

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 7/64
A61K 38/08

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98806979.2

[43]公开日 2000年8月9日

[11]公开号 CN 1262688A

[22]申请日 1998.7.9 [21]申请号 98806979.2
 [30]优先权
 [32]1997.7.11 [33]US [31]08/893,526
 [86]国际申请 PCT/FI98/00579 1998.7.9
 [87]国际公布 WO99/02551 英 1999.1.21
 [85]进入国家阶段日期 2000.1.7
 [71]申请人 拜奥泰治疗有限公司
 地址 芬兰图尔库
 [72]发明人 J·海诺 J·伊瓦斯卡 J·凯派莱

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 代理人 卢新华 杨丽琴

权利要求书 2 页 说明书 32 页 附图页数 10 页

[54]发明名称 整合蛋白结合肽及其应用

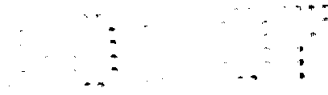
[57]摘要

本发明提供了包括 3 个共线性氨基酸,精氨酸—赖氨酸—赖氨酸(RKK)的环肽用于与整合蛋白 $\alpha 2$ I 域结合,该肽是整合蛋白 $\alpha 2$ I 区与胶原 I 和 IV 和层粘连蛋白-1 相互作用的有效抑制剂。本发明还提供使用这些肽阻断整合蛋白功能并抑制细胞迁移的方法。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种环状整合蛋白结合肽，它包括氨基酸序列 RKK。
2. 根据权利要求 1 的肽，包括氨基酸序列 RKKH (SEQ ID NO. 8)。
3. 一种环肽，包括氨基酸序列 $X_1RKKHX_2X_n$ 。其中 X 为任意氨基酸，
5 n=1-4。
4. 一种环肽整合蛋白结合肽，它包括氨基酸序列 CTRKKHDNC (SEQ ID NO. 4)。
5. 一种环肽整合蛋白结合肽，它包括氨基酸序列 CTRKKHDNAQC (SEQ ID NO. 5)。
- 10 6. 一种药物组合物，它包括根据权利要求 1-5 任一项的整合蛋白结合肽。
7. 根据权利要求 6 的药物组合物，其中组合物适合于局部给药。
8. 一种抑制包含 $\alpha 2I$ 区的整合蛋白与识别所述 $\alpha 2I$ 区的分子结合的方法，所述方法包括将所述整合蛋白暴露于根据权利要求 1-5 任一
15 项的所述整合蛋白结合肽中。
9. 一种抑制病人中整合蛋白依赖性细胞迁移的方法，所述方法包括对所述病人提供有效量的权利要求 1-5 任一项的所述整合蛋白结合肽。
10. 权利要求 8 的方法，其中所述细胞迁移与癌症、心血管病或所述患者的齿根骨膜炎有关。
- 20 11. 一种在需此治疗的患者中抑制胶原上细胞迁移的方法，所述方法包括对所述病人给药有效量的权利要求 1-5 任一项所述的肽。
12. 一种抑制患者血小板对胶原粘附或胶原诱导的血小板聚集的方法，所述方法包括对所述病人提供有效量的权利要求 1-5 任一项所述整合
25 蛋白结合肽。
13. 权利要求 13 的方法，其中所述粘附或聚集与所述病人的心血管疾病有关。
14. 一种鉴定整合蛋白结合试剂的结合分析法，所述方法包括：
 - i) 将待分析的整合蛋白结合试剂进行生物素标记；
 - 30 ii) 在适宜于结合的条件下，将所述生物素标记的试剂与固定化的重组 $\alpha 2I$ 区或区衍生肽反应；
 - iii) 冲洗携带结合试剂的固相支持物；



- iv) 加入标记的生物素结合试剂, 和
- v) 检测任何结合的整合蛋白结合试剂。

15. 一种鉴定整合蛋白结合试剂的结合分析法, 所述方法包括:

i) 铺标记的 $\alpha 2I$ 区

5 ii) 在适宜于结合的条件下, 将待分析的整合蛋白结合试剂与铺
标记的 $\alpha 2I$ 区混合; 并

iii) 检测任何结合的整合蛋白结合试剂。

说明书

整合蛋白结合肽及其应用

发明领域

5 本发明属蛋白治疗领域，更具体地说，本发明涉及环肽及其应用，尤其这些肽阻断或抑制整合蛋白生物活性的应用。

发明背景

10 整合蛋白为异二聚细胞表面糖蛋白，其由非共价连接的 α 和 β 亚基组成。已识别出 16 个 α 亚基，8 个 β 亚基。发现了这些亚基约 20 多种不同组合。

整合蛋白通过调节细胞-基质和细胞-细胞相互作用锚定细胞于周围环境中(综述见 Hemler, M. E. 免疫学年述 8:365-400(1990); 和 Hynes, R. O. 细胞 69: 11-25 (1992) 和本文所引用的)。整合蛋白对细胞外基质蛋白的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列的识别是细胞-基质相互作用的基
15 本现象。纤粘连蛋白是含 RGD 蛋白的原型。此外，哺乳动物，鸟，蛙，和昆虫中的大量其它基质分子通过其 RGD 序列调节细胞粘附。包含 $\beta 1$ ， $\beta 3$ ， $\beta 5$ ，或 $\beta 6$ 亚基的整合蛋白异二聚体可形成 RGD-依赖性受体(Ruoslatchi, E., 临床研究杂志 87:1-5(1991); Busk, M. 等, 生物化学杂志. 267:7875-7881(1992); 和 Elices, M. J. 等细胞生物学杂志. 112:169-181(1991))。在 $\beta 1$ 亚基中，RGD-结合位点被作图于分子的氨基末端部分，有一些证据表明 α 亚基可能影响此相互作用(Shih, D. T. 等. 细胞生物学杂志. 122: 1361-1371 (1993))。综上所述，10 个整合蛋白异二聚体具有共同的 $\beta 1$ 亚基，因此还具有推测的 RGD-结合位点。然而，多数 $\beta 1$ 整合蛋白具有其它配体结合的机制。变性纤维胶原
25 被 RGD-依赖性整合蛋白，如 $\alpha 5 \beta 1$ 识别，而天然胶原与整合蛋白以非 RGD-依赖性方式相互作用(Gullberg, D. 等. 欧洲分子生物学杂志. 11:3865-3873(1992))。

两个整合蛋白， $\alpha 1 \beta 1$ 和 $\alpha 2 \beta 1$ 杂二聚体，为天然胶原的主要细胞受体，如同所有整合蛋白，其与配体的相互作用依赖于二价阳离子
30 (Staatz, W. D. 等, 生物化学杂志. 266:7363-7387(1991))。整合蛋白 $\alpha 2 \beta 1$ 例如在上皮细胞，血小板，肉芽组织细胞，和多种癌细胞中表达。其中 $\alpha 2 \beta 1$ 整合蛋白活性(功能)是基本的生物学现象包括胶原诱导的

血小板集合, 细胞在胶原上迁移, 胶原纤维的细胞依赖性重组。癌症生物学中, $\alpha 2\beta 1$ 整合蛋白与侵袭性细胞表型有关, 它可为侵袭性黑素瘤的标记。另一方面, $\alpha 2\beta 1$ 在乳腺癌细胞过表达恢复正常细胞表型。如其他整合蛋白, $\alpha 2\beta 1$ 还能产生调节细胞功能和基因表达的信号。尤其是胶原酶-1 的 mRNA 水平似乎受 $\alpha 2\beta 1$ 整合蛋白控制。

$\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 亚基在其结构上与所有其它 $\beta 1$ 关联的 α 亚基不同, 它们含有特殊“插入”区, I 区, 该区类似例如在 Willenbrand 因子中发现的 A 区 (Michishita, M. 等, 细胞 72:857-867(1993))。显然, $\alpha 1I$ 和 $\alpha 2I$ 区负责胶原被相应整合蛋白的初步识别 (Kamata, T 等, 生物化学杂志 .269:9659-9663(1994); Kamata, T. 等, 生物化学杂志 269:26006-26101(1994); Kern, A. 等., 生物化学杂志 .269:22811-22816(1994))。 $\alpha 2\beta 1$ 整合蛋白的其它两个配体, 即层粘连蛋白-1 和艾可病毒-1, 也均与 $\alpha 2I$ -区结合。但是, 艾可病毒-1 看来识别不同于基质蛋白的 $\alpha 2I$ -区上的不同位点 (Bergelson, J.M. 等, 临床研究杂志. 92:232-239(1993))。

胶原中 $\alpha 1\beta 1$ 和 $\alpha 2\beta 1$ 整合蛋白的结合位点被定位于分子的三螺旋区 (Eble, J.A. 等, 欧洲分子生物学杂志. 12:4795-4802(1993); Gulberg, D. 等 11:3865-3873(1992))。有报道称来自胶原 α 链的一条肽序列阻断整合蛋白-胶原相互作用, 但在许多研究中它是无效, 它可能不代表胶原的实际结合位点 (Cardarelli, P.M. 等, 生物化学杂志. 267:23159-23164(1992); Pfaff, M. 等, Exp. Cell Res. 实验细胞研究 .206:167-176(1993); 和 Tuckwell, D. 等, 细胞科学杂志. 108:1629-1637(1995))。更可能是胶原-受体整合蛋白识别来自超过一条胶原 α 链的氨基酸残基。在 IV 型胶原- $\alpha 1\beta 1$ 整合蛋白相互作用中, 表明了均来自胶原的不同 α 链的一个精氨酸和两个天冬氨酸残基的重要性 (Eble, J.A. 等., 欧洲分子生物学杂志. 12:4795-4802(1993))。

已知的 $\alpha 2\beta 1$ 整合蛋白的基质分子配体不包含 RKK (H) 序列。富含精氨酸, 来自人免疫缺陷病毒 Tat 蛋白的线性肽包括一个 RKK 序列, 表现出与 $\alpha V\beta 5$ 整合蛋白相互作用 (Vogel, B.E. 等, 细胞生物学杂志 121: 461-468 (1993))。但是发现整合蛋白-肽相互作用在 EDTA 存在下稳定, 暗示了独特的结合机制。以前还描述了在包含 RKK 序列基元的纤连蛋白中的肝素硫酸盐结合序列, 然而该序列显然在整合蛋白 $\alpha 2I$ 区

结合方面不起作用。(Drake 等, 生物化学杂志 268: 15829-15867 (1993))。

来自几种蛇的毒液包含脱整合蛋白样蛋白, 它阻断血小板整合蛋白功能并负责毒液的抗凝作用。这些蛋白有助于对整合蛋白的功能分子机制的理解, 并还在新药开发中具有潜在的价值。许多脱整合蛋白具有 RGD 序列, 并且它们抑制血小板 $\alpha IIb\beta 3$ 和 $\alpha V\beta 3$ 整合蛋白的功能。在 jararhagin 中, 来自凹蝰蛇中具穹蝰蛇属巴西具穹蝰蛇 (Bothrops jararaca) 的脱整合蛋白/金属蛋白酶, 序列 ECD 置换了 RGD (Paine, M. J. 等., 生物化学杂志. 267:22869-22876(1992))。Jararhagin 是胶原诱导的血小板聚集的有效抑制剂, 其作用是基于对 $\alpha 2\beta 1$ 整合蛋白功能的抑制 (De Luca, M. 等, 生物化学生物物理学研究通讯 206:570-576 (1995))。其作用的确切机制不详。整合蛋白 $\alpha 2\beta 1$ 也与 jaracetin 相互作用, 其中 jaracetin 为一种含 jararhagin 的脱整合蛋白区的蛇毒蛋白, 但相互作用看来比与和 jararhagin 的相互作用弱 (De Luca, M. 等, 生物化学生物物理学研究通讯 206:570-576(1993))。

发明概述

本发明提供与人 $\alpha 2I$ 区 (天然和重组的) 结合的环肽。而且, 它们是人整合蛋白与胶原 I 和 IV 和层粘连蛋白-1 相互作用的有效抑制剂。

本发明的环肽最初来自 jararhagin 的金属蛋白酶区。本发明的每个新的整合蛋白结合蛋白包含一个三个氨基酸, 精氨酸-赖氨酸-赖氨酸 (RKK) 的共线性序列。环肽中 RKK 序列的存在给予了整合蛋白结合活性。

本发明进一步提供在肽序列中包含 RKK 序列基元的一或多个拷贝的环肽, 这些拷贝足以使肽具有减少整合蛋白与胶原相互作用的能力。

本发明进一步提供包含氨基酸序列 $X_1RKKX_2X_3X_4X_5X_6$ (SEQ ID NO. 1) 的环肽, 其中氨基酸 $X_1 - X_6$ 可为任意氨基酸, 但优选 X_2 为组氨酸 (H)。

本发明进一步提供环肽, 该环肽优选包含氨基酸序列 $X_1RKKX_2X_3X_4X_5$ (SEQ ID NO. 2), 其中氨基酸 $X_1 - X_5$ 为任意氨基酸, 但优选 X_2 为组氨酸 (H)。

本发明进一步提供环肽, 该环肽较优选包含氨基酸序列 $X_1RKKX_2X_3X_4$ 的 (SEQ ID NO. 3), 其中氨基酸 $X_1 - X_4$ 为任意氨基酸, 但优选 X_2 为组氨酸。

本发明进一步提供分别包含 jararhagin 的金属蛋白酶区的氨基酸 241-247 (CTRKKHD; SEQ ID NO. 6) 和 241-249 (CTRKKHDNA; SEQ ID NO. 7) 的两个环肽, CTRKKHDNC (SEQ ID NO. 4) 和 CTRKKHDNAQC (SEQ ID NO. 5), 和这些肽的缺失一或多个氨基酸的环状片断, 尤其是缺失选自 C, T, H, D, N, A 和/或 Q 的一或多个氨基酸。

本发明进一步提供使用这些肽阻断整合蛋白功能的方法, 以及治疗患有生理疾症或疾病需要此阻断活性患者的方法。

根据本发明的环状整合蛋白结合肽也可用于从样品混合物中分离包含 $\alpha 2$ 的整合蛋白。

附图简要说明

图 1 (A-D). 固相分析中钬标记的 $r\alpha 2I$ 与不同底物的结合。微量滴定板孔中预敷 I 型胶原, IV 型胶原, 层粘连蛋白-1 和纤连蛋白。让 $r\alpha 2I$ 接触 3 小时 (A)。在 EDTA (B) 或 $MgCl_2$ 以及不同浓度的巴西具穹蝮蛇毒液 (C) 存在下, 让 $r\alpha 2I$ 与 I 型胶原接触。另外也可将孔用巴西具穹蝮蛇毒液预敷, 在 $MgCl_2$ (D) 存在下, 让 $r\alpha 2I$ 接触 3 小时。

图 2 (A-B). 固相分析中钬标记的 $r\alpha 2I$ 与粘附蛋白和 jararhagin-衍生肽的结合。微量滴定板孔中预敷不同的肽, I 型胶原, IV 型胶原和纤连蛋白。数据代表来自显示 $r\alpha 2I$ 结合至不同底物 (A) 的三个平行试验的平均值。微量滴定板孔用 BSA 和 I 型胶原预敷, 并在肽存在下 (B), 让 $r\alpha 2I$ 接触 3 小时。

图 3 在 229ox 肽存在下, $r\alpha 2I$ 与肽和巴西具穹蝮蛇毒液的接触。将微量滴定板孔用肽或巴西具穹蝮蛇毒液预敷。在 229ox 存在或缺失时让 $r\alpha 2I$ 结合。数据代表来自三个平行试验的平均值。

图 4 (A-C). 229ox 肽的特性。在环状或线性 229 肽存在下 (A), 对 $r\alpha 2I$ 与 I 型胶原结合的抑制的剂量应答曲线。另外也可将微量滴定板孔用 229ox 肽 (B) 预敷。将 229ox 肽加入各种预敷底物的 $r\alpha 2I$ 结合分析。

图 5. 229ox 对 $r\alpha 2I$ 与 I 型胶原和艾克病毒-1 的结合的作用。将微量滴定板孔用 I 型胶原和艾克病毒-1 预敷, 在肽存在或缺失时, 让 $r\alpha 2I$ 结合。数据代表来自三个平行试验的平均值。

图 6. (A-B). 丙氨酸取代的 229ox 肽对 $r\alpha 2I$ 与 I 型胶原结合的抑制。将肽预敷于微量滴定板孔中, 让 $r\alpha 2I$ 结合 (A)。另外将微量滴定

板孔用 I 型胶原预敷，在该肽存在时加入 $r\alpha 2I$ (B)。

图 7. (A-C). 将 $\alpha 2I$ 区肽 (A) 和 $r\alpha 2I$ (A, B) 结合至固相中并加入生物素标记的 229ox. 229ox 肽与 $\alpha 2I$ 区衍生肽的结合示于 (A). Mg^{++} 对 229ox 与固相结合的结合的重要性示于 (B). Mg^{++} 对 229ox 与固相结合的 I 型胶原的结合的重要性示于 (C).

图 8. 对重组 $\alpha 2I$ 与胶原的结合的抑制。实心圆示 229ox (CTRKKHDNAQC; SEQ ID No. 5) 所述浓度的作用。空心圆示 248ox (CTRKKHDNC; SEQ ID No. 4) 的作用。

图 9 (A-B). HOS-MNNG 细胞在 I 型胶原的迁移。让细胞与底物接触。4 天后将细胞染色，图像分析器 (A) 确定细胞覆盖的表面区和对孔进行拍照 (B)。

图 10 . HaCaT 和 UT-SCC-2 细胞在 229ox 和抗 $\alpha 2$ 整合蛋白的 Gi9 抗体存在下的细胞粘附。

优选实施方案的详述

以下所述中，广泛使用许多医学和蛋白领域所用的术语。为对说明书和权力要求书提供清晰一致的理解，包括这些术语所赋范围，提供以下的定义。

“患者”指需要兽医或医学治疗的，尤其是需要用本发明的组合物治疗的动物或人个体。

“治疗”或“医治”指为了可能包括预防，改善，防止或治疗病症或对该药剂敏感的潜在病症的目的，给药包括本文所述的一或多种肽的有效量的组合物至需要的患者。

“给药”指运用任何适当方法，对患者给药期望的物质。有益的给药方法包括，但不仅限于，肠胃外的（例如，静脉内），肌肉内，皮下，离子渗透，口服，直肠和肠内给药。

“有效量”指足以达到所述期望结果的量。本发明的肽的有效量是足以减少或阻止或预防包含 $\alpha 2I$ 区的整合蛋白与一或多个靶的功能性相互作用程度的量，其中靶在不存在本发明的肽时与整合蛋白相互作用。

“药用盐”指由药物可接受的酸或碱形成的盐，如，但不仅限于，酸如硫酸，盐酸，硝酸，磷酸等，或碱如碱或碱土金属氢氧化物，氢氧化铵，烷基氢氧化铵，等。

术语“药用赋形剂”指包括溶剂，载体，稀释液等，它们被用作本

发明制剂的添加物以提供用于给药这些化合物的载体或佐剂。

当使用人整合蛋白时，常提出以下讨论和例证，本发明的肽和方法可用于任何对 jararhagin 是毒液的活性成分的蛇咬敏感的种类，因该活性是本发明的肽与此种类的靶整合蛋白结合能力的证据。因此，在这方
5 面发明不限于以下使用人实施方案的讨论和例证。

整合蛋白对胶原的识别类似于整合蛋白-纤连蛋白的结合。不仅胶原-结合 α I 区和 RGD-结合推测的 β I 区具有结构类似性，而且环状 RGD 肽也能与 $\alpha 2\beta 1$ 整合蛋白结合。被认为对整合蛋白与胶原结合非常重要的三个胶原氨基酸残基包括两个天冬氨酸和一个精氨酸。

10 发明者推测 jararhagin 中阻止 $r\alpha 2I$ 区与胶原结合的基元一定包括天冬氨酸或精氨酸残基，且此作用的关键基元在亲水环中，因为在基质分子或蛇毒液脱整合蛋白中的已知的整合蛋白识别位点处于亲水环中。发明者对满足这些标准的 jararhagin 结构中的以往未知序列进行了检索，并制备合成肽以用于使用整合蛋白 $r\alpha 2I$ 区的固相结合分析中
15 的检测。

发现一种衍生自金属蛋白酶区 CTRKKHDNAQC (SEQ ID No. 5) 的肽与 $r\alpha 2I$ 区强结合，该其中肽为，包含 jararhagin 的金属蛋白酶区氨基酸 241-249 (任一末端的末端半胱氨酸被加至天然序列)。以下事实表明高结合亲和性，即当铀标记的 $r\alpha 2I$ (重组 $\alpha 2I$) 粘附至该肽时，在
20 随后 2 小时中未测得解吸作用，即使分析中加入过量 10 倍的未标记 $r\alpha 2I$ 区。

所测肽中，这种肽也是唯一抑制 $r\alpha 2I$ 区与 I 型和 IV 型胶原和层粘连蛋白的肽。进一步，此肽与巴西具窍蝮蛇毒液竞争结合 $r\alpha 2I$ 区。因此，发明者得出结论：对应于以上氨基酸 241-249 的氨基酸序列的存在
25 是为什么 jararhagin 与 $\alpha 2\beta 1$ 整合蛋白相互作用的原因。

对肽序列的突变分析揭示了一个新整合蛋白结合基元，RKK 或 RKKH (SEQ ID No. 8)。组氨酸，RKKH 序列中的第四氨基酸，也可能对整个功能至关重要。出乎意料地，肽序列中的天冬氨酸的突变不产生作用。已知的 $\alpha 2\beta 1$ 整合蛋白的基质分子配体不包含 RKK (H) 序列。

30 以上发现的新 $r\alpha 2I$ 区结合基元，或包含它的肽可防止基质蛋白识别。除此解释外，该作用被认为是通过与 I 区配体结合位点直接相互作用或在 I 区构像造成变异从而掩盖配体识别位点而发生。此肽-依赖性

$r\alpha 2I$ 区构象的改变在实验中很明显，说明伴随对胶原结合的阻断，该肽诱导 $r\alpha 2I$ 区对艾可病毒-1 的附着。这也说明占据配体识别位点可调节其它位点的亲和性。

因此，本发明的每个新的整合蛋白结合蛋白包括一个三个氨基酸的共线性序列，精氨酸-赖氨酸-赖氨酸 (RKK)，当肽为环状时，赋予肽整合蛋白结合活性。RKK 序列基元的一个，两个，三个或多个拷贝可存在于肽序列中，这些拷贝足为肽提供减少整合蛋白与胶原相互作用的能力。

第一个实施方案中，本发明的肽是包含氨基酸序列 $X_1RKKX_2X_3X_4X_5X_6$ (SEQ ID NO. 1) 的环肽，其中每个 X 为一个氨基酸，氨基酸 $X_1 - X_6$ 为任意氨基酸 (尤其 A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y 或 V) 但优选 X_2 为组氨酸 (H)。

在进一步的实施方案中，本发明的肽是包含氨基酸序列 $X_1RKKX_2X_3X_4X_5$ (SEQ ID NO. 2) 的环肽，其中氨基酸 $X_1 - X_5$ 如上为任意氨基酸，但优选 X_2 为组氨酸 (H)。

在进一步的实施方案中，本发明的肽是包含氨基酸序列 $X_1RKKX_2X_3X_4$ (SEQ ID NO. 3) 的环肽，其中氨基酸 $X_1 - X_4$ 如上为任意氨基酸，但优选 X_2 为组氨酸 (H)。

在高度优选的实施方案中，本发明的肽是具氨基酸序列 CTRKKHDNC (SEQ ID NO. 4) 的环肽或具氨基酸序列 CTRKKHDNAQC (SEQ ID NO. 5) 的环肽，并优选两个末端半胱氨酸残基参与使肽成环状结构的二硫键形成中。

本发明的环肽可缺失上述的一至多个氨基酸 X，尤其一或多个 C, T, H, D, N, A 或 Q。进一步的，本发明的环肽可包含插入至上述序列和/或位于上述序列旁侧的其它氨基酸，只要 RKK 基元保持共线性，使得这些肽保持与 $\alpha 2$ 整合蛋白结合的能力。

末端半胱氨酸残基仅需以导致肽环化的方式定位。优选的，半胱氨酸被置于肽的末端，以致二硫键的形成导致适当大小的环，从而赋予肽的环状形式以生物学活性。但是，一或两个半胱氨酸残基可能在肽内部，而非末端，任何延伸超过半胱氨酸的“尾”可能不产生问题，只要它不导致丧失剩余肽的环状形式。从此看来，只要肽的环状形式不被阻碍，其为允许它为保持生物活性的构象时，则不同的部分，例如蛋白如白蛋



白，可用作连接器，间隔区，或与环状肽的末端相接，从而使本发明的环状肽连接于上固体载体，或其它所需部分，例如，可检测标记。

当半胱氨酸位于肽的末端，肽优选在半胱氨酸之间包括 9 个氨基酸。8 个氨基酸不增强活性，并因此也可用于这方面。在末端半胱氨酸之间有 7 个氨基酸的环肽比有 7 或 8 个氨基酸的那些有效约 20 倍，因此尤其是优选的。总的看来，在末端半胱氨酸之间包含 10 个或更多氨基酸的肽具有作用更像（无功能的）线性分子而非环状分子的危险。在末端半胱氨酸之间包含 5 或更少氨基酸的环肽如果不是不可能的，也极难制备。因此，在末端半胱氨酸之间包含 7 个氨基酸的环肽为最优选的实施方案。

本发明的肽序列包括上述肽的变体，这些变体具有不重要差异的氨基酸取代，例，一个碱性氨基酸取代另一个（除在 RKK 基元中），一个疏水残基取代另一个，一个中性残基取代另一个，一个酸性残基取代另一个，一个芳香残基取代另一个。

在优选的实施方案中，肽的环状形式由二硫键产生。但是，任何导致肽的环状形式的共价键都被认为有用，因桥的功能仅使肽处于适当的构象。

如本领域所知，使用适当的氨基或羧基保护基团，氨基酸残基可为保护的或非保护形式。可用的药物可接受的阳离子包括碱或碱土金属阳离子（例，Na, K, Li, $1/2\text{Ca}$, $1/2\text{Ba}$, 等）或氨基阳离子（例四烷基铵，三烷基铵，其中每个烷基集团可为 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ ，但优选 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 支链或直链烷基集团）。也可制备药物可接受的低级烷基酯，药物可接受的氯化物和药物可接受的酸加成盐。

可使用本领域熟知的方法，例如在此收入参考文献的 U.S. 5, 627, 263, 中所述的合成并环化本发明的肽。

根据本发明的环状整合蛋白结合肽可用作整合蛋白功能，尤其人整合蛋白功能的阻断剂（抑制剂）。整合蛋白与其天然配体的结合在本发明的肽存在时被抑制或阻断。尤其，环状整合蛋白结合肽可用于阻断整合蛋白 $\alpha 2\text{I}$ 区与和该区相互作用的大分子的相互作用，例如，与胶原如胶原 I 和胶原 IV 和层粘连蛋白的相互作用。

人重组 $\alpha 2\text{I}$ 区的序列提供在 Takada, Y. 和 M. E. Hemler, 细胞生物学杂志. 109: 397-407 (1989) (在此收入参考文献)。 $\alpha 2\text{I}$ 区可用普

通重组宿主，例如，大肠杆菌来制备。其特性可用基于铕标记的 $\alpha 2I$ 区的敏感固相分析和时间分辨荧光测定来表征。该分析使得能在无酶存在或无与之相连的其它大分子时直接测定 $\alpha 2I$ 区的结合。

5 本发明肽的 $\alpha 2$ 整合蛋白结合能力可通过任何检测该结合，尤其是检测该结合阻断整合蛋白与胶原 I 和胶原 IV 或层粘连蛋白 - 1 的相互作用的能力的分析法来确定。如下例证，运用铕标记的重组 $\alpha 2I$ 区结合分析（实施例 2）和检测 $\alpha 2I$ 区的病毒-1 识别位点的活化的分析可用于此方面（实施例 2）。

10 本发明的肽尤其可用于抑制或阻止体内或体外细胞在胶原的迁移。本发明的肽阻断细胞迁移的能力可用如实施例 7 所提供的细胞迁移分析来确定。因此，当该迁移以整合蛋白-依赖性方式介导时，本发明提供在体外和体内在需要治疗以抑制细胞迁移的患者中抑制细胞在胶原上迁移的方法。本发明因而提供治疗疾病，包括齿根骨膜炎的治疗方法，其中细胞迁移为部分致病机制。

15 本发明进一步提供抑制恶性细胞迁移，并因此用于治疗有此特征的疾病的方法，其中疾病例如为癌症，包括骨肉瘤和黑素瘤，尤其是其中 $\alpha 2\beta 1$ 整合蛋白依赖的细胞迁移可能导致恶性机制的疾病。

20 本发明进一步提供一种，抑制血小板对胶原的粘附和胶原诱导的血小板聚集的方法。本发明的肽抑制细胞粘附的能力可如实施例 8 提供的方法来确定。因此，本发明提供一种，治疗需预防或改善治疗疾病或病症的方法，其中疾病或病症如为心脏血管病，其特征在于需防止血小板对胶原的粘附和胶原诱导的血小板聚集，例如中风者或有中风危险的患者。

25 包含本发明的肽的药物制备可尤其包含为用于稳定和有效配制肽的药物可接受载体。合适的赋形剂和它们包括其它人蛋白的制剂，例如人血清白蛋白，描述在 Remington's 药物科学（18 版，A. R. Gennaro 编，Mack 出版，Easton, PA1990）。为了制备适用于对需要该组合物的病人给药有效量的本发明的肽的药物可接受的组合物，此组合物包含有效量的本发明的一或多种肽以及如所需的适量的载体赋形剂。

30 本发明的肽优选被纯化为基本上不含污染物。在细胞中或在体外系统如果基本上从合成时相关的非期望物质中纯化，而达到足以使其可用于所希望的目的的程度，则该物质被称为“基本上不含污染物”。

可用于本发明的方法的组合物可包含一种或多种本发明的肽。当组合物中有不止一种肽时，它可能是与另一肽相同氨基酸链的一部分，或在组合物中以单独的肽存在。用于静脉内，肌肉内或皮下给药的组合物优选给药剂量在约 1pg/kg 体重至 1mg/kg 体重范围内，尽管可给药更高或更低的剂量。所需剂量依赖于患者疾病的严重性，例如患者体重，性别，年龄，和医疗史等标准。剂量也依赖于它是否以兽医学方式给药至动物或是给药至病人。

对于肠胃外给药的目的，包含本发明的肽的组合物优选溶解在蒸馏水中，pH 优选调整到 6-8。如果肽为冻干的形式，可加乳糖至溶液中以易于冻干过程在为这种形式时将溶液灭菌，装入小瓶中，冻干。

肠胃外给药的本发明组合物的有效制剂还包括无菌水和非-水溶剂，悬浮液和乳状液。有用的非水溶剂的实例包括丙二醇，聚乙二醇，植物油，鱼油和可注射有机酯。含水载体的实例包括水，水-乙醇溶液，乳状液或悬浮液，包括盐和缓冲的医学肠胃外载体，包括氯化钠溶液，林格葡萄糖溶液，葡萄糖加氯化钠溶液，含乳糖的林格溶液，或不挥发性油。静脉内赋形剂的实例包括流体营养补充物，电解液补充物，如基于林格葡萄糖的那些等。

可注射制剂，如油质溶液剂，悬浮剂或乳状剂，可根据已知技术，按需要用合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂来配制。当活性化合物为水溶性形式时，如，为水溶性盐的形式，则无菌的可注射制剂可采用无毒的胃肠外可接受的稀释液或溶剂，例，无菌的非致热原水或 1, 3-丁二醇。可使用的其它可接受的载体和溶剂为 5%葡萄糖注射液，林格注射液和等渗的氯化钠注射液（如在 USP/NF 中所述）。当活性化合物以非水溶性形式存在，使用无菌的适当的油状悬浮液，该油状悬浮液包含合适的亲脂性溶剂或载体，如脂肪油，例如芝麻油，或合成脂肪油脂，例如油酸乙酯或甘油三酯。另外，也可采用水性注射悬浮液，其包含增加粘性的物质，例如羧甲基纤维素钠，山梨醇，和/或葡聚糖，并任选还可包含稳定剂。

为了离子电渗传递本发明的肽，肽优选 pH 为约 4.0 或更低，或约 7.0 或更高。离子等渗的方法广为人知，例如描述在被本文引作参考的在 U.S. 5, 637, 084 和 U.S. 4, 950, 229 中。

用于口服（但全身性的）的药物制剂可通过将活性化合物与固体赋



形剂混合而获得，如需要或必需，在加入合适的辅剂后任选研磨得到粒
状混合物并加工混合物或颗粒以制成糖衣锭核心的片剂。治疗齿根骨膜
炎的药物制剂可以保留在口腔中的组合物形式给药，优选将制剂直接放
入牙周腔，最优选为持续释放形式。也可将制剂刷在牙齿和/或牙龈上
5 以在所需部位释放肽。这些教导提供在被本文引作参考的 U. S. 5, 002,
769, U. S. 5, 023, 082, U. S. 5, 160, 737, U. S. 5, 330, 746, U. S. 5,
425, 953, U. S. 5, 438, 076 和 U. S. 5, 639, 795。制剂也可在膜上提
供。

合适的赋形剂尤其为填充物如糖，例乳糖或蔗糖，甘露醇或山梨糖
10 醇，纤维素制剂和/或磷酸钙，例三磷酸钙或磷酸氢钙，以及粘合剂，
如淀粉，糊，使用如玉米淀粉，小麦淀粉，米淀粉，或土豆淀粉，明胶，
黄芪胶，甲基纤维素，羟基丙基甲基纤维素，羧甲基钠纤维素，和/或
聚乙烯吡咯烷酮，和/或，如需要，分散剂，如上所述的淀粉，还有羧
甲基淀粉，交联聚乙烯吡咯烷酮，琼脂或藻酸或其盐，如藻酸钠。辅剂
15 总的为流动调节剂和润滑剂，例如二氧化硅，滑石粉，硬脂酸或其盐，
如硬脂酸镁，硬脂酸钙，如需要合适的外壳，此壳可抗胃液，以及为了
此目的，尤其是浓缩糖溶液，糖溶液可任选包含阿拉伯树胶，滑石粉，
聚乙烯吡咯烷酮，聚乙二醇和/或二氧化钛，紫胶漆溶液和合适的有机
溶剂或溶剂混合物。为了制备抗胃液的外壳，使用适宜的纤维素制剂溶
20 液，如乙酰纤维素邻苯二甲酸盐或羟基丙基甲基纤维素邻苯二甲酸盐。
例如为鉴定或为了表征活性化合物剂量的不同组合，可加染料或颜料至
片剂或糖衣丸外衣中。

口服给药的固体剂型包括胶囊剂，片剂，丸剂，片剂，锭剂干粉
剂和颗粒剂。在这些固体剂型中，可将活性化合物与至少一种惰性稀释
25 剂混合，如蔗糖，乳糖或淀粉。这些剂型在正常情况下还可包含药物辅
助物质，如，硬脂酸润滑剂。固体口服制剂也可用肠衣或其它调节活性
组份释放的外壳制备。

用于口服给药的液体剂型包括包含本领域普遍应用的惰性无毒稀释
剂，如水和酒精的药物可接受的乳剂，溶液剂，悬浮液剂，糖浆和剂。
30 这些组合物也可包含辅剂，如湿润剂，乳化剂，悬浮剂，增甜剂，增味
剂和香料剂。

本发明的组合物也可通过泵，或以持久释放的形式给药。本发明的

组合物也可以通过适当插入的导管高浓度传送到特定器官，或通过以被设计靶定特定器官的嵌合分子（或复合物）的一部分的形式来提供这些分子。在这点上，上面的肽可在较长肽的末端形成环状的“环”，这些肽具有拥有期待活性的第二区。这些融合蛋白可被设计来提供一段帮助杀伤细胞的区，此细胞含有与本发明的环肽结合的膜结合的整合蛋白。

当指定延长时间的重复注射以使患者享有最大限度的舒适时，持续释放形式的给药对患者更为方便，可通过使用聚合物以复合成吸附本发明的肽来制备控制释放制剂。通过选择适当的大分子（例如聚酯，多聚氨基酸，聚乙烯吡咯烷酮，乙烯乙烯基乙酸盐，甲基纤维素，鱼精蛋白锌羧甲基纤维素和鱼精蛋白硫酸盐）及掺入方法以控制释放来进行受控的递送。通过控制释放制剂的另一种可能的控制作用期的方法是掺入期待的肽到聚合物，如聚酯，多聚氨基酸，水凝胶，聚（乳酸）或乙烯乙烯基乙酸盐共聚物的颗粒中。另一方面，代替将肽掺入这些聚合物颗粒中，可将肽包裹到微粒中，其中该微粒通过，例如通过凝聚技术或界面聚合制备，例如分别为羧甲基纤维素或凝胶微囊素和聚（异丁烯酸甲酯）微胶囊，或包裹在胶质的药物传递系统中，例如在脂质体，白蛋白微球体，微滴乳状液，毫微颗粒，和毫微胶囊或在大分子乳浊液中。

本发明的肽的生物学半衰期可通过增加所需环境中环状形式的保留或稳定性而延长。尤其是提高环状形式的稳定性的试剂可望延长肽的生物学半衰期。在这点上，在肽结构中运用一或多个 D-氨基酸（尤其是取代原位点的相同 L-氨基酸），或使用一种或多种氨基酸类似物，如可在肽结构中插入青霉胺（3-巯基缬氨酸），为样 D-氨基酸或氨基酸类似物干扰被给药该组合物的动物或患者中的或所需的体外组合物中的环状结构代谢分解。

还设想了运用 D-氨基酸或氨基酸类似物增加本发明的肽与靶的结合，尤其与含 $\alpha 2I$ 区的整合蛋白的结合。

用于本发明组合物和方法的肽可以如下剂型使用，如片剂，胶囊剂，粉末包装剂，或口服给药的液体溶液剂，如果物质的生物学活性不被消化过程破坏，且化合物的特性容许穿过肠内组织吸收。

本发明的药学组合物可以本身已知的例如常规的混合，颗粒化，制造糖衣丸，溶解，冻干或类似过程生产。

本发明的肽还可用作提取与之结合的配体的亲和试剂，尤其是从混



合物中提取含 $\alpha 2I$ 区的整合蛋白。

现已充分描述了本发明，参考以说明方式提供的实例将更容易理解本发明，且除非特别说明本发明不限于实施例。

实施例

5 实施例 1

人重组整合蛋白 $\alpha 2I$ 区的产生

编码的 $\alpha 2I$ 区的 DNA 通过 PCR，使用人整合蛋白 $\alpha 2$ cDNA 为模板来制备。(整合蛋白 $\alpha 2$ cDNA 由 M.Hemler 博士赠送，DanaFarber，波士顿)。正向引物是 5' -CACAGGGATCCCCTGATTTTCAGCTC -3' (SEQ ID No. 9)，反向引物是 5' -GTGGCTGAATTCAACAGTACCTTCAATG-3' (SEQ ID No. 10)。设计引物以在产物中引入两个限制性位点：5'端的 BamHI-位点和 3'端的 EcoRI-位点。PCR 产物和 pGEX2T(Pharmacia)用 BamHI 和 EcoRI 消化，连接并转化至大肠杆菌 DH $\alpha 5F'$ 细胞接着测序。具 $\alpha 2I$ 区插入物的质粒 (pJK $\alpha 2I$)，转化至大肠杆菌 BL2I 以制备重组蛋白 r $\alpha 2I$ 。谷胱甘肽 S-转移酶-r $\alpha 2I$ 融合蛋白的制备和纯化如下进行：通常将 400ml LB (羧苄青霉素 50 μ g/ml) 用 40ml BL2I/ pJK $\alpha 2I$ 的过夜培养物接种，培养物 37 $^{\circ}$ C 生长 1 小时。加入诱导物 IPTG (终浓度 0.1mM) 4 小时。

人重组整合蛋白 $\alpha 2I$ 如下从大肠杆菌细胞中纯化。离心收获细胞，沉淀重悬在磷酸缓冲液中 (PBS, pH7.4)。悬浮液超声，离心，收获上清。沉淀在 PBS 中重悬，超声，并离心两次，收集上清。加入谷胱甘肽 Sepharose[®] (Pharmacia)，得到的溶解产物室温下孵育 30 分钟，轻柔搅动。溶解产物离心，移去上清部分，与融合蛋白结合的谷胱甘肽 Sepharose[®] 转移至合适的柱上。用 10 体积 PBS (140mM NaCl, 2.7mMKCl, 10mMNa₂HPO₄, 1.8mMKH₂PO₄, pH 7.3) 洗涤，谷胱甘肽洗脱缓冲液 (Pharmacia; 10mM 降低的谷胱甘肽的 50mM Tris-HCl 溶液, pH8.0) 洗脱融合蛋白室温下，用凝血酶蛋白酶 (Pharmacia; 10 单位) 裂解融合蛋白至少 2 小时，PBS 透析去除谷胱甘肽。裂解混合物第二次通过谷胱甘肽的 50mM Tris-HCl 中柱以去除谷胱甘肽 S-转移酶。

从流过液中收集 r $\alpha 2I$ 。必须用 5mM 二硫苏糖醇 (DTT) 处理重组蛋白以允许适当的折叠 (5mM DTT 的 PBS 溶液)，因为通过天然 PAGE 分析时，不经处理可见额外的带。重组蛋白经 SDS-PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳) 为至少 90% 的纯度，天然 PAGE 仅见一条带。

制备的重组 $\alpha 2I$ 区长223个氨基酸,在对应于整合蛋白序列124-339 (PDGQ-IEGTV) (SEQ ID No.11 和 SEQ ID No.12) 的氨基末端(GS)整合蛋白氨基酸中具有2个非整合蛋白氨基酸,在羧基末端具6个非整合蛋白氨基酸(EFIVTD; SEQ ID No.13)。

5 实施例2

铀标记的 $r\alpha 2I$ 的结合分析

巴西具窍蝮蛇凹蝰蛇毒液阻止重组整合蛋白 $\alpha 2I$ 区与I型胶原的结合

开发了基于使用铀标记的 $r\alpha 2I$ 的敏感的固相 $r\alpha 2I$ 配体结合分析。铀标记 $r\alpha 2I$ 如下进行:纯化 $r\alpha 2I$ 中加入1/20体积1MNaHCO₃(pH 8.5)以提高pH用于用异硫氰酸酯标记。铀标记的试剂(Wallac)以过量100倍的摩尔数加入,4℃孵育过夜。未结合的标记物通过葡聚糖凝胶G50/琼脂糖凝胶6B(Pharmacia)柱凝胶过滤去除,收集含标记蛋白的部分。

15 4℃下,通过将其各孔表面暴露于0.1ml PBS中12小时来覆盖96孔免疫板(Maxisorp, Nunc),其中PBS中包含5 μ g/cm²平板表面的I型胶原,(牛皮, Cellon), IV型胶原(Sigma), 层粘连蛋白-1(从Engelbreth-Holm-Swarm 鼠肿瘤基底膜纯化, Collaborative Research), 纤连蛋白(人血浆纤连蛋白, Boehringer Mannheim)或3.3
20 μ g/ml 艾可病毒-1或艾可病毒-7。另外,根据制造商的说明,将肽和巴西具窍蝮蛇毒液(Sigma)以各种浓度在96孔胺结合平板(Costar)中。

所有孔的残余蛋白吸收位点用含0.1%热灭活的牛血清白蛋白的PBS溶液在37℃封闭1小时。艾可病毒-1(Farouk 菌)和艾可病毒-7
25 (Wallace)从ATCC获得。纯化的病毒在含0.5mM MgCl₂的PBS稀释,-70℃冻存直至使用。向被覆盖的孔中加入在PBS中浓度为500ng/ml铀标记的 $r\alpha 2I$, 2mM MgCl₂, 1mg/ml BSA, 37℃孵育3小时。将孔用PBS, 2mM MgCl₂洗三次,将0.1ml Delfia增强溶液(Wallac)加入每孔,荧光计(Model 1232 Delfia, Wallac)测定铀信号。

30 当内源加入肽时,冻干的肽直接溶解至铀标记的 $r\alpha 2I$ 的PBS溶液中,随后加入2mM MgCl₂, 1mg/ml BSA并接着加入各孔中。当使用EDTA替代MgCl₂时,铀标记的 $r\alpha 2I$ 稀释在PBS, 2mM EDTA中,并以此缓冲



液进行随后的冲洗。发现结合分析十分敏感，使得有可能在实验中减少 $r\alpha 2I$ 区的用量。进一步的，铺的小体积说明此测量比用较大的标记分子更可靠。第三，发现此处所述的微量滴定孔分析可用于筛选大量的推测的整合蛋白 $r\alpha 2I$ 区阻断分子。

5 $r\alpha 2I$ 结合 I 型胶原，IV 型胶原和层粘连蛋白-1。但是，它并不显著地与纤连蛋白或白蛋白结合（图 1A）。 $r\alpha 2I$ 以 Mg^{++} 依赖方式结合 I 型胶原，添加 2mM EDTA 可完全解除结合（图 1B）。这与 $\alpha 2\beta 1$ 仅在二价阳离子存在下与胶原相互作用的事实相符合。 $r\alpha 2I$ 区与艾可病毒-1 的结合比其与基质分子的结合弱得多。

10 以往研究显示，巴西具窍蝮蛇毒液抑制血小板 $\alpha 2\beta 1$ 整合蛋白与胶原的相互作用（De Luca, M. 等，生物化学生物物理研究通讯. 206:570-576 (1995)）。但是，此抑制反应是否由于对 $\alpha 2I$ 区功能的阻抑仍然不详。而且，参与相互作用的抗原决定簇仍然未知。

巴西具窍蝮蛇毒液对 $r\alpha 2I$ 区与 I 型胶原结合的作用通过上述的固
15 相配体结合分析研究。让铺标记的 $r\alpha 2I$ 区在 2mM Mg^{++} 存在时与胶原 I 底物接触，确定结合的 $r\alpha 2I$ 的量。毒液的作用在 $1\mu g/ml-1000\mu g/ml$ 浓度范围内检测。毒液有效并以浓度依赖方式抑制 $r\alpha 2I$ 区-胶原相互作用（图 1C）。为确定所见的抑制现象是否是由于 $r\alpha 2I$ 与蛇毒液直接作用，将微量滴定孔用毒液蛋白覆盖并检测 $r\alpha 2I$ 与此底物的结合。发
20 现 $r\alpha 2I$ 以浓度依赖性方式直接与毒液结合（图 1D）。根据已发表的文献，jarahagin 明显为巴西具窍蝮蛇毒液中抑制 $\alpha 2\beta 1$ 整合蛋白与胶原的结合的蛋白（De Luca, M. 等生物化学生物物理研究通讯. 206:570-576 (1995)），因此最可能是与 $r\alpha 2I$ 区结合的毒液组分。

实施例 3

25 运用生物素标记的 229ox 的肽和结合分析

短的环状 jahrahagin 衍生肽模拟具巴西具窍蝮蛇毒液对整合蛋白 $r\alpha 2I$ 区-胶原相互作用的作用

jarahagin 中 $\alpha 2I$ 区结合位点的的鉴定通过使用对应于蛋白区的一系列短环肽进行。检测区域根据以下选择：i) 基质蛋白和蛇毒液脱整合蛋白中整合蛋白结合基元被发现位于环状结构中。ii) 已知整合蛋白结合基元包括天冬氨酸残基。iii) 已发表的整合蛋白-胶原相互作用模型在天冬氨酸残基之外还强调精氨酸残基的作用，
30



Jarahagin-衍生肽根据 jarahagin 氨基酸序列的二级结构设计。使用来自遗传电脑创建组 (GCG) 软件包 (Madison, WI) 的肽结构程序预测二级结构。根据 Emini 方法 (Emini, E.A. 等., 病毒学杂志. 55:836-839(1985)) 的表面可能性和根据 Kyte-Doolittle 方法 (Kyte, J. 等., 分子生物学杂志. 157:105-132(1982)) 的亲水性被予以考虑。

在自动肽合成仪 (应用生物系统 431A) 中, 用 9-芴基甲氧羰基 (Fmoc) 化学合成该肽。用于丙氨酸取代系列的肽从 Research Genetics (Huntsville, AL) 公司购买。合成后肽被氧化形成二硫键。肽以 1mg/ml 浓度溶解在 0.1M 碳酸铵缓冲液中, 4℃ 孵育 16-24 小时。反向高效液相色谱检测氧化, 并将氧化肽冻干。

所有肽在 PBS 中以 10mg/ml 完全溶解。因使用浓度最高为 1mg/ml, 避免了由于不溶性肽的非特异性作用。不同肽的等电点 (PI) 也使用来自遗传电脑创建组 (GCG) 软件包 (Madison, WI) 的等电程序从一级序列确定。肽 225ox (表 1) 被发现具有与 229ox (表 1) 相似的等电点, 因此在一些实验中被选作对照肽。

229ox 的生物素标记如下进行: 冻干的 229ox 肽溶解在 PBS 中, 加入 1/5 体积的 0.1M NaHCO₃, 0.5 M NaCl (pH 8.0) 以提高用于生物素标记的 pH。硫代-NHS-生物素 (Calbiochem) 按 1: 2 (w/w) 229ox: 生物素加入, 室温下孵育 2 小时。加入 1/10 体积 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0) 结束生物素标记反应。

对于使用生物素标记的 229ox 肽进行的结合分析, 根据制造商的说明在 96 孔胺结合平板 (Costar) 中覆盖不同浓度 α 2I 区或 α 2I 区衍生肽。37℃ 下, 所有孔内的残余蛋白吸收位点用含 0.1% 热灭活的牛血清白蛋白的 PBS 溶液封闭 1 小时。向覆盖的孔中加入 100 μ M 生物素标记的 229ox 的 PBS 溶液, 2mM MgCl₂, 1mg/ml BSA, 37℃ 孵育 3 小时。将各孔用 PBS 洗 3 次, 室温下, 加入 2mM MgCl₂ 和浓度为 500 μ g/ml 的钨标记链霉抗生物素蛋白 (Wallac) 的 PBS 溶液, 2mM MgCl₂, 1mg/ml BSA 30 分钟。再洗孔 3 次。每孔中加入 0.1ml Delfia 增强溶液 (Wallac), 荧光计测钨信号 (Model 1232 Delfia, Wallac)。当用 EDTA 替代 MgCl₂ 时, 将钨标记 α 2I 稀释在 PBS, 2mM EDTA 中, 随后以此缓冲液冲洗。

合成对应于选择的序列的肽, 得到的肽总结于表 I。



为研究是否任何该种肽都能与 $\alpha 2I$ 区直接相互作用，加 jarahagin 肽以及环状 RGD 肽，I 型胶原，IV 型胶原和纤连蛋白被加至微量滴定孔中，并加入 $r\alpha 2I$ -Eu。结果显示一种 jararhagin 肽，即 229ox，有效地与 $r\alpha 2I$ 区结合而其它试验肽未显示效果（图 2 A）。

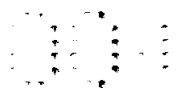
5 该肽随后被检测在浓度为 $500 \mu M$ 时其影响 $r\alpha 2I$ 与 I 型胶原结合的能力。又只有肽，229ox 具有显著作用：它几乎完全抑制 $r\alpha 2I$ 区与胶原的相互作用（图 2 B）。

表 1

10 研究中使用的合成肽的序列。显示基于 jararhagin (Paine, M. J.)¹ 等，生物化学杂志. 267:22869-22876(1992) 和 $\alpha 2I$ 区 (Takada, Y. 和 Hemler, M. E., 细胞生物学杂志. 109:397-407(1989)) 的级序列合成的肽的名称和位置。

15

Jararhagin 肽	氨基酸序列	残基号
192ox; SEQ ID No. 14	CWSNGDKITC*	212-219
195ox; SEQ ID No. 15	CEQQRYPYKC*	151-159
197ox; SEQ ID No. 16	CKLPDSEAHAC*	103-111
223ox; SEQ ID No. 17	CHYSPDGREIC*	46-54
225ox; SEQ ID No. 18	CPADV FHKNC*	441-449
229ox; SEQ ID No. 5	CTRKKHDNAQC*	241-249
231ox; SEQ ID No. 19	CYSNDDEHKGC*	537-545
I 区肽	氨基酸序列	残基号
P1; SEQ ID No. 20	VCDESNSIYC*	149-157
P2; SEQ ID No. 21	VCDESNSIYPWDAVKNC*	149-164



P3; SEQ ID No. 22	IYPWDAVKNFLEKQVQG	155-172
P4; SEQ ID No. 23	AVKNFLEKQVGLDIG	160-176
P5; SEQ ID No. 24	LDIGPTKTQVGLIQYA	173-188
P6; SEQ ID No. 25	QYANNPRVVFNLNTYKTKEE	186-205
P7; SEQ ID No. 26	LNTYKTKEEMIVAT	197-210
P8; SEQ ID No. 27	ATSQTSQYGGDLTNT	209-223
P9; SEQ ID No. 28	RKYAYSAASGGRRSAT	231-246
P10; SEQ ID No. 29	TDGESHDGSMKAVIQ	253-269
P11; SEQ ID No. 30	LDTKNLIKEKALASIPTR	291-310
P12; SEQ ID No. 31	SDEAALLEKAGTLGEQ	316-331

其它肽	氨基酸序列	参考文献
RGD	GACRGDCLGA*; SEQ ID No. 32	Koivunen, E. <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> 268:20205-20210 (1993)
RGE	GACRGECLGA*; SEQ ID No. 33	Koivunen, E. <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> 268:20205-20210 (1993)

* 环肽

5 为显示 229ox 肽的结合特性与具巴西具穹蝮蛇毒液的相互性, 检测 229ox 肽与蛇毒液竞争 $r\alpha 2I$ 结合位点的能力。结果显示 229ox 与具巴西具穹蝮蛇毒液都与 $r\alpha 2I$ 结合, 并且 229ox $r\alpha 2I$ 说明 229ox 代表 jararhagin 中实际的整合蛋白结合位点。因为抑制不完全(约 50%), 所以也可能巴西具穹蝮蛇毒液还包含 $\alpha 2I$ 区的其它结合位点。

10 在许多文献中, 已表明整合蛋白配体模仿合成肽的环状结构是高亲和性结合的关键。为检测这一点, 如前述在固相结合分析中使用氧化和线性的 p229 肽。环状 229ox 表现其抑制 $r\alpha 2I$ 与 I 型胶原的粘附的能力, 而此肽的线性形式作用甚微(图 4A)。 $r\alpha 2I$ 与固相结合的 229ox 的结合被发现为浓度依赖性的, 且在浓度为 $75 \mu\text{g/ml}$ 时观察到最显著的结合(图 4B)。除 I 型胶原外, $r\alpha 2I$ 区还和 IV 型胶原, 以及纤连蛋白结合。229ox 肽抑制 $r\alpha 2I$ 与这些配体的结合, 而等长同构象, 具有类似等电点值的对照肽 225ox 没有抑制作用(图 4C)。这表明 $\alpha 2I$ 区通

过相同机理与所有这些配体结合，且 229ox 通过直接与配体识别位点相互作用或改变 I 区的三维结构使之钝化来抑制结合。

实施例 4

jararhagin-衍生肽活化整合蛋白 $r\alpha 2I$ 区的艾可病毒-1 识别位点

5 除介导细胞对胶原和纤连蛋白-1 的粘附外，整合蛋白 $\alpha 2\beta 1$ 还具有病毒受体的功能，介导人病原体，艾可病毒-1 的细胞表面附着和感染。发现基质蛋白和艾可病毒-1 与整合蛋白以不同方式相互作用，艾可病毒-1 的结合位点也定位在 $\alpha 2$ 亚基的 I 区。如上所述， $r\alpha 2I$ 区显示弱的与包被的艾可病毒-1 的结合，但令人惊奇地，添加 229ox 肽结合增强约
10 10 倍，而对照肽 225ox 无作用（图 5）。此结果说明，229ox 肽与 $\alpha 2I$ 区的结合诱导蛋白的结构变化，从而提高 $r\alpha 2I$ 与艾可病毒-1 的亲
性。

这说明在 I 区存在一个可能的活性调节位点，其中 RKK 的结合可变
15 构地抑制与胶原的结合。RKK-诱导的 $r\alpha 2I$ 区构象的变化在我们的实验
中明显，其中 RKK 肽不仅阻断 $r\alpha 2I$ 区与胶原的粘附，还显著增加 $r\alpha 2I$
区对艾可病毒-1 的附着。除证实以往的论点外，艾可病毒-1，与胶原
识别 $\alpha 2I$ 区的不同位点，数据说明存在一个通过占有其它结合位点（RKK
结合位点）的重要的配体识别位点（艾可病毒-1 结合位点）的调节机制。
20 但是，已知的有关 $\alpha 2I$ 区结构-功能相互关系的信息不足以作结论：RKK
是否直接与胶原识别位点结合或是否它是 $\alpha 2I$ 区-胶原相互作用的变构
抑制剂。在两个种情况下，包含 RKK 的肽是用于揭示整合蛋白 I 区配体
识别功能的研究的十分有价值的工具。

实施例 5

三个氨基酸的序列，RKK，是与整合蛋白 $r\alpha 2I$ 区结合的关键

25 以往发表的有关在不同蛋白中整合蛋白识别位点的信息强调两个氨
基酸残基，即天冬氨酸和精氨酸的重要性。为揭示 229ox 肽中关键的氨
基酸残基，检测一系列新肽，其中 p229 中的氨基酸逐一被丙氨酸残基
取代。肽与固相结合，检测它们与 $r\alpha 2I$ 结合的能力。有趣的是，发现
三个氨基酸，精氨酸-赖氨酸-赖氨酸（RKK）为关键，并且邻近的组氨
30 酸也有一些作用。与此一致的， $r\alpha 2I$ 与 I 型胶原的结合被含丙氨酸取
代的 RKK 序列不良抑制，而天冬氨酸或精氨酸残基的取代则不损害该功
能（图 6A）。



为辨别 $\alpha 2I$ 区中229ox肽的可能结合位点，合成对应于 $\alpha 2I$ 区亲水区的一系列肽，并检测他们与生物素标记的229ox的结合能力。 $\alpha 2I$ 区肽和 $r\alpha 2I$ 与固相结合，加入生物素标记的229ox。229ox明显显示与 $r\alpha 2I$ 和肽P9结合，而在重复实验中不与其它蛋白结合（图7A）。
5 生物素标记的229ox和固相结合的 $r\alpha 2I$ 的相互作用依赖于二价阳离子（图7B），铕标记的 $r\alpha 2I$ 与固相结合的I型胶原和229ox肽的结合也是如此（图7C）。

实施例6

RKK肽的临界长度

10 为确定RKK肽的临界长度，制备如下一系列包括RKK序列和额外氨基酸的肽。检测CTRKKHDNAQC（229ox；SEQ ID No. 5），CTRKKHDNAC（SEQ ID No. 34）和CTRKKHDNC（248ox；SEQ ID No. 4）。最短的肽在浓度为10 μ M时显示对 $r\alpha 2I$ 与胶原结合最强的抑制。它比较长的肽229ox有效10倍以上（图8）。

15 实施例7

细胞迁移分析

迁移分析模仿细胞在胶原基质上的运动。此实施例证明本发明肽阻止这些细胞的运动，并因此可用于治疗特征在于这类细胞迁移的疾病的
20 治疗方法中。

为显示229ox/RKK肽和225ox在细胞-胶原相互作用中的作用，让化学转化的HOS-MNNG细胞与I型胶原接触，随后转移到胶原上。以前表明过 $\alpha 1\beta 1$ 整合蛋白在此过程中的重要性（Vihinen, P.等., 细胞生长分化7: 439-447（1996））。

如前述进行细胞迁移分析（Vihinen, P.等., 细胞生长分化7: 25 439-447（1996））。首先，人HOS-MNNG骨肉瘤细胞（ATCC）悬浮在无血清的Optimem 1培养基（生命技术公司）中，并将20,000-30,000细胞/孔转移到直径为2.80mm的金属圆柱中的24孔细胞培养基培养板（Costar）。将细胞培养孔中覆盖5 μ g/cm²I型胶原。细胞与胶原37 $^{\circ}$ C接触16小时。移去圆柱，用Optimem（生命技术公司）洗去未粘附细胞，
30 让粘附细胞在肽存在下在Optimem中迁移4天。每天更换含肽的新鲜Optimem。4天后，被细胞覆盖的表面区域用微机影像设备模型M4（影像研究公司）测量。

本实验的结果在图 9 显示。229ox 或 225ox 肽以 500 μM 浓度加入到细胞中，每天加入新鲜肽。HOS-MNNG 细胞迁移到 I 型胶原的能力不受 225ox 对照肽的影响，但 229ox 明显抑制 (p<0.001, Student's t-检验) 迁移(图 9)。

5 对骨肉瘤细胞在胶原上迁移的抑制说明 i) 恶性细胞的运动，从而癌细胞侵袭可被 229ox 抑制，和 ii) 当迁移是 α1β1 整合蛋白-胶原相互作用的结果或部分结果时，任何细胞类型的迁移也可被抑制。

实施例 8

RKK 肽对细胞粘附的抑制

10 人角质形成细胞 HaCaT 细胞和从口的鳞状细胞的骨肉瘤建立的细胞系 UT-SCC-2 与 I 型胶原在肽 229ox 或抗 α2 整合蛋白的功能性抗体, Gi9 (商业用抗-α2 整合蛋白抗体, Immunotech/Coulter, Westbrook, Maine, 美国) 存在下的细胞粘附。细胞用放线菌酮 10 μg/ml 在无血清培养基中处理 1 小时。而后分离细胞，并在含 0.1%甘氨酸的 DMEM 中预

15 敷 I 型胶原的微量滴定板上粘附 1 小时。洗去未粘附细胞，粘附细胞用结晶紫染色，通过测量光吸收来估测粘附细胞的数目。

总结于图 10 的结果表明依照本发明的肽，例如肽 229ox (p229ox) 抑制细胞迁移，并因此对治疗或预防涉及细胞迁移的疾病有益，例如齿根骨膜炎，因为上皮细胞结合 α1β1 整合蛋白，并用此结合在胶原上迁

20 移。

实施例 9

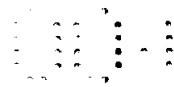
RKK 肽在治疗齿根骨膜炎和齿龈炎中的运用

齿根骨膜炎是一种特征在于发炎并失去牙支撑性结缔组织的疾病。疾病由致病口腔细菌引起，该细菌活化组织细胞以产生和释放降解组织

25 成分的水解酶。疾病过程的首要特征是将牙龈与牙齿表面连接的上皮细胞(连接上皮细胞和囊上皮细胞)增殖和迁移的增加。

对齿根骨膜炎和齿龈炎的传统治疗着眼于通过机械刮牙或抗生素治疗将致病菌从牙周组织除去。进一步的，常用外科矫正牙周组织结构。

30 本发明的肽提供的细胞迁移抑制，例如 p229ox，可单独使用或作为其它治疗的辅助剂来防止或治疗牙周疾病，包括齿根骨膜炎和齿龈炎。尤其是，包括有效量的一或多种本发明的含 RKK 序列的环肽的组合物可被局部给药至需治疗牙周疾病，包括齿根骨膜炎和齿龈炎的患者。在这



点上有益的组合物可用任何常规技术进行配制以用于局部施用。本发明的肽可被配制在载体中，包括聚合物载体如，例如基于乙基纤维素，聚硅氧烷橡胶，和尤其是可降解聚合物和共聚物，如聚（乳酸），聚（乙醇酸），聚（乳酸）-（乙醇酸）共聚物，聚酰胺和聚酯，明胶，胶原，白蛋白和纤维蛋白原的那些，交联被期望给予期待的 RKK 活性或释放特性。口腔用的传递系统在，例如在此被引作参考的 U.S. 5, 002, 769, U.S. 5, 023, 082, U.S. 5, 160, 737, U.S. 5, 330, 746, U.S. 5, 425, 953, U.S. 5, 438, 076 和 U.S. 5, 39, 795, 中描述。肽在口腔中以植入物形式，或以在适当位置凝固在口腔中的液体组合物的一部分，或以在所期待的位点提供有效水平的包含 RKK 的肽的牙膏或凝胶的形式被提供在口腔所需部位。本发明的肽的量因需要而不同以便提供，在口腔和传递系统的环境中提供需要的抑制作用的有效量，但取决于治疗病症的严重性，一般在凝固以前或在固体组合物中可以液体组合物的约为 0.001%-95% 的量存在。

膜也可用作将本发明肽提供至所需部位的载体。

依照本发明的包含 RKK 的肽可用于治疗和/或预防特征在于上皮细胞迁移的疾病，尤其是用于治疗优选局部施用的医学疾病。

现已详细描述了本发明，显然对于本领域普通技术人员来说可进行不影响其内容或实质的微小修改。



序列表

(1) 一般信息:

- (i) 申请人: Heino, Jyrki
Ivaska, Johanna
Käpylä, Jarmo
- (ii) 发明题目: 整合蛋白结合肽及其应用
- (iii) 序列号:
- (iv) 联系地址:
 - (A) 地址: Sterne, Kessler, Goldstein & Fox P.L.L.C.
 - (B) 街: 1100 New York Ave., N.W.
 - (C) 城市: Washington
 - (D) 州: D.C.
 - (E) 国家: USA
 - (F) 编码: 20005-3934
- (v) 计算机可读形式:
 - (A) 媒介类型: Floppy disk
 - (B) 计算机: IBM PC兼容
 - (C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) 软件:
- (vi) 优先申请数据:
 - (A) 申请号: 08/893,526 USA
 - (B) 申请日: (99) - 7 - 11
 - (C) 分类:
- (viii) 代理人/代理机构信息:
 - (A) 名字: Cimbala, Michele, A.
 - (B) 注册号: 33,851
 - (C) 参考/摘要号: 1102.0240000
- (ix) 通讯信息:
 - (A) 电话: 202/371-2600
 - (B) 传真: 202/371-2540
 - (C) 电报:

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 9个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 环状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

Xaa Arg Lys Lys Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

(2) SEQ ID NO:2 的信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 8个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 环状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:

Xaa Arg Lys Lys Xaa Xaa Xaa
1 5

(2) SEQ ID NO:3 的信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 7个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 环状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:3:

Xaa Arg Lys Lys Xaa Xaa Xaa
1 5

(2) SEQ ID NO:4 的信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 9个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 环状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:4:

Cys Thr Arg Lys Lys His Asp Asn Cys
1 5

(2) SEQ ID NO:5 的信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 11个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 环状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:5:

Cys Thr Arg Lys Lys His Asp Asn Ala Gln Cys
1 5 10

(2) SEQ ID NO:6 的信息:

- (i) 序列特征:

- (A) 长度: 7个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑学: 环状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:6:

```
Cys Thr Arg Lys Lys His Asp
1           5
```

(2) SEQ ID NO: 7 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 9个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑学: 环状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:7:

```
Cys Thr Arg Lys Lys His Asp Asn Ala
1           5
```

(2) SEQ ID NO: 8 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 4个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑学: 环状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:8:

```
Arg Lys Lys His
1
```

(2) SEQ ID NO: 9 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 26个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线状

(ii) 分子类型: DNA

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:9:

```
CACAGGGATC CCCTGATTTT CAGCTC
```

(2) SEQ ID NO:10 的信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 28个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线状

(ii) 分子类型: DNA

(xi) 序列说明:SEQ ID NO:10:

GTGGCTGAAT TCAACAGTAC CTTCAATG

28

(2) SEQ ID NO: 11 的信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 4个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 线状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:11:

Pro Asp Phe Gln
1

(2) SEQ ID NO: 12 的信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 5个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 线状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:12:

Ile Glu Gly Thr Val
1 5

(2) SEQ ID NO: 13 的信息:

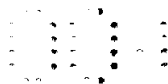
- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 6个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 线状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明:SEQ ID NO:13:

Glu Phe Ile Val Thr Asp
1

(2) SEQ ID NO: 14 的信息:



(2) SEQ ID NO: 18 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 10个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑学: 环状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:18:

Cys Pro Ala Asp Val Phe His Lys Asn Cys
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 19 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 11个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑学: 环状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:19:

Cys Tyr Ser Asn Asp Asp Glu His Lys Gly Cys
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 20 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 10个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑学: 环状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:20:

Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser Ile Tyr Cys
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 21 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 17个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑学: 环状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:21:

Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser Ile Tyr Pro Trp Asp Ala Val Lys Asn Cys

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:25:

Gln Tyr Ala Asn Asn Pro Arg Val Val Phe Asn Leu Asn Thr Tyr Lys Thr
1 5 10 15
Lys Glu Glu
 20

(2) SEQ ID NO: 26 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 14个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑学: 线状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:26:

Leu Asn Thr Tyr Lys Thr Lys Glu Glu Met Ile Val Ala Thr
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 27 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 15个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑学: 线状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:27:

Ala Thr Ser Gln Thr Ser Gln Tyr Gly Gly Asp Lys Thr Asn Thr
1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 28 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 16个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑学: 线状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:28:

Arg Lys Tyr Ala Tyr Ser Ala Ala Ser Gly Gly Arg Arg Ser Ala Thr
1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 29 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 17个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:29:

Thr Asp Gly Glu Ser His Asp Gly Ser Met Leu Lys Ala Val Ile Asp Gln
1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 30 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:30:

Leu Asp Thr Lys Asn Leu Ile Lys Glu Ile Lys Ala Ile Ala Ser Ile Pro
1 5 10 15

Thr Glu Arg
20

(2) SEQ ID NO: 31 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 16个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:31:

Ser Asp Glu Ala Ala Leu Leu Glu Lys Ala Gly Thr Leu Gly Glu Gln
1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 32 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 10个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线状

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列说明: SEQ ID NO:32:

Gly Ala Cys Arg Gly Asp Cys Leu Gly Ala
1 5 10

说明书附图

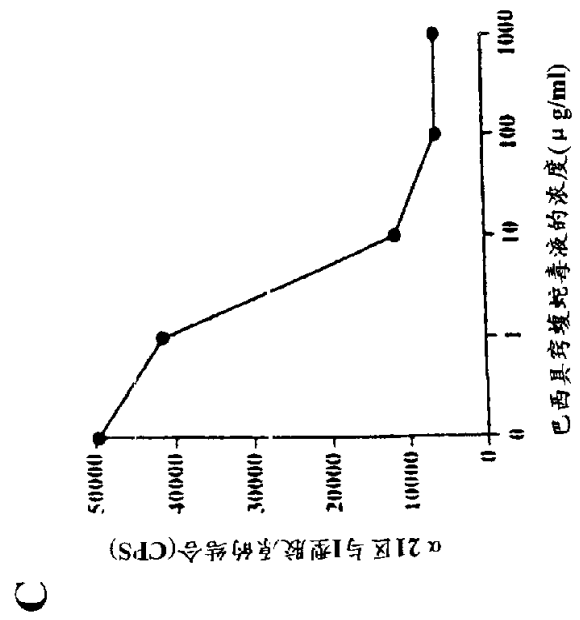
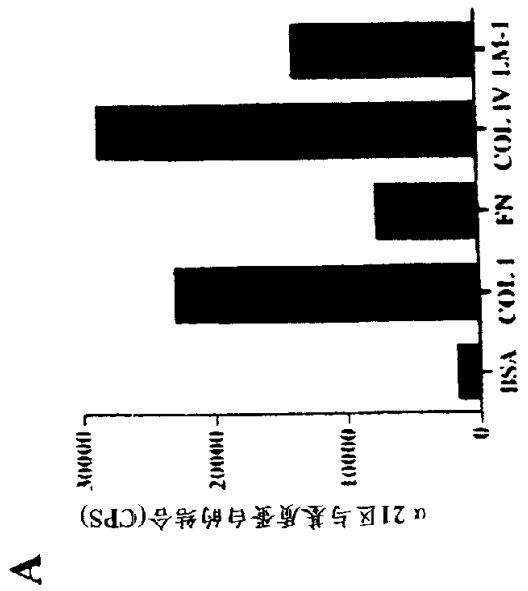
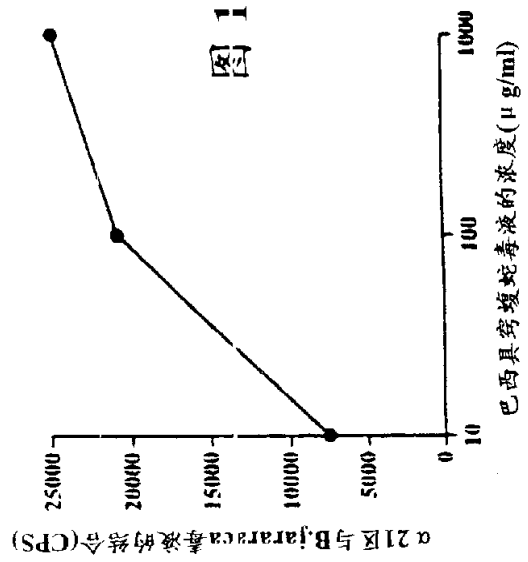
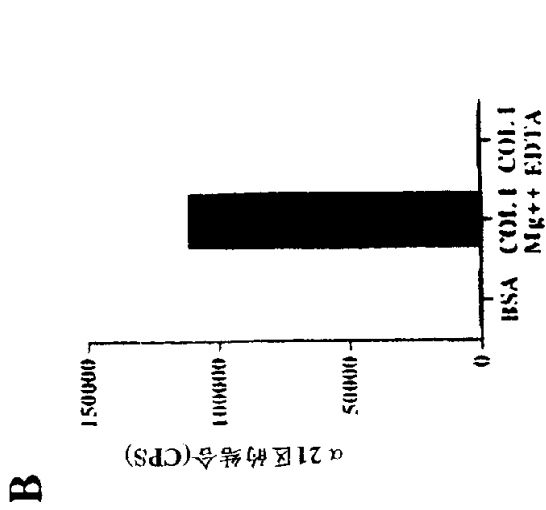




图 2

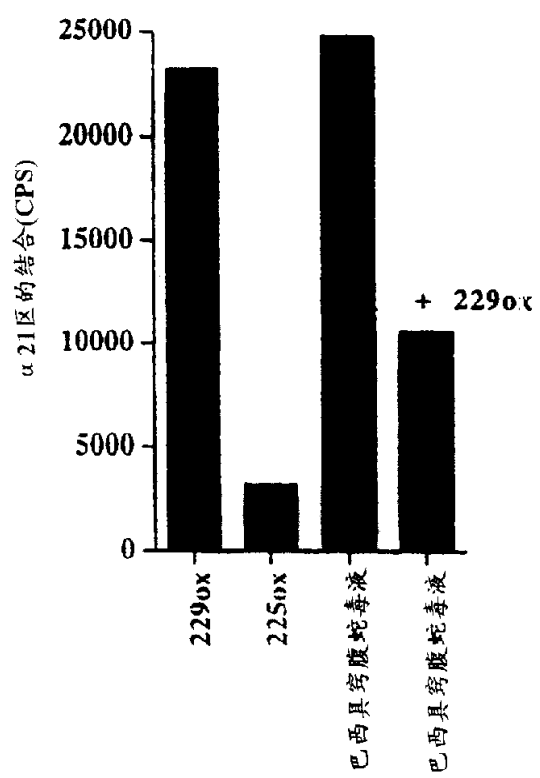


图 3

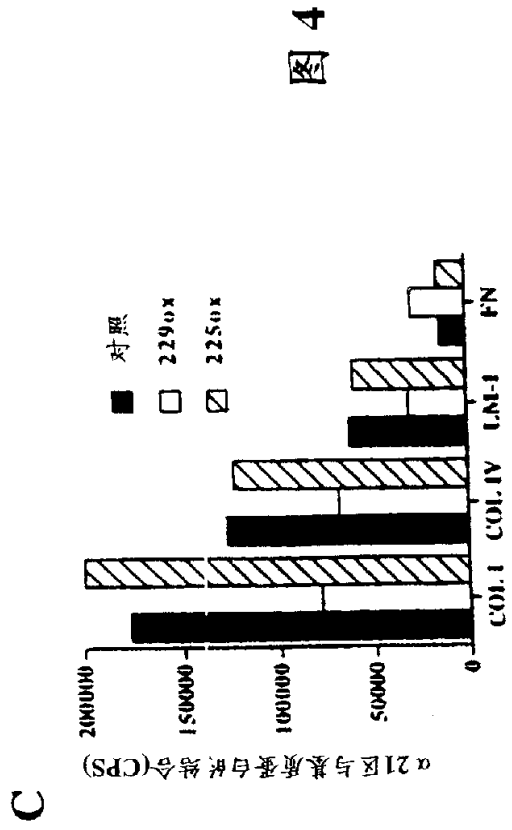
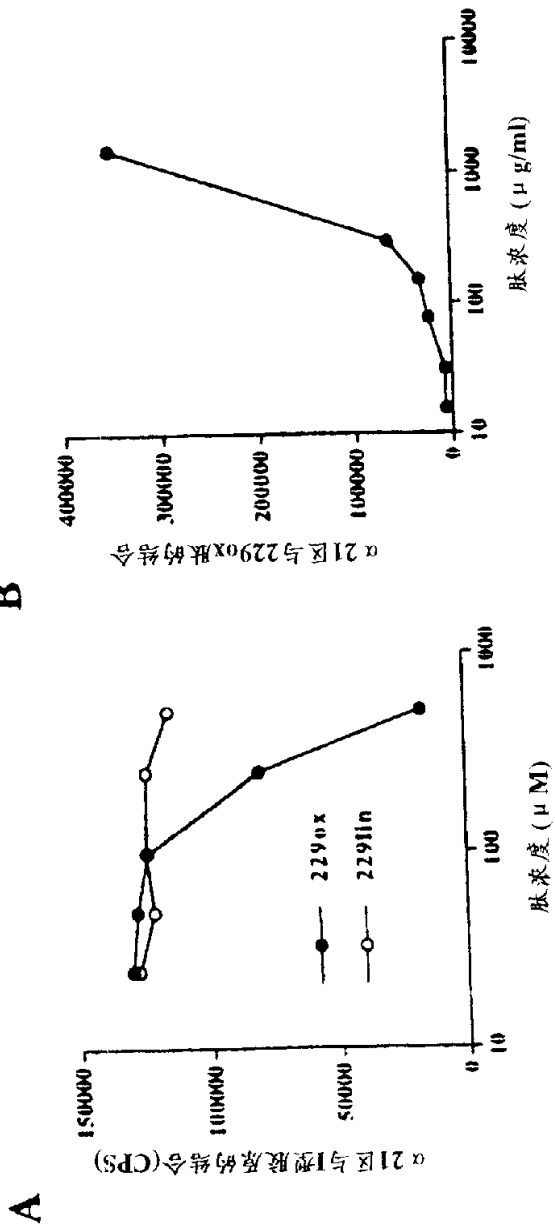


图 4

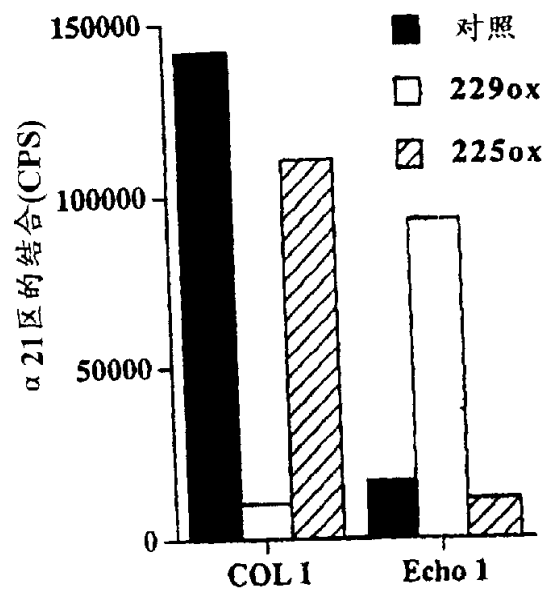


图 5

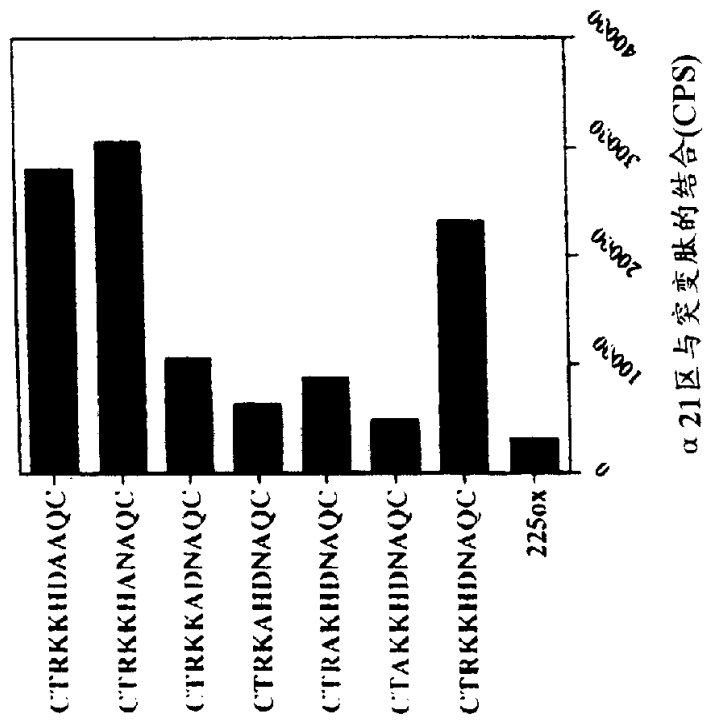
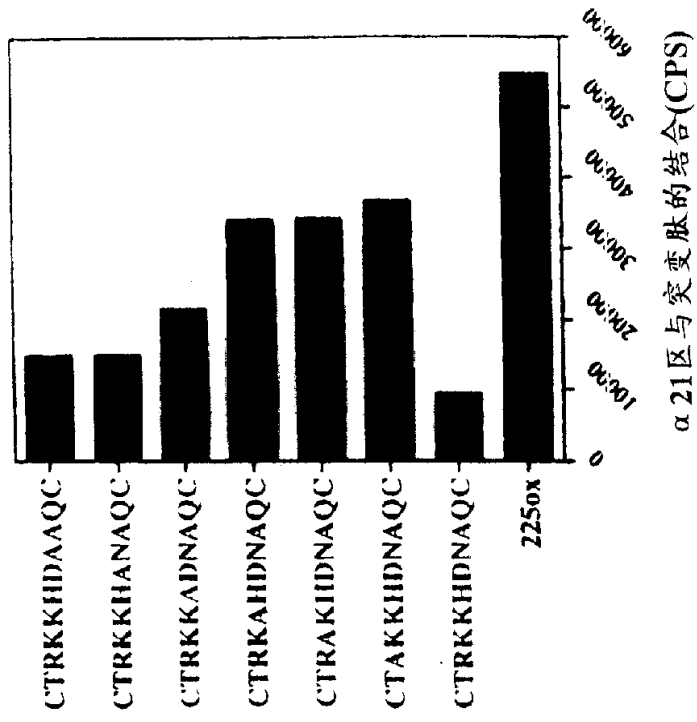


图 6

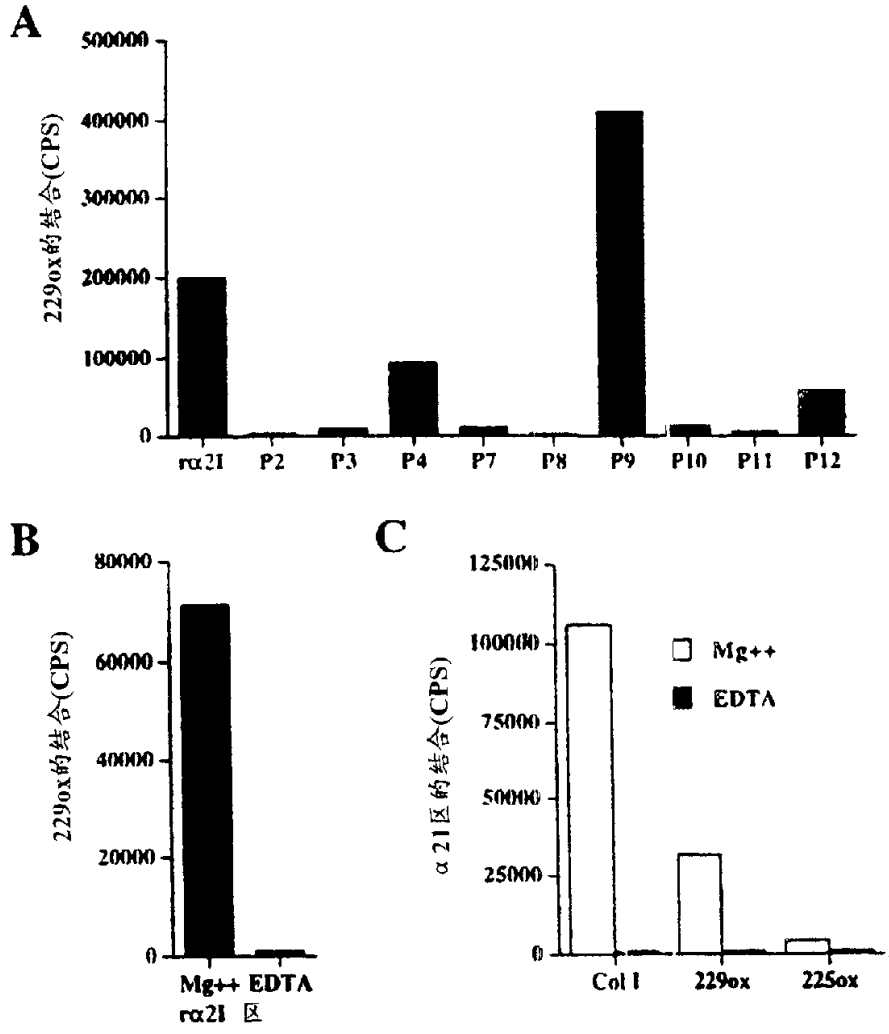


图 7

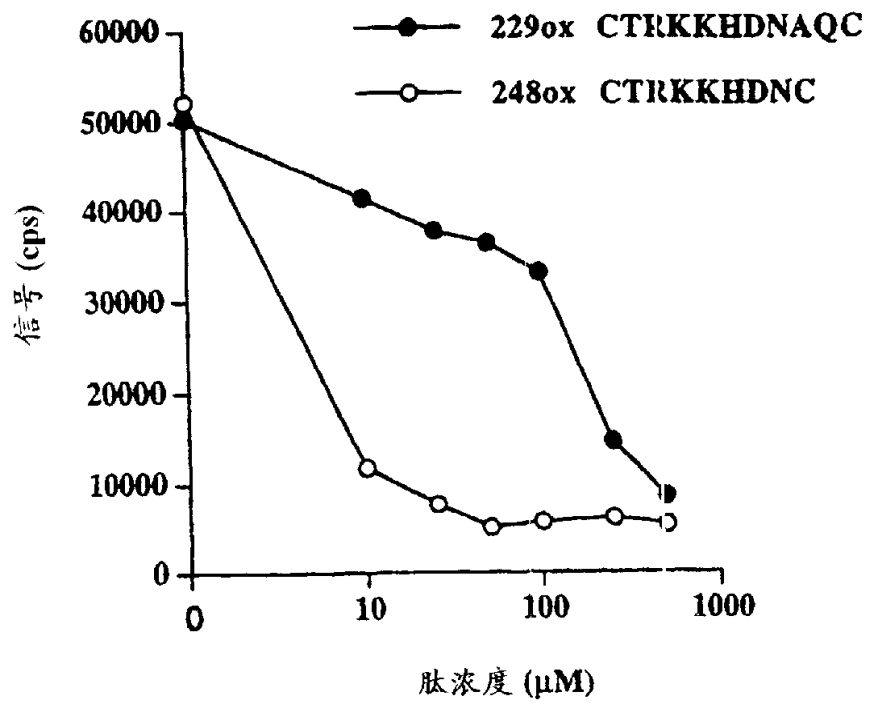
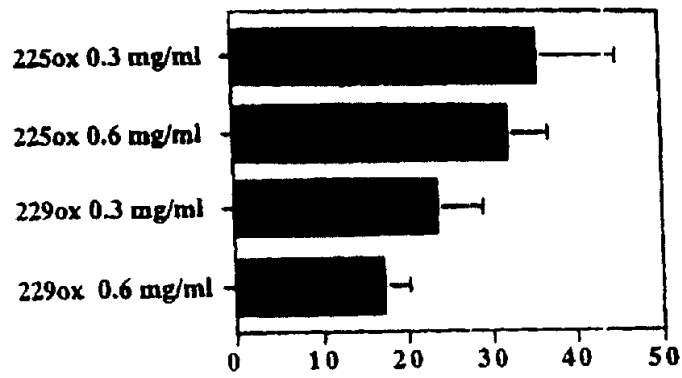


图 8

A



细胞迁移(细胞覆盖的表面,以 mm^2 为单位)

B

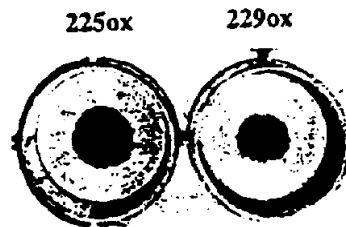


图 9

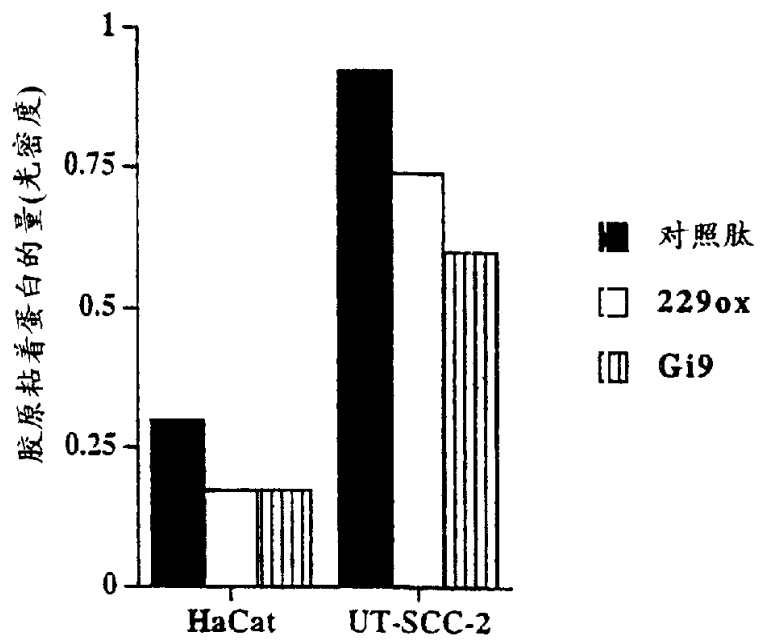


图 10