

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610066257.2

[45] 授权公告日 2009 年 6 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 100502945C

[22] 申请日 2006.3.31

[21] 申请号 200610066257.2

[73] 专利权人 成都康弘生物科技有限公司

地址 610036 四川省成都市金牛区蜀西路
36 号

[72] 发明人 俞德超

[56] 参考文献

WO2005027973A2 2005.3.31

CN1706867A 2005.12.14

CN2005020972A2 2005.3.10

血管内皮生长因子及其受体与眼内新生血管性疾病. 赵世红综述, 何守志审校. 眼科研究, 第 21 卷第 1 期. 2003

血管内皮生长因子受体的结构与功能. 张曼等. 生物化学与生物物理进展, 第 24 卷第 1 期. 1997

审查员 丁 海

[74] 专利代理机构 北京华科联合专利事务所

代理人 王 为

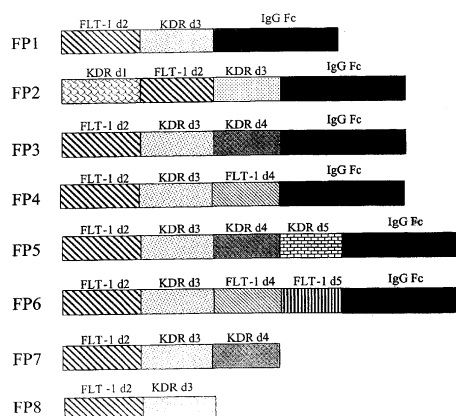
权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 4 页

[54] 发明名称

VEGF 受体融合蛋白在治疗眼睛疾病中的应用

[57] 摘要

本发明涉及 VEGF 受体融合蛋白在治疗眼睛疾病中的应用, 所述眼睛疾病包括年龄相关性黄斑变性, 糖尿病视网膜病变, 糖尿病黄斑瘤腺体以及由新生血管生长而引发的治疗失败如激光凝固体, 手术视网膜移植。



1. 一种血管内皮生长因子 VEGF 的受体融合蛋白 FP3 在制备治疗由新生血管生长而引发的眼科疾病的药物中的应用, 其中 FP3 的氨基酸序列如序列表中的序列 5 所示。

2. 一种血管内皮生长因子 VEGF 的受体融合蛋白 FP3 在制备治疗由视网膜缺血性萎缩导致新生血管形成, 从而引发眼科疾病的药物中的应用, 其中 FP3 的氨基酸序列如序列表中的序列 5 所示。

3. 一种血管内皮生长因子 VEGF 的受体融合蛋白 FP3 在制备治疗由脉络膜新生血管生长, 从而引发眼科疾病的药物中的应用, 其中 FP3 的氨基酸序列如序列表中的序列 5 所示。

4. 根据权利要求 1 所述的应用, 所述眼科疾病包括年龄相关黄斑变性, 糖尿病视网膜病变, 糖尿病性黄斑水肿, 视网膜血管阻塞。

5. 如权利要求 1-4 任一项所述的应用, 所述药物中还含有药学上可接受的载体。

6. 如权利要求 5 所述的应用, 所述药学上可接受的载体选自磷酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液、甘露醇、海藻糖、聚山梨醇酯、氯化钠、蔗糖、三羟甲基氨基甲烷或乳糖。

7. 如权利要求 1-4 任一项所述的应用, 所述融合蛋白能够制成任何适合的药物制剂形式。

8. 如权利要求 7 所述的应用, 所述制剂选自冻干制剂或溶液制剂。

9. 如权利要求 1-4 任一项所述的应用, 所述药物的给药方式包括玻璃体内注射、静脉给药、腹腔注射、皮下注射或以眼药水滴眼方式给药。

10. 如权利要求 1-4 任一项所述的应用, 其中的融合蛋白能够和其他治疗方法结合使用以降低新生血管生长引起的治疗失败机率。

VEGF 受体融合蛋白在治疗眼睛疾病中的应用

技术领域:

本发明涉及 VEGF 受体融合蛋白在治疗因新生血管的生长而引发的各种眼科疾病中的应用。

背景技术:

视网膜血管系统和脉络膜(choroidal)血管系统是组成视网膜的重要组成部分。创伤或疾病而引起的血管管壁结构或功能的异常改变是导致视力下降或丧失的主要原因。例如,糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy)是由于糖尿病而导致视网膜血管增生,进而造成视网膜脱落。它是造成视力丧失的主要原因。在眼睛受伤后或手术后的恢复过程中也可能造成视网膜内新生血管的生长。这一类视网膜血管增生也是造成视力下降或眼睛失明的重要原因(Nature 438: 932-938, 2005)。

年龄相关的黄斑变性(AMD)是一种由视网膜中心区的细胞或组织退化和血管增生而引起的疾病。可分干性和湿性两种。其中湿性 AMD 是脉络膜新生血管形成的最常见形式,它也是引起眼睛失明的主要原因。

血管内皮生长因子(VEGF)是一种专一性调控新生血管生长的蛋白质(Am. J. Pathol. 167:1451-1459, 2005)。VEGF 刺激内皮细胞分裂增生,进而促进新生血管生长,以提供营养和氧气给组织细胞。很多研究表明一旦眼睛视网膜的感光细胞由于营养不足而开始萎缩(称作“缺血性萎缩”),VEGF 在视网膜内的浓度便开始升高,从而促进新生血管生长。这一过程称为“新生血管的形成”(angiogenesis)。在眼内,新生的血管在形态上与正常血管不同,管腔不规则,管壁多为渗漏。这种高通透性或渗漏的血管的异常增生常导致视网膜上产生疤痕,并进一步可发生脱落从而影响到视力。

许多研究表明湿性 AMD 病人的脉络膜组织中有高水平的 VEGF 表达(Invest. Ophthalm. Vis. Sci 37 :855-868, 1996 ; Microvascular Res. 64:162-169, 2002)。由于 VEGF 表达水平与湿性 AMD 之间的相关性,VEGF 可以被用作诊断 AMD 的一个生化指标(Br. J. Ophthalmol. 88:809-815, 2004)。

一些 VEGF 抑制剂可以阻断 VEGF 与内皮细胞上 VEGF 受体 (flt-1、KDR 等) 之间的相互作用, 从而阻止由 VEGF 介导的信息传导, 抑制由 VEGF 高表达而引起的新生血管的生长, 以达到预防和阻止视网膜上出血的目的。这类 VEGF 抑制剂包括 Macugen (pegaptanib sodium), Lucentis, VEGF-Trap, Avastin (bevacizumab) 和 AdPEDF 等。其中 Macugen 和 Avastin 已由美国国家食品和药物管理局 (FDA) 批准上市。

发明内容:

本发明提供一类抑制 VEGF 的融合蛋白, 可用于治疗由于新生血管的生长而引发的各种眼科疾病。所述疾病包括 (但不限于) 所述眼睛疾病包括年龄相关性黄斑变性, 糖尿病视网膜病变, 糖尿病黄斑瘤腺体以及由新生血管生长而引发的治疗失败如激光凝固体, 手术视网膜移植。在本发明中, 所述融合蛋白是指大分子化合物, 特别是 VEGF 受体的重组融合蛋白。更具体而言, 本发明的 VEGF 抑制剂是中国专利申请“抑制血管新生的融合蛋白质及其用途” (申请号 CN200510073595.4) 中描述的 FP₁、FP₂、FP₃、FP₄、FP₅、FP₆ 和本发明提供的 FP₇ 和 FP₈ 中的任何一种。其中 FP₁、FP₂、FP₃、FP₄、FP₅、FP₆ 的融合蛋白氨基酸序列在上述专利说明书中, FP₇ 和 FP₈ 的氨基酸序列在本发明序列表中的序列 1 和序列 2。

本发明所述的 VEGF 受体融合蛋白可以通过上述专利说明书中的方法制备, 其中 FP₁、FP₂、FP₃、FP₄、FP₅、FP₆ 是已知物, FP₇ 和 FP₈ 是新物质, 对于新物质, 本发明提供了其优选的制备方法实施例, 其制备原理和上述专利说明书相同。

本发明经过重组技术制成的制品经过纯化达到药用纯度, 然后根据制剂的需要再将其制备成药物制剂, 这些制剂应该特别适合于静脉注射给药, 玻璃体内注射给药, 腹腔注射, 皮下注射, 局部眼内给药, 其制备工艺可以采用药物制剂的常规制法完成, 优选的是溶液制剂或干粉制剂, 作为干粉制剂, 使用时将干粉溶解使成为溶液。本发明的融合蛋白制剂, 需要时可以加入药物可接受的载体, 所述载体可以是任何适合本发明的制剂形式的药物载体, 优选的选自: 磷酸钠 (sodium phosphate)、琥珀酸钠 (sodium succinate)、组氨酸 (histidine)、甘露醇 (mannitol)、海藻糖 (trehalose dihydrate)、聚山梨醇酯 (polysorbate 20)、氯化钠 (sodium chloride)、蔗糖 (sucrose)、三羟甲基氨基甲烷 (trometamol) 或乳糖, 上述制剂缓冲液 (formulation buffer), 应含有 pH 缓冲系统如磷酸盐

(phosphate)、柠檬酸盐 (citrate)、乙酸盐 (acetate)、琥珀酸盐 (succinate)、三羟甲基氨基甲烷 (trometamol, 又名 Tris) 或组氨酸 (histidine) 等中的一种, pH 的范围在 3 至 9; 可含有渗透压调节剂如氯化钠 (sodium chloride)、葡萄糖 (dextrose) 等; 可含有稳定剂如氨基酸 (amino acids)、甘油 (glycerol)、环糊精 (cyclodextrin)、蔗糖 (sucrose)、海藻糖 (trehalose dihydrate) 等; 可含有防腐剂如噻汞撒 (thimerosal)、亚硫酸氢钠 (sodium bisulfite)、苯基乙醇 (benzyl alcohol) 等。对于冻干制剂, 可含有赋形剂如甘露醇 (mannitol) 等; 对于溶液制剂, 可含有表面活性剂如聚山梨醇酯 (polysorbate 20 或 80)、十二烷基磺酸钠 (SDS) 等。融合蛋白的浓度范围在 0.01mg/ml 至 1000mg/ml。其用量根据临床的需要而定。另外制剂中根据需要还可加入防腐剂, 稳定剂, 助溶剂等辅助成分, 可以选自任何适宜的药剂学常规的辅助成分。溶剂选择水或其他等渗溶液, 缓冲溶液等。

本发明中, 同时还介绍了 VEGF 抑制剂的给药方法。这些抑制剂可以通过多种不同的给药途径给予病人, 其中包括 (但不限于) 静脉给药, 玻璃体内注射, 也可以通过以点眼药的方式在一定剂型下给予病人以达到治疗眼疾的目的。

本发明意外的发现本发明的融合蛋白形式的 VEGF 抑制剂较现有技术具有优良的眼病治疗作用, 而且稳定性好, 安全性高, 副作用小, 效果优良, 本发明通过实验数据证明了本发明的有益效果, 具体数据见实施例。

附图说明:

图 1: 本发明的 8 种融合蛋白的结构示意图

图 2: 融合蛋白与 VEGF 结合的亲和力的比较

图 3: 融合蛋白对视网膜缺血性萎缩引起的新生血管形成的影响

图 4: 融合蛋白对脉络膜新生血管生长的影响

具体实施方式:

以下通过实施例进一步说明本发明, 但不作为对本发明的限制。

实施例 1, FP₇ 的构建

融合蛋白 FP₇ 是由引物 flt-1 D2(F)、flt-1 D2(R)、KDR D3(F) 和 KDR D3-4(R) (见专利申请书, 申请号 CN200510073595.4) 从 HUVEC 细胞提取到的 mRNA 作为模板合成的 cDNA 上放大到的 flt-1 和 KDR 基因片段重组而成。具体

的条件是在变性 95°、30 分钟,退火 56°、45 秒钟,延伸 72°、2 分钟的条件
下,进行 PCR 扩增,30 个循环,获得 flt-1 和 KDR IgG 样结构域的 PCR 产物。
用 TA cloning 试剂盒,把 PCR 产物克隆到 PCR2.1 质粒中,并转染 *E. coli*,选
取白色菌落,加入 LB 培养基,培养过夜。用 Qiagen 质粒提取试剂盒提取质粒
后酶切及测序鉴定。采用拼接 PCR (Sewing PCR) 方法,把 flt-1 片段、KDR
片段和 IgG 铰链区局部序列的核糖核酸一起连接。在两端引物中设计 EcoR1 酶切
位点。PCR 终产物在用 EcoR1 酶切后,经 Qiagen 纯化试剂盒纯化 DNA 片段,并
插入 pcDNA3.1 质粒。重组质粒转染 *E. coli*,选取阳性菌落,加入 LB 培养基,
培养过夜。Qiagen 质粒提取质粒后酶切,并测序鉴定。已获证实的质粒再转染
CHO 细胞就得稳定表达融合蛋白 FP7 的细胞系。FP7 的具体核苷酸序列见序列表 3。
在此融合蛋白 C 末端保留有铰链区 (hinge) 的部分序列。

实施例 2, FP₈ 的构建

融合蛋白 FP8 是以 FP7 为模板直接用 PCR 扩增而成,PCR 所用引物是
flt-1D₂ (F) 和 KDR D3-hing (R)。后者的序列为:
5'-aggtgctgggcacagtgggcatgtgtgagtttgtcttttcattggaccctgacaaatg。它包括与 KDR 第三
免疫球蛋白样区相互补的序列和人 IgG Fc 铰链区的部分核苷酸序列。PCR 扩增
和基因克隆的方法与实例 1 相同。最终将插入了 FP8 的 Pc DNA3.1 质粒转染
CHO 细胞,并获得稳定细胞株,用于蛋白质的表达。FP8 的氨基酸序列见序列表
2,核苷酸序列见序列表 3。

实施例 3 融合蛋白与 VEGF 结合亲和力的实验

本发明用测定 VEGF 的量来确定各种融合蛋白结合 VEGF 的能力。在这一试验
中,将一定量的 VEGF (10PM) 加入试管中,然后将经稀释的含有不同量的各种
融合蛋白加到含有 VEGF 的试管中,混合好后,在 37° 的培养箱中保存一个小时。
一个小时以后,试管中游离的 VEGF 由 R&D 系统公司 (R&D systems) 提供的检测
VEGF 量的试剂盒——VEGF 检测试剂盒 (VEGF assay Kit) 测定。测定到的结果
经软件的处理而得到如图 2 的结果,图 2 表明,FP₁、FP₃和 FP₇都能有效地与 VEGF
亲和结合,其结合亲和能力可由 IC₅₀表示,分别是 11.2PM、4.3PM 和 4.1 PM。
这个实验证明,FP₃和 FP₇在体外与 VEGF 的结合能力相似,且两者都高于 FP₁。

这个试验结果进一步说明了 KDR 的第四免疫球蛋白样区域的氨基酸序列可

增进融合蛋白对 VEGF 的结合能力。

实施例 4 融合蛋白阻止由视网膜缺血性萎缩引起的新生血管的形成的实验结果

将出生七天的幼鼠放在含高氧分压（75%±2%）的培养箱内，并控制温度为 23℃±2℃，日光照明。在此条件下培养几天之后，视网膜中心将无血管新生发生，五天之后，将幼鼠放回到正常氧分压的培养箱中。由于室内相对较低的氧分压浓度而对幼鼠的视网膜产生低氧条件，从而刺激产生类似于糖尿病视网膜病变和其他由于缺血性萎缩视网膜病变的新生血管反应。

利用这个模型，可以对三种融合蛋白（FP₁、FP₃ 和 FP₇）在缺血性萎缩视网膜病变相关的新生血管生成方面的作用做出评估。

将幼鼠放在高氧分压的培养箱中，五天之后带回到正常氧分压室内的培养箱中。幼鼠被分成五个组，每组 10 只，一天之后以 30mg/kg 的量将融合蛋白经腹腔注射幼鼠，每两天注射一次，一共注射 4 次。对照组的幼鼠则被注射含相同量的 Fc 蛋白。治疗期结束后，从各组取小鼠 6 只，心脏注射荧光素 FAM，10 分钟后，幼鼠的视网膜被摘取用来分析新生血管的生成情况。操作时将视网膜放平，在荧光显微镜下观察新生血管及荧光渗漏情况，各组其余四只小鼠的眼睛用石蜡包埋，切片后用 H&E 染色。镜下计数血管内皮细胞核的数目，从而判断融合蛋白对新生血管生长的影响（Investigative Ophthalmology visual science 43, 1994—2000, 2002）。结果如图 3 所示。接受 Fc 蛋白注射的幼鼠视网膜都表现出严重的病变。在视网膜表面内脉膜上可观察到大量杂乱无章的血管。在经融合蛋白处理过的幼鼠其视网膜上则无明显的血管生长（如图 3）。其中 FP₃ 最为有效，FP₇ 也较有效，但其效果类似于 FP₁，其主要原因可能是因缺失 Fc 片段而影响它在体内的稳定性。FP₁ 与 FP₇ 的效果类似。

同时，我们也试验了将这些融合蛋白在通过玻璃体内给药的情况下对新生血管的影响。试验采用同样的动物模型，在动物回到正常氧分压的培养箱内一天后，以每只眼睛 0.5 毫克的量进行玻璃体内注射，每只动物只接受一次治疗。给药之后第七天，动物的视网膜按上述方法收集和处理。融合蛋白对新生血管的影响如图 3 所示。结果表明，经玻璃体内注射，这些融合蛋白对新生血管的生长具有显著的抑制作用。玻璃体内注射的作用效果要优于腹腔注射。同时，通过这组实验，

我们观察到 FP₇ 的效果类似于 FP₃ 两者都要好于 FP₁。在这个试验中, 由于是玻璃体内注射, FP₇ 不需经体内血液循环。因此, 其血液内稳定性较低的物质不会影响它的疗效。

实施例 5 融合蛋白对激光诱发的脉络膜新生血管生长的影响

根据发表的文献资料 (American Journal Pathology 153, 1641-1646, 1998), 我们利用激光在大鼠的眼睛上建立能诱发眼底脉络膜新生血管生成的 AMD 模型。将 150 只左右的大鼠分成四组, 对照组的 10 只大鼠通过皮下注射接受 Fc 蛋白 (20 mg/kg), 处理过的每 10 只大鼠分别通过皮下注射 20 mg/kg 的 FP₁、FP₃ 和 FP₇ 总共接受 5 次注射, 分别在激光处理前一天和激光处理之后的第 3、6、9 和 12 天。在激光处理后第 15 天, 大鼠通过静脉注射接受 50mg 荧光标记的右旋糖苷, 然后经麻醉处理, 将眼睛摘除, 尽快剥离脉络膜, 剖成扁平状或冷冻包埋做切片用于分析 CNV 病变情况。结果如图 4 表明, 经融合蛋白处理小鼠的 CNV 面积都比对照 (Fc) 要小, 其中 FP₃ 的效果要优于 FP₁ 和 FP₇。FP₇ 与 FP₁ 的抑制 CNV 生成方面效果相当。

实施例 6 融合蛋白在治疗眼疾中的应用

这些融合蛋白可以通过适当的方式, 如玻璃体内注射或静脉给药, 可用于治疗与病变新生血管生长相关的一系列眼科疾病, 其中包括年龄相关性黄斑变性 (AMD)、糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy)、糖尿病黄斑水肿 (diabetic macular edema) 和视网膜血管阻塞 (central retinal vein occlusion)。同时这些融合蛋白也可以和其他治疗方法一起结合使用, 如和光敏药物 (photocoagulation) 或者与激光疗法结合使用, 以降低在激光处理之后由新生血管生长引起的治疗失败机率。这些融合蛋白还可以和手术结合使用。如在视网膜移植之后, 由于新生血管的生长而使视网膜移植的手术失败。如果在手术的同时, 病人接受这些融合蛋白的治疗, 就可以提高视网膜移植的成功率。AMD 病人在通过正常眼科检查之后, 建立基本的基准线, 然后通过玻璃体注射的方法将融合蛋白 (如 FP₃ 或 FP₇) 注入体内。经处理后病人将到医院接受观察和检查, 以记录这些融合蛋白对 AMD 的影响。一般在接受治疗之后第 1、2、6、14、30 和 90 天分别检查一次。同时, 病人可能需要接受多次治疗, 可以是每两到八周注射一次。每次注射的量为每只眼睛 10 微克至 5 毫克范围内。

实施例7 FP3 融合蛋白冻干制剂的制备

先配制好制剂缓冲液（formulation buffer），将合格的原液（drug substance）解冻后，用制剂缓冲液稀释到所需的蛋白浓度。进行过滤除菌后，用移液器/分装器按要求装量分装至洁净的西林瓶（规格：0.5ml/2ml）中，往瓶口加洁净的丁基橡胶塞（半压塞）。放入冷冻干燥机中，设定好合适的冻干曲线（包括预冻、冷冻、抽真空、升温各阶段的时间、温度、真空度等参数的设定），进行冻干。当冻干过程结束后，压紧胶塞，取出西林瓶，在胶塞上加铝塑盖，用轧盖器轧紧。往西林瓶上贴标签，装入纸盒，存放于适宜的温度。

实施例8 FP3 融合蛋白溶液制剂的制备

先配制好制剂缓冲液（formulation buffer），将合格的原液（drug substance）解冻后，用制剂缓冲液稀释到所需的蛋白浓度。进行过滤除菌后，用移液器/分装器按要求装量分装至洁净的西林瓶（规格：5ml/20ml）中，往瓶口加洁净的丁基橡胶塞，塞紧。在丁基橡胶塞上加铝塑盖，用轧盖器轧紧。往西林瓶上贴标签，装入纸盒，存放于适宜的温度。

实施例9 FP3 融合蛋白眼用制剂的制备

先配制好制剂缓冲液，将合格的原液（drug substance）解冻后，用制剂缓冲液稀释到所需的蛋白浓度。进行过滤除菌后，用移液器按要求装量（ $\leq 200\mu\text{l}$ ）分装至洁净的西林瓶（规格：0.5ml）中，或用玻璃注射器（规格：1ml，带灰橡胶活塞、27号针头）抽吸至要求装量（ $\leq 100\mu\text{l}$ ）。对于西林瓶，在瓶口端加洁净的丁基橡胶塞，塞紧，在丁基橡胶塞上加铝塑盖，用轧盖器轧紧，往西林瓶上贴标签；对于注射器，在活塞处加装橡胶塞，在针头上加装灰橡胶罩，在橡胶罩外再加装硬塑套，用铝封袋（已印好标签）封装（另配有带螺纹的塑料活塞杆、白色法兰盘接头，用不同的铝封袋封装）。装入纸盒，存放于适宜的温度。

实施例10 FP1 融合蛋白眼用制剂的制备，制备方法同实施例9

实施例11 FP2 融合蛋白眼用制剂的制备，制备方法同实施例9

实施例12 FP4 融合蛋白眼用制剂的制备，制备方法同实施例9

实施例13 FP5 融合蛋白眼用制剂的制备，制备方法同实施例9

实施例14 FP6 融合蛋白眼用制剂的制备，制备方法同实施例9

实施例15 FP7 融合蛋白眼用制剂的制备，制备方法同实施例9

序列表

<110>成都康弘生物科技有限公司

<120> VEGF 受体融合蛋白在治疗眼睛疾病中的应用

<160>4

<210>1

<211>308

<212>PRT

<213>人工序列

<400>1

GlyArgProPheValGluMetTyrSerGluIleProGluIleIle 15
HisMetThrGluGlyArgGluLeuValIleProCysArgValThr 30
SerProAsnIleThrValThrLeuLysLysPheProLeuAspThr 45
LeuIleProAspGlyLysArgIleIleTrpAspSerArgLysGly 60
PheIleIleSerAsnAlaThrTyrLysGluIleGlyLeuLeuThr 75
CysGluAlaThrValAsnGlyHisLeuTyrLysThrAsnTyrLeu 90
ThrHisArgGlnThrAsnThrIleIleAspValValLeuSerPro 105
SerHisGlyIleGluLeuSerValGlyGluLysLeuValLeuAsn 120
CysThrAlaArgThrGluLeuAsnValGlyIleAspPheAsnTrp 135
GluTyrProSerSerLysHisGlnHisLysLysLeuValAsnArg 150
AspLeuLysThrGlnSerGlySerGluMetLysLysPheLeuSer 165
ThrLeuThrIleAspGlyValThrArgSerAspGlnGlyLeuTyr 180
ThrCysAlaAlaSerSerGlyLeuMetThrLysLysAsnSerThr 195
PheValArgValHisGluLysProPheValAlaPheGlySerGly 210
MetGluSerLeuValGluAlaThrValGlyGluArgValArgIle 225
ProAlaLysTyrLeuGlyTyrProProProGluIleLysTrpTyr 240
LysAsnGlyIleProLeuGluSerAsnHisThrIleLysAlaGly 255
HisValLeuThrIleMetGluValSerGluArgAspThrGlyAsn 270
TyrThrValIleLeuThrAsnProIleSerLysGluLysGlnSer 285

HisValValSerLeuValValTyrValProProAspLysThrHis 300

ThrCysProLeuCysProAlaPro 308

<210>2

<211>214

<212>PRT

<213>人工序列

<400>2

GlyArgProPheValGluMetTyrSerGluIleProGluIleIle 15

HisMetThrGluGlyArgGluLeuValIleProCysArgValThr 30

SerProAsnIleThrValThrLeuLysLysPheProLeuAspThr 45

LeuIleProAspGlyLysArgIleIleTrpAspSerArgLysGly 60

PheIleIleSerAsnAlaThrTyrLysGluIleGlyLeuLeuThr 75

CysGluAlaThrValAsnGlyHisLeuTyrLysThrAsnTyrLeu 90

ThrHisArgGlnThrAsnThrIleIleAspValValLeuSerPro 105

SerHisGlyIleGluLeuSerValGlyGluLysLeuValLeuAsn 120

CysThrAlaArgThrGluLeuAsnValGlyIleAspPheAsnTrp 135

GluTyrProSerSerLysHisGlnHisLysLysLeuValAsnArg 150

AspLeuLysThrGlnSerGlySerGluMetLysLysPheLeuSer 165

ThrLeuThrIleAspGlyValThrArgSerAspGlnGlyLeuTyr 180

ThrCysAlaAlaSerSerGlyLeuMetThrLysLysAsnSerThr 195

PheValArgValHisGluLysAspLysThrHisThrCysProLeu 210

CysProAlaPro 214

<210>3

<211>924

<212>DNA

<213>人工序列

<400>3

ggtagacctt tcgtagagat gtacagtga atccccgaaa ttatacacat gactgaagga 60

agggagctcg tcattccctg ccgggttacg tcacctaaca tcaactgttac tttaaaaaag 120
 ttccacttg acactttgat ccctgatgga aaacgcataa tctgggacag tagaaagggc 180
 ttcatcatat caaatgcaac gtacaaagaa atagggttc tgacctgtga agcaacagtc 240
 aatgggcatt tgtataagac aaactatctc acacatcgac aaaccaatac aatcatagat 300
 gtggtttctga gtccgtctca tggaattgaa ctatctgttg gagaaaagct tgtcttaaat 360
 tgtacagcaa gaactgaact aaatgtgggg attgacttca actgggaata cccttcttcg 420
 aagcatcagc ataagaaact tgtaaaccga gacctaaaaa ccagctctgg gagtgagatg 480
 aagaaatfff tgagcacctt aactatagat ggtgtaacct ggagtacca aggattgtac 540
 acctgtgcag catccagtgg gctgatgacc aagaagaaca gcacatttgt cagggtccat 600
 gaaaaacctt ttgttgcttt tggaagtggc atggaatctc tgggtgaagc cacggtgggg 660
 gagcgtgtca gaatccctgc gaagtacctt ggttaccac cccagaaat aaaatggtat 720
 aaaaatggaa tacccttga gtccaatcac acaattaaag cggggcatgt actgacgatt 780
 atggaagtga gtgaaagaga cacaggaaat tacactgtca tccttaccaa tccatttca 840
 aaggagaagc agagccatgt ggtctctctg gttgtgtatg tcccaccgga caaaactcac 900
 acatgccac tgtgcccagc acct 924

<210>4

<211>642

<212>DNA

<213>人工序列

<400>4

ggtagacctt tcgtagagat gtacagtga atccccgaaa ttatacacat gactgaagga 60
 agggagctcg tcattccctg ccgggttacg tcacctaaca tcaactgttac tttaaaaaag 120
 ttccacttg acactttgat ccctgatgga aaacgcataa tctgggacag tagaaagggc 180
 ttcatcatat caaatgcaac gtacaaagaa atagggttc tgacctgtga agcaacagtc 240
 aatgggcatt tgtataagac aaactatctc acacatcgac aaaccaatac aatcatagat 300
 gtggtttctga gtccgtctca tggaattgaa ctatctgttg gagaaaagct tgtcttaaat 360
 tgtacagcaa gaactgaact aaatgtgggg attgacttca actgggaata cccttcttcg 420
 aagcatcagc ataagaaact tgtaaaccga gacctaaaaa ccagctctgg gagtgagatg 480
 aagaaatfff tgagcacctt aactatagat ggtgtaacct ggagtacca aggattgtac 540
 acctgtgcag catccagtgg gctgatgacc aagaagaaca gcacatttgt cagggtccat 600

gaaaaagaca aaactcacaca tgcccactgt gcccagcac ct 642

<210>5

<211>552

<212>PRT

<213>人工序列

<400>5

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

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

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

505 510 515 520

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

525 530 535 540

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

545 550 552

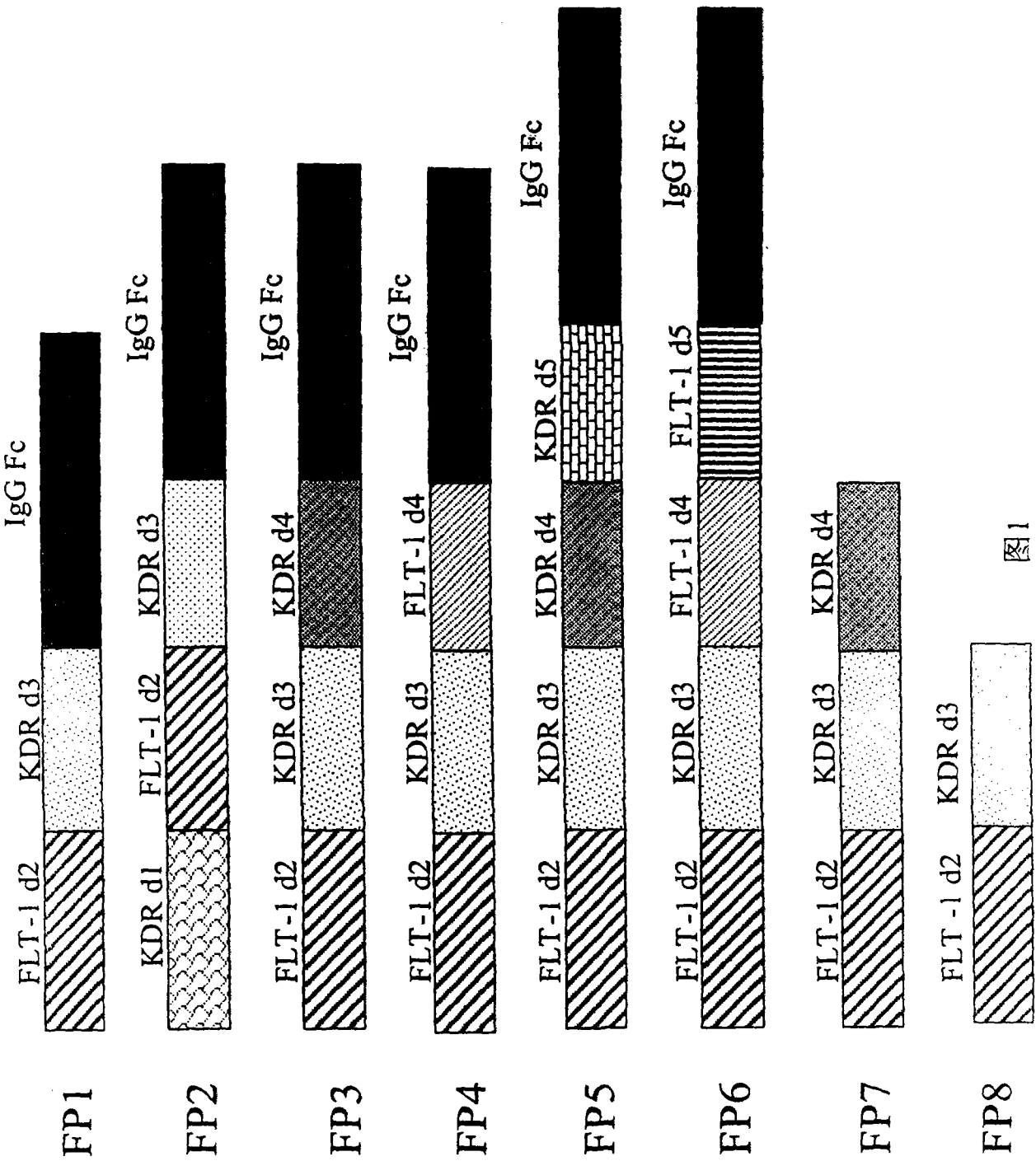
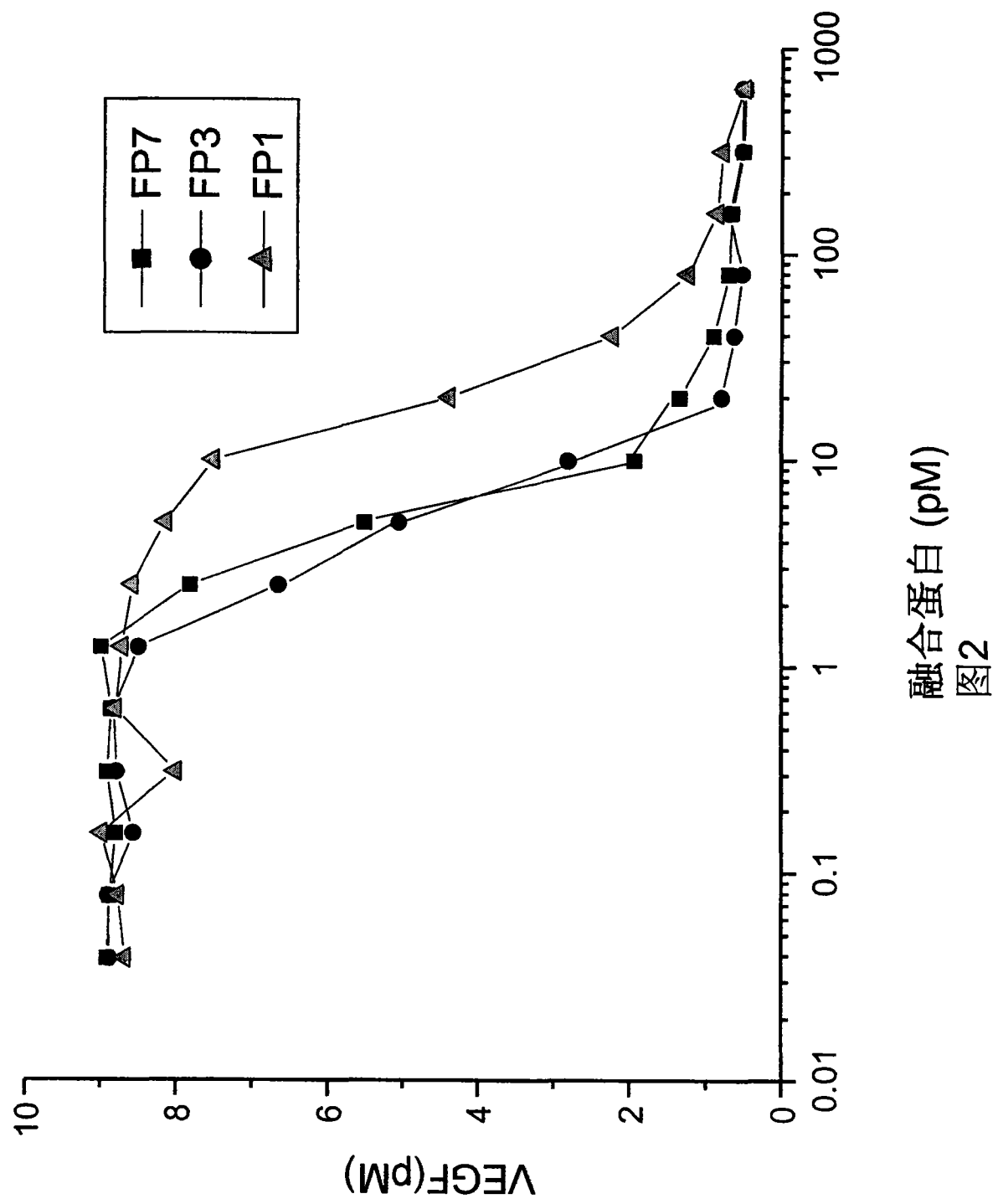
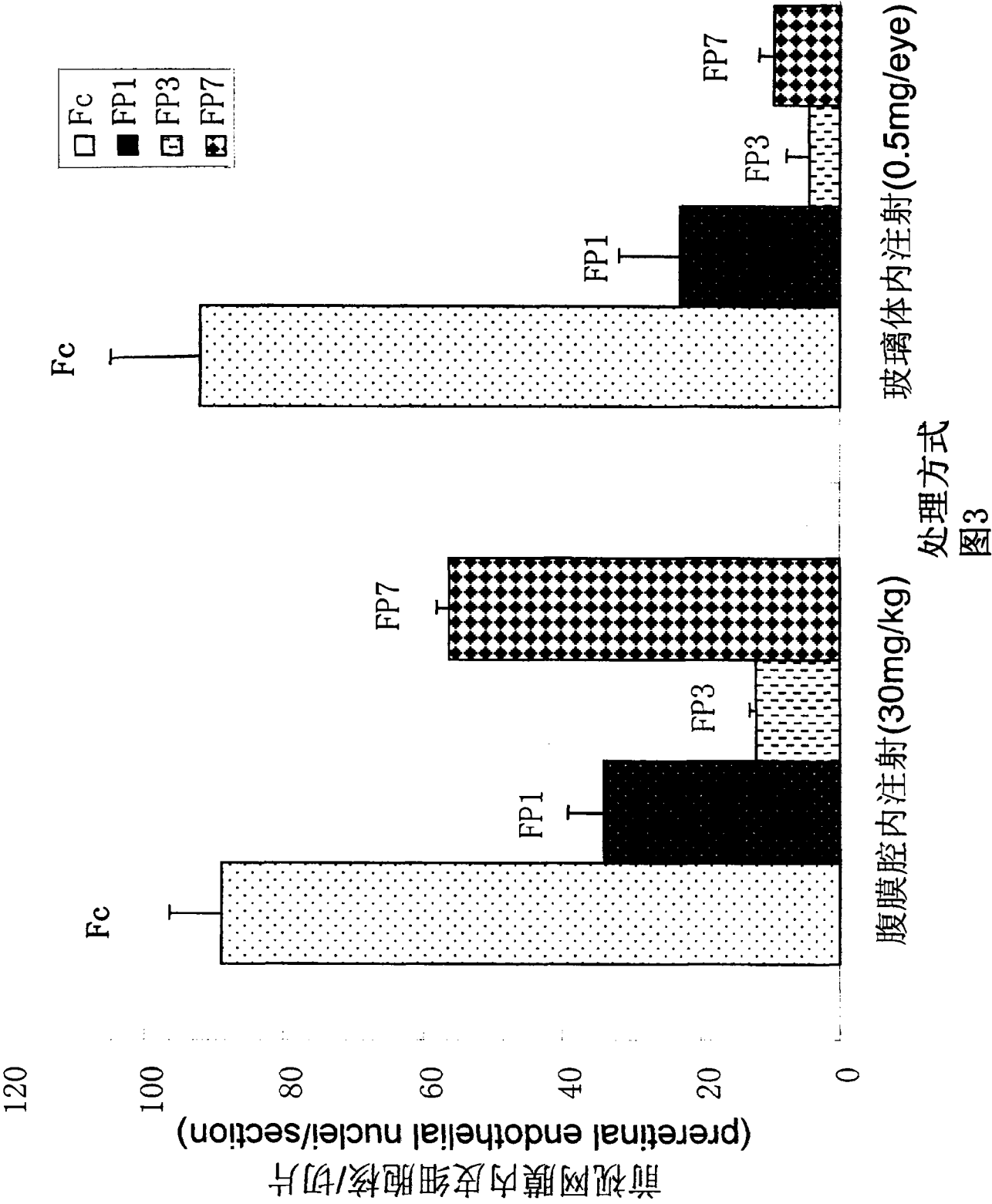


图1



融合蛋白 (pM)
图2



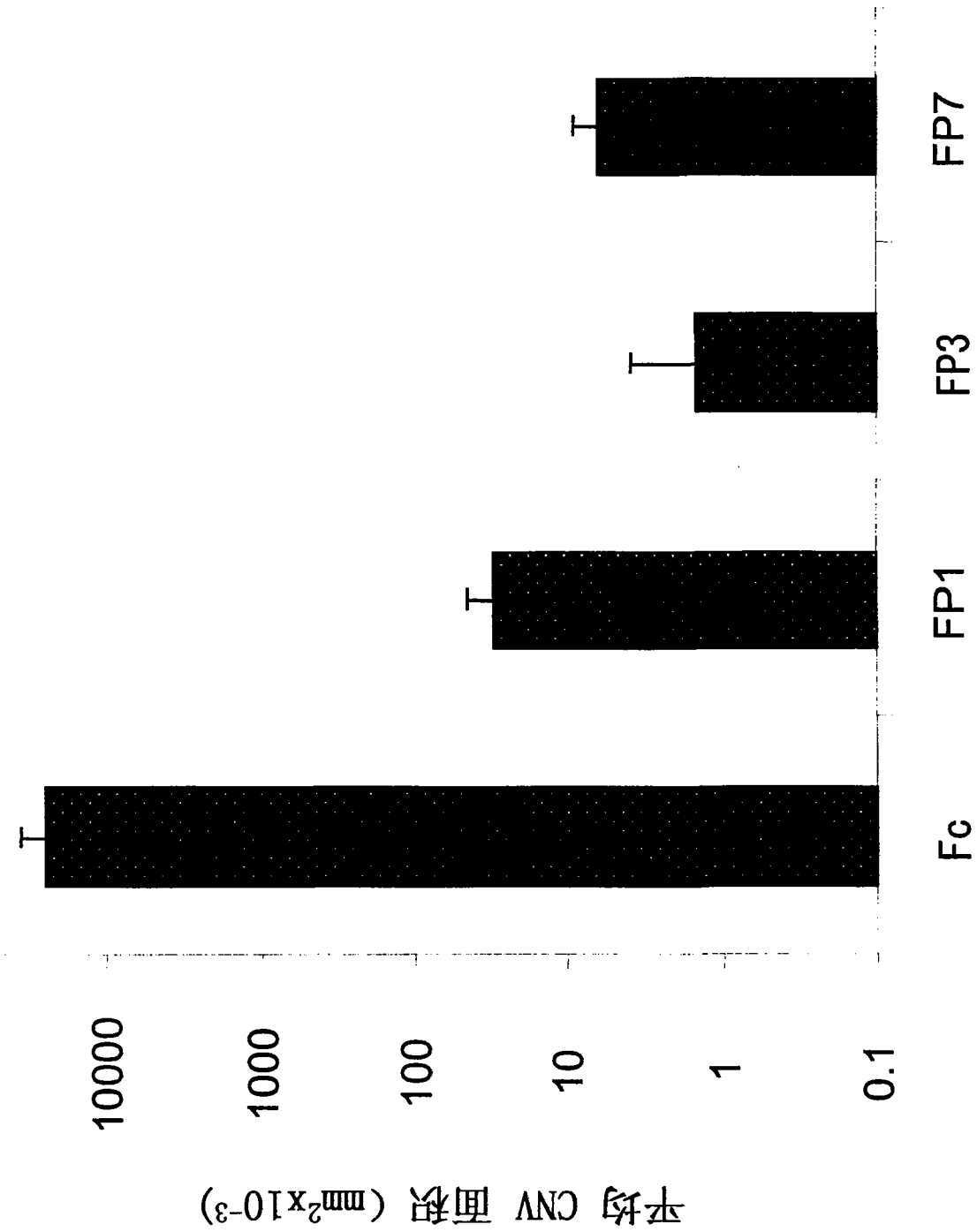


图4