



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104039351 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201280052307. 5

(22) 申请日 2012. 10. 15

(30) 优先权数据

61/546, 748 2011. 10. 13 US

61/546, 697 2011. 10. 13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 04. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/060273 2012. 10. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/056240 EN 2013. 04. 18

(71) 申请人 阿尔皮奥治疗学股份有限公司

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 K. 彼得斯 R. 沙尔维茨

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 李波 黄希贵

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书37页

序列表63页 附图3页

(54) 发明名称

用于治疗血管渗漏综合征和癌症的方法

(57) 摘要

公开了用于治疗血管渗漏综合征和防止癌症转移的方法。还公开了用于治疗因炎性疾病、败血症、癌症或病原体的存在而引发的血管渗漏的方法。

1. 一种用于治疗患有血管渗漏综合征的患者的方法,包括给所述患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐的组合物。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述组合物还包含一种或多种治疗上可接受的赋形剂。

3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的方法,其中所述患者患有炎性疾病或病况、创伤、休克、成人呼吸窘迫综合征、急性肺损伤或败血症。

4. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的方法,其中所述患者患有炎性疾病或病况。

5. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的方法,其中所述患者正在进行癌症治疗。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述癌症是肾细胞癌、恶性黑色素瘤、髓母细胞瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤、纤维状细胞星形细胞瘤、弥漫性星形细胞瘤、间变型星形细胞瘤或胶质母细胞瘤。

7. 一种用于稳定有此需要的患者的血管系统的方法,其包括给所述患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐的组合物。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述组合物还包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。

9. 根据权利要求 7 或权利要求 8 所述的方法,其中在利用 IL-2 的治疗过程开始之前或所述治疗过程期间给所述患者施用所述 HPTP β -ECD 结合剂。

10. 根据权利要求 7 或权利要求 8 所述的方法,其中在癌症治疗过程开始之前或在所述治疗过程期间给所述患者施用所述 HPTP β -ECD 结合剂。

11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述癌症是肾细胞癌或恶性黑色素瘤、髓母细胞瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤、纤维状细胞星形细胞瘤、弥漫性星形细胞瘤、间变型星形细胞瘤或胶质母细胞瘤。

12. 根据权利要求 10 或权利要求 11 所述的方法,其中所述癌症治疗包括给所述患者施用有效量的 IL-2。

13. 根据权利要求 7 或权利要求 8 所述的方法,其中所述患者感染了病原体。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中所述病原体是细菌、病毒、酵母、真菌或原生动物。

15. 根据权利要求 1 至 14 中任一项所述的方法,其还包括给所述患者施用有效量的抗菌剂、抗病毒剂、抗真菌剂或其组合。

16. 一种用于确定患有血管渗漏综合征的患者的治疗过程的方法,包括:

a) 给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物;

b) 在治疗过程中监测存在于患者中的血管生成素-2 的水平;和

c) 当血管生成素-2 水平返回至正常范围内时停止治疗。

17. 一种用于治疗患者的癌症的方法,包括给患者施用包含有效量的特异性结合剂或其药学上可接受的盐的组合物。

18. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述组合物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。

19. 一种用于防止癌症患者中的转移的方法,其通过给患者施用包含有效量的特异性结合剂或其药学上可接受的盐的组合物。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述组合物还包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。

21. 根据权利要求 17 至 20 中任一项所述的方法,其还包括施用一种或多种化学治疗剂。

22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述化学治疗剂选自紫杉醇、IL-2、吉西他滨、埃罗替尼、多柔比星、伊立替康和贝伐单抗。

23. 根据权利要求 17 至 22 中任一项所述的方法,其中所述癌症是肾细胞癌或恶性黑色素瘤、髓母细胞瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤、纤维状细胞星形细胞瘤、弥漫性星形细胞瘤、间变型星形细胞瘤或胶质母细胞瘤。

24. 根据权利要求 1 至 23 中任一项所述的方法,其中所述 HTP β -ECD 结合剂是结合 HTP β 的细胞外部分的抗体、蛋白质、肽、适体、肽体、adnectin 或核酸。

25. 根据权利要求 1 至 23 中任一项所述的方法,其中所述 HTP β -ECD 结合剂是单克隆抗体或多克隆抗体或其抗原结合片段。

26. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述 HTP β -ECD 结合剂是单克隆抗体或其抗原结合片段。

27. 根据权利要求 26 所述的方法,其中所述 HTP β -ECD 结合剂是:由杂交瘤细胞系 ATCCNo. PTA-7680 产生的单克隆抗体或其抗原结合片段。

28. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述 HTP β -ECD 结合剂是具有与由杂交瘤细胞系 ATCCNo. PTA-7680 产生的单克隆抗体或其抗原结合片段的生物特征相同或基本上相同的生物特征的抗体。

29. 根据权利要求 25 至 28 中任一项所述的方法,其中所述 HTP β -ECD 结合剂是抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是:F(ab')₂、Fab、Fab 的二聚体、Fv、Fv 的二聚体或 scFv 的二聚体。

30. 根据权利要求 25 至 26 中任一项所述的方法,其中所述 HTP β -ECD 结合剂是抗原结合片段,其中所述抗原结合片段为 F(ab')₂、Fab 的二聚体、Fv 的二聚体或 scFv 的二聚体。

31. 根据权利要求 25 至 28 中任一项所述的方法,其中所述抗原结合片段为 Fab、Fv 或 scFv。

32. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述 HTP β -ECD 结合剂是蛋白质、肽、适体、肽体、adnectin 或核酸。

33. 根据权利要求 1 至 32 中任一项所述的方法,其中给所述患者施用的 HTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐的剂量为按重量计约 0.01mg/kg 至约 500mg/kg。

34. 根据权利要求 1 至 32 中任一项所述的方法,其中给所述患者施用的 HTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐的剂量为按重量计约 0.1mg/kg 至约 10mg/kg。

35. 根据权利要求 33 或权利要求 34 所述的方法,其中每日 1 次、每周 3 次、每周 2 次、每周 1 次、每月 3 次、每月 2 次、每月 1 次或每隔一个月 1 次施用剂量。

36. 根据权利要求 1 至 35 中任一项所述的方法,其中将所述 HTP β -ECD 结合剂缀合至媒介物。

37. 根据权利要求 36 所述的方法,其中所述媒介物是 PEG。

38. 根据权利要求 1 至 37 中任一项所述的方法,其中通过眼内注射施用所述

HPTP β -ECD 结合剂。

39. 根据权利要求 1 至 37 中任一项所述的方法, 其中通过皮下注射施用所述 HPTP β -ECD 结合剂。

40. 根据权利要求 1 至 37 中任一项所述的方法, 其中通过静脉内注射施用所述 HPTP β -ECD 结合剂。

用于治疗血管渗漏综合征和癌症的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2011 年 10 月 13 日提交的美国临时申请系列 No. 61/546,748 和 2011 年 10 月 13 日提交的美国临时申请系列 No. 61/546,697 的优先权。将美国临时申请系列 No. 61/546,748 和美国临时申请系列 No. 61/546,697 的完整内容通过引用整体并入本文。

[0003] 通过引用并入电子地提交的材料

[0004] 通过引用将其整体并入本文的是与其同时提交的和如下鉴定的计算机可读序列表：一个于 2012 年 10 月 15 日 11:52am 创建的名称为“233106-331560_Seq_Listing_ST25”的 92KBASCII (文本) 文件。

[0005] 领域

[0006] 通过施用 HTP β 抑制剂治疗癌症、阻止转移和血管渗漏综合征的方法。

[0007] 背景

[0008] 血管渗漏综合征 (VLS) 的特征在于低血压、外周性水肿和低白蛋白血症。VLS 可作为疾病特别地因病原体 (除其它以外,病毒和细菌) 而引起的疾病的副作用发生。血管渗漏使得治愈过程变得复杂,并且本身可以是某些疗法的直接结果。例如,给患有恶性肾癌的患者施用白细胞介素-2 (IL-2) 来帮助加强它们的免疫系统。然而,该治疗在许多患者中因在整个治疗过程可被完全施用之前严重 VLS 发作而必须被撤出。VLS 限制可给人施用的 IL-2 的剂量,在一些情况下,在疗法达到最大效果之前必须停止疗法。

[0009] VLS 的特征在于伴随间质性水肿和器官衰竭的液体和蛋白质的外渗的血管通透性的增加。VLS 的表现包括液体潴留、体重的增加、外周性水肿、胸膜和心包渗出、腹水、全身性水肿和以严重形式存在的肺和心血管衰竭的体征。症状在患者间是高度可变的,并且病因知之甚少。内皮细胞修饰或损伤被认为对于血管渗漏是非常重要的。内皮细胞 (EC) 损伤的发病机制非常复杂,可牵涉对 EC 的活化或损伤,细胞因子和炎症介质的释放,细胞-细胞和细胞-基质粘着力以细胞骨架功能的改变。

[0010] 癌症的最令人恐惧的方面之一是扩散或转移的能力。最初,癌细胞被发现聚集在一起,从而形成一个或多个肿瘤。在原发性肿瘤形成后,癌细胞可获得与原始肿瘤分离并且前往身体的其它区域。占据肝并且形成肿瘤的肺癌细胞仍然是肺癌细胞。因此,对于一个特定形式的癌症转移的倾向性取决于许多因素,包括癌症的类型;然而,细胞如何开始转移的过程的总体过程仍然还不完全清楚。

[0011] 如果在其已具有转移的机会之前发现单个局限性肿瘤,则患者存活的预后更高。这是因为可被有效切除或通过放射疗法或化学疗法破坏。因此,肿瘤生长与肿瘤细胞的转移之间存在差异;第一者不总是导致另一者。然而,已转移的癌症因它们已扩散至全身的程度而难以治愈。

[0012] 为了转移,癌细胞必须脱离其肿瘤,并且侵入循环或淋巴系统。随后游离细胞被运送至新的位置,在该位置它们建立它们自己。虽然身体具有防止细胞在脱离它们的天然位置后存活的天然安全保护,但一些癌细胞具有克服这些安全保护的能力。因此,如果转移停止或显著减少,则癌症的程度可被测定,随后可被治疗。这样,其中肿瘤已被切除或已使用

放射 / 化学疗法的癌症疗法的随访治疗可以是对抗 - 转移剂的患者治疗。存在对于防止癌细胞转移的方法的长期未满足的需要。

[0013] 原发性肿瘤的生长也提供了对治疗的挑战。如果原发性肿瘤的生长让其发展下去,初始肿瘤就可生长至在原发位置和附近的组织中不利地影响器官功能的尺寸。如果原发性肿瘤的生长不受控制,那么原发性肿瘤的转移也更加可能。存在对减缓或阻止肿瘤生长的方法的需要。

[0014] 在抗病毒和抗细菌感染过程中,患者可产生作为初始感染的结果诱发的血管渗漏。现存在对于防止因病毒或细菌感染而引起的血管渗漏,和用于提供增加被一种或多种病原体感染的人或其它哺乳动物存在的方法的长期未满足的需要。此外,存在对于防止因某些抗癌药或其它抗癌疗法而引起的血管渗漏(以便可给人或其它哺乳动物提供进行进行更长的治疗或疗法过程的抗癌药或抗癌疗法)的方法长期未满足的需要。

[0015] 概述

[0016] 本公开内容提供了用于治疗血管渗漏综合征患者的方法,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐的组合物。

[0017] 还提供了用于治疗血管渗漏综合征患者的方法,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐以及一种或多种药学上可接受的赋形剂的组合物。

[0018] 本公开内容治疗血管渗漏的方法,其中待治疗的患者患有炎性疾病或病况、创伤、休克、成人呼吸窘迫综合征、急性肺损伤或败血症,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐的组合物。

[0019] 本公开内容还提供了治疗其中待治疗的患者患有炎性疾病或病况、创伤、休克、成人呼吸窘迫综合征、急性肺损伤或败血症的血管渗漏的方法,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐以及一种或多种药学上可接受的赋形剂的组合物。

[0020] 由本公开内容提供的另一个方法是用于确定患有血管渗漏综合征的患者的治疗过程的方法,包括:a) 给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物;b) 监测治疗过程中存在于患者中的血管生成素-2的水平;和c) 当血管生成素-2水平返回至正常范围内时停止治疗。

[0021] 由本发明提供的其它方法是治疗患者的癌症的方法,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐的组合物。

[0022] 本发明提供的其它方法是用于治疗患者的癌症的方法,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的赋形剂的组合物。

[0023] 由本公开内容提供的另一个方法是用于通过给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐的组合物,防止癌症患者中的转移的方法。

[0024] 由本公开内容提供的另一个方法是用于通过给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的赋形剂的组合物,防止癌症患者的转移的方法。

[0025] 在本公开内容的方法中,HPTP β -ECD 结合剂包括但不限于抗体、蛋白质、肽、适体、肽体、adnectin 或核酸,所述结合剂结合 HPTP β 的细胞外部分。

[0026] 附图简述

[0027] 图 1. 单克隆抗体 R15E6 识别内皮细胞上的内源 HTP β 。(图框 A) 利用对照抗体(泳道 1)、利用 R15E6(泳道 2) 或用抗-Tie2 与抗-VEGFR2 抗体(泳道 3) 的混合物免疫沉淀内皮细胞裂解物。通过 SDS-PAGE 分离免疫沉淀, 将其转移至 PVDF 膜, 利用 R15E6、抗-Tie2 和抗-VEGFR2 抗体的混合物通过蛋白质印迹探测 PVDF 膜。对于 R15E6(泳道 2) 而非对照抗体(泳道 1), 或抗-Tie2 和抗-VEGFR2 的混合物(泳道 3), 看到与 HTP β 一致的单个主要高分子量条带。对于 R15E6(白色峰) 或无第一抗体对照(黑色峰), (泳道 B) 将内皮细胞经历 FACS 分析。荧光的强烈偏移表明 R15E6 结合完整内皮细胞表面上的 HTP β 。

[0028] 图 2 单克隆抗体 R15E6 增强 HUVEC 中的 Tie2 受体活化。如和例 4 中所述测量人内皮细胞中的 Tie2 活化。R15E6 剂量依赖性地增强基线和 Ang1- 诱导的 Tie2 活化。

[0029] 图 3. 是在一只眼中通过 1 μ g 或 2 μ g 的抗-VE-PTP 细胞外结构域抗体治疗的眼对利用媒介物的另一只眼的类似治疗的激光治疗后 14 天 C57BL/6 小鼠的脉络膜新生血管化的平均面积的图示。

[0030] 图 4. 显示在从 P5 至 P12 于 75% 的氧气氛中密闭并且在 P12 当小鼠返回至室内空气时进行抗-VE-PTP 细胞外结构域抗体的玻璃体内注射后, 在 P17 天 C57BL/6 小鼠的视网膜新血管形成平均面积 (mm²)。

[0031] 图 5. 显示在媒介物或 2 μ g 的抗-VE-PTP 细胞外结构域抗体的玻璃体内注射后氧诱发的视网膜病变模型中小鼠视网膜的代表性荧光显微照片。

[0032] 图 6. 显示在从 P5 至 P12 于 75% 的氧气氛中密闭, 随后在 P12 返回至室内空气, 在第 P12、14 和 16 天皮下施用 1mg/kg 的抗-VE-PTP 细胞外结构域抗体后, 第 P17 天的 C57BL/6 小鼠的视网膜新血管形成的平均面积 (mm²)。

[0033] 图 7. 显示在从 P5 至 P12 于 75% 氧气氛中密闭, 随后在 P12 返回至室内空气, 在第 P12、14 和 16 天皮下施用 2mg/kg 的抗-VE-PTP 细胞外结构域抗体后, 第 P17 天的 C57BL/6 小鼠的视网膜新血管形成的平均面积 (mm²)。

[0034] 详述

[0035] 一般定义

[0036] 在下面的本说明书和权利要求中, 参考许多经定义具有下列含义的术语:

[0037] 术语“HTP β -ECD 结合剂”和“特异性结合剂”在本文中可互抑制使用, 并且是指特异性结合 HTP β 及其变体和衍生物(如本文中定义的)的细胞外部分, 抑制 HTP β 的 Tie2 去磷酸化酶活性的分子。

[0038] 如本文中所用, 除非另有所指, 否则“试剂”是指“HTP β 结合剂”。

[0039] “特异性结合 HTP β -ECD”是指本发明的特异性结合剂识别 HTP β 的细胞外结构域的表位并且以高于其它相关和 / 或不相关分子的结合亲和力结合所述表位的能力。特异性结合剂优选结合蛋白质和 / 或大分子的复杂混合物中的 HTP β 。特异性结合剂优选具有对于 HTP β 的选择性。“选择性的”意指相较于其它相关和 / 或不相关分子对于 HTP β 具有显著更大的活性, 而不是对于其它分子完全无活性的试剂。例如, 选择性试剂可显示相较于对其它相关或不相关分子对 HTP β 的 10 倍、100 倍或 1000 倍的选择性。

[0040] 术语“抗-HTP β -ECD 抗体”是指结合 HTP β 的细胞外结构域的抗体或抗体片段。抗-HTP β -ECD 抗体是一种类型的本文中定义的 HTP β -ECD 结合剂。

[0041] 术语“VE-PTP”是指 HPTP β 的小鼠直系同源物。

[0042] 除非另有所指,否则本文中所有百分比、比率和比例按重量计算。除非另有所指,否则所有温度以摄氏度($^{\circ}\text{C}$)表示。

[0043] 范围在本文中可表达为从特定值至另一个特定值,终点包括在范围内。例如对于从“1mg 至 50mg”的范围,包括 1mg 和 50mg 的具体值。先行词“约”表示值为近似的。例如,对于从“约 1mg 至约 50mg”的范围,表示值为近似值。此外,当表达这样的范围时,范围包括范围“从 1mg 至 50mg”。还应理解,范围的每一个的终点与另一个终点显著相关,并且不依赖于另一个终点。例如范围“从 1mg 至 50mg”包括范围“从 30mg 至 40mg”。

[0044] 如本文中所用,术语“组合地”是指超过一种预防性和/或治疗性试剂的使用。术语“组合地”的使用不限制其中给患者施用预防性和/或治疗性试剂所按的顺序。第一预防性或治疗性试剂可在给已患有、患有或怀疑患有障碍的患者施用第二预防性或治疗性试剂之前(例如,1 分钟、5 分钟、15 分钟、30 分钟、45 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、6 小时、12 小时、24 小时、48 小时、72 小时、96 小时、1 周、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周、8 周或 12 周之前)、同时或之后(例如,1 分钟、5 分钟、15 分钟、30 分钟、45 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、6 小时、12 小时、24 小时、48 小时、72 小时、96 小时、1 周、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周、8 周或 12 周之后)进行施用。按顺序并且在一定的时间间隔内给患者施用预防性或治疗性试剂,以便本公开内容的试剂可与另一种试剂一起来提供相较于当另外地施用它们时增加的益处。可以与另一种额外的预防性或治疗性试剂以任意顺序施用任何另外的预防性或治疗性试剂。

[0045] “有效量”意指对于改善或预防待治疗的患者的障碍或延长存活期是有效的活性剂或试剂的组合的量。有效量可根据本领域已知的因素例如待治疗的人或动物的疾病状态、年龄、性别和体重而变化。虽然特定的给药方案可描述于本文中的实施例,但本领域技术人员将理解,给药方案可被改变来提供最佳治疗反应。例如,可每日施用若干分份剂量或可按治疗状况的紧急性所显示的,相应地减少剂量。此外,可按达到治疗量所必需的频率施用本公开内容的组合物。治疗有效量的测定完全在本领域技术人员的能力范围内,特别地根据本文中提供详细公开内容。

[0046] 如本文中所用,术语“抑制”或“抑制(inhibiting)”是指活性的统计上显著且可测量的减少,优选相对于对照至少约 10% 的减少,更优选约 50% 或更多的减少,更优选约 80% 或更多的减少。

[0047] 如本文中所用,术语“增加”或“增强”是指活性的显著且可测量的增加,优选相对于对照至少约 10% 的增加,更优选约 50% 或更多的增加,更优选约 80% 或更多的增加。

[0048] “HPTP 贝塔”或“HPTP β ”在本文中可互换使用,并且是人蛋白酪氨酸磷酸酶 β 的缩写。

[0049] 如本文中所用,“受试者”意指个体。因此,“受试者”可包括家养动物(例如,猫、狗等)、家畜(例如,牛、马、猪、绵羊、山羊等)、实验室动物(例如,小鼠、兔、大鼠、豚鼠等)和鸟类。“患者”还可包括哺乳动物例如灵长类动物或人。“受试者”和“患者”在本文中可互换使用。优选地受试者是人。

[0050] “减少”或该单词的其它形式例如“减小”或“减少”意指事件或特征(例如,血管渗漏)的下降。应理解,这通常与与一些标准或表达的值相关,换句话说,其是相对的,但对于提及的标准或相对值不总是必需的。

[0051] 术语“治疗”、“医治”、“医疗”等是指获得期望的药理学和 / 或生理学效应例如缓和宿主的疾病或障碍,和 / 或减少、抑制或消除与障碍(例如,血管渗漏)相关的特定特征或事件。因此,术语“治疗”包括,防止障碍在宿主中发生,特别地当宿主易于获得疾病时但还未被诊断患有疾病时;抑制障碍;和 / 或逆转障碍。在本发明的方法用于预防障碍的范围内,应理解术语“患者”不需要疾病状态完全被阻止。相反地,如本文中所用,术语预防是指本领域技术人员鉴定易患障碍的群体,以便可在疾病发作之前施用本公开内容的 HTP β -ECD 结合剂的能力。术语无意指疾病状态被完全避免。

[0052] 如本文中所用,术语“癌症治疗”意指本领域已知的癌症的任何治疗,包括但不限于化学疗法和放射疗法。

[0053] 如本文中所用,术语“癌症治疗”意指本领域已知的癌症的任何治疗,包括但不限于化学疗法和放射疗法。

[0054] 在本说明书的整个描述和权利要求中,单词“包含”及该单记号的其它形式例如“包括”和“含有”意指包括但不限于以及无意排除,例如其它衍生物、组分、整体或步骤。

[0055] 如说明书和所附权利要求中所用,除非另外明确地指定,否则单数形式“一个 / 一种 (a)”、“一个 / 一种 (an)”和“所指物 (the)”包括复数所指物。因此,例如,“一种 (a) 组合物”包括两种或更多种这样的组合物的混合物。

[0056] “任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或情况可以发生或可以不发生,并且描述包括其中事件或情况发生的情况以及其中其不发生的情况。

[0057] “特异性结合 HTP β ”是指本发明的试剂相较于针对其它相关和 / 或不相关分子以更高的亲和力识别和结合 HTP β 的细胞外结构域的能力。试剂优选具有对于 HTP β 的选择性。“特异性的”意指试剂相较于针对其它相关和 / 或不相关分子具有显著更大的针对 HTP β 的活性,而非对其它分子完全无活性。例如,选择性试剂相较于针对其它相关或不相关分子针对于 HTP β 可显示 10 倍、100 倍或 1000 倍的选择性。

[0058] 术语“表位”是指能够被试剂在试剂的抗原结合区域的一个或多个上识别并且结合的任何分子的任意部分。表位通常由不同的表面基团例如氨基酸、糖、脂质、磷酸基或磺酰基组成,并且在某些实施方案中,可具有特殊三维结构特征,和 / 或特殊电荷特征。如本文中所用,表位可以为构象或线性的。

[0059] “肽体”是包含连接至至少一个肽的抗体 Fc 结构域分子。肽体的产生通常描述于 W02002/24782 中。

[0060] “片段”是指试剂的一部分。片段可保留期望的试剂的生物活性,可被认为是试剂本身。例如,其中氨基末端和 / 或羧基末端和 / 或内部氨基酸残基被缺失的截断的蛋白质是蛋白质的片段,免疫球蛋白分子的 Fab 是免疫球蛋白的片段。还可通过直接连接(例如,肽或二硫键)或通过接头将这样的片段连接至另一个分子。

[0061] “蛋白质”在本文中可与肽和多肽互换使用。

[0062] 本发明的肽包括不限于具有约 3 至 75 个氨基酸,或约 5 至约 50 个氨基酸,或约 10 至约 25 个氨基酸的氨基酸序列。肽可以是天然存在的或人造氨基酸序列。

[0063] 本发明的蛋白质可通过本领域公知的方法,例如使用标准直接技术例如通过固相合成来获得。如果基因序列是已知的或可推导时,则可通过标准重组法产生蛋白质。蛋白质可以以本领域技术人员已知的多种方法来分离或纯化。标准纯化法包括利用盐、电泳、层

析技术等的沉淀。

[0064] “衍生物”包括已以一些与插入、缺失或置换变体不同的方式化学修饰的那些结合剂。例如,当结合剂是蛋白质时,可用氨基例如 NH₂ 给羧基末端封端。

[0065] 在一些实施方案中,将一个或多个分子连接在一起形成试剂。例如,可通过接头连接抗体片段。一般而言,接头的化学结构不是至关重要的,因为其主要用作间隔。在一个实施方案中,接头由通过肽键连接在一起的氨基酸组成。在另一个实施方案中,接头是非肽接头例如非空间位阻的 C1-C6 烷基。在另一个实施方案中,接头是 PEG 接并没有。还应理解,接头可被插入在分子中的许多位置。

[0066] 试剂的变体包括在本发明的范围内。如本文中所用,“变体”或“变型”意指具有这样的蛋白质或核苷酸序列的试剂,所述蛋白质或核苷酸序列与非变体试剂的蛋白质或核苷酸序列大体相似,并且共有非变体试剂的类似活性。可以以各种方式改变蛋白质或核苷酸序列以产生本发明包括的变体,包括置换、缺失、截断、插入和其它修饰。用于这样的操作的方法在本领域是公知的。参见,例如,Current Protocols in Molecular Biology (和最近的资料) Ausubel 等人编辑 (1996), John Wiley and Sons, New York: Methods in Molecular Biology, 第 182 卷, In vitro Mutagenesis Protocols, 第 2 版, Barman 编辑 (2002), Humana Press), 以及本文中引用的参考资料。例如,变体包括其中将氨基酸残基插入结合剂的已知氨基酸序列,从所述氨基酸序列缺失氨基酸残基,和 / 或将氨基酸残基置换进入所述氨基酸序列的肽和多肽。在一个实施方案中,氨基酸的置换是保守的,因为其最低限度地改变变体的生物化学性质。在其它实施方案中,变体可以是全长蛋白质的活性片段、化学修饰蛋白质、通过添加亲和或表位标签、或荧光或其它标记部分修饰的蛋白质,无论是通过蛋白质的体内或体外酶促处理还是通过使用修饰氨基酸进行的蛋白质合成获得的。

[0067] 本文中还涉及融合蛋白。通过使用已知方法,本领域技术人员将能够制备本发明的蛋白质的融合蛋白;即,尽管与天然形式不同,但可以是有益的。例如,融合伴侣可以是信号(或前导)多肽序列,其可共翻译地或翻译后地指导蛋白质从其合成位置至另一位置的转移(例如,酵母 α 因子前导序列)。或者,其可被添加来促进本发明的纯化或鉴定(例如,多聚-His、Flag 肽或荧光蛋白)。

[0068] 标准技术可用于重组 DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如,电穿孔、脂转染)。可按照制造商的说明书或如本领域中通常实现的或如本文中所描述的,进行酶促反应和纯化技术。通常按照本领域中已知的和在整个本说明书中引用和论述的各种一般和更专门的参考资料中所描述的常规方法进行技术和方法。除非提供具体定义,否则与本文中描述的分析化学、合成有机化学和医学及药物化学结合使用的命名法以及所述分析化学、合成有机化学和医学及药物化学的实验室方法和技术是本领域中已知的和通常使用的命名法以及实验室方法和技术。标准技术可用于化学合成、化学分析、药物制备、配制、递送以及患者的治疗。

[0069] 序列表

[0070] 表 1.

[0071]

SEQIDNO:1	全长人 HPTP β 核苷酸序列 (X54131)
SEQIDNO:2	全长人 HPTP β 氨基酸序列 (P23467)
SEQIDNO:3	具有 (His)6Gly 标签的人 HPTP β 的细胞外部分
SEQIDNO:4	人 HPTP β 的细胞外部分
SEQIDNO:5	全长小鼠 VE-PTP 核苷酸序列 (AY077755)
SEQIDNO:6	全长小鼠 VE-PTP 氨基酸序列 (AAL75813)
SEQIDNO:7	小鼠 VE-PTP 氨基酸序列的细胞外部分

[0072] HPTP β -ECD 结合剂

[0073] 用于本发明的试剂包括但不限于抗体、蛋白质、darpin、肽、适体、adnectin、肽体或特异性结合 HPTP β 的细胞外部分并且抑制 HPTP β 的至少一种磷酸酶活性的核酸。如本文中所用,“磷酸酶活性”包括其中生物活性通过评估 Tie2 磷酸化来进行测量的酶促活性和生物活性。

[0074] 用于本发明的试剂还包括:结合 HPTP β 的细胞外部分的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段抑制 HPTP β 的至少一个磷酸酶活性。这些试剂包括单克隆和多克隆抗体。试剂可以是抗体的片段,其中所述片段包含重链和轻链可变区,或片段为 $F(ab')_2$,或片段为 Fab、Fv、scFv 的二聚体或三聚体,或来源于抗体的双链、三链或四链抗体。

[0075] 例如,试剂可以是但不限于结合 HPTP β 的细胞外部分的抗体或抗体片段;或具体地结合 HPTP β 的 FN3 重复的集,或更具体地结合 HPTP β 的第一 FN3 重复的抗体。

[0076] 试剂还包括:描述于美国专利 No. 7, 973, 142 (将其通过引用整体并入) 中描述的单克隆抗体。(可用于产生抗体的小鼠杂交瘤 Balbc 脾细胞 (B 细胞),其被赋予 ATCCNo. PTA-7580) (在本文中称为 R15E6),于 2006 年 5 月 4 日保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC), P. O. Box1549, Manassas, Va. 20108USA)、具有与 R15E6 相同或基本上相同的生物特征的抗体;R15E6 的抗体片段,其中片段包含重链和轻链可变区;R15E6 的 $F(ab')_2$;Fab、Fv、scFv 的二聚体或三聚体;以及来源于 R15E6 的双链体、三链体或四链体。

[0077] 具体地,适合用于本发明的试剂是单独的或通过已知技术提供的与其它氨基酸序列组合的抗体、抗体片段、其变体或衍生物。这样的技术包括但不限于酶促切割、化学切割、肽合成或重组技术。本发明还包括衍生剂例如肽体。

[0078] 因此, HPTP β -ECD 结合剂的一个实施方案是抗体,另一个实施方案是蛋白质,另一个实施方案是肽,以及另一个实施方案是 darpin,另一个实施方案是适体,另一个实施方案是肽体,另一个实施方案是 adnectin,另一个实施方案是核酸。在一些实施方案中, HPTP β -ECD 结合剂是单克隆抗体或是多克隆抗体。在具体的实施方案, HPTP β -ECD 结合剂是能够结合 HPTP β -ECD 的抗体片段。优选地, HPTP β -ECD 结合剂是抗体,或抗体片段,包括但不限于 $F(ab')_2$ 、Fab、Fab 的二聚体、Fv、Fv 的二聚体、scFv、scFv 的二聚体、二聚体 Fab、Fv、Fv 的二聚体、scFv、scFv 的二聚体、Fab 的三聚体、Fv 的三聚体、scFv 的三聚体、微型抗

体、双链抗体、三链抗体、四链抗体、线性抗体、蛋白质、肽、适体、肽体、adnectin 或核酸,上述分子结合 HTP β 的细胞外部分。在某些实施方案中,HTP β -ECD 结合剂是单克隆抗体和其 F(ab')₂。在一些实施方案中,HTP β -ECD 结合剂包含多个 HTP β -ECD 结合部位,例如其中 HTP β -ECD 结合剂是完整抗体或 F(ab')₂,或 Fab 的二聚体,或 Fab 的三聚体。例如,在一些实施方案中,HTP β -ECD 结合剂能够同时在相同或不同的表位上结合两个 HTP β 分子,从而将两个 HTP β 分子彼此拉近。在其它实施方案中,HTP β -ECD 结合剂能够同时在相同或不同表位上同时结合 3 个 HTP β 分子,从而将 3 个 HTP β 分子彼此拉近。在另一个实施方案中,HTP β -ECD 结合剂是由杂交瘤细胞系 ATCCNo. PTA-7680 产生的单克隆抗体。在另一个实施方案中,HTP β -ECD 结合剂是由杂交瘤细胞系 ATCCNo. PTA-7680 产生的单克隆抗体的抗原结合片段。在另一个实施方案中,HTP β -ECD 结合剂是具有与由杂交瘤细胞系 ATCCNo. PTA-7680 产生的单克隆抗体相同或基本上相同的生物特征的抗体或其抗原结合片段。

[0079] 可将本申请中公开的 HTP β -ECD 结合剂的实施方案的任一个共价地或非共价地缀合至媒介物。术语“媒介物”是指影响试剂的生物性质的分子。例如,媒介物可阻止试剂的降解和 / 或增加其半衰期、吸收、减小春毒性、减小其免疫原性或增加其生物活性。示例性媒介物包括但不限于免疫球蛋白的 Fc 结构域;聚合物,例如:聚乙二醇 (PEG)、多聚赖氨酸、葡聚糖;脂质;胆固醇基团(例如类固醇);碳水化合物、树状聚合物、寡糖或结合补救受体的肽。在一些实施方案中,媒介物是聚乙二醇 (PEG),在其它实施方案中,媒介物是多聚赖氨酸,在其它实施方案中媒介物是葡聚糖,在其它实施方案中,媒介物是脂质。

[0080] 水溶性聚合物附着例如聚乙二醇、聚氧乙烯二醇或聚丙二醇,如美国专利 No. 4, 64 0, 835, 4, 496, 689, 4, 301, 144, 4, 670, 417, 4, 791, 192 和 4, 179, 337 中描述的,将所述美国专利通过引用整体并入本文。本领域已知的其它有用的聚合物包括单甲氧基-聚乙二醇、葡聚糖、纤维素或其它基于碳水化合物的聚合物、聚-(N-乙烯基吡咯烷酮)-聚乙二醇、丙二醇同聚物、多聚丙烯氧化物 / 乙烯氧化共聚物、聚氧乙烯多元醇(例如,甘油)和聚乙烯醇以及这些聚合物的混合物。特别优选的是利用聚乙二醇 (PEG) 亚单位共价修饰的肽体。可在指定的位置,例如在肽体的氨基末端键合水溶性聚合物,或可将所述聚合物随机地连接至多肽的一个或多个侧链。PEG 用于改善试剂例如肽体和具体地人源化抗体的治疗能力的用途描述于美国专利 No. 6, 133, 426 中。本发明还涉及衍生试剂的肽或媒介物部分。这样的衍生物可改善试剂的溶解度、吸收、生物半衰期等。部分可以可选择地消除或减弱试剂的任何不期望的副作用等。

[0081] 如本文中所用,术语“抗体”(Ab)包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、单链抗体,例如来自骆驼和骆驼的抗体、抗体片段例如可变区和 / 或恒定区片段,只要它们显示期望的生物活性,例如抗原结合活性。术语“免疫球蛋白”(Ig)可与本文中的“抗体”互换使用。

[0082] 如本文中所用,“抗原结合片段”是结合 HTP β 的部分并且抑制 HTP β 的至少一个磷酸酶活性的试剂的片段。

[0083] 基本四链抗体单位是由两个相同轻(L)链和两个相同重(H)链组成的异源四聚体糖蛋白(IgM 抗体由 5 个基本异四聚体单位连同称为 J 链的额外多肽组成,从而包含 10 个结合部位,然而分泌型 IgA 抗体可聚合以形成包含 2-5 个基础 4 链单位连同 J 链的多价

集合体)。在 IgG 的情况下,4 链单位通常为约 150 千道尔顿 (kDa)。每一个 L 链通过一个共价二硫键连接至 H 链,然而,取决于 H 链同种型,两个 H 链通过一个或多个二硫键彼此连接。每一个 H 和 L 链还具有有规律间隔的链间二硫桥。每一个 H 链在 N- 末端具有可变结构域 (V_H),随后 3 个恒定结构域 (C_H) (对于每一个 α 和 γ 链)和 4 个 C_H 结构域 (对于 μ 和 ϵ 同种型)。每一个 L 链在 N- 末端具有可变结构域 (V_L),随后在其另一端一个恒定结构域 (C_L)。 V_L 与 V_H 对齐, C_L 与重链的第一恒定结构域 (C_{H1}) 对齐。特定氨基酸残基据信形成轻链与重链可变结构域之间的界面。 V_H 与 V_L 的配对一起形成单个抗原结合部位。关于不同种类的抗体的结构和性质,参见例如, Basic and Clinical Immunology, 第 8 版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr 和 Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, 1994, 第 71 页和第 6 章。

[0084] 来自任何脊椎动物物种的 L 链可基于它们的恒定结构域的氨基酸序列被分配至称为 κ 和 λ 的两个明确不同类型之一。取决于它们的重链的恒定结构域 (C_H) 的氨基酸序列,免疫球蛋白可被分配至不同的种类或同种型。存在五类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 分别具有称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。基于 C_H 序列和功能的相对小的差异, γ 和 α 种类被进一步细分成亚类,例如人表达下列亚类 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。

[0085] 骆驼科的成员例如骆马、骆驼和单峰骆驼包含独特类型的抗体,其不存在轻链,并且还不存在 C_H 结构域 (Muyldermans, S., Rev. Mol. Biotechnol., 74, 277-302 (2001))。这些重链抗体的可变区称为 V_H 或 VHH, 并且构成来源于功能性免疫球蛋白的最小可获得的完整抗原结合片段 (15kDa)。

[0086] 术语“可变的”是指可变结构域的某些区段在抗体之间在序列广泛不同的事实。V 结构域介导抗原结合并且确定特定抗体对于其抗原的特异性。然而,可变性不是均匀地分配在可变结构域的 110 个氨基酸跨度上的。相反地, V 区域由称为“高变区”的具有极高可变性的更短区域 (其各自在长度上为 9-12 个氨基酸) 间隔的具有 15-30 个氨基酸的称为构架区 (FR) 的相对不变的区段组成。天然重链和轻链的可变结构域各自包含 4 个 FR, 主要采取 β - 折叠片构型,其形成环连接,在一些情况下形成 β - 折叠片结构的部分。每一条链中的高变区通过 FR 和与来自另一条链的高变区紧密地保持在一起,促成抗体的抗原结合部位的形成。恒定结构域并不直接地参与抗体对抗原的结合,但显示不同的效应子功能,例如抗体在抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 中的参与。

[0087] 当在本文中使用时,术语“高变区”是指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基 (例如 V_L 中的大约残基 24-34 (L1)、50-56 (L2) 和 89-97 (L3), 和 V_H 中的大约 1-35 (H1)、50-65 (H2) 和 95-102 (H3); Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 和 / 或来自“高变环”的残基。

[0088] 如本文中所用,术语“单克隆抗体”是指获自一组基本上同源的抗体的抗体,即除以少量存在的可能的天然存在的突变外,包含单个抗体的群体是相同的。与包括针对不同表位的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,每一个单克隆抗体针对单个表位,即单个抗原决定簇。除它们的特异性以外,单克隆抗体还有利的方面在于它们可不受其它抗体污染地合成。修饰词“单克隆的”不被解释为需要通过任何特定方法进行抗体的产生。例如,本

发明中使用的单克隆抗体可通过杂交瘤方法来制备或可使用重组 DNA 法在细菌、真核动物或植物细胞中制备（参见，例如，美国专利 No. 4, 816, 567）。还可使用可获得的技术（例如 Clackson 等人, *Nature*, 第 352 卷, 第 624-628 页 (1991)）从噬菌体抗体文库分离“单克隆抗体”。

[0089] 本文中的单克隆抗体包括“嵌合”抗体，其中一部分重链和 / 或轻链与来源于特定物种或属于特定抗体种类或亚类的抗体的对应序列相同或同源，然而链的其余部分与来源于另一物种或属于另一抗体种类或亚类的抗体的对应序列相同或同源，以及这样的抗体的片段，只要它们显示期望的生物活性（参见美国专利 No. 4, 816, 567；和 Morrison 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 6851-6855 (1984)）。

[0090] “抗体片段”包含多嵌合抗体的一部分，优选完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab 的二聚体和三聚体、Fv、scFv、微型抗体；双链、三链和四链抗体；线性抗体（See Hudson 等人, *Nature Med.* 9, 129-134 (2003)）。

[0091] “Fv”是包含完整抗原结合部位的最小抗体片段。该片段由一个重链和轻链可变区结构域通过紧密的非共价缔合组成的二聚体组成。从这两个结构域的折叠发射出为抗原结合提供氨基酸残基并且赋予抗体抗原结合特异性的 6 个高变环（来自 H 和 L 链的各自 3 个环）。然而，甚至单个可变结构域（或仅包含 3 个对于抗原具有特异性的 CDR 的 Fv 的一半）具有识别并且结合抗原的能力，从而包括在 Fv 的定义中。

[0092] 单链可变片段 (scFv) 是通过 10 至约 25 个氨基酸的短接头肽连接的免疫球蛋白的重链 (V_H) 和轻链 (V_L) 的可变区的融合蛋白。接头通常富含半胱氨酸（以赋予柔性）以及丝氨酸或苏氨酸（以赋予可溶性），并且可连接 V_H 的 N- 末端与 V_L 的 C- 末端或反之亦然。该蛋白质保持原始免疫球蛋白的特异性，尽管除去了恒定区和引入了接头。

[0093] 二价（或双价）单链可变片段（二-scFv，双-scFv）可通过连接两个 scFv 来进行工程化。这可通过利用有两个 V_H 和两个 V_L 区产生单肽链来进行，从而产生串联 scFv。另一个可能性是产生具有接头肽的 scFv，所述接头肽太短以至于两个可变区不能折叠在一起（约 5 个氨基酸），从而迫使 scFv 二聚化。该类型称为双链抗体。已显示双链抗体具有达到对应 scFv 的 1/40 的解离常数，意味着它们具有高得多的对于它们的靶的亲和力。因此，双链抗体药物可以以比其它治疗抗体低得多的剂量给药，并且能够高度特异性地体内靶向肿瘤。更短的接头（1 或 2 个氨基酸）导致三聚体（所谓的三链体或或三体）形成。四链抗体是已知的，并且经显示显示甚至比双链抗体更高的对于它们的靶的亲和力。

[0094] 术语“人源化抗体”或“人抗体”是指这样的抗体，所述抗体包含来自非人物种（例如，小鼠）的重链和轻链可变区，但其中 V_H 和 / 或 V_L 序列的至少一部分已被改变而成为更加“人样”，即与人种系可变序列更相似。一种类型的人源化抗体是 CDR 移植抗体，其中人 CDR 序列被引入非人 V_H 和 V_L 序列以替代对应的非人 CDR 序列。用于制备嵌合 CDR 移植和人源化抗体的方法对于本领域技术人员来说是已知的（参见，例如，美国专利 No. 4, 816, 567 和 5, 225, 539）。用于人抗体的一个方法使用转基因动物，例如转基因小鼠。这些转基因动物包含插入它们自己的基因组的一大部分人抗体生成基因组，并且使动物自己的内源抗体产生在抗体的产生中缺乏。用于产生这样的转基因动物的方法在本领域是已知的。这样的转基因动物可使用 XenoMouse, RTM. 技术或通过使用“微小基因座 (minilocus)”法来制备。用于制备 XenoMice, RTM. 的方法描述于美国专利 No. 6, 162, 963, 6, 150, 584, 6, 114, 598

和 6,075,181 中。用于使用“微小基因座”法制备转基因动物的方法描述于美国专利 No. 5,545,807, 5,545,806, 5,625,825 和 W093/12227 中。

[0095] 非人抗体的人源化近年来已成为常规技术,并且现在在本领域技术人员知识范围内。几个公司提供了制备人源化抗体的服务例如, Xoma, Aries, Medarex, PDL 和 CambridgeAntibodyTechnologies。人源化方案详尽地描述于技术文献中,例如 Kipriyanov 和 LeGall, *MolecularBiotechnol.*, 第 26 卷, 第 39-60 页 (2004), HumanaPress, Totowa, N. J. ;Lo, *MethodsMol. Biol.*, 第 248 卷, 第 135-159 页 (2004), HumanaPress, Totowa, N. J. ;Wu 等人, *J. Mol. Biol.*, 294, 第 151-162 页 (1999)。

[0096] 在某些实施方案中,本发明中使用的抗体可在除杂交瘤细胞系外的细胞系中表达。编码特定抗体的序列可用于通过用于将多核苷酸引入宿主细胞的已知方法转化适当的哺乳动物宿主细胞,包括例如将多核苷酸包含装在病毒中(或包装进入病毒载体)和利用病毒(或载体)转导宿主细胞,或通过本领域已知的转染方法转染宿主细胞,如美国专利 No. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461 和 4,959,455 中举例说明的。使用的转化法可取决于待转化的宿主。用于将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞的方法在本领域是已知的并且包括但不限于葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、多核苷酸在脂质体中的封装、核酸与带正电荷的脂质的混合以及 DNA 至细胞核的直接显微注射。

[0097] 以适当的组合编码抗体或其片段的重链恒定区、重链可变区、轻链恒定区或轻链可变区的氨基酸序列的核酸分子必要时,使用标准连接技术来将其插入适当的表达载体。可将抗体重链或轻链恒定区连接至适当可变区的 C 末端,连接进入表达载体。载体通常被选择在使用s的特定宿主细胞中具有功能(即,载体可与宿主细胞的机器相容,以便基因的扩增和/或基因的表达式可进行)。关于表达载体的综述,参见 *MethodsEnzymol.* 第 185 卷 (Goeddel 编辑), 1990, AcademicPress。

[0098] 特异性结合剂的鉴定

[0099] 适当的选择结合剂可使用本领域已知的多种技术来鉴定。例如,可筛选候选试剂的对 HTP β 的结合,筛选其活性。一般地,首先筛选候选试剂的结合,随后筛选显示选择性结合的那些候选试剂以测定抑制 HTP β - 介导的 Tie2 的去磷酸化的能力。然而,在一些情况下,可以首先体外筛选候选试剂的活性。

[0100] 结合活性的测定

[0101] 用于鉴定特异性结合剂的适当的测定的选择取决于待筛选的候选试剂。本领域技术人员能够选择用于特定候选试剂的适当测定。

[0102] 例如,当候选试剂是抗体或包含 Fc 部分的肽体时,如实施例 3B 中描述的 FACS 分析允许基于其结合表达 HTP β 的细胞的能力来选择候选试剂。细胞可内源地表达 HTP β 或可进行遗传工程以表达 HTP β 。

[0103] 对于其它候选试剂例如适体,其它技术在本领域是已知的。例如,特异性结合 HTP β 的适体可使用称为 SELEX(指数富集的配体系统进化技术)的技术来选择,所述技术通过重复轮的体内选择来选择特异性适体。

[0104] 通过蛋白质印迹进行的抑制剂活性的测定

[0105] 如实施例 4 中例举的,在一个适当的测定中,将 HUVEC 在不同浓度的候选试剂存在

或不存在的条件下培养在无血清培养基中,制备细胞的裂解物,利用 Tie2 抗体进行免疫沉淀,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,随后转移至 PVDF 膜。随后利用抗磷酸酪氨酸抗体对膜结合的免疫沉淀的蛋白质进行系列蛋白质印迹,接着用 Tie2 抗体定量总的 Tie2。Tie2 磷酸化表达为抗-磷酸酪氨酸信号对总的 Tie2 信号的比率。更高水平的抗磷酸酪氨酸信号表明候选试剂的更大 HPTP β 抑制。

[0106] 可筛选的候选试剂包括但不限于已知试剂的文库,所述试剂包括天然产物例如植物或动物提取物、生物活性分子,包括蛋白质、肽,包括但不限于随机肽文库的成员,以及由 D 或 L 构型氨基酸组成的组合化学衍生的分子文库、抗体(包括但不限于多克隆、单克隆、嵌合、人、单链抗体、Fab、F(ab)₂ 和 Fab 表达文库片段及其表位结合片段)。

[0107] 如本文中所用,“抗体片段”包括但不限于 F(ab')₂、Fab、Fv、scFv 的二聚体或三聚体,或来源于抗体的双链抗体、三链抗体或四链抗体。

[0108] 在整个本申请中,参考各种出版物。将这些出版物的公开内容通过引用整体并入本申请,以更全面地描述现有技术水平。

[0109] 血管内皮内衬在所有血管的内侧,形成控制血浆和白细胞从血管进出的非血栓形成表面。非活跃内皮具有数月至数年的周转率,并且仅在血管生成活化后增殖。内皮稳态的丧失是病况例如炎症、动脉粥样硬化、再狭窄、血管生成和不同类型的血管病变的共同特性。

[0110] 血管发生和血管生成在健康成人中被下调,并且当通过微环境因素例如缺氧或炎症诱导血管生成时,除雌性生殖系统的器官外,几乎完全与病状相关。与血管生成相关或通过血管生成诱发的这些病理学过程包括多样如癌症、银屑病、黄斑变性、糖尿病视网膜病变、血栓形成和炎症性障碍包括关节炎和动脉粥样硬化的疾病。然而,在某些情况下,不充足的血管生成可导致疾病例如缺血性心脏病和先兆子痫。

[0111] 不活跃血管内皮形成控制血浆和细胞从血流进入下层组织的紧密屏障。内皮细胞通过连接至特定细胞内结构和信号传导复合物的连接跨膜蛋白彼此粘附。内皮层可经历从静息状态至活跃状态的转变,其中内皮的活化导致粘附分子的表达。该内皮活化是起始血管生成、炎症和炎症相关疾病的前提。

[0112] Tie-2(受体样酪氨酸激酶)只在控制内皮分化的内皮细胞中表达。Tie-2 结合刺激性配体血管生成素-1(Ang-1)并且被其激活,所述血管生成素促进 Tie-2 受体的自磷酸化,从而导致一连串事件,所述事件通过促进内皮细胞存活并且防止基膜溶出来导致血管结构的稳定化。这样,Tie-2 激活是用于通过维持不活跃的完整血管内皮来减弱渗漏脉管系统的方法。Tie-2 激活被 Ang-2 抑制,所述 Ang-2 显示通过对 Tie-2 的竞争性结合(从而阻断 Tie-2 的磷酸化)产生的 Ang-1 拮抗作用。已发现升高的水平的 Ang-2 与炎性疾病(除其它以外,败血症、狼疮、炎性肠病和转移性疾病例如癌症)相关。

[0113] 在高 Ang-2 水平期中,内皮中导致血管渗漏综合征的裂缝或断裂形成。血管渗漏综合征导致危害生命的作用例如组织和肺水肿。对于许多疾病状态,升高的 Ang-2 水平是疾病状态或病况存在的明确标志物。一旦疾病状态已被解决,Ang-1/Ang-2 平衡就回复,并且血管内皮被稳定。在其中 Ang-1 与 Ang-2 之间的正常平衡已被破坏的病况中,已发现公开的试剂通过抑制磷酸化 Tie-2 的去磷酸(通过对人蛋白酪氨酸磷酸酶- β (HPTP- β) 的抑制)来放大 Tie-2 信号转导。此外,可以以不同量使用公开的试剂来以非常受控的方式

增强 Tie-2 信号转导,从而滴定 Tie-2 放大的水平。

[0114] 本公开内容提供了用于治疗患有血管渗漏综合征的患者,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐的组合物。本公开内容的组合物还可包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0115] 本文中公开了包含 HPTP β -ECD 结合剂的组合物,其中组合物用于治疗公开的病况、疾病、损伤、治疗过程、细胞治疗等。

[0116] 在一个实施方案中,方法包括治疗患者的血管渗漏,其中患者患有炎性疾病或病况的患者,所述方法包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物。另一个实施方案是治疗患有物理创伤的患者,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物。在具体的实施方案中,创伤是手术创伤。在一个实施方案中,方法是治疗患有休克的患者,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物。

[0117] 特定的实施方案包括出血后休克或创伤后休克或脓毒性休克。本公开内容还提供了通过给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物来治疗患有成人呼吸窘迫综合征的患者。另一个实施方案是治疗急性肺损伤患者的方法,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物。下面包括癌症转移以及细菌和病毒感染。

[0118] 在一些实施方案中,预防性施用 HPTP β -ECD 结合剂以在将患者置于血管渗漏的风险中的事件之前稳定患者的血管系统。在一个实施方案中,预防性施用 HPTP β -ECD 结合剂以在手术之前稳定患者的血管系统。另一个实施方案是防止患者的血管渗漏综合征的方法,其中在经历化疗疗法之前给患者施用有效量的 HPTP β -ECD 结合剂。另一个实施方案是治疗处于休克的风险中的患者的方法,包括给患者施用有效量的 HPTP β -ECD 结合剂。

[0119] 公开的 HPTP β -ECD 结合剂可用于预防、缓和人和动物的肿瘤转移、使肿瘤转移降至最低程度、控制和 / 或减少肿瘤转移。公开的 HPTP β -ECD 结合剂还可用于显示原发性肿瘤生长的速度。这样,本文中公开的试剂可作为利用一种或多种药物或其它药物试剂的组合法的部分进行施用。当用作组合法的部分时,通过公开的试剂提供的原发性肿瘤的转移的减少和生长的减少允许待用于治疗患者的任何药物或药物疗法的更有效和高效的使用。此外,通过公开的试剂控制转移为受试者提供了更大的将疾病集中在一个位置中的能力。

[0120] 因此,本公开内容的一个实施方案是治疗患者的癌症的方法,包括施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐的组合物。另一个实施方案是防止患有癌症的患者中的转移的方法,包括施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐的组合物。另一个实施方案是使患有癌症的患者的肿瘤转移减小至最低程度的方法,包括施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐的组合物。本文中公开了用于防止恶性肿瘤的转移或减小肿瘤生长速度的方法。因此,另一个实施方案是治疗经诊断患有恶性肿瘤的患者的方法,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐的组合物。另一个实施方案是防止经诊断患有恶性肿瘤的患者中的转移的方法,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐的组合物。另一个实施方案是减小经诊断患有肿瘤的患者中的肿瘤生长速度的方法,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂或其药学上可接受的盐的组合物。

[0121] 下面是可通过公开的方法和组合物治疗的癌症的非限制性实例:白血病例如慢性髓

性白血病；急性淋巴母细胞白血病；儿童急性髓细胞性白血病、成人急性髓细胞性白血病、毛细胞白血病；淋巴瘤例如伯基特淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、皮肤 t 细胞淋巴瘤、中枢神经系统淋巴瘤；星形细胞瘤例如小脑星形细胞瘤、儿童星形细胞瘤、纤维状细胞星形细胞瘤、弥漫性星形细胞瘤、间变型星形细胞瘤、神经胶质瘤、少突神经胶质瘤、脑星形细胞瘤视路神经胶质瘤 (cerebral astrocytoma visual pathway glioma) 和下丘脑神经胶质瘤、脑干胶质瘤、视通路、下丘脑神经胶质瘤、脑星形细胞瘤 / 恶性神经胶质瘤；癌例如胸腺瘤、胸腺癌、鳞状细胞癌、皮肤癌、Merkel 细胞癌、肾上腺皮质癌、肾上腺皮质癌、基底细胞癌；肉瘤例如横纹肌肉瘤、卡波西肉瘤、软组织肉瘤、子宫肉瘤、骨肉瘤、骨的恶性纤维组织细胞瘤；阑尾肿瘤；肝外胆管癌；膀胱癌；骨癌；唾液腺癌；脑瘤；儿童中枢神经系统非典型畸胎样 (childhood central nervous system atypical teratoid) / 杆状瘤；中枢神经系统胚胎瘤 (central nervous system embryonal tumors)；颅咽管瘤；室管膜母细胞瘤；室管膜瘤；髓母细胞瘤；髓上皮瘤；中间分化的松果体实质肿瘤 (pineal parenchymal tumor of intermediate differentiation)；原始神经外胚叶肿瘤和成松果体细胞瘤 (supratentorial primitive neuroectodermal tumors and pineoblastoma)；脑和脊髓肿瘤 (brain and spinal cord tumors)；乳腺癌；支气管肿瘤；类癌瘤；胃肠道类癌肿瘤；中枢神经系统胚胎瘤；宫颈癌；儿童脊索瘤；慢性脊髓增生性疾病；结肠癌；结直肠癌；颅咽管瘤；性腺外生殖细胞肿瘤；睾丸生殖细胞肿瘤 (testicular germ cell tumor)；视网膜母细胞瘤；胆囊癌；胃癌；胃肠道类癌肿瘤；胃肠道间质瘤 (gastrointestinal stromal tumor)；颅外生殖细胞瘤 (extracranial germ cell tumor)；妊娠滋养细胞肿瘤；胶质母细胞瘤；头颈癌；肝细胞癌 (肝) 癌；郎格汉氏细胞组织细胞增多病；下咽癌；胰岛细胞瘤；肾癌 (肾 (肾细胞) 癌)；喉癌；唇和口腔癌；唇和口腔癌；非小细胞肺癌；间皮瘤；具有隐蔽原发性的转移性鳞状颈癌 (metastatic squamous neck cancer with occult primary)；口腔癌；儿童多发性内分泌腺瘤综合征；多发性骨髓瘤 / 浆细胞肿瘤 (plasma cell neoplasm)；蕈样霉菌病 (mycosis fungoides)；骨髓增生异常综合征；多发性骨髓瘤；慢性骨髓增殖性疾病；鼻腔和鼻窦肿瘤 (nasal cavity and paranasal sinus cancer)；神经母细胞瘤；口癌；口咽癌；卵巢癌例如卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢低度潜在恶性肿瘤 (ovarian low malignant potential tumor)；胰腺癌；胰岛细胞瘤；乳头状瘤病；甲状腺癌；甲状旁腺癌；阴茎癌；食管癌；咽癌；鼻咽癌；嗜铬细胞瘤；松果体瘤；垂体瘤；浆细胞肿瘤 / 多发性骨髓瘤；胸膜肺母细胞瘤；前列腺癌；直肠癌；肾细胞 (肾) 癌；肾盂和输尿管癌；Sézary 综合征；皮肤癌 (非黑色素瘤)；皮肤癌 (黑色素瘤)；眼内黑色素瘤；恶性黑色素瘤、小肠癌；转移性鳞状颈癌；胃 (gastric) 癌；睾丸癌；喉癌；肾盂和输尿管的移行细胞癌 (transitional cell cancer of the renal pelvis and ureter)；妊娠滋养细胞肿瘤；尿道癌；子宫癌、子宫内膜；阴道癌；外阴癌；原发性巨球蛋白血症；和肾母细胞瘤。

[0122] 可将 HPTP β -ECD 结合剂与一种或多种化学治疗剂组合施用。

[0123] “化学治疗剂”或“化学治疗性化合物”是用于治疗癌症的化合物。可与本文中公开的 HPTP β -ECD 结合剂组合使用的癌症化学治疗剂包括但不限于有丝分裂抑制剂 (长春花生物碱)。这些治疗剂包括长春新碱、长春碱、长春地辛和 Navelbine™ (长春瑞滨-5'-脱水长春花碱)。在其它实施方案中，癌症化学治疗剂包括拓扑异构酶 I 抑制剂，例如喜树碱化合物。如本文中所用，“喜树碱化合物”包括 Camptosar™ (盐酸伊立替康)、Hycamtin™ (盐

酸拓扑特肯)和来源于喜树碱及其类似物的其它化合物。可用于本公开内容的方法和组合物的癌症化学治疗剂的另一种类是鬼臼毒素衍生物例如依托泊苷、替尼泊苷和米托蒽。本公开内容还包括称为烷化剂的其它癌症化学治疗剂,所述治疗剂烷基化肿瘤细胞中的遗传物质。这些治疗剂包括但不限于顺铂、环磷酰胺、氮芥、三乙烯硫代磷酰胺、卡莫司汀、白消安、苯丁酸氮芥、洛莫司汀、尿嘧啶氮芥、chlomaphazin 和达卡巴嗪。本公开内容包括抗代谢药如化学治疗剂。这些类型的试剂的实例包括胞嘧啶阿糖核苷、氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、巯嘌呤、硫唑嘌呤和丙卡巴肼。可用于本公开内容的方法和组合物的另一类癌症化学治疗剂包括抗生素。实例包括但不限于多柔比星、博来霉素、更生霉素、柔红霉素、光辉霉素、丝裂霉素、丝裂霉素 C 和道诺霉素。对于这些化合物存在许多商购可得的脂质体制剂。本公开内容还包括其它癌症化学治疗剂,包括但不限于抗-肿瘤抗体、达卡巴嗪、氮胞苷、安吡啶、美法仑、VM-26、异环磷酰胺、泰素及其衍生物、L-天冬酰氨酶、米托蒽醌、IF-2、吉西他滨、厄洛替尼、多柔比星、irinotecan 和贝伐珠单抗。

[0124] 可与公开的 HTP β -ECD 结合剂组合使用的其它抗癌剂包括但不限于:阿西维辛(Acivicin)、阿柔比星(Aclarubicin)、盐酸阿考达唑(AcodazoleHydrochloride)、阿克罗宁(AcrQnine)、阿多来新(Adozelesin)、阿地介白素(Aldesleukin)、六甲蜜胺(Altretamine)、安波霉素(Ambomycin)、乙酸阿美蒽醌(AmetantroneAcetate)、氨鲁米特(Aminoglutethimide)、阿那曲唑(Anastrozole)、胺茴霉素(Anthramycin)、曲林菌素(Asperlin)、阿扎胞苷(Azacitidine)、阿扎替派(Azetepa)、阿佐霉素(Azotomycin)、巴马司他(Batimastat)、苯佐替派(Benzodepa)、比卡鲁胺(Bicalutamide)、盐酸比生群(BisantreneHydrochloride)、二甲磺酸双奈法德(BisnafideDimesylate)、比折来新(Bizelesin)、硫酸博来霉素(BleomycinSulfate)、布喹那钠(BrequinarSodium)、溴匹立明(Bropirimine)、放线菌素 C(Cactinomycin)、卡普睾酮(Calusterone)、卡醋酸(Caracemide)、卡贝替姆(Carbetimer)、卡铂(Carboplatin)、盐酸卡柔比星(CarubicinHydrochloride)、卡折来新(Carzelesin)、西地芬戈(Cedefingol)、苯丁酸氮芥(Chlorambucil)、克拉屈滨(Cladribine)、甲磺酸克里斯奈托(CrisnatolMesylate)、阿糖胞苷(Cytarabine)、盐酸道诺霉素(DaunorubicinHydrochloride)、地西他滨(Decitabine)、右奥马铂(Dexormaplatin)、地扎胍宁(Dezaguanine)、甲磺酸地扎胍宁(dezaguaninemesylate)、地吡醌(Diaziquone)、多西他赛(Docetaxel)、盐酸多柔比星(doxorubicinhydrochloride)、屈洛昔芬(Droloxifene)、柠檬酸屈洛昔芬(droloxifenecitrate)、丙酸屈他雄酮(Dromostanolone Propionate)、达佐霉素(Duazomycin)、依达曲沙(Edatrexate)、盐酸依氟鸟氨酸(eflornithinehydrochloride)、依沙芦星(Elsamitrucin)、恩洛铂(Enloplatin)、恩普胺酯(Enpromate)、依匹哌啶(Epipropidine)、盐酸表柔比星(epirubicinhydrochloride)、厄布洛唑(Erbulazole)、盐酸依索比星(EsorubicinHydrochloride)、雌莫司汀(Estramustine)、雌莫司汀磷酸钠(EstramustinePhosphateSodium)、依他硝唑(Etanidazole)、磷酸依托泊甙(etoposidephosphate)、埃托宁(Etoprine)、盐酸法屈唑(Fadrozole Hydrochloride)、法扎拉滨(Fazarabine)、芬维 A 胺(Fenretinide)、氟尿苷(Floxuridine)、磷酸氟达拉滨(FludarabinePhosphate)、氟西他滨(Fluorocitabine)、磷喹酮(Fosquidone)、福司曲星钠(FostriecinSodium)、盐酸吉西他滨(gemcitabinehydrochloride)、羟基脲

(hydroxyurea)、盐酸伊达比星 (IdarubicinHydrochloride)、伊莫福新 (Ilmofosine)、白细胞介素 2 (包括重组白细胞介素 2 或 rIL2)、干扰素 α -2a(interferon α -2a)、干扰素 α -2b(interferon α -2b)、干扰素 α -n1(interferon α -n1)、 α 干扰素 -n3(interferon α -n3,)、干扰素 β -1a(interferon β -1a)、干扰素 γ -1b(interferon γ -1b)、异丙铂 (Iproplatin)、盐酸伊立替康 (IrinotecanHydrochloride)、乙酸兰瑞肽 (LanreotideAcetate)、乙酸亮丙立德 (LeuprolideAcetate)、盐酸利阿唑 (LiarozoleHydrochloride)、洛美曲索钠 (LometrexolSodium)、洛莫司汀 (Lomustine)、盐酸洛索蒽醌 (LosoxantroneHydrochloride)、马索罗酚 (Masoprocol)、香美登素 (Maytansine)、盐酸甲二氯二乙胺 (MechlorethamineHydrochloride)、乙酸甲地孕酮 (MegestrolAcetate)、乙酸美仑孕酮 (MelengestrolAcetate)、美诺立尔 (Menogaril)、甲氨蝶呤钠 (methotrexatesodium)、蔓托宁 (Metoprine)、美妥替哌 (Meturedopa)、米丁度胺 (Mitindomide)、米托卡西 (Mitocarcin)、米托罗米 (Mitocromin)、米托洁林 (Mitogillin)、米托马星 (Mitomalcin)、米托司培 (Mitosper)、米托坦 (Mitotane)、盐酸米托蒽醌 (mitoxantronehydrochloride)、霉酚酸 (MycophenolicAcid)、诺考达唑 (Nocodazole)、诺加霉素 (Nogalamycin)、奥马铂 (Ormaplatin)、奥昔舒仑 (Oxisuran)、紫杉醇 (Paclitaxel)、培门冬酶 (Pegaspargase)、培利霉素 (Peliomycin)、奈莫司汀 (Pentamustine)、硫酸培洛霉素 (PeplomycinSulfate)、培磷酰胺 (Perfosfamide)、哌泊溴烷 (Pipobroman)、哌泊舒凡 (Piposulfan)、盐酸吡罗蒽醌 (PiroxantroneHydrochloride)、普卡霉素 (Plicamycin)、普洛美坦 (Plomestane)、吡吩姆钠 (PorfimerSodium)、泼尼莫司汀 (Prednimustine)、盐酸甲基苄肼 (ProcarbazineHydrochloride)、嘌呤霉素 (Puromycin)、盐酸嘌呤霉素 (puromycinhydrochloride)、吡唑呋喃菌素 (Pyrazofurin)、利波腺苷 (Riboprime)、罗谷亚胺 (Rogletimide)、沙芬戈 (Safmgol)、盐酸沙芬戈 (SafingolHydrochloride)、司莫司汀 (Semustine)、辛曲秦 (Simtrazene)、司泊索非钠 (SparfosateSodium)、司帕霉素 (Sparsomycin)、盐酸锗螺胺 (SpirogermaniumHydrochloride)、螺莫司汀 (Spiromustine)、螺铂 (Spiroplatin)、链黑菌素 (Streptonigrin)、链脉霉素 (Streptozocin)、磺氯苯脲 (Sulofenur)、他利霉素 (Talisomycin)、替康兰钠 (TecogalanSodium)、喃氟啉 (Tegafur)、盐酸替洛蒽醌 (TeloxantroneHydrochloride)、替莫泊芬 (Temoporfin)、替罗昔隆 (Teroxirone)、睾内酯 (Testolactone)、硫咪嘌呤 (Thiamiprine)、睾内酯 (Testolactone)、噻唑呋啉 (Tiazofurin)、替拉扎明 (Tirapazamine)、柠檬酸托瑞米芬 (ToremifeneCitrate)、乙酸曲托龙 (TrestoloneAcetate)、磷酸曲西立滨 (TriciribinePhosphate)、三甲曲沙 (Trimetrexate) 三甲曲沙 (trimetrexateglucuronate)、曲普瑞林 (Triptorelin)、盐酸妥布氯唑 (TubulazoleHydrochloride)、乌瑞替派 (Uredopa)、伐普肽 (Vapreotide)、维替泊芬 (Verteporfin)、硫酸长春碱 (VinblastineSulfate)、硫酸长春新碱 (VincristineSulfate)、硫酸长春地辛 (vindesinesulfate)、硫酸长春匹定 (VinepidineSulfate)、硫酸长春甘酯 (VinglycinateSulfate)、硫酸长春罗新 (VinleurosineSulfate)、酒石酸长春瑞宾 (VinorelbineTartrate)、硫酸长春罗定 (VinrosidineSulfate)、硫酸长春利定 (VinzolidineSulfate)、伏罗唑 (Vorozole)、折尼

铂 (Zeniplatein)、净司他丁 (Zinostatin)、盐酸左柔比星 (ZorubicinHydrochloride)。其它抗癌药包括但不限于:20-表-1,25-二羟基维生素 D₃、5-乙炔尿嘧啶、阿比特龙 (abiraterone)、阿柔比星 (aclarubicin)、酰基富烯 (acylfulvene)、阿的培诺 (adecyphenol)、阿多来新 (adozelesin)、阿地介白素 (aldesleukin)、ALL-TK 拮抗剂 (ALL-TKantagonists)、六甲蜜胺 (altretamine)、氨莫司汀 (ambamustine)、艾美多 (amidox)、氨磷汀 (amifostine)、氨基酮戊酸 (aminolevulinicacid)、氨柔比星 (amrubicin)、安吡啶 (Amsacrine)、阿那格雷 (anagrelide)、阿那曲唑 (anastrozole)、穿心莲内酯 (andrographolide)、血管生成抑制剂 (angiogenesisinhibitors)、拮抗剂 D (antagonistD)、拮抗剂 G (antagonist G)、安雷利克斯 (antarelix)、抗背部化形态发生蛋白-1 (anti-dorsalizing morphogeneticprotein-1)、抗雄激素 (antiandrogen)、前列腺癌 (prostatic carcinoma)、抗雌激素 (antiestrogen)、抗新普拉通 (antineoplaston)、甘氨酸阿非迪霉素 (aphidicolinglycinate)、细胞凋亡基因调节剂 (apoptosis genemodulator)、细胞凋亡调节剂 (apoptosisregulator)、脱嘌呤核酸 (apurinicacid)、ara-CDP-DL-PTBA;精氨酸脱氨酶 (arginine deaminase)、奥沙那宁 (asulacrine)、精氨酸脱氨酶、阿莫司汀 (atrimustine)、阿新司坦汀 1 (axinastatin1)、阿新司坦汀 2 (axinastatin2)、阿新司坦汀 3 (axinastatin3)、阿扎司琼 (azasetron)、阿扎托新 (azatoxin)、重氮酪氨酸 (azatyrosine)、巴卡亭 III (baccatinIII) 衍生物 (baccatinIII derivatives)、班兰诺 (balanol)、巴马司他 (batimastat)、BCR/ABL 拮抗剂 (BCR/ABLantagonist)、苯并二氢卟吩 (benzochlorin)、苯甲酰基星形孢菌素 (benzoylstauroporine)、 β 内酰胺衍生物 (betalactam derivative)、 β -阿立辛 (beta-alethine)、 β 可来霉素 B (betaclamycinB)、桦木酸 (betulinicacid)、bFGF 抑制剂 (bFGFinhibitor)、比卡鲁胺 (bicalutamide)、比生群 (bisantrene)、双氮丙啶基精胺 (bisaziridinylspermine)、比卡鲁胺 (bicalutamide)、双奈法德、bistratene A、比折来新 (bizelesin)、比锐来特 (breflate)、溴匹立明 (bropirimine)、布多替钛 (budotitane)、丁硫氨酸磺酰亚胺 (buthioninesulfoximine)、卡泊三醇 (calcipotriol)、钙磷酸蛋白 C (calphostinC)、丝雀痘病毒 IL-2 (canarypoxIL-2)、卡培他滨 (capecitabine)、甲酰胺-氨基-三唑 (carboxamide-amino-triazole)、羧酰胺基三唑 (carboxyamidotriazole)、CaRestM3、CARN700、软骨源性抑制剂 (cartilage derivedinhibitor)、卡折来新 (carzelesin)、酪蛋白激酶抑制剂 (ICOS) (caseinkinase inhibitors (ICOS))、栗树精胺 (castanospermine)、杀菌肽 B (cecropinB)、西曲瑞克 (cetorelix)、二氢卟吩 (chlorin)、氯喹啉磺酰胺 (chloroquinoxalinesulfonamide)、西卡前列素 (cicaprost)、顺式卟吩 (cis-porphyrin)、克拉屈滨 (cladribine)、氯米芬类似物 (clomifene analogue)、克霉唑 (clotrimazole)、克立霉素 A (collismycinA)、克立霉素 B (collismycinB)、康柏斯达汀 A4 (combretastatinA4)、康柏斯达汀类似物 (combretastatinanalogue)、康纳京尼 (conagenin)、卡那贝西汀 816 (crambescidin816)、克里斯奈托 (crisnatol)、念珠藻环肽 8 (cryptophycin8)、念珠藻环肽 A 衍生物 (cryptophycinA derivative)、卡拉新 A (curacinA)、环戊蒽醌 (cyclopentantraquinone)、环普兰姆 (cycloplatam)、西匹霉素 (cypemycin)、十八烷基磷酸阿糖胞苷 (cytarabineocfosfate)、溶细胞因子 (cytolyticfactor)、磷酸己烷雌酚 (cytostatin)、达昔单抗 (dacliximab)、地西他滨

(decitabine)、去氢膜海鞘素 B(dehydrodidemninB)、地洛瑞林 (deslorelin)、地塞米松 (dexamethasone)、右异环磷酰胺 (dexifosfamide)、右雷佐生 (dexrazoxane)、右维拉帕米 (dexverapamil)、地吡酮 (diaziquone)、膜海鞘素 B(didemninB)、地多西 (didox)、二乙基降精胺 (diethylnorspermine)、二氢-5-氮杂胞嘧啶核苷 (dihydro-5-azacytidine)、9-二氢紫杉醇 (dihydrorotaxol,9-)、二恶霉素 (dioxamycin)、二苯基螺莫司汀 (diphenylspiromustine)、多西他赛 (Docetaxel)、多可沙诺 (docosanol)、多拉司琼 (dolasetron)、脱氧氟尿苷 (doxifluridine)、屈洛昔芬 (droloxifene)、屈大麻酚 (dronabinol)、多卡霉素 SA(duocannycin SA)、依布硒啉 (ebselen)、依考莫司汀 (ecomustine)、依地福新 (edelfosine)、依决洛单抗 (edrecolomab)、依氟鸟氨酸 (eflornithine)、榄香烯 (elemene)、乙嘧替氟 (emitefur)、表柔比星 (epirubicin)、爱普列特 (epristeride)、雌莫司汀类似物 (estramustineanalogue)、雌激素激动剂 (estrogenagonist)、雌激素拮抗剂、(estrogenantagonist)、依他硝唑 (etanidazole)、磷酸依托泊苷 (etoposidephosphate)、依西美坦 (exemestane)、法屈唑 (fadrozole)、法扎拉滨 (fazarabine)、维甲酰酚胺 (fenretinide)、非格司亭 (filgrastim)、非那雄安 (fmasteride)、夫拉平度 (flavopiridol)、夫来折司汀 (flezelastine)、夫斯特隆 (fluasterone)、氟达拉滨 (fludarabine)、盐酸氟道诺霉素 (fluorodaunorunicinhydrochloride)、福酚美克 (forfenimex)、福美司坦 (formestane)、福司曲星 (fostriciccin)、福莫司汀 (fotemustine)、钆德卟啉 (gadoliniumtexaphyrin)、硝酸镓 (galliumnitrate)、加洛他滨 (galocitabine)、加尼瑞克 (ganirelix)、明胶酶抑制剂 (gelatinaseinhibitor)、吉西他滨 (gemcitabine)、谷胱甘肽抑制剂 (glutathioneinhibitor)、和普苏姆 (hepsulfam)、和瑞古林 (heregulin)、六亚甲基双乙酰胺 (hexamethylenebisacetamide)、金丝桃素 (hypericin)、伊班膦酸 (ibandronicacid)、伊达比星 (idarubicin)、艾多昔芬 (idoxifene)、伊决孟酮 (idramantone)、伊莫福新 (ilmofosine)、伊洛马司他 (ilomastat)、咪唑吡啶酮 (imidazoacridone)、咪喹莫特 (imiquimod)、免疫刺激剂肽 (immunostimulantpeptide)、胰岛素样生长因子-1受体抑制剂 (insulin-likegrowthfactor-1receptorinhibitor)、干扰素激动剂 (interferonagonist)、碘苄胍 (iobenguane)、碘多柔比星 (iododoxorubicin)、4-甘薯醇 (ipomeanol,4-)、伊罗普拉 (iroplact)、伊索拉定 (irsogladine)、异苯胍唑 (isobengazole)、异质哈立康定 B(isohomohalicondrinB)、伊他司琼 (itasetron)、杰斯普拉克立德 (jasplakinolide)、卡哈拉立得 F(kahalalideF)、三乙酸层状素-N(lamellarin-Ntriacetate)、兰乐肽 (lanreotide)、leinamycin、来格司亭 (lenograstim)、硫酸香菇多糖 (lentinansulfate)、来曲唑 (letrozole)、白血病抑制因子 (leukemia-inhibitingfactor)、白血球 α 干扰素 (leukocytealphainterferon)、亮丙立德+雌激素+孕酮 (leuprolide+estrogen+progesterone)、亮丙瑞林 (leuprorelin)、左旋咪唑 (levamisole)、利阿唑 (liarozole)、直链聚胺类似物 (linearpolyamine analogue)、亲脂性二糖肽 (lipophilicdisaccharidepeptide)、亲脂性铂化合物 (lipophilicplatinumcompound)、立索克林酰胺 7(lissoclinamide7) 洛铂 (lobaplatin)、蚯蚓磷脂 (lombricine)、洛美曲索 (lometrexol)、氯尼达明 (lonidamine)、洛索萘酮 (losoxantrone)、洛伐他汀 (lovastatin)、洛索立宾 (loxoribine)、勒托替康 (lurtotecan)、镧德卟啉 (lutetium texaphyrin)、立索茶碱 (lysofylline)、裂解肽

(lyticpeptide)、美坦新(maitansine)、麦洛坦汀A(mannostatinA)、马立马斯他(marimastat)、马索罗酚(masoprocol)、马司非(maspin)、基质溶素抑制剂(matrilysin inhibitor)、基质金属蛋白酶抑制剂(matrixmetalloproteinaseinhibitor)、美诺立尔(menogaril)、麦尔巴隆(merbarone)、美替瑞林(meterelin)、甲硫氨酸酶(methioninase)、甲氧氯普胺(metoclopramide)、MIF抑制剂(MIFinhibitor)、美服培酮(mifepristone)、米替福新(miltefosine)、米立司亭(mirimostim)、错配双链RNA(mismatcheddoublestrandedRNA)、米托胍脲(mitoguazone)、二溴卫矛醇(mitolactol)、丝裂霉素类似物(mitomycinanalogue)、米托蒽胺(mitonaftide)、刺尾鱼毒素纤维母细胞生长因子-皂草素(mitotoxinfibroblastgrowthfactor-saporin)、莫法罗汀(mofarotene)、莫拉司亭(molgramostim)、单克隆抗体(monoclonal antibody)、人绒毛膜促性腺激素(humanchorionicgonadotrophin)、单磷酸基脂质A+分枝杆菌细胞壁sk(monophosphoryllipidA+myobacteriumcellwallsk)、莫哌达醇(mopidamol)、多重抗药性基因抑制剂(multipledrugresistancegeneinhibitor)、基于多肿瘤抑制因子1的治疗剂(multipletumorsuppressor1-basedtherapy)、芥末抗癌剂(mustardanticanceragent)、美卡普罗B(mycaperoxideB)、分枝杆菌细胞壁提取物(mycobacterialcellwallextract)、美瑞泡仁(myriaporone)、N-乙酰基地那林(N-acetyldinaline)、N-取代苯甲酰胺(N-substitutedbenzamide)、那法瑞林(nafarelin)、纳格瑞替(nagrestip)、纳洛酮(naloxone)+戊唑星(pentazocine)、纳普维(napavin)、萘特非(naphterpin)、那托司亭(nartograstim)、奈达铂(nedaplatin)、奈莫柔比星(nemorubicin)、奈立膦酸(neridronicacid)、中性内肽酶(neutral endopeptidase)、尼鲁米特(nilutamide)、丽沙霉素(nisamycin)、一氧化氮调节剂(nitricoxidemodulator)、氮氧化物抗氧化剂(nitroxide antioxidant)、里挫林(nitrullyn)、06-苯甲基鸟嘌呤(06-benzylguanine)、奥曲肽(octreotide)、奥克恩(okicenone)、寡核苷酸(oligonucleotide)、奥那司酮(onapristone)、昂丹司琼(ondansetron)、昂丹司琼(ondansetron)、奥拉新(oracin)、口服细胞因子诱导剂(oral cytokine inducer)、奥马铂(ormaplatin)、奥沙特隆(osaterone)、奥赛力铂(oxaliplatin)、厄诺霉素(oxaunomycin)、紫杉醇(paclitaxel)、紫杉醇类似物(paclitaxelanalogue)、紫杉醇衍生物(paclitaxel derivative)、帕诺明(palauamine)、十六酰基根霉素(palmitoylrhizoxin)、帕米膦酸(pamidronicacid)、人参三醇(panaxytriol)、帕诺米芬(panomifene)、帕拉贝新(parabactin)、帕折普汀(pazelliptine)、培门冬酶(pegaspargase)、皮地新(peldesine)、戊聚糖聚硫酸钠(pentosanpolysulfatesodium)、喷司他汀(pentostatin)、喷唑(pentozole)、潘氟隆(perflubron)、培磷酰胺(perfosfamide)、紫苏子醇(perillylalcohol)、苯连氮霉素(phenazinomycin)、乙酸苯酯(phenylacetate)、磷酸酶抑制剂(phosphatase inhibitor)、皮西板尼(picibanil)、盐酸毛果芸香碱(pilocarpine hydrochloride)、吡柔比星(pirarubicin)、吡曲克辛(piritrexim)、普来司汀A(placetinA)、普来司汀B(placetinB)、血纤维蛋白溶酶原活化剂抑制剂(plasminogenactivatorinhibitor)、铂络合物(platinumcomplex)、铂化合物(platinumcompound)、铂-三胺络合物(platinum-triamine complex)、卟吩姆钠(porfimersodium)、泊非霉素(porfiromycin)、泼尼松(prednisone)、丙基双吡啶酮(propylbis-acridone)、前列腺素

J2(prostaglandinJ2)、蛋白酶抑制剂 (proteasomeinhibitor)、基于蛋白 A 的免疫调节剂 (proteinA-basedimmunemodulator)、蛋白激酶 C 抑制剂 (proteinkinaseCinhibitor)、蛋白激酶 C 抑制剂 (proteinkinaseC inhibitor)、微藻 (microalgal)、蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂 (protein tyrosinephosphataseinhibitor)、嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂 (purine nucleosidephosphorylaseinhibitor)、紫红素 (purpurins)、吡唑并吡啶 (pyrazoloacridine)、吡哆醛化血色素聚氧乙烯结合物 (pyridoxylated hemoglobinpolyoxyethyleneconjugate)、raf 拮抗剂 (rafantagonist)、雷替曲赛 (raltitrexed)、雷莫司琼 (ramosetron)、ras 法呢基蛋白转移酶抑制剂 (rasfarnesylproteintransferaseinhibitor)、ras 抑制剂、ras-GAP 抑制剂 (ras-GAPinhibitor)、去甲基化瑞替立汀 (retelliptinedemethylated)、依替膦酸铼 Re186(rheniumRe186etidronate)、根霉素 (rhizoxin)、核酶 (ribozyme)、RII 视黄酰胺 (RIIretinamide)、罗谷亚胺 (rogletimide)、罗希吐碱 (rohitukine)、罗莫肽 (romurtide)、罗喹美克 (roquinimex)、鲁滨吉隆 B1(rubiginoneB1)、鲁泊塞 (ruboxyl)、沙芬戈 (Safmgol)、圣特平 (saintopin)、SarCNU、沙卡弗托 A(sarcophytolA)、沙格司亭 (sargramostim)、Sdi1 模拟物 (Sdi1mimetics)、司莫司汀 (semustine)、衰老源性抑制剂 1(senescencederivedinhibitor1)、有义寡核苷酸 (sense oligonucleotide)、信号转导抑制剂 (signaltransductioninhibitor)、信号转导调节剂 (signaltransductionmodulator)、单链抗原结合蛋白 (single chainantigenbindingprotein)、西佐糖 (sizofiran)、索布佐生 (sobuzoxane)、硼卡钠 (sodiumborocaptate)、苯基乙酸钠 (sodium phenylacetate)、索佛罗 (solverol)、生长调节素 (somatomedin) 结合蛋白、索纳明 (sonermin)、斯帕福斯酸 (sparfosicacid)、斯皮卡霉素 D(spicamycinD)、螺莫司汀 (spiromustine)、斯兰罗皮汀 (splenopentin)、海绵抑制素 1(spongistatin1)、角鲨胺 (squalamine)、干细胞抑制剂 (stem cellinhibitor)、干细胞分裂抑制剂 (stem-celldivisioninhibitor)、斯替皮米德 (stipiamide)、基质溶素抑制剂 (stromelysininhibitor)、索非罗新 (sulfinosine)、超活性激脉肠肽拮抗剂 (superactive vasoactiveintestinal peptideantagonist)、磺化偏端霉素 (suradista)、苏拉明 (suramin)、苦马豆素 (swainsonine)、合成糖胺 (syntheticglycosaminoglycan)、他莫司汀 (tallimustine)、甲碘化他莫昔芬 (tamoxifenmethiodide)、牛磺莫司汀 (tauromustine)、他扎罗汀 (tazarotene)、替康兰钠 (tecogalansodium)、喃氟啶 (tegafur)、碲吡喃鎓 (tellurapyrylium)、端粒酶抑制剂 (telomerase inhibitors、替莫泊芬 (temoporfin)、替莫唑胺 (temozolomide)、四氯十氧化物 (tetrachlorodecaoxide)、替唑明 (tetrazomine)、噻立拉斯汀 (thaliblastine)、噻考瑞林 (thiocoraline)、血小板生成素 (thrombopoietin)、血小板生成素模拟物 (thrombopoietinmimetic)、胸腺法新 (thymalfasin)、促胸腺生成素受体激动剂 (thymopoietin receptor agonist)、胸腺曲南 (thymotrinan)、促甲状腺激素 (thyroid stimulating hormone)、锡乙基初吡啶 (tinethyletiopurpurin)、替拉扎明 (tirapazamine)、二氯化二茂钛 (titanocenebichloride)、托普升替 (topsentin)、托瑞米芬 (toremifene)、全能干细胞因子 (totipotentstemcell factor)、转译抑制剂、维甲酸 (tretinoin)、三乙酰基尿苷 (triacytyluridine)、曲西立滨 (triciribine)、三甲曲沙 (trimetrexate)、曲普瑞林 (triptorelin)、托烷司琼 (tropisetron)、妥罗雄脲 (turosteride)、酪氨酸激酶抑制剂

(tyrosinekinaseinhibitor)、酪氨酸磷酸化抑制剂 (tyrphostin)、UBC 抑制剂 (UBCinhibitor)、乌苯美司 (ubenimex)、泌尿生殖窦源性生长抑制因子 (urogenitalsinus-derivedgrowthinhibitory factor)、尿激酶受体拮抗剂 (urokinasereceptorantagonist)、伐普肽 (vapreotide)、凡瑞林 B (variolinB)、载体系统 (vectorsystem)、红细胞基因治疗剂 (erythrocytegenetherapy)、维拉雷琐 (velaresol)、凡拉明 (veramine)、凡啉 (verdin)、维替泊芬 (verteporfin)、维萨汀 (vinxaltine) 维他欣 (vitaxin)、伏罗唑 (vorozole)、扎诺特隆 (zanoterone)、折尼铂 (zeniplatine)、亚苡维 C (zilascorb) 和净司他丁斯酯 (zinostatin stimalamer)。在一个实施方案中,抗癌药为 5- 氟尿嘧啶 (fluorouracil) 或甲酰四氢叶酸 (leucovorin)。

[0125] 抗血管生成剂还用于治疗癌症。抗血管生成剂对于本领域技术人员来说是公知的。用于本公开内容的方法和组合物的适当的抗肿瘤生成剂包括抗 VEGF 抗体,包括人源化和嵌合抗体、抗 VEGF 适体和反义寡核苷酸。其它已知的血管生成抑制剂包括血管他丁、内皮他丁、干扰素、白细胞介素 1 (包括 α 和 β) 白细胞介素 12、维甲酸和金属蛋白酶 -1 和金属蛋白酶 -2 的组织抑制剂 (TIMP-1 和 -2)。还可使用小分子包括拓扑异构酶抑制剂例如丙亚胺、具有抗血管生成活性的拓扑异构酶 II 抑制剂。

[0126] 本公开内容的一个实施方案是用于治疗经诊断患有癌症的患者的方法,包括给患者施用包含有效量的 HTP β -ECD 结合剂的组合物。另一个实施方案是用于治疗经诊断患有癌症的患者的方法,包括给患者施用包含与有效量的化学治疗剂组合的有效量的 HTP β -ECD 结合剂的组合物,其中将 HTP β -ECD 结合剂和化学治疗剂一起施用或以任意顺序施用。

[0127] 本公开内容的一个实施方案用于防止或减少经诊断患有癌症的患者中的转移的方法,包括给患者施用包含有效量的 HTP β -ECD 结合剂的组合物。另一个实施方案是用于防止或减少经诊断患有癌症的患者的转移的方法,包括给患者施用包含与有效量的化学治疗剂组合的有效量的 HTP β -ECD 结合剂的组合物,其中将 HTP β -ECD 结合剂与化学治疗剂一起施用或以任意顺序施用。

[0128] 本公开内容的另一个实施方案是用于治疗经诊断患有癌症的患者的方法,包括给患者施用包含有效量的 HTP β -ECD 结合剂的组合物。另一个实施方案是用于治疗经诊断患有癌症的患者的方法,包括给患者施用包含与有效量的化学治疗剂组合的有效量的 HTP β -ECD 结合剂,其中将 HTP β -ECD 结合剂与化学治疗剂一起施用或以任意顺序施用。

[0129] 本公开内容的另一个实施方案是用于防止或减少经诊断患有癌症的患者中的转移的方法,包括给患者施用包含有效量的 HTP β -ECD 结合剂的组合物。另一个实施方案是用于防止或减少经诊断患有癌症的患者中的转移的方法,包括给患者施用包含与有效量的一种或多种化学治疗剂组合的有效量的 HTP β -ECD 结合剂的组合物,其中将 HTP β -ECD 结合剂与一种或多种化学治疗剂一起施用或以任意顺序施用。

[0130] 本公开内容的另一个实施方案是用于治疗经诊断患有胰腺癌的患者的方法,包括给患者施用包含有效量的 HTP β -ECD 结合剂的组合物。另一个实施方案是用于治疗经诊断患有胰腺癌的患者的方法,包括给患者施用包含与有效量的一种或多种化学治疗剂组合的有效量的 HTP β -ECD 结合剂的组合物,其中将 HTP β -ECD 结合剂与一种或多种化学治疗剂一起施用或以任意顺序施用。

[0131] 本公开内容的另一个实施方案是用于防止或减少经诊断患有胰腺癌的患者中的转移的方法,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物。另一个实施方案是用于防止或减少经诊断患有胰腺癌的患者中的转移的方法,包括给患者施用包含与有效量的一种或多种化学治疗剂组合的有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物,其中将 HPTP β -ECD 结合剂与一种或多种化学治疗剂一起施用或以任意顺序施用。

[0132] 在一些实施方案中,用于治疗胰腺癌的化学治疗剂是吉西他滨或 5- 氟尿嘧啶,或顺铂或卡培他滨,或奥沙利铂,或丝裂霉素,或其任意组合。

[0133] 另一个实施方案是用于治疗经诊断患有恶性黑色素瘤的患者的方法,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物。另一个实施方案是用于治疗经诊断患有转移性黑色素瘤的患者的方法,包括给患者施用包含与有效量的一种或多种化学治疗剂组合的有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物,其中将 HPTP β -ECD 结合剂与一种或多种化学治疗剂一起施用或以任意顺序施用。

[0134] 另一个实施方案是用于防止或减少经诊断患有恶性黑色素瘤的患者中的转移的方法,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物。另一个实施方案是用于防止或减少经诊断患有转移性黑色素瘤的患者中的转移的方法,包括给患者施用包含与有效量的一种或多种化学治疗剂组合的有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物,其中将 HPTP β -ECD 结合剂与一种或多种化学治疗剂一起施用或以任意顺序施用。

[0135] 在一些实施方案中,用于治疗黑色素瘤的化学治疗剂是顺铂,或长春碱,或达卡巴嗪,或其任意组合。

[0136] 另一个实施方案是用于治疗经诊断患有乳腺癌的患者的方法,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物。另一个实施方案是用于治疗经诊断患有乳腺癌的患者的方法,包括给患者施用包含与有效量的一种或多种化学治疗剂组合的有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物,其中将 HPTP β -ECD 结合剂与一种或多种化学治疗剂一起施用或以任意顺序施用。另一个实施方案是用于防止或减少经诊断患有乳腺癌的患者中的转移的方法,包括给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物。另一个实施方案是用于防止或减少经诊断患有乳腺癌的患者中的转移的方法,包括给患者施用包含与有效量的一种或多种化学治疗剂组合的有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物,其中将 HPTP β -ECD 结合剂与一种或多种化学治疗剂一起施用或以任意顺序施用。在一些实施方案中,用于乳腺癌的治疗的化学治疗剂是紫杉醇或紫杉醇的类似物。

[0137] 在特定实施方案中,将 HPTP β -ECD 结合剂与 IL-2 组合施用。

[0138] IL-2 诱发的血管渗漏:转移性癌症的治疗

[0139] 免疫疗法是治疗癌症的一个方法。身体自己的免疫系统的上调是免疫疗法的一个方面。在免疫系统信号分子之中,许多免疫系统信号分子是白细胞介素-2(IL-2),其在身体对微生物感染的天然反应中和在区分外来物(非自我)与自我中起着重要作用。高剂量白细胞介素-2 是 FDA 批准的用于转移性肾细胞癌和转移性黑色素瘤患者的治疗。虽然已报导仅 23% 的给予该疗法的这类受试者显示肿瘤反应,但该反应的持续时间可超过 10 年(EliasL. 等人,“Aliteratureanalysisof prognosticfactorsforresponseandqualityof responseofpatientswith renalcellcarcinomato interleukin-2-basedtherapy.”Oncology, (2001), 第 61 卷,第 91-101 页)。这样,IL-2 疗法是唯一可获得的提供治愈潜能的治疗。

[0140] Gallagher (Gallagher, D. C. 等人, “Angiopoietin2IsaPotential MediatorofHigh-DoseInterleukin2-InducedVascularLeak”Clin. CancerRes., (2007), 第 13 卷, No. 7, 第 2115-2120 页) 报导在利用高剂量 IL-2 治疗患者中发现升高的水平的血管生成素-2, 并且表明克服 Tie-2 信号转导的 Ang-2 阻断可能治愈为该疗法的副作用的血管渗漏综合征。

[0141] 已知 IL-2 引起内皮细胞活化, 然而丧失固有的屏障功能。在高剂量 IL-2 免疫疗法过程中 Tie-2 信号转导的放大可导致血管渗漏的减弱, 因为 Tie-2 刺激改善内皮细胞稳定性。这样, 通过施用可放大 Tie-2 信号转导的试剂, 可增加血管稳定性, 因此, 高 IL-2 给药的副作用被缓解。公开的 HTP β -ECD 结合剂可在低血管生成素-1 浓度的条件下或当高浓度的血管生成素-2 存在于 IL-2 治疗的患者中放大 Tie-2 信号转导。

[0142] 通过放大 Tie-2 信号转导而不影响 Ang-2 水平, 升高的水平的 Ang-2 用作潜在病状标志物的用途得到保留。例如, 患有炎症疾病例如败血症的患者通常具有用于抑制 Tie-2 的 Ang-1 刺激的升高的 Ang-2 水平。该升高的 Ang-2 导致作为血管渗漏的症状的水肿。本发明的方法, 通过放大 Tie-2 信号转导而不影响 Ang-2 水平, 提供了用于减轻与血管渗漏相关的症状同时保持使用 Ang-2 水平作为疾病进展和分辨的量的能力。

[0143] 多至 65% 的接受该 IL-2 疗法的患者必定因 VLS 而中断或停止治疗。白细胞介素-2 (IL-2) 和免疫毒素 (IT) 疗法的主要剂量限制性毒性是血管渗漏综合征 (VLS)。VLS 的特征在于伴随液体和蛋白质的外渗的血管通透性的增加, 从而导致间质性水肿或器官衰竭。VLS 的表现包括液体滞留、低血压、体重的增加、外周性水肿、肺水肿、胸膜和心包渗出、腹水、全身性水肿和以严重形式存在的肺和心血管衰竭的体征。

[0144] 公开的 HTP β -ECD 结合剂可用作减少因利用 IL-2 的治疗引起的血管渗漏的有效疗法。因此, 本发明的实施方案是治疗、减少或防止待施用 IL-2 的患者的血管渗漏的方法, 其中所述方法包括给患者施用包含有效量的 HTP β -ECD 结合剂的组合物。可将 HTP β -ECD 结合剂与 IL-2 共施用或分开施用。可以以任意顺序和通过任何方法例如静脉内、口服、通过贴剂、皮下注射等施用 IL-2 和 HTP β -ECD 结合剂。

[0145] 本公开内容的一个实施方案是用于治疗肾细胞癌的方法, 包括给患者施用组合物, 所述组合物包含: a) 有效量的白细胞介素-2, 以便提供免疫反应; 和 b) 有效量的 HTP β -ECD 结合剂; 其中可将白细胞介素-2 与 HTP β -ECD 结合剂一起施用或以任意顺序施用。另一个实施方案本文中公开了用于治疗肾细胞癌的方法, 包括给患者施用组合物, 所述组合物包含: a) 高剂量的白细胞介素-2; 和 b) 有效量的 HTP β -ECD 结合剂。

[0146] 还公开了用于治疗转移性黑色素瘤的方法, 包括给患者施用一系列组合物, 其中将组合物以任意顺序和以任意有效量施用, 第一组合物包含高剂量的白细胞介素-2, 第二组合物包含有效量的 HTP β -ECD 结合剂。

[0147] 还公开了用于治疗肾细胞癌的方法, 包括给患者施用一系列组合物, 其中可将组合物以任意顺序和以任意有效量施用, 第一组合物包含高剂量的白细胞介素-2, 第二组合物包含有效量的 HTP β -ECD 结合剂。

[0148] 本文中公开用于通过给需要治疗的患者施用疗法来治疗转移性黑色素瘤的方法, 所述疗法包含: a) 有效量的白细胞介素-2, 以便提供免疫反应; 和 b) 有效量的 HTP β -ECD 结合剂; 其中可将白细胞介素-2 与 HTP β -ECD 结合剂一起施用或以任意顺序施用。

[0149] 本文中公开了用于通过给需要治疗的患者施用疗法来治疗转移性黑色素瘤

的方法,所述疗法包含:a)有效量的白细胞介素-2,以便提供免疫反应;和b)有效量的HPTP β -ECD结合剂;其中可将白细胞介素-2与HPTP β -ECD结合剂一起施用或以任意顺序施用。

[0150] 本文中公开了可用于治疗癌症患者的组合物,其中利用一种或多种诱发患者的血管渗漏综合征癌症药物治疗癌症患者。这样,本文中公开了有效地减少因癌症治疗而引起的血管渗漏的组合物,所述组合物包含有效量的HPTP β -ECD结合剂。

[0151] 本文中公开的另一个方面是对于治疗具有医学病况或疾病状态的人或其它哺乳动物是有效的组合物,其中医学病况或疾病状态的治疗诱发血管渗漏综合征,组合物包含:a)有效量的HPTP β -ECD结合剂;和b)一种或多种药物;其中药物的至少之一诱发血管渗漏综合征。

[0152] 在其它方面,本文中公开了包含:a)有效量的HPTP β -ECD结合剂;和b)一种或多种化学治疗剂的组合物。

[0153] 本文中公开了可用于控制血管渗漏的组合物,所述组合物包含有效量的一种或多种本文中公开的试剂。本文中公开了可用于治疗炎症性疾病患者的组合物,所述炎症性疾病的非限定性实例包括败血症、狼疮和炎性肠病,组合物包含有效量的本文中公开的HPTP β -ECD结合剂。HPTP β -ECD结合剂抑制用作Tie-2信号转导放大器的HPTP β 的Tie2去磷酸化酶活性。

[0154] 肿瘤生长通常是多步骤过程,该过程始于细胞增殖的控制的丧失。随后癌细胞开始快速分裂,导致用显微镜观察到的小的球状肿瘤:原位癌。随着肿瘤块生长,细胞本身将离最近的毛细血管越来越远。最后肿瘤终止生长并达到稳定状态,其中增殖细胞的数目抗衡正在死亡的细胞数目。尺寸的限制因营养物和氧气的缺乏而引起。在组织中,氧扩散限制对应于毛细血管与细胞之间的100 μ m的距离,该距离在围绕单个血管的3-5行细胞的范围内。原位癌可保持不活动,并且许多年未被检测出来,转移极少与这些小的(2至3mm²)无血管肿瘤相关。

[0155] 当肿瘤生长因营养物和/或氧气的缺乏而终止时,该肿瘤血管系统的减少也限制抗肿瘤药物被递送至恶性细胞的能力。此外,如果存在肿瘤血管系统的略微增加,这将允许抗肿瘤疗法至恶性细胞的递送而不起始转移。这样,当用于略微放大Tie-2信号转导时公开的试剂可用于增加至肿瘤细胞的血流而不导致转移或当提供用于将抗肿瘤药递送至恶性细胞时不受控制的肿瘤细胞增殖。

[0156] 本文中公开了用于治疗癌症的方法,包括给有此需要的患者的施用有效量的与一种或多种化学治疗性化合物或免疫治疗性化合物结合的HPTP β -ECD结合剂。“略微放大Tie-2信号转导”意指将足够量的公开的化合物给患者施用,以例肿瘤细胞血管的量增加,以便增加的循环允许递送抗肿瘤化合物或疗法而不刺激肿瘤生长,其中肿瘤细胞生长的速度少于肿瘤细胞死亡的速度。应承认,放大Tie2信号转导可稳定肿瘤血管系统,从而使得其抗血管生成信号,从而减少肿瘤血管生成和肿瘤生长,同时改善肿瘤血流和化学治疗剂的递送。

[0157] 血管生成素-2与格里逊打分、转移和与癌症相关存活显著相关(LindA. J. 等人,“Angiopoietin-2expressionisrelatedtohistological grade, vascular density, metastasisandoutcomeinprostatecancer”Prostate, (2005),第62卷,第394-299页)。经发现血

管生成素-2 在前列腺癌骨、肝和淋巴结转移中表达,但在骨、肝和淋巴结中的前列腺癌肿瘤细胞中几乎或无血管生成素-1 表达 (Morrissey C. 等人,“Differential expression of angiogenesis associated genes in prostate cancer bone, liver and lymph node metastasis” Clin. Exp. Metastasis (2008), 第 25 卷,第 377-388 页)。这样,监测 Ang-2 的水平提供了用于评价前列腺癌的存在和前列腺癌细胞因血管渗漏而遍布身体的扩散的方法。

[0158] 因此,本公开内容的另一个实施方案是评价治疗的效率的方法,包括当患者正在经历治疗时监测患者的 Ang-2 水平。

[0159] 由病原体引起的疾病中的血管稳定化

[0160] 本文中公开了用于防止或治疗由一种或多种病原体引起的血管渗漏综合征的方法,包括给需要治疗的人或其它哺乳动物施用有效量的一种或多种 HPTP β -ECD 结合剂。

[0161] 一个实施方案是用于治疗由一种或多种病原体引起的血管渗漏综合征的方法,包括给需要治疗的人或其它哺乳动物施用组合物,所述组合物包含:a) 有效量的一种或多种有效地抗存在于人或哺乳动物中的病原体的化合物;和 b) 有效量的 HPTP β -ECD 结合剂;其中可将一种或多种有效地抗病原体的化合物与 HPTP β -ECD 结合剂一起施用或以任意顺序施用。

[0162] 还公开了用于防止经诊断患有可产生人或哺乳动物的血管渗漏综合征的病原体感染的人或其它哺乳动物的血管渗漏综合征的方法,包括给人或哺乳动物施用组合物,所述组合物包含:a) 有效量的一种或多种有效地抗存在于人或哺乳动物中的病原体的化合物;和 b) 有效量的 HPTP β -ECD 结合剂;其中可将一种或多种有效地抗病原体的化合物与 HPTP β -ECD 结合剂一起施用或以任意顺序施用。

[0163] 下列是其中毒力可通过减轻由所述生物体诱发的血管渗漏的程度来控制的病毒、细菌和其它病原体的非限定性实例。金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)、炭疽芽孢杆菌 (Bacillus anthracis)、假单胞菌属 (Pseudomonas)、酿脓链球菌 (Streptococcus pyogenes) 和登革热病毒。

[0164] 一个实施方案是用于通过给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物来治疗患有细菌感染的患者的血管渗漏综合征的方法。还公开了用于防止经诊断患有细菌感染的人或其它哺乳动物的血管渗漏综合征的方法。

[0165] 因此,本公开内容的一个实施方案是通过给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物来治疗患有细菌感染的患者的方法。在具体实施方案中,细菌感染是炭疽芽孢杆菌感染。在其它实施方案中,细菌感染是假单胞菌属感染。在其它实施方案中,细菌感染是酿脓链球菌感染。

[0166] 一个实施方案是用于通过给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物来治疗患有病毒感染的患者的血管渗漏综合征的方法。还公开了用于防止经诊断患有病毒感染的人或其它哺乳动物的血管渗漏综合征的方法。

[0167] 另一个实施方案是通过给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物来治疗患有病毒感染的患者的方法。在具体实施方案中,病毒感染是登革热病毒感染。

[0168] 可将 HPTP β -ECD 结合剂与一种或多种抗菌或抗病毒剂组合施用,其中可将 HPTP β -ECD 结合剂与抗病毒或抗菌剂一起施用或以任意顺序施用。因此,本公开内容的实施方案是治疗患有细菌感染的患者的方法,其包括:a) HPTP β -ECD 结合剂;和 b) 一种或多

种抗菌剂,其中将 HPTP β -ECD 结合剂与抗菌剂一起施用或以任意顺序施用。本公开内容的另一个实施方案是治疗患有病毒感染的患者,包括施用:a)HPTP β -ECD 结合剂;和 b) 一种或多种抗病毒剂,其中将 HPTP β -ECD 结合剂与抗病毒剂一起施用或以任意顺序施用。

[0169] 由本公开内容提供的另一个方法是用于确定患有血管渗漏综合征的患者的治疗过程的方法,包括:a) 给患者施用包含有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物;b) 在治疗过程中监测存在于患者中的血管生成素-2 的水平;和 c) 当血管生成素-2 水平返回至正常范围内时停止治疗。

[0170] 其它方面涉及治疗感染炭疽的患者的血管渗漏的方法,包括将包含与有效量的一种或多种有效地抗炭疽的抗菌剂组合的有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物,其中将 HPTP β -ECD 结合剂与有效地抗炭疽的抗菌剂一起施用或以任意顺序施用。

[0171] 另一个方面涉及治疗感染病毒的患者血管渗漏的方法,包括施用包含与有效量的一种或多种抗病毒剂组合的有效量的 HPTP β -ECD 结合剂的组合物,其中将 HPTP β -ECD 结合剂与抗病毒剂一起施用或以任意顺序施用。

[0172] 使用公开的试剂进行的 Tie-2 的增加的放大提供了用于稳定血管系统而无需影响 Ang-1 和 / 或 Ang-2 水平的方法。本文中公开了用于稳定血管系统的方法,包括给患者施用有效量的 HPTP β -ECD 结合剂。

[0173] 因为公开的试剂可放大 Tie-2 信号转导而不增加 Ang-2 的量,因此当给患者施用 HPTP β -ECD 结合剂时监测患者的血清中的 Ang-2 的量,用作用于测定与血管渗漏综合征(例如,作为感染的结果的败血症)相关的各种疾病或疾病状态的过程的方法。这样,公开了用于稳定患有炎症疾病的患者的血管系统的方法,其中血管生成素-2 的水平升高,包括:a) 给患者施用有效量的 HPTP β -ECD 结合剂;b) 监测存在于患者中的血管生成素-2 的水平;和 c) 当血管生成素-2 水平返回至正常范围时,停止治疗。

[0174] “正常血管生成素-2 水平”在本文中所指的意思是血清中约 1ng/mL 至约 2ng/mL 的 Ang-2 的量。或者,可测定患有疾病状态(例如,严重败血症)的个体的 Ang-2 的水平,并且可监测 Ang-2 的水平直至患者血清中的 Ang-2 的量下降至更接近正常范围的水平。在该情况下,可继续或停止药物的共施用。

[0175] 因此,本文中公开了用于在治疗过程中稳定患者的血管系统的方法,包括:a) 给患者共施用有效量的 HPTP β -ECD 结合剂和一种或多种药物作为治疗;b) 监测存在于患者中的血管生成素-2 的水平;和 c) 停止施用一种或多种药物,选择一种或多种用作治疗的药物,如果血清血管生成素-2 的水平不下降的话。

[0176] HPTP β -ECD 结合剂,当稳定患者的血管系统以便抗病原体的治疗过程可持续时,还可用于在其中将测定抗病原体的有效治疗的时期中稳定患者。即,HPTP β -ECD 结合剂本身可因减少血管渗漏及其并发症而具有对由病原体引起的疾病的结果具有有益作用。

[0177] 包含 HPTP β -ECD 结合剂的上述组合物的任何组合物适合用于制备用于治疗上述疾病或障碍的任一种的药剂。此外,包含 HPTP β -ECD 结合剂的上述组合物的任一种适合用于治疗上述疾病或障碍的任一种。

[0178] 体内血管渗漏

[0179] Miles 测定 (Miles, A. A. 和 E. M. Miles (1952) Vascular reaction to histamine, histamine-liberator and leukotaxine in the skin of guinea-pigs. J. Physiol., 第

118 卷,第 228-257 页,通过引用整体并入本文)可用于直接研究和定量致死毒素以及水肿毒素(ET[PA 加 EF])—介导的小鼠模型中的血管渗漏。下列是如由 GozesY. 等人, *AnthraxLethalToxin InducesKetotifen-SensitiveIntradermalVascularLeakageinCertain InbredMiceInfect. Immun.*, 2006February, 第 74 卷, No. 2, 第 1266 - 1272 页(通过引用将其整体并入本文)描述的改进的 Miles 测定,其可用于评价公开的 HPTP β -ECD 结合剂的防止暴露于炭疽的人和动物的血管渗漏。

[0180] 如先前所描述的(VarugheseM. 等人, (1998) *Internalizationofa Bacillusanthracisprotectiveantigen-c-Mycfusionproteinmediatedby cellsurfaceanti-c-Mycantibodies. Mol. Med.* 4:87-95 通过引用将其整体并入本文),纯化高纯度的 PA、LF 和突变体 LFE687C。ET 或 LT 的剂量是指每一种组分的量(即, 100 μ gLT 是 100 μ gPA+100 μ g 的 LF)。除氮卓斯汀外所有药物可购自 SigmaAldrich(St. Louis, MO); 氮卓斯汀可购自 LKTLaboratories(St. Paul, MN)。LT 是致死毒素的缩写;PA 是保护性抗原的缩写;LF 是致死因子的缩写;和 EP 是水肿因子的缩写。

[0181] 动物。

[0182] BALB/cJ、DBA/2J、C3H/HeJ、C3H/HeO_uJ、WBB6F1/J-Kit^W/Kit^{W-v} 和集落匹配的野生型纯合对照小鼠可购自 TheJacksonLaboratory(Bar Harbor, ME)。BALB/c 裸小鼠、C57BL/6J 裸小鼠和 C3H 无毛(C3. Cg/TifBomTac-hr)小鼠可购自 TaconicFarms(Germantown, NY)。C3H 裸小鼠可购自 NationalCancerInstituteAnimalProduction Area(Frederick, MD)。当它们为 8 至 12 周龄时,使用小鼠。除对于 C3H 无毛发和裸动物外,在所有小鼠在真皮内(i. d.)注射之前 24 小时,剃除所有小鼠的毛发。为了评价对系统性 LT 的易感性,用 100 μ gLT 腹膜内注射(i. p.)小鼠,在 5 天中观察到全身乏力或死亡的体征。Fischer344 大鼠可购自 TaconicFarms(Germantown, NY)并且在体重为 150 至 180g 时使用。利用 12 μ gLT,利用或不利用 250 μ g 的肥大细胞稳定药酮替芬在尾静脉中脉内注射(i. v.)大鼠,监测确切死亡时间。

[0183] Miles 测定。

[0184] Miles 测定使用作为示踪剂的伊文思蓝染料(其结合内源性血清白蛋白)的 i. v. 注射来测定测试物质的 i. d. 注射后来自周围血管的大分子渗漏。利用 200 μ l 的 0.1%伊文思蓝染料(SigmaChemicalCo., St. Louis, MO) i. v. 注射裸小鼠和正常剃除毛发的小鼠。10 分钟后,在左和右侧以及在单个或二个背部位置上 i. d. 注射 30 μ l 的测试毒素或对照样品(仅 PA、仅 LF、仅 EF 或磷酸盐缓冲溶液)。为了定量渗漏的程度,在注射后 60 分钟取出围绕 i. d. 注射位置的相同大小的(1.0-至 1.5-cm 的直径)皮肤区域,将其在 41°C 于甲酰胺(1ml)放置 48h,允许染料提取。读取样品的 A₆₂₀,通过与磷酸盐缓冲盐溶液、PA 或 LF 处理的对照相比较来计算渗漏的程度。

[0185] 在其中测试 HPTP β -ECD 结合剂对 LT 介导的渗漏的效力的实验中,如上所述利用伊文思蓝 i. v. 注射小鼠,在染料注射后 10 分钟通过 i. p. 注射全身性引入测试试剂。在伊文思蓝注射后 30 分钟,通过 i. d. 注射引入 LT。在另一个实施方案中,待测试的试剂可通过 i. d. 注射局部引入,10 分钟后在相同位置注射 LT。

[0186] 细胞毒性实验。

[0187] MC/9 肥大细胞可获自 ATCC(Manassas, VA)并且生长在补充有 1-谷氨酰胺(2mM)、

2- 巯基乙醇 (0.05mM)、大鼠 T-STIM(BD Biosciences-DiscoveryLabware, Bedford, MA) (10 %) 和胎牛血清 (FBS, 10 % 的终浓度 ;Invitrogen-GIBCOBRL, Gaithersburg, MD) 的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基中。随后以 104/ 孔的密度将细胞接种在 96 孔板中,随后利用不同 LT 浓度或仅 PA 对照进行处理。在 6、12 和 24 小时后,按照制造商的方案使用 Promega aCellTiter96AQ_{ueous} OneSolution 细胞增殖测定 (Promega, Madison, WI) 评价活力。或者,在提供以除 FBS(无血清培养基)外的全部补充剂的培养基中进行毒性测定。在其它实施方案中,可从 CambrexCorp. (Cambrex, Walkersville, MD) 获得处于第 3 至第 5 代的混合人脐静脉内皮细胞 (HUVEC),将其于利用内皮细胞贴壁因子 (Sigma, St. Louis, MO) 预处理的培养瓶中生长在 EGM-MVBulletkit (Cambrex, Walkersville, MD) 中。为了进行毒性实验,通常将细胞接种在 EGM-MVBulletkit 中的 96 孔板中。在测定当天,随后用补充有 10% FBS 或人血清 (Sigma, St. Louis, MO) 的 M199 培养基 (Sigma, St. Louis, MO) 替代该培养基,将细胞以 2×10^3 /0.1ml/ 孔的密度重新接种在 96 孔板中,以一式三份利用不同浓度的 LT 进行处理。对于 MC/9 细胞,通常在 24、48 和 72 小时的时间点上评价细胞活力。

[0188] HUVEC 通透性测定

[0189] 可将 HUVEC 单层有效地在 24 孔板中培养在 Transwell-Clear 细胞培养插入物 (6.5-mm 的直径、0.4- μ m 孔径 ;Corning-Costar, Acton, MA) 上,从而产生由腔室 (插入物内部) 和亚腔室 (组织培养板孔) 组成的两室培养系统。在接种细胞之前,用内皮细胞贴壁因子 (Sigma, St. Louis, MO) 涂覆插入物。在插入物旋转之前,将包含 10% 补充铁的胎牛血清和 1% 的内皮细胞生长因子 (Sigma, St. Louis, MO) 的预温热的 CS-C 培养基 (Sigma, St. Louis, MO) 添加至孔中。随后将 HUVEC 细胞悬浮物 (200 μ L 的 5×10^5 个细胞 /ml) 添加至每一个插入物中。将细胞在 37°C 于 5% CO₂ 中培养达到 21 天以确保单层的正确形成。为了测试屏障功能,可将培养基更换成利用 10% FBS 补充的 RPMI 或无血清 RPMI。为了评价屏障功能,将辣根过氧化物酶 (Sigma, St. Louis, MO) 添加至插入物 (10 μ g/ 孔) 中。将 LT (1 μ g/mL) 或单独的 PA 对照处理 (1 μ g/mL) 或单独的 LF (1 μ g/mL) 添加至一式两份孔中,随后每隔 1 小时 (进行 12 小时),从亚腔室取出 10 μ L 的样品,通过添加 100 μ L 底物 [2', 2' - 连氨基 - 双 (3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸)] (A-3219 ;Sigma, St. Louis, MO) 和在 405nm 读数来测试辣根过氧化物酶的酶促活性。

[0190] 炭疽的组合法

[0191] 血管组织的增加的稳定化可增加已知抗微生物剂抗炭疽感染的功效。这样,可将 HPTP β -ECD 结合剂作为用于治疗炭疽的组合法进行评价。下列描述了一系列可用于测定 HPTP β -ECD 结合剂作为用于治疗炭疽感染的组合法的一部分的功效的测定。

[0192] 已发现 LF 切割促分裂原活化蛋白激酶 (MAPKK),破坏信号转导,和导致巨噬细胞裂解。这样,除了 Miles 测定以外,下列基于细胞和肽切割的测定可用于确认 HPTP β -ECD 结合剂抑制 LT 活性作用的效力。为了进行下列测定,MAPKKide 可购自 ListBiological Laboratories (Campbell, CA)。氟化肽底物可获自 Anaspec (San Jose, CA)。

[0193] 体内测定

[0194] 在开始评价炭疽的组合法治疗过程之前 1 周,将测试试剂 (各自 200mg) 溶解于 800 μ L 的 DMSO 中并于 -20°C 下贮存。在即将注射之前,将每一种测试试剂于 PBS 中进行稀释,导致 0.5mg/mL 的于 2% DMSO 中的终浓度。在第 0 天通过 i. p. 注射用 2×10^7 个孢子 /

小鼠（于 PBS 中）攻击测试动物。处理始于攻击后 24 小时。适当的治疗方案的一个实例是环丙沙星（50mg/kg）和 HPTP β -ECD 结合剂（5mg/kg）的组合。未处理的动物的对照样品，将单独的环丙沙星、单独的公开的试剂和与公开的试剂组合的环丙沙星给动物施用，每天 2 次监测它们直至注射后第 14 天。

[0195] 可每天一次利用 200 μ L 的体积通过胃肠外注射方便地施用环丙沙星和待测试的试剂，进行 10 天。在第 14 天处死所有存活的动物。应当将表现出垂死（即，显示严重地减少的或不存在的活性或移位水平、对外部刺激无应答性或不能获得可容易获得的食物或水，以及任何下列伴随体征：起伏的发型、弓起的姿势、不能维持正常体温、体温过低的体征、呼吸性窘迫或其它严重地使虚弱的病况）的患病动物在表现这些症状的当天处死。

[0196] 细菌诱发的血管渗漏的调节

[0197] 已知病原菌引起血管渗漏。该诱发的血管渗漏抑制抗微生物剂和其它药物靶向侵入微生物的能力。这样，可单独地或与其它药物成分组合地使用 HPTP β -ECD 结合剂以防止作为细菌感染の結果发生的过度血管渗漏来加强宿主免疫系统。

[0198] 下面描述可用于测定 HPTP β -ECD 结合剂（单独的或组合疗法）的功効的测试和测定。

[0199] 金黄色葡萄球菌（*S. aureus*）是革兰阳性脓毒性休克的主要病原体，并且与血浆激肽原的消耗相关。HPTP β -ECD 结合剂对金黄色葡萄球菌诱发的血管渗漏活性的作用可通过测量这些试剂针对由金黄色葡萄球菌分泌的两个半胱氨酸蛋白酶的活性来测定。蛋白水解的活性 staphopainA (ScpA) 以缓激肽 (BK) B2-受体 - 依赖性方式诱发豚鼠皮肤的血管渗漏。该作用被 staphopainB (SspB) 增强，所述 staphopainB 本身不具有血管渗漏活性。ScpA 也从人血浆产生血管渗漏活性。

[0200] 脓毒性休克的重要病理生理机制是由血浆渗漏至血管外空间引起的低血容量性低血压。已发现在注射入豚鼠皮肤后 5 分钟内在低至 20nM 的浓度上 ScpA 诱发血管渗漏—反应被共存在的 SspB 加强，表明通过这些蛋白酶产生的血管渗漏诱发高效地在体内发生 (Imamura T. 等人, Induction of vascular leakage through release of bradykinin and a novel kinin by cysteine proteinases from *Staphylococcus aureus* (2005) *J. Experimental Medicine*, 第 201 卷, No. 10, 第 1669-1676 页)。

[0201] 血管渗漏测定。

[0202] 可使用下列方法评价动物的血管渗漏。将 100 μ L 的 1% 的盐水中的伊文思蓝染料溶液 (SigmaAldrich) 注射进尾静脉。30 分钟后，处死小鼠，通过右心室利用盐水灌注小鼠以除去血管内伊文思蓝。切取肺，将其在 55°C 于 1mL 甲酰胺中提取过夜。伊文思蓝含量被测定为甲酰胺提取物的 OD₆₂₀ 减去 OD₅₀₀。

[0203] 本文中公开的试剂可用作单一药物疗法来通过调节由病毒引起的血管渗漏的作用减轻流感的严重度，从而允许身体自己的免疫系统产生更大的对这些病原体的抗性。下列测定可用于测定 HPTP β -ECD 结合剂因改善的血管完整性而抑制病毒严重度的作用。

[0204] 公开的测定可使用病毒斑、病毒致细胞病理改变效应 (CPE) 和病毒血凝素的抑制。

[0205] 蛋白水解的敏感性测定

[0206] HPTP β -ECD 结合剂可被决定来结合血凝素，从而使蛋白质装配物去稳定。下列方

法可用于测定去稳定化的增加,从而增加的血凝素对由 HPTP β -ECD 结合剂引起的蛋白水解的攻击的敏感性。在融合构象上,HA 变得对蛋白酶消化更加敏感。该性质可用于验证融合抑制剂是否与 HA 相互作用 (LuoG. 等人,“Molecular mechanism underlying the action of a novel fusion inhibitor of influenza A virus.” J. Virol., (1997), 第 71 卷, No. 5, 第 4062-4070 页)。因此,由于血管渗漏的控制,可评价 HPTP β -ECD 结合剂通过增强身体的免疫反应间接影响 HA 消化的能力。

[0207] 用 5 μ M 的浓度的待测试的试剂温育纯化的血凝素胞外域的三聚体。将三聚体在 pH7.0 和 pH5.0 经历胰蛋白酶消化,以未处理的 HA 和利用作为用于溶解测试试剂的溶剂的 DMSO 处理的 HA 为对照。对于 pH5.0 样品,利用 pH5.0 缓冲液处理 HA 三聚体进行 15 分钟,将其中和至 pH7.0。将胰蛋白酶 (20ng) 添加至 10 μ L 中的样品中,在 37°C 下使消化进行 1 小时。使用抗-HA (H3) 抗血清,通过蛋白质印迹凝胶电泳估量存在的 HA 的量。包含有效抑制剂的样品提供胰蛋白酶对 HA 的消化的增加。

[0208] 此外,组合疗法可提供用于治疗流感的方法,所述方法通过提供与防止因流感病毒引起的血管渗漏的严重度的试剂一起的抗病毒药剂来治疗流感。

[0209] 抗病毒化合物例如奥司他韦可用于公开的组合疗法的体内评价和用于评价 HPTP β -ECD 结合剂的功效。可以以单份剂量给流感 A/NWS/(H1N1) 病毒感染的小鼠施用药物组合。在一些情况下,动物的感染包括病毒通过它们的肺的多次传代。一个方便的方法包括始于病毒暴露之前 4 小时的每天 2 次施用 20mg/kg/天,进行 5 天。随后用在从 10^{-2} ($10^{5.75}$ 细胞培养物 50% 感染剂量 (CCID₅₀)/mL) 开始的 10 倍的范围内变化的不同浓度的病毒攻击动物。在第 6 天处死每一个组中的 4 只小鼠,取出它们的肺,赋予在 0 (正常) 至 4 (最大李子呈色) 的范围内变化的实变评分 (consolidation score),称取重量,匀浆,将匀浆物以 2000 $\times$ g 离心 10 分钟,使用在 37°C 下进行 96 小时温育后产生的 CPE 作为终点,测定不同的上清液的 10 倍稀释物在 MDCK 细胞中的病毒滴度。

[0210] 使用单放射免疫扩散试剂盒测定在第 6 天获自小鼠的血清的 a1-AG。每日连续观察每一个组中的另外 8 只小鼠的死亡,进行 21 天,在第 3 天 (此时 SaO₂ 下降通常开始发生) 利用脉氧仪 (Sidwell R. 等人, (1992) Utilization of pulse oximetry for the study of the inhibitory effects of antiviral agents on influenza virus in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 36, 473-476) 测定它们的动脉血氧饱和度 (SaO₂) 值,进行至第 11 天,此时看到值下降至动物的最大程度 (否则死亡)。

[0211] 细胞中蛋白酪氨酸磷酸酶 β 的抑制

[0212] 本文中公开了用于抑制细胞的蛋白酪氨酸磷酸酶 β (HPTP- β) 活性的方法,包括将细胞与有效量的 HPTP β -ECD 结合剂接触。可在体内、离体地或体外接触细胞。

[0213] 施用

[0214] 取决于特定试剂的性质,可胃肠外 (例如,通过静脉内或腹膜内注射)、皮下、口服、局部、经直肠、经口腔、作为口腔或鼻腔喷雾给人和其它动物施用本公开内容的试剂。

[0215] 优选以剂量单位形式配制本公开内容的 HPTP β -ECD 结合剂以使施用容易和使剂量均一。如本文中所用,表达“剂量”或“剂量单位形式”是指适合于待治疗的患者的试剂的物理上分开的单位。然而,应理解,本发明的 HPTP β -ECD 结合剂和组合物的总的日使用将由主治医生在足够的医学判断的范围内决定。

[0216] 给药

[0217] 可经验地确定施用 HPTP β -ECD 结合剂的有效剂量和时间安排,产生这样的决定在本领域技术人员的能力范围内。本领域技术人员应理解,必须施用的试剂的剂量可取决于例如将接受试剂的受试者、施用途径、使用的试剂的具体类型以及待给受试者施用的其它药物而变化。例如,选择抗体的适当剂量的指导方针见于关于抗体的治疗性应用的文献例如 Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone 等人编辑., Nokes Publications, Park Ridge, N. J., (1985) 第 22 章和第 303-357 页; Smith 等人, Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber 等人编辑, Raven Press, New York (1977) 第 365-389 页中。取决于上述因素,单独使用的试剂的典型剂量可在约 0.01mg/kg 至达到 500mg/kg 的体重或更多 / 天,或约 0.01mg/kg 至约 50mg/kg,或 0.1mg/kg 至约 50mg/kg,或约 0.1mg/kg 至达到约 10mg/kg,或约 0.2mg/kg 至约 1mg/kg,或约 1mg/kg 至约 10mg/kg 的范围内。

[0218] 用于 HPTP β -ECD 结合剂的施用的给药方案包括但不限于每天 1 次、每周 3 次、每周 2 次、每周 1 次、每月 3 次、2 次、每月 1 次和每 2 月 1 次。

[0219] 制剂

[0220] 在本发明的一个方面,提供了药学上可接受的组合物,其中这些组合物包含本文中描述的任何试剂和药学上可接受的载体,此外,还可包含其它药物试剂、佐剂或稀释剂。例如,药物组合物还可包含一种或多种另外的活性成分例如抗微生物剂、抗炎剂、麻醉剂等。

[0221] 制剂可取决于施用模式而变化。药物组合物可以以固体、半固体或液体剂型例如片剂、栓剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、液体、悬浮剂、洗剂、乳膏剂、凝胶等形式存在,优选适合于精确剂量的单次施用的单位剂型存在。

[0222] 为了本公开内容的目的,术语“赋形剂”和“载体”在本公开内容的整个说明书中可互换使用,并且所述术语在本文中定义为“在配制安全有效的药物组合物的实践中使用的成分”。配制者应理解,赋形剂主要用于在递送安全、稳定的功能性药物中起作用,不仅用于递送的总的媒介物的部分而且还用于实现被活性成分的接受者有效吸收的工具。赋形剂可简单地作为惰性填充剂起作用,或如本文中所用,赋形剂可以为 pH 稳定系统或涂层的部分来确保成分的递送。

[0223] “药学上可接受的”意指不是生物学上或另外地不想要的物质,即可给患者施用所述物质而不引起任何不想要的生物效应或以有害的方式与包含在其中的药物制剂的任何其它组分相互作用。载体可天然地被选择来使活性成分的任何降解降至最低程度和使患者中的任何不利副作用减小至最小,这对于本领域技术人员来说是公知的。参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Gennaro, AR. 编辑, Mack Publishing, Easton Pa. (1990), 其公开了可与本文中公开的试剂的制剂的制备结合使用的常见载体和制备药物组合物的常规方法。对于本领域技术人员来说很显然的是取决于例如施用途径和待施用的组合物的浓度,某些载体可以是更加优选的。

[0224] 对于固体组合物,常规无毒性固体载体包括例如药物组的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。药学上可施用的液体组合物可以例如通过将本文中公开的活性剂和任选的药物佐剂在赋形剂中溶解、分解等(从而形成溶液或悬浮剂)来制备,所述赋形剂是例如水、含水葡萄糖盐溶液、甘油、乙醇等。必要时,待施用

的药物组合物还可包含少量无毒辅助物质例如湿润剂或乳化剂、pH 缓冲剂等,例如醋酸钠、脱水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺醋酸钠、三乙醇胺油酸酯等。制备这样的剂型的实际方法是已知的,或对于本领域技术人员来说是显然的。

[0225] 公开的试剂还可存在于用于递送活性治疗剂的液体、乳剂或悬浮剂中。药学上可施用的液体组合物可以例如通过在本文中描述的活性剂和任选的药物佐剂在赋形剂中溶解、分散等(从而形成溶液或悬浮剂)来制备,所述赋形剂是例如水、含水葡萄糖溶液、甘油、乙醇等。必要时,待施用的药物组合物还可包含少量无毒辅助物质例如湿润剂或乳化剂、pH 缓冲剂等,例如醋酸钠、脱水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺醋酸钠、三乙醇胺油酸酯等。制备这样的剂型的实际方法是已知的,或对于本领域技术人员来说是显然的;例如参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Gennaro, AR. 编辑, Mack Publishing, Easton Pa. (1990)。

[0226] 可使用适当的分散剂或湿润剂和混悬剂,按照已知的技术来配制可注射制剂例如无菌可注射含水或油状悬浮剂。无菌可注射制剂还可以是在无毒性胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射液、悬浮剂或乳剂,例如 1,3-丁二醇中的溶液。在媒介物和溶剂中,可使用的可接受的媒介物和溶液是水、林格氏溶液、U. S. P. 和等渗氯化钠溶液。此外,无菌不挥发性油常规地用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可使用任何温和的不挥发性油,包括合成甘油一酯或甘油二酯。此外,脂肪酸例如油酸用于制备可注射物。

[0227] 可注射制剂可以例如通过通过细菌截留滤器的过滤来灭菌或通过掺入灭菌剂以无菌固体组合物的形式来进行灭菌,可将所述固体组合物在使用溶解或分散在无菌水或其它无菌可注射介质中。

[0228] 公开的试剂还可存在于液体、乳剂或悬浮剂中,以将以气雾剂形式存在的活性治疗剂递送至身体的腔例如鼻、咽喉或支气管通道。试剂对存在于这些制剂中的其它助剂的比率可根据剂型要求而变化。

[0229] 取决于期望的施用模式,药物组合物可以以固体、半固体或液体剂型的形式存在,例如片剂、栓剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、液体、悬浮剂、洗剂、乳膏剂、凝胶等,优选以适合于精确剂量的单次施用的单位剂型存在。组合物可包含(如上所述的)有效量的与药学上可接受的载体组合的试剂,此外,可包含其它治疗剂、药物试剂、载体、佐剂、稀释剂等。

[0230] 当将要试剂递送至除人外的哺乳动物中时,哺乳动物可以是非人灵长类动物、马、猪、兔、绵羊、山羊、牛、猫、豚鼠或啮齿类动物。术语人和哺乳动物不表示特定年龄或性别。因此,成年和新生受试者以及胎儿,无论是雄性还是雌性,意欲被涵盖。患者、受试者、人或哺乳动物是指受疾病或障碍折磨的受试者。术语“患者”包括人和兽医受试者。

[0231] 试剂盒

[0232] 还公开了包括待递送至人、哺乳动物或细胞内的试剂的试剂盒。试剂盒可包括一个或多个包装单位剂量的包含待递送至人、哺乳动物或细胞内的 HTP β -ECD 结合剂的组合物。试剂盒任选地包括使用试剂盒的组分的说明书。可将试剂包装为无菌制剂,熔封容器被设计来保持制剂的无菌性直至使用。

实施例

[0233] 实施例 1

[0234] HTP β 细胞外结构域蛋白的产生

[0235] 按照制造商 (Origene) 的说明书, 从人胎盘文库克隆全长 HTP β cDNA (SEQIDNO:1)。通过 PCR 从编码具有添加的 c 末端 His-His-His-His-His-His-Gly (6His-Gly) 的氨基酸 1-1621 (SEQIDNO:3) 的全长 cDNA 克隆编码 HTP β 的完整可溶性细胞外结构域 (ECD) 的 cDNA。将所得的 cDNA 克隆进入哺乳动物表达载体以在 HEK293 细胞中进行瞬时 (pShuttle-CMV) 或稳定的 (pcDNA3.1(-)) 表达。为了获得纯化的 HTP β ECD (β ED), 在正常生长条件下将利用 β ECD 表达载体转染的 HEK293 细胞在无血清 OptiMEM (Gibco) 中温育 24 小时。随后回收条件培养基, 离心以除去碎片, 将 1mL 洗涤的 Ni-NTA 琼脂糖 (Qiagen) (500 μ L 包装材料) 添加至每一个 10 μ L 的清洁培养基, 使其在 4°C 下摇动过夜。在第二天, 将混合物加载至柱子中, 用 20 倍床体积的 50mMNa₂HPO₄、300mMNaCl、20mM 咪唑、pH8 洗涤。随后以 200 μ L/ 洗脱于 50mMNa₂HPO₄、300mMNaCl、250mM 咪唑、pH8 中洗脱纯化的 HTP β 细胞外结构域蛋白 (SEQIDNO:4)。使用还原-变性 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析级分的蛋白质含量, 通过银染 (Invitrogen) 进行检测, 和通过质谱法进行确认。

[0236] 实施例 2

[0237] 通过例如实施例 1 中描述的方法产生纯化的 HTP β 细胞外结构域蛋白。为了产生 HTP β 细胞外结构域免疫原, 使用 EDC 偶联化学 (Hockfield, S. 等人, (1993) ColdSpringHaborLaboratoryPress., 第 1 卷, 第 111-201 页, Immunocytochemistry) 将纯化的 HTP β 细胞外结构域 -6-His 蛋白缀合至猪甲状腺球蛋白 (Sigma)。将所得的 HTP β 细胞外结构域 - 甲状腺球蛋白缀合物针对 PBS, pH7.4 进行透析。随后利用所述缀合物 (100-200 μ g) 和完全弗氏佐剂的 1:1 混合物皮下免疫成年 Balb/c 小鼠。2-3 周后, 利用不完全弗氏佐剂和缀合物的 1:1 混合物腹腔内或皮下注射小鼠。在第 4-6 周重复注射。在第三次注射后 7 天从小鼠收集血清, 利用 ELISA 和蛋白质印迹测定其对 HTP β 细胞外结构域抗原的免疫反应性。通过使用 31 规超长针 (Goding, J. W., (1996) Monoclonal Antibodies: Principles and Practices. 第 3 版, Academic Press Limited. 第 145 页), 利用 50 μ l 的与氢氧化铝 1:1 混合的纯化的 HTP β 细胞外结构域蛋白的单次脾内注射, 加强显示良好的对抗原的反应的小鼠。简而言之, 用 2.5% 阿佛丁麻醉小鼠, 在皮肤和左斜肌体壁上产生 1 厘米的切口。通过在纵向注射中将针从脾的后部插入前部来施用抗原混合物。缝合体壁, 用两个小的金属夹封闭皮肤。监测小鼠的安全回收。手术后 4 天, 取出小鼠的脾, 制备单细胞悬浮物来与小鼠骨髓瘤细胞融合, 以产生杂交瘤细胞系 (Spitz, M., (1986) Methods In Enzymology, 第 121 卷. Eds. John J. Lagone 和 Helen Van Vunakis. 第 33-41 页 (Academic Press, New York, NY))。将所得的杂交瘤培养在补充有 15% 胎牛血清 (Hyclone) 和次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的 Dulbeccos 改良培养基 (Gibco) 中。

[0238] 阳性杂交瘤的筛选在融合后 8 天开始, 并且继续 15 天。在两组 96 孔板上通过 ELISA 鉴定产生抗 -HTP β 细胞外结构域抗体的杂交瘤: 一个用组氨酸标记的 -HTP β 细胞外结构域涂覆, 另一个用组氨酸标记的细菌 MurA 蛋白涂覆作为阴性对照。第二抗体是用辣根过氧化物酶 (HRP) (Jackson ImmunoResearch) 标记的驴抗 - 小鼠 IgG。使用通过溶解在 TBS 缓冲液, pH7.5 中的 ABTS 片剂起始的显色监测孔中的免疫反应性。通过添加 100 微升的 1% SDS 终止单个 HRP 反应混合物, 利用分光光度计在 405nm 读取吸光度。产生与 HTP β 细胞外结构域 -6His 相互作用, 但不与 murA-6His 蛋白作用的抗体的杂交瘤用于进一步分

析。对 96 孔板中的阳性克隆进行有限稀释 (0.8 个细胞 / 孔) 两次, 克隆形成能力被定义为具有大于 99% 的具有阳性反应性的孔。使用 iso-strip 技术 (Roche) 测定抗体的同种型。为了获得纯化的抗体以进行进一步评价, 使用蛋白 A 或蛋白 G 柱亲和纯化组织培养上清液。

[0239] 分离 5 个对 HPTP β -ECD 蛋白免疫反应的单克隆抗体, 并且给予其下列命名: R15E6、R12A7、R3A2、R11C3、R15G2 和 R5A8。基于其在 ELISA 和蛋白质印迹中与 HPTP β -ECD 蛋白的反应, R15E6 被选择用于进一步研究。

[0240] 实施例 3

[0241] 单克隆抗体 R15E6

[0242] 如本申请和美国专利 No. 7, 973, 142 中的实施例 2 中所述鉴定和表征单克隆抗体 R15E6; 过程和结果概述于下文中。

[0243] A. R15E6 结合内源性 HPTP β , 如通过免疫沉淀显示的。

[0244] 材料: 来自 Cambrex 的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC)、EGM 培养基和胰蛋白酶中和溶液; OPTIMEMI (Gibco)、牛血清白蛋白 (BSA; SantaCruz)、磷酸盐缓冲盐溶液 (PBS; Gibco)、生长因子, 包括血管生成素 1 (Ang1)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和成纤维细胞生长因子 (FGF) (R&DSYSTEMS)、Tie2 单克隆抗体 (DukeUniversity/P&GP)、VEGF 受体 2 (VEGFR2) 多克隆抗体 (Whitaker 等人)、蛋白 A/G 琼脂糖 (SantaCruz)、Tris- 甘氨酸预制凝胶电泳 / 转移系统 (6-8%) (Invitrogen)、PVDF 膜 (Invitrogen)、裂解缓冲液 (20mmTris-HCl, 137mmNaCl, 10% 甘油, 1% triton-X-100, 2mMEDTA, 1mMNaOH, 1mMNaF, 1mMPMSF, 1 μ g/ml 亮抑酶肽, 1 μ g/ml 胃酶抑素)。

[0245] 方法: 利用单独的抗体 (于 OPTIMEM 中) 或 OPTIMEMI 预处理 HUVEC, 进行 30 分钟。在除去预处理后, 用 Ang1 (100ng/ml) 在 PBS+0.2% BSA 中处理细胞 6 分钟, 在裂解缓冲液中裂解所述细胞。将裂解物在 Tris- 甘氨酸凝胶上直接电泳或用 2-5 μ g/ml Tie-2 抗体或 10 μ g/ml R15E6 抗体和 A/G 琼脂糖进行免疫沉淀。利用裂解缓冲液对免疫沉淀的样品漂洗 1 次, 在 1 倍样品缓冲液中煮沸 5 分钟。在 Tris- 甘氨酸凝胶上分离样品, 将其转移至 PVDF 膜, 使用指定的抗体 (pTYRAB (PY99, SantaCruz), Tie-2, VEGFR2 和 / 或 R15E6) 通过蛋白质印迹进行检测。

[0246] 结果: 通过 IP/ 蛋白质印迹, R15E6 识别与 HPTP β 的大小一致的主要高分子量条带 (图 1, 图框 A, 泳道 2)。不太强的更低分子量的条带可能代表糖基化程度较低的 HPTP β 的前体形式。利用对照、非免疫 IgG 的免疫沉淀 (IP) 在 HPTP β 的分子量范围内未显示条带 (图 1, 图框 A, 泳道 1), 组合的 Tie2/VEGFR2IP 显示具有预期分子量的条带 (图 1, 图框 A, 泳道 3)。该结果显示 R15E6 识别 HPTP β 并且对于 HPTP β 是特异性的。

[0247] B. R15E6 结合内源性 HPTP β , 如通过 FACS 分析显示的

[0248] 材料: 来自 Cambrex 的 HUVEC、EGM 培养基和胰蛋白酶中和溶液; 来自 MolecularProbes 的第二 Alexfluor488- 标记抗体; Hanks 平衡盐溶液 (Gibco); 来自 BectonDickenson 的 FACSCAN 流式细胞仪和 CellQuest 软件。

[0249] 方法: 对 HUVEC 进行胰蛋白酶处理, 随后利用胰蛋白酶中和溶液处理, 利用 HBSS 进行漂洗。将 R15E6 抗体 (0.6 μ g) 添加至 50 μ l 的 HBSS 中的 250,000 个细胞, 在冰上温育 20 分钟。用 1ml HBSS 漂洗细胞, 随后添加 2 μ g 的缀合有荧光的第二抗体, 在冰上进行 20 分

钟。在 1ml HBSS 漂洗和重悬浮细胞,随后在 FACSCAN 流式细胞仪上,利用 CellQuest 软件进行分析。仅用缀合有荧光的第二抗体处理对照细胞。

[0250] 结果:通过 FACS 分析,完整 HUVEC、R15E6 相较于单独的第二抗体引起荧光信号的强烈偏离(>90%的细胞)(图 1,图框 B)。该结果显示 R15E6 结合存在于完整内皮细胞表面上的内源 HTP β 。

[0251] 实施例 4

[0252] R15E6 增强 Tie2 激活

[0253] R15E6 在血管生成素 1(Ang1)(Tie2 配体)不存在和存在的情况下增强 Tie2 磷酸化。

[0254] 方法:在不同浓度的 R15E6 存在或不存在的条件下以及在添加 Ang1 或不添加 Ang1 的情况下将 HUVEC 培养在上述无血清培养基中。制备裂解物,利用 Tie2 抗体进行免疫沉淀,利用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,将其转移至 PVDF 膜。随后利用抗磷酸酪氨酸抗体对膜结合的免疫沉淀的蛋白质进行一系列蛋白质印迹,以定量 Tie2 磷酸化,随后利用 Tie2 抗体定量总的 Tie2。Tie2 磷酸化表达为抗磷酸酪氨酸信号相对总的 Tie2 信号的比率。

[0255] 结果:R15E6 在 Ang1 不存在和存在的情况下增强 Tie2 磷酸化(图 2)。该结果表明 R15E6 对内皮细胞表面上的 HTP β 的结合调节其生物功能,从而在配体不存在或存在的情况下导致增强的 Tie2 的激活。

[0256] 实施例 5

[0257] 抗 -VE-PTP 细胞外结构域抗体的产生

[0258] A. 小鼠 VE-PTP 细胞外结构域蛋白(VE-PTP-ECD)的产生

[0259] VE-PTP-ECD 可通过任何适当的方法产生。这样的方法在本领域是公知的。例如,可使用与本公开内容的实施例 1 相似的方法产生 VE-PTP-ECD,其中 VE-PTP-ECD cDNA 用于替代编码 HTP β -ECD 的 cDNA。SEQIDNO:7 提供编码 VE-PTP-ECD 的核苷酸序列。SEQIDNO:8 提供 VE-PTP-ECD 的氨基酸序列。

[0260] B. 针对 VE-PTPECD 的抗体的产生

[0261] 抗 -VE-PTP 抗体可通过本领域公知的方法容易地产生。例如,抗 VE-PTP 抗体可使用本公开内容的实施例 2 的方法,通过用 VE-PTP-ECD 替代 HTP β 细胞外结构域和利用所得的蛋白质免疫大鼠来产生。本研究中使用的大鼠抗 -小鼠 VE-PTP 抗体由 Dr. D. Vestweber 友好地提供(mAb109)。如 Baumer S. 等人, Blood, 2006, 第 107 卷, 第 4754-4762 页中所述产生抗体。简而言之,通过用 VE-PTP-Fc 融合蛋白免疫大鼠来产生抗体。如 Gotsch U. 等人, JCellSci., 1997, 第 110 卷, 第 583-588 页以及 Bosse R. 和 Vestweber D., Eur J Immunol., 1994, 第 24 卷, 第 3019-3024 中所述进行免疫、杂交瘤融合和筛选。

[0262] 这样构建融合蛋白,以便以 VE-PTP 的位置 732 上的氨基酸脯氨酸结尾的前 8 个纤连蛋白 III 型样重复与人 IgG1 的 Fc 部分(始于位置 239 上的氨基酸脯氨酸)框内融合。将克隆进入 pcDNA3(Invitrogen)的该构建体稳定地转染入 CHO 细胞,通过蛋白 A 琼脂糖亲和层析纯化融合蛋白。

[0263] 实施例 6

[0264] 抗-VE-PTPECD 抗体的玻璃体内注射

[0265] 激光诱发的脉络膜新生血管化模型：脉络膜新生血管化模型被认为代表新生血管性年龄相关性黄斑变性的模型。如先前所述产生脉络膜 NV。参见 TobeT, 等人, Am. J. Pathol., 1998, 第 153 卷, 第 1641-1646 页。成年 C57BL/6 小鼠在每一只眼的 3 个位置具有激光诱发的布鲁赫膜破裂, 随后在一只眼中给予 1 或 2 μ g 的大鼠抗-小鼠 VE-PTP-ECD 抗体 (IgG2a) 的 1 μ L 玻璃体内注射, 在对侧眼中给予媒介物 (5% 葡萄糖) 的玻璃体内注射。在第 7 天重复这些处理。在激光处理后 14 天, 利用荧光素标记葡聚糖 (2×10^6 的平均 MW, Sigma, St. Louis, MO) 灌注小鼠, 利用荧光显微镜术在脉络膜平展支架中评价新生血管形成的程度。由对处理组不知情的观察者通过成像分析测量每一个布鲁赫膜破裂位置上的 CNV 面积。CNV 的面积是是一只眼中的 3 个破裂位置的平均值。如图 3 中所示, 利用 VE-PTP-ECD 抗体的处理相对于利用媒介物对照的处理在 1 和 2 μ g 的剂量显著减少脉络膜新生血管化。

[0266] 实施例 7

[0267] 氧诱发的缺血性视网膜病变

[0268] 氧诱发的缺血性视网膜病变模型被认为代表了增生型糖尿病性视网膜病变的模型。利用由 Smith, L. E. H., 等人 Oxygen-induced retinopathy in the mouse. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 35, 101-111 (1994) 描述的方法产生 C57BL/6 小鼠的缺血性视网膜病变。

[0269] 将出生后第 7 天 (P7) 的 C57BL/6 小鼠及它们的母亲置于密闭室中并且暴露于高氧症 ($75 \pm 3\%$ 的氧气) 进行 5 天。利用 PROOX 型 110 氧气控制器 (RemingBioinstruments Co., Redfield, NY) 连续监测氧。在 P12, 将小鼠返回室内空气并且在解剖显微镜下, 将 Harvard 泵显微注射系统和控制的玻璃吸管用于递送 1 μ L 的 1 或 2 μ g 的 VE-PTP-ECD 抗体的玻璃体内注射 (在一只眼中进行的) 和在对侧眼中注射媒介物。在 P17, 如先前所述, 在 P17 测量视网膜表面上 NV 的面积。参见 Shen J, 等人, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2007, 第 48 卷, 第 4335-4341 页。简而言之, 给小鼠提供 1 μ L 的包含 0.5 μ g 大鼠抗小鼠 PECAM 抗体 (PharMingen, San Jose, CA) 的眼内注射。12 小时后, 使小鼠无痛致死, 在 10% 福尔马林中固定眼睛。切取视网膜, 将其在 1:500 的缀合有 Alexa488 的山羊抗-大鼠 IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中温育 40 分钟, 随后洗涤, 进行全标本包埋。对处理组不知情的观察者利用 Nikon 荧光显微镜检查载玻片, 使用 ImageProPlus 软件 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) 通过计算机化成像分析测量每视网膜 NV 的面积。图 4 显示利用 VE-PTP-ECD 抗体的处理在约 1 和 2 μ g 的剂量上相对于利用媒介物对照的处理显著减少视网膜新血管形成。图 5 显示利用媒介物处理的小鼠相对于利用 2 μ g 的 VE-PTP-ECD 抗体处理的小鼠的代表性视网膜全标本包埋。

[0270] 实施例 8

[0271] VE-PTP-ECD 抗体的皮下注射

[0272] 除在 P12 当将小鼠返回室内空气时进行 VE-PTP-ECD 抗体 (1mg/kg) 的皮下给药和在第 P14 和 P16 天再次给药 (总共 3 个剂量) 外, 如实施例 7 中所述 (从 P5 至 P12 于 75% 氧气氛中封闭) 进行氧诱导的缺血性视网膜病变模型的玻璃体内给药。如上述在第 (P17) 天所描述的, 评价新生血管形成。图 6 显示 VE-PTP-ECD 抗体的皮下给药减少视网膜新血管

形成的面积。

[0273] 实施例 9

[0274] 在 2mg/kg 的皮下剂量上报告了实施例 8 中描述的实验。(图 7)

[0275] 虽然描述了本公开内容的许多实施方案,但很明显基本实施方案可被改变来提供利用或包括本发明的 HTP β -ECD 结合剂、方法和过程的其它实施方案。实施方案和实施例用于举例说明目的,并且不被解释为限定本发明的公开内容,相反地,所述权利要求界定本发明的范围。

[0001]

序列表

<110> Aerpio Therapeutics, Inc.
Peters, Kevin
Shalwitz, Robert

<120> 用于治疗血管渗漏综合征和癌症的方法

<130> 233106-331560

<150> US 61/546,748

<151> 2011-10-13

<150> US 61/546,697

<151> 2011-10-13

<160> 7

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 6045

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

```
atgctgagcc atggagccgg gttggccttg tggatcacac tgagcctgct gcagactgga      60
ctggcgggagc cagagagatg taacttcacc ctggcggagt ccaaggcctc cagccattct      120
gtgtctatcc agtggagaat tttgggetca cctgttaact ttagecctcat ctatagcagt      180
gacaccctgg gggccgcgtt gtgccctacc tticggatag acaacaccac atacggatgt      240
aacctticaag atttacaage aggaaccatc tataacttca agattatttc tctggatgaa      300
gagagaactg tggctttgca aacagatcct ttacctcctg ctaggtttgg agtcagtaaa      360
gagaagacga cttaaccggc ctgcatgtt tgggtggactc cttcttccgg aaaagtcacc      420
tcatatgagg tgcaattatt tgatgaaaat aacccaaaaga tacagggggt tcaaattcaa      480
gaaagtactt catggaatga atacactttt ttcaatctca ctgctggtag taaatacaat      540
```

[0002]

attgccatca cagctgtttc tggaggaaaa cgttcttttt cagtttatac caatggatca	600
acagtgccat ctccagtga agatatttgt atttcacaaa aagccaattc tctctgatt	660
tcctggfccc atggttctgg gaatgtggaa cgataccggc tgatgctaata ggataaaggg	720
atcctagttc atggcggtgt tgtggacaaa catgctaact cctatgcttt tcaagggtg	780
tcccttggt acctctacaa cctcactgtt atgactgagg ctgcagggt gcaaaactac	840
aggtggaaac tagtcaggac agcccccatg gaagtctcaa atctgaaggt gacaaatgat	900
ggcagtttga cctctctaaa agtcaaattg caaagacctc ctggaaatgt ggattcttac	960
aattacccc tgtctcacia agggaccatc aaggaatcca gattattage accttggtt	1020
actgaaactc actttaaga gttatgcccc ggtcgacttt atcaagtta tctcagctgt	1080
gtctctggtg aactgtctgc tcagaagatg gcagtgggca gaacatttc agacaaagt	1140
gcaaacctgg aggcaacaa taatggcagg atgaggcttc ttgtatgag ctggctgccc	1200
cctgttgag actgggagca gtatcggtc ctactctca atgattctgt ggtgtgctc	1260
aacatcactg tgggaaagga agaaacacag tatgtcatgg atgacacggg gctcgtaccg	1320
ggaagacagt atgagggtga agtcattgtt gagagtggaa attgaagaa ttctgagcgt	1380
tgccaaggca ggacagtccc cctggctgtc ctccagcttc gtgtcaaaca tgccaatgaa	1440
acctcactga gtatcatgtg gcagaccctc gtagcagaat gggagaaata catcatttc	1500
ctagctgaca gagacctctt actgaccac aagtcactct ccaaagatgc caaagaattc	1560
acttttactg acctggtgcc tggacgaaaa tacatggcta cagtcaccag tattagtga	1620
gacttaaaaa attctcttc agtaaaagga agaacagtgc ctgccaagt gactgacttg	1680
catgtggcca accaaggaat gaccagtgt cgttttacta actggacca ggcacaagga	1740
gacgtagaat ttaccaagt cttactgac catgaaaatg tggtcattaa aaatgaaagc	1800
atctccagtg agaccagcag atacagcttc cactctctca agtccggcag cctgtactcc	1860

[0003]

gtggtggtaa caacagtga tggagggatc tcttcccgac aagtggttgt ggagggaaga	1920
acagtccect ccagtgtgag tggagtaacg gtgaacaatt ccggtcgtaa tgactacctc	1980
agcgtttctt ggctcgtagc gcccgagat gtggataact atgaggtaac attgtctcat	2040
gacggcaagg tggttcagtc cctgtcatt gccaaagtctg tcagagaatg ttccttcage	2100
tccctacccc caggccgcct ctacaccgtg accataacta caaggagtgg caagtatgaa	2160
aatcactcct tcagccaaga gccgacagtg cctgacaaag tccagggagt cagtgttagc	2220
aactcagcca ggagtgacta tttaagggtg tcttgggtgc atgccactgg agactttgat	2280
cactatgaag tcaccattaa aaacaaaaac aacttcattc aaactaaaag cattcccaag	2340
tcagaaaacg aatgtgtatt tgttcagcta gtcctggac ggtgttacag tgtcactgtt	2400
actacaaaaa gtggacaata tgaagccaat gaacaaggga atgggagaac aattccagag	2460
cctgttaagg atctaacatt gcgcaacagg agcactgagg acttgcattg gacttggta	2520
ggagctaatg gggatgtcga ccaatatgag atccagctgc tcttcaatga catgaaagta	2580
tttctctctt ttcacettgt aaataccgca accgagtatc gatttacttc cctaacacca	2640
ggccgccaat acaaaattct tgtcttgacg attagcgggg atgtacagca gtcagcctc	2700
attgagggtt tcacagtcc tagtctgtc aaaaatatc acatttctc caatggagca	2760
acagatagcc tgacggtgaa ctggactcct ggtaggggag acgttgattc ctacacggtg	2820
tggcattca ggcacagta aaaggtagc tctcagacta ttcccaagca cgtctttgag	2880
cacacgttcc acagactgga ggccggggag cagtaccaga tcattgattc ctacagtcagc	2940
gggtccctga agaactcagat aaatgtggtt ggccgggacag ttccagctc tgtccaagga	3000
gtaattgcag acaatgcata cagcagttat tcttaatatg taagttagca aaaagctgct	3060
ggtgtggcag aaagatatga tatctgctt ctaactgaaa atggaatcct tctgcgcaac	3120
acaicagagc cagccaccac taagcaacac aaatttgaag atctaacacc aggcaagaaa	3180

[0004]

tacaagatac agatcctaac tgtcagtgga ggcctcttta gcaaggaagc ccagactgaa	3240
ggccgaacag tcccagcagc tgtcaccgac ctgaggatca cagagaactc caccaggcac	3300
ctgtcccttc gctggaccgc ctgagagggg gagetcagct ggtacaacat ctttttgtac	3360
aaccacagatg ggaatctcca ggagagagct caagttgacc cactagtcca gagcttctct	3420
ttccagaact tgctacaagg cagaatgtac aagatggtga ttgtaactca cagtggggag	3480
ctgtetaatg agtctttcat atttggtaga acagtcccag cctctgtgag tcattctcagg	3540
gggtccaatc ggaacacgac agacagcctt tggttcaact ggagtccagc ctctggggac	3600
tttgactttt atgagetgat tctctataat cccaatggca caaagaagga aaactggaaa	3660
gacaaggacc tgacggagtg gcggtttcaa ggccttgctc ctggaaggaa gtacgtgctg	3720
tgggtggtaa ctcacagtgg agatctcagc aataaagtca cagcggagag cagaacagct	3780
ccaagtcctc ccagtcttat gtcatttgct gacattgcaa acacatcctt ggccatcacg	3840
tggaaagggc cccagactg gacagactac aacgactttg agctgcagtg gttgcccaga	3900
gatgcactta ctgtcttcaa cccctacaac aacagaaaat cagaaggacg catttgttat	3960
ggtcttcgtc caggagatc ctatcaattc aacgtcaaga ctgtcagtgg tgattcctgg	4020
aaaacttaca gcaaaccaat ttttgatct gtgaggacaa agcctgacaa gatacaaac	4080
ctgcattgcc ggcctcagaa ctccacggcc attgcctgtt cttggatccc tctgattct	4140
gactttgatg gttatagtat tgaatgccgg aaaatggaca cccaagaagt tgagttttcc	4200
agaaaagctgg agaaagaaaa atctctgctc aacatcatga tgctagtgcc ccataagagg	4260
tacctggtgt ccataaagt gcagtcggcc ggcatgacca gcgagtggt tgaagacagc	4320
actatcacia tgatagaccg cccccctcct ccacccccac acattcgtgt gaatgaaaag	4380
gatgtgetaa tiagcaagtc ttccatcaac ttactgtca actgcagctg gttcagcgac	4440
accaatggag ctgtgaaata cttcacagtg gtggtgagag aggctgatgg cagtgatgag	4500

[0005]

ctgaagccag aacagcagca cctctccct tectacctgg agtacaggca caatgcctcc	4560
attcgggtgt atcagactaa ttattttgcc agcaaatgtg ccgaaaatcc taacagcaac	4620
tccaagagtt ttaacattaa gcttggagca gagatggaga gcttaggtgg aaaacgcgat	4680
cccactcagc aaaaattctg tgatggacca ctgaagccac aactgccta cagaatcagc	4740
attcgagctt ttacacagct ctttgatgag gacctgaagg aattcacaaa gccactctat	4800
tcagacacat tttttcttt acccatcact actgaatcag agcccttggt tggagctatt	4860
gaagggtga gtgctggtct gtttttaatt ggcatgctag tggtgttgt tgccttattg	4920
atctgcagac agaaagttag ccatggtcga gaaagaccct ctgccctct gagcattcgt	4980
agggatcgac cattatctgt ccacttaaac ctgggccaga aaggtaaccg gaaaacttct	5040
tgtccaataa aaataaatca gtttgaaggc catttcaiga agctacagc tgactccaac	5100
tacctctat ccaaggaata cgaggagtta aaagacgtgg gccgaaacca gtcatgtgac	5160
attgcactct tgccggagaa tagaggga aaatcgatca acaatatatt gccctatgat	5220
gccacgcgag tgaagctctc caatgtagat gatgatcctt gctctgacta catcaatgcc	5280
agctacatcc ctggcaacaa cttcagaaga gaatacattg tcaactcagg accgcttcct	5340
ggcaccaagg atgacttctg gaaaatggtg tgggaacaaa acgttcacaa catcgtcatg	5400
gtgaccagtg gtgttgagaa gggccgagta aagtgtgacc attactggcc agcggaccag	5460
gattccctct actatgggga cctcatcttg cagatgctct cagagtccgt cctgcctgag	5520
tggaccatcc gggagtttaa gatatgcggt gaggaacagc ttgatgcaca cagactcate	5580
cgccacttcc actatacggg gtggccagac catggagtcc cagaaaccac ccagtctctg	5640
atccagtttg tgagaactgt cagggactac atcaacagaa gcccggtgc tgggccact	5700
gtggtgcact gcagtgtggt tgtgggtagg actggaacct ttattgcatt ggaccgaatc	5760
ctccagcagt tagactccaa agactctgtg gacatttatg gagcagtga cgacctaga	5820

[0006]

cttcacaggg ttcacatggt ccagactgag tgtcagtatg tctacctaca tcagtgtgta 5880
agagatgtcc tcagagcaag aaagctacgg agtgaacaag aaaaccctt gtttccaatc 5940
tatgaaaatg tgaatccaga gtatcacaga gatccagtct attcaaggca ttgagaatgt 6000
acctgaagag ctcttgata aaaattatc actgtgtgat ttgtt 6045

<210> 2
<211> 1997
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Met Leu Ser His Gly Ala Gly Leu Ala Leu Trp Ile Thr Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Gln Thr Gly Leu Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
20 25 30

Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
35 40 45

Gly Ser Pro Cys Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Leu Gly
50 55 60

Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
65 70 75 80

Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Arg Ile Ile
85 90 95

Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
100 105 110

[0007]

Pro Ala Arg Phe Gly Val Ser Lys Glu Lys Thr Thr Ser Thr Ser Leu
115 120 125

His Val Trp Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Thr Ser Tyr Glu Val
130 135 140

Gln Leu Phe Asp Glu Asn Asn Gln Lys Ile Gln Gly Val Gln Ile Gln
145 150 155 160

Glu Ser Thr Ser Trp Asn Glu Tyr Thr Phe Phe Asn Leu Thr Ala Gly
165 170 175

Ser Lys Tyr Asn Ile Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Gly Lys Arg Ser
180 185 190

Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys Asp
195 200 205

Ile Gly Ile Ser Thr Lys Ala Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser His
210 215 220

Gly Ser Gly Asn Val Glu Arg Tyr Arg Leu Met Leu Met Asp Lys Gly
225 230 235 240

Ile Leu Val His Gly Gly Val Val Asp Lys His Ala Thr Ser Tyr Ala
245 250 255

Phe His Gly Leu Thr Pro Gly Tyr Leu Tyr Asn Leu Thr Val Met Thr
260 265 270

Glu Ala Ala Gly Leu Gln Asn Tyr Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr Ala
275 280 285

[0008]

Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Ser Leu Thr
290 295 300

Ser Leu Lys Val Lys Trp Gln Arg Pro Pro Gly Asn Val Asp Ser Tyr
305 310 315 320

Asn Ile Thr Leu Ser His Lys Gly Thr Ile Lys Glu Ser Arg Val Leu
325 330 335

Ala Pro Trp Ile Thr Glu Thr His Phe Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg
340 345 350

Leu Tyr Gln Val Thr Val Ser Cys Val Ser Gly Glu Leu Ser Ala Gln
355 360 365

Lys Met Ala Val Gly Arg Thr Phe Pro Asp Lys Val Ala Asn Leu Glu
370 375 380

Ala Asn Asn Asn Gly Arg Met Arg Ser Leu Val Val Ser Trp Ser Pro
385 390 395 400

Pro Ala Gly Asp Trp Glu Gln Tyr Arg Ile Leu Leu Phe Asn Asp Ser
405 410 415

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

Met Asp Asp Thr Gly Leu Val Pro Gly Arg Gln Tyr Glu Val Glu Val
435 440 445

Ile Val Glu Ser Gly Asn Leu Lys Asn Ser Glu Arg Cys Gln Gly Arg
450 455 460

[0009]

Thr Val Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg Val Lys His Ala Asn Glu
465 470 475 480

Thr Ser Leu Ser Ile Met Trp Gln Thr Pro Val Ala Glu Trp Glu Lys
485 490 495

Tyr Ile Ile Ser Leu Ala Asp Arg Asp Leu Leu Leu Ile His Lys Ser
500 505 510

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

Arg Lys Tyr Met Ala Thr Val Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu Lys Asn
530 535 540

Ser Ser Ser Val Lys Gly Arg Thr Val Pro Ala Gln Val Thr Asp Leu
545 550 555 560

His Val Ala Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser Leu Phe Thr Asn Trp Thr
565 570 575

Gln Ala Gln Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln Val Leu Leu Ile His Glu
580 585 590

Asn Val Val Ile Lys Asn Glu Ser Ile Ser Ser Glu Thr Ser Arg Tyr
595 600 605

Ser Phe His Ser Leu Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val Thr
610 615 620

Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Val Val Val Glu Gly Arg
625 630 635 640

[0010]

Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr Val Asn Asn Ser Gly Arg
645 650 655

Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Leu Ala Pro Gly Asp Val Asp
660 665 670

Asn Tyr Glu Val Thr Leu Ser His Asp Gly Lys Val Val Gln Ser Leu
675 680 685

Val Ile Ala Lys Ser Val Arg Glu Cys Ser Phe Ser Ser Leu Thr Pro
690 695 700

Gly Arg Leu Tyr Thr Val Thr Ile Thr Thr Arg Ser Gly Lys Tyr Glu
705 710 715 720

Asn His Ser Phe Ser Gln Glu Arg Thr Val Pro Asp Lys Val Gln Gly
725 730 735

Val Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp Tyr Leu Arg Val Ser Trp
740 745 750

Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr Glu Val Thr Ile Lys Asn
755 760 765

Lys Asn Asn Phe Ile Gln Thr Lys Ser Ile Pro Lys Ser Glu Asn Glu
770 775 780

Cys Val Phe Val Gln Leu Val Pro Gly Arg Leu Tyr Ser Val Thr Val
785 790 795 800

Thr Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Asn Glu Gln Gly Asn Gly Arg
805 810 815

[0011]

Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr Leu Arg Asn Arg Ser Thr
820 825 830

Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Gly Ala Asn Gly Asp Val Asp Gln
835 840 845

Tyr Glu Ile Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met Lys Val Phe Pro Pro Phe
850 855 860

His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Arg Phe Thr Ser Leu Thr Pro
865 870 875 880

Gly Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr Ile Ser Gly Asp Val Gln
885 890 895

Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Phe Thr Val Pro Ser Ala Val Lys Asn
900 905 910

Ile His Ile Ser Pro Asn Gly Ala Thr Asp Ser Leu Thr Val Asn Trp
915 920 925

Thr Pro Gly Gly Gly Asp Val Asp Ser Tyr Thr Val Ser Ala Phe Arg
930 935 940

His Ser Gln Lys Val Asp Ser Gln Thr Ile Pro Lys His Val Phe Glu
945 950 955 960

His Thr Phe His Arg Leu Glu Ala Gly Glu Gln Tyr Gln Ile Met Ile
965 970 975

Ala Ser Val Ser Gly Ser Leu Lys Asn Gln Ile Asn Val Val Gly Arg
980 985 990

[0012]

Thr Val Pro Ala Ser Val Gln Gly	Val Ile Ala Asp Asn	Ala Tyr Ser
995	1000	1005
Ser Tyr Ser Leu Ile Val Ser	Trp Gln Lys Ala Ala	Gly Val Ala
1010	1015	1020
Glu Arg Tyr Asp Ile Leu Leu	Leu Thr Glu Asn Gly	Ile Leu Leu
1025	1030	1035
Arg Asn Thr Ser Glu Pro Ala	Thr Thr Lys Gln His	Lys Phe Glu
1040	1045	1050
Asp Leu Thr Pro Gly Lys Lys	Tyr Lys Ile Gln Ile	Leu Thr Val
1055	1060	1065
Ser Gly Gly Leu Phe Ser Lys	Glu Ala Gln Thr Glu	Gly Arg Thr
1070	1075	1080
Val Pro Ala Ala Val Thr Asp	Leu Arg Ile Thr Glu	Asn Ser Thr
1085	1090	1095
Arg His Leu Ser Phe Arg Trp	Thr Ala Ser Glu Gly	Glu Leu Ser
1100	1105	1110
Trp Tyr Asn Ile Phe Leu Tyr	Asn Pro Asp Gly Asn	Leu Gln Glu
1115	1120	1125
Arg Ala Gln Val Asp Pro Leu	Val Gln Ser Phe Ser	Phe Gln Asn
1130	1135	1140
Leu Leu Gln Gly Arg Met Tyr	Lys Met Val Ile Val	Thr His Ser
1145	1150	1155

[0013]

Gly Glu	Leu Ser Asn Glu Ser	Phe Ile Phe Gly Arg	Thr Val Pro
1160	1165	1170	
Ala Ser	Val Ser His Leu Arg	Gly Ser Asn Arg Asn	Thr Thr Asp
1175	1180	1185	
Ser Leu	Trp Phe Asn Trp Ser	Pro Ala Ser Gly Asp	Phe Asp Phe
1190	1195	1200	
Tyr Glu	Leu Ile Leu Tyr Asn	Pro Asn Gly Thr Lys	Lys Glu Asn
1205	1210	1215	
Trp Lys	Asp Lys Asp Leu Thr	Glu Trp Arg Phe Gln	Gly Leu Val
1220	1225	1230	
Pro Gly	Arg Lys Tyr Val Leu	Trp Val Val Thr His	Ser Gly Asp
1235	1240	1245	
Leu Ser	Asn Lys Val Thr Ala	Glu Ser Arg Thr Ala	Pro Ser Pro
1250	1255	1260	
Pro Ser	Leu Met Ser Phe Ala	Asp Ile Ala Asn Thr	Ser Leu Ala
1265	1270	1275	
Ile Thr	Trp Lys Gly Pro Pro	Asp Trp Thr Asp Tyr	Asn Asp Phe
1280	1285	1290	
Glu Leu	Gln Trp Leu Pro Arg	Asp Ala Leu Thr Val	Phe Asn Pro
1295	1300	1305	
Tyr Asn	Asn Arg Lys Ser Glu	Gly Arg Ile Val Tyr	Gly Leu Arg
1310	1315	1320	

[0014]

Pro Gly	Arg Ser Tyr Gln Phe	Asn Val Lys Thr Val	Ser Gly Asp
1325	1330	1335	
Ser Trp	Lys Thr Tyr Ser Lys	Pro Ile Phe Gly Ser	Val Arg Thr
1340	1345	1350	
Lys Pro	Asp Lys Ile Gln Asn	Leu His Cys Arg Pro	Gln Asn Ser
1355	1360	1365	
Thr Ala	Ile Ala Cys Ser Trp	Ile Pro Pro Asp Ser	Asp Phe Asp
1370	1375	1380	
Gly Tyr	Ser Ile Glu Cys Arg	Lys Met Asp Thr Gln	Glu Val Glu
1385	1390	1395	
Phe Ser	Arg Lys Leu Glu Lys	Glu Lys Ser Leu Leu	Asn Ile Met
1400	1405	1410	
Met Leu	Val Pro His Lys Arg	Tyr Leu Val Ser Ile	Lys Val Gln
1415	1420	1425	
Ser Ala	Gly Met Thr Ser Glu	Val Val Glu Asp Ser	Thr Ile Thr
1430	1435	1440	
Met Ile	Asp Arg Pro Pro Pro	Pro Pro Pro His Ile	Arg Val Asn
1445	1450	1455	
Glu Lys	Asp Val Leu Ile Ser	Lys Ser Ser Ile Asn	Phe Thr Val
1460	1465	1470	
Asn Cys	Ser Trp Phe Ser Asp	Thr Asn Gly Ala Val	Lys Tyr Phe
1475	1480	1485	

[0015]

Thr Val	Val Val Arg Glu Ala	Asp Gly Asn Asp Glu	Leu Lys Pro
1490	1495	1500	
Glu Gln	Gln His Pro Leu Pro	Ser Tyr Leu Glu Tyr	Arg His Asn
1505	1510	1515	
Ala Ser	Ile Arg Val Tyr Gln	Thr Asn Tyr Phe Ala	Ser Lys Cys
1520	1525	1530	
Ala Glu	Asn Pro Asn Ser Asn	Ser Lys Ser Phe Asn	Ile Lys Leu
1535	1540	1545	
Gly Ala	Glu Met Glu Ser Leu	Gly Gly Lys Cys Asp	Pro Thr Gln
1550	1555	1560	
Gln Lys	Phe Cys Asp Gly Pro	Leu Lys Pro His Thr	Ala Tyr Arg
1565	1570	1575	
Ile Ser	Ile Arg Ala Phe Thr	Gln Leu Phe Asp Glu	Asp Leu Lys
1580	1585	1590	
Glu Phe	Thr Lys Pro Leu Tyr	Ser Asp Thr Phe Phe	Ser Leu Pro
1595	1600	1605	
Ile Thr	Thr Glu Ser Glu Pro	Leu Phe Gly Ala Ile	Glu Gly Val
1610	1615	1620	
Ser Ala	Gly Leu Phe Leu Ile	Gly Met Leu Val Ala	Val Val Ala
1625	1630	1635	
Leu Leu	Ile Cys Arg Gln Lys	Val Ser His Gly Arg	Glu Arg Pro
1640	1645	1650	

[0016]

Ser Ala Arg Leu Ser Ile Arg Arg Asp Arg Pro Leu Ser Val His
1655 1660 1665

Leu Asn Leu Gly Gln Lys Gly Asn Arg Lys Thr Ser Cys Pro Ile
1670 1675 1680

Lys Ile Asn Gln Phe Glu Gly His Phe Met Lys Leu Gln Ala Asp
1685 1690 1695

Ser Asn Tyr Leu Leu Ser Lys Glu Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Val
1700 1705 1710

Gly Arg Asn Gln Ser Cys Asp Ile Ala Leu Leu Pro Glu Asn Arg
1715 1720 1725

Gly Lys Asn Arg Tyr Asn Asn Ile Leu Pro Tyr Asp Ala Thr Arg
1730 1735 1740

Val Lys Leu Ser Asn Val Asp Asp Asp Pro Cys Ser Asp Tyr Ile
1745 1750 1755

Asn Ala Ser Tyr Ile Pro Gly Asn Asn Phe Arg Arg Glu Tyr Ile
1760 1765 1770

Val Thr Gln Gly Pro Leu Pro Gly Thr Lys Asp Asp Phe Trp Lys
1775 1780 1785

Met Val Trp Glu Gln Asn Val His Asn Ile Val Met Val Thr Gln
1790 1795 1800

Cys Val Glu Lys Gly Arg Val Lys Cys Asp His Tyr Trp Pro Ala
1805 1810 1815

[0017]

Asp Gln	Asp Ser Leu Tyr Tyr	Gly Asp Leu Ile Leu	Gln Met Leu
1820	1825	1830	
Ser Glu	Ser Val Leu Pro Glu	Trp Thr Ile Arg Glu	Phe Lys Ile
1835	1840	1845	
Cys Gly	Glu Glu Gln Leu Asp	Ala His Arg Leu Ile	Arg His Phe
1850	1855	1860	
His Tyr	Thr Val Trp Pro Asp	His Gly Val Pro Glu	Thr Thr Gln
1865	1870	1875	
Ser Leu	Ile Gln Phe Val Arg	Thr Val Arg Asp Tyr	Ile Asn Arg
1880	1885	1890	
Ser Pro	Gly Ala Gly Pro Thr	Val Val His Cys Ser	Ala Gly Val
1895	1900	1905	
Gly Arg	Thr Gly Thr Phe Ile	Ala Leu Asp Arg Ile	Leu Gln Gln
1910	1915	1920	
Leu Asp	Ser Lys Asp Ser Val	Asp Ile Tyr Gly Ala	Val His Asp
1925	1930	1935	
Leu Arg	Leu His Arg Val His	Met Val Gln Thr Glu	Cys Gln Tyr
1940	1945	1950	
Val Tyr	Leu His Gln Cys Val	Arg Asp Val Leu Arg	Ala Arg Lys
1955	1960	1965	
Leu Arg	Ser Glu Gln Glu Asn	Pro Leu Phe Pro Ile	Tyr Glu Asn
1970	1975	1980	

[0018]

Val Asn Pro Glu Tyr His Arg Asp Pro Val Tyr Ser Arg His
1985 1990 1995

<210> 3

<211> 1631

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Met Leu Ser His Gly Ala Gly Leu Ala Leu Trp Ile Thr Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Gln Thr Gly Leu Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
20 25 30

Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
35 40 45

Gly Ser Pro Cys Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Leu Gly
50 55 60

Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
65 70 75 80

Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Arg Ile Ile
85 90 95

Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
100 105 110

Pro Ala Arg Phe Gly Val Ser Lys Glu Lys Thr Thr Ser Thr Ser Leu
115 120 125

His Val Trp Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Thr Ser Tyr Glu Val

[0019]

130	135	140
Gln Leu Phe Asp Glu Asn Asn Gln Lys Ile Gln Gly Val Gln Ile Gln		
145	150	155 160
Glu Ser Thr Ser Trp Asn Glu Tyr Thr Phe Phe Asn Leu Thr Ala Gly		
	165	170 175
Ser Lys Tyr Asn Ile Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Gly Lys Arg Ser		
	180	185 190
Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys Asp		
	195	200 205
Ile Gly Ile Ser Thr Lys Ala Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser His		
	210	215 220
Gly Ser Gly Asn Val Glu Arg Tyr Arg Leu Met Leu Met Asp Lys Gly		
225	230	235 240
Ile Leu Val His Gly Gly Val Val Asp Lys His Ala Thr Ser Tyr Ala		
	245	250 255
Phe His Gly Leu Thr Pro Gly Tyr Leu Tyr Asn Leu Thr Val Met Thr		
	260	265 270
Glu Ala Ala Gly Leu Gln Asn Tyr Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr Ala		
	275	280 285
Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Ser Leu Thr		
290	295	300
Ser Leu Lys Val Lys Trp Gln Arg Pro Pro Gly Asn Val Asp Ser Tyr		

[0020]

305	310	315	320
Asn Ile Thr Leu Ser His Lys Gly Thr Ile Lys Glu Ser Arg Val Leu			
325	330	335	
Ala Pro Trp Ile Thr Glu Thr His Phe Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg			
340	345	350	
Leu Tyr Gln Val Thr Val Ser Cys Val Ser Gly Glu Leu Ser Ala Gln			
355	360	365	
Lys Met Ala Val Gly Arg Thr Phe Pro Asp Lys Val Ala Asn Leu Glu			
370	375	380	
Ala Asn Asn Asn Gly Arg Met Arg Ser Leu Val Val Ser Trp Ser Pro			
385	390	395	400
Pro Ala Gly Asp Trp Glu Gln Tyr Arg Ile Leu Leu Phe Asn Asp Ser			
405	410	415	
Val Val Leu Leu Asn Ile Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr Gln Tyr Val			
420	425	430	
Met Asp Asp Thr Gly Leu Val Pro Gly Arg Gln Tyr Glu Val Glu Val			
435	440	445	
Ile Val Glu Ser Gly Asn Leu Lys Asn Ser Glu Arg Cys Gln Gly Arg			
450	455	460	
Thr Val Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg Val Lys His Ala Asn Glu			
465	470	475	480
Thr Ser Leu Ser Ile Met Trp Gln Thr Pro Val Ala Glu Trp Glu Lys			

[0021]

485	490	495
Tyr Ile Ile Ser Leu Ala Asp Arg Asp Leu Leu Leu Ile His Lys Ser		
500	505	510
Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe Thr Asp Leu Val Pro Gly		
515	520	525
Arg Lys Tyr Met Ala Thr Val Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu Lys Asn		
530	535	540
Ser Ser Ser Val Lys Gly Arg Thr Val Pro Ala Gln Val Thr Asp Leu		
545	550	555
560		
His Val Ala Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser Leu Phe Thr Asn Trp Thr		
565	570	575
Gln Ala Gln Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln Val Leu Leu Ile His Glu		
580	585	590
Asn Val Val Ile Lys Asn Glu Ser Ile Ser Ser Glu Thr Ser Arg Tyr		
595	600	605
Ser Phe His Ser Leu Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val Thr		
610	615	620
Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Val Val Val Glu Gly Arg		
625	630	635
640		
Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr Val Asn Asn Ser Gly Arg		
645	650	655
Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Leu Ala Pro Gly Asp Val Asp		

[0022]

660	665	670
Asn Tyr Glu Val Thr Leu Ser His Asp Gly Lys Val Val Gln Ser Leu		
675	680	685
Val Ile Ala Lys Ser Val Arg Glu Cys Ser Phe Ser Ser Leu Thr Pro		
690	695	700
Gly Arg Leu Tyr Thr Val Thr Ile Thr Thr Arg Ser Gly Lys Tyr Glu		
705	710	715
		720
Asn His Ser Phe Ser Gln Glu Arg Thr Val Pro Asp Lys Val Gln Gly		
725	730	735
Val Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp Tyr Leu Arg Val Ser Trp		
740	745	750
Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr Glu Val Thr Ile Lys Asn		
755	760	765
Lys Asn Asn Phe Ile Gln Thr Lys Ser Ile Pro Lys Ser Glu Asn Glu		
770	775	780
Cys Val Phe Val Gln Leu Val Pro Gly Arg Leu Tyr Ser Val Thr Val		
785	790	795
		800
Thr Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Asn Glu Gln Gly Asn Gly Arg		
805	810	815
Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr Leu Arg Asn Arg Ser Thr		
820	825	830
Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Gly Ala Asn Gly Asp Val Asp Gln		

[0023]

835	840	845
Tyr Glu Ile Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met Lys Val Phe Pro Pro Phe		
850	855	860
His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Arg Phe Thr Ser Leu Thr Pro		
865	870	875 880
Gly Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr Ile Ser Gly Asp Val Gln		
885	890	895
Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Phe Thr Val Pro Ser Ala Val Lys Asn		
900	905	910
Ile His Ile Ser Pro Asn Gly Ala Thr Asp Ser Leu Thr Val Asn Trp		
915	920	925
Thr Pro Gly Gly Gly Asp Val Asp Ser Tyr Thr Val Ser Ala Phe Arg		
930	935	940
His Ser Gln Lys Val Asp Ser Gln Thr Ile Pro Lys His Val Phe Glu		
945	950	955 960
His Thr Phe His Arg Leu Glu Ala Gly Glu Gln Tyr Gln Ile Met Ile		
965	970	975
Ala Ser Val Ser Gly Ser Leu Lys Asn Gln Ile Asn Val Val Gly Arg		
980	985	990
Thr Val Pro Ala Ser Val Gln Gly Val Ile Ala Asp Asn Ala Tyr Ser		
995	1000	1005
Ser Tyr Ser Leu Ile Val Ser Trp Gln Lys Ala Ala Gly Val Ala		

[0024]

1010	1015	1020
Glu Arg Tyr Asp Ile Leu Leu	Leu Thr Glu Asn Gly	Ile Leu Leu
1025	1030	1035
Arg Asn Thr Ser Glu Pro Ala	Thr Thr Lys Gln His	Lys Phe Glu
1040	1045	1050
Asp Leu Thr Pro Gly Lys Lys	Tyr Lys Ile Gln Ile	Leu Thr Val
1055	1060	1065
Ser Gly Gly Leu Phe Ser Lys	Glu Ala Gln Thr Glu	Gly Arg Thr
1070	1075	1080
Val Pro Ala Ala Val Thr Asp	Leu Arg Ile Thr Glu	Asn Ser Thr
1085	1090	1095
Arg His Leu Ser Phe Arg Trp	Thr Ala Ser Glu Gly	Glu Leu Ser
1100	1105	1110
Trp Tyr Asn Ile Phe Leu Tyr	Asn Pro Asp Gly Asn	Leu Gln Glu
1115	1120	1125
Arg Ala Gln Val Asp Pro Leu	Val Gln Ser Phe Ser	Phe Gln Asn
1130	1135	1140
Leu Leu Gln Gly Arg Met Tyr	Lys Met Val Ile Val	Thr His Ser
1145	1150	1155
Gly Glu Leu Ser Asn Glu Ser	Phe Ile Phe Gly Arg	Thr Val Pro
1160	1165	1170
Ala Ser Val Ser His Leu Arg	Gly Ser Asn Arg Asn	Thr Thr Asp

[0025]

1175	1180	1185
Ser Leu Trp Phe Asn Trp Ser	Pro Ala Ser Gly Asp	Phe Asp Phe
1190	1195	1200
Tyr Glu Leu Ile Leu Tyr Asn	Pro Asn Gly Thr Lys	Lys Glu Asn
1205	1210	1215
Trp Lys Asp Lys Asp Leu Thr	Glu Trp Arg Phe Gln	Gly Leu Val
1220	1225	1230
Pro Gly Arg Lys Tyr Val Leu	Trp Val Val Thr His	Ser Gly Asp
1235	1240	1245
Leu Ser Asn Lys Val Thr Ala	Glu Ser Arg Thr Ala	Pro Ser Pro
1250	1255	1260
Pro Ser Leu Met Ser Phe Ala	Asp Ile Ala Asn Thr	Ser Leu Ala
1265	1270	1275
Ile Thr Trp Lys Gly Pro Pro	Asp Trp Thr Asp Tyr	Asn Asp Phe
1280	1285	1290
Glu Leu Gln Trp Leu Pro Arg	Asp Ala Leu Thr Val	Phe Asn Pro
1295	1300	1305
Tyr Asn Asn Arg Lys Ser Glu	Gly Arg Ile Val Tyr	Gly Leu Arg
1310	1315	1320
Pro Gly Arg Ser Tyr Gln Phe	Asn Val Lys Thr Val	Ser Gly Asp
1325	1330	1335
Ser Trp Lys Thr Tyr Ser Lys	Pro Ile Phe Gly Ser	Val Arg Thr

[0026]

1340	1345	1350
Lys Pro Asp Lys Ile Gln Asn	Leu His Cys Arg Pro	Gln Asn Ser
1355	1360	1365
Thr Ala Ile Ala Cys Ser Trp	Ile Pro Pro Asp Ser	Asp Phe Asp
1370	1375	1380
Gly Tyr Ser Ile Glu Cys Arg	Lys Met Asp Thr Gln	Glu Val Glu
1385	1390	1395
Phe Ser Arg Lys Leu Glu Lys	Glu Lys Ser Leu Leu	Asn Ile Met
1400	1405	1410
Met Leu Val Pro His Lys Arg	Tyr Leu Val Ser Ile	Lys Val Gln
1415	1420	1425
Ser Ala Gly Met Thr Ser Glu	Val Val Glu Asp Ser	Thr Ile Thr
1430	1435	1440
Met Ile Asp Arg Pro Pro Pro	Pro Pro Pro His Ile	Arg Val Asn
1445	1450	1455
Glu Lys Asp Val Leu Ile Ser	Lys Ser Ser Ile Asn	Phe Thr Val
1460	1465	1470
Asn Cys Ser Trp Phe Ser Asp	Thr Asn Gly Ala Val	Lys Tyr Phe
1475	1480	1485
Thr Val Val Val Arg Glu Ala	Asp Gly Asn Asp Glu	Leu Lys Pro
1490	1495	1500
Glu Gln Gln His Pro Leu Pro	Ser Tyr Leu Glu Tyr	Arg His Asn

[0027]

1505	1510	1515
Ala Ser Ile Arg Val Tyr Gln Thr Asn Tyr Phe Ala Ser Lys Cys		
1520	1525	1530
Ala Glu Asn Pro Asn Ser Asn Ser Lys Ser Phe Asn Ile Lys Leu		
1535	1540	1545
Gly Ala Glu Met Glu Ser Leu Gly Gly Lys Cys Asp Pro Thr Gln		
1550	1555	1560
Gln Lys Phe Cys Asp Gly Pro Leu Lys Pro His Thr Ala Tyr Arg		
1565	1570	1575
Ile Ser Ile Arg Ala Phe Thr Gln Leu Phe Asp Glu Asp Leu Lys		
1580	1585	1590
Glu Phe Thr Lys Pro Leu Tyr Ser Asp Thr Phe Phe Ser Leu Pro		
1595	1600	1605
Ile Thr Thr Glu Ser Glu Pro Leu Phe Gly Ala Ile Glu Arg Gly		
1610	1615	1620
Arg His His His His His His Gly		
1625	1630	
<210> 4		
<211> 1621		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 4		
Met Leu Ser His Gly Ala Gly Leu Ala Leu Trp Ile Thr Leu Ser Leu		
1	5	10 15

[0028]

Leu Gln Thr Gly Leu Ala Glu Pro Glu Arg Cys Asn Phe Thr Leu Ala
20 25 30

Glu Ser Lys Ala Ser Ser His Ser Val Ser Ile Gln Trp Arg Ile Leu
35 40 45

Gly Ser Pro Cys Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Leu Gly
50 55 60

Ala Ala Leu Cys Pro Thr Phe Arg Ile Asp Asn Thr Thr Tyr Gly Cys
65 70 75 80

Asn Leu Gln Asp Leu Gln Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Phe Arg Ile Ile
85 90 95

Ser Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu Pro
100 105 110

Pro Ala Arg Phe Gly Val Ser Lys Glu Lys Thr Thr Ser Thr Ser Leu
115 120 125

His Val Trp Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Thr Ser Tyr Glu Val
130 135 140

Gln Leu Phe Asp Glu Asn Asn Gln Lys Ile Gln Gly Val Gln Ile Gln
145 150 155 160

Glu Ser Thr Ser Trp Asn Glu Tyr Thr Phe Phe Asn Leu Thr Ala Gly
165 170 175

Ser Lys Tyr Asn Ile Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Gly Lys Arg Ser
180 185 190

[0029]

Phe Ser Val Tyr Thr Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys Asp
195 200 205

Ile Gly Ile Ser Thr Lys Ala Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser His
210 215 220

Gly Ser Gly Asn Val Glu Arg Tyr Arg Leu Met Leu Met Asp Lys Gly
225 230 235 240

Ile Leu Val His Gly Gly Val Val Asp Lys His Ala Thr Ser Tyr Ala
245 250 255

Phe His Gly Leu Thr Pro Gly Tyr Leu Tyr Asn Leu Thr Val Met Thr
260 265 270

Glu Ala Ala Gly Leu Gln Asn Tyr Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr Ala
275 280 285

Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Ser Leu Thr
290 295 300

Ser Leu Lys Val Lys Trp Gln Arg Pro Pro Gly Asn Val Asp Ser Tyr
305 310 315 320

Asn Ile Thr Leu Ser His Lys Gly Thr Ile Lys Glu Ser Arg Val Leu
325 330 335

Ala Pro Trp Ile Thr Glu Thr His Phe Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg
340 345 350

Leu Tyr Gln Val Thr Val Ser Cys Val Ser Gly Glu Leu Ser Ala Gln
355 360 365

[0030]

Lys Met Ala Val Gly Arg Thr Phe Pro Asp Lys Val Ala Asn Leu Glu
370 375 380

Ala Asn Asn Asn Gly Arg Met Arg Ser Leu Val Val Ser Trp Ser Pro
385 390 395 400

Pro Ala Gly Asp Trp Glu Gln Tyr Arg Ile Leu Leu Phe Asn Asp Ser
405 410 415

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

Met Asp Asp Thr Gly Leu Val Pro Gly Arg Gln Tyr Glu Val Glu Val
435 440 445

Ile Val Glu Ser Gly Asn Leu Lys Asn Ser Glu Arg Cys Gln Gly Arg
450 455 460

Thr Val Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg Val Lys His Ala Asn Glu
465 470 475 480

Thr Ser Leu Ser Ile Met Trp Gln Thr Pro Val Ala Glu Trp Glu Lys
485 490 495

Tyr Ile Ile Ser Leu Ala Asp Arg Asp Leu Leu Leu Ile His Lys Ser
500 505 510

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

Arg Lys Tyr Met Ala Thr Val Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu Lys Asn
530 535 540

[0031]

Ser Ser Ser Val Lys Gly Arg Thr Val Pro Ala Gln Val Thr Asp Leu
545 550 555 560

His Val Ala Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser Leu Phe Thr Asn Trp Thr
565 570 575

Gln Ala Gln Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln Val Leu Leu Ile His Glu
580 585 590

Asn Val Val Ile Lys Asn Glu Ser Ile Ser Ser Glu Thr Ser Arg Tyr
595 600 605

Ser Phe His Ser Leu Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val Thr
610 615 620

Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Val Val Val Glu Gly Arg
625 630 635 640

Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr Val Asn Asn Ser Gly Arg
645 650 655

Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Leu Ala Pro Gly Asp Val Asp
660 665 670

Asn Tyr Glu Val Thr Leu Ser His Asp Gly Lys Val Val Gln Ser Leu
675 680 685

Val Ile Ala Lys Ser Val Arg Glu Cys Ser Phe Ser Ser Leu Thr Pro
690 695 700

Gly Arg Leu Tyr Thr Val Thr Ile Thr Thr Arg Ser Gly Lys Tyr Glu
705 710 715 720

[0032]

Asn His Ser Phe Ser Gln Glu Arg Thr Val Pro Asp Lys Val Gln Gly
725 730 735

Val Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp Tyr Leu Arg Val Ser Trp
740 745 750

Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr Glu Val Thr Ile Lys Asn
755 760 765

Lys Asn Asn Phe Ile Gln Thr Lys Ser Ile Pro Lys Ser Glu Asn Glu
770 775 780

Cys Val Phe Val Gln Leu Val Pro Gly Arg Leu Tyr Ser Val Thr Val
785 790 795 800

Thr Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Asn Glu Gln Gly Asn Gly Arg
805 810 815

Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr Leu Arg Asn Arg Ser Thr
820 825 830

Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Gly Ala Asn Gly Asp Val Asp Gln
835 840 845

Tyr Glu Ile Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met Lys Val Phe Pro Pro Phe
850 855 860

His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Arg Phe Thr Ser Leu Thr Pro
865 870 875 880

Gly Arg Gln Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr Ile Ser Gly Asp Val Gln
885 890 895

[0033]

Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Phe Thr Val Pro Ser Ala Val Lys Asn
 900 905 910

Ile His Ile Ser Pro Asn Gly Ala Thr Asp Ser Leu Thr Val Asn Trp
 915 920 925

Thr Pro Gly Gly Gly Asp Val Asp Ser Tyr Thr Val Ser Ala Phe Arg
 930 935 940

His Ser Gln Lys Val Asp Ser Gln Thr Ile Pro Lys His Val Phe Glu
 945 950 955 960

His Thr Phe His Arg Leu Glu Ala Gly Glu Gln Tyr Gln Ile Met Ile
 965 970 975

Ala Ser Val Ser Gly Ser Leu Lys Asn Gln Ile Asn Val Val Gly Arg
 980 985 990

Thr Val Pro Ala Ser Val Gln Gly Val Ile Ala Asp Asn Ala Tyr Ser
 995 1000 1005

Ser Tyr Ser Leu Ile Val Ser Trp Gln Lys Ala Ala Gly Val Ala
 1010 1015 1020

Glu Arg Tyr Asp Ile Leu Leu Leu Thr Glu Asn Gly Ile Leu Leu
 1025 1030 1035

Arg Asn Thr Ser Glu Pro Ala Thr Thr Lys Gln His Lys Phe Glu
 1040 1045 1050

Asp Leu Thr Pro Gly Lys Lys Tyr Lys Ile Gln Ile Leu Thr Val
 1055 1060 1065

[0034]

Ser Gly	Gly Leu Phe Ser Lys	Glu Ala Gln Thr Glu	Gly Arg Thr
1070	1075	1080	
Val Pro	Ala Ala Val Thr Asp	Leu Arg Ile Thr Glu	Asn Ser Thr
1085	1090	1095	
Arg His	Leu Ser Phe Arg Trp	Thr Ala Ser Glu Gly	Glu Leu Ser
1100	1105	1110	
Trp Tyr	Asn Ile Phe Leu Tyr	Asn Pro Asp Gly Asn	Leu Gln Glu
1115	1120	1125	
Arg Ala	Gln Val Asp Pro Leu	Val Gln Ser Phe Ser	Phe Gln Asn
1130	1135	1140	
Leu Leu	Gln Gly Arg Met Tyr	Lys Met Val Ile Val	Thr His Ser
1145	1150	1155	
Gly Glu	Leu Ser Asn Glu Ser	Phe Ile Phe Gly Arg	Thr Val Pro
1160	1165	1170	
Ala Ser	Val Ser His Leu Arg	Gly Ser Asn Arg Asn	Thr Thr Asp
1175	1180	1185	
Ser Leu	Trp Phe Asn Trp Ser	Pro Ala Ser Gly Asp	Phe Asp Phe
1190	1195	1200	
Tyr Glu	Leu Ile Leu Tyr Asn	Pro Asn Gly Thr Lys	Lys Glu Asn
1205	1210	1215	
Trp Lys	Asp Lys Asp Leu Thr	Glu Trp Arg Phe Gln	Gly Leu Val
1220	1225	1230	

[0035]

Pro Gly	Arg Lys Tyr Val	Leu Trp Val Val Thr His	Ser Gly Asp
1235		1240	1245
Leu Ser	Asn Lys Val Thr Ala	Glu Ser Arg Thr Ala	Pro Ser Pro
1250		1255	1260
Pro Ser	Leu Met Ser Phe Ala	Asp Ile Ala Asn Thr	Ser Leu Ala
1265		1270	1275
Ile Thr	Trp Lys Gly Pro Pro	Asp Trp Thr Asp Tyr	Asn Asp Phe
1280		1285	1290
Glu Leu	Gln Trp Leu Pro Arg	Asp Ala Leu Thr Val	Phe Asn Pro
1295		1300	1305
Tyr Asn	Asn Arg Lys Ser Glu	Gly Arg Ile Val Tyr	Gly Leu Arg
1310		1315	1320
Pro Gly	Arg Ser Tyr Gln Phe	Asn Val Lys Thr Val	Ser Gly Asp
1325		1330	1335
Ser Trp	Lys Thr Tyr Ser Lys	Pro Ile Phe Gly Ser	Val Arg Thr
1340		1345	1350
Lys Pro	Asp Lys Ile Gln Asn	Leu His Cys Arg Pro	Gln Asn Ser
1355		1360	1365
Thr Ala	Ile Ala Cys Ser Trp	Ile Pro Pro Asp Ser	Asp Phe Asp
1370		1375	1380
Gly Tyr	Ser Ile Glu Cys Arg	Lys Met Asp Thr Gln	Glu Val Glu
1385		1390	1395

[0036]

Phe Ser	Arg Lys Leu Glu Lys	Glu Lys Ser Leu Leu	Asn Ile Met
1400	1405	1410	
Met Leu	Val Pro His Lys Arg	Tyr Leu Val Ser Ile	Lys Val Gln
1415	1420	1425	
Ser Ala	Gly Met Thr Ser Glu	Val Val Glu Asp Ser	Thr Ile Thr
1430	1435	1440	
Met Ile	Asp Arg Pro Pro Pro	Pro Pro Pro His Ile	Arg Val Asn
1445	1450	1455	
Glu Lys	Asp Val Leu Ile Ser	Lys Ser Ser Ile Asn	Phe Thr Val
1460	1465	1470	
Asn Cys	Ser Trp Phe Ser Asp	Thr Asn Gly Ala Val	Lys Tyr Phe
1475	1480	1485	
Thr Val	Val Val Arg Glu Ala	Asp Gly Asn Asp Glu	Leu Lys Pro
1490	1495	1500	
Glu Gln	Gln His Pro Leu Pro	Ser Tyr Leu Glu Tyr	Arg His Asn
1505	1510	1515	
Ala Ser	Ile Arg Val Tyr Gln	Thr Asn Tyr Phe Ala	Ser Lys Cys
1520	1525	1530	
Ala Glu	Asn Pro Asn Ser Asn	Ser Lys Ser Phe Asn	Ile Lys Leu
1535	1540	1545	
Gly Ala	Glu Met Glu Ser Leu	Gly Gly Lys Cys Asp	Pro Thr Gln
1550	1555	1560	

[0037]

Gln Lys Phe Cys Asp Gly Pro Leu Lys Pro His Thr Ala Tyr Arg
1565 1570 1575

Ile Ser Ile Arg Ala Phe Thr Gln Leu Phe Asp Glu Asp Leu Lys
1580 1585 1590

Glu Phe Thr Lys Pro Leu Tyr Ser Asp Thr Phe Phe Ser Leu Pro
1595 1600 1605

Ile Thr Thr Glu Ser Glu Pro Leu Phe Gly Ala Ile Glu
1610 1615 1620

<210> 5

<211> 6199

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 5

```

ggcaegaggg cggtgccac ggcccttgag categccage cccagaggta gcgcgetgcg      60
cccgeccgca gggcgcgctg agcgetcaac aagtgttacc cagaagtgcc ctggettgccc      120
tcccagcgag atgctgagge atggagccct aacggccttg tggataaacac tgagcgctgt      180
gcagactgga gtggcagagc aagtgaatg taacttcaca ctgttgagat ccagggtctc      240
tagcttgtea gegtctatec agtggaggac tttegegtca cctgttaact ttagcctcat      300
ctacagcagt gatacctcgg ggcccatgtg gtgccatcct attcgatag acaactttac      360
ctacggatgt aacccaagg atttacaagc agggaccgtc tataacttca ggattgtttc      420
tetggatgga gaagagagca ctctggtctt acagacagat cegtgcctc ctgccaggtt      480
tgaagtcaat cgggagaaaa cagcatcaac caccctgcag gtccggtgga ctccctcttc      540
tggaagagtc tcttggtatg aggtgcaatt atttgatcat aacaatcaaa agatacaaga      600

```

[0038]

agtccaagtt caagaaagta ccacctggag ccaatatact ttcttgaacc tcaactgaggg	660
taacagttac aaagttgcc aacacagctgt ttctgggagaa aagcgtcctt ttccggtgta	720
tatcaatggc tctacagtac catctccagt gaaagatctt ggcatctccc ccaatcctaa	780
ttctctccta atttcttggg ctctgtgggtc tgggaatgtg gaacaataca ggctgtgtct	840
aatggataaa ggggccatcg ttcaagacac aaacgtggac aggcgtgata ctctctatgc	900
ttttcacgag ctgaccctcg gccacctcta caacctcact attgtcacca tggcctcggg	960
actgcaaaac tccaggtgga aactgggtgag gaccgtctcc atggaagtct caaatctgaa	1020
ggtgacaaat gacgggaggt tgacctctct aaatgtgaag tggcagaaac cccctgggga	1080
tgtagattcc tacagcatta cctgtctca ccaagggacc atcaaagaat ccaaaacatt	1140
agcacctcct gttactgaaa ctcaatttaa ggacttagtc cctggacggc ttaccacagt	1200
gaccatcagc tgcctctctg gtgagctctc tgcctgagaag tcagcagcgg ggagaacagt	1260
tccagaaaaa gtgaggaatc tggtttcta caacgagatt tggatgaagt cctttacagt	1320
gaactggacg cccctgtctg gagattggga gcattatcgt atcgtgtctt tcaatgaatc	1380
cttggctctg ctcaacacca cagtgggaaa ggaagaaacg cactatgcct tggatggctt	1440
ggagctcata ccaggaagac agtatgagat agaagtcatt gttgagagcg gaaatctgcg	1500
gaattccgag cgtgttcaag gcaggacagt acccctggct gtcctccagc ttccgtcaa	1560
acacgctaac gaaacttcac tgggcatac gtggcgggcc cctctaggcg aatgggagaa	1620
atacatcatt tegtgtatgg acagagagct ctgtgtcacc cacaagtcac tctccaaaga	1680
tgcctaaaga ttcaatttta cagacctgat gcctggacgg aattacaagg ctactgtcac	1740
tagcatgagt ggagatttaa aacagtcacc ttcaatcaaa ggaagaacag tgcctgcccc	1800
ggtgactgac ctgcacgtca acaaccaagg gatgaccagt agtctgttca ctactggac	1860
aaaggcactg ggagatgtag agttctacca agttttactg atccatgaaa atgtggtgt	1920

[0039]

caagaacgag agtgtttcca gtgataccag cagatacagc ttccgcgccc tgaaacccgg	1980
cagcctctac tccgtggtgg tgaccacggt gagtggaggg atctcctccc ggcaggtggt	2040
ggcggaagga agaacagtcc cgtccagcgt gagtggggtg acagtcaaca attctggccg	2100
gaatgactac ctcagegttt cctggcigcc ggccgctgga gaagtggatc actacgtggt	2160
gagcctctcc cagcagggca aggtggatca gtctctcacc atcgccaaat ctgtcagcga	2220
gtgttccttc agctccctca ccccgggccg cctctacaac gtcaactgtaa ccaccaagag	2280
cggcaattat gcaageccact ccttcaccga ggaacggaca gtgccagaca aggtccaggg	2340
aatcagtggt agcaactcig ccagaagcga ctacttaaag gtgtcctggg tgcattgccac	2400
tggagacttt gaccactatg aagtcaccat caaaaacaga gaaagcttca ttcaaaccac	2460
aaccatcccc aagtcagaaa atgagtggtg atttatigag ctggttcttg gacgcctgta	2520
cagcgtcact gtcagtacaa agagtggaca atatgaagcc agtgaacagg ggacagggag	2580
aacgatccca gagcctgtga aggatctcac ccttctcaac aggagtacgg aggatctcca	2640
tgtgacttgg tcaagagcca atggggatgt tgatcagtac gaggtccagc tgctcttcaa	2700
cgacatgaaa gtcttccctc atattcacct tgtgaacaca gcaactgagt ataagttcac	2760
ggcgtcacg ccggggcgcc attacaaaat cctcgtcctg accatcagtg gcgatgtcca	2820
gcagtcagcc ttcattgaag gcttcccagt tcccagcact gtcaaaaaca ttcacatttc	2880
tgccaatgga gccacggata ggctgatggt aacctggagc cctggtggcg gggatgtgga	2940
ctcctatgtg gtgtctgcat tcagacagga cgagaagggt gactctcaga ccattcccaa	3000
gcattgcctg gagcacacgt tccacaggct ggagggcgga gccaaagtaca ggatcgccat	3060
tgtttcigtg agtgggtccc tgagaaacca gatagatgcg ctccggacaga cagtcccagc	3120
gtctgtccag ggagtcgtcg cagccaatgc atacagcagt aattccttaa cagtaagttg	3180
gcagaaagcc cttggtgtgg cagaaagata cgatatcctg cttctaaacg agaatgggct	3240

[0040]

tcttttgagc aacgtgtcag agccagctac ggcaagacag cacaaatttg aagatctaac	3300
gccaggcaag aaatacaaga tgcagatcct gactgtcagc ggaggcctct tcagtaaaga	3360
atctcagget gaaggecgaa cagtcccagc agctgtcacc aatctgagga tcacagagaa	3420
ctccagtaga taccgtgcct tcggctggac cgccteggag ggtgaactca gctggtacaa	3480
catcttcttc tacaaccag acaggactct tcaggagcga gctcaagttg acccgctagt	3540
ccagagcttc tctttccaga acttgcatac aggcagaatg tacaagatgg tgattgtcac	3600
tcacagtggg gagctgtcca atgagtcatt tatattcggc agaacagttc ctgctgccgt	3660
gaaccatctc aaaggetccc atcggaacac gacagacagc ctgtggttca gctggagccc	3720
agcctccggg gactttgact tctatgagct gattctttac aatcccaacg gcacgaagaa	3780
ggagaactgg aaagaaaagg acgtgacaga gtggcgtttc caaggtcttg ttcctggaag	3840
gaaatacacc ctgtatgtgg tgactcacag tggggacctc agcaataaag tcacagggga	3900
gggcagaaca gcccgaagtc ctccagttct tttgtcattc gctgatgttg caaacacctc	3960
cttggtatc accctggaagg gacccccaga ctggacagat tacaatgact ttgagctgca	4020
gtggttccct ggagatgcac ttaccatctt caaccttac agcagcagaa agtcagaagg	4080
acgcattgtg tacgggttc acccaggag gtcctatcaa ttcagtgtca agactgtgag	4140
cggggactcc tggaaaacct acagcaaacc aatttctggg tctgtgagga caaagccaga	4200
caagatacaa aacctgcatt gccgccccca gaactccacg gccattgcct gctcttgat	4260
acctctgac tccgaatttg atggctacag cattgagtgc cgaaaaatgg ataccaaga	4320
aatcgagttt tcagaaagc tggagaaaga aaaatactg ctcaacatca tgatgttagt	4380
acctcataag aggtacctgg tgcctatcaa ggtgcagtcg gccggcatga ccagtgaggt	4440
ggttgaagat agcaccatca ccatgataga ccgcccgcct caaccgctc cacacatccg	4500
tgtgaatgaa aaggatgtgc taatcagcaa atcttccatc aactttactg tcaactgcag	4560

[0041]

ctggttcagc gacaccaacg gagcggttaa atactttgct gtgggtggta gagaggccga	4620
cagcatggat gaggtaagc cagaacagea gcacctctc ccttcctacc tggagtacag	4680
acacaacgcc tccatccgag tctaccagac caattatfff gccagcaaat gtgctgaaag	4740
tcccagacgc agttctaaaa gtttcaacat taagcttgga gcagagatgg acagccctcg	4800
tggcaaatgt gatcccgatc agcagaaatt ctgtgatgga ccgctgaagc cacacaccgc	4860
ctacagaatc agcatccggg cttttacaca gctatttgac gaggacttga aagagttcac	4920
caaaccctct tactegcata cgttctctc tatgcccatc accacagagt cagagccctt	4980
gtttggagtt attgaagggt tgagtgetgg cctgtttcta attggcatgc tgggtggcct	5040
tgttgcttc ttcattctga gacagaaagc tagccacagc agggaaagc catctgccc	5100
gctcagcatt cgtagggacc ggcccttgct tgiccatctg aatctgggcc agaaaggcaa	5160
ccgaaaaact tcttgcccca taaagatcaa tcagtttgaa gggcatttca tgaagctgca	5220
ggcagactcc aactacctc tatccaagga atatgaggac ttaaaagacg tgggtagaag	5280
ccagtcattg gacattgccc tcttgctga gaatcgaggg aaaaatcgat acaacaacat	5340
attgccttat gatgectcaa gagtgaagct ctgaatgct gatgacgacc ctgctctga	5400
ctacatcaac gccagctaca tccccgtaa caacttcaga cgagaataca tcgccactca	5460
gggaccgctt ccaggcacca aggatgactt ctggaagatg gcgtgggagc agaacgttca	5520
caacatcgtc atggtagccc agtgtgttga aaagggccga gtaagtggt accattactg	5580
gccagcagac caggaccccc tctactacgg tgatctcacc ctacagatgg tctcgagtc	5640
cgtgctcccc gagtggacca tcaggagatt taagatatgc agtgaagaac agttggatgc	5700
acacagactc atccgtcact ttcactaac ggtgtggcca gaccatgggg tcccagagac	5760
caccagctcc ctgatccaat ttgtgaggac agtcagggac tacatcaaca gaagccccgg	5820
ggctgggccc accgtagtgc actgcagcgc tgggtgtgggc agaacaggga cgttcgttgc	5880

[0042]

```

cctggaccgg atcctccagc agttggactc taaggactcc gtggacatit atggggcagt      5940

gcattgacct agactccaca gggttcacat ggtccagacc gagtgtcaat atgtgtatct      6000

gcattcagtg gtaagagacg tcttcagagc aaagaaactg cggaacgagc aagagaaccc      6060

cctgtttccg atttatgaga atgtgaatcc agagtatcac agagatgcaa tctactcgag      6120

acattaagaa ttcacctgaa gatccctcctgg ataaaagcgt ttcactgtgt gactttaaaa      6180

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa                                          6199

```

<210> 6

<211> 1998

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 6

```

Met Leu Arg His Gly Ala Leu Thr Ala Leu Trp Ile Thr Leu Ser Val
1           5           10          15

```

```

Val Gln Thr Gly Val Ala Glu Gln Val Lys Cys Asn Phe Thr Leu Leu
          20          25          30

```

```

Glu Ser Arg Val Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gln Trp Arg Thr Phe
          35          40          45

```

```

Ala Ser Pro Cys Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Ser Gly
          50          55          60

```

```

Pro Met Trp Cys His Pro Ile Arg Ile Asp Asn Phe Thr Tyr Gly Cys
65           70           75          80

```

```

Asn Pro Lys Asp Leu Gln Ala Gly Thr Val Tyr Asn Phe Arg Ile Val
          85          90          95

```

[0043]

Ser Leu Asp Gly Glu Glu Ser Thr Leu Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu
100 105 110

Pro Pro Ala Arg Phe Glu Val Asn Arg Glu Lys Thr Ala Ser Thr Thr
115 120 125

Leu Gln Val Arg Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Ser Trp Tyr Glu
130 135 140

Val Gln Leu Phe Asp His Asn Asn Gln Lys Ile Gln Glu Val Gln Val
145 150 155 160

Gln Glu Ser Thr Thr Trp Ser Gln Tyr Thr Phe Leu Asn Leu Thr Glu
165 170 175

Gly Asn Ser Tyr Lys Val Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Glu Lys Arg
180 185 190

Ser Phe Pro Val Tyr Ile Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys
195 200 205

Asp Leu Gly Ile Ser Pro Asn Pro Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser
210 215 220

Arg Gly Ser Gly Asn Val Glu Gln Tyr Arg Leu Val Leu Met Asp Lys
225 230 235 240

Gly Ala Ile Val Gln Asp Thr Asn Val Asp Arg Arg Asp Thr Ser Tyr
245 250 255

Ala Phe His Glu Leu Thr Pro Gly His Leu Tyr Asn Leu Thr Ile Val
260 265 270

[0044]

Thr Met Ala Ser Gly Leu Gln Asn Ser Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr
275 280 285

Ala Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Arg Leu
290 295 300

Thr Ser Leu Asn Val Lys Trp Gln Lys Pro Pro Gly Asp Val Asp Ser
305 310 315 320

Tyr Ser Ile Thr Leu Ser His Gln Gly Thr Ile Lys Glu Ser Lys Thr
325 330 335

Leu Ala Pro Pro Val Thr Glu Thr Gln Phe Lys Asp Leu Val Pro Gly
340 345 350

Arg Leu Tyr Gln Val Thr Ile Ser Cys Ile Ser Gly Glu Leu Ser Ala
355 360 365

Glu Lys Ser Ala Ala Gly Arg Thr Val Pro Glu Lys Val Arg Asn Leu
370 375 380

Val Ser Tyr Asn Glu Ile Trp Met Lys Ser Phe Thr Val Asn Trp Thr
385 390 395 400

Pro Pro Ala Gly Asp Trp Glu His Tyr Arg Ile Val Leu Phe Asn Glu
405 410 415

Ser Leu Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr His Tyr
420 425 430

Ala Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ile Pro Gly Arg Gln Tyr Glu Ile Glu
435 440 445

[0045]

Val Ile Val Glu Ser Gly Asn Leu Arg Asn Ser Glu Arg Cys Gln Gly
450 455 460

Arg Thr Val Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg Val Lys His Ala Asn
465 470 475 480

Glu Thr Ser Leu Gly Ile Thr Trp Arg Ala Pro Leu Gly Glu Trp Glu
485 490 495

Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Met Asp Arg Glu Leu Leu Val Ile His Lys
500 505 510

Ser Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe Thr Asp Leu Met Pro
515 520 525

Gly Arg Asn Tyr Lys Ala Thr Val Thr Ser Met Ser Gly Asp Leu Lys
530 535 540

Gln Ser Ser Ser Ile Lys Gly Arg Thr Val Pro Ala Gln Val Thr Asp
545 550 555 560

Leu His Val Asn Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser Leu Phe Thr Asn Trp
565 570 575

Thr Lys Ala Leu Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln Val Leu Leu Ile His
580 585 590

Glu Asn Val Val Val Lys Asn Glu Ser Val Ser Ser Asp Thr Ser Arg
595 600 605

Tyr Ser Phe Arg Ala Leu Lys Pro Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val
610 615 620

[0046]

Thr Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Val Val Ala Glu Gly
625 630 635 640

Arg Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr Val Asn Asn Ser Gly
645 650 655

Arg Asn Asp Tyr Leu Ser Val Ser Trp Leu Pro Ala Pro Gly Glu Val
660 665 670

Asp His Tyr Val Val Ser Leu Ser His Glu Gly Lys Val Asp Gln Phe
675 680 685

Leu Ile Ile Ala Lys Ser Val Ser Glu Cys Ser Phe Ser Ser Leu Thr
690 695 700

Pro Gly Arg Leu Tyr Asn Val Thr Val Thr Thr Lys Ser Gly Asn Tyr
705 710 715 720

Ala Ser His Ser Phe Thr Glu Glu Arg Thr Val Pro Asp Lys Val Gln
725 730 735

Gly Ile Ser Val Ser Asn Ser Ala Arg Ser Asp Tyr Leu Lys Val Ser
740 745 750

Trp Val His Ala Thr Gly Asp Phe Asp His Tyr Glu Val Thr Ile Lys
755 760 765

Asn Arg Glu Ser Phe Ile Gln Thr Lys Thr Ile Pro Lys Ser Glu Asn
770 775 780

Glu Cys Glu Phe Ile Glu Leu Val Pro Gly Arg Leu Tyr Ser Val Thr
785 790 795 800

[0047]

Val Ser Thr Lys Ser Gly Gln Tyr Glu Ala Ser Glu Gln Gly Thr Gly
805 810 815

Arg Thr Ile Pro Glu Pro Val Lys Asp Leu Thr Leu Leu Asn Arg Ser
820 825 830

Thr Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Arg Ala Asn Gly Asp Val Asp
835 840 845

Gln Tyr Glu Val Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met Lys Val Phe Pro His
850 855 860

Ile His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Lys Phe Thr Ala Leu Thr
865 870 875 880

Pro Gly Arg His Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr Ile Ser Gly Asp Val
885 890 895

Gln Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Leu Pro Val Pro Ser Thr Val Lys
900 905 910

Asn Ile His Ile Ser Ala Asn Gly Ala Thr Asp Arg Leu Met Val Thr
915 920 925

Trp Ser Pro Gly Gly Gly Asp Val Asp Ser Tyr Val Val Ser Ala Phe
930 935 940

Arg Gln Asp Glu Lys Val Asp Ser Gln Thr Ile Pro Lys His Ala Ser
945 950 955 960

Glu His Thr Phe His Arg Leu Glu Ala Gly Ala Lys Tyr Arg Ile Ala
965 970 975

[0048]

Ile Val Ser Val Ser Gly Ser Leu Arg Asn Gln Ile Asp Ala Leu Gly
 980 985 990

Gln Thr Val Pro Ala Ser Val Gln Gly Val Val Ala Ala Asn Ala Tyr
 995 1000 1005

Ser Ser Asn Ser Leu Thr Val Ser Trp Gln Lys Ala Leu Gly Val
 1010 1015 1020

Ala Glu Arg Tyr Asp Ile Leu Leu Leu Asn Glu Asn Gly Leu Leu
 1025 1030 1035

Leu Ser Asn Val Ser Glu Pro Ala Thr Ala Arg Gln His Lys Phe
 1040 1045 1050

Glu Asp Leu Thr Pro Gly Lys Lys Tyr Lys Met Gln Ile Leu Thr
 1055 1060 1065

Val Ser Gly Gly Leu Phe Ser Lys Glu Ser Gln Ala Glu Gly Arg
 1070 1075 1080

Thr Val Pro Ala Ala Val Thr Asn Leu Arg Ile Thr Glu Asn Ser
 1085 1090 1095

Ser Arg Tyr Leu Ser Phe Gly Trp Thr Ala Ser Glu Gly Glu Leu
 1100 1105 1110

Ser Trp Tyr Asn Ile Phe Leu Tyr Asn Pro Asp Arg Thr Leu Gln
 1115 1120 1125

Glu Arg Ala Gln Val Asp Pro Leu Val Gln Ser Phe Ser Phe Gln
 1130 1135 1140

[0049]

Asn Leu	Leu Gln Gly Arg Met	Tyr Lys Met Val Ile	Val Thr His
1145	1150	1155	

Ser Gly	Glu Leu Ser Asn Glu	Ser Phe Ile Phe Gly	Arg Thr Val
1160	1165	1170	

Pro Ala	Ala Val Asn His Leu	Lys Gly Ser His Arg	Asn Thr Thr
1175	1180	1185	

Asp Ser	Leu Trp Phe Ser Trp	Ser Pro Ala Ser Gly	Asp Phe Asp
1190	1195	1200	

Phe Tyr	Glu Leu Ile Leu Tyr	Asn Pro Asn Gly Thr	Lys Lys Glu
1205	1210	1215	

Asn Trp	Lys Glu Lys Asp Val	Thr Glu Trp Arg Phe	Gln Gly Leu
1220	1225	1230	

Val Pro	Gly Arg Lys Tyr Thr	Leu Tyr Val Val Thr	His Ser Gly
1235	1240	1245	

Asp Leu	Ser Asn Lys Val Thr	Gly Glu Gly Arg Thr	Ala Pro Ser
1250	1255	1260	

Pro Pro	Ser Leu Leu Ser Phe	Ala Asp Val Ala Asn	Thr Ser Leu
1265	1270	1275	

Ala Ile	Thr Trp Lys Gly Pro	Pro Asp Trp Thr Asp	Tyr Asn Asp
1280	1285	1290	

Phe Glu	Leu Gln Trp Phe Pro	Gly Asp Ala Leu Thr	Ile Phe Asn
1295	1300	1305	

[0050]

Pro Tyr	Ser Ser Arg Lys Ser	Glu Gly Arg Ile Val	Tyr Gly Leu
1310	1315	1320	

His Pro	Gly Arg Ser Tyr Gln	Phe Ser Val Lys Thr	Val Ser Gly
1325	1330	1335	

Asp Ser	Trp Lys Thr Tyr Ser	Lys Pro Ile Ser Gly	Ser Val Arg
1340	1345	1350	

Thr Lys	Pro Asp Lys Ile Gln	Asn Leu His Cys Arg	Pro Gln Asn
1355	1360	1365	

Ser Thr	Ala Ile Ala Cys Ser	Trp Ile Pro Pro Asp	Ser Asp Phe
1370	1375	1380	

Asp Gly	Tyr Ser Ile Glu Cys	Arg Lys Met Asp Thr	Gln Glu Ile
1385	1390	1395	

Glu Phe	Ser Arg Lys Leu Glu	Lys Glu Lys Ser Leu	Leu Asn Ile
1400	1405	1410	

Met Met	Leu Val Pro His Lys	Arg Tyr Leu Val Ser	Ile Lys Val
1415	1420	1425	

Gln Ser	Ala Gly Met Thr Ser	Glu Val Val Glu Asp	Ser Thr Ile
1430	1435	1440	

Thr Met	Ile Asp Arg Pro Pro	Gln Pro Pro Pro His	Ile Arg Val
1445	1450	1455	

Asn Glu	Lys Asp Val Leu Ile	Ser Lys Ser Ser Ile	Asn Phe Thr
1460	1465	1470	

[0051]

Val	Asn	Cys	Ser	Trp	Phe	Ser	Asp	Thr	Asn	Gly	Ala	Val	Lys	Tyr
1475						1480						1485		
Phe	Ala	Val	Val	Val	Arg	Glu	Ala	Asp	Ser	Met	Asp	Glu	Leu	Lys
1490						1495						1500		
Pro	Glu	Gln	Gln	His	Pro	Leu	Pro	Ser	Tyr	Leu	Glu	Tyr	Arg	His
1505						1510						1515		
Asn	Ala	Ser	Ile	Arg	Val	Tyr	Gln	Thr	Asn	Tyr	Phe	Ala	Ser	Lys
1520						1525						1530		
Cys	Ala	Glu	Ser	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Lys	Ser	Phe	Asn	Ile	Lys
1535						1540						1545		
Leu	Gly	Ala	Glu	Met	Asp	Ser	Leu	Gly	Gly	Lys	Cys	Asp	Pro	Ser
1550						1555						1560		
Gln	Gln	Lys	Phe	Cys	Asp	Gly	Pro	Leu	Lys	Pro	His	Thr	Ala	Tyr
1565						1570						1575		
Arg	Ile	Ser	Ile	Arg	Ala	Phe	Thr	Gln	Leu	Phe	Asp	Glu	Asp	Leu
1580						1585						1590		
Lys	Glu	Phe	Thr	Lys	Pro	Leu	Tyr	Ser	Asp	Thr	Phe	Phe	Ser	Met
1595						1600						1605		
Pro	Ile	Thr	Thr	Glu	Ser	Glu	Pro	Leu	Phe	Gly	Val	Ile	Glu	Gly
1610						1615						1620		
Val	Ser	Ala	Gly	Leu	Phe	Leu	Ile	Gly	Met	Leu	Val	Ala	Leu	Val
1625						1630						1635		

[0052]

Ala Phe	Phe Ile Cys Arg Gln	Lys Ala Ser His Ser	Arg Glu Arg
1640	1645	1650	
Pro Ser	Ala Arg Leu Ser Ile	Arg Arg Asp Arg Pro	Leu Ser Val
1655	1660	1665	
His Leu	Asn Leu Gly Gln Lys	Gly Asn Arg Lys Thr	Ser Cys Pro
1670	1675	1680	
Ile Lys	Ile Asn Gln Phe Glu	Gly His Phe Met Lys	Leu Gln Ala
1685	1690	1695	
Asp Ser	Asn Tyr Leu Leu Ser	Lys Glu Tyr Glu Asp	Leu Lys Asp
1700	1705	1710	
Val Gly	Arg Ser Gln Ser Cys	Asp Ile Ala Leu Leu	Pro Glu Asn
1715	1720	1725	
Arg Gly	Lys Asn Arg Tyr Asn	Asn Ile Leu Pro Tyr	Asp Ala Ser
1730	1735	1740	
Arg Val	Lys Leu Ser Asn Val	Asp Asp Asp Pro Cys	Ser Asp Tyr
1745	1750	1755	
Ile Asn	Ala Ser Tyr Ile Pro	Gly Asn Asn Phe Arg	Arg Glu Tyr
1760	1765	1770	
Ile Ala	Thr Gln Gly Pro Leu	Pro Gly Thr Lys Asp	Asp Phe Trp
1775	1780	1785	
Lys Met	Ala Trp Glu Gln Asn	Val His Asn Ile Val	Met Val Thr
1790	1795	1800	

[0053]

Gln Cys Val Glu Lys Gly Arg Val Lys Cys Asp His Tyr Trp Pro		
1805	1810	1815
Ala Asp Gln Asp Pro Leu Tyr Tyr Gly Asp Leu Ile Leu Gln Met		
1820	1825	1830
Val Ser Glu Ser Val Leu Pro Glu Trp Thr Ile Arg Glu Phe Lys		
1835	1840	1845
Ile Cys Ser Glu Glu Gln Leu Asp Ala His Arg Leu Ile Arg His		
1850	1855	1860
Phe His Tyr Thr Val Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu Thr Thr		
1865	1870	1875
Gln Ser Leu Ile Gln Phe Val Arg Thr Val Arg Asp Tyr Ile Asn		
1880	1885	1890
Arg Ser Pro Gly Ala Gly Pro Thr Val Val His Cys Ser Ala Gly		
1895	1900	1905
Val Gly Arg Thr Gly Thr Phe Val Ala Leu Asp Arg Ile Leu Gln		
1910	1915	1920
Gln Leu Asp Ser Lys Asp Ser Val Asp Ile Tyr Gly Ala Val His		
1925	1930	1935
Asp Leu Arg Leu His Arg Val His Met Val Gln Thr Glu Cys Gln		
1940	1945	1950
Tyr Val Tyr Leu His Gln Cys Val Arg Asp Val Leu Arg Ala Lys		
1955	1960	1965

[0054]

Lys Leu Arg Asn Glu Gln Glu Asn Pro Leu Phe Pro Ile Tyr Glu
1970 1975 1980

Asn Val Asn Pro Glu Tyr His Arg Asp Ala Ile Tyr Ser Arg His
1985 1990 1995

<210> 7

<211> 1619

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 7

Met Leu Arg His Gly Ala Leu Thr Ala Leu Trp Ile Thr Leu Ser Val
1 5 10 15

Val Gln Thr Gly Val Ala Glu Gln Val Lys Cys Asn Phe Thr Leu Leu
20 25 30

Glu Ser Arg Val Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gln Trp Arg Thr Phe
35 40 45

Ala Ser Pro Cys Asn Phe Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Asp Thr Ser Gly
50 55 60

Pro Met Trp Cys His Pro Ile Arg Ile Asp Asn Phe Thr Tyr Gly Cys
65 70 75 80

Asn Pro Lys Asp Leu Gln Ala Gly Thr Val Tyr Asn Phe Arg Ile Val
85 90 95

Ser Leu Asp Gly Glu Glu Ser Thr Leu Val Leu Gln Thr Asp Pro Leu
100 105 110

Pro Pro Ala Arg Phe Glu Val Asn Arg Glu Lys Thr Ala Ser Thr Thr

[0055]

115	120	125
Leu Gln Val Arg Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Val Ser Trp Tyr Glu		
130	135	140
Val Gln Leu Phe Asp His Asn Asn Gln Lys Ile Gln Glu Val Gln Val		
145	150	155 160
Gln Glu Ser Thr Thr Trp Ser Gln Tyr Thr Phe Leu Asn Leu Thr Glu		
165	170	175
Gly Asn Ser Tyr Lys Val Ala Ile Thr Ala Val Ser Gly Glu Lys Arg		
180	185	190
Ser Phe Pro Val Tyr Ile Asn Gly Ser Thr Val Pro Ser Pro Val Lys		
195	200	205
Asp Leu Gly Ile Ser Pro Asn Pro Asn Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser		
210	215	220
Arg Gly Ser Gly Asn Val Glu Gln Tyr Arg Leu Val Leu Met Asp Lys		
225	230	235 240
Gly Ala Ile Val Gln Asp Thr Asn Val Asp Arg Arg Asp Thr Ser Tyr		
245	250	255
Ala Phe His Glu Leu Thr Pro Gly His Leu Tyr Asn Leu Thr Ile Val		
260	265	270
Thr Met Ala Ser Gly Leu Gln Asn Ser Arg Trp Lys Leu Val Arg Thr		
275	280	285
Ala Pro Met Glu Val Ser Asn Leu Lys Val Thr Asn Asp Gly Arg Leu		

[0056]

290	295	300	
Thr Ser Leu Asn Val Lys Trp Gln Lys Pro Pro Gly Asp Val Asp Ser			
305	310	315	320
Tyr Ser Ile Thr Leu Ser His Gln Gly Thr Ile Lys Glu Ser Lys Thr			
	325	330	335
Leu Ala Pro Pro Val Thr Glu Thr Gln Phe Lys Asp Leu Val Pro Gly			
	340	345	350
Arg Leu Tyr Gln Val Thr Ile Ser Cys Ile Ser Gly Glu Leu Ser Ala			
	355	360	365
Glu Lys Ser Ala Ala Gly Arg Thr Val Pro Glu Lys Val Arg Asn Leu			
	370	375	380
Val Ser Tyr Asn Glu Ile Trp Met Lys Ser Phe Thr Val Asn Trp Thr			
385	390	395	400
Pro Pro Ala Gly Asp Trp Glu His Tyr Arg Ile Val Leu Phe Asn Glu			
	405	410	415
Ser Leu Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Gly Lys Glu Glu Thr His Tyr			
	420	425	430
Ala Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ile Pro Gly Arg Gln Tyr Glu Ile Glu			
	435	440	445
Val Ile Val Glu Ser Gly Asn Leu Arg Asn Ser Glu Arg Cys Gln Gly			
	450	455	460
Arg Thr Val Pro Leu Ala Val Leu Gln Leu Arg Val Lys His Ala Asn			

[0057]

465	470	475	480
Glu Thr Ser Leu Gly Ile Thr Trp Arg Ala Pro Leu Gly Glu Trp Glu			
485	490	495	
Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Met Asp Arg Glu Leu Leu Val Ile His Lys			
500	505	510	
Ser Leu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Phe Thr Phe Thr Asp Leu Met Pro			
515	520	525	
Gly Arg Asn Tyr Lys Ala Thr Val Thr Ser Met Ser Gly Asp Leu Lys			
530	535	540	
Gln Ser Ser Ser Ile Lys Gly Arg Thr Val Pro Ala Gln Val Thr Asp			
545	550	555	560
Leu His Val Asn Asn Gln Gly Met Thr Ser Ser Leu Phe Thr Asn Trp			
565	570	575	
Thr Lys Ala Leu Gly Asp Val Glu Phe Tyr Gln Val Leu Leu Ile His			
580	585	590	
Glu Asn Val Val Val Lys Asn Glu Ser Val Ser Ser Asp Thr Ser Arg			
595	600	605	
Tyr Ser Phe Arg Ala Leu Lys Pro Gly Ser Leu Tyr Ser Val Val Val			
610	615	620	
Thr Thr Val Ser Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Val Val Ala Glu Gly			
625	630	635	640
Arg Thr Val Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Thr Val Asn Asn Ser Gly			

[0058]

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

[0059]

820	825	830
Thr Glu Asp Leu His Val Thr Trp Ser Arg Ala Asn Gly Asp Val Asp		
835	840	845
Gln Tyr Glu Val Gln Leu Leu Phe Asn Asp Met Lys Val Phe Pro His		
850	855	860
Ile His Leu Val Asn Thr Ala Thr Glu Tyr Lys Phe Thr Ala Leu Thr		
865	870	875 880
Pro Gly Arg His Tyr Lys Ile Leu Val Leu Thr Ile Ser Gly Asp Val		
885	890	895
Gln Gln Ser Ala Phe Ile Glu Gly Leu Pro Val Pro Ser Thr Val Lys		
900	905	910
Asn Ile His Ile Ser Ala Asn Gly Ala Thr Asp Arg Leu Met Val Thr		
915	920	925
Trp Ser Pro Gly Gly Gly Asp Val Asp Ser Tyr Val Val Ser Ala Phe		
930	935	940
Arg Gln Asp Glu Lys Val Asp Ser Gln Thr Ile Pro Lys His Ala Ser		
945	950	955 960
Glu His Thr Phe His Arg Leu Glu Ala Gly Ala Lys Tyr Arg Ile Ala		
965	970	975
Ile Val Ser Val Ser Gly Ser Leu Arg Asn Gln Ile Asp Ala Leu Gly		
980	985	990
Gln Thr Val Pro Ala Ser Val Gln Gly Val Val Ala Ala Asn Ala Tyr		

[0060]

995	1000	1005
Ser Ser Asn Ser Leu Thr Val	Ser Trp Gln Lys Ala	Leu Gly Val
1010	1015	1020
Ala Glu Arg Tyr Asp Ile Leu	Leu Leu Asn Glu Asn	Gly Leu Leu
1025	1030	1035
Leu Ser Asn Val Ser Glu Pro	Ala Thr Ala Arg Gln	His Lys Phe
1040	1045	1050
Glu Asp Leu Thr Pro Gly Lys	Lys Tyr Lys Met Gln	Ile Leu Thr
1055	1060	1065
Val Ser Gly Gly Leu Phe Ser	Lys Glu Ser Gln Ala	Glu Gly Arg
1070	1075	1080
Thr Val Pro Ala Ala Val Thr	Asn Leu Arg Ile Thr	Glu Asn Ser
1085	1090	1095
Ser Arg Tyr Leu Ser Phe Gly	Trp Thr Ala Ser Glu	Gly Glu Leu
1100	1105	1110
Ser Trp Tyr Asn Ile Phe Leu	Tyr Asn Pro Asp Arg	Thr Leu Gln
1115	1120	1125
Glu Arg Ala Gln Val Asp Pro	Leu Val Gln Ser Phe	Ser Phe Gln
1130	1135	1140
Asn Leu Leu Gln Gly Arg Met	Tyr Lys Met Val Ile	Val Thr His
1145	1150	1155
Ser Gly Glu Leu Ser Asn Glu	Ser Phe Ile Phe Gly	Arg Thr Val

[0061]

1160	1165	1170
Pro Ala Ala Val Asn His Leu Lys Gly Ser His Arg Asn Thr Thr		
1175	1180	1185
Asp Ser Leu Trp Phe Ser Trp Ser Pro Ala Ser Gly Asp Phe Asp		
1190	1195	1200
Phe Tyr Glu Leu Ile Leu Tyr Asn Pro Asn Gly Thr Lys Lys Glu		
1205	1210	1215
Asn Trp Lys Glu Lys Asp Val Thr Glu Trp Arg Phe Gln Gly Leu		
1220	1225	1230
Val Pro Gly Arg Lys Tyr Thr Leu Tyr Val Val Thr His Ser Gly		
1235	1240	1245
Asp Leu Ser Asn Lys Val Thr Gly Glu Gly Arg Thr Ala Pro Ser		
1250	1255	1260
Pro Pro Ser Leu Leu Ser Phe Ala Asp Val Ala Asn Thr Ser Leu		
1265	1270	1275
Ala Ile Thr Trp Lys Gly Pro Pro Asp Trp Thr Asp Tyr Asn Asp		
1280	1285	1290
Phe Glu Leu Gln Trp Phe Pro Gly Asp Ala Leu Thr Ile Phe Asn		
1295	1300	1305
Pro Tyr Ser Ser Arg Lys Ser Glu Gly Arg Ile Val Tyr Gly Leu		
1310	1315	1320
His Pro Gly Arg Ser Tyr Gln Phe Ser Val Lys Thr Val Ser Gly		

[0062]

1325	1330	1335
Asp Ser Trp Lys Thr Tyr Ser	Lys Pro Ile Ser Gly	Ser Val Arg
1340	1345	1350
Thr Lys Pro Asp Lys Ile Gln	Asn Leu His Cys Arg	Pro Gln Asn
1355	1360	1365
Ser Thr Ala Ile Ala Cys Ser	Trp Ile Pro Pro Asp	Ser Asp Phe
1370	1375	1380
Asp Gly Tyr Ser Ile Glu Cys	Arg Lys Met Asp Thr	Gln Glu Ile
1385	1390	1395
Glu Phe Ser Arg Lys Leu Glu	Lys Glu Lys Ser Leu	Leu Asn Ile
1400	1405	1410
Met Met Leu Val Pro His Lys	Arg Tyr Leu Val Ser	Ile Lys Val
1415	1420	1425
Gln Ser Ala Gly Met Thr Ser	Glu Val Val Glu Asp	Ser Thr Ile
1430	1435	1440
Thr Met Ile Asp Arg Pro Pro	Gln Pro Pro Pro His	Ile Arg Val
1445	1450	1455
Asn Glu Lys Asp Val Leu Ile	Ser Lys Ser Ser Ile	Asn Phe Thr
1460	1465	1470
Val Asn Cys Ser Trp Phe Ser	Asp Thr Asn Gly Ala	Val Lys Tyr
1475	1480	1485
Phe Ala Val Val Val Arg Glu	Ala Asp Ser Met Asp	Glu Leu Lys

[0063]

1490	1495	1500
Pro Glu Gln Gln His Pro Leu Pro Ser Tyr Leu Glu Tyr Arg His		
1505	1510	1515
Asn Ala Ser Ile Arg Val Tyr Gln Thr Asn Tyr Phe Ala Ser Lys		
1520	1525	1530
Cys Ala Glu Ser Pro Asp Ser Ser Ser Lys Ser Phe Asn Ile Lys		
1535	1540	1545
Leu Gly Ala Glu Met Asp Ser Leu Gly Gly Lys Cys Asp Pro Ser		
1550	1555	1560
Gln Gln Lys Phe Cys Asp Gly Pro Leu Lys Pro His Thr Ala Tyr		
1565	1570	1575
Arg Ile Ser Ile Arg Ala Phe Thr Gln Leu Phe Asp Glu Asp Leu		
1580	1585	1590
Lys Glu Phe Thr Lys Pro Leu Tyr Ser Asp Thr Phe Phe Ser Met		
1595	1600	1605
Pro Ile Thr Thr Glu Ser Glu Pro Leu Phe Gly		
1610	1615	

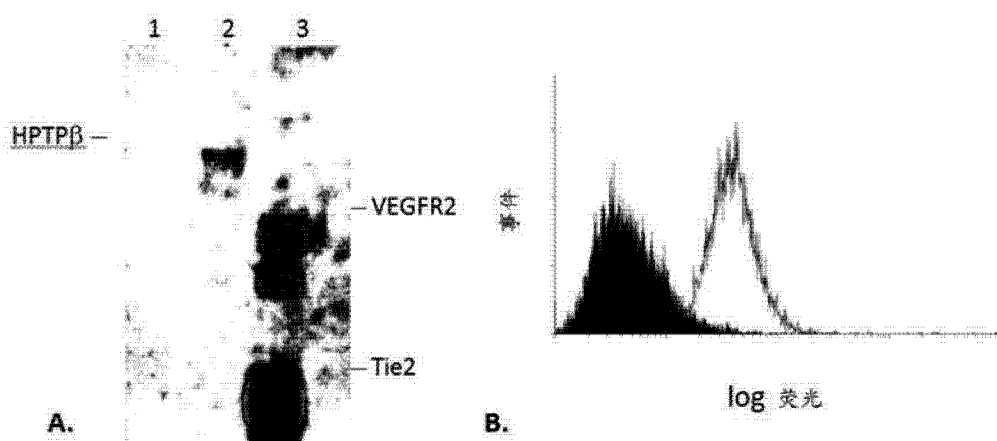


图 1

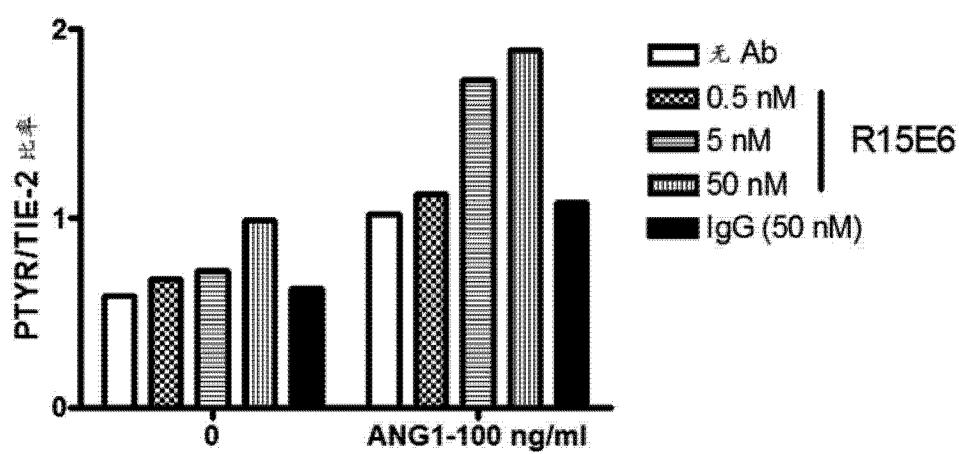


图 2

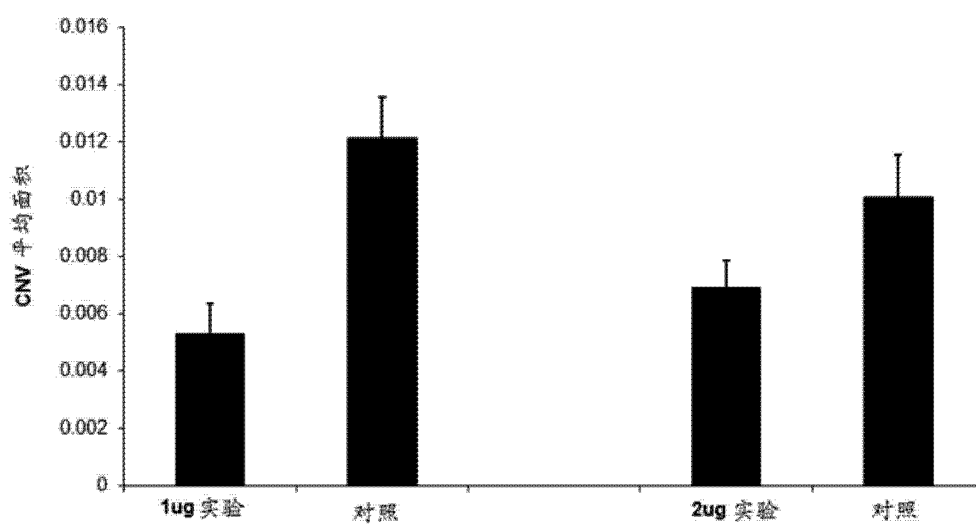


图 3

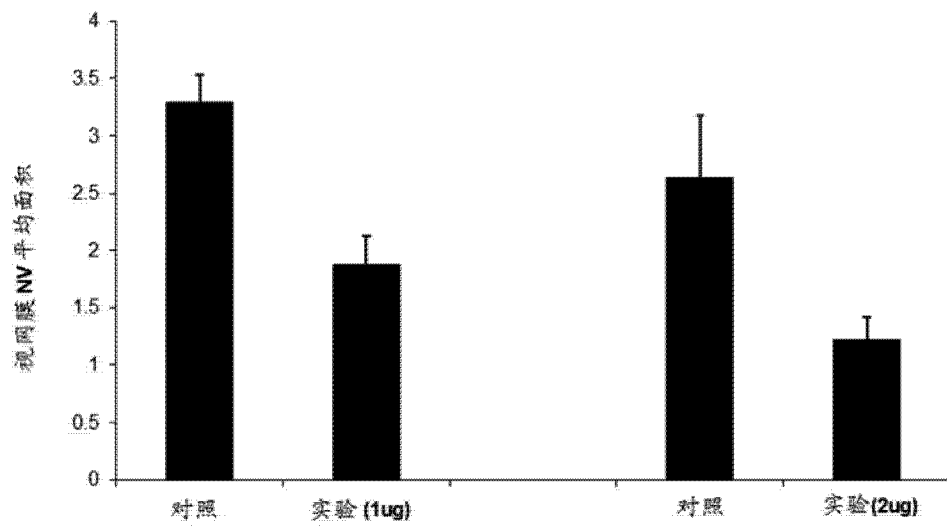


图 4

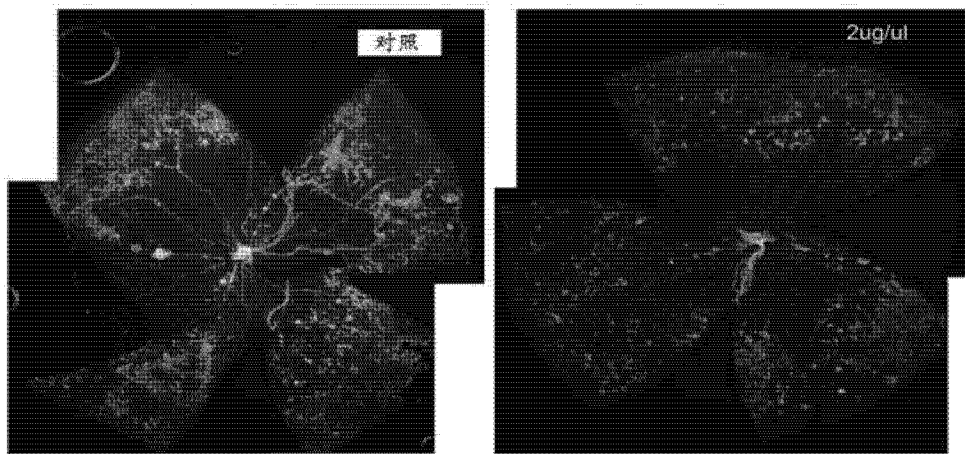


图 5

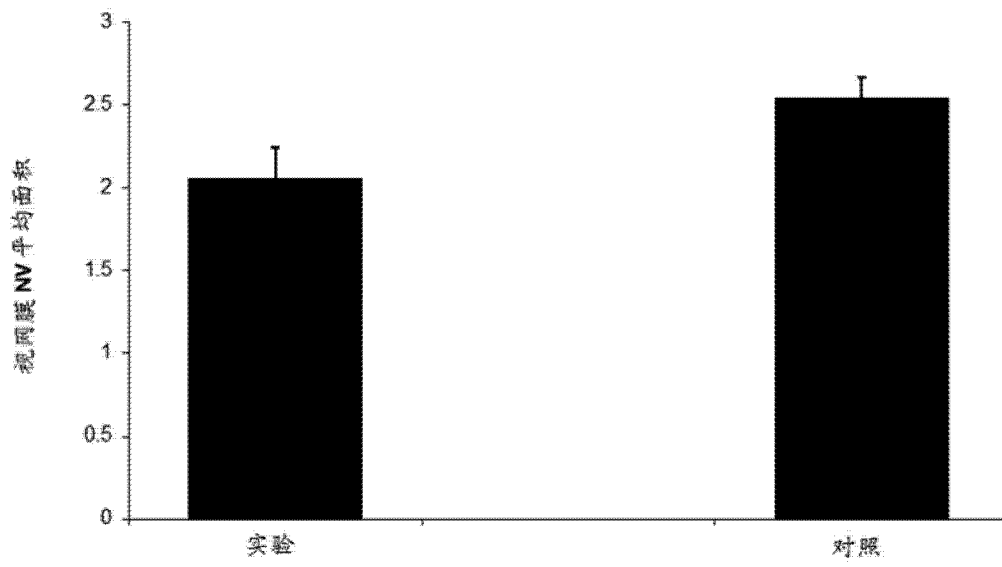


图 6

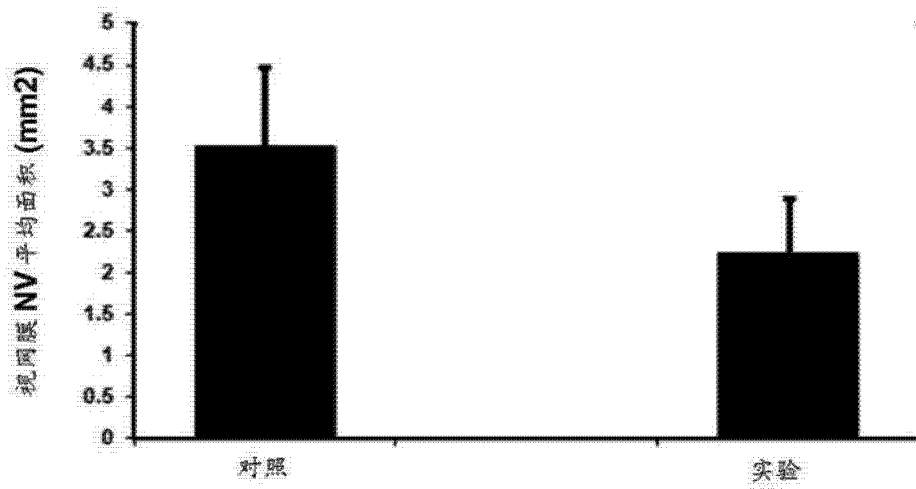


图 7