

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：P3118P0P

※ 申請日期：P3-6-2P

※IPC 分類：C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

VEGF 阱及其治療用途

VEGF TRAPS AND THERAPEUTIC USES THEREOF

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

再生元醫藥公司

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

代表人：(中文/英文)

葛維塔/GREGG, VALETA

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國紐約州泰瑞市歐索米河路 777 號

777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

英國/U.K.

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1.達瑪斯/DALY, THOMAS J.

2.樊俊斯/FANDL, JAMES P.

3.帕尼可/PAPADOPOULOS, NICHOLAS J.

國 籍：(中文/英文)

1~3.均為：美國/U.S.A.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國 U.S.A.; 西元 2003 年 6 月 30 日; 10/609,775

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明背景

發明領域

本發明包含能結合血管內皮細胞生長因子(VEGF)之融合蛋白、VEGF 族成員、及具有特定所需特徵之接合變異體，以及使用彼等之治療方法。

【發明內容】

發明概述

於第一態樣中，本發明之特徵為一種經單離之編碼融合多肽之核酸分子，該融合多肽含有 $(R1R2)_X$ 及 / 或 $(R1R3)_Y$ 諸成分，其中 R1 為血管內皮細胞生長因子(VEGF)受體成分 Flt-1 之 Ig 功能部位 2 (Flt1D2)，R2 為 VEGF 受體成分 Flk-1 之 Ig 功能部位 3 (Flk1D3)，R3 為 VEGF 受體成分 Flt-4 之 Ig 功能部位 3 (FltD3 或 R3)，及其中 $X \geq 1$ ， $Y \geq 1$ 。

於相關之第二態樣中，本發明之特徵為含有 VEGF 受體成分 $(R1R2)_X$ 及 / 或 $(R1R3)_Y$ 之單體性 VEGF 阱，其中 $X \geq 1$ ， $Y \geq 1$ ，R1、R2、及 R3 如上文所界定。該 VEGF 受體成分 R1、R2、及 R3 可彼此直接連接或經由一或多個間隔序列相連接。於一特定具體實例中，該單體性 VEGF 阱為 $(R1R2)_X$ 其中 $X=2$ 。於又一特定具體實例中，該單體性 VEGF 阱為 SEQ ID NO:24，或其功能上相等之胺基酸變異體。本發明包含主要由 VEGF 受體成分 $(R1R2)_X$ 及 / 或

(R1R3)_Y 構成之單體性 VEGF 阱，及其功能上相等之胺基酸變異體。

於第三態樣中，本發明之特徵為一種經單離之編碼融合多肽之核酸分子，其中該融合多肽係由 VEGF 受體成分 (R1R2)_X 及 / 或 (R1R3)_Y，及多聚體化成分 (MC) 所構成，MC 係選自下述組群：(i) 含有可切割的區域 (C 區域) 之多聚體化成分、(ii) 平截之多聚體化成分、(iii) 具有至少一個半胱胺酸殘基之介於 1 至約 200 個胺基酸長之胺基酸序列、(iv) 白胺酸拉鍊 (leucine zipper)、(v) 螺旋環線主結構、(vi) 線圈-線圈主結構、及 (vii) 免疫球蛋白功能部位。本發明進一步包含主要由 (R1R2)_X 及 / 或 (R1R3)_Y、及 MC 構成之融合多肽。

於第四態樣中，本發明之特徵為一種融合多肽，其含有 VEGF 受體成分 (R1R2)_X 及 / 或 (R1R3)_Y，與 MC，其中 MC 係選自下述組群：(i) 含有可切割的區域 (C 區域) 之多聚體化成分、(ii) 平截之多聚體化成分、(iii) 具有至少一個半胱胺酸殘基之介於 1 至約 200 個胺基酸長之胺基酸序列、(iv) 白胺酸拉鍊、(v) 螺旋環線主結構、(vi) 線圈-線圈主結構、及 (vii) 免疫球蛋白功能部位。該等受體成分可依不同順序排列，例如，(R1R2)_X-MC；(R1R2)_X-MC-(R1R2)_X；MC-(R1R2)_X 等。融合多肽之諸成分可彼此直接連接或經由間隔序列相連接。

於第五態樣中，本發明之特徵為一種 VEGF 阱，其含有二或多個由 VEGF 受體成分 (R1R2)_X 及 / 或 (R1R3)_Y，與

MC 構成的融合多肽之多聚體，其中融合多肽之 MC 功能部位含有 C 區域。該 C 區域可為天然存在或為人工造成，及可發生於多聚體化成分內之任何位點，其功能為令母 MC 切割成為平截之 MC。由具有至少一個平截 MC 的二或多個融合蛋白構成的 VEGF 阱稱為「平截之小阱」。

利用插入、刪除、或突變，可於 MC 中製造 C 區域，俾使產生可酵素或化學切割之位點。可於任何 MC 及 MC 內之任何位置製造 C 區域；較佳為，於全長 Fc 功能部位，或其片段，或 C_{H3} 功能部位中製造 C 區域。C 區域可為可利用酵素，例如，凝血酶、無花果蛋白酶、胃蛋白酶、基質金屬蛋白酶、或脯胺酸酶予以切割，或利用，例如，甲酸或 $CuCl_2$ 予以切割之位點。

於第六相關態樣中，本發明之特徵為一種平截之 VEGF 小阱，其為含有二或多個由 $(R1R2)_x$ 及/或 $(R1R3)_y$ ，與多聚體化成分構成的融合多肽之多聚體蛋白質，其中該多聚體成分係由含有 C 區域的母 MC 切割而被平截者 (tMC)。於此具體實例中，本發明之平截小阱係利用將具有含 C 區域的 MC 之母阱置於使一或多個該含 C 區域的 MC 被切割之條件下而形成。於較佳具體實例中，該平截 VEGF 小阱具二聚體性，係利用將具有含 C 區域的 MC 之母阱置於使一或多個該含 C 區域的 MC 被切割之條件下而形成，其中 C 區域係位於母 MC 的一或多個半胱胺酸之 C 端。於另一具體實例中，該平截 VEGF 小阱具單體性，係利用將具有含 C 區域的 MC 之母阱置於使一或多個該含 C 區域的

MC 被切割之條件下而形成，其中 C 區域係位於母 MC 的一或多個半胱胺酸之 N 端。於此具體實例中，持有二或多個融合蛋白之含二硫鍵之 MC 區域被去除，該小阱由 $(R1R2)_x$ 構成。

於第七態樣中，本發明之特徵為由 VEGF 受體成分 $(R1R2)_x$ 及/或 $(R1R3)_y$ 與 MC 構成之融合多肽，其中該 MC 為含有至少一個半胱胺酸殘基之介於 1 至約 200 個胺基酸長之胺基酸序列，其中該至少一個半胱胺酸殘基能與存在另一融合多肽的 MC 中之半胱胺酸殘基形成二硫鍵 (cMC)。本發明此具體實例之例示示於 SEQ ID NO:27，其具有訊息序列(1-16)，隨後為 R1 (27-129)及 R2 (130-231)成分，接著為終止於半胱胺酸殘基的九個胺基酸序列。於另一具體實例中，示於 SEQ ID NO:28，其具有訊息序列(1-16)，隨後為 R1 (27-129)及 R2 (130-231)成分，接著為終止於半胱胺酸殘基的六個胺基酸序列。

於第八態樣中，本發明之特徵為一種 VEGF 小阱，其含有二或多個由 $(R1R2)_x$ 及/或 $(R1R3)_y$ 與 cMC 構成的融合多肽之多聚體。於更明確之具體實例中，該小阱為二聚體。本發明小阱之此具體實例之一例示為示於 SEQ ID NO:2 的融合蛋白之二聚體，其中各融合蛋白 $(R1R2-cMC)$ 具有 23.0 kD 之分子量及 9.22 之 pI。

於另一具體實例中，cMC 為含有兩個半胱胺酸殘基的 4 個胺基酸，例如 XCXC (SEQ ID NO:3)。於本發明此具體實例之一例示中，小阱由本發明 VEGF 受體成分及由 ACGC

組成的 cMC (SEQ ID NO:4)構成。本發明小阱此具體實例之一例示為示於 SEQ ID NO:5 的融合蛋白之二聚體，其中各單體具有 23.0 kD 之分子量及 9.22 之 pI。本發明此具體實例之另一例示示於 SEQ ID NO:26，其具有訊息序列 (1-16)，隨後為 R1 (27-129)及 R2 (130-231)成分，接著為終止於 CPPC 的九個胺基酸序列。

於本發明 VEGF 阱(包括平截之 VEGF 小阱、VEGF 小阱、及單體性 VEGF 小阱)之所有具體實例中，本發明融合多肽的開頭部分(或 N 端)含有訊息序列(S)。訊息序列可為原有的、為重組體、或係合成的。當訊息序列係連接於第一受體成分之 N 端時，則可將融合蛋白命名為，例如，S-(R1R2)_x。

本發明涵蓋含有本發明核酸分子之載體，包括含有操作性連接於表現調控序列的核酸分子之表現載體。本發明進一步涵蓋用於製造融合多肽之宿主-載體系，其包括於適當宿主細胞中之表現載體；其中適當宿主細胞為細菌、酵母、昆蟲、哺乳類細胞；大腸桿菌細胞、或 COS 或 CHO 細胞，之宿主-載體系。此外，亦涵蓋經乙醯基化或聚乙二醇化修飾之本發明之 VEGF 阱。使蛋白質乙醯基化或聚乙二醇化之方法為此項技藝中所悉知。

於相關之第九態樣中，本發明之特徵為製造本發明 VEGF 阱之方法，該方法包括於適於由宿主細胞表現蛋白質之條件下，培養經含有本發明核酸序列的載體轉染之宿主細胞，及回收如此製造之融合蛋白。

本發明之 VEGF 阱可治療性地用於處理藉由去除、抑制、或減少 VEGF 而被改善、減緩、或抑制之任何疾病或症狀。由抑制或減少 VEGF 而改善的特定症狀之非詳盡列表包含，例如，不為所欲之血漿滲漏或血管滲透、不為所欲之血管生長(例如，於腫瘤中)、與炎症病症(例如牛皮癬或關節炎，包括風濕性關節炎)相關之水腫；氣喘；與灼傷相關之全身性水腫；與腫瘤、發炎或外傷相關之腹水及肋膜積水；慢性氣管發炎；微血管滲漏併發症；敗血症；與蛋白質滲漏增加相關之腎臟疾病；胰管腺癌(PDAC)及眼睛疾病例如老年黃斑病變與糖尿病視網膜病變。VEGF 小阱特別適用於治療眼疾，及作為眼部手術(包括青光眼手術)之佐劑用。

因此，於第十態樣中，本發明之特徵為用於處理 VEGF 相關疾病或症狀之治療方法，該方法包括投與罹患 VEGF 相關疾病或症狀之患者本發明之 VEGF 阱，該患者較佳為罹患或瀕臨罹患可使用 VEGF 改善、減緩、抑制或治療之症狀或疾病的人類病患。

於第十一態樣中，本發明之進一步特徵為使用本發明小阱之診斷及預後方法，及供檢測、定量、及/或監控 VEGF 用之套組。

於第十二態樣中，本發明之特徵為含有本發明 VEGF 阱及醫藥上可接受的載劑之醫藥組成物。此等醫藥組成物可含二聚體融合蛋白阱、或編碼該融合多肽之核酸。本發明之小阱於其中 VEGF 阱具有較小的血清半衰期(例如，清

除較快)，及/或由於較小而組織滲透性增加為所需之狀況中找到特定用途。VEGF 小阱之特定用途包含，例如，需要於特定組織或細胞進行局部投與之疾病。此等症狀或疾病之實例為眼睛之眼疾。

本發明之其他目的及優點可由下文之詳細說明顯見。

發明之詳細說明

於敘述本發明之前，需瞭解的是，本發明不受限於任何特定方法、及所述之實驗條件，因為該等方法及條件可修改。亦需瞭解的是，本文所用的術語僅供說明特定具體實例之目的，而不擬構成局限，本發明之範圍只受限於隨附之專利申請範圍。

本說明書及隨附申請專利範圍中所用的單數型不定冠詞及定冠詞除非於文中明確指示，否則均包含複數型涉及物。因此，例如，於提及「方法」時，則包括一或多種方法，及/或本文論述類型之步驟，及/或其對熟習此項技藝人士而言，於閱讀本揭示內容後，為顯見者。

除非另行界定，否則本文所用的所有技術及科學名詞均具有一般為熟習本發明所屬之該項技藝人士所瞭解之相同意義。雖然可使用與本發明敘述者相同或相等之任何方法及材料實施或測試本發明，惟茲將於下文敘述較佳之方法及材料。本文提及的所有文獻均併入本文供參考，以敘述關於文獻所引用之方法及/或材料。

一般說明

本發明包含一種能結合及抑制 VEGF 活性之 VEGF

阱，其為含一或多種融合多肽之單體或多聚體。本發明分子與 VEGF 結合及抑制 VEGF 之生物活性及/或生理反應。關於以 VEGF 受體為基底的拮抗劑阱，Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) (SEQ ID Nos:7-8)與 VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) (SEQ ID Nos:9-10)，之說明見 PCT WO/0075319，其全部內容併入本文以資參考。

本發明之小阱比完整大小之阱小，例如，約 50 至 60 kD 對母阱之 120 kD，包括主要由 VEGF 受體功能部位 (R1R2)_x、(R1R3)_y、或其組合物構成之單體阱；由具有含切割區域(C 區域)的 MC 之多聚體化母阱之一部分被切割所產生之阱；或將半胱胺酸殘基或含一或多個半胱胺酸殘基的胺基酸序列連接於受體成分功能部位或連接於其間產生之阱。於特定具體實例中，本發明小阱以 SDS-PAGE 測定結果小於約 60 kD；較佳為，約 50 kD；又更佳為，約 20 至 30 kD；或約 25 kD；且能以可與見述於 PCT/US00/14142 之完整大小的母阱相較之親和力結合 VEGF。

核酸構築體及表現

本發明提供編碼融合蛋白的核酸分子之構築，其中該等融合蛋白能單獨結合 VEGF 或多聚體化之 VEGF 阱。本發明之核酸分子可編碼野生型 R1、R2、及/或 R3 受體成分，或其功能上相等之變異體。本發明諸阱之 R1、R2、及/或 R3 受體成分之胺基酸序列變異體亦可利用於編碼核酸分子中製造突變予以製備。此等變異體包含，例如，於

R1、R2、及/或 R3 胺基酸序列內發生胺基酸殘基之缺失、插入、或取代。可進行缺失、插入、及取代之任何組合以達成最終構築體，只要該最終構築體持有結合及 VEGF 的能力。

將彼等核酸分子插入載體中，其於引入適當宿主細胞內時，能表現該等融合蛋白。適當宿主細胞包含，惟不限於，細菌、酵母、昆蟲、及哺乳類細胞。熟習將 DNA 片段插入載體中之此項技藝人士已知之任何方法，於控制轉錄/轉譯調控訊息下，均可用於構築編碼本發明融合蛋白之表現載體。

本發明核酸分子之表現可由第二個核酸序列調控，使該分子於經重組 DNA 分子轉形之宿主中表現。例如，可利用此項技藝中已知之任何啟動子/增進子元件調控表現。可用來調控嵌合型多肽分子之表現之啟動子包含，惟不限於，長終端重複體 (Squinto et al. (1991) Cell 65:1-20)、SV40 早期啟動子區域、CMV、M-MuLV、胸腺核苷激酶啟動子、金屬巰基蛋白基因之調控序列；原核生物表現載體例如 b-內鹼胺酶啟動子、或 tac 啟動子(亦參見 Scientific American (1980) 242:74-94)；得自酵母或其他真菌之啟動子元件例如 Gal 4 啟動子、ADH、PGK、鹼性磷酸酶、及衍生自基因例如彈性蛋白酶 I 之組織特異性轉錄調控區域。

使用能於細菌或真核生物宿主中複製、含有本發明核酸分子的表現載體轉染宿主，因而直接表現該等核酸以製

造本發明之融合蛋白，形成能與 VEGF 結合之阱。經轉染之細胞可短暫地或，較佳為，組成性及永遠地表現本發明之 VEGF 阱。

本發明之阱可利用容許接續形成穩定、具生物活性的阱之任何技術予以純化。例如，惟不擬構成侷限地，該等因子可呈可溶性蛋白或呈包涵體自細胞中回收，利用 8M 胍鎳鹽酸鹽及透析自其中進行定量抽取(參見，例如，美國專利案 5,663,304)。為了進一步純化該等因子，可使用習知之離子交換層析法、疏水性交互作用層析法、逆相層析法或凝膠過濾法。

VEGF 受體成分

VEGF 小阱之 VEGF 受體成分由 Flt-1 之 Ig 功能部位 2 (Flt1D2) (R1)、Flk-1 之 Ig 功能部位 3 (Flk1D3) (R2) (一起，R1R2)、及/或 R1 與 Flt-4 之 Ig 功能部位 3 (FltD3) (R3) (一起，R1R3)構成。Flt-1、Flt-4、或 Flk-1 之「Ig 功能部位」一詞意欲包含不僅完整的野生型功能部位，亦包含其插入、缺失、及/或取代之變異體，該等變異體實質上保留完整功能部位之功能特性。熟習此項技藝人士將輕易地顯見，可獲得上述 Ig 功能部位之許多變異體，其實質上保留與野生型功能部位相同的功能特性。

關於 R1、R2、或 R3 所用之「功能相等物」意欲涵蓋具有至少一個改變(例如，缺失、添加、及/或取代)之 R1、R2、或 R3 功能部位，其實質上保留與野生型 R1、R2、或 R3 功能部位相同的功能特性，亦即，實質上相同地與 VEGF

結合。一般將認知，可於 R1、R2、或 R3 中進行各種胺基酸取代而不偏離有關彼等受體成分與 VEGF 結合及使其失活的能力之本發明精神。本發明諸阱之功能特性可用測量所需特性技藝中已知之任何適當篩選分析法予以測定。此等分析法之實例見述於下文實驗章節，其容許測定諸阱對於 VEGF 之結合特性(K_d)，以及阱-配位體複合物解離之半衰期($T_{1/2}$)。其他分析法，例如，與 VEGF 特異性結合的能力變化可利用競爭型 VEGF 結合分析法予以測定。蛋白質性質之修飾作用，例如熱穩定性、疏水性、對蛋白水解降解之感受性、或聚集之趨向性，可利用熟習此項技藝人士已知之方法予以測定。

與多聚體化成分(MC)一起時，彼等成分可依所需順序排列，例如， $(R1R2)_x$ -MC； $(R1R2)_x$ -MC- $(R1R2)_x$ ；MC- $(R1R2)_x$ 等。融合蛋白之諸成分可彼此直接連接或經由間隔子相連接。通常，「間隔子」(或連接子一詞意指可插入一或多個成分功能部位間之一或多個分子，例如，核酸或胺基酸、或非胜肽基團例如聚乙二醇。舉例而言，間隔序列可用於在諸成分之間提供所關注之希望位點，以利於操作。亦可提供間隔子以促進融合蛋白由宿主細胞表現，降低空間阻礙，俾使該成分呈現其最理想的三級結構及/或與其標的分子適當地互相作用。有關間隔子及鑑定所需間隔子之方法，參見，例如，George et al. (2003) Protein Engineering 15:871-879，特別併入本文以資參考。間隔序列可包含與受體成分自然連接之一或多個胺基酸，或可為

用於促進融合蛋白表現、特異性地提供所關注之希望位點、容許成分功能部位形成最理想的三級結構及/或促進成分與其標的分子互相作用之添加序列。於一具體實例中，間隔子包含介於一或多個成分間之一或多個胜肽序列，其為介於 1 至 100 個(較佳為 1 至 25 個)胺基酸。

於最明確之具體實例中，R1 為 SEQ ID NO:8 之胺基酸 27-126、或 SEQ ID NO:8 之 1-126 (包括訊息序列 1-26)；或 SEQ ID NO:10 之胺基酸 27-129、或 SEQ ID NO:10 之 1-129 (包括訊息序列 1-26)。於最明確之具體實例中，R2 為 SEQ ID NO:8 之胺基酸 127-228、或 SEQ ID NO:10 之 130-231。於最明確之具體實例中，R3 為 SEQ ID NO:13 之胺基酸 127-225 (不含訊息序列)。當，例如，R2 位於融合蛋白之 N 端時，則希望訊息序列在受體成分之前。與多聚體化成分相連接之受體成分可進一步包含間隔成分，例如，SEQ ID NO:7 之 GPG 胺基酸序列 229-231。

多聚體化成分

多聚體化成分(MC)為能與另一個 MC 相互作用形成較高級結構(例如，二聚體、三聚體等)之任何天然或合成序列。適當的 MC 可包含白胺酸拉鍊，包括衍生自 c-jun 或 c-fos 之白胺酸拉鍊功能部位；衍生自 κ 或 λ 輕鏈恒定區域之序列；合成序列例如螺旋-環線-螺旋主結構(Müller et al. (1998) FEBS Lett. 432:45-49)、線圈-線圈主結構等；或其他此項技藝中已知之廣被接受之多聚體化功能部位。於一具體實例中，多聚體化成分含有免疫球蛋白衍生之功能部

位，例如 IgG 分子之 Fc 功能部位。

平截 VEGF 小阱之產生

於本發明阱之一具體實例中，係藉由將具有含 C 區域的 MC 之母阱置於使一或多個該含 C 區域的 MC 被切割之條件下，而產生含有二或多個本發明融合蛋白之平截 VEGF 小阱。所得平截小阱可為母阱之完全及部分切割產物。

含 C 區域之 MC 可為能與另一個 MC 相互作用形成較高級結構(例如，二聚體或三聚體)之任何 MC。該 C 區域可於 MC 內之任何希望位置產生。按照下文提供之引導，熟習此項技藝人士將得以根據所得平截阱之所需性質，例如，分子量、單體性或二聚體性等，選擇希望產生 C 區域之位置。

於特定具體實例中，C 區域為插入 N 端 CPPC 序列 (SEQ ID NO:1) 之後的 Fc Δ C1 功能部位內之凝血酶切割位置 (LVPRGS) (SEQ ID NO:6)。於此具體實例中，一完整大小之 VEGF 母阱構築體呈 Fc-標記蛋白於細胞中表現，因而容許利用，例如，Protein A 管柱，予以獲取及純化。於形成二聚體及介於 CPPC 序列 (SEQ ID NO:1) 的一個或兩個半胱氨酸殘基間之共價鍵後，該二聚體在切割一個或兩個 Fc Δ C1 功能部位之條件下暴露於凝血酶，俾使產生平截之二聚體小阱，其分子量大約 50 kD 至 90 kD，且具有可與母阱相較之對 VEGF 之親和力。熟習此項技藝人士可控制該等切割條件，以利於部分切割產物或完全切割產物之形

成，切割條件係根據希望具有特定性質(例如分子量)之特定產物而選擇。

於特定具體實例中，C 區域為插入 CPPC 序列(SEQ ID NO:1) N 端的 Fc Δ C1 功能部位內之凝血酶切割位置(LVPRGS) (SEQ ID NO:6)。於形成二聚體及介於 CPPC 序列(SEQ ID NO:1)的一個或兩個半胱胺酸殘基間之共價鍵後，該二聚體在發生一個或兩個 Fc Δ C1 功能部位之條件下暴露於凝血酶，因而產生平截之單體小阱。如此產生的單體平截小阱含有受體成分及小片段 Fc，大小約為 25 kD，相較於平截二聚體阱及全長母阱，對 VEGF 之親和力減小。呈重組蛋白製得之一類似單體阱，證實具有約 1 nM 之 K_D 。

VEGF 小阱之產生

於一具體實例中，本發明之特徵為具有一或多個受體成分功能部位(R1R2)_x及/或(R1R3)_y及，視需要地，MC 功能部位之 VEGF 小阱，其中 $X \geq 1$ ， $Y \geq 1$ ，R1、R2、及 R3 如上文所界定，MC 功能部位為含有至少一個半胱胺酸殘基之介於 1 至約 200 個胺基酸長之胺基酸序列，其中該至少一個半胱胺酸殘基能與存在另一融合多肽的 MC 中之半胱胺酸殘基形成二硫鍵(cMC)。cMC 可發生於融合蛋白之 N 端或 C 端，或發生於兩個受體成分功能部位之間。於一特定具體實例中，半胱胺酸係添加於 VEGF 受體成分之 C 端，例如 R1R2_c，俾使該融合多肽經由在一融合多肽 C 端的半胱胺酸殘基與另一融合多肽 C 端的半胱胺酸殘基之

間形成共價二硫鍵而形成共價二聚體。此例中，小阱為示於 SEQ ID NO:2 的融合蛋白之二聚體，其中各融合蛋白(R1R2-cMC 或 R1R2_c)具有約 23.0 kD 之分子量。

於另一具體實例中，cMC 為含 4 個胺基酸(XXXX)之序列(SEQ ID NO:11)，其中 X 為任何胺基酸，及該序列含有至少一個半胱胺酸殘基。於特定具體實例中，cMC 係添加於受體成分功能部位之 C 端。於更明確之具體實例中，該 4 個胺基酸之序列為 ACGC (SEQ ID NO:4)，及該 cMC 形成兩個二硫鍵，半胱胺酸殘基存在第二個融合蛋白中。如下文(表 2)所示，兩個例示之小阱均展現與母阱可相較之對 VEGF 之親和力。

治療用途

本發明之 VEGF 小阱可治療性地用於處理藉由去除、抑制、或減少 VEGF 而被改善、減緩、抑制或預防之任何疾病或症狀。由抑制或減少 VEGF 而改善的特定症狀之非詳盡列表包含，其特徵為過度的血管內皮細胞增生之臨床症狀、血管滲透、水腫或炎症例如與受傷相關之腦水腫、中風或腫瘤；與炎症病症(例如牛皮癬或關節炎，包括風濕性關節炎)相關之水腫；氣喘；與灼傷相關之全身性水腫；與腫瘤、發炎或外傷相關之腹水及肋膜積水；慢性氣管發炎；微血管滲漏併發症；敗血症；與蛋白質滲漏增加相關之腎臟疾病；及眼睛疾病例如老年黃斑病變與糖尿病視網膜病變。

本發明組成物可治療性地用於處理與 VEGF 含量增加

相關的多種疾病。例如，誇張的 Th2 炎症及氣管變形為氣喘發病的特徵(參見，例如，Elias et al. (1999) J. Clin. Invest. 104:1001-6)。從罹患氣喘的病患的組織與生物性試樣中檢測出 VEGF 含量增加，其與疾病活性直接相關(Lee et al. (2001) J. Allergy Clin. Immunol. 107:1106-1108)，與氣管直徑及氣管感應逆相關。又，VEGF 被視為會促進氣喘組織水腫。

與 VEGF 增加相關之另一病症為胰管腺癌(PDAC)。此惡性腫瘤常展現內皮細胞增生之增大病灶，且常大量表現 VEGF (Ferrara (1999) J. Mol. Med. 77:527-543)。有 20% 以上因胃腸惡性腫瘤死亡係 PDAC 造成，使其在美國及其他工業化國家成為第四個最常見之有關癌症致死之因。實驗證據證實 VEGF 在胰臟癌中之重要角色，因此 VEGF 抑制劑具有成為減弱胰臟內腫瘤生長及局部與遠處轉移的治療劑之指望。

在大腸桿菌中表現之較小、未糖化之小阱(實例 4)、於 CHO 細胞中表現之糖化小阱(實例 5)、或以受體為基底之單體阱(實例 6)具有最理想之局部/玻璃體內傳遞特性，亦即血清半衰期較短可供迅速清除及將不為所欲之系統暴露減至最小。由於體積小，小阱於眼睛中具有滲透內限膜(ILM)的能力，經由玻璃體擴散至視網膜/視網膜色素上皮(RPE)細胞，有助於治療視網膜疾病。此外，小阱可用於局部投與，以治療例如脈絡膜血管增生、糖尿病性黃斑水腫、增生性糖尿病視網膜病變、角膜血管增生/移植排斥反應等

眼疾。再者，小阱可用於需要暫時(短期)封阻 VEGF，以避免長期暴露於 VEGF 封阻的任何情況，例如，用於牛皮癬的治療。

青光眼手術後，導致失敗的嚴重問題為早期發炎與血管新生，以及太侵犯性的傷口癒合。因此，本發明之 VEGF 阱可作為青光眼手術之佐劑用，以預防青光眼手術後早期血管-與淋巴血管新生及新添巨噬細胞至濾胞，改善手術結果。

組合治療

於許多具體實例中，小阱可與一或多種其他化合物或治療劑組合投與。例如，可一起投與多種小阱，或可結合一或多種小阱與一或多種治療性化合物投與。當本發明之阱去除 VEGF 時，該一或多種其他治療劑係用於預防或處理與 VEGF 存在相關之症狀者。結合使用本發明小阱與第二治療劑的好處為提供增進之效力及/或減少第二治療劑的毒性。

投與方法

本發明提供一種治療方法，該方法包括投與患者有效量的本發明 VEGF 小阱。於較佳態樣中，該小阱實質上經純化(例如，實質上不含限制其作用或產生不為所欲的副作用之物質)。患者較佳為哺乳動物，最佳為人類。

多種遞送系統為已知及可用於投與本發明製劑，例如，包埋於脂質體、微粒、微膠囊中、能表現化合物之重組細胞、受體傳介之內噬作用(參見，例如，Wu and Wu,

1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432)、構築核酸成為反轉錄病毒或其他載劑的一部分等。引入方法可為經腸或非經腸及包含，惟不限於，經皮內、肌內、腹膜內、靜脈內、皮下、鼻內、眼內、及經口途徑。化合物可利用任何方便途徑投與，例如，藉由輸注或推注注射、藉由透過上皮或黏膜皮膚襯裡(例如，月腔黏膜、直腸及小腸黏膜等)吸收，及可與其他生物活性製劑一起投與。投與可為全身性或局部性；可為急性或慢性(例如，每天、每週、每月等)；或與其他製劑組合投與。亦可採用肺部投與，例如，使用吸入器或噴霧器，及以氣溶膠劑調配。

於另一具體實例中，活性劑可於囊泡(特別是脂質體)中、於經控制之釋放系統中、或於泵中遞送。於另一具體實例中，本發明活性劑為編碼蛋白質之核酸，該核酸可利用將其構築為適當核酸表現載體的一部分投與使其位於細胞內[例如，藉由使用反轉錄病毒載體(參見，例如，美國專利案 4,980,286)、藉由直接注射、或藉由使用微粒轟擊法、或被覆脂質或細胞表面受體或轉染劑、或將其連接於已知可進入細胞核(參見例如，Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868)之似同源框的胜肽投與等]，如此進行活體內投與以促進其編碼蛋白質之表現。或者，可將核酸引入細胞內，及利用同源重組將其併入宿主細胞 DNA 中表現。

於特定具體實例中，可能希望將本發明醫藥組成物局部投與至需要治療的區域；此可例如，惟不限於，利用手

術期間之局部灌輸法、局部施敷法，例如，利用注射、使用套管、或利用移植物(該移植物可為多孔性、非多孔性、或為凝膠狀物質，包括膜，例如矽質膜、纖維、或市售皮膚代用品)，而達成。

用於實施本發明方法之組成物可為於溶液中、於懸浮液中、或於二者中含有本發明製劑之液體。「溶液/懸浮液」係指其中第一份活性劑存在溶液中及第二份活性劑呈顆粒形式，存在懸浮液液體基質中之液體組成物。液體組成物亦包含凝膠。液體組成物可為水性溶液或呈軟膏形式。再者，組成物可呈可插入眼睛中之固體物件之形式，例如插入眼睛與眼瞼之間或結膜囊中，於該處釋出 VEGF 阱。通常從該等物件釋出至角膜，或經由淚液或直接至角膜本身(此時固體物件通常直接接觸)。適於植入眼睛中之固體物件通常主要由生物腐蝕性或非生物腐蝕性聚合物構成。水性溶液及/或懸浮液可呈眼滴劑之形式。所需活性劑之劑量可利用於眼睛內投與所知滴數予以測量。例如，就每滴容積 25 微升而言，投與 1 至 6 滴將遞送 25 至 150 微升組成物。

用於實施本發明方法之水性懸浮液或溶液/懸浮液可含一或多種聚合物作為懸浮劑用。有用的聚合物包含水溶性聚合物例如纖維素聚合物及水不溶性聚合物例如交聯之含羧基聚合物。本發明之水性懸浮或溶液/懸浮液較佳為具黏稠性或黏膜黏著性，或甚至更佳為，同時具黏稠性及黏膜黏著性。

於另一具體實例中，用於實施本發明方法之組成物為可就地膠凝之水性組成物。此等組成物含有於接觸眼睛或淚液時，其濃度可有效促進膠凝現象之膠凝劑。適當的膠凝劑包含惟不限於熱固性聚合物。本文所用之「可就地膠凝」一詞不僅包含於接觸眼睛或淚液時即形成凝膠之具低黏稠性之液體，亦包含於投與眼睛時展現實質上增加之黏性或凝膠硬度之更為黏稠之液體，例如半流體及搖溶性凝膠。

診斷及篩檢方法

本發明之 VEGF 小阱可於診斷及/或篩檢方法中使用。例如，於臨床研究中，該阱可用於偵測 VEGF 含量，以評估治療效力。於另一具體實例中，本發明之方法與組成物係用於篩檢參加臨床研究的個體，以鑑定，例如，VEGF 含量太高或太低的個體。本發明之阱可於與 VEGF 的定位及活性相關技藝之已知方法中使用，例如，於適當生理試樣中，於診斷方法等中，測量及使其含量成像。

本發明之阱可於活體內及試管內篩檢方法中使用，以定量存在，例如，鑑定能降低 VEGF 表現的測試劑之篩檢方法中之未結合之 VEGF 量。更概括而言，本發明之阱可於需要定量及/或單離 VEGF 之任何分析法或方法中使用。

醫藥組成物

本發明亦提供含有本發明 VEGF 小阱之醫藥組成物。此等組成物含有治療有效量之一或多個小阱，及醫藥上可接受之載劑。「醫藥上可接受」一詞意指為聯邦或州政府管

理機構認可或列於美國藥典或其他一般認可之藥典上之用於動物，及更詳言之，用於人類者。「載劑」一詞係指用來投與治療劑之稀釋劑、佐劑、賦形劑、或載體。此等醫藥載劑可為無菌液體，例如水及油類，包括石油、動物、植物或合成來源者，例如花生油、大豆油、無機油、芝麻油等。適當的醫藥賦形劑包含澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、稻米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、一硬脂酸甘油酯、滑石、氯化鈉、脫脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。如果需要，則組成物亦可含少量潤濕劑或乳化劑、或 pH 緩衝劑。彼等組成物可為溶液、懸浮液、乳液、錠劑、丸劑、膠囊、粉劑、緩釋調配劑等形式。適當醫藥載劑之實例見述於 E.W. Martin 之 "Remington's Pharmaceutical Sciences"。

本發明之 VEGF 小阱可調配為中性或鹽等形式。醫藥上可接受之鹽包含與游離胺基形成者，例如衍生自鹽酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等者，及與游離羧基形成者，例如衍生自鈉、鉀、銨、鈣、鐵氫氧化物、異丙胺、三乙胺、2-乙胺基乙醇、組胺酸、普魯卡因(procaine)等者。

再者，用於實施本發明方法之水性組成物具有與眼睛相容的 pH 及滲透壓。於本發明組成物中可包含一或多種眼睛可接受的 pH 調整劑及/或緩衝劑，包括酸例如乙酸、硼酸、檸檬酸、乳酸、磷酸與鹽酸；鹼例如氫氧化鈉、磷酸鈉、硼酸鈉、檸檬酸鈉、乙酸鈉、與乳酸鈉；及緩衝劑例如檸檬酸鹽/右旋糖、碳酸氫鈉及氯化銨。此等酸、鹼、

與緩衝劑均涵蓋於維持組成物 pH 於眼睛可接受的範圍內所需之量中。組成物中可包含一或多種眼睛可接受之鹽，其量足以將組成物的滲透壓帶入眼睛可接受之範圍內。此等鹽包含具有鈉、鉀或銨等陽離子及氯、檸檬酸根、抗壞血酸根、硼酸根、磷酸根、碳酸氫根、硫酸根、硫代硫酸根或亞硫酸氫根等陰離子者。

對其意指治療用途具效力的本發明併之量可根據本發明之敘述，以標準臨床技術予以測定。此外，視需要可採用試管內分析法，幫助鑑定最理想之劑量範圍。一般而言，供靜脈內投與之適當劑量範圍通常每公斤體重為約 50 至 5000 微克活性化合物。供鼻內投與之適當劑量範圍通常約 0.01 奈克/公斤體重至 1 毫克/公斤體重。有效劑量可由得自試管內或動物模式測試系統之劑量-反應曲線外推。

供全身投與時，最初可由試管內分析法評估治療有效劑量。例如，可於動物模式中調配達到循環濃度範圍之劑量(包括細胞培養中測定之 IC_{50})。此等資訊可用於更精確地決定於人體中之有用劑量。初始劑量亦可由活體內數據予以評估，例如，於動物模式中，使用此項技藝中悉知之技術。熟習此項一般技藝之人士可根據動物數據容易地使對人體之投與最理想化。

個別調整劑量及投與間隔以提供足以維持治療效果之化合物之血漿含量。於局部投與或選擇性攝入之情形下，化合物之有效局部濃度可能與血漿濃度無關聯。熟習此項技藝人士於不需過度實驗下，即可定出最理想之治療有效

局部劑量。

當然，化合物之投與劑量係取決於所治療的患者、患者體重、病情嚴重性、投與方式、及開列處方醫師之判斷。於症狀可察覺或甚至當症狀尚不可察覺時，可間歇性地重複治療。可單獨提供治療或與其他藥物組合治療。

細胞轉染及基因療法

本發明涵蓋使用編碼融合多肽的核酸及本發明小阱供試管內及活體內之細胞轉染。彼等核酸可插入任何許多悉知之供標的細胞及生物轉染用之載體中。透過載體與標的細胞之相互作用，於活體外及活體內將核酸轉染至細胞中。投與患者組成物(例如，利用注射入肌肉中)，其量足以引起治療反應。足以達成此要求之量被界定為「治療有效劑量或量」。

於另一態樣中，本發明提供減少人類或其他動物 VEGF 含量之方法，包括以編碼本發明融合多肽的核酸轉染細胞，其中該核酸含有操作性地連接於編碼融合多肽或小阱的該核酸之可誘導啟動子。有關治療或預防人類疾病之基因治療程序，參見例如，Van Brunt (1998) Biotechnology 6:1149-1154。

套組

本發明亦提供含有裝填一或多種本發明醫藥組成物成分的一或多個容器之醫藥包或醫藥套組。視需要地，該等容器可聯繫著政府機構規定形式之規範醫藥品或生物性產物的製造、使用或銷售之告示，該告示反映(a)該機構所認

可之供人類投與用之製造、使用或銷售、(b)用法說明，或二者。

基因轉殖動物

本發明包含表現本發明小阱之基因轉殖非人動物。基因轉殖動物可藉由在受精卵細胞之雄性原核中引入核酸(例如，利用顯微注射、反轉錄病毒感染)，令該卵細胞於假孕雌性寄養動物中發育而產生。用於表現載體的任何調控或其他序列均可形成基因轉殖序列的一部分。組織特异性調控序列可操作性地連接於轉殖基因，以引導轉殖基因對特定細胞之表現。表現本發明融合多肽或小阱之基因轉殖非人動物有多種用途，包括為製造此等融合蛋白之工具。再者，可於誘導啟動子之控制下放置轉殖基因，俾使小阱或融合多肽之表現可藉由，例如，投與小分子，予以調控。

特定具體實例

於下述實驗中，產生較小的 VEGF 阱，並研究其結合 VEGF 的能力。此等小阱較佳為用於特定用途。例如，特定症狀或疾病之治療較佳為以 VEGF 阱局部投與特定器官、組織、或細胞，而非全身性投與。於本發明小阱之一具體實例中，利用直接切割 Fc 功能部位產生之具有切割區域(C 區域)之二聚體 VEGF 阱，產生較小的 VEGF 阱(實例 2)。該平截阱展現與完整大小的母阱可相較之對 VEGF 之親和力及半衰期。實例 3 至 5 敘述具有 VEGF 受體成分的融合蛋白及由一或多個半胱胺酸殘基組成的多聚體化成分

之構築。親和力之測定顯示，於大腸桿菌中表現的非糖化融合多肽或於 CHO 細胞中表現的糖化多肽具有與完整大小母阱可相較之對 VEGF 之親和力。實例 6 進一步說明能結合及抑制 VEGF 之由 (R1R2)₂ 組成之單體 VEGF 阱。

【實施方式】

實例

茲提出下文實例，俾使提供一般熟習此項技藝人士完整揭示內容及如何製造與使用本發明方法與組成物之說明，惟不擬對發明人所認定之發明範疇構成局限。有關所用的數值(例如，量、溫度等)均力求精確，惟一些實驗誤差及偏差應被慮及。除非另行指示，否則份數為重量份，分子量為平均分子量，溫度為攝氏溫度，壓力為常壓或接近常壓。

實例 1. Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a)之構築

母 VEGF 阱、Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) (SEQ ID Nos:7-8)、VEGFR1R2.Fc Δ C1(a) (SEQ ID Nos:9-10)、及 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1(a) (SEQ ID Nos:12-13)之構築詳細敘述於 PCT 公告案 WO/0075319，其完整內容特別併入本文以資參考。WO/0075319 中亦敘述編碼 VEGF 阱的核酸構築體之構築與表現方法、與 VEGF 結合的 VEGF 阱之檢測與測量方法、利用 BIAcore 分析法測定 VEGF 結合的化學計算法、及藥物動力學分析。

實例 2. 凝血酶切割之二聚體 VEGF 小阱

藉由在 Fc 功能部位 CPPC (SEQ ID NO:1)之後插入凝

血酶切割位置，以修飾 VEGFR1R2.Fc Δ C1(a) (SEQ ID Nos:9-10)構築體。於 37°C，使純化的 VEGF 阱(5 微克)與凝血酶(Novagen)一起，於 20 mM Tris-HCl、pH 8.4、50 mM NaCl、2.5 mM CaCl₂ 中培育 16 小時。對照組包括不含凝血酶下培育之切割對照蛋白(CCP)及母 VEGF 阱蛋白。SDS-PAGE 分析(Tris-Glycine 4-20%凝膠；每道 5 微克蛋白)證實切割正確(結果未示出)。

親和力測定。如 WO/0075319 中所述，針對母 VEGF 阱、含凝血酶切割位置之未切割之 VEGF 阱(「未切割之 VEGF 阱」)、經切割之 VEGF 小阱及重組單體 R1R2-myc myc his，測定各 VEGF 阱與 hVEGF₁₆₅ 結合之 K_d。詳言之，使用初級人類內皮細胞(HUVECs)測定諸阱封阻依賴 VEGF₁₆₅ 之受體磷酸化反應的能力。於不同濃度之諸測試阱存在下培育 VEGF₁₆₅，添加此混合物於 HUVECs，刺激 VEGFR2 之酪胺酸磷酸化反應。於 VEGF 阱之化學計量以下濃度時，未結合之 VEGF 誘發受體磷酸化反應。然而，當 VEGF 阱對配位體為 1:1 莫耳比或更大時，觀察到受體傳訊完全受封阻，證實單一分子之阱二聚體能封阻單一分子之人類 VEGF₁₆₅。因此，VEGF 阱對 VEGF 之高結合親和力造成複合物之形成，防止 VEGF 與細胞表面諸受體互相作用。對母 VEGF 阱、未切割之 VEGF 阱、及經切割之 VEGF 小阱進行相同的磷酸化反應抑制實驗獲得同樣結果，將結果示於表 1。

表 1

阱	動力學解離速率(1/s)	T _{1/2} (hr)
母 VEGF 阱	$5.51 \times 10^{-5} \pm 0.94\%$	3.5
未切割之 VEGF 阱	$4.93 \times 10^{-5} \pm 0.70\%$	3.9
經切割之 VEGF 小阱	$5.46 \times 10^{-5} \pm 0.62\%$	3.53
R1R2-myc myc his 單體	$6.74 \times 10^{-3} \pm 0.38\%$	0.028

實例 3. 編碼 VEGF 小阱的質體之構築

以母 VEGF 阱之前驅物，VEGFR1R2.Fc Δ C1(a) (SEQ ID Nos:9-10) [其中三個胺基酸，甘胺酸-丙胺酸-脯胺酸，係作為 Flk1 D3 與 Fc Δ C1(a)間之連接子用]，構築 VEGF 小阱。於 VEGF 小阱之構築中使用質體 pTE115，因為連接子 DNA 序列包含有助於建造 VEGF 阱之 Srf I 核酸內切限制酶識別序列。於所有其他態樣中，由 pTE115 編碼之 VEGF 阱與 PCT 公告案 WO/0075319 中詳述之 VEGFR1R2.Fc Δ C1(a) (SEQ ID Nos:9-10)VEGF 阱相同。

構築具有由單一半胱胺酸殘基(R1R2_C) (SEQ ID NO:2) 或胺基酸 ACGC (SEQ ID NO:4) (R1R2_{ACGC}) (SEQ ID NO:5) 添加於受體成分 Flt1D2.FlklD3 之 C 端構成之多聚體化功能部位的兩個 VEGF 小阱。此二構築體均能形成以一個 (R1R2_C)或兩個 (R1R2_{ACGC})分子間二硫鍵穩定之均二聚體分子。

去除以 Srf I 及 Not I 分解 pTE115 產生的 690 bp 片段，並插入由雜合 R1R2NC (SEQ ID NO:14)與 R1R2CC (SEQ ID NO:15)形成的合成 DNA 片段，製造質體 pTE517。所得質體編碼 R1R2_C，其係由後面跟隨半胱胺酸殘基之

Flt1D2.Flk1D3 功能部位 (SEQ ID NO:23) 構成。同樣地，去除以 Srf I 及 Not I 分解 Pte115 產生的 690 bp 片段，然後與雜合 R1R2NACGC (SEQ ID NO:16) 與 R1R2CACGC (SEQ ID NO:17) 形成的合成 DNA 片段連接，製造質體 pTE518。所得質體編碼 R1R2_{ACGC}，其係由後面跟隨胺基酸 ACGC (SEQ ID NO:25) 之 Flt1D2.Flk1D3 功能部位 (SEQ ID NO:25) 構成。

同時構築質體以引導彼等小阱於大腸桿菌中表現。使用引子 R1R2N-Nco-1 (SEQ ID NO:18) 及 R1R2CNot1 (SEQ ID NO:19) 來擴增 pTE115 中編碼相對於母 VEGF 阱 (SEQ ID NO:10) G30 至 K231 胺基酸之 DNA 片段。此序列之擴增導致 5' 端起始甲硫胺酸密碼子之融合，及 3' 端終止密碼子前的半胱胺酸密碼子之融合 (SEQ ID NO:2)。然後將此 DNA 片段轉殖入大腸桿菌表現質體 pRG663 之 Nco I 及 Not I 位置中，產生 pRG1102，俾使 R1R2_C 之表現依賴噬菌體 T7 Φ 1.1 啟動子之轉錄。誘導 pRG1102 基因表現導致 R1R2_{CYS} 在大腸桿菌宿主株 RFJ238 細胞質中蓄積。同樣地，使用引子 R1R2N-Nco-1 (SEQ ID NO:18) 及 R1R2ACGC-Not1 (SEQ ID NO:20) 來擴增 pTE115 中編碼 G30 至 K231 胺基酸 (SEQ ID NO:10) 之 DNA 片段，導致 5' 端起始甲硫胺酸密碼子之融合，及 3' 端終止密碼子前的 ACGC (SEQ ID NO:4) 密碼子之融合。然後將此片段轉殖入大腸桿菌表現質體 pRG663 之 Nco I 及 Not I 位置中，產生 pRG1103，俾使 R1R2_{ACGC} 之表現依賴噬菌體 T7 Φ 1.1 啟動子之轉錄。誘導

pRG1102 以及 pRG1103 二基因表現分別導致 R1R2_C 或 R1R2_{ACGC} 在大腸桿菌宿主株 RFJ238 細胞質中蓄積。

實例 4. 得自大腸桿菌的 VEGF 小阱之純化與鑑定

R1R2_C 及 R1R2_{ACGC} 二者均於大腸桿菌中呈細胞質蛋白表現，並以相同方法純化。於大腸桿菌 K12 菌株 RFJ238 中，噬菌體 T7 Φ 1.1 啟動子對 pRG1102 或 pRG1103 之誘導，導使蛋白質在細胞質中蓄積。誘導後，離心收集細胞，使其再懸浮於 50 mM Tris-HCl、pH 7.5、20 mM EDTA 中，通過 Niro-Soavi 細胞均質器，進行溶菌。離心，自溶菌細胞中收集包涵體，以蒸餾水洗滌一次，然後溶於 8 M 胍鎨-HCl、50 mM Tris-HCl、pH 8.5、100 mM 亞硫酸鈉、10 mM 連四硫酸鈉中，於室溫培育 16 小時。澄清的上澄液於已使用 6 M 胍鎨-HCl、50 mM Tris-HCl、pH 7.5 平衡之 S300 管柱上進行分級分離。收集含 R1R2_C 之級份，於 6M 尿素、50 mM Tris-HCl、pH 7.5 中進行透析。將透析後之蛋白質稀釋至 2M 尿素、50 mM Tris-HCl、pH 8.5、2 mM 半胱氨酸，然後於 4°C 緩緩攪拌 7 天。再折疊之蛋白質於 50 mM Tris-HCl、pH 7.5 中進行透析，然後裝填於已使用 50 mM Tris-HCl、pH 7.5 平衡之 SP-Sepharose 管柱上，以於 50 mM Tris-HCl、pH 7.5 中之 0 至 1 M NaCl 梯度溶洗。收集含 R1R2_C 之溶離份，離心，裝填於已使用 50 mM Tris-HCl、pH 7.5、150 mM NaCl 平衡之 Superdex 200 管柱上。收集含小阱二聚體之溶離份。純化的小阱利用 SDS-PAGE 進行評估，分子量為約 46 kD。

進行 BIAcore 分析(如 WO/0075319 所述)，測定阱對 VEGF 之親和力，結果顯示該等 R1R2_C 及 R1R2_{ACGC} 小阱具有與全長 VEGF 阱可相較之 VEGF 親和力(表 2)。

表 2

阱	動力學解離速率(1/s)	T _{1/2} (hr)
VEGF阱	4.23×10^{-5}	4.53
R1R2 _C	3.39×10^{-5}	5.68
R1R2 _{ACGC}	3.41×10^{-5}	5.65

實例 5. VEGF 小阱於 CHO K1 中之表現

由 pTE517 及 pTE518 編碼的 VEGF 小阱之表現係依賴人類 CMV-MIE 啟動子之轉錄，於 CHO 細胞中表現時，導致該等小阱分泌到培養液中。於呈分泌蛋白在 CHO K1 中表現時，二小阱均在條件化培養液中被發現，且如預期地，其分子量利用 SDS-PAGE 評估後顯示該等蛋白質均被糖化。SDS-PAGE 分析亦顯示，小阱能形成利用 C 端半胱胺酸間之分子間二硫鍵而穩定之均二聚體分子。詳言之，在 CHO 細胞中呈分泌蛋白表現時，R1R2_C 小阱有效地形成共價二聚體。

實例 6. 單鏈 VEGF 小阱之構築與表現

亦構築不需要多聚體化功能部位(SEQ ID NO:24)之 VEGF 小阱。此小阱之構築係利用使 Gly-Pro 連接子介於串聯受體功能部位之間(SEQ ID NO:24 之胺基酸 232-233)，直接融合一 Flt1D2.Flk1D3 功能部位(R1R2)(SEQ ID NO:24 之胺基酸 30-231)於第二個 Flt1D2.Flk1D3 功能部位(R1R2)(SEQ ID NO:24 之胺基酸 234-435)。

為了構築編碼該等串聯 Flt1D2.Flk1D3 功能部位之基因，乃合成編碼一個 Flt1D2.Flk1D3 功能部位之 DNA 片段 (Blue Heron Biotechnology)，使其與於 pTE115 中發現之編碼 Flt1D2.Flk1D3 功能部位之 DNA 之 DNA 同質性減至最小。使此合成 DNA 片段呈 Srf I-Not I 片段轉殖入 pTE115 之 Srf I-Not I 位置中，獲得以 CMV-MIE 啟動子表現 R1R2-R1R2 VEGF 小阱之 pTE570。將此質體轉染入 CHO K1 細胞內時，R1R2-R1R2 VEGF 小阱於培養液中蓄積。

實例 7. VEGF 小阱之構築與表現

如上述，利用直接融合一 Flt1D2.Flk1D3 功能部位 (R1R2) (SEQ ID NO:26 之胺基酸 30-231) 與 C 端九個胺基酸序列 (終端序列為 CPPC)，構築 VEGF 小阱。將此質體轉染入 CHO K1 細胞內時，SEQ ID NO:26 之 VEGF 小阱分泌至培養液中。接續之利用非還原性 SDS-PAGE 電泳之純化以及原態光散射分析，鑑定出具有大約 64 kDa 分子量之阱分子。此分子量表示，在兩個 SEQ ID NO:26 融合多肽之間形成共價二聚體。以編碼 SEQ ID NO:27 與 28 融合多肽之質體進行相同實驗，同樣證實彼等分子形成均二聚體阱。人類 VEGF-165 與由 SEQ ID NO:10 與 SEQ ID NO:26 二聚體構成的 VEGF 阱結合之親和力測定示於表 3。

表 3

VEGF 阱組成物	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
SEQ ID NO:10	2.73×10^{-7}	1.79×10^{-5}	6.55×10^{-13}
SEQ ID NO:26	2.00×10^{-7}	6.56×10^{-6}	3.28×10^{-13}
SEQ ID NO:26	2.61×10^{-7}	5.77×10^{-6}	2.21×10^{-13}

序列表

<110> 達瑪斯 (Daly, Thomas J.)
 樊俊斯 (Fandl, James P.)
 帕尼可 (Papadopoulos, Nicholas J.)

<120> VEGF 拮抗劑及其治療用途

<130> REG 710D-TW

<140> 10/609,775

<141> 2003-06-30

<160> 28

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Cys Pro Pro Cys

1

<210> 2

<211> 200

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

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

Gly Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
 180 185 190
 Phe Val Arg Val His Glu Lys Cys
 195 200

<210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> 變異體
 <222> 1, 3
 <223> Xaa = 任何胺基酸

<400> 3
 Xaa Cys Xaa Cys
 1

<210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4
 Ala Cys Gly Cys
 1

<210> 5
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5
 Met Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile
 1 5 10 15
 His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser
 20 25 30
 Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile
 35 40 45
 Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile
 50 55 60
 Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr
 65 70 75 80
 Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr Gln Thr Asn Thr
 85 90 95
 Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val
 100 105 110
 Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val
 115 120 125
 Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys
 130 135 140
 Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys
 145 150 155 160

Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln
 165 170 175
 Gly Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
 180 185 190
 Phe Val Arg Val His Glu Lys Ala Cys Gly Cys
 195 200

<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6
 Leu Val Pro Arg Gly Ser
 1 5

<210> 7
 <211> 1453
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 7
 aagcttgggc tgcaggctcga tcgactctag aggatcgatc cccggggcgag ctccaatttcg 60
 caaccaccat ggtcagctac tgggacaccg gggtcctgct gtgcgcgctg ctcagctgtc 120
 tgcttctcac aggatctagt tccggaggta gacctttcgt agagatgtac agtgaaatcc 180
 ccgaaattat acacatgact gaaggaaggg agctcgatc tccctgccgg gttacgtcac 240
 ctaacatcac tggtacttta aaaaagtctc cacttgacac tttgatccct gatggaaaac 300
 gcataatctg ggacagtaga aagggcttca tcatatcaaa tgcaacgtac aaagaaatag 360
 ggcttctgac ctgtgaagca acagtcaatg ggcatttgta taagacaaac tatctcacac 420
 atcgacaaac caatacaatc atagatgtgg tcttgagtcc gtctcatgga attgaactat 480
 ctgttggaga aaagcttggtc ttaaattgta cagcaagaac tgaactaaat gtggggattg 540
 acttcaactg ggaataccct tcttcgaagc atcagcataa gaaacttgta aaccgagacc 600
 taaaaaccca gtctgggagt gagatgaaga aatttttgag caccttaact atagatgggtg 660
 taaccgggag tgaccaagga ttgtacacct gtgcagcatc cagtgggctg atgaccaaga 720
 agaacagcac atttgtcagg gtccatgaaa agggcccggg cgacaaaact cacacatgcc 780
 caccgtgccc agcacctgaa ctccctggggg gaccgtcagt ctctctcttc ccccaaaac 840
 ccaaggacac cctcatgatc tcccggacc ctagagtcac atgcgtgggtg gtggacgtga 900
 gccacgaaga ccctgagggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg 960
 ccaagacaaa gccgcggggag gagcagtaga acagcacgta ccgtgtgggtc agcgtcctca 1020
 ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaagggtc tccaacaaag 1080
 ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac 1140
 aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccagggtc agcctgacct 1200
 gcctgggtcaa aggttcttat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc 1260
 cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctec ttcttctctt 1320
 atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg 1380
 tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta 1440
 aatgagcggc cgc 1453

<210> 8
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 8
 Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser

1				5					10					15			
Cys	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Pro	Phe	Val	Glu		
			20					25					30				
Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	Met	Thr	Glu	Gly	Arg	Glu		
		35					40					45					
Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Val	Thr	Leu		
		50				55					60						
Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	Ile	Ile		
65					70					75					80		
Trp	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ser	Asn	Ala	Thr	Tyr	Lys	Glu		
				85					90					95			
Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	His	Leu	Tyr	Lys		
			100					105					110				
Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	His	Arg	Gln	Thr	Asn	Thr	Ile	Ile	Asp	Val	Val		
		115					120						125				
Leu	Ser	Pro	Ser	His	Gly	Ile	Glu	Leu	Ser	Val	Gly	Glu	Lys	Leu	Val		
		130				135					140						
Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Asn	Val	Gly	Ile	Asp	Phe	Asn		
145					150					155					160		
Trp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Lys	His	Gln	His	Lys	Lys	Leu	Val	Asn	Arg		
			165					170						175			
Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	Lys	Lys	Phe	Leu	Ser	Thr		
			180					185					190				
Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	Gln	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys		
		195					200					205					
Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Arg		
	210					215					220						
Val	His	Glu	Lys	Gly	Pro	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys		
225					230					235					240		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro			
			245					250					255				
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys		
			260					265					270				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp		
		275					280					285					
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu		
	290					295					300						
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu		
305					310					315					320		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn		
			325						330					335			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly		
		340						345					350				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu		
		355					360					365					
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr		
	370					375					380						
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn		
385				390						395					400		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe		
			405						410					415			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn		
		420						425					430				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr		
		435					440					445					
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
	450						455										

<210> 9
<211> 1377
<212> DNA
<213> 智人

<400> 9
atgggtcagct actgggacac cgggggtcctg ctgtgcgcg c tgctcagctg tctgcttctc 60
acaggatcta gttccggaag tgataccggt agacctttcg tagagatgta cagtgaaatc 120
cccgaataa tacacatgac tgaaggaagg gagctcgta ttccttgccg gggttacgtca 180
cctaacaatca ctgttacttt aaaaaagttt ccacttgaca ctttgatccc tgatggaaaa 240
cgcataatct gggacagtag aaagggcttc atcatatcaa atgcaacgta caaagaaata 300
gggcttctga cctgtgaagc aacagtcaat gggcatttgt ataagacaaa ctatctcaca 360
catcgacaaa ccaatacaat catagatgtg gttctgagtc cgtctcatgg aattgaacta 420
tctgttgagg aaaagcttgt cttaaattgt acagcaagaa ctgaactaaa tgtggggatt 480
gacttcaact gggaataccc ttcttcgaag catcagcata agaaacttgt aaaccgagac 540
ctaaaaaacc agtctgggag tgagatgaag aaatttttga gcaccttaac tatagatggg 600
gtaacccgga gtgaccaagg attgtacacc tgtgcagcat ccagtgggct gatgaccaag 660
aagaacagca catttgtcag ggtccatgaa aaggacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 720
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac 780
accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa 840
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 900
aagccgcggg agggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 960
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca 1020
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac 1080
accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggtc 1140
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC 1200
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag 1260
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1320
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga 1377

<210> 10
<211> 458
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
1 5 10 15
Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Asp Thr Gly Arg Pro
20 25 30
Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
35 40 45
Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr
50 55 60
Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
65 70 75 80
Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
85 90 95
Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His
100 105 110
Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
115 120 125
Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
130 135 140
Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile

145					150					155				160
Asp	Phe	Asn	Trp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Lys	His	Gln	His	Lys	Lys
				165					170					175
Val	Asn	Arg	Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	Lys	Lys
			180					185					190	Phe
Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	Gln	Gly
		195					200					205		Leu
Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	Asn	Ser
		210				215					220			Thr
Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
225					230					235				Cys
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
			245						250					255
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
			260					265					270	Cys
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
		275					280					285		Trp
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
	290					295					300			Glu
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
305					310					315				320
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
			325						330					335
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
		340					345					350		Gly
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp
	355						360					365		Glu
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
	370					375				380				Tyr
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
385					390					395				400
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
			405						410					415
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
		420					425					430		Asn
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
	435					440						445		Thr
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
	450					455								

<210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> 變異體
 <222> 1, 2, 3, 4
 <223> Xaa = 任何胺基酸

<400> 11
 Xaa Xaa Xaa Xaa
 1

<210> 12

<211> 1444
<212> DNA
<213> 智人

<400> 12

```

aagcttgggc tgcaggtcga tgcactctag aggatcgatc cccgggcgag ctogaattcg 60
caaccacccat ggtcagctac tgggacaccg gggtcctgct gtgcgcgctg ctacagctgtc 120
tgcttctcac aggatctagt tccggaggta gacctttcgt agagatgtac agtgaaatcc 180
ccgaaattat acacatgact gaaggaaggg agctcgctcat tccctgccgg gttacgtcac 240
ctaacaatcac tgttacttta aaaaagtttc cacttgacac tttgatccct gatggaaaac 300
gcataatctg ggacagtaga aagggcttca tcatatcaaa tgcaacgtac aaagaaatag 360
ggcttctgac ctgtgaagca acagtcaatg ggcatttcta taagacaaac tatctcacac 420
atcgacaaac caatacaatc atagatatcc agctgttgcc caggaagtcg ctggagctgc 480
tggtagggga gaagctggtc ctcaactgca ccgtgtgggc tgagtttaac tcaggtgtca 540
cctttgactg ggactaccca ggaagcagg cagagcgggg taagtgggtg cccgagcgac 600
gctcccaaca gacccacaca gaactctcca gcatcctgac catccacaac gtcagccagc 660
acgacctggg ctogtatgtg tgcaaggcca acaacggcat ccagcgattt cgggagagca 720
ccgaggtcat tgtgcatgaa aatggcccgg gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc 780
cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaaa cccaaggaca 840
ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag 900
accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca 960
agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc 1020
accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctccag 1080
ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca 1140
ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca 1200
aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca 1260
actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tatagcaagc 1320
tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg 1380
aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatgagcgg 1440
ccgc

```

<210> 13
<211> 455
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

```

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

```

Trp Asp Tyr Pro Gly Lys Gln Ala Glu Arg Gly Lys Trp Val Pro Glu
165 170 175
Arg Arg Ser Gln Thr His Thr Glu Leu Ser Ser Ile Leu Thr Ile
180 185 190
His Asn Val Ser Gln His Asp Leu Gly Ser Tyr Val Cys Lys Ala Asn
195 200 205
Asn Gly Ile Gln Arg Phe Arg Glu Ser Thr Glu Val Ile Val His Glu
210 215 220
Asn Gly Pro Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> 智人

<400> 14
gggctgttga gagagagaga gagc

24

<210> 15
<211> 28
<212> DNA
<213> 智人

<400> 15
ggccgctctc tctctctctc aacagccc

28

<210> 16
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 智人

 <400> 16
 gggcgcacatgc gggtgttgag agc 23

 <210> 17
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 智人

 <400> 17
 ggccgctctc aacaaccgca tgcgccc 27

 <210> 18
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 智人

 <400> 18
 gagagagacc atgggtagac ctttcgtaga gatgta 36

 <210> 19
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> 智人

 <400> 19
 agagagggcgg ccgctttatc aacacttttc atggaccctg acaaattgt 48

 <210> 20
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> 智人

 <400> 20
 agagagggcgg ccgctttatc aacaaccgca tgccttttca tggaccctga caaatgt 57

 <210> 21
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 智人

 <400> 21
 agttccggaa gtgccatggg tagaccttc gtagagatg 39

 <210> 22
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 智人

 <400> 22
 agagagggcgg ccgctgttat cacttctcgt gcacgcgcac gaag 44

 <210> 23

<211> 235
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23

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

<210> 24
<211> 435
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

Met	Val	Ser	Tyr	Trp	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu	Ser
1				5					10					15	
Cys	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Gly	Arg	Pro
			20					25					30		
Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	Met	Thr	Glu
		35					40					45			
Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr
	50					55					60				
Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	Asp	Gly	Lys
65					70					75					80
Arg	Ile	Ile	Trp	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ser	Asn	Ala	Thr
				85					90					95	
Tyr	Lys	Glu	Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	His
		100						105					110		

```

Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
    115          120          125
Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
    130          135          140
Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
    145          150          155          160
Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
    165          170          175
Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
    180          185          190
Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
    195          200          205
Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
    210          215          220
Phe Val Arg Val His Glu Lys Gly Pro Gly Arg Pro Phe Val Glu Met
    225          230          235          240
Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu
    245          250          255
Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys
    260          265          270
Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp
    275          280          285
Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile
    290          295          300
Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr
    305          310          315          320
Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu
    325          330          335
Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu
    340          345          350
Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp
    355          360          365
Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp
    370          375          380
Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu
    385          390          395          400
Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala
    405          410          415
Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val
    420          425          430
His Glu Lys
    435

```

<210> 25
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 25
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
  1          5          10          15
Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Asp Thr Gly Arg Pro
    20          25          30
Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
    35          40          45
Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr

```

50	55	60
Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asn Thr Leu Ile Pro Asn Gly Lys		
65	70	75
Ala Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr		80
	85	90
Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His		95
	100	105
Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile		110
	115	120
Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu		125
	130	135
Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile		140
145	150	155
Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu		160
	165	170
Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe		175
	180	185
Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu		190
	195	200
Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr		205
	210	215
Phe Val Arg Val His Glu Lys Gly Pro Gly Ala Cys Gly Cys		220
225	230	235

<210> 26
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 26

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser	
1	5
Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Asp Thr Gly Arg Pro	
	20
Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu	
	35
Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr	
50	55
Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys	
65	70
Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr	
	85
Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His	
	100
Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile	
	115
Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu	
	130
Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile	
145	150
Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu	
	165
Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe	
	180
	185
	190

Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	Gln	Gly	Leu
		195					200					205			
Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr
	210					215					220				
Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
225					230					235					240

<210> 27
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> 智人

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

<210> 28
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> 智人

Met	Val	Ser	Tyr	Trp	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu	Ser
1				5				10						15	
Cys	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Gly	Arg	Pro
			20					25					30		
Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	Met	Thr	Glu

		35				40				45					
Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr
50						55					60				
Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	Asp	Gly	Lys
65					70					75					80
Arg	Ile	Ile	Trp	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ser	Asn	Ala	Thr
				85					90					95	
Tyr	Lys	Glu	Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	His
			100					105					110		
Leu	Tyr	Lys	Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	His	Arg	Gln	Thr	Asn	Thr	Ile	Ile
		115					120					125			
Asp	Val	Val	Leu	Ser	Pro	Ser	His	Gly	Ile	Glu	Leu	Ser	Val	Gly	Glu
		130					135					140			
Lys	Leu	Val	Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Asn	Val	Gly	Ile
145				150						155					160
Asp	Phe	Asn	Trp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Lys	His	Gln	His	Lys	Lys	Leu
			165						170					175	
Val	Asn	Arg	Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	Lys	Lys	Phe
			180						185				190		
Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	Gln	Gly	Leu
		195					200					205			
Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr
	210					215					220				
Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys			
225					230						235				

五、中文發明摘要：

本發明乃有關核酸分子及能結合血管內皮細胞生長因子(VEGF)之多聚體蛋白。本發明揭示 VEGF 小阱，其可用於治療 VEGF 相關症狀或疾病，並經特別設計以用於局部投與特定器官、組織、及/或細胞。

六、英文發明摘要：

Nucleic acid molecules and multimeric proteins capable of binding vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF mini-traps are disclosed which are therapeutically useful for treating VEGF-associated conditions and diseases, and are specifically designed for local administration to specific organs, tissues, and/or cells.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

公告本

99年6月17日修(更)正本

專利申請案第 93118909 號
ROC Patent Appln. No. 93118909
修正後無劃線之申請專利範圍中文本替換頁 - 附件(二)
Amended Claims in Chinese - Encl. (II)
(民國 99 年 6 月 17 日送呈)
(Submitted on June 17, 2010)

十、申請專利範圍：

1. 一種經單離之編碼融合多肽之核酸分子，其中該融合多肽係由 R1R2 成分，及多聚體化成分(MC)構成，該多聚體化成分能與另一個 MC 相互作用形成多聚體結構，其中 R1 為血管內皮細胞生長因子(VEGF)受體成分 Flt-1 之 Ig 功能部位 2，R2 為 Flk-1 之 Ig 功能部位 3，且多聚體化成分係選自終端為胱胺酸之 1 至 9 個胺基酸序列組成的群組。
2. 一種融合多肽，係由申請專利範圍第 1 項之核酸分子編碼。
3. 如申請專利範圍第 2 項之融合多肽，其具有 SEQ ID NO:26、27、或 28 之胺基酸序列。
4. 一種能於轉形宿主細胞中複製之表現載體，其含有如申請專利範圍第 1 項之核酸分子。
5. 一種製造 VEGF 融合蛋白之方法，該方法包括於適當表現系統中引入如申請專利範圍第 4 項之表現載體，及產生該 VEGF 融合蛋白的表現之步驟。
6. 一種血管內皮細胞生長因子(VEGF)二聚體，其含有二個如申請專利範圍第 2 或 3 項的融合多肽之多聚體。
7. 一種醫藥組成物，含有如申請專利範圍第 6 項之融合多肽二聚體及醫藥上可接受之載劑。
8. 一種如申請專利範圍第 2 項之融合多肽於製造治療藉由去除或抑制血管內皮細胞生長因子(VEGF)而改善、減

緩、或抑制疾病或症狀之醫藥品的用途。

9.如申請專利範圍第8項之用途，其中該疾病或症狀為眼睛的疾病或症狀。

10.如申請專利範圍第9項之用途，其中該眼睛疾病或症狀為老年黃斑病變。