



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112996528 B

(45) 授权公告日 2025.01.07

(21) 申请号 201980074348.6

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2019.09.11

A61K 38/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112996528 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2021.06.18

US 2012329707 A1, 2012.12.27

(30) 优先权数据

102018000008493 2018.09.11 IT

Salvatore Ponticelli et al.. Modulation of angiogenesis by a tetrameric tripeptide that antagonizes vascular endothelial growth factor receptor 1.《J Biol Chem》.2008, 第283卷(第49期), 摘要、第34252页右栏第3段-第34253页左栏第3段、第34257页右栏第4段、图1.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/057636 2019.09.11

Valeria Cicatiello et al.. Powerful anti-tumor and anti-angiogenic activity of a new anti-vascular endothelial growth factor receptor 1 peptide in colorectal cancer models.《Oncotarget》.2015, 第6卷(第12期), 摘要、第10564页右栏第5段-第10567页右栏第2段、图1.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/053772 EN 2020.03.19

审查员 曹晓聪

(73) 专利权人 安必圣有限责任公司

地址 意大利那不勒斯

(72) 发明人 梅诺蒂·鲁沃 达维德·罗谢洛

桑德罗·德法尔科

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

权利要求书1页 说明书24页

专利代理人 韦昌金 郑霞

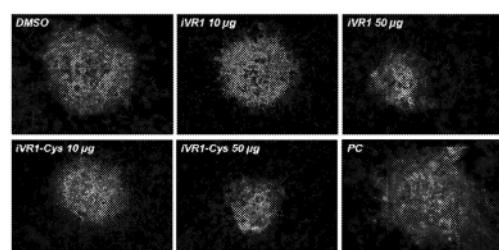
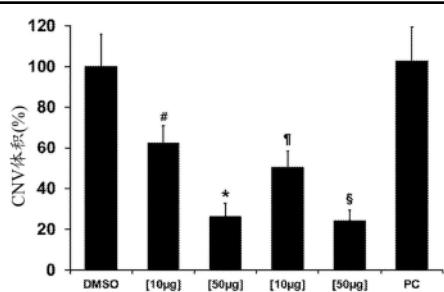
序列表19页 附图3页

(54) 发明名称

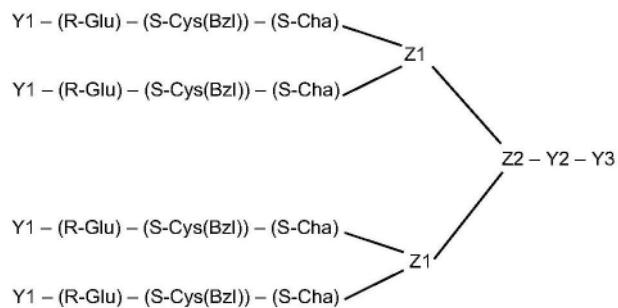
肽及其医学用途

(57) 摘要

本发明涉及肽、包含所述肽的组合物及其作为血管生成和/或新血管生成的抑制剂的用途。此外,本发明涉及所述肽和所述组合物用于治疗与不正确的血管生成和/或新血管生成相关的疾病的用途。特别地,在本文中述及与VEGFR1相关的血管生成和/或新血管生成。



1. 一种分离的肽，所述肽的特征在于以下式 (IIa)



(式 IIa)

其中

-Y1是氨基末端肽官能团(NH_2)；

-Glu表示谷氨酸；

-Cys(Bz1) 表示苄基半胱氨酸；

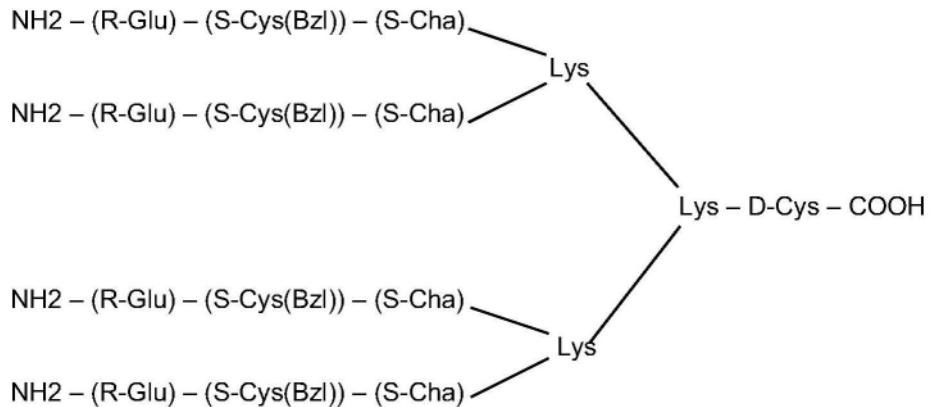
-Cha表示环己基丙氨酸；

-Y2是选自如下的一种 α -氨基酸:D-半胱氨酸、L-半胱氨酸、L-甲硫氨酸、D-甲硫氨酸、L-甲硫氨酸砜、D-甲硫氨酸砜、D-丝氨酸、L-丝氨酸、D-苏氨酸、L-苏氨酸;

-Y3为羧基基团；

-Z1和Z2为S-赖氨酸或R-赖氨酸。

2. 根据权利要求1所述的肽，所述肽的特征在于式 (IIb)，其中：



(式 IIb)。

3. 一种组合物，所述组合物包含至少一种根据权利要求1或2所述的肽和至少一种另外的药学上接受的成分。

肽及其医学用途

技术领域

[0001] 本发明涉及肽、包含所述肽的组合物及其作为血管生成(angiogenesis)和/或新血管生成(neoangiogenesis)的抑制剂的用途。此外,本发明涉及所述肽和所述组合物用于治疗与不正确的血管生成和/或新血管生成相关的疾病的用途。特别地,在本文中述及与VEGFR1相关的血管生成和/或新血管生成。

现有技术

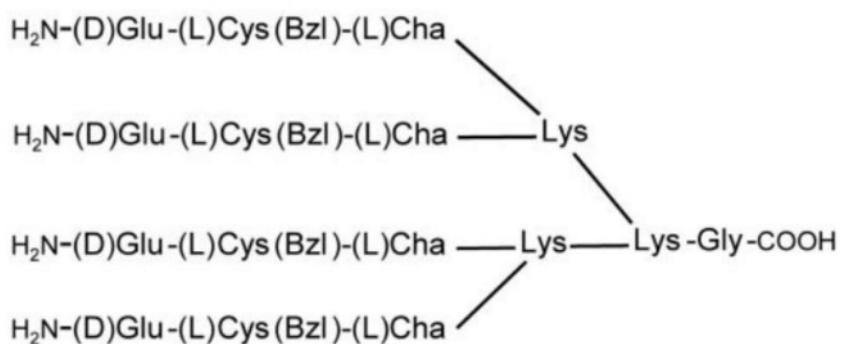
[0002] 鉴于抑制VEGFR-1的激活可以适用于相当严重和广泛范围的疾病,可以设想,将会强烈需要能够结合VEGFR-1并能够干扰配体VEGF-A、PIGF、VEGF-B和VEGF-A/PIGF异二聚体与VEGFR-1之间的相互作用的合成化合物。事实上,有利的是,合成化合物本质上不含生物来源的污染物,并且它们还可以以比重组来源的生物治疗剂低得多的成本生产。

[0003] 为了中和配体,许多治疗方法使用单克隆抗体,因为它们是特征在于高特异性和亲和力的分子。然而,合成分子也有其优势,因为它们生产更容易且更便宜,更稳定,并且更容易递送。

[0004] 在这方面, Ponticelli 等人最近在2008年描述了一种选自肽文库的四聚体三肽, 其中具有式 (R-Glu) - (S-Cys (Bz1)) - (S-Cha) 的肽链被四聚化在三个赖氨酸的“核心”上 (Tam, J. P. 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5409-5413)。

[0005] 四聚体肽具有以下结构:

[0006] 式(I)



[0008] Ponticelli等人报道的科学证据展示出上述四聚体肽在体外能够结合VEGFR1，并抑制PIGF、VEGF-A和VEGF-B的相互作用， IC_{50} 为约10 μ M。此外，该肽不能结合VEGFR-2，也不干扰VEGF-A对VEGFR-2的激活。

[0009] 最后,该肽:

[0010] 1) 在体外显示出抗血管生成活性,干扰PIGF和VEGF-A的促血管生成活性;

[0011] 2) 在角膜中能够代替VEGF-A-sFlt1结合(在生理条件下不形成血管),从而使角膜无VEGF-A(VEGF-A free)并能够抑制新血管生成;

[0012] 3)当腹膜内施用时,减少肿瘤生长、血管生成和动脉生成以及转移;和

[0013] 4) 当玻璃体内施用时,减少脉络膜新血管形成(Cicatiello等人2015)。

[0014] 该肽的抗血管生成活性是由于抑制新血管的形成和抑制炎症细胞(优选地单核巨噬细胞)在新血管生成部位的募集的能力两者。

[0015] 抗动脉生成活性是基于抑制平滑肌细胞在新血管生成部位募集的能力。

[0016] 发明目的

[0017] 在本文中,本发明的作者惊讶地发现,通过在肽的C-末端插入化学基团,特别是特征在于侧链具有与硫醇或硫醚基团相当的空间位阻的氨基酸,人们显著提高了分子的活性。

[0018] 事实上,上述修饰不损害与VEGFR1的选择性结合以及以剂量依赖性方式与VEGF-A和/或P1GF竞争结合VEGFR1的能力。相反,这些修饰能够在低于1000nM的浓度对P1GF或VEGF与VEGFR1之间的相互作用产生50%的抑制(IC_{50}) ;考虑到Ponticelli等人报道的肽对VEGFR1的亲和力等于10000nM或更高(表示为 IC_{50}) ,这是完全出乎意料的结果。换句话说,本发明的肽具有比Ponticelli等人报道的肽高约一个数量级的抑制能力。

[0019] 此外,本发明的作者惊讶地发现,当口服施用或通过灌胃施用时,在Ponticelli等人中描述的肽和本发明的肽都展示出显著的抑制脉络膜新血管形成的能力。因此,这些分子对于治疗(优选地通过口服施用)与血管生成(优选地VEGFR1依赖性血管生成)改变相关的疾病或在任何情况下由血管生成(优选地VEGFR1依赖性血管生成)改变引起的疾病是治疗有效的。

[0020] 下面是本发明的详细描述,以及参考以下附图和定义的非限制性说明性实例。

[0021] 附图简述

[0022] -图1示出了iVR1和iVR1-Cys以及抗P1GF单克隆抗体对P1GF诱导的VEGFR-1磷酸化的抑制活性。通过蛋白印迹法对293-VEGFR-1细胞进行20ng/ml P1GF诱导的VEGFR-1磷酸化分析。iVR1-Cys和iVR1以5 μ M的浓度同时添加至P1GF。使用浓度为3.3nM的人类抗P1GF中和单克隆抗体作为抑制对照。PBS用作阴性对照。

[0023] -图2示出,玻璃体内施用的iVR1-Cys以剂量依赖性方式抑制激光诱导的脉络膜新血管形成。与注射媒介物(DMSO)相比,单次玻璃体内注射10 μ g或50 μ g的iVR1-Cys引起的脉络膜新血管形成的剂量依赖性减少等于48.9%和75.9%。相同量的iVR1引起的CNV抑制等于37.8%和73.9%。对照肽(PC)未显示出抑制能力。对于iVR1 10 μ g和50 μ g在n=12个和15个斑点上进行新血管形成体积的量化,对于iVR1-Cys 10 μ g和50 μ g在n=10个和8个斑点上进行新血管形成体积的量化;对于PC在n=15个斑点上进行新血管形成体积的量化,并且对于DMSO在n=14个斑点上进行新血管形成体积的量化。数据表示为相对于对照的平均值 \pm SEM。#p<0.05;*p>0.0002;¶p<0.02;§p>0.002;对比PC和DMSO。下方是代表CNV的图像。比例尺代表100 μ m。

[0024] -图3示出,口服施用的iVR1-Cys抑制激光诱导的脉络膜新血管形成。与媒介物相比,每天两次口服施用50mg/Kg的iVR1-Cys持续7天,引起脉络膜新血管形成减少45.9%。相同量的iVR1引起类似的CNV抑制(49.7%)。对于iVR1-Cys在n=18个斑点上进行新血管形成体积的量化,对于iVR1在n=20个斑点上进行新血管形成体积的量化,并且对于媒介物在n=10个斑点上进行新血管形成体积的量化。数据表示为相对于对照的平均值 \pm SEM.*p=0.001和§p=0.007,对比DMSO。下方是代表CNV的图像。比例尺代表100 μ m。

[0025] 定义

[0026] 在本文中,术语“VEGF”意指血管内皮生长因子。在人类中存在5种不同的血管内皮生长因子,VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D和P1GF,由5种不同的基因编码。都是糖基化的二聚体蛋白。

[0027] 在本文中,术语“VEGF-A”意指血管内皮生长因子-A,以前也称为VPF(血管通透性因子)。它是VEGF家族中最强有力的因子,在生理性和病理性血管生成中起着决定性作用。通过选择性剪接获得的至少六种不同亚型已在人类中描述。它们都能够与两种受体相互作用,这两种受体被称为VEGFR-1和VEGFR-2。

[0028] 在本文中,术语“P1GF”意指胎盘生长因子,其作用仅限于与病理状态相关的血管生成状况。在人类中已经描述了四种不同的亚型。都能够特异性地结合VEGFR-1。VEGF-A和P1GF在病理状况中以强的协同作用起作用,因为两者都与VEGFR-1相互作用,并且因为当两个相应的基因在同一细胞中表达时,它们能够产生能够与VEGFR-1相互作用或诱导VEGFR-1/VEGFR-2异二聚体化的VEGF-A/P1GF异二聚体。

[0029] 在本文中,术语“VEGFR-1”意指VEGF受体1,也称为F1t-1。VEGFR-1具有细胞内酪氨酸-激酶结构域,而细胞外部分由七个IgG样结构域组成。VEGF-A、VEGF-B或P1GF导致受体二聚体化,随后通过酪氨酸-激酶结构域的自磷酸化激活。除了在内皮细胞中表达,VEGFR-1还在许多其他类型的细胞中表达,包括平滑肌细胞、单核巨噬细胞、成纤维细胞和内皮前体细胞。它在募集不同类型的有助于血管生成的细胞中起着重要作用。在本文中,术语“可溶性VEGFR-1”(sVEGFR-1)意指VEGF受体1的可溶性形式,也称为sF1t-1。它由VEGFR-1的前六个IgG样胞外结构域加上一个尾组成,并且由VEGFR-1基因通过选择性剪接产生。它通常由表达VEGFR-1全长形式的相同细胞表达,但角膜除外,在角膜中可溶性形式优先表达,这对于维持角膜处于无血管状态是决定性的。全长和可溶性人类VEGFR1的信使序列优选地分别为SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2,而全长人类VEGFR1的蛋白序列分别是SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4。特征在于与本文描述的序列具有80% - 99.9%同一性的序列必须被认为是本说明书的一部分。

[0030] 在本文中,术语“VEGFR-2”意指VEGF受体2,在人类中也称为KDR,并且在小鼠中也称为F1k-1。VEGFR-2被VEGF-A特异性地结合,并且具有类似于对VEGFR-1描述的结构域和激活机制。与受体1不同,它主要在内皮细胞中表达。它在刺激内皮细胞的增殖、迁移和分化中具有重要作用。

[0031] 在本文中,术语“血管生成”意指从现有血管形成新血管的过程;在本文中,血管生成优选地被称为与各种类型的病理状况相关的新血管形成过程,所述病理状况优选地选自:

[0032] -新生血管性眼病,优选地选自:黄斑水肿、湿性型年龄相关性黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、早产儿视网膜病变、视网膜中央静脉阻塞视网膜病变、玻璃体出血和视网膜脱离及其组合;和/或

[0033] -实体肿瘤和/或肿瘤转移,所述肿瘤优选地选自:白血病和淋巴瘤,优选地急性淋巴细胞性白血病、急性非淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金病、婴儿或成人实体肿瘤、脑肿瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤、肾母细胞瘤、骨肉瘤和软骨肉瘤、肺肿瘤、结肠直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、子宫癌、卵巢癌、泌尿系统癌症、膀胱癌、口腔肿瘤、胰腺肿瘤、黑素瘤和皮肤肿瘤、胃肿瘤、脑肿瘤、甲状腺肿瘤、

喉肿瘤、肝肿瘤、睾丸肿瘤；和/或

[0034] -骨或关节疾病,优选地选自:类风湿性关节炎、滑膜炎、软骨和/或骨破坏、骨髓炎、滑膜组织肥大和/或增生、骨赘形成、赘生物和/或转移及其组合;和/或

[0035] -血管疾病,优选地选自:动脉粥样硬化、血管瘤、血管内皮瘤及其组合;和/或

[0036] -皮肤病,优选地选自:银屑病、疣、化脓性肉芽肿、毛发生长、卡波西肉瘤、创伤瘢痕瘤、变应性水肿、赘生物及其组合;和/或

[0037] -在脂肪组织疾病,优选地肥胖症中观察到的血管生成;和/或

[0038] -糖尿病和/或其后果,优选地视网膜病变和/或糖尿病足;和/或

[0039] -造血系统疾病,优选地AIDS和/或卡波西肉瘤。

[0040] 在本文中,术语“新血管生成”意指新的血管生成,优选地是指在先前没有新血管的组织中形成新血管和/或在已经血管化的组织中血管数量的增加;在本文中,新血管生成优选地依赖于VEGFR-1的活性。

[0041] 在本文中,术语“血管形成(vascularization)”意指血管生成(angiogenesis),即它们被用作同义词。

[0042] 在本文中,术语“新血管形成(neovascularization)”意指新血管生成(neoangiogenesis),优选地依赖于VEGFR-1的活性。

[0043] 在本文中,术语“动脉生成”意指通过用平滑肌细胞覆盖血管来稳定新血管的过程。

[0044] 在本文中,“抑制剂”意指能够通过结合受体本身和/或其可溶性配体来拮抗受体活性,从而阻止它们的相互作用的化学和/或生物实体。

[0045] 在本文中,术语“有效剂量”意指在其中本发明中描述的活性物质的施用能够确定期望的生物效应的剂量区间。如本领域技术人员所熟知的,有效剂量可以根据以下因素而变化:健康状态、需要治疗的个体的身体状况、年龄、活性物质的配方、照顾患者的医生的评估、单个个体的系统有效地响应的能力、期望的响应程度、分类群(例如人类、非人类灵长类动物、灵长类动物等)以及其他相关因素。预计,本发明中描述的活性物质的有效剂量将落在一个足够宽的区间内,该区间可通过常规试验确定。一般来说,如Ragan-Shaw等人(FASEB J. 2008 Mar; 22 (3) : 659-61)所报道的,并且还因此在本文中,当优选地全身施用,优选地通过肠途径全身施用,更优选地口服、舌下或直肠施用时,施用的有效剂量优选地在10mg/剂量和2000mg/剂量之间的范围内。可选地,当优选地玻璃体内施用时,施用的有效剂量在1mg/剂量和100mg/剂量之间的范围内。可选地,施用的有效剂量优选地在0.16mg/Kg体重至33.3mg/Kg体重之间的范围内。治疗方案提供单剂量或多剂量。

[0046] 本发明的优选实施方案的详述

[0047] 本发明的第一方面涉及肽,优选地多聚体肽,所述肽是分离的肽且特征在于以下通式(II):

[0048] $\{ \{ [Y1-Glu-Cys(Bz1)-Cha]2-Z1 \} i-Z2 \} j-Z3 \} z-Y2-Y3$

[0049] (式II)

[0050] 其中

[0051] -Y1是肽的氨基末端官能团(NH₂)或至少一个优选地在表I中选择的化学基团。该列表还应理解为包括这样的化学基团(优选地氨基酸),所述化学基团(优选地氨基酸)具有

这样的空间位阻和/或化学性质(特别地在氨基酸的情况下侧链),所述空间位阻和/或化学性质(特别地在氨基酸的情况下侧链)模拟表I中列出的化学基团(优选地氨基酸)的空间位阻和/或化学性质(特别地在氨基酸的情况下侧链),和/或其特征在于相似性,优选地至少70%的相似性,所述相似性用本领域技术人员已知的方法确定,例如,但不排他地,用Woong-Hee Shin等人,Molecules 2015,20,12841-12862中描述的方法。

[0052] 在本文中,应该澄清的是,适用于定义本说明书的基团中存在的手性中心的绝对构型的D/L符号可以与按照文献中报道的规则的R/S符号互换,如本领域技术人员已知的。

[0053] 表I

N.	3字母代码	缩写
1	D-丙氨酸	D-Ala
2	D-天冬氨酸	D-Asp
3	D-缬氨酸	D-Val
4	D-谷氨酸	D-Glu
5	L-环己基丙氨酸	L-Cha
6	D-苯丙氨酸	D-Phe
7	D-苏氨酸	D-Thr
8	D-甲硫氨酸	D-Met
9	D-赖氨酸	D-Lys
10	D-半胱氨酸(S-乙酰氨基甲基)	D-Cys(Acm)
11	D-酪氨酸	D-Tyr
12	D-脯氨酸	D-Pro
13	D-亮氨酸	D-Leu
14	D-精氨酸	D-Arg
15	D-天冬酰胺	D-Asn
16	D-异亮氨酸	D-Ile
17	D-精氨酸(N ¹ -甲苯磺酰基)	D-Arg(Tos)
18	D-丝氨酸	D-Ser
19	L-半胱氨酸(S-苄基)	L-Cys(Bzl)
20	L-半胱氨酸(S-乙酰氨基甲基)	L-Cys(Acm)
21	D-组氨酸	D-His
22	D-谷氨酰胺	D-Gln
23	D-色氨酸	D-Trp
24	L-谷氨酸-(β-烯丙基)	L-Glu(β-OAll)
25	β-丙氨酸	β-Ala
26	L-半胱氨酸(S-对甲基苄基)	L-Cys(p-MeBzl)
27	L-半胱氨酸(S-叔丁基)	L-Cys(tBu)
28	L-甲硫氨酸-砜	L-Met(O)2
29	L-甲硫氨酸-亚砜	L-Met(O)
30	甘氨酸	Gly

[0054] -Glu表示谷氨酸, 优选地在氨基酸的C_α上呈绝对构型R(R-Glu)。

[0055] -Cys(Bzl)表示苄基半胱氨酸, 优选地在含有苄基基团的氨基酸的C_α上呈绝对构型S(S-苄基-半胱氨酸/S-Cys(Bzl)), 所述苄基基团与所述氨基酸侧链的硫连接。

[0056] -Cha表示环己基丙氨酸, 优选地在氨基酸的C_α上呈绝对构型S(S-环己基丙氨酸/S-Cha)。

[0057] -Y2优选地选自:

[0058] 1. 三肽R-Glu-S-Cys(Bzl)-S-Cha, 和

[0060] • α -氨基酸, 优选地选自甘氨酸或特征在于至少一个硫醇或硫醚基团的 α -氨基酸, 所述特征在于至少一个硫醇或硫醚基团的 α -氨基酸优选地选自表II中示出的那些及其组合。

[0061] 该列表还应理解为包括这样的化学基团(优选地氨基酸), 所述化学基团(优选地氨基酸)具有这样的空间位阻和/或化学性质(特别地在氨基酸的情况下侧链), 所述空间位阻和/或化学性质(特别地在氨基酸的情况下侧链)模拟表II中列出的化学基团(优选地氨基酸)的空间位阻和/或化学性质(特别地在氨基酸的情况下侧链)且其特征在于相似性, 优选地至少70%的相似性, 所述相似性用本领域技术人员已知的方法确定, 例如, 但不排除地, 用Woong-Hee Shin等人, Molecules 2015, 20, 12841-12862中描述的方法。

[0062] 表II

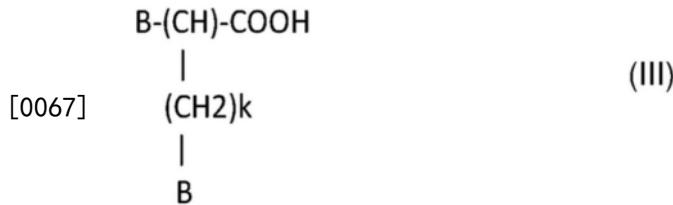
N.	Y
1	D-半胱氨酸
2	L-半胱氨酸
3	L-高半胱氨酸
4	D-高半胱氨酸
5	D-半胱氨酸-S-甲基
6	L-半胱氨酸-S-甲基
7	D-半胱氨酸-S-乙基
8	L-半胱氨酸-S-乙基
9	L-甲硫氨酸
10	D-甲硫氨酸
11	D-半胱氨酸-S-苄基
12	L-半胱氨酸-S-苄基

[0063]

[0064]	13	L-甲硫氨酸亚砜
	14	D-甲硫氨酸亚砜
	15	L-甲硫氨酸砜
	16	D-甲硫氨酸砜
	17	D-丝氨酸
	18	L-丝氨酸
	19	D-丝氨酸-O-甲基
	20	L-丝氨酸-O-甲基
	21	D-丝氨酸-O-乙基
	22	L-丝氨酸-O-乙基
	23	D-丝氨酸-O-苄基
	24	L-丝氨酸-O-苄基
	25	D-苏氨酸
	26	L-苏氨酸
	27	D-苏氨酸-O-甲基
	28	D-苏氨酸-O-甲基
	29	D-苏氨酸-O-乙基
	30	L-苏氨酸-O-乙基
	31	D-苏氨酸-O-苄基
	32	L-苏氨酸-O-苄基

[0065] -Y3优选地选自：羧基基团、羧酰胺基团、N-甲基取代的羧酰胺或二取代的N,N-二甲基基团、羟基基团和氢。

[0066] -Z1、Z2和Z3优选地表示三官能团，优选地特征在于以下式(III)：



[0068] 其中k是整数，优选地包含在1和4之间，并且B优选地是氨基基团或羟基基团。所述三官能分子优选地呈R或S绝对构型。

[0069] 优选地，Z1、Z2和Z3用于获得支链结构的目的。事实上，这种类型的结构通常用于按照为此目的的已知方法将肽多聚体化，例如当B是氨基基团时，可以使用Tam等人描述的方法(Tam J.P., 1988, PNAS, 85, 5409-5413)。

[0070] Z1、Z2和Z3可以以这样的方式组装，以获得具有多于一个基团Z1、Z2和Z3的式(II)结构，优选地包含1、3或7个三官能分子。

[0071] 根据本发明的优选实施方案，Z1和/或Z2和/或Z3优选地通过酰胺键以形成支链结构的方式彼此连接。可选地，它们可以通过酯键彼此连接，例如当B优选地是羟基基团时。

[0072] -i优选地是4、2或1。

[0073] -j优选地是2、1或0。

[0074] -z优选地是1或0。

[0075] 根据优选实施方案，当i=4时，j=2并且z=1。根据另一优选实施方案，当i=2时，

j=1并且z=0。

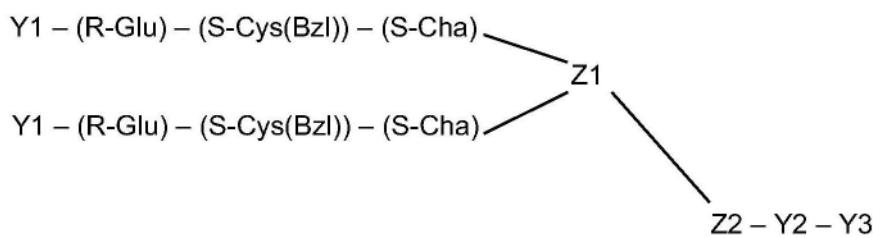
[0076] 根据另一优选实施方案,当*i*=1时,*j*=*z*=0。

[0077] 如果 $j=0$, 则省略 Z2 基团, 并且如果 $z=0$, 则省略 Z3 基团。

[0078] 为了本发明的目的,特别优选的实施方案设想i等于2,j等于1并且Z2为0或省略(换句话说,Z3不出现,即Z3不存在)。

[0079] 在本发明的特别优选的实施方案中, Z1、Z2和Z3是R-赖氨酸或S-赖氨酸($k=4$), 并且i优选地等于2。

[0080] 本发明的多聚体肽的优选的式由下式(式IIa)表示：

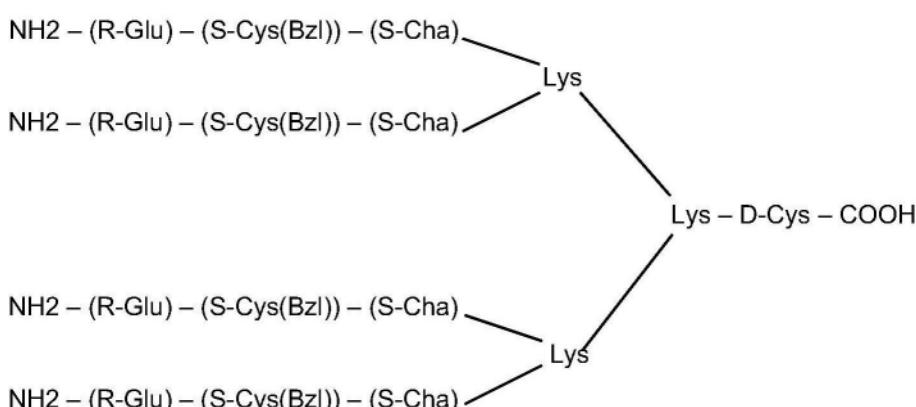


[0081]

$$\begin{array}{c}
 \text{Y1} - (\text{R-Glu}) - (\text{S-Cys(Bzl)}) - (\text{S-Cha}) \\
 \text{Y1} - (\text{R-Glu}) - (\text{S-Cys(Bzl)}) - (\text{S-Cha})
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \nearrow \\
 \searrow
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \text{Z1} \\
 \text{Z1}
 \end{array}$$

[0082] (式11a)

[0083] 根据本发明的特别优选的实施方案,该肽是特征在于式(Ib)的四聚体肽:



〔0085〕 (式11b)

〔0086〕 其由・

〔0087〕 -Y1是NH：

[0088] -Y2是D-半胱氨酸。

[0089] -V3呈羧基团。

[0090] -71 72和73加上

[0091] - i 筆手2.

[0092] - 1等于2，并且

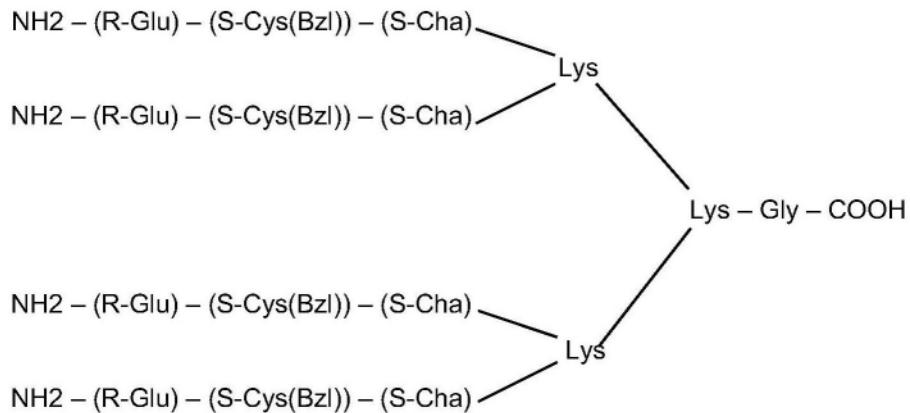
[0093] 等于零 即不左右

[0094] 为了方便

为了方便起见

[0095] 上述肽显示出生物活性,优选地调节活性,更优选地抑制血管生成和/或新血管生成的活性,该活性与Ponticelli等人所述的肽的活性相比得到了改进,如以下实验结果中所报道和讨论的,在本文中,实验结果具有非限制性的说明目的。在本文中述及的血管生成和/或新生血管生成优选地是前面定义的VEGFR1依赖性的。

[0096] Ponticelli等人中描述的肽也是一种四聚体肽,其特征在于式(IIC):



[0098] (式IIc)

[0099] 其中：

[0100] - Y1是NH₂;

[0101] - Y2是甘氨酸；

[0102] -Y3是羧基基因

[0103] -Z1、Z2和Z3如上定义；

[0104] -i等于2;

[0105] - j等于1;并且

[0106] -z等于零。

[0107] 为了方便起见,从此刻起,特征在于式IIc的肽的特别优选的实施方案将被称为iVR1。

[0108] 本发明的作者惊讶地发现,通过修饰IVR1,特别是在羧基末端,优选地通过插入R-Glu-S-Cys (Bz1)-S-Cha基团或 α -氨基酸进行修饰,人们获得特征在于改进的生物活性(优选地改进的调节能力,优选地通过抑制如以上定义的血管生成和/或新血管生成)的肽,所述 α -氨基酸优选地选自特征在于至少一个硫醇或硫醚基团的 α -氨基酸,所述特征在于至少一个硫醇或硫醚基团的 α -氨基酸优选地选自表II中示出的那些及其组合。

[0109] 事实上,如实施例中更详细显示和讨论的,iVR1-Cys展示出以剂量依赖性方式抑制P1GF和VEGF-A两者与VEGFR-1相互作用的能力,这种能力比iVR1有所改进。特别是,iVR1-Cys能够抑制P1GF与VEGFR-1相互作用的50%的浓度(IC_{50})低于1000nM,而抑制VEGF-A/VEGFR-1的 IC_{50} 接近或略高于1000nM。在另一方面,在接近10000nM的浓度,iVR1能够抑制P1GF与VEGFR-1相互作用的50%(IC_{50})。类似地,iVR1对VEGF-A/VEGFR-1抑制的 IC_{50} 接近或略高于10000nM。

[0110] 因此, iVR1-Cys显示的抑制能力是报道的iVR1的抑制能力的10倍大。

[0111] 此外,本作者通过体内测定展示,对比媒介物和PC, iVR1引起脉络膜新血管形成的抑制为37.8%和39.3% ($p<0.05$),而对比媒介物和PC, iVR1-Cys引起的抑制为48.9%和

51.0% (p<0.02)。因此, iVR1-Cys显示出比肽iVR1更大的抑制效力,因为它进一步减少了19.3%的新血管形成。

[0112] 最后,当口服施用或通过灌胃施用时,通过实施例测试的两种肽与媒介物相比能够诱导对新血管形成的显著抑制。

[0113] 后一个事实特别重要,因为尽管Ponticelli等人和Cicatiello等人2015已经展示了iVR1通过玻璃体内注射抑制脉络膜血管生成和新血管形成的能力,但绝对未预料通过不同途径(特别是通过灌胃)施用肽能够维持或甚至改进治疗效力,尤其是在高度复杂的器官如眼睛的情况下,以及由不受调控的(优选地增加的)血管生成/新血管生成引起的或在任何情况下与不受调控的(优选地增加的)血管生成/新血管生成相关的影响眼睛的疾病的情况下能够维持或甚至改进治疗效力。特别地,所述及的眼睛的新血管疾病优选地选自:黄斑水肿、湿性型年龄相关性黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、早产儿视网膜病变、视网膜中央静脉阻塞、玻璃体出血和视网膜脱离及其组合。

[0114] 根据这一证据,明确的是,通过口服途径或通过灌胃施用本发明的肽,对于治疗通常与血管生成/新血管生成相关的疾病,诸如例如癌症,也是治疗有效的。所述及的血管生成或新血管生成优选地是VEGFR1依赖性的。

[0115] 根据本发明的一种实施方案,肽可以被修饰以促进或改进递送,所述修饰优选地通过PEG化,或使用容器/穿梭体(shuttle)/载体系统,优选地脂质体、胶束、胶囊、乳剂、基质、凝胶等进行。

[0116] 本发明的另一方面涉及一种组合物,该组合物包含如详细描述的肽和至少一种另外的药学上接受的成分。

[0117] 该组合物优选地包含至少一种特征在于式IIa的肽,更优选地特征在于式IIb的肽,即iVR1-Cys。

[0118] 在本文中,药学上接受的成分意指选自以下的化合物:赋形剂、稀释剂、载体、辅助剂(adjuvant)、防腐剂、抗生素、抗炎剂、油、维生素、抗氧化剂、螯合剂、增溶剂、粘度剂、惰性气体、表面活性剂、乳化剂、缓冲物质、免疫抑制剂、抗肿瘤剂及其组合。

[0119] 例如,根据一种实施方案,组合物包含本发明的肽与以下的组合:至少一种抗血管生成/抗新血管生成分子、中和P1GF作用的抗体、至少一种抗VEGFR-1、抗VEGFR-2、抗VEGFR-3抗体、至少一种抗VEGF-A、抗VEGF-B、抗VEGF-C、抗VEGF-D、抗VEGF-E抗体及其组合。

[0120] 本发明的另一方面涉及如以上所描述的肽,优选地特征在于式IIa的肽,更优选地特征在于式IIb的肽,即iVR1-Cys,用作药物。

[0121] 本发明的另一方面涉及如以上所描述的肽,优选地特征在于式IIa的肽,更优选地特征在于式IIb的肽,即iVR1-Cys,或如以上所描述的包含所述肽的组合物,用于治疗与不正确的血管生成/新血管生成相关或由不正确的血管生成/新血管生成引起的病理状况,即其中血管生成/新血管生成不受调控的疾病;血管生成/新血管生成优选地已经增加,并且因此需要被抑制。

[0122] 除了可用于治疗所述疾病外,如以上所描述的肽,优选地特征在于式IIa的肽,更优选地特征在于式IIb的肽,即iVR1-Cys,或如以上所描述的包含所述肽的组合物也可用于所述疾病的后续的进一步替代治疗处理。

[0123] 如先前已经描述的,如以先前定义的血管生成/新血管生成优选地依赖于VEGFR1

或VEGFR1途径或由VEGFR1或VEGFR1途径诱导/调节。

[0124] 所述疾病/状况优选地选自：

[0125] -新生血管性眼病,优选地选自:黄斑水肿、湿性型年龄相关性黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、早产儿视网膜病变、视网膜中央静脉阻塞视网膜病变、玻璃体出血和视网膜脱离及其组合;和/或

[0126] -实体肿瘤或液体肿瘤和/或肿瘤转移,所述肿瘤优选地选自:白血病和淋巴瘤,优选地急性淋巴细胞性白血病、急性非淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金病、婴儿或成人实体肿瘤、脑肿瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤、肾母细胞瘤、骨肉瘤和软骨肉瘤、肺肿瘤、结肠直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、子宫癌、卵巢癌、泌尿系统癌症、膀胱癌、口腔肿瘤、胰腺肿瘤、黑素瘤和皮肤肿瘤、胃肿瘤、脑肿瘤、甲状腺肿瘤、喉肿瘤、肝肿瘤、睾丸肿瘤;和/或

[0127] -骨或关节疾病,优选地选自:类风湿性关节炎、滑膜炎、软骨和/或骨破坏、骨髓炎、滑膜组织肥大和/或增生、骨赘形成、赘生物和/或转移及其组合;和/或

[0128] -血管疾病,优选地选自:动脉粥样硬化、血管瘤、血管内皮瘤及其组合;和/或

[0129] -皮肤病,优选地选自:银屑病、疣、化脓性肉芽肿、毛发生长、卡波西肉瘤、创伤瘢痕瘤、变应性水肿、赘生物及其组合;和/或

[0130] -在脂肪组织疾病,优选地肥胖症中观察到的血管生成;和/或

[0131] -糖尿病和/或其后果,优选地视网膜病变和/或糖尿病足;和/或

[0132] -造血系统疾病,优选地AIDS和/或卡波西肉瘤。

[0133] 为了上述医学目的,本发明的肽和组合物可以任选地与用于治疗上述疾病的已知药物组合,或者也可以在用于治疗上述疾病的已知药物之前或之后使用。

[0134] 此外,本发明的肽或组合物可以与用于治疗上述疾病的外科手术、放射治疗或化学治疗类型的已知治疗相关联。

[0135] 本发明的肽或如以上所描述的包含所述肽的组合物可以配制成通过任何途径施用。施用途径优选地选自:全身途径,优选地口服途径、灌胃、舌下或直肠途径,局部、皮下、肌内、静脉内、动脉内、腹膜内、皮内和表皮内途径。

[0136] 本发明的肽或组合物可以配制成固体,例如丸剂、片剂、颗粒剂、可溶性颗粒剂、小丸(pellet)、珠、锭剂等。可选地,本发明的肽或组合物可以配制成液体溶液,例如通过注射、吸入或雾化施用,或配制成滴剂或喷雾剂。

[0137] 本发明的肽或如以上所描述的包含所述肽的组合物可以作为推注(bolus)施用。

[0138] 本发明的肽或如以上所描述的包含所述肽的组合物可以通过医疗装置施用,例如通过支架、泵或贴片施用。

[0139] 施用优选地可以是连续的,通过受控释放或通过恒定释放,优选地使用眼部药物递送装置。

[0140] 特别优选通过口服途径或灌胃施用。事实上,如前所述,当通过灌胃施用时,本发明的肽,包括iVR1,显示出在抑制血管生成/新血管生成方面也是有效的。它们显示出对抑制眼睛中的血管生成/新血管生成也是有效的;换句话说,当本发明的肽,包括iVR1,通过灌胃施用时,令人惊讶地观察到眼睛中血管生成/新血管生成的抑制。所述及的血管生成/新血管生成优选地是VEGFR1依赖性的。

[0141] 根据这一科学证据,本发明的另一方面涉及通过口服或灌胃施用的本发明的肽,优选地至少一种特征在于式IIa的肽,更优选地特征在于式IIb的肽,即iVR1-Cys,和/或特征在于式IIc的肽,即iVR1,或包含所述肽的组合物,用于治疗由不正确的(优选地增加的)血管生成/新血管生成(优选VEGFR1依赖性血管生成/新血管生成)引起的疾病或在任何情况下与不正确的(优选地增加的)血管生成/新血管生成(优选VEGFR1依赖性血管生成/新血管生成)相关的疾病。

[0142] 所述疾病/状况优选地选自:

[0143] -新生血管性眼病,优选地选自:黄斑水肿、湿性型年龄相关性黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、早产儿视网膜病变、视网膜中央静脉阻塞视网膜病变、玻璃体出血和视网膜脱离及其组合;和/或

[0144] -实体肿瘤和/或肿瘤转移,所述肿瘤优选地选自:白血病和淋巴瘤,优选地急性淋巴细胞性白血病、急性非淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金病、婴儿或成人实体肿瘤、脑肿瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤、肾母细胞瘤、骨肉瘤和软骨肉瘤、肺肿瘤、结肠直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、子宫癌、卵巢癌、泌尿系统癌症、膀胱癌、口腔肿瘤、胰腺肿瘤、黑素瘤和皮肤肿瘤、胃肿瘤、脑肿瘤、甲状腺肿瘤、喉肿瘤、肝肿瘤、睾丸肿瘤;和/或

[0145] -骨或关节疾病,优选地选自:类风湿性关节炎、滑膜炎、软骨和/或骨破坏、骨髓炎、滑膜组织肥大和/或增生、骨赘形成、赘生物和/或转移及其组合;和/或

[0146] -血管疾病,优选地选自:动脉粥样硬化、血管瘤、血管内皮瘤及其组合;和/或

[0147] -皮肤病,优选地选自:银屑病、疣、化脓性肉芽肿、毛发生长、卡波西肉瘤、创伤瘢痕瘤、变应性水肿、赘生物及其组合;和/或

[0148] -在脂肪组织疾病,优选地肥胖症中观察到的血管生成;和/或

[0149] -糖尿病和/或其后果,优选地视网膜病变和/或糖尿病足;和/或

[0150] -造血系统疾病,优选地AIDS和/或卡波西肉瘤。

[0151] 将本发明的肽或组合物施用于任何需要它的动物,优选地需要抑制VEGFR-1依赖性新血管生成的动物。

[0152] 所述动物优选地为哺乳动物,更优选地所述动物为人类。

[0153] 施用的如以上所描述的肽或组合物的有效剂量优选地范围为:

[0154] -在10mg/剂量和2000mg/剂量之间,其中优选地全身施用,优选地通过全身性肠内途径,更优选地口服、舌下或直肠施用;或者

[0155] -在1mg/剂量和100mg/剂量之间,其中优选地玻璃体内施用。

[0156] 可选地,施用的有效剂量优选地在0.16mg/Kg体重和33.3mg/Kg体重之间的范围内。

[0157] 治疗方案优选地提供单剂量或多剂量。

[0158] 本发明的序列根据国际标准WIPO ST.25注释,并且其描述用程序Patent-In 3.5生成。序列的描述在此随附。

[0159] 在本发明中,表III中标识的序列和具有从80%至99.9%范围内的同一性的序列应被认为是所描述的。

[0160] 表III

[0161]

序列	名称	SEQ ID
atcgagggtcc	全长	SEQ ID
gcgggaggct	人类	NO: 1
cggagcgcgc	VEGFR1	
caggcggaca	mRNA	
ctcctctcggt		
ctcctccccg		
gcagcggcggt		
cggctcgag		
cgggctccgg		
ggctcggtgt		
cagcggccag		
cgggcgcctg		
gcggcgagga		
ttacccgggg		
aagtggttgt		
ctcctggctg		
gagccgcgag		
acgggcgcgtc		
agggcgcggg		
gccggcggcg		
gcaaacgaga		
ggacggactc		
tggcggccgg		
gtcggtggcc		
gcggggagcg		
cgggcaccgg		
gcgagcaggc		
cgcgtcgcg		
tcaccatggt		
cagctactgg		

[0162]

gacaccgggg tcctgctgtc cgcgctgctc agctgtctgc ttctcacagg atctagttca ggtcaaaat taaaagatcc tgaactgagt taaaaggca cccagcacat catgcaagca ggccagacac tgcacatccca atgcaggggg gaagcagccc ataaatggtc ttgcctgaa atggtagta agggaaagcga aaggctgagc ataactaaat ctgcctgtgg aagaaatggc aaacaattct gcagttacttt aacctgaac acagctcaag caaaccacac tggctctac agctgcaaat atctagctgt acctacttca aagaagaagg aaacagaatc tgcaatctat atatttataa gtgatacagg tagaccttgc gtagagatgt acagtgaat ccccgaaatt atacacatga ctgaaggaag ggagctgctc attccctgcc gggtaacgac acctaaccatc actgttactt taaaaaaagg tccacttgac actttgatcc ctgatggaaa acgcataatc tggacagta gaaagggctt catcatatca aatgcaacgt acaaagaaat agggctctg acctgtgaag caacagtcaa tgggcatttgc tataagacaa actatctcac acatcgacaa accaatacaa tcatacatgt ccaaataagc acaccacgccc cagtcaaatt acttagaggg catactttgc tcctcaatttgc tactgttacc actcccttga acacgagat tcaaattgacc tggagttacc ctgatggaaa aaataagaga gcttccgtaa ggcgacgaat tgaccaaagc aattccatgc ccaacatattt ctacagtgtt cttaactatttgc acaaaatgca gaacaaagac aaaggacttt atactgtcg tgtaaggagt ggaccatcat tcaaattgtt taacacctca gtcatatat atgataaaagc attcatact gtgaaacatc gaaaacagca ggtgctgaa accgttagtgc gcaagcggc ttaccggctc tctatgaaag tgaaggcatttccctcgccg gaagttgtat ggttaaaaga tgggttacccgt gcgactgaga aatctgtcg ctatgttact cgtggctact cgtaattat caaggacgta actgaagagg atgcagggaa ttatacaatc ttgctgagca taaaacagtc aaatgtgtt aaaaacctca ctgcccactt aattgtcaat gtgaaacccc agatttacga aaaggccgtg tcatcggttcc cagaccggc tcttaccca ctggcagca gacaaatccctt gacttgcacc gcataatggta tccctcaacc tacaatcaag tggttctggc acccctgtaa ccataatcat tccgaagcaa ggtgttactt ttgttccat aatgaagagt cctttatccctt ggtatgttgc accaacatgg gaaacagaat tgagagcatc actcagcgca tggcaataat agaaggaaag aataagatgg ctgcaccc gttggcttgc gactcttagaa ttctggaaat ctacatttgc atagcttcca ataaagtgg gactgtggaa agaaaacataa gcttttatat cacagatgtc ccaaattgggt ttcatgtttaa cttggaaaaaa atgcccacgg aaggagagga cctgaaactg tctgcacag ttaacaagttt ctatcaga gacgttactt ggattttactt gggacagtt aataacagaa caatgcacta cagtattagc aagcaaaaaa tggccatcac taaggagcac tccatcactt ttaatcttac catcatgaat gttccctgc aagattcagg cacctatgcc tgcagagcca ggaatgtata cacagggggaa gaaatctcc agaagaaaaga aattacaatc agagatcagg aagcaccata cctcctgcga aacctcagtg atcacacagt ggcacatcagc agttccacca cttagactg tcatgctaattt ggtgtccccc		
--	--	--

[0163]

agcctcagat cacttggttt aaaaacaacc acaaaaataca acaagagcct ggaattattt taggaccagg aagcagcacg ctgttattt aaagagtcac agaagaggat gaaggtgtct atcactgcaa agccaccaac cagaagggt ctgtggaaag tttagcatac ctcaactgttc aaggaacctc ggacaagttt aatctggagc tgatcactt aacatgcacc tggatggctg cgactcttt ctggctccta ttaaccctct ttatccgaaa aatgaaaagg tcttctctg aaataaagac tgactaccta tcaattataa tggaccaggaa tgaagtttgc ttggatggc agtggagcg gctccctt gatgccagca agtggagtt tgcccccggag agacttaaac tggcacaatc acttggaaaga ggggctttt gaaaaatgg tcaagcatca gcattggca ttaagaaatc acctacgtgc cgactgtgg ctgtaaaaat gctgaaagag ggggccccgg ccagcgagta caaagctctg atgactgagc taaaaatctt gaccacattt gcccaccatc tgaacgtgg taacctgctg ggagcctgca ccaagcaagg agggcctctg atggattt ttgaaatctg caaatatggaa aatctctcca actacctcaa gagcaaacgt gactttttt ttctcaacaa ggtgcagca ctacacatgg agcctaagaa agaaaaaaatg gagccaggcc tggaaacaagg caagaaacca agactagata gcgtcaccag cagcgaaagc ttgcgagct ccggcttca ggaagataaa agtctgagtg atgttggaga agaggaggat tctgacgggt tctacaagga gcccacact atgaaagatc tgatttctt cagtttcaa gtggccagag gcatggagtt cctgtctcc agaaatgtca ttcatcgaa cctggcagcg agaaacattc ttttatctga gaacaacgtg gtgaagatgg gtgattttgg cttggccgg gatatttata agaaccgg ttatgtgaga aaaggagata ctgcacttcc tctgaaatgg atggctctg aatctatctt tgacaaaatc tacagcacca agagcgacgt gtggcttac ggagtattgc tgtggaaat cttctccatc ggtgggttc cataccagg agtacaaatg gatgaggact ttgcagtcg cctgaggaa ggcattggaa tgagagctcc tgagtactct actcctgaaa tctatcagat catgctggac tgctggcaca gagacccaaa agaaaggcca agatttgcag aacttggaa aaaacttagt gatttgc aagcaaatgt acaacaggat ggtaaagact acatccaaat caatgccata ctgacaggaa atagtgggtt tacatactca actcctgcct tctctgagga cttctcaag gaaatgtt cagtcggaa gtttaattca ggaagctcg atgatgtcag atacgtaaat gcttcaagt tcatgagctt ggaaagaatc aaaacccgg aagaactttt accgaatgcc acccatgtt ttgtacta ccaggccgac agcagcactc tggccctc tcccatgt aagcgctca cctggactga cagcaaccc aaggcctcg tcaagattga cttggagatc accagtaaaa gtaaggagtc ggggctgtct gatgtcagca ggcccgatgg ctgcattcc agctgtggc acgtcagcga aggcaagcgc aggccaccc acgaccacgc tgagctggaa agggaaatcg cgtgctgc ccggccccc gactacaact cgggtgtcc ttactccacc ccacccatct agagtttgc acgaagcctt atttcttagaa gcacatgtgt atttatacc ccagggaaact agctttgc	
---	--

[0164]

gttattatgc atatataagt ttacaccctt atcttccat gggagccagc tgcttttg gattttta atagtgcctt ttttttttg actaacaaga atgttaactcc agatagagaa atagtgacaa gtgaagaaca ctactgctaa atccatgt tactcagtgt tagagaaatc cttcctaaac ccaatgactt ccctgctcca acccccgcac cctcagggca cgcaggacca gtttgattga ggagctgcac tgcacccca atgcacac tacccactg ggccagccct gcagccaaa acccaggca acaagccgt tagccccagg gatcactggc tggcctgagc aacatctgg gagtcctcta gcaggcctaa gacatgtgag gaggaaaagg aaaaaaaagca aaaagcaagg gagaaaagag aaaccggag aaggcatgag aaagaattt agacgcacca tgtgggcacg gagggggacg gggctcagca atgccattc agtggctcc cagctctgac cttctacat ttgagggccc agccaggagc agatggacag cgatgagggg acatttctg gattctggg gcaagaaaa ggacaaatcttgg actaaagcaa attttagaac ttacatgt gaagtggcatt tgcattcgt gcatgtttt attttagca ctgaggggg cactcaactc tgagccata ctttggctc ctctagtaag atgcactgaa aacttagcca gagtttaggtt gtcaggcaggc catgatggcc ttacactgaa aatgtcacat tctatttttgg gtatataat atagtccaga cacttaactc aatttctgg tattattctg tttgcacag ttagttgtga aagaaagctg agaagaatga aatgcagtc ctgaggagag gagtttctc catatcaaaa cgaggcgtga tggaggaaaaa aggtcaataa ggtcaaggaa aaaccccgctc tctataccaa ccaaaccaat tcaccaacac agttgggacc caaaacacag gaagtcagtc acgtttccctt ttcatttaat ggggattcca ctatctcaca ctaatctgaa aggtgtgg agagcattag ctggcgcata ttaagcactt taagctcctt gagtaaaaag gtggatgt atttatgcaa ggtatttctc cagttggac tcaggatatt agttaatgag ccatcaactag aagaaaagcc catttcaac tgcttgaaa ctgcctgg gtcaggcat gatgggata gggagacagg gtaggaaaagg ggcctactc ttcaaggctt aaagatcaag tggccctgg atcgctaagc tggctctgtt tgatgttattt tgcatttttgc tattttatgt gtcgcaccc tctgcagcca gtcagaagct ggagaggca cagttgg ctgctcttg gggagaagag tatgcttccctt tttatccatg taatttaact gtagaacctg agctctaagt aaccgaagaa tgtatgcctc tggctttagt tgccacatcc ttgtttaaag gctctctgtt tgaagagatg ggaccgtcat cagcacattt cctagtggcactt ctggcagcgg cttttgtgg aagactcaacta gccagaagag aggagtgg cagtccttc caccaagatc taaatccaaa caaaagcagg ctagagccag aagagaggac aaatcttgc tttccctt ctttacatac gcaaaaccacc ttttttttt ggcaatttttta taaatcgatg aactggagg aggttaaaca cagaaaaaaag aagacctcg tcaattcttctt actttttttt tttttccaa atcagataat agcccgacca atagtgataa caaataaaac cttagcttattt catgtcttga ttcaataat taattctt tcattaagag accataataa atactccctt tcaagagaaa agcaaaacca tttagattgt	
---	--

[0165]	tactcagctc cttcaaactc aggttttag catacatgag tccatccatc agtcaaagaa tggttccatc tggagttta atgttagaaag aaaaatggag actgtata atgagctgt tacaaagtgc ttgttcatta aaatagcact gaaaattgaa acatgaatta actgataata ttccaatcat ttgcattta tgacaaaaat ggtggact aacaaagaac gagcacttcc ttcagagtt tctgagataa tgtacgtgga acagtctggg tggaaatgggg ctgaaaccat gtgcaagtct gtgtctgtc agtccaagaa gtgacaccga gatgttaatt ttagggaccc gtgcctgtt tcctagccca caagaatgca aacatcaaac agataactcgc tagcctcatt taaattgatt aaaggaggag tgcacatcgg gccgacagtg gtgttaactgt atgtgtgt gtgtgtgt gtgtgtgt gtgtgtgggt gtatgtgt ttgtgcata actatttaag gaaactggaa tttaaagt actttatac aaaccaagaa tatatgctac agatataaga cagacatggt ttggcctat atttctagtc atgatgaatg tattttgtat accatctca tataataaaac ttccaaaaac aca		
	mvsywdtgv lcallscill tgsssgsklk dpelslkgtq himqagqtih lqcrgeaahk wslpemvske serlsitksa cgrngkqfcs titlntaqan htgfysckyl avptskkket esaiyifisd tgrpfvemys eipei ihmte grelpvipcrv tspnitytlk kfpldtlipd gkriiwsdrk gfiisnatyk eiglltceat vnglyktny lthrqntii dvqistprpv kllrghlavl nctattplnt rvqmtwsyspd eknkrasvrr ridqsnshan ifysvltidk mqnkdkglyt crvrsqpsfk svntsvhiyd kafitvkhk qqvletvagk rsyrlsmkvk afpspevvwl kdglpateks aryltrgysl iikdvteeda gnytllsik qsnvfknlta tlivnvkpqi yekavssfpd palyplgsrq iltctaygip qptikwfwhp cnhnhsearc dfcsnneest ildadsnmgn riesitqrrma iiegknkmas tlvvadsris giyiciasnk vgtvgrnisf yitdvpngfh vnlekmpteg edlklscvn kflyrdvtwi llrvnnrtm hysiskqkma itkehsitln itimnvsldq sgyacrarn vytgeeilqk keitirdqea pyllrnlsdh tvaissstt dchangvpep qitwfknnhk iqeqepgiilg pgsttfier vteedegvyh ckatnqkgsy essayltvqq tsdksnleli tlctcvaat lfwlllthi rkmkrsssei ktdylsiiimd pdevpldeqc erlpvaskw efarerlkig kslrgafgk vvqasafgik ksptcrtvav kmlkegatas eykalmtelk ilthighhln vvnllgactk qggplmvive yckygnlsny lkskrdlffi nkdaalhme p kkekmeple qgkkprldsv tssefassg fqedkslsdv eeeeedsdgfy kepitmedi sysfqvargm efssrkcih rdaarnill sennvvkicd fglardiykn pdyvrkgdtr lplkwmapes ifdkistks dvwsygvllw eifslggspv pgvqmdedfc srlregmrrmr apeystpeiy qimldcwhrd pkerprfael veklgdllqa nvqqdgkdyi pinailtgnz gftystpafs edffkesisa pkfnsgssdd vryvnafkfm sleriktfee llpnatsmfd dyqgdsstl aspmilkrtw tdkpkaslk idlrvtsksk esglsdvrs sfchsscgih segkrrftyd haelerkiac cspppdynsv vlystppi	全长 人类 VEGFR1 蛋白	SEQ ID NO: 2
	atggcagct actgggacac cggggccctg ctgtcgccgc tgctcagctg tctgcttc acaggatcta gtcagggttc aaaattaaaaa gatctgaac tgagttaaa aggcacccag cacatcatgc aagcaggcca gacactgcat ctccaatgca ggggggaaagc agccataaa tggctttgc ctgaaatggt gagtaaggaa agcggaaaggc tgagcataac taaatctgcc tggaaagaa atggcaaaca attctgcagt actttaacct tgaacacagc tcaagcaac cacactggct tctacagctg caaataatcta gctgtaccta ctccaaagaa gaaggaaaca gaatctgca tctatataatt tatttgtat acagtagac ctccgtaga gatgtacagt gaaatccccg aaattataaca catgactgaa ggaaggggagc tcgtcattcc ctggccgggt acgtcaccta acatcactgt tactttaaa aagttccac ttgacactt gatccctgat gaaaacgcga taatctggga cagtagaaag ggcttcatca tatcaaatgc aacgtacaaa gaaatagggc ttctgacctg tgaagcaaca gtcaatgggc atttgtataa gacaaactat ctcacacatc gacaaaccaa tacaatcata gatgtccaaa taagcacacc acgcccagtc aaattactta gaggccatac tcttgtccctc aattgtactg ctaccactcc ctgtacacagc	可溶性 人类 VEGFR1 mRNA	SEQ ID NO: 3

[0166]

agagttcaaa tgacctggag ttaccctgat gaaaaaaaaata agagagcttc cgttaaggcgca cgaattgacc aaagaacaattc ccatgccaac atattctaca gtgttcttac tattgacaaa atgcagaaca aagacaaagg actttatact tgtcgtgtaa ggagtggacc atcattcaaa tctgttaaca ctcagtgca tatatatgtaa aagcattca tcactgtgaa acatcgaaaaa cagcaggtgc ttgaaaccgt agctggcaag cggcttacc ggctctat gaaagtgaag gcattccct cggcggaaagt tgtatggta aaagatgggt tacctgcac tgagaaaatct gctcgctatt tgactcgtgg ctactcgta attatcaagg acgttaactga agaggatgca gggaaattata caatctgct gaggataaaaaa cagtcaaatg tgtttaaaaaa cctcaactgcc actctaattg tcaatgtgaa accccagatt tacgaaaagg ccgtgtcata gtttcagac cccgctctct acccactggg cagcagacaa atcctgactt gtaccgcata tggtatccct caacctacaa tcaagtgggt ctggcacccc tgtaaccata atcattccga agcaaggtgt gactttgtt ccaataatga agagtcctt atcctggatg ctgacagcaa catgggaaac agaattgaga gcatcactca ggcgcattggca ataatagaag gaaagaataa gcttccacca gctaacagtt ctgcacccatg gccacccata agcttctt ccaactactt ccatttcctt ccgtga		
mvsywdtgvl lcallsclll tgsssgsklk dpelslkgtq himqagqtih lqcrgeahk wslpemvske serlsitksa cgrngkqfcs ttlntaqan htgfysckyl avptskkket esaiyifisd tgrpfvemys eipeihamte grelvipcrv tspnivtik kfpldtlipd gkriwdsrk gfiisnatyk eiglltceat vnglyktny lthrqtntii dvqistprpv kllrghlvtl nctattplnt rvqmtwsypd eknkrasvrr ridqsnshan ifysvltidk mqnkdkglyt crvrsgpsfk svntsvhiyd kafitvkrk qqvletvagk rsyrlsmkvk afpspevvwl kdglpateks aryltrgysl iikdvteeda gnytllsik qsnvfknlta tlivnvkpqi yekavssfpd palyplgsrq iiltctaygip qptikwfwhp cnhhsearc dfcsnneest ildadsnmgn riesitqrma iiegknklpp anssfmlppt sfssnyfhflp	可溶性 人类 VEGFR1 蛋白	SEQ ID NO: 4

实施例

- [0167] VEGF-A/VEGFR1和P1GF/VEGFR-1相互作用的剂量依赖性抑制。
- [0168] 测试P1GF或VEGF-A与VEGFR-1受体结合的测定是基于ELISA方法[Ponticelli等人, JBC. 2008 Dec 5; 283 (49): 34250-9], 并使用从R&D Systems获得的试剂进行。
- [0169] 人类重组受体VEGFR-1, 特别是由与人类IgG Fc结构域融合的受体的七个胞外结构域组成的形式(R&D Systems, 目录号321-FL), 以在PBS pH 7.5中的0.5 μ g/ml的浓度在96孔微孔板的孔中(100 μ l/孔)在室温(RT)粘附16小时。
- [0170] 在使用由含有3% BSA的PBS pH 7.5组成的缓冲溶液封闭孔中的非特异性结合位点后, 向粘附有受体的孔中添加PBET(PBS pH 7.5、BSA 0.1%、EDTA 5mM、Tween 0.004%)中的人类来源的5ng/ml重组P1GF(R&D Systems, 目录号264-PG)或5ng/ml重组VEGF-A(R&D Systems, 目录号293-VE)。
- [0171] 与配体(即P1GF或VEGF-A)同时地, 以包含在780nM和50000nM之间的浓度添加分级剂量的iVR1、iVR1-Cys或对照肽(PC-[(S-Ser)-(S-Ala)-(S-Cha)三肽, 具有与iVR1肽的结构相同的四聚体结构])。结合反应在37°C进行1小时, 然后在室温进行1小时。
- [0172] 在结合和/或竞争步骤结束时, 以PBET中300ng/ml的浓度向孔中添加抗人类-P1GF生物素化多克隆抗体(R&D Systems, 目录号BAF264)或抗人类-VEGF-A(R&D Systems, 目录号BAF293)。在37°C孵育1小时, 然后在室温孵育1小时后, 向孔中添加HRP缀合的抗生物素蛋白-链霉抗生物素蛋白系统(Vectastain elite ABC试剂盒)和HRP底物(邻苯二胺-Sigma, 目录号P1526)。通过确定490nM处的吸光度进行量化。
- [0173] 肽的任何抑制活性以剩余结合的%来表示, 将四聚体肽存在的情况下获得的P1GF或VEGF-A与受体结合的数据与四聚体肽不存在时获得的数据进行比较。iVR1代表抑制

P1GF/VEGFR-1或VEGF-A/VEGFR-1相互作用的阳性对照。

[0174] 结果在表IV和表V中给出,并表明, iVR1-Cys展示出以剂量依赖的方式抑制P1GF和VEGF-A两者与VEGFR-1相互作用的能力。

[0175] iVR1-Cys能够抑制P1GF与VEGFR-1相互作用的50%的浓度(IC_{50})低于1000nM,而针对VEGF-A/VEGFR-1的 IC_{50} 接近或略高于1000nM。

[0176] 因此, iVR1-Cys具有的抑制能力为*VR1*的抑制能力的约10倍高,并且因此预期*iVR1-Cys*在涉及血管生成/新血管生成抑制的相同体外和体内实验方案中可以以10倍低的剂量使用,以获得与用*VR1*获得的效果相同的效果。

[0177] PC未提供抑制。

[0178] 表IV-P1GF/VEGFR-1相互作用的剂量依赖性抑制

肽[nM]	结合%		
	iVR1-Cys	iVR1	PC
780	83.82	99.36	98.88
1560	35.50	101.32	102.35
3125	25.54	96.10	99.53
6250	14.09	68.49	93.82
12500	12.59	44.57	87.21
25000	10.27	36.02	88.55
50000	9.18	26.26	90.16

[0180] 表V-VEGF-A/VEGFR-1相互作用的剂量依赖性抑制

肽[nM]	结合%		
	iVR1-Cys	iVR1	PC
780	92.32	98.36	100.09
1560	43.71	96.21	102.59
3125	21.70	93.93	95.20
6250	12.50	66.00	91.37
12500	9.81	37.02	100.04
25000	7.99	21.45	93.44
50000	6.50	8.60	87.93

[0182] 具有式 (II) 但Y2不同于D-半胱氨酸的四聚体肽抑制VEGF-A/VEGFR-1结合的能力通过以上描述的结合测定来评估。肽的Y2和相应的抑制VEGF-A/VEGFR-1相互作用的 IC_{50} 在表VI中示出。

[0183] 表VI-抑制VEGF-A/VEGFR-1相互作用的IC₅₀

Y2	IC ₅₀ , μM
L-半胱氨酸	2.03 ± 0.2
L-甲硫氨酸	2.15 ± 1.0
D-甲硫氨酸	2.89 ± 1.2
L-甲硫氨酸亚砜	15.7 ± 2.1
L-甲硫氨酸砜	4.62 ± 1.4
D-丝氨酸	2.43 ± 0.3
L-丝氨酸	2.90 ± 0.5
D-苏氨酸	2.60 ± 0.6
L-苏氨酸	1.29 ± 0.5

[0186] 抑制P1GF诱导的VEGFR-1磷酸化。

[0187] 进行了P1GF诱导的受体VEGFR-1磷酸化的测定,以评价肽iVR1-Cys的抑制能力并将其活性与iVR1的活性进行比较。

[0188] 为了激活VEGFR-1,使用了过表达该受体的细胞系,称为293-VEGFR-1,其通过稳定转染HEK-293细胞获得(Errico, M. 等人2004 JBC, 279:43929-43939)。

[0189] 为此目的,培养293-VEGFR-1细胞,直到达到亚汇合,并且然后通过将细胞在无血清培养基中保持/孵育至少16小时,使其“饥饿”。

[0190] 在饥饿步骤结束时,去除培养基,并用100μM Na₃VO₄孵育细胞单层5分钟,以抑制内源磷酸酶的活性。

[0191] 然后(1)在37°C在用于饥饿的培养基中用单独的20ng/ml P1GF刺激细胞10分钟,和(2)在5μM浓度的肽的存在下用P1GF刺激细胞。

[0192] 使用浓度为3.3nM的抗人类P1GF中和单克隆抗体(Thrombogenics)作为抑制对照。PBS用作阴性对照。

[0193] 在孵育结束时,用冷的100μM Na₃VO₄洗涤细胞,并且然后在含有Tris-HCl 20mM pH 8、EDTA 5mM、NaCl 150mM、1% Triton-X100、10% 甘油、乙酸锌10mM、Na₃VO₄ 100μM和蛋白酶抑制剂混合物的缓冲液中裂解,并在温和搅拌下在4°C孵育1小时。最后,将细胞裂解物以12000xg离心15分钟,以去除细胞碎片。提取物的量化使用Bio-Rad试剂用Bradford法进行。将100μg每种蛋白提取物加载到8.5%的还原性SDS-PAGE上,并且然后通过蛋白印迹法进行蛋白分析标准方法。

[0194] 1:500稀释的抗p-VEGFR-1抗体(R&D Systems,目录号AF4170)用于检测磷酸化的VEGFR-1,同时通过使用1:500稀释的抗VEGFR-1抗体(Sigma-Aldrich,目录号V4262)检测受体的非磷酸化形式来进行归一化。

[0195] 如图1中示出的,肽iVR1-Cys以结合测定(参见实施例1)中确定的其IC₅₀约5倍高的浓度(5000nM)使用,引起对受体的磷酸化强有力的抑制,类似于用中和抗体获得的抑制,并且明显大于用相同浓度的iVR1获得的抑制。

[0196] 通过玻璃体内和口服(灌胃)施用iVR1和iVR1-Cys抑制脉络膜新血管形成。

[0197] 激光诱导脉络膜新血管形成的实验模型需要对布鲁赫膜(Bruch' smembrane)产生损伤,布鲁赫膜的损伤使脉络膜与视网膜色素上皮(RPE)分开。这种损伤是由激光诱导的烧

灼引起的,烧灼导致布鲁赫膜穿孔,从而激活脉络膜视网膜血管化,即从脉络膜开始侵入上覆的视网膜组织的新血管的生长。这种小鼠模型总括了渗出型人类年龄相关性黄斑变性(AMD)的主要特征,并且事实上通常用作AMD的临床前模型。它使得能够评估感兴趣的分子的抗血管生成活性。

[0198] 为了能够使小鼠的眼底可视化并利用激光诱导损伤,按照下述实验程序,使用了Micron IV集成系统。

[0199] 首先,通过施加0.5%托吡卡胺滴眼液诱导动物瞳孔扩张。然后通过腹膜内注射氯胺酮和赛拉嗪溶液(分别为80mg/Kg和10mg/Kg)对动物进行麻醉。镇静后,将动物放置在台(stand)上,并将2.5%羟丙基甲基纤维素水溶液施加在两只眼睛上。它具有防止角膜脱水和通过将Micron IV的照相机镜头与溶液接触来改进眼底的可视化的双重功能(类似于在具有浸没物镜的显微术中使用的程序)。

[0200] 为了用激光诱导损伤,首先将激光定向器(laser pointer)激活和聚焦,以便使用RPE层作为参考来施加激光束。施加激光束的区域必须远离视网膜的主要血管,以防止可能的出血。通过施加激光束后立即形成的泡证实了在布鲁赫膜层的灼烧效率。激光束的施加条件是功率为200mW,持续100msec。

[0201] 根据文献中呈现的数据,Lambert等人(Nature Protocols,2013,8:2197)在文章中做了很好的总结,已知该实验模型中的最大新血管形成是在损伤后7天获得的。

[0202] 使用C57B16/J小鼠,每组n=5只。在用激光诱导损伤的程序结束时,立即进行玻璃体内注射,并使用带有32g针头的Hamilton注射器施用在1μL DMSO中的10μg和50μg的iVR1-Cys或iVR1和50μg的PC。作为对照,注射了DMSO本身。

[0203] 七天之后,处死动物,并且摘取眼睛,并以4%多聚甲醛固定。随后,在立体显微镜下去除由角膜、虹膜和晶体组成的眼睛前段。剩下的部分,定义为“眼杯”或后段,由巩膜、脉络膜、RPE和视网膜组成,在0.7%FITC-单叶加纳籽(Griffonia simplicifolia)同工凝集素B4(Vector Laboratories,Burlingame,CA)的存在下孵育16小时。经过一系列洗涤后,去除视网膜,并在RPE/脉络膜上进行四次切割,使得RPE/脉络膜能够封固在载玻片上,以便在荧光显微镜下观察。对脉络膜新血管形成的体积进行量化。为了评估每个斑点(spot)的体积,在RPE细胞的水平从上表面到最深的焦平面采集了一系列图像(Z轴叠加(Z-Stacks),约20-25个图像),每个图像具有1μm的厚度。荧光的体积通过ImageJ程序(NIH,Bethesda,MD)测量,取每个单个平面的荧光面积之和。

[0204] 对于iVR1 10μg和50μg在n=12个和15个斑点上进行CNV的量化,对于iVR1-Cys 10μg和50μg在n=10个和8个斑点上进行CNV的量化;对于PC在n=15个斑点上进行CNV的量化,并且对于DMSO在n=14个斑点上进行CNV的量化。图2中给出的结果表明,这两种肽都能够引起对新血管形成的剂量依赖性抑制。在较高剂量(50μg),获得了强有力的、显著的且相当的新血管形成抑制能力:对比媒介物和PC,iVR1-Cys-75.9%和-74.6% (p>0.002);对比媒介物和PC,iVR1-73.9%和-76.5% (p>0.0002)。

[0205] 在10μg的剂量,对比媒介物和PC,iVR1引起新血管形成的抑制为37.8%和39.3% (p<0.05),而对比媒介物和PC,iVR1-Cys引起新血管形成的抑制为48.9%和51.0% (p<0.02)。因此,在低浓度,肽iVR1-Cys展示出比肽iVR1更大的抑制效力,因为它进一步减少了19.3%的新血管形成。因此,在所使用的较高剂量,肽的抑制能力可能达到了最大阈值。

[0206] 对于口服施用(灌胃)的实验,按照前述实验程序,在C57B16/J小鼠中诱导脉络膜新血管形成,每组n=5只动物。在诱导损伤后,动物从麻醉恢复后,立即开始施用肽iVR1和iVR1-Cys以及媒介物,在实验方案规定的7天内每天两次。基于先前腹膜内施用肽iVR1获得的数据(Cicatiello等人2015,Oncotarget,6,10563-10576),肽以50mg/Kg的剂量施用。

[0207] 为了能够进行口服施用,将肽溶解在DMSO中,并且然后与Nutilis食品增稠剂混合,从而得到由9份Nutilis和1份DMSO组成的最终混合物。

[0208] 这些物质的制备浓度使得每个单次施用可以使用200 μ l DMSO混合物中的9:1Nutilis/物质,使用合适的针头直接施用到动物的胃中用于灌胃,针头的开口为20号。在对照组中,施用200 μ l 9:1的Nutilis/DMSO混合物。

[0209] 在实验结束时,处死动物,取出眼睛并解剖以分离RPE-脉络膜,并通过免疫荧光分析确定CNV的体积,如以下所描述的。

[0210] 对于iVR1-Cys在n=18个斑点上进行CNV的量化,对于iVR1在n=20个斑点上进行CNV的量化,并且对于媒介物在n=10个斑点上进行CNV的量化。

[0211] 结果在图3中给出,并展示出,与媒介物相比,肽iVR1-Cys能够诱导对新血管形成的显著抑制(-45.9%,p=0.007),其水平类似于对iVR1观察到的水平(-49.7%,p=0.001)。

[0212] iVR1-Cys的血清蛋白酶稳定性。

[0213] 肽iVR1-Cys在50mM磷酸盐缓冲溶液pH 7.3中的10%血清(胎牛血清,FCS)中在168h时的稳定性如Ponticelli等人描述的确定,依赖于其中描述的基于RP-HPLC色谱术的方法[Ponticelli等人,J Biol Chem.2008Dec5;283(49):34250-9]。

[0214] 参考曲线通过将化合物以0.1 μ mol/L和1000 μ mol/L之间的递增浓度溶解在DMSO中以获得完全溶解来构建。然后,以10 μ mol/L的初始浓度与10%FCS接触的分子的残留浓度通过以下来确定:在时间t=0时抽取3个等分试样,然后在最初的12小时内每小时抽取3个等分试样,并且然后在24h、72h、120h和168h抽取3个等分试样。将等分试样用0.1M乙酸以1:1稀释,以分离任何结合到白蛋白的肽,离心以去除任何沉淀的物质,并在Ponticelli等人报道的条件下通过RP-HPLC进行分析。在等分试样中检测到的残留肽的量表示为相对于初始量的百分比,绘制为随时间变化的表。结果在表VII中示出为三次测定的平均值±标准差(SD)。

[0215] 表VII

[0216]

时间(h)	残留肽±SD%
0	101±4
1	100±11
2	99±7
3	98±5
4	97±4
5	96±5
6	99±6
7	95±8
8	96±5

9	95±6
10	94±10
11	94±8
12	93±4
24	93±6
72	92±7
120	91±5
168	92±8

序列表

〈110〉 安必圣有限责任公司

〈120〉 肽及其医学用途

〈130〉 21.A0615.12.W0.1

〈160〉 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

〈211〉 7123

<212> DNA

〈220〉

atacacatga ctgaaggaag ggagctgac attccctgcc gggtaacgt acctaacatc	780
actgttactt taaaaaagtt tccacttgac actttgatcc ctgatggaaa acgcataatc	840
tgggacagta gaaaggcgtt catcatatca aatgcaacgt acaaagaaat agggcttctg	900
acctgtgaag caacagtcaa tggcatttg tataagacaa actatctcac acatcgacaa	960
accaatacaa tcatagatgt ccaaataagc acaccacgcc cagtcaaatt acttagaggc	1020
catacttttgc tcctcaatttgc tactgctacc actcccttgc acacgagagt tcaaattgacc	1080
tggagttacc ctgatggaaa aaataagaga gcttccgtaa ggccgacgaaat tgaccaaagc	1140
aattcccatg ccaacatatt ctacagtgtt cttaatttgc acaaaatgca gaacaaagac	1200
aaaggacttt atacttgc tgtaaggagt ggaccatcat tcaaatttgt taacacctca	1260
gtgcataat atgataaagc attcatact gtgaaacatc gaaaacagca ggtgcttgc	1320
accgttagctg gcaagcggtc ttaccggctc tctatgaaag tgaaggcatt tccctcgccg	1380
[0002]	
gaagttgtat ggttaaaaga tgggttacct gcgactgaga aatctgctcg ctatttgact	1440
cgtggctact cgtaattat caaggacgtt actgaagagg atgcaggaa ttatacaatc	1500
ttgctgagca taaaacagtc aaatgtttt aaaaacctca ctgccactct aattgtcaat	1560
gtgaaacccc agatttacga aaaggccgtg tcatcggtt cagacccggc tctctaccca	1620
ctgggcagca gacaaatctt gacttgcattt gcatatggta tccctcaacc tacaatcaag	1680
tggttctggc acccctgtaa ccataatcat tccgaagcaa ggtgtgactt ttgttcaat	1740
aatgaagagt cctttatctt ggatgctgac agcaacatgg gaaacagaat tgagagcatc	1800
actcagcgca tggcaataat agaaggaaag aataagatgg ctgcacattt ggttggct	1860
gactctagaa tttctggaaat ctacatttgc atagcttcca ataaagtgg gactgtggaa	1920
agaaacataa gctttatcat cacagatgtt ccaaattggg ttcattgtttaa cttggaaaaa	1980
atgccgacgg aaggagagga cctgaaaactg tcttgcacag ttaacaagtt cttatacaga	2040

gacgttactt ggattttact gcggacagtt aataacagaa caatgcacta cagtattagc	2100
aagcaaaaaa tggccatcac taaggagcac tccatcaactc ttaatcttac catcatgaat	2160
gttccctgc aagattcagg cacctatgcc tgcagagcca ggaatgtata cacagggaa	2220
gaaatcctcc agaagaaaga aattacaatc agagatcagg aagcaccata cctcctgcga	2280
aacctcagtg atcacacagt ggccatcagc agttccacca cttagactg tcatgtaat	2340
ggtgtccccg agcctcagat cacttggtt aaaaacaacc aaaaaataca acaagagcct	2400
ggaattattt taggaccagg aagcagcacg ctgtttattt aaagagtcac agaagaggat	2460
gaaggtgtct atcactgcaa agccaccaac cagaaggct ctgtggaaag ttcagcatac	2520
ctcactgttc aaggaacctc ggacaagtct aatctggagc tgatcactt aacatgcacc	2580
tgtgtggctg cgactcttctt ctggctcta ttaaccctct ttatccgaaa aatgaaaagg	2640
tcttcttctg aaataaaagac tgactaccta tcaattataa tggaccaga tgaagttcct	2700
[0003]	
ttggatgagc agtgtgagcg gtccttat gatgccagca agtggagtt tgccggag	2760
agacttaaac tggcaaaatc acttggaaaga ggggctttt gaaaagtgg tcaagcatca	2820
gcatttggca ttaagaaatc acctacgtgc cggactgtgg ctgtaaaaat gctgaaagag	2880
ggggccacgg ccagcgagta caaagctctg atgactgagc taaaaatctt gaccacatt	2940
ggccaccatc tgaacgtggtaaacctgctggagccctgccaaggaggctctg	3000
atggtgattt ttgaataactg caaatatggaa aatctctcca actacctcaa gagcaaacgt	3060
gacttatttt ttctcaacaa ggtgcagca ctacacatgg agcctaagaa agaaaaatg	3120
gagccaggcc tggaacaagg caagaaacca agactagata gcgtcaccag cagcgaaagc	3180
tttgcgagct ccggctttca ggaagataaa agtctgagtg atgttgagga agaggaggat	3240
tctgacggtt tctacaagga gcccacact atggaagatc tgatttctta cagtttcaa	3300
gtggccagag gcatggagtt cctgtcttcc agaaagtgc ttcatggaa cctggcagcg	3360

agaaaacattc ttttatctga gaacaacgtg gtgaagattt gtgattttgg ccttgcggg	3420
gatatttata agaaccggaa ttatgtgaga aaaggagata ctcgacttcc tctgaaatgg	3480
atggctcctg aatctatctt tgacaaaatc tacagcacca agagcgacgt gtggcttac	3540
ggagtattgc tgtggaaat cttccctta ggtgggtctc cataccagg agtacaaatg	3600
gatgaggact tttcgagtctg cctgaggaa ggcattgagga tgagagctcc tgagtactct	3660
actcctgaaa tctatcagat catgctggac tgctggcaca gagacccaaa agaaaggcca	3720
agatttgcag aacttggaa aaaacttaggt gatttgcctt aagcaaatgt acaacaggat	3780
ggtaaagact acatccaaat caatgccata ctgacaggaa atagtgggtt tacatactca	3840
actcctgcct tctctgagga cttttcaag gaaagtattt cagctccgaa gtttaattca	3900
ggaagctctg atgatgtcag atacgtaaat gcttcaagt tcatgaggct ggaaagaatc	3960
aaaacctttg aagaactttt accgaatgcc acctccatgt ttgatgacta ccagggcgac	4020
[0004]	
agcagcactc tggtggcctc tcccatgctg aagcgcttca cctggactga cagcaaacc	4080
aaggcctcgc tcaagatttga cttgagagta accagtaaaa gtaaggagtc ggggctgtct	4140
gatgtcagca ggcccagttt ctgcatttcc agctgtggc acgtcagcga aggcaagcgc	4200
agttcacct acgaccacgc tgagctggaa aggaaaatcg cgtgctgctc cccgccccca	4260
gactacaact cgggtgtct gtactccacc ccacccatct agagttgac acgaaggcctt	4320
atttctagaa gcacatgtgt atttataccc ccagggaaact agctttgcc agtattatgc	4380
atatataagt ttacacccctt atcttccat gggagccagc tgcttttgt gatttttta	4440
atagtgcctt ttttttttg actaacaaga atgttaactcc agatagagaa atagtgacaa	4500
gtgaagaaca ctactgctaa atcctcatgt tactcagtgt tagagaaatc cttcctaaac	4560
ccaatgactt ccctgctcca accccggcca cctcaggcga cgcaggacca gtttgattga	4620
ggagctgcac tgatcacca atgcatcagc tacccactg ggccagccct gcagccaaa	4680

acccaggca acaagccgt tagccccagg gatcaactggc tggcctgagc aacatctcg	4740	
gagtcctcta gcaggcctaa gacatgttag gaggaaaagg aaaaaaaagca aaaagcaagg	4800	
gagaaaagag aaaccgggag aaggcatgag aaagaattt agacgcacca tgtggcacg	4860	
gagggggacg gggctcagca atgccatttc agtggcttcc cagctctgac cttctacat	4920	
ttgagggccc agccaggagc agatggacag cgatgagggg acatttctg gattctggg	4980	
ggcaagaaaa ggacaaatat ctttttgga actaaagcaa atttagaac tttacctatg	5040	
gaagtggttc tatgttcatt ctcattegtg gcatgtttt attttagca ctgagggtgg	5100	
cactcaactc tgagccata ctttggctc ctctagtaag atgcactgaa aacttagcca	5160	
gagtttaggtt gtctccaggc catgtggcc ttacactgaa aatgtcacat tctattttgg	5220	
gtattaaatat atagtccaga cacttaactc aatttcttgg tattattctg tttgcacag	5280	
ttagttgtga aagaaagctg agaagaatga aaatgcagtc ctgaggagag gagtttctc	5340	
[0005]	catatcaaaa cgagggctga tggagaaaaa aggtcaataa ggtcaaggaa aaacccg	5400
	tctataccaa ccaaaccat tcaccaacac agttgggacc caaaacacag gaagtcagtc	5460
	acgtttcctt ttcatatataat ggggattcca ctatctcaca ctaatctgaa aggatgtgga	5520
	agagcattag ctggcgata ttaagcactt taagctcctt gagtaaaaag gtggatgt	5580
	atttatgaa ggtatttctc cagttggac tcaggatatt agttaatgag ccatcactag	5640
	aagaaaagcc cattttcaac tgcttgaaa ctgcctgg gtctgagcat gatggaaata	5700
	gggagacagg gtaggaaagg ggcctactc ttcaagggtct aaagatcaag tggccttgg	5760
	atcgctaagc tggctctgtt ttagtgcatt tatgcaagtt agggctatg tatttatgat	5820
	gtctgcacct tctgcagcca gtcagaagct ggagaggcaa cagtggattg ctgcttctt	5880
	gggagaagag tatgcttcct tttatccatg taatttaact gttagaacctg agctctaagt	5940
aaccgaagaa tgtatgcctc tgttttatg tgccacatcc ttgtttaag gctctgt	6000	

tgaagagatg ggaccgtcat cagcacattc cctagtggc ctactggctc ctggcagcgg	6060	
cttttgtgga agactcacta gccagaagag aggagtggga cagtcctctc caccaagatc	6120	
taaatccaaa caaaagcagg ctagagccag aagagaggac aaatcttgt tcttcctt	6180	
ctttacatac gcaaaccacc tgtgacagct ggcaattta taaatcaggta aactggagg	6240	
aggttaaaca cagaaaaaaag aagacctcg tcaattctct actttttttt tttttccaa	6300	
atcagataat agcccagcaa atagtataa caaataaaac cttagctatt catgtcttga	6360	
tttcaataat taatttttaa tcattaagag accataataa atactcctt tcaagagaaa	6420	
agcaaaacca tttagaattgt tactcagctc ctccaaactc aggtttgtag catacatgag	6480	
tccatccatc agtcaaagaa tggttccatc tggagtctta atgtagaaag aaaaatggag	6540	
acttgaata atgagctagt tacaaagtgc ttgttcatttta aaatagcact gaaaattgaa	6600	
acatgaatta actgataata ttccaaatcat ttgcatttta tgacaaaaat ggtggcact	6660	
[0006]	aacaaagaac gagcacttcc ttccagagtt tctgagataa tgtacgtgga acagtctgg	6720
	tggaaatgggg ctgaaaccat gtcaagtct gtgtcttgc agtccaagaa gtgacaccga	6780
	gtgttaatt ttagggaccc gtgccttgc ttcttagccca caagaatgca aacatcaaac	6840
	agatactcgc tagcctcatt taaatttgatt aaaggaggag tgcatttttgc ggcgacagt	6900
	gtgttaactgt atgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgggt gtatgtgtgt	6960
	tttgtgcata actatttaag gaaactggaa tttaaagtt acttttatac aaaccaagaa	7020
	tatatgtac agatataaga cagacatggt ttggccttat atttctagtc atgatgaatg	7080
	tatattgtat accatcttca tataataaaac ttccaaaaac aca	7123

<210> 2

<211> 1338

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 全长人类 VEGFR1

<400> 2

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
1 5 10 15

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro
20 25 30

Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr
35 40 45

Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys Trp Ser Leu Pro
50 55 60

[0007] Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala
65 70 75 80

Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr
85 90 95

Ala Gln Ala Asn His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val
100 105 110

Pro Thr Ser Lys Lys Glu Thr Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile
115 120 125

Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
130 135 140

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
145 150 155 160

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
165 170 175

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
180 185 190

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
195 200 205

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
210 215 220

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val
225 230 235 240

[0008] Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr
245 250 255

Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys
260 265 270

Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His
275 280 285

Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys
290 295 300

Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys
305 310 315 320

Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val
325 330 335

Lys His Arg Lys Gln Gln Val Leu Glu Thr Val Ala Gly Lys Arg Ser
 340 345 350

Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe Pro Ser Pro Glu Val Val
 355 360 365

Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu Lys Ser Ala Arg Tyr Leu
 370 375 380

Thr Arg Gly Tyr Ser Leu Ile Ile Lys Asp Val Thr Glu Glu Asp Ala
 385 390 395 400

Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys Gln Ser Asn Val Phe Lys
 405 410 415

[0009] Asn Leu Thr Ala Thr Leu Ile Val Asn Val Lys Pro Gln Ile Tyr Glu
 420 425 430

Lys Ala Val Ser Ser Phe Pro Asp Pro Ala Leu Tyr Pro Leu Gly Ser
 435 440 445

Arg Gln Ile Leu Thr Cys Thr Ala Tyr Gly Ile Pro Gln Pro Thr Ile
 450 455 460

Lys Trp Phe Trp His Pro Cys Asn His Asn His Ser Glu Ala Arg Cys
 465 470 475 480

Asp Phe Cys Ser Asn Asn Glu Glu Ser Phe Ile Leu Asp Ala Asp Ser
 485 490 495

Asn Met Gly Asn Arg Ile Glu Ser Ile Thr Gln Arg Met Ala Ile Ile
 500 505 510

Glu Gly Lys Asn Lys Met Ala Ser Thr Leu Val Val Ala Asp Ser Arg
 515 520 525

Ile Ser Gly Ile Tyr Ile Cys Ile Ala Ser Asn Lys Val Gly Thr Val
 530 535 540

Gly Arg Asn Ile Ser Phe Tyr Ile Thr Asp Val Pro Asn Gly Phe His
 545 550 555 560

Val Asn Leu Glu Lys Met Pro Thr Glu Gly Glu Asp Leu Lys Leu Ser
 565 570 575

Cys Thr Val Asn Lys Phe Leu Tyr Arg Asp Val Thr Trp Ile Leu Leu
 580 585 590

[0010] Arg Thr Val Asn Asn Arg Thr Met His Tyr Ser Ile Ser Lys Gln Lys
 595 600 605

Met Ala Ile Thr Lys Glu His Ser Ile Thr Leu Asn Leu Thr Ile Met
 610 615 620

Asn Val Ser Leu Gln Asp Ser Gly Thr Tyr Ala Cys Arg Ala Arg Asn
 625 630 635 640

Val Tyr Thr Gly Glu Glu Ile Leu Gln Lys Lys Glu Ile Thr Ile Arg
 645 650 655

Asp Gln Glu Ala Pro Tyr Leu Leu Arg Asn Leu Ser Asp His Thr Val
 660 665 670

Ala Ile Ser Ser Ser Thr Thr Leu Asp Cys His Ala Asn Gly Val Pro
 675 680 685

Glu	Pro	Gln	Ile	Thr	Trp	Phe	Lys	Asn	Asn	His	Lys	Ile	Gln	Gln	Glu		
690																	
705	Pro	Gly	Ile	Ile	Leu	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Thr	Leu	Phe	Ile	Glu	Arg	
	710															720	
725	Val	Thr	Glu	Glu	Asp	Glu	Gly	Val	Tyr	His	Cys	Lys	Ala	Thr	Asn	Gln	
															735		
740	Lys	Gly	Ser	Val	Glu	Ser	Ser	Ala	Tyr	Leu	Thr	Val	Gln	Gly	Thr	Ser	
															750		
755	Asp	Lys	Ser	Asn	Leu	Glu	Leu	Ile	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Cys	Val	Ala	
															765		
770	[0011]	Ala	Thr	Leu	Phe	Trp	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Phe	Ile	Arg	Lys	Met	Lys
785	Arg	Ser	Ser	Ser	Glu	Ile	Lys	Thr	Asp	Tyr	Leu	Ser	Ile	Ile	Met	Asp	
															800		
805	Pro	Asp	Glu	Val	Pro	Leu	Asp	Glu	Gln	Cys	Glu	Arg	Leu	Pro	Tyr	Asp	
															815		
820	Ala	Ser	Lys	Trp	Glu	Phe	Ala	Arg	Glu	Arg	Leu	Lys	Leu	Gly	Lys	Ser	
															830		
835	Leu	Gly	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly	Lys	Val	Val	Gln	Ala	Ser	Ala	Phe	Gly	
															845		
850	Ile	Lys	Lys	Ser	Pro	Thr	Cys	Arg	Thr	Val	Ala	Val	Lys	Met	Leu	Lys	

Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu Tyr Lys Ala Leu Met Thr Glu Leu Lys
 865 870 875 880

Ile Leu Thr His Ile Gly His His Leu Asn Val Val Asn Leu Leu Gly
 885 890 895

Ala Cys Thr Lys Gln Gly Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu Tyr Cys
 900 905 910

Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Tyr Leu Lys Ser Lys Arg Asp Leu Phe
 915 920 925

Phe Leu Asn Lys Asp Ala Ala Leu His Met Glu Pro Lys Lys Glu Lys
 930 935 940

[0012] Met Glu Pro Gly Leu Glu Gln Gly Lys Lys Pro Arg Leu Asp Ser Val
 945 950 955 960

Thr Ser Ser Glu Ser Phe Ala Ser Ser Gly Phe Gln Glu Asp Lys Ser
 965 970 975

Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Asp Ser Asp Gly Phe Tyr Lys Glu
 980 985 990

Pro Ile Thr Met Glu Asp Leu Ile Ser Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg
 995 1000 1005

Gly Met Glu Phe Leu Ser Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu
 1010 1015 1020

Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val Val Lys Ile
 1025 1030 1035

Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Pro Asp Tyr
 1040 1045 1050

Val Arg Lys Gly Asp Thr Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro
 1055 1060 1065

Glu Ser Ile Phe Asp Lys Ile Tyr Ser Thr Lys Ser Asp Val Trp
 1070 1075 1080

Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Gly Ser
 1085 1090 1095

Pro Tyr Pro Gly Val Gln Met Asp Glu Asp Phe Cys Ser Arg Leu
 1100 1105 1110

[0013] Arg Glu Gly Met Arg Met Arg Ala Pro Glu Tyr Ser Thr Pro Glu
 1115 1120 1125

Ile Tyr Gln Ile Met Leu Asp Cys Trp His Arg Asp Pro Lys Glu
 1130 1135 1140

Arg Pro Arg Phe Ala Glu Leu Val Glu Lys Leu Gly Asp Leu Leu
 1145 1150 1155

Gln Ala Asn Val Gln Gln Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Pro Ile Asn
 1160 1165 1170

Ala Ile Leu Thr Gly Asn Ser Gly Phe Thr Tyr Ser Thr Pro Ala
 1175 1180 1185

Phe Ser Glu Asp Phe Phe Lys Glu Ser Ile Ser Ala Pro Lys Phe
 1190 1195 1200

Asn Ser Gly Ser Ser Asp Asp Val Arg Tyr Val Asn Ala Phe Lys
 1205 1210 1215

Phe Met Ser Leu Glu Arg Ile Lys Thr Phe Glu Glu Leu Leu Pro
 1220 1225 1230

Asn Ala Thr Ser Met Phe Asp Asp Tyr Gln Gly Asp Ser Ser Thr
 1235 1240 1245

Leu Leu Ala Ser Pro Met Leu Lys Arg Phe Thr Trp Thr Asp Ser
 1250 1255 1260

Lys Pro Lys Ala Ser Leu Lys Ile Asp Leu Arg Val Thr Ser Lys
 1265 1270 1275

[0014] Ser Lys Glu Ser Gly Leu Ser Asp Val Ser Arg Pro Ser Phe Cys
 1280 1285 1290

His Ser Ser Cys Gly His Val Ser Glu Gly Lys Arg Arg Phe Thr
 1295 1300 1305

Tyr Asp His Ala Glu Leu Glu Arg Lys Ile Ala Cys Cys Ser Pro
 1310 1315 1320

Pro Pro Asp Tyr Asn Ser Val Val Leu Tyr Ser Thr Pro Pro Ile
 1325 1330 1335

<210> 3

<211> 1626

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 可溶性人类 VEGFR1

<400> 3		
atggtcagct actgggacac cggggcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgcttctc	60	
acaggatcta gttcaggttc aaaataaaaa gatccctgaac tgagttaaa aggcacccag	120	
cacatcatgc aaggcaggcca gacactgcat ctccaatgca gggggaaagc agccataaaa	180	
tgtctttgc ctgaaatggt gagtaaggaa agcggaaaggc tgagcataac taaatctgcc	240	
tgtggaagaa atggcaaaca attctgcagt actttaacct tgaacacagc tcaagcaaac	300	
cacactggct tctacagctg caaatatcta gctgtaccta cttcaaagaa gaaggaaaca	360	
gaatctgcaa tctatataatt tattagtgtt acaggttagac ctttcgtttaga gatgtacagt	420	
gaaatccccg aaattataca catgactgaa ggaagggagc tcgtcattcc ctgcccgggtt	480	
acgtcaccta acatcactgt tactttaaa aagttccac ttgacacttt gatccctgtat	540	
[0015] ggaaaacgca taatctggta cagtagaaag ggcttcatca tatcaaatgc aacgtacaaa	600	
gaaatagggc ttctgacctg tgaagcaaca gtcaatggc atttgtataa gacaaactat	660	
ctcacacatc gacaaaccaa tacaatcata gatgtccaaa taagcacacc acgeccagtc	720	
aaattactta gaggccatac tcttgcctc aattgtactg ctaccactcc cttgaacacg	780	
agagtccaaa tgacctggag ttaccctgtt gaaaaaaaaa agagagctc cgtaaggcga	840	
cgaattgacc aaagcaattc ccatgccaac atatttaca gtgttcttac tattgacaaa	900	
atgcagaaca aagacaaagg actttatact tgctgttaa ggagtggacc atcattcaaa	960	
tctgttaaca cctcagtgca tatatatgtt aaagcattca tcactgtgaa acatcgaaaa	1020	
cagcaggtgc ttgaaaccgt agctggcaag cggcttacc ggctcttat gaaagtgaag	1080	
gcatttcctt cgccggaagt tgtatggta aaagatgggt tacctgcgcac tgagaaatct	1140	
gctcgctatt tgactcggtt ctactcgta attatcaagg acgtaactga agaggatgca	1200	
ggaaattata caatcttgct gaggataaaa cagtcaaatg tgttaaaaaa cctcactgcc	1260	

actctaattg tcaatgtgaa accccagatt tacgaaaagg ccgtgtcata gtttccagac	1320
ccggctctct acccactggg cagcagacaa atcctgactt gtaccgcata tggtatccct	1380
caacctacaa tcaagtggtt ctggcacccc tgtaaccata atcattccga agcaaggtgt	1440
gactttgtt ccaataatga agagtcctt atcctggatg ctgacagcaa catggaaac	1500
agaattgaga gcatcactca gcgcattggca ataatagaag gaaagaataa gcttccacca	1560
gctaacagtt ctttcatgtt gccacctaca agcttctttt ccaactactt ccatttcctt	1620
ccgtga	1626

<210> 4

<211> 541

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

[0016] <223> 可溶性人类 VEGFR1

<400> 4

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser			
1	5	10	15

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro		
20	25	30

Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr		
35	40	45

Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys Trp Ser Leu Pro		
50	55	60

Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala			
65	70	75	80

Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr
 85 90 95

Ala Gln Ala Asn His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val
 100 105 110

Pro Thr Ser Lys Lys Glu Thr Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile
 115 120 125

Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
 130 135 140

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
 145 150 155 160

[0017] Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
 165 170 175

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
 180 185 190

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
 195 200 205

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
 210 215 220

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val
 225 230 235 240

Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr
 245 250 255

Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys
 260 265 270

Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His
 275 280 285

Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys
 290 295 300

Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys
 305 310 315 320

Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val
 325 330 335

[0018] Lys His Arg Lys Gln Gln Val Leu Glu Thr Val Ala Gly Lys Arg Ser
 340 345 350

Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe Pro Ser Pro Glu Val Val
 355 360 365

Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu Lys Ser Ala Arg Tyr Leu
 370 375 380

Thr Arg Gly Tyr Ser Leu Ile Ile Lys Asp Val Thr Glu Glu Asp Ala
 385 390 395 400

Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys Gln Ser Asn Val Phe Lys
 405 410 415

Asn Leu Thr Ala Thr Leu Ile Val Asn Val Lys Pro Gln Ile Tyr Glu
 420 425 430

Lys Ala Val Ser Ser Phe Pro Asp Pro Ala Leu Tyr Pro Leu Gly Ser
435 440 445

Arg Gln Ile Leu Thr Cys Thr Ala Tyr Gly Ile Pro Gln Pro Thr Ile
450 455 460

Lys Trp Phe Trp His Pro Cys Asn His Asn His Ser Glu Ala Arg Cys
465 470 475 480

[0019] Asp Phe Cys Ser Asn Asn Glu Glu Ser Phe Ile Leu Asp Ala Asp Ser
485 490 495

Asn Met Gly Asn Arg Ile Glu Ser Ile Thr Gln Arg Met Ala Ile Ile
500 505 510

Glu Gly Lys Asn Lys Leu Pro Pro Ala Asn Ser Ser Phe Met Leu Pro
515 520 525

Pro Thr Ser Phe Ser Ser Asn Tyr Phe His Phe Leu Pro
530 535 540

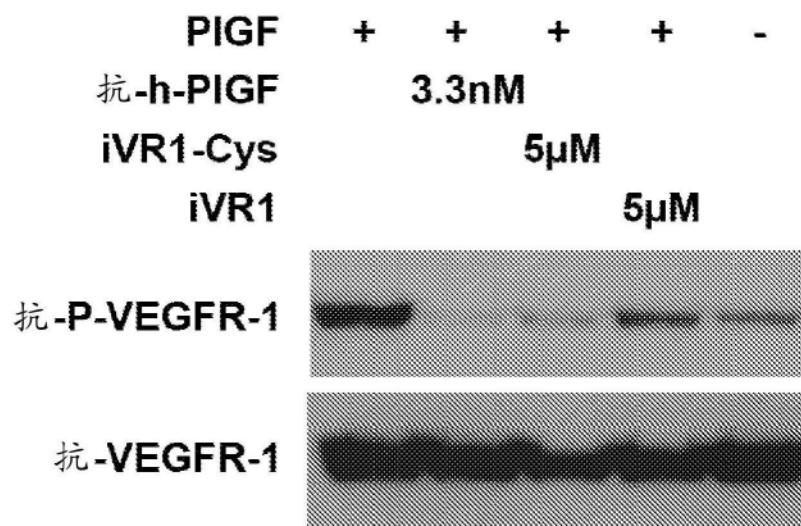


图1

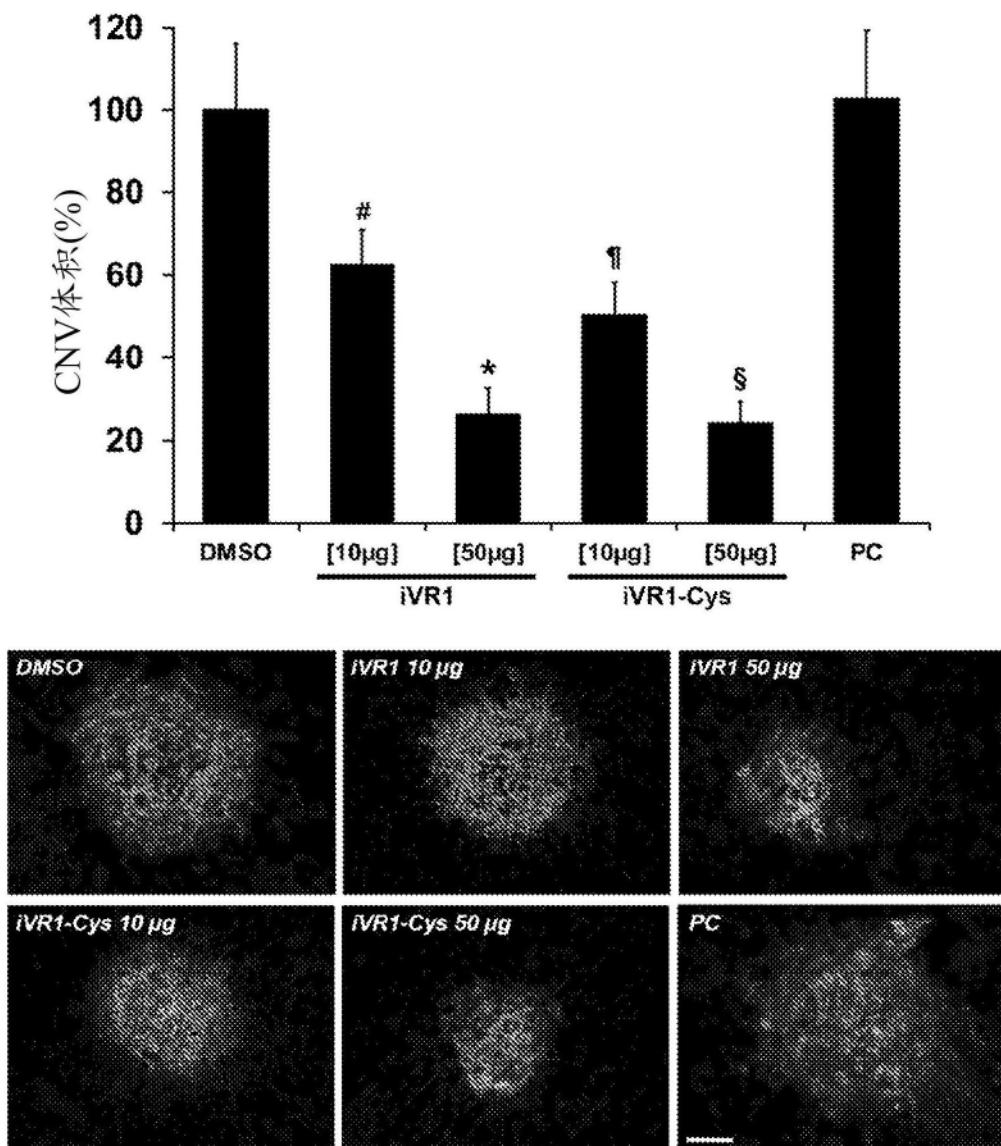


图2

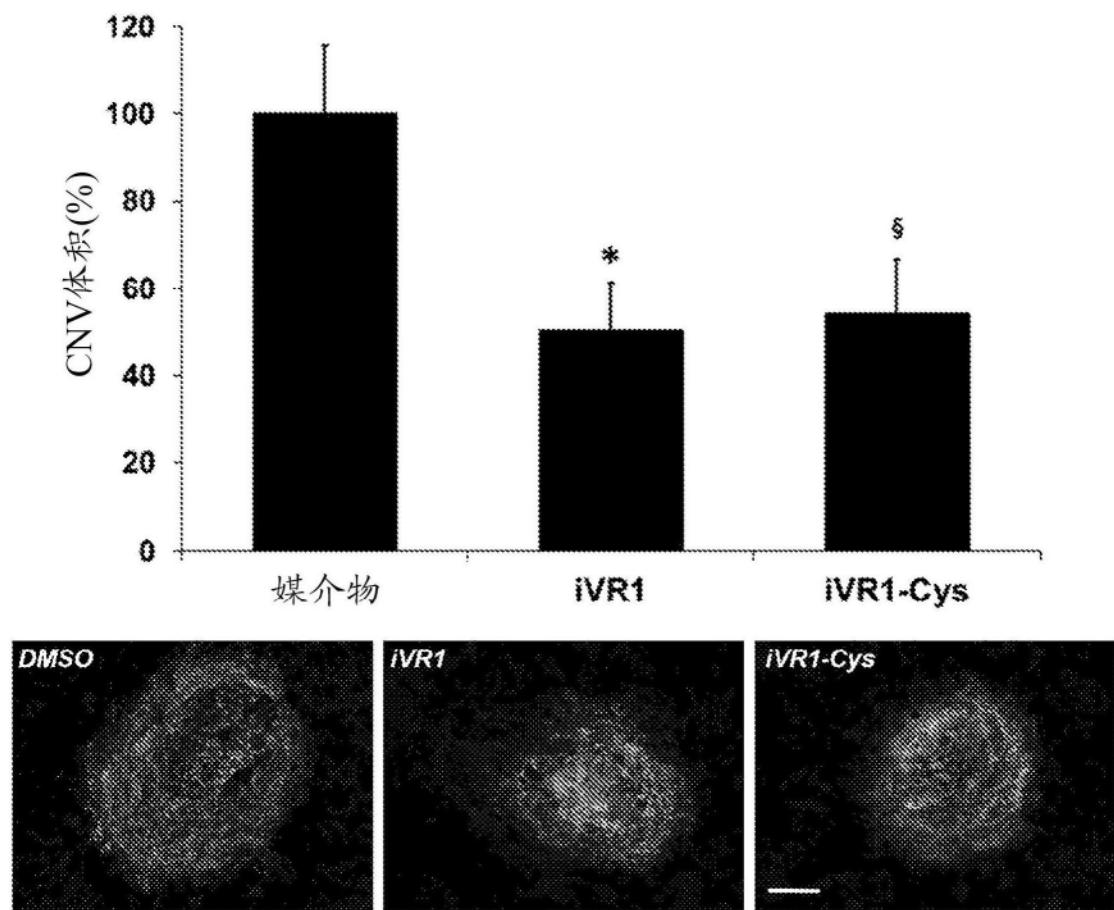


图3