



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I631133 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：103109211

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 13 日

(51)Int. Cl. : C07K14/71 (2006.01)

C07K19/00 (2006.01)

C12N15/861 (2006.01)

A61K38/17 (2006.01)

A61P27/02 (2006.01)

(30)優先權：2013/03/13 美國

61/780,914

(71)申請人：建新公司 (美國) GENZYME CORPORATION (US)

美國

(72)發明人：貝茜 彼得 PECHAN, PETER (CZ)；阿丁格 傑弗瑞 ARDINGER, JEFFERY (US)；魯賓 希拉蕊 RUBIN, HILLARD (US)；瓦斯沃絲 山謬 WADSWORTH, SAMUEL (US)；史考利亞 艾布朗漢 SCARIA, ABRAHAM (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 20060234347A1

審查人員：劉建宏

申請專利範圍項數：51 項 圖式數：8 共 141 頁

(54)名稱

包含 P D G F 及 V E G F 結合部分之融合蛋白及其使用方法

FUSION PROTEINS COMPRISING PDGF AND VEGF BINDING PORTIONS AND METHODS OF USING THEREOF

(57)摘要

本發明提供包含 PDGF 及 VEGF 結合部分之融合蛋白及編碼該等融合蛋白之重組病毒粒子。亦提供包含該等融合蛋白及病毒粒子之組合物以及其使用方法。

The present provides fusion proteins comprising PDGF and VEGF binding portions, and recombinant viral particles encoding the fusion proteins. Compositions comprising the fusion proteins and viral particles as well as methods of using the same are also provided.

指定代表圖：

無新生血管形成之燒傷之百分比

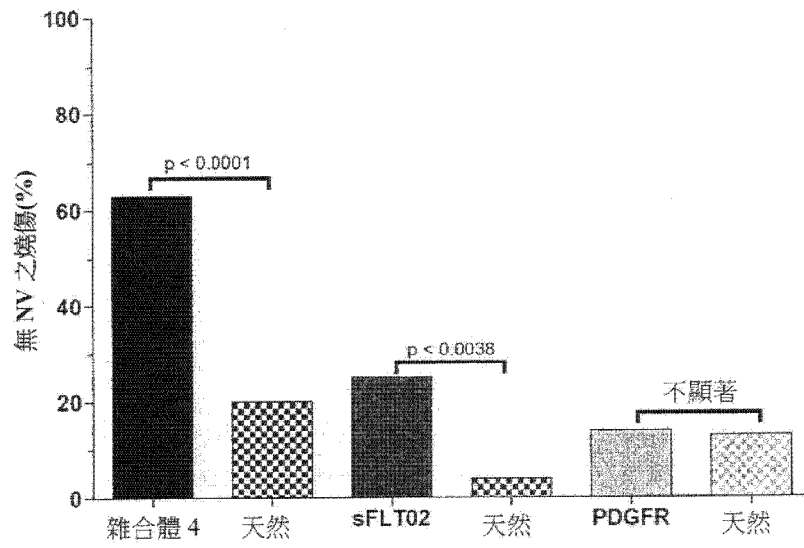


圖 8

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

包含PDGF及VEGF結合部分之融合蛋白及其使用方法

FUSION PROTEINS COMPRISING PDGF AND VEGF BINDING
PORTIONS AND METHODS OF USING THEREOF

相關申請案交叉參考

本申請案根據35 § USC 119(e)主張於2013年3月13日提出申請之先前共同待決之美國臨時專利申請案第61/780,914號的權益，該案件之揭示內容之全文以引用方式併入本文中。

【技術領域】

本發明係關於抑制PDGF途徑及VEGF途徑之融合蛋白、該等融合蛋白之組合物以及其產生及使用方法。

【先前技術】

由生長因子(例如血管內皮生長因子(VEGF))之過量產生引起之新血管形成係如腫瘤生長、年齡相關性黃斑變性(AMD)及增殖性糖尿病性視網膜病變(PDR)等疾病之關鍵要素(Connolly等人, *J Clin Invest.*, 1989, 84(5):1470-8 ; Ferrara等人, *Biochem Biophys Res Commun.*, 1989, 161(2):851-9 ; 及Ferrara等人, *Nat Med.*, 1998, 4(3):336-40)。濕型AMD係特徵在於視網膜下方異常新生血管形成且經常導致永久性視力損失之最嚴重形式之AMD疾病。用抗體、可溶性VEGF受體阻斷VEGF或抑制VEGF受體酪胺酸激酶活性係已在阻抑視網膜新生血管形成中顯示有前途之臨床前及臨床結果之策略(Aiello等人, *PNAS*, 1995, 92:10457-10461及Willet等人, *Nat Med.*, 2004, 10:145-147)。然而，最

近臨床數據顯示僅在VEGF抑制情況下，新血管組織通常不會退化，此乃因與內皮細胞相互作用且促使確立血液-視網膜障壁之外周細胞為新生血管內皮細胞提供存活信號且因此使得其對VEGF戒斷具有抗性(Benjamin等人, *Development*, 1998, 125(9):1591-8及Patel S., *Retina*, 2009, 29(增刊6):S45-8)。此外，增殖性視網膜中發現之血小板衍生之生長因子同型異構體B (PDGF-B)及PDGF受體- β (PDGFR β)在外周細胞之募集用於穩定正發育脈管系統中具有重要作用(Robbins等人, *Invest Opth Vis Sci.*, 1994, 35(10):3649-63；Lindahl等人, *Development*, 1997, 124:3943-3953；及Hellström等人, *Development*, 1999, 126:3047-3055)。

VEGFR1 (Flt-1)之VEGF結合功能已映射至第二細胞外結構域(ECD) (Davis-Smyth等人, *EMBO J.*, 1996, 15:4919-4927；Barleon等人, *J Biol Chem.*, 1997, 272:10382-10388；Wiesmann等人, *Cell*, 1997, 91:695-704；及Davis-Smyth等人, *J Biol Chem.*, 1998, 273:3216-3222)。高親和力VEGF-結合受體之天然選擇性剪接形式，即可溶性VEGFR1 (sFlt1)以主要起誘餌受體作用之分泌蛋白形式存在(Shibuya等人, *Oncogene*, 1990, 5:519-524及Kendall等人, *PNAS*, 1993, 90:10705-10709)。經改造用於治療用途之可溶性受體、VEGF-Trap具有融合至VEGFR2 (KDR)之第三結構域及人類IgG1 Fc區之VEGFR1之第二結構域(Holash等人, 2002)。先前顯示PDGFR β 之細胞外區拮抗PDGF-B刺激之反應(Duan等人, *J Biol Chem*, 1991, 266(1):413-8及Ueno等人, *Science*, 1991, 252(5007):844-8)。利用PDGFR β -Fc嵌合體之研究證實人類PDGFR β ECD 1至3對於高親和力PDGF-B配體結合係足夠的(Heidaran等人, *FASEB J.*, 1995, 9(1):140-5及Lokker等人, *J Biol Chem*, 1997, 272(52):33037-44)。在PDGFR β ECD 1至3稠合至麩胱甘肽S-轉移酶(GST)結構域時，亦闡述預二聚化對高親和力PDGF-B配體結合之

效應(Leppänen等人, *Biochemistry*, 2000, 39(9):2370-5)。

當前眼治療需要由視網膜專家每月玻璃體內注射達數年。因此，需要改良之治療劑及遞送該等治療劑至位點(例如眼)之方法。

【發明內容】

本文提供之本發明尤其揭示抑制PDGF途徑及VEGF途徑之融合蛋白、包含該等融合蛋白之組合物及包含含有編碼融合蛋白之核酸的病毒粒子之組合物、以及該等融合蛋白及病毒粒子之產生及使用方法，其用於治療或預防諸如眼部疾病、發炎性疾病、自體免疫疾病或癌症等疾病。

因此，在一個態樣中，本發明提供包含以下之融合蛋白：(a) PDGF受體之細胞外部分，(b) VEGF受體之細胞外部分，及(c) 多聚化結構域，其中融合蛋白結合至PDGF及VEGF。在一些實施例中，融合蛋白以如下次序自N末端至C末端佈置：(a)、(b)及(c)。在一些實施例中，PDGF受體係PDGFR β 。在本文中之一些實施例中，PDGFR之細胞外部分包含PDGFR之Ig樣結構域D1-D3。在本文中之一些實施例中，PDGFR之細胞外部分包含PDGFR之Ig樣結構域D1-D4。在本文中之一些實施例中，PDGFR之細胞外部分包含PDGFR之Ig樣結構域D1-D5。在本文中之一些實施例中，PDGFR之細胞外部分包含胺基酸序列SEQ ID NO:1、2或3或與SEQ ID NO:1、2或3具有至少85%一致性之胺基酸序列。在本文中之一些實施例中，VEGF受體之細胞外部分包含VEGF受體之Ig樣結構域D2。在本文中之一些實施例中，VEGF受體之細胞外部分包含VEGFR1 (FLT-1)之Ig樣結構域D2。在本文中之一些實施例中，VEGF受體之細胞外部分包含VEGFR1 (FLT-1)之Ig樣結構域D2及VEGFR2之Ig樣結構域D3。在本文中之一些實施例中，VEGF受體之細胞外部分包含VEGFR1 (FLT-1)之Ig樣結構域D1-D3。在本文中之一些實施例中，VEGF受體之細胞外部分包含胺基酸序列

SEQ ID NO:4或5或與SEQ ID NO:4或5具有至少85%一致性之胺基酸序列。在本文中之一些實施例中，融合蛋白進一步包含PDGF受體之細胞外部分與VEGF受體之細胞外部分之間之連接體肽及/或VEGF受體之細胞外部分與多聚化結構域之間之肽連接體。在又一實施例中，肽連接體包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：Gly₉、Glu₉、Ser₉、Gly₅-Cys-Pro₂-Cys、(Gly₄-Ser)₃、Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn、Pro-Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn、Gly-Asp-Leu-Ile-Tyr-Arg-Asn-Gln-Lys及Gly₉-Pro-Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn。在本文中之一些實施例中，多聚化結構域係抗體之Fc區。在又一實施例中，Fc區包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之CH3區或IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之CH2及CH3區。在本文中之一些實施例中，Fc區包含胺基酸序列SEQ ID NO:6或與SEQ ID NO:6具有至少85%一致性之胺基酸序列。在本文中之一些實施例中，融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:13或15或與SEQ ID NO:13或15具有至少85%一致性之胺基酸序列。在本文中之一些實施例中，融合蛋白係呈多聚體形式。在本文中之一些實施例中，融合蛋白係呈二聚體形式。

在一個態樣中，本發明提供融合蛋白，其係藉由在產生融合蛋白之條件下培養包含編碼本文揭示之融合蛋白中之任一者之核酸的宿主細胞及回收由宿主細胞產生之融合蛋白來產生。

在另一態樣中，本發明提供包含兩種融合蛋白之二聚體融合蛋白，其中每一融合蛋白包含本文揭示之融合蛋白中之任一者。

在又一態樣中，本發明提供包含本文揭示之融合蛋白中之任一者及醫藥上可接受之載劑的組合物。

在再一態樣中，本發明提供編碼本文揭示之融合蛋白中之任一者之核酸。

在一些態樣中，本發明亦提供包含編碼本文揭示之融合蛋白中之任一者之核苷酸序列的宿主細胞。

在一些態樣中，本發明提供產生融合蛋白之方法，其包含在產生融合蛋白之條件下培養包含編碼本文揭示之融合蛋白中之任一者之核酸的宿主細胞及回收由宿主細胞產生之融合蛋白。在其他實施例中，宿主細胞係哺乳動物細胞。在其他實施例中，宿主細胞係細菌細胞。在其他實施例中，宿主細胞係大腸桿菌(*Escherichia coli*)細胞。

在另一態樣中，本發明提供遞送融合蛋白至個體之方法，其包含向個體投與有效量之本文揭示之融合蛋白中之任一者。在一些實施例中，個體患有黃斑變性或增殖性糖尿病性視網膜病變。在又一實施例中，黃斑變性係濕型年齡相關性黃斑變性或乾型年齡相關性黃斑變性。在本文中之一些實施例中，融合蛋白係藉由玻璃體內注射投與至個體。在一些實施例中，個體患有癌症。在一些實施例中，個體患有類風濕性關節炎、骨關節炎或哮喘。在一些實施例中，個體患有葡萄膜炎或角膜新生血管形成。

在一些態樣中，本發明提供包含編碼本文揭示之融合蛋白中之任一者之核苷酸序列的載體。在一些實施例中，載體係病毒載體。在又一實施例中，病毒載體係重組腺相關病毒載體(rAAV)。在其他實施例中，rAAV載體包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh8、AAVrh8R或AAVrh10之ITR。

在一個態樣中，本發明亦提供包含編碼本文揭示之融合蛋白中之任一者之核酸的rAAV粒子。在一些實施例中，rAAV粒子包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh8、AAVrh8R或AAVrh10之衣殼蛋白。在一些實施例中，核酸包含不同於衣殼之血清型之血清型的ITR。在又一實施例

中，ITR係AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh8、AAVrh8R或AAVrh10之ITR。

在又一態樣中，本發明提供產生rAAV粒子之方法，其包含(a) 在產生rAAV粒子之條件下培養宿主細胞，其中宿主細胞包含(i) 一個或多個AAV包裝基因，其中每一該AAV包裝基因編碼AAV複製或衣殼化蛋白；(ii) 包含編碼本文揭示之融合蛋白中之任一者且側接至少一個AAV ITR之核苷酸的rAAV前載體，及(iii) AAV輔助功能；及(b) 回收由宿主細胞產生之rAAV粒子。在又一實施例中，rAAV粒子經純化。

在再一態樣中，本發明提供遞送病毒載體至個體之方法，其包含向個體投與本文揭示之rAAV粒子中之任一者，其中由rAAV粒子編碼之融合蛋白係在個體中表現。在一些實施例中，本發明提供遞送病毒載體至個體之方法，其包含向個體投與本文揭示之rAAV粒子中之任一者，其中有效量之由rAAV粒子編碼之融合蛋白係在個體中表現。在一些實施例中，個體患有黃斑變性或增殖性糖尿病性視網膜病變。在又一實施例中，黃斑變性係濕型年齡相關性黃斑變性或乾型年齡相關性黃斑變性。在本文中之一些實施例中，rAAV粒子係藉由玻璃體內注射投與至個體。在一些實施例中，個體患有癌症。在一些實施例中，個體患有類風濕性關節炎、骨關節炎或哮喘。在一些實施例中，個體患有葡萄膜炎或角膜新生血管形成。

認為說明足以使得熟習此項技術者實踐本發明。實際上，除彼等本文所示及闡述者以外，彼等熟習此項技術者根據上述說明將明瞭本發明之各種修改，且該等修改屬於隨附申請專利範圍之範疇內。出於所有目的，本發明所引用之所有出版物、專利及專利申請案之全文均以引用方式併入本文中。

【圖式簡單說明】

圖1顯示經截短PDGFR- β 可溶性受體之生成。A) PDGFR- β IgG1 Fc偶聯二聚化形式PDGFR(D1-D5)9G-Fc、PDGFR(D1-D2)9G-Fc及PDGFR(D1-D3)9G-Fc以及PDGFR- β 單體受體形式PDGFR(D1-D4)及PDGFR(D1-D5)的示意圖。白色框指示PDGFR- β 序列，其包括細胞外結構域及信號肽(sp)。對角線陰影框代表9Gly連接體且黑色虛線框代表人類IgG1 Fc區之結構域CH2及CH3。B) 在經還原(左圖)及未經還原(右圖)條件下單體PDGFR- β 及IgG1 Fc偶聯二聚化可溶性受體形式之西方印跡。利用抗PDGFR- β 抗體檢測蛋白質。

圖2顯示經截短PDGFR- β 可溶性受體之體積PDGF BB結合分析。A) 與全尺寸IgG1 Fc偶聯二聚化形式PDGFR(D1-D5)9G-Fc相比之單體PDGFR- β 可溶性受體形式PDGFR(D1-D4)及PDGFR(D1-D5)。B) 與IgG1 Fc偶聯二聚化形式PDGFR(D1-D5)9G-Fc相比之二聚體IgG1 Fc偶聯sPDGFR- β 可溶性受體形式PDGFR(D1-D2)9G-Fc及PDGFR(D1-D3)9G-Fc。將增加體積(μ l)之含有來自代表性轉染之可溶性受體之條件培養基(CM) (x軸)與人類PDGF BB配體一起培育過夜且藉由ELISA量測未結合配體之量(y軸)。數據表示為平均值 $\pm$ SD (n=3)；藉由2因子ANOVA，所有受體之PDGF結合親和力顯著不同；Bonferroni測試；***P<0.001。

圖3係VEGFR1/ PDGFR- β 及PDGFR- β /VEGFR1雜合蛋白(雜合體1至4)及其親代構築體PDGFR(D1-D5)9G-Fc、PDGFR(D1-D3)9G-Fc及sFLT01之示意圖。白色框指示PDGFR- β 序列，灰色框指示VEGFR1(Flt-1)序列，其包括其細胞外結構域及信號肽(sp)。對角線陰影框代表9Gly或9Ser連接體且黑色虛線框代表人類IgG1 Fc區之結構域CH2及CH3。

圖4係在經還原(左圖)及未經還原(右圖)條件下與全尺寸IgG1 Fc偶聯二聚化形式PDGFR(D1-D5)9G-Fc (示為(D1-D5)9G-Fc)相比之

VEGFR1/ PDGFR- β 及PDGFR- β /VEGFR1雜合蛋白(雜合體1至4)之西方印跡。利用抗PDGFR- β 抗體及抗Flt-1抗體檢測蛋白質。含有雜合體3及4之試樣係一式兩份來自個體轉染。

圖5顯示證實人類臍靜脈內皮細胞(HUVEC)之VEGF誘導及VEGF + PDGF誘導之增殖由雜合蛋白、雜合體1至4抑制的圖。A) 僅利用VEGF之HUVEC增殖分析：在僅VEGF (10 ng/ml)存在下比較5 μ l含有可溶性受體之條件培養基(CM)對HUVEC增殖之抑制效應。B) 在VEGF (10 ng/ml)及PDGF (20 ng/ml)存在下HUVEC競爭性增殖分析：在兩種配體VEGF及PDGF存在下比較5 μ l含有可溶性受體之CM對HUVEC增殖之抑制效應。在一個分析中評估來自三個獨立性轉染(n=3)之試樣。數據表示為平均值 $\pm$ SD。單向ANOVA；Tukey測試；單獨陽性對照VEGF+或VEGF+與PDGF BB+之組合對其他試樣之間之差異之***p<0.001。對照 = EGFP CM；VEGF+ = EGFP CM + 10 ng/ml VEGF；僅BB+ = EGFP CM + 20 ng/ml；VEGF+BB+ = EGFP CM + 10 ng/ml VEGF + 20 ng/ml PDGF BB。

圖6顯示雜合蛋白之體積結合分析。A) 與PDGFR(D1-D5)9G-Fc相比之雜合蛋白1至4之PDGF BB體積結合分析。B) 與sFLT01相比之雜合蛋白1至4之VEGF體積結合分析。將增加體積之含有來自代表性轉染之可溶性受體之條件培養基(x軸)與人類PDGF BB或VEGF配體一起培育過夜且藉由ELISA一式三份地量測未結合配體之量(y軸)。

圖7顯示雜合蛋白之競爭性VEGF及PDGF無細胞結合分析。A) 增加之條件培養基體積(x軸)及如藉由PDGF BB ELISA量測之未結合PDGF配體之量(y軸)中之雜合體3 (雜合體編號3)、雜合體4 (雜合體編號4)及PDGFR(D1-D3)9G-Fc的比較。B) 增加之條件培養基體積(x軸)及如藉由VEGF ELISA量測之未結合VEGF配體之量(y軸)中之雜合體3 (雜合體編號3)、雜合體4 (雜合體編號4)及sFltT01的比較。

圖8係顯示AAV2之活體內功效之圖。小鼠脈絡膜新生血管形成(CNV)雷射模型中之雜合體4玻璃體內遞送。比較AAV2.雜合體4 (示為雜合體-4)、AAV2.sFLT02 (示為sFLT02)、AAV2.PDGFR (示為PDGFR)處理之(左)眼中無新生血管形成之燒傷之數目(NV)與未經處理對側(右；天然)眼。兩隻眼之數據(n=20只眼/處理)表示為無CNV之燒傷之百分比。用於構築AAV2.PDGFR之PDGFR部分係PDGFR(D1-D3)9G-Fc。

【實施方式】

本發明尤其提供融合蛋白及其組合物，其抑制血漿衍生之生長因子(PDGF)信號傳導途徑及血管內皮生長因子(VEGF)信號傳導途徑。如本文所述本發明之融合蛋白包含PDGF受體(PDGFR)之細胞外部分、VEGF受體(VEGFR)之細胞外部分及多聚化結構域，其中融合蛋白分別結合至PDGF及VEGF用於抑制PDGF活性及VEGF活性。本文亦提供產生融合蛋白之方法、遞送融合蛋白之方法及使用融合蛋白治療眼部疾病、自體免疫疾病、發炎性疾病及/或癌症之方法。

I. 一般技術

本文中闡述或提及之技術及程序通常眾所周知且由彼等熟習此項技術者使用習用方法普遍使用，例如，以下中所述之廣泛採用方法：*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook等人，第4版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012)；*Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel等人編輯，2003)；系列*Methods in Enzymology* (Academic Press公司)；*PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson、B.D. Hames及G.R. Taylor編輯，1995)；*Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow及Lane編輯，1988)；*Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney，第6版，J. Wiley and Sons,

2010)； *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait編輯，1984)； *Methods in Molecular Biology*, Humana Press； *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis編輯，Academic Press, 1998)； *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather及P.E. Roberts, Plenum Press, 1998)； *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle、J.B. Griffiths及D.G. Newell編輯，J. Wiley and Sons, 1993-8)； *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir及C.C. Blackwell編輯，1996)； *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller及M.P. Calos編輯，1987)； *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis等人編輯，1994)； *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan等人編輯，1991)； *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等人編輯，J. Wiley and Sons, 2002)； *Immunobiology* (C.A. Janeway等人，2004)； *Antibodies* (P. Finch, 1997)； *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty.編輯，IRL Press, 1988-1989)； *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd及C. Dean編輯，Oxford University Press, 2000)； *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow及D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)； *The Antibodies* (M. Zanetti及J. D. Capra編輯，Harwood Academic Publishers, 1995)；及 *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita等人編輯，J.B. Lippincott公司，2011)。

II. 定義

如本文所用「載體」係指包含欲在活體外或活體內遞送至宿主細胞之核酸的重組質粒或病毒。

本文所用術語「多核苷酸」或「核酸」係指任何長度之核苷酸之聚合物形式，核糖核苷酸或去氧核糖核苷酸。因此，此術語包括(但不限於)單鏈、雙鏈或多鏈DNA或RNA、基因組DNA、cDNA、

DNA-RNA雜合體或包含嘌呤及嘧啶鹼基或其他天然、化學或生物化學修飾之非天然或衍生化核苷酸鹼基的聚合物。多核苷酸之主鏈可含糖及磷酸酯基團(如通常可於RNA或DNA中發現)或經修飾或取代之糖或磷酸酯基團。或者，多核苷酸之主鏈可包含合成亞單元(例如胺基磷醯酯)之聚合物且因此可為寡去氧核苷酸胺基磷醯酯(P-NH₂)或混合胺基磷醯酯-磷酸二酯寡聚物。另外，雙鏈多核苷酸可藉由合成互補鏈及使鏈在適當條件下退火或藉由使用具有適當引物之DNA聚合酶從而合成互補鏈自化學合成之單鏈多核苷酸產物獲得。

「重組病毒載體」係指包含一或多個異源序列(即，並非病毒起源之核酸序列)之重組多核苷酸載體。在重組AAV載體之情形下，重組核酸側接至少一個、較佳兩個反轉末端重複序列(ITR)。

「重組AAV載體(rAAV載體)」係指包含一或多個側接至少一個、較佳兩個AAV反轉末端重複序列(ITR)之異源序列(即，並非AAV起源之核酸序列)之多核苷酸載體。該等rAAV載體可在存於經適宜輔助病毒感染(或表現適宜輔助功能)且表現AAV rep及cap基因產物(即AAV Rep及Cap蛋白)之宿主細胞中時複製且包裝至感染病毒粒子中。在rAAV載體納入較大多核苷酸中(例如在染色體中或在另一載體(例如用於選殖或轉染之質粒)中)時，則rAAV載體可稱作「前載體」，其可藉由在AAV包裝功能及適宜輔助功能存在下複製及衣殼化而「得以復蘇」。rAAV可呈多種形式中之任一者，包括但不限於質粒、直鏈人工染色體，其與脂質複合，囊封於脂質體內，且最佳在病毒粒子、具體而言AAV中衣殼化。rAAV載體可包裝至AAV病毒衣殼中以生成「重組腺相關病毒粒子(rAAV粒子)」。

「異源」意指衍生自與同其比較或其引入或納入之實體之剩餘部分在遺傳上不同之實體。舉例而言，藉由基因工程技術引入至不同細胞類型中之多核苷酸係異源多核苷酸(且在表現時，可編碼異源多

肽)。類似地，納入病毒載體中之細胞序列(例如，基因或其部分)係關於載體之異源核苷酸序列。

「反轉末端重複」或「ITR」序列係業內眾所周知之術語且係指在呈相對定向之病毒基因組末端發現之相對較短序列。

「AAV反轉末端重複(ITR)」序列(業內眾所周知之術語)係在天然單鏈AAV基因組之兩個末端存在之約145個核苷酸序列。ITR之最外125個核苷酸可以兩個替代定向中之任一者存在，從而導致不同AAV基因組之間及單一AAV基因組之兩端之間之異質性。最外125個核苷酸亦含有自互補性之若干較短區，從而允許在ITR之此部分中出現鏈內鹼基配對。

「末端解析序列」或「trs」係在病毒DNA複製期間由AAV rep蛋白解離之AAV ITR的D區中之序列。突變末端解析序列難以由AAV rep蛋白解離。

如參照病毒效價使用之術語「基因組粒子(gp)」、「基因組等效物」或「基因組拷貝」係指含有重組AAV DNA基因組之病毒體之數目，與感染性或功能性無關。特定載體製備中之基因組粒子之數目可藉由(例如)本文實例或(例如) Clark等人 (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039；Veldwijk等人(2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278中所述之程序量測。

如參照病毒效價使用之術語「感染單位(iu)」、「感染粒子」或「複製單位」係指感染及可複製性重組AAV載體粒子之數目，如藉由感染中心分析(亦稱作複製中心分析)量測，如(例如) McLaughlin等人(1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973中所述。

如參照病毒效價使用之術語「轉導單位(tu)」係指引起產生功能轉基因產物之感染性重組AAV載體粒子之數目，如(例如)本文實例或(例如) Xiao等人 (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124中；或Fisher等

人 (1996) *J. Virol.*, 70:520-532 (LFU分析)中所述之功能分析中所量測。

AAV之「輔助病毒」係指允許AAV (其係缺陷性細小病毒)由宿主細胞複製及包裝之病毒。已鑑別多種該等輔助病毒，包括腺病毒、疱疹病毒及痘病毒(例如痘瘡)。腺病毒涵蓋多個不同亞組，但最常使用亞組C之5型腺病毒(Ad5)。已知人類、非人類哺乳動物及禽類起源之多種腺病毒且其可自諸如ATCC等寄存處獲得。疱疹家族之病毒(其亦可自諸如ATCC等寄存處獲得)包括(例如)單純疱疹病毒(HSV)、艾伯斯坦-巴爾(Epstein-Barr)病毒(EBV)、巨細胞病毒(CMV)及偽狂犬病病毒(PRV)。

「融合蛋白」係指具有兩個或更多個共價連接在一起之部分之蛋白質，其中該等部分各自衍生自不同蛋白質。

對於參考多肽或核酸序列而言，「序列一致性百分比(%)」定義為在比對序列並引入空位(若需要)以達到最大序列一致性百分比後候選序列中與參考多肽或核酸序列中之胺基酸殘基或核苷酸一致之胺基酸殘基或核苷酸的百分比，且不將任何保守取代視為序列一致性之一部分。出於測定胺基酸或核酸序列一致性百分比之目的之比對可以為熟習此項技術者熟知之多種方式(例如使用公開獲得之電腦軟體程式，例如，彼等闡述於 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等人編輯，1987)，增刊30，第7.7.18部分，表7.7.1中者，且包括BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體)達成。較佳比對程式係ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Pennsylvania)。彼等熟習此項技術者可測定用於量測比對之適當參數，包括在所比較序列之全長範圍內達成最大比對所需要之任何演算法。出於本文目的，給定胺基酸序列A對、與或針對給定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性% (或者可表達為具有或包含對、與或針對給定

胺基酸序列B之一定胺基酸序列一致性%之給定胺基酸序列A)計算如下： $100 \times \text{分數 } X/Y$ ，其中X係在序列比對程式對A與B之比對中由該程式評定為一致性匹配之胺基酸殘基數，且其中Y係B中胺基酸殘基之總數。應瞭解，倘若胺基酸序列A之長度不等於胺基酸序列B之長度，則A對B之胺基酸序列一致性%將不等於B對A之胺基酸序列一致性%。出於本文目的，給定核酸序列C對、與或針對給定核酸序列D之核酸序列一致性% (或者可表達為具有或包含對、與或針對給定核酸序列D之一定核酸序列一致性%之給定核酸序列C)計算如下： $100 \times \text{分數 } W/Z$ ，其中W係在序列比對程式對C與D之比對中由該程式評定為一致性匹配之核苷酸數，且其中Z係D中核苷酸之總數。應瞭解，倘若核酸序列C之長度不等於核酸序列D之長度，則C對D之核酸序列一致性%將不等於D對C之核酸序列一致性%。

「分離」分子(例如，核酸或蛋白質)或細胞意指其已自其天然環境之組份鑑別並分離及/或回收。

「有效量」係足以實現有益或期望結果(包括臨床結果)之量。有效量可以一或多次投與來投與。就疾病狀態而言，有效量係足以改善、穩定或延遲疾病發展之量。

「個體」(individual或subject)係哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)家養動物(例如，牛、綿羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如，人類及非人類靈長類動物，例如猴子)、兔及齧齒類動物(例如，小鼠及大鼠)。在某些實施例中，個體(individual或subject)係人類。

如本文所用「治療」係獲得有益或期望臨床結果之方法。出於本發明之目的，有益或期望臨床結果包括(但不限於)減輕症狀、降低疾病程度、穩定疾病狀態(即不惡化)、延遲或減慢疾病進展、改善或緩和疾病狀態及可檢測或不可檢測地緩解病情(部分或全部)。「治療」亦可意指與不接受治療之預期存活相比延長存活。

提及「約」一值或參數在本文中包括(且描述)涉及該值或參數/秒的實施例。舉例而言，關於「約X」之說明包括對「X」之說明。

除非另有說明，否則本文所用冠詞之單數形式「一(a、an)」及「該」包括複數個提及物。舉例而言，片語「rAAV粒子」包括一或多個rAAV粒子。

應理解，本文所述本發明之態樣及實施例包括「包含」態樣及實施例、「由其組成」及/或「基本上由其組成」。

III.融合蛋白及融合蛋白組份

血漿衍生之生長因子(PDGF)受體

血漿衍生之生長因子(PDGF)參與許多生物活動且已涉及多種疾病，例如動脈粥樣硬化、腎小球性腎炎、血管成形術後血管再狹窄及癌症。存在調控PDGF信號傳導途徑之蛋白質之血漿衍生之生長因子(PDGF)家族的至少四個成員，具體而言PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C及PDGF-D。該四個PDGF經由同源二聚化或異源二聚化組裝成二硫鍵連接二聚體。迄今已闡述PDGF之至少5種不同二聚體同型異構體且其包括PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-CC、PDGF-DD及PDGF-AB，其皆結合至PDGF受體(PDGFR)以激活PDGF信號傳導途徑。存在至少兩種經鑑別PDGFR，即PDGFR- α 及PDGFR- β 。每一PDGFR具有細胞外區、跨膜結構域及具有細胞內酪胺酸激酶活性之細胞內區。PDGFR可二聚化以形成同源二聚體PDGFR- α /PDGFR- α 或PDGFR- β /PDGFR- β 及異源二聚體PDGFR- α /PDGFR- β 。該等PDGFR二聚體形式中之每一者皆識別PDGF之不同二聚體同型異構體。舉例而言，PDGFR- α /PDGFR- α 識別PDGF-AA、AB、BB及CC配體，PDGFR- α /PDGFR- β 識別PDGF-AB、BB、CC及DD，且PDGFR- β /PDGFR- β 識別PDGF-BB及DD。PDGF-AA及-BB結合位點之缺失誘變已定位至PDGFR- α 之胺基酸1-314，而PDGF-BB結合位點已定位至PDGFR- β 之胺基酸1-315。

調介與PDGF之結合之該等PDGFR之細胞外區含有5個免疫球蛋白(Ig)樣結構域，其各自長度在約88至約114個胺基酸範圍內。參見Lokker等人, *J Biol Chem.*, 1997, 272(52):33037-44, Miyazawa等人, *J Biol Chem.*, 1998, 273(39):25495-502；及Mahadevan等人, *J Biol Chem.*, 1995, 270(46):27595-600，其全文以引用方式併入本文中。

本發明提供可為本文揭示之任何融合蛋白之組份的PDGF受體之細胞外部分。因此，在一個態樣中，本發明提供PDGFR之細胞外部分，其包括(但不限於) PDGFR- α 及PDGFR- β 。在本文中之一些實施例中，PDGFR係來自哺乳動物，例如人類。存在5個自PDGFR細胞外區之N末端開始至C末端編號為1、2、3、4及5之Ig樣結構域。本文所用術語「PDGFR之細胞外部分」係指PDGFR細胞外區中之5個Ig樣結構域中之一或多者。舉例而言，「PDGFR之細胞外部分」係指PDGFR之細胞外區中發現之5個Ig樣結構域(例如Ig樣結構域D1、Ig樣結構域D2、Ig樣結構域D3、Ig樣結構域D4或Ig樣結構域D5)中之任一或多者。諸如PDGFR之「Ig樣結構域D1」或「細胞外結構域(ECD) 1」等本文所用術語具體而言係指在PDGFR之細胞外區之N末端發現之第一Ig樣結構域，PDGFR之「Ig樣結構域D2」或「ECD 1」具體而言係指PDGFR之細胞外區之N末端的第二Ig樣結構域，等等。在本文中任一態樣中，PDGFR之細胞外部分包含一或多種選自由PDGFR- α 及PDGFR- β 組成之群之PDGFR之至少一個Ig樣結構域。在一些態樣中，PDGFR之細胞外部分包含PDGFR (例如，PDGFR- β)之至少1、2、3、4、但不超過5個Ig樣結構域。在一些態樣中，PDGFR之細胞外部分包含PDGFR (例如，PDGFR- β)之1至5、1至4、1至3或1至2個Ig樣結構域。舉例而言，PDGFR之細胞外部分可包含PDGFR之Ig樣結構域D2。在另一實例中，PDGFR之細胞外部分可包含PDGFR (例如，PDGFR- β)之Ig樣結構域D1至D2。在又一實例中，PDGFR之細胞外部

分可包含PDGFR (例如，PDGFR- β)之Ig樣結構域D1至D3、Ig樣結構域D1至D4或Ig樣結構域D1至D5。

本文涵蓋包含每一PDGFR之5個Ig樣結構域之任一組合的細胞外部分。因此，在一個態樣中，本發明提供包含兩種PDGFR之至少一個Ig樣結構域之PDGFR之細胞外部分。在一些實施例中，PDGFR之細胞外部分包含兩種選自由PDGFR- α 及PDGFR- β 組成之群之PDGFR之至少一個Ig樣結構域。舉例而言，如本文所述融合蛋白可包含含有PDGFR- α 之至少一個Ig樣結構域及PDGFR- β 之至少一個Ig樣結構域的細胞外部分。在一些態樣中，PDGFR之細胞外部分包含至少兩種或更多種PDGFR之至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、但不超過10個Ig樣結構域。在又一態樣中，PDGFR之細胞外部分包含至少兩種或更多種PDGFR之1至10、1至9、1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3、或1至2個Ig樣結構域。關於可用作PDGFR之細胞外部分之一部分之Ig樣結構域的進一步說明，參見美國專利第5,686,572號、WO2006113277及Lokker 等人, *J Biol Chem.* 1997, 272(52):33037-44，其全文皆以引用方式併入本文中。

在一些態樣中，PDGFR之細胞外部分包含選自由SEQ ID NO:1-3組成之群之胺基酸序列。舉例而言，包含胺基酸序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3之PDGFR之細胞外部分可為本文揭示之任何融合蛋白之組份。在一些實施例中，PDGFR之細胞外部分包含選自由SEQ ID NO:7及8組成之群之胺基酸序列。

亦涵蓋本文所提供PDGFR之任何細胞外部分的胺基酸序列變體。舉例而言，可藉由改變編碼蛋白質之胺基酸序列改良PDGFR之細胞外部分之結合親和力及/或其他生物性質。PDGFR之細胞外部分之胺基酸序列變體可藉由向編碼蛋白質之核酸序列引入適當修飾或藉由肽合成引入修飾製備。該等修飾包括(例如) PDGFR之細胞外部分

之胺基酸序列之缺失、插入及/或取代。可實施缺失、插入及取代之任一組合以達成PDGFR之細胞外部分之最終胺基酸構築體，前提為最終構築體具有期望特性，例如結合至PDGF家族蛋白及/或抑制PDGF途徑之激活。因此，本文提供可為本文揭示之任何融合蛋白之組份的PDGFR之細胞外部分之變體。在一些實施例中，PDGFR之細胞外部分包含與PDGFR- α (例如，人類PDGFR- α)之Ig樣結構域D1、D2、D3、D4或D5中之任一者之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，PDGFR之細胞外部分包含與PDGFR- β (例如，人類PDGFR- β)之Ig樣結構域D1、D2、D3、D4或D5中之任一者之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，PDGFR之細胞外部分包含與選自由SEQ ID NO:1-3組成之群之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，PDGFR之細胞外部分包含與選自由SEQ ID NO:7及8組成之群之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的胺基酸序列。

不限於理論，本文涵蓋PDGFR之細胞外部分藉由結合至PDGF家族蛋白以阻斷其與PDGFR相互作用來抑制PDGF途徑之激活。不限於

理論，本文亦涵蓋PDGFR之細胞外部分可結合至PDGFR用於PDGF信號傳導途徑之顯性負性抑制。在一些態樣中，PDGFR之細胞外部分結合選自由PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C及PDGF-D組成之群之PDGF家族蛋白。在一些態樣中，PDGFR之細胞外部分結合選自由PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC及PDGF-DD組成之群之PDGF家族蛋白二聚體。在一些態樣中，PDGFR之細胞外部分結合選自由PDGFR- α 及PDGFR- β 組成之群之PDGFR。

PDGFR之細胞外部分可包含或可不包含用作信號序列用於PDGFR之細胞外部分自宿主細胞分泌的信號肽。信號肽可以可操作方式連接至編碼目標蛋白(例如，PDGFR之細胞外部分)之核酸。在一些實施例中，PDGFR之細胞外部分包含信號肽。在一些實施例中，PDGFR之細胞外部分不包含信號肽。

血管內皮生長因子(VEGF)受體

存在調控VEGF信號傳導途徑之蛋白質之VEGF家族之至少5個成員：VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D及胎盤生長因子(PlGF)。此外，編碼VEGF-A、VEGF-B及PlGF之mRNA之選擇性剪接可生成該等蛋白質之多種同型異構體。舉例而言，*VEGF-A*之選擇性剪接產生9種不同同型異構體，包括同型異構體VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉及VEGF₂₀₆。蛋白質之VEGF家族藉由結合至跨膜VEGF受體之細胞外區激活VEGF信號傳導途徑。存在至少3種經鑑別VEGF受體：VEGFR1(亦稱作fms有關之酪胺酸激酶1 (Flt-1))、VEGFR2(亦稱作激酶插入結構域受體(KDR))及VEGFR3(亦稱作fms樣酪胺酸激酶4 (Flt-4))。VEGFR各自含有包含7個免疫球蛋白(Ig)樣結構域之細胞外區、單一跨膜結構域區段、近膜區段及細胞內蛋白質-酪胺酸激酶結構域。VEGFR之細胞外區結合至蛋白質之VEGF家族之不同成員。舉例而言，VEGFR1結合VEGF-A、VEGF-B及PlGF；VEGFR2結合所有

VEGF-A同型異構體、VEGF-C、VEGF-D及VEGF-E；且VEGFR3結合至VEGF-C及VEGF-D。關於VEGF及VEGFR調介之信號傳導之綜述，參見Roskoski, R等人, *Crit Rev Oncol Hematol.*, 2007, 62(3):179-213，其全文以引用方式併入本文中。

本發明提供可為本文揭示之任何融合蛋白之組份的VEGF受體之細胞外部分。因此，在一個態樣中，本發明提供包括但不限於VEGFR1、VEGFR2及VEGFR3之VEGFR之細胞外部分。在本文中之一些實施例中，VEGFR係來自哺乳動物，例如人類。存在7個自VEGFR細胞外區之N末端開始至C末端編號為1、2、3、4、5、6及7之細胞外Ig樣結構域。本文所用術語「VEGFR之細胞外部分」係指VEGFR細胞外區中之7個Ig樣結構域中之一或多者。舉例而言，「VEGFR之細胞外部分」係指VEGFR之細胞外區中發現之7個Ig樣結構域(例如Ig樣結構域D1、Ig樣結構域D2、Ig樣結構域D3、Ig樣結構域D4、Ig樣結構域D5、Ig樣結構域D6或Ig樣結構域D7)中之任一或多者。諸如VEGFR之「Ig樣結構域D1」或「細胞外結構域(ECD) 1」等本文所用術語皆具體而言係指在VEGFR之細胞外區之N末端發現之第一Ig樣結構域，VEGFR之「Ig樣結構域D2」或「ECD 2」二者具體而言係指VEGFR之細胞外區之N末端之第二Ig樣結構域，等等。在本文任何態樣中，VEGFR之細胞外部分包含一或多種選自由VEGFR1、VEGFR2及VEGFR3組成之群之VEGFR之至少一個Ig樣結構域。在一些態樣中，VEGFR之細胞外部分包含VEGFR (例如，VEGFR1)之至少1、2、3、4、5、6、但不超過7個Ig樣結構域。在一些態樣中，VEGFR之細胞外部分包含VEGFR (例如，VEGFR1)之1至7、1至6、1至5、1至4、1至3或1至2個Ig樣結構域。舉例而言，VEGFR之細胞外部分可包含VEGFR1之Ig樣結構域D2。在另一實例中，VEGFR之細胞外部分可包含VEGFR1之Ig樣結構域D1至D3。在又一實例中，VEGFR

之細胞外部分可包含 VEGFR1 之 Ig 樣結構域 D2 至 D3 或 VEGFR2 之 Ig 樣結構域 D1 至 D3。

本文涵蓋包含每一 VEGFR 之 7 個 Ig 樣結構域之任一組合的細胞外部分。因此，在一個態樣中，本發明提供包含兩種或更多種 VEGFR 之至少一個 Ig 樣結構域之 VEGFR 之細胞外部分。在一些實施例中，VEGFR 之細胞外部分包含兩種或更多種選自由 VEGFR1、VEGFR2 及 VEGFR3 組成之群之 VEGFR 之至少一個 Ig 樣結構域。舉例而言，如本文所述融合蛋白可包含含有 VEGFR1 之至少一個 Ig 樣結構域及 VEGFR2 之至少一個 Ig 樣結構域之 VEGFR 的細胞外部分。在另一實例中，如本文所述融合蛋白可包含含有 VEGFR1 之 Ig 樣結構域 D2 及 VEGFR2 之 Ig 樣結構域 D3 至 D4 之 VEGFR 的細胞外部分。在另一實例中，如本文所述融合蛋白可包含含有 VEGFR1 之 Ig 樣結構域 D2 及 VEGFR3 之 Ig 樣結構域 D3 之 VEGFR 的細胞外部分。在一些態樣中，VEGFR 之細胞外部分包含至少兩種或更多種 VEGFR 之至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、但不超過 21 個 Ig 樣結構域。在又一態樣中，VEGFR 之細胞外部分包含至少兩種或更多種 VEGFR 之 1 至 21、1 至 20、1 至 19、1 至 18、1 至 17、1 至 16、1 至 15、1 至 14、1 至 13、1 至 12、1 至 11、1 至 10、1 至 9、1 至 8、1 至 7、1 至 6、1 至 5、1 至 4、1 至 3 或 1 至 2 個 Ig 樣結構域。關於可用作 VEGFR 之細胞外部分之一部分之 Ig 樣結構域的進一步說明，參見美國專利第 7,928,072 號、WO2006113277、Davis-Smyth, T. 等人, *J Biol Chem*, 1998, 273:3216-3222, Holash, J. 等人, *PNAS*, 2002, 99(17):11393-11398 及 Pechan, P. 等人, *Gene Ther*, 2009, 16:10-16，其全文皆以引用方式併入本文中。

在一些態樣中，VEGFR 之細胞外部分包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4。在一些態樣中，VEGFR 之細胞外部分包含胺基酸序列 SEQ ID

NO:5。舉例而言，包含胺基酸序列SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5之VEGFR之細胞外部分可為本文揭示之任何融合蛋白之組份。

亦涵蓋本文所提供VEGFR之任何細胞外部分的胺基酸序列變體。舉例而言，可藉由改變編碼蛋白質之胺基酸序列改良VEGFR之細胞外部分之結合親和力及/或其他生物性質。VEGFR之細胞外部分之胺基酸序列變體可藉由向編碼蛋白質之核酸序列引入適當修飾或藉由肽合成引入修飾製備。該等修飾包括(例如) VEGFR之細胞外部分之胺基酸序列之缺失、插入及/或取代。可實施缺失、插入及取代之任一組合以達成VEGFR之細胞外部分之最終胺基酸構築體，前提為最終構築體具有期望特性，例如結合至VEGF家族蛋白及/或抑制VEGF途徑之激活。因此，本文提供可為本文揭示之任何融合蛋白之組份的VEGFR之細胞外部分之變體。在一些實施例中，VEGFR之細胞外部分包含與VEGFR1 (例如，人類VEGFR1)之Ig樣結構域D1、D2、D3、D4、D5、D6或D7中之任一者之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，VEGFR之細胞外部分包含與VEGFR2 (例如，人類VEGFR2)之Ig樣結構域D1、D2、D3、D4、D5、D6或D7中之任一者之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，VEGFR之細胞外部分包含與VEGFR3 (例如，人類VEGFR3)之Ig樣結構域D1、D2、D3、D4、D5、D6或D7中之任一者之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少

96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，VEGFR之細胞外部分包含與選自由SEQ ID NO:4及5組成之群之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的胺基酸序列。

不限於理論，本文涵蓋VEGFR之細胞外部分藉由結合至VEGF家族蛋白以阻斷其與VEGFR相互作用來抑制VEGF途徑之激活。不限於理論，本文亦涵蓋VEGFR之細胞外部分可結合至VEGFR用於VEGF信號傳導途徑之顯性負性抑制。在一些態樣中，VEGFR之細胞外部分結合選自由VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D及PlGF組成之群之VEGF家族蛋白。在一些態樣中，VEGFR之細胞外部分結合VEGFR(例如，VEGFR1、VEGFR2及/或VEGFR3)。

VEGFR之細胞外部分可包含或可不包含用作信號序列用於VEGFR之細胞外部分自宿主細胞分泌的信號肽。信號肽可以可操作方式連接至編碼目標蛋白(例如，VEGFR之細胞外部分)之核酸。在一些實施例中，VEGFR之細胞外部分包含信號肽。在一些實施例中，VEGFR之細胞外部分不包含信號肽。

多聚化結構域

本發明提供可為本文揭示之任何融合蛋白之組份之多聚化結構域(例如，抗體之Fc區)。多聚化結構域係多聚體蛋白質中促使亞單元締合以形成(例如)二聚體、三聚體、四聚體等等之彼等部分。本文所用術語「多聚化結構域」可用於指二聚化結構域、三聚化結構域、四聚化結構域等等。包含多聚化結構域之融合蛋白可與其他包含多聚化結構域之融合蛋白相互作用以產生融合蛋白多聚體(例如，融合蛋白二聚體)。舉例而言，IgG Fc區係如本文所揭示可融合至PDGFR之細

胞外部分或VEGFR之細胞外部分的二聚化結構域。包含PDGFR之細胞外部分及IgG Fc區之融合蛋白可與另一包含IgG Fc區之融合蛋白二聚化以產生與至少PDGF具有多特異性之融合蛋白。多聚化結構域可為與另一多肽形成多聚體之任一多肽。業內已知可使用之多聚化結構域。參見美國專利第7,928,072號及WO2006/113277。舉例而言，可使用IgG1或IgG2 λ 重鏈之Fc區(例如僅CH3結構域或CH2及CH3兩個結構域)作為多聚化結構域。亦可使用來自免疫球蛋白同種型(例如IgA、IgM、IgD或IgE)之其他Fc區作為多聚化結構域。本文所用術語「Fc區」用於界定免疫球蛋白重鏈中含有恆定區之至少一部分的C末端區。該術語包括天然序列Fc區及變體Fc區。在一個實施例中，人類IgG重鏈Fc區自Cys226、或自Pro230延伸至重鏈之羧基末端。然而，可存在或可不存在Fc區之C末端離胺酸(Lys447)。在一個實施例中，多聚化結構域係抗體之Fc區。在又一實施例中，抗體之Fc區係選自由IgG Fc區、IgA Fc區、IgM Fc區、IgD Fc區及IgE Fc區組成之群。在又一實施例中，抗體之Fc區係選自由IgG1 Fc區、IgG2 Fc區、IgG3 Fc區及IgG4 Fc區組成之群。在一些態樣中，Fc區包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之CH3區。在一些態樣中，Fc區包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之CH2及CH3區。業內熟知編碼包含Fc區之免疫球蛋白之胺基酸序列。舉例而言，可在基因庫登記號CAA75032下找到IgG1 λ 重鏈胺基酸序列。免疫球蛋白之Fc區可藉由用酶木瓜蛋白酶解離或藉由其他方式獲得。在一些實施例中，Fc區包含胺基酸序列SEQ ID NO:6。亦可使用VEGF之多聚化結構域，例如VEGF-A之多聚化結構域。VEGF-A係由在基因庫登記號NM003376下顯示之核酸編碼。舉例而言，VEGF-A之多聚化結構域係由VEGF-A外顯子3編碼且可連接至本文揭示之融合蛋白組份中之任一者，例如PDGFR之細胞外部分及/或VEGFR之細胞外部分。

在一些實施例中，本文提供多聚化結構域之胺基酸序列變體。舉例而言，可期望改良多聚化結構域之生物性質(例如，多聚化性質)。多聚化結構域之胺基酸序列變體可藉由向編碼蛋白質之核酸序列引入適當修飾或藉由肽合成引入修飾製備。該等修飾包括(例如)多聚化結構域之胺基酸序列之缺失、插入及/或取代。可實施缺失、插入及取代之任一組合以達成多聚化之最終胺基酸構築體，前提為最終構築體具有期望特性，例如形成多聚體蛋白質。因此，本文提供可為本文揭示之任何融合蛋白之組份之多聚化結構域的變體(例如，抗體之Fc區)。在一些實施例中，Fc區包含與IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之CH3區之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，Fc區包含與IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之CH2及CH3區之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，Fc區包含與胺基酸序列SEQIDNO:6具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的胺基酸序列。業內熟知多聚化結構域之變體。例如，參見美國專利申請案第2012/0251531號，其全文以引用方式併入本文中。

連接體

融合蛋白之組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分或多聚化結構域)可藉由連接部分(例如肽連接體)連接。較佳地，連接體增加融合蛋白組份之撓性且不顯著干擾融合蛋白內之每一功能

組份之結構。在一些實施例中，連接體部分係肽連接體。在一些實施例中，肽連接體包含2至100個胺基酸。在一些實施例中，肽連接體包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、但不大於100個胺基酸。在一些實施例中，肽連接體之長度介於5至75、5至50、5至25、5至20、5至15、5至10或5至9個胺基酸之間。例示性連接體包括具有至少兩個胺基酸殘基之直鏈肽，例如 Gly-Gly、Gly-Ala-Gly、Gly-Pro-Ala、Gly-Gly-Gly-Gly-Ser。適宜直鏈肽包括聚甘胺酸、聚絲胺酸、聚脯胺酸、聚丙胺酸及由丙胺鹽基及/或絲胺鹽基及/或脯胺鹽基及/或甘胺鹽基胺基酸殘基組成之寡肽。在一些實施例中，肽連接體包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：Gly₉、Glu₉、Ser₉、Gly₅-Cys-Pro₂-Cys、(Gly₄-Ser)₃、Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn、Pro-Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn、Gly-Asp-Leu-Ile-Tyr-Arg-Asn-Gln-Lys 及 Gly₉-Pro-Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn。

連接體部分亦可自其他聚合物(例如聚乙二醇)製得。該等連接體可具有10至1000、10至500、10至250、10至100或10至50個乙二醇單體單元。適宜聚合物之大小應類似於由適當範圍之胺基酸殘基佔據之大小。典型大小之聚合物可提供約10-25埃之間距。

連接體部分可為具有以非直鏈型式連接多個融合蛋白組份之直鏈「臂」的蛋白質多價連接體。在一些實施例中，多價連接體具有約

3至40個胺基酸殘基，其全部或一些提供與融合蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分或多聚化結構域)結合之附接位點。 α 胺基及 α 羧酸可用作附接位點。例示性多價連接體包括(但不限於)聚離胺酸、聚鳥胺酸、聚半胱胺酸、聚麩胺酸及聚天冬胺酸。視情況，胺基酸序列中可包括具有惰性側鏈之胺基酸殘基(例如，甘胺酸、丙胺酸及纈胺酸)。連接體亦可為非肽化學實體，例如在附接至融合蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域)後適於投與(例如，眼部投與)之化學連接體。化學連接體可為雙功能連接體，其各自與融合蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域)反應。或者，化學連接體可為具有多個適當間隔開之反應基團之具支鏈連接體，該等基團各自可與融合蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域)之官能基反應。融合蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域)藉助反應性官能基附接且間隔開，以使空間位阻不會實質上干擾一些反應性官能基(例如，胺、羧酸、醇、醛及硫醇)與肽之間之共價鍵之形成。連接體部分之實例包括(但不限於)彼等揭示於Tarn, J.P.等人, *J. of Immunol Methods*, 1996, 196:17-32中者。

連接體部分可用於連接本文揭示之融合蛋白之組份中之任一者。舉例而言，肽連接體(例如，Gly₉)可用於將PDGFR之細胞外部分之C末端連接至VEGFR之細胞外部分之N末端且可進一步用於將VEGR之細胞外部分之C末端連接至多聚化結構域(例如，IgG1 Fc區)之N末端。在一些實施例中，在PDGFR之細胞外部分與多聚化結構域之間使用連接體。在一些實施例中，在VEGFR之細胞外部分與多聚化結構域之間使用連接體。在一些實施例中，在PDGFR之細胞外部分與VEGFR之細胞外部分之間使用連接體。在一些實施例中，融合

蛋白包含PDGFR之細胞外部分與VEGFR之細胞外區之間之連接體及VEGFR之細胞外區與多聚化結構域(例如，Fc區)之間之連接體。在一些實施例中，融合蛋白包含至少一個連接體、但不超過四個連接體。舉例而言，融合蛋白可自N末端至C末端以選自由以下組成之群之次序包含(a) PDGFR之細胞外部分，(b) VEGFR之細胞外部分，(c) 多聚化結構域(例如，IgG1 Fc區)及至少一個連接體：(1) 連接體、a、連接體、b、連接體、c、連接體；(2) a、連接體、b、連接體、c、連接體；(3) 連接體、a、連接體、b、連接體、c；(4) a、連接體、b、連接體、c；(5) a、連接體、b、c；及(6) a、b、連接體、c。在另一實施例中，融合蛋白可N末端至C末端以選自由以下組成之群之次序包含(a) PDGFR之細胞外部分，(b) 多聚化結構域(例如，IgG1 Fc區)及至少一個連接體：(1) 連接體、a、連接體、b、連接體；(2) 連接體、a、連接體、b；(3) a、b、連接體；(4) a、連接體、b；(5) 連接體、b、連接體、a、連接體；(6) 連接體、b、連接體、a；(7) b、a、連接體；及(8) b、連接體、a。

融合蛋白

本文提供對至少兩種不同結合配偶體(例如，PDGF及VEGF)具有結合特異性之融合蛋白。在一些實施例中，融合蛋白包含對PDGF家族之蛋白質(例如，PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C或PDGF-D)之第一結合特異性及對VEGF (例如，VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D或PlGF)之第二結合特異性。在一些實施例中，融合蛋白包含對PDGF家族之蛋白質二聚體(例如，PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC或PDGF-DD)之第一結合特異性及對VEGF (例如，VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D或PlGF)之第二結合特異性。在一些實施例中，融合蛋白包含對哺乳動物(例如，人類) PDGF之第一結合特異性及對哺乳動物(例如，人類) VEGF之第二結合特異性。

在一些實施例中，融合蛋白結合至與本文所述PDGFR中之任一者相同之PDGF。在一些實施例中，融合蛋白結合至與PDGFR- α 或PDGFR- β 中之任一者相同之PDGF途徑之組份。在一些實施例中，融合蛋白結合至與PDGFR- α /PDGFR- α 、PDGFR- β /PDGFR- β 或PDGFR- α /PDGFR- β 二聚體中之任一者相同之PDGF。在一些實施例中，融合蛋白包含本文所述PDGFR中之任一者之PDGFR之至少一個細胞外部分。舉例而言，融合蛋白可包含PDGFR- α 之至少一個細胞外部分及PDGFR- β 之至少一個細胞外部分。在另一實例中，融合蛋白可包含PDGFR- β 之兩個細胞外部分，例如Ig樣結構域D1-D3及Ig樣結構域D1-D5。在一些態樣中，融合蛋白包含含有選自由SEQ ID NO:1-3組成之群之胺基酸序列的PDGFR之細胞外部分。在一些態樣中，融合蛋白包含含有選自由SEQ ID NO:7及8組成之群之胺基酸序列的PDGFR之細胞外部分。在一些實施例中，融合蛋白結合至與本文所述VEGFR中之任一者相同之VEGF途徑之組份。在一些實施例中，融合蛋白結合至與VEGFR1、VEGFR2或VEGFR3中之任一者相同之VEGF途徑之組份。在一些實施例中，融合蛋白包含本文所述VEGFR中之任一者之VEGFR之至少一個細胞外部分。舉例而言，融合蛋白可包含VEGFR1之至少一個細胞外部分及VEGFR2之至少一個細胞外部分。在另一實例中，融合蛋白可包含VEGFR1之兩個細胞外部分，例如Ig樣結構域D2及Ig樣結構域D1-D3。在一些態樣中，融合蛋白包含含有選自由SEQ ID NO:4及5組成之群之胺基酸序列的VEGFR之細胞外部分。包含PDGFR之細胞外部分及VEGFR之細胞外部分之本文揭示之融合蛋白中之任一者可進一步包含多聚化結構域。在一些實施例中，多聚化結構域係Fc區(例如，IgG1 Fc區)。在一些實施例中，Fc區包含胺基酸序列SEQ ID NO:6。在一些實施例中，包含PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及多聚化結構域之融合蛋白抑制PDGF及VEGF

信號傳導途徑(例如，抑制PDGF及VEGF活性)。包含PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及多聚化結構域之本文揭示之融合蛋白中之任一者可進一步包含連接體。連接體可為如本文揭示之任何連接體。在一些實施例中，連接體係肽連接體。在一些實施例中，連接體包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：Gly₉、Glu₉、Ser₉、Gly₅-Cys-Pro₂-Cys、(Gly₄-Ser)₃、Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn、Pro-Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn、Gly-Asp-Leu-Ile-Tyr-Arg-Asn-Gln-Lys及Gly₉-Pro-Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn。在一些實施例中，PDGFR之細胞外部分包含哺乳動物(例如，人類)PDGFR之細胞外部分。在一些實施例中，VEGFR之細胞外部分包含哺乳動物(例如，人類)VEGFR之細胞外部分。在一些實施例中，融合蛋白包含人類PDGFR(例如，人類PDGFR-β)之細胞外部分及人類VEGFR(例如，人類VEGFR1)之細胞外部分。

在一個態樣中，本發明提供包含以下之融合蛋白：a) 包含胺基酸序列SEQ ID NO:1、2、3、7或8之PDGFR之細胞外部分；b) 包含胺基酸序列SEQ ID NO:4或5之VEGFR之細胞外部分；及c) 包含胺基酸序列SEQ ID NO:6之多聚化結構域。在一些實施例中，融合蛋白包含：a) 包含胺基酸序列SEQ ID NO:1之PDGFR之細胞外部分；b) 包含胺基酸序列SEQ ID NO:4之VEGFR之細胞外部分；及c) 包含胺基酸序列SEQ ID NO:6之多聚化結構域。在一些實施例中，融合蛋白包含：a) 包含胺基酸序列SEQ ID NO:3之PDGFR之細胞外部分；b) 包含胺基酸序列SEQ ID NO:4之VEGFR之細胞外部分；及c) 包含胺基酸序列SEQ ID NO:6之多聚化結構域。

本文提供以特定次序包含PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及多聚化結構域之融合蛋白。在一些實施例中，融合蛋白包含

(a) PDGFR之細胞外部分、(b) VEGFR之細胞外部分及(c) Fc區，自N末端至C末端以a、b、c之次序佈置。在一些實施例中，PDGFR之細胞外部分包含PDGFR (例如，PDGFR- β)之Ig樣結構域D1-D3。在一些實施例中，PDGFR之細胞外部分包含PDGFR (例如，PDGFR- β)之Ig樣結構域D1-D4。在一些實施例中，PDGFR之細胞外部分包含PDGFR (例如，PDGFR- β)之Ig樣結構域D1-D5。在一些實施例中，VEGFR之細胞外部分包含VEGFR (例如，VEGFR1)之Ig樣結構域D2。在一些實施例中，VEGFR之細胞外部分包含VEGFR (例如，VEGFR1)之Ig樣結構域D1-D3。在一些實施例中，多聚化結構域包含IgG1抗體之Fc區。

在一些實施例中，融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:12。在其他實施例中，融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:13。在又一些實施例中，融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:14。在再一些實施例中，融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:15。

亦涵蓋包含PDGFR之至少兩個或更多個細胞外部分、VEGFR之兩個或更多個細胞外部分及/或兩個或更多個多聚化結構域的融合蛋白。舉例而言，融合蛋白可包含(a) PDGFR之細胞外部分、(b) VEGFR之細胞外部分及(c) Fc區，自N末端至C末端以a、a、b、c之次序或以a、b、b、c之次序佈置。本文提供PDGFR之至少一個細胞外部分、VEGFR之至少一個細胞外部分及至少一個多聚化結構域的任一組合，如同本文已明確說明每一組合一般。

亦涵蓋包含PDGFR之細胞外部分及多聚化結構域的融合蛋白。在一些實施例中，融合蛋白包含(a) PDGFR之細胞外部分及(b) Fc區，自N末端至C末端以a及b之次序佈置。在一些實施例中，融合蛋白包含(a) PDGFR之細胞外部分及(b) Fc區，自N末端至C末端以b及a之次序佈置。在一些實施例中，PDGFR之細胞外部分包含PDGFR (例如，PDGFR- β)之Ig樣結構域D1-D2。在一些實施例中，PDGFR之細胞外部

分包含PDGFR (例如, PDGFR- β)之Ig樣結構域D1-D3。在一些實施例中, PDGFR之細胞外部分包含PDGFR (例如, PDGFR- β)之Ig樣結構域D1-D4。在一些實施例中, PDGFR之細胞外部分包含PDGFR (例如, PDGFR- β)之Ig樣結構域D1-D5。在一些實施例中, 多聚化結構域包含IgG1抗體之Fc區。本文提供PDGFR之至少一個細胞外部分及至少一個多聚化結構域之任一組合, 如同本文已明確說明每一組合一般。

在一些實施例中, 融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:9。在一些實施例中, 融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:10。在一些實施例中, 融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:11。

本發明中所述融合蛋白可包含PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域之修飾形式。舉例而言, 融合蛋白組份可具有轉譯後修飾, 包括(例如)糖基化、矽基化、乙醯基化及磷酸化。

在一些實施例中, 本文提供融合蛋白之胺基酸序列變體。舉例而言, 可期望改良PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域之結合親和力及/或其他生物性質。融合蛋白之胺基酸序列變體可藉由向編碼PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域之核苷酸序列引入適當修飾或藉由肽合成引入修飾製備。該等修飾包括(例如) PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域之胺基酸序列內之殘基的缺失、插入及/或取代。可實施缺失、插入及取代之任一組合以達成最終胺基酸構築體, 前提為最終構築體具有期望特性(例如, 結合至PDGF、結合至VEGF、抑制PDGF途徑之激活、多聚體形成及/或抑制VEGF途徑之激活)。在一些實施例中, 融合蛋白包含與如本文所揭示包含任一PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域之融合蛋白的胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少

88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%序列一致性。在一些實施例中，融合蛋白變體包含與選自由SEQ ID NO:12-15組成之群之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性。在一些實施例中，融合蛋白變體包含與選自由SEQ ID NO:9-11組成之群之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性。

本文揭示之胺基酸殘基取代亦包括保守取代。保守取代示於下表1中之「保守取代」標題下。若該等取代引起生物活性改變，則可引入更重要之改變(表1中命名為「例示性取代」，或如下文參照胺基酸種類所進一步闡述)，並篩選產物。可向本文提供之融合蛋白或蛋白質組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分、多聚化結構域等)中之任一者中引入如表1中所示或如下文參照胺基酸種類闡述之胺基酸取代。

表1.潛在胺基酸取代

初始 殘基	例示性 取代	保守 取代
Ala (A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg (R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn (N)	Gln ; His ; Asp, Lys ; Arg	Gln
Asp (D)	Glu ; Asn	Glu
Cys (C)	Ser ; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn ; Glu	Asn

Glu (E)	Asp ; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	正白胺酸 ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val ; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸	Leu

對蛋白質或多肽生物性質之實質修飾可藉由選擇在維持下列特徵之作用方面顯著不同的取代來實現：(a) 取代區域中多肽主鏈之結構，例如，呈摺疊或螺旋構象，(b) 靶位點處分子之電荷或疏水性，或(c) 側鏈之大小。可根據常見側鏈性質對胺基酸進行分組：

- (1) 疏水性殘基：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性殘基：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性殘基：Asp、Glu；
- (4) 鹼性殘基：His、Lys、Arg；
- (5) 影響鏈取向之殘基：Gly、Pro；
- (6) 芳族殘基：Trp、Tyr、Phe；
- (7) 大的疏水性殘基：正白胺酸、Met、Val、Leu、Ile。

非保守取代必須將該等類別中之一者之成員交換為另一類別。

用於鑑別融合蛋白上用於誘變之較佳位置之某些殘基或區的有效方法稱為「丙胺酸掃描誘變」，如由Cunningham及Wells於*Science*,

1989, 244:1081-1085中所述。此處，鑑別殘基或目標殘基組(例如，帶電殘基，例如arg、asp、his、lys及glu)並由中性或帶負電之胺基酸(最佳為丙胺酸或聚丙胺酸)代替以實現胺基酸與目標結合配偶體之間之相互作用。隨後藉由在取代位點或針對取代位點引入另外或其他變體來改良彼等顯示對取代具有功能敏感性之胺基酸位置。因此，在預先確定引入胺基酸序列變異之位點時，突變本身之性質無需預先確定。舉例而言，為分析給定位點處之突變性能，在目標密碼子或區處實施ala掃描誘變或隨機誘變並就期望活性對所表現之融合多肽變體加以篩選。

任何不參與維持融合蛋白或蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分、多聚化結構域等)之適當構形的半胱胺酸殘基亦可通常經絲胺酸取代，以改良分子之氧化穩定性並防止異常交聯。相反地，可向融合蛋白或蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分、多聚化結構域等)添加半胱胺酸鍵以改良其穩定性。

在其他實施例中，本發明之蛋白質或肽可包含一或多種非天然或經改質之胺基酸。「非天然胺基酸殘基」係指除彼等上文所列示天然胺基酸殘基者外之殘基，其能夠共價結合多肽鏈中之毗鄰胺基酸殘基。非天然胺基酸包括(但不限於)高離胺酸、高精胺酸、高絲胺酸、氮雜環丁烷羧酸、2-胺基己二酸、3-胺基己二酸、 β -丙胺酸、胺基丙酸、2-胺基丁酸、4-胺基丁酸、6-胺基己酸、2-胺基庚酸、2-胺基異丁酸、3-胺基異丁酸、2-胺基庚二酸、第三丁基甘胺酸、2,4-二胺基異丁酸、鎖鏈素、2,2'-二胺基庚二酸、2,3-二胺基丙酸、N-乙基甘胺酸、N-乙基天冬醯胺、高脯胺酸、羥基離胺酸、異-羥基離胺酸、3-羥基脯胺酸、4-羥基脯胺酸、異鎖鏈素、異-異白胺酸、N-甲基丙胺酸、N-甲基甘胺酸、N-甲基異白胺酸、N-甲基戊基甘胺酸、N-甲基

纈胺酸、蔡丙胺酸、正纈胺酸、正白胺酸、鳥胺酸、瓜胺酸、戊基甘胺酸、哌可酸及硫代脯胺酸。經改質胺基酸包括天然及非天然胺基酸，其可逆或不可逆地經化學阻斷，或在其N末端胺基或其側鏈基團上經改質，例如，N-甲基化D及L胺基酸、經化學改質成另一官能基之側鏈官能基。舉例而言，經改質胺基酸包括甲硫胺酸亞砷；甲硫胺酸砷；天冬胺酸- (β -甲基酯)、天冬胺酸之經改質胺基酸；N-乙基甘胺酸、甘胺酸之經改質胺基酸；或丙胺酸甲醯胺及丙胺酸之經改質胺基酸。業內已知其他非天然及經改質胺基酸及將其納入蛋白質及肽中之方法(例如，參見Sandberg等人, (1998) *J. Med. Chem.* 41: 2481-91；Xie及Schultz (2005) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9: 548-554；Hodgson及Sanderson (2004) *Chem. Soc. Rev.* 33: 422-430。

胺基酸序列插入包括胺基- (「N」)及/或羧基 (「C」)末端融合物(長度在一個殘基至上百或更多殘基範圍內)以及單個或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有N末端甲硫胺醯基殘基之融合蛋白或與細胞毒性多肽融合之融合蛋白。融合蛋白分子之其他插入變體包括允許形成蛋白質多聚體之多肽與融合蛋白之N-或C末端之融合物。

本發明提供信號肽，在本文中亦稱作信號序列，其可為本文提供之任何融合蛋白之組份。舉例而言，包含PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及多聚化結構域之融合蛋白可進一步包含異源肽、較佳信號序列或在成熟融合蛋白之N末端具有特定解離位點之其他肽。所選異源信號序列較佳係由真核宿主細胞識別及處理(即藉由信號肽酶解離)者。對於不識別及處理天然哺乳動物信號序列之原核宿主細胞，真核(即，哺乳動物)信號序列由選自(例如)由鹼性磷酸酶、青黴素酶、lpp或熱穩定腸毒素II基因之前導序列組成之群之原核信號序列取代。對於酵母分泌而言，天然信號序列可經以下來取代：

例如酵母轉化酶前導序列、因子前導序列(包括酵母菌屬(*Saccharomyces*)及克魯維酵母屬(*Kluyveromyces*)之因子前導序列)、或酸性磷酸酶前導序列、白色念珠菌(*C. albicans*)葡萄糖澱粉酶前導序列或WO 90/13646中所述信號。在哺乳動物細胞表現中，可使用哺乳動物信號序列以及病毒分泌性前導序列，例如單純疱疹gD信號。信號肽在其自宿主細胞產生時可自融合蛋白完全解離，或其可部分解離。融合蛋白之混合群體可自宿主細胞產生，其中融合蛋白包含完全解離信號序列(例如，無信號序列)、部分解離信號序列(例如，信號序列之部分)及/或非解離信號序列(例如，完全信號序列)。舉例而言，在N末端進一步包含信號肽之融合蛋白可在N末端由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22個胺基酸殘基中之任一者解離。在一些實施例中，本文所述之任何融合蛋白包含用於自細胞之蛋白質分泌之信號肽。在一些實施例中，本文所述之任何融合蛋白皆不包含用於自細胞之蛋白質分泌之信號肽。

本發明提供包含兩種融合蛋白之二聚體融合蛋白，其中每一融合蛋白包含本文揭示之任何融合蛋白。在一個實施例中，二聚體融合蛋白包含兩種相同融合蛋白。在另一實施例中，二聚體融合蛋白包含兩種不同融合蛋白。本文揭示之融合蛋白可形成兩種或更多種融合蛋白之多聚體。多聚體(例如，二聚體、三聚體、四聚體等)可自相同融合蛋白形成(例如，均多聚體)或自異源融合蛋白形成(例如，雜多聚體)。在另一實施例中，多聚體融合蛋白包含至少一種包含選自由SEQ ID NO:12-15組成之群之胺基酸序列或與選自由SEQ ID NO:12-15組成之群之胺基酸序列具有至少90%一致性之胺基酸序列的融合蛋白。在另一實施例中，多聚體融合蛋白包含至少一種包含選自由SEQ ID NO:9-11組成之群之胺基酸序列或與選自由SEQ ID NO:9-11組成之

群之胺基酸序列具有至少90%一致性之胺基酸序列的融合蛋白。在實施例中，融合蛋白係以蛋白質融合多聚體形式自包含編碼該融合蛋白之核酸的宿主細胞回收。在一些實施例中，融合蛋白經糖基化。舉例而言，融合蛋白可自宿主細胞釋放後在PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域經糖基化。

本文亦提供包含本發明之融合蛋白及醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物。醫藥組合物可適於本文所述多種投與模式，包括(例如)全身或局部投與。醫藥組合物可呈滴眼劑、可注射溶液形式或呈適於吸入(經由口或鼻)或經口投與之形式。在一些實施例中，包含本文所述融合蛋白及醫藥上可接受之載劑之醫藥組合物適於投與人類。在一些實施例中，包含本文所述融合蛋白及醫藥上可接受之載劑之醫藥組合物適於玻璃體內注射或局部施用至眼。該等醫藥上可接受之載劑可為無菌液體，例如水及油，包括彼等石油、動物、植物或合成來源，例如花生油、大豆油、礦物油及諸如此類。亦可採用鹽水溶液及水性右旋糖、聚乙二醇(PEG)及甘油溶液作為液體載劑、具體而言用於可注射溶液。醫藥組合物可進一步包含其他成份，例如防腐劑、緩衝液、張力劑、抗氧化劑及穩定劑、非毒性潤濕劑或澄清劑、黏度增加劑及諸如此類。本文所述醫藥組合物可包裝成單一單位劑型或呈多劑型形式。組合物通常調配為無菌且實質上等滲之溶液。組合物亦可經調配以具有與眼及眼部組織之房水相容之滲透值。該等滲透值通常可在約200至約400毫滲克分子/公斤水(「mOsm/kg」)之範圍內，但較佳可為約300 mOsm/kg。認為視網膜具有約283 mOsm/kg之滲透值。

IV 核酸、載體及宿主細胞

核酸

本文提供編碼本文揭示之融合蛋白組份中之任一者(例如PDGFR之細胞外部分及VEGFR之細胞外部分及多聚化結構域)的分離核酸。

已針對兩種受體類型PDGFR- α 及PDGFR- β 闡述編碼哺乳動物PDGFR之核酸。例示性核酸序列可參見(但不限於) Yarden等人, Nature, 1986, 323:226-232; Matsui等人, Science, 1989, 243: 800-803; 美國專利申請案第07/771,829號, 其係美國專利申請案第07/309,332號(現已放棄)、美國專利第5,686,572號及WO2006/113277之繼續部分。編碼人類PDGFR- α 及PDGFR- β 之mRNA可分別參見基因庫登記號NM_006206.4及NM_002609.3。在一些實施例中, 分離核酸編碼包含選自由SEQ ID NO:1-3組成之群之胺基酸序列的PDGFR之細胞外部分。在一些實施例中, 分離核酸編碼包含與選自由SEQ ID NO:1-3組成之群之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的胺基酸序列之PDGFR之細胞外部分。在一些實施例中, 編碼PDGFR之細胞外部分之分離核酸選自由SEQ ID NO:16及17組成之群。本文亦提供編碼VEGFR之細胞外部分之分離核酸。已針對所有受體類型闡述編碼哺乳動物VEGFR之核酸。例示性核酸序列可參見(但不限於)美國專利第7,928,072號及WO2006/113277。編碼人類VEGFR1及VEGFR2之mRNA可分別參見基因庫登記號NM_001159920.1及NM_002253.2。編碼人類VEGFR3之mRNA可參見基因庫登記號NM_002020.7及NM_182925.4。在一些實施例中, 分離核酸編碼包含選自由SEQ ID NO:4及5組成之群之胺基酸序列的VEGFR之細胞外部分。在一些實施例中, 分離核酸編碼包含與選自由SEQ ID NO:4及5組成之群之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的胺基酸序列之VEGFR之細胞外部分。本文亦提供編

碼多聚化結構域(例如，Fc區)之分離核酸。在一些實施例中，分離核酸編碼包含胺基酸序列SEQ ID NO:6之多聚化結構域。在一些實施例中，分離核酸編碼包含與選自由SEQ ID NO:6組成之群之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性之胺基酸序列的多聚化結構域。

亦提供編碼如本文揭示之融合蛋白之分離核酸。在一些實施例中，分離核酸編碼包含選自由SEQ ID NO:12-15組成之群之胺基酸序列的融合蛋白。在一些實施例中，分離核酸編碼包含選自由SEQ ID NO:9-11組成之群之胺基酸序列的融合蛋白。在一些實施例中，分離核酸編碼包含與選自由SEQ ID NO:12-15組成之群之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的胺基酸序列之融合蛋白。在一些實施例中，分離核酸編碼包含與選自由SEQ ID NO:9-11組成之群之胺基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的胺基酸序列之融合蛋白。在一些實施例中，編碼融合蛋白之分離核酸包含選自由SEQ ID NO:21-24組成之群之核酸序列。在一些實施例中，編碼融合蛋白之分離核酸包含選自由SEQ ID NO:18-20組成之群之核酸序列。

編碼融合蛋白或融合蛋白之組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分或多聚化結構域)之分離核酸序列可進一步包括編碼連接體之核酸序列。在一些實施例中，核酸編碼選自由以下組成之群之連接體：Gly₉、Glu₉、Ser₉、Gly₅-Cys-Pro₂-Cys、(Gly₄-Ser)₃、

Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn 、 Pro-Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn 、 Gly-Asp-Leu-Ile-Tyr-Arg-Asn-Gln-Lys 及 Gly₉-Pro-Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn 。

分離核酸可進一步包括編碼信號肽之序列，該信號肽用作信號序列以自宿主細胞分泌融合蛋白。在一些實施例中，分離核酸不包含編碼信號肽之序列。

編碼融合蛋白或融合蛋白之組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分或多聚化結構域)之分離核酸分子可呈RNA (例如mRNA、hnRNA、tRNA或任何其他形式)形式或呈DNA (包括但不限於藉由選殖獲得或合成產生之cDNA及基因組DNA)形式或其組合。DNA可為三鏈、雙鏈或單鏈或其任何組合。DNA或RNA之至少一條鏈之任一部分可為編碼鏈，亦稱為有義鏈，或其可非編碼鏈，亦稱作反義鏈。分離核酸可自生物來源使用任一數目之彼等熟習此項技術者已知之選殖方法獲得。分離核酸亦可藉由直接化學合成藉由已知方法製備。編碼融合蛋白或融合蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分或多聚化結構域)之核酸可藉由多種業內已知之方法(包括但不限於自天然來源分離或藉由融合蛋白或融合蛋白組份之先前製備之變體或非變體型式之寡核苷酸調介之誘變、定點誘變、PCR誘變及盒式誘變來製備)來製備。參見*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook等人，第4版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012)及*Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel等人編輯，2003)。

載體

本發明涵蓋核酸遞送媒劑之用途，其用於將一或多個編碼融合蛋白或融合蛋白組份之核酸序列引入用於該蛋白質之表現之細胞中。

核酸遞送媒劑之實例係脂質體、生物相容性聚合物(包括天然聚合物及合成聚合物)；脂蛋白；多肽；多糖；脂多糖；人工病毒包膜；金屬粒子；及細菌、或病毒，例如桿狀病毒、腺病毒及逆轉錄病毒、噬菌體、黏粒、質粒、真菌載體及此項技術中通常所用且已闡述用於表現於各種真核及原核宿主中之其他重組媒劑。在一些實施例中，核酸遞送媒劑係表現載體，例如質粒。載體可包括用以確立表現載體之習用功能之任何元素，例如，啟動子、核糖體結合元素、終止子、增強子、選擇標記及複製起點。啟動子可為組成型、可誘導型或可抑制型啟動子。例示性啟動子包括(但不限於)巨細胞病毒(CMV)極早期啟動子、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸酯激酶-1 (PGK)啟動子、猿猴病毒 40 (SV40)啟動子及CK6啟動子、甲狀腺素蛋白啟動子(TTR)、TK啟動子、四環素反應性啟動子(TRE)、HBV啟動子、hAAT啟動子、LSP啟動子、嵌合肝特異性啟動子(LSP)、E2F啟動子、端粒酶(hTERT)啟動子；巨細胞病毒增強子/雞 β -肌動蛋白/兔 β -珠蛋白啟動子(CAG啟動子；Niwa等人, *Gene*, 1991, 108(2):193-9)及延長因子1- α 啟動子(EF1- α)啟動子(Kim等人, *Gene*, 1990, 91(2):217-23及Guo等人, *Gene Ther.*, 1996, 3(9):802-10)。業內已知許多能夠遞送核酸至細胞(例如，細菌細胞、酵母細胞、植物細胞或哺乳動物細胞)之表現載體且在本文中可用於在細胞中產生融合蛋白或融合蛋白組份。舉例而言，大腸桿菌若經質粒(例如pBR322)轉換、經改質以包含編碼融合蛋白之核酸，則可用於產生融合蛋白(Mandel等人, *J. Mol. Biol.*, 1970, 53:154)。所表現融合蛋白或融合蛋白組份可自細胞收穫且根據業內已知且如本文中所述之習用技術純化。

宿主細胞

本文提供包含編碼本文所述融合蛋白之核酸的宿主細胞。可藉由業內已知之任何方式向靶細胞提供編碼融合蛋白或融合蛋白組份

(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域)之核酸。在一些實施例中，編碼目標蛋白(例如，融合蛋白)之核酸係在病毒載體中且載體經包裝，隨後病毒體可用於感染細胞。在一些實施例中，編碼目標蛋白(例如，融合蛋白)之核酸係在表現載體(例如質粒)中。適於特定細胞之轉染或轉換程序可用於將編碼目標蛋白(例如，融合蛋白)之核酸引入靶細胞中。利用聚合物、脂質體或奈米球之調配物可用於遞送編碼目標蛋白(例如，融合蛋白)之核酸。可根據本發明經重組構築體轉換或轉染之細胞可為對彼等熟習此項技術者方便之任一者。可使用之例示性細胞類型包括細菌、酵母、真菌、昆蟲、植物及哺乳動物細胞。可使用之例示性哺乳動物細胞包括(但不限於)成纖維細胞、肝細胞、內皮細胞、幹細胞、造血細胞、上皮細胞、肌細胞、神經元細胞及角化細胞。可使用之其他例示性哺乳動物細胞系包括(但不限於) COS細胞、VERO細胞、HeLa細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、293細胞、NSO細胞、SP20細胞、3T3成纖維細胞、W138細胞、BHK細胞、HEPG2細胞、DUX細胞及MDCK細胞。該等細胞可用於產生並收穫目標蛋白。在一些實施例中，可向細胞或哺乳動物宿主提供轉換或轉染細胞。適於遞送至細胞或哺乳動物宿主之細胞包括來自任何器官、腫瘤或細胞系之任何哺乳動物細胞類型。舉例而言，可使用人類、鼠類、山羊、綿羊、牛、狗、貓及豬細胞。在一些實施例中，宿主細胞係細菌細胞。在又一實施例中，宿主細胞係大腸桿菌細胞。

術語「宿主細胞」包括已為或可為本發明之載體之接受者及其子代。由於天然、意外或故意突變，子代可不必要與初始親代細胞完全相同(在形貌中或在總DNA補體之基因組中)。宿主細胞較佳係真核細胞、較佳哺乳動物細胞、最佳人類細胞。在一些實施例中，宿主細胞係細菌細胞。在又一實施例中，宿主細胞係大腸桿菌細胞。

V. 產生融合蛋白及融合蛋白組份之方法

本文提供產生如本文揭示之本發明之融合蛋白或融合蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域)的方法。在一些態樣中，提供產生如本文揭示之任何融合蛋白之方法，其包含在產生融合蛋白之條件下培養包含編碼本文揭示之融合蛋白中之任一者之核酸的宿主細胞及回收由宿主細胞產生之融合蛋白。在一些實施例中，編碼融合蛋白之核酸係選自由SEQ ID NO:18-24組成之群。

(1) 培育宿主細胞

使產生本發明之融合蛋白或融合蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域)所用的細胞在業內已知且適於所選宿主細胞之培育之培養基中生長。適宜培養基之實例包括Ham's F10 (Sigma)、最小必需培養基(MEM, Sigma)、RPMI 1640 (Sigma)、杜貝克氏改良鷹氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (DMEM, Sigma)及Luria Broth (LB)。另外，以下中所述之任何培養基可作為培養基用於細胞：Ham等人, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes等人, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980)；美國專利第4,767,704號、第4,657,866號、第4,927,762號、第4,560,655號或第5,122,469號；WIPO公開案第WO 90/03430號、第WO 87/00195號；或美國專利Re. 30,985。若需要，給定培養基通常補充有激素及/或其他生長因子(例如胰島素、鐵傳遞蛋白或表皮生長因子)、DHFR、鹽(例如氯化鈉、鈣、鎂及磷酸鹽)、緩衝液(例如HEPES)、核苷酸(例如腺苷及胸苷)、抗生素、痕量元素及葡萄糖或等效能源。亦可包括彼等熟習此項技術者可已知之適當濃度之任何其他必需補充劑。培養條件(例如溫度、pH及諸如此類)係彼等先前與選擇用於表現之細胞一起使用者，且將為彼等熟習此項技術者所明瞭。對於大腸桿菌生長而言，例如，較佳

溫度在約20℃至約39℃、更佳約25℃至約37℃範圍內，甚至更佳於約30℃下。主要端視宿主有機體而定，培養基之pH可為介於約5至約9範圍內之任一pH。對於大腸桿菌而言，pH較佳係約6.8至約7.4，且更佳約7.0。若在表現載體中使用可誘導型啟動子，則在適於激活啟動子之條件下誘導蛋白質表現。舉例而言，若PhoA啟動子用於控制轉錄，則可在用於誘導之磷酸鹽限制培養基中培養轉換宿主細胞。根據所用載體構築體，可使用多種其他誘導劑，如業內已知。

(2) 融合蛋白或融合蛋白組份之純化

在使用重組技術時，本文所述融合蛋白或融合蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域)可在細胞內、在壁膜間隙中產生，或直接分泌至培養基中。若多肽係在細胞內產生，則作為第一步驟，蛋白質回收通常包括通常藉由諸如滲透衝擊、超音波處理或溶解等方式使細胞破碎。在細胞破碎後，藉由(例如)離心或超濾去除宿主細胞或經溶解片段之微粒碎屑。若多肽分泌至培養基中，則通常首先使用市售蛋白質濃縮濾器(例如Amicon或Millipore Pellicon超濾單元)過濾並濃縮來自該等表現系統之上清液。在任一前述步驟中可包括諸如PMSF等蛋白酶抑制劑以抑制蛋白質水解，且可包括抗生素以防止外來污染物生長。

自該等細胞製備之融合蛋白或融合蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域)之組合物可使用(例如)羧基磷灰石層析、凝膠電泳、透析及親和層析來純化。在一些實施例中，蛋白質A或蛋白質G用作親和配體用於親和層析中。蛋白質A作為親和配體之適合性取決於存於融合蛋白中之任何免疫球蛋白Fc區之物種及同種型(Lindmark 等人，*J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)。在一些實施例中，蛋白質A作為親和配體用於分離及純化如本文所述融合蛋白或融合蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、

VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域)。在一些實施例中，蛋白質G作為親和配體用於分離及純化如本文所述融合蛋白或融合蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域)。親和配體所附接之基質最經常為瓊脂糖，但可使用其他基質。機械上穩定之基質(例如定孔玻璃或聚(苯乙烯-二乙烯基)苯)使得可達成較使用瓊脂糖更快之流速及更短之處理時間。端視欲回收之融合蛋白或融合蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域)，亦可使用其他蛋白質純化技術，例如在離子交換管柱上分級分離、乙醇沈澱、反相HPLC、二氧化矽、肝素、SEPHAROSE™、陰離子或陽離子交換樹脂(例如聚天冬胺酸管柱)上層析、以及層析聚焦、SDS-PAGE及硫酸銨沈澱。在一些實施例中，所回收融合蛋白實質上純。在又一實施例中，所回收融合蛋白至少係90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%純中之任一者。在任一或多個初步純化步驟後，可使用pH介於約2.5-4.5之間之洗脫緩衝液對包含目標融合蛋白或融合蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域)及污染物之混合物實施低pH疏水相互作用層析，較佳在低鹽濃度(例如，約0-0.25 M鹽)中實施。

一般而言，製備用於研究、測試及臨床應用中之融合蛋白或融合蛋白組份(例如，PDGFR之細胞外部分、VEGFR之細胞外部分及/或多聚化結構域)的各種方法已在業內充分確立，與上述方法一致及/或如由彼等熟習此項技術者認為適用於特定目標融合蛋白或融合蛋白組份。

(3) 融合蛋白或融合蛋白組份之生物活性

蛋白質可使用常用已知方法純化並鑑別，該等方法係(例如)在免疫親和力或離子交換管柱上分級分離；乙醇沈澱；反相HPLC；二氧

化矽上或陽離子交換樹脂(例如DEAE)上層析；層析聚焦；SDS-PAGE；硫酸銨沈澱；使用(例如) Sephadex G-75凝膠過濾；疏水性親和力樹脂、使用固定於基質上之適宜結合配偶體的配體親和力、離心、ELISA、BIAcore、西方印跡分析、胺基酸及核酸測序及生物活性。

可表徵或評定本文揭示之融合蛋白或融合蛋白組份的生物活性，包括但不限於與靶結合配偶體(例如，PDGF及/或VEGF家族蛋白)之親和力、競爭性結合(例如，阻斷與PDGFR或VEGFR之靶結合配偶體)、抑制活性(例如，抑制PDGF或VEGF途徑激活)、抑制細胞增殖、抑制腫瘤生長及抑制血管生成(例如，脈絡膜新生血管形成)。在一些實施例中，可評定本文揭示之融合蛋白或融合蛋白組份之活體內或活體外生物活性。在本文所述分析之任一者中，分析係於4℃、20℃至28℃(例如，25℃)或37℃之溫度下實施。

可評定本文揭示之融合蛋白或融合蛋白組份與結合配偶體(例如PDGF家族蛋白(例如，PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C或PDGF-D)、PDGF家族蛋白之二聚體(例如，PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC或PDGF-DD)或VEGF家族蛋白(例如，VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D或PlGF))之親和力。許多評定結合親和力之方法已為業內所知且可用於鑑別融合蛋白或融合蛋白組份與結合配偶體之結合親和力。結合親和力可表示為解離常數(K_d)值或半最大有效濃度(EC₅₀)值。用於測定結合親和力(例如，K_d值)之技術已為業內所熟知，例如酶聯免疫吸附分析(ELISA)及BIAcore。參見Harlow及Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Publications, NY (1988)；Ausubel等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, (2009)；Altschuh等人, *Biochem.*, 31:6298 (1992)；及由Pharmacia Biosensor揭示之BIAcore方法，所有該等方法皆以引用方

式併入本文中。舉例而言，可使用ELISA測定融合蛋白與結合配偶體之結合親和力。在一些實施例中，使用ELISA分析融合蛋白與PDGF-BB之結合。在此例示性分析中，將所分泌融合蛋白連續稀釋，與20 pM最終濃度之人類PDGF BB配體混合並於室溫下在回轉式振盪器平臺上培育過夜。在培育後，藉由人類PDGF特異性ELISA (Human PDGF-BB DuoSet產品編號DY220, R&D Systems)量測未結合PDGF-BB之量。使用Prism 5.0d (GraphPad Software公司)分析結合親和力之統計顯著性且使用2因子ANOVA測試進行計算，之後Bonferroni校正。在又一實例中，使用ELISA分析融合蛋白與VEGF家族蛋白之結合。在例示性分析中，將所分泌融合蛋白連續稀釋，與20 pM最終濃度之人類VEGF混合並於室溫下在回轉式振盪器平臺上培育過夜。隨後藉由人類VEGF特異性ELISA (Human VEGF Quantikine ELISA套組目錄編號DVE00, R&D Systems)量測未結合VEGF之量。

在本文所述實施例中之任一者中，融合蛋白對於抑制活性(例如，抑制PDGF活性及/或VEGF活性)之EC50為 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{ nM}$ 、 $\leq 10\text{ nM}$ 、 $\leq 1\text{ nM}$ 、 $\leq 0.1\text{ nM}$ 、 $\leq 0.01\text{ nM}$ 或 $\leq 0.001\text{ nM}$ (例如， 10^{-8} M 或更小，例如， 10^{-8} M 至 10^{-13} M ，例如， 10^{-9} M 至 10^{-13} M)。在本文所述實施例中之任一者中，融合蛋白對於結合配偶體(例如，PDGF及/或VEGF)之Kd為小於以下中之約任一者：約1.0 mM、500 μM 、100 μM 、50 μM 、25 μM 、10 μM 、5 μM 、1 μM 、900 nM、800 nM、700 nM、600 nM、500 nM、400 nM、350 nM、300 nM、250 nM、200 nM、150 nM、100 nM、95 nM、90 nM、85 nM、80 nM、75 nM、70 nM、65 nM、60 nM、55 nM、50 nM、45 nM、40 nM、35 nM、30 nM、25 nM、20 nM、15 nM、10 nM、5 nM、1 nM、900 pM、800 pM、700 pM、600 pM、500 pM、400 pM、300 pM、200 pM、100 pM、50 pM、25 pM、12.5 pM、6.25 pM、5 pM、4 pM或3 pM，包括

該等值，包括介於該等數值之間之任何值。在一些實施例中，與本文所述野生型融合蛋白之結合相比，本文所述融合蛋白變體以較高親和力結合至結合配偶體。在一些態樣中，與結合配偶體由包含選自由 SEQ ID NO:9-15組成之群之胺基酸序列的融合蛋白之結合相比，融合蛋白變體以10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、6000、7000、8000、9000或10,000 (包括該等值，包括介於該等數值之間之任一值)倍親和力中之至少任一者結合至結合配偶體。

在一些實施例中，可評定本文揭示之融合蛋白的抗增殖活性(例如減少細胞增殖)。業內已知許多用於評定融合蛋白之抗增殖性質的方法。在一個例示性分析中，可使用人類臍靜脈內皮細胞(HUVEC)以證實VEGF依賴性及/或PDGF依賴性細胞增殖由本文所述融合蛋白之抑制。在此分析中，在VEGF及/或PDGF存在下將融合蛋白施加至HUVEC且細胞增殖係量度。舉例而言，將HUVEC (HUVEC- Cambrex Bio Science Walkersville公司)以2,000個細胞/孔之密度接種於補充有5%胎牛血清(Invitrogen)之培養基199 (Invitrogen)中之96孔板中並沉降過夜。在培育後，將培養基更換為培養基199 (Invitrogen)，該培養基補充有以100 μ l/孔之最終體積含有相等體積(5 μ l)收穫細胞培養物及最終濃度為10 ng/ml之僅重組hVEGF-165配體(R&D Systems目錄編號293-VE)或與最終濃度為20 ng/ml之PDGF-BB配體(R&D Systems目錄編號220-BB)組合的5%胎牛血清(Invitrogen)。將細胞於37°C下在5% CO₂中培育三至四天。以20 μ l/孔添加Cell Titer96 AQueous One Solution Reagent (Promega目錄編號G3580)且4小時後取490 nm下之吸光率以測定由融合蛋白之細胞增殖抑制。在一些實施例中，使用業內熟知之技術量測融合蛋白之抗血管生成性質。在例示性分析中，使用濕型年齡

相關性黃斑變性之動物模型以分析眼中新生血管形成由融合蛋白之抑制。在此分析中，在第0研究天用向左眼(OS)中單一玻璃體內注射融合蛋白或包含編碼融合蛋白之核酸的rAAV粒子處理正常成年小鼠之眼，而右眼(OD)未經處理。在第28研究天在雙眼中使用雷射(例如，每只眼放置3個燒傷，200 mW功率，50 μ m斑點，100 ms)誘導CNV。對小鼠灌注FITC-葡聚糖並在第42研究天無痛致死。採集眼，固定於10%中性緩衝福爾馬林(formalin)中且隨後製備脈絡膜鋪片以檢查新生血管形成之程度。比較經處理(OS)眼中無CNV之燒傷之數目與對側(OD)眼以測定融合蛋白之功效。例如，參見實例5。

VI. 病毒粒子及產生病毒粒子之方法

本文亦提供包含編碼本文所述融合蛋白之核酸的病毒粒子。病毒載體可用於遞送編碼融合蛋白或融合蛋白組份之核酸用於表現特定靶組織(例如，患病組織)內之靶細胞中之蛋白質。已知許多病毒物種，且出於遞送核酸至靶細胞之目的已對許多病毒進行研究。可將外源性核酸插入載體(例如腺病毒、部分缺失腺病毒、完全缺失腺病毒、腺相關病毒(AAV)、逆轉錄病毒、慢病毒等)用於遞送至細胞。在一些實施例中，細胞係在個體中且病毒係經由靜脈內、肌內、門靜脈內或其他投與路徑遞送。最常用病載體包括彼等衍生自腺病毒、腺相關病毒(AAV)及逆轉錄病毒(包括慢病毒，例如人類免疫缺陷性病毒(HIV))者。對於例示性病毒載體而言，參見美國專利第7,928,072號及WO2006/113277，兩個案件之全文皆以引用方式併入本文中。

在一些實施例中，病毒粒子係包含含有一或兩個AAV ITR之核酸及編碼本文所述融合蛋白且側接一或兩個ITR之序列的重組AAV粒子。核酸在AAV粒子中衣殼化。AAV粒子亦包含衣殼蛋白。在一些實施例中，核酸包含在轉錄方向上以可操作方式連接之組份、包括轉錄起始及終止序列之控制序列及目標蛋白質編碼序列(例如，編碼融

合蛋白之核酸)。該等組份在5'及3'末端上側接功能AAV ITR序列。

「功能AAV ITR序列」意指ITR序列按預期用於AAV病毒體之挽救、複製及包裝。參見Davidson等人, *PNAS*, 2000, 97(7):3428-32; Passini等人, *J. Virol.*, 2003, 77(12):7034-40; 及Pechan等人, *Gene Ther.*, 2009, 16:10-16, 所有全文皆以引用方式併入本文中。對於實踐本發明之一些態樣, 重組載體包含衣殼化必需之AAV之至少所有序列及物理結構用於由rAAV感染。用於本發明載體中之AAV ITR無需具有野生型核苷酸序列(例如, 如Kotin, *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5:793-801中所述), 且可藉由核苷酸之插入、缺失或取代改變或AAV ITR可衍生自若干AAV血清型中之任一者。當前已知AAV之40種以上血清型, 且繼續鑑別新血清型及現存血清型之變體。參見Gao等人, *PNAS*, 2002, 99(18): 11854-6; Gao等人, *PNAS*, 2003, 100(10):6081-6; 及Bossis等人, *J. Virol.*, 2003, 77(12):6799-810。認為任何AAV血清型之使用皆在本發明範疇內。在一些實施例中, rAAV載體係衍生自AAV血清型(包括但不限於AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AA6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.8、AAVrh8R、AAVrh.10、AAV11或AAV12)之載體。在一些實施例中, AAV中之核酸包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AA6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.8、AAVrh8R、AAVrh.10、AAV11或AAV12之ITR。在一些實施例中, 選自由SEQ ID NO:12-15組成之群之編碼融合蛋白的核酸側接至少一個AAV ITR。在一些實施例中, 核酸係選自由SEQ ID NO:21-24組成之群。在其他實施例中, rAAV粒子包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AA6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.8、AAVrh8R、AAVrh.10、AAV11或AAV12之衣殼蛋白。在其他實施例中, rAAV粒子包含來自分枝A-F之AAV血清型之衣殼蛋白(Gao等人, *J. Virol.* 2004, 78(12):6381)。

使用不同AAV血清型以最佳化特定靶細胞之轉導或靶向特定靶組織(例如，患病組織)內之特定細胞類型。rAAV粒子可包含相同血清型或混合血清型之病毒蛋白質及病毒核酸。舉例而言，rAAV粒子可包含AAV2衣殼蛋白及至少一個AAV2 ITR或其可包含AAV2 衣殼蛋白及至少一個AAV1 ITR。在另一實例中，rAAV粒子可包含AAV1衣殼蛋白及至少一個AAV2 ITR。在再一實例中，rAAV粒子可包含AAV1及AAV2二者之衣殼蛋白，且進一步包含至少一個AAV2 ITR。本文提供用於產生rAAV粒子之AAV血清型之任一組合，如同本文已明確說明每一組合一般。

在一些態樣中，本發明提供包含重組自補基因組之病毒粒子。具有自補基因組之AAV病毒粒子及使用自補AAV基因組之方法闡述於美國專利第6,596,535號、第7,125,717號、第7,765,583號、第7,785,888號、第7,790,154號、第7,846,729號、第8,093,054號及第8,361,457號；及Wang Z.等人, (2003) Gene Ther 10:2105-2111中，其全文各自以引用方式併入本文中。包含自補基因組之rAAV藉助其部分互補序列(例如，轉基因之互補編碼及非編碼鏈)將快速形成雙鏈DNA分子。在一些實施例中，本發明提供包含AAV基因組之AAV病毒粒子，其中rAAV基因組包含第一異源多核苷酸序列(例如，融合蛋白編碼鏈)及第二異源多核苷酸序列(例如，融合蛋白非編碼或反義鏈)，其中第一異源多核苷酸序列可與第二多核苷酸序列沿其大部分或所有長度形成鏈內鹼基對。在一些實施例中，第一異源多核苷酸序列及第二異源多核苷酸序列由促進鏈內鹼基配對之序列連接；例如，髮夾DNA結構。業內已知(例如) siRNA分子中之髮夾結構。在一些實施例中，第一異源多核苷酸序列及第二異源多核苷酸序列由突變ITR(例如，右側ITR)連接。在一些實施例中，ITR包含多核苷酸序列5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT

GAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCCGGGCTTTGCCCGGG CG - 3'(SEQ ID NO:41)。突變ITR包含包含末端解析序列之D區之缺失。因此，在複製AAV病毒基因組時，rep蛋白質在突變ITR處不會解離病毒基因組，且因此，以5'至3'次序包含以下之重組病毒基因組將包裝於病毒衣殼中：AAV ITR、包括調控序列之第一異源多核苷酸序列、突變AAV ITR、與第一異源多核苷酸呈相反定向之第二異源多核苷酸及第三AAV ITR。在一些實施例中，本發明提供包含重組病毒基因組之AAV病毒粒子，該重組病毒基因組包含功能AAV2 ITR、編碼融合蛋白之第一多核苷酸序列、包含D區之缺失及無功能末端解析序列之突變AAV2 ITR、包含與編碼第一多核苷酸序列及功能AAV2 ITR之融合蛋白之序列互補之序列的第二多核苷酸序列。

rAAV粒子可使用業內已知之方法產生。例如，參見美國專利第6,566,118號、第6,989,264號、第6,995,006號。在實踐本發明中，用於產生rAAV粒子之宿主細胞包括哺乳動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞、微生物及酵母。宿主細胞亦可為包裝細胞(其中AAV rep及cap基因穩定維持於宿主細胞中)或產生物細胞(其中穩定維持AAV載體基因組)。例示性包裝及產生物細胞係衍生自293、A549或HeLa細胞。AAV載體係使用業內已知之標準技術純化並調配。

在一些態樣中，提供產生如本文所揭示rAAV粒子之方法，其包含(a) 在產生rAAV粒子之條件下培養宿主細胞，其中宿主細胞包含(i) 一或多個AAV包裝基因，其中該AAV包裝基因各自編碼AAV複製或衣殼化蛋白；(ii) 包含編碼本文揭示之任何融合蛋白且側接至少一個AAV ITR之核酸的rAAV前載體，及(iii) AAV輔助功能；及(b) 回收由宿主細胞產生之rAAV粒子。在一些實施例中，核酸編碼選自由SEQ ID NO:12-15組成之群之融合蛋白。在一些實施例中，該至少一個AAV ITR係選自由AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AA6、

AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.8、AAVrh8R及AAVrh.10 ITR組成之群。在一些實施例中，該衣殼化蛋白質係選自由AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AA6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.8、AAVrh8R、AAVrh10、AAV10、AAV11、AAV12衣殼蛋白及諸如此類組成之群。在其他實施例中，rAAV粒子包含來自分枝A-F之AAV血清型之衣殼蛋白。在一些實施例中，rAAV粒子包含AAV9衣殼及包含AAV2 ITR、突變體AAV2 ITR及編碼融合蛋白之轉基因之重組自補基因組。在又一實施例中，rAAV粒子經純化。本文所用術語「純化」包括不含至少一些亦可存在之其他組份之rAAV粒子的製備，其中rAAV粒子天然存在或初始製得。因此，例如，分離rAAV粒子可使用純化技術製備以將其自來源混合物(例如培養裂解物或產生培養上清液)製備。富集可以多種方式、例如藉由溶液中存在之DNase抗性粒子(DRP)或基因組拷貝(gc)之比例或藉由感染性量測，或其可關於來源混合物(例如污染物，包括製造培養污染物或過程中污染物，包括輔助病毒、培養基組份及諸如此類)中存在之第二潛在干擾物質量測。

本文亦提供包含含有編碼本發明之融合蛋白之核酸的rAAV粒子及醫藥上可接受之載劑之醫藥組合物。醫藥組合物可適於本文所述多種投與模式，包括(例如)全身或局部投與。包含編碼本文所述融合蛋白之核酸的rAAV之醫藥組合物可(例如)藉由靜脈內注射、藉由導管(參見美國專利第5,328,470號)或藉由立體定位注射(Chen等人, 1994, PNAS, 91: 3054-3057)全身引入。醫藥組合物可呈滴眼劑、可注射溶液形式或呈適於吸入或經口投與之形式。在一些實施例中，包含本文所述rAAV及醫藥上可接受之載劑之醫藥組合物適於投與人類。在一些實施例中，包含本文所述rAAV及醫藥上可接受之載劑之醫藥組合物適於玻璃體內注射或局部施用至眼。該等醫藥上可接受之載劑可為無菌液體，例如水及油，包括彼等石油、動物、植物或合成來源，例

如花生油、大豆油、礦物油及諸如此類。亦可採用鹽水溶液及水性右旋糖、聚乙二醇(PEG)及甘油溶液作為液體載劑、具體而言用於可注射溶液。醫藥組合物可進一步包含其他成份，例如防腐劑、緩衝液、張力劑、抗氧化劑及穩定劑、非毒性潤濕劑或澄清劑、黏度增加劑及諸如此類。本文所述醫藥組合物可包裝成單一單位劑型或呈多劑型形式。組合物通常調配為無菌且實質上等滲之溶液。組合物亦可經調配以具有與眼及眼部組織之房水相容之滲透值。該等滲透值通常可在約200至約400 mOsm/kg之範圍內，但較佳可為約300 mOsm/kg。可用於儲存及/或遞送表現載體或病毒載體之眼部溶液已揭示於(例如) WO03077796A2中。

VII. 使用融合蛋白及病毒粒子之處理方法

本發明之方法使用本文揭示之任何融合蛋白。在一些實施例中，融合蛋白結合PDGF蛋白或VEGF蛋白。在一些實施例中，融合蛋白結合PDGFR蛋白及VEGFR蛋白。本文所述融合蛋白可具有以下特性中之一或多者：(a) 結合PDGF家族中之一或多種蛋白質，例如PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C或PDGF-D；(b) 結合VEGF家族中之一或多種蛋白質，例如VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D或PIGF；(c) 阻斷PDGF家族蛋白與PDGF受體結合；(d) 阻斷VEGF家族蛋白與VEGF受體結合；(e) 抑制PDGF信號傳導途徑及/或VEGF信號傳導途徑之激活；(f) 治療及/或預防諸如眼部疾病、自體免疫疾病、發炎性疾病或癌症等疾病。融合蛋白之活性可在活體外及/或活體內量測。

本發明提供藉由向個體投與有效量之本文所述任何融合蛋白治療疾病(例如眼部疾病、發炎性疾病、自體免疫疾病或癌症)的方法。在一些實施例中，治療疾病之方法包含向個體投與有效量之包含融合蛋白之組合物。在一些實施例中，治療疾病之方法包含向個體投與有

效量之包含編碼融合蛋白之核酸的rAAV。亦提供藉由向個體投與有效量之本文所述任何融合蛋白治療或預防疾病(例如眼部疾病、發炎性疾病、自體免疫疾病或癌症)之一或多個態樣或症狀之方法。在一些實施例中，治療或預防疾病之一或多個態樣或症狀之方法包含向個體投與有效量之包含融合蛋白之組合物。在一些實施例中，治療或預防疾病之一或多個態樣或症狀之方法包含向個體投與有效量之包含編碼融合蛋白之核酸的rAAV。

本文所述方法可用於治療多種疾病，包括但不限於發炎性疾病、眼部疾病、自體免疫疾病或癌症。在一些實施例中，欲治療之疾病包括(但不限於)類風濕性關節炎、發炎性關節炎、骨關節炎、癌症、年齡相關性黃斑變性(AMD) (例如濕型AMD或乾型AMD)、特徵在於新生血管形成(例如脈絡膜新生血管形成)之眼部疾病、葡萄膜炎(例如前葡萄膜炎或後葡萄膜炎)、色素性視網膜炎及糖尿病性視網膜病變。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物可用於治療自體免疫疾病。在一些實施例中，自體免疫疾病係類風濕性關節炎、多發性硬化症或全身性紅斑狼瘡。類風濕性關節炎(RA)係導致關節發炎之慢性自體免疫疾病。儘管RA主要影響滑膜關節，但其可影響周圍組織及器官。RA之病理學涉及可導致軟骨破壞及關節之關節強直(融合)的發炎過程。RA之其他病理表現包括血管炎(血管發炎)，其可影響幾何任何器官系統且可引起其他併發症，包括多神經病、皮膚潰瘍及內臟梗塞。胸膜肺表現包括胸膜炎、間質性纖維化、卡普蘭症候群(Caplan's syndrome)、胸膜肺結節、肺炎、類風濕肺病及動脈炎。其他表現包括多種關節周結構(例如伸面)上以及胸膜及腦膜上之發炎性類風濕性結節的發生。骨骼肌無力及萎縮係常見的。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物可用於治療發炎性疾

病。在一些實施例中，發炎性疾病係發炎性關節炎、骨關節炎、牛皮癬、慢性發炎、刺激性腸疾病、肺發炎或哮喘。發炎性關節炎係指可由自體免疫疾病(例如，強直性脊柱炎、幼年型特發性關節炎、混合型結締組織病、牛皮癬性關節炎、反應性關節炎、硬皮病、薛格連氏症候群(Sjogren's Syndrome)、斯蒂爾病(Still's Disease)及全身性紅斑狼瘡)引起之關節反應。發炎性關節炎亦可由某些類型之細菌(例如對於反應性關節炎)或由關節中之晶體結構之沈積物(例如對於痛風及假痛風)引起。發炎性關節炎之特徵性症狀係一或多個關節疼痛及腫脹，該關節可較其他關節溫暖。長期不活動後關節僵硬(例如在早上或在長時間靜坐後)係極為常見症狀。患有發炎性關節炎之患者通常具有多個關節病狀。骨關節炎(亦稱作退行性關節炎或退行性關節病)係一組涉及關節(包括關節軟骨及軟骨下骨)退化之機械異常。症狀可包括關節疼痛、壓痛、僵硬、鎖住及有時積液(即，存在增加之關節內流體)。多種病因(例如，遺傳性、發育性、代謝性、肥胖症有關及機械病因)可起始導致軟骨損失之過程。隨著軟骨之分解產物釋放至滑液空間中，擴散至關節中之細胞試圖將其移除。新的骨生長物或「骨刺」可形成。經常，在骨不太由軟骨保護時，骨可暴露且受損。該等骨變化以及關節發炎引起疼痛。由於繼發於疼痛之減少運動，區域肌肉可萎縮，且韌帶可變得更鬆弛。

持續性失調血管生成發生在多種疾病狀態(例如癌症)中。在癌症中，細胞不受控地分化且生長，從而形成惡性腫瘤，其血管化並侵入身體之附近部分。癌症亦可經由淋巴系統或血流擴散(轉移)至更大距離之身體部分。癌症之病因可為環境(由於暴露於化學物質、輻射或由於生活方式)、遺傳性或感染性。在一些實施例中，本發明之方法及組合物可用於治療癌症。在一些實施例中，癌症係前列腺癌、乳癌、肺癌、食管癌、結腸癌、直腸癌、肝癌、尿道癌(例如，膀胱

癌)、腎癌、肺癌(例如,非小細胞肺癌)、卵巢癌、宮頸癌、子宮內膜癌、胰腺癌、胃癌、甲狀腺癌、皮膚癌(例如,黑色素瘤)、淋巴或骨髓譜系之造血性癌症、頭頸癌、鼻咽癌(NPC)、神經膠母細胞瘤、畸胎瘤、神經母細胞瘤、腺癌、間質器官癌(例如纖維肉瘤或橫紋肌肉瘤)、軟組織肉瘤及癌、絨毛膜癌、肝母細胞瘤、卡波西氏肉瘤(Karposi's sarcoma)或威姆氏腫瘤(WiIm 's tumor)。

可用本文揭示之方法及組合物治療與血管生成相關之其他疾病。該等疾病包括動脈粥樣硬化、晶狀體後纖維增生症、甲狀腺增生(包括格雷弗氏病(grave's disease))、腎病症候群、子癲前症、腹水、心包積液(例如與心包炎相關)及胸腔積液。

在一些實施例中,本發明之方法及組合物可用於治療眼部疾病。在一些實施例中,眼部疾病係AMD(例如濕型AMD或乾型AMD)、葡萄膜炎、色素性視網膜炎、新生血管性青光眼、糖尿病性視網膜病變及涉及局部發炎過程之其他眼病。在一些實施例中,眼部疾病之特徵在於新生血管形成,例如脈絡膜新生血管形成。在一些實施例中,眼部疾病係角膜移植之結果。在一些實施例中,本發明提供治療或預防眼部疾病之一或多個態樣或症狀(包括但不限於形成眼玻璃膜疣、眼或眼組織中發炎及損失視力)之方法。在某些實施例中,本文所述組合物及方法可用於檢測及/或治療葡萄膜炎,即,葡萄膜(即鞏膜下方眼之中間層)發炎。在美國,估計葡萄膜炎導致約10%-20%失明。葡萄膜傳統上分成3個區域,自前至後為虹膜、睫狀體及脈絡膜。葡萄膜之首要功能係營養及氣體交換、光吸收及由睫狀突分泌房水。葡萄膜炎通常與暴露於毒素、感染及/或自體免疫病症相關。然而,在許多情形下,病因未知。葡萄膜炎可影響一隻或兩隻眼。症狀可快速發展且可包括視力模糊、視野中之浮動暗點、眼睛疼痛、眼睛發紅及對光敏感。葡萄膜炎之最常見形式係前葡萄膜炎或虹

膜炎，其涉及虹膜發炎。睫狀體平坦部炎係指眼睛中間、即介於虹膜與脈絡膜之間之葡萄膜發炎。後葡萄膜炎影響眼睛後部，即，脈絡膜。與後葡萄膜炎相關之反應亦可影響視網膜(視網膜炎)或眼睛後部之血管(血管炎)。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物可用於治療色素性視網膜炎(RP)。RP係由視網膜之光感受器(視柱細胞及視錐細胞)或視網膜色素上皮異常引起的可遺傳眼病。該疾病可導致進行性視力損失且經常導致失明。RP之症狀包括在晚上或低光中視力降低、側(周邊)視力損失及在晚期情形中中央視力損失。RP之診斷取決於經由視野測試及視網膜電描記術之光感受器細胞功能之進行性損失的文件記載。已知至少35個遺傳位點會引起「非症候群性色素性視網膜炎」(即，並非另一疾病之結果或較寬症候群之部分的RP)。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物可用於治療糖尿病性視網膜病變。糖尿病性視網膜病變係指由糖尿病之併發症引起之視網膜之損害。具體而言，血管壁因高血糖症受損，從而改變血液-視網膜障壁之形成並使得視網膜血管更具滲透性。受損血管使流體及脂質滲漏至黃斑中，從而引起黃斑腫脹(即，黃斑水腫)，此使視力模糊。隨著疾病進展，其進入增殖階段，其中血管沿視網膜並在填充眼睛之玻璃體液中生長。該等血管可流血、使視力模糊且(例如)破壞視網膜、引起視網膜脫落或引起新生血管性青光眼。

在某些實施例中，本發明之方法及組合物可用於治療年齡相關性黃斑變性(AMD)。AMD之特徵在於中央視力進行性損失，其係由於稱為黃斑之視網膜之區域中之光感受器細胞的損害而發生。AMD已廣泛地分成兩種臨床狀態：濕式形式及乾式形式，其中乾式形式佔總病例之80-90%。乾型AMD之特徵在於形成黃斑玻璃膜疣，即在眼之布魯赫氏膜(Bruch's membrane)與視網膜色素上皮之間累積之細胞

外物質之微黃色或白色累積物。濕型AMD佔嚴重視力損失之約90%，其與新生血管形成(其中血管自視網膜下方之脈絡膜生長)及該等新血管之洩漏相關。血液及流體之累積可引起視網膜脫離，之後快速光感受器變性及呈任一形式之AMD之視力損失。人們普遍認為，濕式形式之AMD在乾式形式之後進行且由乾式形式產生。

本文提供遞送有效量之融合蛋白至個體之方法。融合蛋白可在組合物中遞送至個體。融合蛋白亦可藉由包含編碼融合蛋白之核酸之rAAV遞送至個體。本文涵蓋包含融合蛋白之組合物或包含編碼融合蛋白之核酸之rAAV。

本文所述組合物可經由任一路徑投與個體，該路徑包括但不限于靜脈內(例如，藉由輸注幫浦)、腹膜內、眼內、動脈內、肺內、經口、吸入、囊泡內、肌內、氣管內、皮下、眼內、鞘內、經皮、經胸膜、動脈內、局部、吸入(例如，以噴霧形式)、黏膜(例如經由鼻黏膜)、皮下、經皮、胃腸道、關節內、腦池內、心室內、顱內、尿道內、肝內及瘤內。在一些實施例中，組合物係在血管內(例如靜脈內(IV)或動脈內)投與。在一些實施例中，組合物直接投與至動脈內。在一些實施例中，組合物係全身(例如藉由靜脈內注射)投與。在一些實施例中，組合物係局部(例如藉由動脈內或眼內注射)投與。

在一些實施例中，組合物直接投與眼或眼組織。在一些實施例中，組合物以(例如)滴眼劑局部投與眼。在一些實施例中，組合物藉由注射至眼(眼內注射)或與眼相關之組織投與。組合物可藉由(例如)眼內注射、眼周注射、視網膜下注射、玻璃體內注射、經中隔注射、鞏膜下注射、脈絡膜內注射、前房注射、結膜下注射、特農囊下注射、眼球後注射、眼球周注射或球周鞏膜後遞送來投與。該等方法已為業內已知。舉例而言，對於視網膜藥物遞送之例示性眼周路徑的說明，參見Raghava等人, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2004, 1(1):99-114。

組合物可投與(例如)玻璃體、房水、鞏膜、結膜、鞏膜與結膜之間之區域、視網膜 脈絡膜組織、黃斑或個體眼中或靠近眼之其他區域。組合物亦可以植入體形式投與個體。較佳植入體係生物相容及/或生物可降解之持續釋放調配物，其在一段時間內逐漸釋放化合物。藥物遞送之眼部植入體已為業內熟知。例如，參見美國專利第5,501,856號、第5,476,511號及第6,331,313號。組合物亦可使用電離子透入法(包括但不限於美國專利第4,454,151號及美國專利申請公開案第2003/0181531號及第2004/0058313號中所述之電離子透入方法)投與個體。

組合物之最佳有效量可按經驗確定且將取決於疾病之類型及嚴重程度、投與路徑、疾病進展及個體之健康狀況、質量及身體區域。該等確定為熟習此項技術者已知。舉例而言，在眼內投與時，可以DNase抗性粒子(drp)效價為約 10^4 至約 10^{14} drp/劑量向個體投與一定量之包含編碼本文所述融合蛋白之核酸的rAAV。在一些實施例中，可以約 10^5 至約 10^{13} 、約 10^6 至約 10^{12} 、約 10^7 至約 10^{11} 、約 10^8 至約 10^{10} 、約 10^9 至約 10^{10} 、約 10^{10} 至約 10^{11} 或約 10^{11} 至約 10^{12} drp/劑量向個體投與一定量之包含編碼融合蛋白之核酸之rAAV。

包含融合蛋白之組合物可以單一日劑量投與，或總日劑量可以每日兩次、三次或四次之分開劑量投與。包含融合蛋白之組合物亦可一週六次、一週五次、一週四次、一週三次、一週兩次、一週一次、每兩週一次、每三週一次、一月一次、每兩個月一次、每三個月一次、每六個月一次、每九個月一次或每年一次投與。包含含有編碼融合蛋白之核酸之rAAV的組合物可投與較不頻繁，例如，每三個月一次、每四個月一次、每五個月一次、每六個月一次、每七個月一次、每八個月一次、每九個月一次、每十個月一次、每十一個月一次或每年一次。在一些實施例中，包含含有編碼本文所述融合蛋白之核酸之

rAAV的組合物之單一劑量每年投與一次。組合物亦可於持續釋放調配物中、例如於植入體中投與，該植入體在一段時間內逐漸釋放化合物以使用，且允許較不頻繁地投與組合物，例如一月一次、每2-6個月一次、每年一次或甚至單一投與。持續釋放裝置(例如丸粒、奈米粒子、微粒、奈米球、微球體及諸如此類)可藉由注射投與或手術植入於眼或與眼相關之組織中之不同位置中(例如眼內、玻璃體內、視網膜下、眼周、結膜下、或特農囊下)。

本發明組合物(例如，融合蛋白或包含編碼融合蛋白之核酸之rAAV)可單獨或與一或多種其他治療劑組合使用。舉例而言，本發明組合物可單獨投與或與已知對年齡相關性黃斑變性(AMD)、視網膜附著或受損視網膜組織具有有益效應之其他治療劑組合投與。例示性治療劑包括補體抑制劑、抗血管生成劑、抗VEGF試劑(包括但不限於Macugen (哌加他尼鈉(pegaptanib sodium))、Eylea (VEGF Trap-Eye)及抗VEGF抗體(例如Lucentis®或Avastin®)及抗PDGF試劑(例如Fostiva™)。本發明組合物可與顯示有益於降低黃斑變性進展至晚期階段之風險之營養補充劑(例如，維生素C、維生素E、β胡蘿蔔素、鋅氧化物及銅)組合投與。其他有用之輔因子包括減輕症狀之輔因子，包括殺菌劑、抗生素、抗病毒及抗真菌劑及鎮痛藥及麻醉劑。在一些實施例中，以同時投與形式提供組合，其中融合蛋白或包含編碼融合蛋白之核酸及至少一種治療劑之rAAV在相同組合物中一起投與或在不同組合物中同時投與。在一些實施例中，以單獨投與形式提供組合，其中融合蛋白或包含編碼融合蛋白之核酸之rAAV之投與可在至少一種治療劑之投與之前、同時及/或之後發生。依序投與之間之間隔可按照至少(或另一選擇為，小於)分鐘、小時或天。

本文所述組合物亦可結合其他AMD療法(例如光動力療法)使用。光動力療法需要靜脈內投與維速達爾(Visudyne，維替泊芳

(verteporfin))，其後將特定波長之光施加至異常血管。光激活維速達爾並除去血管。或者，本文所述組合物可與雷射療法結合使用，此需要使用高能雷射束以破壞黃斑下方之異常血管。

VIII. 製品及套組

亦提供呈適宜包裝之包含本文所述組合物(例如，融合蛋白或rAAV粒子)的套組或製品。適於本文所述組合物(例如眼用組合物)之包裝已為業內已知，且包括(例如)小瓶(例如密封小瓶)、容器、安瓿、瓶、罐、撓性包裝(例如，密封Mylar或塑膠袋)及諸如此類。該等製品可進一步經滅菌及/或密封。

本發明亦提供包含本文所述組合物之套組且可進一步包含關於使用組合物之方法(例如本文所述用途)之說明。本文所述套組可進一步包括自商業及用戶角度所期望之其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、濾器、針、注射器及具有實施本文所述任何方法之說明之包裝插頁。舉例而言，在一些實施例中，套組包含本文所述融合蛋白/或編碼本文所述融合蛋白之rAAV、適於眼內注射之醫藥上可接受之載劑及以下中之一或多者：緩衝液、稀釋劑、濾器、針、注射器及具有實施眼內注射之說明之包裝插頁。

實例

實例1：sPDGFR- β /Fc融合蛋白之產生。

PDGF- β 受體(PDGFR- β)胞外結構域含有5個自蛋白質之N末端至C末端編碼為1至5個之細胞外結構域(ECD)。使用全長PDGFR- β 胞外結構域以產生若干經截短可溶性PDGFR- β (PDGFR- β)單體及二聚體蛋白質(圖1A)。

製造兩個PDGFR- β 單體構築體，其在全長PDGFR- β 胞外結構域PDGFR(D1-D5) (SEQ ID NO:7)之N末端或在含有前四個ECD之PDGFR- β 胞外結構域PDGFR(D1-D4) (SEQ ID NO:8)之N末端處含有

PDGFR- β 信號肽(SP)。三個PDGFR- β 二聚體構築體係藉由將PDGFR- β 胞外結構域(ECD)之所有五個、前三個或前三個結構域經由由9個甘胺酸殘基(9Gly)組成之肽連接體融合至人類免疫球蛋白G1重鏈片段(IgG1 Fc)之N末端產生且分別稱為PDGFR(D1-D5)9G-Fc (SEQ ID NO:9)、PDGFR(D1-D3)9G-Fc (SEQ ID NO:10)及PDGFR(D1-D2)9G-Fc (SEQ ID NO:11)。類似於單體構築體，所有二聚體構築體皆在融合全長或經截短PDGFR- β 胞外結構域之N末端含有SP。對於PDGFR(D1-D2)9G-Fc之構築而言，一起使用質粒pCMV6-XL5-PDGFRB (目錄編號SC309979; Origene, Rockville, MD)與引物作為模板，該等引物向模板中引入限制位點 SpeI (PDGFRBPR6SpeI F: 5'-GACTAGTATGCGGCTTCCGGGTG (SEQ ID NO:25) 及 AgeI (PDGFRBPR7AgeI R: 5'-ACCGGTGGATGACACCTGGAGTCTG (SEQ ID NO:26)。在以下循環參數下達成PCR產物之擴增：於50°C下1個循環達2 min，於95°C下1個循環達10 min，95°C下40個循環達15 sec，及60°C達60 sec。使用TOPO Cloning Kit (Invitrogen)將PCR產物插入pCR-Blunt II-TOPO質粒中且藉由測序來驗證PCR產物插入物之序列，然後亞選殖至質粒pCMV/K-D2-9Gly-Fc (關於pCMV/K-D2-9Gly-Fc之說明，參見Pechan P.等人，*Gene Ther.* (2009), 16:10-16)之SpeI及AgeI位點中，以在CMV啟動子及SV40多腺苷酸化序列之控制下生成具有PDGFR(D1-D2)9G-Fc (SEQ ID NO:20)之開放閱讀框之質粒pCMV-PDGFR-S-(D1-D2)-9Gly-Fc。對於PDGFR(D1-D5)9G-Fc之構築而言，一起使用質粒pCMV6-XL5-PDGFRB (目錄編號SC309979; Origene, Rockville, MD)與引物作為模板，該等引物向模板中引入限制位點 AccI (PDGFRB-PR1-Acc F: 5'-CTATGTCTACAGACTCCAGGTGTC (SEQ ID NO:27)及AgeI (D5-PR9-AgeI-Rev R: 5'-ACCGGTAAAGGGCAAGGAGTGTGGC (SEQ

ID NO:28)。在以下循環參數下達成PCR產物之擴增：於50℃下1個循環達2 min，於95℃下1個循環達10 min，95℃下40個循環達15 sec，及60℃達60 sec。隨後使用TOPO Cloning Kit (Invitrogen)將PCR產物插入pCR-Blunt II-TOPO質粒中並藉由測序驗證pTOPO-PDGFRB (D3-D5)中之PCR產物插入物之序列。將來自質粒pCMV-PDGFR-S-(D1-D2)-9Gly-Fc之622個鹼基對(bp) SpeI-AccI片段插入質粒pTOPO-PDGFRB (D3-5)之SpeI及AccI位點中以生成質粒pTOPO-PDGFR(D1-D5)。隨後將來自質粒pTOPO-PDGFR(D1-D5)之1,596 bp SpeI-AgeI片段插入質粒pCMV-PDGFR-S-(D1-D2)-9Gly-Fc之SpeI及AgeI位點中以在CMV啟動子及SV40多腺苷酸化序列之控制下生成具有PDGFR(D1-D5)9G-Fc (SEQ ID NO:18)之開放閱讀框之質粒pCMV-PDGFR-(D1-D5)-9Gly-Fc。對於PDGFR(D1-D3)9G-Fc之構築，一起使用質粒pCMV-PDGFR (D1-5)9G-Fc及引物作為模板，該等引物向模板中引入限制位點 SpeI (PDGF02 F: 5'-CCTCCACCGGTGTAGCCGCTCTCAACCACGGT (SEQ ID NO:29)及 AgeI (PDGF03 R: 5'-CCCGGGACTAGTATGCGGCTTCCGGGTG (SEQ ID NO:30)。在以下循環參數下達成PCR產物之擴增：於95℃下1個循環達1 min，95℃下35個循環達30 sec，60℃達30 sec及72℃達1 min。將PCR產物插入質粒pCMV-PDGFR (D1-5)9G-Fc之SpeI及AgeI位點中以完成PDGFR (D1-3)9G-Fc (SEQ ID NO:19)之開放閱讀框。對於PDGFR(D1-D5)之構築，將質粒pCMV-sPDGFR(D1-D5)-9G-Fc之5307 bp AgeI-EagI片段連接至由寡核苷酸 D5-SV40 F: CCGGTTAGGGA (SEQ ID NO:31)及D5-SV40 B-2: GGCCTCCCTAA (SEQ ID NO:32)組成之經退火寡核苷酸片段，以在CMV啟動子及SV40多腺苷酸化序列之控制下生成具有PDGFR(D1-D5) (SEQ ID NO:16)之開放閱讀框之質粒pCMVPDGFRB (D1-D5)。對於

PDGFR(D1-D4)之構築，將質粒pCMV-sPDGFR(D1-D5)-9G-Fc之4924 bp BbvCI-EagI 片段連接至由寡核苷酸 D4-SV40 F : TGAGGTCCAGCTCTCCTTCCAGCTACAGATCAATGTCCCTGTCCGA GTGCTGGAGTAGC (SEQ ID NO:33) 及 D4-SV40 B: GGCCGCTACTCCAGCACTCGGACAGGGACATTGATCTGTAGCTGG AAGGAGAGCTGGACC (SEQ ID NO:34)組成之經退火寡核苷酸片段，以在CMV啟動子及SV40多腺苷酸化序列之控制下生成具有PDGFR(D1-D4) (SEQ ID NO:17)之開放閱讀框之質粒pCMV-PDGFRB (D1-D4)。

成熟蛋白質(不包括SP區)之預測分子量對於PDGFR(D1-D5)係56.2 kDa且對於PDGFR(D1-D4)係43.6 kDa。作為單體之成熟蛋白質(不包括SP區)之預測分子量對於PDGFR(D1-D5)9G-Fc係82.7 kDa，對於PDGFR(D1-D2)9G-Fc係46.7 kDa，且對於PDGFR(D1-D3)9G-Fc係58.2 kDa。編碼該等蛋白質構築體之質粒用於轉染293細胞。轉染後72小時收集細胞之培養基且使用粗條件培養基(CM)分析所分泌PDGFR(D1-D5)、PDGFR(D1-D4)、PDGFR(D1-D5)9G-Fc、PDGFR(D1-D2)9G-Fc及PDGFR(D1-D3)9G-Fc蛋白質。藉由西方印跡分析確認PDGFR(D1-D5)9G-Fc、PDGFR(D1-D2)9G-Fc及PDGFR(D1-D3)9G-Fc蛋白質同源二聚體藉由經其各別構築體轉染之細胞之產生。簡言之，將自細胞培養基純化之分泌蛋白質裝載至經還原或未經還原聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)凝膠中。亦將自經EGFP構築體轉染之細胞之細胞培養基純化的增強綠色螢光蛋白質(EGFP)裝載於凝膠上並用作對照。在SDS-PAGE凝膠(NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris, Invitrogen)上分離蛋白質後，將蛋白質轉移至硝酸纖維素膜。用生物素化山羊抗人類PDGFR-β抗體(R&D Systems)探測膜，之後用連接至辣根過氧化物酶(R&D Systems)之鏈黴抗生物素蛋白標記並在成像之

前用化學發光試劑(ThermoScientific Pierce)顯影。PDGFR(D1-D5)9G-Fc、PDGFR(D1-D2)9G-Fc及PDGFR(D1-D3)9G-Fc蛋白質之遷移率在經還原及未經還原條件下改變，而PDGFR(D1-D5)及PDGFR(D1-D4)單體蛋白質之遷移率保持未變，指示PDGFR- β /Fc融合蛋白形成同源二聚體(圖1B)。

使用無細胞之體積PDGF結合分析系統測定PDGF BB配體與PDGFR- β 單體及二聚體蛋白質之間之相對結合親和力(圖2)。對於PDGFR- β 單體及二聚體蛋白質之產生，將293細胞用編碼PDGFR(D1-D5)、PDGFR(D1-D4)、PDGFR(D1-D5)9G-Fc、PDGFR(D1-D2)9G-Fc或PDGFR(D1-D3)9G-Fc蛋白質之質粒轉染且轉染後72小時收穫細胞培養基。在結合親和力分析之前藉由ELISA及西方印跡分析確認分泌PDGFR- β 單體及二聚體蛋白質之存在。將所分泌蛋白質連續稀釋，與人類PDGF BB配體(20 pM最終濃度)配體混合並於室溫下在回轉式振盪器平臺上培育過夜。隨後藉由人類PDGF特異性ELISA (Human PDGF-BB DuoSet產品編號DY220, R&D Systems)量測未結合PDGF BB之量。使用Prism 5.0d (GraphPad Software公司)分析結合親和力之統計顯著性且使用2因子ANOVA測試進行計算，之後Bonferroni校正。結合親和力分析顯示單體PDGFR(D1-D4)蛋白質較含有所有5個ECD之單體PDGFR(D1-D5)蛋白質以顯著(** $P < 0.001$)較高親和力結合PDGF(圖2A)。然而，用作PDGF結合之陽性對照之二聚體全長PDGFR(D1-D5)9G-Fc蛋白質較單體PDGFR(D1-D4)及PDGFR(D1-D5)二者係顯著(** $P < 0.001$)更好之PDGF結合劑(圖2A)。在三種生成之二聚體IgG1 Fc偶聯PDGFR- β 構築體中，具有前三個ECD之構築體PDGFR(D1-D3)9G-Fc較全尺寸PDGFR(D1-D5)9G-Fc蛋白質係顯著(** $P < 0.001$)更好之PDGF結合劑，而具有前兩個ECD之構築體PDGFR(D1-D2)9G-Fc不顯示PDGF-結合親和力(圖2B)。

實例2：雜合體VEGFR1/ PDGFR-β及PDGFR-β/VEGFR-1蛋白質之生成。

Flt-1受體(VEGFR-1)胞外結構域含有7個自蛋白質之N末端至C末端編號為1至7之細胞外結構域(ECD)。為阻斷PDGF BB及VEGF配體二者，生成包含PDGFR-β及VEGFR1之ECD之融合蛋白且其稱作雜合蛋白(圖3)。

使用由連接至人類免疫球蛋白G1重鏈片段(IgG1 Fc)之人類VEGFR1之ECD 2組成的先前生成之VEGF-結合蛋白質sFLT01以生成編碼VEGFR1/ PDGFR-β或PDGFR-β/VEGFR1雜合蛋白之DNA構築體。關於sFLT01蛋白質之說明，參見Pechan P.等人 *Gene Ther.* (2009), 16:10-16，其全文以引用方式併入本文中。藉由將含有VEGFR1信號肽(SP)及VEGFR1 ECD 2之sFLT01之片段經由由9個絲胺酸殘基(9Ser)組成之肽連接體連接至PDGFR-β ECD 1-5之N末端構築VEGFR1/ PDGFR-β雜合體1 (SEQ ID NO:12)，該9個絲胺酸殘基經由由9個甘胺酸殘基(9Gly)組成之肽連接體進一步連接至IgG1 Fc。藉由將PDGFR-β ECD 1-5及PDGFR-β SP經由9Ser肽連接體連接至VEGFR1 ECD 2之N末端構築PDGFR-β/VEGFR1雜合體2 (SEQ ID NO:13)，該9Ser肽連接體經由9Gly肽連接體進一步連接至IgG1 Fc。VEGFR1/ PDGFR-β雜合體3 (SEQ ID NO:14)及PDGFR-β/VEGFR1雜合體4 (SEQ ID NO:15)分別類似地由雜合體1及2組成，除使用PDGFR-β ECD 1-3替代PDGFR-β ECD 1-5外。對於VEGFR1/PDGFR-β雜合體1之構築，將編碼融合至包含9個絲胺酸(9Ser)連接體(SEQ ID NO:35)之VEGFR1結構域D2之VEGFR1信號肽的372 bp SpeI-XhoI片段Kozak-SP-D2-9Ser插入質粒 pTOPO-PDGFR(D1-D5)之 SpeI 及 XhoI 位點以生成質粒 pTOPO-(D2-9Ser)-PDGFR(D1-D5)。將質粒 pTOPO-(D2-9Ser)-PDGFR(D1-D5)之 SpeI-AgeI 片段插入質粒 pCMV-PDGFR-(D1-D5)-

9Gly-Fc之SpeI-AgeI位點以在CMV啟動子及SV40多腺苷酸化序列之控制下生成具有VEGFR1/PDGFR- β 雜合體1 (SEQ ID NO:21)之開放閱讀框之pCMV-F(D2-9S)-P(D1-D5)-9G-Fc或pCMV-雜合體1。對於PDGFR- β /VEGFR1雜合體2之構築，將含有合成DNA (GenScript) (SEQ ID NO:36)之678 bp BstBI-BmgXI片段與質粒pCMV-sPDGFR(D1-D5)-9G-Fc之5626 bp BstBI-BmgXI片段連接以在CMV啟動子及SV40多腺苷酸化序列之控制下生成具有PDGFR- β /VEGFR-1雜合體2 (SEQ ID NO:22)之開放閱讀框的pCMV- P(D1-D5)-9S- F(D2)-9G-Fc或pCMV-雜合體2。對於VEGFR1/PDGFR- β 雜合體3之構築，將含有合成DNA (GenScript) (SEQ ID NO:37)之452 bp BmgBI- PshAI片段與質粒pCMV-P(D1-D5)-9S- F(D2)-9G-Fc或pCMV-雜合體2之5334 bp BmgBI- PshAI片段連接以在CMV啟動子及SV40多腺苷酸化序列之控制下生成具有VEGFR1/PDGFR- β 雜合體3 (SEQ ID NO:23)之開放閱讀框的pCMV-F(D2-9S)-P(D1-D3)-9G-Fc或pCMV-雜合體3。對於PDGFR- β /VEGFR1雜合體4之構築，將含有合成DNA (GenScript) (SEQ ID NO:38)之758 bp BmgBI- PshAI片段與質粒pCMV- P(D1-D5)-9S- F(D2)-9G-Fc或pCMV-雜合體2之5021 bp BmgBI- PshAI片段連接，以在CMV啟動子及SV40多腺苷酸化序列之控制下生成具有PDGFR- β /VEGFR1雜合體4 (SEQ ID NO:24)之開放閱讀框的pCMV- P(D1-D3)-9S- F(D2)-9G-Fc或pCMV-雜合體4。

藉由西方印跡分析確認雜合體1、雜合體2、雜合體3及雜合體4蛋白質同源二聚體由經其各別構築體轉染之細胞之產生。簡言之，將細胞培養基之分泌蛋白質裝載至經還原或未經還原聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)凝膠中。亦將PDGFR(D1-D5)9G-Fc蛋白質裝載於凝膠上並用作對照。在SDS-PAGE凝膠(NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris, Invitrogen)上分離蛋白質後，將蛋白質轉移至硝酸纖維素膜。用生物

素化山羊抗人類PDGFR- β 抗體(R&D Systems)探測膜，之後用連接至辣根過氧化物酶(R&D Systems)之鏈黴抗生物素蛋白標記並在成像之前用化學發光試劑(ThermoScientific Pierce)顯影。與經還原條件相比，在未經還原條件下雜合體1、2、3及4之蛋白質遷移率確認雜合蛋白二聚化(圖4)。皆含有5個PDGFR- β ECD之PDGFR(D1-D5)9G-Fc及雜合體1及2顯示在還原條件下兩個PDGFR陽性帶，此表明在第五PDGFR- β ECD之區域中該等蛋白質可能蛋白水解解離(圖4，左圖)。僅含有前三個PDGFR- β ECD之雜合體3及4似乎不解離，指示其不含雜合體1及2中觀察到之蛋白水解解離位點(圖4，左圖)。

實例3：HUVEC增殖由PDGFR- β /VEGFR1雜合蛋白之抑制。

測試雜合PDGFR- β / VEGFR1蛋白質抑制人類臍靜脈內皮細胞(HUVEC)之VEGF-及/或PDGFR- β 誘導之增殖的能力。對於雜合蛋白之產生，將293細胞用編碼雜合體1、雜合體2、雜合體3或雜合體4之構築體轉染且轉染後72小時收穫含有分泌雜合蛋白之細胞培養基。在VEGF配體存在下將收穫細胞培養物施加至HUVEC。將HUVEC(HUVEC- Cambrex Bio Science Walkersville公司)以2,000個細胞/孔之密度接種於補充有5%胎牛血清(Invitrogen)之培養基199 (Invitrogen)中之96孔板中並沉降過夜。在培育後，將培養基更換為培養基199 (Invitrogen)，該培養基補充有以100 μ l/孔之最終體積含有相等體積(5 μ l)之自三個獨立性受體或對照轉染生成之收穫細胞培養物以及最終濃度為10 ng/ml之僅重組hVEGF-165配體(R&D Systems目錄編號293-VE)或與最終濃度為20 ng/ml之PDGF-BB配體(R&D Systems目錄編號220-BB)組合的5%胎牛血清(Invitrogen)。陰性對照由相等體積(5 μ l)之經100 μ L最終體積/孔之EGFP構築體轉染之收穫細胞培養物組成。陽性對照包括相等體積(5 μ l)之在100 μ L最終體積/孔之VEGF配體或VEGF及PDGF BB配體存在下經EGFP構築體轉染之細胞的收穫細胞培

養物。將細胞於37°C下在5% CO₂中培育三至四天。以20 μl/孔添加Cell Titer 96 AQueous One Solution Reagent (Promega目錄編號G3580)並4小時後取490 nm下之吸光率。在VEGF依賴性HUVEC增殖分析中，雜合體2、雜合體3及雜合體4顯著阻斷HUVEC增殖，其中雜合體2及4與sFLT01具有類似效能(圖5A)。與雜合體2、3及4相比，雜合體1不阻斷VEGF誘導之HUVEC增殖且與無VEGFR1 ECD之PDGFR(D1-D5)9G-Fc蛋白質具有類似程度之抗增殖活性(圖5A)。雜合體1中之二聚化IgG1-Fc序列之蛋白水解切除可能經由其VEGF結合能力消除，此乃因在不存在ECD時，二聚化係VEGFR1 D2調介之VEGF結合之限制因素(Pechan P.等人 *Gene Ther.* (2009), 16:10-16)。在雜合體2中，然而，蛋白水解解離將分子分成仍能夠結合VEGF之含有PDGFR-β ECD及sFLT01之單元(圖5A)。亦在HUVEC競爭性增殖分析中測試所收穫雜合PDGFR-β/VEGFR1蛋白質。在此分析中，在如上文所述VEGF配體及PDGF BB配體二者存在下將所收穫細胞培養物施加至HUVEC。此分析之結果與先前分析之類似之處在於雜合體2及雜合體4顯著阻斷HUVEC增殖，其中雜合體2及4具有與sFLT01類似之效能(圖5B)。在兩種配體存在下，雜合體1亦不阻斷HUVEC增殖。與最後分析相反，在兩種配體存在下雜合體3具有較弱抗增殖效能，且與無VEGFR1 ECD之PDGFR(D1-D5)9G-Fc蛋白質之活性相當(圖5B)。使用Prism 5.0d (GraphPadSoftware公司)分析兩個HUVEC增殖分析之統計顯著性且使用單因子ANOVA測試進行計算，之後Tukey測試。

實例4：PDGFR-β/VEGFR1雜合蛋白之結合親和力。

使用無細胞之體積PDGF或VEGF結合分析系統測定VEGF及PDGF BB兩種配體與PDGFR-β/VEGFR1雜合蛋白之間之相對結合親和力(圖6)。對於雜合PDGFR-β/VEGFR1蛋白質之產生，將293細胞用編碼雜合體1、雜合體2、雜合體3或雜合體4之質粒轉染。亦用編碼

PDGFR(D1-D5)9G-Fc或sFLT01蛋白質之質粒轉染細胞用作結合對照。轉染後72小時收穫細胞培養基且在結合親和力分析之前藉由ELISA及西方印跡分析確認分泌蛋白質之存在。將所分泌蛋白質連續稀釋，與人類VEGFR1配體(20 pM最終濃度)或人類PDGF BB配體(80 pM最終濃度)混合並於室溫下在回轉式振盪器平臺上培育過夜。隨後藉由人類VEGF特異性ELISA (Human VEGF Quantikine ELISA套組目錄編號DVE00, R&D Systems)或人類PDGF特異性ELISA (Human PDGF-BB DuoSet, R&D Systems)量測未結合PDGF BB之量。VEGF結合分析中所有四個雜合體之比較顯示雜合體1係最弱之VEGF結合劑(圖6A)。自一個分析中三個個別轉染收穫之條件培養基中的雜合體3、雜合體4及sFLT01之VEGF結合比較顯示雜合體4類似於sFLT01結合VEGF且係較雜合體3強之VEGF結合劑(圖6A)。PDGF結合分析中所有四個雜合體之比較證實雜合體1亦係最弱之PDGF結合劑，而雜合體4證實在所有四個雜合體中結合最佳(圖6B)。

使用自經編碼雜合體3、雜合體4、PDGFR(D1-D3)9G-Fc或sFLT01蛋白質之構築體轉染之293細胞收穫的條件培養基實施競爭性VEGF及PDGF無細胞之結合分析。轉染後72小時收穫細胞培養基且在結合親和力分析之前藉由ELISA及西方印跡分析確認分泌蛋白質之存在。將所分泌蛋白質連續稀釋，與人類PDGF BB配體(20 pM最終濃度)及人類VEGFR1配體(20 pM最終濃度)二者混合並於室溫下在回轉式振盪器平臺上培育過夜。隨後藉由人類VEGF特異性ELISA (Human VEGF Quantikine ELISA套組目錄編號DVE00, R&D Systems)或人類PDGF特異性ELISA (Human PDGF-BB DuoSet, R&D Systems)量測未結合PDGF-BB及VEGF配體之量。雜合體3及雜合體4與PDGF BB結合對照(PDGFR(D1-D3)9G-Fc)及VEGF結合對照(sFLT01)之比較顯示雜合體3及雜合體4二者結合至PDGF BB (圖7A)及VEGF (圖7B)配體，其

中雜合體4證實對兩種配體具有更高結合親和力。使用來自表現雜合體3、雜合體4、PDGFR(D1-D5)9G-Fc或PDGFR(D1-D3)9G-Fc之細胞之細胞培養基的PDGF結合比較證實雜合體4與最佳PDGF結合劑PDGFR(D1-D3)9G-Fc具有類似親和力(圖7A)，而PDGFR(D1-D5)9G-Fc係較所有雜合體1至4 (圖6B)或PDGFR(D1-D3)9G-Fc (圖2B)顯著更弱之PDGF結合劑。

實例5：小鼠中雷射誘導之CNV由雜合PDGFR- β /VEGFR1蛋白質之抑制。

腺相關病毒(AAV)載體由於非病原性質、最小毒性及免疫原性、其轉導未分裂細胞之能力及其對治療蛋白之壽命表現之潛能係用於眼內基因遞送之有吸引力之工具(Ali等人 1996; Ali等人 1997; Ali等人, 1998; Lai等人 2005)。

對於雜合體4之腺相關病毒調介之遞送，由雞 β -肌動蛋白啟動子-CMV內含子/增強子替代CMV啟動子且將包含啟動子及編碼雜合體4之片段之表現盒插入前病毒質粒載體pAAVSP70之RsrII及MluI位點。參見Ziegler等人，*Mol Ther.*, 2004; 9: 231-240。質粒sp70.BR/雜合體4中之所得AAV基因組之總大小係4.6 kb。重組載體AAV2.雜合體4係藉由使用輔助質粒p5rep-D-CMVcap及pHelper (Stratagene, La Jolla, CA, USA)藉由293細胞之三重轉染產生，且根據製造商之方案使用碘克沙醇分級梯度及HiTrap Heparin管柱(GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA)在 $\square$ KTA FPLC系統(GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ)上進行純化。參見Vincent等人，*J Virol.*, 1997; 71: 1897-1905。AAV2.雜合體4病毒製劑具有 2.2×10^{12} drp (DNase抗性粒子)/ml之效價。使用實時TaqMan PCR分析(ABI Prism 7700; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)測定病毒效價。如美國專利第7,928,072號中先前所述使用編碼VEGFR1 D2-9Gly-CH3蛋

白質(SEQ ID NO:39)之核酸(SEQ ID NO:40)構築AAV2.sFLT02。在小鼠脈絡膜新生血管形成(CNV)雷射模型中藉由玻璃體內遞送投與AAV2. 雜合體4、AAV2.sFLT02或AAV2.PDGFR (PDGFR = PDGFR(D1-D3)9G-Fc)以評定雜合體4在CNV之抑制中之活體內功效。簡言之，在第0研究天利用向左眼(OS)中單一玻璃體內注射1 E9 drp AAV2.雜合體4、AAV2.sFLT02或AAV2.PDGFR處理正常成年C57BL/6小鼠之眼，而右眼(OD)未經處理。在第28研究天在雙眼中使用雷射(每只眼放置3個燒傷，200 mW功率，50 μ m斑點，100 ms)誘導CNV。對小鼠灌注5 mg/mL 2.0×10^6 分子量FITC-葡聚糖並在第42研究天無痛致死。採集眼，固定於10%中性緩衝福爾馬林中且隨後製備脈絡膜鋪片以檢查新生血管形成之程度。比較經處理(OS)眼與對側(OD)眼中無CNV之燒傷之數目。活體內功效之分析證實AAV2.雜合體4之單一玻璃體內注射較AAV2.sFLT02在抑制視網膜新生血管形成中更有效(圖8)。此外，在鼠類雷射誘導之CNV模型中，AAV2.PDGFR不抑制視網膜新生血管形成(圖8)。

序列

PDGFR細胞外區D1-D3胺基酸序列

LVVTPPGPELVNLVSSTFVLTCSGSAPVWVERMSQEPPQEMAKAQDGTFFSSVLTLTNLT
GLDTGEYFCTHNSRGLTDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTD
PQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYVYRLQVS
SINVSVNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFEWTPRKESGRLVEPVTDFLLDMPYHI
RSILHIPSAELEDSTYTCNVTESVNDHQDEKAINITVVESGY (SEQ ID NO:1)

PDGFR細胞外區D1-D4胺基酸序列

LVVTPPGPELVLNVSSTFVLTCSGSAPVVWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLT
GLDTGEYFCTHNSRGLTDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTD
PQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVS
SINVSVNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFEWYTPRKESGRLVEPVTDFLLDMPYHI
RSILHIPSAELEDSTYTCNVTESVNDHQDEKAINITVVESGYVRLLGEVGTQLQFAELHRS
RTLQVVFEAYPPPTVLWFKDNRTLGDSSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAG
HYTMRAFHEDAQVLSFQLQINVPVRVLE (SEQ ID NO:2)

PDGFR細胞外區D1-D5胺基酸序列

LVVTPPGPELVLNVSSTFVLTCSGSAPVVWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLT
GLDTGEYFCTHNSRGLTDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTD
PQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVS
SINVSVNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFEWYTPRKESGRLVEPVTDFLLDMPYHI
RSILHIPSAELEDSTYTCNVTESVNDHQDEKAINITVVESGYVRLLGEVGTQLQFAELHRS
RTLQVVFEAYPPPTVLWFKDNRTLGDSSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAG
HYTMRAFHEDAQVLSFQLQINVPVRVLELSESHPDSEGTVCRCRGRGMPQPNIIWSAC
RDLKRCPRELPPTLLGNSSEESQLETNVTYWEEQEFEVSTLRLQHVDRLSVRCTLR
NAVGQDTQEVIVPHSLPFK (SEQ ID NO:3)

VEGFR1細胞外區D2胺基酸序列

RPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRRIWDSRKGFIIISN
ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQT (SEQ ID NO:4)

VEGFR1細胞外區D1-D3胺基酸序列

PELSLKGQTQHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGKQFCS
TLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGREL
ELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRRIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHL
YKTNYLTHRQTNTHIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNK
RASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDKMQNKDGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDK
(SEQ ID NO:5)

IgG1 Fc區胺基酸序列

PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO:6)

具有分泌肽(加下劃線)之PDGFR(D1-D5)胺基酸序列

MRLPGAMPALALKGELLLLSLLLLLEPQISQGLVVTTPPGPELVLVNSSTFVLTCSGSAPV
VWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERKRLYIF
VPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDLPQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFF
GIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSINVSVNAVQTVVRQGENITLMCIVIGN
EVVNFEWTYPRKESGRLVEPVTDFLLDMPYHIRSILHIPS AELEDSGTYTCNVTESVNDH
QDEKAINITVVESGYVRLLEGEVGT LQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTVLWFKDNRTLGD
SSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAGHYTMRAFHEDAEVQLSFQLQINVPVR
VLELSESHPDSGEQT VRCRGRGMPQPNIIWSACRDLKRCPRELPPTLLGNSSEESQLET
NVTYWEEEQEFVVSTLRLQHVDRLSVRCTLRNAVGQDTQEVIVVPHSLPFK (SEQ ID
NO:7)

具有分泌肽(加下劃線)之 PDGFR(D1-D4)胺基酸序列

MRLPGAMPALALKGELLLLSLLLLLEPQISQGLVVTTPPGPELVLVNSSTFVLTCSGSAPV
VWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERKRLYIF
VPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDLPQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFF
GIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSINVSVNAVQTVVRQGENITLMCIVIGN
EVVNFEWTYPRKESGRLVEPVTDFLLDMPYHIRSILHIPS AELEDSGTYTCNVTESVNDH
QDEKAINITVVESGYVRLLEGEVGT LQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTVLWFKDNRTLGD
SSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAGHYTMRAFHEDAEVQLSFQLQINVPVR
VLE (SEQ ID NO:8)

具有分泌肽(加下劃線)之 PDGFR(D1-D5)9G-Fc胺基酸序列

MRLPGAMPALALKGELLLLSLLLLLEPQISQGLVVTTPPGPELVLVNSSTFVLTCSGSAPV
VWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERKRLYIF
VPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDLPQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFF
GIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSINVSVNAVQTVVRQGENITLMCIVIGN
EVVNFEWTYPRKESGRLVEPVTDFLLDMPYHIRSILHIPS AELEDSGTYTCNVTESVNDH
QDEKAINITVVESGYVRLLEGEVGT LQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTVLWFKDNRTLGD
SSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAGHYTMRAFHEDAEVQLSFQLQINVPVR
VLELSESHPDSGEQT VRCRGRGMPQPNIIWSACRDLKRCPRELPPTLLGNSSEESQLET
NVTYWEEEQEFVVSTLRLQHVDRLSVRCTLRNAVGQDTQEVIVVPHSLPFKGGGGG
GGGGPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K (SEQ ID NO:9)

具有分泌肽(加下劃線)之 PDGFR(D1-D3)9G-Fc胺基酸序列

MRLPGAMPALALKGELLLLSLLLLLEPQISQGLVVTTPGPELVLNVSSTFVLTCSGSAPV
VWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERKRLYIF
VPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDQPQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFF
GIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSINVSVNAVQTVVRQGENITLMCIVIGN
EVVNFEWTPRKESGRLVEPVTDFLLDMPYHIRSILHIPSAAELEDSTYTCNVTESVNDH
QDEKAINITVVESGYGGGGGGGGGPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:10)

具有分泌肽(加下劃線)之PDGFR(D1-D2)9G-Fc胺基酸序列

MRLPGAMPALALKGELLLLSLLLLLEPQISQGLVVTTPGPELVLNVSSTFVLTCSGSAPV
VWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERKRLYIF
VPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDQPQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFF
GIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSGGGGGGGGGPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:11)

雜合體1胺基酸序列

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTL
KKFPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTSSSSS
SSSSQISQGLVVTTPGPELVLNVSSTFVLTCSGSAPV VWERMSQEPPQEMAKAQDGTFS
VLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEI
TIPCRVTDQPQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYY
VYRLQVSSINVSVNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFEWTPRKESGRLVEPVTD
FLLDMPYHIRSILHIPSAAELEDSTYTCNVTESVNDHQDEKAINITVVESGYVRLLEGEVGT
LQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTVLWFKDNRTLGDSSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVR
VKVAEAGHYTMRAFHEDAQVLSFQLQINVPVRVLELSESHPDSEGTQVRCRGRGMPQ
PNIIWSACRDLKRCPRELPPTLLGNSSEEEESQLETNVTYWEEEQEFVVSTLRLQHVD
RPLSVRCTLRNAVGQDTQEVIVVPHSLPFTGGGGGGGGGPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:12)

雜合體2胺基酸序列

MRLPGAMPALALKGELLLLLSLLLLLEPQISQGLVVTTPGPELVLNVSSSTFVLTCGSAPV
VWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERKRLYIF
VPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDLPQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFF
GIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSINVSVNAVQTVVRQGENITLMCIVIGN
EVVNFETYPRKESGRLVEPVTDFLDMPYHIRSILHIPSAELEDSTYTCNVTESVNDH
QDEKAINITVVESGYVRLGEGVTLQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTVLWFKDNRTLGD
SSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAGHYTMRAFHEDAQVLSFQLQINVPVR
VLELSESHPDSEGTQVRCRGRGMPQPNIIWSACRDLKRCPRELPPTLLGNSSEESQLET
NVTYWEEEQEFVSTLRLQHVDRLSVRCTLRNAVGQDTQEVIVPHSLPFSSSSSSSS
SRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII
NATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTGGGGGGGGGPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)

雜合體3胺基酸序列

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTL
KKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTSSSS
SSSSQISQGLVVTTPGPELVLNVSSSTFVLTCGSAPVVWERMSQEPPQEMAKAQDGTFS
VLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEI
TIPCRVTDLPQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYY
VYRLQVSSINVSVNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFETYPRKESGRLVEPVTD
FLDMPYHIRSILHIPSAELEDSTYTCNVTESVNDHQDEKAINITVVESGYTGGGGGGGG
GPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:14)

雜合體4胺基酸序列

MRLPGAMPALALKGELLLLSLLLLLEPQISQGLVVTPPGPELVLNVSSTFVLTCSGSAPV
VWERMSQEPPQEMAKAQDGTFFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNDSRGLETDERKRLYIF
VPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDLPQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFF
GIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSINVSVNAVQTVVRQGENITLMCIVIGN
EVVNFEWPTYPRKESGRLVEPVTDFLDMPYHIRSILHIPSAELEDSTYTCNVTESVNDH
QDEKAINITVVESGYSSSSSSSSSRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKK
FPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTGGGGG
GGGGPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K (SEQ ID NO:15)

PDGFR(D1-D5)開放閱讀框

ATGCGGCTTCCGGGTGCGATGCCAGCTCTGGCCCTCAAAGGCGAGCTGCTGTTGCTG
TCTCTCCTGTTACTTCTGGAACACAGATCTCTCAGGGCCTGGTCGTCACACCCCCG
GGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTCTCCAGCACCTTCGTTCTGACCTGCTCGGGTTCA
GCTCCGGTGGTGTGGGAACGGATGTCCCAGGAGCCCCCACAGGAAATGGCCAAGGC
CCAGGATGGCACCTTCTCCAGCGTGCTCACACTGACCAACCTCACTGGGCTAGACAC
GGGAGAATACTTTTGCACCCACAATGACTCCCGTGGACTGGAGACCGATGAGCGGA
AACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCCTCCCTAATGATGCCG
AGGAACTATTCATCTTTCTCACGGAAATAACTGAGATCACCATTCATGCCGAGTAA
CAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAGGGGACGTTGCACTGCCT
GTCCCCATATGATCACCAACGTGGCTTTTTTGGTATCTTTGAGGACAGAAGCTACATCT
GCAAAACCACCATTGGGGACAGGGAGGTGGATTCTGATGCCTACTATGTCTACAGA
CTCCAGGTGTCATCCATCAACGTCTCTGTGAACGCAGTGCAGACTGTGGTCCGCCAG
GGTGAGAACATCACCTCATGTGCATTGTGATCGGGAATGAGGTGGTCAACTTCGAG

TGGACATACCCCCGCAAAGAAAAGTGGGCGGCTGGTGGAGCCGGTGACTGACTTCCT
 CTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCCATCCTGCACATCCCCAGTGCCGAGTTAGA
 AGACTCGGGGACCTACACCTGCAATGTGACGGAGAGTGTGAATGACCATCAGGATG
 AAAAGGCCATCAACATCACCGTGGTTGAGAGCGGCTACGTGCGGCTCCTGGGAGAG
 GTGGGCACACTACAATTTGCTGAGCTGCATCGGAGCCGGACACTGCAGGTAGTGTT
 GAGGCCTACCCACCGCCCACTGTCCTGTGGTTCAAAGACAACCGCACCCCTGGGCGA
 CTCCAGCGCTGGCGAAATCGCCCTGTCCACGCGCAACGTGTGCGGAGACCCGGTATGT
 GTCAGAGCTGACACTGGTTTCGCGTGAAGGTGGCAGAGGCTGGCCACTACACCATGC
 GGGCCTTCCATGAGGATGCTGAGGTCCAGCTCTCCTTCCAGCTACAGATCAATGTCC
 CTGTCCGAGTGCTGGAGCTAAGTGAGAGCCACCCTGACAGTGGGGAACAGACAGTC
 CGCTGTCGTGGCCGGGGCATGCCCCAGCCGAACATCATCTGGTCTGCCTGCAGAGAC
 CTCAAAGGTGTCCACGTGAGCTGCCGCCACGCTGCTGGGGAACAGTTCCGAAGA
 GGAGAGCCAGCTGGAGACTAACGTGACGTACTGGGAGGAGGAGCAGGAGTTTGAG
 GTGGTGAGCACACTGCGTCTGCAGCACGTGGATCGGCCACTGTCCGTGCGCTGCACG
 CTGCGCAACGCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTT
 GCCCTTTTAA (SEQ ID NO:16)

PDGFR(D1-D4)開放閱讀框

ATGCGGCTTCCGGGTGCGATGCCAGCTCTGGCCCTCAAAGGCGAGCTGCTGTTGCTG
 TCTCTCCTGTTACTTCTGGAACCACAGATCTCTCAGGGCCTGGTCGTCACACCCCCG
 GGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTCTCCAGCACCTTCGTTCTGACCTGCTCGGGTTCA
 GCTCCGGTGGTGTGGGAACGGATGTCCCAGGAGCCCCCACAGGAAATGGCCAAGGC
 CCAGGATGGCACCTTCTCCAGCGTGCTCACACTGACCAACCTCACTGGGCTAGACAC
 GGGAGAATACTTTTGCACCCACAATGACTCCCGTGGACTGGAGACCGATGAGCGGA
 AACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCCTCCCTAATGATGCCG
 AGGAACTATTCATCTTTCTCACGGAAATAACTGAGATCACCATTCCATGCCGAGTAA
 CAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAGGGGACGTTGCACTGCCT
 GTCCCCTATGATCACCAACGTGGCTTTTTTGGTATCTTTGAGGACAGAAGCTACATCT
 GCAAACCCACCATTTGGGGACAGGGAGGTGGATTCTGATGCCTACTATGTCTACAGA
 CTCCAGGTGTCATCCATCAACGTCTCTGTGAACGCAGTGCAGACTGTGGTCCGCCAG
 GGTGAGAACATCACCCCTCATGTGCATTGTGATCGGGAATGAGGTGGTCAACTTCGAG

TGGACATACCCCCGCAAAGAAAGTGGGCGGCTGGTGGAGCCGGTGACTGACTTCCT
CTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCCATCCTGCACATCCCCAGTGCCGAGTTAGA
AGACTCGGGGACCTACACCTGCAATGTGACGGAGAGTGTGAATGACCATCAGGATG
AAAAGGCCATCAACATCACCGTGGTTGAGAGCGGCTACGTGCGGCTCCTGGGAGAG
GTGGGCACACTACAATTTGCTGAGCTGCATCGGAGCCGGACACTGCAGGTAGTGTTT
GAGGCCTACCCACCGCCCACTGTCCTGTGGTTCAAAGACAACCGCACCCCTGGGCGA
CTCCAGCGCTGGCGAAATCGCCCTGTCCACGCGCAACGTGTGCGGAGACCCGGTATGT
GTCAGAGCTGACACTGGTTCGCGTGAAGGTGGCAGAGGCTGGCCACTACACCATGC
GGGCCTTCCATGAGGATGCTGAGGTCCAGCTCTCCTTCCAGCTACAGATCAATGTCC
CTGTCCGAGTGCTGGAGTAG (SEQ ID NO:17)

PDGFR(D1-D5)9G-Fc開放閱讀框

ATGCGGCTTCCGGGTGCGATGCCAGCTCTGGCCCTCAAAGGCGAGCTGCTGTTGCTG
TCTCTCCTGTTACTTCTGGAACCACAGATCTCTCAGGGCCTGGTTCGTACACCCCCG
GGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTCTCCAGCACCTTCGTTCTGACCTGCTCGGGTTCA
GCTCCGGTGGTGTGGGAACGGATGTCCCAGGAGCCCCCACAGGAAATGGCCAAGGC
CCAGGATGGCACCTTCTCCAGCGTGCTCACACTGACCAACCTCACTGGGCTAGACAC
GGGAGAATACTTTTGCACCCACAATGACTCCCGTGGACTGGAGACCGATGAGCGGA
AACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCCTCCCTAATGATGCCG
AGGAACTATTATCTTTCTCACGGAAATAACTGAGATCACCATTCCATGCCGAGTAA
CAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAGGGGACGTTGCACTGCCT
GTCCCCATATGATCACCAACGTGGCTTTTTTTGGTATCTTTGAGGACAGAAGCTACATCT
GCAAAACCACCATTTGGGGACAGGGAGGTGGATTCTGATGCCTACTATGTCTACAGA
CTCCAGGTGTCATCCATCAACGTCTCTGTGAACGCAGTGCAGACTGTGGTCCGCCAG
GGTGAGAACATCACCCCTCATGTGCATTGTGATCGGGAATGAGGTGGTCAACTTCGAG
TGGACATACCCCCGCAAAGAAAGTGGGCGGCTGGTGGAGCCGGTGACTGACTTCCT
CTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCCATCCTGCACATCCCCAGTGCCGAGTTAGA
AGACTCGGGGACCTACACCTGCAATGTGACGGAGAGTGTGAATGACCATCAGGATG
AAAAGGCCATCAACATCACCGTGGTTGAGAGCGGCTACGTGCGGCTCCTGGGAGAG
GTGGGCACACTACAATTTGCTGAGCTGCATCGGAGCCGGACACTGCAGGTAGTGTTT
GAGGCCTACCCACCGCCCACTGTCCTGTGGTTCAAAGACAACCGCACCCCTGGGCGA

CTCCAGCGCTGGCGAAATCGCCCTGTCCACGCGCAACGTGTCGGAGACCCGGTATGT
 GTCAGAGCTGACACTGGTTTCGCGTGAAGGTGGCAGAGGCTGGCCACTACACCATGC
 GGGCCTTCCATGAGGATGCTGAGGTCCAGCTCTCCTTCCAGCTACAGATCAATGTCC
 CTGTCCGAGTGCTGGAGCTAAGTGAGAGCCACCCTGACAGTGGGGAACAGACAGTC
 CGCTGTCGTGGCCGGGGCATGCCCCAGCCGAACATCATCTGGTCTGCCTGCAGAGAC
 CTCAAAGGTGTCCACGTGAGCTGCCGCCACGCTGCTGGGGAACAGTTCCGAAGA
 GGAGAGCCAGCTGGAGACTAACGTGACGTACTGGGAGGAGGAGCAGGAGTTTGAG
 GTGGTGAGCACACTGCGTCTGCAGCACGTGGATCGGCCACTGTCGGTGCGCTGCACG
 CTGCGCAACGCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTT
 GCCCTTTACCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTCTCTAAATCTTGTGACAAAA
 CTCACACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC
 TCTTCCCCCCTAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
 GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
 GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
 GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA
 AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC
 ATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC
 CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT
 ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTAC
 AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC
 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
 TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATA
 G (SEQ ID NO:18)

PDGFR(D1-D3)9G-Fc開放閱讀框

ATGCGGCTTCCGGGTGCGATGCCAGCTCTGGCCCTCAAAGGCGAGCTGCTGTTGCTG
 TCTCTCCTGTTACTTCTGGAACCACAGATCTCTCAGGGCCTGGTCGTCACACCCCCG
 GGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTCTCCAGCACCTTCGTTCTGACCTGCTCGGGTTCA
 GCTCCGGTGGTGTGGGAACGGATGTCCCAGGAGCCCCCACAGGAAATGGCCAAGGC
 CCAGGATGGCACCTTCTCCAGCGTGCTCACACTGACCAACCTCACTGGGCTAGACAC
 GGGAGAATACTTTTGCACCCACAATGACTCCCGTGGACTGGAGACCGATGAGCGGA

AACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCCTCCCTAATGATGCCG
 AGGAACTATTTCATCTTTCTCACGGAAATAACTGAGATCACCATTCATGCCGAGTAA
 CAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAGGGGACGTTGCACTGCCT
 GTCCCCTATGATCACCAACGTGGCTTTTTTGGTATCTTTGAGGACAGAAGCTACATCT
 GCAAAACCACCATTTGGGGACAGGGAGGTGGATTCTGATGCCTACTATGTCTACAGA
 CTCCAGGTGTCATCCATCAACGTCTCTGTGAACGCAGTGCAGACTGTGGTCCGCCAG
 GGTGAGAACATCACCCCTCATGTGCATTGTGATCGGGAATGAGGTGGTCAACTTCGAG
 TGGACATACCCCCGCAAAGAAAGTGGGCGGCTGGTGGAGCCGGTGACTGACTTCCT
 CTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCCATCCTGCACATCCCCAGTGCCGAGTTAGA
 AGACTCGGGGACCTACACCTGCAATGTGACGGAGAGTGTGAATGACCATCAGGATG
 AAAAGGCCATCAACATCACCGTGGTTGAGAGCGGCTACACCGGTGGAGGTGGAGGT
 GGAGGTGGAGGTCCTAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACGC
 ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACAC
 CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
 AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
 AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
 ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
 CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC
 GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG
 GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
 GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
 CGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
 GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
 GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG (SEQ ID NO:19)

PDGFR(D1-D2)9G-Fc開放閱讀框

ATGCGGCTTCCGGGTGCGATGCCAGCTCTGGCCCTCAAAGGCGAGCTGCTGTTGCTG
 TCTCTCCTGTTACTTCTGGAACCACAGATCTCTCAGGGCCTGGTCGTACACCCCCG
 GGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTCTCCAGCACCTTCGTTCTGACCTGCTCGGGTTCA
 GCTCCGGTGGTGTGGGAACGGATGTCCAGGAGCCCCACAGGAAATGGCCAAGGC
 CCAGGATGGCACCTTCTCCAGCGTGCTCACACTGACCAACCTCACTGGGCTAGACAC

GGGAGAATACTTTTGCACCCACAATGACTCCCGTGGACTGGAGACCGATGAGCGGA
AACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCCTCCCTAATGATGCCG
AGGAACTATTCATCTTTCTCACGGAAATAACTGAGATCACCATTCCATGCCGAGTAA
CAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAGGGGACGTTGCACTGCCT
GTCCCCTATGATCACCAACGTGGCTTTTTTGGTATCTTTGAGGACAGAAGCTACATCT
GCAAAACCACCATTTGGGGACAGGGAGGTGGATTCTGATGCCTACTATGTCTACAGA
CTCCAGGTGTCATCCACCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTCCTAAATCTTGT
GACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC
AGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA
GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT
GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA
ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA
GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC
GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
GGTAAATAG (SEQ ID NO:20)

雜合體1開放閱讀框

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTT
CTCACAGGATCTGGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATA
CACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTACGTACCTAACATC
ACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATA
ATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGG
GCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTGTATAAGACAAACTATCTCAC
ACATCGACAAACCTCGAGTTCCAGCTCCTCTTCCTCAAGCCAGATCTCTCAGGGCCT
GGTCGTACACCCCCGGGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTCTCCAGCACCTTCGTTCT
GACCTGCTCGGGTTCAGCTCCGGTGGTGTGGGAACGGATGTCCCAGGAGCCCCCAC

AGGAAATGGCCAAGGCCAGGATGGCACCTTCTCCAGCGTGCTCACACTGACCAAC
 CTCACTGGGCTAGACACGGGAGAATACTTTTGACCCACAATGACTCCCGTGGAAGT
 GAGACCGATGAGCGGAAACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGATCCACCGTGCGGCTC
 CTCCTAATGATGCCGAGGAAGTATTCATCTTTCTCACGGAAATAACTGAGATCACC
 ATTCCATGCCGAGTAACAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAGG
 GGACGTTGCACTGCCTGTCCCCTATGATCACCAACGTGGCTTTTTTGGTATCTTTGAG
 GACAGAAGCTACATCTGCAAAACCACCATTTGGGGACAGGGAGGTGGATTCTGATGC
 CTACTATGTCTACAGACTCCAGGTGTATCCATCAACGTCTCTGTGAACGCAGTGCA
 GACTGTGGTCCGCCAGGGTGAGAACATCACCTCATGTGCATTGTGATCGGGAATGA
 GGTGGTCAACTTCGAGTGGACATACCCCCGCAAAGAAAGTGGGCGGCTGGTGGAGC
 CGGTGACTGACTTCCTCTTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCCATCCTGCACATCCC
 CAGTGCCGAGTTAGAAGACTCGGGGACCTACACCTGCAATGTGACGGAGAGTGTGA
 ATGACCATCAGGATGAAAAGGCCATCAACATCACCGTGGTTGAGAGCGGCTACGTG
 CGGCTCCTGGGAGAGGTGGGCACACTACAATTTGCTGAGCTGCATCGGAGCCGGAC
 ACTGCAGGTAGTGTTTCGAGGCCTACCCACCGCCCACTGTCCTGTGGTTCAAAGACAA
 CCGCACCCCTGGGCGACTCCAGCGCTGGCGAAATCGCCCTGTCCACGCGCAACGTGTC
 GGAGACCCGGTATGTGTCAGAGCTGACACTGGTTCGCGTGAAGGTGGCAGAGGCTG
 GCCACTACACCATGCGGGCCTTCCATGAGGATGCTGAGGTCCAGCTCTCCTTCCAGC
 TACAGATCAATGTCCCTGTCCGAGTGCTGGAGCTAAGTGAGAGCCACCTGACAGTG
 GGGAAACAGACAGTCCGCTGTCTGTGGCCGGGGCATGCCCCAGCCGAACATCATCTGG
 TCTGCCTGCAGAGACCTCAAAAGGTGTCCACGTGAGCTGCCGCCACGCTGCTGGGG
 AACAGTTCCGAAGAGGAGAGCCAGCTGGAGACTAACGTGACGTACTGGGAGGAGG
 AGCAGGAGTTTGAGGTGGTGAGCACACTGCGTCTGCAGCACGTGGATCGGCCACTG
 TCGGTGCGCTGCACGCTGCGCAACGCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTATCGT
 GGTGCCACACTCCTTGCCCTTTACCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTCCTAA
 ATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG
 ACCGTCACTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC
 CCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
 TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
 GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGA
 CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC

CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC
 ACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT
 GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
 CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
 TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG
 TCTCCGGGTAAATAG (SEQ ID NO:21)

雜合體2開放閱讀框

ATGCGGCTTCCGGGTGCGATGCCAGCTCTGGCCCTCAAAGGCGAGCTGCTGTTGCTG
 TCTCTCCTGTTACTTCTGGAACCACAGATCTCTCAGGGCCTGGTCGTCACACCCCCG
 GGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTCTCCAGCACCTTCGTTCTGACCTGCTCGGGTTCA
 GCTCCGGTGGTGTGGGAACGGATGTCCCAGGAGCCCCCACAGGAAATGGCCAAGGC
 CCAGGATGGCACCTTCTCCAGCGTGCTCACACTGACCAACCTCACTGGGCTAGACAC
 GGGAGAATACTTTTGCACCCACAATGACTCCCGTGGACTGGAGACCGATGAGCGGA
 AACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCCTCCCTAATGATGCCG
 AGGAACTATTCATCTTTCTCACGGAAATAACTGAGATCACCATTCCATGCCGAGTAA
 CAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAGGGGACGTTGCACTGCCT
 GTCCCCTATGATCACCAACGTGGCTTTTTTGGTATCTTTGAGGACAGAAGCTACATCT
 GCAAAACCACCATTTGGGGACAGGGAGGTGGATTCTGATGCCTACTATGTCTACAGA
 CTCCAGGTGTCATCCATCAACGTCTCTGTGAACGCAGTGCAGACTGTGGTCCGCCAG
 GGTGAGAACATCACCTCATGTGCATTGTGATCGGGAATGAGGTGGTCAACTTCGAG
 TGGACATACCCCCGCAAAGAAAGTGGGCGGCTGGTGGAGCCGGTGACTIONCTCCT
 CTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCCATCCTGCACATCCCCAGTGCCGAGTTAGA
 AGACTCGGGGACCTACACCTGCAATGTGACGGAGAGTGTGAATGACCATCAGGATG
 AAAAGGCCATCAACATCACCGTGGTTGAGAGCGGCTACGTGCGGCTCCTGGGAGAG
 GTGGGCACACTACAATTTGCTGAGCTGCATCGGAGCCGGACACTGCAGGTAGTGTTT
 GAGGCCTACCCACCGCCCACTGTCCTGTGGTTCAAAGACAACCGCACCTGGGCGA
 CTCCAGCGCTGGCGAAATCGCCCTGTCCACGCGCAACGTGTGCGAGACCCGGTATGT
 GTCAGAGCTGACACTGGTTTCGCGTGAAGGTGGCAGAGGCTGGCCACTACACCATGC
 GGGCCTTCCATGAGGATGCTGAGGTCCAGCTCTCCTTCCAGCTACAGATCAATGTCC

CTGTCCGAGTGCTGGAGCTAAGTGAGAGCCACCCTGACAGTGGGGAACAGACAGTC
CGCTGTCTGGCCGGGGCATGCCCCAGCCGAACATCATCTGGTCTGCCTGCAGAGAC
CTCAAAAGGTGTCCACGTGAGCTGCCGCCACGCTGCTGGGGAACAGTTCCGAAGA
GGAGAGCCAGCTGGAGACTAACGTGACGTACTGGGAGGAGGAGCAGGAGTTTGAG
GTGGTGAGCACACTGCGTCTGCAGCACGTGGATCGGCCACTGTCGGTGCCTGCACG
CTGCGCAACGCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTT
GCCCTTTAGTTCCAGCTCCTCTTCCTCAAGCTCGCCTTTTCGTAGAGATGTACAGTGAA
ATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGT
ACGTCACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTG
ATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACG
TACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAA
GACAACTATCTCACACATCGACAAACCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTC
CTAAATCTTGACAAAACCTCACACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGG
GGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC
AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC
AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT
GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCGGGTAAATAG (SEQ ID NO:22)

雜合體3開放閱讀框

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTT
CTCACAGGATCTGGTAGACCTTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATA
CACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTACGTCACCTAACATC
ACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATA

ATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGG
GCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCAC
ACATCGACAAACCTCGAGTTCCAGCTCCTCTTCCTCAAGCCAGATCTCTCAGGGCCT
GGTCGTACACCCCCGGGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTCTCCAGCACCTTCGTTCT
GACCTGCTCGGGTTCAGCTCCGGTGGTGTGGGAACGGATGTCCCAGGAGCCCCCAC
AGGAAATGGCCAAGGCCCAGGATGGCACCTTCTCCAGCGTGCTCACACTGACCAAC
CTCACTGGGCTAGACACGGGAGAATACITTTTGCACCCACAATGACTCCCGTGGACTG
GAGACCGATGAGCGGAAACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTC
CTCCCTAATGATGCCGAGGAACTATTCATCTTTCTCACGGAAATAACTGAGATCACC
ATTCCATGCCGAGTAACAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAGG
GGACGTTGCACTGCCTGTCCCCTATGATCACCACCGTGGCTTTTTTGGTATCTTTGAG
GACAGAAGCTACATCTGCAAAACCACCATTTGGGGACAGGGAGGTGGATTCTGATGC
CTACTATGTCTACAGACTCCAGGTGTCATCCATCAACGTCTCTGTGAACGCAGTGCA
GACTGTGGTCCGCCAGGGTGAGAACATCACCTCATGTGCATTGTGATCGGGAATGA
GGTGGTCAACTTCGAGTGGACATAACCCCGCAAAGAAAGTGGGCGGCTGGTGGAGC
CGGTGACTGACTTCCTCTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCCATCCTGCACATCCC
CAGTGCCGAGTTAGAAGACTCGGGGACCTACACCTGCAATGTGACGGAGAGTGTGA
ATGACCATCAGGATGAAAAGGCCATCAACATCACCGTGGTTGAGAGCGGCTACACC
GGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTCCCTAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATG
CCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGT
GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG
CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG
CTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGC
CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA
AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG (SEQ ID
NO:23)

雜合體4開放閱讀框

ATGCGGCTTCCGGGTGCGATGCCAGCTCTGGCCCTCAAAGGCGAGCTGCTGTTGCTG
 TCTCTCCTGTTACTTCTGGAACACAGATCTCTCAGGGCCTGGTTCGTACACCCCCG
 GGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTCTCCAGCACCTTCGTTCTGACCTGCTCGGGTTCA
 GCTCCGGTGGTGTGGGAACGGATGTCCCAGGAGCCCCACAGGAAATGGCCAAGGC
 CCAGGATGGCACCTTCTCCAGCGTGCTCACACTGACCAACCTCACTGGGCTAGACAC
 GGGAGAATACTTTTGCACCCACAATGACTCCCGTGGACTGGAGACCGATGAGCGGA
 AACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCCTCCCTAATGATGCCG
 AGGAACTATTCATCTTTCTCACGGAAATAACTGAGATCACCATTCCATGCCGAGTAA
 CAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAGGGGACGTTGCACTGCCT
 GTCCCCATATGATCACCAACGTGGCTTTTTTGGTATCTTTGAGGACAGAAGCTACATCT
 GCAAAACCACCATTGGGGACAGGGAGGTGGATTCTGATGCCTACTATGTCTACAGA
 CTCCAGGTGTCATCCATCAACGTCTCTGTGAACGCAGTGCAGACTGTGGTCCGCCAG
 GGTGAGAACATCACCTCATGTGCATTGTGATCGGGAATGAGGTGGTCAACTTCGAG
 TGGACATACCCCCGCAAAGAAAGTGGGCGGCTGGTGGAGCCGGTGACTGACTTCCT
 CTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCCATCCTGCACATCCCCAGTGCCGAGTTAGA
 AGACTCGGGGACCTACACCTGCAATGTGACGGAGAGTGTGAATGACCATCAGGATG
 AAAAGGCCATCAACATCACCGTGGTTGAGAGCGGCTACAGTTCAGCTCCTCTTCCT
 CAAGCTCGAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGA
 CTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTACGTCACCTAACATCACTGTTA
 CTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGG
 ACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTG
 ACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGA
 CAAACCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGCTAAATCTTGTGACAAAACCTCA
 CACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT
 CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGT
 GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
 GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
 GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
 GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT
 CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGG
 GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC
 AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGA
 CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCG
 TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
 GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG
 (SEQ ID NO:24)

PDGFRBPR6SpeI F核酸引物

GACTAGTATGCGGCTTCCGGGTG (SEQ ID NO:25)

PDGFRBPR7AgeI R核酸引物

ACCGGTGGATGACACCTGGAGTCTG (SEQ ID NO:26)

PDGFRB-PR1-Acc F核酸引物

CTATGTCTACAGACTCCAGGTGTC (SEQ ID NO:27)

D5-PR9-AgeI-Rev R核酸引物

ACCGGTAAAGGGCAAGGAGTGTGGC (SEQ ID NO:28)

PDGF02 F核酸引物

CCTCCACCGGTGTAGCCGCTCTCAACCACGGT (SEQ ID NO:29)

PDGF03 R核酸引物

CCCGGGACTAGTATGCGGCTTCCGGGTG (SEQ ID NO:30)

D5-SV40 F核酸引物

CCGGTTAGGGA (SEQ ID NO:31)

D5-SV40 B-2核酸引物

GGCCTCCCTAA (SEQ ID NO:32)

D4-SV40 F核酸引物

TGAGGTCCAGCTCTCCTTCCAGCTACAGATCAATGTCCCTGTC
CGAGTGCTGGAGTAGC (SEQ ID NO:33)

D4-SV40 B核酸引物

GGCCGCTACTCCAGCACTCGGACAGGGACATTGATCTGTAGC
TGGAAGGAGAGCTGGACC (SEQ ID NO:34)

Kozak-SP-D2-9Ser合成核酸片段

ACTAGTGGCGGCCGCCACCATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGC
GCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATCTGGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAG
TGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCG
GGTTACGTACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATC
CCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGC
AACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGT
ATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAACCTCGAGTTCAGCTCCTCTTCCTCAA
GCCAGATCT (SEQ ID NO:35)

D2-2220-2908合成核酸片段

CCACGCTGCTGGGGAACAGTTCGGAAGAGGAGAGCCAGCTGGGAGACTAACGTGACG
TACTGGGAGGAGGAGCAGGAGTTTGAGGTGGTGAGCACACTGCGTCTGCAGCACGT
GGATCGGCCACTGTCGGTGCCTGACGCTGCGCAACGCTGTGGGCCAGGACACGC
AGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTTGCCCTTTAGTTCAGCTCCTCTTCCTCAAG
CTCGAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGA
AGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTTACGTCACCTAACATCACTGTTACTTT
AAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAG
TAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCT
GTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAACTATCTCACACATCGACAA
ACCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTCCTAAATCTTGTGACAAAACCTCACAC
ATGCCACCGTGCCACGACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC
CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT
GGTGGACGTG (SEQ ID NO:36)

D3-Fc合成核酸片段

GACTGTGGTCCGCCAGGGTGAGAACATCACCTCATGTGCATTGTGATCGGGAATGA
GGTGGTCAACTTCGAGTGGACATACCCCCGAAAGAAAGTGGGCGGCTGGTGGAGC
CGGTGACTGACTTCCTCTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCCATCCTGCACATCCC
CAGTGCCGAGTTAGAAGACTCGGGGACCTACACCTGCAATGTGACGGAGAGTGTGA
ATGACCATCAGGATGAAAAGGCCATCAACATCACCGTGGTTGAGAGCGGCTACACC
GGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTCCTAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATG
CCCACCGTGCCACGACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT
GGACGTG (SEQ ID NO:37)

D3-F(D2)合成核酸片段

GACTGTGGTCCGCCAGGGTGAGAACATCACCTCATGTGCATTGTGATCGGGAATGA
GGTGGTCAACTTCGAGTGGACATACCCCCGAAAGAAAGTGGGCGGCTGGTGGAGC
CGGTGACTGACTTCCTCTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCCATCCTGCACATCCC
CAGTGCCGAGTTAGAAGACTCGGGGACCTACACCTGCAATGTGACGGAGAGTGTGA
ATGACCATCAGGATGAAAAGGCCATCAACATCACCGTGGTTGAGAGCGGCTACAGT
TCCAGCTCCTCTTCTCAAGCTCGAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCC
GAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTACGTCA
CCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAA
AACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAA
GAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAA
CTATCTCACACATCGACAAACCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTCCTAAAT
CTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGAC
CGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG (SEQ ID NO:38)

sFLT02 (D2-9Gly-CH3)胺基酸序列

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSGRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTL
KKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTGGG
GGGGGGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO:39)

sFLT02 (D2-9Gly-CH3)開放閱讀框

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTT
CTCACAGGATCTGGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATA
CACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTTACGTCACCTAACATC
ACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATA
ATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGG
GCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAACTATCTCAC
ACATCGACAAACCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGAGGTCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG (SEQ ID NO:40)

突變ITR核酸序列

CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCG
ACCAAAGGTCGCCCACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCG (SEQ ID
NO:41)

無分泌肽之雜合體1胺基酸序列

RPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRJIWDSRKGFIIISN
ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTSSSSSSSSSQISQGLVVTTPGPPELVLNVSST
FVLTCSGSAPVVWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHND SRG
LETDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTD PQLVVTLHEKKGDVAL
PVPYDHQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSINVS VNAVQTVVRQGE
NITLMCIVIGNEVVNF EWTYPRKESGRLVEPVTDFLLDMPYHIRSILHIPS AELEDSGTYT
CNVTESVNDHQDEKAINITVVESGYVRLLGEVGT LQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTVL
WFKDNRTLGDSSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAGHYTMRAFHEDA EVQL
SFQLQINVPVRVLELSESHPDSGEQTVRCRGRGMPQPNIIWSACRDLKRCPRELPPTLLG
NSSEESQLETNVTYWEEEQEFVVSTLRLQHVD RPLSVRCTL RNAVGQDTQEVI VVPH
SLPFTGGGGGGGGGPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:42)

無分泌肽之雜合體2胺基酸序列

LVVTPPGPELVLNVSSTFVLTCSGSAPVVWERMSQEPPQEMAKAQDGTFFSSVLTLTNLT
GLDTGEYFCTHNSRGLETDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTD
PQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVS
SINVSVNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFEWYPRKESGRLVEPVTDFLLDMPYHI
RSILHIPSAELEDSTYTCNVTESVNDHQDEKAINITVVESGYVRLGVEVGTQLQFAELHRS
RTLQVVFEAYPPPTVLWFKDNRTLGDSSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAG
HYTMRAFHEDAQVLSFQLQINVPVRVLELSESHPDSEGTQVRCRGRGMPQPNIIWSAC
RDLKRCPRELPPTLLGNSSEESQLETNVTYWEEEQEFVSTLRLQHVDRLSVRCTLR
NAVGGQDTQEVIVPHSLPFSSSSSSSSSRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITV
TLKKFPLDTLIPDGKRRIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTGG
GGGGGGGPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK (SEQ ID NO:43)

無分泌肽之雜合體3胺基酸序列

RPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRRIWDSRKGFIIISN
ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTSSSSSSSSSQISQGLVVTPPGPELVLNVSST
FVLTCSGSAPVVWERMSQEPPQEMAKAQDGTFFSSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRG
LETDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTD PQLVVTLHEKKGDVAL
PVPYDHQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSINVSVNAVQTVVRQGE
NITLMCIVIGNEVVNFEWYPRKESGRLVEPVTDFLLDMPYHIRSILHIPSAELEDSTYTC
CNVTESVNDHQDEKAINITVVESGYTGGGGGGGGGPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:44)

無分泌肽之雜合體4胺基酸序列

LVVTPPGPELVNLVSSTFVLTCSGSAPVVWERMSQEPPQEMAKAQDGTFFSSVLTLTNLT
GLDTGEYFCTHND SRGLETDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTD
PQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVS
SINVSVNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFEWTPRKESGRLVEPVTDFLLDMPYHI
RSILHIPSAELED SGTYTCNVTESVNDHQDEKAINITVVESGYSSSSSSSSSRPFVEMYSEIP
EIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIGLLTC
EATVNGHLYKTNYLTHRQTGGGGGGGGGPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:45)

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 彼得 貝茜
傑弗瑞 阿丁格
希拉蕊 魯賓
山謬 瓦斯沃絲
艾布朗漢 史考利亞

<120> 包含 PDGF 及 VEGF 結合部分之融合蛋白及其使用方法

<130> 159792009540

<140> Not Yet Assigned
<141> Concurrently Herewith

<150> US 61/780,914
<151> 2013-03-13

<160> 55

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 283
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1
Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser
1 5 10 15
Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg
20 25 30
Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr
35 40 45
Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly
50 55 60
Glu Tyr Phe Cys Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr Asp Glu
65 70 75 80
Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu
85 90 95
Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu
100 105 110
Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu
115 120 125
His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln
130 135 140
Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr
145 150 155 160
Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg
165 170 175
Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val
180 185 190
Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn
195 200 205
Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg
210 215 220
Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile
225 230 235 240
Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr
245 250 255
Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys
260 265 270
Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr
275 280

<210> 2
<211> 389
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3
 Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser
 1 5 10 15
 Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg
 20 25 30
 Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr
 35 40 45
 Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly
 50 55 60
 Glu Tyr Phe Cys Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr Asp Glu
 65 70 75 80
 Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu
 85 90 95
 Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu
 100 105 110
 Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu
 115 120 125
 His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln
 130 135 140

Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr
 145 150 155 160
 Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg
 165 170 175
 Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val
 180 185 190
 Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn
 195 200 205
 Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg
 210 215 220
 Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile
 225 230 235 240
 Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr
 245 250 255
 Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys
 260 265 270
 Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val Arg Leu Leu Gly
 275 280 285
 Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu Leu His Arg Ser Arg Thr Leu
 290 295 300
 Gln Val Val Phe Glu Ala Tyr Pro Pro Pro Thr Val Leu Trp Phe Lys
 305 310 315 320
 Asp Asn Arg Thr Leu Gly Asp Ser Ser Ala Gly Glu Ile Ala Leu Ser
 325 330 335
 Thr Arg Asn Val Ser Glu Thr Arg Tyr Val Ser Glu Leu Thr Leu Val
 340 345 350
 Arg Val Lys Val Ala Glu Ala Gly His Tyr Thr Met Arg Ala Phe His
 355 360 365
 Glu Asp Ala Glu Val Gln Leu Ser Phe Gln Leu Gln Ile Asn Val Pro
 370 375 380
 Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Glu Ser His Pro Asp Ser Gly Glu Gln
 385 390 395 400
 Thr Val Arg Cys Arg Gly Arg Gly Met Pro Gln Pro Asn Ile Ile Trp
 405 410 415
 Ser Ala Cys Arg Asp Leu Lys Arg Cys Pro Arg Glu Leu Pro Pro Thr
 420 425 430
 Leu Leu Gly Asn Ser Ser Glu Glu Glu Ser Gln Leu Glu Thr Asn Val
 435 440 445
 Thr Tyr Trp Glu Glu Glu Gln Glu Phe Glu Val Val Ser Thr Leu Arg
 450 455 460
 Leu Gln His Val Asp Arg Pro Leu Ser Val Arg Cys Thr Leu Arg Asn
 465 470 475 480
 Ala Val Gly Gln Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu
 485 490 495
 Pro Phe Lys

<210> 4
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4
 Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met
 1 5 10 15
 Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn
 20 25 30
 Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp
 35 40 45
 Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn
 50 55 60
 Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn
 65 70 75 80
 Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr
 85 90

<210> 5
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5
 Pro Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln His Ile Met Gln Ala Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys Trp Ser Leu

Pro Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser
Ala Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn
Thr Ala Gln Ala Asn His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala
Val Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe
Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro
Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg
Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp
Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly
Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys
Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His
Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro
Val Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr
Thr Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu
Lys Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser
His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn
Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe
Lys Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys

<210> 6
<211> 231
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

<210> 7
<211> 531



<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

```

Met Arg Leu Pro Gly Ala Met Pro Ala Leu Ala Leu Lys Gly Glu Leu
1      5      10      15
Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Leu Glu Pro Gln Ile Ser Gln Gly
20      25      30
Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser
35      40      45
Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg
50      55      60
Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr
65      70      75      80
Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly
85      90      95
Glu Tyr Phe Cys Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr Asp Glu
100     105     110
Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu
115     120     125
Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu
130     135     140
Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu
145     150     155     160
His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln
165     170     175
Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr
180     185     190
Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg
195     200     205
Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val
210     215     220
Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn
225     230     235     240
Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg
245     250     255
Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile
260     265     270
Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr
275     280     285
Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys
290     295     300
Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val Arg Leu Leu Gly
305     310     315     320
Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu Leu His Arg Ser Arg Thr Leu
325     330     335
Gln Val Val Phe Glu Ala Tyr Pro Pro Pro Thr Val Leu Trp Phe Lys
340     345     350
Asp Asn Arg Thr Leu Gly Asp Ser Ser Ala Gly Glu Ile Ala Leu Ser
355     360     365
Thr Arg Asn Val Ser Glu Thr Arg Tyr Val Ser Glu Leu Thr Leu Val
370     375     380
Arg Val Lys Val Ala Glu Ala Gly His Tyr Thr Met Arg Ala Phe His
385     390     395     400
Glu Asp Ala Glu Val Gln Leu Ser Phe Gln Leu Gln Ile Asn Val Pro
405     410     415
Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Glu Ser His Pro Asp Ser Gly Glu Gln
420     425     430
Thr Val Arg Cys Arg Gly Arg Gly Met Pro Gln Pro Asn Ile Ile Trp
435     440     445
Ser Ala Cys Arg Asp Leu Lys Arg Cys Pro Arg Glu Leu Pro Pro Thr
450     455     460
Leu Leu Gly Asn Ser Ser Glu Glu Glu Ser Gln Leu Glu Thr Asn Val
465     470     475     480
Thr Tyr Trp Glu Glu Gln Glu Phe Glu Val Val Ser Thr Leu Arg
485     490     495
Leu Gln His Val Asp Arg Pro Leu Ser Val Arg Cys Thr Leu Arg Asn
500     505     510
Ala Val Gly Gln Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu
515     520     525
Pro Phe Lys
530

```

<210> 8

<211> 421

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

```

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

```

<210> 9

<211> 771

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 9

```

Met Arg Leu Pro Gly Ala Met Pro Ala Leu Ala Leu Lys Gly Glu Leu
1      5      10      15
Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Leu Glu Pro Gln Ile Ser Gln Gly
20      25      30
Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser
35      40      45
Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg

```

50	Met	Ser	Gln	Glu	Pro	Pro	Gln	Glu	Met	Ala	Lys	Ala	Gln	Asp	Gly	Thr	
65	Phe	Ser	Ser	Val	Leu	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Thr	Gly	80
					85	His	Asn	Asp	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu	Thr	Asp	Glu	95
	Glu	Tyr	Phe	Cys	Thr				100								110
	Arg	Lys	Arg	Leu	Tyr	Ile	Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Val	Gly	Phe	Leu	
									115								125
	Pro	Asn	Asp	Ala	Glu	Glu	Leu	Phe	Ile	Phe	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Glu	
									130								140
	Ile	Thr	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Asp	Pro	Gln	Leu	Val	Val	Thr	Leu	
									135								150
	His	Glu	Lys	Lys	Gly	Asp	Val	Ala	Leu	Pro	Val	Pro	Tyr	Asp	His	Gln	
									145								160
	Arg	Gly	Phe	Phe	Gly	Ile	Phe	Glu	Asp	Arg	Ser	Tyr	Ile	Cys	Lys	Thr	
									155								175
	Thr	Ile	Gly	Asp	Arg	Glu	Val	Asp	Ser	Asp	Ala	Tyr	Tyr	Val	Tyr	Arg	
									165								190
	Leu	Gln	Val	Ser	Ser	Ile	Asn	Val	Ser	Val	Asn	Ala	Val	Gln	Thr	Val	
									170								205
	Val	Arg	Gln	Gly	Glu	Asn	Ile	Thr	Leu	Met	Cys	Ile	Val	Ile	Gly	Asn	
									180								220
	Glu	Val	Val	Asn	Phe	Glu	Trp	Thr	Tyr	Pro	Arg	Lys	Glu	Ser	Gly	Arg	
									185								235
	Leu	Val	Glu	Pro	Val	Thr	Asp	Phe	Leu	Leu	Asp	Met	Pro	Tyr	His	Ile	
									190								255
	Arg	Ser	Ile	Leu	His	Ile	Pro	Ser	Ala	Glu	Leu	Glu	Asp	Ser	Gly	Thr	
									195								270
	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Thr	Glu	Ser	Val	Asn	Asp	His	Gln	Asp	Glu	Lys	
									200								285
	Ala	Ile	Asn	Ile	Thr	Val	Val	Glu	Ser	Gly	Tyr	Val	Arg	Leu	Leu	Gly	
									205								300
	Glu	Val	Gly	Thr	Leu	Gln	Phe	Ala	Glu	Leu	His	Arg	Ser	Arg	Thr	Leu	
									210								315
	Gln	Val	Val	Phe	Glu	Ala	Tyr	Pro	Pro	Pro	Thr	Val	Leu	Trp	Phe	Lys	
									215								330
	Asp	Asn	Arg	Thr	Leu	Gly	Asp	Ser	Ser	Ala	Gly	Glu	Ile	Ala	Leu	Ser	
									220								345
	Thr	Arg	Asn	Val	Ser	Glu	Thr	Arg	Tyr	Val	Ser	Glu	Leu	Thr	Leu	Val	
									225								360
	Arg	Val	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Gly	His	Tyr	Thr	Met	Arg	Ala	Phe	His	
									230								375
	Glu	Asp	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Ser	Phe	Gln	Leu	Gln	Ile	Asn	Val	Pro	
									235								390
	Val	Arg	Val	Leu	Glu	Leu	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Asp	Ser	Gly	Glu	Gln	
									240								405
	Thr	Val	Arg	Cys	Arg	Gly	Arg	Gly	Met	Pro	Gln	Pro	Asn	Ile	Ile	Trp	
									245								420
	Ser	Ala	Cys	Arg	Asp	Leu	Lys	Arg	Cys	Pro	Arg	Glu	Leu	Pro	Pro	Thr	
									250								435
	Leu	Leu	Gly	Asn	Ser	Ser	Glu	Glu	Glu	Ser	Gln	Leu	Glu	Thr	Asn	Val	
									255								450
	Thr	Tyr	Trp	Glu	Glu	Glu	Gln	Glu	Phe	Glu	Val	Val	Ser	Thr	Leu	Arg	
									260								465
	Leu	Gln	His	Val	Asp	Arg	Pro	Leu	Ser	Val	Arg	Cys	Thr	Leu	Arg	Asn	
									265								480
	Ala	Val	Gly	Gln	Asp	Thr	Gln	Glu	Val	Ile	Val	Val	Pro	His	Ser	Leu	
									270								495
	Pro	Phe	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Pro	Lys	Ser	Cys	
									275								510
	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	
									280								525
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
									285								540
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
									290								555
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
									295								570
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
									300								585
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
									305								600
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
									310								615
									315								630
									320								645
									325								650
									330								655

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 Tyr Thr Leu 660 Pro Pro Ser Arg Asp 665 Glu Leu Thr Lys Asn 670 Gln Val Ser
 Leu Thr Cys 675 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 685 Ile Ala Val Glu
 Trp 690 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 705 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 740 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 755 Pro Gly Lys 760 765 770

<210> 10
 <211> 555
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

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

```

385      390      395      400
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
545      550      555

```

<210> 11
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

```

<400> 11
Met Arg Leu Pro Gly Ala Met Pro Ala Leu Ala Leu Lys Gly Glu Leu
1      5      10      15
Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Leu Glu Pro Gln Ile Ser Gln Gly
20      25      30
Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser
35      40      45
Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg
50      55      60
Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr
65      70      75      80
Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly
85      90      95
Glu Tyr Phe Cys Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr Asp Glu
100      105      110
Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu
115      120      125
Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu
130      135      140
Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu
145      150      155      160
His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln
165      170      175
Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr
180      185      190
Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg
195      200      205
Leu Gln Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Lys
210      215      220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225      230      235      240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245      250      255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260      265      270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275      280      285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290      295      300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305      310      315      320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325      330      335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340      345      350

```

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 12
 <211> 871
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 12
 Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser
 20 25 30
 Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile
 35 40 45
 Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe
 50 55 60
 Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser
 65 70 75 80
 Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu
 85 90 95
 Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr
 100 105 110
 Leu Thr His Arg Gln Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gln
 115 120 125
 Ile Ser Gln Gly Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu
 130 135 140
 Asn Val Ser Ser Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val
 145 150 155 160
 Val Trp Glu Arg Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala
 165 170 175
 Gln Asp Gly Thr Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly
 180 185 190
 Leu Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu
 195 200 205
 Glu Thr Asp Glu Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr
 210 215 220
 Val Gly Phe Leu Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr
 225 230 235 240
 Glu Ile Thr Glu Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu
 245 250 255
 Val Val Thr Leu His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro
 260 265 270
 Tyr Asp His Gln Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr
 275 280 285
 Ile Cys Lys Thr Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr
 290 295 300
 Tyr Val Tyr Arg Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala
 305 310 315 320
 Val Gln Thr Val Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile
 325 330 335
 Val Ile Gly Asn Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys
 340 345 350
 Glu Ser Gly Arg Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met
 355 360 365
 Pro Tyr His Ile Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu
 370 375 380
 Asp Ser Gly Thr Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His
 385 390 395 400
 Gln Asp Glu Lys Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val

Arg Leu Leu Gly Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu Leu His Arg
405 410 415
Ser Arg Thr 420 Leu Gln Val Val Phe Glu Ala Tyr Pro Pro Thr Val
435 440 445
Leu Trp Phe Lys Asp Asn Arg Thr Leu Gly Asp Ser Ser Ala Gly Glu
450 455 460
Ile Ala Leu Ser Thr Arg Asn Val Ser Glu Thr Arg Tyr Val Ser Glu
465 470 475 480
Leu Thr Leu Val Arg Val Lys Val Ala Glu Ala Gly His Tyr Thr Met
485 490 495
Arg Ala Phe His Glu Asp Ala Glu Val Gln Leu Ser Phe Gln Leu Gln
500 505 510
Ile Asn Val Pro Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Glu Ser His Pro Asp
515 520 525
Ser Gly Glu Gln Thr Val Arg Cys Arg Gly Arg Gly Met Pro Gln Pro
530 535 540
Asn Ile Ile Trp Ser Ala Cys Arg Asp Leu Lys Arg Cys Pro Arg Glu
545 550 555 560
Leu Pro Pro Thr Leu Leu Gly Asn Ser Ser Glu Glu Glu Ser Gln Leu
565 570 575
Glu Thr Asn Val Thr Tyr Trp Glu Glu Gln Glu Phe Glu Val Val
580 585 590
Ser Thr Leu Arg Leu Gln His Val Asp Arg Pro Leu Ser Val Arg Cys
595 600 605
Thr Leu Arg Asn Ala Val Gly Gln Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val
610 615 620
Pro His Ser Leu Pro Phe Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
625 630 635 640
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
645 650 655
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
660 665 670
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
675 680 685
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
690 695 700
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
705 710 715 720
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
725 730 735
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
740 745 750
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
755 760 765
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
770 775 780
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
785 790 795 800
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
805 810 815
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
820 825 830
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
835 840 845
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
850 855 860
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
865 870

<210> 13
<211> 873
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 13
Met Arg Leu Pro Gly Ala Met Pro Ala Leu Ala Leu Lys Gly Glu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Leu Glu Pro Gln Ile Ser Gln Gly
20 25 30
Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser
35 40 45

Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg
 50 55 60
 Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr
 65 70 75 80
 Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly
 85 90 95
 Glu Tyr Phe Cys Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr Asp Glu
 100 105 110
 Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu
 115 120 125
 Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu
 130 135 140
 Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu
 145 150 155 160
 His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln
 165 170 175
 Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr
 180 185 190
 Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg
 195 200 205
 Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val
 210 215 220
 Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn
 225 230 235 240
 Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg
 245 250 255
 Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile
 260 265 270
 Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr
 275 280 285
 Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys
 290 295 300
 Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val Arg Leu Leu Gly
 305 310 315 320
 Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu Leu His Arg Ser Arg Thr Leu
 325 330 335
 Gln Val Val Phe Glu Ala Tyr Pro Pro Thr Val Leu Trp Phe Lys
 340 345 350
 Asp Asn Arg Thr Leu Gly Asp Ser Ser Ala Gly Glu Ile Ala Leu Ser
 355 360 365
 Thr Arg Asn Val Ser Glu Thr Arg Tyr Val Ser Glu Leu Thr Leu Val
 370 375 380
 Arg Val Lys Val Ala Glu Ala Gly His Tyr Thr Met Arg Ala Phe His
 385 390 395 400
 Glu Asp Ala Glu Val Gln Leu Ser Phe Gln Leu Gln Ile Asn Val Pro
 405 410 415
 Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Glu Ser His Pro Asp Ser Gly Glu Gln
 420 425 430
 Thr Val Arg Cys Arg Gly Arg Gly Met Pro Gln Pro Asn Ile Ile Trp
 435 440 445
 Ser Ala Cys Arg Asp Leu Lys Arg Cys Pro Arg Glu Leu Pro Pro Thr
 450 455 460
 Leu Leu Gly Asn Ser Ser Glu Glu Glu Ser Gln Leu Glu Thr Asn Val
 465 470 475 480
 Thr Tyr Trp Glu Glu Glu Gln Glu Phe Glu Val Val Ser Thr Leu Arg
 485 490 495
 Leu Gln His Val Asp Arg Pro Leu Ser Val Arg Cys Thr Leu Arg Asn
 500 505 510
 Ala Val Gly Gln Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu
 515 520 525
 Pro Phe Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Arg Pro Phe Val Glu
 530 535 540
 Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu
 545 550 555 560
 Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu
 565 570 575
 Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile
 580 585 590
 Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu
 595 600 605
 Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys
 610 615 620
 Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 625 630 635 640
 Gly Gly Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

645 650 655
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 660 665 670
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 675 680 685
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 690 700
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 705 710 715 720
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 725 730 735
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 740 745 750
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 755 760 765
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 770 775 780
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 785 790 795 800
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 805 810 815
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 820 825 830
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 835 840 845
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 850 855 860
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 865 870

<210> 14

<211> 656

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 14

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

```

Ile Cys Lys Thr Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr
290      295      300
Tyr Val Tyr Arg Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala
305      310      315      320
Val Gln Thr Val Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile
      325      330      335
Val Ile Gly Asn Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys
      340      345      350
Glu Ser Gly Arg Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met
      355      360      365
Pro Tyr His Ile Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu
      370      375      380
Asp Ser Gly Thr Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His
385      390      395      400
Gln Asp Glu Lys Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Thr
      405      410      415
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
      420      425      430
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
      435      440      445
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
      450      455      460
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
465      470      475      480
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
      485      490      495
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
      500      505      510
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
      515      520      525
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
      530      535      540
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
545      550      555      560
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
      565      570      575
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
      580      585      590
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
      595      600      605
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
      610      615      620
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
625      630      635      640
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      645      650      655

```

<210> 15
 <211> 658
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

```

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

```

145 150 155 160
His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln
165 170 175
Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr
180 185 190
Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg
195 200 205
Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val
210 215 220
Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn
225 230 235 240
Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg
245 250 255
Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile
260 265 270
Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr
275 280 285
Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys
290 295 300
Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Ser Ser Ser Ser
305 310 315 320
Ser Ser Ser Ser Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
325 330 335
Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
340 345 350
Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
355 360 365
Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
370 375 380
Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
385 390 395 400
Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
405 410 415
Gln Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Lys Ser Cys Asp
420 425 430
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
435 440 445
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
450 455 460
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
465 470 475 480
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
485 490 495
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
500 505 510
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
515 520 525
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
530 535 540
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
545 550 555 560
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
565 570 575
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
580 585 590
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
595 600 605
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
610 615 620
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
625 630 635 640
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
645 650 655
Gly Lys

<210> 16
<211> 1593
<212> DNA
<213> 智人

<400> 16
atgcggcttc cgggtgcgat gccagctctg gccctcaaag gcgagctgct gttgctgtct 60
ctcctgttac ttctggaacc acagatctct cagggcctgg tcgtcacacc cccggggcca 120
gagcttgtcc tcaatgtctc cagcaccttc gtctgacct gctcgggttc agctccggtg 180

```

gtgtgggaac ggaatgtccca ggagccccca caggaaatgg ccaaggccca ggaatggcacc 240
tttccagcgg tgcacacact gaccaacctc acitgggctag acacgggaga atacttttgc 300
accacaaatg actcccgtag actggagacc gatgagcgga aacggctcfa catctttgtg 360
ccagatccca ccgtgggctt cctccctaat gatgccgagg aactattcat ctttctcacg 420
gaaataactg agatcaccat tccatgccga gtaacagacc cacagctggt ggtgacactg 480
cacgagaaga aaggggacgt tgcactgcct gtcccctatg atcaccaacg tggctttttt 540
ggatcttttgg aggacagaag ctacatctgc aaaaccacca ttggggacag ggaggtggat 600
tttgaatgctt actatgtcta cagactccag gtgtcatcca tcaacgtctc tgtgaacgca 660
gtgcagactg tgggtccgcca ggggtgagaac atcacccctca tgtgcatgtt gatcgggaat 720
gaggttggtca acttcgagtg gacatacccc cgcaaaagaaa gtgggcggct ggtggagccg 780
gtgactgact tctctttgga tatgcccctac cacatccgct ccatcctgca catccccagt 840
gccgagttag aagactcggg gacctacacc tgcattgtga cggagagttt gaatgacct 900
caggatgaaa agggccatcaa calcacctgt gttgagagcg gctacgtgcg gctcctggga 960
gaggtgggca cactacaatt tgcctgagctg catcggagcc ggacactgca ggtagtgttc 1020
gaggcctacc caccgcccac tgcctgttgg ttcaaagaca accgcacctt gggcgactcc 1080
agcgttggcg aaatcgccct gtccacgcgc aacgtgtcgg agaccgggta tgtgtcagag 1140
ctgacactgg ttccgctgaa ggtggcagag gctggccact acaccatgcg ggccttccat 1200
gaggatgctg aggtccagct ctccttccag ctacagatca atgtccctgt ccgagtgtctg 1260
gagctaagtg agggccaccc tgcagttggg gaacagacag tccgtgtgtc tggccggggc 1320
atgccccagc cgaacatcat ctggtctgct tgcagagacc tcaaaagggt tccacgtgag 1380
ctgcccccca cgtgtgtggg gaacagtctc gaagaggaga gccagctgga gactaacgtg 1440
acgtactggg agggaggagca ggagttttag gtgtgtgagc cactgtgtct gcagcacgtg 1500
gatcggccac tgtcgggtcg ctgcacgtct cgcaacgtct tgggccagga cagcaggag 1560
gtcatcgttg tgcacacact ctgtcccttt taa 1593

```

<210> 17
 <211> 1266
 <212> DNA
 <213> 智人

```

<400> 17
atcgggcttc cgggtgcat gccagctctg gcccicaaag gcgagctgct gttgtgtct 60
ctcctgttac ttctggaacc acagatctct cagggccttg tctcacacc cccggggcca 120
gagcttgtcc tcaatgtctc cagcaccctc gttctgacct gctcgggttc agctccgggtg 180
gtgtgggaac ggaatgtccca ggagccccca caggaaatgg ccaaggccca ggaatggcacc 240
tttccagcgg tgcacacact gaccaacctc actgggctag acacgggaga atacttttgc 300
accacaaatg actcccgtag actggagacc gatgagcgga aacggctcfa calctttgtg 360
ccagatccca ccgtgggctt cctccctaat gatgccgagg aactattcat ctttctcacg 420
gaaataactg agatcaccat tccatgccga gtaacagacc cacagctggt ggtgacactg 480
cacgagaaga aaggggacgt tgcactgcct gtcccctatg atcaccaacg tggctttttt 540
ggatcttttgg aggacagaag ctacatctgc aaaaccacca ttggggacag ggaggtggat 600
tttgaatgctt actatgtcta cagactccag gtgtcatcca tcaacgtctc tgtgaacgca 660
gtgcagactg tgggtccgcca ggggtgagaac atcacccctca tgtgcatgtt gatcgggaat 720
gaggttggtca acttcgagtg gacatacccc cgcaaaagaaa gtgggcggct ggtggagccg 780
gtgactgact tctctttgga tatgcccctac cacatccgct ccatcctgca catccccagt 840
gccgagttag aagactcggg gacctacacc tgcattgtga cggagagttt gaatgacct 900
caggatgaaa agggccatcaa calcacctgt gttgagagcg gctacgtgcg gctcctggga 960
gaggtgggca cactacaatt tgcctgagctg catcggagcc ggacactgca ggtagtgttc 1020
gaggcctacc caccgcccac tgcctgttgg ttcaaagaca accgcacctt gggcgactcc 1080
agcgttggcg aaatcgccct gtccacgcgc aacgtgtcgg agaccgggta tgtgtcagag 1140
ctgacactgg ttccgctgaa ggtggcagag gctggccact acaccatgcg ggccttccat 1200
gaggatgctg aggtccagct ctccttccag ctacagatca atgtccctgt ccgagtgtctg 1266
gagtag

```

<210> 18
 <211> 2316
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

```

<400> 18
atcgggcttc cgggtgcat gccagctctg gcccicaaag gcgagctgct gttgtgtct 60
ctcctgttac ttctggaacc acagatctct cagggccttg tctcacacc cccggggcca 120
gagcttgtcc tcaatgtctc cagcaccctc gttctgacct gctcgggttc agctccgggtg 180
gtgtgggaac ggaatgtccca ggagccccca caggaaatgg ccaaggccca ggaatggcacc 240
tttccagcgg tgcacacact gaccaacctc actgggctag acacgggaga atacttttgc 300
accacaaatg actcccgtag actggagacc gatgagcgga aacggctcfa catctttgtg 360
ccagatccca ccgtgggctt cctccctaat gatgccgagg aactattcat ctttctcacg 420
gaaataactg agatcaccat tccatgccga gtaacagacc cacagctggt ggtgacactg 480
cacgagaaga aaggggacgt tgcactgcct gtcccctatg atcaccaacg tggctttttt 540
ggatcttttgg aggacagaag ctacatctgc aaaaccacca ttggggacag ggaggtggat 600
tttgaatgctt actatgtcta cagactccag gtgtcatcca tcaacgtctc tgtgaacgca 660
gtgcagactg tgggtccgcca ggggtgagaac atcacccctca tgtgcatgtt gatcgggaat 720

```

gagggtggta	acttcgagtg	gacatacccc	cgcaaaagaaa	gtgggagggt	ggtggagccg	780
gtgactgact	tcctcttggg	tatgccttac	cacatccgct	ccatcctgca	catccccagt	840
gccgagttag	aagactcggg	gacctacacc	tgcaatgtga	cggagagltg	gaatgacat	900
caggatgaaa	aggccatcaa	catcaccgtg	gttgagagcg	gctacgtgcg	gctcctggga	960
gagggtggca	cactacaatt	tgctgagctg	catcggagcc	ggacactgca	ggtagtgttc	1020
gaggccctacc	caccgcccac	tgctcctgtg	ttcaaaagaca	accgcaccct	gggcgactcc	1080
agcgctggcg	aaatcgccct	gtccacgcgc	aacgtgtcgg	agaccgggta	tgtgtcagag	1140
ctgacactgg	ttcgctgaa	gggtggcagag	gctggccact	acaccaigcg	ggccttccat	1200
gaggatgctg	aggctccagct	ctccttccag	ctacagatca	atgtccctgt	ccgagtgtctg	1260
gagctaaagtg	agagccaccc	tgacagtggg	gaacagacag	lccgtgtctg	tggccggggc	1320
atgccccagc	cgaacatcat	ctggtctgcc	tgcaagagacc	tcaaaagggt	tccacgtgag	1380
ctgcccccca	cgtgctggg	gaacagtctc	gaagaggaga	gccagctgga	gactaacgtg	1440
acgtactggg	aggaggagca	ggagttlgag	gtggtgagca	cactgcgtct	gcagcacgtg	1500
gatcgccccc	tgctgggtgg	ctgcacgctg	cgcaacgctg	tggccaggga	cacgcaggag	1560
gtcatcgttg	tgccacactc	cttgcccttt	accggtggag	gtggagggtg	agggtggagt	1620
cctaaatctt	gtgacaaaac	tcacacatgc	ccaccgtgcc	cagcacctga	actcctgggg	1680
ggaccgticag	tcctcctctt	ccccccaaaa	cccaaggaca	ccctcatgat	ctcccgagcc	1740
cctgagggtca	catgctgtgt	gggtggacgtg	agccacgaag	accctgaggt	caagttcaac	1800
tggtactgtg	acggcgttga	ggtgcataat	gccaaagaaa	agccgcggga	ggagcagttc	1860
aacagcacgt	accgtgtgtg	cagcgtcttc	accgtctctg	accaggactg	gctgaattgg	1920
aaggagtaca	agtgcagggt	ctccaacaaa	gccctcccag	cccccatcga	gaaaaccatc	1980
tccaaagcca	aagggcagcc	ccgagaacca	cagggtgtaca	ccctgcccc	atcccgagat	2040
gagctgacca	agaaccaggt	cagcctgacc	tgccctggta	aaggcttcta	tccagcgagc	2100
atcgccgttg	agtgggagag	caatgggcag	ccggagaaca	actacaagac	cacgcctccc	2160
gtgctggact	ccgacggctc	cttcttcttc	tacagcaagc	tcaccgttga	caagagcagg	2220
tggcagcaga	ggaacgtctt	ctcatgtctc	gtgatgcatg	aggctctgca	caaccactac	2280
acgcagaaga	gcctctccct	gtctccgggt	aaatag			2316

<210> 19
<211> 1671
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 19						
atcgccgcttc	cgggtgtcgat	gccagctctg	gccctcaaaag	gcgagctgct	gttgctgtct	60
ctcctgtttac	ttctggaacc	acagatctct	caggggcctgg	tcgttcacacc	cccggggcca	120
gagacttgtcc	tcaatgtctc	cagcaccttc	gttctgacct	gctcgggttc	agctccggtg	180
gtgtgggaac	ggatgtccca	ggagccccca	caggaaatgg	ccaaggccca	ggatggcacc	240
ttctccagcg	tgctcacact	gaccaacctc	actgggctag	acacgggaga	atacttttgc	300
acccacaatg	actcccgttg	actggagacc	gatgagcgga	aacggctcta	catcttttgg	360
ccagatccca	ccgtgggctt	cctccctaata	gatgccgagg	aactattcat	ctttctcacg	420
gaaataactg	agatcaccat	tccatgccga	gtaacagacc	cacagctggt	ggtgacactg	480
cacgagaaga	aaggggagct	tgacatgcct	gtccccfatg	atcaccaacg	tggctttttt	540
gggtatcttt	aggacagaag	ctacatctgc	aaaaccacca	tgggggacag	ggaggtggat	600
ictgatgcct	actatgtcta	cagactccag	gtgtcatcca	tcaacgtctc	tgtgaacgca	660
gtgcagactg	tggtccgcca	gggtgagaac	atcaccttca	tgtgcattgt	gatcgggaat	720
gaggtagtca	acttcgagtg	gacatacccc	cgcaaaagaaa	gtgggagggt	ggtaggagccg	780
gtgactgact	tcctcttggg	tatgccttac	cacatccgct	ccatcctgca	catccccagt	840
gccgagttag	aagactcggg	gacctacacc	tgcaatgtga	cggagagltg	gaatgacat	900
caggatlgaaa	aggccatcaa	catcaccgtg	gttgagagcg	gctacaccgg	tggaggttga	960
ggtaggagtg	gaggctctaa	atcttgtgac	aaaactcaca	catgccacc	gtgccagca	1020
cctgaactcc	tggggggacc	gtcagctctc	ctcttcccc	caaaacccaa	ggacaccctc	1080
atgatctccc	ggacccttga	ggtcacatgc	gtggtgtgtg	acgtgagcca	cgaagacctt	1140
gagggtcaagt	tcaacttggt	cgtggagcgc	gtggaggtgc	ataatgccaa	gacaaagccg	1200
cgggaggagc	agtacaacag	cacgtacgtg	gtggtagcgc	tcctcaccgt	ccgtgaccag	1260
gactggctga	atggcaagga	gtacaagtgc	aagggtctcca	acaaagccct	cccagccccc	1320
atcgagaaaa	ccatctccaa	agccaaaggg	cagccccgag	aaccacaggt	gtacacccctg	1380
cccccatccc	gggatgagct	gaccaagaac	caggtcagcc	tgacctgcct	ggicaaaggc	1440
ttctatccca	gcgacatcgc	cgtggagttg	gagagcaatg	ggcagccgga	gaacaactac	1500
aagaccacgc	ctcccgtgct	ggactccgac	ggctccttct	tcctctacag	caagctcacc	1560
gtggacaaga	gcagggtggca	gcaggggaac	gtcttctcat	gctccgtgat	gcatgaggct	1620
ctgcacaacc	actlacgca	gaagagcctc	tccctgtctc	cgggtaaata	g	1671

<210> 20
<211> 1365
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 20

atgcggcttc cgggigcgat gccagctctg gccctcaaag gcgagctgct gttgctgtct 60
ctcctgtitac ttctggaaac acagatctct caggggcttg tcttcacacc cccggggcca 120
gagcttgttc tcaatgtctc cagcaccttc gttctgacct gctcgggttc agctccgggtg 180
gtgtgggaac ggaatgtcca ggagcccca caggaaatgg ccaaggccca ggaatggcacc 240
ttctccagcg tcttcacact gaccaacctc actgggctag acacgggaga atacttttgc 300
acccacaatg actcccggtg actggagacc gatgagcgga aacggctcta catctttgtg 360
ccagatccca cgtggggttt cctccctaact gatccgagg aactaitcat ctttttcacg 420
gaaataactg agatcaccat tccatgccga gtaacagacc cacagctggt ggtgacactg 480
cacgagaaga aaggggacgt tgcactgcct gtccccatg atcaccacg tggctttttt 540
ggtatctttg aggacagaag ctacatctgc aaaaccacca ttggggacag ggaggtggat 600
tctgatgcct actatgtcta cagactccag gtgtcatcca ccggtggagg tggaggtgga 660
gggtggaggtc ctaaaatctt tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 720
ctcctggggg gaccgtcagt cttctcttcc ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgac 780
tcccggaacc ctgagggtac atgcgttggt gtggacgtga gccacgaaga ccttgaggtc 840
aagttcaact ggtacgttga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gcccgggag 900
gagcagtaca acagcacgtg ccgtgtgttc agcgtcttca ccgtcctgca ccaggactgg 960
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaagggt tccaacaaag ccttcccagc ccccatcgag 1020
aaaaccatct ccaaaagcca agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgcccca 1080
tccgggatg agctgaccaa gaaccagggt agcctgacct gccttggtcaa aggccttctat 1140
cccagcgaca tgcctgttga gtgggagagc aatgggcagc cggaagaaca ctacaagacc 1200
acgcttcccg tctgtgacac cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac 1260
aagcagcagg gcgacgaagg gaacgtcttc tcatgtccg tgaatcatga ggctctgcac 1320
aacactata ccgagaagag cctctctctg tctccggta aatag 1365

<210> 21
<211> 2616
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 21
atggtcagct actgggacac cgggggtctg ctgtgcgcgc tgcicagctg tctgcttctc 60
acaggatctg gtagaccttt cgtagagatg tacagtgaaa tccccgaaat tatacacatg 120
actgaaggaa gggagctcgt cattccctgc cgggttacgt cacctaacat cactgttact 180
tlaaaaaagt ttccacttga cactttgatc cctgatggaa aacgcataat ctgggacagt 240
agaaagggtc tcatcatalc aaatgcaacg tacaagaaa tagggcttct gaccttgaa 300
gcaacagtca atgggcatit gtataagaca aactatctca cacatcgaca aacctcgagt 360
tccagctcct ctctctcaag ccagatctct caggggcctg tcttcacacc cccggggcca 420
gagcttgtcc tcaatgtctc cagcaccttc gttctgacct gctcgggttc agctccgggtg 480
gtgtgggaac ggaatgtcca ggagcccca caggaaatgg ccaaggccca ggaatggcacc 540
ttctccagcg tgcctcacact gaccaacctc actgggctag acacgggaga atacttttgc 600
accacaatg actcccggtg actggagacc gatgagcgga aacggctcta catctttgtg 660
ccagatccca cgtggggttt cctccctaact gatccgagg aactaitcat ctttttcacg 720
gaaataactg agatcaccat tccatgccga gtaacagacc cacagctggt ggtgacactg 780
cacgagaaga aaggggacgt tgcactgcct gtccccatg atcaccacg tggctttttt 840
ggtatctttg aggacagaag ctacatctgc aaaaccacca ttggggacag ggaggtggat 900
tctgatgcct actatgtcta cagactccag gtgtcatcca tcaacgtctc tgtgaacgca 960
gtgcagactg tgggtccgca ggggtgagaac atcaccttca tgtgcatgtt gatcgggaat 1020
gaggttggtca acttccagtg gacatacccc cgcaagaaa gtgggcggct ggtggagccg 1080
gtgactgact tctcttggga tatgccttac cacatccgct ccatcctgca catccccagt 1140
gccgagttag aagactcggg gacctacacc tgcaatgtga cggagagigt gaatgacct 1200
caggatgaaa aggccatcaa catcaccgtg gttgagagcg gctacgtgcg gctccggga 1260
gaggtgggca cactacaatt tgcgtgagct catcggagcc ggacactgca ggtagtgttc 1320
gaggcctacc caccgcccac tglccttggg ttcaaagaca accgcaccct gggcgactcc 1380
agcgctggcg aaatcgccct gtccacgcgc aacgtgtcgg agaccgggta tgtgtcagag 1440
ctgacactgg ttccgctgaa gggtggcagag gctggccact acaccatgcg ggcttccat 1500
gaggatgctg aggtccagct ctcttccag ctacagatca atgtctctgt ccgagtgtctg 1560
gagctaaagt agagccacc ttgacagtggg gaacagacag tccgtgtlct tggccggggc 1620
atgccccagc cgaacatcat ctggctgtcc tgcagagacc tcaaaagggt tccacgtgag 1680
ctgccgcca cgtgtgttgg gaacagtctc gaagaggaga gccagctgga gactaacgtg 1740
acgtactggg agggaggagca ggaattttag gtgttgagca cactgctct gcagcacgtg 1800
gatcggccac tgtcgtgtcg ctgcacgctg cgcaacgctg tgggccagga caccgaggag 1860
gtcatctggg tgcacactc ctgtcccttt accgggtggag gtggaggttg aggtggaggt 1920
cctaaatctt gtgacaaaac tcaacatgac ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 1980
ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa ccaaggaca cctcatgat ctcccgacc 2040
cctgaggcta catgctgtgt gggtggacgt agccacgaag accctlgagt caagttcaac 2100
tggtagcttg acggcgttga ggtgcataat gccaagacaa agcccgggga ggagcagtac 2160
aacagcacgt accgtgtgtt cagcgtcttc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 2220
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 2280
tccaaagcca aaggggcagc ccgagaacca caggtgtaca ccttcccccc atccgggat 2340
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgttca aaggcttcta tcccagcgac 2400
atcggcgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac caccctccc 2460
gtgtcggact ccgacggctc ctcttctct tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 2520



tggcagcagg ggaacgctt ctcagctcc gtgatcatg aggcctcga caaccactac 2580
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatag 2616

<210> 22
<211> 2619
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 22
atgcggcttc cgggtgcgat gccagctctg gccctcaaa ggcagctgct gtgtgtgtct 60
ctcctgttac tcttggaacc acagatctct cagggcctgg tctgtacacc cccggggcca 120
gagcttgtcc tcaatgtctc cagcaccttc gtctgtacct gctcgggttc agctccggtg 180
gtgtgggaac ggaatgtccca ggagccccc caggaaatgg ccaaggccca ggaatggcacc 240
ttctccagcg tgcctacact gaccaacctc actgggctag acacgggaga atacttttgc 300
accacaaatg actcccgtag actggagacc gatgagcggg aacggctcta catctttgtg 360
ccagatccca cgttgggctt cctccctaai gatcccgagg aactatlcac ctctctcacg 420
gaaataactg agatcaccal tccatgccga gtaacagacc cacagctggt ggtgacactg 480
cagcagaaga aaggggagct tgcactgcct gtcccttatg atcaccacag tggctttttt 540
ggatcttttg aggcagagaag ctacatctgc aaaaccacca ttggggacag ggaggtggat 600
tctgatgctt actatgtcta cagactccag gtgtcatcca tcaacgtctc tgtgaacgca 660
gtgcagactg tggctccgca gggtgagaac atcacctca tgtgcatgtg gatcgggaat 720
gaggtgggtc acttgcagtg gacatacccc cgcaaaagaa gtgggcggct ggtggagccg 780
gtgactgact tctcttggga tatgccttac cacatccgct ccatcctgca catccccagt 840
gccgagttag aagactcggg gacctacacc tgcattgtga cggagaggtg gaatgaccat 900
caggatgaaa aggcacataa catcacctgt gttagagcgg gctacgtgcg gctcctggga 960
gaggtgggca cactacaatt tgcctgagctg catcggagcc ggacactgca ggtagtgttc 1020
gagggctacc caccgcccac tctcctgtgg ttcaaaagca accgcaccct gggcgactcc 1080
agcgtcggcg aaatcgccct gtccacgcgc aacgtgtcgg agaccgggta tgtgtcagag 1140
ctgacactgg ttcgctgtaa gggtggcagag gctggccact acaccatgcg ggccttccat 1200
gaggtatgct aggtccagct ctccctccag ctacagatca atgtccctgt ccgagtgctg 1260
gagctaaagt agagccaccc tgacagtggtg gaacagacag tccgctgtcg tggccggggc 1320
atgccccagc cgaacatcat ctggtctgct tgcagagacc tcaaaagggt tccacgtgag 1380
ctgcccgcga cgtgtctggg gaacagttcc gaagaggaga gccagctgga gactaacgtg 1440
acgtactggg agggaggagca ggagtttag gtgtgtgagca cactgcgtct gcagcacgtg 1500
gatcggccac tgtcgtgtcg ctgcacgtcg cgcaacgtcg tgggccagga cagcaggag 1560
gtcatctgtg tggcacactc ctgtcccttt agttccagct cctcttctc aagctcgctt 1620
ttcgtagaga tgtacagtga aatccccgaa attatacaca tgactgaagg aaggaggctc 1680
gtcatctccct gccgggttac gtcacctaac atcactgtta ctttaaaaaa gtttccactt 1740
gacactttga tccctgatgg aaaacgcata atctgggaca gtagaaaggg ctctcatata 1800
tcaaatgcaa cgtacaaaga aatagggctt ctgacctgtg aagcaacagt caatgggcat 1860
ttgtataaga caaacatctt cacacatcga caaacgggtg gaggtggagg tggagggtga 1920
ggctcctaaa ctgttgacaa aactcacaca tggccaccgt gccagcacc tgaactcctg 1980
ggggggaccgt cagcttctct ctcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 2040
acccctgagg tcacatgcgt ggtgtgtggc gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 2100
aactgtgtac tggacggcgt ggaggtgcat aatggcaga caaaggcccg ggaggagcag 2160
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgct ctacaccgtc tgcaccagga ctggctgaat 2220
ggcaaggagt acaagtgcga ggtctccaac aaagccctcc cagcccccac cgagaaaacc 2280
atctccaaag ccaaaaggga gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 2340
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcttgg tcaaaaggct ctatcccagc 2400
gacatgcccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgctt 2460
cccgctcgtg actccgacgg ctccctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 2520
agggtggcag aggggaacgt ctctcatgct tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 2580
tacacgcaga agagcctctc cctgtctcgg ggtaaatag 2619

<210> 23
<211> 1971
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 23
atgggtcagct actgggacac cggggctcctg ctgtgcgcgc tgcctcagctg tctgtctctc 60
acaggatctg gtagaccttt cgttagagatg tacagtgaat tccccgaaat tatacacatg 120
actgaaggaa ggagctcgtt catctccctgc cgggttacgt cacctaacat cactgttact 180
tlaaaaaagt ttcacttga cactttgalt cctgatggaa aacgcataat ctgggacagt 240
agaaagggtt tcatcatatc aaatgcaacg taaaaagaaa tagggcttct gacctgtgaa 300
gcaacagica atgggcatit gtataagaca aactatctca cacatcgaca aacctcgagt 360
tccagctcct ctccctcaag ccagatctct cagggcctgg tctgtacacc cccggggcca 420
gagcttgtcc tcaatgtctc cagcaccttc gtctgtacct gctcgggttc agctccggtg 480
gtgtgggaac ggaatgtccca ggagccccc caggaaatgg ccaaggccca ggaatggcacc 540


```

ttctccagcg tgcacacact gaccaaccic actgggctag acacgggaga atacttttgc 600
acccacaatg actcccgtgg actggagacc gatgagcgga aacggctcta catcttttg 660
ccagatccca ccgtgggclt cctccctaat gatgccgagg aactattcat ctttctcacg 720
gaaataactg agatcaccat tccatgccga gtaacagacc cacagcttgt ggtgacactg 780
cacgagaaga aaggggagct tgcactgcct gtccctatg atcaccaacg tggctttttt 840
gglatctttg aggacagaag ctacatctgc aaaaccacca ttggggacag ggagggtgat 900
tctgatgcct actatgicta cagactccag gtgicattca tcaacgtctc tgtgaacgca 960
gtgcagactg tggtcggcca gggtgagaac atcacccica tgtgcatlgt gatcgggaat 1020
gagggtgtca acttcgagtg gacataccce cgcaaagaaa gtgggcggct ggtggagccg 1080
gtgactgact tctcttggga tatgccctac cacatccgct ccatcctgca catccccagt 1140
gccgagttag aagactcggg gacctacacc tgcattgiga cggagagigt gaatgacct 1200
caggatgaaa agggcatcaa catcaccgtg gttgagagcg gctacaccgg tggaggttga 1260
gttggaggtg gagggtccta atcttttgac aaaactcaca catgccacc glgcccagca 1320
cctgaactcc tggggggacc gtcagcttcc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 1380
atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtgtgtgtgt acgtgagcca cgaagacctt 1440
gaggltcaagt tcaactgtgt cgtggagcgc gtggaggtgt ataatgcaa gacaaagccg 1500
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtgtcagcg tcttcaccgt cctgcaccag 1560
gacttggctga atggcaagga gtacaagtgc aagggtctca acaaaagccct cccagcccc 1620
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaagg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1680
cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggicagcc tgacctgcct ggtcaaaagg 1740
tctatccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaatg ggagccgga gaacaactac 1800
aagaccacgc ctcccgctgt ggacitccgc ggctccttct tctctacag caagctcacc 1860
gtggacaaga gcagggtgca gcaggggaaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1920
ctgcacaacc actacacgca gaagagcttc tccctgtctc cgggtaaaat g 1971

```

<210> 24
 <211> 1977
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

```

atcgccgttc cgggtgcat gccagctctg gccctcaaa gcgagctgct gttgctgtct 60
ctccgtttac ttctggaacc acagatctct caggcccttg tctgtcacacc cccggggcca 120
gagcttgtcc tcaatgtctc cagcaccttc gtctgacct gctcgggttc agctccgggtg 180
gtgtgggaac ggaatgtcca ggagcccca caggaaatgg ccaaggccca ggaatggcacc 240
ttctccagcg tgcacacact gaccaaccic actgggctag acacgggaga atacttttgc 300
acccacaatg actcccgtgg actggagacc gatgagcgga aacggctcta catcttttg 360
ccagatccca ccgtgggclt cctccctaat gatgccgagg aactattcat ctttctcacg 420
gaaataactg agatcaccat tccatgccga gtaacagacc cacagcttgt ggtgacactg 480
cacgagaaga aaggggagct tgcactgcct gtccctatg atcaccaacg tggctttttt 540
gglatctttg aggacagaag ctacatctgc aaaaccacca ttggggacag ggagggtgat 600
tctgatgcct actatgicta cagactccag gtgtcatcca tcaacgtctc tgtgaacgca 660
gtgcagactg tggtcggcca gggtgagaac atcacccica tgtgcatlgt gatcgggaat 720
gagggtgtca acttcgagtg gacataccce cgcaaagaaa gtgggcggct ggtggagccg 780
gtgactgact tctcttggga tatgccctac cacatccgct ccatcctgca catccccagt 840
gccgagttag aagactcggg gacctacacc tgcattgiga cggagagigt gaatgacct 900
caggatgaaa agggcatcaa catcaccgtg gttgagagcg gctacaccgg tggaggttga 960
tcttcaagct cgagaccttt cgttagagatg tacagtgaat tccccgaat tatacacatg 1020
actgaaggaa gggagctcgt catctccctg cgggttacct cacctaacat cactgttact 1080
ttaaaaaagt ttccacttga cactttgatc cctgatggaa aacgcataat ctgggacagt 1140
agaaaaggct tcatcatatc aaatgcaacg tacaagaaa tagggcttct gacctgtgaa 1200
gcaacagtca atgggcattt gtataagaca aactatctca cacatcgaca aaccgggtga 1260
ggtggaggtg gagggtggag tcttaaaict tgtgacaaa ctacacatg cccaccgtgc 1320
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac 1380
acctcatga tctcccgac ccttgaggtc acatgcgttg tgggtggact gagccacgaa 1440
gaccttgagg tcaagtcaa ctggtacgtg gacggcggtg aggtgcataa tgccaagaca 1500
aagcccgagg agggagcagta caacagcag taccgtgtg tcagcgtcct caccgtcctg 1560
caccaggact ggcgtgaatg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca 1620
gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac 1680
acctgtccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgctgtgtc 1740
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa 1800
aactacaaga ccacgcctcc cgtgtgtgac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag 1860
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgtct cgtgatgcat 1920
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agccttctcc tgtctccggg taaaatag 1977

```

<210> 25
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 25 gactagtatg cggcttccgg gtg	23
<210> 26 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成構築體	
<400> 26 accggtggat gacacctgga gtctg	25
<210> 27 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成構築體	
<400> 27 ctatgtctac agacitccagg tgtc	24
<210> 28 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成構築體	
<400> 28 accggtaaaag ggcaaggagt gtggc	25
<210> 29 <211> 32 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成構築體	
<400> 29 cctccaccgg tglagccgct ctcaaccacg gt	32
<210> 30 <211> 28 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成構築體	
<400> 30 cccgggacta gtatgcggct tccgggtg	28
<210> 31 <211> 11 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成構築體	
<400> 31 ccggttaggg a	11
<210> 32 <211> 11 <212> DNA <213> 人工序列	

<220>
<223> 合成構築體

<400> 32
ggcctcccta a

11

<210> 33
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 33
ttaggtccag ctctccttcc agctacagat caatgtccct gtccgagtcg tggagtagc

59

<210> 34
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 34
ggccgclact ccagcactcg gacagggaca ttgatctgta gctggaagga gagctggacc

60

<210> 35
<211> 407
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 35
actagtggcg gccgccacca tggtcagcta ctgggacacc ggggtcctgc tgtgcgcgt
gtcagctgt ctgcttctca caggatctgg tagacctttc gtagagatgt acagtgaat
ccccgaaatt atacacatga ctgaagggaag ggagctcgtc attccctgcc gggttacgic
acctaacatc actgttactt taaaaaagtt tccacttgac actttagtcc ctgaaggaaa
acgcataatc tgggacagla gaaagggctt catcataica aatgcaacgt acaagaaaat
agggtctctg accttgaag caacagltcaa tgggcatttg tataagacaa actatctcac
acatcgacaa acctcgagtt ccagctcctc ttctcaagc cagatct

60
120
180
240
300
360
407

<210> 36
<211> 689
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 36
ccacgtctgt ggggaacagt tccgaagagg agagccagct ggagactaac gtgacgtact
gggaggagga gcaggagtgt gagggtggtga gcacactgctg tctgcagcac glggatcggc
cactgtcggg gcgctgcacg ctgcgcaacg ctgtgggcca ggacacgcag gaggtcatcg
tgggtccaca ctcttggccc tttagttcca gctcctcttc ctcaagctcg agacctttcg
tagagatgta cagtgaatc cccgaaatia tacacatgac tgaagggaagg gagctcgtca
ttccctgccc gggttacgtca cctaacalca ctgttacttt aaaaaagttt ccacttgaca
ctttgaiccc tgaaggaaaa cgcalaatct gggacagtag aaagggttct atcataatcaa
atgcaacgta caaagaaala gggcttctga cctgtgaagc aacagtcaat gggcatttgt
ataagacaaa ctatctcaca catcgacaaa ccggtggagg tggaggtgga ggtggaggic
ctaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctctggggg
gaccgtcagt ctctctctc ccccaaaac ccaaggacac cctcaigatc tcccggaccc
ctgaggtcac atgcgtggg gtggacgtg

60
120
180
240
300
360
420
480
540
600
660
689

<210> 37
<211> 460
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 37
gactgtggtc cgccagggtg agaacatcac cctcatgtgc atttgtatcg ggaatgaggt 60
ggtaacatlc gagtggacat acccccgcaa agaaagtggg cggctgggtg agccggtgac 120
tgacttcttc ttggatatgc ctaccacat ccgctccalc ctgcacatcc ccagtgccga 180
gttagaagac tgggggacct acacctgcaa tgtgacggag agtltgaatg accatcagga 240
tgaagaggcc atcaacatca ccgtgggtga gagcggctac accggtggag gtggagggtg 300
agggtggagg cctaaatctt gtgacaaaac tcaCacatgc ccaccgtgcc cagcacctga 360
actcctgggg ggaccgtcag tcttctcttt cccccaaaa cccaaggaca ccttcatgat 420
ctcccggacc cctgagggtca catgcgtggt ggtggacgtg 460

<210> 38
<211> 766
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 38
gactgtggtc cgccagggtg agaacatcac cctcatgtgc atttgtatcg ggaatgaggt 60
ggtaacatlc gagtggacat acccccgcaa agaaagtggg cggctgggtg agccggtgac 120
tgacttcttc ttggatatgc ctaccacat ccgctccalc ctgcacatcc ccagtgccga 180
gttagaagac tgggggacct acacctgcaa tgtgacggag agtltgaatg accatcagga 240
tgaagaggcc atcaacatca ccgtgggtga gagcggctac agtltcagct ccttctcttc 300
aagctcgaga cctttcgtag agatgtacag tgaatcccc gaaattatc acatgactga 360
aggaaggagg ctggcatttc cctgccgggt tacgtcacct aacatcactg ttactttaaa 420
aaagtttcca ctgacactt tgaatccctga tggaaaacgc ataactctggg acagttagaaa 480
gggcttcatc atataaatg caacgtacaa agaaataggg ctctlgacct gtgaagcaac 540
agtcaatggg catttgtata agacaaacta tctcacacat cgacaaaccg gtggagggtg 600
agggtggagg ggaggtccta aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccagc 660
acctgaactc ctggggggac cgtcagctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct 720
catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtg 766

<210> 39
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 39
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
1 5 10 15
Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser
20 25 30
Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile
35 40 45
Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe
50 55 60
Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser
65 70 75 80
Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu
85 90 95
Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr
100 105 110
Leu Thr His Arg Gln Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gln
115 120 125
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
130 135 140
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145 150 155 160
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
165 170 175
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
180 185 190
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
195 200 205
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
210 215 220
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 40
<211> 702

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 40
algggtcagct actgggacac cgggggtccig ctgtgcgcgc tgctcagctg tcigcttctc 60
acaggatctg gtagaccttt cgtagagatg tacagtgaaa tccccgaaal talacacatg 120
actgaaggaa gggagctcgt catlccctgc cgggttacgt cacctaacat cactgitact 180
ttaaaaaagt ttccacttga cactttgaic ccigatggaa aacgcataal ctgggacagt 240
agaaaagggt tcatcataic aaatgcaacg tacaaagaaa tagggcttct gacctgtgaa 300
gcaacagtca atggggcattt gtataagaca aactatctca cacatcgaca aaccggtgga 360
gggtggagggt gaggtggagg tcagccccga gaaccacagg tgiacacctt gccccatcc 420
cgggatgagc tgaccaagaa ccagggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg ctctatccc 480
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 540
cctcccgtgc tggactccga cggctccctt ttctcttaca gcaagctcac cgtggacaag 600
agcagggtgc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgiga tgcatgaggc tcigcacaac 660
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cgggttaaat ag 702

<210> 41
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 41
cactccctct ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccggg cgaccaagg tcgcccacgc 60
ccgggctttg cccgggcg 78

<210> 42
<211> 847
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 42
Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met
1 5 10 15
Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn
20 25 30
Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp
35 40 45
Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn
50 55 60
Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn
65 70 75 80
Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Ser Ser
85 90 95
Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gln Ile Ser Gln Gly Leu Val Val Thr
100 105 110
Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser Thr Phe Val Leu
115 120 125
Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg Met Ser Gln Glu
130 135 140
Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr Phe Ser Ser Val
145 150 155 160
Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys
165 170 175
Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr Asp Glu Arg Lys Arg Leu
180 185 190
Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu Pro Asn Asp Ala
195 200 205
Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu Ile Thr Ile Pro
210 215 220
Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu His Glu Lys Lys
225 230 235 240
Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln Arg Gly Phe Phe
245 250 255
Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr Thr Ile Gly Asp
260 265 270



Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg Leu Gln Val Ser
 275 280 285
 Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val Val Arg Gln Gly
 290 295 300
 Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn Glu Val Val Asn
 305 310 315 320
 Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg Leu Val Glu Pro
 325 330 335
 Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile Arg Ser Ile Leu
 340 345 350
 His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr Tyr Thr Cys Asn
 355 360 365
 Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys Ala Ile Asn Ile
 370 375 380
 Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val Arg Leu Leu Gly Glu Val Gly Thr
 385 390 395 400
 Leu Gln Phe Ala Glu Leu His Arg Ser Arg Thr Leu Gln Val Val Phe
 405 410 415
 Glu Ala Tyr Pro Pro Thr Val Leu Trp Phe Lys Asp Asn Arg Thr
 420 425 430
 Leu Gly Asp Ser Ser Ala Gly Glu Ile Ala Leu Ser Thr Arg Asn Val
 435 440 445
 Ser Glu Thr Arg Tyr Val Ser Glu Leu Thr Leu Val Arg Val Lys Val
 450 455 460
 Ala Glu Ala Gly His Tyr Thr Met Arg Ala Phe His Glu Asp Ala Glu
 465 470 475 480
 Val Gln Leu Ser Phe Gln Leu Gln Ile Asn Val Pro Val Arg Val Leu
 485 490 495
 Glu Leu Ser Glu Ser His Pro Asp Ser Gly Glu Gln Thr Val Arg Cys
 500 505 510
 Arg Gly Arg Gly Met Pro Gln Pro Asn Ile Ile Trp Ser Ala Cys Arg
 515 520 525
 Asp Leu Lys Arg Cys Pro Arg Glu Leu Pro Pro Thr Leu Leu Gly Asn
 530 535 540
 Ser Ser Glu Glu Glu Ser Gln Leu Glu Thr Asn Val Thr Tyr Trp Glu
 545 550 555 560
 Glu Glu Gln Glu Phe Glu Val Val Ser Thr Leu Arg Leu Gln His Val
 565 570 575
 Asp Arg Pro Leu Ser Val Arg Cys Thr Leu Arg Asn Ala Val Gly Gln
 580 585 590
 Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu Pro Phe Thr Gly
 595 600 605
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 610 615 620
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 625 630 635 640
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 645 650 655
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 660 665 670
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 675 680 685
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 690 695 700
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 705 710 715 720
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 725 730 735
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 740 745 750
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 755 760 765
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 770 775 780
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 785 790 795 800
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 805 810 815
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 820 825 830
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 835 840 845

<210> 43
 <211> 841

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 43

```

Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser
1      5      10      15
Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg
20      25      30
Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr
35      40      45
Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly
50      55      60
Glu Tyr Phe Cys Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr Asp Glu
65      70      75      80
Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu
85      90      95
Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu
100     105     110
Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu
115     120     125
His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln
130     135     140
Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr
145     150     155     160
Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg
165     170     175
Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val
180     185     190
Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn
195     200     205
Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg
210     215     220
Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile
225     230     235     240
Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr
245     250     255
Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys
260     265     270
Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val Arg Leu Leu Gly
275     280     285
Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu Leu His Arg Ser Arg Thr Leu
290     295     300
Gln Val Val Phe Glu Ala Tyr Pro Pro Pro Thr Val Leu Trp Phe Lys
305     310     315     320
Asp Asn Arg Thr Leu Gly Asp Ser Ser Ala Gly Glu Ile Ala Leu Ser
325     330     335
Thr Arg Asn Val Ser Glu Thr Arg Tyr Val Ser Glu Leu Thr Leu Val
340     345     350
Arg Val Lys Val Ala Glu Ala Gly His Tyr Thr Met Arg Ala Phe His
355     360     365
Glu Asp Ala Glu Val Gln Leu Ser Phe Gln Leu Gln Ile Asn Val Pro
370     375     380
Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Glu Ser His Pro Asp Ser Gly Glu Gln
385     390     395     400
Thr Val Arg Cys Arg Gly Arg Gly Met Pro Gln Pro Asn Ile Ile Trp
405     410     415
Ser Ala Cys Arg Asp Leu Lys Arg Cys Pro Arg Glu Leu Pro Pro Thr
420     425     430
Leu Leu Gly Asn Ser Ser Glu Glu Glu Ser Gln Leu Glu Thr Asn Val
435     440     445
Thr Tyr Trp Glu Glu Glu Gln Glu Phe Glu Val Val Ser Thr Leu Arg
450     455     460
Leu Gln His Val Asp Arg Pro Leu Ser Val Arg Cys Thr Leu Arg Asn
465     470     475     480
Ala Val Gly Gln Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu
485     490     495
Pro Phe Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Arg Pro Phe Val Glu
500     505     510
Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu
515     520     525
Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu
530     535     540

```

Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile
 545 550 555 560
 Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys
 580 585 590
 Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 595 600 605
 Gly Gly Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 610 615 620
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 625 630 635 640
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 645 650 655
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 660 665 670
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 675 680 685
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 690 695 700
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 705 710 715 720
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 725 730 735
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 740 745 750
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 755 760 765
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 770 775 780
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 785 790 795 800
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 805 810 815
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 820 825 830
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 835 840

<210> 44
 <211> 632
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 44
 Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met
 1 5 10 15
 Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn
 20 25 30
 Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp
 35 40 45
 Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn
 50 55 60
 Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn
 65 70 75 80
 Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Ser Ser
 85 90 95
 Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gln Ile Ser Gln Gly Leu Val Val Thr
 100 105 110
 Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser Thr Phe Val Leu
 115 120 125
 Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg Met Ser Gln Glu
 130 135 140
 Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr Phe Ser Ser Val
 145 150 155 160
 Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys
 165 170 175
 Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr Asp Glu Arg Lys Arg Leu
 180 185 190
 Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu Pro Asn Asp Ala
 195 200 205
 Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu Ile Thr Ile Pro

210 215 220
 Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu His Glu Lys Lys
 225 230 235 240
 Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln Arg Gly Phe Phe
 245 250 255
 Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr Thr Ile Gly Asp
 260 265 270
 Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg Leu Gln Val Ser
 275 280 285
 Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val Val Arg Gln Gly
 290 295 300
 Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn Glu Val Val Asn
 305 310 315 320
 Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg Leu Val Glu Pro
 325 330 335
 Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile Arg Ser Ile Leu
 340 345 350
 His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr Tyr Thr Cys Asn
 355 360 365
 Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys Ala Ile Asn Ile
 370 375 380
 Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 405 410 415
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 420 425 430
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 435 440 445
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 450 455 460
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 465 470 475 480
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 485 490 495
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 500 505 510
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 515 520 525
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 530 535 540
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 545 550 555 560
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 565 570 575
 Lys Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 580 585 590
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 595 600 605
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 610 615 620
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 625 630

<210> 45
 <211> 626
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

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

Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu
 100 105 110
 Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Thr Leu
 115 120 125
 His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln
 130 135 140
 Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr
 145 150 155 160
 Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg
 165 170 175
 Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val
 180 185 190
 Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn
 195 200 205
 Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg
 210 215 220
 Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile
 225 230 235 240
 Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr
 245 250 255
 Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys
 260 265 270
 Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Ser Ser Ser Ser
 275 280 285
 Ser Ser Ser Ser Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
 290 295 300
 Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
 305 310 315 320
 Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
 325 330 335
 Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
 340 345 350
 Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
 355 360 365
 Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
 370 375 380
 Gln Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Lys Ser Cys Asp
 385 390 395 400
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 405 410 415
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 420 425 430
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 435 440 445
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 450 455 460
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 465 470 475 480
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 485 490 495
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 500 505 510
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 515 520 525
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 530 535 540
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 545 550 555 560
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 565 570 575
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 580 585 590
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 595 600 605
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Pro
 610 615 620
 Gly Lys
 625

<210> 46
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 合成構築體

<400> 46
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 47
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 48
Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 49
Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 50
Gly Gly Gly Gly Gly Cys Pro Pro Cys
1 5

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 51
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 52

Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn
1 5 10

<210> 53
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 53
Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn
1 5 10

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 54
Gly Asp Leu Ile Tyr Arg Asn Gln Lys
1 5

<210> 55
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 55
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
1 5 10 15
Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn
20

I631133

發明摘要

※ 申請案號：103109211

※ 申請日：103/03/13

※IPC 分類：C07K; A61K

【發明名稱】

包含PDGF及VEGF結合部分之融合蛋白及其使用方法

FUSION PROTEINS COMPRISING PDGF AND VEGF BINDING
PORTIONS AND METHODS OF USING THEREOF

【中文】

本發明提供包含PDGF及VEGF結合部分之融合蛋白及編碼該等融合蛋白之重組病毒粒子。亦提供包含該等融合蛋白及病毒粒子之組合物以及其使用方法。

【英文】

The present provides fusion proteins comprising PDGF and VEGF binding portions, and recombinant viral particles encoding the fusion proteins. Compositions comprising the fusion proteins and viral particles as well as methods of using the same are also provided.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（8）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種融合蛋白，其包含(a)血小板衍生之生長因子(platelet-derived growth factor, PDGF)受體之細胞外部分，(b)血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)受體之細胞外部分，及(c)多聚化結構域，其中該融合蛋白結合至PDGF及VEGF，且該融合蛋白係以如下次序自N末端至C末端配置：(a)、(b)及(c)，且其中該融合蛋白不包含VEGFR2之Ig樣結構域D3。
2. 如請求項1之融合蛋白，其中該PDGF受體係PDGFR β 。
3. 如請求項1或2之融合蛋白，其中該PDGFR之該細胞外部分包含該PDGFR之Ig樣結構域D1-D3。
4. 如請求項1或2之融合蛋白，其中該PDGFR之該細胞外部分包含該PDGFR之Ig樣結構域D1-D4。
5. 如請求項1或2之融合蛋白，其中該PDGFR之該細胞外部分包含該PDGFR之Ig樣結構域D1-D5。
6. 如請求項1或2之融合蛋白，其中該PDGFR之該細胞外部分包含胺基酸序列SEQ ID NO:1、2或3或與SEQ ID NO:1、2或3具有至少90%一致性之胺基酸序列。
7. 如請求項1或2之融合蛋白，其中該VEGF受體之該細胞外部分包含VEGF受體之Ig樣結構域D2。
8. 如請求項1或2之融合蛋白，其中該VEGF受體之該細胞外部分包含VEGFR1 (FLT-1)之Ig樣結構域D2。
9. 如請求項1或2之融合蛋白，其中該VEGF受體之該細胞外部分包含VEGFR1 (FLT-1)之該等Ig樣結構域D1-D3。
10. 如請求項1或2之融合蛋白，其中該VEGF受體之該細胞外部分包

含胺基酸序列SEQ ID NO:4或5或與SEQ ID NO:4或5具有至少90%一致性之胺基酸序列。

11. 如請求項1或2之融合蛋白，其中該融合蛋白進一步包含該PDGF受體之該細胞外部分與該VEGF受體之該細胞外部分之間之連接體肽及/或該VEGF受體之該細胞外部分與該多聚化結構域之間之肽連接體。
12. 如請求項11之融合蛋白，其中該肽連接體包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：Gly₉、Glu₉、Ser₉、Gly₅-Cys-Pro₂-Cys、(Gly₄-Ser)₃、Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn、Pro-Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn、Gly-Asp-Leu-Ile-Tyr-Arg-Asn-Gln-Lys及Gly₉-Pro-Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn。
13. 如請求項1或2之融合蛋白，其中該多聚化結構域係抗體之Fc區。
14. 如請求項13之融合蛋白，其中該Fc區包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之CH3區或IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之CH2及CH3區。
15. 如請求項1或2之融合蛋白，其中該Fc區包含胺基酸序列SEQ ID NO:6或與SEQ ID NO:6具有至少90%一致性之胺基酸序列。
16. 如請求項1或2之融合蛋白，其中該融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:13、15、43或45或與SEQ ID NO:13、15、43或45具有至少90%一致性之胺基酸序列。
17. 如請求項1或2之融合蛋白，其中該融合蛋白係呈多聚體形式。
18. 如請求項1或2之融合蛋白，其中該融合蛋白係呈二聚體形式。
19. 一種融合蛋白，其係藉由在產生該融合蛋白之條件下培養包含編碼如請求項1至18中任一項之融合蛋白之核酸的宿主細胞及回收由該宿主細胞產生之該融合蛋白來產生。

20. 一種二聚體融合蛋白，其包含兩種融合蛋白，其中每一融合蛋白包含如請求項1至16中任一項之融合蛋白。
21. 一種組合物，其包含如請求項1至20中任一項之融合蛋白及醫藥上可接受之載劑。
22. 一種核酸，其編碼如請求項1至16中任一項之融合蛋白。
23. 一種宿主細胞，其包含編碼如請求項1至16中任一項之融合蛋白的核苷酸序列。
24. 一種產生融合蛋白之方法，其包含在產生該融合蛋白之條件下培養包含編碼如請求項1至16中任一項之融合蛋白之核酸的宿主細胞及回收由該宿主細胞產生之該融合蛋白。
25. 如請求項24之方法，其中該宿主細胞係哺乳動物細胞。
26. 一種如請求項1至20中任一項之融合蛋白之用途，其係用於製備遞送融合蛋白至個體之藥物。
27. 如請求項26之用途，其中該個體患有黃斑變性或增殖性糖尿病性視網膜病變。
28. 如請求項27之用途，其中該黃斑變性係濕型年齡相關性黃斑變性或乾型年齡相關性黃斑變性。
29. 如請求項26至28中任一項之用途，其中該藥物係用於以玻璃體內注射投與。
30. 如請求項26之用途，其中該個體患有癌症。
31. 如請求項26之用途，其中該個體患有類風濕性關節炎、骨關節炎或哮喘。
32. 如請求項26之用途，其中該個體患有葡萄膜炎或角膜新生血管形成。
33. 一種載體，其包含編碼如請求項1至16中任一項之融合蛋白的核苷酸序列。

34. 如請求項33之載體，其係病毒載體。
35. 如請求項34之載體，其中該病毒載體係重組腺相關病毒載體(rAAV)。
36. 如請求項35之載體，其中該rAAV載體包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh8、AAVrh8R或AAVrh10之ITR。
37. 一種rAAV粒子，其包含編碼如請求項1至16中任一項之融合蛋白的核酸。
38. 如請求項37之rAAV粒子，其中該rAAV粒子包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh8、AAVrh8R或AAVrh10之衣殼蛋白。
39. 如請求項38之rAAV粒子，其中該核酸包含血清型不同於該衣殼之該血清型之ITR。
40. 如請求項39之rAAV粒子，其中該ITR係AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh8、AAVrh8R或AAVrh10之ITR。
41. 一種產生rAAV粒子之方法，其包含：
 - (a) 在產生rAAV粒子之條件下培養宿主細胞，其中該宿主細胞包含(i) 一或多個AAV包裝基因，其中每一該AAV包裝基因編碼AAV複製或衣殼化蛋白質；(ii) rAAV前載體，其包含編碼如請求項1至16中任一項之融合蛋白且側接至少一個AAV ITR之核苷酸，及(iii) AAV輔助功能；及
 - (b) 回收由該宿主細胞產生之該等rAAV粒子。
42. 如請求項41之方法，其中該等rAAV粒子經純化。
43. 一種如請求項37至40中任一項之rAAV粒子之用途，其係用於製備遞送病毒載體至個體之藥物，其中由該rAAV粒子編碼之該融

合蛋白在該個體中表現。

44. 如請求項43之用途，其中該個體患有黃斑變性或增殖性糖尿病性視網膜病變。
45. 如請求項44之用途，其中該黃斑變性係濕型年齡相關性黃斑變性或乾型年齡相關性黃斑變性。
46. 如請求項43至45中任一項之用途，其中該藥物係用於以玻璃體內注射投與。
47. 如請求項43之用途，其中該個體患有癌症。
48. 如請求項43之用途，其中該個體患有類風濕性關節炎、骨關節炎或哮喘。
49. 如請求項43之用途，其中該個體患有葡萄膜炎或角膜新生血管形成。
50. 一種製品或套組，其包含如請求項1至20中任一項之融合蛋白或如請求項21之組合物。
51. 一種製品或套組，其包含如請求項37至40中任一項之rAAV粒子。