

1. 一种嵌合促细胞程序死亡的前列腺归巢肽，其包含连接于一种抗微生物肽的前列腺归巢肽，

所述嵌合肽由前列腺组织选择性内在化，并对前列腺组织呈现高毒性，

所述抗微生物肽当不与所述前列腺归巢肽连接时，对哺乳动物细胞呈现低毒性。

2. 权利要求 1 的嵌合肽，其中所述前列腺归巢肽包含序列 SMSIARL (SEQ ID NO:207)，或功能等价序列。

3. 权利要求 1 的嵌合肽，其中所述抗微生物肽具有两亲性 α 螺旋。

4. 权利要求 1 的嵌合肽，其中所述抗微生物肽包含选自以下一组的一种序列：

(KLAKLAK)₂ (SEQ ID NO:200)，

(KLAKKLA)₂ (SEQ ID NO:201)，

(KAAKAA)₂ (SEQ ID NO:202)，和

(KLGKKLK)₂ (SEQ ID NO:203)。

5. 权利要求 1 的嵌合肽，其中所述抗微生物肽包含序列_D(KLAKLAK)₂。

6. 权利要求 5 的嵌合肽，包含序列 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂。

7. 权利要求 6 的嵌合肽，由序列 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂ 组成。

8. 一种将抗微生物肽在体内定向到前列腺癌的方法，包含施用权利要求 1 的嵌合肽。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述前列腺归巢肽包含序列 SMSIARL (SEQ ID NO:207)，或功能等价序列。

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/47

A61K 47/48 A61P 35/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01806891. X

[43] 公开日 2003 年 5 月 21 日

[11] 公开号 CN 1419565A

[22] 申请日 2001.1.16 [21] 申请号 01806891. X

[30] 优先权

[32] 2000. 1. 21 [33] US [31] 09/489,582

[86] 国际申请 PCT/US01/01362 2001. 1. 16

[87] 国际公布 WO01/53342 英 2001. 7. 26

[85] 进入国家阶段日期 2002. 9. 20

[71] 申请人 伯纳姆研究所

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 埃尔基·I·罗斯拉赫蒂

雷纳塔·帕斯夸利尼 瓦地·阿拉普

戴尔·E·布勒德森

H·迈克尔·埃勒比

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 68 页 序列表 48 页
附图 9 页

[54] 发明名称 具有促细胞程序死亡活性的嵌合前列腺归巢肽

[57] 摘要

本发明提供了具有促细胞程序死亡活性的嵌合前列腺归巢肽。在一优选的实施方案中，所述促细胞程序死亡嵌合前列腺归巢肽含有序列 SMSIARL - GG - _D(KLAKLAK)₂。本发明还提供了用所述嵌合肽治疗患有前列腺癌的方法。

ISSN 1008-4274

10. 权利要求 8 的方法，其中所述抗微生物肽包含序列_D(KLAKLAK)₂。
11. 权利要求 10 的方法，其中所述嵌合肽包含序列 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂。
12. 权利要求 11 的方法，其中所述嵌合肽是 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂。
13. 一种在前列腺癌中诱导体内选择性活性的方法，包括为患有前列腺癌的个体施用权利要求 1 的嵌合肽。
14. 权利要求 13 的方法，其中所述前列腺归巢肽包含序列 SMSIARL (SEQ ID NO:207)，或功能等价序列。
15. 权利要求 13 的方法，其中所述抗微生物肽包含序列_D(KLAKLAK)₂。
16. 权利要求 15 的方法，其中所述嵌合肽包含序列 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂。
17. 权利要求 16 的方法，其中所述嵌合肽是 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂。
18. 一种治疗患有前列腺癌的患者方法，包括为患者施用权利要求 1 的嵌合肽，从而所述嵌合肽对所述肿瘤具有选择性毒性。
19. 权利要求 18 的方法，其中所述前列腺归巢肽包含序列 SMSIARL (SEQ ID NO:207)，或功能等价序列。
20. 权利要求 18 的方法，其中所述抗微生物肽包含序列_D(KLAKLAK)₂。
21. 权利要求 20 的方法，其中所述嵌合肽包含序列 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂。
22. 权利要求 21 的方法，其中所述嵌合肽是 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂。

具有促细胞程序死亡活性的嵌合前列腺归巢肽

本项研究是由国立癌症研究所(USA)的资金 CA74238, CA28896 和 CA30199 以及国防部资金 DAMD17-98-1-8581 资助的。美国政府在本发明中具有一定的权利。

发明背景

发明领域

本发明涉及癌症生物学和药物施用领域, 及更特别地涉及将抗微生物肽选择性定向于前列腺。

背景资料

前列腺腺癌近年来成为美国人中诊断出的发病率最高的癌症, 头一次超过了肺癌的发病率。据估计每年有 30000 个美国人死于这种恶性肿瘤。另外, 前列腺癌影响整个世界的男性, 据报道最高的发病率是在美国和北欧国家, 在整个欧洲有中等程度的高发病率。前列腺癌是一种老年男性疾病, 这种疾病的患者 75% 是 60—80 岁。在 50 岁, 估计美国人发生临床上明显的前列腺癌的可能性是大约 10%。然而, 尸检研究显示前列腺癌的真正发病率实际上明显高于临床迹象所表明的发病率。

治疗癌症如前列腺癌的一个主要障碍是相对缺少可以选择性定向癌组织而不影响正常组织的制剂。例如, 放疗和手术治疗通常是局部治疗, 可以引起治疗区域的正常组织损伤, 产生疤痕, 严重情况下可以丧失正常组织功能。化疗通常是全身施用化疗剂, 可引起器官如骨髓, 粘膜, 皮肤和小肠的损伤, 经历快速细胞转换和连续细胞分化。结果, 在用化疗剂治疗癌症患者时由于全身应用而导致

发生非所需的副作用，例如恶心，脱发和血细胞数降低。这种非所需副作用通常限制可以施用的治疗量。由于治疗中的这个缺点，癌症仍然是导致患者发病和死亡的主要因素。

已经观测到有一类肽具有有效的抗微生物活性，这类肽包括天然发生的肽如蜂毒肽，短杆菌肽，爪蟾抗菌肽，防卫素和杀菌肽。天然发生的抗微生物肽和相关的合成的抗微生物序列，通常在两亲性结构域中具有等价数目的极性和非极性残基，及足够数目的碱性残基以使所述肽在中性 pH 中全部是正电荷。抗革兰氏阳性菌的两亲性 α 螺旋肽的生物活性可以得自这些肽形成穿经双分子层膜的离子通道的能力。由于细菌和哺乳动物细胞之间细胞膜的不同，许多抗微生物肽选择性抑制和杀死细菌，同时维持低哺乳动物细胞毒性，并具有不同的细菌细胞敏感性。如本文所示，这些抗微生物肽可以被赋予抗一种特定的真核细胞的选择性胞毒性，如针对前列腺内皮细胞。

因此，需要能选择性定向于前列腺的一种新抗癌治疗剂。本发明通过提供促细胞程序死亡的前列腺归巢肽（prostate-homing proapoptotic peptides）而满足这一需要，其组合一种抗微生物肽和一种前列腺归巢肽，产生一种具有抗前列腺的选择性毒性的缀合物。也提供了相关的优点。

发明概述

本发明提供了一种嵌合的促细胞程序死亡的前列腺归巢肽，其含有与一种抗微生物肽连接的前列腺归巢肽，其中此嵌合肽由前列腺组织选择性内在化并呈现对其具有高胞毒性，同时此抗微生物肽当不与前列腺归巢肽连接时对哺乳动物细胞具有低胞毒性。在本发明的嵌合肽中，前列腺归巢肽（prostate-homing）部分可以含有例如序列 SMSIARL (SEQ ID NO : 207) 或功能等价序列，抗微生物肽部

分可以具有两亲性 α 螺旋结构如序列(KLAKLAK)₂ (SEQ ID NO : 200), (KLAKKLA)₂ (SEQ ID NO : 201), (KAAKCAA)₂ (SEQ ID NO : 202) 或 (KLGKCLG)₃ (SEQ ID NO : 203)。在一个优选的实施方案中, 抗微生物肽部分含有序列_D(KLAKLAK)₂。本文提供的一种促细胞程序死亡的前列腺归巢肽的一个例子是 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂。本发明还提供了一种将抗微生物肽在体内定向于前列腺癌的方法。这种方法包括施用一种嵌合的促细胞程序死亡的前列腺归巢肽, 其含有连接于一种抗微生物肽的前列腺归巢肽, 其中嵌合肽由前列腺组织选择性内在化并对其呈现高胞毒性, 而抗微生物肽当不与前列腺归巢肽连接时对哺乳动物的胞毒性较低, 在本发明的一种方法中, 前列腺归巢肽可以含有例如序列 SMSIARL (SEQ ID NO : 207) 或功能等价序列, 抗微生物肽可以含有序列_D(KLAKLAK)₂。在一个优选的实施方案中, 嵌合的促细胞程序死亡的前列腺归巢肽包括序列 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂。

本发明还提供了一种在体内诱导对前列腺癌选择性毒性的方法。这个方法包括给患有前列腺癌的患者施用一种嵌合的促细胞程序死亡的前列腺归巢肽, 其含有连接于一种抗微生物肽的前列腺归巢肽, 其中嵌合肽由前列腺组织选择性内在化并对其呈现高胞毒性, 而抗微生物肽当不与前列腺归巢肽连接时对哺乳动物的胞毒性较低。这种在体内诱导对前列腺癌选择性毒性的方法, 可以例如通过用含有序列 SMSIARL (SEQ ID NO : 207)或功能等价序列的前列腺归巢肽进行。抗微生物肽可以包括例如序列_D(KLAKLAK)₂。在一个优选的实施方案中, 嵌合的促细胞程序死亡的前列腺归巢肽包括序列 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂。

另外, 本发明提供了一种治疗患有前列腺癌的患者们的的方法, 通过为患者施用一种嵌合的促细胞程序死亡的前列腺归巢肽, 从而此嵌合肽对肿瘤具有选择性毒性。此嵌合肽含有连接于一种抗微生物

肽的前列腺归巢肽，其中嵌合肽由前列腺组织选择性内在化并对其呈现高胞毒性，而抗微生物肽当不与前列腺归巢肽连接时对哺乳动物的胞毒性较低。前列腺归巢肽部分可以患有例如序列 SMSIARL (SEQ ID NO : 207) 或功能等价序列，抗微生物肽部分可以含有例如序列 $D(KLAKLAK)_2$ 。在一个优选的实施方案中，此嵌合肽含有序列 SMSIARL-GG- $D(KLAKLAK)_2$ 。

附图简述

图 1 示出一种计算机产生的模型和氨基酸序列 CNGRC-GG- $D(KLAKLAK)_2$ ，称为 "HPP-1."

上组： CNGRC-GG- $D(KLAKLAK)_2$ (HPP-1) 是由通过偶联结构域结合的归巢结构域和膜破坏结构域组成。

下组：相当于上组中所示结构的"HPP-1"的氨基酸序列。

图 2：示出在存在 $D(KLAKLAK)_2$ 的情况下，线粒体溶胀和线粒体依赖性细胞程序死亡。

a. 示出在存在 $D(KLAKLAK)_2$ 或 Ca^{+2} （阳性对照）的情况下的线粒体溶胀曲线（光学吸收光谱）。

b. 示出在存在 $D(KLAKLAK)_2$ 或 DLSLARLATALAI (SEQ ID NO : 204)，在有或无线粒体情况下，32 kDa proform 及 8 和 20kDa 加工形式的 caspase-3 裂解的免疫印迹。示出了典型的实验。结果是在三个独立实验的综合。

图 3 示出在用 CNGRC-GG- $D(KLAKLAK)_2$ (HPP-1)处理的皮肤微管内皮细胞中线粒体溶胀和细胞程序死亡。

a. 皮肤微管内皮细胞索形成，标尺= 250um。

b. 用 CNGRC-GG- $D(KLAKLAK)_2$ (HPP-1)处理的增殖皮肤微管内皮细胞中 DEVD-pNA 水解(caspase 活化)。

c. 用 HPP-1 处理的（黑色条杆）或用对照的肽 $D(KLAKLAK)_2$ （灰

色条杆)处理一段时间后, 增殖皮肤微管内皮细胞的存活率 (t 检验, $P < 0.05$)

d. 用 HPP-1 处理的 (黑色条杆) 或用对照的肽_D(KLAKLAK)₂(灰色条杆)处理一段时间后, 形成索的皮肤微管内皮细胞的存活率 (t 检验, $P < 0.05$)。

图 4 示出用 HPP-1 处理携带人 MDA-MB-435 衍生的乳腺癌异种移植体的裸鼠的作用。

a. 用 HPP-1 处理的肿瘤的体积与用对照的 CARAC-GG-_D(KLAKLAK)₂ 处理的肿瘤的体积的对比。示出了在第 1 天至第 50 天内肿瘤体积的不同(t 检验, $P = 0.027$)。

b. 示出用 HPP-1 或对照肽 (_D(KLAKLAK)₂ 和 CNGRC (SEQ ID NO : 8)的混合物) 处理携带人 MDA-MB-435 衍生的乳腺癌异种移植体的裸鼠的生存的 Kaplan-Meier 生存图。每组均包含 13 只动物 (Log-Rank 检验, $P < 0.05$)。

图 5 示出在新生小鼠中 CDCRGDCFC-GG-_D(KLAKLAK)₂ 对氧诱导的视网膜新血管化的作用。示出用载体 (黑色条杆); CDCRGDCFC-GG-_D(KLAKLAK)₂(斑纹条杆); 和未缀合的 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1)与 _D(KLAKLAK)₂的对照混合物 (阴影条杆) 处理的视网膜新血管数。

图 6 示出静脉内注射的前列腺归巢肽的生物素缀合物在前列腺组织中的积聚。a. 对来自经注射生物素标记的前列腺归巢肽 SMSIARL (SEQ ID NO : 207)的小鼠的前列腺组织切片进行的亲和素-过氧化物酶染色。b. 对来自经注射生物素标记的对照肽 CARAC (SEQ ID NO : 208)的小鼠的前列腺组织切片进行的亲和素-过氧化物酶染色。

图 7 示出在正常小鼠前列腺中由 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂ 诱导的细胞程序死亡。a. 对来自用 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂ 嵌

合肽处理的小鼠的前列腺组织进行的 TUNEL 染色。b.类似于 a 的视野的放大倍数观察。c. 对用 250ug SMSIARL (SEQ ID NO : 207)和_D(KLAKLAK)₂ 的未缀合混合物处理的阴性对照小鼠进行的 TUNEL 染色。

图 8 示出用 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂, 单独的载体, 单独的_D(KLAKLAK)₂ 肽, 或单独的 SMSIARL 肽 (SEQ ID NO : 207) 处理 TRAMP 小鼠的存活力。

图 9 示出前列腺归巢 SMSIARL (SEQ ID NO : 207)噬菌体与人前列腺血管的结合。a 和 b.对人前列腺组织切片进行的过氧化物酶染色, 所述切片含有均用 10⁹TU SMSIARL 噬菌体(SEQ ID NO : 207)覆盖及用抗噬菌体抗体检测的正常组织和癌组织。a 是一般性观察 (x 20) 而 b 示出对 a 组进行的高倍率详细观察 (x 40)。c.如 a 组用没有肽插入体的噬菌体进行过氧化物酶染色。d.如 a 组用可溶的包含在盖玻片中的 SMSIARL 肽 SEQ ID NO : 207 进行的过氧化物酶染色。

发明详述

抗微生物肽, 也称为溶细胞肽或通道形成肽, 是广谱的抗菌剂。这些肽典型地破坏细菌细胞膜, 导致细胞裂解和死亡。有 100 多种抗微生物肽是天然发生的。另外, 已经合成了一些类似物, 如 Javadpour 等, *J. Med. Chem.* 39 : 3107-3113 (1996) ; 及 Blondelle 和 Houghten, *生物化学* 31 : 12688-12694 (1992)所述, 在此均并入参考。一些抗微生物肽如蜂毒肽不是选择性的, 在最小的杀菌浓度对正常哺乳动物细胞有损伤, 其它一些是对细菌细胞有选择性的。例如天然发生的爪蟾抗菌肽和杀菌肽在对正常哺乳动物细胞不致死的浓度呈现基本的杀菌活性。

抗微生物肽通常含有阳离子氨基酸, 其附着于阴离子磷脂的头

部基团，导致负电荷的膜优先破坏。一旦静电结合，两亲性螺旋可以使脂质基质变形，导致丧失膜屏障功能 (Epanand, 两亲性螺旋, CRC 出版社 : Boca Raton (1993) ; Lugtenberg 和 Alphen, 生物化学生物生理学综述 737 : 51-115 (1983), 所述文献均并入参考)。原核胞质膜保持大跨膜电位，并具有高含量的阴离子磷脂。相反，真核胞质膜的外层通常具有较低的或没有膜电位，而且几乎只由兼性磷脂组成。因此，由于独特的膜组分，相比之下抗微生物肽可以优先破坏原核细胞膜而非真核细胞膜。

本发明涉及令人惊奇的发现，即抗微生物肽序列可以连接于一种定向肿瘤的分子，以产生归巢的促细胞程序死亡缀合物，其通常在真核细胞外无毒性，但是当将其定向于真核细胞并被其内在化时，其促进线粒体膜的破坏及相继的细胞死亡。归巢的促细胞程序死亡缀合物如 HPP-1，其含有连接于环状肿瘤归巢分子 CNGRC (SEQ ID NO : 8)的抗微生物肽_D(KLAKLAK)₂，在体内对血管发生内皮细胞有选择性毒性，因此可以用作新的抗癌治疗剂。

因此本发明提供了一种归巢的促细胞程序死亡缀合物，其包括连接于抗微生物肽的一种肿瘤归巢分子，其选择性归巢于选择的细胞或组织，其中缀合物被哺乳动物细胞或组织选择性内在化，并对其具有高毒性，而当抗微生物肽不与肿瘤归巢分子连接时对哺乳动物的毒性较低。例如，本发明的归巢促细胞程序死亡缀合物对血管生成内皮细胞具有选择性毒性，并可以用于例如在体内诱导对具有血管生成结构的肿瘤的选择毒性。

如本发明所揭示，一种具有对细菌而非真核细胞具有选择性毒性的合成的抗微生物肽，_D(KLAKLAK)₂，在明显低于杀死真核细胞的浓度的 10uM 浓度诱导明显的线粒体溶胀 (图 2a)，相比之下表明_D(KLAKLAK)₂ 优先破坏线粒体膜而非真核细胞膜 (见实施例 1)。另外，如通过特征性 caspase-3 加工测定，_D(KLAKLAK)₂ 激活线粒体

依赖性游离细胞程序死亡（图 2b），而无 α 螺旋形成肽 DLSLARLATARLAI (SEQ ID NO : 204) 无此功能。这些结果表明抗微生物肽如 $D(KLAKLAK)_2$ 可以破坏线粒体膜，线粒体膜与细菌膜一样，具有高含量的阴离子磷脂，反映细菌和线粒体是共同祖先 (Epan, 如前, 1993 ; Lugtenberg 和 Alphen, 如前, 1983 ; Matsuzaki 等, 生物化学 34 : 6521-6526 (1995); Hovius 等, FEBS 通信 330 : 71-76 (1993); 及 Baltcheffsky 和 Baltcheffsky Lee 等, 线粒体和微粒体, Addison-Wesley : Reading, MA (1981), 所述文献均在此并入参考)。

如本发明所进一步揭示的，抗微生物肽 $D(KLAKLAK)_2$ 通过甘氨酸-甘氨酸键与环状肿瘤归巢肽 CNGRC (SEQ ID NO : 8) 缀合，产生肽 CNGRC-GG- $D(KLAKLAK)_2$ ，称为“HPP-1”。如本发明所揭示，在血管生成的组织培养模型中，通过分析索形成对 HPP-1 进行测试，索形成是一种迁移形式，这是根据内皮细胞形态从一般的“鹅卵石”形转变为链状或索状所表示。用 60uM HPP-1 处理正常人体皮肤微管细胞(DMECs)，在增殖条件（图 3c）或索形成条件（图 3d）下，随着时间推移可以降低存活性百分率，而用未定向的 $D(KLAKLAK)_2$ 肽处理，存活性只有可忽略的损失（见实施例 2）。另外，如表 1 所示，用 HPP-1 处理的 DMECs 的增殖或迁移 LC_{50} 低于血管生成的 LC_{50} 。DMECs 在单层细胞中保持 100% 的铺满率，表明在血管生成条件下优先被 HPP-1 杀死。本发明揭示的结果进一步表明用 $D(KLAKLAK)_2$ 处理 24 小时的 DMECs 的线粒体保持正常的形态，而那些用 CNGRC-GG- $D(KLAKLAK)_2$ 或 ACDCRGDCFC-GG- $D(KLAKLAK)_2$ 处理的线粒体形态改变，之后表现为细胞程序死亡的经典的形态学指征包括核浓缩和破碎。

如实施例 3 所示，HPP-1 肽 CNGRC-GG- $D(KLAKLAK)_2$ 在体内也具有活性。如图 4a 和 4b 所示，用 HPP-1 处理携带人 MDA-MD-435

乳腺癌异种移植体的裸鼠。与对照组相比，用 HPP-1 处理的动物组中肿瘤体积平均较小，而且存活时间较长。另外，一些经 HPP-1 处理的小鼠比对照小鼠的存活时间长几个月，表示原发肿瘤生长和转移均被抑制。基于对肿瘤的组织病理学分析，肿瘤结构的破坏和广泛的细胞死亡很明显，大约 50% 的细胞程序死亡。HPP-1 对衍生自人黑素瘤细胞系 C8161 的肿瘤也有抵抗作用；ACDCRGDCFC-GG-_D(KLAKLAK)₂ 对 MDA-MD-435 乳腺癌肿瘤有抵抗作用。总而言之，这些结果表明基于肿瘤归巢分子和抗微生物肽序列的归巢促细胞程序死亡肽，在真核细胞外可以是无毒性的，但当被定向的真核靶细胞内在化时，可以促进线粒体膜破坏及相继的细胞死亡。归巢促细胞程序死亡肽如 HPP-1，其对血管生成内皮细胞具有选择性毒性，对抗癌治疗具有特殊价值。

本发明揭示的其它结果示出视网膜新血管化可以被本发明的归巢促细胞程序死亡缀合物选择性抑制。特别地，用归巢促细胞程序死亡缀合物 CDCRGDCFC-GG-_D(KLAKLAK)₂ 处理的小鼠中视网膜新血管数目，比对照水平降低 30—40%（见图 5）。因此，本发明的归巢促细胞程序死亡缀合物可以含有一种肿瘤归巢分子，或可以含有另一种分子，其选择性归巢选择的哺乳动物细胞或组织。

本发明的归巢促细胞程序死亡缀合物特征在于对将其内在化的哺乳动物细胞具有高毒性。如本文所用术语“高毒性”是指缀合物在导致所选择的细胞或组织的细胞死亡中的相对作用力。本领域技术人员了解可以使用各种熟知的细胞存活力实验分析毒性。通常地，术语高毒性是指一种缀合物，其中半数致死量（LC50）浓度低于大约 100uM，优选低于大约 50uM。例如，如本发明所揭示，归巢促细胞程序死亡缀合物 HPP-1 的特征在于对血管增殖和索形成 DMEM 细胞及 KS1767 而言，LC50 分别为 51，34 和 42。另外，用本发明的归巢促细胞程序死亡缀合物处理的携带肿瘤的小鼠的存活力延

表明选择性毒性可以在体内再生。

如本发明所用术语“抗微生物肽”是指具有抗微生物活性的一种天然发生的或合成的肽，其具有杀死或减缓一或多种微生物生长的能力。一种抗微生物肽可以例如杀死或减缓一或多种细菌菌株生长，包括革兰氏阳性或革兰氏阴性菌，或真菌或原生动物。因此，抗微生物肽可以具有例如抑菌或杀菌活性，抵抗例如大肠杆菌，铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）或金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）的一或多种菌株。虽然不期望受以下理论的限制，抗微生物肽可以由于通过自身聚集形成穿经双分子层膜的离子通道的能力而具有生物活性。

抗微生物肽是典型高碱性的，并可以具有线性或环状结构。如下所述，抗微生物肽可以具有两亲性 α 螺旋结构（见美国专利5789542；Javadpour等，如前，1996；Blondelle和Houghten，如前，1992）所述。抗微生物肽也可以是例如 α 链/片层形成肽，如Mancheno等，*J. Peptide Res.* 51 : 142-148 (1998)所述。

抗微生物肽可以是天然发生的或合成的肽。天然发生的抗微生物肽已经分离自生物学原料如细菌，昆虫，两栖动物和哺乳动物并认为代表可诱导的防御蛋白，保护宿主机体免于细菌感染。天然发生的抗微生物肽包括短杆菌肽，爪蟾抗菌肽，蜂毒肽，防卫素和杀菌肽(见例如Maloy和Kari，*生物聚合物* 37 : 105-122 (1995)；Alvarez-Bravo等，*生物化学杂志* 302 : 535-538 (1994)；Bessalle等，*FEBS* 274 : 151-155 (1990)；及Blondelle和Houghten在Bristol编辑的*医用化学年鉴*，p159-168，科学出版社，San Diego,所述文献在此均并入参考)。如以下进一步揭示，抗微生物肽也可以是天然肽的类似物，尤其是其保留或增强两亲性。

掺入本发明归巢促细胞程序死亡缀合物的抗微生物肽，当不与肿瘤归巢分子连接时，对哺乳动物细胞具有低毒性。对哺乳动物细

胞的毒性可易于使用常规方法确定。例如对哺乳动物毒性可以通过在体外人体红细胞的裂解加以分析，例如 Javadpour 等，如前，1996 所述。具有“低哺乳动物细胞毒性”的抗微生物肽是指不裂解人体红细胞或需要高于 100uM 的裂解活性浓度，优选高于 200, 300, 5000 或 1000uM 浓度。

在一个优选的实施方案中，本发明还提供了一种归巢促细胞程序死亡缀合物，其中抗微生物肽部分当被真核细胞内在化时，促进线粒体膜破坏。特别地，相比之下这种抗微生物肽优先破坏线粒体膜而非真核细胞膜。线粒体膜，与细菌膜一样但与真核胞质膜相反，具有高含量负电荷磷脂。可以使用例如线粒体溶胀分析（如实施例 1 所述）或其它本领域熟知的方法分析抗微生物肽在破坏线粒体膜中的活性。如本发明所揭示例如 $_D(KLAKLAK)_2$ 在 10uM 浓度诱导明显的线粒体溶胀，明显低于杀死真核细胞所需的浓度。在例如 50 uM, 40 uM, 30 uM, 20 uM, 10 uM, 或更低浓度诱导明显线粒体溶胀的抗微生物肽，认为是促进线粒体膜破坏的肽。

本发明还提供了一种归巢促细胞程序死亡缀合物，其中肿瘤归巢分子连接于具有两亲性 α 螺旋结构的抗微生物肽。在本发明的归巢促细胞程序死亡缀合物中，抗微生物肽部分可以具有例如序列 $(KLAKLAK)_2$ (SEQ ID NO : 200) ; $(KLAKKLA)_2$ (SEQ ID NO : 201) ; $(KAAKAA)_2$ (SEQ ID NO : 202) ; 或 $(KLGKKLK)_3$ (SEQ ID NO: 203), 尤其序列 $_D(KLAKLAK)_2$ 。本发明的促细胞程序死亡缀合物可以具有例如序列 CNGRC-GG- $_D(KLAKLAK)_2$ 或 ACDCRGDCFC-GG- $_D(KLAKLAK)_2$ 。

抗微生物肽通常在稀释的水相溶液中具有随机卷曲构象，而高水平螺旋可以通过促螺旋溶剂和两亲性培养基如微胶粒，合成的双分子层或细胞膜诱导。本领域熟知 α 螺旋结构，理想的 α 螺旋特征在于每个转角具有 3.6 个残基，及每个残基翻译 1.5Å (5.4 每个转角；

见 Creighton, 蛋白质: 结构和分子学性质, W. H Freeman, New York (1984)。在两亲性 α 螺旋结构中, 极性和非极性氨基酸残基排列为两亲性螺旋, 这是一种 α 螺旋, 当只观察肽的螺旋轴时, 其中疏水性氨基酸残基集中在一面, 亲水性氨基酸残基集中在相对的那一面。

已经分离了多种具有不同序列的抗微生物肽, 共同特点是呈现一个两亲性 α 螺旋结构(Saberwal 等, 生物化学生物生理学综述 1197 : 109-131 (1994))。推测由于氨基酸取代形成的两亲性和螺旋性增强的天然肽的类似物, 典型地具有增强的抗微生物活性。通常地, 具有抗微生物活性增强的类似物, 其抗哺乳动物细胞的胞毒性也提高(Maloy 等, 生物聚合物 37 : 105-122 (1995))。

关于抗微生物肽所用的术语“两亲性 α 螺旋结构”, 是指一种 α 螺旋, 其疏水性一面在生理 pH 含有一些极性残基, 亲水性一面含有非极性残基。极性残基可以是例如赖氨酸残基或精氨酸残基, 而非极性残基可以是例如亮氨酸或丙氨酸残基。具有两亲性 α 螺旋结构的抗微生物肽在两亲性结构域中具有相同数目的极性和非极性残基, 和足够数目的碱性残基, 以使肽在中性 pH 中全部是正电荷(Saberwal 等, 生物化学生物生理学综述 1197 : 109-131 (1994), 在此并入参考)。本领域技术人员了解在本发明的两亲性肽中包含促进螺旋的氨基酸如亮氨酸和丙氨酸是有利的(见例如 Creighton 如前, 1984)。

本领域熟知具有两亲性 α 螺旋结构的各种抗微生物肽。这种肽包括基于 7 体模块模式 (heptad building block scheme) 的合成的最低限要求的肽, 其中重复的 7 体模块由重复的三聚体和一另外的残基组成。这种合成的抗微生物肽包括例如通式为 $[(X_1X_2X_2)(X_1X_2X_2)X_1]_n$ (SEQ ID NO : 205) 或 $[(X_1X_2X_2)X_1(X_1X_2X_2)]_n$ (SEQ ID NO : 206) 的肽, 其中 X_1 是极性残基, X_2 是非极性残基; n 是 2 或 3 (见 Javadpour 等, 如前, 1996)。例如 $(KLAKLAK)_2$ (SEQ IDNO : 200); $(KLAKKLA)_2$

(SEQ ID NO : 201) ; (KAAKKAA)₂ (SEQ ID NO : 202); 和 (KLGKKLK)₃ (SEQ ID NO : 203)是具有两亲性 α 螺旋结构的合成的抗微生物肽。本领域也已知具有两亲性 α 螺旋结构的相似的合成的抗微生物肽, 例如 McLaughlin 和 Becker 的美国专利 No.5789542 所述。

本领域技术人员可易于确定螺旋性, 例如使用圆二色谱学确定。在 222nm 测定摩尔椭圆率后, 可以测定 α 螺旋性的百分率, 如 Javadpour 等, 如前, 1996 所述 (也见于 McLean 等, 生物化学 30 : 31-37 (1991)所述, 在此将其并入参考)。当在两亲性介质如 25mM SDS 中分析时, 本发明的两亲性 α 螺旋抗微生物肽可以具有例如至少大约 20%的螺旋性。本领域技术人员了解这种具有两亲性 α 螺旋结构的抗微生物肽当在 25mM SDS 中分析时, 可以具有例如至少大约 25%, 30%, 35%或 40%螺旋性。具有 α 螺旋结构的抗微生物肽当在 25mM SDS 中分析时, 可以具有例如 25%—90% 螺旋性; 25%—60%螺旋性; 25%—50% 螺旋性; 25%—40% 螺旋性; 30%—90%螺旋性; 30%—60%螺旋性; 30%—50% 螺旋性; 40%—90% 螺旋性或 40%—60% 螺旋性。两亲性可易于确定, 例如使用代表肽的螺旋轮确定(见例如 Blondelle 和 Houghten, 如前, 1994 所述)。

本发明的归巢促细胞程序死亡缀合物 CNGRC-GG-D(KLAKLAK)₂ 的结构示于图 1。从图 1 中可以看出, 归巢结构域 CNGRC (SEQ ID NO : 8) 是一种二硫键环状结构, 并通过甘氨酸—甘氨酸桥连偶联于膜破坏结构域 D(KLAKLAKKLAKLAK)。缀合物的膜破坏抗微生物部分中的 D-氨基酸, 可以用于赋予缀合物以提高的体内稳定性。另外, 膜破坏性 D (KLAKLAKKLAKLAK)部分, 形成一种两亲性螺旋。尤其地, 赖氨酸残基排列在螺旋的一面 (以螺旋的黑暗区域示出), 而非极性亮氨酸和丙氨酸残基排列在相对的那一面 (螺旋的亮区)。

本发明的归巢促细胞程序死亡缀合物可以是一种嵌合肽, 其中

肿瘤归巢分子是肿瘤归巢肽。本发明的归巢促细胞程序死亡嵌合肽可以具有各种长度，从大约 18 个氨基酸至大约 50 个氨基酸或更多。本发明的嵌合肽可以例如具有大约 20—50 个氨基酸，优选 20—40 个氨基酸，更优选 20—30 个氨基酸。这种嵌合肽可以例如具有最多 40, 35, 30, 27, 25 或 21 个氨基酸。本发明的嵌合肽可以是线性的或环状的。在一个优选的实施方案中，本发明的归巢促细胞程序死亡嵌合肽包括一种环状的肿瘤归巢肽部分。

本发明的归巢促细胞程序死亡嵌合肽也可以是肽模拟物。本文所用术语“肽模拟物”广泛用于指一种类肽分子，其基本具有相应肽的活性。肽模拟物包括化学修饰的肽，含有非天然发生的氨基酸的类肽分子等，具有从中衍生肽模拟物的肽的选择性归巢活性和高毒性（见例如 Burger's, 医用化学和药物揭示，第 5 版，1—3 卷（ed. M. E. Wolff ; Wiley Interscience 1995），将其在此并入参考）。例如，在本发明的嵌合肽的抗微生物肽部分内包含 D 氨基酸可以是有利的（见实施例 1 和 2 所述）。肽模拟物提供了各种比所述肽更好的优点，包括在通过消化管期间稳定性提高，并因此可利于用作口服治疗剂。

在本发明的归巢促细胞程序死亡缀合物中，“偶联结构域”可以用于连接肿瘤归巢肽和抗微生物肽，并可以例如使完整缀合物具有机动性。偶联结构域可以是例如甘氨酸—甘氨酸接头，丙氨酸—丙氨酸接头，或其它掺入甘氨酸，丙氨酸或其它氨基酸的接头。甘氨酸—甘氨酸偶联结构域的使用见实施例 2 所述。

肿瘤内的血管通常经过激活血管生成，导致新血管持续形成以支持肿瘤生长。这种血管生成性血管与成熟的血管不同，血管生成性血管表现为独特的内皮细胞表面标记，包括 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白 (Brooks, 细胞 79 : 1157-1164 (1994); WO 95/14714, Int. Filing Date November 22, 1994)和血管生成生长因子的受体(Mustonen 和 Alitalo, 细胞生物学杂志 129 : 895-898 (1995); Lappi, Semin.癌症生物学 6 : 279-288

(1995))。另外，肿瘤血管与其它血管从组织学方面可以区别，肿瘤血管是有孔的 (Folkman, 自然医学 1 : 27-31 (1995); Rak 等, 抗癌药物 6 : 3-18 (1995))。因此，肿瘤血管的独特性质使其成为对抗癌治疗剂特别有吸引力的靶。

如本发明所揭示，肿瘤归巢分子可以结合肿瘤小血管的内皮细胞系。肿瘤内的血管是独特的，据推测由于持续的新血管化，形成肿瘤生长所需的新血管。肿瘤内血管生成性新血管的独特性质是通过内皮细胞及周围细胞内存在特殊标记而反映出来的(Folkman, 自然生物技术 15 : 510 (1997); Risau, FASEB 杂志 9 : 926-933 (1995); Brooks 等, 如前, 1994); 这些标记很可能被所揭示的肿瘤归巢分子所定向。

肿瘤归巢分子定向肿瘤内血管的能力，为全身治疗肿瘤或直接定向肿瘤细胞的治疗方法提供了有益的帮助。例如，肿瘤细胞基于血管供养而存活，及血管的内皮细胞系易于进行循环探查。相反，为到达固体肿瘤细胞，治疗剂必须克服潜在的远距离扩散，紧密包裹肿瘤细胞，以及具有高间质压力阻止溢出的密集纤维基质 (Burrows and Thorpe, Pharmacol. Ther. 64 : 155-174 (1994))。

另外，当定向于肿瘤血管时，可以不需要杀死全部的靶细胞，因为内皮的部分裸露可导致阻塞性血栓形成，阻止血液流向全部的肿瘤血管(Burrows 和 Thorpe, 如前, 1994)。另外，与直接定向肿瘤不同，在肿瘤血管定向中存在一个固有的扩增机制。一条单一的毛细管可供养最多 100 个肿瘤细胞，每个细胞均是主要依赖于血液供养 (Denekamp, Cancer Metast. Rev. 9 : 267-282 (1990); Folkman, 如前, 1997)。

如上所述及在此所例证的，选择性归巢肿瘤血管的血管生成性内皮细胞的肿瘤归巢分子，可以特别用于将促细胞程序死亡抗微生物肽定向于肿瘤血管，同时降低促细胞程序死亡抗微生物肽对正常

的健康器官或组织具有毒性作用的可能性。因此，在一个实施方案中，本发明提供了一种归巢促细胞程序死亡缀合物，其包括与抗微生物肽连接的一种选择性归巢血管生成性内皮细胞的肿瘤归巢分子，缀合物被血管生成性内皮细胞选择性内在化，并呈现对其具有高毒性，而当抗微生物肽不与肿瘤归巢分子连接时，其对哺乳动物归巢的毒性较低。

如本文所用术语“选择性毒性”是指与导致的细胞或组织相比，在所选择的细胞或组织中细胞死亡增强。通常地，选择性毒性特征在于与对照的细胞或组织如抑制血管发生（angiostatic）的内皮细胞相比，在选择的细胞或组织如血管生成性内皮细胞中，细胞死亡程度高至少两倍。因此如本文所用术语选择性毒性涵盖了比毒性，从而细胞死亡基本只发生在所选择的细胞或组织中，以及毒性只针对除了选择的细胞或组织之外限量的细胞或组织。本领域技术人员进一步了解术语选择性毒性指通过所有机制包括细胞程序死亡和坏死性细胞死亡所引起的细胞死亡。因此，对血管生成性内皮细胞呈现选择性毒性的本发明归巢促细胞程序死亡缀合物，相比之下可以增强血管生成内皮细胞死亡而非增强抑制血管发生的内皮细胞或周围的其它细胞死亡。

如本发明所揭示，鉴别的肿瘤归巢分子用于将与归巢分子连接的所需的抗微生物肽定向于选择的细胞类型如血管生成性内皮细胞。在被肿瘤血管中的血管生成性内皮细胞内在化之后，抗微生物肽对内皮细胞具有毒性，从而限制肿瘤的血供并抑制肿瘤生长。

用于本发明归巢促细胞程序死亡缀合物中的肿瘤归巢分子，可以是一种肽，其含有例如 NGR 基序如 CNGRC (SEQ ID NO : 8) ; NGRAHA (SEQ ID NO : 6)或 CNGRCVSGCAGRC (SEQ ID NO : 3)。用于本发明中的肿瘤归巢分子还可以含有 RGD 基序并可以是例如 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1)或可以含有 GSL 基序如肽 CGSLVRC

(SEQ ID NO : 5)。其它肿瘤归巢分子可以通过在体内淘选经筛选分子文库而鉴别，如以下详细阐述（也见于实施例 4—8 所述；1997 年 4 月 22 日发布的美国专利 No.5622699；及 Pasqualini 和 Ruoslahti, 自然 380 : 364-366 (1996) 所述，在此均将其并入参考）。

本文所用术语“肿瘤归巢分子”是指一种有机化合物如药物；一种核酸分子；一种肽或肽模拟物或蛋白质，其在体内选择性归巢于所选择的细胞或组织。“选择性归巢”是指在体内肿瘤归巢分子优先结合选择的细胞或组织，而不是对照细胞，组织或器官，而且通常特征在于在选择的细胞或组织处的定位比对照细胞或组织高至少两倍。用于本发明的肿瘤归巢分子可以例如是一种分子，其优先结合血管生成性内皮细胞而不是其它细胞或抑制血管发生的血管内皮细胞。

肿瘤归巢分子是使用如下所述体内淘选方法鉴别的。通过抗乳腺癌，黑素瘤和 Kaposi's 肉瘤的体内淘选，鉴别表达选择性归巢肿瘤的各种肽的噬菌体（分别见表 2, 3 和 4）。由于噬菌体的规格大 (900-1000 nm) 及循环时间短 (3—5 min)，因此不太可能将噬菌体从循环系统，尤其在脑和肾脏中除去。组织染色研究表明主要归巢并结合内皮细胞表面标记的肿瘤归巢分子，其可能以器官特异性方式表达。这些结果表明体内淘选可以用于鉴别和分析内皮细胞特异性。这种分析不可能使用培养的内皮细胞，因为培养的细胞趋于丧失其组织特异性差异 (Pauli 和 Lee, 实验研究 58 : 379-387 (1988))。

尽管在进行体内淘选的条件下鉴别肿瘤归巢肽通常结合内皮细胞标记，但在肿瘤实质尤其在施用所述肽之后的稍后的时间，也观测到特异的存在表达肿瘤归巢肽的噬菌体（实施例 7）。这些结果表明表达所述肽的噬菌体可以经过肿瘤中的血管，这可能是由于血管的有孔性质所致的，并表明体内淘选方法可以用于鉴别由肿瘤细胞表达的靶分子，以及由内皮细胞表达的靶分子。

基本如 Smith 和 Scott 所述构建噬菌体肽展示文库（如前，1993；也见于 Koivunen 等，生物技术学 13：265-270 (1995)；Koivunen 等，酶学方法 245：346-369 (1994b)，在此均将其并入参考）。编码基本具有随机氨基酸序列的肽的寡核苷酸是基于“NNK”密码子合成的，其中 N 是 A，T，C 或 G，K 是 G 或 T。“NNK”编码 32 个三链体，其编码 20 个氨基酸和一个琥珀终止密码子 (Scott 和 Smith 如前，1990)。在一些文库中，每个寡核苷酸中包含至少一个编码半胱氨酸密码子，以可以通过二硫键形成环肽（实施例 4）。将此寡核苷酸插入载体，与编码基因 III (gIII) 蛋白的序列同框，由此表达肽-gIII 融合蛋白。在表达之后，融合蛋白在含有载体的噬菌体表面表达 (Koivunen 等，如前，1994b；Smith 和 Scott，如前，1993)。

在体内淘选之后，基于其选择性归巢人乳腺癌，小鼠黑素瘤或人 Kaposi's 肉瘤的能力分离的噬菌体，展示只有少量不同的肽序列（分别见表 2，3 和 4）。一种筛选揭示了含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 整联蛋白识别序列的肽序列 (Ruoslahti, Ann. Rev. Cell Devel. Biol. 12：697 (1996))，一种预先证实选择性结合含有 α_v 的整联蛋白的肽 (Koivunen 等，如前，1995；WO 95/14714)。大多数剩余的肿瘤归巢肽的序列不显示与内皮细胞受体的已知配体有任何明显的相似性。然而有一种肿瘤归巢肽含有天冬酰胺-甘氨酸-精氨酸 (NGR) 基序，其是弱整联蛋白结合基序，类似于整联蛋白结合肽中存在的基序 (Ruoslahti 等，1996 年 7 月 16 日公布的美国专利 N0.5536814，在此并入参考；也见于 Koivunen 等，如前，1994a)。其它筛选已经揭示了许多含有 NGR 的肽（见表 2）。尽管 NGR 肽结合整联蛋白的能力较弱，整联蛋白受体可以不是由在此例证的 NGR 肿瘤归巢肽识别的靶分子。所用术语“整联蛋白”是指一种异源二聚体细胞表面粘着受体。

由噬菌体表达的归巢乳腺癌的肽包括肽 CGRECPRLCQSSC

(SEQ ID NO : 2)和 CNGRCVSGCAGRC (SEQ ID NO : 3; 见表 2; 实施例 4)。相似的, 肿瘤归巢肽, 包括肽 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1) 和 CGSLVRC (SEQ ID NO : 5), 是从施用于携带乳腺癌的小鼠的两个其它噬菌体文库中鉴别的 (表 2)。这些基序中有一些基序以及新的基序, 也是通过筛选抗小鼠黑素瘤和人 Kaposi's 肉瘤而分离的 (见表 3 和 4)。这些经过表明肿瘤归巢分子可以使用体内淘选方法鉴别。

鉴别的三个归巢肿瘤基序可以特别用于本发明的归巢促细胞程序死亡缀合物中。其中肿瘤归巢分子部分含有 NGR 基序, RGD 基序或 GSL 基序的归巢促细胞程序死亡缀合物可以用于将连接的抗微生物肽定向于血管生成性血管内皮细胞。

在一个实施方案中, 本发明提供了一种归巢促细胞程序死亡缀合物, 其包括一种含有 NGR 序列的肿瘤归巢肽, 其连接于一种抗微生物肽。在本发明的这种归巢促细胞程序死亡缀合物中, 肿瘤归巢肽可以是例如 CNGRC (SEQ ID NO : 8); NGRAHA (SEQ ID NO : 6) 或 CNGRCVSGCAGRC (SEQ ID NO : 3)。在一个优选的实施方案中, 归巢促细胞程序死亡缀合物包括序列 CNGRC-GG-_D(KLAKLAK)₂。

在另一个实施方案中, 本发明提供了一种归巢促细胞程序死亡缀合物, 其包括一种含有 RGD 序列的肿瘤归巢肽, 其连接于一种抗微生物肽。在这种归巢促细胞程序死亡缀合物中, 肿瘤归巢肽可以是例如 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1)。在一个优选的实施方案中, 归巢促细胞程序死亡缀合物包括序列 ACDCRGDCFC-GG-_D(KLAKLAK)₂。

本发明另外提供了一种归巢促细胞程序死亡缀合物, 其包括一种含有 GSL 序列的肿瘤归巢肽, 其连接于一种抗微生物肽。在这种归巢促细胞程序死亡缀合物中, 肿瘤归巢肽可以是例如 CGSLVRC (SEQ ID NO : 5)。

如上所述, 一个基序含有包埋于肽结构 CDCRGDCFC (SEQ ID

NO : 1)中的 RGD 序列(Ruoslahti, 如前, 1996), 已知其选择性结合 α_v 整联蛋白(Koivunen 等, 如前, 1995; WO 95/14714)。由于 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白均是血管生成性血管的标记物(Brooks 等, 如前, 1994; Friedlander 等, 科学 270 : 1500 (1995)), 对表达肽 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1)的噬菌体检测定向肿瘤情况, 如本发明所揭示, 其以高选择性方式归巢肿瘤(见实施例 6)。另外, 由 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1) 噬菌体进行的归巢, 通过联合施用游离 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1)肽而抑制。

另一种归巢乳腺肿瘤的肽具有序列 CNGRCVSGCAGRC (SEQ ID NO : 3), 其含有预先已知具有弱整联蛋白结合活性的 NGR 基序(Koivunen 等, 生物化学杂志 268 : 20205-20210 (1993) ; Koivunen 等, 如前, 1994a ; WO 95/14714)。由于鉴别了一种含有 NGR 的肽, 对两种均含有 NGR 基序的其它肽, 线性肽 NGRAHA (SEQ ID NO : 6) 和环状肽 CVLNGRMEC (SEQ ID NO : 7) 进行检测其归巢肿瘤情况。与表达 CNGRCVSGCAGRC (SEQ ID NO : 3)的噬菌体一样, 表达 NGRAHA (SEQ ID NO : 6)或 CVLNGRMEC (SEQ ID NO : 7)的噬菌体归巢肿瘤。另外, 归巢肿瘤不是依赖于肿瘤类型或物种, 因为噬菌体选择性积聚在人乳腺癌以及携带小鼠黑素瘤的小鼠和携带人 Kaposi's 肉瘤异种移植体的小鼠的肿瘤中。

有许多肽包括含有 RGD 和 NGR 的肽, 结合肿瘤血管。最小的环状 NGR 肽 CNGRC (SEQ ID NO : 8)是基于 CNGRCVSGCAGRC (SEQ ID NO : 3)序列合成的。当 CNGRC (SEQ ID NO : 8) 肽与表达 CNGRCVSGCAGRC (SEQ ID NO : 3), NGRAHA (SEQ ID NO : 6) 或 CVLNGRMEC (SEQ ID NO : 7)的噬菌体共同注射时, 噬菌体在乳腺癌异种移植体中的积聚受抑制。然而, 甚至当以比抑制 NGR 噬菌体归巢的剂量高 10 倍的数量施用时, CNGRC (SEQ ID NO : 8) 肽也不抑制表达 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1)肽的噬菌体的归巢。相比之

下, CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1)肽部分抑制 NGR 噬菌体的归巢, 虽然需要的数量是 CNGRC (SEQ ID NO : 8)肽的 5—10 倍。这些结果表明 NGR 肽和 RGD 肽在肿瘤血管中结合不同的受体位点。

第三种基序 GSL (甘氨酸—丝氨酸—亮氨酸), 也是在对携带乳腺癌, 恶性黑素瘤或 Kaposi's 肉瘤的小鼠中进行体内淘选后鉴别的。表达 GSL 肽 CGSLVRC (SEQ ID NO : 5)的噬菌体的归巢, 通过共同施用游离 CGSLVRC (SEQ ID NO : 5)肽而受到抑制。与 RGD 和 NGR 肽一样, 表达 GSL 肽的噬菌体也结合肿瘤血管。鉴于存在于肿瘤归巢肽中的保守的 RGD, NGR 和 GSL 基序的鉴别, 应意识到含有这些基序的肽可以用作肿瘤归巢肽, 并特别可以形成归巢促细胞程序死亡缀合物, 其可以选择性将抗微生物肽输送至肿瘤。

构建含有最多 13 个氨基酸的各种肽文库, 通过在体内淘选抗乳腺癌肿瘤肽而获得 NGR 肽 CNGRCVSGCAGRC (SEQ ID NO : 3)。通过筛选一个随机肽文库获得的这种 NGR 肽, 是一种肿瘤归巢肽。另外, 当基于通式 CXXXNGRXX (SEQ ID NO : 13) 或 CXXCNGRCX (SEQ ID NO : 14)构建肽文库, 且所述序列均有偏于 NGR 序列, 并用于体内淘选抗乳腺癌肿瘤时, 可以获得许多 NGR 肽 (见表 2)。

这些结果表明本发明的肿瘤归巢分子可以包含 RGD 或 NGR 或 GSL 氨基酸序列。这种肿瘤归巢分子可以是小如 5 个氨基酸的肽如 CNGRC (SEQ ID NO : 8)。这种肿瘤归巢肽的长度可以不仅是至少 13 个氨基酸, 这是所列举的最大的肽, 但也可以是达到所需的 20 个氨基酸, 或 30 个氨基酸, 或 50—100 个氨基酸。本发明的肿瘤归巢肽通常是通过常规合成方法产生的。

通过使噬菌体循环大约 4 分钟, 随后通过心脏灌注到小鼠体内, 对比组织染色, 或在注射噬菌体后 24 小时分析组织, 进行免疫组织化学分析。在施用 24 小时后, 在循环中基本没有噬菌体残留, 并因此不需灌注(Pasqualini 等, 如前, 1997)。在肿瘤血管中观测到明显

的噬菌体染色，但在正常内皮细胞中，在施用 CNGRCVSGCAGRC (SEQ ID NO : 3) 噬菌体后 4 分钟检测的样品中（实施例 7），没有染色。相比之下，肿瘤染色在 24 小时很明显，并表现为从血管之外播散到肿瘤实质内。NGRAHA (SEQ ID NO : 6)和 CVLNGRMEC (SEQ ID NO : 7) 噬菌体示出相似的染色模式（实施例 7）。相反，对照器官和组织示出很少的或没有免疫染色，证实 NGR 基序对肿瘤血管的特异性。然而，脾和肝正如所预期那样捕获噬菌体，因为被网状内皮组织系统吸收是噬菌体颗粒的通性，不依赖于由噬菌体表达的肽存在与否（Pasqualini 等，如前，1997）。

在施用表达含有 GSL 基序的肽 CLSGSLSC (SEQ ID NO : 4)的噬菌体后，也可以观测到免疫染色，而且与 NGR 肽一样，在这种情况下定位于黑素瘤内的血管（见以下所述；也见于实施例 7 和 8 所述）。相似的，在将表达含有 RGD 基序的肽 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1)的噬菌体施用于携带乳腺肿瘤的小鼠后，免疫染色定位于肿瘤内的血管，但在脑，肾或各种其它非肿瘤组织中未观测到染色（见实施例 6 和 7；也见于 Pasqualini 等，如前，1997）。这些结果表明各种肿瘤归巢肽通常归巢于肿瘤的血管。

体内淘选方法在鉴别肿瘤归巢分子中的普遍适应性，是通过将表达不同群体肽的噬菌体注射至携带同系黑素瘤的小鼠而加以检测（实施例 8）。为进行这些研究选择 B16 小鼠黑素瘤模型，因为这样的肿瘤是高血管化的，而且这种肿瘤细胞系的生物学特点已经充分定性。（见 Miner 等，癌症研究 42 : 4631-4638 (1982)）。另外，由于 B16 黑素瘤细胞是来源于小鼠的，因此与在正常器官中的分布相比，在宿主和肿瘤归巢供体之间的种属差异不影响例如噬菌体在肿瘤中的分布。如本发明所述，揭示肿瘤归巢肽，包括例如含有 GSL 基序的肽的体内抗 B16 黑素瘤细胞的淘选，及施用抗噬菌体抗体对肿瘤和其它器官进行的免疫染色表明，表达 CLSGSLSC (SEQ ID NO : 4)

的噬菌体在黑素瘤中产生免疫染色，但在皮肤，肾或其它对照器官中基本无染色（实施例 8）。染色模式通常在黑素瘤内的血管，但非只限于血管。

尽管在小鼠中进行了体内淘选，但肿瘤归巢分子如包含 NGR, RGD 或 GSL 基序的肽也似乎可以定向人体血管。NGR 噬菌体结合移植的人乳腺肿瘤中的血管，但不结合正常组织中的血管，表明这个基序可以特别用于定向患者体内的肿瘤。CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1) 肽结合人 α_v 整联蛋白(Koivunen 等, 如前, 1995), 其选择性在患者的肿瘤血管中表达(Max 等, *Int. J. Cancer* 71 : 320 (1997); Max et al., *Int. J. Cancer* 72 : 706 (1997))。使用其中 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1) 连接于抗微生物肽的归巢促细胞程序死亡缀合物, 提供了另外的优势, 即由于乳腺癌细胞例如可以表达 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白, 抗微生物肽可以自身定向于肿瘤细胞(Pasqualini 等, 如前, 1997)。事实上, 许多人体肿瘤表达这种整联蛋白, 其可以参与一些肿瘤如恶性黑素瘤的进展 (Albelda 等, *癌症研究* 50 : 6757-6764 (1990) ; Danen 等, *Int. J. Cancer* 61 : 491-496 (1995); Felding-Habermann 等, *J. Clin. Invest.* 89 : 2018-2022 (1992) ; Sanders 等, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 58 : 233-240 (1992) ; Mitjans 等, *J. Cell. Sci.*108 : 3067-3078 (1995))。与 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1) 肽不同, NGR 肽表现为不结合 MDA-MD-435 乳腺癌细胞。然而, NGR 肽能将治疗有效量的阿霉素输送于乳腺肿瘤, 表示即使肿瘤归巢分子只归巢肿瘤血管, 即不直接归巢肿瘤细胞, 这种血管定向已经足以赋予与分子连接的基序的作用。

由于 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白是由血管生成性血管的内皮细胞表达的, 因此进行实验以确定经历血管发生的肿瘤血管是否可以在体内使用所述方法定向。将表达已知结合 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白的肽 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1 ; 见 Koivunen 等, 如前, 1995)的噬菌体, 注射入携带肿

瘤的小鼠体内，小鼠携带的肿瘤是从人体乳腺癌细胞，小鼠黑素瘤细胞或人 Kaposi's 肉瘤细胞中形成的（见实施例 7）。CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1)噬菌体选择性归巢每种肿瘤，而这种归巢用对照噬菌体不发生。例如，在携带通过移植人乳腺癌细胞而形成的肿瘤的小鼠中，与未选择的对照噬菌体相对比，CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1)噬菌体在肿瘤中积聚 20—80 倍。

噬菌体的组织染色示出 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1)噬菌体在肿瘤内的血管中积聚，而在脑，肾或其它对照器官中未观测到染色。CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1) 噬菌体的归巢特异性，可以通过竞争实验证实，其中，联合注射游离 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1)肽明显降低 RGD 噬菌体的肿瘤归巢，而联合注射不含有 RGD 的对照肽，对 RGD 噬菌体的归巢没有作用（见实施例 6）。这些结果表明 $\alpha_v\beta_3$ 定向分子是在肿瘤血管内皮细胞的腔表面上表达，而且结合含有 α_v 的整联蛋白的肽可以选择性结合这个整联蛋白，并因此选择性结合经过血管发生的血管。

这些研究结果表明肿瘤归巢分子可以通过体内淘选鉴别，而且在一些情况中，肿瘤归巢分子可以归巢肿瘤中的血管组织以及肿瘤实质，可能是由于血管上有孔使噬菌体易于从循环系统中透出。由于这种肿瘤归巢分子的归巢肿瘤的能力，这种分子用于将连接的抗微生物肽定向于肿瘤。因此，本发明提供了一种缀合物，这种缀合物包含与一种基序连接的一种肿瘤归巢分子，可以用于将所述基序定向于肿瘤细胞。

分子归巢于一种特殊的肿瘤以选择性归巢另一种相同或相似组织学类型的肿瘤的能力，可以使用例如在裸鼠中生长的人体肿瘤或生长于同系小鼠中的小鼠肿瘤进行实验测定。例如，各种人乳腺癌细胞系，包括 MDA-MB-435 乳腺癌(Price 等，癌症研究 50 : 717-721 (1990))，SKBR-1-II 和 SK-BR-3 (Fogh 等，J. Natl. Cancer Inst. 59 :

221-226 (1975)), 及小鼠乳腺肿瘤细胞系, 包括 EMT6 (Rosen 等, *Int. J. Cancer* 57 : 706-714 (1994)) 和 C3-L5 (Lala 和 Parhar, *Int. J. Cancer* 54 : 677-684 (1993)), 是易于获得的, 并通常用作人体乳腺癌的模型。使用这种乳腺肿瘤模型, 例如可以获得关于鉴别的乳腺肿瘤归巢分子多不同的乳腺肿瘤的特异性的信息, 而且可以鉴别归巢广泛的不同乳腺肿瘤的或提供最有利特异性的分子。另外, 这种分析可以产生新的信息, 例如关于肿瘤基质的信息, 因为基质细胞基因表达与内皮细胞一样, 可以通过肿瘤以不能再生的方式修饰。

分子如肽或蛋白质对肿瘤的选择性归巢, 可以归因于肽对肿瘤细胞是存在的特定细胞靶分子如细胞表面受体的特殊识别。细胞的选择性依赖于特定的靶分子, 所述分子只由一种或少量不同类型的细胞表达, 这样所述分子开始归巢于肿瘤。如上所述, 鉴别的肿瘤归巢肽, 至少部分可识别肿瘤血管内的内皮细胞表面标记。然而, 大多数细胞, 尤其与器官或组织不同的细胞, 可以表达不同的靶分子。因此, 体内淘选可以用于鉴别这样的分子, 其选择性归巢于特定类型的肿瘤细胞如乳腺癌细胞; 特异性归巢可以通过进行适当的竞争分析证实。

如本文所述术语“肿瘤”是指一种细胞团, 其特征在于至少部分含有血管生成性血管。所用术语“肿瘤”广泛性包括肿瘤实质细胞以及供养其的基质, 包括可以渗透肿瘤实质细胞团的血管生成性血管。尽管肿瘤通常是恶性肿瘤即“癌”, 但肿瘤也可以是非恶性肿瘤, 导致与肿瘤血管的新血管化。术语“正常的”或“非肿瘤”组织是指不是肿瘤的组织。如本文所揭示, 肿瘤归巢分子可以基于其归巢肿瘤而不归巢于相应的非肿瘤组织的能力加以鉴别。

本文所用术语“相应的”, 当用于指肿瘤或组织或二者时, 是指相同组织学类型的两或多个肿瘤, 或两或多个组织, 或肿瘤和组织。本领域技术人员意识到组织的组织学类型是细胞包括组织的一种功

能。因此，技术人员意识到例如相应于乳腺肿瘤的非肿瘤组织是正常组织，而相应于黑素瘤的非肿瘤组织是皮肤，其含有色素细胞。另外，针对本发明，应意识到肿瘤归巢分子可以特异性结合由肿瘤血管表达的靶分子，其通常含有经过新血管化的血管，在这种情况下，相应于肿瘤的一种组织包含非肿瘤组织，所述组织含有未经历激活血管生成的血管。

用于本发明的一种肿瘤归巢分子，可以通过体内淘选方法筛选一种分子文库而鉴别，如1997年4月22日公布的美国专利 No. 5, 622, 699 和 Pasqualini 和 Ruoslahti，自然 380 : 364-366 (1996)所述，意识文献均并入参考。本文所用术语“文库”普遍是指分子的集合。一个文库可以含有少量或大量不同的分子，从大约10个分子到几十亿个分子或更多。如果需要，分子可以连接于一个标记，这个标记可以易于回收或鉴别所述分子。

如本文所用术语“分子”普遍是指一种多聚或非多聚的有机化合物如药物；一种核酸分子如 RNA，cDNA 或寡核苷酸；一种肽，包括所述肽的变体或修饰的肽或类肽分子，在此称为肽模拟物，其模拟肽的活性；或一种蛋白质如一种抗体或一种生长因子受体或其片段如抗体的 Fv，Fd，或 Fab 片段，其含有一个结合结构域。为方便起见，术语“肽”在此是指肽，蛋白质，蛋白质片段等。分子也可以是非天然发生的分子，其不是在自然界中发生的，但可以通过体外方法产生的，或可以是天然发生的分子如从一个 cDNA 文库中表达的蛋白质或其片段。

肿瘤归巢分子也可以是一种肽模拟物。本文所用术语“肽模拟物”普遍是指一种类肽分子，其具有肿瘤归巢分子的结合活性。针对本发明的肿瘤归巢肽，肽模拟物，包括化学修饰的肽，含有非天然发生的氨基酸的类肽分子，peptoids 等，具有衍生肽模拟物的肿瘤归巢肽的结合活性（见例如 Burger's 医用化学和药物开发，如前，

1995)。本领域熟知鉴别肽模拟物的方法，包括例如筛选含有潜在的肽模拟物的文库。例如，Cambridge Structural Database 含有已知具有晶体结构的 300,000 个以上化合物 (Allen 等, *Acta Crystallogr. Section B*, 35 : 2331 (1979))。这个结构性数据库不断地被校正，因为新晶体结构不断测定，而且其可以筛选具有适当形状的化合物，例如与肿瘤归巢分子相同形状的化合物，以及潜在的与结合肿瘤归巢肽的靶分子在空间和化学结构互补的化合物。在不能获得肿瘤归巢肽或结合肿瘤归巢分子的靶分子的晶体结构之处，可以产生一种结构，使用例如 CONCORD 程序 (Rusinko 等, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 29 : 251 (1989))。另一种数据库 Available Chemicals Directory (Molecular Design Limited, Informations Systems ; San Leandro CA)，含有大约 100,000 种化合物，它们可以商购并也可以研究以鉴别潜在的肿瘤归巢肽的肽模拟物。

本领域熟知制备含有不同的各种类型分子如肽，类肽 (peptoids)，和肽模拟物的文库的方法，而且可以商购各种文库 (见例如 Ecker 和 Crooke, *生物技术* 13 : 351-360 (1995)，和 Blondelle 等 *Trends Anal. Chem.* 14 : 83-92 (1995)；也见于 Goodman 和 Ro, 设计药物的肽模拟物, *Burger's 医用化学和药物开发*, 第一卷 (M. E. Wolff 编辑; John Wiley & Sons 1995), p803-861 和 Gordon 等 *J. Med. Chem.* 37 : 1385-1401 (1994)；以上所述文献均并入参考)。在分子是肽，蛋白质或其片段之处，所述分子可以在体外直接产生，或可以从可以在体外产生的核酸中表达。本领域熟知合成肽和核酸的化学方法。

分子的文库也可以这样产生，例如从收集自细胞，组织，器官或相应有机体的 mRNA 中构建一个 cDNA 表达文库。本领域熟知产生这种文库的方法 (见例如 Sambrook 等, *分子克隆实验手册* (冷泉港实验室出版社出版社 1989)，在此将其并入参考)。优选地，由所述 cDNA 编码的肽是在含有所述 cDNA 的细胞或病毒表面表达的。

例如，可以将 cDNA 克隆入一种噬菌体载体如 fuse 5 (实施例 4) 中，其中基于表达，编码的肽以融合蛋白形式在噬菌体表面表达。另外，分子的文库可以包含核酸分子的文库，其可以是 DNA 或 RNA 或其类似物。核酸分子结合例如细胞表面受体是熟知的（见例如 O'Connell 等，美国科学院院报 93 : 5883-5887 (1996)；Tuerk 和 Gold 科学 249 : 505-510 (1990)；Gold 等，Ann. Rev. Biochem. 64 : 763-797 (1995)；以上文献在此均并入参考）。因此，可以将核酸分子文库施用于患有肿瘤的治疗个体，并随后通过体内淘选鉴别肿瘤归巢分子。如果需要，所述核酸分子可以是核酸类似物，例如是对核酸酶攻击的敏感性较低的核酸(见例如 Jelinek 等，生物化学 34 : 11363-11372 (1995)；Latham 等，核酸研究 22 : 2817-2822 (1994)；Tam 等，核酸研究 22 : 977-986 (1994)；Reed 等，癌症研究 59 : 6565-6570 (1990)，以上文献均并入参考)。

如本发明所述，体内淘选可以用于鉴别一种肿瘤归巢分子，其可以连接于抗微生物肽以形成本发明的归巢促细胞程序死亡肽。体内淘选包含将一种文库施用于治疗个体，收集肿瘤样品并鉴别肿瘤归巢分子。肿瘤归巢分子可以用本领域熟知的各种方法鉴别。通常地，肿瘤中存在肿瘤归巢分子是基于文库中分子共有的一或多种特性，然后鉴别特定的肿瘤归巢分子的结构。例如，一种高灵敏检测方法如质谱法，单独使用或组合如气相层析这种方法，可以用于鉴别肿瘤中肿瘤归巢分子。因此，在文库包含通常基于有机分子如药物的结构而不同的分子之处，肿瘤归巢分子可以通过确定特定分子存在的亲代峰值而鉴别。

如果需要，可以收集肿瘤，然后使用如 HPLC 这样的方法加工，依赖于例如文库中包含的分子的共性，可以使一种组分富集在具有限定范围分子量或极性或非极性特性的分子中。进行 HPLC 的条件依赖于特定分子的化学性，而且这已经为本领域技术人员所熟知。

相似地，本领域熟知大批除去潜在的干扰细胞原料如 DNA，RNA，蛋白质，脂质或碳水化合物的方法，可以是使用例如选择性提取方法富集含有一种有机分子的组分。在文库包含一群不同的有机化学分子之处，每种分子均连接特异的寡核苷酸标记，这样特异的分子可以通过使用聚合酶链反应（PCR）确定寡核苷酸的序列而加以鉴别，从收集的肿瘤样品中除去基因组 DNA，以降低背景 PCR 的潜力。另外，文库可以包含一群不同的分子，如有机化合物分子，其均连于一种普通的共有标记。基于共有标记的存在和性质，从肿瘤样品中可以基本分离出选择性归巢肿瘤的文库分子。这些及其它方法可以用于富集针对特定的肿瘤归巢分子收集的肿瘤样品，从而从收集的肿瘤样品中除去潜在的污染物，并提高检测分子的敏感性。

在此提供的迹象表明在体内淘选期间有足够量的肿瘤归巢分子选择性归巢肿瘤，这样可以易于鉴别所述分子。例如，在肿瘤中鉴别表达相同肽的各种独立的噬菌体，所述肿瘤是从移植的人体乳腺癌细胞（表 2），小鼠黑素瘤细胞（表 3）或人 Kaposi's 肉瘤细胞（表 4）中形成的。

尽管鉴别的肿瘤归巢分子的一个基本组分具有相同的结构，但只测定了少数分离的噬菌体的肽插入体。然而应意识到在对归巢器官的分子进行体内淘选后，已经回收了成百上千个至数百万个表达归巢血管肽的分子（见例如美国专利 No. 5, 622, 699；Pasqualini 和 Ruoslahti，如前，1996）。这些结果表明在体内归巢后，在肿瘤中存在一定数量的特异性肿瘤归巢分子，从而提高了鉴别所述分子的便利性。

鉴别肿瘤归巢分子，尤其未标记的分子的便利性，依赖于各种因素，包括存在潜在的污染背景细胞物。因此，在肿瘤归巢分子是一种未标记的肽的情况下，必须有大量分子归巢肿瘤，以鉴别抗细胞蛋白背景的特异性肽。相反，少量未标记的有机化合物归巢分子

如药物是可以鉴别的，因为这种分子在机体内通常没有或只有少量。在这种情况下，可以使用高灵敏方法如质谱法鉴别肿瘤归巢分子。技术人员意识到鉴别分子的方法部分依赖于特定分子的化学性。

在肿瘤归巢分子是一种核酸分子或是用一种核酸分子标记的情况下，一种分析如 PCR 可以特别用于鉴别所述分子的存在，因为原则上 PCR 可以检测一个单一核酸分子的存在（见例如 Erlich, PCR 技术原理和用于 DNA 扩增(Stockton 出版社 1989)在此将其并入参考)。初步研究表明在将 10ng 大约 600bp 质粒经静脉内注射入小鼠并使其循环 2 分钟后，通过 PCR 在肺组织样品中可以检测到所述质粒。这些结果表明当施用于循环系统中时，所述核酸分子是足够稳定的，这样体内淘选可以用于鉴别选择性归巢肿瘤的核酸分子。

对文库分子可以进行标记，这样可易于回收或鉴别所述分子。如本文所用术语“标记”是指一种物理的，化学的或生物学组分，如分别是一种塑料微珠，一种寡核苷酸或一种噬菌体，其连接于一种文库分子。本领域熟知标记分子的方法（Hermanson, 生物缀合技术(科学出版社, 1996), 在此将其并入参考)。

一种标记，可以是共有标记或特异性标记，可以用于鉴别归巢肿瘤的文库分子的存在和结构。如本文所用术语“共有标记”是指文库中每个分子均共有的一种物理的，化学的或生物学组分。生物素，例如可以是一种共有标记，其连接文库中的每个分子。共有标记可以用于鉴别样品中文库分子的存在与否，并还可以用于从样品中基本分离所述分子。例如，在共有标记是生物素的情况下，文库中生物素标记的分子可以通过与链亲和素结合而基本分离，或者其存在可以通过与标记的链亲和素结合加以鉴别。在文库是一种噬菌体展示文库的情况下，表达肽的噬菌体是另一种共有标记，因为每个文库肽均连接于噬菌体。另外，肽如血凝素抗原可以是一种共有标记，其连接于文库中的每个分子，从而可以使用血凝素抗原特异

性抗体，以从选择的肿瘤样品中基本分离文库分子。

共有标记也可以是一种核酸序列，其可以用于鉴别样品中文库分子的存在与否，或从样品中鉴别分离文库分子。例如，每种文库分子均可以连接于同样的选择的核苷酸序列，所述核苷酸序列组成共有标记。然后，一种含有互补于共有标记的核苷酸序列的亲合柱，可以用于杂交含有共有标记的文库分子，这样从肿瘤样品中基本分离所述分子。互补于共有核苷酸序列标记的一部分的核苷酸序列，也可以用作 PCR 引物，这样可以通过 PCR 鉴别样品中是否存在含有共有标记的分子。

标记也可以是一种特异性标记。如本文所用术语“特异性标记”是指一种物理的，化学的或生物学标记，其连接于文库中特定的分子，而且是特定分子所特有的。如果一种特异性标记是可易于鉴别的，则是特别适用的。对文库的一种特定分子而言是唯一的一种核苷酸序列，例如是一种特异性标记。例如，合成用独特的核苷酸序列标记的肽的方法，提供了一个分子文库，文库分子均含有一种特异性标记，这样基于确定核苷酸序列，可以认识到肽的相同性(见 Brenner 和 Lerner, 美国科学院院报 89 : 5381-5383 (1992)在此并入参考)。使用一种核苷酸序列作为肽或其它类型分子的特异性标记，提供了一种鉴别样品中是否存在所述分子的简便方法，因为可以使用一种非常灵敏的方法如 PCR 方法确定特异性标记的核苷酸序列，从而鉴别与特异性标记连接的分子的序列。相似地，编码在噬菌体上表达的肽的核酸序列，例如是另一种 特异性标记，因为对特异性标记进行测序可以鉴别表达的肽的氨基酸序列。

存在共有标记或特异性标记可以提供一种在体内淘选后鉴别或回收肿瘤归巢分子的方法。另外，组合共有标记和特异性标记尤其可以用于鉴别肿瘤归巢分子。例如，可以制备一个肽文库，使每个肽均连接于一个特异性核苷酸序列标记（见例如 Brenner 和 Lerner，

如前, 1992), 其中每个特异性核苷酸序列标记已经掺入一个共有标记如生物素中。在归巢肿瘤时, 特定的肿瘤归巢肽可以基于共有标记从肿瘤样品中基本分离, 特异性肽可以基于特异性标记例如通过PCR 鉴别(见 Erlich, 如前, 1989)。

标记也可以作为一种支持物。如本文所用术语“支持物”是指一种标记, 其具有分子可以附着的限定表面。通常地, 用作支持物的标记是一种共有标记。例如, 支持物可以是一种生物学标记如病毒或类病毒颗粒如噬菌体; 一种细菌如大肠杆菌; 或一种真核细胞如酵母, 昆虫或哺乳动物细胞; 或者可以是一种物理标记如脂质体或微珠, 其可以由塑料, 琼脂糖, 明胶或其它生物学或惰性材料。如果需要, 用作支持物的共有标记可以与特异性标记连接。因此, 例如可以认为一种噬菌体展示文库是由噬菌体和编码表达的肽的核酸序列组成, 所述噬菌体即是共有标记也是一种支持物, 所述核酸序列是一种特异性标记。

通常地, 支持物的最短直径应小于大约 10um—50um, 这样支持物可以相对不受妨碍地穿过所述个体的毛细管基膜, 而且不阻塞循环。另外, 支持物可以是非毒性的, 以不影响细胞表面分子的正常表达或所述个体的生理功能, 而且是可生物降解的, 尤其在未处死用于体内淘选的个体以收集选择的肿瘤的情况下。

在分子连接于支持物时, 标记的分子包含附着于支持物表面的分子, 这样可定位推测能与所述个体细胞中的靶分子相互作用的分子部分, 以能参与这种相互作用。例如, 在肿瘤归巢分子怀疑是生长因子受体的配体时, 定位附着于支持物的分子的结合部分, 因此其可以与肿瘤细胞上的生长因子受体相互作用。如果需要, 可以将一种适当的间隔分子定位在分子与支持物之间, 这样潜在的肿瘤归巢分子与靶分子的相互作用的能力不受影响。间隔分子也可以含有一种反应基团, 提供一种常规及有效地连接分子与支持物的方式,

并且如果需要，可以含有一种标记，其可以易于回收或鉴别所述分子（见 Hermanson 如前，1996）。

如本发明所例证，怀疑能归巢选择的肿瘤如乳腺癌或黑素瘤的肽，表达为融合蛋白的 N 末端，其中 C 末端由噬菌体包被蛋白组成。在表达融合蛋白时，C 末端的包被蛋白将融合蛋白与噬菌体表面连接起来，这样 N 末端肽定位于与肿瘤中靶分子相互作用的位置上。因此，具有共有标记的分子是通过将肽与噬菌体连接而形成的，其中所述噬菌体提供了一个生物学支持物，所述肽分子连接为融合蛋白，融合蛋白的噬菌体编码部分作为一种将分子，而且编码所述肽的核酸提供了一种特异性标记，可以鉴别肿瘤归巢肽。

如本文所用术语“体内淘选”，当涉及用于鉴别肿瘤归巢分子时，是指一种筛选文库的方法，通过将所述文库施用于一个个体，并鉴别选择性归巢个体体内肿瘤分子（见美国专利 No. 5, 622, 699）。术语“施用于个体”，当涉及一个分子文库或这个文库的一部分时，普遍是指将所述文库输送于个体体内肿瘤，所述个体通常是脊椎动物，特别是哺乳动物如人体。

文库可以这样施用于个体，例如通过将所述文库注射入循环系统中，这样所述分子穿经肿瘤；在经过适当的一段时间之后，通过将个体处死或除去肿瘤样品将循环终止（实施例 4；也见于美国专利 No. 5, 622, 699；Pasqualini 和 Ruoslahti，如前，1996）。或者，可以将一个套管插入个体的血管中，这样可以通过灌注适当的一段时间而施用文库，之后文库可以通过从循环中除去，或可以处死个体以收集肿瘤，或者将肿瘤制成样品，以终止循环。相似的，可以将文库通过不流经个体适当的血管，以避免经过一或几个器官包括肿瘤。应意识到文库也可以施用于一种分离的灌注的肿瘤。在分离的灌注的肿瘤中进行的这种淘选，可以有效地鉴别结合肿瘤分子，并且如果需要，可以用于初始筛选文库。

除了筛选噬菌体展示文库之外，体内淘选可以用于筛选各种其它类型的文库，包括例如 RNA 或 DNA 文库或化学制品文库。如果需要，可以将肿瘤归巢分子标记，这可以易于从肿瘤中回收所述分子，或鉴别肿瘤中所述分子。例如，在筛选一个有机分子文库时，所述文库中有机分子均含有共有标记，所述标记可以是一种组分如生物素，其可以直接连接于分子，或连接于含有所述分子的支持物。生物素提供了一种共有标记，用于从选择的肿瘤样品中使用亲和素或链亲和素亲和基质回收所述分子。另外，分子或含有分子的支持物可以连接于一种半抗原，如 4-乙氧基-亚甲基-2-苯基-2-咪唑-5-one (phOx)，其可以由连接于一个磁珠的抗 phOx 抗体结合，从而回收所述分子。本领域熟知纯化生物素或 phOx 苯基的缀合物的方法，而且进行这些步骤的材料是可以商购的（例如 Invitrogen, La Jolla CA; 和 Promega Corp., Madison WI)。在筛选噬菌体文库的情况中，可以使用如实施例 4 所述方法回收所述噬菌体。

体内淘选提供了一种直接鉴别肿瘤归巢分子的方法，所示分子可以选择性归巢肿瘤。如本文所用术语“归巢”或“选择性归巢”是指在施用于个体后，一种特定的分子相对特异性结合肿瘤中的靶分子。通常地，与对照器官或组织相比，肿瘤归巢分子的特征是部分表现为与肿瘤的特异性结合至少高两倍（2×）。应意识到，在一些情况中，分子可以非特异性定位于含有肿瘤的一个器官或组织。例如，体内淘选噬菌体展示文库可以在器官中产生高背景，如在肝和脾中，其含有网状内皮细胞组织系统（RES）的一个标志成分。因此，在肿瘤存在于例如肝脏中的情况下，归因于 RES 吸收的分子的非特异性结合可以使鉴别肿瘤归巢分子更加困难。

肿瘤归巢分子的选择性归巢，通过检测不同个体噬菌体的抗体归巢肿瘤能力的不同，可以与非特异性结合区分。例如，选择性归巢可以通过如下鉴别，将推定的归巢肿分子如在噬菌体上表达的

使用体内淘选鉴别肿瘤归巢分子在此加以了例证，通过在携带肿瘤的小鼠中筛选一种噬菌体肽展示文库，并鉴别选择性归巢乳腺肿瘤或黑素瘤的特异性肽（实施例 4）。然而，展示蛋白质受体分子的噬菌体文库，包括例如一种抗体或抗体的抗原结合片段如 Fv, Fd, 或 fAB 片段；或一种细胞粘着受体如一种整联蛋白或一种选择蛋白，也可以用于进行本发明。可以使用熟知的方法构建这种分子的变体，如随机诱变，位点直接诱变或基于密码子的诱变（见 Huse, 1993 年 11 月 23 日公布的美国专利 No. 5, 264, 563 所述，在此将其并入参考）。如果需要，可以在噬菌体表达后但在施用于个体之前，将肽进行化学修饰。因此，可以通过各种体内淘选筛选各种类型的噬菌体展示文库。噬菌体展示技术提供了一种表达不同种群的随机的或选择性随机肽的方法。本领域熟知噬菌体展示的各种方法和产生不同种群肽的方法。例如，Ladner 等（1993 年 6 月 29 日公布的美国专利 No. 5223409，在此并入参考）阐述了制备噬菌体表面上不同种群的结合结构域的方法。尤其 Ladner 等阐述了用于产生噬菌体展示文库的噬菌体载体，以及选择潜在的结合结构域及产生随机或选择性突变的结合结构域的方法。

相似地，Smith 和 Scott (酶学方法 217 : 228-257 (1993))；也见于 Scott 和 Smith, 科学 249 : 386-390 (1990), 在此均并入参考)阐述了产生噬菌体展示文库，包括载体的方法，以及使表达的肽种群多样化的方法（也见于 Huse, WO 91/07141 和 WO 91/07149, 在此均并入参考；也见于实施例 4）。当与例如基于密码子的诱变方法一起使用时，噬菌体展示技术可以是特别有力的，这可以用于产生随机肽或随机或所需有偏差的肽(Huse, 美国专利 No. 5, 264, 563, 如前, 1993)。这些或其它熟知方法可以用于产生一个噬菌体展示文库，其可以进行体内淘选以鉴别肿瘤归巢分子，用于本发明的归巢促细胞程序死亡缀合物中。

肽，与过量的非感染性噬菌体或大约 5 倍量的表达未选择的肽的噬菌体组合，将混合物注射入个体中，并收集肿瘤样品。在后一情况中，例如提供的表达肿瘤归巢肽的噬菌体的注射量非常低，对靶分子而言是不饱和的，测定到肿瘤中大约 20%以上的噬菌体表达推定的肿瘤归巢分子，这表明由噬菌体表达的肽是一种特异性肿瘤归巢分子。另外，非特异性定位与选择性归巢可以通过竞争实验加以区分，例如使用表达推定的肿瘤归巢肽的噬菌体组合过量的“游离”肽进行竞争实验（实施例 7）。

另外，可以使用各种方法防止分子与含有 RES 成分的器官非特异性结合。例如，一种选择性归巢含有 RES 成分的器官中肿瘤分子，可以通过首先封阻 RES 而获得，例如使用聚苯乙烯乳胶颗粒或葡聚糖硫酸酯封阻(见 Kalin 等, Nucl. Med. Biol. 20 : 171-174 (1993); Illum 等, 药物科学杂志 75 : 16-22 (1986); Takeya 等, 普通微生物学杂志 100 : 373-379 (1977), 在此均并入参考), 然后将所述文库施用于个体。例如, 预先施用葡聚糖硫酸酯 500 或聚苯乙烯微球体, 之后再施用测试物质, 用于封阻 Kupffer 细胞对测试物质的非特异性吸收, Kupffer 细胞是肝脏的 RES 成分(Illum 等, 如前, 1986)。相似的, RES 对制剂的非特异性吸收已经使用碳粒或硅石 (Takeya 等, 如前, 1977), 或明胶(Kalin 等, 如前, 1993)封阻。因此, 已知用于封阻 RES 的非特异性吸收的各种制剂并已经常规使用。

防止噬菌体与 RES 或其它位点的非特异性结合, 也可以例如通过用特异性噬菌体展示文库与不产生感染的相同噬菌体一起组合注射小鼠而进行(Smith 等, 如前, 1990, 1993)。另外, 归巢含有 RES 成分的器官中肿瘤的肽, 可以通过使用与特定器官表现为低背景结合的噬菌体制备噬菌体文库而鉴别。例如, Merrill 等(美国科学院报 93 : 3188-3192 (1996), 在此并入参考)选择不被 RES 吸收的 λ 噬菌体, 结果可以在循环中保留时间延长。使用相似的方法可以

选择一种纤维状噬菌体变体。

肿瘤归巢分子的选择性归巢，可以通过测定与对照器官或组织相比，肿瘤归巢分子对肿瘤的特异性而证实。选择性归巢也可以通过示出通过一次体内淘选鉴别的归巢肿瘤分子，在随后的体内淘选中肿瘤归巢分子更多。例如通过体内淘选分离选择性归巢黑素瘤的表达肽的噬菌体，然后进行另外的体内淘选。在第二次筛选之后，从肿瘤回收的噬菌体比从脑中回收的噬菌体高 3 倍。在第三次筛选后，回收自肿瘤的噬菌体比在脑中平均高 10 倍。选择性归巢也可以通过示出通过体内淘选鉴别的归巢选择的肿瘤分子，在随后的体内淘选中更多。

肿瘤归巢分子可以通过体内淘选例如含有移植肿瘤的小鼠加以鉴别。这种移植的肿瘤可以是例如移植至免疫缺陷的小鼠如裸鼠的人体肿瘤，或者是通过在组织培养物或在小鼠中传代而维持的鼠肿瘤。由于细胞受体和结合特定受体的配体的保守性质，期望各种种属的血管发生性血管和组织学相似的肿瘤细胞，可以具有共有的细胞表面标记，用作肿瘤归巢分子的靶分子。因此，本领域技术人员意识到在小鼠中鉴别的肿瘤归巢分子也结合人体或其它种属肿瘤中的相应靶分子，所述鉴别的肿瘤归巢分子是通过例如在含有限定组织学类型的鼠肿瘤如黑素瘤的小鼠中进行体内淘选而鉴别的。相似地，在实验动物中生长的肿瘤需要相关的新血管化，与在人体或其它种属中生长的肿瘤所需求的一样。因此，结合在小鼠中生长的肿瘤血管中的靶分子的肿瘤归巢分子，也可以结合人体或其它哺乳动物个体的肿瘤血管中的相应靶分子。肿瘤归巢分子的例如即归巢人乳腺肿瘤又归巢人 Kaposi's 肉瘤，或归巢小鼠黑素瘤的一般能力，表明所述靶分子是许多肿瘤所共有的。事实上，本发明揭示的结果表明所述靶分子是在新血管中表达的，所述新血管是宿主组织（见实施例 7）。

对在实验动物如小鼠中使用体内淘选鉴别的肿瘤归巢分子，可以易于检测其结合患者的相应肿瘤的能力，例如通过所述分子也特异性结合得自患者肿瘤的样品而证实。例如，CDCRGDCFC (SEQ ID NO: 1)噬菌体和 NGR 肽已经示出结合人体肿瘤显微切片中的血管，而在非肿瘤组织的血管中很少或不发生结合。因此，可以使用常规方法证实在实验动物中通过体内淘选鉴别的肿瘤归巢分子，也可以结合人体肿瘤中的靶分子。

一次体内淘选包含以下步骤：将文库施用于个体，收集选择的肿瘤，并鉴别归巢肿瘤的肿瘤归巢分子。尽管不需要，但通常也进行一或多次附加的体内淘选。在进行附加的体内淘选的情况下，将在前一次体内淘选中回收自肿瘤分子施用于个体，所述个体可以是前一次淘选所用的相同个体，只收集肿瘤的一部分。

通过进行第二次体内淘选，可以确定从第一次体内淘选回收的分子的相对结合选择性，这可以通过将鉴别的分子施用于个体，收集肿瘤，并确定在第二次体内淘选之后与第一次相比是否有更多的噬菌体回收自肿瘤。尽管不需要，但也可以收集对照器官或组织，并将回收自肿瘤分子与回收自对照器官的那些分子相比较。理想地，在第二次或随后的体内淘选后，从对照器官或组织中没有分子可回收。然而通常地，对照器官或组织中也存在一定比例的所述分子。在这种情况下，可以测定选择的肿瘤与对照器官中分子比率（选择的：对照的）。例如，第一次体内淘选后归巢黑素瘤的噬菌体，在二次附加的体内淘选后，在归巢选择的肿瘤比归巢对照器官高 3 倍（实施例 8）。

可以使用附加的体内淘选测定一种特定的分子是否只归巢选择的肿瘤，或可以识别肿瘤上的一个标记，所述标记也是在个体的一或多个正常器官或组织中表达的，或是与肿瘤上的靶分子充分相似的。不太可能的是肿瘤归巢分子也归巢相应的正常组织，因为体内

淘选方法只选择那些归巢选择的肿瘤分子。在肿瘤归巢分子除了肿瘤之外也直接归巢一或多个正常器官或组织的情况下，认为所述器官或组织组成了选择的器官或组织的一个家族。使用体内淘选方法，可以将只归巢选择的肿瘤分子与也归巢一或多个选择的器官或组织的分子区分。这种鉴别在随后的体内淘选期间通过收集各种器官或组织而加快进行。

术语“对照器官或组织”是指一种非肿瘤的器官，其是鉴别肿瘤归巢分子所需的。对照器官或组织的特征在于肿瘤归巢分子不选择性地归巢对照器官。可以收集对照器官或组织，例如以鉴别所述分子的非特异性结合，或确定归巢分子的选择性。另外，非特异性结合可以通过施用例如一个对照分子而鉴别，所述对照分子已知不归巢肿瘤但其化学结构类似于潜在的肿瘤归巢分子。或者，在施用的分子连接于支持物的情况中，单独施用支持物也可以用于鉴别非特异性结合。例如，只表达基因 III 蛋白，但不含有肽融合蛋白的噬菌体，可以通过体内淘选加以研究以确定噬菌体支持物的非特异性结合水平。

如本发明所揭示，肿瘤归巢分子的特异性归巢，可以通过对比检测选择的肿瘤组织和相应非肿瘤组织，以及对照器官或组织而易于鉴别。例如，可以对肿瘤组织和相应的非肿瘤组织进行免疫组织学分析，使用特异于用于展示肿瘤归巢肽的噬菌体的抗体进行（实施例 7）。或者，可以使用一种特异于共有标记的抗体，如 FLAG 表位等，所述共有标记是与所述肽一起表达的，这种检测系统是可商购的。

通常地，制备一个分子文库，其含有不同种群的随机或选择性随机化的相应分子，然后将其施用于个体。在施用之后的一个选择的时间，将个体处死并收集肿瘤，这样可以鉴别肿瘤中存在的所述分子（实施例 4）。如果需要，可以将一或多个对照器官或组织或它

在此并入参考)。然而，当细胞在培养物中生长时，由细胞在体内表达的细胞表面分子通常改变。因此，使用培养无中的细胞的体外淘选方法也受到一定限制，其中不能保证归因于结合培养物中细胞而鉴别的分子在体内也具有相同结合活性。另外，不能使用体外淘选方法区分分子，所述分子只归巢筛选中使用的肿瘤细胞，但不归巢其它类型细胞。

相反，体内淘选不需要预先了解靶分子或其实用性，而且可以鉴别结合体内表达的细胞表面靶分子的分子。同样，由于在筛选期间存在“未定向的组织”，因此分离缺乏归巢特异性的肿瘤归巢分子的可能性明显降低。另外，在通过体内淘选获得肿瘤归巢分子中，归因于例如代谢活性而对在体内循环中降解特别敏感的任何分子，不可回收。因此，体内淘选方法在鉴别选择性在体内归巢肿瘤中存在的靶分子的肿瘤归巢分子方面，比以往的方法具有明显的优势。

尽管还未充分揭示所述体内淘选方法的运行机制，但一种可能是分子如在噬菌体上表达的肽识别并结合肿瘤血管内皮细胞系上存在的靶分子。有迹象表明例如各种器官中的血管组织各不相同，而且这种不同可以参与调节机体的细胞运输。例如，淋巴细胞归巢淋巴结或其它淋巴组织，部分归因于那些组织中内皮细胞表达特异性“地址”分子 (Salmi 等，美国科学院院报 89 : 11436-11440 (1992); Springer, 细胞 76 : 301-314 (1994))。相似地，各种白细胞可以识别炎症位点，部分归因于由炎症信号诱导的内皮细胞标记表达 (见 Butcher 和 Picker, 科学 272 : 60-66 (1996); Springer, 如前 1994)。因此，内皮细胞标记提供了一种潜在的靶位，其可以由肿瘤归巢分子选择性结合，并用于将连接的抗微生物肽定向于肿瘤。

如果需要，可以包括其它的成分作为归巢促细胞程序死亡缀合物的一部分。例如，在一些情况中，在肿瘤归巢分子和抗微生物肽之间需要一种寡肽间隔物。这种间隔物是本领域熟知的，例如

Fitzpatrick 和 Garnett, 抗癌药物开发 10 : 1-9 (1995))所述。

本发明的归巢促细胞程序死亡嵌合肽, 可以易于使用常规的固相肽合成方法以所需数量合成。本发明的嵌合肽也可以商购(例如购自 AnaSpec, Inc.; San Jose, CA)。在抗微生物肽与非肽肿瘤归巢分子连接的情况下, 抗微生物肽部分可以使用熟知方法独立地合成或商购获得。

可以使用的将抗微生物肽与肿瘤归巢分子连接的一些方法是本领域已知的, 根据分子的特殊化学性质选用不同的方法。例如, 将半抗原与载体蛋白连接的方法是在应用免疫学领域常规使用的(见例如 Harlow 和 Lane, 如前, 1988 ; Hermanson, 如前, 1996)。

预制的抗微生物肽也可以缀合于肿瘤归巢肽, 例如使用碳二亚胺缀合法(Bauminger 和 Wilchek, 酶学方法 70 : 151-159 (1980), 在此并入参考)。碳二亚胺包含具有通式 $R-N=C=N-R'$ 的一组化合物, 其中 R 和 R' 可以是脂肪族或芳香族化合物, 并用于合成肽键。制备程序是简便的, 相对快速的, 而且是在适度条件下进行的。碳二亚胺化合物攻击羧基团, 将它们改变为游离氨基的反应位点。碳二亚胺缀合法已经用于将各种化合物缀合于载体以产生抗体。

水溶性碳二亚胺, 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基) 碳二亚胺(EDC) 可以用于将一种抗微生物肽与肿瘤归巢分子缀合。这种缀合需要存在一个氨基团, 其可以例如由抗微生物肽提供, 及需要一个羧基团, 其可以由肿瘤归巢分子提供。

除了使用碳二亚胺直接形成肽键之外, 也可以使用 EDC 制备活性酯如 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (NHS)。只结合氨基团的 NHS 酯, 然后可以用于诱导与阿霉素的单一氨基团形成酰胺键。组合使用 EDC 和 NHS 通常用于进行缀合, 以提高缀合物形成的产量 (Bauminger 和 Wilchek, 如前, 1980)。

也可以使用其它将抗微生物肽与肿瘤归巢分子缀合的方法。例

如，可以使用高碘酸钠氧化随后对适当的反应物还原性烷化，因为可以交联戊二醛。然而，应意识到，不论选择何种产生本发明缀合物的方法，必须保证肿瘤归巢分子保留其定向能力及抗微生物肽保留其抗微生物活性。本领域已知的方法能证实本发明归巢促细胞程序死亡缀合物的活性。

使用常规方法确定形成的抗微生物肽/肿瘤归巢分子缀合物的产量。例如，可以使用 HPLC 或毛细管电泳或其它定性或定量方法（键例如 Liu 等, *J. Chromatogr.* 735 : 357-366 (1996); Rose 等, *J. Chromatogr.* 425 : 419-412 (1988), 在此均并入参考；也见于实施例 8)。特别地，本领域技术人员意识到选择一种确定缀合反应的产量的方法，部分依赖于特异性抗微生物肽和肿瘤归巢分子的物理和化学特性。在缀合之后，将反应产物脱盐以除去任何游离肽或分子。

本发明还提供了将抗微生物肽在体内定向于具有血管发生性血管的肿瘤的方法。这个方法是将本发明的归巢促细胞程序死亡缀合物施用于具有血管发生性血管的肿瘤的个体。在本发明的一个将抗微生物肽在体内定向于具有血管发生性血管的肿瘤的方法中，所述抗微生物肽可以包括例如序列 $_D(KLAKLAK)_2$ 。可以施用于含有血管发生性血管的肿瘤的个体的特别有效的缀合物包括 CNGRC-GG- $_D(KLAKLAK)_2$ 和 ACDCRGDCFC-GG- $_D(KLAKLAK)_2$ 。

本发明还提供了在体内诱导对具有血管发生性血管的肿瘤具有选择性毒性的方法。这个方法是将本发明的归巢出细胞程序死亡缀合物施用于含有血管发生性血管的肿瘤的个体。在本发明方法中用于诱导选择性毒性的抗微生物肽可以是例如含有序列 $_D(KLAKLAK)_2$ 的肽。可以施用的，以诱导对含有血管发生性血管的肿瘤具有体内选择性毒性的特别有效的缀合物包括 CNGRC-GG- $_D(KLAKLAK)_2$ 和 ACDCRGDCFC-GG- $_D(KLAKLAK)_2$ 。

本发明还提供了治疗患有肿瘤的患者方法，所述肿瘤具有血

管发生性血管。在这种治疗方法中，将本发明的归巢促细胞程序死亡缀合物施用于患者，所述缀合物对肿瘤具有选择性毒性。抗微生物肽部分可以包括例如序列_D(KLAKLAK)₂。在一个优选的实施方案中，所述归巢促细胞程序死亡缀合物具有序列 CNGRC-GG-_D(KLAKLAK)₂ 或 ACDCRGDCFC-GG-_D(KLAKLAK)₂。

当施用于个体时，本发明的归巢促细胞程序死亡缀合物可以是药物组合物，其患有例如所述缀合物和一种药物适当的载体。药物适当的载体是本领域熟知的，包括例如水相溶液如水或生理缓冲盐水或其它溶剂或载体如二醇，甘油，油如橄榄油或可注射的有机酯。

药物适当的载体可以患有生理适当的化合物，例如发挥稳定或提高缀合物吸收的作用。这种生理适当的化合物包括例如碳水化合物如葡萄糖，蔗糖或葡聚糖；抗氧化剂如抗坏血酸或谷胱甘肽；螯合剂；低分子量蛋白；或其它稳定剂或赋形剂。本领域技术人员已知选择药物适当的载体，包括生理适当的化合物，依赖于例如所述组合物的施用途径。所述药物组合物还可以含有一种制剂如癌症治疗剂。

本领域技术人员已知本发明的归巢促细胞程序死亡缀合物，可以作为药物组合物通过各种途径施用于个体，包括例如通过口服或非肠道施用，如静脉内施用。含有所述缀合物的药物组合物可以通过注射或插管而施用。所述药物组合物还可以是一种连接于可以掺入其中的脂质体或其它聚合物基质的肿瘤归巢分子，和一种抗微生物肽 (Gregoriadis, 脂质体技术, 第一卷(CRC 出版社, Boca Raton, FL 1984), 在此将其并入参考)。例如由磷脂或其它脂质组成的脂质体，是无毒的生理适当的及可代谢的载体，其相对便于生产和施用。

针对本发明所揭示的方法，必须对个体施用有效量的所述归巢促细胞程序死亡缀合物。所用术语“有效量”是指产生所需效应的所述缀合物的数量。有效量通常依赖于与肿瘤归巢分子连接的特定

的抗微生物肽。其中肿瘤归巢分子与特定的抗微生物肽连接的归巢促细胞程序死亡缀合物，其有效量可以施用本领域熟知的方法确定。

施用归巢促细胞程序死亡缀合物的途径，部分依赖于所述分子的化学结构。例如当口服施用时，肽是特别不适用的，因为其可以在消化道中降解。然而，本领域熟知对肽进行化学修饰，以使其对内源性蛋白酶降解的敏感性降低，或更易于通过消化道的方法，包括掺入 D-氨基酸（见例如 Blondelle 等，1995；Ecker 和 Crooke，如前，1995；Goodman 和 Ro，如前，1995）。这种修饰可以在通过体内淘选鉴别的归巢留肽上以及在抗微生物肽上进行。另外，本领域已知制备肽模拟物文库的方法，所述肽模拟物可以含有 D-氨基酸，其它非天然发生的氨基酸，或化学修饰的氨基酸；或可以是模拟所述肽结构的有机分子；或可以是如 vinylogous peptoids 这样的肽，而且可以用于鉴别口服施用稳定的肿瘤归巢分子。

肿瘤归巢肽可以具有线性或环状结构。在这些肽中包括半胱氨酸残基以环化所述肽。特别地，含有至少两个半胱氨酸残基的肽自动环化。另外，这种环状肽当以线性方式存在时也可以是活性的（见例如 Koivunen 等，如前，1993）。例如，线性肽 NGRAHA (SEQ ID NO : 6)也用作肿瘤归巢分子（见表 2）。因此，在一些情况中，本发明揭示的肿瘤归巢肽或其它经鉴别为肿瘤归巢肽中的一或多个半胱氨酸残基可以缺失，而不明显影响所述肽的归巢肿瘤活性。确定半胱氨酸残基或半胱氨酸残基的 C 末端或 N 末端氨基酸残基对所述肽的肿瘤归巢活性的必需性的方法，是本领域常规应用并熟知的。

如本发明进一步揭示，一些（非全部）肿瘤归巢分子也可以归巢不包含在肿瘤内的血管发生性血管。例如含有 RGD 基序或 GSL 基序的肿瘤归巢分子，特异性归巢视网膜新生血管（Smith 等，Invest. Ophthalmol. Vis.Sci. 35 : 101-111 (1994)，在此将其并入参考），而含有 NGR 基序的肿瘤归巢肽在这种血管生成性血管中基本不积聚。这

些结果表明肿瘤血管表达基本上不是由其它种类血管方式性血管表达的靶分子。本发明所揭示的方法可以用于区分肿瘤归巢肽与归巢非肿瘤血管发生性血管的肽。本领域技术人员了解为治疗肿瘤，优选施用一种具有肿瘤归巢肽的缀合物，所述肽选择性归巢肿瘤血管。

本发明提供了嵌合的促细胞程序死亡的前列腺归巢肽，其可以用于治疗例如良性前列腺增生或前列腺癌。如本发明所揭示，当系统施用时，SMSIARL 肽 (SEQ ID NO : 207)可选择性定位于前列腺组织，特别是前列腺血管（见实施例 9B 和 9E）。另外，前列腺归巢肽 SMSIARL (SEQ ID NO : 207)可用于选择性将一种连接的组分如生物素或噬菌体输送至前列腺组织。如本发明所进一步揭示，在小鼠前列腺中细胞程序死亡是由系统施用 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂ 嵌合肽而诱导的；在非前列腺组织中没有细胞程序死亡迹象（见图 7 和实施例 9C）。在此揭示的结果还表明施 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂ 嵌合肽可延长 TRAMP 小鼠的存活时间，所述小鼠在转基因的影响下发生前列腺癌，如 Gingrich 等，癌症研究 56 : 4096-4102 (1996)所示。图 8 示出 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂ 处理的的小鼠的存活时间比用单独的载体，单独的 _D(KLAKLAK)₂ 肽或单独的 SMSIARL 肽(SEQ ID NO : 207)处理的小鼠长。基于这些结果，本发明提供了一种嵌合的促细胞程序死亡的前列腺归巢肽，以及施用所述肽治疗患有前列腺癌的必然的方法，如以下进一步阐述。

因此本发明提供了一种嵌合的促细胞程序死亡的前列腺归巢肽，其患有一种与抗微生物肽连接的前列腺归巢肽，嵌合肽由前列腺组织选择性内在化并对其呈现高毒性，而抗微生物肽当不与前列腺归巢肽连接时，对哺乳动物的毒性很低。在本发明的嵌合肽中，归巢前列腺部分可以含有例如序列 SMSIARL (SEQ ID NO : 207)或功能等价序列，抗微生物肽部分可以具有一个两亲性 α 螺旋结构如序列 (KLAKLAK)₂ (SEQ ID NO : 200)， (KLAKKLA)₂ (SEQ ID NO :

201), (KAAKAA)₂ (SEQ ID NO : 202) 或(KLGKKLG)₃ (SEQ ID NO : 203)。在一个优选的实施方案中, 所述抗微生物肽部分含有序列_D(KLAKLAK)₂。本发明提供的一个促细胞程序死亡的前列腺归巢肽例如是 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂。

本发明还提供了一种将抗微生物肽在体内定向于前列腺癌的方法。这个方法包括施用嵌合的归巢前列腺的促寻细胞程序死亡肽, 所述嵌合肽含有连接于抗微生物肽的前列腺归巢肽, 嵌合肽由前列腺组织选择性内在化并对其呈现高毒性, 而当抗微生物肽不与前列腺归巢肽连接时, 对哺乳动物细胞的毒性很低。在本发明的一个方法中, 前列腺归巢肽可以含有例如序列 SMSIARL (SEQ ID NO : 207) 或功能等价序列, 抗微生物肽可以含有序列如_D(KLAKLAK)₂。在一个优选的实施方案中, 嵌合的归巢前列腺的促归巢程序死亡肽包括序列 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂。

本发明还提供了一种在难题诱导对前列腺癌具有选择性毒性的方法。这个方法包括为患有前列腺癌的个体施用嵌合的促细胞程序死亡的前列腺归巢肽, 所述嵌合肽含有连接于抗微生物肽的前列腺归巢肽, 嵌合肽由前列腺组织选择性内在化并对其呈现高毒性, 而当抗微生物肽不与前列腺归巢肽连接时, 对哺乳动物细胞的毒性很低。诱导在体内对前列腺癌具有选择性毒性的方法, 例如可以用含有序列 SMSIARL (SEQ ID NO : 207) 或功能等价序列的前列腺归巢肽进行。抗微生物肽可以包括例如序列_D(KLAKLAK)₂。在一个优选的实施方案中, 嵌合的促细胞程序死亡的前列腺归巢肽包括序列 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂。

另外, 本发明提供了一种治疗患有前列腺癌的患者, 这种方法是为患者施用本发明的嵌合的促细胞程序死亡的前列腺归巢肽, 从而嵌合肽对肿瘤具有选择性毒性。嵌合肽含有连接于抗微生物肽的前列腺归巢肽, 嵌合肽被前列腺组织选择性内在化并对其

具有高毒性，而抗微生物肽当不与前列腺归巢肽连接时，对哺乳动物细胞的毒性很低。前列腺归巢肽部分可含有例如序列 SMSIARL (SEQ ID NO : 207)或功能等价序列，抗微生物肽部分可以含有例如序列_D(KLAKLAK)₂。在一个优选的实施方案中，为治疗患有前列腺肿瘤的患者，所述嵌合肽含有序列 SMSIARL-GG-_D(KLAKLAK)₂。

如本文所用术语“前列腺归巢肽”是指一种肽，与地址组织如脑相比，其在体内选择性归巢前列腺组织。这种肽的一般特征是与对照细胞或组织相比，定位于前列腺组织至少高 2 倍。前列腺归巢肽可以例如选择性归巢前列腺血管，而不归巢其它类型细胞或其它血管（见实施例 9）。

归因于前列腺归巢肽部分的选择性归巢活性，本发明的嵌合肽选择性输送于前列腺。用于本发明的各种前列腺归巢肽包括 SMSIARL (SEQ ID NO : 207)和 VSFLEYR (SEQ ID NO : 222)，它们是通过将 X₇文库注射入小鼠中（表 7），并随后如美国专利 No. 5, 622, 699 所述进行体内淘选而鉴别的。前列腺归巢肽 SMSIARL (SEQ ID NO : 21) 和 VSFLEYR (SEQ ID NO : 22)，与在脑中的富集相比在前列腺中分别富集 34 倍和 17 倍。

在一个实施方案中，本发明依赖于含有序列 SMSIARL (SEQ ID NO : 207)或功能等价序列的前列腺归巢肽。针对 SMSIARL (SEQ ID NO : 207)序列的术语“功能等价序列”是指一种序列，其选择性结合前列腺血管的内皮细胞，如图 9 针对序列 SMSIARL (SEQ ID NO : 207)所示出的那些，而且具有选择性结合相同受体的功能。

应了解本发明的嵌合的促细胞程序死亡的前列腺归巢肽，可以用于在各种前列腺疾病中诱导选择性毒性。这种疾病包括前列腺良性结节性增生，以及原发或二级癌症，包括临床迹象明显的以及亚临床癌症。用本发明的嵌合肽治疗的癌症包括前列腺癌，如腺癌。

以下实施例用于例证本发明，而无限制本发明之意。

实施例 1：对 $D(KLAKLAK)_2$ 定性

这个实施例表明了 $D(KLAKLAK)_2$ 优先破坏线粒体膜及诱导线粒体依赖性细胞程序死亡。

选择合成的 14-mer KLAKLAKKLAKLAK (SEQ ID NO : 200), 将其称为 $(KLAKLAK)_2$, 因为其在比杀死真核细胞所需的浓度低 2 个数量级的浓度下可以杀死细菌(Javadpour 等, J. Med. Chem. 39 : 3107-3113 (1996))。所有的 D-对映异构体 $D(KLAKLAK)_2$ 用于避免蛋白酶降解 (Bessalle 等, FEBS 通信 274 : 151-155 (1990); Wade 等, 美国科学院院报 87 : 4761-4765 (1990))。

$D(KLAKLAK)_2$ 优先破坏线粒体膜

$D(KLAKLAK)_2$ 优先通过真核细胞质膜破坏线粒体膜的能力, 通过线粒体溶胀分析及在线粒体依赖性无细胞系统的细胞程序死亡中, 和通过胞毒性分析加以评价。

如下进行线粒体溶胀分析。简而言之, 如 Ellerby 等, J. Neurosci. 17 : 6165-6178 (1997)所述制备大鼠肝脏线粒体。通过 HPLC 合成纯度高于 90%的肽(DLSLARLATARLAI (SEQ ID NO : 204), 得自 Coast Scientific, Inc., San Diego, CA ; 所有其它肽得自 AnaSpec, Inc.)。将线粒体用浓度为 $10\mu\text{M}$ 的 $D(KLAKLAK)_2$, $10\mu\text{M}$ 的 DLSLARLATARLAI 阴性对照肽(SEQ ID NO : 204), 或 $200\mu\text{M}$ 的 Ca^{+2} 阳性对照物处理。将所述肽加入试管中的线粒体中, 并通过测定在 520nm 的吸光度对溶胀定量。

如图 2a 所示, $10\mu\text{M}$ 的 $D(KLAKLAK)_2$ 诱导明显的线粒体溶胀。在 $3\mu\text{M}$ 浓度发生明显的适度溶胀, $3\mu\text{M}$ 这个浓度比杀死真核细胞需要的浓度 (大约 $300\mu\text{M}$) 低两个数量级, 这是与测定杀死 50%的单层细胞所需的浓度 (LC_{50} ; 表 1) 同样测定的。用作阴性对照肽的非 α 螺旋形成肽 DLSLARLATARLAI (SEQ ID NO : 204) 不诱导线粒体

溶胀。这些结果表明与真核细胞质膜相比， $D(KLAKLAK)_2$ 优先破坏线粒体膜。

表 1

用 HPP-1 和 $D(KLAKLAK)_2$ 处理的真核细胞的 LC_{50} (μM)

	DMEC		KS1767	MDA-MB-435
	抑制血管发生的 增殖	血管生成性 索形成	增殖	增殖
HPP-1	481	51	42	415
$D(KLAKLAK)_2$	492	346	387	333

结果是一式三份的三个独立实验的平均值(t-检验, $P < 0.03$)。

$D(KLAKLAK)_2$ 诱导线粒体依赖性细胞程序死亡

分析 $D(KLAKLAK)_2$ 肽在无细胞系统中激活线粒体依赖性细胞程序死亡的能力, 所述系统由悬浮于正常胞质提取物中的正常的线粒体组成 (Ellerby 等, *J. Neurosci.* 17 : 6165-6178 (1997))。通过特征的 caspase-3 从失活的原形式加工为活性的蛋白酶形式测定细胞程序死亡 (Alnemri 等, *细胞* 87 : 171 (1996))。

无细胞的细胞程序死亡分析基本如下进行。如 Ellerby 等, 如前, 1997 所述重建无细胞系统, 而且针对线粒体依赖性反应, 将大鼠肝脏线粒体悬浮于正常 (无细胞程序死亡) 胞质提取物中, 所述胞质提取物是从皮肤微血管内皮细胞中制备的。在加入浓度为 100 μM 的肽并在 30° C 或 37° C 温育 2 小时后, 通过离心除去线粒体, 并将上清在 12%凝胶 (Biorad ; Hercules, CA) 上通过 SDS/PAGE 免疫印迹分析。将蛋白质移至 PVDF 膜 (Biorad) 上, 并用抗 caspase-3 抗体 (Santa Cruz Biotechnology ; SantaCruz, CA) 温育, 随后进行 ECL 检测 (Amersham ; Arlington Heights, IL)。

特征的 caspase-3 加工是在皮肤微血管内皮细胞裂解物中测定的, 如 Ellerby 等, 如前, 1997 所述。简而言之, 将细胞裂解物等分 (1 μl 裂解物, 8-15 mg/ml) 加入 100 μM 的 N-乙酰-Asp-Glu-Val-

Asp-pNA (DEVD-pNA ;BioMol ; 100 ul, 100 mM HEPES, 10% 蔗糖, 0.1% CHAPS, 1 mM DTT, pH 7.0)。在 25° C 通过分光光度法(400 nm) 监测 DEVD-pNA 的水解。

如图 2b 所示, 在泳道 4 在存在线粒体和 $D(KLAKLAK)_2$ 的情况下, 观测到特征的 caspase-3 加工为活性的蛋白酶。用作阴性对照的非 α 螺旋形成肽 DL $SLARLARLAI$ (SEQ ID NO : 204) , 当在无细胞系统中测试时是失活的, 而且对真核细胞无致死性 (图 2b; 也见于 Ellerby 等, 如前, 1997)。

总之, 这些结果表明与真核细胞质膜相比, $D(KLAKLAK)_2$ 优先破坏线粒体膜, 并激活线粒体依赖性细胞程序死亡。

实施例 2: HPP-1 的特征

这个实施例表明 CNGRC-GG- $D(KLAKLAK)_2$ (HPP-1)在组织培养模型中抑制血管发生。

制备含有通过甘氨酸-甘氨酸桥连于抗微生物肽的归巢结构域的嵌合物。如上所述, 由 AnaSpec 公司通过 HPLC 商业合成纯度高于 90%的肽。

归巢结构域可以是环状的肽 (通过半胱氨酸之间的二硫键形成的) CNGRC (SEQ ID NO : 8 ; 见图 1), 或者是双环状的肽 ACDCRGDCFC (SEQ ID NO : 16), 二者均具有归巢肿瘤性质 (Pasqualini 等, 自然生物技术 15 : 542-546 (1997); Arap 等, 科学 279 : 377-380 (1998))并可以由肿瘤内在化 (Arap 等, 如前, 1998 ; Hart 等, 生物化学杂志 269 : 12468-12474 (1994); Bretscher 等, EMBO 杂志 8 : 1341-1348 (1989))。归因于归巢结构域与受体之间的相互作用的推测的手性性质, 归巢结构域是从所有 L 氨基酸中合成的。甘氨酸-甘氨酸桥连用于偶联归巢结构域和抗微生物结构域, 以增强所述肽的灵活性, 及使潜在的空间相互作用最小化。

用 HPP-1 处理的皮肤微血管内皮细胞的存活能力

在血管发生性组织培养模型中评价 HPP-1 的效力和特异性，如 Goto 等，*Lab. Invest.* 69 : 508-517 (1993)所述。在血管发生期间，毛细管内皮细胞增殖及迁移(Risau, *自然* 386 : 671-674 (1997) ; Zetter, *Ann. Rev. Med.* 49 : 407-424 (1998))。索形成是一种迁移形式，这是在体外通过内皮细胞的形态从通常的“橄榄形”转变为链状或索状所示出，如图 3 所示(也见于 Goto 等，如前，1993)。

在增殖和索形成的血管发生条件下，在正常人体皮肤微血管内皮细胞(DMECs)上分析 HPP-1 的作用。另外，在单层细胞保持在 100% 铺满的抑制血管发生的条件下，分析 HPP-1 的作用。

简而言之 TM，将皮肤微血管内皮细胞(DMECs)在 CADMEC Growth Media™ (Cell Applications, Inc. ; San Diego, CA)上生长。然后将皮肤微血管内皮细胞在三种实验条件下培养：增殖，在补加 500 ng/ml 人重组血管内皮生长因子(VEGF ;Pharmingen)的生长培养基中达到 30% 铺满；不增殖，在保持单层细胞的培养基中达到 100% 铺满；索形成，在诱导索形成的培养基中达到 60%铺满（进行诱导所需的）。将 KS1767 和 MDA-MB-435 细胞如 Arap 等，如前，1998 ; Hernier 等，如前，1994)所述进行培养。

通过细胞程序死亡形态学测定存活百分率和 LC_{50} (表 1)，如 Ellerby 等，*J. Neurosci.* 17 : 6165-6178 (1997)所述。针对存活百分率分析，将皮肤微血管内皮细胞用 60 μ M HPP-1 或对照肽_D(KLAKLAK)₂ 处理。在指定的时间点，将细胞培养基从粘着的细胞中抽吸出，并将细胞用 PBS 在 37° C 轻轻冲洗一次。随后将在 PBS 中稀释 20 倍的染料混合物(100 μ g/ml 口丫啶橙和 100 μ g/ml 溴化乙锭)轻轻移液在所述细胞上，在倒置显微镜(Nikon TE 300)上进行观测。细胞核居于边缘和染色体浓缩和/或细胞核破碎（早期/中期细胞程序死亡）

们的一部分制成样品。例如，用一个噬菌体肽展示文库注射携带乳腺肿瘤或黑素瘤的小鼠，然后在大约 1—5 分钟之后，将小鼠麻醉，在液氮中冷冻或优选通过心脏灌注以终止噬菌体循环，从每只小鼠收集肿瘤和一或多个对照器官，回收肿瘤和对照器官中存在的噬菌体，并鉴别选择性归巢各个肿瘤的肽（见实施例 4，5 和 8）。

在提供的实施例中，将动物处死以收集选择的肿瘤和对照器官或组织。然而应意识到只需要收集一部分肿瘤以回收含有肿瘤归巢分子的支持物，而且相似地，只需要收集一部分器官或组织以作为对照。因此，可例如通过活检收集一部分肿瘤，这样可以将分子如噬菌体表达的肽根据所需第二次或更多次施用于相同个体。在第二次施用于相同个体的分子是标记的或连接于例如支持物的情况中，所述标记或支持物应是非毒性和可生物降解的，以不干扰随后的筛选。

在体外筛选噬菌体文库已经用于鉴别结合抗体或细胞表面受体的肽（Smith 和 Scott，如前，1993）。例如，体外筛选噬菌体展示文库已经用于鉴别特异性结合整联蛋白粘着受体的新肽（Koivunen 等，细胞生物学杂志 124 : 373-380 (1994a)，在此将其并入参考），和特异性结合人尿激酶受体的新肽（Goodson 等，美国科学院院报 91 : 7129-7133 (1994)）。然而，这种体外研究不能洞察在体外特异性结合选择的受体的肽是否在体内也结合所述受体，或者所述结合肽或受体是否与机体内的特异性器官所独特的。另外，所述体外方法是使用限定的充分定性的靶分子在人工系统中进行的。例如，Goodson 等，如前 1994，利用表达重组的尿激酶受体的细胞进行实验。然而，这种体外方法受到一定限制，因为需要预先了解靶分子，并产生很少（如果有的话）的关于体内应用的信息。

在培养物中体外淘选细胞也已经用于鉴别可特异性结合由所述细胞表达的受体的分子（Barry 等，Nature Med. 2 : 299-305 (1996)，

或者危及到细胞膜（晚期细胞程序死亡）的细胞是有损伤的，不能存活。在每个实验中给定的时间点有至少 500 个细胞是损伤的。存活百分率是相对于未处理的对照物计算的。单层细胞的 LC_{50} ，增殖（60%铺满），和索形成在 72 小时受损。

如图 3 所示，用 60mM 的 HPP-1 在增殖和索形成条件下处理皮肤微血管内皮细胞，相对于未处理的对照物，随着时间推移存活百分率降低（分别见图 3c 和 3d）。相反，用作为阴性对照的未定向的肽 $_D(KLAKLAK)_2$ 处理，存活力几乎不降低。另外，用 HPP-1 处理的皮肤微血管内皮细胞的增殖 LC_{50} 和迁移，比在保持 100%铺满单层细胞的 angiostatic 皮肤微血管内皮细胞的增殖 LC_{50} 和迁移第一个数量级（表 1）。这些结果表明 HPP-1 在血管发生条件下比在抑制血管发生的条件下杀伤力强。

对各种对照物对皮肤微血管内皮细胞的存活力的作用也进行分析。在血管发生条件下未定向的对照 $_D(KLAKLAK)_2$ 的 LC_{50} 与在抑制血管发生的条件下 HPP-1 的 LC_{50} 相似。另外，未偶联的 $_D(KLAKLAK)_2$ 和 CNGRC (SEQ ID NO : 8)，非定向形式的 CARACGG- $_D(KLAKLAK)_2$ 和混杂形式的 CGRNC-GG- $_D(KLAKLAK)_2$ 的结果与 $_D(KLAKLAK)_2$ 相似。另外，另一种原型 ACDCRGDCFC- $_D(KLAKLAK)_2$ 的结果与 CNGRC-GG- $_D(KLAKLAK)_2$ (HPP-1) 的结果相似（数据未示出）。

用 HPP-1 处理的皮肤微血管内皮细胞的线粒体形态

如下在用 60uM HPP-1 (ACDCRGDCFC-GG- $_D(KLAKLAK)_2$) 或未定向的 $_D(KLAKLAK)_2$ 处理后，在增殖的细胞中评定皮肤微血管内皮细胞的线粒体形态。在用所述肽处理 24 和 72 小时后，将皮肤微血管内皮细胞在 37° C 用 100nM 线粒体染色剂 MitoTracker Red™ (Molecular Probes, Inc., Eugene,OR) 和 500nM 核染色剂

CDCRGDCFC-GG-_D(KLAKLAK)₂ 抑制视网膜新血管化。

A. CNGRC-GG-_D(KLAKLAK)₂ (HPP-1)的体内活性

如下在体内用携带人 MDA-MD-435 乳腺癌异种移植体的裸鼠测试 HPP-1 的活性。简而言之，在 2 月龄的雌性裸鼠(Jackson Labs ; Bar Harbor, ME)中建立 MDA-MB-435 和 C8161 衍生的肿瘤异种移植体，如 Arap 等，如前，1998 所述。在用在蒸馏水中制备的 2, 2, 2-三溴乙醇(Aldrich ; Milwaukee, WI)和 2-甲基-丁醇(Aldrich)的混合物将小鼠麻醉之后，将所述肽通过尾静脉以 250ug/周/小鼠的剂量，以 200ul 体积缓慢地施用。在麻醉下用测径器对肿瘤进行三维测定，并用于计算肿瘤体积(Pasqualini 等，如前，1996)。

如图 4a 所示，肿瘤体积比对照组平均小一个数量级，对照组是用非定向的 CARAC-GG-_D(KLAKLAK)₂ 和非偶联的 _D(KLAKLAK)₂ 和 CNGRC (SEQ ID NO : 8)肽混合物进行处理的。如图 4b 的进一步所示，HPP-1 处理组比对照组的存活期长。一些 HPP-1 处理的小鼠比对照组多活几个月，表明 HPP-1 即抑制原发肿瘤生长又抑制肿瘤转移。组织病理学分析证实肿瘤体系明显破坏及肿瘤内细胞普遍死亡，这表明细胞死亡几乎就是细胞程序死亡和坏死。在相似的实验中，HPP-1 也有效地抗衍生自人黑素瘤细胞系 C8161 的肿瘤(Welch 等, Int. J. Cancer 47 : 227-237 (1991))。

这些结果表明归巢促细胞程序死亡缀合物如 CNGRC-GG-_D(KLAKLAK)₂ (HPP-1) 在体内具有强抗肿瘤活性。

B. CDCRGDCFC-GG-_D(KLAKLAK)₂ 的体内活性

在新生小鼠中用氧诱导视网膜血管发生。随后将小鼠用单一的 13ug 静脉内剂量的载体（每组一只动物）；CDCRGDCFC-GG-_D(KLAKLAK)₂；或未缀合的 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1)和

$D(KLAKLAK)_2$ 的对照混合物处理。4 天后，测定每种处理的视网膜新血管数。

图 5 所示的结果表明与用单独的载体处理的小鼠（1 列；黑条）或用未定向的促细胞程序死亡肽处理的小鼠（3 列，阴影线条）相比，视网膜新血管数在用归巢促细胞程序死亡肽 CDCRGDCFC-GG- $D(KLAKLAK)_2$ （2 列，斑纹条）处理的小鼠中减少。尤其地，在用归巢促细胞程序死亡肽 CDCRGDCFC-GG- $D(KLAKLAK)_2$ 处理的小鼠中，血管发生应答只是在对照小鼠中发生应答的 30-40%。

这些结果表明归巢促细胞程序死亡肽如 CDCRGDCFC-GG- $D(KLAKLAK)_2$ 可以选择性抑制血管发生性应答如视网膜新血管化。

实施例 4：体内淘选

这个实施例阐述了制备噬菌体文库和使用体内淘选方法筛选此文库，以鉴别表达肿瘤归巢肽的噬菌体的方法。

A. 制备噬菌体文库：

使用融合 5 载体构建噬菌体展示文库，如 Koivunen 等所述(如前，1995；Koivunen 等，如前，1994b)。制备编码称为 CX_5C (SEQ ID NO : 9)， CX_6C (SEQ ID NO : 10)， CX_7C (SEQ ID NO : 11) 和 $CX_3CX_3CX_3C$ (SEQ ID NO : 12) 肽的文库，其中 C 表示半胱氨酸， X_N 表示各个选择的氨基酸的给定数。当所述肽中存在至少两个半胱氨酸残基时，这些文库可以展示环状的肽。另外，还构建不含有选定的氨基酸残基的文库。这种文库产生初级的线性肽，尽管环状肽也随机发生。

还构建一个基于序列 $CXXXNGRXX$ (SEQ ID NO : 13) 的偏倚文库。另外，在一些情况中，通过在 NGR 序列两侧掺入半胱氨酸残基，使 $CXXXNGRXX$ (SEQ ID NO : 13) 文库进一步偏倚，即成为 $CXXCNGRCX$ (SEQ ID NO : 14；见表 2)。

使用构建的寡核苷酸产生含有选定半胱氨酸残基的文库，这样 C 由密码子 TGT 编码， X_N 由 NNK 编码，其中 N 是 A, C, G 和 T 的等摩尔混合物，K 是 G 和 T 的等摩尔混合物。这样，由 CX_5C (SEQ ID NO : 9) 表示的肽可以用具有序列 TGT (NNK)₅TGT (SEQ ID NO : 14) 的寡核苷酸表示。通过 3 次 PCR 扩增，纯化及在融合 5 载体中连于编码基因 III 蛋白的核酸，产生双链的寡核苷酸，这样，基于表达，所述肽作为融合蛋白呈递于基因 III 蛋白的 N 末端。

将所述载体通过电穿孔转染入 MC1061 细胞中。将细菌在存在 20ug/ml 四环素的情况下培养 24 小时，然后从用聚乙二醇沉淀两次上清中收集噬菌体。每个文库含有大约 5×10^9 至 5×10^{10} 个转导单位 (TU; 单独的重组噬菌体)。

B. 体内淘选噬菌体

将肿瘤移植到小鼠体内，如以下实施例 5 和 6 所述。将含有 1×10^9 — 1×10^{14} TU 的噬菌体文库混合物在 200ul DMEM 中稀释，然后注射入麻醉的小鼠的尾静脉中 (AVERTIN (0.015 ml/g); 见美国专利 No. 5, 622, 699; Pasqualini 和 Ruoslahti, 如前, 1996)。在 1—4 分钟后，将小鼠速冻于液氮中。为回收噬菌体，将小鼠尸体在室温部分解冻 1 小时，收集肿瘤和对照器官并称重，然后在 1ml DMEM-PI (含有蛋白酶抑制剂 (PI) 的 DMEM); 苯甲基磺酰氟 (PMSF; 1 mM), 抑蛋白酶肽 (20 ug/ml), 亮抑蛋白酶肽 (1 ug/ml) 中研磨。

或者，在将文库导入小鼠后，通过心脏灌注终止循环。简而言之，将小鼠用 AVERTIN 麻醉，然后将心脏暴露并将通过 0.5mm 套管与 10cc 注射器连接的 0.4mm 针头插入左心室中。在右心房作一切口，缓慢施用 5—10ml 的 DMEM，灌注整个机体大约需要 5—10 分钟以上的时间。通过组织学分析直接监测灌注效力。

将肿瘤和器官样品用冰冻的含有 1% 胎牛血清白蛋白 (BSA) 的

DMEM-PI 冲洗 3 次，然后用 1ml K91-kan 细菌直接温育 1 小时。将 10ml 含有 0.2ug/ml 四环素的 NZY 培养基 (NZY/tet) 加入细菌培养物中，将混合物在 37° C 摇瓶中温育 1 小时，然后将 10ul 或 100ul 等分铺板于含有 12.5ug/ml 四环素的琼脂铺板 (tet/琼脂) 中。将回收自肿瘤的含有噬菌体的各个集落在 5ml NZY/tet 中生长 16 小时。集合得自各个集落的细菌培养物，并将噬菌体纯化及如上述再注射入小鼠中，进行第二次体内淘选。通常地，还进行第三次体内淘选。从得自最后一次体内淘选的各个细菌集落中纯化噬菌体 DNA，测定编码由选择的噬菌体表达的肽的 DNA 序列 (见 Koivunen 等，如前，1994b)。

实施例 5：通过对乳腺肿瘤体内淘选鉴别肿瘤归巢肽

整个实施例表明可以对乳腺肿瘤进行体内淘选，以鉴别归巢各种肿瘤的肿瘤归巢肽。

将人 435 乳腺癌细胞(Price 等，癌症研究 50 : 717-721 (1990)) 接种于裸鼠乳房脂肪层中。当肿瘤直径达到大约 1cm 时，进行噬菌体定向实验，其中将表达特异性肽的噬菌体施用于携带肿瘤的小鼠，或者进行体内淘选。将携带乳腺肿瘤的小鼠注射表达 CX₃CX₃CX₃C (SEQ ID NO : 12)肽文库的 1×10⁹噬菌体，其中 X₃ 表示单独选择的 3 组随机氨基酸。使噬菌体循环 4 分钟，然后将小鼠麻醉，在麻醉下在液氮中速冻，及取出肿瘤。从肿瘤中分离噬菌体并进行两次体内淘选。

DAPI(Molecular Probes, Inc.)温育 30 分钟进行染色。随后使用荧光显微镜检方法(100×)在倒置显微镜下(Nikon),使用 3×滤光波长设置观测线粒体。

用 $_D(KLAKLAK)_2$ 处理 24 小时的皮肤微血管内皮细胞的线粒体保持正常的形态,而用每种原型处理的那些细胞的线粒体形态发生变化。尤其地,在细胞聚集之前,用 CNGRC-GG- $_D(KLAKLAK)_2$ 或 ACDCRGDCFC-GG- $_D(KLAKLAK)_2$ 处理的细胞大约 80%发生明显的线粒体形态改变。最后,在 72 小时可以见到用 CNGRC-GG- $_D(KLAKLAK)_2$ (HPP-1) 处理的皮肤微血管内皮细胞表现为细胞程序死亡的特征性形态学变化,包括核浓缩和破裂 (Ellerby 等, 如前, 1997)。通过分析 caspase 活性证实细胞程序死亡情况(见图 3b; Ellerby 等, 如前, 1997)。

用 HPP-1 处理的 KS1767 和 MDA-MB-435 细胞的存活力

嵌合的 HPP-1 对衍生自 Kaposi's 肉瘤的 KS1767 细胞的毒性与对皮肤微血管内皮细胞的增殖和迁移毒性一样(表 1; Hernier 等, AIDS 8 : 575-581 (1994))。相反, HPP-1 对 MDA-MB-435 人乳腺癌细胞的毒性低将近一个数量级(表 1)。KS1767 细胞,是内皮的起源,类似血管发生性内皮细胞而且结合 CNGRC 肽(SEQ ID NO : 8),而 MDA-MB-435 细胞不这样(Samaniego 等, Amer. J. Path. 152 : 1433-1443 (1998); Arap 等, 如前, 1998)。

总之,这些结果表明 HPP-1 在皮肤微血管内皮细胞中诱导线粒体溶胀和细胞程序死亡。

实施例 3: 归巢的促细胞程序死亡肽的体内活性

这个实施例表明 CNGRC-GG- $_D(KLAKLAK)_2$ (HPP-1)抑制肿瘤生长及延长携带肿瘤的动物的存活时间。这个实施例还表明

表 2
来自回收自人乳腺癌的噬菌体的肽

CGRECPRLCQSSC (2*)	CNGRCVSGCAGRC (3)	
CGEACGGQCALPC (20)	IWSGYGVYW (21)	
PSCAYMCIT (22)	WESLYFPRE (23)	
SKVLYYNWE (24)	CGLMCQGACFDVC (25)	
CERACRNLCREGC (26)	CPRGCLAVCVSQC (27)	
CKVCNGRCCG (28)	CEMCNGRCMG (29)	CPLCNGRCAL (30)
CPTCNGRCVR (31)	CGVCNGRCGL (32)	CEQCNGRCGQ (33)
CRNCNGRCEG (34)	CVLCNGRCWS (35)	CVTCNGRCRV (36)
CTECNGRCQL (37)	CRTCNGRCLE (38)	CETCNGRCVG (39)
CAVCNGRCGF (40)	CRDLNGRKVM (41)	CSCCNGRCGD (42)
CWGCNGRCRM (43)	CPLCNGRCAR (44)	CKSCNGRCLA (45)
CVPCNGRCHE (46)	CQSCNGRCVR (47)	CRTCNGRCQV (48)
CVQCNGRCAL (49)	CRCCNGRCSP (50)	CASNNGRVVL (51)
CGRCNGRCLL (52)	CWLCNGRCGR (53)	CSKCNGRCGH (54)
CVWCNGRCGL (55)	CIRCNGRCVS (56)	CGECNGRCVE (57)
CEGVNRRRLR (58)	CLSCNGRCPS (59)	CEVCNGRCAL (60)
CGSLVRC (5)	GRSQMQI (61)	HHTRFVS (62)
SKGLRHR (63)	VASVVA (64)	WRVLA AF (65)
KMGPKVW (66)	IFSGSRE (67)	SPGSWTW (68)
NPRWFD (69)	GRWYKWA (70)	IKARASP (71)
SGWCYRC (72)	ALVGLMR (73)	LWAEMTG (74)
CWSGVDC (75)	DTLRLRI (76)	SKSSGVS (77)
IVADYQR (78)	VWRTGHL (79)	VVDRFPD (80)
LSMFTRP (81)	GLPVKWS (82)	IMYPGWL (83)
CVMVRDGDC (84)	CVRIRPC (85)	CQLAAVC (86)
CGVGSSC (87)	CVSGPRC (88)	CGLSDSC (89)
CGEGHPC (90)	CYTADPC (91)	CELSLISKC (92)
CPEHRSLVC (93)	CLVVHEAAC (94)	CYVELHC (95)
CWRKFYC (96)	CFWPNRC (97)	CYSYFLAC (98)
CPRGSRC (99)	CRLGIAC (100)	CDDSWKC (101)
CAQLLQVSC (102)	CYPADPC (103)	CKALSQAC (104)
CTDYVRC (105)	CGETMRC (106)	

*-括号中的数字表示 SEQ ID NO :。

在经过第三次淘选后，将噬菌体定量并确定由克隆的噬菌体表

达的肽序列。克隆的噬菌体表达各种不同的肽，包括表 2 所示那些肽。相似地，筛选 CX7C (SEQ ID NO : 11) 和 CX5C (SEQ ID NO : 9) 文库，并鉴别归巢乳腺肿瘤的肽（表 2）。这些结果表明对乳腺肿瘤的体内淘选可以鉴别肿瘤归巢分子。

实施例 6：将表达 RGD 肽的噬菌体在体内定向于肿瘤

将人 435 乳腺癌细胞接种于裸鼠的乳房脂肪层中。当肿瘤直径达到大约 1cm 时，将表达特异性的含有 RGD 的肽的噬菌体施用于携带肿瘤的小鼠。用携带通过移植人黑素瘤 C8161 细胞或移植小鼠 B16 黑素瘤细胞形成的肿瘤的裸鼠也可以获得与如下所述相似的结果。

将表达含有 RGD 的肽 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1 ; 见 Koivunen 等，如前，1995)的 1×10^9 个噬菌体或对照（无插入体）噬菌体，静脉内（iv）注射至小鼠体内，并使其循环 4 分钟。然后将小鼠速冻或在麻醉下通过心脏灌注，切取各种器官包括肿瘤，脑和肾，并对器官中存在的噬菌体进行定量（见美国专利 No. 5, 622, 699; Pasqualini 和 Ruoslahti, 如前，1996）。

与在脑和肾脏中相比，表达 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1)肽的噬菌体在乳腺肿瘤中的表达大约多 2—3 倍，表明 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1 ; RGD 噬菌体)肽使所述噬菌体选择性归巢乳腺肿瘤。在一个平行研究中，将表达各种不同肽的未选择的噬菌体注射至携带肿瘤的小鼠中，并检测各种器官中噬菌体存在情况。与在肿瘤中相比，在肾脏中存在噬菌体非常多，在脑中较少一些。因此，表达 RGD 的噬菌体在肿瘤中比未选择的噬菌体浓缩 80 倍。这些结果表明表达含有 RGD 的肽的噬菌体归巢肿瘤，可能归因于 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白在肿瘤中形成的血管上的表达。

归巢乳腺肿瘤的肽的特异性是通过竞争实验证实的，其中与表

达肿瘤归巢肽的噬菌体一起注射 500ug 游离肽 ACDCRGDCFCG (SEQ ID NO : 16; 见 Pasqualini 等, 如前, 1997) , 使肿瘤中噬菌体的数量降低大约 10 倍, 而与失活的对照肽 GRGESP (SEQ ID NO : 17) 一起注射基本没有作用。这些结果表明展示可结合在血管发生性血管上表达的整联蛋白的肽的噬菌体, 可选择性在体内归巢器官或组织如含有这种血管的肿瘤。

实施例 7: 对肿瘤归巢肽进行免疫组织学分析

这个实施例提供了一种通过免疫组织学检测鉴别肿瘤归巢分子定位的方法。

表达肿瘤归巢肽的噬菌体的定位是在组织切片中通过免疫化学方法鉴别的, 所述切片是在将表达肿瘤归巢肽的噬菌体 (肽-噬菌体) 施用于携带肿瘤的小鼠后 5 分钟或 24 小时后获得的。针对施用肽-噬菌体后 5 分钟获得的样品, 将小鼠用 DMEM 灌注并切除各种器官包括肿瘤, 固定于 Bouin's 溶液中。针对在施用 24 小时后获得的样品, 在循环中没有肽-噬菌体残留, 因此不需灌注。制备组织切片并与抗 M13 (噬菌体) 反应 (Pharmacia Biotech; 见美国专利 No. 5, 622, 699 ; Pasqualini 和 Ruoslahti, 如前 1996)。使用过氧化物酶缀合的二级抗体(Sigma; St. Louis MO), 根据生产者的指导进行观测结合的抗 M13 抗体。

如实施例 6 所揭示, 将表达肿瘤归巢肽的噬菌体 CDCRGDCFC (SEQ ID NO : 1; RGD 噬菌体), 经静脉内施用于携带乳腺肿瘤的小鼠体内。另外, 将此 RGD 噬菌体施用于携带小鼠黑素瘤或人 Kaposi's 肉瘤的小鼠体内。如上述终止噬菌体循环及处死小鼠, 并收集肿瘤, 肿瘤附近的皮肤样品, 脑, 肾, 肺和肝样品。

对噬菌体进行免疫组织化学染色示出 RGD 噬菌体体积聚在乳腺肿瘤以及黑素瘤和 Kaposi's 肉瘤的血管中, 而在对照器官中只有少量

的常规方法。

实施例 8: 通过体内抗黑素瘤淘选鉴别肿瘤归巢肽

通过进行体内抗移植的小鼠黑素瘤的淘选, 检测体内淘选方法鉴别肿瘤归巢肽的普遍适应性。

携带黑素瘤的小鼠是通过移植 B16B15b 小鼠黑素瘤细胞产生的, 所述黑素瘤细胞产生高度血管化的肿瘤。将 B16B15b 小时黑素瘤细胞皮下注射到裸鼠 (2 个月大) 的乳房脂肪层中, 并使肿瘤生长直至直径为大约 1cm。

如上所述进行体内淘选。

将大约 1×10^{12} 转导单位的表达 CX5C (SEQ ID NO : 9), CX6C (SEQ ID NO : 10) or CX7C (SEQ ID NO : 11)文库的噬菌体, 经静脉内注射, 并使其循环 4 分钟。然后将小鼠在液氮中速冻或在麻醉下将液氮通过心脏灌注, 除去肿瘤组织和脑 (对照器官), 并如上述分离噬菌体。进行 3 次体内淘选。

表 3 来自回收自小鼠 B16B15b 黑素瘤的噬菌体的肽

CLSGSLSC (4*)	GICKDDWCQ (107)	TSCDPSLCE (108)
KGCGTRQCW (109)	YRCREVLQ (110)	CWGTGLC (111)
WSCADRTCM (112)	AGCRLKSCA (113)	SRCKTGLCQ (114)
PICEVSRW (115)	WTCRASWCS (116)	GRCLLMQCR (117)
TECDMSRCM (118)	ARCRVDPCV (119)	CIEGVLGGC (120)
CSVANSC (121)	CSSTMRC (122)	SIDSTTF (123)
GPSRVGG (124)	WWSGLEA (125)	LGTDVRQ (126)
LVGVRL (127)	GRPGDIW (128)	TVWNPVG (129)
GLLLVVP (130)	FAATSAE (131)	WCCRQFN (132)
VGFGKAL (133)	DSSLRLP (134)	KLWCAMS (135)
SLVSFLG (136)	GSFAFLV (137)	IASVRWA (138)
TWHLRA (139)	QYREGLV (140)	QSADRSV (141)
YMFWTSR (142)	LVRRWYL (143)	TARGSSR (144)
TTREKNL (145)	PKWLLFS (146)	LRTNVVH (147)
AVMGLAA (148)	VRNSLRN (149)	

*-括号中的数字表示 SEQ ID NO :

或没有 RGD 噬菌体积聚。

使用表达肿瘤归巢肽的噬菌体 CNGRCVSGCAGRC (SEQ ID NO : 3; NGR 噬菌体)进行相似实验, 这个噬菌体是在抗通过 MDA-MB-435 形成的肿瘤进行的体内淘选鉴别的。在这些实验中, 将 NGR 噬菌体或不表达肽的对照噬菌体施用于携带肿瘤的小鼠体内, 所述肿瘤是由 MDA-MB-435 乳腺癌或人 SLK Kaposi's 肉瘤异种移植体形成的, 然后将小鼠如上述处死, 收集肿瘤以及对照器官, 包括脑, 淋巴结, 肾, 胰腺, 子宫, 乳房脂肪层, 肺, 小肠, 皮肤, 骨骼肌, 心脏和肾盂, 膀胱, 及输尿管的上皮。制备组织学样品并通过如上述免疫染色进行检测。

在得自施用 NGR 噬菌体 4 分钟后处死的小鼠的样品中, 对乳腺肿瘤和 Kaposi's 肉瘤的血管的免疫染色均进行观测。在施用无插入体的对照噬菌体的小鼠的内皮中观测到非常少的或没有染色。在得自施用 NGR 噬菌体后 24 小时处死的小鼠的样品中, 肿瘤样品的染色遍布于血管外侧, 及乳腺肿瘤实质和 Kaposi's 肉瘤实质内。

再一次, 在从施用无插入体的对照噬菌体的小鼠的这些肿瘤中制备的样品中, 观测到很少的或没有染色。另外, 在施用 NGR 噬菌体的对照小鼠的各种对照器官中也只观测到很少的或没有染色。

在其它实验中, 在将表达 NGR 肿瘤归巢肽的噬菌体 NGRAHA (SEQ ID NO : 6)或 CVLNGRMEC (SEQ ID NO : 7), 施用于携带肿瘤的小鼠后, 获得相似结果。同样, 如下所述, 施用表达 GSL 肿瘤归巢肽的噬菌体 CLSGSLSC (SEQ ID NO : 4)获得相似结果, 这种噬菌体是通过体内淘选黑素瘤鉴别的 (见实施例 8)。

这些结果证实肿瘤归巢肽选择性归巢肿瘤, 尤其肿瘤的血管, 而且例如通过体内抗乳腺肿瘤淘选而鉴别的肿瘤归巢肽, 也选择性归巢其它肿瘤, 包括 Kaposi's 肉瘤和黑素瘤。另外, 这些结果证实免疫组织化学分析提供了一种鉴别表达肿瘤归巢肽的噬菌体的定位

在回收自 B16B15b 肿瘤的 89 个克隆的噬菌体中测定氨基酸序列中插入体情况。由这些噬菌体表达的肽以两种主要序列表示 CLSGSLSC (SEQ ID NO : 4 ;测序克隆的 52%)和 WGTGLC (SEQ ID NO : 18 ; 克隆的 25%; 见表 3)。再次感染表达选择的肽之一的噬菌体, 相比之下噬菌体归巢肿瘤比脑高接近 3 倍。

表达肿瘤归巢肽的噬菌体在小鼠器官中的定位, 也通过对肿瘤和其它各种组织进行免疫组织化学染色进行检测(见实施例 7)。在这些实验中, 将 1×10^9 pfu 的对照(无插入体)噬菌体或表达肿瘤归巢肽 CLSGSLSC (SEQ ID NO : 4)的噬菌体, 经静脉内注射入携带肿瘤的小鼠中, 并使其循环 4 分钟。

在得自用表达 CLSGSLSC (SEQ ID NO : 4)肿瘤归巢肽的噬菌体注射的小鼠的黑素瘤中, 免疫染色明显。黑素瘤的染色通常定位于肿瘤内的血管, 尽管一些染色也位于肿瘤实质中。在得自用无插入体的对照噬菌体注射的小鼠的肿瘤中, 或在得自用任一种噬菌体注射的小鼠的皮肤或肾样品中, 基本观测不到染色。

然而, 在肝脏 sinusoids 和脾中检测到免疫染色, 表明噬菌体可以非特异性地被含有 RES 的器官捕获。

使用相似的方法, 在携带 SLK 人 Kaposi's 肉瘤的小鼠中进行体内淘选。

鉴别肿瘤归巢肽并示于表 4。这些结果表明体内淘选方法是一种筛选噬菌体文库, 以鉴别表达肿瘤归巢肽的普遍适用的方法。

表 4

来自回收自人 KAPOSI'S 肉瘤的噬菌体的肽

TDCTPSRCT (150*)	SWCQFEKCL (151)	VPCRFKQCW (152)
CTAMRNTDC (153)	CRESLKNC (154)	CMEMGVKC (155)
VTCRSLMCQ (156)	CNNVGSYC (157)	CGTRVDHC (158)
CISLDRSC (159)	CAMVSMED (160)	CYLGVSNC (161)
CYLVNVDC (162)	CIRSAVSC (163)	LVCLPPSCE (164)
RHCFSQWCS (165)	FYCPGVGCR (166)	ISCAVDACL (167)
EACEMAGCL (168)	PRCESQLCP (169)	RSCIKHQCP (170)
QWCSRRWCT (171)	MFCRMRSCD (172)	GICKDLWCQ (173)
NACESAICG (174)	APCGLLACI (175)	NRCRGVSCT (176)
FPCEGKKCL (177)	ADCRQKPCL (178)	FGCVMASCR (179)
AGCINGLCG (180)	RSCAEPWCY (181)	DTCRALRCN (182)
KGCGTRQCW (109)	GRCVDGGCT (183)	YRCIARECE (184)
KRCSSSLCA (185)	ICLLAHCA (186)	QACPMLLCM (187)
LDCLSELCS (188)	AGCRVESC (189)	HTCLVALCA (190)
IYCPGQECE (191)	RLCSLYGCV (192)	RKCEVPGCQ (193)
EDCTSRFCS (194)	LECVVDSCR (195)	EICVDGLCV (196)
RWCREKSCW (197)	FRCLERVCT (198)	RPCGDQACE (199)
CNKTDGDEGVTC (15)		

*括号内数字表示 SEQ ID NO :。

实施例 9: 对由前列腺归巢肽和 D (KLAKLAK) 2 组成的嵌合肽进行定性

这个实施例证实嵌合肽 SMSIARL-GG-D (KLAKLAK) 2, 在全身施用后可以在前列腺组织中选择性诱导细胞程序死亡, 并可以延长具有实验性前列腺癌的动物的存活时间。

A. 分离前列腺归巢肽

将一种 X7 文库注射入小鼠中, 并分离相比之下在前列腺而不是脑中优先发现的序列, 如 WO 99/46284 所述。相比之下, 前列腺

归巢肽 SMSIARL (SEQ ID NO : 207) 和 VSFLEYR (SEQ ID NO : 222) 的前列腺中比在脑中分别富集 34 倍和 17 倍。通过体内淘选鉴别的其它归巢前列腺序列示于表 5。

表 5
来自回收自前列腺的噬菌体的肽

EVQSAKW (209)	KRVYVLG (210)
GRLSVQV (211)	WKPASLS (212)
FAVRVVG (213)	LVRPLEG (214)
GFYRMLG (215)	EGRPMVY (216)
GSRSLGA (217)	RVWQGDV (218)
GDELLA (219)	FVWLVGS (220)
GSEPMFR (221)	VSFLEYR (222)
WHQPL (223)	SMSIARL* (207)
RGRWLAL* (224)	QVEEFPC (225)
LWLSGNW (226)	GPMLSVM (227)
WTFLERL (228)	VLPGGQW (229)
REVKES (230)	RTPAAVM (231)
GEWLGEC (232)	PNPLMPL (233)
SLWYLGA (234)	YVGGWEL (235)

括号内数字前有 SEQ ID NO :。

*表示不止一次分离的序列。

B. 前列腺归巢肽生物素缀合物的归巢前列腺功能

使用体内筛选一种七肽噬菌体文库，鉴别了一种前列腺归巢肽，其在前列腺比在其它组织中浓缩 35 倍。这个噬菌体展示肽 SMSIARL (SEQ ID NO : 207)。联合注射合成的肽 SMSIARL (SEQ ID NO : 207)，抑制携带 SMSIARL (SEQ ID NO : 207) 的噬菌体对前列腺的选择性归巢。

另外，在将噬菌体经静脉内注射入小鼠后，对组织切片进行的抗体染色示出 SMSIARL (SEQ ID NO : 207) 噬菌体定位于前列腺组织，但不定位于其它组织。对照噬菌体也不在前列腺中积聚。

受 250ug/剂的 SMSIARL-GG-D (KLAKLAK) 2 肽或对照肽，隔周一次共 10 次。将 4 只无可观测的肿瘤的小鼠，从注射后几分钟之内死亡后的 SMSIARL-GG-D (KLAKLAK) 2 组中除去。如图 8 所示，经 SMSIARL-GG-D (KLAKLAK) 2 处理的小鼠的存活时间长于对照组小鼠。对照组是只用 D (KLAKLAK) 2 肽或 SMSIARL(SEQ ID NO : 207)肽处理的。因此，用定向的促细胞程序死亡的 SMSIARL-GG-D (KLAKLAK) 2 化合物处理的 TRAMP 小鼠，在经过几个月之后处理的小鼠的存活时间比对照组小鼠明显延长。

E. 归巢前列腺的 SMSIARL (SEQ ID NO : 207)噬菌体结合人前列腺血管

将含有正常组织和癌组织的人前列腺组织切片用 109TU SMSIARL(SEQ ID NO : 207)噬菌体覆盖，并用抗噬菌体抗体检测噬菌体结合并进行过氧化物酶染色。如图 9 所示，SMSIARL (SEQ ID NO : 207)噬菌体结合人前列腺血管的内皮（见 a 组和 b 组）。施用不含有肽插入体的噬菌体的实验组观测到没有内皮细胞染色（c 组）。另外，当覆盖层中包括 0.3mg/ml 可溶的 SMSIARL 肽（SEQ ID NO : 207）时，SMSIARL (SEQ ID NO : 207)-噬菌体染色受抑制。示于图 9 的结果表明至少一些肿瘤保留归巢肽的受体。另外，肽（SEQ ID NO : 207）可以结合前列腺癌内的血管，而一些其它人体组织中的血管不被 SMSIARL (SEQ ID NO : 207) 噬菌体染色。

上述在括号中或以其它形式引用的所有杂志文章，参考资料和专利均在此并入参考。

尽管本发明已经参考上述实施例加以阐述，但应意识到在不偏离本发明精神的范围内可以对本发明加以各种修改。因此，本发明只由以下权利要求限制。

- <110> 伯纳姆研究所
- <120> 具有促细胞程序死亡活性的嵌合前列腺归巢肽
- <130> FP-LJ 5311
- <150> US 09/489,582
<151> 2000-01-21
- <150> PCT/US01/01362
<151> 2001-01-16
- <160> 235
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成肽
- <400> 1
Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
1 5
- <210> 2
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成肽
- <400> 2
Cys Gly Arg Glu Cys Pro Arg Leu Cys Gln Ser Ser Cys
1 5 10
- <210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成肽
- <400> 3
Cys Asn Gly Arg Cys Val Ser Gly Cys Ala Gly Arg Cys
1 5 10
- <210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

SMSIARL (SEQ ID NO : 207)噬菌体还归巢大鼠前列腺组织。

如图 6 所示, 生物素缀合的 SMSIARL (SEQ ID NO : 207)合成肽示出归巢前列腺。简而言之, 将 1mg 生物素缀合的前列腺归巢肽 SMSIARL (SEQ ID NO : 207)或生物素标记的对照肽 CARAC (SEQ ID NO : 208), 经静脉内注射入小鼠体内, 10 分钟后将其处死。收集前列腺和其它组织, 切片并用亲和素-过氧化物酶染色加工。在全身性注射缀合物之后 10 分钟, 生物素染色就主要在腺体内腔中发现而不是在血管中。这些结果表明 SMSIARL (SEQ ID NO : 207) 肽, 以及附着于其的其它基序如噬菌体或生物素, 转位于前列腺上皮然后进入腺腔内。

C. 诱导前列腺选择性细胞程序死亡

分析 SMSIARL(SEQ ID NO : 207)肽将促细胞程序死亡肽 KLAKLAK 输送于前列腺的能力。简而言之, 将 SMSIARL-GG-D (KLAKLAK) 2 嵌合肽或对照物以 250ug 肽/小鼠的单一剂量施用, 并对在 24 小时后获得的组织进行 TUNEL 染色。如图 7 所示, 用 SMSIARL-GG-D (KLAKLAK) 2 缀合物注射的小鼠示出在其前列腺中细胞程序死亡增强, 尤其在前列腺的毛细管内皮及基底肌上皮细胞中。在其它组织中没有细胞程序死亡增强的迹象, 如在睾丸, 肾或脑中。在用 250ug 未缀合的 SMSIARL (SEQ ID NO : 207)和 D (KLAKLAK) 2 的混合物注处理的阴性对照小鼠中未观测到细胞程序死亡。

D. 用 SMSIARL-GG-D (KLAKLAK) 2 处理 TRAMP 小鼠

TRAMP 小鼠在转基因的影响下发生前列腺癌, 如 Gingrich 等, 如前, 1996。分析 SMSIARL-GG-D (KLAKLAK) 2 嵌合肽抑制 TRAMP 小鼠中癌症发生的能力。将 12 周龄的小鼠 (10 只/组) 接

<220>

<223> 合成肽

<400> 4

Cys Leu Ser Gly Ser Leu Ser Cys
1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 5

Cys Gly Ser Leu Val Arg Cys
1 5

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 6

Asn Gly Arg Ala His Ala
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 7

Cys Val Leu Asn Gly Arg Met Glu Cys
1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 8

Cys Asn Gly Arg Cys
1 5

<210> 9

<220>

<223> 合成肽
 <400> 9
 000
 <210> 10
 <220>
 <223> 合成肽
 <400> 10
 000
 <210> 11
 <220>
 <223> 合成肽
 <400> 11
 000
 <210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(13)
 <223> Xaa = 任何氨基酸
 <400> 12
 Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(9)
 <223> Xaa = 任何氨基酸
 <400> 13
 Cys Xaa Xaa Xaa Asn Gly Arg Xaa Xaa
 1 5
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <221> VARIANT

<222> (1)...(9)

<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 14

Cys Xaa Xaa Cys Asn Gly Arg Cys Xaa
1 5

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 15

Cys Asn Lys Thr Asp Gly Asp Glu Gly Val Thr Cys
1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 16

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

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 17

Gly Arg Gly Glu Ser Pro
1 5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 18

Trp Gly Thr Gly Leu Cys
1 5

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 19

Gly Ala Cys Val Phe Ser Ile Ala His Glu Cys Gly Ala
1 5 10

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 20

Cys Gly Glu Ala Cys Gly Gly Gln Cys Ala Leu Pro Cys
1 5 10

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 21

Ile Trp Ser Gly Tyr Gly Val Tyr Trp
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 22

Pro Ser Cys Ala Tyr Met Cys Ile Thr
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 23

Trp Glu Ser Leu Tyr Phe Pro Arg Glu
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 24

Ser Lys Val Leu Tyr Tyr Asn Trp Glu
1 5

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 25

Cys Gly Leu Met Cys Gln Gly Ala Cys Phe Asp Val Cys
1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 26

Cys Glu Arg Ala Cys Arg Asn Leu Cys Arg Glu Gly Cys
1 5 10

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 27

Cys Pro Arg Gly Cys Leu Ala Val Cys Val Ser Gln Cys
1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 28

Cys Lys Val Cys Asn Gly Arg Cys Cys Gly
1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 29
Cys Glu Met Cys Asn Gly Arg Cys Met Gly
1 5 10

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 30
Cys Pro Leu Cys Asn Gly Arg Cys Ala Leu
1 5 10

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 31
Cys Pro Thr Cys Asn Gly Arg Cys Val Arg
1 5 10

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 32
Cys Gly Val Cys Asn Gly Arg Cys Gly Leu
1 5 10

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 33
Cys Glu Gln Cys Asn Gly Arg Cys Gly Gln
1 5 10

<210> 34

<211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成肽

 <400> 34
 Cys Arg Asn Cys Asn Gly Arg Cys Glu Gly
 1 5 10

 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成肽

 <400> 35
 Cys Val Leu Cys Asn Gly Arg Cys Trp Ser
 1 5 10

 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成肽

 <400> 36
 Cys Val Thr Cys Asn Gly Arg Cys Arg Val
 1 5 10

 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成肽

 <400> 37
 Cys Thr Glu Cys Asn Gly Arg Cys Gln Leu
 1 5 10

 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成肽

 <400> 38
 Cys Arg Thr Cys Asn Gly Arg Cys Leu Glu
 1 5 10

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 39
Cys Glu Thr Cys Asn Gly Arg Cys Val Gly
1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 40
Cys Ala Val Cys Asn Gly Arg Cys Gly Phe
1 5 10

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 41
Cys Arg Asp Leu Asn Gly Arg Lys Val Met
1 5 10

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 42
Cys Ser Cys Cys Asn Gly Arg Cys Gly Asp
1 5 10

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 43
Cys Trp Gly Cys Asn Gly Arg Cys Arg Met
1 5 10

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 44
Cys Pro Leu Cys Asn Gly Arg Cys Ala Arg
1 5 10

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 45
Cys Lys Ser Cys Asn Gly Arg Cys Leu Ala
1 5 10

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 46
Cys Val Pro Cys Asn Gly Arg Cys His Glu
1 5 10

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 47
Cys Gln Ser Cys Asn Gly Arg Cys Val Arg
1 5 10

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 48
Cys Arg Thr Cys Asn Gly Arg Cys Gln Val
1 5 10

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 49
Cys Val Gln Cys Asn Gly Arg Cys Ala Leu
1 5 10

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 50
Cys Arg Cys Cys Asn Gly Arg Cys Ser
1 5

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 51
Cys Ala Ser Asn Asn Gly Arg Val Val Leu
1 5 10

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 52
Cys Gly Arg Cys Asn Gly Arg Cys Leu Leu
1 5 10

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 53
Cys Trp Leu Cys Asn Gly Arg Cys Gly Arg

Cys Glu Gly Val Asn Gly Arg Arg Leu Arg
1 5 10

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 59
Cys Leu Ser Cys Asn Gly Arg Cys Pro Ser
1 5 10

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 60
Cys Glu Val Cys Asn Gly Arg Cys Ala Leu
1 5 10

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 61
Gly Arg Ser Gln Met Gln Ile
1 5

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 62
His His Thr Arg Phe Val Ser
1 5

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 63
Ser Lys Gly Leu Arg His Arg
1 5

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 64
Val Ala Ser Val Ser Val Ala
1 5

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 65
Trp Arg Val Leu Ala Ala Phe
1 5

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 66
Lys Met Gly Pro Lys Val Trp
1 5

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 67
Ile Phe Ser Gly Ser Arg Glu
1 5

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<223> 合成肽

<400> 73

Ala Leu Val Gly Leu Met Arg
1 5

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 74

Leu Trp Ala Glu Met Thr Gly
1 5

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 75

Cys Trp Ser Gly Val Asp Cys
1 5

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 76

Asp Thr Leu Arg Leu Arg Ile
1 5

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 77

Ser Lys Ser Ser Gly Val Ser
1 5

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 68
Ser Pro Gly Ser Trp Thr Trp
1 5

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 69
Asn Pro Arg Trp Phe Trp Asp
1 5

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 70
Gly Arg Trp Tyr Lys Trp Ala
1 5

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 71
Ile Lys Ala Arg Ala Ser Pro
1 5

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 72
Ser Gly Trp Cys Tyr Arg Cys
1 5

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<220>

<223> 合成肽

<400> 78

Ile Val Ala Asp Tyr Gln Arg
1 5

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 79

Val Trp Arg Thr Gly His Leu
1 5

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 80

Val Val Asp Arg Phe Pro Asp
1 5

<210> 81

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 81

Leu Ser Met Phe Thr Arg Pro
1 5

<210> 82

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 82

Gly Leu Pro Val Lys Trp Ser
1 5

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 83

Ile Met Tyr Pro Gly Trp Leu
1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 84

Cys Val Met Val Arg Asp Gly Asp Cys
1 5

<210> 85

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 85

Cys Val Arg Ile Arg Pro Cys
1 5

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 86

Cys Gln Leu Ala Ala Val Cys
1 5

<210> 87

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 87

Cys Gly Val Gly Ser Ser Cys
1 5

<210> 88

<211> 7

<212> PRT

<210> 103
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 103
Cys Tyr Pro Ala Asp Pro Cys
1 5

<210> 104
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 104
Cys Lys Ala Leu Ser Gln Ala Cys
1 5

<210> 105
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 105
Cys Thr Asp Tyr Val Arg Cys
1 5

<210> 106
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 106
Cys Gly Glu Thr Met Arg Cys
1 5

<210> 107
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 107
Gly Ile Cys Lys Asp Asp Trp Cys Gln
1 5

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 93
Cys Pro Glu His Arg Ser Leu Val Cys
1 5

<210> 94
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 94
Cys Leu Val Val His Glu Ala Ala Cys
1 5

<210> 95
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 95
Cys Tyr Val Glu Leu His Cys
1 5

<210> 96
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 96
Cys Trp Arg Lys Phe Tyr Cys
1 5

<210> 97
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 97
Cys Phe Trp Pro Asn Arg Cys
1 5

<210> 98

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 98
Cys Tyr Ser Tyr Phe Leu Ala Cys
1 5

<210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 99
Cys Pro Arg Gly Ser Arg Cys
1 5

<210> 100
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 100
Cys Arg Leu Gly Ile Ala Cys
1 5

<210> 101
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 101
Cys Asp Asp Ser Trp Lys Cys Pro
1 5

<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 102
Cys Ala Gln Leu Leu Gln Val Ser Cys
1 5

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 88

Cys Val Ser Gly Pro Arg Cys
1 5

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 89

Cys Gly Leu Ser Asp Ser Cys
1 5

<210> 90

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 90

Cys Gly Glu Gly His Pro Cys
1 5

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 91

Cys Tyr Thr Ala Asp Pro Cys
1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 92

Cys Glu Leu Ser Leu Ile Ser Lys Cys
1 5

<210> 93

<211> 9

<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 108
Thr Ser Cys Asp Pro Ser Leu Cys Glu
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 109
Lys Gly Cys Gly Thr Arg Gln Cys Trp
1 5

<210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 110
Tyr Arg Cys Arg Glu Val Leu Cys Gln
1 5

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 111
Cys Trp Gly Thr Gly Leu Cys
1 5

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 112
Trp Ser Cys Ala Asp Arg Thr Cys Met
1 5

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 113
Ala Gly Cys Arg Leu Lys Ser Cys Ala
1 5

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 114
Ser Arg Cys Lys Thr Gly Leu Cys Gln
1 5

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 115
Pro Ile Cys Glu Val Ser Arg Cys Trp
1 5

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 116
Trp Thr Cys Arg Ala Ser Trp Cys Ser
1 5

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 117
Gly Arg Cys Leu Leu Met Gln Cys Arg

Cys Ser Ser Thr Met Arg Cys
1 5

<210> 123
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 123
Ser Ile Asp Ser Thr Thr Phe
1 5

<210> 124
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 124
Gly Pro Ser Arg Val Gly Gly
1 5

<210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 125
Trp Trp Ser Gly Leu Glu Ala
1 5

<210> 126
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 126
Leu Gly Thr Asp Val Arg Gln
1 5

<210> 127
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 127
Leu Val Gly Val Arg Leu Leu
1 5

<210> 128
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 128
Gly Arg Pro Gly Asp Ile Trp
1 5

<210> 129
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 129
Thr Val Trp Asn Pro Val Gly
1 5

<210> 130
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 130
Gly Leu Leu Leu Val Val Pro
1 5

<210> 131
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 131
Phe Ala Ala Thr Ser Ala Glu
1 5

<210> 132
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 132
Trp Cys Cys Arg Gln Phe Asn
1 5

<210> 133
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 133
Val Gly Phe Gly Lys Ala Leu
1 5

<210> 134
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 134
Asp Ser Ser Leu Arg Leu Pro
1 5

<210> 135
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 135
Lys Leu Trp Cys Ala Met Ser
1 5

<210> 136
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 136
Ser Leu Val Ser Phe Leu Gly
1 5

<210> 137
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 137

Gly Ser Phe Ala Phe Leu Val
1 5

<210> 138

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 138

Ile Ala Ser Val Arg Trp Ala
1 5

<210> 139

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 139

Thr Trp Gly His Leu Arg Ala
1 5

<210> 140

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 140

Gln Tyr Arg Glu Gly Leu Val
1 5

<210> 141

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 141

Gln Ser Ala Asp Arg Ser Val
1 5

<210> 142

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 152

Val Pro Cys Arg Phe Lys Gln Cys Trp
1 5

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 153

Cys Thr Ala Met Arg Asn Thr Asp Cys
1 5

<210> 154

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 154

Cys Arg Glu Ser Leu Lys Asn Cys
1 5

<210> 155

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 155

Cys Met Glu Met Gly Val Lys Cys
1 5

<210> 156

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 156

Val Thr Cys Arg Ser Leu Met Cys Gln
1 5

<210> 157

<211> 8

<220>

<223> 合成肽

<400> 142

Tyr Met Phe Trp Thr Ser Arg
1 5

<210> 143

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 143

Leu Val Arg Arg Trp Tyr Leu
1 5

<210> 144

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 144

Thr Ala Arg Gly Ser Ser Arg
1 5

<210> 145

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 145

Thr Thr Arg Glu Lys Asn Leu
1 5

<210> 146

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 146

Pro Lys Trp Leu Leu Phe Ser
1 5

<210> 147

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 147

Leu Arg Thr Asn Val Val His
1 5

<210> 148

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 148

Ala Val Met Gly Leu Ala Ala
1 5

<210> 149

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 149

Val Arg Asn Ser Leu Arg Asn
1 5

<210> 150

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 150

Thr Asp Cys Thr Pro Ser Arg Cys Thr
1 5

<210> 151

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 151

Ser Trp Cys Gln Phe Glu Lys Cys Leu
1 5

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 162
Cys Tyr Leu Val Asn Val Asp Cys
1 5

<210> 163
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 163
Cys Ile Arg Ser Ala Val Ser Cys
1 5

<210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 164
Leu Val Cys Leu Pro Pro Ser Cys Glu
1 5

<210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 165
Arg His Cys Phe Ser Gln Trp Cys Ser
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 166
Phe Tyr Cys Pro Gly Val Gly Cys Arg
1 5

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 157
Cys Asn Asn Val Gly Ser Tyr Cys
1 5

<210> 158
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 158
Cys Gly Thr Arg Val Asp His Cys
1 5

<210> 159
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 159
Cys Ile Ser Leu Asp Arg Ser Cys
1 5

<210> 160
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 160
Cys Ala Met Val Ser Met Glu Asp
1 5

<210> 161
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 161
Cys Tyr Leu Gly Val Ser Asn Cys
1 5

<210> 162

<210> 167
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 167
Ile Ser Cys Ala Val Asp Ala Cys Leu
1 5

<210> 168
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 168
Glu Ala Cys Glu Met Ala Gly Cys Leu
1 5

<210> 169
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 169
Pro Arg Cys Glu Ser Gln Leu Cys Pro
1 5

<210> 170
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 170
Arg Ser Cys Ile Lys His Gln Cys Pro
1 5

<210> 171
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 171
Gln Trp Cys Ser Arg Arg Trp Cys Thr
1 5

<210> 172
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 172
Met Phe Cys Arg Met Arg Ser Cys Asp
1 5

<210> 173
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 173
Gly Ile Cys Lys Asp Leu Trp Cys Gln
1 5

<210> 174
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 174
Asn Ala Cys Glu Ser Ala Ile Cys Gly
1 5

<210> 175
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 175
Ala Pro Cys Gly Leu Leu Ala Cys Ile
1 5

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 176
Asn Arg Cys Arg Gly Val Ser Cys Thr
1 5

<210> 177
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 177
Phe Pro Cys Glu Gly Lys Lys Cys Leu
1 5

<210> 178
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 178
Ala Asp Cys Arg Gln Lys Pro Cys Leu
1 5

<210> 179
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 179
Phe Gly Cys Val Met Ala Ser Cys Arg
1 5

<210> 180
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 180
Ala Gly Cys Ile Asn Gly Leu Cys Gly
1 5

<210> 181
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 181
Arg Ser Cys Ala Glu Pro Trp Cys Tyr

1	5
---	---

<210> 182
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 182
Asp Thr Cys Arg Ala Leu Arg Cys Asn
1 5

<210> 183
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 183
Gly Arg Cys Val Asp Gly Gly Cys Thr
1 5

<210> 184
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 184
Tyr Arg Cys Ile Ala Arg Glu Cys Glu
1 5

<210> 185
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 185
Lys Arg Cys Ser Ser Ser Leu Cys Ala
1 5

<210> 186
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 186

Ile Cys Leu Leu Ala His Cys Ala
1 5

<210> 187
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 187
Gln Ala Cys Pro Met Leu Leu Cys Met
1 5

<210> 188
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 188
Leu Asp Cys Leu Ser Glu Leu Cys Ser
1 5

<210> 189
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 189
Ala Gly Cys Arg Val Glu Ser Cys
1 5

<210> 190
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 190
His Thr Cys Leu Val Ala Leu Cys Ala
1 5

<210> 191
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 191
Ile Tyr Cys Pro Gly Gln Glu Cys Glu
1 5

<210> 192
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 192
Arg Leu Cys Ser Leu Tyr Gly Cys Val
1 5

<210> 193
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 193
Arg Lys Cys Glu Val Pro Gly Cys Gln
1 5

<210> 194
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 194
Glu Asp Cys Thr Ser Arg Phe Cys Ser
1 5

<210> 195
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 195
Leu Glu Cys Val Val Asp Ser Cys Arg
1 5

<210> 196
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 196

Glu Ile Cys Val Asp Gly Leu Cys Val
1 5

<210> 197

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 197

Arg Trp Cys Arg Glu Lys Ser Cys Trp
1 5

<210> 198

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 198

Phe Arg Cys Leu Glu Arg Val Cys Thr
1 5

<210> 199

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 199

Arg Pro Cys Gly Asp Gln Ala Cys Glu
1 5

<210> 200

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 200

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys
1 5 10

<210> 201

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 201

Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala
 1 5 10

<210> 202

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 202

Lys Ala Ala Lys Lys Ala Ala Lys Ala Ala Lys Lys Ala Ala
 1 5 10

<210> 203

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 203

Lys Leu Gly Lys Lys Leu Gly Lys Leu Gly Lys Lys Leu Gly Lys Leu
 1 5 10 15
 Gly Lys Lys Leu Gly
 20

<210> 204

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 204

Asp Leu Ser Leu Ala Arg Leu Ala Thr Ala Arg Leu Ala Ile
 1 5 10

<210> 205

<220>

<223> 合成肽

<400> 205

000

<210> 206

<220>

<223> 合成肽

<400> 206

000

<210> 207
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 207
Ser Met Ser Ile Ala Arg Leu
1 5

<210> 208
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 208
Cys Ala Arg Ala Cys
1 5

<210> 209
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 209
Glu Val Gln Ser Ala Lys Trp
1 5

<210> 210
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 210
Lys Arg Val Tyr Val Leu Gly
1 5

<210> 211
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 211
Gly Arg Leu Ser Val Gln Val
1 5

<210> 212
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 212
Trp Lys Pro Ala Ser Leu Ser
1 5

<210> 213
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 213
Phe Ala Val Arg Val Val Gly
1 5

<210> 214
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 214
Leu Val Arg Pro Leu Glu Gly
1 5

<210> 215
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 215
Gly Phe Tyr Arg Met Leu Gly
1 5

<210> 216
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 216
Glu Gly Arg Pro Met Val Tyr
1 5

<210> 217
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 217
Gly Ser Arg Ser Leu Gly Ala
1 5

<210> 218
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 218
Arg Val Trp Gln Gly Asp Val
1 5

<210> 219
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 219
Gly Asp Glu Leu Leu Ala
1 5

<210> 220
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 220
Phe Val Trp Leu Val Gly Ser
1 5

<210> 221
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 221
Gly Ser Glu Pro Met Phe Arg

1

5

<210> 222
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 222
Val Ser Phe Leu Glu Tyr Arg
1 5

<210> 223
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 223
Trp His Gln Pro Leu
1 5

<210> 224
<211> 7
<212> PRT
<213> e人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 224
Arg Gly Arg Trp Leu Ala Leu
1 5

<210> 225
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 225
Gln Val Glu Glu Phe Pro Cys
1 5

<210> 226
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 226

Leu Trp Leu Ser Gly Asn Trp
1 5

<210> 227
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 227
Gly Pro Met Leu Ser Val Met
1 5

<210> 228
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 228
Trp Thr Phe Leu Glu Arg Leu
1 5

<210> 229
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 229
Val Leu Pro Gly Gly Gln Trp
1 5

<210> 230
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 230
Arg Glu Val Lys Glu Ser
1 5

<210> 231
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

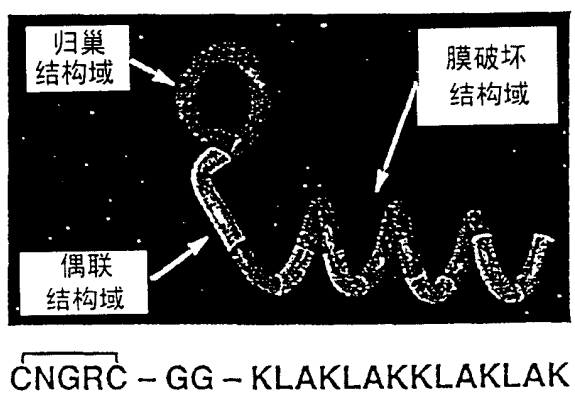


图1

<400> 231
Arg Thr Pro Ala Ala Val Met
1 5

<210> 232
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 232
Gly Glu Trp Leu Gly Glu Cys
1 5

<210> 233
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 233
Pro Asn Pro Leu Met Pro Leu
1 5

<210> 234
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 234
Ser Leu Trp Tyr Leu Gly Ala
1 5

<210> 235
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 235
Tyr Val Gly Gly Trp Glu Leu
1 5

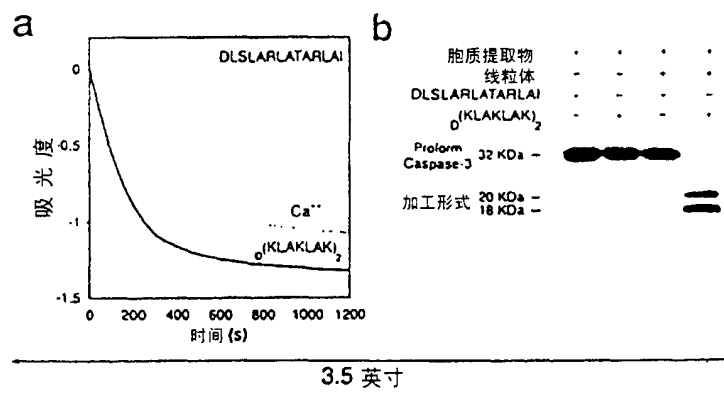


图2

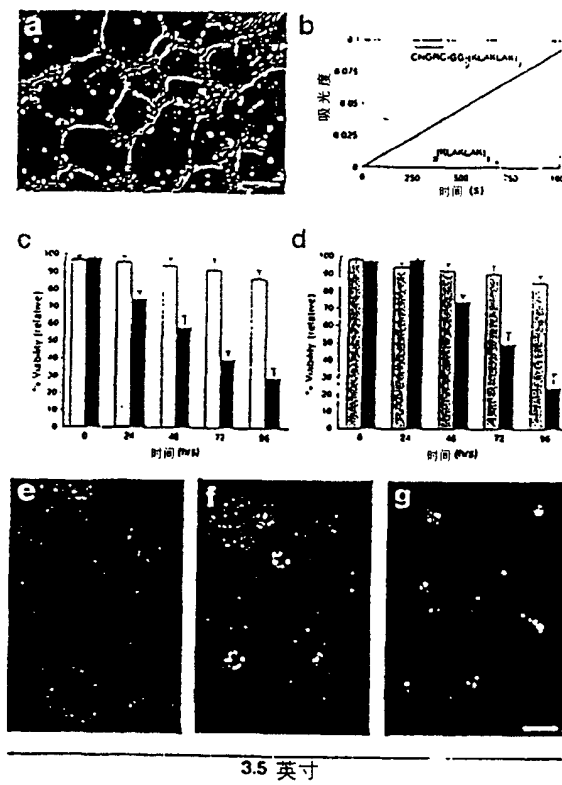


图 3

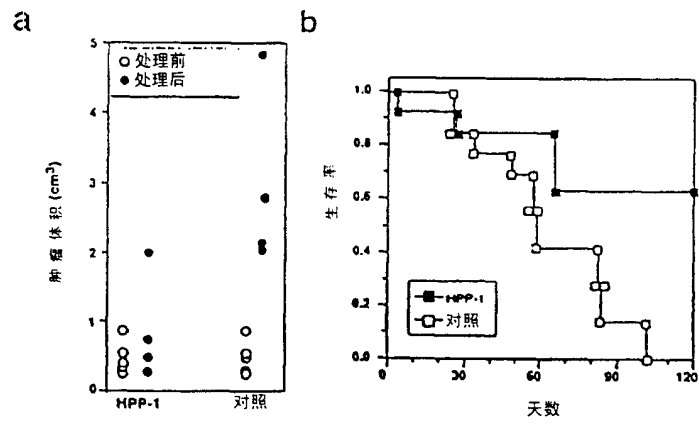


图4

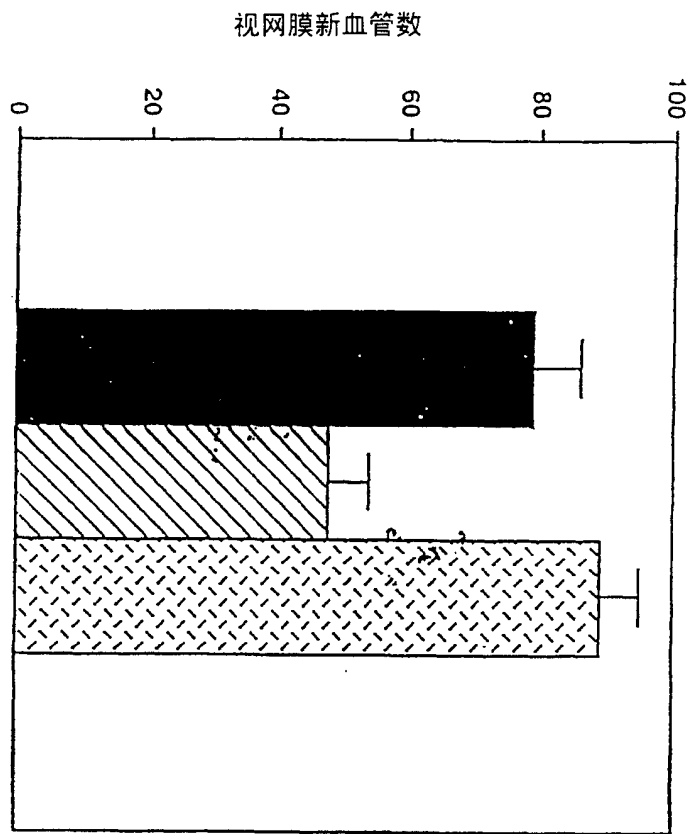


图5

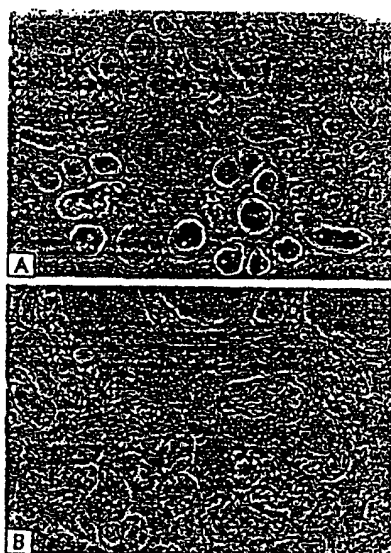


图6

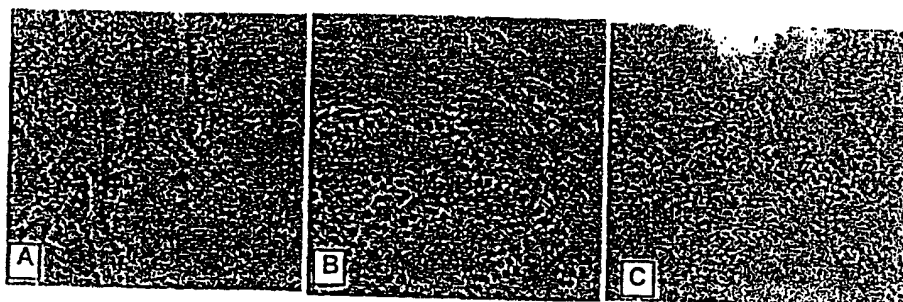


图7

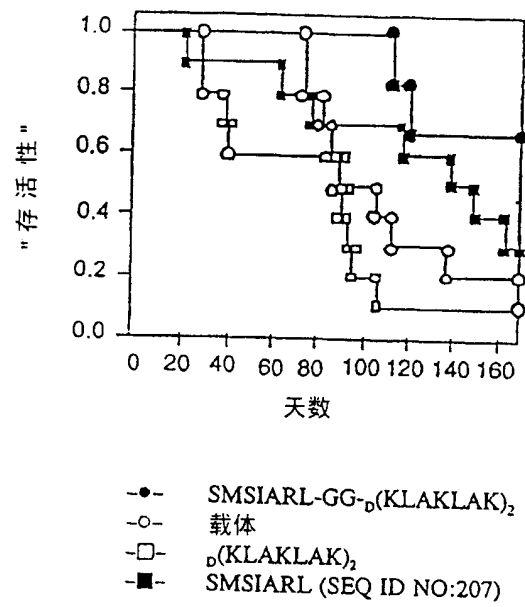


图8

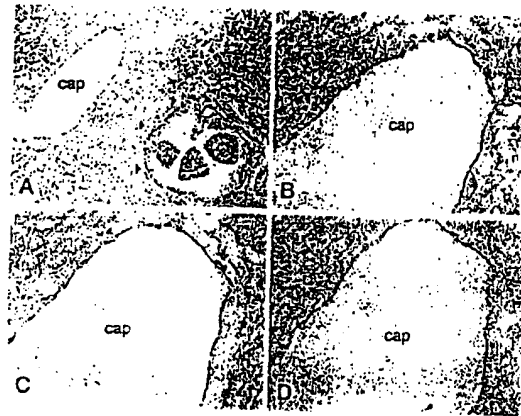


图9