

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 5/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480024804. X

[43] 公开日 2006 年 10 月 25 日

[11] 公开号 CN 1852919A

[22] 申请日 2004. 7. 15

[21] 申请号 200480024804. X

[30] 优先权

[32] 2003. 7. 15 [33] US [31] 60/487,889

[86] 国际申请 PCT/US2004/022753 2004. 7. 15

[87] 国际公布 WO2005/010022 英 2005. 2. 3

[85] 进入国家阶段日期 2006. 2. 28

[71] 申请人 马里兰州巴尔的摩大学

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 A·法萨诺 S·N·沃格尔

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 沙 捷 彭益群

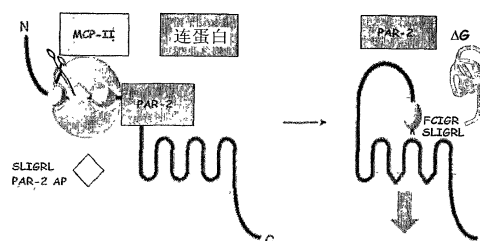
权利要求书 10 页 说明书 27 页 序列表 10 页
附图 8 页

[54] 发明名称

ZOT 和连蛋白受体的激动剂多肽

[57] 摘要

本发明鉴别一种受体蛋白的激动剂多肽。该激动剂可用于促进药物和抗原的吸收。适当的给药途径包括口服、鼻、经皮、以及静脉内。药物配方可以包含与该激动剂多肽结合的治疗剂或免疫原性制剂。



1. 一种连蛋白和霍乱弧菌噬菌体 CTXΦ ZOT 蛋白的人类受体的
激动剂多肽，所述的激动剂多肽包含 FCIGRL (SEQ ID NO: 4)，其中
5 所述多肽的长度小于 100 个氨基酸残基。

2. 根据权利要求 1 所述的激动剂多肽，其中所述的多肽由氨基酸
残基 FCIGRL (SEQ ID NO: 4) 组成。

10 3. 根据权利要求 1 所述的激动剂多肽，其中所述的多肽不包含
SEQ ID NO: 1 的残基 294-298。

4. 根据权利要求 1 所述的激动剂多肽，其中所述多肽的长度小于
50 个氨基酸残基。
15

5. 根据权利要求 1 所述的激动剂多肽，其中所述多肽的长度小于
40 个氨基酸残基。

6. 根据权利要求 1 所述的激动剂多肽，其中所述多肽的长度小于
20 30 个氨基酸残基。

7. 根据权利要求 1 所述的激动剂多肽，其中所述多肽的长度小于
20 个氨基酸残基。

25 8. 根据权利要求 1 所述的激动剂多肽，其中所述多肽的长度小于
10 个氨基酸残基。

9. 根据权利要求 1 所述的激动剂多肽，其中所述多肽的长度小于
8 个氨基酸残基。
30

10. 一种治疗疾病的药物组合物，其包括：
治疗所述疾病的治疗剂；和

根据权利要求 1 所述的激动剂多肽。

11. 一种治疗疾病的药物组合物，其包括：

治疗所述疾病的治疗剂；和

5 根据权利要求 2 所述的激动剂多肽。

12. 根据权利要求 10 所述的药物组合物，其中所述的疾病是食物过敏。

10 13. 根据权利要求 10 所述的药物组合物，其中所述的疾病是肠胃传染。

14. 根据权利要求 10 所述的药物组合物，其中所述的疾病是自身免疫性疾病。

15

15. 根据权利要求 10 所述的药物组合物，其中所述的疾病是炎症性肠病。

16. 根据权利要求 10 所述的药物组合物，其中所述的疾病是乳糜
20 泻。

17. 根据权利要求 10 所述的药物组合物，其中所述的疾病是胃肠炎症。

25 18. 根据权利要求 10 所述的药物组合物，其中所述的治疗剂是药物。

19. 根据权利要求 10 所述的药物组合物，其中所述的治疗剂是生物活性肽。

30

20. 根据权利要求 10 所述的药物组合物，其中所述的治疗剂是抗体。

21. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中所述的治疗剂是抗体片段。

22. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中所述的治疗剂是单
5 链抗体 (ScFv)。

23. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中所述的治疗剂是抗癌药物。

10 24. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中所述的治疗剂是抗生素。

25. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中所述的治疗剂是激素。

15 26. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中所述的治疗剂是细胞因子。

27. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中所述治疗剂与所述
20 激动剂多肽的比例为 1: 10 至 5: 1。

28. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中所述治疗剂与所述激动剂多肽的比例为 1: 5 至 2: 1。

25 29. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中所述的治疗剂以心脏为目标。

30. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中所述的治疗剂以脑为目标。

30 31. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中所述的治疗剂以肠为目标。

32. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中所述的治疗剂以肾脏为目标。

5 33. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中所述激动剂多肽的存在量足以促进所述治疗剂在心脏中吸收。

34. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中所述激动剂多肽的存在量足以促进所述治疗剂在脑中吸收。

10 35. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中所述激动剂多肽的存在量足以促进所述治疗剂在肠中吸收。

36. 根据权利要求 10 所述的药物组合物, 其中所述激动剂多肽的存在量足以促进所述治疗剂在肾脏中吸收。

15

37. 一种向靶组织输送治疗剂的方法, 其包括:
用根据权利要求 12 所述的组合物为患有所述疾病的患者给药。

20 38. 一种向靶组织输送治疗剂的方法, 其包括:
用根据权利要求 13 所述的组合物为患有所述疾病的患者给药。

39. 一种向靶组织输送治疗剂的方法, 其包括:
用根据权利要求 14 所述的组合物为患有所述疾病的患者给药。

25 40. 一种向靶组织输送治疗剂的方法, 其包括:
用根据权利要求 15 所述的组合物为患有所述疾病的患者给药。

41. 一种向靶组织输送治疗剂的方法, 其包括:
用根据权利要求 16 所述的组合物为患有所述疾病的患者给药。

30

42. 一种向靶组织输送治疗剂的方法, 其包括:
用根据权利要求 17 所述的组合物为患有所述疾病的患者给药。

43. 一种向靶组织输送治疗剂的方法，其包括：
用根据权利要求 33 所述的组合物为患有所述疾病的患者给药。
- 5 44. 一种向靶组织输送治疗剂的方法，其包括：
用根据权利要求 34 所述的组合物为患有所述疾病的患者给药。
45. 一种向靶组织输送治疗剂的方法，其包括：
用根据权利要求 35 所述的组合物为患有所述疾病的患者给药。
- 10 46. 一种向靶组织输送治疗剂的方法，其包括：
用根据权利要求 36 所述的组合物为患有所述疾病的患者给药。
47. 一种向靶组织输送治疗剂的方法，其包括：
用根据权利要求 10 所述的组合物通过患者的鼻腔为患有所述疾病
15 的患者给药。
48. 一种向靶组织输送治疗剂的方法，其包括：
用根据权利要求 10 所述的组合物通过患者的口腔为患有所述疾病
的患者给药。
- 20 49. 一种向靶组织输送治疗剂的方法，其包括：
用根据权利要求 10 所述的组合物通过患者的皮肤为患有所述疾病
的患者给药。
- 25 50. 一种向靶组织输送治疗剂的方法，其包括：
用根据权利要求 10 所述的组合物通过患者的血液为患有所述疾病
的患者给药。
51. 一种鉴别或提纯连蛋白和霍乱弧菌噬菌体 CTXΦ Zot 的人类
30 受体的方法，其包括：
在适合抗体抗原结合的条件下，使包含一种或多种蛋白的样本与
针对如 SEQ ID NO: 5 中所示的氨基酸 SLIGKVDGTSHVTG 培养的抗

体接触；

除去样本中未与所述抗体结合的蛋白，其中将结合在所述抗体上的蛋白鉴别为连蛋白和 Zot 的人类受体，或者鉴别为形成富含所述受体的制剂。

5

52. 根据权利要求 51 所述的方法，其进一步包括如下步骤：

用富含所述受体的制剂使哺乳动物免疫；

从所述哺乳动物中采集抗体以形成与所述受体结合的抗体制剂。

10

53. 根据权利要求 51 所述的方法，其中所述的样本选自肠细胞、肠上皮细胞、内皮细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、及其溶解产物。

54. 一种筛选治疗疾病的药物候选物的方法，其包括：

使抗体 SAM11 所识别的第一种人类蛋白与选自霍乱弧菌噬菌体 CTX Φ Zot、人类连蛋白、和 MyD88 的第二种蛋白相接触，其中该接
15 触在存在和不存在测试物质的情况下分别进行；

将存在测试物质的情况下第一种蛋白结合到第二种蛋白上的量与不存在测试物质的情况下的结合量进行比较；

如果测试物质降低了第一种蛋白在第二种蛋白上结合的量，则将
20 该测试物质鉴别为药物候选物。

55. 根据权利要求 54 所述的方法，其中所述的第二种蛋白是 Zot。

56. 根据权利要求 54 所述的方法，其中所述的第二种蛋白是连蛋
25 白。

57. 根据权利要求 54 所述的方法，其中所述的第二种蛋白是 MyD88。

30 58. 根据权利要求 54 所述的方法，其中所述的第二种蛋白是 Zot 的 ΔG 片段 (SEQ ID NO: 6)。

59. 一种诱发免疫反应的疫苗组合物，其包含：
诱发免疫反应的免疫原性制剂；和
根据权利要求 1 所述的激动剂多肽。

- 5 60. 一种诊断患者体内自身免疫性疾病的方法，其包括：
使来自患者的第一份人体样本与针对如 SEQ ID NO: 5 中所示的
氨基酸 SLIGKVDGTSHVTG 培养的抗体相接触；
将所述第一份人体样本所结合的抗体的量，与不患有自身免疫性
疾病的健康对照的第二份人体样本所结合的量进行比较；
10 如果所述第一份人体样本比所述第二份人体样本结合更多的抗
体，则鉴别出自身免疫性疾病。

61. 一种用相对于对照健康个体增加的连蛋白表达来治疗患者的
方法，其包括：
15 用针对如 SEQ ID NO: 5 中所示的氨基酸 SLIGKVDGTSHVTG 培
养的抗体为患者给药，从而减轻疾病的症状。

62. 根据权利要求 61 所述的方法，其中所述的疾病是癌症。

- 20 63. 根据权利要求 61 所述的方法，其中所述的疾病是自身免疫性
疾病。

64. 根据权利要求 61 所述的方法，其中所述的疾病是血管病。

- 25 65. 根据权利要求 61 所述的方法，其中所述的疾病是细菌感染。

66. 根据权利要求 61 所述的方法，其中所述的疾病是胃炎。

67. 根据权利要求 61 所述的方法，其中所述的疾病是胃癌。

- 30 68. 根据权利要求 61 所述的方法，其中所述的疾病是胶原性结肠
炎。

69. 根据权利要求 61 所述的方法, 其中所述的疾病是炎症性肠病。

70. 根据权利要求 61 所述的方法, 其中所述的疾病是乳糜泻。

5 71. 根据权利要求 61 所述的方法, 其中所述的疾病是系统性红斑狼疮。

72. 根据权利要求 61 所述的方法, 其中所述的疾病是食物过敏。

10 73. 根据权利要求 61 所述的方法, 其中所述的疾病是哮喘。

74. 根据权利要求 61 所述的方法, 其中所述的疾病是过敏性肠综合症。

15 75. 一种针对如 SEQ ID NO: 5 中所示的氨基酸 SLIGKVDGTSHVTG 培养的抗体, 其与 CaCo2 细胞中表达的蛋白结合, 所述蛋白与合成抑制剂肽 FZ1/0 (如 SEQ ID NO: 3 中所示) 所结合的蛋白共同定位, 并且所述抗体不与表达重组人类 PAR-2 的人类或大鼠细胞结合, 其中所述抗体不是 SAM11。

20 76. 一种抗体, 其与 CaCo2 细胞中表达的蛋白结合, 所述蛋白与合成抑制剂肽 FZ1/0 (如 SEQ ID NO: 3 中所示) 所结合的蛋白共同定位, 并且所述抗体不与表达重组人类 PAR-2 的人类或大鼠细胞结合, 其中所述抗体不是 SAM11。

25 77. 一种连蛋白和霍乱弧菌噬菌体 CTXΦ ZOT 蛋白的人类受体的激动剂多肽, 所述的激动剂多肽含有选自如下的序列,

Xaa₁ Cys Ile Gly Arg Leu (SEQ ID NO: 7),

Phe Xaa₂ Ile Gly Arg Leu (SEQ ID NO: 8),

30 Phe Cys Xaa₃ Gly Arg Leu (SEQ ID NO: 9),

Phe Cys Ile Xaa₄ Arg Leu (SEQ ID NO: 10),

Phe Cys Ile Gly Xaa₅ Leu (SEQ ID NO: 11),

Phe Cys Ile Gly Arg Xaa₆ (SEQ ID NO: 12),
其中所述多肽的长度小于 100 个氨基酸残基, 其中 Xaa₁ 选自 Ala、Val、
Leu、Ile、Pro、Trp、Tyr 和 Met; 其中 Xaa₂ 选自 Gly、Ser、Thr、Tyr、
Asn 和 Gln; Xaa₃ 选自 Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Trp 和 Met; Xaa₄ 选
5 自 Gly、Ser、Thr、Tyr、Asn、Ala 和 Gln; Xaa₅ 选自 Lys 和 His; Xaa₆
选自 Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Trp 和 Met。

78. 根据权利要求 77 所述的激动剂多肽, 其中所述的多肽由 6 个
氨基酸残基组成。

10

79. 一种连蛋白和霍乱弧菌噬菌体 CTXΦ ZOT 蛋白的人类受体的
激动剂多肽, 所述的激动剂多肽含有选自如下的序列:

Xaa₁ Xaa₂ Ile Gly Arg Leu (SEQ ID NO: 13),
Xaa₁ Cys Xaa₃ Gly Arg Leu (SEQ ID NO: 14),
15 Xaa₁ Cys Ile Xaa₄ Arg Leu (SEQ ID NO: 15),
Xaa₁ Cys Ile Gly Xaa₅ Leu (SEQ ID NO: 16),
Xaa₁ Cys Ile Gly Arg Xaa₆ (SEQ ID NO: 17),
Phe Xaa₂ Xaa₃ Gly Arg Leu (SEQ ID NO: 18),
Phe Xaa₂ Ile Xaa₄ Arg Leu (SEQ ID NO: 19),
20 Phe Xaa₂ Ile Gly Xaa₅ Leu (SEQ ID NO: 20),
Phe Xaa₂ Ile Gly Arg Xaa₆ (SEQ ID NO: 21),
Phe Cys Xaa₃ Xaa₄ Arg Leu (SEQ ID NO: 22),
Phe Cys Xaa₃ Gly Xaa₅ Leu (SEQ ID NO: 23),
Phe Cys Xaa₃ Gly Arg Xaa₆ (SEQ ID NO: 24),
25 Phe Cys Ile Xaa₄ Xaa₅ Leu (SEQ ID NO: 25),
Phe Cys Ile Xaa₄ Arg Xaa₆ (SEQ ID NO: 26), 和
Phe Cys Ile Gly Xaa₅ Xaa₆ (SEQ ID NO: 27),
其中所述多肽的长度小于 100 个氨基酸残基, 其中 Xaa₁ 选自 Ala、Val、
Leu、Ile、Pro、Trp、Tyr 和 Met; 其中 Xaa₂ 选自 Gly、Ser、Thr、Tyr、
Asn 和 Gln; Xaa₃ 选自 Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Trp 和 Met; Xaa₄ 选
30 自 Gly、Ser、Thr、Tyr、Asn、Ala 和 Gln; Xaa₅ 选自 Lys 和 His; Xaa₆

选自 Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Trp 和 Met。

80. 根据权利要求 79 所述的激动剂多肽，其中所述的多肽由 6 个氨基酸残基组成。

5

ZOT 和连蛋白受体的激动剂多肽

- 5 本申请要求 2003 年 7 月 15 日提交的临时申请第 60/487,889 号的
优先权，在此特别引入其公开内容。

技术领域

- 本发明涉及诊断、治疗、药学、药物发现及免疫治疗领域。具体
10 来说，它涉及操作和使用 Zot/连蛋白/受体体系来改善健康。

背景技术

- 肠紧密连接机能障碍（intestinal tight junction dysfunction）发生在
包括食物过敏、肠胃传染、自身免疫性疾病和炎症性肠病的多种临床
15 状态中（42）。健康、成熟的肠黏膜及其完整的紧密连接充当着大分子
通过的主要屏障。在健康状态期间，少量的免疫活性抗原穿过肠宿主
屏障。这些抗原通过至少两种途径穿过黏膜得以吸收。大多数吸收的
蛋白（多达 90%）经由跨细胞途径穿过肠屏障，随后进行将蛋白转化
成更小的非免疫原性肽的溶酶体降解。这些残余的肽作为完整的蛋白
20 通过细胞旁（paracellular）途径被转运；它涉及对细胞间紧密连接的微
妙但是复杂的调节，其导致了抗原耐受性。当紧密连接体系的完整性
被损害时，如由于早熟或者在暴露于辐射、化学治疗和/或毒素后，可
能引发有害的对环境抗原的免疫反应（包括自身免疫性疾病和食物过
敏）。本领域一直需要诊断和治疗这样的疾病和状况。本领域一直需要
25 鉴别治疗这种疾病的新药。

- 几种微生物对上皮细胞施加了不可逆的致细胞病变效应，其影响
了细胞骨架组构和紧密连接功能。这些细菌或者直接改变肠的通透性
（即 EPEC），或者通过毒素的精制来改变肠的通透性（例如 *Clostridium*
difficile, *Bacteroides fragilis*）（43）。霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ ZOT 蛋白
30 模拟人类蛋白连蛋白，并利用紧密连接调节的生理学机制。Zot 具有多
个结构域，其使得蛋白具有作为霍乱弧菌噬菌体 CTXΦ 的形态发生噬

菌体肽和作为调节肠紧密连接的肠毒素的双重功能。Zot 作用由细胞内活动的串联介导，该细胞内活动的串联导致关键处定位以调节细胞旁途径的肌动蛋白微丝发生依赖 PKC α 的聚合 (38)。毒素通过与肠细胞表面的相互作用施加它的影响。Zot 结合在肠内变化，其在空肠和回肠
5 末端是可检测的，并沿着绒毛状隐窝轴降低，而在结肠中是检测不到的 (44)。这一结合分布符合 Zot 对肠通透性的区域性效应 (44)，并符合成熟绒毛细胞中的 Zot 诱发的优先 F-肌动蛋白的重分配 (38)。

发明内容

10 本发明第一个实施方式是连蛋白和霍乱弧菌噬菌体 CTX Φ ZOT 蛋白的人类受体的激动剂多肽。该激动剂多肽包含氨基酸序列 FCIGRL (SEQ ID NO: 4)。多肽的长度小于 100 个氨基酸残基。

本发明的第二个实施方式是治疗疾病的药物组合物。该组合物包含治疗疾病的治疗剂、以及连蛋白和霍乱弧菌噬菌体 CTX Φ ZOT 蛋白
15 的人类受体的激动剂多肽。激动剂多肽包含氨基酸序列 FCIGRL (SEQ ID NO: 4)。多肽的长度小于 100 个氨基酸残基。

本发明的第三个实施方式是向靶组织输送治疗剂的方法。将治疗疾病的治疗剂、和连蛋白和霍乱弧菌噬菌体 CTX Φ ZOT 蛋白的人类受体的激动剂多肽施用给患有疾病的患者。激动剂多肽包含氨基酸序列
20 FCIGRL (SEQ ID NO: 4)。多肽的长度小于 100 个氨基酸残基。

本发明的第四个实施方式是向靶组织输送治疗剂的方法。将治疗疾病的治疗剂、和连蛋白和霍乱弧菌噬菌体 CTX Φ ZOT 蛋白的人类受体的激动剂多肽通过患病患者的鼻腔给药。激动剂多肽包含氨基酸序列
FCIGRL (SEQ ID NO: 4)。多肽的长度小于 100 个氨基酸残基。

25 本发明的第五个实施方式是向靶组织输送治疗剂的方法。将治疗疾病的治疗剂、和连蛋白和霍乱弧菌噬菌体 CTX Φ ZOT 蛋白的人类受体的激动剂多肽通过患病患者的口腔给药。激动剂多肽包含氨基酸序列 FCIGRL (SEQ ID NO: 4)。多肽的长度小于 100 个氨基酸残基。

本发明的第六个实施方式是向靶组织输送治疗剂的方法。将治疗
30 疾病的治疗剂、和连蛋白和霍乱弧菌噬菌体 CTX Φ ZOT 蛋白的人类受体的激动剂多肽通过患病患者的皮肤给药。激动剂多肽包含氨基酸序

列 FCIGRL (SEQ ID NO: 4)。多肽的长度小于 100 个氨基酸残基。

本发明的第七个实施方式是向靶组织输送治疗剂的方法。将治疗疾病的治疗剂、和连蛋白和霍乱弧菌噬菌体 CTXΦ ZOT 蛋白的人类受体的激动剂多肽通过患病患者的血液给药。激动剂多肽包含氨基酸序
5 列 FCIGRL (SEQ ID NO: 4)。多肽的长度小于 100 个氨基酸残基。

本发明的第八个实施方式是鉴别或提纯连蛋白和霍乱弧菌噬菌体 CTXΦ Zot 的人类受体的方法。在适于抗体抗原结合的条件下,使包含一种或多种蛋白的样本与抗体接触。培养针对如 SEQ ID NO: 5 中所示的氨基酸 SLIGKVDGTSHVTG 的抗体。除去样本中未与抗体结合的
10 蛋白。将结合在抗体上的蛋白鉴别为连蛋白和 Zot 的人类受体,或者鉴别为形成富含所述受体的制剂。

本发明的第九个实施方式是筛选治疗疾病的药物候选物的方法。使抗体 SAM11 所识别的第一种人类蛋白与选自霍乱弧菌噬菌体 CTXΦ Zot、人类连蛋白和 MyD88 的第二种蛋白相接触。在存在和不存在测试物质的情况下分别进行接触。将第一种蛋白在测试物质的存在下结合到第二种蛋白上的量,与不存在测试物质的情况下的结合量进行比较。如果测试物质降低了第一种蛋白在第二种蛋白上结合的量,则将该测试物质鉴别为药物候选物。
15

本发明的第十个实施方式是诱发免疫反应的疫苗组合物。该疫苗
20 包含诱发免疫反应的免疫原性制剂、和连蛋白和霍乱弧菌噬菌体 CTXΦ ZOT 蛋白的人类受体的激动剂。激动剂多肽包含氨基酸序列 FCIGRL (SEQ ID NO: 4)。多肽的长度小于 100 个氨基酸残基。

本发明的第十一个实施方式是诊断患者体内自身免疫性疾病的方法。使来自患者的第一份人体样本与针对如 SEQ ID NO: 5 中所示的氨基酸 SLIGKVDGTSHVTG 培养的抗体相接触。将第一份人体样本所结合的抗体的量,与不患有自身免疫性疾病的健康对照的第二份人体样本所结合的量进行比较。如果第一份人体样本比第二份样本结合更多的抗体,则鉴别出患者的自身免疫性疾病。
25

本发明的第十二的实施方式是用相对于对照的健康个体增加的连
30 蛋白表达来治疗患者的方法。用针对如 SEQ ID NO: 5 中所示的氨基酸 SLIGKVDGTSHVTG 培养的抗体为患者给药。由此减轻疾病的症状。

本发明的第十三个实施方式是针对如 SEQ ID NO: 5 中所示的氨基酸 SLIGKVDGTSHVTG 培养的抗体。该抗体与 CaCo2 细胞中表达的蛋白结合，该蛋白与合成抑制剂肽 FZ1/0（如 SEQ ID NO: 3 中所示）所结合的蛋白共同定位。该抗体不与表达重组人类 PAR-2 的人类或大
5 鼠细胞结合。该抗体不是 SAM11。

本发明的第十四个实施方式是与 CaCo2 细胞中表达的蛋白结合的抗体，该蛋白与合成抑制剂肽 FZ1/0（如 SEQ ID NO: 3 中所示）所结合的蛋白共同定位。该抗体不与表达重组人类 PAR-2 的人类或大鼠细胞结合。该抗体不是 SAM11。

10 本发明的第十五个实施方式是连蛋白和霍乱弧菌噬菌体 CTXΦ ZOT 蛋白的人类受体的激动剂多肽。该促效剂多肽含有选自 Xaa₁ Cys Ile Gly Arg Leu (SEQ ID NO: 7)、Phe Xaa₂ Ile Gly Arg Leu (SEQ ID NO: 8)、Phe Cys Xaa₃ Gly Arg Leu (SEQ ID NO: 9)、Phe Cys Ile Xaa₄ Arg Leu (SEQ ID NO: 10)、Phe Cys Ile Gly Xaa₅ Leu (SEQ ID NO: 11) 和
15 Phe Cys Ile Gly Arg Xaa₆ (SEQ ID NO: 12) 的序列。多肽的长度小于 100 个氨基酸残基。Xaa₁ 选自 Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Trp、Tyr 和 Met；Xaa₂ 选自 Gly、Ser、Thr、Tyr、Asn 和 Gln；Xaa₃ 选自 Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Trp 和 Met；Xaa₄ 选自 Gly、Ser、Thr、Tyr、Asn、Ala 和 Gln；Xaa₅ 选自 Lys 和 His；Xaa₆ 选自 Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Trp
20 和 Met。

本发明的第十六个实施方式是连蛋白和霍乱弧菌噬菌体 CTXΦ ZOT 蛋白的人类受体的激动剂多肽。该促效剂多肽含有选自 Xaa₁ Xaa₂ Ile Gly Arg Leu (SEQ ID NO: 13)、Xaa₁ Cys Xaa₃ Gly Arg Leu (SEQ ID NO: 14)、Xaa₁ Cys Ile Xaa₄ Arg Leu (SEQ ID NO: 15)、Xaa₁ Cys Ile Gly
25 Xaa₅ Leu (SEQ ID NO: 16)、Xaa₁ Cys Ile Gly Arg Xaa₆ (SEQ ID NO: 17)、Phe Xaa₂ Xaa₃ Gly Arg Leu (SEQ ID NO: 18)、Phe Xaa₂ Ile Xaa₄ Arg Leu (SEQ ID NO: 19)、Phe Xaa₂ Ile Gly Xaa₅ Leu (SEQ ID NO: 20)、Phe Xaa₂ Ile Gly Arg Xaa₆ (SEQ ID NO: 21)、Phe Cys Xaa₃ Xaa₄ Arg Leu (SEQ ID NO: 22)、Phe Cys Xaa₃ Gly Xaa₅ Leu (SEQ ID NO: 23)、
30 Phe Cys Xaa₃ Gly Arg Xaa₆ (SEQ ID NO: 24)、Phe Cys Ile Xaa₄ Xaa₅ Leu (SEQ ID NO: 25)、Phe Cys Ile Xaa₄ Arg Xaa₆ (SEQ ID NO: 26) 和

Phe Cys Ile Gly Xaa₅ Xaa₆ (SEQ ID NO: 27) 的序列。多肽的长度小于 100 个氨基酸残基。Xaa₁ 选自 Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Trp、Tyr 和 Met; Xaa₂ 选自 Gly、Ser、Thr、Tyr、Asn 和 Gln; Xaa₃ 选自 Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Trp 和 Met; Xaa₄ 选自 Gly、Ser、Thr、Tyr、Asn、Ala 和 Gln; Xaa₅ 选自 Lys 和 His; Xaa₆ 选自 Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Trp 和 Met。

经阅读本说明书, 这些及其它实施方式对于本领域的技术人员将是显而易见的, 它为本领域提供了治疗疾病、诊断疾病和发现药物的药剂和方法。

10

附图说明

图 1A 和 1B. 自肠组织溶解产物得到的六个 HPLC 组分的 Comassie (图 1A) 和蛋白质免疫印迹 (图 1B)。连蛋白-阳性组分 F5 显示了其它五个组分中不存在的~23kDa。

15 图 2A 和 2B. 暴露于荧光标记的 FZI/0 (图 2A) 或 FZI/1 (图 2B) 的大鼠小肠的原位免疫荧光显微术。注意绒毛的上三分之一处的荧光分布, 最初对其中的 Zot/连蛋白受体进行了描述 (参见参考文献 44)。

图 3A-3C. PAR-2-FZI/0 的共同定位。用 FITC-FZI/0 (图 3A) 或小鼠抗-人 PAR2 单克隆抗体 (图 3B) 对 Caco 2 细胞进行免疫印迹。20 两个图像的重叠 (图 3C) 显示了 PAR-2 和 FZI/0 免疫荧光微粒的共同定位。

图 4A-4D. FZI/0-PAR-2 AP 竞争性结合实验。与暴露于培养基对照的细胞 (图 4A) 相比, 暴露于 FITC-标记的 FZI/0 的 Caco2 细胞 (图 4B) 显示出数目众多的荧光微粒。过量的 PAR2-AP (100x) 置换了 FZI/0 (图 4C), 而 100x 的合成的肽则不会 (图 4D)。

25 图 5A-5D. 暴露于 PAR2-AP (图 5A)、BSA (图 5B)、PAR2-AP+FZI/0 (图 5C) 或 PAR-2 AP+FZI/1 (图 5D) 的 Caco2 细胞中的肌动蛋白细胞骨架排列。

图 6A-6B. MCP-II (图 6A) 和 PAR-2 AP (图 6B) 对小鼠肠 TEER 的影响。与对照组织 (◇) 相比, MCP-II (○) 和 PAR-2 AP (△) 二者均诱发了 TEER 的显著下降。这些变化与 ΔG-诱发的变化 (■) 是可比

较的，并且通过用 FZI/0 预温育完全防止了这些变化 (x)。

图 7A-7B. PAR-2 AP 对野生型 (图 7A) 和 MyD88 KO (图 7B) 小鼠体内肠 TEER 的影响。在野生型小鼠体内，与对照组织 (◇) 相比，PAR-2 AP (△) 和 ΔG (■) 二者均诱发了 TEER 的显著下降，通过用 FZI/0 预温育则完全防止了这种下降 (x)。在任何处理条件下均未观察到 MyD88 KO 小鼠体内的 TEER 变化。

图 8. 提出的受体被 Zot 和连蛋白的激活。作为 MCP-II 类似物，连蛋白通过切割其 N-端来激活受体，而 Zot 通过其 PAR-2 AP-同源的 N-端基序直接结合并激活受体。PAR-2 被 MCP-II 和 PAR-2 AP 激活，或者连蛋白受体被连蛋白和 ΔG 激活，被竞争性结合抑制剂 FZI/0 所阻断。

具体实施方式

发明人开发了一种连蛋白和霍乱弧菌噬菌体 CTXΦ ZOT 蛋白的人类受体的激动剂多肽。该激动剂多肽包含氨基酸序列 FCIGRL (SEQ ID NO: 4)。该多肽小于 100 个氨基酸残基，或者小于 50、40、30、20、10 或 8 个氨基酸残基。该多肽可以仅含 6 个氨基酸 FCIGRL (SEQ ID NO: 4)，或者它可以含有另外的氨基酸。其它的氨基酸可以提供其它的功能，例如利于提纯抗原标记。

该激动剂多肽可以用于促进治疗剂或免疫原性制剂的吸收。该激动剂多肽促进了穿过肠、血-脑屏障、皮肤和鼻黏膜的吸收。因此可以将该激动剂多肽与靶向肠、脑、皮肤和鼻的治疗剂或免疫原性制剂配制或者共同给药。根据本发明的药物组合物不需要在给药之前预先混合，而是能够在将两种制剂彼此给药的 24 小时之内在体内形成。优选将两种制剂彼此在 12、8、4、2 或 1 小时之内给药。

根据本发明的治疗剂是可以用于治疗人类或其它哺乳动物的任何治疗剂。举例来说，治疗剂可以是抗体或抗体片段 (例如 Fab、F(ab')₂、单链抗体 (ScFv))、抗癌药物、抗生素、激素或者细胞因子。治疗剂可以是作用于身体任何器官的治疗剂，如心脏、脑、肠或者肾脏。根据本发明可以治疗的疾病包括但不限于食物过敏、肠胃传染、自身免疫性疾病、炎症性肠病、乳糜泻、胃肠炎症。

输送至脑的静脉内剂量组合物在本领域中是公知的。这样的静脉内剂量组合物主要包括生理稀释剂，例如蒸馏水或者 0.9% (w/v) 的 NaCl。

“鼻”输送组合物与“肠”输送组合物的不同之处在于后者必须具有胃抵抗性质以防止活性物质（例如连蛋白受体激动剂和治疗剂）在胃中发生酸降解，而前者主要包含直径为大约 50 μm 的水溶性聚合物，以降低黏液纤毛清除功能并达到经鼻腔给药的制剂可重复的生物利用率。“静脉内”输送组合物与“鼻”和“肠”输送组合物二者的不同之处在于“静脉内”输送组合物不需要胃抵抗性或水溶性聚合物。

给药的方式对于本发明并不关键。给药的方式可以是口服用于肠输送；鼻内用于鼻输送；和静脉内用于通过血脑屏障输送。也可使用其它本领域已知的给药方式，包括但不限于鞘内、肌肉内、支气管内、直肠内、眼内和阴道内给药。

用于小肠输送的口服剂量组合物在本领域中是公知的。这样的口服剂量组合物可以包括胃抵抗性药片或胶囊（Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Eds. Osol, Mack Publishing Co., Chapter 89 (1980); Digenis 等人, J. Pharm. Sci., 83: 915-921 (1994); Vantini 等人, Clinica Terapeutica, 145: 445-451 (1993); Yoshitomi 等人, Chem. Pharm. Bull., 40: 1902-1905 (1992); Thoma 等人, Pharmazie, 46: 331-336 (1991); Morishita 等人, Drug Design and Delivery, 7: 309-319 (1991); 和 Lin 等人, Pharmaceutical Res., 8: 919-924 (1991); 在此引入各自的全部内容作为参考）。

可以通过加入诸如邻苯二甲酸醋酸纤维素或对苯二甲酸醋酸纤维素使药片具有胃抵抗性。

胶囊是将生物活性成分（或多种生物活性成分）包封在硬性或软性的可溶性外皮或明胶壳中的固体剂型。通过水解可以从胶原材料中得到用于胶囊制造的明胶。明胶有两种类型。通过酸处理从猪皮得到的类型 A 和通过碱处理从骨骼和动物皮得到的类型 B。硬性明胶胶囊的使用使得人们可以选择被视为对个体受试者最佳精确剂量水平的单个生物活性成分或其组合。硬性明胶胶囊典型地由两部分组成，其一套接另一部分，从而将生物活性成分完全包围。通过向胶囊的较长一

端中引入生物活性成分或者含有生物活性成分的胃抵抗性小珠，然后套上帽来填充这些胶囊。硬性明胶胶囊主要从明胶、FD&C 着色剂制成，有时从例如二氧化钛的遮光剂制成。USP 允许该用途的胶囊含有 0.15% (w/v) 的二氧化硫，以防止制造过程中的分解。

5 用于小肠输送的口服剂量组合物还包括可以任选地含有水相缓冲剂的液体组合物，所述的水相缓冲剂防止治疗剂和激动剂多肽由于胃中的胃液而严重失活，从而使得生物活性成分和激动剂多肽以活性形式抵达小肠。可以用于本发明的这种水相缓冲剂的例子包括碳酸氢盐缓冲液 (pH 5.5 至 8.7，优选大约 pH 7.4)。

10 当口服剂量组合物是液体组合物时，优选恰好在给药之前制备组合物，以使稳定性问题最小化。在这种情况下，可以通过将冻干的治疗剂和激动剂多肽溶于水相缓冲剂中来制备液体组合物。

 用于鼻输送的鼻剂量组合物在本领域中是公知的。这种鼻剂量组合物通常包含已经广泛用于制备药物剂型的水溶性聚合物 (Martin 等人, In: Physical Chemical Principles of Pharmaceutical Sciences, 3rd Ed., 第 592-638 页 (1983))，所述的药物剂型可以用作鼻给药的肽的载体 (Davis, In: Delivery Systems for Peptide Drugs, 125: 1-21 (1986))。已经显示嵌入到聚合物基质中的肽的鼻吸收，通过鼻粘液纤毛清除功能的延滞而得以促进 (Illum 等人, Int. J. Pharm., 46: 261-265 (1988))。

15 其它可能的促进机制包括浓度梯度增加或者肽吸收的扩散途径减少 (Ting 等人, Pharm. Res., 9: 1330-1335 (1992))。但是，已经预示降低粘液纤毛清除率是实现鼻给药体系药物的可重复生物利用率的良好方法 (Gonda 等人, Pharm. Res., 7: 69-75 (1990))。预计直径大约 50 μm 的微粒沉积在鼻腔中 (Bjork 等人, Int. J. Pharm., 62: 187-192 (1990))；

20 和 Illum 等人, Int. J. Pharm., 39: 189-199 (1987))，而直径小于 10 μm 的微粒能够从鼻过滤体系中逃逸并沉积在下气道中。直径大于 200 μm 的微粒将不会在鼻给药之后保留在鼻中 (Lewis 等人, Proc. Int. Symp. Control Rel. Bioact. Mater., 17: 280-290 (1990))。

 具体采用的水溶性聚合物对于本发明并不关键，可以选自任何公知的用于鼻剂型的水溶性聚合物。可用于鼻输送的水溶性聚合物的典型例子是聚乙烯醇 (PVA)。该物质是可膨胀的亲水聚合物，它的物理

30

性质取决于分子量、水解程度、交联密度和结晶度 (Peppas 等人, In: *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, 3: 109-131 (1987))。PVC 可以通过相分离、喷雾干燥、喷雾嵌入和喷雾-densation 用于分散材料的涂覆 (Ting 等人, 同上)。

- 5 本发明的“皮肤”输送组合物除了治疗剂或免疫原性制剂以外, 可以包括香料、膏状物、软膏、染色剂和其它化合物, 只要添加的成分不会对治疗剂或免疫原性制剂的经皮肤传递产生有害影响。还可以添加传统的药物可接受的乳化剂、表面活性剂、悬浮剂、抗氧化剂、渗透促进剂、膨胀剂、稀释剂和防腐剂。水溶性聚合物也可以用作载体。
- 10 体。

具体采用的治疗剂或免疫原性试剂对本发明并不关键, 其可以是例如任何药物化合物、生物活性肽、疫苗或者否则不论其大小或电荷, 不会通过跨细胞途径吸收的其它部分。

- 15 本发明可以采用的药物化合物的例子包括作用于心血管系统的药物、作用于中枢神经系统的药物、抗肿瘤药物和抗生素。本发明可以采用的作用于心血管系统的药物的例子包括利多卡因、腺苷、多巴酚丁胺、多巴胺、肾上腺素、去甲肾上腺素和酚妥拉明。也可以使用其它本领域公知的药物。

- 20 本发明可以采用的作用于中枢神经系统的药物的例子包括吗啉吡咯酮、阿尔芬太尼、氨甲苯环葵醇、环丁甲羟基吗啡、叔丁啡、烯丙羟吗啡酮、酮咯酸、咪达唑仑、普罗泼非、metacurine、醚洼科龙和琥珀酰碱。也可以使用其它本领域公知的药物。

本发明可以采用的抗肿瘤药物的例子包括阿糖胞苷、丝裂霉素、阿霉素、长春新碱和长春花碱。也可以使用其它本领域公知的药物。

- 25 本发明可以采用的抗生素的例子包括甲氧苯青霉素、美洛西林、哌哌青霉素、cetoxitin、头孢尼西、头孢美唑和氮噻酸单胺菌素。也可以使用其它本领域公知的药物。

- 30 本发明可以采用的生物活性肽的例子包括激素、淋巴因子、球蛋白、白蛋白。本发明可以采用的激素的例子包括睾酮、nandrolene、促卵泡激素、胰岛素和 urofolltropin。也可以使用其它本领域公知的生物活性肽。当生物活性肽是胰岛素时, 本发明的口服剂量组合物可用于

糖尿病的治疗。本发明可以采用的淋巴因子的例子包括 α 干扰素、 β 干扰素、 γ 干扰素、白细胞介素 1、白细胞介素 2、白细胞介素 4 和白细胞介素 8。

5 本发明可以采用的球蛋白的例子包括 α -球蛋白、 β -球蛋白和 γ -球蛋白(免疫球蛋白)。本发明可以采用的免疫球蛋白的例子包括多价 IgG 或特定的 IgG、IgA 和 IgM，例如抗破伤风抗体。本发明可以采用的白蛋白的例子是人血清白蛋白。也可以使用本领域公知的其它球蛋白和白蛋白。

10 本发明可以采用的疫苗的例子包括肽抗原和减毒微生物和病毒。本发明可以采用的肽抗原的例子包括肠产毒性大肠杆菌的热不稳定肠毒素的 B 亚单位、霍乱毒素的 B 亚单位、肠道病原体的荚膜抗原、肠道病原体的菌毛或伞毛、HIV 表面抗原、尘过敏原、和蜱螨过敏原。也可以使用本领域公知的其它疫苗。

15 本发明可以采用的减毒微生物和病毒的例子包括肠产毒性大肠杆菌、肠致病性大肠杆菌、霍乱弧菌、弗氏志贺菌、伤寒沙门氏菌和轮状病毒的减毒微生物和病毒 (Fasano 等人, In: *Le Vaccinazioni in Pediatria*, Eds. Vierucci 等人, CSH, Milan, 第 109-121 页 (1991); Guandalini 等人, In: *Management of Digestive and Liver Disorders in Infants and Children*, Elsevier, Eds. Butz 等人, Amsterdam, 第 25 章 (1993); Levine 等人, *Sem. Ped. Infect. Dis.*, 5: 243-250 (1994); 和 Kaper 等人, *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 48-86 (1995), 在此引入各自的全部内容作为参考)。

25 治疗剂或免疫原性制剂的用量对本发明并不关键，其取决于所选的具体成分、被治疗的疾病或症状以及被治疗的受试者的年龄、体重和性别而变化。

30 ZOT 受体激动剂多肽的用量对于本发明也并不关键，其取决于被治疗的受试者的年龄、体重和性别而变化。通常，本发明采用的促进生物活性成分被肠吸收的 ZOT 受体激动剂多肽的最终浓度在大约 10^{-5} M 至 10^{-10} M 的范围之内，优选大约 10^{-6} M 至 5.0×10^{-5} M。为了达到这样的最终肠内浓度，本发明单次口服剂量组合中 ZOT 受体激动剂多肽的量通常为大约 4.0 ng 至 1000 ng，优选大约 40 ng 至 80 ng。

所用治疗剂或免疫原性制剂与 ZOT 受体激动剂多肽的比例对于本发明并不关键，其取决于选定的时间期间内被输送的生物活性成分的量而变化。通常，本发明采用的治疗剂或免疫原性制剂与 ZOT 受体激动剂多肽的重量比在大约 1: 10 至 3: 1 的范围之内，优选大约 1: 5 至 2: 1。

可以诊断性、治疗性地、并且作为研究工具来使用与针对氨基酸 SLIGKVDGTSHVTG (SEQ ID NO: 5) 培养的抗体所识别的蛋白结合的抗体。SAM11 是一种这样的抗体，它自 Zymed Laboratories, South San Francisco, California 得到。使用培养单克隆或多克隆抗体的标准技术可以容易地制得其它这样的抗体。使用 SAM11 抗体或者其它与相同人类蛋白结合的抗体可以检测出疾病中连蛋白受体的增量调节。可以将抗体与诊断性可检测的标记结合。对于治疗用途，可以将抗体与包括放射性核素、抗肿瘤制剂等的治疗剂或毒性剂结合。

连蛋白和 Zot 受体蛋白的结合配偶体的识别使人们可以对干扰结合的测试物质进行化验。目前识别的结合配偶体包括 MyD88、连蛋白、Zot 和 ΔG 。可以使用两种蛋白的结合的任何化验。这些化验可以是体外或体内化验。化验可以采用抗体或固相结合底物。可以使用任何本领域公知的这样的化验。

具有 SEQ ID NO: 4 序列的激动剂多肽中可以进行将一个氨基酸换成具有类似性质的另一氨基酸的保守替换。保守替换的例子包括但不限于 Gly $\leftrightarrow$ Ala、Val $\leftrightarrow$ Ile $\leftrightarrow$ Leu、Asp $\leftrightarrow$ Glu、Lys $\leftrightarrow$ Arg、Asn $\leftrightarrow$ Gln、和 Phe $\leftrightarrow$ Trp $\leftrightarrow$ Tyr。保守性氨基酸替换典型地落入大约 1 至 2 个氨基酸残基的范围之内。使用本领域公知的计算机程序，例如 DNASTAR 软件，或者在 Dayhoff 等人(1978)的 *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) 中可以找到指导，确定哪些氨基酸残基可以被替换而不丧失生物或免疫活性。

氨基酸替换定义为一对一的氨基酸置换。当替换的氨基酸具有相似的结构和/或化学性质时，它们在本质上是保守性的。保守替换的例子为用异亮氨酸或缬氨酸替代亮氨酸、用谷氨酸替代天冬氨酸、或者用丝氨酸替代苏氨酸。

尤其优选的寡肽类似物包括本质上为保守性的替换物，即那些发

生在其侧链有关联的氨基酸种类之内的替换。具体来说，通常将氨基酸划分为以下几类：（1）酸性 – 天冬氨酸和谷氨酸；（2）碱性 – 赖氨酸、精氨酸、组氨酸；（3）非极性 – 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸；不带电极性 – 甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸；和（5）芳香性氨基酸 – 苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。例如，可以合理地预测亮氨酸与异亮氨酸或缬氨酸、天冬氨酸与谷氨酸、苏氨酸与丝氨酸的单独置换，或者氨基酸与结构相关氨基酸的相似的保守置换，不会对生物活性产生主要影响。

10 可以使用任何本领域公知的检测来测定 ZOT 受体激动剂的生物活性。例如，检测可以涉及（1）如 Fasano 等人在 *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 8: 5242-5246（1991）中所述，检测装在 Ussing 室中的回肠组织抗性（Rt）的降低；（2）如下文所述，检测 Ussing 室中肠上皮细胞单层组织抗性（Rt）的降低；或（3）如 WO 96/37196；1995 年 5 月 24 日提交的美国专利申请第 08/443,864 号；1996 年 2 月 9 日提交的美国专利申请第 08/598,852 号；和 1997 年 1 月 9 日提交的美国专利申请第 08/781,057 号中所述，检测治疗剂或免疫原性制剂肠或鼻吸收的增加。

20 ZOT 受体激动剂将会以可逆并且可重复的方式迅速打开紧密连接，因此可以将其以与 ZOT 用作肠或鼻吸收促进剂相同的方式用作治疗剂或免疫原性制剂的肠或鼻吸收促进剂，如 WO 96/37196；1995 年 5 月 24 日提交的美国专利申请第 08/443,864 号；1996 年 2 月 9 日提交的美国专利申请第 08/598,852 号；和 1997 年 1 月 9 日提交的美国专利申请第 08/781,057 号中所述。

25 Zot/连蛋白受体的抗体可以用作治疗使增加的肠通透性升高的胃肠炎症的抗炎剂。因此，本发明的抗体可以用于治疗例如导致失蛋白性肠病的肠症状。失蛋白性肠病可能由于以下原因产生：感染，例如艰难梭状芽孢杆菌感染、小肠结肠炎、志贺菌病、病毒性胃肠炎、寄生物侵染、细菌生长过度、惠普耳氏病；伴有黏膜糜烂或溃疡的疾病，例如胃炎、胃癌、胶原性结肠炎、炎症性肠病；以淋巴管梗阻为标志的疾病，例如先天性肠淋巴管扩张、肉样瘤病-淋巴瘤、肠系膜结核、和用丰塔纳氏手术对先天性心脏病进行外科矫正之后；无溃疡的黏膜

30

病，例如梅内特里埃氏病、乳糜泻、嗜酸性胃肠炎；和免疫性疾病，例如系统性红斑狼疮或食物过敏，主要为对牛奶过敏（同样参见 *Pediatric Gastrointestinal Disease Pathophysiology Diagnosis Management*, Eds. Wyllie 等人, Saunders Co. (1993), 第 536-543 页中的表 40-2；在此引入其全部内容作为参考）。可以用该抗体为患有癌症、自身免疫性疾病、血管病、细菌感染、乳糜泻、哮喘和过敏性肠综合

5 症的患者给药。

上文的公开内容主要描述了本发明。特别引入本文公开的所有参考文献作为参考。参考以下的具体实施例可以更全面地理解本发明，

10 在此提供实施例仅仅是为了说明用途，而并非要对本发明的范围进行限定。

实施例 1

通过结合凝胶过滤色谱和连蛋白 ELISA 对大鼠的小肠组织进行分析。将大鼠小肠匀浆装入聚丙烯酰胺葡聚糖柱（长度 90 cm，直径 2.6 cm，用标准分子量标记物校准），收集各组分并通过连蛋白 ELISA 对其进行分析，测定连蛋白浓度。在测试的 6 个组分（F1-F6）中，F5 含有最高的连蛋白浓度。将各个组分通过 SDS-PAGE 分辨，转移，并用连蛋白-免疫反应性的抗 Zot 抗体进行免疫印迹（图 1B）。蛋白质印迹分析显示连蛋白-阳性组分 F5 中有两条以 24,000 和 23,000 的近似表观 Mr 迁移的主要条带，而连蛋白-阴性组分 F1-4、6 显示各自仅有一条免疫反应性条带（~24 kDa）。因此，将来自 F5 的~23 kDa 条带（见图 1B 箭头）从 Comassie 蓝染色的凝胶上切除，并进行基质辅助激光解吸电离（MALDI）质谱分析。使用 ProFound 搜索引擎进行蛋白匹配

15 搜索（域名 129.85.19.192，目录 profound_bin；程序 WebProFound.exe?FORM=1），显示该蛋白（估计 Z 得分 1.58）与大鼠肥大细胞蛋白酶 II 具有高度的相似性 1。肥大细胞蛋白酶是肥大细胞颗粒体中含有的具有胰蛋白酶样（类胰蛋白酶）和胰凝乳蛋白酶样（类胰凝乳蛋白酶）性质的丝氨酸蛋白酶。黏膜肥大细胞（MMC）主要含有蛋白酶 II（MCP-II），而结缔组织肥大细胞主要含有蛋白酶 I（46）。MCP-II 尤其大量存在于肺部和胃肠（47）黏膜。在胃肠道中， MCP-II

20 25 30

得到较好表征的生物活性之一是线虫侵染后对黏膜上皮通透性的调节 (48)。体外研究显示, MCP-II 通过干扰紧密结合复合体来打开上皮屏障。因此, 我们提出的连蛋白体系假定模型与 MCP-II 已确立的功能是非常相容的。但是, 我们检测到连蛋白和 MCP-II 之间的主要差异, 包括它们的来源 (连蛋白存在于肠细胞 (49) 和巨噬细胞中) 和释放它们的刺激物 (MCP-II 为肠内寄生虫侵染[48], 连蛋白为细菌和麦醇溶蛋白[49])。

我们在生殖细胞、RBC's 和黏膜肥大细胞中具有多效性缺陷, 并因此缺乏 MCP-II 的 WBB6/F1-W/Wv 小鼠中进行了 microsnapwell 实验 (55)。安装在 microsnapwell 系统中并在递增的时间间隔 (直至 3 小时) 下暴露于释放连蛋白的刺激物的组织, 显示出 TEER 的降低 ($-170 \pm 15.8 \text{ Omhs/cm}^2$ 对未处理的组织的 -43 ± 11), 以及平行的连蛋白释放的增加 ($10.0 \pm 0.8 \text{ ng/mg}$ 蛋白对未处理的组织中的 0.2 ± 0.7), 这一结果与野生型动物中所观察到的相似 (分别为 -120 ± 20 和 15.1 ± 3.1)。

总之, 我们的数据显示连蛋白与 MCP-II 不同, 它可以代表 PAR-2 或者 PAR-2 变体的几种生理激活剂之一。胰腺胰蛋白酶是最有效的 PAR-2 激活剂, 但是胰腺胰蛋白酶的有效性与 PAR-2 的分布之间存在差异 (47)。生物活性的胰蛋白酶存在于小肠内腔中, 在此它可以在肠细胞的顶膜处激活 PAR-2 (47), 但是在许多组织中也可以找到 PAR-2, 在其中它必须被一种迄今鉴别的生理激活剂激活 (50)。连蛋白代表了这样的 PAR-2 激活剂的一种有力候选物, 由于已经从肠内和肠外组织中将其分离出来, 它可以调和这一明显差异 (51)。

实施例 2

之前我们已经阐述了 Zot 与家兔肠上皮细胞表面结合, 并且这一结合沿着肠的不同区域而改变 (44)。该结合分布与 Zot 对肠通透性的区域效应相一致, 并与绒毛的成熟细胞中由 Zot 诱导的优先 F-肌动蛋白的再分布相一致 (38, 44)。为了进一步对 Zot 受体进行表征, 我们进行了下列实验。

30

A. 结合实验

以若干上皮细胞系进行结合实验，包括 IEC6（大鼠，肠）、CaCo2（人类，类绒毛状肠细胞）、T84（人类，类隐窝肠细胞）、MDCK（犬，肾脏）、和牛肺动脉（BPA）上皮细胞。为了进行免疫荧光分析，将载玻片上融合的单细胞层（ 2.0×10^5 ）在 4℃ 或 37℃ 下与 5×10^{-9} M Zot 或者负对照一起以递增的时间间隔（5 分钟，30 分钟，60 分钟）培养。单细胞层在 37℃ 下与 Zot (0.2 μ M) 培养 15 分钟后，将细胞用冷的 PBS 洗涤 10 次，悬浮并溶解。将细胞溶解产物通过 SDS-PAGE 分辨，转移至 PVDF 膜，并用抗-Zot 抗体探测。为了确立 Zot 结合的特异性，使用放射性同位素标记的 Zot。在存在或不存在摩尔过量 10 倍或 50 倍的冷的未标记 Zot 的情况下进行这些实验。与暴露于负对照的细胞相比，当与 Zot 蛋白培养递增的时间间隔时，CaCo2 和 IEC6 肠上皮细胞及内皮细胞显示了细胞表面上的结合。与此相反，在与 His-Zot 培养直至 60 分钟之后，T84 或 MDCK 细胞上没有观察到染色。免疫印迹分析证实了 Zot 结合的细胞特异性。Zot 与 IEC6、CaCo2 和 BPA 结合，但是不与 T84 和 MDCK 细胞结合。

B. Zot-结合蛋白的提纯

在室温下将 1.0 mg 提纯的 His-Zot 在预活化的硅胶（Aminolink, Pierce）上固定化过夜，制备 His-Zot 亲和柱。将柱子用 PBS 洗涤，然后在其中装入使用 106 个 IEC6 细胞或 CaCo2 细胞得到的粗细胞溶解产物。在室温下培养 90 分钟后，将柱子用 14 ml PBS 洗涤 5 次，用 4.0 ml 50 mM 的甘氨酸（pH 2.5）、150 mM NaCl 和 0.1%（v/v）的 Triton X-100 将结合在 His-Zot 上的蛋白从柱子上洗脱。立刻用 1.0 N NaOH 中和 1.0 ml 洗脱组分的 pH。将收集的组分在还原条件下进行 6.0-15.0%（w/v）的梯度 SDS-PAGE 分析。将分开的蛋白转移到硝酸纤维素膜上，使用 Perkin-Elmer Applied Biosystems Apparatus Model 494 进行 NH₂-端微量测序。自 IEC6 和 CaCo2 细胞得到的洗脱组分中均含有表观 Mr 为 66 kDa 的单一蛋白质条带，如通过 SDS-PAGE 在还原条件下所观察到的。用神经氨酸酶处理将假定的 Zot 受体的大小降至 35 kDa，表明这一受体被唾液酸化（sialylated）（51）。

C. Zot/连蛋白受体的表征

我们最近的数据表明连蛋白在结构上与肥大细胞蛋白酶(MCP)-II 相似,这一数据引导我们假设,Zot/连蛋白受体可能与 MCP-II 蛋白酶激活的受体(PAR-2)相似,如果不是相同的话。PAR-2 有几点特征与

5 我们对 Zot/连蛋白受体描述过的特征是共同的。具体地说,成熟的 PAR-2 是 68-80 kDa 的糖蛋白,其通过去糖基化被降低至 36-40 kDa (47)。类似地,Zot/连蛋白受体的分子量为 66 kDa,其通过去糖基化被降至 35 kDa (51)。PAR-2 在肠胃道内的分布(47)与 Zot/连蛋白受体在肠中的分布(44)相一致。PAR-2 的细胞内信号传导涉及磷脂酶 C

10 (PLC)、蛋白激酶 C (PKC) 的激活(52)和导致细胞骨架重组的肌动蛋白聚合(53)。Zot 和连蛋白通过共同的肠表面受体激活了这些相同的细胞内信号传导途径(38)。与 Zot/连蛋白在肠中的效果类似,肠 PAR-2 的激活导致了肠通透性增加(54)。最后,PAR-2 通过它的细胞外结构域被胰蛋白酶切割而激活,产生起“束缚配体”作用的新的 N-

15 端。外源加入肽 SLIGRL (PAR-2 AP) 也不依赖于受体切割而激活了 PAR-2 (52),该肽对应于蛋白水解激活的、新生成的 N-端。12 kDa 的、生物活性的 Zot 片段(ΔG)的 N-端含有在宿主肠道中被霍乱弧菌蛋白水解切割的 Zot 细胞外结构域(氨基酸残基 288-399)。 ΔG 的 N-端含有在结构上与 PAR-2 激动剂的配体基序相似的肽(FCIGRL 氨基酸

20 288-293)。为了更精确地定义靶受体结合和激活的结构要求,通过使假定的 PAR-2 结合基序($\Delta G291$)或者刚好该配体基序的下游区($\Delta G298$)发生变异,合成两种 ΔG 突变体。对这些肽与 ΔG 进行了与 IEC-6 细胞结合能力的比较,以及它们对安装在 Ussing 室中的大鼠小肠的生物活性的比较。同与 ΔG 培养的细胞相比,与 $\Delta G291$ (G291V) 培养的 IEC6

25 细胞显示出与 IEC6 细胞的结合降低,而与 $\Delta G298$ 肽(G298V)培养的细胞上则观察不到结合。Ussing 室中的生物检验显示, $\Delta G291$ 对 t_j 分解(t_j disassembly)具有残余的但是在统计学上不显著的影响,而 $\Delta G298$ 则不能引起任何可检测的通透效应。这些结果与结合检验中用这两种突变体得到的效应相应,并且表明 291 位上的 G 残基,更重要的是 298 位上的 G 残基可能通过蛋白构象的改变,在其靶受体的 ΔG

30 结合和激活中发挥着至关重要的作用。目前,在生理和病理环境下研

究 PAR-2 功能的主要限制之一是缺乏特异性的 PAR-2 抑制剂 (52)。基于我们的结构-功能分析, 我们设计了一种合成八肽 (对应于 Zot 氨基酸残基 291-298), 其包含 2 个我们作为突变发生的目标的 G 残基, 但是缺少假定配体基序的前 3 个氨基酸残基 (288-290)。对该合成肽

5 FZI/0 在安装在 Ussing 室中的回肠组织上单独进行测试, 或者与 Zot、 Δ G 或连蛋白结合起来进行测试。暴露于 FZI/0 或合成八肽 (FZI/1) 的组织 Rt 中均没有观察到变化。在研究之前或者贯穿研究期间, 用 FZI/0 对回肠组织进行处理防止了响应于 Zot、 Δ G 和连蛋白的 Rt 变化, 而这 3 种蛋白的通透效应则不受 FZI/1 预处理的影响。这些数据加强了我们的

10 关于 Zot 和连蛋白靶向相同受体的假设, 并且表明 FZI/0 可能是通过结合在该受体上, 而不是将其激活来施加它的抑制效应。为了检验最后这一假设, 我们使用与荧光标记的 FZI/0 或 FZI/1 培养的大鼠小肠进行了原位结合实验。暴露于 FZI/0 的组织显示出大量的荧光颗粒, 而与 FZI/1 培养的组织中则检测不到信号。

15

实施例 3

Zot/连蛋白合成抑制剂 FZI/0 与 PAR-2 结合。为了确立 FZI/0 是否与 PAR-2 相结合, 在 CaCo2 细胞单层中进行了双重标记、共同定位的免疫荧光显微术。简言之, 将细胞与 FITC-FZI/0 或者与小鼠单克隆抗

20 人类 PAR-2 抗体以递增的时间间隔培养, 然后与罗丹明-标记的抗小鼠 IgG 抗体培养。然后将细胞用 PBS 洗涤 3 次, 在室温下于 PBS (pH 7.4) 中的 3.7% 低聚甲醛中固定 15 分钟, 在 pH 8.0 下将盖玻片用甘油-PBS (1: 1) 安装, 并用荧光显微镜 (ZEISS) 进行分析。FITC-FZI/0 暴露和抗-PAR-2 抗体暴露的细胞中均观察到了免疫荧光颗粒 (图 3)。两张

25 图像的重叠显示 PAR-2 受体和 FZI/0 的共同定位是明显的 (图 3)。

实施例 4

FZI/0 – PAR-2 AP 竞争结合实验。PAR-2 的激活要求其类胰蛋白酶生成的、断裂的 N-端部分或合成肽的等价物 PAR-2 AP 与受体的细胞

30 外环 2 (ECL2) 结合 (47)。为了确定 FZI/0 是否与相同的受体结构域结合, 在 Caco2 细胞中进行了竞争结合实验。将单细胞层在过量 PAR-2

AP (10^{-6} M) 或合成肽的存在下与 FITC-FZI/0 (2×10^{-8} M) 培养, 然后通过荧光显微镜进行分析。与暴露于合成肽的单细胞层相比, 暴露于过量 PAR-2 AP 的细胞显示出 FZI/0 免疫荧光染色颗粒的显著降低 (图 4), 这表明 FZI/0 与 PAR-2 结合, 并且能够竞争性地被 PAR-2 AP 所取代。

Zot/连蛋白抑制剂 FZI/0 对 PAR-2 AP-诱导的肌动蛋白重排的影响。最近已经报道了 PAR-2 受体被 PAR-2 AP 激活促进了细胞骨架的重组 (53)。为了确定合成的 Zot/连蛋白肽抑制剂 FZI/0 是否能够防止这一影响, 在 Caco2 细胞单层中进行了免疫荧光研究。暴露于 10^{-6} M PAR-2 AP 的细胞 (图 5A) 显示出应力纤维的溶解, 而 BSA-处理过的单细胞层则不会 (图 5B)。与 2×10^{-6} M FZI/0 预温育阻断了这些细胞骨架的变化 (图 5C), 但是合成的肽 FZI/1 则不会 (图 5D)。因此, 看起来 PAR-2 AP 与 FZI/0 与肠细胞上的相同结构结合。

15 实施例 5

PAR-2 AP 和 MCP-II 对肠通透性的影响。PAR-2 在肠细胞顶膜上得以高度表达, 并推测其调节一种或多种肠细胞功能 (52)。我们探询这些功能之一是否可以是连蛋白介导的、响应于细菌建群的肠通透性调节。为了探讨这一假设, 我们在 microsnapwell 检测中测试了 MCP-II 和 PAR-2 AP 处理对小鼠肠小肠的影响。与未经处理的组织相比, 向肠的内腔方面加入 10^{-6} M PAR-2 AP 或 MCP-II (10^{-8} M) 降低了 TEER, 而用 FZI/0 预处理则完全防止了这一依赖 PAR2 的递减 (图 6)。这些结果提供了更多的证据支持 PAR-2 是 Zot 和连蛋白二者的靶受体这一假设, 而且表明这一受体也牵涉到细胞间紧密连接的调节。

25

实施例 6

MyD88 在 PAR-2 信号传导中的牵连。许多微生物结构, 例如细菌脂多糖或者来自呼吸道合胞病毒的融合蛋白, 以及某些内源蛋白, 通过 Toll 样受体 (TLRs; 55) 引发的胞质内信号传导激活了先天免疫系统的细胞。迄今已经鉴别了 10 种哺乳动物 TLR。TLR、白细胞介素 1 和白细胞介素 18 受体的胞质内结构域当中是称为 “Toll-IL-1 受体” 或

30

“TIR”结构域的同源区。TIR 结构域负责与例如髓样细胞分化因子 88 (MyD88) 的关键性衔接分子结合。PAR-2 激活参与的信号传导途径与 TLRs (例如 NF- κ B 等; 52) 参与的信号转导途径之间惊人的相似性, 令我们猜测 zot/连蛋白可能接合 (engage) TLR 家族或者密切相关的蛋白中的一员。因此, 我们测试了野生型小鼠中和 MyD88 基因中具有靶突变 (敲除, KO) 的小鼠中, Zot 和 PAR-2 AP 诱发肠的跨上皮电阻 (TEER) 变化的能力 (图 7A 和 7B)。图 7A 中的数据表明 PAR-2 AP 和 Δ G 均诱发了野生型组织中肠电阻随时间的可比较的下降, 其通过与抑制性 zot 肽 FZI/0 预温育而逆转。与此相反, 自 MyD88 基因敲除的小鼠中得到的肠组织则不能响应于任一刺激而表现出 TEER 的降低。

总之, 这些结果显示 Zot 和连蛋白可能是通过两种不同的机制 (图 8) 激活了相同的受体 (PAR-2 变体或同系物)。我们的数据支持以下观点, Zot 与 PAR-2 (变体或同系物) ECL2 直接结合并激活受体的信号传导, 而连蛋白作为 MCP II 类似物则可以通过在其 N-端切割而激活靶受体 (图 8)。而且, 我们提出 PAR-2 (变体或同系物) 可以通过 TIR 样结构域直接参与 MyD88。

参考文献

1. Anderson, JM 和 Van Itallie, CM. 1995. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability (调节细胞旁通透性的紧密连接以及分子基础) . *Am. J. Physiol.* 269: 467-475.
- 5 2. Cereijido, M. 2001. Evolution of ideas on the tight junction (紧密连接概念的发展) . *In* Tight Junctions, CRC Press, Inc. Boca Raton, FL. 1-18.
3. Fasano, A., Baudry B., Pumplin, DW, Wasserman SS, Tall BD, Ketley J. 和 Kaper, JB. 1991. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions (霍乱弧菌生成影响肠紧密连接的第二肠毒素) . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:5242-5246.
- 10 4. Baudry, B., Fasano A., Ketley JM.和 Kaper, JB. 1992. Cloning of a gene (zot) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae* (编码霍乱弧菌生成的新毒素的基因 (zot) 的克隆) . *Infect. Immun.* 60: 428-434.
- 15 5. Diamond JM. The epithelial junction: bridge, gate and fence (上皮连接: 桥梁、门和栅栏) . 1977. *Physiologist* 20: 10-18.
6. Madara JL. Loosing Tight Functions Lessons from the Intestine (来自肠的使紧密功能松弛的教训) . 1989. *J. Clin. Invest.* 83: 1089-1094.
7. Madara JL 和 Dharmasathaphorn. 1985. Occluding junction structure-function relationships in a cultured epithelial monolayer (培养的上皮单细胞层中闭锁连结的结构-功能关系) . *J. Cell Biol.* 101: 2124-2133.
- 20 8. Magnuson T, Jacobson JB 和 Stackpole CW. 1978. Relationship between intercellular permeability and junction organization in the preimplantation mouse embryo (胚胎植入前小鼠胚胎中细胞间通透性与连接组织的关系) . *Dev. Biol.* 67: 214-224.
- 25 9. Revel JP 和 Brown SS. 1976. Cell junction in development with particular reference to the neural tube (发育中的具体关于神经管的细胞连接) . *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 40: 443-455.
- 30 10. Schneeberger EE, Walters DV 和 Olver RE. 1978. Development of intercellular junctions in the pulmonary epithelium of the foetal lamb

- (胎体小羊肺上皮细胞中细胞间连接的发育) . *J. Cell Sci.* 32:307-324。
11. Gilula NB, Fawcett DW 和 Aoki A. 1976. The sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis
5 (成熟及发育中的哺乳动物睾丸中的支持细胞闭锁连结及缝隙连接) . *Dev. Biol.* 50: 142-168。
12. Madara JL 和 Pappenheimer JR. 1987. Structural basis for physiological regulations of paracellular pathways in intestinal epithelia (肠上皮细胞中细胞旁途径生理调节的结构基础) . *J. Membr. Biol.* 100: 149-164。
- 10 13. Mazariegos MR. Tice LW 和 Hand AR. 1984. Alteration of tight junctional permeability in the rat parotid gland after isoproteranol stimulation (异丙基肾上腺素刺激后大鼠腮腺中紧密连接通透性的变化) . *J. Cell Biol.* 98: 1865-1877。
14. Sardet C, Pisam M 和 Maetz J. 1979. The surface epithelium of
15 teleostean fish gills. Cellular and junctional adaptations of the chloride cell in relation to salt adaptation (硬骨鱼鱼腮表面上皮细胞。氯细胞关于盐适应的细胞和连接性适应) . *J. Cell Biol.* 80: 96-117。
15. Milks LC, Conyers GP 和 Cramer EB. 1986. The effect of neutrophil migration on epithelial permeability (嗜中性粒细胞迁移对上皮细胞通
20 透性的影响) . *J. Cell. Biol.* 103: 2729-2738。
16. Nash S, Stafford J 和 Madara JL. 1988. The selective and superoxide-independent disruption of intestinal epithelial tight junctions during leukocyte transmigration (白细胞迁移期间肠上皮细胞紧密结合的不依赖于过氧化物的选择性破坏) . *Lab. Invest.* 59: 531-537。
- 25 17. Shasby DM, Winter M 和 Shasby SS. 1988. Oxidants and conductance of cultured epithelial cell monolayers: inositol phospholipid hydrolysis (培养的上皮细胞单细胞层的氧化剂和电导: 肌醇磷脂水解) . *Am. J. Physiol.* 255 (*Cell Physiol.* 24): C781-C788。
18. Furuse, M., Hirase, M., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita,
30 Sa. 和 Tsukita, Sh. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions (闭合蛋白: 一种定位在紧密间接处的新的整体膜蛋白) . *J. Cell Biol.* 123: 1777-1788。

19. Furuse Mikio, F.K., Hiiragi Takashi, Fujimoto Kazushi, Tsukita Shoichiro. 1998. Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin (密蛋白-1 和-2: 序列与闭合蛋白无相似性的定位于紧密连接处的新的整体膜蛋白) . *J. Cell Biol.* 141: 1539-1550。
5
20. Martin-Padura, I., Lostgallio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Vill, A., Simmons, D.和 Dejana, E. 1998. Junctional Adhesion Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily That Distributes at Intercellular Junctions and Modulates Monocyte Transmigration (连接性黏着分子, 分布于细胞间连接处并调节单核细胞迁移的免疫球蛋白总科新成员) . *J. Biol. Chem.* 142: 117-127。
10
21. Bazzoni, G., Martinez-Estrada O., Orsenigo, F., Cordenonsi, M., Citi, S. 和 Dejana, E. 2000. Interaction of Junctional Adhesion Molecule with the Tight Junction Components, ZO-1, Cingulin, and Occludin (连接性黏着分子与紧密连接组分 ZO-1、带蛋白和闭合蛋白的相互作用) . *J. Biol. Chem.* 275: 20520-20526。
15
22. Mitic L.L., Van Itallie C.M. 2001. Occludin and claudins: transmembrane proteins of the tight junction (闭合蛋白和密蛋白: 紧密连接的跨膜蛋白) . *In Tight Junctions*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. 213-230。
20
23. Furuse M., Sasaki H., Tsukita S. 1999. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands (紧密连接链之内及之间的异种密蛋白物种相互作用的方式) . *J. Cell Biol.*, 147: 891-903。
25
24. Citi S. 2001. The cytoplasmic plaque proteins of the tight junction (紧密连接的细胞质噬斑蛋白) . *In Tight Junctions*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. 231-264。
25. Stevenson BR, Anderson JM 和 Bullivant S. 1988. The epithelial tight junction: Structure, function and preliminary biochemical characterization (上皮细胞紧密连接: 结构、功能和初步的生化表征) . *Molec. Cell Biochem.* 83: 129-145。
30

26. Anderson, JM. 1996. Cell signaling: MAGUK magic (细胞信号传导: MAGUK 神话) . *Curr. Biol.* 6: 382-384。
27. Citi S, Sabannay H, Jakes R, Geiger B 和 Kendrick-Jones J. 1988. Cingulin, a new peripheral component of tight junctions (带蛋白, 一种新的紧密连接外围成分) . *Nature (London)* 333: 272-275。
28. Zahraoui A., Joberty G, Arpin M., Fontaine JJ., Hellio R, Tavitian A.和 Louvard D. 1994. A small rab GTPase is distributed in cytoplasmic vesicles in non polarized cells but colocalized with the tight junction marker Zo-1 in polarized epithelial cells(小型家兔 GTP 酶分布于非极化细胞中的细胞质囊泡中, 但是在极化的表皮细胞中与紧密连接标记 Zo-1 共同定位) . *J. Cell Biol.* 124: 101-115。
29. Denker BM, Saha, C, Khawaja, S 和 Nigam, SK. 1996. Involvement of a heterotrimeric G protein a subunit in tight junction biogenesis(异源三聚 G 蛋白亚单位在紧密连接生源说中的牵涉) . *J. Biol. Chem.* 271: 25750-25753。
30. Dodane, V.和 Kachar, B. 1996. Identification of isoforms of G proteins and PKC that colocalize with tight junctions (与紧密连接共同定位的 G 蛋白和 PKC 同种型的识别) . *J. Membr. Biol.* 149: 199-209。
31. Keon BH, Schafer, S, Kuhn, C, Grund, C 和 WW Franke. 1996. Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein (Symplekin, 一种新型的紧密连接噬斑蛋白) . *J. Cell Biol.* 134: 1003-1018。
32. Gottardi CJ, Arpin, M, Fanning AS 和 Louvard D. 1996. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts(与连接有关的蛋白, 闭锁小带-1, 在成熟之前及细胞-细胞接触的重塑过程中定位于细胞核上) . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 10779-84。
33. Gumbiner B. 1987. Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions (上皮细胞紧密连接的结构、生物化学及组装) . *Am. J. Physiol.* 253: C749-C758。
34. Madara JL, Barenberg D 和 Carlson S. 1986. Effects of Cytochalasin D on Occluding Junctions of Intestinal Absorptive Cells: Further Evidence That the Cytoskeleton May Influence Paracellular Permeability and

- Junctional Charge Selectivity (松胞菌素 D 对肠吸收细胞闭锁连接的影响: 细胞骨架可以影响细胞旁通透性和连接性电荷选择性的进一步证据). *J. Cell Biol.* 102: 2125-2136.3。
- 35.Drenchahn D 和 Dermietzel R. 1988. Organization of the Actin Filament
5 Cytoskeleton in the Intestinal Brush Border: A Quantitative and Qualitative Immunoelectron Microscope Study (肠刷状缘中肌动蛋白纤维细胞骨架的组构: 定量和定性免疫电子显微镜研究). *J. Cell Biol.* 107: 1037-1048。
- 36.Hecht F.等人, 1996. Expression of the catalytic domain of myosin light
10 chain kinase increases paracellular permeability (肌球蛋白轻链激酶催化结构域的表达增加了细胞旁通透性). *Am. J. Physiol.* 271: C1678-1684。
- 37.Tsuneo K., Brauneis U., Gatmaitan Z.和 Arias, I. 1991. Extracellular
15 ATP, intracellular calcium and canalicula contraction in rat hepatocyte doublets(大鼠肝细胞双联体中的细胞外 ATP、细胞内钙和小管收缩). *Hepatology.* 14: 640-647。
- 38.Fasano A., Fiorentini C, Donelli G, Uzzau S, Kaper JB, Margaretten K.,
Ding, X, Guandalini S. Comstock L, Goldblum SE. 1995. Zonula
Occludens Toxin Modulates Tight Junctions through Protein Kinase
20 C-dependent Actin Reorganization (闭锁小带毒素通过依赖蛋白激酶 C 的肌动蛋白重组来调节紧密连接), *In Vitro. J. Clinical Invest.* 96: 710-720。
- 39.Itoh M., Furuse M., Morita K., Kubota K., Saitou M., Tsukita S. 1999.
25 Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins(三种与紧密连接有关的 MAGUKs, ZO-1、ZO-2 和 ZO-3 与密蛋白 COOH 端的直接结合). *J. Cell Biol.* 147: 1351-1363。
- 40.Benais-Pont G, Matter K., Balda M.S. 2001. Intracellular signaling in
classical and new tight junction functions (经典和新的紧密连接功能
30 中的细胞内信号传导). *In Tight Junctions*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. 367-394。
- 41.W. Wang, R. Lu, M.G. Clemente, A. Fasano. Zonulin and its prokaryotic

- analogue *Vibrio cholerae*-derived Zonula occludens toxin (Zot) share the same mechanism of action on intercellular tight junctions (连蛋白和它的原核类似物自霍乱弧菌得到的闭锁小带毒素 (Zot) 具有相同的细胞间紧密连接作用机制) . *Ped Res* (修订中)。
- 5 42.Fasano A. 2001. Pathological and therapeutical implications of macromolecule passage through the tight junction (通过紧密连接的大分子通道的病理学和治疗意义) . *In* Tight Junctions, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. 697-722。
- 43.Hecht G. 2001. Microbial pathogens that affect tight junctions (影响紧密连接的微生物病原体) . *In* Tight Junctions, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. 493-515。
- 10 44.A. Fasano, S. Uzzau, C. Fiore, K. Margaretten. 1997. The Enterotoxic Effect of Zonula Occludens Toxin (Zot) on Rabbit Small Intestine Involves the Paracellular Pathway (闭锁小带毒素 (Zot) 对家兔小肠的产肠毒素影响与细胞旁途径有关) . *Gastroenterology*; 112: 839-846。
- 15 45.Marcial M.A., Carlson S.L., Madara J.L. 1984. Partitioning of paracellular conductance along the ileal crypt-villus axis: a hypothesis based on structural analysis with detailed consideration of tight junction structure-function relationships (细胞旁电导沿回肠隐窝绒毛轴的分
- 20 区: 基于结构分析与详细考虑的紧密连接的结构-功能关系的假设) . *J Membr Biol.*, 80: 59-70。
- 46.H.R.P. Miller, A.D. Pemberton. Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation of the lung and gut (肥大细胞颗粒体丝氨酸蛋白酶的組織特异性表达以及它们在肺
- 25 和肠发炎中的作用) . *Immunology*, 105: 275-390。
- 47.S. Gibson, A. Mackeller, G.F.J. Newlands, H.R.P. Miller. 1987. Phenotype expression of mast cell granule proteinases. Distribution of mast cell proteinase I and II in the rat digestive system (肥大细胞颗粒体蛋白酶的显型表达。肥大细胞蛋白酶 I 和 II 在大鼠消化系统中的
- 30 分布) . *Immunology*, 62: 621-627。
- 48.S.J. King, R.P. Miller. 1984. Anaphylactic release of mucosal mast cell

- protease and its relationship to gut permeability in *Nippostrongylus*-primed rats (黏膜肥大细胞蛋白酶的过敏性释放及其与 *Nippostrongylus*-primed 大鼠中肠通透性的关系). *Immunology*, 51: 653-660。
- 5 49.M.G. Clemente, S. De Virgiliis, J.S. Kang, R. Macatagney, M. Congia, A. Fasano. 2003. New insights on celiac disease pathogenesis: gliadin-induced zonulin release, actin polymerization, and early increased gut permeability (乳糜泻发病机理的新视角: 麦醇溶蛋白诱发的连蛋白释放、肌动蛋白聚合和早期增加的肠通透性). *Gut*, 52: 10 218-223。
- 50.C. Cicala. 2002. Protease activated receptor 2 and the cardiovascular system (蛋白酶激活的受体 2 和心血管系统). *Br. J. Pharmacol*, 135: 14-20。
- 51.R. Lu, W. Wang, S. Uzzau, R. Vigorito, H.R. Zielke, A. Fasano. 2000. Affinity Purification and Partial Characterization of the Zonulin/Zonula Occludens Toxin (Zot) Receptor from Human Brain (来自人脑的连蛋白/闭锁小带毒素(Zot)受体的亲和提纯和部分表征). *J. Neurochem.*; 15 74: 320-326。
- 52.S.R. Macfarlane, M.J. Seatter, T. Kanke, G.D. Hunter, R. Plevin. 2001. Proteinase-activated receptors(蛋白酶激活的受体). *Pharmacol Rev* 53, 20 245282。
- 53.E. R. Sharlow, C.S. Paine, L. Babiarz, M. Eisinger, S. Shapiro, M. Seiberg. 2000. The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis(蛋白酶激活的受体-2 增量调节角质化细胞的吞噬作用). *J. Cell Sci.*, 113: 3093-3101。 25
- 54.N. Cenac 等人, 2003. Proteinase-activated receptor-2 induced colonic inflammation in mice: possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability(蛋白酶激活的受体-2 诱发的小鼠结肠发炎: 与传入神经元、氧化氮和细胞旁通透性的可能关联). *J. Immunol*, 170: 4296-4300。 30
- 55.Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS(Toll 受体 CD14 和巨噬细胞被 LPS

激活和失活) . *Microbes Infect.* 2002. Jul; 4(9): 903-14。

在此特别引入所引用的各参考文献的公开内容。

	<110> A. 法萨诺 S. N. 沃格尔
5	<120> ZOT 和连蛋白受体的激动剂多肽 <130> 006552.00097
10	<140> TBA <141> 2004-07-15 <150> 60/487,889 <151> 2003-07-15
15	<160> 27 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
20	<210> 1 <211> 399 <212> PRT <213> 霍乱弧菌噬菌体 CTXΦ
25	<400> 1 Met Ser Ile Phe Ile His His Gly Ala Pro Gly Ser Tyr Lys Thr Ser 1 5 10 15 Gly Ala Leu Trp Leu Arg Leu Leu Pro Ala Ile Lys Ser Gly Arg His 20 25 30
30	Ile Ile Thr Asn Val Arg Gly Leu Asn Leu Glu Arg Met Ala Lys Tyr 35 40 45 Leu Lys Met Asp Val Ser Asp Ile Ser Ile Glu Phe Ile Asp Thr Asp 50 55 60 His Pro Asp Gly Arg Leu Thr Met Ala Arg Phe Trp His Trp Ala Arg 65 70 75 80
35	Lys Asp Ala Phe Leu Phe Ile Asp Glu Cys Gly Arg Ile Trp Pro Pro 85 90 95 Arg Leu Thr Val Thr Asn Leu Lys Ala Leu Asp Thr Pro Pro Asp Leu 100 105 110
40	Val Ala Glu Asp Arg Pro Glu Ser Phe Glu Val Ala Phe Asp Met His 115 120 125 Arg His His Gly Trp Asp Ile Cys Leu Thr Thr Pro Asn Ile Ala Lys 130 135 140 Val His Asn Met Ile Arg Glu Ala Ala Glu Ile Gly Tyr Arg His Phe 145 150 155 160
45	Asn Arg Ala Thr Val Gly Leu Gly Ala Lys Phe Thr Leu Thr Thr His 165 170 175 Asp Ala Ala Asn Ser Gly Gln Met Asp Ser His Ala Leu Thr Arg Gln 180 185 190
50	Val Lys Lys Ile Pro Ser Pro Ile Phe Lys Met Tyr Ala Ser Thr Thr 195 200 205 Thr Gly Lys Ala Arg Asp Thr Met Ala Gly Thr Ala Leu Trp Lys Asp 210 215 220 Arg Lys Ile Leu Phe Leu Phe Gly Met Val Phe Leu Met Phe Ser Tyr 225 230 235 240
55	Ser Phe Tyr Gly Leu His Asp Asn Pro Ile Phe Thr Gly Gly Asn Asp 245 250 255 Ala Thr Ile Glu Ser Glu Gln Ser Glu Pro Gln Ser Lys Ala Thr Val 260 265 270
60	

Gly Asn Ala Val Gly Ser Lys Ala Val Ala Pro Ala Ser Phe Gly Phe
 275 280 285
 Cys Ile Gly Arg Leu Cys Val Gln Asp Gly Phe Val Thr Val Gly Asp
 290 295 300
 5 Glu Arg Tyr Arg Leu Val Asp Asn Leu Asp Ile Pro Tyr Arg Gly Leu
 305 310 315 320
 Trp Ala Thr Gly His His Ile Tyr Lys Asp Thr Leu Thr Val Phe Phe
 325 330 335
 10 Glu Thr Glu Ser Gly Ser Val Pro Thr Glu Leu Phe Ala Ser Ser Tyr
 340 345 350
 Arg Tyr Lys Val Leu Pro Leu Pro Asp Phe Asn His Phe Val Val Phe
 355 360 365
 Asp Thr Phe Ala Ala Gln Ala Leu Trp Val Glu Val Lys Arg Gly Leu
 370 375 380
 15 Pro Ile Lys Thr Glu Asn Asp Lys Lys Gly Leu Asn Ser Ile Phe
 385 390 395

 <210> 2
 <211> 397
 20 <212> PRT
 <213> 智人

 <400> 2
 Met Arg Ser Pro Ser Ala Ala Trp Leu Leu Gly Ala Ala Ile Leu Leu
 25 1 5 10 15
 Ala Ala Ser Leu Ser Cys Ser Gly Thr Ile Gln Gly Thr Asn Arg Ser
 20 25 30
 Ser Lys Gly Arg Ser Leu Ile Gly Lys Val Asp Gly Thr Ser His Val
 35 40 45
 30 Thr Gly Lys Gly Val Thr Val Glu Thr Val Phe Ser Val Asp Glu Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Val Leu Thr Gly Lys Leu Thr Thr Val Phe Leu Pro Ile
 65 70 75 80
 Val Tyr Thr Ile Val Phe Val Val Gly Leu Pro Ser Asn Gly Met Ala
 85 90 95
 35 Leu Trp Val Phe Leu Phe Arg Thr Lys Lys Lys His Pro Ala Val Ile
 100 105 110
 Tyr Met Ala Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Ser Val Ile Trp Phe
 115 120 125
 40 Pro Leu Lys Ile Ala Tyr His Ile His Gly Asn Asn Trp Ile Tyr Gly
 130 135 140
 Glu Ala Leu Cys Asn Val Leu Ile Gly Phe Phe Tyr Gly Asn Met Tyr
 145 150 155 160
 Cys Ser Ile Leu Phe Met Thr Cys Leu Ser Val Gln Arg Tyr Trp Val
 165 170 175
 45 Ile Val Asn Pro Met Gly His Ser Arg Lys Lys Ala Asn Ile Ala Ile
 180 185 190
 Gly Ile Ser Leu Ala Ile Trp Leu Leu Ile Leu Leu Val Thr Ile Pro
 195 200 205
 50 Leu Tyr Val Val Lys Gln Thr Ile Phe Ile Pro Ala Leu Asn Ile Thr
 210 215 220
 Thr Cys His Asp Val Leu Pro Glu Gln Leu Leu Val Gly Asp Met Phe
 225 230 235 240
 Asn Tyr Phe Leu Ser Leu Ala Ile Gly Val Phe Leu Phe Pro Ala Phe
 245 250 255
 55 Leu Thr Ala Ser Ala Tyr Val Leu Met Ile Arg Met Leu Arg Ser Ser
 260 265 270
 Ala Met Asp Glu Asn Ser Glu Lys Lys Asp Lys Arg Ala Ile Lys Leu
 275 280 285
 60 Ile Val Thr Val Leu Ala Met Tyr Leu Ile Cys Phe Thr Pro Ser Asn
 290 295 300

Leu Leu Leu Val Val His Tyr Phe Leu Ile Lys Ser Gln Gly Gln Ser
 305 310 315 320
 His Val Tyr Ala Leu Tyr Ile Val Ala Leu Cys Leu Ser Thr Leu Asn
 325 330 335
 5 Ser Cys Ile Asp Pro Phe Val Tyr Tyr Phe Val Ser His Asp Phe Arg
 340 345 350
 Asp His Ala Lys Asn Ala Leu Leu Cys Arg Ser Val Arg Thr Val Lys
 355 360 365
 10 Gln Met Gln Val Ser Leu Thr Ser Lys Lys His Ser Arg Lys Ser Ser
 370 375 380
 Ser Tyr Ser Ser Ser Ser Thr Thr Val Lys Thr Ser Tyr
 385 390 395

 <210> 3
 15 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人

 <400> 3
 20 Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly
 1 5

 <210> 4
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> 霍乱弧菌噬菌体 CTXΦ

 <400> 4
 30 Phe Cys Ile Gly Arg Leu
 1 5

 <210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 35 <213> 智人

 <400> 5
 Ser Leu Ile Gly Lys Val Asp Gly Thr Ser His Val Thr Gly
 1 5 10
 40
 <210> 6
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 霍乱弧菌噬菌体 CTXΦ
 45
 <400> 6
 Phe Cys Ile Gly Arg Leu Cys Val Gln Asp Gly Phe Val Thr Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Glu Arg Tyr Arg Leu Val Asp Asn Leu Asp Ile Pro Tyr Arg Gly
 20 25 30
 50 Leu Trp Ala Thr Gly His His Ile Tyr Lys Asp Thr Leu Thr Val Phe
 35 40 45
 Phe Glu Thr Glu Ser Gly Ser Val Pro Thr Glu Leu Phe Ala Ser Ser
 50 55 60
 55 Tyr Arg Tyr Lys Val Leu Pro Leu Pro Asp Phe Asn His Phe Val Val
 65 70 75 80
 Phe Asp Thr Phe Ala Ala Gln Ala Leu Trp Val Glu Val Lys Arg Gly
 85 90 95
 60 Leu Pro Ile Lys Thr Glu Asn Asp Lys Lys Gly Leu Asn Ser Ile Phe
 100 105 110

	<210> 7
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> 人工序列
5	<220>
	<223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体
	<221> 变量
10	<222> (1)...(1)
	<223> Xaa = Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, Tyr, or Met
	<400> 7
	Xaa Cys Ile Gly Arg Leu
15	1 5
	<210> 8
	<211> 6
	<212> PRT
20	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体
25	<221> 变量
	<222> (2)...(2)
	<223> Xaa = Gly, Ser, Thr, Tyr, Asn, or Gln
	<400> 8
30	Phe Xaa Ile Gly Arg Leu
	1 5
	<210> 9
	<211> 6
35	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体
40	<221> 变量
	<222> (3)...(3)
	<223> Xaa = Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, or Met
45	<400> 9
	Phe Cys Xaa Gly Arg Leu
	1 5
	<210> 10
50	<211> 6
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
55	<223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体
	<221> 变量
	<222> (4)...(4)
60	<223> Xaa =Gly, Ser, Thr, Tyr, Asn, Ala, or Gln

- <400> 10
 Phe Cys Ile Xaa Arg Leu
 1 5
- 5 <210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- 10 <220>
 <223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体
- <221> 变量
 <222> (5)...(5)
 15 <223> Xaa=Lys or His
- <400> 11
 Phe Cys Ile Gly Xaa Leu
 1 5
- 20 <210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- 25 <220>
 <223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体
- <221> 变量
 30 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa = Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, or Met
- <400> 12
 Phe Cys Ile Gly Arg Xaa
 35 1 5
- <210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 40 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体
- 45 <221> 变量
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, Tyr, or Met
- <221> 变量
 50 <222> (2)...(2)
 <223> Xaa = Gly, Ser, Thr, Tyr, Asn, or Gn
- <400> 13
 Xaa Xaa Ile Gly Arg Leu
 55 1 5
- <210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 60 <213> 人工序列

<220>
 <223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体

5 <221> 变量
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, Tyr, or Met

10 <221> 变量
 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa=Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, or Met

15 <400> 14
 Xaa Cys Xaa Gly Arg Leu
 1 5

 <210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

20 <220>
 <223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体

25 <221> 变量
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, Tyr, or Met

30 <221> 变量
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa=Gly, Ser, Thr, Tyr, Asn, Ala, or Gln

35 <400> 15
 Xaa Cys Ile Xaa Arg Leu
 1 5

 <210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

40 <220>
 <223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体

45 <221> 变量
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, Tyr, or Met

50 <221> 变量
 <222> (5)...(5)
 <223> Xaa= Lys or His

55 <400> 16
 Xaa Cys Ile Gly Xaa Leu
 1 5

 <210> 17
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

60

	<220>
	<223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体
	<221> 变量
5	<222> (1)...(1)
	<223> Xaa = Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, Tyr, or Met
	<221> 变量
	<222> (6)...(6)
10	<223> Xaa= Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, or Met
	<400> 17
	Xaa Cys Ile Gly Arg Xaa
	1 5
15	
	<210> 18
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> 人工序列
20	
	<220>
	<223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体
	<221> 变量
25	<222> (2)...(2)
	<223> Xaa = Gly, Ser, Thr, Tyr, Asn, or Gln
	<221> 变量
	<222> (3)...(3)
30	<223> Xaa=Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, or Met
	<400> 18
	Phe Xaa Xaa Gly Arg Leu
	1 5
35	
	<210> 19
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> 人工序列
40	
	<220>
	<223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体
	<221> 变量
45	<222> (2)...(2)
	<223> Xaa = Gly, Ser, Thr, Tyr, Asn, or Gln
	<221> 变量
	<222> (4)...(4)
50	<223> Var=Gly, Ser, Thr, Tyr, Asn, Ala, or Gln
	<400> 19
	Phe Xaa Ile Xaa Arg Leu
	1 5
55	
	<210> 20
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> 人工序列
60	

	<220>
	<223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (susbstition) 突变体
	<221> 变量
5	<222> (2)...(2)
	<223> Xaa = Gly, Ser, Thr, Tyr, Asn, or Gln
	<221> 变量
	<222> (5)...(5)
10	<223> Xaa= Lys or His
	<400> 20
	Phe Xaa Ile Gly Xaa Leu
	1 5
15	<210> 21
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> 人工序列
20	<220>
	<223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (susbstition) 突变体
	<221> 变量
25	<222> (2)...(2)
	<223> Xaa = Gly, Ser, Thr, Tyr, Asn, or Gln
	<221> 变量
	<222> (6)...(6)
30	<223> Xaa=Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, or Met
	<400> 21
	Phe Xaa Ile Gly Arg Xaa
	1 5
35	<210> 22
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> 人工序列
40	<220>
	<223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (susbstition) 突变体
	<221> 变量
45	<222> (3)...(3)
	<223> Xaa =Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, or Met
	<221> 变量
	<222> (4)...(4)
50	<223> Xaa=Gly, Ser, Thr, Tyr, Asn, Ala, or Gln
	<400> 22
	Phe Cys Xaa Xaa Arg Leu
	1 5
55	<210> 23
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> 人工序列
60	

<220>
 <223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体

<221> 变量
 5 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa = Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, or Met

<221> 变量
 10 <222> (5)...(5)
 <223> Xaa= Lys or His

<400> 23
 Phe Cys Xaa Gly Xaa Leu
 1 5

15 <210> 24
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

20 <220>
 <223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体

<221> 变量
 25 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa =Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, or Met

<221> 变量
 30 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa= Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, or Met

<400> 24
 Phe Cys Xaa Gly Arg Xaa
 1 5

35 <210> 25
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

40 <220>
 <223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体

<221> 变量
 45 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Gly, Ser, Thr, Tyr, Asn, Ala, or Gln

<221> 变量
 50 <222> (5)...(5)
 <223> Xaa= Lys or His

<400> 25
 Phe Cys Ile Xaa Xaa Leu
 1 5

55 <210> 26
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

60

-
- <220>
 <223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体
- 5 <221> 变量
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Gly, Ser, Thr, Tyr, Asn, Ala, or Gln
- 10 <221> 变量
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa= Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, or Met
- 15 <400> 26
 Phe Cys Ile Xaa Arg Xaa
 1 5
- 20 <210> 27
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- 25 <220>
 <223> 霍乱弧菌噬菌体 CXTΦ 蛋白 Zot 寡肽的替代 (substitution) 突变体
- 30 <221> 变量
 <222> (5)...(5)
 <223> Xaa = Lys or His
- 30 <221> 变量
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa= Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, or Met
- <400> 27
 Phe Cys Ile Gly Xaa Xaa
 1 5

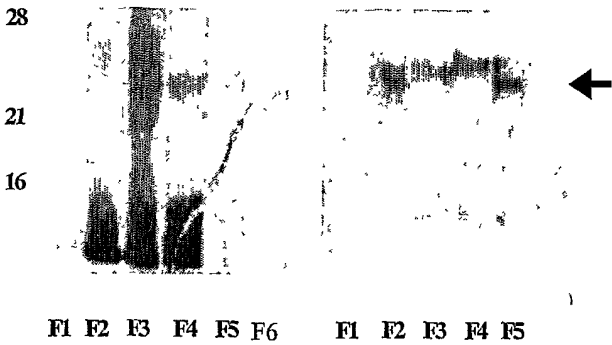


图1A

图1B

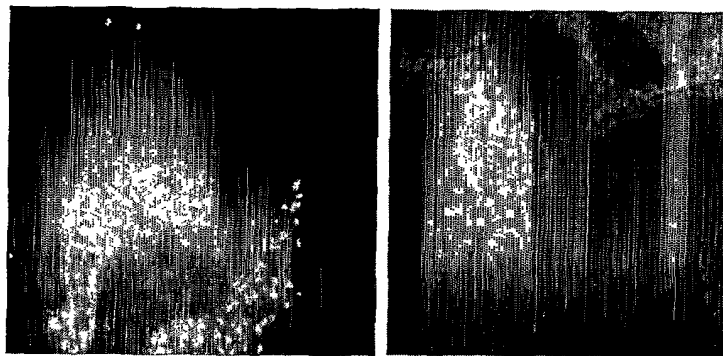
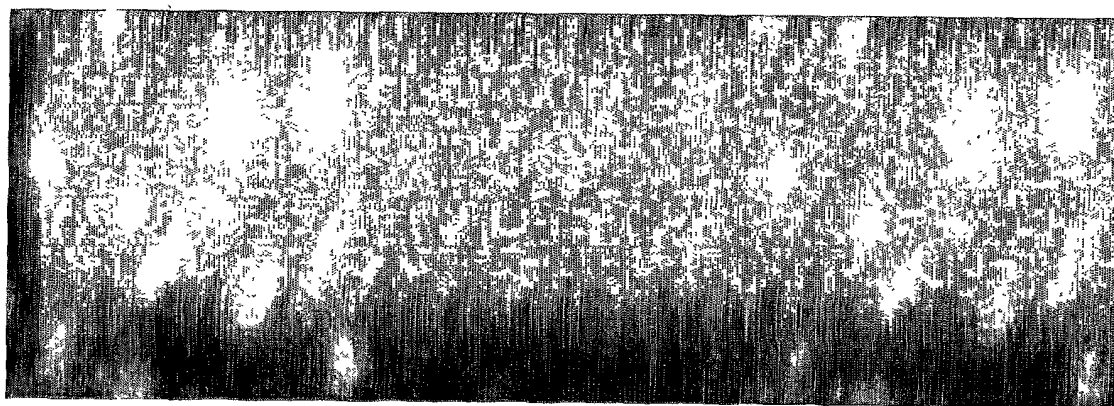


图2A

图2B



A

B

C

图3

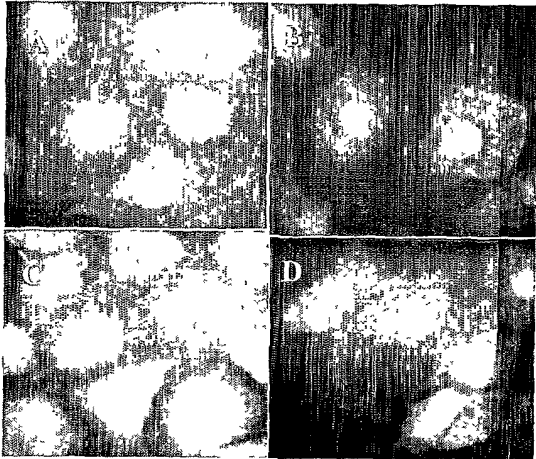


图4

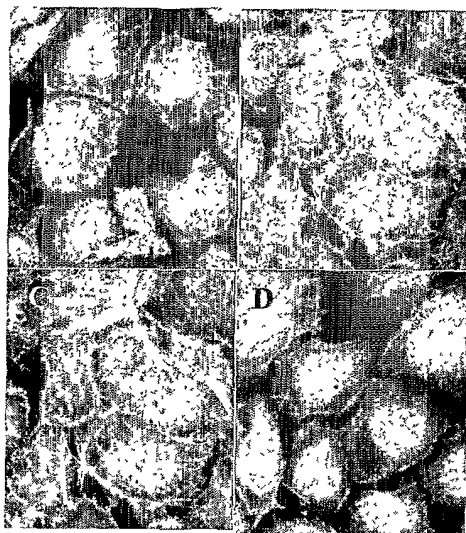


图5

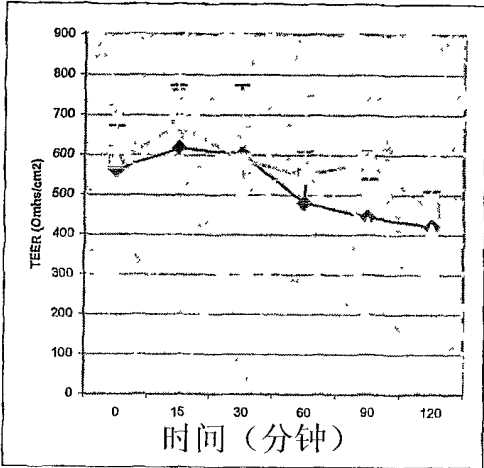


图6A

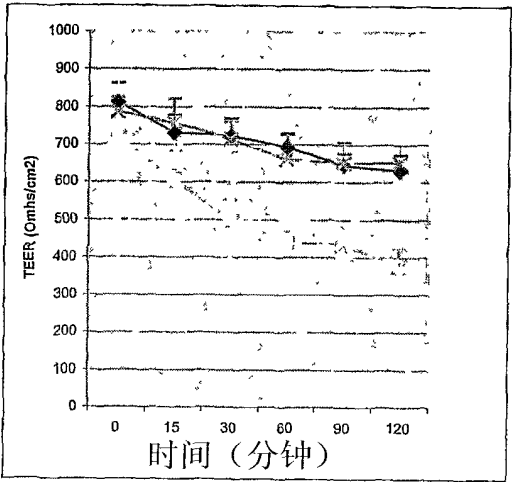


图6B

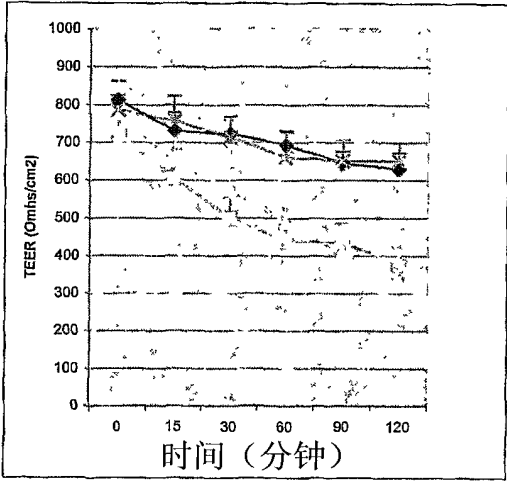


图7A

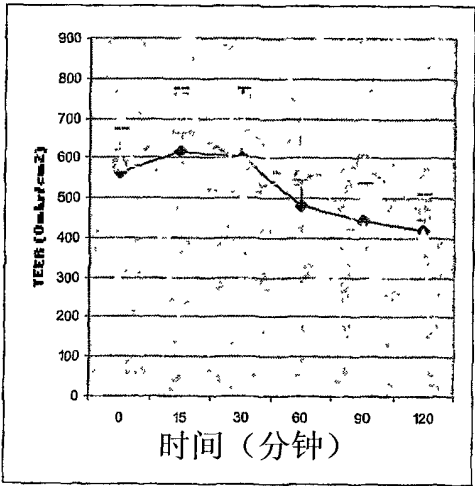


图7B

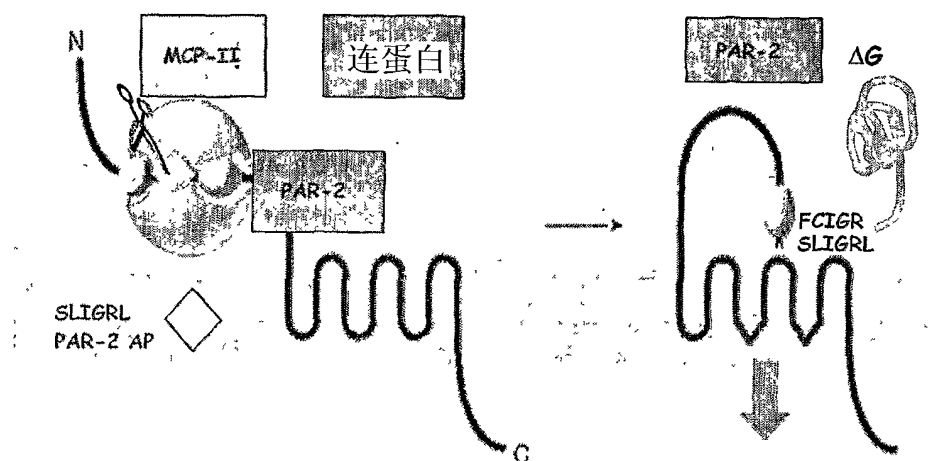


图8