



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108178789 B

(45) 授权公告日 2021. 11. 02

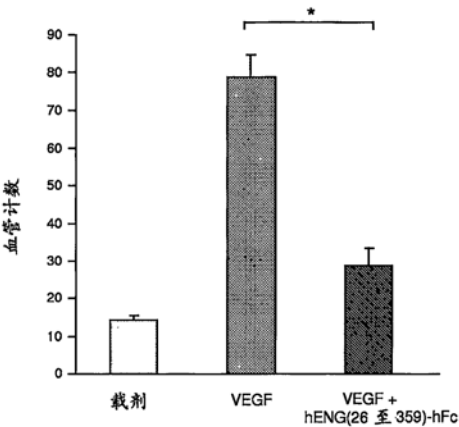
(21) 申请号 201810139884.7  
(22) 申请日 2012.04.19  
(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108178789 A  
(43) 申请公布日 2018.06.19  
(30) 优先权数据  
61/477,585 2011.04.20 US  
(62) 分案原申请数据  
201280030070.0 2012.04.19  
(73) 专利权人 阿塞勒隆制药公司  
地址 美国马萨诸塞州  
(72) 发明人 阿斯亚·格林贝格  
罗斯莱因·卡斯顿盖  
埃里克·维尔纳 拉温德拉·库玛  
(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227  
代理人 彭鲲鹏 郑斌  
(51) Int.Cl.  
C07K 14/705 (2006.01)  
C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)  
C12N 15/62 (2006.01)  
A61K 38/17 (2006.01)  
A61K 47/64 (2017.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
(56) 对比文件  
W0 2007/143023 A1,2007.12.13  
W0 2008/151078 A1,2008.12.11  
Francisco J.B. et al.Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1,two components of the endothelia transforming growth factor-[beta] receptor complex.《Journal of Cellular Physiology》.2005,574-584.  
Scharpfenecker M. et al.BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis.《Journal of Cell Science》.2007,964-972.  
审查员 李影  
权利要求书1页 说明书43页  
序列表56页 附图38页

(54) 发明名称  
内皮糖蛋白多肽及其用途  
(57) 摘要

本发明涉及内皮糖蛋白多肽及其用途。在某些方面中,本公开内容涉及发现包含内皮糖蛋白(endoglin,ENG)多肽胞外结构域之截短配体结合部分的多肽可用于在体内(特别是在患有血管发生相关疾病的哺乳动物中)抑制血管发生。

图38. hENG (26至359)-hFc在CAM测定中抑制VEGF刺激的血管发生



1. 有效量的内皮糖蛋白多肽在制备用于在有此需要的对象中治疗或预防可由VEGF诱导的血管发生的药物中的用途,其中所述内皮糖蛋白多肽包含:

(a) 包含以下氨基酸序列的第一部分:

(i) 起始于SEQ ID NO:1第26至42位氨基酸中的任一氨基酸,

(ii) 终止于SEQ ID NO:1的第346至378位氨基酸中的任一氨基酸;以及

(b) 包含免疫球蛋白Fc结构域的第二异源部分。

2. 权利要求1所述的用途,其中所述第二异源部分包含IgG的Fc结构域。

3. 权利要求1所述的用途,其中所述内皮糖蛋白多肽以小于 $1 \times 10^{-9}$ M的平衡解离常数( $K_D$ )或小于 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 的解离速率常数( $k_d$ )与人BMP-9相结合。

4. 权利要求1所述的用途,其中所述内皮糖蛋白多肽以小于 $1 \times 10^{-9}$ M的平衡解离常数( $K_D$ )或小于 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的解离速率常数( $k_d$ )与人BMP-9相结合。

5. 权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述内皮糖蛋白多肽以小于 $1 \times 10^{-9}$ M的平衡解离常数( $K_D$ )或小于 $5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 的解离速率常数( $k_d$ )与人BMP-10相结合。

6. 权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述内皮糖蛋白多肽以小于 $1 \times 10^{-9}$ M的平衡解离常数( $K_D$ )或小于 $2.5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 的解离速率常数( $k_d$ )与人BMP-10相结合。

7. 权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述内皮糖蛋白多肽不与人TGF- $\beta$ 1、人TGF- $\beta$ 3、人VEGF、或人碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)相结合。

8. 权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述第二异源部分通过接头与所述第一部分相连接。

9. 权利要求8所述的用途,其中所述接头由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:31 (TGGG)或SEQ ID NO:32 (GGG)组成。

10. 权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述内皮糖蛋白多肽包含一个或更多个选自以下的经修饰的氨基酸残基:糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法呢基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质部分缀合的氨基酸、以及与有机衍生剂缀合的氨基酸。

11. 权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述内皮糖蛋白多肽包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。

12. 权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述内皮糖蛋白多肽包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

## 内皮糖蛋白多肽及其用途

[0001] 本申请是申请号为201280030070.0的中国专利申请的分案申请,原申请是2012年4月19日提交的PCT国际申请PCT/US2012/034295于2013年12月18日进入中国国家阶段的申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求于2011年4月20日提交的题目为“Endoglin Polypeptides And Uses Thereof”的美国临时专利申请序号US 61/477,585的申请日期的权益,其全部内容通过引入并入本文。

### 技术领域

[0004] 本发明涉及内皮糖蛋白多肽及其用途。

### 背景技术

[0005] 血管发生(angiogenesis)(形成新血管的过程)在许多正常和异常的生理状态中是至关重要的。在正常生理条件下,人和动物在特定且受限的情况中进行血管发生。例如,通常在伤口愈合,胎儿和胚胎发育,以及黄体、子宫内膜和胎盘的形中观察到血管发生。

[0006] 在许多疾病中发生不期望的或不适当地调节的血管发生,其中异常内皮生长可导致或参与病理过程。例如,血管发生参与许多肿瘤的生长。失调的血管发生与病理过程(例如类风湿性关节炎、视网膜病、血管瘤和银屑病)相关。多种病理疾病状态(其中出现失调的血管发生)已被归类为血管发生相关疾病。

[0007] 认为受控和非受控的血管发生二者是以类似的方式进行的。毛细血管主要由内皮细胞和周细胞(pericyte)构成,并且被基底膜包围。血管发生始于由内皮细胞和白细胞释放的酶侵蚀基底膜。内衬于血管腔的内皮细胞随后突出透过基底膜。血管发生因子(angiogenic factor)诱导内皮细胞迁移穿过被侵蚀的基底膜。迁移细胞形成从母体血管突出的“萌芽”,内皮细胞在此进行有丝分裂和增殖。内皮萌芽相互融合以形成毛细血管袢,产生新的血管。

[0008] 抑制血管发生的药剂已被证明有效地治疗多种疾病。Avastin™(贝伐单抗)(一种结合血管内皮生长因子(VEGF)的单克隆抗体)用于治疗多种癌症。Macugen™(一种结合VEGF的适配体(aptamer))已被证明有效地治疗新生血管性(湿性)年龄相关性黄斑变性。SDF/CXCR4信号传导途径的拮抗剂抑制肿瘤新血管形成(neovascularization)并且在小鼠模型中有效地抗癌症(Guleng et al.Cancer Res.2005 Jul 1;65(13):5864-71)。多种所谓的多靶点酪氨酸激酶抑制剂(包括凡德他尼(vandetanib)、舒尼替尼(sunitinib)、阿西替尼(axitinib)、索拉非尼(sorafenib)、瓦他拉尼(vatalanib)和帕唑帕尼(pazopanib)在多种肿瘤类型的治疗中用作抗血管发生剂。沙利度胺及相关化合物(包括泊马度胺(pomalidomide)和来那度胺(lenalidomide))已在癌症的治疗中显示出有益作用,虽然作用的分子机制尚不明确,但是抑制血管发生似乎是抗肿瘤作用的重要组成部分(参见例如Dredge et al.Microvasc Res.2005 Jan;69(1-2):56-63)。虽然许多抗血管发生剂对不论

何种受影响组织的血管发生都有作用,但另一些血管发生剂可倾向于具有组织选择性作用.

[0009] 期望有用于抑制血管发生的另外的组合物和方法.这些包括这样的方法和组合物,其可抑制一般的或在某些组织和/或疾病状态中的不期望的血管生长.

## 发明内容

[0010] 部分地,本公开内容提供内皮糖蛋白(endoglin,ENG)多肽和这种内皮糖蛋白多肽作为针对BMP9和/或BMP10的选择性拮抗剂的用途.如本文中所述,包含内皮糖蛋白胞外结构域(extracellular domain,ECD)的一部分或全部的多肽与BMP9和BMP10相结合而不表现出与TGF- $\beta$ 超家族的其他成员的牢固(substantial)结合.该公开内容证明包含内皮糖蛋白ECD的一部分或者全部的多肽是BMP9和BMP10信号传导的有效拮抗剂并且作用在于抑制体内的血管发生和肿瘤生长.因此,在某些方面,本公开内容提供作为BMP9和/或BMP10拮抗剂的内皮糖蛋白多肽,其用于抑制血管发生以及本文中所述的与BMP9或BMP10相关的其他疾病.

[0011] 在某些方面,本公开内容提供包含内皮糖蛋白的截短之胞外结构域的多肽,其用于抑制血管发生和治疗与BMP9或BMP10相关的其他疾病.虽然不希望受限于任何具体的作用机制,但预期这样的多肽通过与BMP9和/或BMP10相结合并且抑制这些配体与受体(例如ALK1、ALK2、ActRIIA、ActRIIB和BMPRII)形成信号传导复合物的能力而发挥作用.在某些实施方案中,内皮糖蛋白多肽包含与SEQ ID NO:1的人内皮糖蛋白序列的第42至333、26至346、26至359或者26至378位氨基酸的序列至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的氨基酸序列,由其组成,或基本由其组成.内皮糖蛋白多肽可包含与起始于SEQ ID NO:1第26至42位中任意位置并且终止于SEQ ID NO:1的人内皮糖蛋白序列第333至378位中任意位置的氨基酸序列至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的氨基酸序列,由其组成,或基本由其组成.内皮糖蛋白多肽可包含在较不严格、严格或高度严格的条件下与核苷酸序列的互补物(complement)杂交的核酸编码的多肽,由其组成,或基本由其组成,所述核苷酸序列选自:SEQ ID NO:2的第537至1412位核苷酸、SEQ ID NO:30的第121至1035位核苷酸、SEQ ID NO:26的第121至1074位核苷酸、SEQ ID NO:24的第121至1131位核苷酸、SEQ ID NO:30的第73至1035位核苷酸、SEQ ID NO:26的第73至1074位核苷酸、以及SEQ ID NO:24的第73至1131位核苷酸.在前述每一项中,可这样选择内皮糖蛋白多肽,以使其不包含全长的内皮糖蛋白ECD(例如,可这样选择内皮糖蛋白多肽,以使其不包含SEQ ID NO:1的第379至430位氨基酸的序列或其一部分或者SEQ ID NO:1的独特序列的任何其他部分).内皮糖蛋白多肽可作为单体蛋白质或以二聚化形式使用.内皮糖蛋白多肽还可与第二多肽部分融合以提供改进的性质,例如提高的半衰期或者更容易生产或纯化.可直接融合或者在内皮糖蛋白多肽与任意其他部分之间插入接头.接头可以是结构化或非结构化的,并且可由1、2、3、4、5、10、15、20、30、50个或更多个氨基酸组成,任选地可以是相对自由的二级结构.接头可富含甘氨酸和脯氨酸残基,并可例如含有苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸(例如,TGGG(SEQ ID NO:31))的序列或简单地一个或更多个甘氨酸残基(例如,GGG(SEQ ID NO:32)).与免疫球蛋白的Fc部分的融合或与聚氧化乙烯基部分(例如,聚乙二醇)的连接可特别地用于提高全身施用(例如,静脉内、动脉内和腹膜内施用)中内皮糖蛋白



多肽的血清半衰期.在某些实施方案中,内皮糖蛋白-Fc融合蛋白包含这样的多肽,所述多肽包含与起始于SEQ ID NO:1第26至42位中任意位置并且终止于SEQ ID NO:1的人内皮糖蛋白序列第333至378位中任意位置之氨基酸的序列至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的氨基酸序列,由其组成,或基本由其组成,并且任选地可不包含全长的内皮糖蛋白ECD(例如,可以这样选择内皮糖蛋白多肽,以使其不包含SEQ ID NO:1的第379至430位氨基酸的序列或其一部分,或者使其不包含内皮糖蛋白的任意部分或SEQ ID NO:1第379至581位氨基酸之任意部分的任何5、10、20、30、40、50、52、60、70、100、150或200或者更多个其他氨基酸),所述多肽(无论有或者没有插入接头)与免疫球蛋白的Fc部分相融合.包含内皮糖蛋白-Fc融合蛋白的内皮糖蛋白多肽可以以小于 $10^{-8}\text{M}$ 、 $10^{-9}\text{M}$ 、 $10^{-10}\text{M}$ 、 $10^{-11}\text{M}$ 或更小的 $K_D$ 或者小于 $10^{-3}\text{s}^{-1}$ 、 $3 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 的解离常数(dissociation constant,  $k_d$ )与BMP9和/或BMP10相结合.可以这样选择内皮糖蛋白多肽,以使其对BMP9的 $K_D$ 小于对BMP10的 $K_D$ ,任选小5倍、10倍、20倍、30倍、40倍或更多倍.内皮糖蛋白多肽可具有对TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2或TGF- $\beta$ 3中的任一种或全部的很小的亲和力或者对它们基本上没有亲和力,并且可具有对TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2或TGF- $\beta$ 3中的任一种或者全部的大于 $10^{-9}\text{M}$ 、 $10^{-8}\text{M}$ 、 $10^{-7}\text{M}$ 或 $10^{-6}\text{M}$ 的 $K_D$ .

[0012] 可以选择Fc部分以使其适合于生物体.任选地,Fc部分是人IgG1的Fc部分.任选地,内皮糖蛋白-Fc融合蛋白包含SEQ ID NO:33、34、35或36中任一种的氨基酸序列.任选地,内皮糖蛋白-Fc融合蛋白是由SEQ ID No:17、20、22、24、26、28或30中任一种的核酸在哺乳动物细胞系(特别是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系)中表达产生的蛋白质.内皮糖蛋白多肽可配制成药物制剂,其基本上不含热原.可制备药物制剂,其用于全身递送(例如,静脉内、动脉内或皮下递送)或局部递送(例如,至眼睛).

[0013] 本文中公开的内皮糖蛋白多肽可与一种或更多种另外的治疗剂联合或依次使用,所述另外的治疗剂包括例如抗血管发生剂、VEGF拮抗剂、抗VEGF抗体、抗肿瘤组合物、细胞毒剂、化疗剂、抗激素剂和生长抑制剂.本文中提供了上述种类之分子的另一一些实例.

[0014] 在某些方面,本公开内容提供了用于通过施用本文中一般地或具体地描述的内皮糖蛋白多肽的任一种在哺乳动物中抑制血管发生的方法.内皮糖蛋白多肽可局部地递送(例如,至眼睛)或全身递送(例如,静脉内、动脉内或皮下).在某些实施方案中,本公开内容提供了用于通过在远离眼睛的部位向哺乳动物施用内皮糖蛋白多肽(例如通过全身施用)在哺乳动物的眼中抑制血管发生的方法.

[0015] 在某些方面,本公开内容提供了用于在哺乳动物中治疗肿瘤的方法.这样的方法可包括向患有肿瘤的哺乳动物施用有效剂量的内皮糖蛋白多肽.方法还可包括施用一种或更多种其他药剂,包括例如抗血管发生剂、VEGF拮抗剂、抗VEGF抗体、抗肿瘤组合物、细胞毒剂、化疗剂、抗激素剂和生长抑制剂.肿瘤也可以是利用多种促血管发生因子(pro-angiogenic factor)的肿瘤,例如耐受抗VEGF治疗的肿瘤.

[0016] 在某些方面,本公开内容提供了用于治疗患有与BMP9或BMP10相关疾病之患者的方法.本文中提供了此类疾病的实例,并且其通常可包括脉管系统的疾病、高血压和纤维化疾病.

[0017] 在某些方面,本公开内容提供了眼用制剂(ophthalmic formulation).这样的制剂可包含本文中公开的内皮糖蛋白多肽.在某些方面,本公开内容提供用于治疗眼之血管

发生相关疾病的方法.这样的方法可包括全身施用或者向所述眼施用包含有效剂量的本文中公开之内皮糖蛋白多肽的药物制剂.

## 附图说明

[0018] 图1示出了人ENG同种型1 (L-ENG) 的天然氨基酸序列.前导序列(残基1至25)和预测的跨膜结构域(残基587至611) 分别标有下划线.

[0019] 图2示出了编码人ENG同种型1 (L-ENG) 的天然核苷酸序列.编码前导序列(核苷酸414至488) 和预测的跨膜结构域(核苷酸2172至2246) 的序列分别标有下划线.

[0020] 图3示出了人ENG同种型2 (S-ENG) 的天然氨基酸序列.前导序列(残基1至25) 和预测的跨膜结构域(残基587至611) 分别标有下划线.与同种型1相比,同种型2具有更短且不同的C末端,但是胞外结构域的序列(见图9) 是一致的.

[0021] 图4示出了编码人ENG同种型2 (S-ENG) 的天然核苷酸序列.编码前导序列(核苷酸414至488) 和预测的跨膜结构域(核苷酸2172至2246) 的序列分别标有下划线.

[0022] 图5示出了鼠ENG同种型1 (L-ENG) 的天然氨基酸序列.前导序列(残基1至26) 和预测的跨膜结构域(残基582至606) 标有下划线并且括出成熟肽的胞外结构域(见图10).鼠ENG同种型3 (GenBank登录号NM\_001146348) 与所描述序列的差异仅在于前导序列,其中第23位的苏氨酸(突显的) 缺失并且在第24位(也是突显的) 有甘氨酸至丝氨酸的替换.

[0023] 图6示出了鼠ENG同种型1 (L-ENG) 的天然核苷酸序列.编码前导序列(核苷酸364至441) 和预测的跨膜结构域(核苷酸2107至2181) 的序列标有下划线.编码鼠ENG的同种型3的核苷酸序列 (GenBank登录号NM\_001146348) 与所描述序列的差异仅在于前导序列,具体地为第430至433位(突显的).

[0024] 图7示出了鼠ENG同种型2 (S-ENG) 的天然氨基酸序列.前导序列(残基1至26) 和预测的跨膜结构域(残基582至606) 标有下划线.与同种型1相比,同种型2具有更短且不同的C末端,但是胞外结构域的序列(见图10) 是一致的.

[0025] 图8示出了编码鼠ENG同种型2 (S-ENG) 的天然核苷酸序列.编码前导序列(核苷酸364至441) 和预测的跨膜结构域(核苷酸2107至2181) 的序列标有下划线.

[0026] 图9示出了人ENG的胞外结构域的氨基酸序列.两种人同种型的胞外结构域在氨基酸和核苷酸序列二者上都是一致的.

[0027] 图10示出了鼠ENG的胞外结构域的氨基酸序列,其与它的人相应物(counterpart) 69%一致.两种鼠同种型的胞外结构域在氨基酸和核苷酸序列二者上都是一致的.

[0028] 图11示出了人IgG1 Fc结构域的氨基酸序列.标有下划线的残基是如文本中所讨论的任选的突变位点.

[0029] 图12示出了人IgG1 Fc结构域的N末端截短的氨基酸序列.标有下划线的残基是如文本中所讨论的任选的突变位点.

[0030] 图13示出了hENG (26至586) -hFc的氨基酸序列.ENG结构域标有下划线,TPA前导序列标有双下划线,并且接头序列是加粗且突显的.

[0031] 图14示出了编码hENG (26至586) -hFc的核苷酸序列.编码ENG结构域的核苷酸标有下划线,编码TPA前导序列的核苷酸标有双下划线,并且编码接头序列的核苷酸是加粗且突显的.

[0032] 图15示出了具有N末端截短之Fc结构域的hENG (26至586) -hFc的氨基酸序列.ENG结构域标有下划线,TPA前导序列标有双下划线,并且接头序列是加粗且突显的.

[0033] 图16示出了mENG (27至581) -mFc的氨基酸序列.ENG结构域标有下划线,TPA前导序列标有双下划线,并且接头序列是加粗且突显的.

[0034] 图17示出了编码mENG (27至581) -mFc的核苷酸序列.编码ENG结构域的核苷酸标有下划线,编码TPA前导序列的核苷酸标有双下划线,并且编码接头序列的核苷酸是加粗且突显的.

[0035] 图18示出了在基于表面等离子共振(surface plasmon resonance,SPR)的测定中确定的对BMP-9与hENG (26至586) -hFc之结合的特征.在配体浓度为0和0.01至0.625nM(以2倍递增,排除0.3125nM)下评估BMP-9与所捕获的hENG (26至586) -hFc的结合,并使用非线性回归确定 $K_D$ 为298M.

[0036] 图19示出了在基于SPR的测定中确定的对BMP-10与hENG (26至586) -hFc之结合的特征.在配体浓度为0和0.01至1.25nM(以2倍递增)下评估BMP-10与所捕获的hENG (26至586) -hFc的结合,并使用非线性回归确定 $K_D$ 为400pM.

[0037] 图20示出了可溶性人ENG胞外结构域hENG (26至586) 对BMP-9与ALK1之结合的作用.将浓度为0至50nM的hENG (26至586) 与固定浓度的BMP-9 (10nM) 预混合,并且通过基于SPR的测定确定BMP-9与所捕获的ALK1的结合.最高的迹线(trace)对应于没有hENG (26至586),而最低的迹线对应于5:1的ENG:BMP-9比例.BMP-9与ALK1的结合以浓度依赖的方式( $IC_{50}$ 为9.7nM)被可溶性hENG (26至586)所抑制.

[0038] 图21示出了可溶性人ENG胞外结构域hENG (26至586) 对BMP-10与ALK1之结合的作用.将浓度为0至50nM的hENG (26至586) 与固定浓度的BMP-10 (10nM) 预混合,并且通过基于SPR的测定确定BMP-10与所捕获的ALK1的结合.最高的迹线对应于没有hENG (26至586),而最低的迹线对应于5:1的ENG:BMP-10比例.BMP-10与ALK1的结合以浓度依赖的方式( $IC_{50}$ 为6.3nM)被可溶性hENG (26至586)所抑制.

[0039] 图22示出了mENG (27至581) -hFc对培养的人脐静脉内皮细胞(human vein endothelial cell,HUVEC)索(cord)形成的作用.数据是一式两份培养的平均值 $\pm$ SD.诱导剂内皮细胞生长物质(endothelial cell growth substance,ECGS)使平均索长度与未处理的相比翻了一番,并且mENG (27至581) -hFc削减这一增长近60%.在不存在刺激(无处理)下,mENG (27至581) -hFc几乎没有作用.

[0040] 图23示出了mENG (27至581) -hFc在鸡胚绒毛尿囊膜(chick chorioallantoic membrane,CAM)测定中对VEGF刺激的血管发生的作用.数据为平均值 $\pm$ SEM,\* $P < 0.05$ .用mENG (27至581) -hFc同时处理时,由VEGF处理诱导的额外血管数目降低了65%.

[0041] 图24示出了mENG (27至581) -mFc处理11天在小鼠血管发生反应器(angioreactor)测定中对生长因子(growth factor,GF)血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)之组合刺激的血管发生的作用.以相对荧光单位表示的血管发生 $\pm$ SEM;\* $P < 0.05$ .mENG (27至581) -mFc在这种体内测定中完全阻断GF刺激的血管发生.

[0042] 图25示出了hENG-Fc融合构建体的结构域结构.全长ENG胞外结构域(顶部结构中的残基26至586)由孤儿结构域(orphan domain)和N末端及C末端透明带(zona pellucida,ZP)结构域组成.其下方示出选定的截短变体的结构以及它们是否在基于SPR的测定中表现

出对BMP-9和BMP-10的高亲和力结合(+/-)。

[0043] 图26示出了hENG (26至437) -hFc的氨基酸序列。ENG结构域标有下划线,TPA前导序列标有双下划线,并且接头序列是加粗且突显的。

[0044] 图27示出了编码hENG (26至437) -hFc的核苷酸序列。编码ENG结构域的核苷酸标有下划线,编码TPA前导序列的核苷酸标有双下划线,并且编码接头序列的核苷酸是加粗且突显的。

[0045] 图28示出了具有N末端截短之Fc结构域的hENG (26至378) -hFc的氨基酸序列。ENG结构域标有下划线,TPA前导序列标有双下划线,并且接头序列是加粗且突显的。

[0046] 图29示出了编码具有N末端截短之Fc结构域的hENG (26至378) -hFc的核苷酸序列。编码ENG结构域的核苷酸标有下划线,并且编码接头序列的核苷酸是加粗且突显的。

[0047] 图30示出了hENG (26至359) -hFc的氨基酸序列。ENG结构域标有下划线,TPA前导序列标有双下划线,并且接头序列是加粗且突显的。

[0048] 图31示出了编码hENG (26至359) -hFc的核苷酸序列。编码ENG结构域的核苷酸标有下划线,编码TPA前导序列的核苷酸标有双下划线,并且编码接头序列的核苷酸是加粗且突显的。

[0049] 图32示出了具有N末端截短之Fc结构域的hENG (26至359) -hFc的氨基酸序列。ENG结构域标有下划线,TPA前导序列标有双下划线,并且接头序列是加粗且突显的。

[0050] 图33示出了编码具有N末端截短之Fc结构域的hENG (26至359) -hFc的核苷酸序列。编码ENG结构域的核苷酸标有下划线,编码TPA前导序列的核苷酸标有双下划线,并且编码接头序列的核苷酸是加粗且突显的。

[0051] 图34示出了具有N末端截短之Fc结构域的hENG (26至346) -hFc的氨基酸序列。ENG结构域标有下划线,TPA前导序列标有双下划线,并且接头序列是加粗且突显的。

[0052] 图35示出了编码具有N末端截短之Fc结构域的hENG (26至346) -hFc的核苷酸序列。编码ENG结构域的核苷酸标有下划线,并且编码接头序列的核苷酸是加粗且突显的。

[0053] 图36示出了在来源于CHO细胞的每种蛋白质通过蛋白质A亲和层析纯化之后针对hENG (26至586) -hFc (A)、hENG (26至359) -hFc (B) 和hENG (26至346) -hFc (C) 的尺寸排阻色谱图。单体hENG (26至346) -hFc的回收百分比与hENG (26至586) -hFc的回收百分比相等。与此相反,额外的高分子量聚集体的存在降低了hENG (26至359) -hFc的回收,因此需要额外的工序以获得等同于其他构建体之纯度的纯度。

[0054] 图37示出了基于SPR的测定所确定的对BMP-9与hENG (26至586) -hFc (A)、hENG (26至359) -hFc (B) 和hENG (26至346) -hFc (C) 之结合的动力学表征。在以2倍递增的0.0195至0.625nM的配体浓度下评估BMP-9与所捕获的来源于CHO细胞之蛋白质的结合。RU,响应单位(response unit)。注意到截短的变体与hENG (26至586) -hFc相比更缓慢的解离速率(off-rate)。

[0055] 图38示出了hENG (26至359) -hFc在CAM测定中对VEGF刺激之血管发生的作用。数据为平均值±SEM; \*, $P<0.05$ 。尽管hENG (26至359) -hFc不与VEGF结合,用hENG (26至359) -hFc同时处理时,VEGF处理诱导的额外的血管数目降低了75%。

[0056] 图39示出了hENG (26至346) -hFc处理11天在小鼠血管发生反应器测定中对生长因子(GF) VEGF和FGF-2之组合刺激的血管发生的作用。A.以相对荧光为单位的血管发生±

SEM; \*,  $P < 0.05$ . B. 按照处理组排列单个血管发生反应器的照片(每只小鼠4张), 可见呈深色内容物的血管形成. 虽然不能与VEGF或FGF-2本身结合, hENG (26至346) -hFc在这种体内测定中完全阻断了GF刺激的血管发生.

[0057] 图40示出了mENG (27至581) -mFc对4T1乳腺肿瘤异种移植物在小鼠中之生长的作用. 数据为平均值 $\pm$ SEM. 移植后第24天, 用mENG (27至581) -mFc处理的小鼠中的肿瘤体积与载剂相比低45% ( $P < 0.05$ ).

[0058] 图41示出了mENG (27至581) -mFc对结肠-26肿瘤异种移植物在小鼠中之生长的作用. mENG (27至581) -mFc处理以剂量依赖的方式抑制肿瘤生长, 植入后第58天, 高剂量组中的肿瘤体积比载剂的低接近70%.

## 具体实施方式

### [0059] 1. 概述

[0060] 在某些方面, 本发明涉及ENG多肽. ENG (还称为CD105) 被称为转化生长因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 超家族配体的共同受体 (coreceptor) 并且与正常和病理性血管发生相关. ENG表达在静态血管内皮中较低, 但是在伤口愈合、胚胎发育、炎症组织和实体瘤的内皮细胞中上调 (Dallas et al., 2008, Clin Cancer Res 14:1931-1937). 敲除ENG等位基因的纯合子小鼠由于脉管发育缺陷在妊娠早期死亡 (Li et al, 1999, Science 284:1534-1537), 而杂合子敲除ENG的小鼠成年后显示出血管发生的异常 (Jerkic et al, 2006, Cardiovasc Res 69: 845-854). 在人中, ENG基因突变已被确定为1型遗传性出血性毛细血管扩张 (HHT-1) (Osler-Rendu-Weber综合征) 的原因, 其作为一种常染色体显性的血管发育异常, 特征在于导致从动脉至静脉的直接流动 (相通) (动静脉短路) 而不通过入毛细血管床 (capillary bed) 的动静脉畸形 (McAllister et al, 1994, Nat Genet 8:345-351; Fernandez-L et al, 2006, Clin Med Res 4:66-78). 患有HHT的患者的典型症状包括反复鼻出血 (recurrent epistaxis)、胃肠道出血、皮肤和皮肤黏膜毛细血管扩张、以及肺、脑或肝脉管中的动静脉畸形.

[0061] 尽管ENG在血管发生中的具体作用仍有待确定, 它在这一过程中很可能与TGF- $\beta$ 信号传导系统的重要作用相关 (Cheifetz et al, 1992, J Biol Chem 267:19027-19030; Pardali et al, 2010, Trends Cell Biol 20:556-567). 值得注意的是, 在肿瘤组织内增殖的血管内皮细胞中, ENG表达上调 (Burrows et al, 1995, Clin Cancer Res 1:1623-1634; Miller et al, 1999, Int J Cancer 81:568-572), 并且对于很多种人肿瘤, 肿瘤中表达ENG之血管的数目与存活负相关 (Fonsatti et al, 2010, Cardiovasc Res 86:12-19). 因此, ENG对于一般性的抗血管发生治疗以及特别是癌症治疗来说是有希望的靶标 (Dallas et al, 2008, Clin Cancer Res 14:1931-1937; Bernabeu et al, 2009, Biochim Biophys Acta 1792:954-973).

[0062] 在结构上, ENG是同二聚体细胞表面糖蛋白. 它属于透明带 (zona pelucida, ZP) 蛋白质家族, 并且由短的C末端胞质结构域、单疏水跨膜结构域、以及长的胞外结构域 (ECD) 组成 (Gougos et al, 1990, J Biol Chem 265:8361-8364). 如通过电子显微镜所确定的, 单体ENG ECD由两个ZP区和位于N末端的孤儿结构域组成 (Llorca et al, 2007, J Mol Biol 365:694-705). 在人中, 初级转录物的选择性剪接产生两种ENG同种型, 一种由658个残基组

成(长的,L,SEQ ID NO:1)而另一种由625个残基(短的,S,SEQ ID NO:3)组成,两种同种型的差异仅在于其胞质结构域(Bellon et al,1993,23:2340-2345;ten Diike et al,2008,Angiogenesis 11:79-89).鼠ENG作为三种同种型而存在:L-ENG(SEQ ID NO:5)、S-ENG(SEQ ID NO:7)、以及功能意义未知的第三变体(同种型3),所述第三变体与L-ENG一致,只是在前导序列内的两个位置处有变化(Perez-Gomez et al,2005,Oncogene 24:4450-4461).鼠ENG的ECD显示与人ENG的ECD 69%的氨基酸一致性,并且缺乏见于人蛋白质中的Arg-Gly-Asp(RGD)整合素相互作用模体(motif).最近的证据表明,L-ENG和S-ENG同种型可以在体内发挥不同的功能作用(Blanco et al,2008,Circ Res 103:1383-1392;ten Dijke et al,2008,Angiogenesis 11:79-89).

[0063] 作为共同受体,认为ENG调节其他受体对TGF- $\beta$ 家族配体的应答,而本身不直接介导配体信号传导.在TGF- $\beta$ 家族中配体通常通过与同二聚体的II型受体相结合而发信号,这引发同二聚体I型受体的募集和转磷酸作用,从而导致Smad蛋白的磷酸化,Smad蛋白负责特定基因的转录活化(Massague,2000,Nat Rev Mol Cell Biol 1:169-178).基于异位细胞表达测定,已报道ENG不能凭其自身结合配体,并且其与TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 3、活化素A(activin A)、骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2,BMP-2)和BMP-7的结合需要适当的I型和/或II型受体的存在(Barbara et al,1999,J Biol Chem 274:584-594).然而,有证据表明,由成纤维细胞系表达的ENG可结合TGF- $\beta$ 1(St.-Jacques et al,1994,Endocrinology 134:2645-2657),并且最近的在COS细胞中的结果表明经转染的全长ENG可以在经转染的I型或II型受体不存在下结合BMP-9(Scharpfenecker et al,2007,J Cell Sci 120:964-972).

[0064] 除了以上所述,在蛋白水解切割全长的膜结合蛋白之后,ENG在某些条件下可在体内以可溶形式存在(Hawinkels et al,2010,Cancer Res 70:4141-4150).已经在患有癌症或者先兆子痫的患者的循环中观察到升高水平的可溶性ENG(Li et al,2000,Int J Cancer 89:122-126;Calabro et al.,2003,J Cell Physiol 194:171-175;Venkatesha et al,2006,Nat Med 12:642-649;Levine et al,2006,N Engl J Med 355:992-1005).虽然对内源性可溶性ENG的作用知之甚少,对应于ENG前体的残基26至437(SEQ ID NO:1的第26至437位氨基酸)的蛋白质已经被提议作为TGF- $\beta$ 家族配体的清除剂或诱捕剂(trap)(Venkatesha et al,2006,Nat Med 12:642-649;WO-2007/143023),其中仅TGF- $\beta$ 1和TGF- $\beta$ 3特异性地与其相关.

[0065] 本公开内容涉及以下发现:包含ENG胞外结构域之截短部分的多肽选择性地与BMP9和/或BMP10相结合并且可充当BMP9和/或BMP10拮抗剂,提供与全长胞外结构域相比的有利性质,并且可在体内抑制由多种血管发生因子(包括VEGF和碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2))介导的血管发生.部分地,本公开内容提供针对可溶性ENG多肽的生理高亲和力配体的鉴定.令人惊讶的是,可溶性ENG多肽在本文中显示出具有高度特异性,对于BMP-9和BMP-10的高亲和力结合,而没有展示出对TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2或TGF- $\beta$ 3的任何有意义的结合,而且,可溶性ENG多肽在本文中显示出抑制BMP9和BMP10与II型受体的相互作用,从而抑制细胞的信号转导.本公开内容进一步证明,ENG多肽抑制血管发生.数据还证明,ENG多肽可以发挥抗血管发生作用,尽管发现ENG多肽没有展示出对TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、VEGF或FGF-2的有意义的结合.

[0066] 因此,在某些方面,本公开内容提供内皮糖蛋白多肽作为BMP-9或BMP-10的拮抗剂,其通常用于抑制任何BMP-9或BMP-10疾病,具体地用于抑制血管发生,包括VEGF依赖性血管发生和VEGF非依赖性血管发生二者。然而,应该指出的是,针对ENG本身的抗体预期将对ENG多肽有不同的作用。针对ENG的泛中和抗体(pan-neutralizing antibody)(抑制所有强配体和弱配体之结合的抗体)预计会通过ENG抑制这样的配体的信号传导,但预计不会抑制此类配体通过其他受体(例如,在BMP-9或BMP-10情况中的ALK-1、ALK-2、BMPRII、ActRIIA或ActRIIB)进行信号传导的能力。还应当指出的是,由于天然的循环的可溶性ENG多肽的存在(根据本文给出的数据,推测所述多肽充当天然的BMP-9/10拮抗剂),不清楚是否中和性抗ENG抗体会主要抑制ENG的膜结合形式(从而充当ENG/BMP-9/10拮抗剂)或ENG的可溶形式(从而充当ENG/BMP-9/10激动剂)。另一方面,基于本公开内容,ENG多肽预计将抑制所有与其紧密结合的配体(包括BMP-9或BMP-10,构建体如在实施例显示的那些),但不会影响与其弱结合的配体。所以,尽管针对ENG的泛中和性抗体可通过ENG阻断BMP-9和BMP-10信号传导,它不会阻断通过其他受体的BMP-9或BMP-10信号传导。另外,尽管ENG多肽可以通过所有的受体(包括除了ENG以外的受体)抑制BMP-9信号传导,它预计不会通过任何受体(即便是ENG)的弱结合配体信号传导。

[0067] 除非另有指明,本文所描述的蛋白质是人形式的。蛋白质的Genbank参考如下:人ENG同种型1(L-ENG),NM\_001114753;人ENG同种型2(S-SCH),NM\_000118;鼠ENG同种型1(L-ENG),NM\_007932;鼠ENG同种型2(S-ENG),NM\_001146350;鼠ENG同种型3,NM\_001146348。来自人和小鼠的天然ENG蛋白质的序列示于图1至8。

[0068] 本说明书中使用的术语通常具有其在本领域中、在本公开内容的上下文中以及在使用每个术语的特定上下文中的一般含义。在本说明书中讨论了某些术语,以为实施者在描述本文所公开的组合物和方法以及如何制造和使用它们中提供额外的指导。任何术语之使用的范围和含义在该术语所使用的特定上下文中将是显而易见的。

## [0069] 2.可溶性ENG多肽

[0070] 除了在某些情况下,天然ENG蛋白是跨膜蛋白质,具有位于细胞外侧的蛋白质部分(胞外部分)和位于细胞内侧的蛋白质部分(胞内部分)。本公开内容的一些方面包括包含ENG胞外结构域(ECD)之一部分的多肽。

[0071] 在某些实施方案中,本公开内容提供ENG多肽。ENG多肽可包括这样的多肽,其包含氨基酸序列与天然ENG多肽的截短的ECD结构域至少90%一致、并且任选地至少95%、96%、97%、98%、99%、或100%一致的氨基酸序列或者由其组成,其C末端位于SEQ ID NO:1的第333至378位氨基酸的任一处,并且所述多肽不包含由SEQ ID NO:1的第379至430位氨基酸组成的序列。任选地,ENG多肽不包含多于5个连续的氨基酸或者多于10、20、30、40、50、52、60、70、80、90、100、150或200个或更多个连续的氨基酸,所述连续的氨基酸来自自由SEQ ID NO:1的第379至586位氨基酸组成的序列或者来自自由SEQ ID NO:1的第379至581位氨基酸组成的序列。未经加工的ENG多肽可包含或者排除任何信号序列以及信号序列N末端的任何序列。如本文中所论述的,成熟(经加工的)ENG多肽的N末端可位于SEQ ID NO:1的第26至42位氨基酸的任一处。成熟ENG多肽的实例包括SEQ ID NO:23的第25至377位氨基酸、SEQ ID NO:25的第25至358位氨基酸、以及SEQ ID NO:29的第25至345位氨基酸。同样地,ENG多肽可包含由SEQ ID NO:24的第73至1131位核苷酸、SEQ ID NO:26的第73至1074位核苷酸或者

SEQ ID NO:30的第73至1035位核苷酸编码的多肽或其沉默变体(silent variant)或者在严格杂交条件(通常这样的条件是本领域中已知的,例如,涉及在50%v/v甲酰胺、5×SSC、2%w/v封闭剂、0.1%N-月桂酰肌氨酸、以及0.3%SDS在65℃下过夜杂交并在例如5×SSC中在约65℃下洗涤)下与其互补物杂交的核酸.因此,术语“ENG多肽”涵盖分离的ENG多肽的胞外部分、其变体(包括这样的变体,其包含例如在对应于SEQ ID NO:1的第26至378位氨基酸的序列中例如不多于2、3、4、5、10、15、20、25、30或35个氨基酸替换)、其片段、以及包含前述任一种的融合蛋白,但在每种情况中,优选任何上述ENG多肽将保留对BMP-9和/或BMP-10的牢固(substantial)亲和力.通常,将ENG多肽设计成在生物学相关的温度、pH水平和渗量下在水溶液中可溶.

[0072] 在此呈现的数据显示,包含ENG多肽的较短C末端截短变体的Fc融合蛋白,与ENG(26至437)-Fc或者包括全长ENG ECD的Fc融合蛋白相比,没有展示出与TGF-β1和TGF-β3明显的结合,相反展示出更高的与BMP-9结合的亲和力(具有显著更慢的解离速率).特别地,发现在SEQ ID NO:1的第378、359和346位氨基酸终止的C末截短变体与ENG(26至437)或ENG(26至586)相比,以显著更高的亲和力与BMP-9相结合(并且以未降低的亲和力与BMP-10相结合).但是,与BMP-9和BMP-10的结合被延伸至第332、329或257位氨基酸的更长C末端截短完全地破坏.因此,在第333位氨基酸和第378位氨基酸之间终止的ENG多肽预计都可以是有活性的,但在第346位氨基酸和第359位氨基酸处或者在第346位氨基酸与第359位氨基酸之间终止的构建体可以是最有活性的.预计在第360位氨基酸和第378位氨基酸处或者第360位氨基酸与第378位氨基酸之间终止的形式倾向于ENG(26至378)所示的中间配体结合亲和力.基于观察到的ENG(26至346)-Fc与包含全长ENG ECD的融合蛋白(见实施例)相比在蛋白质表达和消除半衰期中的改进,预计了在第333位氨基酸和第378位氨基酸或者第333位氨基酸与第378位氨基酸之间终止的某些构建体在其他关键参数中的改进.任何这些截短的变体形式可能是期望使用的,这取决于临床或实验设置.

[0073] 在N末端,预计在SEQ ID NO:1的第26位氨基酸(起始的谷氨酸)或者之前起始的ENG多肽将保留配体结合活性.如本文中所公开的,如更长的N末端截短那样,N末端截短至SEQ ID NO:1的第61位氨基酸取消了配体结合.然而,也如本文中所公开的,ENG一级序列的一致性建模(consensus modeling)表明,在由SEQ ID NO:1的第26至60位氨基酸所定义的区域内的有序二级结构被限制为预测在SEQ ID NO:1的第42至45位具有高置信度的4个残基之β链和在SEQ ID NO:1的第28至29位具有非常低置信度的2个残基之β链.因此,活性ENG多肽将优先起始于SEQ ID NO:1的第26位氨基酸(或者之前)或者起始于SEQ ID NO:1的第27至42位氨基酸中的任一个.

[0074] 综上所述,ENG多肽的活性部分可包含SEQ ID NO:1的第26至333、26至334、26至335、26至336、26至337、26至338、26至339、26至340、26至341、26至342、26至343、26至344、26至345或26至346位的氨基酸序列,以及起始于SEQ ID NO:1的第27至42位氨基酸中任一个的这些序列的变体.示例性的ENG多肽包含SEQ ID NO:1的第26至346、26至359和26至378位的氨基酸序列.还考虑这些范围内的变体,特别是与SEQ ID NO:1的对应部分具有至少80%、85%、90%、95%或者99%一致性的那些.ENG多肽可不包含由SEQ ID NO:1的第379至430位氨基酸组成的序列.

[0075] 如上所述,本公开内容提供与天然ENG多肽共有特定程度的序列一致性或相似性



的ENG多肽.为了确定两个氨基酸序列的百分一致性,将序列比对以用于最佳的比较目的(例如,可以在第一和第二氨基酸中的一个或二者或者核酸序列引入缺口(gap)用于最佳比对,并且出于比较目的,非同源序列可以忽略不计).然后比较在对应氨基酸位置的氨基酸残基.当第一序列中的位置被与第二序列中对应位置的相同氨基酸残基占据时,则分子在该位置是一致的.(如本文中使用的氨基酸“一致性”等同于氨基酸“同源性”).两个序列之间的百分一致性是序列共有的一致位置数目的函数,其中考虑了缺口的数目和每个缺口的长度(需要引入以对两个序列进行最佳对比).

[0076] 可以用数学算法来完成两个序列之间序列的比较和百分一致性和相似性的确定(Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.,编辑,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.,ed.,Academic Press,New York,1993;Computer Analysis of Sequence Data,Part 1,Griffin,A.M.,and Griffin,H.G.,eds.,Humana Press,New Jersey,1994;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;以及Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.and Devereux,J.,eds.,M Stockton Press,New York,1991).

[0077] 在一个实施方案中,使用Needleman和Wunsch(J Mol.Biol.(48):444-453(1970))算法确定两个氨基酸序列之间的百分一致性,所述算法已经被并入GCG软件包的GAP程序中(可得自<http://www.gcg.com>).在一个具体的实施方案中,在GAP程序中使用下列参数:Blosum 62矩阵或PAM250矩阵,以及16、14、12、10、8、6或4的缺口权重以及1、2、3、4、5或6的长度权重.在另一个实施方案中,使用在GCG软件包中的GAP程序确定两个核苷酸序列之间的百分一致性(Devereux,J.,et al.,Nucleic Acids Res.12(1):387(1984))(可得自<http://www.gcg.com>).示例性参数包括使用NWSgapdna.CMP矩阵和40、50、60、70或80的缺口权重以及1、2、3、4、5或6的长度权重.除非另有指明,使用GAP程序确定两个氨基酸序列之间的百分一致性,该程序使用Blosum 62矩阵、10的缺口权重和3的长度权重,并且如果这种算法不能计算期望的百分一致性,应当选择本文中公开的合适的替代物.

[0078] 在另一实施方案中,使用Myers和W.Miller的算法(CABIOS,4:11-17(1989))来确定两个氨基酸序列之间的百分一致性,所述算法已被并入ALIGN程序(版本2.0)中,使用PAM120权重残基表(weight residue table)、12的缺口长度罚分和4的缺口罚分.

[0079] 另一个用于确定两个氨基酸序列之间最佳整体比对的实施方案可使用基于Brutlag等的算法(Comp.App.Biosci.,6:237-245(1990))的FASTDB计算机程序来确定.在序列比对中,查询和目标序列都是氨基酸序列.所述全局序列比对的结果以百分一致性表示.在一个实施方案中,氨基酸序列一致性使用基于Brutlag等的算法(Comp.App.Biosci.,6:237-245(1990))的FASTDB计算机程序来进行.在一个具体的实施方案中,为计算氨基酸比对的百分一致性和相似性而采用的参数包括:矩阵=PAM 150,k-元组(k-tuple)=2,错配罚分=1,连接罚分=20,随机化基团长度=0,截止分数=1,缺口罚分=5并且缺口大小罚分=0.05.

[0080] 在某些实施方案中,ENG多肽与BMP-9和BMP-10相结合,并且ENG多肽不显示与TGF- $\beta$ 1或TGF- $\beta$ 3的牢固结合.可以在溶液中或在表面等离子共振系统(例如Biacore™系统)中使用纯化的蛋白质来评估结合.可选择ENG多肽以抑制抗血管发生活性.用于血管发生抑制活

性的生物测定包括鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 测定、小鼠血管发生反应器测定、以及用于测量在植入的肿瘤上施用分离或者合成之蛋白质的作用的测定。在实施例中描述了CAM测定、小鼠血管发生反应器测定、以及其他测定。

[0081] ENG多肽可在N末端额外地包含多种前导序列中的任一种。这样的序列可允许多肽在真核系统中表达并靶向分泌途径。参见例如Ernst等, 美国专利No.5,082,783 (1992)。或者, 可使用天然ENG信号序列以实现从细胞中排出 (extrusion)。可行的前导序列包括蜜蜂蜂毒肽 (honeybee mellitin)、TPA和天然前导序列 (分别为SEQ ID NO:13至15)。并入了TPA前导序列的ENG-Fc融合蛋白的实例包括SEQ ID NO:23、25、27和29。信号肽的加工可根据所选择的前导序列、所用的细胞类型和培养条件等变量而改变, 因此成熟ENG多肽的实际N末端的起始位点可以在N末端或C末端方向上移动1、2、3、4或5个氨基酸。成熟ENG-Fc融合蛋白的实例包括SEQ ID NO:33至36, 如下所示, ENG多肽部分标有下划线。

[0082] 人ENG (26至378) -hFc (截短的Fc)

ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLFLEF  
PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN  
SSLVTFQEPP GVNTTELPSPF PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR  
LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTF ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL  
RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW LIDANHNMQI  
WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMNLNASIV ASFVELPLAS  
[0083] IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS PELLMSLIQT KCADDAMTLV  
LKKELVATGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC  
VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ  
DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN  
QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT  
VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 33)

[0084] 人ENG (26至359) -hFc

[0085] ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF  
PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN  
SSLVTFQEPP GVNTTELPSE PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR  
LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTF ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL  
RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDVAVL ILQGPPYVSW LIDANHNMQI  
WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS  
IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS PELLMSLITG GGPCKSCDKT  
TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS  
NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP  
SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS  
CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK (SEQ ID NO: 34)

[0086] 人ENG (26至359) -hFc (截短的Fc)

[0087] ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF  
PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN  
SSLVTFQEPP GVNTTELPSE PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR  
LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTF ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL  
RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDVAVL ILQGPPYVSW LIDANHNMQI  
WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS  
IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS PELLMSLITG GGHTCPCPCP  
APELLGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 35)

[0088] 人ENG (26至346) -hFc (截短的Fc)

ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF  
 PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLVLVSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN  
 SSLVTFQEPP GVNTTELPSPF PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR  
 LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTF ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL  
 RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDVAVL ILQGPPYVSW LIDANHNMQI  
 WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMNLNASIV ASFVELPLAS  
 [0089] IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPTGGGT HTCPCCPAPE LLGGPSVFLF  
 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE  
 EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP  
 REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT  
 TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL  
 SPGK (SEQ ID NO: 36)

[0090] 在某些实施方案中,本公开内容考虑ENG多肽的特定突变从而改变该多肽的糖基化.可选择这样的突变以引入或消除一个或更多个糖基化位点,例如O-连接或N-连接的糖基化位点.天冬酰胺连接的糖基化识别位点通常包含三肽序列——天冬酰胺-X-苏氨酸(或天冬酰胺-X-丝氨酸)(其中“x”是任意氨基酸),其被合适的细胞糖基化酶特异性识别.还可以通过将一个或更多个丝氨酸或苏氨酸残基添加、替换至野生型ENG多肽序列(针对O-连接的糖基化位点)来进行改变.在糖基化识别位点的第一个或第三个氨基酸位置的一处或两处进行多种氨基酸替换或缺失(和/或在第二个位置进行氨基酸缺失)导致经修饰三肽序列的非糖基化.在ENG多肽上提高碳水化合物部分数目的另一种方式是将糖苷化学或酶促地偶联至ENG多肽来实现.取决于所使用的偶联模式,可以使糖连接至(a)精氨酸和组氨酸;(b)游离的羧基;(c)游离的巯基(例如半胱氨酸的巯基);(d)游离的羟基(例如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的羟基);(e)芳族残基(例如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳族残基);或者(f)谷氨酰胺的酰胺基团.这些方法描述于1987年9月11日公布的WO 87/05330以及Aplin和Wriston(1981)CRC Crit.Rev.Biochem.,259-306页中,其通过引用并入本文.可化学和/或酶促地去除ENG多肽上存在的一个或更多个碳水化合物部分.化学去糖基化可包括例如使ENG多肽暴露于化合物三氟甲磺酸或等同化合物.该处理导致除连接糖(N-乙酰葡萄糖胺或N-乙酰半乳糖胺)以外的大多数或所有糖被切割,而氨基酸序列则保持完好.化学去糖基化还描述于Hakimuddin等(1987)Arch.Biochem.Biophys.259:52以及Edge等(1981)Anal.Biochem.118:131中.酶促切割ENG多肽上的碳水化合物部分可通过使用多种内切和外切糖苷酶来实现,如Thotakura等(1987)Meth.Enzymol.138:350所描述.需要时,可根据所用表达系统的类型来调整ENG多肽的序列,这是因为哺乳动物、酵母、昆虫和植物细胞均可引入不同的糖基化模式,这些糖基化模式可受到肽的氨基酸序列的影响.一般地,用于人中的ENG蛋白将表达在提供适当糖基化的哺乳动物细胞系中,例如HEK293或CHO细胞系,然而预计也可使用另一些哺乳动物表达细胞系、昆虫细胞以及含有经改造之糖基化酶的酵母细胞系.

[0091] 本公开内容还考虑产生突变体的方法,特别是ENG多肽的组合突变体集合以及截短的突变体;组合突变体库尤其可用于鉴定功能性变体序列.筛选此类组合文库的目的可以是产生例如可用作激动剂或拮抗剂的ENG多肽变体或者具有新活性的ENG多肽变体.以下提供了多种筛选测定,这样的测定可用于评价变体.例如,可根据结合ENG配体之能力、阻止ENG配体与ENG多肽结合或者干扰ENG配体引起之信号传导的能力来筛选ENG多肽变体.ENG多肽或其变体的活性还可以在基于细胞的测定或体内测定中进行测试,特别是实施例中所公开的任意测定.

[0092] 可产生源于组合的变体,其具有相对于ENG多肽(其包含天然ENG多肽的胞外结构域)来说选择性的或通常提高的效力.同样,可通过诱变来产生血清半衰期显著不同于对应野生型ENG多肽的变体.例如,可使经改变的蛋白质对蛋白水解降解或者导致天然ENG多肽被破坏、或被清除或失活的其他过程更稳定或更不稳定.可利用这样的变体和编码它们的基因通过调节ENG多肽的半衰期来改变ENG多肽水平.例如,短半衰期可产生更短暂的生物学效应,并可允许更严格地控制患者体内的重组ENG多肽水平.在Fc融合蛋白中,可在接头(如果存在的话)和/或Fc部分形成突变以改变该蛋白质的半衰期.

[0093] 可通过编码多肽文库之基因的简并文库来得到组合文库,所述多肽均包含潜在ENG多肽序列的至少一部分.例如,可将合成的寡核苷酸的混合物酶促连接到基因序列中,从而潜在ENG多肽核苷酸序列的简并集合可表达为单独的多肽,或者表达为一组较大的融合蛋白(例如,用于噬菌体展示).

[0094] 可通过许多方法从简并寡核苷酸序列产生潜在ENG变体的文库.可以在自动DNA合成仪中化学合成简并基因序列,然后将合成基因连接到合适的表达载体中.简并寡核苷酸的合成在本领域是公知的(参见例如Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al., (1981) Recombinant DNA, Proc. 第3版Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier 273-289页; Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477).这样的技术已用于其他蛋白质的定向演化(参见例如Scott et al., (1990) Science 249:386-390; Roberts et al., (1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) Science 249:404-406; Cwirla et al., (1990) PNAS USA 87:6378-6382; 以及美国专利No: 5,223,409、5,198,346和5,096,815).

[0095] 或者,可利用其他形式的诱变来产生组合文库.例如,可通过使用例如丙氨酸扫描诱变及类似方法(Ruf et al., (1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wang et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint et al., (1993) Gene 137:109-118; Grodberg et al., (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima et al., (1993) J. Biol. Chem. 268: 2888-2892; Lowman et al., (1991) Biochemistry 30:10832-10838; 和Cunningham et al., (1989) Science 244:1081-1085)、接头扫描诱变(linker scanning mutagenesis)(Gustin et al., (1993) Virology 193:653-660; Brown et al., (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight et al., (1982) Science 232:316)、饱和诱变(saturation mutagenesis)(Meyers et al., (1986) Science 232:613)、PCR诱变(Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 11:11-19)或随机诱变包括化学诱变等(Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; 和Greener

et al., (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34) 来筛选而从文库产生并分离出ENG多肽变体. 接头扫描诱变 (特别是在组合的背景下进行的) 是鉴定ENG多肽截短 (生物活性) 形式的有吸引力的方法.

[0096] 本领域中已知很多种用于筛选由点突变和截短形成的组合文库之基因产物的技术, 以及就此而言用于针对具有特定性质之基因产物筛选cDNA文库的技术. 这样的技术一般适用于迅速筛选由组合诱变ENG多肽产生的基因文库. 筛选大基因文库的最广泛使用的技术通常包括: 将基因文库克隆到可复制的表达载体中; 用得到的载体文库转化合适的细胞; 以及在下述条件下表达组合基因, 在此条件下对期望活性的检测便于相对容易地分离编码其产物被检测之基因的载体. 优选的测定包括ENG配体结合测定和配体介导的细胞信号传导测定.

[0097] 在某些实施方案中, 本公开内容的ENG多肽还可包含除了ENG多肽中天然存在的任何翻译后修饰之外的翻译后修饰. 这样的修饰包括但不限于乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂质化、聚乙二醇化 (聚乙二醇) 和酰基化. 结果, 经修饰的ENG多肽可包含非氨基酸组分, 例如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖以及磷酸. 这样的非氨基酸组分对ENG多肽功能的作用可如本文针对其他ENG多肽变体所述的那样进行测试. 当ENG多肽通过对ENG多肽初始形式进行切割在细胞中产生时, 翻译后加工对于正确折叠和/或蛋白质功能可能也是重要的. 不同的细胞 (例如CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3或HEK293) 具有针对这些翻译后活性的特定细胞机器和特有机制, 并且可以选择不同的细胞以确保ENG多肽的正确修饰和加工.

[0098] 在某些方面, ENG多肽的功能性变体或经修饰形式包括具有ENG多肽之至少一部分以及一个或更多个融合结构域的融合蛋白. 此类融合结构域的公知实例包括但不限于多组氨酸 (polyhistidine)、Glu-Glu、谷胱甘肽S转移酶 (GST)、硫氧还蛋白、蛋白质A、蛋白质G、免疫球蛋白重链恒定区 (Fc)、麦芽糖结合蛋白 (MBP) 或人血清白蛋白. 可选择融合结构域使其具备所需特质. 例如, 某些融合结构域特别地可用于通过亲和层析来分离融合蛋白. 为了亲和纯化的目的, 针对亲和层析使用了相关基质, 例如缀合有谷胱甘肽、淀粉酶以及镍或钴的树脂. 许多这样的基质可以“试剂盒”形式得到, 例如可用于HIS<sub>6</sub>融合伴侣的Pharmacia GST纯化系统和QIAexpress<sup>TM</sup>系统 (Qiagen). 另一个实例是, 可选择融合结构域从而有利于ENG多肽的检测. 这些检测结构域的实例包括多种荧光蛋白 (例如GFP) 以及通常是短肽序列的“表位标签” (可获得针对所述表位标签的特异性抗体). 很容易获得特异性单克隆抗体的公知表位标签, 其包括FLAG、流感病毒血凝素 (HA) 和c-myc标签. 在一些情况下, 融合结构域具有蛋白酶切割位点, 例如针对Xa因子或凝血酶的切割位点, 这使得相关蛋白酶部分地消化该融合蛋白并因而从中释放重组蛋白. 然后, 所释放的蛋白质通过随后的层析分离得以与融合结构域分离. 在某些优选的实施方案中, ENG多肽与在体内稳定ENG多肽的结构域 (“稳定”结构域) 融合. “稳定”是指提高血清半衰期, 不论是由于降低破坏、降低通过肾的清除还是其他药代动力学效应引起. 已知与免疫球蛋白的Fc部分融合会赋予多数蛋白质以理想的药物代谢动力学性质. 同样, 与人血清白蛋白融合可赋予理想的性质. 可选择的其他类型融合结构域包括多聚化 (例如, 二聚化、四聚化) 结构域和功能性结构域.

[0099] 作为一些具体实例, 本公开内容提供了包含与两个Fc结构域序列 (例如, SEQ ID NO: 11、12) 之一融合之ENG多肽变体的融合蛋白. 任选地, Fc结构域在例如Asp-265、Lys-322和Asn-434 (根据相应的全长IgG编码) 残基处具有一个或更多个突变. 在某些情况下, 具有

这些突变中的一个或多个(例如Asp-265突变)的突变Fc结构域与野生型Fc结构域相比具有降低的与Fc $\gamma$ 受体相结合的能力.在另一些情况下,具有一个或多个所述突变(例如,Asn-434突变)的突变Fc结构域与野生型Fc结构域相比具有提高的与I类MHC相关Fc受体(FcRN)相结合的能力.

[0100] 应理解,融合蛋白的不同组分可以按照符合期望功能的任何方式排列.例如,ENG多肽可置于异源结构域的C末端,或者异源结构域可置于ENG多肽的C末端.ENG多肽结构域和异源结构域不需要在融合蛋白中邻接,另外的结构域或氨基酸序列可包含在各结构域的C末端或N末端或者所述结构域之间.

[0101] 本文中使用的术语“免疫球蛋白Fc结构域”或简称“Fc”应理解是指免疫球蛋白链恒定区(优选免疫球蛋白重链恒定区)的羧基端部分或其一部分.例如,免疫球蛋白Fc区可包含:1)CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域;2)CH1结构域和CH2结构域;3)CH1结构域和CH3结构域;4)CH2结构域和CH3结构域;或5)两个或多个结构域和免疫球蛋白铰链区的组合.在一个优选的实施方案中,所述免疫球蛋白Fc区包含至少免疫球蛋白铰链区、CH2结构域和CH3结构域,优选缺少CH1结构域.

[0102] 在一个实施方案中,所述重链恒定区源自的免疫球蛋白类型是IgG(Ig $\gamma$ )( $\gamma$ 亚型1、2、3或4).可使用免疫球蛋白的其他类型:IgA(Ig $\alpha$ )、IgD(Ig $\delta$ )、IgE(Ig $\epsilon$ )和IgM(Ig $\mu$ ).有关选择合适的免疫球蛋白重链恒定区的论述详见美国专利No.5,541,087和5,726,044.认为从某些免疫球蛋白类型和亚型选择特定免疫球蛋白重链恒定区序列以实现特定的结果是在本领域技术水平之内的.编码免疫球蛋白Fc区之DNA构建体的一部分优选包含铰链结构域的至少一部分以及优选地Fc $\gamma$ 的CH<sub>3</sub>结构域或者IgA、IgD、IgE或IgM中任一种的同源结构域的至少一部分.

[0103] 此外,还考虑到,在本文中公开的方法和组合物的实施中,替换或缺失免疫球蛋白重链恒定区内的氨基酸可以是有用的.一个实例是在上游的CH2区域中引入氨基酸替换以产生与Fc受体亲和力降低的Fc变体(Cole et al.(1997)J.Immunol.159:3613).

[0104] 在某些实施方案中,本公开内容使得可获得分离和/或纯化形式的ENG多肽,其与其他蛋白质和/或其他ENG多肽种类分离或者基本不含(例如,至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%地不含)其他蛋白质和/或其他ENG多肽种类.

[0105] 在某些实施方案中,本公开内容包括编码可溶性ENG多肽的核酸,所述核酸包含ENG蛋白胞外部分的编码序列.在另一些实施方案中,本公开内容还涉及包含所述核酸的宿主细胞.所述宿主细胞可以是任意原核和真核细胞.例如,本公开内容的多肽可以表达于细菌细胞(例如大肠杆菌)、昆虫细胞(例如,使用杆状病毒表达载体)、酵母或哺乳动物细胞中.其他合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的.因此,本公开内容的一些实施方案还涉及生产ENG多肽的方法.已证实,SEQ ID NO:25和29所示的在CHO细胞中表达的ENG-Fc融合蛋白具有强的抗血管发生活性.

### [0106] 3. 编码ENG多肽的核酸

[0107] 在某些方面中,本公开内容提供了编码包括本文中公开的片段、功能性变体和融合蛋白在内的任何ENG多肽的分离的和/或重组的核酸.例如,SEQ ID NO:2和4分别编码天然人ENG前体多肽的长同种型和短同种型,而SEQ ID NO:30编码与IgG1 Fc结构域融合的ENG胞外结构域的一种变体.所述目标核酸可以是单链的或双链的.这样的核酸可以是DNA

或RNA分子.这些核酸可用于例如制备ENG多肽的方法中或用作直接的治疗剂(例如,用于反义核酸、RNAi或基因治疗方法中)。

[0108] 在某些方面中,所述编码ENG多肽的目标核酸还应理解为包括SEQ ID NO:24、26、28或30之变体的核酸.变体核苷酸序列包括由于一个或多个核苷酸替换、添加或缺失而不同的序列,例如等位基因变体。

[0109] 在某些实施方案中,本公开内容提供了分离的或重组的核酸序列,其与SEQ ID NO:24、26、28或30至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致.本领域普通技术人员会理解,与SEQ ID NOs:24、26、28或30互补以及与SEQ ID NOs:24、26、28或30的变体互补的核酸序列也在本公开的范围之内.在另一些实施方案中,本公开内容的核酸序列可被分离、重组和/或与异源核苷酸序列融合,或者在DNA文库中。

[0110] 在另一些实施方案中,本公开内容的核酸还包括在高度严格条件下与SEQ ID NO:24、26、28或30所示核苷酸序列杂交的核苷酸序列、SEQ ID NO:24、26、28或30的互补序列或者其片段.如上所述,本领域普通技术人员会容易地理解,促进DNA杂交的合适的严格条件可有不同.例如,可以于约45℃下在 $6.0\times$ 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中进行杂交,然后于50℃下用 $2.0\times$ SSC清洗.例如,所述清洗步骤中的盐浓度可以从低严格的50℃、约 $2.0\times$ SSC至高严格的50℃、约 $0.2\times$ SSC之中选择.另外,所述清洗步骤中的温度可从低严格条件的室温(约22℃)提高到高严格条件的约65℃.温度和盐均可变化,或者温度或盐浓度可保持恒定而其他变量发生改变.在一个实施方案中,本公开内容提供了在室温 $6\times$ SSC的低严格条件下杂交并随后在室温用 $2\times$ SSC清洗的核酸。

[0111] 本公开内容的范围还包括由于遗传密码简并性而导致不同于SEQ ID NO:24、26、28或30所示核酸的分离的核酸.例如,许多氨基酸对应于超过一种的三联体.对应于同一氨基酸的密码子,或称“同义密码子”(例如,CAU和CAC是组氨酸的同义密码子),可导致不影响该蛋白质之氨基酸序列的“沉默”突变.然而,导致目的蛋白质之氨基酸序列改变的DNA序列多态性预期会存在于哺乳动物细胞中.本领域技术人员会理解,在编码特定蛋白质之核酸的一个或多个核苷酸(多达核苷酸的约3%至5%)中的这些变化可能由于天然等位基因变化而存在于给定物种的个体中.任何以及全部这样的核苷酸改变和得到的氨基酸多态性均在本公开内容的范围内。

[0112] 在某些实施方案中,本公开内容的重组核酸可与表达构建体的一个或多个调节核苷酸序列可操作地相连接.调节核苷酸序列一般会适合用于表达的宿主细胞.本领域已知针对多种宿主细胞的众多类型的合适表达载体和适当调节序列.通常,所述一种或更多种调节核苷酸序列可包括但不限于:启动子序列、前导序列或信号序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列以及增强子或激活子(activator)序列.本公开内容考虑本领域已知的组成型或诱导型启动子.所述启动子可以是天然启动子或者组合了多于一种启动子之元件的杂合启动子.表达构建体可以以附加体(例如质粒)的形式存在于细胞中,或者表达构建体可插入染色体中.在一个优选的实施方案中,表达载体包含选择标记基因以允许选择经转化的宿主细胞.选择标记基因是本领域中公知的,并且随所使用宿主细胞而不同。

[0113] 在本文中公开的某些方面中,目标核酸在包含编码ENG多肽并与至少一种调节序列可操作地相连接的核苷酸序列的表达载体中提供.调节序列是本领域公知的,并被选择



用于指导ENG多肽的表达.因此,术语调节序列包括启动子、增强子和其他表达控制元件.示例性的调节序列描述于Goeddel;Gene表达Technology:Methods in Enzymology,Academic Press,San Diego,CA(1990).例如,在与之可操作地相连接时控制DNA序列表达的许多种表达控制序列中任意一种均可用于这些载体中以表达编码ENG多肽的DNA序列.这样可用的表达控制序列包括例如SV40的早期和晚期启动子、tet启动子、腺病毒或巨细胞病毒立即早期启动子、RSV启动子、lac系统、trp系统、TAC或TRC系统、表达由T7RNA聚合酶指导的T7启动子、 $\lambda$ 噬菌体的主要操纵子和启动子区、fd外被蛋白的控制区、3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子(例如Pho5)、酵母 $\alpha$ -交配因子的启动子、杆状病毒系统的多面体启动子以及其他已知控制原核或真核细胞或其病毒之基因表达的序列,及其多种组合.应理解,表达载体的设计可取决于如下因素:待转化之宿主细胞的选择和/或期望表达之蛋白的类型.并且,还应考虑载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力以及该载体编码之任何其他蛋白质(例如抗生素标记)的表达.

[0114] 本公开内容中涉及的重组核酸可通过将所克隆基因或其一部分连接到适于在原核细胞、真核细胞(酵母、鸟类、昆虫或哺乳动物)或两者中表达的载体中而产生.用于产生重组ENG多肽的表达载体包括质粒和其他载体.例如,合适的载体包括用于在原核细胞(例如大肠杆菌)中表达的如下类型的质粒:pBR322来源的质粒、pEMBL来源的质粒、pEX来源的质粒、pBTac来源的质粒和pUC来源的质粒.

[0115] 一些哺乳动物表达载体既包含利于在细菌中扩增载体的原核序列,也包含在真核细胞中表达的一种或更多种真核转录单元.适于转染真核细胞的哺乳动物表达载体的实例有:pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg来源的载体.这些载体中的一些用来自细菌质粒(例如pBR322)的序列进行修饰,以利于在原核和真核细胞二者中进行复制和药物抗性选择.或者,病毒例如牛乳头瘤病毒(BPV-1)或EB病毒的衍生物(pHEBo、pREP来源的以及p205)可用于在真核细胞中瞬时表达蛋白.其他病毒(包括逆转录病毒)表达系统的实例可见于以下对基因治疗递送系统的描述.用于制备质粒和转化宿主生物的多种方法是本领域中公知的.对于其他针对原核和真核细胞的合适表达系统以及通用重组方法,参见Sambrook,Fritsch和Maniatis编著的Molecular Cloning A Laboratory Manual,第3版(Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001).在一些情况下,通过使用杆状病毒表达系统来表达重组多肽可以是理想的.这样的杆状病毒表达系统的实例包括pVL来源的载体(例如pVL1392、pVL1393和pVL941)、pAcUW来源的载体(例如pAcUW1)和pBlueBac来源的载体(例如含 $\beta$ -gal的pBlueBac III).

[0116] 在一个优选的实施方案中,载体被设计成用于在CHO细胞中产生目的ENG多肽,例如Pcmv-Script载体(Stratagene,La Jolla,Calif.)、pcDNA4载体(Invitrogen,Carlsbad,Calif.)和pCI-neo载体(Promega,Madison,Wisc.).很明显,可使用目的基因构建体使目的ENG多肽在培养扩增的细胞中表达,从而例如产生用于纯化的蛋白质,包括融合蛋白或变体蛋白.

[0117] 本公开内容还涉及转染有包含编码序列(例如,N0:24、26、28或30)之重组基因的宿主细胞,所述编码序列针对一种或更多种目的ENG多肽.所述宿主细胞可以是任何原核或真核细胞.例如,本文中公开的ENG多肽可表达于细菌细胞(例如大肠杆菌)、昆虫细胞(例如,使用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞中.其他合适的宿主细胞也是本领域技

术人员已知的。

[0118] 因此,本公开内容还涉及产生目的ENG多肽的方法。例如,可以在合适的条件下培养转染有编码ENG多肽之表达载体的宿主细胞以表达ENG多肽。所述ENG多肽可从含有ENG多肽的细胞和培养基混合物中分泌出并分离。或者,ENG多肽可保留在胞质中或膜级分中,收集、裂解细胞并分离蛋白质。细胞培养物包含宿主细胞、培养基和其他副产物。用于细胞培养的合适培养基是本领域中公知的。可使用本领域中已知的用于纯化蛋白质的技术来从细胞培养基、宿主细胞或这二者中分离出目的ENG多肽,所述技术包括离子交换层析、凝胶过滤层析、超滤、电泳、使用特异性针对ENG多肽之特定表位的抗体的免疫亲和纯化以及使用与融合到ENG多肽之结构域相结合的试剂的亲和纯化(例如,可使用蛋白质A柱来纯化ENG-Fc融合蛋白)。在一个优选的实施方案中,所述ENG多肽是含有利于其纯化之结构域的融合蛋白。作为实例,纯化可通过一系列柱层析步骤来实现,包括例如下述的三种或更多种:蛋白质A层析、Q琼脂糖凝胶(sepharose)层析、苯基琼脂糖凝胶(phenylsepharose)层析、大小排阻层析和阳离子交换层析。可以通过病毒过滤(viral filtration)和缓冲液交换(buffer exchange)来完成纯化。

[0119] 在另一个实施方案中,编码用于纯化用前导序列的(例如在重组ENG多肽的期望部分之N末端的多-(His)/肠激酶切割位点序列)的融合基因可允许使用 $\text{Ni}^{2+}$ 金属树脂的亲和层析来纯化所表达的融合蛋白。然后,可通过用肠激酶处理来除去所述纯化用前导序列,以提供经纯化的ENG多肽(例如,参见Hochuli et al., (1987) J.Chromatography 411:177;以及Janknecht et al., PNAS USA 88:8972)。

[0120] 用于制备融合基因的技术是公知的。实质上,按照常规技术对编码不同多肽序列的多种DNA片段进行连接,其使用平末端或交错末端(stagger-end)进行连接,使用限制酶消化以提供合适的末端,需要时填补黏性末端,用碱性磷酸酶处理以避免不期望的连接,以及酶促连接。在另一实施方案中,可通过常规技术(包括自动DNA合成仪)来合成融合基因。或者,可使用锚定引物对基因片段进行PCR扩增,所述锚定引物产生了两个连续基因片段之间的互补突出端,所述突出端可随后退火以产生嵌合基因序列(参见,例如Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel等编著, John Wiley&Sons:1992)。

[0121] ENG、BMP9或BMP10之拮抗剂的核酸化合物的类别的实例包括反义核酸、RNAi构建体和催化性核酸构建体。核酸化合物可以是单链或双链的。双链化合物还可包含突出端或非互补的区域,在此处一条链或另一条链是单链的。单链化合物可包含自身互补的区域,即该化合物的双螺旋结构区域形成所谓“发夹”或“茎环”结构。核酸化合物可包含与由全长ENG核酸序列或配体核酸序列之至多1000、至多500、至多250、至多100或至多50、35、30、25、22、20或18个核苷酸组成的区域互补的核苷酸序列。互补区域优选为至少8个核苷酸,任选地至少10个或至少15个核苷酸,任选地在15到25个核苷酸之间。互补区域可落入靶转录物的内含子、编码序列或非编码序列内,例如编码序列部分。一般地,核酸化合物的长度为约8至约500个核苷酸或碱基对,任选地其长度为约14至约50个核苷酸。核酸可以是DNA(特别是用作反义核酸时)、RNA或RNA:DNA杂合物。任何一条链可包含DNA和RNA的混合物,以及不能简单归类为DNA或RNA的经修饰形式。同样,双链化合物可以是DNA:DNA、DNA:RNA或RNA:RNA,任何一条链也可包含DNA和RNA的混合物以及不能简单归类为DNA或RNA的经修饰形式。核酸化合物可包含多种修饰中的任一种,包括对骨架(天然核酸的糖-磷酸部分,包括核苷酸间

的连接)或碱基部分(天然核酸的嘌呤或嘧啶部分)的一种或更多种修饰.反义核酸化合物优选具有约15至约30个核苷酸的长度,并常包含一种或更多种修饰以改善性质,例如在血清中、在细胞中或者在该化合物可能被递送至的位置(例如,在经口递送化合物情形中的胃,对吸入化合物来说的肺)中的稳定性.在RNAi构建体的情形中,与靶转录物互补的链一般是RNA或其修饰物.另一条链可以是RNA、DNA或任何其他变化形式.双链或单链“发夹”RNAi构建体的双链体部分优选具有18至40个核苷酸的长度,任选地约21至23个核苷酸长度,只要其可作为切酶(Dicer)的底物即可.催化性或酶促性核酸可以是核酶或DNA酶,还可包括经修饰的形式.当在生理条件下以及在无义或有义对照很少或没有作用的浓度下与细胞接触时,核酸化合物可抑制靶标表达约50%、75%、90%或更多.测试核酸化合物效应的优选浓度为1、5和10微摩尔/升(micromolar).还可测试核酸化合物针对例如血管发生的作用.

#### [0122] 5.Fc融合蛋白中的改变

[0123] 本申请还提供了具有经改造的Fc区或变体Fc区的ENG-Fc融合蛋白.这样的抗体和Fc融合蛋白可用于例如调节效应子功能,例如抗原依赖性细胞毒作用(ADCC)和补体依赖性细胞毒作用(CDC).此外,所述修饰可改善抗体和Fc融合蛋白的稳定性.通过将合适的核苷酸改变引入DNA或通过肽合成来制备所述抗体和Fc融合蛋白的氨基酸序列变体.这样的变体包括例如在本文中公开的抗体和Fc融合蛋白的氨基酸序列中缺失和/或插入和/或替换残基.可进行缺失、插入和替换的任意组合以形成最终的构建体,条件是最终构建体具有期望的特征.氨基酸变化还可改变抗体和Fc融合蛋白的翻译后加工,例如改变糖基化位点的数目或位置.

[0124] 效应子功能降低的抗体和Fc融合蛋白可通过在氨基酸序列中引入改变来产生,所述改变包括但不限于Bluestone等所述的Ala-Ala突变(参见WO 94/28027和WO 98/47531;还参见Xu等2000 Cell Immunol 200;16-26).因此,在某些实施方案中,在恒定区内具有突变(包括Ala-Ala突变)的本公开内容之抗体和Fc融合蛋白可用于降低或消除效应子功能.根据这些实施方案,抗体和Fc融合蛋白可包含第234位的丙氨酸突变或第235位的丙氨酸突变,或者其组合.在一个实施方案中,所述抗体或Fc融合蛋白包含IgG4框架,其中Ala-Ala突变为在第234位从苯丙氨酸突变为丙氨酸和/或在第235位从亮氨酸突变为丙氨酸.在另一个实施方案中,所述抗体或Fc融合蛋白包含IgG1框架,其中Ala-Ala突变表示在第234位从亮氨酸突变为丙氨酸和/或在第235位从亮氨酸突变为丙氨酸.所述抗体或Fc融合蛋白可作为替代地或另外地携带其他突变,包括CH2结构域中的点突变K322A(Hezareh et al.2001 J Virol.75:12161-8).

[0125] 在一些具体实施方案中,可对所述抗体或Fc融合蛋白进行修饰使其增强或抑制补体依赖性细胞毒作用(CDC).可通过在Fc区中引入一个或更多个氨基酸替换、插入或缺失来实现CDC活性的调节(参见,例如美国专利No.6,194,551).作为替代地或另外地,可在Fc区中引入半胱氨酸残基,从而允许在该区域中形成链间二硫键.因此,所得到的同源二聚体抗体可具有提高的或降低的内化能力和/或增强的或减弱的补体介导之细胞杀伤.参见,Caron et al.,J.Exp Med.176:1191-1195(1992)和Shopes,B.J.Immunol.148:2918-2922(1992),W099/51642,Duncan&Winter Nature 322:738-40(1988);美国专利No.5,648,260;美国专利No.5,624,821以及W094/29351.

## [0126] 6. 治疗用途

[0127] 本公开内容提供用于治疗或预防血管发生失调的病症(包括肿瘤疾病或非肿瘤疾病二者)的方法和组合物.还提供用于治疗或预防某些心血管疾病的方法和组合物.此外,本公开内容提供了用于治疗或预防纤维化疾病和病症方法和组合物.此外,本公开内容提供了用于治疗与BMP9和/或BMP10活性相关的疾病的方法.

[0128] 本公开内容提供在哺乳动物中抑制血管发生的方法,通过给对象施用有效量的ENG多肽,包括以上的ENG-Fc融合蛋白或者核酸拮抗剂(例如反义核酸或者siRNA),下文统称为“治疗剂”.所给出的数据特别地表明本文所公开的抗血管发生治疗剂可用于抑制与肿瘤相关的血管发生.预计这些治疗剂还可用于在眼中抑制血管发生.

[0129] 血管发生相关疾病包括但不限于血管发生依赖性癌症,其包括例如实体瘤、血源性肿瘤(例如白血病)和肿瘤转移;良性肿瘤,例如血管瘤、听神经瘤(acoustic neuroma)、神经纤维瘤(neurofibroma)、沙眼(trachoma)和化脓性肉芽肿(pyogenic granuloma);类风湿性关节炎;银屑病;红变(rubeosis);奥斯勒-韦伯综合征(Osler-Webber Syndrome);心肌血管发生(myocardial angiogenesis);动脉粥样斑块新血管形成(plaque neovascularization);毛细血管扩张(telangiectasia);血友病性关节(hemophilic joint)和血管纤维瘤(angiofibroma).

[0130] 特别地,本公开内容的多肽治疗剂可用于治疗或预防癌症(肿瘤),特别是已知依赖于血管发生过程来支持生长的那些癌症.与大多数抗血管发生剂不同的是,ENG多肽影响由多种因素引起的血管发生.这与癌症中的情况高度地相关,在癌症中常需要多种因素来支持肿瘤血管发生.因此,本文中公开的治疗剂特别有效地用于治疗对于靶向单一血管发生因素之药物(例如,靶向VEGF的贝伐单抗)治疗具有抗性的肿瘤,并且结合其他工作机理不同的抗血管发生化合物也可以是特别有效的.

[0131] 血管发生的失调可导致多种可以通过本发明的组合物和方法治疗的疾病.这些疾病包括肿瘤病症和非肿瘤病症.术语“癌症”和“癌性”是指或者描述在哺乳动物中典型特征为细胞不受控制生长/增殖的生理状态.癌症或肿瘤疾病的实例包括但不限于癌(carcinoma)、淋巴瘤、母细胞瘤(blastoma)、肉瘤和白血病.此类癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、胃癌、黑色素瘤、和各种类型的头颈癌,包括鳞状细胞头颈癌.肿瘤疾病和相关病症的其他实例包括食管癌、泡膜细胞瘤(thecoma)、成男性细胞瘤(arrhenoblastomas)、子宫内膜增生、子宫内膜异位、纤维肉瘤、绒毛膜癌、鼻咽癌、喉癌、成肝细胞瘤(hepatoblastoma)、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、皮肤癌、血管瘤、海绵状血管瘤、成血管细胞瘤、成视网膜细胞瘤、星形细胞瘤、成胶质细胞瘤、神经鞘瘤(Schwannoma)、少突胶质瘤、成神经管细胞瘤、成神经细胞瘤、横纹肌肉瘤、骨源性肉瘤、平滑肌肉瘤、泌尿道癌、维尔姆斯瘤(Wilm's tumor)、肾细胞癌、前列腺癌、与斑痣性错构瘤病(phakomatoses)相关的异常血管增生、以及梅格斯综合征(Meigs' syndrome).特别适合于用本文所述的治疗剂治疗的癌的特征可在于以下一种或更多种:癌具有血管发生活性,在肿瘤或血清中可检测到升高的ENG水平,BMP-9或BMP-10表达水平或生物学活性升高,癌症

为转移性或有风险成为转移性,或其任意组合.

[0132] 具有血管发生失调的适合于使用在本发明中可用的ENG多肽治疗的非肿瘤疾病包括但不限于:不期望的或异常的增生、关节炎、类风湿关节炎、银屑病、银屑病斑块、结节病、动脉粥样硬化、动脉粥样硬化斑块、糖尿病和其他增生性视网膜病(包括早产儿视网膜病(retinopathy of prematurity))、晶状体后纤维增生症(retrolental fibroplasia)、新生血管性青光眼、年龄相关性黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿、角膜新生血管、角膜移植新血管形成、角膜移植片排斥、视网膜/脉络膜新血管形成、角(angle)新血管形成(neovascularisation of the angle)(发红)、眼部新生血管性疾病、血管再狭窄、动静脉畸形(arteriovenous malformation,AVM)、脑膜瘤、血管瘤、血管纤维瘤、甲状腺增生(包括格雷夫斯病(Grave's disease))、角膜和其他组织移植、慢性炎症、肺部炎症、急性肺损伤/ARDS、败血症、原发性肺动脉高压、恶性肺部积液、脑水肿(例如,与急性卒中/闭合性颅脑损伤/创伤相关)、滑膜炎、在RA中血管翳形成、骨化性肌炎、肥厚骨形成、骨关节炎、顽固性腹水、多囊性卵巢疾病、子宫内膜异位、第3间距流体疾病(胰腺炎、隔室综合征、烧伤、肠疾病)、子宫肌瘤、早产、慢性炎症如IBD(克罗恩病(Crohn's disease)和溃疡性结肠炎)、肾同种异体移植排斥、炎性肠病、肾病综合症、不期望的或异常的组织块生长(非癌症)、血友病性关节、肥厚性疤痕、毛发生长抑制、奥斯勒-韦伯综合症(Osler-Weber syndrome)、化脓性肉芽肿晶状体后纤维组织增生症、硬皮病、沙眼、血管黏连、滑膜炎、皮炎、先兆子痫、腹水、心包积液(例如与心包炎相关)、以及胸腔积液.这类疾病的实例还包括上皮或心脏疾病.

[0133] 在所述方法的一些实施方案中,可一起(同时)或在不同时间(依次地)施用一种或更多种多肽治疗剂.另外,多肽治疗剂可与另一类治疗癌症或抑制血管发生的化合物一起施用.

[0134] 在一些实施方案中,本公开内容的主题方法可单独使用.或者,可将所述主题方法与其他用于治疗或预防增殖性疾病(例如肿瘤)的常规抗癌治疗方法组合使用.例如,这样的方法可用于预防癌症、预防癌症复发和手术后转移,以及作为其他癌症治疗的辅助手段.本公开内容表明,可通过使用目标多肽治疗剂来增强常规癌症治疗(例如,化疗、放疗、光疗、免疫治疗和外科手术)的有效性.

[0135] 众多的常规化合物已显示出具有抗肿瘤活性.这些化合物已用作化疗中的药用剂来缩小实体瘤、预防转移及进一步生长、或者降低白血病或骨髓恶性肿瘤中恶性细胞的数目.尽管化疗已有效用于治疗多种类型的恶性肿瘤,但是许多抗肿瘤化合物会诱导不期望的副作用.已显示,当联合应用两种或更多种不同的治疗时,这些治疗可协同作用并使每种治疗的剂量降低,从而降低了每种化合物在较高剂量下的有害副作用.在另一些情况下,对某种治疗具有难治性的恶性肿瘤可对包括两种或更多种不同治疗的组合治疗产生响应.

[0136] 当将本文中公开的治疗剂与另一常规抗肿瘤剂(同时或依次)联合施用时,这样的治疗剂可提高该抗肿瘤药剂的治疗效果或者克服对该抗肿瘤药剂的细胞抗性.这允许降低抗肿瘤剂的剂量,从而降低不期望的副作用,或者恢复抗肿瘤剂在抗性细胞中的有效性.

[0137] 根据本公开内容,本文中所述的抗血管发生药剂可与其他用于治疗疾病的组合物和方法联合使用.例如,可使用与ENG多肽相联合的外科手术、放疗或化疗来常规地治疗肿瘤,随后可向患者施用该ENG多肽以延长微转移(micrometastasis)的休眠以及稳定任何残余的原发肿瘤.

[0138] 在本领域中已知已鉴定许多抗血管发生剂,包括本文中所列的那些,例如由 Carmeliet and Jain, *Nature* 407:249-257 (2000), Ferrara et al., *Nature Reviews: Drug Discovery*, 3:391-400 (2004); 以及 Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) 所列的. 也参见, US 专利申请 US20030055006. 在一个实施方案中, ENG 多肽与如下联合使用: 抗 VEGF 中和抗体 (或片段) 和/或另一种 VEGF 拮抗剂或 VEGF 受体拮抗剂, 其包括但不限于例如可溶性 VEGF 受体 (例如, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, 神经毡蛋白 (neuropillin) (例如, NRP1, NRP2)) 片段, 能够阻断 VEGF 或 VEGFR 的适配体, 中和性抗 VEGFR 抗体, VEGFR 酪氨酸激酶 (RTK) 的低分子量抑制剂, 针对 VEGF 的反义策略, 针对 VEGF 或 VEGF 受体的核酶, VEGF 的拮抗剂变体, 及其任意组合. 作为替代或补充, 除了 VEGF 拮抗剂和其他药剂, 还可任选地向患者共施用两种或更多种血管发生抑制剂. 在某些实施方案中, 可以将一种或更多种其他治疗剂 (例如, 抗癌剂) 与 ENG 多肽、VEGF 拮抗剂和抗血管发生剂联合施用.

[0139] 术语“VEGF”和“VEGF-A”可互换使用, 指 165 个氨基酸的血管内皮细胞生长因子及相关的 121、145、183、189 和 206 个氨基酸的血管内皮细胞生长因子, 参见 Leung et al. *Science*, 246:1306 (1989), Houck et al. *Mol Endocrinol*, 5:1806 (1991), 和 Robinson & Stringer, *J Cell Sci*, 144 (5):853-865 (2001), 连同其天然产生的等位基因和加工形式.

[0140] “VEGF 拮抗剂”指能够中和、阻断、抑制、消除、降低或干扰 VEGF 活性 (包括其结合到一种或更多种 VEGF 受体) 的分子. VEGF 拮抗剂包括抗 VEGF 抗体及其抗原结合片段、特异性结合 VEGF 从而隔绝其与一种或更多种受体之结合的受体分子及衍生物、抗 VEGF 受体抗体和 VEGF 受体拮抗剂 (例如 VEGFR 酪氨酸激酶的小分子抑制剂)、以及融合蛋白 (例如, VEGF-Trap (Regeneron)、VEGF121-gelonin (Peregrine)). VEGF 拮抗剂还包括 VEGF 的拮抗剂变体, 针对 VEGF 的反义分子、RNA 适配体、以及针对 VEGF 或 VEGF 受体的核酶.

[0141] “抗 VEGF 抗体”是指以充分的亲和力和特异性与 VEGF 结合的抗体. 抗 VEGF 抗体可用作在靶向和干扰其中涉及 VEGF 活性之疾病或病症中的治疗剂. 参见例如, 美国专利 6,582,959、6,703,020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; WO2005/044853; EP 0666868B1; US 专利申请 20030206899、20030190317、20030203409、20050112126、20050186208、以及 20050112126; Popkov et al., *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004); 以及 WO2005012359. 抗 VEGF 抗体通常不会结合其他 VEGF 同源物, 例如 VEGF-B 或 VEGF-C, 也不结合其他生长因子例如 PlGF、PDGF 或 bFGF. 抗 VEGF 抗体“贝伐单抗 (Bevacizumab, BV)”也称为“rhuMAb VEGF”或“**Avastin®**”, 是根据 Presta 等 *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997) 产生的重组人源化抗 VEGF 单克隆抗体. 其包括突变的人 IgG1 构架区 (framework region) 和来自鼠抗 hVEGF 单克隆抗体 A.4.6.1 的抗原结合互补决定区, 其阻断人 VEGF 与其受体结合. 约 93% 的贝伐单抗氨基酸序列 (包括大部分构架区) 来自人 IgG1, 而大约 7% 的序列来自鼠抗体 A4.6.1. 贝伐单抗具有约 149,000 道尔顿的分子量, 并且是糖基化的. 贝伐单抗和其他人源化抗 VEGF 抗体 (包括抗 VEGF 抗体片段“兰尼单抗 (ranibizumab)”, 也被称为“**Lucentis®**”) 在 2005 年 2 月 26 日公布的美国专利 No. 6,884,879 中进一步描述.

[0142] 术语“抗肿瘤组合物”是指可用于治疗癌症的包含至少一种活性治疗剂 (例如“抗癌剂”) 的组合物. 治疗剂 (抗癌剂, 本文中也称为“抗肿瘤剂”) 的实例包括但不限于例如化疗剂、生长抑制剂、细胞毒剂、放疗中使用的药剂、抗血管发生剂、凋亡剂、抗微管蛋白剂、毒

素、和其他治疗癌症的药剂,例如,抗VEGF中和抗体、VEGF拮抗剂、抗HER-2、抗CD20、表皮生长因子受体(EGFR)拮抗剂(例如,酪氨酸激酶抑制剂)、HER1/EGFR抑制剂、埃罗替尼、COX-2抑制剂(例如,塞来昔布)、干扰素、细胞因子、与ErbB2、ErbB3、ErbB4或VEGF受体中的一种或更多种相结合的拮抗剂(例如,中和抗体)、血小板衍生生长因子(PDGF)和/或干细胞因子(SCF)的受体酪氨酸激酶的抑制剂(例如,甲磺酸伊马替尼(**Gleevec®**Novartis)), TRAIL/Apo2L、以及其他生物活性和有机化学试剂等。

[0143] “血管发生因子或血管发生剂”是刺激血管发育(例如,促进血管发生、内皮细胞生长、血管稳定性、和/或血管生成等)的生长因子.例如血管发生因子,包括但不限于例如VEGF和VEGF家族成员、PlGF、PDGF家族、成纤维细胞生长因子家族(FGF)、TIE配体(血管生成素(Angiopoietin))、肝配蛋白(heparin)、ANGPTL3、ALK-1等.也包括加速伤口愈合的因子,例如生长激素、胰岛素样生长因子-I(IGF-I)、VIGF、表皮生长因子(EGF)、CTGF及其家族成员、以及TGF- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ .参见例如Klagsbrun and D'Amore,Annu.Rev.Physiol,53:217-39(1991);Streit and Detmar,Oncogene,22:3172-3179(2003);Ferrara&Alitalo,Nature Medicine 5(12):1359-1364(1999);Tonini et al.,Oncogene,22:6549-6556(2003)(例如,表1列出的血管发生因子);以及Sato Int.J.Clin.Oncol.,8:200-206(2003)。

[0144] “抗血管发生剂”或“血管发生抑制剂”指的是小分子量物质、多核苷酸(包括例如抑制性RNA(RNAi或siRNA))、多肽、分离的蛋白质、重组蛋白质、抗体、缀合物或其融合蛋白,其直接或间接地抑制血管发生、血管生成、或不期望的血管通透性.例如,抗血管发生剂是对如上定义之血管发生剂的抗体或其他拮抗剂,例如,针对VEGF的抗体、针对VEGF受体的受体、阻断VEGF受体信号传导的小分子(例如,PTK787/ZK2284、SU6668、**SUTENT®**/SU11248(苹果酸舒尼替尼)、AMG706或在例如国际专利WO 2004/113304中描述的那些).抗血管发生剂还包括天然血管发生抑制剂,例如血管抑素(angiostatin)、内皮生长抑素(endostatin)等,参见例如,Klagsbrun and D'Amore,Annu.Rev.Physiol,53:217-39(1991);Streit and Detmar,Oncogene,22:3172-3179(2003)(例如,表3列出了在恶性黑色素瘤中的抗血管发生治疗);Ferrara&Alitalo,Nat Med 5(12):1359-1364(1999);Tonini et al,Oncogene,22:6549-6556(2003)(例如,表2列出抗血管发生因子);以及Sato Int.J.Clin.Oncol,8:200-206(2003)(例如,表1列出了临床试验中使用的抗血管发生剂)。

[0145] 在本发明的某些方面中,可用于与ENG多肽联合治疗肿瘤的其他治疗剂包括其他癌症治疗:例如,外科手术、细胞毒剂、涉及放射或放射性物质之施用的放射治疗、化疗剂、抗激素剂、抗肿瘤组合物、以及使用本文中所列出的且本领域已知的抗癌剂的治疗、或其组合。

[0146] 在本文所用的术语“细胞毒剂”是指抑制或阻止细胞的功能和/或引起细胞之破坏的物质.该术语旨在包括放射性同位素(例如,At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、p<sup>32</sup>和Lu的放射性同位素),化疗剂例如甲氨蝶呤、阿霉素、长春花生物碱(长春新碱、长春碱、依托泊苷)、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、柔红霉素或其他嵌入剂、酶(例如溶核酶)及其片段、抗生素、以及毒素(例如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,包括其片段和/或变体,以及下文中公开的多种抗肿瘤剂或抗癌剂.其他细胞毒剂如下文所述.杀肿瘤剂引起肿瘤细胞的破坏。

[0147] “化疗剂”是可用于治疗癌症的化合物.治疗剂的实例包括:烷化剂,例如塞替派



(thiotepa) 和 **CYTOXAN®** 环磷酰胺; 烷基磺酸酯, 例如白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (piposulfan); 氮丙啶类 (aziridines), 例如苯佐替派 (benzodopa)、卡波醌 (carboquone)、美妥替派 (meturedopa) 和乌瑞替派 (uredepa); 乙撑亚胺类 (ethylenimines) 和甲基蜜胺类 (methylamelamines), 包括六甲蜜胺 (altretamine)、三乙撑蜜胺 (triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺 (triethylenethiophosphoramidate) 和三羟基甲蜜胺 (trimethylolomelamine); 聚乙酸类 (acetogenins) (尤其是布拉他辛 (bullatacin) 和布拉他辛酮 (bullatacinone));  $\Delta$ -9-四氢大麻酚 (delta-9-tetrahydrocannabinol) (屈大麻酚 (dronabinol), **MARINOL®**);  $\beta$ -拉帕醌 (beta-lapachone); 拉帕醇 (lapachol); 秋水仙素类 (colchicines); 桦木酸 (betulinic acid); 喜树碱 (camptothecin) (包括合成的类似物托泊替康 (**HYCAMTIN®**), CPT-11 (伊立替康, **CAMPTOSAR®**), 乙酰喜树碱、东莨菪亭 (scopoletin) 和 9-氨基喜树碱); 苔藓抑素 (bryostatin); callystatin; CC-1065 (包括其阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物); 鬼臼毒素 (podophyllotoxin); 鬼臼酸 (podophyllinic acid); 替尼泊苷 (teniposide); 念珠藻素类 (cryptophycins) (特别是念珠藻素 1 和念珠藻素 8); 多拉司他汀 (dolastatin); 多卡霉素 (duocarmycin) (包括合成类似物 KW-2189 和 CB1-TM1); 艾榴素 (eleutherobin); 水鬼蕉亭 (pancratistatin); 珊瑚类二萜 (sarcodictyin); 海绵抑素 (spongistatin); 氮芥类 (nitrogen mustards), 例如苯丁酸氮芥、萘氮芥 (chlornaphazine)、胆磷酰胺 (cholophosphamide)、雌莫司汀 (estramustine)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、氮芥 (mechlorethamine)、盐酸氧氮芥 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑 (melphalan)、新恩比兴 (novembichin)、苯芥胆留醇 (phenesterine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard); 亚硝基脲类 (nitrosoureas), 例如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲霉素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine) 和雷莫司汀 (ranimustine); 抗生素类, 例如烯二炔 (enediyne) 抗生素 (例如, 刺孢霉素 (calicheamicin), 尤其是刺孢霉素  $\gamma$  II 和刺孢霉素  $\omega$  II (参见例如 Angew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))); 达诺霉素 (dynemicin), 包括达诺霉素 A; 埃斯波霉素 (esperamicin); 以及新制癌菌素 (neocarzinostatin) 发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素 (actinomycin)、氨茴霉素 (authramycin)、偶氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycin)、放线菌素 C (cactinomycin)、卡柔比星 (carabycin)、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycin)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、**ADRIAMYCIN®** 多柔比星 (包括吗啉代多柔比星 (morpholino-doxorubicin)、氰基吗啉代多柔比星 (cyanomorpholino-doxorubicin)、2-吡咯琳代多柔比星 (2-pyrrolino-doxorubicin)、脱氧多柔比星)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellmycin)、丝裂霉素类 (mitomycins) (例如丝裂霉素 C)、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺拉霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、培洛霉素



(peplomycin)、泊非霉素 (potfiromycin)、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链佐星 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢物类, 例如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 例如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物, 例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤 (6-mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物, 例如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮杂尿苷 (6-azauridine)、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (flxuridine); 雄激素类, 例如卡普睾酮 (calusterone)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、环硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone); 抗肾上腺类, 例如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂, 例如亚叶酸 (folinic acid); 醋葡萄糖内酯 (aceglatone); 醛磷酸胺糖苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶 (eniluracil); 安吡啶 (amsacrine); 百垂布西 (bestrabucil); 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); 地磷酰胺 (defofamide); 地美可辛 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); 依氟鸟氨酸 (elfornithine); 依利醋铵 (elliptinium acetate); 埃博霉素 (epothilone); 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓 (gallium nitrate); 羟基脲 (hydroxyurea); 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lnidamine); 美登素类 (maytansinoids), 例如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocin); 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫哌达醇 (mopidamol); nitracrine; 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸芥 (phenamet); 批柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (lsoxantrone); 2-乙肼 (ethylhydrazide); 丙卡巴肼 (procarbazine); **PSK®** 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生 (razoxane); 利索新 (rhizoxin); 西佐喃 (sizofiran); 锗螺旋胺 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2, 2', 2''-三氯三乙胺; 单端孢霉烯类 (trichothecenes) (尤其是T-2毒素、抚孢菌素A (verracurin A)、杆孢菌素A (roridin A) 和蛇形菌素 (anguidine)); 乌拉坦 (urethan); 长春地辛 (**ELDISINE®**、**FILDESIN®**); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露莫司汀 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 (arabinoside) ("Ara-C"); 塞替派; 紫杉烷类 (taxoids), 例如**TAXOL®** 紫杉醇 (paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE™ 不含聚氧乙烯蓖麻油 (Cremophor-free)、紫杉醇的白蛋白改造的纳米颗粒制剂 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)、以及**TAXOTERE®** 多西他塞 (**Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France**); 苯丁酸氮芥 (chloranbucil); 吉西他滨 (**GEMZAR®**); 6-硫鸟嘌呤 (6-thioguanine); 巯嘌呤 (mercaptopurine); 甲氨蝶呤; 铂类似物, 例如顺铂和卡铂; 长春碱 (**VELBAN®**); 铂; 依托泊苷 (VP-16); 异环磷酰胺 (ifosfamide); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 长春新碱 (**mitoxantrone®**); 奥沙利铂 (oxaliplatin); 亚叶酸 (leucovorin); 长春瑞宾

(**Navelbine®**) 诺凡特龙 (novantrone); 依达曲沙 (edatrexate); 柔红霉素 (daunomycin); 氨基蝶呤 (aminopterin); 伊班膦酸盐 (ibandronate); 拓扑异构酶抑制剂 RFS2000; 二氟甲基鸟氨酸 (difluoromethylornithine, DMFO); 类视黄醇类 (retinoids), 例如视黄酸 (retinoic acid); 卡培他滨 (**XELODA®**); 任何上述物质的可药用盐、酸或衍生物; 以及两种或更多种上述物质的组合, 例如 CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙联合治疗的缩写) 和 FOLFOX (奥沙利铂 (ELOXATIN™) 联合 5-FU 和亚叶酸的治疗方案的缩写)。

[0148] 该定义中还包括“抗激素剂”, 其作用在于调节、降低、阻断或抑制可促进癌症生长的激素的效果, 并且通常是以系统或全身治疗的形式。它们可以本身就是激素。实例包括抗雌激素类, 和选择性雌激素受体调节剂 (selective estrogen receptor modulator, SERM), 包括例如他莫昔芬 (包括 **NOLVADEX®** 他莫昔芬), **EVISTA®** 雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、那洛西芬 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮、以及 **FARESTON®** 托瑞米芬; 抗孕酮; 雌激素受体下调剂类 (estrogen receptor down-regulator, ERD); 功能为抑制或关闭卵巢的药剂, 例如, 促黄体生成激素释放激素 (LHRH) 激动剂 (例如 **LUPRON®** 和 **ELIGARD®** 醋酸亮丙瑞林、醋酸戈舍瑞林、醋酸布舍瑞林和曲普瑞林 (tripterelin); 其他抗雄激素, 例如氟他胺、尼鲁米特和比卡鲁胺; 以及抑制芳香酶的芳香酶抑制剂, 其调节肾上腺中的雌激素产生, 例如 4 (5) -咪唑、氨鲁米特、**MEGASE®** 醋酸甲地孕酮、**AROMASIN®** 依西美坦、福美司坦 (formestane)、法偈唑 (fadrozole)、RIVISOR® 伏氯唑 (vorozole)、**FEMARA®** 来曲唑, 以及 **ARIMIDEX®** 阿那曲唑。此外, 化疗剂的这种定义包括二膦酸盐, 例如氯膦酸盐 (clodronate) (例如, **BONEFOS®** 或 **OSTAC®**)、**DIDROCAL®** 依替膦酸盐 (etidronate)、NE-58095、**ZOMETA®** 唑来膦酸 (zoledronic acid) / 唑来膦酸盐 (zoledronate)、**FOSAMAX®** 阿仑膦酸盐 (alendronate)、**AREDIA®** 帕米膦酸盐 (pamidronate)、**SKELID®** 替鲁膦酸盐 (tiludronate)、或 **ACTONEL®** 利塞膦酸盐 (risedronate); 以及曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3--二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 特别是抑制在牵涉异常细胞增殖的信号通路中基因表达的那些, 例如, PKC- $\alpha$ 、Raf、H-Ras、以及表皮生长因子受体 (EGF-R); 疫苗, 例如 **THERATOPE®** 疫苗和基因治疗疫苗, 例如, **ALLOVECTIN®** 疫苗、**LEUVECTIN®** 疫苗、和 **VAXID®** 疫苗; **LURTOTECAN®** 拓扑异构酶 I 抑制剂; **ABARELIX®** rmRH; 二甲苯磺酸拉帕替尼 (ErbB-2 和 EGFR 双重酪氨酸激酶小分子抑制剂, 也称为 GW572016); 任何上述物质的可药用盐、酸或衍生物。

[0149] “生长抑制剂”在本文使用时, 指在体外或体内抑制细胞生长的化合物或组合物。因此, 生长抑制剂可以是一种显著降低处于 S 期的细胞百分比的药剂。生长抑制剂的实例包括阻断细胞周期行进 (处于 S 期以外的位置) 的药剂, 例如诱导 G1 停滞和 M 期停滞的药剂。经典的 M 期阻断剂包括长春花类 (长春新碱和长春碱)、紫杉烷类和拓扑异构酶 II 抑制剂 (例如多柔比星、表柔比星、柔红霉素、依托泊苷和博来霉素)。那些阻滞 G1 的药剂也导致 S 期阻滞, 例如, DNA 烷化剂如他莫昔芬、泼尼松、达卡巴嗪、氮芥、顺铂、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、以及阿糖胞苷 (ara-C)。另外的信息还可见于 The Mendelsohn 和 Israel, eds, Molecular Basis of Cancer, 第 1 章, Murakami 等撰写, 题目为 “Cell cycle regulation, oncogenes, and

antineoplastic drugs”(WB Saunders:Philadelphia,1995),尤其是在第13页.紫杉烷类(紫杉醇和多西他赛)都是衍生自紫杉(yew tree)的抗癌药物.多西他赛(**TAXOTERE®**,Rhône-Poulenc Rorer),衍生自欧洲紫杉,是紫杉醇的半合成类似物(**TAXOL®**,Bristol-Myers Squibb).紫杉醇和多西他赛促进从微管蛋白二聚体组装微管并通过阻止解聚而稳定微管,从而导致细胞中有丝分裂的抑制.

[0150] 血管发生抑制剂还可以预防性地给予已知的高风险发生新癌症或复发癌症的个体.因此,本公开内容的一个方面包括在对象中预防癌症的方法,其包括向对象施用有效量的ENG多肽和/或其衍生物,或者本公开内容的其他血管发生抑制剂.

[0151] 某些正常的生理过程也与血管发生相关,例如排卵、月经和胎盘形成.本公开内容的血管发生抑制蛋白可用于治疗血管内皮细胞的过度或异常刺激疾病.这些疾病包括但不限于肠黏连、动脉粥样硬化、硬皮病和增生性疤痕(即,瘢痕疙瘩(keloid)).它们还可用于治疗具有血管发生作为病理结果的疾病,例如猫抓病(cat scratch disease,Rochelominalia quintosa)和溃疡(幽门螺杆菌(Helicobacter pylori)).

[0152] 一般的血管发生抑制蛋白可用作节育剂(birth control agent),其降低或防止胚胎植入所需的子宫血管形成.因此,本公开内容提供了一种有效的节育方法,其中向女性施用足以阻止胚胎植入之量的蛋白质.在节育方法的一个方面中,在交媾和受精发生之前或之后施用足以阻止胚胎植入之量的抑制蛋白质,从而提供节育的有效方法,可能提供有效的节育方法(可以是“早晨后”的方法).虽然不希望被这一陈述约束,据信对子宫内膜之血管形成的抑制干扰胚泡的植入.相似的子宫管黏膜的血管形成抑制干扰胚泡的植入,防止发生输卵管妊娠.施用方法可包括但不限于丸剂、注射剂(静脉内、皮下、肌肉)、栓剂、阴道海绵、阴道塞以及宫内节育器.据信本公开内容的血管发生抑制剂的施用会干扰胎盘的正常增强的血管形成,并且还干扰成功植入的胚泡和发育的胚胎和胎儿中血管的发育.

[0153] 在眼内,血管发生与例如糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、黄斑变性、角膜移植排斥、新生血管性青光眼和晶状体后纤维增生症相关.本文中公开的治疗剂可眼内或通过其他局部施用向眼施用.与眼中血管发生相关的其他疾病包括但不限于流行性角膜结膜炎(epidemic keratoconjunctivitis)、维生素A缺乏症(vitamin A deficiency)、过度使用隐形眼镜(contact lens overwear)、特应性角膜炎(atopic keratitis)、上边缘角膜炎(superior limbic keratitis)、干燥性翼状胬肉角膜炎(ptyerygium keratitis sicca)、舍格伦病(sjogren)、玫瑰痤疮(acne rosacea)、小水疱病(phylectenulosis)、梅毒(syphilis)、分支杆菌感染(Mycobacteria infection)、脂质变性(lipid degeneration)、化学烧伤、细菌性溃疡(bacterial ulcer)、真菌性溃疡(fungal ulcer)、单纯疱疹感染(Herpes simplex infection)、带状疱疹感染(Herpes zoster infection)、原生动物感染(protozoan infection)、卡波西肉瘤(Kaposi sarcoma)、莫伦溃疡(Mooren ulcer)、Terrien边缘性角膜变性(Terrien's marginal degeneration)、边缘性角质分离(marginal keratolysis)、类风湿性关节炎、系统性狼疮(systemic lupus)、多动脉炎(polyarteritis)、创伤(trauma)、韦格纳结节病(Wegeners sarcoidosis)、巩膜炎(Scleritis)、史-约病(Steven's Johnson disease)、类天疱疮放射状角膜切开术(periphigoid radial keratotomy)、角膜移植排斥(corneal graft rejection)、镰状细胞贫血(sickle cell anemia)、结节病(sarcoid)、弹性假黄瘤(pseudoxanthoma

elasticum)、佩吉特病(Pagets disease)、静脉阻塞(vein occlusion)、动脉阻塞(artery occlusion)、颈动脉阻塞性疾病(carotid obstructive disease)、慢性葡萄膜炎/玻璃体炎(chronic uveitis/vitritis)、分支杆菌感染(mycobacterial infections)、莱姆病(Lyme's disease)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus)、早产儿视网膜病(retinopathy of prematurity)、伊尔斯病(Eales disease)、白塞病(Bechets disease)、导致视网膜炎(retinitis)或脉络膜炎(choroiditis)的感染、假定的眼组织胞浆菌病(presumed ocular histoplasmosis)、贝斯特病(Bests disease)、近视(myopia)、视凹(optic pit)、斯达加特病(Stargarts disease)、睫状体平坦部炎(pars planitis)、慢性视网膜脱落(chronic retinal detachment)、高黏滞综合征(hyperviscosity syndromes)、弓形体病(toxoplasmosis)、创伤和激光手术后并发症(post-laser complication)。其他疾病包括但不限于与红变(角新生血管形成)相关的疾病以及由纤维血管(fibrovascular)或纤维组织(fibrous tissue)异常增生引起的疾病,包括所有形式的增生性玻璃体视网膜病(vitreoretinopathy)。

[0154] 可通过例如以下方式治疗或预防眼部病症:通过治疗剂的全身、局部、眼内注射或通过植入释放治疗剂的持续释放装置来实现。可利用可药用眼用载体来递送治疗剂,从而使该化合物与眼表面保持接触足够的时间以允许该化合物穿透眼的角膜和内部区域(例如前房(anterior chamber)、后房(posterior chamber)、玻璃体(vitreous body)、房水(aqueous humor)、玻璃体液(vitreous humor)、角膜(cornea)、虹膜/睫状体(iris/ciliary)、晶状体、脉络膜/视网膜(choroid/retina)和巩膜(sclera)。所述可药用的眼用载体可以是例如软膏、植物油或包封材料。或者,本公开内容的治疗剂可直接注射到玻璃体液或房水中。在另一替代性方案中,可全身施用(例如通过静脉内输注或注射)所述化合物进行眼部治疗。

[0155] 可施用一种或更多种治疗剂。本公开内容的方法还包括与用于治疗眼部病症的其他药物共施用。当施用多于一种药剂或者药剂和药物的组合时,可同时施用或依时间前后施用。可通过不同施用途径或通过同样的施用途径来施用所述治疗剂和/或药物。在一个实施方案中,治疗剂和药物以眼用药物制剂的形式一起施用。

[0156] 在一个实施方案中,使用治疗剂来治疗与眼中血管发生相关的疾病,其通过与作用在于通过药理学机制阻断血管发生的其他药物同时施用来实现。可与本公开内容的治疗剂同时施用的药物包括但不限于:倍加他尼(Macugen<sup>TM</sup>)、雷珠单抗(Lucentis<sup>TM</sup>)、乳酸角鲨胺(squalamine lactate)(Evizon<sup>TM</sup>)、肝素酶(heparinase)、以及糖皮质激素类(例如曲安西龙(Triamcinolone))。在一个实施方案中,提供了治疗血管发生相关疾病的方法,其通过施用含有至少一种本文中公开之治疗剂和至少一种以下药物的眼用药物制剂来治疗:倍加他尼(Macugen<sup>TM</sup>)、雷珠单抗(Lucentis<sup>TM</sup>)、乳酸角鲨胺(Evizon<sup>TM</sup>)、肝素酶、以及糖皮质激素类(例如曲安西龙)。

[0157] 在另一些实施方案中,ENG多肽可用于治疗患有与BMP-9或BMP-10相关、但不一定伴有血管发生之心血管疾病或病症的患者。这种类型的示例性疾病包括但不限于心脏病(包括心肌病、心肌梗死、心绞痛和心脏瓣膜疾病)、肾病(包括慢性肾小球炎症、糖尿病性肾功能衰竭、与狼疮相关的肾炎症)、血压疾病(包括全身型和肺型)、与动脉粥样硬化或其他类型的动脉硬化相关的疾病(包括卒中、脑出血、蛛网膜下腔出血、心绞痛、以及肾动脉硬

化);血栓形成性疾病(包括脑血管血栓形成、肺血栓形成、血栓性肠坏死);糖尿病的并发症(包括与糖尿病相关的视网膜病、白内障、与糖尿病相关的肾病、与糖尿病相关的神经病、与糖尿病相关性坏疽、与糖尿病相关的慢性感染);血管炎性疾病(系统性红斑狼疮、关节风湿痛、关节动脉炎症、大细胞动脉炎症、川崎病(Kawasaki disease)、高安动脉炎(Takayasu arteritis)、丘-斯综合征(Churg-Strauss syndrome)、以及亨-舍紫癜(Henoch-Schoenlein purpura));以及心脏疾病,例如先天性心脏病,心肌病(例如,扩张型、肥厚型、限制型心肌病)、以及充血性心力衰竭.ENG多肽可单独或与一种或更多种药物或治疗方式(例如,可用于治疗与BMP-9/10相关之心血管疾病和/或病症的治疗剂)组合施用于对象.在一个实施方案中,第二药剂或治疗方式是选自以下的一个或多个:血管成形术、 $\beta$ 受体阻滞剂、抗高血压剂、强心剂、抗血栓形成剂、血管扩张剂、激素拮抗剂、内皮素拮抗剂、钙通道阻滞剂、磷酸二酯酶抑制剂、2型血管紧张素拮抗剂和/或细胞因子阻滞剂/抑制剂.

[0158] 在另一些实施方案中,ENG多肽可用于治疗或预防纤维化.本文中使用的术语“纤维化”是指由器官或组织中的细胞异常形成或发展的过量纤维结缔组织.虽然涉及纤维化的过程可能作为正常组织形成或修复的一部分而发生,这些过程的失调可导致细胞成分改变和多余的结缔组织沉积,逐渐削弱组织或器官的功能.纤维组织的形成可由修复或反应过程导致.纤维化疾病或病症包括但不限于与血管疾病(例如心脏病、脑病和周围血管病)以及组织和器官系统(包括心脏、皮肤、肾、肺、腹膜、肠和肝脏)相关的纤维增生性疾病(例如Wynn,2004,Nat Rev 4:583-594中所公开的,其通过引用并入本文).可被治疗的示例性疾病包括但不限于肾纤维化,包括与损伤/纤维化相关的肾病,例如,与糖尿病(例如,糖尿病性肾病)、狼疮、硬皮病、肾小球肾炎、局灶性节段性肾小球硬化和IgA肾病相关的慢性肾病;肺或肺纤维化,例如,特发性肺纤维化、辐射诱发的纤维化、慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)、硬皮病、慢性哮喘;肠纤维化,例如,硬皮病和辐射诱导的肠纤维化;肝纤维化,例如,肝硬化、酒精引起的肝纤维化、胆管损伤、原发性胆汁性肝硬化、感染或病毒引起的肝纤维化、先天性肝纤维化和自身免疫性肝炎;以及其他纤维化病症,如囊性纤维化、心内膜心肌纤维化、纵隔纤维化、胸膜纤维化、结节病、硬皮病、脊髓损伤/纤维化、骨髓纤维化、血管再狭窄、动脉粥样硬化、胰腺和肺的囊性纤维化、注射纤维化(其可作为肌肉注射的并发症而发生,尤其在儿童中)、心内膜心肌纤维化、肺的特发性肺纤维化、纵隔纤维化、骨髓纤维化(myelofibrosis)、腹膜后纤维化、进行性大块纤维化、煤工尘肺的并发症、以及肾源性系统性纤维化(nephrogenic systemic fibrosis).

[0159] 本文中使用的术语“纤维化疾病”,“纤维化病症”和“纤维化病”可互换使用,指以纤维化为特征的疾病、病症或病.纤维化疾病的实例包括但不限于:血管纤维化、肺纤维化(例如,特发性肺纤维化)、胰纤维化、肝纤维化(例如,肝硬化)、肾纤维化、肌肉骨骼纤维化、心脏纤维化(例如,心内膜心肌纤维化、特发性心肌病)、皮肤纤维化(例如,硬皮病、创伤后皮肤瘢痕、手术性皮肤瘢痕、瘢痕疙瘩和皮肤瘢痕疙瘩形成)、眼纤维化(例如,青光眼、眼的硬化、结膜和角膜瘢痕,以及翼状胬肉(pterygium))、进行性系统性硬化症(progressive systemic sclerosis,PSS)、慢性移植物抗宿主病、佩罗尼病(Peyronie's disease)、膀胱后尿道狭窄、特发性和药理学诱导的腹膜后纤维化、纵隔纤维化、进行性大块纤维化、增生性纤维化、以及肿瘤纤维化.

[0160] 如本文使用的术语“细胞”是指任何倾向于发生纤维化响应的细胞,包括但不限于

单独的细胞、组织、以及组织和器官内的细胞。本文中使用的术语细胞包括细胞本身,以及细胞周围的胞外基质(extracellular matrix,ECM)。例如,抑制细胞的纤维化响应包括但不限于抑制肺(或肺组织)中的一个或多个细胞、肝脏(或肝组织)内的一个或多个细胞、肾(或肾组织)内的一个或多个细胞、肌肉组织内的一个或多个细胞、心脏(或心脏组织)内的一个或多个细胞、胰内一个或多个细胞、皮肤内的一个或多个细胞、骨内的一个或多个细胞、脉管系统内的一个或多个细胞、一个或多个干细胞或眼内的一个或多个细胞的纤维化响应。

[0161] 本发明的方法和组合物可用于治疗和/或预防纤维化疾病。纤维化疾病的示例性类型包括但不限于血管纤维化、肺纤维化(例如,特发性肺纤维化)、胰纤维化、肝纤维化(如肝硬化)、肾纤维化、肌肉骨骼纤维化、心脏纤维化(例如,心内膜心肌纤维化、特发性心肌病)、皮肤纤维化(例如,硬皮病、创伤后皮肤瘢痕、手术性皮肤瘢痕、瘢痕疙瘩和皮肤瘢痕疙瘩形成)、眼纤维化(例如,青光眼、眼的硬化,结膜和角膜瘢痕、以及翼状胬肉)、进行性系统性硬化症(PSS)、慢性移植物抗宿主病、佩罗尼病,膀胱后尿道狭窄、特发性和药理学诱导的腹膜后纤维化、纵隔纤维化、进行性大块纤维化、增生性纤维化、肿瘤纤维化、迪皮特朗病(Dupuytren's disease)、狭窄、以及辐射引起的纤维化。在一个具体的实施方案中,所述纤维化疾病不是骨髓纤维化。

[0162] 本发明考虑ENG多肽与一种或更多种其他治疗方式联合施用。因而,除了使用ENG多肽,可以向对象施用一个或多个用于治疗纤维化疾病的“标准”治疗。例如,可与细胞毒素、免疫抑制剂、放射毒剂、和/或治疗性抗体联合(即,一起)施用ENG多肽。本发明考虑的具体的共治疗剂包括但不限于:类固醇类(例如糖皮质激素类,如泼尼松)、免疫抑制和/或抗炎剂(例如, $\gamma$ -干扰素、环磷酰胺、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、青霉胺、环孢霉素、秋水仙素、抗胸腺细胞球蛋白、麦考酚酸吗乙酯、以及羟氯喹)、细胞毒药物、钙通道阻滞剂(例如,硝苯地平)、血管紧张素转化酶抑制剂(ACE)抑制剂、对氨基苯甲酸(PABA)、二甲基亚砷、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )抑制剂、白介素-5(IL-5)抑制剂、以及泛胱天蛋白酶(caspase)抑制剂。

[0163] 可与ENG多肽组合使用的其他抗纤维化剂包括但不限于凝集素(例如,如美国专利No.:7,026,283所描述,其全部内容通过引用并入本文),以及由Wynn等所述的抗纤维化剂(2007,J Clin Invest 117:524-529,其全部内容通过引用并入本文)。例如,其他抗纤维化剂和疗法包括但不限于多种抗炎/免疫抑制/细胞毒药物(包括秋水仙素、硫唑嘌呤、环磷酰胺、泼尼松、沙利度胺、己酮可可碱(pentoxifylline)和茶碱)、TGF- $\beta$ 信号调节剂(包括松弛素、SMAD7、HGF、和BMP7、以及TGF- $\beta$ 1、TGF $\beta$ RI、TGF $\beta$ RII、EGR-I、和CTGF抑制剂)、细胞因子和细胞因子受体拮抗剂(IL-1 $\beta$ 、IL-5、IL-6、IL-13、IL-21、IL-4R、IL-13R $\alpha$ 1、GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、制瘤素M、W1SP-I和PDGF的抑制剂)、细胞因子和趋化因子(IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha/\beta$ 、IL-12、IL-10、HGF、CXCL10和CXCL11)、趋化因子拮抗剂(CXCL1、CXCL2、CXCL12、CCL2、CCL3、CCL6、CCL17和CCL18的抑制剂)、趋化因子受体拮抗剂(CCR2、CCR3、CCR5、CCR7、CXCR2和CXCR4的抑制剂)、TLR拮抗剂(TLR3、TLR4和TLR9的抑制剂)、血管发生拮抗剂(VEGF特异性抗体和腺苷脱氨酶替代疗法)、抗高血压药物( $\beta$ 受体阻滞剂以及ANG11、ACE和醛固酮的抑制剂)、血管活性物质(ET-1受体拮抗剂和波生坦(bosentan))、合成和加工胶原之酶的抑制剂(脯氨酰羟化酶的抑制剂)、B细胞拮抗剂(利妥昔单抗)、整合素/黏附分子拮抗剂(阻断 $\alpha$ 1 $\beta$ 1和 $\alpha$ v $\beta$ 6整合素分子、以及整合素连接激酶的抑制剂、和对ICAM-1和VCAM-1特异性的抗体)、靶向肌成纤维细胞的

促凋亡药物、MMP抑制剂(MMP2、MMP9和MMP12的抑制剂)、和TIMP抑制剂(对TIMP-1特异性的抗体)。

[0164] ENG多肽和共治疗剂或联合治疗在同一制剂中施用或分开施用。在分开施用的情况下,ENG多肽可在共同治疗或联合治疗之前、之后或与其同时施用。一种药剂可以在施用另一种药剂之前或之后施用,间隔数分钟至数周。在两个或更多个不同类型的治疗剂被分开施加于对象的一些实施方案中,通常会确保显著期在每次递送的时间之间不失效,这样,这些不同种类的药剂仍将能够对目标组织或细胞施加有利的组合作用。

[0165] 在另一些实施方案中,ENG多肽可用于治疗可能与BMP9相关但以上没有说明的炎症性疾病或病症。示例性的疾病包括肝病(包括急性肝炎、慢性肝炎、以及肝硬化);胸部水肿或腹部水肿;慢性胰腺疾病;变态反应(包括鼻变态反应、哮喘、支气管炎、和特应性皮炎);阿尔茨海默病;雷诺综合征(Raynaud's syndrome);以及弥漫性硬化。

#### [0166] 6. 制剂和有效剂量

[0167] 可将本文中所述的治疗剂配制成药物组合物。根据本公开内容使用的药物组合物可使用一种或更多种生理学上可接受的载体或赋形剂以常规方式进行配制。这样的制剂通常基本不含热原,这符合大多数法规要求。

[0168] 在某些实施方案中,本公开内容的治疗方法包括作为植入物或装置全身性地或局部地施用所述组合物。当施用时,在本公开内容中所使用的治疗组合物是无热原的、生理学上可接受的形式。在本文中所公开的方法中,还可任选地包含在上述组合物中的除了ENG信号拮抗剂之外的治疗上可用的药剂可与主题化合物(例如,ENG多肽)同时或依次施用。

[0169] 通常,本文中公开的蛋白质治疗剂将肠胃外施用,特别是静脉内或皮下施用。适于肠胃外施用的药物组合物可包含与一种或更多种可药用无菌等张水溶液或非水溶液、分散体、悬浮液或乳状液、或无菌粉末(其在临用前重构成无菌注射溶液或分散体)组合的一种或更多种ENG多肽,所述组合物可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、溶质(其使得制剂与预期接受者的血液等张)或者助悬剂或增稠剂。可在本公开内容的药物组合物中使用的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油,丙二醇、聚乙二醇等)、及其合适的混合物、植物油(例如橄榄油)、以及可注射的有机酯(例如油酸乙酯)。可保持适当的流动性,例如,通过使用包衣材料(如卵磷脂),通过在分散体的情况中维持所要求的颗粒大小,以及通过使用表面活性剂。

[0170] 在一个实施方案中,本文中公开的ENG多肽以眼用药物制剂施用。在一些实施方案中,眼用药物制剂是无菌水溶液(优选用于注射的合适浓度)、或者油膏(salve)或软膏。这样的油膏或软膏通常包含本文中所公开的一种或更多种ENG多肽,其溶解或混悬于无菌的可药用油膏或软膏基质(例如矿物油-白凡士林基质)中。在油膏或软膏组合物中,无水羊毛脂也可以包含在制剂中。硫柳汞或氯丁醇也优选地作为抗微生物剂而添加至这样的软膏组合物。在一个实施方案中,无菌水溶液如在美国专利No.6,071,958中所描述。

[0171] 本发明提供这样的制剂,其可被改变以包含酸和碱来调节pH;以及缓冲剂来保持pH在狭窄的范围内。另一些药物可添加至所述制剂中。这些包括但不限于哌加他尼(pegaptanib)、肝素酶(heparinase)、兰尼单抗、或糖皮质激素类。根据本公开内容的眼用药物制剂通过无菌操作制备,或者在制备的适当阶段进行灭菌。

[0172] 如果期望的话,组合物和制剂可呈现在包装或分配器装置中,其可包含一个或更

多个含有活性成分的单位剂量形式.包装可例如包括金属或塑料箔,例如泡罩包装.所述包装或分配器装置可附有施用说明书.

[0173] 实施例:

[0174] 现已一般性地描述了本发明,通过参照以下实施例,本发明将更容易被理解,包括以下实施例仅是为了举例说明本发明的某些实施方案和实施方案,并且不旨在限制本发明.

[0175] 实施例1:表达包括人ENG之全长胞外结构域的融合蛋白

[0176] 申请人构建了可溶性的内皮糖蛋白(ENG)融合蛋白(hENG(26至586)-hFc),其中使用这些结构域之间尽可能小的接头将人ENG全长的胞外结构域(ECD)(Figure 9,SEQ ID NO:9)与人IgG1 Fc结构域(Figure 11,SEQ ID NO:11)相连接.hENG(26至586)-hFc通过瞬时转染到HEK 293细胞中而表达.简要地,将HEK 293细胞放置(set up)在500ml旋转器中,以 $6 \times 10^5$ 个细胞/ml于250ml体积的Freestyle培养基(Invitrogen)中并培养过夜.次日,用DNA:PEI(1:1)混合物(以0.5ug/ml的DNA终浓度)处理这些细胞.4小时后,添加250ml培养基,并将细胞培养7天.通过旋转沉降细胞收获条件化的培养基(conditioned media)并浓缩.为了在CHO细胞中表达,将ENG多肽构建体转染到CHO DUKX B11细胞系中.通常在5nM或10nM的初始浓度下在甲氨蝶呤(MTX)中选择克隆,并任选地随后通过在50nM MTX中扩增以提高表达.高表达克隆可通过稀释克隆鉴定并且适应无血清悬浮培养以产生用于纯化的条件化培养基.任选地,普遍存在的染色质开放元件(ubiquitous chromatin opening element,UCOE)可包含在载体中以促进表达.参见例如Cytotechnology.2002 Jan;38(1-3):43-6.

[0177] 可以使用的三种不同的前导序列:

[0178] (i) 蜜蜂蜂毒肽(honey bee mellitin,HBML):

[0179] MKFLVNVALVFMVYISYIYA(SEQ ID NO:13)

[0180] (ii) 组织纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator,TPA):

[0181] MDAMKRGLCVLLLCGAVFVSP(SEQ ID NO:14)

[0182] (iii) 天然人ENG:MDRGTLPLAVALLLASCSLSPTSLA(SEQ ID NO:15)

[0183] hENG(26至586)-hFc的选定形式使用TPA前导序列,具有图13所示未加工的氨基酸序列(SEQ ID NO:16)并且由图14所示核苷酸序列(SEQ ID NO:17)编码.申请人还构想作为替代的具有TPA前导序列(图15,SEQ ID NO:18)的hENG(26至586)-hFc序列,其包含通过TGGG接头与hENG(26至586)相连的N末端截短的hFc结构域(图12,SEQ ID NO:12).使用多种技术实现纯化,所述技术包括例如过滤条件化的培养基,接着蛋白质A层析,用低pH(3.0)甘氨酸缓冲液洗脱,样品中和,并针对PBS透析.通过分析型尺寸排阻色谱、SDS-PAGE、银染色和Western印迹评价样品的纯度.成熟蛋白质的分析通过预期的N末端序列证实.

[0184] 实施例2:包括鼠ENG的全长胞外结构域的融合蛋白的表达

[0185] 申请人构建体了可溶性鼠ENG融合蛋白(mENG(27至581)-mFc),其中鼠ENG的全长胞外结构域(图10,SEQ ID NO:10)通过这些结构域之间尽可能小的接头与鼠IgG<sub>2a</sub> Fc结构域相融合.mENG(27至581)-mFc通过瞬时转染到HEK 293细胞中而表达.

[0186] mENG(27至581)-mFc的选定形式使用TPA前导序列,具有图16所示未加工的氨基酸序列(SEQ ID NO:19),并且由图17所示核苷酸序列(SEQ ID NO:20)编码.通过纯化来自经



转染的HEK 293细胞的条件化培养基,随后蛋白质A层析而实现纯化.通过分析型尺寸排阻色谱、SDS-PAGE、银染色和Western印迹评价样品的纯度.

[0187] 实施例3:BMP-9/BMP-10与包括全长胞外ENG结构域的蛋白质的选择性结合

[0188] ENG被认为是共受体,普遍认为通过促进TGF- $\beta$ 1和TGF- $\beta$ 3的结合形成I型和II性受体的多蛋白质复合物而发挥功能.为了研究分离的ENG直接结合配体的可能性,申请人使用表面等离子共振 (SPR) 方法 (Biacore™ instrument) 来筛选捕获的包括ENG的全长胞外结构域的蛋白质与多种可溶性人TGF- $\beta$ 家族配体的结合.

	配体	构建体结合		
		hENG(26至586)-hFc*	hENG(26至586)**	mENG(27至581)-hFc***
[0189]	hBMP-2	-	-	-
	hBMP-2/7	-	-	-
	hBMP-7	-	-	-
	hBMP-9	++++	++++	++++
	hBMP-10	++++	++++	++++
	hTGF- $\beta$ 1	-	-	-
	hTGF- $\beta$ 2	-	-	-
	hTGF- $\beta$ 3	-	-	-
	h活化素A	-	-	-

[0190] \* [hBMP-9]、[hBMP-10] = 2.5nM;所有其他配体在100nM检测

[0191] \* \* [hBMP-9]、[hBMP-10] = 2.5nM;所有其他配体在25nM检测

[0192] \* \* \* [hBMP-9]、[hBMP-10] = 0.5nM; [hTGF- $\beta$ 1]、[hTGF- $\beta$ 2]、[hTGF- $\beta$ 3] = 10nM;所有其他配体在25nM检测

[0193] 如在该表中所示,hENG (26至586) -hFc对hBMP-9和hBMP-10的结合亲和力在低配体浓度下评价为高(++++,  $K_D < 1nM$ ).甚至在40倍更高浓度都无法检测到TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、活化素A、BMP-2、和BMP-7与hENG (26至586) -hFc的结合(-).对于这后一组配体,对分离的ENG融合蛋白缺乏直接结合是显著的,由于I型和II型受体的在ENG存在时比在其不存在时显示出更好地结合它们的绝大多数.在以上表中也显示出,当筛选配体与固定的hENG (26至586) (R&D Systems,catalog#1097-EN) (一种没有Fc结构域的人变体) 的结合能力时,或者与捕获的mENG (27至581) -hFc (R&D Systems,catalog#1320-EN) (其由通过6个残基的接头序列(IEGRMD) 与人IgG1的Fc结构域相连的鼠ENG的胞外结构域(残基27至581) 组成) 的结合能力时,获得了相似的结果.通过SPR的表征(图18、19) 确定捕获的hENG (26至586) -hFc以29pM的 $K_D$ 结合可溶性BMP-9并且以400pM的 $K_D$ 结合可溶性BMP-10.因此,通过不同的物种可以归纳出,ENG胞外结构域与BMP-9和BMP-10的选择性高亲和力结合是先前未认识到的性质.

[0194] 实施例4:可溶性hENG胞外结构域抑制BMP-9/BMP-10与ALK1和另一些同源受体的结合

[0195] BMP-9和BMP-10是I型受体ALK1(活化素受体样激酶1)的高亲和力配体.使用基于SPR的测定来确定可溶性hENG (26至586) (R&D Systems,产品编号#1097-EN) 对BMP-9和BMP-10与ALK1之结合的影响.捕获ALK1-hFc,然后将其暴露于与多种比率BMP-9预混合的含有可溶性hENG (26至586) 的溶液中.如在图20中所示,可溶性hENG (26至586) 以 $IC_{50}$ 小于10nM的浓度依赖性方式抑制BMP-9与ALK1-Fc的结合.与BMP-10类似地获得结果(图21).单独的实验

中已经证明,可溶性hENG (26至586) 不与ALK1结合,因此不通过这一机制抑制配体与ALK1结合.实际上,另外的基于SPR的实验表明,可溶性hENG (26至586) 既不与I型受体 (ALK2至ALK7) 也不与II型受体 (例如激活素受体II A、激活素受体IIB、骨形态发生蛋白受体II、以及TGF- $\beta$ 受体II) 相结合.这些结果提供了进一步的证据,表明ENG主要通过直接与这些配体的直接相互作用来抑制BMP-9和BMP-10与ALK1相结合.

[0196] 总而言之,这些数据表明,可溶性ENG-Fc嵌合蛋白以及非嵌合可溶性ENG可用作通过多种信号途径 (包括ALK1) 的BMP-9和BMP-10信号的拮抗剂,.

[0197] 实施例5:mENG (27至581) -hFc对培养的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的作用

[0198] 申请人在基于HUVEC的培养系统中研究了mENG (27至581) -hFc对血管发生作用. HUVEC在聚合基质胶基板 (Matrigel substrate) 上培养,暴露12小时后通过相差显微镜评估受试品 (test article) 对内皮细胞管 (索) 之形成的影响.通过视觉鉴定具有单细胞和至少三个分叉之索的宽度,并且使用计算机图像分析来确定这些索的总长度.平均值基于每个实验条件的一式两份的培养孔,每孔由三个观察视野的平均值作来表征.相对于基本条件 (无处理),强诱导剂内皮细胞生长物质 (ECGS, 0.2 $\mu$ g/ml) 使平均索长度加倍 (图22). mENG (27至581) -hFc (R&D Systems, 产品编号#1320-EN; 10 $\mu$ g/ml) 使这一增长降低了近60%,这是对刺激条件的特异性的作用,因为在相同浓度的mENG (27至581) -hFc在ECGS不存在的情况下没有作用 (图22). 这些结果表明,ENG-Fc融合蛋白在血管发生的细胞培养模型中可以抑制在其他刺激条件下的内皮细胞聚集.

[0199] 实施例6:ENG-Fc在鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 测定中抑制可由VEGF诱导的血管发生

[0200] 使用鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 测定系统来研究ENG-Fc融合蛋白对血管发生的作用. 简要地,在受控的温度 (37 $^{\circ}$ C) 和湿度 (60%) 下将9日龄的受精鸡胚胎保持在卵孵育器中. 使用醇软化卵壳,刺出一个小洞以建立壳膜与CAM之间的“泡 (blister)”,并将其移除以建立覆盖主要血管的窗口 (window). 在存在或不存在溶于缓冲液 (pH 7.4) 的mENG (27至581) -hFc蛋白 (R&D Systems, 产品编号#1320-EN; 每日14 $\mu$ g) 下,用VEGF (每日50ng) 处理小滤盘 (filter disk),所述缓冲液含有0.01M HEPES、0.5M NaCl、3mM EDTA、0.005% v/v表面活性剂P20、以及0.5mg/ml牛血清白蛋白. 然后通过所述开口插入含受试品的滤盘,并将其放在CAM附近. 每天用新鲜的受试品处理卵 (n=8/组),处理三天,并且在第四天时,在卵灯 (egg lamp) 的协助下通过目测检查确定与滤盘相关的血管的数目.

[0201] 正如预期的那样,与用载剂处理相比,CAM实验系统中的VEGF处理显著地提高了血管的数目. 通过用mENG (27至581) -hFc同时处理,由VEGF处理诱导的额外血管数目降低了65% (图23). 基于SPR的研究表明,VEGF不结合mENG (27至581) -mFc,因此本CAM实验中mENG (27至581) -hFc对血管发生的作用不是因为融合蛋白与VEGF的直接相互作用. 上述结果表明,ENG-Fc可在体内模型中显著地抑制VEGF的公知的血管发生作用,而不与VEGF本身相接触.

[0202] 实施例7:mENG (27至581) -mFc在小鼠血管发生反应器测定中对血管发生的作用

[0203] 在小鼠血管发生反应器测定 (还称为定向体内血管发生测定 (directed in vivo angiogenesis assay)) 中进一步研究ENG-Fc融合蛋白对血管发生的作用 (DIVAA<sup>TM</sup>; Guedez et al., 2003, Am J Pathol 162:1431-1439), 其根据制造商 (**Trevigen®**) 的说明书进行. 简而言之,用20 $\mu$ l与或不与碱性成纤维细胞生长因子 (FGF-2, 1.8g) 和VEGF (600ng) 之组

合预混的基底膜提取物 (basement membrane extract, BME) 填充由植入级硅酮制造的且一端封闭的空心圆柱体. BME发生胶凝化后, 将血管发生反应器皮下植入无胸腺裸鼠 (每只小鼠4个). 每日用mENG (27至581) -mFc (10mg/kg, 皮下) 或载剂 (Tris缓冲盐水) 处理小鼠11天, 然后给小鼠注射用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的葡聚糖 (20mg/kg, 静脉内) 并使其在20分钟后安乐死. 移出血管发生反应器, 用荧光板读数器 (**Infinite®M200**, Tecan) 以485nm激发/520nm发射对每个血管发生反应器中所含FITC-葡聚糖的量进行定量, 作为血管形成的指标. 如在图24中所示, 在研究完成时, 向BME添加FGF-2和VEGF导致血管发生反应器中血管形成显著提高, 而同时施用mENG (27至581) -mFc完全阻止了这种提高. 在哺乳动物系统中获得的这些结果补充了以上所述由CAM测定得到的那些结果, 并且证明并入全长ENG胞外结构域的ENG-Fc融合蛋白的体内抗血管发生的活性.

[0204] 实施例8: 具有截短的hENG胞外结构域的变体的表达

[0205] 申请人产生了可溶性ENG融合蛋白, 其中人ENG ECD的截短变体通过尽可能小的接头与人IgG<sub>1</sub> Fc结构域相融合. 这些变体如下所列, 并且所选择的变体的结构在图25中示意性地示出.

	人构建体	瞬时表达	纯化的	稳定表达 (CHO 细胞)
全长 羧基 末端 截短	hENG(26 至 586)-hFc	HEK 293	是	是
	hENG(26 至 581)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(26 至 437)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(26 至 378)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(26 至 359)-hFc	HEK 293	是	是
	hENG(26 至 346)-hFc	HEK 293	是	是
	hENG(26 至 332)-hFc	HEK 293	是	否
[0206]  氨基 末端 截短 双截短	hENG(26至329)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(26至257)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(360至586)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(438至586)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(458至586)-hFc	COS	否	否
	hENG(61至346)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(129至346)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(133至346)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(166至346)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(258至346)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(360至581)-hFc	HEK 293	是	否
	hENG(360至457)-hFc	COS	否	否
	hENG(360至437)-hFc	COS	否	否
	hENG(458至581)-hFc	COS	否	否

[0207] 如所指明的, 通过在HEK 293细胞或COS细胞中瞬时转染表达这些变体.

[0208] hENG (26至437) -hFc的选定形式采用TPA前导序列, 其具有图26所示未经处理的氨基酸序列 (SEQ ID NO:21), 并且由图27所示核苷酸序列 (SEQ ID NO:22) 编码. hENG (26至378) -hFc的选定形式也使用了TPA前导序列, 其具有图28所示未经处理的氨基酸序列 (SEQ ID NO:23), 并且由图29所示核苷酸序列 (SEQ ID NO:24) 编码. hENG (26至359) -hFc的选定

形式也使用了TPA前导序列,其具有图30所示未经处理的氨基酸序列(SEQ ID NO:25),并且由图31所示核苷酸序列(SEQ ID NO:26)编码.申请人还考虑作为替代的具有TPA前导序列的hENG(26至359)-hFc序列(图32,SEQ ID NO:27),其包含通过TGGG接头与hENG(26至359)相连的N末端截短的hFc结构域(图12,SEQ ID NO:12).编码这一作为替代的hENG(26至359)-hFc蛋白的核苷酸序列(SEQ ID NO:28)示于图33中.hENG(26至346)-hFc的选定形式采用TPA前导序列,其具有图34所示的包含N末端截短的hFc结构域未经处理的氨基酸序列(SEQ ID NO:29),并且由图35所示核苷酸序列(SEQ ID NO:30)编码.

[0209] 各自具有N末端截短之Fc结构域(SEQ ID NO:12)的选定的hENG-hFc变体在CHO细胞中稳定地表达(使用上文所述的方法),并通过过滤和蛋白质A层析法从条件化的培养基中进行纯化.在CHO细胞中表达的成熟蛋白的分析证实hENG(26至359)-hFc和hENG(26至346)-hFc的N末端序列如所预期.在蛋白质产率(未修正理论分子量的差异)的基础上,hENG(26至346)-hFc(90mg/升)优于hENG(26至359)-hFc(9mg/升)和全长hENG(26至586)-hFc(31mg/升)二者.如图36所示,通过尺寸排阻色谱分析这些纯化样品表明hENG(26至346)-hFc蛋白的品质(96%单体)优于hENG(26至359)-hFc蛋白的品质(84%单体),并且与hENG(26至586)-hFc蛋白的品质(96%单体)相当.因此,与hENG(26至346)-hFc相比,高分子量聚集体的更高水平需要使用针对hENG(26至359)-hFc其他的纯化步骤.

[0210] 实施例9:BMP-9/BMP-10与截短的hENG-hFc变体的高亲和力结合

[0211] 申请人使用SPR方法以筛选以下hENG-hFc蛋白变体与人BMP-9和BMP-10的高亲和力结合.在这些实验中,捕获的hENG-hFc暴露于分别在100nM下可溶的BMP-9或BMP-10.

人构建体		与 hBMP-9 和 hBMP-10 结合
全长	hENG(26 至 586)-hFc	++++
	hENG(26 至 581)-hFc	++++
	hENG(26 至 437)-hFc	++++
	hENG(26 至 378)-hFc	++++
	hENG(26 至 359)-hFc	++++
	hENG(26 至 346)-hFc	++++
	hENG(26 至 332)-hFc	-
	hENG(26 至 329)-hFc	-
	hENG(26 至 257)-hFc	-
	hENG(360 至 586)-hFc	-
	hENG(438 至 586)-hFc	-
	hENG(458 至 586)-hFc	-
	hENG(61 至 346)-hFc	-
	hENG(129 至 346)-hFc	-
[0212] 氨基酸末端 截短	hENG(133 至 346)-hFc	-
	hENG(166 至 346)-hFc	-
	hENG(258 至 346)-hFc	-
	hENG(360 至 581)-hFc	-
	hENG(360 至 457)-hFc	-
	hENG(360 至 437)-hFc	-
	hENG(458 至 581)-hFc	-
	hENG(61 至 346)-hFc	-
	hENG(129 至 346)-hFc	-
	hENG(133 至 346)-hFc	-
双截短	hENG(166 至 346)-hFc	-
	hENG(258 至 346)-hFc	-
	hENG(360 至 581)-hFc	-
	hENG(360 至 457)-hFc	-
	hENG(360 至 437)-hFc	-
	hENG(458 至 581)-hFc	-

[0213] +++++ KD<1nM

[0214] -未检测到结合

[0215] 如上表中所示,仅在全长构建体和C末端截短的变体(与hENG(26至346)-hFc一样短)中观察到了与BMP-9和BMP-10的高亲和力结合.测试到所有超过61个氨基酸的N末端截短都丧失了与BMP-9和BMP-10的高亲和力结合.

[0216] 筛选了一组配体与C末端截短变体hENG(26至346)-hFc、hENG(26至359)-hFc和hENG(26至437)-hFc的潜在结合.这三种蛋白质与BMP-9和BMP-10的高亲和力结合是选择性的.无论是hENG(26至346)-hFc、hENG(26至359)-hFc还是hENG(26至437)-hFc都未显示与BMP-2、BMP-7、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、或活化素A的可检出的结合,即便在高配体浓度下也是如此.

	配体	构建体结合		
		hENG(26至346)-hFc*	hENG(26至359)-hFc**	hENG(26至437)-hFc**
[0217]	hBMP-2	-	-	-
	hBMP-2/7	-	-	-
	hBMP-7	-	-	-
	hBMP-9	++++	++++	++++
	hBMP-10	++++	++++	++++
	hTGF- $\beta$ 1	-	-	-
	hTGF- $\beta$ 2	-	-	-
	hTGF- $\beta$ 3	-	-	-
	h活化素A	-	-	-

[0218] \* [hBMP-9]、[hBMP-10] = 5nM; [hTGF- $\beta$ 3] = 50nM; 所有其他配体在100nM测试

[0219] \* \* [hBMP-9]、[hBMP-10] = 5nM; [hTGF- $\beta$ 3] = 50nM; 所有其他配体在100nM测试

[0220] ++++KD < 1nM

[0221] -未检测到结合

[0222] 申请人使用SPR方法比较BMP-9与5种构建体结合的动力学:hENG(26至586)-hFc、hENG(26至437)-hFc、hENG(26至378)-hFc、hENG(26至359)-hFc、以及hENG(26至346)-hFc.图37示出数种构建体的结合曲线,并且下表列出了平衡解离常数和解离速率常数( $k_d$ )的计算值.人BMP-9对hENG(26至359)-hFc或hENG(26至346)-hFc的亲和力( $K_D$ 在低皮摩尔每升(picomolar)范围内)比全长构建体强接近一个数量级.非常期望配体诱捕剂(ligand trap)(例如ENG-Fc)表现出相对低的配体解离速率,这样BMP-9与hENG(26至346)-hFc的解离速率与对全长构建体相比10倍的提高(降低)是特别值得注意的.

	配体	构建体	$K_D$ ( $\times 10^{-12}$ M)		$k_d$ ( $\times 10^{-4}$ s $^{-1}$ )	
[0223]	hBMP-9	hENG(26至586)-hFc *	33		25	
		hENG(26至437)-hFc **	19		14	
		hENG(26至378)-hFc **	6.7		3.4	
		hENG(26至359)-hFc *	4.2		3.5	
		hENG(26至346)-hFc *	4.3		2.4	

[0224] \* CHO细胞来源的蛋白质

[0225] \* \* HEK293细胞来源的蛋白质

[0226] 如下所示,与全长构建体相比,每种截短的变体还与BMP-10结合,并且具有更高的亲和力和更好的动力学.即便这样,截短的变体在其偏好BMP-9超过BMP-10的程度(基于 $K_D$

率)上有所不同,hENG(26至346)-hFc表现出最大的差异而hENG(26至437)-hFc最小.在截短的变体中这种配体偏好程度中的差异可潜在地转化成其体内活性中的有意义差异.

	配体	构建体	$K_D$ ( $\times 10^{-12}$ M)	$k_d$ ( $\times 10^{-4}$ s $^{-1}$ )
[0227]	hBMP-10	hENG(26至586)-hFc *	490	110
		hENG(26至437)-hFc **	130	28
		hENG(26至378)-hFc **	95	19
		hENG(26至359)-hFc *	86	23
		hENG(26至346)-hFc *	140	28

[0228] \* CHO细胞来源的蛋白质

[0229] \* \* HEK293细胞来源的蛋白质

[0230] 前述结果表明,包含某些hENG ECD之C末端截短变体的融合蛋白表现出与BMP-9和BMP-10但不与多种其他TGF- $\beta$ 家族配体(包括TGF- $\beta$ 1和TGF- $\beta$ 3)的高亲和力结合.特别地,与全长构建体hENG(26至586)-hFc和截短的变体hENG(26至437)-hFc二者相比,截短的变体hENG(26至359)-hFc、hENG(26至346)-hFc和hENG(26至378)-hFc表现出平衡时对BMP-9更高的结合亲和力和提高动力学性质.

[0231] 实施例10:对ENG N末端区域的二级结构预测

[0232] 如上所述,发现短至36个氨基酸的N末端截短(hENG(61至346)-hFc)取消了配体与ENG多肽的结合.为了预测甚至更短的N末端截短对配体结合的影响,使用改进的Psipred第3版(Jones,1999,J Mol Biol 292:195-202)对人内皮糖蛋白孤儿域的二级结构进行计算预测.分析表明,在由SEQ ID NO:1的第26至60位氨基酸定义的ENG多肽区内有序的二级结构被限制为预测在SEQ ID NO:1的第42至45位置具有高置信度的4个残基之 $\beta$ 链和在SEQ ID NO:1的第28至29位具有低置信度的两个残基之 $\beta$ 链.因此,开始于氨基酸27或28的ENG多肽变体和任选的开始于SEQ ID NO:1的29至42位任何氨基酸中任一个的那些多肽变体很可能保留重要的结构元件和配体结合.

[0233] 实施例11:基于细胞之测定中ENG-Fc变体的效力

[0234] 使用在A204细胞中的报道基因测定以确定hENG-hFc融合蛋白抑制BMP-9和BMP-10A信号的效力.该测定基于转染了pGL3BRE-萤光素酶报道质粒的人横纹肌肉瘤细胞系(Korchynskyi et al,2002,J Biol Chem 277:4883-4891),以及海肾荧光报道质粒(pRLCMV-萤光素酶)以控制转染效率.在BMP应答基因(含Id1启动子)中出现BRE模体,所以该载体一般用于通过Smad1和/或Smad5进行信号传导的因子.在不存在ENG-Fc融合蛋白情况下,BMP-9和BMP-10剂量依赖性地刺激A204细胞中的信号传导.

[0235] 在测定的第一天,A204细胞中(ATCC®编号:HTB-82™;保藏者:DJ Giard)以每孔 $10^5$ 个细胞分散于48孔板中.第二天,将含有12 $\mu$ g pGL3 BRE-萤光素酶、0.1 $\mu$ g pRLCMV-萤光素酶、30 $\mu$ l Eugene 6(Roche Diagnostics)以及970 $\mu$ l OptiMEM(Invitrogen)的溶液在室温预孵育30分钟,然后添加24ml测定缓冲液(补充有0.1%BSA的McCoy培养基).将该混合物施用于平板接种的细胞(500 $\mu$ l/孔),在37℃下孵育过夜.第三天,除去培养基,并在测定缓冲液中稀释的受试物质(250 $\mu$ l/孔)替换.在37℃孵育过夜后,用被动裂解缓冲液(Promega E1941)冲洗并裂解细胞,并冷冻于-70℃.测定之前,将板在轻微摇动下升温至室温.将细胞裂解物一式两份地转移至化学发光板(96孔),并在带有来自双萤光素酶报道基因检测系统(Promega E1980)试剂的光度计(luminometer)中分析,以确定归一化的萤光素

酶活性。

[0236] 结果表明, hENG-hFc蛋白是由BMP-9和BMP-10介导的细胞信号传导的强效抑制剂。如下表中所示, 全长构建体hENG (26至586) -hFc通过BMP-9和BMP-10分别以亚纳摩尔和低纳摩尔范围内的 $IC_{50}$ 值抑制信号传导。此外, 截短的变体hENG (26至359) -hFc和hENG (26至346) -hFc二者都比hENG (26至586) -hFc更有效。

	构建体	IC <sub>50</sub> (nM)	
		hBMP-9	hBMP-10
[0237]	hENG(26至586)-hFc	0.26	7.9
	hENG(26至359)-hFc	0.16	3.5
	hENG(26至346)-hFc	0.19	4.6

[0238] 实施例12: 截短的变体hENG (26至359) -hFc在CAM测定中抑制可由VEGF诱导的血管发生

[0239] 申请人在与实施例6中描述的相同的CAM测定中研究截短的变体hENG (26至359) -hFc对血管发生的作用, 其中使用VEGF诱导血管发生。由VEGF处理(每天50ng) 诱导的额外血管的数目因同时存在的hENG (26至359) -hFc (SEQ ID NO:25; 每天20 $\mu$ g) 而降低了75% (图38)。基于SPR的研究确认了VEGF不与hENG (26至359) -hFc结合, 因此该变体在该CAM测定中对血管发生的作用并不是因为融合蛋白与VEGF之间的直接相互作用。需要注意的是, 对于hENG (26至359) -hFc, 10 $\mu$ g的剂量对应于14 $\mu$ g用于在实施例6中测试的较长ENG-Fc构建体的剂量(基于每种构建体的理论分子量)。因此, 在同一测定系统中, 与具有全长ECD的ENG构建体(图23) 相比, 截短的变体hENG (26至359) -hFc在抑制可由VEGF诱导的血管发生中表现出相当的(如果不是更高的话) 有效性。

[0240] 实施例13: 截短的变体hENG (26至346) -hFc在小鼠血管发生反应器测定中抑制血管发生

[0241] 在与实施例7中所述的相同的小鼠血管发生反应器测定中测试截短的变体hENG (26至346) -hFc。将血管发生反应器皮下植入无胸腺裸鼠(每只小鼠4个)。小鼠每日使用hENG (26至346) -hFc (10mg/kg, 皮下) 或载剂(Tris缓冲盐水) 处理11天, 此时给小鼠注射用异硫氰酸荧光素(FITC) 标记的葡聚糖 (20mg/kg, 静脉内) 并在20分钟后安乐死。然后测量每个血管发生反应器中所含FITC-葡聚糖的量, 作为血管发生的指标。如图39中所示, 向血管发生反应器添加生长因子(GF) FGF-2和VEG导致血管形成的显著提高, 而同时施用hENG (26至346) -hFc完全阻止了这一提高。基于SPR的研究证实, hENG (26至346) -hFc既不结合FGF-2也不结合VEGF, 从而排除了本实验中hENG (26至346) -hFc对可诱导的血管发生的作用是由于融合蛋白与FGF-2或VEGF之直接相互作用的可能性。在哺乳动物测定系统中的本结果补充了截短的变体hENG (26至359) -hFc在CAM测定中(实施例12) 获得的那些结果。综上所述, 它们表明并入优选的ENG胞外结构域之截短体的ENG-Fc融合蛋白的体内抗血管发生活性。

[0242] 实施例14: 截短的变体hENG (26至346) -hFc的较长体内半衰期

[0243] 申请人进行了改进的药物代谢动力学研究以确定hENG (26至346) -hFc的全身消除半衰期, 并将其与全长蛋白mENG (27至581) -mFc的全身消除半衰期进行比较。hENG (26至346) -hFc蛋白是根据制造商(Invitrogen™) 的说明书使用SAIVI™(小动物体内成像) 迅速抗体标记试剂盒(Rapid Antibody Labeling kit) 以Alexa**Fluor**®750染料荧光标记的。通过尺寸排阻色谱将被标记的蛋白质与游离标签分开。给无胸腺裸鼠(n=3, 17至20g) 注射

标记的hENG (26至346) -hFc (2mg/kg,皮下),并且在注射后2、4、6、8、24、32、48和72小时使用IVIS成像系统(**Xenogen®**/Caliper Life Sciences)进行全身成像以确定融合蛋白的水平.hENG (26至346) -hFc的平均除去半衰期是26.5小时,比在类似研究中mENG (27至581) -mFc的22小时半衰期长20%.

[0244] 实施例15:ENG-Fc蛋白质在小鼠异种移植模型中对肿瘤生长的作用

[0245] 在两个不同的小鼠异种移植模型中测试ENG-Fc蛋白质以确定这些蛋白是否可抑制肿瘤生长.在第一个实验中,无胸腺裸鼠在6周龄时皮下注射 $10^6$ 4T1乳腺癌细胞(**ATCC®**编号:CRL-2539<sup>TM</sup>;保藏者:BA Pulaski).小鼠(n=10只/组)每日(皮下)施用mENG (27至581) -mFc (10mg/kg)或载剂(Tris缓冲盐水).使用数显卡尺手动测量,肿瘤体积根据以下公式计算:体积=0.5(长)(宽<sup>2</sup>).如图40中所示,到移植后第24天,与载剂相比,用mENG (27至581) -mFc治疗降低肿瘤体积的45%.

[0246] 还在结肠-26癌异种移植模型中测试ENG-Fc融合蛋白.BALB/c小鼠7周龄时皮下注射 $1.5 \times 10^6$ 结肠-26癌细胞(**ATCC®**编号:CRL-2638<sup>TM</sup>;保藏者:N Restifo)小鼠(n=10/组)每日(皮下)施用mENG (27至581) -mFc(在1、10或30mg/kg)或载剂(Tris缓冲盐水).按照上文所述测量肿瘤体积,如图41中所示,到移植后第58天,mENG (27至581) -mFc治疗引起了肿瘤体积剂量依赖性降低,与载剂相比,10mg/kg和30mg/kg的剂量分别降低了55%和近70%.因此,mENG (27至581) -mFc在小鼠异种移植模型中显著地减缓了两种不同肿瘤类型的生长,这与前述的并入全长鼠ENG胞外结构域的融合蛋白的抗血管发生活性相一致(实施例5至7).在初步实验中,与载剂相比,截短的hENG (26至346)在结肠-26异种移植模型中也可以减慢肿瘤的生长,与这一变体在血管发生反应器测定中的抗血管发生活性一致.

[0247] 综上所述,上述结果表明,包含全长ENG ECD及其某些截短之变体的融合蛋白,显示与BMP-9和BMP-10的高亲和力结合,但不与多种其他TGF- $\beta$ 家族配体(包括TGF $\beta$ -1和TGF $\beta$ -3)结合.这些ENG多肽在模型系统中可抑制血管发生和肿瘤生长,因而有潜力治疗患不期望的血管发生的(包括那些患癌症的)患者.与包含全长ENG ECD的构建体相比,截短的ENG多肽hENG (26至346) -hFc和/或hENG (26至359) -hFc显示更高的效力并且提高了在数种其他关键参数的表现(参见如下汇总表格).



参数		融合蛋白中的ECD多肽 (CHO细胞来源的)		
		全长 ECD – 人 26 至 586 或 鼠 27 至 581	人 26 至 359	人 26 至 346
[0248]	表达	31 mg/L	9 mg/L	90 mg/L
	量	96% 单体	84% 单体	96% 单体
	品质	33 pM	4.2 pM	4.3 pM
	结合亲和力 ( $K_D$ )	490 pM	86 pM	140 pM
	BMP-9	$25 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$3.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$2.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
	解离速率 ( $k_d$ )	$110 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$23 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$28 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
	BMP-10	0.26 nM	0.16 nM	0.19 nM
	效力 (基于细胞的 $IC_{50}$ )	7.9 nM	3.5 nM	4.6 nM
	BMP-10	22 h	---	26.5 h
	消除半衰期	HUVEC	---	---
	抗血管	CAM	---	---
	发生活性	血管发生反应器	65% 抑制	75% 抑制
[0249]	抗肿瘤	4T1 肿瘤	100% 抑制	---
	活性	结肠-26	---	100% 抑制
		肿瘤	是	是
			剂量依赖性	

[0249] --- 未研究

[0250] 特别地,变体hENG (26至346) -hFc具有优良的性质组合,与全长ENG ECD构建体相比,效力更高,结合亲和力更强,解离速率更缓慢,消除半衰期更长,并且蛋白质生产更好.作为配体诱捕剂,截短的ENG多肽应优选地表现出缓慢的配体解离速率,所以与hENG (26至346) -hFc全长构建体相比10倍降低的BMP-9解离速率是高度期望的.变体hENG (26至378) -hFc表现出介于一方面hENG (26至346) -hFc和hENG (26至359) -hFc与另一方面hENG (26至437) -hFc之间的BMP-9结合特性(亲和力和解离速率),并且hENG (26至378) 更非常类似于较短的构建体.

[0251] 通过引用并入

[0252] 本文中提及的所有出版物和专利通过引用全文并入本文,如同每个单独的出版物或专利被具体地且单独地表明通过引用并入.在冲突的情况下,以本申请(包括本文中的任何定义)为准.

[0253] 等同方案

[0254] 虽然本文中已经明确地公开了本发明的一些具体实施方案,以上说明书是举例说明性的而非限制性的.对于本领域的技术人员来说,通过浏览本说明书和所附权利要求,本发明的许多变化形式将变得明显.本发明的全部范围应通过参照权利要求、其等同方案的全部范围、以及本说明书和这样的变化来确定.

## 序列表

<110> Acceleron Pharma, Inc.  
 Grinberg, Asya  
 Castonguay, Roselyne  
 Werner, Eric  
 Kumar, Ravindra

<120> 内皮糖蛋白多肽及其用途

<130> A0904.70006W000

<140> N/A  
 <141> 2012-04-19

<150> US 61/477585  
 <151> 2011-04-20

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 658  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 1

Met Asp Arg Gly Thr Leu Pro Leu Ala Val Ala Leu Leu Leu Ala Ser  
 1 5 10 15

Cys Ser Leu Ser Pro Thr Ser Leu Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu  
 20 25 30

[0001] Gln Pro Val Gly Pro Glu Arg Gly Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln  
 35 40 45

Val Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val  
 50 55 60

His Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu  
 65 70 75 80

Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu  
 85 90 95

Leu Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu  
 100 105 110

Gly Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln  
 115 120 125

Glu Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr  
 130 135 140

Gln Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala  
 145 150 155 160

Glu Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln  
 165 170 175

Gly Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg  
 180 185 190

Thr Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro Ala Leu Val Arg Gly Cys His  
 195 200 205  
 Leu Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu Ala His Ile Leu Arg Val Leu  
 210 215 220  
 Pro Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Lys Val Glu Leu  
 225 230 235 240  
 Ser Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro  
 245 250 255  
 Pro Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala Asn His Asn Met Gln Ile Trp  
 260 265 270  
 Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg  
 275 280 285  
 Gly Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg  
 290 295 300  
 Met Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala  
 305 310 315 320  
 Ser Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr  
 325 330 335  
 [0002] Ser Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro  
 340 345 350  
 Glu Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Thr Lys Cys Ala Asp Asp Ala Met  
 355 360 365  
 Thr Leu Val Leu Lys Lys Glu Leu Val Ala His Leu Lys Cys Thr Ile  
 370 375 380  
 Thr Gly Leu Thr Phe Trp Asp Pro Ser Cys Glu Ala Glu Asp Arg Gly  
 385 390 395 400  
 Asp Lys Phe Val Leu Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Gln Val  
 405 410 415  
 Ser Ala Ser Met Ile Ser Asn Glu Ala Val Val Asn Ile Leu Ser Ser  
 420 425 430  
 Ser Ser Pro Gln Arg Lys Lys Val His Cys Leu Asn Met Asp Ser Leu  
 435 440 445  
 Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala Ser  
 450 455 460  
 Asn Thr Ile Glu Pro Gly Gln Gln Ser Phe Val Gln Val Arg Val Ser  
 465 470 475 480  
 Pro Ser Val Ser Glu Phe Leu Leu Gln Leu Asp Ser Cys His Leu Asp

	485	490	495
	Leu Gly Pro Glu Gly Gly Thr Val 500	Glu Leu Ile Gln Gly Arg Ala Ala 505	
	Lys Gly Asn Cys Val Ser Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro 515	520	525
	Arg Phe Ser Phe Leu Leu His Phe Tyr Thr Val Pro Ile Pro Lys Thr 530	535	540
	Gly Thr Leu Ser Cys Thr Val Ala Leu Arg Pro Lys Thr Gly Ser Gln 545	550	555 560
	Asp Gln Glu Val His Arg Thr Val Phe Met Arg Leu Asn Ile Ile Ser 565	570	575
	Pro Asp Leu Ser Gly Cys Thr Ser Lys Gly Leu Val Leu Pro Ala Val 580	585	590
	Leu Gly Ile Thr Phe Gly Ala Phe Leu Ile Gly Ala Leu Leu Thr Ala 595	600	605
	Ala Leu Trp Tyr Ile Tyr Ser His Thr Arg Ser Pro Ser Lys Arg Glu 610	615	620
[0003]	Pro Val Val Ala Val Ala Ala Pro Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ser Thr 625	630	635 640
	Asn His Ser Ile Gly Ser Thr Gln Ser Thr Pro Cys Ser Thr Ser Ser 645	650	655
	Met Ala		
	<210> 2		
	<211> 2030		
	<212> DNA		
	<213> 人		
	<400> 2		
	ctgccactg gacacaggat aaggcccagc gcacagggccc ccacgtggac agcatggacc		60
	gcggcacgct ccctctggct gttgccctgc tgcctggccag ctgcagcctc agccccacaa		120
	gtcttgcaga aacagtcctat tgtgaccttc agcctgtggg ccccgagagg ggcgaggtga		180
	catataccac tagccaggtc tcgaagggtc gcgtggctca ggcccccaat gccatccttg		240
	aagtccatgt cctcttcttg gagttccaa cgggcccgtc acagctggag ctgactctcc		300
	aggcatccaa gcaaaatggc acctggcccc gagaggtgct tctggtcctc agtgtaaaca		360
	gcagtgtctt cctgcatctc caggccctgg gaatccact gcacttggcc tacaattcca		420
	gcctggtcac cttccaagag cccccggggg tcaacaccac agagctgcca tccttccca		480
	agaccagat ccttgagtgg gcagctgaga ggggccccat cactctgct gctgagctga		540
	atgaccccca gacatctc ctcgactgg gccaaagcca ggggtcactg tccttctgca		600
	tgtctgaagc cagccaggac atgggccgca cgtctgagtg gggcccgct actccagct		660

[0004]	tggtccgggg ctgccattg gaaggcgtgg ccggccacaa ggaggcgac atcctgaggg	720
	tcctgccggg ccactcgcc gggcccgga cggtagcggg gaaggaggaa ctgagctcg	780
	caccgggga tctcgatgc gtctcatcc tgcagggtcc cccctacgtg tcctggctca	840
	tcgacgcaa ccacaacatg cagatctgga ccactggaga atactcttc aagatcttc	900
	cagagaaaa cattcgtggc ttcaagctcc cagacacacc tcaaggctc ctgggggagg	960
	cccgatgct caatgccagc attgtggcat ccttcgtgga gctaccgtg gccagcattg	1020
	tctcactta tgctccagc tgcgttggtg ggctgcagac ctcaccgca ccgatccaga	1080
	ccactctcc caaggacact ttagccccg agctgctcat gtccttgatc cagacaaagt	1140
	gtgccagca cgccatgacc ctggtactaa agaaagagct tgttcgcat ttgaagtga	1200
	ccatcacggg cctgacctc tgggaccca gctgtgaggc agaggacagg ggtgacaagt	1260
	ttgtcttgcg cagtgttac tccagctgtg gcatgcagg gtcagcaagt atgatcagca	1320
	atgaggcggg ggtcaatata ctgtcgagct catcaccaca gcggaaaaag gtgcactgcc	1380
	tcaacatgga cagcctctct ttccagctgg gcctctacct cagccacac ttctccagg	1440
	cctccaacac catcgagccg gggcagcaga gctttgtgca ggtcagagtg tccccatccg	1500
	tctccgagtt cctgctccag ttagacagct gccacctgga ctggggcct gagggaggca	1560
	ccgtggaact catccaggcg cgggcggcca agggcaactg tgtgagcctg ctgtcccaa	1620
	gccccgaggg tgaccgcgc ttcagcttcc tctccactt ctacacagta ccataccca	1680
	aaaccggcac cctcagctgc acggtagccc tgcgtccaa gaccgggtct caagaccagg	1740
	aagtccatag gactgtctc atgcgcttga acatcatcag cctgacctg tctggttga	1800
	caagcaaagg cctcgtctc cccgccgtg tgggcatcac ctttggtgcc ttctcatcg	1860
	gggcctgct cactgtgca ctctggtaca tctactgca cagcgctcc ccagcaagc	1920
	gggagccgt ggtggcggtg gctgccccg cctctcgga gagcagcagc accaaccaca	1980
	gcatcgggag caccagagc acccctgct ccaccagcag catggcatag	2030
<210> 3 <211> 625 <212> PRT <213> 人		
<400> 3		
Met Asp Arg Gly Thr Leu Pro Leu Ala Val Ala Leu Leu Leu Ala Ser 1 5 10 15		
Cys Ser Leu Ser Pro Thr Ser Leu Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu 20 25 30		
Gln Pro Val Gly Pro Glu Arg Gly Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln 35 40 45		
Val Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val 50 55 60		
His Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu 65 70 75 80		
Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu		

	85	90	95
	Leu Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu 100 105 110		
	Gly Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln 115 120 125		
	Glu Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr 130 135 140		
	Gln Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala 145 150 155 160		
	Glu Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln 165 170 175		
	Gly Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg 180 185 190		
	Thr Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro Ala Leu Val Arg Gly Cys His 195 200 205		
	Leu Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu Ala His Ile Leu Arg Val Leu 210 215 220		
[0005]	Pro Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Lys Val Glu Leu 225 230 235 240		
	Ser Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro 245 250 255		
	Pro Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala Asn His Asn Met Gln Ile Trp 260 265 270		
	Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg 275 280 285		
	Gly Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg 290 295 300		
	Met Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala 305 310 315 320		
	Ser Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr 325 330 335		
	Ser Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro 340 345 350		
	Glu Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Thr Lys Cys Ala Asp Asp Ala Met 355 360 365		
	Thr Leu Val Leu Lys Lys Glu Leu Val Ala His Leu Lys Cys Thr Ile 370 375 380		

	Thr Gly Leu Thr Phe Trp Asp Pro Ser Cys Glu Ala Glu Asp Arg Gly 385 390 395 400	
	Asp Lys Phe Val Leu Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Gln Val 405 410 415	
	Ser Ala Ser Met Ile Ser Asn Glu Ala Val Val Asn Ile Leu Ser Ser 420 425 430	
	Ser Ser Pro Gln Arg Lys Lys Val His Cys Leu Asn Met Asp Ser Leu 435 440 445	
	Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala Ser 450 455 460	
	Asn Thr Ile Glu Pro Gly Gln Gln Ser Phe Val Gln Val Arg Val Ser 465 470 475 480	
	Pro Ser Val Ser Glu Phe Leu Leu Gln Leu Asp Ser Cys His Leu Asp 485 490 495	
	Leu Gly Pro Glu Gly Gly Thr Val Glu Leu Ile Gln Gly Arg Ala Ala 500 505 510	
	Lys Gly Asn Cys Val Ser Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro 515 520 525	
[0006]	Arg Phe Ser Phe Leu Leu His Phe Tyr Thr Val Pro Ile Pro Lys Thr 530 535 540	
	Gly Thr Leu Ser Cys Thr Val Ala Leu Arg Pro Lys Thr Gly Ser Gln 545 550 555 560	
	Asp Gln Glu Val His Arg Thr Val Phe Met Arg Leu Asn Ile Ile Ser 565 570 575	
	Pro Asp Leu Ser Gly Cys Thr Ser Lys Gly Leu Val Leu Pro Ala Val 580 585 590	
	Leu Gly Ile Thr Phe Gly Ala Phe Leu Ile Gly Ala Leu Leu Thr Ala 595 600 605	
	Ala Leu Trp Tyr Ile Tyr Ser His Thr Arg Glu Tyr Pro Arg Pro Pro 610 615 620	
	Gln 625	
	<210> 4	
	<211> 1931	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 4	
	cctgccactg gacacaggat aaggcccagc gcacaggccc ccacgtggac agcatggacc	60
	gcggcacgct cctctggct gttgccctgc tgctggccag ctgcagcctc agccccacaa	120
	gtcttgcaga aacagtccat tgtgaccttc agcctgtggg ccccagaggg ggcgaggtga	180

	catataccac tagccaggtc tcgaagggtc gcgtgggtca ggcccccaat gccatccttg	240
	aagtccatgt cctcttctctg gagttcccaa cgggccccgtc acagctggag ctgactctcc	300
	aggcatecaa gcaaaatggc acctggcccc gagagggtgt tctggctctc agtgtaaaca	360
	gcagtgtctt cctgcatctc caggccctgg gaatcccact gcacttggcc tacaattcca	420
	gcctgggtcac ctccaagag cccccggggg tcaacaccac agagctgcca tccttcccca	480
	agaccagat ccttgagtgg gcagctgaga ggggccccat cacctctgtc gctgagctga	540
	atgaccccca gagcactctc ctccgactgg gccaaagcca ggggtcactg tccttctgca	600
	tgctggaagc cagccaggac atgggcccga cgctcgagtg gcggcccgct actccagcct	660
	tggtccgggg ctgccacttg gaaggcgttg cggccacaa ggaggcgac atcctgaggg	720
	tcctgccggg ccactcggcc gggccccgga cggtgacggt gaagggtgaa ctgagctgcg	780
	caccgggga tctcgatgcc gtctctatcc tgcagggtcc cccctacgtg tcctggctca	840
	tcgacgcaa ccacaacatg cagatctgga ccactggaga atactcttc aagatcttc	900
	cagagaaaa cattcgtggc ttcaagctcc cagacacacc tcaaggcctc ctgggggagg	960
	cccggtgct caatgccagc attgtggcat ccttcgtgga gctaccgtg gccagcattg	1020
	tctcacttca tgccctcagc tgcggtggta ggctgcagac ctaccccga ccgatccaga	1080
	ccactctcc caaggacact tgtagcccgg agctgctcat gtccttgatc cagacaaagt	1140
	gtgccgacga cgccatgacc ctgggtactaa agaaagagct tgttcgcat ttgaagtga	1200
	ccatcacggg cctgaccttc tgggacccca gctgtgaggc agaggacagg ggtgacaagt	1260
[0007]	ttgtcttgcg cagtgttac tccagctgtg gcattgcaggt gtcagcaagt atgatcagca	1320
	atgaggcggt ggtcaatata ctgtcgagct catcaccaca gcggaaaaag gtgcactgcc	1380
	tcaacatgga cagcctctct ttcagctgg gcctctacct cagcccacac ttctccagg	1440
	cctccaacac catcgagccg gggcagcaga gctttgtgca ggtcagagtg tccccatccg	1500
	tctccgagtt cctgctccag ttagacagct gccacctgga cttggggcct gagggaggca	1560
	ccgtggaact catccagggc cggggcgcca agggcaactg tgtgagcctg ctgtcccaa	1620
	gccccgaggg tgaccgcgc ttcagcttcc tcctccactt ctacacagta cccataccca	1680
	aaaccggcac cctcagctgc acggtagccc tgcgtccca gaccgggtct caagaccagg	1740
	aagtccatag gactgtcttc atgcgttga acatcatcag cctgacctg tctggttga	1800
	caagcaaagg cctcgtctct cccgcgtgc tgggcatcac ctttgggtgcc ttcctcatcg	1860
	gggccctgct cactgtgca ctctggtaca tctactgca cagcgtgag taccacaggc	1920
	ccccacagtg a	1931

<210> 5  
 <211> 653  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 5

Met Asp Arg Gly Val Leu Pro Leu Pro Ile Thr Leu Leu Phe Val Ile  
 1 5 10 15

Tyr Ser Phe Val Pro Thr Thr Gly Leu Ala Glu Arg Val Gly Cys Asp  
 20 25 30



Leu Gln Pro Val Asp Pro Thr Arg Gly Glu Val Thr Phe Thr Thr Ser  
 35 40 45  
 Gln Val Ser Glu Gly Cys Val Ala Gln Ala Ala Asn Ala Val Arg Glu  
 50 55 60  
 Val His Val Leu Phe Leu Asp Phe Pro Gly Met Leu Ser His Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Glu Thr Gln Glu Val  
 85 90 95  
 Phe Leu Val Leu Val Ser Asn Lys Asn Val Phe Val Lys Phe Gln Ala  
 100 105 110  
 Pro Glu Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asp Ser Ser Leu Val Ile Phe  
 115 120 125  
 Gln Gly Gln Pro Arg Val Asn Ile Thr Val Leu Pro Ser Leu Thr Ser  
 130 135 140  
 Arg Lys Gln Ile Leu Asp Trp Ala Ala Thr Lys Gly Ala Ile Thr Ser  
 145 150 155 160  
 Ile Ala Ala Leu Asp Asp Pro Gln Ser Ile Val Leu Gln Leu Gly Gln  
 165 170 175  
 [0008] Asp Pro Lys Ala Pro Phe Leu Cys Leu Pro Glu Ala His Lys Asp Met  
 180 185 190  
 Gly Ala Thr Leu Glu Trp Gln Pro Arg Ala Gln Thr Pro Val Gln Ser  
 195 200 205  
 Cys Arg Leu Glu Gly Val Ser Gly His Lys Glu Ala Tyr Ile Leu Arg  
 210 215 220  
 Ile Leu Pro Gly Ser Glu Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Met Met  
 225 230 235 240  
 Glu Leu Ser Cys Thr Ser Gly Asp Ala Ile Leu Ile Leu His Gly Pro  
 245 250 255  
 Pro Tyr Val Ser Trp Phe Ile Asp Ile Asn His Ser Met Gln Ile Leu  
 260 265 270  
 Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Val Lys Ile Phe Pro Gly Ser Lys Val Lys  
 275 280 285  
 Gly Val Glu Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Ile Ala Glu Ala Arg  
 290 295 300  
 Lys Leu Asn Ala Ser Ile Val Thr Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Val  
 305 310 315 320  
 Ser Asn Val Ser Leu Arg Ala Ser Ser Cys Gly Gly Val Phe Gln Thr

	325	330	335
	Thr Pro Ala Pro Val Val Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro 340 345 350		
	Val Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Pro Lys Cys Gly Asn Gln Val Met 355 360 365		
	Thr Leu Ala Leu Asn Lys Lys His Val Gln Thr Leu Gln Cys Thr Ile 370 375 380		
	Thr Gly Leu Thr Phe Trp Asp Ser Ser Cys Gln Ala Glu Asp Thr Asp 385 390 395 400		
	Asp His Leu Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Lys Val 405 410 415		
	Thr Ala His Val Val Ser Asn Glu Val Ile Ile Ser Phe Pro Ser Gly 420 425 430		
	Ser Pro Pro Leu Arg Lys Lys Val Gln Cys Ile Asp Met Asp Ser Leu 435 440 445		
	Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala Ser 450 455 460		
[0009]	Asn Thr Ile Glu Leu Gly Gln Gln Ala Phe Val Gln Val Ser Val Ser 465 470 475 480		
	Pro Leu Thr Ser Glu Val Thr Val Gln Leu Asp Ser Cys His Leu Asp 485 490 495		
	Leu Gly Pro Glu Gly Asp Met Val Glu Leu Ile Gln Ser Arg Thr Ala 500 505 510		
	Lys Gly Ser Cys Val Thr Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro 515 520 525		
	Arg Phe Ser Phe Leu Leu Arg Val Tyr Met Val Pro Thr Pro Thr Ala 530 535 540		
	Gly Thr Leu Ser Cys Asn Leu Ala Leu Arg Pro Ser Thr Leu Ser Gln 545 550 555 560		
	Glu Val Tyr Lys Thr Val Ser Met Arg Leu Asn Ile Val Ser Pro Asp 565 570 575		
	Leu Ser Gly Lys Gly Leu Val Leu Pro Ser Val Leu Gly Ile Thr Phe 580 585 590		
	Gly Ala Phe Leu Ile Gly Ala Leu Leu Thr Ala Ala Leu Trp Tyr Ile 595 600 605		
	Tyr Ser His Thr Arg Gly Pro Ser Lys Arg Glu Pro Val Val Ala Val 610 615 620		

Ala Ala Pro Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ser Thr Asn His Ser Ile Gly  
625 630 635 640

Ser Thr Gln Ser Thr Pro Cys Ser Thr Ser Ser Met Ala  
645 650

<210> 6  
<211> 1965  
<212> DNA  
<213> 小鼠

<400> 6  
agcatggacc gtggcgtgct cctctgccc attacctgc tgtttgtcat ctatagcttt 60  
gtaccacaaa caggctctgc agaaagagtc ggctgtgac tacagcctgt ggacccaca 120  
aggggtgagg tgacgtttac caccagccag gtctccgagg gctgtgtagc tcaggctgcc 180  
aatgctgtgc gtgaagtcca cgttctcttc ctggattttc ccggaatgct gtcacatctg 240  
gagctgactc ttcaggcatc caagcaaat ggcacggaga ccaggaggt gttcctggtc 300  
ctcgtttcga acaaaaatgt ctctgtgaag ttccagggcc cggaatccc attgcacttg 360  
gcctacgact ccagcctggt catcttccaa ggacagccaa gactcaacat cacagtgcta 420  
ccatccctta cctccaggaa acagatcttc gactgggcag ccaccaaggc cgccatcacc 480  
tcgatagcag cactggatga ccccaaaagc atcgtctctc agttgggcca agacccaaag 540  
gcaccattct tgtgcttgcc agaagctcac aaggacatgg gcgccacact tgaatggcaa 600  
ccacgagccc agaccccagt ccaaagctgt cgcttgggaag gtgtgtcttg ccacaaggag 660  
gcctacatcc tgaggatcct gccaggttct gaggccgggc cccggacggt gaccgtaatg 720  
atggaactga gttgcacatc tggggacgcc attctcatcc tgcattggtc tccatatgtc 780  
tcttggttca tcgacatcaa ccacagcatg cagatcttga ccacaggtga atactccgtc 840  
aagatcttcc caggaagcaa ggtcaaaggc gtggagctcc cagacacacc ccaaggcctg 900  
atagcggagg cccgcaagct caatgccagc attgtcacct cctttgtaga gctccctctg 960  
gtcagcaatg tctccctgag ggctccagc tgcggtggtg tgttccagac caccctgca 1020  
cccgtttga ccacacctcc caaggacaca tgcagccccg tgctactcat gtcctgate 1080  
cagccaaagt gtggcaatca ggtcatgact ctggcactca ataaaaaca cgtgcagact 1140  
ctccagtga ccatcacagg cctgactttc tgggactcca gctgccaggc tgaagacact 1200  
gacgaccatc ttgtctgag tagcgcctac tccagctcgc gcatgaaagt gacagccat 1260  
gtggtcagca atgaggtgat catcagtttc ccgtcaggct caccaccact tcggaaaaag 1320  
gtacagtga tcgacatgga cagcctctcc ttccagctgg gcctctacct cagcccgcac 1380  
ttctccagg catccaacac catcgaacta ggccagcagg ccttcgtaca ggtgagcgtg 1440  
tctccattga cctctgaggt cacagtcag ctagatagct gccatctgga cttggggccc 1500  
gaaggggaca tgggtggaact catccagagc cgaacagcca agggcagctg tgtgacettg 1560  
ctgtctccaa gccctgaagg tgacccacgc ttcagcttcc tctcgggt ctacatggtg 1620  
cccacacca ccgtggcac cctcagttgc aacttagctc tgcgcctag caccctgtcc 1680  
caggaagtct acaagacagt ctccatgcgc ctgaacatcg tcagccctga cctgtctggt 1740  
aaaggccttg tcttgcctc tgtactgggt atcacctttg gtgccttct gattggggcc 1800  
ctgctcacag ctgcactctg gtacatctat tctcacacac gtggccccag caagcgggag 1860

[0010]

```

cccgtggtgg cagtggtgc cccggcctcc tctgagagca gcagtaccaa ccacagcatc      1920
gggagcaccc agagcacccc ctgctccacc agcagcatgg cgtag                        1965

<210> 7
<211> 641
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 7

Met Asp Arg Gly Val Leu Pro Leu Pro Ile Thr Leu Leu Phe Val Ile
1          5          10          15

Tyr Ser Phe Val Pro Thr Thr Gly Leu Ala Glu Arg Val Gly Cys Asp
20          25          30

Leu Gln Pro Val Asp Pro Thr Arg Gly Glu Val Thr Phe Thr Thr Ser
35          40          45

Gln Val Ser Glu Gly Cys Val Ala Gln Ala Ala Asn Ala Val Arg Glu
50          55          60

Val His Val Leu Phe Leu Asp Phe Pro Gly Met Leu Ser His Leu Glu
65          70          75          80

Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Glu Thr Gln Glu Val
85          90          95

[0011] Phe Leu Val Leu Val Ser Asn Lys Asn Val Phe Val Lys Phe Gln Ala
100          105          110

Pro Glu Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asp Ser Ser Leu Val Ile Phe
115          120          125

Gln Gly Gln Pro Arg Val Asn Ile Thr Val Leu Pro Ser Leu Thr Ser
130          135          140

Arg Lys Gln Ile Leu Asp Trp Ala Ala Thr Lys Gly Ala Ile Thr Ser
145          150          155          160

Ile Ala Ala Leu Asp Asp Pro Gln Ser Ile Val Leu Gln Leu Gly Gln
165          170          175

Asp Pro Lys Ala Pro Phe Leu Cys Leu Pro Glu Ala His Lys Asp Met
180          185          190

Gly Ala Thr Leu Glu Trp Gln Pro Arg Ala Gln Thr Pro Val Gln Ser
195          200          205

Cys Arg Leu Glu Gly Val Ser Gly His Lys Glu Ala Tyr Ile Leu Arg
210          215          220

Ile Leu Pro Gly Ser Glu Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Met Met
225          230          235          240

Glu Leu Ser Cys Thr Ser Gly Asp Ala Ile Leu Ile Leu His Gly Pro
245          250          255

```

Pro Tyr Val Ser Trp Phe Ile Asp Ile Asn His Ser Met Gln Ile Leu  
 260 265 270  
 Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Val Lys Ile Phe Pro Gly Ser Lys Val Lys  
 275 280 285  
 Gly Val Glu Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Ile Ala Glu Ala Arg  
 290 295 300  
 Lys Leu Asn Ala Ser Ile Val Thr Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Val  
 305 310 315 320  
 Ser Asn Val Ser Leu Arg Ala Ser Ser Cys Gly Gly Val Phe Gln Thr  
 325 330 335  
 Thr Pro Ala Pro Val Val Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro  
 340 345 350  
 Val Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Pro Lys Cys Gly Asn Gln Val Met  
 355 360 365  
 Thr Leu Ala Leu Asn Lys Lys His Val Gln Thr Leu Gln Cys Thr Ile  
 370 375 380  
 Thr Gly Leu Thr Phe Trp Asp Ser Ser Cys Gln Ala Glu Asp Thr Asp  
 385 390 395 400  
 [0012] Asp His Leu Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Lys Val  
 405 410 415  
 Thr Ala His Val Val Ser Asn Glu Val Ile Ile Ser Phe Pro Ser Gly  
 420 425 430  
 Ser Pro Pro Leu Arg Lys Lys Val Gln Cys Ile Asp Met Asp Ser Leu  
 435 440 445  
 Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala Ser  
 450 455 460  
 Asn Thr Ile Glu Leu Gly Gln Gln Ala Phe Val Gln Val Ser Val Ser  
 465 470 475 480  
 Pro Leu Thr Ser Glu Val Thr Val Gln Leu Asp Ser Cys His Leu Asp  
 485 490 495  
 Leu Gly Pro Glu Gly Asp Met Val Glu Leu Ile Gln Ser Arg Thr Ala  
 500 505 510  
 Lys Gly Ser Cys Val Thr Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro  
 515 520 525  
 Arg Phe Ser Phe Leu Leu Arg Val Tyr Met Val Pro Thr Pro Thr Ala  
 530 535 540  
 Gly Thr Leu Ser Cys Asn Leu Ala Leu Arg Pro Ser Thr Leu Ser Gln

	545	550	555	560
	Glu Val Tyr Lys Thr Val Ser Met Arg Leu Asn Ile Val Ser Pro Asp	565	570	575
	Leu Ser Gly Lys Gly Leu Val Leu Pro Ser Val Leu Gly Ile Thr Phe	580	585	590
	Gly Ala Phe Leu Ile Gly Ala Leu Leu Thr Ala Ala Leu Trp Tyr Ile	595	600	605
	Tyr Ser His Thr Arg Glu Tyr Pro Lys Pro Pro Pro His Ser His Ser	610	615	620
	Lys Arg Ser Gly Pro Val His Thr Thr Pro Gly His Thr Gln Trp Ser	625	630	635
	Leu			640
	<210> 8 <211> 1929 <212> DNA <213> 小鼠			
	<400> 8 agcatggacc gtggcgtgct cctctgccc attaccctgc tgtttgtcat ctatagcttt			
	gtacccacaa caggtctcgc agaaagagtc ggctgtgac tacagcctgt ggacccacaca			
[0013]	aggggtgagg tgacgtttac caccagccag gtctccgagg gctgtgtagc tcaggctgcc			
	aatgctgtgc gtgaagtcca cgttctcttc ctggattttc ccggaatgct gtcacatctg			
	gagctgactc ttacggcctc caagcaaaat ggacaggaga cccaggaggt gttcttggtc			
	ctcgtttcga acaaaaatgt ctctgtgaag ttccaggccc cggaaatccc attgcacttg			
	gcctacgact ccagcctggg catcttccaa ggacagccaa gagtcaacat cacagtgcta			
	ccatccetta cctccaggaa acagatcttc gactgggcag ccaccaaggc cgccatcacc			
	tcgatatgag cactggatga cccccaagc atcgtctctc agttgggcca agacccaag			
	gcaccattct tgtgcttgcc agaagctcac aaggacatgg ggcacacact tgaatggcaa			
	ccacgagccc agaccccagt ccaaagctgt cgcttgggaag gtgtgtcttg ccacaaggag			
	gcctacatcc tgaggatcct gccaggttct gaggcgggc cccggacggt gaccgtaatg			
	atggaactga gttgcacatc tggggacgcc attctcatcc tgcattgtcc tccatattgc			
	tcctggttca tcgacatcaa ccacagcatg cagatcttga ccacagtgga atactccgtc			
	aagatctttc caggaagcaa ggtcaaagc gtggagctcc cagacacacc ccaaggcctg			
	atagcggagg cccgcaagct caatgccagc attgtcacct cctttgtaga gctccctctg			
	gtcagcaatg tctccctgag ggcctccagc tgcgggtggtg tgttcagac caccctgca			
	cccgttgtga ccacacctcc caaggacaca tgcagccccg tgctactcat gtcctgac			
	cagccaaagt gtggcaatca ggtcatgact ctggcactca ataaaaaaca cgtgcagact			
	ctccagtga ccatcacagg cctgactttc tgggactcca gctgccagc tgaagacact			
	gacgaccatc ttgtctgag taggcctac tccagctgcg gcatgaaagt gacagcccat			

```

gtgggtcagca atgaggtgat catcagtttc cgtcagget caccaccact tcggaaaaag      1320
gtacagtgcac tcgacatgga cagcctctcc ttccagctgg gcctctacct cagccccgcac      1380
ttctctcagg catccaacac catcgaacta ggccagcagg ccttcgtaca ggtgagcgtg      1440
tttccattga cctctgaggt cacagtccag ctagatagct gccatctgga cttggggccc      1500
gaaggggaca tgggtggaact catccagagc cgaacagcca agggcagctg tgtgacctg      1560
ctgtctccaa gccctgaagg tgacccacgc ttcagcttcc tctctcgggt ctacatggtg      1620
cccacaccca ccgctggcac cctcagttgc aactagctc tgcgccctag cactttgtcc      1680
caggaagtct acaagacagt ctccatgcgc ctgaacatcg tcagccctga cctgtctggt      1740
aaaggccttg tctgcctc tgtactgggt atcaccttg gtgccttct gattggggcc      1800
ctgtctcacag ctgcactctg gtacatctat tctcacacac gtgagtatcc caagcctcca      1860
ccccattccc acagcaagcg ctcaggcccc gtccacacca cccgggggca caccagtg      1920
agcctctga                                     1929

```

```

<210> 9
<211> 561
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 9

```

```

Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln Pro Val Gly Pro Glu Arg Gly Glu
1          5          10          15

```

[0014]

```

Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala
20          25          30

```

```

Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr
35          40          45

```

```

Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly
50          55          60

```

```

Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val
65          70          75          80

```

```

Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn
85          90          95

```

```

Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu
100         105         110

```

```

Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg
115         120         125

```

```

Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu
130         135         140

```

```

Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu
145         150         155         160

```

```

Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro
165         170         175

```

Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu  
180 185 190

Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr  
195 200 205

Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala  
210 215 220

Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala  
225 230 235 240

Asn His Asn Met Gln Ile Trp Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile  
245 250 255

Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg Gly Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln  
260 265 270

Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg Met Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser  
275 280 285

Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala Ser Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser  
290 295 300

Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr Ser Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro  
305 310 315 320

[0015] Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro Glu Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Thr  
325 330 335

Lys Cys Ala Asp Asp Ala Met Thr Leu Val Leu Lys Lys Glu Leu Val  
340 345 350

Ala His Leu Lys Cys Thr Ile Thr Gly Leu Thr Phe Trp Asp Pro Ser  
355 360 365

Cys Glu Ala Glu Asp Arg Gly Asp Lys Phe Val Leu Arg Ser Ala Tyr  
370 375 380

Ser Ser Cys Gly Met Gln Val Ser Ala Ser Met Ile Ser Asn Glu Ala  
385 390 395 400

Val Val Asn Ile Leu Ser Ser Ser Ser Pro Gln Arg Lys Lys Val His  
405 410 415

Cys Leu Asn Met Asp Ser Leu Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser  
420 425 430

Pro His Phe Leu Gln Ala Ser Asn Thr Ile Glu Pro Gly Gln Gln Ser  
435 440 445

Phe Val Gln Val Arg Val Ser Pro Ser Val Ser Glu Phe Leu Leu Gln  
450 455 460

Leu Asp Ser Cys His Leu Asp Leu Gly Pro Glu Gly Gly Thr Val Glu  
465 470 475 480



Leu Ile Gln Gly Arg Ala Ala Lys Gly Asn Cys Val Ser Leu Leu Ser  
485 490 495

Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro Arg Phe Ser Phe Leu Leu His Phe Tyr  
500 505 510

Thr Val Pro Ile Pro Lys Thr Gly Thr Leu Ser Cys Thr Val Ala Leu  
515 520 525

Arg Pro Lys Thr Gly Ser Gln Asp Gln Glu Val His Arg Thr Val Phe  
530 535 540

Met Arg Leu Asn Ile Ile Ser Pro Asp Leu Ser Gly Cys Thr Ser Lys  
545 550 555 560

Gly

<210> 10  
<211> 555  
<212> PRT  
<213> 小鼠

<400> 10

Glu Arg Val Gly Cys Asp Leu Gln Pro Val Asp Pro Thr Arg Gly Glu  
1 5 10 15

[0016]

Val Thr Phe Thr Thr Ser Gln Val Ser Glu Gly Cys Val Ala Gln Ala  
20 25 30

Ala Asn Ala Val Arg Glu Val His Val Leu Phe Leu Asp Phe Pro Gly  
35 40 45

Met Leu Ser His Leu Glu Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly  
50 55 60

Thr Glu Thr Arg Glu Val Phe Leu Val Leu Val Ser Asn Lys Asn Val  
65 70 75 80

Phe Val Lys Phe Gln Ala Pro Glu Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asp  
85 90 95

Ser Ser Leu Val Ile Phe Gln Gly Gln Pro Arg Val Asn Ile Thr Val  
100 105 110

Leu Pro Ser Leu Thr Ser Arg Lys Gln Ile Leu Asp Trp Ala Ala Thr  
115 120 125

Lys Gly Ala Ile Thr Ser Ile Ala Ala Leu Asp Asp Pro Gln Ser Ile  
130 135 140

Val Leu Gln Leu Gly Gln Asp Pro Lys Ala Pro Phe Leu Cys Leu Pro  
145 150 155 160

Glu Ala His Lys Asp Met Gly Ala Thr Leu Glu Trp Gln Pro Arg Ala  
165 170 175

Gln Thr Pro Val Gln Ser Cys Arg Leu Glu Gly Val Ser Gly His Lys  
 180 185 190  
 Glu Ala Tyr Ile Leu Arg Ile Leu Pro Gly Ser Glu Ala Gly Pro Arg  
 195 200 205  
 Thr Val Thr Val Met Met Glu Leu Ser Cys Thr Ser Gly Asp Ala Ile  
 210 215 220  
 Leu Ile Leu His Gly Pro Pro Tyr Val Ser Trp Phe Ile Asp Ile Asn  
 225 230 235 240  
 His Ser Met Gln Ile Leu Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Val Lys Ile Phe  
 245 250 255  
 Pro Gly Ser Lys Val Lys Gly Val Glu Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly  
 260 265 270  
 Leu Ile Ala Glu Ala Arg Lys Leu Asn Ala Ser Ile Val Thr Ser Phe  
 275 280 285  
 Val Glu Leu Pro Leu Val Ser Asn Val Ser Leu Arg Ala Ser Ser Cys  
 290 295 300  
 Gly Gly Val Phe Gln Thr Thr Pro Ala Pro Val Val Thr Thr Pro Pro  
 305 310 315 320  
 [0017] Lys Asp Thr Cys Ser Pro Val Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Pro Lys  
 325 330 335  
 Cys Gly Asn Gln Val Met Thr Leu Ala Leu Asn Lys Lys His Val Gln  
 340 345 350  
 Thr Leu Gln Cys Thr Ile Thr Gly Leu Thr Phe Trp Asp Ser Ser Cys  
 355 360 365  
 Gln Ala Glu Asp Thr Asp Asp His Leu Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ser  
 370 375 380  
 Ser Cys Gly Met Lys Val Thr Ala His Val Val Ser Asn Glu Val Ile  
 385 390 395 400  
 Ile Ser Phe Pro Ser Gly Ser Pro Pro Leu Arg Lys Lys Val Gln Cys  
 405 410 415  
 Ile Asp Met Asp Ser Leu Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro  
 420 425 430  
 His Phe Leu Gln Ala Ser Asn Thr Ile Glu Leu Gly Gln Gln Ala Phe  
 435 440 445  
 Val Gln Val Ser Val Ser Pro Leu Thr Ser Glu Val Thr Val Gln Leu  
 450 455 460  
 Asp Ser Cys His Leu Asp Leu Gly Pro Glu Gly Asp Met Val Glu Leu

465	470	475	480
Ile Gln Ser Arg Thr Ala Lys Gly Ser Cys Val Thr Leu Leu Ser Pro	485	490	495
Ser Pro Glu Gly Asp Pro Arg Phe Ser Phe Leu Leu Arg Val Tyr Met	500	505	510
Val Pro Thr Pro Thr Ala Gly Thr Leu Ser Cys Asn Leu Ala Leu Arg	515	520	525
Pro Ser Thr Leu Ser Gln Glu Val Tyr Lys Thr Val Ser Met Arg Leu	530	535	540
Asn Val Val Ser Pro Asp Leu Ser Gly Lys Gly	545	550	555
<210> 11			
<211> 233			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 11			
Gly Gly Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	1	5	10 15
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	20	25	30
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val	35	40	45
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr	50	55	60
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	65	70	75 80
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	85	90	95
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	100	105	110
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	115	120	125
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met	130	135	140
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	145	150	155 160
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	165	170	175
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			

[0018]

	180	185	190
	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val 195 200 205		
	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln 210 215 220		
	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 225 230		
	<210> 12 <211> 225 <212> PRT <213> 人		
	<400> 12		
	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro 1 5 10 15		
	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser 20 25 30		
	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp 35 40 45		
	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn 50 55 60		
[0019]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val 65 70 75 80		
	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu 85 90 95		
	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys 100 105 110		
	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr 115 120 125		
	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr 130 135 140		
	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu 145 150 155 160		
	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu 165 170 175		
	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys 180 185 190		
	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu 195 200 205		
	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		

	210	215	220
	Lys 225		
	<210> 13 <211> 21 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 蜜蜂蜂毒肽前导序列		
	<400> 13		
	Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile 1 5 10 15		
	Ser Tyr Ile Tyr Ala 20		
	<210> 14 <211> 22 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 组织纤溶酶原激活物前导序列		
	<400> 14		
[0020]	Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly 1 5 10 15		
	Ala Val Phe Val Ser Pro 20		
	<210> 15 <211> 25 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 天然人ENG前导序列		
	<400> 15		
	Met Asp Arg Gly Thr Leu Pro Leu Ala Val Ala Leu Leu Leu Ala Ser 1 5 10 15		
	Cys Ser Leu Ser Pro Thr Ser Leu Ala 20 25		
	<210> 16 <211> 820 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 重组多肽		
	<400> 16		
	Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly 1 5 10 15		

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln  
20 25 30

Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val  
35 40 45

Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His  
50 55 60

Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr  
65 70 75 80

Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu  
85 90 95

Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly  
100 105 110

Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu  
115 120 125

Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln  
130 135 140

Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu  
145 150 155 160

[0021] Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly  
165 170 175

Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr  
180 185 190

Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu  
195 200 205

Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro  
210 215 220

Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser  
225 230 235 240

Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro  
245 250 255

Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala Asn His Asn Met Gln Ile Trp Thr  
260 265 270

Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg Gly  
275 280 285

Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg Met  
290 295 300

Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala Ser  
305 310 315 320

Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr Ser  
 325 330 335  
 Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro Glu  
 340 345 350  
 Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Thr Lys Cys Ala Asp Asp Ala Met Thr  
 355 360 365  
 Leu Val Leu Lys Lys Glu Leu Val Ala His Leu Lys Cys Thr Ile Thr  
 370 375 380  
 Gly Leu Thr Phe Trp Asp Pro Ser Cys Glu Ala Glu Asp Arg Gly Asp  
 385 390 395 400  
 Lys Phe Val Leu Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Gln Val Ser  
 405 410 415  
 Ala Ser Met Ile Ser Asn Glu Ala Val Val Asn Ile Leu Ser Ser Ser  
 420 425 430  
 Ser Pro Gln Arg Lys Lys Val His Cys Leu Asn Met Asp Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala Ser Asn  
 450 455 460  
 [0022] Thr Ile Glu Pro Gly Gln Gln Ser Phe Val Gln Val Arg Val Ser Pro  
 465 470 475 480  
 Ser Val Ser Glu Phe Leu Leu Gln Leu Asp Ser Cys His Leu Asp Leu  
 485 490 495  
 Gly Pro Glu Gly Gly Thr Val Glu Leu Ile Gln Gly Arg Ala Ala Lys  
 500 505 510  
 Gly Asn Cys Val Ser Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro Arg  
 515 520 525  
 Phe Ser Phe Leu Leu His Phe Tyr Thr Val Pro Ile Pro Lys Thr Gly  
 530 535 540  
 Thr Leu Ser Cys Thr Val Ala Leu Arg Pro Lys Thr Gly Ser Gln Asp  
 545 550 555 560  
 Gln Glu Val His Arg Thr Val Phe Met Arg Leu Asn Ile Ile Ser Pro  
 565 570 575  
 Asp Leu Ser Gly Cys Thr Ser Lys Gly Thr Gly Gly Gly Pro Lys Ser  
 580 585 590  
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 595 600 605  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

	610	615	620
	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 625 630 635 640		
	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 645 650 655		
	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 660 665 670		
	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 675 680 685		
	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro 690 695 700		
	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 705 710 715 720		
	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val 725 730 735		
	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 740 745 750		
[0023]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 755 760 765		
	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 770 775 780		
	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 785 790 795 800		
	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 805 810 815		
	Ser Pro Gly Lys 820		
	<210> 17 <211> 2463 <212> DNA <213> 人工序列		
	<220> <223> 重组多核苷酸		
	<400> 17 atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60 tcgcccggcg ccgaacacgt ccattgtgac cttcagcctg tgggccccga gagggacgag 120 gtgacatata ccactagcca ggtctcgaag ggctgcgtgg ctcaggcccc caatgccatc 180 cttgaagtcc atgtcctctt cctggagttc ccaacgggcc cgtcacagct ggagctgact 240 ctccaggcat ccaagcaaaa tggcacctgg ccccgagagg tgcttctggt cctcagtgt 300		



	aacagcagtg tcttctgca tctccaggcc ctgggaatcc cactgcactt ggcctacaat	360
	tccagcctgg tcaccttcca agagcccccg ggggtcaaca ccacagagct gccatccttc	420
	cccaagaccc agatccttga gtgggcagct gagaggggcc ccatcacctc tgctgctgag	480
	ctgaatgacc ccagagcat cctcttccga ctgggccaag ccaggggtc actgtccttc	540
	tgcattgtgg aagccagcca ggacatgggc cgcacgctcg agtggcggcc gcgtactcca	600
	gccttgggtcc ggggttgcca cttggaaggc gtggccggcc acaaggaggc gcacatcctg	660
	agggtcctgc cgggccactc ggccggggcc cggacgggtga cggtaagggt ggaactgagc	720
	tgcgcacccg gggatctcga tgcctctctc atcctgcagg gtcccccta cgtgtcctgg	780
	ctcatcgacg ccaaccacaa catgcagatc tggaccactg gagaatactc cttcaagatc	840
	tttccagaga aaaacattcg tggtttcaag ctcccagaca cactcaagg cctcctgggg	900
	gaggccccga tgctcaatgc cagcattgtg gcctccttcg tggagctacc gctggccagc	960
	attgtctcac ttcatgcctc cagctgcggt ggtaggctgc agacctcacc cgcaccgatc	1020
	cagaccactc ctcccaagga cacttgtagc ccggagctgc tcatgtcctt gatccagaca	1080
	aagtgtgccg acgacgcat gaccttggtc ctaaagaaag agcttgttgc gcatttgaag	1140
	tgcaccatca cgggcctgac cttctgggac ccagctgtg aggcagagga caggggtgac	1200
	aagtttgtct tgcgcagtgc ttactccagc tgtggcatgc aggtgtcagc aagtatgac	1260
	agcaatgagg cgggtgtcaa tatctgtcgc agctcatcac cacagcggaa aaaggtgcac	1320
	tgcctcaaca tggacagcct ctctttccag ctgggcctct acctcagccc acatttctc	1380
[0024]	caggcctcca acaccatcga gccggggcag cagagctttg tgcaggtcag agtgtcccca	1440
	tccgtctccg agttcctgct ccagtttagc agctgccacc tggacttggg gcctgagggg	1500
	ggcaccgtgg aactcatcca gggccgggag gccaaaggca actgtgtgag cctgtgttcc	1560
	ccaagccccg aggggtgacc gcgcttcagc ttcctcctcc actttacac agtaccata	1620
	ccaaaaccg gcacctcag ctgcacggtc gccctgcgtc ccaagaccgg gtctcaagac	1680
	caggaagtcc ataggactgt cttcatgcgc ttgaacatca tcagccctga cctgtctggt	1740
	tgcacaagca aaggcacggg tgggtgaccc aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca	1800
	ccgtgccag cactgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc ccaaaaccc	1860
	aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc	1920
	cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc	1980
	aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc	2040
	gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc	2100
	ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag	2160
	gtglacaccc tgcctccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggctag cctgacctgc	2220
	ctgggtcaaag gcttttatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg	2280
	gagaacaact acaagaccac gcctccctgt ctggactccg acggctcctt cttcctctat	2340
	agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg	2400
	atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag cagaagagcc tctcctgtc cccgggtaaa	2460
	tga	2463

<210> 18  
 <211> 814  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 重组多肽

<400> 18

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln  
 20 25 30

Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val  
 35 40 45

Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His  
 50 55 60

Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr  
 65 70 75 80

Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu  
 85 90 95

[0025]

Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly  
 100 105 110

Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu  
 115 120 125

Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln  
 130 135 140

Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu  
 145 150 155 160

Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly  
 165 170 175

Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr  
 180 185 190

Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu  
 195 200 205

Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro  
 210 215 220

Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser  
 225 230 235 240

Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro  
 245 250 255

Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala Asn His Asn Met Gln Ile Trp Thr  
 260 265 270  
 Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg Gly  
 275 280 285  
 Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg Met  
 290 295 300  
 Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala Ser  
 305 310 315 320  
 Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr Ser  
 325 330 335  
 Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro Glu  
 340 345 350  
 Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Thr Lys Cys Ala Asp Asp Ala Met Thr  
 355 360 365  
 Leu Val Leu Lys Lys Glu Leu Val Ala His Leu Lys Cys Thr Ile Thr  
 370 375 380  
 Gly Leu Thr Phe Trp Asp Pro Ser Cys Glu Ala Glu Asp Arg Gly Asp  
 385 390 395 400  
 [0026] Lys Phe Val Leu Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Gln Val Ser  
 405 410 415  
 Ala Ser Met Ile Ser Asn Glu Ala Val Val Asn Ile Leu Ser Ser Ser  
 420 425 430  
 Ser Pro Gln Arg Lys Lys Val His Cys Leu Asn Met Asp Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala Ser Asn  
 450 455 460  
 Thr Ile Glu Pro Gly Gln Gln Ser Phe Val Gln Val Arg Val Ser Pro  
 465 470 475 480  
 Ser Val Ser Glu Phe Leu Leu Gln Leu Asp Ser Cys His Leu Asp Leu  
 485 490 495  
 Gly Pro Glu Gly Gly Thr Val Glu Leu Ile Gln Gly Arg Ala Ala Lys  
 500 505 510  
 Gly Asn Cys Val Ser Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro Arg  
 515 520 525  
 Phe Ser Phe Leu Leu His Phe Tyr Thr Val Pro Ile Pro Lys Thr Gly  
 530 535 540  
 Thr Leu Ser Cys Thr Val Ala Leu Arg Pro Lys Thr Gly Ser Gln Asp  
 545 550 555 560

Gln	Glu	Val	His	Arg	Thr	Val	Phe	Met	Arg	Leu	Asn	Ile	Ile	Ser	Pro
				565					570						575
Asp	Leu	Ser	Gly	Cys	Thr	Ser	Lys	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	His	Thr
			580					585					590		
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
		595					600					605			
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
	610					615					620				
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
625					630					635					640
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
				645					650					655	
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
			660					665					670		
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
		675					680					685			
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Val	His	Asn	Ala
	690					695					700				
[0027]	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
	705					710					715				720
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
				725					730					735	
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Asn	Gly
			740					745					750		
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
		755					760					765			
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
	770					775					780				
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
785					790					795					800
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
				805					810						
<210>	19														
<211>	821														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	重组多肽														
<400>	19														

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Gly Glu Arg Val Gly Cys Asp Leu Gln  
 20 25 30  
 Pro Val Asp Pro Thr Arg Gly Glu Val Thr Phe Thr Thr Ser Gln Val  
 35 40 45  
 Ser Glu Gly Cys Val Ala Gln Ala Ala Asn Ala Val Arg Glu Val His  
 50 55 60  
 Val Leu Phe Leu Asp Phe Pro Gly Met Leu Ser His Leu Glu Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Glu Thr Gln Glu Val Phe Leu  
 85 90 95  
 Val Leu Val Ser Asn Lys Asn Val Phe Val Lys Phe Gln Ala Pro Glu  
 100 105 110  
 Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asp Ser Ser Leu Val Ile Phe Gln Gly  
 115 120 125  
 Gln Pro Arg Val Asn Ile Thr Val Leu Pro Ser Leu Thr Ser Arg Lys  
 130 135 140  
 [0028] Gln Ile Leu Asp Trp Ala Ala Thr Lys Gly Ala Ile Thr Ser Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Ala Leu Asp Asp Pro Gln Ser Ile Val Leu Gln Leu Gly Gln Asp Pro  
 165 170 175  
 Lys Ala Pro Phe Leu Cys Leu Pro Glu Ala His Lys Asp Met Gly Ala  
 180 185 190  
 Thr Leu Glu Trp Gln Pro Arg Ala Gln Thr Pro Val Gln Ser Cys Arg  
 195 200 205  
 Leu Glu Gly Val Ser Gly His Lys Glu Ala Tyr Ile Leu Arg Ile Leu  
 210 215 220  
 Pro Gly Ser Glu Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Met Met Glu Leu  
 225 230 235 240  
 Ser Cys Thr Ser Gly Asp Ala Ile Leu Ile Leu His Gly Pro Pro Tyr  
 245 250 255  
 Val Ser Trp Phe Ile Asp Ile Asn His Ser Met Gln Ile Leu Thr Thr  
 260 265 270  
 Gly Glu Tyr Ser Val Lys Ile Phe Pro Gly Ser Lys Val Lys Gly Val  
 275 280 285  
 Glu Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Ile Ala Glu Ala Arg Lys Leu  
 290 295 300

Asn Ala Ser Ile Val Thr Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Val Ser Asn  
 305 310 315 320  
 Val Ser Leu Arg Ala Ser Ser Cys Gly Gly Val Phe Gln Thr Thr Pro  
 325 330 335  
 Ala Pro Val Val Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro Val Leu  
 340 345 350  
 Leu Met Ser Leu Ile Gln Pro Lys Cys Gly Asn Gln Val Met Thr Leu  
 355 360 365  
 Ala Leu Asn Lys Lys His Val Gln Thr Leu Gln Cys Thr Ile Thr Gly  
 370 375 380  
 Leu Thr Phe Trp Asp Ser Ser Cys Gln Ala Glu Asp Thr Asp Asp His  
 385 390 395 400  
 Leu Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Lys Val Thr Ala  
 405 410 415  
 His Val Val Ser Asn Glu Val Ile Ile Ser Phe Pro Ser Gly Ser Pro  
 420 425 430  
 Pro Leu Arg Lys Lys Val Gln Cys Ile Asp Met Asp Ser Leu Ser Phe  
 435 440 445  
 [0029] Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala Ser Asn Thr  
 450 455 460  
 Ile Glu Leu Gly Gln Gln Ala Phe Val Gln Val Ser Val Ser Pro Leu  
 465 470 475 480  
 Thr Ser Glu Val Thr Val Gln Leu Asp Ser Cys His Leu Asp Leu Gly  
 485 490 495  
 Pro Glu Gly Asp Met Val Glu Leu Ile Gln Ser Arg Thr Ala Lys Gly  
 500 505 510  
 Ser Cys Val Thr Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro Arg Phe  
 515 520 525  
 Ser Phe Leu Leu Arg Val Tyr Met Val Pro Thr Pro Thr Ala Gly Thr  
 530 535 540  
 Leu Ser Cys Asn Leu Ala Leu Arg Pro Ser Thr Leu Ser Gln Glu Val  
 545 550 555 560  
 Tyr Lys Thr Val Ser Met Arg Leu Asn Ile Val Ser Pro Asp Leu Ser  
 565 570 575  
 Gly Lys Gly Thr Gly Gly Gly Glu Pro Arg Val Pro Ile Thr Gln Asn  
 580 585 590  
 Pro Cys Pro Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro Cys Ala Ala Pro Asp Leu  
 595 600 605

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val  
 610 615 620  
 Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 625 630 635 640  
 Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val  
 645 650 655  
 Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser  
 660 665 670  
 Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met  
 675 680 685  
 Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ser  
 690 695 700  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg Gly Pro Val Arg Ala Pro  
 705 710 715 720  
 Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Met Thr Lys Lys Glu  
 725 730 735  
 Phe Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala  
 740 745 750  
 [0030] Val Asp Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr  
 755 760 765  
 Ala Thr Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu  
 770 775 780  
 Arg Val Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser  
 785 790 795 800  
 Val Val His Glu Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Ile Ser  
 805 810 815  
 Arg Ser Leu Gly Lys  
 820

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 2466

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 重组多核苷酸

&lt;400&gt; 20

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt	60
tcgcccggcg gggaaagagt cggtgtgat ctacagcctg tggacccac aaggggtgag	120
gtgacgttta ccaccagcca ggtctccgag ggctgtgtag ctgaggtgc caatgctgtg	180
cgtgaagtcc acgttctctt cctggatttt cccggaatgc tgtcacatct ggagctgact	240

	cttcaggcat ccaagcaaaa tggcacggag acccaggagg tgttcctggt cctcgtttcg	300
	aacaaaaatg tcttcgtgaa gttccaggcc ccggaatcc cattgcactt ggcctacgac	360
	tccagcctgg tcatcttcca aggacagcca agagtcaaca tcacagtgt accatccctt	420
	acctccagga aacagatcct cgactgggca gccaccaagg gcgcatacac ctcgatagca	480
	gcactggatg acccccaaag catcgtcttc cagttgggcc aagacccaaa ggcaccattc	540
	ttgtgcttgc cagaagctca caaggacatg ggcgccacac ttgaatggca accacgagcc	600
	cagaccccag tccaaagctg tcgcttgga ggtgtgtctg gccacaagga ggcctacatc	660
	ctgaggatcc tgccagggtc tgaggccggg ccccggaagg tgaccgtaat gatggaactg	720
	agttgcacat ctggggacgc cattctcctc ctgcatggtc ctccataigt ctcttggttc	780
	atcgacatca accacagcat gcagatcttg accacagggt aatactccgt caagatcttt	840
	ccaggaagca aggtcaaagg cgtggagctc ccagacacac cccaaggcct gatagcggag	900
	gcccgaagc tcaatgccag cattgtcacc tctttgttag agctccctct ggtcagcaat	960
	gtctccctga gggcctccag ctgcgggtgt gtgttccaga ccacctctgc acccgttgtg	1020
	accacacctc ccaaggacac atgcagcccc gtgctactca tgtccctgat ccagccaaag	1080
	tgtggcaatc aggtcatgac tctggcactc aataaaaaac acgtgcagac tctccagtgc	1140
	accatcacag gcctgacttt ctgggactcc agctgccagg ctgaagacac tgacgacct	1200
	cttgtctga gtagcgcta ctccagtgc ggcatgaaag tgacagccca tgttggtcagc	1260
	aatgaggtga tcatcagttt cccgtcagge tcaccaccac ttcggaaaaa ggtacagtgc	1320
[0031]	atcgacatgg acagcctctc ctccagctg ggcctctacc tcagcccgca ctctctccag	1380
	gcatccaaca ccatcgaact aggccagcag gccttcgtac aggtgagcgt gtctccattg	1440
	acctctgagg tcacagtcca gctagatagc tgccatctgg acttggggcc cgaaggggac	1500
	atggtggaac tcatccagag ccgaacagcc aagggcagct gtgtgacctt gctgtctcca	1560
	agccctgaag gtgaccacg ctccagcttc ctctccggg tctacatggt gccacaccc	1620
	accgctggca cctcagttg caacttagct ctgcgccta gcacctgtc ccaggaagtc	1680
	tacaagacag tctccatgcg cctgaacatc gtcagccctg acctgtctgg taaaggcacc	1740
	ggtgggggtg agcccagagt gcccataaca cagaaccctt gtcctccact caaagagtgt	1800
	cccccatgcg cagctccaga cctcttgggt ggaccatccg tcttcatctt cctccaaag	1860
	atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc cccatggtca catgtgtggt ggtggatgtg	1920
	agcgaggatg acccagacgt ccagatcagc tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca	1980
	gtcagacac aaaccatag agaggattac aacagtactc tccgggtggt cagtgcctc	2040
	cccatccagc accaggactg gatgagtggc aaggagtcca aatgcaaggt caacaacaga	2100
	gccctcccat ccccatcga gaaaaccatc tcaaaaccca gagggccagt aagagctcca	2160
	caggtatatg tcttgcctcc accagcagaa gagatgacta agaaagagtt cagtctgacc	2220
	tgcatacga caggtctctt acctgccgaa attgctgtgg actggaccag caatgggcgt	2280
	acagagcaaa actacaagaa caccgcaaca gtccctggact ctgatgggtc ttacttcatg	2340
	tacagcaagc tcagagtaca aaagagcact tgggaaagag gaagtctttt cgcctgctca	2400
	gtggteacg agggctctga caatcacctt acgactaaga ccatctccc gteictgggt	2460



aaatga	2466
<210> 21	
<211> 671	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 重组多肽	
<400> 21	
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly	
1 5 10 15	
Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln	
20 25 30	
Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val	
35 40 45	
Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His	
50 55 60	
Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr	
65 70 75 80	
Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu	
85 90 95	
[0032] Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly	
100 105 110	
Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu	
115 120 125	
Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln	
130 135 140	
Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu	
145 150 155 160	
Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly	
165 170 175	
Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr	
180 185 190	
Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu	
195 200 205	
Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro	
210 215 220	
Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser	
225 230 235 240	
Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro	
245 250 255	

Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala Asn His Asn Met Gln Ile Trp Thr  
 260 265 270  
 Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg Gly  
 275 280 285  
 Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg Met  
 290 295 300  
 Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala Ser  
 305 310 315 320  
 Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr Ser  
 325 330 335  
 Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro Glu  
 340 345 350  
 Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Thr Lys Cys Ala Asp Asp Ala Met Thr  
 355 360 365  
 Leu Val Leu Lys Lys Glu Leu Val Ala His Leu Lys Cys Thr Ile Thr  
 370 375 380  
 Gly Leu Thr Phe Trp Asp Pro Ser Cys Glu Ala Glu Asp Arg Gly Asp  
 385 390 395 400  
 [0033] Lys Phe Val Leu Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Gln Val Ser  
 405 410 415  
 Ala Ser Met Ile Ser Asn Glu Ala Val Val Asn Ile Leu Ser Ser Ser  
 420 425 430  
 Ser Pro Gln Arg Thr Gly Gly Gly Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
 435 440 445  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 450 455 460  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 465 470 475 480  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 485 490 495  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 500 505 510  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 515 520 525  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 530 535 540  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

545	550	555	560
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	565	570	575
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	580	585	590
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn	595	600	605
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	610	615	620
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	625	630	635
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	645	650	655
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	660	665	670
<210> 22			
<211> 2016			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
[0034] <220>			
<223> 重组多核苷酸			
<400> 22			
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt			60
tcgcccggcg ccgaacacgt ccattgtgac cttcagcctg tgggccccga gagggacgag			120
gtgacatata ccactagcca ggtctcgaag ggtcgcgtgg ctcaggcccc caatgccatc			180
cttgaagtcc atgtcctctt cctggagttc ccaacgggccc cgtcacagct ggagctgact			240
ctccaggcat ccaagcaaaa tggcacctgg ccccagagagg tgcttctggt cctcagtgtc			300
aacagcagtg tcttcttgca tctccaggcc ctgggaatcc cactgcactt ggctacaaat			360
tccagcctgg tcaccttcca agagcccccg ggggtcaaca ccacagagct gccatccttc			420
ccaagaccc agatccttga gtgggcagct gagaggggccc ccatcacctc tgctgctgag			480
ctgaatgacc cccagagcat cctcctccga ctgggcccaag cccaggggtc actgtccttc			540
tgcatgtctg aagccagcca ggacatgggc cgcacgctcg agtggcgccc gcgtactcca			600
gccttggctc ggggctgcca cttggaaggc gtggccggcc acaaggaggc gcacatcctg			660
agggctctgc cgggccactc ggccgggccc cggacgggtg cgggtgaaggt ggaactgagc			720
tgcgcacccc gggatctcga tgccgtcctc atcctgcagg gtcccccta cgtgtcctgg			780
ctcatcgacg ccaaccacaa catgcagatc tggaccactg gagaatactc cttcaagatc			840
tttccagaga aaaacattcg tggttcaag ctcccagaca cactcaagg cctcctgggg			900
gagggccgga tgetcaatgc cagcattgtg gcatecttcg tggagctacc getggccagc			960
attgtctcac ttcattgcctc cagctgcggg ggtaggctgc agacctcacc cgcaccgatc			1020

```

cagaccactc ctccaagga cacttgtagc cggagctgc tcatgtcctt gatccagaca    1080
aagtgtgccg acgacgccat gacctggta ctaaagaaag agcttgttgc gcatttgaag    1140
tgcaccatca cgggcctgac cttctgggac ccagctgtg aggcagagga caggggtgac    1200
aagtttgtct tgcgcagtgc ttactccagc tgtggcatgc aggtgtcagc aagtatgatc    1260
agcaatgagg cgggtgtcaa taccctgtcg agctcatcac cacagcggac cgggtgtgga    1320
cccaaacttt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg    1380
ggaccgtcag tcttctcttt cccccaaaa ccaaggaca cctcatgat ctcccgacc    1440
cctgaggtea catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttaac    1500
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac    1560
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc    1620
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gcctcccag ccccatcga gaaaaccatc    1680
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccgagg    1740
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtea aaggttcta tccagcgac    1800
atgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccgagaaca actacaagac cagcctccc    1860
gtgtggact ccgacggctc cttctcttc tatagcaagc tcaccgtgga caagacagg    1920
tggcagcagg ggaactctt ctcatgtctc gtgatcatg aggtcttga caaccactac    1980
acgcagaaga gcctctcct gtccccgggt aaatga                                2016

```

[0035]

<210> 23  
 <211> 606  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 重组多肽

<400> 23

```

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1          5          10          15

```

```

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln
          20          25          30

```

```

Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val
          35          40          45

```

```

Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His
50          55          60

```

```

Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr
65          70          75          80

```

```

Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu
          85          90          95

```

```

Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly
100          105          110

```

```

Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu
115          120          125

```

Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln  
 130 135 140  
 Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu  
 145 150 155 160  
 Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly  
 165 170 175  
 Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr  
 180 185 190  
 Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala  
 195 200 205  
 Ala Glu Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu Leu Arg Leu Gly Gln Ala  
 210 215 220  
 Gln Gly Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu Ala Ser Gln Asp Met Gly  
 225 230 235 240  
 Arg Thr Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro Ile Leu Gln Gly Pro Pro  
 245 250 255  
 Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala Asn His Asn Met Gln Ile Trp Thr  
 260 265 270  
 [0036] Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg Gly  
 275 280 285  
 Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg Met  
 290 295 300  
 Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala Ser  
 305 310 315 320  
 Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr Ser  
 325 330 335  
 Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro Glu  
 340 345 350  
 Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Thr Lys Cys Ala Asp Asp Ala Met Thr  
 355 360 365  
 Leu Val Leu Lys Lys Glu Leu Val Ala Thr Gly Gly Gly Thr His Thr  
 370 375 380  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 385 390 395 400  
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 405 410 415  
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

	420	425	430
	Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 435 440 445		
	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 450 455 460		
	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 465 470 475 480		
	Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser 485 490 495		
	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 500 505 510		
	Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 515 520 525		
	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 530 535 540		
	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp 545 550 555 560		
[0037]	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp 565 570 575		
	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His 580 585 590		
	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 595 600 605		
	<210> 24 <211> 1821 <212> DNA <213> 人工序列		
	<220> <223> 重组多核苷酸		
	<400> 24 atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60 tcgccccgcg ccgaacacgt ccattgtgac cttcagcctg tgggccccga gagggacgag 120 gtgacatata ccactagcca ggtctcgaag ggctgcgtgg ctcaggcccc caatgccatc 180 cttgaagtcc atgtctcttt cctggagttc ccaacgggccc cgtcacagct ggagctgact 240 ctccaggcat ccaagcaaaa tggcacctgg ccccgagagg tgcttctggt cctcagtgtg 300 aacagcagtg tcttcttgca tctccaggcc ctgggaatcc cactgcactt ggcctacaat 360 tecagcctgg tcaccttcca agagcccccg ggggtcaaca ccacagagct gccatccttc 420 cccaagaccc agatccttga gtgggcagct gagaggggccc ccatcacctc tgctgctgag 480 ctgaatgacc cccagagcat cctctccga ctgggccaag cccaggggtc actgtccttc 540		

	tgcatgctgg aagccagcca ggacatgggc cgcacgctcg agtggcggcc gcgtactcca	600
	gccttggtcc ggggctgcca cttggaaggc gtggccggcc acaaggaggc gcacatcctg	660
	agggtcctgc cgggcccactc ggccggggccc cggacgggtga cggatgaaggt ggaactgagc	720
	tgcgcacccg gggatctcga tgccgtctctc atcctgcagg gtccccctta cgtgtcctgg	780
	ctcatcgacg ccaaccacaa catgcagatc tggaccactg gagaatactc ctccaagatc	840
	tttccagaga aaaacattcg ttgcttcaag ctcccagaca cacctcaagg cctcctgggg	900
	gaggcccgga tgctcaatgc cagcattgtg gcatccttcg tggagctacc gctggccagc	960
	attgtctcac ttcatgcctc cagctgcggg gtaggctgc agacctcacc cgcaccgatc	1020
	cagaccactc ctcccagga cacttgtagc cgggagctgc tcatgtcctt gatccagaca	1080
	aagtgtgccg acgacgccat gacctggta ctaaaagaag agcttgttgc gaccggtggt	1140
	ggaactcaca catgccacc gtgccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc	1200
	ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacctga ggtcacatgc	1260
	gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	1320
	gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	1380
	gtgttcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	1440
	aaggcttcca acaaagccct ccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg	1500
	cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac	1560
	caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg	1620
[0038]	gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgctgt ggactccgac	1680
	ggctccttct tctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	1740
	gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1800
	tccctgtccc cgggtaaatg a	1821

<210> 25  
 <211> 593  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 重组多肽

<400> 25

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln  
 20 25 30

Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val  
 35 40 45

Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His  
 50 55 60

Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr  
 65 70 75 80

Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu  
 85 90 95  
 Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly  
 100 105 110  
 Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu  
 115 120 125  
 Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln  
 130 135 140  
 Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu  
 145 150 155 160  
 Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly  
 165 170 175  
 Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr  
 180 185 190  
 Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu  
 195 200 205  
 Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro  
 210 215 220  
 [0039] Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser  
 225 230 235 240  
 Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro  
 245 250 255  
 Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala Asn His Asn Met Gln Ile Trp Thr  
 260 265 270  
 Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg Gly  
 275 280 285  
 Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg Met  
 290 295 300  
 Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala Ser  
 305 310 315 320  
 Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr Ser  
 325 330 335  
 Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro Glu  
 340 345 350  
 Leu Leu Met Ser Leu Ile Thr Gly Gly Gly Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 355 360 365  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 370 375 380



	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser 385 390 395 400
	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp 405 410 415
	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn 420 425 430
	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val 435 440 445
	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu 450 455 460
	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys 465 470 475 480
	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr 485 490 495
	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr 500 505 510
	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu 515 520 525
[0040]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu 530 535 540
	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys 545 550 555 560
	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu 565 570 575
	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly 580 585 590
	Lys
	<210> 26
	<211> 1782
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 重组多核苷酸
	<400> 26
	atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60
	tcgccccggc ccgaacacagt ccattgtgac cttcagcctg tgggccccga gagggacgag 120
	gtgacatata ccactagcca ggtctcgaag ggctgcgtgg ctcaggcccc caatgccatc 180
	cttgaagtcc atgtcctctt cctggagttc ccaacgggccc cgtcacagct ggagctgact 240
	ctccaggcat ccaagcaaaa tggcacctgg ccccgagagg tgctttctggt cctcagtgt 300

	aacagcagtg tcttctgca tctccaggcc ctgggaatcc cactgcactt ggcctacaat	360
	tccagcctgg tcaccttcca agagccccg ggggtcaaca ccacagagct gccatccttc	420
	cccaagacct agatccttga gtgggcagct gagaggggcc ccatcacctc tgcctgtgag	480
	ctgaatgacc ccagagcat cctctccga ctgggccaag ccaggggtc actgtccttc	540
	tgcctgtgag aagccagcca ggacatgggc cgcacgctcg agtggcggcc gcgtactcca	600
	gccttgggtc ggggtgcca cttggaaggc gtggccggcc acaaggaggc gcacatcctg	660
	agggtcctgc cgggccactc ggccggggcc cggacggtga cggatgaagg ggaactgagc	720
	tgcgcaccgc gggatctcga tgcgctctc atcctgcagg gtcccccta cgtgtcctgg	780
	ctcatcgacg ccaaccacaa catgcagatc tggaccactg gagaatactc cttcaagatc	840
	tttccagaga aaaacattcg tggtttcaag ctcccagaca cactcaagg cctctgggg	900
	gagggccgga tgcctaatgc cagcattgtg gcctccttcg tggagctacc gctggccagc	960
	attgtctcac ttcatgcctc cagctgcggt ggtaggctgc agacctcacc cgcaccgatc	1020
	cagaccactc ctcccagga cacttgtagc cggagctgc tcatgtcctt gatcaccggt	1080
	ggtggaccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccaccg acctgaactc	1140
	ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca aggacacctt catgatctcc	1200
	cggacccttg aggtcacatg cgtgggtgtg gacgtgagcc acgaagacct tgaggtcaag	1260
	ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag	1320
	cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tctgcacca ggactggctg	1380
[0041]	aatggcaagg agtacaagtg caaggctccc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa	1440
	accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacctt gccccatcc	1500
	cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgce tggtaaagg cttctatccc	1560
	agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg	1620
	cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctata gcaagctcac cgtggacaag	1680
	agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac	1740
	cactacacgc agaagagcct ctccctgtcc ccgggtaaat ga	1782

<210> 27  
 <211> 587  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 重组多肽

<400> 27

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln  
 20 25 30

Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val  
 35 40 45

Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His  
 50 55 60

Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr  
 65 70 75 80

Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu  
 85 90 95

Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly  
 100 105 110

Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu  
 115 120 125

Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln  
 130 135 140

Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu  
 145 150 155 160

Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly  
 165 170 175

Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr  
 180 185 190

[0042] Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu  
 195 200 205

Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro  
 210 215 220

Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser  
 225 230 235 240

Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro  
 245 250 255

Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala Asn His Asn Met Gln Ile Trp Thr  
 260 265 270

Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg Gly  
 275 280 285

Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg Met  
 290 295 300

Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala Ser  
 305 310 315 320

Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr Ser  
 325 330 335

Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro Glu  
 340 345 350

	Leu Leu Met Ser Leu Ile Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro	
	355 360 365	
	Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro	
	370 375 380	
	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr	
	385 390 395 400	
	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn	
	405 410 415	
	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg	
	420 425 430	
	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val	
	435 440 445	
	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser	
	450 455 460	
	Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys	
	465 470 475 480	
	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu	
	485 490 495	
[0043]	Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	
	500 505 510	
	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu	
	515 520 525	
	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe	
	530 535 540	
	Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly	
	545 550 555 560	
	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr	
	565 570 575	
	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
	580 585	
	<210> 28	
	<211> 1764	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 重组多核苷酸	
	<400> 28	
	atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt	60
	tcgccccggcg ccgaacacgt ccattgtgac cttcagcctg tgggccccga gagggacgag	120
	gtgacatata ccactagcca ggtctcgaag ggctgcgtgg ctcaggcccc caatgccatc	180

	cttgaagtcc atgtcctctt cctggagttc ccaacgggcc cgtcacagct ggagctgact	240
	ctccaggcat ccaagcaaaa tggcacctgg ccccgagagg tgcttctggt cctcagtgt	300
	aacagcagtg tcttctgca tctccaggcc ctgggaatcc cactgcactt ggcctacaat	360
	tccagcctgg tcaccttcca agagccccgg ggggtcaaca ccacagagct gccatccttc	420
	cccaagaccc agatccttga gtgggcagct gagaggggcc ccatcacctc tgctgctgag	480
	ctgaatgacc ccagagcat cctcctccga ctgggccaag ccagggggtc actgtccttc	540
	tgcatgctgg aagccagcca ggacatgggc cgcacgctcg agtggcggcc gcgtactcca	600
	gccttggtcc ggggctgcca cttggaagge gtggccggcc acaaggagge gcacatcctg	660
	agggtcctgc cgggccactc ggccggggcc cggacggtga cggtaagggt ggaactgagc	720
	tgcgcacccg gggatctcga tgccgtcttc atcctgcagg gtcccccta cgtgtcctgg	780
	ctcatcgacg ccaaccacaa catgcagatc tggaccactg gagaatactc cttcaagatc	840
	tttccagaga aaaacattcg tggttcaag ctcccagaca cactcaagg cctcctgggg	900
	gagggccgga tgctcaatgc cagcattgtg gcacctctcg tggagctacc gctggccagc	960
	attgtctcac ttcattgcctc cagctgcggt ggtaggctgc agacctcacc cgcaccgac	1020
	cagaccactc ctcccaagga cacttgtagc ccggagctgc tcatgtcctt gatcaccggt	1080
	ggtggaactc acacatgcc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc	1140
	ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	1200
	tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac	1260
[0044]	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	1320
	cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	1380
	tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa	1440
	gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat ccggggagga gatgaccaag	1500
	aaccagggtc gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag	1560
	tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc	1620
	gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg	1680
	aacgtcttct catgtccgt gatgatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	1740
	ctctccctgt ccccggttaa atga	1764

<210> 29  
 <211> 574  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 重组多肽

<400> 29

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln  
 20 25 30

Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val  
 35 40 45  
 Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His  
 50 55 60  
 Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu  
 85 90 95  
 Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly  
 100 105 110  
 Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu  
 115 120 125  
 Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln  
 130 135 140  
 Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu  
 145 150 155 160  
 Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly  
 165 170 175  
 [0045] Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr  
 180 185 190  
 Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu  
 195 200 205  
 Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro  
 210 215 220  
 Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser  
 225 230 235 240  
 Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro  
 245 250 255  
 Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala Asn His Asn Met Gln Ile Trp Thr  
 260 265 270  
 Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg Gly  
 275 280 285  
 Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg Met  
 290 295 300  
 Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala Ser  
 305 310 315 320  
 Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr Ser  
 325 330 335

	Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr 340 345 350
	Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe 355 360 365
	Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 370 375 380
	Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 385 390 395 400
	Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 405 410 415
	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 420 425 430
	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 435 440 445
	Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser 450 455 460
	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 465 470 475 480
[0046]	Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 485 490 495
	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 500 505 510
	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp 515 520 525
	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp 530 535 540
	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His 545 550 555 560
	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 565 570
	<210> 30
	<211> 1725
	<212> DNA
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 重组多核苷酸
	<400> 30
	atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60
	tcgccccgcg ccgaacacgt ccattgtgac cttcagcctg tgggccccga gagggacgag 120

gtgacatata ccactagcca ggtctcgaag ggctgcgtgg ctcaggcccc caatgccatc 180  
 cttgaagtcc atgtctcttt cctggagttc ccaacgggcc cgtcacagct ggagctgact 240  
 ctccaggcat ccaagcaaaa tggcacctgg ccccagaggg tgcttctggt cctcagtgtgta 300  
 aacagcagtg tcttcttcca tctccaggcc ctgggaatcc cactgcactt ggcttacaat 360  
 tccagcctgg tcaccttcca agagccccg ggggtcaaca ccacagagct gccatccttc 420  
 cccaagaccc agatccttga gtgggcagct gagaggggcc ccatcacctc tgctgctgag 480  
 ctgaatgacc cccagagcat cctctctcga ctgggccaaag cccaggggtc actgtccttc 540  
 tgcatgctgg aagccagcca ggacatgggc cgcacgctcg agtggcgccc gcgtactcca 600  
 gccttggtcc ggggctgcca cttggaagge gtggccggcc acaaggaggc gcacatcctg 660  
 agggctctgc cgggccactc ggccggggccc cggacggtga cggtgaaagt ggaactgagc 720  
 tgcgcacccg gggatctcga tgccgtcttc atcctgcagg gtcccccta cgtgtcttgg 780  
 ctcatcgacg ccaaccacaa catgcagatc tggaccactg gagaatactc cttcaagatc 840  
 tttccagaga aaaacattcg tggcttcaag ctcccagaca cactcaagg cctcctgggg 900  
 gagggccgga tgctcaatgc cagcattgtg gcacctctcg tggagctacc gctggccagc 960  
 attgtctcac ttcatgcctc cagctgcggt ggtaggctgc agacctacc cgcaccgac 1020  
 cagaccactc ctcccaccgg tggtggaact cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa 1080  
 ctcttggggg gaccgtcagt ctctctcttc cccccaaac ccaaggacac cctcatgac 1140  
 tcccggaccc ctgaggctac atgcgtgggt gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 1200  
 [0047] aagttaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gcccggggag 1260  
 gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtctca ccgtctgca ccaggactgg 1320  
 ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctccagc ccccatcgag 1380  
 aaaaccatct ccaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1440  
 tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctat 1500  
 cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1560  
 acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttctctctct atagcaagct caccgtggac 1620  
 aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgtccg tgatgcatga ggctctgcac 1680  
 aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tccccggta aatga 1725

<210> 31  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 重组多肽

<400> 31

Thr Gly Gly Gly  
 1

<210> 32  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列



<220>  
<223> 重组多肽

<400> 32

Gly Gly Gly  
1

<210> 33  
<211> 582  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 重组多肽

<400> 33

Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu  
1 5 10 15

Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala  
20 25 30

Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr  
35 40 45

Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly  
50 55 60

[0048] Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val  
65 70 75 80

Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn  
85 90 95

Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu  
100 105 110

Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg  
115 120 125

Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu  
130 135 140

Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu  
145 150 155 160

Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro  
165 170 175

Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu  
180 185 190

Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr  
195 200 205

Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala  
210 215 220

	Val	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly	Pro	Pro	Tyr	Val	Ser	Trp	Leu	Ile	Asp	Ala	
	225					230					235					240	
	Asn	His	Asn	Met	Gln	Ile	Trp	Thr	Thr	Gly	Glu	Tyr	Ser	Phe	Lys	Ile	
					245					250					255		
	Phe	Pro	Glu	Lys	Asn	Ile	Arg	Gly	Phe	Lys	Leu	Pro	Asp	Thr	Pro	Gln	
				260					265					270			
	Gly	Leu	Leu	Gly	Glu	Ala	Arg	Met	Leu	Asn	Ala	Ser	Ile	Val	Ala	Ser	
				275				280					285				
	Phe	Val	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	Ser	Ile	Val	Ser	Leu	His	Ala	Ser	Ser	
		290					295					300					
	Cys	Gly	Gly	Arg	Leu	Gln	Thr	Ser	Pro	Ala	Pro	Ile	Gln	Thr	Thr	Pro	
	305					310					315					320	
	Pro	Lys	Asp	Thr	Cys	Ser	Pro	Glu	Leu	Leu	Met	Ser	Leu	Ile	Gln	Thr	
					325					330					335		
	Lys	Cys	Ala	Asp	Asp	Ala	Met	Thr	Leu	Val	Leu	Lys	Lys	Glu	Leu	Val	
				340					345					350			
	Ala	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	
			355					360					365				
[0049]	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	
		370					375					380					
	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
	385					390					395					400	
	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
					405					410					415		
	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	
				420					425					430			
	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	
			435					440					445				
	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	
		450					455					460					
	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
	465					470					475					480	
	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	
					485					490					495		
	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	
				500					505					510			
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	

	515	520	525
	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys 530 535 540		
	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys 545 550 555 560		
	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu 565 570 575		
	Ser Leu Ser Pro Gly Lys 580		
<210>	34		
<211>	569		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	重组多肽		
<400>	34		
	Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu 1 5 10 15		
	Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala 20 25 30		
[0050]	Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr 35 40 45		
	Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly 50 55 60		
	Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val 65 70 75 80		
	Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn 85 90 95		
	Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu 100 105 110		
	Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg 115 120 125		
	Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu 130 135 140		
	Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu 145 150 155 160		
	Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro 165 170 175		
	Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu		

	180	185	190
	Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr 195 200 205		
	Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala 210 215 220		
	Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala 225 230 235 240		
	Asn His Asn Met Gln Ile Trp Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile 245 250 255		
	Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg Gly Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln 260 265 270		
	Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg Met Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser 275 280 285		
	Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala Ser Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser 290 295 300		
	Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr Ser Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro 305 310 315 320		
[0051]	Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro Glu Leu Leu Met Ser Leu Ile Thr Gly 325 330 335		
	Gly Gly Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro 340 345 350		
	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys 355 360 365		
	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val 370 375 380		
	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr 385 390 395 400		
	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu 405 410 415		
	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His 420 425 430		
	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys 435 440 445		
	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln 450 455 460		
	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met 465 470 475 480		

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
485 490 495

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
500 505 510

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
515 520 525

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
530 535 540

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
545 550 555 560

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
565

<210> 35

<211> 563

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多肽

<400> 35

[0052]

Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu  
1 5 10 15

Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala  
20 25 30

Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr  
35 40 45

Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly  
50 55 60

Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val  
65 70 75 80

Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn  
85 90 95

Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu  
100 105 110

Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg  
115 120 125

Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu  
130 135 140

Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu  
145 150 155 160

Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro  
165 170 175

Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu  
180 185 190

Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr  
195 200 205

Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala  
210 215 220

Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala  
225 230 235 240

Asn His Asn Met Gln Ile Trp Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile  
245 250 255

Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg Gly Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln  
260 265 270

Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg Met Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser  
275 280 285

Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala Ser Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser  
290 295 300

[0053] Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr Ser Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro  
305 310 315 320

Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro Glu Leu Leu Met Ser Leu Ile Thr Gly  
325 330 335

Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
340 345 350

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
355 360 365

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
370 375 380

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
385 390 395 400

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
405 410 415

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
420 425 430

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
435 440 445

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
450 455 460

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
465 470 475 480

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
485 490 495

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
500 505 510

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
515 520 525

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
530 535 540

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
545 550 555 560

Pro Gly Lys

<210> 36

<211> 550

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多肽

[0054]

<400> 36

Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu  
1 5 10 15

Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala  
20 25 30

Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr  
35 40 45

Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly  
50 55 60

Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val  
65 70 75 80

Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn  
85 90 95

Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu  
100 105 110

Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg  
115 120 125

Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu  
130 135 140

Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu  
 145 150 155 160  
 Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro  
 165 170 175  
 Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu  
 180 185 190  
 Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr  
 195 200 205  
 Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala  
 210 215 220  
 Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala  
 225 230 235 240  
 Asn His Asn Met Gln Ile Trp Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile  
 245 250 255  
 Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg Gly Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln  
 260 265 270  
 Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg Met Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser  
 275 280 285  
 [0055] Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala Ser Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser  
 290 295 300  
 Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr Ser Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro  
 305 310 315 320  
 Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 325 330 335  
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 340 345 350  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 355 360 365  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 370 375 380  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 385 390 395 400  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 405 410 415  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 420 425 430  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 435 440 445



Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
450 455 460

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
465 470 475 480

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
485 490 495

[0056] Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
500 505 510

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
515 520 525

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
530 535 540

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
545 550

图1. 人ENG同种型1 (L-ENG) 的氨基酸序列  
(GenBank NM\_001114753)

1 MDRGTLPLAV ALLLASCSLS PTSLAETVHC DLQPVGPERG EVTYTTSQVS KGCVAQAPNA  
61 ILEVHVLFLE FPTGPSQLEL TLQASKQNGT WPREVLLVLS VNSSVFLHLQ ALGIPLHLAY  
121 NSSLVTFQEP PGVNTTELPS FPKIQILEWA AERGPITSAA ELNDPQSILL RLGQAQGSLS  
181 FCMLEASQDM GRTLEWRPRT PALVRGCHLE GVAGHKEAHI LRVLPGHSAG PRTVTVKVEL  
241 SCAPGDLDV LILQGPPYVS WLIDANHNMQ IWTIGEYSFK IFPEKNIRGF KLPDTPQGGL  
301 GEARMLNASI VASFVELPLA SIVSLHASSC GGRLQTSPAP IQTTPPKDTC SPELLMSLIQ  
361 TKCADDAMTL VLKKELVAHL KCTITGLTFW DPSCEAEDRG DKFVLRSAVS SCGMQVSASM  
421 ISNEAVVNIL SSSSPQRKKV HCLNMDLSLF QLGLYLSPHF LQASNTIEPG QQSFEVQVRVS  
481 PSVSEFLLQL DSCHLDLGPE GGTVELIQGR AAKGNCVSLL SPSPEGDPFR SFLHFFYTVF  
541 IPKTGTLST VALRPKTGSQ DQEVHRTVFM RLNIISPDLG GCTSKGLVLP AVLGITFGAF  
601 LIGALLTAAL WYIYSHTRSP SKREPVVAVA APASSESSST NHSIGSTQST PCSTSSMA

(SEQ ID NO: 1)

图2. 编码人ENG同种型1 (L-ENG) 的核苷酸序列  
(GenBank NM\_001114753)

```

361 CCTGCCACTG GACACAGGAT AAGGCCAGC GCACAGGCC CCACGTGGAC AGCATGGACC
421 GCGGCACGCT CCCTCTGGCT GTTGCCCTGC TGCTGGCCAG CTGCAGCCTC AGCCCCACAA
481 GTCTTGCAAG AACAGTCCAT TGTGACCTTC AGCCTGTGGG CCCCAGAGAG GCGGAGGTGA
541 CATATACCAC TAGCCAGGTC TCGAAGGGCT GCGTGGCTCA GGCCCCCAAT GCCATCCTTG
601 AAGTCCATGT CCTCTTCCTG GAGTTCCCAA CGGGCCCGTC ACAGCTGGAG CTGACTCTCC
661 AGGCATCCAA GCAAAATGGC ACCTGGCCCC GAGAGGTGCT TCTGGTCCTC AGTGTAAACA
721 GCAGTGTCTT CCTGCATCTC CAGGCCCTGG GAATCCCACT GCACTTGGCC TACAATTCCA
781 GCCTGGTCAC CTTCCAAGAG CCCCAGGGGG TCAACACCAC AGAGCTGCCA TCCTCCCCA
841 AGACCCAGAT CCTTGAGTGG GCAGCTGAGA GGGGCCCAT CACCTCTGCT GCTGAGCTGA
901 ATGACCCCA GAGCATCCTC CTCCGACTGG GCCAAGCCCA GGGGTCACTG TCCTTCTGCA
961 TGCTGGAAGC CAGCCAGGAC ATGGGCCGCA CGCTCGAGTG GCGGCCGCGT ACTCCAGCCT
1021 TGGTCCGGGG CTGCCACTTG GAAGGCGTGG CCGGCCACAA GGAGGCGCAC ATCTGAGGG
1081 TCCTGCCGGG CCACTCGGCC GGGCCCCGGA CGGTGACGGT GAAGGTGGAA CTGAGCTGCG
1141 CACCCGGGGA TCTCGATGCC GTCTCATCC TGCAGGGTCC CCCCTACGTG TCCTGGCTCA
1201 TCGACGCCAA CCACAACATG CAGATCTGGA CCACTGGAGA ATACTCCTTC AAGATCTTTC
1261 CAGAGAAAAA CATTCGTGGC TTCAAGCTCC CAGACACACC TCAAGGCCTC CTGGGGGAGG
1321 CCCGGATGCT CAATGCCAGC ATTGTGGCAT CCTTCGTGGA GCTACCGCTG GCCAGCATTG
1381 TCTCACTTCA TGCCCTCAGC TCGGTTGGTA GGCTGCAGAC CTCACCCGCA CCGATCCAGA
1441 CCACTCCTCC CAAGGACACT TGTAGCCCGG AGCTGCTCAT GTCTTTGATC CAGACAAAGT
1501 GTGCCGACGA CGCCATGACC CTGGTACTAA AGAAAGAGCT TGTTCGCGAT TTGAAGTGCA
1561 CCATCACGGG CCTGACCTTC TGGGACCCCA GCTGTGAGGC AGAGGACAGG GGTGACAAGT
1621 TTGTCTTGCG CAGTGCTTAC TCCAGCTGTG GCATGCAGGT GTCAGCAAGT ATGATCAGCA
1681 ATGAGGCGGT GGTCAATATC CTGTCGAGCT CATCACCACA GCGGAAAAAG GTGCACTGCC
1741 TCAACATGGA CAGCCTCTCT TTCCAGCTGG GCCTCTACCT CAGCCACAC TTCTCCAGG
1801 CCTCCAACAC CATCGAGCCG GGGCAGCAGA GCTTTGTGCA GGTCAGAGTG TCCCCATCCG
1861 TCTCCGAGTT CCTGCTCCAG TTAGACAGCT GCCACCTGGA CTTGGGGCCT GAGGGAGGCA
1921 CCGTGGAAC TATCCAGGGC CGGCGCGCCA AGGGCAACTG TGTGAGCCTG CTGTCCCCAA
1981 GCCCCGAGGG TGACCCGCGC TTCAGCTTCC TCCTCCACTT CTACACAGTA CCCATACCCA
2041 AAACCGGCAC CCTCAGCTGC ACGGTAGCCC TCGTCCCAA GACCGGTCT CAAGACCAGG
2101 AAGTCCATAG GACTGTCTTC ATGCGCTTGA ACATCATCAG CCCTGACCTG TCTGGTTGCA
2161 CAAGCAAAGG CTTCTGCTG CCGCCGCTGC TGGGCATCAC CTTTGGTGCC TTCCTCATCG
2221 GGGCCCTGCT CACTGCTGCA CTCTGGTACA TCTACTCGCA CACGCGTTCC CCCAGCAAGC
2281 GGGAGCCCGT GGTGGCGGTG GCTGCCCCGG CCTCCTCGGA GAGCAGCAGC ACCAACCACA
2341 GCATCGGGAG CACCCAGAGC ACCCCCTGCT CCACCAGCAG CATGGCATAG

```

(SEQ ID NO: 2)

图3. 人ENG同种型2 (S-ENG) 的氨基酸序列  
(GenBank NM\_000118)

```
1  MDRGTLPLAV ALLLASCSLS PTSLAETVHC DLQPVGPERG EVTYTTSQVS KGCVAQAPNA
61  ILEVHVLFLF FPTGPSQLEL TLQASKQNGT WPREVLLVLS VNSSVFLHLQ ALGIPLHLAY
121 NSSLVTFQEP PGVNTELPS FPKTQILEWA AERGPITSAA ELNDPQSILL RLGQAQGSLS
181 FCMLEASQDM GRTLEWRPRT PALVRGCHLE GVAGHKEAHI LRVLPGHSAG PRVTIVKVLEL
241 SCAPGDLDV LILQGPPYVS WLIDANHNMQ IWTIGEYSFK IFPEKNIRGF KLPDTPQGLL
301 GEARMLNASI VASFVELPLA SIVSLHASSC GGRLQTSPAP IQTTPPKDTC SPELLMSLIQ
361 TKCADDAMTL VLKKELVAHL KCTITGLTFW DPSCEAEDRG DKFVLRSAVS SCGMQVSASM
421 ISNEAVVNIL SSSSPQRKKV HCLNMDLSLF QLGLYLSPHF LQASNTIEPG QQSFEVQVRVS
481 PSVSEFLLQL DSCHLDLGPE GGIVELIQGR AAKGNCVSL SPSPEGDPFR SFLHFFYTV
541 IPKTGTL SCT VALRPKTGSQ DQEVHRTVFM RLNIISPDL GCTSKGLVLP AVLGITFGAF
601 LIGALLTAAL WYIYSH TREY PRPPQ
```

(SEQ ID NO: 3)

图4. 编码人ENG同种型2 (S-ENG) 的核苷酸序列  
(GenBank NM\_000118)

```

361 CCTGCCACTG GACACAGGAT AAGGCCCAGC GCACAGGCC CCACGTGGAC AGCATGGACC
421 GCGGCACGCT CCCTCTGGCT GTTCGCCCTGC TGCTGGCCAG CTGCAGCCTC AGCCCCACAA
481 GTCTTGCA AACAGTCCAT TGTGACCTTC AGCCTGTGGG CCCCAGAGG GCGGAGGTGA
541 CATATACCAC TAGCCAGGTC TCGAAGGGCT GCGTGGCTCA GGCCCCAAT GCCATCCTTG
601 AAGTCCATGT CCTCTTCCTG GAGTTCCTCA CGGGCCCGTC ACAGCTGGAG CTGACTCTCC
661 AGGCATCCAA GCAAAATGGC ACCTGGCCCC GAGAGGTGCT TCTGGTCCTC AGTGTAACA
721 GCAGTGTCTT CCTGCATCTC CAGGCCCTGG GAATCCCACT GCACTTGGCC TACAATTCCA
781 GCCTGGTCAC CTTCCAAGAG CCCCCGGGGG TCAACACCAC AGAGCTGCCA TCCTTCCCCA
841 AGACCCAGAT CTTGAGTGG GCAGCTGAGA GGGGCCCAT CACCTCTGCT GCTGAGCTGA
901 ATGACCCCCA GAGCATCCTC CTCCGACTGG GCCAAGCCCA GGGGTCACTG TCCTTCTGCA
961 TGCTGGAAGC CAGCCAGGAC ATGGGCCGCA CGCTCGAGTG GCGGCCGCGT ACTCCAGCCT
1021 TGGTCCGGGG CTGCCACTTG GAAGGCGTGG CCGGCCACAA GGAGGCGCAC ATCCTGAGGG
1081 TCCTGCCGGG CCACTCGGCC GGGCCCCGGA CGGTGACGGT GAAGGTGGAA CTGAGCTGCG
1141 CACCCGGGGA TCTCGATGCC GTCCTCATCC TGCAGGGTCC CCCCTACGTG TCCTGGCTCA
1201 TCGACGCCAA CCACAACATG CAGATCTGGA CCACTGGAGA ATACTCCTTC AAGATCTTTC
1261 CAGAGAAAAA CATTCGTGGC TTCAAGCTCC CAGACACACC TCAAGGCCTC CTGGGGGAGG
1321 CCCGGATGCT CAATGCCAGC ATTGTGGCAT CCTTCGTGGA GCTACCGCTG GCCAGCATTG
1381 TCTCACTTCA TGCTCCAGC TCGGGTGGTA GGCTGCAGAC CTCACCCGCA CCGATCCAGA
1441 CCACTCCTCC CAAGGACACT TGTAGCCCGG AGCTGCTCAT GTCCTTGATC CAGACAAAGT
1501 GTGCCGACGA CGCCATGACC CTGGTACTAA AGAAAGAGCT TGTGCGCAT TTGAAGTGCA
1561 CCATCACGGG CCTGACCTTC TGGGACCCCA GCTGTGAGGC AGAGGACAGG GGTGACAAGT
1621 TTGTCTTGCG CAGTGCTTAC TCCAGCTGTG GCATGCAGGT GTCAGCAAGT ATGATCAGCA
1681 ATGAGGCGGT GGTCAATATC CTGTCGAGCT CATCACCACA GCGGAAAAAG GTGCACTGCC
1741 TCAACATGGA CAGCCTCTCT TTCCAGCTGG GCCTCTACCT CAGCCCACAC TTCCTCCAGG
1801 CCTCCAACAC CATCGAGCCG GGGCAGCAGA GCTTTGTGCA GGTCAGAGTG TCCCCATCCG
1861 TCTCCGAGTT CTGCTCCAG TTAGACAGCT GCCACCTGGA CTTGGGGCCT GAGGGAGGCA
1921 CCGTGGAACT CATCCAGGGC CGGGCGGCCA AGGGCAACTG TGTGAGCCTG CTGTCCCCAA
1981 GCCCCGAGGG TGACCCGCGC TTCAGCTTCC TCCTCCACTT CTACACAGTA CCCATACCCA
2041 AAACCGGCAC CCTCAGCTGC ACGGTAGCCC TCGTCCCAA GACCGGGTCT CAAGACCAGG
2101 AAGTCCATAG GACTGTCTTC ATGCGCTTGA ACATCATCAG CCCTGACCTG TCTGGTTGCA
2161 CAAGCAAAGG CTTCGTCTTG CCCGCCGTGC TGGGCATCAC CTTTGGTGCC TTCTCATCG
2221 GGGCCCTGCT CATGCTGCA CTCTGGTACA TCTACTCGCA CACGCGTGAG TACCCAGGC
2281 CCCACAGTG A

```

(SEQ ID NO: 4)

图5. 鼠ENG同种型1 (L-ENG) 的氨基酸序列  
(GenBank NM\_007932)

1 MDRGVLPLPI TLLFVIYSFV PTTGLAERVG CDLQVPDPTR GEVTFTTSQV SEGCVAAQAN  
61 AVREHVHLEFL DFPGLSHLE LTLQASKQNG TETQEVFLVL VSNKNVFKF QAPEIPLHLA  
121 YDSSLVIFQG QPRVNITVLP SLTSRKQILD WAATKGAIIS IAALDDPQSI VLQLGQDPKA  
181 PFLCLPEAHK DMGATLEWQP RAQTPVQSCR LEGVSGHKEA YILRILPGSE AGPRTVTVM  
241 ELSCITSGDAI LILHGPPYVS WFIDINHSMQ ILTTGEYSVK IFPGSKVKGV ELPDTPQGLI  
301 AEARKLNASI VTSFVELPLV SNVSLRASSC GGVFQITPAP VVTTPPKDTC SPVLLMSLIQ  
361 PKCGNQVMTL ALNKKHVQTL QCTITGLTFW DSSCQAEDTD DHLVLSSAYS SCGMKVTAHV  
421 VSNEVIISFP SGSPPLRKKV QCIDMDSLSE QLGLYLSPHF LQASNTIELG QQAFVQVSVS  
481 PLTSEVTVQL DSCHLDLGPE GDMVELIQSR TAKGSCVTLL SPSPEGDPRE SFLLRVYMVP  
541 TPTAGTILSCN LALRPSTLSQ EVYKTVSMRL NIVSPDLGK GLVLPVSLGI TFGAFLIGAL  
601 LTAALWYIYS HTRGPSKREP VVAVAAPASS ESSSTNHSIG STQSTPCSTS SMA

(SEQ ID NO: 5)

图6. 编码鼠ENG同种型1 (L-ENG) 的核苷酸序列  
(GenBank NM\_007932)

```
361 AGCAITGGACC GTGGCGTGCT CCCTCTGCCC ATTACCCTGC TGTITGTCAT CTATAGCITT
421 GTACCCACAA CAGGTCCTGC AGAAAGAGTC GGCTGTGATC TACAGCCTGT GGACCCACAA
481 AGGGGTGAGG TGACGTTTAC CACCAGCCAG GTCTCCGAGG GCTGTGTAGC TCAGGCTGCC
541 AATGCTGTGC GTGAAGTCCA CGTTCCTTTC CTGGATTTTC CCGGAATGCT GTCACATCTG
601 GAGCTGACTC TTCAGGCATC CAAGCAAAAT GGCACGGAGA CCCAGGAGGT GTTCCTGGTC
661 CTCGTTTCGA AAAAAATGT CTTCGTGAAG TTCCAGGCCC CGGAAATCCC ATTGCACTTG
721 GCCTACGACT CCAGCCTGGT CATCTTCCAA GGACAGCCAA GAGTCAACAT CACAGTGCTA
781 CCATCCCTTA CCTCCAGGAA ACAGATCCTC GACTGGGCAG CCACCAAGGG CGCCATCACC
841 TCGATAGCAG CACTGGATGA CCCCCAAAGC ATCGTCCTCC AGTTGGGCCA AGACCCAAAG
901 GCACCATTCT TGTGCTTGCC AGAAGCTCAC AAGGACATGG GCGCCACACT TGAATGGCAA
961 CCACGAGCCC AGACCCAGT CCAAAGCTGT CGCTTGAAG GTGTGCTGCG CCACAAGGAG
1021 GCCTACATCC TGAGGATCCT GCCAGGTTCT GAGGCCGGGC CCCGGACGGT GACCGTAATG
1081 ATGGAAGTGA GTTGACATC TGGGGACGCC ATTCTCATCC TGCATGGTCC TCCATATGTC
1141 TCCTGGTTCA TCGACATCAA CCACAGCATG CAGATCTTGA CCACAGGTGA ATACTCCGTC
1201 AAGATCTTTC CAGGAAGCAA GTCAAAGGC GTGGAGCTCC CAGACACACC CCAAGGCCTG
1261 ATAGCGGAGG CCCGCAAGCT CAATGCCAGC ATTGTACCT CCTTTGTAGA GCTCCCTCTG
1321 GTCAGCAATG TCTCCCTGAG GGCTCCAGC TCGGTTGGTG TGTTCAGAC CACCCCTGCA
1381 CCCGTTGTGA CCACACCTCC CAAGGACACA TGCAGCCCCG TGCTACTCAT GTCCCTGATC
1441 CAGCCAAAGT GTGGCAATCA GGTCACTACT CTGGCACTCA ATAAAAACA CGTGCAGACT
1501 CTCCAGTGCA CCATCACAGG CCTGACTTTC TGGGACTCCA GCTGCCAGGC TGAAGACACT
1561 GACGACCATC TTGTCTGAG TAGCGCCTAC TCCAGCTGCG GCATGAAAGT GACAGCCCAT
1621 GTGGTCAGCA ATGAGGTGAT CATCAGTTTC CCGTCAGGCT CACCACCACT TCGGAAAAAG
1681 GTACAGTGCA TCGACATGGA CAGCCTCTCC TTCCAGCTGG GCCTCTACCT CAGCCCGCAC
1741 TTCTCCAGG CATCCAACAC CATCGAACTA GGCCAGCAGG CCTTCGTACA GGTGAGCGTG
1801 TCTCCATTGA CCTCTGAGGT CACAGTCCAG CTAGATAGCT GCCATCTGGA CTTGGGGCCC
1861 GAAGGGGACA TGGTGGAAT CATCCAGAGC CGAACAGCCA AGGGCAGCTG TGTGACCTTG
1921 CTGTCTCCAA GCCCTGAAGG TGACCCACGC TTCAGCTTCC TCCTCCGGGT CTACATGGTG
1981 CCCACACCCA CCGCTGGCAC CCTCAGTTGC AACTTAGCTC TCGCCCTAG CACCTTGTC
2041 CAGGAAGTCT ACAAGACAGT CTCCATGCGC CTGAACATCG TCAGCCCTGA CCTGTCTGGT
2101 AAAGGCCTTG TCCTGCCCTC TGTACTGGGT ATCACCTTG GTGCCTTCT GATTGGGGCC
2161 CTGCTCACAG CTGCACTCTG GTACATCTAT TCTCACACAC GTGGCCCCAG CAAGCGGGAG
2221 CCCGTGGTGG CAGTGGCTGC CCCGGCCTCC TCTGAGAGCA GCAGTACCAA CCACAGCATC
2281 GGGAGCACC AGAGCACCCT CTGCTCCACC AGCAGCATGG CGTAG
```

(SEQ ID NO: 6)

图7. 鼠ENG同种型2 (S-ENG) 的氨基酸序列  
(GenBank NM\_001146350)

```
1  MDRGVLPLPI  TLLFVIYSFV  PTTGLAERVG  CDLQPVDPTR  GEVTFTTSQV  SEGCVQAQAN
61  AVREHVHVLFL  DFPGLSHLE  LTLQASKQNG  TETQEVFLVL  VSNKNVFKF  QAPEIPLHLA
121 YDSSLVIFQG  QPRVNITVLP  SLTSRKQILD  WAATKGAIIS  IAALDDPQSI  VLQLGQDPKA
181 PFLCLPEAHK  DMGATLEWQP  RAQTPVQSCR  LEGVSGHKEA  YILRILPGSE  AGPRITVTMM
241 ELSCTSGDAI  LILHGPPYVS  WFIDINHSMQ  ILTTGEYSVK  IFPGSKVKGV  ELPDTPQGLI
301 AEARKLNASI  VTSFVELPLV  SNVSLRASSC  GGVFQTPAP  VVTTPPKDTC  SPVLLMSLIQ
361 PKCGNQVMTL  ALNKKHVQTL  QCTITGLTFW  DSSCQAEDTD  DHLVLSSAYS  SCGMKVTAHV
421 VSNEVIISFP  SGSPPLRKKV  QCIDMDSLSE  QLGLYLSPHF  LQASNTIELG  QQAFVQVSVS
481 PLTSEVTVQL  DSCHLDLQPE  GDMVELIQSR  TAKGSCVTLL  SPSPEGDPKF  SFLLRVYMPV
541 TPTAGTLSCN  LALRPSTLSQ  EVYKTVSMRL  NIVSPDLGSK  GLVLPVSLGI  TFGAFLIGAL
601 LIAALWYIYS  HTREYKPKPP  HSHSKRSGPV  HTTPGHTQWS  L
```

(SEQ ID NO: 7)



图8. 编码鼠ENG同种型2 (S-ENG) 的核苷酸序列

(GenBank NM\_001146350)

```

361 AGCATGGACC GTGGCGTGCT CCCTCTGCCC ATTACCCCTGC TGTITGTCAT CTATAGCTTT
421 GTACCCACAA CAGGTCTCGC AGAAAGAGTC GGCTGTGATC TACAGCCTGT GGACCCACAA
481 AGGGGTGAGG TGACGTTTAC CACCAGCCAG GTCTCCGAGG GCTGTGTAGC TCAGGCTGCC
541 AATGCTGTGC GTGAAGTCCA CGTTCCTCTC CTGGATTTTC CCGGAATGCT GTCACATCTG
601 GAGCTGACTC TTCAGGCATC CAAGCAAAAT GGCACGGAGA CCCAGGAGGT GTTCCTGGTC
661 CTCGTTTCGA AAAAAATGT CTTCGTGAAG TTCCAGGCCC CGGAAATCCC ATTGCACTTG
721 GCCTACGACT CCAGCCTGGT CATCTTCCAA GGACAGCCAA GAGTCAACAT CACAGTGCTA
781 CCATCCCTTA CCTCCAGGAA ACAGATCCTC GACTGGGCAG CCACCAAGGG CGCCATCACC
841 TCGATAGCAG CACTGGATGA CCCCCAAGC ATCGTCCTCC AGTTGGGCCA AGACCCAAAG
901 GCACATTCTT TGTGCTTGCC AGAAGCTCAC AAGGACATGG GCGCCACACT TGAATGGCAA
961 CCACGAGCCC AGACCCAGT CCAAAGCTGT CGCTTGAAG GTGTGTCTGG CCACAAGGAG
1021 GCCTACATCC TGAGGATCCT GCCAGGTTCT GAGGCCGGGC CCCGACGGT GACCGTAATG
1081 ATGGAAGTGA GTTGACATC TGGGACGCC ATTCTCATCC TGCATGGTCC TCCATATGTC
1141 TCCTGGTTCA TCGACATCAA CCACAGCATG CAGATCTTGA CCACAGGTGA ATACTCCGTC
1201 AAGATCTTTC CAGGAAGCAA GGTCAAAGGC GTGGAGCTCC CAGACACACC CCAAGGCCTG
1261 ATAGCGGAGG CCCGCAAGCT CAATGCCAGC ATTGTACCT CCTTTGTAGA GCTCCCTCTG
1321 GTCAGCAATG TCTCCCTGAG GGCTCCAGC TCGGTGGTG TGTTCAGAC CACCCCTGCA
1381 CCCGTTGTGA CCACACCTCC CAAGGACACA TGCAGCCCCG TGCTACTCAT GTCCCTGATC
1441 CAGCCAAAGT GTGGCAATCA GGTCATGACT CTGGCACTCA ATAAAAACA CGTGCAGACT
1501 CTCCAGTGCA CCATCACAGG CTTGACTTTC TGGGACTCCA GCTGCCAGGC TGAAGACACT
1561 GACGACCATC TTGTCTGAG TAGCGCTAC TCCAGCTGCG GCATGAAAGT GACAGCCCAT
1621 GTGGTCAGCA ATGAGGTGAT CATCAGTTTC CCGTCAGGCT CACCACCACT TCGGAAAAAG
1681 GTACAGTGCA TCGACATGGA CAGCCTCTCC TTCCAGCTGG GCCTCTACCT CAGCCCGCAC
1741 TTCCTCCAGG CATCCAACAC CATCGAACTA GGCCAGCAGG CCTTCGTACA GGTGAGCGTG
1801 TCTCCATTGA CCTCTGAGGT CACAGTCCAG CTAGATAGCT GCCATCTGGA CTTGGGGCCC
1861 GAAGGGGACA TGGTGGAAT CATCCAGAGC CGAACAGCCA AGGGCAGCTG TGTGACCTTG
1921 CTGTCTCCAA GCCCTGAAGG TGACCCACGC TTCAGCTTCC TCCTCCGGGT CTACATGGTG
1981 CCCACACCCA CCGCTGGCAC CCTCAGTTGC AACTTAGCTC TGCGCCCTAG CACCTTGTC
2041 CAGGAAGTCT ACAAGACAGT CTCCATGCGC CTGAACATCG TCAGCCCTGA CCTGTCTGGT
2101 AAAGGCCTTG TCCTGCCCTC TGTACTGGGT ATCACCTTTG GTGCCTTCCT GATTGGGGCC
2161 CTGCTCAGAG CTGCACTCTG GTACATCTAT TCTCACACAC GTGAGTATCC CAAGCCTCCA
2221 CCCATTCCC ACAGCAAGCG CTCAGGGCCC GTCCACACCA CCCCAGGGCA CACCCAGTGG
2281 AGCCTCTGA

```

(SEQ ID NO: 8)

图9. 人ENG胞外结构域的氨基酸序列

ETVHC DLQVGPBERG EVTYTTSQVS KGCVAQAPNA  
ILEVHVLFLE FPTGPSQLEL TLQASKQNGT WPREVLLVLS VNSSVFLHLQ ALGIPLHLAY  
NSSLVTFQEP PGVNTTELPs FPKTQILEWA AERGPITSAA ELNDPQSILL RLGQAQGSLS  
FCMLEASQDM GRTLEWRPRT PALVRGCHLE GVAGHKEAHI LRVLPGHSAG PRTVTVKVEL  
SCAPGDLDAV LILQGPPYVS WLIDANHNMQ IWITGEYSFK IFPEKNIRGF KLPDTPQGLL  
GEARMLNASI VASFVELPLA SIVSLHASSC GGRLQTSPAP IQTTTPPKDTC SPELLMSLIQ  
TKCADDAMTL VLKKELVAHL KCTITGLTFW DPSCEAEDRG DKFVLRSAVS SCGMQVSASM  
ISNEAVVNIL SSSSPQRKKV HCLNMDLSLF QLGLYLSPHF LQASNTIEPG QQSFVQVRVS  
PSVSEFLLQL DSCHLDLGPE GGTVELIQGR AAKGNCVSLI SPSPEGDPFR SFLLFHYTVP  
IPKTGTLSCV VALRPKTGSQ DQEVHRTVFM RLNIISPDLS GCTSKG

(SEQ ID NO: 9)

图10. 鼠ENG胞外结构域的氨基酸序列

ERVG CDLQVPDPTR GEVTFSTSQV SEGCVAAAN  
AVREHVHFLF DFPGLSHLE LTLQASKQNG TETREVFLVL VSNKNVFVKF QAPEIPLHLA  
YDSSLVIFQG QPRVNITVLP SLTSRKQILD WAATKGAITS IAALDDPQSI VLQLGQDPKA  
PFLCLPEAHK DMGATLEWQP RAQTPVQSCR LEGVSGHKEA YILRILPGSE AGPRTVTVM  
ELSCITSGDAI LILHGPPYVS WFIDINHSMQ ILTTGEYSVK IFPGSKVKGV ELPDTPQGLI  
AEARKLNASI VTSFVELPLV SNVSLRASSC GGVFQTPAP VVTTTPPKDTC SPVLLMSLIQ  
PKCGNQVMTL ALNKKHVQTL QCTITGLTFW DSSCQAEDTD DHLVLSSAYS SCGMKVTAHV  
VSNEVIISFP SGSPPLRKKV QCIDMDLSLF QLGLYLSPHF LQASNTIELG QQAFVQVSVS  
PLTSEVTVQL DSCHLDLGPE GDMVELIQSR TAKGSCVTLL SPSPEGDPFR SFLLRVYMVP  
TPTAGTLSCN LALRPSTLSQ EVYKTVSMRL NVVSPDLGK G

(SEQ ID NO: 10)

图11. 人IgG1 Fc结构域的氨基酸序列

```
1   GGPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
61  FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK
121 TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
181 PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HTQKSLSLS PGK
```

(SEQ ID NO: 11)

图12. N末端截短的人IgG1 Fc结构域的氨基酸序列

```
1   THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
61  EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
121 PREPQVYTL PPSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSGDG
181 SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCVMHEAL HNHTQKSLS LSPGK
```

(SEQ ID NO: 12)

图13. hENG (26至586)-hFc的氨基酸序列

1     MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SP**GA**ETVHCD LQVGP~~PERDE~~ VTYTTSQVSK  
51     GCVAQAPNAI LEVHVL~~FLEF~~ PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV  
101    NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELP~~SF~~ PKTQILEWAA  
151    ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRP~~RTP~~  
201    ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGD~~LDAVL~~  
251    ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG  
301    EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKD~~TCS~~  
351    PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELV~~AHLK~~ CTITGLTFWD PSCEAEDRGD  
401    KFVLRSAYSS CGMQVSASMI SNEAVVNILS SSSPQRKKVH CLNMDSL~~SFQ~~  
451    LGLYLSPHFL QASNTIEPGQ QSFVQVRVSP SVSEFLLQLD SCHLDLGPEG  
501    GTVELIQGRA AKGNCVSLLS PSPEGDP~~RFS~~ FLLH~~FYTVPI~~ PKTGTLSCTV  
551    ALRPKTGSQD QEVHRTV~~FMR~~ LNIISPDL~~SG~~ CTSKG**TG**GGP KSCDKTHTCP  
601    PCPAPELLGG PSVFLEPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW  
651    YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA  
701    LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI  
751    AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV  
801    MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 16)

图14. 编码hENG (26至586) -hFc的核苷酸序列

```

1      ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
      AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG
101    TGGGCCCCGA GAGGGACGAG GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
      GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT
201    CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCACGGCAT
      CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCAGAGAG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
301    AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACCTT
      GGCTTACAAT TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA
401    CCACAGAGCT GCCATCCTTC CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT
      GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG CTGAATGACC CCCAGAGCAT
501    CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCTTTC TGCATGCTGG
      AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
601    GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC
      GCACATCTTG AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGCCC CGGACGGTGA
701    CGGTGAAGGT GGAAGTGAAG TGCGCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCTCTC
      ATCTGTCAGG GTCCCCCTA CGTGTCTTGG CTCATCGACG CCAACCACAA
801    CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC TTTCCAGAGA
      AAAACATTCT TGGCTTCAAG CTCCAGACA CACCTCAAGG CCTCTGGGG
901    GAGGCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC
      GCTGGCCAGC ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC
1001   AGACCTCACC CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCAAGGA CACTTGTAGC
      CCGGAGCTGC TCATGTCTTT GATCCAGACA AAGTGTGCCG ACGACGCCAT
1101   GACCCTGGTA CTAAAGAAAG AGCTTGTTGC GCATTGAAG TGCACCATCA
      CGGGCCIGAC CTTCTGGGAC CCCAGCTGTG AGGCAGAGGA CAGGGGTGAC
1201   AAGTTTGTCT TGCGCAGTGC TTAATCCAGC TGTGGCATGC AGGTGTCAGC
      AAGTATGATC AGCAATGAGG CGGTGGTCAA TATCCTGTGC AGTCATCAC
1301   CACAGCGGAA AAAGGTGCAC TGCCTCAACA TGGACAGCCT CTCTTTCCAG
      CTGGGCCTCT ACCTCAGCCC ACACCTCCTC CAGGCCTCCA ACACCATCGA
1401   GCCGGGGCAG CAGAGCTTTG TGCAGGTCAG AGTGTCCCCA TCCGTCTCCG
      AGTTCCTGCT CCAGTTAGAC AGCTGCCACC TGGACTTGGG GCCTGAGGGA
1501   GGCACCGTGG AACTCATCCA GGGCCGGGCG GCCAAGGGCA ACTGTGTGAG
      CCTGCTGTCC CCAAGCCCCG AGGGTGACCC GCGCTTCAGC TTCTTCTTCC
1601   ACTTCTACAC AGTACCCATA CCCAAAACCG GCACCCCTCAG CTGCACGGTA
      GCCCTGCGTC CCAAGACCGG GTCICAAGAC CAGGAAGTCC ATAGGACTGT
1701   CTTATGCGC TTGAACATCA TCAGCCCTGA CCTGTCTGGT TGCACAAGCA
      AAGGCACCGG TGGTGGACCC AAATCTTGTG ACAAACCTCA CACATGCCCA
1801   CCGTGCCCG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
      CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT

```

图14 (2页中的第1页)

```
1901   GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
      TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
2001   GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
      AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
2101   CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
      AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGAGGAG ATGACCAAGA
2201   ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
      GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACCAC
2301   GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAT AGCAAGCTCA
      CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
2401   ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
      CCCGGGTAAA TGA
```

(SEQ ID NO: 17)

图14续 (2页中的第2页)

图15. 具有N末端截短之Fc结构域的hENG (26至586)-hFc的氨基酸序列

1     MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SP**GA**ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK  
51     GCVAQAPNAI LEVHVLFLF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV  
101    NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSPF PKTQILEWAA  
151    ERGPITSAAE LNDPOSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRT  
201    ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDVAVL  
251    ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG  
301    EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTC  
351    PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVAHLK CTITGLTFWD PSCEAEDRGD  
401    KFVLRSAYSS CGMQVSASMI SNEAVVNILS SSSPQRKKVH CLNMDSLSFQ  
451    LGLYLSPHFL QASNTIEPGQ QSFVQVRVSP SVSEFLLQLD SCHLDLGPEG  
501    GTVELIQGRA AKGNCVSLLS PSPEGDPFRS FLLHFYTVPI PKTGTLSCTV  
551    ALRPKTGSQD QEVHRTVFMR LNIISPDLSG CTSKG**TGGG**T HTCPCCPAPE  
601    LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE  
651    VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE  
701    KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES  
751    NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH  
801    NHYTQKSLSL SPGK

(SEQ ID NO: 18)

图16. mENG (27至581) -mFc的氨基酸序列

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SP**GG**ERVGCD LQPVDPTRGE VTFTTSQVSE  
51 GCVAQAANAV REVHVLFLDF PGMLSHLELT LQASKQNGTE TQEVFLVLVS  
101 NKNVFVKFQA PEIPLHLAYD SSLVIFQGQP RVNITVLPSL TSRKQILDWA  
151 ATKGAITSIA ALDDPQSIVL QLGQDPKAPF LCLPEAHKDM GATLEWQPRA  
201 QTPVQSCRLE GVS GHKEAYI LRILPGSEAG PRTVTVM MEL SCTSGDAILI  
251 LHGPPYVSWF IDINHSMQIL TTGEYSVKIF PGSKVKGVEL PDTPQGLIAE  
301 ARKLNASIVT SFVELPLVSN VSLRASSCGG VFQTPAPVV TTPPKDTCSP  
351 VLLMSLIQPK CGNQVMTLAL NKKHVQTLQC TITGLTFWDS SCQAEDTDDH  
401 LVLSSAYSSC GMKVTAHVVS NEVIISFP SG SPPLRKKVQC IDMDSL SFQL  
451 GLYLSPHFLQ ASNTIELGQQ AFVQVSVSPL TSEVTVQLDS CHLDLGPEGD  
501 MVELIQSRTA KGSCVTLLSP SPEGDPRFSF LLRVYMVPTP TAGTLSCNLA  
551 LRPSTLSQEV YKTVSMRLNI VSPDL SGKGT **GGGE**PRVPIT QNPCPPLKEC  
601 PPCAAPDLLG GPSVFIFPPK IKDVL MISLS PMVTCVVVDV SEDDPDVQIS  
651 W FVNNVEVHT AQTQTHREDY NSTLRVVSAL PIQH QDWMSG KEFKCKVNNR  
701 ALPSPIEKTI SKPRGPVRAP QVYVLPPPAE EMTKKEFSLT CMITGFLPAE  
751 IAVDWTSNGR TEQNYKNTAT VLDSDGSYFM YSKLRVQKST WERGS LFACS  
801 VVHEGLHNHL TTKTISRSLG K

(SEQ ID NO: 19)



图17. 编码mENG (27至581) -mFc的核苷酸序列

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG GGGAAAGAGT CGGCTGTGAT CTACAGCCTG  
101 TGGACCCAC AAGGGGTGAG GTGACGTTTA CCACCAGCCA GGTCTCCGAG  
GGCTGTGTAG CTCAGGCTGC CAATGCTGTG CGTGAAGTCC ACGTTCTCTT  
201 CCTGGATTTT CCCGGAATGC TGTACATCT GGAGCTGACT CTTCAGGCAT  
CCAAGCAAAA TGGCACGGAG ACCCAGGAGG GTTTCCTGGT CCTCGTTTCG  
301 AACAAAAATG TCTTCGTGAA GTTCCAGGCC CCGGAAATCC CATTGCACTT  
GGCCTACGAC TCCAGCCTGG TCATCTTCCA AGGACAGCCA AGAGTCAACA  
401 TCACAGTGCT ACCATCCCTT ACCTCCAGGA AACAGATCCT CGACTGGGCA  
GCCACCAAGG GCGCCATCAC CTCGATAGCA GCACTGGATG ACCCCCAAAG  
501 CATCGTCCTC CAGTTGGGCC AAGACCCAAA GGCACCATTC TTGTGCTTGC  
CAGAAGCTCA CAAGGACATG GGCGCCACAC TTGAATGGCA ACCACGAGCC  
601 CAGACCCAG TCCAAGCTG TCGCTTGGAA GGTGTGTCTG GCCACAAGGA  
GGCCTACATC CTGAGGATCC TGCCAGGTC TGAGGCCGGG CCCCAGGACGG  
701 TGACCGTAAT GATGGAATG AGTTGCACAT CTGGGGACGC CATTCTCATC  
CTGCATGGTC CTCCATATGT CTCCTGGTTC ATCGACATCA ACCACAGCAT  
801 GCAGATCTTG ACCACAGGTG AATACTCCGT CAAGATCTTT CCAGGAAGCA  
AGGTCAAAGG CGTGGAGCTC CCAGACACAC CCAAGGCCT GATAGCGGAG  
901 GCCCCAAGC TCAATGCCAG CATTGTCACC TCCTTTGTAG AGCTCCCTCT  
GGTCAGCAAT GTCTCCCTGA GGGCCTCCAG CTGCGGTGGT GTGTTCCAGA  
1001 CCACCCCTGC ACCCGTTGTG ACCACACCTC CCAAGGACAC ATGCAGCCCC  
GTGCTACTCA TGTCCCTGAT CCAGCCAAAG TGTGGCAATC AGGTCATGAC  
1101 TCTGGCACTC AATAAAAAAC ACGTGCAGAC TCTCCAGTGC ACCATCACAG  
GCCTGACTTT CTGGGACTCC AGCTGCCAGG CTGAAGACAC TGACGACCAT  
1201 CTTGTCTGA GTAGCGCTA CTCCAGCTGC GGCATGAAAG TGACAGCCCA  
TGTGGTCAGC AATGAGGTGA TCATCAGTTT CCCGTCAGGC TCACCACCAC  
1301 TTCGGAAAAA GGTACAGTGC ATCGACATGG ACAGCCTCTC CTTCCAGCTG  
GGCCTCTACC TCAGCCCGCA CTTCTCTCCAG GCATCCAACA CCATCGAACT  
1401 AGGCCAGCAG GCCTTCGTAC AGGTGAGCGT GTCTCCATTG ACCTCTGAGG  
TCACAGTCCA GCTAGATAGC TGCCATCTGG ACTTGGGGCC CGAAGGGGAC  
1501 ATGGTGGAAC TCATCCAGAG CCGAACAGCC AAGGGCAGCT GTGTGACCTT  
GCTGTCTCCA AGCCCTGAAG GTGACCCACG CTTCAGCTTC CTCCTCCGGG  
1601 TCTACATGGT GCCCACACCC ACCGCTGGCA CCCTCAGTTG CAACTTAGCT  
CTGCGCCCTA GCACCTTGTC CCAGGAAGTC TACAAGACAG TCTCCATGCG  
1701 CCTGAACATC GTCAGCCCTG ACCTGTCTGG TAAAGGCACC GGTGGGGGTG  
AGCCCAGAGT GCCCATAACA CAGAACCCCT GTCCTCCACT CAAAGAGTGT  
1801 CCCCATGCG CAGCTCCAGA CCTCTGGGT GGACCATCCG TCTTCATCTT  
CCCTCCAAAG ATCAAGGATG TACTCATGAT CTCCTGAGC CCCATGGTCA

图17 (2页中的第1页)

1901 CATGTGTGGT GGTGGATGTG AGCGAGGATG ACCCAGACGT CCAGATCAGC  
TGGTTTGTGA ACAACGTGGA AGTACACACA GTCAGACAC AAACCCATAG  
2001 AGAGGATTAC AACAGTACTC TCCGGGTGGT CAGTGCCCTC CCCATCCAGC  
ACCAGGACTG GATGAGTGGC AAGGAGTTCA AATGCAAGGT CAACAACAGA  
2101 GCCCTCCCAT CCCCCATCGA GAAAACCATC TCAAAACCCA GAGGGCCAGT  
AAGAGCTCCA CAGGTATATG TCTTGCCTCC ACCAGCAGAA GAGATGACTA  
2201 AGAAAGAGTT CAGTCTGACC TGCATGATCA CAGGCTTCTT ACCTGCCGAA  
ATTGCTGTGG ACTGGACCAG CAATGGGCGT ACAGAGCAAA ACTACAAGAA  
2301 CACCGCAACA GTCCTGGACT CTGATGGTTC TTACTTCAIG TACAGCAAGC  
TCAGAGTACA AAAGAGCACT TGGGAAAGAG GAAGTCTTTT CGCCTGCTCA  
2401 GTGGTCCACG AGGGTCTGCA CAATCACCTT ACGACTAAGA CCATCTCCCC  
GTCTCTGGGT AAATGA  
(SEQ ID NO: 20)

图17续 (2页中的第2页)

图18. hENG (26至586) -hFc与BMP-9的高亲和力结合

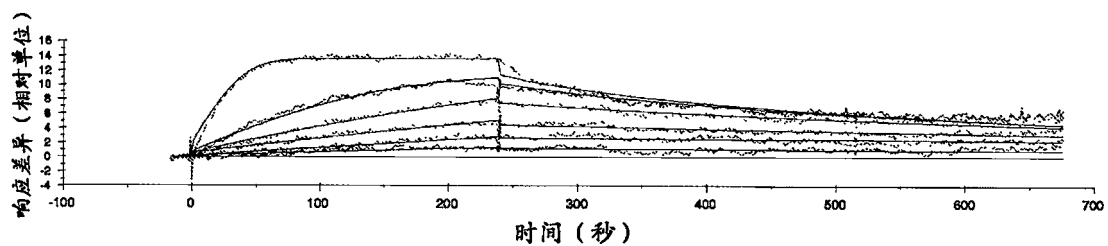


图19. hENG (26至586) -hFc与BMP-10的高亲和力结合

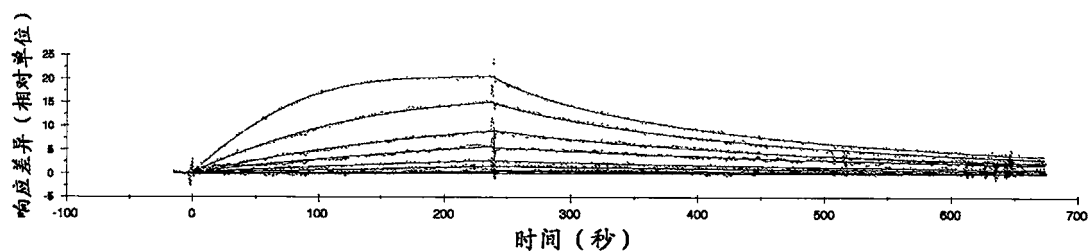


图20. 可溶性hENG胞外结构域hENG (26至586) 对BMP-9与ALK1之结合的作用

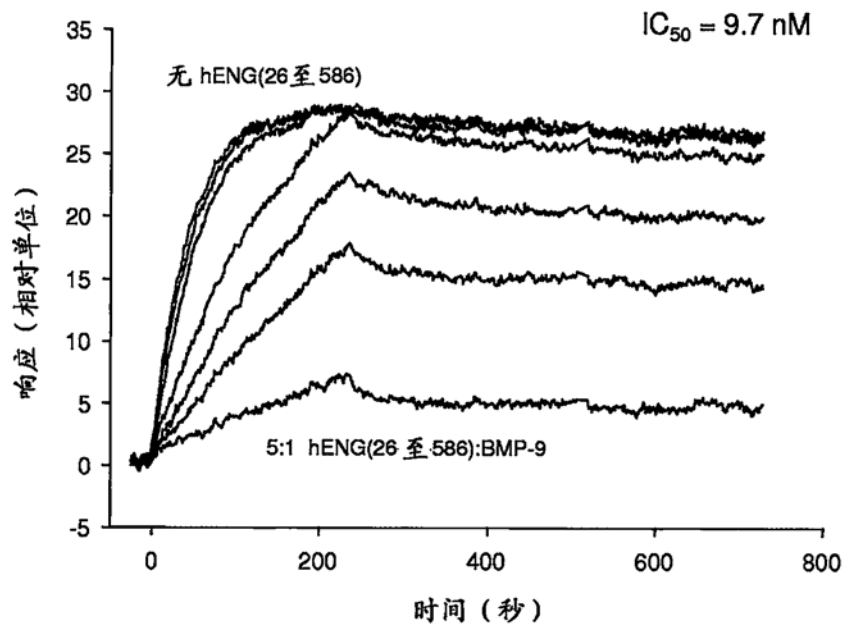


图21. 可溶性hENG胞外结构域hENG (26至586) 对BMP-10与ALK1之结合的作用

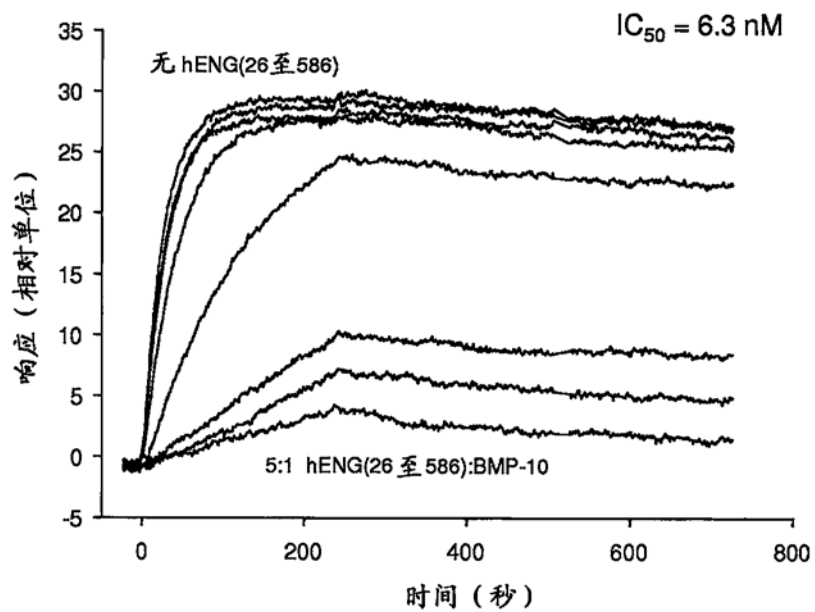


图22. mENG (27至581)-hFc对由培养的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 形成之索的作用

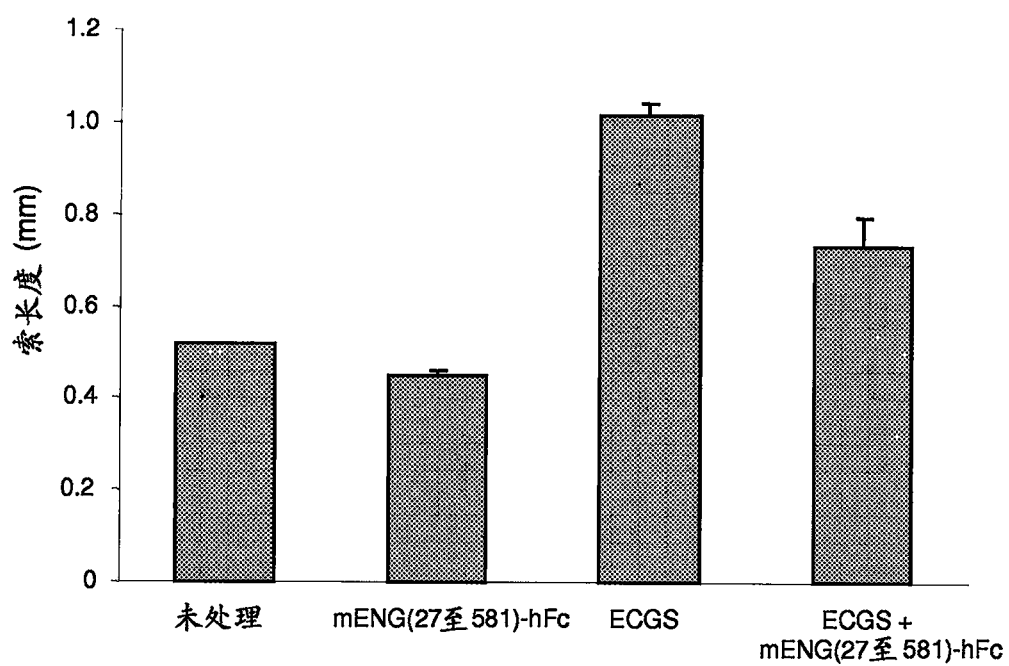


图23. mENG (27至581)-hFc在CAM测定中抑制VEGF刺激的血管发生

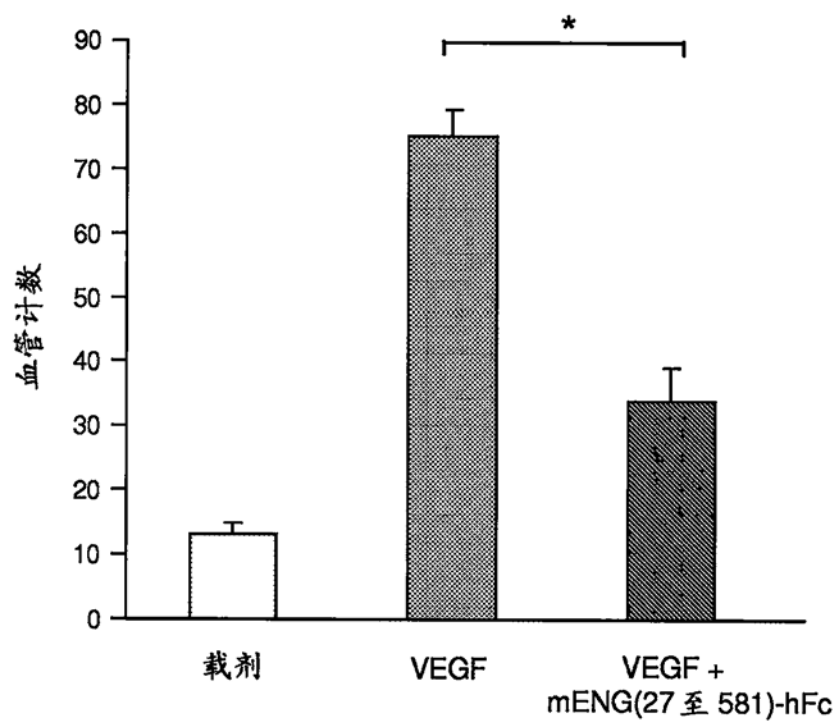


图24. mENG (27至581)-mFc在小鼠血管发生反应器测定中对生长因子刺激之血管发生的作用

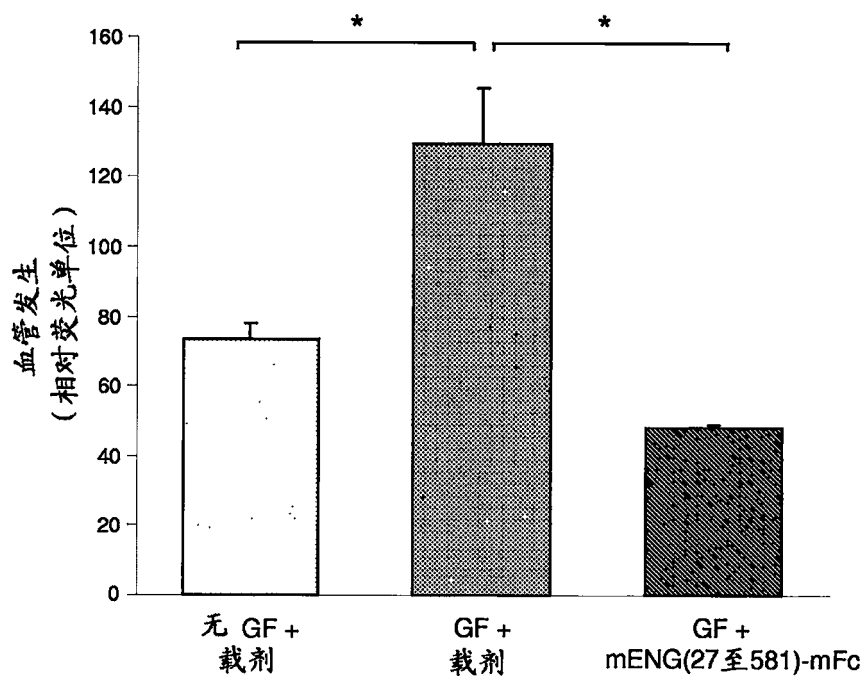


图25. 选定的截短的hENG构建体的示意性比较

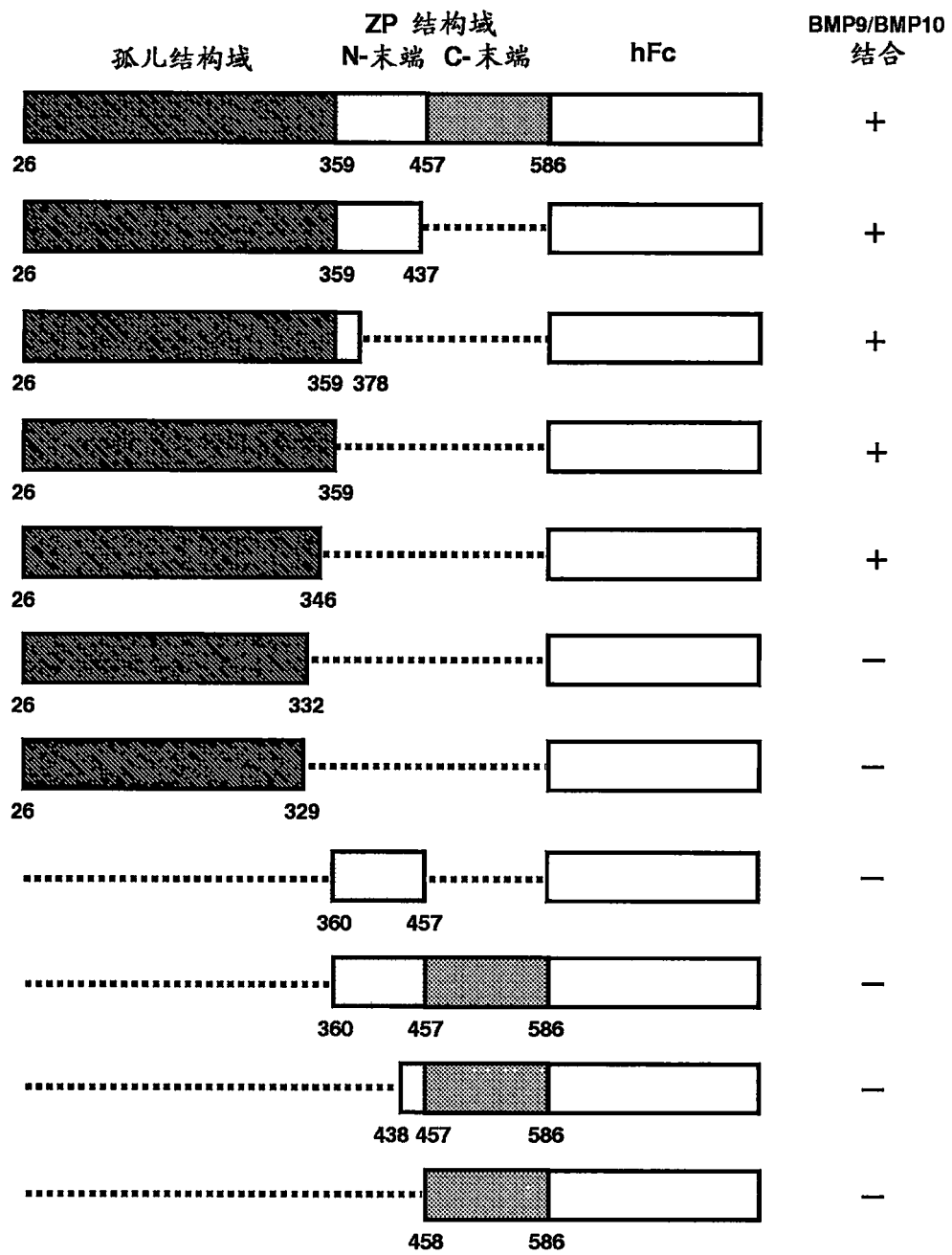


图26. hENG (26至437) -hFc的氨基酸序列

1     MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SP**GA**ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK  
51     GCVAQAPNAI LEVHVLFLF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV  
101    NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPST PKTQILEWAA  
151    ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRT  
201    ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL  
251    ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG  
301    EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS  
351    PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVAHLK CTITGLTFWD PSCEAEDRGD  
401    KFVLR SAYSS CGMQVSASMI SNEAVVNILS SSSPQ**RTG**GG PKSCDKTHTC  
451    PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN  
501    WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK  
551    ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD  
601    IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS  
651    VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

(SEQ ID NO: 21)



图27. 编码hENG (26至437) -hFc的核苷酸序列

```

1      ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGIGTGAGAGC
      AGTCTTTCGTT TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG
101    TGGGCCCCGA GAGGGACGAG GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
      GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT
201    CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCCAGGCAT
      CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCAGAGAG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
301    AACAGCAGTG TCTTCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACCT
      GGCCTACAAT TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA
401    CCACAGAGCT GCCATCCTTC CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT
      GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG CTGAATGACC CCCAGAGCAT
501    CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC TGCATGCTGG
      AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
601    GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC
      GCACATCCTG AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGCC CGGACGGTGA
701    CGGTGAAGGT GGAAGTGAAG TCGCACCCCG GGGATCTCGA TGCCGTCCTC
      ATCCTGCAGG GTCCCCCTA CGTGTCTGG CTCATCGACG CCAACCACAA
801    CAIGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC TTTCCAGAGA
      AAAACATTCG TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCTGGGG
901    GAGGCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC
      GTGGGCCAGC ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC
1001   AGACCTCACC CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCAAGGA CACTTGTAGC
      CCGGAGCTGC TCATGTCCTT GATCCAGACA AAGTGTGCCG ACGACGCCAT
1101   GACCCITGTA CTAAAGAAAG AGCTTGTTCG GCATTTGAAG TGCACCATCA
      CGGGCCTGAC CTTCTGGGAC CCCAGCTGTG AGGCAGAGGA CAGGGGTGAC
1201   AAGTTTGTCT TCGCAGTGC TTAATCCAGC TGTGGCATGC AGGTGTCAGC
      AAGTATGATC AGCAATGAGG CGGTGGTCAA TATCCTGTCG AGCTCATCAC
1301   CACAGCGGAC CGGTGGTGA CCCAAATCTT GTGACAAAAC TCACACATGC
      CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCTCTT
1401   CCCCCAAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
      CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC
1501   TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA
      GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGTC
1601   ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
      GCCCTCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC
1701   CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
      AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCTTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC
1801   ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC
      CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCTC TATAGCAAGC
1901   TCACCGTGGG CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC
      GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT
2001   GTCCCCGGGT AAATGA

```

(SEQ ID NO: 22)

图28. hENG (26至378) -hFc的氨基酸序列

1     MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SP**GA**ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK  
51     GCVAQAPNAI LEVHVLFLF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV  
101    NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELP SF PKTQILEWAA  
151    ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRP RTP  
201    ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGD L DAVL  
251    ILQGPYPVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG  
301    EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKD TCS  
351    PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVA**TGG** GTHTCPPCPA PELLGGPSVF  
401    LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP  
451    REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP IEKTISKAKG  
501    QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY  
551    KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL  
601    SLSPGK

(SEQ ID NO: 23)

图29. 编码hENG (26至378)-hFc的核苷酸序列

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC AGTCTTCGTT
61  TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTAGCCTG TGGGCCCCGA GAGGGACGAG
121 GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC
181 CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT
241 CTCCAGGCAT CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCAGAGAG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACCT GGCCTACAAT
361 TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA CCACAGAGCT GCCATCCTTC
421 CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG
481 CTGAATGACC CCCAGAGCAT CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC
541 TGCATGCTGG AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC GCACATCCTG
661 AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGCC CGGACGGTGA CGGTGAAGGT GGAACIGAGC
721 TGCGCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCTC ATCTGCAGG GTCCCCCTA CGTGTCTTGG
781 CTCATCGACG CCAACCACAA CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC
841 TTTCAGAGA AAAACATTGC TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
901 GAGGCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC GCTGGCCAGC
961 ATTGICTCAC TTCAIGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC AGACCTCACC CGCACCGATC
1021 CAGACCACTC CTCCAAGGA CACTTGTAGC CCGGAGCTGC TCAIGTCCTT GATCCAGACA
1081 AAGTGTGCCG ACGACGCCAT GACCCTGGTA CTAAAGAAAG AGCTTGTGTC GACCGGTGGT
1141 GGAACTCACA CATGCCACC GTGCCAGCA CCTGAACCTC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC
1201 CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGC
1261 GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC
1321 GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT
1381 GTGGTCAGCG TCCTCACCCT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC
1441 AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
1501 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC
1561 CAGGTACAGC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
1621 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACCTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
1681 GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
1741 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
1801 TCCCTGTCCC CGGGTAAATG A

```

(SEQ ID NO: 24)

图30. hENG (26至359)-hFc的氨基酸序列

1     MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SP**GA**ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK  
51     GCVAQAPNAI LEVHVLFLF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV  
101    NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTELPSPF PKTQILEWAA  
151    ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRP RTP  
201    ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL  
251    ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG  
301    EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS  
351    PELLMSLI**TG** GGPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS  
401    RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS  
451    VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS  
501    REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF  
551    FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

(SEQ ID NO: 25)

图31. 编码hENG (26至359) -hFc的核苷酸序列

```

1      ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GIGCTGCTGC TGTGTGGAGC
      AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG
101    TGGGCCCCGA GAGGGACGAG GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
      GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT
201    CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCCAGGCAT
      CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCAGAGAGG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
301    AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACCT
      GGCCTACAAT TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA
401    CCACAGAGCT GCCATCCTTC CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT
      GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG CTGAATGACC CCCAGAGCAT
501    CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC TGCATGCTGG
      AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
601    GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC
      GCACATCCTG AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGCCC CGGACGGTGA
701    CGGTGAAGGT GGAAGTGAAG TCGCACCCCG GGGATCTCGA TGCCGTCCTC
      ATCCTGCAGG GTCCCCCTA CGTGTCTGCG CTCATCGACG CCAACCACAA
801    CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC TTTCCAGAGA
      AAAACATTCG TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
901    GAGGCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC
      GCTGGCCAGC ATTGCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC
1001   AGACCTCACC CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCAAGGA CACTTGTAGC
      CCGGAGCTGC TCAATGCTTT GATCAACGGT GGTGGACCCA AATCTTGTGA
1101   CAAAATCAC ACATGCCCAC CGTGCCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC
      CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC
1201   CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC
      TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA
1301   AGACAAAAGC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC
      GTCCTACCG TCCTGCACCA GGAATGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG
1401   CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA
      AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT GCCCCATCC
1501   CGGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG
      CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG
1601   AGAACAATA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC
      TTCTCTATA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA
1701   CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC
      AGAAGAGCCT CTCCCTGTCC CCGGGTAAAT GA

```

(SEQ ID NO: 26)

图32. 具有N-末端截短之Fc结构域的hENG (26至359)-hFc的氨基酸序列

1     MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SP**GA**ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK  
51     GCVAQAPNAI LEVHVLFFLEF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV  
101    NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSPF PKTQILEWAA  
151    ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTF  
201    ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDVAVL  
251    ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGGLLG  
301    EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTTPPKDTCS  
351    PELLMSLITG **GG**THTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT  
401    CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH  
451    QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK  
501    NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL  
551    TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK

(SEQ ID NO: 27)

图33. 编码具有N-末端截短之Fc结构域的hENG (26至359)-hFc的核苷酸序列

```

1   ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
    AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG
101 TGGGCCCCGA GAGGGACGAG GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
    GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT
201 CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCCAGGCAT
    CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCAGAGAG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACTT
    GGCCTACAAI TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA
401 CCACAGAGCT GCCATCCTTC CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT
    GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG CTGAATGACC CCCAGAGCAT
501 CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC TGCATGCTGG
    AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC
    GCACATCCTG AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGCCC CGGACGGTGA
701 CGGTGAAGGT GGAACIGAGC TGCGCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCCCTC
    ATCCTGCAGG GTCCCCCTA CGTGTCTTGG CTCATCGACG CCAACCACAA
801 CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC TTTCCAGAGA
    AAAACATTCTG TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
901 GAGGCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCAICCTTCG TGGAGCTACC
    GCTGGCCAGC ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC
1001 AGACCTCACC CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCAAGGA CACTGTAGC
    CCGAGCTGC TCATGTCCTT GATCACCGGT GGTGGAACTC ACACATGCCC
1101 ACCGTGCCCA GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC
    CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTACAA
1201 TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG
    GTACGTGGAC GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG
1301 AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCTGCAC
    CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC
1401 CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC
    GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA GATGACCAAG
1501 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT
    CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA
1601 CGCCTCCCGT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTTA TAGCAAGCTC
    ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT
1701 GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT
    CCCCGGGTAA ATGA (SEQ ID NO: 28)

```

图34. 具有N-末端截短之hFc结构域的hENG (26至346)-hFc的氨基酸序列

1     MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SP**GA**ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK  
51     GCVAQAPNAI LEVHVLFLF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV  
101    NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSPF PKTQILEWAA  
151    ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRP RTP  
201    ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLD AVL  
251    ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG  
301    EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPT**TGGGT**  
351    HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV  
401    KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV  
451    SNKALPAPIE KTISKAKQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY  
501    PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDS DGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF  
551    SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK

(SEQ ID NO: 29)



图35. 编码具有N-末端截短之hFc结构域的hENG (26至346)-hFc的核苷酸序列

```

1   ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC AGTCTTCGTT
61  TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG TGGGCCCCGA GAGGGACGAG
121 GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC
181 CTTGAAGTCC ATGTCTCTT CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT
241 CTCCAGGCAT CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCAGAGAG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACIT GGCCTACAAT
361 TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA CCACAGAGCT GCCATCCTTC
421 CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG
481 CTGAATGACC CCCAGAGCAT CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC
541 TGCAIGCTGG AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC GCACATCCTG
661 AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGCCCC CGGACGGTGA CGGTGAAGGT GGAAGTGAAG
721 TGCGCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCTC ATCCTGCAGG GTCCCCCTTA CGTGTCTCTG
781 CTCATCGACG CCAACCACAA CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC
841 TTTCCAGAGA AAAACATTTC TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
901 GAGGCCCCGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC GCTGGCCAGC
961 ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC AGACCTCACC CGCACCGATC
1021 CAGACCACTC CTCCCACCGG TGGTGGAACT CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA
1081 CTCCTGGGGG GACCGTCAGT CTTCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC
1141 TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC
1201 AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG
1261 GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG
1321 CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG
1381 AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA
1441 TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACGAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT
1501 CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC
1561 ACGCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC
1621 AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
1681 AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCCCGGGTA AATGA

```

(SEQ ID NO: 30)

图36. 初始纯化后hENG-hFc蛋白的尺寸排阻色谱图

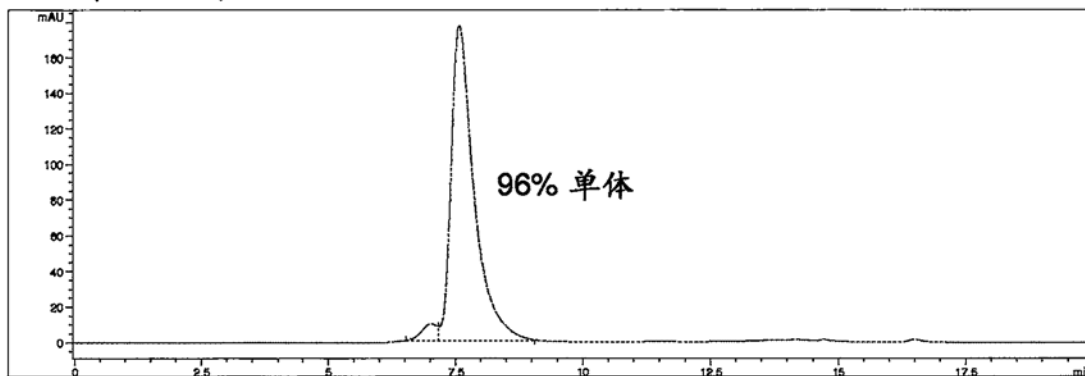
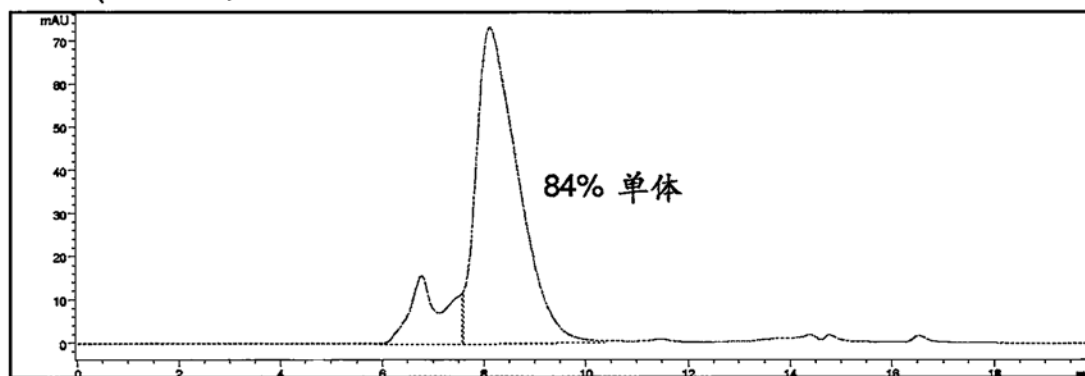
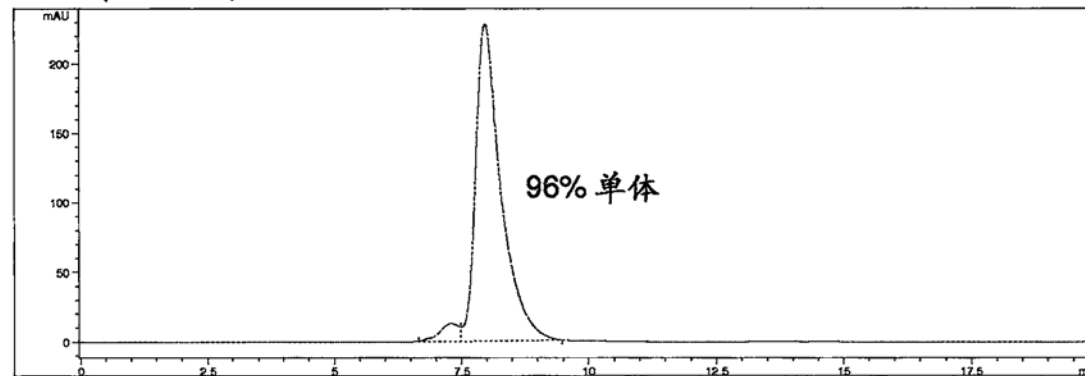
**A** hENG(26至586)-hFc**B** hENG(26至359)-hFc**C** hENG(26至346)-hFc

图37. BMP-9与hENG-hFc变体高亲和力结合的特征

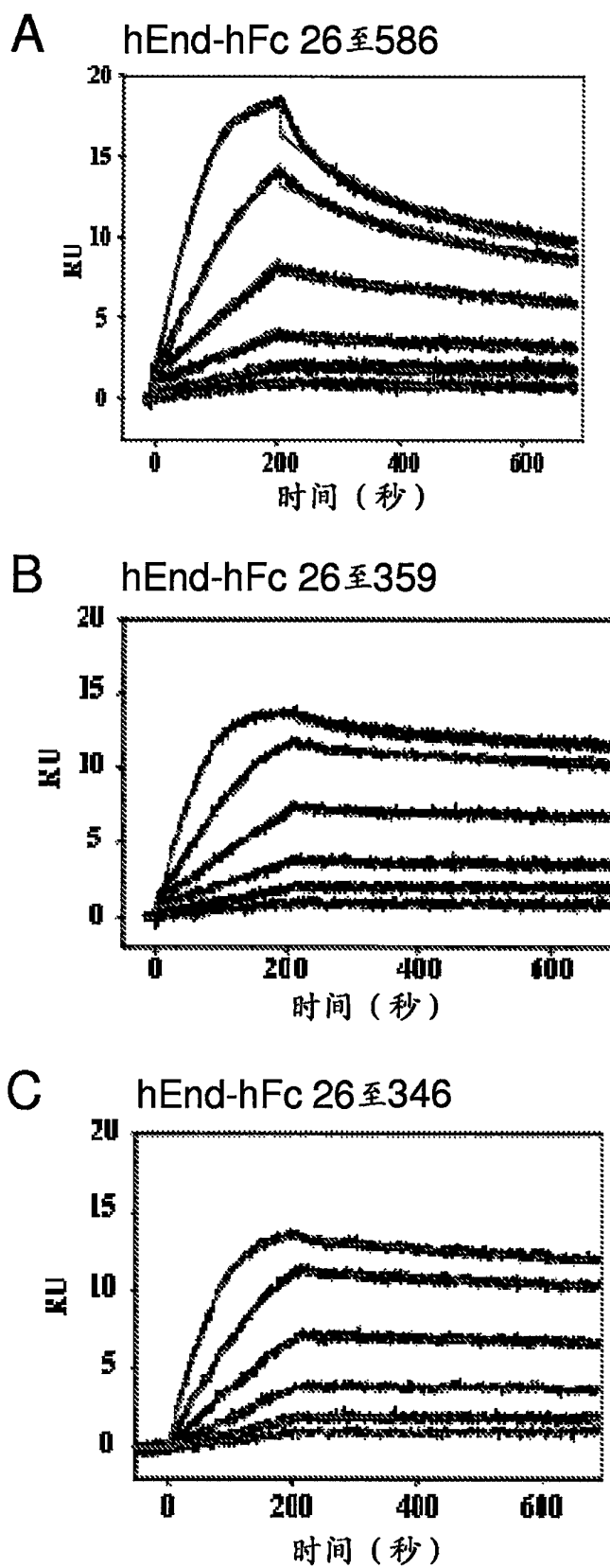


图38. hENG (26至359)-hFc在CAM测定中抑制VEGF刺激的血管发生

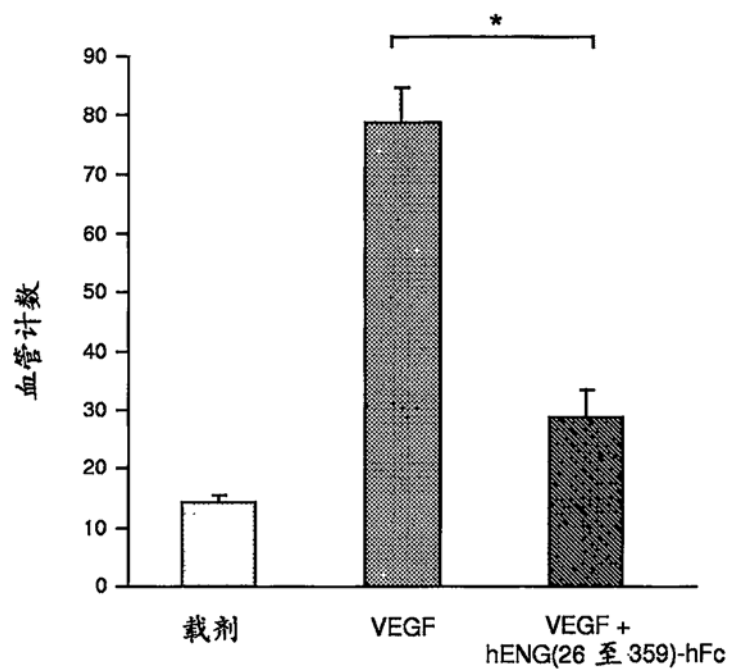


图39. hENG (26至346)-hFc在小鼠血管发生反应器测定中对生长因子刺激之血管发生的作用

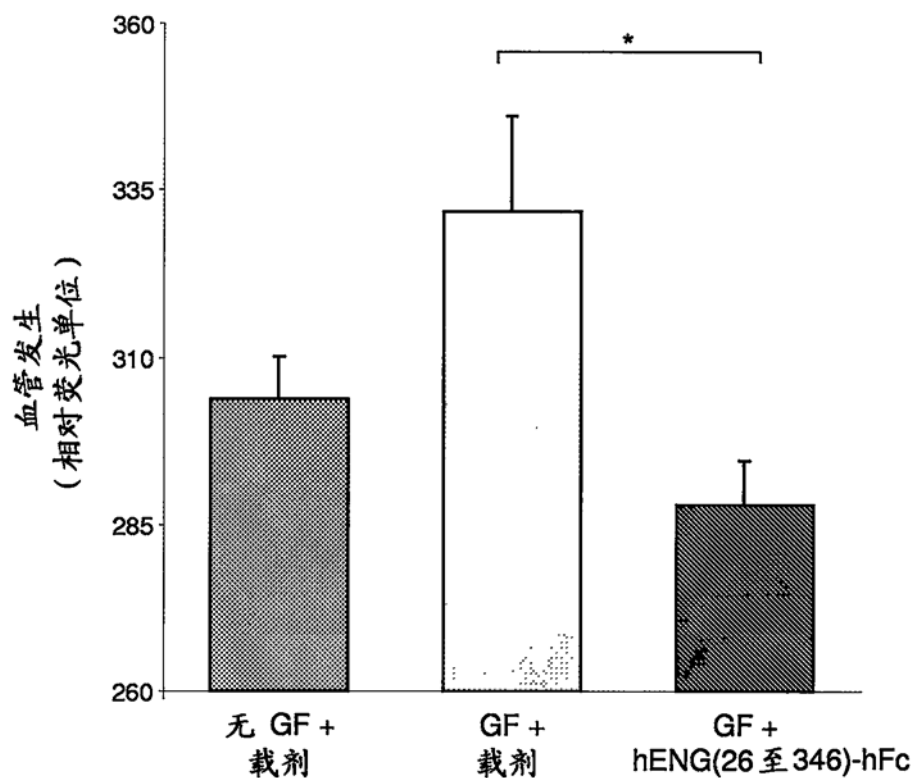


图40. mENG (27至581)-mFc对小鼠中4T1乳腺肿瘤之生长的作用

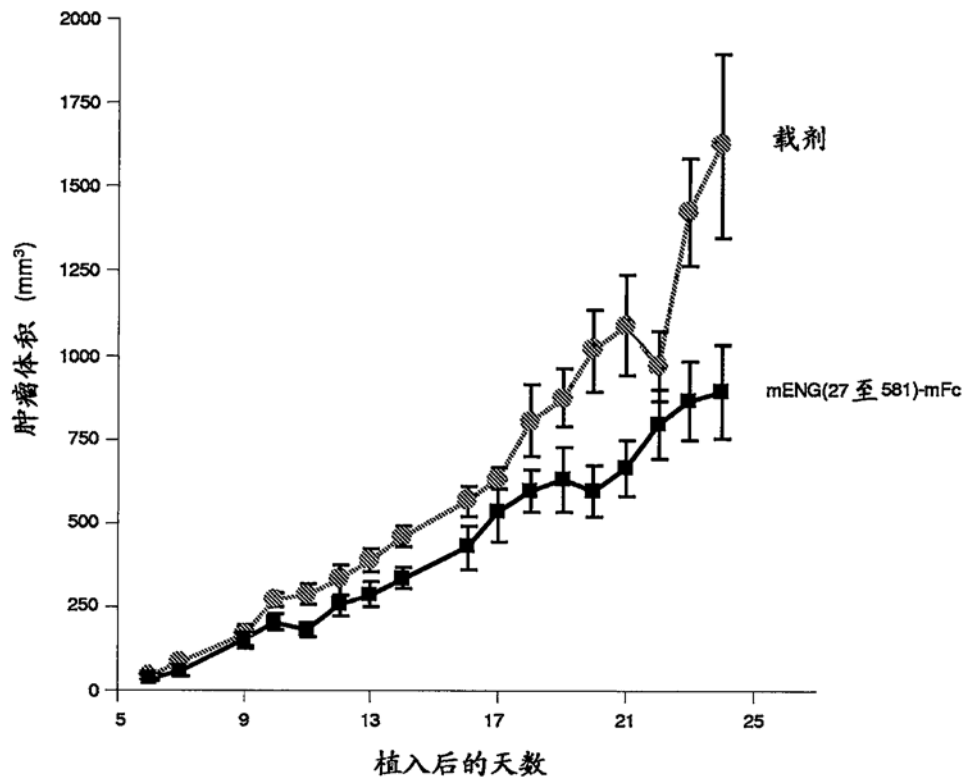


图41. mENG (27至581)-mFc对小鼠中结肠-26肿瘤之生长的作用

