(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111247163 B
(45)授权公告日 2024.11.26

(21)申请号 201880068213.4

(22)申请日 2018.08.21

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111247163 A

(43)申请公布日 2020.06.05

(30)优先权数据
2017903381 2017.08.22 AU
2018902298 2018.06.26 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.04.20

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2018/050883 2018.08.21

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/036753 EN 2019.02.28

(73)专利权人 莫纳施大学
地址 澳大利亚维多利亚
专利权人 西澳大学

(72)发明人 K·D·G·普莱杰 M·C·托马斯
R·J·皮克林 C·罗萨多
C·蒂凯利斯

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 胡志君 黄革生

(51)Int.Cl.
C07K 14/00(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
A61K 31/00(2006.01)
G01N 33/15(2006.01)

(56)对比文件
US 2009220484 A1,2009.09.03
Endy Widya Putranto等.Inhibition of RAGE signaling through the intracellular delivery of inhibitor peptides by PEI cationization.《INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE》.2013,第32卷938-944.
Endy Widya等.Inhibition of RAGE signaling through the intracellular delivery of inhibitor peptides by PEI cationization..《INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE》.2013,第32卷938-944.
Alexander Slowik等.Involvement of formyl peptide receptors in receptor for advanced glycation end products (RAGE) - and amyloid beta 1-42-induced signal transduction in glial cells.《Molecular Neurodegeneration》.2012,第7卷55.
Richard R. Kew et al..The IKKα-Dependent NF-κB p52/RelB Noncanonical Pathway Is Essential To Sustain a CXCL12 Autocrine Loop in Cells Migrating in Response to HMGB1.《J Immunol》.2012,第188卷(第5期),2380-2386. (续)

审查员 刘俊

权利要求书2页 说明书271页
序列表64页 附图84页

(54)发明名称

渐进性糖化终极产物受体(RAGE)活化的筛选测定法、调节物和调节

(57)摘要

根据候选物质调节RAGE活性的能力来筛选候选物质的方法,其中这种RAGE活性由共定位的活性型GPCR诱导,所述方法包括以下步骤:使RAGE多肽与GPCR多肽在候选物质存在下接触,其中所述GPCR多肽是组成型活性的和/或通过添加该GPCR的激动剂、部分激动剂或变构调节物而活化的;和通过检测指示RAGE活化受候选物质的存在而调节的效应和/或通过检测受候选物质的存在而调节的RAGE依赖性信号传导,检测候选物质是否为通过共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物。

CN 111247163 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Weizhong Zhu et al..Interaction of β1-adrenoceptor with RAGE mediates cardiomyopathy via CaMKII signaling.《JCI Insight》.2016,第1卷(第1期),e84969.

Yokomizo等.Modulation of leukotriene B4 receptor 1 signaling by receptor for advanced glycation end products (RAGE).《The FASEB Journal》.2016,第30卷(第5期),1811-1822.

Michaele B等.Small Molecule Inhibition of Ligand-Stimulated RAGE-DIAPH1 Signal Transduction..《scientific reports》.2016,第6卷22450.

1.抑制RAGE配体非依赖性信号传导的分离的或纯化的肽,所述肽由以下组成:

(i)SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基22至390;

(ii)SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基380至404;

(iii)SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基22至404,其中残基391是Y、C、V、R、N、K、H、G、F、E、D或A;

(iv)SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基342至404,其中残基391是A;

(v)SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基370至390;

(vi)SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基370至390,其中残基379是K;

(vii)SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基370至390,其中残基388是A;

(viii)SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基370至390,其中残基380是A;

(ix)SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基370至390,其中残基382是A;

(x)SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基370至390,其中残基384是A;

(xi)SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基374至390;或

(xii)SEQ ID NO:2、5、6、7、8、9、10、11、12或13所示的氨基酸序列。

2.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基22至390组成。

3.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基380至404组成。

4.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基22至404,其中残基391是Y、V、R、N、K、H、G、F、E、D或A组成。

5.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基342至404,其中残基391是A组成。

6.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基370至390组成。

7.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基370至390,其中残基379是K组成。

8.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基370至390,其中残基388是A组成。

9.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基370至390,其中残基380是A组成。

10.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基370至390,其中残基382是A组成。

11.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基370至390,其中残基384是A组成。

12.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:14所示的野生型RAGE的残基374至390组成。

13.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成。

14.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:5所示的氨基酸序

列组成。

15.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成。

16.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列组成。

17.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列组成。

18.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列组成。

19.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列组成。

20.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列组成。

21.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列组成。

22.根据权利要求1的分离的或纯化的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列组成。

23.融合多肽,其包含根据权利要求1至22中任一项所述的肽。

24.核酸,其包含编码权利要求1至22中任一项所述的肽或权利要求23所述的融合多肽的核苷酸序列。

25.药物组合物,其包含治疗量有效的根据权利要求1至22中任一项所述的分离的或纯化的肽、根据权利要求23所述的融合多肽或根据权利要求24所述的核酸。

26.根据权利要求25的药物组合物,其进一步包含一种或多种赋形剂。

渐进性糖化终极产物受体(RAGE)活化的筛选测定法、调节物和调节

发明领域

[0001] 本发明总体上涉及用于鉴定与某些疾病和/或病状相关的受体活化的调节物的筛选测定法、涉及这类调节物和涉及包括施用这类调节物的治疗方法。更具体地,本发明涉及借助RAGE配体非依赖性机制(也称作RAGE配体非依赖性RAGE反式活化),以及调节或不调节RAGE受RAGE配体(包括S100A8/A9、渐进性糖化终极产物(AGEs)和HMGB1)活化的情况下,渐进性糖化终极产物受体(RAGE)通过某些共定位的活化型G蛋白偶联受体(GPCRs)(包括活化型1型血管紧张素受体(AT_1R)和活化型CC趋化因子受体2(CCR2))活化的调节物。本发明还涉及用于鉴定这类调节物的筛选测定法和使用所述调节物治疗RAGE相关病症的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 渐进性糖化终极产物受体(RAGE)是属于免疫球蛋白(Ig)超家族的多价I型跨膜糖蛋白(Neeper等人,1992)。50-55kDa糖基化的RAGE蛋白在有限范围的细胞(例如,血管内皮、II型肺细胞、白细胞)中组成型表达,虽然在损伤和炎症后,大多数细胞类型和组织中可以诱导RAGE表达(Ballinger等人,2005)。RAGE表达在重要的炎性疾病和代谢疾病中明显上调,所述疾病包括但不限于心血管疾病(CVD)、癌症、糖尿病、慢性肾病(CKD)、缺血性损伤和阿尔茨海默病(Yan等人,2010)。

[0004] 先前已经显示,小鼠中遗传缺失编码RAGE的AGER基因导致受保护而免于众多疾病和疾病过程,包括某些癌症(Malik等人,2015)和炎性疾病(Chuah等人,2013),后者包括动脉粥样硬化和糖尿病并发症。例如,在载脂蛋白E(apoE)敲除(KO)小鼠中,缺失RAGE导致随年龄增加但出现较少的斑块积累并且减弱糖尿病加速的动脉粥样硬化(Soro-Paavonen等人,2008)。类似地,缺失AGER能够在不影响葡萄糖控制的情况下,减弱糖尿病小鼠中的肾损伤(Thomas等人,2005)。

[0005] AGER基因中的多态性已经与人类中的众多疾病和疾病过程相关,包括但不限于关节炎、动脉粥样硬化和糖尿病并发症、癌风险、肥胖症、癫痫和认知损害,包括阿尔茨海默病。

[0006] 通过渐进性糖化终极产物(AGE)和非AGE配体(包括蛋白质家族S100钙粒蛋白成员、HMGB1、淀粉样蛋白和Mac-1)与RAGE胞外结构域结合,激活了一系列参与炎症、损伤和功能障碍的信号转导级联(包括核因子κB(NFκB)和肾素-血管紧张素醛固酮系统(RAAS))。

[0007] 在实验模型中,使用可溶性诱饵受体抑制配体介导的RAGE活化,减弱了动脉粥样硬化形成和血管损伤(Schmidt等人1999),提示这些环境下RAGE的病理作用部分地由配体介导的RAGE活化介导。

[0008] 借以活化RAGE并且表现出其全部生物学效果的精确分子机制知之甚少,并且因此,临床环境下尚未出现靶向这些临床上重要的信号传导途径的能力。

[0009] 肾素-血管紧张素醛固酮系统(RAAS)是关键的体内稳态途径,其还参与许多常见疾病和疾病过程的形成和进展。以血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂或血管紧张素II受体1型(AT_1R)阻滞剂(抑制剂)对肾素-血管紧张素醛固酮系统(RAAS)的抑制广泛用于管理许多疾

病和/或病状,包括高血压、心血管疾病(CVD)、心力衰竭、慢性肾病(CKD)和糖尿病并发症。RAAS抑制也已在预防糖尿病(Tikellis等人,2004)、神经保护(Thoene-Reineke等人,2011)、调节某些癌的生长(Shen等人,2016)和甚至在衰老方面显示有益,同时遗传缺失AT_1R在小鼠中带来长寿(Benigni等人,2009)。

[0010] RAAS阻滞剂的这些作用是额外的并且与RAAS阻滞剂带来的血压降低无关,因为采用其他药物可比地降低血压并未带来相同的益处(Lee等人,1993)。具体而言,AT_1R受血管紧张素II(Ang II)活化通过与造成血管收缩的那些途径不同的途径,触发氧化应激的诱导、活化核因子κB (NFκB)和炎症。

[0011] 已知肾素-血管紧张素醛固酮系统(RAAS)的活化是动脉粥样硬化的重要媒介(Lee等人,1993;和Jacoby等人,2003)。在输注血管紧张素(Ang)II后动脉粥样硬化形成增加并且在实验模型中与生理性RAAS活化相关,包括低盐膳食(Tikellis等人,2012)、糖尿病(Goldin等人,2006;和Soro-Paavonen等人,2008)和遗传缺失血管紧张素转化酶2(Ace2)(Thomas等人,2010),与其对血压稳态的影响无关。类似地,抑制RAAS具有额外的和与全身性血压降低无关的抗动脉粥样硬化作用(Candido等人,2002;Candido等人,2004;和Knowles等人,2000)。Ang II具有众多促动脉粥样硬化的直接作用(Daugherty等人,2000;Ferrario等人,2006;和Ekholm等人,2009),包括诱导氧化应激(Rajagopalan等人,1996)、血管黏附(Grafe等人,1997)和炎症(Marvar等人,2010)。

[0012] 认为这些促动脉粥样硬化作用主要由1型血管紧张素受体(AT_1R)活化和后续诱导活性氧类(ROS)及激活NFκB信号传导介导(Li等人,2008)。但是,奠定这些作用的信号传导机制知之甚少,包括它们与借助AT_1R的常规血管收缩物信号传导的相对独立性。

[0013] 还已经显示动脉粥样硬化的发病机制涉及某些趋化因子信号传导途径,同时巨噬细胞浸润入动脉病灶直接促成这种异常的炎性疾病(Boisvert等人,2004)。实际上,全部已知的CC和CXC趋化因子受体,以及CX3CR1和XCR1,均已参与炎症(Murphy等人2000;Zlotnik和Yoshie 2000)。趋化因子配体(CCLs)的主要生理功能是"常规的免疫监视、炎症和发展期间调节细胞移行"(Allen等人,2007)。CCL响应于促炎细胞因子释放并且选择性地结合于庞大家族的G蛋白偶联受体,后者介导对趋化因子的生理应答。趋化因子最初称作趋化性细胞因子。

[0014] 慢性炎性疾病的动物模型研究已经显示,通过拮抗剂抑制MCP-1(单核细胞趋化蛋白-1,也称作单核细胞趋化蛋白-1、单核细胞趋化和活化因子(MCAF)、和趋化因子(C-C基序)配体2(CCL2))与CCR2(趋化因子(C-C基序)受体2)之间的结合,阻抑炎症反应。MCP-1与其相应受体CCR2之间的相互作用已经牵涉(Rollins,1996;Dawson等人,2003)炎性疾病病理学,如葡萄膜炎、动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、多发性硬化、克罗恩病、肾炎、器官同种异体移植排斥、纤维样肺、肾功能不全、糖尿病和糖尿病并发症、糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性视网膜炎、糖尿病性微血管病、结核病、类肉状瘤病、侵袭性葡萄球菌感染、白内障手术后炎症、过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、慢性荨麻疹、过敏性哮喘、牙周病、牙周炎、牙龈炎、牙龈病、扩张性心肌病、心脏梗死、心肌炎、慢性心力衰竭、血管狭窄、再狭窄、再灌注病症、肾小球肾炎、实体瘤和癌症、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓样白血病、多发性骨髓瘤、恶性骨髓瘤、霍奇金病和膀胱癌、乳腺癌、子宫颈癌、结肠癌、肺癌、前列腺癌或胃癌。

[0015] MCP-1和CCR2KO小鼠均已经显示在这些信号传导途径不存在的情况下,单核细胞

向炎性病灶的浸润显著减少。此外,这类KO小鼠抵抗实验性变应性脑脊髓炎(EAE,人多发性硬化模型)、蟑螂变应原诱导的哮喘、动脉粥样硬化和葡萄膜炎的形成。在与减少MCP-1表达和浸润型巨噬细胞数目相关的剂量水平的TNFα拮抗剂(例如,单克隆抗体和可溶性受体)治疗期间,类风湿性关节炎患者和克罗恩病患者得到改善。

[0016] MCP-1已经涉及季节性和慢性过敏性鼻炎的发病机制,已经发现其存在于大部分出现尘螨变态反应的患者的鼻粘膜中。也已经发现MCP-1在体外诱导组胺从嗜碱性粒细胞释放。在过敏性疾病期间,已经显示过敏原和组胺触发(即上调)过敏性鼻炎患者的鼻粘膜中MCP-1和其他趋化因子的表达,提示这类患者中存在正反馈回路。

[0017] 肾脏疾病与特征为肾脏巨噬细胞聚集的慢性炎症相关。已经确定糖尿病性肾脏产生单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1/CCL2)为源自糖尿病性肾病的肾脏疾病中影响巨噬细胞聚集的主导因素(Tesch等人,2008)。在多种动物模型中,抑制CCR2和/或抑制特定CCR2途径和/或抑制CCR2配体MCP-1已经显示减少肾损害(Tesch等人,2008;Rao V等人,2006;Kang等人,2010;Kitagawa等人,2004;Park J等人,2008)。

[0018] Tesch(2008)指出,已经证明在阻抑肾脏疾病(包括糖尿病性肾病)的动物模型中,选择性靶向MCP-1是有效治疗。包括CCR2的小分子拮抗剂(INCB3344、丙帕锗、RS-504393)的治疗已经显示在多发性硬化、肾缺血-再灌注损伤、输尿管阻塞和糖尿病性肾病的小鼠模型中及关节炎的大鼠模型中抑制炎症。也已经证明工程化的CCR2生物学拮抗剂有效。已经发现在狼疮性肾炎的小鼠模型中,皮下输注载体转染的细胞抑制肾炎症形成,其中所述载体表达MCP-1的截短无活性形式。类似地,在肾缺血-再灌注损伤、狼疮性肾炎和糖尿病性肾病的小鼠模型中,采用7ND(MCP-1的一种突变体)的肌肉转染减少肾炎症。迄今,趋化因子单药疗法用于炎性疾病的人体试验尚未得到药物批准。Anders HJ等人考虑了单一趋化因子拮抗剂治疗为何尚未在疾病治疗中有效的原因并且讨论了可能的解释,包括单一趋化因子介质的冗余性和趋化因子受体的可变表达模式(Anders HJ等人2010)。因此,本领域需要有效治疗因激活CCR2途径所致的疾病。

[0019] 重要地是指出了,可以按RAGE配体非依赖性方式借助作为本发明主题的共定位的活化型GPCR活化RAGE的构思对众多GPCR、尤其与炎症和细胞增殖相关的那些GPCR具有意义。

[0020] 正是在这种背景下,描述了某些共定位的活化型GPCR(包括AT_1R和CCR2)和RAGE之间以RAGE配体非依赖性方式的新型功能性相互作用。

[0021] 发明概述

[0022] 已知RAGE信号传导、肾素血管紧张素醛固酮系统(RAAS)和某些趋化因子信号传导途径在涉及血管并发症形成和进展的途径中功能地相互作用。例如,RAGE配体与RAGE结合能够诱导促炎信号传导,这可以由AT_1R的拮抗剂(抑制剂)减少(例如,Fukami等人2004)。同等地,AT_1R受体被Ang II活化增加了RAGE配体的形成和释放,并且抑制RAGE配体与RAGE的结合或减少RAGE配体的干预能够减弱Ang II-AT_1R所致的损伤(例如,Thomas等人2005)。在RAGE配体活化RAGE后诱导的一些下游信号传导途径和介质,尤其是导致炎症的那些,也类似于Ang II活化AT_1R后诱导的那些信号传导途径和介质(例如NFκB活化)。

[0023] 这种现有技术未提示或公开在RAGE和GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某些趋化因子受体(如CCR2))之间复合的任何证据。在任何RAGE配体不存在下或实际上在不需要

RAGE的RAGE配体结合性胞外结构域存在下,未预见通过这种GPCR相应配体活化共定位的GPCR,如通过Ang II活化血管紧张素受体或通过MCP-1活化CCR2,将直接导致活化RAGE,尤其RAGE胞质尾;未预见借助RAGE对信号传导的后续诱导。因此,不能预见,调节RAGE胞质尾的RAGE配体非依赖性活化将涉及调节某种共定位的GPCR活化后所诱导(如通过Ang II与AT_1R结合或MCP-1与CCR2结合所诱导)的信号传导。

[0024] RAGE的突出特征之一是其在自身胞外结构域上的多个位点受多个配体活化,而非可用于抑制的单个配体和单个结合位点。RAGE可以受渐进性糖化终极产物(AGEs)和其他非AGE配体活化,所述的其他非AGE配体包括高迁移率族框-1(HMGB-1),S-100/钙粒蛋白、SAA、Aβ、C3a、热休克蛋白70(HSP70)、酸性和富含半胱氨酸的基质细胞损伤相关糖蛋白分泌型蛋白(SPARC)、β2-整联蛋白Mac-1(CD11b)、磷脂酰丝氨酸(PS)、双链DNA(dsDNA)、双链RNA(dsRNA)、脂多糖(LPS)和高级氧化蛋白质产物。

[0025] RAGE配体活化RAGE胞外结构域触发了NFκB活化和后续的NFκB驱动的基因表达,导致炎症、氧化应激、纤维化和细胞增殖(Bierhaus等人,2001)。

[0026] RAGE配体诱导的信号传导还触发正反馈回路,其中RAGE配体-受体相互作用借助NFκB活化增加RAGE表达,因而增进后续RAGE诱导的细胞活化。实际上,发明人知晓的强烈下调RAGE表达的唯一手段是减少RAGE活化。这种情况与其他受体如低-密度脂蛋白(LDL)受体相反,其中升高水平的配体减少受体表达。

[0027] 重要地,发明人已经显示,活化某些共定位的GPCR(如通过Ang II活化AT_1R或通过MCP-1活化CCR2)后,RAGE胞质尾活化,与任何RAGE配体或RAGE胞外结构域无关,从而启动下游信号传导,所述下游信号传导导致涉及炎症、氧化应激、纤维化、细胞增殖和细胞存活的关键转录因子NFκB活化。缺少RAGE表达,并且尤其缺少RAGE胞质尾中关键结构域的表达,与RAGE胞外结构域的表达无关,阻止了活化共定位的GPCR(如Ang II活化AT_1R或MCP-1活化CCR2)后,对NFκB活化的诱导。不希望受理论约束,发明人认为,某些共定位的活化型GPCR(包括AT_1R和CCR2)对RAGE胞质的RAGE配体非依赖性尾活化是籍此活化RAGE的优势途径。另外并且再次不希望受理论约束,发明人认为,例如遭受损伤、应激或缺氧的细胞中RAGE的从头表达为通过激活已建立的GPCR信号传导而发生的促炎信号传导提供了通道。

[0028] 发明人已经显示,活化某些共定位的GPCR(如通过Ang II活化AT1R或通过MCP-1活化CCR2)后,RAGE胞质尾的RAGE配体非依赖性活化,还触发增加RAGE表达的信号传导。

[0029] RAGE已经涉及肿瘤生物学的许多方面,包括肿瘤细胞生长、移行和侵入(Malik等人,2015;Abe等人,2008)。许多癌具有较高水平的RAGE(示意性实例是乳腺癌、结肠癌、肾癌和胃癌;Taguchi等人,2000)。肺癌例外,其中RAGE表达减少,因为RAGE是肺功能的正常部分并且随着肺部细胞分化并变得更为恶性而损失(Marinakis等人,2014)。在C6胶质瘤细胞中,肿瘤体积在下述肿瘤中明显削弱,所述肿瘤包含其中RAGE受阻断的细胞。相反,过量表达RAGE的肿瘤快速生长并非常高效地侵入周围组织(Taguchi等人,2000)。已经对许多常见的癌要求阻断RAGE信号传导的治疗药作为癌症治疗药,所述癌包括但不限于:多形性胶质瘤/髓母细胞瘤(Taguchi等人,2000);胰腺癌(Malik等人,2015;Leclerc等人,2015);黑素瘤(Malik等人,2015);前列腺癌(Malik等人,2015);乳腺癌(Malik等人,2015);肝癌/肝细胞瘤(Logsdon等人,2007;Volz等人,2010);和结肠癌(Sparvero等人,2009)。

[0030] RAGE已经涉及一系列其中临床前研究和临床研究已经支持RAGE抑制剂可以用于

其治疗中的脑病,包括但不限于阿尔茨海默病(Cai等人,2016)。其中涉及RAGE信号传导的其他脑病包括但不限于:肌萎缩侧索硬化(Ray等人2016);亨廷顿病(Ray等人2016);Creutzfeld-Jakob病(Ray等人2016);神经变性病如糖尿病性神经病、家族性淀粉样蛋白多发性神经病、Charcot神经性关节病和血管炎性神经病变(Ray等人2016);神经病理性疼痛(Wan等人,2016);胶质瘤形成和进展(Angelopoulou等人,2016);和缺血性脑损伤/卒中(Xia等人2010)。

[0031] 在健康状况下,肺的RAGE表达是全部组织中最高的。但是,肺中RAGE表达正常情况下仅见于1型肺细胞中。肺的其他细胞中和其他部位处RAGE信号传导的上调已经涉及一系列肺部病症,包括但不限于:慢性阻塞性肺病(COPD)/肺气肿(Sukkar等人,2012);哮喘(Sukkar等人,2012);归因于吸烟/污染的损伤;急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)(Guo等人,2012);和肺纤维化。

[0032] RAGE严重地涉及众多炎性病症并且因此是其治疗的潜在治疗靶。这类病症包括但不限于:炎性关节炎(Sparvero等人,2009;Chuah等人,2013);骨关节炎(Xie等人,2013);视网膜的疾病(Barile等人,2007);动脉粥样硬化(Soro-Paavonen等人,2008;Schmidt等人,1999;Park等人,1998;Zhou等人,2003;Yan等人,2010);血管钙化(Ott等人,2014);心肌病(第卷等人,2010;Russo等人,2016);缺血性心脏病/心脏重塑/纤维化(Yan等人,2010;Ramasamy等人,2012);心力衰竭(Ramasamy等人,2012);糖尿病性和非糖尿病性肾脏疾病(Fukami等人,2015;Gugliucci等人,2014);炎性肠病(Ott等人,2014);先兆子痫(Daffu等人,2013);多囊卵巢综合征(Garg等人,2015);肝脏脂肪变性、纤维化、缺血性和非缺血性肝损伤(Yamagishi等人,2015);脊髓损伤(Yamagishi等人,2015);皮肤炎症和老化(Tong等人,2014);和角膜炎(Tong等人,2014)。

[0033] 本发明部分地源自发明人确定,RAGE在细胞膜中与某些共定位的GPCR(包括AT_1R和CCR2)形成受体异聚物复合体。

[0034] 另外,本发明部分地源自发明人认识到,活化某些共定位的GPCR,如AT_1R形式的血管紧张素受体,在这种情况下用Ang II活化;或某些趋化因子受体如CCR2,在这种情况下用MCP-1活化,触发了RAGE胞质尾的RAGE配体非依赖性活化。

[0035] 发明人已经显示,活化某些共定位的GPCR(如通过Ang II活化AT_1R或通过MCP-1活化CCR2),导致通过共有机制活化RAGE胞质尾的结构域。这个反式活化途径不需要释放RAGE配体或不需要它们与RAGE胞外结构域结合(即它是RAGE配体非依赖性RAGE活化)。

[0036] 即使存在公开的数据,提示RAGE胞质尾被磷酸化(Sakaguchi等人,2011),但发明人已经显示,活化某些共定位的GPCR(如通过Ang II活化AT_1R受体)后诱导的RAGE配体非依赖性信号传导,不需要RAGE胞质尾在RAGE胞质尾中的丝氨酸391或任何其他位点处磷酸化。另外,发明人已经显示,在RAGE配体(例如S100A8/A9)与RAGE胞外结构域结合后诱导的RAGE配体依赖性信号传导也不必然地要求RAGE胞质尾在胞质尾中丝氨酸391或任何其他位点处磷酸化,因为来自其他哺乳动物的RAGE同源物和缺少能够维持磷酸化的任何残基的RAGE突变体仍能够被活化并且响应于RAGE配体依赖性和RAGE配体非依赖性RAGE活化而诱导信号传导。另外,在RAGE磷酸化的靶不存在下,RAGE的N-截短型构建体(例如$S391A\text{-}RAGE_{362\text{-}404}$)的抑制性功能维持,这证实发明人描述的RAGE构建体的调节性效果与RAGE的磷酸化无关。

[0037] 现有技术表明,PKCζ的抑制剂抑制了借助RAGE的RAGE配体依赖性(例如,s100诱导

的)信号传导,以及许多其他的PKCζ依赖性途径。在人类和动物中,严重疾病因遗传缺失PKCξ所致。研究者已经显示,PKCζ的抑制剂还抑制了借助全长RAGE的RAGE配体非依赖性(即反式活化诱导的)信号传导。然而,RAGE的N-截短型构建体(例如$RAGE_{362-404}$)的调节性功能不受抑制PKCζ影响,这证实发明人描述的RAGE构建体的调节性效果与PKCζ无关。

[0038] RAGE活化后诱导的共有途径(例如myD88、TIRAP、白介素-1受体相关激酶4(IRAK4)或NFκB)的抑制剂非特异地阻断RAGE配体依赖性(例如s100诱导的)和RAGE配体非依赖性(即反式活化诱导的)借助RAGE的信号传导。由于其他受体(例如TLRs)也使用这些信号传导分子/途径,对任何这些介质的抑制将对RAGE信号传导无特异性并且将影响这些信号传导介质的许多其他功能,这可能有损于人类健康(例如,不同于RAGE缺失,遗传缺失myD88、TIRAP、IRAK4或NFκB对人类和动物有害)。

[0039] 发明人已经进一步显示,可以通过选择性地靶向借助RAGE胞质尾介导的信号传导,实现对RAGE配体非依赖性信号传导的选择性调节(如抑制),并且发明人的测定法和从其中鉴定的调节物作用于这种反式活化(RAGE配体非依赖性RAGE活化)过程。

[0040] 发明人已经进一步显示,还可以通过选择性地靶向借助RAGE胞质尾介导的信号传导,实现对RAGE配体依赖性RAGE活化和RAGE配体非依赖性RAGE信号传导反式活化的双重抑制,并且发明人的测定法和从其中鉴定的调节物能够同时作用于两种模式的RAGE活化,原因在于共有的介质。这完全异于可溶性$RAGE_{22-331}$、RAGE中和性抗体和与RAGE胞外结构域选择性结合并且仅可能潜在抑制RAGE配体依赖性RAGE活化的小分子。

[0041] 发明人已经进一步显示,可以在不调节RAGE和透明蛋白-1(Diaphanous-1;Diaph1)的相互作用情况下(其中现有技术提示透明蛋白-1(Diaph1)可能是配体依赖性RAGE活化的调节物),实现通过选择性靶向借助RAGE胞质尾介导的信号传导来调节RAGE配体依赖性信号传导和/或RAGE配体非依赖性RAGE信号传导反式活化(Manigrasso,M.B.等人2016)。另外,在Diaph1不存在下,RAGE的N-截短型构建体(例如$RAGE_{362-404}$)的调节性功能维持,这证实发明人描述的RAGE构建体的调节性效果与Diaph1无关。

[0042] Sakaguchi和合作者发现,当HEK293细胞经RAGE配体S100A11、S100A12、HMGB1或AGE处理,导致RAGE配体依赖性RAGE活化时,共同的促炎性衔接子蛋白TIRAP、MyD88和IRAK优势地与该细胞中过量表达的RAGE共沉淀。这些相互作用对RAGE无特异性,因为TIRAP、MyD88和IRAK还作为衔接子蛋白对除TLR-3之外的全部toll样受体(TLRs)发挥作用,以激活NFκB转录。

[0043] 在这项工作后,同一小组公布了研究结果,通过模拟RAGE的磷酸化状态并且掩蔽衔接子蛋白TIRAP并因而阻止内源性RAGE信号传导,提出$S391E\text{-}RAGE_{387-395}$(RAGE(E)-I)作为RAGE配体依赖性信号传导的特定方面的抑制剂(即抑制凋亡、细胞移行和侵入)(Putranto等人,2013)。但是,发明人已经显示,RAGE活化不需要磷酸化。另外,掩蔽这些共同衔接子蛋白也将影响借助TLR(例如TLR-2和TLR-4)的信号传导,这些TLR当中某些也可以被RAGE配体(例如s100蛋白)活化,这可能解释了Puranto等人的研究结果。在相同实验中,他们还主张,$S391A\text{-}RAGE_{387-39s}$不是合适的抑制剂,因为它并未显示任何可评估的TIRAP结合作用并且未减弱RAGE配体S100B诱导的凋亡(Putranto等人,2013)。他们还指出,$S391E\text{-}RAGE_{387-395}$不抑制全部RAGE配体诱导的信号传导途径,因为如通过测定胞内三磷酸腺苷含量所评估,U-87MG细胞的生长未显著受影响(Putranto等人,2013)。因此,Putran和合作者

推定受抑制的RAGE配体依赖性途径和他们使用的RAGE胞质尾片段显然异于借助共定位的活化型GPCR和作为本发明主题的调节物的RAGE配体非依赖性RAGE活化。实际上,他们用S391A-$RAGE_{387-395}$得到的阴性结果不同于本发明的教导。在这份公开中,Putranto等人从未构思借助共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE胞质尾活化。

[0044] EP 1 415 997-A1详述了多肽的鉴定和用途,所述多肽与RAGE胞质尾直接或间接结合并因而抑制或增进源自配体与RAGE结合的信号转导及后续NFκB活化以及源自该活化的下游途径。本发明以多种方式区别于这种教导。首先,这种教导未构思借助RAGE的RAGE配体非依赖性信号传导或借助RAGE对RAGE配体依赖性和RAGE配体非依赖性信号传导的双重抑制。其次,EP 1 415 997 A1中的权利要求涉及与RAGE胞质尾中未鉴定元件结合的多肽的用途。相反,发明人已经显示,编码RAGE胞质尾的多肽及其突变形式可以用来选择性结合与借助RAGE的RAGE配体非依赖性信号传导或借助RAGE的RAGE配体依赖性和RAGE配体非依赖性信号传导相关的信号传导分子,导致调节后续NFκB活化和源自该活化的下游途径。第三,发明人已经展示了使用选择性修饰的含有RAGE胞质尾关键元件的多肽,调节借助RAGE的RAGE配体非依赖性信号传导的能力。第四,EP 1 415 997-A1中未显示借助RAGE对RAGE配体依赖性信号传导的调节。另外,EP 1 415 997-A1中特别鉴定的能够调节RAGE配体依赖性信号传导的唯一多肽是PKCζ,它是全长RAGE的熟知结合配偶体和信号传导介质。发明人显示,PKCζ不是它们的调节物发挥作用所需的。

[0045] 在结合CpG-DNA后,RAGE在胞质残基K374处受F框蛋白(FBXO10)单遍在蛋白化,触发其内吞及溶酶体介导的降解(Evankovich等人2017)。尚未观察到其他促炎性RAGE配体的内吞和/或RAGE遍在蛋白化。

[0046] RAGE遍在蛋白化部分地依赖于S391,从而FBXO10过量表达后,S391A-RAGE突变体部分地抵抗遍在蛋白化及后续降解。

[0047] 这些数据表明,在某些情况下K374R和S391A-RAGE突变体可以具有遍在蛋白化抗性,这可能允许这些突变体以高于野生型RAGE的水平积累。但是,这种潜在增加的稳定性/抗降解性不能解释在活化共定位的GPCR后,对RAGE配体非依赖性RAGE活化的快速调节,以及下文详述的甚至在1000倍过量递送的野生型RAGE存在下,由S391A-RAGE突变体实现的对RAGE配体非依赖性RAGE活化信号传导的抑制,也不能解释这种调节作用在K374存在和不存在下类似地发生。

[0048] 在不限制以下发明详述的通用性情况下,发明人已经展示,活化某些共定位的GPCR(如,通过例如Ang II活化AT_1R或通过例如MCP-1活化CCR2),触发了共定位的RAGE胞质尾活化。这种活化能够在RAGE胞外结构域不存在的情况下发生并且因此与RAGE配体或它们与RAGE胞外结构域的相互作用完全无关。不希望受理论约束,发明人认为某些共定位的GPCR对RAGE的这种反式活化代表了重要的RAGE活化机制。与这种前提一致,发明人展示,在AGER apoE双重KO(DKO)小鼠中选择性恢复RAGE配体非依赖性RAGE信号传导,使得动脉粥样硬化形成恢复到与富有RAGE的apoE KO小鼠中所观察到水平无显著差异的水平,即便RAGE配体依赖性信号传导仍完全不存在也是如此。

[0049] AT_1R活化诱导的许多不良信号传导事件减弱当RAGE表达缺乏时(例如遗传缺失或沉默,或在不表达RAGE的健康细胞中或当阻止或抑制借助活化型AT_1R的RAGE配体非依赖性RAGE活化时)。

[0050] 同时,受AT_1R拮抗剂抑制的RAGE非依赖性AT_1R信号传导途径,如导致诱导磷酸肌醇和钙内流的由AT_1R活化诱导的Gq信号传导途径,不受RAGE缺失、沉默RAGE表达或抑制RAGE功能影响。

[0051] 从而,对借助某些共定位的活化型GPCR(如AT_1R或CCR2)的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节、尤其抑制,为活化共定位的GPCR后靶向由RAGE诱导的致病信号传导的治疗性干预提供其他优点。例如,在具体的实施方案中,这类调节物允许在不破坏血压调节或不引起限制RAAS抑制剂用途的反馈性"逃避"AT_1R抑制作用(如在AT_1R抑制后发生)情况下,激进靶向AT1R的不良作用。这类调节物还将仅影响其中这种反式活化途径有组成型活性(例如白细胞、内皮细胞)或受诱导(例如,炎症和损伤部位)的细胞和组织,使得也不表达RAGE的细胞(例如健康的平滑肌细胞)中RAAS和其他GPCR介导的信号传导不受影响。

[0052] 活化AT_1R具有血流动力学影响和非血流动力学影响。血流动力学影响是导致血流量变化的那些,并且包括血液容积、血压、流量或速度、阻力、心输出量、紊流和壁张力变化。AT_1R阻滞剂(抑制剂)可以显示出血流动力学影响(例如,较低的血压、改变阻力和心输出量)以及非血流动力学影响(例如,触发氧化应激和炎症)。在其中活化RAAS的状态(例如心脏病、肾脏疾病、高血压)下,血流动力学途径和非血流动力学途径均激活。

[0053] 借助活化型AT_1R的RAGE配体非依赖性RAGE活化是AT_1R活化的非血流动力学(非血液流动效果)的唯一介质。发明人已经观察到,RAGE的完全遗传缺失没有直接的血流动力学影响(例如,不影响血压、血管阻力或流动、血液容积)并且不调节AT_1R活化或抑制作用的血流动力学影响。靶向借助活化型AT_1R的RAGE配体非依赖性RAGE活化的主要优点是,它因此不受血压调节的约束条件限制,所述约束条件限制了不良血流动力学影响致使所述治疗不安全之前可能降低多大血压。

[0054] 另外,血液流动的变化自动触发维持血液流动处于恒定水平的反馈(体内稳态)反应。这些反馈性反应的作用在于偏置或逃避RAAS受AT_1R抑制作用的抑制或抑制血管紧张素转化酶(ACE)的血流动力学影响。相反,通过活化型血管紧张素受体(如AT_1R)抑制RAGE配体非依赖性RAGE活化实现的RAAS活化后所诱导的选择性抑制非血流动力学途径与反馈性/逃避反应不相关。这类反馈性反应的缺失支持这类抑制作用的持久性和有效性。

[0055] 借助共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物

[0056] 在一种形式中,本发明包含RAGE活性调节物,其中这种RAGE活性由某些共定位的活性GPCR诱导。

[0057] 在一种形式中,本发明包含借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物。

[0058] 在一种形式中,本发明包含这样的调节物,其中所述调节物是受某些共定位的活化型GPCR诱导的RAGE依赖性信号传导的调节物。

[0059] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物在任何RAGE配体不存在的情况下发挥作用。

[0060] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物在截短的RAGE胞外结构域存在下发挥作用。

[0061] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物在不大于40、不大于20、不大于10或不大于5个氨基酸长度的截短的RAGE胞外

结构域存在下发挥作用。

[0062] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物含有与大于5、大于10、或大于20个氨基酸长度的RAGE跨膜结构域类似物、片段或衍生物缀合的RAGE完整胞外结构域。

[0063] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物在RAGE配体结合性RAGE胞外结构域不存在下发挥作用。

[0064] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物不含有RAGE胞外结构域。

[0065] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物不含有RAGE胞外结构域类似物、片段或衍生物。

[0066] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物含有RAGE胞外结构域片段。

[0067] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物含有不大于40、不大于20、不大于10或不大于5个氨基酸长度的RAGE胞外结构域片段。

[0068] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物不与RAGE胞外结构域结合。

[0069] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物抑制或促进由共定位的活化型GPCR诱导的借助RAGE的C末端胞质尾发生的信号传导。

[0070] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物抑制发生在RAGE的C末端胞质尾的结合。

[0071] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物抑制或促进RAGE跨膜结构域和某些GPCR之间的相互作用。

[0072] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物抑制RAGE跨膜结构域和某些GPCR之间的相互作用。

[0073] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物抑制或促进活化型GPCR调节RAGE依赖性信号传导的能力,所述RAGE依赖性信号传导依赖于RAGE跨膜结构域和某种GPCR邻近。

[0074] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物抑制活化型GPCR调节RAGE依赖性信号传导的能力,所述RAGE依赖性信号传导依赖于RAGE跨膜结构域和某种GPCR邻近。

[0075] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物抑制或促进活化型GPCR调节RAGE依赖性信号传导的能力,所述RAGE依赖性信号传导依赖于RAGE跨膜结构域和某种GPCR邻近,并且抑制或促进由共定位的活化型GPCR诱导的借助RAGE的C末端胞质尾发生的信号传导。

[0076] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物抑制活化型GPCR调节RAGE依赖性信号传导的能力,所述RAGE依赖性信号传导依赖于RAGE跨膜结构域和某种GPCR邻近,并且抑制由共定位的活化型GPCR诱导的借助RAGE

的C末端胞质尾发生的信号传导。

[0077] 在整个这份说明书范围内,除非上下文另有要求,否则共定位的GPCR意指与RAGE相同的细胞中内源性或因转染而共表达的G蛋白偶联受体超家族成员(GPCR;也称作七次跨膜结构域受体、7TM受体、七螺旋受体、蛇型受体和G蛋白连接的受体;某些其他7TM蛋白已经划分为G蛋白偶联受体超家族成员,包括GPR107、GPR137、OR51E1、TPRA1、GPR143和GPR157)。注意,这种超家族的并非全部成员均偶联于G蛋白并且在本上下文中,术语GPCR包括不偶联于G蛋白的超家族成员。可以通过本领域技术人员已知的众多技术展示相同细胞中的共表达,所述技术包括免疫共沉淀法、生物发光共振能量转移法(BRET)、荧光共振能量转移法(FRET)和显微术。共定位的GPCR优选地是这样的GPCR,其充分地邻近于RAGE,从而在GPCR和RAGE之间发生功能性相互作用。甚至更优选地,共定位的GPCR是这样的GPCR,其充分地邻近于RAGE,从而合适的邻近分析法能够检测这种邻近。合适的邻近分析法的实例是BRET、FRET、酶片段互补作用、分裂的萤光素酶互补作用、分裂的荧光团互补作用、TANGO测定法、NanoLuc Binary Technology(NanoBIT)测定法、邻近连接测定法(PLA)或能够检测两种蛋白质邻近的任何其他邻近分析法,无论这些蛋白质中一者或多者是否标记或加标签以促进该测定法的使用。这类邻近测定法可以按不同方式配置,并且受体-异聚体检查技术(受体-HIT)布局及其衍生型是这类邻近测定法的优选布局(WO2008/055313;Jaeger等人,2014)。

[0078] 在整个这份说明书范围内,除非上下文另有要求,否则活化型GPCR意指处于活性状态的GPCR,所述活性状态可以因结合激动剂、部分激动剂和/或变构调节物所致,和/或因不需要配体结合的组成型活性所致。

[0079] 在整个这份说明书范围内,除非上下文另有要求,否则本发明的某些共定位的活化型GPCR是这样的GPCR,它们在与RAGE相同的细胞中表达并且对其而言,受某些共定位的GPCR的相应配体活化时或GPCR有组成型活性时,检测到对RAGE的影响,所述影响显示调节RAGE活化和/或调节RAGE依赖性信号传导的诱导。

[0080] 在一个实施方案中,指示RAGE活化调节情况的对RAGE的影响是胞内运输的变化,如添加共定位的GPCR的相应配体时,使用生物发光共振能量转移(BRET),依据萤光素酶缀合的RAGE(如RAGE/Rluc8)与胞内区室标志物(如荧光团标记的Rab类,如Rab1、Rab4、Rab5、Rab6、Rab7、Rab8、Rab9和/或Rab11(如Venus-Rab1、Venus-Rab4、Venus-Rab5、Venus-Rab6、Venus-Rab7、Venus-Rab8、Venus-Rab9和/或Venus-Rab11))和/或胞质膜标志物(如荧光团缀合的K-ras片段(如Venus-K-ras))的邻近的变化所检测的那种变化(Tiulpakov等人,2016)。

[0081] 在另一个实施方案中,对RAGE的影响是RAGE依赖性信号传导的变化,如依据萤光素酶缀合的RAGE(如RAGE-Rluc8)与RAGE相互作用性基团(如荧光团标记的与RAGE胞质尾相互作用的蛋白质,如IQGAP-1、蛋白激酶Cζ(PKCζ)、Dock7、MyD88、TIRAP、ERK1/2、(Jules等人,2013;Ramasamy等人,2016)、嗅觉受体2T2、ADP/ATP移位酶2、蛋白磷酸酶1G、胞间黏附分子1、蛋白DJ-1(PARK7)、钙调理蛋白-3、脑发育调节蛋白,细丝蛋白B、Ras-相关蛋白Rab-13、根蛋白(Radixin)/埃兹蛋白(Ezrin)/膜突蛋白、蛋白脂质蛋白2、冠蛋白,S100A11、琥珀酰CoA连接酶[形成GDP的]亚基α、Hsc70-相互作用蛋白、凋亡抑制物5、神经毡蛋白、剪切刺激因子、生长因子受体结合型蛋白2、sec61β亚基或Nck1)的邻近的变化所检测。

[0082] 在另一个实施方案中,对RAGE的影响是RAGE依赖性信号传导的变化,如依据某些

共定位的GPCR由它们的相应配体活化时,NFκB典型活化的变化所检测,所述活化如依据以下一者测量或多者测量:

[0083] • 通过监测底物(如GST-IκBα)的体外磷酸化,检测IkB激酶(IKK)的活性;

[0084] • 检测IkB降解动力学,包括IκB和/或Iκb-α的磷酸化/遍在蛋白化和/或降解;

[0085] • 检测p65(Rel-A)磷酸化/遍在蛋白化,如通过使用抗体、凝胶移位、EMSA和/或质谱法检测;

[0086] • 检测NFκB组分/亚基(如p65/磷酸-p65)的胞质至胞核穿梭/转运;

[0087] • 检测NFκB亚基二聚化/复合;

[0088] • 通过与含有NFκB反应元件/NFκB共有结合基序的固定化DNA序列/寡核苷酸结合,检测活性NFκB组分/亚基,如通过使用电泳迁移率变动分析或凝胶迁移分析、SELEX、蛋白质-结合微阵列、或基于测序的方法检测;

[0089] • 检测NFκB与特定基因的启动子和增强子的DNA原位结合的染色质-免疫沉淀(ChIp)分析;

[0090] • NFκB激酶活性的体外激酶测定法;

[0091] • 使用这类方法如质粒转染、报道细胞系、微环、逆转录病毒或慢病毒,借助报道分子构建体(如LacZ Fluc、eGFP SEAP和NF-gluc)的转基因表达,使用NFκB报道分子测定法测量NFκB转录活性;

[0092] • 通过实时PCR测定法、蛋白质测定法或功能测定法,测量NFκB下游靶(如细胞因子、生长因子、黏附分子和线粒体抗凋亡基因)表达的变化(注:NFκB的多效性质反映于其目前数目约500个的转录靶中(参见http:/www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/截止日期2017年8月2日);并且

[0093] • 测量由NFκB依赖性信号传导诱导的功能或结构变化,如T细胞中的POLKADOTS、内皮细胞中的黏附、白细胞中的活化、或致瘤性。

[0094] 在另一个实施方案中,对RAGE的影响是RAGE信号传导的变化,如通过测量以下一者或多者,通过NFκB非典型活化的变化所检测:

[0095] • 检测NIK(NFκB诱导性激酶);

[0096] • 检测IKKα活化/磷酸化;

[0097] • 通过进行激酶测定法,依据自磷酸化或使底物磷酸化的能力检测NIK激酶活性;

[0098] • 产生含有p52的NFκB二聚体,如p52/RelB;

[0099] • 检测磷酸-NFκB2p100(Ser866/870);

[0100] • 检测前体p100部分降解(称作加工)成p52;

[0101] • 检测p52/RelB向胞核的转运;

[0102] • 检测p52/RelB与NFκB位点的结合;

[0103] • 使用这类方法如质粒转染、报道细胞系、微环、逆转录病毒或慢病毒,借助报道分子构建体(如LacZ Fluc、eGFP SEAP、NF-gluc)的转基因表达,使用NFκB报道分子测定法测量NFκB转录活性;和

[0104] • 通过实时PCR、蛋白质表达或通过功能测定法,测量NFκB非典型信号传导的下游靶(如CXCL12)的表达的变化。

[0105] 共定位的GPCR

[0106] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是那些GPCR,它们在与RAGE相同的细胞中表达并且与RAGE相关病症相关。

[0107] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是那些GPCR,它们在与RAGE相同的细胞中表达、与RAGE相关病症相关并且当移除或抑制它们时导致RAGE相关病症减少或减轻。

[0108] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是涉及炎症的那些GPCR。

[0109] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是那些GPCR,它们涉及炎症并且当移除或抑制它们时导致炎症减少或减轻。

[0110] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是涉及细胞增殖的那些GPCR。

[0111] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是那些GPCR,它们涉及细胞增殖并且当移除或抑制它们时导致细胞增殖减少或减轻。

[0112] 实际上,存在许多GPCR参与炎症至某种程度的证据并且可以根据证据等级区分这些层级:

[0113] 1-迄今未找到证据;

[0114] 2-受体结构或受体内部的基序类似于参与炎症/免疫过程的已知炎症/免疫受体或基序;

[0115] 3-受体结合介导炎症/免疫过程的配体;

[0116] 4-受体相关于/涉及炎性/免疫疾病;

[0117] 5-至少一篇论文描述受体直接参与炎症/免疫过程;

[0118] 6-受体在炎症/免疫细胞中表达;和

[0119] 7-充分表征了受体参与炎症/免疫过程(如http://www.guidetopharmacology.org数据库中所述)。

[0120] 家族A GPCR(除了嗅觉的、犁鼻、视蛋白之外)和其参与炎症的当前证据等级(参见上文要点):

[0121]

类型	亚型	证据等级	参考文献
5-羟色胺受体	5-HT1A 受体	7	(Freire - Garabal 等人, 2003)
5-羟色胺受体	5-HT1B 受体	6	(Stefulj 等人, 2000)
5-羟色胺受体	5-HT1D 受体	5	(Rebeck 等人, 1994)
5-羟色胺受体	5-HT1E 受体	5	(Granados-Soto 等人, 2010)

[0122]

5-羟色胺受体	5-HT1F 受体	6	(Stefulj 等人, 2000)
5-羟色胺受体	5-HT2A 受体	7	(Okamoto 等人, 2002)
5-羟色胺受体	5-HT2B 受体	6	(Stefulj 等人, 2000)
5-羟色胺受体	5-HT2C 受体	6	(Marazziti 等人, 2001)
5-羟色胺受体	5-HT4 受体	4	(Kanazawa 等人, 2011)
5-羟色胺受体	5-HT5A 受体	6	(Marazziti 等人, 2001)
5-羟色胺受体	5-HT5B 受体	1	(Rees 等人, 1994) - 因基因中的内部终止密码子而不在人类中表达
5-羟色胺受体	5-HT6 受体	6	(Stefulj 等人, 2000)
5-羟色胺受体	5-HT7 受体	6	(Stefulj 等人, 2000)
乙酰胆碱受体(毒蕈碱性)	M1 受体	6	(Sato 等人, 1999)
乙酰胆碱受体(毒蕈碱性)	M2 受体	6	(Sato 等人, 1999)
乙酰胆碱受体(毒蕈碱性)	M3 受体	6	(Sato 等人, 1999)
乙酰胆碱受体(毒蕈碱性)	M4 受体	6	(Sato 等人, 1999)
乙酰胆碱受体(毒蕈碱性)	M5 受体	6	(Sato 等人, 1999)
腺苷受体	A1 受体	7	(Satoh 等人, 2000)
腺苷受体	A2A 受体	7	(McPherson 等人, 2001)
腺苷受体	A2B 受体	7	(Németh 等人, 2005)
腺苷受体	A3 受体	7	(Zhong 等人, 2003)
肾上腺素能受体	α1A-肾上腺素能受体	6	(Tayebati 等人, 2000)
肾上腺素能受体	α1B-肾上腺素能受体	6	(Tayebati 等人, 2000)
肾上腺素能受体	α1D-肾上腺素能受体	6	(Tayebati 等人, 2000)
肾上腺素能受体	α2A-肾上腺素能受体	5	(Zhang 等人, 2010a)
肾上腺素能受体	α2B-肾上腺素能受体	5	(Calonge 等人, 2005)
肾上腺素能受体	α2C-肾上腺素能受体	5	(Laukova 等人, 2010)
肾上腺素能受体	β1-肾上腺素能受体	5	(Nishio 等人, 1998)
肾上腺素能受体	β2-肾上腺素能受体	7	(Izeboud 等人, 2000)
肾上腺素能受体	β3-肾上腺素能受体	5	(Lamas 等人, 2003)

[0123]

补体肽受体	C3a 受体	7	(Hartmann 等人, 1997)
补体肽受体	C5a1 受体	7	(Kupp 等人, 1991)
补体肽受体	C5a2 受体	7	(Zhang 等人, 2010b)
血管紧张素受体	AT1 受体	7	(Jaffré 等人, 2009)
血管紧张素受体	AT2 受体	5	(Matavelli 等人, 2011)
爱帕琳受体	爱帕琳受体	7	(Zhou 等人, 2003)
胆汁酸受体	GPBA 受体	6	(Kawamata 等人, 2003)
铃蟾肽受体	BB1 受体	5	(Baroni 等人, 2008)
铃蟾肽受体	BB2(GRP)受体	7	(Czepielewski 等人, 2012)
铃蟾肽受体	BB3 受体	5	(Fleischmann 等人, 2000)
缓激肽受体	B1 受体	7	(Ehrenfeld 等人, 2006)
缓激肽受体	B2 受体	7	(Souza 等人, 2004)
大麻素受体	CB1 受体	6	(Galiègue 等人, 1995)
大麻素受体	CB2 受体	6	(Galiègue 等人, 1995)
趋化因子受体	CCR1	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	CCR2	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	CCR3	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	CCR4	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	CCR5	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	CCR6	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	CCR7	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	CCR8	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	CCR9	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	CCR10	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)

[0124]

趋化因子受体	CXCR1	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	CXCR2	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	CXCR3	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	CXCR4	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	CXCR5	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	CXCR6	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	CX3CR1	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	XCR1	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	ACKR1	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	ACKR2	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	ACKR3	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	ACKR4	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
趋化因子受体	CCRL2	7	(Lazennec 和 Richmond, 2010)
胆囊收缩素受体	CCK1 受体	6	(Schmitz 等人, 2001)
胆囊收缩素受体	CCK2 受体	6	(Schmitz 等人, 2001)
多巴胺受体	D1 受体	6	(Caronti 等人, 1998)
多巴胺受体	D2 受体	6	(Levite 等人, 2001)
多巴胺受体	D3 受体	6	(Levite 等人, 2001)
多巴胺受体	D4 受体	6	(Sarkar 等人, 2006)
多巴胺受体	D5 受体	6	(Caronti 等人, 1998)
内皮素受体	ETA 受体	5	(Sampaio 等人, 2004)

[0125]

内皮素受体	ETB 受体	5	(Suzuki 等人, 2004)
G 蛋白质偶联雌激素受体	GPER	5	(Heublein 等人, 2012)
甲酰基肽受体	FPR1	7	(Schiffmann 等人, 1975)
甲酰基肽受体	FPR2/ALX	7	(Le 等人, 1999)
甲酰基肽受体	FPR3	7	(Yang 等人, 2002)
游离脂肪酸受体	FFA1 受体	6	(Briscoe 等人, 2003)
游离脂肪酸受体	FFA2 受体	7	(Maslowski 等人, 2009)
游离脂肪酸受体	FFA3 受体	6	(Le Poul 等人, 2003)
游离脂肪酸受体	FFA4 受体	7	(Kazemian 等人, 2012)
游离脂肪酸受体	GPR42	1	(Brown 等人, 2003) –可能是假基因
甘丙肽受体	GAL1 受体	5	(Benya 等人, 1998)
甘丙肽受体	GAL2 受体	7	(Jimenez-Andrade 等人, 2004)
甘丙肽受体	GAL3 受体	7	(Schmidhuber 等人, 2009)
生长素释放肽受体	生长素释放肽受体	7	(Dixit 等人, 2004)
糖蛋白激素受体	FSH 受体	6	(Robinson 等人, 2010)
糖蛋白激素受体	LH 受体	6	(Sonoda 等人, 2005)
糖蛋白激素受体	TSH 受体	5	(Cuddihy 等人, 1995)
促性腺激素释放激素受体	GnRH1 受体	6	(Chen 等人, 1999)
促性腺激素释放激素受体	GnRH2 受体	5	(Stockhammer 等人, 2010)
组胺受体	H1 受体	7	(Sonobe 等人, 2004)
组胺受体	H2 受体	7	(Mitsuhashi 等人, 1989)
组胺受体	H3 受体	5	(Teuscher 等人, 2007)
组胺受体	H4 受体	7	(Ling 等人, 2004)
吻素 (kisspeptin) 受体	吻素受体	6	(Muir 等人, 2001)
白三烯受体	BLT1 受体	7	(Arita 等人, 2007)
白三烯受体	BLT2 受体	7	(Yokomizo 等人, 2000)
白三烯受体	CysLT1 受体	7	(Capra 等人, 2005)

[0126]

白三烯受体	CysLT2 受体	7	(Pillai 等人, 2004)
白三烯受体	OXE 受体	7	(Powell 和 Rokach, 2013)
白三烯受体	FPR2/ALX	7	(Krishnamoorthy 等人, 2012)
溶血磷脂(LPA)受体	LPA1 受体	5	(Swaney 等人, 2010)
溶血磷脂(LPA)受体	LPA2 受体	6	(An 等人, 1998)
溶血磷脂(LPA)受体	LPA3 受体	5	(Lin 等人, 2007)
溶血磷脂(LPA)受体	LPA4 受体	5	(Waters 等人, 2007)
溶血磷脂(LPA)受体	LPA5 受体	7	(Lundequist 和 Boyce, 2011)
溶血磷脂(LPA)受体	LPA6 受体	6	(Pasternack 等人, 2008)
黑色素浓集激素受体	MCH1 受体	7	(Ziogas 等人, 2013)
黑色素浓集激素受体	MCH2 受体	6	(Hill 等人, 2001)
黑皮质素受体	MC1 受体	7	(Hartmeyer 等人, 1997)
黑皮质素受体	MC2 受体	5	(Grässel 等人, 2009)
黑皮质素受体	MC3 受体	6	(Getting 等人, 1999)
黑皮质素受体	MC4 受体	5	(Caruso 等人, 2007)
黑皮质素受体	MC5 受体	6	(Chhajlani, 1996)
褪黑激素受体	MT1 受体	7	(Carrillo-Vico 等人, 2003)
褪黑激素受体	MT2 受体	7	(Drazen 和 Nelson, 2001)
促胃动素受体	促胃动素受体	5	(Ter Beek 等人, 2008)
神经调节肽 U 受体	NMU1 受体	7	(Moriyama 等人, 2005)
神经调节肽 U 受体	NMU2 受体	3	(Moriyama 等人, 2005)
神经肽 FF/神经肽 AF 受体	NPFF1 受体	5	(Iwasa 等人, 2014)

[0127]

神经肽 FF/神经肽 AF 受体	NPFF2 受体	5	(Yang 和 Iadarola, 2003)
神经肽 S 受体	NPS 受体	5	(D'Amato 等人, 2007)
神经肽 W/神经肽 B 受体	NPBW1 受体	6	(Brezillon 等人, 2003)
神经肽 W/神经肽 B 受体	NPBW2 受体	6	(Brezillon 等人, 2003)
神经肽 Y 受体	Y1 受体	6	(Mitić 等人, 2011)
神经肽 Y 受体	Y2 受体	6	(Mitić 等人, 2011)
神经肽 Y 受体	Y4 受体	4	(Lin 等人, 2006)
神经肽 Y 受体	Y5 受体	6	(Mitić 等人, 2011)
神经肽 Y 受体	y6 受体	3	(Zhu 等人, 2016)
神经降压肽受体	NTS1 受体	5	(Bossard 等人, 2007)
神经降压肽受体	NTS2 受体	4	(Lafrance 等人, 2010)
羟基羧酸受体	HCA1 受体	5	(Hoque 等人, 2014)
羟基羧酸受体	HCA2 受体	6	(Schaub 等人, 2001)
羟基羧酸受体	HCA3 受体	6	(Irukayama-Tomobe 等人, 2009)
阿片样物质受体	δ 受体	6	(Gaveriaux 等人, 1995)
阿片样物质受体	κ 受体	7	(Taub 等人, 1991)
阿片样物质受体	μ 受体	7	(Taub 等人, 1991)
阿片样物质受体	NOP 受体	6	(Peluso 等人, 1998)
食欲肽受体	OX1 受体	3 或 4–目前不清楚哪个受体亚型介导应答	(Xiong 等人, 2013)
食欲肽受体	OX2 受体	3 或 4–目前不清楚哪个受体亚型介导应答	(Xiong 等人, 2013)
P2Y 受体	P2Y1 受体	7	(Fujita 等人, 2009)
P2Y 受体	P2Y2 受体	7	(Chen 等人, 2006)
P2Y 受体	P2Y4 受体	6	(Moore 等人, 2001)
P2Y 受体	P2Y6 受体	7	(Warny 等人, 2001)
P2Y 受体	P2Y11 受体	7	(Vaughan 等人, 2007)
P2Y 受体	P2Y12 受体	6	(Sasaki 等人, 2003)

[0128]

P2Y 受体	P2Y13 受体	7	(Gao 等人, 2010)
P2Y 受体	P2Y14 受体	7	(Lee 等人, 2003)
QRFP 受体	QRFP 受体	6	(Jossart 等人, 2013)
血小板活化因子受体	PAF 受体	7	(Ferreira 等人, 2004)
前动力蛋白(Prokineticin)受体	PKR1	7	(Cook 等人, 2010)
前动力蛋白受体	PKR2	7	(Giannini 等人, 2009)
泌乳素释放肽受体	PrRP 受体	6	(Dorsch 等人, 2005)
前列腺素类受体	DP1 受体	7	(Wright 等人, 2000)
前列腺素类受体	DP2 受体	7	(Gervais 等人, 2001)
前列腺素类受体	EP1 受体	7	(Nagamachi 等人, 2007)
前列腺素类受体	EP2 受体	7	(Poloso 等人, 2013)
前列腺素类受体	EP3 受体	7	(Kunikata 等人, 2005)
前列腺素类受体	EP4 受体	7	(Kabashima 等人, 2002)
前列腺素类受体	FP 受体	7	(Takayama 等人, 2005)
前列腺素类受体	IP 受体	7	(Ayer 等人, 2008)
前列腺素类受体	TP 受体	7	(Li 和 Tai, 2013)
蛋白酶活化的受体	PAR1	7	(Antoniak 等人, 2013)
蛋白酶活化的受体	PAR2	7	(Davidson 等人, 2013)
蛋白酶活化的受体	PAR3	7	(Ishihara 等人, 1997)
蛋白酶活化的受体	PAR4	7	(Mao 等人, 2010)
松弛素家族肽受体	RXFP1 受体	5	(Horton 等人, 2012)
松弛素家族肽受体	RXFP2 受体	6	(Hsu 等人, 2002)
松弛素家族肽受体	RXFP3 受体	1	(Bathgate 等人, 2013)

[0129]

松弛素家族肽受体	RXFP4 受体	6	(Liu 等人, 2005)
生长抑素受体	sst1 受体	6	(Taniyama 等人, 2005)
生长抑素受体	sst2 受体	6	(Taniyama 等人, 2005)
生长抑素受体	sst3 受体	6	(Taniyama 等人, 2005)
生长抑素受体	sst4 受体	6	(Taniyama 等人, 2005)
生长抑素受体	sst5 受体	6	(Taniyama 等人, 2005)
速激肽受体	NK1 受体	7	(Saban 等人, 2000)
速激肽受体	NK2 受体	5	(Laird 等人, 2001)
速激肽受体	NK3 受体	7	(Improta 等人, 2003)
促甲状腺激素-释放激素受体	TRH1 受体	6	(Mellado 等人, 1999)
促甲状腺激素-释放激素受体	TRH2 受体	1	(Alexander 等人, 2011) –不存在于人类中
痕量胺受体	TA1 受体	6	(D'Andrea 等人, 2003)
硬骨鱼紧张肽受体	UT 受体	5	(Johns 等人, 2004)
血管加压素和催产素受体	V1A 受体	5	(Bucher 等人, 2002)
血管加压素和催产素受体	V1B 受体	3	(Sugimoto 等人, 1994)
血管加压素和催产素受体	V2 受体	5	(Boyd 等人, 2008)
血管加压素和催产素受体	OT 受体	5	(İşeri 等人, 2005)
GPR18、GPR55 和 GPR119	GPR18	7	(Takenouchi 等人, 2012)
GPR18、GPR55 和 GPR119	GPR55	7	(Cantarella 等人, 2011)
GPR18、GPR55 和 GPR119	GPR119	4	(Sakamoto 等人, 2006)
溶血磷脂 (S1P) 受体	S1P1 受体	7	(Matloubian 等人, 2004)
溶血磷脂 (S1P)	S1P2 受体	7	(McQuiston 等人, 2011)

[0130]

受体			
溶血磷脂(S1P)受体	S1P3 受体	7	(Awojoodu 等人, 2013)
溶血磷脂(S1P)受体	S1P4 受体	7	(Allende 等人, 2011)
溶血磷脂(S1P)受体	S1P5 受体	7	(Jenne 等人, 2009)
趋化素(Chemerin)受体	趋化素受体	7	(Haworth 等人, 2011)
琥珀酸受体	琥珀酸受体	7	(Rubic 等人, 2008)
酮戊二酸受体	酮戊二酸受体	6	(Inbe 等人, 2004)
滋味 2 受体	TAS2R1	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R3	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R4	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R5	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R7	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R8	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R9	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R10	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R13	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R14	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R16	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R19	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R20	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R30	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R31	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R38	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R39	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R40	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R41	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R42	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R43	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R45	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R46	6	(Malki 等人, 2015)

[0131]

滋味 2 受体	TAS2R50	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 2 受体	TAS2R60	6	(Malki 等人, 2015)
A 类孤儿	GPR1	6	(Farzan 等人, 1997)
A 类孤儿	GPR3	6	(Uhlén 等人, 2015)
A 类孤儿	GPR4	7	(Chen 等人, 2011)
A 类孤儿	GPR42	1	(棕色等人, 2003) -RT-PCR 未检测人正常组织样品中 GPR42 mRNA 的信号
A 类孤儿	GPR6	6	(Taquet 等人, 2012)
A 类孤儿	GPR12	6	(Fornari 等人, 2011)
A 类孤儿	GPR15	7	(Kim 等人, 2013)
A 类孤儿	GPR17	6	(Maekawa 等人, 2009)
A 类孤儿	GPR18	6	(Gantz 等人, 1997)
A 类孤儿	GPR19	4	(Gazel 等人, 2006)
A 类孤儿	GPR20	6	(Taquet 等人, 2012)
A 类孤儿	GPR21	7	(Osborn 等人, 2012)
A 类孤儿	GPR22	6	(Matteucci 等人, 2010)
A 类孤儿	GPR25	4	(Consortium, 2013)
A 类孤儿	GPR26	6	(Matteucci 等人, 2010)
A 类孤儿	GPR27	6	(Matsumoto 等人, 2000)
A 类孤儿	GPR31	7	(Schaub 等人, 2001)
A 类孤儿	GPR32	7	(Krishnamoorthy 等人, 2010)
A 类孤儿	GPR33	6	(Rompler 等人, 2005)
A 类孤儿	GPR34	7	(Sugo 等人, 2006)
A 类孤儿	GPR35	6	(Wang 等人, 2006)
A 类孤儿	GPR37	4	(Consortium, 2013)
A 类孤儿	GPR37L1	4	(Mas 等人, 2011)
A 类孤儿	GPR39	5	(Sunuwar 等人, 2016)
A 类孤儿	GPR45	5	(Fujita 等人, 2011)
A 类孤儿	GPR50	4	(Elliott 等人, 2016)
A 类孤儿	GPR52	1	
A 类孤儿	GPR55	7	(Schuelert 和 McDougall, 2011)

[0132]

A 类孤儿	GPR61	6	(Matsumura 等人, 2010)
A 类孤儿	GPR62	4	(Kwon 等人, 2014)
A 类孤儿	GPR63	3	(Niedernberg 等人, 2003)
A 类孤儿	GPR65	7	(Kottyan 等人, 2009)
A 类孤儿	GPR68	7	(Ichimonji 等人, 2010)
A 类孤儿	GPR75	3	(Ignatov 等人, 2006)
A 类孤儿	GPR78	6	(Lu 等人, 2010)
A 类孤儿	GPR79	1	
A 类孤儿	GPR82	6	(Engel 等人, 2011)
A 类孤儿	GPR83	6	(Hansen 等人, 2010)
A 类孤儿	GPR84	6	(Venkataraman 和 Kuo, 2005)
A 类孤儿	GPR85	6	(Lattin 等人, 2008)
A 类孤儿	GPR87	6	(Martinez 等人, 2006)
A 类孤儿	GPR88	5	(Jurisic 等人, 2010)
A 类孤儿	GPR101	4	(Watanabe 等人, 2013)
A 类孤儿	GPR119	6	(Parker 等人, 2009)
A 类孤儿	GPR132	7	(Frasch 等人, 2008)
A 类孤儿	GPR135	4	(Kwon 等人, 2014)
A 类孤儿	GPR139	5	(Tichelaar 等人, 2007)
A 类孤儿	GPR141	4	(Hong 等人, 2015)
A 类孤儿	GPR142	6	(Taquet 等人, 2012)
A 类孤儿	GPR146	6	(Lattin 等人, 2008)
A 类孤儿	GPR148	6	(Taquet 等人, 2012)
A 类孤儿	GPR149	4	(Sohn 等人, 2009)
A 类孤儿	GPR150	4	(Yin 等人, 2014)
A 类孤儿	GPR151	4	(Keermann 等人, 2015)
A 类孤儿	GPR152	4	(Ahmad 等人, 2016)
A 类孤儿	GPR153	6	(Shen 等人, 2015)
A 类孤儿	GPR160	6	(Lee 等人, 2011)
A 类孤儿	GPR161	5	(Swan 等人, 2013)
A 类孤儿	GPR162	6	(Lattin 等人, 2008)
A 类孤儿	GPR171	5	(Rossi 等人, 2013)
A 类孤儿	GPR173	6	(Fornari 等人, 2011)

A 类孤儿	GPR174	6	(Shen 等人, 2015)
A 类孤儿	GPR176	6	(Wensman 等人, 2012)
A 类孤儿	GPR182	6	(Matteucci 等人, 2010)
A 类孤儿	GPR183	7	(Gatto 等人, 2011)
A 类孤儿	LGR4	6	(Liu 等人, 2013)
A 类孤儿	LGR5	4	(Quigley 等人, 2009)
A 类孤儿	LGR6	6	(Aho 等人, 2013)
A 类孤儿	MAS1	7	(da Silveira 等人, 2010)
A 类孤儿	MAS1L	6	(Foster 等人, 2016)
A 类孤儿	MRGPRD	5	(Qu 等人, 2014)
A 类孤儿	MRGPRE	4	(Kwon 等人, 2014)
A 类孤儿	MRGPRF	4	(Liang 等人, 2016)
A 类孤儿	MRGPRG	6	(Othman 等人, 2015)
A 类孤儿	MRGPRX1	5	(Solinski 等人, 2013)
A 类孤儿	MRGPRX2	7	(Subramanian 等人, 2011)
A 类孤儿	MRGPRX3	5	(Yi 等人, 2012)
A 类孤儿	MRGPRX4	1	(Bader 等人, 2014)
A 类孤儿	OPN3	6	(White 等人, 2008)
A 类孤儿	OPN4	4	(Wang 等人, 2010)
A 类孤儿	OPN5	3	(Ohshima 等人, 2002)
A 类孤儿	P2RY8	6	(Cantagrel 等人, 2004)
A 类孤儿	P2RY10	6	(Rao 等人, 1999)
A 类孤儿	TAAR2	6	(Babusyte 等人, 2013)
A 类孤儿	TAAR3	4	(D'Andrea 等人, 2012)
A 类孤儿	TAAR4P	1	
A 类孤儿	TAAR5	6	(Taquet 等人, 2012)
A 类孤儿	TAAR6	6	(D'Andrea 等人, 2012)
A 类孤儿	TAAR8	6	(D'Andrea 等人, 2012)
A 类孤儿	TAAR9	6	(Taquet 等人, 2012)

[0133]

[0134] 家族A嗅觉GPCR及它们参与炎症的当前证据等级(参见上文要点):

[0135]

家族 ID	亚家族	符号	证据等级	参考文献
1	C	OR1C1	1	
1	F	OR1F12	1	

[0136]

1	J	OR1J1	1	
1	J	OR1J2	1	
1	J	OR1J4	1	
1	N	OR1N1	1	
1	N	OR1N2	1	
1	L	OR1L8	1	
1	Q	OR1Q1	1	
1	B	OR1B1	1	
1	L	OR1L1	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
1	L	OR1L3	1	
1	L	OR1L4	1	
1	L	OR1L6	1	
1	K	OR1K1	1	
1	S	OR1S2	4	(Lee 等人, 2011)
1	S	OR1S1	4	(Lee 等人, 2011)
1	F	OR1F1	1	
1	D	OR1D5	1	
1	D	OR1D2	5	(Kalbe 等人, 2016)
1	G	OR1G1	1	
1	A	OR1A2	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
1	A	OR1A1	1	
1	D	OR1D4	1	
1	E	OR1E1	1	
1	E	OR1E2	1	
1	M	OR1M1	1	
1	I	OR1I1	1	
2	B	OR2B11	6	(Flegel 等人, 2013)
2	W	OR2W5	1	
2	C	OR2C3	6	(Flegel 等人, 2013)
2	G	OR2G2	1	
2	G	OR2G3	1	
2	W	OR2W3	6	(Flegel 等人, 2013)
2	T	OR2T8	1	
2	AJ	OR2AJ1	1	

[0137]

2	L	OR2L8	1	
2	AK	OR2AK2	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
2	L	OR2L5	1	
2	L	OR2L2	1	
2	L	OR2L3	1	
2	L	OR2L13	6	(Flegel 等人, 2013)
2	M	OR2M5	1	
2	M	OR2M2	1	
2	M	OR2M3	1	
2	M	OR2M4	1	
2	T	OR2T33	1	
2	T	OR2T12	1	
2	M	OR2M7	1	
2	T	OR2T4	1	
2	T	OR2T6	1	
2	T	OR2T1	1	
2	T	OR2T7	1	
2	T	OR2T2	1	
2	T	OR2T3	1	
2	T	OR2T5	1	
2	G	OR2G6	1	
2	T	OR2T29	1	
2	T	OR2T34	6	(Flegel 等人, 2013)
2	T	OR2T10	1	
2	T	OR2T11	6	(Flegel 等人, 2013)
2	T	OR2T35	1	
2	T	OR2T27	1	
2	Y	OR2Y1	1	
2	V	OR2V1	1	
2	V	OR2V2	1	
2	B	OR2B2	1	
2	B	OR2B6	6	(Flegel 等人, 2013)
2	W	OR2W1	1	
2	B	OR2B3	1	

[0138]

2	J	OR2J3	6	(Zhao 等人, 2013)
2	J	OR2J2	1	
2	H	OR2H1	1	
2	H	OR2H2	1	
2	A	OR2A4	6	(Flegel 等人, 2013)
2	AE	OR2AE1	1	
2	F	OR2F2	1	
2	F	OR2F1	1	
2	A	OR2A5	1	
2	A	OR2A25	1	
2	A	OR2A12	1	
2	A	OR2A2	6	(Flegel 等人, 2013)
2	A	OR2A14	1	
2	A	OR2A42	6	(Flegel 等人, 2013)
2	A	OR2A7	6	(Flegel 等人, 2013)
2	A	OR2A1	6	(Flegel 等人, 2013)
2	S	OR2S2	1	
2	K	OR2K2	1	
2	AG	OR2AG2	1	
2	AG	OR2AG1	5	(Kalbe 等人, 2016)
2	D	OR2D2	4	(Lee 等人, 2011)
2	D	OR2D3	4	(Lee 等人, 2011)
2	AT	OR2AT4	1	
2	AP	OR2AP1	1	
2	C	OR2C1	6	(Flegel 等人, 2013)
2	Z	OR2Z1	1	
3	A	OR3A2	1	
3	A	OR3A1	1	
3	A	OR3A4	1	
3	A	OR3A3	6	(Flegel 等人, 2013)
4	F	OR4F5	1	
4	F	OR4F29	1	
4	F	OR4F16	1	
4	F	OR4F3	1	

[0139]

4	F	OR4F21	1	
4	B	OR4B1	1	
4	X	OR4X2	1	
4	X	OR4X1	1	
4	S	OR4S1	1	
4	C	OR4C3	1	
4	C	OR4C5	1	
4	A	OR4A47	1	
4	C	OR4C13	4	(Lee 等人, 2011)
4	C	OR4C12	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
4	A	OR4A5	1	
4	C	OR4C46	1	
4	A	OR4A16	1	
4	A	OR4A15	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
4	C	OR4C15	4	(Lee 等人, 2011)
4	C	OR4C16	4	(Lee 等人, 2011)
4	C	OR4C11	4	(Lee 等人, 2011)
4	P	OR4P4	1	
4	S	OR4S2	1	
4	C	OR4C6	1	
4	D	OR4D6	1	
4	D	OR4D10	6	(Zhao 等人, 2013)
4	D	OR4D11	1	
4	D	OR4D9	1	
4	D	OR4D5	1	
4	Q	OR4Q3	6	(Zhao 等人, 2013)
4	M	OR4M1	6	(Zhao 等人, 2013)
4	N	OR4N2	1	
4	K	OR4K2	1	
4	K	OR4K5	1	
4	K	OR4K1	1	
4	K	OR4K15	4	(Lee 等人, 2011)
4	K	OR4K14	4	(Lee 等人, 2011)
4	K	OR4K13	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)

[0140]

4	L	OR4L1	1	
4	K	OR4K17	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
4	N	OR4N5	4	(Lee 等人, 2011)
4	E	OR4E2	1	
4	M	OR4M2	1	
4	N	OR4N4	1	
4	F	OR4F6	1	
4	F	OR4F15	1	
4	F	OR4F4	1	
4	D	OR4D1	1	
4	D	OR4D2	1	
4	F	OR4F17	1	
4	C	OR4C45	1	
5	AC	OR5AC2	4	(Lee 等人, 2011)
5	H	OR5H1	1	
5	H	OR5H14	1	
5	H	OR5H15	1	
5	H	OR5H6	1	
5	H	OR5H2	1	
5	K	OR5K4	1	
5	K	OR5K3	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
5	K	OR5K1	1	
5	K	OR5K2	1	
5	V	OR5V1	1	
5	C	OR5C1	1	
5	P	OR5P2	1	
5	P	OR5P3	1	
5	D	OR5D13	4	(Lee 等人, 2011)
5	D	OR5D14	4	(Lee 等人, 2011)
5	L	OR5L1	4	(Lee 等人, 2011)
5	D	OR5D18	4	(Lee 等人, 2011)
5	L	OR5L2	4	(Lee 等人, 2011)
5	D	OR5D16	4	(Lee 等人, 2011)
5	W	OR5W2	4	(Lee 等人, 2011)

[0141]

5	I	OR5I1	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
5	F	OR5F1	4	(Lee 等人, 2011)
5	AS	OR5AS1	4	(Lee 等人, 2011)
5	J	OR5J2	4	(Lee 等人, 2011)
5	T	OR5T2	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
5	T	OR5T3	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
5	T	OR5T1	4	(Lee 等人, 2011)
5	R	OR5R1	4	(Lee 等人, 2011)
5	M	OR5M9	4	(Lee 等人, 2011)
5	M	OR5M3	4	(Lee 等人, 2011)
5	M	OR5M8	4	(Lee 等人, 2011)
5	M	OR5M11	4	(Lee 等人, 2011)
5	M	OR5M10	4	(Lee 等人, 2011)
5	M	OR5M1	4	(Lee 等人, 2011)
5	AP	OR5AP2	4	(Lee 等人, 2011)
5	AR	OR5AR1	4	(Lee 等人, 2011)
5	AK	OR5AK2	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
5	B	OR5B17	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
5	B	OR5B3	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
5	B	OR5B2	4	(Lee 等人, 2011)
5	B	OR5B12	4	(Lee 等人, 2011)
5	B	OR5B21	4	(Lee 等人, 2011)
5	AN	OR5AN1	1	
5	A	OR5A2	1	
5	A	OR5A1	1	
5	AU	OR5AU1	1	
6	Y	OR6Y1	1	
6	P	OR6P1	1	
6	K	OR6K2	1	
6	K	OR6K3	1	
6	K	OR6K6	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
6	N	OR6N1	1	
6	N	OR6N2	1	
6	F	OR6F1	1	

[0142]

6	B	OR6B2	1	
6	B	OR6B3	1	
6	V	OR6V1	6	(Feingold 等人, 1999)
6	B	OR6B1	1	
6	A	OR6A2	1	
6	Q	OR6Q1	4	(Lee 等人, 2011)
6	X	OR6X1	4	(Lee 等人, 2011)
6	M	OR6M1	4	(Lee 等人, 2011)
6	T	OR6T1	1	
6	C	OR6C74	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
6	C	OR6C6	1	
6	C	OR6C1	1	
6	C	OR6C3	1	
6	C	OR6C75	1	
6	C	OR6C65	1	
6	C	OR6C76	1	
6	C	OR6C2	1	
6	C	OR6C70	1	
6	C	OR6C68	1	
6	C	OR6C4	1	
6	S	OR6S1	1	
6	J	OR6J1	1	
7	G	OR7G2	1	
7	G	OR7G1	1	
7	G	OR7G3	1	
7	D	OR7D2	6	(Flegel 等人, 2013)
7	D	OR7D4	1	
7	E	OR7E24	1	
7	C	OR7C1	1	
7	A	OR7A5	1	
7	A	OR7A10	1	
7	A	OR7A17	1	
7	C	OR7C2	1	
8	I	OR8I2	1	

[0143]

8	H	OR8H2	4	(Lee 等人, 2011)
8	H	OR8H3	4	(Lee 等人, 2011)
8	J	OR8J3	4	(Lee 等人, 2011)
8	K	OR8K5	4	(Lee 等人, 2011)
8	H	OR8H1	4	(Lee 等人, 2011)
8	K	OR8K3	4	(Lee 等人, 2011)
8	K	OR8K1	4	(Lee 等人, 2011)
8	J	OR8J1	4	(Lee 等人, 2011)
8	U	OR8U1	4	(Lee 等人, 2011)
8	D	OR8D4	1	
8	G	OR8G1	1	
8	G	OR8G5	1	
8	D	OR8D1	1	
8	D	OR8D2	1	
8	B	OR8B2	1	
8	B	OR8B3	1	
8	B	OR8B4	1	
8	B	OR8B8	1	
8	B	OR8B12	1	
8	A	OR8A1	1	
8	S	OR8S1	1	
8	U	OR8U8	4	(Lee 等人, 2011)
8	U	OR8U9	1	
9	A	OR9A4	4	(Lee 等人, 2011)
9	A	OR9A2	6	(Malki 等人, 2015)
9	G	OR9G1	4	(Lee 等人, 2011)
9	G	OR9G4	4	(Lee 等人, 2011)
9	I	OR9I1	1	
9	Q	OR9Q1	1	
9	Q	OR9Q2	4	(Lee 等人, 2011)
9	K	OR9K2	1	
9	G	OR9G9	4	(Lee 等人, 2011)
10	T	OR10T2	1	
10	K	OR10K2	1	

[0144]

10	K	OR10K1	1	
10	R	OR10R2	1	
10	X	OR10X1	1	
10	Z	OR10Z1	1	
10	J	OR10J3	1	
10	J	OR10J1	1	
10	J	OR10J5	1	
10	C	OR10C1	1	
10	A	OR10A5	1	
10	A	OR10A2	1	
10	A	OR10A4	1	
10	A	OR10A6	1	
10	A	OR10A3	1	
10	AG	OR10AG1	4	(Lee 等人, 2011)
10	Q	OR10Q1	4	(Lee 等人, 2011)
10	W	OR10W1	4	(Lee 等人, 2011)
10	V	OR10V1	1	
10	S	OR10S1	1	
10	G	OR10G6	1	
10	G	OR10G4	1	
10	G	OR10G9	1	
10	G	OR10G8	1	
10	G	OR10G7	1	
10	D	OR10D3	1	
10	AD	OR10AD1	1	
10	A	OR10A7	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
10	P	OR10P1	1	
10	G	OR10G3	1	
10	G	OR10G2	1	
10	H	OR10H2	1	
10	H	OR10H3	1	
10	H	OR10H5	1	
10	H	OR10H1	1	
10	H	OR10H4	1	

[0145]

11	L	OR11L1	1	
11	A	OR11A1	1	
11	H	OR11H12	1	
11	H	OR11H2	1	
11	G	OR11G2	1	
11	H	OR11H6	1	
11	H	OR11H4	1	
11	H	OR11H1	6	(Zhao 等人, 2013)
12	D	OR12D3	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
12	D	OR12D2	1	
13	G	OR13G1	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
13	J	OR13J1	1	
13	F	OR13F1	4	(Lee 等人, 2011)
13	C	OR13C4	4	(Garcia-Vivas 等人, 2016)
13	C	OR13C3	4	(Lee 等人, 2011)
13	C	OR13C8	4	(Lee 等人, 2011)
13	C	OR13C5	4	(Lee 等人, 2011)
13	C	OR13C2	4	(Lee 等人, 2011)
13	C	OR13C9	1	
13	D	OR13D1	1	
13	A	OR13A1	1	
13	H	OR13H1	1	
14	A	OR14A2	1	
14	K	OR14K1	1	
14	A	OR14A16	1	
14	C	OR14C36	1	
14	I	OR14I1	1	
14	J	OR14J1	1	
51	D	OR51D1	6	(Malki 等人, 2015)
51	E	OR51E1	6	(Malki 等人, 2015)
51	E	OR51E2	6	(Malki 等人, 2015)
51	F	OR51F1	6	(Malki 等人, 2015)
51	F	OR51F2	6	(Malki 等人, 2015)
51	S	OR51S1	6	(Malki 等人, 2015)

[0146]

51	T	OR51T1	6	(Malki 等人, 2015)
51	A	OR51A7	6	(Malki 等人, 2015)
51	G	OR51G2	6	(Malki 等人, 2015)
51	G	OR51G1	6	(Malki 等人, 2015)
51	A	OR51A4	6	(Malki 等人, 2015)
51	A	OR51A2	6	(Malki 等人, 2015)
51	L	OR51L1	6	(Malki 等人, 2015)
51	V	OR51V1	6	(Malki 等人, 2015)
51	B	OR51B4	6	(Malki 等人, 2015)
51	B	OR51B2	6	(Malki 等人, 2015)
51	B	OR51B5	6	(Malki 等人, 2015)
51	B	OR51B6	6	(Malki 等人, 2015)
51	M	OR51M1	6	(Malki 等人, 2015)
51	J	OR51J1	6	(Malki 等人, 2015)
51	Q	OR51Q1	6	(Malki 等人, 2015)
51	I	OR51I1	6	(Malki 等人, 2015)
51	I	OR51I2	6	(Malki 等人, 2015)
52	B	OR52B4	6	(Malki 等人, 2015)
52	K	OR52K2	6	(Malki 等人, 2015)
52	K	OR52K1	6	(Malki 等人, 2015)
52	M	OR52M1	6	(Malki 等人, 2015)
52	I	OR52I2	6	(Malki 等人, 2015)
52	I	OR52I1	6	(Malki 等人, 2015)
52	R	OR52R1	6	(Malki 等人, 2015)
52	J	OR52J3	6	(Malki 等人, 2015)
52	E	OR52E2	6	(Malki 等人, 2015)
52	A	OR52A4	6	(Malki 等人, 2015)
52	A	OR52A5	6	(Malki 等人, 2015)
52	A	OR52A1	6	(Malki 等人, 2015)
52	D	OR52D1	6	(Malki 等人, 2015)
52	H	OR52H1	6	(Malki 等人, 2015)
52	B	OR52B6	6	(Malki 等人, 2015)
52	N	OR52N4	6	(Flegel 等人, 2013)
52	N	OR52N5	6	(Zhao 等人, 2013)

52	N	OR52N1	6	(Malki 等人, 2015)
52	N	OR52N2	6	(Malki 等人, 2015)
52	E	OR52E6	6	(Malki 等人, 2015)
52	E	OR52E8	6	(Malki 等人, 2015)
52	E	OR52E4	6	(Malki 等人, 2015)
52	E	OR52E5	6	(Malki 等人, 2015)
52	L	OR52L1	6	(Malki 等人, 2015)
52	B	OR52B2	6	(Malki 等人, 2015)
52	W	OR52W1	6	(Malki 等人, 2015)
56	B	OR56B1	6	(Malki 等人, 2015)
56	A	OR56A3	6	(Malki 等人, 2015)
56	A	OR56A5	6	(Malki 等人, 2015)
56	A	OR56A4	6	(Malki 等人, 2015)
56	A	OR56A1	6	(Malki 等人, 2015)
56	B	OR56B4	6	(Malki 等人, 2015)

[0147]

[0148] 家族A犁鼻和视蛋白GPCR及它们参与炎症的当前证据等级(参见上文要点):

类型	亚型	符号	证据等级	参考文献
犁鼻	犁鼻 1 受体 1	VN1R1	1	
犁鼻	犁鼻 1 受体 2	VN1R2	1	
犁鼻	犁鼻 1 受体 3(基因/假基因)	VN1R3	1	
犁鼻	犁鼻 1 受体 4	VN1R4	1	
犁鼻	犁鼻 1 受体 5(基因/假基因)	VN1R5	1	
视蛋白	视蛋白 1(视锥色素)	OPN1LW	1	
视蛋白	视蛋白 1(视锥色素)	OPN1MW	1	
视蛋白	视蛋白 1(视锥色素)	OPN1MW2	1	
视蛋白	视蛋白 1(视锥色素)	OPN1MW3	1	
视蛋白	视蛋白 1(视锥色素)	OPN1SW	1	

[0149]

[0150]

视蛋白	视蛋白 3	OPN3	1	
视蛋白	视蛋白 4	OPN4	4	(Lee 等人, 2011)
视蛋白	视蛋白 5	OPN5	1	
视蛋白	视网膜 G 蛋白偶联受体	RGR	1	
视蛋白	视紫红质	RHO	1	
视蛋白	视网膜色素上皮衍生视紫红质同源物	RRH	1	

[0151] 家族B GPCR及它们参与炎症的当前证据等级(参见上文要点):

[0152]

类型	亚型	证据等级	参考文献
降钙素受体	CT 受体	6	(Body 等人, 1990)
降钙素受体	AMY1 受体	3–目前未知哪种 AMY 受体亚型介导此现象	(Masters 等人, 2010)
降钙素受体	AMY2 受体	3–目前未知哪种 AMY 受体亚型介导此现象	(Masters 等人, 2010)
降钙素受体	AMY3 受体	3–目前未知哪种 AMY 受体亚型介导此现象	(Masters 等人, 2010)
降钙素受体	降钙素受体样受体	6	(Hagner 等人, 2002)
降钙素受体	CGRP 受体	5	(Salmon 等人, 2001)
降钙素受体	AM1 受体	3–目前未知哪种 AM 受体亚型介导此现象	(Elsasser 和 Kahl, 2002)
降钙素受体	AM2 受体	3–目前未知哪种 AM 受体亚型介导此现象	(Elsasser 和 Kahl, 2002)
促肾上腺皮质激素释放因子受体	CRF1 受体	5	(Tsatsanis 等人, 2007)
促肾上腺皮质激素释放因子受体	CRF2 受体	5	(Tsatsanis 等人, 2007)
胰高血糖素受体家	GHRH 受体	6	(Chen 等人, 1999)

[0153]

族			
胰高血糖素受体家族	GIP 受体	5	(Nie 等人, 2012)
胰高血糖素受体家族	GLP-1 受体	5	(Kodera 等人, 2011)
胰高血糖素受体家族	GLP-2 受体	5	(Cani 等人, 2009)
胰高血糖素受体家族	胰高血糖素受体	5	(Buler 等人, 2012)
胰高血糖素受体家族	分泌素受体	5	(Petersen 和 Myren, 1974)
甲状旁腺激素受体	PTH1 受体	3–目前未知哪种 PTH 受体亚型介导此现象	(Jahnsen 等人, 2002)
甲状旁腺激素受体	PTH2 受体	3–目前未知哪种 PTH 受体亚型介导此现象	(Jahnsen 等人, 2002)
VIP 和 PACAP 受体	PAC1 受体	5	(Martinez 等人, 2002)
VIP 和 PACAP 受体	VPAC1 受体	7	(Yadav 等人, 2011)
VIP 和 PACAP 受体	VPAC2 受体	7	(Voice 等人, 2003)
黏附类别 GPCR	ADGRA1	1	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRA2	2	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRA3	1	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRB1	5	(Billings 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRB2	2	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRB3	2	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	CELSR1	2	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	CELSR2	2	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	CELSR3	2	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRD1	1	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRD2	1	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRE1	7	(Lin 等人, 2005)
黏附类别 GPCR	ADGRE2	7	(Chen 等人, 2011)
黏附类别 GPCR	ADGRE3	7	(Stacey 等人, 2001)

[0154]

黏附类别 GPCR	ADGRE4P	6	(Caminschi 等人, 2006)
黏附类别 GPCR	ADGRE5	7	(Galle 等人, 2006)
黏附类别 GPCR	ADGRF1	6	(Harvey 等人, 2010)
黏附类别 GPCR	ADGRF2	1	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRF3	2	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRF4	1	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRF5	1	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRG1	6	(Peng 等人, 2011)
黏附类别 GPCR	ADGRG2	1	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRG3	6	(Peng 等人, 2011)
黏附类别 GPCR	ADGRG4	2	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRG5	6	(Peng 等人, 2011)
黏附类别 GPCR	ADGRG6	1	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRG7	1	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRL1	1	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRL2	1	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRL3	1	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRL4	1	(Nijmeijer 等人, 2016)
黏附类别 GPCR	ADGRV1	2	(Nijmeijer 等人, 2016)

[0155] 家族C GPCR及它们参与炎症的当前证据等级(参见上文要点):

[0156]

类型	亚型	证据等级	参考文献
钙感知受体	CaS 受体	7	(Bandyopadhyay 等人, 2007)
钙感知受体	GPRC6 受体	6	(Wellendorph 和 Bräuner-Osborne, 2004)
GABAB 受体	GABAB1	5	(Ito 等人, 2013)
GABAB 受体	GABAB2	5	(Ito 等人, 2013)
GABAB 受体	GABAB 受体	5	(Ito 等人, 2013)
代谢型谷氨酸受体	mGlu1 受体	7	(Bhave 等人, 2001)
代谢型谷氨酸受体	mGlu2 受体	5	(Zammataro 等人, 2011)
代谢型谷氨酸受体	mGlu3 受体	5	(Boxall 等人, 1997)
代谢型谷氨酸受体	mGlu4 受体	6	(Fallarino 等人, 2010)
代谢型谷氨酸受体	mGlu5 受体	7	(Bhave 等人, 2001)
代谢型谷氨酸受体	mGlu6 受体	1	(Volpi 等人, 2012)
代谢型谷氨酸受体	mGlu7 受体	6	(Fallarino 等人, 2010)

[0157]

代谢型谷氨酸受体	mGlu8 受体	6	(Fallarino 等人, 2010)
滋味 1 受体	TAS1R1	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 1 受体	TAS1R2	6	(Malki 等人, 2015)
滋味 1 受体	TAS1R3	6	(Malki 等人, 2015)
C 类孤儿	GPR156	5	(Calderón-Garcidueñas 等人, 2012)
C 类孤儿	GPR158	5	(Sima 等人, 2015)
C 类孤儿	GPR179	5	(Kononikhin 等人, 2016)
C 类孤儿	GPRC5A	5	(Deng 等人, 2010)
C 类孤儿	GPRC5B	5	(Kim 等人, 2012)
C 类孤儿	GPRC5C	5	(Chhuon 等人, 2016)
C 类孤儿	GPRC5D	6	(Bräuner-Osborne 等人, 2001)

[0158] 卷曲家族(Frizzled Family)GPCR及它们参与炎症的当前证据等级(参见上文要点):

[0159]

亚型	证据等级	参考文献
FZD1	6	(Neumann等人,2010)
FZD2	6	(Zhao等人,1995)
FZD3	6	(Lu等人,2004)
FZD4	5	(You等人,2008)
FZD5	5	(You等人,2008)
FZD6	7	(Wu等人,2009)
FZD7	5	(Wada等人,2013)
FZD8	5	(Gregory等人,2010)
FZD9	5	(Wada等人,2013)
FZD10	1	(Dijksterhuis等人,2014)
SMO	1	(Dijksterhuis等人,2014)

[0160] 其他已经划分为GPCR超家族成员的7TM蛋白及它们参与炎症的当前证据等级(参见上文要点):

[0161]

亚型	证据等级	参考文献
GPR107	5	(Mo 等人, 2013)
GPR137	4	(Fischer 等人, 2012)
OR51E1	6	(Uhlén 等人, 2015)
TPRA1	4	(Guénard 等人, 2015)

[0162]

GPR143	6	(Hohenhaus 等人, 2013)
GPR157	4	(Jia 等人, 2012)

[0163] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:ADGRA2、ADGRB2、ADGRB3、ADGRF3、ADGRG4、ADGRV1、CELSR1、CELSR2、CELSR3、OX1受体、OX2受

体、PTH1受体、PTH2受体、AMY1受体、AMY2受体、AMY3受体、AM1受体、AM2受体、GPR63、GPR75、NMU2受体、OPN5、V1B受体、y6受体、5-HT4受体、GPR101、GPR119、GPR135、GPR137、GPR141、GPR149、GPR150、GPR151、GPR152、GPR157、GPR19、GPR25、GPR37、GPR37L1、GPR50、GPR62、LGR5、MRGPRE、MRGPRF、NTS2受体、OPN4、OPN4、OR10A7、OR10AG1、OR10Q1、OR10W1、OR12D3、OR13C2、OR13C3、OR13C4、OR13C5、OR13C8、OR13F1、OR13G1、OR1A2、OR1L1、OR1S1、OR1S2、OR2AK2、OR2D2、OR2D3、OR4A15、OR4C11、OR4C12、OR4C13、OR4C15、OR4C16、OR4K13、OR4K14、OR4K15、OR4K17、OR4N5、OR5AC2、OR5AK2、OR5AP2、OR5AR1、OR5AS1、OR5B12、OR5B17、OR5B2、OR5B21、OR5B3、OR5D13、OR5D14、OR5D16、OR5D18、OR5F1、OR5I1、OR5J2、OR5K3、OR5L1、OR5L2、OR5M1、OR5M10、OR5M11、OR5M3、OR5M8、OR5M9、OR5R1、OR5T1、OR5T2、OR5T3、OR5W2、OR6C74、OR6K6、OR6M1、OR6Q1、OR6X1、OR8H1、OR8H2、OR8H3、OR8J1、OR8J3、OR8K1、OR8K3、OR8K5、OR8U1、OR8U8、OR9A4、OR9G1、OR9G4、OR9G9、OR9Q2、TAAR3、TPRA1、Y4受体、5-HT1D受体、5-HT1E受体、ADGRB1、AT2受体、BB1受体、BB3受体、CGRP受体、CRF1受体、CRF2受体、ETA受体、ETB受体、FZD4、FZD5、FZD7、FZD8、FZD9、GABAB受体、GABAB1、GABAB2、GAL1受体、GIP受体、GLP-1受体、GLP-2受体、胰高血糖素受体、GnRH2受体、GPER、GPR107、GPR139、GPR156、GPR158、GPR161、GPR171、GPR179、GPR39、GPR45、GPR88、GPRC5A、GPRC5B、GPRC5C、H3受体、HCA1受体、LPA1受体、LPA3受体、LPA4受体、MC2受体、MC4受体、mGlu2受体、mGlu3受体、促胃动素受体、MRGPRD、MRGPRX1、MRGPRX3、NK2受体、NPFF1受体、NPFF2受体、NPS受体、NTS1受体、OR1D2、OR2AG1、OT受体、PAC1受体、RXFP1受体、分泌素受体、TSH受体、UT受体、V1A受体、V2受体、α2A-肾上腺素能受体、α2B-肾上腺素能受体、α2C-肾上腺素能受体、β1-肾上腺素能受体、β3-肾上腺素能受体、5-HT1B受体、5-HT1F受体、5-HT2B受体、5-HT2C受体、5-HT5A受体、5-HT6受体、5-HT7受体、ADGRE4P、ADGRF1、ADGRG1、ADGRG3、ADGRG5、降钙素受体样受体、CB1受体、CB2受体、CCK1受体、CCK2受体、CT受体、D1受体、D2受体、D3受体、D4受体、D5受体、FFA1受体、FFA3受体、FSH受体、FZD1、FZD2、FZD3、GHRH受体、GnRH1受体、GPBA受体、GPR1、GPR119、GPR12、GPR142、GPR143、GPR146、GPR148、GPR153、GPR160、GPR162、GPR17、GPR173、GPR174、GPR176、GPR18、GPR182、GPR20、GPR22、GPR26、GPR27、GPR3、GPR33、GPR35、GPR6、GPR61、GPR78、GPR82、GPR83、GPR84、GPR85、GPR87、GPRC5D、GPRC6受体、HCA2受体、HCA3受体、吻素受体、LGR4、LGR6、LH受体、LPA2受体、LPA6受体、M1受体、M2受体、M3受体、M4受体、M5受体、MAS1L、MC3受体、MC5受体、MCH2受体、mGlu4受体、mGlu7受体、mGlu8受体、MRGPRG、NOP受体、NPBW1受体、NPBW2受体、OPN3、OR11H1、OR2A1、OR2A2、OR2A4、OR2A42、OR2A7、OR2B11、OR2B6、OR2C1、OR2C3、OR2J3、OR2L13、OR2T11、OR2T34、OR2W3、OR3A3、OR4D10、OR4M1、OR4Q3、OR51A2、OR51A4、OR51A7、OR51B2、OR51B4、OR51B5、OR51B6、OR51D1、OR51E1、OR51E1、OR51E2、OR51F1、OR51F2、OR51G1、OR51G2、OR51I1、OR51I2、OR51J1、OR51L1、OR51M1、OR51Q1、OR51S1、OR51T1、OR51V1、OR52A1、OR52A4、OR52A5、OR52B2、OR52B4、OR52B6、OR52D1、OR52E2、OR52E4、OR52E5、OR52E6、OR52E8、OR52H1、OR52I1、OR52I2、OR52J3、OR52K1、OR52K2、OR52L1、OR52M1、OR52N1、OR52N2、OR52N4、OR52N5、OR52R1、OR52W1、OR56A1、OR56A3、OR56A4、OR56A5、OR56B1、OR56B4、OR6V1、OR7D2、OR9A2、酮戊二酸受体、P2RY10、P2RY8、P2Y12受体、P2Y4受体、PrRP受体、QRFP受体、RXFP2受体、RXFP4受体、sst1受体、sst2受体、sst3受体、sst4受体、sst5受体、TA1受体、TAAR2、TAAR5、TAAR6、TAAR8、TAAR9、TAS1R1、TAS1R2、TAS1R3、TAS2R1、TAS2R10、TAS2R13、TAS2R14、TAS2R16、TAS2R19、TAS2R20、TAS2R3、TAS2R30、TAS2R31、TAS2R38、TAS2R39、

TAS2R4、TAS2R40、TAS2R41、TAS2R42、TAS2R43、TAS2R45、TAS2R46、TAS2R5、TAS2R50、TAS2R60、TAS2R7、TAS2R8、TAS2R9、TRH1受体、Y1受体、Y2受体、Y5受体、α1A-肾上腺素能受体、α1B-肾上腺素能受体、α1D-肾上腺素能受体、δ受体、5-HT1A受体、5-HT2A受体、A1受体、A2A受体、A2B受体、A3受体、ACKR1、ACKR2、ACKR3、ACKR4、ADGRE1、ADGRE2、ADGRE3、ADGRE5、爱帕琳受体、AT1受体、B1受体、B2受体、BB2(GRP)受体、BLT1受体、BLT2受体、C3a受体、C5a1受体、C5a2受体、CaS受体、CCR1、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCRL2、趋化素受体、CX3CR1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CysLT1受体、CysLT2受体、DPI受体、DP2受体、EP1受体、EP2受体、EP3受体、EP4受体、FFA2受体、FFA4受体、FP受体、FPR1、FPR2/ALX、FPR2/ALX、FPR3、FZD6、GAL2受体、GAL3受体、生长素释放肽受体、GPR132、GPR15、GPR18、GPR183、GPR21、GPR31、GPR32、GPR34、GPR4、GPR55、GPR55、GPR65、GPR68、H1受体、H2受体、H4受体、IP受体、LPA5受体、MAS1、MC1受体、MCH1受体、mGlu1受体、mGlu5受体、MRGPRX2、MT1受体、MT2受体、NK1受体、NK3受体、NMU1受体、OXE受体、P2Y1受体、P2Y11受体、P2Y13受体、P2Y14受体、P2Y2受体、P2Y6受体、PAF受体、PAR1、PAR2、PAR3、PAR4、PKR1、PKR2、S1P1受体、S1P2受体、S1P3受体、S1P4受体、S1P5受体、琥珀酸受体、TP受体、VPAC1受体、VPAC2受体、XCR1、β2-肾上腺素能受体、κ受体、μ受体。

[0164] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自第[00095]段的GPCR,除了CCR4之外。

[0165] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自第[00095]段的GPCR,除了CCR5之外。

[0166] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自第[00095]段的GPCR,除了CCR4和CCR5之外。

[0167] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自第[00095]段的GPCR,除了CCR4、CCR5、CCR10和CXCR3之外。

[0168] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自第[00095]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能p2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳(apelin)受体、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、神经降压肽NTS2受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0169] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自第[00095]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR4、CCR5、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、神经降压肽NTS2受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0170] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自第[00095]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、M2受体和OX1受体之外。

[0171] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自第[00095]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4、M2受体和OX1受体之外。

[0172] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自第[00095]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR5、M2受体和OX1受体之外。

[0173] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自第[00095]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4、CCR5、M2受体和OX1受体之外。

[0174] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自第[00095]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α1A受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR3、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、M2受体、神经降压肽NTS2受体、OX1受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0175] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自第[00095]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4、CCR5、CCR10、CXCR3、M2受体和OX1受体之外。

[0176] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自第[00095]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α1A受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR3、CCR4、CCR5、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、M2受体、神经降压肽NTS2受体、OX1受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0177] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:OX1受体、OX2受体、PTH1受体、PTH2受体、AMY1受体、AMY2受体、AMY3受体、AM1受体、AM2受体、GPR63、GPR75、NMU2受体、OPN5、V1B受体、y6受体、5-HT4受体、GPR101、GPR119、GPR135、GPR137、GPR141、GPR149、GPR150、GPR151、GPR152、GPR157、GPR19、GPR25、GPR37、GPR37L1、GPR50、GPR62、LGR5、MRGPRE、MRGPRF、NTS2受体、OPN4、OPN4、OR10A7、OR10AG1、OR10Q1、OR10W1、OR12D3、OR13C2、OR13C3、OR13C4、OR13C5、OR13C8、OR13F1、OR13G1、OR1A2、OR1L1、OR1S1、OR1S2、OR2AK2、OR2D2、OR2D3、OR4A15、OR4C11、OR4C12、OR4C13、OR4C15、OR4C16、OR4K13、OR4K14、OR4K15、OR4K17、OR4N5、OR5AC2、OR5AK2、OR5AP2、OR5AR1、OR5AS1、OR5B12、OR5B17、OR5B2、OR5B21、OR5B3、OR5D13、OR5D14、OR5D16、OR5D18、OR5F1、OR5I1、OR5J2、OR5K3、OR5L1、OR5L2、OR5M1、OR5M10、OR5M11、OR5M3、OR5M8、OR5M9、OR5R1、OR5T1、OR5T2、OR5T3、OR5W2、OR6C74、OR6K6、OR6M1、OR6Q1、OR6X1、OR8H1、OR8H2、OR8H3、OR8J1、OR8J3、OR8K1、OR8K3、OR8K5、OR8U1、OR8U8、OR9A4、OR9G1、OR9G4、OR9G9、OR9Q2、TAAR3、TPRA1、Y4受体、5-HT1D受体、5-HT1E受体、ADGRB1、AT2受体、BB1受体、BB3受体、CGRP受体、CRF1受体、CRF2受体、ETA受体、ETB受体、FZD4、FZD5、FZD7、FZD8、FZD9、GABAB受体、GABAB1、GABAB2、GAL1受体、GIP受体、GLP-1受体、GLP-2受体、胰高血糖素受体、GnRH2受体、GPER、GPR107、GPR139、GPR156、GPR158、GPR161、GPR171、GPR179、GPR39、GPR45、GPR88、GPRC5A、GPRC5B、GPRC5C、H3受体、HCA1受体、LPA1受体、LPA3受体、LPA4受体、MC2受体、MC4受体、mGlu2受体、mGlu3受体、促胃动素受体、MRGPRD、MRGPRX1、MRGPRX3、NK2受体、NPFF1受体、NPFF2受体、NPS受体、NTS1受体、OR1D2、OR2AG1、OT受体、PAC1受体、RXFP1受体、分泌素受体、TSH受体、UT受体、V1A受体、V2受体、α2A-肾上腺素能受体、α2B-肾上腺素能受体、α2C-肾上腺素能受体、β1-肾上腺素能受体、β3-肾上腺素能受体、5-HT1B受体、5-HT1F受体、5-HT2B受体、5-HT2C受

体、5-HT5A受体、5-HT6受体、5-HT7受体、ADGRE4P、ADGRF1、ADGRG1、ADGRG3、ADGRG5、降钙素受体样受体、CB1受体、CB2受体、CCK1受体、CCK2受体、CT受体、D1受体、D2受体、D3受体、D4受体、D5受体、FFA1受体、FFA3受体、FSH受体、FZD1、FZD2、FZD3、GHRH受体、GnRH1受体、GPBA受体、GPR1、GPR119、GPR12、GPR142、GPR143、GPR146、GPR148、GPR153、GPR160、GPR162、GPR17、GPR173、GPR174、GPR176、GPR18、GPR182、GPR20、GPR22、GPR26、GPR27、GPR3、GPR33、GPR35、GPR6、GPR61、GPR78、GPR82、GPR83、GPR84、GPR85、GPR87、GPRC5D、GPRC6受体、HCA2受体、HCA3受体、吻素受体、LGR4、LGR6、LH受体、LPA2受体、LPA6受体、M1受体、M2受体、M3受体、M4受体、M5受体、MAS1L、MC3受体、MC5受体、MCH2受体、mGlu4受体、mGlu7受体、mGlu8受体、MRGPRG、NOP受体、NPBW1受体、NPBW2受体、OPN3、OR11H1、OR2A1、OR2A2、OR2A4、OR2A42、OR2A7、OR2B11、OR2B6、OR2C1、OR2C3、OR2J3、OR2L13、OR2T11、OR2T34、OR2W3、OR3A3、OR4D10、OR4M1、OR4Q3、OR51A2、OR51A4、OR51A7、OR51B2、OR51B4、OR51B5、OR51B6、OR51D1、OR51E1、OR51E1、OR51E2、OR51F1、OR51F2、OR51G1、OR51G2、OR51I1、OR51I2、OR51J1、OR51L1、OR51M1、OR51Q1、OR51S1、OR51T1、OR51V1、OR52A1、OR52A4、OR52A5、OR52B2、OR52B4、OR52B6、OR52D1、OR52E2、OR52E4、OR52E5、OR52E6、OR52E8、OR52H1、OR52I1、OR52I2、OR52J3、OR52K1、OR52K2、OR52L1、OR52M1、OR52N1、OR52N2、OR52N4、OR52N5、OR52R1、OR52W1、OR56A1、OR56A3、OR56A4、OR56A5、OR56B1、OR56B4、OR6V1、OR7D2、OR9A2、酮戊二酸受体、P2RY10、P2RY8、P2Y12受体、P2Y4受体、PrRP受体、QRFP受体、RXFP2受体、RXFP4受体、sst1受体、sst2受体、sst3受体、sst4受体、sst5受体、TA1受体、TAAR2、TAAR5、TAAR6、TAAR8、TAAR9、TAS1R1、TAS1R2、TAS1R3、TAS2R1、TAS2R10、TAS2R13、TAS2R14、TAS2R16、TAS2R19、TAS2R20、TAS2R3、TAS2R30、TAS2R31、TAS2R38、TAS2R39、TAS2R4、TAS2R40、TAS2R41、TAS2R42、TAS2R43、TAS2R45、TAS2R46、TAS2R5、TAS2R50、TAS2R60、TAS2R7、TAS2R8、TAS2R9、TRH1受体、Y1受体、Y2受体、Y5受体、α1A-肾上腺素能受体、α1B-肾上腺素能受体、α1D-肾上腺素能受体、6受体、5-HT1A受体、5-HT2A受体、A1受体、A2A受体、A2B受体、A3受体、ACKR1、ACKR2、ACKR3、ACKR4、ADGRE1、ADGRE2、ADGRE3、ADGRE5、爱帕琳受体、AT1受体、B1受体、B2受体、BB2(GRP)受体、BLT1受体、BLT2受体、C3a受体、C5a1受体、C5a2受体、CaS受体、CCR1、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCRL2、趋化素受体、CX3CR1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CysLT1受体、CysLT2受体、DP1受体、DP2受体、EP1受体、EP2受体、EP3受体、EP4受体、FFA2受体、FFA4受体、FP受体、FPR1、FPR2/ALX、FPR2/ALX、FPR3、FZD6、GAL2受体、GAL3受体、生长素释放肽受体、GPR132、GPR15、GPR18、GPR183、GPR21、GPR31、GPR32、GPR34、GPR4、GPR55、GPR55、GPR65、GPR68、H1受体、H2受体、H4受体、IP受体、LPA5受体、MAS1、MC1受体、MCH1受体、mGlu1受体、mGlu5受体、MRGPRX2、MT1受体、MT2受体、NK1受体、NK3受体、NMU1受体、OXE受体、P2Y1受体、P2Y11受体、P2Y13受体、P2Y14受体、P2Y2受体、P2Y6受体、PAF受体、PAR1、PAR2、PAR3、PAR4、PKR1、PKR2、S1P1受体、S1P2受体、S1P3受体、S1P4受体、S1P5受体、琥珀酸受体、TP受体、VPAC1受体、VPAC2受体、XCR1、β2-肾上腺素能受体、κ受体、μ受体。

[0178] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000109]段的GPCR,除了CCR4之外。

[0179] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000109]段的GPCR,除了CCR5之外。

[0180] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000109]段的

GPCR,除了CCR4和CCR5之外。

[0181] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000109]段的GPCR,除了CCR4、CCR5、CCR10和CXCR3之外。

[0182] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000109]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能p1受体、肾上腺素能p2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、神经降压肽NTS2受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0183] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000109]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR4、CCR5、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、神经降压肽NTS2受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0184] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:OX1受体、OX2受体、PTH1受体、PTH2受体、AMY1受体、AMY2受体、AMY3受体、AM1受体、AM2受体。

[0185] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPcR选自第[000109]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、M2受体和OX1受体之外。

[0186] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000109]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4、M2受体和OX1受体之外。

[0187] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000109]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR5、M2受体和OX1受体之外。

[0188] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000109]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4、CCR5、M2受体和OX1受体之外。

[0189] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000109]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α1A受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR3、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、M2受体、神经降压肽NTS2受体、OX1受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0190] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000109]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4、CCR5、CCR10、CXCR3、M2受体和OX1受体之外。

[0191] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000109]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α1A受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR3、CCR4、CCR5、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、M2受体、神经降压肽NTS2受体、OX1受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0192] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:5-HT4受体、GPR101、GPR119、GPR135、GPR137、GPR141、GPR149、GPR150、GPR151、GPR152、GPR157、GPR19、GPR25、GPR37、GPR37L1、GPR50、GPR62、LGR5、MRGPRE、MRGPRF、NTS2受体、OPN4、OPN4、OR10A7、OR10AG1、OR10Q1、OR10W1、OR12D3、OR13C2、OR13C3、OR13C4、OR13C5、OR13C8、OR13F1、OR13G1、OR1A2、OR1L1、OR1S1、OR1S2、OR2AK2、OR2D2、OR2D3、OR4A15、OR4C11、OR4C12、OR4C13、OR4C15、OR4C16、OR4K13、OR4K14、OR4K15、OR4K17、OR4N5、OR5AC2、OR5AK2、OR5AP2、OR5AR1、OR5AS1、OR5B12、OR5B17、OR5B2、OR5B21、OR5B3、OR5D13、OR5D14、OR5D16、OR5D18、OR5F1、OR5I1、OR5J2、OR5K3、OR5L1、OR5L2、OR5M1、OR5M10、OR5M11、OR5M3、OR5M8、OR5M9、OR5R1、OR5T1、OR5T2、OR5T3、OR5W2、OR6C74、OR6K6、OR6M1、OR6Q1、OR6X1、OR8H1、OR8H2、OR8H3、OR8J1、OR8J3、OR8K1、OR8K3、OR8K5、OR8U1、OR8U8、OR9A4、OR9G1、OR9G4、OR9G9、OR9Q2、TAAR3、TPRA1、Y4受体、5-HT1D受体、5-HT1E受体、ADGRB1、AT2受体、BB1受体、BB3受体、CGRP受体、CRF1受体、CRF2受体、ETA受体、ETB受体、FZD4、FZD5、FZD7、FZD8、FZD9、GABAB受体、GABAB1、GABAB2、GAL1受体、GIP受体、GLP-1受体、GLP-2受体、胰高血糖素受体、GnRH2受体、GPER、GPR107、GPR139、GPR156、GPR158、GPR161、GPR171、GPR179、GPR39、GPR45、GPR88、GPRC5A、GPRC5B、GPRC5C、H3受体、HCA1受体、LPA1受体、LPA3受体、LPA4受体、MC2受体、MC4受体、mGlu2受体、mGlu3受体、促胃动素受体、MRGPRD、MRGPRX1、MRGPRX3、NK2受体、NPFF1受体、NPFF2受体、NPS受体、NTS1受体、OR1D2、OR2AG1、OT受体、PAC1受体、RXFP1受体、分泌素受体、TSH受体、UT受体、V1A受体、V2受体、α2A-肾上腺素能受体、α2B-肾上腺素能受体、α2C-肾上腺素能受体、β1-肾上腺素能受体、β3-肾上腺素能受体、5-HT1B受体、5-HT1F受体、5-HT2B受体、5-HT2C受体、5-HT5A受体、5-HT6受体、5-HT7受体、ADGRE4P、ADGRF1、ADGRG1、ADGRG3、ADGRG5、降钙素受体样受体、CB1受体、CB2受体、CCK1受体、CCK2受体、CT受体、D1受体、D2受体、D3受体、D4受体、D5受体、FFA1受体、FFA3受体、FSH受体、FZD1、FZD2、FZD3、GHRH受体、GnRH1受体、GPBA受体、GPR1、GPR119、GPR12、GPR142、GPR143、GPR146、GPR148、GPR153、GPR160、GPR162、GPR17、GPR173、GPR174、GPR176、GPR18、GPR182、GPR20、GPR22、GPR26、GPR27、GPR3、GPR33、GPR35、GPR6、GPR61、GPR78、GPR82、GPR83、GPR84、GPR85、GPR87、GPRC5D、GPRC6受体、HCA2受体、HCA3受体、吻素受体、LGR4、LGR6、LH受体、LPA2受体、LPA6受体、M1受体、M2受体、M3受体、M4受体、M5受体、MAS1L、MC3受体、MC5受体、MCH2受体、mGlu4受体、mGlu7受体、mGlu8受体、MRGPRG、NOP受体、NPBW1受体、NPBW2受体、OPN3、OR11H1、OR2A1、OR2A2、OR2A4、OR2A42、OR2A7、OR2B11、OR2B6、OR2C1、OR2C3、OR2J3、OR2L13、OR2T11、OR2T34、OR2W3、OR3A3、OR4D10、OR4M1、OR4Q3、OR51A2、OR51A4、OR51A7、OR51B2、OR51B4、OR51B5、OR51B6、OR51D1、OR51E1、OR51E1、OR51E2、OR51F1、OR51F2、OR51G1、OR51G2、OR51I1、OR51I2、OR51J1、OR51L1、OR51M1、OR51Q1、OR51S1、OR51T1、OR51V1、OR52A1、OR52A4、OR52A5、OR52B2、OR52B4、OR52B6、OR52D1、OR52E2、OR52E4、OR52E5、OR52E6、OR52E8、OR52H1、OR52I1、OR52I2、OR52J3、OR52K1、OR52K2、OR52L1、OR52M1、OR52N1、OR52N2、OR52N4、OR52N5、OR52R1、OR52W1、OR56A1、OR56A3、OR56A4、OR56A5、OR56B1、OR56B4、OR6V1、OR7D2、OR9A2、酮戊二酸受体、P2RY10、P2RY8、P2Y12受体、P2Y4受体、PrRP受体、QRFP受体、RXFP2受体、RXFP4受体、sst1受体、sst2受体、sst3受体、sst4受体、sst5受体、TA1受体、TAAR2、TAAR5、TAAR6、TAAR8、TAAR9、TAS1R1、TAS1R2、TAS1R3、TAS2R1、TAS2R10、TAS2R13、TAS2R14、TAS2R16、TAS2R19、TAS2R20、TAS2R3、TAS2R30、TAS2R31、TAS2R38、TAS2R39、TAS2R4、TAS2R40、TAS2R41、

TAS2R42、TAS2R43、TAS2R45、TAS2R46、TAS2R5、TAS2R50、TAS2R60、TAS2R7、TAS2R8、TAS2R9、TRH1受体、Y1受体、Y2受体、Y5受体、α1A-肾上腺素能受体、α1B-肾上腺素能受体、α1D-肾上腺素能受体、δ受体、5-HT1A受体、5-HT2A受体、A1受体、A2A受体、A2B受体、A3受体、ACKR1、ACKR2、ACKR3、ACKR4、ADGRE1、ADGRE2、ADGRE3、ADGRE5、爱帕琳受体、AT1受体、B1受体、B2受体、BB2(GRP)受体、BLT1受体、BLT2受体、C3a受体、C5a1受体、C5a2受体、CaS受体、CCR1、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCRL2、趋化素受体、CX3CR1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CysLT1受体、CysLT2受体、DP1受体、DP2受体、EP1受体、EP2受体、EP3受体、EP4受体、FFA2受体、FFA4受体、FP受体、FPR1、FPR2/ALX、FPR2/ALX、FPR3、FZD6、GAL2受体、GAL3受体、生长素释放肽受体、GPR132、GPR15、GPR18、GPR183、GPR21、GPR31、GPR32、GPR34、GPR4、GPR55、GPR55、GPR65、GPR68、H1受体、H2受体、H4受体、IP受体、LPA5受体、MAS1、MC1受体、MCH1受体、mGlu1受体、mGlu5受体、MRGPRX2、MT1受体、MT2受体、NK1受体、NK3受体、NMU1受体、OXE受体、P2Y1受体、P2Y11受体、P2Y13受体、P2Y14受体、P2Y2受体、P2Y6受体、PAF受体、PAR1、PAR2、PAR3、PAR4、PKR1、PKR2、S1P1受体、S1P2受体、S1P3受体、S1P4受体、S1P5受体、琥珀酸受体、TP受体、VPAC1受体、VPAC2受体、XCR1、β2-肾上腺素能受体、κ受体、μ受体。

[0193] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000124]段的GPCR,除了CCR4之外。

[0194] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000124]段的GPCR,除了CCR5之外。

[0195] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000124]段的GPCR,除了CCR4和CCR5之外。

[0196] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000124]段的GPCR,除了CCR4、CCR5、CCR10和CXCR3之外。

[0197] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000124]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能p1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、神经降压肽NTS2受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0198] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000124]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR4、CCR5、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、神经降压肽NTS2受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0199] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000124]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3和M2受体之外。

[0200] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000124]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4和M2受体之外。

[0201] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000124]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR5和M2受体之外。

[0202] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000124]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4、CCR5和M2受体之外。

[0203] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000124]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α1A受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能p1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR3、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、M2受体、神经降压肽NTS2受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0204] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000124]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4、CCR5、CCR10、CXCR3和M2受体之外。

[0205] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000124]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α1A受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR3、CCR4、CCR5、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、M2受体、神经降压肽NTS2受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0206] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:5-HT1D受体、5-HT1E受体、ADGRB1、AT2受体、BB1受体、BB3受体、CGRP受体、CRF1受体、CRF2受体、ETA受体、ETB受体、FZD4、FZD5、FZD7、FZD8、FZD9、GABAB受体、GABAB1、GABAB2、GAL1受体、GIP受体、GLP-1受体、GLP-2受体、胰高血糖素受体、GnRH2受体、GPER、GPR107、GPR139、GPR156、GPR158、GPR161、GPR171、GPR179、GPR39、GPR45、GPR88、GPRC5A、GPRC5B、GPRC5C、H3受体、HCA1受体、LPA1受体、LPA3受体、LPA4受体、MC2受体、MC4受体、mGlu2受体、mGlu3受体、促胃动素受体、MRGPRD、MRGPRX1、MRGPRX3、NK2受体、NPFF1受体、NPFF2受体、NPS受体、NTS1受体、OR1D2、OR2AG1、OT受体、PAC1受体、RXFP1受体、分泌素受体、TSH受体、UT受体、V1A受体、V2受体、α2A-肾上腺素能受体、α2B-肾上腺素能受体、α2C-肾上腺素能受体、β1-肾上腺素能受体、β3-肾上腺素能受体、5-HT1B受体、5-HT1F受体、5-HT2B受体、5-HT2C受体、5-HT5A受体、5-HT6受体、5-HT7受体、ADGRE4P、ADGRF1、ADGRG1、ADGRG3、ADGRG5、降钙素受体样受体、CB1受体、CB2受体、CCK1受体、CCK2受体、CT受体、D1受体、D2受体、D3受体、D4受体、D5受体、FFA1受体、FFA3受体、FSH受体、FZD1、FZD2、FZD3、GHRH受体、GnRH1受体、GPBA受体、GPR1、GPR119、GPR12、GPR142、GPR143、GPR146、GPR148、GPR153、GPR160、GPR162、GPR17、GPR173、GPR174、GPR176、GPR18、GPR182、GPR20、GPR22、GPR26、GPR27、GPR3、GPR33、GPR35、GPR6、GPR61、GPR78、GPR82、GPR83、GPR84、GPR85、GPR87、GPRC5D、GPRC6受体、HCA2受体、HCA3受体、吻素受体、LGR4、LGR6、LH受体、LPA2受体、LPA6受体、M1受体、M2受体、M3受体、M4受体、M5受体、MAS1L、MC3受体、MC5受体、MCH2受体、mGlu4受体、mGlu7受体、mGlu8受体、MRGPRG、NOP受体、NPBW1受体、NPBW2受体、OPN3、OR11H1、OR2A1、OR2A2、OR2A4、OR2A42、OR2A7、OR2811、OR2B6、OR2C1、OR2C3、OR2J3、OR2L13、OR2T11、OR2T34、OR2W3、OR3A3、OR4D10、OR4M1、OR4Q3、OR51A2、OR51A4、OR51A7、OR51B2、OR51B4、OR51B5、OR51B6、OR51D1、OR51E1、OR51E1、OR51E2、

OR51F1、OR51F2、OR51G1、OR51G2、OR51I1、OR51I2、OR51J1、OR51L1、OR51M1、OR51Q1、OR51S1、OR51T1、OR51V1、OR52A1、OR52A4、OR52A5、OR52B2、OR52B4、OR52B6、OR52D1、OR52E2、OR52E4、OR52E5、OR52E6、OR52E8、OR52H1、OR52I1、OR52I2、OR52J3、OR52K1、OR52K2、OR52L1、OR52M1、OR52N1、OR52N2、OR52N4、OR52N5、OR52R1、OR52W1、OR56A1、OR56A3、OR56A4、OR56A5、OR56B1、OR56B4、OR6V1、OR7D2、OR9A2、酮戊二酸受体、P2RY10、P2RY8、P2Y12受体、P2Y4受体、PrRP受体、QRFP受体、RXFP2受体、RXFP4受体、sst1受体、sst2受体、sst3受体、sst4受体、sst5受体、TA1受体、TAAR2、TAAR5、TAAR6、TAAR8、TAAR9、TAS1R1、TAS1R2、TAS1R3、TAS2R1、TAS2R10、TAS2R13、TAS2R14、TAS2R16、TAS2R19、TAS2R20、TAS2R3、TAS2R30、TAS2R31、TAS2R38、TAS2R39、TAS2R4、TAS2R40、TAS2R41、TAS2R42、TAS2R43、TAS2R45、TAS2R46、TAS2R5、TAS2R50、TAS2R60、TAS2R7、TAS2R8、TAS2R9、TRH1受体、Y1受体、Y2受体、Y5受体、α1A-肾上腺素能受体、α1B-肾上腺素能受体、α1D-肾上腺素能受体、δ受体、5-HT1A受体、5-HT2A受体、A1受体、A2A受体、A2B受体、A3受体、ACKR1、ACKR2、ACKR3、ACKR4、ADGRE1、ADGRE2、ADGRE3、ADGRE5、爱帕琳受体、AT1受体、B1受体、B2受体、BB2(GRP)受体、BLT1受体、BLT2受体、C3a受体、C5a1受体、C5a2受体、CaS受体、CCR1、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCRL2、趋化素受体、CX3CR1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CysLT1受体、CysLT2受体、DP1受体、DP2受体、EP1受体、EP2受体、EP3受体、EP4受体、FFA2受体、FFA4受体、FP受体、FPR1、FPR2/ALX、FPR2/ALX、FPR3、FZD6、GAL2受体、GAL3受体、生长素释放肽受体、GPR132、GPR15、GPR18、GPR183、GPR21、GPR31、GPR32、GPR34、GPR4、GPR55、GPR55、GPR65、GPR68、H1受体、H2受体、H4受体、IP受体、LPA5受体、MAS1、MC1受体、MCH1受体、mGlu1受体、mGlu5受体、MRGPRX2、MT1受体、MT2受体、NK1受体、NK3受体、NMU1受体、OXE受体、P2Y1受体、P2Y11受体、P2Y13受体、P2Y14受体、P2Y2受体、P2Y6受体、PAF受体、PAR1、PAR2、PAR3、PAR4、PKR1、PKR2、S1P1受体、S1P2受体、S1P3受体、S1P4受体、S1P5受体、琥珀酸受体、TP受体、VPAC1受体、VPAC2受体、XCR1、β2-肾上腺素能受体、κ受体、μ受体。

[0207] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000138]段的GPCR,除了CCR4之外。

[0208] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000138]段的GPCR,除了CCR5之外。

[0209] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000138]段的GPCR,除了CCR4和CCR5之外。

[0210] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000138]段的GPCR,除了CCR4、CCR5、CCR10和CXCR3之外。

[0211] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000138]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0212] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000138]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受

体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR4、CCR5、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0213] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000138]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3和M2受体之外。

[0214] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000138]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4和M2受体之外。

[0215] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000138]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR5和M2受体之外。

[0216] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000138]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4、CCR5和M2受体之外。

[0217] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000138]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α1A受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR3、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、M2受体、神经降压肽NTS2受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0218] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000138]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4、CCR5、CCR10、CXCR3和M2受体之外。

[0219] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000138]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α1A受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR3、CCR4、CCR5、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、M2受体、神经降压肽NTS2受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0220] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:5-HT1B受体、5-HT1F受体、5-HT2B受体、5-HT2C受体、5-HT5A受体、5-HT6受体、5-HT7受体、ADGRE4P、ADGRF1、ADGRG1、ADGRG3、ADGRG5、降钙素受体样受体、CB1受体、CB2受体、CCK1受体、CCK2受体、CT受体、D1受体、D2受体、D3受体、D4受体、D5受体、FFA1受体、FFA3受体、FSH受体、FZD1、FZD2、FZD3、GHRH受体、GnRH1受体、GPBA受体、GPR1、GPR119、GPR12、GPR142、GPR143、GPR146、GPR148、GPR153、GPR160、GPR162、GPR17、GPR173、GPR174、GPR176、GPR18、GPR182、GPR20、GPR22、GPR26、GPR27、GPR3、GPR33、GPR35、GPR6、GPR61、GPR78、GPR82、GPR83、GPR84、GPR85、GPR87、GPRC5D、GPRC6受体、HCA2受体、HCA3受体、吻素受体、LGR4、LGR6、LH受体、LPA2受体、LPA6受体、M1受体、M2受体、M3受体、M4受体、M5受体、MAS1L、MC3受体、MC5受体、MCH2受体、mGlu4受体、mGlu7受体、mGlu8受体、MRGPRG、NOP受体、NPBW1受体、NPBW2受体、OPN3、OR11H1、OR2A1、OR2A2、OR2A4、OR2A42、OR2A7、OR2B11、OR2B6、OR2C1、OR2C3、OR2J3、OR2L13、OR2T11、OR2T34、OR2W3、OR3A3、OR4D10、OR4M1、OR4Q3、OR51A2、OR51A4、OR51A7、OR51B2、OR51B4、OR51B5、OR51B6、OR51D1、OR51E1、OR51E1、OR51E2、OR51F1、OR51F2、OR51G1、

OR51G2、OR51I1、OR51I2、OR51J1、OR51L1、OR51M1、OR51Q1、OR51S1、OR51T1、OR51V1、OR52A1、OR52A4、OR52A5、OR52B2、OR52B4、OR52B6、OR52D1、OR52E2、OR52E4、OR52E5、OR52E6、OR52E8、OR52H1、OR52I1、OR52I2、OR52J3、OR52K1、OR52K2、OR52L1、OR52M1、OR52N1、OR52N2、OR52N4、OR52N5、OR52R1、OR52W1、OR56A1、OR56A3、OR56A4、OR56A5、OR56B1、OR56B4、OR6V1、OR7D2、OR9A2、酮戊二酸受体、P2RY10、P2RY8、P2Y12受体、P2Y4受体、PrRP受体、QRFP受体、RXFP2受体、RXFP4受体、sst1受体、sst2受体、sst3受体、sst4受体、sst5受体、TA1受体、TAAR2、TAAR5、TAAR6、TAAR8、TAAR9、TAS1R1、TAS1R2、TAS1R3、TAS2R1、TAS2R10、TAS2R13、TAS2R14、TAS2R16、TAS2R19、TAS2R20、TAS2R3、TAS2R30、TAS2R31、TAS2R38、TAS2R39、TAS2R4、TAS2R40、TAS2R41、TAS2R42、TAS2R43、TAS2R45、TAS2R46、TAS2R5、TAS2R50、TAS2R60、TAS2R7、TAS2R8、TAS2R9、TRH1受体、Y1受体、Y2受体、Y5受体、α1A-肾上腺素能受体、α1B-肾上腺素能受体、α1D-肾上腺素能受体、δ受体、5-HT1A受体、5-HT2A受体、A1受体、A2A受体、A2B受体、A3受体、ACKR1、ACKR2、ACKR3、ACKR4、ADGRE1、ADGRE2、ADGRE3、ADGRE5、爱帕琳受体、AT1受体、B1受体、B2受体、BB2(GRP)受体、BLT1受体、BLT2受体、C3a受体、C5a1受体、C5a2受体、CaS受体、CCR1、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCRL2、趋化素受体、CX3CR1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CysLT1受体、CysLT2受体、DP1受体、DP2受体、EP1受体、EP2受体、EP3受体、EP4受体、FFA2受体、FFA4受体、FP受体、FPR1、FPR2/ALX、FPR2/ALX、FPR3、FZD6、GAL2受体、GAL3受体、生长素释放肽受体、GPR132、GPR15、GPR18、GPR183、GPR21、GPR31、GPR32、GPR34、GPR4、GPR55、GPR55、GPR65、GPR68、H1受体、H2受体、H4受体、IP受体、LPA5受体、MAS1、MC1受体、MCH1受体、mGlu1受体、mGlu5受体、MRGPRX2、MT1受体、MT2受体、NK1受体、NK3受体、NMU1受体、OXE受体、P2Y1受体、P2Y11受体、P2Y13受体、P2Y14受体、P2Y2受体、P2Y6受体、PAF受体、PAR1、PAR2、PAR3、PAR4、PKR1、PKR2、S1P1受体、S1P2受体、S1P3受体、S1P4受体、S1P5受体、琥珀酸受体、TP受体、VPAC1受体、VPAC2受体、XCR1、β2-肾上腺素能受体、κ受体、μ受体。

[0221] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000152]段的GPCR,除了CCR4之外。

[0222] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000152]段的GPCR,除了CCR5之外。

[0223] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000152]段的GPCR,除了CCR4和CCR5之外。

[0224] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000152]段的GPCR,除了CCR4、CCR5、CCR10和CXCR3之外。

[0225] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000152]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能β2受体、爱帕琳受体、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0226] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000152]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能β2受体、爱帕琳受体、CCR4、CCR5、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0227] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000152]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3和M2受体之外。

[0228] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000152]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4和M2受体之外。

[0229] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000152]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR5和M2受体之外。

[0230] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000152]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4、CCR5和M2受体之外。

[0231] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000152]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α1A受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR3、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、M2受体、神经降压肽NTS2受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0232] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000152]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4、CCR5、CCR10、CXCR3和M2受体之外。

[0233] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000152]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α1A受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能B3受体、爱帕琳受体、CCR3、CCR4、CCR5、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、M2受体、神经降压肽NTS2受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0234] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:5-HT1A受体、5-HT2A受体、A1受体、A2A受体、A2B受体、A3受体、ACKR1、ACKR2、ACKR3、ACKR4、ADGRE1、ADGRE2、ADGRE3、ADGRE5、爱帕琳受体、AT1受体、B1受体、B2受体、BB2(GRP)受体、BLT1受体、BLT2受体、C3a受体、C5a1受体、C5a2受体、CaS受体、CCR1、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCRL2、趋化素受体、CX3CR1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CysLT1受体、CysLT2受体、DP1受体、DP2受体、EP1受体、EP2受体、EP3受体、EP4受体、FFA2受体、FFA4受体、FP受体、FPR1、FPR2/ALX、FPR2/ALX、FPR3、FZD6、GAL2受体、GAL3受体、生长素释放肽受体、GPR132、GPR15、GPR18、GPR183、GPR21、GPR31、GPR32、GPR34、GPR4、GPR55、GPR55、GPR65、GPR68、H1受体、H2受体、H4受体、IP受体、LPA5受体、MAS1、MC1受体、MCH1受体、mGlu1受体、mGlu5受体、MRGPRX2、MT1受体、MT2受体、NK1受体、NK3受体、NMU1受体、OXE受体、P2Y1受体、P2Y11受体、P2Y13受体、P2Y14受体、P2Y2受体、P2Y6受体、PAF受体、PAR1、PAR2、PAR3、PAR4、PKR1、PKR2、S1P1受体、S1P2受体、S1P3受体、S1P4受体、S1P5受体、琥珀酸受体、TP受体、VPAC1受体、VPAC2受体、XCR1、β2-肾上腺素能受体、κ受体、μ受体。

[0235] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000166]段的GPCR,除了CCR4之外。

[0236] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000166]段的GPCR,除了CCR5之外。

[0237] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000166]段的GPCR,除了CCR4和CCR5之外。

[0238] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000166]段的GPCR,除了CCR4、CCR5、CCR10和CXCR3之外。

[0239] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000166]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能β2受体、爱帕琳受体、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、和前列腺素E4受体之外。

[0240] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000166]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能β2受体、爱帕琳受体、CCR4、CCR5、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、和前列腺素E4受体之外。

[0241] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000166]段的GPCR,除了CCR3之外。

[0242] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000166]段的GPCR,除了CCR3和CCR4之外。

[0243] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000166]段的GPCR,除了CCR3和CCR5之外。

[0244] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000166]段的GPCR,除了CCR3、CCR4、和CCR5之外。

[0245] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000166]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR3、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、神经降压肽NTS2受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0246] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000166]段的GPCR,除了CCR3、CCR4、CCR5、CCR10和CXCR3之外。

[0247] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000166]段的GPCR,除了腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR3、CCR4、CCR5、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、神经降压肽NTS2受体、血小板激活因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体之外。

[0248] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:血管紧张素受体,包括AT_1R,和某些趋化因子受体,包括CCR1、CCR2、CCR6、CCR7、CXCR2、CXCR4、CXCR6和CXCR7。

[0249] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:血管紧张素受体,包括AT_1R,和某些趋化因子受体,包括CCR1、CCR2、CCR6、CCR7、CXCR1、CXCR2、

CXCR4、CXCR6和CXCR7。

[0250] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:血管紧张素受体,包括AT1R,和某些趋化因子受体,包括CCR1、CCR2、CCR6、CCR7、CXCR1、CXCR2、CXCR4和CXCR6。

[0251] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:血管紧张素受体,包括AT1R,和某些趋化因子受体,包括CCR1、CCR2、CCR6、CCR7、CXCR2、CXCR4和CXCR6。

[0252] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:血管紧张素受体,包括AT1R,和某些趋化因子受体,包括CCR1、CCR2、CCR6、CCR7、CXCR1、CXCR2和CXCR6。

[0253] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:血管紧张素受体,包括AT1R,和某些趋化因子受体,包括CCR1、CCR2、CCR6、CCR7、CXCR2和CXCR6。

[0254] 在一个实施方案中,本发明的共定位的活化型GPCR是加压素受体2。

[0255] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达。

[0256] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达、参与炎症并且选自:CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CX3CR1、XCR1。

[0257] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达、参与炎症并且选自:CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CX3CR1、XCR1。

[0258] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达、参与炎症并且选自:CCR1、CCR2、CCR3、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CX3CR1、XCR1。

[0259] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达、参与炎症并且选自:CCR1、CCR2、CCR3、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CX3CR1、XCR1。

[0260] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达、参与炎症并且选自:CCR1、CCR2、CCR3、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CX3CR1、XCR1。

[0261] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达、参与炎症并且选自:CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CX3CR1、XCR1。

[0262] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达、参与炎症并且选自:CCR1、CCR2、CCR4、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CX3CR1、XCR1。

[0263] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达、参与炎症并且选自:CCR1、CCR2、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CX3CR1、XCR1。

[0264] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达、参与炎症并且选自:CCR1、CCR2、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CX3CR1、XCR1。

[0265] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达、参与炎症并且选自:CCR1、CCR2、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CX3CR1、XCR1。

[0266] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达、参与炎症并且选自:CCR1、CCR2、CCR3、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CXCR1、CXCR2、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CX3CR1、XCR1。

[0267] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达、参与炎症并且选自:CCR1、CCR2、CCR3、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CXCR2、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CX3CR1、XCR1。

[0268] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达、参与炎症并且选自:CCR1、CCR2、CCR3、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CXCR2、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CX3CR1、XCR1。

[0269] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达、参与炎症并且选自:CCR1、CCR2、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CXCR1、CXCR2、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CX3CR1、XCR1。

[0270] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达、参与炎症并且选自:CCR1、CCR2、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CXCR2、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CX3CR1、XCR1。

[0271] 在一个实施方案中,某些趋化因子受体是这样的趋化因子受体,它们在与RAGE的相同细胞中共表达、参与炎症并且选自:CCR1、CCR2、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CXCR2、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CX3CR1、XCR1。

[0272] 在本发明的一种形式中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:腺苷1A受体、肾上腺素能α1A受体、肾上腺素能α1B受体、肾上腺素能α2B受体、血管紧张素受体AT_1R、缓激肽受体B2、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR9、CXCR2、CXCR4、CXCR5、多巴胺D1受体、内皮素受体类型A、内皮素受体类型B、组胺H3受体、毒蕈碱性M1受体、毒蕈碱性M2受体、毒蕈碱性M3受体、神经肽Y1受体、神经降压肽1受体、食欲肽受体1、食欲肽受体2、前列腺素E1受体、血清素5-HT1a受体、血清素5-HT2a受体、血清素5-HT2b受体、血清素5-HT2c受体、血清素5-HT4b受体、生长抑素2受体、鞘氨醇1-磷酸受体S1P1、鞘氨醇1-磷酸受体S1P3、促甲状腺素释放激素受体1、加压素受体1A、加压素受体1B或加压素受体2。

[0273] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000204]段的GPCR,除了CCR4之外。

[0274] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000204]段的GPCR,除了CCR5之外。

[0275] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000204]段的GPCR,除了CCR4和CCR5之外。

[0276] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000204]段的

GPCR,除了CCR4、CCR5和CXCR4之外。

[0277] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000204]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、毒蕈碱性M2受体和食欲肽受体1之外。

[0278] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000204]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4、毒蕈碱性M2受体和食欲肽受体1之外。

[0279] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000204]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR5、毒蕈碱性M2受体和食欲肽受体1之外。

[0280] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000204]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4、CCR5、毒蕈碱性M2受体和食欲肽受体1之外。

[0281] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000204]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CXCR4、毒蕈碱性M2受体和食欲肽受体1之外。

[0282] 在本发明的优选形式中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:肾上腺素能α1A受体、肾上腺素能α1B受体、血管紧张素受体AT_1R、缓激肽受体B2、CCR2、CCR3、CCR4、CCR6、CCR9、CXCR4、CXCR5、多巴胺D1受体、内皮素受体类型B、组胺H3受体、毒蕈碱性M2受体、神经肽Y1受体、神经降压肽1受体、食欲肽受体1、食欲肽受体2、前列腺素E1受体、血清素5-HT2b受体、血清素5-HT2c受体、血清素5-HT4b受体、生长抑素2受体、鞘氨醇1-磷酸受体S1P3、加压素受体1A或加压素受体1B。

[0283] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000214]段的GPCR,除了CCR4之外。

[0284] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000214]段的GPCR,除了CCR4和CXCR4之外。

[0285] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000214]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、毒蕈碱性M2受体和食欲肽受体1之外。

[0286] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000214]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4、毒蕈碱性M2受体和食欲肽受体1之外。

[0287] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000214]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CCR4、CXCR4、毒蕈碱性M2受体和食欲肽受体1之外。

[0288] 在本发明的一个特别优选形式中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:肾上腺素能α1A受体、肾上腺素能α1B受体、血管紧张素受体AT_1R、缓激肽受体B2、CCR2、CCR6、CCR9、CXCR4、CXCR5、多巴胺D1受体、内皮素受体类型B、组胺H3受体、毒蕈碱性M2受体、神经肽Y1受体、食欲肽受体1、食欲肽受体2、前列腺素E1受体、血清素5-HT2c受体、血清素5-HT4b受体、生长抑素2受体、鞘氨醇1-磷酸受体S1P3、加压素受体1A或加压素受体1B。

[0289] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000220]段的GPCR,除了CXCR4之外。

[0290] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000220]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、毒蕈碱性M2受体和食欲肽受体1之外。

[0291] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000220]段的GPCR,除了肾上腺素能α1A受体、CCR3、CXCR4、毒蕈碱性M2受体和食欲肽受体1之外。

[0292] 在本发明的一种形式中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:

腺苷A1受体(ADORA1)、肾上腺素能α2B受体、血管紧张素受体AT_1(AT1R)、缓激肽受体2(B2R)、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR9、CXCR2、CXCR4、CXCR5、神经肽Y1受体(NPY1R)、食欲肽受体2、鞘氨醇1-磷酸受体1(S1PR1)、促甲状腺素释放激素受体1(TRHR1)、加压素受体1A(V1aR)、加压素受体1B(V1bR)和加压素受体2(V2R)。

[0293] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000224]段的GPCR,除了CCR4之外。

[0294] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000224]段的GPCR,除了CCR5之外。

[0295] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000224]段的GPCR,除了CCR4和CCR5之外。

[0296] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000224]段的GPCR,除了CXCR4之外。

[0297] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000224]段的GPCR,除了CCR4、CCR5和CXCR4之外。

[0298] 在本发明的优选形式中,本发明的某些共定位的活化型GPCR是选自以下的GPCR:肾上腺素能α2B受体、血管紧张素受体AT_1(AT1R)、缓激肽受体2(B2R)、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CCR9、CXCR2、CXCR4、神经肽Y1受体(NPY1R)、食欲肽受体2、鞘氨醇1-磷酸受体1(S1PR1)、促甲状腺素释放激素受体1(TRHR1)、加压素受体1A(V1aR)、加压素受体1B(V1bR)和加压素受体2(V2R)。

[0299] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000230]段的GPCR,除了CCR4之外。

[0300] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000230]段的GPCR,除了CCR5之外。

[0301] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000230]段的GPCR,除了CCR4和CCR5之外。

[0302] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000230]段的GPCR,除了CXCR4之外。

[0303] 在一个实施方案中,本发明的某些共定位的活化型GPCR选自第[000230]段的GPCR,除了CCR4、CCR5和CXCR4之外。

[0304] 在本发明的具体形式中,本发明的共定位的活化型GPCR是血管紧张素受体。

[0305] 在本发明的具体形式中,本发明的共定位的活化型GPCR是AT_1R。

[0306] 在本发明的具体形式中,本发明的共定位的活化型GPCR是选自以下的某种趋化因子受体:CCR1、CCR2、CCR6、CCR7、CXCR2、CXCR4、CXCR6和CXCR7。

[0307] 在本发明的具体形式中,本发明的共定位的活化型GPCR是选自以下的某种趋化因子受体:CCR1、CCR2、CCR6、CCR7、CXCR1、CXCR2和CXCR6。

[0308] 在本发明的具体形式中,本发明的共定位的活化型GPCR是选自以下的某种趋化因子受体:CCR1、CCR2、CCR6、CCR7、CXCR2和CXCR6。

[0309] 在本发明的具体形式中,本发明的共定位的活化型GPCR是选自CCR2和CCR6的某种趋化因子受体。

[0310] 在本发明的具体形式中,本发明的共定位的活化型GPCR是CCR2。

[0311] 在本发明的具体形式中,本发明的共定位的活化型GPCR是CXCR4。

[0312] 在本发明的一种形式中,RAGE配体是与RAGE胞外结构域相互作用以调节RAGE活化的配体。因此,在本发明的这种形式中,RAGE配体非依赖性RAGE活化意指不通过配体与RAGE胞外结构域相互作用的方式发生的RAGE活化。

[0313] 优选地,RAGE配体是与RAGE胞外结构域相互作用以调节RAGE活化并且不与RAGE跨膜结构域或胞质尾或其中所含基序相互作用的配体。因此,在本发明的这种优选形式中,RAGE配体非依赖性RAGE活化意指这样的RAGE活化,其不通过配体与RAGE胞外结构域相互作用的方式发生,除非配体还与RAGE跨膜结构域或胞质尾或其中所含基序相互作用。

[0314] RAGE的胞外结构域(也称作,细胞外结构域)包括三个免疫球蛋白样区域:N末端V型结构域,后接二个C型结构域(称作C和C'或备选地C1和C2)。主要配体结合部分是V-结构域,然而RAGE活化也可以由配体与C-结构域结合介导。大部分配体倾向于与V结构域和/或C1结构域结合,因为配体倾向于带负电荷,然而,存在配体与C2结构域结合的至少一个实例(S100A6;Leclerc等人,2007)。尽管C1-结构域和C2-结构域可能通常不直接结合配体,但它们可能在稳定V-结构域以介导其与配体相互作用方面具有重要作用。RAGE具有一个单一跨膜结构域和一个胞质尾。在人类中,RAGE胞质尾长43个氨基酸长(残基362至残基404)。这种胞质尾含有对RAGE依赖性细胞活化关键的基序。

[0315] 在本发明的一种形式中,RAGE配体是与RAGE胞外结构域的细胞外V、C1和/或C2结构域相互作用以活化RAGE的配体。在本发明的这种形式中,RAGE配体非依赖性RAGE活化意指不通过配体与RAGE胞外结构域的细胞外V、C1或C2结构域相互作用的方式发生的RAGE活化。

[0316] 优选地,RAGE配体不与RAGE跨膜结构域或胞质尾或其中所含基序相互作用。因此,在本发明的这种形式中,RAGE配体非依赖性RAGE活化意指这样的RAGE活化,其不通过配体与RAGE胞外结构域的细胞外V、C1或C2结构域相互作用的方式发生,除非配体还与RAGE跨膜结构域或胞质尾或其中所含基序相互作用。

[0317] 在本发明的一个形式中,借助共定位的活化型GPCR(如活化型血管紧张素受体如AT_1R或CCR2)调节RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物还调节RAGE配体依赖性RAGE活化。

[0318] 在本发明的优选实施方案中,本发明的调节物不调节、或差异性调节、或不同程度地调节与某种共定位的活化型GPCR相关的RAGE非依赖性信号传导途径。

[0319] 在一个优选的实施方案中,本发明的调节物不抑制或较小程度地抑制一个或多个RAGE非依赖的某些共定位的GPCR信号传导途径。

[0320] 在本发明的一种形式中,RAGE非依赖的某共定位的GPCR信号传导途径是Gq信号传导途径。在本发明的一种形式中,RAGE非依赖的某共定位的GPCR信号传导途径是Gi/o信号传导途径。在本发明的一种形式中,RAGE非依赖的某共定位的GPCR信号传导途径是Gs信号传导途径。在本发明的一种形式中,RAGE非依赖的某共定位的GPCR信号传导途径是钙信号传导途径。在本发明的一种形式中,RAGE非依赖的某共定位的GPCR信号传导途径是磷脂酶C信号传导途径。在本发明的另一种形式中,RAGE非依赖的某共定位的GPCR信号传导途径是β抑制蛋白介导的胞外调节的激酶(ERK)信号传导。

[0321] 在一个特别优选的实施方案中,其中共定位的活化型GPCR是活化型AT_1R,本发明

的调节物不调节或较小程度地调节一个或多个RAGE非依赖性AT_1R信号传导途径。

[0322] 在一个特别优选的实施方案中,其中共定位的活化型GPCR是活化型AT_1R,本发明的调节物不抑制或较小程度地抑制一个或多个RAGE非依赖性AT_1R信号传导途径。

[0323] 在本发明的一种形式中,RAGE非依赖性AT_1R信号传导途径是Gq信号传导途径。在本发明的另一种形式中,RAGE非依赖性AT_1R信号传导途径是β-抑制蛋白介导的胞外调节的激酶(ERK)信号传导。

[0324] 在另一个特别优选的实施方案中,其中共定位的活化型GPCR是活化型CCR2,本发明的调节物不调节或较小程度地调节一个或多个RAGE非依赖性CCR2信号传导途径。

[0325] 在另一个特别优选的实施方案中,其中共定位的活化型GPCR是活化型CCR2,本发明的调节物不抑制或抑制较小程度地一个或多个RAGE非依赖性CCR2信号传导途径。

[0326] 在本发明的一种形式中,RAGE非依赖性AT_1R信号传导途径是Gi/o信号传导途径。在本发明的另一种形式中,RAGE非依赖性CCR2信号传导途径是β-抑制蛋白介导的胞外调节的激酶(ERK)信号传导。在本发明的另一种形式中,RAGE非依赖性CCR2信号传导途径是磷脂酶C信号传导途径。

[0327] 调节物

[0328] 在本发明的一种形式中,本发明的调节物是RAGE胞质尾的激活物、抑制物、变构调节物或有功能或无功能替代物。有功能替代物是这样的调节物,它在某些共定位的GPCR存在下接替RAGE胞质尾并且能够被它们活化,以在野生型RAGE的表达存在或不存在下,诱导下游RAGE依赖性信号传导。无功能替代物是这样的调节物,它在某些共定位的GPCR存在下接替RAGE胞质尾并且不能够被它们活化或诱导下游RAGE依赖性信号传导,并抑制正常情况下通过活化RAGE胞质尾及从其所得的RAGE依赖性信号传导而发生的信号传导。

[0329] 在本发明的一种形式中,本发明的调节物是RAGE的跨膜结构域或其部分的激活物、抑制物、变构调节物无功能替代物。

[0330] 无功能替代物是这样的调节物,它在某些共定位的GPCR存在下接替RAGE跨膜结构域并且不能够被它们活化或诱导下游RAGE依赖性信号传导,并抑制正常情况下通过活化RAGE胞质尾及从其所得的RAGE依赖性信号传导而发生的信号传导。

[0331] 在本发明的一种形式中,调节物包含RAGE跨膜结构域或其部分和RAGE胞外结构域的片段。

[0332] 在本发明的一种形式中,调节物包含RAGE跨膜结构域或其部分和RAGE胞质尾的片段。

[0333] 在本发明的一种形式中,调节物包含RAGE跨膜结构域或其部分和RAGE胞外结构域的片段和RAGE胞质尾的片段。

[0334] 在本发明的一种形式中,本发明的调节物含有不大于40、不大于20、不大于10或不大于5个氨基酸长度的RAGE胞外结构域片段。

[0335] 通过调节物实例,发明人已经显示,$RAGE_{362-404}$是RAGE的有功能替代物并且是能够被某些共定位的GPCR(如AT1R和CCR2)活化,并且在野生型RAGE的表达存在或不存在下,诱导因RAGE配体非依赖性RAGE活化产生的下游RAGE依赖性信号传导。另外,当$RAGE_{362-404}$与细胞穿透肽(TAT)和标记蛋白(mCherry)融合时,通过Ang II活化AT1R后,用TAT-mCherry-$RAGE_{362-404}$寡肽处理能够在野生型RAGE表达不存在的情况下,恢复Ager Apoe DKO小鼠中的

Ang II依赖性炎症及动脉粥样硬化形成。

[0336] $RAGE_{362-404}$的序列是SEQ ID NO:1:

[0337] [L_{362}WQRRQRRGEERKAPENQEEEEERAELNQSEEPEAGESSTGGP$_{404}$]

[0338] 通过额外的调节物实例,发明人已经显示,S391A-$RAGE_{362-404}$是RAGE的无功能替代物,其在某些共定位的GPCR存在下不被它们活化并抑制RAGE依赖性信号传导。S391A-$RAGE_{362-404}$的表达抑制借助活化型AT_1R的RAGE配体非依赖性野生型RAGE活化和借助RAGE配体S100A8/A9的RAGE配体依赖性野生型RAGE活化。另外,当S391A-$RAGE_{362-404}$与细胞穿透肽(TAT)和标记蛋白(mCherry)融合时,用TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$寡肽处理抑制借助活化型AT_1R的RAGE配体非依赖性RAGE活化,以减弱载脂蛋白E敲除小鼠中的Ang II依赖性炎症和动脉粥样硬化形成。下文提供其他实例。

[0339] S391A-$RAGE_{362-404}$的序列是SEQ ID NO:2:

[0340] [L_{362}WQRRQRRGEERKAPENQEEEEERAELNQAEEPEAGESSTGGP$_{404}$]

[0341] 通过另一个调节物实例,发明人已经显示$RAGE_{338-361}$抑制借助活化型AT_1R的RAGE配体非依赖性野生型RAGE活化。通过共表达mCherry-$RAGE_{362-404}$克服这种抑制作用。

[0342] $RAGE_{338-361}$的序列是SEQ ID:3。

[0343] [L_{338}GTLALALGILGGLGTAALLIGVI$_{361}$]

[0344] 在一种形式中,本发明包含借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物,所述调节物调节由活化这类某些共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或趋化因子受体(如CCR2))触发的RAGE胞质尾反式活化。

[0345] 在一种形式中,本发明包括借助些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE胞质尾活化的调节物,所述调节物结合于Ras GTP酶活化样蛋白(IQGAP1)或其他RAGE相关的蛋白质,包括蛋白激酶Cζ(PKCζ)、Dock7、MyD88、TIRAP、IRAK4、ERK1/2、嗅觉受体2T2、ADP/ATP移位酶2、蛋白磷酸酶1G、胞间黏附分子1、蛋白DJ-1(PARK7)、钙调理蛋白-3、脑发育调节蛋白、细丝蛋白B、Ras-相关蛋白Rab-13、根蛋白/埃兹蛋白/膜突蛋白、蛋白脂质蛋白2、冠蛋白、S100A11、琥珀酰CoA连接酶[形成GDP的]亚基α、Hsc70-相互作用蛋白、凋亡抑制物5、神经毡蛋白、剪切刺激因子、生长因子受体结合型蛋白质2、sec61β亚基或Nck1,或破坏这些元件与RAGE的结合,以调节借助某些共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或趋化因子受体(如CCR2))的RAGE反式活化。

[0346] 在本发明的一种形式中,本发明的调节物结合于某些共定位的活化型GPCR、RAGE的胞质元件和/或与前二者中任一者复合的元件,包括IQGAP-1、PKCζ、Dock7、MyD88、TIRAP、IRAK4、ERK1/2、嗅觉受体2T2、ADP/ATP移位酶2、蛋白磷酸酶1G、胞间黏附分子1、蛋白DJ-1(PARK7)、钙调理蛋白-3、脑发育调节蛋白、细丝蛋白B、Ras-相关蛋白Rab-13、根蛋白/埃兹蛋白/膜突蛋白、蛋白脂质蛋白2、冠蛋白、S100A11、琥珀酰CoA连接酶[形成GDP的]亚基α、Hsc70-相互作用蛋白、凋亡抑制物5、神经毡蛋白、剪切刺激因子、生长因子受体结合型蛋白质2、sec61β亚基或Nck1,以通过调节借助某些共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或如趋化因子受体(如CCR2))的RAGE反式活化要求的这些信号传导元件,调节借助RAGE胞质尾的RAGE配体非依赖性信号传导。

[0347] 在本发明的一种形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物还通过结合于RAGE的胞质元件和/或与细胞溶胶中RAGE复合的元件(如

IQGAP-1、PKCζ,Dock7、MyD88、IRAK4、TIRAP、ERK1/2、嗅觉受体2T2、ADP/ATP移位酶2、蛋白磷酸酶1G、胞间黏附分子1、蛋白DJ-1(PARK7)、钙调理蛋白-3、脑发育调节蛋白、细丝蛋白B、Ras-相关蛋白Rab-13、根蛋白/埃兹蛋白/膜突蛋白、蛋白脂质蛋白2、冠蛋白、S100A11、琥珀酰CoA连接酶[形成GDP的]亚基α、Hsc70-相互作用蛋白、凋亡抑制物5、神经毡蛋白,剪切刺激因子、生长因子受体结合型蛋白质2、sec61β亚基或Nck1),调节RAGE配体依赖性RAGE胞质尾活化,以抑制借助这些元件的RAGE配体介导的信号传导。

[0348] 在具体实施方案中,调节物包含如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列、或其类似物、片段或衍生物、由其组成或基本上由其组成。

[0349] 在一些实施方案中,通过基因递送(如通过使用病毒或人工非病毒基因递送如电穿孔、微量注射、基因枪、穿刺转染(impalefection)、静水压力、连续输注、超声处理、脂质体转染、脂质体、纳米泡和聚合物基因载体)引入调节物,并且作为转录和翻译过程的结果,由细胞产生肽片段、生物学活性类似物或衍生物。

[0350] 在这个方面的一些实施方案中,调节物具有与某些共定位的GPCR(如AT1R或CCR2)或与它们复合的元件形成复合物的改进能力。例如,RAGE类似物或衍生物可以因置换、添加或缺失至少一个氨基酸残基或添加或置换不寻常或非常规氨基酸或非氨基酸残基,区别于野生型RAGE多肽或片段序列。

[0351] 在一些实施方案中,调节物缺少或具有正常情况下存在于野生型人RAGE多肽中的丝氨酸391的修饰。在这个类型的示意性实例中,RAGE胞质尾的片段、类似物或衍生物缺少野生型RAGE序列的位置391处的丝氨酸(例如,$RAGE_{370-390}$构建体在Glu390截短)。适当地,将位置391处的丝氨酸缺失或置换为另一个氨基酸残基、类似物或衍生物,以破坏或消除在活化共定位的GPCR后,由这个位点处的丝氨酸赋予的信号传导。在一个实施方案中,将位置391处的丝氨酸缺失或置换为选自以下的另一个氨基酸残基:丙氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、缬氨酸、甘氨酸、半胱氨酸或谷氨酸。

[0352] 在一些实施方案中,调节物保留正常情况下存在于野生型人RAGE多肽中或由另一个保留391位置处丝氨酸的相同功能的氨基酸或其类似物或衍生物置换的丝氨酸391。在这个类型的示意性实例中,RAGE胞质尾的片段保留野生型RAGE序列的位置391处的丝氨酸(例如,$RAGE_{370-404}$构建体)。适当地,将位置391处的丝氨酸置换为另一个氨基酸残基或其类似物或衍生物,以复制在这个位点含有丝氨酸的RAGE构建体活化共定位的GPCR后赋予的信号传导。在一个实施方案中,将位置391处的丝氨酸置换为选自以下的另一个氨基酸残基:脯氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸或色氨酸。

[0353] 在一些实施方案中,相对于人野生型RAGE,调节物缺少或具有受损的对Diaphanous 1(Diaph1)的结合能力。在这个类型的示意性实例中,肽或其类似物、片段或衍生物缺少RAGE-Diaph1结合位点(如$RAGE_{370-390}$、$RAGE_{374-390}$或$RAGE_{379-390}$)或具有改变的Diaph1结合位点(如366A/367A),以消除或破坏这个位点。适当地,将366/367处的残基缺失或置换为其他残基(如置换为丙氨酸),以破坏或消除这个位点,并且在这样做的同时,通过减少由野生型与Diaph1结合所引起的约束,改进与其他靶结合的亲和力。

[0354] 在本发明的一个方面,本发明的调节物包括分离的或纯化的肽,所述肽包含式I代表的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成:

[0355] Z1 M Z2(I)

[0356] 其中

[0357] Z1不存在或选自包含约1至约50个氨基酸残基的蛋白质性部分至少之一;并且M是如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,或其类似物、片段或衍生物;并且Z2不存在或是包含约1至约50个氨基酸残基的蛋白质性部分。

[0358] 在上文描述的一些本发明实施方案中,调节物(如上文和本文他处广泛描述的RAGE胞质尾的片段、其类似物或衍生物)能够穿透细胞膜。在这个类型的非限制性实例中,RAGE调节物缀合、融合或否则连接至细胞膜穿透分子(例如,HIV TAT基序,如下文SEQ ID NO:4中所述)。

[0359] SEQ ID NO:4:

[0360] [YGRKKRRQRRR]。

[0361] 在本发明的一些形式中,调节物是非肽分子,所述非肽分子与上文描述的肽调节物共有结合于和/或干扰与借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化相关的元件的能力。这些非肽调节物可以含有或可以不含有与肽调节物中所含的功能重要的结构域的结构相似性。

[0362] 在一个优选形式中,非肽调节物含有与肽调节物中所含的功能重要的结构域的结构相似性,如第[000318]段中描述的药效团所代表。

[0363] 在本发明的优选形式中,调节物是抑制剂。

[0364] 在本发明的某些形式中,除了是借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的抑制剂之外,调节物还是某种共定位的GPCR的抑制剂和/或某种共定位的GPCR信号传导途径的抑制剂。

[0365] 在本发明的某些形式中,除了是借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的抑制剂之外,调节物还是RAGE配体依赖性活化RAGE的抑制剂和/或组成型活性RAGE的抑制剂和/或RAGE信号传导途径的抑制剂。

[0366] 在本发明的某些形式中,其中某种共定位的GPCR是AT_1R,除了是RAGE配体非依赖性RAGE活化的抑制剂之外,调节物还是AT_1R抑制剂和/或AT_1R信号传导途径的抑制剂。

[0367] 在本发明的某些形式中,除了是借助活化型血管紧张素受体、优选地活化型AT_1R的RAGE配体非依赖性RAGE活化的抑制剂之外,调节物还是RAGE配体依赖性RAGE活化的抑制剂和/或组成型活性RAGE的抑制剂和/或RAGE信号传导途径的抑制剂。

[0368] 在本发明的某些形式中,除了是借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的抑制剂之外,调节物还是某种共定位的GPCR的抑制剂和/或某种共定位的GPCR信号传导途径的抑制剂和RAGE配体依赖性RAGE活化的抑制剂和/或组成型活性RAGE的抑制剂和/或RAGE信号传导途径的抑制剂。

[0369] 在本发明的某些形式中,除了是借助活化型血管紧张素受体、优选地活化型AT_1R的RAGE配体非依赖性RAGE活化的抑制剂之外,调节物还是AT_1R抑制剂和/或AT_1R信号传导途径的抑制剂和RAGE配体依赖性RAGE活化的抑制剂和/或组成型活性RAGE的抑制剂和/或RAGE信号传导途径的抑制剂。

[0370] 在本发明的某种形式中,其中某种共定位的GPCR是某种趋化因子受体,优选地CCR2,除了是RAGE配体非依赖性RAGE活化的抑制剂之外,调节物还是某种趋化因子受体抑制剂、优选地CCR2抑制剂,和/或某种趋化因子信号传导途径、优选地CCR2信号传导途径的

抑制剂。

[0371] 在本发明的某些形式中,除了是借助活化型某种趋化因子受体、优选地活化型CCR2的RAGE配体非依赖性RAGE活化的抑制剂之外,调节物还是RAGE配体依赖性RAGE活化的抑制剂和/或组成型活性RAGE的抑制剂和/或RAGE信号传导途径的抑制剂。

[0372] 在本发明的某些形式中,除了是借助活化型趋化因子受体、优选地活化型CCR2的RAGE配体非依赖性RAGE活化的抑制剂之外,调节物还是某种趋化因子受体抑制剂、优选地CCR2抑制剂和/或某种趋化因子信号传导途径、优选地CCR2信号传导途径的抑制剂和RAGE配体依赖性RAGE活化的抑制剂和/或组成型活性RAGE的抑制剂和/或RAGE信号传导途径的抑制剂。

[0373] 在本发明的某些形式中,调节物是RAGE胞质尾或其部分的有功能替代物并且能够被某些共定位的GPCR(如活化型AT_1R和活化型CCR2)活化,并且在野生型RAGE的表达存在或不存在下,诱导下游RAGE依赖性信号传导。

[0374] 在本发明的某些形式中,调节物是RAGE胞质尾或其部分的无功能替代物,所述无功能替代物不能够被共定位的GPCR活化或不能够促进下游RAGE依赖性信号传导,并且抑制借助RAGE胞质尾发生的信号传导和RAGE依赖性信号传导。

[0375] 在本发明的某些形式中,调节物是RAGE跨膜结构域或其部分的无功能替代物,所述无功能替代物不能够被共定位的GPCR活化或不能够促进下游RAGE依赖性信号传导,并且抑制借助RAGE胞质尾发生的信号传导和RAGE依赖性信号传导。

[0376] 在本发明的某些形式中,调节物包含RAGE跨膜结构域或其部分和RAGE胞外结构域的片段。在本发明的某些形式中,调节物包含RAGE跨膜结构域或其部分和RAGE胞质尾的片段。

[0377] 在本发明的某些形式中,调节物包含RAGE跨膜结构域或其部分和RAGE胞外结构域的片段和RAGE胞质尾的片段。

[0378] 在本发明的某些形式中,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物含有人野生型RAGE的配体结合性胞外结构域的片段,所述片段不大于40、不大于20、不大于10或不大于5个氨基酸长度。

[0379] 发明人已经进一步发现,包含RAGE胞质尾的残基370-390(参见SEQ ID NO:5)的肽是一种抑制肽,其抑制RAGE配体非依赖性和RAGE配体依赖性野生型RAGE活化。

[0380] SEQ ID NO:5:

[0381] $[G_{370}$EERKAPENQEEEEERAELNQ$_{390}]$.

[0382] 存在$RAGE_{363-404}$的溶液NMR结构(Rai V等人,2012),其显示这种肽的N末端(残基363-376)有序。存在$RAGE-_{362-404}$的Rosetta衍生模型(模型4),其与NMR结构一致(http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2LMB,2016年8月25日访问)),并且这还表明肽的剩余部分形成α螺旋。

[0383] 通过截短模型4构建了$RAGE_{370-390}$的初始模型(模型$4_{-370-390}$)。模型4是RAGE胞质尾的理论模型,通过将序列输入I-Tasser网络服务器(http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/)中生成。还参见Yang等人(2015)、Roy等人(2010)和Y Zhang(2008)。I-Tasser服务器展示的全部五个模型均预测区域370-390形成螺旋。这些模型和NMR结构通过肽序列主链C-α碳对齐。选择模型4作为优选的模型,因为模型4

中与Diaphanous 1结合位点对应的预测结构区域最接近于对这个区域记录的NMR结构。

[0384] 使用GROMACS,进行了水中模型4的20纳秒分子动力学模拟(Hess等人,2008)。分子动力学模拟表明,模型$4_{_370\text{-}390}$的α螺旋区域稳定。在众多带电荷的侧链之间观察到强相互作用,这表明这些相互作用使折叠结构稳定并表明这些残基的任何保守可能因其在使肽结构稳定中的作用所致。

[0385] Blast检索用来鉴定$RAGE_{370\text{-}390}$的同源序列。序列如下比对:

[0386] CLUSTAL 2.0.10多重序列比对

[0387]

```
模型 4_370-390.pdb                    ----GEERKAPENQ--EEEEERAELNQ---
gi|505855911|ref|XP_004621364.  RRRRGEERKVPENQ--EEEEERAELKQSGE
gi|836716008|ref|XP_012791097.  RRRRGEERKVPENQ--EEEEERAELKQSGE
gi|830242517|ref|XP_012589882.  RRR-GEQRKAPENR--EEEEERAELNQSEE
gi|830242520|ref|XP_012589883.  RRR-GEQRKAPENR--EEEEERAELNQSEE
gi|830242532|ref|XP_012589884.  RRR-GEQRKAPENR--EEEEERAELNQSEE
gi|859958468|ref|XP_012905636.  RPR-REERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|505855913|ref|XP_004621365.  RRRRGEERKVPENQ--EEEEERAELKQSGE
gi|859958474|ref|XP_012905637.  RPR-REERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|674092933|ref|XP_008819684.  QHR-GEERKTPENQ--EDEEERAELNQSEE
```

[0388]

```
gi|852803202|ref|XP_012890437. QHR-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|586986169|ref|XP_006931651. RRQ-GEERKAPENQEEEEEEEREELNQSGE
gi|752437365|ref|XP_011235981. RHR-REERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|671038558|ref|XP_008710071. RHR-REERKAPENQ--EEEEERAELNQSVE
gi|859958450|ref|XP_012905633. RPR-REERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|1040099494|gb|OBS60144.1|   QPR-GEERKTPENQ--EDEEERAELNQSED
gi|674092931|ref|XP_008819683. QHR-GEERKTPENQ--EDEEERAELNQSEE
gi|641730582|ref|XP_008155542. RHR-GEERKAPENQA-EEEEERAELNQSQE
gi|641730580|ref|XP_008155541. RHR-GEERKAPENQA-EEEEERAELNQSQE
gi|946738855|ref|XP_014389946. RRR-GEERKAPENQ--EEEEERAELHQSQE
gi|940771956|ref|XP_006104444. RRR-GEERKAPENQ--EEEEERAELHQSQE
gi|355748446|gb|EHH52929.1|    RRQ-GEERKASENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|355561569|gb|EHH18201.1|    RRQ-GEERKASENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|544428837|ref|XP_005553456. RRQ-GEERKASENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|635095937|ref|XP_007971201. RRQ-GEERKASENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|402866556|ref|XP_003897445. RRQ-REERKASENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|795466133|ref|XP_011890032. RRQ-GEERKASENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|795466129|ref|XP_011890031. RRQ-GEERKASENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|795317622|ref|XP_011824818. RRQ-GEERKASENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|326693968|ref|NP_001192046. RRQ-GEERKASENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|724802002|ref|XP_010376439. RRQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|724801999|ref|XP_010376432. RRQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|795178216|ref|XP_011800170. RRQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|312182478|gb|ADQ42279.1|    RRQ-GEERKASENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|795178211|ref|XP_011800169. RRQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|332800965|ref|NP_001193858. QRR-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|10835203|ref|NP_001127.1|   QRR-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|332800967|ref|NP_001193861. QRR-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|823672830|gb|AKI71626.1|    QRR-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|190846|gb|AAA03574.1|       QRR-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|194389738|dbj|BAG60385.1|   QRR-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|694915715|ref|XP_009449249. QRQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|694915717|ref|XP_009449250. QRQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|694915721|ref|XP_009449252. QRQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|397519329|ref|XP_003829814. QRQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|397519323|ref|XP_003829811. QRQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|820970747|ref|XP_012358508. RRQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|820970749|ref|XP_012358509. RRQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|817330292|ref|XP_012292176. RRR-GEERKAPENQ--EEEEEHAELNQSEE
gi|817330294|ref|XP_012292177. RRR-GEERKAPENQ--EEEEEHAELNQSEE
```

gi|725608250|ref|XP_010330526. RRR-GEERKAPENQ--EEEEEHAELNQSEE
gi|725608252|ref|XP_010330527. RRR-GEERKAPENQ--EEEEEHAELNQSEE
gi|296197788|ref|XP_002746422. RRRRGEERKAPENQ--EEEEEHAELNQSEE
gi|826320184|ref|XP_012509111. RGQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|826320169|ref|XP_012509105. RGQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|826320175|ref|XP_012509107. RGQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|826320172|ref|XP_012509106. RGQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|829933710|ref|XP_012596554. RHQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|829933718|ref|XP_012596557. RHQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|829933722|ref|XP_012596558. RHQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|743731194|ref|XP_010959751. QRR-GEERKAPENQ-EEEEEERAELNQQEE
gi|560905029|ref|XP_006178871. QRR-GEERKAPENQ-EEEEEERAELNQQEE
gi|593759840|ref|XP_007118666. QRR-GEERKAPENQ-EEEEEERTELNQPEE
gi|560986474|ref|XP_006215428. QRR-GEERKAPENQ-EEEEEERAELNQQEE
gi|927155182|ref|XP_013833109. QRR-GQERKAPENQ-EEDEEERAELNQPED
gi|147225137|emb|CAN13265.1| QRR-GQERKAPENQ-EEDEEERAELNQPED
gi|178056480|ref|NP_001116690. QRR-GQERKAPENQ-EEDEEERAELNQPED

[0389] gi|162138238|gb|ABX82823.1| QRR-GQERKAPENQ-EEDEEERAELNQPED

gi|471418692|ref|XP_004390841. KHR-GEERKAPENQ--EEEEEHAELNQSEE
gi|471418700|ref|XP_004390845. KHR-GEERKAPENQ--EEEEEHAELNQSEE
gi|471418694|ref|XP_004390842. KHR-GEERKAPENQ--EEEEEHAELNQSEE
gi|829933714|ref|XP_012596556. RHQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|831224940|ref|XP_012660273. QCQ-GEERKAPENQ--EEEEERTELNQSEE
gi|984103351|ref|XP_015342983. RRQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|532108558|ref|XP_005339001. RRQ-GEERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|955504646|ref|XP_014638416. QHR-REERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|478500097|ref|XP_004424372. QHR-REERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|955504650|ref|XP_014638417. QHR-REERKAPENQ--EEEEERAELNQSEE
gi|1048457071|ref|XP_017510394 QCR-GEERKAPENQ--EEEEERAELSQSEE
gi|589966171|ref|XP_006995615. QPR-REERKAPENQ--EDEEERAELNQSED
gi|589966173|ref|XP_006995616. QPR-REERKAPENQ--EDEEERAELNQSED
gi|532056239|ref|XP_005370828. QPR--EERKAPENE--EDEEERAELNQSED
gi|532056241|ref|XP_005370829. QPR--EERKAPENE--EDEEERAELNQSED
gi|532056245|ref|XP_005370831. QPR--EERKAPENE--EDEEERAELNQSED
gi|641730578|ref|XP_008155540. RHR-GEERKAPENQA-EEEEERAELNQSQE

[0390] 这项分析鉴定了$RAGE_{370-390}$中如下标记的许多强保守的残基:*(星号)表示具有完全保守的单一残基的位置。:(冒号)表示具有强烈相似特性(Gonnet PAM 250矩阵中评分＞0.5)的群组之间的保守。.(点号)表示具有微弱相似特性(Gonnet PAM 250矩阵中评分＝＜0.5)的群组之间的保守。

[0391]

		:	:	*	*	•	•	*	*	•	*	:	*	*	*	:	•	*	*	•	*
RAGE-	G	E	E	R	K	A	P	E	N	Q	E	E	E	E	E	R	A	E	L	N	Q

[0392] 高度保守残基可能发挥结构性作用。加下划线的残基位于螺旋的一个面上并且可能代表结合性药效团。

[0393] 检验模型4_RAGE$_{370-390}$结构和分子动力学模拟结果显示结构中存在众多盐桥。分子动力学模拟显示,这些相互作用是重要的结构性特征。结构性功能是这些氨基酸的保守性质的可能原因。

[0394] 许多强保守的氨基酸不参与盐桥形成。这些氨基酸存在于RAGE$_{370-390}$螺旋的一个面上并且可能代表结合界面。这些氨基酸是Glu380、Glu384、Glu387和Leu388。另一个高度保守残基Glu377也存在于肽的这个面上并且除了形成到达Lys374的α-螺旋稳定性盐桥之外,也可能参与结合。

[0395] 用丙氨酸替换重要的疏水性残基L388(例如L388A-RAGE$_{370-390}$)导致作用于野生型RAGE时,由RAGE$_{370-390}$实现的抑制作用丧失。消除380和384的RAGE的N截断(例如RAGE$_{385-390}$和RAGE$_{385-404}$)导致这些RAGE构建体的调节性作用丧失。相反,消除374和377的RAGE的N-截短不导致RAGE肽作为抑制剂(RAGE$_{379-390}$)或作为野生型RAGE的有功能替代物(例如RAGE$_{379-404}$)丧失功能,提示这些保守残基(374和377)不是调节活性必需的,即使它们可能起到使RAGE胞质尾的α螺旋三级结构稳定的作用。

[0396] 与代表结合界面的这四个氨基酸的保守性质一致,发明人已经进一步发现,仅包含RAGE胞质尾的残基379-390的肽(即RAGE$_{379-390}$)是一种抑制肽,其抑制配体非依赖性和配体依赖性野生型RAGE活化,并发现,RAGE$_{379-404}$能够在CHO细胞中被某些共定位的GPCR活化。

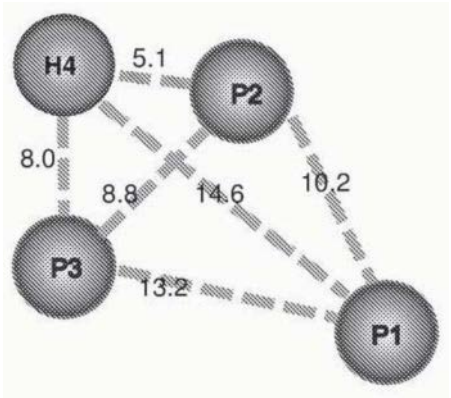
[0397] 在本发明的一个优选形式中,借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT$_1$R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物是如SEQ ID NO:6中所述的肽Q$_{379}$EEEEERAELNQ$_{390}$或其衍生物。

[0398] SEQ ID NO:6:

[0399] [Q$_{379}$EEEEERAELNQ$_{390}$]

[0400] 下文显示了衍生自结构模型4_RAGE$_{370-390}$的RAGE$_{379-390}$肽的药效团:

[0401]



[0402] H4是疏水性残基并且P1-P3是极性残基,并且距离以埃显示。部位点之间距离的矩阵如下,其中P表示极性部位点(形成氢键或带电荷),并且H表示疏水性部位点。距离以埃计。公差应当应用于每个点的位置。

[0403]

AA seq #	380 (P1)	384 (P2)	387 (P3)	388 (H4)
380	0			
384	10.2 Å	0		
387	13.2 Å	8.8 Å	0	
388	14.6 Å	5.1 Å	8 Å	0

[0404] 分子动力学模拟显示$RAGE_{379-390}$的相互作用性基团是移动的并且公差应当应用于每个基团直至±10Å的位置,条件是部位点之间的距离在数值上为正。

[0405] 如本领域技术人员将理解,可以通过取上述的亚集,生成额外的更小的药效团,并且本发明涵盖这类药效团、使用这类药效团鉴定化合物的方法和如此鉴定的化合物。

[0406] 在一种形式中,本发明还包含借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物,所述调节物包含选自以下的两个或更多个特征:第一带电荷或成氢键基团(A)、第二带电荷或成氢键基团(B)、第三带电荷或成氢键基团(C)和疏水基团(D),其中在高达±10 Å的公差范围内,所述特征的部位点之间的距离如下,条件是部位点之间的距离在数值上为正:

[0407]

	A	B	C	D
A				
B	10.2 Å			
C	13.2 Å	8.8 Å		
D	14.6 Å	5.1 Å	8 Å	

[0408] 在本发明的优选形式中,公差高达±5 Å,条件是部位点之间的距离在数值上为正。在本发明的优选形式中,公差高达±2 Å,条件是部位点之间的距离在数值上为正。在本发明的优选形式中,公差高达±1 Å,条件是部位点之间的距离在数值上为正。

[0409] 在本发明的优选形式中,调节物包含选自上文具体所述基团的三个或更多个特征。

[0410] 在本发明的优选形式中,调节物包含来自上文具体所述基团的四个或更多个特征。

[0411] 在本发明的一种形式中,提供了一种调节物,其特征在于调节物包含选自以下组合之一的至少两个特征:AB、AC、AD、BC、BD和CD。

[0412] 在本发明的一种形式中,提供一种调节物,其特征在于调节物包含选自以下组合之一的至少三个特征:ABC、ABD、ACD和BCD。

[0413] 在本发明的一种形式中,提供一种调节物,其特征在于调节物包含选自以下组合之一的至少四个特征:ABCD。

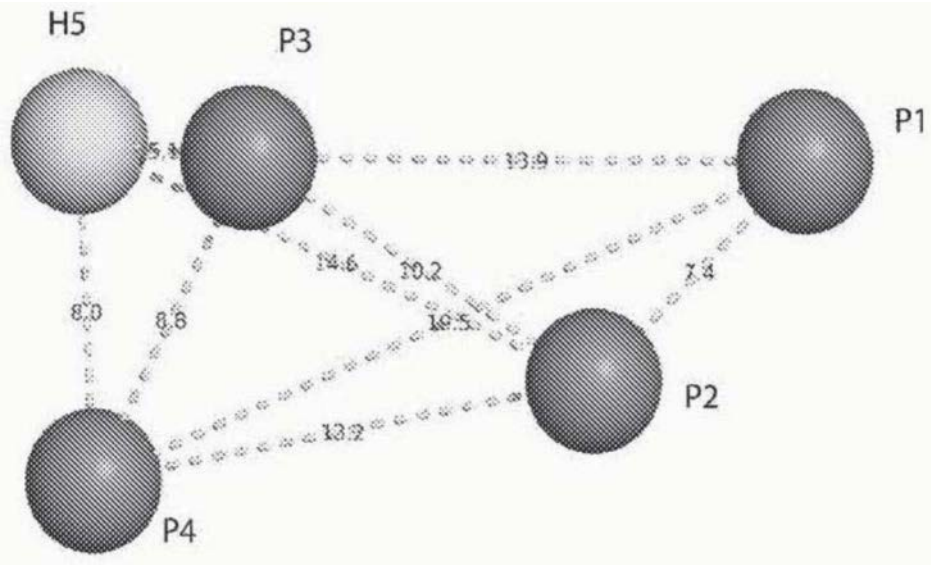
[0414] 在本发明的一种形式中,提供一种调节物,其特征在于调节物包含额外的带电荷或成氢键基团(P1),与$RAGE_{370-390}$中E377的保守性稳定作用相符,并且因此包含选自以下的两个或更多个特征:第一带电荷或成氢键基团(A)、第二带电荷或成氢键基团(B)、第三带电

荷或成氢键基团(C)、第四带电荷的或氢基团(D)和疏水基团(E),其中特征的部位点之间距离如下,处于±10 Å的公差范围内:

[0415]

AA seq #	377 (P1)	380 (P2)	384 (P3)	387 (P4)	388 (H5)
	A	B	C	D	E
A					
B	7.4 Å				
C	13.9 Å	10.2 Å			
D	19.5 Å	13.2 Å	8.8 Å		
E	18.5 Å	14.6 Å	5.1 Å	8 Å	

[0416]



[0417] RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物可以是肽或是非肽基化合物。

[0418] 在本发明的一种形式中,疏水基团是选自以下的氨基酸残基:Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Trp、Tyr。

[0419] 在本发明的一种形式中,疏水基团是选自以下的化学部分:C_{1-8}烷基、C_{1-8}链烯基、C_{3-6}环烷基、芳基、取代的芳基、烷基芳基、杂芳基、烷基杂芳基。

[0420] “烷基”意指脂族烃基团,其可以是直链或支链的并且在链中包含约1至约20个碳原子。优选的烷基在链中含有约1至约12个碳原子。更优选的烷基在链中含有约1至约6个碳原子。分支意指与直链烷基链连接的一个或多个低级烷基,如甲基、乙基或丙基。

[0421] “低级烷基”意指在链中具有约1至约6个碳原子的基团,所述基团可以是直链或支链的。烷基可以任选由一个或多个取代基取代,所述取代基可以相同或不同,每个取代基独立选自卤素、烷基、芳基、环烷基、氰基、羟基、烷氧基、烷硫基、氨基、-NH(烷基),-NH(环烷基)、-N(烷基)$_2$、羧基和-C(O)O-烷基。合适烷基的非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。

[0422] “链烯基”意指这样的脂族烃基团,其含有至少一个碳-碳双键并且可以是直链或支链的且在链中包含约2至约15个碳原子。优选的链烯基在链中具有约2至约12个碳原子;并且更优选地在链中具有约2至约4个碳原子。分支意指与线型链烯基链连接的一个或多个

低级烷基,如甲基、乙基或丙基。

[0423] “低级链烯基”意指在链中约2至约6个碳原子,其可以是直链或支链的。合适链烯基的非限制性实例包括乙烯基、丙烯基、2-丁烯基和3-甲基丁烯基。术语“取代的链烯基”意指链烯基可以由一个或多个取代基取代,所述取代基可以相同或不同,每个取代基独立选自烷基、芳基和环烷基。

[0424] “炔基”意指这样的脂族烃基团,其含有至少一个碳-碳参键并且可以是直链或支链的且在链中包含约2至约15个碳原子。优选的炔基在链中具有约2至约12个碳原子;并且更优选地在链中具有约2至约4个碳原子。分支意指与线型炔基链连接的一个或多个低级烷基,如甲基、乙基或丙基。

[0425] “低级炔基”意指在链中约2至约6个碳原子,其可以是直链或支链的。合适炔基的非限制性实例包括乙炔基、丙炔基、2-丁炔基和3-甲基丁炔基。术语“取代的炔基”意指炔基可以由一个或多个取代基取代,所述取代基可以相同或不同,每个取代基独立选自烷基、芳基和环烷基。

[0426] “脂族的”意指并且包括烷、烯或炔碳原子的直链或支链。脂族基团可以任选由一个或多个取代基取代,所述取代基可以相同或不同,每个取代基独立选自H、卤素、卤素、烷基、芳基、环烷基、环烷基氨基、链烯基、杂环的、炔基、环烷基氨基羰基、羟基、硫代、氰基、羟基、烷氧基、烷硫基、氨基、-NH(烷基)、-NH(环烷基)、-N(烷基)2)羧基、-C(O)O-烷基、杂芳基、芳烷基、烷基芳基、芳烯基、杂芳烷基、烷基杂芳基、杂芳烯基、杂烷基、羰基、羟烷基、芳氧基、芳烷氧基、酰基、芳酰基、硝基、氨基、酰氨基、酯、羧酸芳氧羰基、芳烷氧羰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、杂芳基磺酰基、烷基亚磺酰基、芳基亚磺酰基、杂芳基亚磺酰基、烷硫基、芳硫基、杂芳基硫基、芳烷基硫基、杂芳烷基硫基、环烯基、杂环烯基、杂环、氨基甲酸酯、脲、酮、醛、氰基、磺酰胺、亚砜、砜、磺酰脲、磺酰、酰肼、氧肟酸盐、S(烷基)Y1Y2N-烷基-、Y1Y2N-烷基-、Y1Y2NC(O)-和Y1Y2NSO$_2$-,其中Y1和Y2可以相同或不同并且独立地选自氢、烷基、芳基和芳烷基。

[0427] “杂脂族”意指一种另外的脂族基团,其含有至少一个杂原子(如氧、氮或硫)。术语“杂脂族的”包括取代的杂脂族。

[0428] “芳基”意指包含约6至约14个碳原子、优选地约6至约10个碳原子的芳族单环状或多环状环系统。芳基可以任选地用一个或多个“环系统取代基”取代,所述环系统取代基可以相同或不同并且如本文定义。合适芳基的非限制性实例包括苯基和萘基。

[0429] “杂烷基”意指如上文定义的烷基,其中一个或多个氢原子由选自N、S或O的杂原子取代。

[0430] “杂芳基”意指包含约5至约14个环原子、优选地约5至约10个环原子的芳族单环状或多环状环系统,其中一个或多种个环原子是单独或组合的除碳之外的元素,例如氮、氧或硫。优选的杂芳基含有约5至约6个环原子。“杂芳基”可以任选地用一个或多个“环系统取代基”取代,所述环系统取代基可以相同或不同并且如本文定义。在杂芳基原子团名称之前的前缀氮杂、氧杂或硫代意指至少氮、氧或硫原子分别作为环原子存在。杂芳基的氮原子可以任选地氧化成相应的N-氧化物。合适杂芳基的非限制性实例包括吡啶基、吡嗪基、呋喃基、噻吩基、嘧啶基、吡啶并(包括N-取代的吡啶酮),异噁唑基、异噻唑基、噁唑基、噻唑基、吡唑基、呋咱基、吡咯基、吡唑基、三唑基、1,2,4-噻二唑基、吡嗪基、哒嗪基、喹噁啉基、酞嗪基、

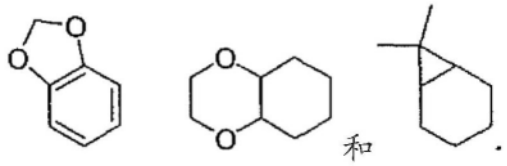
羟吲哚基(oxazolidinyl),咪唑并[1,2-a]吡啶基、咪唑并[2,1-b]噻唑基、苯并呋咱基、吲哚基、氮杂吲哚基、苯并咪唑基、苯并噻吩基、喹啉基、咪唑基、噻吩并吡啶基、喹唑啉基、噻吩并嘧啶基、吡咯并吡啶基、咪唑并吡啶基、异喹啉基、苯并氮杂吲哚基、1,2,4-三嗪基、苯并噻唑基等。术语“杂芳基”还指部分饱和的杂芳基部分,例如,四氢异喹啉基、四氢喹啉基等。

[0431] “芳烷基”或“芳基烷基”意指芳基-烷基,其中芳基和烷基如先前所述。优选的芳烷基包括低级烷基。合适芳烷基的非限制性实例包括苄基、2-苯乙基和萘基甲基。通过烷基与母体部分键接。

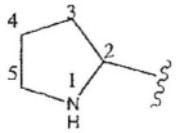
[0432] “烷基芳基”意指烷基-芳基,其中烷基和芳基如先前所述。优选的烷基芳基包括低级烷基。合适烷基芳基的非限制性实例是甲苯基。通过芳基与母体部分键接。

[0433] 环烷基”意指包含约3至约10个碳原子、优选地约5至约10个碳原子的非芳族单环状或多环状环系统。优选的环烷基环含有约5约7环原子。环烷基可以任选地用一个或多个“环系统取代基”取代,所述环系统取代基可以相同或不同并且如上文定义。合适单环状环烷基的非限制性实例包括环丙基、环戊基、环已基、环庚基等。合适多环状环烷基的非限制性实例包括1-萘烷基、降冰片基、金刚烷基等,以及部分饱和的种类,如,例如,茚满基、四氢萘基等。“卤素”意指氟、氯、溴或碘。优选的是氟、氯和溴。

[0434] “环系统取代基”意指与芳环或非芳环系统连接的取代基,其例如替代环系统上的可用氢。环系统取代基可以相同或不同,每个取代基独立选自烷基、链烯基、炔基、芳基、杂芳基、芳烷基、烷基芳基、杂芳烷基、杂芳基烯基、杂芳基炔基、烷基杂芳基、羟基、羟烷基、烷氧基、芳氧基、芳烷氧基、酰基、芳酰基、卤素、硝基、氰基、羧基、烷氧羰基、芳氧羰基、芳烷氧羰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、杂芳基磺酰基、烷硫基、芳硫基、杂芳基硫基、芳烷基硫基、杂芳烷基硫基、环烷基、杂环基、-C(=N-CN)-NH_2、-C(=NH)-NH_2、-C(=NH)-NH(烷基)、Y1Y2N-、Y1Y2N-烷基-、Y1Y2NC(O)-、Y1Y2NSO_2-和-SO_2NY1Y2,其中Y1和Y2可以相同或不同并且独立地选自氢、烷基、芳基、环烷基和芳烷基。“环系统取代基”还可以意指单一部分,其同时替代环系统的二个毗邻碳原子上的二个可用氢(每个碳上一个H)。这类部分的实例是亚甲基二氧基、亚乙基二氧基、-C(CH_3)$_2$-等,其形成部分,如,例如:

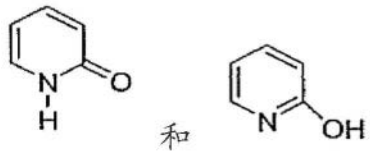
[0435] 

[0436] 应当指出在含有杂原子的本发明环系统中,与N、O或S1毗邻的碳原子上不存在羟基以及与另一个杂原子毗邻的碳上不存在N或S基团。因此,例如,在以下环中:

[0437] 

[0438] 不存在与标为2和5的碳直接连接的-OH。

[0439] 还应当指出,互变异构形式,例如,以下部分:

[0440] 

[0441] 在本发明的某些实施方案中视为等同。

[0442] “炔基烷基”意指这样的炔基-烷基,其中炔基和烷基如先前所述。优选的炔基烷基含有低级炔基和低级烷基。通过烷基与母体部分键接。合适炔基的非限制性实例包括炔丙基甲基。

[0443] “杂芳烷基”意指杂芳基-烷基,其中杂芳基和烷基如先前所述。优选的杂芳烷基含有低级烷基。合适芳烷基的非限制性实例包括吡啶甲基和咪-3-基甲基。通过烷基与母体部分键接。

[0444] “羟烷基”意指HO-烷基,其中烷基如先前定义。优选的羟烷基含有低级烷基。合适羟烷基的非限制性实例包括羟甲基和2-羟乙基。

[0445] “酰基”意指H-C(O)-、烷基-C(O)-或环烷基-C(O)-基团,其中多种基团如先前所述。通过羰基与母体部分键接。优选的酰基含有低级烷基。合适酰基的非限制性实例包括甲酰基、乙酰基和丙酰基。

[0446] “芳酰基”意指芳基-C(O)-基团,其中芳基如先前所述。通过羰基与母体部分键接。合适基团的非限制性实例包括苯甲酰基和1-萘酰基。

[0447] “烷氧基”意指烷基-O-基团,其中烷基如先前所述。合适烷氧基的非限制性实例包括甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基和正丁氧基。通过醚氧与母体部分键接。

[0448] “芳氧基”意指芳基-O-基团,其中芳基如先前所述。合适芳氧基的非限制性实例包括苯氧基和萘氧基。通过醚氧与母体部分键接。

[0449] “烷硫基”意指烷基-S-基团,其中烷基如先前所述。合适烷硫基基团的非限制性实例包括甲基硫基和乙基硫基。通过硫与母体部分键接。

[0450] “芳硫基”意指芳基-S-基团,其中芳基如先前所述。合适芳硫基基团的非限制性实例包括苯硫基和萘硫基。通过硫与母体部分键接。

[0451] “芳烷基硫基”意指芳烷基-S-基团,其中芳烷基如先前所描述。合适的芳烷基硫基的非限制性实例是苄基硫基。通过硫与母体部分键接。

[0452] “烷氧羰基”意指烷基-O-CO-基团。合适烷氧羰基基团的非限制性实例包括甲氧羰基和乙氧羰基。通过羰基与母体部分键接。

[0453] “芳烷氧羰基”意指芳烷基-O-C(O)-基团。合适芳烷氧羰基的非限制性实例是苄氧羰基。通过羰基与母体部分键接。

[0454] “烷基磺酰基”意指烷基-S(O_2)-基团。优选的基团是其中烷基是低级烷基的那些基团。通过磺酰基与母体部分键接。

[0455] “芳基磺酰基”意指芳基-S(O_2)-基团。通过磺酰基与母体部分键接。

[0456] 术语“取代的”意指所指定原子上的一个或多个氢由选自所示基团的替换,条件是不超过现存环境下所指定原子的正常价态及这种取代产生稳定的化合物。仅取代基和/或变量的组合产生稳定化合物时,这种组合才是允许的。

[0457] “稳定化合物”或“稳定的结构”意指这样的化合物,其充分地稳健以经受住从反应

混合物分离到可用纯度及配制成有效治疗剂。

[0458] 术语“任选取代的”意指任选地用指定的基团、原子团或部分取代。

[0459] 当化合物中的官能团称作“受保护”时,这意指当该化合物进行反应时,该基团处于在受保护位点处杜绝所不需副反应的修饰形式。本领域普通技术人员以及通过参考标准教材如,例如,Greene等人(1991),将会认识到合适的保护基。

[0460] 当任何变量(例如,芳基、杂环,R2)在任何组分中或在本发明中出现多于一次时,每次出现时其定义与每次其他出现时的其定义无关。

[0461] 在本发明的一种形式中,每个带电荷或成氢键基团是独立选自以下的氨基酸残基:Asp、Glu。

[0462] 在本发明的一种形式中,每个带电荷或成氢键基团是具有羧酸部分的氨基酸残基。

[0463] 在本发明的一种形式中,每个带电荷或成氢键基团独立选自以下的化学部分:羧酸、羟肟酸类、膦酸类和次膦酸类、磺酸类和亚磺酸类、磺酰胺类、酰基磺酰胺类和磺酰脲类、2,2,2-三氟乙-1-醇和三氟甲基酮类、四唑类、5-氧代-1,2,4-噁二唑类和5-氧代-1,2,4-噻二唑、噻唑烷二酮类、噁唑烷二酮和噁二唑烷-二酮、3-羟异噁唑类和3-羟异噻唑类、取代的酚类、方形酸类、3-和4-羟喹啉-2-酮类、季酮酸和特特拉姆酸(Tetramic Acid)、环戊烷-1,3-二酮类和其他环状和无环结构物,包括硼酸类、巯基唑类(mercaptoazoles)和磺酰亚胺酰胺类(sulfonimidamides)(Ballatore等人,2013)。

[0464] 在一种形式中,本发明提供一种鉴定借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物的方法,所述方法包括步骤:(1)将化合物的三维结构与药效团比较,所述药效团包含选自以下的两个或更多个特征:第一带电荷或成氢键基团(A)、第二带电荷或成氢键基团(B)、第三带电荷或成氢键基团(C)和疏水基团(D),其中在±10A的公差范围内,各特征之间的距离如下:

[0465]

	A	B	C	D
A				
B	10.2 Å			
C	13.2 Å	8.8 Å		
D	14.6 Å	5.1 Å	8 Å	

[0466] 和(2)选择疏水性和/或带电荷或成氢键化学部分如此定位的化合物。

[0467] 通过包括与药效团比较的上述方法鉴定的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物可以是肽或非肽基化合物。

[0468] 在本发明的优选形式中,公差高达±5 Å,条件是部位点之间的距离在数值上为正。在本发明的优选形式中,公差高达±2 Å,条件是部位点之间的距离在数值上为正。在本发明的优选形式中,公差高达±1 Å,条件是部位点之间的距离在数值上为正。

[0469] 在本发明的优选形式中,调节物包含选自上文具体所述基团的三个或更多个特征。

[0470] 在本发明的一个优选形式中,调节物包含来自上文具体所述基团的四个特征。

[0471] 在本发明的一种形式中,化合物的三维结构与药效团的比较包括化合物的最小能量结构与药效团比较。

[0472] 从可能庞大数目的化合物选择化合物的高效手段包括使用计算机程序(例如Catalyst(MS1))筛选化合物三维化学结构的一个或多个计算机化数据库,将化合物比照本发明的药效团比较。

[0473] 在本发明的一种形式中,借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物是具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的肽或其含有至少残基379-390的类似物、片段或衍生物。

[0474] 在本发明的一个形式中,借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物是式SEQ ID NO:1的肽或其类似物或衍生物。

[0475] 在本发明的一个形式中,借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物是式SEQ ID NO:2的肽或其类似物或衍生物。

[0476] 在本发明的一个形式中,借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物是式SEQ ID NO:5的肽或其类似物或衍生物。

[0477] 在本发明的一个形式中,借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物是式SEQ ID NO:6的肽或其类似物或衍生物。

[0478] 在本发明的一个形式中,借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物是如SEQ ID NO:7中所述的S391A-E392X-RAGE肽或其类似物或衍生物。

[0479] SEQ ID NO:7:

[0480] $[L_{362}WQRRQRRGEERKAPENQEEEEERAELNQA_{391}]$

[0481] 在本发明的一个形式中,借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物是如SEQ ID NO:8中所述的S391X-RAGE肽或其类似物或衍生物。

[0482] SEQ ID NO:8:

[0483] $[L_{362}WQRRQRRGEERKAPENQEEEEERAELNQ_{390}]$

[0484] 优选的具体衍生物包括下文如SEQ ID NO:9中所述的$Q_{379}EEEEERAELNR_{390}$,如SEQ ID NO:10中所述的$Q_{379}EEEEERAELNK_{390}$,如SEQ ID NO:11中所述的$K_{379}EEEEERAELNQ_{390}$,如SEQ ID NO:12中所述的$K_{379}EEEERAELNK_{390}$和如SEQ ID NO:13中所述的$K_{379}EEEEERAELNR_{390}$。

[0485] SEQ ID NO:9:$[Q_{379}EEEEERAELNR_{390}]$

[0486] SEQ ID NO:10:$[Q_{379}EEEEERAELNK_{390}]$

[0487] SEQ ID NO:11:$[K_{379}EEEEERAELNQ_{390}]$

[0488] SEQ ID NO:12:$[K_{379}EEEEERAELNK_{390}]$

[0489] SEQ ID NO:13:$[K_{379}EEEEERAELNR_{390}]$

[0490] 如本文中涉及本发明调节物如SEQ ID NO:1、2、5至13时所用的术语“衍生物”指这样的调节物,所述调节物特征在于其一级结构取自RAGE的C末端胞质尾或其片段或者衍生自RAGE的C末端胞质尾或其片段而成,但所述调节物包含氨基酸添加、置换、截短、化学和/或生物化学修饰(乙酰化、羧化、磷酸化、糖基化、遍在蛋白化、侧链甲基化)、经放射性核苷酸或卤素标记、不寻常或人工氨基酸(如D-氨基酸、N-甲基化氨基酸、四-置换、β-肽、焦谷氨酸;2-氨基己二酸;3-氨基己二酸;β-丙氨酸;β-氨基丙酸;2-氨基丁酸;4-氨基丁酸;哌啶酸;6-氨基己酸;2-氨基庚酸;2-氨基异丁酸;3-氨基异丁酸;2-氨基庚二酸;2.4-二氨基丁酸;锁链素;2,2″-二氨基庚二酸;2,3-二氨基丙酸;N-乙基甘氨酸;N-乙基天冬酰胺;羟赖氨酸;别-羟赖氨酸;3-羟脯氨酸;4-羟脯氨酸;异锁链素;别-异亮氨酸;N-甲基甘氨酸;肌氨酸;N-甲基异亮氨酸;N-甲基缬氨酸;正缬氨酸;正亮氨酸;鸟氨酸;他汀)、反向倒置序列(retroinverted sequences)、环状肽、类肽、或与非肽药物、非肽标记物、非肽运载体(non-peptide carrier)或非肽树脂键接。

[0491] 发明人已经进一步发现,包含野生型RAGE的残基343-361(SEQ ID NO:14)的肽是一种抑制肽,其抑制RAGE配体非依赖性和RAGE配体依赖性RAGE活化。

[0492] 置换涵盖其中氨基酸替换为不同的天然存在的或非常规氨基酸残基的氨基酸改变。这类置换可以划分为“保守”,在这种情况下,多肽中所含的氨基酸残基替换为相对于极性、侧链官能度或大小而言具有相似特征的另一个天然存在的氨基酸,例如Ser↔Thr↔Pro↔Hyp↔Gly↔Ala、Val↔Ile↔Leu、His↔Lys↔Arg、Asn↔Gln↔Asp↔Glu或Phe↔Trp↔Tyr。应当理解某些非常规氨基酸也可以是天然存在氨基酸的合适替换。例如,鸟氨酸、高精氨酸和二甲基赖氨酸与His、Arg和Lys有关。

[0493] 本发明涵盖的置换也可以是“非保守的”,其中,存在于多肽中的氨基酸残基由具有不同特性的氨基酸置换,如来自不同组的天然存在氨基酸(例如将带电荷或疏水性氨基酸置换为丙氨酸),或备选地,其中将天然存在的氨基酸置换为非常规氨基酸。

[0494] 氨基酸置换一般是单残基的,但可以是多残基的,为聚类或分散的。优选地,氨基酸置换是保守的。

[0495] 添加涵盖添加一个或多个天然存在或非常规的氨基酸残基。缺失涵盖缺失一个或多个氨基酸残基。

[0496] 如上文所述,本发明包括其中一个或多个氨基酸已经历侧链修饰的肽。本发明构思的侧链修饰实例包括修饰氨基,如通过与醛反应,随后用$NaBH_4$还原的还原性烷基化;用甲基乙酰亚胺酯进行酰胺化;用乙酸酐进行酰化;用氰酸酯进行氨基的氨甲酰化;用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)进行氨基的三硝基苄基化;用琥珀酐和四氢化邻苯二甲酸酐进行氨基的酰化;和用5-磷酸吡哆醛进行赖氨酸的吡哆化,随后用$NaBH_4$还原。

[0497] 可以通过与试剂如2,3-丁二酮、苯乙醛和乙二醛形成杂环缩合产物,修饰精氨酸残基的胍基。

[0498] 可以通过碳二亚胺活化,借助O-酰基异脲(O-acylisourea)形成,随后接着衍生化(例如,衍生化成相应的酰胺),修饰羧基。可以通过多种方法修饰巯基,如用碘乙酸或碘乙酰胺进行羧甲基化;过甲酸氧化成氧化半胱氨酸;与他巯基化合物形成混合型二硫键;与马来酰亚胺、马来酐或其他取代的马来酰亚胺反应;使用4-氯汞苯甲酸酯、4-氯汞苯磺酸、苯基氯化汞、2-氯汞-4-硝基酚和其他汞制剂形成汞衍生物;用氰酸酯在碱性pH进行氨甲酰

化。在本发明的优选形式中,任何对半胱氨酸残基的修饰不得影响肽形成必需二硫键的能力。还可能将半胱氨酸的巯基替换为硒等同物,从而肽形成替代一个或多个二硫键的二硒键。

[0499] 可以例如通过用N-溴代琥珀酰亚胺氧化或用2-羟-5-硝基溴化苄或氧硫基卤进行吲哚环的烷基化,修饰色氨酸残基。在另一方面,可以通过用四硝基甲烷硝化以形成3-硝基酪氨酸衍生物,改变酪氨酸残基。

[0500] 可以通过用碘乙酸衍生物进行烷基化或焦碳酸二乙酯进行N-乙氧羰基化,实现修饰组氨酸残基的咪唑环。可以例如通过在4-位置羟化,修饰脯氨酸残基。

[0501] 下表中显示具有修饰侧链的一些氨基酸和其他非天然氨基酸的清单:

非常规氨基酸	代码	非常规氨基酸	代码
L-α-氨基丁酸	Abu	L-α-甲基组氨酸	Mhis
α-氨基-α-甲基丁酸酯	Mgabu	L-α-甲基异亮氨酸	Mile
氨基环丙烷-羧酸酯	Cpro	L-α-甲基亮氨酸	Mleu
		L-α-甲基甲硫氨酸	Mmet
氨基异丁酸	Aib	L-α-甲基正缬氨酸	Mnva
氨基降冰片烷基-羧酸酯	Norb	L-α-甲基苯丙氨酸	Mphe
		L-α-甲基丝氨酸	Mser
环己基丙氨酸	Chexa	L-α-甲基色氨酸	Mtrp
环戊基丙氨酸	Cpen	L-α-甲基缬氨酸	Mval
D-丙氨酸	DAla	N-(N-(2,2-二苯乙基)	Nnbhm
D-精氨酸	DArg	氨甲酰甲基甘氨酸	
D-天冬酰胺	DAsn	1-羧基-l-(2,2-二苯基-	Nmbc
D-天冬氨酸	DAsp	乙基氨基)环丙烷	
D-半胱氨酸	DCys	L-N-甲基丙氨酸	Nmala
D-谷氨酰胺	DGln	L-N-甲基精氨酸	Nmarg
D-谷氨酸	DGlu	L-N-甲基天冬氨酸	Nmasp
D-组氨酸	DHis	L-N-甲基半胱氨酸	Nmcys
D-异亮氨酸	Dlle	L-N-甲基谷氨酰胺	Nmgln
D-亮氨酸	DLeu	L-N-甲基谷氨酸	Nmglu
D-赖氨酸	DLys	L-N-甲基组氨酸	Nmhis
D-甲硫氨酸	DMet	L-N-甲基异亮氨酸	Nmile
D-鸟氨酸	DOm	L-N-甲基亮氨酸	Nmleu
D-苯丙氨酸	DPhe	L-N-甲基赖氨酸	Nmlys
D-脯氨酸	DPro	L-N-甲基甲硫氨酸	Nmmet
D-丝氨酸	DSer	L-N-甲基正亮氨酸	Nmnle
D-苏氨酸	DThr	L-N-甲基正缬氨酸	Nmnva
D-色氨酸	DTrp	L-N-甲基鸟氨酸	Nmom
D-酪氨酸	DTyr	L-N-甲基苯丙氨酸	Nmphe
D-缬氨酸	DVal	L-N-甲基脯氨酸	Nmpro

[0502]

[0503]

D-α-甲基丙氨酸	DMala	L-N-甲基丝氨酸	Nmser
D-α-甲基精氨酸	DMarg	L-N-甲基苏氨酸	Nmthr
D-α-甲基天冬酰胺	DMasn	L-N-甲基色氨酸	Nmtrp
D-α-甲基天冬氨酸	DMasp	L-N-甲基酪氨酸	Nmtyr
D-α-甲基半胱氨酸	DMcys	L-N-甲基缬氨酸	Nmval
D-α-甲基谷氨酰胺	DMgln	L-N-甲基乙基甘氨酸	Nmetg
D-α-甲基组氨酸	DMhis	L-N-甲基叔丁基甘氨酸	Nmtbug
D-α-甲基异亮氨酸	DMile	L-正亮氨酸	Nle
D-α-甲基亮氨酸	DMleu	L-正缬氨酸	Nva
D-α-甲基赖氨酸	DMlys	α-甲基-氨基异丁酸酯	Maib
D-α-甲基甲硫氨酸	DMmet	α-甲基-γ-氨基丁酸酯	Mgabu
D-α-甲基鸟氨酸	DMorn	α-甲基环己基丙氨酸	Mchexa
D-α-甲基苯丙氨酸	DMphe	α-甲基环戊基丙氨酸	Mcpen
D-α-甲基脯氨酸	DMpro	α-甲基-α-萘基丙氨酸	Manap
D-α-甲基丝氨酸	DMser	α-甲基青霉胺	Mpen
D-α-甲基苏氨酸	DMthr	N-(4-氨基丁基)甘氨酸	Nglu
D-α-甲基色氨酸	DMtrp	N-(2-氨基乙基)甘氨酸	Naeg
D-α-甲基酪氨酸	DMty	N-(3-氨基丙基) 甘氨酸	Norn
D-α-甲基缬氨酸	DMval	N-氨基-α-甲基丁酸酯	Nmaabu
D-N-甲基丙氨酸	DNmala	α-萘基丙氨酸	Anap
D-N-甲基精氨酸	DNmarg	N-苄基甘氨酸	Nphe
D-N-甲基天冬酰胺	DNmasn	N-(2-氨甲酰乙基)甘氨酸	Nglu
D-N-甲基天冬氨酸	DNmasp	N-(氨甲酰甲基) 甘氨酸	Nasn
D-N-甲基半胱氨酸	DNmcys	N-(2-羧基乙基)甘氨酸	Nglu
D-N-甲基谷氨酰胺	DNmgln	N-(羧基甲基)甘氨酸	Nasp
γ-羧基谷氨酸	Gla	N-环丁基甘氨酸	Ncbut
4-羟基脯氨酸	Hyp	N-环癸基甘氨酸	Ncdec
5-羟基 赖氨酸	Hlys	N-环十二烷基甘氨酸	Ncdod
2-氨基苯甲酰基(邻氨基苯甲酰)	Abz	N-环辛基甘氨酸	Ncoct
		N-环丙基甘氨酸	Ncpro
环己基丙氨酸	Cha	N-环十一烷基甘氨酸	Ncund
苯基甘氨酸	Phg	N-(2,2-二苯基乙基)甘氨酸	Nbhm
4-苯基-苯丙氨酸	Bib	N-(3,3-二苯基丙基)甘氨酸	Nbhe
L-瓜氨酸	Cit	N-(羟基乙基)甘氨酸	Nser
L-1,2,3,4-四氢异-	Tic	N-(咪唑基乙基)甘氨酸	Nhis

[0504] 如果肽施用至个体或用作诊断试剂,这些类型的修饰可能对稳定肽而言重要。

[0505] 如本文所用,保守性氨基酸置换可以包含在具有足够相似物理化学特性的组内部的氨基酸残基,从而该组成员之间的置换将保留分子的生物学活性(参见例如Grantham,R.,1974)。特别地,保守性氨基酸置换优选地是这样的置换,其中氨基酸源自相同类别的氨基酸(例如,碱性氨基酸、酸性氨基酸、极性氨基酸、具有脂族侧链的氨基酸、具有正电荷或负电荷侧链的氨基酸,侧链中带芳族基团的氨基酸、具有可以形成氢桥的侧链,例如具有羟基官能团的侧链的氨基酸)。保守性置换在这种情况下例如是将碱性氨基酸残基(Lys、Arg、His)置换为另一个碱性氨基酸残基(Lys、Arg、His),将脂族氨基酸残基(Gly、Ala、Val、Leu、lie)置换为另一个脂族氨基酸残基、用芳族氨基酸残基(Phe、Tyr、Trp)置换另一个芳族氨基酸残基、将苏氨酸置换为丝氨酸或将亮氨酸置换为异亮氨酸。本领域技术人将员已知其他的保守氨基酸交换。应当优选地维持异构体形式,例如,优选地用K置换R或H、同时优选地用k置换r和h。

[0506] 当考虑替换用氨基酸时,本发明的优选替换是在Grantham,R.(1974)被描述为具有小于100的D的那些替换,所述文献的内容通过引用的方式并入。最优选的替换是被描述为具有小于50的D的那些替换。

[0507] 本发明的肽调节物包括SEQ ID NO:1、2、5、6、7、8、9、10、11、12或13的反向倒置异构体(retro inverso isomers)或其修饰或取代的变体或通过添加或缺失形成的肽(Li等人,2010)。

[0508] 用于治疗、预防或管理RAGE相关病症的方法

[0509] 在另一个相关方面,本发明提供用于治疗、预防或管理需要这种治疗的患者中RAGE相关病症的方法,所述方法包括施用有效量的借助本发明某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物。

[0510] 在另一个方面,本发明包括借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物用于制造药物的用途,所述药物用于治疗、预防或管理需要这种治疗的患者中的RAGE相关病症。

[0511] 在另一个方面,本发明包括借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物用于治疗、预防或管理需要这种治疗的患者中RAGE相关病症的用途。

[0512] 在本发明的优选形式中,某些共定位的GPCR是血管紧张素受体。在本发明的优选形式中,某些共定位的GPCR是AT_1R。

[0513] 在本发明的优选形式中,某种共定位的GPCR是某种趋化因子受体。在本发明的优选形式中,某些共定位的GPCR是CCR2。

[0514] 另外,本发明提供用于治疗、预防或管理需要这种治疗的患者中RAGE相关病症的方法,所述方法包括施用有效量的借助本发明某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物与某种共定位的GPCR的调节物和/或某种共定位的GPCR信号传导途径的调节物的组合。

[0515] 在本发明的优选形式中,某些共定位的GPCR是血管紧张素受体。在本发明的优选形式中,某些共定位的GPCR是AT_1R。

[0516] 在本发明的优选形式中,某种共定位的GPCR是某种趋化因子受体。在本发明的优选形式中,某些共定位的GPCR是CCR2。

[0517] 该方法可以包括施用有效量的借助本发明某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物与某种共定位的GPCR的调节物和/或某种共定位的GPCR信号传导途径的调节物的组合,其中某种共定位的GPCR的调节物和/或某种共定位的GPCR信号传导途径的调节物以比通常为治疗与某种共定位的GPCR有关的病症所施用剂量低的剂量施用。

[0518] 该方法可以包括施用有效量的借助本发明某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物与某种共定位的GPCR的调节物和/或某种共定位的GPCR信号传导途径的调节物的组合,其中某种共定位的GPCR的调节物和/或某种共定位的GPCR信号传导途径的调节物以比通常为治疗与RAGE有关的病症所施用剂量低的剂量施用。

[0519] 在本发明的一个特别优选形式中,该方法可以包括施用有效量的借助本发明活化型血管紧张素受体的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物与AT_1R的调节物和/或AT_1R信号传导途径的调节物的组合,其中AT_1R的调节物和/或AT_1R信号传导途径的调节物以比通常为

治疗AT_1R相关病症所施用剂量低的剂量施用。

[0520] 在本发明的另一个特别优选形式中,该方法可以包括施用有效量的借助本发明活化型某种趋化因子受体的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物与CCR2的调节物和/或CCR2信号传导途径的调节物的组合,其中CCR2的调节物和/或CCR2信号传导途径的调节物以比通常为治疗CCR2相关病症所施用剂量低的剂量施用。

[0521] 另外,本发明提供用于治疗、预防或管理需要这种治疗的患者中RAGE相关病症的方法,所述方法包括施用有效量的借助本发明某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物与RAGE配体依赖性RAGE活化的调节物和/或组成型活性RAGE的调节物和/或RAGE信号传导途径的调节物的组合。

[0522] 在本发明的一个特别优选形式中,该方法可以包括施用有效量的本发明借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物与RAGE配体依赖性RAGE活化的调节物和/或组成型活性RAGE的调节物和/或RAGE信号传导途径的调节物的组合,其中RAGE配体依赖性RAGE活化的调节物和/或组成型活性RAGE的调节物和/或RAGE信号传导途径的调节物以比通常为治疗与RAGE相关病症所施用剂量低的剂量施用。

[0523] 另外,本发明提供用于治疗、预防或管理需要这种治疗的患者中RAGE相关病症的方法,所述方法包括施用有效量的借助本发明某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物与某种共定位的GPCR的调节物和/或某种共定位的GPCR信号传导途径的调节物的组合。

[0524] 例如,本发明提供用于治疗、预防或管理需要这种治疗的患者中RAGE相关病症的方法,所述方法包括施用有效量的本发明借助活化型血管紧张素受体的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物与RAGE配体依赖性RAGE活化的调节物和/或组成型活性RAGE的调节物和/或RAGE信号传导途径的调节物和AT_1R的调节物和/或AT_1R信号传导途径的调节物的组合。

[0525] 例如,本发明提供用于治疗、预防或管理需要这种治疗的患者中RAGE相关病症的方法,所述方法包括施用有效量的本发明借助某种活化型趋化因子受体的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物与RAGE配体依赖性RAGE活化的调节物和/或组成型活性RAGE的调节物和/或RAGE信号传导途径的调节物和CCR2的调节物和/或CCR2信号传导途径的调节物的组合。

[0526] 在本发明的一个特别优选形式中,该方法可以包括施用有效量的借助本发明某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物与该共定位的GPCR的调节物和/或某种共定位的GPCR信号传导途径的调节物和RAGE配体依赖性RAGE活化的调节物和/或组成型活性RAGE的调节物和/或RAGE信号传导途径的调节物的组合,其中RAGE配体依赖性RAGE活化的调节物和/或组成型活性RAGE的调节物和/或RAGE信号传导途径的调节物以比通常为治疗RAGE相关病症所施用剂量低的剂量施用,和/或某种共定位的GPCR的调节物和/或某种共定位的GPCR信号传导途径的调节物以比通常为治疗与该GPCR相关的病症所施用剂量低的剂量施用。

[0527] 在本发明的一个特别优选形式中,该方法可以包括施用有效量的借助本发明活化型血管紧张素受体的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物与AT_1R的调节物和/或AT_1R信号传导途径的调节物和RAGE配体依赖性RAGE活化的调节物和/或组成型活性RAGE的调节物

和/或RAGE信号传导途径的调节物的组合，其中RAGE配体依赖性RAGE活化的调节物和/或组成型活性RAGE的调节物和/或RAGE信号传导途径的调节物以比通常为治疗RAGE相关病症所施用剂量低的剂量施用，和/或AT_1R的调节物和/或AT_1R信号传导途径的调节物以比通常为治疗AT_1R相关病症所施用剂量低的剂量施用。

[0528] 在本在本发明的一个特别优选形式中，该方法可以包括施用有效量的借助本发明某种活化型趋化因子受体的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物与CCR2的调节物和/或CCR2信号传导途径的调节物和RAGE配体依赖性RAGE活化的调节物和/或组成型活性RAGE的调节物和/或RAGE信号传导途径的调节物的组合，其中RAGE配体依赖性RAGE活化的调节物和/或组成型活性RAGE的调节物和/或RAGE信号传导途径的调节物以比通常为治疗RAGE相关病症所施用剂量低的剂量施用，和/或CCR2的调节物和/或CCR2信号传导途径的调节物以比通常为治疗CCR2相关病症所施用剂量低的剂量施用。

[0529] RAGE相关病症定义为依赖于RAGE表达的病症。它不排除也依赖于RAGE表达的与某种共定位的GPCR有关的病症，如AT_1R相关病症或CCR2相关病症。实际上，病症可以是RAGE相关的且与某种共定位的GPCR有关，包括AT_1R相关或CCR2相关。

[0530] 与某种共定位的GPCR有关的病症定义为依赖于某种共定位的GPCR表达的病症。它不排除也依赖于某种共定位的GPCR表达的RAGE相关病症。实际上，病症可以是RAGE相关的且与某种共定位的GPCR有关，包括AT_1R相关或CCR2相关。

[0531] 在本发明的一种形式中，RAGE相关病症是选自以下的病症：心血管病、消化系统病、癌症、神经系统疾病、呼吸系统疾病、结缔组织病、肾脏病、生殖疾病、皮肤病、眼病和内分泌病。

[0532] 在本发明的一种形式中，RAGE相关病症是选自以下的心血管病：动脉粥样硬化、缺血性心脏病、心肌炎、心内膜炎、心肌病、急性风湿热、慢性风湿性心脏病、脑血管病/卒中、心力衰竭、血管钙化、外周血管疾病和淋巴管炎。

[0533] 在本发明的一种形式中，RAGE相关病症是选自以下的消化系统病：牙周炎、食道炎、胃炎、胃-十二指肠溃疡、克罗恩病、溃疡性结肠炎、缺血性结肠炎、肠炎和小肠结肠炎、腹膜炎、酒精性肝病、肝炎、中毒性肝脏疾病、胆汁性肝硬化、肝纤维化/肝硬化、非酒精性脂肪肝病/非酒精性脂肪性肝炎(NAFLD/NASH)、肝外伤和自肝损伤、外伤或手术康复。

[0534] 在本发明的一种形式中，RAGE相关病症是选自以下的癌症：唇、口腔和咽恶性肿瘤、消化器官恶性肿瘤、呼吸器官和胸腔内器官恶性肿瘤、骨和关节软骨恶性肿瘤、黑素瘤和皮肤的其他恶性肿瘤、间皮组织和软组织恶性肿瘤、乳腺恶性肿瘤、女性生殖器官恶性肿瘤、男性生殖器官恶性肿瘤、尿路恶性肿瘤、眼、脑和中枢神经系统其他部分的恶性肿瘤、甲状腺和其他内分泌腺的恶性肿瘤、淋巴样组织、造血组织和相关组织的恶性肿瘤、疾病限定的部位、继发的和/或未指明部位的恶性肿瘤。

[0535] 在本发明的一种形式中，RAGE相关病症是神经系统疾病并且选自以下群组：中枢神经系统炎性疾病、主要影响中枢神经系统的全身性萎缩、锥体束外和运动障碍、帕金森病、中枢神经系统脱髓鞘病、阿尔茨海默病、局限性脑萎缩、路易体病、癫痫、偏头痛、神经病理性疼痛、糖尿病性神经病、多发性神经病、胶质瘤形成和进展、脊髓外伤、和缺血性脑损伤/卒中、脑外伤和自脑损伤、外伤或手术康复。

[0536] 在本发明的一种形式中，RAGE相关病症是精神疾病并且选自以下群组：痴呆、阿尔

茨海默病、血管性痴呆、成瘾、精神分裂症、重度情感障碍、抑郁、躁狂、双相型障碍和焦虑。

[0537] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症是呼吸(肺)疾病并且选自以下群组:急性上呼吸道感染、鼻炎、鼻咽炎、鼻窦炎、喉炎、流感和肺炎、急性支气管炎、急性细支气管炎、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、支气管扩张症、肺气肿、归因外部物质的慢性肺部疾病、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、肺嗜酸粒细胞增多症和胸膜、肺外伤和自肺损伤、外伤或手术康复。

[0538] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症是结缔组织病并且选自以下群组:骨关节炎、感染性关节炎、类风湿性关节炎、银屑病性关节病和肠病性关节病、幼年型关节炎、痛风和其他结晶性关节病、糖尿病性关节病、结节性多发性动脉炎、Churg-Strauss综合征、粘膜皮肤淋巴结综合征[川崎病]、超敏反应血管炎、Goodpasture综合征、血栓性微血管病、韦格纳肉芽肿、主动脉弓综合征[高安病]、巨细胞动脉炎、风湿性多肌痛、显微镜下多血管炎、低补体血症性血管炎、系统性红斑狼疮、皮肤多发性肌炎、多发性肌炎、全身性硬化症、CR(E)ST综合征、干燥综合征[Sjögren病]、混合型结缔组织病、Behçet病、外伤性肌肉损伤、扭伤、拉伤和骨折。

[0539] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症是肾脏病并且选自以下群组:肾小球肾炎、肾炎、糖尿病性肾脏疾病、间质性肾炎、阻塞性和返流性肾病、急性肾衰竭和慢性肾病。

[0540] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症是生殖疾病并且选自以下群组:前列腺炎、前列腺肥大、前列腺异型增生、输卵管炎、卵巢炎、骨盆炎性疾病(PID)、多囊卵巢综合征、宫颈炎、宫颈异型增生、阴道炎、外阴炎。

[0541] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症是选自以下的皮肤病:皮炎、湿疹、天疱疮/类天疱疮、银屑病、玫瑰糠疹、扁平苔癣、荨麻疹、多形红斑、结节性红斑、晒伤、角化病、光老化性皮肤溃疡、浅表皮肤损伤和开放伤口。

[0542] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症是选自以下的眼病:角膜炎、结膜炎、视网膜炎、青光眼、巩膜炎、巩膜外层炎、脉络膜视网膜炎症、糖尿病性视网膜病变、黄斑水肿、早产儿视网膜病变和视神经炎、眼外伤及自眼损伤、外伤或手术康复。

[0543] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症是选自以下的内分泌病:糖尿病、胰岛素抵抗、糖耐量受损和甲状腺炎。

[0544] 在本发明的一种形式中,抑制AT_1R或抑制AT_1R信号传导途径的抑制剂选自以下群组:依普罗沙坦(上市名称Teveten®,Abbott Laboratories USA)、氯沙坦(上市名称Cozaar®,Merck&Co)、缬沙坦(上市名称Diovan®,Novartis)、替米沙坦(上市名称Micardis®,Boehringer Ingelheim)、厄贝沙坦(上市名称Avapro®,SanofiAventis)、奥美沙坦(上市名称Benicar®,Daiichi Sankyo Inc)、阿齐沙坦(上市名称Edarbi、Takeda)、坎地沙坦(上市名称Atacand®,AstraZeneca)、ZD-7115、肌丙抗增压素((Sar1-Ala8)AngII)、Sarthran((Sar1-Thr8)AngII)和DuP753。该清单还包括这些抑制剂的前药,包括坎地沙坦(坎地沙坦酯)、阿齐沙坦(阿齐沙坦酯(Azilsartan medoxomi))和奥美沙坦(奥美沙坦酯(Olmesartan medoxomil)),所述前药可以是施用它们的形式以及活性代谢物(如,EXP-3174,氯沙坦的活性代谢物)。注意:部分激动剂可以发挥抑制内源Ang II的作用,因为即便显示激动作用,部分激动剂也不产生最大功效,并且在治疗上可以充当抑制剂。

[0545] 在本发明的一种形式中,抑制某趋化因子受体或抑制某趋化因子信号传导途径的

抑制剂选自以下群组:丙帕锗(也称作3-[(2-羧乙基-氧甲锗烷基)氧-甲锗烷基]丙酸、proxigermanium、Ge-132、双(2-羧乙基锗)倍半氧化物(CEGS)、2-羧乙基锗倍半氧烷、SK-818、有机锗、锗倍半氧化物、3,3′-(1,3-二氧代-1,3-二锗氧烷二基)双丙酸,3-氧甲锗烷基丙酸聚合物、聚-反-(2-羧乙基)锗倍半氧烷、proxigermanium、瑞帕锗和Serocion;CCR2)、BMS CCR222(CCR2)、白藜芦醇(CCR2)、RS504393(CCR2)、RS102895(CCR2)、MLN-1202(Millennium Pharmaceuticals;CCR2)、INCB8696(Incyte Pharmaceuticals;CCR2)、MK-0812(Merck;CCR2)、CCX140(ChemoCentryx;CCR2)、PF-4136309(Pfizer;CCR2)、BMS-741672(Bristol-Myers Squibb;CCR2);瑞帕利辛(Repertaxin)(CXCR2)、TAK-779(CCR5)、TAK-220(CCR5)、TAK-652(CCR5)、AK692(CCR5)、CMPD167(CCR5)、BX-471(CCR1)、AMD3100(CXCR4)、AMD11070(CXCR4)、FC131(CXCR4)、MLN3897(CCR1)、CP-481715(CCR1)、GW-873140(CCR5)、SB 225002(CXCR2)和SB265610(CXCR2)。

[0546] 在本发明的一种形式中,抑制CCR2或抑制CCR2信号传导途径的抑制剂选自以下群组:丙帕锗(也称作3-[(2-羧乙基-氧甲锗烷基)氧-甲锗烷基]丙酸、proxigermanium、Ge-132、双(2-羧乙基锗)倍半氧化物(CEGS)、2-羧乙基锗倍半氧烷、SK-818、有机锗、锗倍半氧化物、3,3′-(1,3-二氧代-1,3-二锗氧烷二基)双丙酸,3-氧甲锗烷基丙酸聚合物、聚-反-(2-羧乙基)锗倍半氧烷、proxigermanium、瑞帕锗和Serocion)、BMS CCR2 22(CCR2)、白藜芦醇(CCR2)、RS504393、RS102895、MLN-1202(Millennium Pharmaceuticals)、INCB8696(Incyte Pharmaceuticals)、MK-0812(Merck)、CCX140(ChemoCentryx)、PF-4136309(Pfizer)、BMS-741672(Bristol-Myers Squibb)。

[0547] 在本发明的一种形式中,RAGE配体依赖性RAGE活化的抑制剂和/或组成型活性RAGE的抑制剂和/或RAGE信号传导途径的抑制剂选自以下群组:Azeliragon (TTP488/PF-04494700)(靶向V-结构域的RAGE配体相互作用的口服小分子抑制剂);TTP4000(如US 7981423中所述的RAGE的可溶性融合蛋白抑制剂,其使用与人Ig Fc结构域连接的RAGE的配体结合性胞外结构域);如WO 2007109747中所述的与RAGE特异性结合的抗体及其RAGE结合性片段;FPS-ZM127(以高亲和力阻断Aβ/RAGE相互作用的叔酰胺);如US 20100249038中所述的拮抗RAGE配体诱导信号传导的肽;如WO2012109569中所述的溶血磷脂酸(LPA)拮抗剂;如Han等人(2012)中所述的2-氨基嘧啶类;如Han等人(2014)中所述的吡唑-5-羧酰胺类;如Han等人(2015)中所述的4,6-联苯基-2-(3-烷氧基苯胺基)嘧啶;如Manigrasso等人(2016)中所述的配体刺激的RAGE-DIAPH1信号转导的小分子抑制剂;如US20090220484中所述,基本上由RAGE胞质尾的全部或一部分组成或基本上由结合于RAGE胞质尾的透明蛋白-1的一部分组成的多肽。

[0548] 在具体实施方案中,调节物在以下基础上施用至受试者:使用筛选方法或鉴定本文广泛描述的调节物的方法,将它鉴定为借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物。

[0549] AT_1R相关病症定义为依赖于AT_1R表达的病症。它不排除也依赖于AT_1R表达的RAGE相关病症。实际上,病症可以是RAGE相关的且AT_1R相关的。

[0550] 某种趋化因子受体相关病症定义为依赖于某种趋化因子受体表达的病症。它不排除也依赖于某种趋化因子受体表达的RAGE相关病症。实际上,病症可以是RAGE相关的且某种趋化因子受体相关的。

[0551] CCR2相关病症定义为依赖于CCR2表达的病症。它不排除也依赖于CCR2表达的RAGE相关病症。实际上,病症可以是RAGE相关的且CCR2相关的。

[0552] 对于联合药剂,“正常情况下”施用以下剂量。

[0553]

RAS 抑制剂	给药
坎地沙坦(上市名称 Atacand®)	**高血压**: 口服: 初始: 16 mg 每日一次。范围: 4 至 32 mg 每日一次。剂量必须个体化。它可以每日一次或两次施用,每日总剂量范围是 8-32 mg。 **充血性心力衰竭**: 口服: 初始: 4 mg 每日一次。如耐受,按 2 周间隔时间剂量加倍; 目标剂量: 32 mg。
依普罗沙坦(上市名称 Teveten®)	**高血压**: 口服: 常用初始剂量是 600 mg 每日一次。剂量必须个体化。可以施用每日一次或两次,每日总剂量为 400 至 800 mg。剂量大于 800 mg 时临床经验有限。
厄贝沙坦(上市名称 Avapro®)	**高血压**: 口服: 150 mg 每日一次。可以对患者滴定到 300 mg 每日一次。注意: 血容不足患者中起始剂量应当是 75 mg。
氯沙坦(上市名称 Cozaar®),	常用起始剂量: 50 mg 每日一次; 可以每日一次或两次施用,每日总剂量范围是 25-100 mg。
奥美沙坦(上市名称 Benicar®)	**高血压**: 口服: 初始: 常用起始剂量是 20 mg 每日一次。如果初始应答不充分,2 周后可以增加到 40 mg 每日一次。在血容量可能不足的患者中考虑较低的起始剂量。
替米沙坦(上市名称 Micardis®)	**高血压**: 口服: 初始: 40 mg 每日一次。常用维持剂量范围: 每日 20 至 80 mg。血容不足患者应当在密切监督下启用较低剂量。
缬沙坦(上市名称 Diovan®)	**高血压**: 初始: 80 mg 或 160 mg 每日一次(在无血容量不足的患者中)。可以增加剂量以实现所需的效果。最大推荐剂量: 320 mg 每日。 **充血性心力衰竭**: 初始: 40 mg 每日二次。如耐受,滴定剂量到 80 至 160 mg 每日二次。最大每日剂量: 320 mg。
阿齐沙坦(上市名称 Edarbi®)	成人推荐剂量是每日一次服用 80 mg。对于大剂量利尿剂治疗的患者,考虑 40 mg 起始剂量。

[0554] 筛选候选物质的方法

[0555] 在一种形式中,本发明包括了就其调节RAGE活性的能力筛选候选物质的方法,其中这种RAGE活性由共定位的活性型GPCR诱导,所述方法包括步骤:使RAGE多肽与GPCR多肽在候选物质存在下接触,其中GPCR多肽有组成型活性和/或通过添加这种GPCR的激动剂、部分激动剂或变构调节物来活化;并且通过检测指示RAGE活化受候选物质的存在而调节的效应和/或通过检测受候选物质的存在而调节的RAGE依赖性信号传导,检测候选物质是否为借助共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物。

[0556] 在一种形式中,本发明包括就其调节(即激活、抑制或变构调节)借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化(也称作RAGE配体非依赖性RAGE反式活化)的能力筛选候选物质的方法。这些方法通包括以下步骤、由其组成或基本上由其组成:

[0557] a.使RAGE多肽与GPCR多肽在候选物质存在下接触,其中GPCR多肽有组成型活性和/或通过添加这种GPCR的激动剂、部分激动剂或变构调节物来活化;并且

[0558] b.通过检测指示RAGE活化受候选物质的存在而调节的效应和/或通过检测受候选物质的存在而调节的RAGE依赖性信号传导,检测候选物质是否为借助共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物。

[0559] 在一些实施方案中,筛选方法进一步包括检测在RAGE存在或不存在时,候选物质是否为某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))或某种共定位的GPCR的信号传导途径如血管紧张素受体信号传导途径(如AT_1R信号传导途径)或如某种趋化因子受体信号传导途径(如CCR2信号传导途径)的调节物(如激活物、抑制物或变构调节物)。在一些实施方案中,相对于因共定位的GPCR活化所致的RAGE非依赖性信号传导,与RAGE多肽不存在时相比,其存在时导致更大调节该信号的候选物质对调节借助共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化有选择性。

[0560] 在一种形式中,本发明包含通过所述方法鉴定为调节物的肽。在一种形式中,本发明包含通过所述方法鉴定为调节物的化合物。

[0561] 在一些实施方案中,筛选方法进一步包括检测在某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT1R)或如某种趋化因子受体(如CCR2))存在或不存在时,候选物质是否为RAGE或RAGE信号传导途径的调节物(如激活物、抑制物、变构调节物或有功能替代物)。在一些实施方案中,与GPCR多肽不存在时相比,其存在时导致更大调节RAGE依赖性信号的候选物质对调节借助共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化有选择性。

[0562] 在一些实施方案中,筛选方法进一步包括检测候选物质是否为RAGE多肽或RAGE信号传导途径以及某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))或某种共定位的GPCR的信号传导途径如血管紧张素受体信号传导途径(如AT_1R信号传导途径)或如某种趋化因子受体信号传导途径(如CCR2信号传导途径)的调节物(如激活物、抑制物、变构调节物或有功能替代物)。

[0563] 在一些实施方案中,筛选方法还包括步骤:使用RAGE配体的抑制剂,所述RAGE配体与本身按RAGE配体依赖性方式抑制RAGE活化的RAGE胞外结构域结合。

[0564] 在一些实施方案中,筛选方法还包括使用RAGE多肽,所述RAGE多肽如此突变和/或截短,从而它不能够使RAGE配体与其胞外结构域结合并且本身不能够按RAGE配体依赖性方式活化。

[0565] 在一些实施方案中,RAGE配体与RAGE胞外结构域的结合因使细胞暴露于调节RAGE配体与RAGE结合的调节物而受损。

[0566] 在一些实施方案中,在涉及能够结合RAGE配体的RAGE多肽的筛选之前、之后或与之平行使用RAGE多肽,所述RAGE多肽如此突变和/或截短,从而它不能够结合RAGE配体并且本身不能够按RAGE配体依赖性方式活化。

[0567] 适当地,这样的候选物质或候选物质衍生物特别可用于治疗、预防或管理RAGE相

关病症,所述候选物质调节借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化,并且适当调节某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))和/或某种共定位的GPCR的信号传导途径(如血管紧张素受体信号传导途径(如AT_1R信号传导途径)或如某种趋化因子受体信号传导途径(入CCR2信号传导途径))和/或抑制RAGE配体依赖性RAGE活化和/或抑制组成型活性RAGE和/或RAGE信号传导途径。

[0568] 在本发明筛选方法的某些实施方案中,其中如果候选物质调节RAGE多肽与GPCR多肽接触时检测到的RAGE依赖性信号,该方法还包括在GPCR多肽不存在下,确定候选物质是否调节RAGE依赖性信号和/或调节至何种程度,从而当GPCR多肽存在时导致更大调节RAGE依赖性信号的候选物质对调节借助共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化有选择性。

[0569] 在本发明筛选方法的某些实施方案中,其中如果候选物质调节RAGE多肽与GPCR多肽接触时检测到的RAGE依赖性信号,该方法还包括确定在RAGE多肽不存在下,信号是否生成和/或生成至何种程度,并且如果在RAGE多肽不存在下,信号生成,则确定在RAGE多肽不存在下,候选物质是否调节该信号和/或调节至何种程度,从而相对于因共定位的GPCR活化所致的RAGE非依赖性信号传导,当RAGE多肽存在时导致更大调节该信号的候选物质对调节因共定位的GPCR活化所致的RAGE配体非依赖性RAGE活化有选择性。

[0570] 在某些实施方案中,使用邻近筛选测定法,筛选方法评估RAGE多肽对某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的邻近。在这个类型的示意性实例中,RAGE多肽偶联(例如,缀合或否则连接)于第一报道分子组分,并且某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))是偶联(例如,缀合或否则连接)于第二报道分子组分。第一报道分子组分和第二报道分子组分的邻近生成能够由检测器检测的信号。第一报道分子组分和第二报道分子组分构成互补对,其意义在于,在不明显影响本发明功能的情况下,第一报道分子组分可以与第二报道分子组分互换。第一报道分子组分和第二报道分子组分可以相同或不同。

[0571] 在一个实施方案中,邻近筛选测定法是专利WO2008055313(Dimerix Bioscience Pty Ltd;还见US8283127、US8568997、EP2080012、CA2669088、CN101657715)中描述的那种方法,也称作受体异聚体检查技术或受体-HIT(Jaeger等人,2014)。采用这种方法,RAGE偶联于第一报道分子组分,某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))相对于邻近筛选测定法而言未标记,并且GPCR相互作用性基团连接于互补的第二报道分子组分,当结合对未标记的GPCR或异聚复合体有特异选择性的配体时,所述第二报道分子组分与复合体的相互作用受到调节。GPCR相互作用性基团的优选实例是抑制蛋白(arrestin)、G蛋白和配体。备选地,某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))偶联于第一报道分子组分,RAGE相对于邻近筛选测定法而言未标记,并且,并且RAGE相互作用性基团连接于互补的第二报道分子组分,当结合对未标记的RAGE或异聚复合体有特异选择性的配体时,所述第二报道分子组分与复合体的相互作用受到调节。RAGE相互作用性基团的优选实例是与RAGE胞质尾相互作用的蛋白质,如IQGAP-1、Diaphanous 1、Dock7、MyD88、TIRAP、IRAK4、ERK1/2和PKCζ(Jules等人,2013;Ramasamy等人,2016)。

[0572] 报道分子组分可以包括通过并入酶剪切位点的接头与RAGE、某种共定位的GPCR或相互作用性基团偶联的酶、发光分子或生物发光分子、荧光分子和转录因子或其他分子。简而言之,能够因其空间邻近而发射可检出信号的任何已知的有机或无机、蛋白质性或非蛋白质性分子或其复合体。

[0573] 优选地,在报道分子组分引发剂存在下因第一报道分子组分和第二报道分子组分邻近所生成的信号选自:发光、荧光和比色变化。

[0574] 在一些实施方案中,发光由生物发光蛋白产生,所述生物发光蛋白选自萤光素酶、半乳糖苷酶、内酰胺酶、过氧化物酶或在合适底物存在下能够发光的任何蛋白质。

[0575] 第一报道分子组分和第二报道分子组分的优选组合包括美国专利8,283,127中详述的那些,然而,第一报道分子组分和第二报道分子组分的有用组合无论如何不限于此。

[0576] 在一些实施方案中,筛选方法还包括检测第一报道分子组分和第二报道分子组分彼此的邻近,因而确定候选物质是否调节RAGE多肽和某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))之间的相互作用。通常,这在第一报道分子组分和第二报道分子组分的邻近生成邻近信号时实现,其中通过候选物质调节RAGE多肽和某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))之间的邻近,改变所述邻近信号。

[0577] RAGE和某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))中一者或两者可以处于可溶性形式或表达在细胞表面上。

[0578] 在一些实施方案中,RAGE和某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))位于、部分地位于单一膜中,或位于单一膜上;例如,二者均表达于宿主细胞的表面。

[0579] 在本发明的另一个实施方案中,某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))在细胞膜处与预形成的复合体中的RAGE预组装。

[0580] 在本发明的另一个实施方案中,在通过接合相应配体(如结合AT_1R的Ang II或结合CCR2的MCP-1)活化某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))后,触发了涉及RAGE胞质尾的信号传导。

[0581] 在本发明的一个实施方案中,RAGE胞质尾活化与其结构性构象和/或结合配偶体亲和力的变化相关。

[0582] 在本发明的一个实施方案中,当RAGE胞质尾已经如此突变和/或截短,从而它可以不再被RAGE配体或借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化过程活化时,对RAGE的结构性构象和/或结合配偶体亲和力的监测发生。

[0583] 在本发明的一个实施方案中,监测结构性构象和/或结合配偶体亲和力在抑制RAGE被RAGE配体结合和/或活化或借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的物质存在下发生。

[0584] 在本发明的一个实施方案中,监测结合配偶体召集过程在RAGE被RAGE配体活化或借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化之前发生。

[0585] 在本发明的一个实施方案中,监测信号传导介质和/或结合配偶体召集和活化至RAGE胞质尾,随RAGE被RAGE配体活化或借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化之后发生。

[0586] 在本发明的一个实施方案中,监测在RAGE被RAGE配体活化或借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化之后结合配偶体召集过程,在抑制RAGE被RAGE配体结合和/或活化的物质存在下发生。

[0587] 本发明的其他实施方案包括通过检测对RAGE介导信号传导的调节,就其调节(如,激活、抑制或否则调节)借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化的能力筛选候选物质的方法。这类方法可以包括通过测量以下一者或多者,测量NFκB典型活化的步骤:

[0588] • 通过监测底物(如GST-IκBα)的体外磷酸化,检测IkB激酶(IKK)的活性;

[0589] • 检测IkB降解动力学,包括IκB和/或IκB-α的磷酸化/遍在蛋白化和/或降解;

[0590] • 检测p65(Rel-A)磷酸化/遍在蛋白化,如通过使用抗体、凝胶移位、EMSA和/或质谱法检测;

[0591] • 检测NFκB组分/亚基(如p65/磷酸-p65)的细胞质至胞核穿梭/转运;

[0592] • 检测NFκB亚基二聚化/复合;

[0593] • 通过与含有NFκB反应元件/NFκB共有结合基序的固定化DNA序列/寡核苷酸结合,检测活性NFκB组分/亚基,如通过使用电泳迁移率变动分析或凝胶迁移分析、SELEX、蛋白质-结合微阵列、或基于测序的方法检测;

[0594] • 检测NFκB与特定基因的启动子和增强子的DNA原位结合的染色质-免疫沉淀(ChIp)分析;

[0595] • NFκB激酶活性的体外激酶测定法;

[0596] • 使用这类方法如质粒转染、报道细胞系、微环、逆转录病毒或慢病毒,借助报道分子构建体(如LacZ Fluc、eGFP SEAP、NF-gluc)的转基因表达,使用NFκB报道分子测定法测量NFκB转录活性;

[0597] • 测量NFκB下游靶(如,通过实时PCR测定法、蛋白质测定法或功能测定法测量细胞因子、生长因子、黏附分子和线粒体抗凋亡基因)表达的变化(注:NFκB的多效性质反映于其目前数目逾500个的转录靶中(参见http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/,2017年8月2日访问)和;

[0598] • 测量由NFκB依赖性信号传导诱导的功能或结构变化,如T细胞中的POLKADOTS、内皮细胞中的黏附、白细胞中的活化、或致瘤性。

[0599] 额外地或备选地,这类方法可以包括通过测量以下一者或多者,测量源自NF-κB非典型作用的信号:

[0600] • 检测NIK(NFκB诱导性激酶);

[0601] • 检测IKKα活化/磷酸化;

[0602] • 通过进行激酶测定法,依据自磷酸化或使底物磷酸化的能力检测NIK激酶活性;

[0603] • 产生含有p52的NFκB二聚体,如p52/RelB;

[0604] • 检测磷酸-NFκB2p100(Ser866/870);

[0605] • 检测前体p100部分降解(称作加工)成p52;

[0606] • 检测p52/RelB向胞核的转运;

[0607] • 检测p52/RelB与κB位点的结合;

[0608] • 使用这类方法如质粒转染、报道细胞系、微环、逆转录病毒或慢病毒,借助报道

分子构建体(如LacZ Fluc、eGFP SEAP、NF-gluc)的转基因表达,使用NFκB报道分子测定法测量NFκB转录活性;

[0609] • 通过实时PCR、蛋白质表达或通过功能测定法,测量NFκB非典型信号传导的下游靶(如CXCL12)的表达的变化。

[0610] 在另一个方面,本发明提供鉴定调节物(如激活物、抑制物、变构调节物或有功能替代物)的方法,其中在某种共定位的GPCR被相应配体活化(如AT_1R被AngII活化或CCR2被MCP-1活化)后或如果某种共定位的GPCR有组成型活性,所述调节物调节(即,激活、抑制或否则调节)RAGE配体非依赖性RAGE活化,并且适当地调节某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))和/或调节RAGE多肽或RAGE信号传导途径。在本发明的优选形式中,这种调节物是RAGE或RAGE信号传导途径中某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))中一者或两者的抑制剂。在本发明的一个特别优选形式中,对RAGE信号传导途径的调节区别于对某些经典共定位的GPCR信号传导途径(如AT_1R信号传导途径,如Gq信号传导途径,或CCR2信号传导途径,如Gi信号传导途径)的调节和/或相对于其而言,以显著差异的程度发生。在本发明的一个特别优选形式中,对RAGE信号传导途径的抑制区别于或大于对某些经典共定位的GPCR信号传导途径(如AT_1R信号传导途径,如Gq信号传导途径,或CCR2信号传导途径,如Gi信号传导途径)的抑制。

[0611] 构建体

[0612] 在一个相关方面,本发明提供构建体系统,用于鉴定RAGE和某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))之间邻近的调节物。

[0613] 在一些实施方案中,这些构建体系统包含第一构建体,所述第一构建体包含与第一编码性序列有效连接的调节序列,其中第一编码性序列包含了编码与RAGE多肽对应的多肽的核酸序列和编码邻近信号或能量供体分子的核酸序列;和第二构建体,所述第二构建体包含与第二编码性序列有效连接的调节序列,其中第二编码性序列包含了编码与某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))对应的多肽的核酸序列和编码邻近信号或能量受体分子(energy acceptor molecule)的核酸序列。在具体实施方案中,能量供体分子是生物发光分子或荧光分子并且能量受体分子是荧光受体分子。

[0614] 在其他实施方案中,本发明的构建体系统包含第一构建体,所述第一构建体包含与第一编码性序列有效连接的调节序列,其中第一编码性序列包含了编码与某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))对应的多肽的核酸序列和编码邻近信号或能量供体分子的核酸序列;和第二构建体,所述第二构建体包含与第二编码性序列有效连接的调节序列,其中第二编码性序列包含了编码与RAGE多肽对应的多肽的核酸序列和编码邻近信号或能量受体分子的核酸序列。在具体实施方案中,能量供体分子是生物发光分子或荧光分子并且能量受体分子是荧光受体分子。

[0615] 在其他实施方案中,本发明的构建体系统包含第一构建体,所述第一构建体包含与第一编码性序列有效连接的调节序列,其中第一编码性序列包含了编码与某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))对应的多肽的核酸序列;和第二构建体,所述第二构建体包含与第二编码性序列有效连接的调节序列,其中第二编码性序列包含了编码与RAGE多肽对应的多肽的核酸序列,其中RAGE多肽已经缺失天然序列

的一个或多个胞外结构域。

[0616] 用于调节RAGE配体非依赖性RAGE活化的方法

[0617] 在一个相关方面,本发明提供在动物或动物源的细胞或组织(其可以是或可以不是人类或人源的)中调节借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化的方法。

[0618] 用于特异性调节RAGE配体非依赖性RAGE活化的方法

[0619] 在另一个相关方面,本发明提供在细胞中特异性调节借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化和后续下游信号传导途径的方法。这些方法包括将RAGE如此截短或突变,从而它不能使RAGE配体与其胞外结构域结合,或从而RAGE配体与其胞外结构域的结合因使细胞暴露于调节RAGE配体与RAGE结合的调节物而受损。

[0620] 在本发明的一个优选形式中,对RAGE配体非依赖性信号传导途径的调节区别于对RAGE配体依赖性信号传导途径的调节和/或比这种调节更显著。

[0621] 在本发明的一个特别优选形式中,对RAGE配体非依赖性信号传导途径的抑制区别于对RAGE配体依赖性信号传导途径的抑制和/或比这种抑制更显著。

[0622] 用于调节RAGE配体依赖性RAGE活化和RAGE配体非依赖性RAGE活化二者的方法

[0623] 在另一个相关方面,本发明提供在细胞、组织或动物中除调节借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化之外,抑制借助RAGE配体(包括AGE修饰的蛋白质、脂质或DNA、S100钙粒蛋白蛋白质家族成员、HMGB1、淀粉样蛋白和Mac-1)的RAGE配体依赖性RAGE活化和后续下游信号传导途径的方法。

[0624] 在本发明的一个方面,这些方法包括使用如本文所述的调节物,包括RAGE胞质尾的片段、类似物或衍生物,以在结合性相互作用中接替RAGE胞质尾并且在其中阻止激活RAGE配体依赖性RAGE活化和借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化。在本发明的一个方面,RAGE依赖性信号传导因使细胞暴露于抑制剂而受损,所述抑制剂抑制信号传导元件与RAGE胞质尾的结合,导致抑制RAGE配体介导的RAGE活化和借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化。

[0625] 在本发明的一个方面,这些方法包括使用如本文所述的调节物,包括RAGE跨膜结构域的片段、类似物或衍生物,以接替RAGE跨膜结构域并且在其中阻止激活RAGE配体依赖性RAGE活化和借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化。在本发明的一个方面,调节物包含RAGE跨膜结构域或其部分和RAGE胞外结构域的片段。在本发明的一个方面,调节物包含RAGE跨膜结构域或其部分和RAGE胞质尾的片段。在本发明的一个方面,调节物包含RAGE跨膜结构域或其部分和RAGE胞外结构域的片段和RAGE胞质尾的片段。

[0626] 在本发明的一个方面,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物含有RAGE的配体结合性胞外结构域的片段,所述片段不大于40、不大于20、不大于10或不大于5个氨基酸长度。

[0627] 在一个方面,抑制RAGE配体依赖性RAGE活化与抑制助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化同时发生。

[0628] 在一个方面,这些方法包括如此沉默、截短、修饰或突变RAGE,从而RAGE或其类似物、片段或衍生物是野生型RAGE的胞质尾或其部分的无功能替代物,所述无功能替代物不

能够被RAGE配体依赖性途径或RAGE配体非依赖性途径活化(如S391A-RAGE突变)或不能够促进下游RAGE依赖性信号传导,并且从而抑制借助RAGE胞质尾发生的信号传导和RAGE依赖性信号传导。

[0629] 在一个方面,这些方法包括如此沉默、截短、修饰或突变RAGE,从而RAGE或其类似物、片段或衍生物是野生型RAGE的跨膜结构域或其部分的无功能替代物,所述无功能替代物不能够被RAGE配体依赖性途径或RAGE配体非依赖性途径活化或不能够促进下游RAGE依赖性信号传导,并且从而抑制借助RAGE胞质尾发生的信号传导和RAGE依赖性信号传导。在本发明的一个方面,调节物包含RAGE跨膜结构域或其部分和RAGE胞外结构域的片段。在本发明的一个方面,调节物包含RAGE跨膜结构域或其部分和RAGE胞质尾的片段。在本发明的一个方面,调节物包含RAGE跨膜结构域或其部分和RAGE胞外结构域的片段和RAGE胞质尾的片段。

[0630] 在一个方面,借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物含有RAGE的配体结合性胞外结构域的片段,所述片段不大于40、不大于20、不大于10或不大于5个氨基酸长度。

[0631] 在一个方面,这些方法包括如此沉默、截短、修饰或突变RAGE,从而RAGE或其类似物、片段或衍生物调节涉及RAGE胞质尾介导的信号传导的共同元件(如PKCζ、Diaph1、MyD88、TIRAP、NFκB)。与借助RAGE配体依赖性活化途径或RAGE配体非依赖性活化途径活化RAGE相关。

[0632] 在一个方面,这些方法包括除(如借助调节RAGE配体与RAGE胞外结构域结合的调节物)调节RAGE配体依赖性RAGE活化的调节物之外,还使用这样的调节物,所述调节物调节借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化。

[0633] 用于调节借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化、同时还调节借助某些共定位的GPCR的RAGE非依赖性信号传导的方法。

[0634] 在一个方面,本发明提供一种用于调节受相应配体活化后诱导的RAGE非依赖的某种共定位的GPCR信号传导途径以及调节借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的方法。

[0635] 在一个形式中,本发明提供一种用于调节通过相应配体活化后诱导的RAGE非依赖的某种共定位的GPCR信号传导途径,与此同时调节借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的方法。

[0636] 在一个形式中,受相应配体活化后诱导的RAGE非依赖的某种共定位的GPCR信号传导途径是Gq信号传导途径,如对于受Ang II活化的AT_1R而言如此。在另一种形式中,RAGE非依赖的某共定位的GPCR信号传导途径是Gi信号传导途径,如对于受MCP-1活化的CCR2而言如此。在另一种形式中,RAGE非依赖的某共定位的GPCR信号传导途径是β-抑制蛋白介导的胞外调节的激酶(ERK)信号传导。在另一种形式中,RAGE非依赖的某共定位的GPCR信号传导途径是胞内信号传导中间体(如磷酸肌醇或钙)的变化。

[0637] 附图简述

[0638] 实施例1.

[0639] 图1A.输注Ang II(1μg/kg/分钟)或溶媒对照四周后,雄性apoE KO小鼠和AGER/

apoE双敲除(DKO)小鼠中的定量斑块面积,表示为苏丹IV染色阳性的主动脉弓表面积百分数。

[0640] 图1B.输注Ang II(1μg/kg/分钟)或溶媒对照四周后,来自apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠的主动脉匀浆中,如通过实时RT-PCR所测量,促动脉粥样硬化介质的表达,所述促动脉粥样硬化介质包括AGER本身、黏附分子(ICAM-1、VCAM-1)、炎性细胞因子和趋化因子(TNFα、MCP-1和IL-6)和巨噬细胞标志物(Mac-1/Cd11b)。

[0641] 图1C.输注Ang II(1μg/kg/分钟)或溶媒对照4周后,apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠中氧化应激的标志物,如依据以下者估计:(i)血浆8-羟脱氧鸟苷(8-OH-dG)(氧化性DNA损伤标志物)和(ii)apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠的主动脉中诱导NADPH氧化酶亚基NOX-1和NOX-4的基因表达,如通过主动脉匀浆中实时RT-PCR所估计。

[0642] 图1D.输注Ang II(1μg/kg/分钟)或溶媒4周后,apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠中RAGE配体的表达,包括(i)如通过商业ELISA所测量的S100A8/A9循环型血浆水平,(ii)如通过自有ELISA所测量的血浆AGE水平,(iii)如通过HPLC所测量的循环型AGE-前体(甲基乙二醛)水平。

[0643] 图1E.输注Ang II(1μg/kg/分钟)或溶媒对照4周后,apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠中如通过尾套体积描记法(tail-cuff plethysmography)测量的收缩血压。

[0644] 数据是均值±SEM;每组n＝8,*vs对照apoE KO小鼠,#vs apoE KO+Ang II,p＜0.05。

[0645] 实施例2.

[0646] 图2A.六周0.05%(低)钠膳食或正常饲料后,apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠中的定量斑块面积,表示为苏丹IV染色阳性的主动脉弓表面积百分数。

[0647] 图2B.六周0.05%(低)钠膳食或正常饲料后,apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠的主动脉匀浆中如通过实时RT-PCR所测量,促动脉粥样硬化介质的表达,所述促动脉粥样硬化介质包括AGER本身、黏附分子(ICAM-1、VCAM-1)、炎性细胞因子和趋化因子(TNFα、MCP-1和IL-6)和巨噬细胞标志物(Mac-1/Cd11b)。

[0648] 图2C.六周0.05%(低)钠膳食或正常饲料后,apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠中氧化应激的标志物,如依据以下者估计:(i)血浆8-羟脱氧鸟苷(8-OH-dG)(氧化性DNA损伤标志物)和(ii)apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠的主动脉中诱导NADPH氧化酶亚基NOX-1和NOX-4的基因表达,如通过主动脉匀浆中实时RT-PCR所估计。

[0649] 图2D.暴露于0.05%(低)钠膳食或正常饲料六周的apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠中,如通过ELISA所测量的可溶性MCP-1和ICAM-1的循环水平。

[0650] 图2E.暴露于低钠膳食或正常饲料之前1周后,如通过动态流量测定法所测量,离体黏附apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠的主动脉表面的经标记白细胞的数目。

[0651] 图2F.六周0.05%(低)钠膳食或正常饲料后,apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠中RAGE配体的表达,包括(i)如通过商业ELISA所测量的S100A8/A9循环型血浆水平,(ii)如通过自有ELISA所测量的血浆AGE水平,和(iii)如通过HPLC所测量的循环型AGE-前体(甲基乙二醛)水平。

[0652] 图2G.六周0.05%(低)钠膳食或正常饲料后,apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠中如通过尾套体积描记法测量的收缩血压。

[0653] 图2H.六周0.05％(低)钠膳食或正常饲料后,apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠中如通过放射免疫测定测量的RAAS活化的标志物,包括(i)钠排泄减少,(ii)血浆肾素活性升高和(iii)血浆醛固酮水平升高。

[0654] 数据是均值±SEM;每组n＝8,*vs喂饲正常饲料的apoE KO小鼠,p＜0.05。#vs apoE KO小鼠+低钠。

[0655] 实施例3.

[0656] 图3A.如通过放射免疫测定所测量,具有或没有遗传性Ace2缺乏的apoE KO小鼠和AGER/apoE KO小鼠中的循环型Ang II浓度。

[0657] 图3B.具有或没有遗传性Ace2缺乏的18周龄apoE KO小鼠和AGER/apoE KO小鼠中,如通过尾套体积描记法测量的收缩血压。

[0658] 图3C.具有或没有遗传性Ace2缺乏的18周龄apoE KO小鼠和AGER/apoE KO小鼠中的定量斑块面积,表示为苏丹IV染色阳性的主动脉弓表面积百分数。

[0659] 图3D.存在或不存在Ace2和或RAGE的apoE KO小鼠的主动脉匀浆中如通过实时RT-PCR所测量,促动脉粥样硬化介质的主动脉表达,所述促动脉粥样硬化介质包括AGER本身、黏附分子(ICAM-1、VCAM-1)、炎性细胞因子和趋化因子(TNFα、MCP-1和IL-6)和巨噬细胞标志物(Mac-1/Cd11b)。

[0660] 图3E.18周龄apoE KO小鼠、Ace2/apoE DKO小鼠、AGER/apoE DKO和Ace2/AGER/apoE三KO(TKO)小鼠中的氧化应激,如依据血浆8-羟脱氧鸟苷(8-OH-dG)(氧化性DNA损伤的标志物)估计。

[0661] 图3F.18周龄apoE KO小鼠、Ace2/apoE DKO小鼠、AGER/apoE DKO和Ace2/AGER/apoE TKO小鼠中RAGE配体的表达,包括(i)如通过商业ELISA所测量的S100A8/A9循环型血浆水平,(ii)如通过自有ELISA所测量的血浆AGE水平。

[0662] 数据是均值±SEM;每组n＝8,*vs apoE KO对照;#vs Ace2/apoE DKO小鼠。

[0663] 实施例4.

[0664] 图4A.如通过实时RT-PCR在离体暴露于Ang II或溶媒后的主动脉匀浆中所测量,apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO中促动脉粥样硬化介质的主动脉表达,所述促动脉粥样硬化介质包括AGER本身、黏附分子(ICAM-1、VCAM-1)、炎性细胞因子和趋化因子(TNFα、MCP-1和IL-6)和巨噬细胞标志物(Mac-1/Cd17b)。数据是均值±SEM;每组n＝6,*vs未处理的apoE KO对照;#vs apoE KO+Ang II;p＜0.05

[0665] 图4B.如通过动态流量测定法所测量,作为四小时离体暴露于Ang II(1μM)或溶媒对照后内皮活化的标志物,黏附apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO的主动脉表面的经标记白细胞的数目。数据是均值±SEM;每组n＝6,*vs未处理的apoE Ko对照;#AGER/apoE DKO+Ang II vs apoE KO+Ang II;p＜0.05

[0666] 图4C.在Ang II(1μM持续2小时)预处理存在或不存在时,与来自C57b16或AGER KO小鼠的鼠主动脉原代内皮细胞(PMAEC)单层黏附的标记的THP-1单核细胞的数目。

[0667] 图4D.暴露于Ang II(1μM)或溶媒对照后,来自C57b16的鼠主动脉原代内皮细胞(PMAEC)和来自AGER KO小鼠的PMAEC中如通过实时RT-PCR所测量,促动脉粥样硬化介质的表达,所述促动脉粥样硬化介质包括AGER本身、关键黏附分子(ICAM-1、VCAM-1)、炎性细胞因子和趋化因子(TNFα和MCP-1)。

[0668] 图4E.暴露于Ang II或溶媒对照后,来自c57b16小鼠和AGER KO小鼠的PMAEC中氧化应激的标志物,如依据以下估计:(i)流动室测定法中诱导DCFH荧光,和(ii)GTP活化型NADPH氧化酶亚基(Rac-1)水平和(iii)氧化型谷胱甘肽水平。

[0669] 图4F.暴露于Ang II.PMAEC后,来自C57b16和AGER KO小鼠的鼠主动脉原代内皮细胞(PMAEC)单层中如通过实时RT-PCR所测量,VCAM-1和借助NFκB的非典型信号传导和典型信号传导标志物(分别是CXCL12和CXCL2)的基因表达。显示TNFa作为典型特异性对照。显示VCAM-1作为靶特异性对照,重复图4D中的数据。

[0670] 图4G.经RAGE配体S100A8/A9(5ng/mL)处理的来自C57b16小鼠和AGER KO小鼠的鼠主动脉原代内皮细胞(PMAEC)中如通过实时RT-PCR所测量,促动脉粥样硬化介质的表达,所述促动脉粥样硬化介质包括黏附分子(ICAM-1、VCAM-1)和炎性细胞因子及趋化因子(TNFα和MCP-1)。数据是均值±SEM;每组n=6,符号指*vs未处理的野生型PMAEC;#vs S100A8/A9处理的野生型PMAEC,p<0.05。

[0671] 图4H.如通过实时RT-PCR估计,PMAEC单层中关键黏附蛋白VCAM-1的基因表达,其中RAGE或NFκB亚基p65的表达已经使用siRNA选择性沉默或未改变(乱序RNA对照),并且随后暴露于Ang II(1μM)或RAGE配体S100A8/A9(5ng/mL)。

[0672] 图4I.来自c57b16小鼠和AGER KO小鼠的PMAEC单层中,Ang II(1μM)活化AT1R后所诱导的Gq介导的信号传导的标志物,所述标志物包括(i)如通过IP-1估计的诱导磷酸肌醇合成和(ii)早期生长应答基因(EGR1)的下游诱导。

[0673] 数据是均值±SEM;每组n=6,除非另外声明,否则*vs未处理的野生型对照PMAEC并且#vs Ang II处理的野生型对照,p<0.05。

[0674] 实施例5.

[0675] 图5A.在人AT_1R表达存在或不存在下、具有或没有全长人RAGE额外表达时,CHO细胞中如通过IP-1水平估计的响应于Ang II(1μM)诱导磷酸肌醇合成,其为针对外源Ang II的经典应答性的标志物。

[0676] 图5B.在人AT_1R表达存在或不存在下、具有或没有全长人RAGE额外表达时,CHO细胞中如通过下游诱导EGR1基因所估计的响应于Ang II(1μM)的诱导EGR1表达,其是针对外源Ang II的应答性的标志物。

[0677] 图5C.作为CHO细胞中RAGE信号传导的完整性的对照,暴露于Ang II(1μM)后的NFκB活化,其通过以下方式测量:(i)化学发光SEAP报道基因测定法和(ii)具有或没有全长人RAGE的额外表达时,CHO细胞中人AT_1R表达存在或不存在下,NFκB亚基p65的基因表达诱导,和(iii)暴露于RAGE配体S100A8/A9(5ng/mL)后。

[0678] 图5D.AT_1R-CHO细胞中暴露于Ang II(1μM)后的NFκB活化,如全长人RAGE和N-截短型mCherry-RAGE构建体的表达存在或不存在时,通过NFκB亚基p65的基因表达诱导和NFκB活性的化学发光SEAP报道基因测定法所测量。数据是均值±SEM,每组n=6,*vs.载体(neo)转染的AT_1R-CHO,p<0.05。

[0679] 图5E.AT_1R-CHO中暴露于Ang II(1μM)后的NFκB活化,如全长人RAGE和C-截短型mCherry-RAGE构建体的表达存在或不存在时,通过NFκB亚基p65的基因表达诱导和NFκB活性的化学发光SEAP报道基因测定法所估计。数据是均值±SEM,每组n=6,*vs.载体(neo)转染的AT_1R-CHO,p<0.05。

[0680] 图5F.AT_1R-CHO中暴露于S100A8/A9(5ng/mL)或Ang II(1μM)后的NFκB活化,如全长人RAGE和N-截短型mCherry-RAGE构建体的表达存在或不存在时,通过NFκB亚基p65的基因表达诱导所估计。数据是均值±SEM,每组n=6,*vs.载体(neo)转染的AT_1R-CHO,p<0.05。

[0681] 图5G.AT_1R-CHO中暴露于S100A8/A9(5ng/mL)或Ang II(1μM)后NFκB活化,如全长人RAGE和C-截短型mCherry-RAGE构建体的表达存在或不存在时,通过NFκB亚基p65的基因表达诱导所估计。数据是均值±SEM,每组n=6,*vs.载体(neo)转染的AT_1R-CHO,p<0.05。

[0682] 图5H.AT_1R-CHO中暴露于Ang II(1μM)后的NFκB活化,如不融合于mCherry的N-截短型RAGE构建体的表达存在时,通过NFκB亚基p65的基因表达诱导所估计。

[0683] 数据是均值±SEM,每组n=6,除非另外声明,否则*vs未处理的AT_1R-CHO,p<0.05。

[0684] 实施例6.

[0685] 图6A.靶向RAGE胞外结构域的RAGE中和抗体(RAGEab)或具有配体结合亲和力的诱饵受体(可溶性$RAGE_{22-331}$)抑制了RAGE-AT_1R-CHO细胞中RAGE配体S100A8/A9对促炎信号传导的诱导,但不抑制Ang II(1μM)对促炎信号传导的诱导,如依据如RT-PCR所测量的NFκB亚基p65表达所估计。数据显示为均值±SEM;每组n=6。*vs仅溶媒,p<0.05。

[0686] 图6B.靶向RAGE胞外结构域的RAGE中和抗体(RAGEab)或具有配体结合亲和力的诱饵受体(可溶性$RAGE_{22-331}$;sRAGE)不抑制来自野生型小鼠的PMAEC中Ang II(1μM)对促炎信号传导的诱导,如依据诱导关键黏附基因(ICAM-1和VCAM-1)和炎性趋化因子基因(MCP-1)所估计。来自AGER KO小鼠的数据作为阴性对照显示。数据显示为均值±SEM;每组n=6,*vs仅用溶媒处理的对照细胞(白色柱),#vs仅用Ang II处理的对照细胞,p<0.05。

[0687] 图6C.靶向RAGE胞外结构域的RAGE中和抗体(RAGEab)或具有配体结合亲和力的诱饵受体(可溶性$RAGE_{22-331}$)抑制来自野生型小鼠的PMAEC中RAGE配体S100A8/A9对促炎信号传导的诱导,如依据诱导关键黏附基因(ICAM-1)所估计。数据显示为均值±SEM;每组n=6,*vs仅用溶媒处理的对照细胞(白色柱),#vs仅用S100A8/A9处理的对照细胞,p<0.05。

[0688] 实施例7.

[0689] 图7A.还表达全长野生型$RAGE_{22-404}$或所选择的S391-$RAGE_{22-404}$突变体的AT_1R-CHO细胞中RAGE配体S100A8/A9(5ng/ml;灰色柱)或Ang II(1gM;黑色柱)诱导促炎信号传导,如通过NFκB亚基p65的基因表达诱导所测量。数据显示为均值±SEM;每组n=6-8。*vs溶媒处理的表达全长RAGE的AT_1R-CHO细胞,p<0.05。

[0690] 图7B.AT_1R-CHO细胞中RAGE配体S100A8/A9(5ng/ml)或Ang II(1μM)诱导促炎信号传导,所述细胞还表达非S391胞质尾的缺少可磷酸化基序的嵌合RAGE(嵌合RAGE;cRAGE)和胞质尾中完全缺少任何可磷酸化基序的S391 cRAGE突变体,如AT_1R-CHO细胞中通过NFκB亚基p65的基因表达诱导所测量。数据显示为均值±SEM;每组n=6-8。*vs溶媒处理的表达全长嵌合RAGE的AT_1R-CHO细胞;p<0.05。

[0691] 图7C.还表达全长或N-截短型S391A-RAGE突变体的AT_1R-CHO细胞中Ang II(1μM)诱导促炎信号传导,如通过NFκB亚基p65的基因表达诱导所测量。数据显示为均值±SEM;每组n=6-8。*vs载体转染的AT_1R-CHO细胞,p<0.05。

[0692] 图7D.在野生型mCherry-$RAGE_{362-404}$存在下,还表达S391-$RAGE_{362-404}$突变体的AT_1R-

CHO细胞中Ang II(1μM)诱导促炎信号传导,如通过NFκB亚基p65的基因表达诱导所测量。数据显示为均值±SEM;每组n=6-8。*vs溶媒对照;p<0.05。

[0693] 实施例8.

[0694] 图8A.来自C57b16小鼠的PMAEC单层中使用siRNA或乱序对照选择性抑制MyD88表达对诱导借助RAGE配体S100A8/A9(5ng/ml)的RAGE配体依赖性促炎信号传导诱导过程的影响,如依据实时RT-PCR测量的ICAM-1表达所估计。作为阳性对照,显示使用siRNA选择性抑制p65表达(RAGE信号传导的另一个下游介质)。

[0695] 图8B.来自C57b16小鼠的PMAEC单层中使用siRNA或乱序对照选择性抑制MyD88表达对Ang II(1μM)诱导RAGE配体非依赖性诱导促炎信号传导的影响,如依据实时RT-PCR测量的ICAM-1表达所估计。

[0696] 图8C.在$RAGE_{362-404}$存在和不存在下,HMEC单层中使用siRNA或乱序对照选择性抑制MyD88表达对Ang II(1μM)诱导RAGE配体非依赖性诱导促炎信号传导的影响,如依据实时RT-PCR测量的MCP-1表达所估计。

[0697] 数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs乱序对照,p<0.05。

[0698] 实施例9.

[0699] 图9A.来自C57b16小鼠的PMAEC单层中使用PKCζ的假底物(iPKCz)或靶向PKCζ表达的siRNA(siPKCz)或靶向RAGE表达的siRNA(siRAGE)或乱序对照选择性抑制PKCζ对RAGE配体S100A8/A9诱导RAGE配体依赖性信号传导的影响,如依据实时RT-PCR测量的ICAM-1表达所估计。

[0700] 图9B.来自C57b16小鼠的PMAEC单层中使用PKCζ的假底物(iPKCζ)或靶向PKCζ的siRNA(siPKCζ)选择性抑制PKCζ表达对借助Ang II(1μM)的RAGE配体非依赖性诱导促炎信号传导的影响,如依据实时RT-PCR测量的ICAM-1基因表达所估计。列1和列2含有乱序siRNA对照。

[0701] 图9C.CHO细胞中使用PKCζ的假底物(PKCζi)选择性抑制PKCζ表达对借助Ang II(1μM)的RAGE配体非依赖性p65和PCNA诱导的影响,所述细胞表达非S391胞质尾的缺少可磷酸化基序的嵌合RAGE(cRAGE)以及还含有S391Q-RAGE突变(S319Q-cRAGE),因而移除胞质尾中全部磷酸化位点的cRAGE,如依据实时RT-PCR测量的RelA/p65和PCNA基因表达所估计。

[0702] 图9D.在$RAGE_{362-404}$存在和不存在下,HMEC单层中使用siRNA或乱序对照选择性抑制PKCζ表达对Ang II(1μM)诱导RAGE配体非依赖性诱导促炎信号传导的影响,如依据实时RT-PCR测量的MCP-1表达所估计。

[0703] 数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs未处理的对照,p<0.05。

[0704] 实施例10.

[0705] 图10A.来自C57b16小鼠的PMAEC单层中使用siRNA选择性抑制Diaph1表达对RAGE配体S100A8/A9诱导RAGE配体依赖性信号传导的影响,如依据实时RT-PCR测量的ICAM-1表达所估计。纳入采用siRAGE的数据作为对照。

[0706] 图10B.AT_1R-CHO细胞中R366A-Q367A-RAGE突变对RAGE配体S100A8/A9诱导的信号传导和Ang II诱导的RAGE配体非依赖性信号传导的差异性影响,所述突变选择性破坏Diaph1和RAGE借以推定性相互作用的带电荷簇。

[0707] 图10C.来自C57b16小鼠的PMAEC单层中使用siRNA选择性抑制Diaph1表达对Ang

II(1μM)诱导的RAGE配体依赖性信号传导的影响,如依据如实时RT-PCR测量的ICAM-1和VCAM-1表达所估计。数据是均值±SEM;每组n=6,*vs乱序对照,p<0.05。

[0708] 图10D.在SVEC单层中对比乱序对照,使用siRNA选择性抑制Diaph1或AGER表达对暴露于Ang II后诱导白细胞黏附于内皮细胞单层的影响。数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs乱序对照,p<0.05。

[0709] 图10E.AT_1R-CHO细胞中用R366A-Q367A-RAGE突变体转染对Ang II诱导的信号传导的影响,如通过NFκB亚基p65的基因表达诱导所测量,在所述突变体中破坏或缺失Diaph1和RAGE借以推定性相互作用的带电荷簇。数据是均值±SEM;每组n=6,*vs mCherry对照,p<0.05。

[0710] 图10F.在$RAGE_{362-404}$存在和不存在下,HMEC单层中使用siRNA或乱序对照选择性抑制Diaph1表达对Ang II(1μM)诱导RAGE配体非依赖性诱导促炎信号传导的影响,如依据实时RT-PCR测量的MCP-1表达所估计。数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs乱序siRNA处理的溶媒对照,p<0.05。

[0711] 图10G.抑制肽S391A-$RAGE_{362-404}$预处理的AT_1R-CHO细胞中用全长RAGE、截短的RAGE或RAGE突变体转染对Ang II诱导的信号传导的影响,如通过NFκB亚基p65的基因表达诱导所测量。数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs mCherry对照,p<0.05

[0712] 除非另外声明,否则数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs溶媒对照,p<0.05。

[0713] 实施例11.

[0714] 图11A.来自C57b16小鼠的PMAEC单层中,对比乱序对照,使用靶向IQGAP-1的siRNA选择性抑制IQGAP-1表达对Ang II(1μM)诱导RAGE配体非依赖性诱导促炎信号传导的影响,如依据实时RT-PCR测量的ICAM-1表达所估计。

[0715] 图11B.来自C57b16小鼠的PMAEC单层中,对比乱序对照,使用siRNA对择性抑制IQGAP-1表达对RAGE配体S100A8/A9诱导RAGE配体依赖性促炎信号传导的影响,如依据实时RT-PCR测量的ICAM-1和VCAM-1表达所估计。

[0716] 图11C.使用突变体RAGE胞质尾(S391A-$RAGE_{362-404}$)包被的柱,以及IQGAP-1相关蛋白(埃兹蛋白/根蛋白/膜突蛋白)和GPCR嗅觉受体2T2,下拉从其他胞质组分中鉴定为IQGAP-1的蛋白质。

[0717] 图11D.在$RAGE_{362-404}$存在和不存在下,HMEC单层中使用siRNA或乱序对照选择性抑制IQGAP-1表达对Ang II(1μM)诱导RAGE配体非依赖性诱导促炎信号传导的影响,如依据实时RT-PCR测量的MCP-1表达所估计。

[0718] 数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs乱序对照,p<0.05,#vs乱序对照+配体(根据需要为Ang II或s100A8/A9),p<0.05。

[0719] 实施例12.

[0720] 图12A.与仅载体(pc-Neo)作为对照相比,用RAGE或RAGE突变体转染鼠SVEC对Ang II诱导ICAM-1的影响,如通过RT-PCR所测量。数据是均值±SEM;每组n=6-8.*vs未处理的对照,#vs neo+Ang II,p<0.05。

[0721] 图12B.用截短的RAGE突变体转染对鼠SVEC中Ang II诱导ICAM-1的影响以鉴定具有抑制活性的最小片段。数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs无处理对照,p<0.05。

[0722] 图12C.RAGE-AT_1R-CHO中暴露于Ang II(1μM)后对NFκB活化的抑制,如不融合于

mCherry的突变和N-截短型RAGE构建体的表达存在时,通过NFκB亚基p65的基因表达诱导所估计。数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs无处理对照,p<0.05。

[0723] 图12D.用$RAGE_{370-390}$的单一位点特异性丙氨酸或赖氨酸突变体转染对鼠SVEC中Ang II诱导ICAM-1的影响。数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs无处理对照,p<0.05。

[0724] 图12E.在$RAGE_{379-390}$和链霉菌属(Streptomyces)抗炎蛋白和来自其他微生物的蛋白质之间的序列同源性。

[0725] 实施例13.

[0726] 图13A.与单独的TAT-Cherry(8μg)相比时,AT_1R-CHO细胞中无或有S391A-RAGE突变的TAT-mCherry-$RAGE_{362-404}$(0.4ng/ml)对Ang II(1μM;黑色柱)诱导NFκB亚基p65的基因表达的影响。数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs无处理对照,p<0.05。

[0727] 图13B.野生型$RAGE_{362-404}$肽预处理并未逆转AT_1R-CHO细胞中由S391A-$RAGE_{362-404}$肽借助Ang II依赖性NFκB亚基p65的基因表达诱导所实现的信号传导抑制。数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs无处理对照;p<0.05。

[0728] 图13C.观察到AT_1R-CHO细胞中由S391A-$RAGE_{362-404}$肽借助Ang II依赖性NFκB亚基p65的基因表达诱导所实现的信号传导抑制,无论后续是否用千倍过量的野生型$RAGE_{362-404}$肽处理。数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs无处理对照,p<0.05。

[0729] 图13D.经无可用磷酸化靶的全长S391Q-cRAGE转染的AT_1R-CHO细胞中,S391A-$RAGE_{362-404}$肽对响应于Ang II诱导p65和PCNA基因表达的抑制性影响。数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs Ang II,#vs全长野生型RAGE;p<0.05。

[0730] 图13E.野生型$RAGE_{362-404}$肽(0.4ng/ml)对RAGE缺乏的PMAEC中响应于Ang II诱导促炎性基因表达的影响。数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs无处理对照,p<0.05。

[0731] 图13F.S391A-$RAGE_{362-404}$肽对PMAEC中响应于Ang II诱导促炎性VCAM-1、CXCL2和CXCL12基因表达的影响,使用针对TNFα的应答作为对照。数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs经溶媒和对照(TAT)处理,#vs经Ang II和对照(TAT)处理;p<0.05。

[0732] 图13G.S391A-$RAGE_{362-404}$肽和AT_1R阻滞剂厄贝沙坦对HAEC中响应于Ang II诱导促炎性基因表达的影响。

[0733] 图13H.(i)S391A-$RAGE_{362-404}$肽对还表达全长RAGE的AT_1R-CHO细胞中响应于RAGE配体S100A8/A9诱导促炎性基因表达(p65)的抑制性影响,同时显示表达无活性全长S391A-RAGE突变体的AT_1R-CHO细胞作为对照。(ii)S391A-$RAGE_{362-404}$肽对内源性富有RAGE的PMAEC中响应于Ang II或RAGE配体S100A8/A9诱导促炎性基因表达(VCAM-1)的抑制性影响。

[0734] 除非另外声明,否则数据是均值±SEM;每组n=6-8,*vs溶媒对照,p<0.05;#vs对照+Ang II,p<0.05。

[0735] 实施例14.

[0736] 图14A.来自apoE KO小鼠的完整主动脉离体(ex vivo)暴露于Ang II(1μμM)后,S391A-$RAGE_{362-404}$对Ang II-依赖性诱导促炎性标志物的影响。数据是均值±SEM;每组n=6,*vs apoE KO+溶媒+TAT-mCherry对照,p<0.05;#vs apoE KO+TAT-mCherry对照+Ang II,p<0.05。

[0737] 图14B.来自AGER/apoE KO小鼠的完整主动脉离体暴露于Ang II(1μM)后,野生型$RAGE_{362-404}$对Ang II-依赖性诱导促炎性标志物的影响。数据是均值±SEM;每组n=8,*vs

apoE KO+溶媒+TAT-mCherry对照,p＜0.05。

[0738] 实施例15.

[0739] 图15A.apoE KO小鼠和Ace2/AGER/apoE三KO小鼠中,标有mCherry荧光蛋白和HIV-TAT基序以促进细胞穿透的包含RAGE C末端42个氨基酸的TAT-mCherry-$RAGE_{362-404}$对Ang II-依赖性诱导主动脉粥样硬化的促动脉粥样硬化影响。这与TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$对Ace2/apoE DKO小鼠中Ang II-依赖性诱导主动脉粥样硬化的抗动脉粥样硬化影响比较。数据是均值±SEM;每组n＝8;*vs apoE KO对照;#vs Ace2/apoE DKO对照;p＜0.05。

[0740] 图15B.糖尿病性apoE KO小鼠和糖尿病性AGER/apoE DKO小鼠中,标有mCherry荧光蛋白和HIV-TAT基序以促进细胞穿透的包含RAGE C末端42个氨基酸的TAT-mCherry-$RAGE_{362-404}$肽对Ang II-依赖性诱导主动脉粥样硬化的促动脉粥样硬化影响。这与TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$对糖尿病性apoE KO小鼠中Ang II-依赖性诱导主动脉粥样硬化的抗动脉粥样硬化影响比较。数据是均值±SEM;每组n＝8;*vs apoE KO对照,#vs糖尿病性apoEDKO对照;p＜0.05。

[0741] 图15C.如所示,TAT-mCherry-$RAGE_{362-404}$和TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$对具有或没有AGER表达的小鼠和糖尿病性apoE KO小鼠中的收缩血压缺少影响。

[0742] 实施例16.

[0743] 图16A.在具有或没有可溶性$RAGE_{22-331}$(sRAGE)的情况下,添加Ang II或溶媒后60分钟生成的AT_1/Rluc8和RAGE/Venu的BRET饱和曲线。数据合并自3个独立实验。

[0744] 图16B.Ang II诱导的招募β抑制蛋白2/Venus至AT_1/Rluc8和CCL22诱导的招募β抑制蛋白2/Venus至CCR4/Rluc8作为对照。

[0745] 图16C.在AT_1受体存在下暴露于Ang II后,Ang II诱导的招募β-抑制蛋白2/Venu接近于RAGE/Rluc8,及CCR4存在下暴露于CCL22后,无前述招募。

[0746] 图16D.在未加标签的CCR4存在下共表达Gαi/Nluc和Gγ2/Venu时,观察到CCL22诱导的BRET信号。

[0747] 实施例17.

[0748] 图17A.在AT_1受体存在下,Ang II诱导的招募β-抑制蛋白2/Venu(β-arr2/Venus)接近于RAGE/Rluc8,但在AT_1受体不存在下,无前述招募。纳入Ang II诱导的招募β抑制蛋白2/Venus至AT_1/Rluc8作为对照。

[0749] 图17B.在TRH受体1(TRHR1)存在下,促甲状腺素释放激素(TRH)诱导的微弱招募β-抑制蛋白2/Venu(β-arr2/Venus)接近于RAGE/Rluc8,但在TRH受体1(TRHR1)不存在下,无前述招募。纳入TRH诱导的招募β抑制蛋白2/Venus至TRHR1/Rluc8作为对照。小图显示用y-轴刻度扩展的相同数据。

[0750] 图17C.在食欲肽受体1(OxR1)存在下,食欲肽A(OxA)诱导的招募β-抑制蛋白2/Vonu(β-arr2/Venus)接近于RAGE/Rluc8,但在食欲肽受体1(OxR1)不存在下,无前述招募。纳入OxA诱导的招募β抑制蛋白2/Venus至OxR1/Rluc8作为对照。

[0751] 图17D.在BDK受体2(BDKR)存在下,缓激肽(BDK)诱导的微弱招募β-抑制蛋白2/Venu(β-art2/Venus)接近于RAGE/Rluc8,但在BDK受体2(BDKR)不存在下,无前述招募。纳入BDK诱导的招募β抑制蛋白2/Venus至BDKR/Rluc8作为对照。小图显示用y-轴刻度扩展的相

同数据。

[0752] 图17E.在加压素受体2(V2R)存在下,精氨酸加压素(AVP)诱导的招募β-抑制蛋白2/Venu(β-arr2/Venus)接近于RAGE/Rluc8,但在加压素受体2(V2R)不存在下,无前述招募。纳入AVP诱导的招募β抑制蛋白2/Venus至V2R/Rluc8作为对照。

[0753] 图17F.在CCR2存在下,CCL2(MCP1)诱导的招募β-抑制蛋白2/Venu(β-arr2/Venus)接近于RAGE/Rluc8,但在CCR2不存在下,无前述招募。纳入MCP1诱导的招募β抑制蛋白2/Venus至CCR2/Rluc8作为对照。

[0754] 图17G.暴露于MIP1β后,尤其与CCR5不存在下的对照相比,在CCR5存在下,CCL4(MIP1β)诱导特别微弱地招募β-抑制蛋白2/Venu(β-arr2/Venus)接近于RAGE/Rluc8,。纳入MIP1β诱导的招募β抑制蛋白2/Venus至CCR5/Rluc8作为又一对照。小图显示用y-轴刻度扩展的相同数据。

[0755] 全部数据是3个独立实验的均值±SEM。

[0756] 实施例18.

[0757] 图18A.在CCR1存在下,CCL3诱导的招募β-arr2/Venus接近于RAGE/Rluc8。

[0758] 图18B.在CCR2存在下,CCL2诱导的招募β-arr2/Venus接近于RAGE/Rluc8。

[0759] 图18C.在CCR4存在下,缺少CCL22诱导的招募β-arr2/Venus接近于RAGE/Rluc8。

[0760] 图18D.在CCR5存在下,缺少CCL4诱导的招募β-arr2/Venus接近于RAGE/Rluc8。

[0761] 图18E.在CCR6存在下,CCL20诱导的招募β-arr2/Venus接近于RAGE/Rluc8。

[0762] 图18F.在CCR7存在下,CCL19诱导的招募β-arr2/Venus接近于RAGE/Rluc8。

[0763] 图18G.在CCR10存在下,缺少CCL27诱导的招募β-arr2/Venus接近于RAGE/Rluc8。

[0764] 图18H.在CXCR1存在下,CXCL8诱导的微弱招募β-arr2/Venus接近于RAGE/Rluc8。

[0765] 图18I.在CXCR2存在下,CXCL8诱导的招募β-arr2/Venus接近于RAGE/Rluc8。

[0766] 图18J.在CXCR3存在下,缺少CXCL11诱导的招募β-arr2/Venus接近于RAGE/Rluc8。

[0767] 图18K.在CXCR4存在下,CXCL12诱导的β-arr2/Venus接近于RAGE/Rluc8减少。

[0768] 图18L.在CXCR6存在下,CXCL16诱导的招募β-arr2/Venus接近于RAGE/Rluc8。

[0769] 全部数据是3个独立实验的均值±SEM。

[0770] 实施例19.

[0771] 图19A-OO.在时间零于所示浓度的所示配体活化的所示未加BRET标签的GPCR存在下,加Rluc8标签的RAGE接近于加Venus标签的所示亚细胞区室标志物。

[0772] 实施例20.

[0773] 图20A.在RAGE共表达存在或不存在下,表达CCR2的CHO细胞中CCL2(MCP-1)对NFκB的活化,如通过NFκB亚基p65的基因表达诱导所测量。

[0774] 图20B.在RAGE共表达存在或不存在下,表达CXCR2的CHO细胞中CXCL2(IL-8)对NFκB的活化,如通过NFκB亚基p65的基因表达诱导所测量。

[0775] 图20C.在RAGE活化的肽抑制剂S391A-$RAGE_{362-404}$存在或不存在下,骨髓衍生的原代巨噬细胞中CCL2(MCP-1)对NFκB的活化,如通过NFκB亚基p65的基因表达诱导所测量。

[0776] 图20D.在RAGE活化的肽抑制剂S391A-$RAGE_{362-404}$存在或不存在下,HMEC中CCL2(MCP-1)对NFκB的活化,如通过MCP-1基因表达的自诱导所测量。

[0777] 图20E.在RAGE活化的肽抑制剂S391A-$RAGE_{362-404}$存在或不存在下,表达CXCR2的

HMEC中IL-8对NFκB的活化,如通过MCP-1基因表达的诱导所测量。

[0778] 实施例21

[0779] 图21A.mCherry/RAGE$_{338-361}$和Nluc/AT1之间的BRET随Ang II增加。数据展示为均值±SEM;n=3-5。

[0780] 图21B.如所示添加溶媒或Ang II后60分钟生成的AT$_1$/Rluc8和RAGE/Venu的BRET饱和曲线,其中将细胞也用200ng或400ng mCherry/RAGE$_{338-361}$cDNA转染。数据合并自3个独立实验。

[0781] 图21C.Ang II诱导对AT$_1$/Rluc8和RAGE/Venu之间BRET信号的调节,其中如所示,将细胞也用0、50、100、200、300或400ng mCherry/RAGE$_{338-361}$cDNA或pcDNA3对照质粒转染。数据展示为均值±SEM;n=3-4。滤光片:Venus 550nm/Rluc8450nm。

[0782] 图21D.缺乏AT$_1$/Rluc8和mCherry/RAGE$_{338-361}$之间Ang II诱导的BRET信号,其中如所示,将细胞用50ng AT$_1$/Rluc8cDNA、300ng RAGE/Venus cDNA和0、50、100、200、300或400ng mCherry/RAGE$_{338-361}$cDNA或pcDNA3对照质粒转染。数据展示为均值±SEM;n=3-4。滤光片:mCherry 650nm/Rluc8450nm。

[0783] 图21E.图21C和图21D所示的实验中来自AT$_1$/Rluc8的发光、来自RAGE/Venu的荧光和来自mCherry/RAGE$_{338-361}$的荧光。数据展示为均值±SEM;n=3-4。

[0784] 图21F.配体诱导对GPCR/Rluc8和RAGE/Venu之间BRET信号的调节,其中如所示,将细胞也用mCherry/RAGE$_{338-361}$cDNA或pcDNA3对照质粒转染。数据展示为均值±SEM;n=2-4。滤光片:Venus 550nm/Rluc8450nm。转染的cDNA的量:50ng GPCR/Rluc8+300ng RAGE/Venus+400ng mCherry/RAGE$_{338-361}$或pcDNA3。在时间零由所示浓度的所示配体活化的所示加Rluc8标签的GPCR。

[0785] 图21G.HMEC1中被mCherry/RAGE$_{338-361}$抑制的AngII介导的促炎信号传导(ICAM-1表达)由mCherry/RAGE$_{362-404}$拯救。数据展示为均值±SEM;n=6-8。

[0786] 图21H.HMEC细胞中Ang II对促炎信号传导的诱导受融合或不融合监测表达的N端mCherry的RAGE跨膜结构域RAGE$_{343-361}$过量表达的抑制,如通过使用实时RT-PCR测量的ICAM1表达代表。数据展示为均值±SEM;n=6-8。

[0787] 图21I.RAGE-CHO细胞中RAGE配体S100A8/A9对促炎信号传导的诱导受仅RAGE跨膜结构域RAGE$_{343-361}$或受RAGE$_{370-390}$过量表达抑制,如通过使用实时RT-PCR测量的p65表达代表。数据展示为均值±SEM;n=6-8。

[0788] 图21J.HMEC细胞中Ang II对促炎信号传导的诱导受靶向Diaph1或PKCz的siRNA抑制,如通过借助实时RT-PCR测量的ICAM-1表达代表。RAGE$_{362-404}$拯救这种抑制,但RAGE$_{343-404}$不拯救。数据展示为均值±SEM;n=6-8。

[0789] 序列简述

[0790]

序列ID编号	序列	长度
SEQ ID NO:1	RAGE$_{362-404}$的多肽序列	43aa
SEQ ID NO:2	S391A-RAGE$_{362-404}$的多肽序列	43aa
SEQ ID NO:3	RAGE$_{338-361}$的多肽序列	24aa
SEQ ID NO:4	HIV TAT细胞穿透基序(YGRKKRRQRRR)	11aa
SEQ ID NO:5	RAGE$_{370-390}$的多肽序列	21aa

SEQ ID NO:6	$RAGE_{379-390}$的多肽序列	12aa
SEQ ID NO:7	S391A-$RAGE_{362-391}$的多肽序列	30aa
SEQ ID NO:8	$RAGE_{362-390}$的多肽序列	29aa
SEQ ID NO:9	Q390R $RAGE_{379-390}$的多肽序列	12aa
SEQ ID NO:10	Q390K $RAGE_{379-390}$的多肽序列	12aa
SEQ ID NO:11	Q379K $RAGE_{379-390}$的多肽序列	12aa
SEQ ID NO:12	Q379K Q390K $RAGE_{379-390}$的多肽序列	12aa
SEQ ID NO:13	Q379K Q390R $RAGE_{379-390}$的多肽序列	12aa
SEQ ID NO:14	野生型人RAGE的全长多肽序列。	404aa
SEQ ID NO:15	人AGER基因的全长多核苷酸序列。	1704nts
SEQ ID NO:16至58	野生型人G蛋白偶联受体的全长多肽序列。	多种
SEQ ID NO:59	野生型海肾(Renilla reniformi)萤光素酶多肽序列。	311aa
SEQ ID NO:60	Cys124Ala/Met185Val变体海肾萤光素酶多肽序列。	311aa
SEQ ID NO:61	变体海肾萤光素酶多肽序列(RLuc8)。	311aa

[0791] 发明详述

[0792] 1.定义

[0793] 除非另外规定,本文中所用的全部术语及科学术语具有与本发明所属领域的那些技术人员通常理解的相同意思。尽管与本文所述的那些方法和材料相似或等效的任意方法和材料可以用于实施或测试本发明,然而描述了优选的方法和材料。出于本发明目的,下文定义以下术语。

[0794] “受体异聚体”定义为“由至少两个(有功能)受体单位组成的生物化学特性显然异于其各自组分的大分子复合体”(Ferre等人,2009)。

[0795] 冠词“一个(a)”和“一种(an)”在本文中用来指该冠词的一个或多于一个(即至少一个)的语法对象。例如,“一个要素”意指一个要素或多于一个要素。

[0796] 通过“约”意指相对于参考量值、量、水平、值、数目、频率、百分数、尺度、大小、数量、重量或长度,变化多达10、9、8、7、6、5、4、3、2或1%的量值、量、水平、值、数目、频率、百分数、尺度、大小、数量、重量或长度。

[0797] 如本文所用,“和/或”指并且包括一个或多个相关的所列项的任何及全部可能组合,以及当按替代性(或)解读时,指并且包括组合的缺少。

[0798] 术语“物质”、“候选物质”、“调节剂”、“调节物”、“替代物”、“有功能替代物”、“无功能替代物”或“抑制剂”包括引起所需药理学和/或生理效应的化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子、从生物材料、生物机体或其部分制成的提取物或其他材料。这些术语还涵盖本文特别提到的那些化合物的可药用成分和药理活性成分,所述那些化合物包括但不限于盐、酯、酰胺、前药、活性代谢物、类似物等。当使用以上术语时,则应当理解,这包括活性物质本身以及可药用的药理活性盐、酯、酰胺、前药、代谢物和类似物。术语“物质”、“调节物”、“替代物”或“抑制剂”不作狭义解释,而扩展至小分子、蛋白质性分子(proteinaceous molecules)如肽、多肽和蛋白质以及包含它们的组合物及遗传分子如RNA、DNA和拟似物和化学类似物其以及细胞物质。术语“物质”、“调节物”、“替代物”或“抑制剂”包括一种细胞,所述细胞能够产生并分泌本文提及的多肽以及包含了编码这种多肽的核苷酸序列的多核苷酸。因此,术语“物质”、“调节物”、“替代物”或“抑制剂”扩展至用于一系列细胞中表达和

分泌的核酸构建体,包括载体如病毒载体或非病毒载体、表达载体和质粒。

[0799] 术语“抑制剂”以其最广意义使用,并且包括减少另一分子的活性、活化或功能中至少一个方面的任何化合物,包括蛋白质、多肽、肽、抗体、抗体片段、大分子或小分子(小于10kDa)。例如,抑制剂可以减少RAGE和/或某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的活性、活化或功能、和/或适当地减少借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化。因此,“借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的抑制剂”指能够大幅度减少、抑制、拮抗、阻断、负向调节和/或缓解借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的物质。某抑制剂对借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的抑制适当地减少或抑制其生物学效应,所述生物学效应包括由细胞产生促炎介质(包括促炎细胞因子)或调节与异常RAGE配体非依赖性RAGE活化疾病症状相关的其他细胞成分。注意:部分激动剂可以充当抑制剂,因为即便显示激动作用,它也不产生最大功效。因此,通过竞争或调节一种更有效激动剂(如内源激动剂)的激动活性,它可以有效地充当受体多肽和/或其信号传导途径的抑制剂,因为与如果缺少它相比,它减少信号传导输出。因此,部分激动剂可以在治疗背景下作为抑制剂发挥作用。抑制剂不必要抑制另一分子的活性、活化或功能的全部方面,并且实际上,可以抑制某些方面,同时活化其他方面和/或不调节其他方面。因此,抑制剂可以显示出配体偏置。

[0800] 术语“配体偏置(ligand bias)”指这样的现象,其中对于相同受体,可能存在选择性促进或抑制不同信号传导途径活化的不同的配体稳定化受体状态(Mustafa等人,2010)。已经赋予这种现象多个名称,包括但不限于:配体偏置的信号传导、配体诱导的偏置信号传导、受体信号的激动剂交换、基于细胞的功能选择性、基于受体活性状态的选择性、刺激物交换、偏置的激动作用、附属功效和配体诱导的选择性信号传导(Mustafa等人,2010)。以举例方式,这包括以下构思:并非全部激动剂均活化正常情况下由参考激动剂(其经常为内源激动剂)活化的全部信号传导途径。相对于参考,某激动剂可以活化某些途径,但是不活化其他途径,因而显示偏置。另外,拮抗剂或反向激动剂或抑制剂可以仅抑制某些途径,但是不抑制其他途径,并且可以在正构配体结合位点和/或变构结合位点发挥作用。正构和变构结合位点如本领域共知那样定义,并且变构可以跨复合体从一个受体至另一受体如此发生,从而配体与一个受体的结合可以导致变构调节相同大分子复合体中的另一受体。变构调节物还可以显示出配体偏置并且调节某些信号传导途径,但不调节其他信号传导途径。本领域还已知,配体可以例如潜在地充当一个信号传导途径的激动剂,同时作为另一个信号传导途径的抑制剂发挥作用和/或不影响第三信号传导途径。实际上,可以出现信号传导调节效应的多个变型和组合。配体偏置也不是绝对的,在于配体可以例如借助一个途径减少信号传导,而不是完全抑制它,和/或不完整地活化另一个信号传导途径。可以调节各途径至不同程度并且这种情况可以依据多个参数测量,所述参数包括但不限于效价和/或功效的差异和/或信号传导的时间方面和/或信号传导的空间方面。

[0801] 术语“有功能替代物”以其最广意义使用,并且包括在接替另一个分子时能够模仿或增加该分子的活性、活化或功能中至少一个方面的任何化合物,包括蛋白质、多肽、肽、抗体、抗体片段、大分子或小分子(小于10kDa)。例如,在否则缺少RAGE表达的系统中,RAGE的有功能替代物可以复制RAGE和/或某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种

趋化因子受体(如CCR2))的活性、活化或功能、和/或适当地减少借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化。因此,借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的“有功能替代物”指能够大幅度增加、增进、激动和/或正向调节借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的物质。通过有功能替代物恢复某抑制剂对借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的信号传导能力适当地恢复或增进其生物学效应,所述生物学效应包括由细胞产生促炎介质(包括促炎细胞因子)或调节与RAGE配体非依赖性RAGE活化疾病症状相关的其他细胞成分。有功能替代物不必要模拟另一分子的活性、活化或功能的全部方面,并且实际上,可以抑制某些方面,同时活化其他方面,和/或不调节其他方面。因此,有功能替代物也可以显示出配体偏置。

[0802] 术语“无功能替代物”以其最广意义使用,并且包括在接替另一个分子时能够抑制、拮抗或减少该分子的活性、活化或功能中至少一个方面的任何化合物,包括蛋白质、多肽、肽、抗体、抗体片段、大分子或小分子(小于10kDa)。例如,RAGE的无功能替代物可以抑制RAGE和/或某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的活性、活化或功能、和/或适当地减少借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化。因此,借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的“无功能替代物”指能够大幅度减少、抑制、拮抗和/或负向调节借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的物质。通过无功能替代物减少某抑制剂对借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的信号传导能力适当地减少或抑制其生物学效应,所述生物学效应包括由细胞产生促炎介质(包括促炎细胞因子)或调节与RAGE配体非依赖性RAGE活化疾病症状相关的其他细胞成分。注意:部分激动剂也可以充当抑制剂,因为即便显示激动作用,它也不产生最大功效。因此,通过竞争或调节一种更有效激动剂(如内源激动剂)的激动活性,它可以有效地充当受体多肽和/或其信号传导途径的抑制剂,因为与如果缺少它相比,它减少信号传导输出。因此,部分激动剂可以在治疗背景下作为抑制剂发挥作用。无功能替代物不必要减少另一分子的活性、活化或功能的全部方面,并且实际上,可以抑制某些方面,同时促进其他方面和/或不调节其他方面。因此,无功能替代物也可以显示出配体偏置。

[0803] 术语“结合”及其语法等同物指生理条件下分子之间例如因共价、静电、疏水性和离子和/或氢键相互作用所致的物理联系,并且包括多种相互作用,如盐桥和水桥,以及任何其他常规的结合手段。结合可以直接发生或借助相互作用于一个或多个其他中介分子而发生。

[0804] 遍及整个说明书,除非上下文另外要求,否则词“包含”、“包含了”和“包含着”将理解成表明包括所述的步骤或要素或者所述的步骤或要素群组,但不排除任何其它的步骤或要素或任何其它的步骤或要素群组。因此,使用术语“包含着”等表示所列的要素是需要或强制的,但是其他要素是任选的并且可以存在或可以不存在。“由.....组成”意指包含并且限于短语“由.....组成”之后的任何对象。因此,短语“由.....组成”表示所列的要素是需要或强制的,并且其他要素不可以存在。通过“基本上由.....组成”意指包括在该短语后所列的任何要素,并且限于不干扰或无助于所列要素的公开内容中具体规定的活性或作用的其他要素。因此,短语“基本上由.....组成”表示所列的要素是需要或强制的,但是

其他要素是任选的并且可以存在或可以不存在,者取决于它们是否影响所列要素的活性或作用。

[0805] 术语“构建体”指包含一个或多个来自不同来源的已分离核酸序列的重组遗传分子。因此,构建体是其中不同来源的两个或更多个核酸序列装配成单一核酸分子的嵌合分子并且包括这样的任何构建体,所述构建体含有(1)在自然界中不一起存在的核酸序列(即,核苷酸序列中至少之一相对于其他核苷酸序列中至少之一为异源),包括调节序列和编码性序列,或(2)编码不天然毗连的功能性RNA分子或蛋白质之部分的序列,或(3)启动子的不天然毗连的部分。代表性构建体包括衍生自任何来源、能够进行基因组整合或自主复制的任何重组核酸分子,如质粒、粘粒、病毒、自主复制型多核苷酸分子、噬菌体或线型或环状单链或双链DNA或RNA核酸分子,包括其中一个或多个核酸分子已经有效连接的核酸分子。本发明的构建体通常将包含指导目的核酸序列表达的必要元件,所述目的核酸序列也含于构建体中,如,例如,靶核酸序列或调节物核酸序列。这类元件可以包括控制元件如与目的核酸序列有效连接(从而指导其转录)的启动子,并且经常还包括多聚腺苷化序列。在本发明的某些实施方案范围内,构建体可以包含于载体内部。除构建体的组分之外,载体还可以例如包含一个或多个选择标记、一个或多个复制起点(如原核复制起点和真核复制起点)、至少一个多克隆位点和/或促进构建体稳定整合入宿主细胞基因促进构建体稳定整合入宿主细胞基因的元件组。两个或更多个构建体可以包含于单一核酸分子(如单一载体)内部,或可以包含于两个或更多个独立的核酸分子(如两个或更多个独立的载体)内部。“表达构建体”通常包含至少一个与目的核苷酸序列有效连接的控制序列。以这种方式,例如,在表达构建体中提供与待表达的核苷酸序有效连接的启动子,用于在生物或其部分(包括宿主细胞)中表达。为了实施本发明,用于制备和使用构建体和宿主细胞的常规组合物和方法是本领域技术人员熟知的,参见例如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版第1、第2和第3卷J.F.Sambrook,D.W.Russell和N.Irwin,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2000。

[0806] 通过“对应于”或“与.....相对应”意指与参考核酸序列显示基本的序列同一性(例如,与参考核酸序列的总体或一部分显示至少约50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、97%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至高达100%序列同一性)的核酸序列,或与参考氨基酸序列显示基本的序列同一性(例如,与参考氨基酸序列的总体或一部分显示至少约50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、97%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至高达100%序列同一性)的氨基酸序列。

[0807] 在治疗或预防某疾病的上下文中,“有效量”意指按单剂或作为一系列的部分,向需要这种治疗或预防的个体施用某个量的药剂或调节物如抑制剂或组合物,所述量有效防止招致这种病状的症状、限制这类症状和/或治疗现有症状。有效量将取决于待治疗个体的健康和身体状况、待治疗个体的分类群、组合物的制剂、医疗情况评估和其他有关因素而变

动。预期该量将落在可以通过例行试验确定的相对宽泛的范围内。

[0808] 如本文所用,术语“编码”、“编码性”等指某核酸以提供另一核酸或多肽的能力。例如,如果可以转录和/或翻译某核酸序列以产生某多肽或如果可以将其加工成可以转录和/或翻译以产生该多肽的形式,则称该核酸序列为“编码”该多肽。这种核酸序列可以包括编码性序列或包括编码性序列和非编码性序列两者。因此,术语“编码”、“编码性”等包括因转录DNA分子而产生的RNA产物、因翻译RNA分子而产生的蛋白质、因转录DNA分子以形成RNA产物并随后翻译该RNA产物而产生的蛋白质或因转录DNA分子以提供RNA产物、加工该RNA产物以提供加工的RNA产物(例如,mRNA)并且随后翻译加工的RNA产物而产生的蛋白质。

[0809] 关于基因序列,术语“表达”指转录基因以产生RNA转录物(例如mRNA、反义RNA、siRNA、shRNA、miRNA),并且根据需要,翻译所得的mRNA转录物成蛋白质。因此,如将从上下文显而易见,编码性序列的表达因转录和翻译编码性序列而来。反过来,非编码性序列的表达因转录非编码性序列而来。“表达”还可以指基因产物位于在细胞中、细胞上或细胞外部,所述细胞包括细胞区室或结构,其示意性实例包括细胞质、胞核、核糖体、溶酶体和细胞膜或表面。

[0810] “表达载体”意指这样的任何遗传元件,其能够指引包含于载体内部的多核苷酸转录并且适当地合成由多核苷酸编码的肽或多肽。本领域从业者已知这类表达载体。

[0811] 如本文所用,术语“功能”指生物学功能、酶促功能或治疗功能。

[0812] 如本文所用,术语“基因”指能够用来产生mRNA、反义RNA、siRNA、shRNA、miRNA等的核酸分子。基因可以或不可以能够用来产生功能蛋白质。基因可以包括编码区和非编码区(例如、内含子、调节元件、启动子、增强子、终止序列和5′和3′非翻译区)。

[0813] 术语“宿主细胞”指向其中引入多核苷酸或核酸构建体的细胞。本发明的宿主细胞包括,但无需限于细菌、酵母和动物(包括落在如本文定义的术语“受试者”范围内的脊椎动物)。宿主细胞可以是单细胞的,或可以在组织培养中作为液体培养物、单层等培育。宿主细胞也可以直接或间接地衍生自组织或可以存在于生物内部,所述生物包括动物(包括落在如本文定义的术语“受试者”范围内的脊椎动物)。

[0814] 术语“相互作用”指基于二个分子之间分子间力的影响,并且其实例包括离子与离子相互作用、通过氢键相互作用、偶极-偶极相互作用、疏水相互作用及其组合,并且包括分子之间的结合。相互作用可以直接发生或借助一个或多个其他中介分子而发生。

[0815] 术语“功能性相互作用”指一个分子影响另一个分子的功能,并且不必然地意指二个分子物理上彼此相互作用。

[0816] 术语“萤光素酶”意指与氧化其底物时发射光的萤光素酶蛋白相对应的多肽。示例性萤光素酶蛋白是氧化腔肠素(coelenterazine)的海肾萤光素酶或其衍生物。萤光素酶蛋白的另一个实例是NanoLuc。

[0817] 术语“类似物”指小分子,所述小分子因为其与内源肽的结构类似性而能够模拟与之类似的肽的至少一种生物学功能。“肽类似物”是这样的类似物,它本质上是肽,因为它含有肽键并且具有由氨基酸或其衍生物组成的模块结构。“非肽类似物”是这样的类似物,它本质上不是肽,因为它不含有肽键并且没有由氨基酸或其衍生物作为结构单元组成的模块结构。

[0818] 以说明的方式,RAGE类似物可以模拟RAGE与AT_1R形成异聚复合体的能力,但适当

地抑制通过借助AT_1R发挥作用的AT_1R配体对RAGE的反式活化。

[0819] 术语“衍生物”指分子指这样的分子,其一级结构取自RAGE的胞质尾或其片段或者衍生自RAGE的胞质尾或其片段而成,但所述分子包含氨基酸添加、置换、截短、化学和/或生物化学修饰、反向倒置序列、环状肽、类肽、β肽或与非肽药物、非肽标记物、非肽载体或非肽树脂的键。

[0820] 如本文所用,术语“调节”、“调控”及其语法等同物指改变生物学活性或效应(例如,细胞因子产生、细胞黏附、GPCR信号传导、RAGE信号传导)的作用。例如,具体生物分子的激动剂、拮抗剂、反向激动剂或变构调节物通过增加/刺激(例如,激动剂、激活物、正变构调节物)或减少/抑制(例如,拮抗剂、抑制剂、反向激动剂、阴性变构调节物)该生物分子(如受体)的活性或效应(例如,细胞因子产生、细胞黏附、受体信号传导),调节该生物分子(例如,受体)的活性。

[0821] 如本文中所用,术语“有效连接”或“有效地连接”指如此描述的组分处在允许它们以其预期方式发挥功能的关系中的并置。例如,与编码性序列“有效连接”的调节序列指调节序列相对于编码性序列而言允许编码性序列在相容于该调节序列的条件下表达的定位和/或取向。

[0822] 通过“可药用载体”意指包含下述材料的药用载体,所述材料无生物上不利或另外的不利,即,该材料可以连同选定的活性物质或调节物(如抑制剂)一起施用至受试者,不造成任何或明显不良反应。载体可以包括赋形剂和其他添加物如稀释剂、去垢剂、着色剂、润湿或乳化剂、pH缓冲剂、防腐剂、转染剂等。

[0823] 类似地,如本文提供的化合物的“可药用”盐、酯、酰胺、前药或衍生物是无生物上不利或另外不利的盐、酯、酰胺、前药或衍生物。

[0824] 术语“多核苷酸”、“核酸”和“核苷酸序列”包括RNA、cDNA、基因组DNA、合成性形式和混合型聚合物,有义链和反义链二者,并且可以经化学或生物化学修饰或可以含有非自然或衍生化的核苷酸碱基,如本领域技术人员将轻易地领会。

[0825] 术语“多肽”、“蛋白质性(proteinaceous)分子”、“肽”和“蛋白质”在本文中互换地用来指氨基酸残基的聚合物及前者的变体和合成性类似物。因此,这些术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是合成的非天然存在的氨基酸(如相应天然存在的氨基酸的化学类似物)的氨基酸聚合物以及天然存在的氨基酸聚合物。这些术语不排除修饰,例如,糖基化、乙酰化、磷酸化等。可溶形式的主题蛋白质性分子特别有用。该定义范围内包括例如这样的多肽,它们含有氨基酸的一个或多个类似物,例如包括非天然的氨基酸或具有置换键的多肽。

[0826] 术语“多肽变体”指其中一个或多个氨基酸已经由不同氨基酸替换的多肽。本领域充分理解,可以将一些氨基酸变更成具有充分相似特性的其他氨基酸,而不改变多肽活性的性质(保守性置换),如下文所述。这些术语还涵盖其中已经添加或缺失一个或多个氨基酸或将其替换为不同氨基酸的多肽。

[0827] 如本文所用,术语“防止”、“阻止”或“预防”指预防性治疗,其增加受试者对形成疾病或条件的抵抗性,或者,换言之,降低受试者将形成该疾病或病状的可能性,以及疾病或病状已经开始后的治疗,旨在总体上减少或消除它或防止它变得更重。这些术语在其范围内还包括防止疾病或病状在可能倾向于发生该疾病或病状但尚未诊断患上它的受试者中出现。

[0828] 本文中对“启动子”应在其最广义背景下提及并且包括经典基因组基因的转录调节序列,所述转录调节序列包括对精确转录启动所需的TATA框,具有或没有CCAAT框序列,和响应于发育性刺激和/或环境刺激或以组织特异性方式而改变基因表达的额外调节元件(即,上游激活序列、增强子和沉默子)。启动子通常,但不必然地,位于该启动子调节其表达的结构基因的上游或5’。另外,包含启动子的调节元件通常位于基因转录起始位点的2kb范围内。本发明的优选启动子可以含有附加拷贝的一个或多个特异性调节元件以进一步增强细胞中的表达,和/或以改变与之有效连接的结构基因的表达时序。

[0829] “邻近”指两个整体(通常,多肽)之间的距离。例如,RAGE多肽与GPCR多肽的邻近意指这两个多肽之间的相对距离。如果两个多肽直接相互作用,则将它们视为空间上彼此接近,或称作紧邻。如果两个多肽是相同异聚体和/或大分子复合体的部分,但未直接相互作用,则也将它们视为紧邻。更具体地,出于本发明目的,约30nm或更小、10nm或更小,或5nm或更小的距离将会视为在紧邻范围内。

[0830] “邻近筛选测定法”意指一种测定法、系统或实验方案,其包括使得第一报道分子组分和第二报道分子组分邻近以产生可检测的邻近信号。第一报道分子组分和第二报道分子组分的接近生成能够有检测器检测的近度信号。第一报道分子组分和第二报道分子组分构成互补对,其意义在于,在不明显影响本发明功能的情况下,第一报道分子组分可以与第二报道分子组分互换(即与RAGE多肽偶联的第一报道分子组分和与GPCR多肽偶联的第二报道分子组分或与GPCR多肽偶联的第一报道分子组分和与RAGE多肽偶联的第二报道分子组分)。不需要RAGE多肽和GPCR多肽之间或报道分子组分之间的直接物理接触并且它们之间可以由一个或多个连接分子介导。优选地,在报道分子组分引发剂存在下因第一报道分子组分和第二报道分子组分邻近所生成的邻近信号选自:发光、荧光和比色变化。在一些实施方案中,发光由生物发光蛋白产生,所述生物发光蛋白选自萤光素酶、半乳糖苷酶、内酰胺酶、过氧化物酶或在合适底物存在下能够发光的任何蛋白质。

[0831] 术语“报道分子组分”可以是有机或无机、蛋白质性质或非蛋白质性质的任何已知化合物或其复合体,其邻近于另一报道分子组分时能够导致可检测的邻近信号发射。在一些实施方案中,报道分子组分选自这样的群组,所述群组包含与RAGE多肽和/或某种共定位的GPCR多肽(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某些趋化因子受体(如CCR2))偶联的酶、发光分子或其部分、荧光分子或其部分和转录因子或其他分子、由其组成或基本上由其组成。在一些实施方案中,报道分子组分可以包括通过并入酶剪切位点的接头与RAGE和/或某种共定位的GPCR多肽偶联的酶、发光分子或生物发光分子、荧光分子和转录因子或其他分子。

[0832] 在本发明的一些方面,邻近报道系统包括能够成为供体和/或受体分子的成对报道分子组分的组合。因此,根据本发明可以使用的报道分子组分可以基于其物理特性来选择,如本领域已知,共振能量转移(RET)物理特性,二者如此选择,从而它们一起包含一个RET对的供体分子和受体分子。如果RET对内部的报道分子组分之一是生物发光蛋白,RET是称作生物发光RET(BRET)。如果形成RET对的两种报道分子组分是荧光团,则所得的RET称作荧光RET(FRET)。已知的合适供体和接纳体对的实例包括:海肾萤光素酶(或其变体)和黄色荧光蛋白;海肾萤光素酶(或其变体)和绿色荧光蛋白(或其变体);NanoLuc和黄色荧光蛋白;NanoLuc和mCherry荧光蛋白;NanoLuc和HaloTag(具有合适的HaloTag配体);青色荧光蛋白和黄色荧光蛋白;荧光素和四甲基罗丹明;5-(2′-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS)和

荧光素(通常参见R.Haugland,Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals,第六版1995)。荧光团之一或两者可以是荧光蛋白如绿色荧光蛋白,并且特别有利的是通过制备RAGE多肽或某种共定位的GPCR多肽和荧光蛋白的融合蛋白,利用荧光蛋白作为荧光团。

[0833] 第一报道分子组分和第二报道分子组分的优选组合包括发光报道分子组分与荧光报道分子组分,发光报道分子组分与非荧光猝灭剂、荧光报道分子组分与非荧光猝灭剂、能够发生共振能量转移的第一和第二荧光报道分子组分。但是,第一报道分子组分和第二报道分子组分的可用组合无论如何不限于此。可以为本发明所用第一报道分子组分和第二报道分子组分的替代性组合包括例举以下文献中例举的那些:US6893827(Applera Corporation);US6800445(Applera Corporation);US7049076(Sentigen Biosciences, Inc.和纽约市哥伦比亚大学受托人);US6110693(杜克大学);US5891646(杜克大学);WO/2005/031 309(ODYSSEY THERA INC.);和US8101373(DiscoveRx Corporation)

[0834] 如本文所用的术语“偶联”、“直接偶联”和“间接偶联”意指,报道分子组分接合于或缔合于RAGE多肽和/或某种共定位的GPCR多肽以形成能够加以分析或检测的实体。可以借助偶联二个分子的任何已知的共价或非共价手段,使报道分子组分与RAGE多肽和/或某种共定位的GPCR多肽直接或间接偶联,所述手段包括化学交联、蛋白质的化学修饰、氨基酸的化学修饰、核酸的化学修饰、糖的化学修饰、脂质的化学修饰、任何其他有机或无机分子的化学修饰、生物素-抗生物素蛋白相互作用、抗原-抗体相互作用和核酸杂交。在本发明的一种形式中,报道分子组分通过接头间接地偶联于RAGE多肽和/或某种共定位的GPCR多肽。在一些实施方案中,接头包含酶剪切位点。偶联RAGE多肽和/或某种共定位的GPCR多肽和蛋白质性质报道分子组分的直接方法的实例是遗传融合,其中使编码RAGE多肽和/或某种共定位的GPCR多肽和生物发光或荧光蛋白的基因融合以产生单一多肽链。直接偶联方法的另一个实例是缀合,其中利用酶偶联RAGE多肽和/或某种共定位的GPCR多肽与报道分子组分,如连接酶、水解酶、尤其磷酸酶、酯酶和糖苷酶、或氧化还原酶,尤其过氧化物酶。

[0835] 在本发明的一个优选实施方案中,RAGE多肽与报道分子组分形成单一多肽链和/或某种共定位的GPCR多肽与报道分子组分形成单一多肽链。在本发明的一个特别优选形式中,报道分子组分是不同的。额外的官能团可以形成相同多肽链的部分。例如,单一多肽链额外地包含:编码肽序列的序列,所述肽序列用于亲和纯化融合构建体;和/或编码肽序列的序列,所述肽序列指导融合构建体到达真核细胞的亚细胞区室;和/或编码肽序列的序列,所述肽序列促进穿透真核细胞膜;和/或使得通过使用抗体或另行评估表达水平成为可能的序列。

[0836] “调节序列”意指这样的核酸序列(例如,DNA),其在特定宿主细胞中表达有效连接的核苷酸序列(例如,编码性序列)。适于原核细胞的调节序列例如包括启动子,和任选地顺式作用序列如操纵基因序列和核糖体结合位点。适于真核细胞的控制序列包括启动子、多聚腺苷化信号、转录增强子、翻译增强子、调节mRNA稳定性的前导序列或加尾序列、以及将转录的多核苷酸编码的产物靶向到达细胞内部胞内区室或胞外环境的靶向序列。

[0837] 术语“盐”、“衍生物”和“前药”包括当施用至受者时能够(直接或间接)提供本发明化合物或其活性代谢物或残留物的任何可药用盐、酯、水合物或任何其他化合物。合适的可药用盐包括可药用无机酸如氢氯酸、硫酸、磷、硝酸、碳酸、硼酸、氨基磺酸和氢溴酸的盐,或

可药用有机酸如乙酸、丙酸、丁酸、酒石酸、马来酸、羟马来酸、延胡索酸、柠檬酸、乳酸、黏酸、葡糖酸、苯甲酸、琥珀酸、草酸、苯乙酸、甲磺酸、甲苯磺酸、苯磺酸、水杨酸、对氨基苯磺酸、天冬氨酸、谷氨酸、依地酸、硬脂酸、棕榈酸、油酸、月桂酸、泛酸、鞣酸、抗坏血酸和戊酸的盐。碱性盐包括但不限于与可药用阳离子如钠、钾、锂、钙、镁、铵和烷基铵形成的那些盐。另外,碱性含氮基团可以用下述物质季铵化,如低级烷基卤化物,例如甲基、乙基、丙基和丁基氯化物、溴化物和碘化物;二烷基硫酸盐如二甲基硫酸盐和二乙基硫酸盐;和其他。但是,将可以理解,非可药用盐也落于本发明的范围内,原因是这些盐可以用于制备可药用盐。可以通过本领域已知的方法实施盐和前药和衍生物的制备。例如,可以通过使本发明的化合物与金属氢氧化物反应,制备金属盐。可以通过使适宜的酸与本发明的化合物反应,制备酸式盐。

[0838] 术语“选择性”指在基本上不调节RAGE多肽或某种共定位的GPCR多肽的另一生物学相互作用的情况下,调节RAGE多肽和某种共定位的GPCR多肽之间相互作用、适当地调节物理相互作用(例如,结合)的化合物。因此,对RAGE-某种共定位的GPCR直接相互作用有选择性的化合物显示出相对于调节RAGE或某种共定位的GPCR对另一个底物或结合性配偶体的另一结合活性,大于约2倍、5倍、10倍、20倍、50倍或大于约100倍的选择性。

[0839] 如本文所用的术语“序列同一性”指序列基于核苷酸对核苷酸或基于氨基酸对氨基酸在比较窗口范围内相同的程度。因此,通过以下方式计算“序列同一性百分数”:在比较窗口范围内比较两个最佳对齐的序列;确定其中相同核酸碱基(例如,A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如,Ala、Pro、Ser、Thr;Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys Arg、His、Asp、Glu、Asn;Gln、Cy和Met)在两个序列中出现的位置的数目以产生匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以比较窗口(即,窗口大小)中的位置总数并且将结果乘以100以产生序列同一性百分数。出于本发明目的,“序列同一性”将理解为意指通过适宜方法计算的“匹配百分数”。例如,可以使用DNASIS计算机程序(用于视窗系统的2.5版;从美国加利福尼亚州南旧金山日立软件工程化有限公司可获得),使用如随附软件的参考手册中所用的标准默认,实施序列同一性分析。

[0840] “相似性”指相同或构成如下文所限定的保守性置换的氨基酸的百分数。

[0841]

原始残基	示例性置换
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln、His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn、Gln
Ile	Leu、Val
Leu	Ile、Val
Lys	Arg、Gln、Glu
Met	Leu、Ile,
Phe	Met、Leu、Tyr

[0842]

Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp、Phe
Val	Ile、Leu

[0843] 可以使用序列比较程序如GAP(Deveraux等人1984,Nucleic Acids Research 12:387-395)确定相似性。以这种方式,可能通过向比对结果插入空位,比较长度与本文中援引的那些序列相似或明显不同的序列,通过GAP使用的比较算法确定这类空位。

[0844] 用来描述两个或多个多核苷酸或多肽之间序列关系的术语包括:“参考序列”、“比较窗口”、“序列同一性百分数”、“序列同一性百分数”和“基本同一性”。“参考序列”长至少12个但往往15至18个和经常至少25个单体单位,包括核苷酸和氨基酸残基。因为两个多核苷酸可以各自包含(1)在两个多核苷酸之间相似的序列(即,完整多核苷酸序列的仅一部分)和(2)在两个多核苷酸之间趋异的序列,所以一般通过比较在“比较窗口”范围内两个多核苷酸的序列,进行两个或更多个多核苷酸之间的序列比较,以鉴定并比较具有序列相似性的局部区域。“比较窗口”指具有至少6个、通常约50至约100个、更通常约100至约150个邻近位置的概念性区段,其中将一个序列与具有相同邻近位置数目的参考序列在最佳对齐这两个序列后比较。如与参考序列(不包含添加或缺失)相比,比较窗口可以包含约20%或更少的添加或缺失(即,空位)以最佳对齐两个序列。可以通过算法(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0,Genetics Computer Group,575Science Drive Madison,WI,USA中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)的计算机化执行或通过视检和用所选

各种方法中任一者生成的最佳比对结果(即,产生比较窗口范围内最高同源性百分数),实施用于对齐比较窗口的序列的最佳比对。还可以参考如例如Altschul等人,1997,Nucl.Acids Res.25:3389公开的BLAST程序家族。可以在Ausubel等人,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley&Sons Inc,1994-1998,第15章第19.3单元中找到序列分析的详细讨论。

[0845] 如本文所用,“小分子”指具有小于3千道尔顿(kDa)、和一般小于1.5千道尔顿并且更优选地小于约1千道尔顿的分子量的组合物。小分子可以是核酸、肽、多肽、肽模拟物、糖、脂质或其他有机(含碳)或无机分子。如本领域技术人员将领会,基于本说明书,可以用鉴定调节生物活性的化合物的本发明测定法的任一者筛选广泛的化学混合物和/或生物学混合物(经常是真菌提取物、细菌提取物或藻提取物)文库。“有机小分子”是具有小于3kDa、小于1.5kDa、或甚至小于约1kDa的分子量的有机化合物(或与无机化合物(例如,金属)复合的有机化合物)。

[0846] 如本文所用,“严格性”指温度和离子强度条件和在杂交和洗涤流程期间存在或不存在某些有机溶剂。严格性越高,固定的靶核苷酸序列和洗涤后仍与靶杂交的探针核苷酸序列之间的互补性程度将越高。严格性条件包括低、中等、高和极高严格性条件,这些条件描述用于杂交和洗涤的某些条件。进行杂交反应的指南可以见于Ausubel等人,(1998,上文),第6.3.1-6.3.6部分。参考文献中描述了含水方法和非含水方法并且可以使用任一方法。本文中对低严格性条件的称谓包括并且涵盖至少约1%v/v到至少约15%v/v甲酰胺和至少约1M到至少约2M盐用于42℃杂交,和至少约1M到至少约2M盐用于42℃洗涤。低严格性条件还可以包括1%牛血清白蛋白(BSA)、1mM EDTA、0.5M $NaHPO_4$(pH 7.2)、7%SDS用于65℃杂交,和(i)2x SSC、0.1%SDS;或(ii)0.5%BSA、1mM EDTA、40mM $NaHPO_4$(pH 7.2)、5%SDS用于室温洗涤。一个低严格性条件实施方案包括在约45℃于6x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中杂交,随后至少在50℃于0.2x SSC、0.1%SDS中洗涤两次(对于低严格性条件,洗液温度可以升至55℃)。对中等严格性条件的称谓包括并且涵盖至少约16%v/v到至少约30%v/v甲酰胺和至少约0.5M到至少约0.9M盐用于42℃杂交,和至少约0.1M到至少约0.2M盐用于55℃洗涤。中等严格性条件还可以包括1%牛血清白蛋白(BSA)、1mM EDTA、0.5M $NaHPO_4$(pH 7.2)、7%SDS用于65℃杂交,和(i)2xx SSC、0.1%SDS;或(ii)0.5%BSA、1mM EDTA、40mM $NaHPO_4$(pH 7.2)、5%SDS用于60-65℃洗涤。一个中等严格性条件实施方案包括在约45℃于6xx SSC中杂交,随后在60℃于0.2xx SSC、0.1%SDS中洗涤一次或多次。对高严格性条件的称谓包括并且涵盖至少约31%v/v到至少约50%v/v甲酰胺和约0.01M至约0.15M盐用于42℃杂交,和约0.01M至约0.02M盐用于55℃洗涤。高严格性条件还可以包括1%BSA、1mM EDTA、0.5M$NaHPO_4$(pH 7.2)、7%SDS用于65℃杂交,和(i)0.2xx SSC、0.1%SDS;或(ii)0.5%BSA、1mM EDTA、40mM $NaHPO_4$(pH 7.2)、1%SDS用于超过65℃的温度时洗涤。一个高严格性条件实施方案包括在约45℃于6xx SSC中杂交,随后在65℃于0.2xx SSC、0.1%SDS中洗涤一次或多次。在某些实施方案中,肽或多肽由极高严格性条件下与参考核苷酸序列杂交的多核苷酸编码。一个极高严格性条件实施方案包括在约65℃于0.5M磷酸钠、7%SDS中杂交,随后在65℃于0.2x SSC、1%SDS洗涤一次或多次。其他严格性条件是本领域熟知的并且熟练读者会认识到,可以操作多种因素以优化特异性杂交。优化最终洗涤的严格性可以起到确保高程度杂交的作用。关于详细实例,参见上文Ausubel等人第2.10.1页至第

2.10.16页处和Sambrook等人(1989,上文)第1.101至第1.104部分。尽管严格洗涤一般在约42℃至68℃的温度实施,本领域技术人员将理解,其他温度可以适用于严格条件。最大杂交速率一般在形成DNA-DNA杂交体的Tm以下约20℃至25℃时出现。本领域熟知,Tm是解链温度或二个互补性多核苷酸序列解离的温度。本领域熟知用于估计Tm的方法(参见上文Ausubel等人第2.10.8页)。通常,完美配的双链体DNA的Tm可以依据下式预测为近似值:

[0847] Tm=81.5+16.6(log10M)+0.41(%G+C)-0.63(甲酰胺%)-(600/长度)

[0848] 其中

[0849] M是Na+浓度、优选地处于0.01摩尔至0.4摩尔范围内;%G+C是作为碱基总数的百分数的鸟苷碱基和胞嘧啶碱基总和,在30%和75%G+C之间的范围内;%甲酰胺是以体积计的甲酰胺浓度百分数;长度是DNA双链体中碱基对的数目。双链体DNA的Tm按照随机错配的碱基对数目每增加1%而降低1℃。对于高严格性,洗涤通常在Tm-15℃实施,或对于中等严格性,在$Tm-30^{oo}C$实施。在一个杂交流程实例中,含有固定化DNA的膜(例如,硝酸纤维素膜或尼龙膜)在$42^{oo}C$于含有标记探针的杂交缓冲液(50%去离子化甲酰胺、5x SSC、5x Denhardt溶液(0.1%ficoll、0.1%聚乙烯吡咯烷酮和0.1%牛血清白蛋白)、0.1%SDS和200mg/mL变性鲑精DNA)中杂交过夜。该膜随后经历二次后续中等严格性洗涤(即,在45℃持续15分钟2x SSC、0.1%SDS,随后在50℃持续15分钟2x SSC、0.1%SDS),随后经历二次后续较高严格性洗涤(即,在55℃持续12分钟0.2x SSC、0.1%SDS,随后在65-68℃持续12分钟0.2x SSC和0.1%SDS溶液)。

[0850] 本文中互换使用的术语“受试者”、“宿主”、“个体”或“患者”指其需要治疗或预防的任何受试者,具体地指脊椎动物受试者,并且甚至更具体地指哺乳动物受试者。落于本发明范围内的合适脊椎动物包括但不是限于脊索动物亚门的任何成员,包括灵长类(例如,人、猴和猿,并且包括猴物种,如来自猕猴属(Macaca)(例如,食蟹猴类,如食蟹猴(Macaca fascicularis)和/或恒河猴类(猕猴(Macaca mulatta)))和狒狒(豚尾狒狒(Papio ursinus))以及狨猴类(来自狨属(Callithrix)的物种)、松鼠猴(来自松鼠猴属(Saimiri)的物种)和柳猴类(来自柽柳猴属(Saguinus)的物种)、以及猿物种,如黑猩猩类(黑猩猩(Pan troglodytes)))、啮齿类(例如,小鼠、大鼠、豚鼠)、兔形目(例如,兔、野兔)、牛(例如,牛)、羊(例如,羊)、山羊(例如,山羊)、猪(例如,猪)、马(例如,马)、犬(例如,犬)、猫(例如,猫)、禽类(例如,鸡、火鸡、鸭、鹅、宠物鸟如金丝雀、鹦鹉)、海洋哺乳动物(例如,海豚、鲸)、爬行类(蛇、青蛙、蜥蜴)和鱼类。在具体实施方案中,受试者是灵长类如人类。但是,应当理解术语“患者”、“受试者”、“宿主”或“个体”不表明存在症状。

[0851] 如本文所用,术语“治疗”、“治疗着”等指获得所需的药理效应和/或生理效应。该效应可以根据部分或完全治愈疾病或病状(例如,血液学恶性病)和/或归咎于该疾病或病状的副作用而言是治疗性的。这些术语还覆盖对哺乳动物中,尤其人类中病状或疾病的任何治疗,并且包括:(a)抑制该疾病或病状,即,停止其发展;或(b)减轻该疾病或病状、即,造成该疾病或病状消退。

[0852] 术语“变体”广义地用来指以某种方式异于参考野生型蛋白的蛋白质,其中该蛋白质可以保留参考野生型蛋白的生物学特性或可以具有与参考野生型蛋白不同的生物学特性。术语主题蛋白质的“生物学特性”包括但不限于光谱特性,如发射最大值、量子产率、亮度等;体内和/或体外稳定性(例如半衰期)等。变体可以包含单一氨基酸变化(置换)、缺失

一个或多个氨基酸(点缺失)、N端截短、C端截短、插入等。可以使用分子生物学中熟知的标准技术,生成多肽变体。

[0853] “载体(vector)”意指可以向其中插入或克隆核酸序列的核酸分子,优选地例如衍生自质粒、噬菌体、或植物病毒的DNA分子。载体优选地含有一个或多个独特的限制性位点并且可以在规定的宿主细胞(包括靶细胞或组织或祖细胞或其组织)中有能力自主复制,或与所规定宿主的基因组如此整合,从而克隆的序列是可复制的。因此,载体可以是自主复制型载体,即作为其复制不依赖于染色体复制的染色体外实体存在的载体,例如,线型或闭合环状质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。载体可以含有用于确保自我复制的任何手段。可选地,载体可以这样的载体,当导入分离的宿主细胞中时,所述载体整合入基因组中并且随已经整合入该载体的染色体一起复制。载体系统可以包含单一载体或质粒,或共同含有向宿主细胞基因组待引入的总DNA的两种或更多种载体或质粒,或者转座子。载体的选择一般将取决于载体与向其中待引入载体的宿主细胞的相容性。载体还可以包括可以用于选择合适转化体的选择标记如抗生素耐药基因。这类抗性基因的实例是本领域技术人员熟知的。

[0854] 除非上下文另有要求,否则“RAGE”或“RAGE多肽”应当指从转录和翻译和/或可变剪接AGER基因(也称作AGER核苷酸或AGER多核苷酸、或RAGE核苷酸或RAGE多核苷酸)产生的蛋白质产物或产物类。

[0855] 除非上下文另有要求,否则“AT_1R”或“AT_1R多肽”或“AT_1受体”或“AT_1R”应当指从转录和翻译和/或备选剪接AGTR1、Agtr1a或Agtr1b基因(也称作AT_1R核苷酸或AT_1R多核苷酸)产生的蛋白质产物或产物类。例如,在人类中,一个基因编码位于染色体3q21-q25上的AT_1R(IUPHAR数据库,www.guidetopharmacology.org)。在小鼠中,二个基因编码AT_1R,为位于染色体13 16.0cM上的Agtr1a和位于染色体3 7.6cM上的Agtr1b (IUPHAR数据库,www.guidetopharmacology.org)。在大鼠中,二个基因编码AT_1R,为位于染色体17q12上的Agtr1a和位于染色体2q24上的Agtr1b(IUPHAR数据库,www.guidetopharmacology.org)。

[0856] 在一些情况下,Agtr1a基因的蛋白质产物或产物类可以称作$AT_{1a}R$,并且Agtr1b基因的蛋白质产物或产物类可以称作$AT_{1b}R$,然而,Agtr1a基因和Agtr1b基因的蛋白质产物或产物类均可以称作AT_1R。

[0857] 除非另外特别声明,否则已作必要修正情况下,本文所述的每个实施方案应适用于每种和每个实施方案。

[0858] 2.缩略语

[0859] 在本申请通篇范围内使用以下缩写:

[0860] aa=氨基酸;

[0861] d=天;

[0862] h=小时;

[0863] kb=千碱基或千碱基对;

[0864] kDa=千道尔顿;

[0865] nm=纳米;

[0866] nt=核苷酸;

[0867] nts=多个核苷酸;

[0868] s＝秒

[0869] 3.受体多肽以及编码多肽的构建体和核苷酸序列

[0870] 在一些实施方案中,编码受体多肽的多核苷酸与编码邻近筛选测定法的生物发光供体分子或荧光供体分子或荧光受体分子或其他合适的报道分子组分的核酸序列有效连接。一旦已经分离或合成所需多肽的编码性序列,可以将它们克隆入任何合适的构建体供表达(例如,瞬时或稳定表达)。本领域技术人员已知众多构建体,包括克隆载体和表达载体,并且选择适宜的构建体完全处于本领域从业者的能力范围内。

[0871] 在一些实施方案中,使用例行技术和分子生物学方法(包括DNA合成、PCR诱变和限制性核酸内切酶消化),将受体多核苷酸编码性序列插入合适构建体内部的某位置中,随后PCR连接。核心蛋白的任何编码性序列适于制备编码本发明嵌合多肽的核酸序列。

[0872] 描述适用于本发明的分子生物技术如克隆、突变等的通用教材包括Berger和Kimmel,Guide to Molecular Cloning Techniques,Methods in Enzymology第152卷Academic Press,Inc.,San Diego,Calif.(Berger);Sambrook等人,Molecular Cloning-A Laboratory Manual(第3版),第1-3卷,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.,2000(“Sambrook”)和Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel等人编著,Current Protocols,Greene Publishing Associates,Inc.和John Wiley&Sons,Inc.之间的合资公司(“Ausubel”)。这些教材描述了诱变、载体用途、启动子和例如涉及克隆和表达嵌合核心蛋白的许多其他主题。

[0873] 3.1渐进性糖化终极产物受体(RAGE)多肽

[0874] RAGE的明显作用是结合于渐进性糖化终极产物(AGE),包括已经通过Maillard反应非酶促修饰其上氨基的糖化蛋白质。RAGE经常称作模式识别受体,原因在于其通过共同基序检测一类配体的能力。

[0875] 在本发明的具体实施方案中,RAGE多肽包含RAGE蛋白序列或与RAGE蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％序列同一性或相似性。在一些实施方案中,RAGE蛋白序列对应于哺乳动物RAGE蛋白序列。在一些实施方案中,RAGE蛋白序列衍生自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号Q15109)、小鼠(UniProtKB登录号Q62151)、奶牛(UniProtKB登录号Q28173)、大鼠(UniProtKB登录号Q63495)、猕猴(UniProtKB登录号G7P2Q8)和犬(UniProtKB登录号Q20JV7)。在优选的实施方案中,RAGE蛋白序列对应于人野生型RAGE蛋白序列(例如,UniProtKB登录号Q15109)或这个序列的功能性片段。如下描述了UniProtKB登录号Q15109所定义的人全长野生型蛋白序列:

[0876] MAAGTAVGAWVLVLSLWGAVVGAQNITARIGEPLVLKCKGAPKKPPQRL

[0877] EWKLNTGRTEAWKVLSPQGGGPWDSVARVLPNGSLFLPAVGIQDEGIFRCQAMNRNG KETKSNYRVRVYQIPGKPEIVDSASELTAGVPNKVGTCVSEGSYPAGTLSWHLDGKPL VPNEKGVSVKEQTRRHPETGLFTLQSELMVTPARGGDPRPTFSCSFSPGLPRHRALRTA PIQPRVWEPVPLEEVQLVVEPEGGAVAPGGTVTLTCEVPAQPSPQIHWMKDGVPLPLP PSPVLILPEIGPQDQGTYSCVATHSSHGPQESRAVSISIIEPGEEGPTAGSVGGSGLGTLA LALGILGGLGTAALLIGVILWQRRQRRGEERKAPENQEEEEERAELNQSEEPEAGESST GGP [SEQ ID NO: 14]。

[0878] 野生型RAGE包含五个不同的结构域。RAGE胞外结构域携带三个免疫球蛋白样(Ig)结构域:V、C1和C2结构域(SEQ ID NO:14的残基23-342)。这些Ig结构域分别属于V-型、C-型和S-型。第四个结构域包含单次跨膜(TM)螺旋(SEQ ID NO:14的残基343-361)并最后包含缺少激酶活性并假定为非结构化的胞质尾(SEQ ID NO:14的残基362-404,如SEQ ID NO:1中所述)(参见Neepers,1992)。此外,人野生型RAGE蛋白序列包含一个22氨基酸N端信号肽,其中先前已经显示所述信号肽在运输RAGE蛋白至胞质膜中发挥作用。

[0879] 在整个这份说明书范围内,除非上下文另有要求,否则提到RAGE胞外结构域意指提到野生型RAGE(SEQ ID NO:14)的氨基酸残基23-342。

[0880] 在整个这份说明书范围内,除非上下文另有要求,否则提到RAGE跨膜结构域(或TM)意指提到野生型RAGE (SEQ ID NO:14)的氨基酸残基343-361。

[0881] 在整个这份说明书范围内,除非上下文另有要求,否则提到RAGE胞质尾意指提到野生型RAGE (SEQ ID NO:14)的氨基酸残基362-404。

[0882] 在本发明的一种形式中,RAGE多肽包含截短形式的哺乳动物野生型RAGE蛋白序列。例如,该RAGE多肽序列可以包含这样的人野生型RAGE蛋白序列,其中突变或缺失RAGE胞外结构域的一个或多个配体结合性区域(V型、C型或S型Ig结构域),从而破坏RAGE配体诱导的信号传导。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的RAGE多肽含有如SEQ ID NO:1所示的人野生型RAGE蛋白序列的氨基酸残基362至404。

[0883] RAGE胞质尾(SEQ ID NO:1的残基362-404)负责信号转导。在一些实施方案中,本发明的RAGE多肽包含RAGE胞质尾或其片段或突变、截短或融合片段、由其组成或基本上由其组成。例如,RAGE多肽可以包含如SEQ ID NO:1所示的人野生型RAGE的残基362至404、由其组成或基本上由其组成。

[0884] 3.2编码RAGE多肽的载体和核苷酸序列

[0885] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的RAGE多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[0886] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如Genbank登录号L33412.1、EU570247.1、EU570246.1、EU570245.1、EU570244.1、EU570242.1、EU570241.1、EU570240.1中所述的小鼠AGER核苷酸序列对应的序列。

[0887] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号M91212.1或NM_173982.3中所述的牛AGER核苷酸序列对应的序列。

[0888] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号L33413.1、NM_053336.2中所述的大鼠AGER核苷酸序列对应的序列。

[0889] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号CM001279.1、NM_001205117.1、GU139408.1、GU139409.1、GU139410.1、GU139411.1、GU139412.1、GU139413.1、GU139414.1、GU139415.1、GU139416.1、GU139417.1、GU139418.1、GU139419.1、GU139420.1、GU139421.1、GU139422.1中所述的猕猴AGER核苷酸序列对应的序列。

[0890] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如Genbank登录号DQ125936.1、DQ125937.1、DQ125938.1、DQ125940.1、或DQ125939中所述的犬AGER核苷酸序列对应的序列。

[0891] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号AF001095.1、

AB061668.1、AJ012753.1、Y18060.1、EU826620.1、EU826618.1、EU826617.1、EU826616.1、AF065213.1、AF065212.1、AF065210.1、CU690977.1、CU690976.1、AJ238896.1、Y18762.1中所述的人AGER核苷酸序列对应的序列。在这种类型的一些实施方案中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％序列同一性的AGER核苷酸序列。

[0892] 在一些实施方案中,AGER多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物RAGE蛋白或其片段具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、92％、95％、99％或100％序列同一性。在一些实施方案中,AGER多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物RAGE蛋白或其片段的可读框。

[0893] 3.3 1型血管紧张素II受体(AT_1R)多肽

[0894] 通过AT_1R的G蛋白依赖性信号传导对正常的心血管稳态至关重要,然而在与细胞死亡和组织纤维化相关并导致心脏肥大和心力衰竭的慢性功能障碍方面有害(Ma等人,2010)。

[0895] 尽管其医学意义大且经历数十年研究,仅最近才阐明AT_1R的结构和充分确立的AT_1R阻滞剂(ARB)的结合模型(Zhang等人,2015)。该结构显示,AT_1R的胞外部分由连接螺旋II和III的N末端区段ECL1(人AT_1R的Glu91-Phe96)、连接螺旋IV和V的ECL2(人AT_1R的His166至Ile191)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人AT_1R的Ile270至Cys274)组成。两个二硫键帮助AT_1R的胞外侧面定型,其中Cys18-Cys274连接N末端和ECL3且Cys101-Cys180连接螺旋III和ECL2(类似于与AT_1R共有约36％序列同一性的趋化因子受体CXCR4)。

[0896] 在本发明的具体实施方案中,AT_1R多肽包含AT_1R蛋白序列或与AT_1R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％序列同一性或相似性。

[0897] 在一些实施方案中,AT_1R蛋白序列对应于哺乳动物AT_1R蛋白序列。合适的AT_1R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号P30556)、绵羊(UniProtKB登录号077590)、奶牛(UniProtKB登录号P25104)、兔(UniProtKB登录号P34976)、豚鼠(UniProtKB登录号Q9WV26)、猪(UniProtKB登录号P30555)、黑猩猩(UniProtKB登录号Q9GLN9)、沙鼠(UniProtKB登录号035210、大鼠(UniProtKB登录号P29089)、小鼠(UniProtKB登录号P29754)、猫(UniProtKB登录号M3VVA2)、袋獾(UniProtKB登录号G3WOM6)、马(UniProtKB登录号F7D1NO)和熊猫(UniProtKB登录号D2HWD9)。

[0898] 在一些优选的实施方案中,AT_1R蛋白序列对应于人AT_1R蛋白序列。在一些实施方案中,AT1R多肽包含如下文所述的人全长野生型AT_1R蛋白序列(UniProtKB登录号P30556)或野生型AT_1R蛋白序列的功能性片段。

[0899] MILNSSTEDGIKRIQDDCPKAGRHNYIFVMIPTLYSIIFVVGIFGNSLVVIVIY

FYMKLKTVASVFLLNLALADLCFLLTLPLWAVYTAMEYRWPFGNYLCKIASASVSFN
LYASVFLLTCLSIDRYLAIVHPMKSRLRRTMLVAKVTCIIIWLLAGLASLPAIIHRNVFFI
ENTNITVCAFHYESQNSTLPIGLGLTKNILGFLFPFLIILTSYTLIWKALKKAYEIQKNKP
RNDDIFKIIMAIVLFFFFSWIPHQIFTFLDVLIQLGIIRDCRIADIVDTAMPITICIAYFNNCL
NPLFYGFLGKKFKRYFLQLLKYIPPKAKSHSNLSTKMSTLSYRPSDNVSSSTKKPAPCF
EVE [SEQ ID NO: 16]。

[0900] 在本发明的一种形式中,AT_1R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型AT_1R蛋白序列。例如,AT_1R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型AT_1R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基320-359)。备选地或额外地,AT_1R多肽序列可以包含带N端截短的野生型AT_1R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型AT_1R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基7-16)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的AT_1R多肽含有如SEQ ID NO:16中所述的人野生型AT_1R蛋白序列的氨基酸残基2-6和17-319。

[0901] 3.4编码AT_1R多肽的构建体和核苷酸序列。

[0902] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的AT_1R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[0903] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号KR711424.1、KR711423.1、KR711422.1、KR711421.1、KJ896399.1、KJ896398.1、NM_032049.3、NM_031850.3、NM_004835.4、NM_000685.4、NM_009585.3、DQ895601.2、BC068494.1、BC022447.1、DQ892388.2和AK291541.1中所述的人AT_1R核苷酸(即,对应于AGTR1基因)序列对应的序列。在这种类型的一些实施方案中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的AT_1R核苷酸序列。

[0904] 在一些实施方案中,AT_1R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物AT_1R多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,AT_1R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物AT_1R蛋白或其片段的可读框。

[0905] 3.5腺苷1受体(A1R)多肽

[0906] A1R是重要的心血管系统调节物,并且还具有多种其他作用,如那些在神经系统过程、代谢过程和骨骼过程中的作用(Fredholm等人,2011)。

[0907] 迄今,尚未公开A1R的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征。A1R的胞外部分由N末端区段(人A1R的Met1-Ser4)、连接螺旋II和III的ECL1(人AiR的Pro73-Thr75)、连接螺旋IV和V的ECL2(人A1R的Trp146-Ile175)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人A1R的Pro261-Lys265)组成。认为四个二硫键可以在A1R的胞外侧上形成(如A2A的晶体结构中所见),所述二硫键帮助稳定配体结合性裂隙(Piirainen等人,2011)。

[0908] 在本发明的具体实施方案中,A1R多肽包含A1R蛋白序列或与A1R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[0909] 在一些实施方案中,A1R蛋白序列对应于哺乳动物A1R蛋白序列。合适的A1R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:黑猩猩(UniProtKB登录号H2Q0X8)、奶牛(UniProtKB登录号P28190)、犬(UniProtKB登录号P11616)、豚鼠(UniProtKB登录号P47745)、马(UniProtKB登录号F6RAN5)、人(UniProtKB登录号P30542)、小鼠(UniProtKB登录号Q60612)、熊猫(UniProtKB登录号G1M0W2)、猪(UniProtKB登录号13LEN5)、兔(UniProtKB登录号P34970)、大鼠(UniProtKB登录号008766)、大鼠(UniProtKB登录号P25099)、绵羊(UniProtKB登录号W5NSY0)、袋獾(UniProtKB登录号G3WVA4)。

[0910] 在一些优选的实施方案中,A1R蛋白序列对应于人A1R蛋白序列。在一些实施方案中,A1R多肽包含如下文所述的人全长野生型A1R蛋白序列(UniProtKB登录号P30542)或野生型A1R蛋白序列的功能性片段。

[0911] MPPSISAFQAAYIGIEVLIALVSVPGNVLVIWAVKVNQALRDATFCFIVSLA
VADVAVGALVIPLAILINIGPQTYFHTCLMVACPVLILTQSSILALLAIAVDRYLRVKIPL
RYKMVVTPRRAAVAIAGCWILSFVVGLTPMFGWNNLSAVERAWAANGSMGEPVIKC
EFEKVISMEYMVYFNFFVWVLPPLLLMVLIYLEVFYLIRKQLNKKVSASSGDPQKYYG

[0912] KELKIAKSLALILFLFALSWLPLHILNCITLFCPSCHKPSILTYIAIFLTHGNSAMNPIVYA
FRIQKFRVTFLKIWNDHFRCQPAPPIDEDLPEERPDD [SEQ ID NO: 17]。

[0913] 在本发明的一种形式中,A1R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型A1R蛋白序列。例如,A1R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型A1R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基315-326)。备选地或额外地,A1R多肽序列可以包含带N端截短的野生型A1R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型A1R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基154-161)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的A1R多肽包含如SEQ ID NO:17中所述的人野生型A1R蛋白序列的氨基酸残基2-153和162-314。

[0914] 3.6编码A1R多肽的构建体和核苷酸序列。

[0915] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的A1R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[0916] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号CR541749.1、NM_000674.2、NM_001048230.1、NG_052917.1、KC884744.1、KC881108.1、L22214.1、AY136746.1和BC026340.1中所述的人A1R核苷酸(即,对应于ADORA1基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的A1R核苷酸序列。

[0917] 在一些实施方案中,A1R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物A1R多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,A1R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物A1R蛋白或其片段的可读框。

[0918] 3.7肾上腺素能α1A受体(α1A-AR)多肽

[0919] α1A-AR涉及心血管系统调节、并且尤其似乎介导血压和心脏收缩性升高(Chen和Minneman,2005)。

[0920] 迄今,尚未公开α1A-AR的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征α1A-AR的胞外部分由N末端区段(人α1A-AR的Met1-Asn22)、连接螺旋II和III的ECL1(人α1A-AR的Gly90-Phe94)、连接螺旋IV和V的ECL2(人α1A-AR的Trp165-Glu180)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人α1A-AR的Pro299-Pro303)组成。如同大部分GPCR,α1A-AR可能含有连接ECL1和ECL2的二硫键(Finch等人,2006)。

[0921] 在本发明的具体实施方案中,α1A-AR多肽包含α1A-AR蛋白序列或与α1A-AR蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[0922] 在一些实施方案中,α1A-AR蛋白序列对应于哺乳动物α1A-AR蛋白序列。合适的α1A-AR序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号M3WRU5)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2ROT2)、奶牛(UniProtKB登录号F1MYI6)、犬(UniProtKB登录号A0A0A0MPB9)、沙鼠(UniProtKB登录号E0AE55)、大猩猩(UniProtKB登录号G3QE17)、豚鼠(UniProtKB登录号Q9WU25)、马(UniProtKB登录号F6UTQ3)、人(UniProtKB登录号E7EW16)、小鼠(UniPratKB登录号Q8BUE5)、兔(UniPratKB登录号G1TM07)、大鼠(UniPratKB登录号P70648)、恒河猴(UniPratKB登录号F7DLK7)、绵羊(UniProtKB登录号W5PJ34)。

[0923] 在一些优选的实施方案中,α1A-AR蛋白序列对应于人α1A-AR蛋白序列。在一些实施方案中,α1A-AR多肽包含如下文所述的人全长野生型α1A-AR蛋白序列(UniProtKB登录号E7EW16)或野生型α1A-AR蛋白序列的功能性片段。

[0924] MVFLSGNASDSSNCTQPPAPVNISKAILLGVILGGLILFGVLGNILVILSVACHRHLHSV
THYYIVNLAVADLLLTSTVLPFSAIFEVLGYWAFGRVFCNIWAAVDVLCCTASIMGLCII
SIDRYIGVSYPLRYPTIVTQRRGLMALLCVWALSLVISIGPLFGWRQPAPEDETICQINE
EPGYVLFSALGSFYLPLAIILVMYCRVYVVAKRESRGLKSGLKTDKSDSEQVTLRIHRKN
APAGGSGMASAKTKTHFSVRLLKFSREKKAAKTLGIVVGCFVLCWLPFFLVMPIGSFFPD
FKPSETVFKIVFWLGYLNSCINPIIYPCSSQEFKKAFQNVLRIQCLCRKQSSKHALGYTL
HPPSQAVEGQHKDMVRIPVGSRETFYRISKTDGVCEWKFFSSMPRGSARITVSKDQSSCT TARSSGF
[SEQ ID NO: 18].

[0925] 在本发明的一种形式中,α1A-AR多肽包含截短形式的哺乳动物野生型α1A-AR蛋白序列。例如,α1A-AR多肽序列可以包含带C端截短的人野生型α1A-AR蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基342-413)。备选地或额外地,α1A-AR多肽序列可以包含带N端截短的野生型α1A-AR蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型α1A-AR蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基174-185)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的α1A-AR多肽包含如SEQ ID NO:18中所述的人野生型α1A-AR蛋白序列的氨基酸残基2-173和186-341。

[0926] 3.8编码α1A-AR多肽的构建体和核苷酸序列。

[0927] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的α1A-AR多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[0928] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号AY389505.1、NG_029395.1、NM_001322504.1、NM_001322502.1、NM_033304.3、NM_033303.4、NM_033302.3、

NR_136343.1、NM_000680.3、NM_001322503.1、AY491781.1、AY491780.1、AY491779.1、AY491778.1、AY491777.1和AY491776.1中所述的人α1A-AR核苷酸(即,对应于ADRA1A基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的α1A-AR核苷酸序列。

[0929] 在一些实施方案中,α1A-AR多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物α1A-AR多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,α1A-AR多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物α1A-AR蛋白或其片段的可读框。

[0930] 3.9肾上腺素能α1B受体(α1B-AR)多肽

[0931] α1B-AR参与心血管系统调节、运动活动(locomotor activity)和葡萄糖代谢(Chen和Minneman,2005)。

[0932] 迄今,尚未公开α1B-AR的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征α1B-AR的胞外部分由N末端区段(人α1B-AR的Met1-Thr36)、连接螺旋II和III的ECL1(人α1B-AR的Gly109-Leu113)、连接螺旋IV和V的ECL2(人α1B-AR的Lys185-Glu199)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人α1B-AR的Ser321-Pro325)组成。如同大部分GPCR,α1B-AR可能含有连接ECL1和ECL2的二硫键(Finch等人,2006)。

[0933] 在本发明的具体实施方案中,α1B-AR多肽包含α1B-AR蛋白序列或与α1B-AR蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序同一性或相似性。

[0934] 在一些实施方案中,α1B-AR蛋白序列对应于哺乳动物α1B-AR蛋白序列。合适的α1B-AR序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:黑猩猩(UniProtKB登录号H2QRX4)、奶牛(UniProtKB登录号F1MGA6)、犬(UniProtKB登录号F1PK71)、大猩猩(UniProtKB登录号G3S977)、豚鼠(UniProtKB登录号H0WBQ9)、仓鼠(UniProtKB登录号P18841)、马(UniProtKB登录号F7ATM9)、人(UniProtKB登录号P35368)、狨猴(UniProtKB登录号U3DR86)、小鼠(UniProtKB登录号P97717)、猪(UniProtKB登录号F1RR36)、兔(UniProtKB登录号U3KM59)、大鼠(UniProtKB登录号P15823)、袋獾(UniProtKB登录号G3VWX9)。

[0935] 在一些优选的实施方案中,α1B-AR蛋白序列对应于人α1B-AR蛋白序列。在一些实施方案中,α1B-AR多肽包含如下文所述的人全长野生型α1B-AR蛋白序列(UniProtKB登录号P35368)或野生型α1B-AR蛋白序列的功能性片段。

[0936] MNPDLDTGHNTSAPAHWGELKNANFTGPNQTSSNSTLPQLDITRAISVGLV
LGAFILFAIVGNILVILSVACNRHLRTPTNYFIVNLAMADLLLSFTVLPFSAALEVLGYW

[0937] VLGRIFCDIWAAVDVLCCTASILSLCAISIDRYIGVRYSLQYPTLVTRRKAILALLSVWV LSTVISIGPLLGWKEPAPNDDKECGVTEEPFYALFSSLGSFYIPLAVILVMYCRVYIVAK RTTKNLEAGVMKEMSNSKELTLRIHSKNFHEDTLSSTKAKGHNPRSSIAVKLFKFSREK KAAKTLGIVVGMFILCWLPFFIALPLGSLFSTLKPPDAVFKVVFWLGYFNSCLNPIIYPC SSKEFKRAFVRILGCQCRGRGRRRRRRRRRLGGCAYTYRPWTRGGSLERSQSRKDSLD DSGSCLSGSQRTLPSASPSPGYLGRGAPPPVELCAFPEWKAPGALLSLPAPEPPGRRGR HDSGPLFTFKLLTEPESPGTDGGASNGGCEAAADVANGQPGFKSNMPLAPGQF [SEQ ID NO: 19]。

[0938] 在本发明的一种形式中,α1B-AR多肽包含截短形式的哺乳动物野生型α1B-AR蛋白序列。例如,α1B-AR多肽序列可以包含带C端截短的人野生型α1B-AR蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基365-520)。备选地或额外地,α1B-AR多肽序列可以包含带N端截短的野生型α1B-AR蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型α1B-AR蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基186-196)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的α1B-AR多肽包含如SEQ ID NO:19中所述的人野生型α1B-AR蛋白序列的氨基酸残基2-185和197-364。

[0939] 3.10编码α1B-AR多肽的构建体和核苷酸序列。

[0940] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的α1B-AR多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[0941] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_000679.3、AY530191.1、EU332831.1、BC136569.1和BC136568.1中所述的人α1B-AR核苷酸(即,对应于ADRA1B基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的α1B-AR核苷酸序列。

[0942] 在一些实施方案中,α1B-AR多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物α1B-AR多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,α1B-AR多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物α1B-AR蛋白或其片段的可读框。

[0943] 3.11肾上腺素能α2B受体(α2B-AR)多肽

[0944] α2B-AR是一种表征不好的GPCR,然而它似乎涉及血压调节以及在发育过程中具有作用(Kable等人,2000)。

[0945] 迄今,尚未公开α2B-AR的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征α2B-AR的胞外部分由N末端区段(人α2B-AR的Met1-Ser8)、连接螺旋II和III的ECL1(人α2B-AR的Gly76-Phe80)、连接螺旋IV和V的ECL2(人α2B-AR的Lys151-Gln168)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人α2B-AR的Pro395-Val400)组成。

[0946] 在本发明的具体实施方案中,α2B-AR多肽包含α2B-AR蛋白序列或与α2B-AR蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[0947] 在一些实施方案中,α2B-AR蛋白序列对应于哺乳动物α2B-AR蛋白序列。合适的α2B-AR序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号M3X1F7)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2RHZ6)、奶牛(UniProtKB登录号G3X6S2)、犬(UniProtKB登录号F1Q1Q4)、大猩猩(UniProtKB登录号G3RMW6)、豚鼠(UniProtKB登录号Q60475)、马(UniProtKB登录号F7BW54)、人(UniProtKB登录号P18089)、狨猴(UniProtKB登录号F7IPR3)、小鼠(UniProtKB登录号P30545)、猪(UniProtKB登录号Q38PT0)、兔(UniProtKB登录号G1TQL5)、大鼠(UniProtKB登录号P19328)、袋獾(UniProtKB登录号G3VWZ4)。

[0948] 在一些优选的实施方案中,α2B-AR蛋白序列对应于人α2B-AR蛋白序列。在一些实施方案中,α2B-AR多肽包含如下文所述的人全长野生型α2B-AR蛋白序列(UniProtKB登录号P18089)或野生型α2B-AR蛋白序列的功能性片段。

[0949] MDHQDPYSVQATAAIAAAITFLILFTIFGNALVILAVLTSRSLRAPQNLFLVS
LAAADILVATLIIPFSLANELLGYWYFRRTWCEVYLALDVLFCTSSIVHLCAISLDRYW
AVSRALEYNSKRTPRRIKCIILTVWLIAAVISLPPLIYKGDQGPQPRGRPQCKLNQEAWY
ILASSIGSFFAPCLIMILVYLRIYLIAKRSNRRGPRAKGGPGQGESKQPRPDHGGALASA
KLPALASVASAREVNGHSKSTGEKEEGETPEDTGTRALPPSWAALPNSGQGQKEGVC
GASPEDEAEEEEEEEEEEECEPQAVPVSPASACSPPLQQPQGSRVLATLRGQVLLGRG
VGAIGGQWWRRRAQLTREKRFTFVLAVVIGVFVLCWFPFFFSYSLGAICPKHCKVPHG
LFQFFFWIGYCNSSLNPVIYTIFNQDFRRAFRRILCRPWTQTAW [SEQ ID NO: 20]。

[0950] 在本发明的一种形式中,α2B-AR多肽包含截短形式的哺乳动物野生型α2B-AR蛋白序列。例如,α2B-AR多肽序列可以包含带C端截短的人野生型α2B-AR蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基440-447)。备选地或额外地,α2B-AR多肽序列可以包含带N端截短的野生型α2B-AR蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型α2B-AR蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基153-161)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的α2B-AR多肽包含如SEQ ID NO:20中所述的人野生型α2B-AR蛋白序列的氨基酸残基2-152和162-439。

[0951] 3.12编码α2B-AR多肽的构建体和核苷酸序列。

[0952] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的a2B-AR多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[0953] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_000682.6、HF583494.1、EU332847.1、NG_032950.1、AF316895.1、DQ057076.1、BC136537.1、BC133021.1和AY548167.1中所述的人α2B-AR核苷酸(即,对应于ADRA2B基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的α2B-AR核苷酸序列。

[0954] 在一些实施方案中,α2B-AR多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物α2B-AR多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,α2B-AR多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳

动物α2B-AR蛋白或其片段的可读框。

[0955] 3.13缓激肽受体B2(B2R)多肽

[0956] B2R最常见地因其介导血管舒张以及水和盐丢失而与具有低血压作用相关,然而它还涉及炎症、增殖、凋亡和血管生成(Blaes和Girolami,2013)。

[0957] 迄今,尚未公开B2R的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征B2R的胞外部分由N末端区段(人B2R的Met1-Gly54)、连接螺旋II和III的ECL1(人B2R的Asn120-Phe125)、连接螺旋IV和V的ECL2(人B2R的Thr197-Ile219)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人B2R的Ile300-Ser302)组成。如同大部分GPCR,B2R可能含有连接ECL1和ECL2的二硫键(Leeb-Lundberg等人,2005)。

[0958] 在本发明的具体实施方案中,B2R多肽包含B2R蛋白序列或与B2R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[0959] 在一些实施方案中,B2R蛋白序列对应于哺乳动物B2R蛋白序列。合适的B2R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:蝙蝠(UniProtKB登录号G1Q158)、猫(UniProtKB登录号M3WR05)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2Q8W1)、奶牛(UniProtKB登录号F1MWK0)、犬(UniProtKB登录号Q9BDQ4)、豚鼠(UniProtKB登录号O70526)、人(UniProtKB登录号P30411)、狨猴(UniProtKB登录号U3CVS9)、小鼠(UniProtKB登录号P32299)、熊猫(UniProtKB登录号G1LAZ3)、猪(UniProtKB登录号Q9GLX8)、兔(UniProtKB登录号Q28642)、大鼠(UniProtKB登录号P25023)、绵羊(UniProtKB登录号W5Q382)。

[0960] 在一些优选的实施方案中,B2R蛋白序列对应于人B2R蛋白序列。在一些实施方案中,B2R多肽包含如下文所述的人全长野生型B2R蛋白序列(UniProtKB登录号P30411)或野生型B2R蛋白序列的功能性片段。

[0961] MFSPWKISMFLSVREDSVPTTASFSADMLNVTLQGPTLNGTFAQSKCPQVE
WLGWLNTIQPPFLWVLFVLATLENIFVLSVFCLHKSSCTVAEIYLGNLAAADLILACGL
PFWAITISNNFDWLFGETLCRVVNAIISMNLYSSICFLMLVSIDRYLALVKTMSMGRMR
GVRWAKLYSLVIWGCTLLLSSPMLVFRTMKEYSDEGHNVTACVISYPSLIWEVFTNML
LNVVGFLLPLSVITFCTMQIMQVLRNNEMQKFKEIQTERRATVLVLVVLLLFIICWLPF
QISTFLDTLHRLGILSSCQDERIIDVITQIASFMAYSNSCLNPLVYVIVGKRFRKKSWEVY
QGVCQKGGCRSEPIQMENSMGTLRTSISVERQIHKLQDWAGSRQ [SEQ ID NO: 21]。

[0962] 在本发明的一种形式中,B2R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型B2R蛋白序列。例如,B2R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型B2R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基351-391)。备选地或额外地,B2R多肽序列可以包含带N端截短的野生型B2R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型B2R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基199-208)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的B2R多肽包含如SEQ ID NO:21中所述的人野生型B2R蛋白序列的氨基酸残基2-198和209-350。

[0963] 3.14编码B2R多肽的构建体和核苷酸序列。

[0964] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的B2R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[0965] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号HF583430.1、AY275465.1、NM_000623.3、KJ950628.1、AF378542.2、BC074894.2和BC074895.2中所述的人B2R核苷酸(即,对应于BDKRB2基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的B2R核苷酸序列。

[0966] 在一些实施方案中,B2R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物B2R多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,B2R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物B2R蛋白或其片段的可读框。

[0967] 3.15CC趋化因子受体CCR1(CCR1)多肽

[0968] 如同全部趋化因子受体,CCR1参与介导炎症过程。它存在于T细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞中并且与类风湿性关节炎和多发性硬化相关(Charo和Ransohoff,2006)。

[0969] 迄今,尚未公开CCR1的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征CCR1的胞外部分由N末端区段(人CCR1的Met1-Asn28)、连接螺旋II和III的ECL1(人CCR1的Asp 97-Phe101)、连接螺旋IV和V的ECL2(人CCR1的Lys173-Ser191)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人CCR1的Thr270-His271)组成。如同全部趋化因子受体,N末端似乎对配体结合和受体活化至关重要(Kufareva等人,2015)。

[0970] 在本发明的具体实施方案中,CCR1多肽包含CCR1蛋白序列或与CCR1蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[0971] 在一些实施方案中,CCR1蛋白序列对应于哺乳动物CCR1蛋白序列。合适的CCR1序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号B6DXF4)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2QMG4)、奶牛(UniProtKB登录号A0JN72)、犬(UniProtKB登录号Q2V0Q7)、大猩猩(UniProtKB登录号G3RL29)、马(UniProtKB登录号F6U0D1)、人(UniProtKB登录号P32246)、狨猴(UniProtKB登录号Q9MYJ8)、小鼠(UniProtKB登录号P51675)、猪(UniProtKB登录号Q6YST0)、兔(UniProtKB登录号Q9MYJ9)、大鼠(UniProtKB登录号Q9JLY8)、恒河猴(UniProtKB登录号F6QJR2)、绵羊(UniProtKB登录号W5PXX5)。

[0972] 在一些优选的实施方案中,CCR1蛋白序列对应于人CCR1蛋白序列。在一些实施方案中,CCR1多肽包含如下文所述的人全长野生型CCR1蛋白序列(UniProtKB登录号P32246)或野生型CCR1蛋白序列的功能性片段。

[0973] METPNTTEDYDTTTEFDYGDATPCQKVNERAFGAQLLPPLYSLVFVIGLVG

NILVVLVLVQYKRLKNMTSIYLLNLAISDLLFLFTLPFWIDYKLKDDWVFGDAMCKILS
GFYYTGLYSEIFFIILLTIDRYLAIVHAVFALRARTVTFGVITSIIIWALAILASMPGLYFS
KTQWEFTHHTCSLHFPHESLREWKLFQALKLNLFGLVLPLLVMIICYTGIIKILLRRPNE
KKSKAVRLIFVIMIIFFLFWTPYNLTILISVFQDFLFTHECEQSRHLDLAVQVTEVIAYTH
CCVNPVIYAFVGERFRKYLRQLFHRRVAVHLVKWLPFLSVDRLERVSSTSPSTGEHELS
AGF [SEQ ID NO: 22]。

[0974] 在本发明的一种形式中,CCR1多肽包含截短形式的哺乳动物野生型CCR1蛋白序列。例如,CCR1多肽序列可以包含带C端截短的人野生型CCR1蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基318-355)。备选地或额外地,CCR1多肽序列可以包含带N端截短的野生型CCR1蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型CCR1蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基174-182)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的CCR1多肽包含如SEQ ID NO:22中所述的人野生型CCR1蛋白序列的氨基酸残基2-173和183-317。

[0975] 3.16编码CCR1多肽的构建体和核苷酸序列。

[0976] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的CCR1多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[0977] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_001295.2、AF051305.1、BC064991.1和BC051306.1中所述的人CCR1核苷酸(即,对应于CCR1基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的CCR1核苷酸序列。

[0978] 在一些实施方案中,CCR1多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物CCR1多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,CCR1多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物CCR1蛋白或其片段的可读框。

[0979] 3.17CC趋化因子受体CCR2(CCR2)多肽

[0980] 如同全部趋化因子受体,CCR2参与介导炎症过程。它存在于单核细胞、树状细胞和记忆T细胞中并且与动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、多发性硬化、胞内病原体抗性和2型糖尿病相关(Charo和Ransohoff,2006)。

[0981] 最近已经发表CCR2的晶体结构(Zheng等人,2016),从而深入了解其配体结合模式和活化过程。CCR2的胞外部分由N末端区段(人CCR2的Met1-D36)、连接螺旋II和III的ECL1(人CCR2的Glu105-Phe108)、连接螺旋IV和V的ECL2(人CCR2的Lys180-Phe194)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人CCR2的Leu274-Ser275)组成。如同全部趋化因子受体,预期CCR2在其胞外结构域中具有两个保守的二硫键(Zheng等人,2016)。

[0982] 在本发明的具体实施方案中,CCR2多肽包含CCR2蛋白序列或与CCR2蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列一性或相似性。

[0983] 在一些实施方案中,CCR2蛋白序列对应于哺乳动物CCR2蛋白序列。合适的CCR2序

列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:黑猩猩(UniProtKB登录号H2QMG5)、奶牛(UniProtKB登录号D9ZDD9)、大猩猩(UniProtKB登录号G3S6T3)、豚鼠(UniProtKB登录号H0VII5)、马(UniProtKB登录号B3SPX1)、人(UniProtKB登录号P41597)、狨猴(UniProtKB登录号F7DT70)、小鼠(UniProtKB登录号P51683)、熊猫(UniProtKB登录号G1MMF1)、猪(UniProtKB登录号Q6YT42)、兔(UniProtKB登录号G1SK57)、大鼠(UniProtKB登录号055193)、恒河猴(UniProtKB登录号018793)、绵羊(UniProtKB登录号W5PXU4)。

[0984] 在一些优选的实施方案中,CCR2蛋白序列对应于人CCR2蛋白序列。在一些实施方案中,CCR2多肽包含如下文所述的人全长野生型CCR2蛋白序列(UniProtKB登录号P41597)或野生型CCR2蛋白序列的功能性片段。

[0985] MLSTSRSRFIRNTNESGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLYSLV FIFGFVGNMLVVLILINCKKLKCLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAHSAANEWVFGNA MCKLFTGLYHIGYFGGIFFIILLTIDRYLAIVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWLVAVFA SVPGIIFTKCQKEDSVYVCGPYFPRGWNNFHTIMRNILGLVLPLLIMVICYSGILKTLLR CRNEKKRHRAVRVIFTIMIVYFLFWTPYNIVILLNTFQEFFGLSNCESTSQLDQATQVTE TLGMTHCCINPIIYAFVGEKFRSLFHIALGCRIAPLQKPVCGGPGVRPGKNVKVTTQGL LDGRGKGKSIGRAPEASLQDKEGA [SEQ ID NO: 23]。

[0986] 在本发明的一种形式中,CCR2多肽包含截短形式的哺乳动物野生型CCR2蛋白序列。例如,CCR2多肽序列可以包含带C端截短的人野生型CCR2蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基322-374)。备选地或额外地,CCR2多肽序列可以包含带N端截短的野生型CCR2蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型CCR2蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基182-199)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的CCR2多肽包含如SEQ ID NO:23中所述的人野生型CCR2蛋白序列的氨基酸残基2-181和200-321。

[0987] 3.18编码CCR2多肽的构建体和核苷酸序列。

[0988] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的CCR2多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[0989] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_001123396.1、NM_001123041.2、NG_021428.1、KC248079.1、KC248078.1、KC248077.1、KC248076.1、KC248075.1、KC248074.1、KC248073.1、KC248072.1、KC248071.1、KC248070.1、AF545480.1、BC126452.1和BC095540.1中所述的人CCR2核苷酸(即,对应于CCR2基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的CCR2核苷酸序列。

[0990] 在一些实施方案中,CCR2多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物CCR2多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,CCR2多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物CCR2蛋白或其片段的可读框。

[0991] 3.19CC趋化因子受体CCR3(CCR3)多肽

[0992] 如同全部趋化因子受体,CCR3参与介导炎症过程。它存在于嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、Th2细胞和血小板中并且与过敏性哮喘和鼻炎相关(Charo和Ransohoff,2006)。

[0993] 迄今,尚未公开CCR3的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征CCR3的胞外部分由N末端区段(人CCR3的Met1-Asp28)、连接螺旋II和III的ECL1(人CCR3的His97-Phe101)、连接螺旋IV和V的ECL2(人CCR3的Glu173-Thr191)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人CCR3的Gly270-Asn271)组成。如同全部趋化因子受体,预期CCR3在其胞外结构域中具有两个保守的二硫键(Zheng等人,2016)。

[0994] 在本发明的具体实施方案中,CCR3多肽包含CCR3蛋白序列或与CCR3蛋白序列共有.至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[0995] 在一些实施方案中,CCR3蛋白序列对应于哺乳动物CCR3蛋白序列。合适的CCR3序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号M3WZ27)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2R0Z4)、奶牛(UniProtKB登录号F1MP16)、犬(UniProtKB登录号Q64H34)、豚鼠(UniProtKB登录号Q9Z2I3)、马(UniProtKB登录号F6UH12)、人(UniProtKB登录号P51677)、狨猴(UniProtKB登录号F7DTA4)、小鼠(UniProtKB登录号Q8BHB8)、熊猫(UniProtKB登录号G1MMC8)、猪(UniProtKB登录号Q75ZH4)、兔(UniProtKB登录号B5SU39)、大鼠(UniProtKB登录号054814)、绵羊(UniProtKB登录号W5PXW1)。

[0996] 在一些优选的实施方案中,CCR3蛋白序列对应于人CCR3蛋白序列。在一些实施方案中,CCR3多肽包含如下文所述的人全长野生型CCR3蛋白序列(UniProtKB登录号P51677)或野生型CCR3蛋白序列的功能性片段。

[0997] MTTSLDTVETFGTTSYYDDVGLLCEKADTRALMAQFVPPLYSLVFTVGLL GNVVVVMILIKYRRLRIMTNIYLLNLAISDLLFLVTLPFWIHYVRGHNWVFGHGMCKL LSGFYHTGLYSEIFFIILLTIDRYLAIVHAVFALRARTVTFGVITSIVTWGLAVLAALPEFI FYETEELFEETLCSALYPEDTVYSWRHFHTLRMTIFCLVLPLLVMAICYTGIIKTLLRCP SKKKYKAIRLIFVIMAVFFIFWTPYNVAILLSSYQSILFGNDCERSKHLDLVMLVTEVIA YSHCCMNPVIYAFVGERFRKYLRHFFHRHLLMHLGRYIPFLPSEKLERTSSVSPSTAEPE LSIVF [SEQ ID NO: 24]。

[0998] 在本发明的一种形式中,CCR3多肽包含截短形式的哺乳动物野生型CCR3蛋白序列。例如,CCR3多肽序列可以包含带C端截短的人野生型CCR3蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基318-355)。备选地或额外地,CCR3多肽序列可以包含带N端截短的野生型CCR3蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型CCR3蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基175-187)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的CCR3多肽包含如SEQ ID NO:24中所述的人野生型CCR3蛋白序列的氨基酸残基2-174和188-317。

[0999] 3.20编码CCR3多肽的构建体和核苷酸序列。

[1000] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的CCR3多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1001] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_178329.2、NM_001837.3、NM_001164680.1、NM_178328.1、AH009867.2、AF247361.1、AF262303.1、AF262302.1、AF262301.1、AF262300.1、AF262299.1、AH010691.2、AF224495.1、AF247360.1、AF247359.1和AF026535.1中所述的人CCR3核苷酸(即,对应于CCR3基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的CCR3核苷酸序列。

[1002] 在一些实施方案中,CCR3多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物CCR3多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,CCR3多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物CCR3蛋白或其片段的可读框。

[1003] 3.21CC趋化因子受体CCR4(CCR4)多肽

[1004] 如同全部趋化因子受体,CCR4参与介导炎症过程。它存在于T细胞(Th2)、树状细胞(成熟)、嗜碱性粒细胞、巨噬细胞和血小板中并且与寄生虫感染、移植排斥和T细胞归巢至皮肤相关(Charo和Ransohoff,2006)。

[1005] 迄今,尚未公开CCR4的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征。CCR4的胞外部分由N末端区段(人CCR4的Met1-Gly33)、连接螺旋II和III的ECL1(人CCR4的Gln102-Phe105)、连接螺旋IV和V的ECL2(人CCR4的Thr177-Asn194)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人CCR4的Leu273-Gln274)组成。如同全部趋化因子受体,预期CCR4在其胞外结构域中具有两个保守的二硫键(Zheng等人,2016)。

[1006] 在本发明的具体实施方案中,CCR4多肽包含CCR4蛋白序列或与CCR4蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1007] 在一些实施方案中,CCR4蛋白序列对应于哺乳动物CCR4蛋白序列。合适的CCR4序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号M3VZE0)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2QM91)、奶牛(UniProtKB登录号A6QLA5)、犬(UniProtKB登录号Q8MJW8)、大猩猩(UniProtKB登录号G3RC17)、豚鼠(UniProtKB登录号H0V3A3)、马(UniProtKB登录号F6RJT2)、人(UniProtKB登录号P51679)、狨猴(UniProtKB登录号F7F2B0)、小鼠(UniProtKB登录号P51680)、猪(UniProtKB登录号13L552)、兔(UniProtKB登录号G1TXV0)、大鼠(UniProtKB登录号Q91ZH4)、绵羊(UniProtKB登录号W5Q1A7)。

[1008] 在一些优选的实施方案中,CCR4蛋白序列对应于人CCR4蛋白序列。在一些实施方案中,CCR4多肽包含如下文所述的人全长野生型CCR4蛋白序列(UniProtKB登录号P51679)或野生型CCR4蛋白序列的功能性片段。

[1009] MNPTDIADTTLDESIYSNYYLYESIPKPCTKEGIKAFGELFLPPLYSLVFVFG

LLGNSVVVLVLFKYKRLRSMTDVYLLNLAISDLLFVFSLPFWGYYAADQWVFGLGLC
KMISWMYLVGFYSGIFFVMLMSIDRYLAIVHAVFSLRARTLTYGVITSLATWSVAVFA
SLPGFLFSTCYTERNHTYCKTKYSLNSTTWKVLSSLEINILGLVIPLGIMLFCYSMIIRTL
QHCKNEKKNKAVKMIFAVVVLFLGFWTPYNIVLFLETLVELEVLQDCTFERYLDYAIQ
ATETLAFVHCCLNPIIYFFLGEKFRKYILQLFKTCRGLFVLCQYCGLLQIYSADTPSSSYT
QSTMDHDLHDAL [SEQ ID NO: 25]。

[1010] 在本发明的一种形式中,CCR4多肽包含截短形式的哺乳动物野生型CCR4蛋白序列。例如,CCR4多肽序列可以包含带C端截短的人野生型CCR4蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基321-360)。备选地或额外地,CCR4多肽序列可以包含带N端截短的野生型CCR4蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型CCR4蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基179-189)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的CCR4多肽包含如SEQ ID NO:25中所述的人野生型CCR4蛋白序列的氨基酸残基2-178和190-320。

[1011] 3.22编码CCR4多肽的构建体和核苷酸序列。

[1012] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的CCR4多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1013] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号AY322539.1、NC_000005.10、NM_005508.4、EF064759.1、BC074935.2、BC071751.1和BC069139.1中所述的人CCR4核苷酸(即,对应于CCR4基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的CCR4核苷酸序列。

[1014] 在一些实施方案中,CCR4多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物CCR4多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,CCR4多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物CCR4蛋白或其片段的可读框。

[1015] 3.23CC趋化因子受体CCR5(CCR5)多肽

[1016] 如同全部趋化因子受体,CCR5参与介导炎症过程。它存在于T细胞和单核细胞中并且与HIV-1感染和移植排斥相关(Charo和Ransohoff,2006)。

[1017] 已经解析CCR5的晶体结构(Tan等人,2013),从而深入了解其配体结合模式和活化过程。CCR5的胞外部分由N末端区段(人CCR5的Met1-Asn24)、连接螺旋II和III的ECL1(人CCR5的Gln93-Phe96)、连接螺旋IV和V的ECL2(人CCR5的Arg168-Gln186)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人CCR5的Leu266-Asn267)组成。如对全部趋化因子受体预期,CCR5在其胞外结构域中具有两个保守的二硫键(Tan等人,2013)。

[1018] 在本发明的具体实施方案中,CCR5多肽包含CCR5蛋白序列或与CCR5蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1019] 在一些实施方案中,CCR5蛋白序列对应于哺乳动物CCR5蛋白序列。合适的CCR5序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号

A4ZY83)、黑猩猩(UniProtKB登录号P56440)、奶牛(UniProtKB登录号Q2HJ17)、犬(UniProtKB登录号Q5ECR9)、山羊(UniProtKB登录号F5B6L8)、大猩猩(UniProtKB登录号P56439)、马(UniProtKB登录号A4ZZ54)、人(UniProtKB登录号P51681)、狨猴(UniProtKB登录号Q6WN98)、小鼠(UniProtKB登录号P51682)、猪(UniProtKB登录号Q6YT41)、兔(UniProtKB登录号Q1ZY22)、大鼠(UniProtKB登录号008556)、绵羊(UniProtKB登录号B7T903)。

[1020] 在一些优选的实施方案中,CCR5蛋白序列对应于人CCR5蛋白序列。在一些实施方案中,CCR5多肽包含如下文所述的人全长野生型CCR5蛋白序列(UniProtKB登录号P51681)或野生型CCR5蛋白序列的功能性片段。

[1021] MDYQVSSPIYDINYYTSEPCQKINVKQIAARLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVIL
ILINCKRLKSMTDIYLLNLAISDLFFLLTVPFWAHYAAAQWDFGNTMCQLLTGLYFIGF
FSGIFFIILLTIDRYLAVVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWVVAVFASLPGIIFTRSQKEG
LHYTCSSHFPYSQYQFWKNFQTLKIVILGLVLPLLVMVICYSGILKTLLRCRNEKKRHR
AVRLIFTIMIVYFLFWAPYNIVLLLNTFQEFFGLNNCSSSNRLDQAMQVTETLGMTHCC
INPIIYAFVGEKFRNYLLVFFQKHIAKRFCKCCSIFQQEAPERASSVYTRSTGEQEISVGL
[SEQ ID NO: 26]。

[1022] 在本发明的一种形式中,CCR5多肽包含截短形式的哺乳动物野生型CCR5蛋白序列。例如,CCR5多肽序列可以包含带C端截短的人野生型CCR5蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基314-352)。备选地或额外地,CCR5多肽序列可以包含带N端截短的野生型CCR5蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型CCR5蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基171-181)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的CCR5多肽包含如SEQ ID NO:26中所述的人野生型CCR5蛋白序列的氨基酸残基2-170和182-313。

[1023] 3.24编码CCR5多肽的构建体和核苷酸序列。

[1024] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的CCR5多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1025] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号AY463215.1、GQ121035.1、AH005786.2、NM_000579.3、NM_001100168.1、AF056019.1、AB182990.1、AB182984.1、AB182986.1、AF011537.1、AF011532.1、AF011525.1、AF011521.1、JQ291232.1、EF202089.1、AF052539.1中所述的人CCR5核苷酸(即,对应于CCR5基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的CCR5核苷酸序列。

[1026] 在一些实施方案中,CCR5多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物CCR5多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,CCR5多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物CCR5蛋白或其片段的可读框。

[1027] 3.25CC趋化因子受体CCR6(CCR6)多肽

[1028] 如同全部趋化因子受体,CCR6参与介导炎症过程。它存在于T细胞(调节性和记忆型T细胞)、B细胞和树状细胞中并且与粘膜体液免疫、过敏性哮喘和肠道T细胞归巢相关(Charo和Ransohoff,2006)。

[1029] 迄今,尚未公开CCR4的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征。CCR6的胞外部分由N末端区段(人CCR6的Met1-Glu40)、连接螺旋II和III的ECL1(人CCR6的Gly109-Phe113)、连接螺旋IV和V的ECL2(人CCR6的Gln187-Glu206)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人CCR6的Asn285-Arg286)组成。如同全部趋化因子受体,预期CCR6在其胞外结构域中具有两个保守的二硫键(Zheng等人,2016)。

[1030] 在本发明的具体实施方案中,CCR6多肽包含CCR6蛋白序列或与CCR6蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1031] 在一些实施方案中,CCR6蛋白序列对应于哺乳动物CCR6蛋白序列。合适的CCR6序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号M3WPJ2)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2QU13)、奶牛(UniProtKB登录号F1MT56)、犬(UniProtKB登录号J9P428)、大猩猩(UniProtKB登录号G3R6S8)、豚鼠(UniProtKB登录号H0WBT8)、马(UniProtKB登录号F6PP77)、人(UniProtKB登录号P51684)、狨猴(UniProtKB登录号F6PMZ8)、小鼠(UniProtKB登录号054689)、猪(UniProtKB登录号I3LBI5)、兔(UniProtKB登录号G1U041)、大鼠(UniProtKB登录号Q5BK58)、绵羊(UniProtKB登录号W5P4D1)。

[1032] 在一些优选的实施方案中,CCR6蛋白序列对应于人CCR6蛋白序列。在一些实施方案中,CCR6多肽包含如下文所述的人全长野生型CCR6蛋白序列(UniProtKB登录号P51684)或野生型CCR6蛋白序列的功能性片段。

[1033] MSGESMNFSDVFDSSEDYFVSVNTSYYSVDSEMLLCSLQEVRQFSRLFVPI
AYSLICVFGLLGNILVVITFAFYKKARSMTDVYLLNMAIADILFVLTLPFWAVSHATGA
WVFSNATCKLLKGIYAINFNCGMLLLTCISMDRYIAIVQATKSFRLRSRTLPRSKIICLV
VWGLSVIISSSTFVFNQKYNTQGSDVCEPKYQTVSEPIRWKLLMLGLELLFGFFIPLMF
MIFCYTFIVKTLVQAQNSKRHKAIRVIIAVVLVFLACQIPHNMVLLVTAANLGKMNRS
CQSEKLIGYTKTVTEVLAFLHCCLNPVLYAFIGQKFRNYFLKILKDLWCVRRKYKSSGF
SCAGRYSENISRQTSETADNDNASSFTM [SEQ ID NO: 27]。

[1034] 在本发明的一种形式中,CCR6多肽包含截短形式的哺乳动物野生型CCR6蛋白序列。例如,CCR6多肽序列可以包含带C端截短的人野生型CCR6蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基333-374)。备选地或额外地,CCR6多肽序列可以包含带N端截短的野生型CCR6蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型CCR6蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基191-202)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的CCR6多肽包含如SEQ ID NO:27中所述的人野生型CCR6蛋白序列的氨基酸残基2-190和203-332。

[1035] 3.26编码CCR6多肽的构建体和核苷酸序列。

[1036] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的CCR6多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1037] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_004367.5、NM_031409.3、AY242126.1、BC037960.1和U45984.1中所述的人CCR6核苷酸(即,对应于CCR6基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的CCR6核苷酸序列。

[1038] 在一些实施方案中,CCR6多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物CCR6多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,CCR6多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物CCR6蛋白或其片段的可读框。

[1039] 3.27CC趋化因子受体CCR7(CCR7)多肽

[1040] 如同全部趋化因子受体,CCR7参与介导炎症过程。它存在于T细胞和成熟树状细胞中并且与T细胞和树状细胞运输至淋巴结、抗原呈递和细胞免疫相关(Charo和Ransohoff,2006)。

[1041] 迄今,尚未公开CCR7的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征CCR7的胞外部分由N末端区段(人CCR7的Met1-Asp52)、连接螺旋II和III的ECL1(人CCR7的Ser121-Phe124)、连接螺旋IV和V的ECL2(人CCR7的Asp198-Val217)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人CCR7的Thr294-Ser296)组成。如同全部趋化因子受体,预期CCR7在其胞外结构域中具有两个保守的二硫键(Zheng等人,2016)。

[1042] 在本发明的具体实施方案中,CCR7多肽包含CCR7蛋白序列或与CCR7蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1043] 在一些实施方案中,CCR7蛋白序列对应于哺乳动物CCR7蛋白序列。合适的CCR7序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:小鼠(UniProtKB登录号P47774)、人(UniProtKB登录号P32248)、大鼠(UniProtKB登录号Q6U2D6)、猪(UniProtKB登录号Q861S1)、奶牛(UniProtKB登录号A0JNA6)、犬(UniProtKB登录号J9P893)、兔(UniProtKB登录号G1TKJ1)、狨猴(UniProtKB登录号F6R3A6)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2R9P0)、袋獾(UniProtKB登录号G3WAF3)、绵羊(UniProtKB登录号W5PZG4)、豚鼠(UniProtKB登录号H0VL65)、猫(UniProtKB登录号M3WBU1)、马(UniProtKB登录号F6SPH5)。

[1044] 在一些优选的实施方案中,CCR7蛋白序列对应于人CCR7蛋白序列。在一些实施方案中,CCR7多肽包含如下文所述的人全长野生型CCR7蛋白序列(UniProtKB登录号P32248)或野生型CCR7蛋白序列的功能性片段。

[1045] MDLGKPMKSVLVVALLVIFQVCLCQDEVTDDYIGDNTTVDYTLFESLCSK
KDVRNFKAWFLPIMYSIICFVGLLGNGLVVLTYIYFKRLKTMTDTYLLNLAVADILFLL
TLPFWAYSAAKSWVFGVHFCKLIFAIYKMSFFSGMLLLLCISIDRYVAIVQAVSAHRHR
ARVLLISKLSCVGIWILATVLSIPELLYSDLQRSSSEQAMRCSLITEHVEAFITIQVAQMV
IGFLVPLLAMSFCYLVIIRTLLQARNFERNKAIKVIIAVVVVFIVFQLPYNGVVLAQTVA
NFNITSSTCELSKQLNIAYDVTYSLACVRCCVNPFLYAFIGVKFRNDLFKLFKDLGCLS
QEQLRQWSSCRHIRRSSMSVEAETTTTFSP [SEQ ID NO: 28]。

[1046] 在本发明的一种形式中,CCR7多肽包含截短形式的哺乳动物野生型CCR7蛋白序列。例如,CCR7多肽序列可以包含带C端截短的人野生型CCR7蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基358-378)。备选地或额外地,CCR7多肽序列可以包含带N端截短的野生型CCR7蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型CCR7蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基201-209)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的CCR7多肽包含如SEQ ID NO:28中所述的人野生型CCR7蛋白序列的氨基酸残基2-200和210-357。

[1047] 3.28编码CCR7多肽的构建体和核苷酸序列

[1048] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的CCR7多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1049] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_001301718.1、NM_001301717.1、NM_001301716.1、NM_001301714.1、NM_001838.3、EF064758.1、NC_000017.11、NC_018928.2、CM000268.1、BC035343.1中所述的人CCR7核苷酸(即,对应于CCR7基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的CCR7核苷酸序列。

[1050] 在一些实施方案中,CCR7多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物CCR7多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,CCR7多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物CCR7蛋白或其片段的可读框。

[1051] 3.29CC趋化因子受体CCR9(CCR9)多肽

[1052] 如同全部趋化因子受体,CCR9涉及介质炎症过程。它存在于T细胞和IgA+浆细胞中并且与T细胞和IgA+浆细胞归巢至肠及炎性肠病相关(Charo和Ransohoff,2006)。

[1053] 迄今,尚未公开CCR9的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征。CCR9的胞外部分由N末端区段(人CCR9的Met1-Asn42)、连接螺旋II和III的ECL1(人CCR9的Gln111-Phe114)、连接螺旋IV和V的ECL2(人CCR9的Gln188-Glu206)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人CCR9的Phe285-Ser287)组成。如同全部趋化因子受体,预期CCR9在其胞外结构域中具有两个保守的二硫键(Zheng等人,2016)。

[1054] 在本发明的具体实施方案中,CCR9多肽包含CCR9蛋白序列或与CCR9蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1055] 在一些实施方案中,CCR9蛋白序列对应于哺乳动物CCR9蛋白序列。合适的CCR9序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号M3W6K0)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2QMG2)、奶牛(UniProtKB登录号F6RMK7)、犬(UniProtKB登录号E2RQ21)、大猩猩(UniProtKB登录号G3QQ18)、豚鼠(UniProtKB登录号H0VWP5)、马(UniProtKB登录号F6X7N4)、人(UniProtKB登录号P51686)、狨猴(UniProtKB登录号F7F023)、小鼠(UniProtKB登录号Q9WUT7)、熊猫(UniProtKB登录号G1M0T5)、猪(UniProtKB登录号Q6YT47)、兔(UniProtKB登录号G1SUQ1)、绵羊(UniProtKB登录号

Q1WLP9)。

[1056] 在一些优选的实施方案中,CCR9蛋白序列对应于人CCR9蛋白序列。在一些实施方案中,CCR9多肽包含如下文所述的人全长野生型CCR9蛋白序列(UniProtKB登录号P51686)或野生型CCR9蛋白序列的功能性片段。

[1057] MTPTDFTSPIPNMADDYGSESTSSMEDYVNFNFTDFYCEKNNVRQFASHFL
PPLYWLVFIVGALGNSLVILVYWYCTRVKTMTDMFLLNLAIADLLFLVTLPFWAIAAA
DQWKFQTFMCKVVNSMYKMNFYSCVLLIMCISVDRYIAIAQAMRAHTWREKRLLYS
KMVCFTIWVLAAALCIPEILYSQIKEESGIAICTMVYPSDESTKLKSAVLTLKVILGFFLP
FVVMACCYTIIIHTLIQAKKSSKHKALKVTITVLTVFVLSQFPYNCILLVQTIDAYAMFIS
NCAVSTNIDICFQVTQTIAFFHSCLNPVLYVFVGERFRRDLVKTLKNLGCISQAQWVSF
TRREGSLKLSSMLLETTSGALSL [SEQ ID NO: 29]。

[1058] 在本发明的一种形式中,CCR9多肽包含截短形式的哺乳动物野生型CCR9蛋白序列。例如,CCR9多肽序列可以包含带C端截短的人野生型CCR9蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基334-369)。备选地或额外地,CCR9多肽序列可以包含带N端截短的野生型CCR9蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型CCR9蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基190-204)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的CCR9多肽包含如SEQ ID NO:29中所述的人野生型CCR9蛋白序列的氨基酸残基2-189和205-333。

[1059] 3.30编码CCR9多肽的构建体和核苷酸序列。

[1060] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的CCR9多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1061] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号AY242127.1、NM_001256369.1、NM_031200.2、NM_006641.3、AF145207.1、NG_029472.1、AF145440.1、AF145439.1、BC095516.1、BC069678.1和AJ132337.1中所述的人CCR9核苷酸(即,对应于CCR9基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的CCR9核苷酸序列。

[1062] 在一些实施方案中,CCR9多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物CCR9多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,CCR9多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物CCR9蛋白或其片段的可读框。

[1063] 3.31CXC趋化因子受体CXCR2(CXCR2)多肽

[1064] 如同全部趋化因子受体,CXCR2涉及介质炎症过程。它存在于中性粒细胞、单核细胞和微血管内皮细胞中并且与炎性肺疾病、COPD相关并且对肿瘤生长有生血管性(Charo和Ransohoff,2006)。

[1065] 迄今,尚未公开CXCR2的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征CXCR2的胞外部分由N末端区段(人CXCR2的Met1-Glu42)、连接螺旋II和III的ECL1(人CXCR2的Gly111-Phe114)、连接螺旋IV和V的ECL2(人

CXCR2的Arg185-Ala205)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人CXCR2的Val281-Glu284)组成。如同全部趋化因子受体,预期CXCR2在其胞外结构域中具有两个保守的二硫键(Zheng等人,2016)。

[1066] 在本发明的具体实施方案中,CXCR2多肽包含CXCR2蛋白序列或与CXCR2蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1067] 在一些实施方案中,CXCR2蛋白序列对应于哺乳动物CXCR2蛋白序列。合适的CXCR2序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号P25025)、小鼠(UniProtKB登录号P35343)、大鼠(UniProtKB登录号P35407)、兔(UniProtKB登录号P35344)、犬(UniProtKB登录号097571)、奶牛(UniProtKB登录号Q28003)、黑猩猩(UniProtKB登录号Q28807)、大猩猩(UniProtKB登录号Q28422)、狨猴(UniProtKB登录号F6YI18)、蝙蝠(UniProtKB登录号G1P3F4)、猫(UniProtKB登录号M3XFH4)、豚鼠(UniProtKB登录号Q810T4)、猪(UniProtKB登录号F1SS05)、绵羊(UniProtKB登录号W5QDX4)。

[1068] 在一些优选的实施方案中,CXCR2蛋白序列对应于人CXCR2蛋白序列。在一些实施方案中,CXCR2多肽包含如下文所述的人全长野生型CXCR2蛋白序列(UniProtKB登录号P25025)或野生型CXCR2蛋白序列的功能性片段。

[1069] MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSSTLPPFLLDAAPCEPESLEINKYFVV IIYALVFLLSLLGNSLVMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPIWAASKVNG WIFGTFLCKVVSLLKEVNFYSGILLLACISVDRYLAIVHATRTLTQKRYLVKFICLSIWG LSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNTANWRMLLRILPQSFGFIVPLLIMLFC YGFTLRTLFKAHMGQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQETCER RNHIDRALDATEILGILHSCLNPLIYAFIGQKFRHGLLKILAIHGLISKDSLPKDSRPSFVG SSSGHTSTTL [SEQ ID NO: 30]。

[1070] 在本发明的一种形式中,CXCR2多肽包含截短形式的哺乳动物野生型CXCR2蛋白序列。例如,CXCR2多肽序列可以包含带C端截短的人野生型CXCR2蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基346-360)。备选地或额外地,CXCR2多肽序列可以包含带N端截短的野生型CXCR2蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型CXCR2蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基187-202)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的CXCR2多肽包含如SEQ ID NO:30中所述的人野生型CXCR2蛋白序列的氨基酸残基2-186和203-345。

[1071] 3.32编码CXCR2多肽的构建体和核苷酸序列

[1072] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的CXCR2多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1073] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_001168298.1、NM_001557.3、AB032734.1、AB032733.1、NG_052975.1、XM_017003992.1、XM_017003991.1、XM_017003990.1、XM_005246530.3中所述的人CXCR2核苷酸(即,对应于CXCR2基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、

96、97、98或99％序列同一性的CXCR2核苷酸序列。

[1074] 在一些实施方案中,CXCR2多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物CXCR2多核苷酸或其片段具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、92％、95％、99％或100％序列同一性。在一些实施方案中,CXCR2多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物CXCR2蛋白或其片段的可读框。

[1075] 3.33CXC趋化因子受体CXCR4(CXCR4)多肽

[1076] 如同全部趋化因子受体,CXCR4涉及介质炎症过程。它遍及免疫系统广泛表达并且与HIV-感染、肿瘤转移和造血相关(Charo和Ransohoff,2006)。

[1077] 迄今,两项研究已经报道了解析CXCR4晶体结构,为它怎样结合其配体提供深入了解(Wu等人,2010;Qin等人,2015)。CXCR4的胞外部分由N末端区段(人CXCR4的Met1-Phe29)、连接螺旋II和III的ECL1(人CXCR4的Asn101-Phe104)、连接螺旋IV和V的ECL2(人CXCR4的Asn176-Asn192)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人CXCR4的Ile269-Gln272)组成。如对大部分趋化因子受体预期的那样,CXCR4在其胞外结构域中具有两个保守的二硫键(Wu等人,2010)。

[1078] 在本发明的具体实施方案中,CXCR4多肽包含CXCR4蛋白序列或与CXCR4蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％序列同一性或相似性。

[1079] 在一些实施方案中,CXCR4蛋白序列对应于哺乳动物CXCR4蛋白序列。合适的CXCR4序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号P56498)、黑猩猩(UniProtKB登录号P61072)、奶牛(UniProtKB登录号P25930)、犬(UniProtKB登录号Q3LSL6)、刺猬(UniProtKB登录号A0A1S2ZV52)、马(UniProtKB登录号F6Y9M7)、人(UniProtKB登录号P61073)、狮(UniProtKB登录号B5LVX6)、狨猴(UniProtKB登录号Q8HZU1)、小鼠(UniProtKB登录号A0A0R4J0N8)、猪(UniProtKB登录号Q764M9)、兔(UniProtKB登录号G1SGF1)、大鼠(UniProtKB登录号A0A0G2K9U1)、绵羊(UniProtKB登录号W5PLA4)。

[1080] 在一些优选的实施方案中,CXCR4蛋白序列对应于人CXCR4蛋白序列。在一些实施方案中,CXCR4多肽包含如下文所述的人全长野生型CXCR4蛋白序列(UniProtKB登录号P61073)或野生型CXCR4蛋白序列的功能性片段。

[1081] MEGISIYTSDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANFNKIFLPTIYSIIFLTGIV
GNGLVILVMGYQKKLRSMTDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGNFLCK
AVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAIVHATNSQRPRKLLAEKVVYVGVWIPALLLTIP
DFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVILSCYCIIISKLSHSKG
HQKRKALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEIIKQGCEFENTVHKWISITEALAFF
HCCLNPILYAFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSLKILSKGKRGGHSSVSTESESSSFHSS
[SEQ ID NO: 31]。

[1082] 在本发明的一种形式中,CXCR4多肽包含截短形式的哺乳动物野生型CXCR4蛋白序列。例如,CXCR4多肽序列可以包含带C端截短的人野生型CXCR4蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基319-352)。备选地或额外地,CXCR4多肽序列可以包含带N端截短的野生型CXCR4蛋

白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型CXCR4蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基179-188)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的CXCR4多肽包含如SEQ ID NO:31中所述的人野生型CXCR4蛋白序列的氨基酸残基2-178和189-318。

[1083] 3.34编码CXCR4多肽的构建体和核苷酸序列。

[1084] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的CXCR4多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1085] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号AY242129.1、AJ224869.1、NM_003467.2、NM_001008540.2、NM_001348056.1、NM_001348060.1、NM_001348059.1、AF147204.2、AY826773.1、KU245647.1、KU245646.1、Y14739.1、AF025375.1、AF052572.1、AF348491.1和U81003.1中所述的人CXCR4核苷酸(即,对应于CXCR4基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的CXCR4核苷酸序列。

[1086] 在一些实施方案中,CXCR4多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物CXCR4多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,CXCR4多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物CXCR4蛋白或其片段的可读框。

[1087] 3.35CXC趋化因子受体CXCR5(CXCR5)多肽

[1088] 如同全部趋化因子受体,CXCR5涉及介质炎症过程。它表达于B细胞和滤泡辅助T细胞中并且涉及B细胞滤泡的形成(Charo和Ransohoff,2006)。

[1089] 迄今,尚未公开CCR9的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征。CXCR5的胞外部分由N末端区段(人CXCR5的Met1-Glu42)、连接螺旋II和III的ECL1(人CXCR5的Gly114-Leu117)、连接螺旋IV和V的ECL2(人CXCR5的Lys189-Glu211)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人CXCR5的Ala289-Asn292)组成。如同全部趋化因子受体,预期CCR9在其胞外结构域中具有两个保守的二硫键(Zheng等人,2016)。

[1090] 在本发明的具体实施方案中,CXCR5多肽包含CXCR5蛋白序列或与CXCR5蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1091] 在一些实施方案中,CXCR5蛋白序列对应于哺乳动物CXCR5蛋白序列。合适的CXCR5序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号M3XAS4)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2Q4W8)、奶牛(UniProtKB登录号G3N3U0)、犬(UniProtKB登录号E2RR03)、大猩猩(UniProtKB登录号G3RDW5)、豚鼠(UniProtKB登录号H0W6I1)、人(UniProtKB登录号P32302)、狨猴(UniProtKB登录号F7A1S1)、小鼠(UniProtKB登录号Q04683)、熊猫(UniProtKB登录号G1KZK8)、猪(UniProtKB登录号F1SAJ4)、兔(UniProtKB登录号G1TNG1)、大鼠(UniProtKB登录号P34997)、绵羊(UniProtKB登录号W5PPW1)。

[1092] 在一些优选的实施方案中,CXCR5蛋白序列对应于人CXCR5蛋白序列。在一些实施方案中,CXCR5多肽包含如下文所述的人全长野生型CXCR5蛋白序列(UniProtKB登录号P32302)或野生型CXCR5蛋白序列的功能性片段。

[1093] MNYPLTLEMDLENLEDLFWELDRLDNYNDTSLVENHLCPATEGPLMASFK AVFVPVAYSLIFLLGVIGNVLVLVILERHRQTRSSTETFLFHLAVADLLLVFILPFAVAE GSVGWVLGTFLCKTVIALHKVNFYCSSLLLACIAVDRYLAIVHAVHAYRHRRLLSIHIT CGTIWLVGFLLALPEILFAKVSQGHHNNSLPRCTFSQENQAETHAWFTSRFLYHVAGFL LPMLVMGWCYVGVVHRLRQAQRRPQRQKAVRVAILVTSIFFLCWSPYHIVIFLDTLAR LKAVDNTCKLNGSLPVAITMCEFLGLAHCCLNPMLYTFAGVKFRSDLSRLLTKLGCTG PASLCQLFPSWRRSSLSESENATSLTTF [SEQ ID NO: 32]。

[1094] 在本发明的一种形式中,CXCR5多肽包含截短形式的哺乳动物野生型CXCR5蛋白序列。例如,CXCR5多肽序列可以包含带C端截短的人野生型CXCR5蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基339-372)。备选地或额外地,CXCR5多肽序列可以包含带N端截短的野生型CXCR5蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型CXCR5蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基193-208)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的CXCR5多肽包含如SEQ ID NO:32中所述的人野生型CXCR5蛋白序列的氨基酸残基2-192和209-338。

[1095] 3.36编码CXCR5多肽的构建体和核苷酸序列。

[1096] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的CXCR5多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1097] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_001716.4、NM_032966.2和BC110352.1中所述的人CXCR5核苷酸(即,对应于CXCR5基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的CXCR5核苷酸序列。

[1098] 在一些实施方案中,CXCR5多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物CXCR5多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,CXCR5多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物CXCR5蛋白或其片段的可读框。

[1099] 3.37CXC趋化因子受体CXCR6(CXCR6)多肽

[1100] 如同全部趋化因子受体,CXCR6涉及介质炎症过程。它存在于CD8+ T细胞、天然杀伤细胞和记忆CD4+ T细胞中并且与炎性肝脏疾病和动脉粥样硬化相关(Charo和Ransohoff,2006)。

[1101] 迄今,尚未公开CXCR6的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征CXCR6的胞外部分由N末端区段(人CXCR6的Met1-Asp25)、连接螺旋II和III的ECL1(人CXCR6的Glu94-Phe97)、连接螺旋IV和V的ECL2(人CXCR6的Asn171-Glu185)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人CXCR6的Trp258-Ala262)组成。如同全部趋化因子受体,预期CXCR6在其胞外结构域中具有两个保守的二硫键(Zheng等人,

2016)。

[1102] 在本发明的具体实施方案中,CXCR6多肽包含CXCR6蛋白序列或与CXCR6蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1103] 在一些实施方案中,CXCR6蛋白序列对应于哺乳动物CXCR6蛋白序列。合适的CXCR6序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号O00574)、黑猩猩(UniProtKB登录号Q9TV16)、小鼠(UniProtKB登录号Q9EQ16)、大鼠(UniProtKB登录号A7ISD5)、猪(UniProtKB登录号Q6YT44)、奶牛(UniProtKB登录号Q5EA94)、犬(UniProtKB登录号F1PMU3)、袋獾(UniProtKB登录号G3W5Z9)、狨猴(UniProtKB登录号F7DTR0)、猫(UniProtKB登录号M3W6K1)、蝙蝠(UniProtKB登录号G1P8C6)、兔(UniProtKB登录号G1SLJ0)、豚鼠(UniProtKB登录号H0W823)、马(UniProtKB登录号F6XQ88)。

[1104] 在一些优选的实施方案中,CXCR6蛋白序列对应于人CXCR6蛋白序列。在一些实施方案中,CXCR6多肽包含如下文所述的人全长野生型CXCR6蛋白序列(UniProtKB登录号O00574)或野生型CXCR6蛋白序列的功能性片段。

[1105] MAEHDYHEDYGFSSFNDSSQEEHQDFLQFSKVFLPCMYLVVFVCGLVGNS
LVLVISIFYHKLQSLTDVFLVNLPLADLVFVCTLPFWAYAGIHEWVFGQVMCKSLLGIY
TINFYTSMLILTCITVDRFIVVVKATKAYNQQAKRMTWGKVTSLLIWVISLLVSLPQIIY
GNVFNLDKLICGYHDEAISTVVLATQMTLGFFLPLLTMIVCYSVIIKTLLHAGGFQKHR
SLKIIFLVMAVFLLTQMPFNLMKFIRSTHWEYYAMTSFHYTIMVTEAIAYLRACLNPVL
YAFVSLKFRKNFWKLVKDIGCLPYLGVSHQWKSSEDNSKTFSASHNVEATSMFQL
[SEQ ID NO: 33]。

[1106] 在本发明的一种形式中,CXCR6多肽包含截短形式的哺乳动物野生型CXCR6蛋白序列。例如,CXCR6多肽序列可以包含带C端截短的人野生型CXCR6蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基318-342)。备选地或额外地,CXCR6多肽序列可以包含带N端截短的野生型CXCR6蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型CXCR6蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基172-180)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的CXCR6多肽包含如SEQ ID NO:33中所述的人野生型CXCR6蛋白序列的氨基酸残基2-171和181-317。

[1107] 3.38编码CXCR6多肽的构建体和核苷酸序列

[1108] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的CXCR6多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1109] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_006564.1、XM_005264809.2、XM_011533291.2、XM_011533290.2、EU076974.1、EF064741.1、AK313754.1中所述的人CXCR6核苷酸(即,对应于CXCR6基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的CXCR6核苷酸序列。

[1110] 在一些实施方案中,CXCR6多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述

多肽与野生型哺乳动物CXCR6多核苷酸或其片段具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、92％、95％、99％或100％序列同一性。在一些实施方案中,CXCR6多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物CXCR6蛋白或其片段的可读框。

[1111] 3.39CXC趋化因子受体CXCR7(也称作非典型趋化因子受体3;ACKR3)多肽

[1112] 如同全部趋化因子受体,CXCR7涉及介质炎症过程。它存在于网织红细胞、毛细血管后微静脉、肾脏上皮细胞和肺和小脑神经元中。CXCR7已经与各种自身免疫性疾病、移植并发症、HIV感染、先兆子痫和恶性肿瘤相关(Horne和Woolley,2009)。

[1113] 迄今,尚未公开CXCR7的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征CXCR7的胞外部分由N末端区段(人CXCR7的Met1-Ser41)、连接螺旋II和III的ECL1(人CXCR7的His107-Met112)、连接螺旋IV和V的ECL2(人CXCR7的Lys184-Glu207)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人CXCR7的Tyr282-Phe285)组成。胞外氨基端结构域在残基16、27和33处携带三个潜在N-糖基化位点(Czerwinski等人,2007)。

[1114] 在本发明的具体实施方案中,CXCR7多肽包含CXCR7蛋白序列或与CXCR7蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％序列同一性或相似性。

[1115] 在一些实施方案中,CXCR7蛋白序列对应于哺乳动物CXCR7蛋白序列。合适的CXCR7序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号P25106)、大鼠(UniProtKB登录号O89039)、小鼠(UniProtKB登录号P56485)、犬(UniProtKB登录号P11613)、奶牛(UniProtKB登录号A4IF77)、恒河猴(UniProtKB登录号F7GTL4)、狨猴(UniProtKB登录号F7HZX1)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2QJP1)、貂(UniProtKB登录号U6DE19)。

[1116] 在一些优选的实施方案中,CXCR7蛋白序列对应于人CXCR7蛋白序列。在一些实施方案中,CXCR7多肽包含如下文所述的人全长野生型CXCR7蛋白序列(UniProtKB登录号P25106)或野生型CXCR7蛋白序列的功能性片段。

[1117] MDLHLFDYSEPGNFSDISWPCNSSDCIVVDTVMCPNMPNKSVLLYTLSFIYI FIFVIGMIANSVVVWVNIQAKTTGYDTHCYILNLAIADLWVVLTIPVWVVSLVQHNQW PMGELTCKVTHLIFSINLFGSIFFLTCMSVDRYLSITYFTNTPSSRKKMVRRVVCILVWL LAFCVSLPDTYYLKTVTSASNNETYCRSFYPEHSIKEWLIGMELVSVVLGFAVPFSIIAV FYFLLARAISASSDQEKHSSRKIIFSYVVVFLVCWLPYHVAVLLDIFSILHYIPFTCRLEH ALFTALHVTQCLSLVHCCVNPVLYSFINRNYRYELMKAFIFKYSAKTGLTKLIDASRVS ETEYSALEQS TK [SEQ ID NO: 34]。

[1118] 在本发明的一种形式中,CXCR7多肽包含截短形式的哺乳动物野生型CXCR7蛋白序列。例如,CXCR7多肽序列可以包含带C端截短的人野生型CXCR7蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基339-362)。备选地或额外地,CXCR7多肽序列可以包含带N端截短的野生型CXCR7蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型CXCR7蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基187-204)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的CXCR7多肽包含如SEQ ID NO:34中所述的人野生型CXCR7蛋白序列的氨基酸残基2-186和205-338。

[1119] 3.40编码CXCR7多肽的构建体和核苷酸序列

[1120] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的CXCR7多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1121] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_020311.2、XM_017004516.1、XM_005246098.3、XM_005246097.2、BC036661.2中所述的人CXCR7核苷酸(即,对应于ACKR3基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的CXCR7核苷酸序列。

[1122] 在一些实施方案中,CXCR7多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物CXCR7多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,CXCR7多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物CXCR7蛋白或其片段的可读框。

[1123] 3.41多巴胺D1受体(D1R)多肽

[1124] 在中枢神经系统(CNS)中,D1R具有众多功能,包括刺激运动活动、参与奖励和强化机构及在学习、记忆和其他认知功能中的作用。在CNS之外,D1R调节肾素分泌及肾功能维持(Beaulieu和Gainetdinov,2011)。

[1125] 迄今,尚未公开D1R的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征D1R的胞外部分由N末端区段(人D1R的Met1-Leu14)、连接螺旋II和III的ECL1(人D1R的Ala87-Phe92)、连接螺旋IV和V的ECL2(人D1R的Trp163-Leu190)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人D1R的Gly299-Pro305)组成。

[1126] 在本发明的具体实施方案中,D1R多肽包含D1R蛋白序列或与D1R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1127] 在一些实施方案中,D1R蛋白序列对应于哺乳动物D1R蛋白序列。合适的D1R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号M3VVD1)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2QS18)、奶牛(UniProtKB登录号Q95136)、犬(UniProtKB登录号F1P121)、大猩猩(UniProtKB登录号G3RXE8)、豚鼠(UniProtKB登录号HOVES0)、人(UniProtKB登录号P21728)、小鼠(UniProtKB登录号Q61616)、熊猫(UniProtKB登录号G1LK07)、猪(UniProtKB登录号P50130)、兔(UniProtKB登录号G1SML2)、大鼠(UniProtKB登录号P18901)、绵羊(UniProtKB登录号W5PPK6)、袋獾(UniProtKB登录号G3VDD8)。

[1128] 在一些优选的实施方案中,D1R蛋白序列对应于人D1R蛋白序列。在一些实施方案中,D1R多肽包含如下文所述的人全长野生型D1R蛋白序列(UniProtKB登录号P21728)或野生型D1R蛋白序列的功能性片段。

[1129] MRTLNTSAMDGTGLVVERDFSVRILTACFLSLLILSTLLGNTLVCAAVIRFR

HLRSKVTNFFVISLAVSDLLVAVLVMPWKAVAEIAGFWPFGSFCNIWVAFDIMCSTASI
LNLCVISVDRYWAISSPFRYERKMTPKAAFILISVAWTLSVLISFIPVQLSWHKAKPTSP
SDGNATSLAETIDNCDSSLSRTYAISSSVISFYIPVAIMIVTYTRIYRIAQKQIRRIAALER
AAVHAKNCQTTTGNGKPVECSQPESSFKMSFKRETKVLKTLSVIMGVFVCCWLPFFIL
NCILPFCGSGETQPFCIDSNTFDVFVWFGWANSSLNPIIYAFNADFRKAFSTLLGCYRLC
PATNNAIETVSINNNGAAMFSSHHEPRGSISKECNLVYLIPHAVGSSEDLKKEEAAGIAR
PLEKLSPALSVILDYDTDVSLEKIQPITQNGQHPT [SEQ ID NO: 35]。

[1130] 在本发明的一种形式中,D1R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型D1R蛋白序列。例如,D1R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型D1R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基348-446)。备选地或额外地,D1R多肽序列可以包含带N端截短的野生型D1R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型D1R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基166-186)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的D1R多肽包含如SEQ ID NO:35中所述的人野生型D1R蛋白序列的氨基酸残基2-165和187-347。

[1131] 3.42编码D1R多肽的构建体和核苷酸序列。

[1132] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的D1R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1133] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号CR541922.1、EU249297.1、KR712133.1、KR712132.1、KR712131.1、KR712130.1、KJ896726.1、NM_000794.3、和NG_011802.1中所述的人D1R核苷酸(即,对应于DRD1基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的D1R核苷酸序列。

[1134] 在一些实施方案中,D1R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物D1R多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,D1R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物D1R蛋白或其片段的可读框。

[1135] 3.43内皮素受体A型(ETAR)多肽

[1136] ETAR介导许多功能,包括血管收缩、心血管重塑、细胞增殖、细胞分化、胞外基质产生和控制水和钠分泌。它还涉及形成多种疾病,如肺动脉高压、动脉粥样硬化、糖尿病和心肌局部缺血后心脏重塑(Horinouchi等人,2013)。

[1137] 迄今,尚未公开ETAR的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征ETAR的胞外部分由N末端区段(人ETAR的Met1-Cys69)、连接螺旋II和III的ECL1(人ETAR的Gly144-Phe148)、连接螺旋IV和V的ECL2(人ETAR的Val225-Ser245)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人ETAR的Asn334-Asn339)组成。

[1138] 在本发明的具体实施方案中,ETAR多肽包含ETAR蛋白序列或与ETAR蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1139] 在一些实施方案中,ETA蛋白序列对应于哺乳动物ETA蛋白序列。合适的ETAR序列

可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号M3WMJ5)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2QQ94)、奶牛(UniProtKB登录号P21450)、犬(UniProtKB登录号Q5KSU9)、马(UniProtKB登录号F7CHF1)、人(UniProtKB登录号P25101)、狨猴(UniProtKB登录号F6YN68)、小鼠(UniProtKB登录号Q61614)、熊猫(UniProtKB登录号G1L5F1)、猪(UniProtKB登录号Q29010)、兔(UniProtKB登录号A5A8K3)、大鼠(UniProtKB登录号P26684)、绵羊(UniProtKB登录号Q95L55)、袋獾(UniProtKB登录号G3VXK8)。

[1140] 在一些优选的实施方案中,ETAR蛋白序列对应于人ETAR蛋白序列。在一些实施方案中,ETAR多肽包含如下文所述的人全长野生型ETAR蛋白序列(UniProtKB登录号P25101)或野生型ETAR蛋白序列的功能性片段。

[1141] METLCLRASFWLALVGCVISDNPERYSTNLSNHVDDFTTFRGTELSFLVTT
HQPTNLVLPSNGSMHNYCPQQTKITSAFKYINTVISCTIFIVGMVGNATLLRIIYQNKCM
RNGPNALIASLALGDLIYVVIDLPINVFKLLAGRWPFDHNDFGVFLCKLFPFLQKSSVGI
TVLNLCALSVDRYRAVASWSRVQGIGIPLVTAIEIVSIWILSFILAIPEAIGFVMVPFEYR
GEQHKTCMLNATSKFMEFYQDVKDWWLFGFYFCMPLVCTAIFYTLMTCEMLNRRNG
SLRIALSEHLKQRREVAKTVFCLVVIFALCWFPLHLSRILKKTVYNEMDKNRCELLSFL
LLMDYIGINLATMNSCINPIALYFVSKKFKNCFQSCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGTSIQ
WKNHDQNNHNTDRSSHKDSMN [SEQ ID NO: 36]。

[1142] 在本发明的一种形式中,ETAR多肽包含截短形式的哺乳动物野生型ETAR蛋白序列。例如,ETAR多肽序列可以包含带C端截短的人野生型ETAR蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基387-427)。备选地或额外地,ETAR多肽序列可以包含带N端截短的野生型ETAR蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型ETAR蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基228-242)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的ETAR多肽包含如SEQ ID NO:36中所述的人野生型ETAR蛋白序列的氨基酸残基2-227和243-386。

[1143] 3.44编码ETAR多肽的构建体和核苷酸序列。

[1144] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的ETAR多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1145] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_001957.3、NG_013343.1、NR_045958.1、NM_001256283.1、NM_001166055.1、AY275462.1、L06622.1和AY422989.1中所述的人ETAR核苷酸(即,对应于EDNRA基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的ETAR核苷酸序列。

[1146] 在一些实施方案中,ETAR多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物ETAR多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,ETAR多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物ETAR蛋白或其片段的可读框。

[1147] 3.45内皮素受体B型(ETBR)多肽

[1148] 认为ETBR通过内皮产生一氧化氮和前列环素来介导血管舒张。此外,认为它通过消耗内源性配体水平,减弱ETAR的许多病理作用(Horinouchi等人,2013)。

[1149] 最近已经解析ETBR的晶体结构,从而深入了解其配体结合模式和活化过程(Shihoya等人,2016)。ETBR的胞外部分由N末端区段(人ETBR的Met1-Cys90)、连接螺旋II和III的ECL1(人ETBR的Glu165-Phe169)、连接螺旋IV和V的ECL2(人ETBR的Asp241-Thr263)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人ETBR的Asn351-Asn356)。ETBR在其胞外结构域中含有两个二硫键(Shihoya等人,2016)。

[1150] 在本发明的具体实施方案中,ETBR多肽包含ETBR蛋白序列或与ETBR蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1151] 在一些实施方案中,ETBR蛋白序列对应于哺乳动物ETBR蛋白序列。合适的ETBR序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号M3WRP2)、黑猩猩(UniProtKB登录号K7DEA2)、奶牛(UniProtKB登录号P28088)、犬(UniProtKB登录号P56497)、狐狸(UniProtKB登录号I6UG97)、大猩猩(UniProtKB登录号G3RES6)、马(UniProtKB登录号062709)、人(UniProtKB登录号P24530)、小鼠(UniProtKB登录号P48302)、熊猫(UniProtKB登录号G1LGC8)、猪(UniProtKB登录号P35463)、兔(UniProtKB登录号Q9N0W7)、大鼠(UniProtKB登录号P21451)、绵羊(UniProtKB登录号W5NPP6)。

[1152] 在一些优选的实施方案中,ETBR蛋白序列对应于人ETBR蛋白序列。在一些实施方案中,ETBR多肽包含如下文所述的人全长野生型ETBR蛋白序列(UniProtKB登录号P24530)或野生型ETBR蛋白序列的功能性片段。

[1153] MQPPPSLCGRALVALVLACGLSRIWGEERGFPPDRATPLLQTAEIMTPPTKT
LWPKGSNASLARSLAPAEVPKGDRTAGSPPRTISPPPCQGPIEIKETFKYINTVVSCLVF
VLGIIGNSTLLRIIYKNKCMRNGPNILIASLALGDLLHIVIDIPINVYKLLAEDWPFGAEM
CKLVPFIQKASVGITVLSLCALSIDRYRAVASWSRIKGIGVPKWTAVEIVLIWVVSVVL
AVPEAIGFDIITMDYKGSYLRICLLHPVQKTAFMQFYKTAKDWWLFSFYFCLPLAITAF
FYTLMTCEMLRKKSGMQIALNDHLKQRREVAKTVFCLVLVFALCWLPLHLSRILKLTL
YNQNDPNRCELLSFLLVLDYIGINMASLNSCINPIALYLVSKRFKNCFKSCLCCWCQSF
EEKQSLEEKQSCLKFKANDHGYDNFRSSNKYSSS [SEQ ID NO: 37]。

[1154] 在本发明的一种形式中,ETBR多肽包含截短形式的哺乳动物野生型ETBR蛋白序列。例如,ETBR多肽序列可以包含带C端截短的人野生型ETBR蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基404-442)。备选地或额外地,ETBR多肽序列可以包含带N端截短的野生型ETBR蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型ETBR蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基245-260)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的ETBR多肽包含如SEQ ID NO:37中所述的人野生型ETBR蛋白序列的氨基酸残基2-244和261-403。

[1155] 3.46编码ETBR多肽的构建体和核苷酸序列。

[1156] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的ETBR多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1157] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号AY275463.1、NM_000115.4、NM_001122659.2、NM_003991.3、NM_001201397.1、L06623.1、NG_011630.2、AY547312.1、AY275463.1、AB209198.1和BC014472.1中所述的人ETBR核苷酸(即,对应于EDNRB基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的ETBR核苷酸序列。

[1158] 在一些实施方案中,ETBR多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物ETBR多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,ETBR多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物ETBR蛋白或其片段的可读框。

[1159] 3.47组胺H3受体(H3R)多肽

[1160] H3R调节血清素能、去甲肾上腺素能、胆碱能和多巴胺能神经递质释放并涉及运动、哺乳动物冬眠和胃酸分泌。它还可能在免疫应答和多发性硬化中具有作用(Panula等人,2015)。

[1161] 迄今,尚未公开H3R的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征H3R的胞外部分由N末端区段(人H3R的Met1-Ser30)、连接螺旋II和III的ECL1(人H3R的Gly98-Phe102)、连接螺旋IV和V的ECL2(人H3R的Trp174-Tyr194)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人H3R的His385-Val389)组成。

[1162] 在本发明的具体实施方案中,H3R多肽包含H3R蛋白序列或与H3R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1163] 在一些实施方案中,H3R蛋白序列对应于哺乳动物H3R蛋白序列。合适的H3R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:黑猩猩(UniProtKB登录号H2R2N9)、奶牛(UniProtKB登录号F1MML8)、犬(UniProtKB登录号F1PSJ0)、大猩猩(UniProtKB登录号G3SJN4)、豚鼠(UniProtKB登录号Q9JI35)、马(UniProtKB登录号F6UMY9)、人(UniProtKB登录号Q9Y5N1)、狨猴(UniProtKB登录号U3EPT7)、小鼠(UniProtKB登录号P58406)、猩猩(UniProtKB登录号H2P2I0)、鸭嘴兽(UniProtKB登录号F6VA72)、大鼠(UniProtKB登录号Q9QYN8)、绵羊(UniProtKB登录号W5PY09)、袋獾(UniProtKB登录号G3WQV4)。

[1164] 在一些优选的实施方案中,H3R蛋白序列对应于人H3R蛋白序列。在一些实施方案中,H3R多肽包含如下文所述的人全长野生型H3R蛋白序列(UniProtKB登录号Q9Y5N1)或野生型H3R蛋白序列的功能性片段。

[1165] MERAPPDGPLNASGALAGEAAAAGGARGFSAAWTAVLAALMALLIVATV

LGNALVMLAFVADSSLRTQNNFFLLNLAISDFLVGAFCIPLYVPYVLTGRWTFGRGLC
KLWLVVDYLLCTSSAFNIVLISYDRFLSVTRAVSYRAQQGDTRRAVRKMLLVWVLAF
LLYGPAILSWEYLSGGSSIPEGHCYAEFFYNWYFLITASTLEFFTPFLSVTFFNLSIYLNIQ
RRTRLRLDGAREAAGPEPPPEAQPSPPPPPGCWGCWQKGHGEAMPLHRYGVGEAAVG
AEAGEATLGGGGGGGSVASPTSSSGSSSRGTERPRSLKRGSKPSASSASLEKRMKMVS
QSFTQRFRLSRDRKVAKSLAVIVSIFGLCWAPYTLLMIIRAACHGHCVPDYWYETSFW
LLWANSAVNPVLYPLCHHSFRRAFTKLLCPQKLKIQPHSSLEHCWK [SEQ ID NO: 38]。

[1166] 在本发明的一种形式中,H3R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型H3R蛋白序列。例如,H3R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型H3R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基429-445)。备选地或额外地,H3R多肽序列可以包含带N端截短的野生型H3R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型H3R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基177-192)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的H3R多肽包含如SEQ ID NO:38中所述的人野生型H3R蛋白序列的氨基酸残基2-176和193-428。

[1167] 3.48编码H3R多肽的构建体和核苷酸序列。

[1168] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的H3R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1169] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_007232.2、AF346904.1、AF346903.1、AF321913.1、AF321912.1、AF321911.1、AF321910.1、AF363791.1、BC096840.1、AJ296652.1和AJ278250.1中所述的人H3R核苷酸(即,对应于HRH3基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的H3R核苷酸序列。

[1170] 在一些实施方案中,H3R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物H3R多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,H3R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物H3R蛋白或其片段的可读框。

[1171] 3.49毒蕈碱性M1受体(M1R)多肽

[1172] M1R在学习、记忆和认知中发挥重要作用。将它视为一种用于多种CNS疾病,如阿尔茨海默病、精神分裂症和药物成瘾的有前景靶(Thal等人,2016)。

[1173] 最近已经解析M1R的晶体结构,从而深入了解其配体结合模式和活化过程(Thal等人,2016)。M1R的胞外部分由N末端区段(人M1R的Met1-Gly21)、连接螺旋II和III的ECL1(人M1R的Gly89-Leu93)、连接螺旋IV和V的ECL2(人M1R的Glu170-Ser184)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人M1R的Lys392-Val395)组成。它在其胞外结构域中含有一个二硫键(Thal等人,2016)。

[1174] 在本发明的具体实施方案中,M1R多肽包含M1R蛋白序列或与M1R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1175] 在一些实施方案中,M1R蛋白序列对应于哺乳动物M1R蛋白序列。合适的M1R序列可

以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号M3VUK2)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2Q3X5)、奶牛(UniProtKB登录号F1N5C5)、犬(UniProtKB登录号F1PT23)、大猩猩(UniProtKB登录号G3RJP5)、豚鼠(UniProtKB登录号H0W4R2)、刺猬(UniProtKB登录号A0A1S3WFM0)、马(UniProtKB登录号F6SLG5)、人(UniProtKB登录号P11229)、狨猴(UniProtKB登录号F7IPY9)、小鼠(UniProtKB登录号P12657)、猪(UniProtKB登录号P04761)、兔(UniProtKB登录号G1SR55)、大鼠(UniProtKB登录号P08482)。

[1176] 在一些优选的实施方案中,M1R蛋白序列对应于人M1R蛋白序列。在一些实施方案中,M1R多肽包含如下文所述的人全长野生型M1R蛋白序列(UniProtKB登录号P11229)或野生型M1R蛋白序列的功能性片段。

[1177] MNTSAPPAVSPNITVLAPGKGPWQVAFIGITTGLLSLATVTGNLLVLISFKV
NTELKTVNNYFLLSLACADLIIGTFSMNLYTTYLLMGHWALGTLACDLWLALDYVAS
NASVMNLLLISFDRYFSVTRPLSYRAKRTPRRAALMIGLAWLVSFVLWAPAILFWQYL
VGERTVLAGQCYIQFLSQPIITFGTAMAAFYLPVTVMCTLYWRIYRETENRARELAAL
QGSETPGKGGGSSSSSERSQPGAEGSPETPPGRCCRCCRAPRLLQAYSWKEEEEEDEGS
MESLTSSEGEEPGSEVVIKMPMVDPEAQAPTKQPPRSSPNTVKRPTKKGRDRAGKGQK
PRGKEQLAKRKTFSLVKEKKAARTLSAILLAFILTWTPYNIMVLVSTFCKDCVPETLWE
LGYWLCYVNSTINPMCYALCNKAFRDTFRLLLLCRWDKRRWRKIPKRPGSVHRTPSR
QC [SEQ ID NO: 39]。

[1178] 在本发明的一种形式中,M1R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型M1R蛋白序列。例如,M1R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型M1R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基435-460)。备选地或额外地,M1R多肽序列可以包含带N端截短的野生型M1R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型M1R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基171-182)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的M1R多肽包含如SEQ ID NO:39中所述的人野生型M1R蛋白序列的氨基酸残基2-170和183-434。

[1179] 3.50编码M1R多肽的构建体和核苷酸序列。

[1180] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的M1R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1181] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_000738.2、BC007740.2、BC022984.1、BT007166.1和AF385587.1中所述的人M1R核苷酸(即,对应于CHRM1基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的M1R核苷酸序列。

[1182] 在一些实施方案中,M1R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物M1R多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,M1R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物M1R蛋白或其片段的可读框。

[1183] 3.51毒蕈碱性M2受体(M2R)多肽

[1184] M2R在调节心脏功能中发挥重要作用,并且还涉及许多CNS过程、包括认知和疼痛知觉(Kruse等人,2013)。

[1185] 迄今,已经发表了M2R的两种晶体结构(Haga等人,2012;Kruse等人,2013),从而对受体的配体结合机制和活化机制提供了深入了解。M2R的胞外部分由N末端区段(人M2R的Met1-Tyr18)、连接螺旋II和III的ECL1(人M2R的Gly87-Leu91)、连接螺旋IV和V的ECL2(人M2R的Val168-Ser182)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人M2R的Ala414-Ile417)组成。它在其胞外结构域中含有两个二硫键(Haga等人,2012)。

[1186] 在本发明的具体实施方案中,M2R多肽包含M2R蛋白序列或与M2R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1187] 在一些实施方案中,M2R蛋白序列对应于哺乳动物M2R蛋白序列。合适的M2R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:蝙蝠(UniProtKB登录号G1PWZ4)、猫(UniProtKB登录号M3WSG4)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2RAP9)、奶牛(UniProtKB登录号P41985)、犬(UniProtKB登录号F1PWR7)、大猩猩(UniProtKB登录号G3QKB8)、人(UniProtKB登录号P08172)、狨猴(UniProtKB登录号F7APE0)、小鼠(UniProtKB登录号Q9ERZ4)、猪(UniProtKB登录号P06199)、兔(UniProtKB登录号G1TBX1)、大鼠(UniProtKB登录号P10980)、绵羊(UniProtKB登录号W5NSW2)、袋獾(UniProtKB登录号G3VX75)。

[1188] 在一些优选的实施方案中,M2R蛋白序列对应于人M2R蛋白序列。在一些实施方案中,M2R多肽包含如下文所述的人全长野生型M2R蛋白序列(UniProtKB登录号P08172)或野生型M2R蛋白序列的功能性片段。

[1189] MNNSTNSSNNSLALTSPYKTFEVVFIVLVAGSLSLVTIIGNILVMVSIKVNRH
LQTVNNYFLFSLACADLIIGVFSMNLYTLYTVIGYWPLGPVVCDLWLALDYVVSNASV
MNLLIISFDRYFCVTKPLTYPVKRTTKMAGMMIAAAWVLSFILWAPAILFWQFIVGVR
TVEDGECYIQFFSNAAVTFGTAIAAFYLPVIIMTVLYWHISRASKSRIKKDKKEPVANQ
DPVSPSLVQGRIVKPNNNNMPSSDDGLEHNKIQNGKAPRDPVTENCVQGEEKESSNDS
TSVSAVASNMRDDEITQDENTVSTSLGHSKDENSKQTCIRIGTKTPKSDSCTPTNTTVE
VVGSSGQNGDEKQNIVARKIVKMTKQPAKKKPPPSREKKVTRTILAILLAFIITWAPYN
VMVLINTFCAPCIPNTVWTIGYWLCYINSTINPACYALCNATFKKTFKHLLMCHYKNIG
ATR [SEQ ID NO: 40]。

[1190] 在本发明的一种形式中,M2R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型M2R蛋白序列。例如,M2R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型M2R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基457-466)。备选地或额外地,M2R多肽序列可以包含带N端截短的野生型M2R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型M2R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基172-177)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的M2R多肽包含如SEQ ID NO:40中所述的人野生型M2R蛋白序列的氨基酸残基2-171和178-456。

[1191] 3.52编码M2R多肽的构建体和核苷酸序列。

[1192] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的M2R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1193] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号AF498916.1、NM_001006632.1、NM_001006631.1、NM_001006630.1、NM_001006629.1、NM_001006628.1、NM_001006627.1、NM_001006626.1、NM_000739.2、NG_011846.2和M16404.1中所述的人M2R核苷酸(即,对应于CHRM2基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的M2R核苷酸序列。

[1194] 在一些实施方案中,M2R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物M2R多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,M2R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物M2R蛋白或其片段的可读框。

[1195] 3.53毒蕈碱性M3受体(M3R)多肽

[1196] M3R广泛地分布于CNS和外周组织中。它是几种疾病的潜在治疗靶,所述疾病包括Si6gren'综合征、2型糖尿病、肥胖症、消化性溃疡疾病、膀胱过度活动、慢性阻塞性肺病、肠激惹综合征和胃肠道痉挛(Wess等人,2007)。

[1197] 迄今,尚未公开M3R的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征M3R的胞外部分由N末端区段(人M3R的Met1-Thr64)、连接螺旋II和III的ECL1(人M3R的Asn132-Leu136)、连接螺旋IV和V的ECL2(人M3R的Lys213-Ser227)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人M3R的Asp518-Ile521)组成。

[1198] 在本发明的具体实施方案中,M3R多肽包含M3R蛋白序列或与M3R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1199] 在一些实施方案中,M3R蛋白序列对应于哺乳动物M3R蛋白序列。合适的M3R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:蝙蝠(UniProtKB登录号G1Q9Z8)、猫(UniProtKB登录号M3X7A6)、黑猩猩(UniProtKB登录号Q9N2A4)、奶牛(UniProtKB登录号P41984)、犬(UniProtKB登录号F1PGZ2)、大猩猩(UniProtKB登录号Q9N2A3)、人(UniProtKB登录号P20309)、狨猴(UniProtKB登录号U3D417)、小鼠(UniProtKB登录号Q9ERZ3)、熊猫(UniProtKB登录号G1MP56)、猪(UniProtKB登录号P11483)、兔(UniProtKB登录号G1U308)、大鼠(UniProtKB登录号P08483)、绵羊(UniProtKB登录号W5Q8R1)。

[1200] 在一些优选的实施方案中,M3R蛋白序列对应于人M3R蛋白序列。在一些实施方案中,M3R多肽包含如下文所述的人全长野生型M3R蛋白序列(UniProtKB登录号P20309)或野生型M3R蛋白序列的功能性片段。

[1201] MTLHNNSTTSPLFPNISSSWIHSPSDAGLPPGTVTHFGSYNVSRAAGNFSSPD

GTTDDPLGGHTVWQVVFIAFLTGILALVTIIGNILVIVSFKVNKQLKTVNNYFLLSLACA
DLIIGVISMNLFTTYIIMNRWALGNLACDLWLAIDYVASNASVMNLLVISFDRYFSITRP
LTYRAKRTTKRAGVMIGLAWVISFVLWAPAILFWQYFVGKRTVPPGECFIQFLSEPTIT
FGTAIAAFYMPVTIMTILYWRIYKETEKRTKELAGLQASGTEAETENFVHPTGSSRSCSS
YELQQQSMKRSNRRKYGRCHFWFTTKSWKPSSEQMDQDHSSSDSWNNNDAAASLEN
SASSDEEDIGSETRAIYSIVLKLPGHSTILNSTKLPSSDNLQVPEEELGMVDLERKADKL
QAQKSVDDGGSFPKSFSKLPIQLESAVDTAKTSDVNSSVGKSTATLPLSFKEATLAKRF
ALKTRSQITKRKRMSLVKEKKAAQTLSAILLAFIITWTPYNIMVLVNTFCDSCIPKTFW
NLGYWLCYINSTVNPVCYALCNKTFRTTFKMLLLCQCDKKKRRKQQYQQRQSVIFHK
RAPEQAL [SEQ ID NO: 41]。

[1202] 在本发明的一种形式中,M3R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型M3R蛋白序列。例如,M3R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型M3R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基560-590)。备选地或额外地,M3R多肽序列可以包含带N端截短的野生型M3R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型M3R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基216-221)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的M3R多肽包含如SEQ ID NO:41中所述的人野生型M3R蛋白序列的氨基酸残基2-215和222-559。

[1203] 3.54编码M3R多肽的构建体和核苷酸序列。

[1204] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的M3R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1205] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号AF498917.1、NG_032046.2、NM_001347716.1、NM_000740.3、AH011672.2、AF385589.1、U29589.1、AB041395.1、BC096844.1和BC121026.2中所述的人M3R核苷酸(即,对应于CHRM3基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的M3R核苷酸序列。

[1206] 在一些实施方案中,M3R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物M3R多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,M3R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物M3R蛋白或其片段的可读框。

[1207] 3.55神经肽Y1受体(Y1R)多肽

[1208] Y1R表达于多种组织中,包括脑、心脏、肾脏和胃肠道,并且早期研究显示,它介导血管收缩和抗焦虑效应(Michel等人,1998)。它已经涉及多种疾病,如肥胖症、焦虑和抑郁、酒精依赖性、骨代谢、疼痛、癌症、心血管疾病、肠道疾病、昼夜节紊乱和阿尔茨海默病(Brothers和Wahlestedt,2010)。

[1209] 迄今,尚未公开Y1R的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征Y1R的胞外部分由N末端区段(人Y1R的Met1-A38)、连接螺旋II和III的ECL1(人Y1R的Glu104-Phe108)、连接螺旋IV和V的ECL2(人Y1R的Va1178-Ser204)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人Y1R的His290-Ala294)组成。

[1210] 在本发明的具体实施方案中,Y1R多肽包含Y1R蛋白序列或与Y1R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％序列同一性或相似性。

[1211] 在一些实施方案中,Y1R蛋白序列对应于哺乳动物Y1R蛋白序列。合适的Y1R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:蝙蝠(UniProtKB登录号G1P047)、猫(UniProtKB登录号M3W4X9)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2QQD5)、奶牛(UniProtKB登录号Q1RMU8)、犬(UniProtKB登录号002813)、大猩猩(UniProtKB登录号G3QP89)、豚鼠(UniProtKB登录号Q9WVD0)、人(UniProtKB登录号P25929)、狨猴(UniProtKB登录号F7I8A1)、小鼠(UniProtKB登录号Q04573)、猪(UniProtKB登录号002835)、兔(UniProtKB登录号B6VRS4)、大鼠(UniProtKB登录号P21555)、绵羊(UniProtKB登录号W5PW25)。

[1212] 在一些优选的实施方案中,Y1R蛋白序列对应于人Y1R蛋白序列。在一些实施方案中,Y1R多肽包含如下文所述的人全长野生型Y1R蛋白序列(UniProtKB登录号P25929)或野生型Y1R蛋白序列的功能性片段。

[1213] MNSTLFSQVENHSVHSNFSEKNAQLLAFENDDCHLPLAMIFTLALAYGAVI

[1214] ILGVSGNLALIIIILKQKEMRNVTNILIVNLSFSDLLVAIMCLPFTFVYTLMDHWVFGEA MCKLNPFVQCVSITVSIFSLVLIAVERHQLIINPRGWRPNNRHAYVGIAVIWVLAVASSL PFLIYQVMTDEPFQNVTLDAYKDKYVCFDQFPSDSHRLSYTTLLLVLQYFGPLCFIFICY FKIYIRLKRRNNMMDKMRDNKYRSSETKRINIMLLSIVVAFAVCWLPLTIFNTVFDWN HQIIATCNHNLLFLLCHLTAMISTCVNPIFYGFLNKNFQRDLQFFFNFCDFRSRDDDYET IAMSTMHTDVSKTSLKQASPVAFKKINNNDDNEKI [SEQ ID NO: 42]。

[1215] 在本发明的一种形式中,Y1R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型Y1R蛋白序列。例如,Y1R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型Y1R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基336-384)。备选地或额外地,Y1R多肽序列可以包含带N端截短的野生型Y1R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型Y1R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基183-195)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的Y1R多肽包含如SEQ ID NO:42中所述的人野生型Y1R蛋白序列的氨基酸残基2-182和196-335。

[1216] 3.56编码Y1R多肽的构建体和核苷酸序列。

[1217] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的Y1R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1218] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号AY548168.1、NM_000909.5、BC071720.1、BC036657.2和AK312578.1中所述的人Y1R核苷酸(即,对应于NPY1R基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％序列同一性的Y1R核苷酸序列。

[1219] 在一些实施方案中,Y1R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物Y1R多核苷酸或其片段具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、92％、95％、99％或100％序列同一性。在一些实施方案中,Y1R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物Y1R蛋

白或其片段的可读框。

[1220] 3.57神经降压肽1受体(NTS1R)多肽

[1221] NTS1R介导神经降压肽的大部分已知作用,如调节多巴胺神经传递、体温过低、抗伤害感受和促进癌细胞生长。它还已经涉及帕金森病和精神分裂症发病机制(White等人,2012)。

[1222] 已经发表了NTS1R的晶体结构(White等人,2012),从而对受体的配体结合机制和活化机制提供了深入了解。NTS1R的胞外部分由N末端区段(人NTS1R的Met1-Asp59)、连接螺旋II和III的ECL1(人NTS1R的His131-Phe136)、连接螺旋IV和V的ECL2(人NTS1R的Gly208-His229)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人NTS1R的Ser330-Trp334)组成。它具有一个连接螺旋ECL2和III的二硫键(White等人,2012)。

[1223] 在本发明的具体实施方案中,NTS1R多肽包含NTS1R蛋白序列或与NTS1R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1224] 在一些实施方案中,NTS1R蛋白序列对应于哺乳动物NTS1R蛋白序列。合适的NTS1R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号M3X9J3)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2QKR3)、奶牛(UniProtKB登录号F1MWG2)、犬(UniProtKB登录号E2RN63)、大猩猩(UniProtKB登录号G3RLF9)、豚鼠(UniProtKB登录号H0W4P3)、刺猬(UniProtKB登录号A0A1S2ZJT3)、马(UniProtKB登录号F7BSR0)、人(UniProtKB登录号P30989)、狨猴(UniProtKB登录号U3D2G1)、小鼠(UniProtKB登录号088319)、大鼠(UniProtKB登录号P20789)、绵羊(UniProtKB登录号W5PSM7)、袋獾(UniProtKB登录号G3VE69)。

[1225] 在一些优选的实施方案中,NTS1R蛋白序列对应于人NTS1R蛋白序列。在一些实施方案中,NTS1R多肽包含如下文所述的人全长野生型NTS1R蛋白序列(UniProtKB登录号P30989)或野生型NTS1R蛋白序列的功能性片段。

[1226] MRLNSSAPGTPGTPAADPFQRAQAGLEEALLAPGFGNASGNASERVLAAPS
SELDVNTDIYSKVLVTAVYLALFVVGTVGNTVTAFTLARKKSLQSLQSTVHYHLGSLA
LSDLLTLLLAMPVELYNFIWVHHPWAFGDAGCRGYYFLRDACTYATALNVASLSVER
YLAICHPFKAKTLMSRSRTKKFISAIWLASALLAVPMLFTMGEQNRSADGQHAGGLVC

[1227] TPTIHTATVKVVIQVNTFMSFIFPMVVISVLNTIIANKLTVMVRQAAEQGQVCTVGGEH
STFSMAIEPGRVQALRHGVRVLRAVVIAFVVCWLPYHVRRLMFCYISDEQWTPFLYDF
YHYFYMVTNALFYVSSTINPILYNLVSANFRHIFLATLACLCPVWRRRRKRPAFSRKAD
SVSSNHTLSSNATRETLY [SEQ ID NO: 43]。

[1228] 在本发明的一种形式中,NTS1R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型NTS1R蛋白序列。例如,NTS1R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型NTS1R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基380-418)。备选地或额外地,NTS1R多肽序列可以包含带N端截短的野生型NTS1R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型NTS1R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基213-223)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的NTS1R多肽包含如SEQ ID NO:43中所述的人野生型NTS1R蛋白序列的氨基酸残基2-212和224-379。

[1229] 3.58编码NTS1R多肽的构建体和核苷酸序列。

[1230] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的NTS1R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1231] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号AY429106.1和NM_002531.2中所述的人NTS1R核苷酸(即,对应于NTS1R基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的NTS1R核苷酸序列。

[1232] 在一些实施方案中,NTS1R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物NTS1R多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,NTS1R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物NTS1R蛋白或其片段的可读框。

[1233] 3.59食欲肽受体1(OX1R)多肽

[1234] OX1R在调节进食、奖励、伤害感受和应激中具有重要作用。认为OX1R的拮抗可能在治疗睡眠障碍、肥胖症、疼痛和成瘾方面有益(Yin等人,2016)。

[1235] 已经发表了OX1R的晶体结构(Yin等人,2016),从而对受体的配体结合机制和活化机制提供了深入了解。OX1R的胞外部分由N末端区段(人OX1R的Met1-Tyr45)、连接螺旋II和III的ECL1(人OX1R的Glu110-Phe114)、连接螺旋IV和V的ECL2(人OX1R的Glu184-Asp208)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人OX1R的Gly325-Asp332)组成。

[1236] 在本发明的具体实施方案中,OX1R多肽包含OX1R蛋白序列或与OX1R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1237] 在一些实施方案中,OX1R蛋白序列对应于哺乳动物OX1R蛋白序列。合适的OX1R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号M3WN13)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2PYJ1)、奶牛(UniProtKB登录号Q0GBZ5)、犬(UniProtKB登录号E2R2A3)、豚鼠(UniProtKB登录号H0V9F2)、马(UniProtKB登录号F6Y1U3)、人(UniProtKB登录号O43613)、狨猴(UniProtKB登录号F7H2M7)、小鼠(UniProtKB登录号P58307)、猪(UniProtKB登录号F1SVA1)、猪(UniProtKB登录号O97661)、兔(UniProtKB登录号G1SPJ3)、大鼠(UniProtKB登录号P56718)、绵羊(UniProtKB登录号W5NTE0)。

[1238] 在一些优选的实施方案中,OX1R蛋白序列对应于人OX1R蛋白序列。在一些实施方案中,OX1R多肽包含如下文所述的人全长野生型OX1R蛋白序列(UniProtKB登录号O43613)或野生型OX1R蛋白序列的功能性片段。

[1239] MEPSATPGAQMGVPPGSREPSPVPPDYEDEFLRYLWRDYLYPKQYEWVLI

AAYVAVFVVALVGNTLVCLAVWRNHHMRTVTNYFIVNLSLADVLVTAICLPASLLVD
ITESWLFGHALCKVIPYLQAVSVSVAVLTLSFIALDRWYAICHPLLFKSTARRARGSILG
IWAVSLAIMVPQAAVMECSSVLPELANRTRLFSVCDERWADDLYPKIYHSCFFIVTYL
APLGLMAMAYFQIFRKLWGRQIPGTTSALVRNWKRPSDQLGDLEQGLSGEPQPRARA
FLAEVKQMRARRKTAKMLMVVLLVFALCYLPISVLNVLKRVFGMFRQASDREAVYA
CFTFSHWLVYANSAANPIIYNFLSGKFREQFKAAFSCCLPGLGPCGSLKAPSPRSSASHK
SLSLQSRCSISKISEHVVLTSVTTVLP [SEQ ID NO: 44]。

[1240] 在本发明的一种形式中,OX1R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型OX1R蛋白序列。例如,OX1R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型OX1R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基374-425)。备选地或额外地,OX1R多肽序列可以包含带N端截短的野生型OX1R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型OX1R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基189-196)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的OX1R多肽包含如SEQ ID NO:44中所述的人野生型OX1R蛋白序列的氨基酸残基2-188和197-373。

[1241] 3.60编码OX1R多肽的构建体和核苷酸序列。

[1242] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的OX1R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1243] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号AF041243.1、NM_001525.2和BC074796.2中所述的人OX1R核苷酸(即,对应于HCRTR1基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的OX1R核苷酸序列。

[1244] 在一些实施方案中,OX1R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物OX1R多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,OX1R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物OX1R蛋白或其片段的可读框。

[1245] 3.61食欲肽受体2(OX2R)多肽

[1246] 如同OX1R,认为OX2R可能在治疗睡眠障碍、肥胖症、疼痛和成瘾方面有益。但是,OX2R具有迥异于OX1R的生理功能,因为它优势地介导食欲肽肽的促觉醒作用(Yin等人,2016)。

[1247] 已经发表了OX2R的晶体结构(Yin等人,2015),从而对受体的配体结合机制和活化机制提供了深入了解。OX2R的胞外部分由N末端区段(人OX2R的Met1-Gu52)、连接螺旋II和III的ECL1(人OX2R的Glu118-Phe122)、连接螺旋IV和V的ECL2(人OX2R的Glu192-Gly216)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人OX2R的Gly331-Asp338)组成。

[1248] 在本发明的具体实施方案中,OX2R多肽包含OX2R蛋白序列或与OX2R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1249] 在一些实施方案中,OX2R蛋白序列对应于哺乳动物OX2R蛋白序列。合适的OX2R序

列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:猫(UniProtKB登录号M3X961)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2QT82)、奶牛(UniProtKB登录号F1MG23)、犬(UniProtKB登录号Q9TUP7)、大猩猩(UniProtKB登录号G3SII0)、马(UniProtKB登录号F6XS13)、人(UniProtKB登录号043614)、狨猴(UniProtKB登录号F7D3X8)、小鼠(UniProtKB登录号P58308)、熊猫(UniProtKB登录号G1MGF7)、猪(UniProtKB登录号062809)、兔(UniProtKB登录号G1STQ8)、大鼠(UniProtKB登录号P56719)、绵羊(UniProtKB登录号W5P9D8)。

[1250] 在一些优选的实施方案中,OX2R蛋白序列对应于人OX2R蛋白序列。在一些实施方案中,OX2R多肽包含如下文所述的人全长野生型OX2R蛋白序列(UniProtKB登录号043614)或野生型OX2R蛋白序列的功能性片段。

[1251] MSGTKLEDSPPCRNWSSASELNETQEPFLNPTDYDDEEFLRYLWREYLHPK EYEWVLIAGYIIVFVVALIGNVLVCVAVWKNHHMRTVTNYFIVNLSLADVLVTITCLP ATLVVDITETWFFGQSLCKVIPYLQTVSVSVSVLTLSCIALDRWYAICHPLMFKSTAKR ARNSIVIIWIVSCIIMIPQAIVMECSTVFPGLANKTTLFTVCDERWGGEIYPKMYHICFFL VTYMAPLCLMVLAYLQIFRKLWCRQIPGTSSVVQRKWKPLQPVSQPRGPGQPTKSRM SAVAAEIKQIRARRKTARMLMIVLLVFAICYLPISILNVLKRVFGMFAHTEDRETVYAW FTFSHWLVYANSAANPIIYNFLSGKFREEFKAAFSCCCLGVHHRQEDRLTRGRTSTESR KSLTTQISNFDNISKLSEQVVLTSISTLPAANGAGPLQNW [SEQ ID NO: 45]。

[1252] 在本发明的一种形式中,OX2R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型OX2R蛋白序列。例如,OX2R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型OX2R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基380-444)。备选地或额外地,OX2R多肽序列可以包含带N端截短的野生型OX2R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型OX2R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基195-204)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的OX2R多肽包含如SEQ ID NO:45中所述的人野生型OX2R蛋白序列的氨基酸残基2-194和205-379。

[1253] 3.62编码OX2R多肽的构建体和核苷酸序列。

[1254] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的OX2R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1255] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号AF041245.2、NM_001526.4、KC812500.1、KC812499.1、NG_012447.2和AF283760.1中所述的人OX2R核苷酸(即,对应于HCRTR2基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的OX2R核苷酸序列。

[1256] 在一些实施方案中,OX2R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物OX2R多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,OX2R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物OX2R蛋白或其片段的可读框。

[1257] 3.63前列腺素E1受体(EP1R)多肽

[1258] EP1R介导应激反应(ACTH分泌和应激行为)、促进化学性癌发生并且介导炎性热性痛觉过敏(Sugimoto和Narumiya,2007)。

[1259] 迄今,尚未公开EP1R的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征EP1R的胞外部分由N末端区段(人EP1R的Met1-Ser27)、连接螺旋II和III的ECL1(人EP1R的Ala101-Ala106)、连接螺旋IV和V的ECL2(人EP1R的Val176-Arg199)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人EP1R的Trp324-Ser328)组成。

[1260] 在本发明的具体实施方案中,EP1R多肽包含EP1R蛋白序列或与EP1R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1261] 在一些实施方案中,EP1R蛋白序列对应于哺乳动物EP1R蛋白序列。合适的EP1R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号P34995)、蝙蝠(UniProtKB登录号G1PBB3)、奶牛(UniProtKB登录号F1MUY4)、犬(UniProtKB登录号Q9BGL8)、蛙(UniProtKB登录号F7C7N3)、大猩猩(UniProtKB登录号G3S6M0)、恒河猴(UniProtKB登录号Q564H5)、狨猴(UniProtKB登录号F7HTH9)、猴(UniProtKB登录号A0A0D9R1Y9)、小鼠(UniProtKB登录号P35375)、熊猫(UniProtKB登录号G1M4C2)、大鼠(UniProtKB登录号P70597)、袋獾(UniProtKB登录号G3VPS1)。

[1262] 在一些优选的实施方案中,EP1R蛋白序列对应于人EP1R蛋白序列。在一些实施方案中,EP1R多肽包含如下文所述的人全长野生型EP1R蛋白序列(UniProtKB登录号P34995)或野生型EP1R蛋白序列的功能性片段。

[1263] MSPCGPLNLSLAGEATTCAAPWVPNTSAVPPSGASPALPIFSMTLGAVSNLL
ALALLAQAAGRLRRRRSAATFLLFVASLLATDLAGHVIPGALVLRLYTAGRAPAGGAC
HFLGGCMVFFGLCPLLLGCGMAVERCVGVTRPLLHAARVSVARARLALAAVAAVAL
AVALLPLARVGRYELQYPGTWCFIGLGPPGGWRQALLAGLFASLGLVALLAALVCNT
LSGLALLRARWRRRSRRPPPASGPDSRRRWGAHGPRSASASSASSIASASTFFGGSRSS
GSARRARAHDVEMVGQLVGIMVVSCICWSPMLVLVALAVGGWSSTSLQRPLFLAVRL
ASWNQILDPWVYILLRQAVLRQLLRLLPPRAGAKGGPAGLGLTPSAWEASSLRSSRHS
GLSHF [SEQ ID NO: 46]。

[1264] 在本发明的一种形式中,EP1R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型EP1R蛋白序列。例如,EP1R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型EP1R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基378-402)。备选地或额外地,EP1R多肽序列可以包含带N端截短的野生型EP1R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型EP1R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基185-189)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的EP1R多肽包含如SEQ ID NO:46中所述的人野生型EP1R蛋白序列的氨基酸残基2-184和190-377。

[1265] 3.64编码EP1R多肽的构建体和核苷酸序列。

[1266] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的EP1R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1267] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号AY275470.1、NM_000955.2和BC029768.1中所述的人EP1R核苷酸(即,对应于PTGER1基因)序列对应的序列。

在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％序列同一性的EP1R核苷酸序列。

[1268] 在一些实施方案中,EP1R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物EP1R多核苷酸或其片段具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、92％、95％、99％或100％序列同一性。在一些实施方案中,EP1R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物EP1R蛋白或其片段的可读框。

[1269] 3.65血清素5-HT1a受体(5-HT1aR)多肽

[1270] 5-HT1aR涉及介导焦虑、应激反应、抑郁、精神分裂症和成瘾。认为它还具有对抗缺血性脑损害的神经保护作用(Nichols和Nichols,2008)。

[1271] 迄今,尚未公开5-HT1aR的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征5-HT1aR的胞外部分由N末端区段(人5-HT1aR的Met1-Thr32)、连接螺旋II和III的ECL1(人5-HT1aR的Asn100-Leu104)、连接螺旋IV和V的ECL2(人5-HT1aR的Trp175-Lys191)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人5-HT1aR的Cys371-Met377)组成。认为它在螺旋III和ECL2之间形成一个二硫键(Nichols和Nichols,2008)。

[1272] 在本发明的具体实施方案中,5-HT1aR多肽包含5-HT1aR蛋白序列或与5-HT1aR蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％序列同一性或相似性。

[1273] 在一些实施方案中,5-HT1aR蛋白序列对应于哺乳动物5-HT1aR蛋白序列。合适的5-HT1aR序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号P08908)、短吻鳄(UniProtKB登录号A0A151MXE8)、鸡(UniProtKB登录号D2K8P9)、黑猩猩(UniProtKB登录号Q9N298)、犬(UniProtKB登录号Q6XXX9)、狐狸(UniProtKB登录号Q6XXY0)、蛙(UniProtKB登录号Q98998)、大猩猩(UniProtKB登录号Q9N297)、马(UniProtKB登录号Q0EAB6)、小鼠(UniProtKB登录号Q64264)、猩猩(UniProtKB登录号Q9N296)、大鼠(UniProtKB登录号P19327)。

[1274] 在一些优选的实施方案中,5-HT1aR蛋白序列对应于人5-HT1aR蛋白序列。在一些实施方案中,5-HT1aR多肽包含如下文所述的人全长野生型5-HT1aR蛋白序列(UniProtKB登录号P08908)或野生型5-HT1aR蛋白序列的功能性片段。

[1275] MDVLSPGQGNNTTSPPAPFETGGNTTGISDVTVSYQVITSLLLGTLIFCAVL
GNACVVAAIALERSLQNVANYLIGSLAVTDLMVSVLVLPMAALYQVLNKWTLGQVT
CDLFIALDVLCCTSSILHLCAIALDRYWAITDPIDYVNKRTPRRAAALISLTWLIGFLISIP
PMLGWRTPEDRSDPDACTISKDHGYTIYSTFGAFYIPLLLMLVLYGRIFRAARFRIRKTV
KKVEKTGADTRHGASPAPQPKKSVNGESGSRNWRLGVESKAGGALCANGAVRQGDD
GAALEVIEVHRVGNSKEHLPLPSEAGPTPCAPASFERKNERNAEAKRKMALARERKTV
KTLGIIMGTFILCWLPFFIVALVLPFCESSCHMPTLLGAIINWLGYSNSLLNPVIYAYFNK
DFQNAFKKIIKCKFCRQ [SEQ ID NO: 47]。

[1276] 在本发明的一种形式中,5-HT1aR多肽包含截短形式的哺乳动物野生型5-HT1aR蛋白序列。例如,5-HT1aR多肽序列可以包含带C端截短的人野生型5-HT1aR蛋白序列(例如,可

以截去氨基酸残基416-2)。备选地或额外地,5-HT1aR多肽序列可以包含带N端截短的野生型5-HT1aR蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型5-HT1aR蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基181-187)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的5-HT1aR多肽包含如SEQ ID NO:47中所述的人野生型5-HT1aR蛋白序列的氨基酸残基2-180和188-415。

[1277] 3.66编码5-HT1aR多肽的构建体和核苷酸序列。

[1278] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的5-HT1aR多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1279] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_000524.3、AF498978.1、NG_032816.1、AB041403.1、BC136263.1和BC069159.1中所述的人5-HT1aR核苷酸(即,对应于HTR1A基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的5-HT1aR核苷酸序列。

[1280] 在一些实施方案中,5-HT1aR多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物5-HT1aR多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,5-HT1aR多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物5-HT1aR蛋白或其片段的可读框。

[1281] 3.67血清素5-HT2a受体(5-HT2aR)多肽

[1282] 在CNS中,5-HT2aR是致幻作用的关键位点之一。在外周中,5-HT2aR具有多种其他功能,包括动脉成纤维细胞增殖、主动脉平滑肌细胞移行、动脉血管收缩和痛觉缺失(Nichols和Nichols,2008)。

[1283] 迄今,尚未公开5-HT2aR的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征5-HT2aR的胞外部分由N末端区段(人5-HT2aR的Met1-Glu73)、连接螺旋II和III的ECL1(人5-HT2aR的Gly138-Leu143)、连接螺旋IV和V的ECL2(人5-HT2aR的Leu215-Ala-230)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人5-HT2aR的Lys350-Asn354)组成。认为它在螺旋III和ECL2之间形成一个二硫键(Nichols和Nichols,2008)。

[1284] 在本发明的具体实施方案中,5-HT2aR多肽包含5-HT2aR蛋白序列或与5-HT2aR蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1285] 在一些实施方案中,5-HT2aR蛋白序列对应于哺乳动物5-HT2aR蛋白序列。合适的5-HT2aR序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号P28223)、鸡(UniProtKB登录号E1BVI5)、奶牛(UniProtKB登录号Q75Z89)、犬(UniProtKB登录号046635)、仓鼠(UniProtKB登录号P18599)、刺猬(UniProtKB登录号A0A1S2ZLM4)、恒河猴(UniProtKB登录号P50128)、小鼠(UniProtKB登录号P35363)、猩猩(UniProtKB登录号Q5R4Q6)、猪(UniProtKB登录号P50129)、大鼠(UniProtKB登录号P14842)。

[1286] 在一些优选的实施方案中,5-HT2aR蛋白序列对应于人5-HT2aR蛋白序列。在一些实施方案中,5-HT2aR多肽包含如下文所述的人全长野生型5-HT2aR蛋白序列(UniProtKB登

录号P28223)或野生型5-HT2aR蛋白序列的功能性片段。

[1287] MDILCEENTSLSSTTNSLMQLNDDTRLYSNDFNSGEANTSDAFNWTVDSEN RTNLSCEGCLSPSCLSLLHLQEKNWSALLTAVVIILTIAGNILVIMAVSLEKKLQNATNY FLMSLAIADMLLGFLVMPVSMLTILYGYRWPLPSKLCAVWIYLDVLFSTASIMHLCAIS LDRYVAIQNPIHHSRFNSRTKAFLKIIAVWTISVGISMPIPVFGLQDDSKVFKEGSCLLA DDNFVLIGSFVSFFIPLTIMVITYFLTIKSLQKEATLCVSDLGTRAKLASFSFLPQSSLSSE KLFQRSIHREPGSYTGRRTMQSISNEQKACKVLGIVFFLFVVMWCPFFITNIMAVICKES CNEDVIGALLNVFVWIGYLSSAVNPLVYTLFNKTYRSAFSRYIQCQYKENKKPLQLILV NTIPALAYKSSQLQMGQKKNSKQDAKTTDNDCSMVALGKQHSEEASKDNSDGVNEK VSCV [SEQ ID NO: 48]。

[1288] 在本发明的一种形式中,5-HT2aR多肽包含截短形式的哺乳动物野生型5-HT2aR蛋白序列。例如,5-HT2aR多肽序列可以包含带C端截短的人野生型5-HT2aR蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基396-471)。备选地或额外地,5-HT2aR多肽序列可以包含带N端截短的野生型5-HT2aR蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型5-HT2aR蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基219-224)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的5-HT2aR多肽包含如SEQ ID NO:48中所述的人野生型5-HT2aR蛋白序列的氨基酸残基2-218和225-397。

[1289] 3.68编码5-HT2aR多肽的构建体和核苷酸序列。

[1290] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的5-HT2aR多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1291] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_000621.4、NM_001165947.2、NG_013011.1、AF498982.1、EU796424.1、EU796429.1、EU796434.1、KC603613.1、BC074849.2、BC074848.2、BC069576.1和BC069356.1中所述的人5-HT2aR核苷酸(即,对应于HTR2A基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的5-HT2aR核苷酸序列。

[1292] 在一些实施方案中,5-HT2aR多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物5-HT2aR多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,5-HT2aR多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物5-HT2aR蛋白或其片段的可读框。

[1293] 3.69血清素5-HT2b受体(5-HT2bR)多肽

[1294] 在CNS中,5-HT2bR似乎在听觉系统中具有作用并且与药物滥用易感性相关。但是,它更多高度表达于外周中,在外周,它在发育期间重要,协调心脏和脑的正确形成(Nichols和Nichols,2008)。

[1295] 迄今,两项研究已经报道了解析CXCR4晶体结构,为它怎样结合其配体提供深入了解(Liu等人,2013;Wacker等人,2013)。5-HT2bR的胞外部分由N末端区段(人5-HT2bR的Met1-Lys53)、连接螺旋II和III的ECL1(人5-HT2bR的Glu118-Leu123)、连接螺旋IV和V的ECL2(人5-HT2bR的Ile195-Arg213)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人5-HT2bR的Asp351-

Asn354)组成。认为它在螺旋III和ECL2之间形成一个二硫键(Nichols和Nichols,2008)。

[1296] 在本发明的具体实施方案中,5-HT2bR多肽包含5-HT2bR蛋白序列或与5-HT2bR蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％序列同一性或相似性。

[1297] 在一些实施方案中,5-HT2bR蛋白序列对应于哺乳动物5-HT2bR蛋白序列。合适的5-HT2bR序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号P41595)、猫(UniProtKB登录号M3WRH8)、catfish(UniProtKB登录号W5UAH8)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2QJL0)、奶牛(UniProtKB登录号F6QI78)、蛙(UniProtKB登录号F6WGJ8)、豚鼠(UniProtKB登录号A3RL34)、hedgehig(UniProtKB登录号A0A1S2ZHK9)、马(UniProtKB登录号F6V714)、恒河猴(UniProtKB登录号F7HQF4)、小鼠(UniProtKB登录号Q02152)、大鼠(UniProtKB登录号P30994)、绵羊(UniProtKB登录号W5QHN7)、斑马鱼(UniProtKB登录号Q0GH74)。

[1298] 在一些优选的实施方案中,5-HT2bR蛋白序列对应于人5-HT2bR蛋白序列。在一些实施方案中,5-HT2bR多肽包含如下文所述的人全长野生型5-HT2bR蛋白序列(UniProtKB登录号P41595)或野生型5-HT2bR蛋白序列的功能性片段。

[1299] MALSYRVSELQSTIPEHILQSTFVHVISSNWSGLQTESIPEEMKQIVEEQGNK LHWAALLILMVIIPTIGGNTLVILAVSLEKKLQYATNYFLMSLAVADLLVGLFVMPIAL LTIMFEAMWPLPLVLCPAWLFLDVLFSTASIMHLCAISVDRYIAIKKPIQANQYNSRAT AFIKITVVWLISIGIAIPVPIKGIETDVDNPNNITCVLTKERFGDFMLFGSLAAFFTPLAIMI VTYFLTIHALQKKAYLVKNKPPQRLTWLTVSTVFQRDETPCSSPEKVAMLDGSRKDK ALPNSGDETLMRRTSTIGKKSVQTISNEQRASKVLGIVFFLFLLMWCPFFITNITLVLCD SCNQTTLQMLLEIFVWIGYVSSGVNPLVYTLFNKTFRDAFGRYITCNYRATKSVKTLR KRSSKIYFRNPMAENSKFFKKHGIRNGINPAMYQSPMRLRSSTIQSSSIILLDTLLLTENE GDKTEEQVSYV [SEQ ID NO: 49]。

[1300] 在本发明的一种形式中,5-HT2bR多肽包含截短形式的哺乳动物野生型5-HT2bR蛋白序列。例如,5-HT2bR多肽序列可以包含带C端截短的人野生型5-HT2bR蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基396-481)。备选地或额外地,5-HT2bR多肽序列可以包含带N端截短的野生型5-HT2bR蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型5-HT2bR蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基200-208)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的5-HT2bR多肽包含如SEQ ID NO:49中所述的人野生型5-HT2bR蛋白序列的氨基酸残基2-199和209-395。

[1301] 3.70编码5-HT2bR多肽的构建体和核苷酸序列。

[1302] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的5-HT2bR多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1303] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_001320758.1、NM_000867.4、EU796439.1、EU796444.1、AY114103.1、AH007819.3、AY136751.1和BC063123.1中所述的人5-HT2bR核苷酸(即,对应于HTR2B基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％序列同

一性的5-HT2BR核苷酸序列。

[1304] 在一些实施方案中,5-HT2bR多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物5-HT2bR多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,5-HT2bR多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物5-HT2bR蛋白或其片段的可读框。

[1305] 3.71血清素5-HT2c受体(5-HT2cR)多肽

[1306] 已经显示5-HT2cR调节中脑边缘多巴胺能功能。另外,认为它们在介导焦虑、体重调节和精神兴奋药滥用中发挥作用(Nichols和Nichols,2008)。

[1307] 迄今,尚未公开5-HT2cR的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征5-HT2cR的胞外部分由N末端区段(人5-HT2cR的Met1-Val52)、连接螺旋II和III的ECL1(人5-HT2cR的Asp117-Leu122)、连接螺旋IV和V的ECL2(人5-HT2cR的Leu194-Asn210)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人5-HT2cR的Glu338-Asn342)组成。认为它在螺旋III和ECL2之间形成一个二硫键(Nichols和Nichols,2008)。

[1308] 在本发明的具体实施方案中,5-HT2cR多肽包含5-HT2cR蛋白序列或与5-HT2cR蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1309] 在一些实施方案中,5-HT2cR蛋白序列对应于哺乳动物5-HT2cR蛋白序列。合适的5-HT2cR序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号P28335)、短吻鳄(UniProtKB登录号A0A151N7D9)、狒狒(UniProtKB登录号A0A096MPH1、猫(UniProtKB登录号M3X5M0)、鸡(UniProtKB登录号F1N989)、黑猩猩(UniProtKB登录号Q5IS66)、犬(UniProtKB登录号Q60F97)、蛙(UniProtKB登录号F7AZS9)、刺猬(UniProtKB登录号A0A1S3ADC2)、马(UniProtKB登录号F6PSU6)、人(UniProtKB登录号P28335)、恒河猴(UniProtKB登录号F7A578)、小鼠(UniProtKB登录号P34968)、猪(UniProtKB登录号G8YY03)、大鼠(UniProtKB登录号P08909)。

[1310] 在一些优选的实施方案中,5-HT2cR蛋白序列对应于人5-HT2cR蛋白序列。在一些实施方案中,5-HT2cR多肽包含如下文所述的人全长野生型5-HT2cR蛋白序列(UniProtKB登录号P28335)或野生型5-HT2cR蛋白序列的功能性片段。

[1311] MVNLRNAVHSFLVHLIGLLVWQCDISVSPVAAIVTDIFNTSDGGRFKFPDG

[1312] VQNWPALSIVIIIIMTIGGNILVIMAVSMEKKLHNATNYFLMSLAIADMLVGLLVMPLS
LLAILYDYVWLPRYLCPVWISLDVLFSTASIMHLCAISLDRYVAIRNPIEHSRFNSRTKAI
MKIAIVWAISIGVSVPIPVIGLRDEEKVFVNNTTCVLNDPNFVLIGSFVAFFIPLTIMVITY
CLTIYVLRRQALMLLHGHTEEPPGLSLDFLKCCKRNTAEEENSANPNQDQNARRRKKK
ERRPRGTMQAINNERKASKVLGIVFFVFLIMWCPFFITNILSVLCEKSCNQKLMEKLLN
VFVWIGYVCSGINPLVYTLFNKIYRRAFSNYLRCNYKVEKKPPVRQIPRVAATALSGRE
LNVNIYRHTNEPVIEKASDNEPGIEMQVENLELPVNPSSVVSERISSV [SEQ ID NO: 50]。

[1313] 在本发明的一种形式中,5-HT2cR多肽包含截短形式的哺乳动物野生型5-HT2cR蛋白序列。例如,5-HT2cR多肽序列可以包含带C端截短的人野生型5-HT2cR蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基384-458)。备选地或额外地,5-HT2cR多肽序列可以包含带N端截短的野

生型5-HT2cR蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型5-HT2cR蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基198-205)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的5-HT2cR多肽包含如SEQ ID NO:50中所述的人野生型5-HT2cR蛋白序列的氨基酸残基2-197和206-383。

[1314] 3.72编码5-HT2cR多肽的构建体和核苷酸序列

[1315] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的5-HT2cR多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1316] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_001256760.2、NM_000868.3、NM_001256761.2、NG_012082.2、EU796454.1、AF498983.1和BC095543.1中所述的人5-HT2cR核苷酸(即,对应于HTR2C基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的5-HT2CR核苷酸序列。

[1317] 在一些实施方案中,5-HT2cR多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物5-HT2cR多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,5-HT2cR多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物5-HT2cR蛋白或其片段的可读框。

[1318] 3.73血清素5-HT4受体(5-HT4R)多肽

[1319] 在CNS中,认为5-HT4R涉及学习和记忆及运动活动的介导。在外周中,它们在胃肠道功能和心血管功能中发挥作用(Nichols和Nichols,2008)。

[1320] 迄今,尚未公开5-HT4R的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征5-HT4R的胞外部分由N末端区段(人5-HT4R的Met1-Ser10)、连接螺旋II和III的ECL1(人5-HT4R的Glu84-Tyr88)、连接螺旋IV和V的ECL2(人5-HT4R的Trp161-Val188)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人5-HT4R的Glu286-Val289)组成。认为它在螺旋III和ECL2之间形成一个二硫键(Nichols和Nichols,2008)。

[1321] 在本发明的具体实施方案中,5-HT4R多肽包含5-HT4R蛋白序列或与5-HT4R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1322] 在一些实施方案中,5-HT4R蛋白序列对应于哺乳动物5-HT4R蛋白序列。合适的5-HT4R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号Q13639)、短吻鳄(UniProtKB登录号A0A151M6L1)、奶牛(UniProtKB登录号Q5E9Q5)、蛙(UniProtKB登录号F7BIA5)、豚鼠(UniProtKB登录号O70528)、刺猬(UniProtKB登录号A0A1S2ZAK9)、马(UniProtKB登录号D2Y0Z2)、狨猴(UniProtKB登录号F7FE43)、小鼠(UniProtKB登录号P97288)、猪(UniProtKB登录号F1RLB0)、大鼠(UniProtKB登录号Q62758)。

[1323] 在一些优选的实施方案中,5-HT4R蛋白序列对应于人5-HT4R蛋白序列。在一些实施方案中,5-HT4R多肽包含如下文所述的人全长野生型5-HT4R蛋白序列(UniProtKB登录号Q13639)或野生型5-HT4R蛋白序列的功能性片段。

[1324] MDKLDANVSSEEGFGSVEKVVLLTFLSTVILMAILGNLLVMVAVCWDRQL RKIKTNYFIVSLAFADLLVSVLVMPFGAIELVQDIWIYGEVFCLVRTSLDVLLTTASIFH LCCISLDRYYAICCQPLVYRNKMTPLRIALMLGGCWVIPTFISFLPIMQGWNNIGIIDLIE KRKFNQNSNSTYCVFMVNKPYAITCSVVAFYIPFLLMVLAYYRIYVTAKEHAHQIQML QRAGASSESRPQSADQHSTHRMRTETKAAKTLCIIMGCFCLCWAPFFVTNIVDPFIDYT VPGQVWTAFLWLGYINSGLNPFLYAFLNKSFRRAFLIILCCDDERYRRPSILGQTVPCST TTINGSTHVLRDAVECGGQWESQCHPPATSPLVAAQPSDT [SEQ ID NO: 51]。

[1325] 在本发明的一种形式中,5-HT4R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型5-HT4R蛋白序列。例如,5-HT4R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型5-HT4R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基329-388)。备选地或额外地,5-HT4R多肽序列可以包含带N端截短的野生型5-HT4R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型5-HT4R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基166-183)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的5-HT4R多肽包含如SEQ ID NO:51中所述的人野生型5-HT4R蛋白序列的氨基酸残基2-165和184-328。

[1326] 3.74编码5-HT4R多肽的构建体和核苷酸序列。

[1327] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的5-HT4R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1328] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_000870.6、NM_001286410.1、NM_001040173.2、NM_001040172.2、NM_001040169.2、NM_199453.3、NR_104445.1、NG_029052.1、AM712912.1、AJ633645.1、AJ278982.1、AJ278981.1、AJ278980.1、AJ278979.1、AB070620.2和AB070621.1中所述的人5-HT4R核苷酸(即,对应于HTR4基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的5-HT4R核苷酸序列。

[1329] 在一些实施方案中,5-HT4R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物5-HT4R多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,5-HT4R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物5-HT4R蛋白或其片段的可读框。

[1330] 3.75生长抑素2受体(SST2R)多肽

[1331] SST2R遍及身体广泛表达,包括脑、肺、心脏、胃、肾脏、肝脏和众多类型免疫细胞(De Martino等人,2010)。认为它介导细胞周期调节、凋亡和转录性调节(Theodoropoulou和Stalla,2013)。

[1332] 迄今,尚未公开SST2R的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征SST2R的胞外部分由N末端区段(人SST2R的Met1-Glu39)、连接螺旋II和III的ECL1(人SST2R的Va1106-Phe110)、连接螺旋IV和V的ECL2(人SST2R的Gly182-Glu200)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人SST2R的Ala283-Pro286)组成。认为它在螺旋III和ECL2之间形成一个二硫键(Patel,1999)。

[1333] 在本发明的具体实施方案中,SST2R多肽包含SST2R蛋白序列或与SST2R蛋白序列

共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％序列同一性或相似性。

[1334] 在一些实施方案中,SST2R蛋白序列对应于哺乳动物SST2R蛋白序列。合适的SST2R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号P30874)、短吻鳄(UniProtKB登录号A0A151N260)、carp(UniProtKB登录号B2D1T6)、猫(UniProtKB登录号M3W2Q8)、鸡(UniProtKB登录号Q58G84)、黑猩猩(UniProtKB登录号G2HFH4)、奶牛(UniProtKB登录号P34993)、犬(UniProtKB登录号Q49LX6)、蛙(UniProtKB登录号F6T888)、恒河猴(UniProtKB登录号G7NJD6)、小鼠(UniProtKB登录号P30875)、猪(UniProtKB登录号P34994)、兔(UniProtKB登录号G1SX13)、大鼠(UniProtKB登录号P30680)、绵羊(UniProtKB登录号W5NPT8)。

[1335] 在一些优选的实施方案中,SST2R蛋白序列对应于人SST2R蛋白序列。在一些实施方案中,SST2R多肽包含如下文所述的人全长野生型SST2R蛋白序列(UniProtKB登录号P30874)或野生型SST2R蛋白序列的功能性片段。

[1336] MDMADEPLNGSHTWLSIPFDLNGSVVSTNTSNQTEPYYDLTSNAVLTFIYF

[1337] VVCIIGLCGNTLVIYVILRYAKMKTITNIYILNLAIADELFMLGLPFLAMQVALVHWPFG KAICRVVMTVDGINQFTSIFCLTVMSIDRYLAVVHPIKSAKWRRPRTAKMITMAVWGV SLLVILPIMIYAGLRSNQWGRSSCTINWPGESGAWYTGFIIYTFILGFLVPLTIICLCYLFII IKVKSSGIRVGSSKRKKSEKKVTRMVSIVVAVFIFCWLPFYIFNVSSVSMAISPTPALKG MFDFVVVLTYANSCANPILYAFLSDNFKKSFQNVLCLVKVSGTDDGERSDSKQDKSRL NETTETQRTLLNGDLQTSI [SEQ ID NO: 52]。

[1338] 在本发明的一种形式中,SST2R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型SST2R蛋白序列。例如,SST2R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型SST2R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基329-369)。备选地或额外地,SST2R多肽序列可以包含带N端截短的野生型SST2R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型SST2R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基183-193)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的SST2R多肽包含如SEQ ID NO:52中所述的人野生型SST2R蛋白序列的氨基酸残基2-182和194-328。

[1339] 3.76编码SST2R多肽的构建体和核苷酸序列。

[1340] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的SST2R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1341] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_001050.2、NG_029371.1、L34689.1、AY236542.1、M81830.1、AF184174.1、L13033.1、BC095495.1和BC019610.1中所述的人SST2R核苷酸(即,对应于SSTR2基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％序列同一性的SST2R核苷酸序列。

[1342] 在一些实施方案中,SST2R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物SST2R多核苷酸或其片段具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、92％、95％、99％或100％序列同一性。在一些实施方案中,SST2R多

核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物SST2R蛋白或其片段的可读框。

[1343] 3.77鞘氨醇1-磷酸受体1(S1P1R)多肽

[1344] S1P1R介导多种生理功能,包括星形细胞移行、B细胞趋化和离开抑制、T细胞趋化和离开抑制、心肌细胞正性肌力升高、早期血管系统发育和神经干细胞移行(Rosen等人,2009)。

[1345] 已经发表了S1P1R的晶体结构(Hanson等人,2012),从而对受体的配体结合机制和活化机制提供了深入了解。S1P1R的胞外部分由N末端区段(人S1P1R的Met1-Lys41)、连接螺旋II和III的ECL1(人S1P1R的Ser105-Leu112)、连接螺旋IV和V的ECL2(人S1P1R的Trp182-Tyr198)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人S1P1R的Lys283-Cys287)组成。两个二硫键帮助S1P1R的胞外侧面定型(Hansan等人,2012)。

[1346] 在本发明的具体实施方案中,S1P1R多肽包含S1P1R蛋白序列或与S1P1R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1347] 在一些实施方案中,S1P1R蛋白序列对应于哺乳动物S1P1R蛋白序列。合适的S1P1R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号P21453)、短吻鳄(UniProtKB登录号A0A151M4S4)、猫(UniProtKB登录号M3W6R4)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2PZI1)、奶牛(UniProtKB登录号Q5E9P3)、犬(UniProtKB登录号W5VNF7)、豚鼠(UniProtKB登录号H0V7G9)、刺猬(UniProtKB登录号A0A1S3A399)、恒河猴(UniProtKB登录号H9EUW9)、狨猴(UniProtKB登录号F7HBI1)、小鼠(UniProtKB登录号O08530)、兔(UniProtKB登录号G1T9R2)、大鼠(UniProtKB登录号P48303)、袋獾(UniProtKB登录号G3WFF9)、乌龟(UniProtKB登录号K7F150)。

[1348] 在一些优选的实施方案中,S1P1R蛋白序列对应于人S1P1R蛋白序列。在一些实施方案中,S1P1R多肽包含如下文所述的人全长野生型S1P1R蛋白序列(UniProtKB登录号P21453)或野生型S1P1R蛋白序列的功能性片段。

[1349] MGPTSVPLVKAHRSSVSDYVNYDIIVRHYNYTGKLNISADKENSIKLTSVVF
ILICCFIILENIFVLLTIWKTKKFHRPMYYFIGNLALSDLLAGVAYTANLLLSGATTYKLT
PAQWFLREGSMFVALSASVFSLLAIAIERYITMLKMKLHNGSNNFRLFLLISACWVISLI
LGGLPIMGWNCISALSSCSTVLPLYHKHYILFCTTVFTLLLLSIVILYCRIYSLVRTRSRR
LTFRKNISKASRSSEKSLALLKTVIIVLSVFIACWAPLFILLLLDVGCKVKTCDILFRAEY
FLVLAVLNSGTNPIIYTLTNKEMRRAFIRIMSCCKCPSGDSAGKFKRPIIAGMEFSRSKS
DNSSHPQKDEGDNPETIMSSGNVNSSS [SEQ ID NO: 53]。

[1350] 在本发明的一种形式中,S1P1R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型S1P1R蛋白序列。例如,S1P1R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型S1P1R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基328-382)。备选地或额外地,S1P1R多肽序列可以包含带N端截短的野生型S1P1R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型S1P1R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基187-193)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的S1P1R多肽包含如SEQ ID NO:53中所述的人野生型S1P1R蛋白序列的氨基酸残基2-186和194-327。

[1351] 3.78编码S1P1R多肽的构建体和核苷酸序列。

[1352] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的S1P1R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1353] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_001320730.1、NM_001400.4、NG_016181.1和BC018650.1中所述的人S1P1R核苷酸(即,对应于S1PR1基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的S1P1R核苷酸序列。

[1354] 在一些实施方案中,S1P1R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物S1P1R多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,S1P1R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物S1P1R蛋白或其片段的可读框。

[1355] 3.79鞘氨醇1-磷酸受体3(S1P3R)多肽

[1356] S1P3R存在于脑、心脏、脾脏、肝脏、肺、胸腺、肾脏、睾丸和骨骼肌中。它介导多种生理功能,包括局部缺血-再灌注后的心肌细胞存活在和树状细胞致死性/炎症/凝集(Rosen等人,2009)。

[1357] 迄今,尚未公开S1P3R的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征S1P3R的胞外部分由N末端区段(人S1P3R的Met1-Ala35)、连接螺旋II和III的ECL1(人S1P3R的Ser99-Leu106)、连接螺旋IV和V的ECL2(人S1P3R的Trp176-Tyr192)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人S1P3R的Arg270-Cys274)组成。

[1358] 在本发明的具体实施方案中,S1P3R多肽包含S1P3R蛋白序列或与S1P3R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1359] 在一些实施方案中,S1P3R蛋白序列对应于哺乳动物S1P3R蛋白序列。合适的S1P3R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号Q99500)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2RBL8)、奶牛(UniProtKB登录号A6QR17)、犬(UniProtKB登录号E2RF74)、豚鼠(UniProtKB登录号H0WDH2)、刺猬(UniProtKB登录号A0A1S3ASI7)、恒河猴(UniProtKB登录号G7NEM6)、狨猴(UniProtKB登录号F7F4H4)、小鼠(UniProtKB登录号Q9Z0U9)、猩猩(UniProtKB登录号K7EVQ8)、兔(UniProtKB登录号G1T9A8)、大鼠(UniProtKB登录号F1M9D3)、鲑鱼(UniProtKB登录号A0A1S3LU52)、袋獾(UniProtKB登录号G3VPD8)。

[1360] 在一些优选的实施方案中,S1P3R蛋白序列对应于人S1P3R蛋白序列。在一些实施方案中,S1P3R多肽包含如下文所述的人全长野生型S1P3R蛋白序列(UniProtKB登录号Q99500)或野生型S1P3R蛋白序列的功能性片段。

[1361] MATALPPRLQPVRGNETLREHYQYVGKLAGRLKEASEGSTLTTVLFLVICS
FIVLENLMVLIAIWKNNKFHNRMYFFIGNLALCDLLAGIAYKVNILMSGKKTFSLSPTV
WFLREGSMFVALGASTCSLLAIAIERHLTMIKMRPYDANKRHRVFLLIGMCWLIAFTL
GALPILGWNCLHNLPDCSTILPLYSKKYIAFCISIFTAILVTIVILYARIYFLVKSSSRKVA

NHNNSERSMALLRTVVIVVSVFIACWSPLFILFLIDVACRVQACPILFKAQWFIVLAVLN

[1362] SAMNPVIYTLASKEMRRAFFRLVCNCLVRGRGARASPIQPALDPSRSKSSSSNNSSHSP KVKEDLPHTAP SSCIMDKNAALQNGIFCN [SEQ ID NO: 54]。

[1363] 在本发明的一种形式中,S1P3R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型S1P3R蛋白序列。例如,S1P3R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型S1P3R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基315-378)。备选地或额外地,S1P3R多肽序列可以包含带N端截短的野生型S1P3R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型S1P3R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基181-188)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的S1P3R多肽包含如SEQ ID NO:54中所述的人野生型S1P3R蛋白序列的氨基酸残基2-180和189-314。

[1364] 3.80编码S1P3R多肽的构建体和核苷酸序列。

[1365] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的S1P3R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1366] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_005226.3、BC060827.1和BC069579.1中所述的人S1P3R核苷酸(即,对应于S1PR3基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的S1P3R核苷酸序列。

[1367] 在一些实施方案中,S1P3R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物S1P3R多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,S1P3R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物S1P3R蛋白或其片段的可读框。

[1368] 3.81促甲状腺素释放激素受体1(TRH1R)多肽

[1369] TRH1R刺激催乳素和促甲状腺素的释放(Perret等人,1988)并且TRH对TRH1R的作用是甲状腺轴正常功能必需的(Hollenberg,2008)。

[1370] 迄今,尚未公开TRH1R的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征。TRH1R的胞外部分由N末端区段(人TRH1R的Met1-Ala21)、连接螺旋II和III的ECL1(人TRH1R的Tyr88-Tyr93)、连接螺旋IV和V的ECL2(人TRH1R的Asp165-Ile183)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人TRH1R的Ser293-Gln297)组成。

[1371] 在本发明的具体实施方案中,TRH1R多肽包含TRH1R蛋白序列或与TRH1R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1372] 在一些实施方案中,TRH1R蛋白序列对应于哺乳动物TRH1R蛋白序列。合适的TRH1R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号P34981)、短吻鳄(UniProtKB登录号A0A151P2B9)、鸡(UniProtKB登录号093603)、奶牛(UniProtKB登录号046639)、蛙(UniProtKB登录号F6X115)、刺猬(UniProtKB登录号A0A1S2ZTF7)、恒河猴(UniProtKB登录号F7DWM0)、小鼠(UniProtKB登录号P21761)、猪(UniProtKB登录号D5FUH1)、大鼠(UniProtKB登录号Q01717)、绵羊(UniProtKB登录号

Q28596)。

[1373] 在一些优选的实施方案中,TRH1R蛋白序列对应于人TRH1R蛋白序列。在一些实施方案中,TRH1R多肽包含如下文所述的人全长野生型TRH1R蛋白序列(UniProtKB登录号P34981)或野生型TRH1R蛋白序列的功能性片段。

[1374] MENETVSELNQTQLQPRAVVALEYQVVTILLVLIICGLGIVGNIMVVLVVM RTKHMRTPTNCYLVSLAVADLMVLVAAGLPNITDSIYGSWVYGYVGCLCITYLQYLGI NASSCSITAFTIERYIAICHPIKAQFLCTFSRAKKIIIFVWAFTSLYCMLWFFLLDLNISTY KDAIVISCGYKISRNYYSPIYLMDFGVFYVVPMILATVLYGFIARILFLNPIPSDPKENSK TWKNDSTHQNTNLNVNTSNRCFNSTVSSRKQVTKMLAVVVILFALLWMPYRTLVVV NSFLSSPFQENWFLLFCRICIYLNSAINPVIYNLMSQKFRAAFRKLCNCKQKPTEKPANY SVALNYSVIKESDHFSTELDDITVTDTYLSATKVSFDDTCLASEVSFSQS [SEQ ID NO: 55]。

[1375] 在本发明的一种形式中,TRH1R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型TRH1R蛋白序列。例如,TRH1R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型TRH1R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基337-398)。备选地或额外地,TRH1R多肽序列可以包含带N端截短的野生型TRH1R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型TRH1R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基167-175)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的TRH1R多肽含有如SEQ ID NO:55中所述的人野生型TRH1R蛋白序列的氨基酸残基2-166和176-336。

[1376] 3.82编码TRH1R多肽的构建体和核苷酸序列。

[1377] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的TRHR多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1378] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_003301.5、NG_017161.1、AJ011701.1、BC113360.1、BC105045.1和AY493373.1中所述的人TRHR核苷酸(即,对应于TRHR基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的TRHR核苷酸序列。

[1379] 在一些实施方案中,TRH1R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物TRH1R多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,TRH1R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物TRH1R蛋白或其片段的可读框。

[1380] 3.83加压素受体1A(V1AR)多肽

[1381] V1AR表达于许多组织中,包括肝脏、血管平滑肌细胞和脑。在血管系统中,该受体介导血管收缩,而在脑中,它介导致焦虑反应和致攻击反应(Manning等人,2008)。

[1382] 迄今,尚未公开V1AR的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征V1AR的胞外部分由N末端区段(人V1AR的Met1-Asn47)、连接螺旋II和III的ECL1(人V1AR的Thr114-Phe117)、连接螺旋IV和V的ECL2(人V1AR的Ser190-Ile208)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人V1AR的Pro318-Trp322)组成。

[1383] 在本发明的具体实施方案中,V1AR多肽包含V1AR蛋白序列或与V1AR蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％序列同一性或相似性。

[1384] 在一些实施方案中,V1AR蛋白序列对应于哺乳动物V1AR蛋白序列。合适的V1AR序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号P37288)、猫(UniProtKB登录号M3WKK5)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2Q6D6)、奶牛(UniProtKB登录号A2VDS9)、犬(UniProtKB登录号E2R8D3)、蛙(UniProtKB登录号F7B836)、马(UniProtKB登录号F6QLP1)、恒河猴(UniProtKB登录号F6ZXQ6)、小鼠(UniProtKB登录号Q62463)、猪(UniProtKB登录号A0A1D5NXS1)、兔(UniProtKB登录号G1TLM4)、大鼠(UniProtKB登录号P30560)、绵羊(UniProtKB登录号P48043)、乌龟(UniProtKB登录号K7FSS7)、vole(UniProtKB登录号Q9WTV8)。

[1385] 在一些优选的实施方案中,V1AR蛋白序列对应于人V1AR蛋白序列。在一些实施方案中,V1AR多肽包含如下文所述的人全长野生型V1AR蛋白序列(UniProtKB登录号P37288)或野生型V1AR蛋白序列的功能性片段。

[1386] MRLSAGPDAGPSGNSSPWWPLATGAGNTSREAEALGEGNGPPRDVRNEEL
AKLEIAVLAVTFAVAVLGNSSVLLALHRTPRKTSRMHLFIRHLSLADLAVAFFQVLPQ
MCWDITYRFRGPDWLCRVVKHLQVFGMFASAYMLVVMTADRYIAVCHPLKTLQQPA
RRSRLMIAAAWVLSFVLSTPQYFVFSMIEVNNVTKARDCWATFIQPWGSRAYVTWMT

[1387] GGIFVAPVVILGTCYGFICYNIWCNVRGKTASRQSKGAEQAGVAFQKGFLLAPCVSSV
KSISRAKIRTVKMTFVIVTAYIVCWAPFFIIQMWSVWDPMSVWTESENPTITITALLGSL
NSCCNPWIYMFFSGHLLQDCVQSFPCCQNMKEKFNKEDTDSMSRRQTFYSNNRSPTNS
TGMWKDSPKSSKSIKFIPVST [SEQ ID NO: 56]。

[1388] 在本发明的一种形式中,V1AR多肽包含截短形式的哺乳动物野生型T V1AR蛋白序列。例如,V1AR多肽序列可以包含带C端截短的人野生型V1AR蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基365-418)。备选地或额外地,V1AR多肽序列可以包含带N端截短的野生型V1AR蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型V1AR蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基192-205)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的V1AR多肽包含如SEQ ID NO:56中所述的人野生型V1AR蛋白序列的氨基酸残基2-191和206-364。

[1389] 3.84编码V1AR多肽的构建体和核苷酸序列。

[1390] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的V1AR多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1391] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_000706.4、KJ534780.1、KJ534779.1、BC074803.2、BC074804.2、AF208541.1和AY322550.1中所述的人V1AR核苷酸(即,对应于AVPR1A基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％序列同一性的V1AR核苷酸序列。

[1392] 在一些实施方案中,V1AR多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物V1AR多核苷酸或其片段具有至少50％、55％、60％、65％、70％、

75％、80％、85％、90％、92％、95％、99％或100％序列同一性。在一些实施方案中,V1AR多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物V1AR蛋白或其片段的可读框。

[1393] 3.85加压素受体1B(V1BR)多肽

[1394] V1BR表达于许多组织中,包括脑、肾脏和肾上腺髓质。在脑垂体前叶中,它刺激促肾上腺皮质激素释放并且认为它还介导焦虑和应激反应(Manning等人,2008)。

[1395] 迄今,尚未公开V1BR的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征V1BR的胞外部分由N末端区段(人V1BR的Met1-Glu30)、连接螺旋II和III的ECL1(人V1BR的Thr97-Phe100)、连接螺旋IV和V的ECL2(人V1BR的Ser173-Gly191)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人V1BR的Lys308-Glu312)组成。

[1396] 在本发明的具体实施方案中,V1BR多肽包含V1BR蛋白序列或与V1BR蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％序列同一性或相似性。

[1397] 在一些实施方案中,V1BR蛋白序列对应于哺乳动物V1BR蛋白序列。合适的V1BR序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号P47901)、猫(UniProtKB登录号M3W6E7)、鸡(UniProtKB登录号F1NVW1)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2R1Q0)、奶牛(UniProtKB登录号F1ME85)、犬(UniProtKB登录号F1P9D6)、蛙(UniProtKB登录号F7EHY9)、豚鼠(UniProtKB登录号H0V8M7)、马(UniProtKB登录号F7BNU0)、恒河猴(UniProtKB登录号F7BAU2)、小鼠(UniProtKB登录号Q9WU02)、猪(UniProtKB登录号F1SF06)、兔(UniProtKB登录号G1SSV5)、大鼠(UniProtKB登录号P48974)、袋獾(UniProtKB登录号G3WX95)。

[1398] 在一些优选的实施方案中,V1BR蛋白序列对应于人V1BR蛋白序列。在一些实施方案中,V1BR多肽包含如下文所述的人全长野生型V1BR蛋白序列(UniProtKB登录号P47901)或野生型V1BR蛋白序列的功能性片段。

[1399] MDSGPLWDANPTPRGTLSAPNATTPWLGRDEELAKVEIGVLATVLVLATG
GNLAVLLTLGQLGRKRSRMHLFVLHLALTDLAVALFQVLPQLLWDITYRFQGPDLLC
RAVKYLQVLSMFASTYMLLAMTLDRYLAVCHPLRSLQQPGQSTYLLIAAPWLLAAIFS
LPQVFIFSLREVIQGSGVLDCWADFGFPWGPRAYLTWTTLAIFVLPVTMLTACYSLICH
EICKNLKVKTQAWRVGGGGWRTWDRPSPSTLAATTRGLPSRVSSINTISRAKIRTVKM
TFVIVLAYIACWAPFFSVQMWSVWDKNAPDEDSTNVAFTISMLLGNLNSCCNPWIYM
GFNSHLLPRPLRHLACCGGPQPRMRRRLSDGSLSSRHTTLLTRSSCPATLSLSLSLTLSG
RPRPEESPRDLELADGEGTAETIIF [SEQ ID NO: 57]。

[1400] 在本发明的一种形式中,V1BR多肽包含截短形式的哺乳动物野生型T V1BR蛋白序列。例如,V1BR多肽序列可以包含带C端截短的人野生型V1BR蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基355-424)。备选地或额外地,V1BR多肽序列可以包含带N端截短的野生型V1BR蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型V1BR蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基175-183)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的V1BR多肽包含如SEQ ID NO:57中所述的人野生型V1BR蛋白序列的氨基酸残基2-174和184-354。

[1401] 3.86编码V1BR多肽的构建体和核苷酸序列。

[1402] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的V1BR多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1403] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_000707.3、DQ194816.1和EU432111.1中所述的人V1BR核苷酸(即,对应于AVPR1B基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的V1BR核苷酸序列。

[1404] 在一些实施方案中,V1BR多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物V1BR多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,V1BR多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物V1BR蛋白或其片段的可读框。

[1405] 3.87加压素受体2(V2R)多肽

[1406] V2R通过肾集合管中存在的受体介导抗利尿。另外,它似乎介导加压素诱导的疼痛反应(Manning等人,2008)。

[1407] 迄今,尚未公开V2R的晶体结构,从而不得不通过间接方案如诱变和同源性建模推断该受体的结构特征和配体结合性特征V2R的胞外部分由N末端区段(人V2R的Met1-Glu33)、连接螺旋II和III的ECL1(人V2R的Thr102-Phe105)、连接螺旋IV和V的ECL2(人V2R的Ala179-Ala197)和连接螺旋VI至VII的ECL3(人V2R的Pro298-Leu302)组成。

[1408] 在本发明的具体实施方案中,V2R多肽包含V2R蛋白序列或与V2R蛋白序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性。

[1409] 在一些实施方案中,V2R蛋白序列对应于哺乳动物V2R蛋白序列。合适的V2R序列可以适当地来自哺乳动物,所述哺乳动物选自包含以下者的群组:人(UniProtKB登录号P30518)、猫(UniProtKB登录号M3WF07)、鸡(UniProtKB登录号F1NV74)、黑猩猩(UniProtKB登录号H2RCC1)、奶牛(UniProtKB登录号P48044)、犬(UniProtKB登录号077808)、马(UniProtKB登录号F6UX08)、小鼠(UniProtKB登录号088721)、猪(UniProtKB登录号P32307)、大鼠(UniProtKB登录号Q00788)、绵羊(UniProtKB登录号W5NTL0)、火鸡(UniProtKB登录号G1NAI7)、乌龟(UniProtKB登录号K7FJ45)。

[1410] 在一些优选的实施方案中,V2R蛋白序列对应于人V2R蛋白序列。在一些实施方案中,V2R多肽包含如下文所述的人全长野生型V2R蛋白序列(UniProtKB登录号P30518)或野生型V2R蛋白序列的功能性片段。

[1411] MLMASTTSAVPGHPSLPSLPSNSSQERPLDTRDPLLARAELALLSIVFVAVA

[1412] LSNGLVLAALARRGRRGHWAPIHVFIGHLCLADLAVALFQVLPQLAWKATDRFRGPD ALCRAVKYLQMVGMYASSYMILAMTLDRHRAICRPMLAYRHGSGAHWNRPVLVAW AFSLLLSLPQLFIFAQRNVEGGSGVTDCWACFAEPWGRRTYVTWIALMVFVAPTLGIA ACQVLIFREIHASLVPGPSERPGGRRRGRRTGSPGEGAHVSAAVAKTVRMTLVIVVVY VLCWAPFFLVQLWAAWDPEAPLEGAPFVLLMLLASLNSCTNPWIYASFSSSVSSELRS LLCCARGRTPPSLGPQDESCTTASSSLAKDTSS [SEQ ID NO: 58]。

[1413] 在本发明的一种形式中,V2R多肽包含截短形式的哺乳动物野生型V2R蛋白序列。例如,V2R多肽序列可以包含带C端截短的人野生型V2R蛋白序列(例如,可以截去氨基酸残基342-371)。备选地或额外地,V2R多肽序列可以包含带N端截短的野生型V2R蛋白序列。备选地或除C末端或N末端截短之外,还可以进行截短以移除野生型V2R蛋白序列的内部部分(例如,可以截去氨基酸残基187-191)。通过非限制性示意实例,适于配合本发明使用的V2R多肽包含如SEQ ID NO:58中所述的人野生型V2R蛋白序列的氨基酸残基2-186和192-341。

[1414] 3.88编码V2R多肽的构建体和核苷酸序列。

[1415] 本发明还涵盖分离的多核苷酸序列和构建体,其编码如上文和本文他处广泛描述的V2R多肽。还构思了包含那些多核苷酸序列或构建体的宿主细胞。

[1416] 在一些实施方案中,多核苷酸序列包含与例如GenBank登录号NM_000054.4、NM_001146151.1、NR_027419.1、U04357.1、NG_008687.1、BC112181.1和BC101484.1中所述的人V2R核苷酸(即,对应于AVPR2基因)序列对应的序列。在这种类型的代表性实例中,多核苷酸包含与这些序列中任一者共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的V2R核苷酸序列。

[1417] 在一些实施方案中,V2R多核苷酸编码性序列包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽与野生型哺乳动物V2R多核苷酸或其片段具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,V2R多核苷酸包含核苷酸序列,所述核苷酸序列在低、中等或高严格性条件下杂交于野生型哺乳动物V2R蛋白或其片段的可读框。

[1418] 4.表达某种共定位的GPCR和/或RAGE的细胞

[1419] 可以将编码某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))和/或RAGE的核酸分子(优选地处于构建体(包括载体)的形式)瞬时或稳定转染或共转染入宿主细胞、适当地转染入任何细胞系,包括稳定的细胞系。在优选的实施方案中,细胞系是哺乳动物衍生的细胞系。优选的细胞系是衍生下述生物的那些,所述生物与自其中衍生出RAGE和某种共定位的GPCR的生物相同。因此,使用的细胞系可以针对每种特定目的优化,例如,如果所述细胞中待表达的多核苷酸编码人蛋白质(或衍生自人蛋白质的多肽),则衍生自人细胞的细胞系将可能最合适。但是,这不排除使用衍生自不同生物的多肽和细胞。实例是在人类衍生的细胞的表面上表达大鼠衍生或小鼠衍生的多肽。另一个实例是在仓鼠衍生的细胞(如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)的表面上表达大鼠衍生的或人衍生的多肽。

[1420] 适于实施本发明的人衍生的细胞系的一个实例是HEK293细胞系(例如,HEK293细胞系或HEK293FT细胞系)。合适细胞系的其他实例包括但不限于COS-1细胞系、或COS-7细胞系、或CHO细胞系、或HeLa细胞系。

[1421] 因此,本发明的细胞表达RAGE和某种共定位的GPCR,如血管紧张素受体,如AT_1R;或某种趋化因子受体,如CCR2。

[1422] 5.候选物质

[1423] 在某些方面,本发明提供在细胞中筛选调节信号传导的物质的方法,所述信号传导因借助某些共定位的活化型GPCR(包括AT_1R和CCR2)的RAGE配体非依赖性RAGE活化而产生。这些物质可以与某种共定位的活化型GPCR和RAGE中一者或二者和/或与前二者之一复合的蛋白质结合,条件是它们借助某种共定位的活化型GPCR调节(例如,抑制或发送信号)RAGE配体非依赖性RAGE活化。代表性物质可以除RAGE胞外结构域之外与某种共定位的活化型GPCR和RAGE或与RAGE和/或某种共定位的活化型GPCR复合的其他蛋白质的任何结构域结合。不希望受任一个理论或工作模式约束,发明人假设,借助某种共定位的活化型GPCR介导RAGE配体非依赖性RAGE活化的位点存在于膜的细胞质(胞质)侧。从而,在一些实施方案中,确定筛选的候选物质为可穿透细胞(即,能够穿过胞质膜运输)或将其修饰成可穿透细胞。在一个实施方案中,本发明的细胞表达缺少胞外结构域的RAGE多肽和某种共定位的活化型GPCR。在另一个实施方案中,本发明的细胞表达RAGE胞质尾或其片段和某种共定位的活化型GPCR。在另一个实施方案中,本发明的细胞表达某种共定位的活化型GPCR,但不表达内源性RAGE。

[1424] 构思任何已知类型的筛选测定法是适合将候选物质鉴定为借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物。在一个实施方案中,使用邻近筛选测定法。待运行的邻近筛选测定法的一个实例是研究某种共定位的活化型GPCR和RAGE之间邻近变化的生物发光共振能量转移(BRET)测定法。在一些实施方案中,构思了使用可溶性重组多肽并体外进行的筛选测定法。这类筛选测定法的实例是常规的双杂交、表面等离子体共振(SPR)或互补作用系统。在另一个实施方案中,使用结合测定法,所述结合测定法例如使用与某种共定位的活化型GPCR和/或RAGE结合的荧光标记肽的或其他试剂。为了利用BRET,这种测定法可以随缀合于某种共定位的活化型GPCR或RAGE的NanoLuc一起使用或可以不随前者一起使用(Stoddart等人,2015)。NanoLuc与某种共定位的活化型GPCR或RAGE融合可以在N末端、在C末端或在某种共定位的活化型GPCR或RAGE多肽内部的另一个合适位点发生。

[1425] 免疫测定法也可以用来分析特异性结合并且包括但不限于使用多项技术的竞争性和非竞争性分析体系,所述技术如是蛋白质印迹法、放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定法、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定法、凝集测定法、补体-固定测定法、免疫放射测定法、荧光免疫测定法、蛋白A免疫测定法,仅举数例。此类测定法是例行且本领域熟知的(参见,例如,Ausubel等人编著,1994,Current Protocols in Molecular Biology,第1卷,John Wiley&Sons,Inc.,New York,所述文献通过引用的方式完整并入本文)。在一些实施方案中,使用ELISA,对RAGE多肽分析与某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的结合。在这个类型的示意性实例中,使重组RAGE多肽或重组的某种共定位的GPCR多肽连同候选物质一起与已经用包被其他结合配偶体(例如,限制量的靶)其底面的微量滴定平板接触。将平板用缓冲液洗涤,以除去非特异性结合的多肽和多余的候选物质。随后,通过用可以识别RAGE多肽或某种共定位的GPCR多肽(例如,多肽的标签或恒定部分)的量的抗体探测平板,测定与平板上的靶结合的RAGE多肽或某种共定位的GPCR多肽。抗体连接于检测系统(例如,

提供适宜底物时产生比色产物的酶,如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶(HRP))。

[1426] 在其他实施方案中,使用均相测定法(即,在添加测定法的全部组分后,不需要额外流体操作),分析候选物质调节的RAGE多肽与某种共定位的GPCR多肽结合的能力。例如,荧光共振能量转移法(FRET)可以用作均相测定法(参见,例如,美国专利号5,631,169;和美国专利号4,868,103)。如此选择第一分子(例如,RAGE多肽)上的荧光团标记物,从而如果RAGE多肽接近于某种共定位的GPCR多肽,则共振能量可以由第二分子(例如,某些共定位的GPCR多肽)上的荧光受体吸收。某种共定位的GPCR多肽上的荧光受体吸收转移的能量时,它发射荧光。由于标记物之间的能量转移效率与隔开分子的距离有关,故可以评估分子之间的空间关系。在多肽接近的情况下,应当可检测到测定法中荧光受体的荧光发射。可以通过标准荧光检测手段(例如,使用荧光计),便利地测量FRET。

[1427] 在其他实施方案中,使用表面等离子体共振法(SPR)分析RAGE多肽和某种共定位的GPCR多肽之间的相互作用。SPR或生物分子相互作用分析(BIA)在不标记任何相互作用的情况下,实时检测生物特异性相互作用。BIA芯片的结合表面处质量的变更(表示结合事件)导致表面附近光的折射率改变(表面等离子体共振(SPR)的光学现象)。折射率的变化生成可检出信号,测量所述可检出信号作为生物分子之间实时反应的指示。使用SPR的方法例如在美国专利号5,641,640;Raether,1988;Sjolander和Urbaniczky(1991);Szabo等人(1995)和BIAcore国际AB(乌普萨拉、瑞典)提供的在线资源中描述。

[1428] 一旦鉴定了候选物质调节RAGE多肽和某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))之间相互作用的能力,可以通过标准药学流程在细胞培养物或实验动物中测定候选物质的毒性和/或功效,例如,测定LD_{50}(对群体的50%致死的剂量)和ED_{50}(在群体的50%中治疗有效的剂量)。毒性作用和治疗作用之间的剂量比是治疗指数,它可以表述为LD_{50}/ED_{50}比。优选显示出大治疗指数的治疗药。尽管可以使用显示出毒性副作用的治疗药,但应当小心设计一个递送系统,所述递送系统导引这类药剂至受累组织的部位,旨在最大限度减少对未感染细胞的潜在损伤并因而减少副作用。

[1429] 从细胞培养测定法和动物研究中获得的数据可以用于配制一系列剂量用于哺乳动物(包括人类)中的预防药和/或治疗活药。这类药剂的剂量合适地处于包含ED_{50}的一系列循环型浓度范围内,毒性低或无毒性。该剂量可以在这个范围内变动,这取决于所用的剂型和所用的施用途径。对于本发明方法中所用的任何治疗药,可以从细胞培养测定法初步估计治疗有效剂量。可以在动物模型中配制某个剂量,以实现如细胞培养中所测定的包含IC_{50}(即,实现症状半数最大抑制作用的供试化合物浓度)的循环型血浆浓度范围。这种信息可以用来更准确地确定人体中的有用剂量。可以测量血浆中的水平,例如,通过高效液相色谱法测量。

[1430] 候选物质涵盖众多化学类别,不过它们一般是有机分子、优选地分子量大于50道尔顿且小于约2,500道尔顿的小有机化合物。候选物质包含与蛋白质结构性相互作用必需的官能团、尤其氢键,并且一般包含至少胺、羰基、羟基或羧基,合乎需要地至少两种功能性化学基团。候选物质经常包含经一个或多个上述官能团取代的环状碳结构或杂环结构或芳族或多芳族结构。候选物质还存在于以下生物分子当中,所述生物分子包括但不限于肽、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、其衍生物、结构类似物或其组合。

[1431] 小(非肽)分子调节物特别有利。在这个方面,小分子是合乎需要的,因为这类分子

在口服施用后更易吸收、具有更少的潜在抗原决定簇或比更大的基于蛋白质的药物更可能跨越细胞膜。有机小分子还可以具有进入适宜细胞并影响基因表达(例如通过与涉及基因表达的调节区或转录因子相互作用)的能力;或通过抑制或增强辅助分子的结合作用,影响基因的活性。

[1432] 备选地,可获得或轻易地产生处于细菌提取物、真菌提取物、植物提取物和动物提取物形式的天然化合物文库。另外,通过常规的化学、物理和生物化学手段轻易地修饰天然的或合成产生的文库和化合物,并且它们可以用来产生组合文库。已知的药理学物质可以经历定向或随机化学修饰,如酰化、烷基化、酯化或酸化,以产生结构类似物。

[1433] 筛选也可以指向已知的药理活性化合物和其化学类似物。

[1434] 可以在动物模型中进一步测试化合物,以鉴定那些具有最强力体内效果的化合物。通过例如使化合物经历依次修饰、分子建模和合理药物设计中所用的其他例行程序,这些分子可以充当进一步开发药物的“先导化合物”。

[1435] 5.1RAGE多肽的片段、类似物和衍生物

[1436] 在一些实施方案中,候选物质是RAGE胞质尾的片段,其中候选物质包括RAGE多肽或编码RAGE多肽的DNA的片段,其中基因递送后随后从所述RAGE多肽生成该片段。适当地,候选物质是一种肽,所述肽与RAGE胞质尾多肽序列的片段共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性或在不多于1、2、3、5个或甚至10、15或20个氨基酸残基处与其不同。如上所述,在本发明的一些实施方案中,RAGE片段氨基酸序列对应于野生型RAGE多肽的胞质尾(例如,野生型RAGE蛋白(SEQ ID NO:1或其片段)的氨基酸残基362至404)。

[1437] 在一些优选的实例中,该片段对应于野生型RAGE蛋白的C端胞质尾(即,SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的氨基酸残基362至404)。肽类似物还可以在其N末端或C末端包含额外的氨基酸残基,或它们的衍生物。类似地,类似物可以包含野生型RAGE蛋白的C末端胞质尾的任意8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41或42个氨基酸片段或它们的衍生物。

[1438] 从而,该肽可以包含以下氨基酸序列:[SEQ ID NO:1]。

[1439] 备选地,类似物可以与SEQ ID NO:1所示的序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性或在不多于1、2、3、5个或甚至10个氨基酸残基处与其不同。

[1440] 在一些实施方案中,候选物质是RAGE跨膜结构域或其部分的激活物、抑制物、变构调节物或无功能替代物,其中候选物质包含RAGE多肽的片段或编码RAGE多肽的DNA的片段,其中基因递送后随后生成该片段。适当地,候选物质是一种肽,所述肽与包含RAGE跨膜结构域或其片段的RAGE多肽序列的片段共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性或在不多于1、2、3、5个或甚至10、15或20个氨基酸残基处与其不同。无功能替代物是这样的候选物质,它在某些共定位的GPCR存在下接替RAGE跨膜结构域并且不能够被它们活化或诱导下游RAGE依赖性信号传导,并抑制正常情况下通过活化RAGE胞质尾及从其所得的RAGE依赖性信号传导而发生的信号传导。在一些实施方案中,候选物质包含RAGE跨膜结构域或其部分和RAGE胞外结构域的片段。在一些实施方案中,候选物质包含RAGE跨膜结构域或其部分和

RAGE胞质尾的片段。在一些实施方案中,候选物质包含RAGE跨膜结构域或其部分和RAGE胞外结构域的片段和/或RAGE胞质尾的片段。

[1441] 在一些实施方案中,类似物氨基酸序列因置换、添加或缺失至少一个(例如,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个)氨基酸残基而区别于野生型RAGE多肽序列,所述置换、添加或缺失导致调节通过某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE胞质尾活化。

[1442] 在一些实施方案中,肽、其类似物、片段或衍生物适当地抑制因相应配体活化某种共定位的GPCR产生的信号传导。

[1443] 因此,在一些实施方案中肽、其类似物、片段或衍生物对应于某种共定位的活化型GPCR-结合位点受损的RAGE多肽序列。至少一个氨基酸置换、添加或缺失适当地位于与RAGE和某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))之间相互作用中关键的残基对应的任何位置。在这个类型的示意性实例中,肽类似物氨基酸序列因(如SEQ ID NO:1所示的)野生型RAGE蛋白的胞质尾的氨基酸残基位置S391处置换、添加或缺失另一个氨基酸残基而区别于野生型RAGE多肽序列。

[1444] 在一些实施方案中,肽、其类似物、片段或衍生物对应于某种共定位的活化型GPCR发生其功能性相互作用的位点受损的RAGE多肽序列。至少一个氨基酸置换、添加或缺失适当地位于与RAGE和某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))之间功能性相互作用中关键的残基对应的任何位置。

[1445] 氨基酸位置391处的残基是发明人确定在借助某种共定位的活化型GPCR(如AT_1R和CCR2)的RAGE配体非依赖性RAGE活化中重要的位点。适当地,在这些实施方案中,将丝氨酸391移除或用另一个氨基酸(如丙氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、缬氨酸、甘氨酸、半胱氨酸或谷氨酸)置换,以抑制RAGE胞质尾的活化。在其他实施方案中,将丝氨酸391留下或置换为另一个氨基酸(如脯氨酸、谷氨酰胺、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸或色氨酸),旨在活化某种共定位的GPCR后活化该氨基酸,并且因而在需要或不需要表达野生型RAGE的情况下,诱导RAGE依赖性信号传导。不希望受理论约束,发明人认为,置换或移除S391影响接近于这个残基的α-螺旋(例如$RAGE_{379-390}$)的构象(即$RAGE_{379-390}$)和/或其对结合配偶体的亲和力。

[1446] 在这种类型的其他实例中,该肽、其类似物、片段或衍生物因置换、添加或缺失对接近于S391位点的α螺旋的构象至关重要的任何氨基酸(例如,与氨基酸位置S391直接毗邻的氨基酸)而区别于野生型RAGE多肽序列。例如,当野生型RAGE蛋白序列的氨基酸位置390处的谷氨酰胺残基置换为极性氨基酸(例如,精氨酸或赖氨酸)时,可以增强α螺旋在其C末端处的封盖[例如SEQ ID NO:9和10]。这类置换产生这样的肽,所述肽是借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化的抑制剂。

[1447] 备选地,肽、其类似物、片段或衍生物与SEQ ID NO:5中所述的序列共有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性或相似性或在不多于1、2、3、5个或甚至10个氨基酸残基处与其不同。还构思对以上肽、其类似物、片段或衍生物在C末端或N末端中任一者或二者的任何截短。因此,包含来自SEQ ID NO:5中所述序列的8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、

21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41或42个氨基酸的片段适合作为肽、类似物、片段或其衍生物，条件是它们包含与(如SEQ ID NO:1所示的)胞质尾的野生型RAGE氨基酸序列的位置Ser391对应的置换或缺失。

[1448] 在一些实施方案中，本发明的RAGE肽拟似物缀合、融合或否则连接于天然或合成性蛋白质转导结构域或拟似物或置于非共价载体(carrier)系统(例如脂质体、PEP-1)中，所述的结构域或拟似物或载体系统适当地导引RAGE肽进入细胞的胞内组分并且是本领域熟知的。这类分子的非限制性实例包括具有天然细胞膜穿透肽的融合物，所述天然细胞膜穿透肽包括HIV-TAT基序(SEQ ID NO:4:YGRKKRRQRRR，如Schwarze等人，2000中综述)，以及天然和/或合成性细胞膜穿透肽，例如美国专利申请号2014/0213775、2014/0141452和2013/0136742中描述的那些，所述文献通过引用方式完整并入本文。

[1449] 6.邻近筛选测定法

[1450] 在某种实施方案中，通过评估RAGE多肽对某种共定位的活化型GPCR(如AT_1R)的邻近的变化，筛选方法评估候选物质是否可以调节RAGE多肽和某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))之间的相互作用。在这个类型的示意性实例中，RAGE多肽偶联(例如，缀合、融合或否则连接)于第一报道分子组分，并且某种共定位的活化型GPCR是偶联(例如，缀合或否则连接)于第二报道分子组分。第一报道分子组分和第二报道分子组分可以相同或不同。例如，一个报道分子组分可以是邻近信号或能量供体，并且另一个可以是邻近信号或能量受体。第一报道分子组分和第二报道分子组分可以是紧邻时能够发射可检出信号的任何已知分子(例如，有机分子、无机分子、蛋白质性分子、非蛋白质分子或其组合)。

[1451] 本领域充分建立了适于评估相互作用性多肽的邻近的筛选测定法，并且此类测定法的任何样式适于如上文和本文他处所述的本发明方法。例如，美国专利号8,283,127描述了这样一个检测分子缔合的合适系统，所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。

[1452] 通过类属实例，为了确定候选物质是否能够调节RAGE多肽对某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))之间的相互作用，向该分析体系提供三个组分的每一者(即，(i)与第一报道分子组分偶联的RAGE多肽、(ii)与第二报道分子组分偶联的某种共定位的活化型GPCR和(iii)候选物质)。观察来自第一报道分子组分和第二报道分子组分的邻近信号并且与候选物质不存在的情况下，从相互作用的RAGE和某种共定位的活化型GPCR发射的参考邻近信号(即，当RAGE多肽和某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))无相互作用时，由第一报道分子组分和第二报道分子组分发射的邻近信号)比较。当候选物质不调节RAGE多肽和某种共定位的活化型GPCR之间的相互作用时，观察不到参考邻近信号的变化。但是，当候选物质能够调节RAGE多肽和某种共定位的活化型GPCR之间的相互作用时，观测到当分析体系的候选物质存在时，从第一报道分子组分和第二报道分子组分发射的邻近信号的变化。一般，与参考邻近信号相比时，邻近信号减少表示候选物质拮抗或否则抑制RAGE多肽和某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))之间的相互作用。反之，与参考邻近信号相比时，邻近信号增加通常表示候选物质激动或否则刺激RAGE多肽和某种共定位的GPCR之间的相互作用。代表性报道分子组分适当地选自生物发光供体分子和荧光受体分子。在一些说明性实施方案中，生物发光供体分子和荧光受体分子是蛋白质。

[1453] 某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))和/或RAGE多肽与报道分子组分的偶联可以借助直接或间接偶联进行并且可以借助任何已知的偶联两个分子的共价或非共价手段进行。偶联方法的示意性实例包括化学交联、蛋白质的化学修饰、氨基酸的化学修饰、核酸的化学修饰、糖的化学修饰、脂质的化学修饰、任何其他有机或无机分子的化学修饰、生物素-抗生物素蛋白相互作用、抗原-抗体相互作用和核酸杂交。在本发明的一些形式中,第一和/或第二报道分子组分通过接头间接偶联于RAGE和/或某种共定位的GPCR,如血管紧张素受体,如AT_1R;或某种趋化因子受体,如CCR2。在一些实施方案中,接头包含酶剪切位点。

[1454] 备选地,RAGE多肽和/或某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))可以直接偶联于蛋白质性报道分子组分。本领域充分建立了直接缀合蛋白质性分子的方法,例如,通过遗传融合进行,其中使编码RAGE多肽和/或某种共定位的活化型GPCR的核酸和第一和/或第二报道分子组分融合以产生编码单一多肽的核酸。

[1455] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,RAGE多肽和/或某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))和第一和/或第二报道分子组分各自分别形成单一多肽的部分。额外的官能团可以形成相同多肽的部分。例如,RAGE和/或某种共定位的活化型GPCR和第一和/或第二报道分子组分分别成单一多肽的部分,所述单一多肽额外地包含以下任一者或多者:用于亲和纯化的氨基酸序列;指导多肽至真核细胞亚细胞区室的氨基酸序列;促进穿透真核细胞膜的氨基酸序列;和使得通过使用抗体或另行评估表达水平成为可能的氨基酸序列。

[1456] 在一些实施方案中,筛选测定法利用能量供体和能量受体分子评估某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))和RAGE多肽之间的相互作用。可以利用两个分子之间能量转移的原理作为手段,以提供关于其邻近和彼此方向的相对变化的信息。共振能量转移(RET)是激发态能量从供体至受体分子的转移。Förster或荧光共振能量转移法(FRET)是两个染料分子的电子激发状态之间的距离依赖性相互作用,其中在不发射光子的情况下,激发从供体分子转移至受体分子。这仅可以在受体分子的吸收光谱与重叠供体的发射光谱时才发生。Förster确定能量供体和能量接纳体之间共振能量转移的程度与两个分子之间的距离成反比至六次幂。在FRET情况下,特定波长的外部光源用来激发供体分子。

[1457] 在Pfleger和Eidne(2006)、美国专利8,283,127、Jaeger等人,2014和Stoddart等人2015中描述了生物发光共振能量转移法(BRET)。已经用于BRET中的萤光素酶包括来自萤火虫、海肾和Gaussiaprinceps的那些以及NanoLuc萤光素酶(Promega)。

[1458] 在具体实施方案中,筛选测定法使用BRET技术或测定法。为了进行BRET筛选,需要三种组分:生物发光供体、调节物和荧光受体。荧光受体可以从生物发光供体接受能量并且当这些组分处于适宜特殊关系时且适宜底物(生物发光引发化合物)存在,将生成发光。调节物可以影响生物发光供体和荧光受体的邻近和/或方向并因而调节组分之间的能量转移,或它可以在影响生物发光供体生成的发光和荧光受体之间的能量转移中发挥不同作用。

[1459] BRET技术的一个优点是可以在用配体活化后实时监测和/或测定活细胞中的蛋白

质-蛋白质相互作用。

[1460] 在一些实施方案中,某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))或RAGE多肽与生物发光供体融合或否则连接。在一些实施方案中,某种共定位的活化型GPCR或RAGE多肽与荧光受体融合或否则连接。例如,在一个实施方案中,某种共定位的活化型GPCR与生物发光供体融合或否则连接并且RAGE多肽与荧光受体融合或否则连接。

[1461] 6.1生物发光供体

[1462] 如上文提到,生物发光供体包括但不限于第一靶蛋白质(RAGE多肽或某种共定位的活化型GPCR,如血管紧张素受体如AT_1R或某种趋化因子受体如CCR2)和生物发光供体分子。生物发光供体分子可以包括但不限于海肾萤光素酶及其片段;海肾萤光素酶的多肽变体等。特别地,生物发光供体分子可以包括但不限于以下任何海肾萤光素酶蛋白序列:

[1463] 野生型海肾萤光素酶:

[1464] MTSKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAVIFLHGNAAS SYLWRHVVPHIEPVARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPKKII FVGHDWGACLAFHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIESWDEWPDIEEDIALIKSEEGEK MVLENNFFVETMLPSKIMRKLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPD VVQIVRNYNAYLRASDDLPKMFIESDPGFFSNAIVEGAKKFPNTEFVKVKGLHFSQED APDEMGKYIKSFVERVLKNEQ [SEQ ID NO: 59]。

[1465] Cys124Ala/Met185Val变体海肾萤光素酶:

[1466] MTSKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAVIFLHGNAAS SYLWRHVVPHIEPVARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPKKII FVGHDWGAALAFHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIESWDEWPDIEEDIALIKSEEGEK MVLENNFFVETVLPSKIMRKLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPD VVQIVRNYNAYLRASDDLPKMFIESDPGFFSNAIVEGAKKFPNTEFVKVKGLHFSQED APDEMGKYIKSFVERVLKNEQ [SEQ ID NO: 60]。

[1467] RLuc8变体海肾萤光素酶:

[1468] MASKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAVIFLHGNATS SYLWRHVVPHIEPVARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPKKII FVGHDWGAALAFHYAYEHQDRIKAIVHMESVVDVIESWDEWPDIEEDIALIKSEEGEK MVLENNFFVETVLPSKIMRKLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPD VVQIVRNYNAYLRASDDLPKLFIESDPGFFSNAIVEGAKKFPNTEFVKVKGLHFLQEDA PDEMGKYIKSFVERVLKNEQ [SEQ ID NO: 61]。

[1469] 其他合适的生物发光供体分子包括但不限于其他萤光素酶或发光蛋白如NanoLuc萤光素酶(Promega)、鞘翅目(Coleoptera)萤光素酶、萤火虫(Photinus pyralis)萤光素酶(fLuc)、长腹水蚤(Gaussia)萤光素酶、Anachnocampa属物种萤光素酶、叩甲红色萤光素酶和水母发光蛋白。可以用于本发明中的替代性非萤光素酶、生物发光供体分子是可以作用于合适底物以产生发光信号的任何酶。这类酶的具体实例是β-半乳糖苷酶、内酰胺酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-葡糖醛酸糖苷酶和β-葡糖苷酶。这些酶的合成性发光底物是本领域熟知并且可商业获得自多个公司,如Tropix Inc.(Bedford,Mass.,USA)。

[1470] 在一个优选的实施方案中,使用具有小分子量的生物发光供体分子阻止或最大限度减少因空间位阻对相互作用的抑制。生物发光供体优选地由单一多肽链组成。生物发光蛋白还优选地不形成低聚物或聚集物。生物发光供体分子海肾萤光素酶、长腹水蚤萤光素酶、萤火虫萤光素酶和NanoLuc符合全部或大部分的这些标准。在一些优选的实施方案中,生物发光供体包含如上文充分定义的某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体如AT_1R或某种趋化因子受体如CCR2)。

[1471] 在一些实施方案中,生物发光供体包含萤光素酶变体。萤光素酶变体保留萤光素酶活性(即,在分子氧存在下催化腔肠素底物转化成发光产物)。萤光素酶变体可以相对其相应的参考野生型蛋白具有以下特性至少之一:受调节的稳定性;增强的光输出;受调节的发射波长最大值;和受调节的底物利用。在某些实施方案中,适于本发明的萤光素酶变体包括以上特性中的两者或更多者(例如,受调节的稳定性和增强的亮度、增强的光输出和受调节的发射最大值、受调节的稳定性和受调节的发射最大值等)、或包括以上特性中的三者或更多者(例如,受调节的稳定性、增强光输出和受调节的发射最大值)。

[1472] 如上文提到,与野生型氨基酸序列(SEQ ID NO:61)相比,具体构思的这样一个变体海肾萤光素酶蛋白包含但不限于八个氨基酸置换。这些氨基酸置换包括A1a55Thr、Cys124Ala、Ser130Ala、Lys136Arg、Ala143Met、Met185Val、Met253Leu和Ser287Leu。此外,变体海肾萤光素酶蛋白可以包含一个或多个额外的保守性置换,只要保守性修饰的变体保留突变的海肾萤光素酶蛋白的特征。

[1473] 6.2编码生物发光供体的载体(vector)

[1474] 在一些实施方案中,编码生物发光供体的载体可以包含但不限于编码生物发光供体(例如,编码与RLuc8融合或否则连接的某种共定位的GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2)))的多核苷酸。本领域熟知产生载体(例如,病毒载体和非病毒载体)和多核苷酸的方法。应当指出,可以使用其他表达系统表达生物发光供体,并且该生物发光供体载体仅是说明性实施方案。

[1475] 6.3荧光受体(Fluorescent acceptors)

[1476] 如上文提到,荧光受体包括但不限于第二靶蛋白,其中第二靶蛋白由RAGE多肽或某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))和荧光受体分子组成。通常而言,荧光团在一个波长吸收电磁能量和/或共振能量并且在第二波长发射电磁能量。在一些优选的实施方案中,如上文和本文他处充分定义,荧光受体包含RAGE多肽。

[1477] 代表性荧光受体分子(即,荧光团)可以包括但不限于sgGFP、sgBFP、蓝移GFP(Y66H)、蓝色荧光蛋白(BFP)、青色荧光蛋白(CFP)、Cyan GFP、DsRed、DsRed2、单聚体RFP、增强型BFP(EBFP)、增强型CFP(ECFP)、增强型GFP(EGFP)、去稳定化EGFP、去稳定化ECFP、去稳定化EYFP、GFP(S65T)、红移GFP(rsGFP)、野生型GFP(GFP)、GFPuv、HcRed、t-HcRed、rsGFP、Sapphire GFP、sgBFP™、sgBFP™(超级发光BFP)、sgGFP™、sgGFP™(超级发光GFP)、野生型GFP、黄色变体GFP、YFP、Venus、Venus、Emerald、Topaz、Citrine、YPet、t-二聚体2、t二聚体2(12)、mRFP1、pocilloporin、海肾GFP、Monster GFP、paGFP和Kaede蛋白。有利地,与YFP序列相比,Venus含有在37℃加速发色团氧化(成熟过程的限速步骤)的氨基酸置换。Venus还具有允许荧光团充分折叠并改进蛋白质的酸中毒和Cl^-忍耐性的其他置换(例如,F63L、

M153T、V163A和S175G)。

[1478] 其他的代表性荧光受体分子(即,荧光团)可以包括但不限于:Alexa Fluor衍生物、BODIPY衍生物和在美国专利8,283,127中谈及的那些;1,5IAEDANS;1,8-ANS;4-甲基伞形酮;5-羧-2,7-二氯荧光素;5-羧荧光素(5-FAM);5-羧萘酰荧光素;5-羧四甲基罗丹明(5-TAMRA);5-FAM(5-羧基荧光素);5-HAT(羟基色胺);5-羟色胺(HAT);5-ROX(羧基-X-罗丹明);5-TAMRA(5-羧基四甲基罗丹明);6-羧基罗丹明6G;6-CR6G;6-JOE;7-氨基-4-甲基香豆素;7-氨基放线菌素D(7-AAD);7-羟基-4-甲基香豆素;9-氨基-6-氯-2-甲氧基吖啶;ABQ;酸性品红;ACMA(9-氨基-6-氯-2-甲氧基吖啶);吖啶橙;吖啶红;吖啶黄;吖啶黄(Acriflavin);吖啶黄福尔根SITSA;水母发光蛋白(光蛋白);AFPs-自发荧光蛋白-(Quantum Biotechnologies);ALEXA FLUOR 350™;ALEXA FLUOR 430™;ALEXA FLUOR 488™;ALEXA FLUOR 532™;ALEXA FLUOR 546™;ALEXA FLUOR568™;ALEXA FLUOR 594™;ALEXA FLUOR 633™;ALEXA FLUOR 647™;ALEXA FLUOR 660™;ALEXA FLUOR 680™;茜素络合指示剂;茜素红;别藻蓝蛋白(APC);AMC、AMCA-S;AMCA(氨基甲基香豆素);AMCA-X;氨基放线菌素D;氨基香豆素;氨基甲基香豆素(AMCA);苯胺蓝;硬脂酸葸;APC(别藻蓝蛋白);APC-Cy7;APTRA-BTC;APTS;Astrazon艳红4G;Astrazon橙R;Astrazon红6B;Astrazon黄7GLL;Atabrine;ATTO-TAG™ CBQCA;ATTO-TAG™ FQ;金胺;Aurophosphine G;Aurophosphine;BAO9(双氨基苯基噁二唑);BCECF(高pH);BCECF(低pH);硫酸小檗碱;β内酰胺酶;Bimane;双苯酰胺;双苯甲酰亚胺(Hoechst);双-BTC;Blancophor FFG;BlancophorSV;BOBO™-1;BOBO™-3;Bodipy 492/515;Bodipy 493/503;Bodipy 500/510;Bodipy 505/515;Bodipy530/550;Bodipy 542/563;Bodipy 558/568;Bodipy 564/570;Bodipy 576/589;Bodipy581/591;Bodipy 630/650-X;Bodipy 650/665-X;Bodipy 665/676;Bodipy Fl;Bodipy FL ATP;Bodipy Fl-神经酰胺;Bodipy R6G SE;Bodipy TMR;Bodipy TMR-X conjugate;Bodipy TMR-X,SE;Bodipy TR;Bodipy TR ATP;Bodipy TR-X SE;BO-PRO™-1;BO-PRO™-3;亮磺基黄素FF;BTC;BTC-5N;钙黄绿素;钙黄绿素蓝;CALCIUM CRIMSON™;钙绿;钙绿-1Ca2+染料;钙绿-2Ca2+;钙绿-5N Ca2+;钙绿-C18Ca2+;钙橙;Calcofluor White;羧-X-罗丹明(5-ROX);瀑布蓝™;瀑布黄;儿茶酚胺;CCF2(GeneBlazer);CFDA;叶绿素;色霉素A;色霉素A;CL-NERF;CMFDA;香豆素鬼笔环肽;C-藻青蛋白;CPM甲基香豆素;CTC;CTC甲脒;Cy2™;Cy3.18;Cy3.5™;Cy3™;Cy5.18;Cy5.5™;Cy5™;Cy7™;环状AMP Fluorosensor(FiCRhR);Dabcyl;丹磺酰;丹磺酰胺;丹磺酰尸胺;丹磺酰氯;丹磺酰DHPE;丹磺酰氟;DAPI;Dapoxyl;Dapoxyl2;Dapoxyl3′DCFDA;DCFH(二氯二氢荧光素二乙酸酯);DDAO;DHR(二氢罗丹明123);Di-4-ANEPPS;Di-8-ANEPPS(非比率);DiA(4-Di-16-ASP);二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH);DiD-亲脂示踪剂;DiD(DilC18(5));DIDS;二氢罗丹明123(DHR);Dil(DilC18(3));二硝基酚;DiO(DiOC18(3));DiR;DiR(DilC18(7));DM-NERF(高pH);DNP;多巴胺;DTAF;DY-630-NHS;DY-635-NHS;ELF97;曙红;赤藓红;赤藓红ITC;溴化乙锭;乙锭同型二聚体-1(EthD-1);Euchrysin;EukoLight;氯化铕(III);EYFP;固蓝;FDA;福尔根(副玫瑰苯胺);FIF(甲醛诱导的荧光);FITC;Flazo Orange;Fluo-3;Fluo-4;Fluorescein(FITC);荧光素二乙酸酯;Fluoro-Emerald;Fluoro-Gold(羟芪巴胨);Fluor-Ruby;FluorX;FM 1-43™;FM 4-46;Fura Red™(高pH);Fura Red™/Fluo-3;Fura-2;Fura-2/BCECF;Genacryl艳红B;Genacryl亮黄10GF;Genacryl粉3G;Genacryl黄5GF;GeneBlazer(CCF2);Gloxalic Acid;颗

粒蓝;血卟啉;Hoechst 33258;Hoechst 33342;Hoechst 34580;HPTS;羟香豆素;羟芘巴胂(FLUOR);羟色胺;Indo-1,高钙;Indo-1,低钙;吲哚二碳菁(DiD);吲哚三碳菁(DiR);Intrawhite Cf;JC-1;JO-JO-1;JO-PRO-1;LaserPro;Laurodan;LDS 751(DNA);LDS 751(RNA);Leucophor PAF;Leucophor SF;Leucophor WS;丽丝胺罗丹明;丽丝胺罗丹明B;钙黄绿素/乙锭同型二聚体;LOLO-1;LO-PRO-1;Lucifer Yellow;Lyso Tracker Blue;Lyso Tracker Blue-White;Lyso Tracker Green;Lyso Tracker Red;Lyso Tracker Yellow;LysoSensor Blue;LysoSensor Green;LysoSensor Yellow/Blue;Mag Green;Magdala Red(Phloxin B);Mag-Fura Red;Mag-Fura-2;Mag-Fura-5;Mag-Indo-1;镁绿;镁橙;孔雀石绿;海洋蓝;Maxilon亮黄素10GFF;Maxilon亮黄素8GFF;份菁;甲氧基香豆素;线粒体示踪剂绿色FM;线粒体示踪剂橙;线粒体示踪剂红;光辉霉素;单溴二胺;单溴二胺(mBBr-GSH);单氯二胺;MPS(甲基绿派若宁芘);NBD;NBD胺;尼罗红;硝基苯并噁二唑;去甲肾上腺素;胞核永固红;胞核黄;Nylosan亮lavin E8G;俄勒冈绿;俄勒冈绿488-X;俄勒冈绿;俄勒冈绿488;俄勒冈绿500;俄勒冈绿514;太平洋蓝;副玫瑰苯胺(福尔根);PBFI;PE-Cv5;PE-Cy7;PerCP;PerCP-Cy5.5;PE-德克萨斯州[Red 613];Phloxin B(Magdal Red);Phorwite AR;Phorwite BKL;Phorwite Rev;Phorwite RPA;膦3R;PhotoResist;藻红蛋白B[PE];藻红蛋白R[PE];PKH26(Sigma);PKH67;PMIA;Pontochrome蓝黑;POPO-1;POPO-3;PO-PRO-1;PO-PRO-3;樱草灵;普施安黄;碘化丙啶(PI);PyMPO;芘;派若宁;派若宁B;Pyrozal亮黄素7GF;QSY7;氮芥喹吖因;红613[PE-德克萨斯];试卤灵;RH414;Rhod-2;罗丹明;罗丹明110;罗丹明123;罗丹明5GLD;罗丹明6G;罗丹明B;罗丹明B200;罗丹明B extra;罗丹明BB;罗丹明BG;罗丹明绿;罗丹明Phallicidine;罗丹明鬼笔环肽;罗丹明红;罗丹明WT;虎红;R-藻青蛋白;R-藻红蛋白(PE);S65A;S65C;S65L;S65T;SBFI;血清素;Sevron艳红2B;Sevron艳红4G;Sevron艳红B;Sevron橙;Sevron黄L;SITS;SITS (Primuline);SITS(芪异硫代磺酸);SNAFL钙黄绿素;SNAFL-1;SNAFL-2;SNARF钙黄绿素;SNARF1;Sodium Green;SpectrumAqua;SpectrumGreen;SpectrumOrange;Spectrum Red;SPQ(6-甲氧基-N-(-3-磺丙基)喹啉鎓);芪;Sulphorhodamine B can C;Sulphorhodamine Extra;SYTO11;SYTO12;SYTO13;SYTO14;SYTO15;SYTO16;SYTO17;SYTO18;SYTO20;SYTO21;SYTO22;SYTO23;SYTO24;SYTO25;SYTO40;SYTO41;SYTO42;SYTO43;SYTO44;SYTO45;SYTO59;SYTO60;SYTO61;SYTO62;SYTO63;SYTO64;SYTO80;SYTO81;SYTO82;SYTO83;SYTO84;SYTO85;SYTOX蓝;SYTOX绿;SYTOX橙;四环素;四甲基罗丹明(TRITC);德克萨斯红™;德克萨斯红-X™缀合物;噻二碳菁(DiSC3);噻嗪红R;噻唑橙;Thioflavin 5;Thioflavin S;Thioflavin TCN;Thiolyte;噻唑橙;T Tinopol CBS(Calcofluor White);TMR;TO-PRO-1;TO-PRO-3;TO-PRO-5;TOTO-1;TOTO-3;TriColor(PE-Cy5);TRITC四甲基罗丹明异硫氰酸酯;True Blue;TruRed;Ultralite;Uranine B;Uvitex SFC;WW781;X-罗丹明;XRITC;二甲苯橙;Y66F;Y66H;Y66W;YO-PRO-1;YO-PRO-3;YOYO-1;YOYO-3、Sybr Green、噻唑橙(嵌插染料)或其组合。

[1479] 荧光受体分子可以是与下述分子缀合的荧光团,所述分子能够实现结合于另一个分子。能够实现与另一个分子附着的分子的实例是HaloTag。可以或不可以使用于与HaloTag附着并且因而可以或不可以称作HaloTag配体的荧光团的实例是俄勒冈绿、四甲基罗丹明(TMR)和无氯TOM(NCT)。

[1480] 6.4荧光受体载体(Fluorescent acceptor vectors)

[1481] 荧光受体载体可以包括但不限于编码荧光受体融合蛋白(例如,RAGE多肽和绿色荧光蛋白变体Venus)的多核苷酸及其简并核苷酸序列。本领域熟知产生多核苷酸和载体(例如,病毒载体和非病毒载体)的方法。应当指出,可以使用其他表达系统表达荧光融合蛋白,并且该荧光载体仅是说明性实施方案。

[1482] 6.5生物发光引发化合物

[1483] 生物发光引发化合物的选择可以影响生物发光供体产生的光的波长和强度。

[1484] 已知适用于BRET技术的示例性生物发光引发化合物是腔肠素。腔肠素出现在腔肠动物、桡足类、毛颚类、栉水母类、十足目虾类、糠虾类、放射虫类和某些鱼类中(Greer和Szalay,2002)。对于海肾萤光素酶和海肾萤光素酶变体,可获得在418和512nm之间产生光发射的腔肠素类似物及其功能衍生物(Inouye等人,1997)。一些腔肠素类似物及其功能衍生物可以在低于418nm的波长导致光发射。双脱氧腔肠素(也称作DeepBlueC、也称作腔肠素400a)及其衍生物是具有下述发射光谱的底物的实例,所述发射光谱包括低于418nm的光发射以及高于418nm的光发射。

[1485] 生物发光引发化合物可以包括但不限于腔肠素和类似物及其功能衍生物。腔肠素的示例性衍生物包括但不限于腔肠素400a、腔肠素cp、腔肠素f、腔肠素fcp、腔肠素h、腔肠素hcp;腔肠素ip、腔肠素n、腔肠素0、腔肠素c、腔肠素c、腔肠素i、腔肠素icp、2-甲基腔肠素、苄基腔肠素、双脱氧腔肠素、EnduRen、ViviRen、深蓝色腔肠素(DBC;DeepBlueC)(在美国专利号6,020,192;5,968,750和5,874,304中更详细地描述)、furimazine及其变体。

[1486] 通常,已知腔肠素受多种类型的生物发光蛋白、尤其萤光素酶作用时发光。美国专利申请系列号10/053,482中公开了可用、但非限制性的腔肠素,所述文献的公开内容因而通过引用的方式完整并入。腔肠素可获得自Promega Corporation(U.S.A.)和Molecular Probes,Inc.(U.S.A.)。腔肠素也可以如例如Shimomura等人,Biochem.J.261:913-20,1989;Inouye等人,Biochem.Biophys.Res.Comm.233:349-53,1997;和Teranishi等人,Anal.Biochem.249:37-43,1997中所述那样合成。

[1487] 6.6开展BRET测定法的方法

[1488] 如上文提到,本发明包括使用BRET系统确定(即,检测、定位或定量)活细胞、组织、或器官或活生物内部RAGE多肽和AT_1R多肽之间邻近的方法。例如,可以使用BRET系统对活动物成像,以测量RAGE多肽和AT1R多肽的接近和这种接近的程度。这种方法促进研究蛋白质-蛋白质相互作用,以理解基础性细胞生物学,并且将能够实现体内检测已经被鉴定为RAGE-AT_1R复合体的调节物的候选物质。

[1489] 例如,BRET系统可以用来测量和定量活细胞中RAGE和AT_1R之间的邻近,以确定为调节(即,增加或减少)该邻近所施用的候选物质的能力。另外,BRET系统可以用来测量靶向RAGE-AT_1R复合体的候选物质的作用。

[1490] 在一些实施方案中,利用RAGE多肽和AT_1R多肽的编码区,开发了用如上文和本文他处所述的载体构建体转染的细胞系,随后在合适的酶标仪或光学成像法中测量,旨在候选物质存在和不存在下定量RAGE和AT_1R之间的邻近,鉴定所述候选物质是否调节(即,刺激或抑制)在RAGE和AT_1R之间的邻近。熟练实施者将领会通过允许检验体内,这项技术将明显地加速候选物质验证。

[1491] 如本领域技术人员将领会,也可以在细胞培养物中进行这种筛选。优选地,筛选的

化合物适于施用至哺乳动物。甚至更优选地,筛选的化合物适于施用至人类。

[1492] 6.7BRET试剂盒

[1493] 本发明涵盖试剂盒,所述试剂盒可以包括以下两者或更多者、三者或更多者、四者或更多者或以下全体:生物发光供体(其例如包含与生物发光供体分子RLuc8融合或否则连接的AT_1R多肽);包含生物发光供体的载体;荧光受体(其例如与荧光受体分子Venus融合或否则连接的RAGE多肽);包含荧光受体的载体;生物发光引发化合物;候选物质;和说明(书面的其使用说明书)。因此,在一些实施方案中,生物发光供体将包含AT_1R多肽并且荧光受体包含RAGE多肽。试剂盒还可以包括本领域已知的用于施用上文所列组分的各种组合至宿主细胞或宿主生物的适宜缓冲液和试剂。

[1494] 通过例举具体的示意性实例,试剂盒可以包括生物发光供体,所述生物发光供体包含与生物发光供体分子Rluc8融合或否则连接的AT_1R多肽;和荧光受体,所述荧光受体包含与荧光受体分子Venus融合或否则连接的RAGE多肽。

[1495] 通过例举具体的示意性实例,为了实施BRET测定法,将生物发光供体和荧光受体共表达于如上文充分描述的细胞中。产生强烈和可饱和的BRET信号表示AT_1R多肽和RAGE多肽之间紧邻(例如,小于10nm),从而允许因细胞穿透性腔肠素底物被供体氧化而产生的能量转移至受体,所述受体转而在较长的特征波长发荧光。因此,基于因共表达标记的AT_1R多肽和标记的RAGE多肽的细胞暴露于候选物质,由该细胞生成的BRET信号的变化(例如,增加或减少),将候选物质鉴定为AT1R多肽和RAGE多肽邻近的调节物。具体而言,由细胞响应于暴露于某候选物质所生成的BRET信号的减少鉴定该物质为RAGE和AT_1R之间邻近的抑制剂。反之,由细胞响应于暴露于某候选物质所生成的BRET信号的增加鉴定该物质为RAGE和AT_1R之间邻近的诱导物。

[1496] 7.构建体系统

[1497] 根据本发明,提供构建体系统以鉴定RAGE多肽和AT1R多肽之间邻近的调节物。在一种广义形式中,该系统包含了编码RAGE多肽和能量供体分子(例如,生物发光供体分子)的第一合成性构建体;和第二合成性构建体编码AT1R多肽和能量受体分子(例如,荧光受体分子)。在另一广义形式中,该系统包含了编码AT_1R多肽和能量供体分子(例如,生物发光供体分子)的第一合成性构建体;和第二合成性构建体编码RAGE多肽和能量受体分子(例如,荧光受体分子)。

[1498] 本发明的合成性构建体各自包含与生物发光供体编码性序列或荧光受体编码性序列有效连接的调节序列。调节序列适当地包含将相容于目的细胞或生物中表达的转录性和/或翻译性控制序列。一般,转录性和翻译性调节控制序列包括但不限于启动子序列、5'非编码区、顺式调节区如转录调节蛋白或翻译调节蛋白的有功能结合位点、上游可读框、核糖体结合序列、转录起始位点、翻译起始位点、和/或编码前导序列、终止密码子、翻译终止位点和3'非翻译区的核苷酸序列。本发明构思了如本领域已知的组成型或诱导型启动子。启动子可以是天然存在的启动子或组合多于一种启动子的元件的杂合启动子。本发明构思的启动子序列可以原产于目的生物或可以衍生自备选性来源,其中该区域在选定的生物中有功能。取决于预期的宿主,启动子的选择将不同。例如,可以用于植物中表达的启动子包括植物启动子如:组成型植物启动子,其实例包括CaMV35S植物启动子、CaMV19S植物启动子、FMV34S植物启动子、甘蔗杆状DNA病毒(badnavirus)植物启动子、CsVMV植物启动子、拟

南芥(Arabidopsis)ACT2/ACT8肌动蛋白植物启动子、拟南芥遍在蛋白UBQ1植物启动子、大麦叶硫堇蛋白BTH6植物启动子和稻肌动蛋白植物启动子;组织特异性植物启动子,其实例包括菜豆的菜豆蛋白贮藏蛋白植物启动子、DLEC植物启动子、PHS植物启动子、玉米醇溶蛋白贮藏蛋白植物启动子、来自大豆的羽扇豆球蛋白γ植物启动子、AT2S1基因植物启动子、来自拟南芥的ACT11肌动蛋白植物启动子、来自欧洲油菜(Brassica napus)的napA植物启动子和马铃薯patatin基因植物启动子;和诱导型植物启动子,其实例包括衍生自豌豆rbcS基因的光诱导型植物启动子、来自苜蓿rbcS基因的植物启动子、干旱时有活性的DRE、MYC和MYB植物启动子;高盐度和渗透胁迫时有活性的INT、INPS、prxEa、Ha hsp17.7G4和RD21植物启动子、和致病胁迫时有活性的hsr203J和str246C植物启动子。备选地,可以用于哺乳动物中表达的启动子包括可以响应于重金属如镉被诱导的金属硫蛋白启动子、β-肌动蛋白启动子以及病毒启动子如SV40大T抗原启动子、人巨细胞病毒(CMV)立即早期(IE)启动子、罗斯肉瘤病毒LTR启动子、腺病毒启动子、或HPV启动子,尤其也可以使用HPV上游调节区fURR)。全部这些启动子均得到充分描述并且是本领域轻易地可获得的。

[1499] 本发明的合成性构建体还可以包含3'非翻译序列。3'非翻译序列涉及基因的这个部分,所述部分包含了含有多聚腺苷化信号和能够实现mRNA加工或基因表达的任何其他调节信号的DNA区段。多聚腺苷化信号以实现向mRNA前体的3'末端添加聚腺苷酸串为特征。多聚腺苷化信号因存在与典型形式5'AATAAA-3'的同源性而公认,不过变型并非不常见。3'非翻译的调节性DNA序列优选地包含从约50至1,000个核苷酸碱基对,并且除多聚腺苷化信号和能够实现mRNA加工或基因表达的任何其他调节信号之外,还可以含有转录性和翻译性终止序列。

[1500] 在具体实施方案中,合成性构建体还含有选择标记基因以允许选择含有合成性构建体的生物或其前体。选择基因是本领域熟知的并且将相容于目的细胞或生物或其祖细胞或前体中的表达。

[1501] 在一些实施方案中,本发明的合成性构建体处于有能力作为染色体外元件复制的病毒载体形式,如猴病毒40(SV40)或牛乳头瘤病毒(BPV)(Eukaryotic Viral Vectors,Cold Spring Harbor Laboratory,Gluzman编著,1982;Sarver等人,1981,Mol.Cell.Biol.1:486)。病毒载体包含为了在细胞中引入并指导多核苷酸或转基因表达而修饰的逆转录病毒(慢病毒)基因组、腺联病毒(参见,例如,Okada,1996,Gene Ther.3:957-964;Muzyczka,1994,J.Clin.Invst.94:1351;美国专利号6,156,303;6,143,548、5,952,221,其描述AAV载体;还参见美国专利号6,004,799;5,833,993)基因组、腺病毒(参见,例如,美国专利号6,140,087;6,136,594;6,133,028;6,120,764)基因组、呼肠孤病毒基因组、疱疹病毒基因组或轮状病毒基因组。逆转录病毒载体可以包括基于鼠白血病病毒(参见,例如,美国专利号6,132,731)、长臂猿猿白血病病毒(参见,例如,美国专利号6,033,905)、猴免疫缺陷病毒、人免疫缺陷病毒(参见,例如,美国专利号5,985,641)及其组合的那些。

[1502] 载体还包括在体内高效递送基因至动物细胞(例如,干细胞)的那些(参见,例如,美国专利号5,821,235和5,786,340;Croyle等人,1998,Gene Ther.5:645;Croyle等人,1998,Pharm.Res.15:1348;Croyle等人,1998,Hum.Gene Ther.9:561;Foreman等人,1998,Hum.Gene Ther.9:1313;Wirtz等人,1999,Gut 44:800)。例如美国专利号5,700,470、5,731,172和5,604,090中描述了适于体内递送的腺病毒载体和腺相关病毒载体。适于体内递

送的额外载体包括单纯疱疹病毒载体(参见,例如,美国专利号5,501,979)、逆转录病毒载体(参见,例如,美国专利号5,624,820、5,693,508和5,674,703;和WO92/05266和WO92/14829)、牛乳头瘤病毒(BPV)载体(参见,例如,美国专利号5,719,054)、基于CMV的载体(参见,例如,美国专利号5,561,063)和细小病毒、轮状病毒和诺瓦克病毒载体。慢病毒载体可用于感染分裂性细胞以及非分裂性细胞(参见,例如,美国专利号6,013,516)。

[1503] 昆虫细胞表达用载体常见地使用杆状病毒和其他核型多角体病毒的重组变型,例如,家蚕(Bombyx mori)核型多角体病毒载体(参见,例如,Choi,2000,Arch.Virol.145:171-177)。例如,鳞翅类细胞和鞘翅类细胞用来复制杆状病毒,以促进杆状病毒携带的外来基因表达,例如,用携带异源(例如,人类)编码性序列的重组苜蓿银纹夜蛾(Autographa californica)核多角体病毒(AcNPV)感染草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞(参见,例如,Lee,2000,J.Virol.74:11873-11880;Wu,2000,J.Biotechnol.80:75-83)。参见,例如,美国专利号6,143,565,其描述了寄生性胡蜂-印度刻绒茧蜂(Glyptapanteles indiensis)的多分DNA病毒(polydnavirus)使核酸稳定整合入鳞翅类昆虫细胞系和鞘翅类昆虫细胞系的基因组的用途。还参见,美国专利号6,130,074;5,858,353;5,004,687。

[1504] 本发明进一步构思其中含有本发明合成性构建体的细胞。在这个方面,将可以理解,本发明的构建体系统适用于原核宿主细胞以及真核宿主细胞并且例如包括单细胞生物和衍生自多细胞生物的细胞,如但不限于酵母、植物和动物,包括脊椎动物动物如哺乳动物、爬行类、鱼类和禽类,以及无脊椎动物,如后生动物、海绵、蠕虫、软体动物、线虫、甲壳类和棘皮动物。在某些实施方案中,构建体系统用来测定不同的同义密码子在植物细胞或动物细胞中的翻译效率或用来测定候选物质调节RAGE多肽和AT_1R多肽之间邻近的能力。

[1505] 真核生物的示意性实例包括但不限于真菌如酵母和丝状真菌,包括曲霉属(Aspergillus)、木霉属(Trichoderma)、和脉孢菌属(Neurospora)的物种;动物宿主,包括脊椎动物,其示意性实例包括鱼类(例如,鲑鱼、鳟鱼、罗非鱼、金枪鱼、鲤鱼、比目鱼、大比目鱼、剑鱼、鳕鱼和斑马鱼)、禽类(例如,鸡、鸭、鹌鹑、雉和火鸡、和其他原鸡或可狩猎鸟类)和哺乳动物(例如,犬、猫、马、奶牛、水牛、鹿、绵羊、兔、啮齿类如小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠、山羊、猪、灵长类、海洋哺乳动物,包括海豚和鲸,以及细胞系,如任何组织类型或干细胞类型的人或其他哺乳动物细胞系(例如,COS、NIH 3T3CHO、BHK、HEK293或HeLa细胞),和干细胞,包括多能干细胞和非多干细胞能及胚胎干细胞以及非人类合子),以及无脊椎动物,其示意性实例包括线虫(其代表性属包括感染动物的那些属,如但不限于钩口属(Ancylostoma)、蛔虫目(Ascaridia)、蛔虫属(Ascaris)、仰口属(Bunostomum)、新小杆线虫属(Caenorhabditis)、毛细线虫属(Capillaria)、夏伯特属(Chabertia)、古柏属(Cooperia)、网尾属(Dictyocaulus)、血矛线虫属(Haernonchus)、异刺属(Heterakis)、细颈属(Nematodirus)、食道口属(Oesophagostomum)、奥思特属(Ostertagia)、尖尾属(Oxyuris)、副蛔虫属(Parascaris)、圆线虫属(Strongylus)、弓蛔虫属(Toxascaris)、鞭虫属(Trichuris)、毛圆属(Trichostrongylus)、Tflichonema、弓蛔虫属(Toxocara)、弯口属(Uncinaria),和感染植物的那些属,如但不限于伞滑刃属(Bursaphalenchus)、Criconerriella、Diiylenchus、茎线虫属(Ditylenchus)、球形胞囊属(Globodera)、螺旋属(Helicotylenchus)、孢囊线虫属(Heterodera)、长针属(Longidorus)、根结线虫属(Melodoigyne)、珍珠线虫属(Nacobbus)、针线虫属(Paratylenchus)、短体属

(Pratylenchus)、穿孔属(Radopholus)、盘旋线虫属(Rotelynchus)、Tylenchus和剑线虫属(Xiphinema))和其他蠕虫、果蝇及其他昆虫(如来自蜜蜂科(Apidae)、象甲科(Curculionidae)、金龟子科(Scarabaeidae)、实蝇科(Tephritidae)、卷蛾科(Tortricidae),昆虫的代表性目包括鞘翅目(Coleoptera)、双翅目(Diptera)、鳞翅目(Lepidoptera)、和同翅目(Homoptera))。

[1506] 可以将本发明的合成性构建体离体直接引入或在细胞培养中引入目的细胞。可以使用任何合适的方法,将本发明的合成性构建体引入目的细胞,并且取决于预期的目的细胞类型,所用的该类方法将不同。例如,已经描述四个通用类别的向细胞递送核酸分子的方法:(1)化学方法,如磷酸钙沉淀法、聚乙二醇(PEG)介导沉淀法和脂质体转染法;(2)物理方法,如微量注射法、电穿孔法、加速法和真空浸润法;(3)基于载体的方法,如细菌介导和病毒载体介导的转化法;和(4)受体介导的方法。本领域人员熟知落于这些类别和其他类别范围内的转化技术,并且新技术持续变得已知。转化技术的具体选择将决定于其转化某些宿主物种的效率以及实施本发明的人对选定具体方法体系的经验和偏好。技术人员将显而易见,将本发明合成性构建体引入细胞中的转化系统的具体选择并不重要或不限制本发明,条件是它实现可接受水平的核酸转移。因此,通过任何数目的途径将合成性构建体引入组织或宿主细胞,所述途径包括病毒性感染、噬菌体感染、微量注射、电穿孔或小泡融合、脂质体转染、根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)或发根农杆菌(A.rhizogenes)感染、或原生质体融合。射流注射也可以用于肌内施用(例如,如Furth等人,1992,Anal Biochem205:365-368所述那样)。可以将合成性构建体涂覆到微抛射体上,并通过粒子轰击装置或“基因枪”递送到宿主细胞或递送到组织中(参见,例如,Tang等人,1992,Nature 356:152-154)。备选地,可以将合成性构建体直接送至或注射入宿主生物或可以将它引入细胞(即,胞内引入)或胞外地引入至腔体、组织间隙、引入生物的循环中或经口引入。用于经口引入的方法包括将合成性构建体与生物的食物直接混合。在某些实施方案中,使用核酸流体动力施用方法(例如,参见Chang等人,2001,J.Virol.75:3469-3473;Liu等人,1999,Gene Ther.6:1258-1266;Wolff等人,1990,Science247:1465-1468;Zhang等人,1999,Hum.Gene Ther.10:1735-1737;和Zhang等人,1999,Gene Ther.7:1344-1349)。其他的核酸递送方法包括但不限于脂质体介导的转移、裸DNA递送(直接注射)和受体介导的转移(配体-DNA复合物)。

[1507] 8.检测由RAGE活化介导的下游信号传导的测定法

[1508] 已知RAGE活化触发了涉及细胞功能特定方面的许多胞内信号传导途径,这取决于具体的细胞类型、其状态和刺激持续时间。通过借助NADPH氧化酶产生ROS和多种激酶的活化,活化这些信号传导途径,所述酶包括促分裂原活化蛋白激酶类(MAPK),如胞外信号调节的激酶1/2(ERK1/2)、应激活化的蛋白激酶(SAPK)/c-Jun N末端激酶(JNK)、蛋白激酶C(PKC)、p38-MAP激酶;Rho激酶(Rho)、AMP激酶(AMPK)、磷脂酰肌醇3激酶/Akt(P13K/Akt);Janus活化的激酶(JAK)/信号转导及转录激活蛋白(STAT);糖原合酶激酶3β(GSK3β)(Batkulwar KB等人2015)。这些激酶使下游信号传导分子磷酸化并往往通过活化转录因子核因子κB(NF-κB)、egr1和特异性蛋白1(SP1),引起特异性细胞反应,因而调节特定细胞过程,包括炎症、细胞运动性、黏附和结构。

[1509] 可以通过检测ROS本身的测定法(通过用ROS修饰探针及检测它们的加合物)、测量

ROS诱导对内源性或合成性底物的修饰或因它们导致对信号传导途径的诱导,测量RAGE活化后ROS的产生。

[1510] 可以通过检测这些激酶活化过程的测定法(即激酶活性测定法)、激酶活性的合成性或内源性靶的磷酸化、或诱导下游转录因子(例如NFκB、AP-1、EGR-1)、因其导致的基因表达变化、蛋白质表达变化或细胞功能/表型变化,测量RAGE活化后的这些特定下游信号。

[1511] 9.药物组合物

[1512] 通常,当鉴定某候选物质为借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或某种趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化的调节物并且因此被选定为具有治疗潜力时,以药物组合物形式制造该物质,所述药物组合物任选地包含可药用载体、赋形剂和/或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编著(1980))。这些组合物通常处于冻干制剂或水溶液剂形式。还构思抗体晶体(参见,美国专利申请2002/0136719)。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用的剂量和浓度对接受者无毒,并且包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂(包括抗坏血酸和甲硫氨酸);防腐剂(如十八烷基苄基二甲基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵、苯扎溴铵;苯酚、丁醇或苄醇;烷基尼泊金酯如尼泊金甲酯或丙酯;儿茶酚;雷琐辛;环己醇;3-戊醇和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他糖包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖、甘露糖、海藻糖或山梨糖;成盐反离子如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白质络合物)和/或非离子表面活性剂如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。WO 97/04801中描述了冻干的抗体制剂。

[1513] 药物组合物根据正在治疗的特定适应症需要而含有活性化合物,合乎需要地是具有并未相互不利影响的互补活性的那些。此类分子适当地以有效用于预期目的的量组合存在。

[1514] 有效成分也可以包埋于例如分别通过凝聚技术或界面聚合制备的微胶囊(例如,羟甲基纤维素微胶囊或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、胶态药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)或乳浊液中。此类技术在Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编著(1980)中公开。

[1515] 可以制备持续释放制品。持续释放制品的合适实例包括含有抗体的固态疏水性聚合物半通透性基质,所述基质处于成型制品(例如,薄膜或微胶囊)形式。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和γ-乙基-谷氨酸酯的共聚物、不可降解性乙烯-乙酸乙烯酯、可降解性乳酸-乙醇酸共聚物如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和亮丙瑞林乙酸酯组成的可注射微球体)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[1516] 在一些实施方案中,并且取决于预期的施用模式,组合物将通常含有按重量计约0.000001%至90%、约0.0001%至50%或约0.01%至约25%的调节物,剩余部分是合适的药用载体、稀释剂或赋形剂。调节物的剂量可以取决于多种因素,如施用模式、受累受试者的物种、年龄、性别、体重和总体健康状况,并且可以本领域技术人员使用标准方案容易地确定。剂量也将考虑调节物对其结合配偶体(即,共定位的GPCR如AT_1R和/或RAGE)的结合亲和力、其生物利用度及其体内特性和药代动力学特性。在这个方面,用于施用的物质的精确

量还可能取决于执业者的判断。在确定治疗或预防心脏代谢性疾病和/或病状时待施用的物质的有效量方面,医师或兽医师可以随时间推移评价疾病或病状的进展。在任何情况下,本领域技术人员可以在无需过多实验的情况下,轻易地确定本发明物质的合适剂量。施用至患者的活性物的剂量应当随时间推移足以在患者中和/或治疗和/或防止治疗或预防心脏代谢性疾病和/或病状时实现有益反应。可以按合适的间隔时间施用各剂量,以减轻心脏代谢性疾病和/或病状的症状。可以使用本领域技术人员已知的例行程序确定这类间隔时间,并且它们可以根据所用活性物质及其制剂的类型变动。例如,间隔时间可以是每日、每两天、每周、每两周、每月、每两月、每季度、每半年或每年。

[1517] 对于使用本发明方法鉴定的任何调节物,可以从细胞培养测定法初步估计治疗有效剂量。如,可以在动物模型中配制某剂量,以实现包含如细胞培养中所测定IC_{50}(例如,实现借助某种共定位的活化型GPCR(如血管紧张素受体(如AT_1R)或趋化因子受体(如CCR2))的RAGE配体非依赖性RAGE活化的半数最大抑制的调节物浓度)的循环型浓度范围。这种信息可以用来更准确地确定哺乳动物(包括人类)中有用的剂量。

[1518] 可以逐一调整剂量数量和间隔时间以提供足以维持治疗效果的活性物质血浆水平。用于全身性施用的患者常见剂量为1-2000mg/天,通常为1-250mg/天并且一般为10-150mg/天。根据患者体重描述,常见剂量为0.02-25mg/kg/天,通常为0.02-3mg/kg/天,一般为0.2-1.5mg/kg/天。根据患者体表面积描述,常见剂量为0.5-1200mg/m^2/天,通常为0.5-150mg/m^2/天,一般为5-100mg/m^2/天。

[1519] 调节物可以与治疗或减轻受试者中心脏代谢性疾病和/或病状的症状或逆转或抑制其形成或进展的至少一种辅助治疗药同时施用。调节物可以在辅助治疗药后治疗性使用或可以在该治疗药施用之前或与该治疗药一起使用。因此,本发明构思了联合疗法,其利用调节物和同步施用辅助治疗药(例如,医用治疗药),所述辅助治疗药的非限制性实例包括利尿剂、β阻滞剂、α抑制剂、ACE抑制剂和血管紧张素受体阻滞剂。

[1520] 为了可以轻易理解本发明并产生实际效果,现在将通过以下非限制性实施例描述具体的优选实施方案。

实施例

[1521] 除非上下文另有要求,否则以下实施1-21的每者中独立地,以下的一般材料和方法适用。

[1522] 动物模型

[1523] 采购C57b16小鼠、AGER敲除(KO)小鼠、apoE KO小鼠、AGER/apoE双敲除(DKO)小鼠、Ace2/apoE DKO小鼠和AGER/Ace2/apoE三敲除(TKO)小鼠并且在AMPREP动物房自行繁殖。全部小鼠均在C57b16背景繁育。对于实验研究,使用年龄6-8周且体重在20-25g之间的雄性小鼠,体内研究每组至少8只动物,并且离体研究为每组至少n=6只/组。整个研究期间,动物自由取得小鼠饲料和水。全部实验均由阿弗雷德医学研究中心动物伦理委员会批准并且根据美国国家卫生研究院(NIH出版编号85-23,1996年修订)发布的实验动物护理与使用指南实施。

[1524] 主动脉斑块面积定量方法

[1525] 从小鼠取出主动脉弓,清洁除去多余脂肪,置于10%中性缓冲福尔马林中并且随

后用Sudan IV-Herxheimer溶液(0.5％w/vol;Gurr,BDH Limited,Poole,UK)染色。随后纵向剖开主动脉,并且平铺钉在蜡垫上。将整个主动脉弓的斑块积累量定量为红染面积的百分数。

[1526] 通过定量实时PCR的主动脉表达促炎介质

[1527] 在每种研究阶段结束时,将胸主动脉和腹主动脉置于TRIZOL中,急冻并储存在-80℃。使用Trizol方法,对主动脉匀浆进行RNA提取和cDNA合成。通过定量实时RT-PCR估计主动脉匀浆中促动脉粥样硬化介质(包括黏附分子、细胞因子、炎性标志物、氧化应激标志物和巨噬细胞标志物)的基因表达,所述的定量实时RT-PCR使用基于实时检测已积累荧光的TaqMan系统(ABI Prism 7700,Perkin-Elmer Inc,PE Biosystems,Foster City,CA,USA)进行。将基因表达对18S mRNA归一化并且报告为与未处理的对照小鼠/细胞中的表达水平(赋予其任意值1)相比的倍数变化。

[1528] 诱导氧化应激

[1529] 通过使用OxiSelect氧化性DNA损伤ELISA试剂盒(8-OHdG Quantitation;Cell Biolabs,Inc)测量8-羟脱氧鸟苷的血浆水平并且按照生产商的说明进行,估计每个动物模型中的氧化应激诱导情况。此外,如上文详述,使用实时RT-PCR,在小鼠的主动脉中定量产生超氧化物的NADPH氧化酶亚基NOX-1和NOX-4的基因表达。

[1530] RAGE配体的循环浓度

[1531] 在动物模型中评估RAGE配体的循环水平的变化。通过根据生产商的说明进行的ELISA(Immundiagnostik,德国),估计S100A8/A9水平。通过自有ELISA测量血浆AGE。通过HPLC测量血浆甲基乙二醛(AGE的反应性前体)。

[1532] 收缩血压测量

[1533] 在清醒、预保温的小鼠中使用计算机化、非侵入尾套体系统(Kent Scientific,USA),通过尾套体积描记法测量收缩血压。在测量血压之前,使动物习惯化该装置以确保量值准确。

[1534] 体外研究

[1535] 钿胞培养

[1536] 从(野生型)C57b16小鼠和AGER KO小鼠的主动脉分离原代主动脉内皮细胞(PMAEC)并且在Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)/F12内皮细胞生长补充物(ECGS)补充的培养基中培养。使用F12培养基(10％FCS兼含2mM谷氨酰胺)培养中国仓鼠卵巢(CHo)细胞。在MCDB 131培养基(10％FCS兼含10mM谷氨酰胺、EGF和氢化可的松)中培养人微血管内皮细胞(HMEC)。

[1537] 转基因中国仓鼠卵巢细胞的产生

[1538] 使用脂质转染胺2000(Thermo),将100ng AT_1R-Rluc8构建体转染入CHO细胞。使用G418选择稳定的转染子。随后使用脂质转染胺2000(Invitrogen),以RAGE构建体瞬时转染AT_1R-CHO并温育16小时。将智人(Homo sapiens)AGER转录物变体1编码性序列(NM_001136)合成并且克隆在pCIneo(Promega)的NheI位点和XbaI位点之间,以产生载体pCIneo-RAGE。这个质粒随后用来产生突变体AGER克隆(NP_001127)的文库。引物1-RAGE-SP-5′和mCherry-XhoI-NotI-3′用来从载体pmCherry-C1扩增mCherry的编码性序列。随后使用所得到的PCR产物作为第二PCR的模板,所述第二PCR使用引物2-RAGE-SP-5′和mCherry-XhoI-

NotI-3′。将生成的PCR产物用NheI和NotI消化并且插在pCIneo的NheI位点和NotI位点之间,以产生pCIneo-SP-mCherry。通过DNA测序确认插入物的序列(Micromon,莫纳什大学)。对于截短的RAGE构建体,引物1-RAGE-SP-5′和mCherry-XhoI-NotI-3′用来从载体pmCherry-C1扩增mCherry的编码性序列。随后使用所得到的PCR产物作为第二PCR的模板,所述第二PCR使用引物2-RAGE-SP-5′和mCherry-XhoI-NotI-3′。将生成的PCR产物用NheI和NotI消化并且插在pCIneo的NheI位点和NotI位点之间,以产生pCIneo-SP-mCherry。通过DNA测序确认插入物的序列(Micromon,莫纳什大学)。

[1539] 通过定量实时PCR的细胞表达促炎标志物和介质

[1540] 在2小时暴露于Ang II(1μM)或RAGE配体后,将S100A8/A9(5ng/mL)细胞置于Trizol中,提取mRNA并合成cDNA。通过定量实时RT-PCR估计NFκB亚基p65(RelA)或NFκB活化的靶基因(例如,ICAM-1、VCAM-1)的基因表达的变化,所述的定量实时RT-PCR使用基于实时检测已积累荧光的TaqMan系统(ABI Prism 7700,Perkin-Elmer Inc,PE Biosystems,Foster City,CA,USA)进行。将基因表达对18S mRNA归一化并且报告为与未处理的对照小鼠/细胞中的表达水平(赋予其任意值1)相比的倍数变化。

[1541] 使用siRNA使基因表达选择性沉默

[1542] 按照生产商的说明,使用脂质转染胺RNAiMAX(Invitrogen)、还以针对RAGE(2nM;Ambion,ID:s62119)、p65(RelA)(10nM;Ambion,ID:s72857)、MyD88(10nM;Ambion,ID:s201719)、PKCζ(10nM;Ambion,ID:s71716)、IQGAP-1(Ambion,ID:s78119)、Diaph1(10nM;有义5’-UACAGAGGAAGCUGAUAUUGAAGCC,反义3’-GGCUUCAAUAUCAGCUUCCUCUGUA;Invitrogen)或乱序对照#1(2nM或10nM;Ambion)的siRNA转染来自C57b16小鼠的PMAEC。允许细胞在含有10%FBS的培养基中恢复16小时,之后用1μM Ang II或用5ng/ml的RAGE配体8_{100}A8/A9处理,作为信号传导对照。

[1543] 肽生成

[1544] 通过转化大肠杆菌(Escherichia coli)菌株ClearColi BL21(DE3;Lucigen),产生寡肽(Cherry-TAT(对照)、mCherry-TAT-$RAGE_{362-404}$和mCherry-S391A-TAT-$RAGE_{362-404}$。将转化的单一菌落接种入50ml含有100μg/ml氨苄青霉素的2YT培养基并且将培养物在250转/分钟振摇时于37℃培育过夜。10ml过夜培养物用来接种1升含有100μg/ml氨苄青霉素的2YT培养基并且将培养物在250转/分钟振摇时于37℃培育。当培养物达到OD_{600}0.8时,将温度变动到15℃持续30分钟,此后,通过添加1mM异丙基β-D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)诱导蛋白质表达。在添加IPTG后,将培养物在15℃培育~16小时,伴以250转/分钟振摇。将细胞通过离心收获(3500g,4℃,20分钟)并且重悬于冰冷的裂解缓冲液(50mM Tris pH7.4,300mM NaCl,10mM咪唑和5mMβ-巯基乙醇)中。超声处理重悬的细胞并且通过离心(13,000g,4℃,30分钟)沉淀不溶性物质。将上清液过滤(0.2μm)并施加到具有裂解缓冲液预平衡的1ml Ni-NTA琼脂糖树脂床体积(Qiagen)的依重力流动柱上。在上清液经过树脂后,将柱用100ml洗涤缓冲液(20mM咪唑,50mM Tris pH 7.4,150mM NaCl,5mMβ-巯基乙醇)洗涤。使用洗脱缓冲液(250mM咪唑,50mM Tris pH7.4,150mM NaCl,5mM β-巯基乙醇)从树脂洗脱加His标签的TAT-mCherry肽和TAT-mCherry-RAGE肽。通过SDS-PAGE评估纯化蛋白质的纯度。一般,每升培养物产生10mg蛋白质。汇集洗脱的含有蛋白质的级分并且通过Nanodrop分光光度测定法(Thermo Scientific)和BCA蛋白质分析法(Pierce)定量。

[1545] 生物发光共振能量转移(BRET)

[1546] BRET是活细胞中研究蛋白质-蛋白质邻近、尤其涉及GPCR的既有技术(Pfleger和Eidne,2006)。一种目的蛋白连接于生物发光供体酶(Rluc8,海肾萤光素酶的变体),并且第二蛋白连接于受体荧光团(Venus,绿色荧光蛋白的变体)。如果紧邻(＜10nm),因细胞穿透性腔肠素底物被供体快速氧化而产生的能量可以转移至受体,所述受体转而在较长的特征波长发荧光。

[1547] 在人胚肾(HEK)293FT细胞中瞬时共表达质粒并且在37℃使用带460-490nm(‘供体发射’)滤光片和520-550nm(‘受体发射)滤光片的POLARstar Omega或LUMIstar平板读数仪(BMG Labtech,Mornington,Victoria,澳大利亚),或带400-475nm(‘供体发射’)滤光片和520-540nm(‘受体发射’)滤光片的VICTOR Light平板读数仪(Perkin Elmer,Glen Waverley,Victoria,澳大利亚),或带420-480nm(‘供体发射’)滤光片和520-620nm(‘受体发射)滤光片的CLARIOstar平板读数仪(BMG Labtech,Momington,Victoria,澳大利亚)取得BRET量值。

[1548] 通过从表达加Rluc8标签和加Venus标签的蛋白质二者的细胞样品的‘受体发射’对‘供体发射’比率扣减仅表达加Rluc8标签的蛋白质的细胞样品的相同比率,计算BRET比率。备选地,通过从第二等分的经激动剂处理的相同细胞的‘受体发射’对‘供体发射’比率扣减经溶媒处理的细胞样品的相同比率,计算配体诱导的BRET信号。

[1549] 对于BRET动力学测定法,处理前最终读数呈现于零时间点处(添加配体/溶媒的时间)。对于饱和测定法,在EnVision 2102多标签平板读数仪(PerkinElmer,Glen Waverley,Victoria,澳大利亚)上,使用485/14激发滤光片、535/25发射滤光片和D505镜子,测量光激发后的荧光。通过将按任意单位计的荧光值(用EnVision获得)除以也按任意单位计的发光值(作为BRET测定法的部分获得),生成荧光/发光比率。

[1550] 对于RAGE/Rluc8和β-抑制蛋白2/Venus的受体-HIT测定法,在HEK293FT细胞中共表达相对于BRET系统未加标签的GPCR。随后将这些细胞用适宜的对共表达的GPCR有选择性的相应激动剂处理,目的是促进β-抑制蛋白2/Venus向这种GPCR招募。配体诱导的BRET信号表示招募β-抑制蛋白2/Venu接近于RAGE/Rluc8,因而表示RAGE和活化型GPCR之间的紧邻。

[1551] 在37℃使用带420-480nm(‘供体发射’)滤光片和520-580nm(‘受体发射’)滤光片的CLARIOstar平板读数仪(BMG Labtech,Mornington,Victoria,澳大利亚)取得图21B、C、D中的BRET量值。取得图21E中的发光量值作为BRET量值的部分(‘供体发射’)。使用CLARIOstar平板读数仪取得图21E中的荧光量值,所述平板读数仪具有用于Venus的497/15nm激发滤光片、540/20nm发射滤光片和517.2nm二色镜,和用于mCherry的580/8nm激发滤光片、615/10nm发射滤光片和597nm二色镜。

[1552] 统计结果

[1553] 连续数据表述为均值±SEM。使用2-因素ANOVA,比较各组间均值的差异。用Student-Newman-Keul事后分析进行配对多重比较,以检测各组之间的显著差异。P＜0.05视为统计显著。

[1554] 实施例1.AGER/APOEDKO小鼠中与输注ANG II相关的动脉粥样硬化形成减少

[1555] 这个实施例表明,对于输注血管紧张素II(Ang II),需要RAGE的表达来增加易患动脉粥样硬化的apoE KO小鼠中的动脉粥样硬化形成。

[1556] 与未处理的apoE KO小鼠相比时,输注Ang II(1μg/kg/分钟)四周增加易患动脉粥样硬化的apoE KO小鼠中的动脉粥样硬化形成,如通过指示存在动脉粥样硬化斑块的苏丹IV染色阳性的主动脉弓表面积百分数的百分数升高所展示(图1A)。

[1557] 输注Ang II(1μg/kg/分钟)四周还增加编码促动脉粥样硬化介质(图1B)和氧化应激标志物(图1C)的基因的主动脉表达。

[1558] 在apoE KO小鼠中,输注Ang II(1μg/kg/分钟)四周还增加RAGE配体,包括S100A8/A9、AGE及其反应性二羰基前体的循环水平(图1D),以及增加Ang II处理的小鼠的主动脉中RAGE配体Mac1/CD11b的基因表达(图1B)。

[1559] RAGE的遗传缺失阻止了AGER/apoE DKO小鼠(图1A)中输注Ang II(1μg/kg/分钟)四周后观察到的动脉粥样硬化形成增加,以及阻止输注Ang II后apoE KO小鼠中观察到的Ang II诱导的主动脉表达促动脉粥样硬化介质(图1B)、Ang II诱导的氧化应激(图1C)和Ang II诱导的RAGE配体循环型水平(图1D)。

[1560] 在apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠(图1E)中输注Ang II(1μg/kg/分钟)四周后,收缩血压水平升高至相似的程度,显示RAGE缺乏不影响由Ang II借助AT_1R诱导的血流动力学信号传导。

[1561] 额外的材料和方法

[1562] 血管紧张素输注模型

[1563] 将年龄6-8周的雄性apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠(n=8/组)随机分组,以使用微型渗透泵(型号2004,ALZET,BioScientific,Gymea,澳大利亚),通过皮下输注接受Ang II(1μg/kg/分钟;Sigma-Aldrich,Castle Hill,澳大利亚)或溶媒4周,其中将所述微型渗透泵在腹膜内注射氯胺酮(150mg/kg)和赛拉嗪(10mg/kg)所致的全身麻醉下,沿每只小鼠的背中线置于皮下间隙。在每个模型中的每个研究阶段结束时,使用CO_2窒息法人工处死小鼠,随后通过心脏穿刺放血。

[1564] 实施例2.AGER/APOE DKO小鼠中与活化RAAS的低钠膳食相关的动脉粥样硬化形成减少

[1565] 这个实施例显示,对于与低钠膳食相关的RAAS活化,需要RAGE的表达来诱导易患动脉粥样硬化的apoE KO小鼠中的动脉粥样硬化形成,。

[1566] 低钠膳食是已接受的生理肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)活化实验模型并且是RAAS适当保留盐的能力作为其体内稳态功能的部分的试验。

[1567] 六周暴露于0.05%(低)钠膳食导致apoE KO小鼠中斑块积累量的RAAS依赖性增加(图2A),如通过指示存在动脉粥样硬化斑块的苏丹IV染色阳性的主动脉弓表面积百分数的百分数升高所展示。

[1568] 六周暴露于0.05%(低)钠膳食还导致主动脉表达促动脉粥样硬化介质(图2B)增加、氧化应激标志物增加(图2C)和可溶性MCP-1和ICAM-1的循环型浓度升高(图2D)。

[1569] 与来自饲以正常饲料的apoE KO小鼠的主动脉相比时,暴露于低钠膳食1周后,更多白细胞黏附于取自apoE KO小鼠的主动脉(图2E)。

[1570] 在apoE KO小鼠中,低盐膳食还增加RAGE配体,包括S100A8/A9、AGE及其反应性二羰基前体的循环水平(图2F),以及增加主动脉中RAGE配体Mac1/CD11b的基因表达(图2B)。

[1571] 在四周低钠膳食后,与饲以相同饮食的apoE KO小鼠相比时,遗传缺失RAGE阻止

AGER/apoE DKO小鼠中动脉粥样硬化形成的诱导(图2A),并且还阻止血管炎症标志物的主动脉表达的增加、氧化应激标志物的增加或循环型炎症标志物的增加(图2B、2C和2D)。

[1572] 与饲喂相同膳食的apoE KO小鼠相比时,取自饲喂低钠膳食一周的AGER/apoE DKO的主动脉未显示标记的白细胞与离体主动脉内皮的黏附性增加(图2E)。

[1573] apoE KO小鼠中见到的RAGE配体S100A8/A9和AGE的循环水平响应于饲喂低钠膳食升高未在经相同的低钠膳食处理四周的AGER/apoE KO小鼠中观察到(图2F)。

[1574] apoE KO小鼠或AGER/apoE DKO小鼠中,血压水平未因低钠膳食改善(图2G)。

[1575] 与低钠膳食相关的生理诱导RAAS活化的标志物(例如,血浆醛固酮、血浆肾素)和钠保留在apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠之间无显著差异(图2H)。

[1576] 额外的材料和方法

[1577] 小鼠暴露于0.05%(低)钠膳食

[1578] 暴露于低钠膳食(0.05%钠)是接受的生理RAAS活化实验模型(Tikellis等人2012)。在这项研究中,将apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠(n=8/组)随机分组接受具有低含盐量(0.05%钠)或正常含盐量(0.3%钠)的均含有6%脂肪的等热量膳食(Specialty Feeds,Perth,澳大利亚),持续1周或6周。

[1579] 血浆肾素和醛固酮

[1580] RAAS的活化与醛固酮和肾素(原)的循环型水平升高相关。每个组中通过商业化放射免疫测定(ProSearch International,Malvem,澳大利亚)估计这些RAAS组分。

[1581] 循环型可溶性MCP-1和ICAM-1

[1582] 通过根据生产商的说明各自进行的ELISA(R&D Biosystems),估计循环型可溶性MCP-1和ICAM-1。

[1583] 尿钠排泄

[1584] 在6周正常钠膳食或低钠膳食后,将小鼠置于独立的代谢笼(Iffa Credo,L'Arbresele,法国)中24小时并且详实记录其体重、饮水量和摄食量(钠)和尿排出量。在稀释的尿中用COBAS INTEGRA 400自动分析仪(Roche Diagnostics,印第安纳波利斯,USA),使用离子敏感电极测量钠浓度,并且通过乘以每日总泌尿输出量估计总钠排泄量(μmol/天)。

[1585] 标记的白细胞黏附于主动脉

[1586] 在1周低钠膳食或正常钠膳食后,将apoE KO动物和AGER/apoE DKO动物人工处死,并且将主动脉分离、清除脂肪并安放在备有Kreb缓冲液的血管灌流室(vessel chamber)中,并且在37℃通过引入碳合气(95%O_2;5%CO_2)穿过该缓冲液而维持在生理pH,如先前所描述。随后将DilC18(1:1000)标记的全血按0.12ml/分钟穿过主动脉灌注。作为阳性对照,将血管(n=6/组)用TNFα(4ng/ml)或Ang II(1μM)在37℃预处理4小时。使用连接至数码照相机(HAMAMATSU ORCA-ER)的荧光显微镜(Zeiss Discovery.V20),获得血管壁-细胞相互作用的图像和视频并用AxioVison软件分析。每个时间点拍摄两至三帧并且记录每帧的贴壁细胞数目。

[1587] 实施例3.在ACE2/APOE双KO小鼠中的动脉粥样硬化形成,在ACE2/AGER/APOE三KO小鼠中是减少的

[1588] 这个实施例显示,对于遗传性Ace2缺乏,需要RAGE的表达来在易患动脉粥样硬化的Ace2/apoE DKO小鼠中诱导动脉粥样硬化形成增加。

[1589] ACE2是代谢Ang II(RAAS的主效应物)的酶。与组成型富有Ace2的apoE KO小鼠(图3C)相比时,Ace2/apoE DKO小鼠中Ace2遗传性缺乏导致与Ang II循环型水平升高(图3A)、收缩血压升高(图3B)和主动脉弓中斑块积累量增加相关的RAAS组成型活化。

[1590] 与apoE KO小鼠相比时,Ace2/apoE DKO小鼠的主动脉还显示促动脉粥样硬化介质表达增加(图3D)。

[1591] 与apoE KO小鼠相比时,Ace2/apoE KO小鼠具有升高的氧化应激循环型标志物(图3E)和升高的RAGE配体(包括S100A8/A9和AGE)循环型水平(图3F)。

[1592] 在Ace2/AGER/apoE TKO小鼠中遗传缺失编码RAGE的AGER基因阻止了Ace2/apoE DKO小鼠中观察到的动脉粥样硬化形成增加(图3C)及促炎标志物(图3D)、氧化应激标志物(图3E)和RAGE配体(图3F)的诱导,使这些标志物恢复到类似于apoE KO小鼠中所观察到的水平。

[1593] 血压水平和Ang II循环型浓度在Ace2/apoE DKO或Ace2/AGER/apoE TKO之间无显著差异(图3A和图3B)。

[1594] 额外的材料和方法

[1595] apoE KO小鼠中的Ace2遗传性缺乏

[1596] Ace2是血管系统中代谢Ang II的主要酶。与野生型apoE KO小鼠相比时,易患动脉粥样硬化的apoE KO小鼠中的Ace2遗传性缺乏导致Ang II循环型水平升高和斑块积累量增加(Thomas等人2012)。在这些研究中,跟踪雄性Ace2/apoE DKO和AGER/Ace2/apoE TKO小鼠到16-18周龄,所述小鼠到16-18周龄是与Ace2/apoE DKO小鼠中斑块积累量增加相关的时间点。

[1597] 血浆血管紧张素II

[1598] 通过商业化放射免疫测定(ProSearch International,Malvern,澳大利亚)估计血浆血管紧张素II水平。

[1599] 实施例4.主动脉和内皮中暴露于血管紧张素II所致的促炎信号传导诱导依赖于RAGE表达

[1600] 这个实施例显示,对于暴露于Ang II,需要RAGE的表达来诱导主动脉和取自前者的主动脉内皮细胞中的促炎信号传导。

[1601] 与未处理的主动脉(图4B)相比时,从apoE KO小鼠分离的主动脉离体暴露于Ang II(1μM),增加了促动脉粥样硬化介质的表达(图4A)并且导致黏附性白细胞数目增加。

[1602] 与来自apoE KO小鼠的主动脉相比时,AGER/apoE DKO小鼠中RAGE的遗传缺失阻止了这些致动脉粥样硬化介质的诱导(图4A)或暴露于Ang II(1μM)后引发的白细胞(图4B)与主动脉的内皮黏附性增加。

[1603] 在分离自C57b16小鼠主动脉的鼠原代主动脉内皮细胞(PMAEC)中,暴露于Ang II(1μM)还导致促炎信号传导的诱导。这相关于标记的THP-1(单核细胞型)细胞与Ang II处理PMAEC单层的黏附增加(图4C)和关键促炎基因的表达增加(图4D),以及ROS和其他氧化应激标志物、活化型rac-1和氧化型谷胱甘肽的产生快速增加(图4E)。

[1604] 在分离自C57b16小鼠主动脉的PMAEC中,暴露于Ang II还导致NFκB下游的典型和非典型信号传导的诱导,如通过诱导经典标志物CXCL2和CXCL12所展示(图4F)。TNFα作为阳性对照显示,原因在于其选择性诱导NFκB活化过程下游的典型信号传导的能力。显示VCAM-

1表达作为额外的目标响应基因,重复图4D中的数据。

[1605] 在分离自C57b16小鼠主动脉的PMAEC中,暴露于RAGE配体S100A8/A9还导致NFκB依赖的目标促炎基因(包括ICAM-1、VCAM-1、TNFα和MCP-1)的诱导(图4G)。

[1606] 在分离自AGER KO小鼠的PMAEC中,Ang II处理未导致对关键促炎基因(图4D)、典型或非典型NFκB活化标志物(图4F)、ROS产生和氧化应激增加(图4E)或内皮黏附性功能性增加(图4C)的诱导。

[1607] 在分离自AGER KO小鼠主动脉的PMAEC中,暴露于RAGE配体S100A8/A9未导致促炎基因(包括ICAM-1、VCAM-1和MCP-1)的诱导(图4G)。

[1608] 使用siRNA在PMAEC中沉默AGER表达实现了相似的遗传性RAGE缺失表型,阻止NFκB依赖的通过Ang II或RAGE配体S100A8/A9对VCAM-1基因表达的诱导(图4H)。显示p65表达沉默作为这个信号传导途径的NFκB依赖性的阳性对照。

[1609] 总之,在AGER KO小鼠内皮细胞和已经用siRNA抑制RAGE表达的PMAEC中的结果均显示:S100A8/A9在这些细胞中的作用经RAGE特异性介导,并且其他受体(例如,Toll样受体)在PMAEC的这种现象中并未发挥重要作用,其中S100A8/A9也有可能借助所述其他受体活化NFκB和其他细胞系统中(例如,白细胞和神经胶质细胞中)存在的下游信号传导途径。

[1610] 观察到的AGER KO小鼠PMAEC中Ang II效应减弱不归因于RAGE不存在下RAAS-信号传导的损失,因为RAGE缺乏的PMAEC暴露于Ang II导致了相似的磷酸肌醇合成增加,如通过IP-1升高和早期生长反应基因(EGR1)的下游诱导(二者均视为活性Ang II介导的信号传导的标志物)估计(图4I)。

[1611] 额外的材料和方法

[1612] 分离的主动脉中的离体研究

[1613] 将主动脉从apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠分离,分开并置于Kreb缓冲液中,并且在37℃通过引入碳合气(95%0_2;5%CO_2)穿过该缓冲液而维持在生理pH。随后用Ang II(1μM)处理血管(n=6/组)4小时。在此时间后,将DilC18(1:1000)标记的全血按0.12ml/分钟通过主动脉灌注。使用连接至数码照相机(HAMAMATSU ORCA-ER)的荧光显微镜(Zeiss Discovery.V20),观察血管壁-细胞相互作用的图像和视频并用AxioVison软件分析。

[1614] 静态黏附测定法

[1615] 使用静态黏附测定法,在PMAEC中测定Ang II的功能反应性,其中将PMAEC按50,000个细胞/孔接种入六孔平板并且允许生长至70%汇合度,之后用1μM Ang II处理24小时。按照生产商的说明,使用CellVue Burgundy荧光细胞标记试剂盒(LICOR),对模拟血管系统中单核细胞和巨噬细胞的人THP-1细胞染色,之后将它们按每孔$3x10^5$个活细胞接种到内皮细胞单层上并在37℃温育20分钟。移除尚未黏附于内皮细胞单层的细胞并且将孔用PBS洗涤,之后用PBS中的4%福尔马林固定30分钟。随后使用ODYSSEY红外成像仪(Licor)定量细胞黏附。另外,使用光学显微术(Olympus CKX41)按x20对细胞黏附照相。

[1616] 超氧化物和额外氧化应激标记物的产生

[1617] 为了定量Ang II诱导的超氧化物产生,血管灌流室测定法用来实时测量来自AGER KO和C57B16主动脉的PMAEC中的胞质和线粒体超氧化物总产生。将PMAEC在胶原蛋白包被的盖玻片上培育并且当它们达到80%汇合时,安装入密封的玻璃灌流室中。将这些灌流室用Kreb缓冲液灌注一小时,每10分钟取得荧光读数以建立基线读数。随后将细胞用1μM Ang

II灌注60分钟并且每1分钟取得荧光读数,持续另外10分钟。荧光读数表示为任意单位的荧光距基线的变化(Δ)。按照生产商的说明,使用Rac-1 G-LISA活化测定法(Cytoskeleton),还在暴露于Ang II后的细胞裂解物中测量活化型NADPH氧化酶亚基(Rac-1活化)的水平。还分析了额外的氧化应激标记物,包括氧化型谷胱甘肽的水平(Cayman Chemical Company,US),按照生产商的说明进行。

[1618] 经AT_1R的信号传导的完整性

[1619] 为了确认AT_1R信号传导级联在来自AGER KO的PMAEC中有功能,使用生产商的说明,使用IP-one HTRF测定法(CisBio bioassays,Bagnols-sur-C6ze Cedex,法国),我们测量了Gq受体活化后积累于细胞中的磷酸肌醇(IP1)(磷酸肌醇(IP_3)的稳定下游代谢物),并且暴露于1μM Ang II后2小时,随后测定EGR1基因表达和AT_1R的变化,如通过实时RT-PCR所评估。

[1620] 实施例5.全长和截短的人RAGE构建体对AT_1R-CHO细胞中促炎信号传导的调节效应

[1621] 这个实施例显示,对于暴露于Ang II以诱导中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中关键促炎转录因子p65-NFκB表达和NFκB活性增加,还需要表达AT_1R和RAGE二者。

[1622] CHO细胞表达少数细胞表面受体,并且尤其在其表面上不表达内源AT_1R或RAGE,这使其成为探索AT_1R-RAGE相互作用的理想系统。此外,CHO细胞不表达潜在地具有以下能力的TLR:结合RAGE配体并被它们活化,导致NFκB活化。

[1623] 用人AT_1R基因稳定转染CHO细胞产生了AT_1R-CHO细胞,并且赋予对外源Ang II(1μM)的经典反应性,如通过诱导磷酸肌醇合成(图5A)和诱导早期生长反应基因EGR1(图5B)所展示。

[1624] 相反,外源Ang II(1μM)不能在AT1R-CHO细胞中诱导关键促炎转录因子(p65-NFκB)表达或NFκB活化增加(图5C)。

[1625] 仅在AT_1R-CHO细胞也经全长人RAGE多肽转染并表达该多肽时,外源Ang II(1μM)才能够活化关键促炎转录因子(p65-NFκB)(图5C)。仅在细胞还表达RAGE多肽时,RAGE配体S100A8/A9(5ng/mL)才能够诱导关键促炎转录因子p65-NFκB活化(图5C),所述细胞充当转染的CHO细胞中RAGE转基因表达和其信号传导途径完整性的阳性对照。

[1626] 与单独的空质粒(载体)相比时,用下述N-截短型mCherry-RAGE构建体转染AT_1R-CHO细胞保留了全长$RAGE_{22-404}$响应于Ang II介导促炎信号传导的能力,条件是保留Q379(图5D),其中所述构建体(i)缺少RAGE胞外结构域(即$mCherry\text{-}RAGE_{342-404}$),(ii)缺少RAGE的胞外结构域和跨膜结构域(即$mCherry\text{-}RAGE_{362-404}$)或(iii)缺少RAGE的胞外结构域、跨膜结构域和透明蛋白-1结合结构域(366-367)(即$mCherry\text{-}RAGE_{370-404}$)。超出Q379之外的N-截短(例如$mCherry\text{-}RAGE_{380-404}$)产生不能响应于Ang II介导促炎信号传导的无活性突变体RAGE肽。

[1627] 用C-截短型RAGE构建体转染AT_1R-CHO细胞保留了响应于Ang II介导促炎信号传导的能力,条件是保留至少野生型RAGE的C末端Ser391(即$RAGE_{22-391}$;图5E)。

[1628] 在AT_1R-CHO细胞中保留响应于Ang II介导促炎信号传导的能力的最小构建体是13聚构建体$mCherry\text{-}RAGE_{379-391}$(图5E)。

[1629] 转染入AT_1R-CHO细胞时,缺少RAGE配体结合性胞外结构域的N-截短型mCherry-

RAGE构建体不能够响应于RAGE配体S100A8/A9促进信号传导(图5F),因为除RAGE的其他部分之外,RAGE配体依赖性RAGE活化还需要这种配体结合性胞外结构域以结合该配体,随后传递其信号,召集并活化其胞内信号传导级联。

[1630] 转染入AT_1R-CHO细胞时,C-截短型RAGE构建体能够保留响应于S100A8/A9介导促炎信号传导的能力,条件是保留至少野生型RAGE的C末端Ser391(即$RAGE_{22-391}$;图5G)。

[1631] 这种额外的mCherry蛋白提供了确保转基因构建体在细胞模型中表达的实用手段。但是,它没有在N-截短型RAGE的促炎信号传导作用中发挥作用,因为(i)mCherry的表达本身对信号传导途径没有影响(即,图5F中的mCherry对照)和(ii)其中已经省去mCherry蛋白的N-截短型RAGE构建体(图5H)实现与表达mCherry-RAGE融合蛋白的那些构建体相同的响应于Ang II的信号传导功能水平(图5D、图5F)。类似地,超出Q379之外的N-截短使α螺旋去稳定并且导致具有和没有mCherry-RAGE融合的构建体中信号传导功能丧失(分别见图5F和图5H)。

[1632] 额外的材料和方法

[1633] 经典的GPCR信号传导

[1634] 使用生产商的说明,使用IP-one HTRF测定法(CisBio bioassays,Bagnols-sur-Cèze Cedex,法国),通过诱导Gq受体活化后积累于细胞中的磷酸肌醇(IP1)(IP_3的稳定下游代谢物),在1μM Ang II处理的细胞中确认经典的GPCR信号传导。

[1635] NFκB活性测定法

[1636] 为了测量NFκB活性受1μM Ang II或5ng/ml作为信号传导对照的RAGE配体S100A8/A9诱导,按照生产商的说明,使用脂质转染胺2000(Invitrogen),用0.4μg编码NFκB-SEAP或β-半乳糖苷酶(β-Gal)的质粒转染AT_1R-CHO细胞。在24小时后,则将每种质粒组合转染的细胞用Ang II(1μM)处理或不作处理并且温育4小时,之后收集细胞上清液和细胞裂解物。使用化学发光SEAP报道基因测定法(Roche Applied Science)分析细胞上清液,以检测处理后的SEAP产生情况。为了作为转染效率的对照,使用市售试剂盒(Promega)分析细胞裂解物的β-Gal。

[1637] 实施例6.ANG II活化AT_1R后的RAGE配体非依赖性RAGE活化

[1638] 这个实施例显示Ang II与AT_1R结合后,RAGE通过RAGE配体非依赖性途径发生活化且不通过释放RAGE配体发生活化。

[1639] 已知AT_1R的活化因活化下述途径而触发酪氨酸-激酶受体活化,所述途径导致蛋白酶介导的膜系留型配体胞外"散播",随后所述配体不受约束以结合于并活化这些酪氨酸激酶受体。

[1640] 用靶向RAGE配体结合性胞外结构域的中和抗体(RAGEab)或具有配体结合亲和力的可溶性RAGE诱饵($sRAGE_{22-331}$)预处理均阻断表达全长RAGE和全长AT_1R的RAGE-AT_1R-CHO细胞中RAGE配体S100A8/A9对RAGE配体依赖性促炎信号传导的诱导(图6A)。

[1641] 用靶向RAGE配体结合性胞外结构域的中和抗体(RAGEab)或具有配体结合亲和力的可溶性RAGE诱饵($sRAGE_{22-331}$)预处理不影响RAGE-AT_1R-CHO中Ang II对RAGE配体非依赖性诱导促炎信号传导的诱导(图6A)。

[1642] 用靶向RAGE配体结合性胞外结构域的中和抗体(RAGEab)或具有配体结合亲和力的可溶性RAGE诱饵($sRAGE_{22-331}$)预处理也不减弱内源性富有AT_1R和RAGE二者的PMAEC中Ang

II-AT_1R依赖性促炎信号传导的诱导(图6B)。来自AGER KO小鼠的PMAEC作为阴性对照显示。

[1643] 相反,用靶向RAGE配体结合性胞外结构域的中和抗体(RAGEab)或具有配体结合亲和力的可溶性RAGE诱饵($sRAGE_{22-331}$)预处理能够减弱内源性富有AT_1R和RAGE二者的PMAEC中暴露于RAGE配体S100A8/A9后所诱导的促炎信号传导(图6C)。

[1644] 连同使用实施例5中详述的N-截短型RAGE构建体的结果一起,这些数据确认,暴露于Ang II后RAGE受体的活化与释放RAGE配体或这类释放的配体活化RAGE胞外结构域无关。

[1645] 额外的材料和方法

[1646] 在暴露于1μM Ang II或5ng/ml RAGE配体S100A8/A9之前,采用或不采用针对RAGE的中和抗体(RAGEab;R&D Systems;1μg/mL)或可溶性$RAGE_{22-331}$(sRAGE;1μg/mL)预处理1小时的情况下,实施额外的实验。

[1647] 实施例7.借助共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化不需要胞质尾的磷酸化来诱导促炎信号传导

[1648] 这个实施例显示借助某种共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化不需要RAGE的磷酸化来诱导促炎信号传导。

[1649] 先前已经认为Ser391的磷酸化对借助RAGE的配体依赖性信号传导重要,这可能在于促进招募衔接子蛋白到RAGE胞质尾上,后者随后转导促炎信号传导。

[1650] 但是,许多其他哺乳动物在RAGE的391位置具有除丝氨酸之外的不能磷酸化的另一个氨基酸。例如,骆驼在391具有谷氨酰胺,而在牛、绵羊、山羊、猪、鹿以及一些其他哺乳动物中,脯氨酸天然存在于相同位置。这些残基不能维持磷酸化,然而这些动物具有完好的RAGE信号传导途径。

[1651] 用其中S391突变成谷氨酰胺(S391Q-RAGE)或脯氨酸(S391P-RAGE),因而在这个位点阻断潜在磷酸化的全长RAGE构建体转染AT_1R-CHO细胞,继续介导Ang II依赖的p65-NFκB基因表达诱导。用其中S391处推定性磷酸化位点突变成谷氨酰胺(S391Q-RAGE)或脯氨酸(S391P-RAGE)的全长RAGE构建体转染,也继续介导AT_1R-CHO细胞中S100A8/A9依赖的NFκB基因表达诱导(图7A)。

[1652] 通过以下方式实现阻断人RAGE胞质尾上的全部其他潜在磷酸化位点(即S399、S400和T401):将RAGE 394-404的最后十一个C末端残基替换为鼠RAGE胞质尾中存在的天然不含潜在磷酸化位点的那些残基(即,将$hRAGE_{394-404}$;P_{394}EAGESSTGGP替换为$mRAGE_{392-404}$;A_{394}EMPENGAGGP,生成无潜在磷酸化位点的嵌合RAGE(cRAGE)(S391Q-cRAGE))。值得注意地,这种构建体能够在AT_1R-CHO细胞中响应于Ang II发送与野生型RAGE相同的信号(图7B),从而确认,信号传导诱导的RAGE磷酸化不是借助RAGE的配体非依赖性诱导促炎信号传导必需的,并且确认,当S391突变时,其他位点不传输RAGE磷酸化的冗余性。

[1653] 还显示S391Q-cRAGE介导AT_1R-CHO细胞中S100A8/A9诱导的信号传导(图7B)。这些数据确认,信号传导诱导的RAGE磷酸化也不是借助RAGE的配体依赖性促炎信号传导必需的,或确认,当S391突变时,胞质尾中的其他磷酸化位点可以传输RAGE磷酸化的冗余性。

[1654] 其中已经缺失S391的RAGE构建体(例如$RAGE_{22-390}$)没有能力在AT_1R-CHO细胞中介导Ang II依赖的对NFκB活化或p65表达的诱导(参见实施例5,图5G)。

[1655] 其中仅S391突变成丙氨酸的全长RAGE构建体(S391A-RAGE)没有能力在AT_1R-CHO细胞中介导Ang II依赖的或S100A8/A9依赖的对NFκB表达或活性诱导(如通过p65表达所确

定)(图7A),即便人RAGE中S399、S400和T401处存在其他潜在磷酸化位点也是如此。

[1656] 其中仅S391选择性突变成丙氨酸的全长和N-截短型RAGE构建体(S391A-RAGE)也没有能力在AT_1R-CHO细胞中介导Ang II依赖的对NFκB表达或活性的诱导(如通过p65表达所确定)(图7C)。

[1657] 其中仅S391突变成半胱氨酸的RAGE构建体(S391C-RAGE)也没有能力在AT_1R-CHO细胞中介导Ang II依赖的或S100A8/A9依赖的对NFκB表达或活性的诱导(如通过p65表达所确定)(图7A)。

[1658] 其中S391突变成亮氨酸的全长RAGE构建体(S391L-RAGE)保留在AT_1R-CHO细胞中介导Ang II依赖的对NFκB表达诱导的能力,但丧失由RAGE配体S100A8/A9诱导的信号传导(图7A)。

[1659] 相反,其中S391突变成谷氨酸的全长RAGE构建体(S391E-RAGE)丧失在AT_1R-CHO细胞中介导Ang II依赖的对NFκB表达诱导的能力(图7A),但是保留暴露于RAGE配体S100A8/A9后发送信号的能力(图7A)。

[1660] 用其中S391突变成异亮氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸或色氨酸的N-截短型mCherry-$RAGE_{362-404}$构建体转染AT_1R-CHO细胞,保留了野生型$RAGE_{362-404}$转染时介导Ang II依赖的对NFκB表达诱导的能力(如通过p65表达所确定)(图7D)。相反,与野生型RAGE相比时,用其中S391突变成丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、精氨酸、缬氨酸或酪氨酸的N-截短型$RAGE_{362-404}$构建体转染,没有恢复AT_1R-CHO细胞中Ang II依赖的对NFκB表达或活性的诱导(如通过p65表达所确定)(图7D)。

[1661] 实施例8.MYD88在借助共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化和在RAGE配体依赖性RAGE活化中的共同作用

[1662] 这个实施例描述了髓样分化因子88(myD88)在借助某种共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化以及在RAGE配体依赖性RAGE活化中的共同作用。

[1663] 先前已经显示共同衔接子蛋白myD88对RAGE以及许多其他受体(包括全部Toll样受体(TLRs)(TLR-3除外))活化后的下游促炎信号传导重要。认为配体依赖性RAGE活化促进了招募MyD88和其他共同衔接子蛋白(包括含有Toll白介素1受体结构域的衔接子蛋白(TIRAP))至RAGE胞质尾,后者随后招募并转导借助IRAK4的信号传导,最终导致NFκB活化。

[1664] 使用siRNA使myD88表达沉默抑制了PMAEC中RAGE配体S100A8/A9诱导的NFκB依赖的关键黏附分子ICAM-1诱导(图8A)。这种影响可比于沉默其下游靶p65。

[1665] 使用siRNA使MyD88表达沉默还抑制了PMAEC中借助Ang II的RAGE配体非依赖性RAGE活化所诱导的信号传导,包括关键黏附分子ICAM-1的NFκB依赖性基因表达活化(图8B)。

[1666] 使用siRNA使MyD88表达沉默还抑制了HMEC中NFκB依赖的关键黏附分子MCP-1基因表达活化,所述活化由借助Ang II的RAGE配体非依赖性RAGE活化诱导(图8C)。这种抑制作用被$RAGE_{362-404}$拯救(图8C),从而确认发明人鉴定的RAGE的功能性替代物独立于MyD88发挥作用。

[1667] 实施例9.PKC-ξ在借助共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化和在RAGE配体依赖性RAGE活化中的共同作用

[1668] 这个实施例描述了PKCξ在借助某种共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化

和在RAGE配体依赖性RAGE活化中的共同作用。

[1669] 先前已经显示非典型PKC(PKCζ)对RAGE配体依赖性RAGE活化和下游途径后续活化重要。已经显示PKCξ结合于RAGE胞质尾以及Diaph1,另一个RAGE结合配偶体。

[1670] PKCζ是涉及许多信号传导途径的多效性激酶,所述信号传导途径包括MAP激酶信号传导、NFκB-活化、细胞极性、胰岛素介导的葡萄糖摄取和长期记忆增强。PKCζ还涉及许多其他信号传导途径,包括TLR2/4-依赖性促炎信号传导诱导。PKCζ还调节活化型GPCR的磷酸化状态,一个在受体下游信号传导和发挥功能中的关键事件。

[1671] 使用siRNA使PKCζ表达沉默或用假底物(iPKCζ)抑制PKCζ抑制了PMAEC中RAGE配体S100A8/A9诱导的信号传导(图9A),效果等同于使RAGE表达沉默。这进一步确认,沉默或抑制PKCξ不因借助TLR2/4,反而特别借助特异性通过全长RAGE改变信号传导,使S100A8/A9的信号传导沉默来发挥作用。

[1672] 使用siRNA使PKCζ表达沉默或用假底物(iPKCζ)抑制PKCζ还抑制了借助Ang II的RAGE配体非依赖性全长RAGE活化所诱导的信号传导,包括关键黏附分子ICAM-1的NFκB依赖性活化(图9B)。

[1673] 用假底物(PKCζi)抑制PKCζ还抑制由全长S391Q-cRAGE$_{22-404}$(其在能够被磷酸化的胞质尾中不含丝氨酸或苏氨酸)的RAGE配体非依赖性活化诱导的信号传导,如通过AT$_1$R-CHO细胞中暴露于Ang II后NFκB-依赖性p65和PCNA活化所评估(图9C),从而确认PKCζ在借助诱导RAGE磷酸化的RAGE信号传导途径中不起作用。

[1674] 相反,使用siRNA使PKCζ表达沉默并未抑制HMEC中NFκB依赖的关键黏附分子MCP-1基因表达活化,所述活化由借助Ang II的RAGE配体非依赖性RAGE$_{362-404}$活化诱导(图9D),从而确认发明人鉴定的RAGE的功能性替代物独立于PKCζ发挥作用。

[1675] 额外的材料和方法

[1676] 采用或不采用PKCζ的假底物(iPKCζ,5μM,Tocris)预处理1小时的情况下,实施额外的实验。

[1677] 实施例10.与RAGE配体依赖性RAGE活化相比,透明蛋白-1在借助共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化中的差异性作用

[1678] 这个实施例描述了与RAGE配体依赖性RAGE活化相比,透明蛋白-1(Diaph1)在借助某种共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化中的差异性作用,尤其是其对RAGE的带电荷簇(R366-Q367)和其稳定化的已知与Diaph1复合的α-转角的依赖性,提示借助RAGE诱导的RAGE配体依赖性和RAGE配体非依赖性(反式活化)信号传导之间的差异关键点。

[1679] 形成素(formin)型蛋白质透明蛋白-1(Diaph1)视为RAGE配体诱导的促炎信号传导的关键要素。

[1680] 使Diaph1表达沉默减弱了PMAEC中借助RAGE配体S100A8/A9(5ng/mL)诱导的全长RAGE的配体依赖性信号传导(图10A),效果等同于充当阴性对照的使RAGE沉默。

[1681] 认为RAGE的带电荷簇(R366-Q367)形成α-转角,后者使其与Diaph1的复合物稳定(Rai,等人2016)。选择性破坏认为Diaph1和RAGE借以相互作用的带电荷簇的R366-Q367突变,能够阻止表达全长R366A-Q367A-RAGE的AT$_1$R CHO细胞中S100A8/A9诱导的信号传导(图10B)。

[1682] 使Diaph1表达沉默还减弱了由Ang II诱导的借助全长RAGE的RAGE配体非依赖性

信号传导,所述诱导包括在PMAEC中诱导ICAM-1和VCAM-1表达(图10C),并且抑制暴露于Ang II后,对白细胞与内皮单层黏附的功能性诱导(图10D)。

[1683] 相反,突变的全长R366A-Q367A-RAGE$_{22-404}$和其中认为Diaph1和RAGE借以相互作用的带电荷簇遭破坏的N-截短型mCherry-R366A-Q367A-RAGE$_{362-404}$仍介导AT$_1$R-CHO细胞中Ang II诱导的RAGE配体非依赖性信号传导(图10B)。

[1684] 另外,删除其中认为Diaph1和RAGE借以相互作用的带电荷簇(例如,在RAGE$_{370-404}$中)并未阻止AT$_1$R-CHO细胞中Ang II诱导的RAGE配体非依赖性RAGE活化和促炎信号传导(图10E)。

[1685] 此外,使用siRNA使Diaph7表达沉默并未抑制HMEC中NFκB依赖的MCP-1基因表达活化,所述活化由借助Ang II的RAGE配体非依赖性RAGE$_{362-404}$活化诱导(图10F),从而确认发明人鉴定的RAGE的功能性替代物独立于Diaph1发挥作用。

[1686] 总之,这些数据提示,破坏RAGE的带电荷簇和Diaph1之间相互作用的方法不直接影响借助某种共定位的GPCR的经由RAGE的RAGE配体非依赖性信号传导。

[1687] 不希望受理论约束,发明人认为,突变或缺失认为Diaph1和全长RAGE借以相互作用的带电荷簇减轻了因这种相互作用发生的结合约束,这意味着没有这个结合结构域的N-截短型RAGE肽(例如RAGE$_{370-404}$)或其中这种结构域被改变的突变肽(例如R366A-Q367A-RAGE$_{362-404}$)能够克服通过其中带电荷簇保持存在的构建体mCherry-S391A-RAGE$_{362-404}$(0.4ng/ml)预处理所赋予的反式活化抑制作用(图10G)。

[1688] 实施例11IQGAP-1在借助共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化和在RAGE配体依赖性RAGE活化中的共同作用

[1689] 这个实施例描述了IQGAP-1在RAGE活化中的作用。

[1690] IQGAP-1是参与调节多种细胞过程的支架蛋白,所述细胞过程范围从肌动蛋白细胞骨架的组织、转录和细胞黏附至调节细胞周期。已知IQGAP-1结合于RAGE效应分子,后者包括Cdc42、Rac-1、钙调蛋白-1和ERK1/2的活性形式。

[1691] 使IQGAP-1表达沉默减弱了PMAEC中Ang II诱导的借助RAGE的RAGE配体非依赖性信号传导(图11A)和PMAEC中S100A8/A9诱导的RAGE配体依赖性信号传导(图11B)。

[1692] RAGE胞质尾的突变体形式S391A-RAGE$_{362-404}$偏好地缔合于IQGAP-1,如使用S391A-RAGE$_{362-404}$包被的柱使其与其他胞质组分差异性纯化的能力所示(图11C)。这种策略还下拉了IQGAP-1相关的蛋白质-埃兹蛋白/根蛋白/膜突蛋白。

[1693] 使用siRNA使IQGAP-1表达沉默还抑制了HMEC中NFκB依赖的MCP-1基因表达活化,所述活化由借助Ang II的RAGE配体非依赖性RAGE$_{362-404}$活化诱导(图11D),从而确认发明人鉴定的RAGE的功能性替代物在功能上依赖于IQGAP-1。

[1694] 额外的材料和方法

[1695] 用于下拉实验(pull-down experiments)的方法

[1696] 将TAT-Cherry-S391A-RAGE$_{362-404}$肽和TAT-mCherry对照肽依重力流动地与NiNTA柱结合,并且使用裂解缓冲液(50mM Tris pH 7.5,300mM NaCl,5mM β-巯基乙醇,10mM咪唑)平衡。使用RIPA缓冲液(补充有1%NP-40、0.5%脱氧胆酸Na及蛋白酶和磷酸酶抑制剂的1x PBS),裂解5x 10^7个经Hs-AT$_1$R稳定转染的CHO细胞,在裂解缓冲液中稀释至50ml并且依重力流动地通过Ni-NTA柱两次。充分洗涤该1ml柱(200ml洗涤缓冲液-50mM Tris pH 7.4,

300mM NaCl,5mM β-巯基乙醇,20mM咪唑)。在洗涤后,将2ml洗脱缓冲液(50mM Tris pH 7.4,300mM NaCl,5mM β-巯基乙醇,250mM咪唑)施加至该柱,并用来洗脱已经与A肽或TAT-mCherry对照肽结合的蛋白质。交付1ml样品用于通过质谱法进行蛋白质组分析。Venny 2.1.0用来生成与两种蛋白质差异结合的蛋白质的列表。

[1697] 实施例12.抑制鼠SVEC中借助共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化

[1698] 这个实施例描述了使用RAGE胞质尾的特定组分抑制暴露于Ang II后鼠SVEC中借助RAGE诱导的RAGE配体非依赖性信号传导。

[1699] 用全长S391A-$RAGE_{22-404}$和N-截短型mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$转染鼠SVEC能够阻止内源性富有RAGE表达的鼠SVEC中Ang II对ICAM-1基因表达的诱导(图12A)。

[1700] 用其中保留野生型构象(S391)的全长($RAGE_{22-404}$)构建体和N-截短型mCherry-RAGE构建体转染鼠SVEC,并未影响暴露于Ang II后对ICAM-1基因表达的诱导(图12A)。

[1701] 用C-截短型S391X-RAGE突变体(即$RAGE_{22-390}$和m-Cherry-$RAGE_{370-390}$)转染鼠SVEC也阻止内源性富有RAGE表达的鼠SVEC中Ang II对ICAM-1的诱导(图12A)。

[1702] 在SVEC中展示有RAGE信号传导抑制性的最小序列是mCherry-$RAGE_{379-390}$(图12B)。其他N端或C端截短物(例如mCherry-$RAGE_{380-390}$)或包含胞质尾其他组分、但不含$RAGE_{379-390}$十二肽的肽对借助RAGE活化的Ang II促炎作用不显示抑制作用。

[1703] 这种额外的mCherry蛋白提供了确保转基因构建体在细胞模型中表达的实用手段。但是,它没有在N-截短型RAGE的功能性抑制作用中发挥作用,因为(i)mCherry(对照)的表达本身对信号传导途径没有抑制性影响(图12B)和(ii)其中已经省略mCherry蛋白的N-截短型RAGE构建体在RAGE-AT_1R-CHO细胞(图12C)中实现与表达mCherry-RAGE融合蛋白的构建体相同的Ang II依赖性信号传导抑制作用,如上文详述(图12B)。

[1704] 预测从这个RAGE序列产生的肽是α螺旋。由于可能通过变成封端氨基酸稳定或破坏α螺旋,故进行额外的选择性突变。值得注意地,谷氨酰胺379或谷氨酰胺390因丙氨酸置换而丧失使得该螺旋去稳定并导致抑制作用丧失,而谷氨酰胺至赖氨酸突变体Q390K-$RAGE_{370-390}$和Q379K-$RAGE_{370-390}$似乎保留最大抑制作用,这与末端赖氨酸或精氨酸在使α螺旋构象下的十二肽稳定方面拥有更大影响的已知技术相符(图12D)。

[1705] 十二肽$RAGE_{379-390}$的这个序列与来自共生生物(包括链霉菌(Streptomyces))的免疫调节性细菌蛋白中的序列具有同源性(图12E)。尽管仅哺乳动物拥有RAGE的基因,病原体中RAGE抑制性序列的存在与逃避/减弱哺乳动物宿主防御(包括炎症)的存活机制一致。

[1706] 尽管$RAGE_{370-390}$抑制SVEC细胞中Ang II活化AT_1R后ICAM-1表达诱导作用的能力随以下谷氨酰胺至丙氨酸突变而丧失:Q390A-$RAGE_{370-390}$或Q379A-$RAGE_{370-390}$(图12D),但L388A-$RAGE_{370-390}$、E384A-$RAGE_{370-390}$、E382A-$RAGE_{370-390}$和E380A-$RAGE_{370-390}$如野生型$RAGE_{370-390}$那样继续抑制SVEC细胞中的信号传导。

[1707] 额外的材料和方法

[1708] 为了探索RAGE构建体抑制内源RAGE反式活化的潜力,在永生化小鼠内皮细胞(Svec4-10,ATCC)中实施额外的实验,所述细胞在含25mM葡萄糖的10%FBS/DMEM中培养。按照生产商的说明,使用脂质转染胺2000(Invitrogen),以截短的RAGE构建体转染SVEC,或用RAGE寡肽(280pM)处理。允许细胞在含有10%FBS的培养基中恢复16小时,之后用1μM Ang II处理。

[1709] 实施例13.体外靶向借助共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化

[1710] 在这个实施例中,我们显示,用借助某种共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的细胞穿透肽调节物处理细胞,能够调节细胞培养物中借助RAGE配体非依赖性RAGE活化对促炎信号传导的诱导。

[1711] 为了验证通过活化RAGE胞质尾靶向AT_1R依赖性信号传导的治疗潜力,生成包含RAGE的C末端43个氨基酸的寡肽充当替代物,所述寡肽加mCherry-荧光蛋白(以对表达和递送定量)和HIV-TAT基序(以促进细胞穿透)标签。在一个形式中,391处的丝氨酸残基变更成丙氨酸(S391A-$RAGE_{362-404}$;SEQ ID NO:1)以抵消其信号发送能力并增强其抑制内源性RAGE活化的能力。

[1712] 采用与活化性野生型构建体仅一个氨基酸残基不同的TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$融合蛋白(0.4ng/ml)处理AT_1R-CHO细胞(不表达RAGE),未促进Ang II对p65-NFκB表达的诱导(图13A)。

[1713] 在野生型TAT-mCherry-$RAGE_{362-404}$融合肽(1ng/ml)预处理的AT_1R-CHO细胞中,TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$融合蛋白(1ng/ml)后续处理能够阻止野生型肽恢复Ang II诱导的促炎信号传导(图13B)。

[1714] 在TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$融合蛋白(1ng/ml)处理的AT_1R-CHO细胞中,与未处理的细胞相比时,用野生型TAT-mCherry-$RAGE_{362-404}$融合肽后续处理,甚至1000倍过量情况下,亦不能够恢复Ang II诱导的p65表达的应答性(图13C)。

[1715] 在表达S391Q-$cRAGE_{22-404}$(即,没有可磷酸化元件的构建体)的AT_iR-CHO细胞中,用TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$融合蛋白(0.4ng/ml)后续处理能够阻止Ang II诱导对p65-NFκB和增殖标志物PCNA的诱导,从而确认独立于RAGE的磷酸化实现调节作用(图13D)。

[1716] 用野生型TAT-mCherry-$RAGE_{362-404}$融合肽(0.4ng/ml)处理来自AGER KO小鼠的PMAEC (RAGE缺乏)能够恢复Ang II介导对p65-NFκB和NFκB依赖性促炎基因(ICAM-1、VCAM-1和MCP-1)表达的诱导(图13E)。

[1717] 用TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$融合蛋白(0.4ng/ml)处理从c57b16小鼠获得的富有RAGE的PMAEC,阻断了Ang II诱导的下游信号传导诱导,导致典型和非典型的NFκB活化途径活化(如通过分别诱导CXCL12表达和CXCL2表达所检测),和VCAM-1基因表达的NFκB-依赖性下游诱导(图13F)。TNFα作为典型NFκB-信号传导的阳性对照显示并且不受TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$融合蛋白影响。

[1718] 用TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$融合蛋白(0.4ng/ml)处理富有RAGE的人AEC也阻断Ang II诱导的下游信号传导,导致NFκB-依赖的对促炎基因ICAM-1、VCAM-1、MCP-1、TNFα和IL-6的诱导(图13G)。抑制作用与AT_1R阻滞剂(厄贝沙坦)在HAEC中实现的抑制作用可比较。

[1719] 用TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$融合蛋白(0.4ng/ml)处理还抑制(i)RAGE-AT_1R-CHO细胞和(ii)富有RAGE的PMAEC(图13H)中RAGE配体S100A8/A9对促炎基因表达的后续诱导。

[1720] 额外的材料和方法

[1721] 为了确认抑制策略对人类组织的适用性,在来自人的原代主动脉内皮细胞中进行额外的实验(Lonza)。EGM-2培养基中培养HAEC。在每种情况下,在Ang II(1μM)或S100A8/A9

(2μg/ml;R&D systems)处理2小时之前,将细胞用mCherry-TAT(对照)、TAT-mCherry-$RAGE_{362-404}$(野生型)或TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$以剂量0.4ng/ml处理30分钟。作为又一对照,在HAEC中探索AT_1R阻滞剂厄贝沙坦(1μM;30分钟,之后给予Ang II)的抑制作用。

[1722] 实施例14.离体主动脉中靶向借助共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化

[1723] 在这个实施例中,我们显示,用RAGE配体非依赖性RAGE活化的细胞穿透肽抑制剂(TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$融合蛋白,8ng/ml)处理主动脉,能够离体阻止诱导RAAS介导的炎症。

[1724] 还如实施例4中详述,离体暴露于Ang II增加从apoE KO小鼠分离的主动脉中促动脉粥样硬化介质的表达(图14A)。相反,用Ang II离体处理取自AGER/apoE DKO小鼠的主动脉未导致诱导这些致动脉粥样硬化介质(图14B)。

[1725] 用RAGE配体非依赖性RAGE活化的细胞穿透肽抑制剂(TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$融合蛋白,8ng/ml)预处理来自apoE KO小鼠的主动脉,阻止Ang II依赖的黏附分子诱导作用,如依据实时RT-PCR测量的基因表达所检测(图14A)。

[1726] 用细胞穿透性野生型RAGE肽(TAT-mCherry-$RAGE_{362-404}$融合蛋白,8μg/ml)预处理来自AGER/apoE DKO小鼠的主动脉,恢复了Ang II依赖的黏附分子和炎症标志物诱导作用,如依据实时RT-PCR测量的基因表达所检测(图14B)。

[1727] 额外的材料和方法

[1728] 将主动脉从apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO小鼠分离,分开并置于Kreb缓冲液中,并且在37℃通过引入碳合气(carbogen gas)(95%O_2;5%CO_2)穿过该缓冲液而维持在生理pH。随机分组主动脉以接受mCherry-TAT(对照)、mCherry-TAT-$RAGE_{362-404}$(野生型)或mCherry-TAT-S391A-$RAGE_{362-404}$寡肽(全部8ng/mL)预处理。三十分钟后,使主动脉暴露于Ang II(1μM)持续4小时。在温育结束时,将主动脉置于Trizol中,提取mRNA并合成cDNA。随后如上文详述,通过定量实时RT-PCR估计促动脉粥样硬化介质的基因表达。

[1729] 实施例15.活小鼠中靶向借助共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化(反式活化)

[1730] 在这个实施例中,我们显示,用RAGE配体非依赖性RAGE活化的细胞穿透肽抑制剂处理,能够阻止apoE KO小鼠中RAAS介导的炎症的诱导。

[1731] 如实施例3中详述,与富有Ace2的apoE KO小鼠相比时,Ace2/apoE DKO小鼠中Ace2遗传性缺乏导致16周龄时斑块积累量增加。Ace2/AGER/apoE三KO小鼠受到保护免遭与遗传性Ace2缺乏相关的这种动脉粥样硬化增加(图15A)。

[1732] 用RAGE配体非依赖性RAGE活化的细胞穿透肽抑制剂(TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$融合蛋白(S391A);每两天10μg/kg/IP,持续十周)处理Ace2/apoE DKO小鼠,减弱这个模型中Ang II依赖的动脉粥样硬化(图15A)。

[1733] 用RAGE配体非依赖性RAGE活化的细胞穿透肽转导物(TAT-mCherry-$RAGE_{362-404}$融合蛋白(WT);每两天10μg/kg/IP,持续十周)处理Ace2/AGER/apoE三KO小鼠,恢复动脉粥样硬化至富有RAGE的Ace2/apoE DKO小鼠中观察到的动脉粥样硬化(图15A),尽管仅恢复能够信号传导的RAGE胞质尾并且全长RAGE及其相关的配体结合结构域持续不存在。

[1734] 用RAGE配体非依赖性RAGE活化的细胞穿透肽抑制剂(TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$融合蛋白;每两天10μg/kg/IP,持续十周)处理Ace2/apoE DKO小鼠,不影响血压

水平(图15C)。

[1735] 链脲霉素所致糖尿病也是与RAAS活化和动脉粥样硬化增加相关的模型,通过抑制RAAS阻止所述模型,同时不降低血压或改变葡萄糖控制(Candido等人,2002)。

[1736] 在诱导糖尿病后,AGER/apoE DKO小鼠受到保护免于动脉粥样硬化增加(Soro-Paavonen等人,2008)。

[1737] 用RAGE配体非依赖性RAGE活化的细胞穿透肽抑制剂(TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$融合蛋白(S391A);每两天10μg/kg/IP,持续十周)处理糖尿病性apoE KO小鼠,减弱这个模型中的动脉粥样硬化(图15B),同时不影响血压水平(图15C)。

[1738] 用RAGE配体非依赖性RAGE活化的细胞穿透肽转导物(TAT-mCherry-$RAGE_{362-404}$融合蛋白;每两天10μg/kg/IP,持续十周)处理糖尿病性apoEKO小鼠,增加动脉粥样硬化超出仅患有糖尿病情况下所观察到的动脉粥样硬化(图15B),尽管仅恢复能够信号传导的RAGE胞质尾并且全长RAGE及其相关的配体结合结构域持续不存在。

[1739] 用RAGE配体非依赖性RAGE活化的细胞穿透肽转导物(TAT-mCherry-$RAGE_{362-404}$融合蛋白,每两天10μg/kg/IP,持续十周)处理糖尿病性AGER/apoE DKO小鼠,逆转通过遗传性RAGE缺失提供的保护作用并且增加动脉粥样硬化(图15B)到富有RAGE的小鼠中所观察到的水平,尽管仅恢复能够信号传导的RAGE胞质尾并且全长RAGE及其相关的配体结合结构域持续不存在。

[1740] 额外的材料和方法

[1741] 将雄性apoE KO小鼠、Ace2/apoE DKO小鼠和Ace2/AGER/apoE TKO小鼠随机分组以接受TAT-Cherry-S391A-$RAGE_{362-404}$(抑制剂)肽(每两天10μg/kg/IP)、TAT-Cherry-$RAGE_{362-404}$(野生型;每两天10μg/kg/IP)寡肽或mCherry-TAT(对照;每两天10μg/kg/IP)持续10周,此时人工处死它们。

[1742] 在Ang II-依赖性动脉粥样硬化的第二模型中,将apoE KO小鼠和AGER/apoE DKO随机分组以接受按五个连续每日剂量腹腔内递送的链脲霉素(streptozotocin)(55mg/kg,Sigma Chemical Co,St.Louis,MO,USA)或缓冲液(柠檬酸钠缓冲液pH4.5)(Soro-Pavinonen等人2008)。这种方案诱导与高血糖(血糖约30mM)相关、但具有防止酮症或需要胰岛素补充的足够β-细胞功能的胰岛素分泌匮乏形式的糖尿病。通过首剂链脲霉素后一周空腹血糖水平>15mM确认糖尿病的存在。全部糖尿病小鼠还在十周后实现HbA1c>8%(中位数11.2%)。在一周糖尿病后,将小鼠进一步随机分组以接受mCherry-TAT-S391A-$RAGE_{362-404}$(抑制剂)肽(每两天100μg/kg/IP)、mCherry-TAT-$RAGE_{362-404}$(野生型;每两天100μg/kg/IP)寡肽或mCherry-TAT(对照;每两天100μg/kg/IP)持续10周,此时人工处死它们。

[1743] 实施例16.BRET表示在活细胞中共表达时AT_1R与RAGE紧邻

[1744] 在这个实施例中,我们展示HEK293FT细胞中Rluc8标记的AT_1R(AT_1R/Rluc8)和Venu标记的RAGE(RAGE/Venus)的共表达导致与它们紧邻相符的强烈和可饱和BRET信号生成,用Ang II处理时所述生成减少(图16A)。可溶性$RAGE_{22-331}$(sRAGE)的存在不改变这些结果(图16A)。

[1745] 用Ang II处理共表达AT_1R/Rluc8和β-抑制蛋白2/Venus的细胞导致诱导与招募β-抑制蛋白2至AT_1R相符的配体诱导的强劲和稳定BRET信号(图16B)。用其相应配体CCL22处理共表达趋化因子(C-C基序)受体4(CCR4)/Rluc8和β-抑制蛋白2/Venus的细胞也导致诱导

与招募β-抑制蛋白2至CCR4相符的配体诱导的强劲BRET信号(图16B)。

[1746] 用Ang II处理共表达RAGE/Rluc8和β-抑制蛋白2/Venus的细胞在未加标签的AT_1R存在下诱导BRET信号(图16C),表示RAGE和AT_1R之间紧邻。

[1747] 通过对照方式,用其相应配体CCL22处理时,在未加标签的CCR4的存在下,未观察到这种情况(图16C)。

[1748] 作为展示未加标签的CCR4表达/功能的额外对照,在共表达Gαi/Nluc和Gγ2/Venu时,观察到CCL22诱导的BRET信号(图16D)。

[1749] 额外的材料和方法

[1750] Rluc8的备选BRET供体是Nanoluc(Nluc)并且这种供体可以与Venus连同Furimazine底物组合使用,如Tiulpakov等人,2016中所述。当监测Gαi/Nluc和Gγ2/Venus邻近以评估CCR4的功能时,使用这种方法。

[1751] 实施例17.BRET表示活细胞中RAGE还与AT_1R之外的某些活化型GPCR紧邻

[1752] 在这个实施例中,我们显示也在RAGE和某些其他共定位的活化型GPCR之间观察到上文实施例16中描述的活细胞中RAGE和AT_1R之间紧邻。

[1753] 用针对该GPCR的适宜相应激动剂处理共表达Rluc8标记的GPCR和β-抑制蛋白2/Venus的细胞导致诱导与招募β-抑制蛋白2至Rluc8标记的活化型GPCR相符的配体诱导的强劲BRET信号。对AT_1R联合Ang II(图17A)、TRHR1联合TRH(图17B)、OxR1联合OxA(图17C)、缓激肽受体2(BDKR)联合缓激肽(图17D)、V2R联合AVP(图17E)、CCR2联合MCP1(图17F)和CCR5联合MIP1β(图17G)观察到这种情况。

[1754] 受体-HIT:在AT_1R(图17A)、OxR1(图17C)、V2R(图17E)或CCR2(图17F)存在下,用针对该GPCR的适宜相应激动剂处理共表达Rluc8标记的RAGE(RAGE/Rluc8)和β-抑制蛋白2/Venus的细胞导致诱导与招募β-抑制蛋白2至GPCR相符的配体诱导的清晰BRET信号。这转而表示RAGE与活化型GPCR邻近。在共表达的GPCR不存在情况下,未观察到配体诱导的BRET信号。

[1755] 在TRHR1(图17B)或缓激肽受体2(BDKR;图17D)存在下,用针对该GPCR的适宜相应激动剂处理共表达Rluc8标记的RAGE(RAGE/Rluc8)和β-抑制蛋白2/Venus的细胞导致诱导配体诱导的微弱BRET信号,所述信号与不存在共表达的GPCR时观察到的缺少配体诱导的BRET信号可区分并且与招募β-抑制蛋白2至GPCR相符。这转而可能表示RAGE与活化型GPCR邻近,但这不像针对AT_1R、OxR1、V2R或CCR2所观察到的那样明确。

[1756] 在CCR5(图17G)存在下,用MIP1β处理共表达Rluc8标记的RAGE(RAGE/Rluc8)和β-抑制蛋白2/Venus的细胞导致诱导配体诱导的微弱BRET信号,所述信号难以与不存在共表达的GPCR时观察到的情况区分。

[1757] 实施例18.BRET表示当在活细胞中共表达时RAGE与某些活化型趋化因子受体紧邻

[1758] 在这个实施例中,使用受体-HIT测定法配置,我们显示在活细胞中观察到RAGE和某些趋化因子受体之间紧邻。

[1759] 在CCR1(图18A)、CCR2(图18B)、CCR6(图18E)、CCR7(图18F)、CXCR2(图18I)或CXCR6(图17F)存在下,用针对该GPCR的适宜相应激动剂(如标示)处理共表达Rluc8标记的RAGE(RAGE/Rluc8)和β-抑制蛋白2/Venus的细胞导致诱导与招募β-抑制蛋白2至GPCR相符的配体诱导的BRET信号清晰增加。这转而表示RAGE与活化型GPCR邻近。

[1760] 在CXCR1(图18H)存在下,用CXCL8处理共表达Rluc8标记的RAGE(RAGE/Rluc8)和β-抑制蛋白2/Venus的细胞导致诱导与招募β-抑制蛋白2至GPCR相符的配体诱导的BRET信号可察觉增加。这转而表示RAGE与活化型GPCR邻近,但这不像针对前述受体那样明确。

[1761] 在CXCR4(图18K)存在下,用CXCL12处理共表达Rluc8标记的RAGE(RAGE/Rluc8)和β-抑制蛋白2/Venus的细胞导致诱导清晰的配体诱导的BRET信号减少,所述减少与β-抑制蛋白2和RAGE之间的邻近减少或构象变化导致Rluc8和Venus之间共振能量转移更少相符。这转而表示RAGE与招募β-抑制蛋白2/Venu至其的活化型GPCR邻近的改变。

[1762] 在CCR4(图18C)、CCR5(图18D)、CCR10(图18G)或CXCR3(图17J)存在下,用针对该GPCR的适宜相应激动剂(如标示)处理共表达Rluc8标记的RAGE(RAGE/Rluc8)和β-抑制蛋白2/Venus的细胞未导致配体诱导的可察觉的BRET信号变化。尽管对CCL22诱导的招募β-抑制蛋白2/Venus至CCR4/Rluc8(图16B)和CCL4诱导的招募β-抑制蛋白2/Venus至CCR5/Rluc8观察到配体诱导的BRET信号非常强烈(n=3;数据未显示)。但仍对CCL27诱导的招募β-抑制蛋白2/Venus至CCR10/Rluc8和CXCL11诱导的招募β-抑制蛋白2/Venus至CXCR3/Rluc8观察到微弱、但仍清晰的配体诱导的BRET信号(n=3;数据未显示)。

[1763] 实施例19.BRET表示共定位的GPCR活化导致活细胞中RAGE亚细胞定位的变化

[1764] 在这个实施例中,我们显示当活化某种共定位的GPCR时,RAGE和亚细胞区室标志物之间的邻近变化,表示GPCR活化对众多GPCR的RAGE功能的影响。

[1765] 使用的加Venus标签的亚细胞区室标志物是胞质膜标志物KRAS,以及RabGTP酶Rab1(运输到高尔基体内侧的内质网)、Rab4(早期内体再循环)、Rab5(早期内体)、Rab7(晚期内体/溶酶体)、Rab8(高尔基体外侧网络至胞质膜)、Rab9(晚期内体运输至高尔基体外侧网络)和Rab11(再循环型内体)。在时间零并按指示浓度添加GPCR的适宜的相应激动剂之前和之后,实时评估加Rluc8标签的RAGE与加Venus标签的亚细胞区室标志物的邻近。

[1766] 对于肾上腺素能α1A受体、肾上腺素能α1B受体、血管紧张素受体AT_1R、缓激肽受体B2、CCR2、CCR6、CCR9、CXCR4、CXCR5、多巴胺D1受体、内皮素受体类型B、组胺H3受体、毒蕈碱性M2受体、神经肽Y1受体、食欲肽受体1、食欲肽受体2、前列腺素E1受体、血清素5-HT2c受体、血清素5-HT4b受体、生长抑素2受体、鞘氨醇1-磷酸受体S1P3、加压素受体1A和加压素受体1B,作为添加配体的结果,观察到配体诱导的BRET信号的特别清晰的变化,其表示对亚细胞区室标志物中至少一者邻近的变化。

[1767] 对于CCR3、CCR4、神经降压肽1受体和血清素5-HT2b受体,作为添加配体的结果,观察到配体诱导的BRET信号的清晰变化,其表示对亚细胞区室标志物中至少一者邻近的变化。

[1768] 对于腺苷A1受体,肾上腺素能α2B受体,CCR1、CCR5、CCR7、CXCR2、内皮素受体类型A、毒蕈碱性M1受体、毒蕈碱性M3受体、血清素5-HT1a受体、血清素5-HT2a受体、鞘氨醇1-磷酸受体S1P1、促甲状腺素释放激素受体1和加压素受体2,作为添加配体的结果,观察到配体诱导的BRET信号的微小但仍可辨识的变化,其表示对亚细胞区室标志物中至少一者邻近的变化。

[1769] 对于腺苷A2A受体、腺苷A2B受体、腺苷A3受体、肾上腺素能α2A受体、肾上腺素能α2C受体、肾上腺素能β1受体、肾上腺素能β2受体、肾上腺素能β3受体、爱帕琳受体、CCR8、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR6、CXCR7、多巴胺D2受体、胰高血糖素样肽受体1、神经降压肽2受

体、血小板活化因子受体、前列腺素E2受体、前列腺素E3受体、前列腺素E4受体、生长抑素1受体和生长抑素3受体,作为添加配体的结果,对任何亚细胞区室标志物观察到配体诱导的BRET信号的几乎不可察觉(little discemible)的变化(数据未显示)。

[1770] 实施例20.借助非AT_1受体的某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化

[1771] 在这个实施例中,我们显示某些趋化因子受体(CCR2和CXCR2)由其相应配体(分别是MCP-1和CXCL8)活化以诱导关键促炎转录因子p65-NFκB表达,还需要RAGE的共表达。

[1772] 在用编码CCR2的质粒稳定转染并在其表面上表达CCR2的CHO细胞(CCR2-CHO细胞)中,RAGE转染和暴露于CCR2的相应配体MCP-1(10^{-7}),导致NFκB活化和p65表达的诱导(图20A)。在RAGE共表达不存在的情况下,MCP-1不诱导NFκB活化以诱导CCR2-CHO细胞中p65的表达。

[1773] 在用编码CXCR2的质粒稳定转染并在其表面上表达CXCR2的CHO细胞(CXCR2-CHO细胞)中,RAGE转染和暴露于相应配体IL-8(CXCL8),在共表达的RAGE存在下导致p65表达增加(图20B)。在RAGE不存在的情况下,IL-8不诱导NFκB活化以诱导CXCR2-CHO细胞中p65的表达。

[1774] 在骨髓衍生的原代鼠巨噬细胞中,暴露于CCR2的相应配体MCP-1(10^{-7}M),导致NFκB活化和p65表达的诱导(图20C)。通过TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$融合蛋白(0.4ng/ml)预处理,阻断原代巨噬细胞中p65-NFκB受MCP-1诱导表达。

[1775] 在HMEC中,暴露于CCR2的相应配体MCP-1(10^{-7}M),导致NFκB活化和自诱导MCP-1表达(图20D)。通过TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$融合蛋白(0.4ng/ml)预处理,阻断HMEC的自诱导MCP-1表达。总之,这些数据确认了共定位的内源RAGE在MCP-1/CCR2信号传导过程中的作用。

[1776] 在表达CXCR2的HMEC中,暴露于CXCR2的相应配体IL-8(10^{-7}M),导致NFκB活化和诱导MCP-1表达(图20E)。通过TAT-mCherry-S391A-$RAGE_{362-404}$融合蛋白(0.4ng/ml)预处理,阻断HMEC的诱导MCP-1表达。总之,这些数据确认了共定位的内源RAGE在IL-8/CXCR2信号传导过程中的作用。

[1777] 额外的材料和方法

[1778] 转基因中国仓鼠卵巢细胞的产生

[1779] 使用脂质转染胺2000(Thermo),将100ng CCR2-Rluc8构建体或CXCR2-Rluc8转染入CHO细胞。使用G418选择稳定的转染子。随后使用脂质转染胺2000(Invitrogen),以全长RAGE构建体瞬时转染CCR2-CHO和CXCR2-CHO细胞并温育16小时。随后使CCR2-CHO细胞暴露于CCR2的相应配体MCP-1(10^{-7})两小时。使CXCR2-CHO细胞暴露于相应配体IL-8(CXCL8)两小时。将细胞置于Trizol中,提取mRNA并合成cDNA。如一般方法中详述,通过定量实时RT-PCR测定NFκB亚基p65(RelA)的基因表达的变化,所述的定量实时RT-PCR使用基于实时检测已积累荧光的TaqMan系统(ABI Prism 7700,Perkin-Elmer Inc,PE Biosystems,Foster City,CA,USA)进行。

[1780] 骨髓衍生的原代巨噬细胞

[1781] 用$RAGE_{362-404}$、突变体RAGE肽S391A-$RAGE_{362-404}$或TAT-cherry对照预处理骨髓衍生的原代巨噬细胞1小时。随后使细胞暴露于CCR2的相应配体MCP-1(10^{-7}M)两小时。将细胞置

于Trizol中,提取mRNA并合成cDNA。如一般方法中详述,通过定量实时RT-PCR测定NFκB亚基p65(RelA)的基因表达的变化,所述的定量实时RT-PCR使用基于实时检测已积累荧光的TaqMan系统(ABI Prism 7700,Perkin-Elmer Inc,PE Biosystems,Foster City,CA,USA)进行。

[1782] 实施例21.通过靶向RAGE的跨膜结构域,抑制借助某些共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化

[1783] 这个实施例显示在修饰RAGE的跨膜结构域(TMD)后,抑制了借助某种共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化和借助RAGE配体的RAGE活化。

[1784] RAGE是包含单次跨膜跨越螺旋(SEQ ID NO:14的残基343-361)的1型跨膜蛋白。RAGE TMD在全部哺乳动物物种高度保守。

[1785] RAGE TMD对膜靶向和锚定重要,因为缺少这个疏水结构域的RAGE同工型(例如可溶性RAGE;sRAGE)被分泌并且未保留在胞质膜中。

[1786] RAGE在细胞表面上的同型二聚化为RAGE介导的信号转导必需。RAGE胞外部分的V、C1和C2结构域含有促进RAGE二聚化的元件(例如$RAGE_{22-331}$能够同型二聚化)并且可以通过过量表达sRAGE抑制RAGE的二聚化。RAGE的TMD还潜在地在寡聚化中发挥活跃作用,并且先前已经显示TMD同型二聚化,与RAGE胞外结构域无关(Su等人2013)。

[1787] RAGE配体诱导的信号从胞外结构域传输至胞质结构域中的信号传导元件也需要RAGE TMD。不希望受理论约束,发明人认为这种情况因配体结合后构象变化的转导(如剪式运动以增加C末端之间距离至100 Å)而发生(Xue等人2017)。

[1788] 已知RAGE配体结合作用通过分泌酶ADAM10/17和MMP9诱导$RAGE_{22-331}$的胞外结构域散播,此后RAGE剩余的膜结合的C端片段由γ-分泌酶(膜内切割蛋白酶)加工。抑制γ-分泌酶导致RAGE配体结合后RAGE的C端片段在膜中的停留增加,以及抑制RAGE配体诱导的信号传导,这显示RAGE跨膜结构域的膜内蛋白酶解是RAGE配体依赖性信号传导的关键步骤(Braley等人2016)。

[1789] 总之,这些数据提供了靶向RAGE TMD作为活化某些共定位的GPCR后调节RAGE配体非依赖性RAGE活化的手段的依据。

[1790] 我们显示,在N末端加标签的mCherry-$RAGE_{338-361}$(与mCherry连接的具有胞外近膜片段的RAGE TMD)和胞外加萤光素酶标签的AT_1受体(Nluc-AT_1;图21A)之间观察到BRET信号,确认TMD还涉及RAGE和某些GPCR之间的相互作用。

[1791] mCherry-$RAGE_{338-361}$的过量表达以剂量依赖方式调节全长RAGE和AT_1之间的BRET,这用BRET饱和测定法(图21B)和动力学测定法(图21C)展示,从而确认全长RAGE和AT_1之间的BRET受具有胞外结构域近膜部分的RAGE TMD的无功能替代物抑制。值得注意地,sRAGE(即,RAGE的胞外配体结合性V-C1-C2结构域;$RAGE_{22-331}$)不抑制AT_1R和RAGE之间的BRET(图16A)。

[1792] 图21D中显示对照实验,其显示在AT_1/Rluc8和mCherry/$RAGE_{338-361}$之间不存在配体诱导的BRET信号,甚至采用适宜的滤光片组时也是如此。mCherry标签用来在外部光源激发后独立地评估mCherry/$RAGE_{338-361}$融合蛋白的相对表达水平,如图21E中所示。图21E中还显示,依据来自萤光素酶的相似的相对发光发射展示了AT1/Rluc8跨各种转染法的相似表达水平。另外,依据外部光源激发后相似的相对荧光发射展示了RAGE/Venus跨各种转染法的

相似表达水平。

[1793] 对于肾上腺素能α2B受体、血管紧张素受体AT_1(AT1R)、缓激肽受体2(B2R)、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CCR9、CXCR2、CXCR4、神经肽Y1受体(NPY1R)、食欲肽受体2、鞘氨醇1-磷酸受体1(S1PR1)、促甲状腺素释放激素受体1(TRHR1)、加压素受体1A(V1aR)、加压素受体1B(V1bR)和加压素受体2(V2R),当共表达mCherry-$RAGE_{338-361}$(图21F)时,观察到特别明确地抑制配体诱导的在加Rluc8标签的GPCR和RAGE/Venu之间BRET信号的变化,从而确认全长RAGE和这些GPCR之间的BRET受具有胞外结构域近膜部分的RAGE TMD的无功能替代物抑制。

[1794] 对于腺苷A1受体(ADORA1)、CCR7和CXCR5,当共表达mCherry-$RAGE_{338-361}$(图21F)时,观察到微小但仍可辨识地抑制配体诱导的在加Rluc8标签的GPCR和RAGE/Venu之间BRET信号的变化,从而确认全长RAGE和这些GPCR之间的BRET受具有胞外结构域近膜部分的RAGE TMD的无功能替代物抑制。

[1795] 对于肾上腺素能α1A受体、CCR3、毒蕈碱性乙酰胆碱受体2(CHRM2)和食欲肽受体1,在加Rluc8标签的GPCR和RAGE/Venu之间观察到配体诱导的BRET信号的几乎不可察觉的变化,这意味着不能确定mCherry-RAGE338-361共表达的影响(图21F)。

[1796] 如上文详述,RAGE反式活化需要胞质结构域($RAGE_{379-391}$)的表达,从而$RAGE_{338-361}$不能活化。但是,人微血管内皮细胞(HMEC)中反式活化全长RAGE后诱导的Ang II介导的促炎信号传导,如ICAM-1基因表达所示,受$RAGE_{338-361}$转染抑制。通过额外表达mCherry-$RAGE_{362-404}$(即RAGE的胞质结构域;图21G),拯救这种抑制作用。这表明TMD和胞质结构域能够独立地发挥作用,但在全长RAGE构建体中彼此依赖。值得注意地,活化某些共定位的GPCR后,sRAGE(即,RAGE胞外结构域)不抑制RAGE配体非依赖性RAGE活化。

[1797] 为了验证以下假设:RAGE的TMD单独可以充当借助某种共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的抑制剂,仅用RAGE的TMD($RAGE_{343-361}$)或mCherry-TMD融合物转染HMEC。任一个构建体的表达能够阻止内源性富有RAGE表达的HMEC中Ang II对MCP1和ICAM1二者基因表达的诱导(图21H)。

[1798] 为了验证以下假设:RAGE的TMD单独也可以充当RAGE配体依赖性RAGE活化的抑制剂,在仅表达RAGE的TMD的构建体($RAGE_{343-36]}$)转染存在和不存在下,用RAGE配体S100A8/A9处理表达全长人RAGE的CHO细胞。类似于$RAGE_{370-390}$,这个构建体的表达能够阻止S100A8/A9诱导p65基因表达(图21I)。

[1799] mDiaph1和PKCζ在RAGE反式活化中的作用由它们在RAGE TMD处的作用介导,因为使用siRNA令mDiaph1和PKCζ沉默抑制了$RAGE_{343-404}$诱导的信号传导,但不抑制$RAGE_{362-404}$诱导的信号传导。(图21J)。

[1800] 总之,这些数据确认,对RAGE TMD的特定修饰能够抑制在活化RAGE胞外结构域后,借助某些共定位的GPCR的RAGE反式活化以及RAGE配体依赖性信号传导。

[1801] 实施例22.筛选RAGE配体非依赖性RAGE活化的潜在抑制剂的先知性实施例

[1802] 以下测定法是本文所述的发明将怎样逻辑上适用于鉴定借助活化某种共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE信号传导(例如AT_1R诱导的或CCR2介导的RAGE反式活化)的潜在抑制剂的先知性实施例。

[1803] 测定法1:竞争测定法测量对RAGE胞质尾(全长或截短、野生型或抑制性突变体)和IQGAP-1或其片段之间结合的抑制作用。

[1804] 方法:夹心测定法具有与平板或柱结合的IQGAP或RAGE胞质尾(全长或截短的)。在供试化合物/调节物的连续稀释物存在下,添加结合配偶体(即IQGAP或RAGE胞质尾)。通过固有标记物(荧光标记物、酶融合物)或通过检测探针(例如,针对结合配偶体的抗体带有标记物),测量结合配偶体的存在。不存在结合配偶体表示:添加的供试化合物是胞质RAGE和IQGAP-1或其片段之间结合的竞争性抑制剂。

[1805] 测定法2:酵母双杂交用来测量RAGE胞质尾和IQGAP-1之间的结合。

[1806] 方法:酵母双杂交分析表达IQGAP-1和胞质RAGE(全长或截短、野生型或抑制性突变体)。通过固有标记物(例如荧光标记物、酶融合物、报道分子系统(例如KISS)),测量结合配偶体的存在。不存在结合配偶体表示,添加的供试化合物是RAGE胞质尾和IQGAP-1或其片段之间结合的竞争性抑制剂。

[1807] 测定法3:BRET用来测量RAGE胞质尾(全长或截短、野生型或抑制性突变体)和IQGAP-1之间的结合。

[1808] 方法:BRET测定法表达标记的IQGAP和胞质RAGE并且测量它们之间共振能量的转移,表明它们邻近。当添加供试化合物/调节物时,对BRET信号的抑制表示供试化合物/调节物是胞质RAGE和IQGAP或其片段之间相互作用的竞争性抑制剂。

[1809] 测定法4:通过检测借助RAGE的下游信号传导的诱导,测量对(例如AT_1R诱导的)借助某种共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的抑制。

[1810] RAGE配体非依赖性(例如AT_1R诱导的反式活化)RAGE信号传导的抑制剂由下述供试化合物指示,所述供试化合物在暴露于Ang II(或暴露于相应配体的另一种GPCR)的表达AT_1R和RAGE的CHO细胞中减少RAGE依赖性下游NFκB活化,但是不减少由S100A8/A9诱导的RAGE信号传导或由S100A8/A9或其他RAGE配体诱导的下游NFκB活化,或在Ang II活化AT_1R后所诱导的RAGE非依赖性Gq信号传导(例如钙内流、磷酸肌醇水平、标志物(如EGR)表达)。

[1811] 测定法5.$RAGE_{379-390}$的结合配偶体。

[1812] 方法:已经展示$RAGE_{379-390}$是调节RAGE配体非依赖性RAGE活化的重要的信号传导元件,通过筛选肽和非肽文库(即化学品)或基于结构的药物设计,计算机模拟方式或体外方式进行$RAGE_{379-390}$的高亲和力特异性结合配偶体的鉴定。

[1813] 结论

[1814] 某些共定位的GPCR被其相应配体活化,如AT_1R被Ang II活化和CCR2被MCP-1活化,通过下述途径触发炎症,所述途径不同于借助例如诱导钙内流、磷酸肌醇合成和PKA活化的GPCR的经典性典型信号传导。在此,发明人显示RAGE胞质尾借助某些共定位的GPCR的RAGE配体非依赖性活化是这种区分的关键决定因素。发明人显示,对许多GPCR下游促炎信号传导关键的NFκB活化由共定位的RAGE的RAGE配体非依赖性活化介导。因此,当缺失RAGE时或当抑制RAGE活化时,例如受Ang II-AT_1R活化诱导的许多不良血管变化减弱。相反,借助经典Gq途径的AT_1R-依赖性信号传导不受RAGE表达影响并且RAGE缺失对Ang II的盐缺乏或血压反应性中的血管稳态无有害作用。

[1815] 发明人在此提供以下具体证据:RAGE和GPCR(包括AT_1R或CCR2)形成异聚体复合物,同时生成清晰的受体-HIT BRET信号。这进一步得到发明人在此提供的以下具体证据支持:通过表达具有或没有RAGE胞外结构域的额外近膜片段的RAGE跨膜结构域的无功能替代物,抑制异聚体复合物形成和反式活化。认为GPCR与信号传导组分无活性状态预组装成临

时复合体使快速和增加的反应性成为可能。不希望受理论约束,发明人认为RAGE与某些共定位的GPCR的预组装起到相似的作用,从而使GPCR活化后RAGE配体非依赖性RAGE胞质尾快速活化和下游促炎信号传导成为可能。

[1816] 发明人还显示,RAGE的残基391的构象对GPCR依赖性促炎信号传导重要,因为不同于仅在一个氨基酸(丝氨酸391)不同于野生型RAGE,在活化某些共定位的GPCR(如Ang II活化AT_1R)后,S391A-RAGE突变体和390X-RAGE突变体不诱导促炎信号传导。这不是如先前所提出的那样是因为Ser391在RAGE活化后磷酸化,原因在于在这个位置含有不同氨基酸即Q391和P391(分别天然存在于骆驼和牛中)的RAGE也可以被RAGE配体活化以及借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性活化过程活化(参见实施例7)。尽管PKCζ抑制能够阻止全长RAGE活化,但它不通过阻止RAGE磷酸化发挥作用,因为它还抑制借助全长S391Q嵌合RAGE突变体的信号传导,所述突变体不含能够维持磷酸化的氨基酸(即,无丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸)。

[1817] 已知RAGE胞质尾与Diaph1的相互作用对促炎信号传导重要,可能原因是它促进招募和活化还与Diaph1结合的PKCζ和通过与跨膜结构域相互作用所介导的RAGE结构的后续"剪式"变化。在发明人的实验中,沉默Diaph1或PKCζ抑制了Ang II和s100诱导的借助全长RAGE的促炎信号传导和由保留RAGE TMD的N-截短型RAGE构建体介导的借助Ang II的信号传导。但是,在沉默Diaph1或PKCζ后,丢失RAGE TMD的N-截短型RAGE构建体仍能够由Ang II活化。认为Diaph1通过小带电荷簇与细胞溶胶中的RAGE相互作用。丙氨酸置换这个带电荷簇(R366A-Q367A)阻止RAGE配体s100A8/A9介导的信号传导。但是,突变这个带电荷簇或删除其稳定的α-环(例如RAGE370-404)不影响活化某些共定位的GPCR(如Ang II活化AT_1R)后RAGE配体非依赖性RAGE胞质尾活化。因此,使用小分子或其他抑制剂破坏Diaph-1与RAGE结合的拟议方法(Ramasamy等人2016)将不影响借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化。另外,使用siRNA抑制PKCζ或Diaph-1并不抑制N截短型RAGE362-404被某些共定位的GPCR(如AT_1R)活化的能力,从而确认这个结构域的作用机制与这两种RAGE结合配偶体无关。

[1818] 即使RAGE胞外结构域历史上曾视为对其功能必需,但不希望受理论约束,发明人认为,借助些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE胞质尾活化似乎是诱导下游效应物活化和信号传导的优势机制。与这种假设一致,用野生型$RAGE_{362-404}$寡肽处理恢复了糖尿病性AGER/apoE DKO小鼠中的动脉粥样硬化形成,显示对这种RAGE配体非依赖性反式活化途径的抑制介导了AGER KO小鼠中观察到的相对血管保护作用,进一步凸显其病理生理重要性及抑制借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE胞质尾活化的依据。

[1819] 仅一某些细胞(例如内皮细胞、白细胞)在基础状态下表达RAGE,这意味着发明人描述的借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化限于基础状态下的这些细胞类型。大部分其他细胞类型在基础状态下不表达RAGE。关于RAGE表达不影响AT_1R活化后诱导的经典Gq信号传导是超出上述发现之外的,这种有限的表达分布可以部分地解释为何RAGE缺失/抑制不影响血压、钠尿增多或全身性RAAS的其他体内稳态功能。但是,在损伤、炎症、应激或缺氧后,全新或增强的RAGE表达可以为局部GPCR活化的促炎效应提供通路。

[1820] 尽管目前存在GPCR介导的信号传导的全身性拮抗剂(例如AT_1R拮抗剂、CCR2拮抗

剂),但通过这种策略实现的抑制作用移除从相应的受阻断GPCR产生的全部信号传导。在某些情况下,这可能是次优的,因为它可能诱导反馈性逃避抑制作用或产生源自抑制生理信号的不利影响。例如,抑制AT_1R导致某些情况下(例如在心肌梗死、卒中后或在严重心力衰竭中)可能是不利的血压降低以及诱导RAAS的反馈性'逃避'活化。仅靶向其中这种RAGE配体非依赖性RAGE活化发挥作用的关键细胞和随后仅促炎信号源自GPCR活化的潜在优点在于,对全身性抑制的限制不适用。

[1821] 作为原理验证,发明人显示,在富有RAGE和AT_1R二者的内皮细胞中,过量表达S391A-RAGE或用TAT-S391A-$RAGE_{362-404}$寡肽处理是能够抑制Ang II-AT_1R依赖性促炎信号传导,如AT_1R阻滞剂一样有效,但是不调节典型的IP-1-依赖性信号传导。施加至离体主动脉的相同寡肽也能够阻断暴露于Ang II后促炎分子的诱导。此外,当递送至Ace2/apoE DKO小鼠或糖尿病性apoE KO小鼠十周时,S391A-$RAGE_{362-404}$肽能够减弱RAAS-依赖性动脉粥样硬化,同时不影响血压水平。另外,发明人已经显示,$RAGE_{338-361}$或$RAGE_{343-361}$也可以在富有RAGE和AT_1R二者的内皮细胞中抑制Ang II-AT1R依赖性促炎信号传导。这些数据突出了特异性靶向这个新促炎信号传导途径的治疗潜力。

[1822] 过量的野生型$RAGE_{362-404}$不能克服采用S391A-$RAGE_{362-404}$寡肽实现的抑制,而低浓度的S391A-$RAGE_{362-404}$寡肽克服野生型RAGE的存在,提示其作用并非单纯为竞争性的。而且,可以使用十二肽$RAGE_{379-390}$实现等同抑制作用的情况显示,对α螺旋小区域和尤其对这个区域上关键残基的变更,改变了这类RAGE突变体对信号传导介质(包括IQGAP-1)的亲和力,这随后使内源信号传导被野生型RAGE阻断。

[1823] 值得注意地,S391A-$RAGE_{362-404}$在抑制活化共定位的GPCR(例如CCR2被MCP-1活化)后所诱导的促炎信号传导中的功效和RAGE在GPCR由相应配体活化(例如CCR2-CHO细胞由MCP活化或CXCR2-CHO由IL-8细胞)后介导NFκB活化中的作用确认,共定位的活化型GPCR导致RAGE配体非依赖性RAGE活化的作用不排他地为AT_1R,并且可推广至活化某些其他共定位的GPCR后诱导的促炎信号传导。不希望受理论约束,发明人认为,本文鉴定的关键RAGE药效团与具有促炎效应的许多GPCR共有的信号传导元件相互作用或通过与野生型RAGE相互作用。

[1824] 发明人预见,对RAGE-GPCR异聚体的机理性理解将直接导致开发新的治疗药,所述治疗药能够特异性靶向借助某些共定位的活化型GPCR的RAGE配体非依赖性RAGE活化的不良作用,同时不损害生理信号或不诱导反馈性'逃避'其抑制作用。这些数据可以适用于其中已经涉及RAGE介导的信号传导的广泛类型病状,包括动脉粥样硬化、神经变性病、恶性病、糖尿病并发症和其他重要的炎性和促增生性疾病。

[1825] 本文引用的每份专利、专利申请和出版物的公开内容因此通过引用的方式完整并入本文。

[1826] 本文中对任何参考文献的援引不应当解释为承认这种参考文献可用作本申请的现有技术。

[1827] 本说明书通篇范围内,已经实现描述本发明优选实施方案的目标,而不将本发明限于任一个实施方案或特定的特征集合。本领域技术人员将因此理解,根据本公开,可以在例举的具体实施方案中做出多种修改和改变,而不脱离本发明的范围。全部这类修改和改变均意在纳入所附权利要求的范围内。

[1828] 如本文所用,当描述肽本发明的调节物时,“分离”意指本文所述的肽,所述肽不处于天然状态(例如,它与自身天然存在于其中或正常情况下与之结合的较大蛋白质分子或细胞残片解离),或是天然存在蛋白质的非天然存在片段(例如,该肽占天然存在蛋白质的少于25%、优选地少于10%和最优选地少于5%)。分离还可以意指,该肽的氨基酸序列在自然界中不存在,例如,因为序列从自天然存在的序列修饰而来(例如通过改变某些氨基酸,包括碱性(即阳离子)氨基酸如精氨酸、色氨酸、或赖氨酸),或因为序列不含有自然界中存在的旁侧氨基酸。术语“分离”可以意指肽或氨基酸序列是人造的序列或多肽并且可以是非天然存在的。

[1829] 同样地,如与编码肽的核酸相联系使用时,“分离”包括全部前述情况,例如,分离的核酸与自然界中与它们结合的相邻核苷酸解离,并且可以重组地、合成地、通过从生物提取物纯化来产生等。分离的核酸可以含有一个编码前述多肽之一者的部分和编码另一种肽或蛋白质的另一个部分。分离的核酸还可以是标记的。核酸包含对动物、细菌、植物或真菌利用为优选的密码子。在某些实施方案中,分离的核酸是载体,如表达载体,所述载体包括编码前述多肽之一者的核酸。例如在Brown J.等人(1979),Methods in Enzymology,68:109;Sambrook J,Maniatis T(1989),上文中提供用于构建任何所需DNA序列的一般方法。

[1830] 如本文所用的术语“氨基酸”或“残基”包括以下任一者:二十个天然存在的氨基酸、D-形式的任一个天然存在的氨基酸、非天然存在的氨基酸及其衍生物、类似物和拟似物。可以商购或通过本领域已知的方法合成任何氨基酸,包括天然存在的氨基酸。非天然存在氨基酸的实例包括正亮氨酸(“Nle”)、正缬氨酸(“Nva”)、β-丙氨酸,L-或D-萘丙氨酸、鸟氨酸(“Orn”)、高精氨酸(homoArg)和肽技术领域熟知的其他氨基酸,包括在M.Bodanzsky,“Principles of Peptide Synthesis,”第1和第2修订版,Springer-Verlag,New York,N.Y.,1984与1993,和Stewart和Young,“Solid Phase Peptide Synthesis,”第2版,Pierce Chemical Co.,Rockford,Ill.,1984中描述的那些,所述两份文献均通过引用方式并入本文。

[1831] 常见的氨基酸可以通过其全名、标准单字母记号(IUPAC)、或标准三字母记号提到,例如:A、Ala、丙氨酸;C、Cys、半胱氨酸;D、Asp、天冬氨酸(aspartate);E、Glu、谷氨酸(glutamate);F、Phe、苯丙氨酸;G、Gly、甘氨酸;H、His、组氨酸;I、Ile异亮氨酸;K、Lys、赖氨酸;L、Leu、亮氨酸;M、Met、甲硫氨酸;N、Asn、天冬酰胺;P、Pro、脯氨酸;Q、Gln、谷氨酰胺;R、Arg、精氨酸;S、Ser、丝氨酸;T、Thr、苏氨酸;V、Val、缬氨酸;W、Trp、色氨酸;X、Hyp、羟脯氨酸;Y、Tyr、酪氨酸。本文组合物中的任何和全部氨基酸均可以是天然存在的、合成的及其衍生物或拟似物。

[1832] 还构思肽的非肽类似物,例如,提供稳定化结构或减轻生物降解的那些。可以基于选择的肽,通过将一个或多个残基替换为非肽部分,制备肽拟似类似物。优选地,非肽部分允许肽保留其天然构象,或使优选的(例如,生物活性)构象稳定。Nachman等人,Regul.Pept.57:359-370(1995)中描述了从肽制备非肽拟似类似物的一个方法实例。如本文所用的术语“肽”包括前述全体。

[1833] 如上文提到,本发明的肽可以由天然存在的氨基酸(即L-氨基酸)组成,或由D-氨基酸组成,即,与天然序列相比,由按反向-翻转(retro-inverso)顺序包含D-氨基酸的氨基酸序列组成。术语“反向-翻转”指线形肽的异构体,其中序列的方向逆转并且每个氨基酸残

基的手性翻转。因此,本文的任何序列,以L-形式存在的,还内在地在本文中作为D-对映异构(反向-翻转)肽序列公开。可以例如通过合成相应的天然L-氨基酸序列的反向氨基酸序列,构建本发明的D-对映异构(反向-翻转)肽序列。在D-反向-翻转对映异构肽(例如,分离肽的组分)中,每个单一酰胺键中羰基和氨基的位置交换,同时每个α碳处侧链基团的位置保持不变。

[1834] 可以通过化学合成相应的天然存在的L-形式氨基酸序列的反向氨基酸序列或通过技术人员已知的任何其他合适方法,实现上文定义的本发明实施方案的分离肽调节物组分的制备,所述组分具有D-对映异构氨基酸。备选地,可以使用如上文公开的化学合成,利用L-形式肽或其组分作为化学合成D-反向-翻转对映异构形式的基质,制备D-反向-翻转对映异构形式的肽或其组分。

[1835] 可以做出各种变化,包括添加各种侧基团,所述侧基团不影响其中本发明实施方案的肽调节物发挥作用的方式,或有利地影响其中本发明实施方案的肽调节物发挥作用的方式。这类变化可以涉及添加或扣减带电荷基团、置换氨基酸、添加不影响结合、但影响本发明实施方案的肽调节物的总体电荷特征,促进跨血-脑屏障递送等的亲脂部分。对于这类变化的每者,需要不多于例行实验以测试分子是否根据本发明发挥作用。某人单纯地做出所需的变化或选择所需的肽并按照实例中详述的方式应用它。

[1836] 在本发明的一种形式中,如本文定义的术语"序列同一性"意指如下比较序列。为了确定两个氨基酸序列的同一性百分数,可以将所述序列出于最佳比较目的比对(例如,可以在第一氨基酸序列的序列中引入空位)。随后可以比较相应氨基酸位置处的氨基酸。在第一序列中的位置由与第二序列中在对应位置处相同的氨基酸占据时,则所述分子在这个位置处是相同的。两个序列之间的同一性百分数随这些序列共有的相同位置变化而变化。例如,在称某具体肽与限定长度的参考多肽具有特定同一性百分数时,同一性百分数相对于参考肽而言。因此,与长100个氨基酸的参考多肽相同50%的肽可以是完全与参考多肽的50个氨基酸长度部分相同的50个氨基酸多肽。它可能还是长100个氨基酸的多肽,其与参考多肽在其整个长度范围内相同50%。使用数学算法,可以完成两个序列的同一性百分数的这种确定。

[1837] 用来比较两个序列的数学算法的一个优选的非限制性实例是Karlin等人(1993),PNAS USA,90:5873-5877的算法。这种算法集成入NBLAST程序,后者可以用来鉴定与本发明氨基酸序列具有所需同一性的序列。为了出于比较目的获得带空位的比对结果,可以如Altschul等人,(1997),Nucleic Acids Res,25:3389-3402中所述那样使用空位BLAST。当使用BLAST和空位BLAST程序时,可以使用相应程序(例如NBLAST)的默认参数。可以使用默认(BLOSUM62)矩阵(值-4至+11),连同空位开口罚分-12(对于空位的首个空缺)和空位延伸罚分-4(空位中每个额外的连续空缺),使用第9版Genetic Computing Group's GAP(全局比对程序),进一步比对这些序列。在比对后,通过将匹配数目表述为所要求的序列中氨基酸数目的百分数,计算同一性百分数。确定两个氨基酸序列的同一性百分数的所述方法可以相应地适用于核酸序列。

[1838] 在一个实施方案中,本发明实施方案的肽调节物可以直接或经接头连接。在本发明语境下,"接头"通常是肽、寡肽或多肽并且可以用来彼此连接多个肽。经选择待彼此连接的本发明肽可以是相同序列,或选自本发明的任何肽。接头可以具有1-10个氨基酸的长度,

更优选地1至5个氨基酸的长度和最优选地1至3个氨基酸的长度。在某些实施方案中,接头不需要具有形成任何二级结构的特性,即不需要形成α-螺旋或β-折叠结构的倾向性,例如,如果接头由至少35%的甘氨酸残基组成。如本文中提到,接头可以是借助正常细胞过程胞内剪切的可剪切肽如MMP肽,这有效地升高先前连接的肽的胞内剂量,同时保持胞外剂量低到足以不视为有毒。使用某个胞内/内源可剪切肽、寡肽或多肽序列作为接头允这些许肽在递送入靶细胞后彼此分隔。在这种情况下,可剪切寡聚序列或多肽序列还包括蛋白酶可剪切寡聚序列或多肽序列,其中一般取决于已处理细胞内源表达的蛋白酶,选择蛋白酶剪切位点。如上文定义的接头,如果作为寡聚序列或多肽序列存在,可以由D-氨基酸组成或由天然存在的氨基酸即L-氨基酸组成。作为上文的备选,可以借助偶联剂或缀合剂(例如交联试剂)实现肽的偶联或融合。

[1839] 存在可以利用的几种分子间交联试剂,参见例如,Means和Feeney,Chemical Modification of Proteins,Holden-Day,1974,第39-43页。在这些试剂当中例如有N-琥珀酰亚胺3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)或N,N′-(1,3-亚苯基)双马来酰亚胺;N,N′-亚乙基-双-(碘乙酰胺)或具有6至11个碳亚甲基桥的其他这类试剂;和1,5-二氟-2,4-二硝基苯。可用于这种目的其他交联试剂包括:p,p′-二氟-m,m′-二硝基二苯砜;己二亚氨二甲酯;苯酚-1,4-二磺酰氯;六亚甲基二异氰酸酯或二异硫氰酸酯、或二偶氮苯基-对-二异氰酸酯;戊二醛和去重氮联苯胺(disdiazobenzidine)。交联试剂可以是同双官能的,即,具有经历相同反应的两个官能团。优选的同双官能交联试剂是双马来酰亚胺己烷(BMH)。BMH含有两个马来酰亚胺官能团,其与含硫氢基的化合物在温和条件下(pH6.5-7.7)特异性反应。两个马来酰亚胺基由烃链连接。因此,BMH可用于不可逆性交联含有半胱氨酸残基的蛋白质(或多肽)。交联试剂也可以是异双官能的。异双官能交联试剂具有两个不同的官能团,例如胺反应基团和巯基反应基团,所述官能团将交联分别有游离胺和巯基的两种蛋白质。异双官能交联试剂的实例是琥珀酰亚胺琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧化物(SMCC)、间-马来酰亚胺基苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)和琥珀酰亚胺4-(对-马来酰亚胺苯基)丁酸酯(SMPB),MBS的延长链类似物。这些交联试剂的琥珀酰亚胺基团与伯胺并且巯基反应性马来酰亚胺与半胱氨酸残基的巯基形成共价键。因为交联试剂经常在水中具有低溶解度,可以向交联试剂添加亲水部分,如磺酸酯基团,以改善其水溶解度。磺基-MBS和磺基-SMCC是水溶解度改性的交联试剂的实例。许多交联试剂产生细胞条件下实质上不可剪切的缀合物。因此,一些交联试剂含有细胞条件下可剪切的共价键,如二硫键。例如,Traut′试剂、二硫代双(琥珀酰亚胺丙酸酯)(DSP)和N-琥珀酰亚胺3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)是熟知的可剪切交联剂。如果需要,可剪切交联试剂的使用允许在递送入靶细胞后分隔肽,条件是细胞能够剪切交联剂试剂的特定序列。为此目的,直接二硫键也可以有用。化学交联还可以包括使用间隔臂。间隔臂提供分子内灵活性或调节已缀合部分之间的分子内距离并因而可以帮助保留生物学活性。间隔臂可以处于包含间隔氨基酸(例如脯氨酸)的蛋白质(或多肽)部分的形式。备选地,间隔臂可以是交联试剂的部分,如“长链SPDP”中那样(Pierce Chem.Co.,Rockford,Ill.,目录号21651H)。众多交联试剂,包括上文讨论的那些,是市售的。从商业供应商轻易可获得其用法的详述说明。关于蛋白质交联和缀合物制备的一般参考是:Wong,Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking,CRC Press(1991)。

[1840] 在一个实施方案中,肽调节物还可以含有“衍生物”、“变体”或“功能性片段”,即通过以下方式从如上文定义的本发明肽的天然存在(L-氨基酸)序列衍生的肽的序列:置换氨基酸序列的一种或多种位点处的一个或多个氨基酸、缺失天然存在序列的任何位点处的一个或多个氨基酸、和/或在天然存在的肽序列的一个或多个位点处插入一个或多个氨基酸。如果作为本发明的肽使用,“衍生物”应当保留它们的生物学活性。在本发明的上下文中,衍生物还可以按其如上文定义的L-或D-氨基酸序列或同时二者的形式出现。

[1841] 如果实施置换氨基酸以制备本发明肽的衍生物,则优选保守性氨基酸置换。保守性(氨基酸)置换一般包括在以下组内部的置换:甘氨酸和丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸;天冬氨酸(aspartate)和谷氨酸(glutamate);天冬酰胺和谷氨酰胺;丝氨酸和苏氨酸;赖氨酸和精氨酸;和苯丙氨酸和酪氨酸。因此,优选的保守性置换组是天冬氨酸-谷氨酸;天冬酰胺-谷氨酰胺;缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸;丙氨酸-缬氨酸;和苯丙氨酸-酪氨酸。通过这类突变,可以增强例如肽的稳定性和/或有效性。如果向肽引入突变,则肽保持(功能上)同源,例如,在序列方面、在功能方面和在抗原性特征或其他功能方面保持同源。肽的这类突变的组分可以拥有改变的特性,对某些应用,所述改变的特性可以相对于本发明肽的未改变序列是有利的(例如最适pH增加、温度稳定性增加等)。

[1842] 在一个实施方案中,本发明肽的衍生物定义为与本发明肽的未修饰序列具有基本同一性。特别优选与天然存在的类似物具有至少30%序列同一性、优选地至少50%序列同一性、甚至优选地至少60%序列同一性、甚至优选地至少75%序列同一性、甚至更优选地至少80%、然而更优选地90%序列同一性和最优选地至少95%或甚至99%序列同一性的基酸序列。上文描述了用于合成或分离本发明肽的功能性衍生物以及确定两个氨基酸序列的同一性百分数的适宜方法。另外,用于产生如上文公开的肽的衍生物的方法是熟知的并且可以遵循本领域技术人员熟知的标准方法实施(参见,例如,Sambrook J,Maniatis T(1989))。

[1843] 作为又一个实施方案,本发明提供包含如本文定义的调节物的药物组合物或药物。在某些实施方案中,这类药物组合物或药物包含如本文定义的调节物以及任选性接头。

[1844] 另外,这种药物组合物或药物可以包含可药用载体、辅助剂或溶媒。本发明的“可药用载体、辅助剂或溶媒”指不破坏用其配制的调节物的药理活性或生理靶向作用的无毒载体、辅助剂或溶媒。可以在本发明药物组合物中使用的可药用载体、辅助剂或溶媒包括但不限于可以颅部或颅内施加或可以跨越血-脑屏障(BBB)的那些。尽管如此,本发明的药物组合物可以包含离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白如人血清白蛋白、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、偏甘油酯混合物饱和植物脂肪酸、水、盐或电解质如磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

[1845] 本发明的药物组合物可以经口、肠胃外、通过吸入喷雾、局部、经直肠、经鼻、经颊、经阴道、经脑或通过植入的储库施用。

[1846] 如本文提及RAGE的任何结构域时或提及任何其他多肽序列时所用,术语“片段”将理解为意指比RAGE的结构域更小的一个或多个氨基酸残基或它所指的任何其他多肽序列。

[1847] 如本文所用,术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘

内、肝内、病灶内和颅内注射或输注技术。口服、腹腔内或静脉内施用药物组合物。无菌注射剂形式的本发明药物组合物可以是水质或油质混悬剂。可以使用合适的分散或润湿剂和助悬剂,根据本领域已知的技术配制这些混悬剂。无菌可注射制品也可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液剂或混悬剂,如,1,3-丁二醇中的溶液剂。可以使用的可接受溶媒和溶剂包括水、林格液和等渗氯化钠溶液。此外,无菌的固定油常规地用作溶剂或助悬介质。

[1848] 从而,可以使用任何刺激性低的固定油,包括合成性单酰甘油或二酰甘油。脂肪酸,如油酸及其甘油酯衍生物可用于制备注射剂,这同样适用于天然可药用油,如橄榄油或蓖麻油,尤其处于其聚氧乙基化形式时。这些油溶液剂或混悬剂还可以含有在配制可药用剂型(包括乳剂和混悬剂)中通常使用的长链醇稀释剂或分散剂,如羧甲基纤维素或类似的分散剂。在制造可药用固态、液态或其他剂型时常用的其他常用表面活性剂,如Tween类、Span类和其他乳化剂或生物利用度增强剂,也可以出于配制目的使用。

[1849] 本文中的可药用组合物可以在任何口服可接受剂型中口服施用,所述的口服可接受剂型包括但不限于胶囊剂、片剂、水质混悬剂或水溶液剂。在口服使用的片剂情况下,常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。一般还添加润滑剂,如硬脂酸镁。对于以胶囊形式口服施用,有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当需要水质混悬剂供口服使用时,有效成分与乳化剂和助悬剂组合。如果需要,也可以添加某些甜味剂、矫味道剂或着色剂。

[1850] 备选地,如本文定义的药物组合物可以按直肠施用的栓剂形式施用。可以通过将药物与合适的无刺激性赋形剂混合,制备这种栓剂,其中所述赋形剂在室温为固态,但在肛温为液态,并且因此将会在直肠中融化以释放药物。这类材料包括可可脂、蜂蜡和聚乙二醇。

[1851] 也可以局部施用如本文定义的药物组合物,尤其当治疗靶包括通过局部施加轻易可及的区域或器官,包括脑部、其他颅内组织、眼或皮肤的疾病时。为这些区域或器官的每一者轻易配制合适的制剂。

[1852] 对于局部应用,如本文定义的药物组合物可以配制在合适的软膏剂中,所述软膏剂含有悬浮或溶解于一种或多种载体中的如本文鉴定的调节物。用于局部施用肽的载体包括但不限于矿物油、液体矿脂、白矿脂、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。对于局部应用,如本文定义的药物组合物可以配制在含有肽的合适洗剂或乳膏剂中,所述肽悬浮或溶解于一种或多种可药用载体中。合适的载体包括但不限于矿物油、山梨糖醇酐单硬脂酸酯、聚山梨醇酯-60、合成鲸蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苯甲醇和水。

[1853] 也可以通过鼻气雾剂或吸入法施用如本文定义的药物组合物。这种组合物可以根据药物配制领域熟知的技术配制并且可以使用苯甲醇或其他合适的防腐剂、增强生物利用率的吸收促进剂、氟烃和/或其他常规溶解或分散剂,配制为盐水中的溶液剂。配制本文中的可药用组合物或药品供口服或肠胃外施用,例如通过注射施用。

[1854] 出于治疗目的,无毒、有效量的调节物可以用于制备如上文定义的药物组合物。因此,某个量的调节物可以与载体材料组合,以产生如上文定义的组合物。

[1855] 药物组合物一般按单一(或多个)剂型制备,这将根据治疗的宿主和具体施用模式变动。通常,如此配制药物组合物,从而可以将0.0001至100mg/kg体重/天肽的每剂剂量范围施用至接受药物组合物的患者。优选的每剂剂量范围从0.01mg/kg体重/天至50mg/kg体

重/天变动,甚至进一步优选的剂量范围是0.1mg/kg体重/天至10mg/kg体重/天。

[1856] 然而,如上文提及的具体剂量范围和治疗方案可以依据多种因素,针对任何具体患者适当调整,所述因素包括所用具体调节物的活性、年龄、体重、总体健康状况、性别、膳食、施用时间、排泄速率、药物组合、正在治疗的医生的判断和正在接受治疗的具体疾病的严重程度。在这种情况下,施用可以用初始剂量范围实施,所述初始剂量可以历经治疗的时间变动,例如通过在如上述的范围内增加或减少初始剂量范围。备选地,施用可以通过施用特定剂量范围以连续方式实施,因而历经完整的治疗时间维持初始剂量范围。两种施用形式还可以合并,例如,如果剂量范围应在各个治疗阶段之间调整(增加或减少),但在单个阶段范围内保持恒定,从而各个阶段的剂量范围彼此不同。

[1857] 当治疗性使用时,本发明的调节物以治疗有效量施用。通常而言,治疗有效量意指为延迟正在接受治疗的具体病状的发作、抑制其进展或使其完全停顿而必要的量。通常,治疗有效量将随受试者的年龄和状况,以及受试者中疾病的性质和程度而变动,前者均可以由本领域普通技术人员确定。可以由个人医师调节剂量,尤其在出现任何并发症的情况下。

[1858] 如上文提到,本发明的一个方面涉及编码分离的肽调节物或其变体的核酸序列及其衍生物和在严格条件下与上述核苷酸序列组成的核酸分子杂交的其他核酸序列。如本文所用的术语“严格性条件”指本领域技术人员熟悉的参数。可以在编纂这类方法的以下参考文献中找到核酸杂交参数,例如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook等人编著,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989或Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel等人编著,John Wiley& Sons,Inc.,New York。更具体地,如本文所用的严格条件指在65℃于杂交缓冲液(3.5×SSC,0.02%Ficoll、0.02%聚乙烯吡咯烷酮,0.02%牛血清白蛋白,25mM NaH_2PO_4(pH 7),0.5%SDS,2mM EDTA)中杂交。SSC是0.15M氯化钠/0.15M柠檬酸钠,pH 7;SDS是十二烷基硫酸钠;并且EDTA是乙二胺四乙酸。在杂交后,将其上转移有DNA的膜在室温于2×SSC中洗涤并且随后在65℃于0.1×SSC/0.1×SDS中洗涤。

[1859] 本发明另外提供套装,所述套装包含在以上制剂至少一者中的上述药物组合物(在一个或多个容器中)及关于施加药物组合物方面的说明和/或信息的使用手册或信息手册。

[1860] 本发明领域的技术人员将理解,除了具体描述的那些内容之外,本文中所述的本发明易于进行变动和修改。应当理解,本发明包括全部这类功能性变动和修改。本发明还分别或总体地包括在本发明中提及或显示的全部步骤、特征、组合物和化合物,以及任意和全部组合或任意两个或多个所述步骤或特征。本发明在范围上不受本文所述的具体实施方案限制,所述具体实施方案仅意在起到示例目的。如本文所述,功能等同的产物、组合物和方法明确地处于本发明的范围内。另外,除非另外说明,否则使用分子生物学、微生物学、神经生物学、病毒学、重组DNA技术、溶液中肽合成、固相肽合成和免疫学的常规技术或本文中援引的技术,在无需过多实验的情况下开展本发明。

[1861] 参考文献

[1862] 1.Abe,R.和Yamagishi,S.(2008)AGE-RAGE系统与致癌作用(AGE-RAGE system and carcinogenesis).Current pharmaceutical design,14:940-945.

[1863] 2.Ahmad,A.,Bhattacharya,S.,Sridhar,A.,Iqbal,A.M.和Mariani,T.J.(2016)

与支气管肺发育不良相关的复发拷贝数变异(Recurrent copy number variants associated with bronchopulmonary dysplasia).Pediatric research,79,940-945.

[1864] 3.Aho,V.,Ollila,H.M.,Rantanen,V.,Kronholm,E.,Surakka,I.,van Leeuwen,W.M.A.,Lehto,M.,Matikainen,S.,Ripatti,S.,Harma,M.,Sallinen,M.,Salomaa,V.,Jauhiainen,M.,Alenius,H.,Paunio,T.和Porkka-Heiskanen,T.(2013)部分睡眠限制会激活与免疫反应相关的基因表达途径:人类的实验和流行病学研究(Partial Sleep RestrictionActivates Immune Response-Related Gene Expression Pathways:Experimental and Epidemiological Studies in Humans).PLoS ONE,8,e77184.

[1865] 4.Alexander,S.,Mathie,A.和Peter,J.(2011)受体和通道指南(GRAC)(Guide to Receptors and Channels(GRAC)),第5版.Br.J.Pharmacol.,164,S1-S324.

[1866] 5.Allen,S.等人,趋化因子:受体结构,相互作用和拮抗作用(Chemokine:Receptor Structure,Interactions and Antagonism).Annual Review Immunology,2007,25:787-820.

[1867] 6.Allende,M.L.,Bektas,M.,Lee,B.G.,Bonifacino,E.,Kang,J.,Tuymetova,G.,Chen,W.,Saba,J.D.和Proia,R.L.(2011)鞘氨醇-1-磷酸裂合酶缺乏会产生促炎反应,同时损害中性粒细胞的运输(Sphingosine-1-phosphate lyase deficiency produces a pro-inflammatory response while impairing neutrophil trafficking).Journal of Biological Chemistry,286,7348-7358.

[1868] 7.An,S.,Bleu,T.,Hallmark,O.G.和Goetzl,E.J.(1998)新型人类G蛋白偶联的溶血磷脂酸受体的表征(Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid).Journal ofBiological Chemistry,273,7906-7910.

[1869] 8.Anders HJ等人(2010)关于肾炎中趋化因子和趋化因子受体拮抗作用的问题(Questions about Chemokine and Chemokine Receptor Antagonism in Renal Inflammation),Nephron Exp Nephrol,114:e33-e38.

[1870] 9.Angelopoulou,E.,Piperi,C.,Adamopoulos,C.和Papavassiliou,A.G.(2016)高迁移率族框1(HMGB1)信号通路在神经胶质瘤发展和进展中的关键作用(Pivotal role of high-mobility group box 1(HMGB1)signalling pathways in glioma development and progression).Journal ofmolecular medicine,doi:10.1007/s00109-016-1435-y

[1871] 10.Antoniak,S.,Owens,A.P.,Baunacke,M.,Williams,J.C.,Lee,R.D.,Weithäuser,A.,Sheridan,P.A.,Malz,R.,Luyendyk,J.P.和Esserman,D.A.(2013)PAR-1有助于病毒感染期间的先天免疫应答(PAR-1 contributes to the innate immune response during viral infection).The Journal of clinical investigation,123,1310-1322.

[1872] 11.Arita,M.,Ohira,T.,Sun,Y.-P.,Elangovan,S.,Chiang,N.和Serhan,C.N.(2007)Resolvin E1与白三烯B4受体BLT1和ChemR23选择性相互作用以调节炎症(Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation).The Journal of Immunology,178,3912-3917.

[1873] 12.Awojoodu,A.O.,Ogle,M.E.,Sefcik,L.S.,Bowers,D.T.,Martin,K.,Brayman,

K.L.,Lynch,K.R.,Peirce-Cottler,S.M.和Botchwey,E.(2013)鞘氨醇1磷酸受体3调节植入物动脉生成过程中抗炎单核细胞向微血管的募集(Sphingosine 1-phosphate receptor 3 regulates recruitment of anti-inflammatory monocytes to microvessels during implant arteriogenesis).Proceedings ofthe National Academy of Sciences,110,13785-13790.

[1874] 13.Ayer,L.M.,Wilson,S.M.,Traves,S.L.,Proud,D.和Giembycz,M.A.(2008)4,5-二氢-1H-咪唑-2-基)-[4-(4-异丙氧基-苄基)-苯基]-胺(RO1138452)是人呼吸道上皮细胞表达的前列环素(IP)受体的一种选择性、伪不可逆的正构拮抗剂:IP受体介导的CXCL9和CXCL10释放抑制(4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-y1)-[4-(4-isopropoxy-benzyl)-phenyl]-amine(RO1138452)is a selective,pseudo-irreversible orthosteric antagonist at the prostacyclin(IP)-receptor expressed by human airway epithelial cells:IP-receptor-mediated inhibition of CXCL9and CXCL10release).Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,324,815-826.

[1875] 14.Babusyte,A.,Kotthoff,M.,Fiedler,J.和Krautwurst,D.(2013)生物胺通过微量胺相关受体TAAR1和TAAR2激活血液白细胞(Biogenic amines activate blood leukocytes via trace amine-associated receptors TAAR1 and TAAR2).Journal of leukocyte biology,93,387-394.

[1876] 15.Bader,M.,Alenina,N.,Andrade-Navarro,M.A.和Santos,R.A.(2014)MAS及其相关的G蛋白偶联受体(MAS and its related G protein-coupled receptors),Mrgprs.Pharmacol.Rev.,66,1080-1105.

[1877] 16.Ballatore C.,Huryn D.M.和Smith A.B.药物设计中的羧酸(生物)等排物(Carboxylic Acid(Bio)Isosteres in Drug Design).ChemMedChem,2013,8:385-395.

[1878] 17.Ballinger,M.L.等人,糖化和羧甲基化的蛋白质不会直接激活人血管平滑肌细胞(Glycated and carboxy-methylated proteins do not directly activate human vascular smooth muscle cells).Kidney Int,2005,68:2756-2765.

[1879] 18.Bandyopadhyay,S.,Jeong,K.H.,Hansen,J.T.,Vassilev,P.M.,Brown,E.M.和Chattopadhyay,N.(2007)钙敏感受体刺激永生的GnRH神经元中干扰素γ诱导的单因子(CXCL10)和单核细胞趋化蛋白3的分泌(Calcium-sensing receptor stimulates secretion of an interferon-γ-induced monokine(CXCL10)and monocyte chemoattractant protein-3in immortalized GnRH neurons).Journal ofneuroscience research,85,882-895.

[1880] 19.Barile,G.R.和Schmidt,A.M.(2007)RAGE及其配体在视网膜疾病中的作用(RAGE and its ligands in retinal disease).Current molecular medicine,7:758-765.

[1881] 20.Baroni,A.,Perfetto,B.,Canozo,N.,Braca,A.,Farina,E.,Melito,A.,De Maria,S.和Carteni,M.(2008)Bombesin:在伤口修复中的可能作用(Bombesin:A possible role in wound repair).Peptides,29,1157-1166.

[1882] 21.Bathgate,R.,Halls,M.,Van Der Westhuizen,E.,Callander,G.,Kocan,M.和Summers,R.(2013)松弛素家族肽及其受体(Relaxin family peptides and their

receptors).Physiological reviews,93,405-480.

[1883] 22.Batkulwar KB,Bansode SB,Patil GV,Godbole RK,Kazi RS,Chinnathambi S,Shanmugam D,Kulkarni MJ(2015)RAGE信号转导中磷酸化蛋白质组的研究(Investigation ofphosphoproteome in RAGE signalling).Proteomics,15,245-259.

[1884] 23.Beaulieu,J.M.和Gainetdinov,R.R.(2011)多巴胺受体的生理,信号传导和药理作用(The physiology,signalling,and pharmacology of dopamine receptors).Pharmacol Rev,63,182-217.

[1885] 24.Benigni A,Corna D,Zoja C等人(2009)血管紧张素II 1型受体的破坏促进小鼠寿命(Disruption of the angiotensin II type 1 receptor promotes longevity in mice).J Clin Invest,119:524-530.

[1886] 25.Benigni,A.,Cassis,P.and Remuzzi,G.(2010)血管紧张素II:炎症,免疫学和衰老中的新作用(Angiotensin II revisited:new roles in inflammation,immunology and aging).EMBO Mol Med,2:247-257.

[1887] 26.Benya,R.V.,Matkowskyj,K.A.,Danilkovich,A.和Hecht,G.(1998)甘丙肽导致人类结肠Cl-分泌:炎症相关的NF-κB激活对甘丙肽-1受体表达和功能的潜在意义(Galanin Causes Cl-Secretion in the Human Colon:Potential Significance of Inflammation-Associated NF-κB Activation on Galanin-1 Receptor Expression and Function).Annals of the New York Academy of Sciences,863,64-77.

[1888] 27.Bernardi,S.,Candido,R.,Toffoli,B.,Carretta,R.和Fabris,B.(2011)通过AT1受体阻滞预防实验性肾衰竭加速动脉粥样硬化(Prevention of accelerated atherosclerosis by AT_1 receptor blockade in experimental renal failure).Nephrology,dialysis,transplantation:official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association,26:832-838.

[1889] 28.Bhave,G.,Karim,F.,Carlton,S.和Gereau Iv,R.(2001)外周I类代谢型谷氨酸受体调节小鼠的伤害感受(Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice).Nature neuroscience,4,417-423.

[1890] 29.Bierhaus,A.等人(2001)糖尿病相关转录因子核因子-κ B的持续激活(Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB).Diabetes,50:2792-2808.

[1891] 30.Billings,E.A.,Lee,C.S.,Owen,K.A.,D'Souza,R.S.,Ravichandran,K.S.和Casanova,J.E.(2016)粘附GPCR BAI1介导巨噬细胞ROS的产生和对革兰氏阴性菌的杀菌活性(The adhesion GPCR BAI1 mediates macrophage ROS production and microbicidal activity against Gram-negative bacteria).Sci.Signal.,9,ra14-ra14.

[1892] 31.Blaes,N.和Girolami,J.-P.(2013)Targeting the'Janus face'of the B2-bradykinin receptor.Expert Opinion on Therapeutic Targets,17,1145-1166.

[1893] 32.Body,J.-J.,Glibert,F.,Nejai,S.,Fernandez,G.,Van Langendonek,A.和Borkowski,A.(1990)循环正常人淋巴细胞的降钙素受体(Calcitonin Receptors on Circulating Normal Human Lymphocytes)*.The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,71,675-681.

[1894] 33.Boie,Y.,N.Sawyer,D.M.Slipetz,K.M.Metters,和M.Abramovitz.人类前列腺素DP受体的分子克隆和表征(Molecular cloning and characterization ofthe human prostanoid DP receptor).J Biol Chem,1995,270:18910-6.

[1895] 34.Boie,Y.,T.H.Rushmore,A.Darmon-Goodwin,R.Grygorczyk,D.M.Slipetz,和K.M.Metters.人前列腺素IP受体cDNA的克隆和表达(Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor).J Biol Chem,1994,269:12173-8.

[1896] 35.Boisvert,W.A.(2004)趋化因子对动脉粥样硬化的调节(Modulation of atherogenesis by chemokines).Trends in Cardiovascular Medicine,14:161-165.

[1897] 36.Bossard,C.,Souazé,F.,Jarry,A.,Bezieau,S.,Mosnier,J.-F.,Forgez,P.和Laboisse,C.L.(2007)神经降压素高亲和力受体1(NTS1)及其配体神经降压素(NT)和核β-连环蛋白在炎症性肠病相关肿瘤发生中的过表达(Over-expression of neurotensin high-affinity receptor 1(NTS1)in relation with its ligand neurotensin(NT)and nuclear β-catenin in inflammatory bowel disease-related oncogenesis).Peptides,28,2030-2035.

[1898] 37.Boulay,F.,M.Tardif,L.Brouchon,和P.Vignais.人类的N-甲酰肽受体:两个cDNA分离物的表征以及G蛋白偶联受体新亚家族的证据(The human N-formylpeptide receptor:characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors).Biochemistry,1990,29:11123-33.

[1899] 38.Boxall,S.,Berthele,A.,Laurie,D.,Sommer,B.,Zieglgänsberger,W.,Urban,L.和Tölle,T.(1997)紫外线诱导大鼠外周炎症过程中代谢型谷氨酸受体3信使RNA在大鼠脊髓中的表达增强(Enhanced expression of metabotropic glutamate receptor 3messenger RNA in the rat spinal cord during ultraviolet irradiation induced peripheral inflammation).Neuroscience,82,591-602.

[1900] 39.Boyd,J.H.,Holmes,C.L.,Wang,Y.,Roberts,H.和Walley,K.R.(2008)加压素通过V2R减少败血症诱导的肺部炎症(Vasopressin decreases sepsis-induced pulmonary inflammation through the V2R).Resuscitation,79,325-331.

[1901] 40.Braley A.,Kwak T.,Jules J.,Harja E.,Landgraf R.,Hudson B.I.(2016)渐进性糖化终极产物受体(RAGE)胞外域脱落的调控及其在细胞功能中的作用(Regulation of Receptor for Advanced Glycation End Products(RAGE)Ectodomain Shedding and Its Role in Cell Function).J Biol Chem.291,12057-73.

[1902] 41.Bräuner-Osborne,H.,Jensen,A.A.,Sheppard,P.O.,Brodin,B.,Krogsgaard-Larsen,P.和O'Hara,P.(2001)人类孤儿家族C G蛋白偶联受体GPRC5D的克隆与鉴定(Cloning and characterization of a human orphan family C G-protein coupled receptor GPRC5D).Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Gene Structure and Expression,1518,237-248.

[1903] 42.Breyer,R.M.,C.K.Bagdassarian,S.A.Myers,和M.D.Breyer.前列腺素受体:亚型和信号(Prostanoid receptors:subtypes and signalling).Annu Rev Pharmacol Toxicol,2001,41:661-90.

[1904] 43.Brezillon,S.,Lannoy,V.,Franssen,J.-D.,Le Poul,E.,Dupriez,V.,

Lucchetti,J.,Detheux,M.和Parmentier,M.(2003)鉴定孤儿G蛋白偶联受体GPR7和GPR8的天然配体(Identification of natural ligands for the orphan G protein-coupled receptors GPR7and GPR8).Journal of Biological Chemistry,278,776-783.

[1905] 44.Briscoe,C.P.,Tadayyon,M.,Andrews,J.L.,Benson,W.G.,Chambers,J.K.,Eilert,M.M.,Ellis,C.,Elshourbagy,N.A.,Goetz,A.S.和Minnick,D.T.(2003)孤儿G蛋白偶联受体GPR40被中长链脂肪酸激活(The orphan G protein-coupled receptor GPR40is activated by medium and long chain fatty acids).Journal of Biological chemistry,278,11303-11311.

[1906] 45.Brothers,S.P.和Wahlestedt,C.(2010)神经肽Y(NPY)受体配体的治疗潜力(Therapeutic potential of neuropeptide Y(NPY)receptorligands).EMBO Mol Med,2,429-439.

[1907] 46.Brown,A.J.,Goldsworthy,S.M.,Barnes,A.A.,Eilert,M.M.,Tcheang,L.,Daniels,D.,Muir,A.I.,Wigglesworth,M.J.,Kinghorn,I.和Fraser,N.J.(2003)孤儿G蛋白偶联受体GPR41和GPR43被丙酸酯和其他短链羧酸激活(The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43are activated by propionate and other short chain carboxylic acids).Journal of Biological Chemistry,278,11312-11319.

[1908] 47.Bucher,M.,Hobbhahn,J.,Taeger,K.和Kurtz,A.(2002)大鼠急性内毒素血症期间细胞因子介导的血管加压素V1A受体下调(Cytokine-mediated downregulation of vasopressin V1A receptors during acute endotoxemia in rats).American Journal of Physiology-Regulatory,Integrative and Comparative Physiology,282,R979-R984.

[1909] 48.Buler,M.,Aatsinki,S.-M.,Skoumal,R.,Komka,Z.,Tóth,M.,Kerkelä,R.,Georgiadi,A.,Kersten,S.和Hakkola,J.(2012)能量敏感因子共激活物过氧化物酶体增殖物激活受体γ共激活因子1-α(PGC-1α)和AMP激活的蛋白激酶控制肝脏中炎症介质的表达(Energy-sensing Factors Coactivator Peroxisome Proliferator-activated Receptorγ Coactivator1-α(PGC-1α)and AMP-activated Protein Kinase Control Expression of Inflammatory Mediators in Liver)白介素1受体拮抗剂的介绍(INDUCTION OF INTERLEUKIN 1 RECEPTOR ANTAGONIST).Journal of Biological Chemistry,287,1847-1860.

[1910] 49.Burgess,G.M.,M.N.Perkins,H.P.Rang,E.A.Campbell,M.C.Brown,和P.McIntyre.缓激肽,一种有效的非肽B(2)缓激肽受体拮抗剂,在炎症性痛觉过敏动物模型中具有.持久的口服活性(Bradyzide,a potent non-peptide B(2)bradykinin receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia).Br J Pharmacol,2000,129:77-86.

[1911] 50.Cai,Z.等人,RAGE在阿尔茨海默氏病中的作用(Role of RAGE in Alzheimer′s Disease).Cellular and molecular neurobiology,2016,36:483-495.

[1912] 51.Calderón-Garcidueñas,L.,Kavanaugh,M.,Block,M.,D′Angiulli,A.,Delgado-Chávez,R.,Torres-Jardón,R.,González-Maciel,A.,Reynoso-Robles,R.,Osnaya,N.和Villarreal-Calderon,R.(2012)在暴露于空气污染的儿童和年轻人中,神经炎症、tau蛋白

过度磷酸化、淀粉样蛋白弥散性斑块和细胞病毒蛋白下调(Neuroinflammation, hyperphosphorylated tau,diffuse amyloid plaques,and down-regulation of the callular prion protein in air pollution exposed children and young adults).Journal ofAlzheimer's Disease,28,93-107.

[1913] 52.Calonge,M.,de Salamanca,A.E.,Siemasko,K.F.,Diebold,Y.,Gao,J.,Juárez-Campo,M.和Stern,M.E.(2005)人结膜上皮细胞中炎症标志物和神经受体表达的变化(Variation in the Expression of Inflammatory Markers and Neuroreceptors in Human Conjunctival Epithelial Cells).The Ocular Surface,3,S-145-S-148.

[1914] 53.Caminschi,I.,Vandenabeele,S.,Sofi,M.,Mcknight,A.J.,Ward,N.,Brodnicki,T.C.,Toy,T.,Lahoud,M.,Maraskovsky,E.和Shortman,K.(2006)人和小鼠EGF-TM7分子的基因结构和转录本分析(Gene structure and transcript analysis ofthe human and mouse EGF-TM7molecule),FIRE:Full Length Research Paper.DNA Sequence,17,8-14.

[1915] 54.Candido,R.等人(2002)通过血管紧张素转换酶抑制作用预防糖尿病载脂蛋白E缺乏症小鼠加速动脉粥样硬化(Prevention of accelerated atherosclerosis by angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic apolipoprotein E-deficient mice).Circulation,106:246-253.

[1916] 55.Candido,R.等人(2004)厄贝沙坦但非氨氯地平抑制糖尿病相关的动脉粥样硬化(Irbesartan but not amlodipine suppresses diabetes-associated atherosclerosis).Circulation,109:1536-1542.

[1917] 56.Cani,P.D.,Possemiers,S.,Van de Wiele,T.,Guiot,Y.,Everard,A.,Rottier,O.,Geurts,L.,Naslain,D.,Neyrinck,A.和Lambert,D.M.(2009)肠道微生物群的变化通过涉及GLP-2驱动的肠道通透性改善机制控制肥胖小鼠的炎症(Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability).Gut,58,1091-1103.

[1918] 57.Cantagrel,V.,Lossi,A.,Boulanger,S.,Depetris,D.,Mattei,M.,Gecz,J.,Schwartz,C.,Van Maldergem,L.和Villard,L.(2004)在一个有两名智障男性的家庭中,大脑中高表达的一个新的X连锁基因的破坏(Disruption of a new X linked gene highly expressed in brain in a family with two mentally retarded males.Journal of medical genetics),41,736-742.

[1919] 58.Cantarella,G.,Scollo,M.,Lempereur,L.,Saccani-Jotti,G.,Basile,F.和Bernardini,R.(2011)内源性大麻素抑制炎症激活的肥大细胞释放神经生长因子(Endocannabinoids inhibit release of nerve growth factor by inflammation-activated mast cells).Biochemical pharmacology,82,380-388.

[1920] 59.Capra,V.,Ravasi,S.,Accomazzo,M.R.,Citro,S.,Grimoldi,M.,Abbracchio,M.P.和Rovati,G.E.(2005)CysLT1受体是细胞外核苷酸诱导的异源脱敏的靶:炎症中可能的反馈机制(CysLT1 receptor is a target for extracellular nucleotide-induced heterologous desensitization:a possible feedback mechanism in inflammation).Journal of Cell Science,118,5625-5636.

[1921] 60.Caronti,B.,Calderaro,C.,Passarelli,F.,Palladini,G.和Pontieri,F.E.(1998)大鼠淋巴细胞中的多巴胺受体mRNA(Dopamine receptor mRNAs in the rat lymphocytes).Life sciences,62,1919-1925.

[1922] 61.Carrillo-Vico,A.,GARCÍA,S.,Calvo,J.R.和Guerrero,J.M.(2003)褪黑素通过其mt1膜受体抵消了PGE2对人淋巴细胞IL-2产生的抑制作用(Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE2 on IL-2production in human lymphocytes via its mt1 membrane receptor).The FASEB Journal,17,755-757.

[1923] 62.Caruso,C.,Durand,D.,Schioth,H.B.,Rey,R.,Seilicovich,A.和Lasaga,M.(2007)黑皮质素4受体的激活减少炎症反应,并防止星形胶质细胞中脂多糖和干扰素-γ诱导的细胞凋亡(Activation of melanocortin 4receptors reduces the inflammatory response and prevents apoptosis induced by lipopolysaccharide and interferon-gamma in astrocytes).Endocrinology,148,4918-4926.

[1924] 63.Charo,I.F.和Ransohoff,R.M.(2006)趋化因子和趋化因子受体在炎症中的许多作用(The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation).N Engl J Med,354,610-621.

[1925] 64.Chen,A.,Dong,L.,Leffler,N.R.,Asch,A.S.,Witte,O.N.和Yang,L.V.(2011)酸中毒激活GPR4可通过cAMP/Epac途径增加内皮细胞粘附(Activation of GPR4 by acidosis increases endothelial cell adhesion through the cAMP/Epac pathway).PloS one,6,e27586.

[1926] 65.Chen,H.F.,Jeung,E.B.,Stephenson,M.和Leung,P.C.(1999)人外周血单核细胞表达促性腺激素释放激素(GnRH),GnRH受体和白介素2受体γ链信使核糖核酸,这些物质在体外受GnRH调节(Human peripheral blood mononuclear cells express gonadotropin-releasing hormone(GnRH),GnRH receptor,and interleukin-2receptor gamma-chain messenger ribonucleic acids that are regulated by GnRH in vitro).The Journal of clinical endocrinology and metabolism,84,743-750.

[1927] 66.Chen,H.F.,Jeung,E.B.,Stephenson,M.和Leung,P.C.(1999)人外周血单核细胞表达促性腺激素释放激素(GnRH),GnRH受体和白介素2受体γ链信使核糖核酸,这些物质在体外受GnRH调节(Human peripheral blood mononuclear cells express gonadotropin-releasing hormone(GnRH),GnRH receptor,and interleukin-2receptor gamma-chain messenger ribonucleic acids that are regulated by GnRH in vitro).The Journal of clinical endocrinology and metabolism,84,743-750.

[1928] 67.Chen,T.-Y.,Hwang,T.-L.,Lin,C.-Y.,Lin,T.-N.,Lai,H.-Y.,Tsai,W.-P.和Lin,H.-H.(2011)EMR2受体连接调节脂多糖治疗的中性粒细胞的细胞因子分泌特性和细胞存活(EMR2 receptor ligation modulates cytokine secretion profiles and cell survival of lipopolysaccharide-treated neutrophils).Chang Gung Med J,34,468-477.

[1929] 68.Chen,Y.,Corriden,R.,Inoue,Y.,Yip,L.,Hashiguchi,N.,Zinkernagel,A.,Nizet,V.,Insel,P.A.和Junger,W.G.(2006)ATP释放通过P2Y2和A3受体引导中性粒细胞趋化(ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2and A3receptors).Science,

314,1792-1795.

[1930] 69.Chen,Z.J.和Minneman,K.P.(2005)α1-肾上腺素受体研究的最新进展(Recent progress in alpha1-adrenergic receptor research).Acta Pharmacol Sin,26,1281-1287.

[1931] 70.Chhajlani,V.(1996)人体组织中黑皮质素受体亚型的cDNA分布(Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues).Biochemistry and molecular biology international,38,73-80.

[1932] 71.Chhuon,C.,Pranke,I.,Borot,F.,Tondelier,D.,Lipecka,J.,Fritsch,J.,Chanson,M.,Edelman,A.,Ouero,M.和Guerrera,I.(2016)TNF-α刺激囊性纤维化细胞时脂质筏蛋白质组的变化(Changes in lipid raft proteome upon TNF-α stimulation of cystic fibrosis cells).Journal of Proteomics,145,246-253.

[1933] 72.Chuah,Y.K.,Basir,R.,Talib,H.,Tie,T.H.和Nordin,N.渐进性糖化终极产物受体及其与炎性疾病的关系(Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases).International journal of inflammation,2013,2013:403460.

[1934] 73.Consortium,I.G.o.A.S.(2013)通过免疫相关基因座的高密度基因分型鉴定强直性脊柱炎的多种风险变异(Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci).Nature genetics,45,730-738.

[1935] 74.Cook,I.H.,Evans,J.,Maldonado-Pérez,D.,Critchley,H.O.,Sales,K.J.和Jabbour,H.N.(2010)Prokineticin(PROK1)通过prokineticin受体1(PROKR1)和钙调神经磷酸酶/NFAT信号通路调节白介素(IL)-11表达(Prokineticin(PROK1)modulates interleukin(IL)-11expression via prokineticin receptor 1(PROKR1)and the calcineurin/NFAT signalling pathway).Molecular human reproduction,16,158-169.

[1936] 75.Costa,A.,Toschi,A.,Murfuni,I.等人,V1a-Vasopressin受体的局部过表达增强了肿瘤坏死因子诱导的肌肉萎缩的再生(Local Overexpression of V1a-Vasopressin Receptor Enhances Regeneration in Tumor Necrosis Factor-Induced Muscle Atrophy).BioMed Research International,2014,Article ID 235426,doi:10.1155/2014/235426.

[1937] 76.Cuddihy,R.M.,Dutton,C.M.和Bahn,R.S.(1995)促甲状腺激素受体细胞外结构域的多态性与女性自身免疫性甲状腺疾病高度相关(A polymorphism in the extracellular domain of the thyrotropin receptor is highly associated with autoimmune thyroid disease in females).Thyroid,5,89-95.

[1938] 77.Cunningham,M.A.,E.Rondeau,X.Chen,S.R.Coughlin,S.R.Holdsworth,和P.G.Tipping.蛋白酶激活受体1在增加的肾小球肾炎中介导凝血酶依赖性细胞介导的肾脏炎症(Protease-activated receptor 1 mediates thrombin-dependent,cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis).J Exp Med,2000,191:455-62.

[1939] 78.Czepielewski,R.S.,Porto,B.N.,Rizzo,L.B.,Roesler,R.,Abujamra,A.L.,

Pinto,L.G.,Schwartsmann,G.,de Queiroz Cunha,F.和Bonorino,C.(2012)胃泌素释放肽受体(GRPR)介导嗜中性粒细胞的趋化性(Gastrin-releasing peptide receptor(GRPR) mediates chemotaxis in neutrophils).Proceedings of the National Academy of Sciences,109,547-552.

[1940] 79.Czerwinski,M.,Kern,J.,Grodecka,M.,Paprocka,M.,Krop-Watorek,A.和Wasniowska,K.(2007)Duffy抗原/受体趋化因子的N-糖基化位点的突变分析(Mutational analysis of the N-glycosylation sites of Duffy antigen/receptor for chemokines).Biochem Biophys Res Commun,356,816-821.

[1941] 80.D'Andrea,G.,Terrazzino,S.,Fortin,D.,Farruggio,A.,Rinaldi,L.和Leon,A.(2003)HPLC electrochemical detection of trace amines in human plasma and platelets and expression of mRNA transcripts of trace amine receptors in circulating leukocytes.Neuroscience letters,346,89-92.

[1942] 81.D'Amato,M.,Bruce,S.,Bresso,F.,Zucchelli,M.,Ezer,S.,Pulkkinen,V.,Lindgren,C.,Astegiano,M.,Rizzetto,M.和Gionchetti,P.(2007)神经肽受体1基因多态性与炎症性肠病易感性相关(Neuropeptide s receptor 1 gene polymorphism is associated with susceptibility to inflammatory bowel disease).Gastroenterology,133,808-817.

[1943] 82.D'Andrea,G.,D'Arrigo,A.,Facchinetti,F.,Del Giudice,E.,Colavito,D.,Bernardini,D.和Leon,A.(2012)与其他微量胺不同,Octopamine通过β-肾上腺素受体介导的机制抑制了富含星状胶质的培养物对脂多糖的反应(Octopamine,unlike other trace amines,inhibits responses of astroglia-enriched cultures to lipopolysaccharide via a β-adrenoreceptor-mediated mechanism).Neuroscience letters,517,36-40.

[1944] 83.da Silveira,K.D.,Coelho,F.M.,Vieira,A.T.,Sachs,D.,Barroso,L.C.,Costa,V.V.,Bretas,T.L.B.,Bader,M.,de Sousa,L.P.和da Silva,T.A.(2010)在关节炎实验模型中,血管紧张素-(1-7)受体MAS激活的抗炎作用(Anti-inflammatory effects of the activation of the angiotensin-(1-7)receptor,MAS,in experimental models of arthritis).The Journal of Immunology,185,5569-5576.

[1945] 84.Daffu,G.等人,RAGE在心血管疾病及其他疾病氧化应激发病机理中的自由基作用(Radical roles for RAGE in the pathogenesis of oxidative stress in cardiovascular diseases and beyond).International journal of molecular sciences,2013,14:19891-19910.

[1946] 85.Daugherty,A.,Manning,M.W.和Cassis,L.A.(2000)血管紧张素II促进载脂蛋白E缺乏症小鼠的动脉粥样硬化病变和动脉瘤(Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice).J Clin Invest,105:1605-1612.

[1947] 86.Davidson,C.,Asaduzzaman,M.,Arizmendi,N.,Polley,D.,Wu,Y.,Gordon,J.,Hollenberg,M.,Cameron,L.和Vliagoftis,H.(2013)蛋白酶激活的受体2激活参与对小鼠模型中屋尘螨过敏原的过敏致敏(Proteinase-activated receptor-2activation

participates in allergic sensitization to house dust mite allergens in a murine model).Clinical and Experimental Allergy,43,1274-1285.

[1948] 87.Dawson,J.,Miltz,W.,Mir,A.K.,和Wiessner,C.(2003)在疾病中靶向单核细胞趋化蛋白-1信号传导(Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease).Expert Opin Ther Targets,7:35-48.

[1949] 88.De Martino,M.C.,Hofland,L.J.和Lamberts,S.W.(2010)生长抑素和生长抑素受体:从基本概念到临床应用(Somatostatin and somatostatin receptors:from basic concepts to clinical applications).Prog Brain Res,182,255-280.

[1950] 89.Deng,J.,Fujimoto,J.,Ye,X.-F.,Men,T.-Y.,Van Pelt,C.S.,Chen,Y.-L.,Lin,X.-F.,Kadara,H.,Tao,Q.和Lotan,D.(2010)小鼠抑癌基因Gprc5a的敲除导致气道上皮中的NF-κ B活化并促进肺部炎症和肿瘤发生(Knockout of the tumor suppressor gene Gprc5a in mice leads to NF-κB activation in airway epithelium and promotes lung innammation and tumorigenesis).Cancer prevention research,3,424-437.

[1951] 90.Dijksterhuis,J.,Petersen,J.和Schulte,G.(2014)WNT/卷曲信号:受体-配体选择性重点是FZD-G蛋白信号及其生理相关性:IUPHAR评论3(WNT/Frizzled signalling:receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance:IUPHAR Review 3).British journal of pharmacology,171,1195-1209.

[1952] 91.Dixit,V.D.,Schaffer,E.M.,Pyle,R.S.,Collins,G.D.,Sakthivel,S.K.,Palaniappan,R.,Lillard,J.W.和Taub,D.D.(2004)Ghrelin抑制人单核细胞和T细胞的瘦素和激活诱导的促炎细胞因子表达(Ghrelin inhibits leptin-and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells).The Journal of clinical investigation,114,57-66.92.Doi,Y.,T.Minami,M.Nishizawa,T.Mabuchi,H.Mori,和S.Ito.外周炎症诱导前列环素(IP)受体的中央伤害作用(Central nociceptive role of prostacyclin(IP)receptor induced by peripheral inflammation).Neuroreport,2002,13:93-6.

[1953] 93.Donoghue,M.等人,一种新型的血管紧张素转换酶相关的羧肽酶(ACE2)将血管紧张素I转化为血管紧张素1-9(A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase(ACE2)converts angiotensin I to angiotensin 1-9).Circulation research,2000,87:E1-9.

[1954] 94.Dorsch,M.,Qiu,Y.,Soler,D.,Frank,N.,Duong,T.,Goodearl,A.,O'Neil,S.,Lora,J.和Fraser,C.C.(2005)PK1/EG-VEGF诱导单核细胞分化和激活(PK1/EG-VEGF induces monocyte differentiation and activation).Journal of Leukocyte Biology,78,426-434.

[1955] 95.Drazen,D.L.和Nelson,R.J.(2001)褪黑激素受体亚型MT2(Mel 1b)而非mt1(Mel 1a)与褪黑素诱导的细胞介导的体液免疫和体液免疫增强有关(Melatonin receptor subtype MT2(Mel 1b)and not mt1(Mel 1a)is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity).Neuroendocrinology,74,178-

184.

[1956] 96.Duchene,J.,和A.Ahluwalia.激肽B(1)受体和炎症:心血管疾病的新治疗靶标(The kinin B(1)receptor and inflammation:new therapeutic target for cardiovascular disease).Curr Opin Pharmacol,2009,9:125-31.

[1957] 97.Duffy,R.A.神经激肽-1受体拮抗剂的潜在治疗靶标(Potential therapeutic targets for neurokinin-1 receptor antagonists).Expert Opin Emerg Drugs,2004,9:9-21.

[1958] 98.Ehrenfeld,P.,Millan,C.,Matus,C.,Figueroa,J.,Burgos,R.,Nualart,F.,Bhoola,K.和Figueroa,C.(2006)激肽B1受体的激活诱导人类嗜中性粒细胞的趋化性(Activation of kinin B1 receptors induces chemotaxis of human neutrophils).Journal of leukocyte biology,80,117-124.

[1959] 99.Ekholm,M.,Kahan,T.,Jorneskog,G.,Broijersen,A.和Wallen,N.H.(2009)人体血管紧张素II输注具有促炎作用,但对体内凝血酶生成没有短期影响(Angiotensin II infusion in man is proinflammatory but has no short-term effects on thrombin generation in vivo).Thromb Res,124:110-115.

[1960] 100.Elliott,S.E.,Parchim,N.F.,Kellems,R.E.,Xia,Y.,Soffici,A.R.和Daugherty,P.S.(2016)子痫前期相关的爱泼斯坦-巴尔病毒抗体与胎盘GPR50交叉反应(Apre-eclampsia-associated Epstein-Barr virus antibody cross-reacts with placental GPR50).Clinical Immunology,1 68,64-71.

[1961] 101.Elsasser,T.H.和Kahl,S.(2002)肾上腺髓质素在疾病压力中具有多种作用:炎症反应的发展和缓解(Adrenomedullin has multiple roles in disease stress:development and remission of the inflammatory response).Microscopy research and technique,57,120-129.

[1962] 102.Engel,K.M.,Schröck,K.,Teupser,D.,Holdt,L.M.,Tönjes,A.,Kern,M.,Dietrich,K.,Kovacs,P.,Krügel,U.和Scheidt,H.A.(2011)缺乏G蛋白偶联受体GPR82的小鼠的食物摄入量和体重减少(Reduced food intake and body weight in mice deficient for the G protein-coupled receptor GPR82).PLoS One,6,e29400.

[1963] 103.English,D.,A.T.Kovala,Z.Welch,K.A.Harvey,R.A.Siddiqui,和D.N.Brindley.1-磷酸鞘氨醇诱导内皮细胞趋化性和溶血磷脂酸(造血血管生成的潜在介质)稳定内皮单层屏障功能(Induction of endothelial cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate and stabilization of endothelial monolayer barrier function by lysophosphatidic acid,potential mediators ofhematopoietic angiogenesis).J Hematother Stem Cell Res,1999,8:627-34.

[1964] 104.Evankovich,J.,Lear,T.,Mckelvey,A.,Dunn,S.,Londino,J.,Liu,Y.,Chen,B.B.,Mallampalli,R.K.(2017)FBXO10靶向渐进性糖化终极产物受体进行泛素化和降解(Receptor for advanced glycation end products is targeted by FBXO 10 for ubiquitination and degradation).FASEB J.doi:10.1096/fj.201700031R.

[1965] 105.Fallarino,F.,Volpi,C.,Fazio,F.,Notartomaso,S.,Vacca,C.,Busceti,C.,Bicciato,S.,Battaglia,G.,Bruno,V.和Puccetti,P.(2010)代谢型谷氨酸受体4调节

适应性免疫并抑制神经炎症(Metabotropic glutamate receptor-4 modulates adaptive immunity and restrains neuroinflammation).Nature medicine,16,897-902.

[1966] 106.Farzan,M.,Choe,H.,Martin,K.,Marcon,L.,Hofmann,W.,Karlsson,G.,Sun,Y.,Barrett,P.,Marchand,N.和Sullivan,N.(1997)CD4阳性细胞中表达的两个孤立的七跨膜段受体支持猿猴免疫缺陷病毒感染(Two orphan seven-transmembrane segment receptors which are expressed in CD4-positive cells support simian immunodeficiency virus infection).The Journal of experimental medicine,186,405-411.

[1967] 107.Feingold,E.A.,Penny,L.A.,Nienhuis,A.W.和Forget,B.G.(1999)嗅觉受体基因位于扩展的人β-珠蛋白基因簇中,并在红系细胞中表达(An olfactory receptor gene is located in the extended human p-globin gene cluster and is expressed in erythroid cells).Genomics,61,15-23.

[1968] 108.Ferrario,C.M.和Strawn,W.B.(2006)肾素-血管紧张素-醛固酮系统和促炎介质在心血管疾病中的作用(Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease).Am J Cardiol,98:121-128.

[1969] 109.Ferré,S.,Baler,R.,Bouvier,M.,Caron,M.G.,Devi,L.A.,Durroux,T.,Fuxe,K.,George,S.R.,Javitch,J.A.,Lohse,M.J.,Mackie,K.,Milligan,G.,Pfleger,K.D.G.,Pin,J.P.,Volkow,N.,Waldhoer,M.,Woods,A.S.and Franco R.(2009)建立受体异聚体的新概念框架(Building a new conceptual framework for receptor heteromers).Nat Chem Biol,5:131-134.

[1970] 110.Ferreira,M.,Barcelos,L.S.,Campos,P.P.,Vasconcelos,A.C.,Teixeira,M.M.和Andrade,S.P.(2004)PAF受体缺失小鼠(PAFR-KO)的海绵诱导的血管生成和炎症(Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO)).British journal of pharmacology,141,1185-1192.

[1971] 111.Ferrier L,Serradeil-Le Gal C,Schulte AM,Vasina V,Gaultier E,Schroedel S,Ursino MG,Chaumaz G,Pascal M,De Ponti F,Bueno L.血管加压素通过V1b受体在小鼠半抗原诱发的实验性结肠炎中的促炎作用:对IBD的影响(Proinnammatory role of vasopressin through V1b receptors in hapten-induced experimental colitis in rodents:implication in IBD).Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2010,299:G1298-307.

[1972] 112.Finch,A.M.,Sarramegna,V.和Graham,R.M.(2006)配体结合、激活和激动剂转运(Ligand Binding,Activation,and Agonist Trafficking).Perez,D.M.(编著),肾上腺素能受体:21世纪(The Adrenergic Receptors:In the 21st Century).Humana Press,Totowa,NJ,pp.25-85.

[1973] 113.Fischer,A.,Schmid,B.,Ellinghaus,D.,Nothnagel,M.,Gaede,K.I.,Schürmann,M.,Lipinski,S.,Rosenstiel,P.,Zissel,G.和Höhne,K.(2012)在欧洲人染色体11q13.1上发现的1个新的结节病危险源(A novel sarcoidosis risk locus for Europeans on chromosome 11q13.1).American journal of respiratory and critical care medicine,186,877-885.

[1974] 114.Flegel,C.,Manteniotis,S.,Osthold,S.,Hatt,H.和Gisselmann,G.(2013)深度测序确定异位嗅觉受体的表达谱(Expression Profile of Ectopic Olfactory Reeeptors Determined by Deep Sequencing).PLoS ONE,8,e55368.

[1975] 115.Fleischmann,A.,Läderach,U.,Friess,H.,Buechler,M.W.和Rcubi,J.C.(2000)人胰腺疾病不同组织区中的Bombesin受体(Bombesin receptors in distincttissue compartments of human pancreatic diseases).Laboratory investigation,80,1807-1817.

[1976] 116.Fornari,T.A.,Donate,P.B.,Macedo,C.,Sakamoto-Hojo,E.T.,Donadi,E.A.和Passos,G.A.(2011)非肥胖糖尿病小鼠的1型糖尿病的发生与胸腺细胞和外周T淋巴细胞转录活性的变化有关(Development of type 1 diabetes mellitus in nonobese diabetic mice follows changes in thymocyte and peripheral T lymphocyte transcriptional activity).Clinical and Developmental Immunology,2011.

[1977] 117.Foster,H.R.,Fuerst,E.,Branchett,W.,Lee,T.H.,Cousins,D.J.和Woszczek,G.(2016)白三烯E4是人类半胱氨酰白三烯1型受体依赖性基因表达的全功能激动剂(Leukotriene E4 is a full functional agonist for human cysteinyl leukotriene type 1 receptor-dependent gene expression).Scientific reports,6.

[1978] 118.Frasch,S.C.,Berry,K.Z.,Femandez-Boyanapalli,R.,Jin,H.-S.,Leslie,C.,Henson,P.M.,Murphy,R.C.和Bratton,D.L.(2008)NADPH氧化酶依赖性的溶血磷脂酰丝氨酸生成可通过G2A增强活化和垂死的中性粒细胞的清除率(NADPH oxidase-dependent generation of lysophosphatidylserine enhances clearance of activated and dying neutrophils via G2A).Journal of Biological Chemistry,283,33736-33749.

[1979] 119.Fredholm,B.B.,AP,I.J.,Jacobson,K.A.,Linden,J.和Muller,C.E.(2011)国际基础和临床药理学联盟.LXXXI.腺苷受体的命名和分类-最新进展(International Union of Basic and Clinical Pharmacology.LXXXI.Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update).Pharmacol Rev,63,1-34.

[1980] 120.Freire-Garabal,M.,Nunez,M.,Balboa,J.,L ópez-Delgado,P.,Gallego,R.,Garc í a-Caballero,T.,Fernández-Roel,M.,Brenlla,J.和Rey-Méndez,M.(2003)血清素通过5-HT1A受体上调吞噬作用(Serotonin upregulates the activity of phagocytosis through 5-HT1A receptors).British journal of pharmacology,139,457-463.

[1981] 121.Fujita,T.,Matsuoka,T.,Honda,T.,Kabashima,K.,Hirata,T.和Narumiya,S.(2011)GPR40激动剂GW9508抑制角质形成细胞中CCL5、CCL17和CXCL10的诱导并减轻皮肤免疫炎症(A GPR40agonist GW9508suppressesCCL5,CCL17,and CXCL10induction in keratinocytes and attenuates cutaneous immune inflammation).Journal of Investigative Dermatology,131,1660-1667.

[1982] 122.Fujita,T.,Tozaki-Saitoh,H.和Inoue,K.(2009)P2Y1受体信号通过海马培养物中的IL-6释放增强星形胶质细胞对氧化应激的神经保护作用(P2Y1receptor signalling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL-6release in hippocampal cultures).Glia,57,244-257.

[1983] 123.Fukami K,Ueda S,Yamagishi S,Kato S,Inagaki Y,Takeuchi M,Motomiya Y,Bucala R,Iida S,Tamaki K,Imaizumi T,Cooper ME,Okuda S.(2004)AGEs通过血管紧张素II型I受体相互作用激活肾小球系膜TGF-β-Smad信号传导(AGEs activate mesangial TGF-β-Smad signalling via an angiotensin II type I receptor interaction).Kidney Int,66:2137-2147.

[1984] 124.Fukami,K.,Taguchi,K.,Yamagishi,S.和Okuda,S.渐进性糖化终极产物受体和进行性肾脏疾病的受体(Receptor for advanced glycation endproducts and progressive kidney disease).Current opinion in nephrology and hypertension,2015,24:54-60.

[1985] 125.Galiègue,S.,Mary,S.,Marchand,J.,Dussossoy,D.,Carrière,D.,Carayon,P.,Bouaboula,M.,Shire,D.,Le Fur,G.和Casellas,P.(1995)中枢和外周大麻素受体在人类免疫组织和白细胞亚群中的表达(Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations).European Journal of Biochemistry,232,54-61.

[1986] 126.Galle,J.,Sittig,D.,Hanisch,I.,Wobus,M.,Wandel,E.,Loeffler,M.和Aust,G.(2006)基于单个细胞的肿瘤与环境相互作用的模型:CD97对肿瘤侵袭的多重影响(Individual cell-based models of tumor-environment interactions:Multiple effects of CD97 on tumor invasion).Am J Pathol,169,1802-1811.

[1987] 127.Gantz,I.,Muraoka,A.,Yang,Y.-K.,Samuelson,L.C.,Zimmerman,E.M.,Cook,H.和Yamada,T.(1997)编码在脾脏和睾丸中高度表达的新型七种跨膜受体的基因(GPR18)的克隆和染色体定位(Cloning and chromosomal localization of a gene (GPR18)encoding a novel seven transmembrane receptor highly expressed in spleen and testis).Genomics,42,462-466.

[1988] 128.Gao,Z.-G.,Ding,Y.和Jacobson,K.A.(2010)P2Y 13受体负责RDP-2H3大鼠肥大细胞中ADP介导的脱粒(P2Y 13 receptor is responsible for ADP-mediated degranulation in RBL-2H3rat mast cells).Pharmacological research,62,500-505.

[1989] 129.Garcia-Vivas,J.M.,Galaviz-Hernandez,C.,Fernandez-Retana,J.,Pedroza-Torres,A.,Perez-Plasencia,C.,Lopez-Camarillo,C.和Marchat,L.A.(2016)肥胖妇女对针灸埋线疗法与艾灸疗法的肥胖女性进行转录组分析(Transcriptomic Profiling of Adipose Tissue in Obese Women in Response to Acupuncture Catgut Embedding Therapy with Moxibustion).The Journal of Alternative and Complementary Medicine,22,658-668.

[1990] 130.Garcia,J.G.,A.Siflinger-Birnboim,R.Bizios,P.J.Del Vecchio,J.W.Fenton,2nd,和A.B.Malik.凝血酶诱导的白蛋白穿过内皮的通透性增加(Thrombin-induced increase in albumin permeability across the endothelium).J Cell Physiol,1986,128:96-104.

[1991] 131.Garg,D.和Merhi,Z.渐进性糖化终极产物:饮食与PCOS排卵功能障碍之间的联系?(Advanced Glycation End Products:Link between Diet and Ovulatory Dysfunction in PCOS?)Nutrients,2015,7:10129-10144.

[1992] 132.Gatto,D.,Wood,K.和Brink,R.(2011)EBI2独立于CXCR5和CCR7而运作,但可指导B细胞在卵泡和生发中心的迁移和组织(EBI2 operates independently of but in cooperation with CXCR5and CCR7to direct B cell migration and organization in follicles and the germinal center).The Journal of Immunology,187,4621-4628.

[1993] 133.Gaveriaux,C.,Peluso,J.,Simonin,F.,Laforet,J.和Kieffer,B.(1995)免疫细胞中κ和δ阿片受体转录物的鉴定(Identification of kappa-and delta-opioid receptor transcripts in immune cells).FEBS Lett,369,272-276.

[1994] 134.Gazel,A.,Rosdy,M.,Bertino,B.,Tornier,C.,Sahuc,F.和Blumenberg,M.(2006)银屑病相关基因的一个特征子集由重组表皮中的制瘤素-M诱导(A characteristic subset of psoriasis-associated genes is induced by oncostatin-M in reconstituted epidermis).Journal of investigative dermatology,126,2647-2657.

[1995] 135.Gervais,F.G.,Cruz,R.P.,Chateauneuf,A.,Gale,S.,Sawyer,N.,Nantel,F.,Metters,K.M.和O′Neill,G.P.(2001)通过PGD 2受体CRTH2和DP选择性调节嗜酸性粒细胞的趋化因子,脱颗粒和细胞凋亡(Selective modulation of chemokinesis,degranulation,and apoptosis in eosinophils through the PGD 2receptors CRTH2and DP).Journal of Allergy and Clinical Immunology,108,982-988.

[1996] 136.Getting,S.J.,Gibbs,L.,Clark,A.J.,Flower,R.J.和Perretti,M.(1999)POMC基因衍生的肽激活小鼠巨噬细胞上的黑皮质素3型受体,抑制细胞因子释放,并抑制急性实验炎症中的中性粒细胞迁移(POMC gene-derived peptides activate melanocortin type 3receptor on murine macrophages,suppress cytokine release,and inhibit neutrophil migration in acute experimental inflammation).The Journal of Immunology,162,7446-7453.

[1997] 137.Giannini,E.,Lattanzi,R.,Nicotra,A.,Campese,A.F.,Grazioli,P.,Screpanti,I.,Balboni,G.,Salvadori,S.,Sacerdote,P.和Negri,L.(2009)趋化因子Bv8/prokineticin 2在炎性粒细胞中上调并调节炎性疼痛(The chcmokine Bv8/prokineticin 2is up-regulated in inflammatory granulocytes and modulates inflammatory pain).Proceedings of the National Academy of Sciences,106,14646-14651.

[1998] 138.Goldin,A.,Beckman,J.A.,Schmidt,A.M.,和CreAGER,M.A.(2006)渐进性糖化终极产物:引发糖尿病性血管损伤的发展(Advanced glycation end products:sparking the development of diabetic vascular injury),Circulation,114:597-605.

[1999] 139.Grafe,M.等人(1997)E-选择素介导血管紧张素II诱导的人冠状动脉内皮细胞白细胞粘附(Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin).Circ Res,81:804-811.

[2000] 140.Granados-Soto,V.,Argüelles,C.F.,Rocha-González,H.I.,Godinez-Chaparro,B.,Flores-Murrieta,F.J.和Villalón,C.M.(2010)周围5-HT1A,5-HT1B,5-HT1D,5-HT1E和5-HT1F血清素能受体在减轻大鼠伤害感受中的作用(The role of peripheral 5-HT1A,5-HT1B,5-HT1D,5-HT1E and 5-HT1F serotonergic receptors in the reduction of hociception in rats).Neuroscience,165,561-568.

[2001] 141.Grantham,R.(1974)氨基酸差异公式可帮助解释蛋白质进化(Amino acid differenee formula to help explain protein evolution).Science,185:862-864.

[2002] 142.Grässel,S.,Opolka,A.,Anders,S.,Straub,R.H.,Grifka,J.,Luger,T.A.和Böhm,M.(2009)关节软骨细胞中的黑皮质素系统:黑皮质素受体,促乳黑素皮质激素,前体蛋白酶以及α-促黑素细胞激素对促炎细胞因子和细胞外基质成分的调节作用(The melanocortin system in articular chondrocytes:Melanocortin receptors,pro-opiomelanocortin,precursor proteases,and a regulatory effect of α-melanocyte-stimulating hormone on proinflammatory cytokines and extracellular matrix components).Arthritis and Rheumatism,60,3017-3027.

[2003] 143.Greene T.W.等人Protective groups in organic synthesis,1991,Wiley,New York.

[2004] 144.Gregory,M.A.,Phang,T.L.,Neviani,P.,Alvarez-Calderon,F.,Eide,C.A.,O'Hare,T.,Zaberezhnyy,V.,Williams,R.T.,Druker,B.J.和Perrotti,D.(2010)Wnt/Ca 2+/NFAT信号传导通过抑制Bcr-Abl维持Ph+白血病细胞的存活(Wnt/Ca 2+/NFAT signalling maintains survival of Ph+leukemia cells upon inhibition of Bcr-Abl).Cancer cell,18,74-87.

[2005] 145.Guénard,F.,Lamontagne,M.,Bossé,Y.,Deshaies,Y.,Cianflone,K.,Kral,J.G.,Marceau,P.和Vohl,M.-C.(2015)妊娠期肥胖对孕产妇胃肠道肥胖手术之后的后代基因型与基因表达水平之间关联的影响(Influences of Gestational Obesity on Associations between Genotypes and Gene Expression Levels in Offspring following Maternal Gastrointestinal Bypass Surgery for Obesity).PloS one,10,e0117011.

[2006] 146.Gugliucci,A.和Menini,T.轴AGE-RAGE可溶性RAGE与慢性肾脏病中的氧化应激(The axis AGE-RAGE-soluble RAGE and oxidative stress in chronic kidney disease).Advances in experimental medicine and biology,2014,824:191-208.

[2007] 147.Guo,W.A.,Knight,P.R.和Raghavendran,K.渐进性糖化终极产物受体和急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(The receptor for advanced glycation end products and acute lung injury/acute respiratory distress syndrome).Intensive care medicine¬¬,2012,38:1588-1598.

[2008] 148.Haga,K.,Kruse,A.C.,Asada,H.,Yurugi-Kobayashi,T.,Shiroishi,M.,Zhang,C.,Weis,W.I.,Okada,T.,Kobilka,B.K.,Haga,T.和Kobayashi,T.(2012)与拮抗剂结合的人M2毒蕈碱型乙酰胆碱受体的结构(Structure of the human M2muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist).Nature,482,547-551.

[2009] 149.Hagner,S.,Stahl,U.,Knoblauch,B.,McGregor,G.和Lang,R.(2002)降钙素受体样受体:在人外周组织中的鉴定和分布(Calcitonin receptor-like receptor:identification and distribution in human peripheral tissues).Cell and tissue research,310,41-50.

[2010] 150.Han,Y.T.等人,对4,6-双苯基-2-(3-烷氧基苯胺基)嘧啶集中于对活性有用的氨基烷氧基部分进行微调,是渐进性糖化终极产物受体(RAGE)的治疗上有用的抑制剂

(Fine tuning of 4,6-bisphenyl-2-(3-alkoxyanilino)pyrimidine focusing on the activity-sensitive aminoalkoxy moiety for a therapeutically useful inhibitor of receptor for advanced glycation end products(RAGE)).Bioorganic和medicinal chemistry,2015,23:579-587.

[2011] 151.Han,Y.T.等人,基于配体的2-氨基嘧啶的设计,合成和生物学评估,这是一系列渐进性糖化终极产物受体(RAGE)新型抑制剂(Ligand-based design,synthesis,and biological evaluation of 2-aminopyrimidines,a novel series of receptor for advanced glycation end products(RAGE)inhibitors).Journal ofmedicinal chemistry,2012,55:9120-9135.

[2012] 152.Han,Y.T.等人,吡唑-5-羧酰胺,新型渐进性糖化终极产物受体(RAGE)抑制剂(Pyrazole-5-carboxamides,novel inhibitors of receptor for advanced glycation end products(RAGE)).European journal of medicinal chemistry,2014,79:128-142.

[2013] 153.Handley,D.A.,C.M.Arbeeny,M.L.Lee,R.G.Van Valen,和R.N.Saunders.血小板活化因子对内皮对血浆大分子渗透性的影响(Effect of platelet activating factor on endothelial permeability to plasma macromolecules).Immunopharmacology,1984,8:137-42.

[2014] 154.Hansen,W.,Westendorf,A.,Toepfer,T.,Mauel,S.,Geffers,R.,Gruber,A.和Buer,J.(2010)体内炎症由调节性T细胞中的GPR83同工型-4调节,但不受GPR83同工型-1的表达调节(Inflammation in vivo is modulated by GPR83isoform-4but not GPR83isoform-1 expression in regulatory T cells).Genes and immunity,11,357-361.

[2015] 155.Hanson,M.A.,Roth,C.B.,Jo,E.,Griffith,M.T.,Scott,F.L.,Reinhart,G.,Desale,H.,Clemons,B.,Cahalan,S.M.,Schuerer,S.C.,Sanna,M.G.,Han,G.W.,Kuhn,P.,Rosen,H.和Stevens,R.C.(2012)脂质G蛋白偶联受体的晶体结构(Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor).Science,335,851-855.

[2016] 156.Hartmann,K.,Henz,B.M.,Krüger-Krasagakes,S.,Köhl,J.,Burger,R.,Guhl,S.,Haase,I.,Lippert,U.和Zuberbier,T.(1997)C3a and C5a stimulate chemotaxis ofhuman mast cells.Blood,89,2863-2870.

[2017] 157.Hartmeyer,M.,Scholzen,T.,Becher,E.,Bhardwaj,R.,Schwarz,T.和Luger,T.(1997)人皮肤微血管内皮细胞表达1型黑皮质素受体,并在用α-黑素细胞刺激激素刺激后产生水平升高的IL-8(Human dermal microvascular endothelial cells express the melanocortin receptor type 1 and produce increased levels of IL-8upon stimulation with alpha-melanocyte-stimulating hormone).The Journal of Immunology,159,1930-1937.

[2018] 158.Harvey,R.C.,Mullighan,C.G.,Wang,X.,Dobbin,K.K.,Davidson,G.S.,Bedrick,E.J.,Chen,I.-M.,Atlas,S.R.,Kang,H.和Ar,K.(2010)鉴定具有基因表达谱的儿科高危B前体急性淋巴细胞白血病中的新簇群:与全基因组DNA拷贝数变化,临床特征和结果的相关性(Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling:

correlation with genome-wide DNA copy number alterations,clinical characteristics,and outcome).Blood,116,4874-4884.

[2019] 159.Hata,A.N.,和R.M.Breyer.前列腺素受体的药理作用和信号传导:在炎症和免疫调节中的多种作用(Pharmacology and signalling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation).Pharmacol Ther,2004,103:147-66.

[2020] 160.Haworth,O.,Cernadas,M.和Levy,B.D.(2011)NK细胞是RESOLVIN E1的效应物,可及时解决过敏性气道炎症(NK cells are effectors for resolvin E1 in the timely resolution of allergic airway inflammation).The Journal of Immunology,186,6129-6135.

[2021] 161.Hess B,Kutzner C,Van Der Spoel D,Lindahl E.GROMACS 4:用于高效,负载平衡和可扩展分子模拟的算法(GROMACS 4:Algorithms for highly efficient,load-balanced,and scalable molecular simulation).J Chem Theory Comput,2008,4:435.

[2022] 162.Heublein,S.,Lenhard,M.,Vrekoussis,T.,Schoepfer,J.,Kuhn,C.,Friese,K.,Makrigiannakis,A.,Mayr,D.和Jeschke,U.(2012)G蛋白偶联雌激素受体(GPER)在正常人的卵巢中表达,并在卵巢子宫内膜异位症和涉及卵巢的盆腔炎中上调(The G-protein-coupled estrogen receptor(GPER)is expressed in normal human ovaries and is upregulated in ovarian endometriosis and pelvic inflammatory disease involving the ovary).Reproductive Sciences,19,1197-1204.

[2023] 163.Hill,J.,Duckworth,M.,Murdock,P.,Rennie,G.,Sabido-David,C.,Ames,R.S.,Szekeres,P.,Wilson,S.,Bergsma,D.J.和Gloger,I.S.(2001)新型人类MCH受体MCH2的分子克隆和功能表征(Molecular cloning and functional characterization of MCH2,a novel human MCH receptor).Journal ofBiological Chemistry,276,20125-20129.

[2024] 164.Hohenhaus,D.M.,Schaale,K.,Le Cao,K.-A.,Seow,V.,Iyer,A.,Fairlie,D.P.和Sweet,M.J.(2013)在人类单核细胞/巨噬细胞分化和脂多糖介导的激活过程中,G蛋白偶联受体表达的mRNA图谱确定了炎症的靶向候选调节剂(An mRNA atlas of G protein-coupled receptor expression during primary human monocyte/macrophage difierentiation and lipopolysaccharide-mediated activation identifies targetable candidate regulators of inflammation).Immunobiology,218,1345-1353.

[2025] 165.Hollenberg,A.N.(2008)促甲状腺激素释放激素(TRH)神经元作为代谢传感器的作用(The role of the thyrotropin-releasing hormone(TRH)neuron as a metabolic sensor).Thyroid,18,131-139.

[2026] 166.Hong,K.W.,Shin,M.S.,Ahn,Y.B.,Lee,H.J.和Kim,H.D.(2015)韩国人群慢性牙周炎的全基因组关联研究:来自Yangpyeong健康队列的结果(Genomewide association study on chronic periodontitis in Korean population:results from the Yangpyeong health cohort).Journal of clinical pe riodontology,42,703-710.

[2027] 167.Hoque,R.,Farooq,A.,Ghani,A.,Gorelick,F.和Mehal,W.Z.(2014)乳酸通过GPR81介导的先天免疫抑制作用减少Toll样受体和炎症小体介导的炎症中的肝脏和胰腺损

伤(Lactate reduces liver and pancreatic injury in Toll-like receptor-and inflammasome-mediated inflammation via GPR81-mediated suppression of innate immunity).Gastroenterology,146,1763-1774.

[2028] 168.Horinouchi,T.,Terada,K.,Higashi,T.和Miwa,S.(2013)内皮素受体信号传导:对其调节机制的新见解(Endothelin receptor signalling:new insight into its regulatory mechanisms).J Pharmacol Sci,123,85-101.

[2029] 169.Horne,K.和Woolley,I.J.(2009)深入探讨DARC:达菲抗原/受体对趋化因子在炎症,感染和恶性肿瘤中的作用(Shedding light on DARC:the role of the Duffy antigen/receptor for chemokines in inflammation,infection and malignancy).Inflamm Res,58,431-435.167.Horton,J.,Yamamoto,S.和Bryant-Greenwood,G.(2012)松弛素增强脉络膜蜕膜中的炎症性IL6反应(Relaxin augments the inflammatory IL6response in the choriodecidua).Placenta,33,399-407.

[2030] 170.Hsu,S.Y.,Nakabayashi,K.,Nishi,S.,Kumagai,J.,Kudo,M.,Sherwood,O.D.和Hsueh,A.J.(2002)激素松弛素激活孤儿受体(Activation of orphan receptors by the hormone relaxin).Science,295,671-674.

[2031] 171.Ichimonji,I.,Tomura,H.,Mogi,C.,Sato,K.,Aoki,H.,Hisada,T.,Dobashi,K.,Ishizuka,T.,Mori,M.和Okajima,F.(2010)细胞外酸化通过人气道平滑肌细胞中的质子感应OGR1受体刺激IL-6的产生和Ca2+的动员(Extracellular acidification stimulates IL-6production and Ca2+mobilization through proton-sensing OGR1 receptors in human airway smooth muscle cells).Amcrican Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology,299,L567-L577.

[2032] 172.Ignatov,A.,Robert,J.,Gregory-Evans,C.和Schaller,H.(2006)RANTES刺激G蛋白偶联受体转染的细胞中Ca2+动员和三磷酸肌醇(IP3)的形成75(RANTES stimulates Ca2+mobilization and inositol trisphosphate(IP3)formation in cells transfected with G protein-coupled receptor 75.British journal of pharmacology,149,490-497.

[2033] 173.Improta,G.,Carpino,F.,Petrozza,V.,Guglietta,A.,Tabacco,A.和Broccardo,M.(2003)选择性NK 1和NK 3速激肽受体激动剂对大鼠实验性结肠炎两种模型的中枢作用(Central efiects of selective NK 1 and NK 3tachykinin receptor agonists on two models of experimentally-induced colitis in rats).Peptides,24,903-911.

[2034] 174.Inbe,H.,Watanabe,S.,Miyawaki,M.,Tanabe,E.和Encinas,J.A.(2004)鉴定和表征AMP和腺苷的细胞表面受体P2Y15(Identification and characterization of a cell-surface receptor,P2Y15,for AMP and adenosine).Journal of Biological Chemistry,279,19790-19799.

[2035] 175.Irukayama-Tomobe,Y.,Tanaka,H.,Yokomizo,T.,Hashidate-Yoshida,T.,Yabagisawa,M.和Sakurai,T.(2009)芳香族D-氨基酸通过G蛋白偶联受体GPR109B充当人类白细胞的趋化因(Aromatic D-amino acids act as chemoattractant factors for human leukocytes through a G protein-coupled receptor,GPR 109B).Proceedings

of the National Academy of Sciences,106,3930-3934.

[2036] 176.İşeri, S.Ö., Şener,G.,Sağlam,B.,Gedik,N.,Ercan,F.和Yeğen, B.Ç.(2005)催产素通过中性粒细胞依赖性机制改善结肠氧化性炎症(Oxytocin ameliorates oxidative colonic inflammation by a neutrophil-dependent mechanism).Peptides,26,483-491.

[2037] 177.Ishihara,H.,Connolly,A.J.,Zeng,D.,Kahn,M.L.,Zheng,Y.W.,Timmons,C.,Tram,T.和Coughlin,S.R.(1997)蛋白酶激活受体3是人类的第二种凝血酶受体(Protease-activated receptor 3is a second thrombin receptor in humans).

[2038] 178.Ito,Y.,Banno,R.,Shibata,M.,Adachi,K.,Hagimoto,S.,Hagiwara,D.,Ozawa,Y.,Goto,M.,Suga,H.和Sugimura,Y.(2013)高脂饮食的雄性小鼠中proopiomelanocortin神经元中的GABA B受体信号传导可防止肥胖,胰岛素抵抗和下丘脑炎症(GABA type B receptor signalling in proopiomelanocortin neurons protects against obesity,insulin resistance,and hypothalamic inflammation in male mice on a high-fat diet).The Journal of Neuroscience,33,17166-17173.

[2039] 179.Iwasa,T.,Matsuzaki,T.,Tungalagsuvd,A.,Munkhzaya,M.,Kawami,T.,Niki,H.,Kato,T.,Kuwahara,A.,Uemura,H.,Yasui,T.和Irahara,M.(2014)高剂量脂多糖对雌性大鼠下丘脑Kiss1和RFRP基因表达的影响(Hypothalamic Kiss1 and RFRP gene expressions are changed by a high dose of lipopolysaccharide in female rats).Hormones and Behavior,66,309-316.

[2040] 180.Izeboud,C.A.,Vermeulen,R.M.,Zwart,A.,Voss,H.-P.,van Miert,A.S.J.P.A.M.和Witkamp,R.F.(2000)β2-肾上腺素受体对巨噬细胞的立体选择性是β2-激动剂抗炎作用的主要决定因素(Stereoselectivity at the β2-adrenoceptor on macrophages is a major determinant of the anti-inflammatory effects of β2-agonists).Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology,362,184-189.

[2041] 181.Jacoby,D.S.,和Rader,D.J.(2003)肾素-血管紧张素系统和动脉粥样硬化性疾病:从基因到治疗(Renin-angiotensin system and atherothrombotic disease:from genes to treatment).Arch Intern Med,163:1155-64.

[2042] 182.Jaeger,W.C.,Armstrong,S.P.,Hill,S.J.and Pfleger,K.D.G.,Biophysical detection ofdiversity and bias in GPCR function.Front Endocrinol,2014,5:26.

[2043] 183.Jaffré,F.,Bonnin,P.,Callebert,J.,Debbabi,H.,Setola,V.,Doly,S.,Monassier,L.,Mettauer,B.,Blaxall,B.C.和Launay,J.-M.(2009)心脏成纤维细胞中的血清素和血管紧张素受体使肾上腺素依赖性心脏肥大(Serotonin and angiotensin receptors in cardiac fibroblasts coregulate adrenergic-dependent cardiac hypertrophy).Circulation research,104,113-123.

[2044] 184.Jahnsen,J.,Falch,J.,Mowinckel,P.和Aadland,E.(2002)炎性肠病患者的维生素D状况,甲状旁腺激素和骨矿物质密度(Vitamin D status,parathyroid hormone and bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease).Scandinavian journal of gastroenterology,37,192-199.

[2045] 185.Jenne,C.N.,Enders,A.,Rivera,R.,Watson,S.R.,Bankovich,A.J.,Pereira,J.P.,Xu,Y.,Roots,C.M.,Beilke,J.N.和Banerjee,A.(2009)NK细胞中依赖T-bet的S1P5表达促进从淋巴结和骨髓的流出(T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow).The Journal of experimental medicine,206,2469-2481.

[2046] 186.Jia,R.-Z.,Zhang,X.,Hu,P.,Liu,X.-M.,Hua,X.-D.,Wang,X.和Ding,H.-J.(2012)使用CpG岛加上启动子微阵列筛选先兆子痫中人胎盘中甲基化状态的差异(Screening for differential methylation status in human placenta in preeclampsia using a CpG island plus promoter microarray).International journal of molecular medicine,30,133.

[2047] 187.Jimenez-Andrade,J.M.,Zhou,S.,Du,J.,Yamani,A.,Grady,J.J.,Castañeda-Hernandez,G.和Carlton,S.M.(2004)外周甘丙肽在炎性疼痛中的伤害感受作用(Pro-nociceptive role ofperipheral galanin in inflammatory pain).Pain,110,10-21.

[2048] 188.Johns,D.G.,Ao,Z.,Naselsky,D.,Herold,C.L.,Maniscalco,K.,Sarov-Blat,L.,Steplewski,K.,Aiyar,N.和Douglas,S.A.(2004)降压素II介导的心肌肥大:受体拮抗作用和炎症介质的作用(Urotensin-II-mediated cardiomyocyte hypertrophy: effect of receptor antagonism and role of inflammatory mediators).Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology,370,238-250.

[2049] 189.Jossart,C.,Mulumba,M.,Granata,R.,Gallo,D.,Ghigo,E.,Marleau,S.,Servant,M.J.和Ong,H.(2013)焦谷氨酰化RF-酰胺肽(QRFP)基因受代谢性内毒素血症的调节(Pyroglutamylated RF-amide peptide(QRFP)gene is regulated by metabolic endotoxemia).Molecular Endocrinology,28,65-79.

[2050] 190.Jules J,Maiguel D,Hudson BI,RAGE细胞质域的备选剪接调节细胞信号传导和功能(Alternative Splicing of the RAGE Cytoplasmic Domain Regulates Cell Signalling and Function).PLoS ONE,2013,8:e78267.

[2051] 191.Jurisic,G.,Sundberg,J.,Bleich,A.,Leiter,E.,Broman,K.,Buechler,G.,Alley,L.,Vestweber,D.和Detmar,M.(2010)定量淋巴管特征分析表明,Vcam1是炎症性肠病的候选修饰基因(Quantitative lymphatic vessel trait analysis suggests Vcaml as candidate modifier gene of inflammatory bowel disease).Genes and immunity,11,219-231.

[2052] 192.Kabashima,K.,Saji,T.,Murata,T.,Nagamachi,M.,Matsuoka,T.,Segi,E.,Tsuboi,K.,Sugimoto,Y.,Kobayashi,T.和Miyachi,Y.(2002)前列腺素受体EP4抑制肠道中的结肠炎,粘膜损伤和CD4细胞活化(The prostaglandin receptor EP4suppresses colitis,mucosal damage and CD4cell activation in the gut).The Journal of clinical investigation,109,883-893.

[2053] 193.Kable,J.W.,Murrin,L.C.和Bylund,D.B.(2000)体内基因修饰阐明了α(2)-肾上腺素受体的亚型特异性功能(In vivo gene modific ation elucidates subtype-specific functiohs of alpha(2)-adrenergic receptors).J Pharmacol Exp Ther,

293,1-7.

[2054] 194.Kahn,M.L.,Y.W.Zheng,W.Huang,V.Bigornia,D.Zeng,和S.Moff.用于血小板活化的双重凝血酶受体系统(A dual thrombin receptor system for platelet activation).Nature,1998,394:690-4.

[2055] 195.Kalbe,B.,Knobloch,J.,Schulz,V.M.,Wecker,C.,Schlimm,M.,Scholz,P.,Jansen,F.,Stoelben,E.,Philippou,S.,Hecker,E.,Lübbert,H.,Koch,A.,Hatt,H.和Osterloh,S.(2016)嗅觉受体调节人呼吸道平滑肌细胞的生理过程(Olfactory Receptors Modulate Physiological Processes in Human Airway Smooth Muscle Cells).Frontiers in Physiology,7.

[2056] 196.Kaminski,N.E.大麻素类化合物通过抑制环状AMP信号级联反应和改变基因表达来调节免疫力(Immune regulation by cannabinoid compounds through the inhibition of the cyclic AMP signalling cascade and altered gene expression).Biochem Pharmacot,1996,52:1133-40.

[2057] 197.Kanazawa,M.,Watanabe,S.,Tana,C.,Komuro,H.,Aoki,M.和Fukudo,S.(2011)5-HT4受体激动剂柠檬酸莫沙必利对肠易激综合征患者直肠乙状结肠感觉运动功能的影响(Effect of 5-HT4receptor agonist mosapride citrate on rectosigmoid sensorimotor function in patients with irritable bowel syndrome).Neurogastroenterology和Motility,23,754-e332.

[2058] 198.Kang,Y.S等人(2010)CCR2拮抗作用可改善2型糖尿病小鼠的胰岛素抵抗,脂质代谢和糖尿病肾病(CCR2antagonism improves insulin resistance,lipid metabolism,and diabetic nephropathy in type 2diabetic mice).Kidney International,78:883-894.

[2059] 199.Kawamata,Y.,Fujii,R.,Hosoya,M.,Harada,M.,Yoshida,H.,Miwa,M.,Fukusumi,S.,Habata,Y.,Itoh,T.和Shintani,Y.(2003)响应胆汁酸的AG蛋白偶联受体(AG protein-coupled receptor responsive to bile acids).Journal of Biological Chemistry,278,9435-9440.

[2060] 200.Kazemian,P.,Kazemi-Bajestani,S.M.,Alherbish,A.,Steed,J.和Oudit,G.Y.(2012)ω-3多不饱和脂肪酸在心力衰竭中的应用:在糖尿病患者中的重要作用(The use of ω-3poly-unsaturated fatty acids in heart failure:a preferential role in patients with diabetes).Cardiovascular drugs and therapy,26,311-320.

[2061] 201.Keermann,M.,Kõks,S.,Reimann,E.,Prans,E.,Abram,K.和Kingo,K.(2015)牛皮癣的转录环境确定了IL36和IL36RN的参与(Transcriptional landscape of psoriasis identifies the involvement of IL36and IL36RN).BMC genomics,16,1.

[2062] 202.Khasar,S.G.,M.S.Gold,和J.D.Levine.抗河豚毒素的钠电流介导大鼠的炎症性疼痛(A tetrodotoxin-resistant sodium current mediates inflammatory pain in the rat).Neurosci Lett,1998,256:17-20.

[2063] 203.Kim,S.V.,Xiang,W.V.,Kwak,C.,Yang,Y.,Lin,X.W.,Ota,M.,Sarpel,U.,Rifkin,D.B.,Xu,R.和Littman,D.R.(2013)GPR15介导的归巢控制大肠黏膜的免疫稳态(GPR15-mediated homing controls immune homeostasis in the large intestine

mucosa).Science,340,1456-1459.

[2064] 204.Kim,Y.-J.,Sano,T.,Nabetani,T.,Asano,Y.和Hirabayashi,Y.(2012)GPRC5B激活肥胖细胞中与肥胖相关的炎症信号(GPRC5B activates obesity-associated inflammatory signalling in adipocytes).Sci.Signal.,5,ra85-ra85.

[2065] 205.Kitagawa K等人(2004)阻断CCR2可改善肾脏进行性纤维化(Blockade of CCR2 Ameliorates Progressive Fibrosis in Kidney),American Journal of Pathology,165:237-246.

[2066] 206.Knowles,J.W.等人(2000)依那普利治疗可改善eNOS(-/-)ApoE(-/-)小鼠的动脉粥样硬化和肾功能不全(Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)ApoE(-/-)mice are ameliorated by cnalapril treatment).J Clin Invest,105:451-458.

[2067] 207.Kodera,R.,Shikata,K.,Kataoka,H.,Takatsuka,T.,Miyamoto,S.,Sasaki,M.,Kajitani,N.,Nishishita,S.,Sarai,K.和Hirota,D.(2011)胰高血糖素样肽1受体激动剂通过抗炎作用改善肾损伤,而不会降低1型糖尿病大鼠模型的血糖水平(Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model oftype1diabetes).Diabetologia,54,965-978.

[2068] 208.Kononikhin,A.,Fedorchenko,K.Y.,Ryabokon,A.,Starodubtseva,N.,Popov,I.,Zavialova,M.,Anaev,E.,Chuchalin,A.,Varfolomeev,S.和Nikolaev,E.(2016)呼出气冷凝物的蛋白质组学分析,用于呼吸系统疾病的诊断(Proteomic analysis of exhaled breath condensate for diagnostics of respiratory system diseases).Biochemistry(Moscow)Supplement Series B:Biomedical Chemistry,10,230-234.

[2069] 209.Kottyan,L.C.,Collier,A.R.,Cao,K.H.,Niese,K.A.,Hedgebeth,M.,Radu,C.G.,Witte,O.N.,Hershey,G.K.K.,Rothenberg,M.E.和Zimmermann,N.(2009)酸性pH以cAMP和GPR65依赖性增加嗜酸性粒细胞的活力(Eosinophil viability is increased by acidic pH in a cAMP-and GPR65-dependent manner).Blood,114,2774-2782.

[2070] 210.Krishnamoorthy,S.,Recchiuti,A.,Chiang,N.,Fredman,G.和Serhan,C.N.(2012)Resolvin D1受体的立体选择性和炎症调节及microRNA的调控(Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving microRNAs).The American journal of pathology,180,2018-2027.

[2071] 211.Krishnamoorthy,S.,Reechiuti,A.,Chiang,N.,Yacoubian,S.,Lee,C.-H.,Yang,R.,Petasis,N.A.和Serhan,C.N.(2010)Resolvin D1结合人类吞噬细胞并具有可分辨受体的证据(Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors).Proeecdings of the National Academy of Sciences,107,1660-1665.

[2072] 212.Kruse,A.C.,Ring,A.M.,Manglik,A.,Hu,J.,Hu,K.,Eitel,K.,Hubner,H.,Pardon,E.,Valant,C.,Sexton,P.M.,Christopoulos,A.,Felder,C.C.,Gmeiner,P.,Steyaert,J.,Weis,W.I.,Garcia,K.C.,Wess,J.和Kobilka,B.K.(2013)毒蕈碱乙酰胆碱受体的激活和变构调节(Activation and allosteric modulation of a muscarinic

acetylcholine receptor).Nature,504,101-106.

[2073] 213.Kuduk,S.D.,和M.G.Bock.缓激肽B1受体拮抗剂作为新型镇痛药:所选药物化学进展的回顾(Bradykinin B1 receptor antagonists as novel analgesics:a retrospective of selected medicinal chemistry developments).Curr Top Med Chem,2008,8:1420-30.

[2074] 214.Kufareva,I.,Salanga,C.L.和Handel,T.M.(2015)趋化因子和趋化因子受体的结构和相互作用:对治疗策略的影响(Chemokine and chemokine receptor structure and interactions:implications for therapeutic strategies).Immunol Cell Biol,93,372-383.

[2075] 215.Kunikata,T.,Yamane,H.,Segi,E.,Matsuoka,T.,Sugimoto,Y.,Tanaka,S.,Tanaka,H.,Nagai,H.,Ichikawa,A.和Narumiya,S.(2005)前列腺素E受体亚型EP3抑制过敏性炎症(Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3).Nature immunology,6,524-531.

[2076] 216.Kupp,L.I.,Kosco,M.H.,Schenkein,H.A.和Tew,J.G.(1991)生发中心B细胞对C5a的趋化性(Chemotaxis of germinal centers B cells in response to C5a).European journal of immunology,21,2697-2701.

[2077] 217.Kwon,J.Y.,Park,M.K.,Seo,Y.R.和Song,J.-J.(2014)基于基因组的新型潜在生物标志物和分子信号网络的识别,可响应人中耳上皮细胞中的柴油机废气颗粒(Genomic-based identification of hovel potential biomarkers and molecular signalling networks in response to diesel exhaust particles in human middle ear epithelial cells).Molecular and Cellular Toxicology,10,95-105.

[2078] 218.Lafrance,M.,Roussy,G.,Belleville,K.,Maeno,H.,Beaudet,N.,Wada,K.和Sarret,P.(2010)NTS2受体参与应激性镇痛(Involvement of NTS2receptors in stress-induced analgesia).Neuroscience,166,639-652.

[2079] 219.Laird,J.M.,Olivar,T.,Lopez-Garcia,J.A.,Maggi,C.A.和Cervero,F.(2001)大鼠脊髓神经元对发炎结肠扩张的反应:速激肽NK2受体的作用(Responses of rat spinal neurons to distension of inflamed colon:role of tachykinin NK2 receptors).Neuropharmacology,40,696-701.

[2080] 220.Lamas,O.,Martinez,J.A.和Marti,A.(2003)β3-肾上腺素能激动剂对饮食诱导(食堂)肥胖动物免疫反应的影响(Effects ofa β3-adrenergic agonist on the immune response in diet-induced(cafeteria)obese animals).Journal of Physiology and Biochemistry,59,183-191.

[2081] 221.Lattin,J.E.,Schroder,K.,Su,A.I.,Walker,J.R.,Zhang,J.,Wiltshire,T.,Saijo,K.,Glass,C.K.,Hume,D.A.和Kellie,S.(2008)G蛋白偶联受体在小鼠巨噬细胞中的表达分析(Expression analysis of G Protein-Coupled Receptors in mouse macrophages).Immunome research,4,1.

[2082] 222.Laukova,M.,Vargovic,P.,Krizanova,O.和Kvetnansky,R.(2010)重复应激下调大鼠脾脏中的β2-和α2C-肾上腺素能受体并上调IL-6的基因表达(Repeated Stress Down-Regulates β2-and α2C-Adrenergic Receptors and Up-Regulates Gene

Expression of IL-6in the Rat Spleen).Cellular and Molecular Neurobiology,30,1077-1087.

[2083] 223.Lazennec,G.和Richmond,A.(2010)趋化因子和趋化因子受体:癌症相关炎症的新见解(Chemokines and chemokine receptors:new insights into cancer-related inflammation).Trends in molecular medicine,16,133-144.

[2084] 224.Leeb-Lundberg,L.M.,Marceau,F.,Muller-Esterl,W.,Pettibone,D.J.和Zuraw,B.L.(2005)International union ofpharmacology.XLV.激肽受体家族的分类:从分子机制到病理生理后果(Classification of the kinin receptor family:from molecular mechanisms to pathophysiological consequences).Pharmacol Rev,57,27-77.

[2085] 225.Le Poul,E.,Loison,C.,Struyf,S.,Springael,J.-Y.,Lannoy,V.,Decobecq,M.-E.,Brezillon,S.,Dupriez,V.,Vassart,G.和Van Damme,J.(2003)人短链脂肪酸受体的功能表征及其在多形核细胞激活中的作用(Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation).Journal of Biological Chemistry,278,25481-25489.

[2086] 226.Le,Y.,Gong,W.,Li,B.,Dunlop,N.M.,Shen,W.,Su,S.B.,Richard,D.Y.和Wang,J.M.(1999)通过合成六肽WKYMVm,利用两个七跨膜,G蛋白偶联受体,甲酰肽受体样1和甲酰肽受体来激活人吞噬细胞(Utilization of two seven-transmembrane,G protein-coupled receptors,formyl peptide receptor-like 1 and formyl peptide receptor,by the synthetic hexapeptide WKYMVm for human phagocyte activation).The Journal of Immunology,163,6777-6784.

[2087] 227.Leclerc E,Fritz G,Weibel M,Heizmann CW,Galichet A.(2007)S100B和S100A6通过与不同的RAGE(渐进性糖化终极产物受体)免疫球蛋白结构域相互作用,差异性地调节细胞存活(S100B and S100A6differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE(receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains).J Biol Chem,282:31317-31331.

[2088] 228.Leclerc,E.和Vetter,S.W.(2015)S100蛋白及其受体RAGE在胰腺癌中的作用(The role of S100proteins and their receptor RAGE in pancreatic cancer).Biochimica et biophysica acta,1852:2706-2711.

[2089] 229.Lee,B.-C.,Cheng,T.,Adams,G.B.,Attar,E.C.,Miura,N.,Lee,S.B.,Saito,Y.,Olszak,I.,Dombkowski,D.和Olson,D.P.(2003)P2Y样受体GPR105(P2Y14)识别并介导骨髓造血干细胞的趋化性(P2Y-like receptor,GPR105(P2Y14),identifies and mediates chemotaxis of bone-marrowhematopoietic stem cells).Genes and development,17,1592-1604.

[2090] 230.Lee,B.-Y.,Cho,S.,Shin,D.H.和Kim,H.(2011)韩国相关资源(KARE)队列中与肺功能测量相关的拷贝数变异的全基因组关联研究(Genome-wide association study of copy number variations associated with pulmonary function measures in Korea Associated Resource(KARE)cohorts).Genomics,97,101-105.

[2091] 231.Lee,J.E.,Hong,E.J.,Nam,H.Y.,Kim,J.W.,Han,B.G.和Jeon,J.P.(2011)与EBV转化的淋巴母细胞细胞系永生化相关的MicroRNA标记及其临床特征(MicroRNA signatures associated with immortalization of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines and their clinical traits).Cell proliferation,44,59-66.

[2092] 232.Lee,M.A.,Bohm,M.,Paul,M.,和Ganten,D.(1993)组织肾素-血管紧张素系统,它们在心血管疾病中的作用(Tissue renin-angiotensin systems.Their role in cardiovascular disease).Circulation,87:IV7-13.

[2093] 233.Leeb-Lundberg,L.M.,F.Marceau,W.Muller-Esterl,D.J.Pettibone,和B.L.Zuraw.(2005)International Union ofPharmacology.XLV.激肽受体家族的分类:从分子机制到病理生理后果(Classification of the kinin receptor family:from molecular mechanisms to pathophysiological consequences).Pharmacol Rev,57:27-77.

[2094] 234.Levite,M.,Chowers,Y.,Ganor,Y.,Besser,M.,Hershkovits,R.和Cahalon,L.(2001)多巴胺与其正常人T细胞上的D3和D2受体直接相互作用,并激活β1整合素功能(Dopamine interacts directly with its D3 and D2receptors on normal human T cells,and activates β1 integrin function).European journal of immunology,31,3504-3512.

[2095] 235.Li C.,Pazgier M.,Li J.,Li C.,Liu M.,Zou G.,Li Z.,Chen J.,Tarasov S.G.,Lu W.Y.,Lu W.肽模拟逆向异构化的局限性(Limitations ofpeptide retro-inverso isomerization in molecular mimicry).J Biol Chem,2010,285:19572-19581.

[2096] 236.LiX.C.,和Zhuo J,L.(2008)核因子-κB作为激素的细胞内信号转导分子:专注于血管紧张素II诱导的心血管和肾脏损伤(Nuclear factor-kappaB as a hormonal intracellular signalling molecule:focus on angiotensin II-induced cardiovascular and renal injury).Current opinion in nephrology and hypertension.17:37-43

[2097] 237.Li,X.和Tai,H.H.(2013)血栓烷A2受体(TP)的激活增加了单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)/趋化因子(C-C基序)配体2(CCL2)的表达,并募集巨噬细胞来促进肺癌细胞的侵袭(Activation of thromboxane A2receptor(TP)increases the expression of monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)/chemokine(C-C motif)ligand 2(CCL2) and recruits macrophages to promote invasion of lung cancer cells).PLoS One,8,e54073.

[2098] 238.Liang,M.,Niu,J.,Zhang,L.,Deng,H.,Ma,J.,Zhou,W.,Duan,D.,Zhou,Y.,Xu,H.和Chen,L.(2016)基因表达谱揭示早期和晚期发作先兆子痫之间G蛋白偶联受体信号通路中的不同分子模式(Gene expression profiling reveals different molecular pattems in G-protein coupled receptor signalling pathways between early-and late-onset preeclampsia).Placenta,40,52-59.

[2099] 239.Lin,C.-I.,Chen,C.-N.,Lin,P.-W.,Chang,K.-J.,Hsieh,F.-J.和Lee,H.(2007)溶血磷脂酸通过LPA 1和LPA 3调节人内皮细胞中的炎症相关基因(Lysophosphatidic acid regulates inflammation-related genes in human

endothelial cells through LPA 1 and LPA 3).Biochemical and biophysical research communications,363,1001-1008.

[2100] 240.Lin,E.-J.D.,Sainsbury,A.,Lee,N.J.,Boey,D.,Couzens,M.,Enriquez,R.,Slack,K.,Bland,R.,During,M.J.和Herzog,H.(2006)Y1,Y2和Y4受体的联合缺失可防止下丘脑神经肽Y过度表达引起的高胰岛素血症,尽管持续存在食欲亢进和肥胖(Combined deletion of Y1,Y2,and Y4 receptors prevents hypothalamic neuropeptide Y overexpression-induced hyperinsulinemia despite persistence of hyperphagia and obesity).Endocrinology,147,5094-5101.

[2101] 241.Lin,H.H.,Faunce,D.E.,Stacey,M.,Terajewicz,A.,Nakamura,T.,Zhang-Hoover,J.,Kerley,M.,Mucenski,M.L.,Gordon,S.和Stein-Streilein,J.(2005)巨噬细胞F4/80受体是诱导外周耐受中抗原特异性传出的调节性T细胞所必需的(The macrophage F4/80receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance).J Exp Med,201,1615-1625.

[2102] 242.Ling,P.,Ngo,K.,Nguyen,S.,Thurmond,R.L.,Edwards,J.P.,Karlsson,L.和Fung-Leung,W.P.(2004)组胺H4受体介导嗜酸性粒细胞趋化性与细胞形态变化和粘附分子上调(Histamine H4receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation).British journal of pharmacology,142,161-171.

[2103] 243.Liu,C.,Kuei,C.,Sutton,S.,Chen,J.,Bonaventure,P.,Wu,J.,Nepomuceno,D.,Kamme,F.,Tran,D.-T.和Zhu,J.(2005)INSL5是GPCR142(GPR100)的高亲和力特异性激动剂(INSL5 is a high affinity specific agonist for GPCR142(GPR100)).Journal of Biological Chemistry,280,292-300.

[2104] 244.Liu,J.,Escher,A.,工程性分泌的海肾荧光素酶提高的测定灵敏度(Improved assay sensitivity of an engineered secreted Renilla luciferase),Gene,1999,237(1):153-9.

[2105] 245.Liu,S.,Qian,Y.,Li,L.,Wei,G.,Guan,Y.,Pan,H.,Guan,X.,Zhang,L.,Lu,X.和Zhao,Y.(2013)Lgr4基因缺陷增加了小鼠右旋糖酐硫酸钠引起的炎症性肠病的敏感性和严重性(Lgr4 gene deficiency increases susceptibility and severity of dextran sodium sulfate-induced inflammatory bowel disease in mice).Journal of Biological Chemistry,288,8794-8803.

[2106] 246.Liu,W.,Wacker,D.,Gati,C.,Han,G.W.,James,D.,Wang,D.,Nelson,G.,Weierstall,U.,Katritch,V.,Barty,A.,Zatsepin,N.A.,Li,D.,Messerschmidt,M.,Boutet,S.,Williams,G.J.,Koglin,J.E.,Seibert,M.M.,Wang,C.,Shah,S.T.,Basu,S.,Fromme,R.,Kupitz,C.,Rendek,K.N.,Grotjohann,I.,Fromme,P.,Kirian,R.A.,Beyerlein,K.R.,White,T.A.,Chapman,H.N.,Caffrey,M.,Spence,J.C.,Stevens,R.C.和Cherezov,V.(2013)G蛋白偶联受体的连续飞秒晶体学(Serial femtosecond crystallography of G protein-coupled receptors).Science,342,1521-1524.

[2107] 247.Logsdon,C.D.,Fuentes,M.K.,Huang,E.H.和Arumugam,T.(2007)癌症中的RAGE和RAGE配体(RAGE and RAGE ligands in cancer).Current molecular medicine,7:

777-789.

[2108] 248.Lu,D.,Zhao,Y.,Tawatao,R.,Cottam,H.B.,Sen,M.,Leoni,L.M.,Kipps,T.J.,Corr,M.和Carson,D.A.(2004)Wnt信号通路在慢性淋巴细胞白血病中的激活(Activation of the Wnt signalling pathway in chronic lymphocytic leukemia).Proceedings of the National Academy of Sciences ofthe United States of Amcrica,101,3118-3123.

[2109] 249.Lu,M.C.,Lai,N.S.,Yu,H.C.,Huang,H.B.,Hsieh,S.C.和Yu,C.L.(2010)抗瓜氨酸化蛋白抗体结合单核细胞/巨噬细胞上表面表达的瓜氨酸化Grp78,并刺激肿瘤坏死因子α的产生(Anti-citrullinated protein antibodies bind surface-expressed citrullinated Grp78on monocyte/macrophages and stimulate tumor necrosis factor α production).Arthritis and Rheumatism,62,1213-1223.

[2110] 250.Lundequist,A.和Boyce,J.A.(2011)LPA5在人肥大细胞中大量表达,对溶血磷脂酸诱导的MIP-1 β释放很重要(LPA5is abundantly expressed by human mast cells and important for lysophosphatidic acid induced MIP-1β relcase).PLoS One,6,e18192.

[2111] 251.Ma,T.K.,Kam,K.K.,Yan,B.P.,Lam,Y.Y.,肾素-血管紧张素-醛固酮系统阻断对心血管疾病的现状(Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases:current status),Br J Pharmacol,2010,160:1273-1292.

[2112] 252.Maekawa,A.,Balestrieri,B.,Austen,K.F.和Kanaoka,Y.(2009)GPR17是半胱氨酰白三烯1受体对白三烯D4响应的负调节剂(GPR17is a negative regulator of the cysteinyl leukotriene 1 receptor response to leukotriene D4).Proceedings of the National Academy of Sciences,106,11685-11690.

[2113] 253.Malik,P.,Chaudhry,N.,Mittal,R.和Mukherjee,T.K.(2015)渐进性糖化终极产物受体在各种类型癌症的并发症和进展中的作用(Role of receptor for advanced glycation end products in the complication and progression of various types of cancers).Biochimica et biophysica acta,1850:1898-1904.

[2114] 254.Malki,A.,Fiedler,J.,Fricke,K.,Ballweg,I.,Pfaffl,M.W.和Krautwurst,D.(2015)I类气味受体TAS1R和TAS2R味觉受体是循环白细胞亚群的标志物(Class I odorant receptors,TAS1R and TAS2R taste receptors,are markers for subpopulations of circulating leukocytes).Journal of leukocyte biology,97,533-545.

[2115] 255.Malki,A.,Fiedler,J.,Fricke,K.,Ballweg,I.,Pfaffl,M.W.和Krautwurst,D.(2015)I类气味受体TAS1R和TAS2R味觉受体是循环白细胞亚群的标志物(Class I odorant receptors,TAS1R and TAS2R taste receptors,are markers for subpopulations of circulating leukocytes).Journal of leukocyte biology,97,533-545.

[2116] 256.Malki,A.,Fiedler,J.,Fricke,K.,Ballweg,I.,Pfaffl,M.W.和Krautwurst,D.(2015)I类气味受体TAS1R和TAS2R味觉受体是循环白细胞亚群的标志物(Class I odorant receptors,TAS1R and TAS2R taste receptors,are markers for

subpopulations of circulating leukocytes).Journal of leukocyte biology,97,533-545.

[2117] 257.Manigrasso,M.B.等人(2016)小分子抑制配体刺激的RAGE-DIAPH1信号转导(Small Molecule Inhibition of Ligand-Stimulated RAGE-DIAPH1 Signal Transduction).Scientific reports,6:22450.

[2118] 258.Manning,M.,Stoev,S.,Chini,B.,Durroux,T.,Mouillac,B.和Guillon,G.(2008)加压素和催产素V1a,V1b,V2和OT受体的肽和非肽激动剂和拮抗剂:研究工具和潜在的治疗剂(Peptide and non-peptide agonists and antagonists for the vasopressin and oxytocin V1a,V1b,V2and OT receptors:research tools and potential therapeutic agents).Prog Brain Res,170,473-512.

[2119] 259.Mao,Y.,Zhang,M.,Tuma,R.F.和Kunapuli,S.P.(2010)缺乏PAR4可减轻小鼠脑缺血/再灌注损伤(Deficiency of PAR4 attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in mice).Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism,30,1044-1052.

[2120] 260.Marazziti,D.,Ori,M.,Nardini,M.,Rossi,A.,Nardi,I.和Cassano,G.B.(2001)2C和5A型血清素受体在人静息淋巴细胞中的mRNA表达(mRNA expression of serotonin receptors of type 2C and 5A in human resting lymphocytes).Neuropsychobiology,43,123-126.

[2121] 261.Marinakis,E.,Bagkos,G.,Piperi,C.,Roussou,P.和Diamanti-Kandarakis,E.(2014)RAGE在肺生理和肿瘤发生中的关键作用:治疗干预的潜在目标?(Critical role of RAGE in lung physiology and tumorigenesis:a potential target of therapeutic intervention?)Clinical chemistry and laboratory medicine,52:189-200.

[2122] 262.Martinez,C.,Abad,C.,Delgado,M.,Arranz,A.,Juarranz,M.G.,Rodriguez-Henche,N.,Brabet,P.,Leceta,J.和Gomariz,R.P.(2002)在垂体腺苷酸环化酶激活多肽受体的败血性休克中的抗炎作用(Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor).Proceedings of the National Academy of Sciences,99,1053-1058.

[2123] 263.Martinez,F.O.,Gordon,S.,Locati,M.和Mantovani,A.(2006)人类单核细胞向巨噬细胞分化和极化的转录谱:新的分子和基因表达模式(Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization:new molecules and patterns ofgene expression).The Journal ofImmunology,177,7303-7311.

[2124] 264.Marvar,P.J.等人(2010)血管紧张素II诱导的高血压引起的T淋巴细胞活化和血管炎症的中枢和外周机制(Central and peripheral mechanisms of T-lymphocyte activation and vascular inflammation produced by angiotensin II-induced hypertension).Circ Res,107:263-270.

[2125] 265.Mas,V.,Maluf,D.,Archer,K.J.,Potter,A.,Suh,J.,Gehrau,R.,Descalzi,V.和Villamil,F.(2011)丙型肝炎病毒复发时的转录组可能预测肝移植后纤维化进展的严重性(Transcriptome at the time of hepatitis C virus recurrence may predict

the severity of fibrosis progression after liver transplantation).Liver Transplantation,17,824-835.

[2126] 266.Maslowski,K.M.,Vieira,A.T.,Ng,A.,Kranich,J.,Sierro,F.,Yu,D.,Schilter,H.C.,Rolph,M.S.,Mackay,F.和Artis,D.(2009)肠道菌群和趋化因子受体GPR43对炎症反应的调节(Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43).Nature,461,1282-1286.

[2127] 267.Masters,S.L.,Dunne,A.,Subramanian,S.L.,Hull,R.L.,Tannahill,G.M.,Sharp,F.A.,Becker,C.,Franchi,L.,Yoshihara,E.和Chen,Z.(2010)胰岛淀粉样多肽对NLRP3炎性体的激活为2型糖尿病的IL-1β增强提供了一种机制(Activation of the NLRP3inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1[beta]in type 2diabetes).Nature immunology,11,897-904.

[2128] 268.Matavelli,L.C.,Huang,J.和Siragy,H.M.(2011)血管紧张素AT2受体刺激抑制肾血管性高血压的早期肾脏炎症(Angiotensin AT2receptor stimulation inhibits early renal inflammation in renovascular hypertension).Hypertension,57,308-313.

[2129] 269.Matloubian,M.,Lo,C.G.,Cinamon,G.,Lesneski,M.J.,Xu,Y.,Brinkmann,V.,Allende,M.L.,Proia,R.L.和Cyster,J.G.(2004)胸腺和外周淋巴器官的淋巴细胞流出取决于S1P受体1(Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1).Nature,427,355-360.

[2130] 270.Matsumoto,M.,Saito,T.,Takasaki,J.,Kamohara,M.,Sugimoto,T.,Kobayashi,M.,Tadokoro,M.,Matsumoto,S.-i.,Ohishi,T.和Furuichi,K.(2000)在中枢神经系统中表达的进化保守的G蛋白偶联受体家族SREB(An evolutionarily conserved G-protein coupled receptor family,SREB,expressed in the central nervous system).Biochemical and biophysical research communications,272,576-582.

[2131] 271.Matsumura,T.,Oyama,M.,Kozuka-Hata,H.,Ishikawa,K.,Inoue,T.,Muta,T.,Semba,K.和Inoue,J.-i.(2010)酪氨酸磷酸化蛋白质组学鉴定BCAP-L作为TLR信号诱导巨噬细胞IL-6和IL-10产生的负调节剂(Identification of BCAP-L as a negative regulator of the TLR signalling-induced production of IL-6 and IL-10in macrophages by tyrosine phosphoproteomics).Biochemical and Biophysical Research Communications,400,265-270.

[2132] 272.Matsuoka,T.,M.Hirata,H.Tanaka,Y.Takahashi,T.Murata,和K.Kabashima.前列腺素D2介导过敏性哮喘(Prostaglandin D2as a mediator of allergic asthma).Science,2000,287:2013-7.

[2133] 273.Matteucci,C.,Minutolo,A.,Sinibaldi-Vallebona,P.,Palamara,A.T.,Rasi,G.,Mastino,A.和Garaci,E.(2010)胸腺素α-1体外处理后人淋巴细胞的转录特征(Transcription profile of human lymphocytes following in vitro treatment with thymosin alpha-1).Annals of the New York Academy of Sciences,1194,6-19.

[2134] 274.McPherson,J.A.,Barringhaus,K.G.,Bishop,G.G.,Sanders,J.M.,Rieger,J.M.,Hesselbacher,S.E.,Gimple,L.W.,Powers,E.R.,Macdonald,T.和Sullivan,G.

(2001)腺苷A2A受体刺激在小鼠颈动脉结扎模型中减少炎症和新内膜生长(Adenosine A2A receptor stimulation reduces inflammation and neointimal growth in a murine carotid ligation model).Arteriosclerosis,Thrombosis,and Vascular Biology,21,791-796.

[2135] 275.McQuiston,T.,Luberto,C.和Del Poeta,M.(2011)鞘氨醇-1-磷酸(S1P)和S1P受体2在肺泡巨噬细胞吞噬新隐球菌中的作用(Role of sphingosine-1-phosphate (S1P)and S1P receptor 2in the phagocytosis of Cryptococcus neoformans by alveolar macrophages).Microbiology,157,1416-1427.

[2136] 276.McVerry,B.J.,X.Peng,P.M.Hassoun,S.Sammani,B.A.Simon,和J.G.Garcia.鞘氨醇1-磷酸减少急性肺损伤的小鼠和犬模型的血管渗漏(Sphingosine 1-phosphate reduces vascular leak in murine and canine models of acute lung injury).Am J Respir Crit Care Med,2004,170:987-93.

[2137] 277.Mehta,D.,M.Konstantoulaki,G.U.Ahmmed,和A.B.Malik.鞘氨醇1-磷酸诱导的细胞内Ca2+的动员介导rac激活和粘附连接组装(Sphingosine 1-phosphate-induced mobilization of intracellular Ca2+mediates rac activation and adherens junction assembly in endothelial cells).J Biol Chem,2005,280:17320-8.

[2138] 278.Mellado,M.,Fernández-Agulló,T.,Rodríguez-Frade,J.M.,García San Frutos,M.,de laPeña,P.,Martínez-A,C.和Montoya,E.(1999)使用激动剂抗TRHR单克隆抗体分析促甲状腺激素释放激素受体(TRHR)在免疫系统中的表达(Expression analysis of the thyrotropin-releasing hormone receptor(TRHR)in the immune system using agonist anti-TRHR monoclonal antibodies).FEBS Letters,451,308-314.

[2139] 279.Michel,M.C.,Beck-Sickinger,A.,Cox,H.,Doods,H.N.,Herzog,H.,Larhammar,D.,Quirion,R.,Schwartz,T.和Westfall,T.(1998)十六.国际药理学联盟关于神经肽Y,肽YY和胰腺多肽受体命名的建议(XVI.International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y,peptide YY,and pancreatic polypeptide receptors).Pharmacol Rev,50,143-150.

[2140] 280.Minami,T.,H.Nakano,T.Kobayashi,Y.Sugimoto,F.Ushikubi,和A.Ichikawa.通过使用EP1和EP3受体敲除小鼠来表征负责前列腺素E2诱导的疼痛反应的EP受体亚型(Characterization of EP receptor subtypes responsible for prostaglandin E2-induced pain responses by use of EP1 and EP3receptor knockout mice).Br J Pharmacol,2001,133:438-44.

[2141] 281.Mitić,K.,Stanojević,S.,Kuštrimović,N.,Vujić,V.和Dimitrijević,M.(2011)神经肽Y调节大鼠炎症细胞的功能:Y1,Y2和Y5受体的不同作用(Neuropeptide Y modulates functions of inflammatory cells in the rat:Distinct role for Y1,Y2and Y5receptors).Peptides,32,1626-1633.

[2142] 282.Mitsuhashi,M.,Mitsuhashi,T.和Payan,D.(1989)组胺H2受体的多种信号通路,鉴定人HL-60早幼粒细胞白血病细胞中H2受体依赖性Ca2+动员途径(Multiple signalling pathways of histamine H2 receptors.Identification of an H2 receptor-dependent Ca2+mobilization pathway in human HL-60promyelocytic

leukemia cells).Journal of Biological Chemistry,264,18356-18362.

[2143] 283.Mo,J.,Yang,A.,Chen,Z.,Shao,T.,Zhang,Y.和Chen,Q.(2013)Neuronostatin改善牛磺胆酸钠引起的大鼠急性胰腺炎(Neuronostatin ameliorates sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in rats).Digestive diseases and sciences,58,2903-2907.

[2144] 284.Moore,D.J.,Chambers,J.K.,Wahlin,J.-P.,Tan,K.B.,Moore,G.B.,Jenkins,O.,Emson,P.C.和Murdock,P.R.(2001)人类P2Y受体亚型的表达模式:定量逆转录聚合酶链反应研究(Expression pattern of human P2Y receptor subtypes:a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study).Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Gene Structure and Expression,1521,107-119.

[2145] 285.Moriyama,M.,Sato,T.,Inoue,H.,Fukuyama,S.,Teranishi,H.,Kangawa,K.,Kano,T.,Yoshimura,A.和Kojima,M.(2005)神经肽Neuromedin U通过直接激活肥大细胞促进炎症(The neuropeptide neuromedin U promotes inflammation by direct activation of mast cells).The Journal of experimental medicine,202,217-224.

[2146] 286.Morooka H,Iwanaga Y,Tamaki Y,Takase T,Akahoshi Y,Nakano Y,Fujiki H,Miyazaki S.长期使用口服2型加压素受体拮抗剂托伐普坦对高血压性心力衰竭大鼠具有心肌和肾脏保护作用(Chronic administration of oral vasopressin type 2receptor antagonist tolvaptan exerts both myocardial and renal protective effects in rats with hypertensive heart failure).Circ Heart Fail,2012,5:484-92.

[2147] 287.Muir,A.I.,Chamberlain,L.,Elshourbagy,N.A.,Michalovich,D.,Moore,D.J.,Calamari,A.,Szekeres,P.G.,Sarau,H.M.,Chambers,J.K.和Murdock,P.(2001)AXOR12,一种新型人G蛋白偶联受体,被KiSS-1肽激活(AXOR12,a novel human G protein-coupled receptor,activated by the peptide KiSS-1).Journal of Biological Chemistry,276,28969-28975.

[2148] 288.Murata,T.,F.Ushikubi,T.Matsuoka,M.Hirata,A.Yamasaki,和Y.Sugimoto.缺乏前列环素受体的小鼠的疼痛感知和炎症反应改变(Altered pain perception and inflammator.y response in mice lacking prostacyclin receptor).Nature,1997,388:678-82.

[2149] 289.Murphy,P.M.,M.Baggiolini,I.F.Charo,C.A.Hebert,R.Horuk,和K.Matsushima.(2000)International Union of Pharmacology.XXII.趋化因子受体的命名法(Nomenclature for chemokine receptors).Pharmacol Rev,52:145-76.

[2150] 290.Mustafa,S.,Ayoub,M.A.and Pfleger,K.D.G.,(2010)揭示GPCR异构体偏向的配体(Uncovering GPCR heteromer-biasedligands).Drug Discov Today Technol,7:e77-e85.

[2151] 291.Mustafa,S.,See,H.B.,Seeber,R.M.,Armstrong,S.P.,White,C.W.,Ventura,S.,Ayoub,M.A.,和Pfleger,K.D.,新型α1A-肾上腺素受体-CXC趋化因子受体2异聚体的鉴定和分析(Identification and profiling of novel alpha1A-adrenoceptor-

CXC chemokine receptor 2heteromer),J Biol Chem,2012,287:12952-65.

[2152] 292.Nagamachi,M.,Sakata,D.,Kabashima,K.,Furuyashiki,T.,Murata,T.,Segi-Nishida,E.,Soontrapa,K.,Matsuoka,T.,Miyachi,Y.和Narumiya,S.(2007)前列腺素E受体EP1促进Th1介导的免疫反应(Facilitation of Th1-mediated immune response by prostaglandin E receptor EP1).The Journal of experimental medicine,204,2865-2874.

[2153] 293.Neeper,M.,Schmidt,A.M.,Brett,J.,Yan,S.D.,Wang,F.,Pan,Y.C.,Elliston,K.,Stern,D.,Shaw,A.,蛋白质渐进性糖化终极产物细胞表面受体的克隆和表达(Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins),J Biol Chem,1992,268:21,14998-5004.

[2154] 294.Németh,Z.H.,Lutz,C.S.,Csóka,B.,Deitch,E.A.,Leibovich,S.J.,Gause,W.C.,Tone,M.,Pacher,P.,Vizi,E.S.和Haskó,G.(2005)腺苷通过A2B受体介导的转录后机制增加巨噬细胞的IL-10产生(Adenosine augments IL-10production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism).The Journal of Immunology,175,8260-8270.

[2155] 295.Neumann,J.,Schaale,K.,Farhat,K.,Endermann,T.,Ulmer,A.J.,Ehlers,S.和Reiling,N.(2010)Frizzled1是炎性巨噬细胞的标志物,其配体Wnt3a参与了结核分枝杆菌感染巨噬细胞的重编程(Frizzledl is a marker of inflammatory macrophages,and its ligand Wnt3a is involved in reprogramming Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages).The FASEB Journal,24,4599-4612.

[2156] 296.Nichols,D.E.和Nichols,C.D.(2008)血清素受体(Serotonin receptors).Chem Rev,108,1614-1641.

[2157] 297.Nie,Y.,Ma,R.C.,Chan,J.C.,Xu,H.和Xu,G.(2012)葡萄糖依赖性促胰岛素肽通过诱导葡萄糖依赖性促胰岛素肽受体过表达的脂肪细胞中的脂肪细胞炎症而损害胰岛素信号传导(Glucose-dependent insulinotropic peptide impairs insulin signalling via inducing adipocyte inflammation in glucose-dependent insulinotropic peptide receptor-overexpressing adipocytes).The FASEB Journal,26,2383-2393.

[2158] 298.Niedemberg,A.,Tunaru,S.,Blaukat,A.,Ardati,A.和Kostenis,E.(2003)鞘氨醇1-磷酸和油酰磷脂酸是孤儿受体GPR63的低亲和力激动剂(Sphingosine 1-phosphate and dioleoylphosphatidic acid are low affinity agonists for the orphan receptor GPR63).Cellular Signalling,15,435-446.

[2159] 299.Nijmeijer,S.,Vischer,H.F.和Leurs,R.(2016)免疫学中的粘附GPCR(Adhesion GPCRs in immunology).Biochemical pharmacology.

[2160] 300.Nishio,R.,Matsumori,A.,Shioi,T.,Wang,W.,Yamada,T.,Ono,K.和Sasayama,S.(1998)β1肾上腺素能激动剂Denopamine可延长病毒性心肌炎诱发的充血性心力衰竭的鼠模型的存活:抑制心脏中肿瘤坏死因子-α的产生(Denopamine,aβ1-adrenergic agonist,prolongs survival in a murine model of congestive heart failure induced by viral myocarditis:suppression of tumor necrosis factor-α

production in the heart).Journal of the American College of Cardiology,32,808-815.

[2161] 301.Obinata,H.and Hla,T.,鞘氨醇1-磷酸在凝血和炎症中的作用(Sphingosine 1-phosphate in coagulation and inflammation),Semin Immunopathol,2012,34:73-91.

[2162] 302.Ohshima,S.,Yamaguchi,N.,Nishioka,K.,Mima,T.,Ishii,T.,Umeshita-Sasai,M.,Kobayashi,H.,Shimizu,M.,Katada,Y.和Wakitani,S.(2002)类风湿关节中骨桥蛋白的局部增强(Enhanced local production of osteopontin in rheumatoid joints).The Joumal of Rheumatology,29,2061-2067.

[2163] 303.Okamoto,K.,Imbe,H.,Morikawa,Y.,Itoh,M.,Sekimoto,M.,Nemoto,K.和Senba,E.(2002)感觉纤维外围分支中的5-HT 2A受体亚型与大鼠炎性疼痛的增强有关(5-HT2A receptor subtype in the peripheral branch of sensory fibers is involved in the potentiation of inflammatory pain in rats).Pain,99,133-143.

[2164] 304.Osborn,O.,McNelis,J.,Sanchez-Alavez,M.,Talukdar,S.,Lu,M.,Li,P.,Thiede,L.,Morinaga,H.,Kim,J.J.和Heinrichsdorff,J.(2012)G蛋白偶联受体21缺失可改善饮食诱发的肥胖小鼠的胰岛素敏感性(G protein-coupled receptor 21 deletion improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice).The Joumal ofclinical investigation,122,2444-2453.

[2165] 305.Othman,M.A.,Grygalewicz,B.,Pienkowska-Grela,B.,Rincic,M.,Rittscher,K.,Melo,J.B.,Carreira,I.M.,Meyer,B.,Marzena,W.和Liehr,T.(2015)成人B细胞前体急性淋巴细胞白血病涉及MLL基因的新型隐匿性重排(Novel Cryptic Rearrangements in Adult B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Involving the MLL Gene).Journal of Histochemistry and Cytochemistry,0022155415576201.

[2166] 306.Ott,C.等人,渐进性糖化终极产物在细胞信号转导中的作用(Role of advanced glycation end products in cellular signalling).Redox biology,2014,2:411-429.

[2167] 307.Paavonen,A.,Watson,A.M.,Li J.,Paavonen,K.,Koitka,A.,Calkin,A.C.,Barit,D.,Coughlan,M.T.,Drew,B.G.,Lancaster,G.I.,Thomas,M.,Forbes,J.M.,Nawroth,P.P.,Bierhaus A.,Cooper M.E.,和Jandeleit-Dahm K.A.渐进性糖化终极产物受体(RAGE)缺乏减弱了糖尿病的动脉粥样硬化的发展(Receptor for advanced glycation end products(RAGE)deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes),Diabetes.2008,57:2461-9.

[2168] 308.Panula,P.,Chazot,P.L.,Cowart,M.,Gutzmer,R.,Leurs,R.,Liu,W.L.,Stark,H.,Thurmond,R.L.和Haas,H.L.(2015)International Union of Basic and Clinical Pharmacology.XCVIII.组胺受体(Histamine Receptors).Pharmacol Rev,67,601-655.

[2169] 309.Park J等人(2008)MCP-1/CCR2系统参与高糖诱导的肾小球系膜细胞中纤连蛋白和IV型胶原的表达(MCP-1/CCR2system is involved in high glucose-induced

fibronectin and type IV collagen expression in cultured mesangial cells),Am J Physiol Renal Physiol,295:F749-F757.

[2170] 310.Park,L.等人(1998)渐进性糖化终极产物的可溶性受体抑制糖尿病加速性动脉粥样硬化(Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts).Nature medicine,4:1025-1031.

[2171] 311.Parker,H.,Habib,A.,Rogers,G.,Gribble,F.和Reimann,F.(2009)从原代鼠K细胞分泌葡萄糖依赖性促胰岛素多肽的营养成分(Nutrient-dependent secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide from primary murine K cells).Diabetologia,52,289-298.

[2172] 312.Pasternack,S.M.,von Kügelgen,I.,Al Aboud,K.,Lee,Y.-A.,Rüschendorf,F.,Voss,K.,Hillmer,A.M.,Molderings,G.J.,Franz,T.和Ramirez,A.(2008)G蛋白偶联受体P2Y5及其配体LPA参与维持人的头发生长(G protein-coupled receptor P2Y5and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth).Nature genetics,40,329-334.

[2173] 313.Patel,Y.C.(1999)生长抑素及其受体家族(Somatostatin and its receptor family).Front Neuroendocrinol,20,157-198.

[2174] 314.Peluso,J.,LaForge,K.S.,Matthes,H.W.,Kreek,M.J.,Kiefier,B.L.和Gavériaux-Ruff,C.(1998)hociceptin/orphanin FQ受体转录本在人中枢神经系统和免疫细胞中的分布(Distribution of nociceptin/orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells).Journal of neuroimmunology,81,184-192.

[2175] 315.Peng,Y.-M.,van de Garde,M.D.,Cheng,K.-F.,Baars,P.A.,Remmerswaal,E.B.,van Lier,R.A.,Mackay,C.R.,Lin,H.-H.和Hamann,J.(2011)人类细胞毒性淋巴细胞对GPR56的特异性表达(Specific expression of GPR56by human cytotoxic lymphocytes).Journal of leukocyte biology,90,735-740.

[2176] 316.Perret,G.,Valensi,P.,Hugues,J.N.,Vassy,R.和Uzzan,B.(1988)使用药代动力学模型表征人的促甲状腺激素(TSH)和催乳激素(PRL)对促甲状腺激素释放激素(THR)的反应(Use of a pharmacokinetic model to characterize the thyrotropin(TSH)and prolactin(PRL)response to thyrotropin-releasing hormone(THR)in man).Methods and findings in experimental and clinical pharmacology,10,387-391.

[2177] 317.Petersen,H.和Myren,J.(1974)促胰液素在健康和慢性胰腺炎中的剂量反应(Secretin dose-response in health and chronic pancreatic inflammatory disease).Scandinavian journal of gastroenterology,10,851-861.

[2178] 318.Pfleger,K.D.和Eidne,K.A.(2006)使用生物发光共振能量转移(BRET)探究蛋白质-蛋白质相互作用(Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer(BRET)).Nat Methods 3,165-174.

[2179] 319.Piirainen,H.,Ashok,Y.,Nanekar,R.T.和Jaakola,V.P.(2011)腺苷受体的结构特征:从晶体到功能(Structural features of adenosine receptors:from crystal to function).Biochim Biophys Acta,1808,1233-1244.

[2180] 320.Pillai,S.G.,Cousens,D.J.,Barnes,A.A.,Buckley,P.T.,Chiano,M.N.,Hosking,L.K.,Cameron,L.-A.,Fling,M.E.,Foley,J.J.和Green,A.(2004)CYSLT2受体中与LTD4亲和力降低的编码多态性与哮喘相关(A coding polymorphism in the CYSLT2receptor with reduced affinity to LTD4is associated with asthma).Pharmacogenetics and Genomics,14,627-633.

[2181] 321.Piomelli,D.,A.Giuffrida,A.Calignano,和F.Rodriguez de Fonseca.内大麻素系统作为治疗药物的靶标(The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs).Trends Pharmacol Sci,2000,21:218-24.

[2182] 322.Poloso,N.J.,Urquhart,P.,Nicolaou,A.,Wang,J.和Woodward,D.F.(2013)PGE 2取决于受体的使用(EP 2/EP 4)差异调节单核细胞衍生的树突状细胞细胞因子反应(PGE2differentially regulates monocyte-derived dendritic cell cytokine responses depending on receptor usage(EP 2/EP 4)).Molecular immunology,54,284-295.

[2183] 323.Powell,W.S.和Rokach,J.(2013)嗜酸性粒细胞趋化因子5-氧代-ETE和OXE受体(The eosinophil chemoattractant 5-oxo-ETE and the OXE receptor).Progress in lipid research,52,651-665.

[2184] 324.Putranto EW,Murata H,Yamamoto K,Kataoka K,Yamada H,Futami J,Sakaguchi M,Huh NH(2013)通过PEI阳离子化通过抑制剂肽的细胞内递送抑制RAGE信号传导(Inhibition of RAGE signalling through the intracellular delivery of inhibitor peptides by PEI cationization).Int J Mol Med.,32,938-944.

[2185] 325.Qin,L.,Kufareva,I.,Holden,L.G.,Wang,C.,Zheng,Y.,Zhao,C.,Fenalti,G.,Wu,H.,Han,G.W.,Cherezov,V.,Abagyan,R.,Stevens,R.C.和Handel,T.M.(2015)结构生物学.趋化因子受体CXCR4与病毒趋化因子复合物的晶体结构(Structural biology.Crystal structure of the chemokine receptor CXCR4in complex with a viral chemokine).Science,347,1117-1122.

[2186] 326.Qu,L.,Fan,N.,Ma,C.,Wang,T.,Han,L.,Fu,K.,Wang,Y.,Shimada,S.G.,Dong,X.和LaMotte,R.H.(2014)在炎症性瘙痒和疼痛模型中增强了MRGPRA3和MRGPRD阳性nociceptor的兴奋性(Enhanced excitability of MRGPRA3-and MRGPRD-positive nociceptors in a model of inflammatory itch and pain).Brain,137,1039-1050.

[2187] 327.Quigley,D.A.,To,M.D.,Pérez-Losada,J.,Pelorosso,F.G.,Mao,J.-H.,Nagase,H.,Ginzinger,D.G.和Balmain,A.(2009)小鼠皮肤炎症和肿瘤易感性的遗传结构(Genetic architecture of mouse skin inflammation and tumour susceptibility).Nature,458,505-508.

[2188] 328.Raether H.光滑和粗糙表面以及格栅上的表面等离子(Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings),Series Springer Tracts in Modern Physics,1988,Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

[2189] 329.Rai V,Maldonado AY,Burz DS,Reverdatto S,Schmidt AM和Shekhtman A;渐进性糖化终极产物受体(RAGE)的信号转导(Signal Transduction in Receptor for Advanced Glycation End Products(RAGE)),J Biol Chem,2012,287:5133-44.

[2190] 330.Rajagopalan,S.,Kurz,S.,Munzel,T.,Tarpey,M.,Freeman,B.A.,Griendling,K.K.and Harrison,D.G.,(1996)大鼠血管紧张素II介导的高血压通过膜NADH/NADPH氧化酶激活增加了血管超氧化物的产生.对血管舒缩张力改变的贡献(Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation.Contribution to alteratiohs of vasomotor tone),J Clin Invest.,97:1916-23.

[2191] 331.Ramasamy R,Shekhtman A,Schmidt AM,RAGE的多面性-在衰老和慢性疾病中进行治疗性干预的机会(The multiple faces of RAGE-opportunities for therapeutic intervention in aging and chronic disease).Expert Opin Ther Targets,2016,20:431-446.

[2192] 332.Ramasamy,R.和Schmidt,A.M.渐进性糖化终极产物受体(RAGE)及其对心力衰竭的病理生理学的影响(Receptor for advanced glycation end products(RAGE)and implicatiohs for the pathophysiology of heartfailure).Current heart failure reports,2012,9:107-116.

[2193] 333.Rao V等人(2006)巨噬细胞金属弹性蛋白酶在与Alport综合征相关的肾小球基底膜损伤中的作用(Role for Maerophage Metalloelastase in Glomerular Basement Membrane Damage Associated with Alport Syndrome),American Journal of Pathology,169:32-46.

[2194] 334.Rao,S.,Garrett-Sinha,L.A.,Yoon,J.和Simon,M.C.(1999)Ets因子PU.1和Spi-B调节P2Y10(一种淋巴受限的七螺旋受体)的体内转录(The Ets Factors PU.1and Spi-B Regulate the Transcriptionin Vivo of P2Y10,a Lymphoid Restricted Heptahelical Receptor).Journal of Biological Chemistry,274,34245-34252.

[2195] 335.Ray,R.,Juranek,J.K.和Rai,V.RAGE轴在神经炎症,神经变性及其在肌萎缩性侧索硬化症发病机理中的新兴作用(RAGE axis in neuroinflammation,neurodegeneration and its emerging role in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis).Neuroscience and biobehavioral reviews,2016,62:48-55.

[2196] 336.Rebeck,G.W.,Maynard,K.I.,Hyman,B.T.和Moskowitz,M.A.(1994)三叉神经节中选择性5-HT1D α血清素受体基因表达:对偏头痛药物开发的影响(Selective 5-HT1D alpha serotonin receptor gene expression in trigeminal ganglia:implications for antimigraine drug development).Proceedings of the National Academy of Sciences,91,3666-3669.

[2197] 337.Rees,S.,den Daas,I.,Foord,S.,Goodson,S.,Bull,D.,Kilpatrick,G.和Lee,M.(1994)人5-HT5A5-羟色胺受体的克隆与鉴定(Cloning and characterisation of the human 5-HT5A serotonin receptor).FEBS letters,355,242-246.

[2198] 338.Robinson,L.J.,Tourkova,I.,Wang,Y.,Sharrow,A.C.,Landau,M.S.,Yaroslavskiy,B.B.,Sun,L.,Zaidi,M.和Blair,H.C.(2010)人类单核细胞和破骨细胞中FSH受体亚型和FSH依赖性基因转录(FSH-receptor isoforms and FSH-dependent gene transcription in human monocytes and osteoclasts).Biochemical and biophysical research communications,394,12-17.

[2199] 339.Rollins,B.J.(1996)单核细胞趋化蛋白1:炎性疾病中单核细胞募集的潜在调节剂(Monoeyte chemoattractant protein 1:a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease).Mol.Med.Today,2:198-204.

[2200] 340.Rompler,H.,Schulz,A.,Pitra,C.,Coop,G.,Przeworski,M.,Paabo,S.和Schoneberg,T.(2005)趋化因子受体GPR33的上升和下降(The rise and fall of the chemoattractant receptor GPR33).Journal of Biological Chemistry.

[2201] 341.Rosen,H.,Gonzalez-Cabrera,P.J.,Sanna,M.G.和Brown,S.(2009)鞘氨醇1-磷酸受体信号传导(Sphingosine 1-phosphate receptor signalling).Annu Rev Biochem,78,743-768.

[2202] 342.Rossi,L.,Lemoli,R.M.和Goodell,M.A.(2013)Gpr171,一个推定的P2Y样受体,负调节鼠造血祖细胞中的髓样分化(Gpr171,a putative P2Y-like receptor, negatively regulates myeloid differentiation in murine hematopoietic progenitors).Experimental hematology,41,102-112.

[2203] 343.Roy A,Kucukural A,Zhang Y.I-TASSER:用于自动化蛋白质结构和功能预测的统一平台(I-TASSER:a unified platform for automated protein structure and function prediction).Nature Protocols,2010,5:725-738.

[2204] 344.Rubic,T.,Lametschwandtner,G.,Jost,S.,Hinteregger,S.,Kund,J.,Carballido-Perrig,N.,Schwärzler,C.,Junt,T.,Voshol,H.和Meingassner,J.G.(2008)触发树突状细胞上的琥珀酸受体GPR91增强免疫(Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity).Nature immunology,9,1261-1269.

[2205] 345.Russo,I.和Frangogiannis,N.G.糖尿病相关性心肌纤维化:细胞效应子,分子机制和治疗机会(Diabetes-associated cardiac fibrosis:Cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities).Journal of molecular and cellular cardiology,2016,90:84-93.

[2206] 346.Saban,R.,Saban,M.R.,Nguyen,N.-B.,Lu,B.,Gerard,C.,Gerard,N.P.和Hammond,T.G.(2000)抗原诱导的膀胱炎需要Neurokinin-1(NK-1)受体(Neurokinin-1(NK-1)receptor is required in antigeh-induced cystitis).The American journal of pathology,156,775-780.

[2207] 347.Sakaguchi M,Murata H,Yamamoto K,Ono T,Sakaguchi Y,Motoyama A,Hibino T,Kataoka K,Huh NH.(2011)TIRAP,TLR2/4的衔接蛋白,转导配体结合后磷酸化的RAGE信号(TIRAP,an adaptor protein for TLR2/4,transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding).PLoS One,6:e23132.

[2208] 348.Sakamoto,Y.,Inoue,H.,Kawakami,S.,Miyawaki,K.,Miyamoto,T.,Mizuta,K.和Itakura,M.(2006)Gprl19在小鼠和大鼠胰岛中的表达和分布:主要在胰分泌多肽的PP细胞中定位(Expression and distribution of Gprl19in the pancreatic islets of mice and rats:predominant localization in pancreatic polypeptide-secreting PP-cells).Biochemical and biophysical research communications,351,474-480.

[2209] 349.Salmon,A.-M.,Damaj,M.I.,Marubio,L.M.,Epping-Jordan,M.P.,Merlo-Pich,E.和Changeux,J.-P.(2001)αCGRP缺陷小鼠的阿片依赖和神经源性炎症伤害感受的

神经适应改变(Altered neuroadaptation in opiate dependence and neurogenic inflammatory nociception in αCGRP-deficient mice).Nature neuroscience,4,357-358.

[2210] 350.Sampaio,A.L.,Rae,G.A.和Maria dasGraças,M.(2004)内皮素ETA受体拮抗作用对LPS诱导的炎症中粒细胞和淋巴细胞积累的影响(Effects of endothelin ETA receptor antagonism on granulocyte and lymphocyte accumulation in LPS-induced inflammation).Journal of leukocyte biology,76,210-216.

[2211] 351.Sarkar,C.,Das,S.,Chakroborty,D.,Chowdhury,U.R.,Basu,B.,Dasgupta,P.S.和Basu,S.(2006)前沿:多巴胺D4受体的刺激通过抑制ERK1/ERK2磷酸化来上调Krüppel样因子2表达,从而诱导T细胞静止(Cutting edge:stimulation of dopamine D4receptors induce T cell quiescence by up-regulating Krüppel-like factor-2expression through Inhibition ofERK1/ERK2phosphorylation).The Journal of Immunology,177,7525-7529.

[2212] 352.Sasaki,Y.,Hoshi,M.,Akazawa,C.,Nakamura,Y.,Tsuzuki,H.,Inoue,K.和Kohsaka,S.(2003)Gi/o偶联的ATP受体P2Y12在大鼠脑小胶质细胞中的选择性表达(Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y12in microglia in rat brain).Glia,44,242-250.

[2213] 353.Sato,K.Z.,Fujii,T.,Watanabe,Y.,Yamada,S.,Ando,T.,Kazuko,F.和Kawashima,K.(1999)人单核白细胞和白血病细胞系中毒蕈碱型乙酰胆碱受体亚型和神经元烟碱型乙酰胆碱受体亚基的mRNA表达多样性(Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines).Neuroscience letters,266,17-20.

[2214] 354.Satoh,A.,Shimosegawa,T.,Satoh,K.,Ito,H.,Kohno,Y.,Masamune,A.,Fujita,M.和Toyota,T.(2000)腺苷A1-受体途径的激活诱导大鼠胰腺水肿的形成(Activation of adenosine A1-receptor pathway induces edema formation in the pancreas of rats).Gastroenterology,119,829-836.

[2215] 355.Schaub,A.,Futterer,A.和Pfeffer,K.(2001)PUMA-G,an IFN-gamma-inducible gene in macrophages is a novel member of the seven transmembrane spanning receptor superfamily.Eur J Immunol,31,3714-3725.

[2216] 356.Schiffmann,E.,Corcoran,B.A.和Wahl,S.M.(1975)N-甲酰基蛋氨酸肽作为白细胞的化学引诱剂(N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes).Proceedings of the National Academy of Sciences,72,1059-1062.

[2217] 357.Schmidhuber,S.M.,Rauch,I.,Kofler,B.和Brain,S.D.(2009)甘丙肽对炎症性水肿形成的调节作用是由鼠微血管中的甘丙肽受体3介导的证据(Evidence that the modulatory effect of galanin on inflammatory edema formation is mediated by the galanin receptor 3in the murine microvasculature).Journal of molecular neuroscience:MN,37,177-181.

[2218] 358.Schmidt,A.M.,Yan,S.D.,Wautier,J.L.和Stern,D.(1999)渐进性糖化终极

产物受体的激活:糖尿病性血管病和动脉粥样硬化中慢性血管功能障碍的机制(Activation of receptor for advanced glycation end products:a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis).Circ Res,84:489-497.

[2219] 359.Schmitz,F.,Schrader,H.,Otte,J.-M.,Schmitz,H.,Stüber,E.,Herzig,K.-H.和Schmidt,W.E.(2001)人外周血单核细胞中CCK-B/胃泌素受体剪接变体的鉴定(Identification of CCK-B/gastrin receptor splice variants in human peripheral blood mononuclear cells).Regulatory peptides,101,25-33.

[2220] 360.Schuelert,N.和McDougall,J.J.(2011)异常大麻素类似物O-1602通过假定的大麻素受体GPR55降低了急性关节炎大鼠模型的伤害感受(The abnormal cannabidiol analogue O-1602reduces nociception in a rat model of acute arthritis via the putative cannabinoid receptor GPR55).Neuroscience letters,500,72-76.

[2221] 361.Schwarze,S.R.,Hruska,K.A.,Dowdy,S.F.(2000)蛋白质转导:无限制地传递到所有细胞中?(Protein transduction:unrestricted delivery into all cells?)Trends Cell Biol,10:290-295.

[2222] 362.Shen,Z.-J.,Hu,J.,Esnault,S.,Dozmorov,I.和Malter,J.S.(2015)RNA Seq分析揭示了人类血液嗜酸性粒细胞中TGF-β靶基因的新型表达模式(RNA Seq profiling reveals a novel expression pattern of TGF-β target genes in human blood eosinophils).Immunology letters,167,1-10.

[2223] 363.Shen.J.,Huang.Y.M.,Wang.M.等人(2016)肾素-血管紧张素系统阻断癌和死亡风险(Renin-angiotensin system blockade for the risk of cancer and death).J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.8,17(3).

[2224] 364.Shihoya,W.,Nishizawa,T.,Okuta,A.,Tani,K.,Dohmae,N.,Fujiyoshi,Y.,Nureki,O.和Doi,T.(2016)内皮素-1激活内皮素ETB受体的机制(Activation mechanism of endothelin ETB receptor by endothelin-1).Nature,537,363-368.

[2225] 365.Sima,C.,Cheng,Q.,Rautava,J.,Levesque,C.,Sherman,P.和Glogauer,M.(2015)鉴定影响炎症介导的牙槽骨丢失的数量性状位点:牙周炎宿主生物膜失衡的多基因遗传的见解(Identification of quantitative trait loci influencing inflammation-mediated alveolar bone loss:insights into polygenic inheritance of host-biofilm disequilibria in periodontitis).Journal of periodontal research.

[2226] 366.Sjolander S和Urbaniczky C.集成的流体处理系统,用于生物分子相互作用分析(Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis).Anal.Chem.,1991,63:2338-2345.

[2227] 367.Sohn,S.-H.,Chung,H.-S.,Ko,E.,Jeong,H.-j.,Kim,S.-H.,Jeong,J.-H.,Kim,Y.,Shin,M.,Hong,M.和Bae,H.(2009)Nelumbinis精液在脂多糖刺激的BV-2小胶质细胞上的全基因组表达谱(The genome-wide expression profile of Nelumbinis semen on lipopolysaccharide-stimulated BV-2microglial cells).Biological and Pharmaceutical Bulletin,32,1012-1020.

[2228] 368.Solinski,H.J.,Petermann,F.,Rothe,K.,Boekhoff,I.,Gudermann,T.和Breit,A.(2013)人类Mas相关的G蛋白偶联受体X1诱导大鼠背根神经节神经元趋化因子受体2表达,并从人LAD-2肥大细胞系释放趋化因子配体2(Human Mas-Related G Protein-Coupled Receptors-X1 Induce Chemokine Receptor2 Expression in Rat Dorsal Root Ganglia Neurons and Release of Chemokine Ligand 2 from the Human LAD-2Mast Cell Line.)PLoS ONE,8,e58756.

[2229] 369.Sonobe,Y.,Nakane,H.,Watanabe,T.和Nakano,K.(2004)通过组胺的自分泌调节CD4+和CD8+ T淋巴细胞对Con A依赖性细胞因子的产生(Regulation of Con A-dependent cytokine production from CD4+and CD8+T lymphocytes by autosecretion of histamine).Inflammation Research,53,87-92.

[2230] 370.Sonoda,N.,Katabuchi,H.,Tashiro,H.,Ohba,T.,Nishimura,R.,Minegishi,T.和Okamura,H.(2005)黄体生成激素/绒毛膜促性腺激素受体变异体在绒毛膜绒毛巨噬细胞中的表达及绒毛膜促性腺激素的降解(Expression of variant luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors and degradation of chorionic gonadotropin in human chorionic villous macrophages).Placenta,26,298-307.

[2231] 371.Soro-Paavonen,A.,Watson,AM.,Thomas,M.C.等人(2008)渐进性糖化终极产物受体(RAGE)缺乏减弱糖尿病的动脉粥样硬化的发展(Receptor for advanced glycation end products(RAGE)deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes),Diabetes,57:2461-2469.

[2232] 372.Souza,D.G.,Lomez,E.S.L.,Pinho,V.,Pesquero,J.B.,Bader,M.,Pesquero,J.L.和Teixeira,M.M.(2004)缓激肽B2和B1受体在肠道缺血和再灌注损伤后的局部,远距离和全身炎症反应中的作用(Role of Bradykinin B2and B1Receptors in the Local,Remote,and Systemic Inflammatory Responses That Follow Intestinal Ischemia and Reperfusion Injury).The Journal of Immunology,172,2542-2548.

[2233] 373.Sparvero,L.J.等人(2009)RAGE(渐进性糖化终极产物受体)、RAGE配体及其在癌症和炎症中的作用(RAGE(Receptor for Advanced Glycation Endproducts),RAGE ligands,and their role in cancer and inflammation).Journal of translational medicine,7:17.

[2234] 374.Stacey,M.,Lin,H.-H.,Hilyard,K.L.,Gordon,S.和McKnight,A.J.(2001)包含人表皮生长因子(EGF)模块的粘蛋白样激素受体3是EGF-TM7家族的新成员,该家族可识别人巨噬细胞和活化的中性粒细胞上的配体(Human epidermal growth factor(EGF)module-containing mucin-like hormone receptor 3is a new member ofthe EGF-TM7 family that recognizes a ligand on human macrophages and activated neutrophils).Journal of Biological Chemistry,276,18863-18870.

[2235] 375.Stefulj,J.,Jernej,B.,Cicin-Sain,L.,Rinner,I.和Schauenstein,K.(2000)血清素受体在大鼠免疫组织细胞中的mRNA表达(mRNA expression of serotonin receptors in cells ofthe immune tissues ofthe rat).Brain,behavior,and immunity,14,219-224.

[2236] 376.Stockhammer,O.W.,Rauwerda,H.,Wittink,F.R.,Breit,T.M.,Meijer,A.H.

和Spaink,H.P.(2010)转录组分析Traf6在斑马鱼胚胎固有免疫反应中的功能(Transcriptome analysis of Traf6 function in the innate immune response of zebrafish embryos).Molecular immunology,48,179-190.

[2237] 377.Stoddart LA,Johnstone EKM,Wheal AJ,Goulding J,Robers MB,Machleidt T,Wood KV,Hill SJ和Pfleger KDG.BRET在监测配体与GPCR结合中的应用(Application of BRET to monitor ligand binding to GPCRs).Nat Methods,2015,12:661-663.

[2238] 378.Su P.C.,Berger B.W.(2013)一种评估对受体异二聚体重要的近膜和跨膜结构域相互作用的新方法(A novel assay for assessing juxtamembrane and transmembrane domain interactions important for receptor heterodimerization).J Mol Biol.425,4652-4658.

[2239] 379.Subramanian,H.,Gupta,K.,Guo,Q.,Price,R.和Ali,H.(2011)Mas相关基因X2(MrgX2)是人肥大细胞中抗菌肽LL-37的新型G蛋白偶联受体,可抵抗受体磷酸化,脱敏和内在化(Mas-related Gene X2(MrgX2)Is a Novel G Protein-coupled Receptor for the Antimicrobial Peptide LL-37in Human Mast Cells RESISTANCE TO RECEPTOR PHOSPHORYLATION,DESENSITIZATION,AND INTERNALIZATION).Journal of Biological Chemistry,286,44739-44749.

[2240] 380.Sugimoto,T.,Saito,M.,Mochizuki,S.,Watanabe,Y.,Hashimoto,S.和Kawashima,H.(1994)编码人V1b血管加压素受体的cDNA的分子克隆和功能表达(Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human V1b vasopressin receptor).Journal of Biological Chemistry,269,27088-27092.

[2241] 381.Sugimoto,Y.和Narumiya,S.(2007)前列腺素E受体(Prostaglandin E receptors).J Biol Chem,282,11613-11617.

[2242] 382.Sugo,T.,Tachimoto,H.,Chikatsu,T.,Murakami,Y.,Kikukawa,Y.,Sato,S.,Kikuchi,K.,Nagi,T.,Harada,M.和Ogi,K.(2006)肥大细胞上溶血磷脂酰丝氨酸受体的鉴定(Identification of a lysophosphatidylserine receptor on mast cells).Biochemical and biophysical research communications,341,1078-1087.

[2243] 383.Sukkar,M.B.等人,RAGE:慢性气道疾病的新领域(RAGE:a new frontier in chronic airways disease).British Journal ofPharmacology,2012,167:1161-1176.

[2244] 384.Sunuwar,L.,Medini,M.,Cohen,L.,Sekler,I.和Hershfinkel,M.(2016)锌敏感受体ZnR/GPR39触发结肠细胞中代谢型钙信号传导并调节实验性结肠炎中的闭合蛋白恢复(The zinc sensing receptor,ZnR/GPR39,triggers metabotropic calcium signalling in colonocytes and regulates occludin recovery in experimental colitis).Phil.Trans.R.Soc.B,371,20150420.

[2245] 385.Suzuki,T.,Won,K.-J.,Horiguchi,K.,Kinoshita,K.,Hori,M.,Torihashi,S.,Momotani,E.,Itoh,K.,Hirayama,K.和Ward,S.M.(2004)内皮素ETB受体无效大鼠的肌肉炎症和Cajal间质细胞的丢失(Muscularis inflammation and the loss of interstitial cells of Cajal in the endothelin ETB receptor null rat).American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology,287,G638-G646.

[2246] 386.Swan,C.,Duroudier,N.P.,Campbell,E.,Zaitoun,A.,Hastings,M.,Dukes,

G.E.,Cox,J.,Kelly,F.M.,Wilde,J.和Lennon,M.G.(2013)识别和测试肠易激综合征(IBS)中的候选基因多态性:与TNFSF15和TNFα的关联(Identifying and testing candidate genetic polymorphisms in the irritable bowel syndrome(IBS):association with TNFSF15and TNFα).Gut,62,985-994.

[2247] 387.Swaney,J.,Chapman,C.,Correa,L.,Stebbins,K.,Bundey,R.,Prodanovich,P.,Fagan,P.,Baccei,C.,Santini,A.和Hutchinson,J.(2010)新型口服活性LPA1受体拮抗剂可抑制小鼠博来霉素模型中的肺纤维化(A novel,orally active LPA1 receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model).British journal of pharmacology,160,1699-1713.

[2248] 388.Szabo,A.,Stolz,L.and Granzow,R.表面等离子体共振及其在生物分子相互作用分析中的应用(Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis(BIA)).Curr Opin Struct Biol,1995,5:699-705.

[2249] 389.Taguchi,A.等人(2000)RAGE-amphoterin信号传导的阻滞抑制肿瘤的生长和转移(Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases).Nature,405:354-360.

[2250] 390.Takayama,K.,Yuhki,K.,Ono,K.,Fujino,T.,Hara,A.,Yamada,T.,Kuriyama,S.,Karibe,H.,Okada,Y.,Takahata,O.,Taniguchi,T.,Iijima,T.,Iwasaki,H.,Narumiya,S.和Ushikubi,F.(2005)血栓烷A2和前列腺素F2α介导炎性心动过速(Thromboxane A2and prostaglandin F2alpha mediate inflammatory tachycardia).Nat Med,11,562-566.

[2251] 391.Takenouchi,R.,Inoue,K.,Kambe,Y.和Miyata,A.(2012)N-花生四烯酸甘氨酸通过GPR18诱导巨噬细胞凋亡(N-arachidonoyl glycine induces macrophage apoptosis via GPR18).Biochemical and biophysical research communicatiohs,418,366-371.

[2252] 392.Tan,Q.,Zhu,Y.,Li,J.,Chen,Z.,Han,G.W.,Kufareva,I.,Li,T.,Ma,L.,Fenalti,G.,Li,J.,Zhang,W.,Xie,X.,Yang,H.,Jiang,H.,Cherezov,V.,Liu,H.,Stevens,R.C.,Zhao,Q.和Wu,B.(2013)CCR5趋化因子受体-HIV进入抑制剂maraviroc复合物的结构(Structure of the CCR5chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex).Science,341,1387-1390.

[2253] 393.Taniyama,Y.,Suzuki,T.,Mikami,Y.,Moriya,T.,Satomi,S.和Sasano,H.(2005)生长抑素受体亚型在人体中的全身分布:免疫组织化学研究(Systemic distribution of somatostatin receptor subtypes in human:an immunohistochemical study).Endocrine journal,52,605-611.

[2254] 394.Taquet,N.,Philippe,C.,Reimund,J.-M.和Muller,C.D.(2012)炎性肠病G蛋白偶联受体(GPCR)表达谱与微流卡(Inflammaory Bowel Disease G-Protein Coupled Receptors(GPCRs)Expression Profiling with Microfluidic Cards).

[2255] 395.Taub,D.D.,Eisenstein,T.K.,Geller,E.B.,Adler,M.W.和Rogers,T.J.(1991)mu和κ选择性阿片类激动剂的免疫调节活性(Immunomodulatory activity of mu-and kappa-selective opioid agonists).Proceedings of the National Academy of Sciences,88,360-364.

[2256] 396.Tayebati,S.,Bronzetti,E.,Morra Di Cella,S.,Mulatero,P.,Rieci,A.,Rossodivita,I.,Schena,M.,Schiavone,D.,Veglio,F.和Amenta,F.(2000)人外周血淋巴细胞中α1-肾上腺素受体的原位杂交和免疫细胞化学(In situ hybridization and immunocytochemistry of alphal-adrenoceptors in human peripheral blood lymphocytes).Journal of autonomic pharmacology,20,305-312.

[2257] 397.Ter Beek,W.P.,Muller,E.S.,Van Den Berg,M.,Meijer,M.J.,Biemond,I.和Lamers,C.B.(2008)发炎和未发炎的小肠平滑肌,肌间神经丛和粘膜中胃动素受体的表达(Motilin receptor expression in smooth muscle,myenteric plexus,and mucosa of human inflamed and noninflamed intestine).Inflammatory bowel diseases,14,612-619.

[2258] 398.Tesch,G.H.(2008)MCP-1/CCL2:糖尿病肾病进行性肾损伤的新诊断标志物和治疗靶标(MCP-1/CCL2:a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy).Am J Physiol Renal Physiol,294:697-701.

[2259] 399.Teuscher,C.,Subramanian,M.,Noubade,R.,Gao,J.F.,Offner,H.,Zachary,J.F.和Blankenhorn,E.P.(2007)中枢组胺H3受体信号负调节中枢神经系统自身免疫性炎症疾病的易感性(Central histamine H3receptor signalling negatively regulates susceptibility to autoimmune inflammatory disease of the CNS).Proceedings of the National Academy of Sciences,104,10146-10151.

[2260] 400.Thal,D.M.,Sun,B.,Feng,D.,Nawaratne,V.,Leaeh,K.,Felder,C.C.,Bures,M.G.,Evans,D.A.,Weis,W.I.,Bachhawat,P.,Kobilka,T.S.,Sexton,P.M.,Kobilka,B.K.和Christopoulos,A.(2016)M1和M4毒蕈碱乙酰胆碱受体的晶体结构(Crystal structures of the M1 and M4muscarinic acetylcholine receptors).Nature,531,335-340.

[2261] 401.Theodoropoulou,M.和Stalla,G.K.(2013)生长抑素受体:从信号传导到临床实践(Somatostatin receptors:from signalling to clinical practice).Front Neuroendocrinol,34,228-252.

[2262] 402.Thoene-Reineke,C.,Rumschussel,K.,Schmerbach,K.等人,替米沙坦,雷米普利及其组合在不同大鼠中风模型中的预防和干预研究(Prevention and intervention studies with telmisartan,ramipril and their combination in different rat stroke models).PloS One,2011,6:e23646.

[2263] 403.Thomas,M.C.,Pickering,R.J.,Tsorotes,D.,Koitka,A.,Sheehy,K.,Bemardi,S.,ToffoliB.,Nguyen-Huu,T.P.,Head,G.A.,Fu,Y.,Chin-Dusting,J.,Cooper,M.E.,Tikellis C.(2010)基因Ace2缺乏症会加重ApoE基因敲除小鼠的血管炎症和动脉粥样硬化(Genetic Ace2deficiency accentuates vascular inflammation and atherosclerosis in the AApoE knockout mouse).Circulation Research,107:888-97.

[2264] 404.Thomas,M.C.,Tikellis,C.,Burns,W.M.等人,肾素血管紧张素系统与肾脏晚期糖基化之间的相互作用(Interactions between renin angiotensin system and advanced glycation in the kidney),Journal of the American Society of Nephrology,2005,16:2976-2984.

[2265] 405.Thompson,S.W.,A.Dray,和L.Urban.损伤引起的脊髓反射活动的可塑性:体外大鼠脊髓中的NK1神经激肽受体活化和增强的A纤维和C纤维介导的反应(Injury-induced plasticity of spinal reflex activity:NK1 neurokinin receptor activation and enhanced A-and C-fiber mediated responses in the rat spinal cord in vitro).J Neurosci,1994,14:3672-87.

[2266] 406.Tichelaar,J.W.,Wesselkamper,S.C.,Chowdhury,S.,Yin,H.,Berclaz,P.-Y.,Sartor,M.A.,Leikauf,G.D.和Whitsett,J.A.(2007)肺上皮成纤维细胞生长因子7表达的持续时间依赖性细胞保护与炎症作用(Duration-dependent cytoprotective versus inflammatory effects of lung epithelial fibroblast growth factor-7expression).Experimental lung research,33,385-417.

[2267] 407.Tikellis,C,Wookey,P.J.,Candido,R.,Thomas,M.C.(2004)阻断ZDF大鼠肾素-血管紧张素系统后胰岛形态得到改善(Improved islet morphology after blockade of the renin-angiotensin system in the ZDF rat),Diabetes,53:989-997.

[2268] 408.Tikellis,C.,Pickering,R.J.,Tsorotes,D.,Huet,O.,Chin-Dusting,J.,Cooper,M.E.,和Thomas,M.C.(2012)肾素-血管紧张素系统的激活介导饮食盐摄入对载脂蛋白E基因敲除小鼠的动脉粥样硬化的影响(Activation of the Renin-Angiotensin system mediates the effects of dietary salt intake on atherogenesis in the apolipoprotein E knockout mouse),Hypertension,60:98-105.

[2269] 409.Tiruppathi,C.,R.D.Minshall,B.C.Paria,S.M.Vogel,和A.B.Malik.Ca2+信号传导在调节内皮细胞通透性中的作用(Role of Ca2+signalling in the regulation of endothelial permeability).Vascul Pharmacol,2002,39:173-85.

[2270] 410.Tiulpakov A,White CW,Abhayawardana RS,See HB,Chan AS,Seeber RM,Heng JI,Dedov I,Pavlos NJ,Pfleger KDG,包括新的L312S在内的血管加压素受体2的突变对贩运具有不同的影响(Mutations of vasopressin receptor 2including novel L312S have differential effects on trafficking),Mol Endocrinol,2016,30:889-904.

[2271] 411.Tong,L.,Lan,W.,Lim,R.R.和Chaurasia,S.S.S100A蛋白作为眼表炎性疾病的分子靶标(S100A proteins as molecular targets in the ocular surface inflammatory diseases).The ocular surface,2014,12:23-31.

[2272] 412.Torres,R.,S.D.Croll,J.Vercollone,J.Reinhardt,J.Griffiths,和S.Zabski.遗传缺乏神经调节素U受体2但不是神经调节素U受体1的小鼠具有伤害性伤害反应(Mice genetically deficient in neuromedin U receptor 2,but not neuromedin U receptor 1,have impaired nociceptive responses).Pain,2007,130:267-78.

[2273] 413.Tsatsanis,C.,Androulidaki,A.,Dermitzaki,E.,Gravanis,A.和Margioris,A.N.(2007)促肾上腺皮质激素释放因子受体1(CRF1)和CRF2激动剂在炎症的早期发挥抗炎作用,通过诱导COX-2和PGE2抑制LPS诱导巨噬细胞释放TNFα(Corticotropin releasing factor receptor 1(CRF1)and CRF2agonists exert an anti-inflammatory effect during the early phase of inflammation suppressing LPS-induced TNFα release from macrophages via induction of COX-2and PGE2).Journal of cellular

physiology,210,774-783.

[2274] 414.Uhlén,M.,FAGERberg,L.,Hallström,B.M.,Lindskog,C.,Oksvold,P.,Mardinoglu,A.,Sivertsson,Å.,Kampf,C.,Sjöstedt,E.和Asplund,A.(2015)人体蛋白质组的基于组织的图(Tissue-based map of the human proteome).Science,347,1260419.

[2275] 415.Uhlén,M.,FAGERberg,L.,Hallström,B.M.,Lindskog,C.,Oksvold,P.,Mardinoglu,A.,Sivertsson,Å.,Kampf,C.,Sjöstedt,E.和Asplund,A.(2015)人体蛋白质组的基于组织的图(Tissue-based map of the human proteome).Science,347,1260419.

[2276] 416.Vaughan,K.R.,Stokes,L.,Prince,L.R.,Marriott,H.M.,Meis,S.,Kassack,M.U.,Bingle,C.D.,Sabroe,I.,Surprenant,A.和Whyte,M.K.(2007)ATP抑制中性粒细胞凋亡是由P2Y11受体介导的(Inhibition of neutrophil apoptosis by ATP is mediated by the P2Y11 receptor).The Journal of Immunology,179,8544-8553.

[2277] 417.Venkataraman,C.和Kuo,F.(2005)G蛋白偶联受体GPR84响应CD3交联蛋白调节T淋巴细胞产生IL-4(The G-protein coupled receptor,GPR84regulates IL-4production by T lymphocytes in response to CD3crosslinking).Immunology letters,101,144-153.

[2278] 418.Voice,J.K.,Grinninger,C.,Kong,Y.,Bangale,Y.,Paul,S.和Goetzl,E.J.(2003)血管活性肠肽(VIP)在野生型小鼠和靶向T细胞的II型VIP受体转基因小鼠表达不同免疫表型中的作用(Roles of vasoactive intestinal peptide(VIP)in the expression of different immune phenotypes by wild-type mice and T cell-targeted type II VIP receptor transgenic mice).The Journal of Immunology,170,308-314.

[2279] 419.Volpi,C.,Fazio,F.和Fallarino,F.(2012)在神经免疫交流中靶向代谢型谷氨酸受体(Targeting metabotropic glutamate receptors in neuroimmune communication).Neuropharmacology,63,501-506.

[2280] 420.Volz,H.C.,Kaya,Z.,Katus,H.A.和Andrassy,M.(2010)HMGB1/RAGE在炎性心肌病中的作用(The role of HMGB1/RAGE in inflammatory cardiomyopathy).Seminars in thrombosis and hemostasis,36:185-194.

[2281] 421.Vu,T.K.,D.T.Hung,V.I.Wheaton,和S.R.Coughlin.功能性凝血酶受体的分子克隆揭示了受体激活的新蛋白水解机制(Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation).Cell,1991,64:1057-68.

[2282] 422.Wacker,D.,Wang,C.,Katritch,V.,Han,G.W.,Huang,X.P.,Vardy,E.,McCorvy,J.D.,Jiang,Y.,Chu,M.,Siu,F.Y.,Liu,W.,Xu,H.E.,Cherezov,V.,Roth,B.L.和Stevens,R.C.(2013)血清素受体功能选择性的结构特征(Structural features for functional selectivity at serotonin receptors).Science,340,615-619.

[2283] 423.Wada,N.,Hashinaga,T.,Otabe,S.,Yuan,X.,Kurita,Y.,Kakino,S.,Ohoki,T.,Nakayama,H.,Fukutani,T.和Tajiri,Y.(2013)慢性高脂联素血症对脂肪组织中Wnt配体及其受体的选择性调节(Selective modulation of Wnt ligands and their receptors in adipose tissue by chronic hyperadiponectinemia).PloS one,8,

e67712.

[2284] 424.Wan,W.等人,HMGB1在神经性疼痛中的新兴作用:神经炎症的潜在治疗靶标(The Emerging Role of HMGB1 in Neuropathic Pain:A Potential Therapeutic Target for Neuroinflammation).Journal of immunology research,2016,2016:6430423.

[2285] 425.Wang,D.B.,Dayton,R.D.,Zweig,R.M.和Klein,R.L.(2010)大鼠tau过表达模型的转录组分析表明早期炎症反应(Transcriptome analysis of a tau overexpression model in rats implicates an early pro-inflammatory response).Experimental neurology,224,197-206.

[2286] 426.Wang,J.,Simonavicius,N.,Wu,X.,Swaminath,G.,Reagan,J.,Tian,H.和Ling,L.(2006)尿酸作为孤儿G蛋白偶联受体GPR35的配体(Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled reeeptor GPR35).Journal ofBiological Chemistry,281,22021-22028.

[2287] 427.Wamy,M.,Aboudola,S.,Robson,S.C.,Sévigny,J.,Communi,D.,Soltoff,S.P.和Kelly,C.P.(2001)P2Y6核苷酸受体响应UDP或脂多糖介导单核细胞白细胞介素8的产生(P2Y6nueleotide reeeptor mediates monoeyte interleukin-8production in response to UDP or lipopolysaeeharide).Journal of Biological Chemistry,276,26051-26056.

[2288] 428.Watanabe,T.,Tomioka,N.H.,Doshi,M.,Watanabe,S.,Tsuehiya,M.和Hosoyamada,M.(2013)巨噬细胞迁移抑制因子可能是诱导糖尿病db/db小鼠微量白蛋白尿的候选药物(Maerophage migration inhibitory factor is a possible candidate for the induction of mieroalbuminuria in diabetic db/db mice).Biological and Pharmaceutical Bulletin,36,741-747.

[2289] 429.Waters,K.M.,Tan,R.,Genetos,D.C.,Verma,S.,Yellowley,C.E.和Karin,N.J.(2007)DNA微阵列分析揭示了溶血磷脂酸在调节MC3T3-E1细胞中抗炎基因中的作用(DNA microarray analysis reveals a role for lysophosphatidic acid in the regulation of anti-inflammatory genes in MC3T3-E1 cells).Bone,41,833-841.

[2290] 430.Wellendorph,P.和Bräuner-Osborne,H.(2004)新型家族C G蛋白偶联受体GPRC6A的分子克隆,表达和序列分析(Molecular cloning,expression,and sequence analysis of GPRC6A,a novel family C G-protein-coupled receptor).Gene,335,37-46.

[2291] 431.Wensman,H.,Kamgari,N.,Johansson,A.,Grujic,M.,Calounova,G.,Lundequist,A.,Rönnberg,E.和Pejler,G.(2012)肿瘤-肥大细胞相互作用:在MCs中诱导对Lewis肺癌应答的促肿瘤基因和抗肿瘤4-1BB(Tumor-mast cell interactions:Induction of pro-tumorigenic genes and anti-tumorigenic 4-1BB in MCs in response to Lewis Lung Carcinoma).Molecularimmunology,50,210-219.

[2292] 432.Wess,J.,Eglen,R.M.和Gautam,D.(2007)毒蕈碱型乙酰胆碱受体:突变小鼠为药物开发提供新见解(Muscarinic acetylcholine receptors:mutant mice provide new insights for drug development).Nat Rev Drug Discov,6,721-733.

[2293] 433.White,J.F.,Noinaj,N.,Shibata,Y.,Love,J.,Kloss,B.,Xu,F.,Gvozdenovic-Jeremic,J.,Shah,P.,Shiloach,J.,Tate,C.G.和Grisshammer,R.(2012)激动剂结合的神经降压素受体的结构(Structure of the agonist-bound neurotensin receptor).Nature,490,508-513.

[2294] 434.White,J.H.,Chiano,M.,Wigglesworth,M.,Geske,R.,Riley,J.,White,N.,Hall,S.,Zhu,G.,Maurio,F.和Savage,T.(2008)染色体1qter上一个新的哮喘易感基因的鉴定及其功能评价(Identification of a novel asthma susceptibility gene on chromosome 1qter and its functional evaluation).Human molecular genetics,17,1890-1903.

[2295] 435.Wright,D.H.,Ford-Hutchinson,A.W.,Chadee,K.和Metters,K.M.(2000)人前列腺素DP受体刺激LS174T细胞中粘蛋白的分泌(The human prostanoid DP receptor stimulates mucin secretion in LS174T cells).British journal of pharmacology,131,1537-1545.

[2296] 436.Wu,B.,Chien,E.Y.,Mol,C.D.,Fenalti,G.,Liu,W.,Katritch,V.,Abagyan,R.,Brooun,A.,Wells,P.,Bi,F.C.,Hamel,D.J.,Kuhn,P.,Handel,T.M.,Cherezov,V.和Stevens,R.C.(2010)具有小分子和环肽拮抗剂的CXCR4趋化因子GPCR的结构(Structures of the CXCR4chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists).Science,330,1066-1071.

[2297] 437.Wu,Q.-L.,Zierold,C.和Ranheim,E.A.(2009)在慢性淋巴细胞性白血病的小鼠模型中,卷曲蛋白6的失调是B细胞白血病发生的关键因素(Dysregulation of Frizzled 6is a critical component of B-cell leukemogenesis in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia).Blood,113,3031-3039.

[2298] 438.Xia,W.,Han,J.,Huang,G.和Ying,W.缺血性脑损伤中的炎症:当前进展和未来展望(Inflammation in ischaemic brain injury:current advances and future perspectives).Clinical and experimental pharmacology&physiology,2010,37:253-258.

[2299] 439.Xie,J.,Mendez,J.D.,Mendez-Valenzuela,V.和Aguilar-Hernandez,M.M.渐进性糖化终极产物受体(RAGE)的细胞信号传导(Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products(RAGE)).Cellular signalling,2013,25:2185-2197.

[2300] 440.Xiong,X.,White,R.E.,Xu,L.,Yang,L.,Sun,X.,Zou,B.,Pascual,C.,Sakurai,T.,Giifard,R.G.和Xie,X.S.(2013)降钙素/食欲素系统减轻鼠局灶性脑缺血与炎症减少有关(Mitigation of murine focal cerebral ischemia by the hypocretin/orexin system is associated with reduced inflammation).Stroke,44,764-770.

[2301] 441.Xue J.,Manigrasso M.,Scalabrin M.,Rai V.,Reverdatto S.,Burz D.S.,Fabris D.,Schmidt A.M.,Shekhtman A.(2016)RAGE-配体配合物分子尺寸的变化触发RAGE信号传导(Change in the Molecular Dimension of a RAGE-Ligand Complex Triggers RAGE Signaling).Structure.24,1509-22.

[2302] 442.Yadav,M.,Huang,M.-C.和Goetzl,E.J.(2011)VPAC1(1型血管活性肠肽(VIP)

受体)G蛋白偶联受体介导VIP增强鼠实验性结肠炎(VPAC1(vasoactive intestinal peptide(VIP)receptor type 1)G protein-coupled receptor mediation of VIP enhancement of murine experimental colitis).Cellular immunology,267,124-132.

[2303] 443.Yamagishi,S.和Matsui,T.渐进性糖化终极产物受体(RAGE)在肝病中的作用(Role of receptor for advanced glycation end products(RAGE)in liver disease).European journal of medical research,2015,20:15.

[2304] 444.Yan,S.F.,Ramasamy,R.,Schmidt,A.M.,RAGE轴:发出信号通知脆弱血管的危险的基本机制(The RAGE axis:A fundamental mechanism signalling danger to the vulherable vasculature).Circ Res,2010,106:842-853.

[2305] 445.Yang J,Yan R,Roy A,Xu D,Poisson J,Zhang Y.I-TASSER Suite:蛋白质结构和功能预测(The I-TASSER Suite:Protein structure and function prediction),Nature Methods,2015,12:7-8.

[2306] 446.Yang,D.,Chen,Q.,Gertz,B.,He,R.,Phulsuksombati,M.,Ye,R.D.和Oppenheim,J.J.(2002)人类树突状细胞在整个成熟过程中均表达功能性甲酰肽受体样2(FPRL2)(Human dendritic cells express functional formyl peptide receptor-like-2(FPRL2)throughout maturation).J Leukoc Biol,72,598-607.

[2307] 447.Yang,H.-Y.和Iadarola,M.(2003)炎性痛觉过敏大鼠脊髓神经肽FF和神经肽FF受体2的激活(Activation of spinal neuropeptide FF and the neuropeptide FF receptor 2during inflammatory hyperalgesia in rats).Neuroscience,118,179-187.

[2308] 448.Ye,R.D.,F.Boulay,J.M.Wang,C.Dahlgren,C.Gerard,和M.Parmentier.International Union of Basic and Clinical Pharmacology.LXXIII.甲酰基肽受体(FPR)家族的命名法(Nomenclature for the formyl peptide receptor(FPR)family).Pharmacol Rev,2009,61:119-61.

[2309] 449.Yi,T.,Lee,D.-S.,Jeon,M.-S.,Kwon,S.W.和Song,S.U.(2012)基因表达谱显示STAT2参与人骨髓间充质干细胞的免疫抑制功能(Gene expression profile reveals that STAT2is involved in the immunosuppressive function of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells).Gene,497,131-139.

[2310] 450.Yin,J.,Babaoglu,K.,Brautigam,C.A.,Clark,L.,Shao,Z.,Scheuermann,T.H.,Harrell,C.M.,Gotter,A.L.,Roecker,A.J.,Winrow,C.J.,Renger,J.J.,Coleman,P.J.和Rosenbaum,D.M.(2016)人OX1和OX2 Orexin受体的结构和配体结合机制(Structure and ligand-binding mechanism of the human OX1 and OX2 orexin receptors).Nat Struct Mol Biol,23,293-299.

[2311] 451.Yin,J.,Mobarec,J.C.,Kolb,P.和Rosenbaum,D.M.(2015)人OX2orexin受体与失眠药suvorexant结合的晶体结构(Crystal structure of the human OX2orexin receptor bound to the insomnia drug suvorexant).Nature,519,247-250.

[2312] 452.Yin,X.,Cheng,H.,Lin,Y.,Fan,X.,Cui,Y.,Zhou,F.,Shen,C.,Zuo,X.,Zheng,X.和Zhang,W.(2014)通过匹配eQTL和GWAS在牛皮癣中检测到的五个调节基因(Five regulatory genes detected by matching signatures of eQTL and GWAS in psoriasis).Journal of dermatological science,76,139-142.

[2313] 453.Yokomizo,T.,Kato,K.,Terawaki,K.,Izumi,T.和Shimizu,T.(2000)第二个白三烯B4受体Blt2是炎症和免疫疾病的新治疗靶标(A Second Leukotriene B4Receptor,Blt2A New Therapeutic Target in Inflammation and Immunological Disorders).The Journal of experimental medicine,192,421-432.

[2314] 454.Yost,C.C.,A.S.Weyrich,和G.A.Zimmerman.血小板活化因子(PAF)信号传导系统性炎症反应(The platelet activating factor(PAF)signalling cascade in systemic inflammatory responses).Biochimie,2010,92:692-7.

[2315] 455.You,J.,Nguyen,A.V.,Albers,C.G.,Lin,F.和Holcombe,R.F.(2008)Wnt通路相关基因在炎症性肠病中的表达(Wnt pathway-related gene expression in inflammatory bowel disease).Digestive diseases and sciences,53,1013-1019.

[2316] 456.Zammataro,M.,Chiechio,S.,Montana,M.C.,Traficante,A.,Copani,A.,Nicoletti,F.和Gereau,R.W.(2011)mGlu2代谢型谷氨酸受体抑制炎性疼痛并介导双重mGlu2/mGlu3受体激动剂的镇痛活性(mGlu2metabotropic glutamate receptors restrain inflammatory pain and mediate the analgesic activity of dual mGlu2/mGlu3receptor agonists).Molecular pain,7,1.

[2317] 457.Zeng,H.,A.GrAGERov,J.G.Hohmann,M.N.Pavlova,B.A.Schimpf,和H.Xu.Neuromedin U受体2缺陷型小鼠在感觉知觉,压力和进食方面表现出不同的反应(Neuromedin U receptor 2-deficient mice display differential responses in sensory perception,stress,and feeding).Mol Cell Biol,2006,26:9352-63.

[2318] 458.Zhang Y.I-TASSER服务器用于蛋白质3D结构预测(I-TASSER server for protein 3D structure prediction).BMC Bioinformatics,2008,9:40.

[2319] 459.Zhang,F.,Wu,R.,Qiang,X.,Zhou,M.和Wang,P.(2010a)α2A肾上腺素受体拮抗作用:抑制败血症中炎症反应的新方法(Antagonism of α2A-adrenoceptor:a novel approach to inhibit inflammatory responses in sepsis).Journal of Molecular Medicine,88,289-296.

[2320] 460.Zhang,H.,Unal,H.,Gati,C.,Won Han,G.,Liu,W.,Zatsepin,N.A.,James,D.,Want,D.,Nelson,G.,Weierstall,U.,Sawaya,M.R.,Xu,Q.,Messerschmidt,M.,Williams,G.J.,Boutet,S.,Yefanov,O.M.,White,T.,A.,Wang,C.,Ishchenko,A.,Tirupula,K.C.,Desnoyer等人,飞秒晶体学揭示血管紧张素受体的结构(Structure of the Angiotensin Receptor Revealed by Serial Femtosecond Crystallography),Cell,2015,161:4,833-844.

[2321] 461.Zhang,X.,Schmudde,I.,Laumonnier,Y.,Pandey,M.,Clark,J.,König,P.,Gerard,N.,Gerard,C.,Wills-Karp,M.和Köhl,J.(2010b)C5L2在实验性过敏性哮喘发病机理中的关键作用(A critical role for C5L2 in the pathogenesis of experimental allergic asthma).Journal ofimmunology(Baltimore,Md.:1950),185,6741.

[2322] 462.Zhao,W.,Ho,L.,Varghese,M.,Yemul,S.,Dams-O′Connor,K.,Gordon,W.,Knable,L.,Freire,D.,Haroutunian,V.和Pasinetti,G.M.(2013)脑外伤后血细胞中的嗅觉受体水平降低,并可能与tauopathy相关(Decreased level of olfactory receptors in blood cells following traumatic brain injury and potential association

with tauopathy).Journal of Alzheimer's Disease,34,417-429.

[2323] 463.Zhao,Z.,Lee,C.C.,Baldini,A.和Caskey,C.T.(1995)果蝇极性基因卷曲的人类同系物已被鉴定并映射到17q21.1(A Human Homologue ofthe Drosophila Polarity Gene frizzled Has Been Identified and Mapped to 17q21.1).Genomics,27,370-373.

[2324] 464.Zheng,Y.,Qin,L.,Zacarias,N.V.,de Vries,H.,Han,G.W.,Gustavsson,M.,Dabros,M.,Zhao,C.,Cherney,R.J.,Carter,P.,Stamos,D.,Abagyan,R.,Cherezov,V.,Stevens,R.C.,AP,I.J.,Heitman,L.H.,Tebben,A.,Kufareva,I.和Handel,T.M.(2016)正构和变构拮抗剂的CC趋化因子受体2的结构(Structure of CC chemokine receptor 2with orthosteric and allosteric antagonists).Nature,540,458-461.

[2325] 465.Zhong,H.,Shlykov,S.G.,Molina,J.G.,Sanborn,B.M.,Jacobson,M.A.,Tilley,S.L.和Blackburn,M.R.(2003)腺苷A3受体激活鼠肺肥大细胞(Activation of murine lung mast cells by the adenosine A3 receptor).The Journal ofImmunology,171,338-345.

[2326] 466.Zhou,N.,Fan,X.,Mukhtar,M.,Fang,J.,Patel,C.A.,DuBois,G.C.和Pomerantz,R.J.(2003)基于CNS的HIV-1共受体的细胞与细胞融合和内在化(Cell-cell fusion and intemalization ofthe CNS-based,HIV-1 co-receptor),APJ.Virology,307,22-36.

[2327] 467.Zhou,Z.等人,AGE受体(RAGE)介导对动脉损伤的新内膜形成(Receptor for AGE(RAGE)mediates neointimal formation in response to arterial injury).Circulation,2003,107:2238-2243.

[2328] 468.Zhu,P.,Sun,W.,Zhang,C.,Song,Z.和Lin,S.(2016)神经肽Y在动脉粥样硬化性心血管疾病的病理生理中的作用(The role of neuropeptide Y in the pathophysiology of atherosclerotic cardiovascular disease).International Journal of Cardiology,220,235-241.

[2329] 469.Ziogas,D.C.,Gras-Miralles,B.,Mustafa,S.,Geiger,B.M.,Najarian,R.M.,Nagel,J.M.,Flier,S.N.,Popov,Y.,Tseng,Y.-H.和Kokkotou,E.(2013)抗黑色素浓缩激素治疗可减轻慢性实验性结肠炎和纤维化(Anti-melanin-concentrating hormone treatment attenuates chronic experimental colitis and fibrosis).American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology,304,G876-G884.

[2330] 470.Zlotnik,A.和O.Yoshie.(2000)趋化因子:一种新的分类系统及其在免疫中的作用(Chemokines:a new classification system and their role in immunity).Immunity,12:121-7.

序列表

<110> 莫纳施大学
西澳大学
<120> 渐进性糖化终极产物受体(RAGE)活化的筛选测定法、调节物和调节
<130> 264950
<160> 61
<170> PatentIn 版本 3.5
<210> 1
<211> 43
<212> PRT
<213> 智人
<400> 1
Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala Pro Glu
1 5 10 15
Asn Gln Glu Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Gln Ser Glu Glu
20 25 30
Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser Thr Gly Gly Pro
35 40
<210> 2
<211> 43
<212> PRT
<213> 智人
[0001]
<400> 2
Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala Pro Glu
1 5 10 15
Asn Gln Glu Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Gln Ala Glu Glu
20 25 30
Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser Thr Gly Gly Pro
35 40
<210> 3
<211> 24
<212> PRT
<213> 智人
<400> 3
Leu Gly Thr Leu Ala Leu Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly Thr
1 5 10 15
Ala Ala Leu Leu Ile Gly Val Ile
20
<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 4
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Gly Glu Glu Arg Lys Ala Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu Glu Arg
1 5 10 15

Ala Glu Leu Asn Gln
20

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Gln Glu Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Gln
1 5 10

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

[0002]

Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala Pro Glu
1 5 10 15

Asn Gln Glu Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Gln Ala
20 25 30

<210> 8

<211> 29

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala Pro Glu
1 5 10 15

Asn Gln Glu Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Gln
20 25

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Gln Glu Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Arg
1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT
<213> 智人
<400> 10
Gln Glu Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Lys
1 5 10
<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人
<400> 11
Lys Glu Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Gln
1 5 10
<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人
<400> 12
Lys Glu Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Lys
1 5 10
<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人
<400> 13
Lys Glu Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Arg
1 5 10
<210> 14
<211> 404
<212> PRT
<213> 智人
<400> 14
Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
1 5 10 15
Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30
Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45
Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60
Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80
Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
85 90 95
Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn

[0003]

[0004]

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

<210> 15
<211> 1704
<212> DNA
<213> 智人
<400> 15

[0005]

```
tcatcttaaa ccaatagaat cgctcggtgg acgagagtgt ctgactcaga tatctacctc      60
ggagggagtt tctgctactt tagggaatta ttgactgggc tttggggttg aacttttttt     120
tttttaaaga aagaaaaaga aaccctggga tccatctatt ttttttgttg ttgttggttt     180
ttgttgttgg tggtggtggt ggtggtggtg gttcttaatt tttaatttag tttggggaag     240
tagcttgttt tttttttttat aaatatgttg atttcttgtc ttttttttttt atttcttact     300
ttcccatatt aggggtagcc atgaaagggg tactggtaag agaaaggggg acaaacagaa     360
ctggtaaaga ggccccccctg gctccaggcc tgtccatcag gaagtaaatt ttacagggca     420
ccaagctttg ccccctaaaa tcccttaggt gttctttgtt catgcaggca ggtttctgcc     480
gcatttgatg tggaggcagt gaagggcttg ccctgctggc ctctcatccc ccttcttccc     540
acaacccttg ggcagggctg gactcagtaa ttttgaggaa attgaagatg ccatcttccc     600
ctgtgagtga catgtcttta atttttttaaa aaactactat ttgaaaattg gaggggggaag     660
aatgggaagg gagttattgc caaatatgtt aaatatgggt tggggtgctt gtatatgtat     720
cttcctcaat ttccccataa atgaggtatc tttttgtcac accaaaatca aggggtaggg     780
agagggagga ggttgcaaaa agccagatgt gggggaaaag taacatcaac actgtcccat     840
cctcagccct gaactagcta ccatctgatc ccctcagaca ttctcaggat tttacaagac     900
tgtcagagtg gggaacccct cccattaaag atccgggcag gactgggaca ggttggaagt     960
gtgatgggtg gggggtggg aggcatgggc cgggggcagt tctctcctca cttgtaaact    1020
tgtgtagttt cacagaaaaa aaacaaaatg cagttttaaa taaagaaatt tctttttttc    1080
cctgggttta gttgagaatt tttttcaaaa aacatgagaa accccagaaa aaaaatgatt    1140
ttctttcacg aagttccaaa caggtttctc tcctgttccc cagccttgcc ttcatgatgc    1200
aggcccaatt gcacccttgc agacaacagt ctggcctgaa ccctattgat gcaactttgc    1260
gcaatcaaga tggggctcca gtgggtcacc aggcagccct gatggactga tggaataaat    1320
aggatcgggg gctctgaggg aatgagaccc tagagggtac actccccatc ccccagggaa    1380
gtgactgtac ccagaggctg gtagtaccca ggggtggggt gataattatt tctctagtac    1440
ctgaaggact cttgtcccaa aggcatgaat tcctagcatt ccctgtgaca agacgactga    1500
aagatggggg ctggagagag ggtgcaggcc ccacctaggg cggaggccac agcagggaga    1560
ggggcagaca gagccaggac cctggaagga agcaggatgg cagccggaac agcagttgga    1620
gcctgggtgc tggtcctcag tcttggggtg agccactccc tcaaccccac tgaccctccc    1680
tgcagaaagc actttaaccc caca                                           1704
<210> 16
<211> 359
<212> PRT
<213> 智人
<400> 16
Met Ile Leu Asn Ser Ser Thr Glu Asp Gly Ile Lys Arg Ile Gln Asp
1               5                  10                  15
Asp Cys Pro Lys Ala Gly Arg His Asn Tyr Ile Phe Val Met Ile Pro
            20                  25                  30
Thr Leu Tyr Ser Ile Ile Phe Val Val Gly Ile Phe Gly Asn Ser Leu
        35                  40                  45
Val Val Ile Val Ile Tyr Phe Tyr Met Lys Leu Lys Thr Val Ala Ser
    50                  55                  60
Val Phe Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Cys Phe Leu Leu Thr
65                  70                  75                  80
```

[0006]

Leu Pro Leu Trp Ala Val Tyr Thr Ala Met Glu Tyr Arg Trp Pro Phe
85 90 95
Gly Asn Tyr Leu Cys Lys Ile Ala Ser Ala Ser Val Ser Phe Asn Leu
100 105 110
Tyr Ala Ser Val Phe Leu Leu Thr Cys Leu Ser Ile Asp Arg Tyr Leu
115 120 125
Ala Ile Val His Pro Met Lys Ser Arg Leu Arg Arg Thr Met Leu Val
130 135 140
Ala Lys Val Thr Cys Ile Ile Ile Trp Leu Leu Ala Gly Leu Ala Ser
145 150 155 160
Leu Pro Ala Ile Ile His Arg Asn Val Phe Phe Ile Glu Asn Thr Asn
165 170 175
Ile Thr Val Cys Ala Phe His Tyr Glu Ser Gln Asn Ser Thr Leu Pro
180 185 190
Ile Gly Leu Gly Leu Thr Lys Asn Ile Leu Gly Phe Leu Phe Pro Phe
195 200 205
Leu Ile Ile Leu Thr Ser Tyr Thr Leu Ile Trp Lys Ala Leu Lys Lys
210 215 220
Ala Tyr Glu Ile Gln Lys Asn Lys Pro Arg Asn Asp Asp Ile Phe Lys
225 230 235 240
Ile Ile Met Ala Ile Val Leu Phe Phe Phe Phe Ser Trp Ile Pro His
245 250 255
Gln Ile Phe Thr Phe Leu Asp Val Leu Ile Gln Leu Gly Ile Ile Arg
260 265 270
Asp Cys Arg Ile Ala Asp Ile Val Asp Thr Ala Met Pro Ile Thr Ile
275 280 285
Cys Ile Ala Tyr Phe Asn Asn Cys Leu Asn Pro Leu Phe Tyr Gly Phe
290 295 300
Leu Gly Lys Lys Phe Lys Arg Tyr Phe Leu Gln Leu Leu Lys Tyr Ile
305 310 315 320
Pro Pro Lys Ala Lys Ser His Ser Asn Leu Ser Thr Lys Met Ser Thr
325 330 335
Leu Ser Tyr Arg Pro Ser Asp Asn Val Ser Ser Ser Thr Lys Lys Pro
340 345 350
Ala Pro Cys Phe Glu Val Glu
355

<210> 17
<211> 326
<212> PRT
<213> 智人
<400> 17

Met Pro Pro Ser Ile Ser Ala Phe Gln Ala Ala Tyr Ile Gly Ile Glu
1 5 10 15
Val Leu Ile Ala Leu Val Ser Val Pro Gly Asn Val Leu Val Ile Trp

[0007]

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

<210> 18
<211> 427
<212> PRT
<213> 智人
<400> 18

[0008]

```
Met Val Phe Leu Ser Gly Asn Ala Ser Asp Ser Ser Asn Cys Thr Gln
1               5                  10                  15
Pro Pro Ala Pro Val Asn Ile Ser Lys Ala Ile Leu Leu Gly Val Ile
            20                  25                  30
Leu Gly Gly Leu Ile Leu Phe Gly Val Leu Gly Asn Ile Leu Val Ile
        35                  40                  45
Leu Ser Val Ala Cys His Arg His Leu His Ser Val Thr His Tyr Tyr
    50                  55                  60
Ile Val Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Leu Thr Ser Thr Val Leu
65                  70                  75                  80
Pro Phe Ser Ala Ile Phe Glu Val Leu Gly Tyr Trp Ala Phe Gly Arg
                85                  90                  95
Val Phe Cys Asn Ile Trp Ala Ala Val Asp Val Leu Cys Cys Thr Ala
            100                 105                 110
Ser Ile Met Gly Leu Cys Ile Ile Ser Ile Asp Arg Tyr Ile Gly Val
        115                 120                 125
Ser Tyr Pro Leu Arg Tyr Pro Thr Ile Val Thr Gln Arg Arg Gly Leu
    130                 135                 140
Met Ala Leu Leu Cys Val Trp Ala Leu Ser Leu Val Ile Ser Ile Gly
145                 150                 155                 160
Pro Leu Phe Gly Trp Arg Gln Pro Ala Pro Glu Asp Glu Thr Ile Cys
                165                 170                 175
Gln Ile Asn Glu Glu Pro Gly Tyr Val Leu Phe Ser Ala Leu Gly Ser
            180                 185                 190
Phe Tyr Leu Pro Leu Ala Ile Ile Leu Val Met Tyr Cys Arg Val Tyr
        195                 200                 205
Val Val Ala Lys Arg Glu Ser Arg Gly Leu Lys Ser Gly Leu Lys Thr
    210                 215                 220
Asp Lys Ser Asp Ser Glu Gln Val Thr Leu Arg Ile His Arg Lys Asn
225                 230                 235                 240
Ala Pro Ala Gly Gly Ser Gly Met Ala Ser Ala Lys Thr Lys Thr His
                245                 250                 255
Phe Ser Val Arg Leu Leu Lys Phe Ser Arg Glu Lys Lys Ala Ala Lys
            260                 265                 270
Thr Leu Gly Ile Val Val Gly Cys Phe Val Leu Cys Trp Leu Pro Phe
        275                 280                 285
Phe Leu Val Met Pro Ile Gly Ser Phe Phe Pro Asp Phe Lys Pro Ser
    290                 295                 300
Glu Thr Val Phe Lys Ile Val Phe Trp Leu Gly Tyr Leu Asn Ser Cys
305                 310                 315                 320
Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Pro Cys Ser Ser Gln Glu Phe Lys Lys Ala
                325                 330                 335
Phe Gln Asn Val Leu Arg Ile Gln Cys Leu Cys Arg Lys Gln Ser Ser
            340                 345                 350
```

Lys His Ala Leu Gly Tyr Thr Leu His Pro Pro Ser Gln Ala Val Glu
355 360 365
Gly Gln His Lys Asp Met Val Arg Ile Pro Val Gly Ser Arg Glu Thr
370 375 380
Phe Tyr Arg Ile Ser Lys Thr Asp Gly Val Cys Glu Trp Lys Phe Phe
385 390 395 400
Ser Ser Met Pro Arg Gly Ser Ala Arg Ile Thr Val Ser Lys Asp Gln
405 410 415
Ser Ser Cys Thr Thr Ala Arg Ser Ser Gly Phe
420 425

<210> 19
<211> 520
<212> PRT
<213> 智人
<400> 19

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

[0009]

Gly Leu Val Leu Gly Ala Phe Ile Leu Phe Ala Ile Val Gly Asn Ile
50 55 60
Leu Val Ile Leu Ser Val Ala Cys Asn Arg His Leu Arg Thr Pro Thr
65 70 75 80
Asn Tyr Phe Ile Val Asn Leu Ala Met Ala Asp Leu Leu Leu Ser Phe
85 90 95
Thr Val Leu Pro Phe Ser Ala Ala Leu Glu Val Leu Gly Tyr Trp Val
100 105 110
Leu Gly Arg Ile Phe Cys Asp Ile Trp Ala Ala Val Asp Val Leu Cys
115 120 125
Cys Thr Ala Ser Ile Leu Ser Leu Cys Ala Ile Ser Ile Asp Arg Tyr
130 135 140
Ile Gly Val Arg Tyr Ser Leu Gln Tyr Pro Thr Leu Val Thr Arg Arg
145 150 155 160
Lys Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ser Val Trp Val Leu Ser Thr Val Ile
165 170 175
Ser Ile Gly Pro Leu Leu Gly Trp Lys Glu Pro Ala Pro Asn Asp Asp
180 185 190
Lys Glu Cys Gly Val Thr Glu Glu Pro Phe Tyr Ala Leu Phe Ser Ser
195 200 205
Leu Gly Ser Phe Tyr Ile Pro Leu Ala Val Ile Leu Val Met Tyr Cys
210 215 220

[0010]

Arg Val Tyr Ile Val Ala Lys Arg Thr Thr Lys Asn Leu Glu Ala Gly
225 230 235 240
Val Met Lys Glu Met Ser Asn Ser Lys Glu Leu Thr Leu Arg Ile His
245 250 255
Ser Lys Asn Phe His Glu Asp Thr Leu Ser Ser Thr Lys Ala Lys Gly
260 265 270
His Asn Pro Arg Ser Ser Ile Ala Val Lys Leu Phe Lys Phe Ser Arg
275 280 285
Glu Lys Lys Ala Ala Lys Thr Leu Gly Ile Val Val Gly Met Phe Ile
290 295 300
Leu Cys Trp Leu Pro Phe Phe Ile Ala Leu Pro Leu Gly Ser Leu Phe
305 310 315 320
Ser Thr Leu Lys Pro Pro Asp Ala Val Phe Lys Val Val Phe Trp Leu
325 330 335
Gly Tyr Phe Asn Ser Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Pro Cys Ser Ser
340 345 350
Lys Glu Phe Lys Arg Ala Phe Val Arg Ile Leu Gly Cys Gln Cys Arg
355 360 365
Gly Arg Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Leu Gly Gly Cys
370 375 380
Ala Tyr Thr Tyr Arg Pro Trp Thr Arg Gly Gly Ser Leu Glu Arg Ser
385 390 395 400
Gln Ser Arg Lys Asp Ser Leu Asp Asp Ser Gly Ser Cys Leu Ser Gly
405 410 415
Ser Gln Arg Thr Leu Pro Ser Ala Ser Pro Ser Pro Gly Tyr Leu Gly
420 425 430
Arg Gly Ala Pro Pro Pro Val Glu Leu Cys Ala Phe Pro Glu Trp Lys
435 440 445
Ala Pro Gly Ala Leu Leu Ser Leu Pro Ala Pro Glu Pro Pro Gly Arg
450 455 460
Arg Gly Arg His Asp Ser Gly Pro Leu Phe Thr Phe Lys Leu Leu Thr
465 470 475 480
Glu Pro Glu Ser Pro Gly Thr Asp Gly Gly Ala Ser Asn Gly Gly Cys
485 490 495
Glu Ala Ala Ala Asp Val Ala Asn Gly Gln Pro Gly Phe Lys Ser Asn
500 505 510
Met Pro Leu Ala Pro Gly Gln Phe
515 520

<210> 20
<211> 450
<212> PRT
<213> 智人
<400> 20
Met Asp His Gln Asp Pro Tyr Ser Val Gln Ala Thr Ala Ala Ile Ala

[0011]

```
1               5                   10                  15
Ala Ala Ile Thr Phe Leu Ile Leu Phe Thr Ile Phe Gly Asn Ala Leu
            20                  25                  30
Val Ile Leu Ala Val Leu Thr Ser Arg Ser Leu Arg Ala Pro Gln Asn
        35                  40                  45
Leu Phe Leu Val Ser Leu Ala Ala Ala Asp Ile Leu Val Ala Thr Leu
    50                  55                  60
Ile Ile Pro Phe Ser Leu Ala Asn Glu Leu Leu Gly Tyr Trp Tyr Phe
65                  70                  75                  80
Arg Arg Thr Trp Cys Glu Val Tyr Leu Ala Leu Asp Val Leu Phe Cys
                85                  90                  95
Thr Ser Ser Ile Val His Leu Cys Ala Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Trp
            100                 105                 110
Ala Val Ser Arg Ala Leu Glu Tyr Asn Ser Lys Arg Thr Pro Arg Arg
        115                 120                 125
Ile Lys Cys Ile Ile Leu Thr Val Trp Leu Ile Ala Ala Val Ile Ser
    130                 135                 140
Leu Pro Pro Leu Ile Tyr Lys Gly Asp Gln Gly Pro Gln Pro Arg Gly
145                 150                 155                 160
Arg Pro Gln Cys Lys Leu Asn Gln Glu Ala Trp Tyr Ile Leu Ala Ser
                165                 170                 175
Ser Ile Gly Ser Phe Phe Ala Pro Cys Leu Ile Met Ile Leu Val Tyr
            180                 185                 190
Leu Arg Ile Tyr Leu Ile Ala Lys Arg Ser Asn Arg Arg Gly Pro Arg
        195                 200                 205
Ala Lys Gly Gly Pro Gly Gln Gly Glu Ser Lys Gln Pro Arg Pro Asp
    210                 215                 220
His Gly Gly Ala Leu Ala Ser Ala Lys Leu Pro Ala Leu Ala Ser Val
225                 230                 235                 240
Ala Ser Ala Arg Glu Val Asn Gly His Ser Lys Ser Thr Gly Glu Lys
                245                 250                 255
Glu Glu Gly Glu Thr Pro Glu Asp Thr Gly Thr Arg Ala Leu Pro Pro
            260                 265                 270
Ser Trp Ala Ala Leu Pro Asn Ser Gly Gln Gly Gln Lys Glu Gly Val
        275                 280                 285
Cys Gly Ala Ser Pro Glu Asp Glu Ala Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
    290                 295                 300
Glu Glu Glu Glu Glu Cys Glu Pro Gln Ala Val Pro Val Ser Pro Ala
305                 310                 315                 320
Ser Ala Cys Ser Pro Pro Leu Gln Gln Pro Gln Gly Ser Arg Val Leu
                325                 330                 335
Ala Thr Leu Arg Gly Gln Val Leu Leu Gly Arg Gly Val Gly Ala Ile
            340                 345                 350
Gly Gly Gln Trp Trp Arg Arg Arg Ala Gln Leu Thr Arg Glu Lys Arg
```

355 360 365

Phe Thr Phe Val Leu Ala Val Val Ile Gly Val Phe Val Leu Cys Trp
370 375 380

Phe Pro Phe Phe Phe Ser Tyr Ser Leu Gly Ala Ile Cys Pro Lys His
385 390 395 400

Cys Lys Val Pro His Gly Leu Phe Gln Phe Phe Phe Trp Ile Gly Tyr
405 410 415

Cys Asn Ser Ser Leu Asn Pro Val Ile Tyr Thr Ile Phe Asn Gln Asp
420 425 430

Phe Arg Arg Ala Phe Arg Arg Ile Leu Cys Arg Pro Trp Thr Gln Thr
435 440 445

Ala Trp
450

<210> 21
<211> 391
<212> PRT
<213> 智人
<400> 21

[0012]

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

Ser Val Pro Thr Thr Ala Ser Phe Ser Ala Asp Met Leu Asn Val Thr
20 25 30

Leu Gln Gly Pro Thr Leu Asn Gly Thr Phe Ala Gln Ser Lys Cys Pro
35 40 45

Gln Val Glu Trp Leu Gly Trp Leu Asn Thr Ile Gln Pro Pro Phe Leu
50 55 60

Trp Val Leu Phe Val Leu Ala Thr Leu Glu Asn Ile Phe Val Leu Ser
65 70 75 80

Val Phe Cys Leu His Lys Ser Ser Cys Thr Val Ala Glu Ile Tyr Leu
85 90 95

Gly Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu Ile Leu Ala Cys Gly Leu Pro Phe
100 105 110

Trp Ala Ile Thr Ile Ser Asn Asn Phe Asp Trp Leu Phe Gly Glu Thr
115 120 125

Leu Cys Arg Val Val Asn Ala Ile Ile Ser Met Asn Leu Tyr Ser Ser
130 135 140

Ile Cys Phe Leu Met Leu Val Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Leu Val
145 150 155 160

Lys Thr Met Ser Met Gly Arg Met Arg Gly Val Arg Trp Ala Lys Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Val Ile Trp Gly Cys Thr Leu Leu Leu Ser Ser Pro Met
180 185 190

Leu Val Phe Arg Thr Met Lys Glu Tyr Ser Asp Glu Gly His Asn Val
195 200 205

[0013]

Thr Ala Cys Val Ile Ser Tyr Pro Ser Leu Ile Trp Glu Val Phe Thr
210 215 220
Asn Met Leu Leu Asn Val Val Gly Phe Leu Leu Pro Leu Ser Val Ile
225 230 235 240
Thr Phe Cys Thr Met Gln Ile Met Gln Val Leu Arg Asn Asn Glu Met
245 250 255
Gln Lys Phe Lys Glu Ile Gln Thr Glu Arg Arg Ala Thr Val Leu Val
260 265 270
Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ile Ile Cys Trp Leu Pro Phe Gln Ile
275 280 285
Ser Thr Phe Leu Asp Thr Leu His Arg Leu Gly Ile Leu Ser Ser Cys
290 295 300
Gln Asp Glu Arg Ile Ile Asp Val Ile Thr Gln Ile Ala Ser Phe Met
305 310 315 320
Ala Tyr Ser Asn Ser Cys Leu Asn Pro Leu Val Tyr Val Ile Val Gly
325 330 335
Lys Arg Phe Arg Lys Lys Ser Trp Glu Val Tyr Gln Gly Val Cys Gln
340 345 350
Lys Gly Gly Cys Arg Ser Glu Pro Ile Gln Met Glu Asn Ser Met Gly
355 360 365
Thr Leu Arg Thr Ser Ile Ser Val Glu Arg Gln Ile His Lys Leu Gln
370 375 380
Asp Trp Ala Gly Ser Arg Gln
385 390

<210> 22
<211> 355
<212> PRT
<213> 智人
<400> 22

Met Glu Thr Pro Asn Thr Thr Glu Asp Tyr Asp Thr Thr Thr Glu Phe
1 5 10 15
Asp Tyr Gly Asp Ala Thr Pro Cys Gln Lys Val Asn Glu Arg Ala Phe
20 25 30
Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Val Ile Gly
35 40 45
Leu Val Gly Asn Ile Leu Val Val Leu Val Leu Val Gln Tyr Lys Arg
50 55 60
Leu Lys Asn Met Thr Ser Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp
65 70 75 80
Leu Leu Phe Leu Phe Thr Leu Pro Phe Trp Ile Asp Tyr Lys Leu Lys
85 90 95
Asp Asp Trp Val Phe Gly Asp Ala Met Cys Lys Ile Leu Ser Gly Phe
100 105 110
Tyr Tyr Thr Gly Leu Tyr Ser Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr

[0014]

115 120 125
Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Arg Ala
130 135 140
Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Ile Thr Ser Ile Ile Ile Trp Ala Leu
145 150 155 160
Ala Ile Leu Ala Ser Met Pro Gly Leu Tyr Phe Ser Lys Thr Gln Trp
165 170 175
Glu Phe Thr His His Thr Cys Ser Leu His Phe Pro His Glu Ser Leu
180 185 190
Arg Glu Trp Lys Leu Phe Gln Ala Leu Lys Leu Asn Leu Phe Gly Leu
195 200 205
Val Leu Pro Leu Leu Val Met Ile Ile Cys Tyr Thr Gly Ile Ile Lys
210 215 220
Ile Leu Leu Arg Arg Pro Asn Glu Lys Lys Ser Lys Ala Val Arg Leu
225 230 235 240
Ile Phe Val Ile Met Ile Ile Phe Phe Leu Phe Trp Thr Pro Tyr Asn
245 250 255
Leu Thr Ile Leu Ile Ser Val Phe Gln Asp Phe Leu Phe Thr His Glu
260 265 270
Cys Glu Gln Ser Arg His Leu Asp Leu Ala Val Gln Val Thr Glu Val
275 280 285
Ile Ala Tyr Thr His Cys Cys Val Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Val
290 295 300
Gly Glu Arg Phe Arg Lys Tyr Leu Arg Gln Leu Phe His Arg Arg Val
305 310 315 320
Ala Val His Leu Val Lys Trp Leu Pro Phe Leu Ser Val Asp Arg Leu
325 330 335
Glu Arg Val Ser Ser Thr Ser Pro Ser Thr Gly Glu His Glu Leu Ser
340 345 350
Ala Gly Phe
355

<210> 23
<211> 374
<212> PRT
<213> 智人
<400> 23

Met Leu Ser Thr Ser Arg Ser Arg Phe Ile Arg Asn Thr Asn Glu Ser
1 5 10 15
Gly Glu Glu Val Thr Thr Phe Phe Asp Tyr Asp Tyr Gly Ala Pro Cys
20 25 30
His Lys Phe Asp Val Lys Gln Ile Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu
35 40 45
Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn Met Leu Val Val
50 55 60

[0015]

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

<210> 24
<211> 355
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

[0016]

Met Thr Thr Ser Leu Asp Thr Val Glu Thr Phe Gly Thr Thr Ser Tyr
1 5 10 15
Tyr Asp Asp Val Gly Leu Leu Cys Glu Lys Ala Asp Thr Arg Ala Leu
20 25 30
Met Ala Gln Phe Val Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Thr Val Gly
35 40 45
Leu Leu Gly Asn Val Val Val Val Met Ile Leu Ile Lys Tyr Arg Arg
50 55 60
Leu Arg Ile Met Thr Asn Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp
65 70 75 80
Leu Leu Phe Leu Val Thr Leu Pro Phe Trp Ile His Tyr Val Arg Gly
85 90 95
His Asn Trp Val Phe Gly His Gly Met Cys Lys Leu Leu Ser Gly Phe
100 105 110
Tyr His Thr Gly Leu Tyr Ser Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr
115 120 125
Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Arg Ala
130 135 140
Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Ile Thr Ser Ile Val Thr Trp Gly Leu
145 150 155 160
Ala Val Leu Ala Ala Leu Pro Glu Phe Ile Phe Tyr Glu Thr Glu Glu
165 170 175
Leu Phe Glu Glu Thr Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Pro Glu Asp Thr Val
180 185 190
Tyr Ser Trp Arg His Phe His Thr Leu Arg Met Thr Ile Phe Cys Leu
195 200 205
Val Leu Pro Leu Leu Val Met Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Ile Ile Lys
210 215 220
Thr Leu Leu Arg Cys Pro Ser Lys Lys Lys Tyr Lys Ala Ile Arg Leu
225 230 235 240
Ile Phe Val Ile Met Ala Val Phe Phe Ile Phe Trp Thr Pro Tyr Asn
245 250 255
Val Ala Ile Leu Leu Ser Ser Tyr Gln Ser Ile Leu Phe Gly Asn Asp
260 265 270
Cys Glu Arg Ser Lys His Leu Asp Leu Val Met Leu Val Thr Glu Val
275 280 285
Ile Ala Tyr Ser His Cys Cys Met Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Val
290 295 300
Gly Glu Arg Phe Arg Lys Tyr Leu Arg His Phe Phe His Arg His Leu
305 310 315 320
Leu Met His Leu Gly Arg Tyr Ile Pro Phe Leu Pro Ser Glu Lys Leu
325 330 335
Glu Arg Thr Ser Ser Val Ser Pro Ser Thr Ala Glu Pro Glu Leu Ser

340 345 350

Ile Val Phe
355

<210> 25
<211> 360
<212> PRT
<213> 智人
<400> 25

Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr
1 5 10 15
Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu
20 25 30
Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu
35 40 45
Val Phe Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn Ser Val Val Val Leu Val Leu
50 55 60
Phe Lys Tyr Lys Arg Leu Arg Ser Met Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn
65 70 75 80
Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Val Phe Ser Leu Pro Phe Trp Gly
85 90 95
Tyr Tyr Ala Ala Asp Gln Trp Val Phe Gly Leu Gly Leu Cys Lys Met
100 105 110
Ile Ser Trp Met Tyr Leu Val Gly Phe Tyr Ser Gly Ile Phe Phe Val
115 120 125
Met Leu Met Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe
130 135 140
Ser Leu Arg Ala Arg Thr Leu Thr Tyr Gly Val Ile Thr Ser Leu Ala
145 150 155 160
Thr Trp Ser Val Ala Val Phe Ala Ser Leu Pro Gly Phe Leu Phe Ser
165 170 175
Thr Cys Tyr Thr Glu Arg Asn His Thr Tyr Cys Lys Thr Lys Tyr Ser
180 185 190
Leu Asn Ser Thr Thr Trp Lys Val Leu Ser Ser Leu Glu Ile Asn Ile
195 200 205
Leu Gly Leu Val Ile Pro Leu Gly Ile Met Leu Phe Cys Tyr Ser Met
210 215 220
Ile Ile Arg Thr Leu Gln His Cys Lys Asn Glu Lys Lys Asn Lys Ala
225 230 235 240
Val Lys Met Ile Phe Ala Val Val Val Leu Phe Leu Gly Phe Trp Thr
245 250 255
Pro Tyr Asn Ile Val Leu Phe Leu Glu Thr Leu Val Glu Leu Glu Val
260 265 270
Leu Gln Asp Cys Thr Phe Glu Arg Tyr Leu Asp Tyr Ala Ile Gln Ala
275 280 285

[0017]

Thr Glu Thr Leu Ala Phe Val His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr
290 295 300
Phe Phe Leu Gly Glu Lys Phe Arg Lys Tyr Ile Leu Gln Leu Phe Lys
305 310 315 320
Thr Cys Arg Gly Leu Phe Val Leu Cys Gln Tyr Cys Gly Leu Leu Gln
325 330 335
Ile Tyr Ser Ala Asp Thr Pro Ser Ser Ser Tyr Thr Gln Ser Thr Met
340 345 350
Asp His Asp Leu His Asp Ala Leu
355 360

<210> 26
<211> 352
<212> PRT
<213> 智人
<400> 26

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

[0018]

225 230 235 240
Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu
245 250 255
Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser
260 265 270
Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr
275 280 285
His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe
290 295 300
Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe
305 310 315 320
Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser
325 330 335
Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Gly Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu
340 345 350

<210> 27
<211> 374
<212> PRT
<213> 智人
<400> 27

[0019]

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

Gly Ser Asp Val Cys Glu Pro Lys Tyr Gln Thr Val Ser Glu Pro Ile
195 200 205
Arg Trp Lys Leu Leu Met Leu Gly Leu Glu Leu Leu Phe Gly Phe Phe
210 215 220
Ile Pro Leu Met Phe Met Ile Phe Cys Tyr Thr Phe Ile Val Lys Thr
225 230 235 240
Leu Val Gln Ala Gln Asn Ser Lys Arg His Lys Ala Ile Arg Val Ile
245 250 255
Ile Ala Val Val Leu Val Phe Leu Ala Cys Gln Ile Pro His Asn Met
260 265 270
Val Leu Leu Val Thr Ala Ala Asn Leu Gly Lys Met Asn Arg Ser Cys
275 280 285

Gln Ser Glu Lys Leu Ile Gly Tyr Thr Lys Thr Val Thr Glu Val Leu
290 295 300
Ala Phe Leu His Cys Cys Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Ile Gly
305 310 315 320
Gln Lys Phe Arg Asn Tyr Phe Leu Lys Ile Leu Lys Asp Leu Trp Cys
325 330 335
Val Arg Arg Lys Tyr Lys Ser Ser Gly Phe Ser Cys Ala Gly Arg Tyr
340 345 350
[0020] Ser Glu Asn Ile Ser Arg Gln Thr Ser Glu Thr Ala Asp Asn Asp Asn
355 360 365
Ala Ser Ser Phe Thr Met
370

<210> 28
<211> 378
<212> PRT
<213> 智人
<400> 28

Met Asp Leu Gly Lys Pro Met Lys Ser Val Leu Val Val Ala Leu Leu
1 5 10 15
Val Ile Phe Gln Val Cys Leu Cys Gln Asp Glu Val Thr Asp Asp Tyr
20 25 30
Ile Gly Asp Asn Thr Thr Val Asp Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Leu Cys
35 40 45
Ser Lys Lys Asp Val Arg Asn Phe Lys Ala Trp Phe Leu Pro Ile Met
50 55 60
Tyr Ser Ile Ile Cys Phe Val Gly Leu Leu Gly Asn Gly Leu Val Val
65 70 75 80
Leu Thr Tyr Ile Tyr Phe Lys Arg Leu Lys Thr Met Thr Asp Thr Tyr
85 90 95
Leu Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Ile Leu Phe Leu Leu Thr Leu Pro
100 105 110

[0021]

Phe Trp Ala Tyr Ser Ala Ala Lys Ser Trp Val Phe Gly Val His Phe
115 120 125
Cys Lys Leu Ile Phe Ala Ile Tyr Lys Met Ser Phe Phe Ser Gly Met
130 135 140
Leu Leu Leu Leu Cys Ile Ser Ile Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val Gln
145 150 155 160
Ala Val Ser Ala His Arg His Arg Ala Arg Val Leu Leu Ile Ser Lys
165 170 175
Leu Ser Cys Val Gly Ile Trp Ile Leu Ala Thr Val Leu Ser Ile Pro
180 185 190
Glu Leu Leu Tyr Ser Asp Leu Gln Arg Ser Ser Ser Glu Gln Ala Met
195 200 205
Arg Cys Ser Leu Ile Thr Glu His Val Glu Ala Phe Ile Thr Ile Gln
210 215 220
Val Ala Gln Met Val Ile Gly Phe Leu Val Pro Leu Leu Ala Met Ser
225 230 235 240
Phe Cys Tyr Leu Val Ile Ile Arg Thr Leu Leu Gln Ala Arg Asn Phe
245 250 255
Glu Arg Asn Lys Ala Ile Lys Val Ile Ile Ala Val Val Val Val Phe
260 265 270
Ile Val Phe Gln Leu Pro Tyr Asn Gly Val Val Leu Ala Gln Thr Val
275 280 285
Ala Asn Phe Asn Ile Thr Ser Ser Thr Cys Glu Leu Ser Lys Gln Leu
290 295 300
Asn Ile Ala Tyr Asp Val Thr Tyr Ser Leu Ala Cys Val Arg Cys Cys
305 310 315 320
Val Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Phe Ile Gly Val Lys Phe Arg Asn Asp
325 330 335
Leu Phe Lys Leu Phe Lys Asp Leu Gly Cys Leu Ser Gln Glu Gln Leu
340 345 350
Arg Gln Trp Ser Ser Cys Arg His Ile Arg Arg Ser Ser Met Ser Val
355 360 365
Glu Ala Glu Thr Thr Thr Thr Phe Ser Pro
370 375

<210> 29
<211> 369
<212> PRT
<213> 智人
<400> 29

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

35 40 45

His Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Trp Leu Val Phe Ile Val Gly Ala Leu
50 55 60

Gly Asn Ser Leu Val Ile Leu Val Tyr Trp Tyr Cys Thr Arg Val Lys
65 70 75 80

Thr Met Thr Asp Met Phe Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ala Asp Leu Leu
85 90 95

Phe Leu Val Thr Leu Pro Phe Trp Ala Ile Ala Ala Ala Asp Gln Trp
100 105 110

Lys Phe Gln Thr Phe Met Cys Lys Val Val Asn Ser Met Tyr Lys Met
115 120 125

Asn Phe Tyr Ser Cys Val Leu Leu Ile Met Cys Ile Ser Val Asp Arg
130 135 140

Tyr Ile Ala Ile Ala Gln Ala Met Arg Ala His Thr Trp Arg Glu Lys
145 150 155 160

Arg Leu Leu Tyr Ser Lys Met Val Cys Phe Thr Ile Trp Val Leu Ala
165 170 175

Ala Ala Leu Cys Ile Pro Glu Ile Leu Tyr Ser Gln Ile Lys Glu Glu
180 185 190

Ser Gly Ile Ala Ile Cys Thr Met Val Tyr Pro Ser Asp Glu Ser Thr
195 200 205

[0022] Lys Leu Lys Ser Ala Val Leu Thr Leu Lys Val Ile Leu Gly Phe Phe
210 215 220

Leu Pro Phe Val Val Met Ala Cys Cys Tyr Thr Ile Ile Ile His Thr
225 230 235 240

Leu Ile Gln Ala Lys Lys Ser Ser Lys His Lys Ala Leu Lys Val Thr
245 250 255

Ile Thr Val Leu Thr Val Phe Val Leu Ser Gln Phe Pro Tyr Asn Cys
260 265 270

Ile Leu Leu Val Gln Thr Ile Asp Ala Tyr Ala Met Phe Ile Ser Asn
275 280 285

Cys Ala Val Ser Thr Asn Ile Asp Ile Cys Phe Gln Val Thr Gln Thr
290 295 300

Ile Ala Phe Phe His Ser Cys Leu Asn Pro Val Leu Tyr Val Phe Val
305 310 315 320

Gly Glu Arg Phe Arg Arg Asp Leu Val Lys Thr Leu Lys Asn Leu Gly
325 330 335

Cys Ile Ser Gln Ala Gln Trp Val Ser Phe Thr Arg Arg Glu Gly Ser
340 345 350

Leu Lys Leu Ser Ser Met Leu Leu Glu Thr Thr Ser Gly Ala Leu Ser
355 360 365

Leu

<210> 30

[0023]

<211> 360
<212> PRT
<213> 智人
<400> 30

Met Glu Asp Phe Asn Met Glu Ser Asp Ser Phe Glu Asp Phe Trp Lys
1 5 10 15
Gly Glu Asp Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Thr Leu Pro Pro Phe
20 25 30
Leu Leu Asp Ala Ala Pro Cys Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys
35 40 45
Tyr Phe Val Val Ile Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu
50 55 60
Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg
65 70 75 80
Ser Val Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu
85 90 95
Phe Ala Leu Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp
100 105 110
Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val
115 120 125
Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg
130 135 140
Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr
145 150 155 160
Leu Val Lys Phe Ile Cys Leu Ser Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Leu
165 170 175
Ala Leu Pro Val Leu Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val
180 185 190
Ser Pro Ala Cys Tyr Glu Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Arg
195 200 205
Met Leu Leu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu
210 215 220
Leu Ile Met Leu Phe Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys
225 230 235 240
Ala His Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val
245 250 255
Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn Leu Val Leu Leu
260 265 270
Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg
275 280 285
Arg Asn His Ile Asp Arg Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile
290 295 300
Leu His Ser Cys Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys
305 310 315 320

Phe Arg His Gly Leu Leu Lys Ile Leu Ala Ile His Gly Leu Ile Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Leu Pro Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser
340 345 350
Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu
355 360

<210> 31
<211> 352
<212> PRT
<213> 智人
<400> 31

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

[0024]

260 265 270

Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu
275 280 285

Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe
290 295 300

Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala Leu Thr Ser Val
305 310 315 320

Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly
325 330 335

His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser
340 345 350

<210> 32

<211> 372

<212> PRT

<213> 智人

<400> 32

[0025]

Met Asn Tyr Pro Leu Thr Leu Glu Met Asp Leu Glu Asn Leu Glu Asp
1 5 10 15

Leu Phe Trp Glu Leu Asp Arg Leu Asp Asn Tyr Asn Asp Thr Ser Leu
20 25 30

Val Glu Asn His Leu Cys Pro Ala Thr Glu Gly Pro Leu Met Ala Ser
35 40 45

Phe Lys Ala Val Phe Val Pro Val Ala Tyr Ser Leu Ile Phe Leu Leu
50 55 60

Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val Leu Val Ile Leu Glu Arg His Arg
65 70 75 80

Gln Thr Arg Ser Ser Thr Glu Thr Phe Leu Phe His Leu Ala Val Ala
85 90 95

Asp Leu Leu Leu Val Phe Ile Leu Pro Phe Ala Val Ala Glu Gly Ser
100 105 110

Val Gly Trp Val Leu Gly Thr Phe Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala Leu
115 120 125

His Lys Val Asn Phe Tyr Cys Ser Ser Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ala
130 135 140

Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val His Ala Tyr Arg His
145 150 155 160

Arg Arg Leu Leu Ser Ile His Ile Thr Cys Gly Thr Ile Trp Leu Val
165 170 175

Gly Phe Leu Leu Ala Leu Pro Glu Ile Leu Phe Ala Lys Val Ser Gln
180 185 190

Gly His His Asn Asn Ser Leu Pro Arg Cys Thr Phe Ser Gln Glu Asn
195 200 205

Gln Ala Glu Thr His Ala Trp Phe Thr Ser Arg Phe Leu Tyr His Val
210 215 220

Ala Gly Phe Leu Leu Pro Met Leu Val Met Gly Trp Cys Tyr Val Gly
225 230 235 240
Val Val His Arg Leu Arg Gln Ala Gln Arg Arg Pro Gln Arg Gln Lys
245 250 255
Ala Val Arg Val Ala Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe Phe Leu Cys Trp
260 265 270
Ser Pro Tyr His Ile Val Ile Phe Leu Asp Thr Leu Ala Arg Leu Lys
275 280 285
Ala Val Asp Asn Thr Cys Lys Leu Asn Gly Ser Leu Pro Val Ala Ile
290 295 300
Thr Met Cys Glu Phe Leu Gly Leu Ala His Cys Cys Leu Asn Pro Met
305 310 315 320
Leu Tyr Thr Phe Ala Gly Val Lys Phe Arg Ser Asp Leu Ser Arg Leu
325 330 335
Leu Thr Lys Leu Gly Cys Thr Gly Pro Ala Ser Leu Cys Gln Leu Phe
340 345 350
Pro Ser Trp Arg Arg Ser Ser Leu Ser Glu Ser Glu Asn Ala Thr Ser
355 360 365
Leu Thr Thr Phe
370

[0026]

<210> 33
<211> 342
<212> PRT
<213> 智人
<400> 33

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

145 150 155 160
Leu Val Ser Leu Pro Gln Ile Ile Tyr Gly Asn Val Phe Asn Leu Asp
165 170 175
Lys Leu Ile Cys Gly Tyr His Asp Glu Ala Ile Ser Thr Val Val Leu
180 185 190
Ala Thr Gln Met Thr Leu Gly Phe Phe Leu Pro Leu Leu Thr Met Ile
195 200 205
Val Cys Tyr Ser Val Ile Ile Lys Thr Leu Leu His Ala Gly Gly Phe
210 215 220
Gln Lys His Arg Ser Leu Lys Ile Ile Phe Leu Val Met Ala Val Phe
225 230 235 240
Leu Leu Thr Gln Met Pro Phe Asn Leu Met Lys Phe Ile Arg Ser Thr
245 250 255
His Trp Glu Tyr Tyr Ala Met Thr Ser Phe His Tyr Thr Ile Met Val
260 265 270
Thr Glu Ala Ile Ala Tyr Leu Arg Ala Cys Leu Asn Pro Val Leu Tyr
275 280 285
Ala Phe Val Ser Leu Lys Phe Arg Lys Asn Phe Trp Lys Leu Val Lys
290 295 300
Asp Ile Gly Cys Leu Pro Tyr Leu Gly Val Ser His Gln Trp Lys Ser
305 310 315 320
[0027] Ser Glu Asp Asn Ser Lys Thr Phe Ser Ala Ser His Asn Val Glu Ala
325 330 335
Thr Ser Met Phe Gln Leu
340

<210> 34
<211> 362
<212> PRT
<213> 智人
<400> 34

Met Asp Leu His Leu Phe Asp Tyr Ser Glu Pro Gly Asn Phe Ser Asp
1 5 10 15
Ile Ser Trp Pro Cys Asn Ser Ser Asp Cys Ile Val Val Asp Thr Val
20 25 30
Met Cys Pro Asn Met Pro Asn Lys Ser Val Leu Leu Tyr Thr Leu Ser
35 40 45
Phe Ile Tyr Ile Phe Ile Phe Val Ile Gly Met Ile Ala Asn Ser Val
50 55 60
Val Val Trp Val Asn Ile Gln Ala Lys Thr Thr Gly Tyr Asp Thr His
65 70 75 80
Cys Tyr Ile Leu Asn Leu Ala Ile Ala Asp Leu Trp Val Val Leu Thr
85 90 95
Ile Pro Val Trp Val Val Ser Leu Val Gln His Asn Gln Trp Pro Met
100 105 110

[0028]

Gly Glu Leu Thr Cys Lys Val Thr His Leu Ile Phe Ser Ile Asn Leu
115 120 125
Phe Gly Ser Ile Phe Phe Leu Thr Cys Met Ser Val Asp Arg Tyr Leu
130 135 140
Ser Ile Thr Tyr Phe Thr Asn Thr Pro Ser Ser Arg Lys Lys Met Val
145 150 155 160
Arg Arg Val Val Cys Ile Leu Val Trp Leu Leu Ala Phe Cys Val Ser
165 170 175
Leu Pro Asp Thr Tyr Tyr Leu Lys Thr Val Thr Ser Ala Ser Asn Asn
180 185 190
Glu Thr Tyr Cys Arg Ser Phe Tyr Pro Glu His Ser Ile Lys Glu Trp
195 200 205
Leu Ile Gly Met Glu Leu Val Ser Val Val Leu Gly Phe Ala Val Pro
210 215 220
Phe Ser Ile Ile Ala Val Phe Tyr Phe Leu Leu Ala Arg Ala Ile Ser
225 230 235 240
Ala Ser Ser Asp Gln Glu Lys His Ser Ser Arg Lys Ile Ile Phe Ser
245 250 255
Tyr Val Val Val Phe Leu Val Cys Trp Leu Pro Tyr His Val Ala Val
260 265 270
Leu Leu Asp Ile Phe Ser Ile Leu His Tyr Ile Pro Phe Thr Cys Arg
275 280 285
Leu Glu His Ala Leu Phe Thr Ala Leu His Val Thr Gln Cys Leu Ser
290 295 300
Leu Val His Cys Cys Val Asn Pro Val Leu Tyr Ser Phe Ile Asn Arg
305 310 315 320
Asn Tyr Arg Tyr Glu Leu Met Lys Ala Phe Ile Phe Lys Tyr Ser Ala
325 330 335
Lys Thr Gly Leu Thr Lys Leu Ile Asp Ala Ser Arg Val Ser Glu Thr
340 345 350
Glu Tyr Ser Ala Leu Glu Gln Ser Thr Lys
355 360

<210> 35
<211> 446
<212> PRT
<213> 智人
<400> 35

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

50 55 60
Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Ala Val Leu Val Met Pro Trp
65 70 75 80
Lys Ala Val Ala Glu Ile Ala Gly Phe Trp Pro Phe Gly Ser Phe Cys
85 90 95
Asn Ile Trp Val Ala Phe Asp Ile Met Cys Ser Thr Ala Ser Ile Leu
100 105 110
Asn Leu Cys Val Ile Ser Val Asp Arg Tyr Trp Ala Ile Ser Ser Pro
115 120 125
Phe Arg Tyr Glu Arg Lys Met Thr Pro Lys Ala Ala Phe Ile Leu Ile
130 135 140
Ser Val Ala Trp Thr Leu Ser Val Leu Ile Ser Phe Ile Pro Val Gln
145 150 155 160
Leu Ser Trp His Lys Ala Lys Pro Thr Ser Pro Ser Asp Gly Asn Ala
165 170 175
Thr Ser Leu Ala Glu Thr Ile Asp Asn Cys Asp Ser Ser Leu Ser Arg
180 185 190
Thr Tyr Ala Ile Ser Ser Ser Val Ile Ser Phe Tyr Ile Pro Val Ala
195 200 205
Ile Met Ile Val Thr Tyr Thr Arg Ile Tyr Arg Ile Ala Gln Lys Gln
210 215 220
[0029] Ile Arg Arg Ile Ala Ala Leu Glu Arg Ala Ala Val His Ala Lys Asn
225 230 235 240
Cys Gln Thr Thr Thr Gly Asn Gly Lys Pro Val Glu Cys Ser Gln Pro
245 250 255
Glu Ser Ser Phe Lys Met Ser Phe Lys Arg Glu Thr Lys Val Leu Lys
260 265 270
Thr Leu Ser Val Ile Met Gly Val Phe Val Cys Cys Trp Leu Pro Phe
275 280 285
Phe Ile Leu Asn Cys Ile Leu Pro Phe Cys Gly Ser Gly Glu Thr Gln
290 295 300
Pro Phe Cys Ile Asp Ser Asn Thr Phe Asp Val Phe Val Trp Phe Gly
305 310 315 320
Trp Ala Asn Ser Ser Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Asn Ala Asp
325 330 335
Phe Arg Lys Ala Phe Ser Thr Leu Leu Gly Cys Tyr Arg Leu Cys Pro
340 345 350
Ala Thr Asn Asn Ala Ile Glu Thr Val Ser Ile Asn Asn Asn Gly Ala
355 360 365
Ala Met Phe Ser Ser His His Glu Pro Arg Gly Ser Ile Ser Lys Glu
370 375 380
Cys Asn Leu Val Tyr Leu Ile Pro His Ala Val Gly Ser Ser Glu Asp
385 390 395 400
Leu Lys Lys Glu Glu Ala Ala Gly Ile Ala Arg Pro Leu Glu Lys Leu

405 410 415

Ser Pro Ala Leu Ser Val Ile Leu Asp Tyr Asp Thr Asp Val Ser Leu
420 425 430

Glu Lys Ile Gln Pro Ile Thr Gln Asn Gly Gln His Pro Thr
435 440 445

<210> 36
<211> 427
<212> PRT
<213> 智人
<400> 36

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

Cys Val Ile Ser Asp Asn Pro Glu Arg Tyr Ser Thr Asn Leu Ser Asn
20 25 30

His Val Asp Asp Phe Thr Thr Phe Arg Gly Thr Glu Leu Ser Phe Leu
35 40 45

Val Thr Thr His Gln Pro Thr Asn Leu Val Leu Pro Ser Asn Gly Ser
50 55 60

Met His Asn Tyr Cys Pro Gln Gln Thr Lys Ile Thr Ser Ala Phe Lys
65 70 75 80

Tyr Ile Asn Thr Val Ile Ser Cys Thr Ile Phe Ile Val Gly Met Val
85 90 95

[0030]

Gly Asn Ala Thr Leu Leu Arg Ile Ile Tyr Gln Asn Lys Cys Met Arg
100 105 110

Asn Gly Pro Asn Ala Leu Ile Ala Ser Leu Ala Leu Gly Asp Leu Ile
115 120 125

Tyr Val Val Ile Asp Leu Pro Ile Asn Val Phe Lys Leu Leu Ala Gly
130 135 140

Arg Trp Pro Phe Asp His Asn Asp Phe Gly Val Phe Leu Cys Lys Leu
145 150 155 160

Phe Pro Phe Leu Gln Lys Ser Ser Val Gly Ile Thr Val Leu Asn Leu
165 170 175

Cys Ala Leu Ser Val Asp Arg Tyr Arg Ala Val Ala Ser Trp Ser Arg
180 185 190

Val Gln Gly Ile Gly Ile Pro Leu Val Thr Ala Ile Glu Ile Val Ser
195 200 205

Ile Trp Ile Leu Ser Phe Ile Leu Ala Ile Pro Glu Ala Ile Gly Phe
210 215 220

Val Met Val Pro Phe Glu Tyr Arg Gly Glu Gln His Lys Thr Cys Met
225 230 235 240

Leu Asn Ala Thr Ser Lys Phe Met Glu Phe Tyr Gln Asp Val Lys Asp
245 250 255

Trp Trp Leu Phe Gly Phe Tyr Phe Cys Met Pro Leu Val Cys Thr Ala
260 265 270

Ile Phe Tyr Thr Leu Met Thr Cys Glu Met Leu Asn Arg Arg Asn Gly
275 280 285
Ser Leu Arg Ile Ala Leu Ser Glu His Leu Lys Gln Arg Arg Glu Val
290 295 300
Ala Lys Thr Val Phe Cys Leu Val Val Ile Phe Ala Leu Cys Trp Phe
305 310 315 320
Pro Leu His Leu Ser Arg Ile Leu Lys Lys Thr Val Tyr Asn Glu Met
325 330 335
Asp Lys Asn Arg Cys Glu Leu Leu Ser Phe Leu Leu Leu Met Asp Tyr
340 345 350
Ile Gly Ile Asn Leu Ala Thr Met Asn Ser Cys Ile Asn Pro Ile Ala
355 360 365
Leu Tyr Phe Val Ser Lys Lys Phe Lys Asn Cys Phe Gln Ser Cys Leu
370 375 380
Cys Cys Cys Cys Tyr Gln Ser Lys Ser Leu Met Thr Ser Val Pro Met
385 390 395 400
Asn Gly Thr Ser Ile Gln Trp Lys Asn His Asp Gln Asn Asn His Asn
405 410 415
Thr Asp Arg Ser Ser His Lys Asp Ser Met Asn
420 425

[0031]

<210> 37
<211> 442
<212> PRT
<213> 智人
<400> 37

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

145 150 155 160
Lys Leu Leu Ala Glu Asp Trp Pro Phe Gly Ala Glu Met Cys Lys Leu
165 170 175
Val Pro Phe Ile Gln Lys Ala Ser Val Gly Ile Thr Val Leu Ser Leu
180 185 190
Cys Ala Leu Ser Ile Asp Arg Tyr Arg Ala Val Ala Ser Trp Ser Arg
195 200 205
Ile Lys Gly Ile Gly Val Pro Lys Trp Thr Ala Val Glu Ile Val Leu
210 215 220
Ile Trp Val Val Ser Val Val Leu Ala Val Pro Glu Ala Ile Gly Phe
225 230 235 240
Asp Ile Ile Thr Met Asp Tyr Lys Gly Ser Tyr Leu Arg Ile Cys Leu
245 250 255
Leu His Pro Val Gln Lys Thr Ala Phe Met Gln Phe Tyr Lys Thr Ala
260 265 270
Lys Asp Trp Trp Leu Phe Ser Phe Tyr Phe Cys Leu Pro Leu Ala Ile
275 280 285
Thr Ala Phe Phe Tyr Thr Leu Met Thr Cys Glu Met Leu Arg Lys Lys
290 295 300
Ser Gly Met Gln Ile Ala Leu Asn Asp His Leu Lys Gln Arg Arg Glu
305 310 315 320
[0032] Val Ala Lys Thr Val Phe Cys Leu Val Leu Val Phe Ala Leu Cys Trp
325 330 335
Leu Pro Leu His Leu Ser Arg Ile Leu Lys Leu Thr Leu Tyr Asn Gln
340 345 350
Asn Asp Pro Asn Arg Cys Glu Leu Leu Ser Phe Leu Leu Val Leu Asp
355 360 365
Tyr Ile Gly Ile Asn Met Ala Ser Leu Asn Ser Cys Ile Asn Pro Ile
370 375 380
Ala Leu Tyr Leu Val Ser Lys Arg Phe Lys Asn Cys Phe Lys Ser Cys
385 390 395 400
Leu Cys Cys Trp Cys Gln Ser Phe Glu Glu Lys Gln Ser Leu Glu Glu
405 410 415
Lys Gln Ser Cys Leu Lys Phe Lys Ala Asn Asp His Gly Tyr Asp Asn
420 425 430
Phe Arg Ser Ser Asn Lys Tyr Ser Ser Ser
435 440

<210> 38
<211> 445
<212> PRT
<213> 智人
<400> 38

Met Glu Arg Ala Pro Pro Asp Gly Pro Leu Asn Ala Ser Gly Ala Leu
1 5 10 15

[0033]

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

Leu Cys Trp Ala Pro Tyr Thr Leu Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys
370 375 380
His Gly His Cys Val Pro Asp Tyr Trp Tyr Glu Thr Ser Phe Trp Leu
385 390 395 400
Leu Trp Ala Asn Ser Ala Val Asn Pro Val Leu Tyr Pro Leu Cys His
405 410 415
His Ser Phe Arg Arg Ala Phe Thr Lys Leu Leu Cys Pro Gln Lys Leu
420 425 430
Lys Ile Gln Pro His Ser Ser Leu Glu His Cys Trp Lys
435 440 445

<210> 39
<211> 460
<212> PRT
<213> 智人
<400> 39

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

[0034]

225 230 235 240
Ser Glu Arg Ser Gln Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro Glu Thr Pro Pro
245 250 255
Gly Arg Cys Cys Arg Cys Cys Arg Ala Pro Arg Leu Leu Gln Ala Tyr
260 265 270
Ser Trp Lys Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Gly Ser Met Glu Ser Leu
275 280 285
Thr Ser Ser Glu Gly Glu Glu Pro Gly Ser Glu Val Val Ile Lys Met
290 295 300
Pro Met Val Asp Pro Glu Ala Gln Ala Pro Thr Lys Gln Pro Pro Arg
305 310 315 320
Ser Ser Pro Asn Thr Val Lys Arg Pro Thr Lys Lys Gly Arg Asp Arg
325 330 335
Ala Gly Lys Gly Gln Lys Pro Arg Gly Lys Glu Gln Leu Ala Lys Arg
340 345 350
Lys Thr Phe Ser Leu Val Lys Glu Lys Lys Ala Ala Arg Thr Leu Ser
355 360 365
Ala Ile Leu Leu Ala Phe Ile Leu Thr Trp Thr Pro Tyr Asn Ile Met
370 375 380
Val Leu Val Ser Thr Phe Cys Lys Asp Cys Val Pro Glu Thr Leu Trp
385 390 395 400
Glu Leu Gly Tyr Trp Leu Cys Tyr Val Asn Ser Thr Ile Asn Pro Met
405 410 415
Cys Tyr Ala Leu Cys Asn Lys Ala Phe Arg Asp Thr Phe Arg Leu Leu
420 425 430
Leu Leu Cys Arg Trp Asp Lys Arg Arg Trp Arg Lys Ile Pro Lys Arg
435 440 445
Pro Gly Ser Val His Arg Thr Pro Ser Arg Gln Cys
450 455 460

[0035]

<210> 40
<211> 466
<212> PRT
<213> 智人
<400> 40
Met Asn Asn Ser Thr Asn Ser Ser Asn Asn Ser Leu Ala Leu Thr Ser
1 5 10 15
Pro Tyr Lys Thr Phe Glu Val Val Phe Ile Val Leu Val Ala Gly Ser
20 25 30
Leu Ser Leu Val Thr Ile Ile Gly Asn Ile Leu Val Met Val Ser Ile
35 40 45
Lys Val Asn Arg His Leu Gln Thr Val Asn Asn Tyr Phe Leu Phe Ser
50 55 60
Leu Ala Cys Ala Asp Leu Ile Ile Gly Val Phe Ser Met Asn Leu Tyr
65 70 75 80

[0036]

```
Thr Leu Tyr Thr Val Ile Gly Tyr Trp Pro Leu Gly Pro Val Val Cys
                85                  90                  95
Asp Leu Trp Leu Ala Leu Asp Tyr Val Val Ser Asn Ala Ser Val Met
            100                 105                 110
Asn Leu Leu Ile Ile Ser Phe Asp Arg Tyr Phe Cys Val Thr Lys Pro
        115                 120                 125
Leu Thr Tyr Pro Val Lys Arg Thr Thr Lys Met Ala Gly Met Met Ile
    130                 135                 140
Ala Ala Ala Trp Val Leu Ser Phe Ile Leu Trp Ala Pro Ala Ile Leu
145                 150                 155                 160
Phe Trp Gln Phe Ile Val Gly Val Arg Thr Val Glu Asp Gly Glu Cys
                165                 170                 175
Tyr Ile Gln Phe Phe Ser Asn Ala Ala Val Thr Phe Gly Thr Ala Ile
            180                 185                 190
Ala Ala Phe Tyr Leu Pro Val Ile Ile Met Thr Val Leu Tyr Trp His
        195                 200                 205
Ile Ser Arg Ala Ser Lys Ser Arg Ile Lys Lys Asp Lys Lys Glu Pro
    210                 215                 220
Val Ala Asn Gln Asp Pro Val Ser Pro Ser Leu Val Gln Gly Arg Ile
225                 230                 235                 240
Val Lys Pro Asn Asn Asn Asn Met Pro Ser Ser Asp Asp Gly Leu Glu
                245                 250                 255
His Asn Lys Ile Gln Asn Gly Lys Ala Pro Arg Asp Pro Val Thr Glu
            260                 265                 270
Asn Cys Val Gln Gly Glu Glu Lys Glu Ser Ser Asn Asp Ser Thr Ser
        275                 280                 285
Val Ser Ala Val Ala Ser Asn Met Arg Asp Asp Glu Ile Thr Gln Asp
    290                 295                 300
Glu Asn Thr Val Ser Thr Ser Leu Gly His Ser Lys Asp Glu Asn Ser
305                 310                 315                 320
Lys Gln Thr Cys Ile Arg Ile Gly Thr Lys Thr Pro Lys Ser Asp Ser
                325                 330                 335
Cys Thr Pro Thr Asn Thr Thr Val Glu Val Val Gly Ser Ser Gly Gln
            340                 345                 350
Asn Gly Asp Glu Lys Gln Asn Ile Val Ala Arg Lys Ile Val Lys Met
        355                 360                 365
Thr Lys Gln Pro Ala Lys Lys Lys Pro Pro Pro Ser Arg Glu Lys Lys
    370                 375                 380
Val Thr Arg Thr Ile Leu Ala Ile Leu Leu Ala Phe Ile Ile Thr Trp
385                 390                 395                 400
Ala Pro Tyr Asn Val Met Val Leu Ile Asn Thr Phe Cys Ala Pro Cys
                405                 410                 415
Ile Pro Asn Thr Val Trp Thr Ile Gly Tyr Trp Leu Cys Tyr Ile Asn
            420                 425                 430
```

Ser Thr Ile Asn Pro Ala Cys Tyr Ala Leu Cys Asn Ala Thr Phe Lys
435 440 445
Lys Thr Phe Lys His Leu Leu Met Cys His Tyr Lys Asn Ile Gly Ala
450 455 460
Thr Arg
465

<210> 41
<211> 590
<212> PRT
<213> 智人
<400> 41

[0037]

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

[0038]

260 265 270

Thr Glu Ala Glu Thr Glu Asn Phe Val His Pro Thr Gly Ser Ser Arg
275 280 285

Ser Cys Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Gln Gln Ser Met Lys Arg Ser Asn
290 295 300

Arg Arg Lys Tyr Gly Arg Cys His Phe Trp Phe Thr Thr Lys Ser Trp
305 310 315 320

Lys Pro Ser Ser Glu Gln Met Asp Gln Asp His Ser Ser Ser Asp Ser
325 330 335

Trp Asn Asn Asn Asp Ala Ala Ala Ser Leu Glu Asn Ser Ala Ser Ser
340 345 350

Asp Glu Glu Asp Ile Gly Ser Glu Thr Arg Ala Ile Tyr Ser Ile Val
355 360 365

Leu Lys Leu Pro Gly His Ser Thr Ile Leu Asn Ser Thr Lys Leu Pro
370 375 380

Ser Ser Asp Asn Leu Gln Val Pro Glu Glu Glu Leu Gly Met Val Asp
385 390 395 400

Leu Glu Arg Lys Ala Asp Lys Leu Gln Ala Gln Lys Ser Val Asp Asp
405 410 415

Gly Gly Ser Phe Pro Lys Ser Phe Ser Lys Leu Pro Ile Gln Leu Glu
420 425 430

Ser Ala Val Asp Thr Ala Lys Thr Ser Asp Val Asn Ser Ser Val Gly
435 440 445

Lys Ser Thr Ala Thr Leu Pro Leu Ser Phe Lys Glu Ala Thr Leu Ala
450 455 460

Lys Arg Phe Ala Leu Lys Thr Arg Ser Gln Ile Thr Lys Arg Lys Arg
465 470 475 480

Met Ser Leu Val Lys Glu Lys Lys Ala Ala Gln Thr Leu Ser Ala Ile
485 490 495

Leu Leu Ala Phe Ile Ile Thr Trp Thr Pro Tyr Asn Ile Met Val Leu
500 505 510

Val Asn Thr Phe Cys Asp Ser Cys Ile Pro Lys Thr Phe Trp Asn Leu
515 520 525

Gly Tyr Trp Leu Cys Tyr Ile Asn Ser Thr Val Asn Pro Val Cys Tyr
530 535 540

Ala Leu Cys Asn Lys Thr Phe Arg Thr Thr Phe Lys Met Leu Leu Leu
545 550 555 560

Cys Gln Cys Asp Lys Lys Lys Arg Arg Lys Gln Gln Tyr Gln Gln Arg
565 570 575

Gln Ser Val Ile Phe His Lys Arg Ala Pro Glu Gln Ala Leu
580 585 590

<210> 42

<211> 384

<212> PRT

<213> 智人

<400> 42

[0039]

Met Asn Ser Thr Leu Phe Ser Gln Val Glu Asn His Ser Val His Ser
1 5 10 15
Asn Phe Ser Glu Lys Asn Ala Gln Leu Leu Ala Phe Glu Asn Asp Asp
20 25 30
Cys His Leu Pro Leu Ala Met Ile Phe Thr Leu Ala Leu Ala Tyr Gly
35 40 45
Ala Val Ile Ile Leu Gly Val Ser Gly Asn Leu Ala Leu Ile Ile Ile
50 55 60
Ile Leu Lys Gln Lys Glu Met Arg Asn Val Thr Asn Ile Leu Ile Val
65 70 75 80
Asn Leu Ser Phe Ser Asp Leu Leu Val Ala Ile Met Cys Leu Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Val Tyr Thr Leu Met Asp His Trp Val Phe Gly Glu Ala Met
100 105 110
Cys Lys Leu Asn Pro Phe Val Gln Cys Val Ser Ile Thr Val Ser Ile
115 120 125
Phe Ser Leu Val Leu Ile Ala Val Glu Arg His Gln Leu Ile Ile Asn
130 135 140
Pro Arg Gly Trp Arg Pro Asn Asn Arg His Ala Tyr Val Gly Ile Ala
145 150 155 160
Val Ile Trp Val Leu Ala Val Ala Ser Ser Leu Pro Phe Leu Ile Tyr
165 170 175
Gln Val Met Thr Asp Glu Pro Phe Gln Asn Val Thr Leu Asp Ala Tyr
180 185 190
Lys Asp Lys Tyr Val Cys Phe Asp Gln Phe Pro Ser Asp Ser His Arg
195 200 205
Leu Ser Tyr Thr Thr Leu Leu Leu Val Leu Gln Tyr Phe Gly Pro Leu
210 215 220
Cys Phe Ile Phe Ile Cys Tyr Phe Lys Ile Tyr Ile Arg Leu Lys Arg
225 230 235 240
Arg Asn Asn Met Met Asp Lys Met Arg Asp Asn Lys Tyr Arg Ser Ser
245 250 255
Glu Thr Lys Arg Ile Asn Ile Met Leu Leu Ser Ile Val Val Ala Phe
260 265 270
Ala Val Cys Trp Leu Pro Leu Thr Ile Phe Asn Thr Val Phe Asp Trp
275 280 285
Asn His Gln Ile Ile Ala Thr Cys Asn His Asn Leu Leu Phe Leu Leu
290 295 300
Cys His Leu Thr Ala Met Ile Ser Thr Cys Val Asn Pro Ile Phe Tyr
305 310 315 320
Gly Phe Leu Asn Lys Asn Phe Gln Arg Asp Leu Gln Phe Phe Phe Asn
325 330 335

Phe Cys Asp Phe Arg Ser Arg Asp Asp Asp Tyr Glu Thr Ile Ala Met
340 345 350
Ser Thr Met His Thr Asp Val Ser Lys Thr Ser Leu Lys Gln Ala Ser
355 360 365
Pro Val Ala Phe Lys Lys Ile Asn Asn Asn Asp Asp Asn Glu Lys Ile
370 375 380

<210> 43
<211> 418
<212> PRT
<213> 智人
<400> 43

Met Arg Leu Asn Ser Ser Ala Pro Gly Thr Pro Gly Thr Pro Ala Ala
1 5 10 15
Asp Pro Phe Gln Arg Ala Gln Ala Gly Leu Glu Glu Ala Leu Leu Ala
20 25 30
Pro Gly Phe Gly Asn Ala Ser Gly Asn Ala Ser Glu Arg Val Leu Ala
35 40 45
Ala Pro Ser Ser Glu Leu Asp Val Asn Thr Asp Ile Tyr Ser Lys Val
50 55 60
Leu Val Thr Ala Val Tyr Leu Ala Leu Phe Val Val Gly Thr Val Gly
65 70 75 80

[0040]

Asn Thr Val Thr Ala Phe Thr Leu Ala Arg Lys Lys Ser Leu Gln Ser
85 90 95
Leu Gln Ser Thr Val His Tyr His Leu Gly Ser Leu Ala Leu Ser Asp
100 105 110
Leu Leu Thr Leu Leu Leu Ala Met Pro Val Glu Leu Tyr Asn Phe Ile
115 120 125
Trp Val His His Pro Trp Ala Phe Gly Asp Ala Gly Cys Arg Gly Tyr
130 135 140
Tyr Phe Leu Arg Asp Ala Cys Thr Tyr Ala Thr Ala Leu Asn Val Ala
145 150 155 160
Ser Leu Ser Val Glu Arg Tyr Leu Ala Ile Cys His Pro Phe Lys Ala
165 170 175
Lys Thr Leu Met Ser Arg Ser Arg Thr Lys Lys Phe Ile Ser Ala Ile
180 185 190
Trp Leu Ala Ser Ala Leu Leu Ala Val Pro Met Leu Phe Thr Met Gly
195 200 205
Glu Gln Asn Arg Ser Ala Asp Gly Gln His Ala Gly Gly Leu Val Cys
210 215 220

Thr Pro Thr Ile His Thr Ala Thr Val Lys Val Val Ile Gln Val Asn
225 230 235 240
Thr Phe Met Ser Phe Ile Phe Pro Met Val Val Ile Ser Val Leu Asn
245 250 255

Thr Ile Ile Ala Asn Lys Leu Thr Val Met Val Arg Gln Ala Ala Glu
260 265 270
Gln Gly Gln Val Cys Thr Val Gly Gly Glu His Ser Thr Phe Ser Met
275 280 285
Ala Ile Glu Pro Gly Arg Val Gln Ala Leu Arg His Gly Val Arg Val
290 295 300
Leu Arg Ala Val Val Ile Ala Phe Val Val Cys Trp Leu Pro Tyr His
305 310 315 320
Val Arg Arg Leu Met Phe Cys Tyr Ile Ser Asp Glu Gln Trp Thr Pro
325 330 335
Phe Leu Tyr Asp Phe Tyr His Tyr Phe Tyr Met Val Thr Asn Ala Leu
340 345 350
Phe Tyr Val Ser Ser Thr Ile Asn Pro Ile Leu Tyr Asn Leu Val Ser
355 360 365
Ala Asn Phe Arg His Ile Phe Leu Ala Thr Leu Ala Cys Leu Cys Pro
370 375 380
Val Trp Arg Arg Arg Arg Lys Arg Pro Ala Phe Ser Arg Lys Ala Asp
385 390 395 400
Ser Val Ser Ser Asn His Thr Leu Ser Ser Asn Ala Thr Arg Glu Thr
405 410 415
Leu Tyr

[0041]

<210> 44
<211> 425
<212> PRT
<213> 智人
<400> 44
Met Glu Pro Ser Ala Thr Pro Gly Ala Gln Met Gly Val Pro Pro Gly
1 5 10 15
Ser Arg Glu Pro Ser Pro Val Pro Pro Asp Tyr Glu Asp Glu Phe Leu
20 25 30
Arg Tyr Leu Trp Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Lys Gln Tyr Glu Trp Val
35 40 45
Leu Ile Ala Ala Tyr Val Ala Val Phe Val Val Ala Leu Val Gly Asn
50 55 60
Thr Leu Val Cys Leu Ala Val Trp Arg Asn His His Met Arg Thr Val
65 70 75 80
Thr Asn Tyr Phe Ile Val Asn Leu Ser Leu Ala Asp Val Leu Val Thr
85 90 95
Ala Ile Cys Leu Pro Ala Ser Leu Leu Val Asp Ile Thr Glu Ser Trp
100 105 110
Leu Phe Gly His Ala Leu Cys Lys Val Ile Pro Tyr Leu Gln Ala Val
115 120 125
Ser Val Ser Val Ala Val Leu Thr Leu Ser Phe Ile Ala Leu Asp Arg

130 135 140

Trp Tyr Ala Ile Cys His Pro Leu Leu Phe Lys Ser Thr Ala Arg Arg
145 150 155 160

Ala Arg Gly Ser Ile Leu Gly Ile Trp Ala Val Ser Leu Ala Ile Met
165 170 175

Val Pro Gln Ala Ala Val Met Glu Cys Ser Ser Val Leu Pro Glu Leu
180 185 190

Ala Asn Arg Thr Arg Leu Phe Ser Val Cys Asp Glu Arg Trp Ala Asp
195 200 205

Asp Leu Tyr Pro Lys Ile Tyr His Ser Cys Phe Phe Ile Val Thr Tyr
210 215 220

Leu Ala Pro Leu Gly Leu Met Ala Met Ala Tyr Phe Gln Ile Phe Arg
225 230 235 240

Lys Leu Trp Gly Arg Gln Ile Pro Gly Thr Thr Ser Ala Leu Val Arg
245 250 255

Asn Trp Lys Arg Pro Ser Asp Gln Leu Gly Asp Leu Glu Gln Gly Leu
260 265 270

Ser Gly Glu Pro Gln Pro Arg Ala Arg Ala Phe Leu Ala Glu Val Lys
275 280 285

Gln Met Arg Ala Arg Arg Lys Thr Ala Lys Met Leu Met Val Val Leu
290 295 300

[0042]

Leu Val Phe Ala Leu Cys Tyr Leu Pro Ile Ser Val Leu Asn Val Leu
305 310 315 320

Lys Arg Val Phe Gly Met Phe Arg Gln Ala Ser Asp Arg Glu Ala Val
325 330 335

Tyr Ala Cys Phe Thr Phe Ser His Trp Leu Val Tyr Ala Asn Ser Ala
340 345 350

Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Asn Phe Leu Ser Gly Lys Phe Arg Glu Gln
355 360 365

Phe Lys Ala Ala Phe Ser Cys Cys Leu Pro Gly Leu Gly Pro Cys Gly
370 375 380

Ser Leu Lys Ala Pro Ser Pro Arg Ser Ser Ala Ser His Lys Ser Leu
385 390 395 400

Ser Leu Gln Ser Arg Cys Ser Ile Ser Lys Ile Ser Glu His Val Val
405 410 415

Leu Thr Ser Val Thr Thr Val Leu Pro
420 425

<210> 45
<211> 444
<212> PRT
<213> 智人
<400> 45

Met Ser Gly Thr Lys Leu Glu Asp Ser Pro Pro Cys Arg Asn Trp Ser
1 5 10 15

[0043]

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

Gly Lys Phe Arg Glu Glu Phe Lys Ala Ala Phe Ser Cys Cys Cys Leu
370 375 380
Gly Val His His Arg Gln Glu Asp Arg Leu Thr Arg Gly Arg Thr Ser
385 390 395 400
Thr Glu Ser Arg Lys Ser Leu Thr Thr Gln Ile Ser Asn Phe Asp Asn
405 410 415
Ile Ser Lys Leu Ser Glu Gln Val Val Leu Thr Ser Ile Ser Thr Leu
420 425 430
Pro Ala Ala Asn Gly Ala Gly Pro Leu Gln Asn Trp
435 440

<210> 46
<211> 402
<212> PRT
<213> 智人
<400> 46

[0044]

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

225 230 235 240
Pro Pro Pro Ala Ser Gly Pro Asp Ser Arg Arg Trp Gly Ala His
245 250 255
Gly Pro Arg Ser Ala Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ile Ala Ser Ala
260 265 270
Ser Thr Phe Phe Gly Gly Ser Arg Ser Ser Gly Ser Ala Arg Arg Ala
275 280 285
Arg Ala His Asp Val Glu Met Val Gly Gln Leu Val Gly Ile Met Val
290 295 300
Val Ser Cys Ile Cys Trp Ser Pro Met Leu Val Leu Val Ala Leu Ala
305 310 315 320
Val Gly Gly Trp Ser Ser Thr Ser Leu Gln Arg Pro Leu Phe Leu Ala
325 330 335
Val Arg Leu Ala Ser Trp Asn Gln Ile Leu Asp Pro Trp Val Tyr Ile
340 345 350
Leu Leu Arg Gln Ala Val Leu Arg Gln Leu Leu Arg Leu Leu Pro Pro
355 360 365
Arg Ala Gly Ala Lys Gly Gly Pro Ala Gly Leu Gly Leu Thr Pro Ser
370 375 380
Ala Trp Glu Ala Ser Ser Leu Arg Ser Ser Arg His Ser Gly Leu Ser
385 390 395 400
His Phe

[0045]

<210> 47
<211> 422
<212> PRT
<213> 智人
<400> 47
Met Asp Val Leu Ser Pro Gly Gln Gly Asn Asn Thr Thr Ser Pro Pro
1 5 10 15
Ala Pro Phe Glu Thr Gly Gly Asn Thr Thr Gly Ile Ser Asp Val Thr
20 25 30
Val Ser Tyr Gln Val Ile Thr Ser Leu Leu Leu Gly Thr Leu Ile Phe
35 40 45
Cys Ala Val Leu Gly Asn Ala Cys Val Val Ala Ala Ile Ala Leu Glu
50 55 60
Arg Ser Leu Gln Asn Val Ala Asn Tyr Leu Ile Gly Ser Leu Ala Val
65 70 75 80
Thr Asp Leu Met Val Ser Val Leu Val Leu Pro Met Ala Ala Leu Tyr
85 90 95
Gln Val Leu Asn Lys Trp Thr Leu Gly Gln Val Thr Cys Asp Leu Phe
100 105 110
Ile Ala Leu Asp Val Leu Cys Cys Thr Ser Ser Ile Leu His Leu Cys
115 120 125

[0046]

Ala Ile Ala Leu Asp Arg Tyr Trp Ala Ile Thr Asp Pro Ile Asp Tyr
130 135 140
Val Asn Lys Arg Thr Pro Arg Arg Ala Ala Ala Leu Ile Ser Leu Thr
145 150 155 160
Trp Leu Ile Gly Phe Leu Ile Ser Ile Pro Pro Met Leu Gly Trp Arg
165 170 175
Thr Pro Glu Asp Arg Ser Asp Pro Asp Ala Cys Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190
His Gly Tyr Thr Ile Tyr Ser Thr Phe Gly Ala Phe Tyr Ile Pro Leu
195 200 205
Leu Leu Met Leu Val Leu Tyr Gly Arg Ile Phe Arg Ala Ala Arg Phe
210 215 220
Arg Ile Arg Lys Thr Val Lys Lys Val Glu Lys Thr Gly Ala Asp Thr
225 230 235 240
Arg His Gly Ala Ser Pro Ala Pro Gln Pro Lys Lys Ser Val Asn Gly
245 250 255
Glu Ser Gly Ser Arg Asn Trp Arg Leu Gly Val Glu Ser Lys Ala Gly
260 265 270
Gly Ala Leu Cys Ala Asn Gly Ala Val Arg Gln Gly Asp Asp Gly Ala
275 280 285
Ala Leu Glu Val Ile Glu Val His Arg Val Gly Asn Ser Lys Glu His
290 295 300
Leu Pro Leu Pro Ser Glu Ala Gly Pro Thr Pro Cys Ala Pro Ala Ser
305 310 315 320
Phe Glu Arg Lys Asn Glu Arg Asn Ala Glu Ala Lys Arg Lys Met Ala
325 330 335
Leu Ala Arg Glu Arg Lys Thr Val Lys Thr Leu Gly Ile Ile Met Gly
340 345 350
Thr Phe Ile Leu Cys Trp Leu Pro Phe Phe Ile Val Ala Leu Val Leu
355 360 365
Pro Phe Cys Glu Ser Ser Cys His Met Pro Thr Leu Leu Gly Ala Ile
370 375 380
Ile Asn Trp Leu Gly Tyr Ser Asn Ser Leu Leu Asn Pro Val Ile Tyr
385 390 395 400
Ala Tyr Phe Asn Lys Asp Phe Gln Asn Ala Phe Lys Lys Ile Ile Lys
405 410 415
Cys Lys Phe Cys Arg Gln
420

<210> 48
<211> 471
<212> PRT
<213> 智人
<400> 48

Met Asp Ile Leu Cys Glu Glu Asn Thr Ser Leu Ser Ser Thr Thr Asn

[0047]

```
1               5                   10                  15
Ser Leu Met Gln Leu Asn Asp Asp Thr Arg Leu Tyr Ser Asn Asp Phe
            20                  25                  30
Asn Ser Gly Glu Ala Asn Thr Ser Asp Ala Phe Asn Trp Thr Val Asp
        35                  40                  45
Ser Glu Asn Arg Thr Asn Leu Ser Cys Glu Gly Cys Leu Ser Pro Ser
    50                  55                  60
Cys Leu Ser Leu Leu His Leu Gln Glu Lys Asn Trp Ser Ala Leu Leu
65                  70                  75                  80
Thr Ala Val Val Ile Ile Leu Thr Ile Ala Gly Asn Ile Leu Val Ile
                85                  90                  95
Met Ala Val Ser Leu Glu Lys Lys Leu Gln Asn Ala Thr Asn Tyr Phe
            100                 105                 110
Leu Met Ser Leu Ala Ile Ala Asp Met Leu Leu Gly Phe Leu Val Met
        115                 120                 125
Pro Val Ser Met Leu Thr Ile Leu Tyr Gly Tyr Arg Trp Pro Leu Pro
    130                 135                 140
Ser Lys Leu Cys Ala Val Trp Ile Tyr Leu Asp Val Leu Phe Ser Thr
145                 150                 155                 160
Ala Ser Ile Met His Leu Cys Ala Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Val Ala
                165                 170                 175
Ile Gln Asn Pro Ile His His Ser Arg Phe Asn Ser Arg Thr Lys Ala
            180                 185                 190
Phe Leu Lys Ile Ile Ala Val Trp Thr Ile Ser Val Gly Ile Ser Met
        195                 200                 205
Pro Ile Pro Val Phe Gly Leu Gln Asp Asp Ser Lys Val Phe Lys Glu
    210                 215                 220
Gly Ser Cys Leu Leu Ala Asp Asp Asn Phe Val Leu Ile Gly Ser Phe
225                 230                 235                 240
Val Ser Phe Phe Ile Pro Leu Thr Ile Met Val Ile Thr Tyr Phe Leu
                245                 250                 255
Thr Ile Lys Ser Leu Gln Lys Glu Ala Thr Leu Cys Val Ser Asp Leu
            260                 265                 270
Gly Thr Arg Ala Lys Leu Ala Ser Phe Ser Phe Leu Pro Gln Ser Ser
        275                 280                 285
Leu Ser Ser Glu Lys Leu Phe Gln Arg Ser Ile His Arg Glu Pro Gly
    290                 295                 300
Ser Tyr Thr Gly Arg Arg Thr Met Gln Ser Ile Ser Asn Glu Gln Lys
305                 310                 315                 320
Ala Cys Lys Val Leu Gly Ile Val Phe Phe Leu Phe Val Val Met Trp
                325                 330                 335
Cys Pro Phe Phe Ile Thr Asn Ile Met Ala Val Ile Cys Lys Glu Ser
            340                 345                 350
Cys Asn Glu Asp Val Ile Gly Ala Leu Leu Asn Val Phe Val Trp Ile
```

355 360 365
Gly Tyr Leu Ser Ser Ala Val Asn Pro Leu Val Tyr Thr Leu Phe Asn
370 375 380
Lys Thr Tyr Arg Ser Ala Phe Ser Arg Tyr Ile Gln Cys Gln Tyr Lys
385 390 395 400
Glu Asn Lys Lys Pro Leu Gln Leu Ile Leu Val Asn Thr Ile Pro Ala
405 410 415
Leu Ala Tyr Lys Ser Ser Gln Leu Gln Met Gly Gln Lys Lys Asn Ser
420 425 430
Lys Gln Asp Ala Lys Thr Thr Asp Asn Asp Cys Ser Met Val Ala Leu
435 440 445
Gly Lys Gln His Ser Glu Glu Ala Ser Lys Asp Asn Ser Asp Gly Val
450 455 460
Asn Glu Lys Val Ser Cys Val
465 470

<210> 49
<211> 481
<212> PRT
<213> 智人
<400> 49

[0048]

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

[0049]

Lys Gly Ile Glu Thr Asp Val Asp Asn Pro Asn Asn Ile Thr Cys Val
195 200 205
Leu Thr Lys Glu Arg Phe Gly Asp Phe Met Leu Phe Gly Ser Leu Ala
210 215 220
Ala Phe Phe Thr Pro Leu Ala Ile Met Ile Val Thr Tyr Phe Leu Thr
225 230 235 240
Ile His Ala Leu Gln Lys Lys Ala Tyr Leu Val Lys Asn Lys Pro Pro
245 250 255
Gln Arg Leu Thr Trp Leu Thr Val Ser Thr Val Phe Gln Arg Asp Glu
260 265 270
Thr Pro Cys Ser Ser Pro Glu Lys Val Ala Met Leu Asp Gly Ser Arg
275 280 285
Lys Asp Lys Ala Leu Pro Asn Ser Gly Asp Glu Thr Leu Met Arg Arg
290 295 300
Thr Ser Thr Ile Gly Lys Lys Ser Val Gln Thr Ile Ser Asn Glu Gln
305 310 315 320
Arg Ala Ser Lys Val Leu Gly Ile Val Phe Phe Leu Phe Leu Leu Met
325 330 335
Trp Cys Pro Phe Phe Ile Thr Asn Ile Thr Leu Val Leu Cys Asp Ser
340 345 350
Cys Asn Gln Thr Thr Leu Gln Met Leu Leu Glu Ile Phe Val Trp Ile
355 360 365
Gly Tyr Val Ser Ser Gly Val Asn Pro Leu Val Tyr Thr Leu Phe Asn
370 375 380
Lys Thr Phe Arg Asp Ala Phe Gly Arg Tyr Ile Thr Cys Asn Tyr Arg
385 390 395 400
Ala Thr Lys Ser Val Lys Thr Leu Arg Lys Arg Ser Ser Lys Ile Tyr
405 410 415
Phe Arg Asn Pro Met Ala Glu Asn Ser Lys Phe Phe Lys Lys His Gly
420 425 430
Ile Arg Asn Gly Ile Asn Pro Ala Met Tyr Gln Ser Pro Met Arg Leu
435 440 445
Arg Ser Ser Thr Ile Gln Ser Ser Ser Ile Ile Leu Leu Asp Thr Leu
450 455 460
Leu Leu Thr Glu Asn Glu Gly Asp Lys Thr Glu Glu Gln Val Ser Tyr
465 470 475 480
Val

<210> 50
<211> 457
<212> PRT
<213> 智人
<400> 50
Met Val Asn Leu Arg Asn Ala Val His Ser Phe Leu Val His Leu Ile

[0050]

```
1               5                   10                  15
Gly Leu Leu Val Trp Gln Cys Asp Ile Ser Val Ser Pro Val Ala Ala
            20                  25                  30
Ile Val Thr Asp Ile Phe Asn Thr Ser Asp Gly Gly Arg Phe Lys Phe
        35                  40                  45
Pro Asp Gly Val Gln Asn Trp Pro Ala Leu Ser Ile Val Ile Ile Ile
    50                  55                  60
Ile Met Thr Ile Gly Gly Asn Ile Leu Val Ile Met Ala Val Ser Met
65                  70                  75                  80
Glu Lys Lys Leu His Asn Ala Thr Asn Tyr Phe Leu Met Ser Leu Ala
                85                  90                  95
Ile Ala Asp Met Leu Val Gly Leu Leu Val Met Pro Leu Ser Leu Leu
            100                 105                 110
Ala Ile Leu Tyr Asp Tyr Val Trp Leu Pro Arg Tyr Leu Cys Pro Val
        115                 120                 125
Trp Ile Ser Leu Asp Val Leu Phe Ser Thr Ala Ser Ile Met His Leu
    130                 135                 140
Cys Ala Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Val Ala Ile Arg Asn Pro Ile Glu
145                 150                 155                 160
His Ser Arg Phe Asn Ser Arg Thr Lys Ala Ile Met Lys Ile Ala Ile
                165                 170                 175
Val Trp Ala Ile Ser Ile Gly Val Ser Val Pro Ile Pro Val Ile Gly
            180                 185                 190
Leu Arg Asp Glu Glu Lys Val Phe Val Asn Asn Thr Thr Cys Val Leu
        195                 200                 205
Asn Asp Pro Asn Phe Val Leu Ile Gly Ser Phe Val Ala Phe Phe Ile
    210                 215                 220
Pro Leu Thr Ile Met Val Ile Thr Tyr Cys Leu Thr Ile Tyr Val Leu
225                 230                 235                 240
Arg Arg Gln Ala Leu Met Leu Leu His Gly His Thr Glu Glu Pro Pro
                245                 250                 255
Gly Leu Ser Leu Asp Phe Leu Lys Cys Cys Lys Arg Asn Thr Ala Glu
            260                 265                 270
Glu Glu Asn Ser Ala Asn Pro Asn Gln Asp Gln Asn Ala Arg Arg Arg
        275                 280                 285
Lys Lys Lys Glu Arg Arg Pro Arg Gly Thr Met Gln Ala Ile Asn Asn
    290                 295                 300
Glu Arg Lys Ala Ser Lys Val Leu Gly Ile Val Phe Phe Val Phe Leu
305                 310                 315                 320
Ile Met Trp Cys Pro Phe Phe Ile Thr Asn Ile Leu Ser Val Leu Cys
                325                 330                 335
Glu Lys Ser Cys Asn Gln Lys Leu Met Glu Lys Leu Leu Asn Val Phe
            340                 345                 350
Val Trp Ile Gly Tyr Val Cys Ser Gly Ile Asn Pro Leu Val Tyr Thr
```

355 360 365

Leu Phe Asn Lys Ile Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asn Tyr Leu Arg Cys
370 375 380

Asn Tyr Lys Val Glu Lys Lys Pro Pro Val Arg Gln Ile Pro Arg Val
385 390 395 400

Ala Ala Thr Ala Leu Ser Gly Arg Glu Leu Asn Val Asn Ile Tyr Arg
405 410 415

His Thr Asn Glu Pro Val Ile Glu Lys Ala Ser Asp Asn Glu Pro Gly
420 425 430

Ile Glu Met Gln Val Glu Asn Leu Glu Leu Pro Val Asn Pro Ser Ser
435 440 445

Val Val Ser Glu Arg Ile Ser Ser Val
450 455

<210> 51

<211> 388

<212> PRT

<213> 智人

<400> 51

[0051]

Met Asp Lys Leu Asp Ala Asn Val Ser Ser Glu Glu Gly Phe Gly Ser
1 5 10 15

Val Glu Lys Val Val Leu Leu Thr Phe Leu Ser Thr Val Ile Leu Met
20 25 30

Ala Ile Leu Gly Asn Leu Leu Val Met Val Ala Val Cys Trp Asp Arg
35 40 45

Gln Leu Arg Lys Ile Lys Thr Asn Tyr Phe Ile Val Ser Leu Ala Phe
50 55 60

Ala Asp Leu Leu Val Ser Val Leu Val Met Pro Phe Gly Ala Ile Glu
65 70 75 80

Leu Val Gln Asp Ile Trp Ile Tyr Gly Glu Val Phe Cys Leu Val Arg
85 90 95

Thr Ser Leu Asp Val Leu Leu Thr Thr Ala Ser Ile Phe His Leu Cys
100 105 110

Cys Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Tyr Ala Ile Cys Cys Gln Pro Leu Val
115 120 125

Tyr Arg Asn Lys Met Thr Pro Leu Arg Ile Ala Leu Met Leu Gly Gly
130 135 140

Cys Trp Val Ile Pro Thr Phe Ile Ser Phe Leu Pro Ile Met Gln Gly
145 150 155 160

Trp Asn Asn Ile Gly Ile Ile Asp Leu Ile Glu Lys Arg Lys Phe Asn
165 170 175

Gln Asn Ser Asn Ser Thr Tyr Cys Val Phe Met Val Asn Lys Pro Tyr
180 185 190

Ala Ile Thr Cys Ser Val Val Ala Phe Tyr Ile Pro Phe Leu Leu Met
195 200 205

Val Leu Ala Tyr Tyr Arg Ile Tyr Val Thr Ala Lys Glu His Ala His
210 215 220
Gln Ile Gln Met Leu Gln Arg Ala Gly Ala Ser Ser Glu Ser Arg Pro
225 230 235 240
Gln Ser Ala Asp Gln His Ser Thr His Arg Met Arg Thr Glu Thr Lys
245 250 255

Ala Ala Lys Thr Leu Cys Ile Ile Met Gly Cys Phe Cys Leu Cys Trp
260 265 270
Ala Pro Phe Phe Val Thr Asn Ile Val Asp Pro Phe Ile Asp Tyr Thr
275 280 285
Val Pro Gly Gln Val Trp Thr Ala Phe Leu Trp Leu Gly Tyr Ile Asn
290 295 300
Ser Gly Leu Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Phe Leu Asn Lys Ser Phe Arg
305 310 315 320
Arg Ala Phe Leu Ile Ile Leu Cys Cys Asp Asp Glu Arg Tyr Arg Arg
325 330 335
Pro Ser Ile Leu Gly Gln Thr Val Pro Cys Ser Thr Thr Thr Ile Asn
340 345 350
Gly Ser Thr His Val Leu Arg Asp Ala Val Glu Cys Gly Gly Gln Trp
355 360 365
[0052] Glu Ser Gln Cys His Pro Pro Ala Thr Ser Pro Leu Val Ala Ala Gln
370 375 380
Pro Ser Asp Thr
385

<210> 52
<211> 369
<212> PRT
<213> 智人
<400> 52

Met Asp Met Ala Asp Glu Pro Leu Asn Gly Ser His Thr Trp Leu Ser
1 5 10 15
Ile Pro Phe Asp Leu Asn Gly Ser Val Val Ser Thr Asn Thr Ser Asn
20 25 30
Gln Thr Glu Pro Tyr Tyr Asp Leu Thr Ser Asn Ala Val Leu Thr Phe
35 40 45
Ile Tyr Phe Val Val Cys Ile Ile Gly Leu Cys Gly Asn Thr Leu Val
50 55 60
Ile Tyr Val Ile Leu Arg Tyr Ala Lys Met Lys Thr Ile Thr Asn Ile
65 70 75 80
Tyr Ile Leu Asn Leu Ala Ile Ala Asp Glu Leu Phe Met Leu Gly Leu
85 90 95
Pro Phe Leu Ala Met Gln Val Ala Leu Val His Trp Pro Phe Gly Lys
100 105 110

Ala Ile Cys Arg Val Val Met Thr Val Asp Gly Ile Asn Gln Phe Thr
115 120 125
Ser Ile Phe Cys Leu Thr Val Met Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Val
130 135 140
Val His Pro Ile Lys Ser Ala Lys Trp Arg Arg Pro Arg Thr Ala Lys
145 150 155 160
Met Ile Thr Met Ala Val Trp Gly Val Ser Leu Leu Val Ile Leu Pro
165 170 175
Ile Met Ile Tyr Ala Gly Leu Arg Ser Asn Gln Trp Gly Arg Ser Ser
180 185 190
Cys Thr Ile Asn Trp Pro Gly Glu Ser Gly Ala Trp Tyr Thr Gly Phe
195 200 205
Ile Ile Tyr Thr Phe Ile Leu Gly Phe Leu Val Pro Leu Thr Ile Ile
210 215 220
Cys Leu Cys Tyr Leu Phe Ile Ile Ile Lys Val Lys Ser Ser Gly Ile
225 230 235 240
Arg Val Gly Ser Ser Lys Arg Lys Lys Ser Glu Lys Lys Val Thr Arg
245 250 255
Met Val Ser Ile Val Val Ala Val Phe Ile Phe Cys Trp Leu Pro Phe
260 265 270
Tyr Ile Phe Asn Val Ser Ser Val Ser Met Ala Ile Ser Pro Thr Pro
275 280 285
[0053] Ala Leu Lys Gly Met Phe Asp Phe Val Val Val Leu Thr Tyr Ala Asn
290 295 300
Ser Cys Ala Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Ser Asp Asn Phe Lys
305 310 315 320
Lys Ser Phe Gln Asn Val Leu Cys Leu Val Lys Val Ser Gly Thr Asp
325 330 335
Asp Gly Glu Arg Ser Asp Ser Lys Gln Asp Lys Ser Arg Leu Asn Glu
340 345 350
Thr Thr Glu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Asn Gly Asp Leu Gln Thr Ser
355 360 365
Ile

<210> 53
<211> 382
<212> PRT
<213> 智人
<400> 53
Met Gly Pro Thr Ser Val Pro Leu Val Lys Ala His Arg Ser Ser Val
1 5 10 15
Ser Asp Tyr Val Asn Tyr Asp Ile Ile Val Arg His Tyr Asn Tyr Thr
20 25 30
Gly Lys Leu Asn Ile Ser Ala Asp Lys Glu Asn Ser Ile Lys Leu Thr

[0054]

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

<210> 54

<211> 378
<212> PRT
<213> 智人
<400> 54

[0055]

Met Ala Thr Ala Leu Pro Pro Arg Leu Gln Pro Val Arg Gly Asn Glu
1 5 10 15
Thr Leu Arg Glu His Tyr Gln Tyr Val Gly Lys Leu Ala Gly Arg Leu
20 25 30
Lys Glu Ala Ser Glu Gly Ser Thr Leu Thr Thr Val Leu Phe Leu Val
35 40 45
Ile Cys Ser Phe Ile Val Leu Glu Asn Leu Met Val Leu Ile Ala Ile
50 55 60
Trp Lys Asn Asn Lys Phe His Asn Arg Met Tyr Phe Phe Ile Gly Asn
65 70 75 80
Leu Ala Leu Cys Asp Leu Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Lys Val Asn Ile
85 90 95
Leu Met Ser Gly Lys Lys Thr Phe Ser Leu Ser Pro Thr Val Trp Phe
100 105 110
Leu Arg Glu Gly Ser Met Phe Val Ala Leu Gly Ala Ser Thr Cys Ser
115 120 125
Leu Leu Ala Ile Ala Ile Glu Arg His Leu Thr Met Ile Lys Met Arg
130 135 140
Pro Tyr Asp Ala Asn Lys Arg His Arg Val Phe Leu Leu Ile Gly Met
145 150 155 160
Cys Trp Leu Ile Ala Phe Thr Leu Gly Ala Leu Pro Ile Leu Gly Trp
165 170 175
Asn Cys Leu His Asn Leu Pro Asp Cys Ser Thr Ile Leu Pro Leu Tyr
180 185 190
Ser Lys Lys Tyr Ile Ala Phe Cys Ile Ser Ile Phe Thr Ala Ile Leu
195 200 205
Val Thr Ile Val Ile Leu Tyr Ala Arg Ile Tyr Phe Leu Val Lys Ser
210 215 220
Ser Ser Arg Lys Val Ala Asn His Asn Asn Ser Glu Arg Ser Met Ala
225 230 235 240
Leu Leu Arg Thr Val Val Ile Val Val Ser Val Phe Ile Ala Cys Trp
245 250 255
Ser Pro Leu Phe Ile Leu Phe Leu Ile Asp Val Ala Cys Arg Val Gln
260 265 270
Ala Cys Pro Ile Leu Phe Lys Ala Gln Trp Phe Ile Val Leu Ala Val
275 280 285
Leu Asn Ser Ala Met Asn Pro Val Ile Tyr Thr Leu Ala Ser Lys Glu
290 295 300
Met Arg Arg Ala Phe Phe Arg Leu Val Cys Asn Cys Leu Val Arg Gly
305 310 315 320

Arg Gly Ala Arg Ala Ser Pro Ile Gln Pro Ala Leu Asp Pro Ser Arg
325 330 335
Ser Lys Ser Ser Ser Ser Asn Asn Ser Ser His Ser Pro Lys Val Lys
340 345 350
Glu Asp Leu Pro His Thr Ala Pro Ser Ser Cys Ile Met Asp Lys Asn
355 360 365
Ala Ala Leu Gln Asn Gly Ile Phe Cys Asn
370 375

<210> 55
<211> 398
<212> PRT
<213> 智人
<400> 55

[0056]

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

245 250 255
Thr Val Ser Ser Arg Lys Gln Val Thr Lys Met Leu Ala Val Val Val
260 265 270
Ile Leu Phe Ala Leu Leu Trp Met Pro Tyr Arg Thr Leu Val Val Val
275 280 285
Asn Ser Phe Leu Ser Ser Pro Phe Gln Glu Asn Trp Phe Leu Leu Phe
290 295 300
Cys Arg Ile Cys Ile Tyr Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Val Ile Tyr
305 310 315 320
Asn Leu Met Ser Gln Lys Phe Arg Ala Ala Phe Arg Lys Leu Cys Asn
325 330 335
Cys Lys Gln Lys Pro Thr Glu Lys Pro Ala Asn Tyr Ser Val Ala Leu
340 345 350
Asn Tyr Ser Val Ile Lys Glu Ser Asp His Phe Ser Thr Glu Leu Asp
355 360 365
Asp Ile Thr Val Thr Asp Thr Tyr Leu Ser Ala Thr Lys Val Ser Phe
370 375 380
Asp Asp Thr Cys Leu Ala Ser Glu Val Ser Phe Ser Gln Ser
385 390 395

[0057]

<210> 56
<211> 418
<212> PRT
<213> 智人
<400> 56

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

Gln Gln Pro Ala Arg Arg Ser Arg Leu Met Ile Ala Ala Ala Trp Val
165 170 175
Leu Ser Phe Val Leu Ser Thr Pro Gln Tyr Phe Val Phe Ser Met Ile
180 185 190
Glu Val Asn Asn Val Thr Lys Ala Arg Asp Cys Trp Ala Thr Phe Ile
195 200 205
Gln Pro Trp Gly Ser Arg Ala Tyr Val Thr Trp Met Thr Gly Gly Ile
210 215 220
Phe Val Ala Pro Val Val Ile Leu Gly Thr Cys Tyr Gly Phe Ile Cys
225 230 235 240
Tyr Asn Ile Trp Cys Asn Val Arg Gly Lys Thr Ala Ser Arg Gln Ser
245 250 255
Lys Gly Ala Glu Gln Ala Gly Val Ala Phe Gln Lys Gly Phe Leu Leu
260 265 270
Ala Pro Cys Val Ser Ser Val Lys Ser Ile Ser Arg Ala Lys Ile Arg
275 280 285
Thr Val Lys Met Thr Phe Val Ile Val Thr Ala Tyr Ile Val Cys Trp
290 295 300
Ala Pro Phe Phe Ile Ile Gln Met Trp Ser Val Trp Asp Pro Met Ser
305 310 315 320
Val Trp Thr Glu Ser Glu Asn Pro Thr Ile Thr Ile Thr Ala Leu Leu
325 330 335

[0058]

Gly Ser Leu Asn Ser Cys Cys Asn Pro Trp Ile Tyr Met Phe Phe Ser
340 345 350
Gly His Leu Leu Gln Asp Cys Val Gln Ser Phe Pro Cys Cys Gln Asn
355 360 365
Met Lys Glu Lys Phe Asn Lys Glu Asp Thr Asp Ser Met Ser Arg Arg
370 375 380
Gln Thr Phe Tyr Ser Asn Asn Arg Ser Pro Thr Asn Ser Thr Gly Met
385 390 395 400
Trp Lys Asp Ser Pro Lys Ser Ser Lys Ser Ile Lys Phe Ile Pro Val
405 410 415
Ser Thr

<210> 57
<211> 424
<212> PRT
<213> 智人
<400> 57
Met Asp Ser Gly Pro Leu Trp Asp Ala Asn Pro Thr Pro Arg Gly Thr
1 5 10 15
Leu Ser Ala Pro Asn Ala Thr Thr Pro Trp Leu Gly Arg Asp Glu Glu
20 25 30
Leu Ala Lys Val Glu Ile Gly Val Leu Ala Thr Val Leu Val Leu Ala

[0059]

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

385 390 395 400
Pro Arg Pro Glu Glu Ser Pro Arg Asp Leu Glu Leu Ala Asp Gly Glu
405 410 415
Gly Thr Ala Glu Thr Ile Ile Phe
420

<210> 58
<211> 371
<212> PRT
<213> 智人
<400> 58

[0060]

Met Leu Met Ala Ser Thr Thr Ser Ala Val Pro Gly His Pro Ser Leu
1 5 10 15
Pro Ser Leu Pro Ser Asn Ser Ser Gln Glu Arg Pro Leu Asp Thr Arg
20 25 30
Asp Pro Leu Leu Ala Arg Ala Glu Leu Ala Leu Leu Ser Ile Val Phe
35 40 45
Val Ala Val Ala Leu Ser Asn Gly Leu Val Leu Ala Ala Leu Ala Arg
50 55 60
Arg Gly Arg Arg Gly His Trp Ala Pro Ile His Val Phe Ile Gly His
65 70 75 80
Leu Cys Leu Ala Asp Leu Ala Val Ala Leu Phe Gln Val Leu Pro Gln
85 90 95
Leu Ala Trp Lys Ala Thr Asp Arg Phe Arg Gly Pro Asp Ala Leu Cys
100 105 110
Arg Ala Val Lys Tyr Leu Gln Met Val Gly Met Tyr Ala Ser Ser Tyr
115 120 125
Met Ile Leu Ala Met Thr Leu Asp Arg His Arg Ala Ile Cys Arg Pro
130 135 140
Met Leu Ala Tyr Arg His Gly Ser Gly Ala His Trp Asn Arg Pro Val
145 150 155 160
Leu Val Ala Trp Ala Phe Ser Leu Leu Leu Ser Leu Pro Gln Leu Phe
165 170 175
Ile Phe Ala Gln Arg Asn Val Glu Gly Gly Ser Gly Val Thr Asp Cys
180 185 190
Trp Ala Cys Phe Ala Glu Pro Trp Gly Arg Arg Thr Tyr Val Thr Trp
195 200 205
Ile Ala Leu Met Val Phe Val Ala Pro Thr Leu Gly Ile Ala Ala Cys
210 215 220
Gln Val Leu Ile Phe Arg Glu Ile His Ala Ser Leu Val Pro Gly Pro
225 230 235 240
Ser Glu Arg Pro Gly Gly Arg Arg Arg Gly Arg Arg Thr Gly Ser Pro
245 250 255
Gly Glu Gly Ala His Val Ser Ala Ala Val Ala Lys Thr Val Arg Met
260 265 270

Thr Leu Val Ile Val Val Val Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Phe
275 280 285
Leu Val Gln Leu Trp Ala Ala Trp Asp Pro Glu Ala Pro Leu Glu Gly
290 295 300
Ala Pro Phe Val Leu Leu Met Leu Leu Ala Ser Leu Asn Ser Cys Thr
305 310 315 320
Asn Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Phe Ser Ser Ser Val Ser Ser Glu Leu
325 330 335
Arg Ser Leu Leu Cys Cys Ala Arg Gly Arg Thr Pro Pro Ser Leu Gly
340 345 350
Pro Gln Asp Glu Ser Cys Thr Thr Ala Ser Ser Ser Leu Ala Lys Asp
355 360 365
Thr Ser Ser
370

<210> 59
<211> 311
<212> PRT
<213> 智人
<400> 59

[0061]

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

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

Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu
195 200 205
Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro
210 215 220
Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr
225 230 235 240
Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu
245 250 255
Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys
260 265 270
Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln
275 280 285
Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu
290 295 300
Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
305 310

<210> 60
<211> 311
<212> PRT
<213> 智人
<400> 60

[0062]

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

180 185 190

Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu
195 200 205

Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro
210 215 220

Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr
225 230 235 240

Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu
245 250 255

Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys
260 265 270

Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln
275 280 285

Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu
290 295 300

Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
305 310

<210> 61
<211> 311
<212> PRT
<213> 智人
<400> 61

[0063]

Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr
1 5 10 15

Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser
20 25 30

Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile
35 40 45

Phe Leu His Gly Asn Ala Thr Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val
50 55 60

Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly
65 70 75 80

Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp
85 90 95

His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys
100 105 110

Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Ala Leu Ala Phe His
115 120 125

Tyr Ala Tyr Glu His Gln Asp Arg Ile Lys Ala Ile Val His Met Glu
130 135 140

Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu
145 150 155 160

Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu
165 170 175

[0064]

Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg
180 185 190
Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu
195 200 205
Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro
210 215 220
Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr
225 230 235 240
Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Leu Phe Ile Glu
245 250 255
Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys
260 265 270
Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Leu Gln
275 280 285
Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu
290 295 300
Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
305 310

实施例1

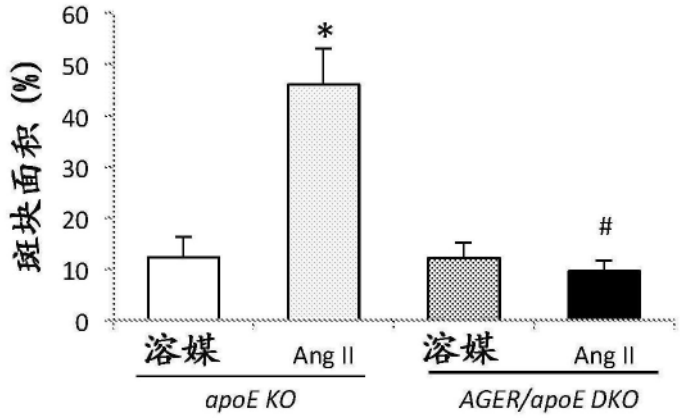

斑块面积（%）
60
50
40
30
20
10
0
*
#
溶媒
Ang II
溶媒
Ang II
apoE KO
AGER/apoE DKO

图1A

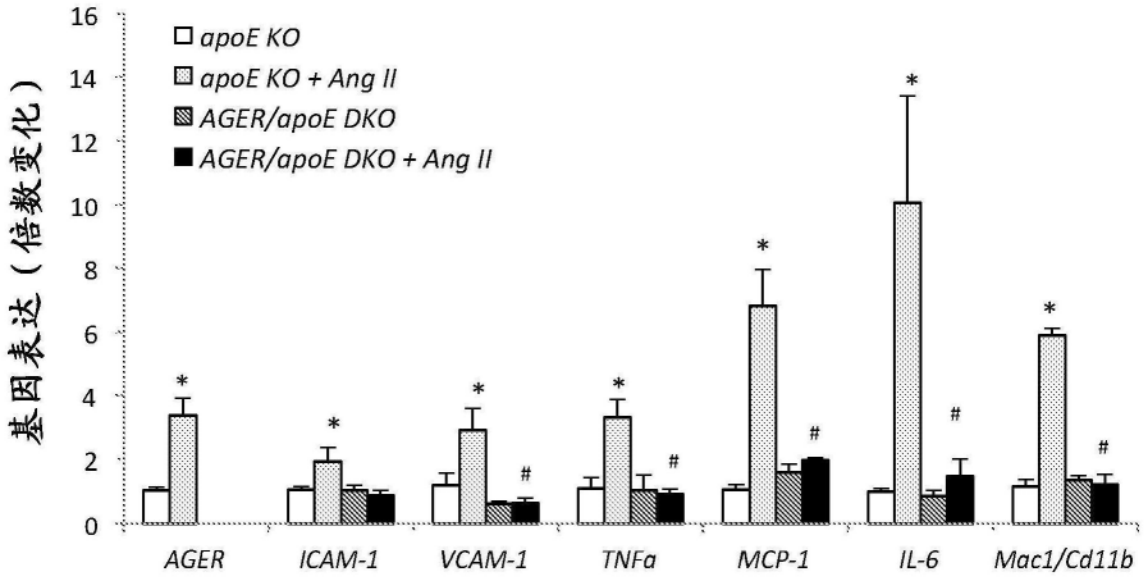

基因表达（倍数变化）
16
14
12
10
8
6
4
2
0
apoE KO
apoE KO + Ang II
AGER/apoE DKO
AGER/apoE DKO + Ang II
AGER
ICAM-1
VCAM-1
TNFa
MCP-1
IL-6
Mac1/Cd11b

图1B

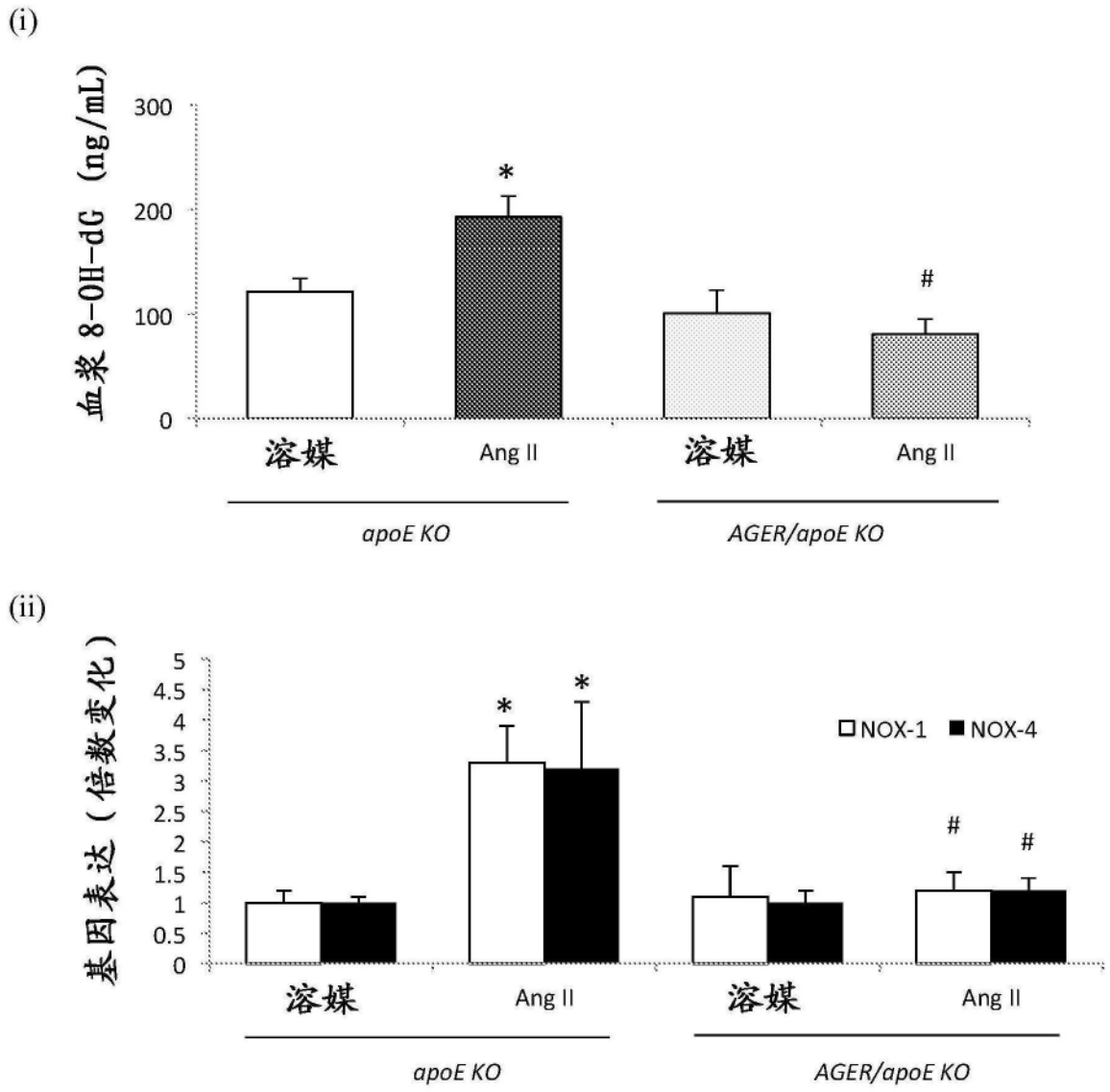
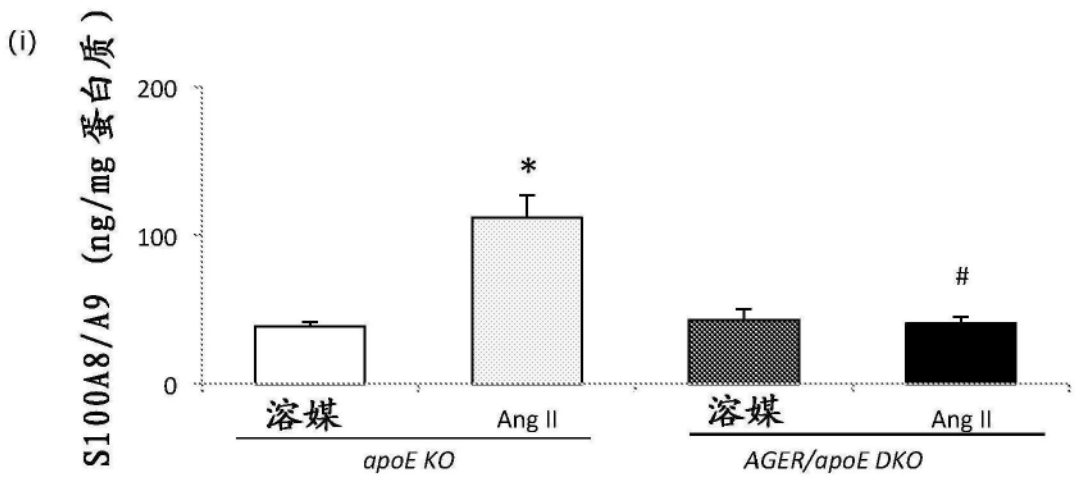
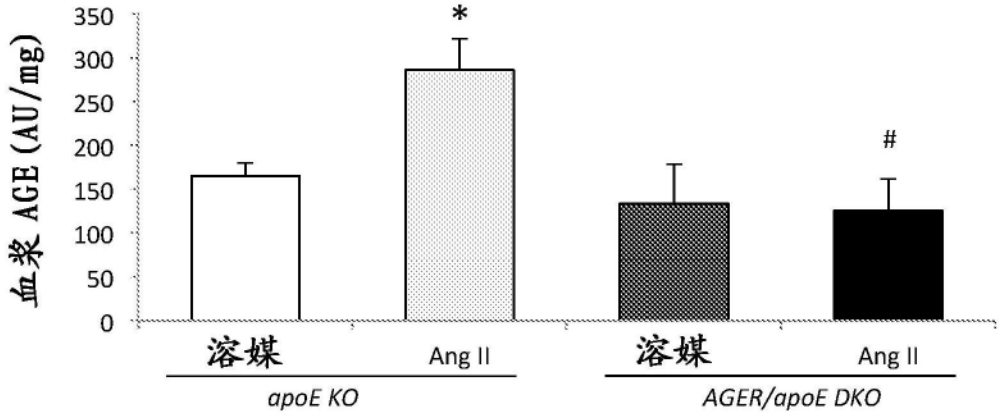

(i)
血浆 8-OH-dG (ng/mL)
300
200
100
0
*
#
溶媒
Ang II
溶媒
Ang II
apoE KO
AGER/apoE KO
(ii)
基因表达（倍数变化）
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
NOX-1
NOX-4
*
*
#
#
溶媒
Ang II
溶媒
Ang II
apoE KO
AGER/apoE KO

图1C


(i)
S100A8/A9 (ng/mg 蛋白质)
200
100
0
*
#
溶媒
Ang II
溶媒
Ang II
apoE KO
AGER/apoE DKO

(ii)



(iii)

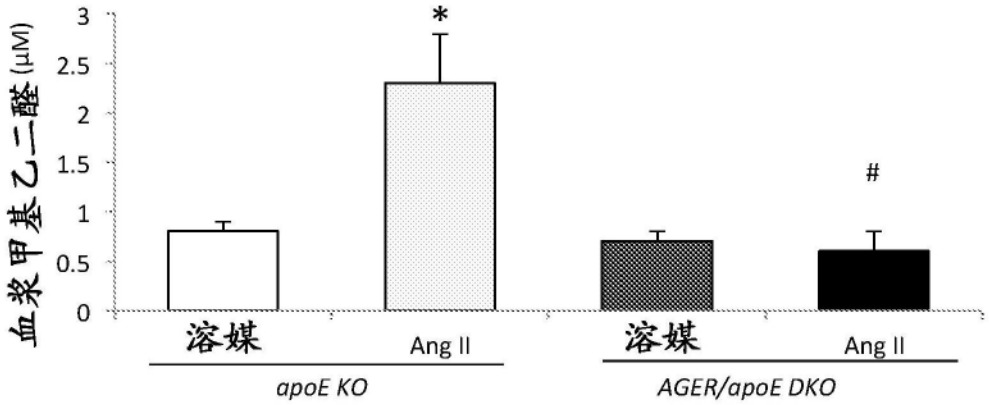


图1D

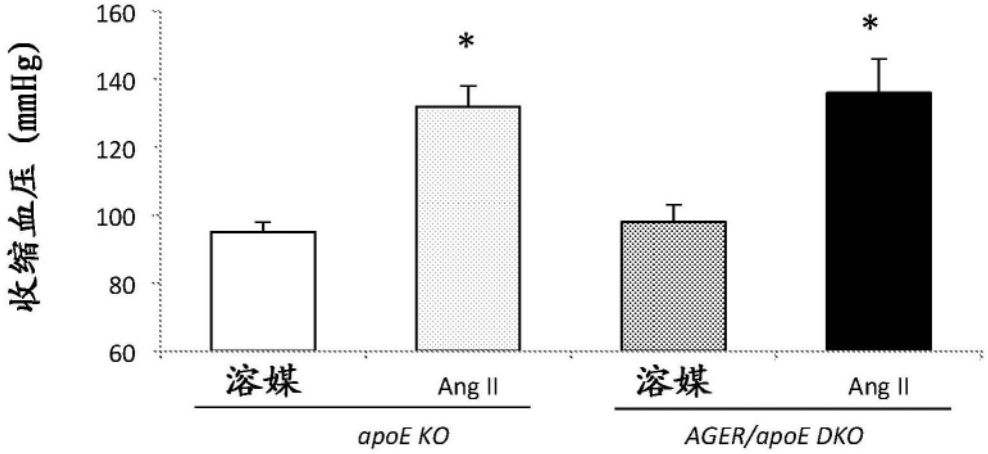


图1E

实施例2

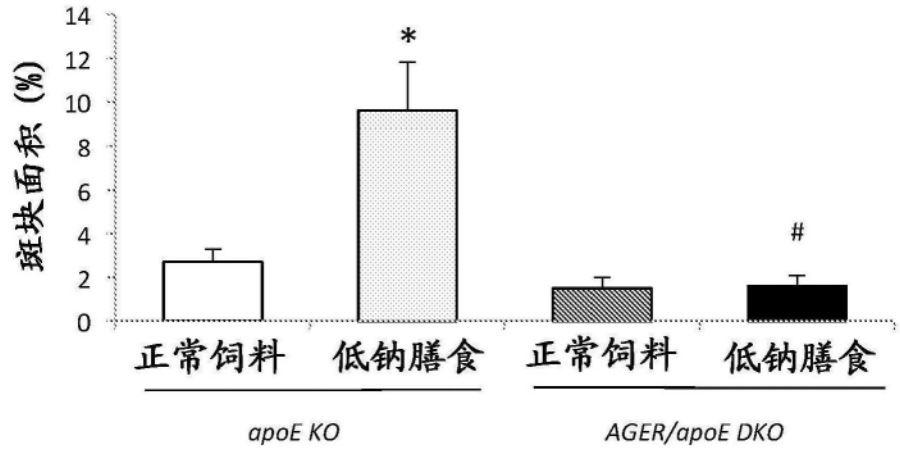

斑块面积（%）
14
12
10
8
6
4
2
0
*
#
正常饲料
低钠膳食
正常饲料
低钠膳食
apoE KO
AGER/apoE DKO

图2A

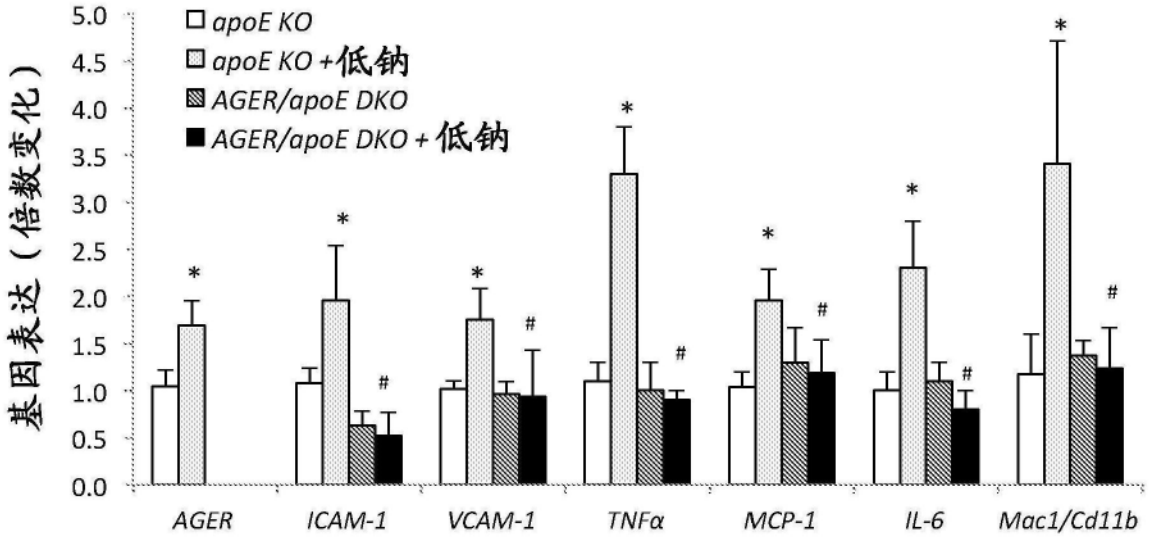

基因表达（倍数变化）
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
apoE KO
apoE KO +低钠
AGER/apoE DKO
AGER/apoE DKO + 低钠
AGER
ICAM-1
VCAM-1
TNFα
MCP-1
IL-6
Mac1/Cd11b

图2B

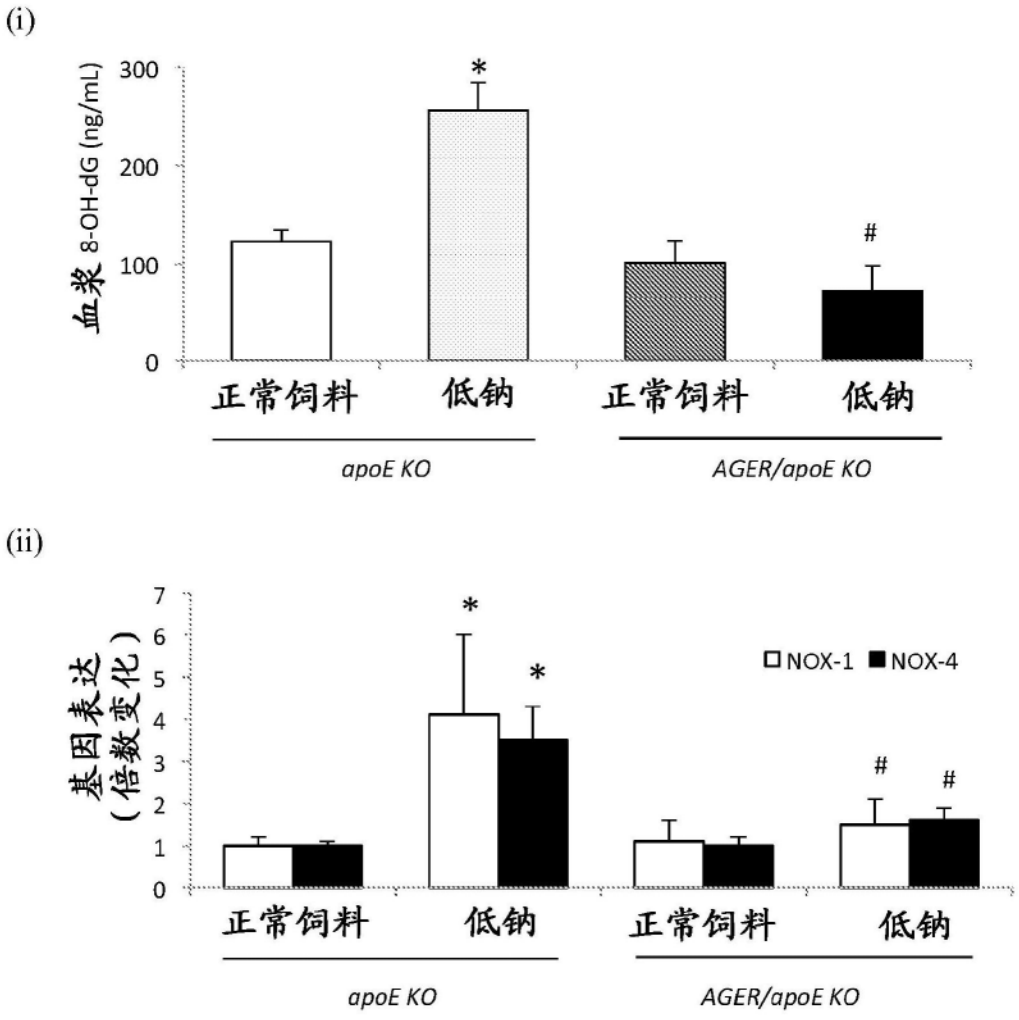

(i)
血浆 8-OH-dG (ng/mL)
300
200
100
0
*
#
正常饲料
低钠
正常饲料
低钠
apoE KO
AGER/apoE KO
(ii)
基因表达
(倍数变化)
7
6
5
4
3
2
1
0
NOX-1
NOX-4
*
*
#
#
正常饲料
低钠
正常饲料
低钠
apoE KO
AGER/apoE KO

图2C

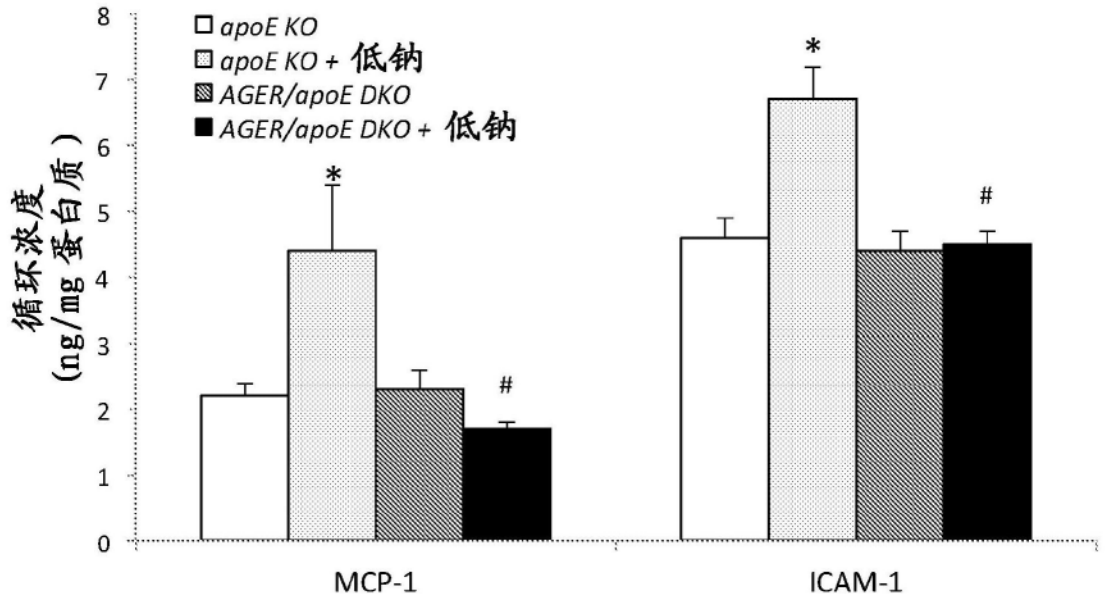

apoE KO
apoE KO + 低钠
AGER/apoE DKO
AGER/apoE DKO + 低钠
循环浓度 (ng/mg 蛋白质)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
*
*
#
#
MCP-1
ICAM-1

图2D

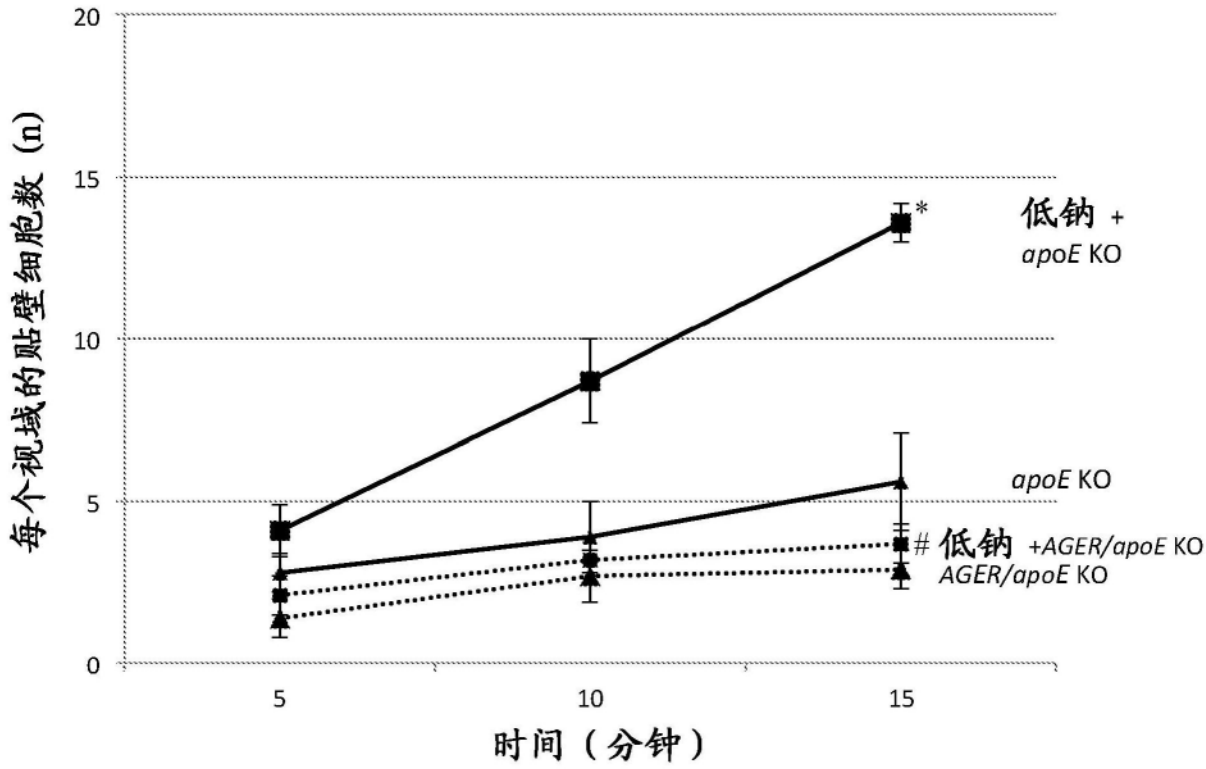

每个视域的贴壁细胞数 (n)
0
5
10
15
20
*
低钠 + apoE KO
apoE KO
低钠 +AGER/apoE KO
AGER/apoE KO
5
10
15
时间（分钟）

图2E

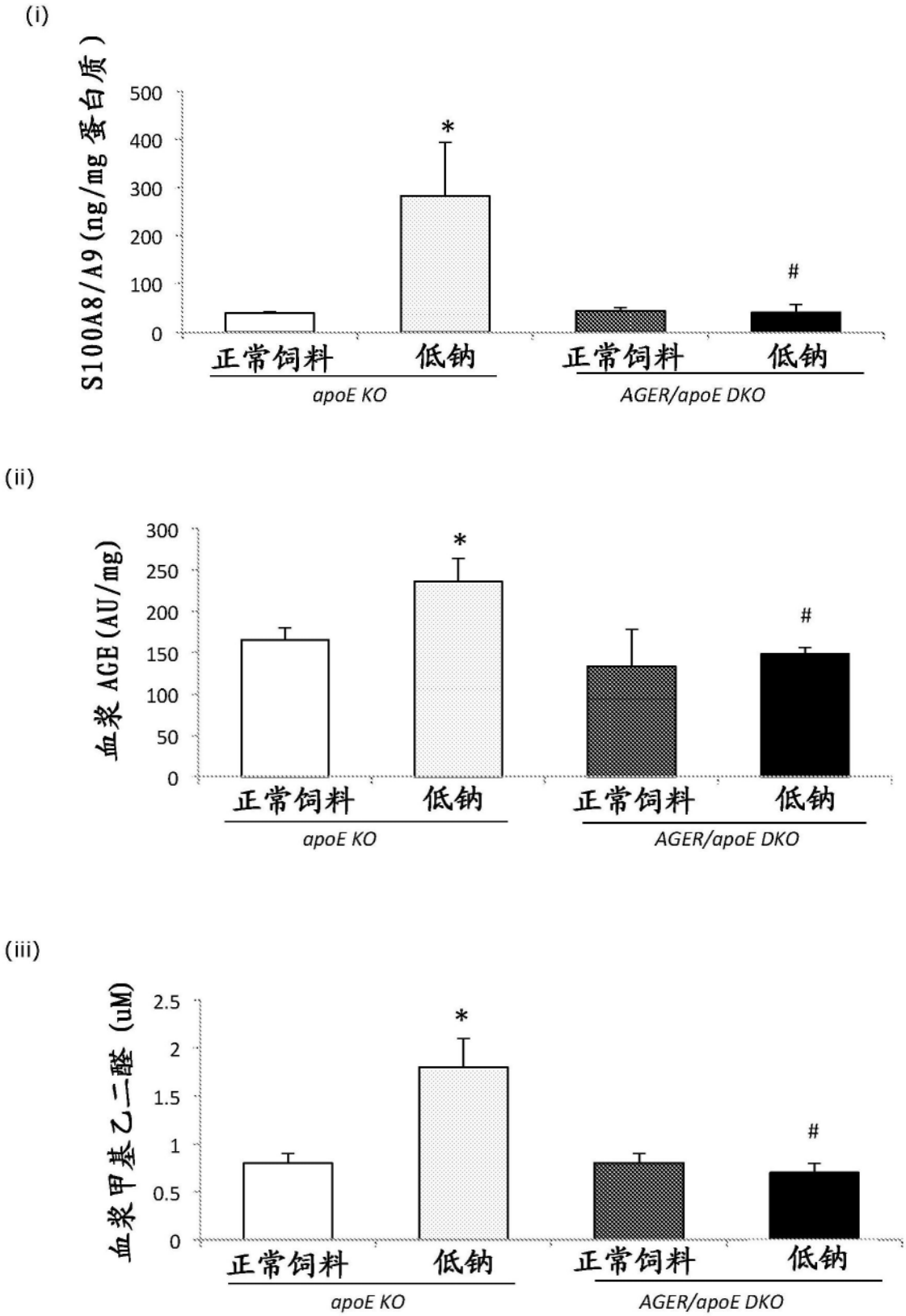

(i)
S100A8/A9 (ng/mg 蛋白质)
500
400
300
200
100
0
*
#
正常饲料
低钠
正常饲料
低钠
apoE KO
AGER/apoE DKO
(ii)
血浆 AGE (AU/mg)
300
250
200
150
100
50
0
*
#
正常饲料
低钠
正常饲料
低钠
apoE KO
AGER/apoE DKO
(iii)
血浆甲基乙二醛 (uM)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
#
正常饲料
低钠
正常饲料
低钠
apoE KO
AGER/apoE DKO

图2F

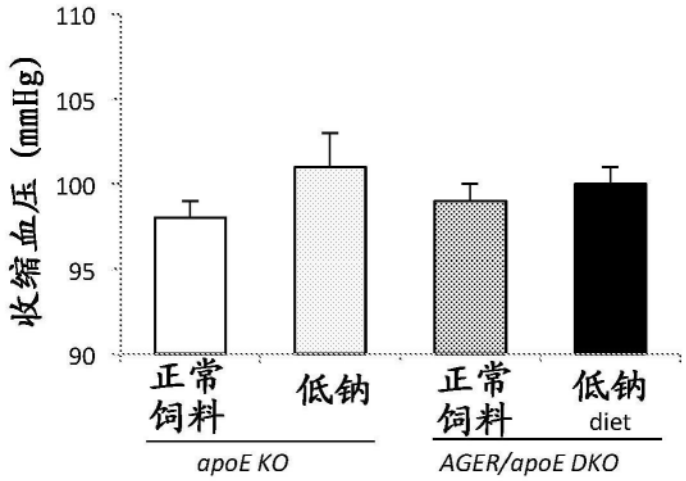
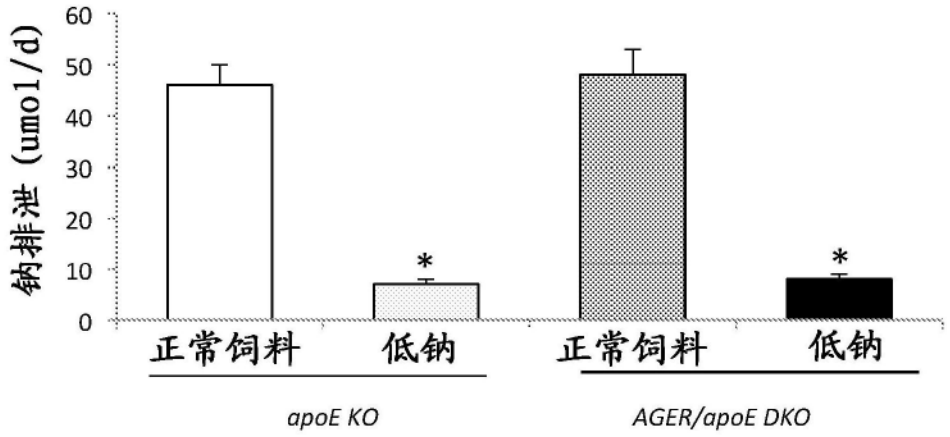
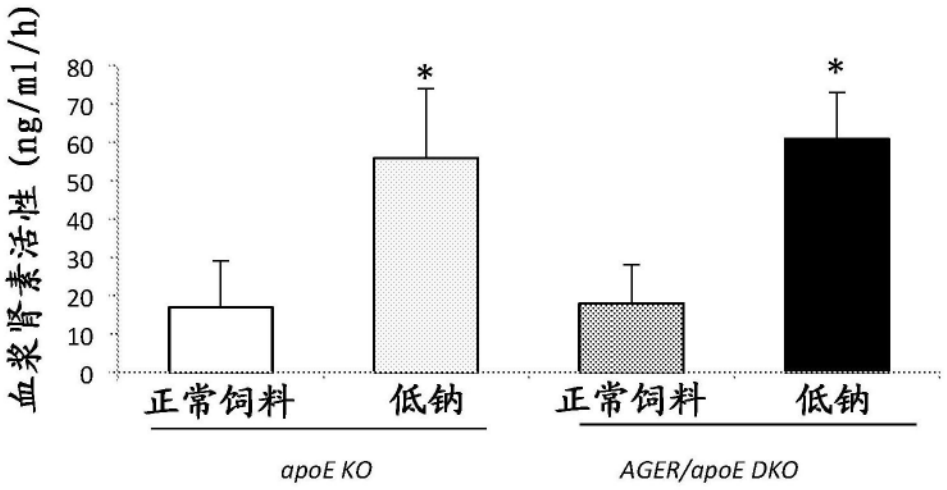

收缩血压（mmHg）
110
105
100
95
90
正常饲料
低钠
正常饲料
低钠 diet
apoE KO
AGER/apoE DKO

图2G

(i)



(ii)



(iii)

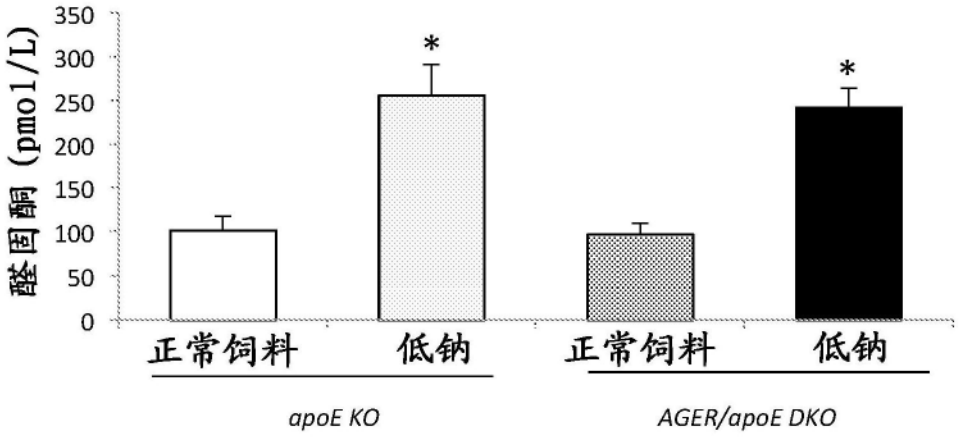


图2H

实施例3

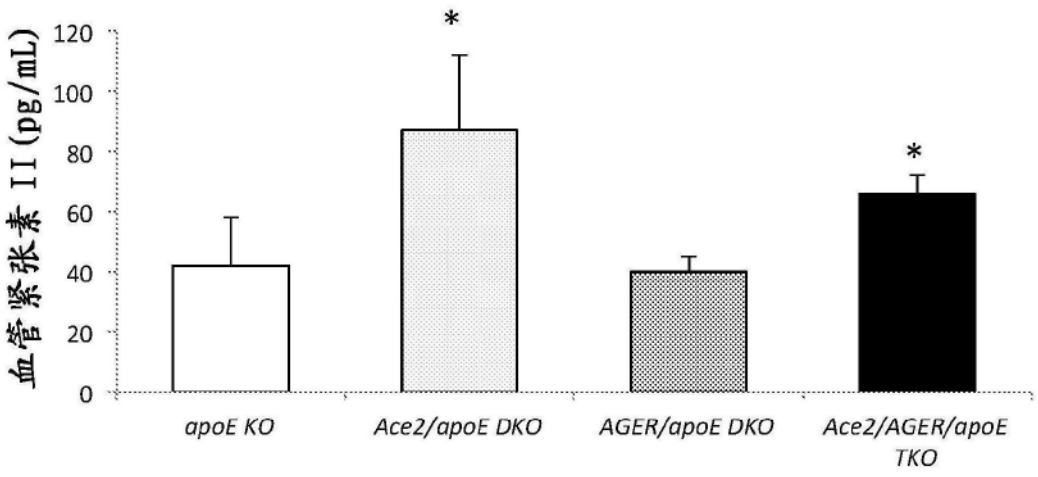

血管紧张素 II (pg/mL)
120
100
80
60
40
20
0
*
*
apoE KO
Ace2/apoE DKO
AGER/apoE DKO
Ace2/AGER/apoE TKO

图3A

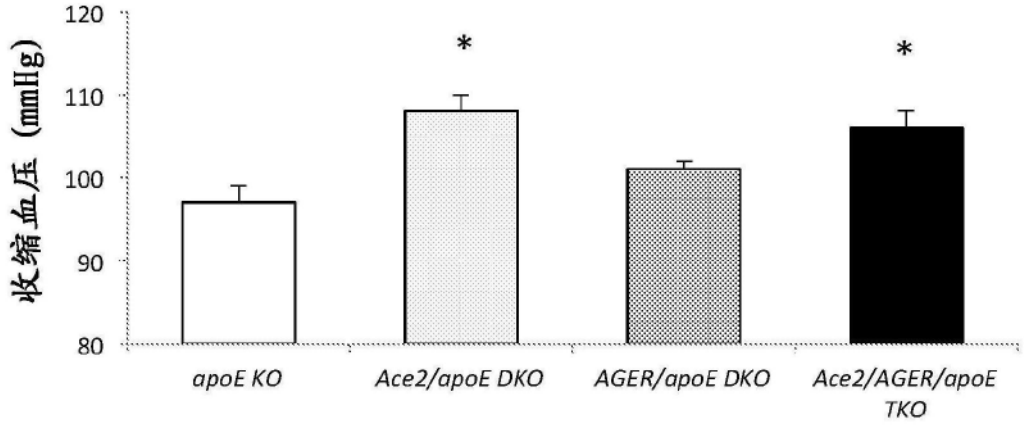

收缩血压 (mmHg)
120
110
100
90
80
*
*
apoE KO
Ace2/apoE DKO
AGER/apoE DKO
Ace2/AGER/apoE TKO

图3B

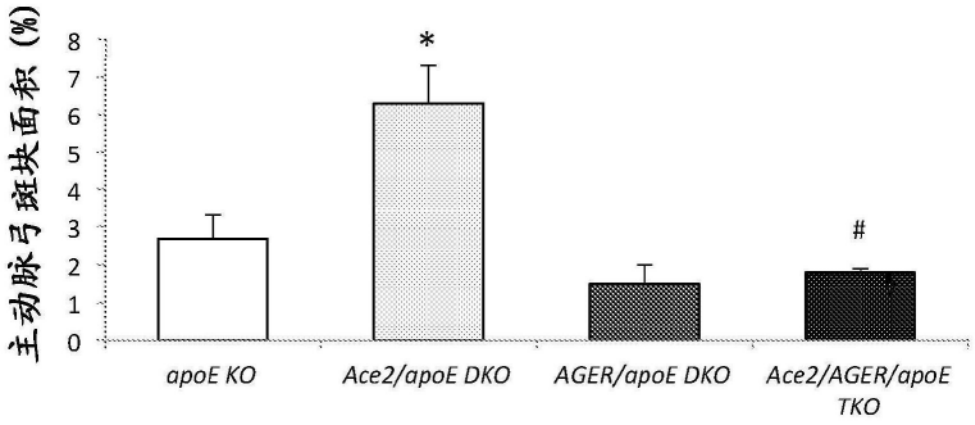

主动脉弓斑块面积 (%)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
#
apoE KO
Ace2/apoE DKO
AGER/apoE DKO
Ace2/AGER/apoE TKO

图3C

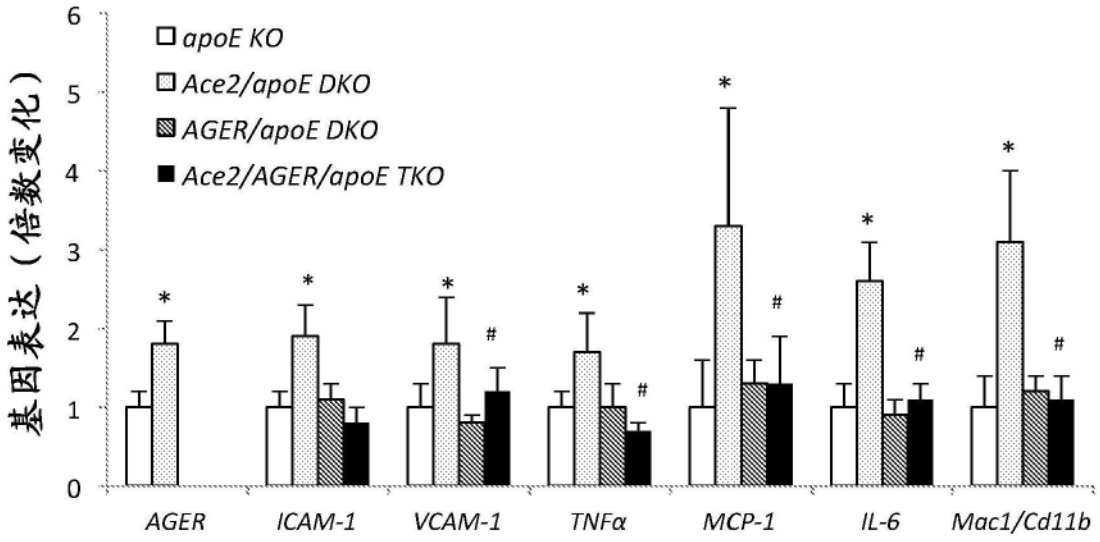

基因表达（倍数变化）
apoE KO
Ace2/apoE DKO
AGER/apoE DKO
Ace2/AGER/apoE TKO
AGER
ICAM-1
VCAM-1
TNFα
MCP-1
IL-6
Mac1/Cd11b

图3D

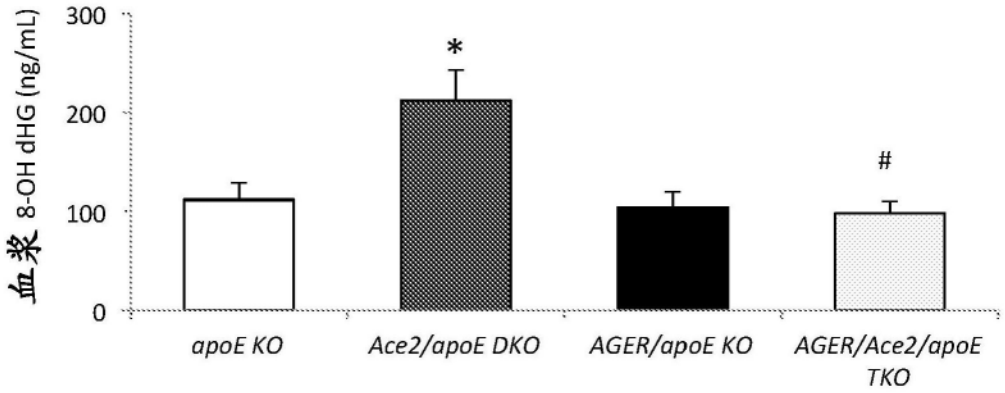

血浆 8-OH dHG (ng/mL)
apoE KO
Ace2/apoE DKO
AGER/apoE KO
AGER/Ace2/apoE TKO

图3E

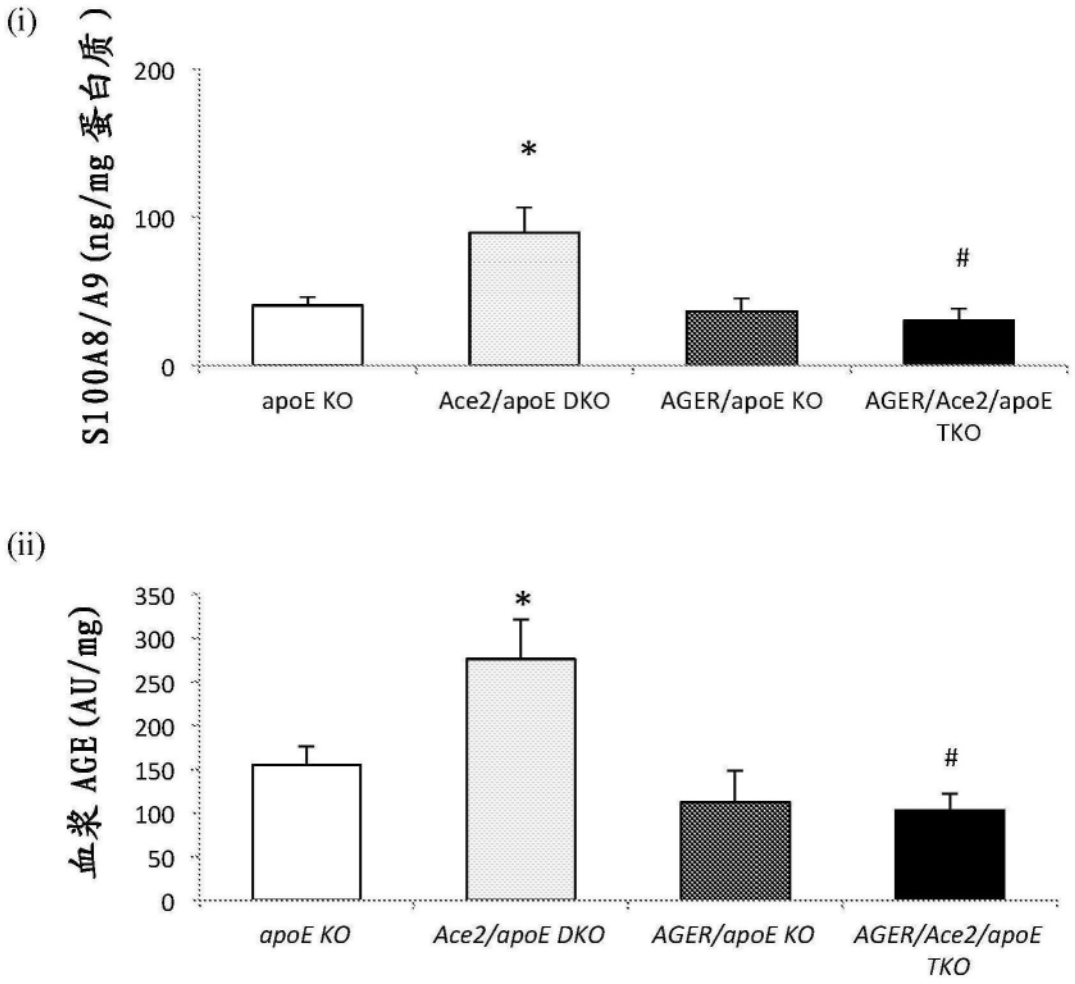

(i)
S100A8/A9 (ng/mg 蛋白质)
200
100
0
*
#
apoE KO
Ace2/apoE DKO
AGER/apoE KO
AGER/Ace2/apoE TKO
(ii)
血浆 AGE (AU/mg)
350
300
250
200
150
100
50
0
*
#
apoE KO
Ace2/apoE DKO
AGER/apoE KO
AGER/Ace2/apoE TKO

图3F

实施例4

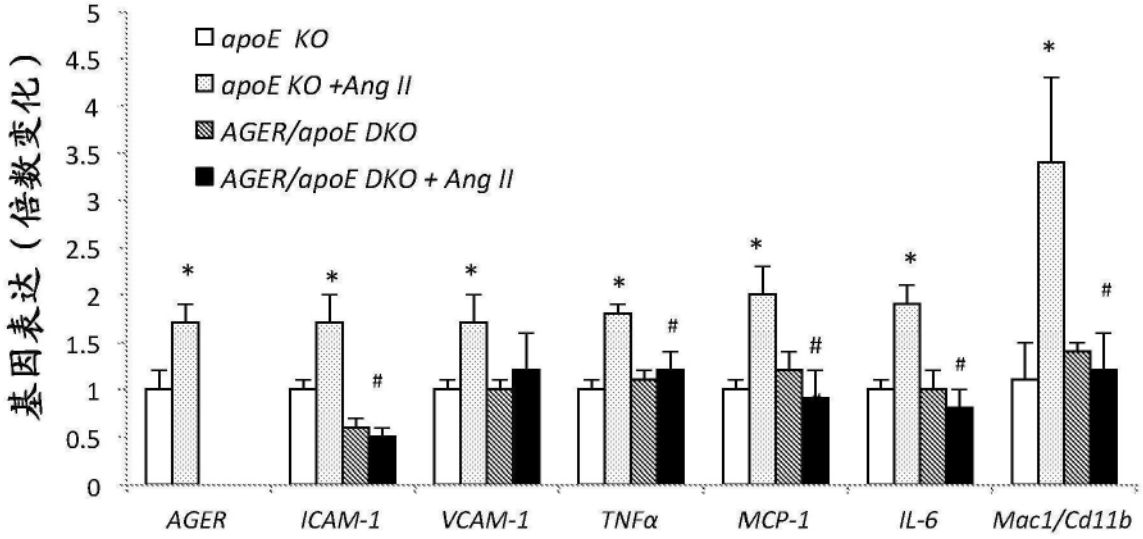

基因表达（倍数变化）
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
apoE KO
apoE KO +Ang II
AGER/apoE DKO
AGER/apoE DKO + Ang II
AGER
ICAM-1
VCAM-1
TNFα
MCP-1
IL-6
Mac1/Cd11b

图4A

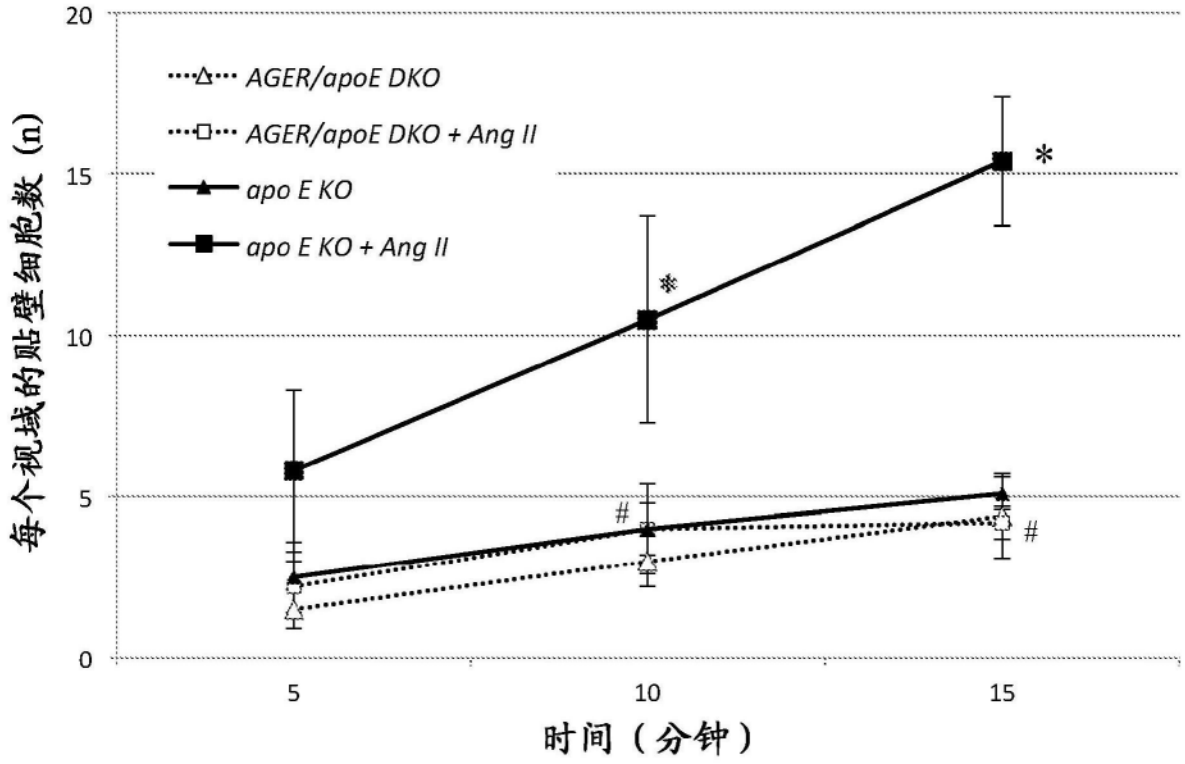

20
15
10
5
0
每个视域的贴壁细胞数（n）
AGER/apoE DKO
AGER/apoE DKO + Ang II
apo E KO
apo E KO + Ang II
*
※
#
#
5
10
15
时间（分钟）

图4B

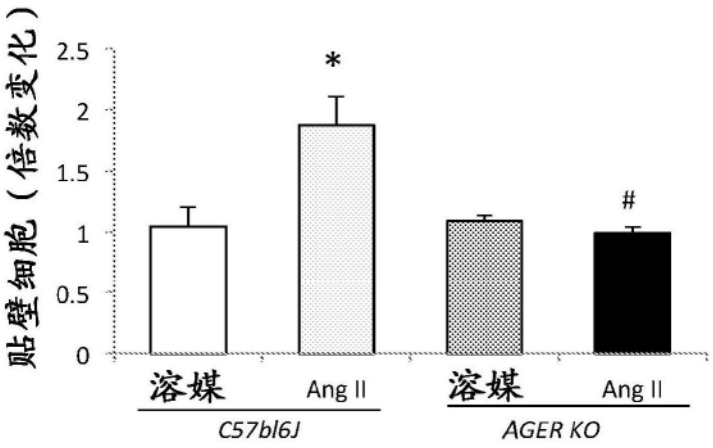

贴壁细胞（倍数变化）
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
#
溶媒
Ang II
溶媒
Ang II
C57bl6J
AGER KO

图4C

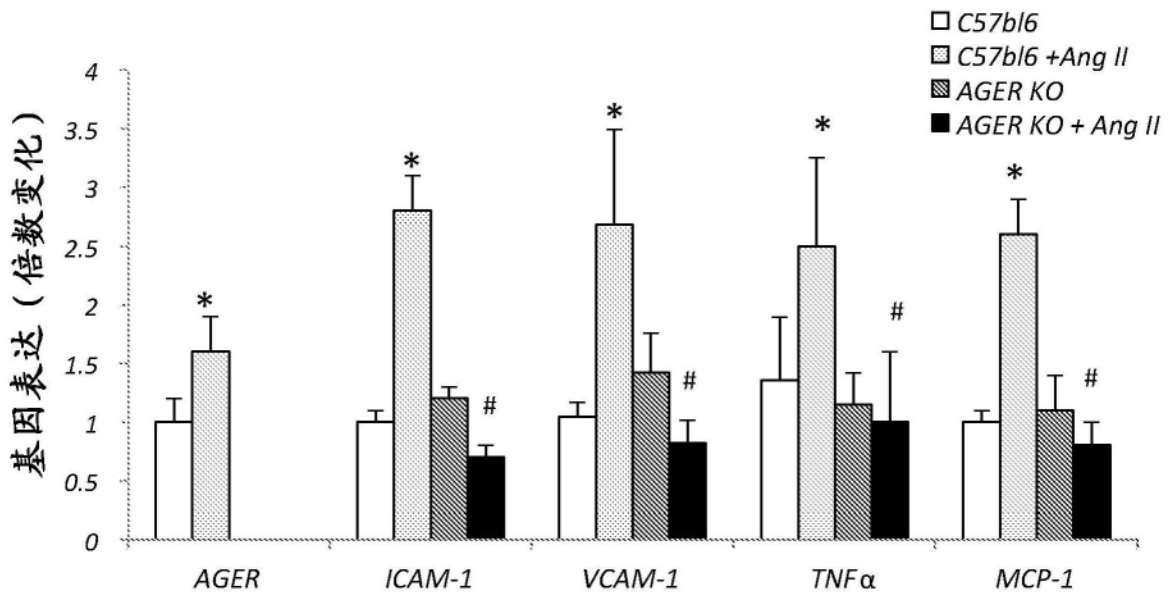
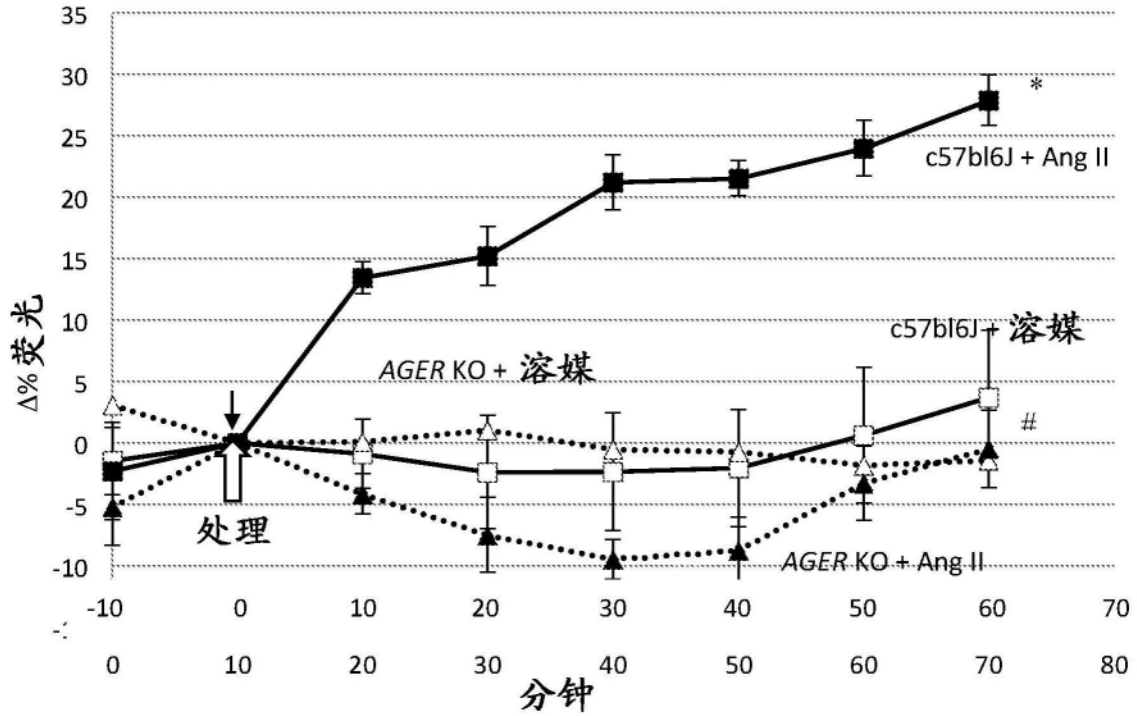

C57bl6
C57bl6 +Ang II
AGER KO
AGER KO + Ang II
基因表达（倍数变化）
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
AGER
ICAM-1
VCAM-1
TNFα
MCP-1
*
#

图4D

(i)


Δ% 荧光
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
c57bl6J + Ang II
c57bl6J + 溶媒
AGER KO + 溶媒
AGER KO + Ang II
处理
*
#
-10
0
10
20
30
40
50
60
70
80
分钟

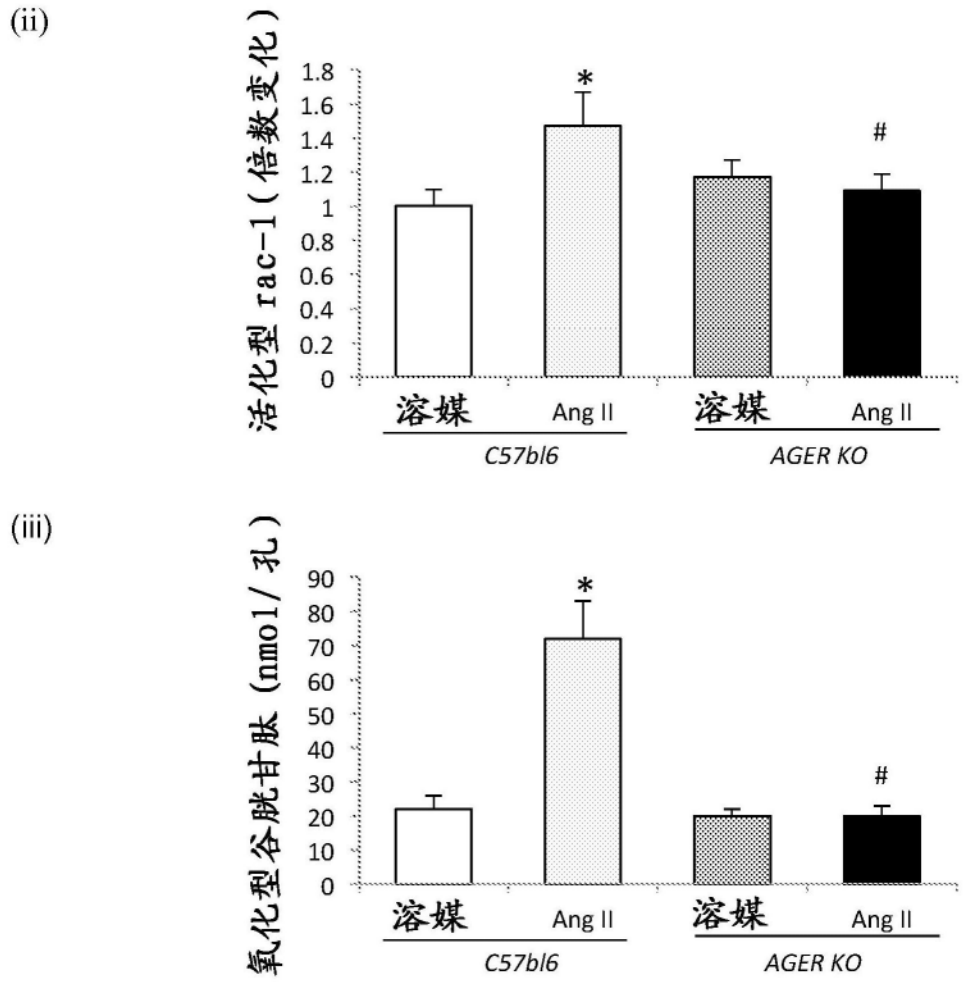
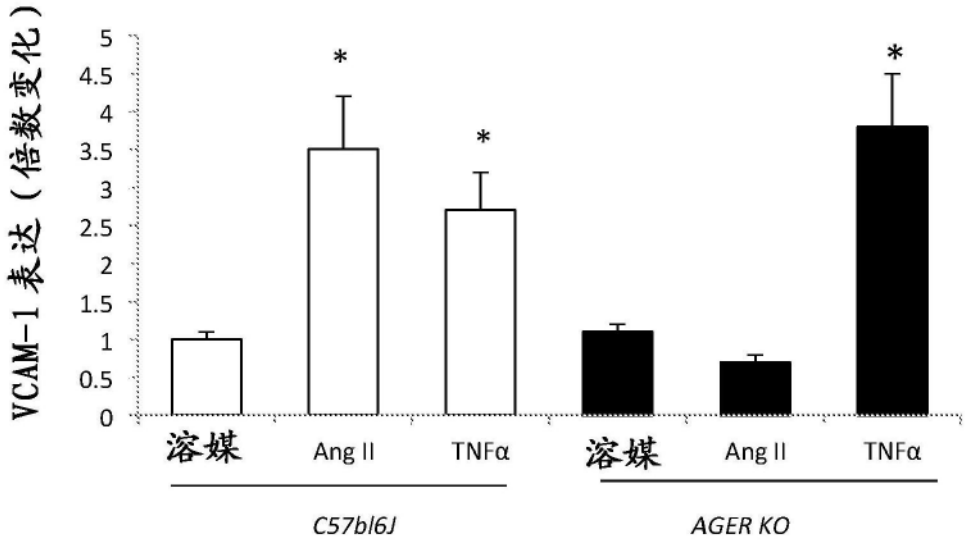

(ii)
活化型 rac-1（倍数变化）
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
#
溶媒
Ang II
溶媒
Ang II
C57bl6
AGER KO
(iii)
氧化型谷胱甘肽（nmol/孔）
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
#
溶媒
Ang II
溶媒
Ang II
C57bl6
AGER KO

图4E


VCAM-1 表达（倍数变化）
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
*
溶媒
Ang II
TNFα
溶媒
Ang II
TNFα
C57bl6J
AGER KO

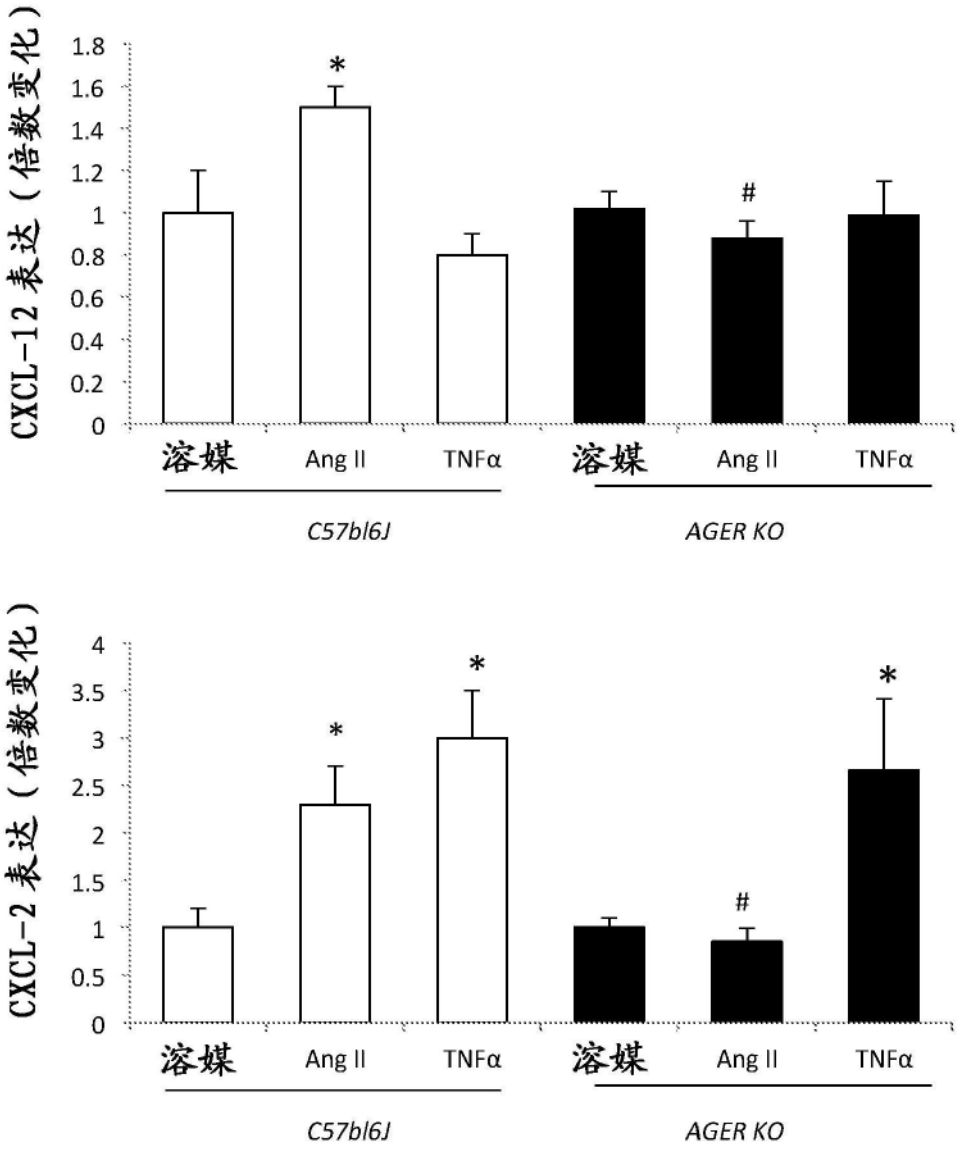

CXCL-12表达（倍数变化）
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
#
溶媒
Ang II
TNFα
溶媒
Ang II
TNFα
C57bl6J
AGER KO
CXCL-2表达（倍数变化）
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
#
*
溶媒
Ang II
TNFα
溶媒
Ang II
TNFα
C57bl6J
AGER KO

图4F

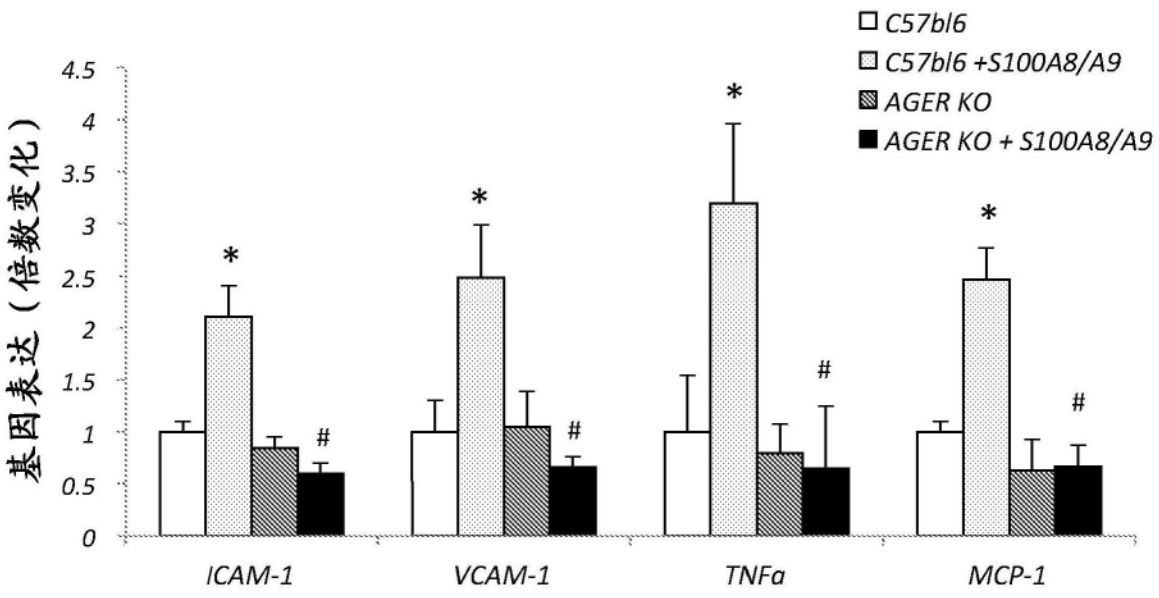

C57bl6
C57bl6 +S100A8/A9
AGER KO
AGER KO + S100A8/A9
基因表达（倍数变化）
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
#
ICAM-1
VCAM-1
TNFa
MCP-1

图4G

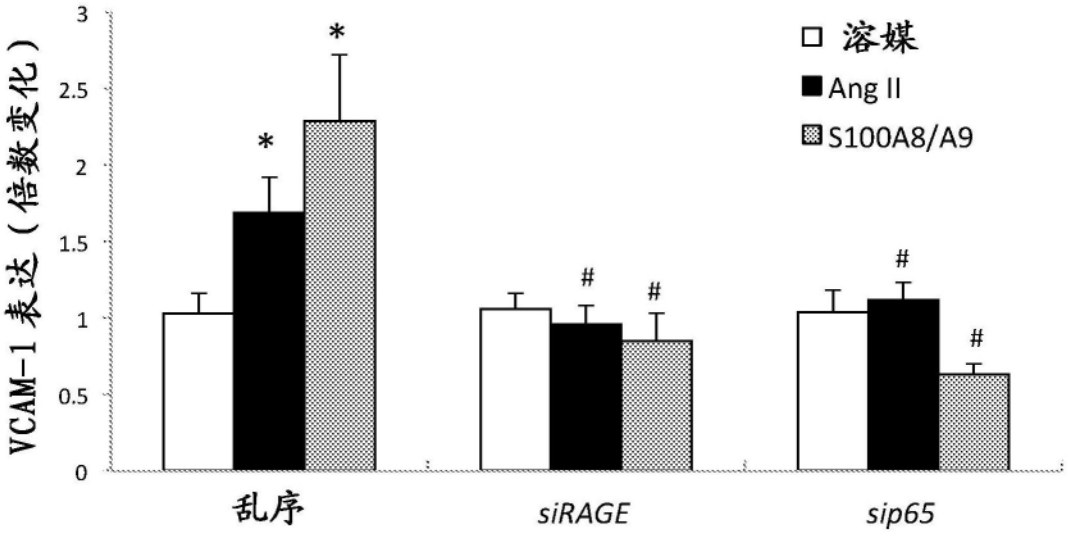

溶媒
Ang II
S100A8/A9
VCAM-1 表达（倍数变化）
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
#
乱序
siRAGE
sip65

图4H

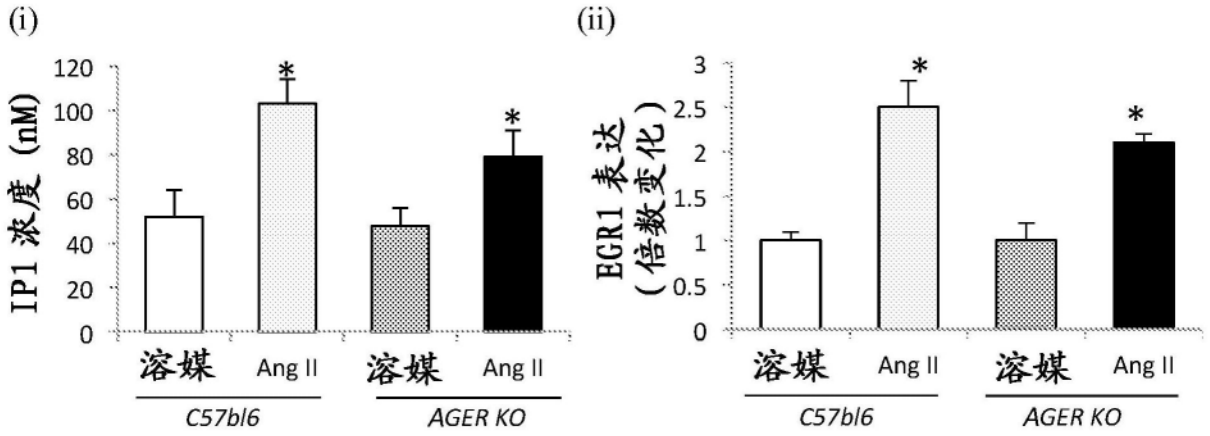


图4I

实施例5

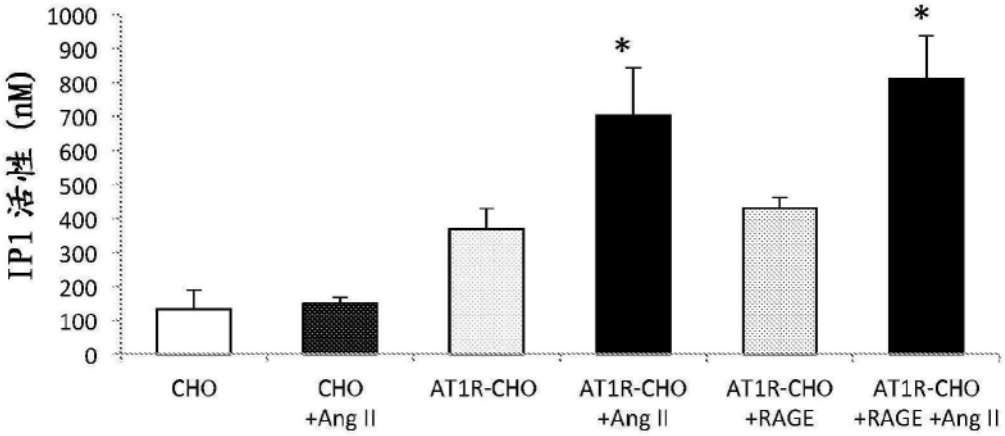


图5A

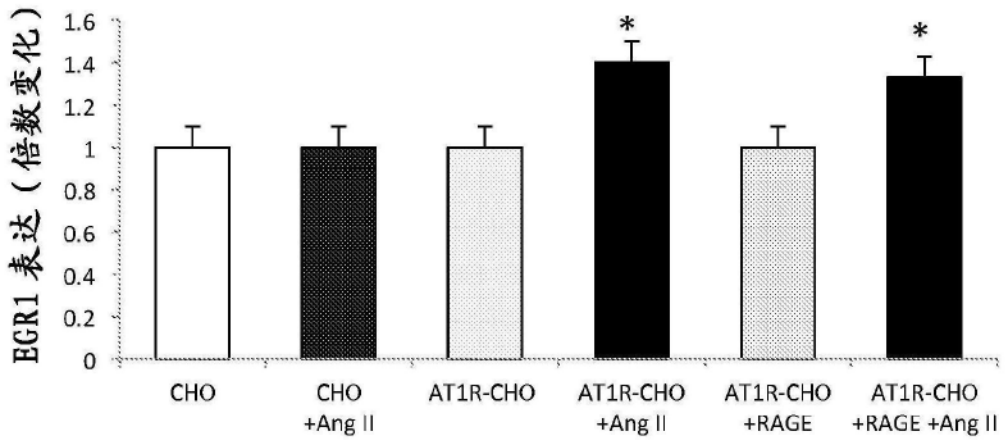


图5B

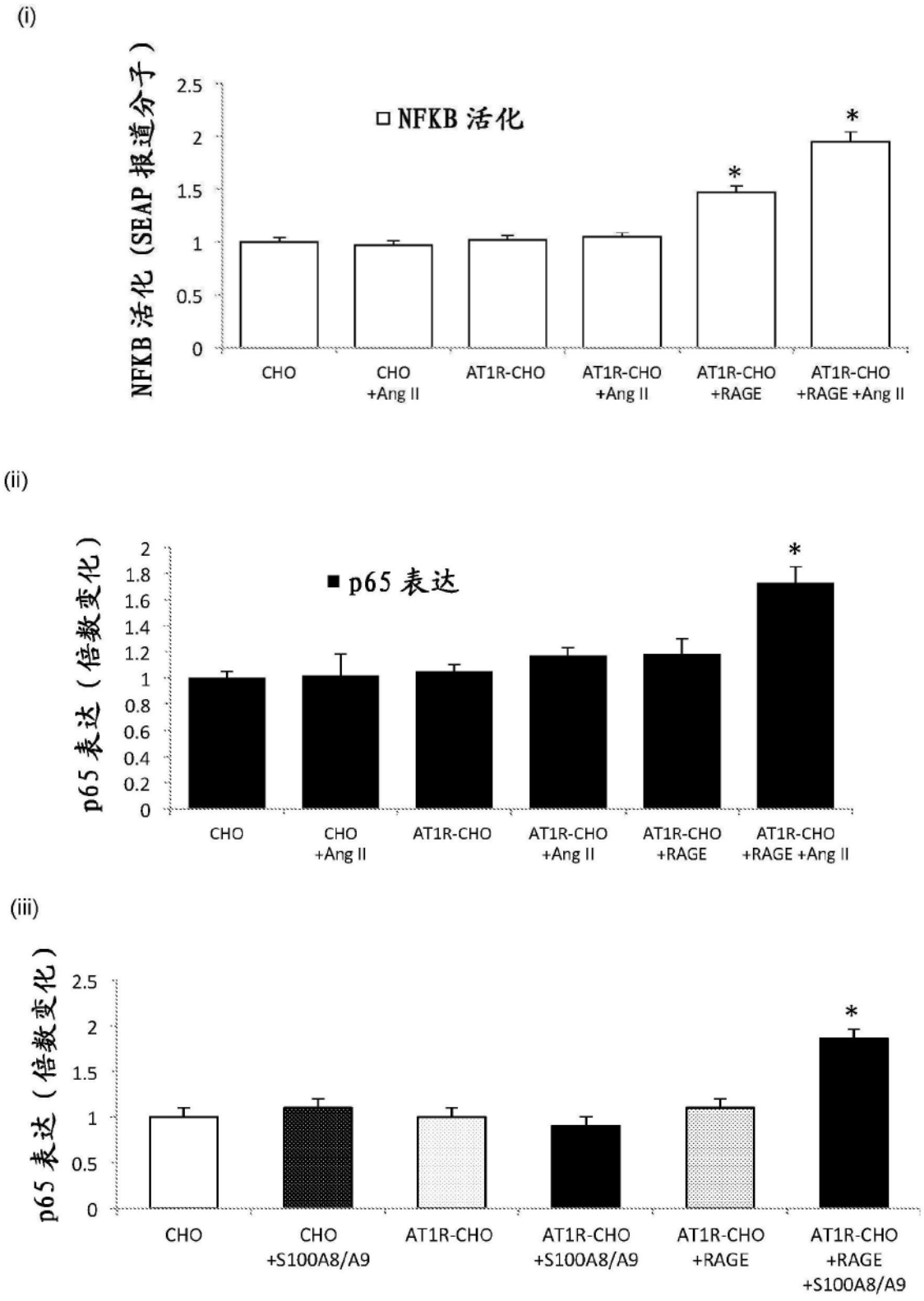

(i)
NFKB 活化（SEAP 报道分子）
□ NFKB 活化
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
CHO
CHO +Ang II
AT1R-CHO
AT1R-CHO +Ang II
AT1R-CHO +RAGE
AT1R-CHO +RAGE +Ang II
(ii)
p65 表达（倍数变化）
■ p65 表达
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
CHO
CHO +Ang II
AT1R-CHO
AT1R-CHO +Ang II
AT1R-CHO +RAGE
AT1R-CHO +RAGE +Ang II
(iii)
p65 表达（倍数变化）
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
CHO
CHO +S100A8/A9
AT1R-CHO
AT1R-CHO +S100A8/A9
AT1R-CHO +RAGE
AT1R-CHO +RAGE +S100A8/A9

图5C

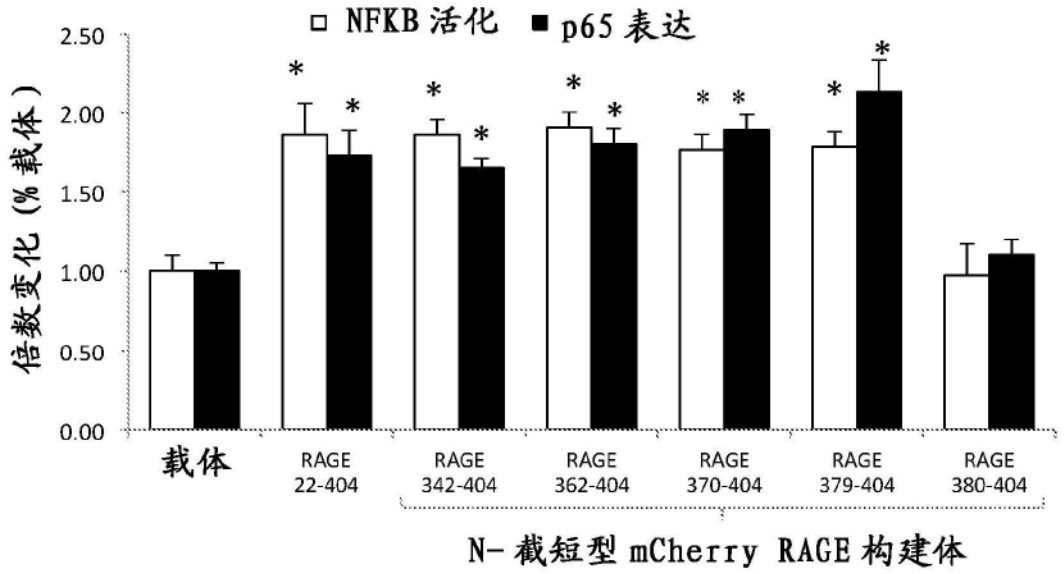

NFKB 活化
p65 表达
倍数变化 (% 载体)
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
载体
RAGE 22-404
RAGE 342-404
RAGE 362-404
RAGE 370-404
RAGE 379-404
RAGE 380-404
N- 截短型 mCherry RAGE 构建体

图5D

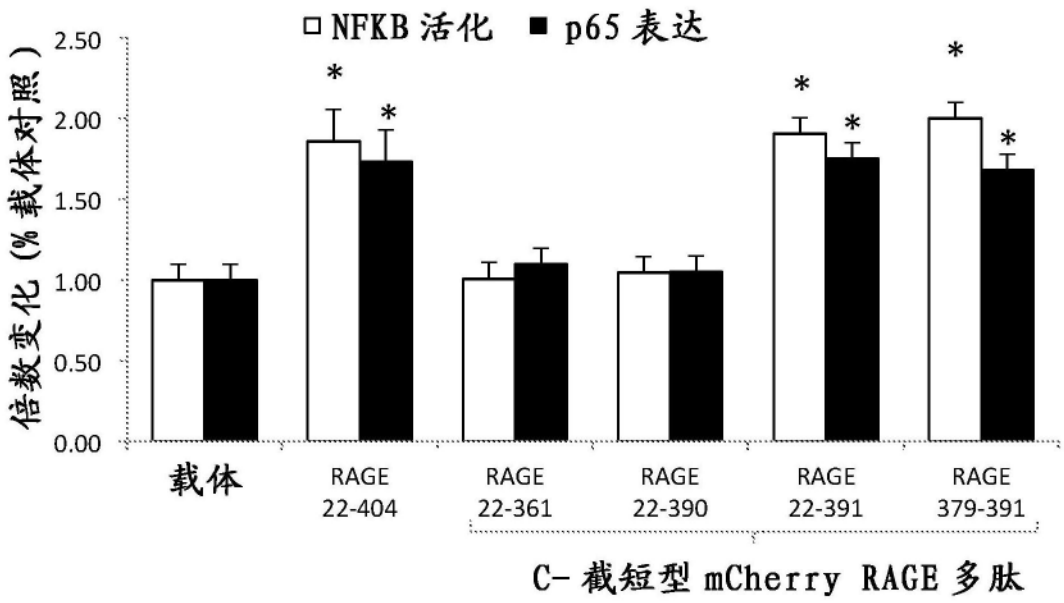

NFKB 活化
p65 表达
倍数变化 (% 载体对照)
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
载体
RAGE 22-404
RAGE 22-361
RAGE 22-390
RAGE 22-391
RAGE 379-391
C- 截短型 mCherry RAGE 多肽

图5E

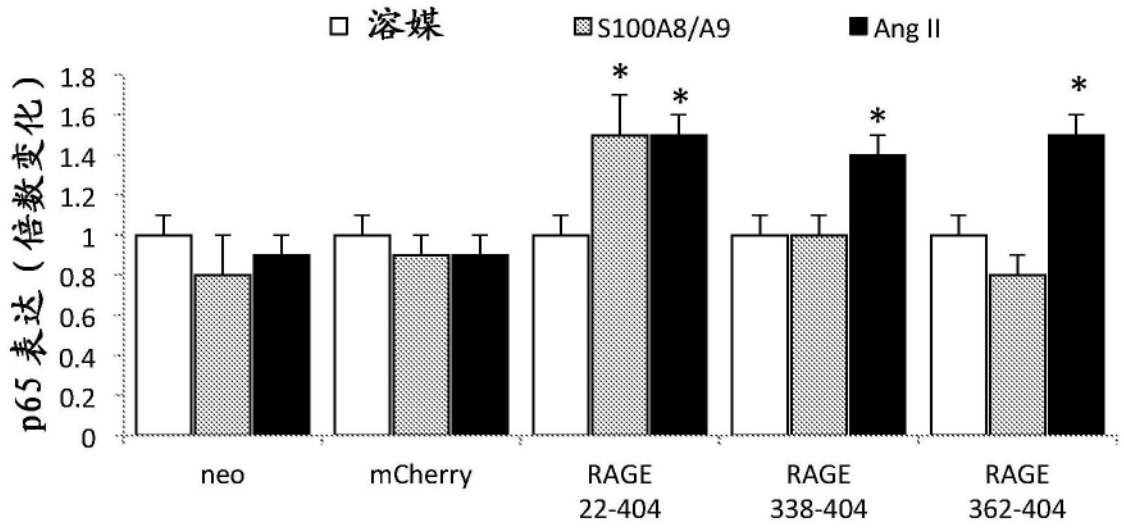

溶媒
S100A8/A9
Ang II
p65表达（倍数变化）
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
neo
mCherry
RAGE 22-404
RAGE 338-404
RAGE 362-404

图5F

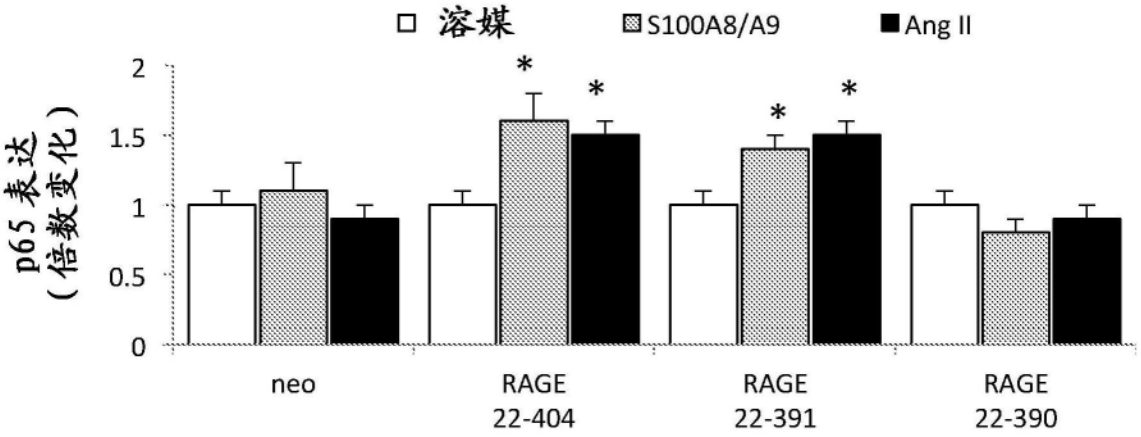

溶媒
S100A8/A9
Ang II
p65表达（倍数变化）
2
1.5
1
0.5
0
neo
RAGE 22-404
RAGE 22-391
RAGE 22-390

图5G

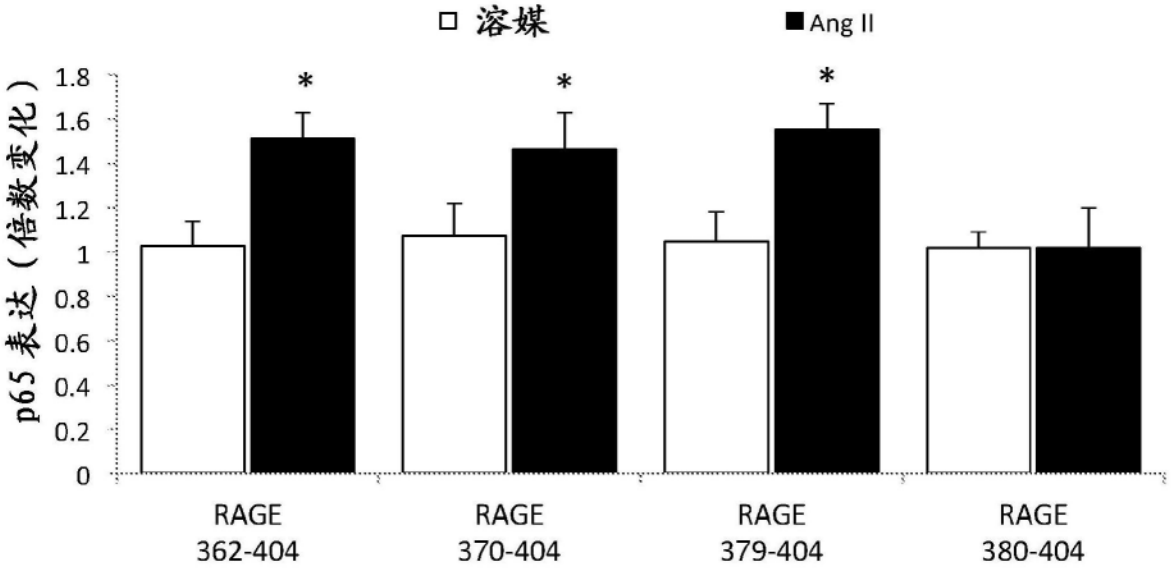

溶媒
Ang II
p65 表达（倍数变化）
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
*
*
RAGE 362-404
RAGE 370-404
RAGE 379-404
RAGE 380-404

图5H

实施例6

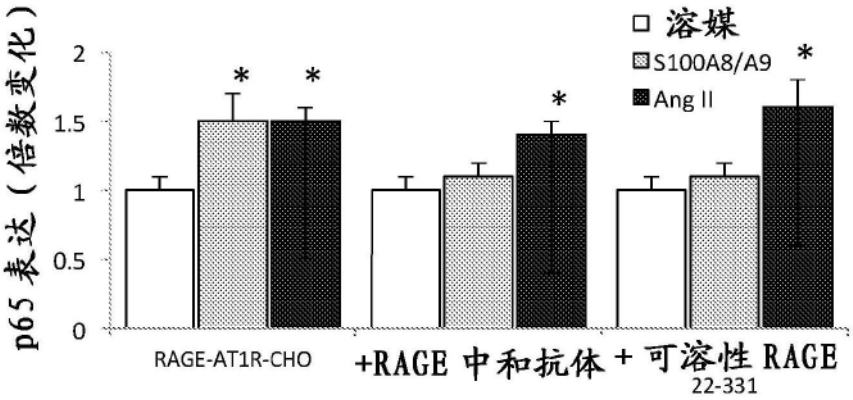

溶媒
S100A8/A9
Ang II
p65 表达（倍数变化）
2
1.5
1
0.5
0
*
*
*
*
RAGE-AT1R-CHO
+RAGE 中和抗体
+ 可溶性 RAGE 22-331

图6A

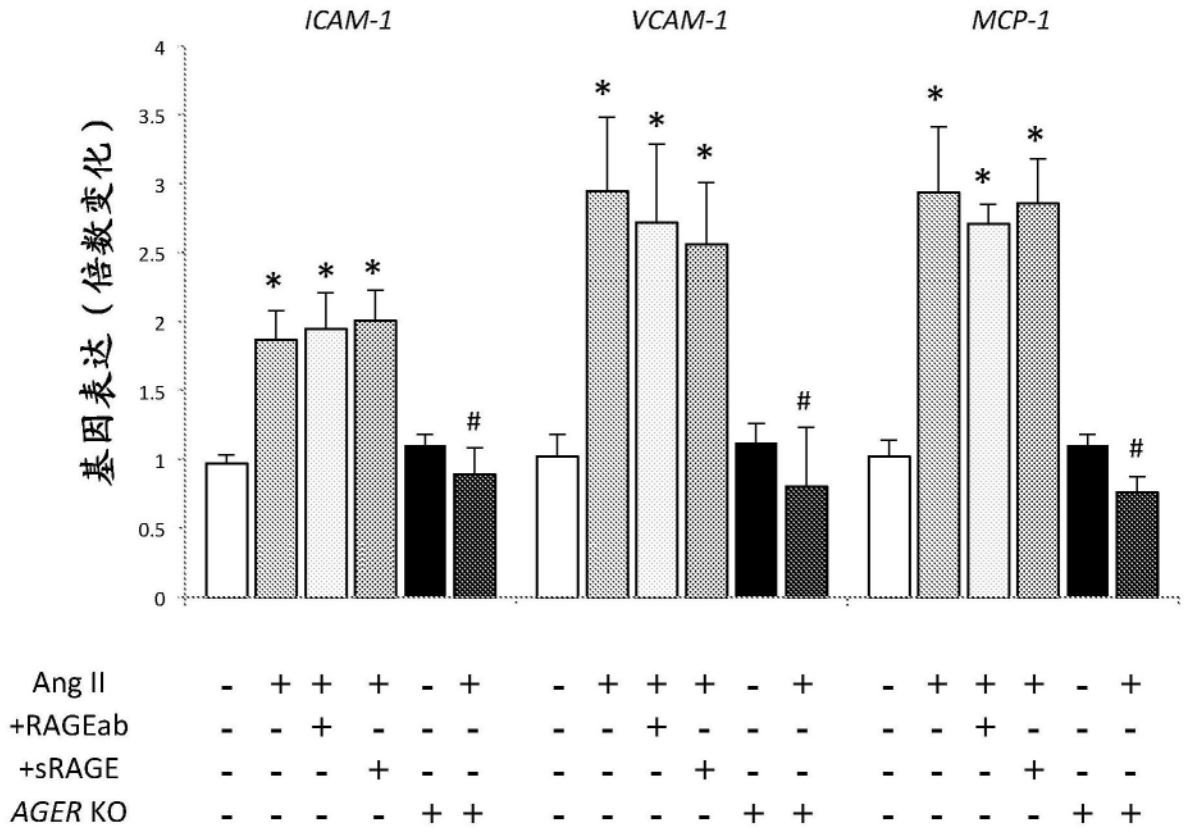

ICAM-1
VCAM-1
MCP-1
基因表达（倍数变化）
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
#
Ang II
+RAGEab
+sRAGE
AGER KO

图6B

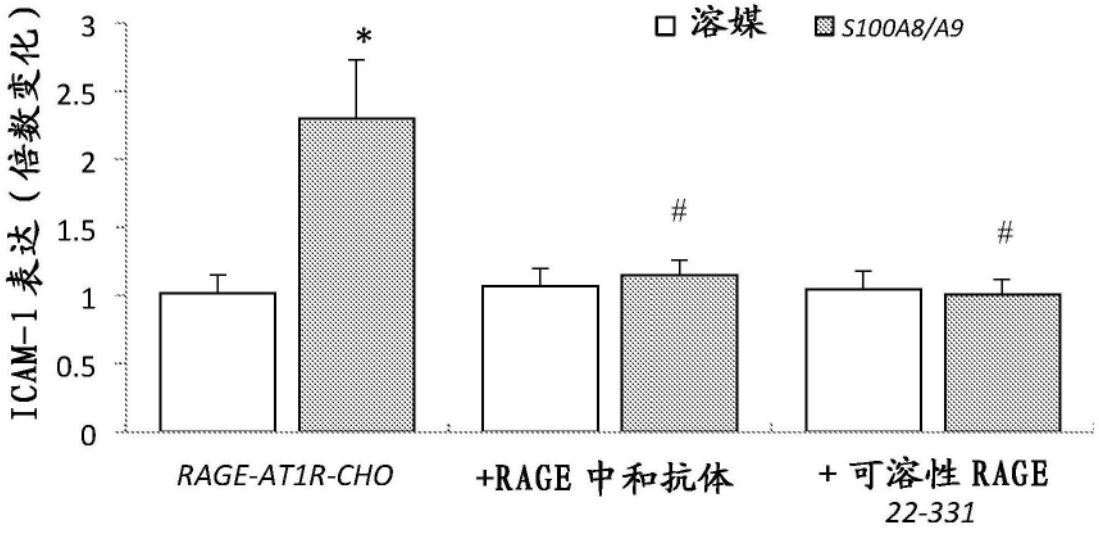

溶媒
S100A8/A9
ICAM-1 表达（倍数变化）
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
#
RAGE-AT1R-CHO
+RAGE 中和抗体
+ 可溶性 RAGE
22-331

图6C

实施例7

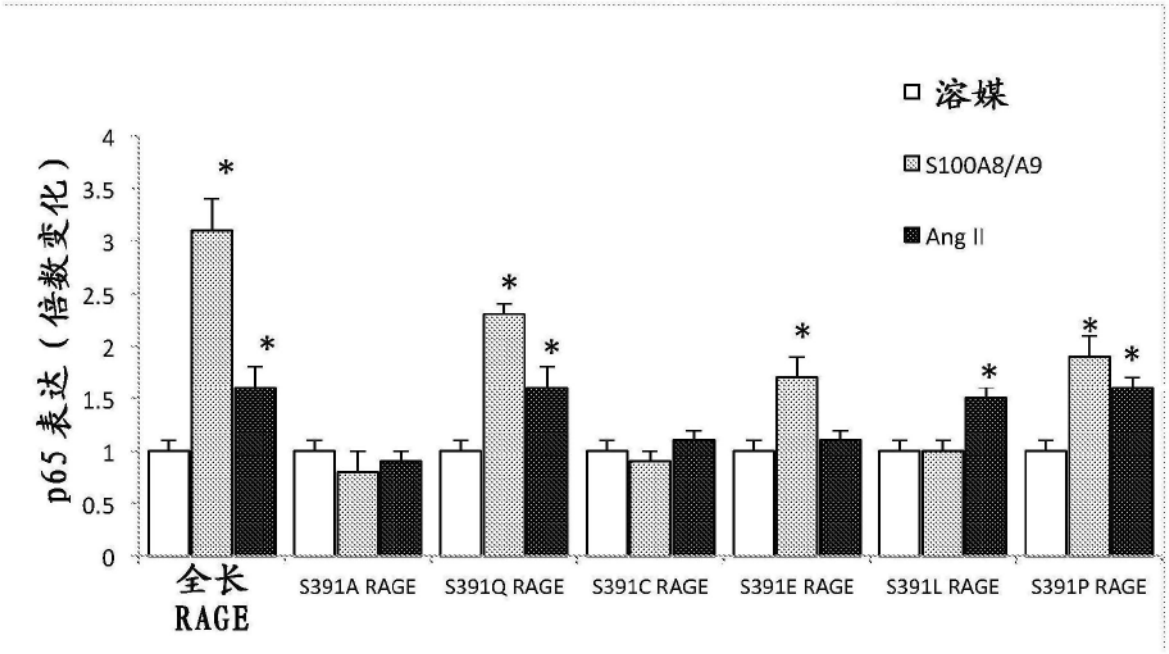

溶媒
S100A8/A9
Ang II
p65 表达（倍数变化）
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
全长 RAGE
S391A RAGE
S391Q RAGE
S391C RAGE
S391E RAGE
S391L RAGE
S391P RAGE

图7A

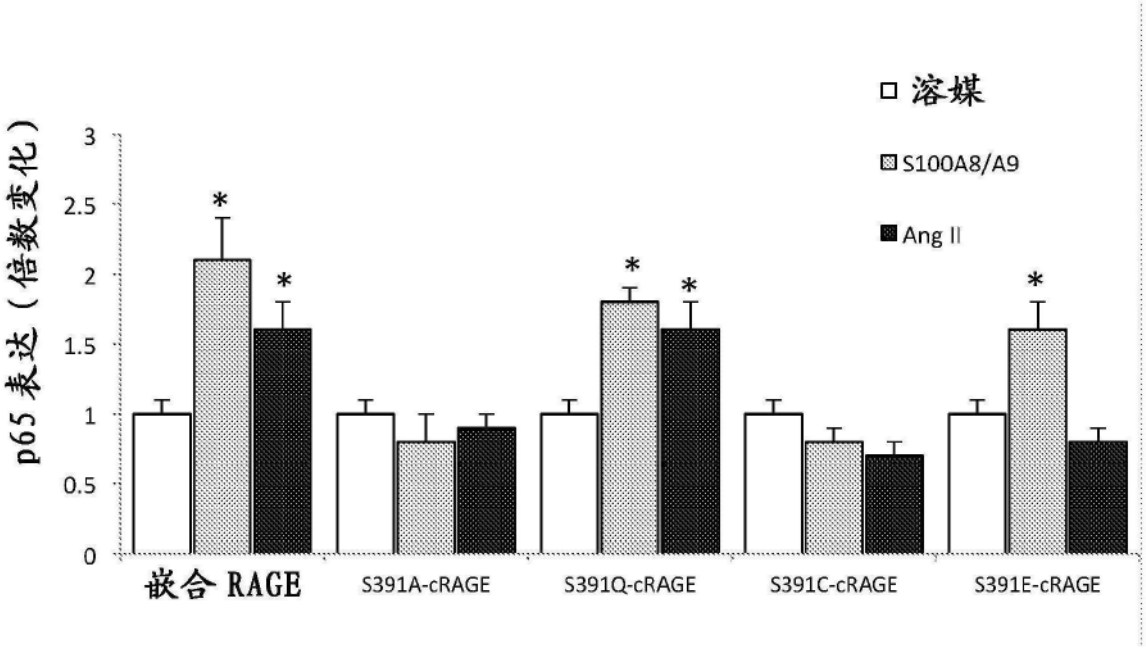

溶媒
S100A8/A9
Ang II
p65 表达（倍数变化）
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
嵌合 RAGE
S391A-cRAGE
S391Q-cRAGE
S391C-cRAGE
S391E-cRAGE

图7B

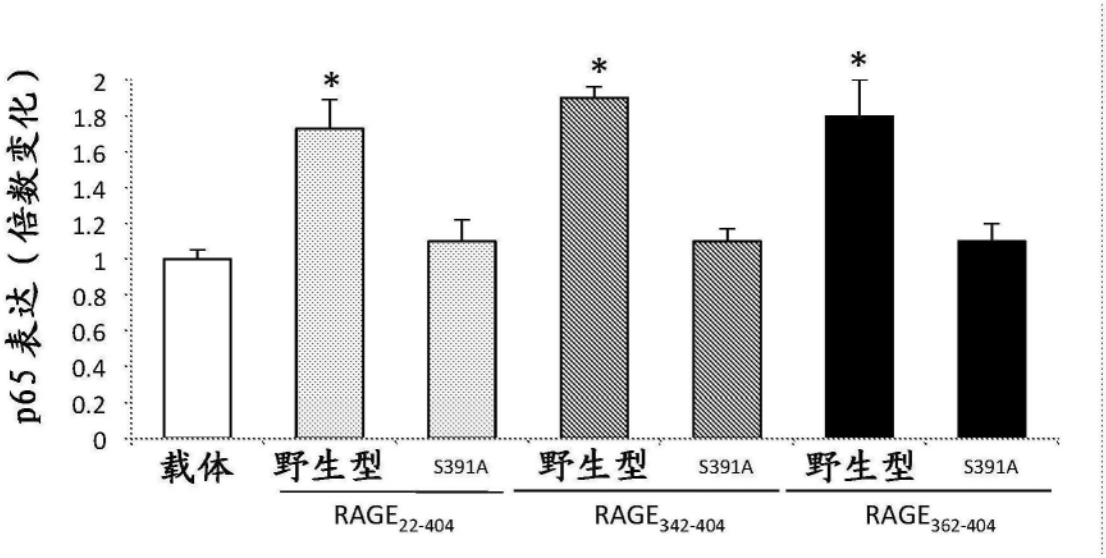

p65 表达（倍数变化）
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
*
*
载体
野生型
S391A
野生型
S391A
野生型
S391A
RAGE22-404
RAGE342-404
RAGE362-404

图7C

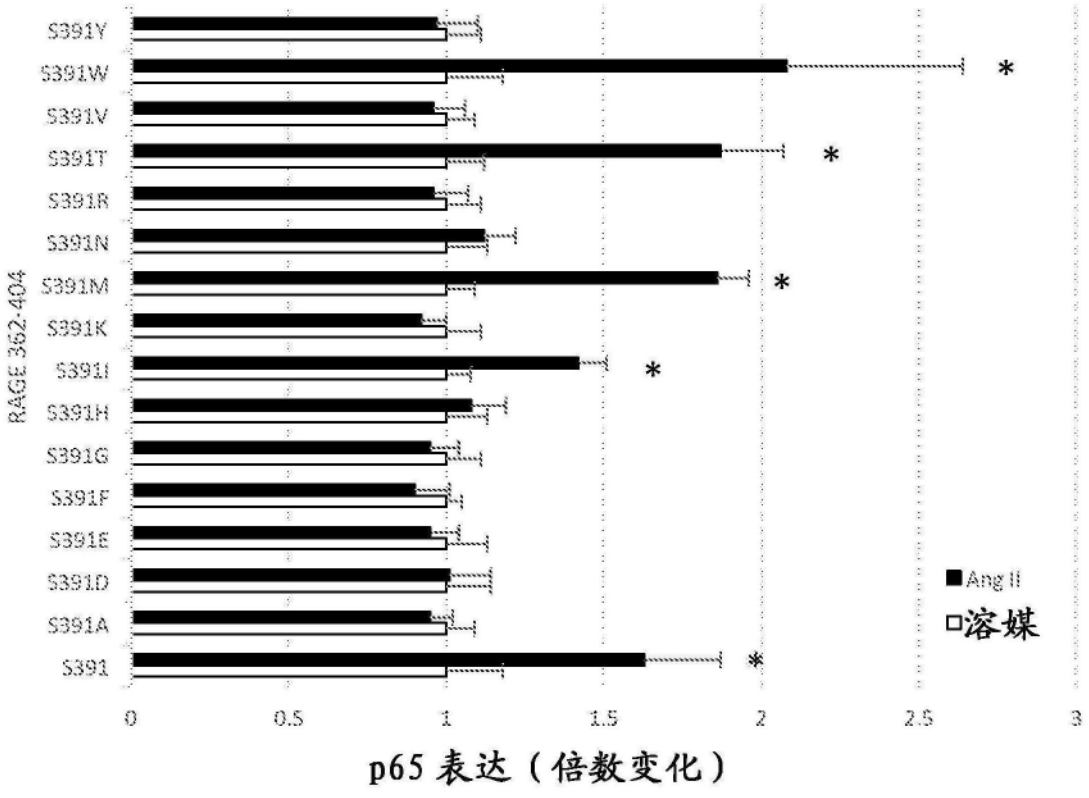

S391Y
S391W
S391V
S391T
S391R
S391N
S391M
S391K
S391I
S391H
S391G
S391F
S391E
S391D
S391A
S391
RAGE 362-404
*
*
*
*
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
p65 表达（倍数变化）
Ang II
溶媒

图7D

实施例8

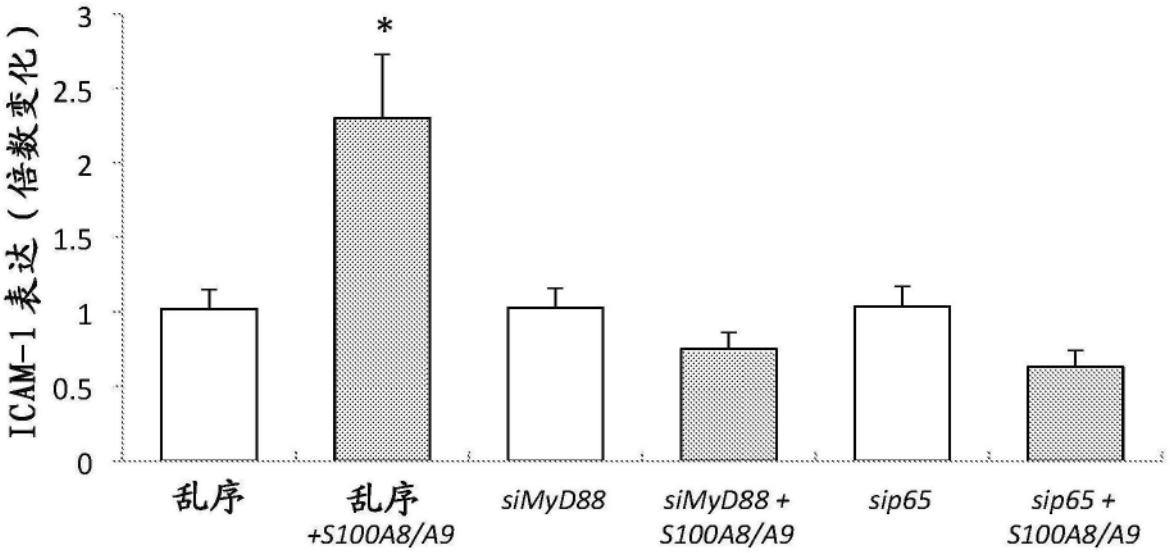

ICAM-1 表达（倍数变化）
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
乱序
乱序 +S100A8/A9
siMyD88
siMyD88 + S100A8/A9
sip65
sip65 + S100A8/A9

图8A

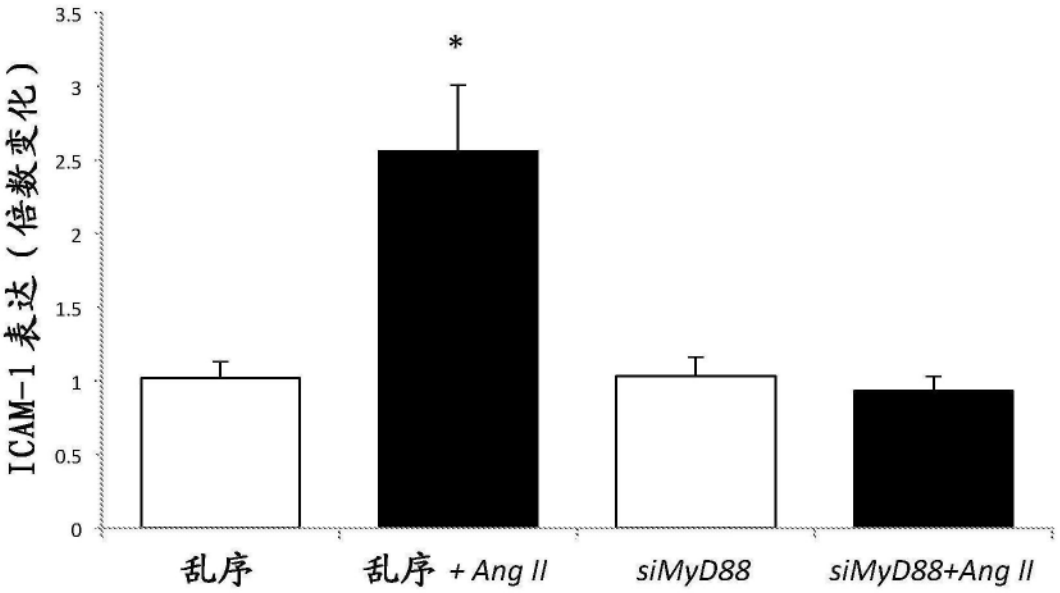

ICAM-1 表达（倍数变化）
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
乱序
乱序 + Ang II
siMyD88
siMyD88+Ang II

图8B

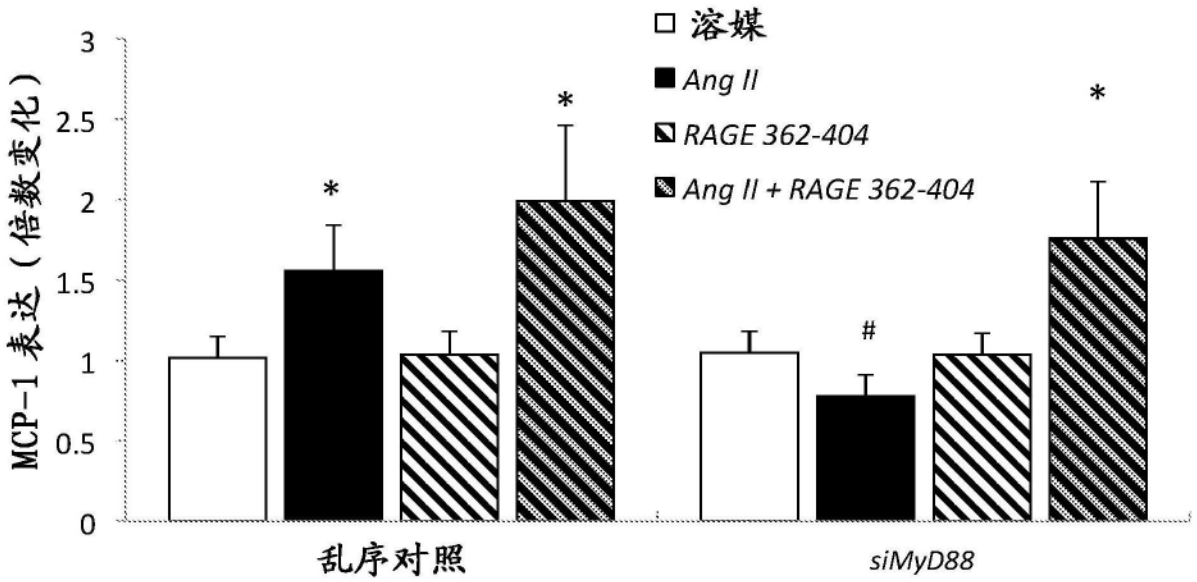

溶媒
Ang II
RAGE 362-404
Ang II + RAGE 362-404
MCP-1 表达（倍数变化）
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
#
*
乱序对照
siMyD88

图8C

实施例9

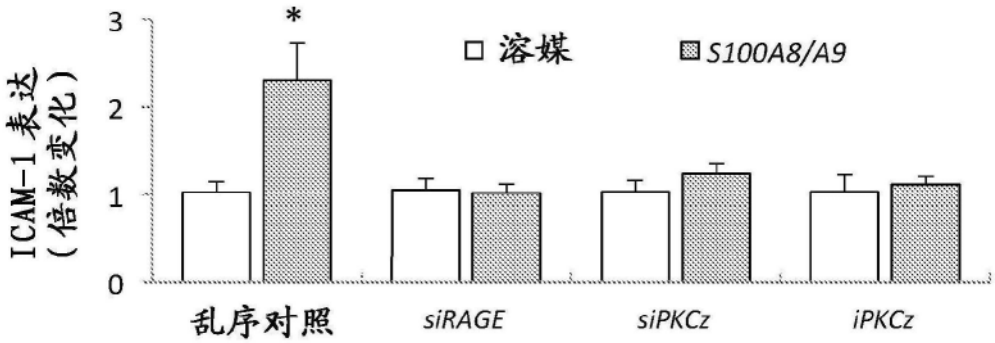

溶媒
S100A8/A9
ICAM-1 表达
（倍数变化）
3
2
1
0
*
乱序对照
siRAGE
siPKCz
iPKCz

图9A

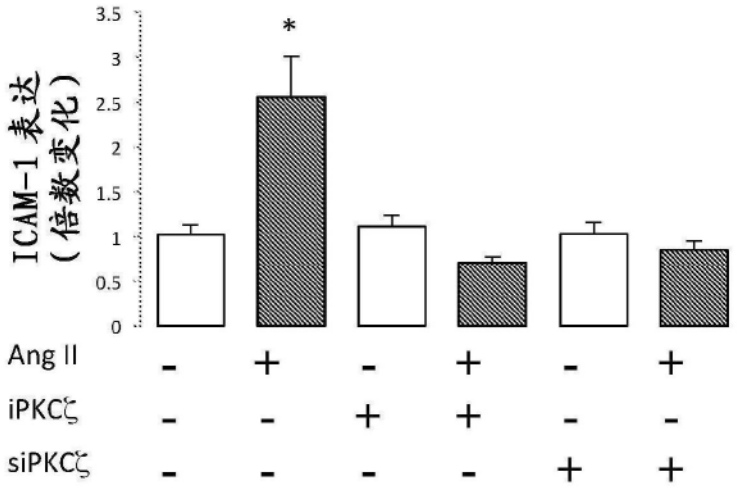

ICAM-1 表达
（倍数变化）
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
Ang II - + - + - +
iPKCζ - - + + - -
siPKCζ - - - - + +

图9B

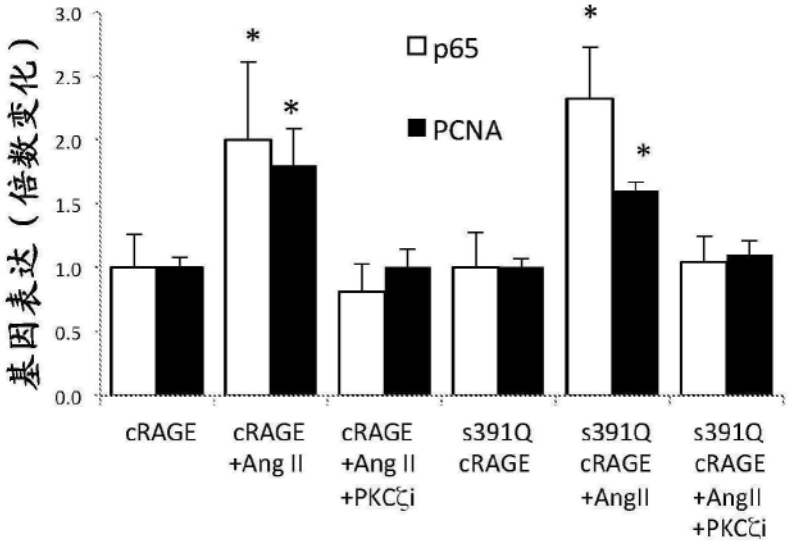

基因表达（倍数变化）
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
p65
PCNA
*
cRAGE
cRAGE +Ang II
cRAGE +Ang II +PKCζi
s391Q cRAGE
s391Q cRAGE +AngII
s391Q cRAGE +AngII +PKCζi

图9C

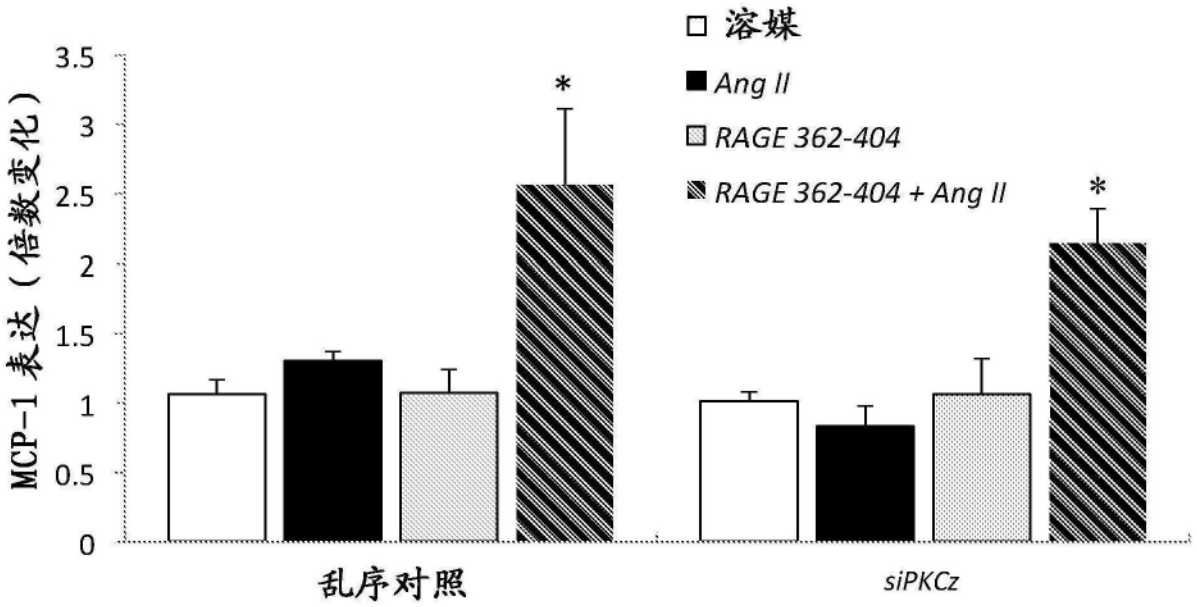


图9D

实施例10

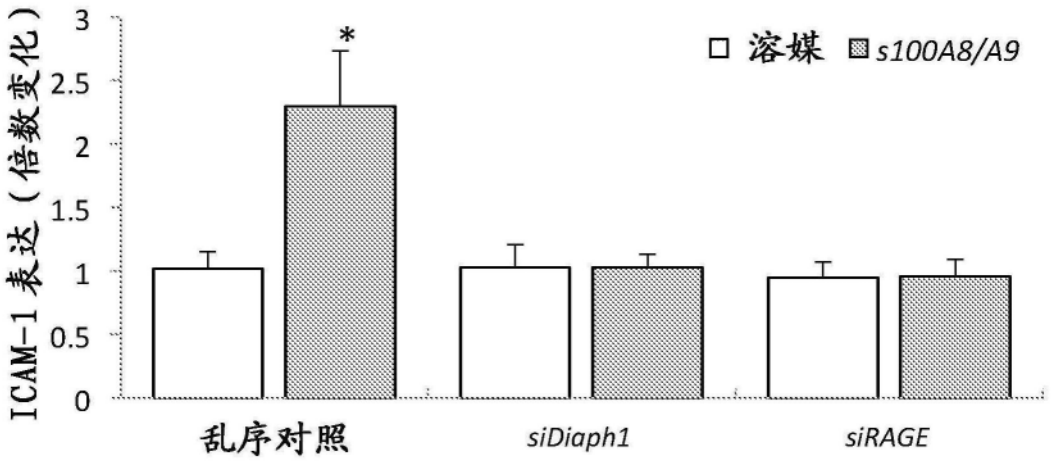


图10A

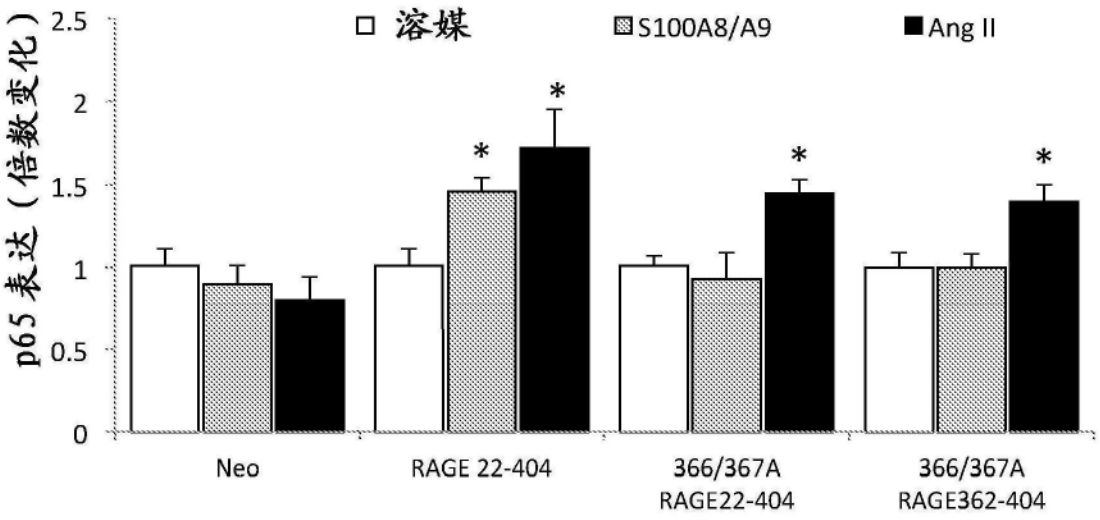

溶媒
S100A8/A9
Ang II
p65表达（倍数变化）
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
*
*
Neo
RAGE 22-404
366/367A
RAGE22-404
366/367A
RAGE362-404

图10B

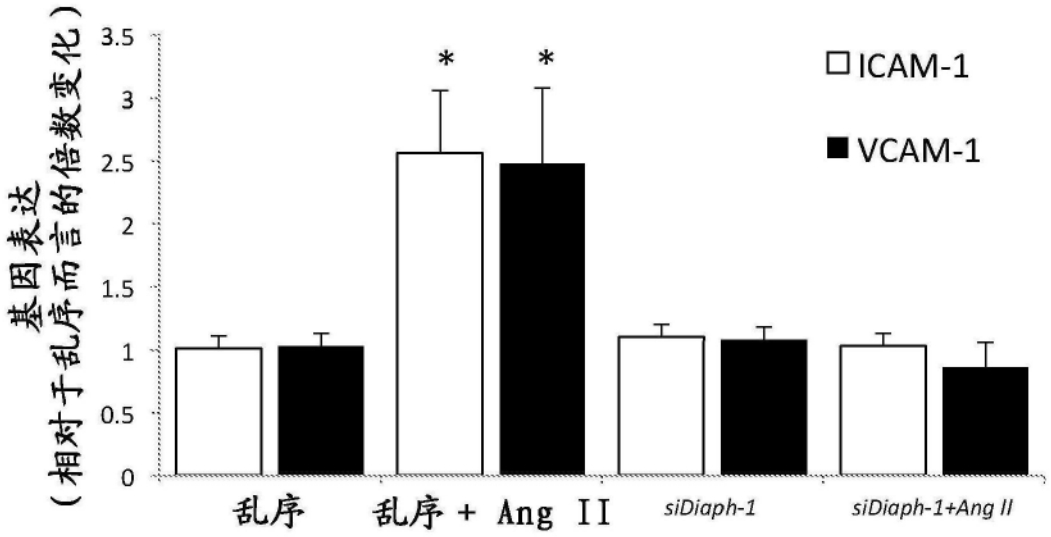

基因表达
（相对于乱序而言的倍数变化）
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
ICAM-1
VCAM-1
乱序
乱序 + Ang II
siDiaph-1
siDiaph-1+Ang II

图10C

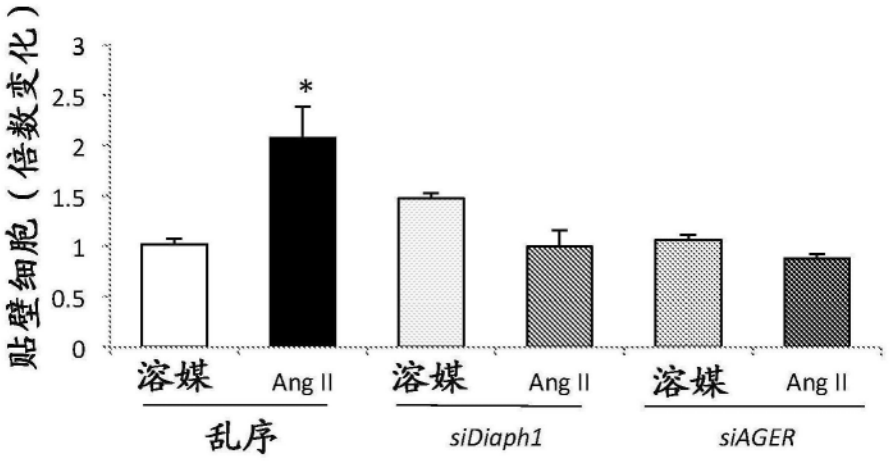

贴壁细胞（倍数变化）
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
溶媒
Ang II
溶媒
Ang II
溶媒
Ang II
乱序
siDiaph1
siAGER

图10D

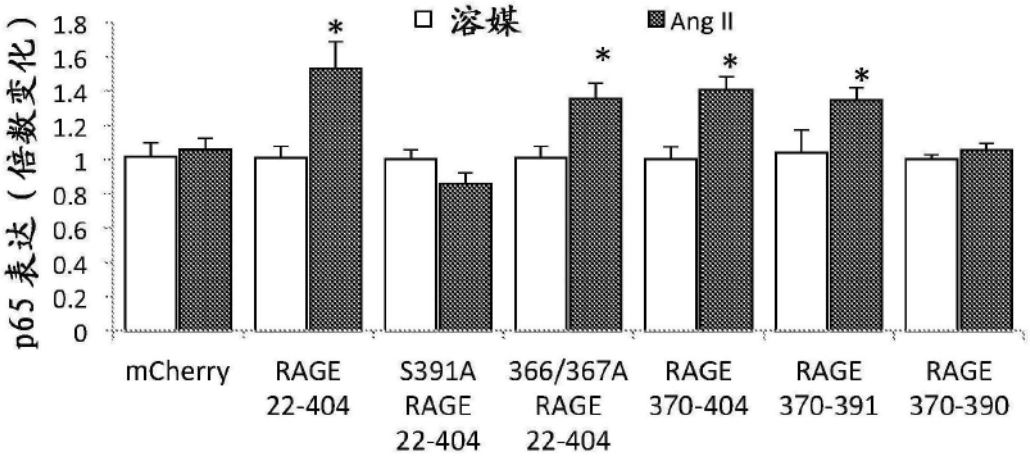

p65表达（倍数变化）
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
溶媒
Ang II
*
*
*
*
mCherry
RAGE 22-404
S391A RAGE 22-404
366/367A RAGE 22-404
RAGE 370-404
RAGE 370-391
RAGE 370-390

图10E

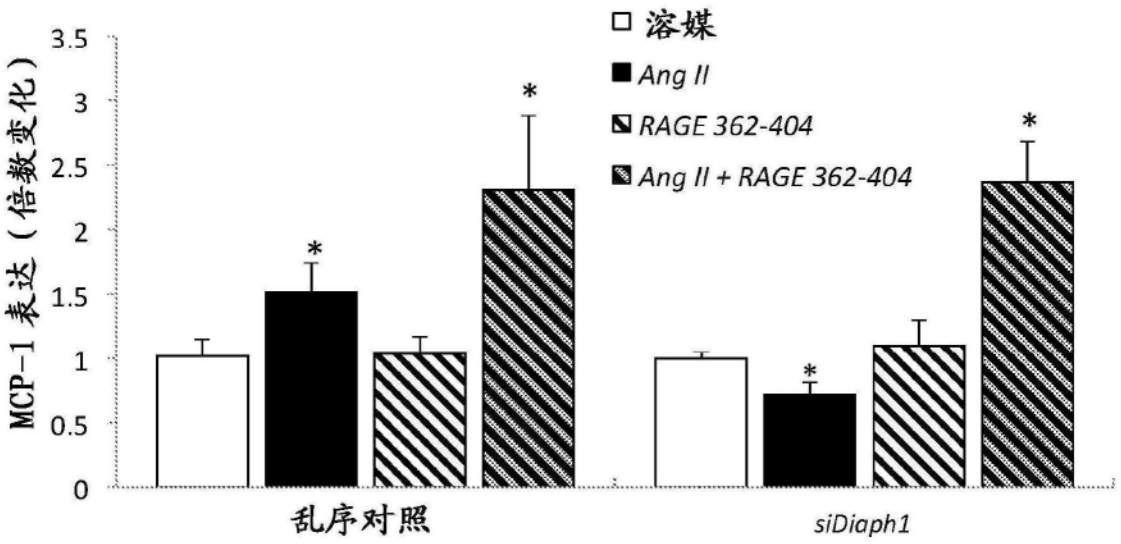


图10F

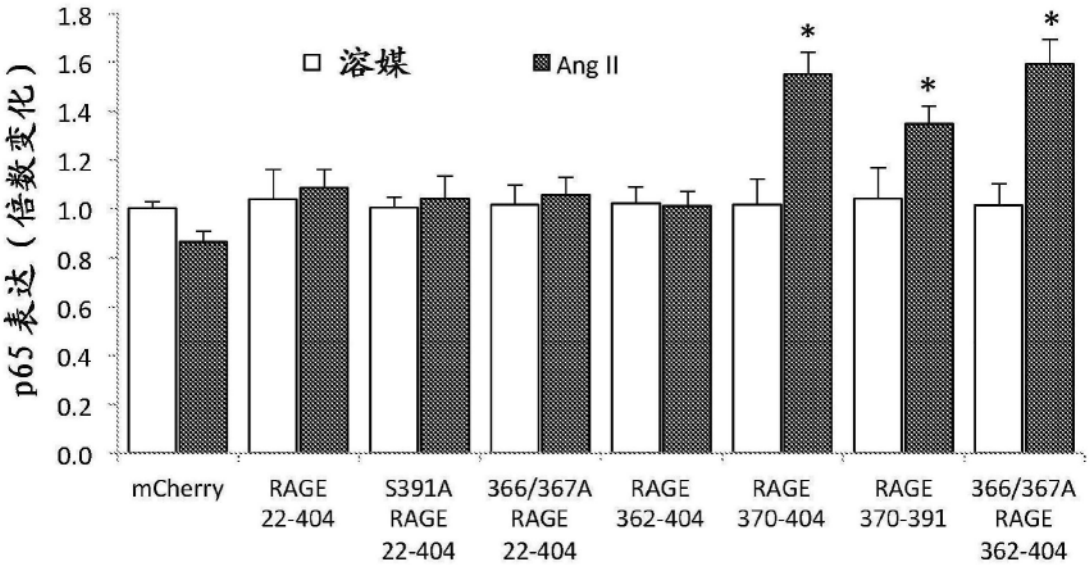


图10G

实施例11

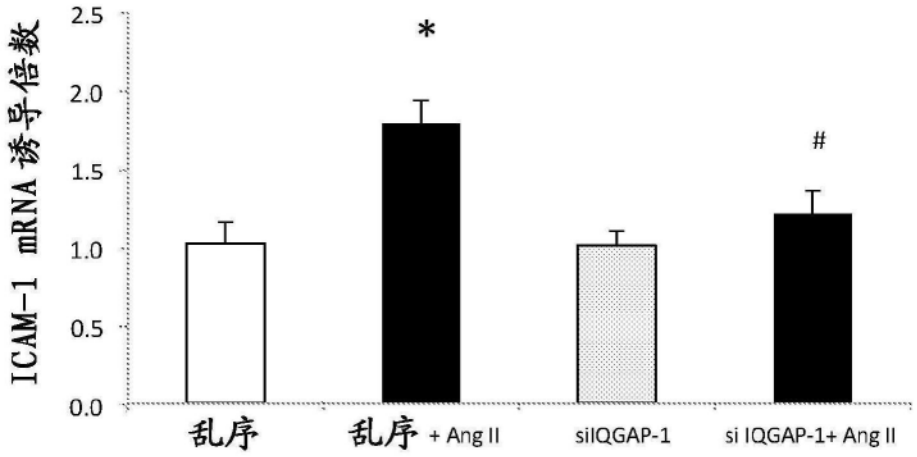

ICAM-1 mRNA 诱导倍数
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
#
乱序
乱序 + Ang II
siIQGAP-1
si IQGAP-1+ Ang II

图11A

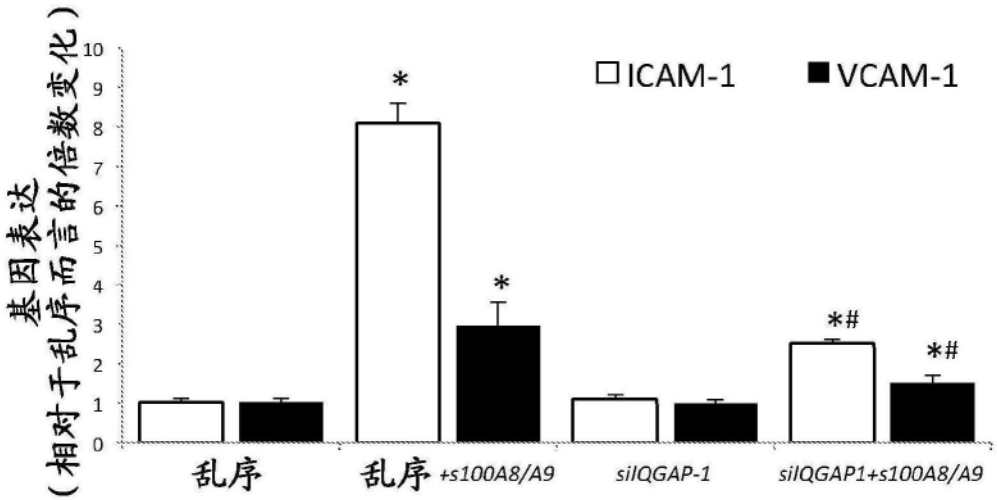

基因表达
（相对于乱序而言的倍数变化）
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ICAM-1
VCAM-1
*
*
*#
*#
乱序
乱序 +s100A8/A9
siIQGAP-1
siIQGAP1+s100A8/A9

图11B

1.G3ICI3-嗅觉受体 2T2
2.G3H777- ADP/ATP 移位酶 2
3.G3GXU1-蛋白磷酸酶 1G
4.Q9ERF7 - 胞间黏附分子 1
5.G3IEU2-蛋白 DJ-1(PARK7)
6.G3I4M4-钙调理蛋白 -3
7.G3H17O-脑发育调节蛋白
8.G3HFM4-细丝蛋白 B
9.G3IF62 - Ras GTP 酶活化样蛋白 IQGAP-1
10.G3HC04- Ras 相关蛋白 Rab-13
11.G3HFP1-根蛋白 / 埃兹蛋白 / 膜突蛋白
12.G3HNB8-蛋白脂质蛋白 2
13.G3I3Z5-冠蛋白
14.G3HUU6-蛋白质 S100 A11
15.G3HQ05-琥珀酰 CoA 连接酶 [形成 GDP 的] 亚基 α
16.G3I539 - Hsc70 相互作用蛋白
17.G3IH34-凋亡抑制物 5

图11C

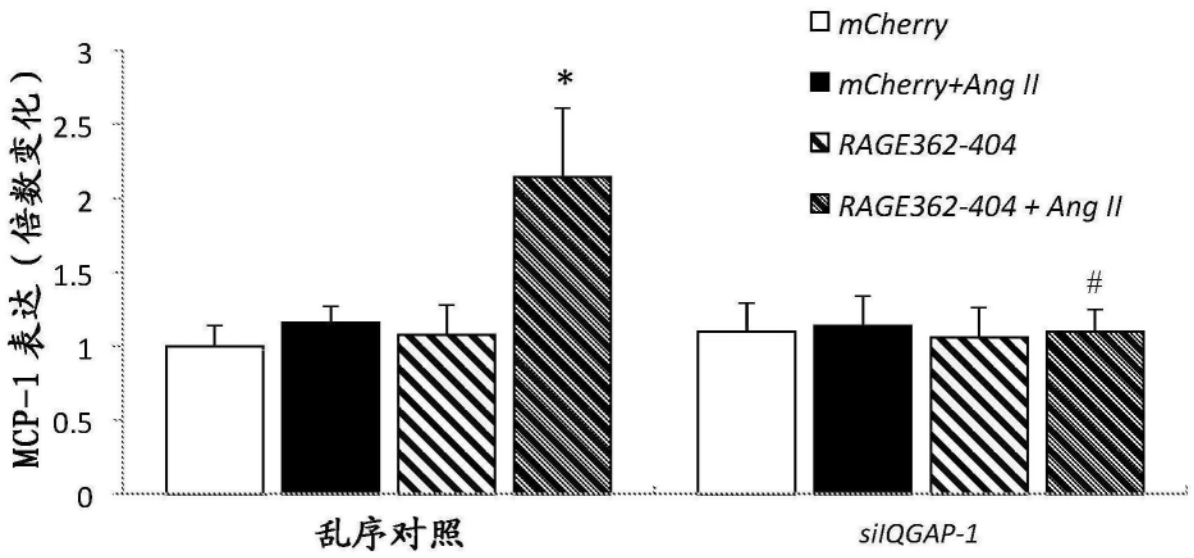


图11D

实施例12

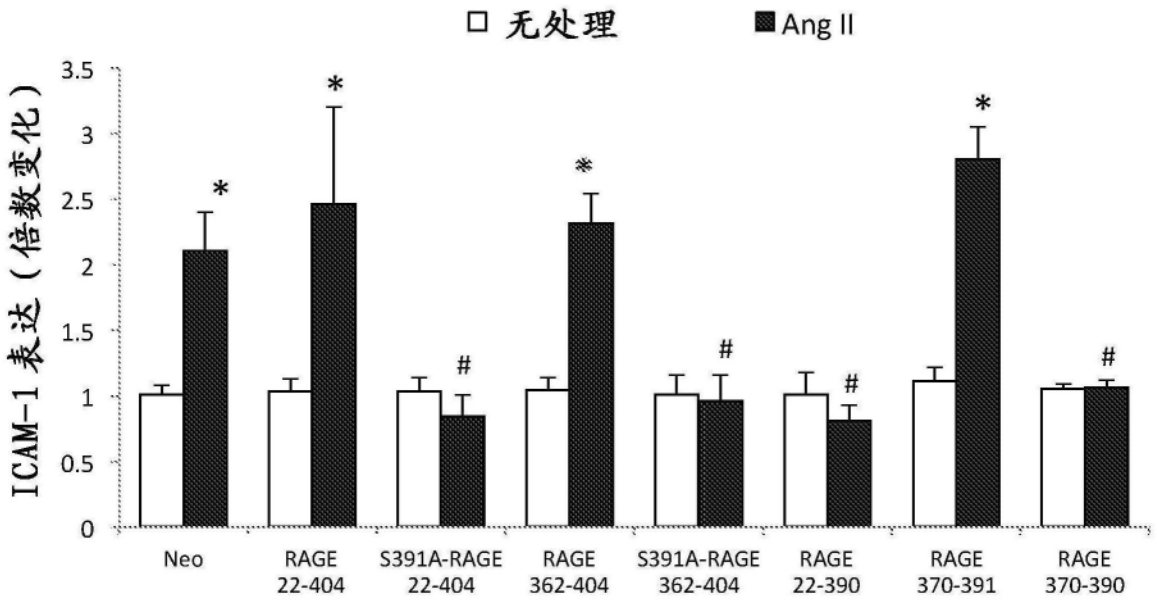
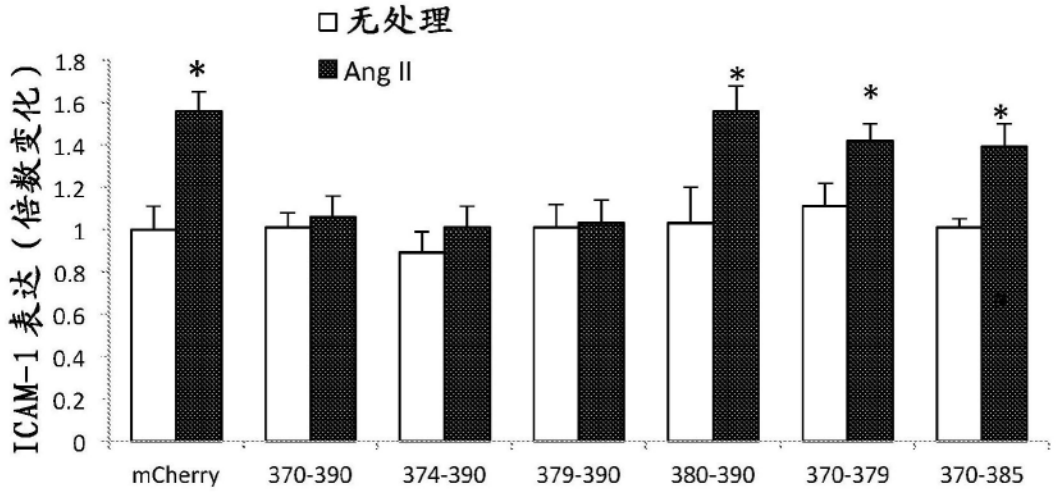


图12A



$RAGE_{370-390}$		G	E	E	R	K	A	P	E	N	Q	E	E	E	E	E	R	A	E	L	N	Q
$RAGE_{374-390}$	1					K	A	P	E	N	Q	E	E	E	E	E	R	A	E	L	N	Q
$RAGE_{379-390}$	2										Q	E	E	E	E	E	R	A	E	L	N	Q
$RAGE_{380-390}$	3											E	E	E	E	E	R	A	E	L	N	Q
$RAGE_{370-379}$	4	G	E	E	R	K	A	P	E	N												
$RAGE_{370-385}$	5	G	E	E	R	K	A	P	E	N	Q	E	E	E	E	E	R					

图12B

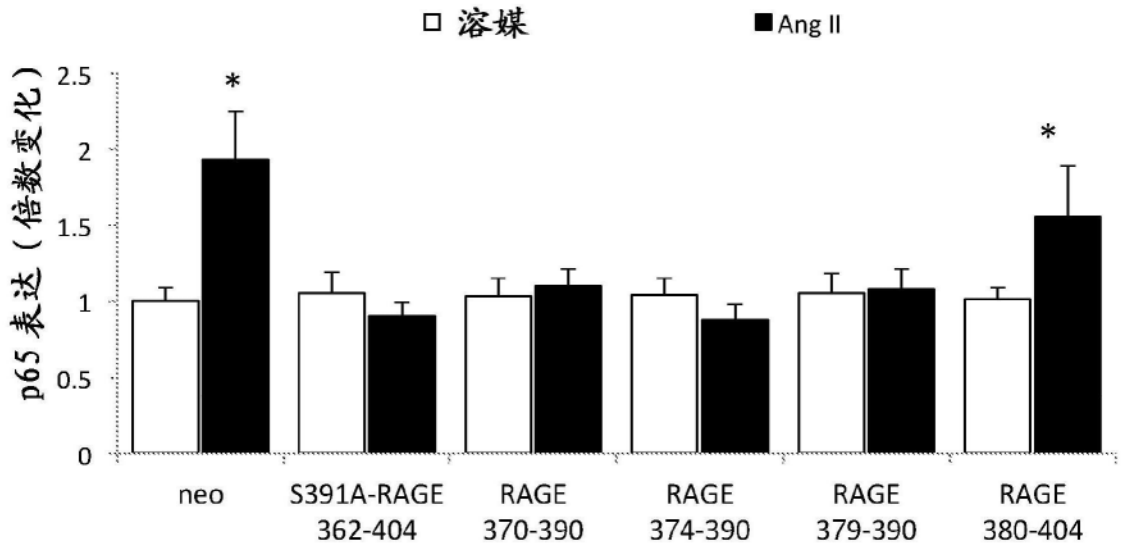

□ 溶媒
■Ang II
p65 表达（倍数变化）
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
neo
S391A-RAGE 362-404
RAGE 370-390
RAGE 374-390
RAGE 379-390
RAGE 380-404

图12C

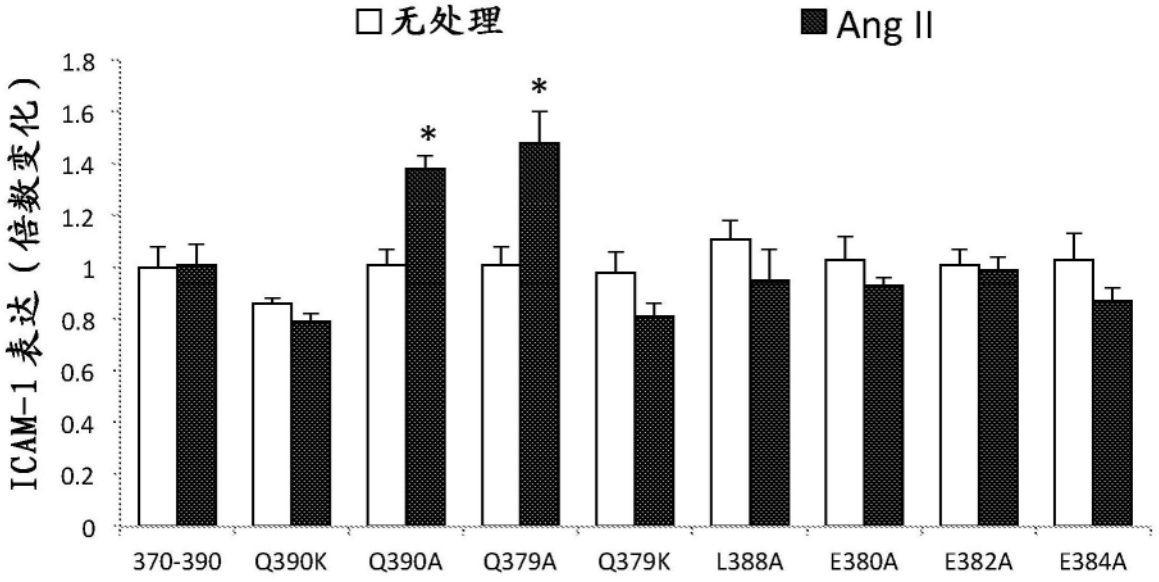

□无处理
■Ang II
ICAM-1 表达（倍数变化）
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
*
370-390
Q390K
Q390A
Q379A
Q379K
L388A
E380A
E382A
E384A

图12D

$RAGE_{379-390}$	Q	E	E	E	E	E	R	-	-	A	E	L	N	Q
链霉菌	K	E	E	E	E	E	R	A	F	A	E	L	N	K
易北河普雷沃氏菌 (Prevotella albensis)	Q	E	E	E	E	E	R	-	-	A	E	G	N	Q
Nafulsella turpanensis	K	E	E	E	E	E	R	-	-	A	S	L	N	
变形菌门细菌		E	E	E	E	E	R	-	-	A	E	L	N	

图12E

实施例13

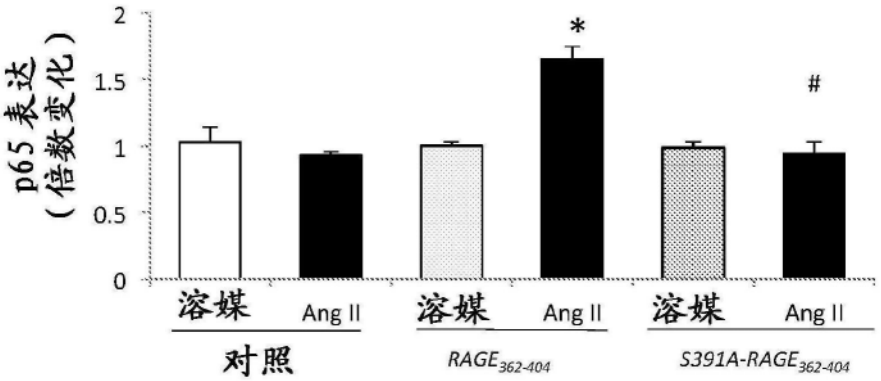


图13A

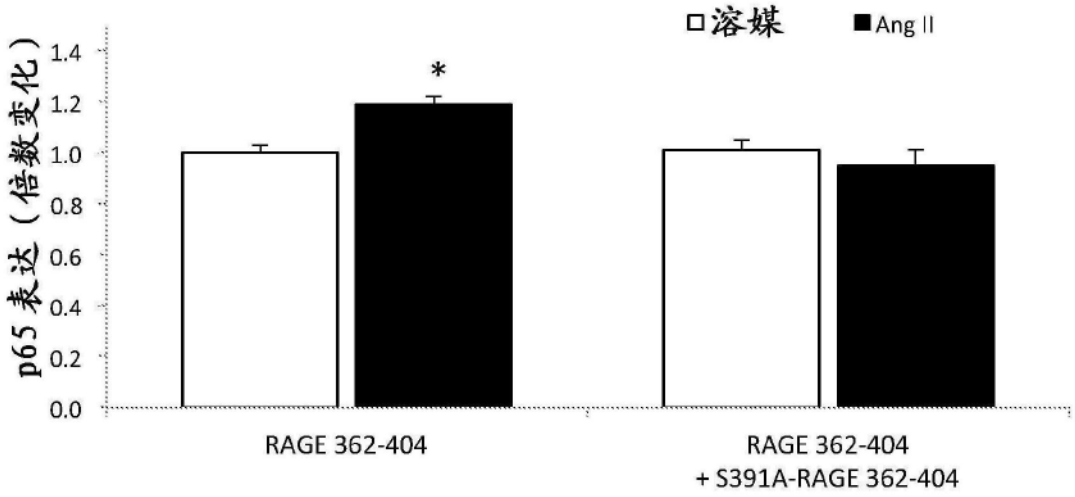


图13B

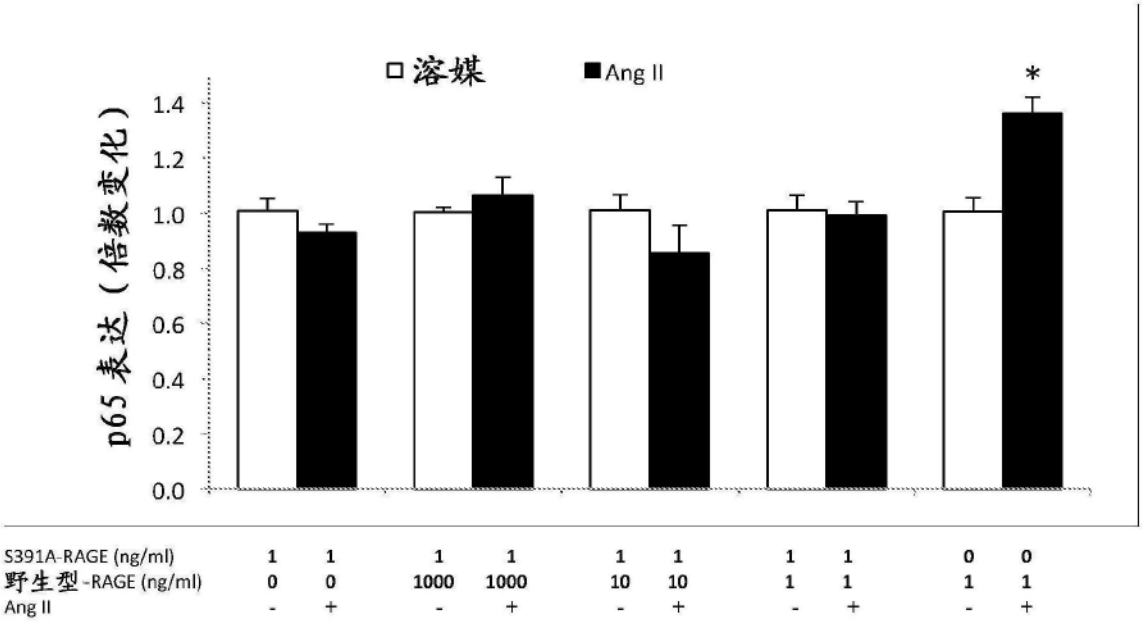

溶媒
Ang II
p65表达（倍数变化）
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
S391A-RAGE (ng/ml) 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0
野生型-RAGE (ng/ml) 0 0 1000 1000 10 10 1 1 1 1
Ang II - + - + - + - + - +

图13C

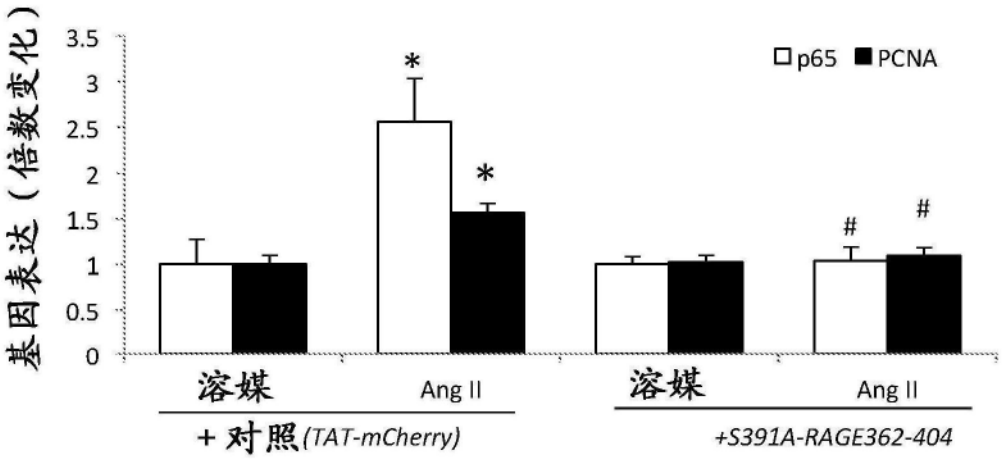

基因表达（倍数变化）
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
p65 PCNA
*
*
#
#
溶媒
Ang II
溶媒
Ang II
+ 对照(TAT-mCherry)
+S391A-RAGE362-404

图13D

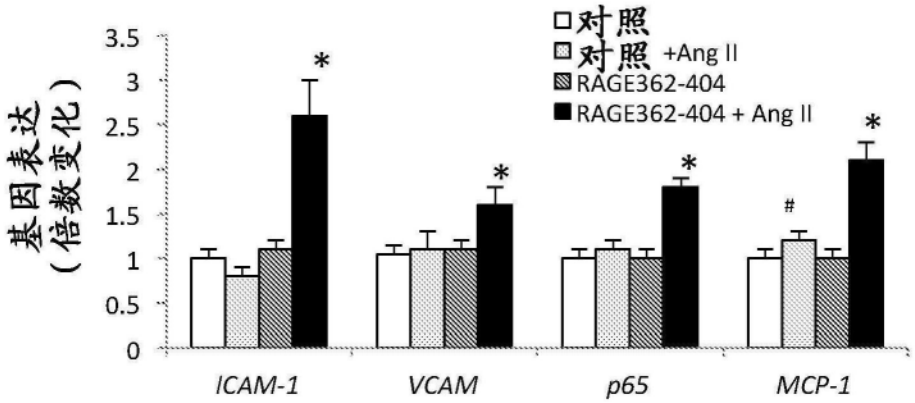

基因表达
（倍数变化）
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
对照
对照 +Ang II
RAGE362-404
RAGE362-404 + Ang II
*
*
*
#
*
ICAM-1
VCAM
p65
MCP-1

图13E

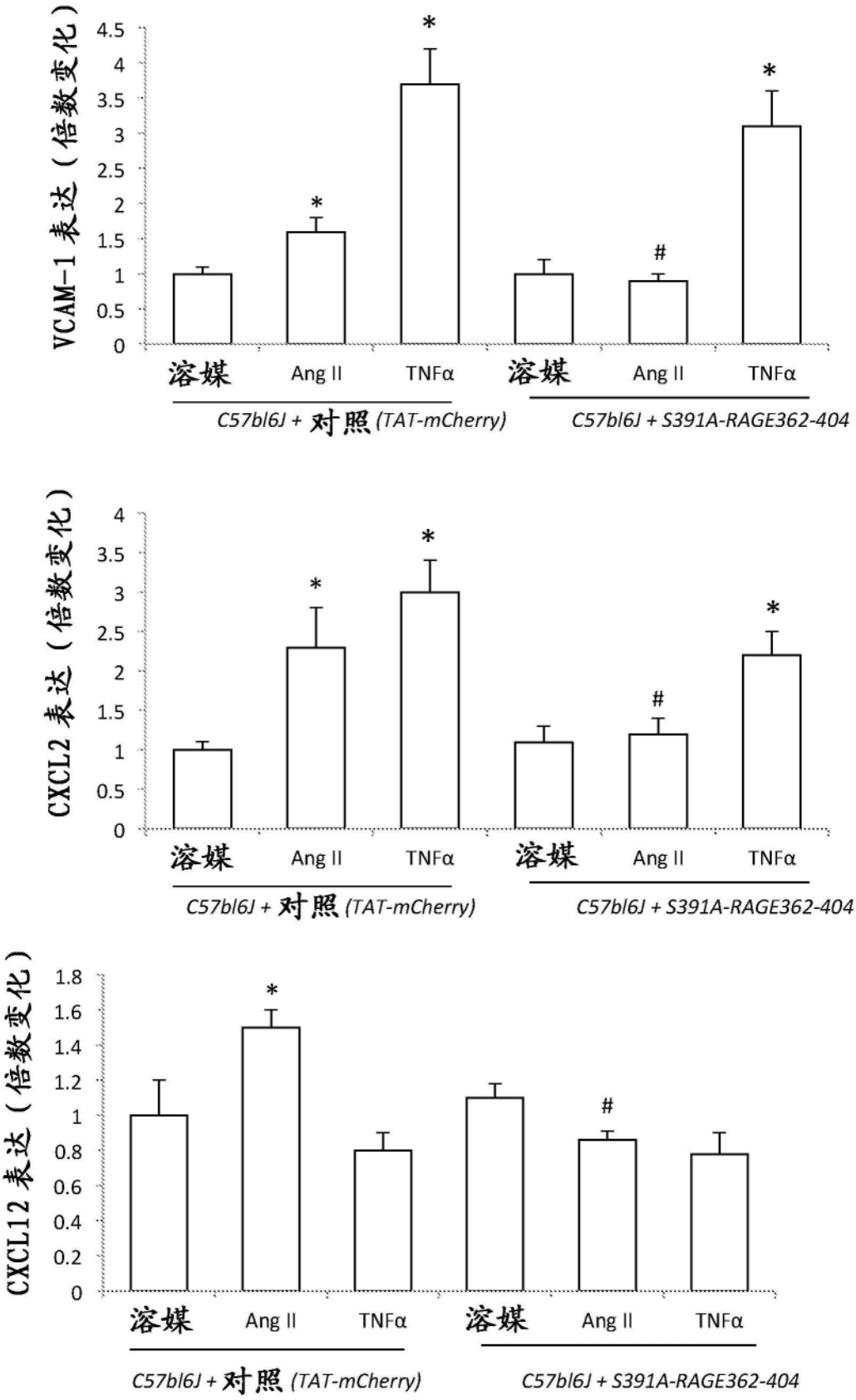

VCAM-1 表达（倍数变化）
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
*
#
溶媒
Ang II
TNFα
溶媒
Ang II
TNFα
C57bl6J + 对照 (TAT-mCherry)
C57bl6J + S391A-RAGE362-404
CXCL2 表达（倍数变化）
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
*
#
溶媒
Ang II
TNFα
溶媒
Ang II
TNFα
C57bl6J + 对照 (TAT-mCherry)
C57bl6J + S391A-RAGE362-404
CXCL12 表达（倍数变化）
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
#
溶媒
Ang II
TNFα
溶媒
Ang II
TNFα
C57bl6J + 对照 (TAT-mCherry)
C57bl6J + S391A-RAGE362-404

图13F

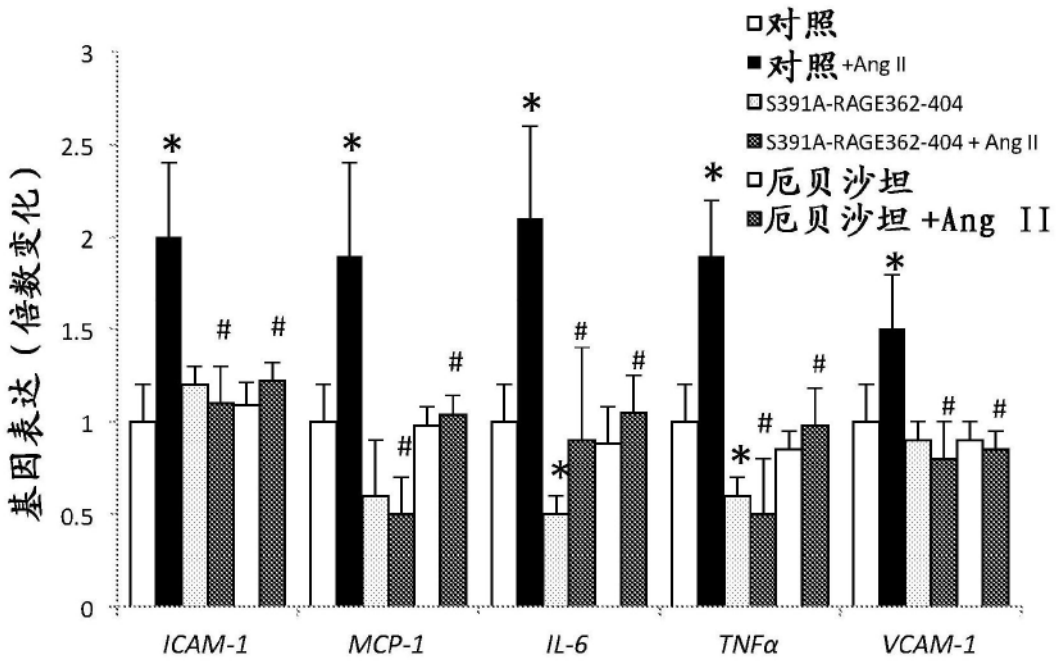

基因表达（倍数变化）
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
对照
对照+Ang II
S391A-RAGE362-404
S391A-RAGE362-404 + Ang II
厄贝沙坦
厄贝沙坦 +Ang II
ICAM-1
MCP-1
IL-6
TNFα
VCAM-1

图13G

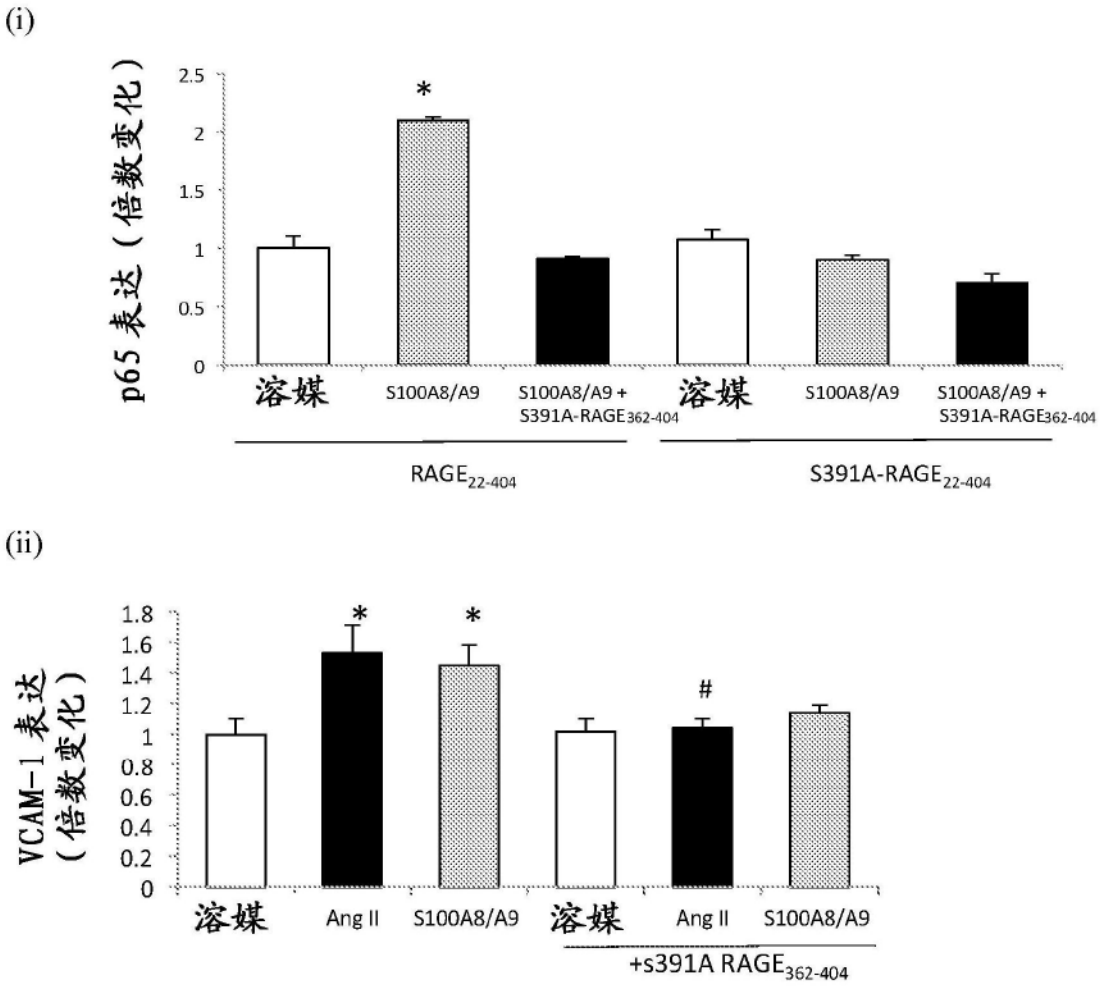

(i)
p65 表达（倍数变化）
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
溶媒
S100A8/A9
S100A8/A9 + S391A-RAGE362-404
溶媒
S100A8/A9
S100A8/A9 + S391A-RAGE362-404
RAGE22-404
S391A-RAGE22-404
(ii)
VCAM-1 表达（倍数变化）
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
*
#
溶媒
Ang II
S100A8/A9
溶媒
Ang II
S100A8/A9
+s391A RAGE362-404

图13H

实施例14

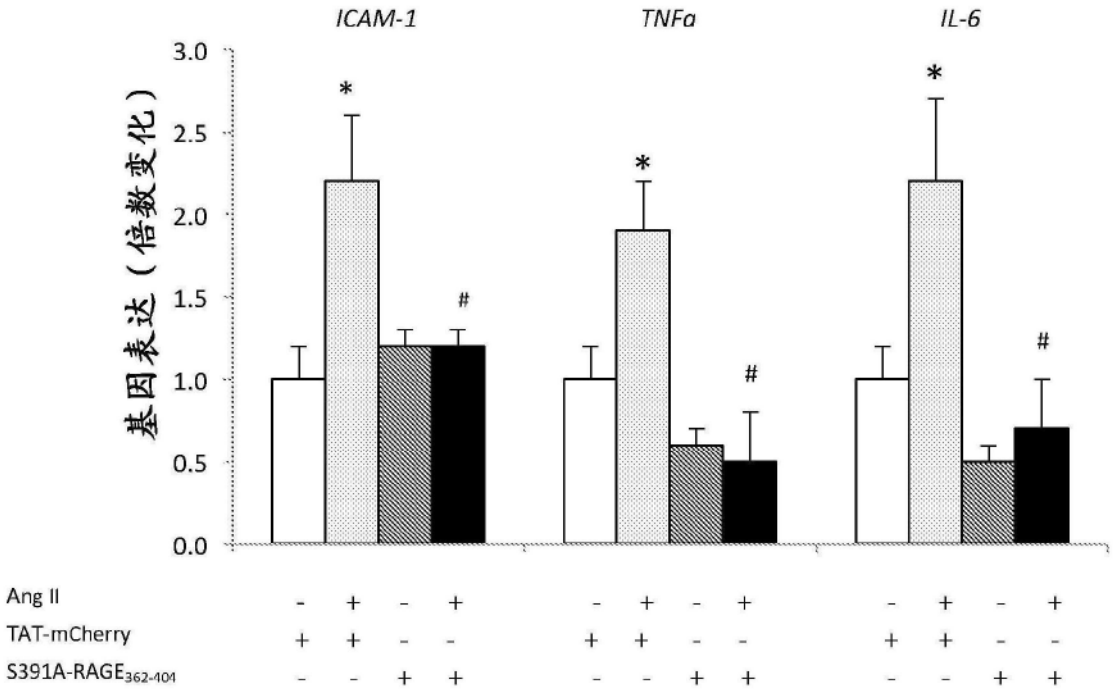


图14A

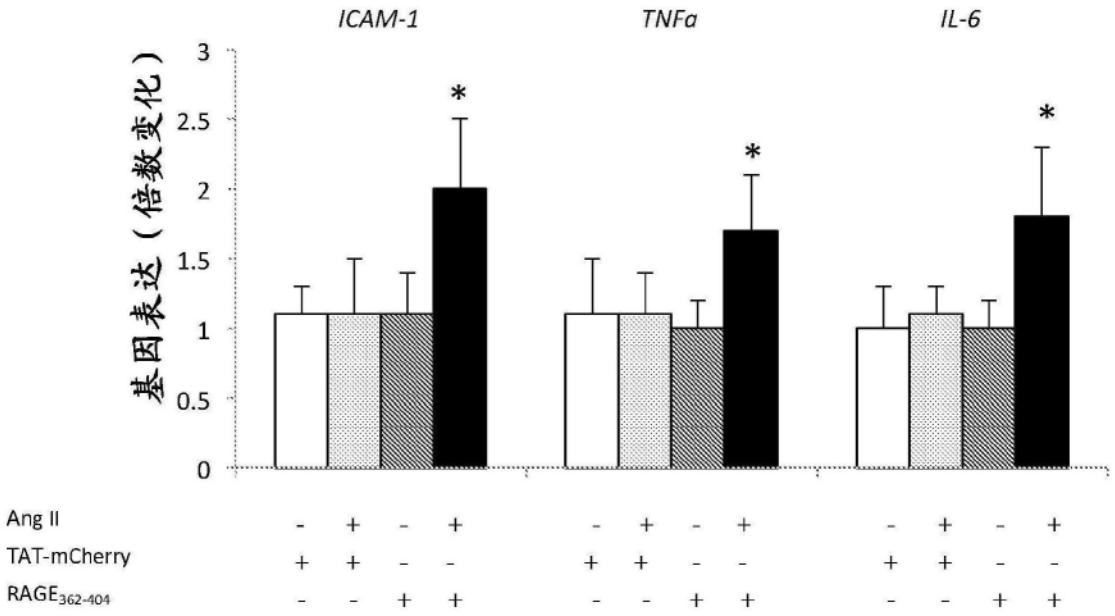


图14B

实施例15

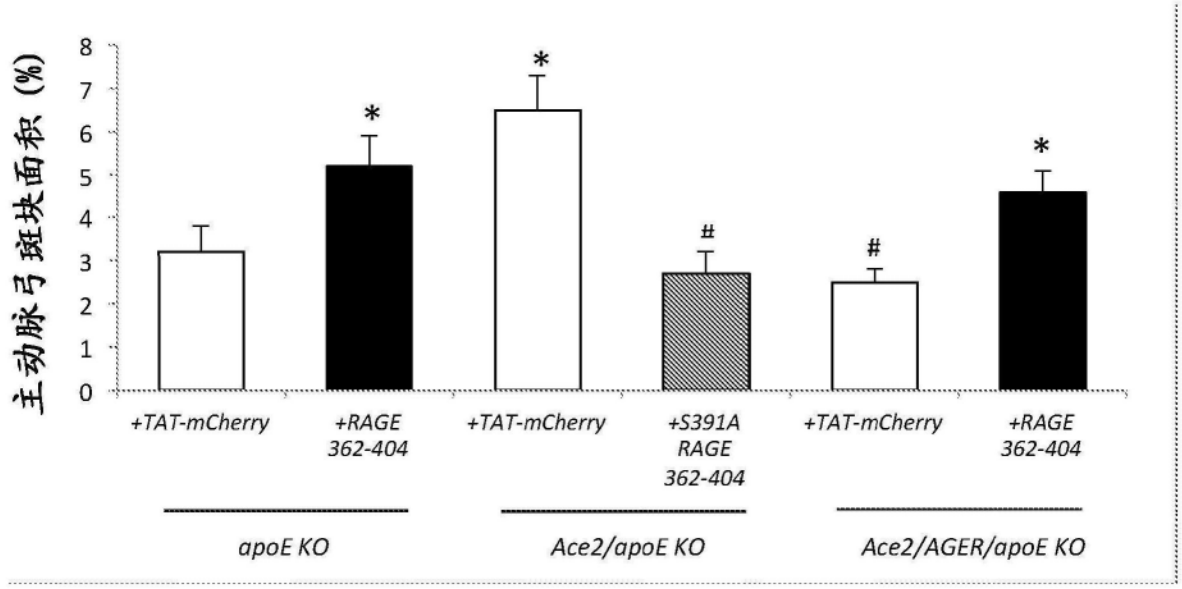

主动脉弓斑块面积 (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
*
*
*
#
#
+TAT-mCherry
+RAGE 362-404
+TAT-mCherry
+S391A RAGE 362-404
+TAT-mCherry
+RAGE 362-404
apoE KO
Ace2/apoE KO
Ace2/AGER/apoE KO

图15A

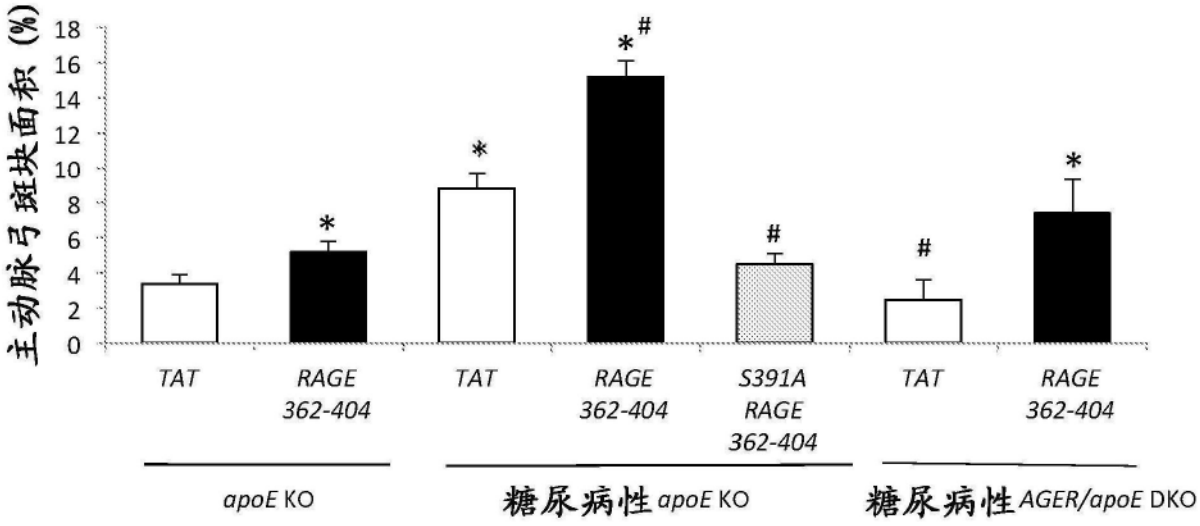

主动脉弓斑块面积 (%)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
*
*
*
*#
#
#
TAT
RAGE 362-404
TAT
RAGE 362-404
S391A RAGE 362-404
TAT
RAGE 362-404
apoE KO
糖尿病性apoE KO
糖尿病性AGER/apoE DKO

图15B

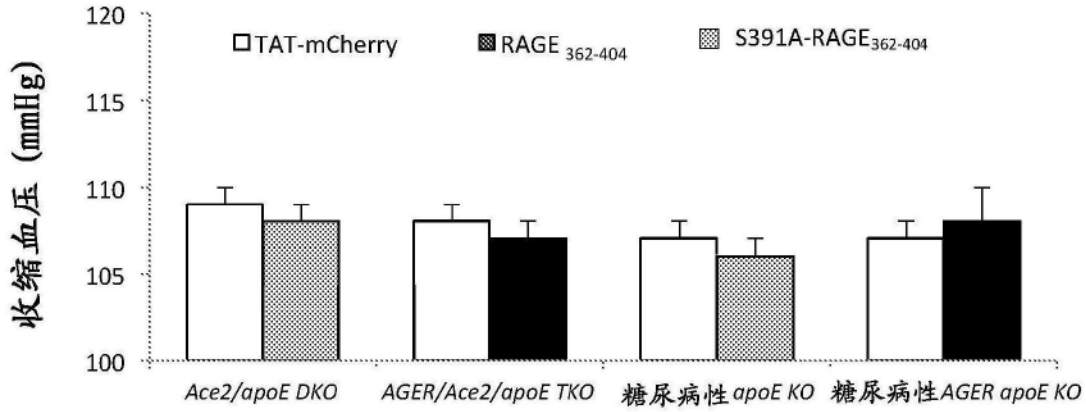


图15C

实施例16

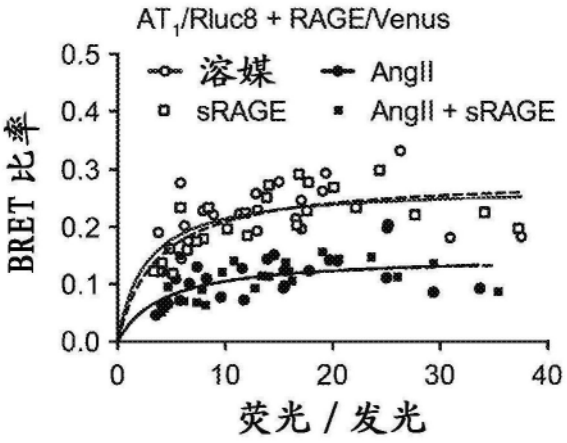


图16A

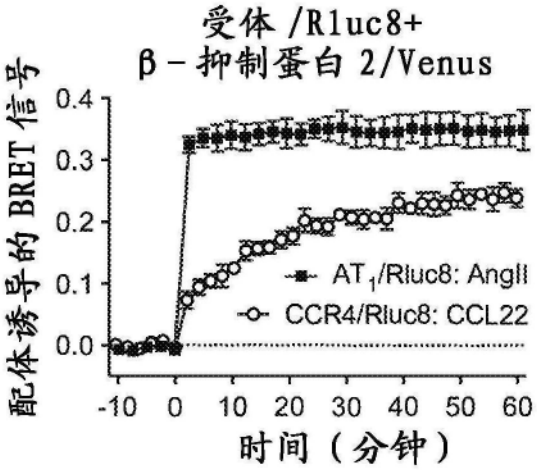


图16B

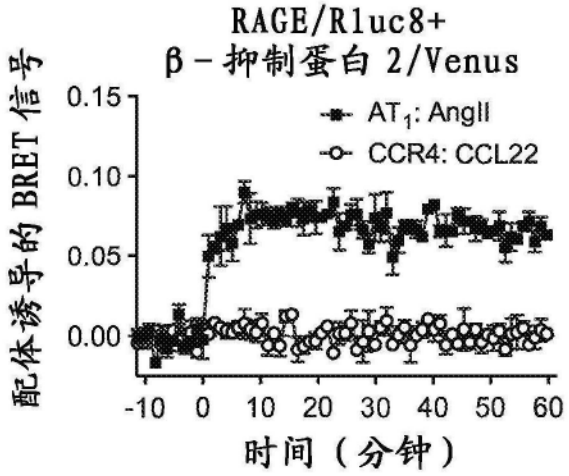


图16C

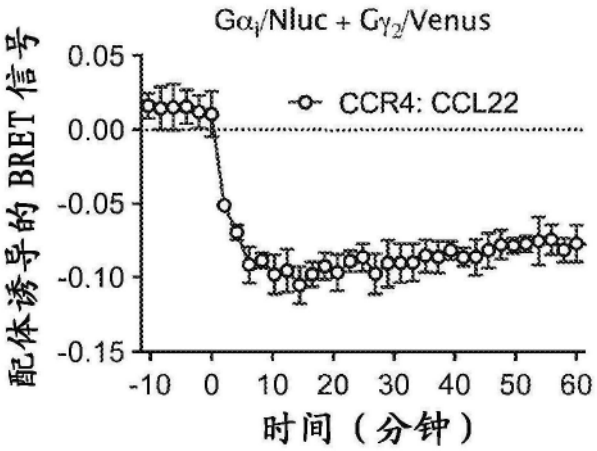


图16D

实施例17

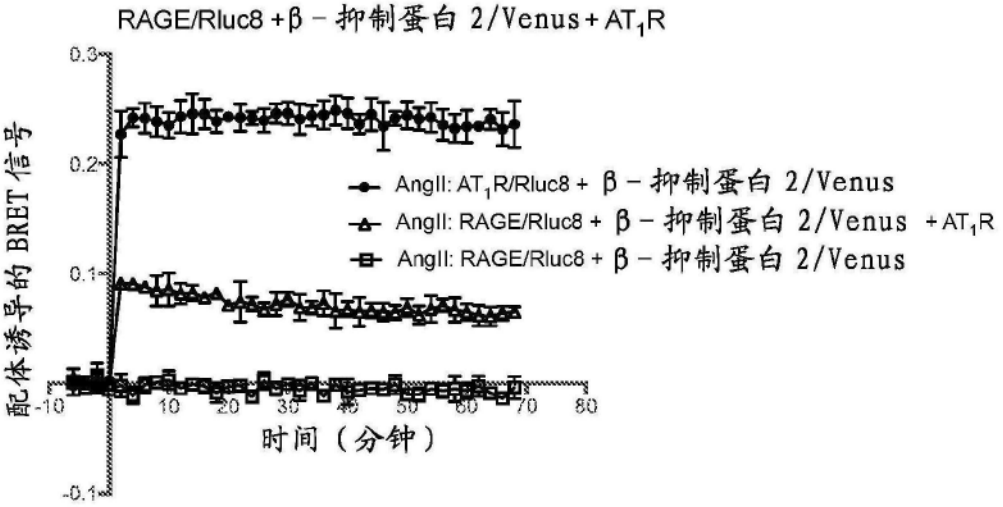

RAGE/Rluc8 +β－抑制蛋白 2/Venus + AT1R
配体诱导的 BRET 信号
时间（分钟）
AngII: AT1R/Rluc8 + β－抑制蛋白 2/Venus
AngII: RAGE/Rluc8 + β－抑制蛋白 2/Venus + AT1R
AngII: RAGE/Rluc8 + β－抑制蛋白 2/Venus

图17A

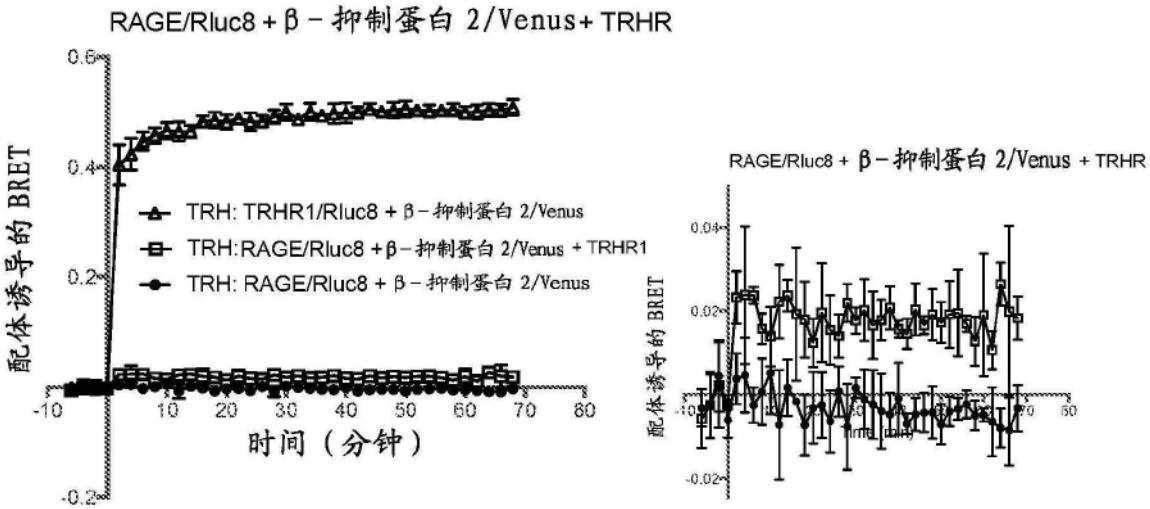

RAGE/Rluc8 + β－抑制蛋白 2/Venus+ TRHR
配体诱导的 BRET
时间（分钟）
TRH: TRHR1/Rluc8 + β－抑制蛋白 2/Venus
TRH:RAGE/Rluc8 +β－抑制蛋白 2/Venus + TRHR1
TRH: RAGE/Rluc8 + β－抑制蛋白 2/Venus
RAGE/Rluc8 + β－抑制蛋白 2/Venus + TRHR

图17B

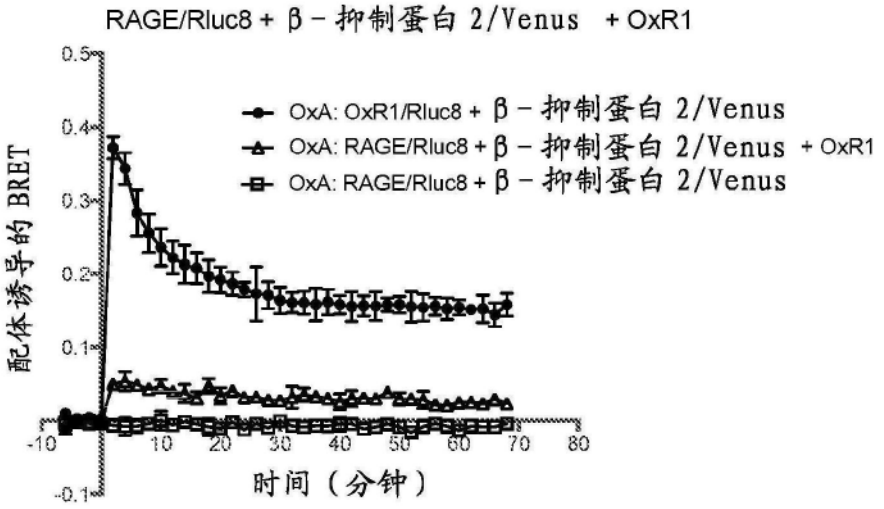

RAGE/Rluc8 + β－抑制蛋白 2/Venus + OxR1
OxA: OxR1/Rluc8 + β－抑制蛋白 2/Venus
OxA: RAGE/Rluc8 + β－抑制蛋白 2/Venus + OxR1
OxA: RAGE/Rluc8 + β－抑制蛋白 2/Venus
配体诱导的 BRET
时间（分钟）

图17C

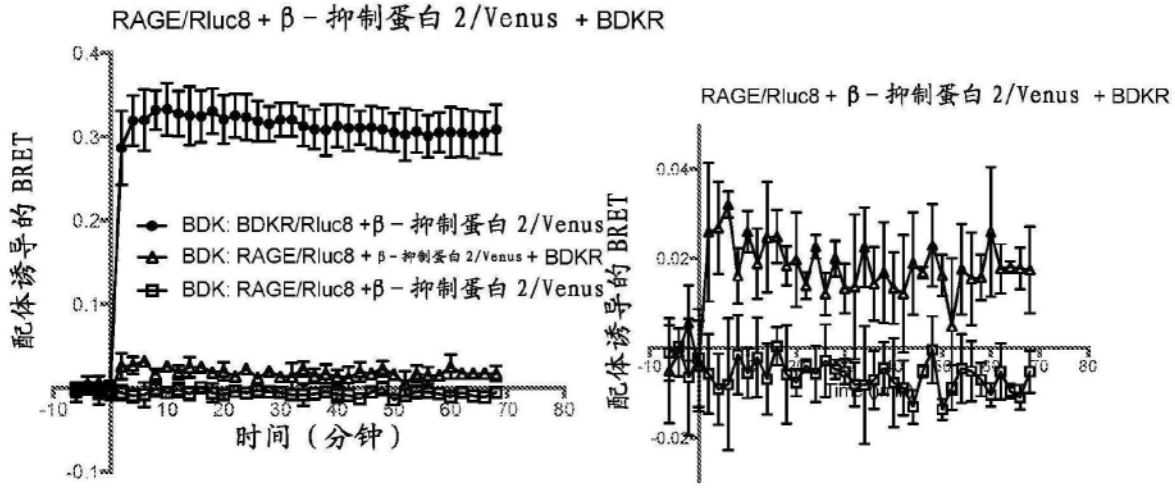

RAGE/Rluc8 + β－抑制蛋白 2/Venus + BDKR
BDK: BDKR/Rluc8 +β－抑制蛋白 2/Venus
BDK: RAGE/Rluc8 + β－抑制蛋白 2/Venus + BDKR
BDK: RAGE/Rluc8 +β－抑制蛋白 2/Venus
配体诱导的 BRET
时间（分钟）
RAGE/Rluc8 + β－抑制蛋白 2/Venus + BDKR
配体诱导的 BRET

图17D

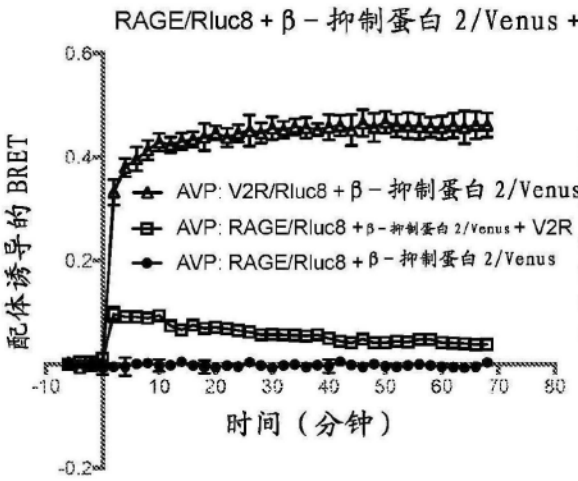


图17E

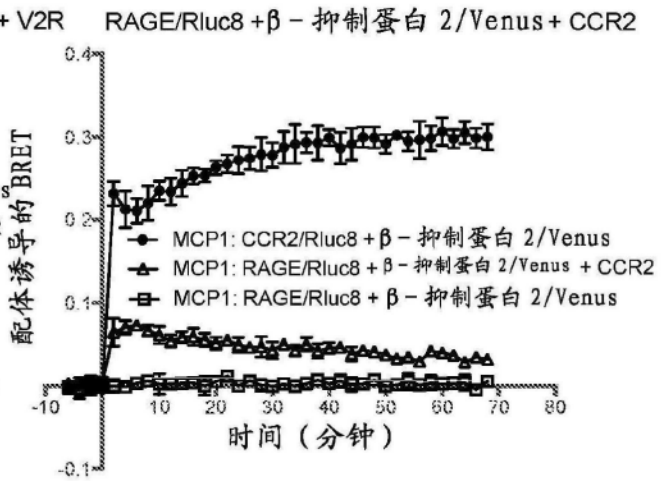


图17F

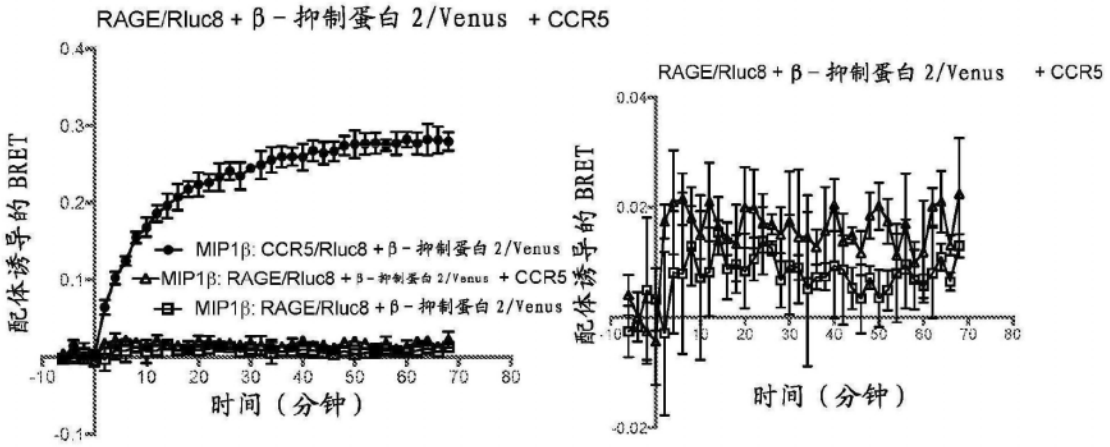


图17G

实施例18

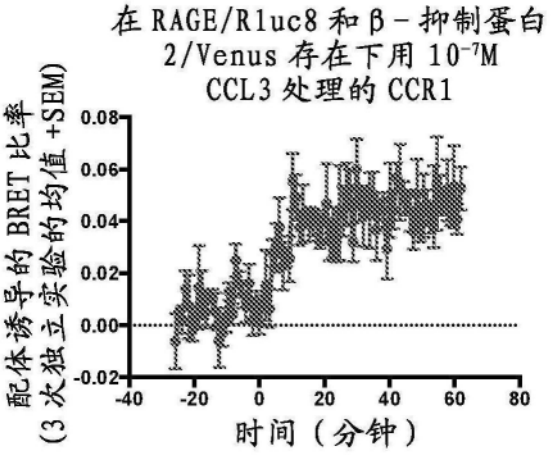


图18A

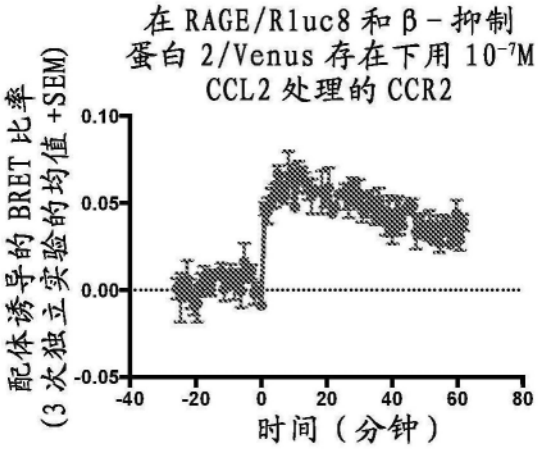


图18B

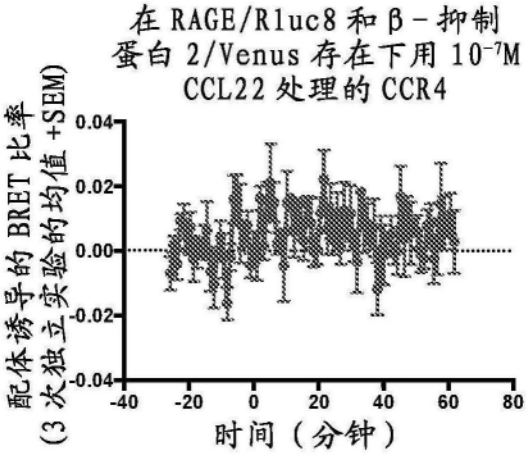


图18C

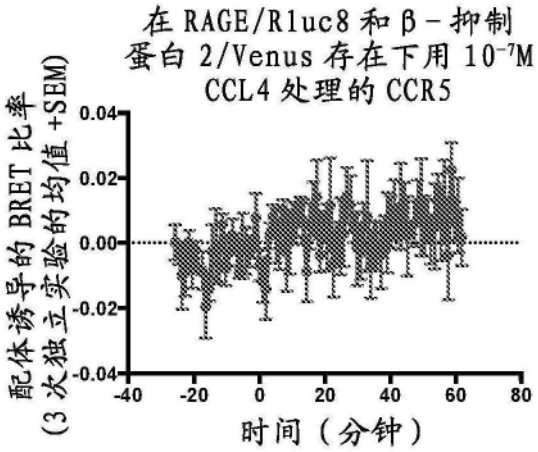


图18D

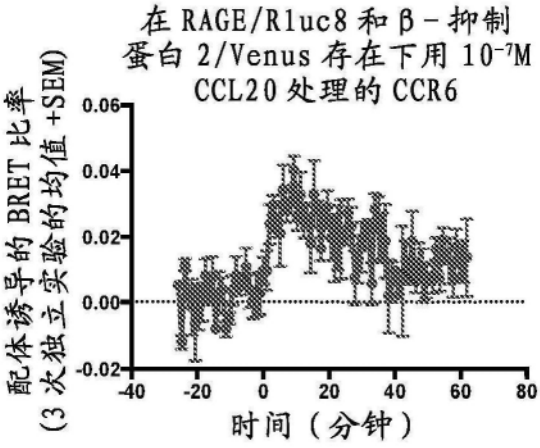


图18E

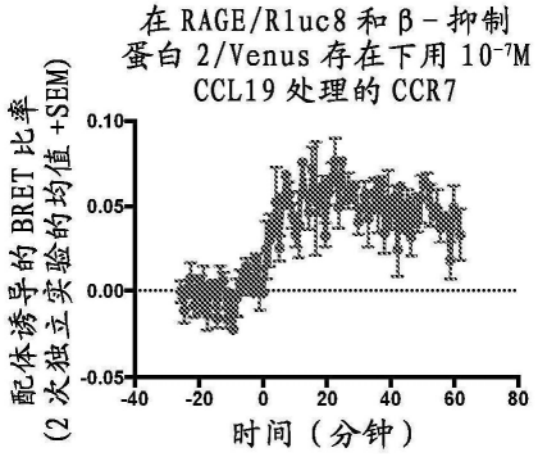


图18F

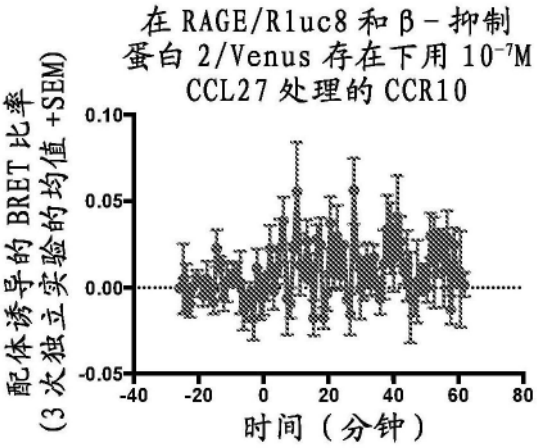


图18G

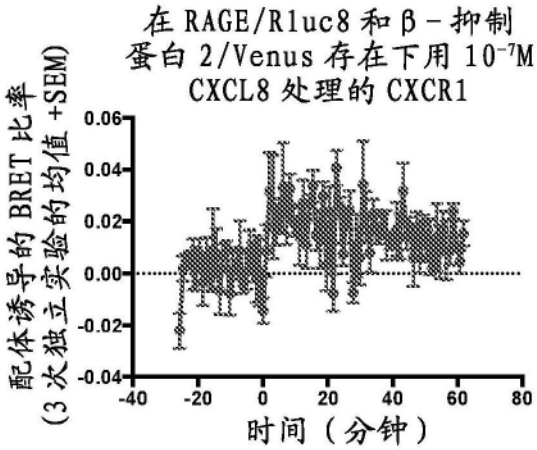


图18H

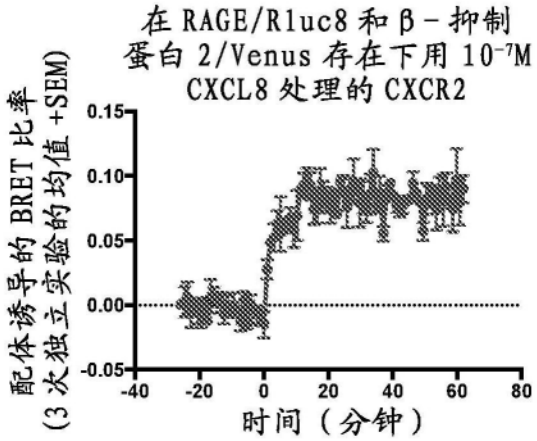


图18I

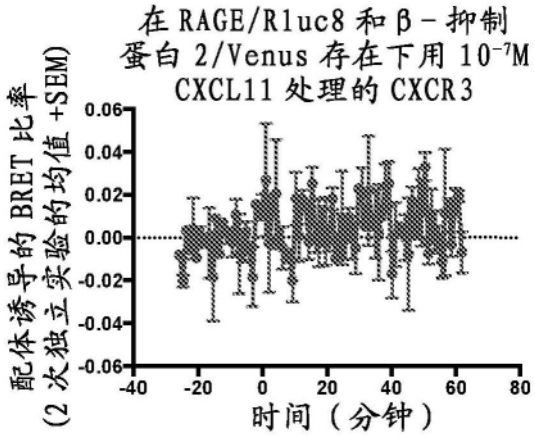


图18J

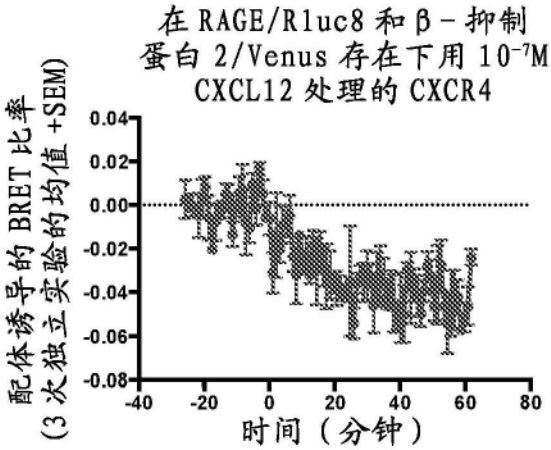


图18K

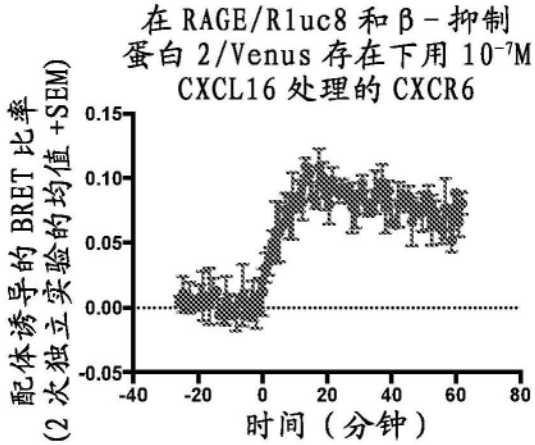


图18L

实施例19

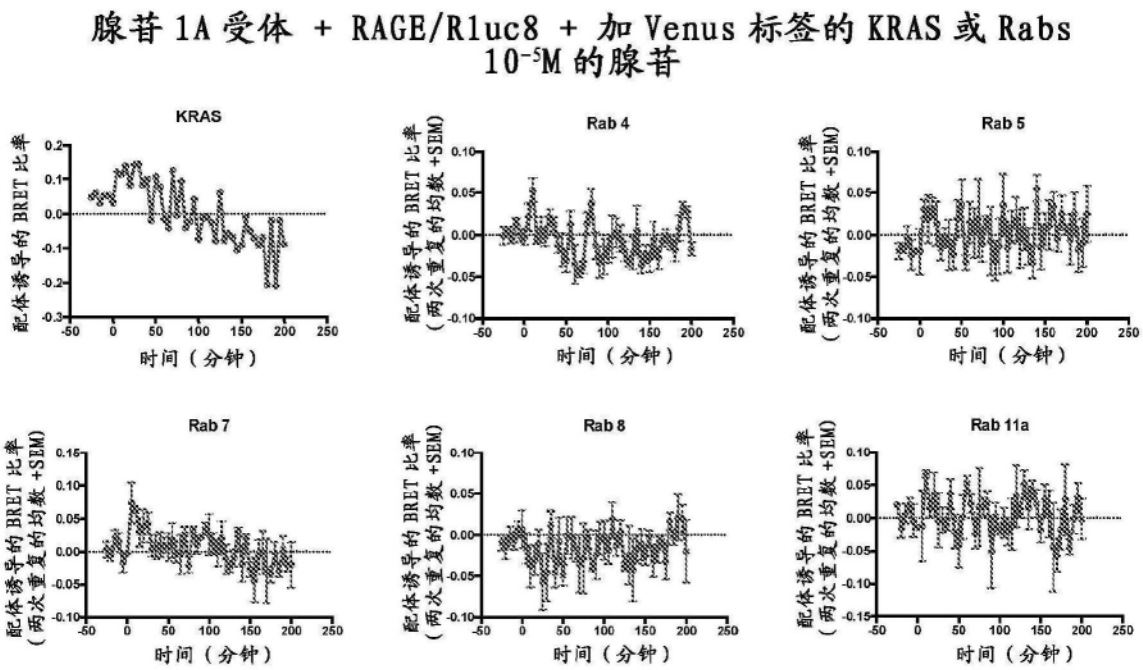

腺苷 1A 受体 + RAGE/R1uc8 + 加 Venus 标签的 KRAS 或 Rabs
10-5M 的腺苷
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的 BRET 比率
(两次重复的均数 +SEM)
时间（分钟）

图19A

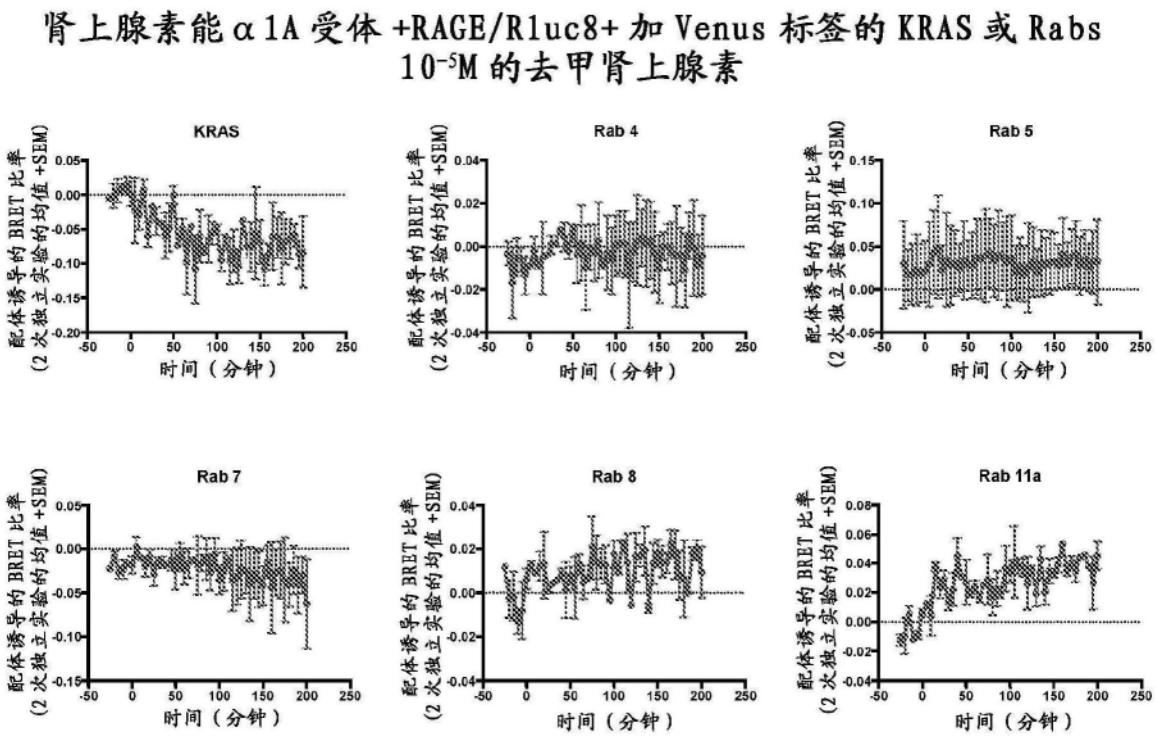

肾上腺素能α1A 受体 +RAGE/R1uc8+ 加 Venus 标签的 KRAS 或 Rabs
10-5M 的去甲肾上腺素
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的 BRET 比率
(2 次独立实验的均值 +SEM)
时间（分钟）

图19B

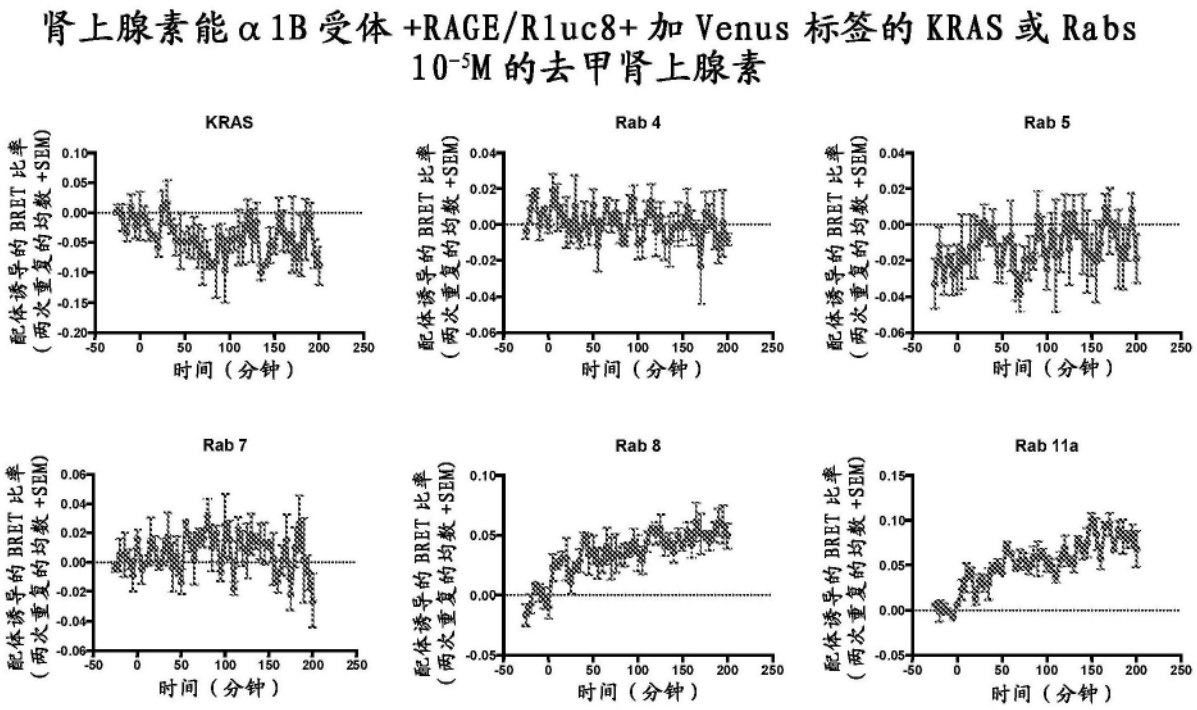

肾上腺素能α1B受体+RAGE/R1uc8+加Venus标签的KRAS或Rabs
10-5M的去甲肾上腺素
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的BRET比率（两次重复的均数+SEM）
时间（分钟）

图19C

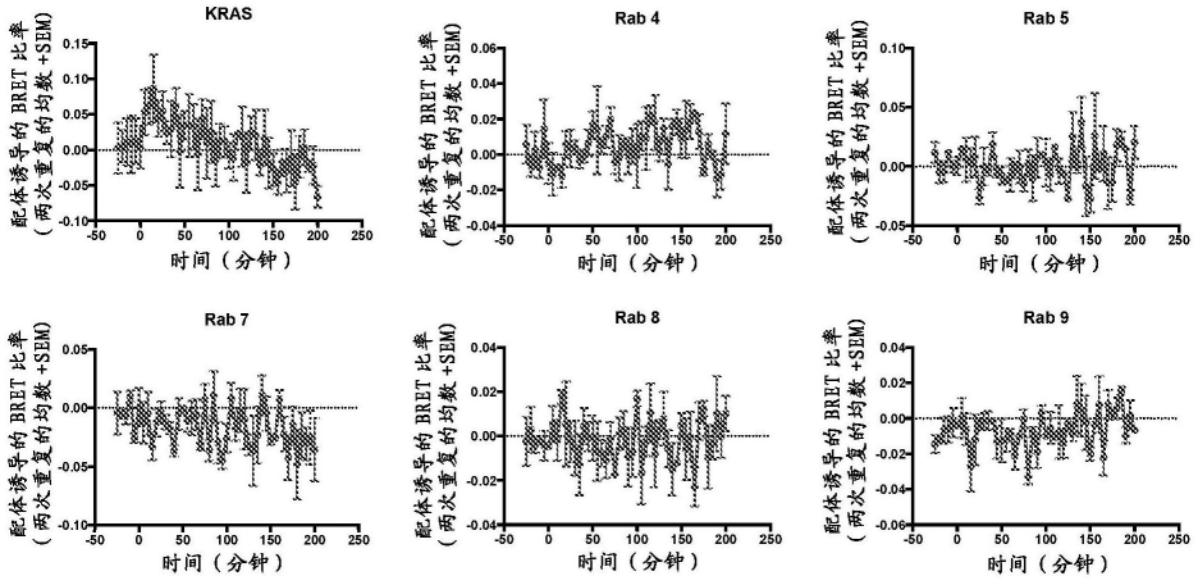

肾上腺素能α2B受体+RAGE/R1uc8+加Venus标签的KRAS或Rabs
10-5M的去甲肾上腺素
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 9
配体诱导的BRET比率（两次重复的均数+SEM）
时间（分钟）

图19D

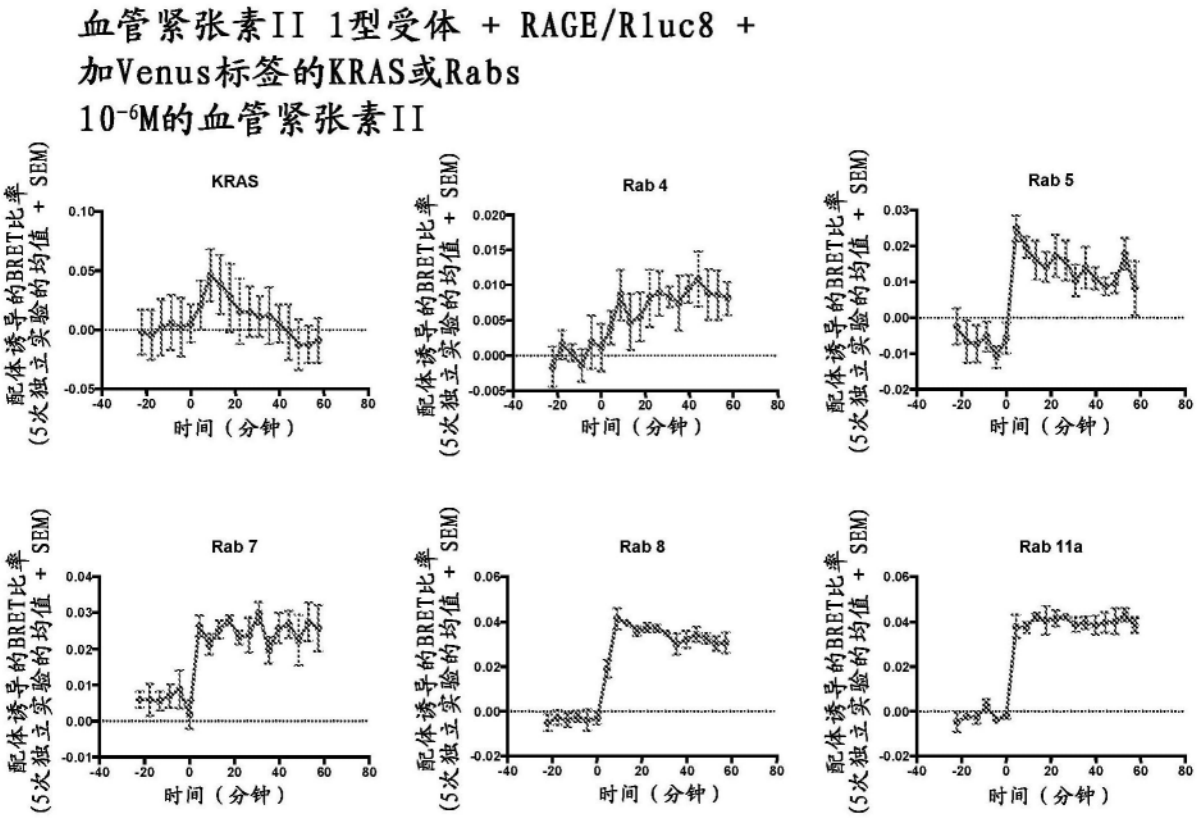

血管紧张素II 1型受体 + RAGE/R1uc8 +
加Venus标签的KRAS或Rabs
10-6M的血管紧张素II
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的BRET比率
(5次独立实验的均值 + SEM)
时间（分钟）

图19E

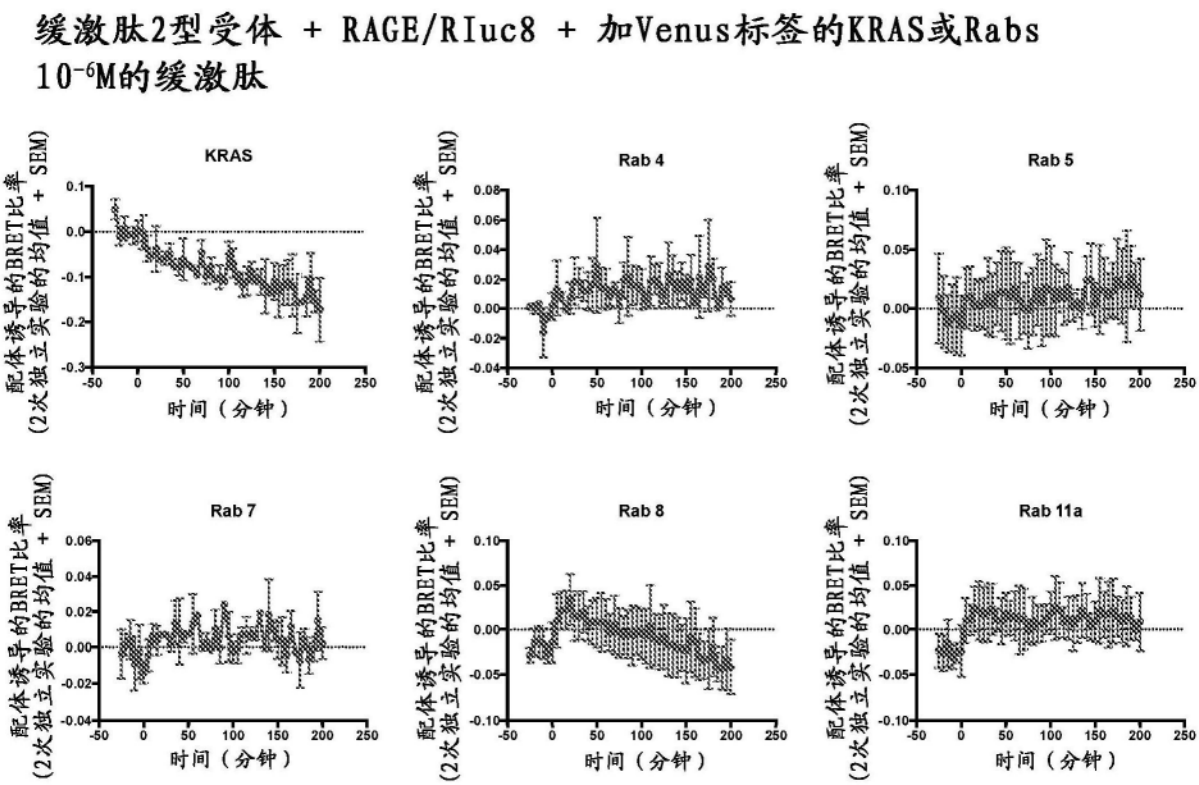

缓激肽2型受体 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-6M的缓激肽
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的BRET比率
(2次独立实验的均值 + SEM)
时间（分钟）

图19F

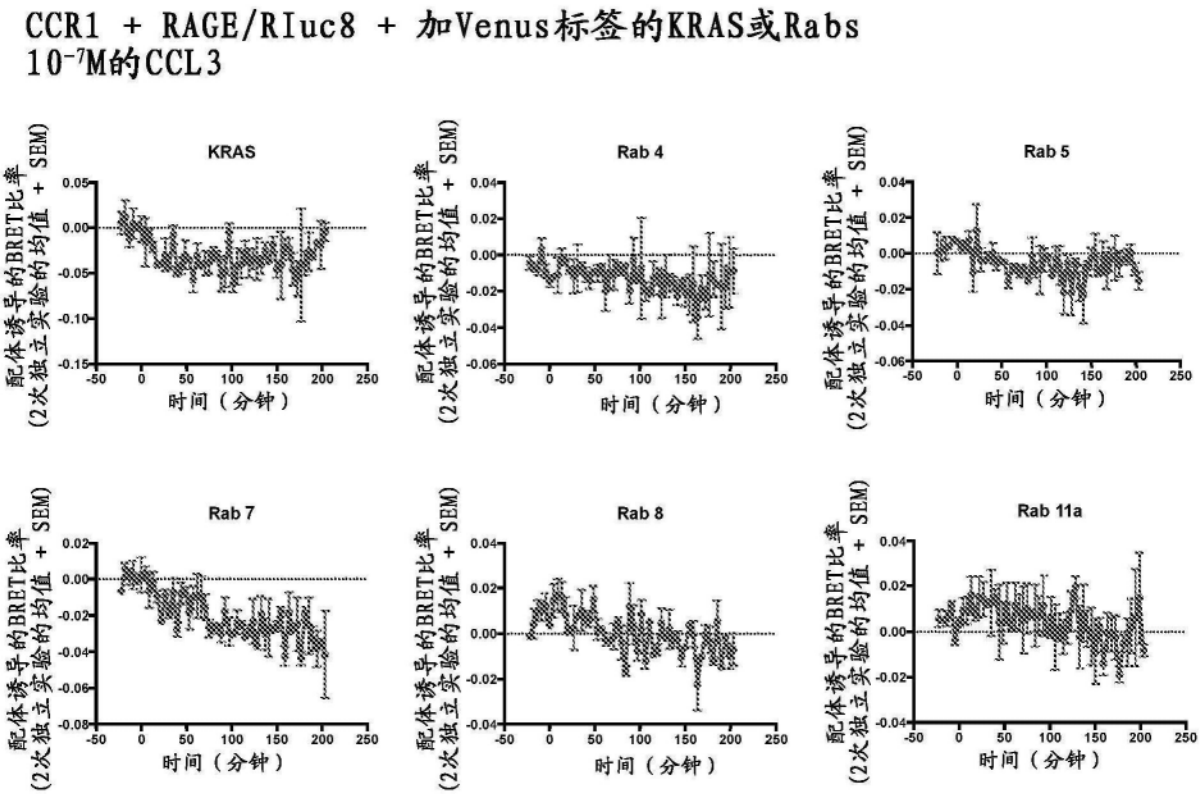

CCR1 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-7M的CCL3
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的BRET比率
(2次独立实验的均值 + SEM)
时间（分钟）

图19G

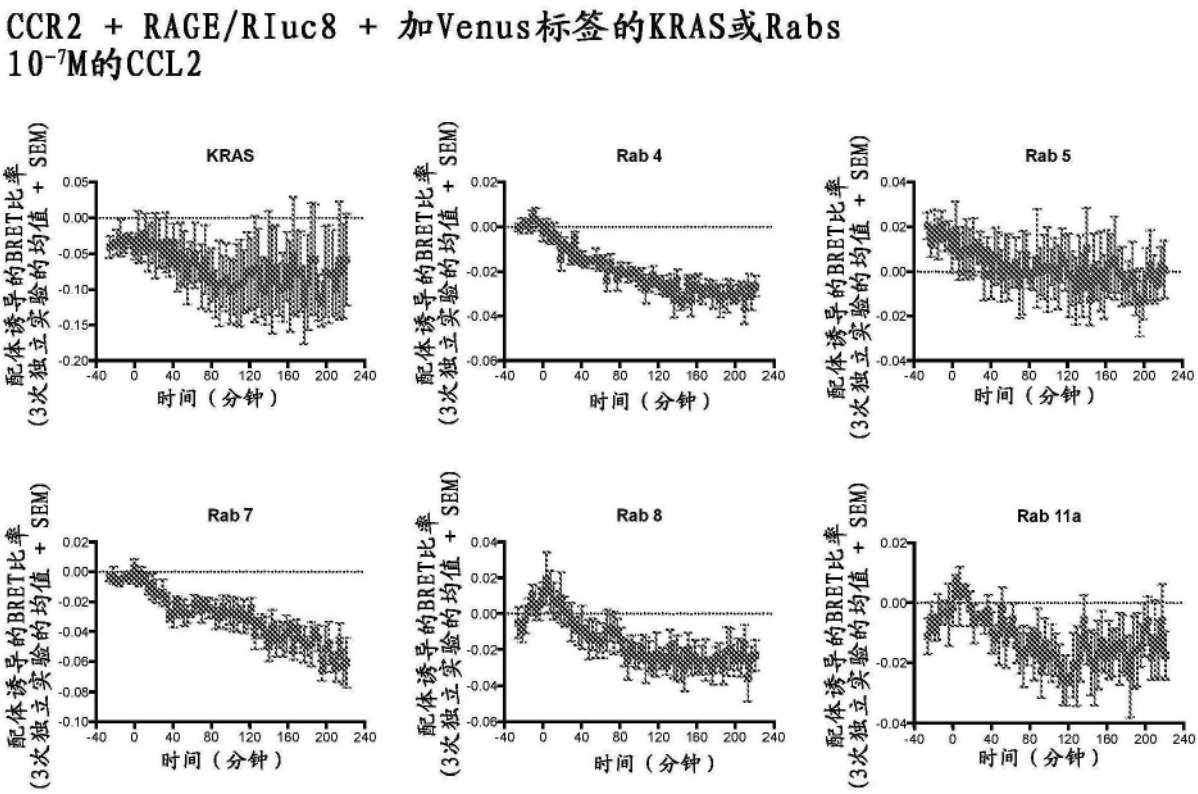

CCR2 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-7M的CCL2
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的BRET比率
(3次独立实验的均值 + SEM)
时间（分钟）

图19H

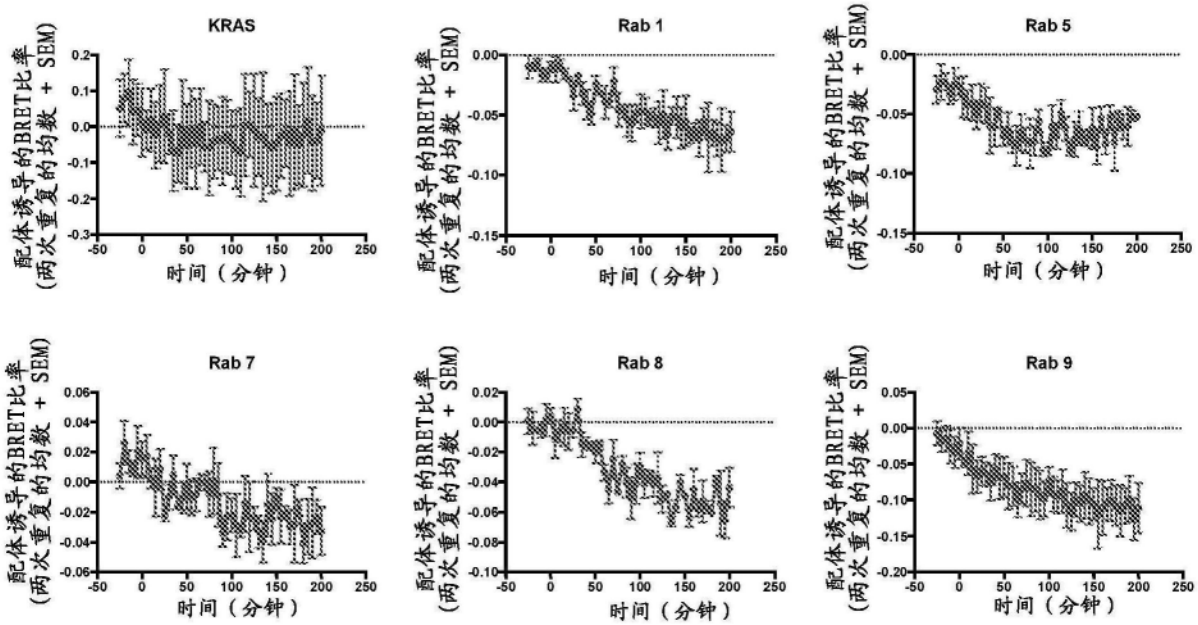

CCR3 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-7M的CCL13
KRAS
Rab 1
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 9
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19I

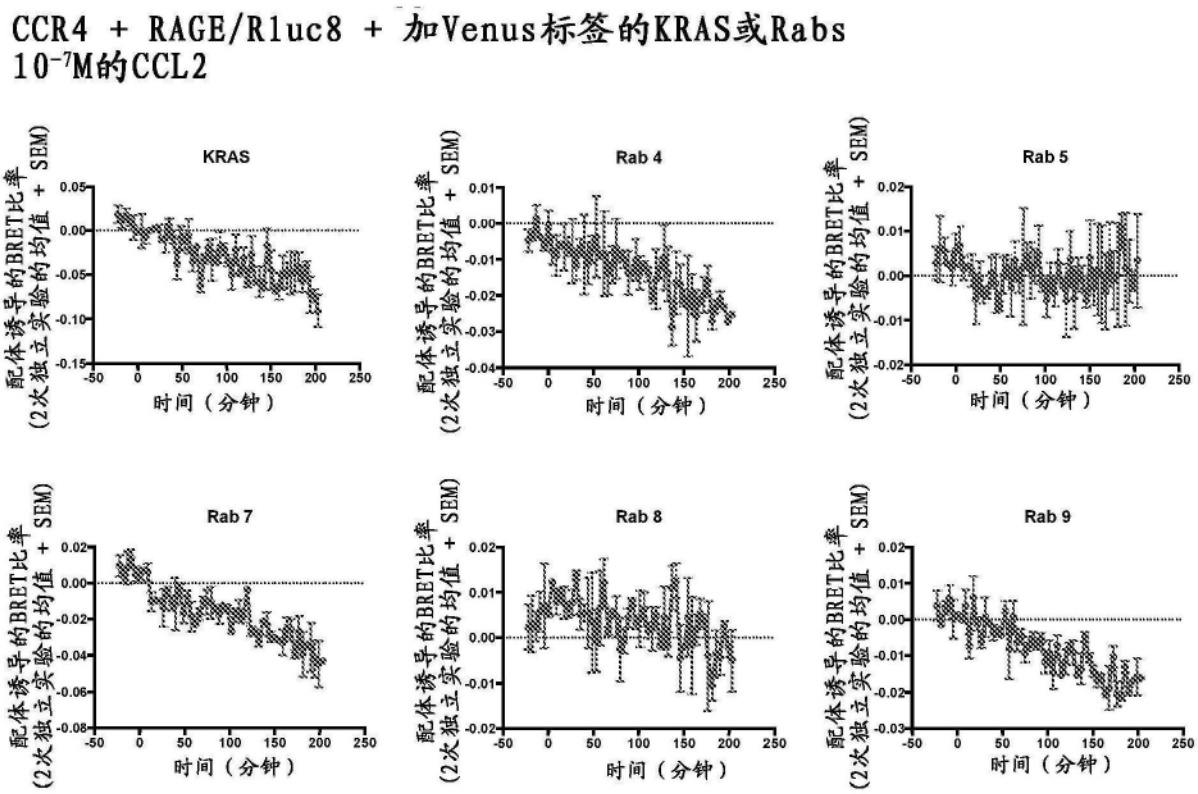

CCR4 + RAGE/R1uc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10⁻⁷M的CCL2
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 9
配体诱导的BRET比率
(2次独立实验的均值 + SEM)
时间（分钟）

图19J

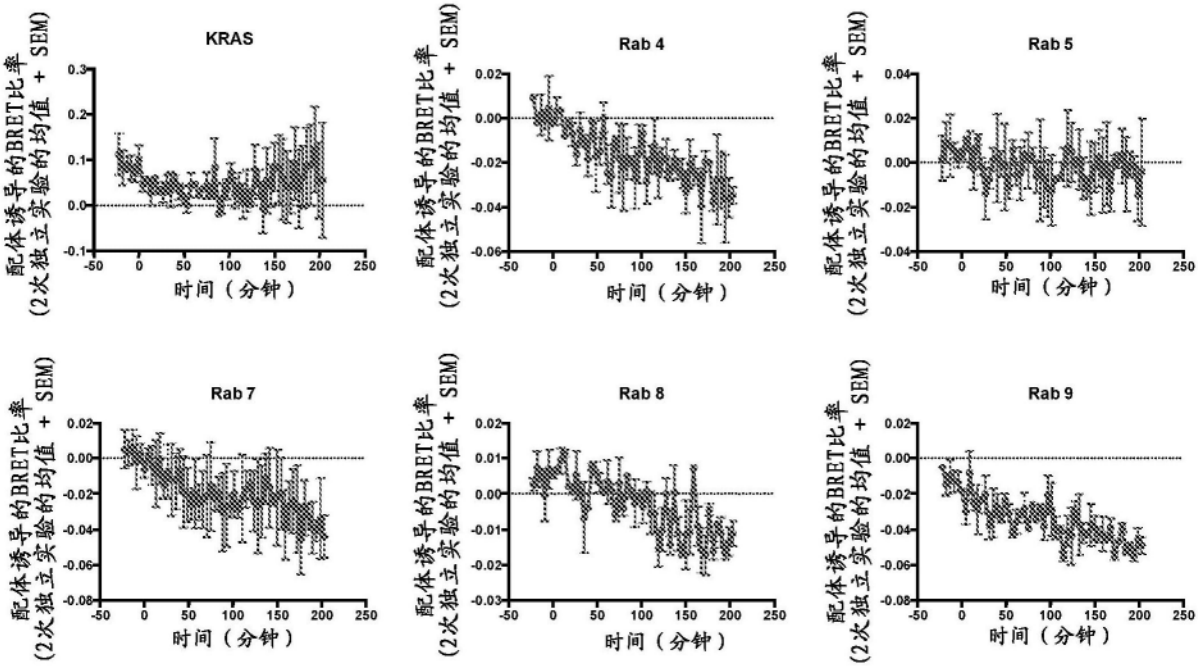

CCR5 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10⁻⁷M的CCL4
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 9
配体诱导的BRET比率
(2次独立实验的均值 + SEM)
时间（分钟）

图19K

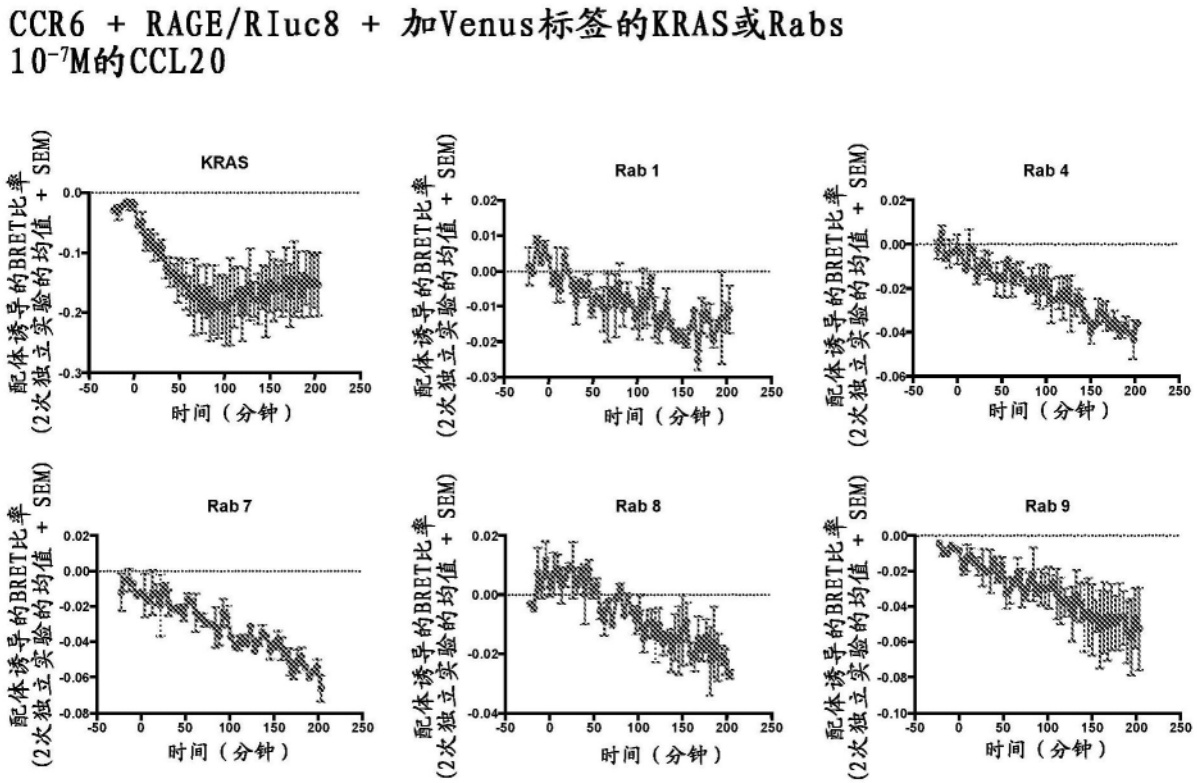

CCR6 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-7M的CCL20
KRAS
Rab 1
Rab 4
Rab 7
Rab 8
Rab 9
配体诱导的BRET比率
(2次独立实验的均值 + SEM)
时间（分钟）

图19L

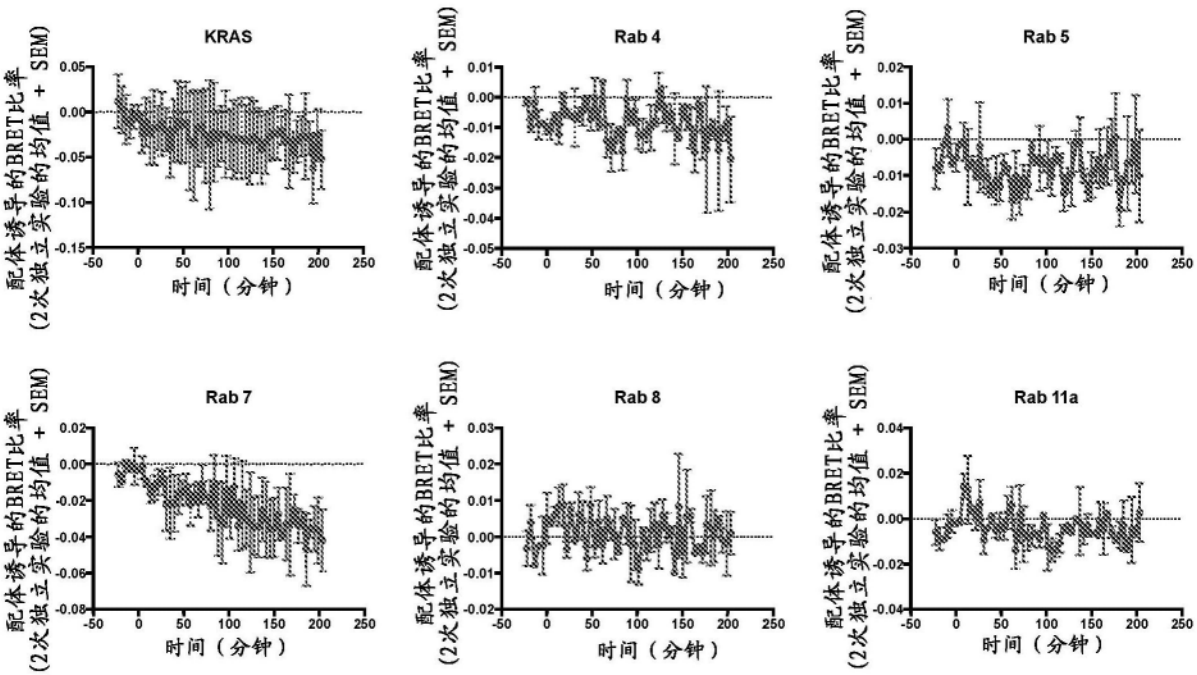

CCR7 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-7M的CCL19
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的BRET比率
(2次独立实验的均值 + SEM)
时间（分钟）

图19M

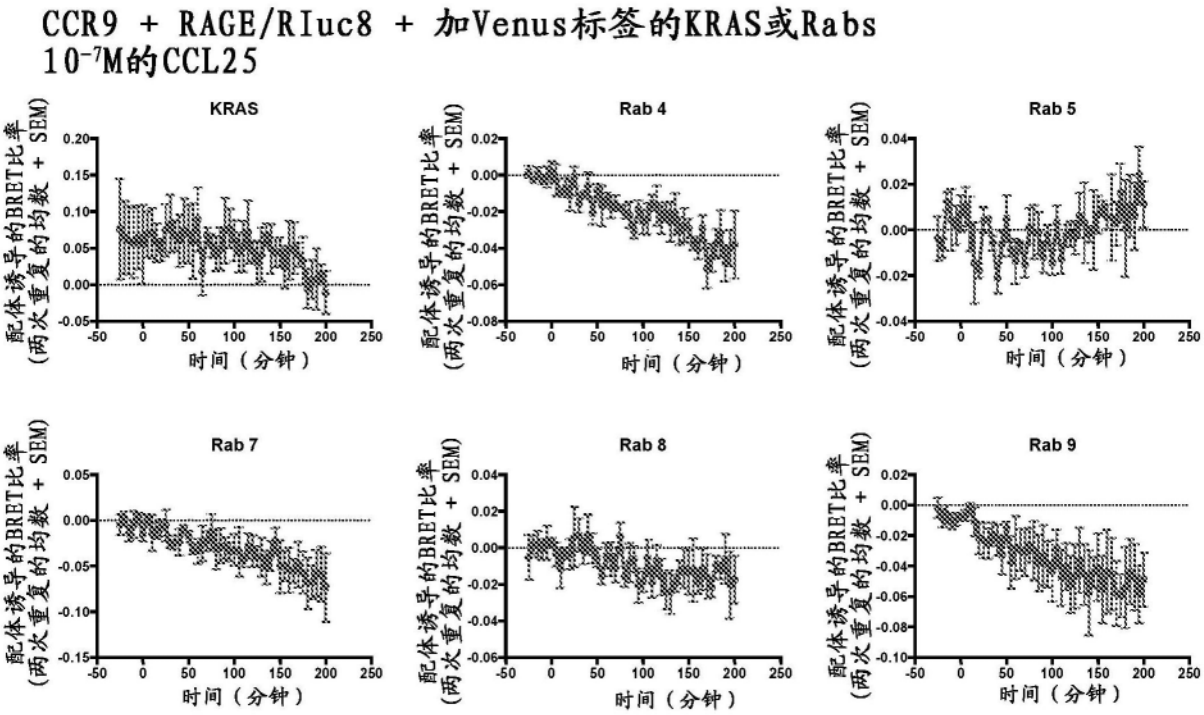

CCR9 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10⁻⁷M的CCL25
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 9
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19N

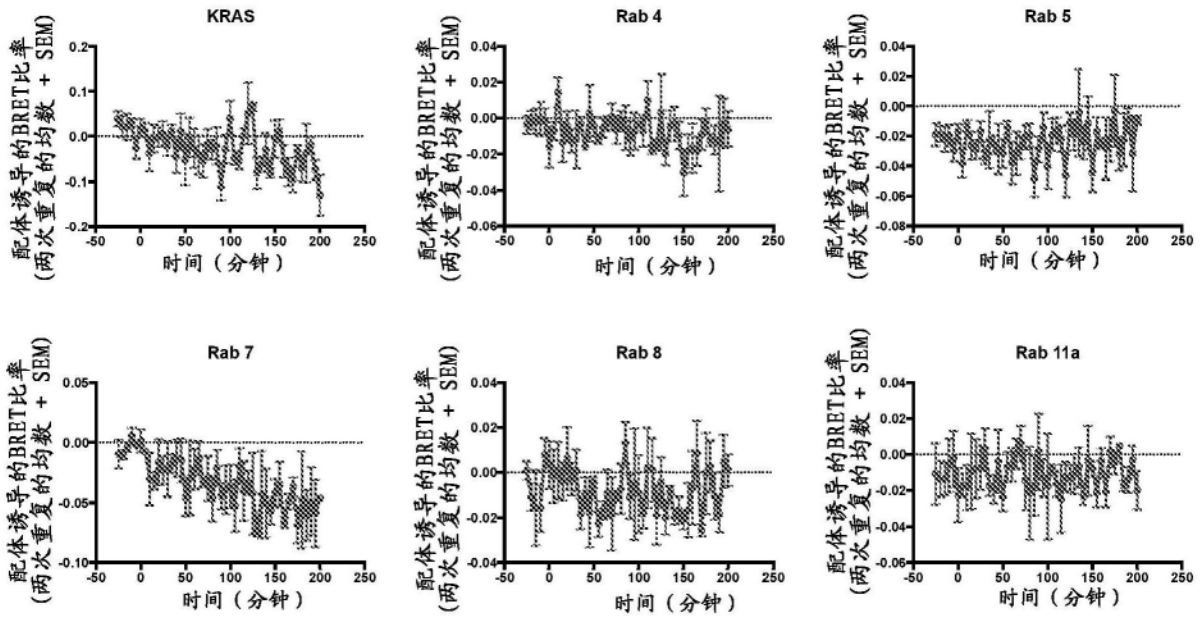

CXCR2 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10⁻⁷M的CXCL8
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图190

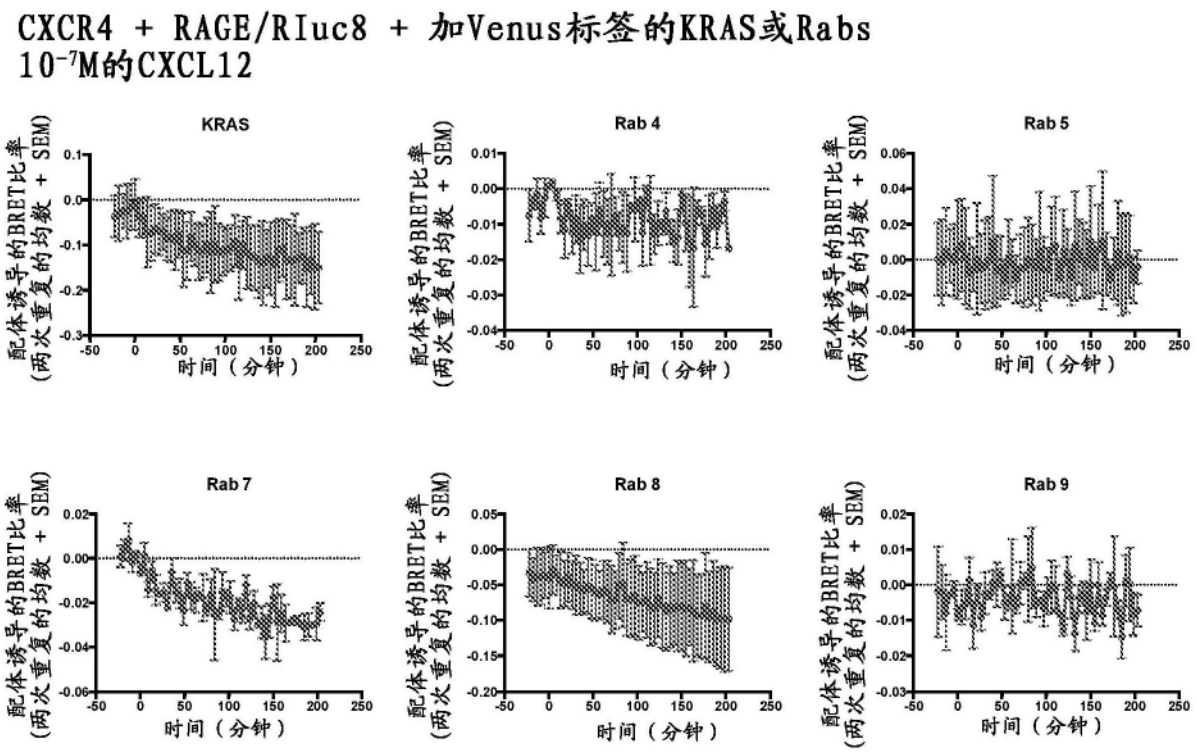

CXCR4 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-7M的CXCL12
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 9
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19P

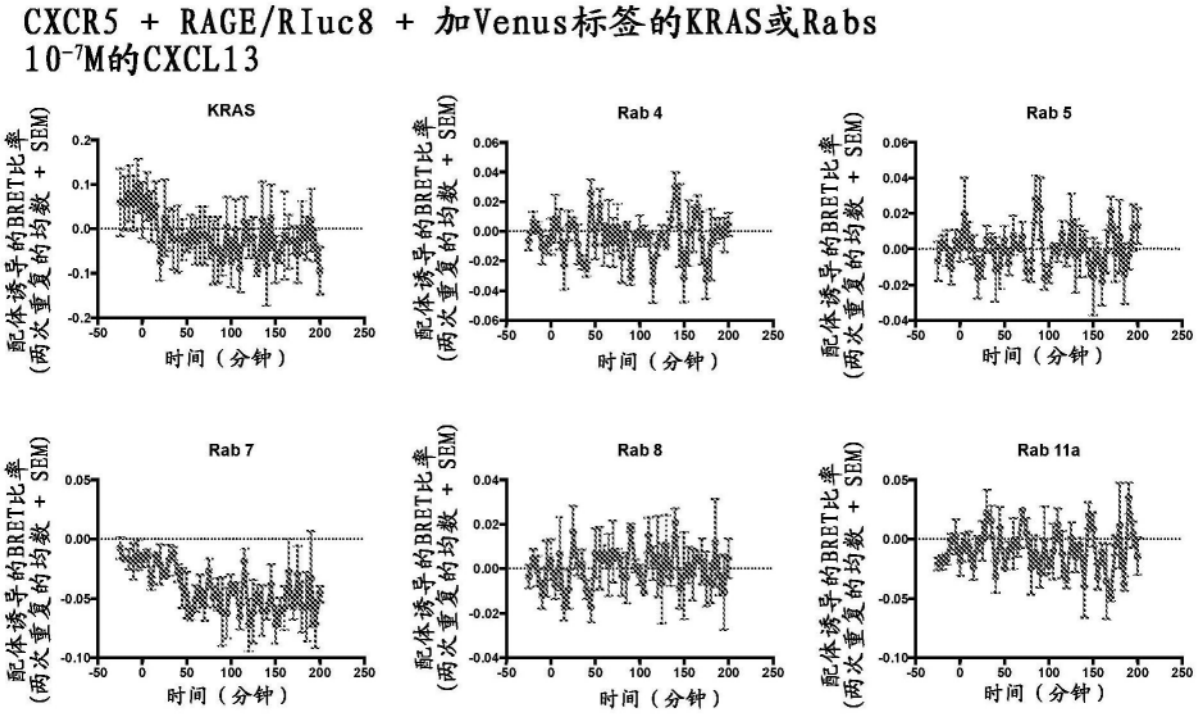

CXCR5 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-7M的CXCL13
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19Q

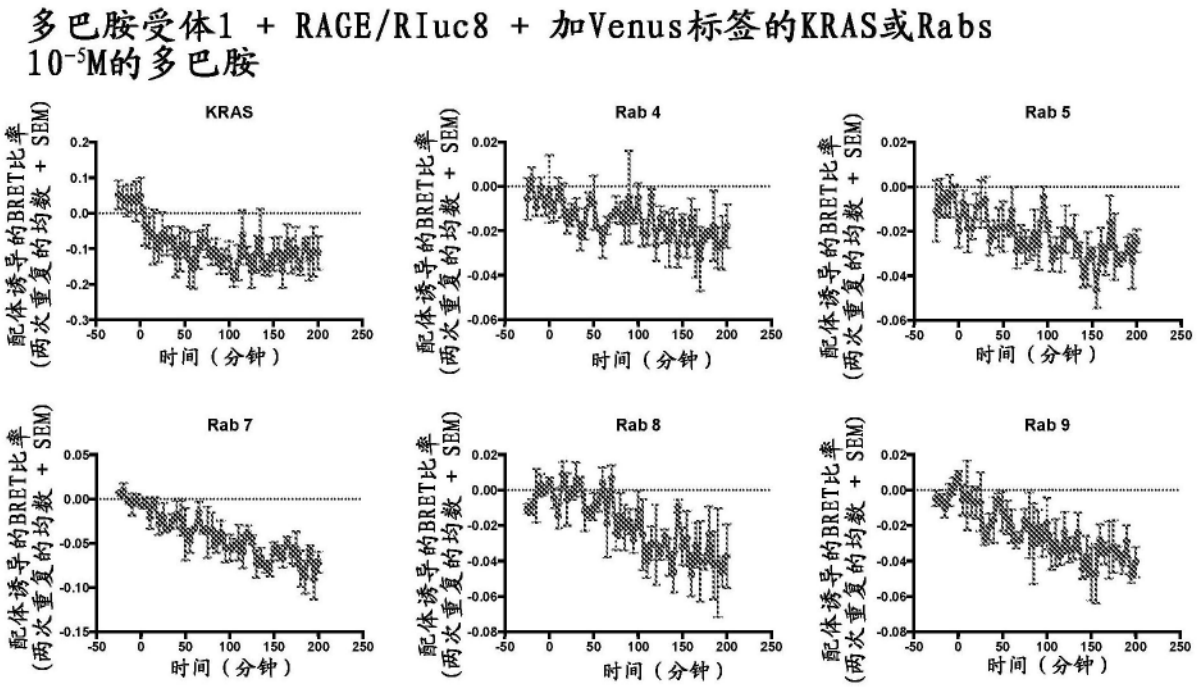

多巴胺受体1 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-5M的多巴胺
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 9
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19R

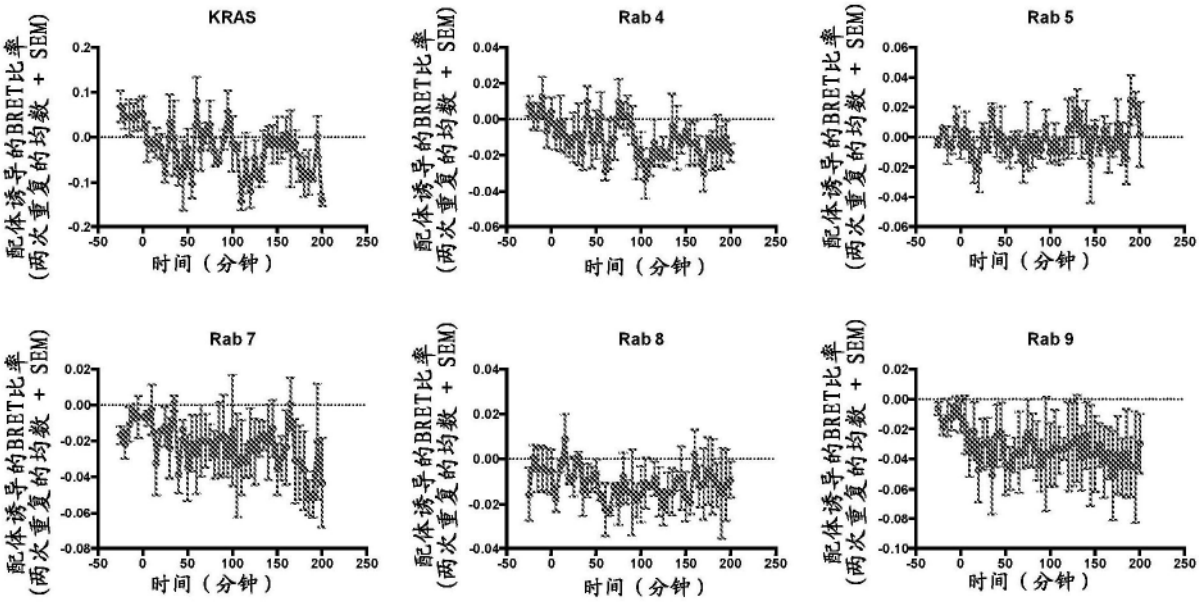

内皮素受体A型 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-7M的内皮素
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 9
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19S

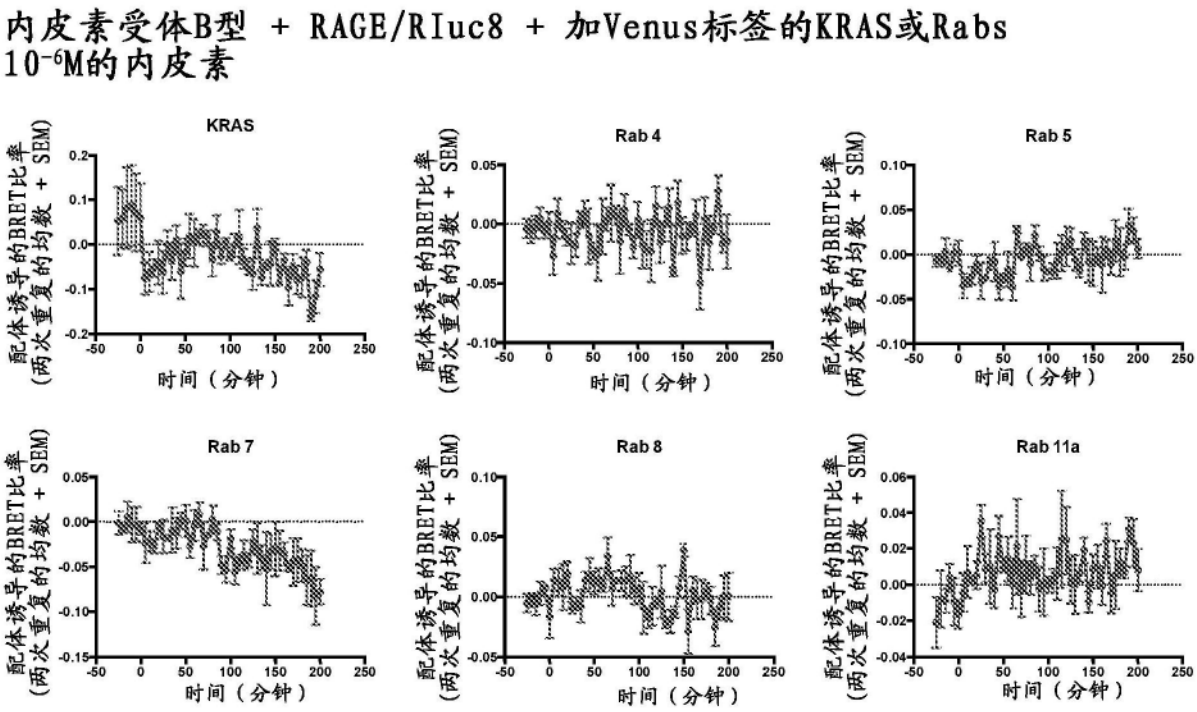

内皮素受体B型 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-6M的内皮素
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19T

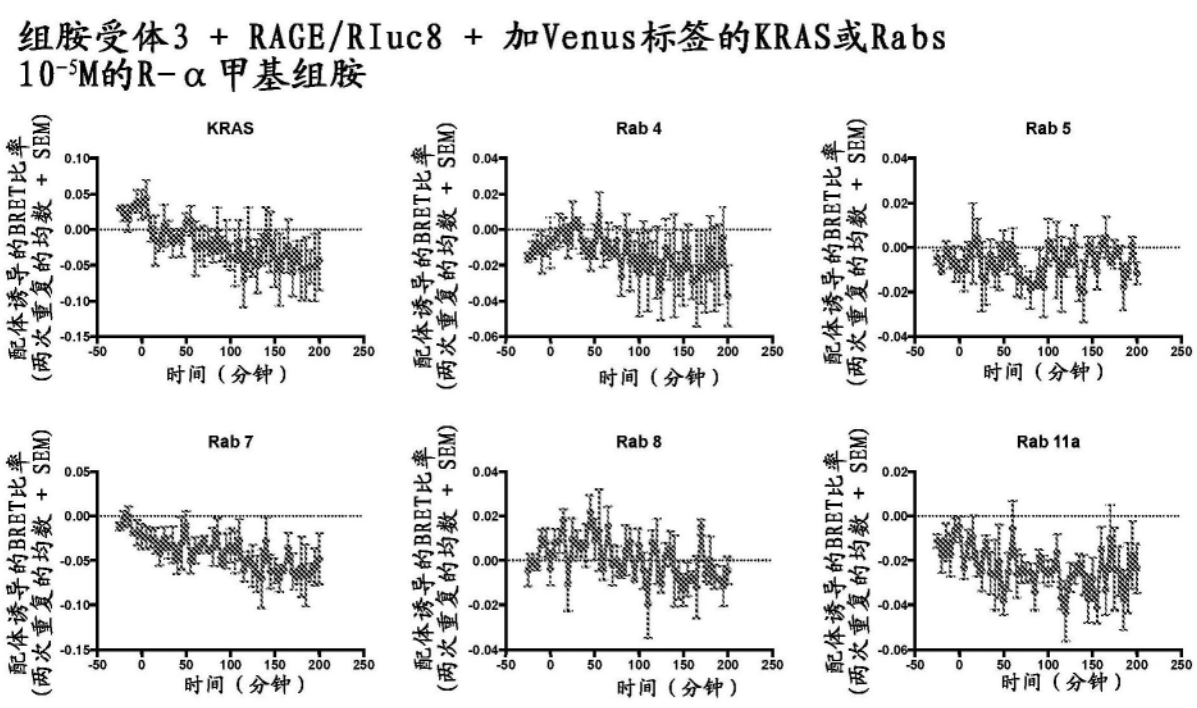

组胺受体3 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-5M的R-α甲基组胺
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19U

毒蕈碱性受体1 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10^{-5}M的乙酰胆碱

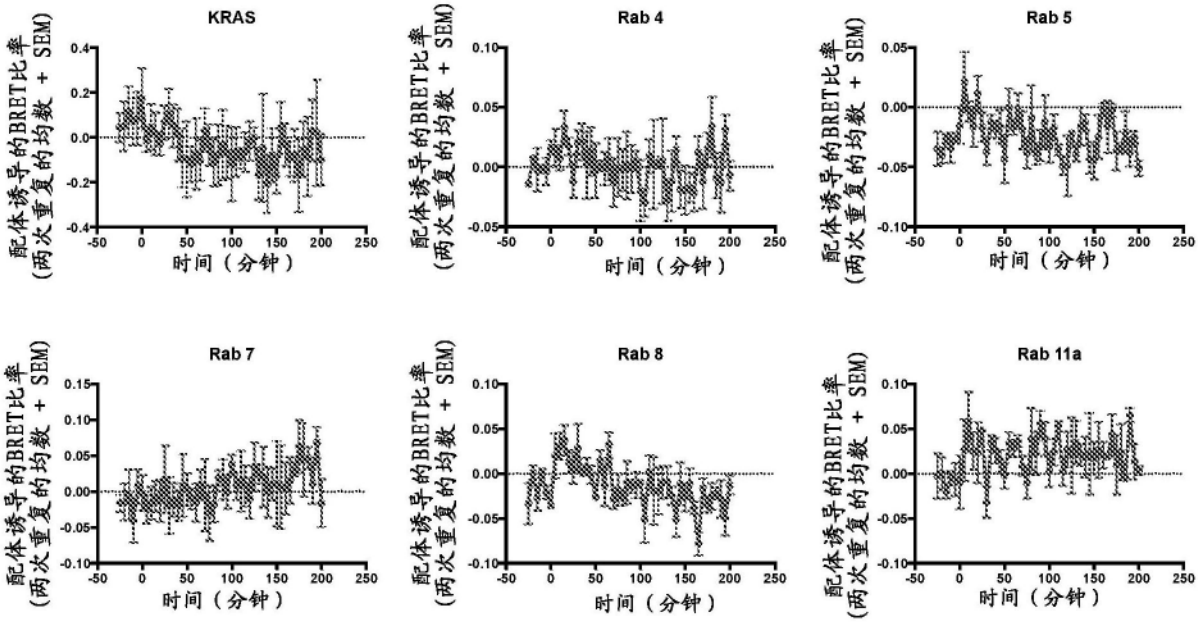


图19V

毒蕈碱性受体2 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10^{-5}M的乙酰胆碱

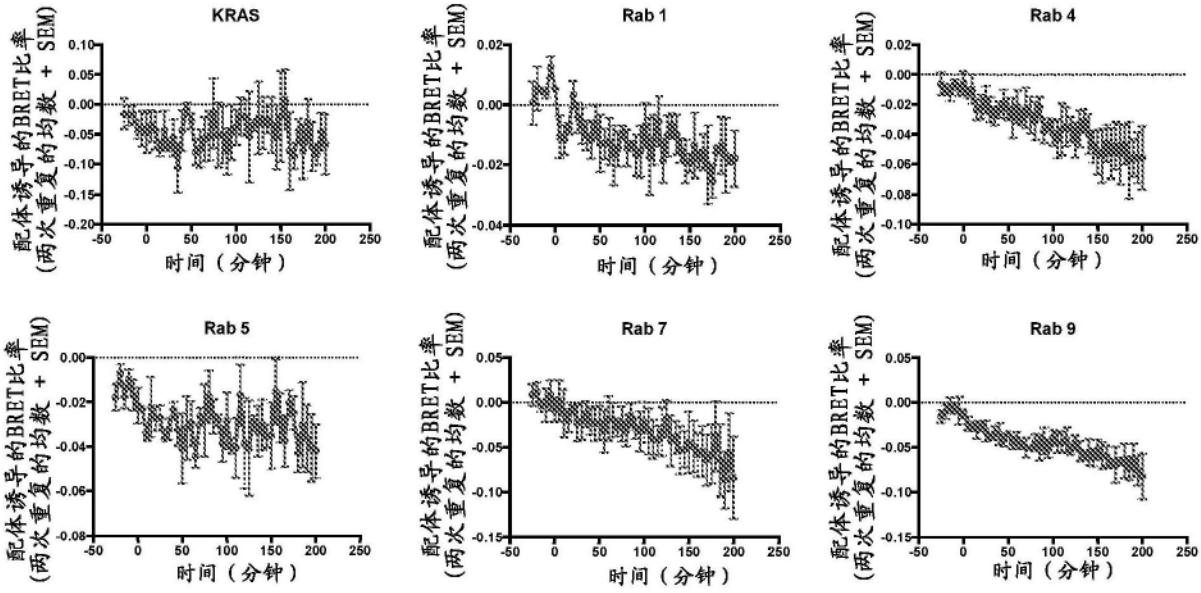


图19W

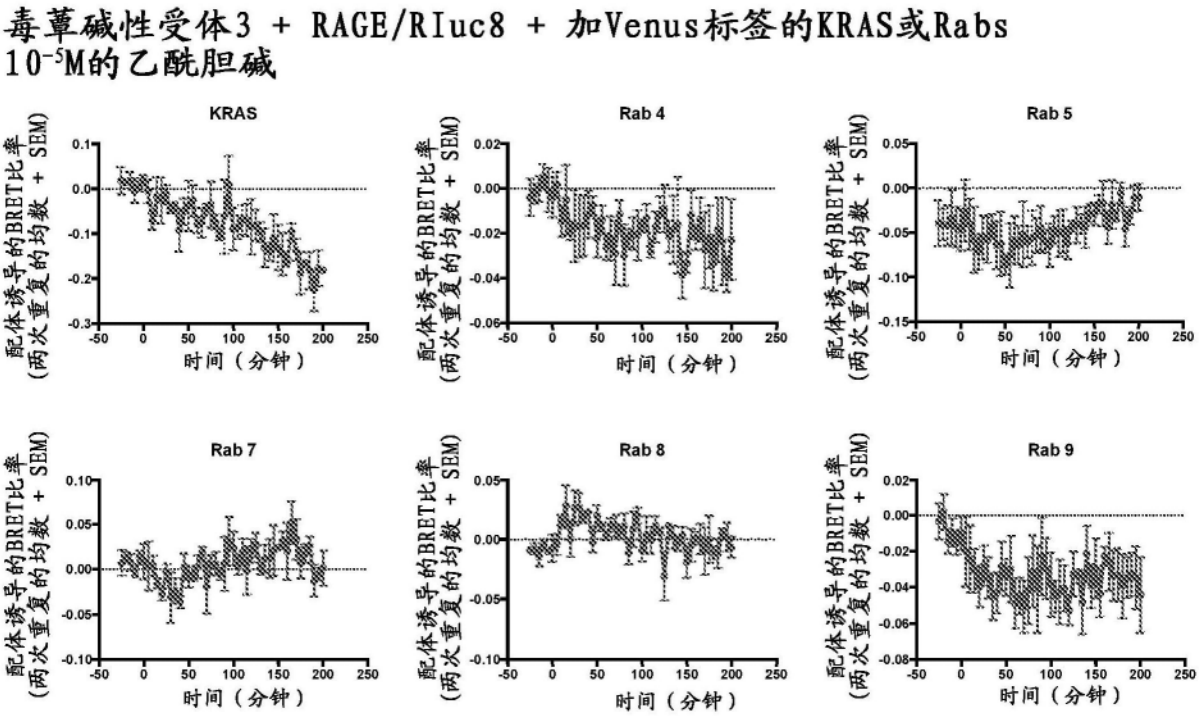

毒蕈碱性受体3 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10⁻⁵M的乙酰胆碱
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 9
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19X

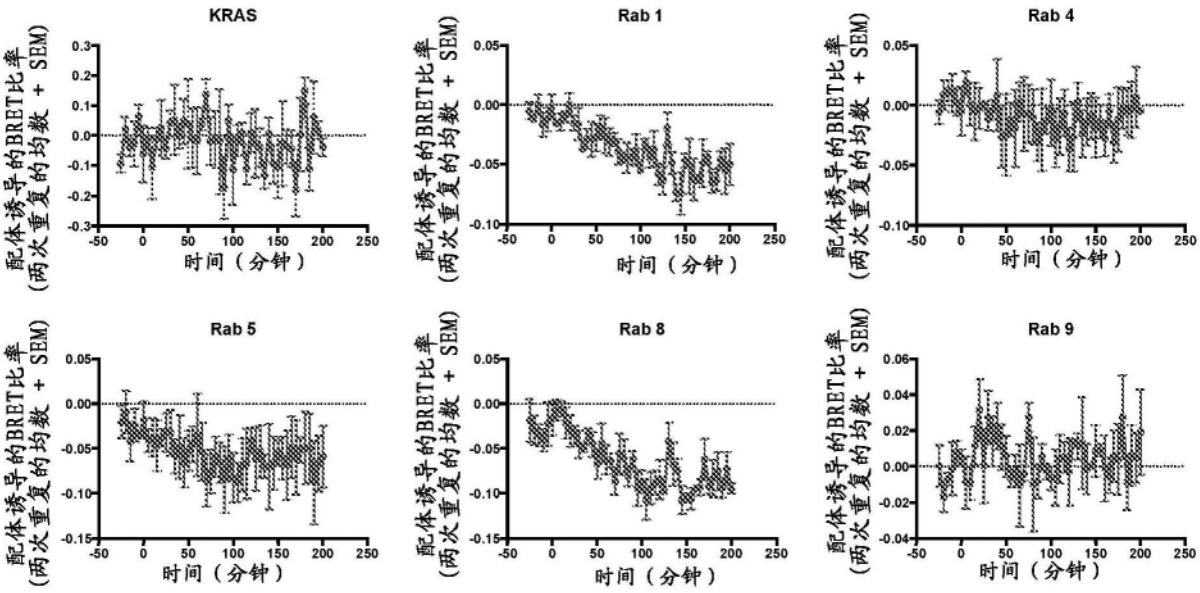

神经肽Y1受体 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10⁻⁷M的神经肽Y
KRAS
Rab 1
Rab 4
Rab 5
Rab 8
Rab 9
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19Y

神经降压肽1受体 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10^{-7}M的神经降压肽

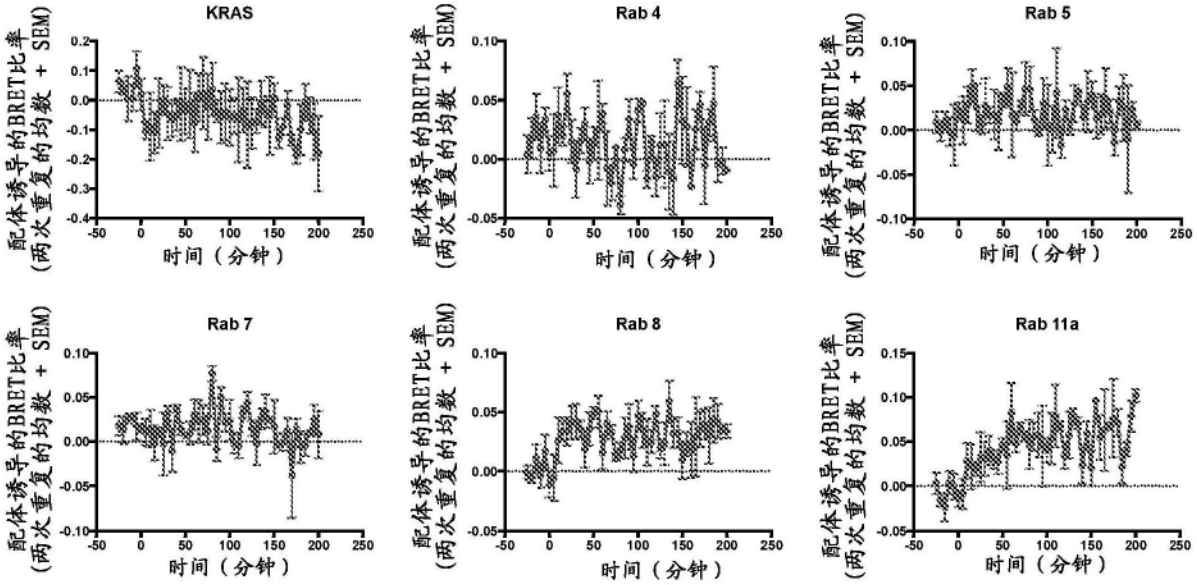


图19Z

食欲肽受体1 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10^{-6}M的食欲肽A

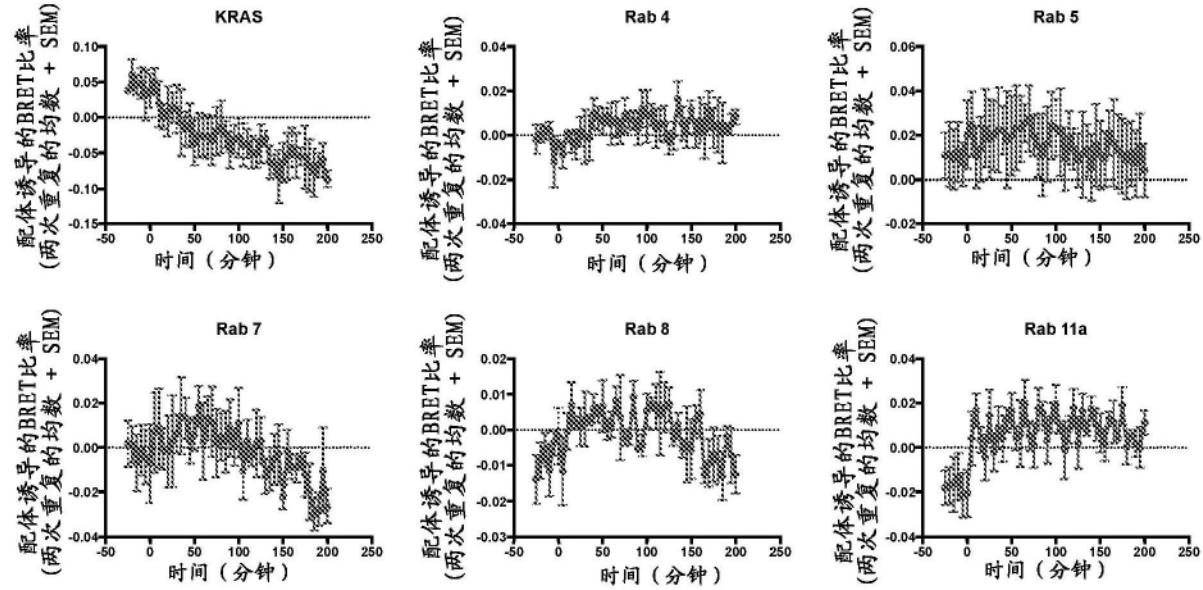


图19AA

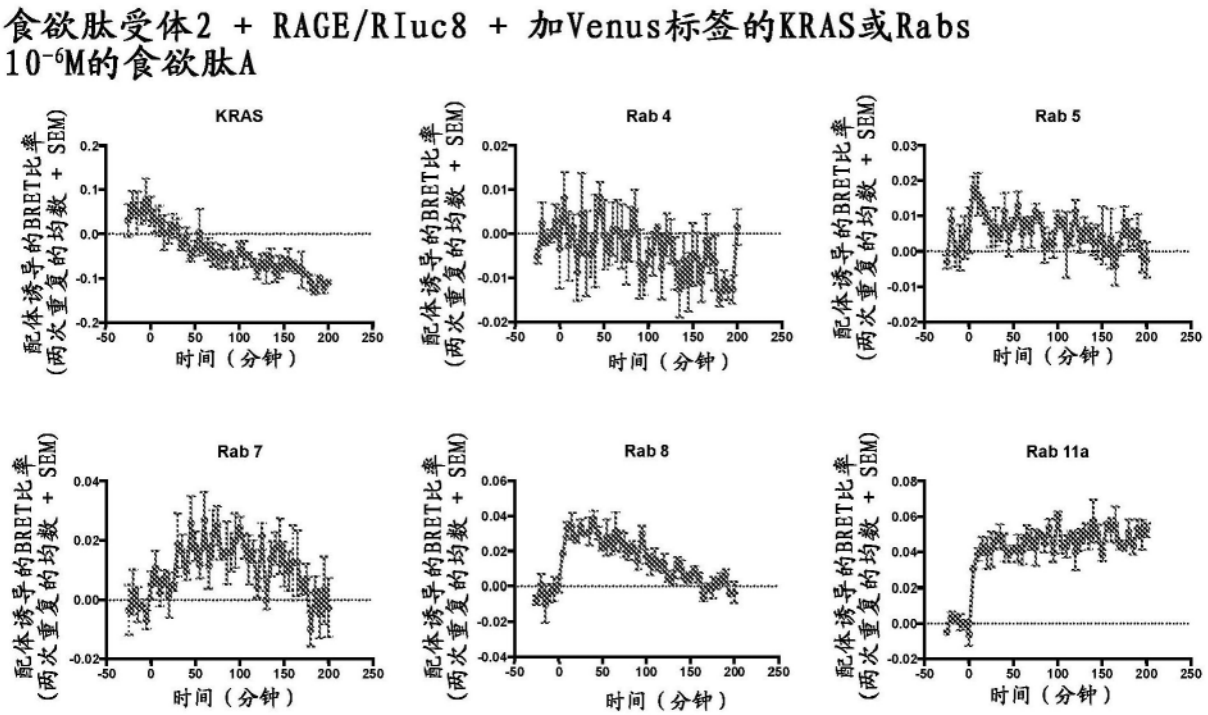

食欲肽受体2 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-6M的食欲肽A
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19BB

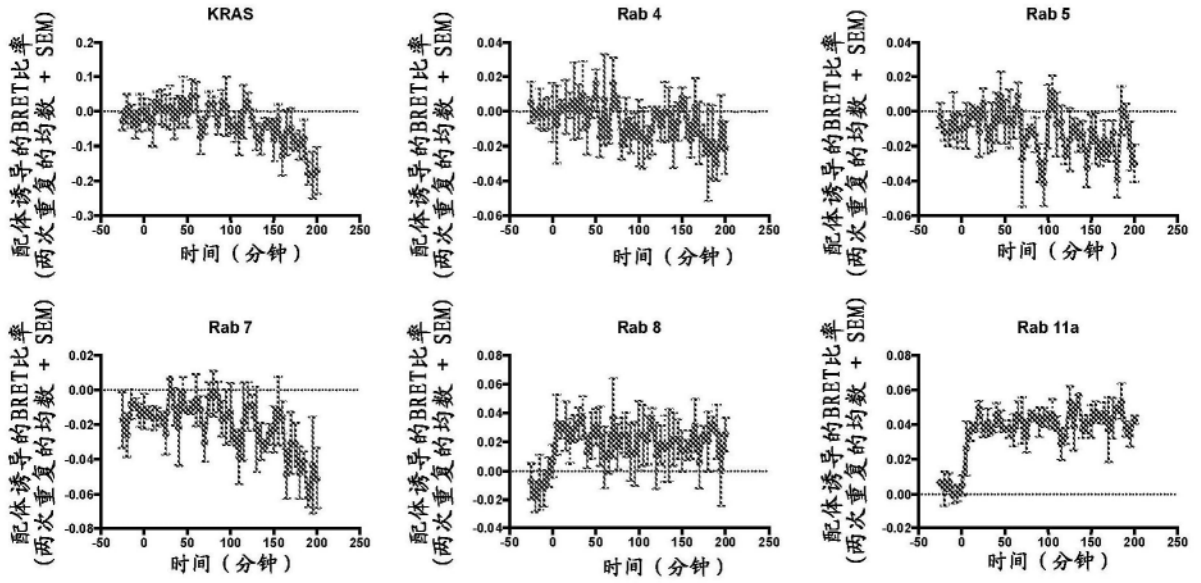

前列腺素E1受体 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-7M的前列腺素E2
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19CC

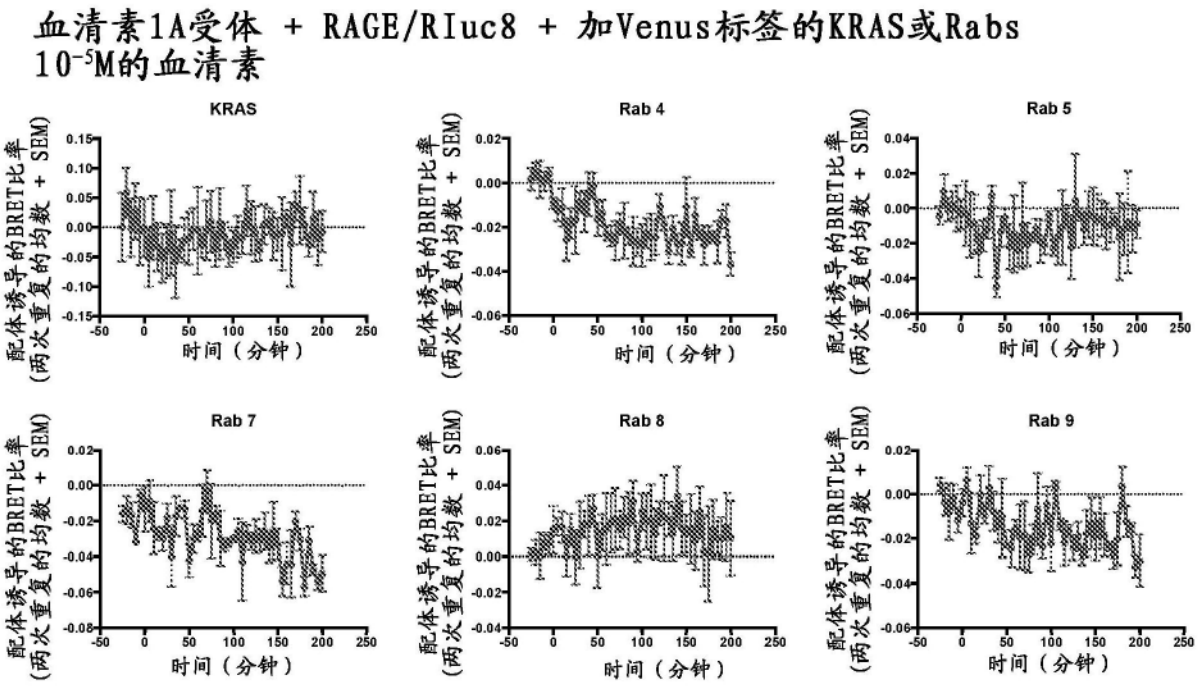

血清素1A受体 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-5M的血清素
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 9
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19DD

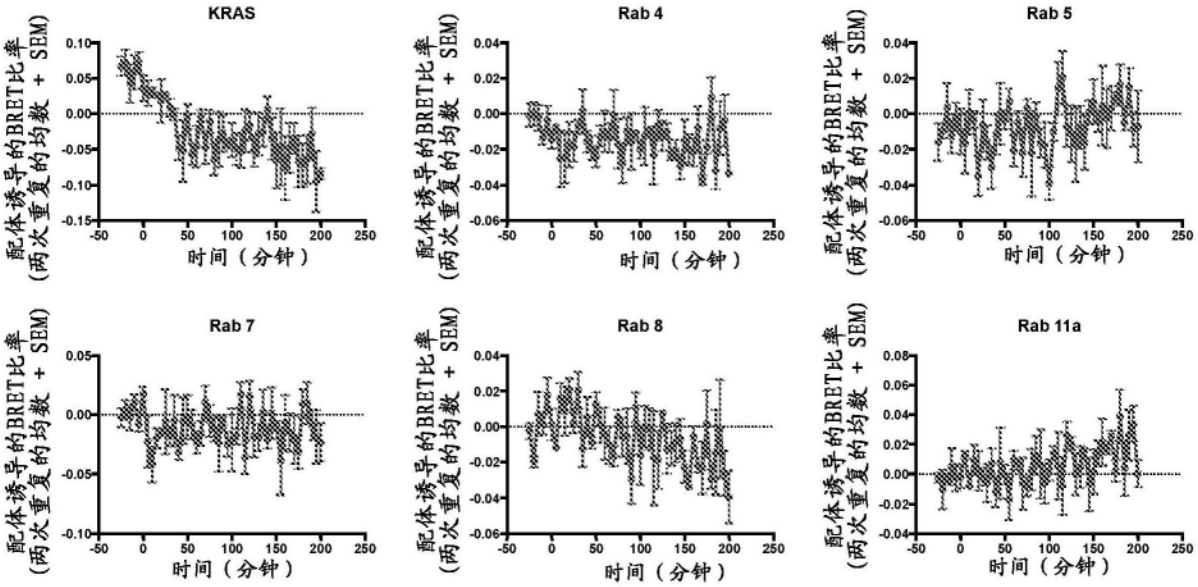

血清素2A受体 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-5M的血清素
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19EE

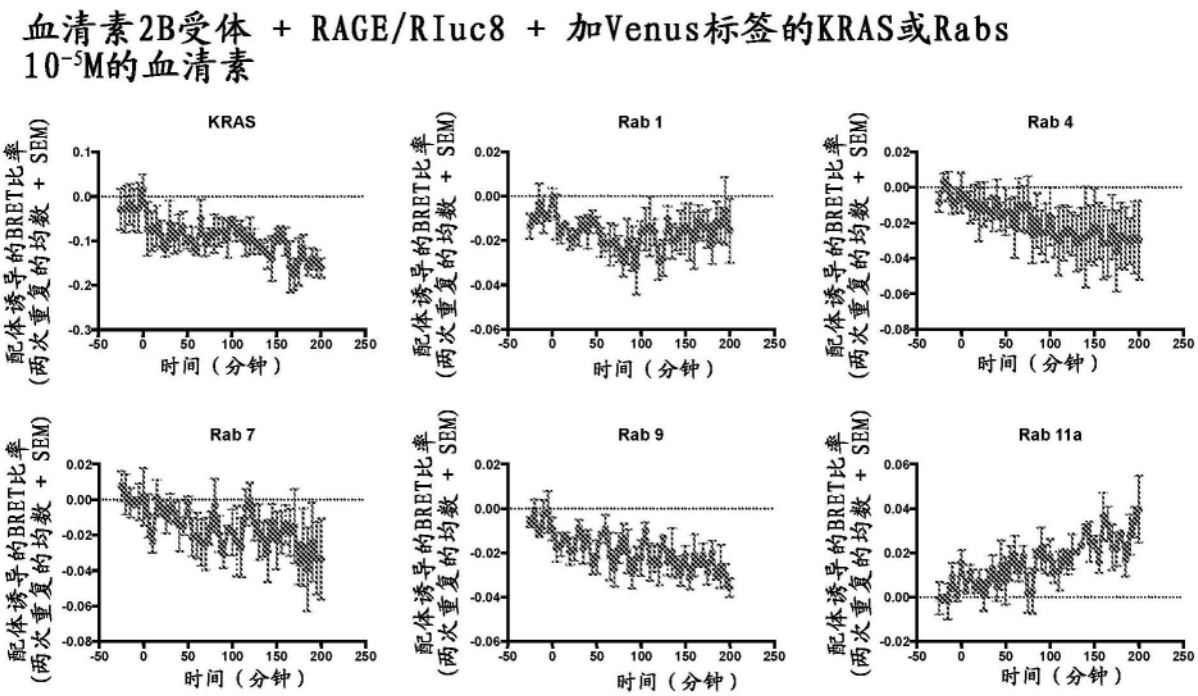

血清素2B受体 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-5M的血清素
KRAS
Rab 1
Rab 4
Rab 7
Rab 9
Rab 11a
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19FF

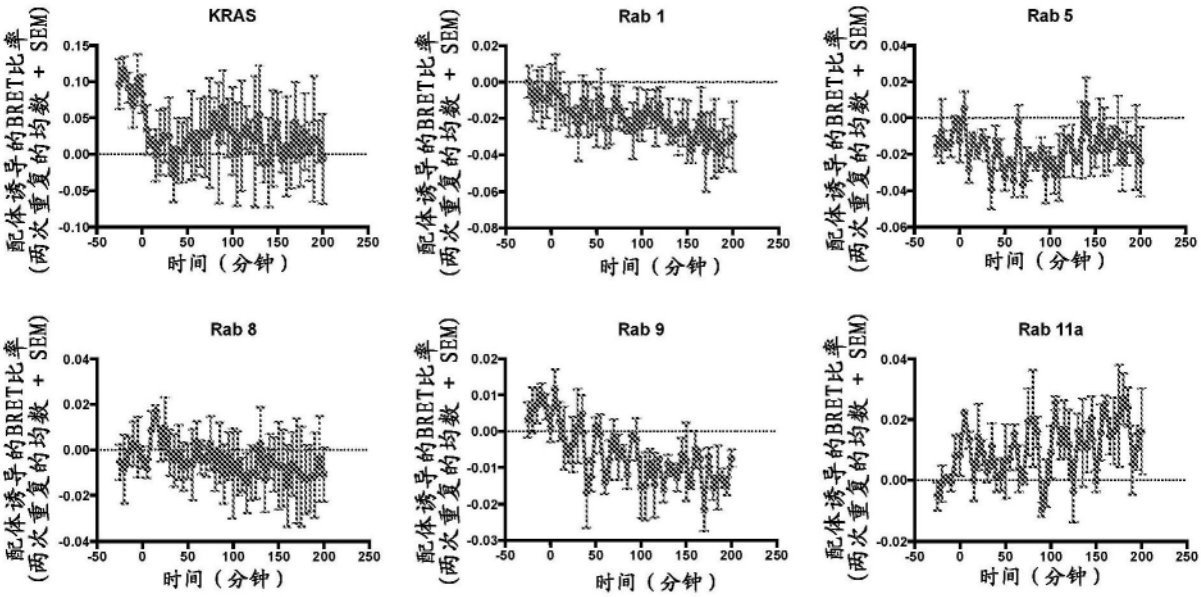

血清素2C受体 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-5M的血清素
KRAS
Rab 1
Rab 5
Rab 8
Rab 9
Rab 11a
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19GG

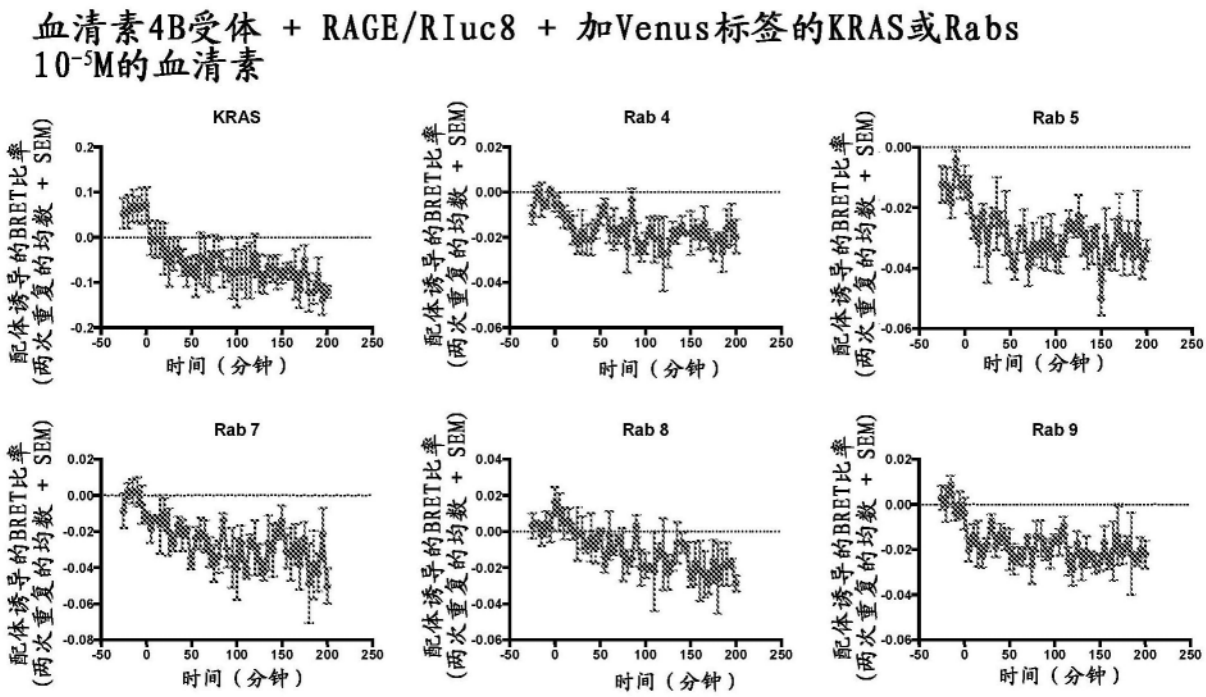

血清素4B受体 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-5M的血清素
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 9
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19HH

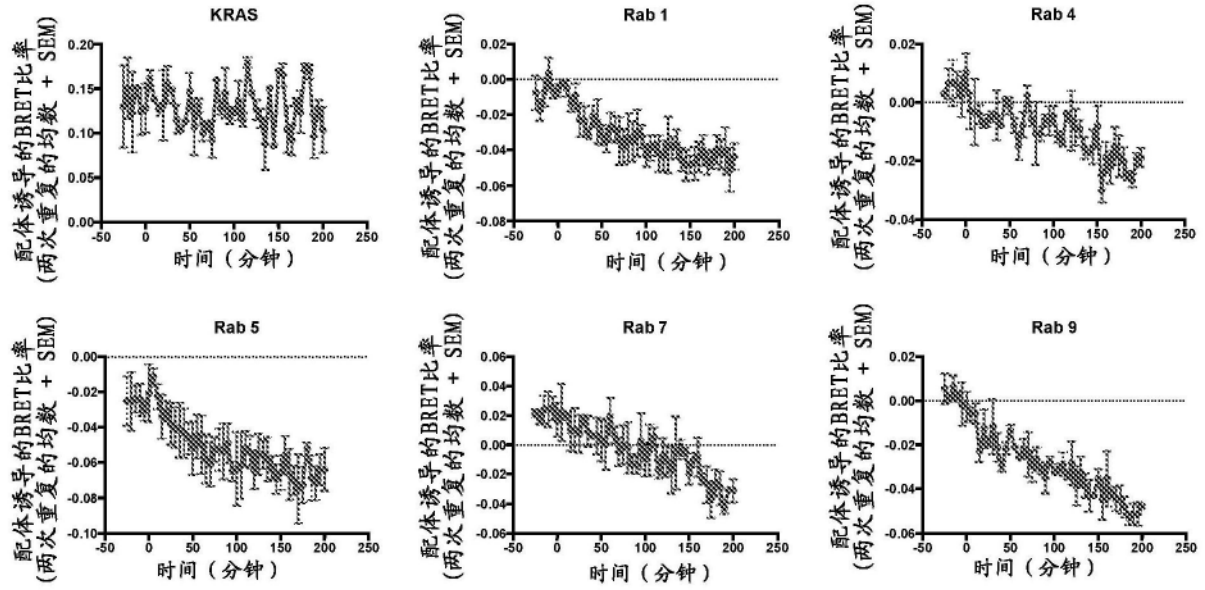

生长抑素受体2 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-6M的生长抑素
KRAS
Rab 1
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 9
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19II

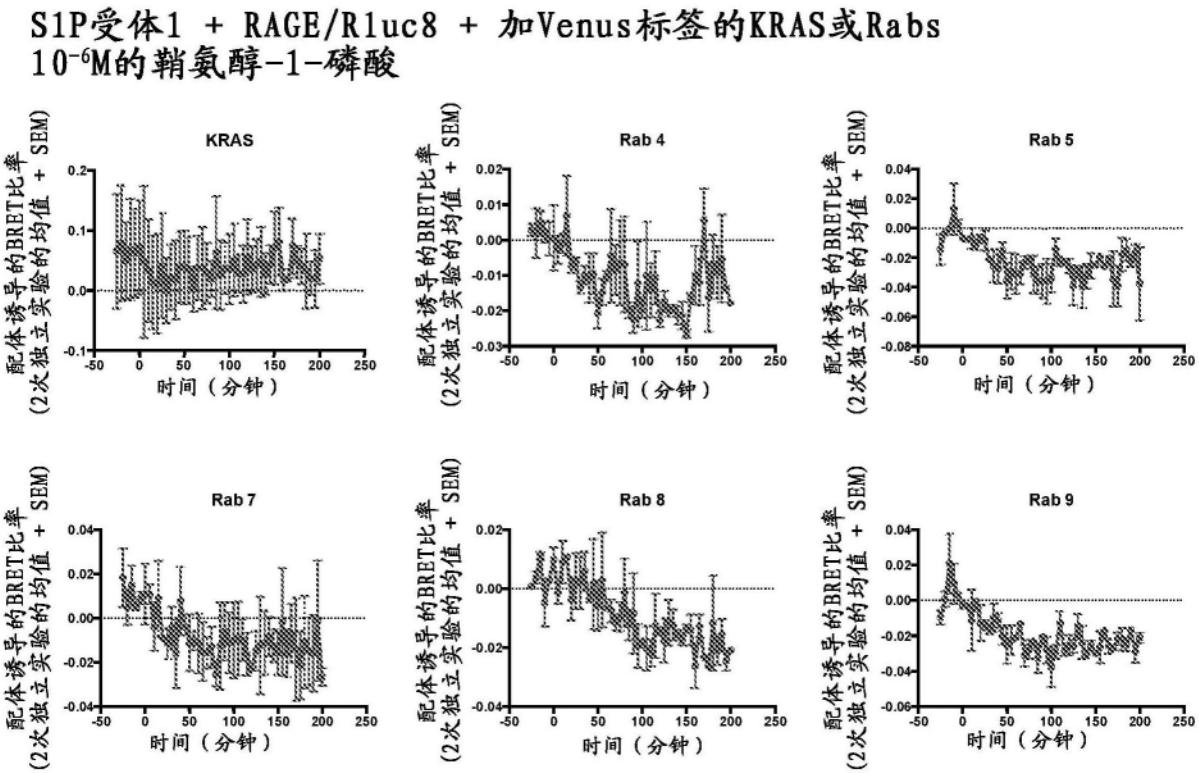

S1P受体1 + RAGE/R1uc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10⁻⁶M的鞘氨醇-1-磷酸
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 9
配体诱导的BRET比率
(2次独立实验的均值 + SEM)
时间（分钟）

图19JJ

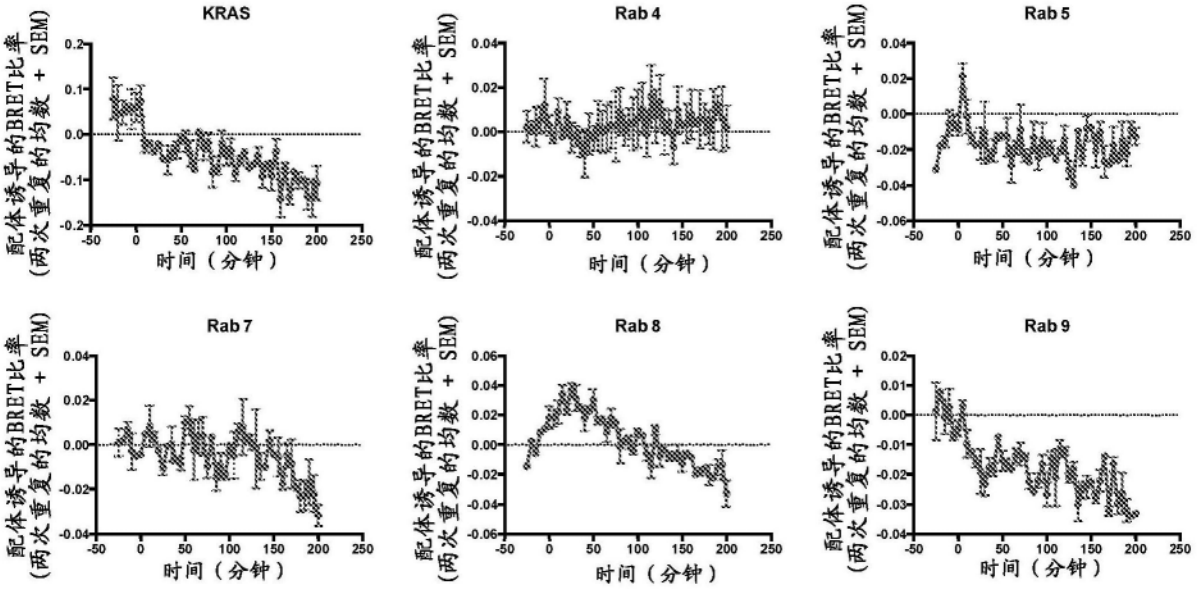

SIP受体3 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10⁻⁶M的鞘氨醇-1-磷酸
KRAS
Rab 4
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 9
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19KK

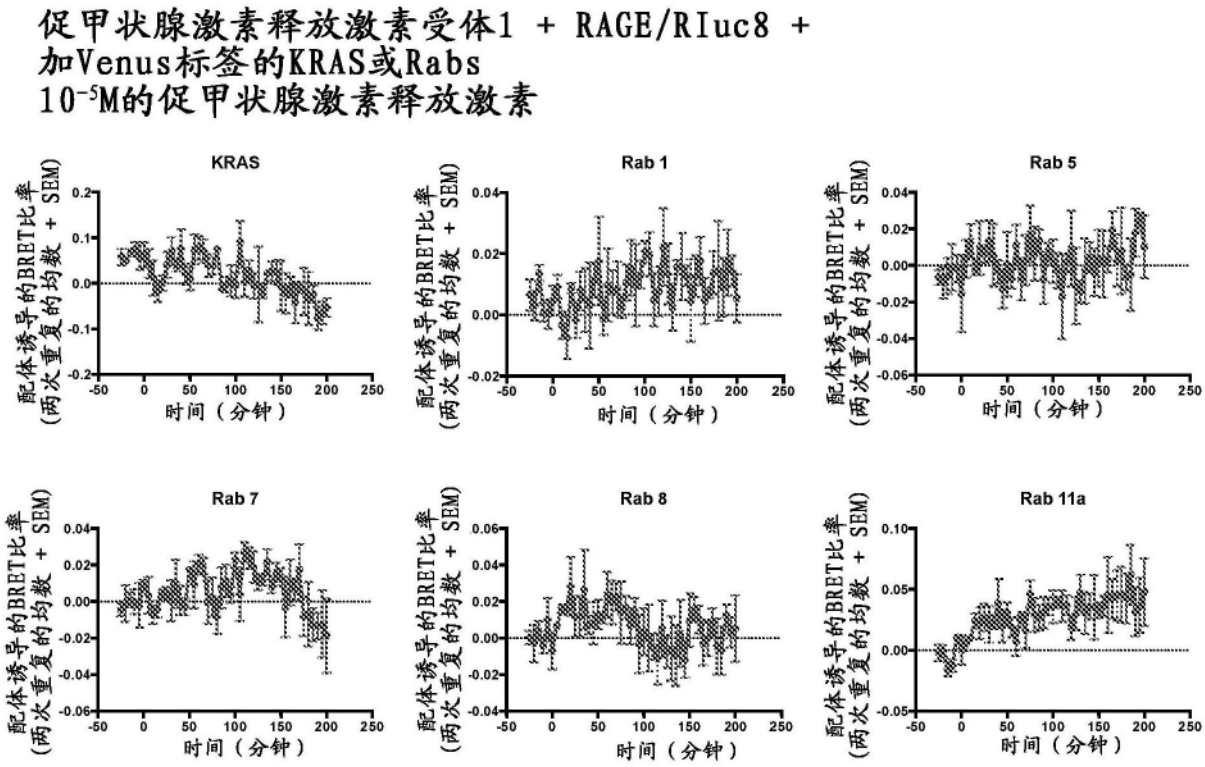

促甲状腺激素释放激素受体1 + RAGE/RIuc8 +
加Venus标签的KRAS或Rabs
10-5M的促甲状腺激素释放激素
KRAS
Rab 1
Rab 5
Rab 7
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19LL

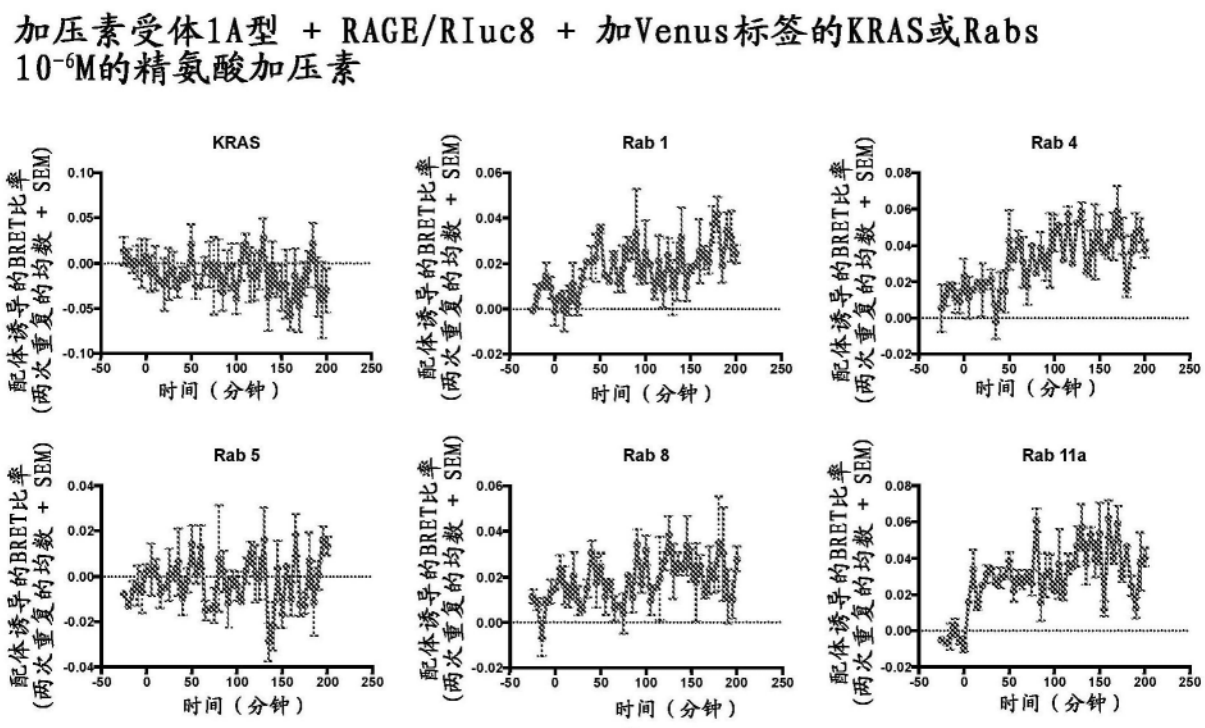

加压素受体1A型 + RAGE/RIuc8 + 加Venus标签的KRAS或Rabs
10-6M的精氨酸加压素
KRAS
Rab 1
Rab 4
Rab 5
Rab 8
Rab 11a
配体诱导的BRET比率
(两次重复的均数 + SEM)
时间（分钟）

图19MM

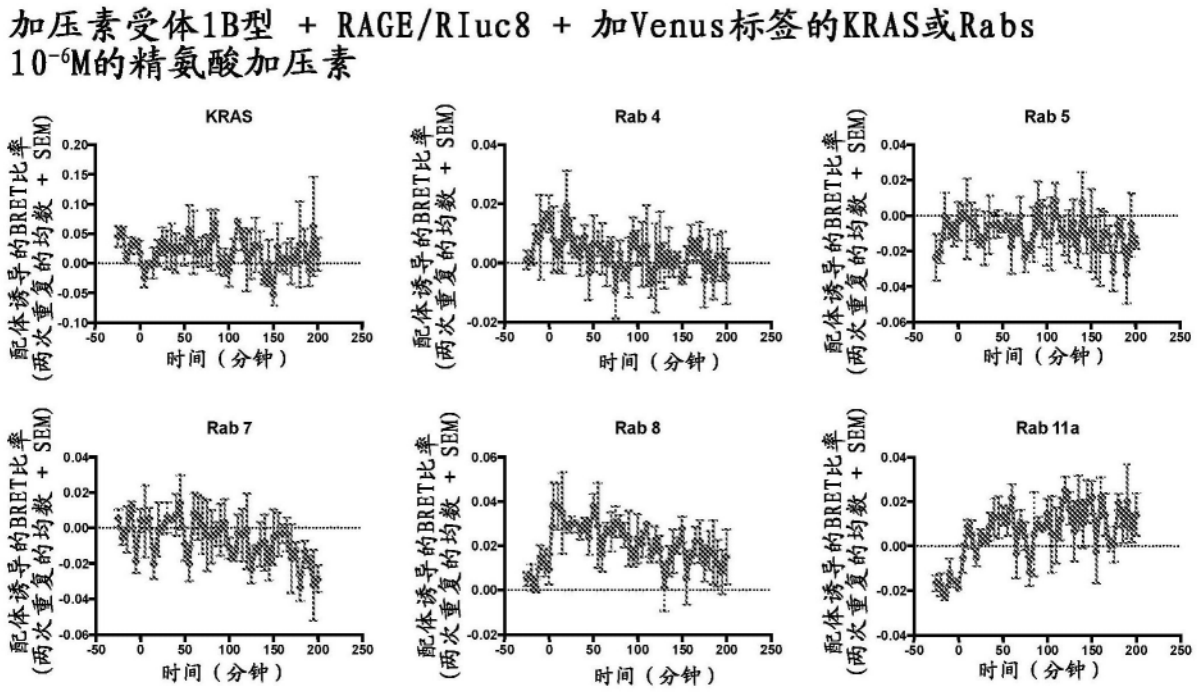


图19NN

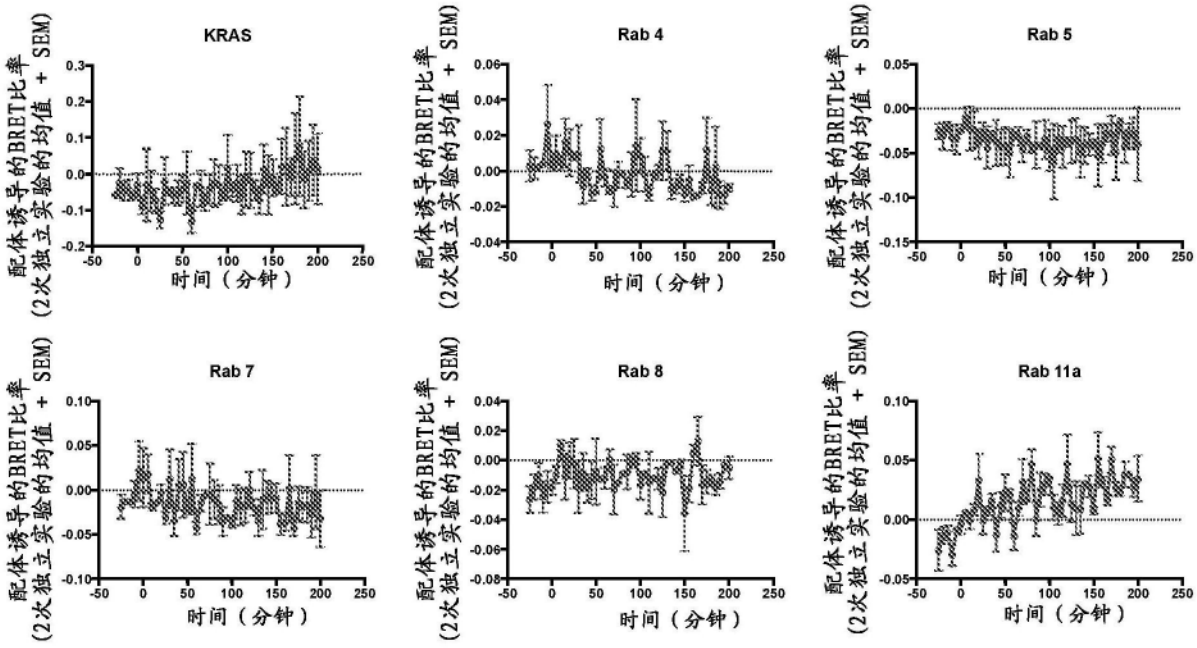


图1900

实施例20

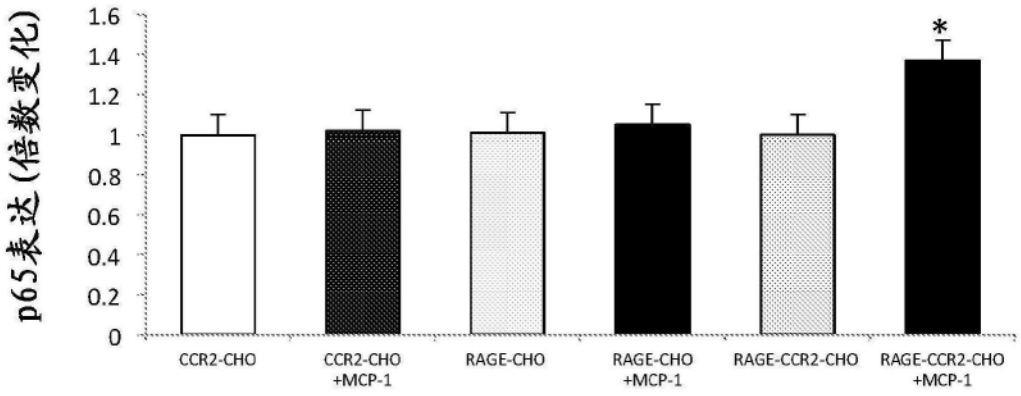


图20A

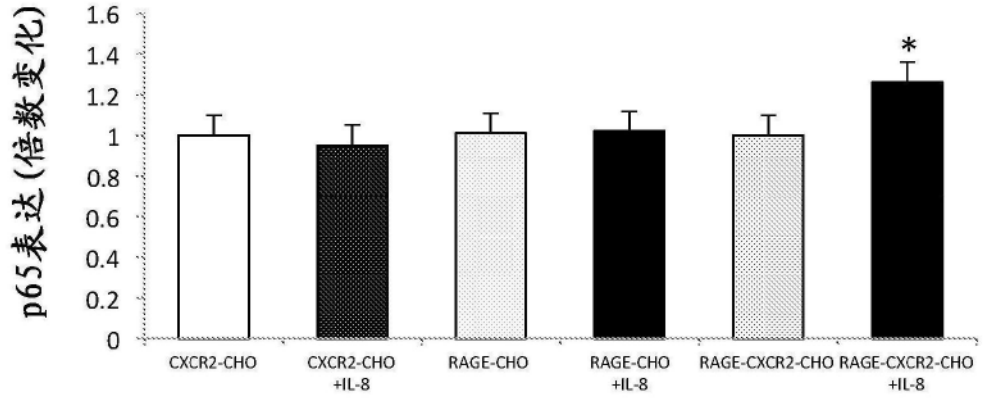


图20B

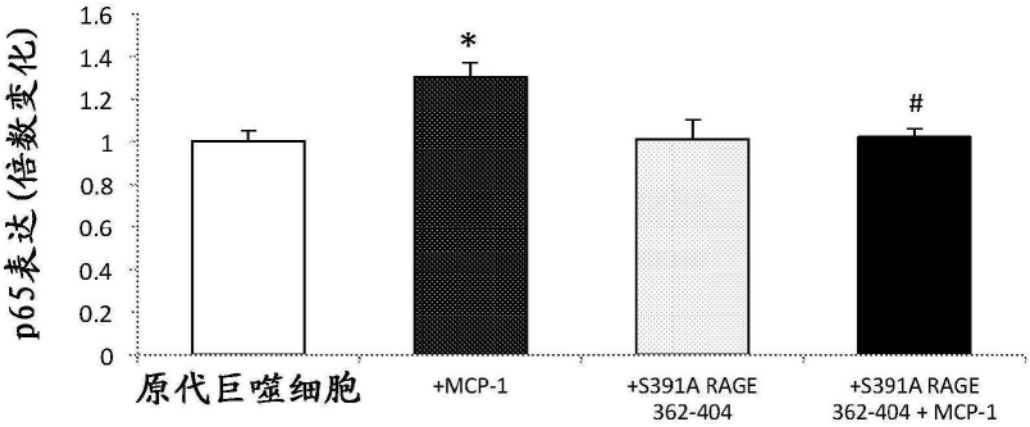


图20C

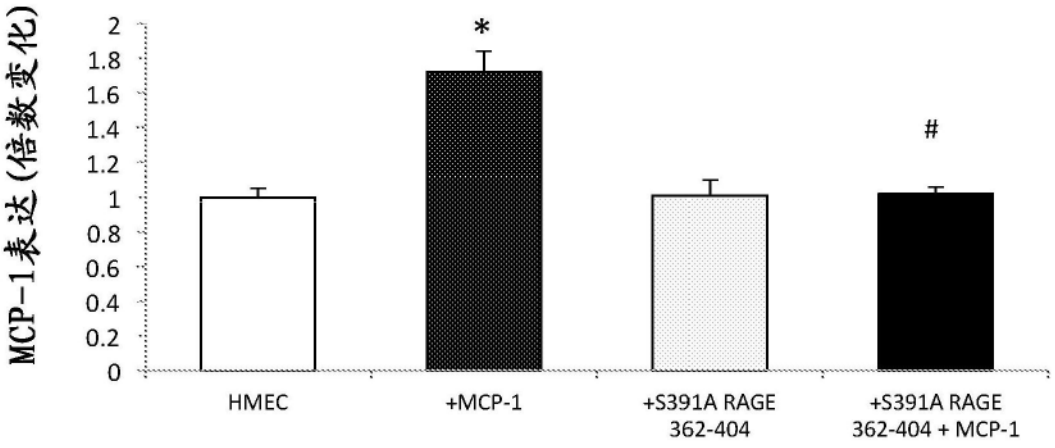


图20D

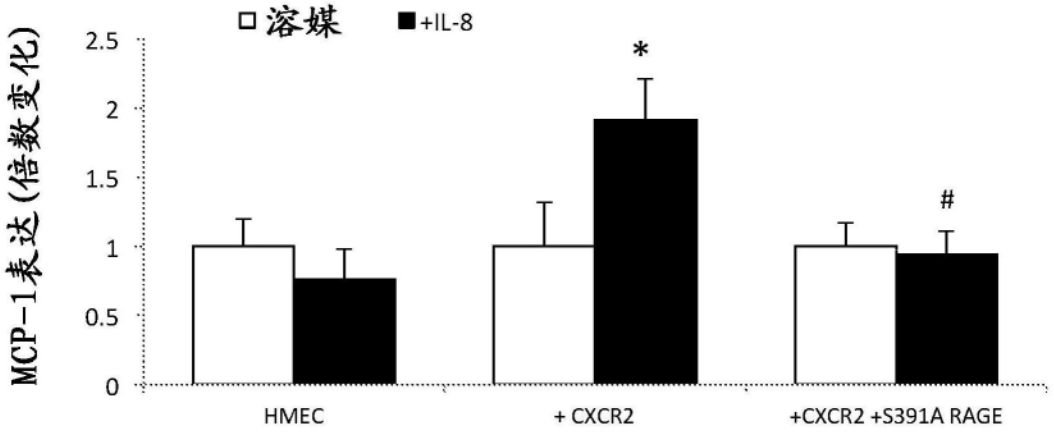


图20E

实施例21

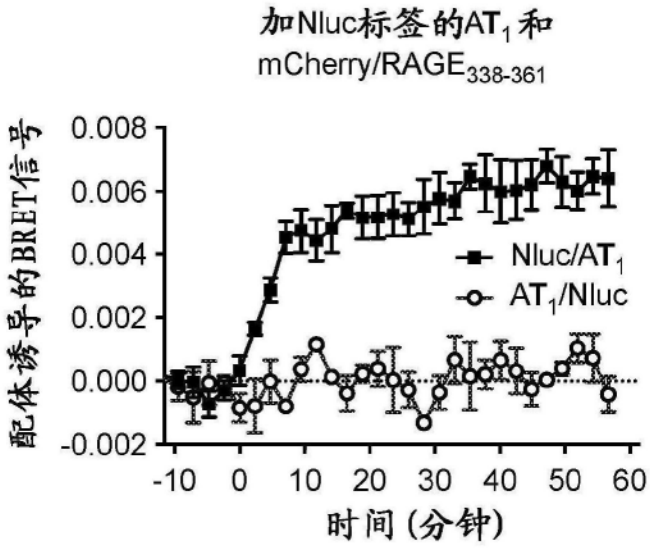

加Nluc标签的AT1和
mCherry/RAGE338-361
配体诱导的BRET信号
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
-0.002
-10
0
10
20
30
40
50
60
时间(分钟)
Nluc/AT1
AT1/Nluc

图21A

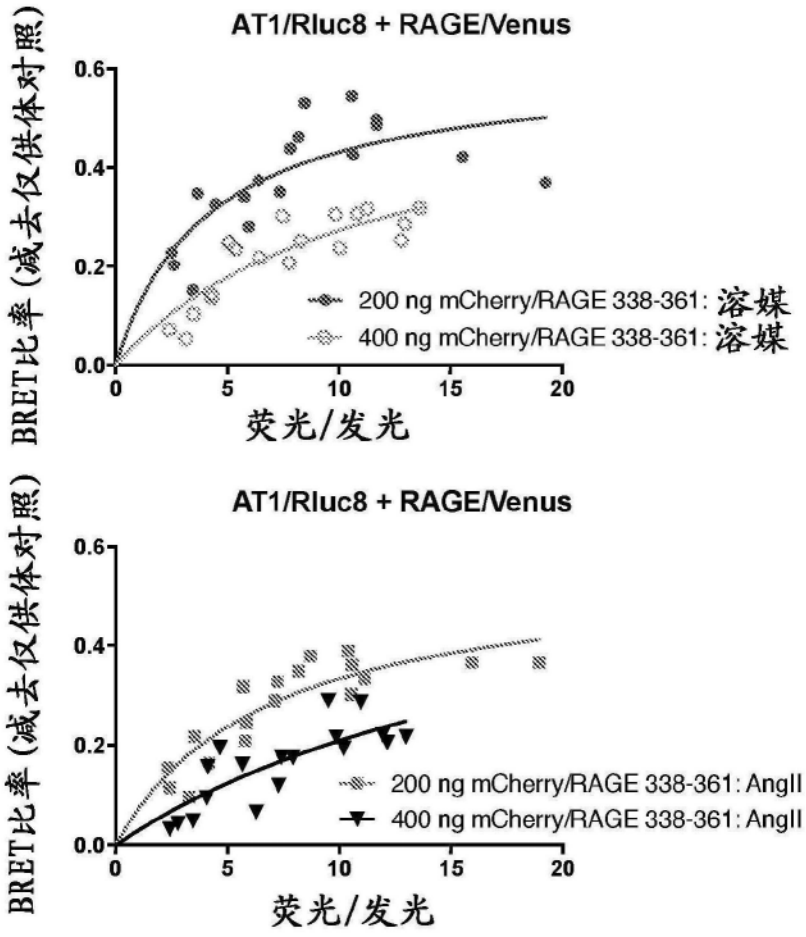

AT1/Rluc8 + RAGE/Venus
BRET比率(减去仅供体对照)
0.6
0.4
0.2
0.0
0
5
10
15
20
荧光/发光
200 ng mCherry/RAGE 338-361: 溶媒
400 ng mCherry/RAGE 338-361: 溶媒
AT1/Rluc8 + RAGE/Venus
BRET比率(减去仅供体对照)
200 ng mCherry/RAGE 338-361: AngII
400 ng mCherry/RAGE 338-361: AngII
荧光/发光

图21B

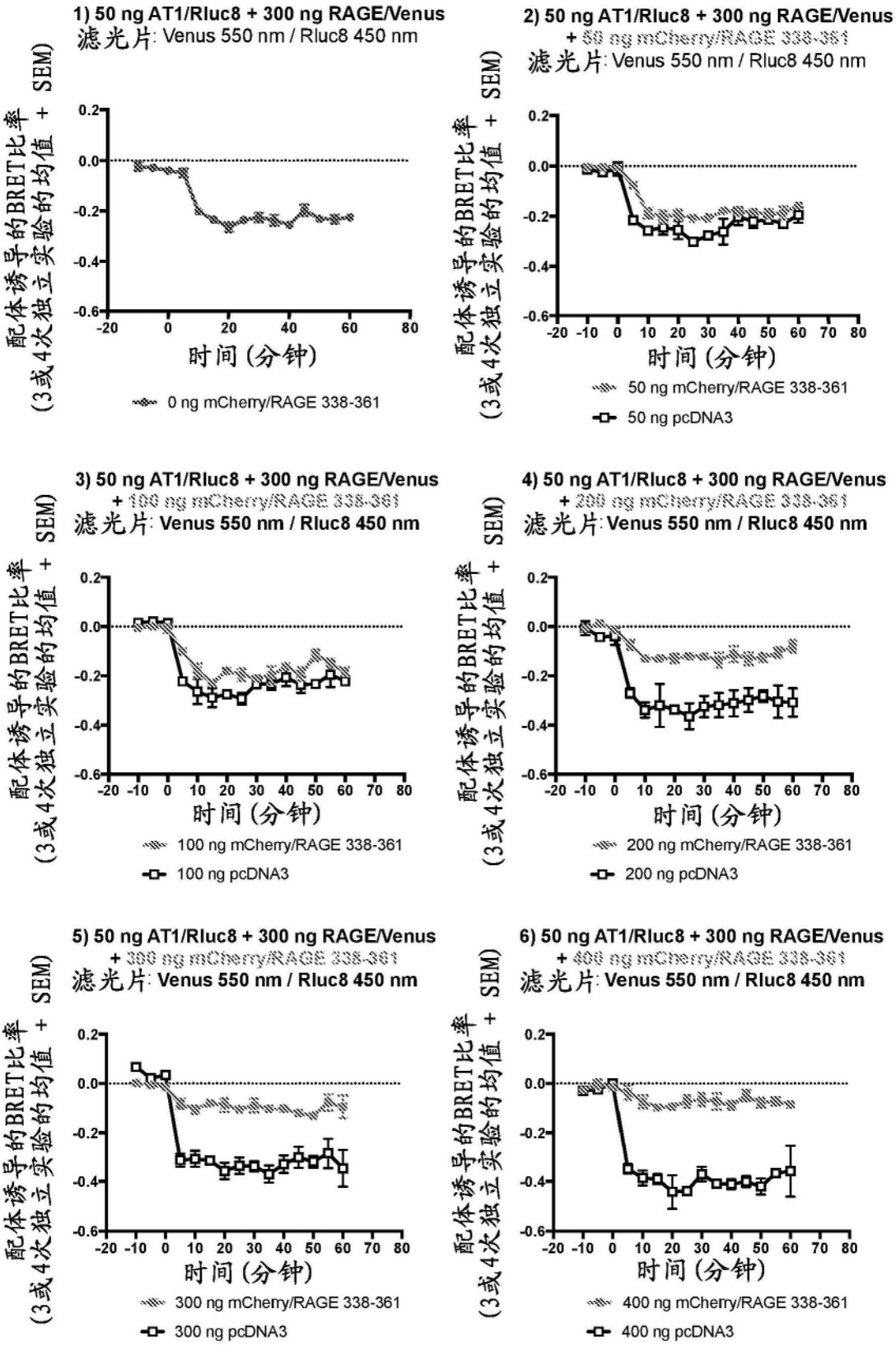

1) 50 ng AT1/Rluc8 + 300 ng RAGE/Venus
滤光片: Venus 550 nm / Rluc8 450 nm
配体诱导的BRET比率 (3或4次独立实验的均值 + SEM)
时间 (分钟)
0 ng mCherry/RAGE 338-361
2) 50 ng AT1/Rluc8 + 300 ng RAGE/Venus
+ 50 ng mCherry/RAGE 338-361
滤光片: Venus 550 nm / Rluc8 450 nm
50 ng mCherry/RAGE 338-361
50 ng pcDNA3
3) 50 ng AT1/Rluc8 + 300 ng RAGE/Venus
+ 100 ng mCherry/RAGE 338-361
滤光片: Venus 550 nm / Rluc8 450 nm
100 ng mCherry/RAGE 338-361
100 ng pcDNA3
4) 50 ng AT1/Rluc8 + 300 ng RAGE/Venus
+ 200 ng mCherry/RAGE 338-361
滤光片: Venus 550 nm / Rluc8 450 nm
200 ng mCherry/RAGE 338-361
200 ng pcDNA3
5) 50 ng AT1/Rluc8 + 300 ng RAGE/Venus
+ 300 ng mCherry/RAGE 338-361
滤光片: Venus 550 nm / Rluc8 450 nm
300 ng mCherry/RAGE 338-361
300 ng pcDNA3
6) 50 ng AT1/Rluc8 + 300 ng RAGE/Venus
+ 400 ng mCherry/RAGE 338-361
滤光片: Venus 550 nm / Rluc8 450 nm
400 ng mCherry/RAGE 338-361
400 ng pcDNA3

图21C

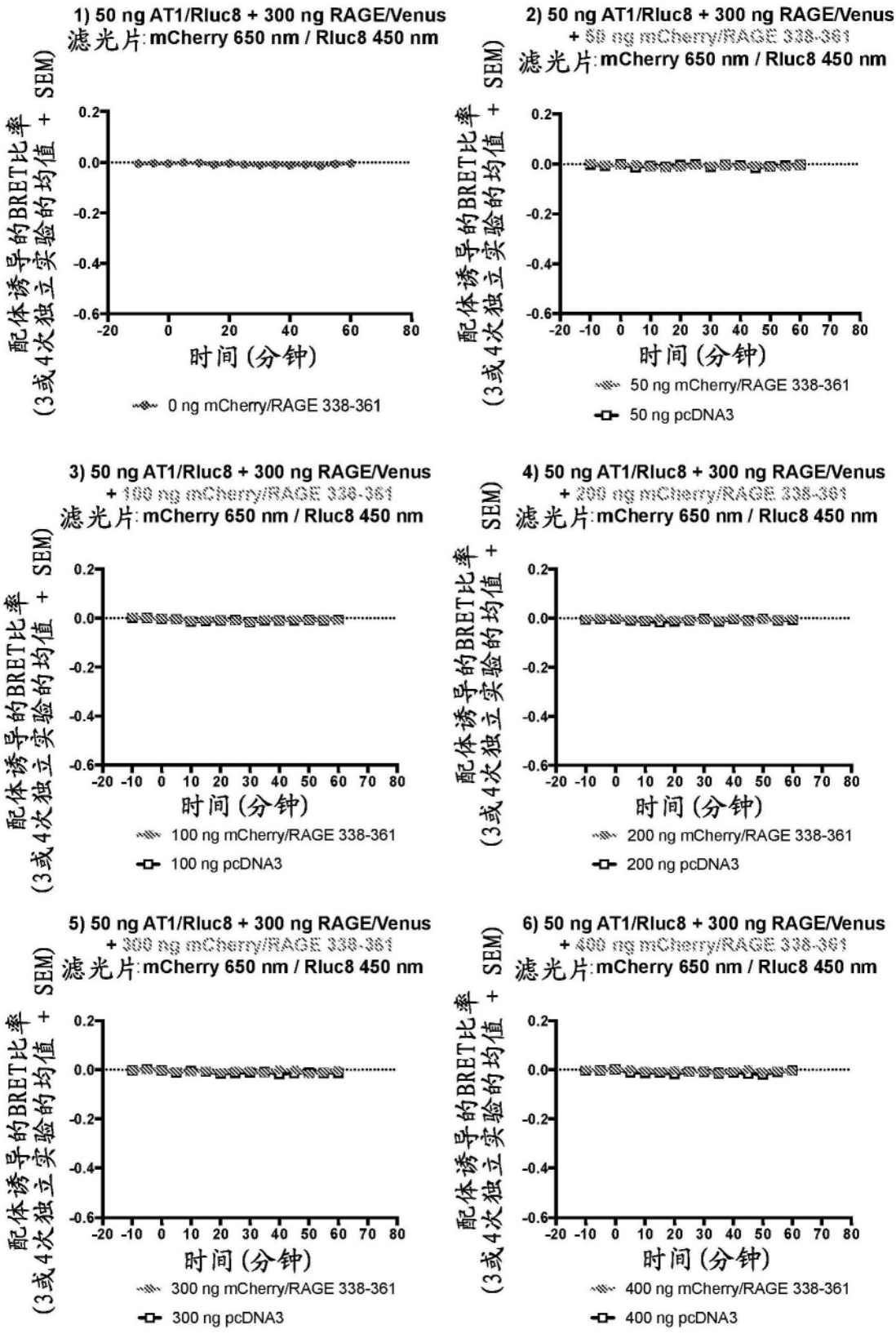

1) 50 ng AT1/Rluc8 + 300 ng RAGE/Venus
滤光片:mCherry 650 nm / Rluc8 450 nm
配体诱导的BRET比率 (3或4次独立实验的均值 + SEM)
时间 (分钟)
0 ng mCherry/RAGE 338-361
2) 50 ng AT1/Rluc8 + 300 ng RAGE/Venus
+ 50 ng mCherry/RAGE 338-361
滤光片:mCherry 650 nm / Rluc8 450 nm
50 ng mCherry/RAGE 338-361
50 ng pcDNA3
3) 50 ng AT1/Rluc8 + 300 ng RAGE/Venus
+ 100 ng mCherry/RAGE 338-361
滤光片:mCherry 650 nm / Rluc8 450 nm
100 ng mCherry/RAGE 338-361
100 ng pcDNA3
4) 50 ng AT1/Rluc8 + 300 ng RAGE/Venus
+ 200 ng mCherry/RAGE 338-361
滤光片:mCherry 650 nm / Rluc8 450 nm
200 ng mCherry/RAGE 338-361
200 ng pcDNA3
5) 50 ng AT1/Rluc8 + 300 ng RAGE/Venus
+ 300 ng mCherry/RAGE 338-361
滤光片:mCherry 650 nm / Rluc8 450 nm
300 ng mCherry/RAGE 338-361
300 ng pcDNA3
6) 50 ng AT1/Rluc8 + 300 ng RAGE/Venus
+ 400 ng mCherry/RAGE 338-361
滤光片:mCherry 650 nm / Rluc8 450 nm
400 ng mCherry/RAGE 338-361
400 ng pcDNA3

图21D

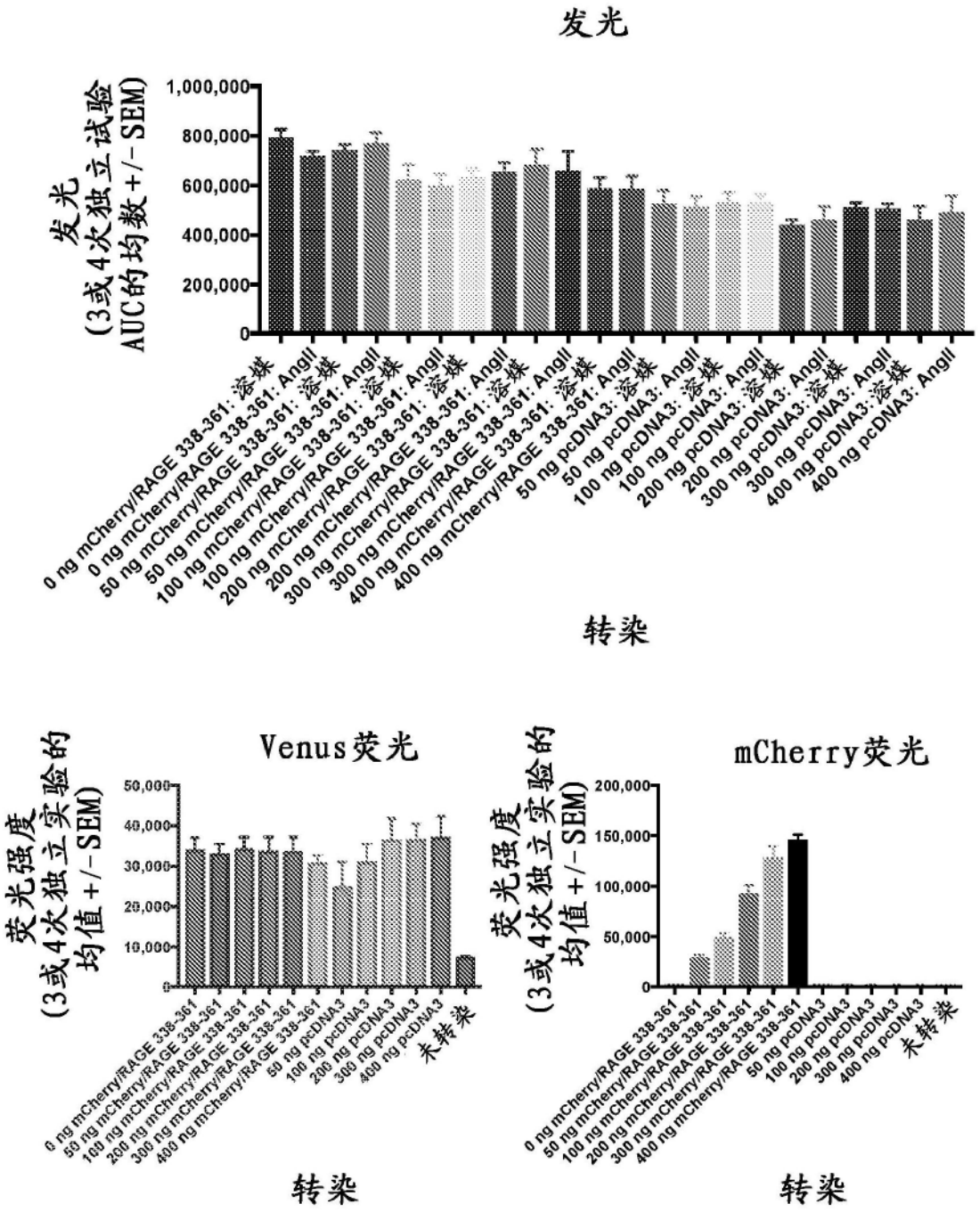
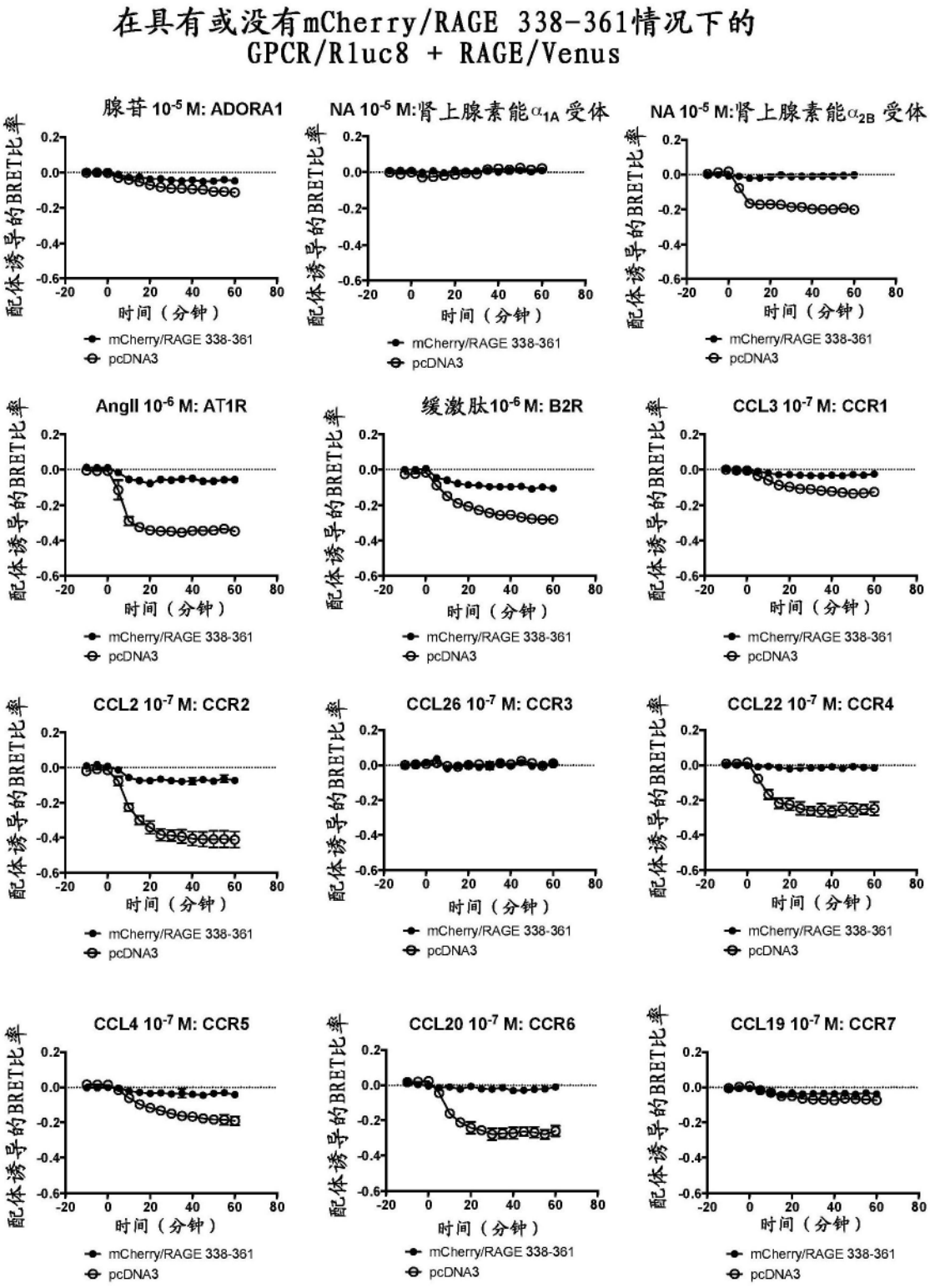

发光
发光
(3或4次独立试验
AUC的均数+/-SEM)
1,000,000
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 ng mCherry/RAGE 338-361: 溶媒
0 ng mCherry/RAGE 338-361: AngII
50 ng mCherry/RAGE 338-361: 溶媒
50 ng mCherry/RAGE 338-361: AngII
100 ng mCherry/RAGE 338-361: 溶媒
100 ng mCherry/RAGE 338-361: AngII
200 ng mCherry/RAGE 338-361: 溶媒
200 ng mCherry/RAGE 338-361: AngII
300 ng mCherry/RAGE 338-361: 溶媒
300 ng mCherry/RAGE 338-361: AngII
400 ng mCherry/RAGE 338-361: 溶媒
400 ng mCherry/RAGE 338-361: AngII
50 ng pcDNA3: 溶媒
50 ng pcDNA3: AngII
100 ng pcDNA3: 溶媒
100 ng pcDNA3: AngII
200 ng pcDNA3: 溶媒
200 ng pcDNA3: AngII
300 ng pcDNA3: 溶媒
300 ng pcDNA3: AngII
400 ng pcDNA3: 溶媒
400 ng pcDNA3: AngII
转染
Venus荧光
荧光强度
(3或4次独立实验的
均值+/-SEM)
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
0 ng mCherry/RAGE 338-361
50 ng mCherry/RAGE 338-361
100 ng mCherry/RAGE 338-361
200 ng mCherry/RAGE 338-361
300 ng mCherry/RAGE 338-361
400 ng mCherry/RAGE 338-361
50 ng pcDNA3
100 ng pcDNA3
200 ng pcDNA3
300 ng pcDNA3
400 ng pcDNA3
未转染
转染
mCherry荧光
荧光强度
(3或4次独立实验的
均值+/-SEM)
200,000
150,000
100,000
50,000
0
0 ng mCherry/RAGE 338-361
50 ng mCherry/RAGE 338-361
100 ng mCherry/RAGE 338-361
200 ng mCherry/RAGE 338-361
300 ng mCherry/RAGE 338-361
400 ng mCherry/RAGE 338-361
50 ng pcDNA3
100 ng pcDNA3
200 ng pcDNA3
300 ng pcDNA3
400 ng pcDNA3
未转染
转染

图21E


在具有或没有mCherry/RAGE 338-361情况下的
GPCR/Rluc8 + RAGE/Venus
腺苷 10-5 M: ADORA1
NA 10-5 M:肾上腺素能α1A 受体
NA 10-5 M:肾上腺素能α2B 受体
AngII 10-6 M: AT1R
缓激肽10-6 M: B2R
CCL3 10-7 M: CCR1
CCL2 10-7 M: CCR2
CCL26 10-7 M: CCR3
CCL22 10-7 M: CCR4
CCL4 10-7 M: CCR5
CCL20 10-7 M: CCR6
CCL19 10-7 M: CCR7
配体诱导的BRET比率
时间（分钟）
mCherry/RAGE 338-361
pcDNA3

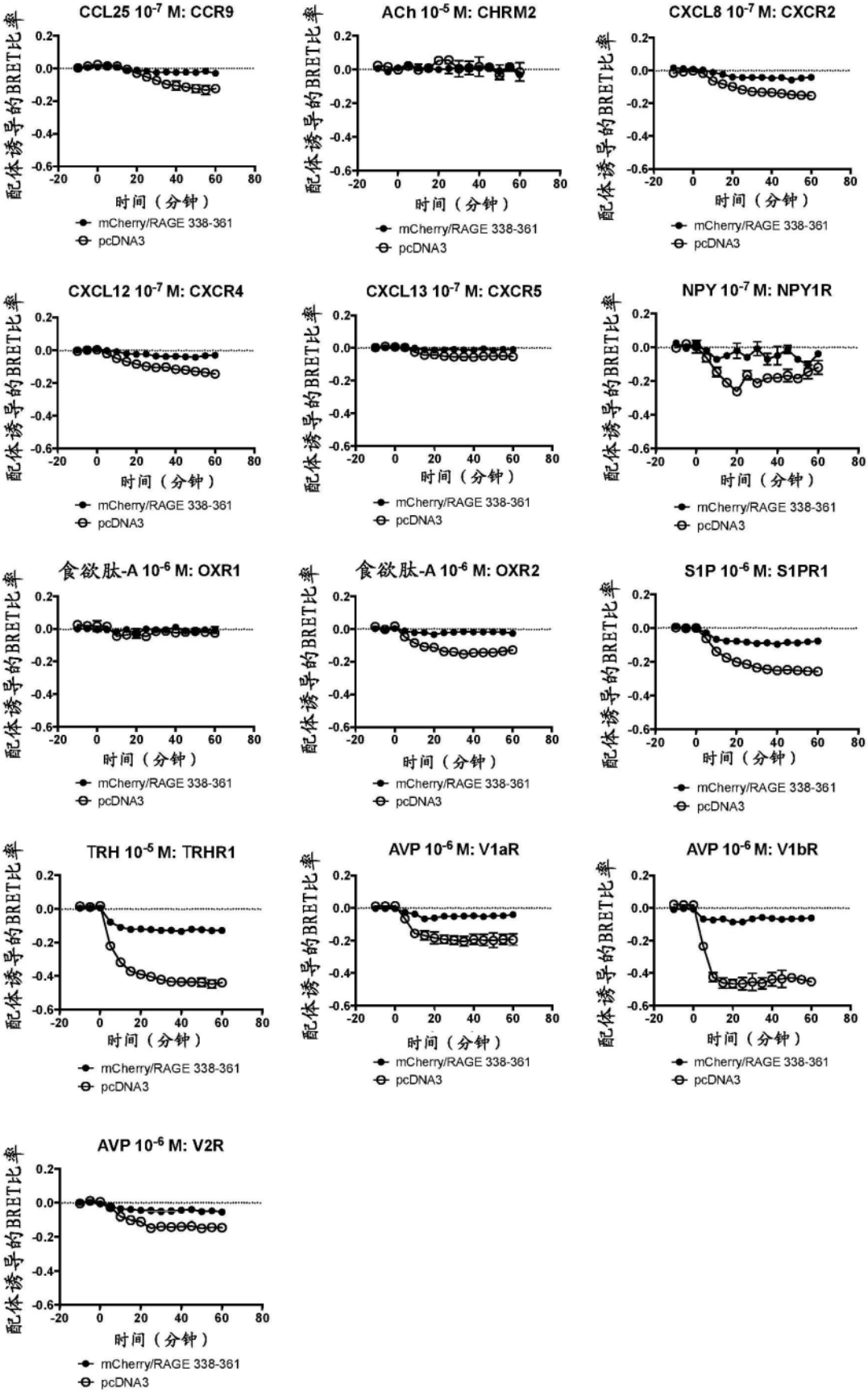

CCL25 10-7 M: CCR9
ACh 10-5 M: CHRM2
CXCL8 10-7 M: CXCR2
CXCL12 10-7 M: CXCR4
CXCL13 10-7 M: CXCR5
NPY 10-7 M: NPY1R
食欲肽-A 10-6 M: OXR1
食欲肽-A 10-6 M: OXR2
S1P 10-6 M: S1PR1
TRH 10-5 M: TRHR1
AVP 10-6 M: V1aR
AVP 10-6 M: V1bR
AVP 10-6 M: V2R
配体诱导的BRET比率
时间（分钟）
mCherry/RAGE 338-361
pcDNA3

图21F

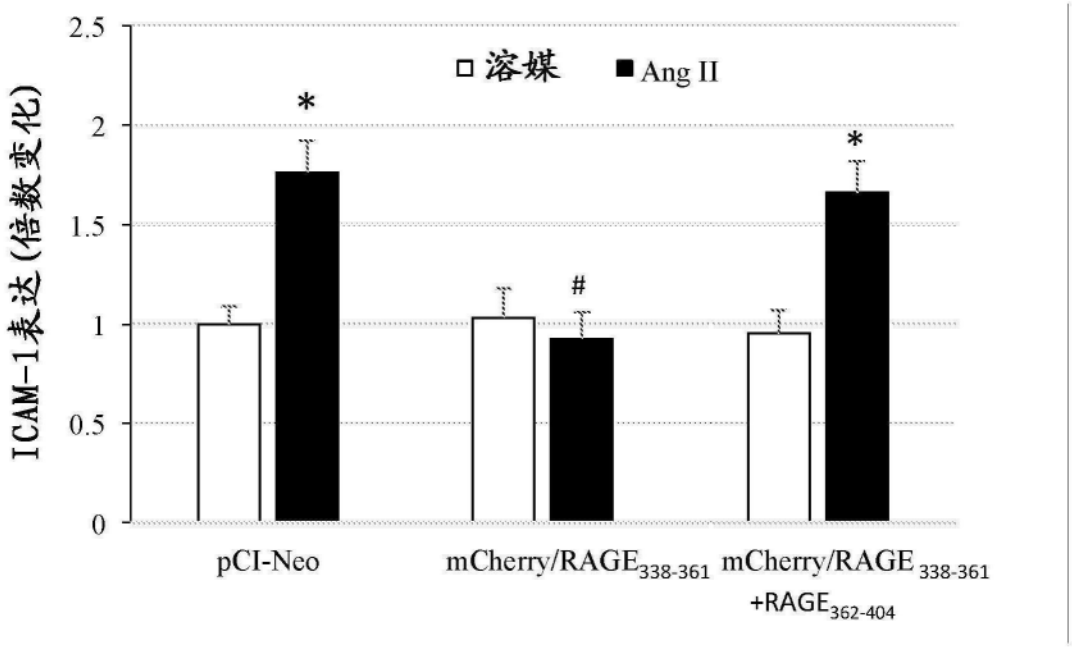

ICAM-1表达(倍数变化)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
溶媒
Ang II
*
*
#
pCI-Neo
mCherry/RAGE338-361
mCherry/RAGE 338-361
+RAGE362-404

图21G

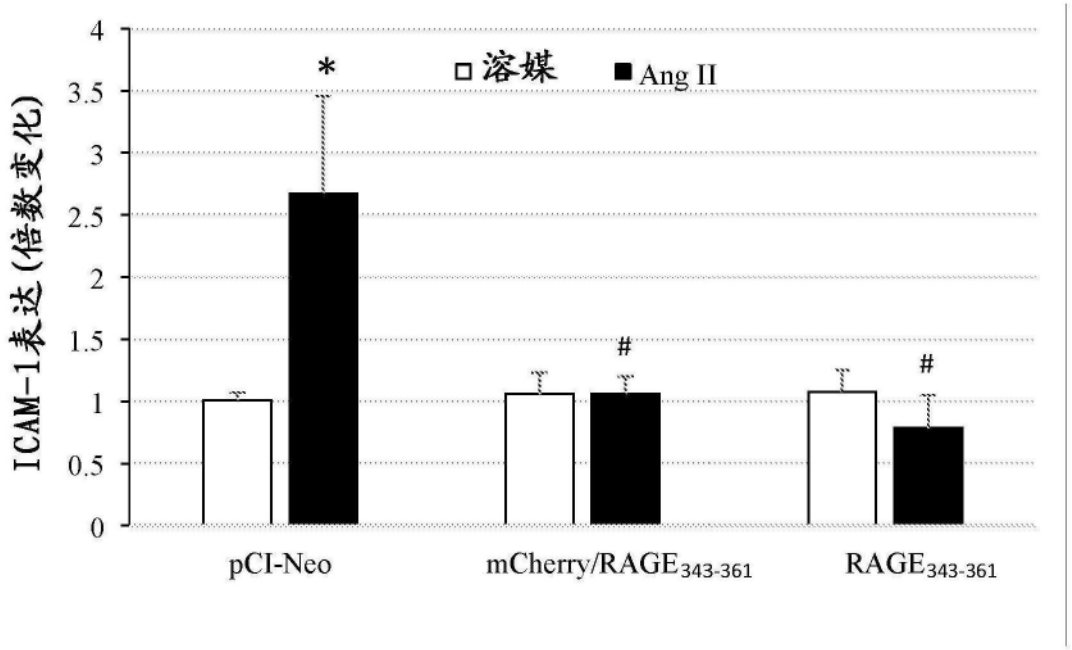

ICAM-1表达(倍数变化)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
溶媒
Ang II
*
#
#
pCI-Neo
mCherry/RAGE343-361
RAGE343-361

图21H

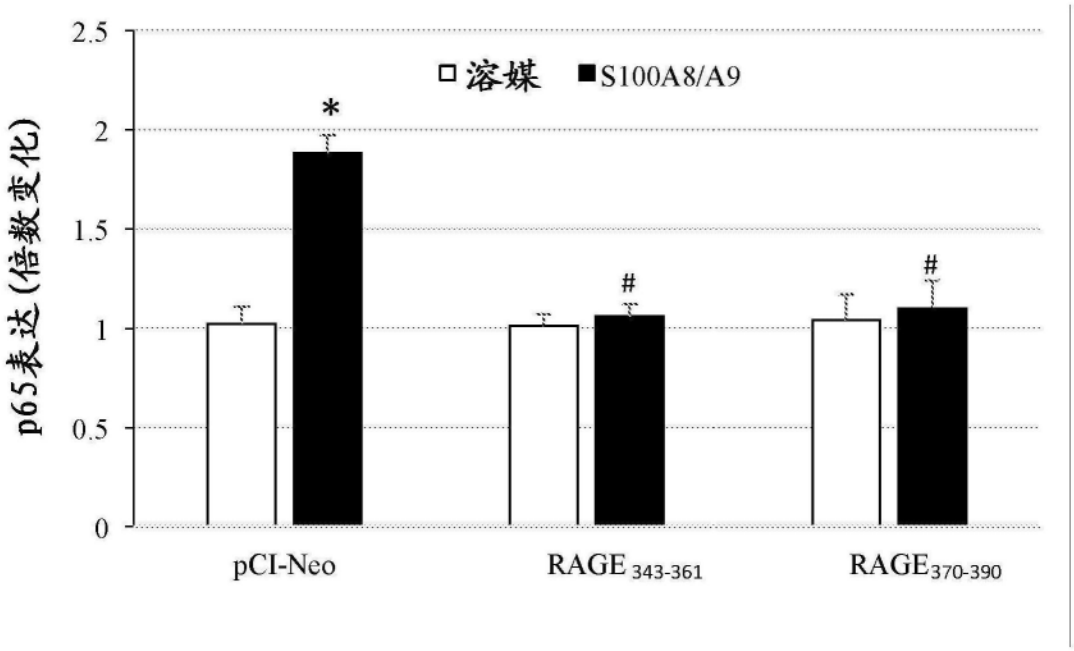

2.5
2
1.5
1
0.5
0
p65表达(倍数变化)
溶媒
S100A8/A9
*
#
#
pCI-Neo
RAGE 343-361
RAGE370-390

图21I

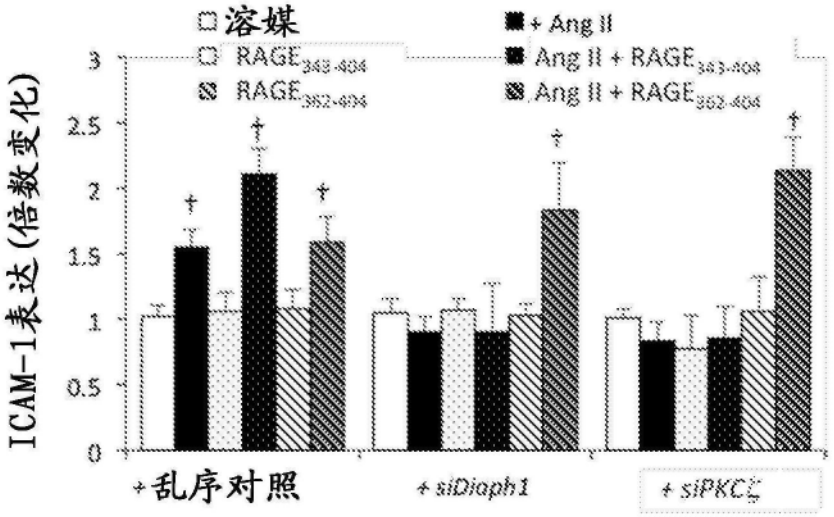

溶媒
RAGE343-404
RAGE352-404
+ Ang II
Ang II + RAGE343-404
Ang II + RAGE352-404
ICAM-1表达(倍数变化)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
+乱序对照
+ siDiaph1
+ siPKCζ

图21J