌刺激增殖的细胞因子。具有成肌纤维细胞特征的内膜细胞分泌胶原,从而引起空斑在一些情况下变得纤维化。由于病变发展,因此存在基质的压迫性萎缩,且弹性薄层受到破坏。进一步胶原沉积会形成空斑(纤维脂质空斑)的致密纤维帽,其含有游离脂质以及巨噬细胞中的脂质。空斑的脆弱内皮通常溃烂,从而允许血小板积聚和血栓形成。诸如血小板来源生长因子的生长因子通过刺激细胞增殖而引起进一步空斑发展。

[0115] 内膜平滑肌细胞增殖的增加引起肌内膜增生(myointimal hyperplasia)和腔变窄(luminal narrowing)。在新生内膜形成中起作用的异常细胞增殖可由诸如血小板来源生长因子(PDGF)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)或血管紧张素 II 的特异性生长因子引起(Ross, Annu. Rev. Physiol. 57 :791(1995);Schwartz 等人, Circ. Res. 77 :445(1995);和 Gibbons 和 Dzau, New Eng. J. Med. 330 :1431(1994))。

[0116] 适用于在本发明的结合物和方法中治疗心血管疾病(诸如血管成形术后的内膜增生)的治疗剂可为生长抑制剂,其通过限制新生内膜平滑肌细胞增殖来减少或预防血管疾病。举例而言,疱疹病毒胸苷激酶(tk)基因和全身性更昔洛韦可用于杀死增殖细胞并限制新生内膜形成。在一项研究中,用编码 tk 的腺病毒载体感染猪髂股动脉,并且在暴露于更昔洛韦后,在气囊损伤后所看到的新生内膜增厚减少 50-87% (Ohno 等人, Science, 265 :781-784(1994);也参看 Guzman 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :10732-10736(1994);Chang 等人, Mol. Med 1 :172-181(1995);和 Simari 等人, Circulation 92 :1-501(1995))。因此,适用于本发明中的治疗剂可为细胞生长抑制剂,诸如(但不限于)胸苷激酶与更昔洛韦的组合。

[0117] 用于限制新生内膜形成的其它治疗剂在所属领域中也是已知的且包括抑制细胞周期蛋白和原癌基因的基因(Simari 和 Nabel, Semin. Intervent. Cardiol. 1 :77-83(1996))。所述治疗剂包括(但不限于)肿瘤抑制基因(诸如 p53 和成视网膜细胞瘤)以及编码 bcl-x、ras 的突变体形式和一氧化氮合成酶的基因。作为非限制性实例,成视网膜细胞瘤基因产物(Rb)抑制许多哺乳动物细胞类型中的细胞增殖,且编码活性 Rb 的重组腺病毒转移到受伤大鼠颈动脉和猪髂动脉中会降低新生内膜形成(Chang 等人, Science 267 :518-522(1994))。已类似地显示 p53 的基因转移会抑制血管平滑肌细胞增殖(Yonemitsu 等人, Circ. Res. 82 :147-156(1998);也参看 Muller, Prog. Cardiovas. Dis. 40 :117-128(1997))。显性负 ras 变异体的直接基因转移也抑制大鼠颈动脉和猪髂股模型中气囊损伤后的内膜发育(Chang 等人, J. Clin. Invest. 96 :2260-2268(1995))。在大鼠颈动脉损伤模型中,一氧化氮合成酶的基因转移也限制内膜形成(von der Leyen 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 :1137-1141(1995))。所属领域技术人员应了解,细胞生长抑制剂也可用作本发明的结合物或方法中的治疗剂。

[0118] 对抗细胞目标（诸如 E2F 或各种细胞周期素之一）的诱捕或反义寡核苷酸也可适用于在本发明方法中限制新生内膜增殖的治疗剂（Morishita 等人, Circ. Res. 82 : 1023-1028(1998) ;和 Mann 等人, Circulation 96 :1-4(1997)）。在活体内血管损伤后于血管平滑肌细胞中快速下调的生长遏制同源异形盒（homeobox）基因 *gax* 也可适用于抑制内膜增生的治疗剂（Smith 等人, Genes Dev. 11 :1674-1689(1997) ;和 Skopicki 等人, Circ. Res. 80 :452-462(1997)）。可用于在本发明的结合物或方法中限制内膜增生的其它治疗剂在所属领域中也是已知的（例如参看 Laitinen 和 Yla-Herttuala, Current Opin. Lipid 9 : 465-469(1998)）。

[0119] 本发明的结合物或方法也可用于治疗再狭窄,再狭窄为可能在血管成形术之后发生的内腔尺寸的再度变窄,血管成形术是将气囊插入受阻血管中、然后充气以使变窄区域扩大的程序。经过 3 到 6 个月的时程在约 30 到 50% 的病例中发生再狭窄,且其包括新生内膜内的细胞增生、血管壁内的血栓组建和总体血管尺寸的收缩。血管成形术剥除通常产生血管平滑肌迁移和增殖的旁分泌抑制剂的內皮细胞的血管。

[0120] 一氧化氮缺乏与血管舒张受损和粘附性增加相联系,从而使血管组织易于形成动脉粥样硬化病变（Gibbons 和 Dzau, Science 272 :689-693(1996)）。适用于本发明的结合物和方法中的治疗剂包括（但不限于）內皮细胞型一氧化氮（NO）合酶药剂,其为增强一氧化氮合酶活性的药剂。所述增强一氧化氮（NO）活性的治疗剂涵盖（但不限于）一氧化氮合酶基因和一氧化氮供体药物。在新生内膜形成大鼠模型中将一氧化氮合酶基因转染到气囊损伤后的血管壁中会导致产生一氧化氮并实质上抑制新生内膜形成所必需的细胞增殖、迁移和基质产生（von der Leyen 等人,上文,1995）。临床研究也表明一氧化氮供体药物可用于增加一氧化氮活性并治疗再狭窄（Ferguson, Circulation 90 :4(1994)）。

[0121] 本发明的结合物和方法也可用于治疗充血性心力衰竭（CHF）,其为仅在美国就影响近五百万人的病症。当心脏由于动脉粥样硬化或诸如高血压、心肌梗塞或有缺陷心脏瓣膜的其它病状而受到破坏时,引起充血性心力衰竭。失效的心脏无法有效工作,从而引起体液滞留（fluid retention）、呼吸急促和疲劳。因此,为治疗充血性心力衰竭,可将选择性锚定到心脏脉管系统的分子与诸如（但不限于）TNF 抑制剂（诸如重组可溶性 TNF 诱捕受体 Embrel™（Immunex Corp. ;Seattle, WA））的治疗剂连接。

[0122] 作为使血管收缩的多肽的內皮素在充血性心力衰竭中也升高。因此,可将选择性锚定到心脏脉管系统的本发明分子与作为內皮素抑制剂（例如小分子药物 TBC11251）的治疗剂连接。由 Texas Biotechnology Corp. 研发的这种药物会抑制內皮素 A 受体结合,并促进平滑肌细胞的松弛。TBC11251 已导致患有中度到严重充血性心力衰竭的患者的显著改善（Potera, Gen. Enen. News 18 :12(1998)）。

[0123] 用于本发明的结合物或方法中的治疗剂也可作为遗传性心脏病的替换基因疗法载体。例如,所述遗传性疾病可为心肌的遗传性疾病,诸如 X 连接的扩张型心肌病（X-linked dilated cardiomyopathy）、肥大性心肌病、长 QT 综合症（Long QT Syndrome）或引起疾病的突变尚未确定的另一疾病（Bowles 等人, Cardiovas. Res. 35 :422-430(1997)）。在一个实施例中,用与腺病毒基因疗法载体连接的选择性锚定到心脏脉管系统的分子实施本发明的结合物或方法,所述载体含有编码所要替换基因产物的核酸分子。

[0124] 举例而言,治疗剂可如 Harada 等人, J. Clin. Invest. 94 :623-630(1994) 中所述

以蛋白形式传递。微球体（例如，经由 SO_3 残余物可逆吸附诸如 bFGF 等血管生成因子的 $7\mu\text{m}$ 直径的微球体）也可与选择性锚定到心脏脉管系统的分子连接以选择性传递用于治疗心血管疾病的微球体。所述微球体留在周围微循环中而不会干扰总流量并经一周时期缓慢释放 (Arras 等人, Nature Biotech. 16 :159-162(1998) ;也参看 Tice 和 Staas, Nature Biotech. 16 :134(1998))。单独注入生物可降解的微球体可用于传递血管生成剂或其它治疗剂,其在注入后经一或数月释放,药物释放的速率和持续时间由诸如聚合物类型和微粒大小等因素控制 (Maulding, Controlled Release 6 :167-176(1987) ;Tice 和 Tabibi, 第 315-339 页, Kydonieus(编辑), Treatise on Controlled Drug Delivery Marcel Dekker, New York(1992))。基因疗法载体也可与选择性锚定到心脏脉管系统的锚定分子连接以传递编码血管生成剂或其它治疗剂的核酸分子（例如参看 Isner 等人, Lancet 348 : 370-374(1996) ;Giordano 等人, Nature Med. 2 :534-539(1996))。

[0125] 在所属领域中已知用于在本发明方法中治疗心脏病或心血管疾病的多种合适的基因疗法（例如参看 Li 等人, Cardiol. 41 :39-46(1997))。作为非限制性实例,包括反转录病毒载体和腺病毒载体的病毒载体在与选择性锚定到心脏脉管系统的分子连接时可用于基因传递。所述基因疗法载体可包括编码治疗剂的核酸分子,所述治疗剂诸如（但不限于）血管生成剂,诸如 VEGF 或 FGF。举例而言,如 Sylven, Drugs of Today 38 :819-827(2002) ; Symes, J. Card. Sure. 15 :283-290(2000) ; 和 Grines 等 人, Am. J. Cardiol. 92(增 刊) : 24N-31N(2003) 中所述,具有 VEGF、FGF 和其它血管生成剂形式的基因疗法在所属领域中众所周知。具有无法复制的血清型 5 腺病毒的血管生成基因疗法在具有慢性稳定型心绞痛的人类体内的安慰剂控制试验中具有有益作用,在所述腺病毒中 E1A 和 E1B 基因已在巨细胞病毒启动子的控制下经人类成纤维细胞生长因子 -4 (FGF-4) 基因替换 (Grines 等人, 上文, 2003)。也参看 Simari 和 Nabel, 上文, 1996 ;和 Indolfi 和 Chiariello, Cardiologia 43 : 365-373(1998))。因此,在一实施例中,本发明方法依赖于表达治疗基因产物的复制缺陷型重组腺病毒载体。

[0126] 鉴于上文,应了解多种治疗剂适用于根据本发明方法治疗心血管疾病。适用的治疗剂涵盖（但不限于）血管生成剂、抗血栓形成剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律不齐剂、肿瘤坏死因子抑制剂、内皮素抑制剂、血管紧张素转化酶抑制剂、钙拮抗剂、抗生素药剂、抗病毒剂和病毒载体。所属领域技术人员应了解,在并入本发明的结合物或方法中时,可将这些和额外已知或其它治疗剂选择性导向到心脏脉管系统。此外,心脏病学领域的技术人员应了解,这些和其它治疗剂都可在本发明的结合物和方法中单独或一起使用。应进一步了解,本发明的结合物可含有所述治疗剂中的一种或一种以上并且其它组份可视情况包括在本发明的结合物中。作为实例,在一些情况下,可能需要在锚定分子与治疗剂之间利用寡肽间隔物。例如参看 Fitzpatrick 和 Garnett, Anticancer Drug Design 10 :1-9(1995)。

[0127] 应进一步了解多种投药途径适用于本发明方法中。所述途径涵盖全身和局部投药且包括（但不限于）经口投药、静脉内注射、腹膜内注射、肌内注射、皮下注射、经皮扩散或电泳、局部注射和缓释传递装置（包括局部植入的缓释装置,诸如可生物腐蚀或以储集层为基础的植入物）。

[0128] 本发明进一步提供在个体中显影心脏脉管系统的方法,其是通过下列步骤实现的:对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2 (SEQ ID NO :

25) 的锚定分子连接的可检测成分的结合物 ;并检测结合物。在显影心脏脉管系统的本发明方法中,锚定分子可以(例如)相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏,且其例如可为锚定肽或肽模拟物。特异性结合 HLP/CRIP2(SEQ ID NO:25) 的多种锚定分子可用于根据本发明方法显影心脏脉管系统。所述锚定分子涵盖(但不限于)含有氨基酸序列 CRPPR(SEQ ID NO:1) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物,和含有氨基酸序列 CGRKSKTVC(SEQ ID NO:2) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物。多种可检测成分适用于上述本发明方法中,所述成分例如包括放射性核素和顺磁离子。

[0129] 本文进一步提供在个体中显影心脏脉管系统的方法,其是通过下列步骤实现的:对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO:27 的锚定分子连接的可检测成分的结合物 ;并检测结合物。在显影心脏脉管系统的本发明方法中,锚定分子可以(例如)相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏。特异性结合 SEQ ID NO:27 的多种锚定分子可用于根据本发明方法显影心脏脉管系统。所述锚定分子涵盖(但不限于)锚定肽或肽模拟物,诸如含有氨基酸序列 CARPAR(SEQ ID NO:5) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物,和含有氨基酸序列 CPKRPR(SEQ ID NO:6) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽或肽模拟物。多种可检测成分适用于显影心脏脉管系统,所述成分例如包括放射性核素和顺磁离子。

[0130] 本发明另外提供在个体中显影心脏脉管系统的方法,其是通过下列步骤实现的:对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 Sigirr/TIR8(SEQ ID NO:29) 的锚定分子连接的可检测成分的结合物 ;并检测结合物。在本发明的显影方法中,锚定分子可以(例如)相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏。此外,多种特异性结合 Sigirr/TIR8(SEQ ID NO:29) 的锚定分子中的任一种都适用于根据本发明方法显影心脏脉管系统,所述锚定分子包括(但不限于)具有氨基酸序列 CKRAVR(SEQ ID NO:7) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物 ;具有氨基酸序列 CRNSWKPNC(SEQ ID NO:8) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物 ;和具有氨基酸序列 RGSSS(SEQ ID NO:9) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物。应认识到,适用于本发明的显影方法中的锚定肽和肽模拟物例如可为线性、环状或在构形上受限。适用于显影的可检测成分包括(但不限于)放射性核素和顺磁离子。

[0131] 本文进一步提供在个体中显影心脏脉管系统的方法,其是通过下列步骤实现的:对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 SEQ ID NO:33 的锚定分子连接的可检测成分的结合物 ;并检测结合物。作为非限制性实例,可用以相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择性在活体内锚定到心脏的锚定分子或者用作为肽或肽模拟物的锚定分子实施本发明的显影方法。适用于本发明的显影方法的锚定分子包括(但不限于)锚定肽和肽模拟物,诸如具有氨基酸序列 CRSTRANPC(SEQ ID NO:11) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物。可用包括(例如)放射性核素和顺磁离子的多种可检测成分中的任一种实施显影心脏脉管系统的本发明方法。

[0132] 本文也提供在个体中显影心脏脉管系统的方法,其是通过下列步骤实现的:对个体投与含有与选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合鼠科膀胱癌相关蛋白同系物(bc10;SEQ ID NO:35) 的锚定分子连接的可检测成分的结合物 ;并检测结合物。适用于根据本发明方法显影的锚定分子包括(但不限于)可以相对于非重组噬菌体至少 5 倍的选择

性在活体内锚定到心脏的锚定分子。特异性结合 bc10 (SEQ ID NO :35) 的多种锚定分子中的任一种都可用于根据本发明方法显影心脏脉管系统,所述锚定分子包括锚定肽和肽模拟物,诸如含有氨基酸序列 CPKTRRVPC (SEQ ID NO :12) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物,和含有氨基酸序列 CSGMARTKC (SEQ ID NO :13) 或其保守变异体或肽模拟物的锚定肽和肽模拟物。适用于本发明中的锚定肽和肽模拟物可以线性、环状或构形上受限的形式使用。如上所述,适用于显影的可检测成分包括(但不限于)放射性核素和顺磁离子。

[0133] 本发明的显影方法依赖可检测成分。如本文所用,术语“可检测成分”是指可在活体内投药并随后检测的任何分子。适用于本发明的结合物和显影方法中的示范性可检测成分包括顺磁离子、放射性核素和荧光分子。示范性放射性核素包括铟-111、镓-67、碳-11 和碳-13。荧光分子包括(但不限于)荧光素(fluorescein)、别藻蓝蛋白(allophycocyanin)、藻红蛋白(phycoerythrin)、若丹明(rhodamine)和德州红(Texas red)。当可检测成分为发射伽玛射线的放射性核素(诸如铟-113、铟-115 或镓-67)时,可在投与个体后使用固态闪烁检测器使结合物显现。

[0134] 本文还提供分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统的锚定分子的方法,其是通过下列步骤实现的:使 HLP/CRIP2 或其片段与分子文库在适于使分子与 HLP/CRIP2 特异性结合的条件下接触;检定特异性结合;并从文库中分离一种或一种以上 HLP/CRIP2 结合分子,从而分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2 的锚定分子。在细胞表面表达 HLP/CRIP2 的细胞以及经纯化 HLP/CRIP2 或其片段可用于本发明的筛检方法中。作为非限制性实例,HLP/CRIP2 的天然、重组、人类、鼠科 (SEQ ID NO :25) 和其它变异体和同系物和其片段(诸如(但不限于)经纯化或在细胞表面表达的 HLP/CRIP2 的 CRPPR (SEQ ID NO :1) 或 CGRKSKTVC (SEQ ID NO :2) 结合片段)可用于本发明的筛检方法中。可根据本发明方法筛检的文库包括(但不限于)肽和肽模拟物文库、小分子文库和抗体和其抗原结合片段文库(包括合成单链或其它抗体文库)。在一实施例中,本发明方法包括另一在静脉内注射后检定一种或一种以上所分离的文库分子的定位的步骤。当使用 HLP/CRIP2 的片段替代全长 HLP/CRIP2 时,应了解所述片段可为(但不限于)特异性结合 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 的片段。

[0135] 多种 HLP/CRIP2 多肽中的任一种都可用于本发明方法中以分离选择性锚定到心脏脉管系统的分子。如本文所用,术语“HLP/CRIP2”意味在心脏脉管系统中选择性表达并与 SEQ ID NO :25 具有至少 60% 氨基酸一致性的多肽。在特定实施例中,HLP/CRIP2 与 SEQ ID NO :25 具有至少 70%、80%、90%、95% 或 95% 以上的氨基酸一致性。

[0136] 本发明进一步提供分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统的锚定分子的方法,其是通过下列步骤实现的:使受体克隆 9 或其片段与分子文库在适于使分子与受体克隆 9 特异性结合的条件下接触;检定特异性结合;并从文库中分离一种或一种以上受体克隆 9 结合分子,从而分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合受体克隆 9 的锚定分子。可用在细胞表面表达受体克隆 9 的细胞以及经纯化受体克隆 9 或其片段实施本发明方法。作为非限制性实例,受体克隆 9 (SEQ ID NO :27) 的天然、重组、人类、鼠科 (SEQ ID NO :27) 和其它变异体和同系物和其片段(诸如(但不限于)经纯化或在细胞表面表达的受体克隆 9 的 SEQ ID NO :5 和 SEQ ID NO :6 结合片段)可用于本发明的筛检方法中。可根据本发明方法筛检多种文库中的任一种,其包括(但不限于)上文所述的文

库。

[0137] 如本文所用,术语“受体克隆 9”意谓在心脏脉管系统中选择性表达并与 SEQ ID NO :27 具有至少 60%氨基酸一致性的多肽。在特定实施例中,受体克隆 9 与 SEQ ID NO :27 具有至少 70%、80%、90%、95%或 95%以上的氨基酸一致性。

[0138] 本发明还提供分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统的锚定分子的方法,其是通过下列步骤实现的:使 Sigirr/TIR8 或其片段与分子文库在适于使分子与 Sigirr/TIR8 特异性结合的条件下接触;检定特异性结合;并从文库中分离一种或一种以上 Sigirr/TIR8 结合分子,从而分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 Sigirr/TIR8 的锚定分子。在细胞表面表达 Sigirr/TIR8 的细胞以及经纯化 Sigirr/TIR8 或其片段可用于本发明的筛检方法中。作为非限制性实例, Sigirr/TIR8 的天然、重组、人类、鼠科 (SEQ ID NO :29) 和其它变异体和物种同系物和其片段(诸如(但不限于)经纯化或在细胞表面表达的 SEQ ID NO :7 或 SEQ ID NO :8 结合片段)可用于本发明的筛检方法中。应进一步了解,如上所述,多种文库中的任一种都可用于本发明的筛检方法中。

[0139] 如本文所用,术语“Sigirr/TIR8”意谓在心脏脉管系统中选择性表达并与 SEQ ID NO :29 具有至少 60%氨基酸一致性的多肽。在特定实施例中, Sigirr/TIR8 与 SEQ ID NO :29 具有至少 70%、80%、90%、95%或 95%以上的氨基酸一致性。

[0140] 本文进一步提供分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统的锚定分子的方法,其是通过下列步骤实现的:使 MpcII-3 相关蛋白或其片段与分子文库在适于使分子与 MpcII-3 相关蛋白特异性结合的条件下接触;检定特异性结合;并从文库中分离一种或一种以上 MpcII-3 相关蛋白结合分子,从而分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 MpcII-3 相关蛋白的锚定分子。举例而言,可用在细胞表面表达 MpcII-3 相关蛋白的细胞或经纯化 MpcII-3 相关蛋白或其片段实施本发明的筛检方法。作为非限制性实例, MpcII-3 相关蛋白的天然、重组、人类、鼠科 (SEQ ID NO :33) 和其它变异体和物种同系物以及 SEQ ID NO :33 或人类或其它 MpcII-3 相关蛋白的片段(包括(但不限于)经纯化或在细胞表面表达的 CRSTRANPC (SEQ ID NO :11) 结合片段)可用于本发明的筛检方法中。本发明方法可用于筛检多种文库中的任一种,诸如(但不限于)肽和肽模拟物文库、小分子文库和抗体或其抗原结合片段文库(包括合成单链或其它抗体文库)。

[0141] 如本文所用,术语“MpcII-3 相关蛋白”意谓在心脏脉管系统中选择性表达并与 SEQ ID NO :33 具有至少 60%氨基酸一致性的多肽。在特定实施例中, MpcII-3 相关蛋白与 SEQ ID NO :33 具有至少 70%、80%、90%、95%或 95%以上的氨基酸一致性。

[0142] 本发明进一步提供分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统的锚定分子的方法,其是通过下列步骤实现的:使 bc10 或其片段与分子文库在适于使分子与 bc10 特异性结合的条件下接触;检定特异性结合;并从文库中分离一种或一种以上 bc10 结合分子,从而分离一种或一种以上选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 bc10 的锚定分子。在细胞表面表达 bc10 的细胞以及经纯化 bc10 或 bc10 片段可用于本发明的筛检方法中。作为非限制性实例, bc10 的天然、重组、人类、鼠科 (SEQ ID NO :35) 以及变异体和其它物种同系物和其片段(包括(但不限于)经纯化或在细胞表面表达的 SEQ ID NO :12 结合片段或 SEQ ID NO :13 结合片段)可用于本发明的筛检方法中。本发明方法可用于筛检上述多种文库中的任一种。

[0143] 如本文所用,术语“bc10”意谓在心脏脉管系统中选择性表达并与 SEQ ID NO:35 具有至少 60%氨基酸一致性的多肽。在特定实施例, bc10 与 SEQ ID NO:35 具有至少 70%、80%、90%、95%或 95%以上的氨基酸一致性。

[0144] 本发明进一步提供多种分离肽和肽模拟物,其例如可用于构建本发明的结合物,或者当肽自身具有生物活性时,可以未结合形式用作治疗如上所述的任何心血管疾病或心肌病的治疗剂。例如,如 Ruoslahti, *Nat. Rev. Cancer* 2:83-90 (2002), 和 Laakkonen 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:9381-9386 (2004) 中所述,其它具有生物活性的锚定肽在所属领域中是已知的。作为一实例,本发明提供具有少于 60 个残基的长度且包括氨基酸序列 CRPPR (SEQ ID NO:1) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。在一实施例中,本发明提供具有少于 60 个残基的长度且包括氨基酸序列 CRPPR (SEQ ID NO:1) 的分离肽。包括氨基酸序列 CRPPR (SEQ ID NO:1) 的本发明的分离肽或肽模拟物例如可具有少于 40 个残基的长度或少于 20 个残基的长度。

[0145] 本发明进一步提供包括氨基酸序列 GRKSKTV (SEQ ID NO:14) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。在一实施例中,本发明提供包括氨基酸序列 GRKSKTV (SEQ ID NO:14) 的分离肽。例如,本发明的分离肽或肽模拟物可在构形上受限且可包括氨基酸序列 CGRKSKTV (SEQ ID NO:2)。在其它实施例中,包括氨基酸序列 GRKSKTV (SEQ ID NO:14) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物具有少于 100 个残基的长度、少于 60 个残基的长度或少于 20 个残基的长度。在另一实施例中,本发明提供包括氨基酸序列 CXGRKSKTVZC (SEQ ID NO:15) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物,其中 X = 0 到 20 个独立选择的残基且 Z = 0 到 20 个独立选择的残基。

[0146] 本发明另外提供具有少于 150 个残基的长度且包括氨基酸序列 CARPAR (SEQ ID NO:5) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。在一实施例中,本发明提供具有少于 150 个残基的长度且包括氨基酸序列 CARPAR (SEQ ID NO:5) 的分离肽。包括氨基酸序列 CARPAR (SEQ ID NO:5) 的本发明的分离肽和肽模拟物可具有(但不限于)少于 100 个残基、少于 60 个残基或少于 20 个残基的长度。

[0147] 本文还提供具有少于 50 个残基的长度且包括氨基酸序列 CPKRPR (SEQ ID NO:6) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。在一实施例中,本发明提供具有少于 50 个残基的长度且包括氨基酸序列 CPKRPR (SEQ ID NO:6) 的分离肽。包括氨基酸序列 SEQ ID NO:6 的本发明的分离肽和肽模拟物可具有多种长度,其包括(但不限于)少于 40 个残基的长度或少于 20 个残基的长度。

[0148] 本发明另外提供具有少于 400 个残基的长度且包括氨基酸序列 CKRAVR (SEQ ID NO:7) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。在一实施例中,本发明提供具有少于 400 个残基的长度且包括氨基酸序列 CKRAVR (SEQ ID NO:7) 的分离肽。包括氨基酸序列 CKRAVR (SEQ ID NO:7) 的本发明的肽或肽模拟物可具有(但不限于)少于 100 个残基的长度、少于 60 个残基的长度或少于 20 个残基的长度。

[0149] 本发明进一步提供包括氨基酸序列 RNSWKPN (SEQ ID NO:16) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。在一实施例中,本发明提供包括氨基酸序列 RNSWKPN (SEQ ID NO:16) 的分离肽。作为非限制性实例,本发明的分离肽或肽模拟物可在构形上受限且可具有少于 100 个残基的长度、少于 60 个残基的长度或少于 20 个残基的长度。在一实施例中,本发明提供

包括氨基酸序列 CXRNSWKPNZC (SEQ ID NO :17) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物, 其中 $X = 0$ 到 20 个独立选择的残基且 $Z = 0$ 到 20 个独立选择的残基。

[0150] 本文进一步提供包括氨基酸序列 RGSSS (SEQ ID NO :9) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。在一实施例中, 本发明提供包括氨基酸序列 RGSSS (SEQ ID NO :9) 的分离肽。在其它实施例中, 含有氨基酸序列 SEQ ID NO :9 的本发明的分离肽或肽模拟物具有少于 100 个残基的长度、少于 60 个残基的长度或少于 20 个残基的长度。

[0151] 本发明还提供具有少于 400 个残基的长度且包括氨基酸序列 RSTRANP (SEQ ID NO :18) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。举例而言, 本发明提供具有少于 400 个残基的长度且包括氨基酸序列 RSTRANP (SEQ ID NO :18) 的分离肽。作为非限制性实例, 本发明的分离肽或肽模拟物可在构形上受限。作为另一非限制性实例, 本发明的分离肽或肽模拟物可包括氨基酸序列 CRSTRANPC (SEQ ID NO :11)。本发明的分离肽或肽模拟物进一步可具有多种长度中的任一种。作为非限制性实例, 本发明的分离肽或肽模拟物可具有少于 100 个残基、少于 60 个残基或少于 20 个残基的长度。在一实施例中, 本发明的分离肽或肽模拟物包括氨基酸序列 CXRSTRANPZC (SEQ ID NO :19) 或其肽模拟物, 其中 $X = 0$ 到 20 个独立选择的残基且 $Z = 0$ 到 20 个独立选择的残基。

[0152] 本发明另外提供具有少于 400 个残基的长度且包括氨基酸序列 PKTRRVP (SEQ ID NO :20) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。在一实施例中, 本发明提供具有少于 400 个残基的长度且包括氨基酸序列 PKTRRVP (SEQ ID NO :20) 的肽。本发明的分离肽或肽模拟物例如可在构形上受限且可包括氨基酸序列 CPKTRRVPC (SEQ ID NO :12)。在特定实施例中, 含有氨基酸序列 SEQ ID NO :20 的本发明的分离肽或肽模拟物具有少于 100 个残基、少于 60 个残基或少于 20 个残基的长度。在另一实施例中, 分离肽或肽模拟物包括氨基酸序列 CXPKTRRVPC (SEQ ID NO :21) 或其肽模拟物, 其中 $X = 0$ 到 20 个独立选择的残基且 $Z = 0$ 到 20 个独立选择的残基。

[0153] 本文进一步提供具有少于 400 个残基的长度且包括氨基酸序列 SGMARTK (SEQ ID NO :22) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物。在一实施例中, 本发明提供具有少于 400 个残基的长度且包括氨基酸序列 SGMARTK (SEQ ID NO :22) 的肽。在另一实施例中, 本发明的分离肽或肽模拟物在构形上受限。在另一实施例中, 本发明的分离肽或肽模拟物包括氨基酸序列 CSGMARTKC (SEQ ID NO :13)。本发明的分离肽或肽模拟物进一步可具有多种长度中的任一种。作为非限制性实例, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO :22 的本发明的分离肽或肽模拟物可具有少于 100 个残基、60 个残基或 20 个残基的长度。在一实施例中, 本发明提供包括氨基酸序列 CXSGMARTKZC (SEQ ID NO :23) 或其肽模拟物的分离肽或肽模拟物, 其中 $X = 0$ 到 20 个独立选择的残基且 $Z = 0$ 到 20 个独立选择的残基。

[0154] 本发明的肽和肽模拟物是以经分离形式提供的。如本文关于本发明的肽或肽模拟物所用, 术语“分离的”意谓肽或肽模拟物是呈相对不含通常在细胞中与肽或肽模拟物相关或在文库或粗制剂中与肽或肽模拟物相关的物质 (诸如污染性多肽、脂质、核酸和其它细胞物质) 的形式。

[0155] 因此, 本发明提供包括如下文公开的构形上受限、双功能和多价肽和肽模拟物的肽和肽模拟物。如本文所用, 术语“肽”广义上用于意谓肽、蛋白、蛋白片段等。如本文所用的术语“肽模拟物”意谓具有作为结构基础的肽的活性的肽样分子。所述肽模

拟物包括经化学修饰的肽、含有非天然存在的氨基酸的肽样分子和类肽,且具有活性,诸如获得肽模拟物的肽的选择性锚定活性(例如参看 Goodman 和 Ro, Peptidomimetics for DrugDesign, "Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery" 第1卷 (M.E. Wolff 编辑; John Wiley & Sons 1995), 第 803-861 页)。

[0156] 多种肽模拟物在所属领域中是已知的且涵盖于本发明内,所述肽模拟物例如包括含有受限氨基酸、模拟肽二级结构的非肽组份或酰胺键等排体 (amide bond isostere) 的肽样分子。例如,含有受限的非天然存在的氨基酸的肽模拟物包括 α -甲基化氨基酸; α , α -二烷基甘氨酸或 α -氨基环烷烃羧酸; $N\alpha$ -C α 环化氨基酸; $N\alpha$ -甲基化氨基酸; β -或 γ -氨基环烷烃羧酸; α , β -不饱和氨基酸; β , β -二甲基或 β -甲基氨基酸; β -经取代-2,3-亚甲基氨基酸; N -C $^{\delta}$ 或 C $^{\alpha}$ -C $^{\delta}$ 环化氨基酸;经取代脯氨酸或另一氨基酸模拟物。例如,模拟肽二级结构的肽模拟物可含有非肽 β 转角模拟物、 γ 转角模拟物、 β 折叠结构的模拟物或螺旋结构的模拟物,其各自在所属领域中众所周知。肽模拟物也可为例如含有酰胺键等排体的肽样分子,所述酰胺键等排体例如逆反式修饰 (retro-inverso modification);经还原的酰胺键;亚甲基硫醚或亚甲基亚砷 (methylene-sulfoxide) 键;亚甲基醚键;亚乙基键;硫代酰胺键;反式烯烃或氟代烯烃键;经 1,5-二取代的四唑环;亚甲基酮 (ketomethylene) 或氟代亚甲基酮键或另一酰胺等排体。所属领域技术人员应了解这些和其它肽模拟物都涵盖于如本文所用的术语“肽模拟物”的含义中。

[0157] 鉴别肽模拟物的方法在所属领域中众所周知且(例如)包括筛选含有潜在肽模拟物文库的数据库。举例而言,剑桥结构数据库 (Cambridge Structural Database) 含有超过 300,000 种具有已知晶体结构的化合物的集合 (Allen 等人, Acta Crystallogr. 章节 B, 35:2331 (1979))。由于新的晶体结构得到确定,所以这一结构存放库不断更新,且可在其中筛选具有合适形状(例如与本发明的肽相同的形状)以及与同源受体的潜在几何和化学互补性的化合物。当无法获得本发明的肽的晶体结构时,可使用例如程序 CONCORD 产生结构 (Rusinko 等人, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 29:251 (1989))。另一种数据库化学品目录数据库 (Available Chemicals Directory) (Molecular Design Limited, Information Systems; San Leandro CA) 含有约 100,000 种市面有售的化合物,且也可进行搜寻以鉴别本发明的肽的潜在肽模拟物,例如在选择性锚定到心脏脉管系统中具有活性的肽模拟物。

[0158] 包括下文所述的构形上受限、双功能和多价肽和肽模拟物的本发明的肽和肽模拟物可具有多种长度。例如,本发明的肽或肽模拟物可具有少于 6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70 或 80 个残基的相对短的长度。本发明的肽或肽模拟物也可用于如下文进一步描述的显著较长的序列的情形中。如本文所用,术语“残基”是指氨基酸或其类似物。应了解,例如含有氨基酸序列 SEQ ID NO:1 的肽包括并未由其它氨基酸分隔的连续序列形式的指定氨基酸。

[0159] 本发明的分离肽或肽模拟物可为(但不限于)环状或在构形上受限。如本文关于分子所用,术语“在构形上受限”意谓三维结构随时间实质上维持成一种空间排列的分子,诸如肽或肽模拟物。构形上受限的分子可具有改进的特性,诸如增加的亲和力、代谢稳定性、膜渗透性或可溶性。构形限制方法在所属领域中众所周知且包括(但不限于)环化。

[0160] 如本文关于肽或肽模拟物所用,术语环状是指在两个非邻近氨基酸或氨基酸类似

物之间包括分子内键的结构。可经由共价或非共价键实现环化。分子内键包括（但不限于）主链与主链、侧链与主链和侧链与侧链的键。环化方法包括（但不限于）在非邻近氨基酸或氨基酸类似物的侧链之间形成二硫键；形成内酰胺键，例如在一个氨基酸或其类似物的侧链基团与氨基端残基的 N 端胺之间；和形成赖氨酸正亮氨酸键和二酪氨酸键。

[0161] 本发明也提供含有作为（例如）CRPPR(SEQ ID NO:1)、CGRKSKTVC(SEQ ID NO:2)、CARPAR(SEQ ID NO:5)、CPKRPR(SEQ ID NO:6)、CKRAVR(SEQ ID NO:7)、CRNSWKPN(SEQ ID NO:8)、RGSSS(SEQ ID NO:9)、CRSTRANPC(SEQ ID NO:11)、CPKTRRVPC(SEQ ID NO:12) 或 CSGMARTKC(SEQ ID NO:13) 序列的保守变异体的氨基酸序列的分离肽或肽模拟物。在特定实施例中，本发明提供含有作为 SEQ ID NO:1、2、5、6、7、8、9、11、12 或 13 的保守变异体（其中准确来说只有一个氨基酸经保守取代）的氨基酸序列的分离肽或肽模拟物。在其它实施例中，本发明提供含有作为 SEQ ID NO:1、2、5、6、7、8、9、11、12 或 13 的保守变异体（其中准确来说有两个氨基酸经保守取代）的氨基酸序列的分离肽或肽模拟物。在其它实施例中，本发明提供含有作为 SEQ ID NO:1、2、5、6、7、8、9、11、12 或 13 的保守变异体（其中准确来说有三、四或五个氨基酸经保守取代）的氨基酸序列的分离肽或肽模拟物。

[0162] 如本文所用，“保守变异体”为第一氨基酸经具有至少一种类似生化特性的第二氨基酸或氨基酸类似物替换的氨基酸序列，所述类似生化特性例如可为类似大小、变化、疏水性或氢键合能力。举例而言，第一疏水性氨基酸可经诸如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸或其类似物的第二（不相同）疏水性氨基酸保守取代。类似地，第一碱性氨基酸可经诸如精氨酸或赖氨酸或其类似物的第二碱性氨基酸保守取代。同样地，第一酸性氨基酸可经诸如天冬氨酸或谷氨酸或其类似物的第二酸性氨基酸保守取代，或者诸如苯丙氨酸的芳香族氨基酸可经诸如酪氨酸的第二芳香族氨基酸或氨基酸类似物保守取代。

[0163] 如本文所公开，选择性锚定到心脏脉管系统的肽或肽模拟物可在显著较长的序列的情形下保持锚定活性。举例而言，5-mer CRPPR(SEQ ID NO:1) 在与噬菌体外壳蛋白融合时保持锚定能力，从而证实本发明的肽在埋入较大蛋白序列后可具有选择性锚定活性。因此，本发明提供含有与异源蛋白融合的本发明的肽或肽模拟物的嵌合蛋白。在某些实施例中，本发明提供含有与异源蛋白融合的选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2、受体克隆 9、Sigirr/TIR8、MpcII-3 相关蛋白或 bc10 的锚定肽或肽模拟物的嵌合蛋白。适用于本发明中的异源蛋白包括（但不限于）具有作为抗体或其抗原结合片段的治疗活性的异源蛋白。在其它实施例中，本发明提供其中含有氨基酸序列 SEQ ID NO:1、2、5、6、7、8、9、11、12 或 13 的肽或肽模拟物或这些序列中之一序列的保守变异体或肽模拟物与异源蛋白融合的嵌合蛋白。如本文关于与本发明的肽或肽模拟物融合的蛋白所用的术语“异源”意谓来源于除编码融合肽的基因或获得融合肽模拟物的来源以外的来源的蛋白。本发明的嵌合蛋白可具有多种长度，其包括（但不限于）至多 100、200、300、400、500、800、1000 或 2000 个残基。

[0164] 本文进一步提供双功能肽，其含有与具有独立功能的第二肽融合的选择性锚定到心脏脉管系统且特异性结合 HLP/CRIP2(SEQ ID NO:25)、受体克隆 9(SEQ ID NO:27)、Sigirr/TIR8(SEQ ID NO:29)、MpcII-3 相关蛋白(SEQ ID NO:33) 或 bc10(SEQ ID NO:35) 的锚定肽。所述双功能肽具有由不同的肽成分所赋予的至少两种功能，且例如可展示除选择性锚定活性之外的促细胞凋亡活性。

[0165] 本发明进一步提供包括至少两个各自独立结合 HLP/CRIP2 (SEQ ID NO :25) 的基序的分离多价肽或肽模拟物。例如,所述多价肽或肽模拟物可具有至少两个各自独立含有氨基酸序列 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 或其保守变异体或肽模拟物的基序。例如,多价肽或肽模拟物可具有所述基序中的至少三个、至少五个或至少十个,其各自独立含有氨基酸序列 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 或其保守变异体或肽模拟物。在特定实施例中,多价肽或肽模拟物具有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 或 20 个氨基酸序列 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 或其保守变异体或肽模拟物的相同或不不同的基序。在另一实施例中,多价肽或肽模拟物含有相同的基序,其是由氨基酸序列 SEQ ID NO :1 或所述序列的保守变异体或肽模拟物组成。在另一实施例中,多价肽或肽模拟物含有相同的基序,其是由氨基酸序列 SEQ ID NO :2 或所述序列的保守变异体或肽模拟物组成。在其它实施例中,多价肽或肽模拟物含有连续的 HLP/CRIP2 结合基序,其可相同或不不同。

[0166] 本文也提供包括至少两个各自独立结合受体克隆 9 (SEQ ID NO :27) 的基序的分离多价肽或肽模拟物。例如,本发明的多价肽或肽模拟物可具有至少两个各自独立含有氨基酸序列 SEQ ID NO :5 或 6 或所述序列的保守变异体或肽模拟物的基序。应了解,本发明的多价肽或肽模拟物 (例如) 可包括所述基序中的至少三个、至少五个或至少十个,其各自独立含有氨基酸序列 SEQ ID NO :5 或 6 或其保守变异体或肽模拟物。在特定实施例中,多价肽或肽模拟物具有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 或 20 个氨基酸序列 SEQ ID NO :5 或 6 或其保守变异体或肽模拟物的相同或不不同的基序。例如,本发明的多价肽或肽模拟物可包括相同基序,其是由氨基酸序列 SEQ ID NO :5 或 6 或所述序列的保守变异体或肽模拟物组成。在其它实施例中,多价肽或肽模拟物含有连续的受体克隆 9 (SEQ ID NO :27) 结合基序,其相同或不不同。

[0167] 本发明进一步提供包括至少两个各自独立结合 Sigirr/TIR8 (SEQ ID NO :29) 的基序的分离多价肽或肽模拟物。例如,本发明的多价肽或肽模拟物可具有至少两个各自独立含有氨基酸序列 SEQ ID NO :7、8 或 9 或所述序列的保守变异体或肽模拟物的基序。应了解,本发明的多价肽或肽模拟物 (例如) 可包括所述基序中的至少三个、至少五个或至少十个,其各自独立含有氨基酸序列 SEQ ID NO :7、8 或 9 或其保守变异体或肽模拟物。在特定实施例中,多价肽或肽模拟物具有 2、3、4、7、8、7、8、9、10、15 或 20 个氨基酸序列 SEQ ID NO :7、8 或 9 或其保守变异体或肽模拟物的相同或不不同的基序。例如,本发明的多价肽或肽模拟物可包括相同基序,其是由氨基酸序列 SEQ ID NO :7、8 或 9 或所述序列的保守变异体或肽模拟物组成。在其它实施例中,多价肽或肽模拟物含有连续的 Sigirr/TIR8 (SEQ ID NO :29) 结合基序,其相同或不不同。

[0168] 本文进一步提供包括至少两个各自独立结合 SEQ ID NO :33 的基序的分离多价肽或肽模拟物。例如,本发明的多价肽或肽模拟物可具有至少两个各自独立含有氨基酸序列 CRSTRANPC (SEQ ID NO :11) 或所述序列的保守变异体或肽模拟物的基序。作为非限制性实例,本发明的多价肽或肽模拟物可包括所述基序中的至少三个、至少五个或至少十个,其各自独立含有氨基酸序列 CRSTRANPC (SEQ ID NO :11) 或其保守变异体或肽模拟物。作为其它非限制性实例,多价肽或肽模拟物可具有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 或 20 个氨基酸序列 CRSTRANPC (SEQ ID NO :11) 或其保守变异体或肽模拟物的相同或不不同的基序。本发明的多价肽或肽模拟物例如也可包括相同基序,其是由氨基酸序列 SEQ ID NO :11 或所述序列

的保守变异体或肽模拟物组成。应了解,多价肽或肽模拟物可包括连续或不连续的 SEQ ID NO:33 结合基序,其可相同或不相同。

[0169] 本发明也提供包括至少两个各自独立结合 bc10 (SEQ ID NO:35) 的基序的分离多价肽或肽模拟物。SEQ ID NO:35 结合基序可连续或不连续,且进一步可相同或不相同。例如,本发明的多价肽或肽模拟物可具有至少两个各自独立含有氨基酸序列 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:13 或所述序列的保守变异体或肽模拟物的基序。作为非限制性实例,本发明的多价肽或肽模拟物可包括所述基序中的至少三个、至少五个或至少十个,其各自独立含有氨基酸序列 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:13 或其保守变异体或肽模拟物。作为其它非限制性实例,多价肽或肽模拟物可具有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 或 20 个氨基酸序列 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:13 或其保守变异体或肽模拟物的相同或不相同的基序。在一实施例中,本发明提供包括相同基序的本发明的多价肽或肽模拟物,所述基序是由氨基酸序列 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:13 的保守变异体或肽模拟物组成。

[0170] 以下实例旨在说明而非限制本发明。

[0171] 实例 I

[0172] 鉴别选择性锚定到心脏脉管系统的肽和锚定肽的同源受体

[0173] 本实例描述使用活体外和活体内噬菌体选择以鉴别选择性锚定到心脏脉管系统的肽,同时结合细菌双杂交检定以鉴别锚定肽的同源受体。

[0174] 使用抗 CD31 磁珠对从鼠科心脏组织获得的细胞悬浮液进行心脏内皮细胞的富集度的活体外噬菌体选择以分离血管内皮细胞。在三轮活体外选择后,与非重组噬菌体相比观察到与心脏细胞的活体外结合的 230 倍强化 (图 1B)。随后用于锚定到心脏的活体内选择得到相对于非重组噬菌体的锚定以近 200 倍的增加在活体内锚定到心脏的噬菌体集合。此外,经活体外 / 活体内选择的噬菌体与其它组织相比优先定位到心脏中。如图 1C 所示,与大脑、肾、皮肤和骨骼肌中的噬菌体积累相比,心脏中的富集为 20 到 50 倍。

[0175] 如下进行对心脏锚定肽的假定受体的分离。通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增心脏锚定噬菌体的编码肽的 DNA 插入物,将其插入细菌双杂交系统的“诱饵载体”中,并与编码心脏 cDNA 文库的靶载体共转染到细菌中。高严格度筛检揭示了表明频率与阳性对照相当的诱饵-目标相互作用的菌落,而在不存在两种载体中任一种的情况下未观察到菌落生长 (图 1D)。此外,用于系统泄漏性的控制在 100 个菌落中去除 75 个可能是假阳性的菌落 (图 1E)。

[0176] 使用 NCBI 非冗余数据库分析来自 25 个剩余候选受体 cDNA 的同框序列。在所述 25 个克隆中,19 个是在心肌中大量表达的蛋白,诸如肌球蛋白、肌红蛋白、铁蛋白和酮戊二酸脱氢酶。代表表 1 中所总结的膜或细胞表面蛋白的剩余 6 个克隆是心脏锚定分子的假定受体。这些结果表明结合活体外 / 活体内噬菌体展示技术与细菌双杂交分析可快速鉴别心脏锚定肽和其同源受体。

[0177] 如下进行活体外和活体内噬菌体选择。如 Laakkonen 等人, *Nat. Med.* 8: 751-755 (2002) 中所述产生在 T7Select415-1 噬菌体 (Novagen; San Diego, CA) 上展示的由 NNK 编码的 CX₇C 文库。如 Clarkson 和 Lowman (编辑) *Phage Display: A Practical Approach* Oxford, U.K.: Oxford University Press (2004) 中的 Hoffman 等人, “In vivo and ex vivo selections using phage-displayed libraries” 所述进行噬菌体选择和确认。在对心脏

细胞进行三轮活体外选择后,在活体内进行三轮选择。为进行活体外选择,使用 1mg/ml 的胶原酶 IA (Sigma ;St. Louis, MO) 分散组织,从而自鼠科心脏组织制备细胞悬浮液。在 4℃ 下将细胞悬浮液与 5×10^{10} 个空斑形成单位 (pfu) 的 CX₇C 文库一起培育过夜并随后洗涤以移除未结合的噬菌体。根据制造商说明书,使用磁珠 (M450 ;Dynal ;Oslo, Norway) 和抗小鼠 CD31 (PharMingen ;San Diego, California) 分离血管内皮细胞。如 Hoffman 等人,上文,2004 所述,救援与 CD31 阳性细胞群体结合的噬菌体并使其在大肠杆菌中扩增。

[0178] 如下进行活体内淘选。将经活体外选择的噬菌体集合 (5×10^9 p. f. u.) 静脉内注入小鼠尾部静脉,并使其循环 10 分钟,然后用 DMEM 通过左心室小心地灌注小鼠以移除未结合的血管内噬菌体。切除心脏和对照组织 (大脑、肾、皮肤和肌肉),并如 Hoffman 等人,上文,2004 所述回收噬菌体。将从心脏回收的噬菌体再注入小鼠,并重复所述循环总共三次。将非重组噬菌体注入单独小鼠以在各实验中作为对照。

[0179] 为进行细菌双杂交实验,通过使用引物 5' -TCAGGTGTGATGCTCGG-3' (SEQ ID NO : 36 ;正向引物) 和 5' -GAGTAACTAGTTAACC-3' (SEQ ID NO :31 ;反向引物) 对来自心脏锚定噬菌体的编码肽的 DNA 插入物进行 PCR 扩增来构建诱饵质粒文库。用 EcoRI 和 XhoI 消化 PCR 产物,并将其亚克隆到诱饵 pBT 质粒 (Stratagene ;La Jolla, CA) 中以产生被称为“pBT-hp”的诱饵的重组文库。将 pBT-hp 质粒转化到 XL1-Blue MRF' Kan 感受态细胞中,并在 100mm LB- 氯霉素平板上涂布 2μ l 或 5μ l 细胞以确定主要转化体的总数量。集中剩余转化体并将其涂布在 150mm LB- 氯霉素平板上。对 20 个克隆进行测序,发现其具有适当的编码肽的插入物。然后刮削平板,并采集细菌。在涂布 2μ l 和 5μ l 所采集的文库以确定经扩增文库的大小之后,使用市面有售的 maxiprep DNA 柱从经集中的细菌中纯化 pBT-hp 质粒集合。根据制造商说明书 (Stratagene ;La Jolla, CA),使用经纯化 DNA 以转化 BacterioMatch®双杂交系统报告菌株感受态细胞。

[0180] 将 2μ l 含有小鼠心脏质粒 cDNA 文库 (Stratagene ;#982303) 的细胞稀释到 25ml SOC 培养基中,然后将细胞涂覆在 25 个 25cm×25cm LB- 四环素平板上,由此平板纯化心脏 cDNA 文库质粒。将平板在 30℃ 下培育 24 小时,然后采集大约 5×10^6 个单独克隆并随后进行质粒纯化。

[0181] 根据制造商说明书,用 BacterioMatch®双杂交系统 (Stratagene) 进行细菌双杂交实验。简言之,使用 50ng 各种质粒共转染 pBT-hp 和心脏 cDNA 文库质粒。将共转染体的等分试样 (100μ l) 涂布在选择性 LB 平板上 (500μ g/ml 羧苄青霉素 (carbenicillin)) 并在 37℃ 下培育 20 小时,然后对平板的生长进行计分。如对于阳性对照 Gal4 和 Gal11P 杂交蛋白所观察到的,在选择性平板上的生长表明在一对杂交蛋白之间存在相互作用。随后,用来自羧苄青霉素平板的个别阳性菌落在 X-gal 平板上划线以进行二级筛选。在将细胞培育 12 到 14 小时后,选择显示 X-gal 平板呈深蓝色的细胞,并且所述细胞能够于 30℃ 下在 LB- 氯霉素或 LB- 四环素 (目标和诱饵质粒的标记) 的存在下生长过夜。纯化质粒 DNA,并用假定诱饵和靶质粒再转化报告菌株。在选择性平板上可再现地生长的克隆被确定为阳性。通过 PCR 扩增诱饵和靶插入物,随后进行序列分析。使用来自靶载体的序列作为非冗余小鼠基因组的 BLASTN 搜寻中的查询序列。

[0182] 实例 II

[0183] 受体 - 肽对和肽心脏锚定活性

[0184] 本实例描述通过用展示心脏锚定活性的肽集合进行细菌双杂交分析而被鉴别为心脏锚定肽的假定受体的由膜或细胞表面表达的蛋白。

[0185] 受体克隆 5

[0186] 如表 1 所总结,受体克隆 5 代表心脏 LIM- 蛋白 (HLP) 的羧基端 92 个氨基酸,其也被称为富半胱氨酸蛋白 2 (CRIP2) 和 ESP1。在血管心脏中表达 (Yu 等人, *Mech. Dev.* 116 : 187-192 (2002)) 的 HLP 是与 Crp-1 具有同源性的含 LIM 结构域的蛋白 (Karim 等人, *Genomics* 31 : 167-176 (1996) ; 和 van Ham 等人, *Genes Cells* 8 : 631-644 (2003))。在来自用 HLP 克隆进行的双杂交分析的 5 个阳性菌落中,鉴别三种同源肽 : CRPPR (SEQ ID NO : 1) 存在两次, CGRKSKTVC (SEQ ID NO : 2) 存在一次且 CGNQVDSRC (SEQ ID NO : 3) 存在两次。在将这些肽克隆到 T7Select415-1 展示载体中之后,检定其在静脉内注射后锚定到心脏脉管系统的能力。相对于非重组噬菌体,展示 CRPPR (SEQ ID NO : 1) 的噬菌体以超过 300 倍的选择性锚定到心脏 (图 2A)。如表 1 所总结, CGRKSKTVC (SEQ ID NO : 2) 噬菌体在心脏锚定中展示约 50 倍的选择性,而对于展示 CGNQVDSRC (SEQ ID NO : 3) 的噬菌体未观察到显著的选择性锚定。

[0187] 受体克隆 9

[0188] 受体克隆 9 也被鉴别为与一种或一种以上心脏锚定肽结合的膜蛋白。如表 1 所示,受体克隆 9 是未注解的 RIKEN EST。在通过用受体克隆 9 进行的双杂交分析鉴别的 5 个群落中,鉴别到三种肽,即 CPSELLLP (SEQ ID NO : 4)、CARPAR (SEQ ID NO : 5) 和 CPKRPR (SEQ ID NO : 6)。后两种肽展现对心脏的选择性锚定,但第一种却没有 (表 1 和图 2B)。

[0189] 受体克隆 154

[0190] 受体克隆 15 是被称为 Sigirr 或 TIR8 的单一 Ig IL-1 受体相关蛋白 (Thomassen 等人, *Cytokine* 11 : 389-399 (1999))。克隆 15 所代表的蛋白部分含有 Sigirr 的跨膜结构域以及约 190 个氨基酸的氨基端胞外部分。已知 Sigirr 在肾、肺、肠和其它组织的上皮中表达 (Thomassen 等人, 上文, 1999 ; 和 Polentarutti 等人, *Eur. Cytokine Netw.* 14 : 211-218 (2003)), 尽管尚未报导心脏或内皮细胞表达。如表 1 所总结,三种肽通过双杂交分析被鉴别为结合 Sigirr。这些肽 CKRAVR (SEQ ID NO : 7)、CRNSWKPNC (SEQ ID NO : 8) 和 RGSSS (SEQ ID NO : 9) 展示 20 到 30 倍的心脏锚定选择性 (参看表 1 和图 2C)。

[0191] 受体克隆 27

[0192] 受体克隆 27 为假定蛋白,其被注解为含有经确定来自嗅觉 cDNA 文库的蛋白的富谷氨酰胺区域。所有经分析的五种诱饵克隆都编码相同的肽 CLIDLHVMC (SEQ ID NO : 10), 其不展示与心脏的特异性锚定 (表 1 和图 2D)。

[0193] 受体克隆 36

[0194] 受体克隆 36 含有来自 RIKEN Fantom 套组的未命名蛋白产物的完整编码序列。这种受体经假定与内在膜蛋白 CII-3 (MpcII-3) 类似, MpcII-3 是作为琥珀酸脱氢酶复合体的部分的线粒体膜蛋白。通过与克隆 36 的结合活性鉴别的 5 种经测序群落中的每一种都编码相同的肽 CRSTRANPC (SEQ ID NO : 5), 其展示约 20 倍的心脏锚定选择性 (表 1 和图 2E)。

[0195] 受体克隆 46

[0196] 受体克隆 46 是人类膀胱癌相关蛋白 10 的小鼠同系物 (bc10) 的一部分, bc10 是随着从膀胱中的前恶性病变发展癌症而下调的小膜蛋白。作为受体克隆 46 分离的片段含

有 bc10 的预测胞外结构域的羧基端 32 个氨基酸。双杂交分析确定两种结合受体克隆 46 的肽:CPKTRRVPC(SEQ ID NO:12) 和 CSGMARTKC(SEQ ID NO:13),其分别展示约 60 倍和 10 倍的心脏锚定选择性(表 1 和图 2F)。

[0197] 总而言之,这些结果表明结合活体内淘选的细菌双杂交分析可用于鉴别器官锚定肽和其同源受体。

[0198] 如下重建个别噬菌体克隆。合成编码来自所选诱饵质粒的肽的寡核苷酸,在 37°C 下用 T4 多核苷酸激酶(PNK;NEB)磷酸化 1 小时,并在 0.08pmol/ μ l 的浓度下退火。将经退火的插入物稀释到 0.04pmol/ μ l 并在 16°C 下用 T4 连接酶连接到 T7Select415-1 侧臂(Novagen)中过夜。次日,通过如制造商所述将连接反应物与包装提取物混合来制备完整的重组噬菌体。通过测序确认插入物,并扩增个别克隆以用于如上文实例 I 所述的活体外和活体内测试。

[0199] 实例 III

[0200] 噬菌体展示的心脏锚定肽定位到心脏脉管系统中

[0201] 本实例证明选择性锚定到心脏脉管系统的所公开肽特异性结合由心脏脉管系统活体内表达的受体。

[0202] A. 噬菌体展示的心脏锚定肽与血管标记协同定位

[0203] 对如表 1 所总结的选择性倍数所表明的 5 种最有效的锚定肽和其假定受体进行进一步表征。分析这些锚定肽在活体内选择性结合心脏内皮的能力和与其假定受体的特异性结合,还分析所述假定受体在心脏内皮中的表达。将展示特定锚定肽的噬菌体中的每一种都单独静脉内注入具有荧光素结合番茄凝集素以作为血管标记的小鼠中。噬菌体与抗 T7 抗体的定位表明展示肽 CRPPR(SEQ ID NO:1)、CARPAR(SEQ ID NO:5)、CKRAVR(SEQ ID NO:7)、CRSTRANPC(SEQ ID NO:11) 或 CPKTRRVPC(SEQ ID NO:12) 的噬菌体存在于心脏内皮中(图 3A 到 C、E 和 F)。展示 CLIDLHVMC(SEQ ID NO:10) 的噬菌体是用作阴性对照(图 3D),且通过噬菌体免疫染色发现其也不存在于心脏中(图 3D)。在相同条件下在除心脏以外的组织中未检测到 6 个噬菌体中的任一个。

[0204] 这些结果证实展示肽 CRPPR(SEQ ID NO:1)、CARPAR(SEQ ID NO:5)、CKRAVR(SEQ ID NO:7)、CRSTRANPC(SEQ ID NO:11) 或 CPKTRRVPC(SEQ ID NO:12) 的噬菌体在活体内定位到心脏脉管系统。

[0205] 如下进行免疫组织化学。从 BD Pharmingen(San Jose,CA) 获得大鼠单克隆抗小鼠 CD31(1:100),并从 GenWay(San Diego,CA) 获得兔多克隆抗 T7 噬菌体(1:500) 和鸡抗小鼠 CRIP2IgY(1:100)。从 Molecular Probes(Eugene,OR) 获得二级抗体 AlexaFluor-488 山羊抗大鼠 IgG(1:1000) 和 AlexaFluor-594 山羊抗大鼠或兔 IgG(1:1000),并从 GenWay 获得二级抗体 GAYFC-AlexaFluor594 山羊抗 IgY Fc(1:250)。将冷冻切片与阻断缓冲液(1×PBS 中的 5% 正常山羊血清和 0.5% BSA) 一起预培育 1 小时,用 PBS 洗涤三次并与所关注的一级抗体在 4°C 下一起培育过夜。在培育过夜后,加入二级抗体并在室温下培育 1 小时。用 PBS 洗涤玻片三次并将其固定在具有 DAPI 的 Vectashield 封片剂(Mounting Medium)中(Vector Laboratories;Burlingame,California)。通过静脉内注射购自 Vector Laboratories 的番茄(Lycopersicon esculentum)凝集素结合荧光素(200 μ l PBS 中的 100 μ g) 另外观察血管。

[0206] B. 与经锚定肽的假定同源受体转染的细胞结合的锚定肽

[0207] 构建四种假定心脏锚定受体 HLP/CRIP2、Sigirr/TIR8、MpcII-3 相关蛋白和 bc10 的全长 cDNA,并在 293T 细胞中表达。如图 4 所示,展示所述四种同源肽中的每一种的噬菌体与经其对应假定受体转染的细胞结合,这比对照噬菌体高出 300 到 500 倍(带点条形图)。另外,噬菌体结合在 100 μ g/ml 的同源肽存在下受到抑制(实心条形图),但不受无关锚定肽抑制(空心条形图)。这些结果证实锚定肽 CRPPR(SEQ ID NO:1) 特异性结合受体 HLP/CRIP2;锚定肽 CKRAVR(SEQ ID NO:7) 特异性结合受体 Sigirr/TIR8;锚定肽 CRSTRANPC(SEQ ID NO:11) 特异性结合 MpcII-3 相关蛋白受体;且锚定肽 CPKTRRVPC(SEQ ID NO:12) 特异性结合受体 bc10。

[0208] 如下进行受体转染和噬菌体结合检定。使用 Fugene 转染试剂(Roche Diagnostics),以编码 HLP/CRIP2、Sigirr/TIR8、MpcII-3 相关蛋白和 bc10 的来源于 pMH6 的质粒(RocheDiagnostics;Indianapolis, IN) 转染 293T 细胞。简言之,将 10 μ g 质粒与 700 μ l 无血清 DMEM 和 30 μ l Fugene 转染试剂混合并在室温下培育 15 分钟,然后将混合物加入细胞中。48 小时后,使用 EDTA 从培养皿分离细胞并用 PBS 洗涤一次。将展示 CRPPR(SEQ ID NO:1)、CKRAVR(SEQ ID NO:7)、CRSTRANPC(SEQ ID NO:11) 或 CPKTRRVPC(SEQ ID NO:12) 的噬菌体和非重组对照噬菌体(1×10^9 p.f.u) 与经转染细胞在 4°C 下一同培育 2 小时。通过用 PBS 中的 1% BSA 洗涤五次来移除未结合的噬菌体。通过加入细菌来救援结合的噬菌体,如上所述由空斑检定来确定结合效率。

[0209] 在固相合成仪中使用 Fmoc 化学在 The Burnham Institute 肽设备上合成用于竞争检定的肽,随后通过 HPLC 纯化并通过质谱分析确定其身份。如 Wender 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:13003-13008 (2000) 中所述,合成荧光素结合肽。通过向细胞和噬菌体中加入 100 μ g 肽来进行竞争检定,随后在 4°C 下培育 2 小时。在用 1% PBS 洗涤五次后,救援结合的噬菌体并通过空斑检定进行量化。

[0210] C. 受体 mRNA 存在于心脏内皮中

[0211] 使用实时 PCR 和原位杂交在组织内研究心脏锚定受体的表达。实时 PCR 分析(图 5A) 展示肽 SEQ ID NO:1 的受体 HLP/CRIP2 在心脏中高度表达并在肺和大脑中以较低程度表达。包括骨骼肌的若干其它组织对 HLP/CRIP2 mRNA 呈阴性。其它心脏锚定受体 Sigirr/TIR8、MpcII-3 相关蛋白和 bc10 也在心脏中最高程度地表达,而在其它组织中以较低程度表达(图 5A)。通过结合熔解曲线和 DNA 序列分析的凝胶电泳(图 5B) 来证实 RT-PCR 分析的特异性。

[0212] 使用原位杂交确认 RT-PCR 分析并确定所关注的受体是否在心脏和其它组织的内皮细胞上表达。如图 5C 第一行所示,在心脏中存在大量 HLP/CRIP2 信号且其展现血管表达图样(图 5C;第一行)。在肺和大脑中也观察到痕量级表达,但在肾中没有观察到表达。虽然原位杂交在肺中检测到 HLP/CRIP2 mRNA 表达,但是在这一组织中仅检测到很少的 CRPPR(SEQ ID NO:1) 噬菌体锚定(参看上文)。

[0213] Sigirr/TIR8 原位杂交分析也证实 RT-PCR 结果。信号在心脏脉管系统中很强(图 5,第二行),在肺和肾中较弱且在大脑中无。MpcII-3 相关蛋白 mRNA 存在于心脏中,主要是在心血管中(图 5,第三行)。MpcII-3 相关蛋白 mRNA 也存在于一些肺血管中,尽管其并不存在于大脑和肾中。如图 5C 最后一行另外所示, bc10 mRNA 存在于心血管中并另外存在

于一些肺、肾和肌肉血管中,但不存在于大脑血管中。总而言之,原位杂交结果很大程度上证实以下 RT-PCR 结果:四种心脏锚定受体都在心脏中最充足地表达。此外,四种心脏锚定受体的 mRNA 定位在心脏内皮上,这与选择性锚定到肺脉管系统的所公开的肽的定位一致。

[0214] 基本上如 St Croix 等人, Science 289:1197-1202 (2000) 所述进行非放射性原位杂交。简言之,使用并入反义引物中的 SP6 启动子和并入正义引物中的 T7 启动子,通过 PCR 扩增来产生经地高辛 (digoxigenin, DIG) 标记的反义 RNA 探针。用 DIG RNA 标记试剂和 T7RNA 聚合酶 (Roche Diagnostics) 进行活体外转录。用 4% 多聚甲醛固定冷冻组织切片,用胃蛋白酶渗透并与 RNA 探针 (200ng/ml) 一起在 55°C 下培育过夜。使用辣根过氧化物酶 (HRP) 兔抗 DIG 抗体 (DAKO; Carpinteria, CA) 来催化使用 GenPoint 试剂盒的生物素-酪胺 (Biotin-Tyramide) 沉积以用于信号扩增 (DAKO)。通过加入辣根过氧化物酶 (HRP) 兔抗生物素 (DAKO)、生物素-酪胺和碱性磷酸酶 (AP) 兔抗生物素 (DAKO) 来实现进一步扩增。在用苏木精复染色的组织切片中,以 AP substrate Fast RedTR/Naphthol AS-MX (Sigma) 检测信号。

[0215] 基本上如 Galang 等人, J. Biol. Chem. 279:11281-11292 (2004) 所述进行实时聚合酶链式反应 (PCR) 检定。简言之,用 RNeasy 试剂盒 (Qiagen; Valencia, CA) 从所关注的器官中提取总 RNA,并使用 Superscript II First-Strand Synthesis System 试剂盒 (Invitrogen; Carlsbad, CA) 从 50ng 总 RNA 制备 cDNA。根据制造商说明书,使用 LightCycler SYBRgreen DNA master mix 进行实时 PCR。为进行相对表达分析,使用控制基因磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的含量使受体表达标准化。将各受体的心脏中 GAPDH 标准化表达定义为 100%,且将其用作比较基础。通过各 PCR 产物的熔解曲线以及琼脂糖凝胶电泳和 DNA 序列分析来确认实时 PCR 的特异性。

[0216] 实例 IV

[0217] 静脉内注射的 CRPPR (SEQ ID NO:1) 肽与 HLP/CRIP2 蛋白在心血管中协同定位

[0218] 本实例展现肽 CRPPR (SEQ ID NO:1) 与其同源受体 HLP/CRIP2 的协同定位。

[0219] 使用抗 HLP/CRIP2 抗体,将心脏中 CRPPR (SEQ ID NO:1) 肽的定位与 HLP/CRIP2 受体的表达相比较。如图 6A 和 6B 所示,来自静脉内注射的 CRPPR (SEQ ID NO:1) 肽的荧光与血管标记 CD31 在心血管和心内膜中广泛地协同定位。此外,在心脏中未检测到经荧光素标记的对照肽 (图 6C)。抗 HLP/CRIP2 染色也与 CD31 和肽 CRPPR (SEQ ID NO:1) 在心血管和心脏心内膜中协同定位 (图 6D 到 6F)。

[0220] 使用竞争检定来检定与心脏脉管系统结合的 CRPPR (SEQ ID NO:1)-噬菌体的特异性。如图 7A 和 7B 所示,CRPPR (SEQ ID NO:1) 肽和抗 HLP/CRIP2 抗体以剂量依赖方式阻断展示 CRPPR (SEQ ID NO:1) 的噬菌体与心脏来源的细胞悬浮液的结合。作为阴性对照,两种其它心脏锚定肽对 CRPPR (SEQ ID NO:1)-噬菌体结合不具有任何作用。此外,共注射的抗 HLP/CRIP2 抗体也抑制 CRPPR (SEQ ID NO:1)-噬菌体的活体内锚定 (图 7C)。总而言之,这些结果证明肽 CRPPR (SEQ ID NO:1) 经由特异性结合到 HLP/CRIP2 上而选择性锚定到心脏脉管系统。

[0221] 上文以括号或以其它方式提供的所有期刊论文、参考文献和专利引证无论先前是否说明都以全文引用的方式并入本文。

[0222] 虽然已经参考上文所提供的实例描述本发明,但是应了解可在不偏离本发明精神

的情况下作出各种修改。因此,本发明仅受以下权利要求书限制。

[0001]

序列表

<110> 伯纳姆研究院

<120> 选择性锚定到心脏脉管系统上的肽和相关结合物和方法

<130> 66821-331

<150> US 10/936,027

<151> 2004-09-07

<160> 36

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构筑体

<400> 1

Cys Arg Pro Pro Arg
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构筑体

<400> 2

Cys Gly Arg Lys Ser Lys Thr Val Cys
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构筑体

[0002]

<400> 3
Cys Gly Asn Gln Val Asp Ser Arg Cys
1 5

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构筑体

<400> 4
Cys Pro Ser Glu Leu Leu Leu Pro
1 5

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构筑体

<400> 5
Cys Ala Arg Pro Ala Arg
1 5

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构筑体

<400> 6
Cys Pro Lys Arg Pro Arg
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构筑体

<400> 7
Cys Lys Arg Ala Val Arg
1 5

<210> 8

[0003]

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构筑体

<400> 8
Cys Arg Asn Ser Trp Lys Pro Asn Cys
1 5

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构筑体

<400> 9
Arg Gly Ser Ser Ser
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构筑体

<400> 10
Cys Leu Ile Asp Leu His Val Met Cys
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构筑体

<400> 11
Cys Arg Ser Thr Arg Ala Asn Pro Cys
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0004]

<223> 合成构筑体

<400> 12

Cys Pro Lys Thr Arg Arg Val Pro Cys
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构筑体

<400> 13

Cys Ser Gly Met Ala Arg Thr Lys Cys
1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构筑体

<400> 14

Gly Arg Lys Ser Lys Thr Val
1 5

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构筑体

<221> VARIANT

<222> 2, 10

<223> Xaa = 0到20个独立选择的残基

<400> 15

Cys Xaa Gly Arg Lys Ser Lys Thr Val Xaa Cys
1 5 10

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构筑体

[0005]

<400> 16
Arg Asn Ser Trp Lys Pro Asn
1 5

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构筑体

<221> VARIANT
<222> 2, 10
<223> Xaa = 0到20个独立选择的残基

<400> 17
Cys Xaa Arg Asn Ser Trp Lys Pro Asn Xaa Cys
1 5 10

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构筑体

<400> 18
Arg Ser Thr Arg Ala Asn Pro
1 5

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构筑体

<221> VARIANT
<222> 2, 10
<223> Xaa = 0到20个独立选择的残基

<400> 19
Cys Xaa Arg Ser Thr Arg Ala Asn Pro Xaa Cys
1 5 10

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

[0006]

<220>
<223> 合成构筑体

<400> 20
Pro Lys Thr Arg Arg Val Pro
1 5

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构筑体

<221> VARIANT
<222> 2,10
<223> Xaa = 1到20个独立选择的残基

<400> 21
Cys Xaa Pro Lys Thr Arg Arg Val Pro Xaa Cys
1 5 10

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构筑体

<400> 22
Ser Gly Met Ala Arg Thr Lys
1 5

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构筑体

<221> VARIANT
<222> 2,10
<223> Xaa = 0到20个独立选择的残基

<400> 23
Cys Xaa Ser Gly Met Ala Arg Thr Lys Xaa Cys
1 5 10

<210> 24

[0007]

<211> 1174

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> CDS

<222> (40)...(666)

<400> 24

```

cggacgcgtg ggtccgcgga ccgaccgagc gcaccgacc atg gcc tcc aag tgt      54
                               Met Ala Ser Lys Cys
                               1           5

```

```

ccc aag tgt gac aag acc gta tac ttc gct gag aag gtg agc tcc ctg      102
Pro Lys Cys Asp Lys Thr Val Tyr Phe Ala Glu Lys Val Ser Ser Leu
                10                15                20

```

```

ggc aag gac tgg cac aag ttc tgt ctc aag tgt gag cgc tgc aac aag      150
Gly Lys Asp Trp His Lys Phe Cys Leu Lys Cys Glu Arg Cys Asn Lys
                25                30                35

```

```

aca ctg acc ccc ggc ggc cat gct gag cat gat ggg aag ccc ttc tgc      198
Thr Leu Thr Pro Gly Gly His Ala Glu His Asp Gly Lys Pro Phe Cys
                40                45                50

```

```

cac aag ccc tgc tat gcc aca ctg ttt gga ccc aaa ggc gtg aac atc      246
His Lys Pro Cys Tyr Ala Thr Leu Phe Gly Pro Lys Gly Val Asn Ile
                55                60                65

```

```

ggg ggc gct ggc tcc tac atc tac gag aag cct cag acc gag gcc cct      294
Gly Gly Ala Gly Ser Tyr Ile Tyr Glu Lys Pro Gln Thr Glu Ala Pro
                70                75                80                85

```

```

cag gtc act ggc ccc atc gag gtc cct gtg gtg aga act gag gag cga      342
Gln Val Thr Gly Pro Ile Glu Val Pro Val Val Arg Thr Glu Glu Arg
                90                95                100

```

```

aag acc agc ggc ccc ccc aag ggt ccc agc aaa gcc tct agt gtc acc      390
Lys Thr Ser Gly Pro Pro Lys Gly Pro Ser Lys Ala Ser Ser Val Thr
                105                110                115

```

```

aca ttc act ggg gag ccc aac atg tgt cct cga tgc aac aag aga gtg      438
Thr Phe Thr Gly Glu Pro Asn Met Cys Pro Arg Cys Asn Lys Arg Val
                120                125                130

```

```

tac ttc gct gag aag gtg acc tct ctg ggc aag gac tgg cac cgg ccc      486
Tyr Phe Ala Glu Lys Val Thr Ser Leu Gly Lys Asp Trp His Arg Pro
                135                140                145

```

```

tgc ctg cgc tgt gag cgc tgc tcc aag acc ctg acc cca ggc ggg cat      534
Cys Leu Arg Cys Glu Arg Cys Ser Lys Thr Leu Thr Pro Gly Gly His
                150                155                160                165

```

[0008]

```

gct gag cac gat ggc cag ccc tac tgc cac aag cct tgc tat gga ata      582
Ala Glu His Asp Gly Gln Pro Tyr Cys His Lys Pro Cys Tyr Gly Ile
                170                      175                      180

ctc ttt gga ccc aaa gga gtg aat act ggt gct gtg ggc agc tat atc      630
Leu Phe Gly Pro Lys Gly Val Asn Thr Gly Ala Val Gly Ser Tyr Ile
                185                      190                      195

tac gac aag gac ccg gaa ggc aca gtt cag ccc tag atctgcagat          676
Tyr Asp Lys Asp Pro Glu Gly Thr Val Gln Pro *
                200                      205

gctgtcctcg ggggtccccct gtttgaccgc gaggcaaagt ggcctgttgc ctagtcctgc      736
ctcagcgtgt ctgcctgca aatccgggac ctaagtgggtg gaggagaaag cctggatagt      796
cccagagctt cagccccctt tgtcaccttg gcgtgtcccg tgcgtccac cgtttacttc      856
ctgtctgtgt gcctccgtag ccccatgggt cctgtgttcc tgtgtccctg atagctctcc      916
aagggtgactg tcctatgata tatccctttg cccacacctg cccaccagta ttatttatgc      976
tctgcttgcc ggtgatggcc gtgagctcac agcattccca ggggtgatggc tgggtgccctt    1036
gcgaggagcc ctctgctggt tccacactac tcctaccta ccctcacatg gttcatggct    1096
atggagactt ttgctgtcaa taaatagttt ggtttgagga ttgcaaaaaa aaaaaaaaaa    1156
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa                                1174

```

<210> 25

<211> 208

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 25

```

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

```

[0009]

195	200	205	
<210> 26			
<211> 1276			
<212> DNA			
<213> 小家鼠			
<220>			
<221> CDS			
<222> (16)...(840)			
<400> 26			
ccagctcaga gcagg atg gcg gcg aca atg tct gaa cct cgg cgt gtg ggc			51
Met Ala Ala Thr Met Ser Glu Pro Arg Arg Val Gly			
1 5 10			
ttc gtg ggt gca ggc cgc atg gcg gag gcc att gcc cga ggc ctc atc			99
Phe Val Gly Ala Gly Arg Met Ala Glu Ala Ile Ala Arg Gly Leu Ile			
15 20 25			
caa gca ggc aaa gta gaa gct aaa caa gtg ctg gcc agt gca cca acg			147
Gln Ala Gly Lys Val Glu Ala Lys Gln Val Leu Ala Ser Ala Pro Thr			
30 35 40			
gac aac aac ctc tgc cac ttc agg gct ctg ggt tgc cag act act cac			195
Asp Asn Asn Leu Cys His Phe Arg Ala Leu Gly Cys Gln Thr Thr His			
45 50 55 60			
tcc aac cat gag gtg ctg caa aac tgc cca ctt gtc atc ttt gcc acc			243
Ser Asn His Glu Val Leu Gln Asn Cys Pro Leu Val Ile Phe Ala Thr			
65 70 75			
aaa ccc caa gtc ctg cca act gtc ctg gcg gaa gtg gcc ccc ata gtc			291
Lys Pro Gln Val Leu Pro Thr Val Leu Ala Glu Val Ala Pro Ile Val			
80 85 90			
acc act gag cac atc atc gta tct gtg gct gct ggg atc tct ctg agc			339
Thr Thr Glu His Ile Ile Val Ser Val Ala Ala Gly Ile Ser Leu Ser			
95 100 105			
aca atg gag ggg ctg tta ccc ccg aac aca cga gta ttg cga gtc tct			387
Thr Met Glu Gly Leu Leu Pro Pro Asn Thr Arg Val Leu Arg Val Ser			
110 115 120			
ccc aat cta ccc tgc gtt gtc cag gag ggg gcc atg gtg atg gcc cgg			435
Pro Asn Leu Pro Cys Val Val Gln Glu Gly Ala Met Val Met Ala Arg			
125 130 135 140			
ggc cac cat gct ggg aac gat gac gca gag ctc cta cag aac ttg ctg			483
Gly His His Ala Gly Asn Asp Asp Ala Glu Leu Leu Gln Asn Leu Leu			
145 150 155			
gaa gcc tgt ggg cag tgc ata gag gtt ccc gag tcc tac gta gat atc			531

[0010]

Glu Ala Cys Gly Gln Cys Ile Glu Val Pro Glu Ser Tyr Val Asp Ile	
160 165 170	
cac acc ggt ctc agt ggc agt ggt gtg gcc ttt gtg tgt aca ttt tca	579
His Thr Gly Leu Ser Gly Ser Gly Val Ala Phe Val Cys Thr Phe Ser	
175 180 185	
gag gcc ctg gct gaa ggt gcc atc aaa atg ggc atg ccc agt ggc ctg	627
Glu Ala Leu Ala Glu Gly Ala Ile Lys Met Gly Met Pro Ser Gly Leu	
190 195 200	
gcc cac cgc att gct gct cag acc ctg ctg ggg aca gcc aag atg ctg	675
Ala His Arg Ile Ala Ala Gln Thr Leu Leu Gly Thr Ala Lys Met Leu	
205 210 215 220	
cag cag gaa ggg aag cac cca gcc cag ctt cgg aca gat gtg ctc aca	723
Gln Gln Glu Gly Lys His Pro Ala Gln Leu Arg Thr Asp Val Leu Thr	
225 230 235	
cca gct gga acc acc atc cat ggg ttg cat gcc cta gag cgg ggc ggt	771
Pro Ala Gly Thr Thr Ile His Gly Leu His Ala Leu Glu Arg Gly Gly	
240 245 250	
ttt cga gcg gct acc atg agt gcg gtg gaa gca gct acc tgc cgg gct	819
Phe Arg Ala Ala Thr Met Ser Ala Val Glu Ala Ala Thr Cys Arg Ala	
255 260 265	
aag gag ctc agc aag aag taa ggcaggcctc agatgagact acgggctcct	870
Lys Glu Leu Ser Lys Lys *	
270	
tgcccagctg cagcctctgt ggtgagaata gccctggacg ggagatgtag tgggcagtc	930
tctaagtggg atggctaatt tatccaagaa gcggtgacta cttgtaagat gctatcaaga	990
cggggttgcc ttgactgtga cattcagtcg aggaagaatc gcttgcccct tacctgagat	1050
tccagatcct cccttctgca cctcctggcc agttgcagtt gtgtcctcat ggtcacagga	1110
gctggtagaa tatgtctcct gtggaggtgg tagacatcat cctccatgct ggcgtagagac	1170
gtctttggtt gtggctgctt tgggataccc cacactccgt aagcagcgcc ccgtccatat	1230
tctctaagcc caataaactc attggttctc taaaaaaaaa aaaaaa	1276
<210> 27	
<211> 274	
<212> PRT	
<213> 小家鼠	
<400> 27	
Met Ala Ala Thr Met Ser Glu Pro Arg Arg Val Gly Phe Val Gly Ala	
1 5 10 15	
Gly Arg Met Ala Glu Ala Ile Ala Arg Gly Leu Ile Gln Ala Gly Lys	
20 25 30	
Val Glu Ala Lys Gln Val Leu Ala Ser Ala Pro Thr Asp Asn Asn Leu	
35 40 45	
Cys His Phe Arg Ala Leu Gly Cys Gln Thr Thr His Ser Asn His Glu	
50 55 60	

[0011]

```

Val Leu Gln Asn Cys Pro Leu Val Ile Phe Ala Thr Lys Pro Gln Val
65          70          75          80
Leu Pro Thr Val Leu Ala Glu Val Ala Pro Ile Val Thr Thr Glu His
          85          90          95
Ile Ile Val Ser Val Ala Ala Gly Ile Ser Leu Ser Thr Met Glu Gly
          100         105         110
Leu Leu Pro Pro Asn Thr Arg Val Leu Arg Val Ser Pro Asn Leu Pro
          115         120         125
Cys Val Val Gln Glu Gly Ala Met Val Met Ala Arg Gly His His Ala
          130         135         140
Gly Asn Asp Asp Ala Glu Leu Leu Gln Asn Leu Leu Glu Ala Cys Gly
145          150          155          160
Gln Cys Ile Glu Val Pro Glu Ser Tyr Val Asp Ile His Thr Gly Leu
          165         170         175
Ser Gly Ser Gly Val Ala Phe Val Cys Thr Phe Ser Glu Ala Leu Ala
          180         185         190
Glu Gly Ala Ile Lys Met Gly Met Pro Ser Gly Leu Ala His Arg Ile
          195         200         205
Ala Ala Gln Thr Leu Leu Gly Thr Ala Lys Met Leu Gln Gln Glu Gly
          210         215         220
Lys His Pro Ala Gln Leu Arg Thr Asp Val Leu Thr Pro Ala Gly Thr
225          230         235         240
Thr Ile His Gly Leu His Ala Leu Glu Arg Gly Gly Phe Arg Ala Ala
          245         250         255
Thr Met Ser Ala Val Glu Ala Ala Thr Cys Arg Ala Lys Glu Leu Ser
          260         265         270
Lys Lys

```

<210> 28

<211> 1568

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> CDS

<222> (120)...(1349)

<400> 28

```

ctacagaaag gagccttct cagcctgcag tggaccccat ctgctcggtt aaggagccac      60
ggcgggtgcca gggagggaaa ccagcgtttg gcctgccgtg aagaggtccc agaagagcc      119
atg gca ggt gtc tgt gac atg gcc cct aat ttc ctt tcc cca tct gaa      167
Met Ala Gly Val Cys Asp Met Ala Pro Asn Phe Leu Ser Pro Ser Glu
  1          5          10          15

gac cag gcc ttg ggt ctt gcc ctt ggc aga gaa gtt gct ttg aat tgc      215
Asp Gln Ala Leu Gly Leu Ala Leu Gly Arg Glu Val Ala Leu Asn Cys
          20          25          30

aca gct tgg gtg ttc tct agg ccc cag tgt ccc cag cca tca gtg cag      263
Thr Ala Trp Val Phe Ser Arg Pro Gln Cys Pro Gln Pro Ser Val Gln
          35          40          45

```

[0012]

tgg ctg aaa gat ggt ctg gca ttg ggc aat gga agc cac ttc agc ctc	311
Trp Leu Lys Asp Gly Leu Ala Leu Gly Asn Gly Ser His Phe Ser Leu	
50 55 60	
cat gag gac ttc tgg gtc agc gcc aac ttc tca gag att gtg tcc agt	359
His Glu Asp Phe Trp Val Ser Ala Asn Phe Ser Glu Ile Val Ser Ser	
65 70 75 80	
gtc ctg gtg ctc aac ttg acc aat gca gag gac tat gga acc ttc acc	407
Val Leu Val Leu Asn Leu Thr Asn Ala Glu Asp Tyr Gly Thr Phe Thr	
85 90 95	
tgt tct gtc tgg aat gtc agc tcc cat tcc ttc act ctt tgg cga gct	455
Cys Ser Val Trp Asn Val Ser Ser His Ser Phe Thr Leu Trp Arg Ala	
100 105 110	
ggc cct gct ggc cat gtg gct gca gta ctg gct tcc ctc ctg gtc ctg	503
Gly Pro Ala Gly His Val Ala Ala Val Leu Ala Ser Leu Leu Val Leu	
115 120 125	
gtg gtt ctg ctg ctg gtg gcc ctg ctc tat gtt aag tgt cgg ctg aac	551
Val Val Leu Leu Leu Val Ala Leu Leu Tyr Val Lys Cys Arg Leu Asn	
130 135 140	
atg ctg ctt tgg tac caa gac act tac ggg gag gtg gag atg aac gat	599
Met Leu Leu Trp Tyr Gln Asp Thr Tyr Gly Glu Val Glu Met Asn Asp	
145 150 155 160	
ggg aag tta tac gat gcc tac gtg tcc tat agc gac tgc cca gag gac	647
Gly Lys Leu Tyr Asp Ala Tyr Val Ser Tyr Ser Asp Cys Pro Glu Asp	
165 170 175	
cgc aaa ttt gta aat ttt att ctg aag cct cag ttg gag cgg cgt cgg	695
Arg Lys Phe Val Asn Phe Ile Leu Lys Pro Gln Leu Glu Arg Arg Arg	
180 185 190	
gga tac aaa ctc ttc cta gag gac cgc gac ctc ttg cct cgc gcg gag	743
Gly Tyr Lys Leu Phe Leu Glu Asp Arg Asp Leu Leu Pro Arg Ala Glu	
195 200 205	
ccc tct gcc gac ctt ttg gtg aac ctg agt cgc tgt cgg cgt ctc atc	791
Pro Ser Ala Asp Leu Leu Val Asn Leu Ser Arg Cys Arg Arg Leu Ile	
210 215 220	
gtg gtt ctt tca gat gcc ttc cta agc cgg ccc tgg tgt agc cag agc	839
Val Val Leu Ser Asp Ala Phe Leu Ser Arg Pro Trp Cys Ser Gln Ser	
225 230 235 240	
ttc cgg gag gga ctg tgc cgc cta ctg gag ctc acc cgc aga cct atc	887
Phe Arg Glu Gly Leu Cys Arg Leu Leu Glu Leu Thr Arg Arg Pro Ile	
245 250 255	
ttc atc acc ttt gag ggc cag agg cgt gag ccc ata cac cct gct ctc	935

[0013]

Phe Ile Thr Phe Glu Gly Gln Arg Arg Glu Pro Ile His Pro Ala Leu	
260 265 270	
cgg ctc ctg cgc cag cac cgc cac ctc gtg acc ctg gtg ctt tgg aag	983
Arg Leu Leu Arg Gln His Arg His Leu Val Thr Leu Val Leu Trp Lys	
275 280 285	
cct ggc tcc gtg act cct tcc tct gat ttt tgg aaa gag cta cag cta	1031
Pro Gly Ser Val Thr Pro Ser Ser Asp Phe Trp Lys Glu Leu Gln Leu	
290 295 300	
gca ctg cca cgg aag gtg cag tac agg ccg gtg gag gga gac cct caa	1079
Ala Leu Pro Arg Lys Val Gln Tyr Arg Pro Val Glu Gly Asp Pro Gln	
305 310 315 320	
acc cga ctt cag gat gac aaa gat ccc atg cta atc gtg aga gga cgt	1127
Thr Arg Leu Gln Asp Asp Lys Asp Pro Met Leu Ile Val Arg Gly Arg	
325 330 335	
gct gcc cag ggc cgg ggc atg gag tca gag ctg gat cca gac cct gag	1175
Ala Ala Gln Gly Arg Gly Met Glu Ser Glu Leu Asp Pro Asp Pro Glu	
340 345 350	
gga gac ctg ggt gtc cgt gga cct gtc ttt ggg gag cca cca act cca	1223
Gly Asp Leu Gly Val Arg Gly Pro Val Phe Gly Glu Pro Pro Thr Pro	
355 360 365	
ctg cag gaa acc agg atc tgc ata gga gag agc cac ggc agt gaa atg	1271
Leu Gln Glu Thr Arg Ile Cys Ile Gly Glu Ser His Gly Ser Glu Met	
370 375 380	
gat gtc tct gac ctc ggc tct cga aac tac agt gca cgg aca gac ttc	1319
Asp Val Ser Asp Leu Gly Ser Arg Asn Tyr Ser Ala Arg Thr Asp Phe	
385 390 395 400	
tac tgc ctc gtg tct gag gat gat gtg tag cccatatccc agcagcccag	1369
Tyr Cys Leu Val Ser Glu Asp Asp Val *	
405	
accatgagat cacggtggca gcttccaggg tagaggcagc aggcactcct tcctaggatc	1429
acaacccttg cctctatccc tgggcccctc aggaaaggag tgtggcccca ggggtgtcaca	1489
aaataaaatc ctgttggttc ctgaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1549
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1568
<210> 29	
<211> 409	
<212> PRT	
<213> 小家鼠	
<400> 29	
Met Ala Gly Val Cys Asp Met Ala Pro Asn Phe Leu Ser Pro Ser Glu	
1 5 10 15	
Asp Gln Ala Leu Gly Leu Ala Leu Gly Arg Glu Val Ala Leu Asn Cys	

[0014]

			20					25				30				
Thr	Ala	Trp	Val	Phe	Ser	Arg	Pro	Gln	Cys	Pro	Gln	Pro	Ser	Val	Gln	
		35						40				45				
Trp	Leu	Lys	Asp	Gly	Leu	Ala	Leu	Gly	Asn	Gly	Ser	His	Phe	Ser	Leu	
	50					55					60					
His	Glu	Asp	Phe	Trp	Val	Ser	Ala	Asn	Phe	Ser	Glu	Ile	Val	Ser	Ser	
65					70					75					80	
Val	Leu	Val	Leu	Asn	Leu	Thr	Asn	Ala	Glu	Asp	Tyr	Gly	Thr	Phe	Thr	
				85					90					95		
Cys	Ser	Val	Trp	Asn	Val	Ser	Ser	His	Ser	Phe	Thr	Leu	Trp	Arg	Ala	
			100					105					110			
Gly	Pro	Ala	Gly	His	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Leu	Leu	Val	Leu	
		115					120					125				
Val	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Leu	Tyr	Val	Lys	Cys	Arg	Leu	Asn	
	130					135					140					
Met	Leu	Leu	Trp	Tyr	Gln	Asp	Thr	Tyr	Gly	Glu	Val	Glu	Met	Asn	Asp	
145					150					155					160	
Gly	Lys	Leu	Tyr	Asp	Ala	Tyr	Val	Ser	Tyr	Ser	Asp	Cys	Pro	Glu	Asp	
				165					170					175		
Arg	Lys	Phe	Val	Asn	Phe	Ile	Leu	Lys	Pro	Gln	Leu	Glu	Arg	Arg	Arg	
			180					185					190			
Gly	Tyr	Lys	Leu	Phe	Leu	Glu	Asp	Arg	Asp	Leu	Leu	Pro	Arg	Ala	Glu	
		195					200					205				
Pro	Ser	Ala	Asp	Leu	Leu	Val	Asn	Leu	Ser	Arg	Cys	Arg	Arg	Leu	Ile	
	210					215					220					
Val	Val	Leu	Ser	Asp	Ala	Phe	Leu	Ser	Arg	Pro	Trp	Cys	Ser	Gln	Ser	
225					230					235					240	
Phe	Arg	Glu	Gly	Leu	Cys	Arg	Leu	Leu	Glu	Leu	Thr	Arg	Arg	Pro	Ile	
				245					250					255		
Phe	Ile	Thr	Phe	Glu	Gly	Gln	Arg	Arg	Glu	Pro	Ile	His	Pro	Ala	Leu	
			260					265					270			
Arg	Leu	Leu	Arg	Gln	His	Arg	His	Leu	Val	Thr	Leu	Val	Leu	Trp	Lys	
		275					280						285			
Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Pro	Ser	Ser	Asp	Phe	Trp	Lys	Glu	Leu	Gln	Leu	
	290					295					300					
Ala	Leu	Pro	Arg	Lys	Val	Gln	Tyr	Arg	Pro	Val	Glu	Gly	Asp	Pro	Gln	
305					310					315					320	
Thr	Arg	Leu	Gln	Asp	Asp	Lys	Asp	Pro	Met	Leu	Ile	Val	Arg	Gly	Arg	
				325					330					335		
Ala	Ala	Gln	Gly	Arg	Gly	Met	Glu	Ser	Glu	Leu	Asp	Pro	Asp	Pro	Glu	
			340					345					350			
Gly	Asp	Leu	Gly	Val	Arg	Gly	Pro	Val	Phe	Gly	Glu	Pro	Pro	Thr	Pro	
	355						360					365				
Leu	Gln	Glu	Thr	Arg	Ile	Cys	Ile	Gly	Glu	Ser	His	Gly	Ser	Glu	Met	
	370					375					380					
Asp	Val	Ser	Asp	Leu	Gly	Ser	Arg	Asn	Tyr	Ser	Ala	Arg	Thr	Asp	Phe	
385					390					395					400	
Tyr	Cys	Leu	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Val								
				405												

<210> 30

<211> 2591

<212> DNA

[0015]

<213> 小家鼠

<400> 30

```

aaggccccct cctctggacc ctccctctccg gccagagtca ataccacacc tagatgacat      60
caccctgccca cccataggag ctccaggcttt tgcccatctg agggcgtgct ggccagggtgc      120
cgggtggccac cttgtgcgca tgctcggtag ctgcacagtg cgcagctctg gtagctgcac      180
aatgcatctt aggcagcgtc ctctctgacc cttgtgcaag accatcctgg tattggcgct      240
taggaagggtg taagcagcag agtctgggtg ccacaaaaag aaaaaaaaat gtttttagtat      300
agtgagaagc aaaagagaaa caactccaat tgtccttgag cgacgaactt ccatggcaga      360
acttttaggtc agtcacaaac agctccgctt tgaatacacg aaaccctcct tgtaccaacc      420
gccgcatgtg tatatccaga tgtgtgggta tacaactgtg gcgattccga attgcatttt      480
tttataacgc gatacgtgta catatttttag tgaaggctcag cagtttttcta acttgtgcct      540
aagaattatt gggaaatgaa aatgcatttc tatctagttt cctggaaata tttctaccca      600
aaatagagaa gaaaagaagg aaagaaagaa agaaaaaaa agaaaaggta gaagcatgcc      660
tatctgccac cgagtgatcc cctgcttaac ctaaaccacca gcgatttgta gatggtaact      720
gcctttggaa aaatagcttc ttagtccaac gtgactgggg tcaactgtac cccactgcag      780
gatttaatta tgacttctcc tatcccaagg aggtgaaatg tagcgggggtg ggggtggggg      840
gaactgagga gtcataatgt ctggccaatg ttttcctcct tagtgattca ttatcttgaa      900
aacaccagtt ttgctccgcc ccccccccca atggcatctt ggaatccatc atcaagctag      960
tattgcgtcc tcaggaaaac atgggagcat gtggcttttg cagcgaggat gagcctgaac      1020
ttggagaaga tcaagaccat gcatggctca tcttcatgac agaggagtct ggtaggggcca      1080
ccatggctcc catcacggcc tctcataggc aacaccacac ttttcagttt ggttctatga      1140
ctcgacccca tcaccacaca acaagatggc tcagggggttc cagtcaaggc ttccagaaac      1200
cagcctttct ctcttgggga aaggagggaa gccagttcta aagggtgctag atcatgtccc      1260
ttctgctgga gggtcaccag ggctgcacct ggtagtagtc ccatcttagc cccagaaggc      1320
tctcccagac aagggaacgc agtgaaacgc ccagccggca tccatcagcc actggactgg      1380
cctttgactc taacacggta gaaattagac cacgaaaggc attcatgtag tgctatggaa      1440
gattagaggc atgatccaca aaggagaagt agttttaaca gtcaacacag tgccgataac      1500
gatacctttg tttcctgtat atgacaagag acccttcact ttctaagcat gggcctgcct      1560
gtccttgagc atgcccaga tgacaagagc aatggagcca agcagaaatg gcctgggcat      1620
ggtgacagct tctccaagga tacacataac tgactcagag gcaaatgtgg tctgtatccc      1680
ttctatggct ctgagttggg cgtccttggc ctcgatgca tctgactgta gccagcttcc      1740
atgggtcctt cccattctgg agacacacac ggtagatata cagagaagaa acaggctctt      1800
tccctttggc tctgcatgat actgggatac tgagctgggc attccataat agtagcccat      1860
gccatgtcag ttacacacac acacacacaa atattttattc ttttagcagg cacaacctgc      1920
aggtataagt ttggttggcc acttagctct ccaagttagg acccgctcc acagctgtac      1980
ctgctgaggg caggtaactc gcaatacaga gttcgatgtg attatagaat gtgggtgcagt      2040
atgttaggct gttgtggtca aagtggtagc aatgttagat ctatgtaccc tcattagggtg      2100
gactagagct ttgcctaata cagcctcgac cctgggcaact tgaataaato tccccatggc      2160
cctggctctg tttctccatc acagacaccc atcacatatg gtacccacac tgaattaagt      2220
tctgagatcc aggtggccag agctgctatg attcctctgc ctccatgctg ctatgatccg      2280
gacctctcgg catggaaaac cgagtctgtc tcccttccca ggctggggaa ctgocgcctc      2340
ccctcctgcc acagacagac ctgccaacaa gctctgttct tcatggagtc aggaggctct      2400
gctggcctgc agcaactcag ttgccttggg ctgggaactgc attcttgtga tgtctggatg      2460
ggtttggggc tggaggtcag gtactctggg attagctgaa gggggcacag tgttctttgt      2520
cctgcccctc cggttaactg tgctccatat ttgtgttgaa ctctaaaagc atattaaagt      2580
gaacctgagg g                                2591

```

<210> 31

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

[0016]

<220>

<223> 合成构筑体

<400> 31

gagtaactag ttaacc

16

<210> 32

<211> 3171

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> CDS

<222> (28)...(534)

<400> 32

tgattttccgt ccaggccgga actcaag atg gct gcg ttc ttg ctg aga cat gtc 54
 Met Ala Ala Phe Leu Leu Arg His Val
 1 5

agc cgt cac tgc ctc cga gcc cac ctg aat gct cag ctt tgt atc aga 102
 Ser Arg His Cys Leu Arg Ala His Leu Asn Ala Gln Leu Cys Ile Arg
 10 15 20 25

aat gct gct cct ttg gga acc aca gct aag gag gag atg gag cgg ttc 150
 Asn Ala Ala Pro Leu Gly Thr Thr Ala Lys Glu Glu Met Glu Arg Phe
 30 35 40

tgg aag aag aac acg agt tca aac cgt cct ctg tct ccc cat ttg act 198
 Trp Lys Lys Asn Thr Ser Ser Asn Arg Pro Leu Ser Pro His Leu Thr
 45 50 55

atc tac aaa tgg tct ctt cct atg gca ctg tcc gtt tgc cac cga ggc 246
 Ile Tyr Lys Trp Ser Leu Pro Met Ala Leu Ser Val Cys His Arg Gly
 60 65 70

tct gga ata gcc ttg agt gga ggg gtc tct ctt ttt ggc ctg tcg gca 294
 Ser Gly Ile Ala Leu Ser Gly Gly Val Ser Leu Phe Gly Leu Ser Ala
 75 80 85

ctg ctg ctt cct ggg aac ttt gag tca tat ttg atg ttt gtg aag tcc 342
 Leu Leu Leu Pro Gly Asn Phe Glu Ser Tyr Leu Met Phe Val Lys Ser
 90 95 100 105

ctg tgt ttg ggg cca aca ctg atc tac tcg gct aag ttt gtg ctt gtc 390
 Leu Cys Leu Gly Pro Thr Leu Ile Tyr Ser Ala Lys Phe Val Leu Val
 110 115 120

ttc ccg ctc atg tac cac tca ctg aat ggg atc cga cac ttg cta tgg 438
 Phe Pro Leu Met Tyr His Ser Leu Asn Gly Ile Arg His Leu Leu Trp
 125 130 135

gac cta gga aaa ggc ctg gca ata ccc cag gtc tgg ctg tct gga gtc 486

[0017]

Asp	Leu	Gly	Lys	Gly	Leu	Ala	Ile	Pro	Gln	Val	Trp	Leu	Ser	Gly	Val	
140							145					150				
gcg gtc gtg gtt ctt gct gtg ttg tcc tct ggc	ggg	ctg	gcc	gcc	ctg											534
Ala Val Val Val Leu Ala Val Leu Ser Ser Gly	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu											
155						160					165					
tgaagagctg	gagttcccag	cacccctgta	catcatcaaa	ctgattttata	ttcctgttta											594
tcaatatccc	cacccctccc	ccccagcctc	ccaggttctc	ctgattttgtt	tagatgccac											654
atgctttcaa	tccccttgga	gtgcagtaga	gcggcttaaa	gacctgttgt	agtaagaaag											714
ggatcatcctc	cctgggcctg	ggagcccttg	ctccggttcc	acatttgact	gatttgtgct											774
gagggtcagc	tttccgctgc	tttctgctga	gacagtggaa	acaatgccag	ttctgtgacc											834
gccccgagtg	ccactgcctg	tgggctgctg	gcttaaagga	cacttctgtc	cattggctcag											894
cttagggcct	ttagcaccca	caccgcgtga	ctgagaggag	agagggtggag	gaggagggat											954
tgtcctgctc	agctagaggg	agataaagag	cagcctggga	gcttggagct	cgagcctggg											1014
aacagataca	gcttttgatg	tatgaggaag	atcaaaaaaa	attgtattaa	gtttctgttc											1074
tgtttttcat	ttctaggaaa	atacaccttt	aatgtcatat	tttctaattct	aaattcttgt											1134
accatcttct	ttggaaacga	ttaaagtact	actcatttta	tgcttgactc	tttggaaatct											1194
agtgcagggt	gggtagaaag	ggctaatctc	ctgcccctcc	ctttggatct	tggacattta											1254
cacctccag	tatggaggga	aatagtttgc	ccaacaacta	ccactgcgaa	aaatgaggta											1314
atcacaacca	agtagtggag	agattttggt	caaggaaaga	acataagaag	tcagctaagc											1374
atgcggggag	cttttggggt	gttgtagggc	ccaggcctgt	ggatggccag	cttggtaactt											1434
aagcacacca	tttggttatg	gacacctagc	accagtggag	gtggaggcta	agggctaaat											1494
agatttgggg	ggaggtaggg	gaagtagaag	agaatttttt	aaaagcaggg	caggattgga											1554
ggcatcagag	ttcttgaaga	tggatataca	gtgggaaacg	ttgcttcttt	accctactg											1614
aggccctgga	tccttaccaa	gggtgctttg	tttgtggtgc	taggggtcaa	agccaggctc											1674
ttgtgcgtgt	tagcaagcgc	tgtaccacta	caccagttcc	ctagccagga	gtgctatttt											1734
gatagatttt	tgccaactct	ggagtaaaaag	ctccatcttg	ggactagaga	tttggttcca											1794
tgatcatatg	cccaaggcct	gtggttcagt	ccccaccacc	aagaaaaaca	ctactccaag											1854
agattggtca	gagcactgga	ttggggagtg	attgctgggt	ggcagttaga	cagggaagaca											1914
gcatgaactc	aaatccgtgg	cagcagaggt	gggctgggcc	caggttaggt	tgggttgagg											1974
gctgtttcat	tagtctcttg	aaatctgtag	aaagggattc	accatttate	cccaaattggc											2034
ctggaagtct	taccagact	accttcaggt	tgggtgtgatc	ttgcttctgc	ctcccggtg											2094
catgttacca	ccaccctcag	ccctcagcct	attcctgatc	ccaagtagtg	tttggcctca											2154
agcaacgata	actaccactc	tcctctagac	aggccccggg	aggtctggtg	gtgccaggaa											2214
ttcagcccag	ggccccatcc	gtgctaggca	agcactgaac	ctgagtcagg	ccttgccaag											2274
taccagccc	agcccagaca	ggcctcgaac	tgaccacca	tctgcttcag	cctcccaagt											2334
agctggaatt	acaggaccat	gctaccacat	gcgactgctg	ggatgtcctg	tagatttcat											2394
ccagcgtcaa	tcaggttgtc	cttagagtag	agtcagagtt	catggggaaa	cacttttgc											2454
ttagacttgg	caagggcatt	aaattcaaca	accagtgcc	gaaagatgta	tagacagggc											2514
aaaggccaac	atattggcag	gctgggaaat	taatgtggac	atttttactt	ttttttttga											2574
tggcttctta	accagtgatt	ggagggaagt	aggtcgccctg	gcttctttat	ttttctcttt											2634
gtaagccggt	ctgtaggctt	atatatatat	atatatatat	ttttttttta	gatttattta											2694
tttattatat	gtaagtacac	tatagttgtc	ttcagatacc	ccagaagagg	gcatcagatc											2754
tcattacaga	tggttgtgaa	ccaccatgtt	gttgttagga	tttgaactca	ggaccttcag											2814
aagagcagac	agtgtcttta	actgtctgagc	catctctcca	gccctggcct	atatctttta											2874
aaacctagtt	taataagggc	atttaaaggc	tttaacctcc	ctttctaacc	taccaccag											2934
cagaggtagt	gggaaggaaa	ggtagtaac	cagacatttt	tacttcaactg	gtctgtcaag											2994
ataactcagc	gggtgcaggc	tctggccccc	aagcctgagg	acgcgagttt	gatcccagga											3054
tccacgtgtc	agaaggatcc	acctccgta	agctgtctct	ggcttccacg	tgcttgaggc											3114
acacctccat	gcatacgtaa	agtcaatgaa	tgcgtgtaat	aaaggcttgt	gtgctct											3171

<210> 33

[0018]

<211> 169
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 33

Met	Ala	Ala	Phe	Leu	Leu	Arg	His	Val	Ser	Arg	His	Cys	Leu	Arg	Ala
1				5					10					15	
His	Leu	Asn	Ala	Gln	Leu	Cys	Ile	Arg	Asn	Ala	Ala	Pro	Leu	Gly	Thr
			20					25						30	
Thr	Ala	Lys	Glu	Glu	Met	Glu	Arg	Phe	Trp	Lys	Lys	Asn	Thr	Ser	Ser
		35					40					45			
Asn	Arg	Pro	Leu	Ser	Pro	His	Leu	Thr	Ile	Tyr	Lys	Trp	Ser	Leu	Pro
	50					55					60				
Met	Ala	Leu	Ser	Val	Cys	His	Arg	Gly	Ser	Gly	Ile	Ala	Leu	Ser	Gly
65					70					75				80	
Gly	Val	Ser	Leu	Phe	Gly	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Gly	Asn	Phe
				85					90					95	
Glu	Ser	Tyr	Leu	Met	Phe	Val	Lys	Ser	Leu	Cys	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu
			100					105						110	
Ile	Tyr	Ser	Ala	Lys	Phe	Val	Leu	Val	Phe	Pro	Leu	Met	Tyr	His	Ser
		115					120						125		
Leu	Asn	Gly	Ile	Arg	His	Leu	Leu	Trp	Asp	Leu	Gly	Lys	Gly	Leu	Ala
	130					135					140				
Ile	Pro	Gln	Val	Trp	Leu	Ser	Gly	Val	Ala	Val	Val	Val	Leu	Ala	Val
145					150					155					160
Leu	Ser	Ser	Gly	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu							
					165										

<210> 34
 <211> 2065
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>

<221> CDS

<222> (253) ... (516)

<400> 34

gttggtggcg	agctaaggtg	gaggcaagca	gcggcggcga	cggcgacagt	ggcggcagtg	60
ccatggtggg	gctcgagga	tccctgctgc	cttggtgatc	ccgggctgac	agccagagag	120
cacagcggct	cagctcctgg	agagagagtc	gaagaaagcg	aagggcagcc	acctgtgcct	180
gctggctccc	attaggtcgg	ttcctgcagc	ggtgcctggc	agccttggtg	aaggccctgc	240
ccggcagaga	tc atg tat	tgc ctc cag	tgg ctg ctg	ccc gtc ctc	ctc ctc atc	291
	Met Tyr Cys	Leu Gln Trp	Leu Leu Pro	Val Leu Leu	Ile	
	1	5		10		
ccc aag ccc	ctc aac ccc	gct ctg tgg	ttc agc cac	tcc atg ttc	atg	339
Pro Lys Pro	Leu Asn Pro	Ala Leu Trp	Phe Ser His	Ser Met Phe	Met	
	15	20		25		
ggc ttc tac	ctg ctc agc	ttc ctc ctg	gaa cgg aaa	cct tgc aca	ata	387
Gly Phe Tyr	Leu Leu Ser	Phe Leu Leu	Glu Arg Lys	Pro Cys Thr	Ile	
	30	35	40		45	

[0019]

tgt gcc ttg gtt ttc ctg gca gcc ctc ttt ctc atc tgc tat agc tgc 435
Cys Ala Leu Val Phe Leu Ala Ala Leu Phe Leu Ile Cys Tyr Ser Cys
50 55 60

tgg gga aat tgt ttc ctg tac cac tgc tcc gat tcc cca ctt ccg gaa 483
Trp Gly Asn Cys Phe Leu Tyr His Cys Ser Asp Ser Pro Leu Pro Glu
65 70 75

tca gcc cat gac ccc ggt gtt gtg ggc acc taa cgtctgccga gatagcttgc 536
Ser Ala His Asp Pro Gly Val Val Gly Thr *
80 85

caaggaagca gaagacggga ggggagggcat tgacataggt cataaagcat tggagtttca 596
aatcccgag tctcggggt accacattcc taatggagcc ttttggcctg tgatgtttta 656
tccttacaat gtgaataatg gcaactgatcg gtgcttctgt tgtagagtcc tgtagtctgtg 716
gggtggtctta tgggtgtgtg ttctgtcacc atctgggtcc cggctgacgg attggccac 776
ccccttgctc attgatttgg ggaatctata cccttgatat gacctgtgtg gatacagtgt 836
agtctcaatg tcacctccat aaccttcct cgtcaagacc ttctctgttc cctcctcgtc 896
ccctttcccc gttttccctt tgggttcaactt ccaacccctt tccttttttg gggagcacct 956
gtccaagaca gggcttgttt ttgcacttat ctcaaatttg aagagattgc tgatgcccgga 1016
gagcctcgct ttttcatcct tcgttccctt ttgagaagggt gagacggaat catgtctcaa 1076
ctgctcgttg tctgcagacc tccagtattt cctctgcctc atttttaaga aagaagcgat 1136
ggggagacat tgccttttg cctgggtatc tgggctcctg ccttcacagcc cagcctctct 1196
ccctttgctc ttctcctgt ctctctcagc tgacctaaag gggccacctc atgtctccag 1256
tgcattgctc tcaggaggga gatgtgcagt attctcgtag acccagtgggt ccctggctga 1316
gtgaatgaga aagtattaca tttttcatag cagccatgat tcccttggtg ggtgtttgga 1376
tatttttgat gtgccctgta tgtatgtgtg cactagtgtc agcgtgtatg tacacacgta 1436
tgtgtgaatg tgtgtgtgt gtgtgtttac ataccaatac atgtgtatat tccttttgaa 1496
gaagctttat tgaatatgtt ctgattttga ggttttagtag tagtagctag ctgtagtagg 1556
tcctgctgca gtttttattt agcatgggga ttgcagagcg accagcacag tggactccaa 1616
gggtggttcag acaagaccca ggggagcagt cgcctcatc ctcaccag gagcttcctc 1676
attgctgcgc acgtagactg tacactatga agaaaacaca ggaagaaaga tttggtgact 1736
tggtaactgt ttgcttttct ctgcgcttca gaaacaagt tttgcaaata agactttctc 1796
ctggcccta cccactgggg atcagcatgg ttgttcttcc agtcggaaat gtacccctc 1856
ccctttcccc tcttgtgtgc aagtgggggg gggggcaggc ataggacaga gctggaagca 1916
ggcttctggg gagggtgact tagaggccac acttgtgaaa cactcggact gctgttgtaa 1976
agcttttatt tctggtgtgt tcgttcaca gctgtttgaa atgtttaata aagctttata 2036
aactttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2065

<210> 35

<211> 87

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 35

Met Tyr Cys Leu Gln Trp Leu Leu Pro Val Leu Leu Ile Pro Lys Pro
1 5 10 15
Leu Asn Pro Ala Leu Trp Phe Ser His Ser Met Phe Met Gly Phe Tyr
20 25 30
Leu Leu Ser Phe Leu Leu Glu Arg Lys Pro Cys Thr Ile Cys Ala Leu
35 40 45
Val Phe Leu Ala Ala Leu Phe Leu Ile Cys Tyr Ser Cys Trp Gly Asn

[0020]

50						55						60				
Cys	Phe	Leu	Tyr	His	Cys	Ser	Asp	Ser	Pro	Leu	Pro	Glu	Ser	Ala	His	
65						70					75				80	
Asp	Pro	Gly	Val	Val	Gly	Thr										
				85												

<210> 36

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构筑体

<400> 36

tcaggtgtga tgctcgg

17

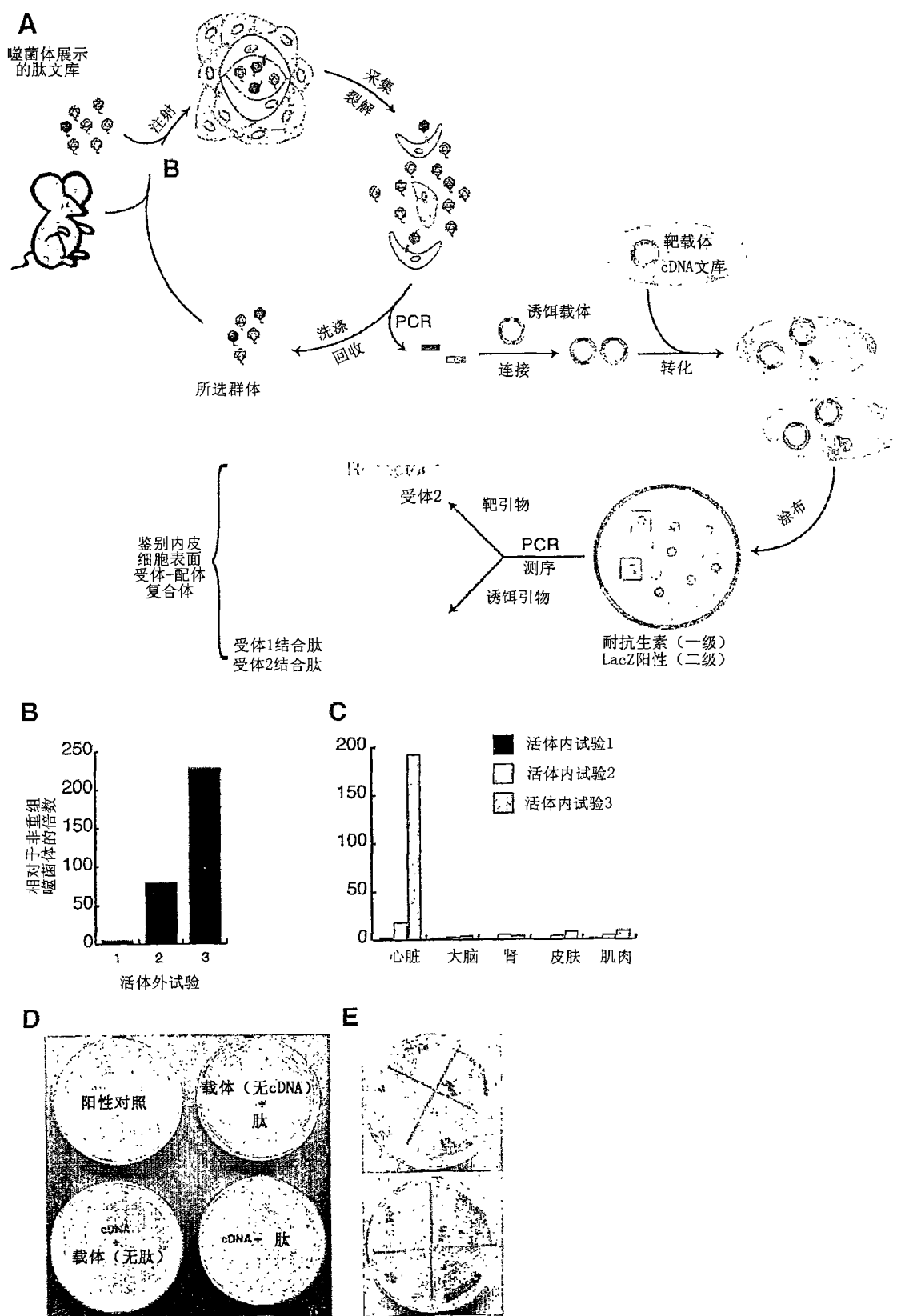


图 1

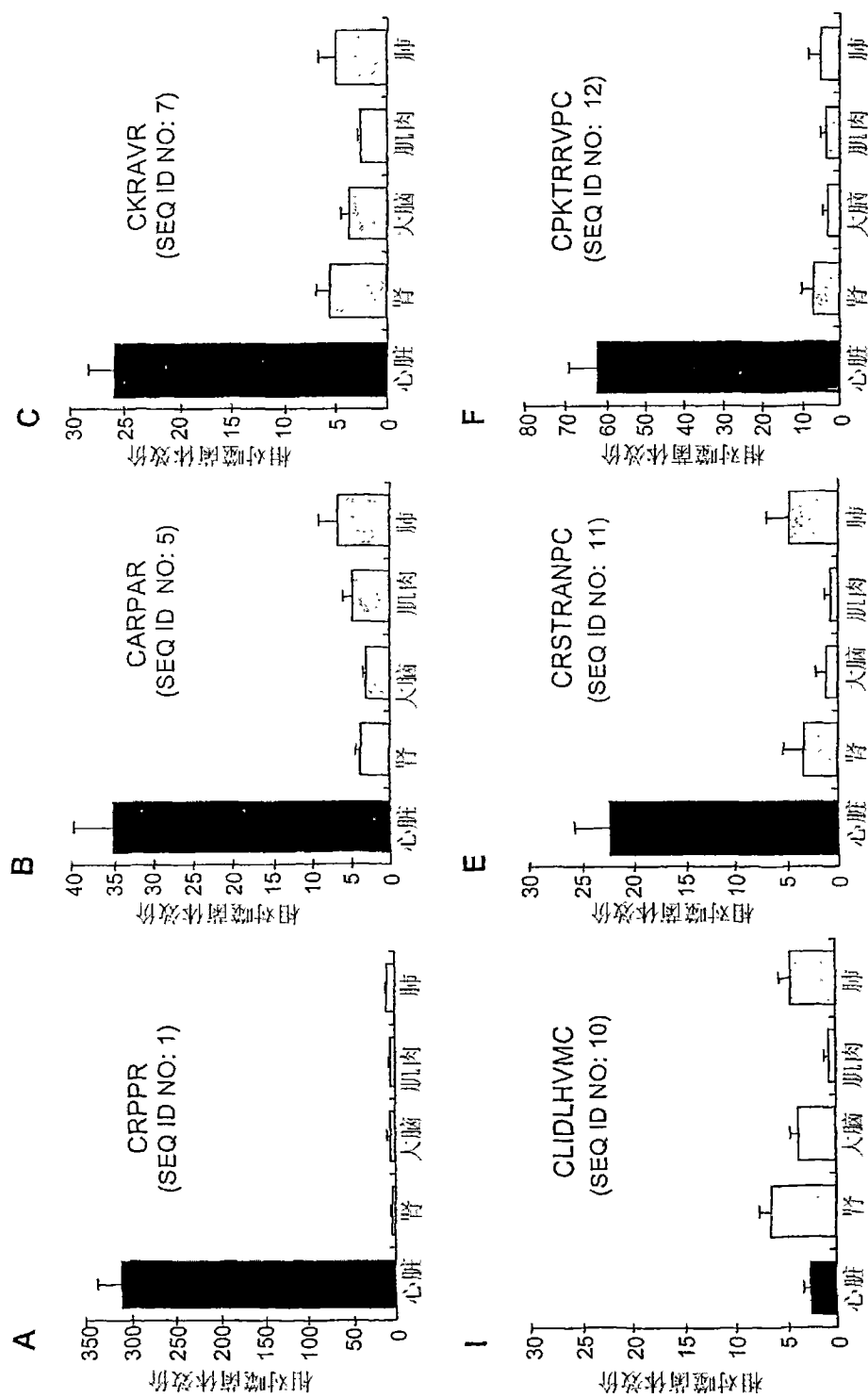


图2

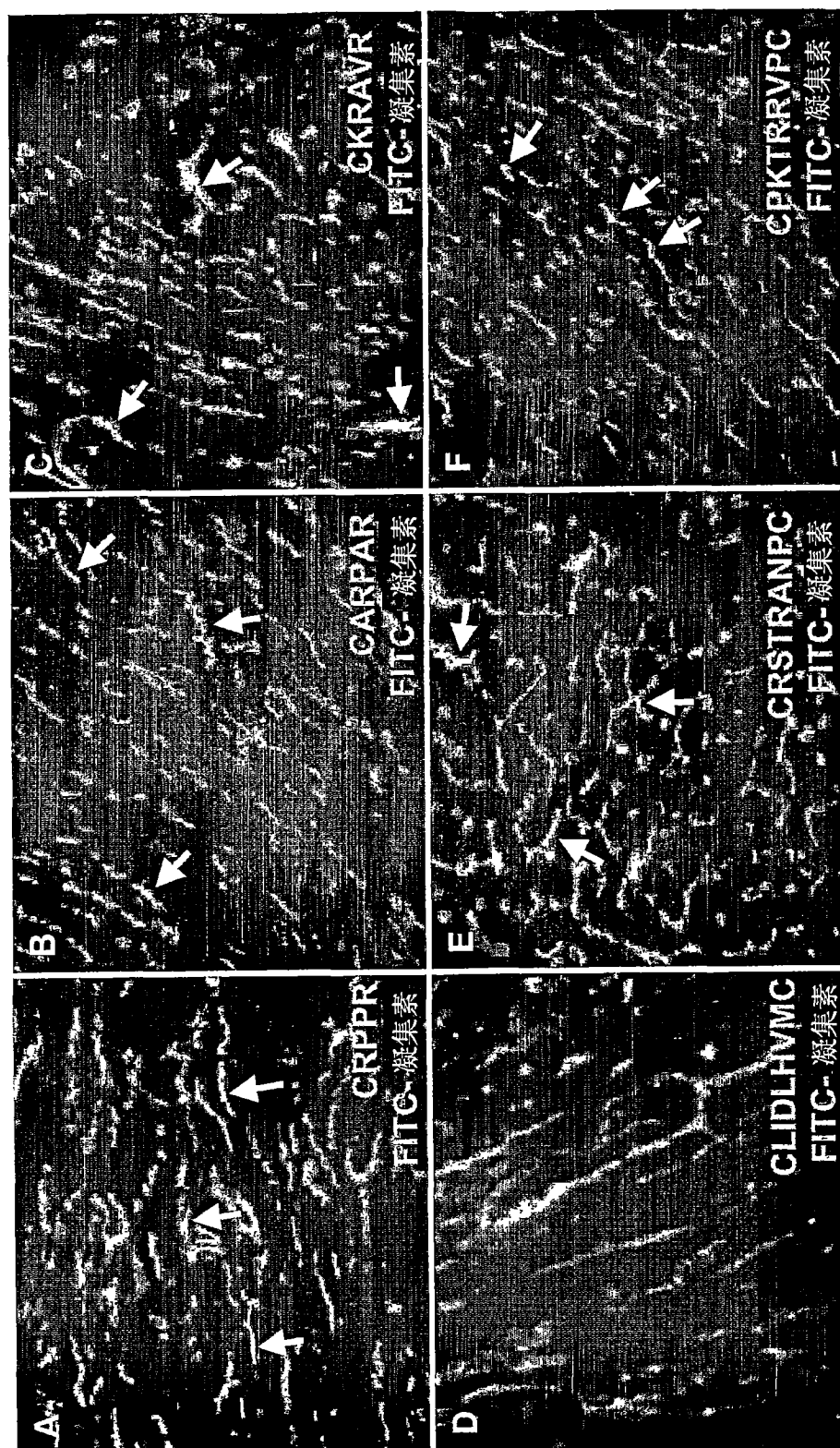


图3

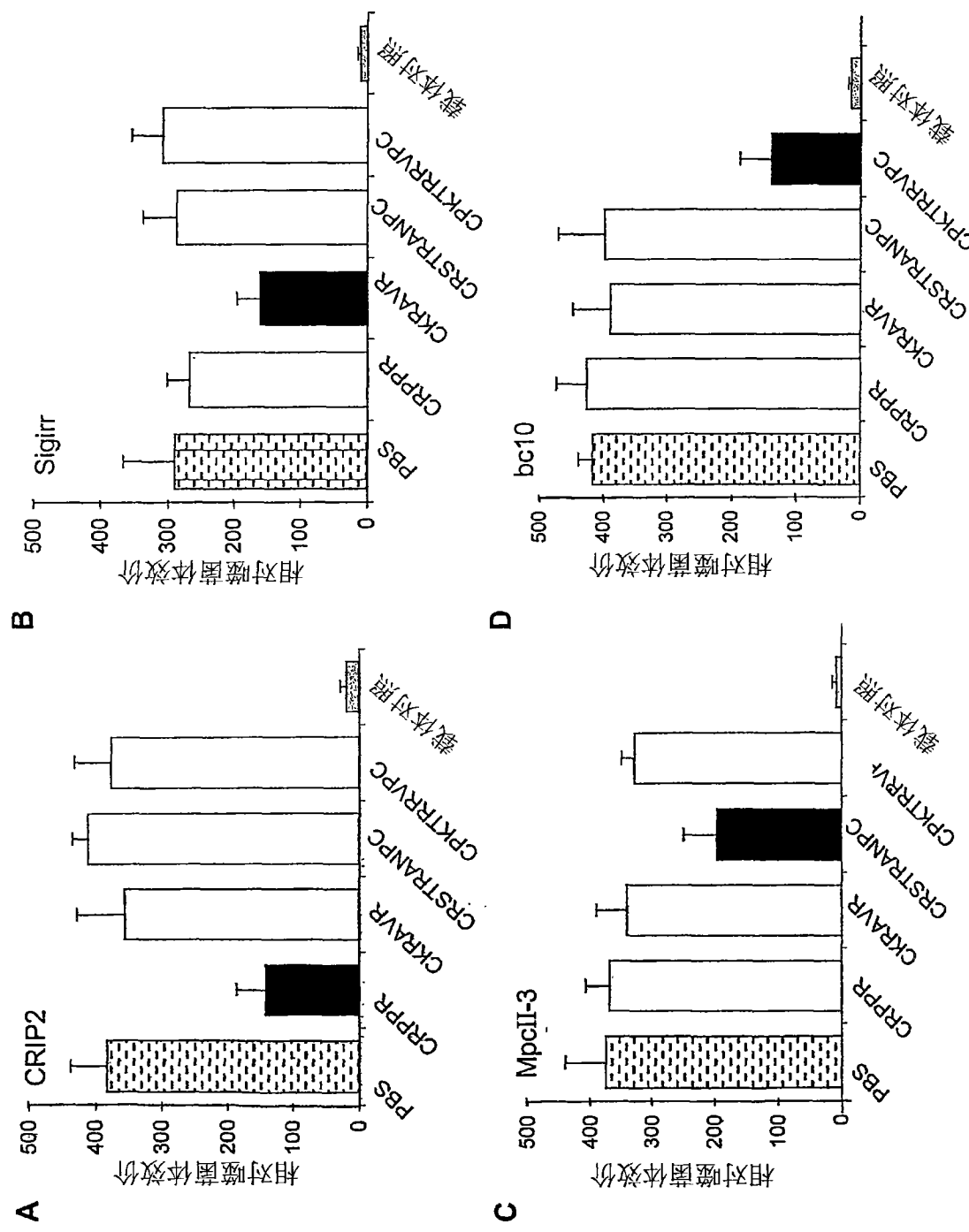


图4

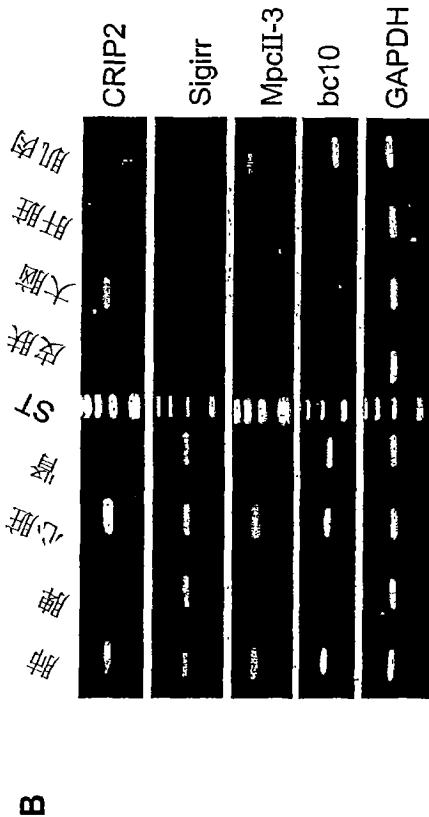
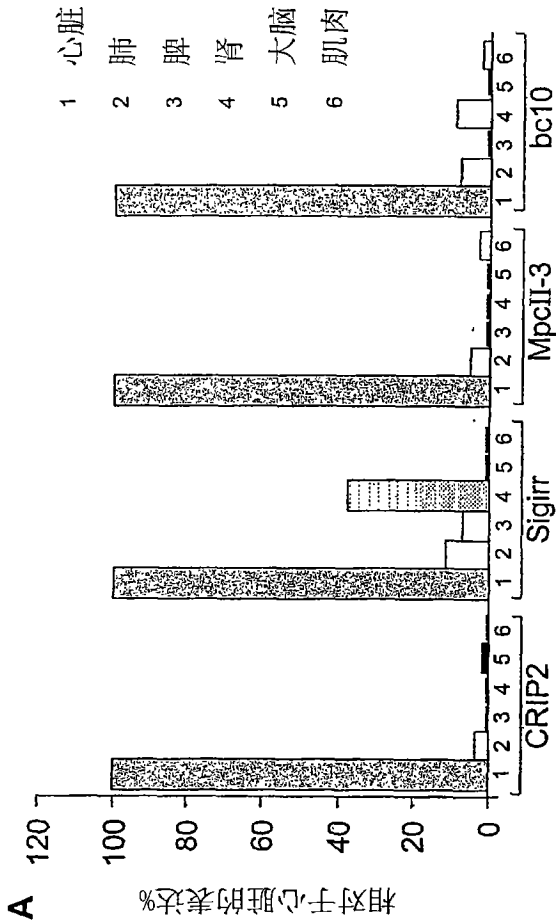


图5

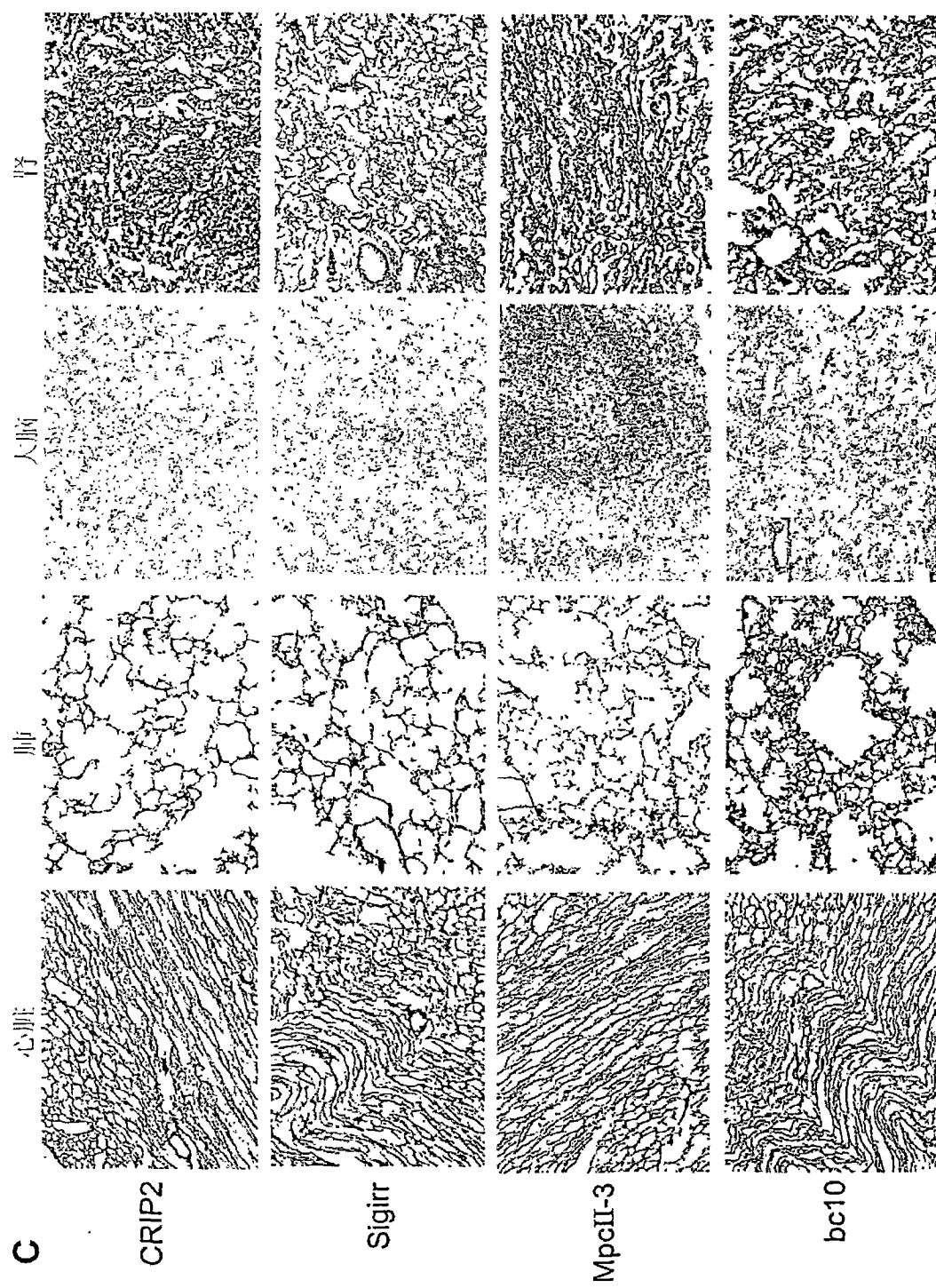


图5 (续)

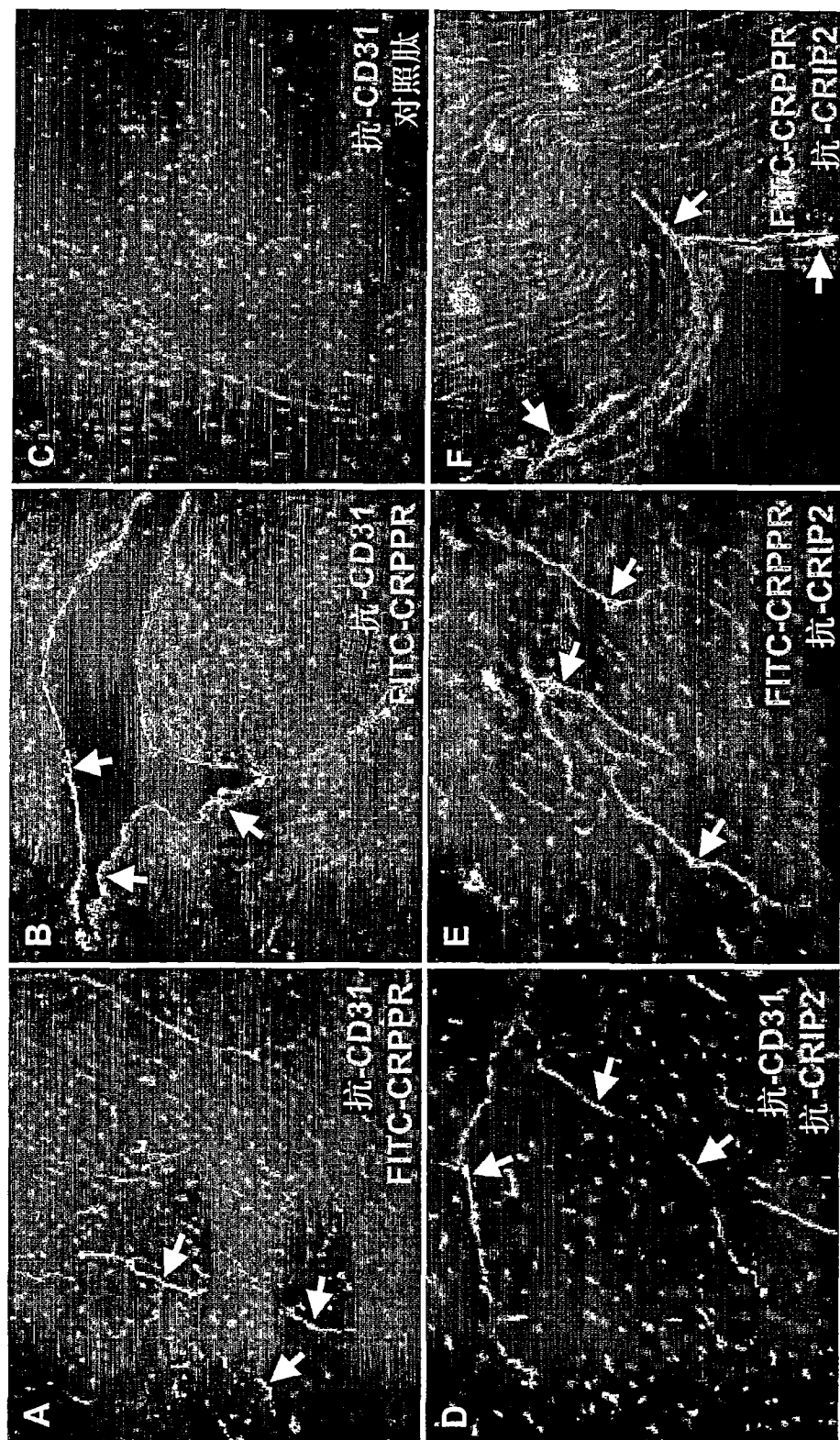


图6

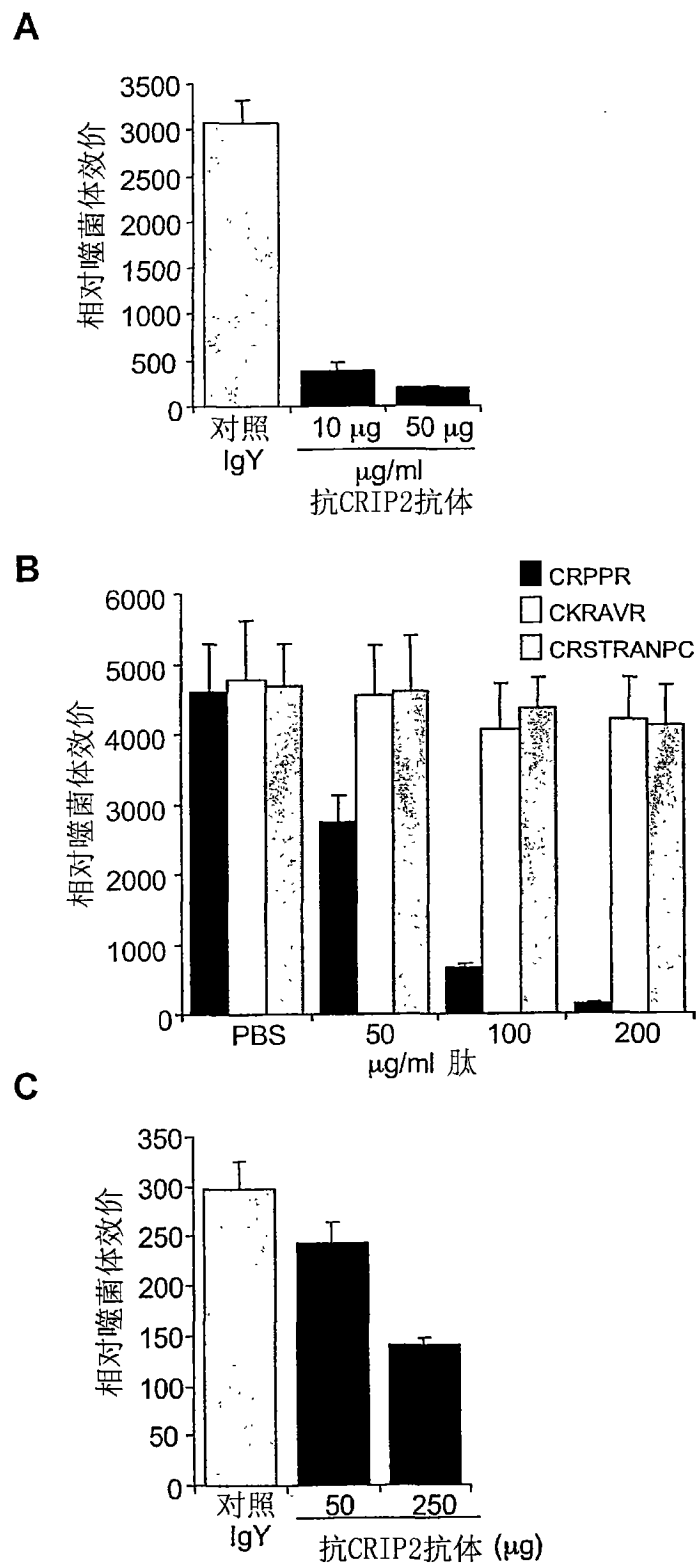


图 7

A.

```

1  cggacgcgtg ggtccgcgga ccgaccgagc gcaccgacca tggcctccaa gtgtcccaa
61  tgtgacaaga ccgtatactt cgtgagaaag gtgagctccc tgggcaagga ctggcacaag
121  ttctgtctca agtgtgagcg ctgcaacaag acactgacct ccggcggcca tctgagcat
181  gatgggaagc ccttctgcca caagccctgc tatgccacac tgtttggacc caaaggcgtg
241  aacatcgggg gcgctggctc ctacatctac gagaagcctc agaccgagc ccctcaggtc
301  actggcccc a tcgaggtccc tgtggtgaga actgaggagc gaaagaccag cggccccccc
361  aagggtccca gcaaaagcctc tagtgtcacc acattcactg gggagcccaa catgtgtcct
421  cgatgcaaca agagagtgtc ctgcgtgagc aaggtgacct ctctgggcaa ggaactggcac
481  cggccctgcc tgcgctgtga gcgctgctc aagaccctga cccagggcgg gcatgctgag
541  cacgatggcc agccctactg ccacaagcct tgctatgga tactctttgg acccaaggga
601  gtgaatactg gtgctgtggg cagctatatac tacgacaagg acccggaagg cacagttcag
661  ccctagatct gcagatgctg tcctcggggg cccctgtttt gaccggagg caaagtggcc
721  tgttgccctag tcctgacctc gcgtgtctcg cctgcaaatc cgggacctaa gtggtggagg
781  agaaagcctg gatagtccca gagcttcagc cccctttgtc accttggcgt gtcccgtgct
841  gccaccgtt tacttccctg ctgtgtgcct ccgtagcccc atgggtcctg tgttccctgtg
901  tccctgatag ctctccaagg tgactgtcct atgatatata cctttgccc cactgcccc
961  ccagtattat ttatgctctg cttgccggtg atggccgtga gctcacagca ttcccagggt
1021 gatggctggt gcccttgcca ggagccctct gctggttcca cactactccc tacctacctt
1081 cacatgggtc atggctatgg agacttttgc tgtcaataaa tagtttggtt tgaggattgc
1141 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaa

```

B.

```

MASKCPKCDKTVYFAEKVSSLGKDWKFKLKCERCNKTLTPGGH
AEHDKPFFCHKPCYATLFGPKGVNIGAGSYIYEKPTQTEAPQVTGPIEVPPVTEERK
TSGPPKGPSKASSVTTFTGEPNMCPRCNKRIFYAEKVTSLGKDWHRPCLRCRCSKTL
TPGGHAEHGQPYCHKPCYGILFGPKGVNTGAVGSYIYDKDPGTVQP

```



A.

```

1  ccagctcaga gcaggatggc ggcgacaaatg tctgaacctc ggctgtgtggg cttcgtgggt
61  gcaggccgca tggcgaggc cattgcccga ggcctcatcc aagcaggcaa agtagaagct
121  aaaagagtgc tggccagtgc accaacggac acaaacctct gccacttcag ggctctgggt
181  tgccagacta ctcaactcca ccatgagggtg ctgcaaaact gccacttgt catctttgcc
241  accaaacccc aagtccctgc aactgtcctg gcggaagtgg ccccatagt caccactgag
301  cacatcatcg tatctgtggc tgctgggac tctctagca caatggaggg gctgttacct
361  ccgaacacac gattattgcg agtctctccc aatctacctt gcgttgtcca ggagggggcc
421  atggtgatgg ccgggggcca ccattgctgg aacgatgacg cagagctcct acagaacttg
481  ctggaagcct gtgggcagtg catagaggtt ccgagtcctt acgtagatat ccacacccgt
541  ctcaagtggc gtggtgtggc ctttgttgtt acattttcag aggccctggc tgaagggtgc
601  atcaaaatgg gcatgcccag tggcctggcc caccgcattg ctgctcagac cctgtgggg
661  acagccaaag tgctgcagca ggaagggaag caccagccc agcttcggac agatgtgctc
721  acaccagctg gaaccacctt ccattgggttg catgccctag agcggggcgg ttttcgagcg
781  gctaccatga gtgcgtgga agcagctacc tgccgggcta aggagctcag caagaagtaa
841  ggcaggcctc agatgagact acgggctcct tgcccagctg cagcctctgt ggtgagaata
901  gccctggacg ggagatgtag tgggcagtcc tctaaagtga atggctaatt tatccaagaa
961  gcggtgacta cttgtaagat gctatcaaga cggggttgcc ttgactgtga cattcagtca
1021  aggaagaatc gcttgccccct tacctgagat tccagatcct cctctctgca cctcctggcc
1081  agttgcagtt gtgtccctcat ggtcacagga gctggtagaa tatgtctcct gtggaggtgg
1141  tagacatcat cctccatgct ggcgtgagac gtctttggtt gtggctgctt tgggatcacc
1201  cacactccgt aagcagcgcc ccgtccatat tctctaagcc caataaactc attggttctc
1261  taataaaaaa aaaaaa

```

B.

```

MAATMSEPRRVGVGAGRMAEAIARGLIQAGKVEAKQVLASAPT
DNNLCHFRALGCQTHSNHEVLQNCPLVI FATKPQVLPTVLAEVAPIVTTEHIIVSVA
AGISLSTMEGLLPNTRVLRVSPNLP CVVQEGAMVMARGHHAGNDDAELLQNLLEACG
QCIEVPESYVDIHTGLSGGVAFVCTFSEALAEAGAIKMGMPSGLAHRIAQTLLGTAK
MLQOEGKHHPAQLRTDVLTPAGTTIHGLHALERGGFRAATMSAVEAATCRAKELSKK

```

9

A.

```

1 ctacagaaaag gagcccttct cagcctgcag tggaccccat ctgctcgggtt aaggagccac
61 ggcgggtgcc gggagggaaa ccagcgtttg gcctgccgtg aagaggtccc agaagagcca
121 tggcaggtgt ctgtgacatg gccctaatt tcctttcccc atctgaagac caggccttgg
181 gtcttgccct tggcagagaa gttgctttga attgcacagc ttgggtgttc tctaggcccc
241 agtgtcccca gccatcagtg cagtggctga aagatggctt ggcattgggc aatggaagcc
301 acttcagcct ccatgaggac ttctgggtca gcgccaactt ctcagagatt gtgtccagtg
361 tcctggtgct caacttgacc aatgcagagg actatggaac cttcacctgt tctgtctgga
421 atgtcagctc ccattccttc actctttggc gagctggccc tgcctggccat gtggtgcgag
481 tactggcttc cctcctggtc ctggtgggtc tgctgctggt ggccctgctc tatgttaagt
541 gtcggctgaa catgctgctt tggtaaccaag acaacttacgg ggaggtggag atgaacgatg
601 ggaagttata cgatgcctac gtgtcctata gcgactgcc agaggaccgc aaatttgtaa
661 attttattct gaagcctcag ttggagcggc gtcggggata caaactcttc ctgagggacc
721 gcgacctctt gcctcgcgcg gagccctctg ccgacctttt ggtgaacctg agtcgctgtc
781 ggcgtctcat cgtggttctt tcagatgcct tcctaagccg gccctggtgt agccagagct
841 tcggggaggg actgtgccgc ctactggagc tcacccgcag acctatcttc atcacctttg
901 agggccagag gcgtgagccc atacaccctg ctctccggt cctgcgccag caccgccacc
961 tcgtgacctt ggtgctttgg aagcctggct ccgtgactcc ttctctgat ttttgaaag
1021 agctacagct agcactgcc cggaaaggtc agtacaggcc ggtggaggga gacctcaaa
1081 cccgacttca ggatgacaaa gatcccatgc taatcgtgag aggacgtgct gcccagggcc
1141 ggggcatgga gtcagagctg gatccagacc ctgagggaga cctgggtgtc cgtggacctg
1201 tctttgggga gccaccaact ccactgcagg aaaccaggat ctgcatagga gagagccacg
1261 gcagtgaat ggatgtctct gacctcggct ctcgaaacta cagtgcacgg acagacttct
1321 actgcctcgt gtctgaggat gatgtgtagc ccataatcca gcagcccaga ccatgagatc
1381 acggtggcag cttccagggt agaggcagca ggcactcctt cctaggatca caacccttgc
1441 ctctatccct gggccctca ggaaggagt gtggcccag ggtgtcaca aataaaatcc
1501 tggttggttc tgaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1561 aaaaaaaa

```

B.

```

MAGVCDMAPNFLSPSEDQALGLALGREVALNCTAWVFSRPQCPQ
PSVQWLKDG LALGN GSHFSLHEDFWVSANFSEIVSSVLVNLNTNAEDYGTFTCSVWNV
SSHSFTLWRAGPAGHVA AVLASLVLVLLVLLVALLYVKRLNMLLWYQDTYGEVEMND
GKLYDAYVSYS DCPEDRK FVNFI LKPOLERRRGYKLFLEDRLDLPRAEPSADLLVNLS
RCRRLIVVLSDAFLSRPWCSQSFREGLCRLLELTRRPIFITFEGQRREPIHPALRLLR
QHRHLVTLVLWKPGSVTPSSDFWKELQLALPRKVQYRPVEGDPQTRLQDDKDPMLIVR
GRAAQGRGMESELDPDPEGDLGVRGPVFGEPPTPLQETRICIGESHGSEMDVSDLGSR
NYSARTDFYCLVSEDDV

```

图 10

```

1 aaggccccct cctctggacc ctctctctccg gccagagtca ataccacacc tagatgacat
61 caccctgcca cccataggag ctccaggcttt tgcccatctg agggcgtgct ggccagggtgc
121 cggtggccac cttgtgcgca tgctcggttag ctgcacagtgc cgcattgctcg gtagctgcac
181 aatgcatctt aggcagcgtc ctctctgacc cttgtgcaag accatcctgg tattggcgct
241 taggaagggtg taagcagcag agtctggtgt ccacaaaaag aaaaaaaat gtttttagtat
301 agtgagaagc aaaagagaaa caactccaat tgccttgag cgacgaactt ccatggcaga
361 acttttaggtc agtcacaaac agctccgcttt tgaatacacg aaacctcct tgtaccaacc
421 gccgcatgtg tatatccaga tgtgtgggtg tacaactgtg gcgattccga attgcatttt
481 ttataaacgc gatacgctga catattttag tgaaggtcag cagttttcta acttgtgctt
541 aagaattatt gggaaatgaa aatgcatttc tatctagttt cctggaaata tttctacca
601 aaatagagaa gaaaagaagg aaagaaagaa agaaaaaaa agaaaaggta gaagcatgcc
661 tatctgcoac cgagtgatcc cctgcttaac ctaaacacca gcgatttgta gatgtaact
721 gcctttggaa aaatagcttc ttagtccaac gtgactgggg tcaactggta cccactgcag
781 gatttaatta tgacttctcc tatcccaagg aggtgaaatg tagcgggggtg ggggtggggg
841 gaactgagga gtcatatagt ctggccaatg tttcctcct tagtgattca ttatcttgaa
901 aacaccagtt ttgctccgcc cccccccca atggcatctt ggaatccatc atcaagctag
961 tattgctgctc tcaggaaaac atgggagcat gtggcttttg cagcgaggat gagcctgaac
1021 ttggagaaga tcaagaccat gcatggtcga tcttcattgac agaggagtct ggtagggccca
1081 ccatggctcc catcacggcc tctcataggc aacaccaca ttttcagttt ggttctatga
1141 ctcgacccca tcaccacaca acaagatggc tcagggggtc cagtcaaggc ttccagaaac
1201 cagcctttct ctcttgggga aaggaggga gccagtctta aagggtgctag atcatgtccc
1261 ttctgctgga gggtcaccag ggtgcacct ggtagtagtc ccatcttagc cccagaaggc
1321 tctccagac aagggaacgc agtgaaacgg ccagccggca tccatcagcc actggactgg
1381 cctttgactc taacacggta gaaattagac cacgaaagg attcattgtag tgctatgga
1441 gattagagga atgatccaca aaggagaagt agttttaaca gtcaacacag tgcgataaac
1501 gatacctttg tttcctgtat atgacaagag accttcaact ttctaagcat gggcctgcct
1561 gtctttgagc atgccaaga tgacaagagc aatggagcca agcagaaatg gcctgggcat
1621 ggtgacagct tctccaagga tacacataac tgactcagag gcaaagtgg tctgtatccc
1681 ttctatgget ctgagttggg cgtccttggc ctcgatgca tctgactgta gccagcttcc
1741 atgggtcttg cccattctgg agacacacac ggtagataga cagagaagaa acaggtcttt
1801 tccctttggc tctgcatgat actgggatac tgagctgggc attccataat agtagcccat
1861 gccatgtcag ttacacacac acacacacaa atatttatc ttttagcagg cacaacctgc
1921 aggtataagt ttggttggcc acttagctct ccaagttagg acccgctcc acagctgtac
1981 ctgctgaggg caggtaactca gcaatacaga gttcgatgtg attatagaat gtggtgcagt
2041 atgttaggct gttgtggtca aagtggtagc aatgttagat ctatgtaccc tcattaggtg
2101 gactagagct ttgcccta atcagacacc atcacatatg gtacccacc tggcctggc
2161 cctggcttgc tttctccatc acagacacc atcacatatg gtacccacc tggcctggc
2221 tctgagatcc aggtggccag agctgctatg attcctctgc ctccatgctg ctatgatccg
2281 gacctctcg catggaaacc cgagtctgtc tcccttccca ggctggggaa ctgcgccctc
2341 ccctcctgcc acagacagac ctgccaacaa gctctgttct tcatggagtc aggaggtcct
2401 gctggcctgc agcaactcag ttgccttggg ctgggactgc attcttgta tgtctggatg
2461 ggtttggggc tggaggtcag gtactctggg attagctgaa gggggcacag tgttctttgt
2521 cctgcccctc cggttaactg tgctccatat ttgtgttgaa ctctaaaagc atattaaagt
2581 gaacctgagg g

```

图 11

A. 1 tgattttccgt ccaggccgga actcaagatg gctgcgttct tgctgagaca tgtcagccgt
61 cactgcctcc gagccaccc gaatgctcag ctttgtatca gaaatgctgc tcctttggga
121 accacagcta aggaggagat ggagcggttc tggaagaaga acacgagttc aaaccgtcct
181 ctgtctcccc atttgactat ctacaaatgg tctcttcccta tggcactgtc cgtttgccac
241 cgaggctctg gaatagocctt gagtggaggg gtctctcttt ttggcctgtc ggcactgctg
301 cttcctggga actttgagtc atatttgatg tttgtgaagt ccctgtgttt ggggccaaca
361 ctgatctact cggctaagtt tgtgcttgtc ttcccgtca tgtaccactc actgaatggg
421 atocgacact tgctatggga cctaggaaaa ggccctggca taccaccagg ctggctgtct
481 ggagtggcgg tcgtggttct tgctgtgttg tcccttgggc ggctggccgc cctgtgaaga
541 gctggagttc ccagcaccctc tgtacatcat caaactgatt tatattcctg tttatcacta
601 tccccacccc tccccccag cctcccagg tctcctgatt tgttttagatg ccacatgctt
661 tcaatccoct tggagtgcag tagagcggct taaagacctg ttgtagtaag aaagggtcat
721 cctccctggg cctgggagcc cttgctccgg ttccacattt gactgatttg tgcagagggt
781 cagctttccg ctgctttctg ctgagacagt ggaaacaatg ccagtctctgt gaccgccccg
841 agtggcactg cctgtgggct gctggcctaa aggacacttc tgtccattgg tcagcttagg
901 gccttttagca cccacaccgc gtgactgaga ggagagaggt ggaggaggag ggattgtcct
961 gctcagctag agggagataa agagcagcct gggagcttgg agctcgagcc tgggaacaga
1021 tacagctttt gatgtatgag gaagatcaaa aaaaattgta ttaagtttct gttctgtttt
1081 tcattttctag gaaaatacac ctttaatgtc atattttcta atctaaatc ttgtaccatc
1141 ttcttttgaa acgattaaag tactactcat tttatgcttg actctttgga atctagtgc
1201 aggtgggtag aaagggtcta atctctgccc ctccctttgg atcttggaac tttacacct
1261 ccagtatgga gggaaatagt ttgcccaaca actaccactg cgaaaaatga ggtaatcaca
1321 accaagttagt ggagagattt tggccaagga aagaacataa gaagtcagct aagcatgcgg
1381 ggagcttttg ggtgttgta gggcccaggc ctgtggatgg ccagcttggg acttaagcag
1441 accatttggt tatggacacc tagcaccagt ggaggtggag gctaagggct aaatagattt
1501 ggggggaggt aggggaagta gaagagaatt ttttaaaagc agggcaggat tggaggcatc
1561 agagtctctg aagatggata tacagtggga aacgttgctt ctttaccctt actgaggccc
1621 tggatcctta ccaagggtgc tttgtttgtg gtgctagggg tcaaagccag gtccctgtgc
1681 gtgttagcaa gcgctgtacc actacaccag ttccctagcc aggagtgtca ttttgataga
1741 tttttgccaa ctctggagta aaagctccat cttgggacta gagatttggg tccatgtaca
1801 tatgcccaag gcctgtgggt cagtcccaac caaccaagaa aacactactc caagagattg
1861 gtcagagcac tggattgggg agtgattgct ggggtggcag tagacaggaa gacagcatga
1921 actcaaacc gtggcagcag aggtgggctg ggcccagggt aggttgggtt gagggtgtt
1981 tcatttagtct ctgaaatct gtagaaaggg attcaccatt tatcccaaaa tggcctggaa
2041 gtcttaccce gactaccttc cagttggtgt gatcttgctt ctgcctcccg ggtgcatgtt
2101 accacpaccc tcagccctca gcctattcct gatcccaagt agtgtttggc ctcaagcaac
2161 gatcactacc actctcctct agacaggccc cgggaggtct ggtggtgcca ggaattcagc
2221 ccagggtccc atccgtgcta ggcaagcact gaacctgagt caggccttgc caagtacca
2281 gccagccca gacaggcctc gaactgacca cccatctgct tcagcctccc aagtagctgg
2341 aattacagga ccatgctacc acatgcgact gctgggatgt cctgtagatt tcatccagcg
2401 tcaatcaggt tgccttaga gtagagtcag agttcatggg gaaacacttt tgctttagac
2461 ttggcaaggg cattaaattc aacaaccagt gccagaaaga tgtatagaca gggcaagggt
2521 caacatattg gcaggtggg aaattaatgt ggacattttt actttttttt ttgatggctt
2581 cttaaccagt gattggaggg aagtaggtcg cctggcttct ttatttttct ctttgaagc
2641 cggctctgtag gcttatatat atatatatat atattttttt ttaagattta tttatttatt
2701 atatgtaagt aactatagt tgtcttcaga taccocagaa gagggcatca gatctcatta
2761 cagatggttg tgaaccaoca tgttgttgtt aggatttgaa ctacaggact tcagaagagc
2821 agacagtgtc cttaactgct gagccatctc tccagccctg gcttatatct tttaaaacct
2881 agtttaataa gggcatttaa aggccttaac ctccctttct aacctaccac ccagcagagg
2941 tagtgggaag gaaaggtag taaccagaca tttttacttc actggtctgt caagataact
3001 cagcgggtgc aggtctggc cccaagcct gaggaacgca gtttgatccc aggatccacg
3061 tgtcagaagg atccacccct cgtaagctgt ctctggcttc cacgtgcttg aggcacacct
3121 ccatgcatac gtaaaagtcaa tgaatgcgtg taataaaggc ttgtgtgctc t

图 12

B. MAAFLLRHVSRLRAHLNAQLCIRNAAPLGTTAKEEMERFWKK
 NTSSNRPLSPHLTIYKWSLPMALSVCHRSGIALSGGVSLFGLSALLLPGNFESYLMF
 VKSLCLGPTLIYSAKFVLVEPLMYHSLNGIRHLLWDLGKGLAI PQVWLSGVAVVVAVLAV
 LSSGGLAAL

图 12(续)

A. 1 gttggtggcg agctaagggtg gaggcaagca gggcgggcga cggcgacagt ggcggcagtg
 61 ccatgggtggg gctcgcagga tccctgctgc cttggtgatc ccgggctgac agccagagag
 121 cacagcggct cagctcctgg agagagagtc gaagaaagcg aagggcagcc acctgtgcct
 181 gctggctccc attaggtcgg ttccctgcagc ggtgcctggc agccttggtg aaggccctgc
 241 ccggcagaga tcatgtattg cctccagtggt ctgctgcccg tcctcctcat ccccaagccc
 301 ctcaaccccg ctctgtggtt cagccactcc atgttcatgg gcttctacct gctcagcttc
 361 ctccctggaac ggaaaccttg cacaatatgt gccttggttt tcctggcagc cctctttctc
 421 atctgctata gctgctgggg aaattgtttc ctgtaccact gtcocgattc cccacttccg
 481 gaatcagccc atgaccccgg tgtgtggggc acctaacgtc tgccgagata gcttgccaag
 541 gaagcagaag acggggagggg aggcattgac ataggtcata aagcattgga gtttcaaate
 601 ccgcagtcct gcgggtacca cattcctaatt ggagcctttt ggctgtgat gttttatcct
 661 tacaatgtga ataattggcag tgatcggtagc ttctgttgta gagtccgtga gtcgtgggtg
 721 gtcttatggt tgtgtgttct gtcaccatct ggggtcccgc tgacggattg gccaccccc
 781 ttgctcattg atttggggaa tctataccct tgatatgacc tgtgtggata cagtgtagtc
 841 tcaatgtcac ctccataacc ctccctcgtc aagaccttcc tcgttccctc ctctctccct
 901 ttccccggtt tccccctggg tcaacttccaa cccctttcct tttttgggga gcacctgtcc
 961 aagacagggc ttgtttttgc acttatctca aatttgaaga gattgtgat gcccgagagc
 1021 ctgcgttttt catccttctg tcccttttga gaaggtgaga cgggaatcatg tctcaactgc
 1081 tggttgtctg cagacctcca gtatttccct tgccctcatt ttaagaaaga agcgatgggg
 1141 agacattgct ctttggectg ggtatctggg ctccctgcct ccagcccagc ctctctccct
 1201 ttgctcttcc tcctgtctct ctacgtgac cttaaaggggc caccctcatgt ctccagtga
 1261 tgctcttcag gagggagatg tgcagtatcc tcgtagaccc agtgggtccct ggctgagtga
 1321 atgagaaagt attacatttt tcatagcagc catgattccc ttggtaggtg tttggatatt
 1381 tttgatgtgc cctgtatgta tgtgtgcaact agtgtcagcg tgtatgtaca cactgatgtg
 1441 tgaatgtgtg ttgtgtgtgt gtttacatac caatacatgt gtatattcct tttgaagaag
 1501 ctttatttgaa tatgttctga ttttgagggt tagtagtagt agctagctgt agtaggtcct
 1561 gctgcagttt ttatttagca tggggattgc agagcgacca gcacagtggg ctccaagggtg
 1621 gttcagacaa gacccagggg agcagtcgcc atcatcctcc caccaggagc ttcctcattg
 1681 ctgcgcacgt agactgtaca ctatgaagaa aacacaggaa gaaagatttg gtgacttggg
 1741 acttgttttc ttttctctgc gcttcagaaa caagtgtttg caaatgagac tttctcctgg
 1801 cccctaccca ctggggatca gcatggttgt tcttccagtc ggaaatgtac cccctcctt
 1861 tccccctctt gtgtgcaagt gggggggggg gcaggcatag gacagagctg gaagcaggct
 1921 tctggggagt gggacttaga ggccacactt gtgaaacact cggactgctg ttgtaaaagt
 1981 tttattttctg gtgtgttctg tccacagctg tttgaaatgt ttaataaagc tttataaaact
 2041 ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

B. MYCLQWLLPVLLIPKPLNPALWFSHSMFMGFYLLSFLLERKPCT
 ICALVFLAALFLICYSCWGNCFLYHCSDSPLPESAHDPGVVGT

图 13