



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112424220 A

(43) 申请公布日 2021.02.26

(21) 申请号 201980045963.4 M·菲德勒
(22) 申请日 2019.06.06 (74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
(30) 优先权数据 72002
PCT/EP2018/065205 2018.06.08 EP 代理人 曹雯
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 (51) Int.Cl.
2021.01.08 C07K 14/78 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 C12N 15/12 (2006.01)
PCT/EP2019/064872 2019.06.06 C12N 1/20 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 A61K 38/00 (2006.01)
W02019/234190 EN 2019.12.12 G01N 33/68 (2006.01)
(71) 申请人 生物技术欧洲股份公司
地址 德国美因兹
(72) 发明人 U·沙欣 B·G·卢伊 N·萨洛蒙
J·维斯特胡贝-劳施 权利要求书4页 说明书42页
M·达内施达尔 H-U·施莫尔特 序列表24页 附图21页

(54) 发明名称

用于癌症诊断和治疗的方法和组合物

(57) 摘要

本发明涉及表达纤连蛋白额外结构域B (EDB) 的疾病的诊断和治疗, 如以组织重塑和/或血管生成成为特征的疾病, 特别是癌性疾病, 如头颈癌、脑癌、结肠直肠癌、肺癌、前列腺和乳腺癌。更特别地, 本发明涉及靶向纤连蛋白额外结构域B的肽。

1. 一种纤连蛋白额外结构域B (EDB) 结合肽,其包含氨基酸序列基序Arg-Ile/Val-Arg。
2. 权利要求1的EDB结合肽,其包含氨基酸序列基序Arg-Ile/Val-Arg-Leu。
3. 权利要求1或2的EDB结合肽,其包含氨基酸序列:
(Xaa) n1 Cys (Xaa) n2 Arg Ile/Val Arg (Xaa) n3 Cys (Xaa) n4 Cys (Xaa) n5 Cys (Xaa) n6 Cys (Xaa) n7 Cys (Xaa) n8
其中
Cys残基形成胱氨酸结构,
Xaa彼此独立地是任何氨基酸,并且
n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7和n8是各自的氨基酸数目,
其中氨基酸Xaa的性质和/或氨基酸的数目n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7和n8使得Cys残基之间能够形成胱氨酸结构。
4. 权利要求1-3中任一项的EDB结合肽,其中
n1是0-4,优选1或2,
n2是3-10,优选4、5、6或7,
n3是0-4,优选0或1,
n4是3-7,优选4、5或6,
n5是2-6,优选2、3或4,
n6是1-3,优选1或2,
n7是3-7,优选4、5或6,并且
n8是0-4,优选1或2。
5. 权利要求3或4的EDB结合肽,其中 (Xaa) n3是Leu或缺失,优选其中 (Xaa) n3是Leu。
6. 权利要求3-5中任一项的EDB结合肽,其中 (Xaa) n2是 (Xaa) n2' Asn,其中优选n2' 是2-9,优选3、4、5或6。
7. 权利要求3-6中任一项的EDB结合肽,其中 (Xaa) n7是Arg (Xaa) n7',其中优选n7' 是2-6,优选3、4或5。
8. 权利要求3-7中任一项的EDB结合肽,其中
n2是5或6或者n2' 是4或5,
n3是0或1,
n4是5,
n5是3,
n6是1,并且
n7是5或n7' 是4。
9. 权利要求3-8中任一项的EDB结合肽,其包含氨基酸序列:
(Xaa) n1 Cys (Xaa) n2 Arg Ile/Val Arg (Xaa) n3 Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys (Xaa) n5 Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys (Xaa) n8。
10. 权利要求3-9中任一项的EDB结合肽,其包含氨基酸序列:
(Xaa) n1 Cys (Xaa) n2 Arg Ile/Val Arg (Xaa) n3 Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys (Xaa) n5 Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly。
11. 权利要求1-10中任一项的EDB结合肽,其中Ile/Val是Ile。

12. 权利要求1-10中任一项的EDB结合肽,其中Ile/Val是Val。
13. 权利要求1-12中任一项的EDB结合肽,其包含选自以下的氨基酸序列:
- (i) TrpLysCysGlnProThrAsnGlyTyrArgIleArgCysArgArgAspSerAspCysProGlyAspCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
- (ii) SerValCysLysAsnValSerIleMetArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysProGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
- (iii) SerValCysAlaHisTyrAsnThrIleArgValArgLeuCysArgArgAspSerAspCysProGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
- (iv) ProMetCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
- (v) SerValCysLysGlnAlaAsnPheValArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysProGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
- (vi) AlaMetCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
- (vii) ProAlaCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
- (viii) ProMetCysAlaGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
- (ix) ProMetCysThrAlaArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
- (x) ProMetCysThrGlnAlaLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
- (xi) ProMetCysThrGlnArgAlaAsnArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
- (xii) ProMetCysThrGlnArgLysAlaArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
- (xiii) ProMetCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysAlaArgAspSerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly, 以及
- (xiv) ProMetCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgAlaAspSerAspCysThrGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly。
14. 权利要求1-13中任一项的EDB结合肽,其形成支架或是支架的一部分。
15. 权利要求1-14中任一项的EDB结合肽,其通过共价修饰来稳定。
16. 权利要求15的EDB结合肽,其中所述共价修饰是环化。
17. 权利要求16的EDB结合肽,其中所述环化是通过一个或多个二硫键。
18. 权利要求1-17中任一项的EDB结合肽,其形成胱氨酸结结构和/或是胱氨酸结结构的一部分,优选抑制剂胱氨酸结结构。
19. 权利要求1-18中任一项的EDB结合肽,所述氨基酸序列基序位于胱氨酸结结构的环1内,优选抑制剂胱氨酸结结构,优选在胱氨酸结结构的环1的C-末端,优选抑制剂胱氨酸结结构。

20. 权利要求18或19的EDB结合肽,其中所述胱氨酸结结构基于来自木鳖子 (*Momordica cochinchinensis*) 的开链胰蛋白酶抑制剂II (oMCoTI-II)。

21. 权利要求1-20中任一项的EDB结合肽,其进一步包含至少一个融合配对物。

22. 权利要求21的EDB结合肽,其中所述融合配对物包含异源氨基酸序列。

23. 一种纤连蛋白额外结构域B (EDB) 结合剂,其包含权利要求1-22中任一项的EDB结合肽。

24. 权利要求23的EDB结合剂,其中将EDB结合肽与至少一个其他部分共价和/或非共价关联,优选共价关联。

25. 权利要求21或22的EDB结合肽或者权利要求24的EDB结合剂,其中所述融合配对物或其他部分包含载体蛋白、标记、报道分子或标签。

26. 权利要求23-25中任一项的EDB结合剂,其包含至少两个共价和/或非共价关联的亚基,所述亚基的每个包含权利要求1-22和25中任一项的EDB结合肽,其中所述EDB结合肽可以相同或不同。

27. 权利要求26的EDB结合剂,其包含至少4个亚基。

28. 权利要求26的EDB结合剂,其包含至少3个亚基。

29. 一种纤连蛋白额外结构域B (EDB) 结合剂,其包含权利要求1-22和25中任一项的EDB结合肽或者权利要求23-28中任一项的EDB结合剂,与至少一种可检测的标记或报道分子和/或至少一个治疗效应子部分共价和/或非共价关联,优选共价关联。

30. 权利要求1-22和25中任一项的EDB结合肽或者权利要求23-29中任一项的EDB结合剂,其结合至EDB的天然表位。

31. 权利要求1-22、25和30中任一项的EDB结合肽或者权利要求23-30中任一项的EDB结合剂,其中所述EDB由内皮细胞和/或肿瘤细胞表达。

32. 权利要求1-22、25、30和31中任一项的EDB结合肽或者权利要求23-31中任一项的EDB结合剂,其中所述结合是特异性结合。

33. 一种重组核酸,其编码权利要求1-22、25和30-32中任一项的EDB结合肽。

34. 一种宿主细胞,其包含权利要求33的重组核酸。

35. 一种测试试剂盒,其包含权利要求1-22、25和30-32中任一项的EDB结合肽或者权利要求23-32中任一项的EDB结合剂。

36. 权利要求35的测试试剂盒,其是诊断测试试剂盒。

37. 一种测定装置,其包含权利要求1-22、25和30-32中任一项的EDB结合肽或者权利要求23-32中任一项的EDB结合剂。

38. 权利要求37的测定装置,其中将所述EDB结合肽或EDB结合剂可释放或不可释放地固定在固体支持物上。

39. 一种测定样品中纤连蛋白额外结构域B (EDB) 的存在和/或量的方法,所述方法包括使用权利要求1-22、25和30-32中任一项的EDB结合肽或者权利要求23-32中任一项的EDB结合剂。

40. 一种诊断、检测或监测患者癌症的方法,所述方法包括使用权利要求1-22、25和30-32中任一项的EDB结合肽或者权利要求23-32中任一项的EDB结合剂测定所述患者中纤连蛋白额外结构域B (EDB) 的存在和/或量。

41. 权利要求40的方法,其中所述测定是在分离自所述患者的生物样品上进行的。
42. 权利要求40或41的方法,其中EDB的存在或与没有癌症的参考相比较高的EDB量表明所述患者患有癌症。
43. 权利要求39-42中任一项的方法,其中测定EDB的存在和/或量包括:
- (i) 使样品与EDB结合肽或EDB结合剂接触,以及
 - (ii) 检测EDB结合肽或EDB结合剂与EDB之间复合物形成和/或确定EDB结合肽或EDB结合剂与EDB之间复合物的量。
44. 权利要求39-43中任一项的方法,其中所述EDB结合肽或EDB结合剂包含或缀合至至少一种可检测标记或报道分子。
45. 权利要求39-44中任一项的方法,其中将所述EDB结合肽或EDB结合剂可释放或不可释放地固定在固体支持物上。
46. 一种药物组合物,其包含权利要求1-22、25和30-32中任一项的EDB结合肽、权利要求23-32中任一项的EDB结合剂、权利要求33的重组核酸或者权利要求34的宿主细胞。
47. 权利要求1-22、25和30-32中任一项的EDB结合肽、权利要求23-32中任一项的EDB结合剂、权利要求33的重组核酸、权利要求34的宿主细胞或者权利要求46的药物组合物,其用于治疗,特别是用于治疗或预防患者的癌症。
48. 权利要求1-22、25和30-32中任一项的EDB结合肽或者权利要求23-32中任一项的EDB结合剂,其用于靶向患者的癌症。
49. 一种治疗患者的方法,所述方法包括向所述患者给药权利要求1-22、25和30-32中任一项的EDB结合肽、权利要求23-32中任一项的EDB结合剂、权利要求33的重组核酸、权利要求34的宿主细胞或者权利要求46的药物组合物,其中,优选地,所述患者患有癌症或有发展癌症的风险。
50. 权利要求46的药物组合物,权利要求47的EDB结合肽、EDB结合剂、重组核酸、宿主细胞或药物组合物,权利要求48的EDB结合肽或EDB结合剂或者权利要求49的方法,其中所述EDB结合肽或EDB结合剂包含或缀合至至少一种治疗效应子部分。
51. 权利要求40-45中任一项的方法,权利要求47或50的EDB结合肽、EDB结合剂、重组核酸、宿主细胞或药物组合物,权利要求48或50的EDB结合肽或EDB结合剂或者权利要求49或50的方法,其中所述癌症是EDB阳性的和/或涉及表达EDB的细胞。

用于癌症诊断和治疗的方法和组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及表达纤连蛋白额外结构域B (EDB) 的疾病的诊断和治疗,如以组织重塑和/或血管生成为特征的疾病,特别是癌性疾病,如头颈癌、脑癌、结肠直肠癌、肺癌、前列腺和乳腺癌。更特别地,本发明涉及靶向纤连蛋白额外结构域B的肽。

背景技术

[0002] 癌症是超越心脏病的全球主要死亡原因之一。2012年,全球有820万人死于癌症。经典的抗癌疗法,例如放射疗法、化学疗法和常规外科手术,经常遭受选择性差的困扰,因此对健康组织有严重的毒副作用。新的治疗形式包括通过对肿瘤相关抗原具有特异性的结合分子将生物活性分子(药物、细胞因子、放射性核素等)靶向递送至肿瘤环境。这会允许药物选择性地指向靶标阳性的肿瘤组织,并且有效地杀死恶性细胞而不损害健康细胞。这伴随着所谓的伴随诊断的发展,使得能够确定患者体内靶标阳性的肿瘤,以便提前保证对个体癌症疗法的合理定制策略。在这方面,靶标特异性成像技术的应用已成为重要的诊断步骤,在过去几十年显示了引人注目的进步。成像技术可以提供关于肿瘤相关蛋白的存在和量、定位、早期检测、分布、患者分层和治疗监测的重要信息。肿瘤成像代表诊断癌症和监测癌症治疗中治疗成功的基础过程。数十年来,已常规使用长期建立的技术,如计算机断层扫描或磁共振成像。但是,由于靶向分子成像利用针对癌症相关蛋白的分子试剂精确地可视化肿瘤,因此引起了更多关注。因此在肿瘤血管生成期间出现的生物标志物非常有帮助,因为它们通常在血管中高水平表达,因此可以很容易地从血流中获得。

[0003] 纤连蛋白(FN)是胞外基质的二聚体二硫键糖蛋白,由I型、II型和III型结构域组成。该蛋白有助于许多生理过程,包括细胞粘附、迁移、分化和止血。FN表达为衍生自初级转录本的多个可变剪接变体。同种型额外结构域B(EDB)包含额外的91个氨基酸的III型结构域,其特异性地插入FN结构域7和8之间。这个高度保守的纤连蛋白额外结构域B序列在小鼠、大鼠、兔和人均相同。纤连蛋白额外结构域B通常在正常的成人组织中不存在,但是参与组织重塑和血管生成。此外,已在许多不同癌症类型中发现了纤连蛋白额外结构域B,其在几种侵袭性实体人类肿瘤(如头部和颈部、脑和乳腺)的新生血管中具有丰富的表达模式。

[0004] 为了靶向不良血管化的肿瘤,大尺寸的抗体甚至其片段可能减慢组织渗透的速度,从而阻碍有效的递送。此外,因为抗体的血液循环延长,它们看来不是用于诊断用途的最佳方法,尤其是在成像概念的情况下。除了上述情况,具有复杂糖基化模式和二硫键的抗体分子结构需要复杂的成本密集型生产,并且使进一步的功能化变得复杂,例如通过成像示踪剂。为了克服这些限制,在过去几十年中出现了一种替代抗体的方法,即所谓的蛋白支架:支架提供强大的结构框架以精确地设计为给定靶标的紧密和特异性识别定制的相互作用分子。它们中的大多数在非还原条件下正确折叠,并且可以在细菌中表达而不需要变性和重新折叠。甚至化学合成也是生产某些形式的一种选项。最后,它们非常适合进一步功能化(标记、寡聚化、与其他肽融合等)以产生多功能的结合分子。在基于支架的不同方法中,

胱氨酸结小蛋白(“knottin”)已显示出开发靶向诊断和治疗剂的巨大潜力。小蛋白是小的、30-50个氨基酸的多肽,包含3个二硫键,形成同名的打结结构。假结胱氨酸拓扑结构是非凡的热、蛋白水解和化学稳定性的原因,这对于体内生物学应用是期望的。例如,在不损失结构和功能完整性的情况下,小蛋白可以在碱性或酸性环境中煮沸。受二硫键限制的环区可耐受广泛的序列多样性,为识别各种生物学靶标的工程蛋白提供强大的分子框架。

[0005] 本领域需要可用于诊断和治疗方法的纤连蛋白额外结构域B结合分子。

[0006] 本文描述了纤连蛋白额外结构域B结合剂如纤连蛋白额外结构域B结合肽,其对纤连蛋白额外结构域B表现出高特异性和选择性。本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合剂是诊断应用(特别是肿瘤成像)以及通过有效靶向肿瘤环境的治疗应用的优秀工具。

发明内容

[0007] 根据本发明,将来自木鳖子(*Momordica cochinchinensis*)的knottin型胰蛋白酶抑制剂II的开链变体(oMCoTI-II)用作分子支架用于工程化纤连蛋白额外结构域B(EDB)特异性结合蛋白。为此,将基于来自木鳖子的胰蛋白酶抑制剂II(oMCoTI-II)的噬菌体文库用来选择针对重组纤连蛋白额外结构域B的胱氨酸结小蛋白。工程化的胱氨酸结小蛋白MC-FN-010和衍生物MC-FN-016的特征是高纤连蛋白额外结构域B特异性以及合理的亲和力。配体的化学寡聚化和位点定向荧光染料缀合极大地增加了结合强度,同时保留其高特异性并允许在基于U-87MG的异种移植胶质母细胞瘤小鼠模型中体内成像。两种纤连蛋白额外结构域B结合分子均在肿瘤中表现出强积累且背景信号低,除肾以外。我们的结果证实胱氨酸结小蛋白作为肿瘤成像技术的分子支架的巨大潜力。

[0008] 本发明总体提供可用于表达纤连蛋白额外结构域B的疾病(如癌症)的治疗和/或诊断的化合物。这些化合物提供表达纤连蛋白额外结构域B的细胞的选择性检测和/或表达纤连蛋白额外结构域B的细胞和/或与其中表达纤连蛋白额外结构域B的环境相关的细胞的根除,如与表达纤连蛋白额外结构域B的细胞相关的细胞。本发明允许最小化对不表达纤连蛋白额外结构域B和/或与其中表达纤连蛋白额外结构域B的环境无关的正常细胞的不利影响。

[0009] 本发明提供纤连蛋白额外结构域B(EDB)结合肽,其包含氨基酸序列基序Arg-Ile/Val-Arg。

[0010] 在一实施方案中,纤连蛋白额外结构域B(EDB)结合肽包含氨基酸序列基序Arg-Ile/Val-Arg-Leu。

[0011] 在一实施方案中,纤连蛋白额外结构域B结合肽包含氨基酸序列:

[0012] (Xaa)ⁿ¹ Cys (Xaa)ⁿ² Arg Ile/Val Arg (Xaa)ⁿ³ Cys (Xaa)ⁿ⁴ Cys (Xaa)ⁿ⁵ Cys (Xaa)ⁿ⁶ Cys (Xaa)ⁿ⁷ Cys (Xaa)ⁿ⁸

[0013] 其中

[0014] Cys残基形成胱氨酸结结构,

[0015] Xaa彼此独立地是任何氨基酸,并且

[0016] n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7和n8是各自的氨基酸数目,

[0017] 其中氨基酸Xaa的性质和/或氨基酸的数目n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7和n8使得Cys残基之间能够形成胱氨酸结结构。

- [0018] 在纤连蛋白额外结构域B结合肽的一实施方案中：
- [0019] n1是0-4, 优选1或2,
- [0020] n2是3-10, 优选4、5、6或7,
- [0021] n3是0-4, 优选0或1,
- [0022] n4是3-7, 优选4、5或6,
- [0023] n5是2-6, 优选2、3或4,
- [0024] n6是1-3, 优选1或2,
- [0025] n7是3-7, 优选4、5或6, 并且
- [0026] n8是0-4, 优选1或2。
- [0027] 在纤连蛋白额外结构域B结合肽的一实施方案中, (Xaa) n3是Leu或缺失, 优选(Xaa) n3是Leu。在纤连蛋白额外结构域B结合肽的一实施方案中, (Xaa) n2是(Xaa) n2' Asn, 其中优选n2' 是2-9, 优选3、4、5或6。在纤连蛋白额外结构域B结合肽的一实施方案中, (Xaa) n7是Arg (Xaa) n7', 其中优选n7' 是2-6, 优选3、4或5。
- [0028] 在纤连蛋白额外结构域B结合肽的一实施方案中：
- [0029] n2是5或6或者n2' 是4或5,
- [0030] n3是0或1,
- [0031] n4是5,
- [0032] n5是3,
- [0033] n6是1, 并且
- [0034] n7是5或n7' 是4。
- [0035] 在一实施方案中, 纤连蛋白额外结构域B结合肽包含氨基酸序列：
- [0036] (Xaa) n1 Cys (Xaa) n2 Arg Ile/Val Arg (Xaa) n3 Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys (Xaa) n5 Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys (Xaa) n8。
- [0037] 在一实施方案中, 纤连蛋白额外结构域B结合肽包含氨基酸序列：
- [0038] (Xaa) n1 Cys (Xaa) n2 Arg Ile/Val Arg (Xaa) n3 Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys (Xaa) n5 Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly。
- [0039] 在纤连蛋白额外结构域B结合肽的一实施方案中, Ile/Val是Ile。在纤连蛋白额外结构域B结合肽的一实施方案中, Ile/Val是Val。
- [0040] 在一实施方案中, 本发明提供纤连蛋白额外结构域B结合肽, 其包含选自以下的氨基酸序列：
- [0041] (i) TrpLysCysGlnProThrAsnGlyTyrArgIleArgCysArgArgAspSerAspCysPro
- [0042] GlyAspCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
- [0043] (ii) SerValCysLysAsnValSerIleMetArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCys
- [0044] ProGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
- [0045] (iii) SerValCysAlaHisTyrAsnThrIleArgValArgLeuCysArgArgAspSerAspCys
- [0046] ProGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
- [0047] (iv) ProMetCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysThr
- [0048] GlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
- [0049] (v) SerValCysLysGlnAlaAsnPheValArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCys

- [0050] ProGlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
 [0051] (vi) AlaMetCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysThr
 [0052] GlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
 [0053] (vii) ProAlaCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysThr
 [0054] GlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
 [0055] (viii) ProMetCysAlaGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysThr
 [0056] GlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
 [0057] (ix) ProMetCysThrAlaArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysThr
 [0058] GlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
 [0059] (x) ProMetCysThrGlnAlaLysAsnArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysThr
 [0060] GlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
 [0061] (xi) ProMetCysThrGlnArgAlaAsnArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysThr
 [0062] GlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
 [0063] (xii) ProMetCysThrGlnArgLysAlaArgIleArgLeuCysArgArgAspSerAspCysThr
 [0064] GlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,
 [0065] (xiii) ProMetCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysAlaArgAspSerAspCysThr
 [0066] GlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly,以及
 [0067] (xiv) ProMetCysThrGlnArgLysAsnArgIleArgLeuCysArgAlaAspSerAspCysThr
 [0068] GlyAlaCysIleCysArgGlyAsnGlyTyrCysGly。

[0069] 在一实施方案中,纤连蛋白额外结构域B结合肽形成支架或是支架的一部分。在一实施方案中,纤连蛋白额外结构域B结合肽通过共价修饰来稳定。在一实施方案中,所述共价修饰是环化。在一实施方案中,所述环化是通过一个或多个二硫键。

[0070] 在一实施方案中,纤连蛋白额外结构域B结合肽形成胱氨酸结结构和/或是胱氨酸结结构的一部分,优选抑制剂胱氨酸结结构。在一实施方案中,氨基酸序列基序位于胱氨酸结结构的环1内,优选抑制剂胱氨酸结结构,优选在胱氨酸结结构的环1的C-末端,优选抑制剂胱氨酸结结构。在一实施方案中,胱氨酸结结构基于来自木鳖子的开链胰蛋白酶抑制剂 II (oMCoTI-II)。

[0071] 在一实施方案中,纤连蛋白额外结构域B结合肽进一步包含至少一个融合配对物。在一实施方案中,所述融合配对物包含异源氨基酸序列。

[0072] 本发明还提供纤连蛋白额外结构域B (EDB) 结合剂,其包含本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合肽。本发明还提供纤连蛋白额外结构域B (EDB) 结合剂,其包含一种或多种如2、3、4、5、6种或更多种本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合肽,其中所述纤连蛋白额外结构域B结合肽可以相同或不同。

[0073] 在纤连蛋白额外结构域B结合剂的一实施方案中,纤连蛋白额外结构域B结合肽与至少一个其他部分共价和/或非共价关联,优选共价关联。

[0074] 在纤连蛋白额外结构域B结合肽或纤连蛋白额外结构域B结合剂的一实施方案中,所述融合配对物或其他部分包含载体蛋白、标记、报道分子或标签。在一实施方案中,报道分子是用于免疫学测定的报道分子,其中所述报道分子优选选自碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶或荧光分子。在一实施方案中,融合配对物或其他部分选自His6-盒、硫氧还蛋白、S-标

签、生物素及其组合。

[0075] 在一实施方案中,纤连蛋白额外结构域B结合剂包含至少两个共价和/或非共价关联的亚基,所述亚基的每个包含本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合肽,其中所述纤连蛋白额外结构域B结合肽可以相同或不同。

[0076] 根据本发明,在一实施方案中,非共价关联是通过包含链霉亲和素的化合物。根据本发明,在一实施方案中,共价关联是通过肽和/或非肽接头。

[0077] 因此,在一实施方案中,本发明的纤连蛋白额外结构域B结合肽以寡聚或多聚形式存在。在这个实施方案中,可以相同或不同的本发明的两个或更多个纤连蛋白额外结构域B结合肽可以通过共价或非共价键连接或偶联,如通过生物素/链霉抗亲和素。因此,本发明的纤连蛋白额外结构域B结合肽可以形成二聚体、三聚体、四聚体等。

[0078] 在一实施方案中,本发明的纤连蛋白额外结构域B结合剂包含至少4个亚基。在一实施方案中,本发明的纤连蛋白额外结构域B结合剂包含至少3个亚基。

[0079] 本发明还提供纤连蛋白额外结构域B (EDB) 结合剂,其包含本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合肽或本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合剂,与至少一种可检测的标记或报道分子和/或至少一种治疗效应子部分共价和/或非共价关联,优选共价关联。

[0080] 在一实施方案中,本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合肽或本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合剂结合至纤连蛋白额外结构域B的天然表位。

[0081] 在一实施方案中,纤连蛋白额外结构域B由内皮细胞和/或肿瘤细胞表达。

[0082] 在本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合肽或本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合剂的一实施方案中,结合是特异性结合。

[0083] 本发明还提供编码本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合肽的重组核酸。在一实施方案中,所述重组核酸为载体形式或RNA形式。

[0084] 本发明还提供包含本文描述的重组核酸的宿主细胞。

[0085] 本发明的另一目的是提供用于诊断、检测或监测表达纤连蛋白额外结构域B的疾病(如癌症疾病),即确定其消退、发展、病程和/或发生的手段和方法。

[0086] 本发明提供包含本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合肽或本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合剂的测试试剂盒。在一实施方案中,所述测试试剂盒还包含至少一种用于进行免疫测定的额外试剂和/或使用试剂盒进行免疫测定的说明书。在一实施方案中,所述测试试剂盒是诊断测试试剂盒。

[0087] 本发明的诊断测试试剂盒可以用于诊断、检测或监测癌症的本发明的方法。这些试剂盒可以包含信息性小册子,例如,告知怎样使用试剂实施本文公开的方法的小册子。

[0088] 本发明还提供包含本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合肽或本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合剂的测定装置。在一实施方案中,所述测定装置是酶联免疫吸附测定装置。在所述测定装置的一实施方案中,所述纤连蛋白额外结构域B结合肽或纤连蛋白额外结构域B结合剂可释放或不可释放地固定在固体支持物上。

[0089] 本发明还提供一种测定样品中纤连蛋白额外结构域B (EDB) 的存在和/或量的方法,所述方法包括使用本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合肽或本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合剂。

[0090] 本发明还提供一种诊断、检测或监测患者的癌症的方法,所述方法包括使用本文

描述的纤连蛋白额外结构域B结合肽或本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合剂测定所述患者中纤连蛋白额外结构域B (EDB) 的存在和/或量。

[0091] 在一特定方面,本发明涉及一种检测癌症疾病的方法,即确定其位置或部位,例如特定组织或器官。在一实施方案中,所述方法包括向患者给药偶联至可检测标记的本发明的纤连蛋白额外结构域B结合化合物,例如结合肽或结合剂。

[0092] 所述患者中组织或器官的标记可以表示所述组织或器官中癌症疾病的存在或风险。

[0093] 在一实施方案中,所述组织或器官是这样的组织或器官,在组织或器官没有癌症时基本上不表达纤连蛋白额外结构域B。

[0094] 在本发明的方法的一实施方案中,所述测定是在分离自所述患者的生物样品上进行的。

[0095] 在一实施方案中,所述生物样品分离自患有癌症疾病、怀疑患有癌症疾病或患有癌症疾病或者有癌症疾病可能性的患者。在一实施方案中,所述生物样品来自这样的组织或器官,在组织或器官没有癌症时基本上不表达纤连蛋白额外结构域B。

[0096] 通常,将生物样品中的纤连蛋白额外结构域B水平与参考水平进行比较,其中与所述参考水平的偏差指示患者中癌症疾病的存在和/或阶段。参考水平可以是在对照样品(例如,来自健康组织或受试者)中确定的水平或来自健康受试者的中值水平。与所述参考水平的“偏差”表示任何显著变化,如增加或减少至少10%、20%或30%,优选至少40%或50%,或者甚至更多。纤连蛋白额外结构域B的存在和/或与参考水平相比(例如与没有癌症疾病的患者相比)增加的纤连蛋白额外结构域B的量可以指示所述患者中癌症疾病的存在或风险(即可能发展为癌症)。

[0097] 在一实施方案中,生物样品和/或对照/参考样品来自与要针对癌症疾病的影响进行诊断、检测或监测的组织或器官对应的组织或器官;例如待诊断、检测或监测的癌症疾病是脑癌,而生物样品和/或对照/参考样品是脑组织。

[0098] 在一实施方案中,所述生物样品和/或对照/参考样品来自这样的组织或器官,在组织或器官没有癌症时基本上不表达纤连蛋白额外结构域B。通过本发明的方法指示患者中癌症疾病的存在或风险可以表示该癌症疾病在所述组织或器官中或者所述组织或器官处于所述癌症疾病的风险中。

[0099] 诊断、检测或监测的方法允许定量和/或定性评价,例如,靶分子的绝对和/或相对测定,例如纤连蛋白额外结构域B的表达水平。

[0100] 本文描述了用于完成所述测定纤连蛋白额外结构域B的存在和/或量的方法,并且对于技术人员是显而易见的。通常,本发明的方法中的测定涉及使用特异性地结合至纤连蛋白额外结构域B的标记的配体,例如特异性地结合至纤连蛋白额外结构域B的本发明的化合物直接或间接结合提供检测的标记,例如指示剂酶、放射性标记、荧光团或顺磁颗粒。

[0101] 在一实施方案中,纤连蛋白额外结构域B的存在或与没有癌症的参考相比更高的纤连蛋白额外结构域B的量表明患者患有癌症。

[0102] 根据本发明的监测方法优选包括在第一时间点在第一样品中以及在第二时间点另一样品中测定纤连蛋白额外结构域B的存在和/或量,其中通过比较两个样品可以确定癌症疾病的消退、发展、病程和/或发生。

[0103] 与较早从患者采集的生物样品相比,生物样品中减少的纤连蛋白额外结构域B的量可能表明所述患者中癌症疾病的消退、阳性过程(positive course)如成功治疗或发生的风险降低。

[0104] 与较早从患者采集的生物样品相比,生物样品中增加的纤连蛋白额外结构域B的量可能表明所述患者中癌症疾病的发展、阴性过程(negative course)如治疗失败、复发或转移行为、发生或有发生风险。

[0105] 在本发明的方法的一实施方案中,测定纤连蛋白额外结构域B的存在和/或量包括:

[0106] (i) 使样品与纤连蛋白额外结构域B结合肽或纤连蛋白额外结构域B结合剂接触,以及

[0107] (ii) 检测纤连蛋白额外结构域B结合肽或纤连蛋白额外结构域B结合剂与纤连蛋白额外结构域B之间的复合物的形成和/或确定其量。

[0108] 在本发明的方法的一实施方案中,纤连蛋白额外结构域B结合肽或纤连蛋白额外结构域B结合剂包含或缀合至至少一种可检测标记或报道分子。

[0109] 在一实施方案中,本发明的方法在免疫测定的环境中进行。

[0110] 在本发明的方法的一实施方案中,纤连蛋白额外结构域B结合肽或纤连蛋白额外结构域B结合剂可释放或不可释放地固定在固体支持物上。

[0111] 根据本发明的纤连蛋白额外结构域B结合化合物与纤连蛋白额外结构域B的结合可以干扰纤连蛋白额外结构域B的功能。此外,可以将纤连蛋白额外结构域B结合化合物连接至治疗效应子部分,例如,放射性标记、细胞毒素、细胞毒性酶等,并且该化合物与纤连蛋白额外结构域B的结合可以选择性地靶向并杀死表达纤连蛋白额外结构域B的细胞或与表达纤连蛋白额外结构域B的细胞相关的细胞,特别是癌细胞。在一实施方案中,所述化合物减少肿瘤细胞生长和/或诱导肿瘤细胞死亡,因此具有抑制肿瘤或破坏肿瘤的作用。因此,本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合化合物可以用于治疗,特别是用于癌症疾病的预防性和/或治疗性治疗。

[0112] 如上所述利用本发明的方法的癌症疾病的阳性诊断可以指示适合本文描述的治疗方法的癌症疾病。

[0113] 因此,本发明的另一目的是提供用于癌症疾病的治疗性和/或预防性治疗的方式和方法。

[0114] 本发明还提供一种药物组合物,其包含本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合肽、本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合剂、本文描述的重组核酸或本文描述的宿主细胞。

[0115] 本发明的药物组合物可以包含药学可接受的载剂,并且可以任选地包含如本文所述的其他物质。

[0116] 本发明还提供本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合肽、本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合剂、本文描述的重组核酸、本文描述的宿主细胞或本文描述的药物组合物,其用于治疗,特别是用于治疗或预防患者的癌症。

[0117] 本发明还提供本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合肽或本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合剂,其用于靶向患者中的癌症。

[0118] 本发明还提供一种治疗患者的方法,所述方法包括向患者给药本文描述的纤连蛋

白额外结构域B结合肽、本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合剂、本文描述的重组核酸、本文描述的宿主细胞或本文描述的药物组合物,其中,优选地,所述患者患有癌症或有发展癌症的风险。

[0119] 在上述方面的一实施方案中,纤连蛋白额外结构域B结合肽或纤连蛋白额外结构域B结合剂包含或缀合至至少一个治疗效应子部分。

[0120] 在上述方面的一实施方案中,所述癌症是纤连蛋白额外结构域B阳性的和/或涉及表达纤连蛋白额外结构域B的细胞。

[0121] 根据本发明的所有方面,癌症优选选自乳腺癌、脑癌、肺的癌症或肺癌、结肠直肠癌、结肠癌、食道癌、头颈癌、胃癌、胰腺癌、肾癌、子宫颈癌、卵巢癌、膀胱癌或前列腺癌。

[0122] 根据本发明的所有方面,纤连蛋白额外结构域B优选包含根据序列表的SEQ ID NO:2的氨基酸序列或所述氨基酸序列的变体。

[0123] 在一方面,本发明提供如本文所述的药剂用于本文所述的治疗方法。在一方面,本发明提供如本文所述的药物组合物用于本文所述的治疗方法。

[0124] 本文描述的治疗可以与手术切除和/或放射和/或传统化学疗法相结合。

[0125] 本发明的其他特征和优点由下文的详细描述和权利要求书会变得清楚。

具体实施方式

[0126] 虽然下文详细描述本发明,但是应当理解本发明并不限于本文描述的特定方法、方案和试剂,因为这些可以变化。还应当理解本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的而不是为了限制本发明的范围,本发明的范围仅受所附权利要求书的限制。除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语均具有与本领域技术人员通常理解的相同的含义。

[0127] 在下文中会描述本发明的要素。这些要素用具体实施方案列出,但是,应当理解它们可以以任何方式和任何数目组合以产生额外的实施方案。描述的各种实例和优选实施方案不应理解为将本发明仅限于明确描述的实施方案。本说明书应当理解为支持并涵盖组合明确描述的实施方案与任何数目的公开和/或优选的元素的实施方案。此外,除非上下文另有说明,本申请中所有描述的元素任何排列和组合应当认为通过本申请的说明书公开。

[0128] 优选地,本文使用的术语如“A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”, H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995) 所示定义。

[0129] 除非另有说明,本发明的实施会采用化学、生物化学、细胞生物学、免疫学和重组DNA技术的常规方法,其在所述领域的文献中解释(参见,例如, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989)。

[0130] 在这个说明书和所附权利要求书中,除非上下文另有要求,否则词语“包含(comprise)”及其变化如“包含(comprises)”和“包含(comprising)”应当理解为意指包括所述成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组,但不排除任何其他成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组,虽然在一些实施方案中,可以排除这样的其他成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组,即主题包括所述成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组。

在描述本发明的上下文中 (特别是在权利要求的上下文中) 使用的术语“一个 (a)”和“一个 (an)”和“这个”以及相似指称应当理解为覆盖单数和复数,除非在本文中另有指明或与上下文明显矛盾。本文中值的范围的列举仅为了用作分别指代落在所述范围内的每个单独不同值的简便方法。除非本文另有说明,每个单独的值如其在本文中单独列举地加入本说明书。除非本文另有说明或其他地方显然违背上下文,本文描述的所有方法可以以任何合适的顺序进行。除非另外要求保护,本文提供的任何和所有实例或者示例性语言(例如,“如”)的使用仅为了更好地说明本发明,并不对本发明的范围构成限制。本说明书中任何描述都不应解释为表示任何未声明的元素对实施本发明是必要的。

[0131] 在这个说明书的整个正文中引用了几个文件。本文引用的每个文件(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、指导等),无论上文或下文,均整体援引加入本文。本文中的任何内容均不解释为承认本发明无法享有在先申请的优先权。

[0132] 本发明涉及纤连蛋白额外结构域B结合化合物或试剂如纤连蛋白额外结构域B结合肽或者包含一种或多种纤连蛋白额外结构域B结合肽的试剂。

[0133] 纤连蛋白(FN)是存在于胞外基质(ECM)和体液中的高分子量粘性糖蛋白,由二聚体组成,所述二聚体由两个约250kDa的亚基组成,所述亚基在C-末端通过两个二硫键连接。每个单体由3种类型的重复单元组成:12个I型的FN重复(每个约40个氨基酸)、2个II型(约60氨基酸)和15-17个III型(约90个氨基酸)。纤连蛋白介导各种细胞相互作用,并且参与许多过程,如细胞粘附、正常细胞形态的建立和维持、细胞迁移、生长和分化。其与几种其他ECM和细胞表面蛋白相互作用,包括胶原蛋白、肝素、纤维蛋白和细胞膜受体。最后, FN可以作为许多整联蛋白的配体,包括重复III-10的RGD序列上的经典FN受体 $\alpha 5-\beta 1$ 。纤连蛋白是位于2号染色体上的单基因的产物,但是pre-mRNA的可变剪接产生不同的同种型,对于一些ECM蛋白,该过程在3个位点受细胞因子和胞外/胞内pH调节:III型连接序列(IIICS),完整的III型重复,额外结构域A(EDA)和完整的III型重复,额外结构域B(EDB)。这些中的最后一个是91个氨基酸的完整的III型同源重复,其中外显子的使用或跳过导致包含或排除这些III型重复。因此,同种型额外结构域B(EDB)包含额外的91个氨基酸的III型结构域,其特异性地插入FN结构域7和8之间。在FN III型重复7和8之间插入EDB诱导构象修饰,这掩盖隐藏序列并阻碍其他序列。纤连蛋白额外结构域B通常在正常的成人组织中不存在,但是参与组织重塑和血管生成。此外,已在许多不同癌症类型中发现了纤连蛋白额外结构域B,其在几种侵袭性实体人类肿瘤的新生血管中具有丰富的表达模式。

[0134] 根据本发明,术语“纤连蛋白额外结构域B”优选涉及人纤连蛋白额外结构域B。

[0135] 优选地,术语“纤连蛋白额外结构域B”或缩写“EDB”涉及包含额外结构域B重复的某种纤连蛋白同种型。在一实施方案中,术语“纤连蛋白额外结构域B”或缩写“EDB”涉及这样的核酸,其包含或者优选由序列表的SEQ ID NO:1的核酸序列或所述核酸序列的变体组成,并且涉及由这种核酸编码的蛋白,优选涉及这样的蛋白,其包含或者优选由序列表的SEQ ID NO:2的氨基酸序列或所述氨基酸序列的变体组成。在某些实施方案中,术语“纤连蛋白额外结构域B”或缩写“EDB”在本文中还用来专门指定EDB纤连蛋白的额外结构域B重复部分。在一实施方案中,EDB纤连蛋白的这种额外结构域B重复部分包含序列表的SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列或所述氨基酸序列的变体。

[0136] 纤连蛋白额外结构域B在各种来源的癌症中表达,如头颈癌、脑癌、结肠直肠癌、肺

癌、前列腺癌和乳腺癌。纤连蛋白额外结构域B是诊断、预防和/或治疗原发性肿瘤和转移的重要靶标。

[0137] 本发明的纤连蛋白额外结构域B结合剂具有结合至纤连蛋白额外结构域B的能力,即结合至纤连蛋白额外结构域B中存在的表位的能力。在一实施方案中,纤连蛋白额外结构域B结合剂结合至血管生成的脉管系统周围表达的纤连蛋白额外结构域B,如在肿瘤发生中。在一实施方案中,纤连蛋白额外结构域B结合剂结合至肿瘤组织内和/或周围(如肿瘤组织的胞外基质中和/或在肿瘤血管如肿瘤新血管中和/或在肿瘤血管如肿瘤新血管处)表达的纤连蛋白额外结构域B。在特别优选的实施方案中,纤连蛋白额外结构域B结合剂结合至纤连蛋白额外结构域B的天然表位。

[0138] 术语“表位”是指分子中被结合剂识别的部分。例如,表位是结合剂识别的分子上的离散的三维位点。表位通常由分子的化学活性表面基团如氨基酸或糖侧链组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于在变性溶剂的存在下会失去对前者而不是后者的结合。蛋白的表位优选包含所述蛋白的连续或不连续部分,并且优选长度为5-100、优选5-50、更优选8-30、最优选10-25个氨基酸,例如,表位可以优选长度为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。

[0139] 根据本发明,术语“纤连蛋白额外结构域B结合剂”或“纤连蛋白额外结构域B结合化合物”包含具有与纤连蛋白额外结构域B结合能力的任何化合物(包括分子复合物)。优选地,这样的结合剂是或包含至少一种本发明的纤连蛋白额外结构域B结合肽。如果纤连蛋白额外结构域B结合剂包含至少两种本发明的纤连蛋白额外结构域B结合肽(其可以相同或不相同),则这些肽可以共价或非共价关联(即,结合)。纤连蛋白额外结构域B结合剂可以包含与任何其他化合物或部分(如标记或治疗效应子部分)共价或非共价关联的一种或多种纤连蛋白额外结构域B结合肽。

[0140] 根据本发明,如果物质对预定靶标具有显著亲和力并在标准测定中结合所述预定靶标,则其能够结合预定靶标如纤连蛋白额外结构域B。“亲和力”或“结合亲和力”常通过平衡解离常数(K_D)测量。优选地,术语“显著亲和力”是指以 $10^{-5}M$ 或更低、 $10^{-6}M$ 或更低、 $10^{-7}M$ 或更低、 $10^{-8}M$ 或更低、 $10^{-9}M$ 或更低、 $10^{-10}M$ 或更低、 $10^{-11}M$ 或更低或者 $10^{-12}M$ 或更低的解离常数(K_D)结合预定靶标。

[0141] 如果物质对靶标没有显著亲和力且在标准测定中不显著结合所述靶标,特别是不可检测地结合所述靶标,则其(基本上)不能结合靶标。优选地,如果以多达2,优选10,更优选20,特别是50或 $100\mu g/ml$ 或更高的浓度存在,则物质不可检测地结合所述靶标。优选地,如果物质以比结合其能够结合的预定靶标的 K_D 高至少10倍、 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍或 10^6 倍的 K_D 结合靶标,则其对所述靶标没有显著亲和力。例如,如果物质结合至其能够结合的靶标的 K_D 是 $10^{-7}M$,则结合至物质没有显著亲和力的靶标的 K_D 会是至少 $10^{-6}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $10^{-2}M$ 或 $10^{-1}M$ 。

[0142] 根据本发明,术语“结合”优选涉及特异性结合。

[0143] “特异性结合”表示与结合至另一靶标相比,物质更强地结合至其特异性的靶标。如果物质以比第二靶标的解离常数低的解离常数(K_D)结合至第一靶标,则与第二靶标相比,其更强地结合至第一靶标。优选地,物质特异性结合的靶标的解离常数(K_D)比该物质不特异性结合的靶标的解离常数(K_D)低 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍、 10^7 倍、 10^8 倍、 10^9 倍

或 10^{10} 倍以上。

[0144] 优选地,如果物质能够结合预定靶标同时其(基本上)不能结合其他靶标,即对其他靶标没有显著亲和力且在标准测定中不显著结合其他靶标,则所述物质对预定靶标如纤连蛋白额外结构域B是特异性的。优选地,如果对这类其他靶标的亲和力和结合不显著超过对与纤连蛋白额外结构域B无关的蛋白如牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白或人血清白蛋白(HSA)或任何其他指定多肽的亲和力或结合,则物质是纤连蛋白额外结构域B特异性的。优选地,如果物质以比结合其非特异性靶标的 K_D 低至少 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍、 10^7 倍、 10^8 倍、 10^9 倍或 10^{10} 倍的 K_D 结合靶标,则其对预定靶标是特异性的。

[0145] 可以利用任何合适的方法实验确定物质对靶标的结合;参见,例如,Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W.E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company New York, N Y (1992), 以及本文描述的方法。亲和力可以利用常规技术容易地测定,例如通过平衡透析;通过使用表面等离子共振分析(例如Biacore), 利用制造商所列的一般方法; 通过利用放射性标记的靶抗原进行放射免疫测定; 或者通过技术人员已知的其他方法。可以例如通过Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949) 的方法分析亲和力数据。如果在不同条件下测量,例如,盐浓度、pH, 测量的特定相互作用的亲和力可以变化。因此, 亲和力和其他抗原结合参数如 K_D 、 IC_{50} 的测量优选结合剂和靶标的标准化溶液以及标准化缓冲液进行。

[0146] 在本发明的一实施方案中,癌症是纤连蛋白额外结构域B阳性癌症。根据本发明,术语“纤连蛋白额外结构域B阳性癌症”或类似术语表示涉及纤连蛋白额外结构域B或与之相关的癌症,特别是涉及细胞如表达纤连蛋白额外结构域B的肿瘤细胞和/或内皮细胞的癌症。在一实施方案中,术语“纤连蛋白额外结构域B阳性癌症”或类似术语表示其中纤连蛋白额外结构域B在肿瘤组织内和/或周围(如肿瘤组织的胞外基质中和/或在肿瘤血管如肿瘤新血管中和/或在肿瘤血管如肿瘤新血管处)表达的癌症。

[0147] 在一实施方案中,如果纤连蛋白额外结构域B在空间上与癌症相关,特别是如果纤连蛋白额外结构域B存在于所述癌症中,如在肿瘤组织的胞外基质中和/或在肿瘤血管中和/或在肿瘤血管处,则所述癌症涉及纤连蛋白额外结构域B或与之相关。优选地,涉及纤连蛋白额外结构域B或与之相关的癌症含有表达纤连蛋白额外结构域B的细胞。所述细胞可以是癌细胞或与癌症相关的细胞如内皮细胞,特别是癌症相关的内皮细胞如肿瘤血管(如肿瘤新血管)的内皮细胞。

[0148] 术语“部分(part)”或“片段”在本文中可互换使用,是指连续的元件。蛋白序列的部分或片段优选包含蛋白序列的至少6个、特别是至少8个、至少12个、至少15个、至少20个、至少30个、至少50个或至少100个连续氨基酸。

[0149] 术语“部分(portion)”是指连续和/或不连续的元件。蛋白序列的一部分优选包含蛋白序列的至少6个、特别是至少8个、至少12个、至少15个、至少20个、至少30个、至少50个或至少100个连续和/或不连续氨基酸。

[0150] 根据本发明,如果表达水平低于检测极限和/或如果表达水平太低而不允许纤连蛋白额外结构域B特异性结合剂结合,则(基本上)不表达纤连蛋白额外结构域B。

[0151] 根据本发明,如果表达水平高于检测极限和/或如果表达水平足够高以允许纤连

蛋白额外结构域B特异性结合剂结合,则表达纤连蛋白额外结构域B。优选地,细胞表达的纤连蛋白额外结构域B从细胞分泌例如至胞外基质中。

[0152] 术语“支架(scaffold)”涉及赋予刚性的结构,例如赋予本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合肽或氨基酸序列基序刚性。

[0153] 胱氨酸结是包含至少3个二硫键(由半胱氨酸分子对形成)的蛋白结构基序。其包含由两个二硫键和它们的连接骨架片段形成嵌入式环,该环被第三个二硫键穿过。这个结构优选与 β -折叠结构相关。包含胱氨酸结的肽的长度优选为25-60、优选25-50或25-40个氨基酸。

[0154] 胱氨酸结存在于许多物种的许多肽或蛋白中,并且提供相当大的结构稳定性。有三种类型的胱氨酸结,其不同之处在于二硫键的拓扑结构:生长因子胱氨酸结(GFCK)、抑制剂胱氨酸结(ICK)以及环状胱氨酸结或环肽(cyclotide)。

[0155] 抑制剂胱氨酸结(ICK)或knottin是包含3个二硫键的蛋白结构基序。连同它们之间的多肽部分,两个二硫键(分别连接第一个和第四个半胱氨酸以及第二个和第五个半胱氨酸)形成环,第三个二硫键(顺序连接第三个和第六个半胱氨酸)通过这个环,形成结。该基序在无脊椎动物毒素中很常见,如来自蛛形纲动物和软体动物的毒素。在植物中发现的一些抑制剂蛋白中也发现了该毒素。

[0156] 因此,根据本发明,ICK基序涉及两个半胱氨酸内骨架片段以及它们的连接二硫键CysI-CysIV和CysII-CysV,其形成一个环,该环被第三个二硫键CysIII-CysVI穿过。

[0157] ICK基序与环状胱氨酸结或环肽相似,但是缺少后者家族中存在的多肽骨架的环化。生长因子胱氨酸结(GFCK)具有相同基序,但是其拓扑结构使得第一和第四半胱氨酸之间的键穿过环(分别形成于第二个和第五个半胱氨酸以及第三个和第六个半胱氨酸之间)。

[0158] 环肽分为两个主要的结构亚家族。Moebius环肽在两个中较不常见,在环5中包含顺式脯氨酸,其诱导局部 180° 骨架扭转,而bracelet环肽不会。基于序列变化和天然活性将胰蛋白酶抑制剂环肽归类至它们各自的家族。与其他环肽相比,胰蛋白酶抑制剂环肽与来自笋瓜(squash)植物的称作knottin或抑制剂胱氨酸结的非环状胰蛋白酶抑制剂家族的同源性更高。

[0159] MCoTI-I和MCoTI-II是来自葫芦木鳖子(spinal gourd *Momordica cochinchinensis*)种子的天然多肽。这些多肽是胰蛋白酶样蛋白酶的抑制剂,并且包含一个连接氨基和羧基末端的额外的环以及3个保守二硫键的结状排列。胱氨酸结由3个分子内二硫键定义,其中线性肽序列的CysICysIV和CysII-CysV形成一个环,该环被第三个二硫键CysIII-CysVI穿过。这种排列提供明确定义且极其稳定的支架,所述支架表现出非凡的热稳定性和蛋白水解稳定性。由于结构相似性和共同的生物活性,即抑制胰蛋白酶家族的蛋白酶,已将MCoTI-I和MCoTI-II归类为小蛋白酶抑制剂的笋瓜抑制剂胱氨酸结(ICK)家族。这个家族的成员是开链分子,形成小的三链 β -折叠和短的 3_{10} 螺旋,通过3个分子内二硫键保持在一起形成胱氨酸结框架。MCoTI-I和MCoTI-II是环状的笋瓜抑制剂大家族中唯一已知的成员。已合成缺少环化环的MCoTI-II的开链变体。

[0160] 在某些实施方案中,本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合肽形成胱氨酸结结构和/或是胱氨酸结结构的一部分,优选抑制剂胱氨酸结结构。在某些实施方案中,本文描述的氨基序列基序是胱氨酸结结构的一部分,优选抑制剂胱氨酸结结构的一部分。在一实施

方案中,本文描述的氨基酸序列基序位于胱氨酸结结构的环1内,优选抑制剂胱氨酸结结构。在一实施方案中,本文描述的氨基酸序列基序位于胱氨酸结结构的环1的C-末端,优选抑制剂胱氨酸结结构。在一实施方案中,胱氨酸结结构的第一个环(环1)位于胱氨酸结结构的第一个半胱氨酸和第二个半胱氨酸之间。

[0161] 根据本发明,本文描述的肽可以通过本领域公知的化学合成方法合成产生,作为分离的肽或者作为另一肽或多肽的一部分。或者,可以在产生肽的微生物中产生该肽,然后将其分离,并且如果需要,进一步纯化。因此,肽可以在微生物如细菌、酵母或真菌中产生;在真核细胞如哺乳动物或昆虫细胞中产生;或者在重组病毒载体如腺病毒、痘病毒、疱疹病毒、Simliki森林病毒、杆状病毒、噬菌体、sindbis病毒或仙台病毒中产生。用于产生肽的合适细菌包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或任何其他能够表达肽的细菌。用于表达肽的合适酵母类型包括但不限于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、念珠菌(*Candida*)或任何其他能够表达肽的酵母。利用上述细菌、重组病毒载体、真核细胞产生肽的方法是本领域公知的。

[0162] 为了产生肽,编码肽的核酸优选在质粒中,并且将核酸可操作地连接至影响肽在微生物中的表达的启动子。合适的启动子包括但不限于T7噬菌体启动子、T3噬菌体启动子、 β -半乳糖苷酶启动子和Sp6噬菌体启动子。分离和纯化肽的方法是本领域公知的,包括诸如凝胶过滤、亲和色谱、离子交换色谱或离心的方法。

[0163] 可以将本发明的肽本身或作为融合肽的一部分缀合至异源肽或蛋白。这类异源蛋白包括但不限于载体蛋白如牛血清白蛋白(BSA),以及报道酶,所述报道酶包括但不限于辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。此外,可以将肽或包含肽的融合肽化学缀合至荧光报道分子,所述荧光报道分子包括但不限于荧光素或R-藻红蛋白。将载体蛋白、酶和荧光报道分子缀合至肽和融合肽的方法是本领域公知的。

[0164] 为了促进肽的分离,可以制备融合多肽,其中将肽翻译融合(共价连接)至异源标签如异源多肽或多组氨酸,优选6个组氨酸残基,其允许简化的融合多肽的回收,例如通过亲和色谱或金属亲和色谱分离,优选通过镍亲和色谱。在某些情况下,在纯化后去除标签可能是期望的。因此,还考虑融合蛋白在肽和异源标签之间的连接处包含切割位点。所述切割位点由氨基酸序列组成,在该位点用该氨基酸序列特异性的酶将其切割。

[0165] 本文描述的纤连蛋白额外结构域B结合剂可以用于测定中来测定纤连蛋白额外结构域B或纤连蛋白额外结构域B抗体的存在或者量。这类测定可以以许多方式进行,包括但不限于免疫检测,并且包括ELISA,特别是肽ELISA,竞争性结合测定,RIA等。本发明的方法允许对纤连蛋白额外结构域B或纤连蛋白额外结构域B抗体进行定量和/或定性评价,例如,绝对和/或相对评价。

[0166] 通常,利用酶联免疫吸附测定(ELISA)实施方案进行测定。

[0167] 如本文所用,术语“酶联免疫吸附测定或ELISA”涉及一种以多孔板形式(通常96-孔板)从样品如血浆、血清或细胞/组织提取物定量或半定量确定蛋白浓度的方法。广泛地讲,溶液中的蛋白被吸附至ELISA板。对所关注的蛋白具有特异性的抗体可以用来探测板。通过优化封闭和洗涤方法(对于IHC)将背景最小化,并且通过阳性和阴性对照的存在确保特异性。检测方法通常基于比色法或化学发光法。

[0168] 可以提供包含许多孔的微量滴定板,其中第一孔或一系列的孔包含固定在其表面的针对纤连蛋白额外结构域B的单克隆抗体。可以将样品添加至包含结合的单克隆抗体的孔。样品中的纤连蛋白额外结构域B结合至单克隆抗体。将ELISA孵育足以形成抗体复合物的时间。可以进一步添加本发明的肽。所述肽可以是融合多肽的一部分。之后,将孔洗涤以去除任何未结合的物质。然后将孔用结合至融合多肽的标记的抗体或缀合至报道分子的抗体孵育以形成可以检测的复合物。来自标记或报道分子的可检测信号表明样品包含纤连蛋白额外结构域B,而没有信号可能表明样品不含纤连蛋白额外结构域B。当融合多肽包含标记或报道分子(如报道酶如碱性磷酸酶)时,可以直接检测抗体复合物而不需要标记的抗体。

[0169] 或者,可以提供包含许多孔的微量滴定板,其中第一孔或一系列的孔包含本发明的肽,可以将其缀合至载体蛋白或融合多肽,固定至其表面。可以将样品添加至包含结合的肽的孔。将样品中的纤连蛋白额外结构域B和结合至孔表面的肽孵育足以形成复合物的时间。之后,将孔洗涤以去除任何未结合的物质。通过将孔与结合纤连蛋白额外结构域B的标记的抗体或缀合至报道分子的抗体孵育以形成可以检测的复合物,来确定结合至孔中固定的肽的纤连蛋白额外结构域B的量。来自报道分子的可检测信号表明样品包含纤连蛋白额外结构域B,而没有信号则表明样品不含纤连蛋白额外结构域B。信号的强度可以提供对样品中纤连蛋白额外结构域B浓度的估计。

[0170] 本发明的肽还可以用于检测针对纤连蛋白额外结构域B的抗体的存在的方法。使这些方法生效的合适免疫测定的设计可能发生很大的变化,并且这些免疫测定中的多种是本领域已知的。合适的免疫测定方案可以基于例如竞争或直接反应或夹心型测定。使用的免疫测定方案还可以例如使用固体支持物,或者可以通过免疫沉淀。测定可以涉及使用标记的肽,并且标记可以是例如荧光、化学发光、放射性或染料分子。特别优选的测定是酶标记和介导的免疫测定,如ELISA测定。

[0171] 因此,所述肽还可以用于测定如ELISA测定以确定样品中针对纤连蛋白额外结构域B的抗体。为了这个目的,可以将ELISA板的孔用所述肽包被。可以将纤连蛋白额外结构域B和结合至孔表面的肽孵育足以形成复合物的时间。随后,可以添加样品如血浆,并且可以用针对一抗的标记的二抗进行纤连蛋白额外结构域B特异性抗体(一抗)的检测。

[0172] 当用作如本文所述的测定试剂时,可以将本发明的肽缀合至标记。

[0173] 根据本发明,标记是可以容易地检测其存在的任何实体。优选地,所述标记是直接标记。直接标记是在其自然状态下易于用肉眼或借助光学滤光器和/或施加的刺激(例如促进荧光的UV光)可见的实体。实例包括放射性、化学发光、电活性(如氧化还原标记)和荧光化合物。直接颗粒标记如染料溶胶、金属溶胶(例如金)和有色乳胶颗粒也非常适合,并且连同荧光化合物是优选的。在这些选择中,最优选有色乳胶颗粒和荧光化合物。将标记集中到小区域或体积应当产生容易检测的信号,例如强烈着色的区域。也可以使用间接标记,如酶,例如碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶,尽管这些通常在可以检测可见信号之前需要添加一种或多种显影剂如底物。

[0174] 根据本发明,标记可以起到以下作用:(i)提供可检测的信号;(ii)与第二标记相互作用以修饰第一或第二标记提供的可检测信号,例如FRET(荧光共振能量转移);(iii)影响移动性,例如电泳迁移率,通过电荷、疏水性、形状或其他物理参数,或者(iv)提供捕获部

分,例如,亲和力、抗体/抗原或离子络合。适合作为标记的是这样的结构,如荧光标记、发光标记、发色团标记、放射性同位素标记、同位素标记(优选稳定的同位素标记)、等压标记、酶标记、颗粒标记(特别是金属颗粒标记、磁性颗粒标记、聚合物颗粒标记)、小有机分子(如生物素)、受体或结合分子的配体(如细胞粘附蛋白或凝集素)、包含可以通过使用结合剂检测的核酸和/或氨基酸残基的标记-序列等。以非限制性方式,标记包括硫酸钡、碘醋酸酸(iocetamic acid)、碘番酸、胺碘苯丙酸钙(calcium ipodate)、泛影钠、泛影葡胺、甲泛葡胺、酪洋酸钠和放射诊断,包括正电子发射体(如氟-18和碳-11)、 γ 发射体(如碘-123、钨-99m、碘-131和铟-111)、用于核磁共振的核素(如氟和钆)。在优选的实施方案中,标记包含放射性核素如镱-177或镓-68,其可以与结合至纤连蛋白额外结构域B结合剂的配体如DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸)复合。

[0175] 将标记缀合至本发明的肽可以通过共价或非共价(包括疏水性)键合,或者通过吸附。用于这种缀合的技术是本领域中常见的,并且可以容易地适用于所采用的特定试剂。

[0176] 如本文所用,术语“样品”包括可以分离自患者并用于分析目的的任何生物样品。所述样品可以是体液样品、组织样品或细胞样品。例如,本发明涵盖的样品是组织(例如切片或外植体)样品、单细胞样品、细胞集落样品、细胞培养样品、血液(例如全血或血液级分如血细胞级分、血清或血浆)样品、尿液样品或来自其他外周来源的样品。可以将所述样品混合或合并,例如样品可以是血液样品和尿液样品的混合物。可以通过从患者取出体液、细胞、细胞集落、外植体或切片来提供所述样品,但是也可以通过使用以前分离的样品来提供。例如,可以通过常规活组织检查技术从患者取出组织样品,或者可以通过常规血液采集技术从患者采集血液样品。可以在治疗开始之前、治疗期间和/或治疗之后从患者获得样品,例如组织样品或血液样品。

[0177] 在一实施方案中,所述样品是体液样品。如本文所用,术语“体液样品”是指源自患者身体的任何液体样品。所述体液样品可以是血液样品、尿液样品、痰样品、母乳样品、脑脊液(CSF)样品、耳垢(耳垢)样品、内淋巴样品、外淋巴样品、胃液样品、粘液样品、腹腔液样品、胸水样品、唾液样品、皮脂(皮油)样品、精液样品、汗液样品、泪液样品、阴道分泌物样品或呕吐物样品,包括其组分或级分。可以将所述体液样品混合或合并。因此,体液样品可以是血液和尿液样品的混合物或者血液和脑脊液样品的混合物。可以通过从患者取出体液来提供所述体液样品,但是也可以通过使用以前分离的体液样品材料来提供。在一优选实施方案中,所述样品是全血样品或血液级分样品如血细胞级分、血清或血浆样品。

[0178] 在一实施方案中,生物样品是获得自怀疑患有疾病(如癌症)的组织的样品。在一实施方案中,生物样品是肿瘤样品,例如获得自肿瘤并包含肿瘤细胞和/或肿瘤基质(如胞外基质或胞外基质组分)的样品。根据本发明,术语“生物样品”还包括加工的生物样品如生物样品的级分或分离物,例如核酸和肽/蛋白分离物。

[0179] 根据本发明,“参考”如参考样品或参考生物可以用来关联和比较本发明的方法中从测试样品或测试生物(即患者)获得的结果。通常参考生物是健康生物,特别是不患有肿瘤疾病的生物。

[0180] 可以通过测量足够大量的参考来根据经验从参考确定“参考值”或“参考水平”。优选地,通过测量至少2个,优选至少3个,优选至少5个,优选至少8个,优选至少12个,优选至少20个,优选至少30个,优选至少50个或优选至少100个参考来确定参考值。

[0181] 如本文所用的“减少”、“降低”或“抑制”表示总体降低或引起总体降低的能力,在水平上,例如在表达水平或细胞增殖水平上,优选降低5%或更大,10%或更大、20%或更大,更优选50%或更大,并且最优选75%或更大。如果在参考样品中可检测但在测试样品中不存在或不可检测,则与参考样品相比,测试样品如生物样品中物质的量也减少。

[0182] 术语如“增加”或“增强”优选涉及增加或增强约至少10%,优选至少20%,优选至少30%,更优选至少40%,更优选至少50%,甚至更优选至少80%,并且最优选至少100%,至少200%,至少500%,至少1000%,至少10000%或甚至更多。如果在测试样品中可检测但在参考样品中不存在或不可检测,则与参考样品相比,测试样品如生物样品中物质的量也增加。

[0183] 纤连蛋白额外结构域B结合剂(如本发明的肽)可以结合至固体支持物,例如免疫测定孔或试纸的表面,和/或与合适的试剂、对照、说明书等一起包装在合适的容器中的试剂盒中。

[0184] 因此,本发明还提供一种试剂盒,其包含至少一种本发明的纤连蛋白额外结构域B结合剂。在一优选实施方案中,所述试剂盒还包含至少一种额外的试剂,例如一种或多种用于进行免疫测定的合适试剂,对照或试剂盒的使用说明书。

[0185] 根据本发明,进一步提供一种测定装置,其包含至少一种本发明的纤连蛋白额外结构域B结合剂。在一实施方案中,所述测定装置选自酶联免疫吸附测定装置。

[0186] 这样的装置可以采用不同形式,并且其可以根据进行的测定的精确性质而变化。例如,可以将本发明的肽包被在固体支持物上,通常是硝酸纤维素或其他疏水性多孔材料。或者,可以将肽包被在合成塑料材料、微量滴定板、微阵列芯片、乳胶珠、包含纤维素或合成聚合物材料的滤器、玻璃或塑料载玻片、试纸、毛细管填充装置等上。将肽包被至这些表面可以通过本领域已知的方法完成。蛋白载体通常用于络合,最优选BSA或粘附肽。在一实施方案中,将本发明的肽可释放地固定在固体支持物上。在进一步优选的实施方案中,将本发明的肽不可释放地固定在固体支持物上。

[0187] 应当理解可以通过给药编码肽的核酸(如RNA)和/或通过给药包含编码肽的核酸(如RNA)的宿主细胞来将本文描述的肽递送至患者。因此,编码肽的核酸在给药至患者时可以有裸露形式存在,或者存在于合适的递送媒介物中,如脂质体或病毒颗粒形式,或者存在于宿主细胞内。提供的核酸可以以持续的方式在延长的时间产生肽。可以通过重组方式产生待递送至患者的核酸。如果将核酸在不存在于宿主细胞内的情况下给药至患者,则其优选被患者的细胞摄取以表达核酸编码的肽。如果将核酸在存在于宿主细胞内的同时给药至患者,则其优选由患者的宿主细胞表达以产生核酸编码的肽。

[0188] 如本文所用,术语“核酸”意图包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)如基因组DNA、cDNA、mRNA,重组产生和化学合成的分子。核酸可以是单链或双链的。RNA包括体外转录的RNA(IVT RNA)或合成的RNA。

[0189] 如本文所用,术语“RNA”表示包含核糖核苷酸残基的分子。“核糖核苷酸”表示在 β -D-核糖-呋喃糖部分的2'-位置具有羟基的核苷酸。该术语包括双链RNA、单链RNA、分离的RNA如部分纯化的RNA、基本上纯的RNA、合成的RNA、重组产生的RNA,以及通过添加、缺失、取代和/或改变一个或多个核苷酸不同于天然存在的RNA的改变的RNA。这类改变可以包括添加非核苷酸物质,如添加至RNA的末端或内部,例如在RNA的一个或多个核苷酸。RNA分子中

的核苷酸还可以包含非标准核苷酸,如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些改变的RNA可以称作类似物或天然存在的RNA的类似物。

[0190] 根据本发明,术语“RNA”包括并优选涉及“mRNA”,其表示“信使RNA”并涉及“转录物”,其可以利用DNA作为模板产生并编码肽或蛋白。mRNA通常包含5'非翻译区(5'-UTR)、蛋白或肽编码区以及3'非翻译区(3'-UTR)。在本发明的一实施方案中,通过体外转录或化学合成获得RNA。优选地,利用DNA模板通过体外转录产生mRNA。体外转录方法是技术人员已知的。例如,有各种体外转录试剂盒可商购。

[0191] 为了增加根据本发明使用的RNA的表达和/或稳定性,可以将其修饰,优选不改变表达的肽或蛋白的序列。

[0192] 根据本发明使用的RNA的上下文中的术语“修饰”包括在所述RNA中不天然存在的RNA的任何修饰。

[0193] 在本发明的一实施方案中,根据本发明使用的RNA没有无帽的5'-三磷酸。可以通过用磷酸酶处理RNA去除这类无帽的5'-三磷酸。

[0194] 根据本发明的RNA可以具有修饰的天然存在或合成的核糖核苷酸以增加其稳定性和/或减少细胞毒性。例如,在一实施方案中,在根据本发明使用的RNA中,5-甲基胞苷部分或完全取代胞苷,优选完全取代胞苷。可选地或额外地,在一实施方案中,在根据本发明使用的RNA中,假尿苷部分或完全取代尿苷,优选完全取代尿苷。

[0195] 在一实施方案中,术语“修饰”涉及提供具有5'-帽或5'-帽类似物的RNA。术语“5'-帽”是指在mRNA分子的5'-末端上发现的帽结构,并且一般由通过不寻常的5'至5'三磷酸键连接至mRNA的鸟苷核苷酸组成。在一实施方案中,这个鸟苷在7-位置甲基化。术语“常规5'-帽”是指天然存在的RNA 5'-帽,优选7-甲基鸟苷帽(m7G)。在本发明的上下文中,术语“5'-帽”包括5'-帽类似物,其类似RNA帽结构并且修饰以在粘附时具有稳定RNA的能力,优选在体内和/或细胞中。

[0196] 提供具有5'-帽或5'-帽类似物的RNA可以通过在所述5'-帽或5'-帽类似物的存在下体外转录DNA模板实现,其中所述5'-帽共转录地掺入产生的RNA链,或者可以例如通过体外转录产生RNA,并且可以利用加帽酶,例如痘苗病毒的加帽酶,将5'-帽转录后连接至RNA。

[0197] RNA可以包含进一步的修饰。例如,本发明中使用的RNA的进一步修饰可以是天然存在的poly(A)尾的延长或截短或者5'-或3'-非翻译区(UTR)的改变如引入与所述RNA的编码区无关的UTR,例如,插入一个或多个,优选两个拷贝的源自珠蛋白基因的3'-UTR,如 $\alpha 2$ -珠蛋白、 $\alpha 1$ -珠蛋白、 β -珠蛋白,优选 β -珠蛋白,更优选人 β -珠蛋白。

[0198] 在本发明的上下文中,术语“转录”涉及一种过程,其中将DNA序列中的遗传密码转录为RNA。随后,可以将RNA翻译为蛋白。根据本发明,术语“转录”包含“体外转录”,其中术语“体外转录”涉及一种过程,其中RNA,特别是mRNA,在不含细胞的系统中体外合成,优选利用适当的细胞提取物。优选地,将克隆载体用于产生转录物。这些克隆载体一般指定为转录载体,并且根据本发明涵盖在术语“载体”内。

[0199] 根据本发明的术语“翻译”涉及细胞核糖体中的过程,通过其信使RNA链指导氨基酸序列组装以产生肽或蛋白。

[0200] 术语“表达”根据本发明以其最普遍的含义使用,包括产生RNA和/或肽或蛋白,例如通过转录和/或翻译。关于RNA,术语“表达”或“翻译”特别涉及产生肽或蛋白。其还包括核

酸的部分表达。此外,表达可以是瞬时或稳定的。根据本发明,术语表达还包括“异常表达”或“不正常表达”。

[0201] “异常表达”或“不正常表达”根据本发明表示与参考相比,例如没有与某种蛋白(例如,纤连蛋白额外结构域B)的异常或不正常表达相关的疾病的个体中的状态,表达改变,优选增加。表达增加是指增加至少10%,特别是至少20%、至少50%、至少100%、至少200%、至少500%、至少1000%、至少10000%,或者更多。在一实施方案中,仅在患病组织中发现表达,而健康组织中的表达受到抑制。

[0202] 术语“特异性地表达”表示蛋白基本上仅在特异性组织或器官中表达。例如,在胃粘液中特异性表达的蛋白表示所述蛋白主要在胃粘液中表达,并且不在其他组织中表达或者在其他组织或器官类型中不表达至显著程度。因此,仅在胃粘液细胞中表达且在任何其他组织(如睾丸)中表达至显著较少程度的蛋白在胃粘液细胞中特异性地表达。

[0203] 根据本发明,术语“核酸编码”表示如果存在于适当环境中,优选在细胞内,核酸可以表达以产生其编码的蛋白或肽。

[0204] 根据本发明描述的核酸优选是已分离的。术语“分离的核酸”根据本发明表示所述核酸是:(i)体外扩增的,例如通过聚合酶链反应(PCR),(ii)通过克隆重组产生的,(iii)纯化的,例如通过切割和凝胶电泳分级分离,或者(iv)合成的,例如通过化学合成。分离的核酸是可用于重组DNA技术操作的核酸。

[0205] 根据本发明,关于例如核酸和氨基酸序列的术语“变体”包括任何变体,特别是突变体、剪接变体、构象、同种型、等位基因变体、物种变体和物种同系物,特别是天然存在的那些。等位基因变体涉及基因正常序列中的改变,其意义通常不清楚。完整基因测序常鉴定给定基因的许多等位基因变体。物种同系物是与给定核酸或氨基酸序列具有不同物种来源的核酸或氨基酸序列。

[0206] 关于核酸分子,术语“变体”包括简并核酸序列,其中根据本发明的简并核酸是由于遗传密码的简并性而在密码子序列上不同于参考试核酸的核酸。

[0207] 此外,根据本发明的特定核酸序列的“变体”包括这样的核酸序列,其包含单个或多个如至少2个、至少4个或至少6个并且优选多达3个、多达4个、多达5个、多达6个、多达10个、多达15或多达20个核苷酸取代、缺失和/或添加。

[0208] 优选地,给定核酸序列和所述给定核酸序列变体的核酸序列之间的相同性程度是至少约60%、65%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。优选对参考试核酸序列的整个长度的至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%的区域给出相同性程度。例如,如果参考试核酸序列由200个核苷酸组成,优选对至少约20个、至少约40个、至少约60个、至少约80个、至少约100个、至少约120个、至少约140个、至少约160个、至少约180个或约200个核苷酸给出相似性或相同性程度,优选连续的核苷酸。在优选的实施方案中,对参考试核酸序列的整个长度给出相同性程度。

[0209] 两个核酸序列之间的“序列相同性”表示所述序列之间相同的核苷酸的百分比。

[0210] 术语“百分比相同性”意图表示最佳比对之后获得的待比较的两个序列之间相同的核苷酸的百分比,这个百分比纯粹是统计的,并且两个序列之间的差异随机分布并在它

们的整个长度中。两个核苷酸序列之间的序列比较通常通过在将它们最佳对齐之后比较这些序列来进行,所述比较通过分段或通过“比较窗口”进行以鉴定和比较局部区域序列相似性。除了手动,用于比较的序列的最佳比对可以这样进行,通过Smith and Waterman,1981, *Ads App. Math.* 2, 482的局部同源性算法,通过Neddleman and Wunsch,1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443的局部同源性算法,通过Pearson and Lipman,1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444的相似性搜索方法,或者通过使用这些算法的计算机程序(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis. 中的GAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N和TFASTA)。

[0211] 百分比相同性这样计算,通过确定比较的两个序列之间相同位置的数目,将这个数目除以比较的位置数目并将获得的结果乘以100以获得这两个序列之间的百分比相同性。

[0212] 优选地,给定核酸序列和作为所述给定核酸序列的变体的核酸序列能够杂交。

[0213] 如果两个序列彼此互补,则核酸与另一核酸“能够杂交”或“杂交”。如果两个序列能够彼此形成稳定的双链体,则核酸与另一核酸“互补”。根据本发明,优选在允许多核苷酸之间特异性杂交的条件(严格条件)下进行杂交。严格条件在例如Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., Editors, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989或Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., Editors, John Wiley & Sons, Inc., New York中描述,是指例如在杂交缓冲液(3.5×SSC, 0.02% Ficoll, 0.02% 聚乙烯吡咯烷酮, 0.02% 牛血清白蛋白, 2.5mM NaH₂PO₄ (pH 7), 0.5% SDS, 2mM EDTA) 中于65°C下杂交。SSC是0.15M氯化钠/0.15M柠檬酸钠, pH 7。杂交之后,将已转移DNA的膜洗涤,例如,在室温下以2×SSC洗涤,然后在高达68°C的温度下以0.1–0.5×SSC/0.1×SDS洗涤。

[0214] 百分比互补性表示可以与第二核酸序列形成氢键(例如, Watson-Crick碱基配对)的核酸分子中连续残基的百分比(例如, 10个中5、6、7、8、9、10个是50%、60%、70%、80%、90%和100%互补)。“完美互补”或“完全互补”表示核酸序列的所有连续残基会与第二核酸序列中相同数目的连续残基氢键键合。优选地,根据本发明的互补程度是至少70%, 优选至少75%, 优选至少80%, 更优选至少85%, 甚至更优选至少90%, 或者最优选至少95%、96%、97%、98%或99%。最优选地,根据本发明的互补程度是100%。

[0215] 术语“衍生物”包括在核苷酸碱基上、在糖上或在磷酸上的核酸的任何化学衍生。术语“衍生物”还包括含有非天然存在的核苷酸和核苷酸类似物的核酸。优选地,核酸的衍生化增加其稳定性。

[0216] 根据本发明,核酸可以单独存在或与其他核酸组合存在,特别是异源核酸。优选地,编码肽或蛋白的核酸表达所述肽或蛋白。在优选的实施方案中,将核酸功能性地连接至表达控制序列或调节序列,所述表达控制序列或调节序列可以与所述核酸同源或异源。如果将编码序列和调节序列以所述核酸的表达或转录在所述调节序列的控制或影响下的方式互相共价连接,则它们互相“功能性地”连接。如果将编码序列翻译为功能蛋白,则通过功能性地连接至所述编码序列的调节序列,诱导所述调节序列导致所述编码序列的转录,而不会引起编码序列的移码或所述编码序列不能翻译为期望的蛋白或肽。

[0217] 根据本发明,术语“表达控制序列”或“调节序列”包括启动子、增强子和调节基因

表达的其他控制元件。在本发明的特定实施方案中,可以调节表达控制序列。调节序列的精确结构可以根据物种或细胞类型变化,但是一般包含5'非转录和5'非翻译序列,其分别参与转录和翻译的起始,如TATA盒、加帽序列、CAAT序列等。更具体地,5'非转录调节序列包含启动子区,其包括用于功能性连接的基因的转录控制的启动子序列。调节序列还可以包含增强子序列或上游激活序列。

[0218] 根据本发明,核酸还可以与另一核酸组合存在,所述另一核酸编码这样的肽,所述肽控制所述核酸编码的蛋白或肽从宿主细胞的分泌。根据本发明,核酸还可以与另一核酸组合存在,所述另一核酸编码这样的肽,所述肽导致编码的蛋白或肽锚定在宿主细胞的细胞膜上或分隔入所述细胞的特定细胞器。相似地,与核酸的组合是可能的,其代表一种报道基因或任何“标签”。

[0219] 在一优选实施方案中,根据本发明,重组核酸分子是载体,在适当情况下具有控制核酸表达的启动子。术语“载体”在本文中以其最普遍的含义使用,并且包括用于核酸的任何中间媒介物,例如,其使得能够将所述核酸引入原核和/或真核细胞,并且在适当情况下能够整合至基因组中。这种载体优选在细胞中复制和/或表达。中间媒介物可以例如适合用于电穿孔、用微粒轰击、脂质体给药、借助于农杆菌转移或者通过DNA或RNA病毒插入。载体包括质粒、噬粒、噬菌体或病毒基因组。

[0220] 根据本发明的核酸可以用于宿主细胞的转染。这里核酸表示重组DNA和RNA。重组RNA可以通过DNA模板的体外转录来制备。此外,可以在应用之前通过稳定序列、加帽和多腺苷酸化来对其进行修饰。

[0221] 在本发明的上下文中术语“重组”表示“通过遗传工程制备”。优选地,在本发明的上下文中“重组物体”如重组核酸不是天然存在的。

[0222] 如本文所用的术语“天然存在”是指物体可以在自然中发现这一事实。例如,存在于生物体(包括病毒)中且可以分离自自然来源并且尚未被人在实验室中有意修改的肽或核酸是天然存在的。

[0223] 术语“细胞”或“宿主细胞”优选涉及完整细胞,即具有完整膜的尚未释放其正常胞内组分(如酶、细胞器或遗传物质)的细胞。完整细胞优选是活细胞,即能够进行其正常代谢功能的活细胞。优选地,根据本发明,所述术语涉及可以用外源核酸转染的任何细胞。优选地,当用外源核酸转染时,所述细胞可以表达该核酸。

[0224] 根据本发明,术语“宿主细胞”包括原核(例如大肠杆菌(*E. coli*))或真核细胞(例如树突细胞、B细胞、CHO细胞、COS细胞、K562细胞、酵母细胞和昆虫细胞)。特别优选哺乳动物细胞如来自人、小鼠、仓鼠、猪、山羊和灵长类的细胞。细胞可以源自多种组织类型,并且包括原代细胞和细胞系。具体实例包括角质形成细胞、外周血白细胞、骨髓干细胞和胚胎干细胞。核酸可以以单拷贝或者两个或更多个拷贝的形式存在于宿主细胞中,并且在实施方案中,在宿主细胞中表达。

[0225] 术语“肽”包括寡和多肽,并且是指包含通过肽键共价连接的2个或更多个,优选3个或更多个,优选4个或更多个,优选6个或更多个,优选8个或更多个,优选10个或更多个,优选13个或更多个,优选16个或更多个,优选21个或更多个并且优选多达8、10、20、30、40或50个,特别是100个氨基酸的物质。术语“蛋白”是指大肽,优选具有超过100个氨基酸残基的肽,但是一般术语“肽”和“蛋白”是同义的,并且在本文中可互换使用。

[0226] 根据本发明,肽可以包括天然氨基酸和非天然氨基酸。在一实施方案中,肽仅包括天然氨基酸。

[0227] 根据本发明,术语“非天然氨基酸”是指具有与20个天然氨基酸种类不同的结构的氨基酸。因为非天然氨基酸具有与天然氨基酸相似的结构,非天然氨基酸可以分为给定天然氨基酸的衍生物或类似物。

[0228] 根据本发明,术语“环肽”涉及形成环的肽或多肽链。肽可以以四种不同方式环化:头至尾(C-末端至N-末端)、头至侧链、侧链至尾或侧链至侧链。根据本发明特别优选的是包含两个或更多个含有巯基的残基如半胱氨酸的肽,所述残基可以形成分子内二硫键,产生环肽。

[0229] 根据本发明,肽可以共价或非共价结合至一种或多种其他化合物。这类化合物包括肽化合物如肽和蛋白,以及非肽化合物如聚乙二醇(PEG)。

[0230] 在一实施方案中,本文描述的肽是聚乙二醇化的。聚乙二醇化是聚乙二醇(PEG)聚合物链共价连接至另一分子(如肽或蛋白)的过程。PEG的共价连接可以从宿主免疫系统“掩盖”物质(降低的免疫原性和抗原性),并且增加物质的流体动力学大小(在溶液中的大小),从而通过减少肾脏清除而延长其循环时间。聚乙二醇化还可以为疏水性药物和蛋白提供水溶性。

[0231] 优选地,根据本发明描述的蛋白和肽是已分离的。术语“分离的蛋白”或“分离的肽”表示蛋白或肽已与其天然环境分离。分离的蛋白或肽可以处于基本上纯化的状态。术语“基本上纯化的”表示蛋白或肽基本上不含其在自然中或体内相关的其他物质。这类蛋白和肽可以例如用于免疫学或诊断测定或者用作治疗剂。根据本发明描述的蛋白和肽可以分离自生物样品如组织或细胞匀浆,并且还可以在多种原核和真核表达细胞中重组表达。

[0232] 术语“抗体”包括至少包含通过二硫键互相连接的两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白,以及包含这种糖蛋白的抗原结合部分的任何分子。术语“抗体”包括单克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、包含抗体的结合片段或衍生物,包括但不限于单链抗体,例如,scFv以及和抗原结合抗体片段如Fab和Fab'片段,并且还包括抗体的所有重组形式,例如,原核生物中表达的抗体、未糖基化的抗体以及如本文描述的任何抗原结合抗体片段和衍生物。每条重链包含重链可变区(在本文中缩写为VH)和重链恒定区。每条轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区。VH和VL区可以进一步细分为高变性的区域,称作互补性决定区(CDR),散布于较保守的区域,称作框架区(FR)。每个VH和VL由3个CDR和4个FR组成,从氨基-末端至羧基-末端按照以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白结合至宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0233] 本文给出的关于特定氨基酸序列的教导,例如序列列表中示出的那些序列,应当理解为还涉及所述特定序列的变体,所述变体导致与所述特定序列功能上等同的序列,例如表现出与特定氨基酸序列相同或相似特性的氨基酸序列。一个重要特性是保留对靶标如纤连蛋白额外结构域B的结合。

[0234] 为了本发明的目的,氨基酸序列的“变体”包含氨基酸插入变体、氨基酸添加变体、氨基酸缺失变体和/或氨基酸取代变体。在蛋白的N-末端和/或C-末端包含缺失的氨基酸缺

失变体也称作N-末端和/或C-末端截短变体。

[0235] 氨基酸插入变体包括在特定氨基酸序列中插入单个或两个或更多个氨基酸。在具有插入的氨基酸序列变体的情况下,将一个或多个氨基酸残基插入氨基酸序列中的特定位点,尽管适当筛选所得产物的随机插入也是可能的。

[0236] 氨基酸添加变体包含一个或多个氨基酸的氨基-和/或羧基-末端融合,如1、2、3、5、10、20、30、50或更多个氨基酸。

[0237] 氨基酸缺失变体的特征在于从序列去除一个或多个氨基酸,如去除1、2、3、5、10、20、30、50或更多个氨基酸。缺失可以在肽或蛋白的任何位置。

[0238] 氨基酸取代变体的特征在于去除序列中的至少一个残基并在其位置插入另一残基。优先考虑在同源蛋白或肽之间不保守的氨基酸序列位置中的修饰和/或用具有相似特性的其他氨基酸代替氨基酸。优选地,蛋白变体中的氨基酸改变是保守氨基酸改变,即,相似带电荷或不带电荷的氨基酸的取代。保守氨基酸改变涉及在它们的侧链中相关的氨基酸家族之一的取代。天然存在的氨基酸一般分为4个家族:酸性(天冬氨酸、谷氨酸),碱性(赖氨酸、精氨酸、组氨酸),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)和不带电荷的极性(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)氨基酸。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时共同归类为芳香氨基酸。

[0239] 优选地,给定氨基酸序列和所述给定氨基酸序列变体的氨基酸序列之间的相似性程度,优选相同性程度是至少约60%、65%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。优选对参考氨基酸序列的整个长度的至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%的氨基酸区域给出相似性或相同性程度。例如,如果参考氨基酸序列由200个氨基酸组成,优选对至少约20、至少约40、至少约60、至少约80、至少约100、至少约120、至少约140、至少约160、至少约180或约200个氨基酸给出相似性或相同性程度,优选连续的氨基酸。在优选的实施方案中,对参考氨基酸序列的整个长度给出相似性或相同性程度。可以利用本领域已知的工具确定序列相似性,优选序列相同性的比对,优选利用最佳序列比对,例如,利用Align,利用标准设置,优选EMBOSS::needle,Matrix:Blosum62,Gap Open 10.0,Gap Extend 0.5。

[0240] “序列相似性”表示相同或代表保守氨基酸取代的氨基酸的百分比。两个氨基酸序列之间的“序列相同性”表示所述序列之间相同的氨基酸的百分比。

[0241] 术语“百分比相同性”意图表示最佳比对之后获得的待比较的两个序列之间相同的氨基酸残基的百分比,这个百分比纯粹是统计的,并且两个序列之间的差异随机分布并在它们的整个长度中。两个氨基酸序列之间的序列比较通常通过在将它们最佳对齐之后比较这些序列进行,所述比较通过分段或通过“比较窗口”进行以鉴定或比较序列局部区域相似性。除了手动,用于比较的序列的最佳比对可以这样进行,通过Smith and Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482的局部同源性算法,通过Neddleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443的局部同源性算法,通过Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444的相似性搜索方法,或者通过使用这些算法的计算机程序(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis. 中的GAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N和TFASTA)。

[0242] 百分比相同性是这样计算的,通过确定比较的两个序列之间相同位置的数目,将这个数目除以比较的位置数目并将获得的结果乘以100以获得这两个序列之间的百分比相同性。

[0243] 本文描述的肽和氨基酸变体可以借助已知的肽合成技术容易地制备,例如,通过固相合成(Merrifield,1964)和相似方法或者通过重组DNA操作。例如,Sambrook等人(1989)详细描述了用于制备具有取代、插入或缺失的蛋白和肽的DNA序列的操作。

[0244] 根据本发明,术语“肽”或“蛋白”包括肽和蛋白的“衍生物”。这类衍生物是肽和蛋白的修饰形式。这类修饰包括任何化学修饰,并且包含与肽或蛋白相关的任何分子的单个或多个取代、缺失和/或添加,如碳水化合物、脂质、蛋白和/或肽。术语“衍生物”还延伸至所述肽和蛋白的所有功能性化学等价物。优选地,修饰的肽具有增加的稳定性和/或增加的免疫原性。

[0245] 本发明的纤连蛋白额外结构域B结合剂可以用于治疗方法。为此,可以将本发明的纤连蛋白额外结构域B结合剂共价和/或非共价结合至一个或多个治疗效应子部分和/或与各种组分组合以产生药学可接受的组合物。药剂如本文描述的肽可以以任何合适的药物组合物的形式给药。

[0246] “靶细胞”应当表示任何不期望的细胞如癌细胞。在优选的实施方案中,靶细胞与纤连蛋白额外结构域B相关或在空间上相连,例如邻近,例如,靶细胞存在于癌症或肿瘤内,所述癌症或肿瘤涉及表达纤连蛋白额外结构域B的细胞如肿瘤细胞和/或内皮细胞。在一实施方案中,纤连蛋白额外结构域B在肿瘤组织内和/或周围表达,如肿瘤组织的胞外基质中和/或在肿瘤血管如肿瘤新血管中和/或在肿瘤血管如肿瘤新血管处。

[0247] 根据本发明,术语“治疗效应子部分”表示可以发挥治疗作用的任何分子。根据本发明,优选将治疗效应子部分选择性地引导至纤连蛋白额外结构域B或者与纤连蛋白额外结构域B相关或在空间上相连的细胞。任何对癌细胞发挥治疗作用的物质都可以用作药物缀合至纤连蛋白额外结构域B结合剂。优选地,如本文讨论的,药物的缀合不改变或不显著改变纤连蛋白额外结构域B的结合特征,特别是特异性。

[0248] 根据本发明,治疗效应子部分包括抗癌剂、放射性同位素如放射性碘标记的化合物、毒素、细胞生长抑制或细胞溶解药物等。抗癌剂包括例如氨鲁米特、硫唑嘌呤、硫酸博来霉素、白消安、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、环胞素、阿糖胞苷(cytarabidine)、达卡巴嗪、放线菌素D、柔红霉素(daunorubin)、多柔比星、紫杉醇、依托泊苷、氟尿嘧啶、干扰素- α 、洛莫司汀、巯嘌呤、甲氨蝶呤、米托坦、盐酸丙卡巴肼、硫鸟嘌呤、硫酸长春碱和硫酸长春新碱。其他抗癌剂在例如Goodman and Gilman,“The Pharmacological Basis of Therapeutics”,8th Edition,1990,McGraw-Hill,Inc.,特别是第52章(Antineoplastic Agents(Paul Calabresi and Bruce A.Chabner)中进行了描述。毒素可以是蛋白如商陆抗病毒蛋白、霍乱毒素、百日咳毒素、蓖麻毒蛋白、白树毒素、相思豆毒蛋白、白喉外毒素或假单胞菌毒素。毒素残基还可以是高能发射放射性核素如钴-60。

[0249] 治疗效应子部分特别包括细胞毒素或细胞毒性剂。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害,特别是杀死细胞的任何物质。

[0250] 可用的细胞毒性剂类别包括例如抗微管蛋白剂、DNA小沟区结合剂(例如,烯二炔和lexitropsin类)、DNA复制抑制剂、烷化剂(例如,铂络合物如顺铂、单(铂)、双(铂)和三核

铂络合物以及卡铂)、葱环类、抗生素、抗叶酸剂、抗代谢药、化疗敏化剂、杜卡霉素(duocarmycin)、依托泊苷、氟化嘧啶、离子载体、亚硝基脲、platinol、预形成化合物、嘌呤抗代谢物、嘌呤霉素、放射敏化剂、类固醇、紫杉烷类(例如,紫杉醇和多西他赛)、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等。

[0251] 单独的细胞毒性剂包括例如雄激素、安曲霉素(AMC)、天冬酰胺酶、5-氮杂胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、白消安、buthionine sulfoximine、喜树碱、卡铂、卡莫司汀(BSNU)、CC-1065、苯丁酸氮芥、顺铂、秋水仙碱、环磷酰胺、阿糖胞苷、cytidine arabinoside、细胞松弛素B、达卡巴嗪、放线菌素D(以前的放线菌素)、柔红霉素、decarbazine、多西他赛、多柔比星、雌激素、5-氟脱氧尿苷(5-fluorodeoxyuridine)、5-氟尿嘧啶、短杆菌肽D、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊立替康、洛莫司汀(CCNU)、氮芥、美法仑、6-巯嘌呤、甲氨蝶呤、光神霉素、丝裂霉素C、米托蒽醌、硝基咪唑、紫杉醇、普卡霉素、甲基苄肼(procabazine)、链佐星、替尼泊苷(tenoposide)、6-硫鸟嘌呤、thioTEPA、托泊替康、长春碱、长春新碱、长春瑞滨、VP-16和VM-26。

[0252] 抗微管蛋白剂的实例包括但不限于多拉司他汀类(例如,auristatin E、AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB)、美登素类、紫杉烷类(例如,紫杉醇、多西他赛)、T67(Tularik)、长春花生物碱(例如,长春新碱、长春碱、长春地辛和长春瑞滨)、浆果赤霉素衍生物、紫杉烷类似物(例如,埃坡霉素A和B)、诺考达唑、秋水仙碱和秋水仙胺(colcimid)、雌莫司汀、隐藻素(cryptophysin)类、西马多丁、考布他汀、圆皮海绵内酯(discodermolide)以及艾榴素(eleutherobin)。

[0253] 产生细胞毒性放射性药物的放射性同位素包括例如碘-131、钷-90或铟-111。

[0254] 将这样的治疗效应子部分(药物)缀合至肽的技术是本领域公知的。可以通过技术人员已知的任何技术完成肽-药物缀合物的产生。肽和药物可以通过它们自己的接头基团直接互相结合,或者通过接头或其他物质间接互相结合。

[0255] 许多不同反应可用于将药物共价连接至肽。这通常是通过肽分子的氨基酸残基反应来完成的,包括赖氨酸的胺基团、谷氨酸和天冬氨酸的游离羧酸基团、半胱氨酸的巯基以及芳香族氨基酸的各种部分。共价连接的最常用的非特异性方法之一是碳二亚胺反应,将化合物的羧基(或氨基)基团连接至肽的氨基(或羧基)基团。此外,双官能剂如二醛或亚氨酸酯已用来将化合物的氨基连接至肽分子的氨基。Schiff碱反应也可用于将药物连接至肽。这种方法涉及含有二醇或羟基基团的药物的高碘酸盐氧化,因此形成醛,然后使其与肽分子反应。通过与肽分子的氨基形成Schiff碱发生连接。异硫氰酸盐也可以用作偶联剂将药物共价连接至肽。其他技术是技术人员已知的,并且在本发明的范围内。

[0256] 有许多本领域已知的连接基团用于制备肽-药物缀合物。接头优选包含一个或多个与肽和药物之一或两者反应的官能团。官能团的实例包括氨基、羧基、巯基、马来酰亚胺和吡啶基。

[0257] 在本发明的一实施方案中,肽通过双功能交联剂与药物连接。如本文所用,“双功能交联剂”是指具有两个反应基团的试剂,其中一个能够与肽反应,而另一个能够与药物反应以连接肽与药物,从而形成缀合物。任何合适的双功能交联剂可以与本发明结合使用,只要接头试剂提供药物的保留,例如,细胞毒性,以及肽的靶向特征。优选地,接头分子通过化学键将药物连接至肽,从而药物和肽互相化学偶联(例如,共价键合)。

[0258] 在一实施方案中,双功能交联剂包含不可切割的接头。不可切割的接头是能够以稳定的共价方式将药物连接至肽的任何化学部分。优选地,不可切割的接头在生理条件下是不可切割的,特别是在体内和/或细胞内。因此,在药物或肽保持活性的条件下,不可切割的接头基本上抗酸诱导的切割、光诱导的切割、肽酶诱导的切割、酯酶诱导的切割和二硫键切割。在药物和肽之间形成不可切割的接头的合适的交联剂是本领域公知的。在一实施方案中,药物通过硫醚键连接至肽。

[0259] 在一特别优选的实施方案中,连接试剂是可切割的接头。优选地,可切割的接头在生理条件下是可切割的,特别是在体内和/或细胞内。合适的可切割的接头的实例包括二硫化物接头、酸不稳定的接头、光不稳定的接头、肽酶不稳定的接头和酯酶不稳定的接头。

[0260] 接头的实例包括但不限于N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫代)丁酸酯(SPDB)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPDP)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(Sulfo-SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷羧酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯)(LC-SMCC)、4-马来酰亚胺基丁酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(GMBS)、3-马来酰亚胺基己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、m-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(α -马来酰亚胺基乙酰氧基)-琥珀酰亚胺酯(AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸酯(SMPH)、N-琥珀酰亚胺基-4-(p-马来酰亚胺基苯基)-丁酸酯(SMPB)、N-(p-马来酰亚胺基苯基)异氰酸酯(PMPI)、6-马来酰亚胺基己酰基(MC)、马来酰亚胺基丙酰基(MP)、p-氨基苄氧基羰基(PAB)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶硫代)戊酸酯(SPP)以及N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)。还可以使用肽接头如缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)或丙氨酸-苯丙氨酸(ala-phe),并且可以以适当组合使用任何上述接头。

[0261] 包含二硫化物的接头是通过二硫化物交换可切割的接头,其可以在生理条件下发生。在其他实施方案中,接头在还原条件下是可切割的(例如,二硫化物接头)。各种二硫化物接头是本领域已知的,包括例如可以利用SATA(N-琥珀酰亚胺基-5-乙酰基硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫代)丁酸酯)和SMPT(N-琥珀酰亚胺基-氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代)甲苯)形成的那些。

[0262] 酸不稳定的接头是在酸性pH下可切割的接头。例如,某些细胞内区室(如内体和溶酶体)具有酸性pH(pH 4-5),并且提供适合切割酸不稳定的接头的条件。酸不稳定的接头在中性pH条件(如血液中的条件)下相对稳定,但是在pH 5.5或5.0以下不稳定。例如,可以使用脎、缩氨基脒、缩氨基硫脒、顺式乌头酸酰胺、原酸酯、缩醛、缩酮等。

[0263] 光不稳定的接头可用于体表和许多光可及的体腔中。此外,红外光可以穿透组织。

[0264] 肽酶不稳定的接头可以用来切割细胞内或细胞外的某些肽。在一实施方案中,在温和条件下,即在细胞毒性剂的活性不受影响的细胞内条件下,切割可切割的接头。

[0265] 接头可以是或可以包含例如肽基接头,其被细胞内肽酶或蛋白酶切割,包括但不限于溶酶体或内体蛋白酶。通常,肽基接头的长度为至少2个氨基酸或至少3个氨基酸。切割剂可以包括组织蛋白酶B和D以及纤维蛋白溶酶,它们均已知水解二肽药物衍生物,导致在靶细胞内释放活性药物。例如,可以使用可被癌组织中高表达的硫醇依赖性蛋白酶组织蛋白酶-B切割的肽基接头(例如,Phe-Leu或Gly-Phe-Leu-Gly接头)。在具体的实施方案中,可

被细胞内蛋白酶切割的肽基接头是缬氨酸-瓜氨酸 (Val-Cit;vc) 接头或苯丙氨酸-赖氨酸 (Phe-Lys) 接头。使用治疗剂的细胞内蛋白水解释放的一个优点是,当缀合时,药剂通常减弱,并且缀合物的血清稳定性通常很高。

[0266] 术语“个体”和“主体”在本文中可互换使用。它们是指可以患有或易患疾病或病症(例如,癌症)但是可能有或可能没有疾病或病症的人、非人灵长类或其他哺乳动物(例如小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、猪、羊、马或灵长类)。在许多实施方案中,个体是人。除非另有说明,术语“个体”和“主体”不表示特定年龄,因此涵盖成年、老年、幼年和新生儿。在本发明的优选实施方案中,“个体”或“主体”是“患者”。根据本发明术语“患者”表示治疗的主体,特别是患病主体。

[0267] 术语“疾病”是指影响个体身体的异常状况。疾病通常理解为与特定症状或体征有关的医学状况。疾病可以由源自外部来源的因素引起,如传染病,或者其可以由内部功能失调引起,如自身免疫性疾病。在人中,“疾病”通常更广泛地用来指引起患病个体的疼痛、功能障碍、痛苦、社会问题或死亡或者与个体接触的人的相似问题的任何状况。在这个更广泛的意义上,其有时包括损伤、残疾、病症、综合征、感染、分离的症状、偏差行为以及结构和功能的非典型变化,但是在其他上下文中和为了其他目的,这些可以认为是可区分的类别。疾病通常不仅在身体上,而且还在情感上影响个体,因为感染和患有许多疾病可以改变一个人的人生观和一个人的性格。根据本发明,术语“疾病”包括癌症,特别是本文所述癌症的那些形式。本文中任何提到癌症或癌症的特定形式的地方还包括其癌症转移。在一优选实施方案中,根据本申请治疗的疾病涉及表达纤连蛋白额外结构域B的细胞。

[0268] “涉及表达纤连蛋白额外结构域B的细胞的疾病”或相似表达根据本发明表示患病组织或器官的细胞表达纤连蛋白额外结构域B。在一实施方案中,与健康组织或器官中的状态相比,患病组织或器官的细胞的纤连蛋白额外结构域B表达增加。在一实施方案中,仅在患病组织中发现表达,而健康组织中的表达受到抑制。根据本发明,涉及表达纤连蛋白额外结构域B的细胞的疾病包括癌症疾病。此外,根据本发明,癌症疾病优选是其中细胞表达纤连蛋白额外结构域B的那些疾病。

[0269] 术语“癌症疾病”或“癌症”是指或描述个体中的生理状况,通常其特征在于无节制的细胞生长。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。更特别地,这类癌症的实例包括骨癌、血癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈的癌症、皮肤或眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛部癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、子宫癌、性和生殖器官癌、霍奇金病、食道癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、膀胱癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统 (CNS) 肿瘤、神经外胚层癌、脊髓轴肿瘤、神经胶质瘤、脑膜瘤以及垂体腺瘤。根据本发明的术语“癌症”还包括癌症转移。优选地,“癌症疾病”的特征在于纤连蛋白额外结构域B的表达或存在。

[0270] “转移”表示癌细胞从其原始部位扩散至身体的另一部分。转移的形成是非常复杂的过程,并且取决于恶性细胞从原发性肿瘤分离,胞外基质的侵袭,穿透内皮基底膜以进入体腔和血管,然后,通过血液运送之后,浸润靶器官。最后,在靶位点处新肿瘤的生长取决于血管生成。肿瘤转移甚至在去除原发性肿瘤之后经常发生,因为肿瘤细胞或组分可以保留并发展转移潜能。在一实施方案中,根据本发明的术语“转移”涉及“远处转移”,其涉及远离原发性肿瘤和区域淋巴结系统的转移。在一实施方案中,根据本发明的术语“转移”涉及淋

巴结转移。

[0271] 根据本发明,术语“肿瘤”或“肿瘤疾病”是指优选形成肿胀或病变的细胞(称作瘤细胞、致瘤细胞或肿瘤细胞)的异常生长。“肿瘤细胞”表示异常细胞,其通过快速、不受控制的细胞增殖生长,并且在引发新生长的刺激停止之后继续生长。肿瘤表现出部分或完全缺少正常组织的结构组织和功能协调,并且通常形成可能是良性、前恶性或恶性的明显的组织块。根据本发明,“癌症疾病”优选是“肿瘤疾病”。但是,一般来说,术语“癌症”和“肿瘤”在本文中可互换使用。

[0272] 优选地,根据本发明的肿瘤疾病是癌症疾病,即恶性疾病,并且肿瘤细胞是癌细胞。优选地,肿瘤疾病或癌症疾病的特征在于纤连蛋白额外结构域B的存在。在一实施方案中,癌症是纤连蛋白额外结构域B阳性癌症。

[0273] 当人再次受到过去影响他们的疾病状况影响时,发生旧病复发或复发。例如,如果患者已患有肿瘤疾病,已接受所述疾病的成功治疗并再次发展所述疾病,所述新发展的疾病可以认为是旧病复发或复发。但是,根据本发明,肿瘤疾病的旧病复发或复发可以但不必发生在原始肿瘤疾病的部位。肿瘤的旧病复发或复发还包括这样的情况,其中肿瘤发生在不同于原始肿瘤部位的部位以及在原始肿瘤的部位。优选地,患者已接受治疗的原始肿瘤是原发性肿瘤,在不同于原始肿瘤部位的部位的肿瘤是继发性或转移性肿瘤。

[0274] 术语“治疗”或“治疗性治疗”涉及改善健康状态和/或延长(增加)个体生命的任何治疗。所述治疗可以消除个体中的疾病,阻止或减缓个体中疾病的发展,抑制或减缓个体中疾病的发展,减少个体中症状的频率或严重程度,和/或减少目前患有或以前患有疾病的个体中的复发。

[0275] 术语“预防性治疗”或“预防治疗”涉及意图防止疾病在个体中发生的任何治疗。术语“预防性治疗”或“预防治疗”在本文中可互换使用。例如,有癌症风险的个体是预防癌症的疗法的候选人。

[0276] “有风险”表示个体,其鉴定为与一般群体相比,有比正常更高的机会发展疾病,特别是癌症。此外,曾经患有或目前患有疾病(特别是癌症)的个体是发展疾病的风险增加的个体,因为这样的个体可能继续发展疾病。目前患有或以前患有癌症的个体的癌症转移的风险也增加。

[0277] 癌症的(治疗性)治疗可以选自手术、化学疗法、放射疗法和靶向疗法。

[0278] 如本文所用,术语“手术”包括在手术中去除肿瘤。其是癌症的常见治疗。外科医生可以利用局部切除术去除肿瘤。

[0279] 如本文所用,术语“化学疗法”是指使用化学治疗剂或化学治疗剂的组合,优选通过杀死细胞或通过阻止其分裂来停止癌细胞的生长。当通过口腔或者静脉或肌肉注射采用化学疗法时,药物进入血流,并且可以到达全身的癌细胞(全身化学疗法)。当将化学疗法直接置于脑脊液、器官或体腔如腹部中时,药物主要影响那些区域中的癌细胞(局部化学疗法)。

[0280] 根据本发明的化学治疗剂包括细胞生长抑制化合物和细胞毒性化合物。传统的化学治疗剂通过杀死快速分裂的细胞发挥作用,这是大多数癌细胞的主要特性之一。这表示化学疗法还会损害在正常情况下快速分裂的细胞,如骨髓、消化道和毛囊中的细胞。这导致化学疗法中最常见的副作用。靶向在癌症中异常表达的蛋白(如纤连蛋白额外结构域B)并

通过缀合至药剂的治疗部分或药剂起作用的药剂可以视作化学疗法的一种形式。但是,在最严格的意义上,根据本发明的术语“化学疗法”不包括靶向疗法。

[0281] 根据本发明,术语“靶向疗法”涉及可以用来优先靶向患病的器官、组织或细胞(如癌组织或细胞)而不靶向或较小程度靶向未患病的器官、组织或细胞的任何疗法。靶向患病的器官、组织或细胞优选导致杀死和/或损害患病细胞的增殖或生存力。这样的疗法包括:
i) 缀合至治疗部分的药剂,其靶向某些靶标,例如,纤连蛋白额外结构域B,以递送治疗部分(例如缀合至治疗部分的纤连蛋白额外结构域B结合剂),或者ii) 靶向某些靶标的药剂,例如,纤连蛋白额外结构域B,并且其损害患病细胞的增殖、扩散、迁移和/或生存力(例如缀合至治疗部分或未缀合至治疗部分的纤连蛋白额外结构域B结合剂)。

[0282] 根据本发明描述的药物组合物 and 治疗方法还可以用来治疗性或预防本文描述的疾病。可以使用动物模型来测试对癌症的影响。例如,可以将人癌细胞引入小鼠以产生肿瘤。可以测量对癌细胞的影响(例如肿瘤大小的减小)作为对给药至动物的药剂的有效性的度量。

[0283] 肽可以以本身已知的方式给药。一般来说,配制并给药1ng-1mg,优选10ng-100 μ g的肽剂量。

[0284] 如果期望给药核酸(DNA和RNA),可以配制并给药1ng-0.1mg的剂量。

[0285] 在一实施方案中,通过离体方法给药核酸,即通过从患者体内取出细胞,对所述细胞进行遗传修饰以掺入核酸并将改变的细胞重新引入患者。这通常包括在体外将基因的功能性拷贝引入患者的细胞并将遗传改变的细胞重新引入患者。基因的功能性拷贝在调节元件的功能控制下,所述调节元件允许基因在遗传改变的细胞中表达。转染和转导方法是技术人员已知的。

[0286] 本发明还提供通过使用例如载体如病毒和靶标控制的脂质体在体内给药核酸。

[0287] 在一优选实施方案中,用于给药核酸的病毒或病毒载体选自腺病毒、腺相关病毒、痘病毒(包括痘苗病毒和减毒痘病毒)、塞姆利基森林病毒、逆转录病毒、Sindbis病毒和Ty病毒样颗粒。特别优选腺病毒和逆转录病毒。逆转录病毒通常是复制缺陷的(即它们不能产生感染性颗粒)。

[0288] 将核酸在体外或体内引入细胞的方法包括核酸磷酸钙沉淀的转染、与DEAE相关的核酸转染、用携带所关注的核酸的上述病毒转染或感染、脂质体介导的转染等。在特定实施方案中,优选将核酸引导至特定细胞。在这类实施方案中,用于将核酸给药至细胞的载体(例如逆转录病毒或脂质体)可以具有结合的靶标控制分子。例如,可以将分子如靶细胞上的表面膜蛋白特异性的抗体或靶细胞上的受体的配体掺入或附着至核酸载体。优选的抗体包含选择性地结合肿瘤抗原的抗体。如果期望通过脂质体给药核酸,可以将结合至与胞吞作用相关的表面膜蛋白的蛋白掺入脂质体制剂以使靶标控制和/或摄取成为可能。这类蛋白包括对特定细胞类型具有特异性的衣壳蛋白或其片段、针对内化蛋白的抗体、针对细胞内位点的蛋白等。

[0289] 本发明的治疗活性化合物可以通过任何常规途径给药,包括通过注射或输注。给药可以例如口服、静脉内、腹腔内、肌肉内、皮下或透皮进行。给药可以是局部的或全身的,优选全身的。

[0290] 术语“全身给药”是指药剂的给药,从而药剂以显著的量广泛分布于个体的身体中

并发展期望效应。例如,药剂可以在血液中发挥期望效应和/或通过血管系统到达其期望的作用部位。典型的全身给药途径包括通过将药剂直接引入血管系统给药或者口服、肺部或肌肉内给药,其中药剂被吸收,进入血管系统,并且通过血液携带至一个或多个期望的作用部位。

[0291] 根据本发明,优选全身给药是通过肠胃外给药。术语“肠胃外给药”是指药剂的给药不通过肠道。术语“肠胃外给药”包括静脉内给药、皮下给药、皮内给药或动脉内给药,但不限于此。

[0292] 本发明的药物组合物优选是无菌的,并且包含有效量的本文描述的药剂和任选存在的如本文讨论的其他药剂以产生期望的反应或期望的效应。

[0293] 药物组合物通常以均一的剂型提供,并且可以以本身已知的方式制备。药物组合物可以例如为溶液或悬浮液形式。

[0294] 药物组合物可以包含盐、缓冲物质、防腐剂、载剂、稀释剂和/或赋形剂,全部优选是药学可接受的。术语“药学可接受的”是指物质的无毒性,其不与药物组合物的活性组分的作用相互作用。

[0295] 非药学可接受的盐可以用于制备药学可接受的盐,并且包括在本发明中。这类药学可接受的盐以非限制性方式包含制备自以下酸的那些盐:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。药学可接受的盐还可以制备为碱金属盐或碱土金属盐,如钠盐、钾盐或钙盐。

[0296] 用于药物组合物的合适的缓冲物质包括盐中的乙酸、盐中的柠檬酸、盐中的硼酸和盐中的磷酸。

[0297] 用于药物组合物的合适的防腐剂包括苯扎氯铵、氯代丁醇、对羟基苯甲酸酯和硫柳汞。

[0298] 术语“载剂”是指自然或合成性质的有机或无机组分,其中将活性组分组合以促进、增强或使得能够应用。根据本发明,术语“载剂”还包括一种或多种相容的固体或液体填充剂、稀释剂或包裹物质,其适合给药至患者。

[0299] 可能的用于肠胃外给药的载剂物质是例如无菌水、林格氏液、乳酸林格氏液、无菌氯化钠溶液、聚亚烷基二醇、氢化萘以及,特别是,生物相容性丙交酯聚合物、丙交酯/乙交酯共聚物或聚氧乙烯/聚氧丙烯共聚物。

[0300] 可注射制剂可以包含药学可接受的赋形剂如乳酸林格氏液。

[0301] 当在本文中使用时,术语“赋形剂”意图表示可能存在于药物组合物中并且不是活性成分的所有物质,例如,载剂、粘合剂、润滑剂、增稠剂、表面活性剂、防腐剂、乳化剂、缓冲剂、增香剂或着色剂。

[0302] 本文描述的药剂或组合物以有效量给药。“有效量”是指单独或与进一步的剂量一起实现期望反应或期望效果的量。在治疗特定疾病或特定疾病状况的情况下,期望的反应优选涉及抑制疾病过程。这包括减缓疾病的发展,以及特别地,中断或逆转疾病的发展。治疗疾病或疾病状况中的期望反应还可以是延迟所述疾病或所述疾病状况的发生或者防止所述疾病或所述疾病状况的发生。

[0303] 本文描述的药剂或组合物的有效量取决于待治疗的疾病状况,疾病的严重程度,患者的个体参数,包括年龄、生理状况、尺寸和体重,治疗的持续时间,伴随疗法的类型(如

果存在),给药的具体途径以及相似因素。因此,本文描述的药剂的给药剂量可以取决于许多这样的参数。在用初始剂量患者中的反应不足的情况下,可以使用更高剂量(或者通过不同的、更局部化的给药途径有效达到的更高剂量)。

[0304] 本文描述的药剂和组合物可以例如体内给药至患者以治疗或预防各种病症(如本文描述的那些)。优选患者包括患有可以通过给药本文描述的药剂和组合物纠正或改善的病症的人类患者。这包括特征在于改变的纤连蛋白额外结构域B表达模式的病症。

[0305] 例如,在一实施方案中,本文描述的药剂可以用来治疗患有癌症疾病的患者,例如本文描述的特征在于存在纤连蛋白额外结构域B的癌症疾病。

[0306] 通过下文的图和实施例详细描述本发明,其仅用于说明目的而不是表示限制。根据描述和实例,技术人员容易理解同样包括在本发明内的其他实施方案。

附图说明

[0307] 图1:A:IMAC和SEC纯化之后FN-蛋白的SDS-PAGE分析。在还原(+ β -巯基乙醇)和非还原(- β -巯基乙醇)条件下,将总计10 μ g蛋白应用于SDS-PAGE。此外,利用ImageQuant软件通过光密度分析从未修饰的SDS-PAGE图像确定蛋白批次纯度。为了更好的可视化,在这个图像中已改变对比度和亮度。B:用抗His-和BC-1抗体的FN-6789、FN-67B89和FN-B的基于酶联免疫吸附测定(ELISA)的结合分析。误差条代表重复测量所致的标准偏差,每孔分别用1 μ g蛋白包被。

[0308] 图2:经过MCopt 1.0和MCopt 2.0文库的3轮噬菌体筛选之后富集的胱氨酸结小蛋白序列。示出了每个候选的克隆名称、胱氨酸结小蛋白序列和总筛选克隆的比例。可变氨基酸以粗体显示。鉴定的共同R-I/V-R-(L)基序以灰色突出显示。

[0309] 图3:MCopt 1.0文库的噬菌体展示筛选和随后的命中鉴定过程所得的EDB结合胱氨酸结小蛋白。基于通过ELISA确定的信号(FN-B)比噪声(BSA)比例计算等级值,并且将其进一步归一化为Trx-胱氨酸结小蛋白的表达率。可变氨基酸以粗体显示。

[0310] 图4:Trx-胱氨酸结小蛋白克隆MCopt 1.0-1/-2/-3和MCopt 2.0-1/-2/-3的特异性分析。将200nM的每种变体应用于固定的FN-B和FN-67B89靶蛋白以及对照蛋白FN-6789、奶粉和牛血清白蛋白(以1 μ g/孔包被)。将HRP缀合的抗s-标签抗体用来分析结合。一式两份进行ELISA,Trx-MC-Myc-010用作阴性对照。

[0311] 图5:Trx-胱氨酸结小蛋白克隆MCopt 1.0-2/-3和MCopt 2.0-1/-2/3的扩展特异性分析。将总计200nM的每种变体应用于FN-B、T7-TEV-B、FN-67B89和FN-B(8-14)靶蛋白以及阴性对照FN-6789、奶粉、牛血清白蛋白、溶菌酶、卵清蛋白和醛缩酶(以1 μ g/孔包被)。一式两份进行ELISA,误差条代表标准偏差,并且Trx-MC-Myc-010用作阴性胱氨酸结小蛋白对照。

[0312] 图6:MCopt 1.0-2/-3和MCopt 2.0-1/-2/-3EDB结合的饱和-结合曲线。以10种不同浓度针对FN-B、FN-67B89和FN-B(8-14)靶标以及针对FN-6789对照蛋白(以1 μ g/孔包被)测定Trx-胱氨酸结小蛋白结合。用HRP缀合的抗s-标签-抗体检测Trx-胱氨酸结小蛋白的结合。一式两份进行ELISA(FN-B(8-14)的单个值)。

[0313] 图7:A:用丙氨酸交换亲本MC-FN-010序列的第一、第二或第五个环中的各个氨基酸。丙氨酸取代以灰色突出显示。B:将亲本MC-FN-010和丙氨酸扫描变体作为Trx-融合蛋白

(50nM-1.563nM)用预包装的人FN-B孵育。用10ng的HRP缀合的抗s-标签-抗体检测结合。一式两份进行ELISA,并且在3个独立的测定中进行。通过确定表观结合常数并与亲本MC-FN-010比较来计算每个变体的相对结合。误差条代表三个重复测量的标准偏差。C:亲本MC-FN-010的序列。粗体字母和括号表示氨基酸半胱氨酸和二硫键连接度。以浅灰色突出显示的残基与靶标结合相关,以灰色标记的那些残基对结合相互作用没有贡献或在较小范围内促进结合相互作用。

[0314] 图8:MC-FN-010与胶质母细胞瘤异种移植肿瘤切片的特异性结合。用EDB配体MC-FN-010和阴性对照MC-FN-0115对U-87MG肿瘤组织进行免疫荧光染色的代表性结果。将组织切片(5 μ m)用四聚化的胱氨酸结小蛋白-生物素链霉亲和素(streptavidin)-Cy3复合物(红色)和抗CD31抗体染色以使脉管系统可见(绿色)。比例尺表示100 μ m。

[0315] 图9:A:使用ELISA的Trx-MC-FN-010对人FN-67B89和FN-6789的特异性分析。B:使用ELISA的Trx-MC-FN-016对人FN-67B89和FN-6789的特异性分析。用50ng的HRP缀合的抗S-标签-抗体检测Trx-MC-FN-010和Trx-MC-FN-016与浓度范围为1.56-50nM的FN-67B89的结合,与FN-6789进行比较。使用1 μ g包被的FN-67B89或FN-6789每孔一式两份进行ELISA。

[0316] 图10:A:表面等离子共振分析所得的MC-FN-010和MC-FN-016的动力学参数。将生物素化的人FN-67B89固定至链霉亲和素传感器以利用从4000nM开始的两倍连续稀释进行MC-FN-010和MC-FN-016的亲合力测定。利用应用于生成的传感图的1:1Langmuir拟合模型计算动力学参数。B:表面等离子共振所得的AF680-(MC-FN-010)₃和AF680-(MC-FN-016)₃的动力学参数,采用单周期动力学分析。将生物素化的人FN-67B89固定至链霉亲和素芯片以利用从10nM开始的两倍连续稀释进行AF680-(MC-FN-010)₃和AF680-(MC-FN-016)₃的结合测定。利用应用于生成的传感图的1:1Langmuir拟合模型计算动力学参数。

[0317] 图11:A:负荷U-87MG的小鼠的体内和离体成像。i.v.施加3.36nmol AF680-(MC-FN-010)₃、AF680-(MC-FN-016)₃(EDB结合物)和对照AF680-(MC-FN-0115)₃之后对小鼠进行成像,所述小鼠具有s.c.注射的人U-87MG细胞产生的肿瘤。将组分为3只小鼠每组,每组携带不同的肿瘤大小。注射后1h、2h和6h进行成像。体内成像之后,切除器官和肿瘤,称重并用于离体荧光信号分析。B:肿瘤、肾、肝和肺中荧光信号随时间的发展。利用Living Image 2.5成像分析软件将器官的荧光信号定量,并且根据各器官/肿瘤重量进行归一化。示出一式三份 \pm SE所得的数据集的平均值。用双向ANOVA计算统计显著性(*P<0.0342;**P<0.0055;***P=0.0001;****P<0.0001;n.s.=不显著)。

[0318] 图12:用EDB配体MC-FN-010和阴性对照MC-FN-0115的正常小鼠脑的代表性免疫荧光染色。将组织切片(6 μ m)用四聚化的胱氨酸结小蛋白-生物素链霉亲和素蛋白-Cy3复合物和抗CD31抗体染色以使脉管系统可见。比例尺,100 μ m。

[0319] 图13:MC-FN-010与源自生长为小鼠异种移植肿瘤的人U-87MG胶质母细胞瘤细胞系的组织切片的特异性结合。用三聚体MC-FN-010和阴性对照MC-FN-0115的U-87MG肿瘤组织(A)和正常小鼠脑(B)的代表性免疫荧光染色。将组织切片(6 μ m)用Alexa Fluor 680缀合的三聚体胱氨酸结小蛋白和抗CD31抗体染色并用二抗检测以使脉管系统可见。比例尺,20 μ m。

[0320] 图14:A:负荷U-87MG的小鼠的体内成像。i.v.施加单独的3.34nmol AF680-(MC-FN-016)₃,或者与同时(共注射)或在此之前30min(预注射)注射的3倍和5倍摩尔过量的

DOTA-(MC-FN-016)₃组合的3.34nmol AF680-(MC-FN-016)₃之后,对肿瘤进行成像,所述肿瘤源自Fox n1/nu小鼠侧翼s.c.注射的人U-87MG细胞。三重丙氨酸-突变肽AF680-(MC-FN-0115)₃用作阴性对照。B:i.v.注射探针之后6h器官的成像。C:将肿瘤中的荧光信号定量并根据各肿瘤重量归一化。

[0321] 图15:胱氨酸结小蛋白变体对EDB的SPR结合分析。通过表面等离子共振测量并利用1:1Langmuir拟合模型计算EDB特异性的胱氨酸结小蛋白变体的动力学参数。将生物素化的人FN-67B89固定至链霉亲和素传感器以利用两倍连续稀释确定DOTA-(MC-FN-016)₃的亲合力。

[0322] 实施例

[0323] 本文使用的技术和方法在本文中描述或以本身已知的方式进行,并且例如 Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd Edition(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.所述。除非特别说明,包括使用试剂盒和试剂在内的所有方法均根据制造商的信息进行。

[0324] 实施例1:材料和方法

[0325] 靶标表达、纯化的生物素化

[0326] 在这个研究中,重组人纤连蛋白EDB作为单独结构域(FN-B,Uniprot ID P02751,同种型7,氨基酸E1265-T1355)或侧翼是其周围的III型结构域(FN-67B89,氨基酸G1080-E1455)的重组人纤连蛋白EDB用作靶蛋白,而没有EDB的结构域6-9(FN-6789)用作对照。在大肠杆菌中表达所有变体,带有c-末端六组氨酸(H6)标签,并且通过固定金属离子亲和色谱(IMAC)和大小排阻色谱(SEC)进行纯化。为此,通过Thermo Fisher Scientific合成密码子优化的DNA序列,将其克隆入pET-21a表达载体(Novagen)并引入大肠杆菌BL21(DE3)细胞(Agilent)。在30°C,120rpm下以750-mL的规模表达蛋白直至达到约0.7的OD₆₀₀。为了诱导蛋白产生,将750μL 1M IPTG添加至主培养物并在25°C,120rpm下孵育过夜。收获细胞,重悬于10mL平衡缓冲液(20mM Tris-HCl pH 8.0,10%甘油,500mM NaCl,10mM咪唑)并通过超声处理(Branson Digital Sonifier 250)进行裂解。利用ÄKTAprime™ plus系统(GE Healthcare)和20min内10-500mM咪唑的线性梯度用1mL HisTrap柱(GE Healthcare)通过IMAC纯化上清液。随后,将蛋白在4°C下对PBS(14mM NaCl,2.7mM KCl,10mM Na₂HPO₄,1.8mM KH₂PO₄,pH 7.5)透析过夜,并且利用HiLoad 26/600Superdex 200pg(用于FN-67B89和FN-6789)或75pg(用于FN-B)柱(GE Healthcare)通过大小排阻色谱进一步纯化。通过SDS-PAGE、分析SEC并利用EDB特异性BC-1抗体(ab154210,Abcam)通过ELISA分析最终纯化的蛋白。将蛋白以等分试样的形式在-20°C下储存于补充了5%甘露醇和5%海藻糖的PBS中。

[0327] 根据制造商的介绍,利用EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin(Thermo Fisher Scientific)通过伯NH₂-基团将FN-B、FN-67B89和FN-6789蛋白生物素化。

[0328] FN-67B89靶蛋白的质量控制

[0329] 为了确定表达和纯化的FN-67B89蛋白的质量,以96-孔形式使用ELISA作为分析蛋白-蛋白相互作用的技术。在第一步中,使用50mM Na₂CO₃ pH 9.4包被缓冲液,在碱性条件下通过被动吸附将10μg/mL靶蛋白以100μL的体积包被在Maxisorb™ 96-孔板上。ELISA板的包被在4°C下进行过夜。去除包被缓冲液之后,将板用300μL PBS-T洗涤3次并添加300μL封闭缓冲液(PBS中3%BSA)。封闭在RT下进行2h。对于初次孵育,将板用300μL PBS-T洗涤3次并

用100 μ L在PBS-T中1:1000稀释的BC-1抗体在4 $^{\circ}$ C下孵育1h。用PBS-T洗涤3次之后,以100 μ L/孔添加在PBS中1:5000稀释的HRP缀合的抗小鼠抗体(554002, BD PharmingenTM)并在4 $^{\circ}$ C下孵育1h。然后将板用PBS-T洗涤3次并用PBS洗涤3次,随后通过HRP介导的TMB底物转化检测抗原-抗体复合物。将100 μ L TMB底物添加至孔,并且与样品中存在的分析物的量成正比显示蓝色。通过添加50 μ L 0.2M HCl终止显色,并且在450nm下测量吸光系数。

[0330] 通过噬菌体展示选择EDB特异性配体

[0331] 通过噬菌体展示,利用基于来自木鳖子的胰蛋白酶抑制剂II(oMCoTI-II)的开放链变体的两个不同组合文库选择EDB特异性胱氨酸结小蛋白。两个文库均基于M13噬粒系统,但在应用的随机化方案方面不同。在MCopt1.0文库中,环1(包括6、9和12个氨基酸的长度变化)和3以及N-末端的2个氨基酸已被随机化,而MCopt2.0文库是通过仅随机化环1的10个氨基酸来构建的。此外,它们的展示类型也不同,MCopt1.0是通过主要外壳蛋白pVIII呈现的,而MCopt2.0是通过pIII呈现的。

[0332] 每个文库总共进行了3轮基于包被有链霉亲和素(SA)的磁珠的筛选。对于一轮筛选,将2x50 μ LDynabeads[®]M-280链霉亲和素(Life Technologies)各自转移至2mL管中,并且用1mL TBS-T(50mM Tris,150mM NaCl,0.1%Tween-20,pH 7.4)洗涤。将200 μ L TBS(50mM Tris,150mM NaCl,pH 7.4)中的100 μ g生物素化的FN-B添加至第一个管中,将没有靶标的200 μ L TBS添加至第二个管中(噬菌体的阴性选择),并且将珠在滚动混合器上以30rpm孵育20min。将管放回磁体中,丢弃剩余溶液并将珠用TBS-T洗涤2次。将珠用TBS中的2%奶粉(Carl Roth)在4 $^{\circ}$ C和30rpm下封闭1h。当将生物素化的FN-B包被的SA-珠再封闭30min时,将 7×10^{13} (第一轮)和 7×10^{12} (第二和第三轮)噬菌体在1mL TBS中的2%奶粉中添加至未包被的SA珠并在RT,30rpm下孵育30min(阴性选择)。丢弃包被有靶标的珠的封闭液;将珠用TBS-T洗涤两次并添加来自阴性选择的噬菌体上清液。将包被有靶标的珠用噬菌体上清液在RT和30rpm下孵育1h。随后,洗去未结合的噬菌体,用TBS-T洗涤珠6次并用TBS洗涤珠2次。为了洗脱结合的噬菌体,进行pH-改变洗脱,将50 μ L 100mM三甲胺(TEA)添加至洗涤的珠。将TEA珠悬浮液在3000rpm下孵育6min,放回磁体中,并且将上清液转移至包含100 μ L 1M Tris/HCl pH 7的新管中进行中和。通过将50 μ L 100mM甘氨酸(pH 2)添加至包被有靶标的珠并将混合物在热混合器中以最大rpm孵育10min来进行第二步洗脱步骤。将管放回磁体中,并且将上清液转移至来自第一次洗脱的Tris/TEA混合物。将噬菌体洗脱液用来感染指数生长的大肠杆菌XL1-Blue(Agilent)用于噬菌体池扩增。将OD₆₀₀为0.5的1800 μ L大肠杆菌XL1-Blue细胞添加至洗脱液,并且在37 $^{\circ}$ C下不搅拌孵育30min和在37 $^{\circ}$ C下以150rpm搅拌孵育30min。然后将感染的XL1-Blue细胞分散在两个包含100 μ g/mL羧苄西林和0.4%葡萄糖的大琼脂平板上,并且在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜,然后在第二天进行噬菌体拯救。

[0333] 为了进行噬菌体拯救,每板分布4mL LB培养基并用细胞刮刀刮下细胞。将50-mL培养物接种至最终OD₆₀₀为0.2。使细胞生长直至OD₆₀₀为0.5并用 0.5×10^{12} VCSM13辅助噬菌体(Agilent)感染以从噬粒载体产生噬菌体。将大肠杆菌XL1-Blue细胞在37 $^{\circ}$ C下孵育30min,不搅拌,然后在150rpm的搅拌下在37 $^{\circ}$ C下孵育30min。将细菌悬浮液在RT下以4500x g离心10min,丢弃上清液。将细菌沉淀溶于50mL LB培养基(补充了100 μ g/mL羧苄西林、25 μ g/mL卡那霉素、1mM IPTG)中用于诱导蛋白生产,使大肠杆菌噬菌体生产培养物在30 $^{\circ}$ C,250rpm下生长过夜。通过在4 $^{\circ}$ C下以4500x g离心15min来收获大肠杆菌细胞。将10mL PEG/NaCl溶液

(25% (w/v) 聚乙二醇, 15% (w/v) NaCl) 添加至40mL包含噬菌体的上清液, 倒置并置于冰上30min。通过在4°C下以15.000x g离心20min沉淀噬菌体颗粒。丢弃上清液, 将噬菌体沉淀溶于1600μL Tris/HCl (pH 8.0) 中, 随后在4°C下以15.000x g离心10min。将包含噬菌体的上清液再次添加至400μL PEG/NaCl并在冰上孵育20min。第二次PEG/NaCl沉淀之后, 将管在4°C下以15.000x g离心15min。将噬菌体沉淀重悬于800μL Tris/HCl中, 并且在最后的纯化步骤中加热至65°C, 15min。将噬菌体悬浮液在RT下以15.000x g离心10min, 取上清液并利用双波长模式OD₂₆₉-OD₃₂₀光度法测定噬菌体颗粒浓度。根据M13噬菌体的核苷酸含量和摩尔消光系数计算噬菌体浓度 (Barbas et al. 2004)。

[0334] 所选胱氨酸结小蛋白的命中鉴定

[0335] 在鉴定过程中, 制备源自第三轮筛选的富集的筛选池噬粒以通过PCR扩增胱氨酸结小蛋白。将PCR-插入物克隆至pET-32a (Novagen) 的衍生物表达载体pET-32-LibEx中, 以使胱氨酸结小蛋白作为硫氧还蛋白-A融合变体表达。这个载体以连续顺序携带DNA序列, 所述DNA序列编码允许在细胞质中有效率形成二硫键的大肠杆菌硫氧还蛋白-A、用于快速纯化的H6-标签、用于通过抗体检测的s-标签以及去除融合标签的凝血酶切割位点。通过独特的Bam HI和Kpn I限制性位点将编码胱氨酸结小蛋白序列的DNA片段在凝血酶切割位点的下游引入pET-32-LibEx载体。通过热休克将载体导入大肠杆菌 SHuffle[®] T7Express细胞 (New England BioLabs), 并且将细胞铺在选择性琼脂培养基上。挑选单菌落, 测序并转移至96-孔板以在1mL自动诱导培养基 (MagicMedia[™], Thermo Fisher Scientific) 中小规模表达。在30°C和220pm下进行蛋白生产过夜。通过以3000x g离心15min收获细胞, 通过在包含0.1mg/mL溶菌酶 (Merck Millipore) and 5U/mL benzonase (Merck Millipore) 的缓冲液 (20mM Tris, 2mM MgCl₂, 20mM NaCl, pH 8) 中孵育结合冻融循环并在80°C下加热10min来裂解细胞。最后离心 (3000x g, 15min, 4°C) 以去除细胞碎片之后, 收集上清液用于E-PAGE[™]和结合分析。

[0336] E-PAGE[™] (Life Technologies) 用作高通量凝胶系统以同时平行分析96-探针, 用于产生和热纯化的蛋白的定量。根据制造商的说明书进行E-PAGE[™]分析。

[0337] ELISA用作分析蛋白-蛋白相互作用的技术。将96-孔微量滴定板 (Nunc MaxiSorp[™], Thermo Fisher Scientific) 的孔洞用1μg FN-B、牛血清白蛋白 (BSA, Eurobio)、奶粉、链霉亲和素 (Sigma Aldrich)、T7-His-TEV-B (LD BioPharma)、FN-B (8-14) (R&D Systems)、溶菌酶、卵清蛋白 (GE Healthcare Life Science)、醛缩酶 (GE Healthcare Life Science) 或0.6μg抗c-myc-抗体 (M4439, Sigma) 在4°C下包被过夜。将孔用PBS-T (含有0.1% (w/v) Tween-20的1x PBS) 洗涤3次, 用PBS中稀释的1x酪蛋白缓冲液 (Sigma Aldrich) 在RT下封闭2h并如所述再次洗涤。将20μL包含各自热纯化的融合蛋白的上清液添加至80μL PBS-T或200nM的在PBS-T中稀释的MC-Myc-010融合蛋白 (含有抗c-myc-抗体的孔), 施加至孔洞并在4°C下孵育1h。用PBS-T洗涤3次之后, 用辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的抗S-标签抗体 (ab18589或ab19324, Abcam) 检测各变体的结合。用TMB作为发色底物测量酶促反应, 并且在约5min之后用0.2M HCl终止。利用Infinite M200 PRO Microplate Reader (Tecan) 在450nm下测量吸光度。

[0338] 为了比较不同板之间的结合信号, 将ELISA信号根据内部板对照 (c-myc结合) 归一化。然后将归一化的FN-B信号参考归一化的BSA信号以评价所选胱氨酸结小蛋白的结合能

力。此外,靶结合信号与蛋白表达率相关,导致命中鉴定的等级值。

[0339] 重组胱氨酸结小蛋白的产生

[0340] 使用携带编码各胱氨酸结小蛋白序列的pET-32-LibEx载体的大肠杆菌 SHuffle[®] T7Express细胞在30℃,120rpm下以750-mL规模进行重组蛋白生产。培养物的OD₆₀₀达到约0.7之后,通过添加750μL 1M IPTG并在25℃,120rpm下孵育过夜来实现生产诱导。收获大肠杆菌细胞,重悬于10mL平衡缓冲液中,通过超声处理裂解并加热至80℃持续10min。将细胞碎片离心(15.000x g进行30min,4℃)之后,使用ÄKTAprime™ plus系统和在20min内10-500mM咪唑的线性梯度,用1mL HisTrap柱通过IMAC纯化上清液。收集包含胱氨酸结小蛋白融合蛋白的级分并在4℃下对凝血酶切割缓冲液(20mM Tris,150mM NaCl,1.5mM CaCl₂和5% (w/v) 甘油,pH 8.45)透析过夜。

[0341] 将融合蛋白直接用于基于ELISA的测定,或者在需要未标记的小蛋白的情况下进一步加工,例如用于SPR分析。为此,将融合蛋白用0.5U凝血酶(Sigma-Aldrich) /1mg蛋白切割并在37℃下孵育过夜。

[0342] 使用补充了0.05%三氟乙酸(TFA)的H₂O中2-80%乙腈的线性梯度,用Agilent 1260Infinity Quaternary LC系统(Agilent)和3mL RESOURCE™RPC柱(GE Healthcare)通过反相色谱进行蛋白片段的分离。作为最后一步,将包含胱氨酸结小蛋白的各个级分在RVC2-18-CD Plus SpeedVac(Christ)中冻干。通过称重确定胱氨酸结小蛋白的量,并且将肽以冻干形式储存在-20℃下。利用标准电喷雾电离方案,用LCMS Single Quad G6130B System(Agilent Technologies)通过质谱法验证身份。

[0343] 所选MC-FN-010的丙氨酸扫描诱变

[0344] 为了鉴定MC-FN-010内有助于EDB-结合的残基,进行丙氨酸扫描诱变。这种方法包括在定义的序列位置将氨基酸系统性替代为丙氨酸,以及随后对产生的突变体进行结合分析。为了产生丙氨酸扫描MC-FN-010衍生物,通过PCR引入突变,或者通过GeneArt™Strings™片段(Thermo Fisher Scientific)的直接合成组装整个编码序列。利用独特的BamHI和KpnI限制性位点将各DNA片段克隆入pET-32-LibEx表达载体并导入大肠杆菌 SHuffle[®] T7Express感受态细胞(New England BioLabs)。通过DNA测序验证所有突变。使用5mL选择性自动诱导培养基以24-孔形式表达丙氨酸扫描诱变变体。如上文对96-孔形式所述进行生产和融合蛋白纯化,但是包括使用HisPur™Ni-NTA旋转柱(Thermo Fisher Scientific)进一步纯化上清液的步骤。如上文所述用基于抗体的ELISA测定进行胱氨酸结融合蛋白对靶标和脱靶蛋白的结合能力和特异性。

[0345] 表面等离子共振光谱术

[0346] 使用Biacore T-100装置(GE Healthcare Life Science)用PBS-T作为运行缓冲液确定单体和三聚体胱氨酸结小蛋白配体对其靶蛋白的结合动力学。为此,通过结合至SA传感器芯片(GE Healthcare Life Science)的流动池来捕获生物素化的FN-67B89蛋白(200-300μg/mL)。为了分析单体配体,应用最大750个响应单位(RU)的固定靶标密度,而对于三聚体变体,目标是最大400的RU。使用多循环动力学方法用50-4000nM的浓度范围进行单体配体的结合分析。循环从90sec的结合时间开始,然后是420sec的解离时间和最后的再生步骤。应用20μL/min的流速进行动力学测量。在相同结合和解离条件下分析三聚体变体,

但是使用恒定流速为30 μ L/mL的单循环动力学测量模式。在这种情况下,分析物浓度为1.25nM-10nM。使用整体动力学拟合模型(1:1Langmuir,Biacore T-100评估软件,GE Healthcare Life Science)计算结合动力学和稳态分析。

[0347] 免疫荧光染色

[0348] 为了进行免疫荧光染色,将冷冻保存的肿瘤或脑碎片切成5微米厚的切片,在冰冷的丙酮中固定5min并风干。然后将玻片在含有3%BSA的PBS中于RT下封闭5min。为了EDB的染色,将1 μ g的各生物素化的胱氨酸结小蛋白用2.9 μ g链霉亲和素-Cy3缀合物(Rockland Immunochemicals)在RT下孵育30min。然后将预先形成的复合物添加至肿瘤切片并在37 $^{\circ}$ C下孵育30min。然后,将玻片用含有1%BSA的PBS洗涤3次。用在含有1%BSA的PBS中1:100稀释的大鼠抗小鼠CD31 IgG抗体(克隆390,eBioscience)在37 $^{\circ}$ C下进行CD31染色30min。在PBS中3次洗涤步骤之后,将细胞核用在PBS中1:5000稀释的H \ddot{o} chst 33342(Thermo Fisher Scientific)在RT下染色30min。如上文所述再次洗涤玻片并在封固剂(Dako)的薄层中盖上盖玻片。用Zeiss Apotome显微镜(Carl Zeiss)捕获图像并用ZEN软件(Carl Zeiss)分析。

[0349] 肽合成

[0350] 三聚体Alexa Fluor 680(AF680)缀合的配体以及N-末端生物素化的小蛋白购自Pepscan。所有获得的肽构建体均以100 μ g等分试样的形式储存在-20 $^{\circ}$ C下。为了进行实验,将所有肽溶于100 μ L DPBS(Gibco)中,浓度为1 μ g/ μ L。对于所有构建体,通过ESI质谱法验证身份并通过分析反相色谱法(Pepscan)分析纯度。此外,通过SDS-PAGE和SPR分析三聚体以表征靶标结合特性(结合至FN-67B89)和特异性(结合至FN-6789)。

[0351] U-87MG异种移植小鼠模型

[0352] 将人胶质母细胞瘤U-87MG(ATCC)细胞系在无菌条件下于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂和95%湿度下在补充了10%FCS的EMEM培养基(ATCC)中培养。

[0353] 将小鼠饲养在BioNTech AG的动物设施中,并且所有动物方案均经Tierschutzkommission des Landesuntersuchungsamts Rheinland-Pfalz批准。4周龄的体重在约25至28g之间的Fox n1/nu小鼠获得自Janvier。对于异种移植小鼠研究,将7 \times 10⁶个人U-87MG细胞皮下注射至Fox n1/nu小鼠的右侧腹中,并且允许肿瘤生长约5周。利用椭圆体公式确定皮下肿瘤大小 $\left(\frac{\text{width} \times \text{length}^2}{2}\right)$ 。所有肿瘤体积在100-1200mm³之间的动物都包括在研究中,并且将小鼠随机分配到实验组中。

[0354] 体内和离体成像

[0355] 包括携带期望肿瘤大小的小鼠用于分析三聚体构建体的生物分布和肿瘤靶向。通过眼球后静脉丛静脉内注射所有三聚体构建体,最终体积为100 μ L PBS缓冲液(3.34nmol/小鼠)。使用615-665nm的激发范围并监测695-770nm的发射信号,在IVIS Spectrum System(Perkin Elmer)中对小鼠(每个构建体n=3)成像。注射后1h、2h或6h进行成像过程,并且在安乐死之后切除肿瘤和特定器官,成像,称重并冷冻保存用于进一步分析。利用Living Image[®]软件(PerkinElmer)定量所关注的区域的荧光强度。利用GraphPad Prism中的双向ANOVA分析基于三次数据集计算统计学意义。

[0356] 实施例2:EDB特异性配体的筛选和选择

[0357] 因为已显示胱氨酸结小蛋白非常适合用作肿瘤成像的试剂(Kimura et al.2009;

Moore et al.2013;Miao et al.2009;Soroceanu et al.1998;Veiseh et al.2007, Nielsen et al.2010;Hackel et al.2013;Zhu et al.2014),我们使用木鳖子胰蛋白酶抑制剂-II (oMCoTI-II) 的开链序列作为基础用于组合噬菌体文库构建以选择靶标结合配体 (Hernandez et al.2000)。我们的第一个文库 (MCopt 1.0) 包含在第一个环中具有随机氨基酸、在第三个环中具有分散位置以及在第一个半胱氨酸前面具有两个可变残基的序列。将胱氨酸结小蛋白序列遗传融合至M13噬菌体的主要外壳蛋白 (pVIII)。此外,开发了第二个文库 (MCopt2.0), 在序列的第一个环随机化, 并且通过M13噬菌体的次要外壳蛋白 (pIII) 呈递蛋白。因此, 文库在随机环位置和序列长度以及蛋白呈递价上有所区别, 这可能导致配体选择结果的变化。平行应用两个文库以鉴定针对纤连蛋白额外结构域B (EDB) 的胱氨酸结小蛋白, 已知纤连蛋白额外结构域B (EDB) 在不同肿瘤实体中高表达, 同时在除了卵巢间质或滑膜细胞 (Carnemolla et al.1989;Castellani et al.1994) 的大多数正常组织中不存在。

[0358] 为了产生合适的靶蛋白和对照蛋白用于随后的筛选和命中鉴定过程, 我们重组产生了单独的EDB结构域 (FN-B), 侧翼是周围的III型结构域的EDB (FN-67B89) 以及没有EDB的III型结构域6-9 (FN-6789)。如图1A所示, 可以证实所有FN变体蛋白大小正确, 并且获得的纯度在93%以上。通过使用区分包含EDB的纤连蛋白和不含EDB的纤连蛋白的单克隆抗体 (BC-1) (Carnemolla et al.1992), 我们评价了FN-67B89蛋白的天然折叠。此外, 在所有FN-融合蛋白中均检测到C-末端H6-标签 (图1B)。在连续三轮中针对生物素化的FN-B筛选两个噬菌体文库, 并且在完成之后对46个单克隆进行测序。在MCopt 1.0筛选中, 一种胱氨酸结小蛋白高度富集, 占池的40%。此外, 两种其他胱氨酸结小蛋白克隆分布富集了4%和2% (图2)。在MCopt 2.0筛选的情况下, 将3种不同的胱氨酸结小蛋白克隆富集至总序列的13%、10%和2%的比例。有趣的是, 6个扩增序列中的5个在环1的c-末端包含共同的R-I/V-R-(L) 基序 (图2)。

[0359] 受这些发现的鼓舞, 我们评价了通过MCopt 1.0文库的筛选得到的富集序列的FN-B结合能力。为此, 以96-孔小规模形式表达胱氨酸结小蛋白, C-末端融合至硫氧还蛋白, his-标签和s-标签 (Trx-胱氨酸结小蛋白)。在ELISA中测定蛋白与FN-B和BSA的结合, 此外, 通过E-PAGE[®]分析确定每个克隆的表达率。基于导出的信噪比和表达值, 我们计算了每个候选物的排名得分作为FN-B相互作用的量度。与BSA对照相比, 3种不同Trx-胱氨酸结小蛋白变体表现出与FN-B的相互作用增加 (图3), 并且序列与预期的来自筛选池的富集克隆对应。包括这3个候选物以及来自MCopt2.0筛选的含有R-I/V-R-(L) 基序的克隆, 用于随后更深入的分析。

[0360] 实施例3: 富集的胱氨酸结小蛋白候选物的特异性分析

[0361] 接下来我们集中于剩余的6个胱氨酸结小蛋白的靶标结合特异性, 使用内部产生的EDB靶蛋白 (FN-B和FN-67B89) 以及脱靶蛋白 (FN-6789) 和不同的对照蛋白 (奶粉、链霉菌素和牛血清白蛋白)。FN-6789代表完美对应的脱靶蛋白, 因为许多不同细胞类型表达缺少额外结构域B的纤连蛋白 (Mao und Schwarzbauer 2005)。所有候选物均表现出合理的EDB靶标结合, 对重组FN-B和FN-67B89靶蛋白同样高 (图4)。在共同的R-I/V-R-(L) 基序的基础上选择的变体 (MCopt 1.0-2/-3和MCopt 2.0-1/-2/-3) 表现出中等至低的脱靶和对照蛋白信号。虽然在MCopt 1.0命中鉴定中已鉴定了MCopt 1.0-2和MCopt1.0-3, 但是在它们的

共同基序基础上仅从MCopt 2.0池鉴定了MCopt 2.0-1、-2和-3,因此之前未测定FN-B靶标结合。但是,不含R-I/V-R-(L)-基序的MCopt 1.0-1在特异性评价中失败了,因为我们观察到与脱靶FN-6789以及除奶粉以外的所有对照蛋白的高的相互作用。这些数据强烈表明观察到的氨基酸基序与EDB结合相关。

[0362] 然后我们还通过包括可商购的T7-TEV-B(LD BioPharma)(N-末端侧翼具有T7-TEV的EDB结构域)和FN-B(8-14)(R&D Systems)(具有C-末端结构域8-13和结构域14的1/2的EDB)进一步评价了5种有前途的候选物的EDB特异性。同样,对于所有测试的包含EDB的靶蛋白,结合信号同样高,脱靶信号相对较低(图5)。因为所有使用的靶蛋白均以不同形式呈递EDB,单独的EDB(FN-B),侧翼是人工N-末端构建体(T7-His-TEV),侧翼是天然C-和N-末端III型结构域(FN-67B89)以及侧翼仅有其相邻的天然C-末端III型结构域(FN-B(8-14)),所以可以得出结论,观察到的结合活性确实是EDB中心部分特异性的。

[0363] 最后,我们用不同受体饱和浓度生成了4个包含R-I/V-R-(L)-基序的候选物(MCopt1.0-2/-3和MCopt2.0-1/-2)对FN-B、FN-67B89和FN-B(8-14)的剂量依赖性结合数据,如图6所示。对FN-6789脱靶观察到的背景信号一般比所有包含EDB的靶蛋白低得多,这表明FN-6789和EDB中的纤连蛋白III型结构域之间的明显区别。如之前在特异性ELISA中已经看到的,克隆MCopt 2.0-3显示了对FN-6789脱靶的高度非特异性结合。尽管克隆MCopt 2.0-3享有看来在EDB靶标结合中起关键作用的共同的R-I/V-R-(L)-基序,但是随机化的胱氨酸结小蛋白环1中的其他残基可能促进非特异性结合,例如由于疏水相互作用。

[0364] 为了将胱氨酸结小蛋白用作显像剂,我们随后通过表面等离子共振(SPR)分析研究了没有标签的蛋白的结合能力。令人惊讶的是,在测试的50-1000nM的浓度范围中,在所有5个候选物中仅MCopt 1.0-3显示出对FN-67B89靶蛋白的强结合(数据未示出)。因此,选择MCopt 1.0-3(以下称作MC-FN-010)用于进一步的分析和光学成像探针开发。

[0365] 实施例4:MC-FN-010结合位点的作图

[0366] 尽管我们以前在不同选定的胱氨酸结小蛋白中发现的氨基酸基序R-I/V-R-(L)已表明对EDB结合有很高的序列贡献,但是我们还是在实验上更详细地评价了其相关性。解决了MC-FN-010靶序列中的单个丙氨酸取代,并且导致总计14个衍生构建体(如图7A所示,从MC-FN-011至MC-FN-0114连续编号)。针对单结构域FN-B测试了所有构建体。正如预期的,在序列的开头具有丙氨酸交换的7个构建体仍显示出强靶标相互作用,表明这些位置对于EDB结合不是至关重要的。相反,在共同的基序位置具有交换的4个构建体显示丧失结合。在第五环中的另一丙氨酸取代也导致靶标相互作用减少,同样表明其相关性(图7B)。这些结果证实第一环中的4个氨基酸残基(RIRL)以及第五环中的精氨酸对与FN-67B89的结合相互作用具有直接影响,或者对小蛋白构象具有间接影响,如图7C总结的。

[0367] 实施例5:亲本MC-FN-010小蛋白在肿瘤组织上的特异性分析

[0368] 此外,我们使用在微环境中包含天然EDB蛋白的U-87MG肿瘤异种移植切片研究了亲本MC-FN-010在细胞环境中的特异性。已知人胶质母细胞瘤在血管结构中包含纤连蛋白EDB同种型(Mariani et al.1997)。基于丙氨酸扫描诱变,我们生成了在3个位置具有丙氨酸取代(PMCTQRANRIAACRRSDCTGACICRGNGYCG)的阴性对照构建体(MC-FN-0115)。对于免疫荧光成像实验,将生物素化形式的MC-FN-010和MC-FN-0115与Cy3标记的链霉亲和素四聚化。如用Alexa Fluor 647缀合的抗CD31抗体证实的,四聚化的MC-FN-010-bio几乎仅装饰

了血管周围的区域,CD31是称作血管标志物的广泛表达的内皮细胞表面蛋白(图8)。Cy3和Alexa Fluor 647的合并图像证实与血管相关的两种荧光信号的共定位。此外,可以检测到四聚化MC-FN-010在血管周围区域周围的定位。相反,用阴性对照构建体MC-FN-0115染色的U-87MG肿瘤切片显示完全没有荧光信号(图8)。在正常小鼠脑切片上未观察到四聚化的MC-FN-010和MC-FN-0115的荧光信号(图12)。

[0369] 实施例6:胱氨酸结小蛋白对FN-67B89的结合和亲和力

[0370] 在使用靶蛋白作为诊断工具之前,需要将它们与显像剂特异性地缀合(Spicer und Davis 2014)。我们的主要候选物MC-FN-010在环1中包含赖氨酸,其不利于选择性试剂与伯胺的连接。基于我们以前的分析,这个氨基酸不会主动促进EDB结合,因此我们选择衍生构建体MC-FN-016作为第二候选物。我们观察到Trx-MC-FN-016对FN-67B89的结合是剂量依赖性的,其信号与亲本Trx-MC-FN-010相当(图9)。相反,对FN-6789的总体背景信号一直相对较低。两个胱氨酸结小蛋白候选物都只靶向FN-67B89,与FN-6789没有相互作用,这很重要,因为纤连蛋白在多种细胞类型中广泛表达(Pankov und Yamada 2002)。通过SPR分析测定没有标签的MC-FN-010和MC-FN-016对生物素化的FN-67B89的亲和力。两种胱氨酸结小蛋白的结合动力学均显示在一位数微摩尔范围内的低结合亲和力,解离速率很快(图10A)。

[0371] 实施例7:EDB特异性光学成像探针的产生和评价

[0372] 为了达到更强的结合强度,通过肽连接将配体化学三聚化以利用潜在的亲合力效应。此外,用近红外荧光染料Alexa Fluor 680标记该分子以使得能够在给药至小鼠之后观察分布和定位。化学合成所有3种三聚体构建体之后,进行不同测定以控制正确的大小和纯度。SDS-PAGE和反相色谱分析显示在所有构建体中均没有关键显著性(数据未示出)。值得注意的是,我们的寡聚化策略导致两种结合EDB的胱氨酸结小蛋白(AF680-(MC-FN-010)₃和AF680-(MC-FN-016)₃)的亲和力大大提高,导致三位数的皮摩尔亲和常数以及与单体变体相比显著更慢的解离速率(图10B)。

[0373] 以前,已显示将其他EDB靶向分子用作诊断试剂以对胶质母细胞瘤成像(Albrecht et al.2016;Mohammadgholi et al.2017)。为此,我们专注于我们的结合EDB的胱氨酸结小蛋白靶向负荷人胶质母细胞瘤的Fox n1/nu小鼠的可行性。静脉内(r.o.)注射3.34nmol AF680-(MC-FN-010)₃、AF680-(MC-FN-016)₃和阴性对照AF680-(MC-FN-0115)₃之后进行器官的全身和离体成像。图11A显示与阴性对照AF680-(MC-FN-0115)₃相比,AF680-(MC-FN-010)₃和AF680-(MC-FN-016)₃所致的具有强肿瘤信号的荧光图像。在早期的时间段还可以在肝、胆囊和肾中检测到所有三聚体构建体。6h之后,除了膀胱,不同器官信号减少,但是重要的是,仍然保留了产生自AF680-(MC-FN-010)₃和AF680-(MC-FN-016)₃的肿瘤信号。此外,如图11B所示,器官的荧光信号与它们各自的重量相关。在所有时间点与阴性对照相比,亲本AF680-(MC-FN-010)₃具有明显较强的肿瘤信号。然而,AF680-(MC-FN-016)₃显示比AF680-(MC-FN-010)₃低的信号,但是比作为阴性对照AF680-(MC-FN-0115)₃高。

[0374] 实施例8:MC-FN-010与源自生长为小鼠异种移植肿瘤的人U-87MG胶质母细胞瘤细胞系的组织切片的特异性结合。

[0375] 将冷冻保存的肿瘤或脑碎片切成6微米厚的切片,在冰冷的丙酮中固定5min并风干。然后将玻片在含有3%BSA的PBS中于RT下封闭5min。为了EDB的染色,然后将0.1μg AF680-(MC-FN-010)₃和在含有1%BSA的PBS中1:100稀释的抗小鼠CD31抗体(RB-10333-P1,

Thermo Fisher) 添加至肿瘤切片并在37℃下孵育30min。然后,将玻片用含有1%BSA的PBS洗涤3次。用在含有1%BSA的PBS中1:400稀释的抗兔IgG-Cy3二抗(111-165-003, Jackson ImmunoResearch)在37℃下检测抗小鼠CD31一抗的CD31染色30min。在PBS中3次洗涤步骤之后,将细胞核用在PBS中1:5000稀释的Höchst 33342(Thermo Fisher Scientific)在RT下染色30min。如上文所述再次洗涤玻片并在封固剂(Dako)的薄层中盖上盖玻片。用Zeiss Apotome显微镜(Carl Zeiss)捕获图像并用ZEN软件(Carl Zeiss)分析。图13显示在人胶质母细胞瘤异种移植肿瘤和正常脑组织样品上用三聚体构建体(AF680-(MC-FN-010)₃和对照AF680-(MC-FN-0115)₃染色的额外免疫荧光。AF680-(MC-FN-010)₃染色U-87MG切片上肿瘤血管周围的区域,用血管标志物CD31定位了这些区域,而对照AF680-(MC-FN-0115)则完全没有染色。在正常小鼠脑切片中用AF680-(MC-FN-010)₃未观察到染色,表明肿瘤脉管系统特异性。

[0376] 实施例9:用所选的胱氨酸结小蛋白的特异性肿瘤靶向。

[0377] 如实施例1所述产生U-87MG异种移植小鼠模型(U-87MG异种移植小鼠模型)。

[0378] 对于体内竞争实验,将携带期望肿瘤大小(~200mm³)的小鼠通过眼球后静脉丛静脉内注射3或5倍摩尔过量的未标记的三聚体探针(DOTA-(MC-FN-016)₃)作为竞争物以及AF680标记的三聚体(3.34nmol)。使用615-665nm的激发范围并监测695-770nm的发射信号,在IVIS Spectrum System(Perkin Elmer)中对小鼠成像。在注射后1h、2h或6h进行整只小鼠成像过程。6h之后将小鼠安乐死,将肿瘤和特定器官切除、成像、称重并冷冻保存用于进一步分析。利用Living Image®软件(PerkinElmer)定量所关注的区域的荧光强度。通过体内和离体成像,将这些小鼠中的肿瘤荧光强度的动力学与用标记的AF680-(MC-FN-016)₃无竞争物处理的小鼠进行比较。DOTA-(MC-FN-016)₃非常适合竞争实验,因为测得的与FN-67B89的表观结合常数与AF680-(MC-FN-016)₃相当(图15)。在每个时间点,用竞争物处理的小鼠体内测量的肿瘤信号均大大减少(图14A)。如以前的实验(图11),阴性对照肽AF680-(MC-FN-0115)₃在肿瘤中未富集。6h之后,将小鼠安乐死,切除肿瘤和器官,并且进行离体荧光成像分析(图14B)。将测量的荧光强度归一化至肿瘤重量。证实了未标记的三聚体的竞争,并且观察到信号减少对竞争物剂量的依赖性(图14C)。与同时注射相比,据发现在标记的三聚体之前30min注射竞争物更有效。

[0379] 我们的研究描述了针对重组EDB从噬菌体文库选择胱氨酸结小蛋白(MC-FN-010)。将MC-FN-010及其衍生物MC-FN-016工程化作为分子支架用于肿瘤成像方法。两种EDB-结合分子在除肾以外的U87-MG异种移植肿瘤中表现出强积累和低背景信号。这些结果证实MC-FN-010和MC-FN-016作为肿瘤诊断技术的药剂的巨大潜力。

[0380] 参考文献

[0381] Albrecht, Valerie; Richter, Antonia; Pfeiffer, Sarah; Gebauer, Michaela; Lindner, Simon; Gieser, Eugenie et al. (2016): Anticalins directed against the fibronectin extra domain B as diagnostic tracers for glioblastomas. In: International journal of cancer 138 (5), S.1269-1280. DOI:10.1002/ijc.29874.

[0382] Barbas, Carlos F.; Burton, D.R.; Scott, J.K.; Silverman, G.J. (2004): Phage Display: Cold Spring Harbor Laboratory Pr.

[0383] Carnemolla, B.; Balza, E.; Siri, A.; Zardi, L.; Nicotra, M.R.; Bigotti, A.;

Natali, P.G. (1989): A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors. In: *The Journal of cell biology* 108(3), S.1139-1148.

[0384] Carnemolla, Barbara; Leprini, Alessandra; Allemanni, Giorgio; Saginati, Marc; Zardi, Luciano (1992): The inclusion of the type III repeat ED-B in the fibronectin molecule generates conformational modifications that unmask a cryptic sequence. In: *Journal of Biological Chemistry* 267(34), S.24689-24692.

[0385] Castellani, Patrizia; Viale, Giuseppe; Dorcaratto, Alessandra; Nicolo, Guido; Kaczmarek, Janusz; Querze, Germano; Zardi, Luciano (1994): The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain. A marker of angiogenesis. In: *Int. J. Cancer* 59(5), S.612-618. DOI:10.1002/ijc.2910590507.

[0386] Hackel, Benjamin J.; Kimura, Richard H.; Miao, Zheng; Liu, Hongguang; Sathirachinda, Ataya; Cheng, Zhen et al. (2013): 18F-fluorobenzoate-labeled cystine knot peptides for PET imaging of integrin $\alpha v \beta 6$. In: *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 54(7), S.1101-1105. DOI:10.2967/jnumed.112.110759.

[0387] Hernandez, J.F.; Gagnon, J.; Chiche, L.; Nguyen, T.M.; Andrieu, J.P.; Heitz, A. et al. (2000): Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure. In: *Biochemistry* 39(19), S.5722-5730.

[0388] Kimura, Richard H.; Cheng, Zhen; Gambhir, Sanjiv Sam; Cochran, Jennifer R. (2009): Engineered knottin peptides: a new class of agents for imaging integrin expression in living subjects. In: *Cancer Research* 69(6), S.2435-2442. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-08-2495.

[0389] Mao, Yong; Schwarzbauer, Jean E. (2005): Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. In: *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology* 24(6), S.389-399. DOI:10.1016/j.matbio.2005.06.008.

[0390] Mariani, G.; Lasku, A.; Balza, E.; Gaggero, B.; Motta, C.; Di Luca, L. et al. (1997): Tumor targeting potential of the monoclonal antibody BC-1 against oncofetal fibronectin in nude mice bearing human tumor implants. In: *Cancer* 80(12 Suppl), S.2378-2384.

[0391] Miao, Zheng; Ren, Gang; Liu, Hongguang; Kimura, Richard H.; Jiang, Lei; Cochran, Jennifer R. et al. (2009): An engineered knottin peptide labeled with 18F for PET imaging of integrin expression. In: *Bioconjugate chemistry* 20(12), S.2342-2347. DOI:10.1021/bc900361g.

[0392] Mohammadgholi, Mohsen; Sadeghzadeh, Nourollah; Erfani, Mostafa; Abediankenari, Saeid; Abedi, Seyed Mohammad; Emrarian, Iman et al. (2017): Human Fibronectin Extra-Domain B (EDB)-Specific Aptide (APTEDB) Radiolabelling with Technetium-99m as a Potent Targeted Tumour-Imaging Agent. In: *Anti-cancer*

agents in medicinal chemistry.DOI:10.2174/1871520617666170918125020.

[0393] Moore,Sarah J.;Hayden Gephart,Melanie G.;Bergen,Jamie M.;Su,YouRong S.;Rayburn,Helen;Scott,Matthew P.;Cochran,Jennifer R. (2013) :Engineered knottin peptide enables noninvasive optical imaging of intracranial medulloblastoma.In:Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110(36) ,S.14598-14603.DOI:10.1073/pnas.1311333110.

[0394] Nielsen,Carsten H.;Kimura,Richard H.;Withofs,Nadia;Tran,Phuoc T.;Miao,Zheng;Cochran,Jennifer R.et al. (2010) :PET imaging of tumor neovascularization in a transgenic mouse model with a novel 64Cu-DOTA-knottin peptide.In:Cancer Research 70(22) ,S.9022-9030.DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-1338.

[0395] Pankov,Roumen;Yamada,Kenneth M. (2002) :Fibronectin at a glance.In:Journal of cell science 115(20) ,S.3861-3863.

[0396] Soroceanu,L.;Gillespie,Y.;Khazaeli,M.B.;Sontheimer,H. (1998) :Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors.In:Cancer Research 58(21) ,S.4871-4879.

[0397] Spicer,Christopher D.;Davis,Benjamin G. (2014) :Selective chemical protein modification.In:Nature communications 5,S.4740.DOI:10.1038/ncomms5740.

[0398] Veiseh,Mandana;Gabikian,Patrik;Bahrami,S-Bahram;Veiseh,Omid;Zhang,Miqin;Hackman,Robert C.et al. (2007) :Tumor paint:a chlorotoxin:cy5.5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci.In:Cancer Research 67(14) ,S.6882-6888.DOI:10.1158/0008-5472.CAN-06-3948.

[0399] Zhu,Xiaohua;Li,Jinbo;Hong,Yeongjin;Kimura,Richard H.;Ma,Xiaowei;Liu,Hongguang et al. (2014) :99mTc-labeled cystine knot peptide targeting integrin $\alpha v\beta 6$ for tumor SPECT imaging.In:Molecular Pharmaceutics 11(4) ,S.1208-1217.DOI:10.1021/mp400683q.

序列表

- <110> 生物技术欧洲股份公司
 <120> 用于癌症诊断和治疗的方法和组合物
 <130> 674-245 PCT2
 <150> PCT/EP2018/065205
 <151> 2018-06-08
 <160> 28
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 7341
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens (智人)
 <400> 1

```

atgcttaggg gtccggggcc cgggctgctg ctgctggccg tccagtgcct ggggacagcg 60
gtgccctcca cgggagcctc gaagagcaag aggcaggctc agcaaattgt tcagccccag 120
tccccggtgg ctgtcagtca aagcaagccc gtttgttatg acaatggaaa aactatcag 180
ataaatcaac agtgggagcg gacctaccta ggcaatgcgt tggtttgtac ttgttatgga 240
ggaagccgag gttttaactg cgagagtaaa cctgaagctg aagagacttg ctttgacaag 300
tacctggga aacttaccg agtgggtgac acttatgagc gtcctaaaga ctccatgac 360
tgggactgta cctgcatcgg ggctgggcca gggagaataa gctgtaccat cgcaaaccgc 420
tgccatgaag ggggtcagtc ctacaagatt ggtgacacct ggaggagacc acatgagact 480
ggtggttaca tgtagagtg tgtgtgtctt ggtaatggaa aaggagaatg gacctgcaag 540
cccatagctg agaagtgttt tgatcatgct gctgggactt cctatgtggt cggagaaac 600
tgggagaagc cctaccaagg ctggatgatg gtagattgta cttgcctggg agaaggcagc 660
ggacgcatca cttgcacttc tagaaataga tgcaacgac aggacacaag gacatcctat 720
agaattggag acacctggag caagaaggat aatcgaggaa acctgctcca gtgcatctgc 780
acaggcaacg gccgaggaga gtggaagtgt gagaggcaca cctctgtgca gaccacatcg 840
agcggatctg gccccttcac cgatgttcgt gcagctgttt accaaccgca gcctacccc 900
cagcctcctc cctatggcca ctgtgtcaca gacagtgggt tggcttactc tgtgggatg 960
cagtggctga agacacaagg aaataagcaa atgctttgca cgtgcctggg caacggagtc 1020
agctgccaag agacagctgt aaccagact tacggtggca actcaaattg agagccatgt 1080
gtcttaccat tcacctaaa tggcaggagc ttctactect gcaccacaga agggcgacag 1140
gacggacatc tttggtgcag cacaacttcg aattatgagc aggaccagaa atactctttc 1200
tgcacagacc aactgtttt gtttcagact cgaggaggaa attccaatg tgccttgtgc 1260
cacttcccct tcctatacaa caaccacaat tacactgatt gcacttctga gggcagaaga 1320
gacaacatga agtgggtgtg gaccacacag aactatgatg ccgaccagaa gtttgggttc 1380
tgccccatgg ctgccacga ggaaatctgc acaaccaatg aagggtcat gtaccgatt 1440
ggagatcagt gggataagca gcatgacatg ggtccatga tgaggtgcac gtgtgttggg 1500

```

aatggctcgtg gggaatggac atgcattgcc tactcgcagc ttcgagatca gtgcattggt 1560
gatgacatca cttacaatgt gaacgacaca ttccacaagc gtcatgaaga ggggcacatg 1620
ctgaactgta catgcttcgg tcagggtcgg ggcaggtgga agtgtgatcc cgtcgaccaa 1680
tgccaggatt cagagactgg gacgttttat caaattggag attcatggga gaagtatgtg 1740
catggtgtca gataccagtg ctactgctat ggccgtggca ttggggagtg gcattgccaa 1800
cctttacaga cctatccaag ctcaagtggc cctgtcgaag tatttatcac tgagactccg 1860
agtcagccca actcccaccc catccagtgg aatgcaccac agccatctca catttccaag 1920
tacattctca ggtggagacc taaaaattct gtaggccgtt ggaaggaagc taccatacca 1980
ggccacttaa actcctacac catcaaaggc ctgaagcctg gtgtggtata cgagggccag 2040
ctcatcagca tccagcagta cggccaccaa gaagtgactc gctttgactt caccaccacc 2100
agcaccagca cacctgtgac cagcaacacc gtgacaggag agacgactcc cttttctct 2160
cttgtggcca cttctgaate tgtgaccgaa atcacagcca gtagctttgt ggtctctctg 2220
gtctcagctt ccgacaccgt gtcgggatte cgggtggaat atgagctgag tgaggagga 2280
gatgagccac agtacctgga tcttccaagc acagccactt ctgtgaacat ccctgacctg 2340
cttctggcc gaaaatacat tgtaaattgc tatcagatat ctgaggatgg ggagcagagt 2400
ttgatcctgt ctacttcaca aacaacagcg cctgatgcc ctctgacc gactgtggac 2460
caagttgatg acacctcaat tgttgttcgc tggagcagac cccaggctcc catcacagg 2520
tacagaatag tctattgcc atcagtagaa ggtagcagca cagaactcaa ctttctgaa 2580
actgcaaact ccgtcacct cagtacttg caacctggtg ttcagtataa catcactatc 2640
tatgctgtgg aagaaaatca agaaagtaca cctgttgc tcaacaaga aacctggc 2700
acccacgct cagatacagt gccctctcc aggacctgc agtttgtgga agtgacagac 2760
gtgaaggtea ccatcatgtg gacaccgct gagagtgcag tgaccggcta ccgtgtggat 2820
gtgatccccg tcaacctgcc tggcgagcac ggcagaggc tgccatcag caggaacacc 2880
tttgcagaag tcaccgggct gtcccctggg gtcacctatt acttcaaagt ctttgcagt 2940
agccatggga gggagagcaa gcctctgact gctcaacaga caacaaact ggatgctccc 3000
actaacctcc agtttgtcaa tgaaactgat tctactgtcc tgggtgagatg gactccacct 3060
cgggcccaga taacaggata ccgactgacc gtgggcctta cccgaagagg acagcccagg 3120
cagtacaatg tgggtccctc tgtctccaag taccactga ggaatctgca gcctgcatct 3180
gagtacaccg tatccctcgt ggccataaag ggcaaccaag agagcccaa agccactgga 3240
gtctttacca cactgcagcc tgggagctct attccactt acaacaccga ggtgactgag 3300
accaccattg tgatcacatg gacgctgct ccaagaattg gttttaagct ggggtgtacga 3360
ccaagccagg gaggagaggc accacgagaa gtgacttcag actcaggaag catcgttgtg 3420
tccggcttga ctccaggagt agaatacgtc tacaccatcc aagtctgag agatggacag 3480
gaaagagatg cgccaattgt aaacaaagtg gtgacacat tgtctccacc aacaaacttg 3540
catctggagg caaacctga cactggagtg ctcacagtct cctgggagag gagcaccacc 3600
ccagacatta ctggttatag aattaccaca accctacaa acggccagca gggaaattct 3660
ttggaagaag tggatccatgc tgatcagagc tctgcactt ttgataacct gactcccggc 3720
ctggagtaca atgtcagtgt ttactgtc aaggatgaca aggaaagtgt ccctatctct 3780
gataccatca tcccagaggt gcccactc actgacctaa gctttgttga tataaccgat 3840

tcaagcatcg gcctgaggtg gaccccgcta aactettcca ccattattgg gtaccgcatc 3900
acagtagttg cggcaggaga aggtatccct atttttgaag attttgtgga ctccctcagta 3960
ggatactaca cagtcacagg gctggagccg ggcatgact atgatatcag cgttatcact 4020
ctcattaatg gcggcgagag tgcccctact aactgacac acaaacggc tgttcctcct 4080
cccactgacc tgcgattcac caacattggt ccagacacca tgcgtgtcac ctgggctcca 4140
cccccatcca ttgatttaac caacttctg gtgcgttact cacctgtgaa aatgaggaa 4200
gatgttgacag agttgtcaat ttctcctca gacaatgcag tggctttaac aatctcctg 4260
cctggtacag aatatgtagt gagtgtctcc agtgtctacg aacaacatga gagcacacct 4320
cttagaggaa gacagaaaac aggtcttgat tcccactg gcattgactt ttctgatatt 4380
actgccaact cttttactgt gcaactggatt gctcctcgag ccaccatcac tggctacagg 4440
atccgccatc atcccagca cttcagtggg agacctcgag aagatcgggt gcccactct 4500
cggaattcca tcacctcac caacctcact ccaggcacag agtatgtggt cagcatcgtt 4560
gctcttaatg gcagagagga aagtcctta ttgattggcc aacaatcaac agtttctgat 4620
gttccgaggg acctggaagt tgttgetgag acccccacca gcctactgat cagctgggat 4680
gctcctgctg tcacagtgag atattacagg atcacttacg gagagacagg aggaaatagc 4740
cctgtccagg agttcactgt gcctgggagc aagtctacag ctaccatcag cggccttaa 4800
cctggagttg attataccat cactgtgtat gctgtcactg gccgtggaga cagccccgca 4860
agcagcaagc caatttccat taattaccga acagaaattg acaaaccatc ccagatgcaa 4920
gtgaccgatg ttcaggacaa cagcattagt gtcaagtggc tgccttcaag ttcccctggt 4980
actggttaca gagtaaccac cactcccaa aatggaccag gaccaaaaa aactaaaact 5040
gcaggtccag atcaaacaga aatgactatt gaaggcttgc agcccacagt ggagtatgtg 5100
gttagtgtct atgctcagaa tccaagcgga gagagtcagc ctctggttca gactgcagta 5160
accaacattg atcgccctaa aggactggca ttcactgatg tggatgtcga ttccatcaaa 5220
attgcttggg aaagcccaca ggggcaagtt tccaggtaca gggtagaccta ctgagccct 5280
gaggatggaa tccatgagct attccctgca cctgatggtg aagaagacac tgcagagctg 5340
caaggcctca gaccgggttc tgagtacaca gtcagtgtgg ttgccttgca cgatgatatg 5400
gagagccagc ccctgattgg aaccagtc acagctattc ctgcaccaac tgacctgaag 5460
ttcactcagg tcacaccac aagcctgagc gccagtgga caccaccaa tgttcagctc 5520
actggatatac gaggcgggt gacccccag gagaagaccg gaccaatgaa agaaatcaac 5580
cttgctcctg acagctcact cgtggttga tcaggactta tggtagccac caaatatgaa 5640
gtgagtgtct atgctcttaa ggacactttg acaagcagac cagctcaggg agttgtcacc 5700
actctggaga atgtcagccc accaagaagg gctcgtgtga cagatgctac tgagaccacc 5760
atcaccatta gctggagaac caagactgag acgateactg gcttccaagt tgatgccgtt 5820
ccagccaatg gccagactcc aatccagaga accatcaagc cagatgtcag aagctacacc 5880
atcacaggtt tacaaccagg cactgactac aagatctacc tgtacacctt gaatgacaat 5940
gctcggagct cccctgtggt catcgacgcc tccactgcca ttgatgcacc atccaacctg 6000
cgtttcctgg ccaccacacc caattcctg ctggtatcat ggcagccgcc acgtgccagg 6060
attaccggct acatcatcaa gtatgagaag cctgggtctc ctcccagaga agtggctcct 6120
cggccccgcc ctggtgtcac agaggctact attactggcc tggaaaccggg aaccgaatat 6180

acaatttatg tcattgccct gaagaataat cagaagagcg agcccctgat tggaaggaaa 6240
 aagacagacg agcttcccca actggtacc cttccacacc ccaatcttca tggaccagag 6300
 atcttggatg ttccttccac agttcaaaag acccctttcg tcaccacacc tgggtatgac 6360
 actggaaatg gtattcagct tcctggcact tctggtcagc aaccagtggt tgggcaacaa 6420
 atgatctttg aggaacatgg ttttaggcgg accacaccgc ccacaacggc caccccata 6480
 aggcataggc caagaccata cccgccgaat gtaggacaag aagctctctc tcagacaacc 6540
 atctcatggg cccattcca ggacacttct gactacatca tttcatgtca tcctgttggc 6600
 actgatgaag aacccttaca gttcagggtt cctggaactt ctaccagtgc cactctgaca 6660
 ggccaccca gaggtgccac ctacaacatc atagtggagg cactgaaaga ccagcagagg 6720
 cataaggttc gggaaagaggt tgttaccgtg ggcaactctg tcaacgaagg cttgaaccaa 6780
 cctacggatg actcgtgctt tgaccctac acagtttccc attatgcegt tggagatgag 6840
 tgggaacgaa tgtctgaatc aggetttaa ctgttgtgcc agtgcttagg ctttgggaagt 6900
 ggtcatttca gatgtgattc atctagatgg tgccatgaca atggtgtgaa ctacaagatt 6960
 ggagagaagt gggaccgtca gggagaaaat ggccagatga tgagctgcac atgtcttggg 7020
 aacggaaaag gagaattcaa gtgtgaccct catgaggcaa cgtgttatga tgatgggaag 7080
 acataccacg taggagaaca gtggcagaag gaatatctcg gtgccatttg ctctgcaca 7140
 tgctttggag gccagcgggg ctggcgtgtg gacaactgcc gcagacctgg gggatgaacc 7200
 agtcccgaag gcactactgg ccagtcctac aaccagtatt ctcagagata ccatcagaga 7260
 acaaacacta atgttaattg cccaattgag tgcttcatgc ctttagatgt acaggctgac 7320
 agagaagatt cccgagagta a 7341

<210> 2

<211> 2446

<212> PRT

<213> Homo sapiens (智人)

<400> 2

Met	Leu	Arg	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Gln	Cys
1				5				10						15	
Leu	Gly	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Thr	Gly	Ala	Ser	Lys	Ser	Lys	Arg	Gln
				20				25						30	
Ala	Gln	Gln	Met	Val	Gln	Pro	Gln	Ser	Pro	Val	Ala	Val	Ser	Gln	Ser
				35				40						45	
Lys	Pro	Gly	Cys	Tyr	Asp	Asn	Gly	Lys	His	Tyr	Gln	Ile	Asn	Gln	Gln
				50				55						60	
Trp	Glu	Arg	Thr	Tyr	Leu	Gly	Asn	Ala	Leu	Val	Cys	Thr	Cys	Tyr	Gly
65				70				75						80	
Gly	Ser	Arg	Gly	Phe	Asn	Cys	Glu	Ser	Lys	Pro	Glu	Ala	Glu	Glu	Thr
				85				90						95	
Cys	Phe	Asp	Lys	Tyr	Thr	Gly	Asn	Thr	Tyr	Arg	Val	Gly	Asp	Thr	Tyr
				100				105						110	

Glu Arg Pro Lys Asp Ser Met Ile Trp Asp Cys Thr Cys Ile Gly Ala		
115	120	125
Gly Arg Gly Arg Ile Ser Cys Thr Ile Ala Asn Arg Cys His Glu Gly		
130	135	140
Gly Gln Ser Tyr Lys Ile Gly Asp Thr Trp Arg Arg Pro His Glu Thr		
145	150	155
Gly Gly Tyr Met Leu Glu Cys Val Cys Leu Gly Asn Gly Lys Gly Glu		
165	170	175
Trp Thr Cys Lys Pro Ile Ala Glu Lys Cys Phe Asp His Ala Ala Gly		
180	185	190
Thr Ser Tyr Val Val Gly Glu Thr Trp Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Trp		
195	200	205
Met Met Val Asp Cys Thr Cys Leu Gly Glu Gly Ser Gly Arg Ile Thr		
210	215	220
Cys Thr Ser Arg Asn Arg Cys Asn Asp Gln Asp Thr Arg Thr Ser Tyr		
225	230	235
Arg Ile Gly Asp Thr Trp Ser Lys Lys Asp Asn Arg Gly Asn Leu Leu		
245	250	255
Gln Cys Ile Cys Thr Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Lys Cys Glu Arg		
260	265	270
His Thr Ser Val Gln Thr Thr Ser Ser Gly Ser Gly Pro Phe Thr Asp		
275	280	285
Val Arg Ala Ala Val Tyr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln Pro Pro Pro		
290	295	300
Tyr Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val Tyr Ser Val Gly Met		
305	310	315
Gln Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met Leu Cys Thr Cys Leu		
325	330	335
Gly Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val Thr Gln Thr Tyr Gly		
340	345	350
Gly Asn Ser Asn Gly Glu Pro Cys Val Leu Pro Phe Thr Tyr Asn Gly		
355	360	365
Arg Thr Phe Tyr Ser Cys Thr Thr Glu Gly Arg Gln Asp Gly His Leu		
370	375	380
Trp Cys Ser Thr Thr Ser Asn Tyr Glu Gln Asp Gln Lys Tyr Ser Phe		
385	390	395
Cys Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Arg Gly Gly Asn Ser Asn		
405	410	415
Gly Ala Leu Cys His Phe Pro Phe Leu Tyr Asn Asn His Asn Tyr Thr		

420	425	430
Asp Cys Thr Ser Glu Gly Arg Arg Asp Asn Met Lys Trp Cys Gly Thr		
435	440	445
Thr Gln Asn Tyr Asp Ala Asp Gln Lys Phe Gly Phe Cys Pro Met Ala		
450	455	460
Ala His Glu Glu Ile Cys Thr Thr Asn Glu Gly Val Met Tyr Arg Ile		
465	470	475
Gly Asp Gln Trp Asp Lys Gln His Asp Met Gly His Met Met Arg Cys		
485	490	495
Thr Cys Val Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Thr Cys Ile Ala Tyr Ser		
500	505	510
Gln Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Asp Ile Thr Tyr Asn Val Asn		
515	520	525
Asp Thr Phe His Lys Arg His Glu Glu Gly His Met Leu Asn Cys Thr		
530	535	540
Cys Phe Gly Gln Gly Arg Gly Arg Trp Lys Cys Asp Pro Val Asp Gln		
545	550	555
Cys Gln Asp Ser Glu Thr Gly Thr Phe Tyr Gln Ile Gly Asp Ser Trp		
565	570	575
Glu Lys Tyr Val His Gly Val Arg Tyr Gln Cys Tyr Cys Tyr Gly Arg		
580	585	590
Gly Ile Gly Glu Trp His Cys Gln Pro Leu Gln Thr Tyr Pro Ser Ser		
595	600	605
Ser Gly Pro Val Glu Val Phe Ile Thr Glu Thr Pro Ser Gln Pro Asn		
610	615	620
Ser His Pro Ile Gln Trp Asn Ala Pro Gln Pro Ser His Ile Ser Lys		
625	630	635
Tyr Ile Leu Arg Trp Arg Pro Lys Asn Ser Val Gly Arg Trp Lys Glu		
645	650	655
Ala Thr Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys Gly Leu Lys		
660	665	670
Pro Gly Val Val Tyr Glu Gly Gln Leu Ile Ser Ile Gln Gln Tyr Gly		
675	680	685
His Gln Glu Val Thr Arg Phe Asp Phe Thr Thr Thr Ser Thr Ser Thr		
690	695	700
Pro Val Thr Ser Asn Thr Val Thr Gly Glu Thr Thr Pro Phe Ser Pro		
705	710	715
Leu Val Ala Thr Ser Glu Ser Val Thr Glu Ile Thr Ala Ser Ser Phe		
725	730	735

Val Val Ser Trp Val Ser Ala Ser Asp Thr Val Ser Gly Phe Arg Val
 740 745 750
 Glu Tyr Glu Leu Ser Glu Glu Gly Asp Glu Pro Gln Tyr Leu Asp Leu
 755 760 765
 Pro Ser Thr Ala Thr Ser Val Asn Ile Pro Asp Leu Leu Pro Gly Arg
 770 775 780
 Lys Tyr Ile Val Asn Val Tyr Gln Ile Ser Glu Asp Gly Glu Gln Ser
 785 790 795 800
 Leu Ile Leu Ser Thr Ser Gln Thr Thr Ala Pro Asp Ala Pro Pro Asp
 805 810 815
 Pro Thr Val Asp Gln Val Asp Asp Thr Ser Ile Val Val Arg Trp Ser
 820 825 830
 Arg Pro Gln Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Val Tyr Ser Pro Ser
 835 840 845
 Val Glu Gly Ser Ser Thr Glu Leu Asn Leu Pro Glu Thr Ala Asn Ser
 850 855 860
 Val Thr Leu Ser Asp Leu Gln Pro Gly Val Gln Tyr Asn Ile Thr Ile
 865 870 875 880
 Tyr Ala Val Glu Glu Asn Gln Glu Ser Thr Pro Val Val Ile Gln Gln
 885 890 895
 Glu Thr Thr Gly Thr Pro Arg Ser Asp Thr Val Pro Ser Pro Arg Asp
 900 905 910
 Leu Gln Phe Val Glu Val Thr Asp Val Lys Val Thr Ile Met Trp Thr
 915 920 925
 Pro Pro Glu Ser Ala Val Thr Gly Tyr Arg Val Asp Val Ile Pro Val
 930 935 940
 Asn Leu Pro Gly Glu His Gly Gln Arg Leu Pro Ile Ser Arg Asn Thr
 945 950 955 960
 Phe Ala Glu Val Thr Gly Leu Ser Pro Gly Val Thr Tyr Tyr Phe Lys
 965 970 975
 Val Phe Ala Val Ser His Gly Arg Glu Ser Lys Pro Leu Thr Ala Gln
 980 985 990
 Gln Thr Thr Lys Leu Asp Ala Pro Thr Asn Leu Gln Phe Val Asn Glu
 995 1000 1005
 Thr Asp Ser Thr Val Leu Val Arg Trp Thr Pro Pro Arg Ala Gln
 1010 1015 1020
 Ile Thr Gly Tyr Arg Leu Thr Val Gly Leu Thr Arg Arg Gly Gln
 1025 1030 1035
 Pro Arg Gln Tyr Asn Val Gly Pro Ser Val Ser Lys Tyr Pro Leu

1040	1045	1050
Arg Asn Leu Gln Pro Ala Ser Glu Tyr Thr Val Ser Leu Val Ala		
1055	1060	1065
Ile Lys Gly Asn Gln Glu Ser Pro Lys Ala Thr Gly Val Phe Thr		
1070	1075	1080
Thr Leu Gln Pro Gly Ser Ser Ile Pro Pro Tyr Asn Thr Glu Val		
1085	1090	1095
Thr Glu Thr Thr Ile Val Ile Thr Trp Thr Pro Ala Pro Arg Ile		
1100	1105	1110
Gly Phe Lys Leu Gly Val Arg Pro Ser Gln Gly Gly Glu Ala Pro		
1115	1120	1125
Arg Glu Val Thr Ser Asp Ser Gly Ser Ile Val Val Ser Gly Leu		
1130	1135	1140
Thr Pro Gly Val Glu Tyr Val Tyr Thr Ile Gln Val Leu Arg Asp		
1145	1150	1155
Gly Gln Glu Arg Asp Ala Pro Ile Val Asn Lys Val Val Thr Pro		
1160	1165	1170
Leu Ser Pro Pro Thr Asn Leu His Leu Glu Ala Asn Pro Asp Thr		
1175	1180	1185
Gly Val Leu Thr Val Ser Trp Glu Arg Ser Thr Thr Pro Asp Ile		
1190	1195	1200
Thr Gly Tyr Arg Ile Thr Thr Thr Pro Thr Asn Gly Gln Gln Gly		
1205	1210	1215
Asn Ser Leu Glu Glu Val Val His Ala Asp Gln Ser Ser Cys Thr		
1220	1225	1230
Phe Asp Asn Leu Ser Pro Gly Leu Glu Tyr Asn Val Ser Val Tyr		
1235	1240	1245
Thr Val Lys Asp Asp Lys Glu Ser Val Pro Ile Ser Asp Thr Ile		
1250	1255	1260
Ile Pro Glu Val Pro Gln Leu Thr Asp Leu Ser Phe Val Asp Ile		
1265	1270	1275
Thr Asp Ser Ser Ile Gly Leu Arg Trp Thr Pro Leu Asn Ser Ser		
1280	1285	1290
Thr Ile Ile Gly Tyr Arg Ile Thr Val Val Ala Ala Gly Glu Gly		
1295	1300	1305
Ile Pro Ile Phe Glu Asp Phe Val Asp Ser Ser Val Gly Tyr Tyr		
1310	1315	1320
Thr Val Thr Gly Leu Glu Pro Gly Ile Asp Tyr Asp Ile Ser Val		
1325	1330	1335

Ile Thr Leu Ile Asn Gly Gly Glu Ser Ala Pro Thr Thr Leu Thr 1340	1345	1350
Gln Gln Thr Ala Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn 1355	1360	1365
Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser 1370	1375	1380
Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn 1385	1390	1395
Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala 1400	1405	1410
Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser 1415	1420	1425
Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly 1430	1435	1440
Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser 1445	1450	1455
Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg 1460	1465	1470
Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe 1475	1480	1485
Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser 1490	1495	1500
Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser 1505	1510	1515
Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly 1520	1525	1530
Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val 1535	1540	1545
Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala 1550	1555	1560
Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly 1565	1570	1575
Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr 1580	1585	1590
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr 1595	1600	1605
Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys 1610	1615	1620
Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln		

1625	1630	1635
Met Gln Val Thr Asp Val	Gln Asp Asn Ser Ile	Ser Val Lys Trp
1640	1645	1650
Leu Pro Ser Ser Ser Pro	Val Thr Gly Tyr Arg	Val Thr Thr Thr
1655	1660	1665
Pro Lys Asn Gly Pro Gly	Pro Thr Lys Thr Lys	Thr Ala Gly Pro
1670	1675	1680
Asp Gln Thr Glu Met Thr	Ile Glu Gly Leu Gln	Pro Thr Val Glu
1685	1690	1695
Tyr Val Val Ser Val Tyr	Ala Gln Asn Pro Ser	Gly Glu Ser Gln
1700	1705	1710
Pro Leu Val Gln Thr Ala	Val Thr Asn Ile Asp	Arg Pro Lys Gly
1715	1720	1725
Leu Ala Phe Thr Asp Val	Asp Val Asp Ser Ile	Lys Ile Ala Trp
1730	1735	1740
Glu Ser Pro Gln Gly Gln	Val Ser Arg Tyr Arg	Val Thr Tyr Ser
1745	1750	1755
Ser Pro Glu Asp Gly Ile	His Glu Leu Phe Pro	Ala Pro Asp Gly
1760	1765	1770
Glu Glu Asp Thr Ala Glu	Leu Gln Gly Leu Arg	Pro Gly Ser Glu
1775	1780	1785
Tyr Thr Val Ser Val Val	Ala Leu His Asp Asp	Met Glu Ser Gln
1790	1795	1800
Pro Leu Ile Gly Thr Gln	Ser Thr Ala Ile Pro	Ala Pro Thr Asp
1805	1810	1815
Leu Lys Phe Thr Gln Val	Thr Pro Thr Ser Leu	Ser Ala Gln Trp
1820	1825	1830
Thr Pro Pro Asn Val Gln	Leu Thr Gly Tyr Arg	Val Arg Val Thr
1835	1840	1845
Pro Lys Glu Lys Thr Gly	Pro Met Lys Glu Ile	Asn Leu Ala Pro
1850	1855	1860
Asp Ser Ser Ser Val Val	Val Ser Gly Leu Met	Val Ala Thr Lys
1865	1870	1875
Tyr Glu Val Ser Val Tyr	Ala Leu Lys Asp Thr	Leu Thr Ser Arg
1880	1885	1890
Pro Ala Gln Gly Val Val	Thr Thr Leu Glu Asn	Val Ser Pro Pro
1895	1900	1905
Arg Arg Ala Arg Val Thr	Asp Ala Thr Glu Thr	Thr Ile Thr Ile
1910	1915	1920

Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp 1925	1930	1935
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys 1940	1945	1950
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr 1955	1960	1965
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser 1970	1975	1980
Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser 1985	1990	1995
Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser 2000	2005	2010
Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr 2015	2020	2025
Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg 2030	2035	2040
Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr 2045	2050	2055
Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser 2060	2065	2070
Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu 2075	2080	2085
Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp 2090	2095	2100
Val Pro Ser Thr Val Gln Lys Thr Pro Phe Val Thr His Pro Gly 2105	2110	2115
Tyr Asp Thr Gly Asn Gly Ile Gln Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gln 2120	2125	2130
Gln Pro Ser Val Gly Gln Gln Met Ile Phe Glu Glu His Gly Phe 2135	2140	2145
Arg Arg Thr Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Pro Ile Arg His Arg 2150	2155	2160
Pro Arg Pro Tyr Pro Pro Asn Val Gly Gln Glu Ala Leu Ser Gln 2165	2170	2175
Thr Thr Ile Ser Trp Ala Pro Phe Gln Asp Thr Ser Glu Tyr Ile 2180	2185	2190
Ile Ser Cys His Pro Val Gly Thr Asp Glu Glu Pro Leu Gln Phe 2195	2200	2205
Arg Val Pro Gly Thr Ser Thr Ser Ala Thr Leu Thr Gly Leu Thr		

2210	2215	2220
Arg Gly Ala Thr Tyr Asn Ile Ile Val Glu Ala Leu Lys Asp Gln		
2225	2230	2235
Gln Arg His Lys Val Arg Glu Glu Val Val Thr Val Gly Asn Ser		
2240	2245	2250
Val Asn Glu Gly Leu Asn Gln Pro Thr Asp Asp Ser Cys Phe Asp		
2255	2260	2265
Pro Tyr Thr Val Ser His Tyr Ala Val Gly Asp Glu Trp Glu Arg		
2270	2275	2280
Met Ser Glu Ser Gly Phe Lys Leu Leu Cys Gln Cys Leu Gly Phe		
2285	2290	2295
Gly Ser Gly His Phe Arg Cys Asp Ser Ser Arg Trp Cys His Asp		
2300	2305	2310
Asn Gly Val Asn Tyr Lys Ile Gly Glu Lys Trp Asp Arg Gln Gly		
2315	2320	2325
Glu Asn Gly Gln Met Met Ser Cys Thr Cys Leu Gly Asn Gly Lys		
2330	2335	2340
Gly Glu Phe Lys Cys Asp Pro His Glu Ala Thr Cys Tyr Asp Asp		
2345	2350	2355
Gly Lys Thr Tyr His Val Gly Glu Gln Trp Gln Lys Glu Tyr Leu		
2360	2365	2370
Gly Ala Ile Cys Ser Cys Thr Cys Phe Gly Gly Gln Arg Gly Trp		
2375	2380	2385
Arg Cys Asp Asn Cys Arg Arg Pro Gly Gly Glu Pro Ser Pro Glu		
2390	2395	2400
Gly Thr Thr Gly Gln Ser Tyr Asn Gln Tyr Ser Gln Arg Tyr His		
2405	2410	2415
Gln Arg Thr Asn Thr Asn Val Asn Cys Pro Ile Glu Cys Phe Met		
2420	2425	2430
Pro Leu Asp Val Gln Ala Asp Arg Glu Asp Ser Arg Glu		
2435	2440	2445
<210> 3		
<211> 4		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> EDB结合肽		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		

- <222> (2) .. (2)
<223> Ile或Val
<400> 3
Arg Xaa Arg Leu
1
<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> EDB结合肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> 彼此独立地是任何氨基酸
<220>
<221> REPEAT
<222> (1) .. (1)
<223> 优选重复0-4次, 优选1或2次
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3) .. (3)
<223> 彼此独立地是任何氨基酸
<220>
<221> REPEAT
<222> (3) .. (3)
<223> 优选重复3-10次, 优选4、5、6或7次
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5) .. (5)
<223> Ile或Val
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7) .. (7)
<223> 彼此独立地是任何氨基酸
<220>
<221> REPEAT
<222> (7) .. (7)
<223> 优选重复0-4次, 优选0或1次

- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9) .. (9)
<223> 彼此独立地是任何氨基酸
<220>
<221> REPEAT
<222> (9) .. (9)
<223> 优选重复3-7次, 优选4、5或6次
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11) .. (11)
<223> 彼此独立地是任何氨基酸
<220>
<221> REPEAT
<222> (11) .. (11)
<223> 优选重复2-6次, 优选2、3或4次
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13) .. (13)
<223> 彼此独立地是任何氨基酸
<220>
<221> REPEAT
<222> (13) .. (13)
<223> 优选重复1-3次, 优选1或2次
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15) .. (15)
<223> 彼此独立地是任何氨基酸
<220>
<221> REPEAT
<222> (15) .. (15)
<223> 优选重复3-7次, 优选4、5或6次
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17) .. (17)
<223> 彼此独立地是任何氨基酸
<220>
<221> REPEAT
<222> (17) .. (17)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15) .. (15)
<223> 彼此独立地是任何氨基酸
<220>
<221> REPEAT
<222> (15) .. (15)
<223> 优选重复2-6次, 优选2、3或4次
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25) .. (25)
<223> 彼此独立地是任何氨基酸
<220>
<221> REPEAT
<222> (25) .. (25)
<223> 优选重复0-4次, 优选1或2次
<400> 5
Xaa Cys Xaa Arg Xaa Arg Xaa Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys Xaa Cys
1 5 10 15
Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Xaa
 20 25
<210> 6
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> EDB结合肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> 彼此独立地是任何氨基酸
<220>
<221> REPEAT
<222> (1) .. (1)
<223> 优选重复0-4次, 优选1或2次
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3) .. (3)
<223> 彼此独立地是任何氨基酸

- <220>
 <221> REPEAT
 <222> (3) .. (3)
 <223> 优选重复3-10次, 优选4、5、6或7次
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5) .. (5)
 <223> Ile或Val
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7) .. (7)
 <223> 彼此独立地是任何氨基酸
 <220>
 <221> REPEAT
 <222> (7) .. (7)
 <223> 优选重复0-4次, 优选0或1次
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15) .. (15)
 <223> 彼此独立地是任何氨基酸
 <220>
 <221> REPEAT
 <222> (15) .. (15)
 <223> 优选重复2-6次, 优选2、3或4次
 <400> 6
 Xaa Cys Xaa Arg Xaa Arg Xaa Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys Xaa Cys
 1 5 10 15
 Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly
 20 25
 <210> 7
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> EDB结合肽
 <400> 7
 Trp Lys Cys Gln Pro Thr Asn Gly Tyr Arg Ile Arg Cys Arg Arg Asp
 1 5 10 15
 Ser Asp Cys Pro Gly Asp Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly

	20	25	30
<210>	8		
<211>	33		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	EDB结合肽		
<400>	8		
Ser Val Cys Lys Asn Val Ser Ile Met Arg Ile Arg Leu Cys Arg Arg			
1	5	10	15
Asp Ser Asp Cys Pro Gly Ala Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys			
	20	25	30
Gly			
<210>	9		
<211>	33		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	EDB结合肽		
<400>	9		
Ser Val Cys Ala His Tyr Asn Thr Ile Arg Val Arg Leu Cys Arg Arg			
1	5	10	15
Asp Ser Asp Cys Pro Gly Ala Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys			
	20	25	30
Gly			
<210>	10		
<211>	32		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	EDB结合肽		
<400>	10		
Trp Thr Cys Thr Lys Lys Tyr Pro Asn Thr Ile Ser Cys Arg Arg Asp			
1	5	10	15
Ser Asp Cys Arg Val Thr Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly			
	20	25	30
<210>	11		
<211>	32		
<212>	PRT		

<213> 人工序列

<220>

<223> EDB结合肽

<400> 11

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

<210> 12

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EDB结合肽

<400> 12

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

Gly

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EDB结合肽

<400> 13

Ala	Met	Cys	Thr	Gln	Arg	Lys	Asn	Arg	Ile	Arg	Leu	Cys	Arg	Arg	Asp
1				5					10					15	
Ser	Asp	Cys	Thr	Gly	Ala	Cys	Ile	Cys	Arg	Gly	Asn	Gly	Tyr	Cys	Gly
				20				25					30		

<210> 14

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EDB结合肽

<400> 14

Pro	Ala	Cys	Thr	Gln	Arg	Lys	Asn	Arg	Ile	Arg	Leu	Cys	Arg	Arg	Asp
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15
Ser Asp Cys Thr Gly Ala Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly			
	20	25	30

<210> 15

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EDB结合肽

<400> 15

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

<210> 16

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EDB结合肽

<400> 16

Pro Met Cys Thr Ala Arg Lys Asn Arg Ile Arg Leu Cys Arg Arg Asp			
1	5	10	15
Ser Asp Cys Thr Gly Ala Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly			
	20	25	30

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EDB结合肽

<400> 17

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

<210> 18

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EDB结合肽

<400> 18

Pro	Met	Cys	Thr	Gln	Arg	Ala	Asn	Arg	Ile	Arg	Leu	Cys	Arg	Arg	Asp
1				5					10					15	
Ser	Asp	Cys	Thr	Gly	Ala	Cys	Ile	Cys	Arg	Gly	Asn	Gly	Tyr	Cys	Gly
				20				25					30		

<210> 19

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EDB结合肽

<400> 19

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

<210> 20

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EDB结合肽

<400> 20

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

<210> 21

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EDB结合肽

<400> 21

Pro	Met	Cys	Thr	Gln	Arg	Lys	Asn	Arg	Ala	Arg	Leu	Cys	Arg	Arg	Asp
1				5					10					15	

Ser Asp Cys Thr Gly Ala Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly
 20 25 30

<210> 22

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EDB结合肽

<400> 22

Pro Met Cys Thr Gln Arg Lys Asn Arg Ile Ala Leu Cys Arg Arg Asp
 1 5 10 15

Ser Asp Cys Thr Gly Ala Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly
 20 25 30

<210> 23

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EDB结合肽

<400> 23

Pro Met Cys Thr Gln Arg Lys Asn Arg Ile Arg Ala Cys Arg Arg Asp
 1 5 10 15

Ser Asp Cys Thr Gly Ala Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly
 20 25 30

<210> 24

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EDB结合肽

<400> 24

Pro Met Cys Thr Gln Arg Lys Asn Arg Ile Arg Leu Cys Ala Arg Asp
 1 5 10 15

Ser Asp Cys Thr Gly Ala Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly
 20 25 30

<210> 25

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EDB结合肽

<400> 25

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

<210> 26

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EDB结合肽

<400> 26

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

<210> 27

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对照肽

<400> 27

Pro	Met	Cys	Thr	Gln	Arg	Ala	Asn	Arg	Ile	Ala	Ala	Cys	Arg	Arg	Asp
1				5					10					15	
Ser	Asp	Cys	Thr	Gly	Ala	Cys	Ile	Cys	Arg	Gly	Asn	Gly	Tyr	Cys	Gly
			20					25					30		

<210> 28

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens (智人)

<400> 28

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

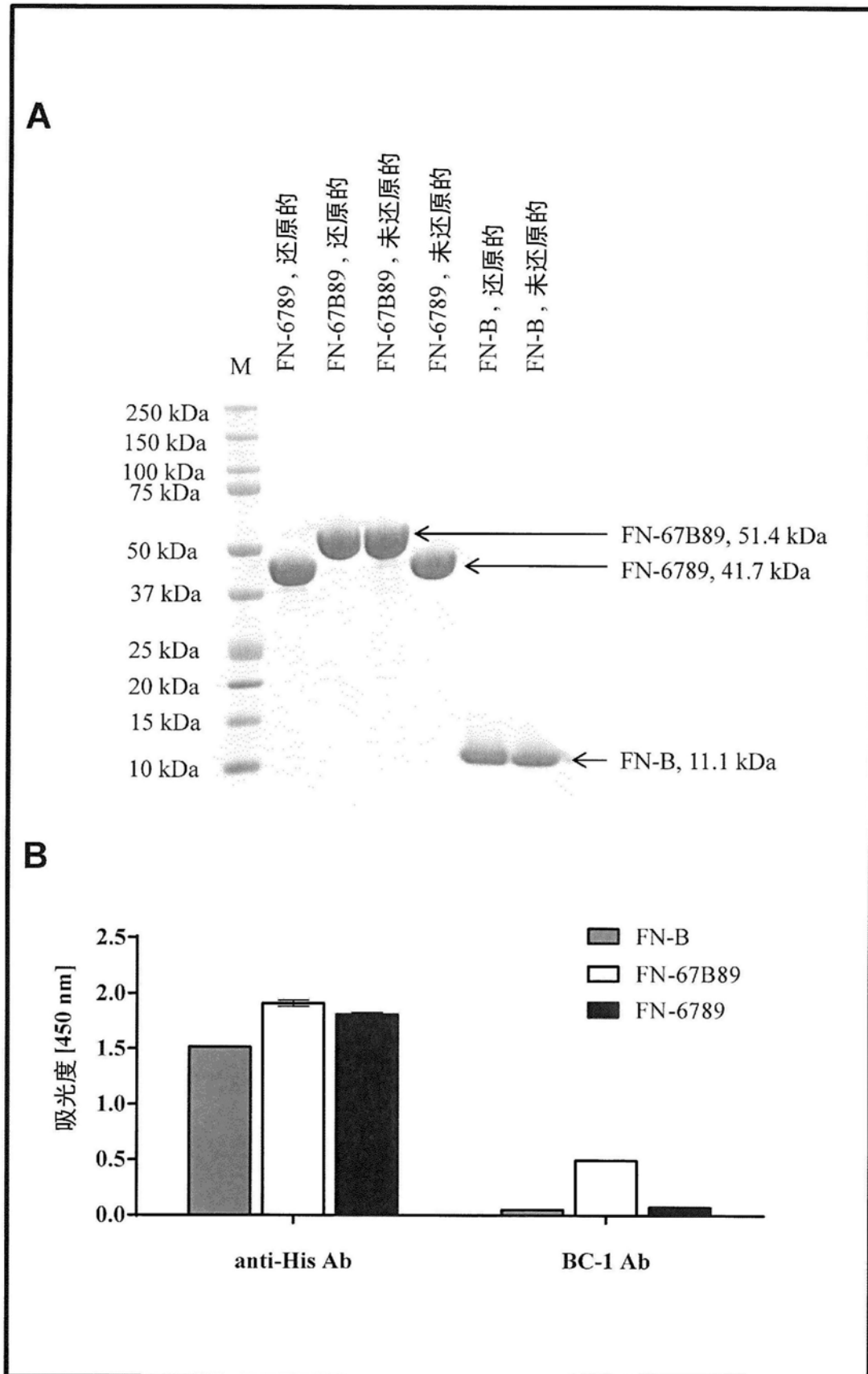


图1

克隆名称	胱氨酸结小蛋白序列	总序列的比例 (%)
MCopt 1.0-2	WKCQPTNGYRIR <u>CRRDSD</u> CPGDCICRGNGYCG	40
MCopt 2.0-2	SVCKNVSIMRIRL <u>CRRDSD</u> CPGACICRGNGYCG	13
MCopt 2.0-1	SVCAHYNTIRVRL <u>CRRDSD</u> CPGACICRGNGYCG	10
MCopt 1.0-1	WTCTKKYPNTIS <u>CRRDSD</u> CRVTCICRGNGYCG	4
MCopt 1.0-3	PMCTQRKNRIRL <u>CRRDSD</u> CTGACICRGNGYCG	2
MCopt 2.0-3	SVCKQANFVRIRL <u>CRRDSD</u> CPGACICRGNGYCG	2

图2

克隆名称	排名值	蛋白序列
MCopt 1.0-1	3.7 to 1.7	WTCTKKYPNTISCRRDSDCRVTCICRGNNGYCG
MCopt 1.0-2	2.7 to 1.6	WKCQPTNGYRIRCRRDSDCPGDCICRGNNGYCG
MCopt 1.0-3	2.6 to 0.6	PMCTQRKNRIRLCRRDSDCTGACICRGNNGYCG

图3

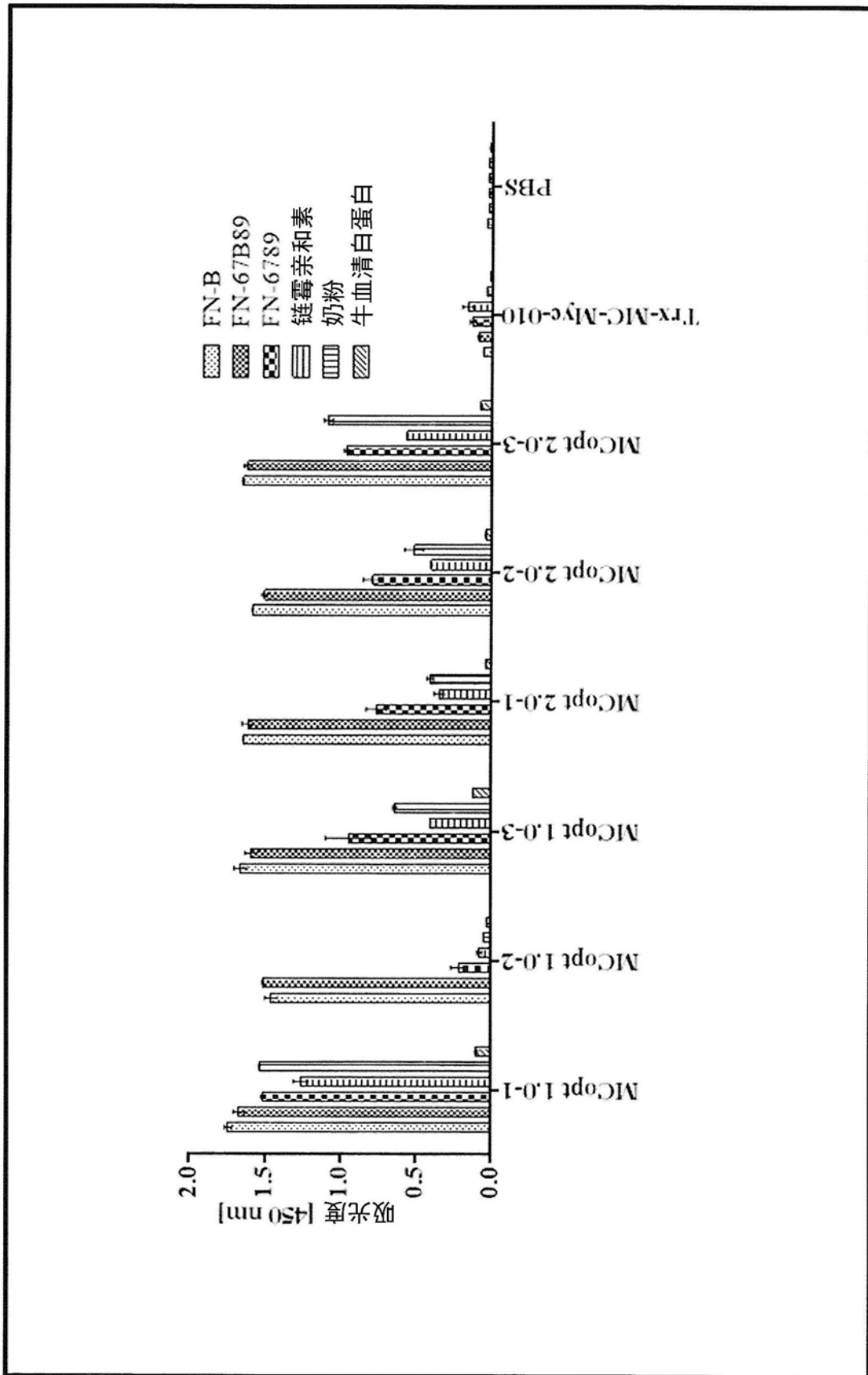


图4

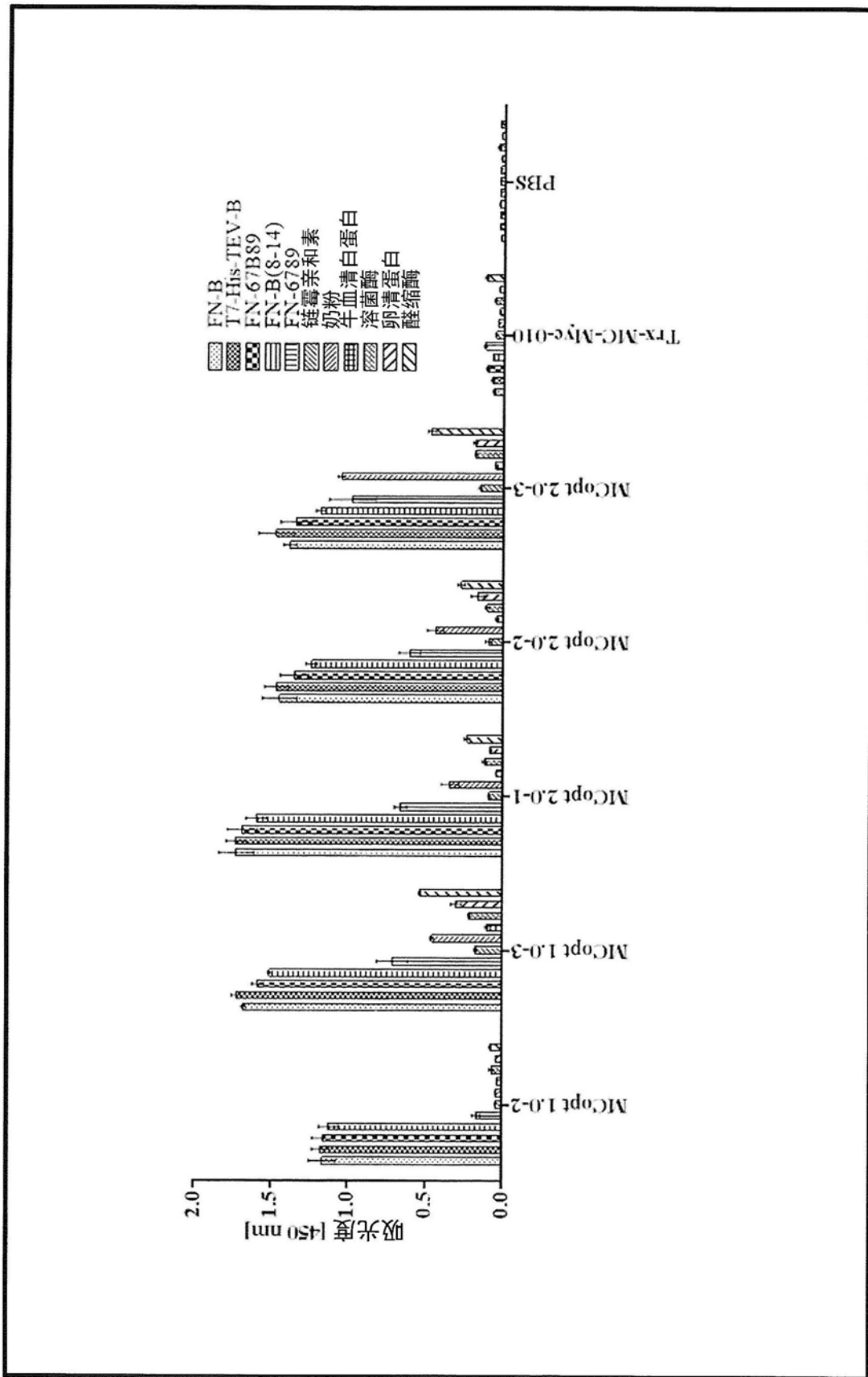


图5

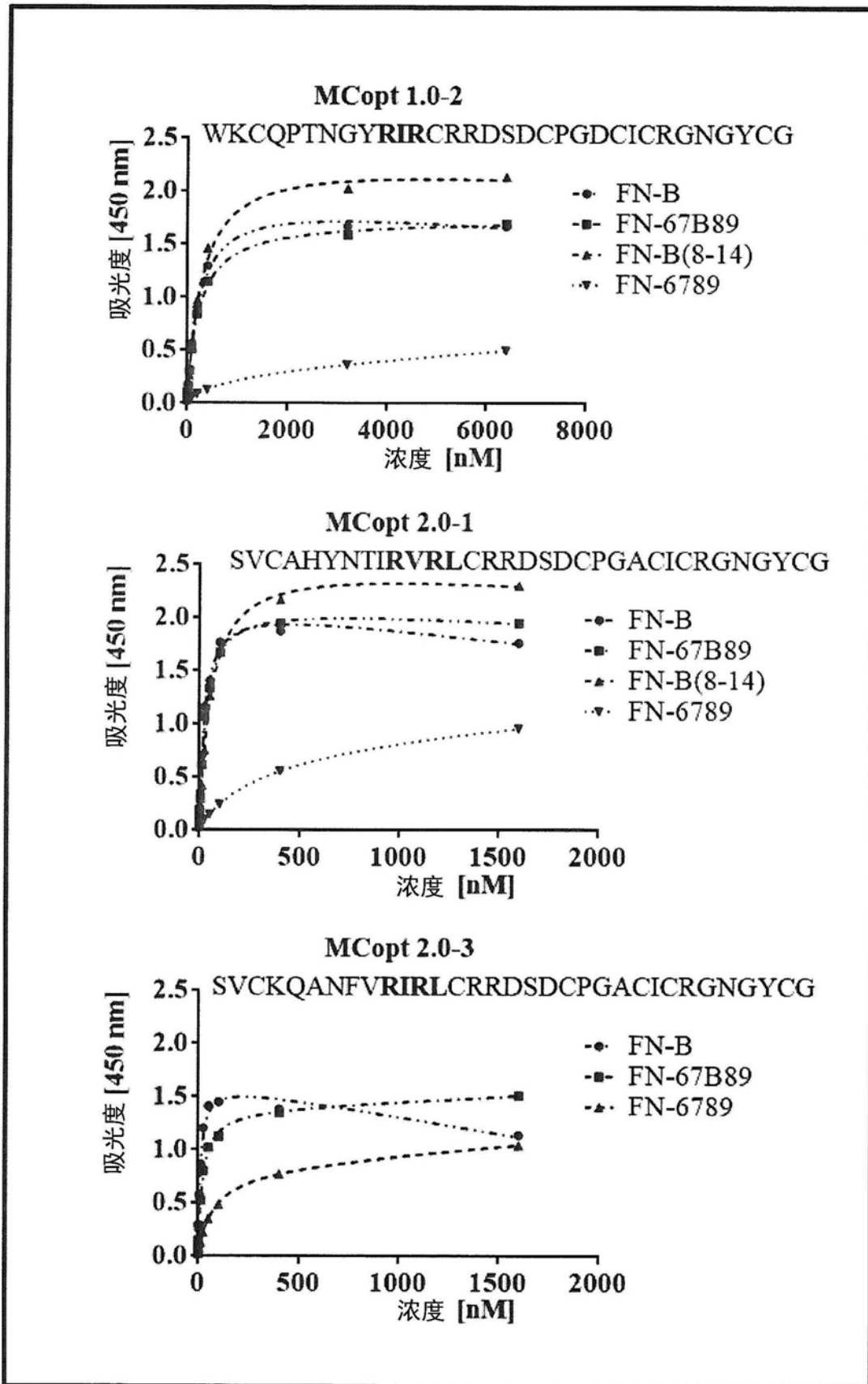


图6

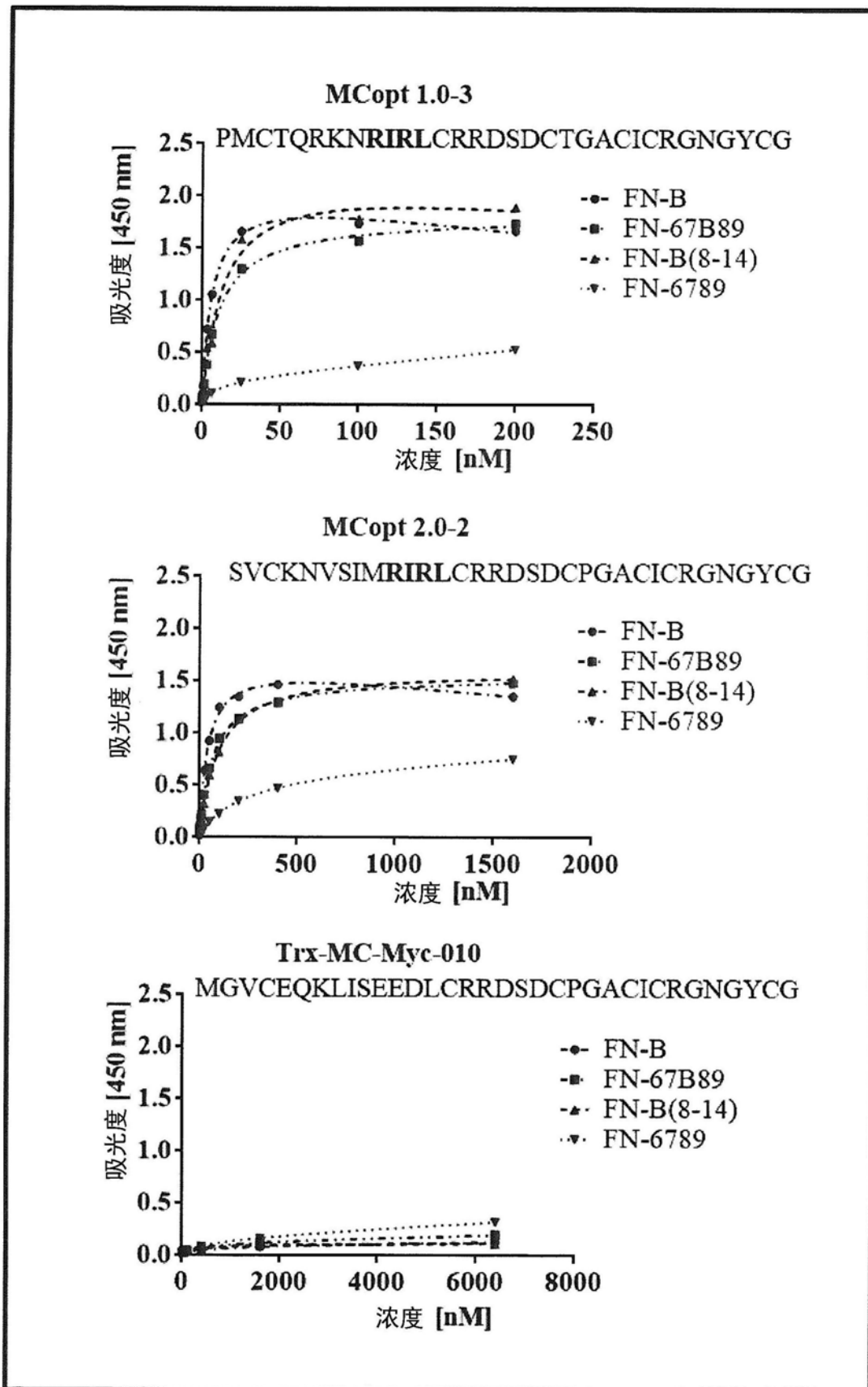
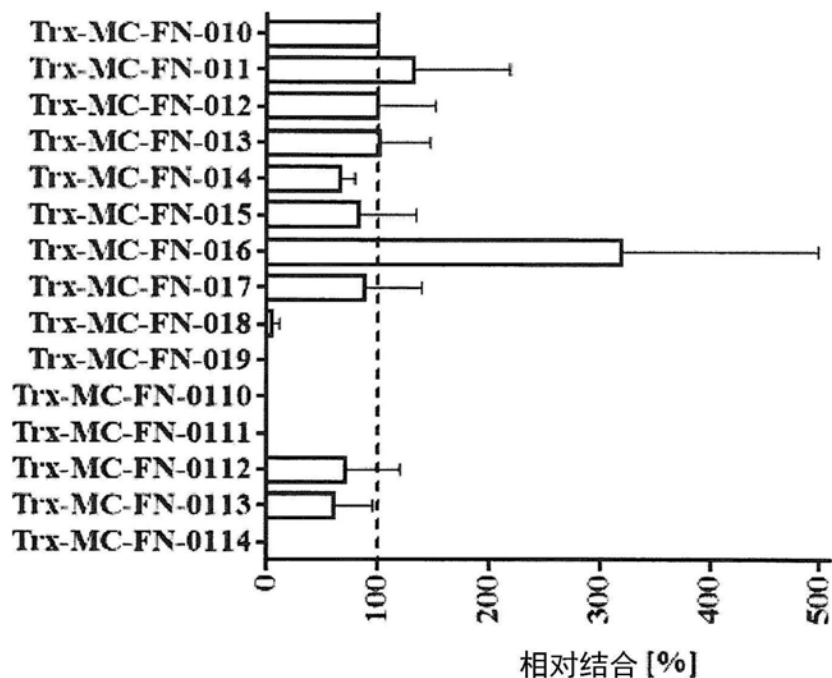


图6 (续)

A

构建体名称	氨基酸序列
MC-FN-010	PMCTQRKNRIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-011	AMCTQRKNRIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-012	PACTQRKNRIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-013	PMCAQRKNRIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-014	PMCTARKNRIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-015	PMCTQAKNRIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-016	PMCTQRANRIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-017	PMCTQRKARIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-018	PMCTQRKNAIRLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-019	PMCTQRKNRARLCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-0110	PMCTQRKNRIALCRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-0111	PMCTQRKNRIRACRRDSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-0112	PMCTQRKNRIRLCARDSCTGACICRGNGYCG
MC-FN-0113	PMCTQRKNRIRLCRADSDCTGACICRGNGYCG
MC-FN-0114	PMCTQRKNRIRLCRRDSDCTGACICAGNGYCG

B



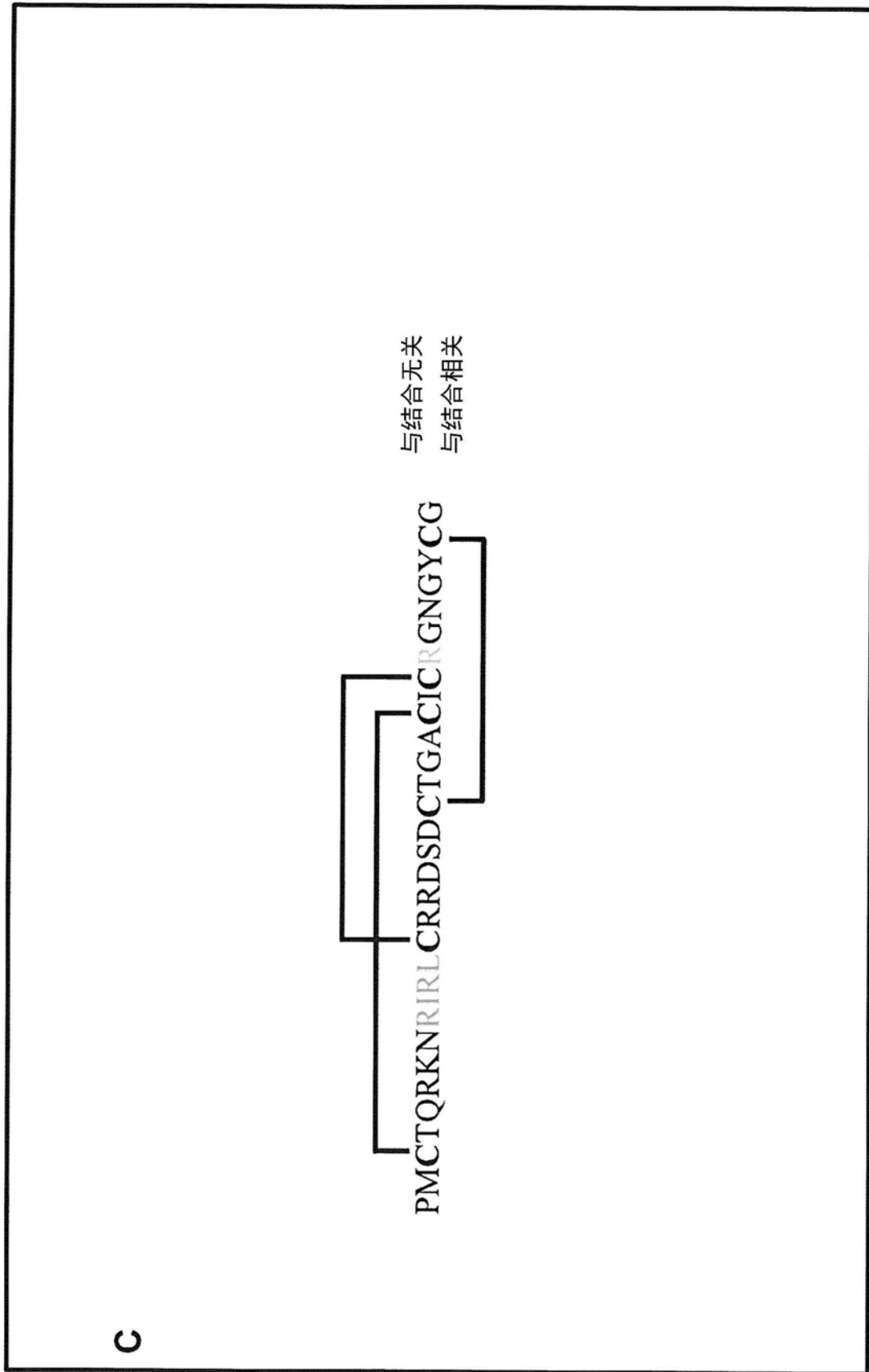


图7

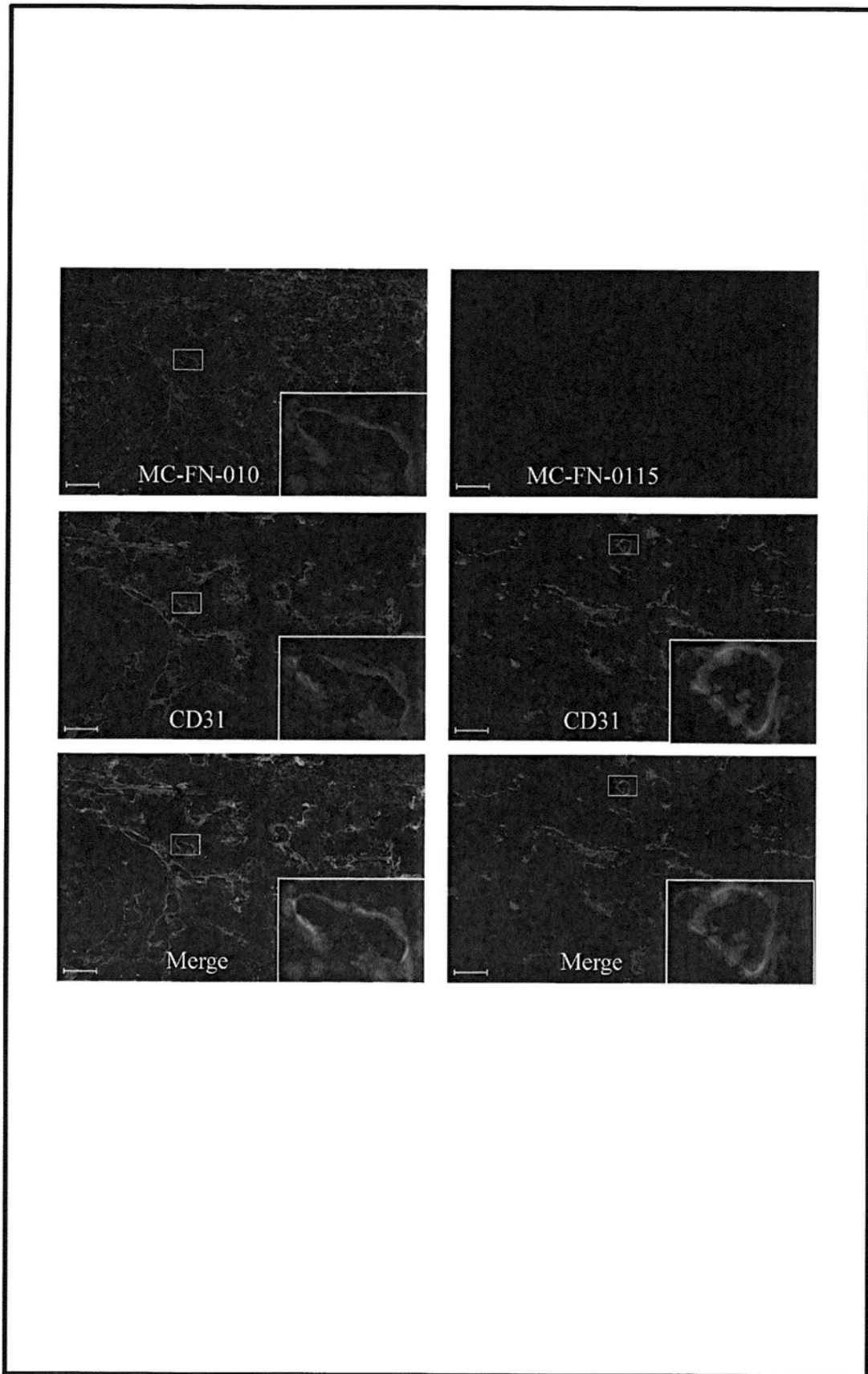


图8

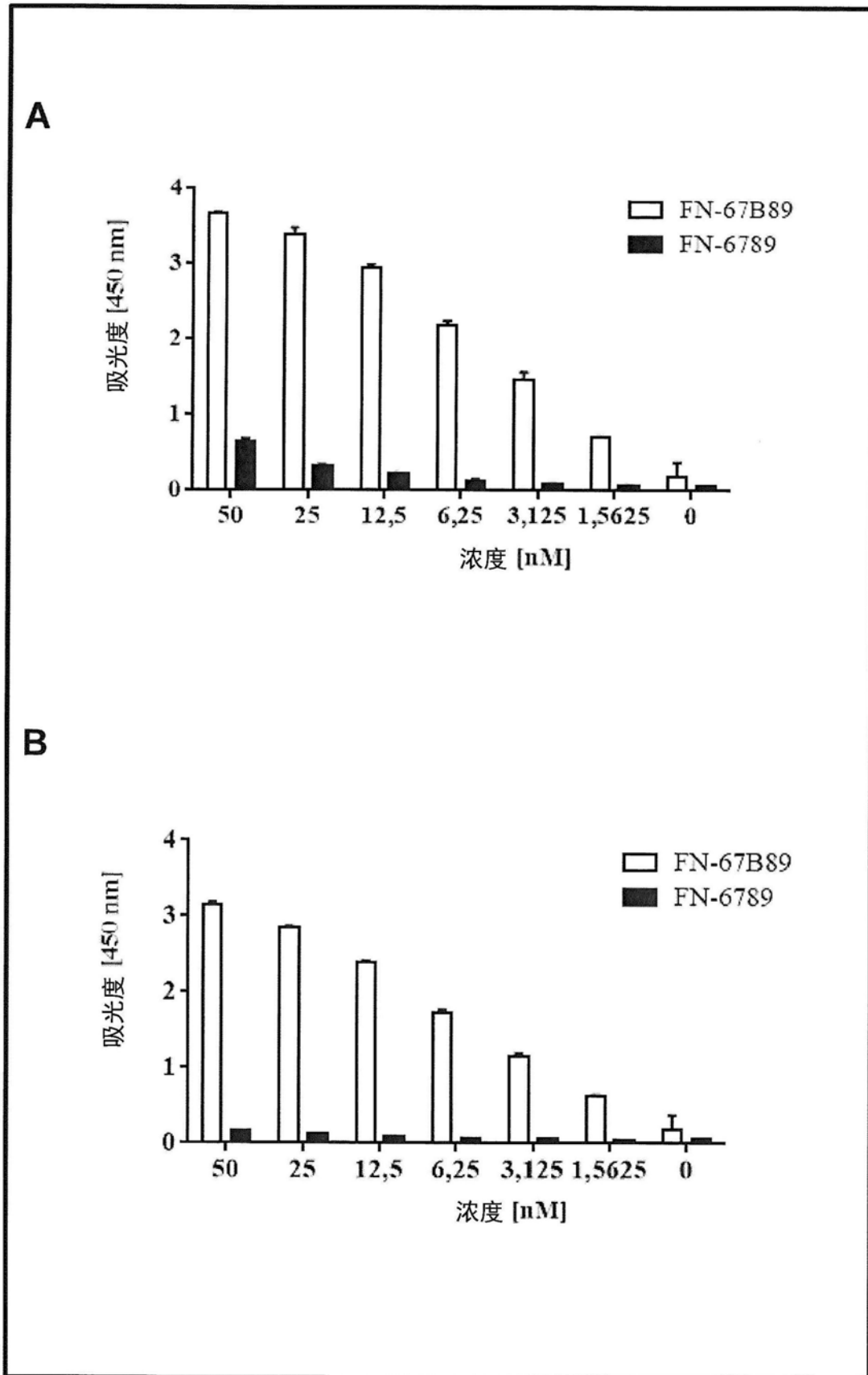


图9

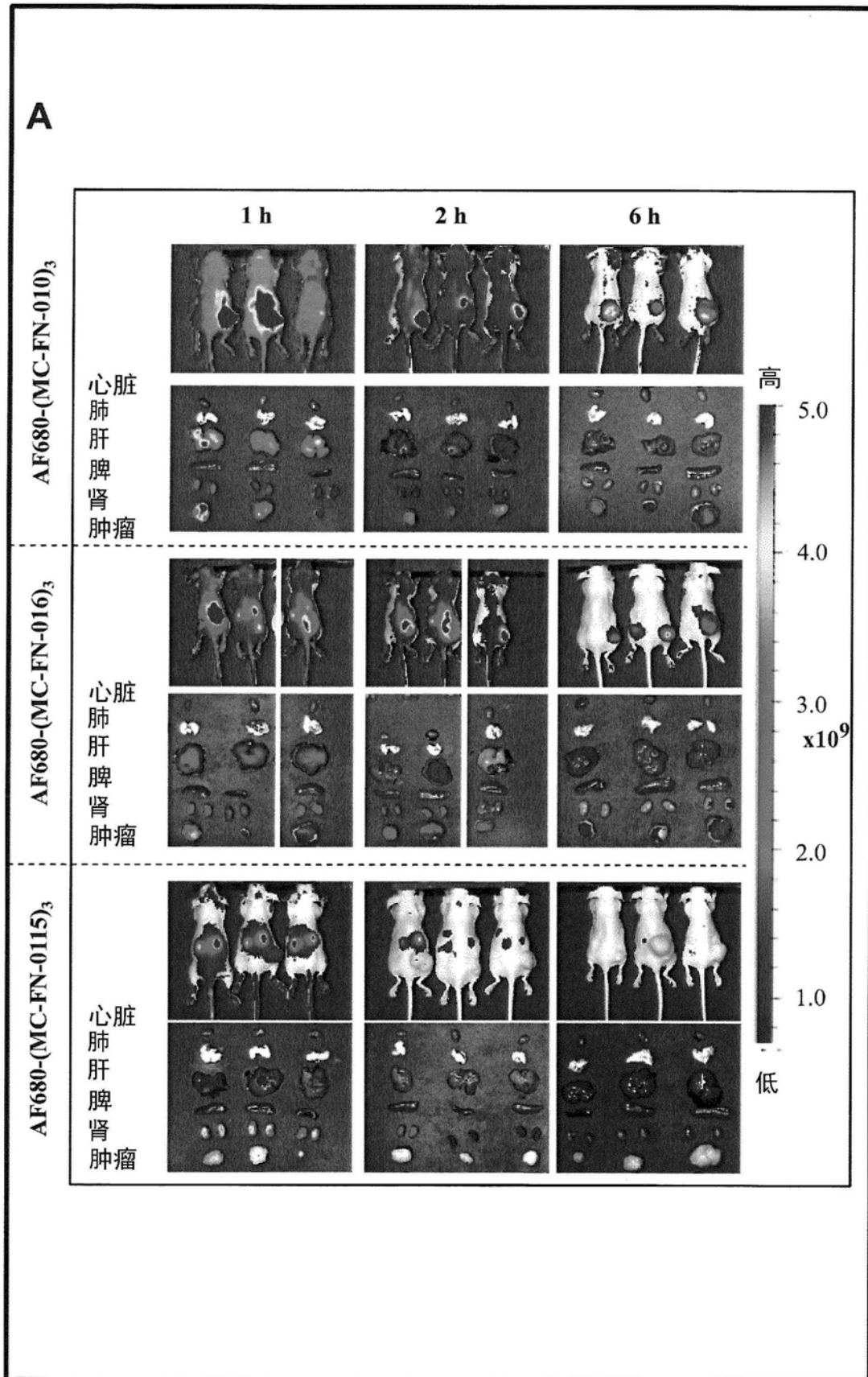
A

名称	浓度 (nM)	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (μ M)
MC-FN-010	50-4000	4.95×10^4	0.07831	1.58
MC-FN-016	62.5-4000	1.33×10^5	0.1873	1.41

B

名称	浓度 (nM)	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (pM)
AF680-(MC-FN-010) ₃	1.25-10	8.04×10^6	3.47×10^{-3}	431
AF680-(MC-FN-016) ₃	1.25-10	2.56×10^6	2.31×10^{-3}	902
AF680-(MC-FN-0115) ₃	1.25-10	对FN-67B89无结合		

图10



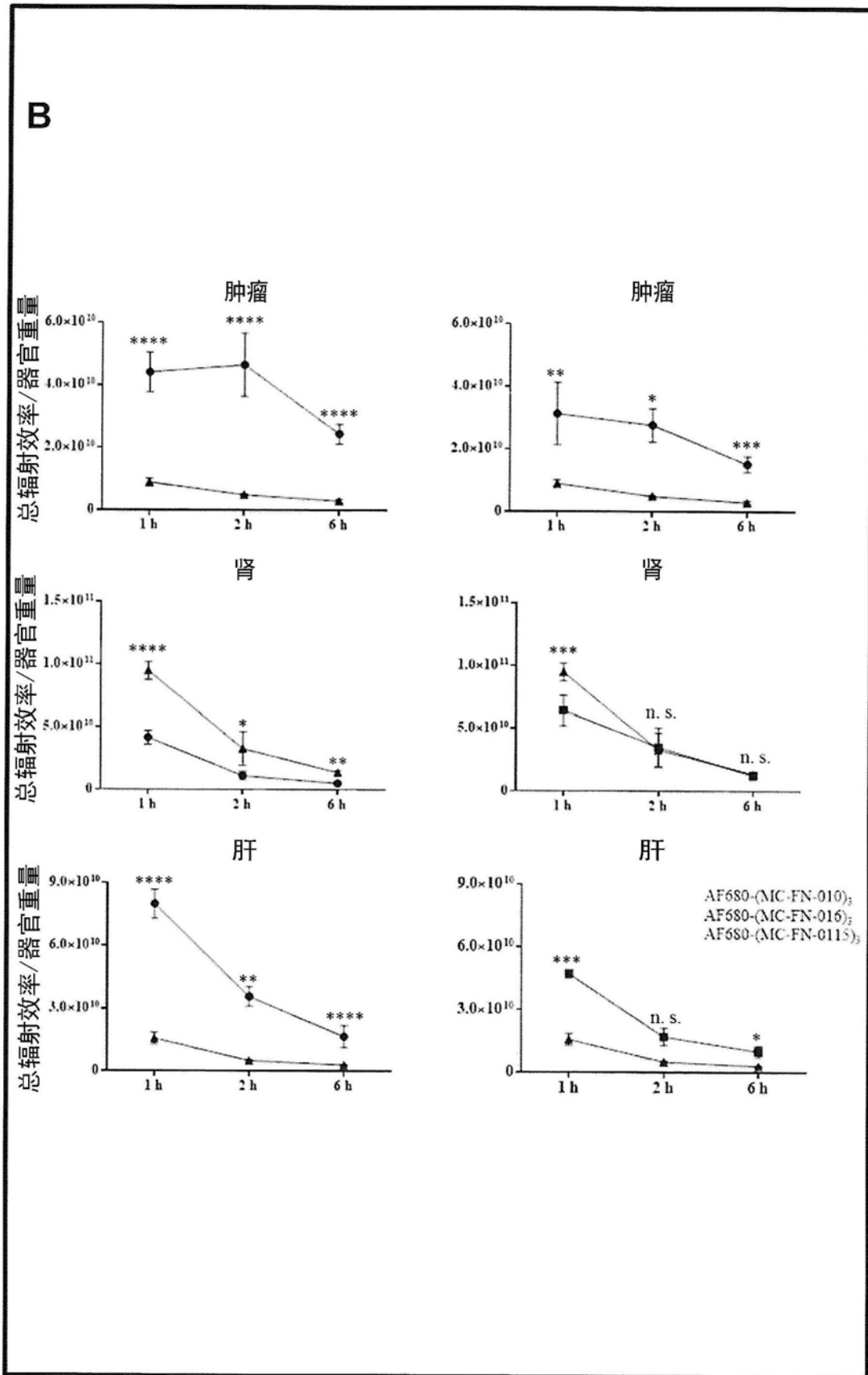


图11

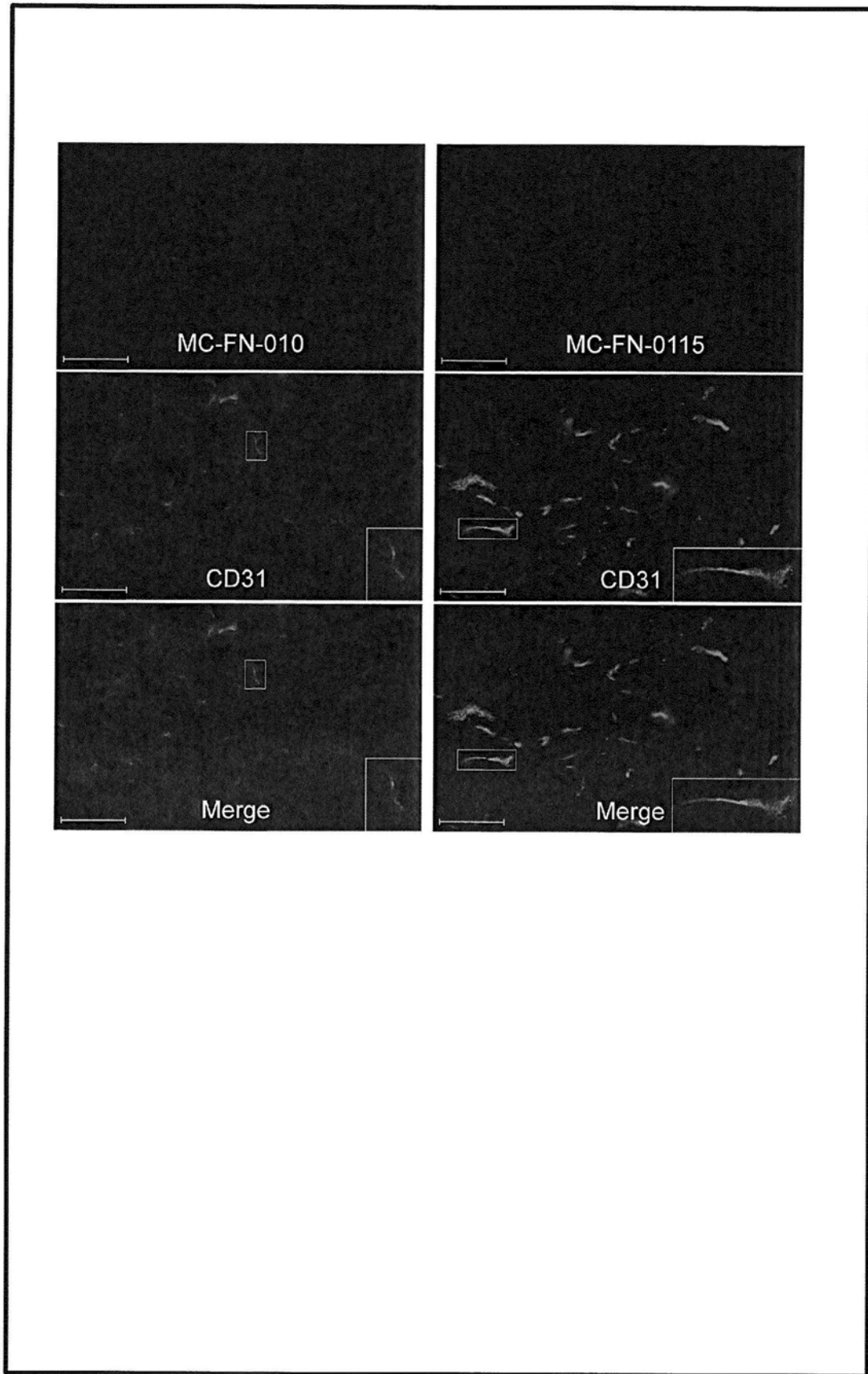
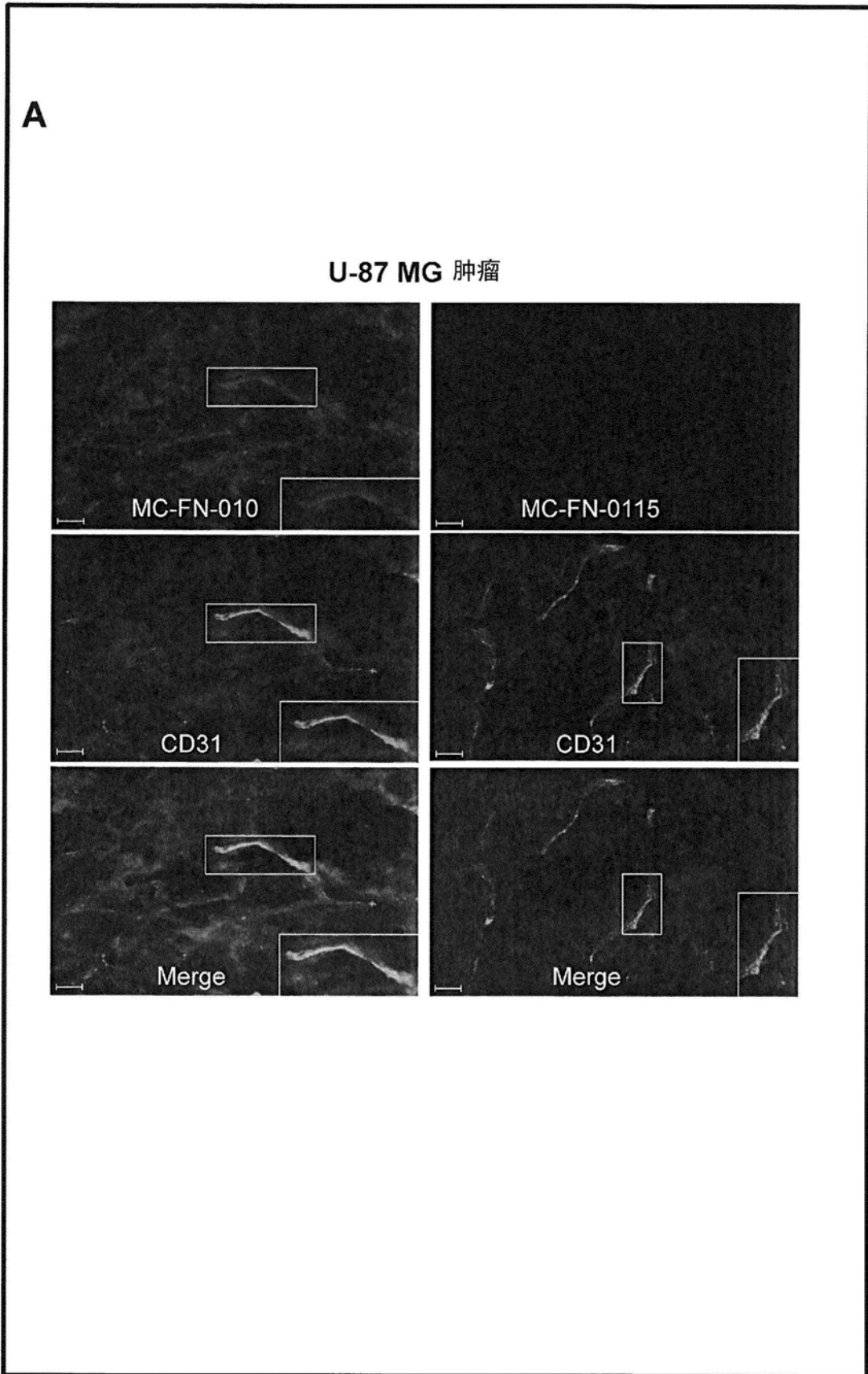


图12



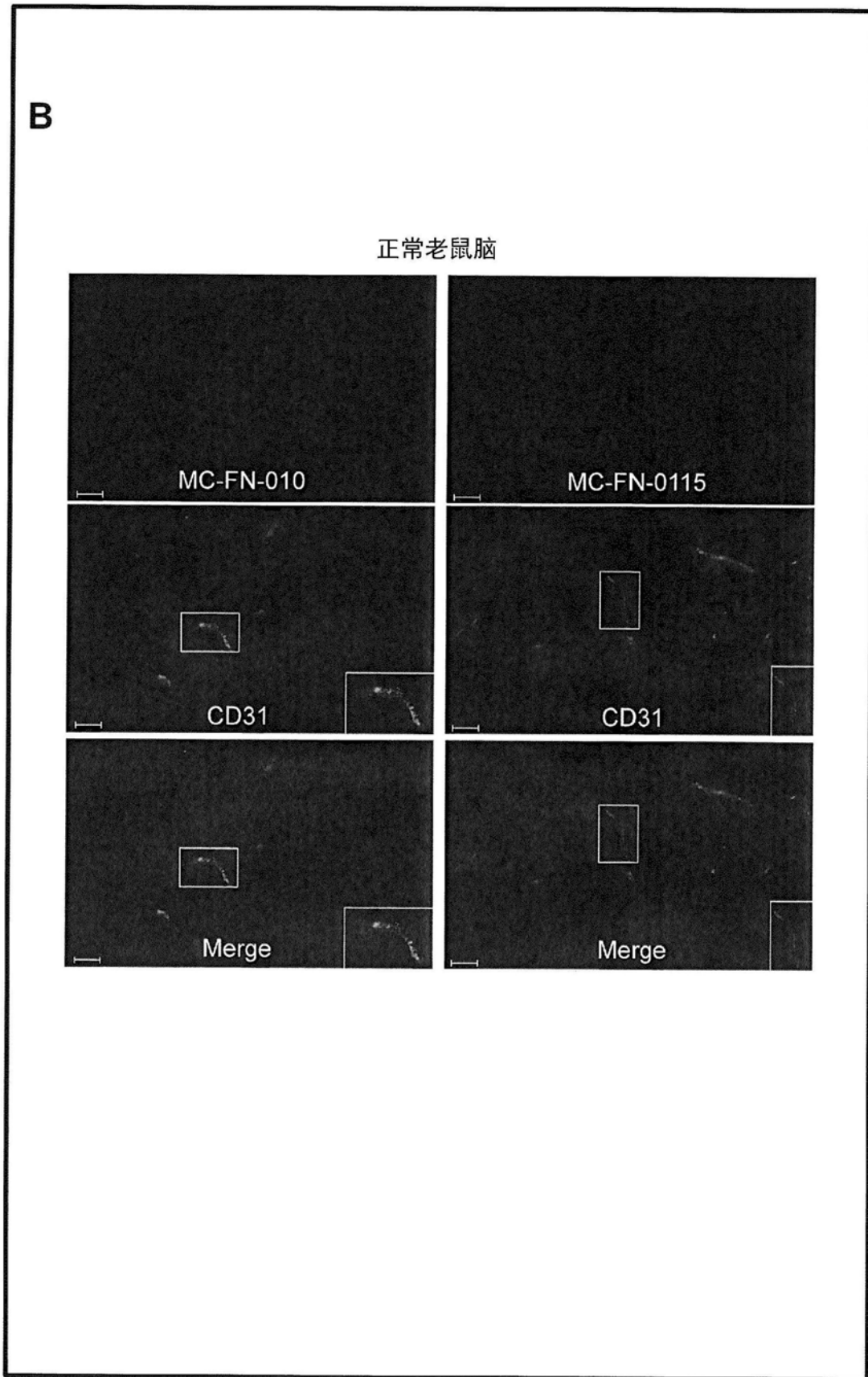
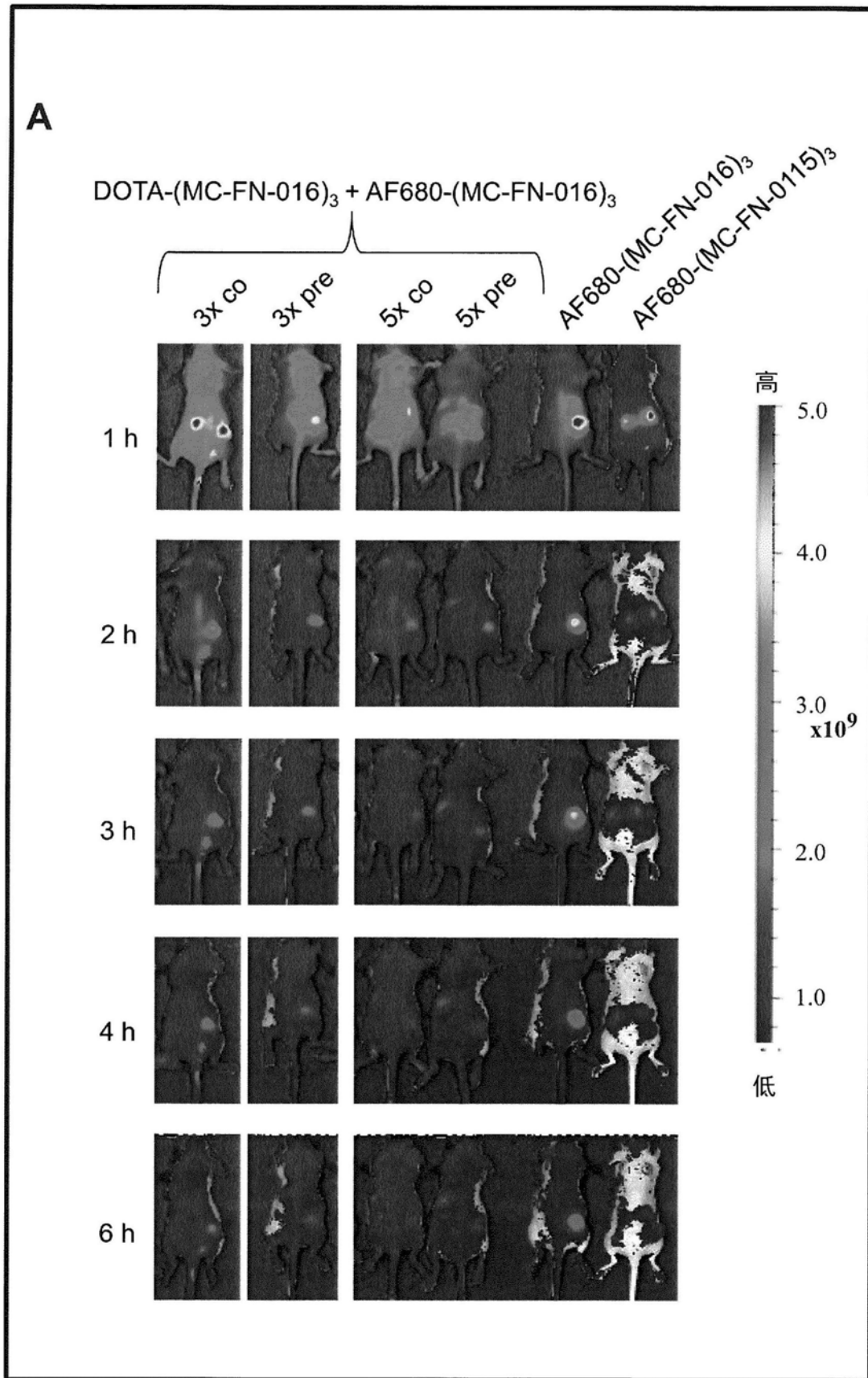
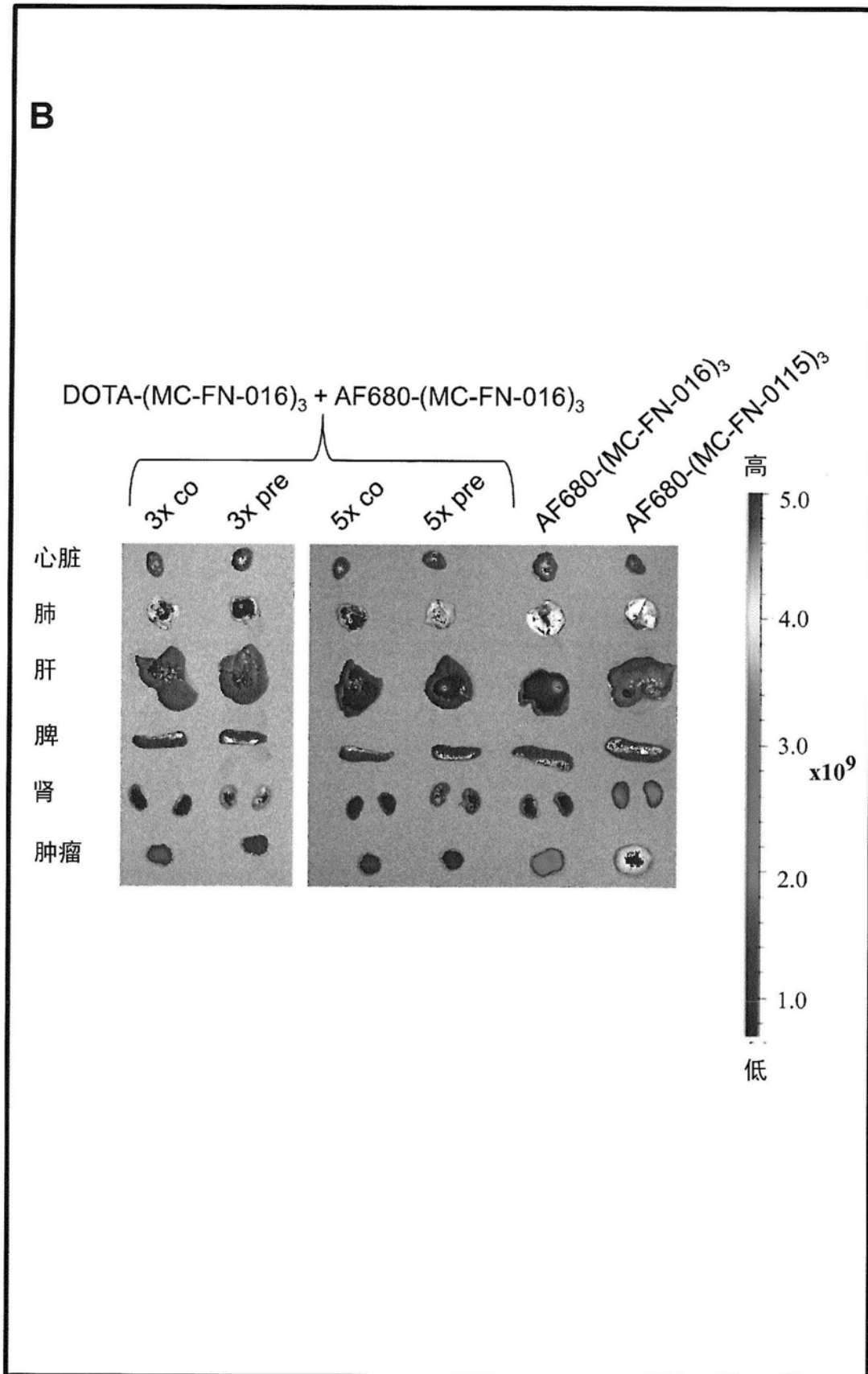


图13





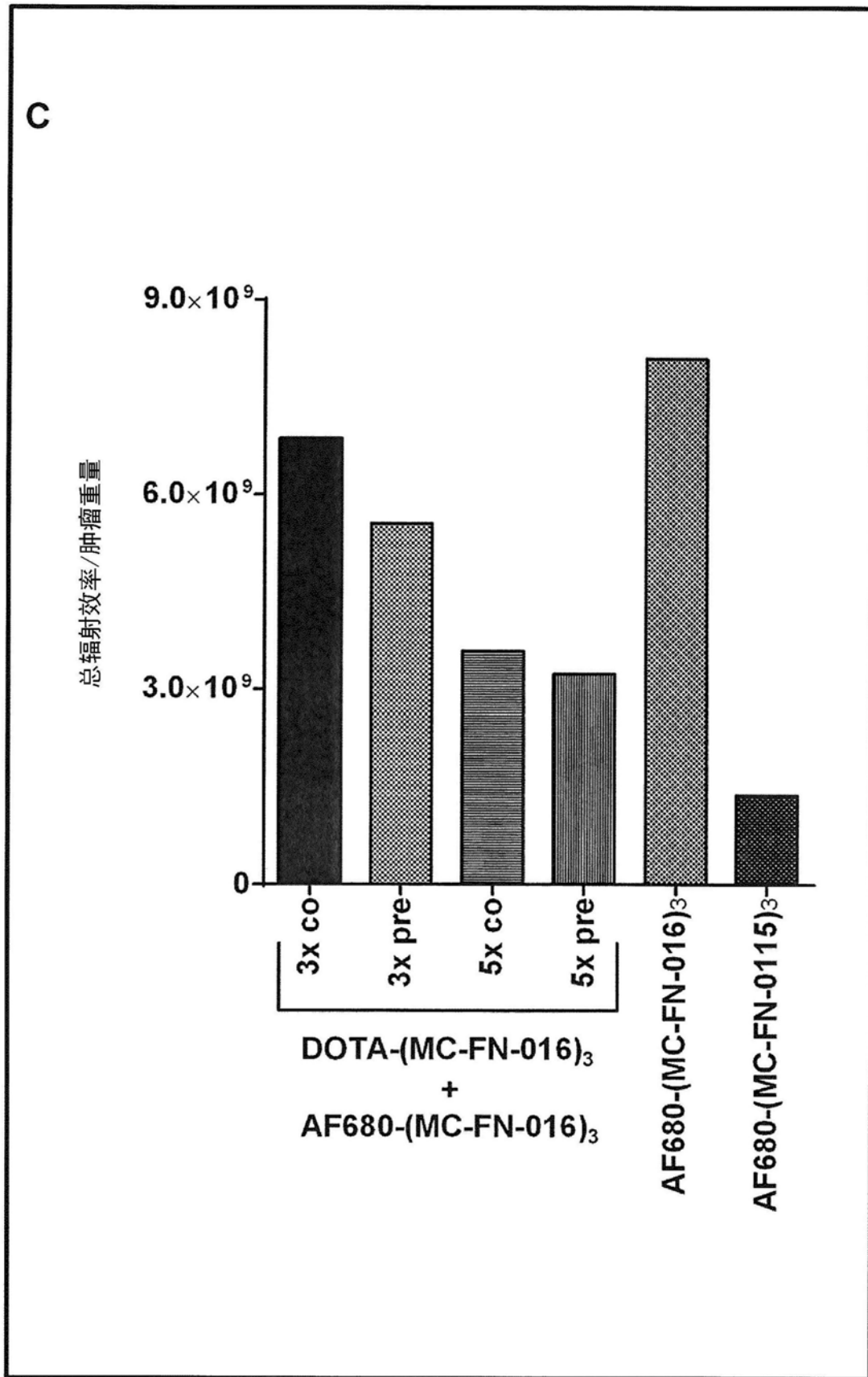


图14

名称	应用的浓度范围 (nM)	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (nM)
DOTA-(MC-FN-016) ₃	1.25-10	3.73x10 ⁶	2.26x10 ⁻³	0.624

图15