

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101433715 B

(45) 授权公告日 2013.04.17

(21) 申请号 200810109355.9

(22) 申请日 2000.05.23

(30) 优先权数据

60/138,133 1999.06.08 US

(62) 分案原申请数据

00811544.3 2000.05.23

(73) 专利权人 里珍纳龙药品有限公司

地址 美国纽约州塔里敦旧锯木厂河路 777 号

(72) 发明人 N·J·帕帕多波洛斯 S·达维斯

G·D·岩科波洛斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

72001

代理人 刘玥

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61P 27/02(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

(56) 对比文件

赵博军. < 血管内皮生长因子与增殖性玻璃

体视网膜疾病 >. < 中国实用眼科杂志 >. 1998, 第 16 卷(第 9 期), 全文.

彭晓燕 等. < 血管内皮生长因子和眼内新生血管 >. < 中华眼底病杂志 >. 1999, 第 15 卷(第 1 期), 全文.

审查员 罗德明

权利要求书 1 页 说明书 31 页 附图 55 页

(54) 发明名称

具有改善的药物动力学特性的修饰嵌合多肽

(57) 摘要

本发明涉及具有改善的药物动力学特性的修饰嵌合多肽。具体地讲,本发明披露了为了改善其药物动力学特征而作过修饰的嵌合 Flt1 受体多肽。还披露了制备和使用所述修饰过的多肽的方法,包括但不限于使用修饰过的多肽降低或抑制哺乳动物的血浆渗漏和/或血管通透性。

1. 一种融合多肽在制备用于治疗以血管通透性为特征的临床病症的药物中的用途,所述融合多肽具有与多聚化成分连接的血管内皮细胞生长因子受体成分,所述的血管内皮细胞生长因子简称 VEGF,其中

(a) 所述的血管内皮细胞生长因子受体成分是第一种 VEGF 受体的免疫球蛋白样 (Ig) 结构域 2,和第二种 VEGF 受体的 Ig 结构域 3,并且不包括任何其他 VEGF 受体结构域;

(b) 所述多聚化成分是免疫球蛋白结构域,并且

所述融合多肽的氨基酸序列如图 21A-21C 或图 24A-24C 所示,所述病症为年龄相关的斑状衰退。

2. 权利要求 1 的用途,其中融合多肽由选自下组的核酸序列编码:

(a) 图 21A-21C 所示的核苷酸序列;

(b) 图 24A-24C 所示的核苷酸序列。

具有改善的药物动力学特性的修饰嵌合多肽

[0001] 本申请是申请日为 2000 年 5 月 23 日,申请号为 00811544.3,发明名称为“具有改善的药物动力学特性的修饰嵌合多肽”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求申请日为 1999 年 6 月 8 日的美国临时申请号 60/138133 的优先权。在本申请中引用了各种文献。这些文献所披露的内容以其全文形式收作本申请的参考。

[0003] 简介

[0004] 本发明的领域是具有改善了的药物动力学的修饰过的多肽。具体地讲,本发明的领域涉及为了改善其药物动力学特征而作过修饰的 Flt1 受体多肽。本发明的领域还涉及制备和使用所述修饰过的多肽的方法,包括但不限于用这种修饰过的多肽减弱或抑制哺乳动物的血浆渗漏和 / 或血管通透性。

[0005] 背景

[0006] 多肽配体结合细胞的能力,以及由此引起诸如细胞生长、存活、细胞产物分泌或分化的表型反应通常是通过细胞上的跨膜受体介导的。所述受体的胞外结构域(即展现在细胞表面上的受体部分)通常是该分子的最独特的部分,因为它能提供具有配体结合特征的蛋白。配体和胞外结构域的结合,通常会导致信号传导,由此将一种生物学信号传递到胞内目标。通常,这种信号传导是通过催化性的胞内结构域起作用。这种催化性胞内结构域的序列基序的特殊排列决定了它接触潜在的激酶底物的能力(Mohammadi 等,1990,分子细胞生物学 11 :5068-5078 ;Fantl 等,1992,细胞 69 :413-413)。通过催化性胞内结构域传导信号的受体的例子包括受体酪氨酸激酶(RTKs),如受体的 Trk 家族,它通常局限于神经系统细胞,受体的细胞因子家族,包括三联 CNTF 受体复合体(Stahl&Yancopoulos,1994,神经生物学杂志 25 :1454-1466),它一般也局限于神经系统的细胞,G-蛋白偶联受体,如存在于心肌细胞上的 β_2 -肾上腺素能受体,以及位于肥大细胞和嗜碱性粒细胞的大部分上的多聚 IgE 高亲和力受体 Fc ϵ RI (Sutton&Gould,1993,自然 366 :421-428)。

[0007] 到目前为止所鉴定的所有受体在配体结合之后似乎都要发生二聚化、多聚化、或某些相关的构象变化(Schlessinger, J.,1988, Trend Biochem. Sci. 13 :443-447 ; Ullrich&Schlessinger1990, 细胞 61 :203-212 ;Schlessinger&Ullrich,1992, Neuron9 :383-391),并且发生在二聚化分子内结合域之间的分子间的相互作用会导致催化功能的激活。在某些场合下,如血小板衍生的生长因子(PDGF),所述配体是与两种受体分子结合的二聚体(Hart 等,1988,科学 240 :1529-1531 ;Heldin,1989,生物学化学杂志 264 :8905-8912),而,举例来说,对于表皮生长因子(EGF)来说,所述配体是单聚体(Weber 等,1984,生物学化学杂志 259 :14631-14636)。对于 Fc ϵ RI 受体来说,结合于 Fc ϵ RI 上的配体 IgE 以单聚体形式存在,并且只有在抗原结合于 IgE/Fc ϵ RI 复合体上之后并与相邻的 IgE 分子交联之后才被激活(Sutton&Gould,1993,自然 366 :421-428)。

[0008] 通常,一种特定受体在高等生物体内的组织分布提供了该受体的生物学功能的线索。诸如成纤维细胞生长因子(FGF)的某些生长和分化因子的 RTKs 是广泛表达的,因此在组织生长和维持中似乎起着某种一般作用。更常见的是,受体的 Trk RTK 家族的成员(Glass&Yancopoulos,1993,细胞生物学趋势,3 :262-268)局限于神经系统细胞,而

神经生长因子家族包括神经生长因子 (NGF)、脑衍生的神经营养因子 (BDNF)、神经营养蛋白 -3 (NT-3) 和神经营养蛋白 -4/5 (NT-4/5), 它能结合 Trk RTK 家族受体, 促进大脑中和外周的各种神经原的分化 (Lindsay, R. M, 1993, 参见神经营养因子, S. E. Loughlin & J. H. Fallon 著, 257-284 页, San Diego, CA, 学术出版社)。Fc ϵ RI 局限于数量非常有限的类型的细胞, 如肥大细胞和嗜碱性粒细胞。肥大细胞源于骨髓多能造血干细胞系, 但是在离开血液之后在组织中完成其成熟 (参见 Janeway & Travers, 1996, 免疫生物学, 第 2 版, M. Robertson & E. Lawrence 著, 1:3-1:4 页, 当代生物学有限公司, 伦敦, 英国, 出版人), 并且与过敏反应有关。

[0009] 很多研究已经证实, 受体的胞外结合域提供了特殊的配体结合特性。另外, 表达受体的细胞环境可能影响配体与受体结合时所表现出的生物学反应。例如, 当表达 Trk 受体的神经原细胞接触神经营养蛋白时, 该蛋白能结合所述受体, 导致神经原的存活和分化。当成纤维细胞表达相同的受体时, 接触神经营养蛋白会导致成纤维细胞的增殖 (Glass 等, 1991, 细胞 66:405-413)。

[0010] 业已鉴定了一种由细胞衍生的对血管内皮细胞具有选择性的二聚体促细胞分裂剂, 并被命名为血管内皮细胞生长因子 (VEGF)。业已从以下 条件生长培养基中纯化了 VEGF: 大鼠神经胶质瘤细胞的条件生长培养基 [Conn 等, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87:2628-2632 页], 和牛垂体滤泡心形细胞的条件生长培养基 [Ferrara 和 Henzel, 1989, 生物化学生物物理学研究通讯 161:851-858 页; Gozpadarowicz 等, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86:7311-7315 页] 和来自人 U937 细胞的条件生长培养基 [Connolly, D. T. 等, 1989, 科学, 246, 1309-1312 页]。VEGF 是表观分子量为大约 46kDa 的二聚体, 每一个亚基的表观分子量大约 23kDa。VEGF 与血小板衍生的生长因子 (PDGF) 具有某些结构相似性, 后者是结缔组织细胞的促细胞分裂剂, 但不能促进来自大的血管的血管内皮细胞的分裂。

[0011] 被称为 Flt 的膜结合酪氨酸激酶受体被证实为 VEGF 受体 (DeVries, C. 等, 1992, 科学, 255, 989-991 页)。能特异性结合 VEGF 的 Flt 受体能诱导细胞分裂。被称为 KDR 的另一种形式的 VEGF 受体也能结合 VEGF 并诱导细胞分裂。KDR 的部分 cDNA 序列以及几乎完整的蛋白序列是众所周知的 [Terman, B. I. 等, 1991, Oncogene 6, 1677-1683 页; Terman, B. I. 等, 1992 生物化学生物物理学研究通讯 187, 1579-1586 页]。

[0012] 持续的血管形成可以导致或加重某些疾病, 如牛皮癣、类风湿性关节炎、血管瘤、血管纤维瘤、糖尿病性视网膜病和新生血管青光眼。VEGF 活性抑制剂可以用作所述疾病和其他 VEGF 诱导的病理性血管形成和血管通透性症状的治疗剂, 如肿瘤血管化。本发明涉及一种基于 VEGF 受体 Flt1 的抑制剂。

[0013] 血浆渗出是发炎的一个关键因素, 它发生在一种特殊类型的微细血管中。具体地讲, 在大多数器官中, 血浆渗出特别发生在小静脉中。与动脉血管和毛细血管不同, 小静脉会因为各种炎性介体的出现而发生渗漏, 所述介体包括组胺、缓激肽和血清紧张素。发炎的一个特征是血浆渗漏, 它是由于在小静脉的内皮细胞中所形成的细胞间隙所导致的。大多数发炎实验模型证实, 所述细胞间隙出现在后毛细血管和集中小静脉的内皮细胞之间 (Baluk, P., 等, 美国病理学杂志 1998, 152:1463-76)。业已证实, 某些凝集素可用于揭示发炎的小静脉中内皮细胞边界上的血浆渗漏、内皮细胞间隙和指状过程的集中

部位 (Thurston, G. 等, 美国生理学杂志, 1996, 271 :H2547-62)。具体地讲, 业已将植物凝集素用于观察诸如大鼠气管的炎性小静脉中的内皮细胞边界处的形态学改变。诸如 conconavalinA 和蓖麻毒蛋白的凝集素能局部结合发炎的小静脉, 发现了由间隙所暴露的亚内皮细胞血管壁的部位, 它相当于血浆渗漏部位 (Thurston, G. 等, 美国生理学杂志, 1996, 271 :H2547-62)。

[0014] 微血管的特征是动态的。例如, 慢性炎症性疾病与包括血管形成和微血管变大在内的微血管再造相关。微血管还可以通过获得异常表型特征而再造。在慢性呼吸道炎症的鼠类模型上, 呼吸道毛细血管获得了小静脉的特征, 包括变宽了的血管直径, 增强了对 von Willebrand 因子的免疫反应性, 以及增强了对 P- 选择蛋白的免疫反应性。另外, 所述再造的血管在炎性介体的作用下会渗漏, 而位于正常小鼠的呼吸道中的同一部位的血管不会发生渗漏。

[0015] 业已证实某些物质能够减弱或抑制血管通透性和 / 或血管渗漏。例如, mystixins 是合成的多肽, 业已报导它能抑制血浆渗漏而不会阻止内皮间隙的形成 (Baluk, P. 等, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1998, 284 :693-9)。另外, β 2- 肾上腺素能受体拮抗剂福莫特罗能通过抑制内皮细胞的间隙形成减轻微血管渗漏 (Baluk, P. 和 McDonald, D. M., 美国生理学杂志 1994, 266 :L461-8)。

[0016] 血管形成蛋白和血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 家族的成员被认为是对血管内皮细胞具有很高专一性的仅有的生长因子。在小鼠上进行的定向基因失活研究业已证实, VEGF 是血管发育早期所必需的, Ang-1 是血管再造后期所需要的。

[0017] 于 2000 年 1 月 4 日授予 Metris 治疗剂有限公司的 US6011003 披露了一种改变过的可溶形式的 Flt 多肽, 这种多肽能够与 VEGF 结合, 并因此产生对它的抑制作用, 这种多肽包括 5 个或更少的完整的免疫球蛋白结合域。于 1998 年 1 月 27 日授权并转让给 Merck&Co. 的 US5712380 披露了血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 抑制剂, 该抑制剂是天然存在的或者通过重组方法工程改造成可溶形式, 有或者没有 VEGF 受体的 C- 末端跨膜区。

[0018] 同样转让给 Merck&Co. 的还有 1998 年 4 月 2 日公开的 PCT 公开号 W098/13071, 该申请披露了抑制原发性肿瘤生长和转移的基因治疗方法, 该方法是通过基因转移转入编码能结合 VEGF 的可溶性受体蛋白的核苷酸序列而实现的。

[0019] 于 1997 年 11 月 27 日公开的以 Genentech 公司的名义申请的 PCT 公开号 W097/44453 披露了新型嵌合 VEGF 受体蛋白, 该蛋白包括源于血管内皮生长因子 (VEGF) 受体 Flt1 和 KDR 的氨基酸序列, 包括人 KDR 受体 FLK1 的鼠类同源物, 其中, 所述嵌合 VEGF 受体蛋白结合于 VEGF 上, 并拮抗内皮细胞增殖及其血管形成活性。

[0020] 于 1997 年 4 月 17 日公开的以 Toa Gosei 有限公司的名义申请的 PCT 公开号 W097/13787 披露了一种可用于治疗与诸如固体肿瘤的新生血管化相伴的疾病的低分子量 VEGF 抑制剂。一种含有 VEGF 受体 Flt 的胞外区的第一个免疫球蛋白样结构域和第二个免疫球蛋白样结构域但不含有它的第六个免疫球蛋白样结构域和第七个免疫球蛋白样结构域的多肽表现出 VEGF 抑制活性。

[0021] Sharifi, J. 等 (1998, The Quarterly Jour. of Nucl. Med. 42 :242-249) 披露说由于单克隆抗体 (Mabs) 是碱性的带正电荷的蛋白, 而哺乳动物细胞是带负电荷的, 这两者之间的静电相互作用能产生较高水平的背景结合, 导致低的肿瘤与正常器官的比例。为了克

服这一影响,研究人员试图通过使用各种方法改善 Mab 清除率,如次级试剂和对 Mab 本身进行化学和电荷修饰。

[0022] Jensen-Pippo 等 (1996, 药物学研究 13 :102-107) 披露了一种治疗蛋白 - 重组人粒细胞集落刺激因子 (PEG-G-CSF) 的聚乙二醇化,能导致在通过十二指肠途径服用时能导致体内生物活性的稳定性和保留时间的增加。Tsutsumi 等 (1997, Thromb Haemost. 77 : 168-73) 披露了一些实验,其中,聚乙二醇修饰过的白介素 -6 (MPEG-IL-6) 的体内血小板生成活性 (其中,IL-6 的 14 个赖氨酸氨基中的 54% 与 PEG 偶联) 与天然 IL-6 相当。

[0023] Yang 等 (1995, Cancer 76 :687-94) 披露了聚乙二醇与重组人白介素 -2 (IL-2) 缀合能产生一种化合物 - 聚乙二醇修饰过的 IL-2 (PEG-IL-2),它保留了 IL-2 的体外和体外活性,但具有明显延长了的循环半衰期。

[0024] R. Duncan 和 F. Spreafico (临床药物动力学 27 :290-306, 296, 1994) 对为了通过缀合聚乙二醇改善天冬酰胺酶的血浆半衰期所作的尝试作了综述。

[0025] 与 1999 年 1 月 28 日公开的以 Regeneron 制药公司和加利福尼亚大学的董事会的名义申请的 PCT 国际公开号 W099/03996 披露了修饰过的人头蛋白多肽,它具有碱性氨基酸区的缺失。所披露的这种修饰过的人头蛋白多肽与未修饰过的人头蛋白相比保留了生物学活性,同时具有对肝素的降低了的亲和力,以及在动物血清中出色的药物动力学。

[0026] 发明概述

[0027] 本发明涉及具有改善了的药物动力学特性的 VEGF 拮抗剂。一种优选的实施方案是编码能够结合一种 VEGF 多肽的融合多肽的分离的核酸分子,它包括 (a) 编码 VEGF 受体成分的核苷酸序列,该序列可操作地连接于 (b) 编码一种多聚成分的核苷酸序列上,其中,所述 VEGF 受体成分是这样融合多肽的唯一的 VEGF 受体成分,并且,其中, (a) 的核苷酸序列主要包括编码第一种 VEGF 受体的胞外结构域的 Ig 结构域 2 的氨基酸序列的核苷酸序列和编码第二种 VEGF 受体的胞外结构域的 Ig 结构域 3 的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0028] 在另一种实施方案中,所述第一种 VEGF 受体的分离的核酸是 Flt1。

[0029] 在另一种实施方案中,所述第二种 VEGF 受体的分离的核酸是 Flk1。

[0030] 在另一种实施方案中,所述第二种 VEGF 受体的分离的核酸是 Flt4。

[0031] 在另一种优选实施方案中,编码所述第一种 VEGF 受体的胞外结构域的 Ig 结构域 2 的核苷酸序列是编码第二种 VEGF 受体的胞外结构域的 Ig 结构域 3 的核苷酸序列的上游。

[0032] 在另一种优选实施方案中,编码第一种 VEGF 受体的胞外结构域的 Ig 结构域 2 的核苷酸序列是编码第二种 VEGF 受体的胞外结构域的 Ig 结构域 3 的核苷酸序列的下游。

[0033] 在本发明的一种优选实施方案中,所述多聚化成分包括一个免疫球蛋白结构域。

[0034] 在另一种实施方案中,所述免疫球蛋白结构域选自下列一组: IgG 的 Fc 结构域、IgG 的重链和 IgG 的轻链。

[0035] 优选的实施方案包括一种分离的核酸分子,它包括编码一种修饰过的 Flt1 受体融合多肽的核苷酸序列,其中,所述核酸分子的编码区包括选自下列一组的核苷酸序列

[0036] (a) 图 13A-13D 所示的核苷酸序列;

[0037] (b) 图 14A-14c 所示的核苷酸序列;

[0038] (c) 图 15A-15c 所示的核苷酸序列;

[0039] (d) 图 16A-16D 所示的核苷酸序列;

- [0040] (e) 图 21A-21c 所示的核苷酸序列；
- [0041] (f) 图 22A-22c 所示的核苷酸序列；
- [0042] (g) 图 24A-24c 所示的核苷酸序列；和
- [0043] (h) 由于遗传密码的简并性而不同于 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 或 (g) 的核苷酸序列的核苷酸序列，并且它能编码具有修饰过的 Flt1 受体融合多肽的生物学活性的融合多肽分子。
- [0044] 在本发明的另一种实施方案中，一种融合多肽是由上述分离的核酸分子编码的。
- [0045] 一种优选的实施方案是一种能够结合 VEGF 分子形成无功能的复合体的组合物，该组合物含有所述融合多肽的多聚体。
- [0046] 同样优选的是这样一种组合物，其中的多聚体是二聚体。
- [0047] 在另一种实施方案中，所述组合物存在于一种载体中。
- [0048] 另一种实施方案是含有上述核酸分子的载体，包括含有上述核酸分子的表达载体，其中，所述核酸分子可操作地连接于一种表达控制序列上。
- [0049] 所包括的其他实施方案是用于生产一种融合多肽的宿主 - 载体系统，它包括存在于一种合适宿主细胞中的表达载体；所述宿主 - 载体系统中的合适的宿主细胞是细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。所述宿主 - 载体系统中的合适的宿主细胞是大肠杆菌；所述宿主 - 载体系统中的合适的宿主细胞是 COS 细胞；所述宿主 - 载体系统中的合适的宿主细胞是 CHO 细胞。
- [0050] 本发明的另一种实施方案是一种生产融合多肽的方法，该方法包括在能够产生所述融合多肽的条件下生长所述宿主 - 载体系统的细胞，和回收所产生的融合多肽。
- [0051] 另一种实施方案包括一种由图 10A-10D 或图 24A-24C 所示核酸序列所编码的融合多肽，所述多肽通过酰化或聚乙二醇化修饰过，其中，酰化是以超出至少大约 100 倍摩尔的酰化试剂完成的，或者其中，酰化是以超出至少大约 10 倍摩尔 - 至少大约 100 倍摩尔的酰化试剂完成的，或者其中的聚乙二醇化是 10K 或 20K PEG。
- [0052] 一种优选实施方案包括一种减弱或抑制哺乳动物血浆渗漏的方法，该方法包括给所述哺乳动物服用上述融合多肽，包括以下实施方案：其中的哺乳动物是人，融合多肽是酰化的或融合多肽是聚乙二醇化的。
- [0053] 另一种实施方案是一种融合多肽，它能专一性地结合 VEG 受体配体 VEGF。
- [0054] 本发明的一种优选实施方案是抑制人类血管生长的方法，包括服用有效量的上述融合多肽。
- [0055] 另外，还优选一种抑制哺乳动物体内 VEGF 受体配体活性的方法，包括给所述哺乳动物服用有效量的上述融合多肽。
- [0056] 上述方法的优选实施方案是，其中的哺乳动物是人类。
- [0057] 本发明方法的另一种实施方案包括在人体内减缓或预防肿瘤生长；减缓或预防人体水肿，特别是其中的水肿是大脑水肿；减缓或预防人体腹水形成，特别是其中的腹水是与卵巢癌相关的腹水。
- [0058] 本发明的优选实施方案包括能够结合 VEGF 多肽的融合多肽，它包括 (a) VEGF 受体成分，可操作地连接于 (b) 一种多聚化成分上，其中，所述 VEGF 受体成分是所述融合多肽上唯一的 VEGF 受体成分，并且主要包括第一种 VEGF 受体的胞外结构域 Ig 结构域 2 的氨基酸

序列和第二种 VEGF 受体的胞外结构域的 Ig 结构域 3 的氨基酸序列。

[0059] 在所述融合多肽的另一种实施方案中,所述第一种 VEGF 受体是 Flt1。

[0060] 在所述融合多肽的另一种实施方案中,所述第二种 VEGF 受体是 Flk1。

[0061] 所述融合多肽的另一种实施方案是这样的,其中,所述第二种 VEGF 受体是 Flt4。

[0062] 优选的实施方案包括一种融合多肽,其中,第一种 VEGF 受体的胞外结构域的 Ig 结构域 2 的氨基酸序列是第二种 VEGF 受体的胞外结构域的 Ig 结构域 3 的氨基酸序列的上游,还包括一种融合多肽,其中,第一种 VEGF 受体的胞外结构域的 Ig 结构域 2 的氨基酸序列是第二种 VEGF 受体的胞外结构域的 Ig 结构域 3 的氨基酸序列的下游。

[0063] 在另一种实施方案中,所述融合多肽的多聚化成分包括一个免疫球蛋白结构域,包括这样一种实施方案,其中,所述免疫球蛋白结构域选自下列一组: IgG 的 Fc 结构域、IgG 的重链和 IgG 的轻链。

[0064] 优选的实施方案包括一种融合多肽,该多肽包括修饰过的 Flt1 受体的氨基酸序列,其中,该氨基酸序列选自下列一组:(a) 图 13A-13D 所示氨基酸序列;(b) 图 14A-14c 所示的氨基酸序列;(c) 图 15A-15c 所示的氨基酸序列;(d) 图 16A-16D 所示的氨基酸序列;(e) 图 21A-21c 所示的氨基酸序列;(f) 图 22A-22c 所示的氨基酸序列;和 (g) 图 24A-24c 所示的氨基酸序列。

[0065] 另一种优选实施方案是一种减轻或防止哺乳动物血浆渗漏的方法,包括给所述哺乳动物服用上述融合多肽。

[0066] 另一种优选实施方案是一种抑制哺乳动物体内 VEGF 受体配体活性的方法,包括给所述哺乳动物服用有效量的上述融合多肽。

[0067] 附图简述

[0068] 图 1. 未修饰过的和酰化的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的 IEF 凝胶分析。

[0069] 未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白不能够进入凝胶,因为它的 pI 大于 9.3,而酰化的 Flt1(1-3)-Fc 能够进入凝胶并在 pI5.2 处平衡。

[0070] 图 2. 将未修饰过 Flt1(1-3)-Fc 的和酰化的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白结合在 Matrigel[®] 包被的平板上,未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白能与 Matrigel[®] 中的胞外基质成分充分结合,而酰化的 Flt1(1-3)-Fc 不能结合。

[0071] 图 3. 未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc、酰化的 Flt1(1-3)-Fc、和聚乙二醇化的 Flt1(1-3)-Fc 在 BIAcore- 基测定中的结合。与对照(柱 1-4)和不相关的蛋白(柱 5-8)相比,酰化的(柱 13-16)、聚乙二醇化的(柱 17-20)、和肝素处理过的 Flt1(1-3)-Fc(柱 21-24)都能完全与 Biacor 芯片结合的 Flt1(1-3)-Fc 竞争结合 VEGF。未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc(柱 5-6)似乎只能部分与 Biacor 芯片结合的 Flt1(1-3)-Fc 竞争结合 VEGF。用 0.5M 氯化钠(柱 7-8)洗涤结合的样品会得到类似于 Flt1(1-3)-Fc 的修饰形式的结合特征,这表明所述未修饰过的蛋白对所述芯片具有非专一性结合,这种结合可以通过盐洗涤消除。

[0072] 图 4. 在基于 ELISA 测定中未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc、酰化的 Flt1(1-3)-Fc、和聚乙二醇化的 Flt1(1-3)-Fc 在 ELISA- 基测定中的结合。聚乙二醇化的和酰化 Flt1(1-3)-Fc 蛋白能够结合 VEGF,其亲和力接近未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc。

[0073] 图 5. 未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc、酰化的 Flt1(1-3)-Fc、和聚乙二醇化的

Flt1(1-3)-Fc 的药物动力学曲线。用 4 毫克 / 千克未修饰过的酰化或聚乙二醇化的 Flt1(1-3)-Fc 皮下注射 Balb/c 小鼠 (23-28 克)。在注射蛋白 1、2、4、6、24 小时、2 天和 3 天之后,从小鼠尾部放血,并在为了检测 Flt1(1-3)-Fc 蛋白而设计的标准的基于 ELISA 测定中测定血清。所有 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的 T_{max} 都出现在 6 小时和 24 小时的时间点之间。不同蛋白的 C_{max} 如下:未修饰过的:0.06-0.15 微克 / 毫升;酰化的:1.5-4.0 微克 / 毫升和聚乙二醇化的:大约 5 微克 / 毫升。

[0074] 图 6A-6B. 未修饰过的和逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的 IEF 凝胶分析。未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白不能进入凝胶,因为其 pI 大于 9.3,而大多数逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 样品(超出 30-100 倍的样品)能够转移到凝胶中,并根据酰化的程度在 4.55-8.43pI 范围内平衡。

[0075] 图 7. 将未修饰过 Flt1(1-3)-Fc 的和逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白结合在 Matrigel® 包被的平板上,与不相关的对照蛋白 rTie2-Fc 相比,逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc(超出 20-30 倍的样品)没有表现出对 Matrigel® 包被的平板的任何结合,而非酰化 Flt1(1-3)-Fc 蛋白表现出明显结合。超出 10 倍的样品表现出减弱了的结合,但酰化的程度不足于完全抑制与胞外基质成分的结合。

[0076] 图 8. 未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 和逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 在 BIAcore-基测定中的结合。在亚化学计量比例下(0.5 微克 / 毫升的未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 和逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 与 0.2 微克 / 毫升 VEGF),在溶液中没有足够的 Flt1(1-3)-Fc(未修饰过的或逐步酰化的)完全结合 VEGF。在接近 1 : 1 的化学计量比例的 1.0 微克 / 毫升的浓度下,未修饰过的和逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 能更好地竞争结合 VEGF,但是仍然没有足够的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白(未修饰过的或逐步酰化的)来完全饱和现有的 VEGF。不过,在高于 1 : 1 的化学计量比例若干倍的 5.0 微克 / 毫升的浓度下,Flt1(1-3)-Fc 和逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白能够饱和 VEGF,而与酰化的程度无关。

[0077] 图 9. 未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 和逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 的药物动力学曲线。用 4 毫克 / 千克未修饰过或超出 10、20、40、60 和 100 倍的逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 皮下注射 Balb/c 小鼠 (23-28 克)(3 只小鼠注射未修饰过的超出 10、20 和 40 倍的样品,2 只小鼠注射超出 60 和 100 倍的样品)。在注射 1、2、4、6、24 小时,2 天和 3 天之后,从小鼠尾部放血。在为了检测 Flt1(1-3)-Fc 蛋白而设计的基于 ELISA 测定中测定血清。所测定的所有 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的 T_{max} 都出现在 6 小时的时间点上,而 C_{max} 如下:未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc:0.06 微克 / 毫升;超出 10 倍的样品:-0.7 微克 / 毫升,超出 20 倍的样品-2 微克 / 毫升,超出 40 倍的样品-4 微克 / 毫升,超出 60 倍的样品-2 微克 / 毫升,超出 100 倍的样品-1 微克 / 毫升。

[0078] 图 10A-10D. Flt1(1-3)-Fc 的核酸和推测的氨基酸序列。

[0079] 图 11. Flt1 的结构示意图。

[0080] 图 12A 和 12B. Flt1 的 Ig 结构域 2 和 Ig 结构域 3 的氨基酸序列的亲水性分析。

[0081] 图 13A-13D. Mut1 :Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 核酸和推测的氨基酸序列。

[0082] 图 14A-14C. Mut2 :Flt1(2-3_{ΔB})-Fc 核酸和推测的氨基酸序列。

[0083] 图 15A-15C. Mut3 :Flt1(2-3)-Fc 核酸和推测的氨基酸序列。

[0084] 图 16A-16D. Mut4 :Flt1(1-3_{R→N})-Fc 核酸和推测的氨基酸序列。

[0085] 图 17. 未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc、碱性区域缺失突变型 Flt1(1-3)-Fc 和 Flt(1-3_{R→N}) 突变型蛋白在基于 BIAcore 测定中的结合。在亚化学计量比例下 (0.25 微克 / 毫升未修饰过的、酰化的或遗传修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 样品与 01. 微克 / 毫升 VEGF), 没有足够的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白抑制 VEGF 固定在 BIAcore 芯片上的 Flt1(1-3)-Fc 结合。在 0.5 微克 / 毫升未修饰过的、酰化的或遗传学修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的浓度下, 其化学计量比例为大约 1 : 1, 抑制 VEGF 结合 BIAcore 芯片的能力增强。在 1.0 微克 / 毫升未修饰过的、酰化的或遗传学修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的浓度下, 其化学计量比例大约为 10 : 1, Flt1(1-3)-Fc 蛋白能够抑制 VEGF 与 BIAcore 芯片的结合, 但它们的作用不相同。未修饰过的、酰化的和 Mut1 :Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 在抑制 VEGF 结合的能力方面基本上相同, 而 Mut4 :Flt1(1-3_{R→N})-Fc 在抑制结合方面的效率略低。

[0086] 图 18. 未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc、Mut1 :Flt1(1-3_{ΔB})-Fc、Mut2 :Flt1(2-3_{ΔB})-Fc 和 Flt1(2-3) 突变蛋白与 Matrigel [®] 包被的平板的结合。未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白能很好地结合这些孔, Mut3 :Flt1(2-3)-Fc 蛋白的结合稍差一些, Mut1 :Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 蛋白的结合更差一些, Mut2 :Flt1(2-3_{ΔB})-Fc 蛋白表现出最佳的特征, 它比任何其他 突变蛋白的结合都弱。Mut4 :Flt1(1-3_{R→N})-Fc 糖基化突变蛋白在 Matrigel 测定中仅表现出微弱的优点。

[0087] 图 19. 未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc、Mut1 :Flt1(1-3_{ΔB})-Fc、Mut2 :Flt1(2-3_{ΔB})-Fc 和 Flt1(2-3) 突变蛋白在基于 ELISA 测定中的结合。在测定的浓度下, 未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc、Mut1 :Flt1(1-3_{ΔB})-Fc、Mut2 :Flt1(2-3_{ΔB})-Fc 和 Flt1(2-3) 突变蛋白与 VEGF 的结合相似。

[0088] 图 20. 未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc、Mut1 :Flt1(1-3_{ΔB})-Fc、Mut2 :Flt1(2-3_{ΔB})-Fc 和 Flt1(2-3) 突变蛋白的药物动力学特征。这些试剂的 C_{max} 如下: 未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc-0.15 微克 / 毫升; 超出 40 倍摩尔的酰化 Flt1(1-3)-Fc-1.5 微克 / 毫升; 和 Mut1 :Flt1(1-3_{ΔB})-Fc-0.7 微克 / 毫升。

[0089] 图 21A-21C. 被称为 Flt1D2, Flk1D3, Fc Δ C1 (a) 的修饰过的 Flt1 受体的核苷酸和推测的氨基酸序列。

[0090] 图 22A-22C. 被称为 Flt1D2, VEGFR3D, Fc Δ C1 (a) 的修饰过的 Flt1 受体的核苷酸和推测的氨基酸序列。

[0091] 图 23. 胞外基质 (ECM) 测定。该测定的结果表明, 与 Flt1(1-3)-Fc 蛋白相比, Flt1D2, Flk1D3, Fc Δ C1 (a) 和 Flt1D2, VEGFR3D, Fc Δ C1 (a) 蛋白对 ECM 的粘性明显较低。

[0092] 图 24A-24C. 被称为 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 的修饰过的 Flt1 受体的核苷酸和推测的氨基酸序列。

[0093] 图 25. 磷酸化测定。在超出 1.5 摩尔的 Flt1(1-3)-Fc、Flt1(1-3)-Fc (A40) 或瞬时 Flt1D2, Flk1D3, Fc Δ C1 (a) 的条件下, 与对照介质刺激相比, 这三种修饰过的 Flt1 受体都能完全抑制受体刺激。相反, 在这种超出的摩尔倍数下, 与 VEGF 阳性对照刺激相比, 瞬时 Flt1D2, VEGFR3D, Fc Δ C1 (a) 不表现出明显的抑制。从图 25B 中可以看到类似结果, 其中, 修饰过的 Flt 受体超过 VEGF165 配体 3 倍摩尔。在图 25C 中, 其中的修饰过的 Flt1 受体超过 VEGF165 配体的摩尔数 6 倍, 现在可以证实瞬时 Flt1D2, VEGFR3D, Fc Δ C1 (a) 能够部分抑制 VEGF165 诱导的细胞表面受体的刺激。

[0094] 图 26A-26B. 磷酸化测定。通过 Western 印迹检测由 VEGF165 配体刺激的酪氨酸磷酸化 VEGFR2 (F1k1) 发现, 细胞表面受体不能被具有 VEGF165 的刺激样品磷酸化, 该样品与超出 1 和 2 倍摩尔 (图 26A) 和 超出 3 和 4 倍摩尔 (图 26B) 的瞬时 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a)、稳定的 F1t1D2F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 或瞬时 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 一起预培养过。在所测试过的所有修饰过的 F1t1 受体浓度下, 在预培养期间存在 VEGF165 配体的完全结合, 与对照介质刺激相比, 得到了不可检测的非结合 VEGF165 对细胞表面受体的刺激。

[0095] 图 27. MG/R2 细胞增殖测定。将下列修饰过的 F1t 受体 F1t1(1-3)-Fc、F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 和 F1t1D2. VEGFR3D3. Fc Δ C1 (a) 和一种被称为 Tie2-Fc 的作为负对照的不相关的受体从 40nM 滴定到 20pM, 并在 37°C 下在细胞上培养 1 小时。然后以 1.56nM 的浓度将存在于确定培养基中的人重组 VEGF165 添加到所有的孔中。负对照受体 Tie2-Fc 任何浓度都不能抑制 VEGF165- 诱导的细胞增殖, 而 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 能抑制 1.56nM 的 VEGF165, 1/2 最大剂量为 0.8nM。F1t1(1-3)-Fc 和 F1t1D2. VEGFR3D3. Fc Δ C1 (a) 在该测定中在抑制 VEGF165 方面效果较差, 1/2 最大剂量为大约 2nM。VEGF165 本身能产生 1.2 吸收单位的读数, 而背景为 0.38 个吸收单位。

[0096] 图 28. 结合剂量学的 BIAcore 分析。结合剂量学是作为结合的 VEGF165 与固定的 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 或 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 的摩尔比计算的, 使用相当于 1ng/ml 的 1000RU 的转换系数。结果证实每一个 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 或 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 分子具有一个 VEGF165 二聚体分子的结合计量学。

[0097] 图 29 和图 30. 大小排阻层析计量学。将浓度为 1nM 的 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 或 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) (估计比 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 或 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a)/VEGF165 相互作用的 KD 高 1000 倍) 与各种浓度的 VEGF165 混合。在培养之后, 测定溶液中游离 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 的浓度。数据显示, 将 1nM VEGF165 添加到 F1t1D2F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 的溶液中能完全抑制 F1t1D2F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 与 VEGF165 表面结合。这一结果表明了每一个 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 分子具有一个 VEGF165 分子的结合计量学。

[0098] 图 31. 在自然条件下的大小排阻层析 (SEC)。1 号峰表示 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a)/VEGF165 复合物, 而 2 号峰表示未结合的 VEGF165。合并于 1.1 和 1.2 毫升之间洗脱的级份, 并添加盐酸胍到 4.5M 的最终浓度, 以便解离该复合物。

[0099] 图 32. 在解离条件下的大小排阻层析 (SEC)。为了分离受体-配体复合物的成分, 并测定其摩尔比例, 将 50 微升解离的复合物加样到用 6 摩尔盐酸胍平衡过的 Superose 12PC 3.2/30 中并洗脱。1 号峰表示 F1t1D2F1k1D3. Fc Δ C1 (a), 而 2 号峰表示 VEGF165。

[0100] 图 33、图 34 和图 35. 具有联机光学散射的大小排阻层析 (SEC)。用具有 MiniDawn 联机光学散射探测器 (Wyatt Technology, Santa Barbara, California) 和折射指数 (RI) 探测器 (Shimadzu, Kyoto, 日本) 的大小排阻层析柱测定受体-配体复合物的分子量 (MW)。如图 33 所示, 洗脱曲线出现了两个峰。1 号峰表示受体-配体复合物, 而 2 号峰表示未结合的 VEGF165。MW 是根据 LS 和 RI 信号计算的。用相同方法测定受体-配体复合物的单一成分的 MW。上述测定的结果如下: F1t1D2F1k1D3. Fc Δ C1 (a)/VEGF165 复合物的 MW 在峰值位置上为 157300 (图 33), VEGF165 在峰值位置上的的分子量为 44390 (图 34), 而 R1R2 在峰值位置上的分子量为 113300 (图 35)。

[0101] 图 36. 肽作图和糖基化分析。通过肽作图方法测定 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 上

面的二硫键结构和糖基化位点。在 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 上面总共有 10 个半胱氨酸；其中的 6 个属于 Fc 区。Cys27 和 Cys76 通过二硫键结合。Cys121 和 Cys182 通过二硫键结合。Fc 区上的头两个半胱氨酸 (Cys211 和 Cys214) 与另一个 Fc 链上的相同位置上的两个相同的半胱氨酸形成分子间二硫键。不过, 不能够确定二硫键是存在于相同的半胱氨酸 (例如 Cys211 和 Cys211) 之间或存在于 Cys211 和 Cys214 之间。Cys216 与 Cys306 通过二硫键连接。Cys352 与 Cys410 通过二硫键连接。

[0102] 在 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 有 5 个可能的 N-连接的糖基化位点, 并且发现它们以不同的程度糖基化。在 Asn33、Asn193 和 Asn282 上观察到了彻底的糖基化。在 Asn65 和 Asn120 上观察到了部分糖基化。糖基化位点通过在附图中加下划线突出。

[0103] 图 37. F1t1(1-3)-Fc(A40)、F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 和 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 的药物动力学。给 Balb/C 小鼠皮下注射 4 毫克 / 千克 F1t1(1-3)-Fc(A40)、CHO 瞬时表达的 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a)、CHO 稳定表达的 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a)、和 CHO 瞬时表达的 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a)。在注射之后 1、2、4、6、24 小时, 2 天、3 天和 6 天之后从小鼠尾部放血。在为了检测 F1t1(1-3)-Fc(A40)、F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 或 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 而设计的 ELISA 中测定血清。F1t1(1-3)-Fc(A40) 的 Tmax 出现在 6 小时, 而瞬时和稳定 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 的 Tmax 和瞬时 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 出现在 24 小时。F1t1(1-3)-Fc(A40) 的 Cmax 为 8 微克 / 毫升, 瞬时 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 和 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 的 Cmax 为 18 微克 / 毫升, 而稳定 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 的 Cmax 为 30 微克 / 毫升。

[0104] 图 38. F1t1(1-3)-Fc(A40)、F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 和 F1t1D2. VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 的药物动力学。给 Balb/C 小鼠皮下注射 4 毫克 / 千克 F1t1(1-3)-Fc(A40)、CHO 瞬时表达的 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 和 CHO 瞬时表达的 F1t1D2. VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a)。在注射之后 1、2、5、6、7、8、12、15 和 20 天之后从小鼠尾部放血。在为了检测 F1t1(1-3)-Fc、F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 或 F1t1D2. VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 而设计的 ELISA 中测定血清。F1t1(1-3)-Fc(A40) 在 5 天之后在血清中不再能检测到, 而 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 和 F1t1D2. VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 在 15 天或更长时间内可以检测到。

[0105] 图 39. F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 在体内抑制 HT-1080 纤维肌瘤肿瘤生长的能力。每隔 1 天或每周 2 次用 25 毫克 / 千克的 HT-1080 处理 SCID 小鼠能明显降低皮下 HT-1080 纤维肌瘤肿瘤的生长。

[0106] 图 40. F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 在体内抑制 C6 神经胶质瘤的能力。每隔 1 天或每周 2 次用剂量低至 2.5 毫克 / 千克的 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 处理 SCID 的小鼠能明显减弱皮下 C6 神经胶质瘤的生长。

[0107] 图 41. VEGF 诱导的子宫通透性过高。皮下注射 PMSG(5IU) 诱导青春期前的雌性大鼠排卵, 导致在 2 天之后雌二醇发生波动, 进而导致在子宫中诱导 VEGF。这种诱导会导致子宫的通透性过高, 并增加子宫的湿度。在注射 PMSG 1 小时之后, 皮下注射 25 毫克 / 千克的 F1t1(1-3)-Fc(A40)、F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 和 F1t1D2. VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 会导致对子宫湿重量增加 50% 的抑制作用。

[0108] 图 42A-42B. 用孕酮作为输出评估黄体血管形成。皮下注射 PMSG(5IU) 诱导青春

期前的雌性大鼠排卵,导致一种完全有功能的黄体,它含有血管的密集的网络,它能向血液中分泌孕酮,以便准备好子宫受孕。黄体中的血管形成诱导需要 VEGF。孕酮的一般水平为 5 纳克 / 毫升,而在注射 PMSG 后可以诱导至 25-40 纳克 / 毫升。在注射 PMSG1 小时之后皮下注射 25 毫克 / 千克或 5 毫克 / 千克的 Flt1(1-3)-Fc(A40) 或 Flt1D2, Flk1D3, Fc Δ C1(a) 会导致在第 4 天孕酮诱导的完全抑制。

[0109] 发明详述

[0110] 本领域长期以来一直存在的问题是生产以 VEGF 拮抗剂为基础的受体,这种受体具有适于作为治疗候选拮抗剂的药物动力学特征。申请人在这里首次披露了一种能够拮抗 VEGF 活性的嵌合多肽分子,与其他已知的基于受体的 VEGF 拮抗剂相比,它具有改善了的药物动力学特征。因此,本文所披露的嵌合多肽分子首次提供了适用于治疗的合适分子,其中,VEGF 的拮抗作用是一种理想的结果。

[0111] 本发明提供了通过将 Flt1 受体的修饰过的胞外配体结合结构域和 IgG 的 Fc 区融合所形成的新型嵌合多肽分子。

[0112] 胞外配体结合结构域被定义为受体的一部分,它在细胞膜中的天然构象中,是朝着细胞外定向的,其中,它可以接触它的同源配体。所述胞外配体结合结构域不包括与受体跨膜结构域相关的疏水性氨基酸或与受体胞内结构域相关的任何氨基酸。一般,一种受体的胞内或细胞质结构域通常由带正电荷的或极性氨基酸(即赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸)组成。前面的 15-30 个氨基酸主要是疏水性或非极性氨基酸(即亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸)构成所述跨膜结构域。所述胞外结构域包括位于疏水性跨膜氨基酸片段前面的氨基酸。通常,所述跨膜结构域的两侧是带正电荷的或极性氨基酸,如赖氨酸或精氨酸。Von Heijone 公开了被本领域技术人员经常引用的用于测定一种特定受体的氨基酸是属于胞外、跨膜或胞内结构域的详细规则(参见 Von Heijone, 1995, BioEssays 17 :25-30)。另外,互联网上的网站如 http://ulrec3.unil.ch/software/TMPRED_form.html。能够向蛋白质化学家提供有关制备蛋白结构域的先决条件的信息。

[0113] 本发明提供了构建编码嵌合多肽分子的核酸的方法,该核酸分子被插入一种载体上,该载体在导入合适的宿主细胞之后能够表达所述嵌合多肽分子。合适的宿主细胞包括,但不限于细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。本领域技术人员所公知的任何用于将 DNA 片段插入载体中的方法都可用于构建编码所述嵌合多肽分子的受转录 / 翻译控制信号控制的表达载体。所述方法可以包括体外重组 DNA 和合成技术和体内重组(遗传重组)(参见 Sambrook 等,分子克隆,实验室手册,冷泉港实验室;当代分子生物学方法, Ausubel 等著, Greene 出版协会, Wiley-Interscience, NY)。

[0114] 编码所述嵌合多肽分子的核酸分子的表达可以受第二种核酸序列的调控,以便该嵌合多肽分子是在用所述重组 DNA 分子转化过的宿主中表达。例如,本文所披露的嵌合多肽的表达可以受本领域所公知的任一种启动子 / 增强子的控制。可用于嵌合多肽分子表达的启动子包括,但不限于 Squinto 等(1991, 细胞 65 :1-20)所披露的长末端重复;SV40 早期启动子片段(Bernoist 和 Chambon, 1981, 自然 290 :304-310), CMV 启动子、M-MuLV5' 末端重复、含有 Rous 肉瘤病毒的 3' 长末端重复的启动子(Yamamoto 等, 1980, 细胞 22 :787-797)、疱疹胸苷激酶启动子(Wagner 等, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78 : 144-1445)、金属硫蛋白基因的调控序列(Brinster 等, 1982, 自然 296 :39-42);原核表达

载体,如 β -内酰胺酶启动子 (Villa-Kamaroff 等,1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75 : 3727-3731),或 tac 启动子 (DeBoer 等,1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80 :21-25,还可以参见发表在美国科技上的“源于重组细菌的有用蛋白”1980,242 :74-94);源于酵母或其他真菌的启动子,如 Gal4 启动子、ADH 启动子、PGK 启动子、碱性磷酸酶启动子、和以下动物转录控制区,这些控制区具有组织专一性并且已经被用于转基因动物上:弹性蛋白酶 I 基因控制区,它是在胰腺泡细胞中起作用的 (Swift 等,1984, 细胞 38 老 :39-646 ;Ornitz 等,1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50 :399-409 ;MacDonald,1987, Hepatology7 : 425-512);胰岛素基因控制区,它是在胰腺 β 细胞中起作用的 (Hanahan,1985, 自然 315 : 115-122),免疫球蛋白基因控制区,它是在淋巴细胞中起作用的 (Grosschedl 等,1984, 细胞 38 :647-658 ;Adames 等,1985 自然 318 :533-538 ;Alexander 等,1987, 分子细胞生物学 7 :1436-1444),小鼠乳腺肿瘤病毒控制区,它是在睾丸、胸腺、淋巴和肥大细胞中起作用的 (Leder 等,1986, 细胞 45 :485-495),白蛋白基因控制区,它是在肝脏中起作用的 (Binkert 等,1987, 基因和发育 1 :268-276), α 胎蛋白基因控制区,它是肝脏中起作用的 (Krumlauf 等,1985, 分子细胞生物学 5 :1639-1648 ;Hammer 等,1987, 科学 235 :53-58); α 1-抗胰蛋白酶基因控制区,它是在肝脏中起作用的 (Keley 等,1987, 基因和发育 1 :161-171), β -珠蛋白基因控制区,它是在骨髓细胞中起作用的 (Mogram 等,1985, 自然 315 :338-340 ;Kollias 等,1986, 细胞 46 :89-94);髓鞘碱性蛋白基因控制区,它是在大脑的少突胶质细胞中起作用的 (Readhead 等,1987, 细胞 48 :703-712);肌球蛋白轻链 -2 基因控制区,它是在骨骼肌中起作用的 (Shani,1985, 自然 314 :283-286),和促性腺释放激素基因控制区,它是在下丘脑中起作用的 (Mason 等,1986, 科学 234 :1372-1378)。

[0115] 因此,根据本发明用含有本文所披露的编码嵌合多肽分子的核酸的能够在细菌或真菌宿主中复制的表达载体转染所述宿主,并因此控制所述核酸的表达,以便产生所述嵌合多肽分子,然后以生物学活性形式回收该多肽分子。在本文中,生物学活性形式包括能够与 VEGF 结合的形式。

[0116] 含有本文所述嵌合核酸分子的表达载体可以通过三种一般方法鉴定:(a)DNA-DNA 杂交,(b)“标记”基因功能的有和无,和(c)插入序列的表达。在第一种方法中,插入一种表达载体的外源基因的存在可以用含有与插入的嵌合多肽分子序列同源的序列的探针进行 DNA-DNA 杂交进行检测。在第二种方法中,可以根据由于在所述载体上插入外源基因所导致的某些“标记”基因功能(例如,腺苷激酶活性、对抗生素的抗性、转化表型、在杆状病毒中包含体的形成等)的有或无鉴定并选择重组载体/宿主系统。例如,如果所述嵌合多肽分子 DNA 序列被插入所述载体的标记基因序列之内,可以通过该标记基因功能的缺乏鉴定含有该插入片段的重组体。在第三种方法中,可以通过检测由重组体所表达的外源基因产物鉴定重组表达载体。例如,所述检测可以基于所述嵌合多肽分子的物理特性或功能特性。

[0117] 本发明的细胞可以瞬时或优选组成型地并且永久地表达所述嵌合多肽分子。

[0118] 所述嵌合多肽分子可以用任何方法纯化,以便能够随后制成稳定的、有生物学活性的嵌合多肽分子。例如,但并非限定,所述因子可以可溶蛋白形式从细胞中回收,或者作为包含体形式回收,然后可以通过 8M 盐酸胍和透析从包含体中定量提取(例如,参见 Builder 等, US5663304)。为了进一步纯化所述因子,可以使用常规的离子交换层析、疏水

性相互作用层析、反相层析或凝胶过滤。

[0119] 在本发明的一种实施方案中,编码第一种成分的核苷酸序列是编码第二种成分的核苷酸序列的上游。在本发明的另一种实施方案中,编码第一种成分的核苷酸序列是编码第二种成分的核苷酸序列的下游。本发明的其他实施方案可以这样制备,其中,第一、第二和第三种融合多肽成分的顺序可以进行重组。例如,如果编码第一种成分的核苷酸序列被称为 1,编码第二种成分的核苷酸序列被称为 2、而编码第三种成分的核苷酸序列被称为 3 的话,本发明的分离的核酸上的这些成分顺序从 5' 到 3' 看可以是下列六种组合的任一种形式:1、2、3;1、3、2;2、1、3;2、3、1;3、1、2;或 3、2、1。

[0120] 本发明还具有诊断和治疗用途。在本发明的具体实施方案中,本文所披露的检测嵌合多肽分子的功能或表达异常的方法可用于疾病的诊断。在另一种实施方案中,对所述嵌合多肽分子或结合于该嵌合多肽分子上的拮抗剂或兴奋剂的操作可用于治疗疾病。在另一种实施方案中,所述嵌合多肽分子被用作抑制结合剂与其目标结合的制剂。

[0121] 举例来说,但不是限定,本发明的方法可用于治疗以血管通透性、水肿或发炎为特征的临床疾病,如与外伤、中风或肿瘤相关的脑水肿;与诸如牛皮癣、关节炎,包括类风湿关节炎的炎性疾病相关的水肿;哮喘;与烧伤相关的常见水肿;与肿瘤、发炎或创伤相关的腹水和胸膜渗漏;慢性呼吸道发炎;毛细血管渗综合症;败血病;与蛋白渗漏增加相关的肾病;和眼病,如与年龄相关的斑状衰退和糖尿病性视网膜病。

[0122] 对 Flt1(1-3)-Fc 所作的氨基酸序列分析发现了异常大数量(46)碱性氨基酸残基赖氨酸的存在。对 Flt1(1-3)-Fc 所作的 IEF 分析发现,该蛋白的 pI 大于 9.3,证实了该蛋白是强碱性的预测。有人假设,Flt1(1-3)-Fc 蛋白的碱性性质是它能够与胞外基质成分结合的原因,并且这种相互作用会导致在注射到小鼠体内后由 Flt1(1-3)-Fc 所表现出的极短时间的可检测的循环血清半衰期。为了验证这种假设,在赖氨酸残基上对 Flt1(1-3)-Fc 蛋白进行酰化,以便降低其碱性电荷。然后按上述检测方法检测酰化的 Flt1(1-3)-Fc。

[0123] 提供以下实施例是为了说明,而不是为了限定。

[0124] 实施例

[0125] 例 1:Flt1(1-3)-Fc 蛋白在 CHO K1 细胞中的表达

[0126] 用标准分子生物学技术(例如,参见分子克隆,实验室手册, Sambrook 等,冷泉港实验室;当代分子生物学方法, Ausubel 等著, Greene 出版协会, Wiley-Interscience, NY)将编码 Flt1(1-3)-Fc 的基因插入表达载体 pEE14.1(Lonza Biologics,plc)上的 CMV 启动子下游的多克隆位点。通过脂转染胺试剂(Gaithersburg, MD)用 pEE14.1/Flt1(1-3)-Fc DNA 结构转染 CHO K1 细胞。在含有 250 微摩尔购自 Sigma 公司(St. Louis, MO)的甲硫氨酸 sulfoximine(MSX)的不含谷氨酰胺的 DMEM(JRH, Kansas 市, MO)中生长转染过的 CHO K1 细胞,并通过能捕获并检测人 Fc 的标准免疫检测从超过 100 个手工挑选的菌落分离物中筛选 CHO K1 细胞上清液获得高重组蛋白表达体。在有 100 微摩尔 MSX 的条件下扩增所筛选的手工挑选的克隆,然后对所扩增的克隆进行第二轮筛选。最高产的克隆的重组 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的比产率为 55pg/细胞/天。

[0127] 用上述细胞培养基在 225 平方厘米的 T-烧瓶(Corning, Acton, MA)中扩增所选择的克隆,然后转移到 8.5 升滚瓶(Corning, Acton, MA)中。通过标准的胰蛋白酶化从滚瓶中除去细胞,并放入 3.5 升悬浮介质中。悬浮介质由不含谷氨酰胺的 ISCHO 培养基组成

(IrvineScientific, Santa Ana, CA), 它含有 5% 胎牛血清 (购自 Hyclone 实验室, Logan, UT 的 FBS)、100 微摩尔 MSX 和 GS 添加剂 (JRHSscientific, Kansas City, MO), 该培养基装在 5 升 Cellign 生物反应器 (New Brunswick Scientific, New Brunswick, NJ) 中, 密度为 0.3×10^6 细胞 / 毫升。在细胞达到 3.6×10^6 / 毫升的密度并且适合悬浮之后, 将其转移到装有 20 升含有 5% 胎牛血清的 ISCHO 培养基的 60 升的生物反应器 (ABEC, Allentown, PA) 中, 其密度为 0.5×10^6 细胞 / 毫升。2 天之后, 将另外 20 升 ISCHO+5% 胎牛血清添加到该生物反应器中。让细胞再生长 2 天, 达到 $3. \times 10^6$ 细胞 / 毫升的最终密度, 在收获时 Flt1(1-3)-Fc 的最终浓度为 95 毫克 / 升。在收获时, 用 0.45 微米 Prostack 过滤器 (Millipore 公司, Bedford, MA) 通过切向流过滤除去细胞。

[0128] 例 2: 纯化从 CHO K1 细胞中获得的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白

[0129] 首先通过亲和层析纯化 Flt1(1-3)-Fc 蛋白。用蛋白 A 柱以高的专一性结合该分子 Fc 部分。然后对亲和纯化的蛋白进行浓缩, 并通过 SEC 柱。然后将该蛋白洗脱到制剂缓冲液中。下面详细披露这些方法。

[0130] 材料和方法

[0131] 所有化合物都获自 J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, 只有 PBS 例外, 它是以 10 倍浓缩液形式从生命技术公司 (gaitthersburg, MD) 获得的。蛋白 A 速流和 Superdex200 制备级树脂是从 Pharmacia (Piscataway, NJ) 获得的。用于蛋白浓缩的设备和膜是从 Millipore, Bedford, MA 获得的。

[0132] 将大约 40 升经过 0.45 微米过滤的含有 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的 CHO 条件培养基加样到用 PBS 平衡过的 290 毫升蛋白 A 速流柱 (直径 10 厘米) 上。用含有 350mM 氯化钠和 0.02% CHAPS 的 PBS 洗涤该柱, 并用含有 10mM 磷酸氢二钠的 20mM 柠檬酸洗脱结合的蛋白。收集该洗脱液中的单一的峰, 并用 1M 氢氧化钠将其 pH 提高到中性。用 10K 再生纤维素膜通过切向流过滤和搅拌细胞浓缩将洗脱级份浓缩到大约 9 毫克 / 毫升。为了清除聚合体和其他污染物, 将浓缩过的蛋白加样到用 Superdex200 制备级树脂填装的柱上 (10 厘米 \times 55 厘米), 并且用含有 5% 甘油的 PBS 洗脱。收集主要的峰级份, 无菌过滤、分装并在 -80°C 下保存。

[0133] 例 3: Flt1(1-3)-Fc 蛋白的酰化

[0134] 用硫代 NHS 乙酸酯改性试剂盒 (Pierce 化学公司, Rockford, IL, 目录号 26777) 所提供的指导手册对 2 毫克 Flt1(1-3)-Fc 蛋白进行酰化。

[0135] 例 4: 酰化 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的鉴定

[0136] (a) IEF 分析: 通过标准 IEF 分析 Flt1(1-3)-Fc 和酰化 Flt1(1-3)-Fc。如图 1 所示, Flt1(1-3)-Fc 蛋白不能够转移到凝胶中, 因而必然具有超过 9.3 的 pI, 这是在该标准物中最大的 pI。不过, 酰化的 Flt1(1-3)-Fc 能够转移到凝胶中, 并且在大约 5.2pI 处平衡。该结果表明, 酰化能降低该蛋白的净正电荷, 并因此明显降低其 pI。

[0137] (b) 与胞外基质成分的结合

[0138] 为了检测与胞外基质成分的结合, Flt1(1-3)-Fc 和酰化 Flt1(1-3)-Fc 用为了模拟胞外基质成分相互作用而设计的测定进行测试。在该测定中, 用 Matrigel 对 96 孔组织培养平板进行包被 (Bioat Matrigel [®] 基质宝层 96 孔平板, 目录号 40607, Becton Dickinson Labware, Bedford, MA)。用各种浓度的 Flt1(1-3)-Fc、酰化 Flt1(1-3)-Fc、或 rTie2-Fc (一

种不相关的对照)蛋白与所述平板一起培养,将其添加到孔中。在室温或者 37°C 下培养所述平板 1-2 小时,然后通过向孔中添加二级碱性磷酸酶缀合的抗人 Fc 抗体检测结合的蛋白。最后,将碱性磷酸酶底物添加到所述孔中,并检测光学密度。图 2 表示该测定的结果。与不相关的对照蛋白 rTie2-Fc 一样,酰化 F1t1(1-3)-Fc 没有表现出与 Matrigel 包被的平板有任何结合,而非酰化 F1t1(1-3)-Fc 蛋白表现出明显的结合。这一结果表明,碱性氨基酸残基的酰化是影响存在于带正电荷的蛋白和它在体内所接触到的带负电荷的胞外基质成分之间的电荷相互作用的有效方法。

[0139] 例 5 :F1t1(1-3)-Fc 蛋白的聚乙二醇化

[0140] 尽管已经证实蛋白的聚乙二醇化(聚乙二醇 -P1)能通过增强其稳定性和生物可利用性同时降低免疫原性而提高其体内效力(参见上面所引用的文献),但违反直觉的是,聚乙二醇化的分子太大,以至于不能通过肾小球过滤,这会改善其药物动力学特征。在不受理论约束的前提下,申请人推测,F1t1(1-3)-Fc 分子的聚乙二醇化可以改善其药物动力学特性,这可能不是由于改变了它的正电荷或者是降低了 F1t1(1-3)-Fc 的 pI,而是由于对正电荷的物理屏蔽,使其不能与胞外基质相互作用。申请人决定按下述方法通过连接 20K PEGs 链来改善 F1t1(1-3)-Fc 分子的药物动力学特性。

[0141] 材料和方法

[0142] 将来自 CHO 细胞的纯化的 F1t1(1-3)-Fc(见上文)用于下面的聚乙二醇化实验中。官能化 PEGs 购自 Shearwater Polymers, Huntsville, AL;Bicine 购自 Sigma, St Louis, MO;Superose6 柱购自 Pharmacia, Piscataway, NJ;10 倍浓度的 PBS 购自生命技术公司, Gaithersburg, MD;甘油购自 J. T. Baker, Phillipsburg, NJ;而 Bis-Tris 预制凝胶购自 Novex, CA。

[0143] 将用胺特异性末端部分官能化的 20K PEG 链用于小规模反应研究中,建立这种研究是为了评估在不同的反应条件中 PEG:蛋白化学计量学的变化。根据上述反应和在标准 SDS-PAGE 上对样品进行的分析,在 pH8.1 下浓度为 1.5 毫克/毫升的 F1t1(1-3)-Fc 与 20K SPA-PEG(PEG 琥珀酰亚胺丙酸酯)分子的 PEG:F1t1(1-3)-Fc 单体的摩尔比为 1:6。让该反应在 8°C 下进行一夜。为了进行初步纯化,将该反应产物加样到用含有 5%甘油的 PBS 平衡过的 10 毫米 × 30 厘米 SUPEROSE6 柱上。该柱似乎根据聚乙二醇化的程度分离聚乙二醇化的 F1t1(1-3)-Fc 分子。合并相当于主要是单聚乙二醇化的和双聚乙二醇化的二聚体 F1t1(1-3)-Fc 的级份,上述级份的性质是根据在还原性和非还原性 SDS-PAGE 凝胶上的带形判断的。通过测定在 280nm 下的吸收值测定蛋白浓度。对聚乙二醇化的 F1t1(1-3)-Fc 蛋白进行消毒过滤,分装并在 -40°C 下保存。

[0144] 例 6 :在基于 BIAcore 测定中未修饰过的、酰化的、和聚乙二醇化的 F1t1(1-3)-Fc 的结合

[0145] 在基于 BIAcore 的测定中检测未修饰过的、酰化的、和聚乙二醇化的 F1t1(1-3)-Fc 蛋白,以便评估其结合 F1t1 配体 VEGF 的能力。在该测定中,将未修饰过的 F1t1(1-3)-Fc 蛋白固定在 BIAcore 芯片表面(有关标准方法参见 BIAcore 指导手册, Pharmacia 公司, Piscataway, NJ)并且让含有 0.2 微克/毫升 VEGF 和未修饰过的 F1t1(1-3)-Fc、酰化 F1t1(1-3)-Fc 或聚乙二醇化的 F1t1(1-3)-Fc(各为 25 微克/毫升)的样品通过 F1t1(1-3)-Fc-包被的芯片。为了降低非专一结合的影响,用 0.5M 氯化钠洗涤

结合样品。在一个样品中,将未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 与肝素混合。肝素是带负电荷的分子,而 Flt1(1-3)-Fc 蛋白是带正电荷的分子,因此当这两种分子混合在一起时,它们会通过其相应的电荷相互作用。这会显著中和 Flt1(1-3)-Fc 所固有的正电荷,使得该分子的性能象是进行过化学或遗传学修饰一样,以便降低其电荷,并降低其通过电荷相互作用进行结合的趋势。如图 3 所示,与对照(柱 1-4)和不相关的蛋白(柱 5-8)相比,酰化的(柱 13-16)、聚乙二醇化的(柱 17-20)、和肝素处理过的 Flt1(1-3)-Fc(柱 21-24)都能够完全与 BIAcore 芯片结合的 Flt1(1-3)-Fc 竞争结合 VEGF。未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc(柱 5-6)似乎只能与 BIAcore 芯片结合的 Flt1(1-3)-Fc 部分竞争结合 VEGF。不过,用 0.5M 氯化钠洗涤结合的样品(柱 7-8)会得到类似于 Flt1(1-3)-Fc 的修饰形式的结合曲线,表明未修饰过的蛋白对芯片的结合是非专一性的,这种结合可以通过盐洗涤消除。

[0146] 例 7:在基于 ELISA 测定中未修饰过的、酰化的或聚乙二醇化的 Flt1(1-3)-Fc 结合。

[0147] 在标准的基于 ELISA 的测定中测定未修饰过的、酰化的或聚乙二醇化的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白,评估其结合 Flt1 受体配体 VEGF 的能力。如图 4 所示,聚乙二醇化的和酰化的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白能够结合 VEGF,表明通过聚乙二醇化或酰化修饰该蛋白不会破坏其结合其配体的能力。

[0148] 例 8:未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc、酰化的 Flt1(1-3)-Fc 或聚乙二醇化的 Flt1(1-3)-Fc 的药物动力学分析

[0149] 设计体内实验,评估未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc、酰化的 Flt1(1-3)-Fc 或聚乙二醇化的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的药物动力学特征。用 4 毫克/千克未修饰过的、酰化的或聚乙二醇化的 Flt1(1-3)-Fc 皮下注射 Balb/C 小鼠(23-28 克;3 只小鼠/组)。在注射蛋白 1、2、4、6、24 小时,2 天和 3 天之后从小鼠尾部放血。在为了检测 Flt1(1-3)-Fc 蛋白而设计的标准的基于 ELISA 的测定中测定血清。简单地讲,该测定包括用 VEGF 对 ELISA 平板进行包被,结合含有未修饰过的、酰化的或聚乙二醇化的 Flt1(1-3)-Fc 的血清,并用与碱性磷酸酶连接的抗 Fc 抗体报导。如图 5 所示,所有 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的 T_{max} 在 6 小时和 24 小时时间点之间。不同蛋白的 C_{max} 如下:未修饰过的:0.06-0.15 微克/毫升;酰化的:1.5-4.0 微克/毫升;而聚乙二醇化的:大约 5 微克/毫升。

[0150] 例 9:Flt1(1-3)-Fc 的逐步酰化

[0151] 为了确定消除与胞外基质成分结合所必需的最低酰化程度,设计了通过增加酰化反应混合物中酰化试剂超出的摩尔量以逐步的方式酰化 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的实验。所超出的摩尔范围如下:每 1 摩尔 Flt1(1-3)-Fc 单体使用 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 和 100 摩尔酰化试剂。反应是按照在硫代 -NSH- 乙酸酯修饰试剂盒(Pierce 化学公司, Rockford, IL, 目录号 26777)所提供的指导手册中的详细说明进行的。

[0152] 例 10:逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 的鉴定

[0153] (a) IEF 分析:通过标准 IEF 分析未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 和逐步酰化 Flt1(1-3)-Fc 蛋白。如图 6A、6B 所示,未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白由于其具有极高的 pI(大于 9.3)而不能转移到凝胶中。不过,大多数逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 样品(超出 30-100 倍摩尔的样品)能够转移到凝胶中,并且根据该蛋白的酰化程度在 4.55-8.43pI 的范围内达到平衡。这一结果表明,酰化作用可以依赖于剂量的方式改变该蛋白的正电荷,并

且 pI 的降低可以通过控制酰化程度进行操纵。

[0154] (b) 逐步酰化 Flt1(1-3)-Fc 与胞外基质成分的结合

[0155] 为了检测与胞外基质成分的结合,在上述为了模拟与胞外基质成分的相互作用而设计的测定中测定 Flt1(1-3)-Fc 和逐步酰化 Flt1(1-3)-Fc。将各种浓度的未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc、逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc(超出 10、20、和 30 倍摩尔的样品)或 rTie2-Fc(一种不相关的对照)蛋白添加到孔中。在室温或者 37°C 下培养所述平板 1-2 小时,然后通过向孔中添加二抗碱性磷酸酶缀合的抗人 Fc 抗体检测结合的蛋白。然后,将碱性磷酸酶底物添加到所述孔中,并检测光学密度。图 7 表示该测定的结果。与不相关的对照蛋白 rTie2-Fc 相似,逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc(超出 20 和 30 倍摩尔的样品)没有表现出与 Matrigel 包被的平板有任何明显结合,而非酰化 Flt1(1-3)-Fc 蛋白表现出明显结合。这种结合是可以饱和的,表明 Flt1(1-3)-Fc 蛋白可以与特殊位点结合,而不是以一种不能够饱和的更常见的电荷介导的相互作用结合。超出 10 倍摩尔的样品表现出减弱的结合,但其酰化程度不足于完全抑制与胞外基质成分的结合。超出 20 倍摩尔的样品没有表现出可检测的结合,尽管事实上通过 IEF 分析证实(图 6A 和 6B)超出较低摩尔的样品仍然具有大的净正电荷。这一结果表明,没有必要将所有碱性氨基酸完全酰化来消除与胞外基质成分的结合。

[0156] (c) 在基于 BIAcore 测定中逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 的结合

[0157] 在基于 BIAcore 的测定中测定未修饰过的和逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白,评估其结合 Flt1 配体 VEGF 的能力。在该测定中,将未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白(0.5、1.0 或 5.0 微克/毫升)固定在 BIAcore 芯片表面(有关标准方法参见 BIAcore 指导手册,Pharmacia 公司,Piscataway, NJ),并让含有 0.2 微克/毫升 VEGF 和未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc(0.5、1.0 或 5.0 微克/毫升)或 10 种不同的逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 样品(各 0.5、1.0 或 5.0 微克/毫升)通过 Flt1(1-3)-Fc-包被的芯片。如图 8 所示,在亚化学计量比例下(0.5 微克/毫升未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 或逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 与 0.2 微克/毫升 VEGF),溶液中没有足够的 Flt1(1-3)-Fc(未修饰过的或逐步酰化的)来完全结合 VEGF。在接近 1 : 1 化学计量比例的 1.0 微克/毫升的浓度下,未修饰过的或逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 能更好地竞争结合 VEGF,但仍然没有足够的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白(未修饰过的或逐步酰化的)完全结合所有 VEGF。不过,在高于 1 : 1 化学计量比例若干倍的 5.0 微克/毫升的浓度下,Flt1(1-3)-Fc 和逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白能够结合 VEGF,而与酰化程度无关。这清楚地表明,酰化作用不会改变 Flt1(1-3)-Fc 结合 VEGF 的能力。

[0158] (d) 逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 的药物动力学分析

[0159] 设计评估未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 和逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的药物动力学特征的体内实验。用 4 毫克/千克未修饰过的或超出 10、20、40、60 和 100 倍摩尔的逐步酰化的 Flt1(1-3)-Fc 样品皮下注射 Balb/C 小鼠(23-28 克)(未修饰过的,超出 10、20 和 40 倍摩尔的样品 3 只小鼠,超出 60 和 100 倍摩尔的样品 2 只小鼠)。在注射 1、2、4、6、24 小时,2 天和 3 天之后从小鼠尾部放血。在为了检测 Flt1(1-3)-Fc 而设计的基于 ELISA 的测定中测定血清(如上文所述)。图 9 详细给出了该研究的结果。所测定过的所有 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的 T_{max} 出现在 6 小时时间点上,而 C_{max} 如下:未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc :0.06 微克/毫升;超出 10 倍摩尔的样品 :-0.7 微克/毫升,超出 20 倍的样品 :-2 微克/毫升,超出 40

倍的样品：-40 微克 / 毫升，超出 60 倍的样品：-2 微克 / 毫升，超出 100 倍的样品：-1 微克 / 毫升。这一结果表明，Flt1(1-3)-Fc 的酰化或聚乙二醇化能明显改善其药物动力学特征。

[0160] 例 11：构建被称为 Mut1:Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 的 Flt1(1-3)-Fc 碱性区缺失突变体

[0161] 根据这样的观察结果，即酰化 Flt1(1-3)-Fc 的 pI 低于 6，它具有好于带有高的正电荷的未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc (pI 大于 9.3) 的药物动力学，人们会提出这样的问题，在药物动力学方面的差异是否是由于该蛋白的净正电荷，这种电荷使得它能够与带负电荷的胞外基质成分结合，或者在 Flt1(1-3)-Fc 蛋白表面是否有可能存在构成胞外基质成分专一性结合位点的特殊部位。例如，已知许多蛋白具有肝素结合位点，该位点通常由一组碱性残基构成。有时候，这些残基存在于该蛋白的一级序列上的一组中；某些文献业已鉴定了这些肝素结合位点的“共有序列”（例如，参见 Hileman 等，1998，Bioessays20(2)：156-67）。在另一种情况下，一种蛋白的已知晶体结构揭示出一组位于该蛋白表面上的带正电荷的残基，但这些残基来自其一级序列的不同部位，并且只有当该蛋白折叠成三级结构时才聚集在一起。因此，要判断一个分离的氨基酸残基是否构成位于该蛋白表面的一组碱性残基的一部分是困难的。不过，如果在一级序列存在一组带正电荷的氨基酸残基的话，推测这些残基在空间上彼此接近并且有可能是构成胞外基质成分结合位点的一部分是合理的。已经对 Flt1 受体进行了深入研究，并且披露了各种结构（例如，参见 Tanaka 等，1997，Jpn. J. Cancer Res88：867-876）。通过参考在图 10A-10D 中所示核酸和氨基酸序列，人们可以确定分泌信号序列，该序列位于所述序列的开始位置到由 76-78 号核苷酸所编码的甘氨酸之间。成熟蛋白始于 Ser-Lys-Leu-Lys，从核酸序列的 79 号核苷酸开始。Flt1 Ig 结构域 1 从 79 号核苷酸延伸到 393 号核苷酸（编码氨基酸，其末端是氨基酸 Ser-Asp-Thr）。Flt1 Ig 结构域 2 从 394 号核苷酸延伸到 687 号核苷酸（编码 Gly-Arg-Pro 至 Asn-Thr-Ile），Flt1 Ig 结构域 3 从 688 号核苷酸延伸到 996 号核苷酸（编码 Ile-Asp-Val 至 Asp-Lys-Ala）。有一个由 997-1005 号核苷酸编码的桥氨基酸序列 Gly-Pro-Gly，其后是编码人 Fc 的核苷酸序列（1006-1701 号核苷酸或氨基酸 Glu-Pro-Lys 至 Pro-Gly-Lys-终止）。

[0162] 对 Flt1 氨基酸序列所作的更详细的分析发现存在一个簇，即是图 10A-10D 中的 272-281 号氨基酸 (KNKRASVRR) 残基，其中，10 个氨基酸残基中有 6 个是碱性的。该序列位于受体的 Flt1 Ig 结构域 3 中（参见图 11），它本身并不是 VEGF 配体结合所必需的，但它能产生结合配体的较高的亲和力。对 Ig 结构域 3 的序列和 Ig 结构域 2 的序列所作的排比发现，在该部分在这两种 Ig 结构域之间存在很差的相同性，在 Ig 结构域 3 中存在多出大约 10 个的氨基酸。对这两个结构域所作的亲水性特征分析 (MacVector 计算机软件) 清楚地表明了在上述蛋白中亲水性区的存在（图 12A-12B）。上述观察增加了 Flt1Ig 结构域 3 的实际三维构象产生某种类型的突出的可能性，这种突出不存在于 Flt1Ig 结构域 2 中。为了验证这一假设，将所述 10 个多余的氨基酸去掉，并对所得到的蛋白进行测定，看是否这种缺失会对药物动力学产生正面影响，而不会严重损害该受体对 VEGF 的亲和力。用标准分子生物学技术（例如，参见分子克隆，实验室手册，Sambrook 等，冷泉港实验室；当代分子生物学方法，Ausubel 等著，Greene 出版协会，Wiley-Interscience，NY）在哺乳动物表达载体 Pmt21（遗传学研究所公司，剑桥，MA）中构建的这种 DNA 结构被称为 Mut1:Flt1(1-3_{ΔB})-Fc。Mut1:Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 结构是通过缺失 814-843 号核苷酸由 Flt1(1-3)-Fc 产生的（如图 10A-10D 所示），这种缺失去掉了 Flt1Ig 结构域 3 中的强碱性的 10 个氨基酸残基序列 Ly

s-Asn-Lys-Arg-Ala-Ser-Val-Arg-Arg-Arg。

[0163] 用 ABI 373A DNA 测序仪和 Taq 双脱氧终止循环测序试剂盒 (应用生物系统公司, Foster 市, CA) 对最终的 DNA 结构进行序列验证。Mut1 :Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 的序列如图 13A-13D 所示。

[0164] 例 12 :构建被称为 Mut2 :Flt1(2-3_{ΔB})-Fc 的 Flt1(1-3)-Fc 碱性区缺失突变体

[0165] 被称为 Mut2 :Flt1(2-3_{ΔB})-Fc 的第二种缺失突变体结构是通过去掉由 79-393 号核苷酸所编码的 Flt1Ig 结构域 1 由 Mut1 :Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 结构产生的;为方便起见,将 73-78 号核苷酸 (TCA GGT) 换成 TCCGGA。这样可以引入一个限制位点 (BspE1) 而又不会改变相关的氨基酸序列 Ser-Gly。用标准分子生物学技术 (例如,参见分子克隆,实验室手册, Sambrook 等,冷泉港实验室;当代分子生物学方法, Ausubel 等著, Greene 出版协会, Wiley-Interscience, NY) 在哺乳动物表达载体 pMT21 (遗传学研究所公司,剑桥, MA) 中构建的这种 DNA 结构同样用 ABI373A DNA 测序仪和 Taq 双脱氧终止循环测序试剂盒 (应用生物系统公司, Foster 市, CA) 对最终的 DNA 结构进行序列验证。Mut2 :Flt1(2-3_{ΔB})-Fc 的序列如图 14A-14C 所示。

[0166] 例 13 :构建被称为 Mut3 :Flt1(2-3)-Fc 的 Flt1(1-3)-Fc 缺失突变体

[0167] 以与 Mut2 :Flt1(2-3_{ΔB}) 结构相同的方法构建被称为 Mut3 :Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 的第三种缺失突变结构。所不同的是 Flt1Ig 结构域 3 保持完好 (碱性区氨基酸没有缺失)。用标准分子生物学方法构建该结构,并按上述方法对最终结构进行序列验证。Mut3 :Flt1(2-3)-Fc 的序列如图 15A-15C 所示。

[0168] 例 14 :构建被称为 Mut4 :Flt1(1-3_{R→N})-Fc 的 Flt1(1-3)-Fc 碱性区 N-糖基化突变体。

[0169] 制备一种最终结构,其中将 N-糖基化位点引入 Flt1Ig 结构域 3 的碱性区的中央。该结构被称为 Mut4 :Flt1(1-3_{R→N})-Fc,并且通过将 824-825 号核苷酸 GA 换成 AC 而制成的,并因此将所编码的 Arg 残基 (AGA) 换成了 Asn 残基 (AAC) (参见图 10A-10D)。因此,所得到的氨基酸序列从 Arg-Ala-Ser 换成了 Asn-Ala-Ser,它与在 Asn 残基上添加 N-糖基化位点的规范信号 (Asn-Xxx-Ser/Thr) 吻合。Mut4 :Flt1(1-3_{R→N})-Fc 的序列如图 16A-16D 所示。

[0170] 例 15 :酰化 Flt1(1-3)-Fc、Mut1 :Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 和 Mut4 :Flt1(1-3_{R→N})-Fc 突变体的鉴定

[0171] (a) 与胞外基质成分的结合

[0172] 为了确定这三种修饰过的蛋白是否有可能具有改善了的药物动力学特性,将用 Matrigel 包被过的 96 孔平皿 (如上文所述) 与各种浓度的突变蛋白一起培养,并检测抗人 Fc/碱性磷酸酶缀合的抗体。如图 18 所示,该实验表明,尽管未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白能够有效结合所述孔,但 Mut3 :Flt1(2-3_{ΔB})-Fc 蛋白的结合更弱一些, Mut1 :Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 蛋白结合还要弱一些,而 Mut2 :Flt1(2-3_{ΔB})-Fc 蛋白表现出最佳的特征,其结合比其他突变蛋白中的任一种都弱。Mut4 :Flt1(1-3_{R→N})-Fc 糖基化突变蛋白在 Matrigel 测定中仅表现出微弱的优点。上述结果证实了有关假说,即可以从一级序列中去掉带正电荷的氨基酸的线性序列,导致与胞外基质成分的电荷成分的相互作用的减弱。

[0173] (b) 在基于 Matrigel 的测定中 Mut1 :Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 和 Mut4 :Flt1(1-3_{R→N})-Fc

的结合。

[0174] 在基于 BIAcore 的测定中测定未修饰过的和酰化的 Flt1(1-3)-Fc 和遗传修饰过的 Mut1:Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 和 Mut4:Flt1(1-3_{R→N})-Fc 蛋白,评估其结合 Flt1 配体 VEGF 的能力。在该测定中,将未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白(0.25、0.5、或 1.0 克/毫升)固定在 BIAcore 芯片表面(有关标准方法参见 BIAcore 指导手册,Pharmacia 公司,Piscataway, NJ),并让含有 0.1 微克/毫升 VEGF 的溶液和纯化的或含有未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc(大约 0.25、0.5、1.0 微克/毫升)的 COS 细胞上清液,纯化的酰化 Flt1(1-3)-Fc(0.25、0.5 或 1.0 微克/毫升)、含有 Mut1:Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 的 COS 细胞上清液(大约 0.25、0.5、1.0 微克/毫升)或含有 Mut4:Flt1(1-3_{R→N})-Fc 的 COS 细胞上清液(大约 0.25、0.5、1.0 微克/毫升)通过用 Flt1(1-3)-Fc 包被的芯片。如图 17 所示,在亚化学计量比例下(0.25 微克/毫升未修饰过的、酰化的或遗传修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 样品与 0.1 微克/毫升 VEGF),没有足够的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白来抑制 VEGF 与固定在芯片上的 Flt1(1-3)-Fc 结合。在化学计量比例接近 1:1 的 0.5 微克/毫升未修饰过的、酰化的或遗传修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的浓度下,抑制 VEGF 与芯片结合的能力增强。在接近 10:1 的化学计量比例的 1.0 微克/毫升修饰过的、酰化的或遗传修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的浓度下,Flt1(1-3)-Fc 蛋白能够抑制 VEGF 与 BIAcore 芯片结合,但它们的作用相同。未修饰过的、酰化的和 Mut1:Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 在其抑制 VEGF 结合的能力方面基本上相同,而 Mut4:Flt1(1-3_{R→N})-Fc 在抑制结合方面效果较差。上述结果证实了这样的假说,即通过遗传学方法除去主要为带负电荷的氨基酸的线性序列可以减弱带正电荷的分子的非专一性结合。

[0175] (c) 在基于 ELISA 测定中 Mut1:Flt1(1-3_{ΔB})-Fc、Mut2:Flt1(2-3_{ΔB})-Fc、Mut3:Flt1(2-3)-Fc 的结合

[0176] 为了确定这三种突变蛋白是否能够结合 Flt1 配体 VEGF,进行了结合实验,其中,将用 VEGF 包被的 96 孔平板与各种浓度的相应的突变蛋白一起培养,并且在洗涤之后,通过与碱性磷酸酶缀合的抗人 Fc 抗体培养检测其结合量,通过添加合适的碱性磷酸酶底物通过比色方法进行定量,如图 19 所示,该实验表明,在测试的浓度下,所有突变蛋白都能够以相似的方式结合 VEGF。

[0177] 例 16:酰化 Flt1(1-3)-Fc、Mut1:Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 和未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc 的药物动力学分析

[0178] 设计体内实验以便评估未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc、Mut1:Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 和超出 40 倍摩尔的酰化 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的药物动力学特征。用 4 毫克/千克 Flt1(1-3)-Fc、超出 40 倍摩尔的酰化的 Flt1(1-3)-Fc 和 Mut1:Flt1(1-3_{ΔB})-Fc 蛋白皮下注射 Balb/C 小鼠(25-30 克)(每一种处理 4 只小鼠)。在注射 1、2、4、6、24 小时,2 天、3 天和 5 天之后从小鼠尾部放血。在为了检测 Flt1(1-3)-Fc 蛋白而设计的 ELISA 中测定血清,该测定包括让 VEGF 接触 ELISA 平板,结合 Flt1(1-3)-Fc,并用与碱性磷酸酶连接的 Fc 抗体报导。如图 20 所示,这些试剂的 C_{max} 如下:未修饰过的 Flt1(1-3)-Fc-0.15 微克/毫升;超出 40 倍摩尔的酰化 Flt1(1-3)-Fc-1.5 微克/毫升;而 Mut1:Flt1(1-3_{ΔB})-Fc-0.7 微克/毫升。

[0179] 例 17:修饰过的 Flt1 受体载体构建

[0180] 用于构建修饰形式的 Flt1 受体(又被称作 VEGFR1)的原理基于以下观察,即 Flt1 的蛋白序列是强碱性的,因此有可能结合在胞外基质(ECM)上。Flt1 的强碱性性质可以解

释为什么未修饰过的 F1t1(1-3)-Fc(如上文所述) 具有较差的药物动力学, 这使得它很难被用作治疗剂。如上文所述, F1t1(1-3)-Fc 的化学修饰形式(以下称之为 A40) 与非酰化的 F1t1(1-3)-Fc 相比具有大大改善了的药物动力学(PK) 特征。因此, 试图制备工程 DNA 分子, 该分子可用于重组表达修饰形式的 F1t1 受体分子, 该分子具有由 A40 所表现出的改善了的 PK 特征, 而仍然保留了与 VEGF 紧密结合的能力。

[0181] 从文献中得知, F1t1 的第一个 Ig 结构域(在中性 pH 下它的净电荷为 +5) 不是与 VEGF 紧密结合所必须的, 因此将该结构域去掉。第三个 Ig 结构域(净电荷为 +11) 不是结合所必须的, 但能产生比第二个 Ig 结构域高的对 VEGF 的亲合力, 因此不是将它完全去掉, 而是用 F1t1 受体家族的 F1k1(又被称作 VEGFR2) 和 F1t4(又被称作 VEGFR3) 的等同的结构域取代它。这些嵌合分子(被称为 R1R2(F1t1. D2. F1k1D3. Fc Δ C1(a) 和 VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) 和 R1R3(F1t1D2. VEGFR3D3-Fc Δ C1(a) 和 VEGFR1R3-Fc Δ C1(a), 其中, R1 和 F1t1D2 = F1t1(VEGFR1) Ig 结构域 2 ; R2 和 F1k1D3 = F1k1(VEGFR2) 的 Ig 结构域 3 ; 而 R3 和 VEGFR3D3 = F1t4(VEGFR3) Ig 结构域 3) 与 ECM 的结合力较低, 这一结论是通过下文所述的体外 ECM 结合测定判断的, 如下文所述, 它具有明显改善了的 PK。另外, 如下文所述, 这些分子能够紧密结合 VEGF, 并且抑制在内皮细胞中所表达的 F1k1 受体的磷酸化, 如下文所述。

[0182] (a) 表达质粒 pF1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1(a) 的构建

[0183] 表达质粒 pMT21. F1t1(1-3)-Fc(6519bp) 和 pMT21. F1k1(1-3)-Fc(5230bp) 分别是编码氨苄青霉素抗性和 Fc 抗性标记形式的人 F1t1 和人 F1k1 的 Ig 结构域 1-3 的质粒。用所述质粒构建包括 F1t1 的 Fc 结构域 2 与 F1k1 的 Ig 结构域 3 的融合 DNA 片段, 通过 PCR 扩增相应的 Ig 结构域, 然后再进行一轮 PCR 实现将这两个结构域融合成一个片段。对于 F1t1 的 Ig 结构域 2 来说, 5' 和 3' 扩增引物如下:

[0184] 5' : bsp/s1t1D2 (5' -GACTAGCAGTCCGGAGGTAGACCTTTCGTAGAGATG-3')

[0185] 3' : F1t1D2F1k1D3. as (5' -CGGACTACAGAACCACATCTATGATTGTATTGGT-3')

[0186] 编码 F1t1 的 Ig 结构域 2 上游的 BspE1 限制酶位点的 5' 扩增引物, 由氨基酸序列 GRPFVEM 限定(相当于图 21A-21C 的 27-33 号氨基酸)。3' 引物编码直接与 F1k1 的 Ig 结构域 3 的 5' 末端融合的 F1t1Ig 结构域 2 的 3' 末端的反向补体, 融合点被确定为 F1t1 的 TIID(相当于图 21A-21C 的 123-126 号氨基酸), 并延续到 F1k1 的 VVLS(相当于图 21A-21C 的 127-130 号氨基酸)。

[0187] 对于 F1k1 的 Ig 结构域 3 来说, 5' 和 3' 扩增引物如下: 5' : F1t1D2-F1k1D3. S (5' -ACAATCATAGATGTGGTTCTGAGTCCGTCTCATGG-3')。

[0188] 3' : F1k1D3/apa/srf. as (5' -GATAATGCCGGGCCCTTTTCATGGACCCTGACAAATG-3')

[0189] 5' 扩增引物编码直接与 F1k1Ig 结构域 3 的开始部分融合的 F1t1Ig 结构域 2 的末端, 如上文所述。3' 扩增引物编码 F1k1Ig 结构域 3 的末端, 该末端由氨基酸 VRVHEK 形成(相当于图 21A-21C 的 223-228 号氨基酸), 其后是一个连接序列, 该序列包括一个限制酶 Srf1 的识别序列, 并且编码氨基酸 GPG。所述连接序列相当于图 21A-21C 的 229-231 号氨基酸。

[0190] 进行一轮 PCR 扩增, 产生所述单一的结构域, 然后在试管中混合该产物, 并用引物 bsp/F1t1D2 和 F1k1D3/apa/srf. as(如上文所述) 进行另一轮 PCR, 以便产生融合产物。然后用限制酶 BspE1 和 SmaI 消化该 PCR 产物, 并将所得到的 614bp 的片段克隆到载体 pMT21/

Δ B2.Fc 的 BspEI 至 SrfI 限制位点上,形成质粒 pMT21/F1t1D2.F1k1D3.Fc。通过标准序列分析方法证实 F1t1D2-F1k1D3 基因融合插入片段的核苷酸序列。然后用限制酶 EcoRI 和 SrfI 消化该质粒,并将所得到的 702bp 的片段转移到质粒 pF1t1(1-3)B2-Fc Δ C1(a) 的 EcoRI 至 SrfI 限制位点上,以便产生质粒 pF1t1D2.F1k1D3.Fc Δ C1(a)。F1t1D2.F1k1D3.Fc Δ C1(a) 嵌合的完整的 DNA 和推测的氨基酸序列如图 21A-21C 所示。

[0191] (b) 表达质粒 pF1t1D2VEGFRD3Fc Δ C1(a) 的构建

[0192] 表达质粒 pMT21.F1t1(1-3)Fc(6519bp) 编码氨苄青霉素抗性和人 F1t1 受体的 Fc 标记形式的 Ig 结构域 1-3。将该质粒用于通过 PCR 生产含有 F1t1 的 Ig 结构域 2 的 DNA 片段。通过标准 RT-PCR 方法用来自细胞系 HEL921.7 的 RNA 生产 F1k1 的 Ig 结构域 3。通过另一轮 PCR 扩增实现将两个 Ig 结构域融合为单一的融合片段。对于 F1t1Ig 结构域 2 来说,其 5' 和 3' 扩增引物如下:

[0193] 5':bsp/F1t1D2(5' -GACTAGCAGTCCGGAGGTAGACCTTTCGTAGAGATG-3')

[0194] 3':F1t1D2. VEGFR3D3. as(TTCCTGGGCAACAGCTGGATATCTATGATTGTATTGGT)

[0195] 5' 扩增引物编码 F1t1 的 Ig 结构域 2 的上游 BspEI 限制位点,由氨基酸序列 GRPFVEM 限定(相当于图 22A-22C 的 27-33 号氨基酸)。3' 扩增引物编码直接与 VEGFR3Ig 结构域 3 的开始部分融合的 F1t1Ig 结构域 2 的末端的反向互补体。融合位点被确定为 F1t1 的 TIID(相当于图 22A-22C 的 123-126 号氨基酸),并且延续到 VEGFR3 的 IQLL(相当于图 22A-22C 的 127-130 号氨基酸)。

[0196] 对于 VEGFR3 的 Ig 结构域 3 来说,用于 RT-PCR 的 5' 和 3' 引物如下:

[0197] 5':R3D3. s(ATCCAGCTGTTGCCAGGAATTCGCTGGAGCTGCTGGTA)

[0198] 3':R3D3. as(ATTTTCATGCACAATGACCTCGGTGCTCTCCCGAAATCG)

[0199] 5' 和 3' 扩增引物能与 VEGFR3 的序列配对。通过标准方法分离该 RT-PCR 反应的 296bp 的扩增产物,并进行第二轮 PCR,以便增加合适的序列来实现 F1t1D2 与 F1k1D3 结构域的融合,以及 F1k1D3 和 Fc 结构域通过 GPG 桥的融合(参见下文)。扩增引物如下:

[0200] 5':F1t1D2. VEGFR3D3. as(TCATAGATATCCAGCTGTTGCCAGGAAGTCGCTGGAG)

[0201] 3':VEGFR3D3/srf. as(GATAATGCCCGGGCCATTTTCATGCACAATGACCTCGGT)

[0202] 5' 扩增引物编码直接与 VEGFR3Ig 结构域 3 的开始部分(5' 末端)融合的 F1t1Ig 结构域 2 的 3' 末端,如上文所述。3' 扩增引物编码 VEGFR3Ig 结构域 3 的 3' 末端,由氨基酸 VIVHEN 限定(相当于图 22A-22C 的 221-226 号氨基酸),其后是连接序列,该序列包括 Srf1 的识别序列,并且编码氨基酸 GPG。该连接序列相当于图 22A-22C 的 227-229 号氨基酸。

[0203] 进行一轮(F1t1Ig 结构域 2)或两轮(F1t4Ig 结构域 3)PCR,以便形成单一的 Ig 结构域,然后在试管中合并该 PCR 产物,并用扩增引物 bsp/F1t1D2 和 VEGFR3D3/srf. as 进行另一轮 PCR,如上文所述,以便产生融合产物。然后用限制酶 BspEI 和 SmaI 消化该 PCR 产物,并将所得到的 625bp 的片段亚克隆到载体 pMT21/F1t1 Δ B2.Fc 的 BspEI 至 SrfI 限制位点上(如上文所述),以便产生质粒 pMT21/F1t1D2. VEGFR3D3.Fc。通过标准序列分析证实 F1t1D2. VEGFR3D3 基因融合插入片段的序列。然后用限制酶 EcoRI 和 SrfI 消化该质粒,并将所得到的 693bp 片段亚克隆到质粒 pF1t1(1-3) Δ B2-Fc Δ C1(a) 的 EcoRI 至 SrfI 位点上,以便产生质粒 pF1t1D2. VEGFR3D3.Fc Δ C1(a)。F1t1D2. VEGFR3D3.Fc Δ C1(a) 嵌合分子的完

整 DNA 和推测的氨基酸序列如图 22A-22C 所示。

[0204] 例 18 :胞外基质结合 (ECM) 结合测定

[0205] 在添加样品之前,用含有谷氨酰胺 (2mM),100 单位青霉素,100 单位链霉素和 10% BCS 加热的 DME 对 ECM 包被的平板 (BectonAickinson 目录号 35-4607) 进行再水合至少 1 小时。然后在室温下用各种浓度的 Flt1D2, Flk1D3, Fc Δ C1(a) 和 Flt1D2, VEGFR3D3, Fc Δ C1(a) 培养平板 1 小时,开始浓度为 10nM,然后用添加 10% BCS 的 PBS 的 2 倍稀释液。然后用添加了 0.1% Triton-X 的 PBS 洗涤平板 3 次,在室温下与碱性磷酸酶缀合的抗人 Fc 抗体 (Promega, 在含有 10% BCS 的 PBS 中的 1 : 4000 的稀释液) 培养 1 小时。然后用添加了 0.1% Triton-X 的 PBS 洗涤平板 4 次,并添加碱性磷酸酶缓冲液 /pNPP (Sigma) 进行显色。然后在 $\lambda = 405-570\text{nm}$ 下对平板进行读数。该实验的结果如图 23 所示,并且证实了 Flt1D2, Flk1D3, Fc Δ C1(a) 和 Flt1D2, VEGFR3D3, Fc Δ C1(a) 蛋白对 ECM 的结合力明显低于 Flt1(1-3)-Fc 蛋白的结合力。

[0206] 例 19 :pFlt1D2, Flk1D3, Fc Δ C1(a) 在 CHO-K1 (E1A) 细胞中的瞬时表达

[0207] 在含有 100 微克 / 毫升氨苄青霉素 TB 营养液中过夜培养含有在例 17(a) 中所述的 pFlt1D2, Flk1D3, Fc Δ C1(a) 的大肠杆菌 DH10B 细胞的大规模 (2 升) 培养物。次日,用 QIAgen Endofree Megaprep 试剂盒按照生产商的方法提取质粒 DNA。用 UV 分光光度计和荧光光度计通过标准技术测定纯化质粒 DNA 的浓度。通过用限制酶 EcoRI 和 NotI 和 AseI 对等份试样进行标准限制酶消化证实所述质粒 DNA。在 1% 琼脂糖凝胶上分析时,所有限制酶消化片段相当于其预测的大小。

[0208] 用 CHO-K1/E1A 细胞接种 40 个 15 厘米的培养皿,其密度为 4×10^6 细胞 / 皿。铺平板的培养基是补充了 10% Hyclone 胎牛血清 (FBS)、100 单位青霉素 / 100 单位链霉素和谷氨酰胺 (2mM) 的 Gibco Ham's F-12。第二天,用 6 微克 pFlt1D2, Flk1D3, Fc Δ C1(a) 质粒 DNA 在 12 毫升的体积中用 Gibco Optimem 和 Gibco 脂转染胺进行转染,按照生产商的方案进行。在向细胞中添加转染混合物 4 小时之后,添加 10 毫升 / 皿补充了 10% FBS 的 Optimem。在 37°C 下在 5% 二氧化碳的培养箱中培养平皿过夜。次日,从每一个培养皿上除去培养基,并添加 25 毫升表达培养基 (补充了谷氨酰胺 (2mM) 和 1mM 丁酸钠的 Gibco CHO-S-SF II)。在 37°C 下培养所述培养皿 3 天。在培养 3 天之后,从每一个培养皿中吸出培养基,并以 400rpm 的速度在挂篮转子上离心,使细胞沉淀。将上清液浸入无菌的 1 升瓶中,并按下文所述方法纯化表达的蛋白。

[0209] 例 20 :pVEGFR1R2-Fc Δ C1(a) 表达载体的构建

[0210] 通过以下方法构建 pVEGFR1R2-Fc Δ C1(a) 表达质粒 :插入编码位于图 21A-21C 的 Flt1d2-Flk1d3-Fc Δ C1(a) 的 26 和 27 号氨基酸之间 (GG) 的氨基酸 STD (相当于图 24A 和图 24C 的 27-29 号氨基酸) 的 DNA,并除去编码相当于图的 229-231 号氨基酸的氨基酸 GPG 的 DNA。STD 氨基酸序列是 Flt1 受体所固有的,并且将它重新添加上去以便降低异源 N- 末端加工的可能性。除去 GPG (连接序列),以便 Flt1 和 Flk1Ig 结构域能彼此直接融合。pVEGFR1R2-Fc Δ C1(a) 嵌合分子的完整 DNA 和推测的氨基酸序列如图 24A-24C 所示。

[0211] 例 21 :用于生产修饰过的 Flt1 受体的培养方法

[0212] (a) 用于生产 Flt1D2, Flk1D3, Fc Δ C1(a) 的细胞培养方法

[0213] 用例 1 中所披露的表达质粒 p Flt1D2, Flk1D3, Fc Δ C1(a) 生产 Flt1D2, Flk1D3,

Fc Δ C1 (a) 蛋白的方法包括对能组成型地表达该蛋白产物的重组中国仓鼠卵 (CHO K1/E1A) 细胞的悬浮培养。在生物反应器中生长该细胞, 并且通过亲和和大小排阻层析分离和纯化该蛋白产物。在下面将更详细地描述该方法。

[0214] 细胞扩增

[0215] 通过将细胞传代到 8 个 T-225 平方厘米烧瓶里的培养基中 (GMEM+10% 血清, GIBCO), 并在 37°C 和 5% 二氧化碳下培养, 扩增含有表达 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 的细胞系的两个铺满的 T-225 平方厘米烧瓶。当所述烧瓶达到铺满时 (大约 3-4 天), 用胰蛋白酶分离细胞。添加所述培养基, 以便使细胞不再接触胰蛋白酶。对细胞进行离心, 并重新悬浮在新的培养基中, 然后转移到 850 平方厘米的滚瓶中, 并在 37°C 和 5% 二氧化碳下培养到铺满。

[0216] 在生物反应器中悬浮培养

[0217] 对生长在滚瓶中的细胞进行胰蛋白酶化, 使其从表面上分离, 并用悬浮培养基洗涤。在无菌条件下将细胞转移到 5 升的生物反应器 (NewBrunswick Celligen Plus), 在这里让细胞在 3.5 升悬浮培养基中生长。悬浮培养基是 IS-CHO (Irvine Scientific) 的不含谷氨酰胺的低葡萄糖改进形式, 其中添加了 5% 胎牛血清 (Hyclone), GS 添加剂 (生命技术公司) 和 25 微摩尔甲硫氨酸 sulfoximine (Sigma)。通过向输入的气体添加二氧化碳或者通过向生物反应器中添加碳酸钠的液体溶液将 pH 控制在 7.2。通过向输入气体中添加氧气或氮气将溶解氧气的水平保持在 30% 的饱和度, 并将温度控制在 37°C。当细胞密度达到 4×10^6 细胞 / 毫升时, 将细胞转移到装有相同培养基的 40 升的生物反应器中, 并设定点, 以便控制该生物反应器。将温度设定值降低到 34°C, 以便延缓细胞生长, 并提高蛋白表达的相对速度。

[0218] (b) 用于生产 F1t1D2. VEGFR3D3. Fc Δ C1 (a) 的细胞培养方法

[0219] 用与上述生产 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 相同的方法生产 F1t1D2. VEGFR3D3. Fc Δ C1 (a)。

[0220] 例 22: 收获并纯化修饰过的 F1t1 受体

[0221] (a) 收获并纯化 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a)

[0222] 在无菌条件下从生物反应器中收获蛋白产物, 同时用 Millipore Prostack 切向流过滤组件和低剪切机械泵 (Fristam) 保留细胞。将新的培养基添加到所述生物反应器中, 以便取代在收获过滤期间除去的培养基。然后将大约 40 升收获的滤液加样到装有蛋白 A Sepharose 树脂 (Amersham Pharmacia) 的 400 毫升柱上)。在对树脂加样之后, 用含有 10mM 磷酸钠、500mM 氯化钠, pH7.2 的缓冲液洗涤, 以便除去任何未结合的污染蛋白。用 pH3.0 的柠檬酸缓冲液洗脱 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a)。通过添加 Tris 碱中和洗脱的蛋白, 并在 -20°C 下冷藏。

[0223] 将来自上述蛋白 A 步骤的若干批冷冻的 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 蛋白解冻, 合并并用 Millipore 30kD 标称分子量截断 (NMWCO) 切向流过滤膜浓缩。将蛋白转移到一个搅拌细胞浓缩器 (Millipore) 中, 并用 30kD NMWCO 进一步浓缩至 30 毫克 / 毫升。将浓缩的蛋白加样到装有 Superdem200 树脂 (Amersham Pharmacia) 的大小排阻柱中, 该柱用添加了 5% 甘油的磷酸缓冲的盐溶液平衡过。让相同的缓冲液通过该柱。收集相当于 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 二聚体的级份, 通过 0.22 微米的滤膜进行消毒过滤, 分装并冷冻。

[0224] (b) 收获并纯化 F1t1D2. VEGFR3D3. Fc Δ C1 (a)

[0225] 用与上述生产 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 相同的方法收获并纯化 F1t1D2. VEGFR3D3. Fc Δ C1 (a)。

[0226] 例 23 :瞬时表达的 VEGFR2 磷酸化测定

[0227] 在无血清 DME 高葡萄糖介质中将传代 4-6 代的原代人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 饥饿 2 小时。制备含有 40 纳克 / 毫升 (1nM) 人 VEGF165 的样品,它是 VEGF 受体 F1t1、F1k1 和 F1t4 (VEGFR3) 的配体,并在室温下与各种浓度的修饰过的 F1t1 受体 F1t1 (1-3)-Fc、F1t1 (1-3)-Fc (A40)、F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 和 F1t1D2. VEGFR3D3. Fc Δ C1 (a) 一起在含有 0.1% BSA 的无血清高葡萄糖培养基中预培养 1 小时。用上面所制备的 +/-VEGF165 样品刺激细胞 5 分钟,然后用完全裂解缓冲液裂解完整细胞。用抗 VEGFR2 受体的 C-末端的抗体对细胞裂解液进行免疫沉淀。将免疫沉淀的裂解物加样到 4-12% SDS-PAGE Novex 凝胶上,然后用标准转移方法转移到 PVDF 膜上。磷酸化 VEGFR2 的检测是通过用被称为 4G10 (UBI) 的抗磷酸酪氨酸 mAb 进行免疫吸印完成的,并用 ECL- 试剂 (Vmersham) 显影。图 25A-25C 和 26A-26B 表示该实验的结果。图 25A-25C 表示通过对用 VEGF165 配体刺激进行的酪氨酸磷酸化进行的 VEGFR2 (F1k1) 的 Western 印迹进行的检测,表明细胞表面受体被以不同的程度磷酸化,其磷酸化程度取决于在与 VEGF 预培养期间所使用的修饰过的 F1t1 受体。如图 25A 所示,在超出 1.5M 的 F1t1 受体 F1t1 (1-3)-Fc、F1t1 (1-3)-Fc (A40) 或瞬时 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a) 的浓度下,与对照培养基刺激相比,这三种修饰过的 F1t1 受体能完全抑制受体刺激。相反,在这种超出的摩尔量下,瞬时 F1t1D2. VEGFR3D3. Fc Δ C1 (a) 与 VEGF 阳性对照刺激相比没有表现出明显的抑制作用。从图 25B 中可以看到类似结果,其中,修饰过的 F1t 受体的摩尔量超过 VEGF165 配体 3 倍。在图 25C 中,修饰过的 F1t1 受体的摩尔量超过 VEGF165 配体 6 倍,现在可以看出瞬时 F1t1D2. VEGFR3D3. Fc Δ C1 (a) 能够部分抑制由 VEGF165- 诱导的对细胞表面受体的刺激。

[0228] 在图 26A-26B 中,通过 Western 印迹检测 VEGF165 配体对酪氨酸磷酸化 VEGFR2 (F1k1) 的刺激发现,具有与超过 1 和 2 倍摩尔 (图 26A) 或 3 和 4 倍摩尔 (图 26B) 瞬时 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a)、稳定的 F1t1D2. F1k1D3. Fc Δ C1 (a)、或瞬时 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 一起预培养过的 VEGF165 的样品刺激不能将细胞表面受体磷酸化。在所实验过的所有修饰过的 F1t1 受体的浓度下,在预培养期间都有 VEGF165 配体的完全结合,导致与对照培养基刺激相比,未结合的 VEGF165 对细胞表面受体没有任何可检测的刺激作用。

[0229] 例 24 :细胞增殖生物测定

[0230] 测试的细胞群体是 MG87 细胞,该细胞业已用一种表达质粒稳定转染过,该质粒含有编码与 TrkB 胞内激酶结构域融合的 VEGFR2 (F1k1) 胞外结构域的 DNA 插入片段。使用 TrkB 胞外激酶结构域而不使用天然 VEGFR2 (F1k1) 胞外激酶结构域的原因是,VEGFR2 (F1k1) 的胞内激酶结构域在所述细胞中用 VEGF165 刺激时不能导致强的增殖反应。众所周知,MG87 细胞含有完整长度的 TrkB 受体,在用 BDNF 刺激时能产生强的增殖反应,因此工程产生 TrkB 胞内激酶结构域,以便取代 VEGFR2 (F1k1) 的胞内激酶结构域,从而利用该增殖反应能力。

[0231] 将 5×10^3 细胞 / 孔铺平板到 96 孔平板上,并在 37°C 下让其沉降 2 小时。将以下修

饰过的F1t受体F1t1(1-3)-Fc、F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)和F1t1D2、VEGFR3D3、Fc Δ C1(a)和作为负对照的被称为Tie2-Fc的一种不相关的受体从40nM滴定到20pM,并在37°C下在细胞上培养1小时。然后以1.56nM的浓度将存在于确定培养基中的人重组VEGF165添加到所有孔中。在37°C下培养所述平板72小时,然后添加MTS(Owen's试剂,Promega),并将平板再培养4小时。最后,在分光光度计上在450/570nm波长下对该平板读数。该实验的结果示于图27中。对照受体Tie2-Fc在任何浓度下都不能抑制VEGF165诱导的细胞增殖,而F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)能以0.8nM的1/2最大剂量抑制1.6nM的VEGF165。在该测定中,F1t1(1-3)-Fc和F1t1D2、VEGFR3D3、Fc Δ C1(a)对VEGF165的抑制效果较差,1/2最大剂量为大约2nM。VEGF165本身能产生1.2吸收单位的读数,而背景为0.38吸收单位。

[0232] 例25:修饰过的F1t受体对VEGF165的结合化学剂量学

[0233] (a)BIAcore分析

[0234] 通过测定VEGF结合F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)或VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)表面的饱和水平或测定完全抑制F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)或VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)结合VEGF BIAcore芯片表面所需要的VEGF165的浓度,测定F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)和VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)与人VEGF165相互作用的化学剂量。

[0235] 修饰过的F1t受体F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)和VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)被首先用胺偶联化学方法固定在BIAcore芯片(BIACORE)上的抗Fc专一性抗体所固定。用空白抗体表面作负对照,以10微升/分钟的速度用1小时将VEGF165以1nM、10nM和50nM注射在F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)和VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)的表面。记录实时结合信号,并在每一次注射结束时达到饱和结合。结合化学计量是以结合的VEGF165与固定的F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)或VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)的摩尔比计算的,使用相当于1ng/ml的1000RU的换算系数。该结果表明,每一个F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)或VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)的分子具有结合一个VEGF165二聚体分子的化学计量(图28)。

[0236] 在溶液中,将浓度为1nM的F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)或VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)(估计比F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)或VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)/VEGF165相互作用的KD高1000倍)与各种浓度的VEGF165混合。在培养1小时之后,以与胺结合的VEGF165表面结合信号形式测定溶液中游离的F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)的浓度。利用校正曲线将F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)BIAcore结合信号转换成它的摩尔浓度。数据表明,向F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)溶液中添加1nMVEGF165能完全抑制F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)与VEGF165表面结合。这一结果表明了每一个F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)分子具有一个VEGF165分子的结合化学计量(图29和30)。当将F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)的浓度作为所添加VEGF165的函数进行作图时,直线部分F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)的斜率为-1.06,而VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)为-1.07。所述斜率的大小非常接近负数,这表明有一个VEGF165分子结合在F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)或VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)的一个分子上。

[0237] (b)大小排阻层析

[0238] 将F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a)与超出3倍摩尔的VEGF165混合,并用Pharmacia Superose 6大小排阻层析柱纯化受体-配体复合体。然后在含有6摩尔盐酸胍缓冲液中培养所述受体-配体复合体,以便将其解离成成分蛋白。用Pharmacia Superose 6大小排阻层析柱从VEGF165上分离F1t1D2、F1k1D3、Fc Δ C1(a),用6摩尔盐酸胍过柱。为了测定复

合体化学计量,制备若干 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1(a) 和 VEGF165 的注射液,并以注射蛋白浓度的函数形式将峰的高度或峰的级份强度作图。在与用于分离 /VEGF 复合体的成分的不同条件下进行校正。根据该校正曲线对 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1(a)/VEGF165 复合体组成进行定量。该实验的结果如图 28 所示,图中示出了在该复合体中 VEGF165 与 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1(a) 的比例为 1 : 1。

[0239] 例 26 :通过大小排阻层析测定 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1(a)/VEGF165 复合体的结合计量

[0240] F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1(a)/VEGF165 复合体的制备

[0241] 将 VEGF165(浓度 = 3.61 毫克 / 毫升)与 CHO 细胞瞬时表达的 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1(a)(浓度 = 0.9 毫克 / 毫升)以 3 : 1 的摩尔比 (F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1(a) : VEGF165) 混合,并在 4℃ 下培养过夜。

[0242] (a) 在天然条件下进行大小排阻层析 (SEC)

[0243] 为了从多余的未结合的 VEGF165 中分离复合体,将 50 微升复合体加样到用 PBS 缓冲液平衡的 Pharmacia Superose12PC3, 2/30 柱上。在室温下用相同缓冲液以 40 微升 / 分钟的流速洗脱该样品。该 SEC 的结果如图 31 所示。1 号峰表示复合体,2 号峰表示未结合的 VEGF165。合并 1.1 和 1.2 毫升之间洗脱的级份并以 4.5 摩尔的最终浓度添加盐酸胍,以便使该复合体解离。

[0244] (b) 在解离条件下进行大小排阻层析 (SEC)

[0245] 为了分离受体 - 配体复合体的成分,并测定其摩尔比,将上述 50 微升解离的复合体加样到用 6 摩尔盐酸胍平衡的 Superose12PC3, 2/30 柱上,并在室温下用相同的溶液以 40 微升 / 分钟的流速洗脱。该 SEC 的结果如图 32 所示。1 号峰表示 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1(a), 而 2 号峰表示 VEGF165。

[0246] (c) 计算 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1(a) : VEGF165 复合体的化学计量

[0247] 根据所述成分的峰面积或峰高测定受体 - 配体复合体的化学计量。分别相当于峰高或峰面积的 VEGF165 和 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1(a) 的浓度是从 VEGF165 和 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1(a) 标准曲线获得的。为了获得标准曲线,将每一种成分的四种不同浓度 (0.04-0.3 毫克 / 毫升) 加样到用 6 摩尔盐酸胍平衡的 Superose12PC3, 2/30 柱上,并在室温下用相同的溶液以 40 微升 / 分钟的流速洗脱。标准曲线是通过将峰面积或峰高对蛋白浓度进行作图获得的。根据成分的峰面积测定的 VEGF165 : F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1(a) 的摩尔比为 1.16。根据成分的峰高测定的 VEGF165 : F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1(a) 的摩尔比为 1.10。

[0248] 例 27 :通过具有联机光学散射的大小排阻层析测定 F1t1D2F1k1D3, Fc Δ C1(a)/VEGF165 复合体的化学计量

[0249] 复合体制备

[0250] 将 VEGF165 与 CHO 细胞瞬时表达的 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1(a) 蛋白以 3 : 1 的摩尔比混合 (F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1(a) : VEGF165),并在 4℃ 下培养过夜。

[0251] (a) 具有联机光学散射的大小排阻层析 (SEC)

[0252] 用装配有 MiniDawn 联机光学散射探测仪 (Wyatt 技术, SantaBarbara, California) 和折射指数 (RI) 探测仪 (Shimadzu, Kyoto, 日本) 的大小排阻层析柱测

定受体-配体复合体的分子量。将样品加样到用 PBS 平衡过的 Superose12HR10/30 柱 (Pharmacia) 上,并在室温下用相同的缓冲液以 0.5 毫升/分钟的流速洗脱。如图 33 所示,洗脱曲线上出现了两个峰。1 号峰表示受体-配体复合体,而 2 号峰表示未结合 VEGF165。根据 LS 和 RI 信号计算分子量。用相同方法测定受体-配体复合体的每一种成分的分子量。该测定的结果如下:F1t1D2.F1k1D3.Fc Δ C1(a)/VEGF165 复合体在峰值位置上的分子量为 157300(图 33),VEGF165 在峰值位置上的分子量为 44390(图 34),R1R2 在峰值位置上的分子量为 113300(图 35)。

[0253] 以上结果表明 F1t1D2.F1k1D3.Fc Δ C1(a)/VEGF 复合物的化学计量为 1:1,相当于 F1t1D2.F1k1D3.Fc Δ C1(a) 和 VEGF165 的分子量的总和。重要的是,该方法结论性地证实了 F1t1D2F1k1D3.Fc Δ C1(a)/VEGF165 复合体确实是由一个 VEGF165 配体分子和一个 F1t1D2F1k1D3.Fc Δ C1(a) 分子组成。

[0254] 例 28:F1t1D2.F1k1D3.Fc Δ C1(a) 的肽作图

[0255] 通过肽作图方法测定 F1t1D2.F1k1D3.Fc Δ C1(a) 中的二硫键结构和糖基化位点。在该方法中,先用胰蛋白酶裂解蛋白。除了利用 N-末端测序技术之外,通过与质谱仪连接的 HPLC 分析并鉴定胰化片段。利用胰化消化产物的还原来帮助鉴定含有二硫键的片段。通过用 PNGaseF (Glyko, Novato, CA) 处理胰化消化物来鉴定具有 N-连接的糖基化位点的片段,其结果归纳在附图 36 中。

[0256] 在 F1t1D2.F1k1D3.Fc Δ C1(a) 中共有 10 个半胱氨酸;其中的 6 个属于 Fc 区。业已证实 Cys27 通过二硫键与 Cys76 连接。业已证实 Cys201 通过二硫键与 Cys182 连接。Fc 区中的头两个半胱氨酸 (Cys211 和 Cys214) 与另一个 Fc 链上的相同的两个半胱氨酸形成分子间二硫键。不过,由于这两个半胱氨酸不能通过酶促方法彼此分开,不能够确定二硫键连接是出现在相同的半胱氨酸之间(例如 Cys211 与 Cys211) 或者是在出现在 Cys211 和 Cys214 之间。业已证实 Cys216 通过二硫键与 Cys306 连接,Cys352 通过二硫键与 Cys410 连接。

[0257] 在 F1t1D2.F1k1D3.Fc Δ C1(a) 中有 5 个可能的 N-连接的糖基化位点。发现所有这 5 个糖基化位点都以不同的程度糖基化。完全的糖基化出现在 Asn33(氨基酸序列 NIT)、Asn193(氨基酸序列 NST)、和 Asn282(氨基酸序列 NST)。另外,在 Asn65 和 Asn120 上出现部分糖基化。在图 36 中通过加下划线的形式突出糖基化位点。

[0258] 例 29:修饰过的 F1t 受体的药物动力学分子

[0259] (a)F1t1(1-3)Fc(A40)、F1t1D2.F1k1D3.Fc Δ C1(a) 和 VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) 的药物动力学分析

[0260] 用 4 毫克/千克 F1t1(1-3)Fc(A40)、CHO 瞬时表达的 F1t1D2.F1k1D3.Fc Δ C1(a)、CHO 稳定表达的 F1t1D2.F1k1D3.Fc Δ C1(a)、和 CHO 瞬时表达的 F1t1D2.VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) 皮下注射 Balb/c 小鼠 (25-30 克)。在注射之后 1、2、4、6、24 小时,2 天、3 天和 6 天之后从小鼠尾部放血。在为了检测 F1t1(1-3)Fc(A40)、F1t1D2.F1k1D3.Fc Δ C1(a) 或 VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) 而设计的 ELISA 中测定血清。ELISA 包括用 VEGF165 对 ELISA 平板进行包被,结合检测的 F1t1(1-3)Fc(A40)、F1t1D2.F1k1D3.Fc Δ C1(a) 或 VEGFR1R2-Fc Δ C1(a),并用与辣根过氧化物酶连接的抗 Fc 的抗体报导。该实验的结果如图 37 所示。F1t1(1-3)Fc(A40) 的 T_{max} 出现在 6 小时,而瞬时和稳定 F1t1D2.F1k1D3.

Fc Δ C1 (a) 以及瞬时 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 的 Tmax 出现在 24 小时。F1t1(1-3)Fc (A40) 的 Cmax 为 8 微克 / 毫升。瞬时 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1 (a) 和 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 的 Cmax 为 18 微克 / 毫升, 而稳定的 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 的 Cmax 为 30 微克 / 毫升。

[0261] (b) F1t1(1-3)Fc (A40)、F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1 (a) 和 F1t1D2, VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 的药物动力学分析

[0262] 用 4 毫克 / 千克 F1t1(1-3)Fc (A40)、CHO 瞬时表达的 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1 (a)、和 CHO 瞬时表达的 VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 皮下注射 bALB/c 小鼠 (25-30 克)。在注射 1、2、5、6、7、8、12、15 和 20 天之后从小鼠尾部放血。在为了检测 F1t1(1-3)Fc (A40)、F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1 (a) 或 F1t1D2, VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 而设计的 ELISA 中测定血清。ELISA 包括用 165 对 ELISA 平板进行包被, 结合 F1t1(1-3)Fc (A40)、F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1 (a) 或 F1t1D2, VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a), 并用与辣根过氧化物酶连接的抗 Fc 抗体报导。5 天之后, 在血清中不再能够检测到 F1t1(1-3)Fc (A40), 而 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1 (a) 或 F1t1D2, VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) 在 15 天或更长时间内都可检测到。该实验的结果如图 38 所示。

[0263] 例 30 : 评估 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1 (a) 在体内抑制肿瘤生长的能力

[0264] 为了评估 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1 (a) 在体内抑制肿瘤生长的能力, 采用了一种模型, 其中, 将肿瘤细胞悬浮液皮下移植雄性严重合并性免疫缺陷 (SCID) 小鼠的右侧。在该测定使用两种细胞系, 人 HT-1080 显微肌瘤细胞系 (ATCC 保藏号 CCL-121) 和大鼠 C6 胶质细胞系 (ATCC 保藏号 CCL-107), 这两个细胞系各自表现出明显不同的形态学和生长特征。在肿瘤移植的当天使用第一种剂量的 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1 (a) (剂量为 25 毫克 / 千克或如图 39 和 40 所示)。然后每隔 1 天 (EOD) 或每周 2 次 (2X/wk) 给动物皮下注射 F1t1(1-3)Fc (A40)、F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1 (a) 或媒介物, 持续 2 周时间。2 周之后, 用固定剂灌注动物, 取出肿瘤并封闭样品。通过测定可见的皮下肿瘤的长度和宽度确定肿瘤体积。F1t1(1-3)Fc (A40) 和 F1t1D2, F1k1D3, Fc Δ C1 (a) 能明显减弱由 HT-1080 和 C6 细胞所形成的肿瘤的生长。上述实验的结果如图 39 和 40 所示。

[0265] 例 31 : VEGF165 和修饰过的 F1t 受体在雌性生殖系统中的作用

[0266] 业已对在生殖周期过程中发生子宫和卵巢中的血管再造的立体形式进行了充分的鉴定, 使得这些组织特别适用于研究调控血管形成, 血管再造和血管退化的机制。实际上, 在生殖组织中进行的原位杂交研究首次提供了 VEGF 在成熟的啮齿类动物和人和非人灵长类动物中起着生理学血管形成的介体作用的证据 (Phillips 等, 1990 ; Ravindranath 等, 1992 ; Shweiki 等, 1993 ; Kamat 等, 1995)。周期性地血管形成和血管再造是正常卵巢和子宫的突出特征。将异常血管生长和 / 或血管病变作为影响所述器官的很多病理学症状的特征并不奇怪。另外, 上述病理学血管异常被认为是由于一种或多种血管形成或抗血管形成因子, 主要是 VEGF 的异常调控的表达所导致或引起的。

[0267] 例如, 异常血管形成是多发性囊性卵巢病变、子宫内膜异位和子宫内膜癌的特征。在每一种情况下, VEGF 在受影响的组织中都超量表达 (Kamat 等, 1995 ; Shifren 等, 1996 ; Guidi 等, 1996 ; Donnez 等, 1998)。VEGF 的超量表达还被认为在卵巢过度刺激综合症中系统性血管通透性过高方面起着致病作用 (McClure 等, 1994 ; Levin 等, 1998) 并在子痫前期中起着致病作用 (Baker 等, 1995 ; Sharkey 等, 1996)。另外, VEGF 还被认为决定产生与卵巢癌和其他肿瘤相关的腹水的渗透性因子 (Senger 等, 1983 ; Boockock 等, 1995)。能有效中

和 VEGF 的生物学作用的制剂可以被合理地认为具有对上述相关症状的治疗作用。

[0268] 血管形成和血管再造还是胚泡移植和胎盘发育的特征 (Findlay, 1986)。VEGF 在母体退膜和胚胎滋养层中能高水平表达, 其中, 它被认为首先在外周移植期间刺激子宫脉管系统膨大和通透性增强, 然后介导母体和胎盘脉管系统的胚胎成分形成 (Shweiki 等, 1993; Cullinan-Bove 和 K00S, 1993; Chakraborty 等, 1995; Das 等, 1997)。VEGF 还是黄体血管形成和相关的孕酮分泌所需要的, 它是子宫准备受孕所必需的 (Ferrara 等, 1998)。因此, 能抑制 VEGF 的生物学作用的试剂可以被证明能用作避孕剂 (抑制受孕) 或在妊娠的早期阶段作为堕胎药。后一种用途特别适用于作为终止异常怀孕的非手术介入方法。

[0269] 尽管 VEGF 受体的表达主要局限于正常生殖组织的血管内皮细胞中, Flt1 还能在人和动物的胎盘滋养层中表达 (Clark 等, 1996; He 等, 1999), 其中, 它被认为在滋养层入侵中起作用。有趣的是, Flt1 和 KDR (Flk1) 是由绒膜细胞系 BeWo 表达的 (Charnock-Jones 等, 1994), 而已经证实 VEGF 能在这些细胞中促进 DNA 合成和 MAP 激酶的酪氨酸磷酸化。另外, 原发性和转移性卵巢癌不仅能表达高水平的 VEGF, 而且 - 除了血管内皮细胞之外 - 肿瘤细胞本身也能表达 KDR 和 / 或 Flt1 (Boocock 等, 1995)。以上发现表明, VEGF 不仅在肿瘤血管系统的形成和保持中起着关键作用, 而且至少在来自生殖系统的某些肿瘤中 VEGF 可以增强自分泌作用, 直接支持肿瘤细胞的存活和繁殖。因此, 能够抑制 VEGF 作用的试剂特别适用于治疗生殖来源的肿瘤。

[0270] 方法和结果

[0271] (a) VEGF 诱导的子宫通透性过高

[0272] 皮下注射 (5IU) 怀孕母体血清促性腺激素 (PMSG), 诱导青春期前的雌性大鼠排卵。这会导致雌激素在 2 天之后升高, 从而进一步导致在子宫中诱导 VEGF。据报导, 这种诱导会导致 6 小时之后子宫通透性过高和子宫湿重量增加, 因此有可能通过修饰过的 Flt 受体 Flt1(1-3)Fc(A40)、Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) 和 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1(a) 阻断。在该活体模型中, 大鼠子宫的正常重量大约为 50 毫克, 并且可以通过 PMSG 将其诱导至 300-350 毫克。组织解剖发现, 这些重量全都是水的重量。在注射 PMSG 1 小时之后注射 25 毫克 / 千克 Flt1(1-3)Fc(A40)、Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) 和 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1(a), 可致子宫湿重量增加大约 50% 的抑制。提高修饰过的 FTL 受体的剂量不会进一步降低湿重量的增加, 这表明该模型存在一种不取决于 VEGF 的因子。该实验的结果如图 41 所示。

[0273] (a) 用孕酮作为输出结果评估黄体血管生成

[0274] 皮下注射 (5IU) 怀孕母体血清促性腺激素 (PMSG), 诱导青春期前的雌性大鼠排卵。这会导致在 4 天之后形成含有密集的血管网络的有完整功能的黄体, 这样可以将孕酮分泌到血液中, 以便使子宫作好受孕的准备。黄体中血管形成的诱导需要 VEGF; 因此, 抑制 VEGF 可以导致新血管的缺乏, 并因此导致分泌到血液中的孕酮的缺乏。在该活体模型中, 孕酮的正常水平大约为 5 纳克 / 毫升, 在 PMSG 诱导之后可以达到 25-40 纳克 / 毫升的水平。在注射 PMSG 1 小时之后皮下注射 25 毫克 / 千克或 5 毫克 / 千克的 Flt1(1-3)Fc(A40) 或 Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a), 会导致在第四天对孕酮诱导的完全抑制。该实验的结果如图 42A-42B 所示。

[0275] 例 33 : Flt1(1-3)Fc(A40) 和聚乙二醇化的 Flt1(1-3)Fc 的药物动力学分析

[0276] 用 10kD 或 20kD PEG 对 Flt1(1-3)-Fc 进行聚乙二醇化, 并在 Balb/c 小鼠中测试

其药物动力学特征。发现这两种聚乙二醇化形式的 Flt1(1-3)-Fc 都具有优于 Flt1(1-3)Fc(A40) 的 PK 曲线,聚乙二醇化的分子的 T_{max} 出现在 24 小时,而 Flt1(1-3)Fc(A40) 出现在 6 小时。

[0277] 例 34 :通过 VEGF165 ELISA 测定修饰过的 Flt1 受体变体的亲和力

[0278] 在室温下将 10pM 的 VEGF165 与 160-0.1pM 的修饰过的 Flt1 受体变体一起培养过夜。用于该实验中的修饰过的 Flt1 受体变体是 Flt1(1-3)-Fc、Flt1(1-3)Fc(A40)、瞬时表达的 Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1(a)、瞬时表达的 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1(a)、Flt1(1-3_{NAS})-Fc、Flt1(1-3_{R→C})-Fc 和 Tie2-Fc。Flt1(1-3_{NAS})-Fc 是 Flt1(1-3)-Fc 的修饰形式,其中,强碱性氨基酸序列 KNKRASVRRR 被 NASVNGSR 所取代,导致两个新的糖基化位点的插入和 5 个正电荷的净减少,这样做的目的是为了降低该序列对 PK 的不利影响。Flt1(1-3_{R→C})-Fc 是一种修饰形式,其中,相同碱性氨基酸序列中的单一的精氨酸 (R) 残基被换成半胱氨酸 (C) (KNKRASVRRR → KNKCASVRRR),以便在该残基上可以进行聚乙二醇化,这样就可以使得该碱性区不对 PK 产生不利影响。在培养之后,将该溶液转移到含有 VEGF165 的捕获抗体的平板上 (R&D)。然后用一种抗体测定游离 VEGF165 的量,以便报导游离的 VEGF165。结果表明,对 VEGF165 具有最高亲和力的修饰过的 Flt1 受体变体 (根据游离 VEGF165 的最低量确定) 是 Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a),其次是 Flt1(1-3)-Fc 和 Flt1(1-3)-Fc(A40),随后是 Flt1(1-3_{R→C}) 和 Flt1(1-3_{NAS})-Fc 以及 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1(a)。Tie2Fc 对 VEGF165 没有亲和力。

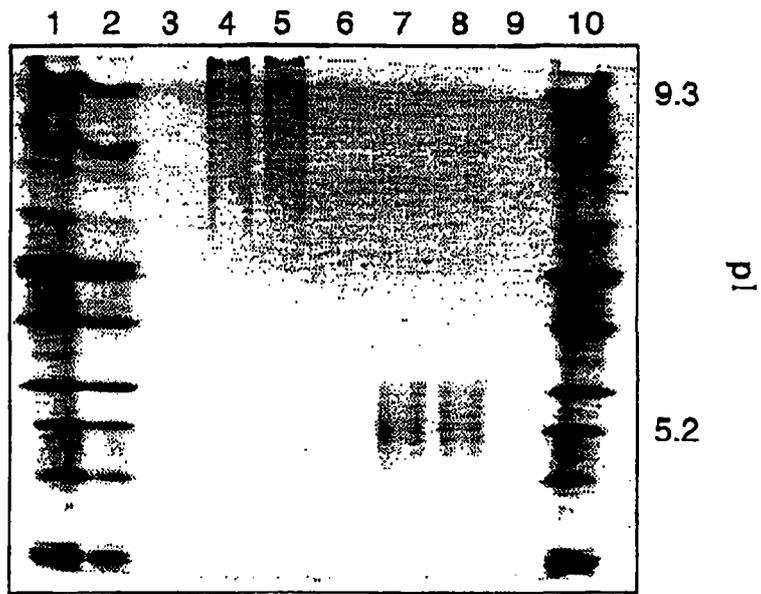


图 1

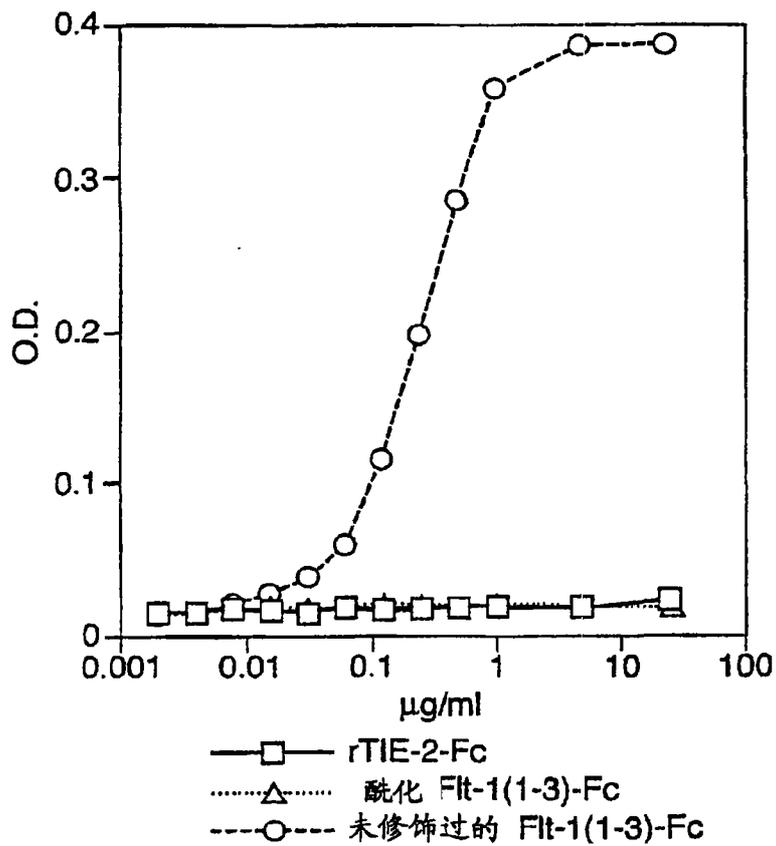


图 2

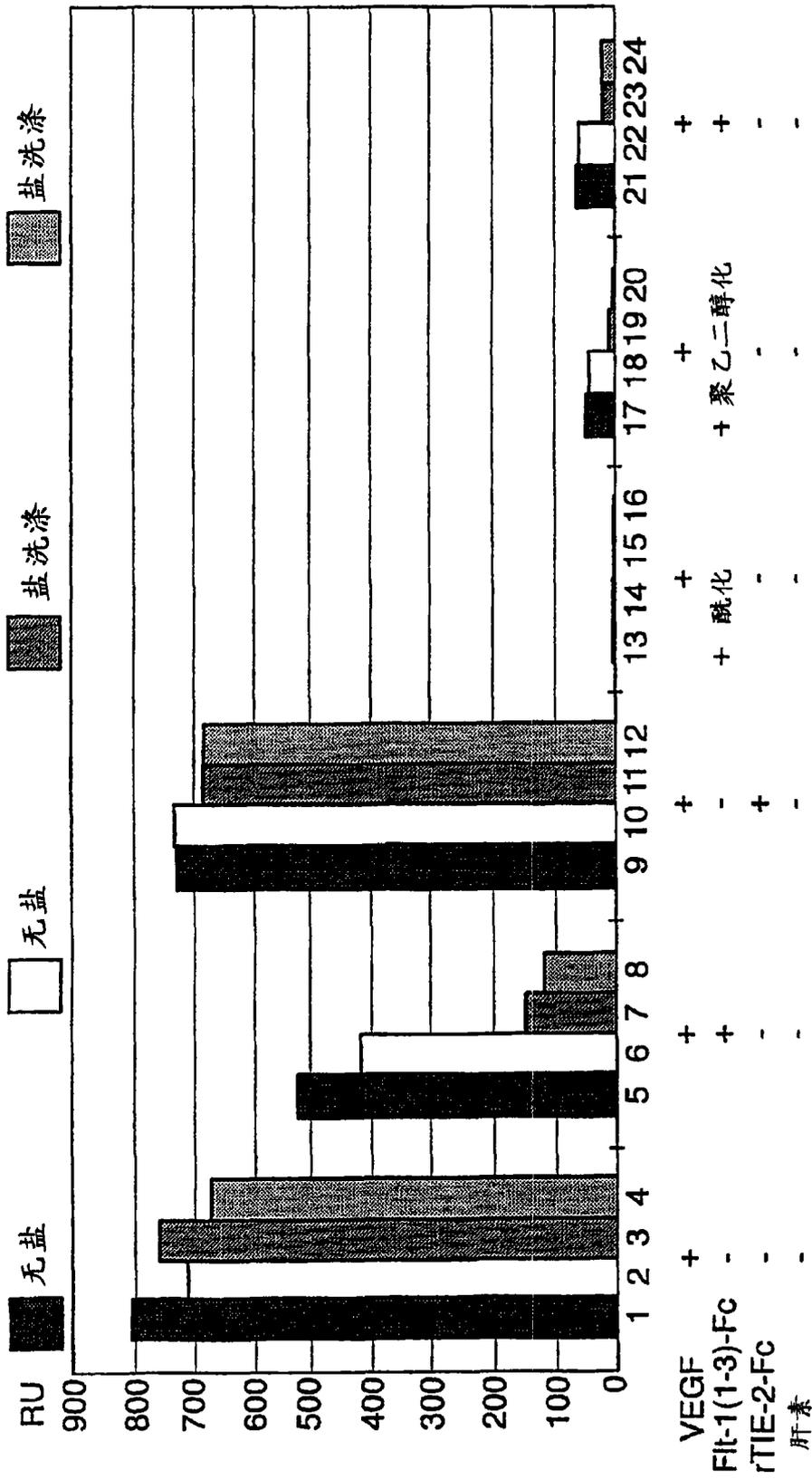


图 3

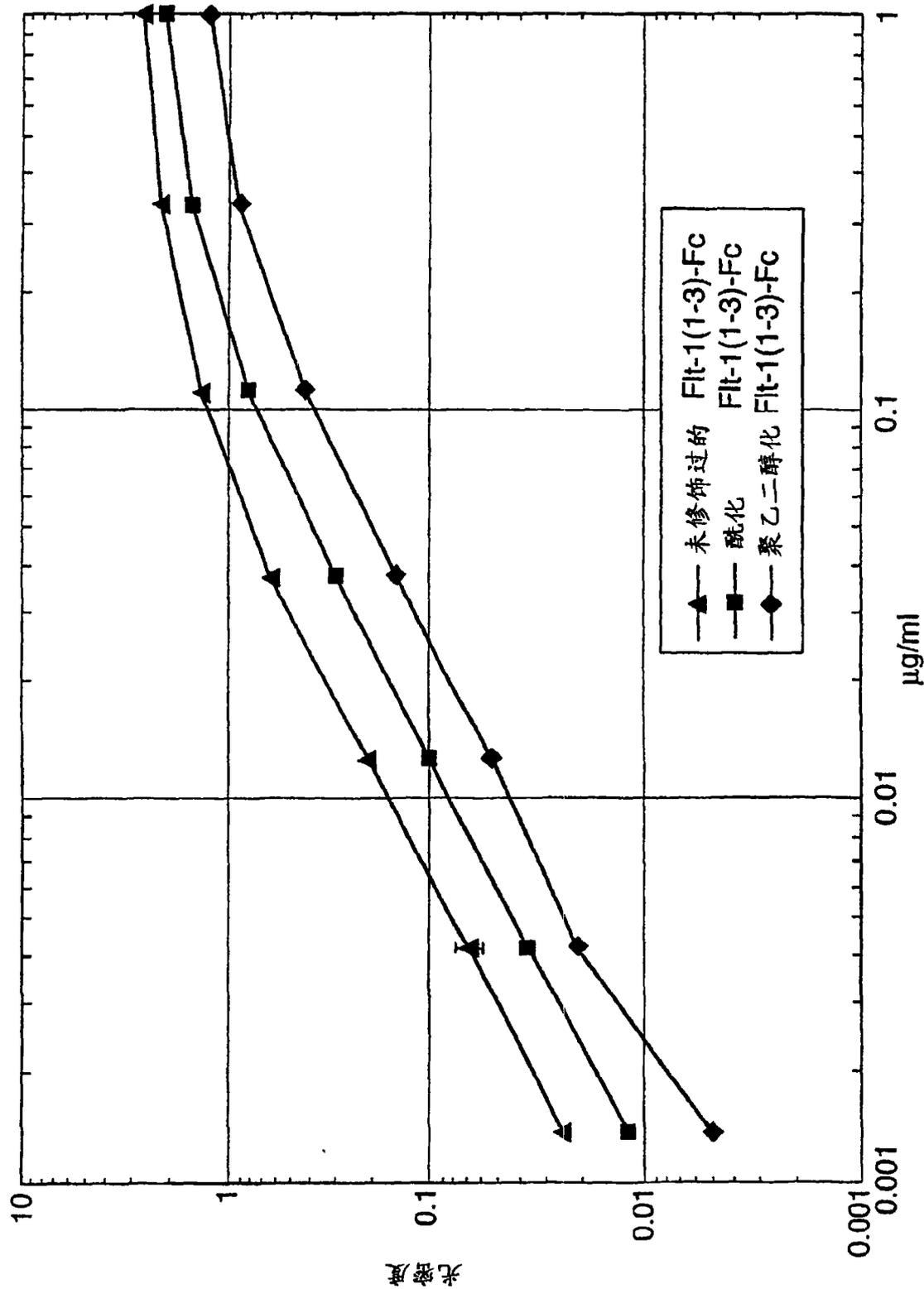


图 4

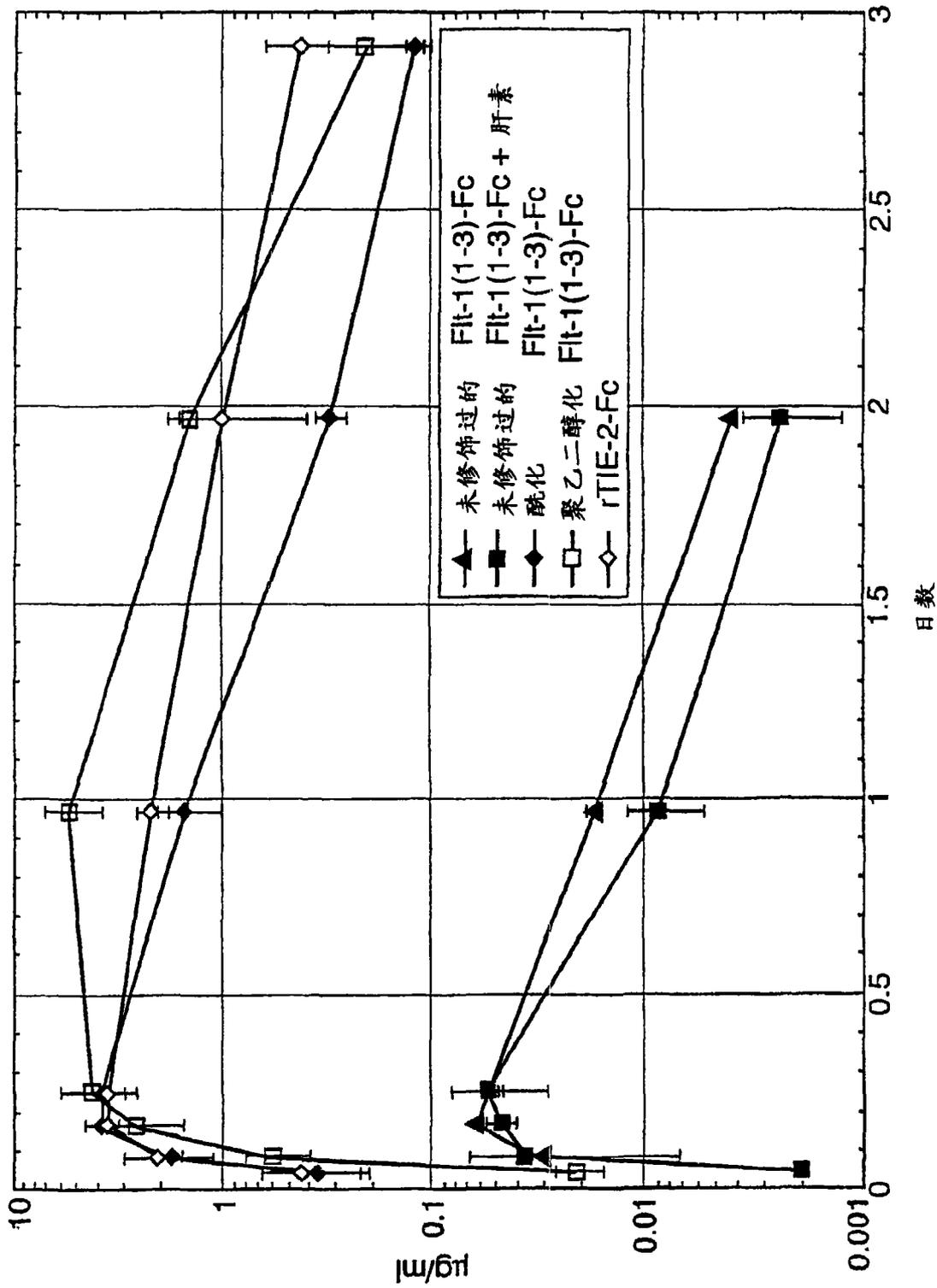


图 5

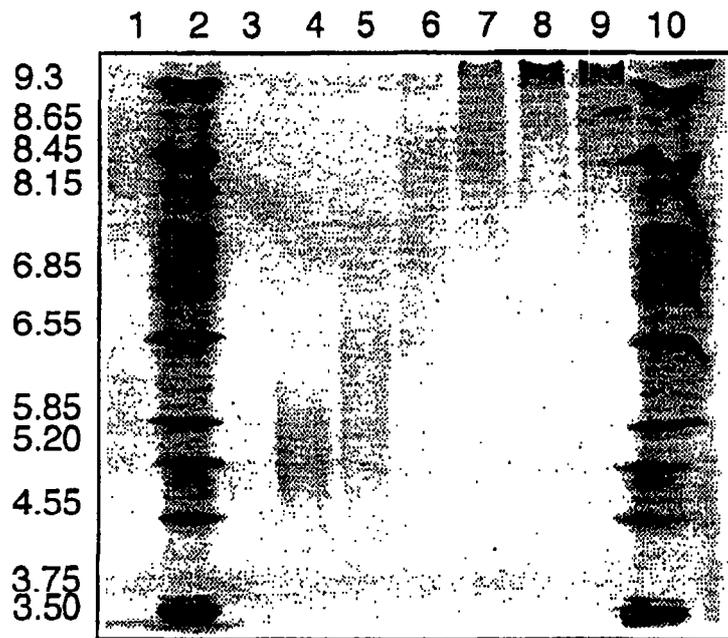


图 6A

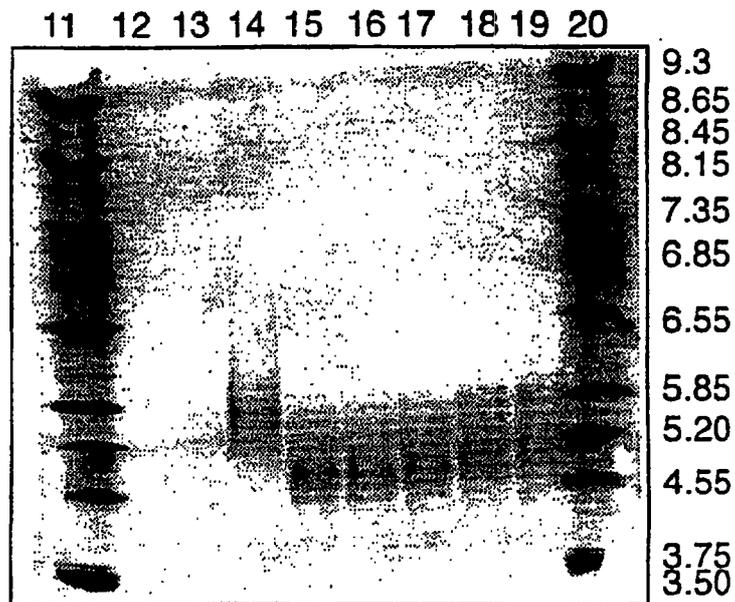


图 6B

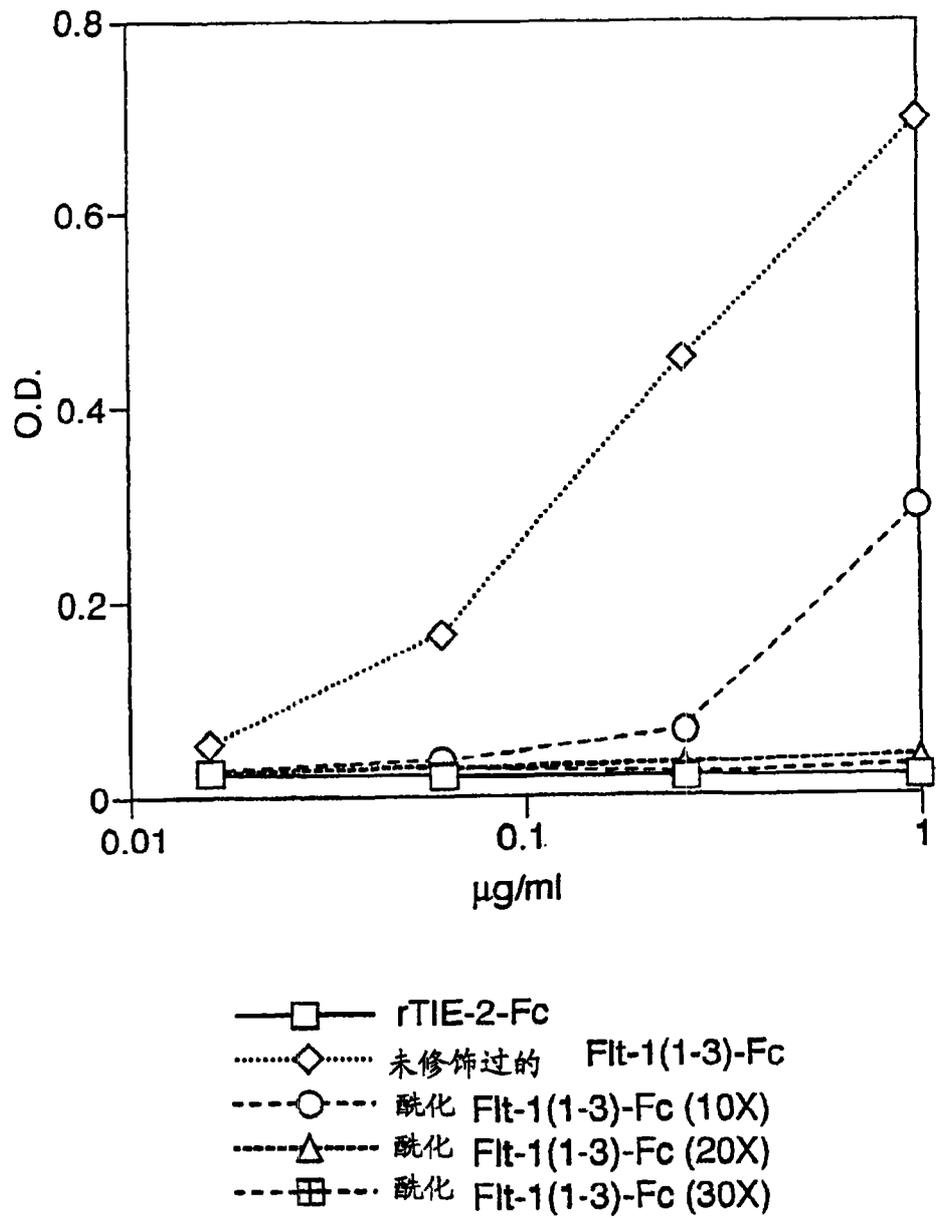


图 7

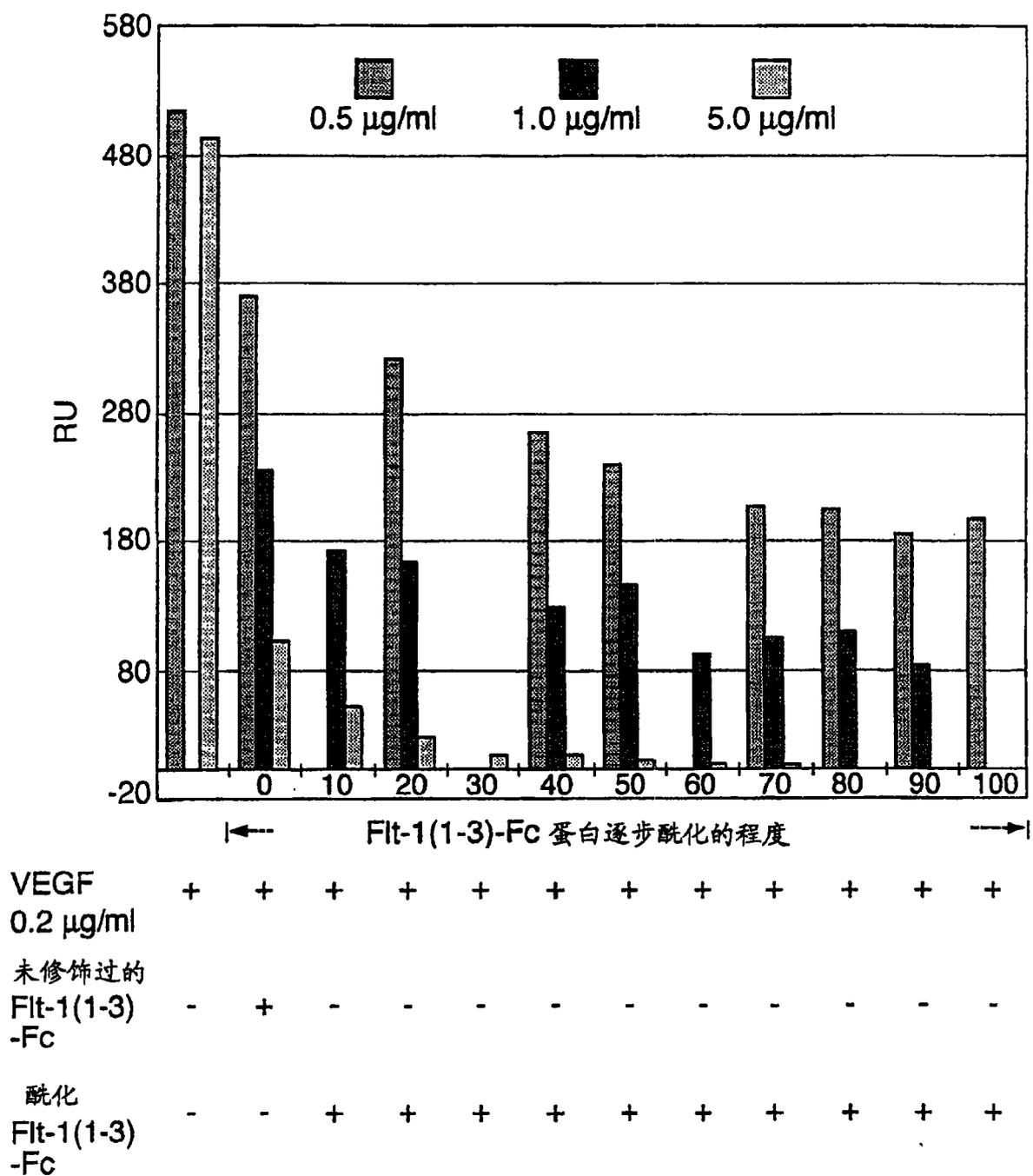


图 8

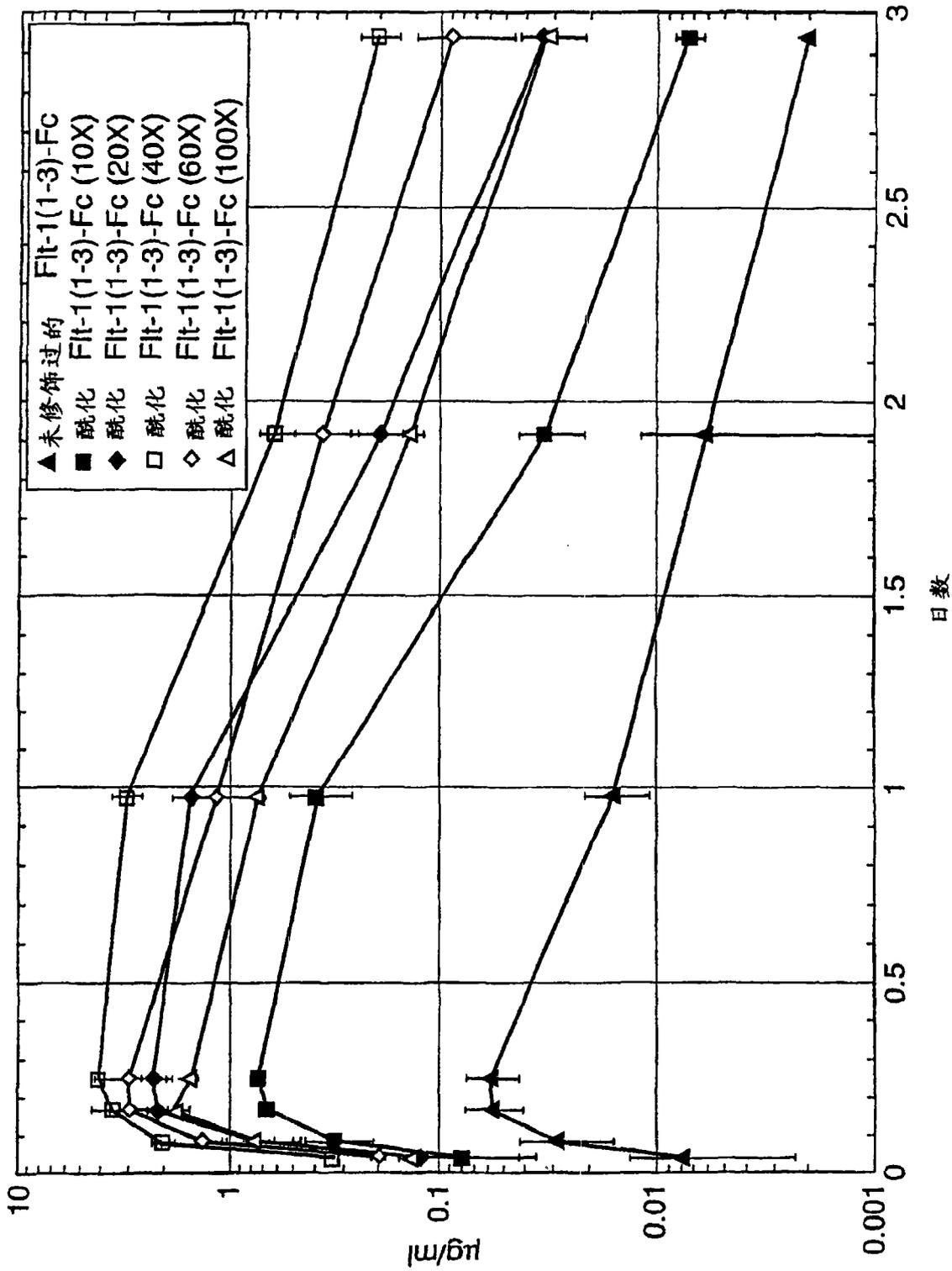


图 9

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

      70      80      90      100     110     120
      *      *      *      *      *      *
ACA GGA TCT AGT TCA GGT TCA AAA TTA AAA GAT CCT GAA CTG AGT TTA AAA GGC ACC CAG
TGT CCT AGA TCA AGT CCA AGT TTT AAT TTT CTA GGA CTT GAC TCA AAT TTT CCG TGG GTC
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln>

      130     140     150     160     170     180
      *      *      *      *      *      *
CAC ATC ATG CAA GCA GGC CAG ACA CTG CAT CTC CAA TGC AGG GGG GAA GCA GCC CAT AAA
GTG TAG TAC GTT CGT CCG GTC TGT GAC GTA GAG GTT ACG TCC CCC CTT CGT CGG GTA TTT
His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys>

      190     200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *      *
TGG TCT TTG CCT GAA ATG GTG AGT AAG GAA AGC GAA AGG CTG AGC ATA ACT AAA TCT GCC
ACC AGA AAC GGA CTT TAC CAC TCA TTC CTT TCG CTT TCC GAC TCG TAT TGA TTT AGA CCG
Trp Ser Leu Pro Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala>

      250     260     270     280     290     300
      *      *      *      *      *      *
TGT GGA AGA AAT GGC AAA CAA TTC TGC AGT ACT TTA ACC TTG AAC ACA GCT CAA GCA AAC
ACA CCT TCT TTA CCG TTT GTT AAG ACG TCA TGA AAT TGG AAC TTG TGT CGA GTT CGT TTG
Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr Ala Gln Ala Asn>

      310     320     330     340     350     360
      *      *      *      *      *      *
CAC ACT GGC TTC TAC AGC TGC AAA TAT CTA GCT GTA CCT ACT TCA AAG AAG AAG GAA ACA
GTG TGA CCG AAG ATG TCG ACG TTT ATA GAT CGA CAT GGA TGA AGT TTC TTC TTC CTT TGT
His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr>

      370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *
GAA TCT GCA ATC TAT ATA TTT ATT AGT GAT ACA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT
CTT AGA CGT TAG ATA TAT AAA TAA TCA CTA TGT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA
Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser>

      430     440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *
GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT
CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA
Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val>

      490     500     510     520     530     540
      *      *      *      *      *      *
ACG TCA CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT
TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA
Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp>

```

图 10A

```

      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *
GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA
CCT TTT GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT
Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys>

      610      620      630      640      650      660
      *      *      *      *      *      *
GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT
CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA
Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr>

      670      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *      *
CTC ACA CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC
GAG TGT GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG
Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val>

      730      740      750      760      770      780
      *      *      *      *      *      *
AAA TTA CTT AGA GGC CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG
TTT AAT GAA TCT CCG GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC
Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr>

      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *
AGA GTT CAA ATG ACC TGG AGT TAC CCT GAT GAA AAA AAT AAG AGA GCT TCC GTA AGG CGA
TCT CAA GTT TAC TGG ACC TCA ATG GGA CTA CTT TTT TTA TTC TCT CGA AGG CAT TCC GCT
Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg>

      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *
CGA ATT GAC CAA ACG AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA
GCT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CCG TTG TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT
Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys>

      910      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *      *
ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA
TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT
Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys>

      970      980      990      1000      1010      1020
      *      *      *      *      *      *
TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT
AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA
Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys>

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
      *      *      *      *      *      *
GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC
CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val>

```

图 10B

```

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
      *        *        *        *        *        *
TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA
AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr>

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
      *        *        *        *        *        *
TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC
ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp>

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
      *        *        *        *        *        *
GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC
CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr>

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
      *        *        *        *        *        *
CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG
GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys>

      1330      1340      1350      1360      1370      1380
      *        *        *        *        *        *
TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA
ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys>

      1390      1400      1410      1420      1430      1440
      *        *        *        *        *        *
GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG
CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys>

      1450      1460      1470      1480      1490      1500
      *        *        *        *        *        *
AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG
TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu>

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
      *        *        *        *        *        *
TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC
ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser>

      1570      1580      1590      1600      1610      1620
      *        *        *        *        *        *
GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG
CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly>

```

图 10C

```
          1630          1640          1650          1660          1670          1680
          *           *           *           *           *           *           *
AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC
TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser>

          1690          1700
          *           *           *           *
CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>
```

图 10D

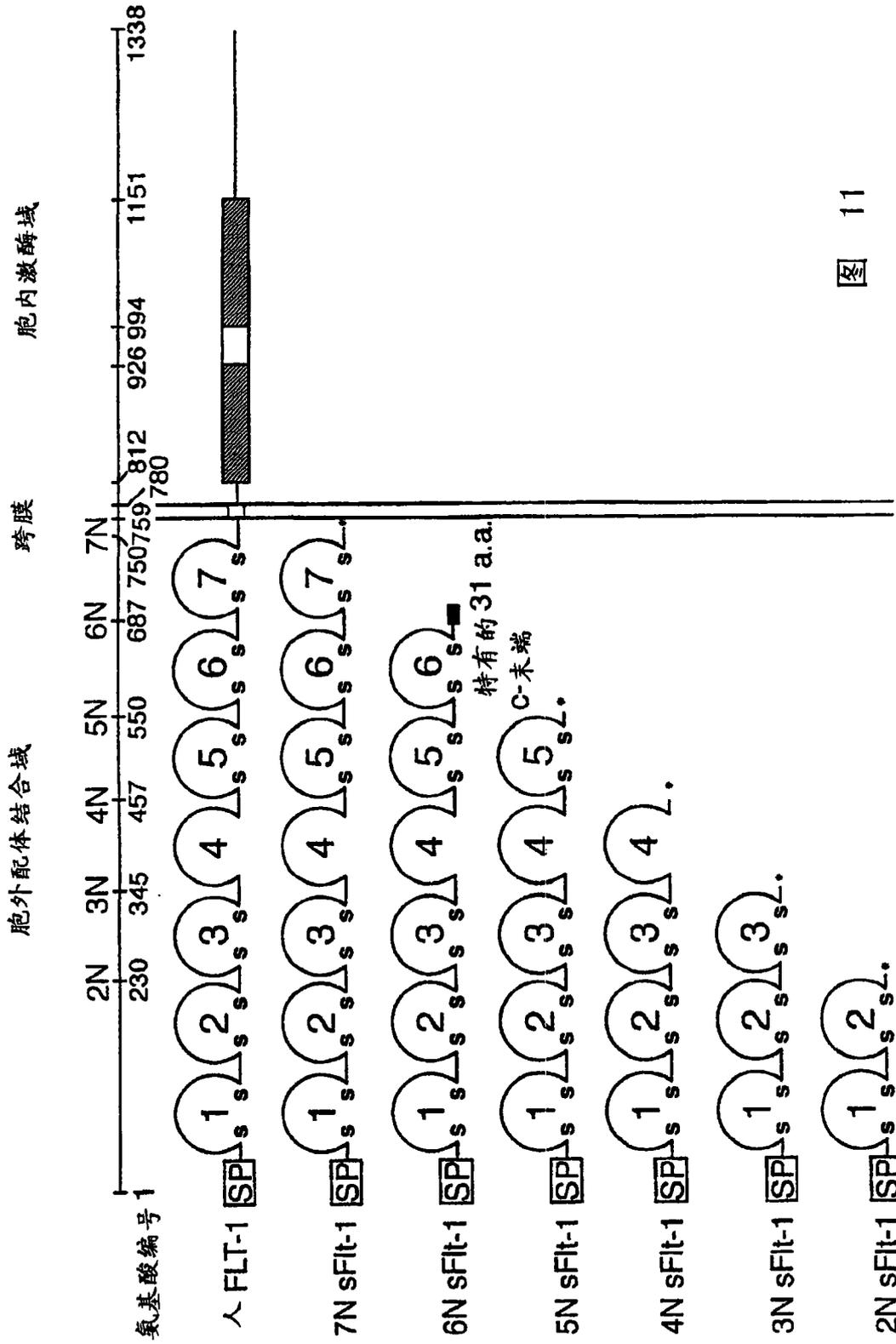


图 11

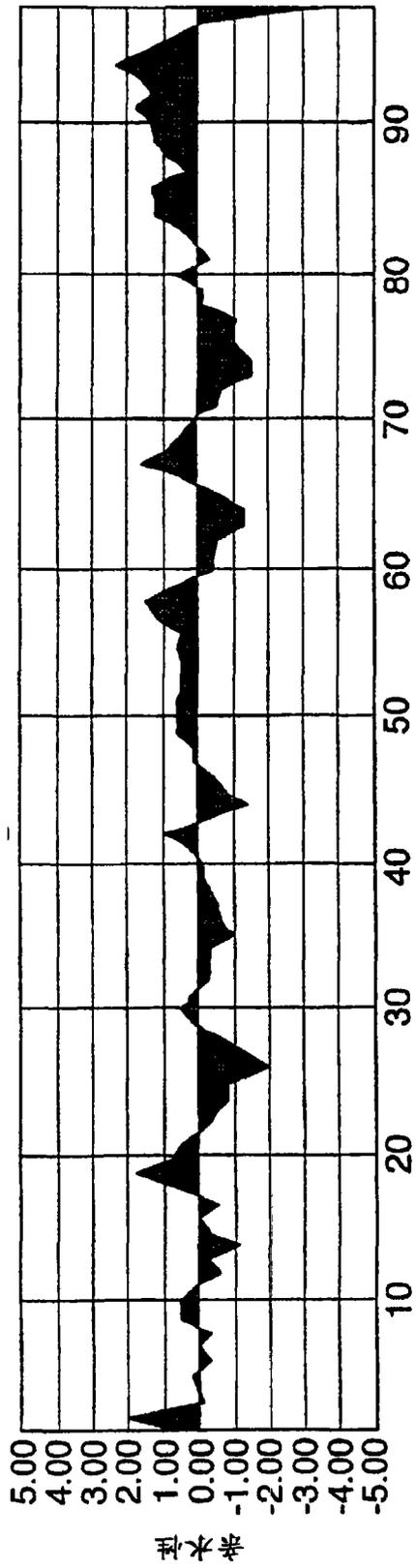


图 12A

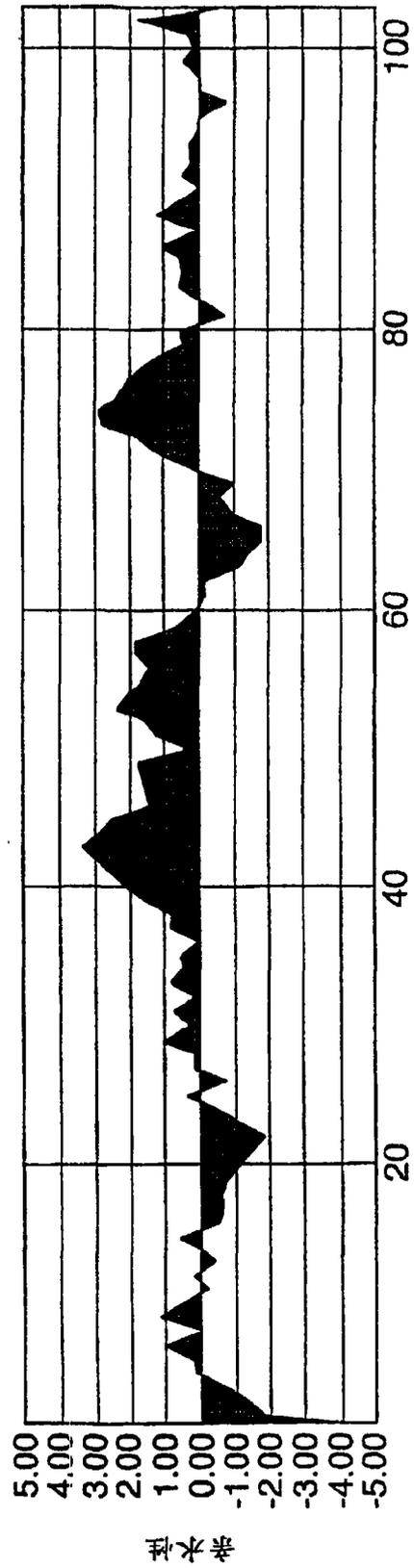


图 12B

```

      10      20      30      40      50      60
    *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
  ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
  TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
  Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

      70      80      90      100      110      120
    *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
  ACA GGA TCT AGT TCA GGT TCA AAA TTA AAA GAT CCT GAA CTG AGT TTA AAA GGC ACC CAG
  TGT CCT AGA TCA AGT CCA AGT TTT AAT TTT CTA GGA CTT GAC TCA AAT TTT CCG TGG GTC
  Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln>

      130      140      150      160      170      180
    *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
  CAC ATC ATG CAA GCA GGC CAG ACA CTG CAT CTC CAA TGC AGG GGG GAA GCA GCC CAT AAA
  GTG TAG TAC GTT CGT CCG GTC TGT GAC GTA GAG GTT ACG TCC CCC CTT CGT CCG GTA TTT
  His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys>

      190      200      210      220      230      240
    *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
  TGG TCT TTG CCT GAA ATG GTG AGT AAG GAA AGC GAA AGG CTG AGC ATA ACT AAA TCT GCC
  ACC AGA AAC GGA CTT TAC CAC TCA TTC CTT TCG CTT TCC GAC TCG TAT TGA TTT AGA CGG
  Trp Ser Leu Pro Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala>

      250      260      270      280      290      300
    *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
  TGT GGA AGA AAT GGC AAA CAA TTC TGC AGT ACT TTA ACC TTG AAC ACA GCT CAA GCA AAC
  ACA CCT TCT TTA CCG TTT GTT AAG ACG TCA TGA AAT TGG AAC TTG TGT CGA GTT CGT TTG
  Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr Ala Gln Ala Asn>

      310      320      330      340      350      360
    *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
  CAC ACT GGC TTC TAC AGC TGC AAA TAT CTA GCT GTA CCT ACT TCA AAG AAG AAG GAA ACA
  GTG TGA CCG AAG ATG TCG ACG TTT ATA GAT CGA CAT GGA TGA AGT TTC TTC TTC CTT TGT
  His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr>

      370      380      390      400      410      420
    *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
  GAA TCT GCA ATC TAT ATA TTT ATT AGT GAT ACA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT
  CTT AGA CGT TAG ATA TAT AAA TAA TCA CTA TGT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA
  Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser>

      430      440      450      460      470      480
    *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
  GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT
  CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA
  Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val>

      490      500      510      520      530      540
    *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
  ACG TCA CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT
  TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA
  Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp>

```

图 13A

```

      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *
GGA AAA CSC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA
CCT TTT GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT
Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys>

      610      620      630      640      650      660
      *      *      *      *      *      *
GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT
CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA
Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr>

      670      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *      *
CTC ACA CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC
GAG TGT GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG
Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val>

      730      740      750      760      770      780
      *      *      *      *      *      *
AAA TTA CTT AGA GGC CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG
TTT AAT GAA TCT CCG GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC
Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr>

      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *
AGA GTT CAA ATG ACC TGG AGT TAC CCT GAT GAA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC
TCT CAA GTT TAC TGG ACC TCA ATG GGA CTA CTT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CCG TTG
Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn>

      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *
ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT
TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA
Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr>

      910      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *      *
TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA TCT GPT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT
ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA
Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp>

      970      980      990      1000      1010      1020
      *      *      *      *      *      *
AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA
TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT
Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro>

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
      *      *      *      *      *      *
GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC
CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr>

```

图 13B

	1090		1100		1110		1120		1130		1140
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	CTC	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACA	TGC
	GAG	TAC	TAG	AGG	GCC	TGG	GGA	CTC	CAG	TGT	ACG
	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
											Val
											Val
											Val
											Asp
											Val
											Ser
											His
											Glu
											Asp>
	1150		1160		1170		1180		1190		1200
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	CCT	GAG	GTC	AAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAC	GGC
	GGA	CTC	CAG	TTC	AAG	TTG	ACC	ATG	CAC	CTG	CCG
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
											Val
											Glu
											Val
											His
											Asn
											Ala
											Lys
											Thr
											Lys>
	1210		1220		1230		1240		1250		1260
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	CCG	CGG	GAG	GAG	CAG	TAC	AAC	AGC	ACG	TAC	CGT
	GGC	GCC	CTC	CTC	GTC	ATG	TTG	TCG	TGC	ATG	GCA
	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
											Val
											Val
											Val
											Ser
											Val
											Leu
											Thr
											Val
											Leu
											His>
	1270		1280		1290		1300		1310		1320
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	CAG	GAC	TGG	CTG	AAT	GGC	AAG	GAG	TAC	AAG	TGC
	GTC	CTG	ACC	GAC	TTA	CCG	TTC	CTC	ATG	TTC	ACG
	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
											Lys
											Val
											Ser
											Asn
											Lys
											Ala
											Leu
											Pro
											Ala>
	1330		1340		1350		1360		1370		1380
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	CCC	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA	GGG
	GGG	TAG	CTC	TTT	TGG	TAG	AGG	TTT	CGG	TTT	CCC
	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
											Gln
											Pro
											Arg
											Glu
											Pro
											Gln
											Val
											Tyr
											Thr>
	1390		1400		1410		1420		1430		1440
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	CTG	CCC	CCA	TCC	CGG	GAT	GAG	CTG	ACC	AAG	AAC
	GAC	GGG	GGT	AGG	GCC	CTA	CTC	GAC	TGG	TTC	TTG
	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn
											Gln
											Val
											Ser
											Leu
											Thr
											Cys
											Leu
											Val
											Lys>
	1450		1460		1470		1480		1490		1500
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	GGC	TTC	TAT	CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	GTG	GAG	TGG
	CCG	AAG	ATA	GGG	TCG	CTG	TAG	CGG	CAC	CTC	ACC
	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
											Glu
											Ser
											Asn
											Gly
											Gln
											Pro
											Glu
											Asn
											Asn>
	1510		1520		1530		1540		1550		1560
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT	CCC	GTG	CTG	GAC	TCC	GAC
	ATG	TTC	TGG	TGC	GGA	GGG	CAC	GAC	CTG	AGG	CTG
	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
											Gly
											Ser
											Asn
											Val
											Ser
											Phe
											Phe
											Leu
											Tyr
											Ser
											Lys
											Leu>
	1570		1580		1590		1600		1610		1620
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC	AGG	TGG	CAG	CAG	GGG	AAC
	TGG	CAC	CTG	TTC	TCG	TCC	ACC	GTC	GTC	CCC	TTG
	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
											Val
											Val
											Phe
											Ser
											Cys
											Ser
											Val
											Met
											His
											Glu>

图 13C

```
          1630          1640          1650          1660          1670
      *      *      *      *      *      *      *      *      *
GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>
```

图 13D

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

      70      80      90      100      110      120
      *      *      *      *      *      *
ACA GGA TCT AGT TCC GGA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC CCC GAA ATT
TGT CCT AGA TCA AGG CCT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG GGG CTT TAA
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile>

      130      140      150      160      170      180
      *      *      *      *      *      *
ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT ACG TCA CCT AAC ATC
TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT GGA TTG TAG
Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile>

      190      200      210      220      230      240
      *      *      *      *      *      *
ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA CGC ATA ATC
TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT GCG TAT TAG
Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile>

      250      260      270      280      290      300
      *      *      *      *      *      *
TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA GGG CTT CTG
ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT CCC GAA GAC
Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu>

      310      320      330      340      350      360
      *      *      *      *      *      *
ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA CAT CGA CAA
TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT GTA GCT GTT
Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln>

      370      380      390      400      410      420
      *      *      *      *      *      *
ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC AAA TTA CTT AGA GGC
TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG TTT AAT GAA TCT CCG
Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val Lys Leu Leu Arg Gly>

      430      440      450      460      470      480
      *      *      *      *      *      *
CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG AGA GTT CAA ATG ACC
GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC TCT CAA GTT TAC TGG
His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr>

      490      500      510      520      530      540
      *      *      *      *      *      *
TGG AGT TAC CCT GAT GAA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT
ACC TCA ATG GGA CTA CTT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CGG TTG TAT AAG ATG TCA CAA
Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val>

```

图 14A

```

      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *
CTT ACT ATT GAC AAA ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT
GAA TGA TAA CTG TTT TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA
Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser>

      610      620      630      640      650      660
      *      *      *      *      *      *
GGA CCA TCA TTC AAA TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC
CCT GGT AGT AAG TTT AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG
Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly>

      670      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *      *
GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG
CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu>

      730      740      750      760      770      780
      *      *      *      *      *      *
GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG
CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg>

      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *
ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC
TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe>

      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *
AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CCG GAG GAG CAG
TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CCG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln>

      910      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *      *
TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT
ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn>

      970      980      990      1000      1010      1020
      *      *      *      *      *      *
GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC
CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGT CCG GGG TAG CTC TTT TGG
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr>

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
      *      *      *      *      *      *
ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG
TAG AGG TTT CCG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg>

```

图 14B

```

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
      *        *        *        *        *        *
GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC
CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser>

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
      *        *        *        *        *        *
GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT
CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro>

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
      *        *        *        *        *        *
CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC
GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser>

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
      *        *        *        *        *        *
AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC
TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His>

      1330      1340      1350
      *        *        *        *        *
TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>

```

图 14C

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

      70      80      90      100      110      120
      *      *      *      *      *      *
ACA GGA TCT AGT TCC GGA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC CCC GAA ATT
TGT CCT AGA TCA AGG CCT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG GGG CTT TAA
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile>

      130      140      150      160      170      180
      *      *      *      *      *      *
ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT ACG TCA CCT AAC ATC
TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT GGA TTG TAG
Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile>

      190      200      210      220      230      240
      *      *      *      *      *      *
ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA CGC ATA ATC
TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT GCG TAT TAG
Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile>

      250      260      270      280      290      300
      *      *      *      *      *      *
TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA GGG CTT CTG
ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT CCC GAA GAC
Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu>

      310      320      330      340      350      360
      *      *      *      *      *      *
ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA CAT CGA CAA
TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT GTA GCT GTT
Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln>

      370      380      390      400      410      420
      *      *      *      *      *      *
ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC AAA TTA CTT AGA GGC
TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG TTT AAT GAA TCT CCG
Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val Lys Leu Leu Arg Gly>

      430      440      450      460      470      480
      *      *      *      *      *      *
CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG AGA GTT CAA ATG ACC
GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC TCT CAA GTT TAC TGG
His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr>

      490      500      510      520      530      540
      *      *      *      *      *      *
TGG AGT TAC CCT GAT GAA AAA AAT AAG AGA GCT TCC GTA AGG CGA CGA ATT GAC CAA AGC
ACC TCA ATG GGA CTA CTT TTT TTA TTC TCT CGA AGG CAT TCC GCT GCT TAA CTG GTT TCG
Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile Asp Gln Ser>

```

图 15A

```

      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *
AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA ATG CAG AAC AAA GAC
TTA AGG GTA CGG TTG TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT TAC GTC TTG TTT CTG
Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp>

      610      620      630      640      650      660
      *      *      *      *      *      *
AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA TCT GTT AAC ACC TCA
TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT AGA CAA TTG TGG AGT
Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser>

      670      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *      *
GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA
CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT
Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr>

      730      740      750      760      770      780
      *      *      *      *      *      *
TGC CCA COG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA
ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro>

      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *
AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC
TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp>

      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *
GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT
CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His>

      910      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *      *
AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC
TTA CCG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val>

      970      980      990      1000      1010      1020
      *      *      *      *      *      *
CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC
GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn>

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
      *      *      *      *      *      *
AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA
TTT CCG GAG GGT CCG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CCG TTT CCC GTC GGG GCT CTT
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu>

```

图 15B

```

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
      *        *        *        *        *        *
CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG
GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu>

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
      *        *        *        *        *        *
ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG
TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CCG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly>

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
      *        *        *        *        *        *
CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC
GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe>

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
      *        *        *        *        *        *
CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC
GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys>

      1330      1340      1350      1360      1370      1380
      *        *        *        *        *        *
TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG
AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro>

*
GGT AAA TGA
CCA TTT ACT
Gly Lys ***>

```

图 15C

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

      70      80      90      100      110      120
      *      *      *      *      *      *
ACA GGA TCT AGT TCA GGT TCA AAA TTA AAA GAT CCT GAA CTG AGT TTA AAA GGC ACC CAG
TGT CCT AGA TCA AGT CCA AGT TTT AAT TTT CTA GGA CTT GAC TCA AAT TTT CCG TGG GTC
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln>

      130      140      150      160      170      180
      *      *      *      *      *      *
CAC ATC ATG CAA GCA GGC CAG ACA CTG CAT CTC CAA TGC AGG GGG GAA GCA GCC CAT AAA
GTG TAG TAC GTT CGT CCG GTC TGT GAC GTA GAG GTT ACG TCC CCC CTT CGT CGG GTA TTT
His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys>

      190      200      210      220      230      240
      *      *      *      *      *      *
TGG TCT TTG CCT GAA ATG GTG AGT AAG GAA AGC GAA AGG CTG AGC ATA ACT AAA TCT GCC
ACC AGA AAC GGA CTT TAC CAC TCA TTC CTT TCG CTT TCC GAC TCG TAT TGA TTT AGA CGG
Trp Ser Leu Pro Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala>

      250      260      270      280      290      300
      *      *      *      *      *      *
TGT GGA AGA AAT GGC AAA CAA TTC TGC AGT ACT TTA ACC TTG AAC ACA GCT CAA GCA AAC
ACA CCT TCT TTA CCG TTT GTT AAG ACG TCA TGA AAT TGG AAC TTG TGT CGA GTT CGT TTG
Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr Ala Gln Ala Asn>

      310      320      330      340      350      360
      *      *      *      *      *      *
CAC ACT GGC TTC TAC AGC TGC AAA TAT CTA GCT GTA CCT ACT TCA AAG AAG AAG GAA ACA
GTG TGA CCG AAG ATG TCG ACG TTT ATA GAT CGA CAT GGA TGA AGT TTC TTC TTC CTT TGT
His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr>

      370      380      390      400      410      420
      *      *      *      *      *      *
GAA TCT GCA ATC TAT ATA TTT ATT AGT GAT ACA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT
CTT AGA CGT TAG ATA TAT AAA TAA TCA CTA TGT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA
Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser>

      430      440      450      460      470      480
      *      *      *      *      *      *
GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT
CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA
Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val>

      490      500      510      520      530      540
      *      *      *      *      *      *
ACG TCA CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT
TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA
Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp>

```

图 16A

```

      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *      *      *
GGA AAA CCC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA
CCT TTT GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT
Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys>

      610      620      630      640      650      660
      *      *      *      *      *      *      *      *
GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT
CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA
Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr>

      670      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *      *      *      *
CTC ACA CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC
GAG TGT GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG
Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val>

      730      740      750      760      770      780
      *      *      *      *      *      *      *      *
AAA TTA CTT AGA GGC CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG
TTT AAT GAA TCT CCG GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC
Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr>

      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *      *      *
AGA GTT CAA ATG ACC TGG AGT TAC CCT GAT GAA AAA AAT AAG AAC GCT TCC GTA AGG CGA
TCT CAA GTT TAC TGG ACC TCA ATG GGA CTA CTT TTT TTA TTC TTG CGA AGG CAT TCC GCT
Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Lys Asn Ala Ser Val Arg Arg>

      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *      *      *
CGA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA
GCT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CCG TTG TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT
Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys>

      910      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *      *      *      *
ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA
TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT
Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys>

      970      980      990      1000      1010      1020
      *      *      *      *      *      *      *      *
TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT
AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA
Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys>

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
      *      *      *      *      *      *      *      *
GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC
CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val>

```

图 16B

		1090		1100		1110		1120		1130		1140							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
TTC	CTC	TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACC	CTC	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACA
AAG	GAG	AAG	GGG	GGT	TTT	GGG	TTC	CTG	TGG	GAG	TAC	TAG	AGG	GCC	TGG	GGA	CTC	CAG	TGT
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr>
		1150		1160		1170		1180		1190		1200							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
TGC	GTG	GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	CAC	GAA	GAC	CCT	GAG	GTC	AAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAC
ACG	CAC	CAC	CAC	CTG	CAC	TCG	GTG	CTT	CTG	GGA	CTC	CAG	TTC	AAG	TTG	ACC	ATG	CAC	CTG
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp>
		1210		1220		1230		1240		1250		1260							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
GGC	GTG	GAG	GTG	CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG	CCG	CGG	GAG	GAG	CAG	TAC	AAC	AGC	ACG	TAC
CCG	CAC	CTC	CAC	GTA	TTA	CGG	TTC	TGT	TTC	GGC	GCC	CTC	CTC	GTC	ATG	TTG	TCG	TGC	ATG
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr>
		1270		1280		1290		1300		1310		1320							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
CGT	GTG	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAT	GGC	AAG	GAG	TAC	AAG
GCA	CAC	CAG	TCG	CAG	GAG	TGG	CAG	GAC	GTG	GTC	CTG	ACC	GAC	TTA	CCG	TTC	CTC	ATG	TTC
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys>
		1330		1340		1350		1360		1370		1380							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
TGC	AAG	GTC	TCC	AAC	AAA	GCC	CTC	CCA	GCC	CCC	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA
ACG	TTC	CAG	AGG	TTG	TTT	CGG	GAG	GGT	CGG	GGG	TAG	CTC	TTT	TGG	TAG	AGG	TTT	CGG	TTT
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys>
		1390		1400		1410		1420		1430		1440							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
GGG	CAG	CCC	CGA	GAA	CCA	CAG	GTG	TAC	ACC	CTG	CCC	CCA	TCC	CGG	GAT	GAG	CTG	ACC	AAG
CCC	GTC	GGG	GCT	CTT	GGT	GTC	CAC	ATG	TGG	GAC	GGG	GGT	AGG	GCC	CTA	CTC	GAC	TGG	TTC
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys>
		1450		1460		1470		1480		1490		1500							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAT	CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	GTG	GAG
TTG	GTC	CAG	TCG	GAC	TGG	ACG	GAC	CAG	TTT	CCG	AAG	ATA	GGG	TCG	CTG	TAG	CGG	CAC	CTC
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu>
		1510		1520		1530		1540		1550		1560							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT	CCC	GTG	CTG	GAC	TCC
ACC	CTC	TCG	TTA	CCC	GTC	GGC	CTC	TTG	TTG	ATG	TTC	TGG	TGC	GGA	GGG	CAC	GAC	CTG	AGG
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser>
		1570		1580		1590		1600		1610		1620							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	AAG	CTC	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC	AGG	TGG	CAG	CAG	GGG
CTG	CCG	AGG	AAG	AAG	GAG	ATG	TCG	TTC	GAG	TGG	CAC	CTG	TTC	TCG	TCC	ACC	GTC	GTC	CCC
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly>

图 16C

```

          1630          1640          1650          1660          1670          1680
          *           *           *           *           *           *           *
AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC
TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser>

          1690          1700
          *           *           *           *
CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>

```

图 16D

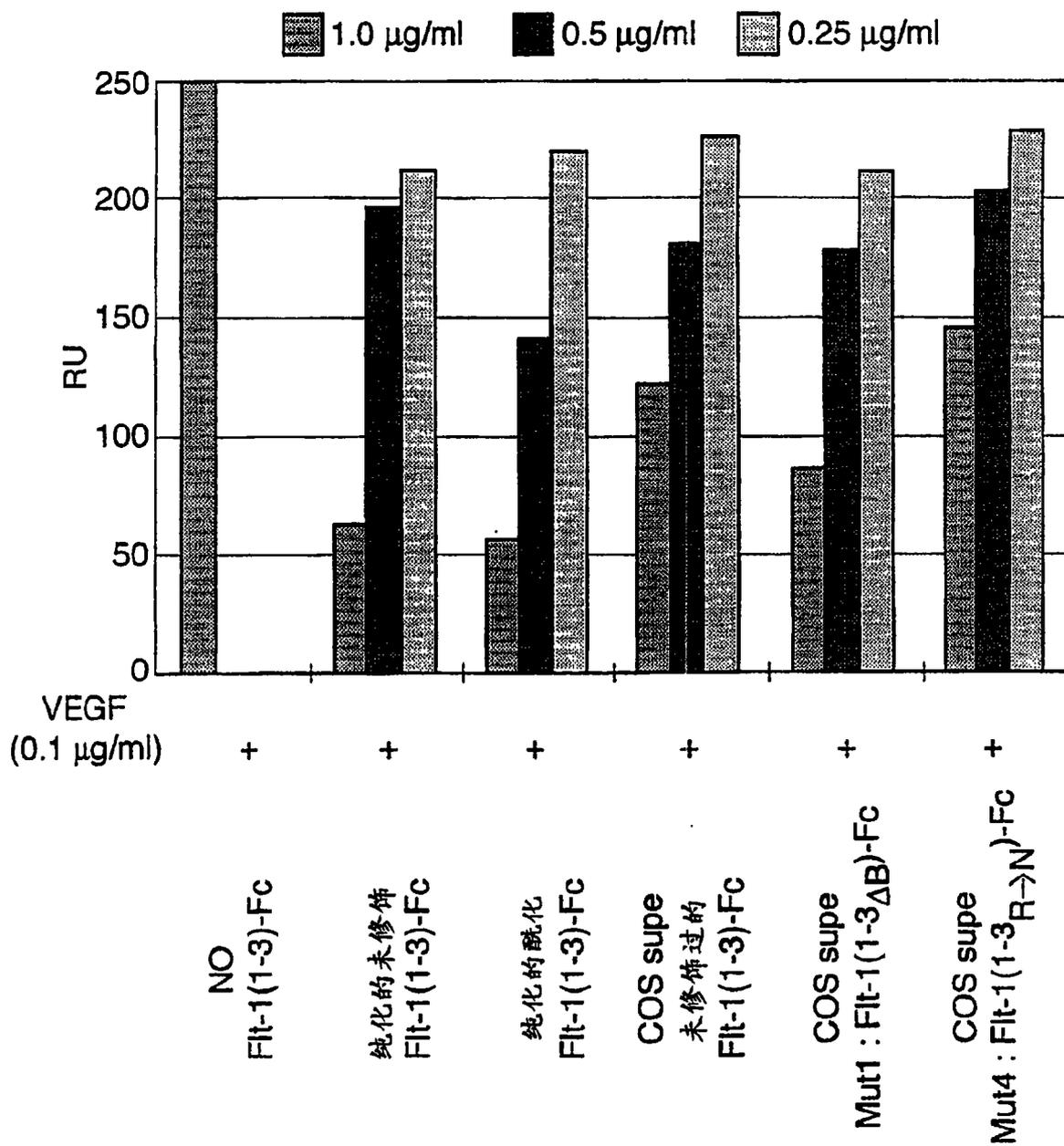


图 17

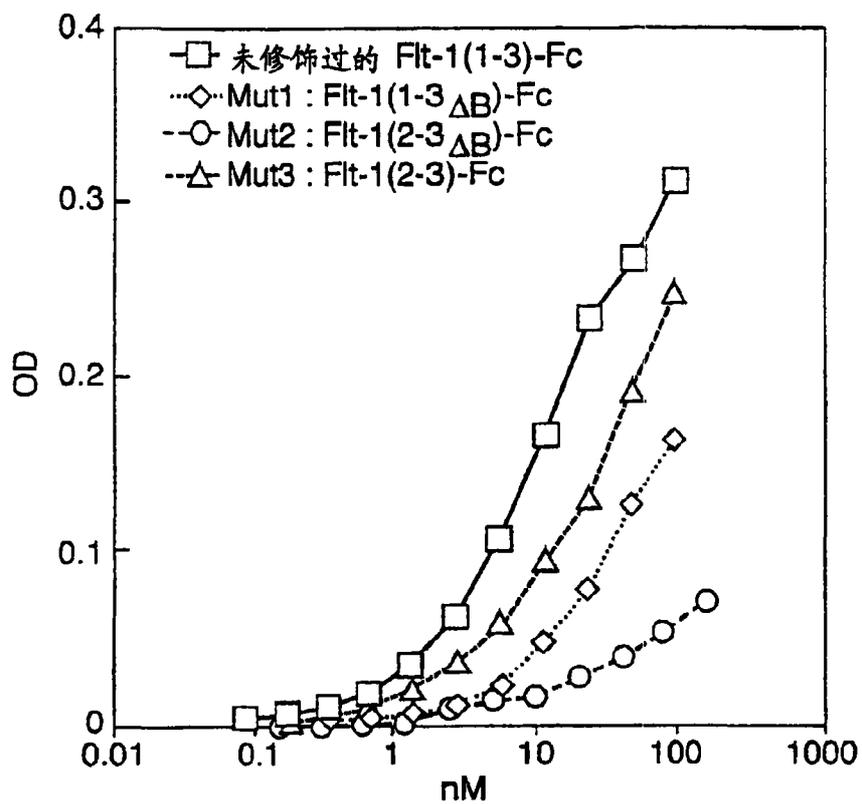


图 18

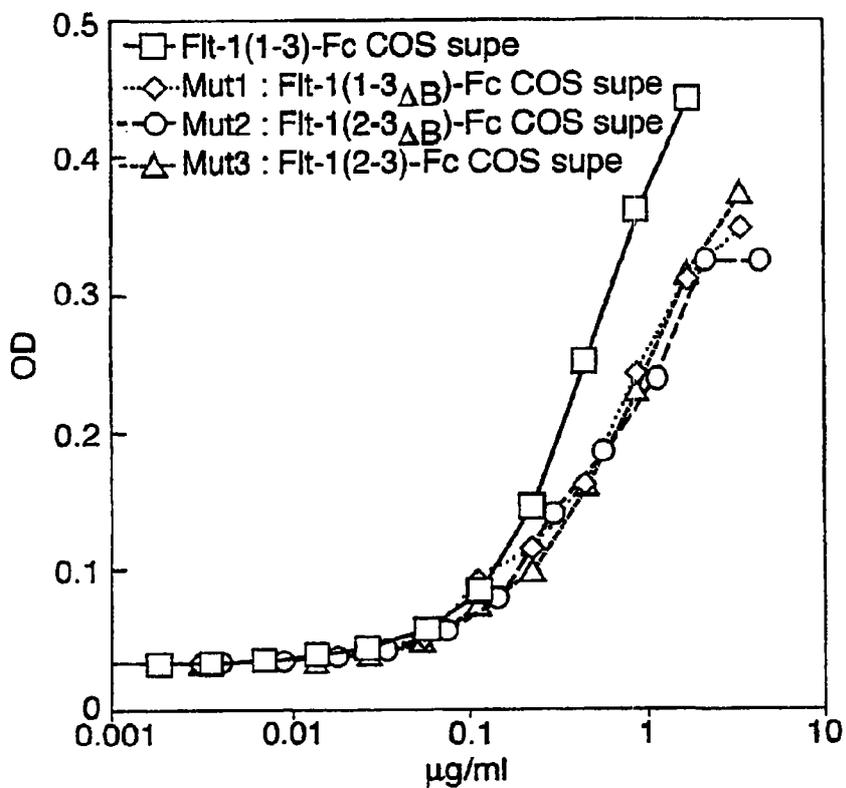


图 19

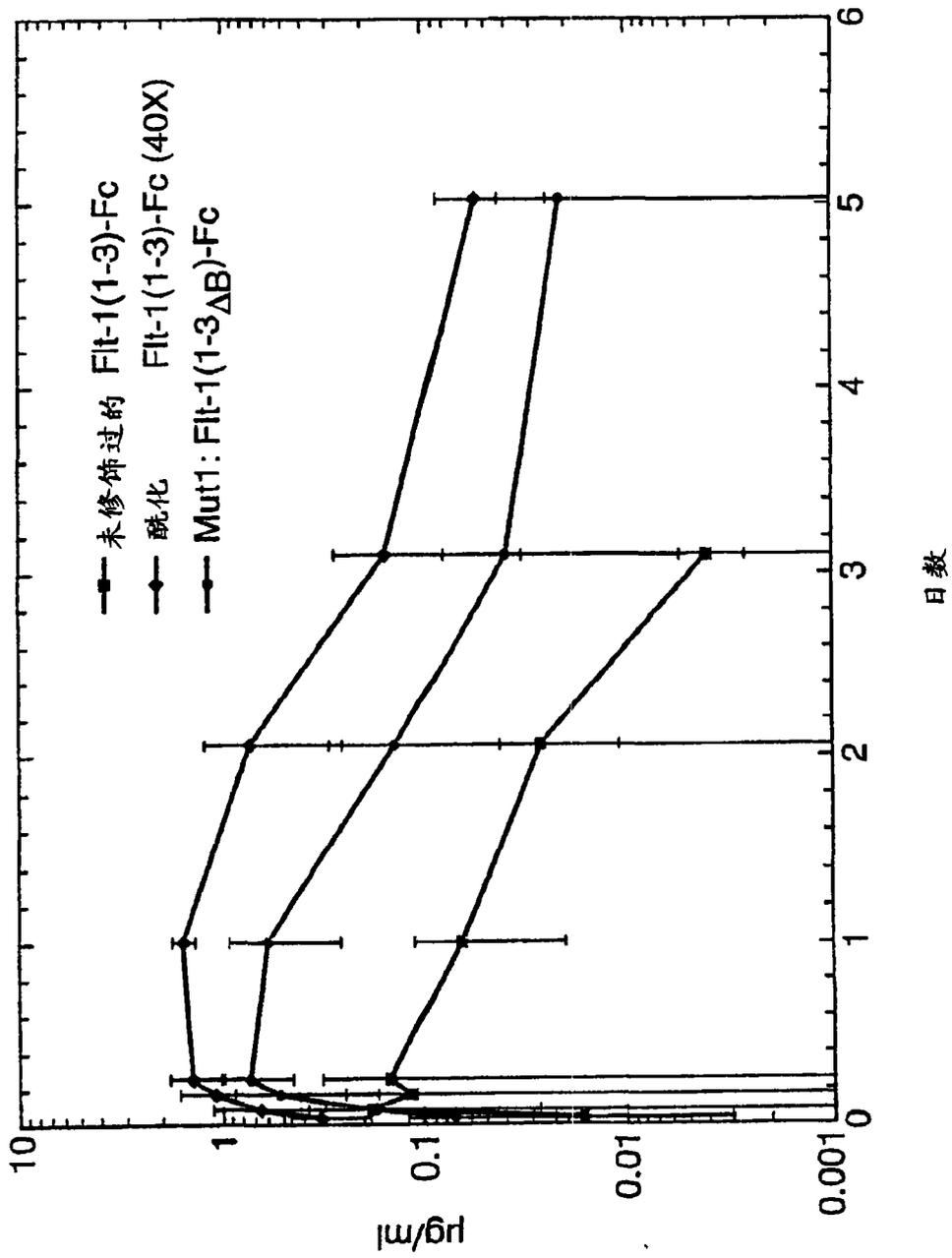


图 20

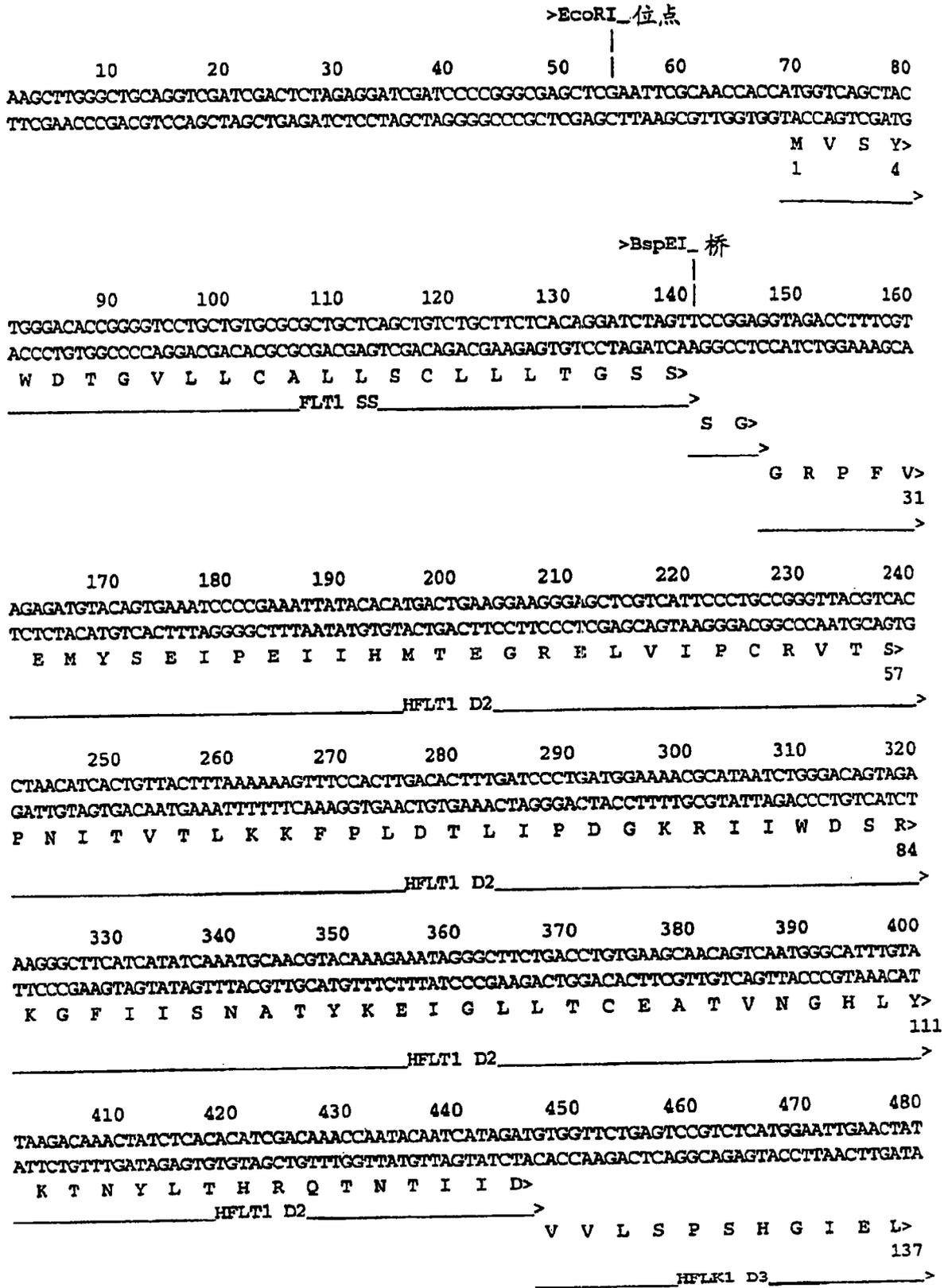


图 21A

```

      490      500      510      520      530      540      550      560
CTGTTGGAGAAAAGCTTGTCTTAAATGTACAGCAAGAAGTGAAGTAAATGTGGGATTGACTTCAACTGGGAATACCCCT
GACAACCTCTTTTTCGAACAGAATTTAACATGTCGTTCTTGACTTGATTACACCCCTAACTGAAGTTGACCCTTATGGGA
S V G E K L V L N C T A R T E L N V G I D F N W E Y P>
                                                                164
_____HFLK1 D3_____>

      570      580      590      600      610      620      630      640
TCTTCGAAGCATCAGCATAAGAACTTGTAAACCGAGACCTAAAAACCCAGTCTGGGAGTGAGATGAAGAAATTTTGTAG
AGAAGCTTCGTAGTCGTATTCTTTGAACATTTGGCTCTGGATTTTTGGGTCAGACCCTCACTCTACTTCTTTAAAAACTC
S S K H Q H K K L V N R D L K T Q S G S E M K K F L S>
                                                                191
_____HFLK1 D3_____>

      650      660      670      680      690      700      710      720
CACCTTAACCTATAGATGGTGTAAACCCGGAGTGACCAAGGATTTGTACACCTGTGCAGCATCCAGTGGGCATGATGACCAAGA
GTGGAATTGATATCTACCACATGGGCCCTCACTGGTTCCCTAACATGTGGACACGTCGTAGGTCACCCGACTACTGGTTCT
T L T I D G V T R S D Q G L Y T C A A S S G L M T K>
                                                                217
_____HFLK1 D3_____>

                                     >Srf_桥_
                                     |
      730      740      750      760      770      780      790      800
AGAACAGCACATTTGTTCAGGGTCCATGAAAAGGGCCCGGGCGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTCGCCAGCACCTGAA
TCTTGTCTGTGTAAACAGTCCCAGGTACTTTTCCCGGGCCCGCTGTTTIGAGTGTGTACGGGTGGCACGGGTCGTGGACTT
K N S T F V R V H E K>
_____HFLK1 D3_____>
                                     G P G>
                                     _____>
                                               D K T H T C P P C P A P E>
                                               244
_____FCAC1 (A)_____>

      810      820      830      840      850      860      870      880
CTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
GAGGACCCCTTGGCAGTCAGAAGGAGAAGGGGGTTTGGGTTCCTGTGGGAGTACTAGAGGGCCTGGGGACTCCAGTG
L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T>
                                                                271
_____FCAC1 (A)_____>

      890      900      910      920      930      940      950      960
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
TAGCCACCACCACCTGCACCTCGGTGCTTCTGGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCACCTGCCGCACCTCCACGTATTAC
C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N>
                                                                297
_____FCAC1 (A)_____>

      970      980      990      1000      1010      1020      1030      1040
CCAAGACAAAGCCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTCACCGTCCCTGCACCAGGACTGG
GGTCTGTGTTTCGGCCCTCCCTCGTCAATGTTGTCGTGCATGGCACACCAGTCCGAGGAGTGGCAGGACGTGGTCTCGACC
A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W>
                                                                324
_____FCAC1 (A)_____>

```

图 21B

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
 GACTTACCGTTCTCATGTTACAGTCCAGAGGTTGTTTCGGGAGGGTCCGGGGTAGCTCTTTTGGTAGAGGTTTCGGTT
 L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K>
 351
 _____FCAC1 (A)_____>

>A>C_A_同种异型

>G>T_A_同种异型

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT
 TCCCGTCGGGGCTCTTGGTGTCCACATGTGGGACGGGGTAGGGCCCTACTCGACTGGTTCTTGGTCCAGTCCGACTGGA
 G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T>
 377
 _____FCAC1 (A)_____>

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
 GCCTGGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC
 CGGACCAGTTTCCGAAGATAGGGTCGCTGTAGCGGCACCTCACCTCTCGTTACCCGTCGGCCCTCTTGTGTATGTTCTGG
 C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T>
 404
 _____FCAC1 (A)_____>

>T>C

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
 ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG
 TGGGAGGGCACGACCTGAGGCTGCCGAGGAAGAAGGAGATATCGTTCGAGTGGCACCTGTTCTCGTCCACCGTCTGTC
 T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G>
 431
 _____FCAC1 (A)_____>

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 GAACGTCFTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
 CTTGCAGAAGAGTACGAGGCACTACGTACTCCGAGACGTGTTGGTGATGTGCGTCTTCTCGGAGAGGGACAGAGGCCCAT
 N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G>
 457
 _____FCAC1 (A)_____>

>NotI_位点

|1450

AATGAGCGGCCGC
 TTACTCGCCGGCG
 K *>
 458
 _____>

图 21C

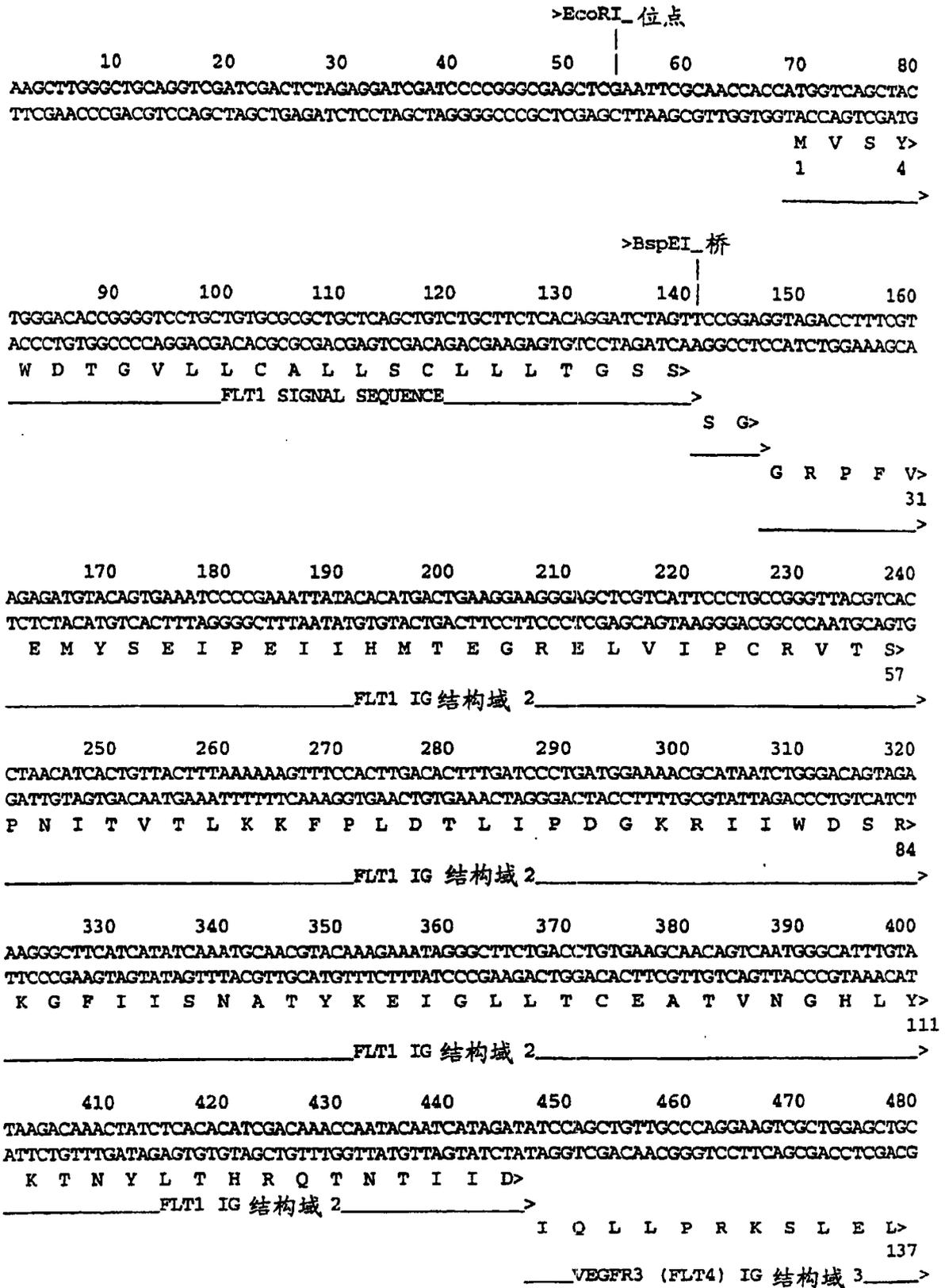


图 22A

490 500 510 520 530 540 550 560
 TGGTAGGGGAGAAGCTGGTCCCTCAACTGCACCGTGTGGGGTGAGTTAACTCAGGTGTACCTTTGACTGGGACTACCCA
 ACCATCCCCTCTTCGACCAGGAGTTGACGTGGCACACCCGACTCAAATTGAGTCCACAGTGGAAACTGACCCCTGATGGGT
 L V G E K L V L N C T V W A E F N S G V T F D W D Y P>
 _____VEGFR3 (FLT4) IG 结构域 3_____>

570 580 590 600 610 620 630 640
 GGAAGCAGGCAGAGCGGGTAAGTGGGTGCCCGAGCGACGCTCCCAACAGACCCACACAGAATCTCCAGCATCCTGAC
 CCCTTCGTCCGTCTCGCCCCATTCACCCACGGGCTCGCTGCGAGGGTTGTCTGGGTGTGTCTTGAGAGGTGCTAGGACTG
 G K Q A E R G K W V P E R R S Q Q T H T E L S S I L T>
 _____VEGFR3 (FLT4) IG 结构域 3_____>

650 660 670 680 690 700 710 720
 CATCCACAACGTCAGCCAGCAGACCTGGGCTCGTATGTGTGCAAGGCCAACAACGGCATCCAGCGATTTCCGGGAGAGCA
 GTAGGTGTTGCGAGTCCGTGCTGGACCCGAGCATAACACAGTTCGGGTGTTGCGGTAGGTGCTAAAGCCCTCTCGT
 I H N V S Q H D L G S Y V C K A N N G I Q R F R E S>
 _____VEGFR3 (FLT4) IG 结构域 3_____>

730 740 750 760 770 780 790 800
 CCGAGGTCAATGTGCATGAAAATGGCCCGGGCGACAAAATCACACATGCCACCGTCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
 GGCTCCAGTAACAGTACTTTTACCGGGCCCGCTGTTTGTAGTGTGTACGGGTGGCACGGGTGCTGGACTTGAGGACCCC
 T E V I V H E N>
 _____VEGFR3 (FLT4) IG_____>

G P G>
 _____>
 D K T H T C P P C P A P E L L G>
 _____FCAC1 - A 同种异型_____>

810 820 830 840 850 860 870 880
 GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT
 CCTGGCAGTCAGAAGGAGAAGGGGGTTTGGGTTCCTGTGGGAGTACTAGAGGGCCCTGGGGACTCCAGTGTACGCCACCA
 G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V>
 _____FCAC1 - A同种异型_____>

890 900 910 920 930 940 950 960
 GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
 CCACCTGCACTCGGTGCTTCTGGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCACCTGCCGCACCTCCACGTATTACGGTTCTGTT
 V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T>
 _____FCAC1 - A 同种异型_____>

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 AGCCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTACGGTCCCTCACCGTCCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 TCGCGGCCCTCCTCGTCATGTTGTCGTGCATGGCACACCAAGTTCGAGGAGTGGCAGGACGTGGTCTGACCGACTTACCG
 K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G>
 _____FCAC1 - A 同种异型_____>

图 22B

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCC
 TTCCTCATGTTACAGTTCAGAGGTGTTTCGGGAGGGTTCGGGGTAGCTCTTTTGGTAGAGGTTTCGGTTTCCCCTCGG
 K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P >
 351
 _____FCAC1 - A同种异型_____>

>A>C_A_ 同种异型

>G>T_A_ 同种异型

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCA
 GGCTCTTGGTGTCCACATGTGGGACGGGGTAGGGCCCTACTCGACTGGTTCCTGGTCCAGTCCGGACTGGACGGACCAGT
 R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V >
 377
 _____FCAC1 - A同种异型_____>

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTCCC
 TTCCGAAGATAGGGTCGCTGTAGCGGCACCTCACCCCTCTCGTTACCCGTCGGCCTCTTGTGTGATGTTCTGGTCCGGAGGG
 K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P >
 404
 _____FCAC1 - A同种异型_____>

>T>C

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
 CACGACCTGAGGCTGCCGAGGAAGAAGGAGATATCGTTCGAGTGGCACCTGTTCTCGTCCACCGTCGTCCTCCCTTCAGAA
 V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F >
 431
 _____FCAC1 - A同种异型_____>

>NotI_位点

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 CTCATGCTCGGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGCGG
 GAGTACGAGGCACCTACGTACTCCGAGACGTGTTGGTIGATGTGCGTCTTCTCGGAGAGGGACAGAGGCCCATTTACTCGCC
 S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K * >
 455
 _____FCAC1 - A同种异型_____>

CCGC
GGCG

图 22C

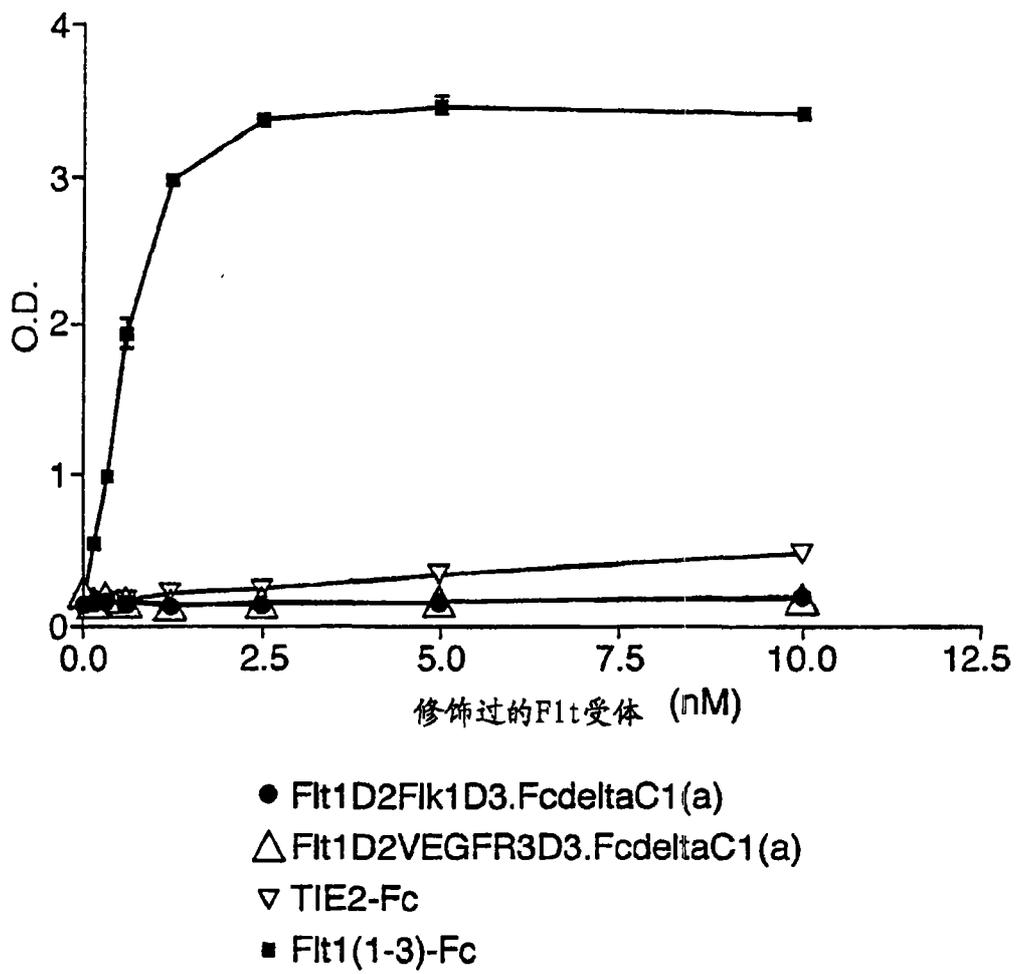


图 23

```

      10          20          30          40          50          60
      *          *          *          *          *          *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
M V S Y W D T G V L L C A L L S C L L L>
1_____5_____hFLT1 信号序列_____15_____20>

      70          80          90          100          110          120
      *          *          *          *          *          *
ACA GGA TCT AGT TCC GGA AGT GAT ACC GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC
TGT CCT AGA TCA AGG CCT TCA CTA TGG CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG
T G S S S G>
21_hFLT1 SIGNAL SEQ_26>
      S D T G R P F V E M Y S E I>
      27_____30_____hFLT1 IG 结构域 2_____40>

      130          140          150          160          170          180
      *          *          *          *          *          *
CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CCG GTT ACG TCA
GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT
P E I I H M T E G R E L V I P C R V T S>
41_____45_____hFLT1 IG 结构域 2_____55_____60>

      190          200          210          220          230          240
      *          *          *          *          *          *
CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA
GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT
P N I T V T L K K F P L D T L I P D G K>
61_____65_____hFLT1 IG 结构域 2_____75_____80>

      250          260          270          280          290          300
      *          *          *          *          *          *
CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA
GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT
R I I W D S R K G F I I S N A T Y K E I>
81_____85_____hFLT1 IG 结构域 2_____95_____100>

      310          320          330          340          350          360
      *          *          *          *          *          *
GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA
CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT
G L L T C E A T V N G H L Y K T N Y L T>
101_____105_____hFLT1 IG 结构域 2_____115_____120>

      370          380          390          400          410          420
      *          *          *          *          *          *
CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTG GTT CTG AGT CCG TCT CAT GGA ATT GAA CTA
GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAC CAA GAC TCA GGC AGA GTA CCT TAA CTT GAT
H R Q T N T I I D>
121_____hFLT1 IG 结构域 2_____129>
      V V L S P S H G I E L>
      130_____hFLK1 IG 结构域 3_____140>

```

图 24A

```

      430      440      450      460      470      480
      *        *        *        *        *        *
TCT GMT GGA GAA AAG CTT GTC TTA AAT TGT ACA GCA AGA ACT GAA CTA AAT GTG GGG AIT
AGA CAA CCT CTT TTC GAA CAG AAT TTA ACA TGT CGT TCT TGA CTT GAT TTA CAC CCC TAA
S V G E K L V L N C T A R T E L N V G I>
141_____145_____hFLK1 IG结构域3_____155_____160>

      490      500      510      520      530      540
      *        *        *        *        *        *
GAC TTC AAC TGG GAA TAC CCT TCT TGG AAG CAT CAG CAT AAG AAA CTT GTA AAC CGA GAC
CTG AAG TTG ACC CTT ATG GGA AGA AGC TTC GTA GTC GTA TTC TTT GAA CAT TTG GCT CTG
D F N W E Y P S S K H Q H K K L V N R D>
161_____165_____hFLK1 IG结构域3_____175_____180>

      550      560      570      580      590      600
      *        *        *        *        *        *
CTA AAA ACC CAG TCT GGG AGT GAG ATG AAG AAA TTT TTG AGC ACC TTA ACT ATA GAT GGT
GAT TTT TGG GTC AGA CCC TCA CTC TAC TTC TTT AAA AAC TCG TGG AAT TGA TAT CTA CCA
L K T Q S G S E M K K F L S T L T I D G>
181_____185_____hFLK1 IG结构域3_____195_____200>

      610      620      630      640      650      660
      *        *        *        *        *        *
GTA ACC CGG AGT GAC CAA GGA TTG TAC ACC TGT GCA GCA TCC AGT GGG CTG ATG ACC AAG
CAT TGG GCC TCA CTG GTT CCT AAC ATG TGG ACA CGT CGT AGG TCA CCC GAC TAC TGG TTC
V T R S D Q G L Y T C A A S S G L M T K>
201_____205_____hFLK1 IG结构域3_____215_____220>

      670      680      690      700      710      720
      *        *        *        *        *        *
AAG AAC AGC ACA TTT GTC AGG GTC CAT GAA AAG GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC
TTC TTG TCG TGT AAA CAG TCC CAG GTA CTT TTC CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG
K N S T F V R V H E K>
221_____hFLK1 IG结构域3_____231>
      D K T H T C P P C>
      232_____hFCAC1 A_____240>

      730      740      750      760      770      780
      *        *        *        *        *        *
CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC
GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG
P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D>
241_____245_____hFCAC1 A_____255_____260>

      790      800      810      820      830      840
      *        *        *        *        *        *
ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA
TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT
T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E>
261_____265_____hFCAC1 A_____275_____280>

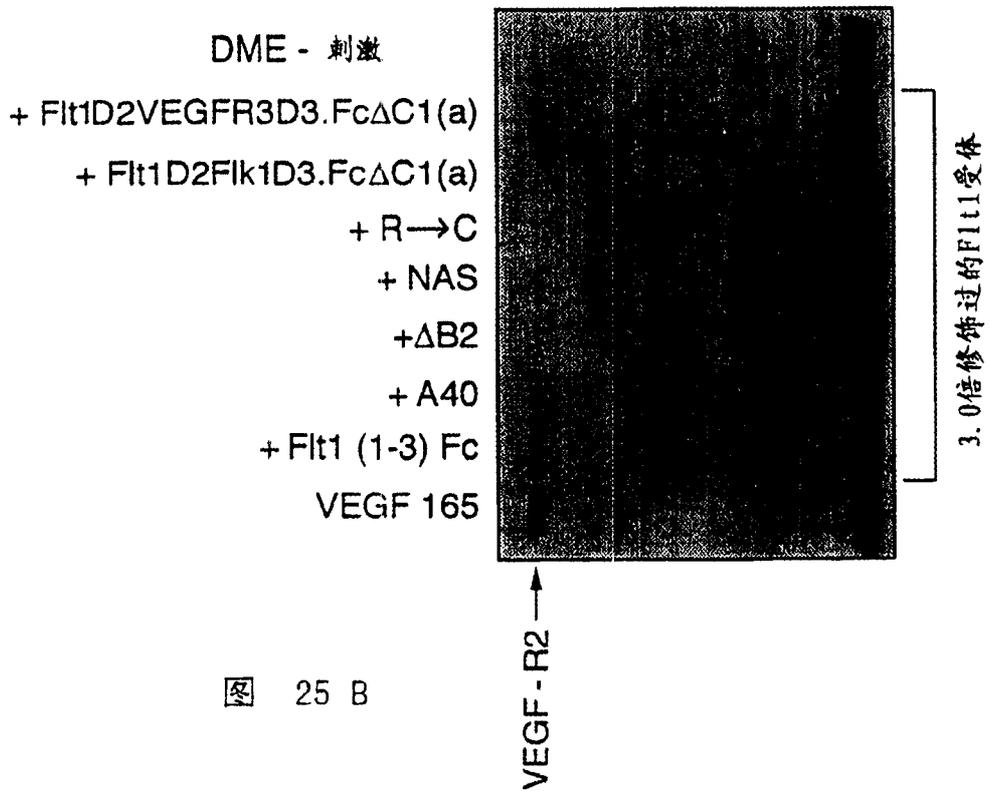
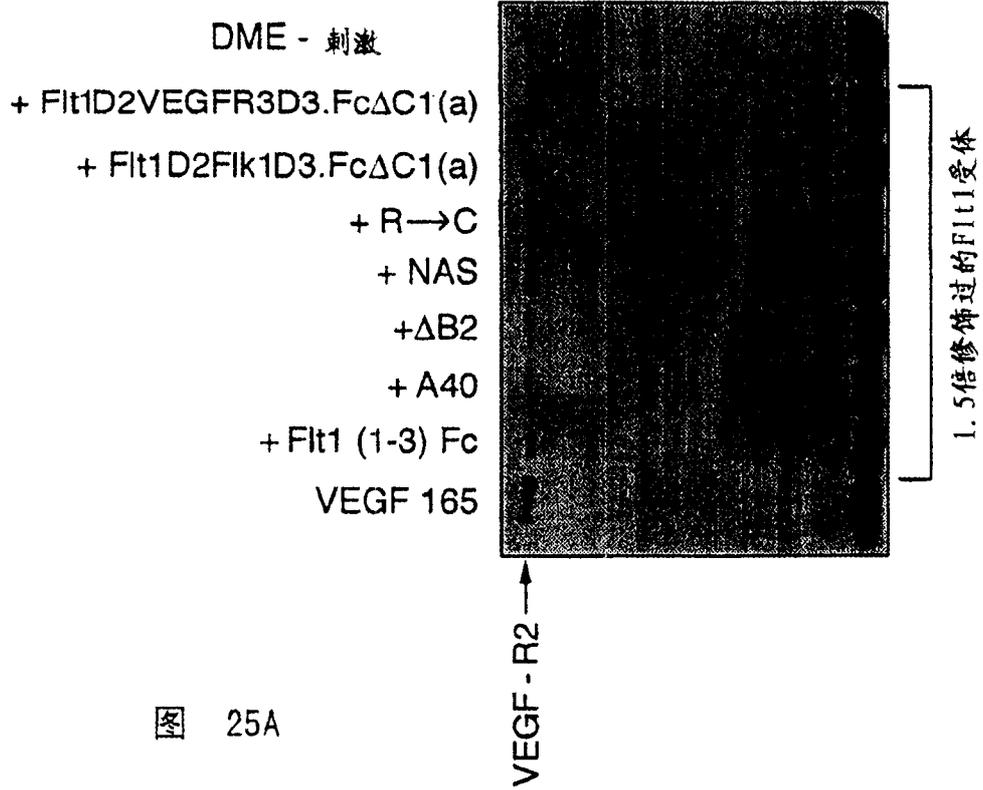
      850      860      870      880      890      900
      *        *        *        *        *        *
GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA
CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CCG TTC TGT
D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T>
281_____285_____hFCAC1 A_____295_____300>

```

图 24B

910	920	930	940	950	960
*	*	*	*	*	*
AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG					
TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC					
K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L>					
301_____305_____hFCAC1 A _____315_____320>					
970	980	990	1000	1010	1020
*	*	*	*	*	*
CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA					
GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGT					
H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P>					
321_____325_____hFCAC1 A _____335_____340>					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
*	*	*	*	*	*
GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC					
CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CCG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG					
A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y>					
341_____345_____hFCAC1 A _____355_____360>					
1090	1100	1110	1120	1130	1140
*	*	*	*	*	*
ACC CTG CCC CCA TCC CCG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC					
TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG					
T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V>					
361_____365_____hFCAC1 A _____375_____380>					
1150	1160	1170	1180	1190	1200
*	*	*	*	*	*
AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC					
TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CCG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG					
K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N>					
381_____385_____hFCAC1 A _____395_____400>					
1210	1220	1230	1240	1250	1260
*	*	*	*	*	*
AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG					
TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC					
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K>					
401_____405_____hFCAC1 A _____415_____420>					
1270	1280	1290	1300	1310	1320
*	*	*	*	*	*
CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT					
GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA					
L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H>					
421_____425_____hFCAC1 A _____435_____440>					
1330	1340	1350	1360	1370	
*	*	*	*	*	
GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA					
CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT					
E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *>					
441_____445_____hFCAC1 A _____455_____458_____>					

图 24C



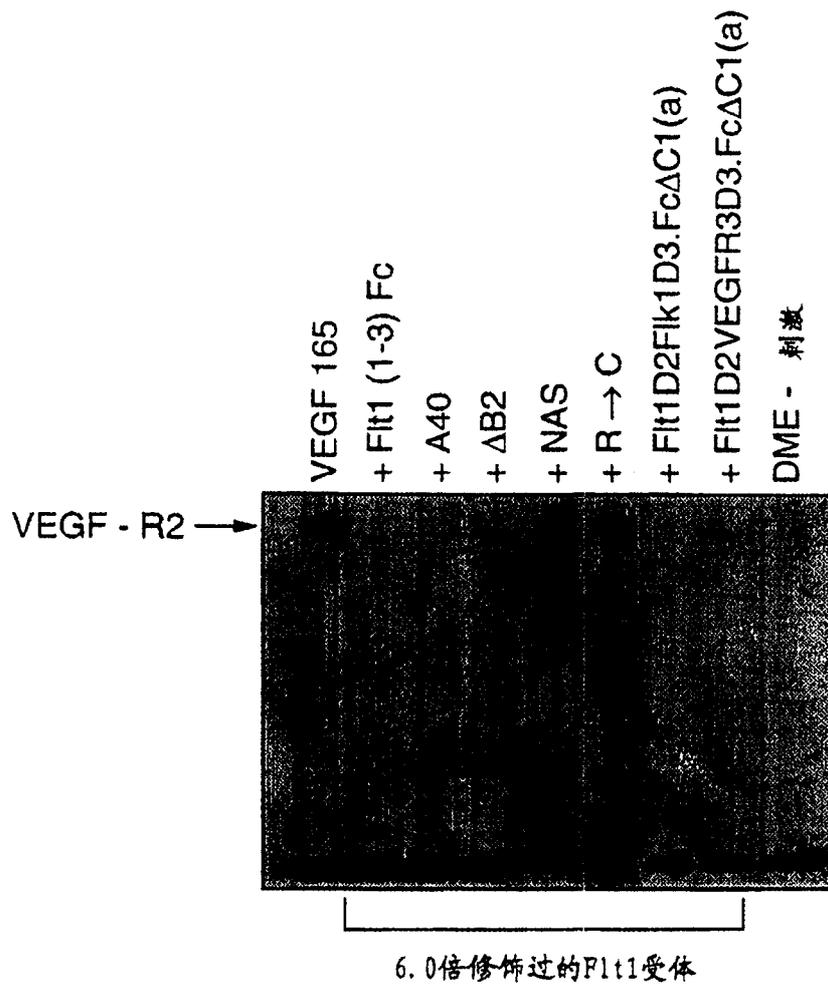


图 25C

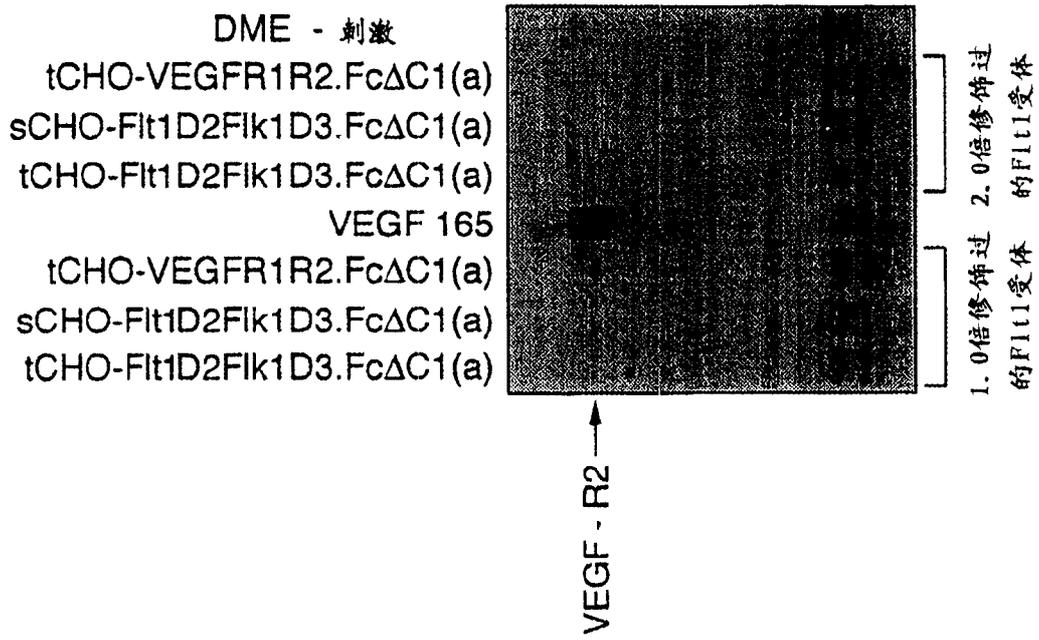


图 26A

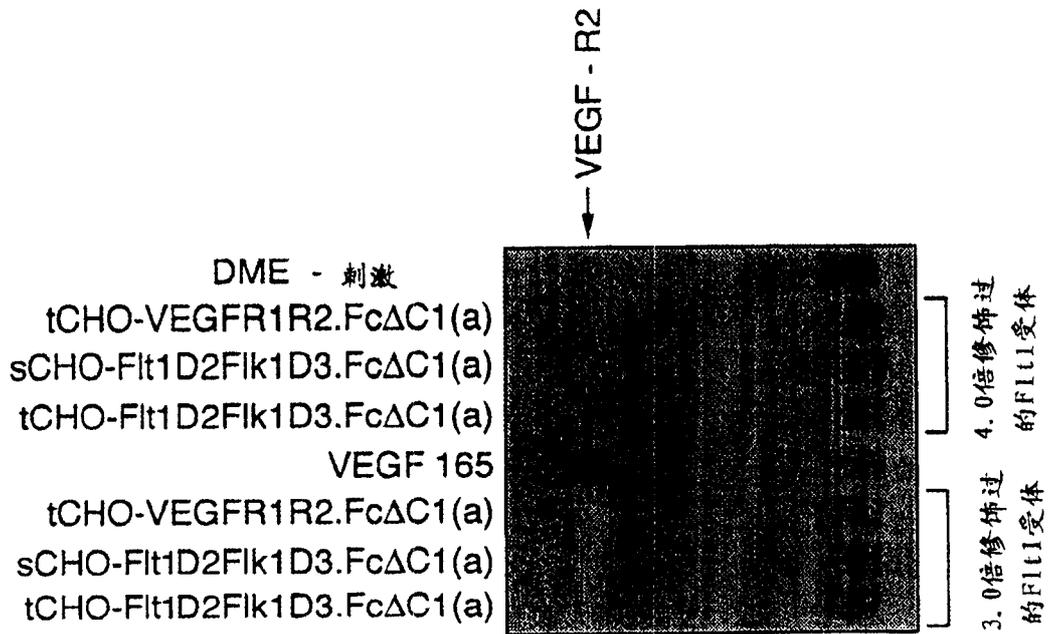


图 26B

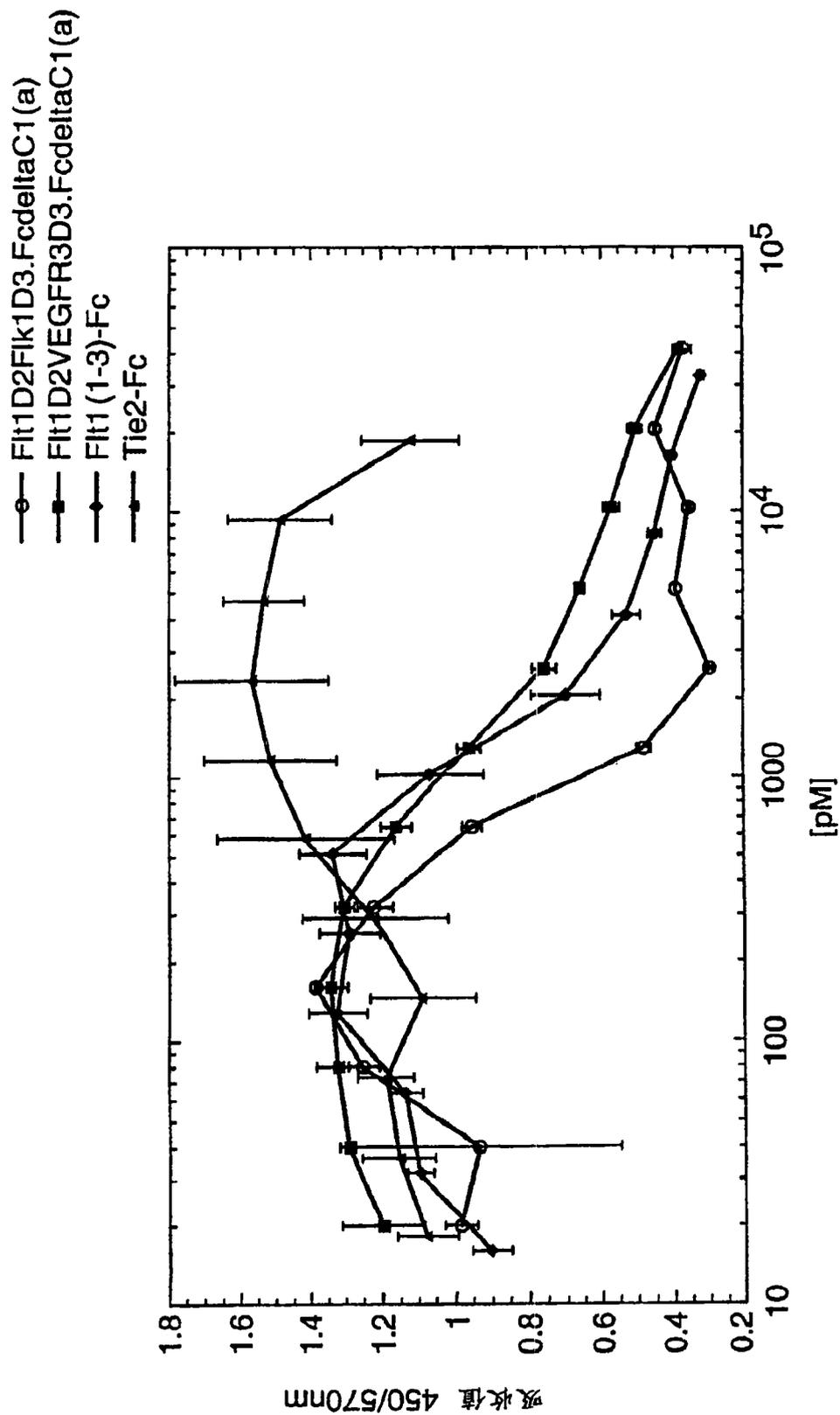


图 27

hVEGF165 与 Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) & VEGFR1R2-FcΔC1(a) 的结合化学计量学		
hVEGF165 (nM)	VEGF/Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)	VEGF/VEGFR1R2-FcΔC1(a)
1	0.93	0.98
10	0.97	0.94
50	1	0.99
平均值 ± 标准误差	0.96 ± 0.03	0.97 ± 0.02

图 28

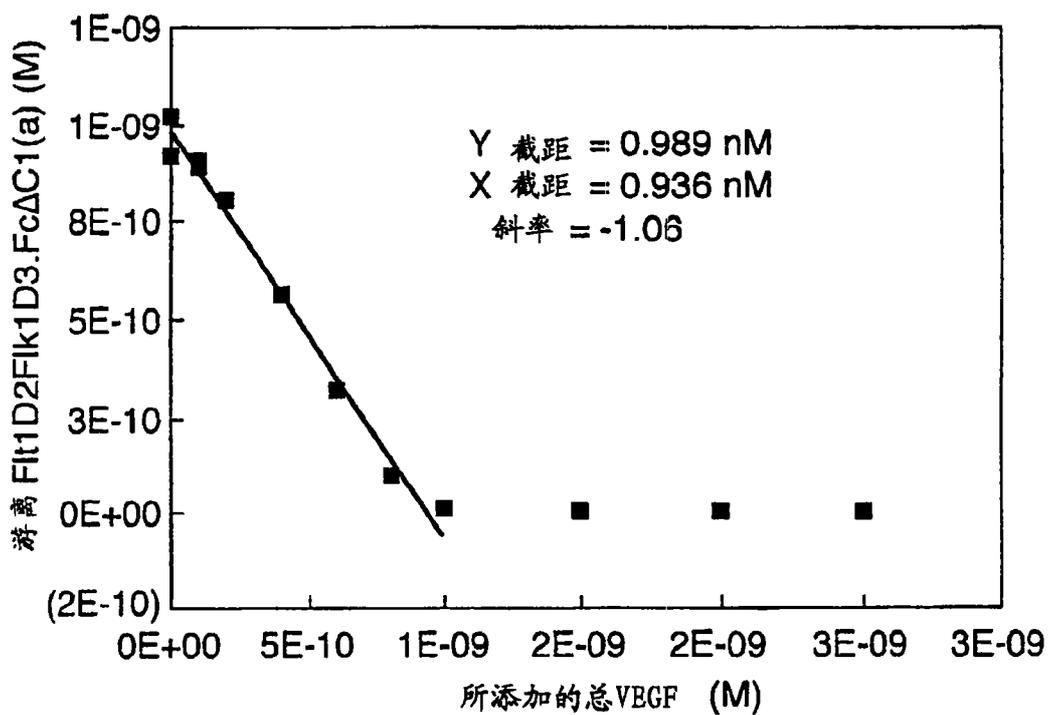


图 29

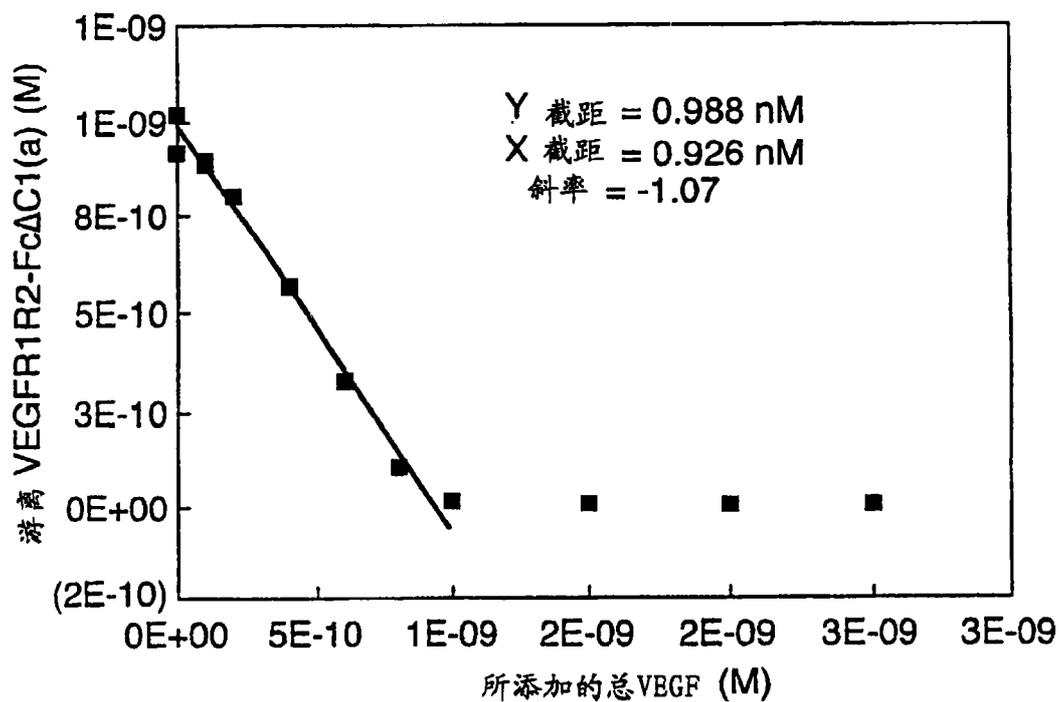


图 30

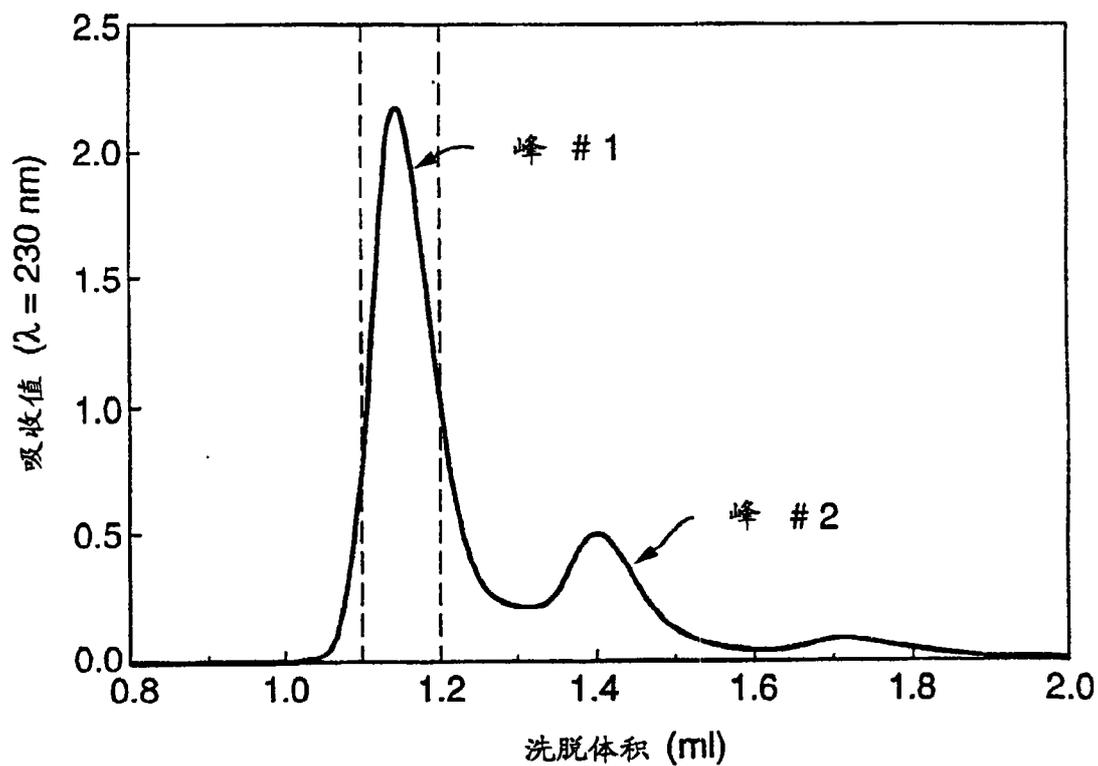


图 31

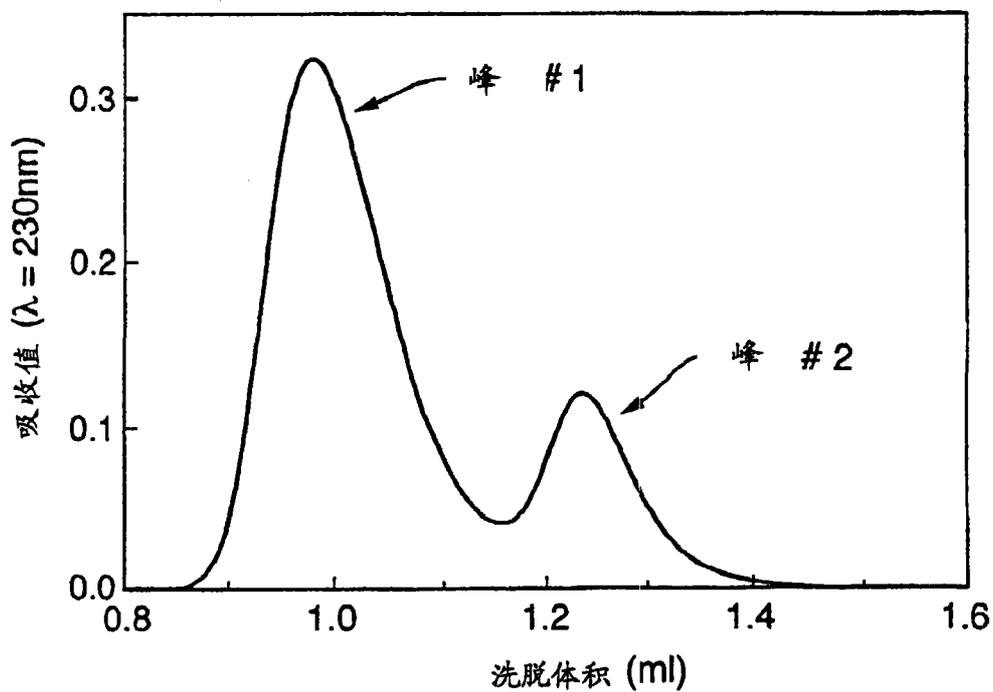


图 32

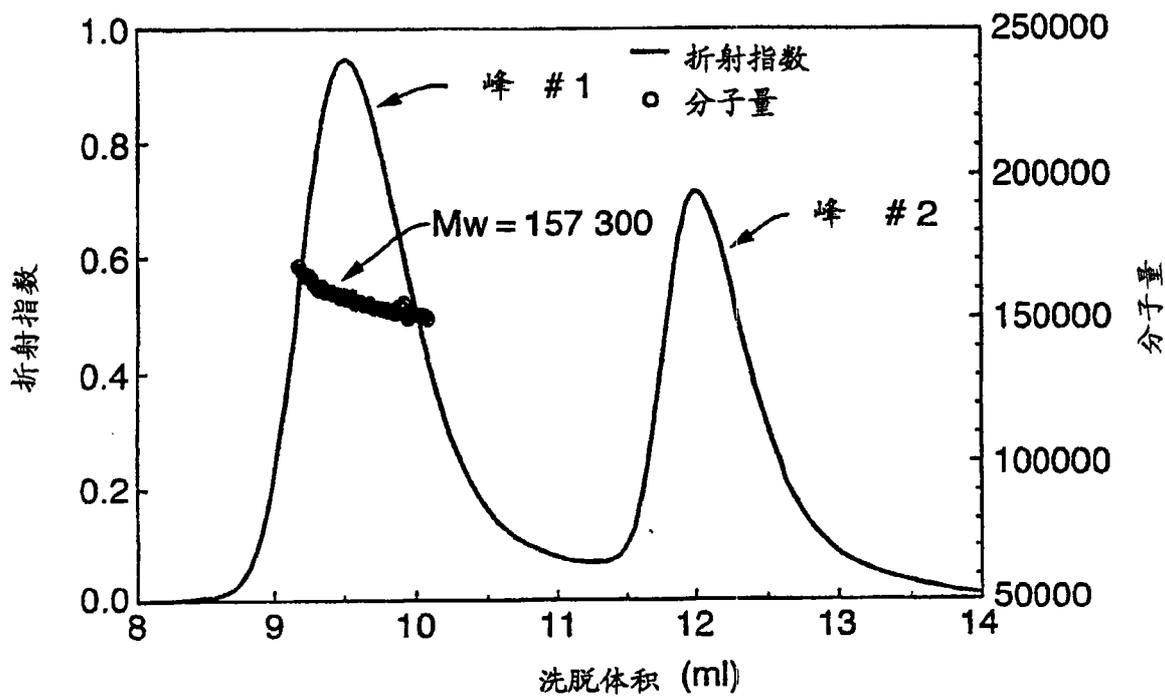


图 33

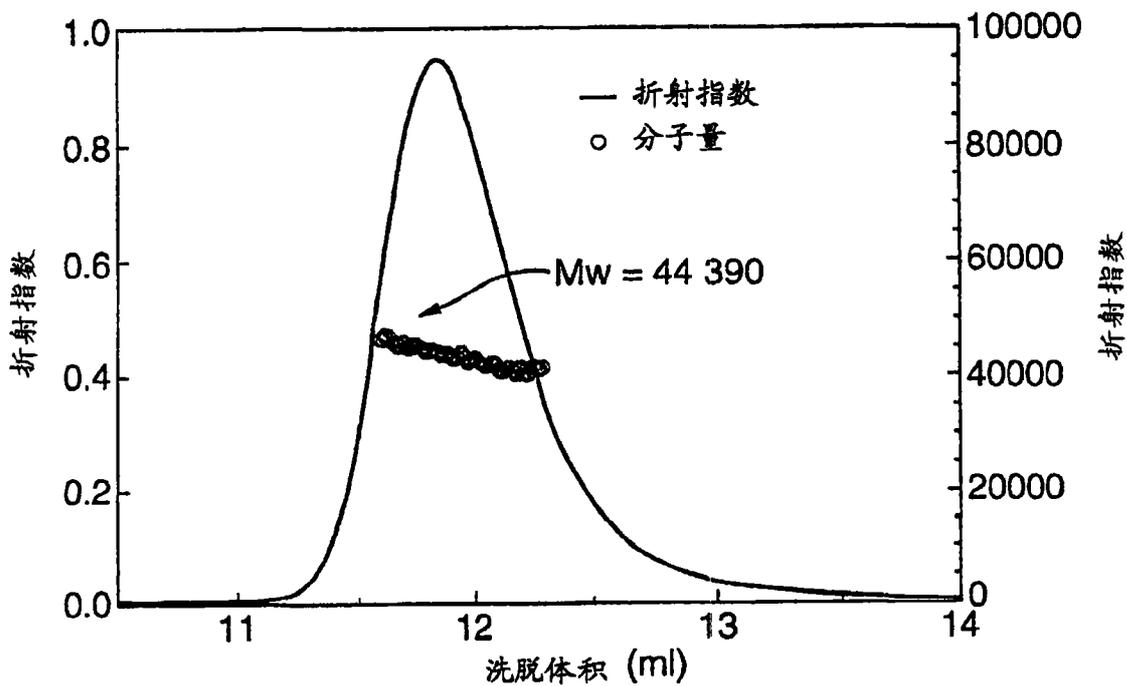


图 34

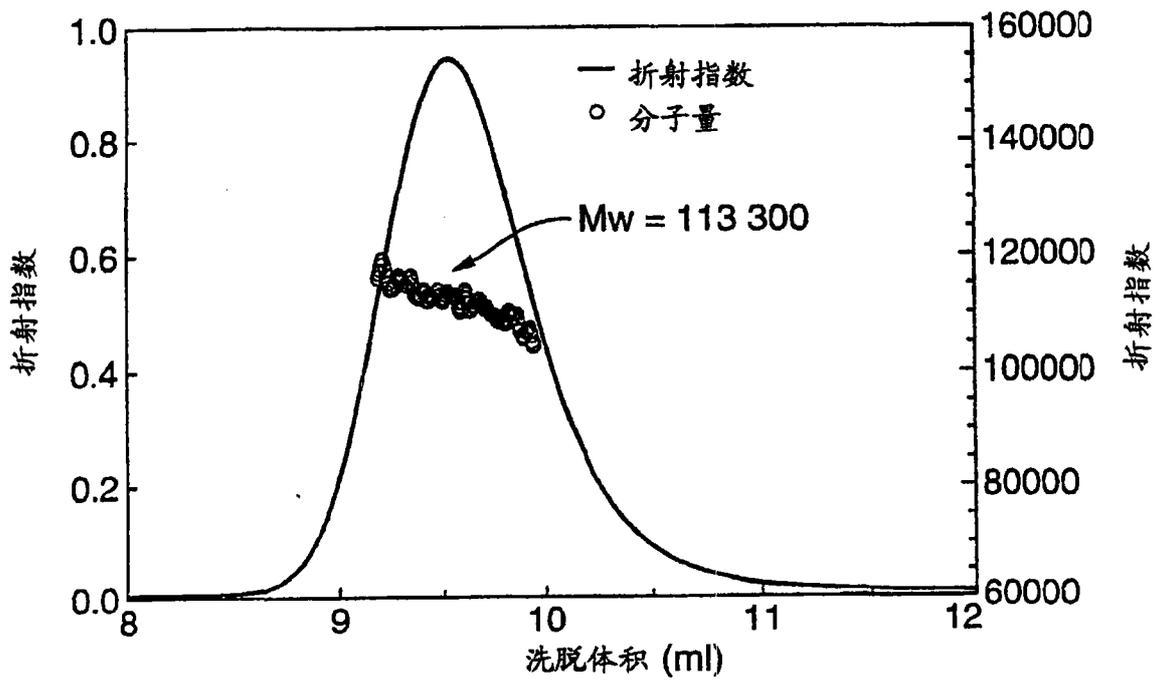


图 35

50
 GRPFVEMYSEIPEIHHMTEGRELVIPCRVTS¹PNITVTLKKFPLD¹TLIPDG
 100
 KRIIWD¹SRKGFII¹SN¹ATYKEIGLLT¹CEATVNGHL¹YK¹TNYL¹THRQ¹TNTIID
 150
 VVLS¹PSHGIELSVGEKLV¹NC¹TARTELV¹GD¹FNW¹EY¹PS¹SK¹HQ¹HK¹KL¹VNR
 200
 DLK¹TQSGSEM¹KK¹FL¹STL¹TID¹GV¹TRSD¹QGLY¹TCA¹ASSGL¹MT¹KK¹NS¹TF¹VR¹VH
 250
 EKG¹PGDK¹TH¹TC¹PPCP¹AP¹ELLGG¹PS¹V¹FL¹FP¹PK¹DK¹TL¹MIS¹RT¹PE¹VC¹V¹VD
 300
 VSHED¹PE¹V¹K¹FN¹W¹Y¹VD¹GV¹EV¹HNA¹KT¹K¹PRE¹EQ¹YN¹ST¹Y¹R¹V¹VS¹VL¹TV¹LHQ¹D¹W¹LN
 350
 GKEY¹K¹CK¹VS¹NK¹AL¹PA¹PIE¹KT¹ISK¹AK¹G¹Q¹PRE¹P¹Q¹VY¹TL¹PP¹SR¹DEL¹T¹KN¹Q¹VS¹L
 400
 T¹CL¹V¹K¹GF¹Y¹PS¹DI¹A¹VE¹WES¹NG¹Q¹PEN¹NY¹K¹T¹PP¹V¹LD¹SD¹GS¹FF¹LY¹SK¹L¹TV¹DK¹S
 RWQ¹Q¹GN¹V¹F¹S¹CS¹VM¹HE¹AL¹HN¹HY¹T¹Q¹KS¹LS¹SP¹GK

图 36

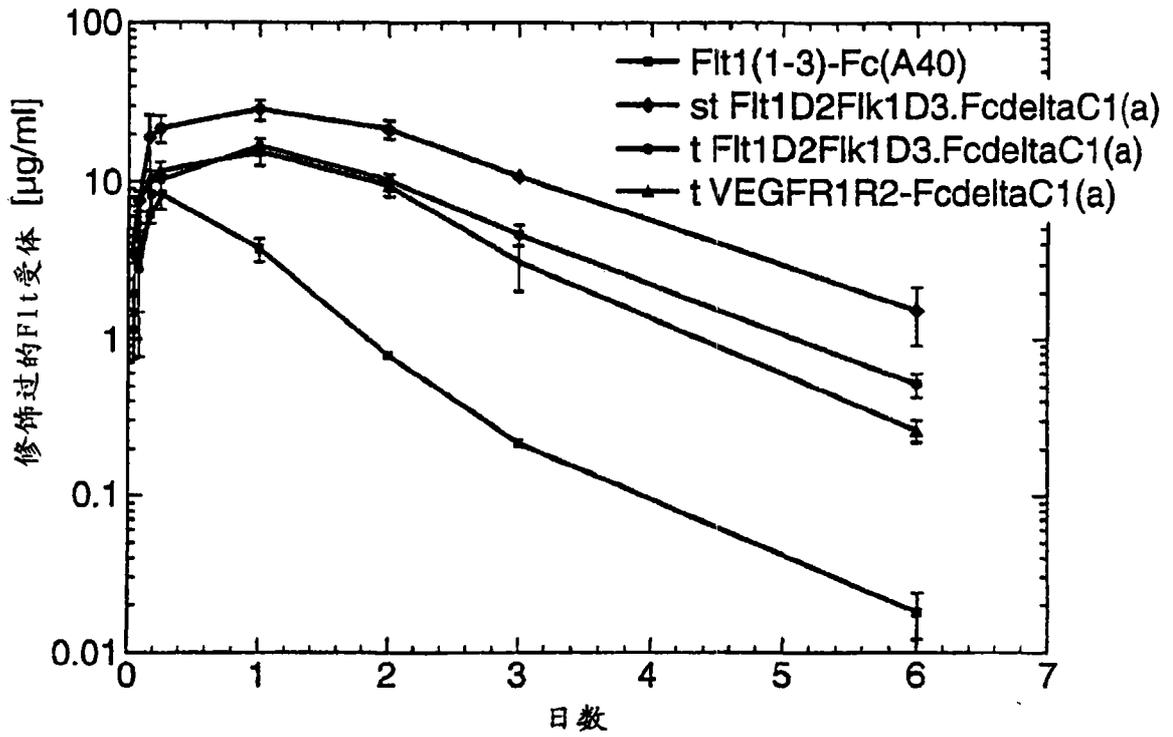


图 37

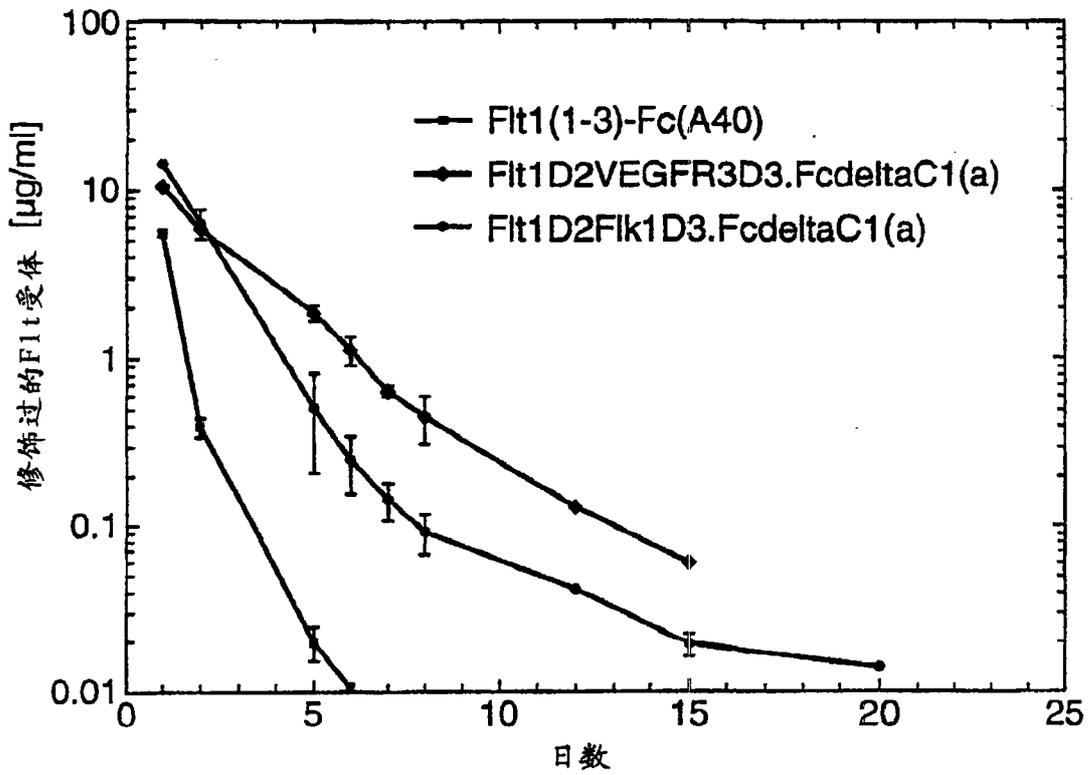


图 38

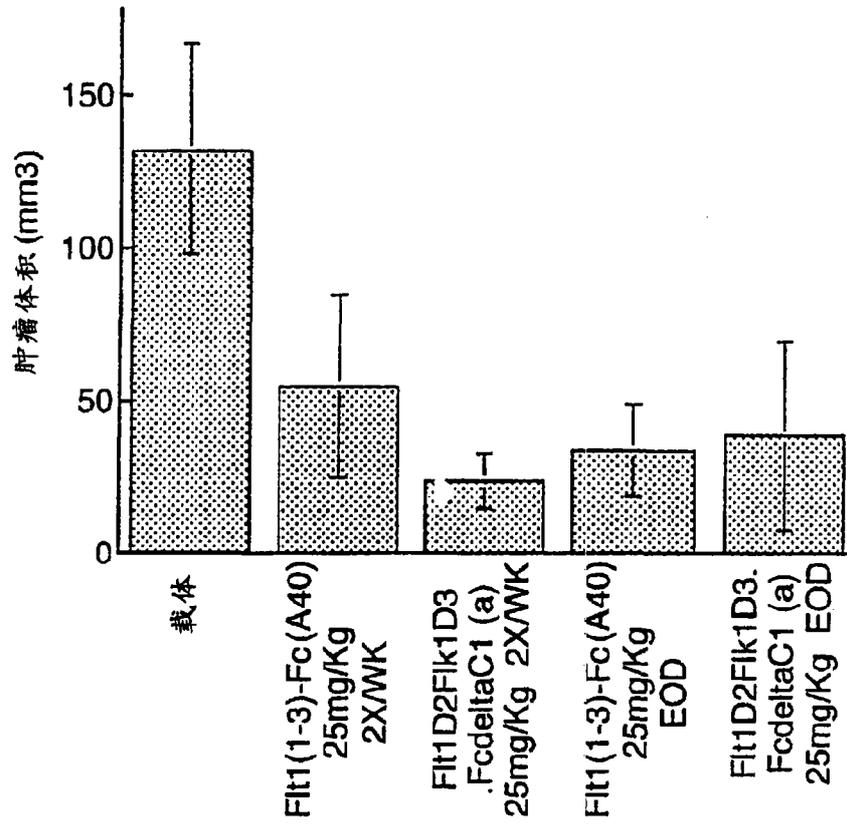


图 39

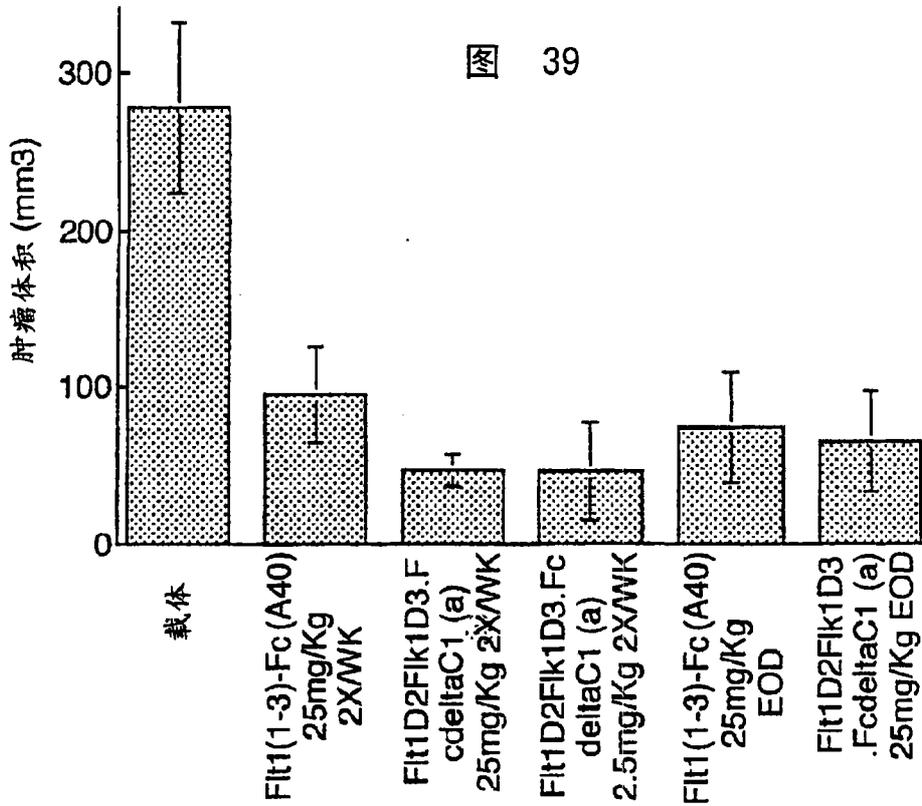


图 40

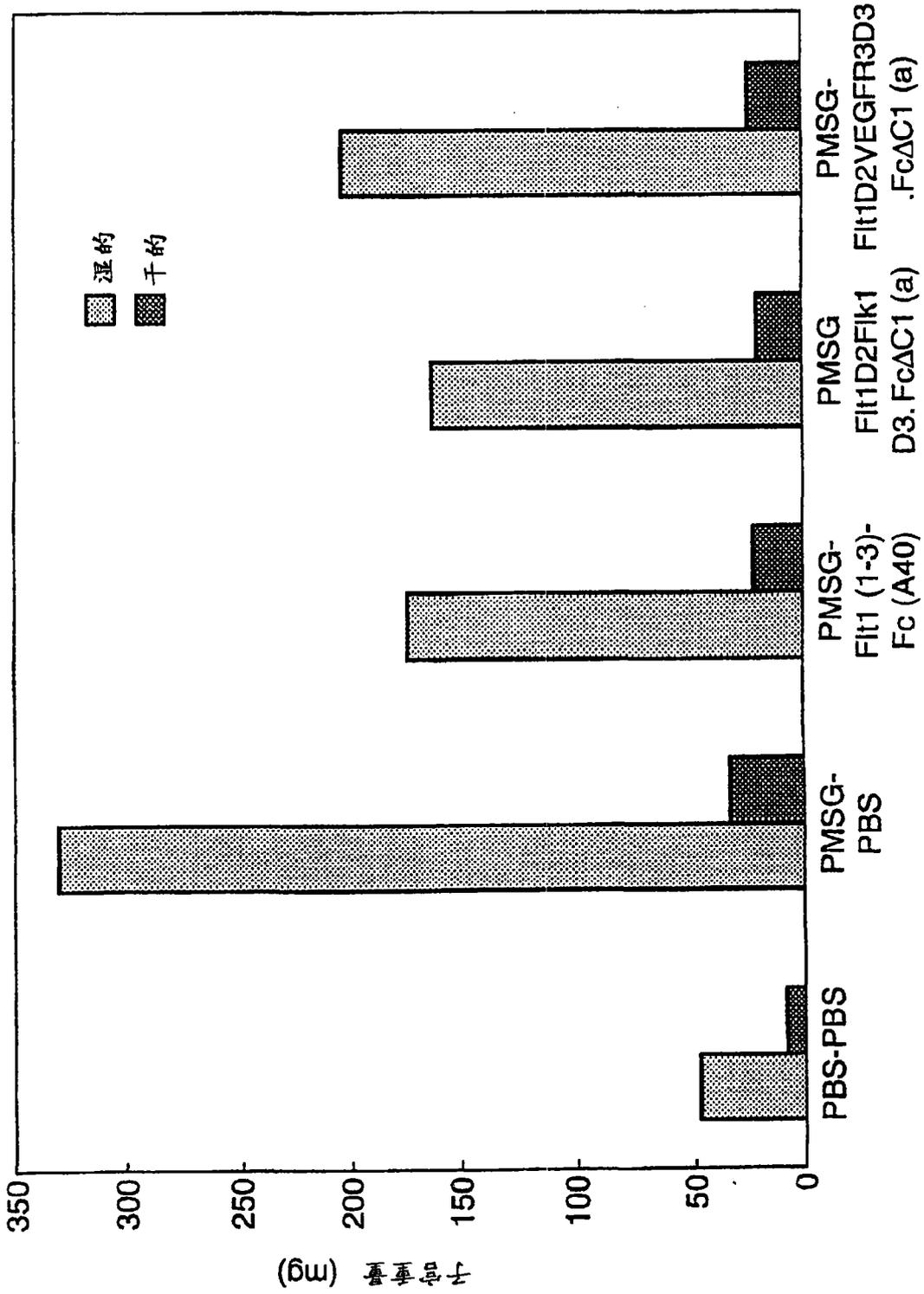


图 41

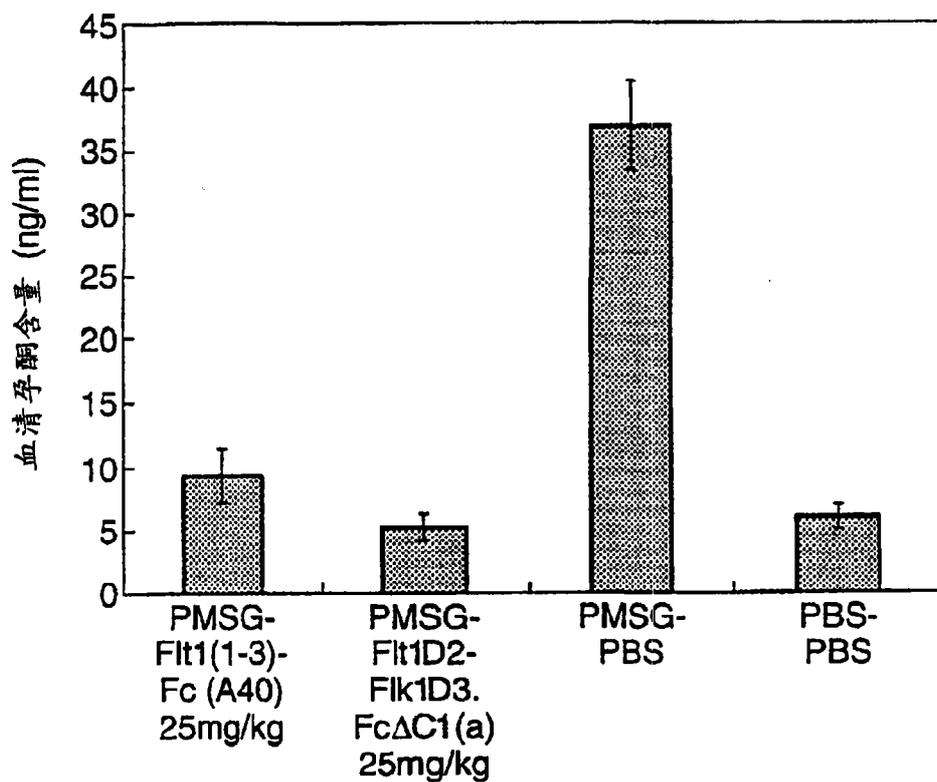


图 42A

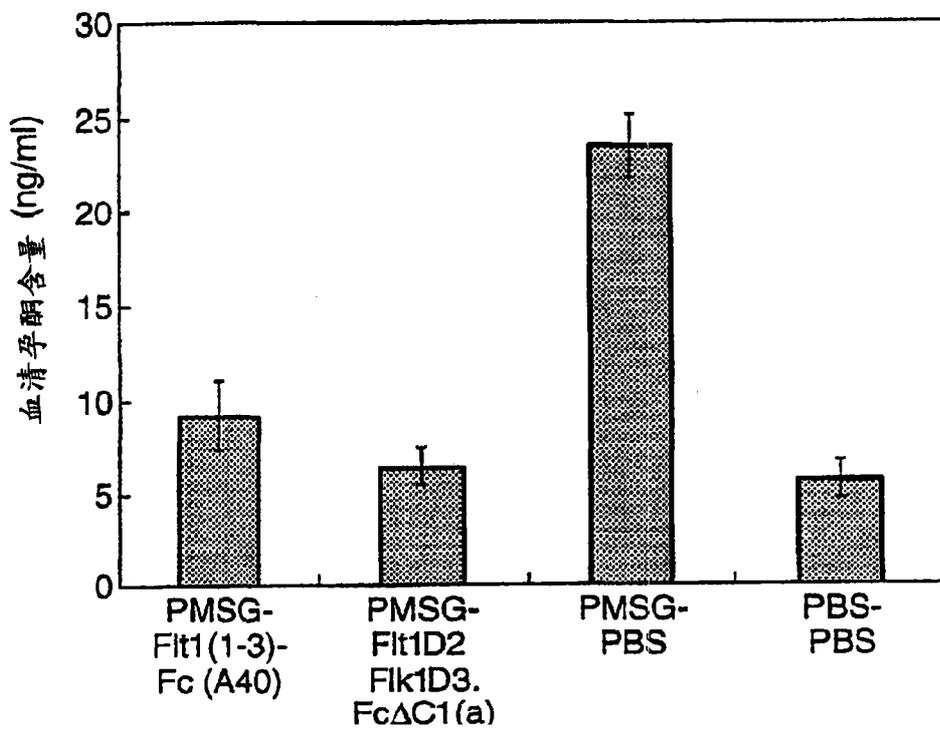


图 42B