

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99814285.9

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 10 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 100340291C

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/574 (2006.01)

[22] 申请日 1999.10.8 [21] 申请号 99814285.9

[30] 优先权

[32] 1998.10.9 [33] US [31] 09/169,079

[86] 国际申请 PCT/US1999/023525 1999.10.8

[87] 国际公布 WO2000/021560 英 2000.4.20

[85] 进入国家阶段日期 2001.6.8

[73] 专利权人 路德维格癌症研究院

地址 美国纽约州

共同专利权人 利森蒂亚有限公司

[72] 发明人 卡里·阿利塔洛 阿加·凯佩南

雷加·瓦尔托拉 洛塔·贾西拉

[56] 参考文献

OW9705250A2 1997.2.13

CN1159827A 1997.9.17

WO9533772A1 1995.12.14

审查员 曲 燕

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 5 页 说明书 98 页 附图 13 页

[54] 发明名称

F1t4 (VEGFR-3) 作为肿瘤显像和抗肿瘤治疗的靶

[57] 摘要

本发明提供纯化的 F1t4 受体酪氨酸激酶多肽及其片段, 编码这类多肽的多核苷酸, 与这类多肽特异性结合的抗体, 以及它们的用途。

1. 一种有效抑制 Flt4 配体蛋白与哺乳动物的血管内皮细胞表达的 Flt4 结合的化合物在制备治疗所述哺乳动物的肿瘤的药物组合物中的用途，该肿瘤的特征为，其邻近区血管的内皮细胞中有 Flt4 受体酪氨酸激酶的表达，其中所述化合物抑制 Flt4 介导的所述血管内皮细胞的增殖，其中所述化合物包含选自下组的成员：

(a) 抗 Flt4 抗体或其抗原结合片段或含抗 Flt4 抗体之抗原结合片段的多肽；

(b) 含可溶性 Flt4 片段的多肽，其中所述片段和所述多肽能够与 Flt4 配体结合；

(c) 一种多肽，其含有脊椎动物血管内皮生长因子 C 前体多肽的片段，其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4；

(d) 一种多肽，其含有脊椎动物血管内皮生长因子 D 前体多肽的片段，其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4；

(e) 抗 VEGF-C 抗体或含抗 VEGF-C 抗体之抗原结合片段的多肽；

(f) 抗 VEGF-D 抗体或含抗 VEGF-D 抗体之抗原结合片段的多肽；

(g) 包含人前原-VEGF-C 或人前原-VEGF-D 的 Flt4 结合片段的多肽，其与抗肿瘤药物偶联；和

(h) 一种双特异性抗体或其片段，其中所述抗体或片段包含特异性结合 Flt4 的抗原结合结构域，和特异性结合血管内皮标记抗原的抗原结合结构域，所述血管内皮标记抗原基本上不出现在淋巴管内皮中。

2. 根据权利要求 1 的用途，所述肿瘤选自癌、淋巴瘤、黑色素瘤或肉瘤。

3. 权利要求 2 的用途，其中所述肿瘤为鳞状细胞癌。

4. 根据权利要求 2 的用途，其中所述肿瘤是以在血管内皮细胞中表达 Flt4 为特点的乳腺癌。

5. 根据权利要求 1 的用途，其中所述药物组合物用于对人的治疗。

6. 根据权利要求 1 的用途，其中所述化合物包括含抗 Flt4 抗体之抗原结合片段的多肽。

7. 根据权利要求 1 的用途，其中所述化合物包含多肽，该多肽包含可溶性 Flt4 片段，其中所述片段和所述多肽能结合 Flt4 配体。

8. 根据权利要求 1 的用途, 其中所述抗体是人源化抗体。
9. 根据权利要求 1-5 任一项的用途, 其中所述化合物包含抗 Flt4 抗体或其抗原结合片段。
10. 根据权利要求 9 的用途, 其中所述抗 Flt4 抗体为人源化抗体。
11. 根据权利要求 1-5 任一项的用途, 其中所述化合物包括双特异性抗体或其片段, 其中所述抗体或片段包含特异性结合 Flt4 的抗原结合结构域, 和特异性结合血管内皮标记抗原的抗原结合结构域, 所述血管内皮标记抗原基本上不出现在淋巴管内皮中。
12. 根据权利要求 11 的用途, 其中所述血管内皮标记抗原选自 PAL-E、VEGFR-1、VEGFR-2、Tie、endoglin 或 von Willebrand 因子。
13. 根据权利要求 11 的用途, 其中所述抗体为人源化抗体。
14. 根据权利要求 11 的用途, 其中所述化合物还包括与所述双特异性抗体偶联的抗肿瘤药物。
15. 根据权利要求 1 的用途, 其中所述化合物还包括与其偶联的抗肿瘤药物。
16. 根据权利要求 1-5 中任一项的用途, 其中所述化合物还包括一种可检测标记。
17. 根据权利要求 1 的用途, 其中所述组合物还包括可药用的稀释剂、佐剂或载体介质。
18. 根据权利要求 11 的用途, 其中所述组合物还包括可药用的稀释剂、佐剂或载体介质。
19. 一种结合 Flt4 的化合物在制备使脊椎动物组织中肿瘤显像的组合物中的用途, 其中, 所述的显像包括使疑有肿瘤的脊椎动物组织与包含结合 Flt4 的化合物的组合物接触; 检测结合到所述组织细胞的结合 Flt4 的化合物; 并且通过鉴定与所述结合 Flt4 的化合物结合的血管内皮细胞使实体瘤显像, 其中表达 Flt4 的血管与该组织中肿瘤的存在和部位相关, 其中所述化合物包含选自下组的成员:
 - (a) 抗 Flt4 抗体或含抗 Flt4 抗体之抗原结合片段的多肽; 和
 - (b) 一种双特异性抗体或其片段, 其中所述抗体或片段包含特异性结合 Flt4 的抗原结合结构域, 和特异性结合血管内皮标记抗原的抗原结合结构域, 所述血管内皮标记抗原基本上不出现在淋巴管内皮中。
20. 根据权利要求 19 的用途, 其中所述化合物还包括与之共价结合的

一种可检测标记。

21. 一种特异性结合 Flt4 受体酪氨酸激酶的化合物在制备检查以新生血管内皮细胞的变化为特点的疾病的组合物中的用途，其中所述检查包括如下步骤：

(a) 获得脊椎动物可疑患者的组织样品，所述可疑患者被怀疑患有以新生血管内皮细胞的变化为特点的疾病；

(b) 将所述组织样品暴露于一种组合物，该组合物包括特异性结合所述生物细胞表达的 Flt4 受体酪氨酸激酶的化合物；

(c) 洗涤所述组织样品；和

(d) 通过检测所述化合物在所述组织样品中的存在、量或分布来检查所述疾病，其中血管内皮细胞中的 Flt4 表达被鉴定为以新生血管内皮细胞之变化为特点的疾病的标志物，

其中所述特异性结合 Flt4 受体酪氨酸激酶的化合物包含选自下组的成员：

(a) 抗 Flt4 抗体或含抗 Flt4 抗体之抗原结合片段的多肽；

(b) 一种多肽，其含有脊椎动物血管内皮生长因子 C 前体多肽的片段，其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4；

(c) 一种多肽，其含有脊椎动物血管内皮生长因子 D 前体多肽的片段，其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4；和

(d) 一种双特异性抗体或其片段，其中所述抗体或片段包含特异性结合 Flt4 的抗原结合结构域，和特异性结合血管内皮标记抗原的抗原结合结构域，所述血管内皮标记抗原基本上不出现在淋巴管内皮中。

22. 根据权利要求 21 的用途，其中，所述组合物还包括可特异性结合一种血管内皮标记物的第二种化合物，所述检查步骤包括对结合 Flt4 的化合物和结合新生血管内皮细胞的第二种化合物进行检测，以测定能同时表达 Flt4 和血管内皮细胞标记物的内皮细胞的存在、量或分布。

23. 根据权利要求 22 的用途，其中所述结合 Flt4 的化合物是双特异性抗体，并且所述血管内皮标记物选自 PAL-E、VEGFR-1、VEGFR-2、Tie、endoglin 或 von Willebrand 因子。

24. 一种特异性结合哺乳动物 Flt4 受体酪氨酸激酶的化合物在制备检测哺乳动物中新生血管内皮细胞的组合物中的用途，其中所述检测包括如下步骤：

(a) 给所述哺乳动物施用一种组合物,该组合物包括特异性结合哺乳动物 Flt4 受体酪氨酸激酶的化合物,和

(b) 检测结合于新生血管内皮细胞的所述化合物,从而检测所述生物中新血管内皮细胞,

其中所述化合物包含选自下组的成员:

(a) 抗 Flt4 抗体或含抗 Flt4 抗体之抗原结合片段的多肽;

(b) 一种多肽,其含有脊椎动物血管内皮生长因子 C 前体多肽的片段,其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4;

(c) 一种多肽,其含有脊椎动物血管内皮生长因子 D 前体多肽的片段,其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4;和

(d) 一种双特异性抗体或其片段,其中所述抗体或片段包含特异性结合 Flt4 的抗原结合结构域,和特异性结合血管内皮标记抗原的抗原结合结构域,所述血管内皮标记抗原基本上不出现在淋巴管内皮中。

25. 根据权利要求 24 的用途,其中,所述组合物还包括可与一种血管内皮标记物特异性结合的第二种化合物,并且所述检测包括检测结合于新生血管内皮细胞的所述化合物和所述第二种化合物。

26. 根据权利要求 25 的用途,其中所述血管内皮标记物选自 PAL-E、VEGFR-1、VEGFR-2、Tie、endoglin 或 von Willebrand 因子。

27. 根据权利要求 19 或 20 的用途,其中所述组织包含人的组织。

28. 根据权利要求 19-26 任一项的用途,其中所述结合 Flt4 的化合物包括抗 Flt4 抗体或含抗 Flt4 抗体之抗原结合片段的多肽。

29. 权利要求 19-26 任一项的用途,其中所述化合物包括抗 Flt4 抗体或含抗 Flt4 抗体之抗原结合片段的多肽。

30. 权利要求 19-26 任一项的用途,其中所述结合 Flt4 的化合物包括抗 Flt4 抗体或含抗 Flt4 抗体之抗原结合片段的多肽。

31. 权利要求 28-30 任一项的用途,其中所述抗 Flt4 抗体是人源化抗体。

32. 权利要求 19-26 任一项的用途,其中所述结合 Flt4 的化合物包括双特异性抗体或其片段,其中所述抗体或片段包括特异性结合 Flt4 的抗原结合结构域,还包括特异性结合在淋巴管中基本上不存在的血管内皮标记物的抗原结合结构域。

33. 权利要求 19-26 任一项的用途,其中,所述组合物还包括第二种化合物,该第二种化合物特异性结合在淋巴管内皮中基本上不存在的血管内

皮标记物, 所述检查、检测或显像包括鉴定既结合所述结合 Flt4 的化合物, 又结合所述第二种化合物的血管, 其中既结合所述结合 Flt4 的化合物, 又结合所述第二种化合物的血管与组织中肿瘤的存在和位置相关。

34. 根据权利要求 32 或 33 的用途, 其中所述血管内皮标记物选自 PAL-E、VEGFR-1、VEGFR-2、Tie、endoglin 或 von Willebrand 因子。

35. 结合 Flt4 受体酪氨酸激酶之化合物在药物制备中的用途, 所述药物用于诊断性检查、显像或治疗以邻近区血管表达 Flt4 为特点的恶性肿瘤, 其中所述化合物包含选自下组的成员:

(a) 抗 Flt4 抗体或其抗原结合片段或含抗 Flt4 抗体之抗原结合片段的多肽;

(b) 一种多肽, 其含有脊椎动物血管内皮生长因子 C 前体多肽的片段, 其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4;

(c) 一种多肽, 其含有脊椎动物血管内皮生长因子 D 前体多肽的片段, 其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4;

(d) 包含人前原-VEGF-C 或人前原-VEGF-D 的 Flt4 结合片段的多肽, 其与抗肿瘤药物偶联; 和

(e) 一种双特异性抗体或其片段, 其中所述抗体或片段包含特异性结合 Flt4 的抗原结合结构域, 和特异性结合血管内皮标记抗原的抗原结合结构域, 所述血管内皮标记抗原基本上不出现在淋巴管内皮中。

36. 根据权利要求 1, 21, 24 和 35 任一项的用途, 其中所述化合物包含一种多肽, 其含有脊椎动物血管内皮生长因子 C 前体多肽的片段, 其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4。

37. 权利要求 1 或 35 的用途, 其中所述化合物包含一种多肽, 其含有脊椎动物血管内皮生长因子 D 前体多肽的片段, 其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4。

38. 权利要求 1 的用途, 其中所述化合物包含抗 VEGF-C 抗体, 抗 VEGF-D 抗体, 或含抗 VEGF-C 抗体之抗原结合片段或抗 VEGF-D 抗体之抗原结合片段的多肽。

39. 权利要求 1 的用途, 其中所述化合物包含含有人前原-VEGF-C 或人前原-VEGF-D 的 Flt4 结合片段的多肽, 其与抗肿瘤药物偶联。

Flt4(VEGFR-3)作为肿瘤显像和抗肿瘤治疗的靶

本申请是一个继续申请，其要求下列专利的优先权，即美国专利 09/169079，1998 年 10 月 9 日提交；美国专利申请 08/901710，1997 年 7 月 28 日提交；美国专利申请 08/340011，1994 年 11 月 14 日提交，现在为美国专利公开号 5776755；美国专利申请 08/257754，1994 年 6 月 9 日提交，现已放弃；后两个是 1992 年 10 月 9 日提交，现已放弃的美国专利申请 07/959951 的部分继续。所有这些全文引入本文作为参考。

发明领域

本发明主要涉及受体的基因，尤其是受体酪氨酸激酶的基因，它们向重组 DNA 载体中的插入，以及在宿主微生物菌株和宿主真核细胞中结果蛋白的产生。更具体而言，本发明涉及：Flt4 这种受体酪氨酸激酶；编码 Flt4 的核苷酸序列；产生 Flt4 的编码 DNA 及其基因产物的方法；特异性识别(杂交)这些受体的编码核酸的核酸探针；特异性识别这些受体的抗体；应用这些探针和抗体以及其它 Flt4 结合化合物的方法，例如用于在动物和人体组织中鉴定淋巴管和高内皮小静脉(HEV)以及用于促进或预防病理状态下 Flt4 表达细胞的生长。

背景

负责分化细胞和组织的发育、维持和修复的细胞行为很大一部分是通过生长因子和类似的配体及它们的受体间所传递的细胞间信号来调节。所述受体位于应答细胞的表面，它们结合已知为生长因子以及其它激素样配体的肽或多肽。该相互作用导致应答细胞中迅速的生物化学改变以及细胞基因表达的迅速和长期的再调整。与各种细胞表面相关的若干受体可以结合特定的生长因子。

酪氨酸磷酸化是跨质膜信号传递的关键方式之一。若干酪氨酸激酶基因编码肽生长因子和激素的跨膜受体，例如表皮生长因子(EGF)、胰岛素、胰岛素样生长因子受体 I(IGF-I)、血小板衍生生长因子(PDGF-A 和 B)及成纤维细胞生长因子(FGFs)[Heldin 等，细胞调节，1：555-566 (1990)；Ullrich 等，细胞，61：243-54 (1990)]。几种造血生长因子的受体都是酪氨酸激酶；这些

包括 c-fms 和 c-kit, c-fms 是集落刺激因子 1 受体[Sherr 等, 细胞, 41:665-676 (1985)], c-kit 为始祖造血生长因子受体[Huang 等, 细胞, 63:225-33(1990)]。

这些受体的特异性和亲和性存在差异。通常, 受体酪氨酸激酶是糖蛋白, 其包括, 胞外结构域(能结合特异生长因子), 跨膜结构域(通常为蛋白质 α 螺旋部分); 近膜结构域(该受体可通过例如蛋白磷酸化进行调节的部位); 酪氨酸激酶结构域(为该受体的酶性组分)和羧基端尾部(在许多受体中参与酪氨酸激酶底物的识别和结合)。

在几个受体酪氨酸激酶中, 选择性剪切和选择性腺苷酸化过程可以从相同的基因中产生几个不同的多肽。这些可以包括或不包括上述的各种结构域。因此一些胞外结构域可以作为细胞分泌的独立蛋白而表达, 而且所述受体的一些形式可以缺乏酪氨酸激酶结构域并且仅含有通过跨膜结构域和短羧基端尾部插入到质膜的胞外结构域。

血管系统、胚胎血管发生和血管生成、凝血、伤口愈合和再生以及几种疾病的生理学涉及排列于血管内壁的血管内皮。血管树的发生通过血管发生产生, 而且根据一些理论, 淋巴系统的形成紧接着动脉和静脉的发育, 始于从静脉出芽。见 Sabin FR, Am J Anat, 9:43 (1909); 和 van der Putte, S.C.J. Adv Anat Embryol Cell Biol, 51:3 (1975)。

胎儿期之后, 除了在与新血管形成相关的血管发生期间外, 内皮细胞增殖非常缓慢。刺激血管发生的生长因子通过特异性内皮细胞表面受体酪氨酸激酶发挥其作用。

在受体酪氨酸激酶的配体中, 血小板衍生生长因子(PDGF)在鸡尿囊绒毛膜中显示了血管生成性, 虽然很弱。转化生长因子 α (TGF α) 是由几种肿瘤细胞和巨噬细胞分泌的血管生成因子。肝细胞生长因子(HGF), 即 c-met 原癌基因编码的受体的配体, 也具有强血管生成性, 包括在培养的内皮细胞中与 TGF α 作用相似的反应。

有证据表明存在内皮细胞特异性生长因子和受体, 其可能主要负责刺激内皮细胞生长、分化以及确定分化的功能。最广泛研究的生长因子是血管内皮生长因子(VEGF), 其为 PDGF 家族成员。血管内皮生长因子是两个 23 kDa 亚单位通过二硫键连接的二聚体糖蛋白, 因其对内皮细胞的有丝分裂活性和其诱导血管渗透的能力(因此其又被称为血管渗透因子)而被发现。报道的 VEGF 的其它作用包括细胞内钙离子动员、诱导纤溶酶原刺激因子和纤溶酶

原刺激因子抑制剂-1的合成、刺激内皮细胞中已糖转移和在体外促进单核细胞迁移。由不同的 mRNA 剪切变体编码的四种 VEGF 异构体表现出相同的刺激内皮细胞有丝分裂的能力。VEGF 的 121 个和 165 个氨基酸的异构体以可溶的形式分泌，而 189 个和 206 个氨基酸残基异构体仍然与细胞表面结合，并且与肝素有强亲和力。可溶性非肝素结合和肝素结合形式还被描述为相关胚胎生长因子(PIGF，分别为 131 和 152 个氨基酸)，其在人胚胎、滋养细胞肿瘤和培养的内皮细胞中表达。

VEGF 表达模式表明其涉及正常血管系统的发育和维持以及肿瘤的血管发生。在小鼠发育期间，交配后全部 7.5 天，内胚层表达 VEGF，并且在毛细血管向内生长阶段室神经外胚层产生 VEGF。在鹌鹑发育的第二天，在卵黄囊的血管形成区域和整个胚胎均表达 VEGF。另外，在成年小鼠中紧靠穿通内皮的内皮细胞持续表达 VEGF，提示其在这个特异性内皮的表型和功能的维持中起作用。

两个 VEGF 的高亲和力受体，VEGFR-1/Flt1(fms 样酪氨酸激酶-1)和 VEGFR-2/Kdr/Flk-1(含受体/胎儿肝激酶-1 的激酶插入结构域)，其特性已经被描述。这些受体分类为 PDGF 受体家族。然而，VEGF 受体在其胞外结构域中具有 7 个免疫球蛋白样环(而 PDGF 家族成员有 5 个环)而且具有较大的激酶插入片段。虽然一些 VEGF 受体可以在单核细胞和黑色素瘤细胞系中出现，VEGF 受体的表达主要发生在血管内皮细胞中。据报道只有内皮细胞应答 VEGF 时发生增殖，而且不同来源的内皮细胞显示不同的应答。因此，通过 VEGFR-1 和 VEGFR-2 介导的信号表现出细胞类型特异性。

VEGFR-1 和 VEGFR-2 以高亲和力结合 VEGF165(K_d 分别约为 20pM 和 200pM)。Flk-1 受体也已经表明在应答 VEGF 时发生自我磷酸化，但是几乎不能检测到 Flt1 的磷酸化。VEGFR-2 介导的信号引起显著的形态学变化、肌动蛋白重组和过量表达这种受体的猪主动脉内皮细胞的膜波动。在这些细胞中，VEGFR2 还介导配体诱导的趋化作用和有丝分裂发生作用；而 VEGFR-1 转染的细胞缺乏对 VEGF 的有丝分裂应答。相反，VEGF 对大鼠中表达 VEGFR-1 的窦状隙内皮细胞具有强生长刺激作用。用 VEGFR-1 和 VEGFR-2 进行的磷酸蛋白共沉淀存在差别，表明不同的信号分子与受体特异性细胞内序列相互作用。

在原位杂交研究中,小鼠 VEGFR-2 mRNA 的表达可见于卵黄囊和胚胎内中胚层(对交配后(p.c.)7.5 天的胚胎进行评估,内皮细胞衍生于该胚胎),而后见于可能的成血管细胞、心内膜和大的与小的血管内皮(12.5 天 p.c.)。血管芽、胚胎期的分支血管和出生后早期的脑中增殖的内皮细胞中富含 VEGFR-2 mRNA,在成年脑中它为低表达,这表明 VEGFR-2 是血管发生和血管生成的主要调节因子。VEGFR-1 表达同样与小鼠胚胎中的早期血管发育和皮肤伤口愈合时的新血管生成相关联。然而,在成年器官中检测到高水平的 VEGFR-1 表达,表明 VEGFR-1 在成熟血管的静止内皮细胞中具有功能,其与细胞生长无关。VEGFR-2 的鸟类同系物从原肠胚形成开始就在中胚层中发现,而 VEGFR-1 同系物首先在共表达内皮标记的细胞中发现。在鹌鹑外胚层体外培养中,这些细胞的血管发生性分化所必需的 FGF-2 上调 VEGFR-2 的表达。发现在发育后期两种 VEGF 受体的表达均更受限制。在人胚胎组织中,VEGFR-1 和 VEGFR-2 表现出重叠的但略有差异的表达模式。这些资料表明 VEGF 及其受体以旁分泌方式发挥作用,来调节内皮细胞的分化和组织的新血管发生。

最近表明 VEGF 是低氧诱导型内皮细胞生长和血管发生的刺激因子,而且利用特异性单克隆抗体抑制 VEGF 的活性以显示可以降低实验肿瘤的生长及其血管密度[Ferrara 等,内分泌综述,18:4-25 (1997); Shibuya 等,癌症研究进展,67:281-316 (1995); Kim 等,自然,362:841-844 (1993)]。

大小超过几立方毫米的实体肿瘤的生长依赖于血管供应,使得血管发生成为抗癌治疗的诱人靶点。已经报道用内源性血管发生抑制剂或含有血管他丁(纤溶酶原的片段)和内膜他丁(胶原 18 的片段)的“抑制素”治疗肿瘤获得令人鼓舞的结果[O'Reilly 等,细胞,79:315-328 (1994); O'Reilly 等,细胞,88:277-85 (1997)]。两种因子均由原发肿瘤正常分泌,而且保持转移静止。在动物模型中,任一种抑制素的全身给药均显示还可诱导并维持原发肿瘤的休眠。抑制素的受体和由抑制素介导的信号传递,以及激活它们的蛋白酶尚有待鉴定。需要其它治疗性分子用于在癌症和其它病理状态的治疗中控制血管生成。

已知原发乳腺癌表达几种血管发生多肽,其中 VEGF 的表达最丰富[见例如 Relf 等,癌症研究,57:963-969 (1997)]。在浸润型和非浸润型导管型(原位)乳腺癌中,肿瘤细胞包括高水平的 VEGF mRNA [Brown 等,人类病理

学, 26: 86-91 (1995).]。靠近原位瘤的内皮细胞表达 VEGFR-1 和 VEGFR-2 mRNA。VEGF 及其受体可以有助于恶性乳腺肿瘤的血管发生进程, 因为在几个独立的研究中, 发现了肿瘤血管密度和疾病预后之间的相关性[Weidner 等, J.Natl.Cancer Inst, 84: 1875-1887 (1992)]。需要针对乳腺癌和乳腺癌相关血管发生的其它标记物, 来改进诊断和普查并作为干预治疗的靶点。

淋巴系统的主要功能是提供组织中液体回流, 并且将许多血管外物质运送回血液。另外, 在其成熟过程中, 淋巴细胞离开血液, 通过淋巴器官和其它组织进行迁移并且进入淋巴管, 然后通过胸导管返回血液。特化小静脉, 即高内皮小静脉(HEV), 再一次结合淋巴细胞并使其外渗到组织中。因此淋巴管和尤其是淋巴结在免疫和不同肿瘤转移性的发展中发挥重要作用。

自从 20 世纪初, 出现了三个不同的关于淋巴系统胚胎起源的理论。然而, 由于缺少已知的可用于淋巴管的特殊标记物, 难于鉴定淋巴管。

对淋巴管的研究通常借助于淋巴造影进行。在淋巴造影中, 将 X-射线对照介质直接注射到淋巴管中。该对照介质沿淋巴系统的离心导液管方向分布。对照介质在淋巴结中汇集, 在此其停留达半年, 这期间 X-射线分析允许监控淋巴结的大小和结构。该诊断在带有淋巴结转移的肿瘤患者和恶性淋巴瘤患者(如淋巴瘤)中尤其重要。然而, 在本领域中, 需要对淋巴组织成像的材料和方法进行改进。

发明概述

本发明提供了位于 5 号染色体的新受体酪氨酸激酶基因, 其被鉴定为人类白血病细胞中未知的酪氨酸激酶同源性 PCR-cDNA 片段[Aprelikova 等, 癌症研究, 52: 746-748(1992)]。该基因及其编码的蛋白命名为 Flt4。该简称来源于 *fms*-样酪氨酸激酶 4 一词。

Flt4 是一种结构上与 VEGFR-1 和 VEGFR-2 基因的产物密切相关的受体酪氨酸激酶。由于这种相似性和随后发现的这三种受体之配体间的相似性, Flt4 又命名为 VEGFR-3。Flt4 和 VEGFR-3 这两个名称在本文中可以互换。尽管这三个受体之间存在相似性, Flt4 的成熟形式与几种 VEGFR 存在差别该差异是 Flt4 的胞外区被水解成两个二硫键连接的多肽, 125/120 kD 和 75 kD。Flt4 基因编码具有可任选的 3'外显子的 4.5 kb 和 5.8 kb mRNA, 分别编码 190 kD 和 195 kD 的多肽。

另一差异是 VEGF 不显示与 Flt4 的特异性结合而且不诱导其自我磷酸化。

对 Flt4、Flt1 和 KDR/Flk-1 受体 mRNA 信号的比较表明在被研究的组织中存在重叠但不相同的表达模式。Kaipainen 等, 实验医学杂志, 178: 2077(1993)。Flt4 基因表达显得比 VEGFR-1 和 VEGFR-2 的表达受到更多的限制。首次检测到 Flt4 的表达是在小鼠交配后 8.5 天, 在其胚胎的头部间质、主静脉以及胚外尿囊中对成血管细胞进行原位杂交之时。在交配后 12.5 天的胚胎中, Flt4 信号可见于发育中的静脉内皮及假定的淋巴内皮, 但动脉内皮表现为阴性。在发育后期, Flt4 mRNA 只见于发育中的淋巴管。在成人组织中仅有淋巴内皮和一些高内皮小静脉表达 Flt4 mRNA, 而且在转移性淋巴结的淋巴窦和淋巴管瘤中其表达增加。这些结果支持淋巴管起源于静脉的理论。

从人红白血病细胞系中克隆的 Flt4 受体酪氨酸激酶 cDNA 的蛋白产物已 N-糖基化并且在其胞外结构域中包括 7 个免疫球蛋白样环。Flt4 的细胞质酪氨酸激酶结构域与 Flt1 和 KDR 的相应结构域在氨基酸水平上大约有 80% 的同一性, 而与血小板衍生生长因子、集落刺激因子-1、干细胞因子和 Flt3 受体有大约 60% 的同一性。见 Pajusola 等, 癌症研究, 52: 5738(1992)。

本发明提供了分离的编码 Flt4 受体酪氨酸激酶的多核苷酸(例如具有指定结构的 DNA 或 RNA 片段), 其可用于制备 Flt4 蛋白及其肽段并回收其它来源的相关基因。

本发明提供了包含编码上述 Flt4 受体酪氨酸激酶或相关蛋白的外源性片段的重组 DNA 载体, 其可插入到微生物或真核细胞并能表达编码的蛋白。

本发明提供了真核细胞, 其能够产生有效量的 Flt4 受体酪氨酸激酶和来源于许多物种的功能相似的蛋白。

本发明提供了可以在实验室合成或通过微生物产生的肽, 所述肽模拟天然 Flt4 受体酪氨酸激酶蛋白的活性。在另一个实施方案中, 本发明涉及抑制 Flt4 受体酪氨酸激酶蛋白活性的肽。

尤其优选的肽选自: (a)短 Flt4 形式, 其核苷酸序列和推导的氨基酸序列见 SEQ ID No 1 和 2; (b)在其羧基末端具有不同的核苷酸和相应氨基酸残

基的第二种形式,即长 Flt4 形式,其核苷酸序列和推导的氨基酸序列见 SEQ ID No 3 和 4。长 Flt4 形式具有 1363 个氨基酸残基。

DNA 和 RNA 分子、重组 DNA 载体、及包含上述任一种蛋白或多肽之核苷酸序列的修饰型微生物或真核细胞也是本发明的一部分。具体而言,含下述两种 DNA 序列之部分或全部的序列,互补 DNA 或 RNA 序列,或相应 RNA 序列均尤其优选:(a)诸如 SEQ ID NO: 1 的 DNA 序列,其编码短 Flt4 形式(SEQ ID NO: 2), (b)诸如 SEQ ID NO: 3 的 DNA 序列,其编码的 Flt4 中 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 3913-4416 已改变,其编码长 Flt4 形式[SEQ ID NO: 4]。

本发明还提供了包括较大序列之片段的 DNA 和 RNA 分子,用于进行本发明关于利用基因工程技术制备这类肽和制备寡核苷酸探针的优选方面。

因为在此确定了编码 Flt4 蛋白的 DNA 序列,所以可以利用市售的仪器通过例如聚合酶链式反应或通过化学合成的方法,制备编码 Flt4 蛋白的 DNA,其后可以利用已知的重组 DNA 技术将该基因插入到任何可用的 DNA 载体中。而且,还可以应用自动化仪器,使任何在此公开的多肽的直接合成可以容易地完成。

本发明还涉及 Flt4 肽和其它构建体,并且涉及将 Flt4 作为淋巴内皮细胞的特异标记的应用。

在特定的实施方案中,本发明涉及识别 Flt4 的核酸探针和抗体,尤其是单克隆抗体和包含此抗体的组合物。

在特定的实施方案中,本发明涉及用于在组织样品和生物体中监控淋巴管的方法。而且,本发明的目的是提供可表示生物中淋巴组织尤其是淋巴管的状态(炎症、感染、创伤、生长等)的临床检测方法,并且提供用于检测淋巴管和淋巴管形成的方法。

本发明的另一个目的是提供特异性识别 Flt4 受体蛋白或其各种抗原决定簇的单克隆抗体。本发明的目的是应用这些诊断性单克隆抗体检测和测定组织中,尤其是在淋巴组织中 Flt4 受体的量。在抗 Flt4 抗体的章节中,术语“特异性识别 Flt4”、“特异性结合 Flt4”、“对 Flt4 特异”等等意指与其它内皮细胞表面受体(包括 VEGFR-2/Kdr/Flk-1 和 VEGFR-1/Flt1)相比抗体优先结合 Flt4 (与之发生免疫反应)。因此,抗 Flt4 抗体或其它对 Flt4 “特异”的

Flt4 结合化合物可用于, 经本发明所述方法(如医学影象、检测、筛查或靶向治疗)对在组织或生物样品中的 Flt4 进行鉴定和/或标记, 因为它们根本就不能结合其它抗原的抗原决定簇, 或者与其它抗原结合的亲和力与 Flt4 的亲和力相比足够低, 低到在这些情况下可以忽略不计。

本发明的另一个方面涉及检测细胞样品中 Flt4 受体的存在的方法, 其步骤包括: (a)将细胞样品暴露于本发明的抗体, 尤其是单克隆抗体; (b)检测该单克隆抗体与 Flt4 受体的结合。

本发明进一步涉及在淋巴管生成中及在炎症、感染和免疫状态中调节(例如拮抗或促进)Flt4 功能的方法。例如, 在一个实施方案中, 这类方法包括通过提供足够量 Flt4 结合化合物以阻断参与此反应的 Flt4 内皮细胞位点, 抑制 Flt4 介导的淋巴管生成, 尤其当 Flt4 功能与诸如转移癌、淋巴瘤、炎症(慢性或急性)、感染和免疫性疾病等疾病相关时。

本发明进一步涉及特异性激活 Flt4 的配体和单克隆体及它们在激活淋巴内皮中的应用, 并且涉及从对配体的研究中得到的片段和多肽以及抗体, 以其用来在需要的时候, 例如在涉及 Flt4 功能的各种疾病状态中, 抑制 Flt4 的功能。

本发明为 Flt4 受体酪氨酸激酶的配体提供了细胞系来源。利用这些细胞的条件培养基, Flt4 配体可经本领域常规方法纯化并克隆。利用此条件培养基或纯化的配体, 可得到用于 Flt4 和二聚作用抑制剂以及 Flt4 信号传导抑制剂的检测系统, 其可用于鉴定和制备这些抑制剂。

在本发明的优选实施方案中, PC-3 细胞系的条件培养基包括蛋白或其片段, 其能够激活 Flt4 受体并且调节特定内皮细胞的生长和分化以及其分化功能。Flt4 配体或其肽或其衍生物有助于调节内皮细胞的生长、分化和它们的分化功能, 而且有助于制备针对此配体的激动剂和拮抗剂。Flt4 配体尤其有助于调节淋巴内皮。然而纯化的或重组产生的 Flt4 配体也可以激活相关的 KDR/Flk-1 受体。

激活 Flt4 的配体的鉴定使得直接检测该配体的抑制剂或 Flt4 功能的抑制剂成为可能。将这些抑制剂简单地加到含 Flt4 配体的条件培养基中, 如果它们能抑制自我磷酸化, 那么就将其作为 Flt4 信号抑制剂。例如, 可以分析重组或合成的肽(包括但不限于 Flt4 胞外结构域的片段)对 Flt4-配体相互作用或 Flt4 二聚作用的抑制。这些推测的 Flt4 抑制剂和抗 Flt4 配体的抗体、阻

断 Flt4 受体-配体相互作用的肽或其它化合物、以及与编码 Flt4 配体的 mRNA 序列互补的反义寡核苷酸,均有助于调节内皮细胞并且有助于治疗与内皮细胞功能相关的疾病。

命名为 VEGF-C 的 Flt4 配体的详细特征见 1998 年 2 月 2 日提交的 PCT 专利申请 PCT/US98/01973, 即国际公开号 WO 98/33917; 1996 年 8 月 1 日提交的 PCT 专利申请 PCT/FI96/00427, 即国际公开号 WO 97/05250; 以及作为上述专利的优先权的美国专利申请优先权文献,所有这些在此引入本文作为参考。推导的前 VEGF-C 氨基酸序列见 SEQ ID NO: 21 所示。

对命名为 VEGF-D 的另一种 Flt4 配体的详细叙述见 Achen 等, 美国国家科学院院刊, 95(2): 548-553(1998)和 Genbank 登记号 AJ000185, 二者在此引入本文作为参考。推导的前体 VEGF-D 氨基酸序列见 SEQ ID NO: 22 所示。

本发明还涉及治疗哺乳动物的方法, 该哺乳动物患有以在细胞中表达 Flt4 酪氨酸激酶为特征的疾病, 所述方法的步骤包括给哺乳动物施用组合物, 该组合物包括可有效抑制 Flt4 配体蛋白与该生物体细胞中表达的 Flt4 结合的化合物, 从而抑制 Flt4 的功能。所述疾病可以是上述已经提及的疾病, 例如以不希望有的淋巴管生成为特征的疾病。另外, 已经发现 Flt4 表达还在相关于至少部分乳腺癌(可能还其它癌症)的血管中发生(即其表达水平大大超过在相应正常(健康)组织的血管系统中几乎不可检测或完全不可检测的表达水平)。因此在优选的实施方案中, 所述细胞包括(淋巴管或血管的)内皮细胞。在另一个实施方案中, 所述细胞包括肿瘤细胞, 例如表达 Flt4 的某些淋巴瘤。尤其考虑对人的治疗。

“可有效抑制 Flt4 配体蛋白与生物体细胞中表达的 Flt4 结合的化合物”意指抑制与在此描述为血管内皮生长因子 C 的 Flt4 配体(其可从 PC-3 条件培养基中分离到)结合的任何化合物。据信这类化合物还可有效抑制血管内皮生长因子 D 与 Flt4 的结合。化合物的实例包括如下的肽: (a)包含抗-Flt4 抗体的抗原结合片段的多肽; (b)包含可溶性 Flt4 片段(例如胞外结构域片段)的多肽, 其中所述片段和多肽可与 Flt4 配体结合; (c)包含脊椎动物血管内皮生长因子 C(VEGF-C)多肽或前体多肽的片段或类似物的多肽, 其中所述多肽或片段或类似物可结合天然宿主细胞(即在其表面表达天然 Flt4 蛋白的生物体细胞)表达的 Flt4, 但是不能激活 Flt4; 和(d)包含脊椎动物血管内皮生长因子

D(VEGF-D)多肽或前体多肽的片段或类似物的多肽,其中所述多肽或片段或类似物可结合天然宿主细胞(即在其表面表达天然 Flt4 蛋白的生物体细胞)表达的 Flt4,但是不能激活 Flt4。还考虑了常规体外筛选检测中用诸如 VEGF-C 和重组表达的 Flt4)可鉴定的小分子抑制剂。高度优选含抗-Flt4 抗体的抗原结合片段的多肽。这些肽包括例如特异性结合 Flt4 的多克隆抗体和单克隆抗体;这些抗体的片段;嵌合或人源化抗体;特异性结合 Flt4 并且还特异性结合另一抗原的双特异性抗体等等。还考虑了与循环的 Flt4 配体结合并且因此抑制该配体与 Flt4 结合的化合物。这类化合物包括抗 VEGF-C 或抗 VEGF-D 抗体或包含其抗原结合片段的多肽。在相关的变化中,本发明考虑了阻断下游细胞内 Flt4 信号传导并因此抑制 Flt4 功能的治疗方法。

在优选的变化中,所述化合物还包括可检测标记(如本文他处所述)或细胞毒试剂。细胞毒试剂包括植物毒素(例如蓖麻毒蛋白,皂草素),细菌或真菌毒素,放射性同位素(例如 211-砒、212-铋、90-钇、131-碘、99m-锝和本文所述的其它同位素),抗代谢药(例如氨甲喋呤,5-氟尿嘧啶),烷化剂(例如苯丁酸氮芥),抗有丝分裂药(例如长春花生物碱)和 DNA 嵌入剂(例如阿霉素)。

同样,为了改进给药,组合物优选还包括可药用的稀释剂、佐剂或载体媒介。

如本文所详述,尽管 Flt4 的表达主要限定于健康成人的淋巴管内皮,在至少某些肿瘤周围的血管中发现了 Flt4 的表达。因此本发明还包括治疗哺乳动物肿瘤患者的方法,所述肿瘤以在血管内皮细胞中表达 Flt4 酪氨酸激酶(Flt4)为特征,所述方法包括如下步骤:给需要该治疗的哺乳动物施用组合物,所述组合物包括可有效抑制 Flt4 配体蛋白与该生物体的血管内皮中表达的 Flt4 结合,因此抑制了 Flt4 介导的血管内皮增生的化合物。

特别考虑了对选自癌(例如乳腺癌)、鳞状细胞癌、淋巴瘤、黑色素瘤和肉瘤等肿瘤的治疗。然而,很显然在本文中详细叙述的检查技术可以鉴定其它以在其血管内皮细胞中表达 Flt4 为特征的肿瘤,所述肿瘤均对本文中叙述的抗 Flt4 治疗方法敏感。特别考虑了以其血管内皮细胞表达 Flt4 为特点的乳腺癌的治疗。以在血管内皮细胞中表达 Flt4 受体酪氨酸激酶为特征的恶性肿瘤意指一种疾病,其中在血管中可以检测到 Flt4,其水平大大超过在健康组织中的几乎不可检测或完全不可检测的水平,如本文中的例证。

可利用本领域公认的剂量递增试验和剂量反应试验,根据经验决定化合物的有效治疗量。肿瘤治疗的有效治疗量是指可以有效减缓肿瘤生长、或有效终止肿瘤的生长、或有效缩小或消除肿瘤,并且对接受肿瘤治疗的患者不产生不可接受的副作用的剂量。当所述化合物包括抗体或其它多肽时,优选其剂量为约 0.1-100 mg 抗体每公斤体重,更优选 1-10 mg/kg。对通常具有较长血液半衰期的人源性抗体,优选从每天给药到每隔一个月给药,更优选每周或每隔一周或每三周一次给药。监控治疗的进展、患者的副作用和循环抗体的水平将给最佳剂量方案提供额外的指导。在以其它抗体(如抗 HER2, 抗 EGF 受体)为基础的癌症治疗方面,所发表的资料和正在进行的临床实验也可有效指导所述剂量方案。

在本文所述治疗方法中,优选的化合物包括含抗 Flt4 抗体之抗原结合片段的多肽和含可溶性 Flt4 胞外结构域片段的多肽。高度优选人和人源化抗 Flt4 抗体。

预计本发明治疗方法的优点在于,Flt4 在健康组织的血管中通常没有明显的表达。在高度优选的实施方案中,治疗化合物包括双特异性抗体或其片段,其中所述抗体或片段特异性结合 Flt4 并特异性结合一种血管内皮标记抗原。“血管内皮标记抗原”是指任何在增殖的血管内皮细胞中表达的细胞表面抗原,并且优选不在淋巴管内皮细胞中表达的表面抗原。血管内皮标记的实例包括 PAL-E[deWaal 等,美国病理杂志,150:1951-1957(1994)], VEGFR1 和 VEGFR2[Ferrara 等,内分泌综述,18:4-25(1997)], Tie[Partanen 等,分子细胞生物学,12:1698-1707(1992)], endoglin[美国专利号 5776427,在此全文引入作为参考]和 von Willebrandt 因子。预计这些双特异性抗体优先定位于同时表达 Flt4 和血管内皮标记物的肿瘤相关血管。在高度优选的实施方案中,所述化合物还包括与该双特异性抗体偶联的抗肿瘤试剂或细胞毒试剂,其目的是杀伤肿瘤细胞和/或杀伤为肿瘤细胞供血的血管。试剂实例包括上述的那些,还包括在宿主体内激活肿瘤免疫应答的治疗性蛋白,例如抑制素、细胞因子、趋化因子等等。

在另一个实施方案中,所述化合物包括抗体(或双特异性抗体),其识别一个(或多个)包含 Flt4/ Flt4 配体复合物(例如 Flt4 与 VEGF-C 或 VEGF-D 结合的复合物)的抗原决定簇。

还进一步考虑了治疗性化合物与可有效抑制血管生成因子的广谱药物偶联或共同给药。这类试剂有肝素结合药物(例如戊聚糖和苏拉明类似物,其可以抑制与肝素结合的血管生成因子),以及阻断内皮细胞生长和迁移的化学试剂,例如烟曲霉素类似物。

还考虑了将抗 Flt4 化合物与药物前体结合,使药物前体通过所述抗 Flt4 化合物靶向肿瘤血管,然后在肿瘤生长部位被局部激活(例如通过放射)。应用这些药物前体的策略预计具有减少药物对表达 Flt4 之健康淋巴管的副作用的优点。

同样,本发明包括治疗患有恶性肿瘤的哺乳动物的方法,所述恶性肿瘤的特点是在血管内皮细胞中表达 Flt4 酪氨酸激酶(Flt4),该方法包括如下步骤:鉴别患有以在血管内皮细胞中表达 Flt4 为特点的恶性肿瘤的哺乳动物体,并且给需要该治疗的所述哺乳动物施用组合物,该组合物包括有效抑制 Flt4 配体蛋白与在该生物体血管内皮细胞中表达的 Flt4 结合,从而抑制 Flt4 介导的血管内皮细胞增殖的化合物。

本发明还提供了检查生物样品中 Flt4 受体酪氨酸激酶蛋白(Flt4)的存在的方法,包括如下步骤:(a)使怀疑含有 Flt4 的生物样品与包含 Flt4 结合化合物的组合物进行接触,其条件可使该化合物与该生物样品中的 Flt4 结合;(b)在可以除去未与生物样品中 Flt4 结合的 Flt4 结合化合物的条件下,洗涤生物样品;并且(c)在洗涤步骤之后,通过检测与生物样品中 Flt4 受体酪氨酸激酶结合的 Flt4 结合化合物,筛选存在 Flt4 的生物样品。所述化合物优选包括选自如下多肽的多肽:(a)包含抗 Flt4 抗体之抗原结合片段的多肽;和(b)包括 Flt4 配体或 Flt4 结合片段或其类似物的多肽。高度优选特异性结合 Flt4 并且还包括可检测标记的抗体。

本发明还涉及使可能含有表达 Flt4 受体酪氨酸激酶蛋白(Flt4)之细胞的脊椎动物组织显像的方法,其包括如下步骤:(a)将脊椎动物组织与包含 Flt4 结合化合物的组合物接触;并且(b)通过检测与该组织结合的 Flt4 结合化合物使该组织显像。所述组织优选人的组织,并且所述方法还包括在接触步骤之后而在显像步骤之前洗涤组织的步骤,其条件可以从组织中除去未与 Flt4 结合的 Flt4 化合物。

在相关的变化中,本发明提供了使哺乳动物组织中肿瘤显像的方法,其包括如下步骤:(a)将疑含肿瘤的脊椎动物组织与含有 Flt4 结合化合物的组

合物接触; (b)检测与该组织中细胞结合的 Flt4 结合化合物; 并且(c)通过鉴定被 Flt4 结合化合物结合的血管内皮细胞使实体肿瘤显像, 其中表达 Flt4 的血管与组织中肿瘤的存在和定位相关。在一个优选的实施方案中, 所述方法还包括将所述组织与第二个化合物(例如抗体)接触的步骤, 该第二个化合物特异性结合在淋巴管内皮中实质上不出现的血管内皮标记(例如 PAL-E、VEGFR-1、VEGFR-2); 并且检测与组织中细胞结合的所述第二种化合物; 其中显像步骤包括鉴别被所述 Flt4 结合化合物和所述第二种化合物标记的血管, 并且其中被所述 Flt4 结合化合物和所述第二种化合物标记的血管与组织中肿瘤的存在和定位相关。应当理解应用第二种化合物有助于开业医生更迅速区分在其表面表达 Flt4 的血管和正常淋巴管。

本发明进一步涉及监测恶性肿瘤状态的方法, 其包括如下步骤: (a)将疑有恶性肿瘤状态的哺乳动物组织与包含特异性结合 Flt4 受体酪氨酸激酶的抗体或抗体片段的组合物接触; (b)检测与所述哺乳动物细胞结合的抗体或抗体片段; 并且(c)根据与所述哺乳动物细胞结合的抗体的量和分布而筛查恶性肿瘤。如同在本文中的叙述, Flt4(其通常在血管中不可检测或几乎不可检测)在至少一些肿瘤的血管中被强染色。因此在一个实施方案的筛选步骤中, 与血管内皮细胞结合的抗体或抗体片段的发现与恶性肿瘤的存在相关。在本方法中, 应该理解“发现”意指发现高水平的 Flt4, 其水平显著高于在相应正常组织中的几乎不可检测或完全不可检测的水平, 如本文中叙述的一样。通过与用健康生物体组织进行的对照实验比较可以确证所述差异表达。尤其优选筛查哺乳动物组织的肿瘤。如上所述, 通过给该哺乳动物施用与血管内皮标记特异性结合的第二种化合物, 可以使所述方法容易进行, 其中检测步骤包括检测与血管生成性内皮细胞结合的所述第一种化合物和所述第二种化合物。

本发明还涉及结合 Flt4 受体酪氨酸激酶之化合物在药物制备中的应用, 所述药物用于诊断性检查、显像或治疗以邻近区血管表达 Flt4 为特点的恶性肿瘤。

由上述还可知, 本发明方法中所用的各种化合物也属于本发明。例如, 所述化合物包括上述的抗 Flt4 抗体和双特异性抗体。同样, 本文所述任何化合物在生产本文所述治疗或诊断或显像所用药物中的的应用(单独或联合)也属于本发明。所述药物还包括可以药用的稀释剂、佐剂、或载体等等。

类似地, 本发明包括试剂盒, 其内含本发明的化合物或组合物, 其包装方式有利于实施本发明的方法。在最简单的实施例中, 这类试剂盒包括由密封瓶或罐等容器容纳的本发明化合物或组合物, 描述实施本发明方法时化合

类似地, 本发明包括试剂盒, 其内含本发明的化合物或组合物, 其包装方式有利于实施本发明的方法。在最简单的实施例中, 这类试剂盒包括由密封瓶或罐等容器容纳的本发明化合物或组合物, 描述实施本发明方法时化合物或组合物之用途的标签贴在该容器上或含在包装中。优选将化合物或组合物以单位剂量的形式进行包装。在另一个实施方案中, 本发明的试剂盒将 Flt4 结合化合物与第二种化合物包装在一起, 所述第二种化合物能结合血管内皮细胞表面所表达的、淋巴管内皮中实质上不出现的标记物(抗原)。

根据本申请的全文(包括详细的说明书), 本发明的其它特点和变化对本领域技术人员是显而易见的, 且所有这些特点均为本发明的方面。同样, 本文所述本发明的特点可以重新组合成其它的实施方案, 这也被认为属于本发明, 不管这些特点的联合是否在上面的叙述中作为本发明的一个方面或实施方案而被具体提及。另外, 仅有本文中作为本发明的关键而被叙述的限制才被视为限制; 本文未作为关键来描述的本发明的无限制改动也被认为属于本发明。

除上述以外, 本发明另包括在任何意义上比上述具体变化范围更小的本发明所有实施方案。虽然申请人发明了所附权利要求的全部, 但其并不想包含其它人在此领域已作的工作。因此, 当专利局或其它实体或个人提请申请人注意某项权利要求包括了法定的现有技术时, 申请人保留根据专利法进行修改的权利, 以重新定义该权利要求的主体, 使之特别排除上述法定现有技术或使之与现有技术相比有明显改变。经这类权利要求的修改而定义的本发明改变也认为属于本发明。

因此, 本发明涉及一种有效抑制 Flt4 配体蛋白与哺乳动物的血管内皮细胞表达的 Flt4 结合的化合物在制备治疗所述哺乳动物的肿瘤的药物组合物中的用途, 该肿瘤的特征为, 其邻近区血管的内皮细胞中有 Flt4 受体酪氨酸激酶的表达, 其中所述化合物抑制 Flt4 介导的所述血管内皮细胞的增殖, 其中所述化合物包含选自下组的成员:

(a) 抗 Flt4 抗体或其抗原结合片段或含抗 Flt4 抗体之抗原结合片段的多肽;

(b) 含可溶性 Flt4 片段的多肽, 其中所述片段和所述多肽能够与 Flt4 配体结合;

(c)一种多肽,其含有脊椎动物血管内皮生长因子 C 前体多肽的片段,其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4;

(d)一种多肽,其含有脊椎动物血管内皮生长因子 D 前体多肽的片段,其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4;

(e) 抗 VEGF-C 抗体或含抗 VEGF-C 抗体之抗原结合片段的多肽;

(f) 抗 VEGF-D 抗体或含抗 VEGF-D 抗体之抗原结合片段的多肽;

(g)包含人前原 - VEGF - C 或人前原 - VEGF - D 的 Flt4 结合片段的多肽,其与抗肿瘤药物偶联; 和

(h)一种双特异性抗体或其片段,其中所述抗体或片段包含特异性结合 Flt4 的抗原结合结构域,和特异性结合血管内皮标记抗原的抗原结合结构域,所述血管内皮标记抗原基本上不出现在淋巴管内皮中。

本发明涉及一种 Flt4 结合化合物在制备使脊椎动物组织中肿瘤显像的组合物中的用途,其中,所述的显像包括使疑有肿瘤的脊椎动物组织与包含 Flt4 结合化合物的组合物接触;检测与所述组织中细胞结合的 Flt4 结合化合物;并且通过鉴定与所述 Flt4 结合化合物结合的血管内皮细胞使实体瘤显像,其中表达 Flt4 的血管与该组织中肿瘤的存在和部位相关,其中所述化合物包含选自下组的成员:

(a) 抗 Flt4 抗体或含抗 Flt4 抗体之抗原结合片段的多肽; 和

(b)一种双特异性抗体或其片段,其中所述抗体或片段包含特异性结合 Flt4 的抗原结合结构域,和特异性结合血管内皮标记抗原的抗原结合结构域,所述血管内皮标记抗原基本上不出现在淋巴管内皮中。

本发明涉及一种特异性结合 Flt4 受体酪氨酸激酶的化合物在制备检查以新生血管内皮细胞的变化为特点的疾病中的用途,其中所述检查包括如下步骤:

(a)获得脊椎动物可疑患者的组织样品,所述可疑患者被怀疑患有以新生血管内皮细胞的变化为特点的疾病;

(b)将所述组织样品暴露于一种组合物,该组合物包括特异性结合所述生物细胞表达的 Flt4 受体酪氨酸激酶的化合物;

(c)洗涤所述组织样品; 和

(d)通过检测所述化合物在所述组织样品中的存在、量或分布来检查所述疾病,其中血管内皮细胞中的 Flt4 表达被鉴定为以新生血管内皮细胞之变化为特点的疾病的标志物,

其中所述特异性结合 Flt4 受体酪氨酸激酶的化合物包含选自下组的成员:

(a) 抗 Flt4 抗体或含抗 Flt4 抗体之抗原结合片段的多肽;

(b)一种多肽,其含有脊椎动物血管内皮生长因子 C 前体多肽的片段,其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4;

(c)一种多肽,其含有脊椎动物血管内皮生长因子 D 前体多肽的片段,其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4;和

(d)一种双特异性抗体或其片段,其中所述抗体或片段包含特异性结合 Flt4 的抗原结合结构域,和特异性结合血管内皮标记抗原的抗原结合结构域,所述血管内皮标记抗原基本上不出现在淋巴管内皮中。

本发明涉及一种特异性结合哺乳动物 Flt4 受体酪氨酸激酶的化合物在制备检测哺乳动物中新生血管内皮细胞的组合物中的用途,其中所述检测包括如下步骤:

(a)给所述哺乳动物施用一种组合物,该组合物包括特异性结合哺乳动物 Flt4 受体酪氨酸激酶(Flt4)的第一种化合物,和

(b)检测结合于新生血管内皮细胞的所述第一种化合物,从而检测所述生物中新生血管内皮细胞,

其中所述化合物包含选自下组的成员:

(a) 抗 Flt4 抗体或含抗 Flt4 抗体之抗原结合片段的多肽;

(b)一种多肽,其含有脊椎动物血管内皮生长因子 C 前体多肽的片段,其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4;

(c)一种多肽,其含有脊椎动物血管内皮生长因子 D 前体多肽的片段,其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4;和

(d)一种双特异性抗体或其片段,其中所述抗体或片段包含特异性结合 Flt4 的抗原结合结构域,和特异性结合血管内皮标记抗原的抗原结合结构域,所述血管内皮标记抗原基本上不出现在淋巴管内皮中。

本发明涉及结合 Flt4 受体酪氨酸激酶之化合物在药物制备中的用途,所述药物用于诊断性检查、显像或治疗以邻近区血管表达 Flt4 为特点的恶性肿瘤,其中所述化合物包含选自下组的成员:

(a) 抗 Flt4 抗体或其抗原结合片段或含抗 Flt4 抗体之抗原结合片段的多肽;

(b) 一种多肽,其含有脊椎动物血管内皮生长因子 C 前体多肽的片段,其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4;

(c) 一种多肽,其含有脊椎动物血管内皮生长因子 D 前体多肽的片段,其中所述多肽和所述片段能结合但不能激活宿主固有细胞上表达的 Flt4;

(d) 包含人前原-VEGF-C 或人前原-VEGF-D 的 Flt4 结合片段的多肽,其与抗肿瘤药物偶联;和

(e) 一种双特异性抗体或其片段,其中所述抗体或片段包含特异性结合 Flt4 的抗原结合结构域,和特异性结合血管内皮标记抗原的抗原结合结构域,所述血管内皮标记抗原基本上不出现在淋巴管内皮中。

附图简述

图 1A 是 Flt4 cDNA 克隆的结构示意图。

图 1B 是 Northern 杂交凝胶的照片复印件。

图 2A-F 表示 Flt4 的结构特点示意图和其与 Flt1 酪氨酸激酶序列进行比较的示意图。

图 3A 是克隆子 J.1.1 和 I.1.1 的 cDNA 插入片段的 3'末端示意图。

图 3B 是与反义 RNA 探针和 Flt4 RNA 的长片段形式和短片段形式杂交的放射自显影照片的复印件。

图 3C 是与反义 RNA 探针和 Flt4 RNA 的长片段形式和短片段形式杂交的放射自显影照片的复印件。

图 4 是凝胶的照片复印件,描述对不同物种的 DNA 样品中 Flt4 序列的杂交分析。

图 5A-5H 描绘了导管内肿瘤中表达 VEGFR-3 的血管的免疫组化特点。在相邻的切片(图 5A, B)中,VEGFR-3 和 PAL-E 在充满癌细胞的导管周围染色成形状相似的“项链”状血管(箭头)。另一套相邻的切片对应 VEGFR-3(图 5C)、层粘连蛋白(图 5D)、胶原 XVIII(图 5E)和 SMA(图 5F)的染色。PAL-E 和 VEGFR-3 双染色的切片(图 5G)与 VEGFR-3 染色的相邻切片(图 5H)进行

比较。与受侵袭的导管相邻的血管为双阳性(箭头),而 VEGFR-3 阳性血管出现在距离受侵袭导管一小段距离的导管间基质中(箭头)。值得注意的是在双染色方法中,基底层为 PAL-E 阳性。放大倍数:图 5A、B 为 400 $\times$,图 5C、D、E、F 为 320 $\times$,图 5E、F 为 480 $\times$ 。

详细描述

被称为 Flt4 的新型受体酪氨酸激酶的克隆、测序和表达如下。Flt4 基因位于染色体 5q35 区,许多生长因子和生长因子受体定位于此。Flt4 的胞外结构域由包括 12 个强效糖基化位点的 7 个免疫球蛋白样环组成。根据结构的相似性,Flt4 与先前已知的 Flt1 和 KDR/FLK1 受体可以组成 III 类酪氨酸激酶的亚家族。Flt4 基因表达产物为 5.8kb 和 4.5kb mRNA,它们的区别在于 3'端序列,以及在 HEL 和 DAMI 白血病细胞中的不同表达。

Wilm's 肿瘤细胞系、视网膜母细胞瘤细胞系和非分化畸胎瘤细胞系可表达 Flt4,而分化的畸胎瘤细胞系则为阴性。大部分胎儿组织也表达 Flt4 mRNA,其中脾脏、脑中间区和肺以最高水平表达。在成人组织中表达水平最高的是胎盘,肺、肾、心脏和肝脏的表达依次递减。在原位杂交中,Flt4 的放射自显影颗粒分布于胎儿肺的内皮细胞。胎儿组织中 Flt4 的免疫组化染色证实了内皮细胞的染色。在 18 周龄的人胎儿组织中 Flt4 的表达模式与 Flt1 和 KDR 相比存在很大差异。见 Kaipainen 等,实验医学杂志,178:2077(1993)。

实施例 4 和 11 叙述了含所述 Flt4 cDNA 的表达载体的产生及在 COS 和 NIH3T3 细胞中的表达。

本发明的 Flt4 DNA 和多肽可用于 Flt4 配体的纯化和各种器官中内皮细胞生长和分化的调节。它们还被证实可用于某些疾病的诊断/治疗。

在下面的叙述中,大量应用了重组 DNA(rDNA)技术的很多术语。为了使说明书和权利要求书(包括这些术语的范围)明确并一致,给出下述定义。

基因. 包含 RNA 聚合酶的模板的 DNA 序列。从基因转录的 RNA 能或不能编码蛋白。编码蛋白的 RNA 称为信使 RNA(mRNA),并且在真核生物中由 RNA 聚合酶 II 进行转录。然而,已知如何构建包括 RNA 聚合酶 II 模板的基因,其中具有与特定 mRNA 序列互补但通常不翻译的 RNA 序列被转录。这样的基因构建体在本文中称为“反义 RNA 基因”并且将这样的转录本称为“反义 RNA”。由于在反义 RNA 中存在翻译的终止密码子,反义 RNA 通常不翻译。

“互补 DNA”或“cDNA”基因包括通过逆转录缺少插入序列(内含子)的 mRNA 而合成的重组基因。

克隆载体. 质粒或噬菌体 DNA 或其它 DNA 序列,其可以在宿主细胞中自主复制,并且其特征在于具有一个或几个内切酶识别位点,可以用可确定的方式在这些位点切割所述 DNA 序列而不损害载体的基本生物学功能,并且为引起其复制和克隆可以将 DNA 剪接入该位点。所述克隆载体可以还包括适合在克隆载体所转染细胞的鉴定中应用的标记物。例如标记物为四环素抗性标记或氨苄青霉素抗性标记。单词“载体”有时指“克隆载体”。

表达载体. 与克隆载体相似的载体,转化了宿主细胞后,其可以表达克隆到该载体的基因。通常将克隆基因置于如启动子序列等调控序列的控制(即与调控序列可操作的连接)之下。表达调控序列可以变化,其依赖于设计载体是用来在原核宿主细胞中还是在真核宿主细胞中表达可操作的连接的基因,并且其还可以另外包括如转录元件如增强子元件、终止序列、组织特异性元件和/或翻译起始和终止位点。

本发明涉及重组 Flt4 蛋白(短和长形式)的表达,并且涉及这些蛋白的功能性衍生物。

功能性衍生物. Flt4 蛋白的功能性衍生物为拥有与非重组 Flt4 蛋白非常相似的生物活性(功能的或结构的)的蛋白。Flt4 蛋白的功能性衍生物可以包括或不包括如共价连接的碳水化合物等翻译后修饰,这取决于实现特定功能时这些修饰的必要性。术语“功能性衍生物”被认为包括分子的“片段”、“变体”、“类似物”和“化学衍生物”。

与在本文中应用的一样,当一种分子包含通常并非其部分的其它化学部分时,其被称为另一个分子的“化学衍生物”。这些部分可以改进分子的可溶性、吸收性、生物半衰期等。所述部分也可降低分子的毒性并且消除或降低分子的任何不良副作用等。在 Remington's 药理学(1980)中公开了能够介导所述作用的部分。用于将这些部分与分子结合的方法在本领域中众所周知。

片段 Flt4 蛋白等分子的片段意指分子的任何部分,例如肽核心或肽核心的变体。

变体 Flt4 蛋白等分子的变体意指在结构和生物活性上与完整分子或其片段基本相似的分子。因此,如果两个分子拥有相似的活性,即使其中一个

分子的组成或次级、三级或四级结构与另一个分子不同或者氨基酸序列不同，它们也被认为是在此作为术语的变体。

类似物 Flt4 蛋白或基因序列的类似物意指在功能上与本文中 Flt4 蛋白或基因序列非常相似的蛋白或基因序列。

优选实施方案描述

本发明涉及被申请人命名为“Flt4”的酪氨酸激酶的受体、编码 Flt4 的核苷酸分子(例如 cDNA、基因组 DNA、RNA、反义 RNA 等)、由 Flt4 基因序列及其产物制备 Flt4 肽或 Flt4 蛋白产物、重组 Flt4 表达载体、Flt4 类似物和衍生物以及应用 Flt4 和相关蛋白、Flt4 配体、Flt4 拮抗剂和抗 Flt4 抗体进行诊断和/或治疗。

重组体 Flt4 的制备

通过在适当的宿主细胞中克隆和表达 Flt4 编码序列或其功能等价物，可以制备具有生物活性的 Flt4。

为了便于叙述，可以将利用重组 DNA 技术制备 Flt4 的方法分成下列步骤：(1)分离或制备目的 Flt4 编码序列(基因)；(2)构建能够指导目的 Flt4 合成的表达载体；(3)转染或转化能够复制并表达所述 Flt4 基因，和/或加工该基因产物来产生目的 Flt4 的适当宿主细胞；和(4)鉴定并纯化目的 Flt4 产物。

分离或制备所述 Flt4 基因

Flt4 的核苷酸编码序列或其功能等价物可以被用来构建重组表达载体，该载体可指导目的 Flt4 产物的表达。在本发明方法的实施中，在本文中描述的核苷酸序列或者其片段或功能等价物可以被用来制备能指导重组 Flt4 产物在适当宿主细胞中表达的重组分子。Flt4 编码序列可以从各种产生 Flt4 样活性和/或表达 Flt4 mRNA 的细胞来源中获得。申请者鉴定了大量的对 Flt4 适合的人细胞来源，包括人胎盘白血病细胞以及一些肿瘤细胞系。

Flt4 编码序列可以通过从这些细胞来源中分离并纯化的 RNA 的 cDNA 克隆获得或通过基因组克隆获得。例如利用本领域中熟知的技术，通过聚合酶链式反应可以从 cDNA 或基因组 DNA 材料中扩增 Flt4 序列。可以利用本领域熟知的技术制备克隆子的 cDNA 或基因组文库，并且用与 Flt4 基因的任何部分基本互补的核苷酸探针针对特定的 Flt4 DNA 筛选文库。全长克隆，即包含目的 Flt4 的完整编码区域的那些克隆，可以被筛选用于构建表达载体。或者，可用本领域标准技术化学合成全部或部分 Flt4 编码 DNA。由于

核苷酸编码序列固有的简并性,在本发明方法的实施中,可以应用编码基本相似或功能上等价的氨基酸序列的其它 DNA 序列。这些 Flt4 核苷酸序列的变化包括缺失、插入或不同核苷酸的替代,其导致得到编码相同的或在功能上等价的基因产物的序列。所述基因产物可以包括导致沉默改变的该序列内氨基酸残基的缺失、插入或代替,因此产生具有生物活性的蛋白。根据相关氨基酸的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性的相似性,可以产生此类氨基酸替代。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;带有具有相似亲水性值之无电荷极性头部基团或非极性头部基团的氨基酸包括:亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸;甘氨酸、丙氨酸;天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;苯丙氨酸、酪氨酸。

构建 Flt4 表达载体

利用此信息,可得到能够提供适当量 Flt4 受体酪氨酸激酶的各种重组 DNA 载体。利用标准的重组 DNA 技术,可以从所述 Flt4 受体酪氨酸激酶 cDNA 制备具有相关结构的其它重组 DNA 载体,其编码具有在此鉴定的关键结构特点的合成蛋白及编码其它来源的相同家族的蛋白。本技术的实例是 Flt4 受体酪氨酸激酶的转化表达(见实施例 3 和 4)。通过转染真核细胞,所述新发现的序列和结构信息可以用来制备用于生物学目的的 Flt4 受体酪氨酸激酶及其各种结构域。

鉴定表达 Flt4 基因产物的转染体或转化体

通过至少下列四种常用的方法可以鉴定包含重组编码序列并表达具有生物活性的成熟产物的宿主细胞:(a)DNA-DNA、DNA-RNA 或 RNA-反义 RNA 杂交;(b)“标记”基因功能的存在或缺乏;(c)通过检测宿主细胞中 Flt4 mRNA 转录本的表达来评估转录水平;(d)通过免疫检测并最终通过其生物活性测定成熟基因产物。

在第一种方法中,利用包含与 Flt4 编码序列同源的核苷酸序列的探针,通过 DNA-DNA 杂交可以检测插入到表达载体中之 Flt4 编码序列的存在。

在第二种方法中,根据特定“标记”基因功能(例如胸腺嘧啶核苷激酶活性、抗生素抗性、氨甲喋呤抗性、转化表型、杆状病毒中包涵体形成等等)的存在或缺失,可以鉴定并筛选所述重组表达载体/宿主系统。例如,如果所述 Flt4 编码序列插入到载体的标记基因序列之内,可以通过检测标记基因功能的缺失鉴定包含该编码序列的重组体。或者将所述标记基因与所述 Flt4 序

列串联排列,处于相同或不同的用于调控所述 Flt4 编码序列表达的启动子控制之下。应答诱导或筛选的所述标记物的表达提示 Flt4 编码序列的表达。

在第三种方法中, Flt4 编码区的转录活性可以通过杂交实验进行检测。例如,利用与所述 Flt4 编码序列或其特殊部分同源的探针,通过 Northern 杂交可以分离并分析多腺苷酸 RNA。或者,可以提取所述宿主细胞的总核酸并用这类探针进行杂交检测。

在第四种方法中, Flt4 的表达可以用免疫学方法进行检测,例如 Western 杂交、放射免疫沉淀等免疫检测、酶联免疫检测等等。然而,成功的表达系统的最终检测包括对生物活性 Flt4 基因产物的检测。所述宿主细胞分泌该基因产物时,从培养的转化宿主细胞中获得的无细胞培养物可以用于 Flt4 活性的检测。基因产物不被分泌时,可分析细胞裂解物的这类活性。在这两种情况中,可以检测与 Flt4 结合的配体或 Flt4 的其它生物活性。

Flt4 衍生物、类似物和肽

还考虑了与 Flt4 相关的衍生物、类似物和肽的制备和应用,而且其在本发明范畴之内。与天然 Flt4 相比,这些衍生物、类似物或肽可以增加或降低生物活性,这依赖于具体应用。本发明的 Flt4 相关衍生物、类似物和肽可以通过各种本领域中熟知的方法制备。基因水平和蛋白水平上的方法和操作属于本发明的范畴。本领域中标准的肽合成法可以用来获得 Flt4 肽。在蛋白水平上,通过本领域熟知的技术,多种化学修饰可以用来制备 Flt4 样衍生物、类似物或肽,所述技术包括但不限于内肽酶(例如溴化氰、胰蛋白酶、糜蛋白酶、V8 蛋白酶等等)或外肽酶的特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、氧化等。

优选那些保留 Flt4 配体结合活性的衍生物、类似物和肽。那些与 Flt4 配体结合但不能传导其应答信号的衍生物、类似物和肽被用作为 Flt4 抑制剂。那些与 Flt4 配体结合且传递其应答信号(例如通过涉及细胞内 Flt4 自我磷酸化的过程)的衍生物、类似物和肽以天然 Flt4 相同的方式应用。用于这类结合和/或自我磷酸化检测的优选 Flt4 配体是可从本文所述之 PC-3 条件培养基中分离的包含约 23kd 多肽的配体。在下列 PCT 专利中详细叙述了这个命名为血管内皮生长因子-C(VEGF-C)的配体的特点, PCT/F196/00427, 1996 年 8 月 1 日提交,其国际公开号为 WO 97/05250; 和其要求优先权的美国专利申请优先权文本,所有这些在此全文引入作为参考。

抗 Flt4 抗体

识别 Flt4 蛋白或相关蛋白的多克隆和单克隆抗体的制备也属于本发明的范畴。

可用在本领域中已知的各种方法制备针对 Flt4 抗原决定簇的多克隆抗体。对于抗体的制备,可以通过注射 Flt4 或合成的 Flt4 肽免疫各种宿主动物(包括但不限于兔、小鼠、大鼠等)。可以依宿主的种类应用各种佐剂来增强免疫应答,佐剂包括但不限于弗氏(完全或不完整)佐剂、氧化铝等矿物胶、如溶血卵磷脂等表面活性物质、pluronic 多元醇、聚阴离子、乳胶油、匙孔血蓝蛋白、二硝基苯酚和如 BCG(Bacillus Calmette-Guerin)和小棒状杆菌等可能有用的人佐剂。

利用通过细胞系连续培养制备抗体分子的任何技术,可以制备针对 Flt4 抗原决定簇的单克隆抗体。这些技术包括但不限于最初由 Kohler 等,自然, 256: 495-497(1975)描述的杂交瘤技术,和更近期的人 B 细胞杂交瘤技术[Kosbor 等, Immunology Today, 4: 72(1983)]及 EBV 杂交瘤技术[Cole 等, 单克隆抗体和癌症治疗, Alan R Liss, Inc, pp.77-96(1985)]。还可以在细菌中从克隆的免疫球蛋白 cDNA 制备抗 Flt4 抗体。利用重组噬菌体抗体系统,可在细菌培养中迅速产生并筛选抗体,还可对其结构进行遗传操作。

包含分子独特型的抗体片段可以用已知的技术制备。例如,这些片段包括但不限于: $F(ab')_2$ 片段,其可以用胃蛋白酶消化抗体分子来产生; Fab' 片段,其可以通过还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫键来产生;两个 Fab 片段,它们可以通过用木瓜蛋白酶和还原试剂处理抗体分子来产生。

Flt4 抗体可用于成熟 Flt4 和 Flt4 前体以及亚成分形式的定性和定量检测、Flt4 多肽的亲合纯化和 Flt4 生物合成、代谢及功能的说明。Flt4 酪氨酸激酶活性的检测可以作为此类试验中 Flt4 特异性信号之产生和扩增的酶方法。Flt4 抗体还可以用作诊断和治疗药物。

Flt4、编码 Flt4 的核酸分子和抗 Flt4 抗体的应用

申请者考虑了本发明组合物的各种广泛应用,包括 Flt4、Flt4 类似物和衍生物、编码 Flt4 的核酸分子、反义核酸分子和抗 Flt4 抗体的诊断和/或治疗应用。

编码 Flt4 的核酸分子或其片段可以作为用来检测和定量编码 Flt4 的 mRNA 的探针。应用核酸探针来检测已知基因的全部或部分序列的检测方法

在本领域众所周知。Flt4 mRNA 水平可以提示恶性肿瘤的出现和/或存在以及提示其它人类疾病的开始和/或发展。因此，能检测并定量 Flt4 mRNA 的试验可以为此提供有价值的诊断工具。

可在以消除 Flt4 的存在或下调其水平为目的的治疗中，用反义 Flt4 RNA 分子有效抑制编码 Flt4 之 mRNA 的翻译。例如，当 Flt4 与致病有关(如由于其过表达)时，对这类疾病的治疗可用 Flt4 反义 RNA 作为 Flt4 拮抗剂。

另外，Flt4 反义 RNA 有助于解释 Flt4 的功能机制。Flt4 的核酸分子可以用于产生本文分别论述的重组 Flt4 蛋白和相关分子。

抗 Flt4 抗体可以在多种情况中用于诊断和定量 Flt4。例如，抗 Flt4 各种结构域的抗体可以作为 Flt4 免疫分析或免疫组化评估的基础。Flt4 的酪氨酸激酶活性可以有助于这些检测，因为可将 Flt4 信号的的产生用酶反应扩大化。抗 Flt4 抗体还有助于研究细胞表面 Flt4 的量。

可以制备作为 Flt4 配体激动剂或拮抗剂的抗体，并因此使 Flt4 活性的调节成为可能。另外，可合成或从随机寡核苷酸中重组产生随机肽，并可利用 Flt4 胞外结构域筛选与所述 Flt4 受体特异性结合的随机肽。还可利用 Flt4 胞外结构域按本领域的标准方法从噬菌体展示文库中筛选此类肽片段。这类肽可能具有激动或拮抗活性。与各种用于在体内使表达 Flt4 的细胞和组织或肿瘤显像的化合物结合后，Flt4 抗体还提供了有用的诊断工具。

抗 Flt4 的单克隆抗体可以与适当的超磁、顺磁、电子密集、产生回波的(echogenic)或放射活性试剂以共价键或非共价键结合，制备靶向显像试剂。可以用通过蛋白水解或化学处理产生的抗体片段或利用单克隆抗体的抗原决定簇结合结构域制备的分子替代完整的抗体。然后此显像试剂将作为对照试剂用于诊断目的的人体 X-射线、磁共振、超声或闪烁显像。

Flt4 的分子生物学

SEQ ID No: 1 和 3 所示 Flt4 cDNA 克隆的完整序列，依据两种不同的剪接分别延伸 4195 或 4795 个核苷酸并包括 1298 或 1363 个氨基酸的开放阅读框架。所述核苷酸和推导的 Flt4 氨基酸序列(短形式)见 SEQ ID Nos: 1 和 2 所示。图 2 描绘了 Flt4 氨基酸序列与 Flt1 酪氨酸激酶氨基酸序列的比较。见 Shibuya 等，癌基因，5: 519-524(1990)。

在起始甲硫氨酸之后为推测的大部分是疏水氨基酸的信号肽序列。相应 ATG 周围的序列与共有的转录起始序列一致[Kozak，核酸研究，15:

8125-8135(1987)]. 预测的两个 Flt4 多肽的细胞外部分长度均为 775 个氨基酸, 并且包括 12 个用于天冬酰胺连接的糖基化(NXS/T)的潜在位点。其还包括显示免疫球蛋白超家族几个成员的间距模式的几个氨基酸残基[Williams 等, 免疫学年鉴(Annu Rev Immunol), 6: 381-405(1988)]. 其有 12 个半胱氨酸残基并且它可以组织成 7 个免疫球蛋白样结构域。预测的 Ig 样结构域 IV 缺少半胱氨酸残基。图 2 还显示了 Flt1 胞外结构域(SEQ ID No.5), 其为与 Flt4 最相似的人型同系物。从此图中可以看到半胱氨酸残基的排列和非常相似的 Ig 样区域的组成。

由 23 个疏水氨基酸残基组成的推测的跨膜结构域将胞浆结构域与胞外结构域分离。该序列在细胞质一侧为一个碱性区, 它提示跨膜结构域与胞浆结构域的结合。酪氨酸激酶同源结构域起始于残基 843, 包括 ATP 结合口袋, 并在 Y1068 上推测有与 c-src 之 Y416 同源的自我磷酸化位点(图 2)。Flt4 的酪氨酸激酶催化结构域被包含 65 个氨基酸的一个序列(氨基酸 944-1008)分成两个亚结构域, 所述 65 个氨基酸序列大部分是亲水性氨基酸并且与 Flt1 没有同源性。与 Flt1 不一样, Flt4 在其激酶插入片段中不包括酪氨酸残基。

第二种 Flt4 mRNA 具有另一种 3'末端, 其编码更长形式的 Flt4 蛋白。

在图 3A-3C 中, 说明了通过两种不同剪接产生的短形式和长形式 Flt4 mRNA。图 3A 给出了克隆 J.1.1 和 I.1.1 之 cDNA 插入片段 3'末端的结构示意图。指出了克隆 J.1.1 的 TAG 终止密码子以及聚腺苷酸化(polyA)位点。克隆 I.1.1 与克隆 J.1.1 的不相同区域用阴影表示(分别为长形式和短形式 Flt4 mRNA)。TAA 和 polyA 表明克隆 I.1.1 的终止密码子和聚腺苷酸位点。另外, 还指出了 EcoRI 和 AvaI 的酶切位点。下面给出的是克隆 I.1.1 中用于 cDNA 保护性分析的 256 bp EcoRI-AvaI 插入片段。浓阴影部分表明用于在体外转录反义链的线性化正义 RNA 模板中多接头的序列。还显示了在 RNA 酶保护性分析之后被保护片段的结构示意图。图 3B 和 3C 显示了 256 bp ³⁵S 标记的反义 RNA 探针以及 211 和 124 bp 消化片段的放射自显影图, 所述两片段分别为 Flt4 RNA 在特定细胞系(Tera-2 为恶性畸胎瘤细胞系, 在此用或不用视黄酸(RA)处理 10 天后对其进行分析)中受到聚腺苷酸化 RNA 保护时的长形式和短形式。(阴性)对照泳道显示了用转移 RNA 进行保护的结果。可见 Tera-2 细胞分化期间 Flt4 mRNA 的下调。Tera-2 细胞系的克隆 13 由 C.F. Granham 博士(牛津大学动物学系, 英国)提供。在本研究中应用传代 18-40 代的细胞。

在含 10%胎牛血清和抗生素的 Eagle's 基本培养基(MEM)中培养细胞。为了诱导分化,将细胞平铺于明胶覆盖的组织培养级培养皿中,其密度为 1.5×10^{13} 细胞/ cm^2 。在第二天,向培养基中加入 2×10^{-6} M RA。在 RA 存在的条件下培养细胞直到 10 天。

图 3A-C 所示结果表明经两种不同剪接产生 Flt4 的这两种形式(短和长)的羧基末端。

根据 Flt4 推导的氨基酸序列,其属于 III 类 RTK。更具体地说,Flt4 属于 RTK 亚家族,其胞外部分包括 7 个 Ig 环,因此它不同于 III 类 RTK 中包含 5 个 Ig 环的其它成员。Flt4 与 FLT 家族的原型受体 Flt1 以及小鼠 KLK1 受体具有最高特异性,其中 Flt1 是从一个人类基因组 DNA 文库中克隆的 v-ros 相关 DNA[Shibuya 等, 癌基因, 5: 519-524 (1990)], KLK1 是从富含造血干细胞的小鼠肝脏级分中克隆的[Matthews 等, 细胞, 65: 1143-1152 (1991); Matthews 等, 美国国家科学院院刊, 88: 9026-9030 (1991)]。Flt4 的胞外结构域与人 Flt1 和小鼠 FLK1 分别有 33%和 37%的氨基酸序列同一性。与 Flt4 一样, Flt1 和 FLK1 在各种正常组织中有广泛的表达,例如肺、心脏和肾脏等。另外,最近鉴定的人内皮细胞受体酪氨酸激酶 KDR[Terman 等, 癌基因, 6: 1677-1683 (1991)]显示与 Flt4 和 Flt1 家族成员具有相当的同源性。从可用的序列资料中计算发现 KDR 与 Flt4 在酪氨酸激酶(TK)结构域有 81%同一性。另外, KDR 的胞外结构域也有 7 个 Ig 环结构并且其 TK1 和 TK2 结构域与小鼠 FLK1 受体的相应结构域有 95%和 97%的同一性。这表明 KDR 是小鼠 FLK1 的人类同系物。

虽然 Flt4 TK 结构域与 Flt1 和 FLK1/KDR 的 TK 结构域大约有 80%相同,但是其与 III 类 RTK 的其它受体的 TK 结构域只有大约 60%相同。因为这些其它受体在胞外结构域中仅具有 5 个 Ig 样结构域,可将 Flt4、Flt1 和 FLK1/KDR 划归 III 类 RTK 家族中一个独立的 FLT 亚家族。

在 PDGFR、c-fms 和 c-kit 的激酶插入片段中位于 D/E-D/E-Y-M/V-P/D/E-M [Cantley 等, 细胞, 64: 281-302 (1991)] (SEQ ID NO.6) 序列中的酪氨酸残基为自我磷酸化位点,其在磷酸化时结合磷脂酰肌醇 3' 激酶(PI-3K)的 SH2 结构域[Reedijk 等, EMBO J. 11: 1365-1372(1992)]。有趣的是,与这些 III 类 RTK 不同,FLT 亚家族成员或 Flt3/FLK2 受体不包含这些保守的基序。

8 个人类 III 类 RTK 基因集结在 3 个不同的染色体上。4 号染色体上含有 c-kit、PDGFR- α 和 KDR 基因[Yarden 等, EMBO J., 6: 3341-3351 (1987); Stenman 等, 基因、染色体、癌症, 1:155-158 (1989); Terman 等, 癌基因, 6:1677-1683 (1991)]。Flt1 和 Flt3 位于 13 号染色体的 q12 区[Satoh 等, 日本癌症研究杂志, 78: 772-775 (1987); Rosnet 等, 基因组学(Genomics), 9: 380-385 (1991)], 而 Flt4 位于 5 号染色体 q35 带[Aprelikova 等, 癌症研究, 52: 746-748 (1992)]; 靠近 fms 和 PDGFR- β 基因[Warrington 等, 基因组学, 11: 701-708 (1991)]。5 号染色体的长臂与在白血病细胞中发现的易位有关。在顽固性贫血和巨红细胞症患者骨髓细胞中发现 5 号染色体长臂的部分缺失[Van Den Berghe 等, 自然, 251: 437-439(1974)]。在几个其它骨髓增生性疾病中发现 5q 染色体异常, 如拌有过量胚细胞的顽固性贫血[Swolin 等, 血液, 58: 986-993 (1981)], 原因不明的髓样化生[Whang-Peng 等, 白血病研究, 2: 41-48 (1978)], 慢性髓源性白血病[Tomiyasu 等, 癌症遗传学.细胞遗传学, 2: 309-315 (1980)], 原发性脾大性红细胞增多(polycythemia vera)[Van Den Berghe 等, 癌症遗传学.细胞遗传学, 1: 157-162 (1979)]和特发性血小板增多[Nowell 等, 癌症, 42: 2254-2260 (1978)]。

关于 Flt4 mRNA 表达的发现表明其蛋白产物为某些白血病细胞特有。已表明成巨核细胞和内皮细胞间存在几个共同的分化抗原, 例如血小板糖蛋白 IIIa[Ylanne 等, 血液, 72: 1478-1486 (1988); Kieffer 等, 血液, 72: 1209-1215 (1998); Berridge 等, 血液, 66: 76-85 (1985)]。另外, 胚胎期某些内皮细胞, 如肺和肾的内皮细胞表达 Flt4。

为了进一步理解 Flt4 在发育期间的作用, 克隆了小鼠 Flt4 的部分 cDNA。在原位杂交中应用这些探针分析了小鼠发育期间 Flt4 mRNA 的表达。确定了在淋巴系统的淋巴管发生和淋巴管生成期间表达 Flt4。还在正常的和病理状态的成人组织中证实了这些发现的关联性, 例如在正常和病理条件下的成人组织的淋巴管内皮及一些高内皮小静脉(HEVs)中均发现了 Flt4。

小鼠 Flt4 cDNA 片段的克隆表明其推导的氨基酸序列与人的相应序列几乎相同(在所研究的两个片段中氨基酸同源性大约 96%)。从 Northern 杂交实验中获得了对于小鼠 Flt4 cDNA 同一性的进一步证据, 其中两个物种的探针均在小鼠组织中产生典型的 5.8 kb mRNA 信号。对从成年小鼠组织中分离的 RNA 的分析表明 Flt4 在肝脏、肺、心脏、脾和肾脏中表达, 而在脑组织

和睾丸中没有或有非常少的杂交。此模式与早期由 Galland 等, 癌基因, 8: 1233(1993)中报道的模式相似。RNA 酶保护实验的结果表明, 小鼠发育期间, 从交配后 8.5 天开始就需要 Flt4 基因, 其相对表达水平较稳定。

为了进行原位杂交, 筛选了两个编码胞外结构域序列的小鼠 Flt4 cDNA 片段。这可使 Flt4 与相关的 FLK-1 和 Flt1 受体(其与 Flt4 在胞外区的序列同一性很低)的杂交模式明确区分。见 Millauer 等, 细胞, 72: 835 (1993); Yamaguchi 等, 发育, 118: 489 (1993); Peters 等, 美国国家科学院院刊, 90: 8915(1993); Finnerty 等, 癌基因, 8: 2293(1993)。

与 FLK-1、Flt1、Tie 和 Tek 内皮受体酪氨酸激酶基因相似, Flt4 在交配后(p.c.)7.5 天的胚胎中不表达。在交配后 8.5 天的胚胎中, 最强的 Flt4 信号位于尿囊、脑间充质的成血管细胞、背侧大动脉和主静脉。在心内膜中可见弱信号。相反, 与 FLK-1 和 Flt1、Tie 和 Tek 不同的是, Flt4 在卵黄囊的成血管细胞中为阴性。见 Korhonen 等, 癌基因, 8: 395(1993); 和 Peters 等, 美国国家科学院院刊, 90: 8915(1993)。Flt4 表达限定于静脉系统的现象在 11.5 天小鼠胚胎样品中更清楚, 而此时 Tie mRNA 在动脉中也表达。在交配后 12.5 的胚胎中, Flt4 信号分布于发育中的静脉和可能的淋巴管内皮中, 但是与内皮的 Tie 受体酪氨酸激酶不同的是, 其在动脉内皮中为阴性。在发育后期, Flt4 mRNA 仅限于不含血细胞的血管丛(其代表发育中的淋巴管)中。在成人组织中, 只有淋巴管内皮和一些高内皮小静脉表达 Flt4 mRNA。表达的增加可见于淋巴窦和高内皮小静脉、转移性淋巴结, 以及淋巴管瘤。

由于解释来自小鼠胚胎的资料有困难, 研究了人的内皮, 因为人的淋巴系统更明确。还可以在细胞培养中研究从各种内皮中建立的细胞, 以验证在体外条件下是否保持特异性 Flt4 表达。已知内皮细胞系在体外培养中将失去分化特点。因此, 预计它们为 Flt4 mRNA 阴性。培养的动脉内皮细胞也无 Flt4 mRNA。然而, 人的微脉管系统、股动脉和脐静脉的内皮细胞中也获得了信号。因此, Flt4 表达的特异性在细胞培养中至少保留了部分。

成人组织的原位杂交分析证实了在发育的小鼠胚胎中见到的 Flt4 限定于淋巴系统的现象。在人淋巴结的淋巴内皮和窦中发现 Flt4 表达。有趣的是部分 HEVs 也为 Flt4 阳性, 它们具有方状内皮, 在白细胞到淋巴结的运输中起作用。而且, 平行杂交分析表明, 与正常淋巴结相比, 在转移性淋巴结的这些结构中 Flt4 mRNA 水平增加。Flt4 在淋巴管瘤中也非常明显, 所述淋巴

管瘤为良性肿瘤，其由结缔组织基质和正生长的内皮状排列的淋巴管道组成。Flt4 mRNA 被限定于这些肿瘤的淋巴管内皮中，而且在其动脉、静脉和毛细血管中缺乏。在人肺中，仅淋巴结构被鉴定为 Flt4 阳性脉管。

上述的结果表明 Flt4 是成人组织中淋巴管和一些高内皮小静脉的新标记物。这些结果还支持淋巴管起源于静脉的理论。作为生长因子受体，Flt4 可能参与这些脉管的分化和功能。在 1996 年 8 月 1 日提交的 PCT/ FI96/ 00427(国际公开号 WO 97/05250)中提供了 Flt4 与 Flt4 配体(VEGF-C)所介导的生物效应的详细特征。

根据这些结果，以及本发明的 Flt4 结合化合物，可以选择性标记淋巴内皮，尤其可利用与放射活性、电子密度或其它可视受体物质偶联的本发明抗体。可向淋巴系统中注射含有诱导 Flt4 受体内在化的单克隆抗体或配体的物质，并因此将指定分子导入淋巴内皮中。还可利用本发明的 Flt4 结合化合物检测高内皮小静脉，尤其是 Flt4 受体表达水平增高的活化 HEV。据我们了解，目前针对淋巴管内皮尚无如此特异性的标记物。

以下实施例仅为举例说明本发明，并非对发明范围的限制。

实施例 1 编码 Flt4 的 cDNA 克隆的分离及鉴定

材料和方法

以 oligo-dT 为引物，在噬菌体 λ gt11 中的人 HEL 细胞 cDNA 文库 [Mortimer Poncz 博士惠赠，费城儿童医院; Poncz 等，血液，69: 219-223(1987)] 用来自相同文库的经过 PCR 扩增的 cDNA 片段进行筛选 [Aprelikova 等，癌症研究，52: 746-748(1992)]。按 [Sambrook 等，分子克隆-实验室指南，冷泉港实验室出版社(1989)] 中叙述的方法，鉴定并纯化阳性噬菌斑。分离 λ 噬菌体的 cDNA 插入子作为 EcoRI 片段并将其亚克隆到 GEM3Zf(+) 质粒 (Promega)。分离完整的 Flt4 蛋白编码区域。根据所获序列设计寡核苷酸引物，用于经双脱氧链终止法对从 HEL-文库中分离的三个重叠克隆(如图 1 所示)测序。对所述 cDNA 两条链的所有部分均进行测序。用 GCG 软件包进行序列分析 [Devereux 等，核酸研究，12:387-395 (1984) 和 Prosite programs for Apple MacIntosh]。

图 1A 为所分析的 Flt4 cDNA 克隆的结构示意图。箭头表示亚克隆的限制性片段(其单位为 kb)，其用于探测图 1B 所示的 Northern 印迹。E = EcoRI 位

点, S=SphI 位点。图 1B 为用图 1A 所示探针对 DAMI 和 HEL 白血病细胞 RNA 的 Northern 杂交分析。

结果

通过 PCR 克隆法从 HEL 细胞 cDNA 文库中分离的 210 bp 长 Flt4 cDNA 片段被用作分子探针以筛选 oligo-dT 为引物的人红白血病 cDNA 文库。

对克隆子的核酸序列分析揭示了包含 1298 个氨基酸残基的一个开放阅读框架(SEQ ID NO: 2, 图 2)。在图中标出的翻译起始点甲硫氨酸被一个常见的保守序列[Kozak, 核酸研究, 12: 857-872(1984)]包围并且其后跟着一个疏水性氨基酸序列, 该序列具有转位到内质网的信号序列的特征。

Flt4 的胞外结构域可以排列成 7 个免疫球蛋白样环(图 2)。此图还给出了 Flt4 与结构非常相似的 Flt1 的比较。Flt1 的氨基酸序列见 SEQ ID NO: 5 所示。

氨基酸 775-798 构成序列的疏水性区域, 其功能可能是作为受体的跨膜结构域, 其后跟着若干碱性残基, 它们位于所述序列的推测细胞质侧。酪氨酸激酶同源序列始于氨基酸 842 处, 它前面为 44 个残基的近膜结构域。一段 65 个氨基酸的激酶插入片段使同源序列在所述受体羧基端的 1175 氨基酸处首次中断同源性。在氨基酸序列数据库(Swissprot & NBRF)中对相关酪氨酸激酶结构域的搜索发现, Flt4 和 PDGRB 酪氨酸激酶在催化性酪氨酸激酶结构域中分别具有约 80%和 60%的同源性。

实施例 2 抗 Flt4 抗血清的制备

将 657 bp EcoRI 片段(其编码预测的 Flt4 短形式的 C 末端)与谷胱甘肽-S-转移酶编码区克隆到 pGEX-1λT 细菌表达载体中的同一阅读框架内, 以便在大肠杆菌中产生 GST-Flt4 融合蛋白。所得融合蛋白在细菌中产生, 并且按说明书用谷胱甘肽亲和层析法纯化。用此蛋白免疫家兔以制备抗 Flt4 多克隆抗体。在第三次加强免疫后, 取抗血清备用。

实施例 3 COS 细胞中 Flt4 的表达

材料和方法

将全长 Flt4 蛋白编码序列(由 3 个克隆组合而成, 图 1)插入 SVpoly 哺乳动物表达载体[Stacey 等, 核酸研究, 18: 2829(1990)]构建体 SV14-2 的 HindIII-BamHI 位点。通过 DEAE-葡聚糖转染法[McCutchan 等, J.Natl.Cancer Inst, 41: 351-357(1968)], 将表达载体(短 SV-FLT4 和长 SV-FLT4, 包括相

应形式的 Flt4 cDNA)导入 COS 细胞。在转染两天后,用磷酸缓冲液(PBS)洗涤细胞并将其刮到免疫沉淀缓冲液中(10mM Tris pH 7.5, 50mM NaCl, 0.5% 去氧胆酸钠, 0.5% Nonidet P40, 0.1% SDS, 0.1 TIU/ml 抑酶肽)。超声处理细胞裂解物, 10000×g 离心 15 分钟并与 3ml 抗血清在冰上保温过夜。加入蛋白 A sepharose 并继续旋转保温 30 分钟。在 SDS-PAGE 分析之前,用免疫沉淀缓冲液洗涤沉淀物四次,用 PBS 和水各洗涤一次。

结果

通过将全长 Flt4 短及长形式蛋白编码区克隆到 pSVpoly 表达载体的 Hind III-BamHI 位点并将这些表达载体转染到 COS 细胞中,检测了 Flt4 cDNA 序列的结构预测。通过这两个构建体制备的蛋白在 C 末端存在差异:长形式包含额外的 65 个氨基酸。在转染两天后,裂解细胞并利用抗 GST-Flt4 融合蛋白抗体进行免疫沉淀,其中 GST-Flt4 融合蛋白包括预测的 Flt4 蛋白短形式的 40 个羧基末端氨基酸(即 Flt4 的短形式和长形式共有的部分)。通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析免疫沉淀的多肽。免疫前的血清未发现任何特异性条带,而 Flt4 特异性抗体识别大约 170 KD 和 190 KD 的两条条带。这两条条带可以代表 Flt4 蛋白的不同糖基化形式。

实施例 4 NIH3T3 细胞中 Flt4 的表达

材料和方法

将全长 Flt4 cDNA(短形式)亚克隆至包含 Moloney 鼠类白血病病毒长末端重复的启动子的 LTRpoly 载体(见 Makela 等, 基因, 118: 293-294(1994), 其公开了 pLTRpoly 载体, 其 ATCC 登记号为 77109, Genbank 登记号为 X60280)。此 LTR-FLT4 表达载体与 pSV2neo 标记质粒共转染到 NIH3T3 细胞,分析 G418 抗性克隆的 Flt4 表达。

为了进行 Western 免疫杂交分析,将一个大融合平板上的细胞在 2.5% SDS、125mM Tris、pH 6.5 中裂解。将细胞裂解物在 SDS-PAGE 上进行电泳并电转到硝酸纤维素膜上。将此膜与抗 Flt4 羧基末端肽的抗血清一起保温,用偶联辣根过氧化物酶的猪抗兔抗血清(Dako)和 ECL 试剂(Amersham)使结合的抗体显色。为了对代谢进行标记,用 100 μ Ci/ml ³⁵S-甲硫氨酸标记所述培养物 1 小时。标记之后,洗涤细胞两次并在其生长培养基中温育 1 或 2 小时,裂解细胞,用抗 Flt4 抗体进行免疫沉淀,并且通过 SDS-PAGE 和荧光自显影进行分析。

结果

在 Flt4 短形式转染的 NIH3T3 细胞中可以检测到 170 KD 和 190 KD 多肽,而在仅转染 pSV2neo 的细胞中则未检测到。除了这两条带,在产生 Flt4 的克隆中发现了约 120Kd 的一条明显带。代谢标记和脉冲追踪实验表明此蛋白短形式 Flt4 多肽翻译后加工的产物。

实施例 5 Flt4 基因座的染色体定位

因为已发现一些 III 类受体基因簇,故确定 Flt4 的染色体位置非常重要。因此分析了啮齿类动物-人类细胞的杂交细胞,表明 Flt4 连锁于人的 5 号染色体。

利用携带部分染色体 5s 的杂交细胞确定 Flt4 基因位于 5q33->5qter 区。通过膜杂交检测这些杂交细胞是否存在 Flt4 基因座。Flt4 阳性杂交细胞共有而在 Flt4 阴性杂交细胞中缺陷的 5 号染色体区域是 5q33.1-qer。因此杂交细胞中人类染色体 5q33-qer 的存在与 Flt4 序列的存在相关。所述区域定位结果表明 Flt4 基因座与 CSG1R/血小板衍生生长因子受体 β (PDGFRB)基因座以及 β 肾上腺素能受体(ADRBR)基因座相对应(is telomeric to),因为这些基因座在 Flt4 阴性的杂交细胞 GB13 中均存在。

实施例 6 肿瘤细胞系和内皮细胞中 Flt4 mRNA 的表达

在本研究中应用的白血病细胞系在几个以前的出版物中已经报道,即 K562[Lozzio 等, 血液, 45: 321-334(1975)], HL-60[Collins 等, 自然, 270:347-349(1977)], HEL[Martin 等, 科学, 216: 1233-1235(1982)], DAMI[Greenberg 等, 血液, 72: 1968-1977(1988)], MOLT-4[Minowada 等, J Natl Cancer Inst, 49: 891-895(1972)], Jurkat[Schwenk 等, Blut, 31: 299-306(1975)], U937[Sundstrom 等, 国际癌症杂志, 17: 565-577(1976)], KG-1[Koeffler 等, 科学, 200: 1153-1154(1978)], JOK-1[Aandersson 等, 1982, 在 R.F. Revoltella(编), 肿瘤细胞中分化功能的表达, 239-245, Raven 出版社, 纽约]和 ML-2[Gahmberg 等, 1985, 在 L.C. Andersson 等(编.), 正常分化和恶性分化期间的基因表达, 107-123, Academic 出版社, 伦敦]。还分析了从美国典型培养物保藏中心获得的下述肿瘤细胞系: JEG-3 绒毛膜癌; A204 横纹肌肉瘤; SK-NEP-1 肾母细胞瘤; BT-474 乳腺癌; Y79 视网膜母细胞瘤。在含 10%胎牛血清(FCS)和抗生素的 RPMI 培养基中培养所述白血病细胞。在含 10%马血清的 Iscove's 改良型 DMEM 培养基中培养 Dami 细胞。在含

10%FCS 和抗生素的 DMEM-HAT 培养基中, 培养由原代人脐静脉内皮细胞与 A549 肺癌细胞融合获得的永生化内皮杂交细胞[Edgell 等, 美国国家科学院院报, 50: 3734-3737(1983)]。

按报道的方法[Sambrook 等, 见上述]从所述细胞系提取 Poly(A)⁺ RNA。取 5 μ g Poly(A)⁺ RNA 在含甲醛的琼脂糖凝胶中进行电泳, 并在标准条件[sambrook 等, 见上述]下进行印迹。用随机引物法标记 Flt4 cDNA 克隆的插入片段并且与上述印迹进行杂交。在下述溶液中 42℃ 杂交 18-24 小时, 即含 50%甲酰胺、5 X Denhardt's 溶液(100 X Denhardt's 溶液为 Ficoll、聚乙烯吡咯烷酮和牛血清白蛋白各 2%)、5 X SSPE(3M NaCl, 200mM NaH₂PO₄·H₂O, 20mM EDTA, pH 7.0)、0.1%SDS(十二烷基磺酸钠)和 0.1 mg/ml 超声处理的鲑精 DNA 的溶液。在 1X SSC(150 mM NaCl, 15 mM 柠檬酸钠, pH 7.0)、0.1% SDS 中 65℃ 洗涤杂交膜并于 Kodak XAR-5 胶片上曝光。

用从 8 个白血病细胞系(HEL、K562、DAMI、U937、MOLT4、HL60、Jurkat 和 KG-1)和内皮杂交细胞系(EAhy926)中提取的 Poly(A)⁺ RNA 进行 Northern 分析。用与 GAPDH 探针的杂交作为内对照, 用来分析 RNA 平均上样量。只有 HEL 红白血病细胞和 DAMI 成巨核细胞白血病的细胞表达 5.8 kb 和 4.5 kb 的 Flt4 mRNA。在 K562 红白血病、Jurkat 和 MOLT-4 T 细胞白血病以及 HL-60 前髓细胞白血病、U937 单核细胞白血病和 KG-1 髓样白血病的细胞中 Flt4 mRNA 为阴性。

用从 5 个肿瘤细胞系(JEG-3、A-204、SK-NEP-1、BT-474 和 Y79)和两个上述的白血病细胞系(JOK-1、MOLT4)中提取的 Poly(A)⁺ RNA 进行 Northern 分析。用标记的 S2.5 cDNA 克隆作为杂交探针。用与 β -肌动蛋白探针的杂交作为内对照, 用来分析 RNA 平均上样量。发现只有 SK-NEP-1 肾母细胞瘤和 Y79 视网膜母细胞瘤中有 Flt4 转录。

用载体(vehicle)(-)或视黄酸(+)处理以诱导神经元分化, 10 天后分析了 Tera-2 畸胎瘤细胞[Thompson 等, 细胞科学杂志, 72: 37-64(1984)]。在从所述细胞中分离的 Poly(A)⁺ RNA 的 Northern 杂交中发现未分化细胞表达 5.8 kb 和 4.7 kb 的 Flt4 mRNA, 但是 10 天分化之后, 在 Northern 印迹和杂交中不能检测到 Flt4 mRNA。这些结果说明在这些细胞分化期间 Flt4 下调。

还分析了未分化和 TPA 诱导分化的 HEL 细胞的 Flt4 mRNA 表达。HEL 和 DAMI 细胞系均拥有红细胞/成巨核细胞双表型, 并且通过用肿瘤促进剂

12-O-四癸酰佛波醇-13 乙酸酯(TPA)处理可以进一步表达成巨核细胞标记物。我们分析了在这些细胞分化期间 Flt4 表达是否受到刺激。在用 TPA 或用来溶解 TPA 的 DMSO 处理 2 天后,分析了 HEL 细胞。在剥离 Flt4 信号后,用 Rb-1 和 β -肌动蛋白 cDNA 探针进行杂交,来证实泳道的平均负载。根据放射自显影光密度扫描分析并针对 GAPDH 基因组成型表达进行标准化之后,确定当在 TPA 诱导的 HEL 细胞进行成巨核细胞分化时其 Flt4 mRNA 水平增加约 3.4 倍。

实施例 7 胚肺中 Flt4 的表达

原位杂交:在大学中心医院和芬兰 Turku 大学的联合伦理委员会的许可下,得到 15 周龄人胚肺组织。用 10%甲醛将样品 4℃固定 18 小时,脱水,石蜡包埋,切为 6 μ m 切片。用 SP6 和 T7 聚合酶及³⁵S]-UTP 从线性化质粒 DNA 中制备 206 和 157 个碱基(反义和正义)的 RNA 探针。根据 Wilkinson 等,发育, 99: 493-500(1987); Wilkinson, 细胞, 50: 79-88(1987)中的方法进行切片原位杂交,有如下的修改: 1)在石蜡包埋前应用二甲苯而不是甲苯; 2)将切为 6 μ m 的切片放置在用 2% 3-氨基丙基-三乙氧基硅烷(Sigma)预处理的玻片表面上的二乙基焦碳酸酯处理的水层上; 3)省略对探针的碱性水解步骤; 4)杂交混合物包括 60%去离子甲酰胺; 5)在含 50 mM DTT 和 1X SSC 的溶液中 65℃高严谨度洗涤 80 分钟; 6)用 NTB2-乳剂(Kodak)覆盖切片并在 4℃保存。在暴露 14 天后,将所述玻片在 Kodak D-19 显色剂中显色 2.5 分钟并用 Unifix 固定 5 分钟。将切片用苏木精在水中染色。

在所述利用反义探针的杂交研究中,主要在 15 周龄胚肺的某些内皮细胞中发现 Flt4 mRNA。在用正义链探针和 RNA 酶 A 处理的切片进行的对照杂交实验中未产生超出上述背景的信号。

对于免疫过氧化酶染色,应用了 1:100 稀释的抗 Flt4 抗体,过氧化酶偶联的猪抗兔抗体和本领域中应用的标准方法。用免疫前血清或免疫原封闭的血清进行的对照染色没有信号。分析了 17 周龄胚肺组织,结果与 mRNA 原位杂交的实验结果一致:肺的某些大血管内皮兔抗 Flt4 抗血清染色为阳性。

实施例 8 在非人类哺乳动物中鉴定 Flt4 基因

图 4 中给出了在不同物种 DNA 中检测 Flt4 序列的实验结果。为了揭示 Flt4 基因在进化中的较高保守程度,将 2.5 kb cDNA 片段(见图 1)与从不同动

物和酵母中纯化并用 EcoR I 消化的染色体 DNA 进行杂交。杂交溶液包括 50%甲酰胺、5 X Denhardt's 溶液(100 X Denhardt's 溶液为 Ficoll、聚乙烯吡咯烷酮和牛血清白蛋白各 2%)、5 X 生理盐水-磷酸钠-EDTA(3M NaCl, 200mM Na₂PO₄ H₂O, 20mM EDTA, pH 7.0)、0.1%SDS(十二烷基磺酸钠)和 0.1 mg/ml 超声处理的鲑精 DNA。在 42℃杂交 24 小时。在 1X 标准柠檬酸盐(150 mM NaCl, 15 mM 柠檬酸钠, pH 7.0)、0.1% SDS 中 65℃洗涤杂交膜并于 Kodak XAR-5 胶片上曝光。在猴、大鼠、小鼠、狗、牛、兔、和鸡 DNA 中观察到特异性条带, 但在酵母中没有信号。曾经从鹤鹑中分离了 Flt4 cDNA。见 Eichmann 等, 基因, 174(1): 3-8(1996 年 9 月 26 日), 其 Genebank 登记号为 X83827。

实施例 9 成人组织中 Flt4 基因的表达

通过用 2 微克来自心脏、脑、胎盘、肺、肝脏、骨骼肌、肾和胰腺组织的 poly(A)⁺RNA 与 Flt4 cDNA 探针杂交, 分析了成人组织中 Flt4 mRNA 的表达(多组织 Northern 印迹, Clontech Inc)。与组成型表达基因的探针进行的对照杂交给出各泳道的平均上样量。

各种人组织的 poly(A)⁺RNA 与 Flt4 cDNA 探针的杂交显示在胎盘、肺、心和肾组织中有 5.8 和 4.5 kb 移动性 mRNA 带和 6.2 kb 弱标记条带。在肝脏和骨骼肌组织中见到模糊的 mRNA 条带, 而在胰腺和脑组织中即便有 Flt4 RNA 也极少。

实施例 10 人胚胎组织中 Flt4 的表达

为了检测人胚胎组织中 Flt4 mRNA 的表达, 将包括下列 16-19 周龄人胚胎组织的总 RNA 与 1.9 kb Flt4 cDNA 片段进行 Northern 杂交(见图 1), 并将得到的放射自显影照片用密度仪进行扫描。用从相应溴乙啶(EtBr)染色的凝胶 UV 照片中估计的 RNA 量将结果标化。下述符号代表 mRNA 水平依次递增: -, +, ++, +++。

表 1

<u>胚胎组织</u>	<u>MRNA</u>
脑	
脑脊膜	+
皮质板	++
中间带	+++

室管膜带	+
小脑	++
脉络丛	+
肝	+
胰腺	+
小肠	-
心脏	+
肺	+++
肾	++
肾上腺	++
皮肤	++
脾脏	+++
胸腺	-

人胚胎组织的分析表明除了胸腺和小肠,所有组织均有 Flt4 转录。肺和脾中表达水平最高。

实施例 11 Flt4 表达载体

通过下述步骤制备全长 Flt4 cDNA(短形式): a)利用两个 SphI 位点将 SphI 切割的 Flt4 cDNA 片段[用引物寡核苷酸 5'-ACATGCATGC CACCATGCAG CGGGGCGCCG CGCTGTGCCT GCGACTGTGG CTCTGCCTGG GACTCCTGGA-3' (SEQ ID NO.7) (正向引物)和 5'-ACATGCATGC CCCGCCGGT CATCC-3' (反向引物) (SEQ ID NO.8)从 S2.5 kb 克隆(见图 1)中扩增] 连接到已亚克隆到 pSP73 载体(Promega)的 S2.5 kb 片段的 5'末端;b)用寡核苷酸引物 5'-CGGAATTCCC CATGACCCCA AC-3' (SEQ ID NO.9) (正向)和 5'-CCATCGATGG ATCCTACCTG AAGCCGCTTT CTT-3' (SEQ ID NO.10) (反向)从 0.6 kb EcoRI 片段(图 1)中 PCR 扩增最后 138 bp 的片段, 利用 EcoRI 和 BamHI 位点将此 PCR 片段连接到构建体 a)的 3' 末端;c)在构建体 b)的 EcoRI 位点连接 1.2 kb EcoRI 片段;d)将所得全长 HindIII-BamHI 片段连接入 HindIII-BamHI 切割的 SV-poly 表达载体[Stacey 等, 核酸研究, 18: 2829 (1990)]。

实施例 12 Flt4 配体的鉴定

将 PC-3 前列腺腺癌细胞系(ATCC CRL 1435)在无胎牛血清(FBS)的 F12 培养基中培养 7 天, 将由此得到的条件培养物 $16000\times g$ 离心 20 分钟, 使其变清, 并且对其诱导 Flt4 酪氨酸磷酸化的能力进行筛选。

将重组表达 Flt4 的 NIH3T3 细胞(见实施例 13)再种植于直径为 5cm 的细胞培养皿中, 并且在含 10%胎牛血清和抗生素的 Dulbecco'改良型最低基本培养基(DMEM)中培养至融合。用磷酸缓冲液(PBS)将融合后的细胞洗涤 2 次, 并且在 DMEM/0.2%牛血清白蛋白中饥饿培养过夜。为激活细胞, 用 1ml 所述条件培养物取代饥饿培养基, 并且将所述细胞 37°C 温育 5 分钟。

用 PC-3 条件培养物刺激后, 将含有细胞的培养皿置于冰上, 用 Tris-HCl pH 7.4, 含 100 mM NaVO_4 的 150 mM NaCl 洗涤两次。除去培养皿中洗涤液, 在含抑酶肽、1mM PMSF 和 1mM NaVO_4 的 RIPA 缓冲液[10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.5%去氧胆酸钠, 0.5% Nonidet P40, 0.1% 十二烷基磺酸钠(SDS)]中裂解细胞, 将细胞裂解物超声 10 秒, 进行两次。然后将裂解物 $16000\times g$ 离心 30 分钟, 将上清转入新试管中, 用于免疫沉淀。

抗 Flt4 C-末端(见上述)的多克隆抗体被用于免疫沉淀。将细胞裂解物上清与 2-4 μl 兔多克隆抗 Flt4 抗血清在冰上保温 2 小时。加入 50%(体积/体积)的蛋白 A-Sepharose (Pharmacia)之 PBS 溶液约 30 μl , 4°C 旋转保温 45 分钟。免疫沉淀物用 RIPA 洗涤 3 次, 用 PBS 洗涤 1 次。

然后将免疫沉淀物在 7.5%的凝胶中进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 并印迹至硝酸纤维素膜上。将这些 Western 印迹与单克隆抗磷酸酪氨酸(anti-P-Tyr)抗体(1:2000 稀释的 PT-66 Sigma, 目录号 P-3300)进行温育, 随后利用化学发光检测系统(Amersham), 用过氧化物酶结合的兔抗小鼠抗体进行检测。有时, 将印迹膜在含 100 mM 2-巯基乙醇、2%SDS、62.5mM Tris-HCl pH 6.7 的溶液于 50°C 放置 30 分钟并偶而搅动, 以彻底去掉印迹膜此前所带的信号, 用抗 Flt4 抗体(1:1000 稀释)再染色, 随后用过氧化物酶结合的猪抗兔抗体(1:1000 稀释, Dako, P217)进行染色。将表达 Flt4 的 NIH3T3 细胞用 100 mM 酪氨酸磷酸酶抑制剂过钒酸钠(PerVO_4)处理 20 分钟, 然后获取该细胞的抗-Flt4 免疫沉淀物, 作为 Flt4 酪氨酸磷酸化的阳性对照。用过钒酸钠对细胞的处理通过下述方法进行, 即向细胞培养基中加入 100mM(终浓度)正钒酸钠和 2mM(终浓度)过氧化氢, 并将所述细胞在 37°C

5%CO₂ 温育 20 分钟。此步骤导致产生钒酸盐的过氧化形式(氧钒基氢过氧化物), 其在活细胞中是蛋白质酪氨酸磷酸酶的强效抑制剂。

PC-3 条件培养物刺激 120KD 多肽的酪氨酸磷酸化, 该多肽与 Flt4 的酪氨酸磷酸化、加工成熟的形式共迁移。用抗 Flt4 抗体再次染色该印迹可证实共迁移。

为了证实 120KD 多肽不是所述条件培养液的非特异性组分, 将 15ml 条件培养基通过 SDS-PAGE 分离, 印迹在硝酸纤维素膜上, 并用抗 P-Tyr 抗体将所述印迹染色。检测了几个多肽, 无一与 Flt4 共迁移, 表明所述 120KD 带的确是从激活细胞中免疫沉淀的酪氨酸磷酸化蛋白。对在室温下用肝素-Sepharose CL-6B(Pharmacia)预处理 2 小时的 PC-3 条件培养基(第 3 泳道)的刺激进行的分析表明 Flt4 配体不与肝素结合。

非条件培养基不诱导 Flt4 自我磷酸化。另外, 非转染 NIH3T3 细胞或 FGFR-4 转染的 NIH3T3 细胞用 PC-3 细胞条件培养基刺激均不表现 120KD 多肽的酪氨酸磷酸化。当将 PC-3 条件培养用 Centricon-10 浓缩器(Amicon)浓缩 4 倍时, 刺激活性显著增加。还有, 通过浓缩获得的包含分子量小于 10000(<10000)的蛋白的流出液不激活 Flt4 的磷酸化。用与 CNBr-活化的 Sepharose (1mg/ml)偶联的 Flt4 胞外结构域(Flt4EC-6xHis, 见下)50ml 按说明书预处理浓缩的 PC-3 细胞条件培养基, 可完全消除 Flt4 的酪氨酸磷酸化。用 Sepharose CL-4B 对条件培养基进行类似预处理不影响其刺激活性。

这些资料证实 PC-3 细胞产生可溶性 Flt4 配体。上述实验证实所述配体与重组 Flt4EC 结构域结合。因此, 该配体可以在亲和层析中利用重组 Flt4EC 结构域进行纯化。可以将该纯化蛋白在 SDS-PAGE 中进行电泳, 印迹到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 并且可以用本领域的标准方法测定其氨基末端序列。或者, 将所述纯化的配体消化成肽, 用于氨基末端序列测定。从纯化蛋白中获得的肽序列被用于合成编码这些序列的寡核苷酸混合物。可以将这些寡核苷酸及其互补 DNA 链进行放射性标记, 并且将其用于筛选由 PC-3 细胞制备的 cDNA 文库, 以获得编码所述配体的 cDNA, 所用的所有方法均为本领域的标准方法(Wen 等, 细胞 69: 559-572(1992))。或者, 这些寡核苷酸及其互补链作为聚合酶链式反应(PCR)的引物, 以由 PC-3 细胞 RNA 制备的 cDNA 为模板扩增编码配体的序列。这些用于 cDNA 合成和 PCR(RT-PCR)的方法为本领域中的标准方法(Innis 等, 1990, PCR 方案, Academic Press; McPherson

片段(其包括 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 86-700)用 HindIII 和 SphI (SphI 位点相应于 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 588-593, 在 Flt4 cDNA 的扩增区域内)消化。

用所得 HindIII-SphI 片段取代上面刚刚叙述的修饰型 LTR-FLT4I 载体中的 HindIII-SphI 片段(HindIII 位点位于 Flt4 插入片段与载体 pLTRpoly 部分的 5'端连接处内, SphI 位点位于 Flt4 cDNA 之内, 相应于 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 588-593)。然后将得到的 Flt4EC-6xHis 插入片段作为 BamHI 片段连接至 pVTBac 质粒的 BamHI 位点(Tessier 等, 基因 98: 177-183(1991))。用脂转染法使该构建体与杆状病毒基因组 DNA 共同转染 SF-9 细胞。产生重组病毒并将其用于感染 High-Five 细胞(Invitrogen)

Flt4-AP 融合构建体 扩增 Flt4 EC 结构域编码序列的 3'末端, 所用寡核苷酸为 5'-CTGGAGTCGACTTGGCGGACT-3' (SEQ ID NO: 15) 和 5'-CGGGATCCCTCCATGCTGCCCTTATCCT-3' (SEQ ID NO: 16), 将其作为 SalI-BamHI 片段连接至 LTR-TLF4I 载体, 取代编码跨膜结构域和胞浆结构域的序列。然后将所得插入片段作为 Hind III-BamHI 片段连接至 APtag-1 质粒的 HindIII-BglII 位点, 使其与碱性磷酸酶编码区在同一阅读框架内(Flanagan 和 Leder, 1990, 细胞 63: 185-194)。利用 DOTAP 转染试剂(Boehringer), 通过脂转染法用此 Flt4-AP 构建体和 pSV2neo 共转染 NIH3T3 细胞(Southern 和 Berg, J.Mol.Appl.Genet 1: 327-341(1982)), 在有 500 mg/ml 新霉素的条件下筛选转染细胞。产生在培养液中的重组蛋白用针对碱性磷酸酶活性的比色反应进行检测(Cheng & Flanagan, 细胞 79:157-168 (1994))。

Flt4-Ig 构建体 编码 Flt4-免疫球蛋白嵌合体的重组 DNA 按如下方法构建。通过 PCR 扩增编码 Flt4(包括编码信号序列的 Flt4 核苷酸)的 cDNA 的 5'末端, 所用引物为 5'-GGCAAGCTTGAATTCGCCACCATGCAGCGGG GCGCC-3'(SEQ ID NO: 17)和 5'-GTTGCCTGTGATGTGCACCA-3' (SEQ ID NO: 18), 将其作为 HindIII-SphI 片段连接至 LTR-FLT4I 载体。扩增 Flt4EC 编码区的 3'末端, 所用寡核苷酸为 5'-CTGGAGTCGACTTGGC GGACT-3' (SEQ ID NO: 19) 和 5'-CGCGGATCCAAGCTTACTTACCTT CCATGCTGCCCTTATCCTCG-3' (SEQ ID NO: 20), 将其作为 SalI-BamHI 片段连接至 LTR-FLT4I 载体, 取代编码跨膜结构域和胞浆结构域的序列。将此包含剪接共体位点的 Flt4EC 插入片段首先连接至 pHγCE2, 其包含编码人免疫球蛋白重链铰链区的外显子以及恒定区外显子(Karjalainen K., TIBTECH,

9: 109-113(1991))。含 Flt4-Ig 嵌合体的 EcoRI-BamHI 插入片段再用本领域的标准方法(Klenow)钝化, 并且与 pREP7 内钝化的 HindIII 位点连接。利用磷酸钙沉淀法将此构建体转染至 293-EBNA 细胞, 用所述条件培养基经蛋白 A-Sepharose 亲和层析来分离 Flt4-Ig 蛋白。

实施例 15-17 Flt4 配体的纯化及测序

用 Centriprep 过滤盒将由 PC-3 细胞在无血清培养条件下产生的细胞培养液上清浓缩 30-50 倍, 上样于固相 Flt4 胞外结构域的柱上。利用两种可选择的构建体和方法制备两种亲和基质。在第一种情况中, 将 Flt4EC-6xHis 融合蛋白与 CNBr-激活的 Sepharose 4B(Pharmacia)交联, 而在第二种情况中, 利用二甲基庚二酸酯(dimethylpimelidate)将 Flt4-Ig 融合蛋白与蛋白 A Sepharose 结合(Schneider 等, 1982, 生物化学杂志, 257: 10766-10769)。从亲和柱中洗脱的物质被进一步纯化, 所用方法有离子交换层析、反向高效层析、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。检测层析级分刺激 Flt4 的酪氨酸磷酸化的能力。对纯化的具有生物活性的配体蛋白进行显微测序, 并且根据获得的氨基酸序列制备简并的寡核苷酸, 用于分离和克隆编码配体的 cDNA; 例如, 从由 PC-3 细胞中分离的 poly(A)⁺ RNA 制备的 cDNA 文库中分离和克隆。

命名为血管内皮生长因子 C(VEGF-C)的 Flt4 配体, 以及天然人、非人类哺乳动物、和禽类的编码 VEGF-C、VEGF-C 变体和其类似物的多核苷酸序列的详细特点公开于 PCT/US98/01973, 1998 年 2 月 2 日提交(1998 年 8 月 6 日公开, 国际公开号为 WO 98/33917); Joukov 等, 生物化学杂志, 273(12): 6599-6602(1998); Joukov 等, EMBO J, 16(13): 3898-3911(1997); 和 PCT/F196/00427, 1996 年 8 月 1 日提交(国际专利公开号为 WO 97/05250), 所有均全文引入本文作为参考。如上述文献所详述, 在人的细胞中最初产生的人 VEGF-C 是 419 个氨基酸的前原-VEGF-C 多肽。人前原-VEGF-C 多肽的氨基酸序列见 SEQ ID NO: 21 所示, 并且根据 Budapest 条约的条款, 已将编码人 VEGF-C 的 cDNA 保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC), 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110-2209 (美国) (保存日期为 1995 年 7 月 24 日, ATCC 登记号为 97231)。其它物种的 VEGF-C 序列也已经被报道。例如见 Genebank 登记号 MMU73620(鼠骨骼肌)和 CCY15837(鹌鹑 *Coturnix coturnix*), 在此引入本文作为参考。

前原-VEGF-C 多肽经多步骤加工产生约 21-23KD(在还原条件下通过 SDS-PAGE 估测)的成熟且活性最强的 VEGF-C 多肽。此加工过程包括剪切信号肽(SEQ ID NO: 21, 残基 1-31); 剪切羧基末端肽(对应于大约 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 228-419, 并具有类似于 Balbiani 环 3 蛋白(BR3P)序列 [Dignam 等, 基因, 88: 133-40 (1990); Paulsson 等, 生物化学杂志, 211: 331-49 (1990)] 的间隔的半胱氨酸残基模式)以产生 29KD 的部分加工形式; (主要在细胞外)剪切氨基端肽(对应于大约 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 32-103)以产生约 21-23KD 的完全加工的成熟形式。实验证据证实 VEGF-C 的部分加工形式(例如 29KD 形式)可以与 Flt4(VEGFR-3)受体结合, 然而只有 VEGF-C 的完全加工形式与 VEGFR-2 发生高亲和性结合。这表明 VEGF-C 多肽天然地连接成非二硫键连接的二聚体。

而且, 已经证实 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 103-227 对维持 VEGF-C 的功能并非都是关键的。由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 113-213(缺少残基 103-112 和 214-227)组成的多肽仍然保留结合并激活 VEGF-C 受体的能力, 并且预计跨越约 131 位残基到约 211 位残基的多肽仍将保留 VEGF-C 的生物活性。已经表明 156 位上的半胱氨酸对于 VEGFR-2 的结合活性非常重要。然而, VEGF-C Δ C₁₅₆ 多肽(即由于缺失或替代而缺少此半胱氨酸的类似物)仍然是 VEGFR-3 的有效激活剂。SEQ ID NO: 2 的 165 位半胱氨酸对于与任何一个受体结合是必需的, 然而缺少 83 或 137 位半胱氨酸的类似物与天然 VEGF-C 竞争结合这两个受体并激活这两个受体。

人 VEGF-C 与其它物种 VEGF-C 的序列比对(应用任何通常被接受的算法进行)表明存在额外的残基, 其中引入了并没有破坏 VEGF-C 生物活性的变化(例如插入、替代和/或缺失)。在两个或更多物种的 VEGF-C 多肽的对比中存在不同氨基酸的任何位点, 尤其是具有不同化学特性的侧链的不同氨基酸的位点, 很可能是易于改变并且不伴有功能消失的位点。在 PCT/US98/01973 的图 5 中给出了人、鼠和鹌鹑 VEGF-C 的比对实例。

除上述的考虑之外, 应该理解可以对野生型 VEGF-C 序列进行无数的保守氨基酸替代, 尤其是如果此替代数目不大时, 其很可能会获得仍具有 VEGF-C 生物活性的多肽。“保守氨基酸替代”是指用具有相似化学特性之侧链的氨基酸进行的氨基酸替代。用于保守氨基酸替代的相似氨基酸包括具有酸性侧链的氨基酸(谷氨酸, 天冬氨酸); 具有碱性侧链的氨基酸(精氨酸、赖

氨酸、组氨酸); 具有极性酰胺侧链的氨基酸(谷氨酰胺、天冬酰胺); 具有疏水性脂肪族侧链的氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、甘氨酸); 或具有芳香族侧链的氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸); 具有小侧链的氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸); 或具有脂肪族羟基侧链的氨基酸(丝氨酸、苏氨酸)。还考虑了增加或去掉一个或几个内部氨基酸而不破坏 VEGF-C 生物活性。

从上述中应该理解许多 VEGF-C 多肽及其变体将与 Flt4(VEGFR-3)以高亲和力结合, 并且因此在本发明一些方面中被用作 Flt4 结合化合物, 这些本发明的方面涉及利用 Flt4 结合化合物显像或筛查组织样品。特殊的目的是包含变化的 VEGF-C 形式, 其降低或消除 VEGFR-2 结合亲和力, 而得到的多肽对 VEGFR-3 的结合特异性增加。如上所述, 这样的变化包括去除或取代基本上消除 VEGFR-3 结合亲和力的 Cys₁₅₆, 或改变破坏天然前原-VEGF-C-蛋白裂解位点的氨基酸序列(因为 VEGFR2 对完全加工型 VEGF-C 的亲和力最高)。另外, 经过修饰仍具有 Flt4 结合亲和力但不能激活 Flt4 自我磷酸化的 VEGF-C 分子在本文叙述的治疗方法中是有用的 Flt4 拮抗剂。从上述介绍中应该进一步清楚本文中所述 Flt4 配体可以用于检测, 以其作为附加的指征来证实人 Flt4 等位基因变体的同一性, 并且证实在本文中介绍的与 Flt4 序列同源的非人基因序列实际上是 Flt4 的非人类对应物。推导的前原 VEGF-C 氨基酸序列见 SEQ ID NO: 21 所示。

命名为血管内皮生长因子 D (VEGF-D)的第二个 Flt4 配体以及编码 VEGF-D、VEGF-D 变体及其类似物的人类多核苷酸序列详述于 PCT/US97/14696, 1997 年 8 月 21 日提交并于 1998 年 2 月 26 日公开为 WO 98/7832; Achen 等, 美国国家科学院院刊 95(2): 548-553(1998), 在此引入本文作为参考。如上述文献所详述, 在人的细胞中最初产生的人 VEGF-D 是 354 个氨基酸的前原-VEGF-D 多肽。前原 VEGF-D 的 cDNA 和推导的氨基酸序列见 SEQ ID NO: 22 所示。其它物种的 VEGF-D 序列也已经报道。例如见 Genebank 登记号 D89628(鼠骨骼肌); 和 AF014827(褐家鼠), 在此引入本文作为参考。

所述前原 VEGF-D 多肽具有 21 个氨基酸的假定信号肽, 似乎其蛋白裂解式加工方式类似于前原 VEGF-C 的。“重组的成熟”VEGF-D 缺乏 SEQ ID NO: 22D 1-92 残基和 202-354 残基, 它保留活化 VEGFR-2 和 VEGFR-3 受体的能力, 且很可能形成非共价连接的二聚体。VEGF-D 多肽作为本发明 Flt4

结合化合物的应用类似于 VEGF-C 的那些。同样, 预计对 VEGF-D 的类似修改(以除去 VEGF 同源性结构域中 8 个保守的半胱氨酸中的第二个 Cys₁₃₆, 或除去蛋白裂解位点)将产生如下多肽, 其 VEGFR-2 结合亲和力已降低或消除, 并因此使 Flt4 特异性增强。已经过修改而保留了 Flt4 结合亲和力但不能激活 Flt4 自我磷酸化的 VEGF-D 分子是本文所述方法的有效 Flt4 拮抗剂。

实施例 18 小鼠 Flt4 cDNA 探针的克隆

用上述覆盖胞外结构域的 S2.5 人 Flt4 受体 cDNA 片段筛选 129SV 小鼠 λ FIX[®] II 基因组文库(Stratagene)的大约 10^6 个噬菌斑。另见 Pajusola 等, 癌症研究, 52: 5738(1992)。从阳性噬菌斑中亚克隆 2.5 kb BamHI 片段并测定其两端的序列。从这个亚克隆中应用 PCR 扩增包括小鼠 Flt4 cDNA 序列之核苷酸 1745-2049 的外显子片段, 并将其克隆到 pBluescript KSII⁺/-载体(Stratagene)。见 Finnerty 等, 癌基因, 8: 2293(1993)。

用相似的方法克隆包括核苷酸 1-192 的第二个片段。

实施例 19 小鼠组织中 Flt4 mRNA 的分析

根据 Chomczynski 等, Anal Biochem 162:156(1987)的方法, 从发育中的胚胎(交配后 8-18 天和 1 日龄的小鼠)分离总 RNA。交配后 8 天的胚胎的样品还包括胎盘。

对于 RNA 酶保护分析, 利用 [³²P]-UTP 和 T7 聚合酶针对从实施例 18 获得的线性化鼠 Flt4 质粒制备反义 RNA 探针。应用 β -肌动蛋白探针, 其对应于公开的小鼠 β -肌动蛋白序列的核苷酸 1187-1279。见 Tokunaga 等, 核酸研究, 14: 1829(1986)。在 6%聚丙烯酰胺/7M 尿素凝胶上纯化之后, 将标记的转录本与 30 μ g 总 RNA 在 52 $^{\circ}$ C 杂交过夜。将未杂交的 RNA 用 RNA 酶 A(10U/ml)和 T1(1mg/ml)在 37 $^{\circ}$ C pH 7.5 条件下消化 1 小时。通过蛋白酶 K 37 $^{\circ}$ C 消化 15 分钟灭活 RNA 酶, 并且将样品在 6%聚丙烯酰胺/7M 尿素凝胶上进行分析。

在这个实验中分析的 Flt4 表达模式表明从肺、肝脏、心脏、肾脏、骨骼肌和脾脏获得的 mRNA 信号很弱, 而在睾丸和脑组织中显然无特异性信号。通过 RNA 酶保护试验对在小鼠不同发育阶段收集的一系列 RNA 进行的分析表明在从交配后 8 天到新生小鼠的整个胚胎发育期间, Flt4 mRNA 均表达, 并且信号强度无大的变化。

实施例 20 小鼠胚胎中 Flt4 的原位杂交

为了更好的确定细胞和组织中的 Flt4 转录本, 将交配后 7.5 天和 8.5 天的小鼠胚胎的切片与标记的 Flt4 RNA 进行杂交。小鼠胚胎来源于 CBA 和 NMRI 小鼠的交配。通过颈脱臼处死怀孕小鼠, 并将胚胎立即冰冻保存或通过磷酸盐缓冲液转入 4% 多聚甲醛中。将所述胚胎和分离的小鼠器官 4℃ 固定 18 小时, 脱水, 石蜡包埋并切割成 6μm 的切片。

用 [³⁵S]-UTP 从线性化的质粒中制备 192 个和 305 个核苷酸(见实施例 18) 的 RNA 探针(反义和正义)。根据下述方法进行切片原位杂交, 所述方法为 Wilkinson 等, 发育, 99: 493(1987); Wilkinson 等, 细胞, 50: 79(1987)(在此引入本文作为参考)中介绍的方法, 并进行了如下修改: 1) 在石蜡包埋前应用二甲苯而不是甲苯; 2) 将切为 6μm 的切片放置在用 2% 3-三乙氧基甲硅烷基丙胺预处理的玻片表面用二乙基焦碳酸酯处理的水层上; 3) 省略探针的碱性水解步骤; 4) 在含 30 mM DTT 和 1X SSC 的溶液中 65℃ 高严谨度洗涤 80 分钟。用 NTB-2 乳剂(Kodak)覆盖切片并在 4℃ 保存。将所述切片暴露 14 天、显影并用苏木精染色。与正义链杂交的对照和 RNA 酶 A 处理的切片中没有产生超出背景的特异性信号。

在交配后 7.5 天的小鼠胚胎中没有检测到 Flt4 mRNA 表达, 但在发育的第 8.5 天于发育的主动脉中检测到亮信号。相反, 发育中的卵黄囊为 Flt4 阴性。在胚胎外组织中, Flt4 在尿囊中显著表达, 而卵黄囊的发育中的血细胞岛为阴性。在另一方面, 脑间充质的成血管细胞为 Flt4 强阳性。在发育中的胎盘中, Flt4 信号首先见于窦状隙静脉中。在交配后 9.5 天的胎盘中, 静脉腔隙的内皮和与 Reichert's 膜部分融合的巨细胞表达 Flt4 mRNA。

因此, 虽然在最早期的内皮细胞前体, 成血管细胞中, Flt4 表达非常显著, 但其仅限于交配后 8.5 天胚胎的某些血管中。已知 Tie 受体在小鼠胚胎发育期间的所有内皮中均表达, 因此为这些细胞提供了标记物。见 Korhonen 等, 癌基因, 8: 395(1993); 和 Korhonen 等, 血液, 80: 2548-2555(1992)。值得注意的是, 与 Tie 探针相比, Flt4 探针如果与交配后 11.5 天胚胎的动脉内皮杂交, 例如与发育中的背主动脉或颈总动脉的内皮杂交, 其杂交信号很弱。相反, 在发育中的静脉中, Flt4 信号则强得多。例如, 在发育的后肾周围的静脉中可检测到 Flt4 信号, 而 Tie 探针主要识别后肾内的毛细血管。

发现 Flt4 mRNA 分布于交配后 12.5 天小鼠胚胎的几个区域, 在腋区的扩张血管中尤其突出。在颈静脉区域的中矢状切片中发现了相似的 Flt4 阳性血管结构(资料未给出)。表达 Flt4 的血管的丛样模式出现于眶周区和发育中的脊椎周围。另外在紧靠发育中的皮肤的下层, 存在 Flt4 阳性血管网。从几个部位中, 包括发育中的脑, 可获得较弱的毛细血管信号。还可以在颈部、发育中的口鼻部和发育中的舌底以及尾部中检测到 Flt4 mRNA。另外, 肝脏的 Flt4 mRNA 表达为强阳性, 其为斑点样模式。

在进一步发育期间, Flt4 mRNA 表现出更进一步限定于胚胎的某些血管中。交配后 14.5 天的胚胎很好的表现了这种限定表达的模式。在此类胚胎的中矢状切片中, 在其前面部分沿着发育中脊椎管观察到最显著的 Flt4 信号。此信号被认为来源于胸导管的内皮细胞, 在这个发育时间点上胸导管是最大的淋巴管。相反, 背主动脉和次级腔静脉为阴性。扩张的肠系膜区血管也为 Flt4 强阳性。而且, 在交配后 12.5 天的胚胎中, 眶周、下颌中沿着其解剖边界的血管网以及颈部的血管网包含 Flt4 阳性内皮。在心包间隙和整个皮下组织中出现相似的结构。值得注意的是与 Flt4 阴性血管相反, 所有的 Flt4 阳性血管在其腔隙中无血细胞。这些表达模式表明在发育的这个时间点上 Flt4 变成限定于所述淋巴管内皮细胞。我们观察到 Flt4 表达的另一位点是发育中骨髓的窦状隙。

还分析了与 Flt4 探针杂交的交配后 16.5 天胚胎之胸廓上部的横切切片。进行苏木精-伊红染色检测此区域中血管的不同类型。这些包括颈总动脉和头臂动脉、腔静脉和大小较小且缺少肌肉组织和结缔组织包绕的胸导管。在较高放大倍数下, 观察胸导管及其附近小血管的内皮细胞与 Flt4 探针的杂交。

实施例 21 培养的内皮细胞中 Flt4 mRNA 的分析

实施例 20 中所述原位杂交的结果表明 Flt4 在静脉内皮细胞中表达, 稍后在淋巴管和一些静脉内皮细胞中表达, 但是不在动脉内皮中表达。为了确定在体外此调节是否维持, 利用 Northern 印迹和杂交分析我们研究了培养的内皮细胞。

分离并培养人的主动脉、股静脉、脐静脉和包皮微血管的内皮细胞, 并且按在本领域中先前所述方法定性。见 Van Hinsberg 等, 动脉硬化, 7:

389(1987); 和 Van Hinsberg 等, Thromb. Haemostas, 57: 148(1987)。取传代 5 到 8 代后(分裂比率 1:3)的融合内皮细胞用于分离聚腺苷酸化 RNA。

内皮细胞系 EA hy926(Edgell 等, 美国国家科学院院刊, 80: 3734-3737(1983))、BCE(Folkman 等, 美国国家科学院院刊, 76: 5217-5221(1979))和 LEII(Schreiber 等, 美国国家科学院院刊, 82: 6138(1985))不表达 Flt4。然而, 培养的人微血管、静脉和脐静脉内皮细胞对 Flt4 特异的 5.8 和 4.5 kb mRNA 为阳性, 而动脉内皮细胞为阴性。相反, 另一种内皮受体酪氨酸激酶基因 Tie 则在所有研究的内皮细胞中表达为 4.4 kb mRNA。

实施例 22 成人组织中 Flt4 mRNA

实施例 20 中得到的结果表明在发育期间, Flt4 mRNA 变为在很大程度上限于淋巴管内皮。由于此发现在人体中的潜在的重要性, 我们利用人 Flt4 探针在成人组织中研究了 Flt4 表达。应用的人 Flt4 探针是包括所述 cDNA(SEQ ID NO: 1)之碱基对 1-595 的 EcoRI-SphI 片段。另见 Pajusola 等, 癌症研究, 52: 5738(1992)。所述 von Willebrand 因子探针是包括碱基对 1-2334 的 EcoRI-HindIII 片段。Bonthron 等, 核酸研究, 141: 7125(1986)。

我们应用了用于组织学诊断的常规固定材料。正常肺组织是从切除的患有表皮样肿瘤的左侧次级肺叶中取得。从患有结肠腺癌的患者取得肠系膜和肠系膜的淋巴结。因大小异常, 摘除靠近唾液腺的正常淋巴结。从两个患者得到的扁桃体和两个阑尾没有诊断学上的变化。研究了两例淋巴管瘤和三例膀胱淋巴管瘤, 结果类似。

对于用 10%福尔马林固定的作为组织学诊断常规标本的人组织, 正常的原位杂交方法仅仅给出背景, 然而用微波而不是蛋白酶 K 处理使其能够特异性杂交。见 Shi 等, 生物化学杂志, 266: 5774(1991); Catorette 等, 病理学杂志, 168: 357: (1992)。

在肠系膜、肺和阑尾中淋巴管内皮有 Flt4 信号, 而静脉、动脉和毛细血管为阴性。为了研究 Flt4 是否在 HEVs 中表达, 研究了扁桃体。在扁桃体的一些 HEVs 中的确检测到 Flt4 特异性放射自显影颗粒。

实施例 23 正常及转移性淋巴结和淋巴管瘤中 Flt4 mRNA 的分析

分析了人正常肠系膜淋巴结(见实施例 22)一个部分的 Flt4 表达。在淋巴窦和传出及传入淋巴管中观察到 Flt4 表达。在包括腺癌转移的淋巴结中可观察到相同的模式。在正常和转移性淋巴结中一些 HEVs 也均为阳性。在膀胱

淋巴管瘤中 Flt4 特异表达于淋巴管内皮,与血管中针对 von Willebrandt 因子的原位杂交信号的比较一样明显。

与这些结果相一致, Flt4 的免疫染色在皮肤淋巴管瘤病的内皮中为强阳性, 皮肤淋巴管瘤病是以推测的淋巴管内皮增生为特点的稀有疾病。见 Lymboussaki 等, 美国病理学杂志, 153(2): 395-403(1998 年 8 月), 在此全文引入本文作为参考。

另外, Flt4 免疫染色鉴定了在 Kaposi's 肉瘤皮肤结节损伤组织样品之内的纺锤细胞。见 Jussila 等, 癌症研究, 58: 1599-1604(1998 年 4 月)。考虑到 Flt4 的明显的淋巴管特异性, 可以认为这些结果与 Kaposi's 肉瘤中某些细胞是起源于淋巴内皮的建议相一致。例如见 Beckstead 等, 美国病理学杂志, 119: 294-300(1985); 和 Dictor 等, 美国病理学杂志, 130: 411-417(1988)。

实施例 24 胎儿内皮细胞中 Flt4 的定位

如实施例 2 所述, 编码短形式的 40 个羧基末端氨基酸的 Flt4 cDNA 片段, 以 657 bp EcoRI 片段被克隆入 pGEX-1 λ T 细菌表达载体(Pharmacia), 其与谷光甘肽-S-转移酶编码区在同一个阅读框架中。在大肠杆菌中制备由上述所得的 GST-Flt4 融合蛋白并通过利用谷光甘肽-Sepharose 4B 柱的亲和层析将其纯化。将纯化的蛋白冻干、溶于 PBS、与弗氏佐剂混合并将其用于免疫家兔。在第三次加强免疫之后, 取抗血清备用。

从用前列腺素诱导的合法流产中取得 17-20 周龄人胎儿组织。本研究由 Helsinki 大学中心医院伦理委员会批准。用胎儿脚长估计孕龄。将胎儿组织包埋于 Tissue-Tek(Miles)、立即冰冻并在 -70℃ 保存。

将抗 Flt4 抗血清与 GST-Sepharose 柱交叉吸收, 去除抗 GST 抗体, 然后通过 GST-Flt4 亲和层析将其纯化。用丙酮将几个 6 微米厚的冰冻组织切片固定, 并用 0.3% H₂O₂ 的甲醇液处理 30 分钟, 阻断内源性过氧化酶活性。洗涤之后, 将所述切片用 5% 正常猪血清温育。然后将切片与抗 Flt4 抗体温育并洗涤。用过氧化酶偶联的猪抗兔 IgG 检测结合的抗体, 随后以 0.2% 3,3'-二氨基联苯胺(Amersham)为底物进行过氧化酶活性染色。将所述切片在 Meyer's 苏木精中进行对比染色。

人胎儿肠系膜的抗 Flt4 免疫过氧化酶染色表明在几个脉管的内皮细胞中存在 Flt4 蛋白, 而用抗原阻断的抗 Flt4 抗体和免疫前血清进行的对照染色为阴性。为了比较, 用血管内皮细胞特异的 VIII 因子相关抗原的抗血清将切

片染色。在不含有红细胞的脉管内皮细胞上观察到 Flt4 免疫过氧化酶染色，而在血管中为阴性。无红细胞的脉管很可能是淋巴内皮，此类脉管在肠系膜中尤其常见。抗 VIII 因子相关抗原的抗体在所有脉管中均将内皮细胞染色。

实施例 25 抗 Flt4 单克隆抗体的制备

融合蛋白 I

通过在 High-Five 细胞中表达 Flt4EC-6xHis-pVTBac 质粒构建体(实施例 14)，制备重组 Flt4 胞外结构域蛋白。根据厂商(Qiagen)的说明书，通过利用 Ni-NTA 亲和层析结合并洗脱在重组 Flt4 胞外结构域的 COOH 末端中编码的 6xHis 标签，从转染的 High-Five 细胞培养基中纯化 Flt4 胞外结构域(Flt4EC)。

通过腹膜内注射经弗氏完全佐剂乳化之纯化的重组制备的 Flt4 胞外结构域(150 μ g/小鼠)，免疫四月龄的 Balb/c 雄性小鼠。间隔三到四周后注射 150 μ g 加强免疫，并且在再间隔三周之后，进行最后一次加强免疫(10 μ g 溶于 PBS 的 Flt4EC，腹膜内给药)。在最后一次加强免疫给药后 4 天，处死小鼠，并将小鼠脾淋巴细胞与 SP 2/0 浆细胞瘤的细胞以 2:1 比率进行融合。

在 96 孔培养板(NUNC)上含 20%胎牛血清和 HAT(次黄嘌呤-氨基喋呤-胸腺嘧啶核苷，GIBCO，043-01060H；稀释 50 倍)的 Ex-Cell320 培养基(SERIALAB)中培养融合细胞。在 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 条件下培养细胞。10 天后，将含 HAT 的培养基换成含 HT 的细胞培养基(GIBCO；043-01065H，稀释 50 倍)。HT 培养基与 HAT 培养基相同，但其没有氨基喋呤。

三周后，通过下面实施例 26 所述抗原特异性免疫荧光测定法(IFMA)确定特异性抗体的产生。按 Staszewski 等，耶鲁大学生物和医学杂志，57: 865-868(1984)所述方法通过有限稀释法，将主要克隆进行克隆。将阳性克隆在 24 孔组织培养板(NUNC)中扩增培养、再克隆并用相同的方法进行再检测。通过荧光激活细胞分类法(FACS)检测阳性克隆。

除了一个克隆分泌的 Ig 可能属于 IgA 类之外，稳定克隆分泌的免疫球蛋白属于 IgG₁ 类。利用抗小鼠亚类的生物素偶联的(SEROTEC)大鼠单克隆抗体，用 IFMA 法确定单克隆抗体的亚类。

利用 Balb/c 小鼠在其腹水中制备单克隆抗体。在用降植烷(2,6,10,14-四甲基十五烷 98%，ALDRICH-CHEMIC D7924 Steinheim，目录号 T2280-2)预处理动物之后，将上述的杂交瘤给小鼠腹腔注射。在注射杂交瘤细胞之前，

注射(i.v.)0.5ml 降植烷约两周。注射的细胞总量约为每只小鼠 $7.5-9 \times 10^6$ 。在注射杂交瘤 10-14 天后, 收集腹水。

融合蛋白 II

通过腹膜内注射用弗氏完全佐剂乳化的重组制备的 Flt4 胞外结构域蛋白(20 μ g/小鼠), 免疫二月龄的 Balb/c(雌性)小鼠。间隔三到四周后注射 20 μ g 加强免疫, 并且在再间隔三周之后, 进行最后一次加强免疫(10 μ g 溶于 PBS 的 Flt4, i.v.给药)。在最后一次加强免疫给药后 4 天, 处死小鼠, 并将小鼠脾淋巴细胞与 SP 2/0 浆细胞瘤以 2:1 比率进行融合。

将融合细胞培养于 96 孔培养板(FALCON)上含 20%胎牛血清和 HAT(次黄嘌呤-氨基喋呤-胸腺嘧啶核苷, GIBCO BRL, 21060-017; 稀释 50 倍)的 OptiMEM1(含 Glutamax, 1, 51985-026 GIBCO BRL)培养基中。在 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 条件下培养细胞。10 天后, 将含 HAT 的培养基换成含 HT 的细胞培养基(GIBCO BRL; 41065-012, 稀释 50 倍)。

三周后, 通过下面实施例 26 中所述抗原特异性免疫荧光测定法(IFMA)确定特异性抗体产物。按 Staszewski 等(1984)所述方法通过有限稀释法, 将主要克隆进行克隆。将阳性克隆在 24 孔组织培养板(FALCON)中扩增培养、再克隆并用相同的方法再检测。通过 FACS 法检测阳性克隆。

2E11 和 6B2 克隆分泌的免疫球蛋白属于 IgG₁ 类, 2B12 克隆产生的 Ig 属于 IgM 亚类。利用抗小鼠亚类重链的生物素偶联大鼠单克隆抗体(SEROTEC), 用 IFMA 法确定小鼠亚类 IgG₁, 并且用小鼠单克隆抗体独特型试剂盒(Dipstick Format)(19663-012, Life Technologies Inc)确定小鼠亚类 IgM。

实施例 26 抗 Flt4 单克隆抗体的特异性

将纯化的重组 Flt4 胞外结构域-6xHis 融合蛋白产物(按实施例 14 和 25 中所述方法制备)用铈标记, 使用的方法是根据 Mukkala 等, Anal.Biochem, 176(2): 319-325(1989)中所述方法, 并进行了如下修改: 将摩尔浓度过量 250 倍的异硫氰酸 DTTA-Eu(N1 螯合物, WALLAC, 芬兰)加入 Flt4 溶液(溶于 PBS, 0.5mg/ml), 并且通过加入 pH 9.8 的 0.5M 碳酸钠缓冲液将 pH 值调到 9 左右。4 $^{\circ}$ C 标记过夜。利用 PD-10(PHARMACIA, 瑞典)以 TSA(50mM Tris-HCl, pH 7.8, 含 0.15M NaCl)作为洗脱液去除未结合的标记物。

纯化之后, 向标记的 Flt4 中加入 1mg/ml 牛血清白蛋白(BSA), 4 $^{\circ}$ C 保存。掺入到每个 Flt4 分子中的铈离子平均数目为 1.9, 其是通过测量相对于已知

EuCl₃ 标准品的荧光比率而确定的(Hemmila 等, Anal Biochem, 137: 335-343(1984))。

用兔抗小鼠 Ig (Z 259, DAKOPATTS)包被的微滴定条孔(strip wells) (NUNC)经夹心免疫荧光试验筛选在实施例 25 中制备的抗体。用 DELFIA 洗涤液在 Platemash 1296-024 (WALLAC)上将预包被孔洗一次。所述 DELFIA 试验缓冲液作为稀释缓冲液,用于稀释初筛中的细胞培养上清和作为阳性对照的脾切除小鼠之血清(1:1000 到 1:100000 稀释)。

在 Plateshake 震荡器(1296-001, WALLAC)上震动 5 分钟,随后用上述洗涤溶液洗涤 4 次, 4℃孵育过夜(或在室温下温育 2 小时)。

将 1:500 稀释的所述标记 Flt4 加入到 100μl 检测缓冲液中。在 Plateshake 震荡器上震荡 5 分钟并在室温下温育 1 小时之后,按上述方法洗涤所述条孔。

加入增强溶液(DELFLA)200 微升/孔。将平板在 Plateshake 震荡器上震荡 5 分钟,用 ARCUS-1230(WALLAC)检测荧光强度 10-15 分钟(Lovgren 等,见: Collins W.P.(主编), Alternative Immunoassays, John Wiley 和 Sons Ltd (1985), 203-216 页)。DELFLA 结果表明,检测的所有单克隆抗体均结合 Flt4EC 抗原。挑选与 Flt4 反应的单克隆抗体(和产生这些抗体的杂交瘤)用于进一步筛选。

用所得单克隆抗体对表达 LTR-FLT4l 构建体的 NIH3T3 细胞和转染新霉素抗性的 NIH3T3 细胞进行双抗免疫荧光染色。细胞用 EDTA 从培养板上脱落,染色,在荧光激活细胞分类器(FACS)上进行分析。FACS 分析的结果表示为用指定单克隆抗体染色的阳性细胞的百分率(见下表 2)。

表 2			
Mab 克隆	LTR % ^{a)}	NEO % ^{b)}	DELFLA-计数
1B1	67.3	1	20625
1B1D11	75	1.2	19694
1B1F8	76.1	1.4	18580
4F6	69.9	1.2	23229
4F6B8G12	75	0.3	24374
4F6B8H11	75.9	0.3	28281
4F6B8E12	74.8	0.4	27097
4F6B8G10	75.3	0.4	26063

9D9	45.1	0.75	17316
9D9D10	71.7	2.3	18230
9D9F9	73	1.8	11904
9D9G6	74.3	2.9	16743
9D9G7	70.7	1.3	17009
10E4	24.2	1.4	39202
10E4B10E12	32.3	0.3	42490
10E4B10G10	36.5	0.3	54815
10E4B10F12	45.6	0.4	43909
10E4B10G12	45.7	0.5	35576
11G2	30.2	1.6	11304
11G2D12	74.4	1.5	14660
11G2G9	74.2	0.9	10283
11G2H7	74.4	2.1	25382

a) LTR 感染细胞的 FACS 结果

b) NEO 感染细胞的 FACS 结果

LTR-FLT4I 转染细胞的 FACS 结果表明所述抗体有效地识别 Flt4-表达细胞。这些相同抗体在新霉素磷酸转移酶转染的 NIH3T3 细胞中只给出背景染色。因此, 所述抗体特异性识别细胞表面的 Flt4 酪氨酸激酶。

发现一个命名为抗 Flt4 杂交瘤 9D9F9 的克隆稳定地分泌单克隆抗体, 通过 IFMA 确定其为 IgG₁ 类免疫球蛋白。杂交瘤 9D9F9 于 1995 年 3 月 23 日保藏于德国微生物和细胞培养物保藏中心, 人类细胞和动物细胞培养物及病毒部, Mascheroder Weg 1b, 3300 Braunschweig, 德国, 登记号为 ACC 2210。

融合蛋白 II 抗体

上述标记的 Flt4 胞外结构域蛋白还被用来筛选实施例 25 中所述融合蛋白 II 的抗体。应用兔抗小鼠 Ig(Z 259 DAKO)包被的微滴定孔(Nunc, Polysorb), 用 Flt4 特异的 IFMA 筛选所述抗体。通过应用 DELFIA 平板洗涤仪, 用洗涤溶液(Wallac)洗涤所述预包被孔一次。

用 DELFIA 检测缓冲液稀释细胞培养上清(在初步筛选中 1:2 稀释)和作为阳性对照的脾切除小鼠血清(1:1000 到 1:100000 稀释)。与标准一样, 纯化

的抗 Flt4 9D9F9(小鼠 IgG₁ 亚类)的使用浓度为 1.0ng/ml - 250ng/ml。首先在室温下将样品在 Plateshake 上震荡 5 分钟, 然后 4℃ 孵育大约 18 小时。首先将框架洗涤 4 次, 然后加入 Eu 标记的 Flt4 (1:2000, 溶于 100μl 检测缓冲液中), 最后在室温下将框架孵育 1 小时。按所述方法洗涤之后, 加入增强溶液(200μl/孔, Wallac), 并将此框架在 Plateshake 震荡器上震荡 5 分钟。用 ARCUS-1230(Wallac)测定荧光强度。挑选与 Flt4 反应的单克隆抗体, 进一步在使用 Flt4 表达型 NIH3T3 细胞的双抗体免疫荧光染色检测进行筛选, 方法按上述。

在表 3 中概括了所得抗 Flt4 的融合蛋白 II 单克隆抗体及其相应的 FACS 分析结果(用指定单克隆抗体染色为阳性的细胞的百分率表示)。

用亲和纯化的抗-Flt4 9D9F9 制备用于抗 Flt4 抗体定量的标准曲线。线性范围为 1.0ng/ml 到 250ng/ml。

将用 pLTRELT4l 构建体共转染的在表面表达全长 Flt4 的 NIH3T3 细胞裂解, 使裂解物在 6.5 % SDS-PAGE 中电泳, 然后将蛋白转到硝酸纤维素膜(0.45μm, SCHLEICHER and SCHUELL)上, 用含单克隆抗体的杂交瘤细胞培养上清(1:10, 含 4% 甲醇和 0.04% SDS 的 50 mM TRIS - 40 mM 甘氨酸缓冲液)进行免疫杂交。与 HRP 偶联型兔抗小鼠 Ig(P161, DAKO, 在含 150 mM 生理盐水和 5% 奶粉的 20 mM TRIS 缓冲液, pH 7.5 中 1:1000 稀释)和 ECL(增强的化学发光剂, AMERSHAM)温育, 检测单克隆抗体的特异性。

表 3				
Mab 克隆	LTR % ^{a)}	NEO ^{b)}	Mab 近似产量 ng/ml/10 ⁶ 细胞 ^{c)}	WB
2B12E10	39.5	6.0	440	+
2E11D11	44.6	8.8	110	+
2E11F9	49.5	4.5	100	+
2E11F12	46.0	4.1	180	+
2E11G8	41.2	7.8	160	+
6B2E12	NF	NF	1390	+
6B2F8	NF	NF	470	+
6B2G6	NF	NF	630	+
6B2H5	NF	NF	740	+

6B2H8	NF	NF	1800	+
-------	----	----	------	---

a) LTR 转染细胞的 FACS 结果

b) NEO 细胞(对照)的 FACS 结果

c)以亲和纯化的抗 FLT 9D9F9 抗体为标准, 定量 Mab 的产量

NF 在 FACS 中无功能

WB 成功的用于 Western 免疫杂交

实施例 27 应用抗 Flt4 抗体鉴定细胞裂解物中的 Flt4 和在人类组织的淋巴内皮细胞中表达的 Flt4

将由前面的实施例中所述杂交瘤 9D9 产生的单克隆抗体用于 HEL 细胞裂解物的免疫沉淀和 Western 杂交。如实施例 6 中所述, 已经在 HEL 细胞中观察到 Flt4 mRNA 表达。将大约 2×10^7 个 HEL 培养细胞在实施例 11 中叙述的 RIPA 缓冲液中裂解, 并与约 2 微克 9D9 抗体(相当于实施例 11 的多克隆抗体)免疫沉淀。使免疫沉淀物在 SDS-PAGE(6%凝胶)上电泳, 电转至硝酸纤维素膜进行 Western 分析。在免疫沉淀物的 Western 杂交分析中, 用 1 微克/ml 9D9 抗体检测到 175 KD 和 125KD 的多肽条带, 它们对应于 Flt4 多肽。

用 9D9 单克隆抗体和碱性磷酸酶 ABC-AP 试剂盒(Dako)对人皮肤组织进行免疫染色。简言之, 在室温(RT)下将成人皮肤样品的 6 μ m 切片干燥 30 分钟, 用冷丙酮固定 10 分钟, 然后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤一次, 5 分钟。然后将样品与 2%马血清在室温下孵育 30 分钟, 并用 PBS 洗涤三次, 每次 5 分钟。

为进行免疫染色, 将样品与 9D9 第一抗体室温温育 1 小时, 用 PBS 洗涤三次, 每次 5 分钟。洗涤后, 将样品与生物素化的兔抗小鼠第二抗体室温孵育 30 分钟, 再用 PBS 洗涤三次, 每次 5 分钟。

所结合的抗体如下进行检测: 在室温下与 ABC-AP 混合物温育 30 分钟, 用 PBS 洗涤三次, 与 AP 底物(Sigma Fast Red TR/Naphtol AS-MX(目录号为 F-4648))在室温下温育 15 分钟, 用水洗涤。然后用 Mayer's 苏木精对染 30 秒, 并用水清洗。应用 Aquamount 和盖玻片, 在显微镜下分析样品。在这些人类皮肤切片中的淋巴内皮细胞中观察到 9D9 抗体染色。血管内皮染色很弱或未被染色。还利用其它分析证实对淋巴管内皮的显著特异性。见 Lymboussaki 等, 美国病理学杂志, 153(2): 395-403 (1998 年 8 月); 和 Jussila 等, 癌症研究, 58: 1599-1604 (1998 年 4 月), 二者均全文引入作为参考。

这些结果进一步证实, Flt4 可作为淋巴管内皮的有效标记物使用, 抗 Flt4 抗体可用于鉴定并显示组织样品的这些细胞中所表达的 Flt4。

实施例 28 在乳腺癌血管发生中 VEGF-C/VEGFR-3 信号途径的上调

上述实施例证实 Flt4(VEGFR-3)是正常组织中有效的淋巴管内皮特异性抗原标记。下述方法还证实 VEGFR-3 是恶性乳腺癌的有效抗原标记(如用于诊断和普查)和治疗药物。与组织学上正常的乳腺组织相比, 在浸润性乳腺癌中发现 VEGFR-3 阳性脉管的数量大大增加($P<0.0001$)。

材料和方法

从 Helsinki 大学病理系的标本库中取得新鲜的冰冻乳腺组织样品。这些样品包括导管癌($n=6$)、小叶癌($n=6$)、导管内癌($n=8$)、纤维腺瘤($n=4$)和组织学上正常的乳腺组织($n=12$)。所有样品均在切除术后立即冻于液氮, 并在 -70°C 保存。

基本上按上述实施例(例如实施例 25)中的方法制备的小鼠抗人 Flt4(VEGFR-3)单克隆抗体(Mab)。通过重组杆状病毒在昆虫细胞中表达 VEGFR-3 胞外结构域(VEGFR-3EC), 并从培养基中纯化。然后用标准的方法制备小鼠抗 VEGFR-3EC 单克隆抗体, 并用蛋白 A 亲和层析从杂交瘤腹水或 Tecnomouse®培养上清中纯化免疫球蛋白级分。

将所述组织样品的 5 微米冰冻切片在空气中干燥, 并用冷丙酮固定 10 分钟。将所述切片在磷酸盐缓冲液中进行再水化, 并与 5%正常马血清在室温下温育 30 分钟。然后将所述切片与浓度为 $1.0\mu\text{g/ml}$ 的 Mab 9D9F9(实施例 26)在潮湿的空气中室温温育 2 小时。还研究了抗 VEGFR-3EC 的不同抗原决定簇的其它抗 VEGFR-3 Mab; 克隆 2E11D11(实施例 26)和 7B8F9(基本上按实施例 26 所述方法制备)的使用浓度分别为 9.5 和 $8.5\mu\text{g/ml}$ 。在生物素化的抗小鼠血清中温育 30 分钟, 随后用 Vectastain Elite 小鼠 IgG ABC 试剂盒(载体实验室, Burlingame, 美国)的试剂温育 60 分钟。用 3-氨基-9-乙基吡唑(AEC, Sigma, St. Louis, USA)使过氧化酶活性显色 10 分钟。最后, 用苏木精将切片染色 20 秒。通过省略第一抗体或应用具有相同独特型的无关第一抗体, 进行阴性对照实验。用纯化的杆状病毒免疫原阻断 9D9 抗体的结合, 以其作为另一个阴性对照。在这些实验中, 所述抗体均与摩尔过量 10 倍的 VEGFR-3EC 蛋白在 PBS 中温育过夜。 4°C , 4000 rpm 离心 4 分钟后, 小心地收集上清, 并将其作为第一抗体。选取与抗 VEGFR-3 抗体染色阳性的切

片相邻的 5 μ m 冰冻切片进行血管内皮标记物的免疫染色, 这些标记物包括 PAL-E(0.15 μ g/ml, Monosan, Uden, 荷兰)、层粘连蛋白(克隆 LAM-89 的上清的 1:4000 稀释, Sigma, St Louis, MO)、胶原 XVIII(1.9 μ g/ml)、 α -平滑肌肌动蛋白(SMA, 0.5 μ g/ml, 克隆 1A4, Sigma)、VEGFR-1(克隆 19 上清的 1:200 稀释)或 VEGFR-2(1:100 稀释)。

染色后对所有样品进行病理学检查。按照 Gasparini 和 Harris 建议的方法[Gasparini G 和 Harris A, 临床肿瘤学杂志, 13: 765-782(1995)], 从 PAL-E 染色的切片中获得血管密度。用相同的方法研究 VEGFR-3 阳性脉管的密度。首先在低倍显微镜下浏览切片, 然后通过血管密度最高的区域(血管热点区)或在 VEGFR-3 阳性脉管密度最高的区域中计数每 400x 高倍视野中染色脉管的数目, 从而估测肿瘤内血管密度。每张切片最少计数 5 个视野, 之后取最高的 3 个计数的平均值。

在两个导管内瘤中, 用双染色来区分淋巴管和血管的免疫组化染色。将丙酮固定的 5 μ m 冰冻切片与用抗-PAL-E 抗体温育 1 小时, 与生物素化的马抗小鼠抗体(Vestastain Elite 小鼠 IgG ABC 试剂盒, 载体实验室, Burlingame, 美国)温育 30 分钟, 与 ABC 过氧化酶(Vestastain, 1:100)温育 45 分钟, 用 AEC 显色 10 分钟。在第二步中, 根据先前在文献中叙述的用于 ISH 信号增强的方法[Kerstens 等, 组织化学细胞化学杂志, 43: 347-352 (1995)], 将切片与抗 VEGFR-3 抗体温育 1 小时(0.14 μ g/ml), 随后与生物素化的抗小鼠抗体温育 30 分钟(克隆上清的 1:200 稀释), 与 ABC 过氧化酶温育 30 分钟(1:100), 与含 0.01%过氧化物的生物素化酪胺溶液(1:2000)温育 5 分钟, 与 ABC 碱性磷酸酶(1:100)温育 20 分钟, 并用 Fast Blue(Sigma, St Louis, 美国)显色 20 分钟。将临近双染色切片的冰冻切片(5 μ m)仅用 VEGFR-3 抗体按上述方法进行免疫染色。

按文献[Joukov 等, EMBO J, 16: 3898-3911 (1997), 在此全文引入作为参考]所述, 在兔中制备人工合成多肽的多克隆抗体, 所述多肽相应于成熟、分泌型人血管内皮生长因子 C (VEGF-C)的 N 末端氨基酸残基 2-18 (VEGF-C 前原 VEGF-C 多肽的氨基酸残基 104-120)。使免疫原性多肽与环氧树脂激活的 Sepharose-6B 柱偶联, 抗血清用其进行亲和纯化, 并利用表达 VEGF-C 或对照 β 半乳糖苷酶的腺病毒感染的细胞检测对 VEGF-C 的特异性染色。

选择 8 个导管内肿瘤和所有用于 VEGFR-3 分析的浸润性肿瘤, 进一步分析 VEGF-C 的表达。将与 VEGFR-3 抗体染色阳性的切片临近的 5 微米冰冻切片在空气中干燥, 并用冷丙酮固定 10 分钟。将这些切片在 PBS 中再水化, 并在 5% 正常山羊血清中温育 30 分钟, 然后与在 PBS 中 1:200 稀释的兔抗人 VEGF-C 多克隆抗体, 在潮湿的空气中室温温育 2 小时。然后在生物素化的抗兔血清中温育 30 分钟, 随后用 Vestastain Elite 兔 IgG ABC 试剂盒(载体实验室, Burlingame, 美国)的试剂温育 60 分钟。按上述方法进一步处理所述切片。将所述纯化的免疫原用于阻断 VEGF-C 抗体, 以其作为阴性对照。在这些实验中, 将 VEGF-C 抗体与 10 倍摩尔过量的 VEGF-C 蛋白在 PBS 中温育过夜。4°C, 4000 rpm 离心 4 分钟后, 小心地收集上清并将其用于免疫染色。

DiaBor Ltd(Oulu, 芬兰)通过用重组多肽 QH48.18 [Saarela 等, Matrix Biology, 16: 319-28 (1998)]免疫小鼠, 制备了抗人型 XVIII 胶原的单克隆抗体, 其中所述重组多肽对应于人型 XVIII 胶原 N 末端 NC1 结构域的共同区。所得克隆用多肽 QH48.18 经 ELISA 和 Western 分析, 以及人的冰冻组织切片的免疫荧光染色进行筛选。对杂交瘤克隆的筛选获得 3 个单克隆抗体, 它们在上述三个试验(ELISA, Western, 免疫荧光染色)中均为阳性。信号最强的抗体 DB144-N2 被用于随后的实验。它的染色模式(例如, 在成人皮肤和肾脏样品中)与多克隆抗全 hu(VXIII)的模式一样。

结果

A. 组织学上正常的乳腺组织和良性纤维腺瘤中的 VEGFR-3

正常乳腺组织中 VEGFR-3 的免疫组化染色表明在导管间间质的毛细血管中染色很弱。这些血管不形成任何特殊的模式, 而是弥散分布于整个间质中。正常乳腺组织样品中 VEGFR-3 阳性血管的密度范围为 6-17/hpf, 中间值为 9(n=12)。此类脉管的大部分对血管内皮标记物 PAL-E 和基底层粘连蛋白组分, 胶原 XVIII 的染色为强阳性, 表明 VEGFR-3 在正常乳腺组织血管中表达很弱。然而, 基质中 VEGFR-3 清晰染色的一些小脉管对 PAL-E 染色为阴性, 对胶原 XVIII 染色很弱, 表明它们是淋巴管。在良性纤维腺瘤中也发现了均一的 VEGFR-3 阳性脉管, 其密度(均值为 8 个脉管/hpf, 范围为 3-19, n=4)与组织学上正常的乳腺组织的密度没有差别(均值 8 对 9, Mann-Whitney 检验 $P>0.1$)。

B. 导管内肿瘤中的 VEGFR-3 阳性脉管

在导管内肿瘤中观察强染色的 VEGFR-3 阳性脉管的不同模式。这些脉管在受侵袭的导管周围形成弓样结构(图 5A)。对临近切片的血管内皮标记物 PAL-E 的染色中,也观察到此“项链状”结构(图 5B),表明在毛细血管内皮中 VEGFR-3 表达增加。为了更进一步明确区分血管和淋巴管,并搜索脉管壁中平滑肌细胞和周细胞的存在,另用抗平滑肌 α 肌动蛋白(SMA)、基底层组分层粘连蛋白及 XVIII 型胶原的抗体进行染色。根据此染色,靠近导管内肿瘤的小脉管同时表达 VEGFR-3 和基底层蛋白,但是对 SMA 染色较弱,表明它们被所述脉管壁中的周细胞/平滑肌细胞不完全覆盖(图 5C-5F 中黑色箭头)。相反,离导管内损伤一定距离的大血管通常为 VEGFR-3 阴性,但其层粘连蛋白、胶原 XVIII 和 SMA 为阳性(红色箭头)。另外,发现了对 VEGFR-3 为阳性,而对基底层的层粘连蛋白和 XVIII 型胶原染色很弱,而且 SMA 根本未染色(绿箭头)的脉管。认为这些脉管代表淋巴管。

C. 血管和淋巴管的差异复染

选择两个导管内肿瘤进行免疫组化复染,以便更进一步明确区分血管和淋巴管[见 de Waal 等,美国病理学杂志,150: 1951-1957(1997)]。应用这种方法,VEGFR-3 阳性血管被染成兰色,而 PAL-E 阳性血管和基底层被染成褐色。两个检测的样品均显示相似的染色模式:排列于填满肿瘤的导管中的血管主要为 PAL-E 阳性(图 5G 和 5H 中箭头所指),而在导管间基质中离其一小段距离的可能的 VEGFR-3 阳性淋巴管为 PAL-E 阴性(图 5G 和图 5H 中黑色箭头)。为了排除由于可能的复染假象造成的误解,单独用抗 VEGFR-3 染色临近的 5 微米切片。此染色证实,若干 PAL-E 阳性血管对 VEGFR-3 也为阳性。

D. 导管内肿瘤细胞中的 VEGF-C、VEGFR-1 和 VEGFR-2 以及临近脉管中的它的受体

用抗人 VEGF-C 的亲合纯化的多克隆抗体对 8 例导管内肿瘤样品染色。所有检测样品包括至少一些 VEGF-C,但发现其染色强度和表达模式有明显异质性。在一些病例中,大部分肿瘤细胞对 VEGF-C 为强阳性,而在其它病例中,只有一些肿瘤细胞给出染色信号。相反,虽然在未受侵袭的正常导管内皮中有弱信号,在受侵袭导管周围的正常组织中发现几乎没有或根本没有染色。抗原阻断实验表明对 VEGF-C 的染色是特异性的。在临近导管内肿瘤

细胞的相同“项链”状脉管中, 另一 VEGF-C 受体 VEGFR-2 以及另一 VEGF 受体(VEGFR-1)均进行表达。

E. 侵袭性乳腺癌中的 VEGFR-3 阳性脉管和 VEGF-C

VEGFR-3 染色强阳性脉管还出现于所研究的所有侵袭性导管癌和小叶癌中。所述 VEGFR-3 阳性脉管不形成任何特殊的分布模式; 这些脉管的大部分还对 PAL-E 抗原具有免疫反应性。侵袭性乳腺癌中肿瘤内 VEGFR-3 阳性脉管密度(均值为 21, 范围为 9-56 脉管/hpf, n=12), 与正常乳腺组织的密度相比显著增加(均值 21 比 9; Mann-Whitney 检测 $P<0.0001$)。偶尔可以观察到肿瘤细胞侵入 VEGFR-3 阳性淋巴管。

在所研究的浸润肿瘤中, 对 VEGF-C 的免疫染色差别很大(n=12)。一些肿瘤细胞对 VEGF-C 染色为强阳性, 而其它肿瘤染色很弱, 或者在一些病例中没有发现染色。与导管内肿瘤的情况一样, 在这些切片的结缔组织中几乎没有或根本没有发现染色。

上述的资料表明在大部分成人组织中是主要的淋巴管内皮标记物的 VEGFR-3 在正常乳腺组织毛细血管内皮中表达很弱。在导管内肿瘤中, 检测到 VEGFR-3 强阳性脉管的“项链”状模式比较明显的排列于填满肿瘤的导管中。大部分的这些脉管表达血管内皮标记物 PAL-E 和基底层组分层粘连蛋白和胶原 XVIII, 但是其周细胞/平滑肌细胞数明显比离肿瘤细胞较远的血管的少, 如抗 SMA 抗体染色所示。这些特征表明所述“项链”状脉管正在经历血管发生。离受侵袭导管一段距离的第二组脉管对 VEGFR-3 为阳性, 但是对基底层组分为弱阳性, 且对 PAL-E 为阴性, 表明它们是淋巴管。这些脉管也缺乏 SMA 阳性的周细胞组分。另外在浸润性乳腺癌中, VEGFR-3 在 PAL-E 阳性血管中上调, 但所见脉管模式在肿瘤细胞周围的结缔组织基质中分布更随机。这些结果表明在与肿瘤生长相关的血管发生期间, 乳腺癌中 VEGFR-3 表达上调。在肿瘤原位中 VEGFR-3 阳性脉管数大大增加的发现, 符合以下假说, 即肿瘤细胞产生了可活化其紧邻区血管生长的因子。

因为 VEGF-C 与 VEGFR-3 和 VEGFR-2 均高亲和力结合, 并且因为导管内肿瘤和侵袭性肿瘤对 VEGF-C 染色经常为阳性, 此生长因子是肿瘤中 VEGFR-3 和 VEGFR-2 阳性脉管的候选生长因子。这些资料与另一研究相一致, 该研究在 Northern 杂交分析中发现 35 例未筛选的恶性浸润性肿瘤(包括乳腺癌、鳞状细胞癌、淋巴瘤、黑色素瘤和肉瘤)的近一半包括 VEGF-C

mRNA[见 Salven 等, 美国病理学杂志, 153(1): 103-108(1998 年 7 月), 已引入本文作参考]。总而言之, 在本文所述资料可指导用阻断 VEGF-C 所介导的 VEGFR-2 和/或 VEGFR-3 刺激作用的试剂对乳腺癌(可能还包括其它非淋巴管性肿瘤)的治疗。可选的阻断剂包括: 抗 VEGF-C 抗体; 抗 VEGFR-3 抗体; 抗 VEGFR-2 抗体; 与 VEGFR-3 和 VEGFR-2 或 VEGFR-1 结合的双特异性抗体; 与循环的 VEGF-C 结合的 VEGFR-3 可溶性胞外片段; 结合 VEGFR-3 和/或 VEGFR-2 并抑制此类受体活化的 VEGF-C 片段和类似物; 与 VEGFR-3 和/或 VEGFR-2 结合并结合适当治疗药物的 VEGF-C 多肽、片段和类似物; VEGFR-3 酪氨酸激酶抑制剂; 和结合并抑制这些受体的小分子。另外, 因为 VEGF-D 与 VEGFR-3 和 VEGFR-2 均结合, 考虑抗 VEGF-D 抗体和抑制性 VEGF-D 片段和类似物为合适的阻断药物。当选用抗体治疗人类时, 优选人或人源化抗体及其片段。另外, 本发明另一方面涉及在体内或体外利用上述任何药物评估哺乳动物组织, 例如用于诊断和普查恶性肿瘤及其传播。

可对上述任何试剂进行进一步改良, 使其适用与诊断和普查, 改良方法有: 结合可检测的标记, 其包括但不限于放射性同位素(例如 ^{14}C 、 ^{133}I 、 ^{125}I)、发色基团(例如荧光素, 藻胆蛋白; 四乙基罗丹明; 可产生荧光或发色物质以便荧光检测的酶; 可产生电子致密产物以便电子显微镜镜检的吸收光、可见色或凝集作用); 或电子致密分子如铁蛋白、过氧化酶或金颗粒等。同样, 可通过结合(如偶联)以下分子或与它们一起施用, 从而改良所述试剂使其适用于治疗, 所述分子有: 具有抗肿瘤特性的分子, 例如植物、动物、微生物或真菌来源的毒素; 放射性同位素; 药物; 酶; 和/或细胞因子和其它治疗性蛋白(见例如 Pietersz 和 McKenzie, “用于癌症治疗的抗体结合物”, 免疫学综述, 129: 57-80 (1992), 在此引入本文作为参考。)

实施例 29 抗-Flt4 抗体作为治疗药物给人施用

A. 抗 Flt4 单克隆抗体的人源化

在本文中(例如实施例 28 中)报道的 Flt4 的生物学, 表明了对阻断配体介导之 Flt4 受体信号传递的 Flt4 抑制剂(拮抗剂)的治疗应用。中和 Flt4 的抗体包括一类作为 Flt4 拮抗剂的治疗药物。下面所述是实验方案, 其用来改进在人类中作为治疗药物的抗 Flt4 单克隆抗体的应用, 其通过“人源化”所述单

克隆抗体来改进其在人体内的血清半衰期并降低其免疫原性(即用来防止人体对非人抗 Flt4 抗体的抗体应答)。

在文献中已经报道了人源化的原则,通过抗体蛋白的分子重排促进人源化。为了使结合补体的可能性最小,优选 IgG4 同种型的人源化抗体。

例如,通过制备嵌合抗体达到人源化水平,所述嵌合抗体包括目的非人抗体蛋白(例如本文中所述抗 Flt4 单克隆抗体)的可变区,和人抗体分子的恒定区[见例如 Morrison 和 Oi, 免疫学进展, 44: 65-92(1989)]。从 B 细胞杂交瘤的染色体 DNA 或从目的杂交瘤的 mRNA 制备的 cDNA 中克隆出中和抗 Flt4 抗体的 Flt4 可变区。将 V 区基因片段与编码人抗体恒定区的外显子连接,并将得到的构建体在适当的哺乳动物宿主细胞(例如骨髓瘤或 CHO 细胞)中表达。

为了获得更高的人源化水平,仅将那些编码非人单克隆抗体基因之抗原结合互补决定区(“CDR”)的可变区基因片段的部分克隆到人抗体序列中[见例如 Jones 等, 自然, 321: 522-525(1986); Riechmann 等, 自然, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen 等, 科学, 239: 1534-36 (1988); 和 Tempest 等, 生物/技术, 9: 266-71(1991)]。必要时,还可修饰围绕 CDR3 区的人抗体 β 片层框架,从而更能影映原始单克隆抗体抗原结合区的三维结构[见 Kettleborough 等, 蛋白质工程, 4: 773-783 (1991); 和 Foote 等, 分子生物学杂志, 224: 487-499 (1992)]。

在另一个方法中,通过如定点诱变改变非人抗体表面的指定残基,但保留非人抗体的所有内部残基和用于连接的残基,可使目的非人单克隆抗体的表面人源化。见 Padlan, 分子免疫学, 28(4/5): 489-98 (1991)。

可用上述方法,通过中和 Flt4 的抗-Flt4 单克隆抗体和产生它们的杂交瘤,例如抗体 9D9F9,来产生人源化 Flt4 中和抗体,其可作为药物有效治疗和缓解以 Flt4 表达为害的病情。

B. 源自噬菌体展示的人源 Flt4 中和抗体

用噬菌体展示技术(如下述)制备人源 Flt4 中和抗体: Aujanme 等, 人类抗体, 8(4): 155-168 (1997); Hoogenboom 等, TIBTECH, 15: 62-70 (1997); 和 Rader 等, Curr. Opin. Biotechnol. 8: 503-508(1997), 均引入本文作为参考。例如,将抗体可变区如 Fab 片段或相连的单链 Fv 片段与丝状噬菌体小衣壳蛋白 pIII 的氨基末端融合。融合蛋白的表达及其向成熟噬菌体衣壳中的掺入

导致产生的噬菌体颗粒在其表面出现抗体并包含编码该抗体的遗传物质。将包括这些构建体的噬菌体文库在细菌中表达,并利用标记的或固相化 Flt4 作为抗原探针,筛选所述文库的 Flt4 特异性噬菌体抗体。

C. 源自转基因小鼠的人 Flt4 中和抗体

基本如 Bruggemann 和 Nueberger, 今日免疫学, 17(8): 391-97 (1996) 和 Bruggemann 和 Taussig 等, Curr.Opin.Biotechnol, 8: 455-58 (1997)中所述在转基因小鼠中制备人 Flt4 中和抗体。利用传统的免疫方法,用 Flt4 组合物对在其种系构型中携带人 V 基因片段并在其淋巴组织中表达这些转基因的转基因小鼠进行免疫。用传统方法免疫小鼠,取其 B 细胞制备杂交瘤,通过筛选来鉴定分泌抗 Flt4 人源抗体的杂交瘤(例如,如上所述)。

D. 双特异性抗体

用文献所述的标准方法,制备、分离和检验与 Flt4 特异性结合并且相关于病理或治疗的其它抗原特异性结合的双特异性抗体。见,例如,Pluckthun 和 Pack, 免疫技术, 3: 83-105(1997); Carter 等, 血液治疗杂志, 4: 463-470 (1995); Renner 和 Pfreundschuh 等, 免疫学综述, 1995, 145 期, 179-209 页; Pfreundschuh, 美国专利号 5643759; Segal 等, 血液治疗杂志, 4: 377-382; Segal 等, 免疫生物学, 185: 390-402 (1992); 和 Bolhuis 等, 癌症免疫学. 免疫治疗, 34: 1-8(1991), 均全文引入本文作为参考。

实施例 30 用来证明抗 Flt4 的癌症治疗功效的动物模型

癌症治疗可接受的任何动物均可用于证实抗 Flt4 的癌症治疗功效。用标准的剂量-应答研究证实对乳腺癌的治疗功效的模型有: Tekmal 和 Durgam, Cancer Lett, 118(1): 21-28(1997); Moshakis 等, 英国癌症杂志, 43: 575-580(1981); 和 Williams 等, J.Nat.Cancer.Inst 66: 147-155(1981)所述。除了小鼠模型,狗和猪的模型也可考虑,因为至少某些人 Flt4 抗体(例如所述 9D9 抗体)还识别狗或猪的 Flt4。监测肿瘤大小和副作用来证实与对照相比的治疗功效。

所有文献,包括本发明所简要引用或详细叙述的专利和期刊文章,均全文引入本文作为参考。

虽然本发明用具体实施方案进行描述,但应该理解它能够进一步修改,而且本申请意图覆盖总体上符合本发明原则而对本发明进行的任何改变、应用或调整,其包括根据本发明所属领域已知或常规的实践所作的不同于本文

的改动，符合本文所述基本特征的改动，以及包含在所附权利要求书范围内的改动。

序 列 表

<110> Helsinki University Licensing Ltd., OY
Ludwig Institute For Cancer Research

<120> Flt4(VEGFR-3)作为肿瘤显像和抗肿瘤治疗的靶

<130> 28113/34891

<140>

<141>

<150> 09/169,079

<151> 1998-10-09

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 4195

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (20).. (3913)

<400> 1

```

ccacgcgcag cggccggag atg cag cgg ggc gcc gcg ctg tgc ctg cga ctg   52
                Met Gln Arg Gly Ala Ala Leu Cys Leu Arg Leu
                  1             5             10

tgg ctc tgc ctg gga ctc ctg gac ggc ctg gtg agt ggc tac tcc atg   100
Trp Leu Cys Leu Gly Leu Leu Asp Gly Leu Val Ser Gly Tyr Ser Met
          15             20             25

acc ccc ccg acc ttg aac atc acg gag gag tca cac gtc atc gac acc   148
Thr Pro Pro Thr Leu Asn Ile Thr Glu Glu Ser His Val Ile Asp Thr
          30             35             40

ggt gac agc ctg tcc atc tcc tgc agg gga cag cac ccc ctc gag tgg   196
Gly Asp Ser Leu Ser Ile Ser Cys Arg Gly Gln His Pro Leu Glu Trp
          45             50             55

gct tgg cca gga gct cag gag gcg cca gcc acc gga gac aag gac agc   244
Ala Trp Pro Gly Ala Gln Glu Ala Pro Ala Thr Gly Asp Lys Asp Ser
          60             65             70             75

gag gac acg ggg gtg gtg cga gac tgc gag ggc aca gac gcc agg ccc   292
Glu Asp Thr Gly Val Val Arg Asp Cys Glu Gly Thr Asp Ala Arg Pro
          80             85             90

tac tgc aag gtg ttg ctg ctg cac gag gta cat gcc aac gac aca ggc   340

```

Tyr Cys Lys Val Leu Leu Leu His Glu Val His Ala Asn Asp Thr Gly	
95 100 105	
agc tac gtc tgc tac tac aag tac atc aag gca cgc atc gag ggc acc	388
Ser Tyr Val Cys Tyr Tyr Lys Tyr Ile Lys Ala Arg Ile Glu Gly Thr	
110 115 120	
acg gcc gcc agc tcc tac gtg ttc gtg aga gac ttt gag cag cca ttc	436
Thr Ala Ala Ser Ser Tyr Val Phe Val Arg Asp Phe Glu Gln Pro Phe	
125 130 135	
atc aac aag cct gac acg ctc ttg gtc aac agg aag gac gcc atg tgg	484
Ile Asn Lys Pro Asp Thr Leu Leu Val Asn Arg Lys Asp Ala Met Trp	
140 145 150 155	
gtg ccc tgt ctg gtg tcc atc ccc ggc ctc aat gtc acg ctg cgc tcg	532
Val Pro Cys Leu Val Ser Ile Pro Gly Leu Asn Val Thr Leu Arg Ser	
160 165 170	
caa agc tcg gtg ctg tgg cca gac ggg cag gag gtg gtg tgg gat gac	580
Gln Ser Ser Val Leu Trp Pro Asp Gly Gln Glu Val Val Trp Asp Asp	
175 180 185	
cgg cgg ggc atg ctc gtg tcc acg cca ctg ctg cac gat gcc ctg tac	628
Arg Arg Gly Met Leu Val Ser Thr Pro Leu Leu His Asp Ala Leu Tyr	
190 195 200	
ctg cag tgc gag acc acc tgg gga gac cag gac ttc ctt tcc aac ccc	676
Leu Gln Cys Glu Thr Thr Trp Gly Asp Gln Asp Phe Leu Ser Asn Pro	
205 210 215	
ttc ctg gtg cac atc aca ggc aac gag ctc tat gac atc cag ctg ttg	724
Phe Leu Val His Ile Thr Gly Asn Glu Leu Tyr Asp Ile Gln Leu Leu	
220 225 230 235	
ccc agg aag tcg ctg gag ctg ctg gta ggg gag aag ctg gtc ctg aac	772
Pro Arg Lys Ser Leu Glu Leu Leu Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn	
240 245 250	
tgc acc gtg tgg gct gag ttt aac tca ggt gtc acc ttt gac tgg gac	820
Cys Thr Val Trp Ala Glu Phe Asn Ser Gly Val Thr Phe Asp Trp Asp	
255 260 265	
tac cca ggg aag cag gca gag cgg ggt aag tgg gtg ccc gag cga cgc	868
Tyr Pro Gly Lys Gln Ala Glu Arg Gly Lys Trp Val Pro Glu Arg Arg	
270 275 280	
tcc cag cag acc cac aca gaa ctc tcc agc atc ctg acc atc cac aac	916
Ser Gln Gln Thr His Thr Glu Leu Ser Ser Ile Leu Thr Ile His Asn	
285 290 295	
gtc agc cag cac gac ctg ggc tcg tat gtg tgc aag gcc aac aac ggc	964
Val Ser Gln His Asp Leu Gly Ser Tyr Val Cys Lys Ala Asn Asn Gly	
300 305 310 315	

atc cag cga ttt cgg gag agc acc gag gtc att gtg cat gaa aat ccc Ile Gln Arg Phe Arg Glu Ser Thr Glu Val Ile Val His Glu Asn Pro 320 325 330	1012
ttc atc agc gtc gag tgg ctc aaa gga ccc atc ctg gag gcc acg gca Phe Ile Ser Val Glu Trp Leu Lys Gly Pro Ile Leu Glu Ala Thr Ala 335 340 345	1060
gga gac gag ctg gtg aag ctg ccc gtg aag ctg gca gcg tac ccc ccg Gly Asp Glu Leu Val Lys Leu Pro Val Lys Leu Ala Ala Tyr Pro Pro 350 355 360	1108
ccc gag ttc cag tgg tac aag gat gga aag gca ctg tcc ggg cgc cac Pro Glu Phe Gln Trp Tyr Lys Asp Gly Lys Ala Leu Ser Gly Arg His 365 370 375	1156
agt cca cat gcc ctg gtg ctc aag gag gtg aca gag gcc agc aca ggc Ser Pro His Ala Leu Val Leu Lys Glu Val Thr Glu Ala Ser Thr Gly 380 385 390 395	1204
acc tac acc ctc gcc ctg tgg aac tcc gct gct ggc ctg agg cgc aac Thr Tyr Thr Leu Ala Leu Trp Asn Ser Ala Ala Gly Leu Arg Arg Asn 400 405 410	1252
atc agc ctg gag ctg gtg gtg aat gtg ccc ccc cag ata cat gag aag Ile Ser Leu Glu Leu Val Val Asn Val Pro Pro Gln Ile His Glu Lys 415 420 425	1300
gag gcc tcc tcc ccc agc atc tac tcg cgt cac agc cgc cag gcc ctc Glu Ala Ser Ser Pro Ser Ile Tyr Ser Arg His Ser Arg Gln Ala Leu 430 435 440	1348
acc tgc acg gcc tac ggg gtg ccc ctg cct ctc agc atc cag tgg cac Thr Cys Thr Ala Tyr Gly Val Pro Leu Pro Leu Ser Ile Gln Trp His 445 450 455	1396
tgg cgg ccc tgg aca ccc tgc aag atg ttt gcc cag cgt agt ctc cgg Trp Arg Pro Trp Thr Pro Cys Lys Met Phe Ala Gln Arg Ser Leu Arg 460 465 470 475	1444
cgg cgg cag cag caa gac ctc atg cca cag tgc cgt gac tgg agg gcg Arg Arg Gln Gln Gln Asp Leu Met Pro Gln Cys Arg Asp Trp Arg Ala 480 485 490	1492
gtg acc acg cag gat gcc gtg aac ccc atc gag agc ctg gac acc tgg Val Thr Thr Gln Asp Ala Val Asn Pro Ile Glu Ser Leu Asp Thr Trp 495 500 505	1540
acc gag ttt gtg gag gga aag aat aag act gtg agc aag ctg gtg atc Thr Glu Phe Val Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Lys Leu Val Ile 510 515 520	1588
cag aat gcc aac gtg tct gcc atg tac aag tgt gtg gtc tcc aac aag Gln Asn Ala Asn Val Ser Ala Met Tyr Lys Cys Val Val Ser Asn Lys 525 530 535	1636

gtg ggc cag gat gag cgg ctc atc tac ttc tat gtg acc acc atc ccc Val Gly Gln Asp Glu Arg Leu Ile Tyr Phe Tyr Val Thr Thr Ile Pro 540 545 550 555	1684
gac ggc ttc acc atc gaa tcc aag cca tcc gag gag cta cta gag ggc Asp Gly Phe Thr Ile Glu Ser Lys Pro Ser Glu Glu Leu Leu Glu Gly 560 565 570	1732
cag ccg gtg ctc ctg agc tgc caa gcc gac agc tac aag tac gag cat Gln Pro Val Leu Leu Ser Cys Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Tyr Glu His 575 580 585	1780
ctg cgc tgg tac cgc ctc aac ctg tcc acg ctg cac gat gcg cac ggg Leu Arg Trp Tyr Arg Leu Asn Leu Ser Thr Leu His Asp Ala His Gly 590 595 600	1828
aac ccg ctt ctg ctc gac tgc aag aac gtg cat ctg ttc gcc acc cct Asn Pro Leu Leu Leu Asp Cys Lys Asn Val His Leu Phe Ala Thr Pro 605 610 615	1876
ctg gcc gcc agc ctg gag gag gtg gca cct ggg gcg cgc cac gcc acg Leu Ala Ala Ser Leu Glu Glu Val Ala Pro Gly Ala Arg His Ala Thr 620 625 630 635	1924
ctc agc ctg agt atc ccc cgc gtc gcg ccc gag cac gag ggc cac tat Leu Ser Leu Ser Ile Pro Arg Val Ala Pro Glu His Glu Gly His Tyr 640 645 650	1972
gtg tgc gaa gtg caa gac cgg cgc agc cat gac aag cac tgc cac aag Val Cys Glu Val Gln Asp Arg Arg Ser His Asp Lys His Cys His Lys 655 660 665	2020
aag tac ctg tgc gtg cag gcc ctg gaa gcc cct cgg ctc acg cag aac Lys Tyr Leu Ser Val Gln Ala Leu Glu Ala Pro Arg Leu Thr Gln Asn 670 675 680	2068
ttg acc gac ctc ctg gtg aac gtg agc gac tgc ctg gag atg cag tgc Leu Thr Asp Leu Leu Val Asn Val Ser Asp Ser Leu Glu Met Gln Cys 685 690 695	2116
ttg gtg gcc gga gcg cac gcg ccc agc atc gtg tgg tac aaa gac gag Leu Val Ala Gly Ala His Ala Pro Ser Ile Val Trp Tyr Lys Asp Glu 700 705 710 715	2164
agg ctg ctg gag gaa aag tct gga gtc gac ttg gcg gac tcc aac cag Arg Leu Leu Glu Glu Lys Ser Gly Val Asp Leu Ala Asp Ser Asn Gln 720 725 730	2212
aag ctg agc atc cag cgc gtg cgc gag gag gat gcg gga cgc tat ctg Lys Leu Ser Ile Gln Arg Val Arg Glu Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu 735 740 745	2260
tgc agc gtg tgc aac gcc aag ggc tgc gtc aac tcc tcc gcc agc gtg Cys Ser Val Cys Asn Ala Lys Gly Cys Val Asn Ser Ser Ala Ser Val	2308

750	755	760	
gcc gtg gaa ggc tcc gag gat aag ggc agc atg gag atc gtg atc ctt Ala Val Glu Gly Ser Glu Asp Lys Gly Ser Met Glu Ile Val Ile Leu 765 770 775			2356
gtc ggt acc ggc gtc atc gct gtc ttc ttc tgg gtc ctc ctc ctc ctc Val Gly Thr Gly Val Ile Ala Val Phe Phe Trp Val Leu Leu Leu Leu 780 785 790 795			2404
atc ttc tgt aac atg agg agg ccg gcc cac gca gac atc aag acg ggc Ile Phe Cys Asn Met Arg Arg Pro Ala His Ala Asp Ile Lys Thr Gly 800 805 810			2452
tac ctg tcc atc atc atg gac ccc ggg gag gtg cct ctg gag gag caa Tyr Leu Ser Ile Ile Met Asp Pro Gly Glu Val Pro Leu Glu Glu Gln 815 820 825			2500
tgc gaa tac ctg tcc tac gat gcc agc cag tgg gaa ttc ccc cga gag Cys Glu Tyr Leu Ser Tyr Asp Ala Ser Gln Trp Glu Phe Pro Arg Glu 830 835 840			2548
cgg ctg cac ctg ggg aga gtg ctc ggc tac ggc gcc ttc ggg aag gtg Arg Leu His Leu Gly Arg Val Leu Gly Tyr Gly Ala Phe Gly Lys Val 845 850 855			2596
gtg gaa gcc tcc gct ttc ggc atc cac aag ggc agc agc tgt gac acc Val Glu Ala Ser Ala Phe Gly Ile His Lys Gly Ser Ser Cys Asp Thr 860 865 870 875			2644
gtg gcc gtg aaa atg ctg aaa gag ggc gcc acg gcc agc gag cac cgc Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu His Arg 880 885 890			2692
gcg ctg atg tcg gag ctc aag atc ctc att cac atc ggc aac cac ctc Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly Asn His Leu 895 900 905			2740
aac gtg gtc aac ctc ctc ggg gcg tgc acc aag ccg cag ggc ccc ctc Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gln Gly Pro Leu 910 915 920			2788
atg gtg atc gtg gag ttc tgc aag tac ggc aac ctc tcc aac ttc ctg Met Val Ile Val Glu Phe Cys Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Phe Leu 925 930 935			2836
cgc gcc aag cgg gac gcc ttc agc ccc tgc gcg gag aag tct ccc gag Arg Ala Lys Arg Asp Ala Phe Ser Pro Cys Ala Glu Lys Ser Pro Glu 940 945 950 955			2884
cag cgc gga cgc ttc cgc gcc atg gtg gag ctc gcc agg ctg gat cgg Gln Arg Gly Arg Phe Arg Ala Met Val Glu Leu Ala Arg Leu Asp Arg 960 965 970			2932
agg cgg ccg ggg agc agc gac agg gtc ctc ttc gcg cgg ttc tcg aag			2980

Arg Arg Pro Gly Ser Ser Asp Arg Val Leu Phe Ala Arg Phe Ser Lys	
975 980 985	
acc gag ggc gga gcg agg cgg gct tct cca gac caa gaa gct gag gac	3028
Thr Glu Gly Gly Ala Arg Arg Ala Ser Pro Asp Gln Glu Ala Glu Asp	
990 995 1000	
ctg tgg ctg agc ccg ctg acc atg gaa gat ctt gtc tgc tac agc ttc	3076
Leu Trp Leu Ser Pro Leu Thr Met Glu Asp Leu Val Cys Tyr Ser Phe	
1005 1010 1015	
cag gtg gcc aga ggg atg gag ttc ctg gct tcc cga aag tgc atc cac	3124
Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile His	
1020 1025 1030 1035	
aga gac ctg gct gct cgg aac att ctg ctg tcg gaa agc gac gtg gtg	3172
Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Ser Asp Val Val	
1040 1045 1050	
aag atc tgt gac ttt ggc ctt gcc cgg gac atc tac aaa gac cct gac	3220
Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro Asp	
1055 1060 1065	
tac gtc cgc aag ggc agt gcc cgg ctg ccc ctg aag tgg atg gcc cct	3268
Tyr Val Arg Lys Gly Ser Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro	
1070 1075 1080	
gaa agc atc ttc gac aag gtg tac acc acg cag agt gac gtg tgg tcc	3316
Glu Ser Ile Phe Asp Lys Val Tyr Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser	
1085 1090 1095	
ttt ggg gtg ctt ctc tgg gag atc ttc tct ctg ggg gcc tcc ccg tac	3364
Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro Tyr	
1100 1105 1110 1115	
cct ggg gtg cag atc aat gag gag ttc tgc cag cgg ctg aga gac ggc	3412
Pro Gly Val Gln Ile Asn Glu Glu Phe Cys Gln Arg Leu Arg Asp Gly	
1120 1125 1130	
aca agg atg agg gcc ccg gag ctg gcc act ccc gcc ata cgc cgc atc	3460
Thr Arg Met Arg Ala Pro Glu Leu Ala Thr Pro Ala Ile Arg Arg Ile	
1135 1140 1145	
atg ctg aac tgc tgg tcc gga gac ccc aag gcg aga cct gca ttc tcg	3508
Met Leu Asn Cys Trp Ser Gly Asp Pro Lys Ala Arg Pro Ala Phe Ser	
1150 1155 1160	
gag ctg gtg gag atc ctg ggg gac ctg ctc cag ggc agg ggc ctg caa	3556
Glu Leu Val Glu Ile Leu Gly Asp Leu Leu Gln Gly Arg Gly Leu Gln	
1165 1170 1175	
gag gaa gag gag gtc tgc atg gcc ccg cgc agc tct cag agc tca gaa	3604
Glu Glu Glu Glu Val Cys Met Ala Pro Arg Ser Ser Gln Ser Ser Glu	
1180 1185 1190 1195	

gag ggc agc ttc tcg cag gtg tcc acc atg gcc cta cac atc gcc cag 3652
 Glu Gly Ser Phe Ser Gln Val Ser Thr Met Ala Leu His Ile Ala Gln
 1200 1205 1210

 gct gac gct gag gac agc ccg cca agc ctg cag cgc cac agc ctg gcc 3700
 Ala Asp Ala Glu Asp Ser Pro Pro Ser Leu Gln Arg His Ser Leu Ala
 1215 1220 1225

 gcc agg tat tac aac tgg gtg tcc ttt ccc ggg tgc ctg gcc aga ggg 3748
 Ala Arg Tyr Tyr Asn Trp Val Ser Phe Pro Gly Cys Leu Ala Arg Gly
 1230 1235 1240

 gct gag acc cgt ggt tcc tcc agg atg aag aca ttt gag gaa ttc ccc 3796
 Ala Glu Thr Arg Gly Ser Ser Arg Met Lys Thr Phe Glu Glu Phe Pro
 1245 1250 1255

 atg acc cca acg acc tac aaa ggc tct gtg gac aac cag aca gac agt 3844
 Met Thr Pro Thr Thr Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gln Thr Asp Ser
 1260 1265 1270 1275

 ggg atg gtg ctg gcc tcg gag gag ttt gag cag ata gag agc agg cat 3892
 Gly Met Val Leu Ala Ser Glu Glu Phe Glu Gln Ile Glu Ser Arg His
 1280 1285 1290

 aga caa gaa agc ggc ttc agg tagctgaagc agagagagag aaggcagcat 3943
 Arg Gln Glu Ser Gly Phe Arg
 1295

 acgtcagcat tttcttctct gcacttataa gaaagatcaa agactttaag actttcgcta 4003

 tttcttctac tgctatctac tacaaacttc aaagaggaac caggaggaca agaggagcat 4063

 gaaagtggac aaggagtgtg accactgaag caccacaggg aaggggtag gcctccgat 4123

 gactgcgggc aggcttgat aatatccagc ctcccacaag aagctggtgg agcagagtgt 4183

 tccctgactc ct 4195

<210> 2
 <211> 1298
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2
 Met Gln Arg Gly Ala Ala Leu Cys Leu Arg Leu Trp Leu Cys Leu Gly
 1 5 10 15

 Leu Leu Asp Gly Leu Val Ser Gly Tyr Ser Met Thr Pro Pro Thr Leu
 20 25 30

 Asn Ile Thr Glu Glu Ser His Val Ile Asp Thr Gly Asp Ser Leu Ser
 35 40 45

 Ile Ser Cys Arg Gly Gln His Pro Leu Glu Trp Ala Trp Pro Gly Ala

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

Lys Leu Pro Val Lys Leu Ala Ala Tyr Pro Pro Pro Glu Phe Gln Trp
 355 360 365

Tyr Lys Asp Gly Lys Ala Leu Ser Gly Arg His Ser Pro His Ala Leu
 370 375 380

Val Leu Lys Glu Val Thr Glu Ala Ser Thr Gly Thr Tyr Thr Leu Ala
 385 390 395 400

Leu Trp Asn Ser Ala Ala Gly Leu Arg Arg Asn Ile Ser Leu Glu Leu
 405 410 415

Val Val Asn Val Pro Pro Gln Ile His Glu Lys Glu Ala Ser Ser Pro
 420 425 430

Ser Ile Tyr Ser Arg His Ser Arg Gln Ala Leu Thr Cys Thr Ala Tyr
 435 440 445

Gly Val Pro Leu Pro Leu Ser Ile Gln Trp His Trp Arg Pro Trp Thr
 450 455 460

Pro Cys Lys Met Phe Ala Gln Arg Ser Leu Arg Arg Arg Gln Gln Gln
 465 470 475 480

Asp Leu Met Pro Gln Cys Arg Asp Trp Arg Ala Val Thr Thr Gln Asp
 485 490 495

Ala Val Asn Pro Ile Glu Ser Leu Asp Thr Trp Thr Glu Phe Val Glu
 500 505 510

Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Lys Leu Val Ile Gln Asn Ala Asn Val
 515 520 525

Ser Ala Met Tyr Lys Cys Val Val Ser Asn Lys Val Gly Gln Asp Glu
 530 535 540

Arg Leu Ile Tyr Phe Tyr Val Thr Thr Ile Pro Asp Gly Phe Thr Ile
 545 550 555 560

Glu Ser Lys Pro Ser Glu Glu Leu Leu Glu Gly Gln Pro Val Leu Leu
 565 570 575

Ser Cys Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Tyr Glu His Leu Arg Trp Tyr Arg
 580 585 590

Leu Asn Leu Ser Thr Leu His Asp Ala His Gly Asn Pro Leu Leu Leu
 595 600 605

Asp Cys Lys Asn Val His Leu Phe Ala Thr Pro Leu Ala Ala Ser Leu
 610 615 620

Glu Glu Val Ala Pro Gly Ala Arg His Ala Thr Leu Ser Leu Ser Ile
 625 630 635 640

Pro Arg Val Ala Pro Glu His Glu Gly His Tyr Val Cys Glu Val Gln
 645 650 655

Asp Arg Arg Ser His Asp Lys His Cys His Lys Lys Tyr Leu Ser Val
 660 665 670

Gln Ala Leu Glu Ala Pro Arg Leu Thr Gln Asn Leu Thr Asp Leu Leu
 675 680 685

Val Asn Val Ser Asp Ser Leu Glu Met Gln Cys Leu Val Ala Gly Ala
 690 695 700

His Ala Pro Ser Ile Val Trp Tyr Lys Asp Glu Arg Leu Leu Glu Glu
 705 710 715 720

Lys Ser Gly Val Asp Leu Ala Asp Ser Asn Gln Lys Leu Ser Ile Gln
 725 730 735

Arg Val Arg Glu Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys Ser Val Cys Asn
 740 745 750

Ala Lys Gly Cys Val Asn Ser Ser Ala Ser Val Ala Val Glu Gly Ser
 755 760 765

Glu Asp Lys Gly Ser Met Glu Ile Val Ile Leu Val Gly Thr Gly Val
 770 775 780

Ile Ala Val Phe Phe Trp Val Leu Leu Leu Leu Ile Phe Cys Asn Met
 785 790 795 800

Arg Arg Pro Ala His Ala Asp Ile Lys Thr Gly Tyr Leu Ser Ile Ile
 805 810 815

Met Asp Pro Gly Glu Val Pro Leu Glu Glu Gln Cys Glu Tyr Leu Ser
 820 825 830

Tyr Asp Ala Ser Gln Trp Glu Phe Pro Arg Glu Arg Leu His Leu Gly
 835 840 845

Arg Val Leu Gly Tyr Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Ser Ala
 850 855 860

Phe Gly Ile His Lys Gly Ser Ser Cys Asp Thr Val Ala Val Lys Met
 865 870 875 880

Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu His Arg Ala Leu Met Ser Glu
 885 890 895

Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly Asn His Leu Asn Val Val Asn Leu
 900 905 910

Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gln Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu
 915 920 925

Phe Cys Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Phe Leu Arg Ala Lys Arg Asp
 930 935 940

Ala Phe Ser Pro Cys Ala Glu Lys Ser Pro Glu Gln Arg Gly Arg Phe
 945 950 955 960

Arg Ala Met Val Glu Leu Ala Arg Leu Asp Arg Arg Arg Pro Gly Ser
 965 970 975

Ser Asp Arg Val Leu Phe Ala Arg Phe Ser Lys Thr Glu Gly Gly Ala
 980 985 990

Arg Arg Ala Ser Pro Asp Gln Glu Ala Glu Asp Leu Trp Leu Ser Pro
 995 1000 1005

Leu Thr Met Glu Asp Leu Val Cys Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg Gly
 1010 1015 1020

Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala
 1025 1030 1035 1040

Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Ser Asp Val Val Lys Ile Cys Asp Phe
 1045 1050 1055

Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly
 1060 1065 1070

Ser Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp
 1075 1080 1085

Lys Val Tyr Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu
 1090 1095 1100

Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro Tyr Pro Gly Val Gln Ile
 1105 1110 1115 1120

Asn Glu Glu Phe Cys Gln Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Met Arg Ala
 1125 1130 1135

Pro Glu Leu Ala Thr Pro Ala Ile Arg Arg Ile Met Leu Asn Cys Trp
 1140 1145 1150

Ser Gly Asp Pro Lys Ala Arg Pro Ala Phe Ser Glu Leu Val Glu Ile
 1155 1160 1165

Leu Gly Asp Leu Leu Gln Gly Arg Gly Leu Gln Glu Glu Glu Val
 1170 1175 1180

Cys Met Ala Pro Arg Ser Ser Gln Ser Ser Glu Glu Gly Ser Phe Ser
 1185 1190 1195 1200

Gln Val Ser Thr Met Ala Leu His Ile Ala Gln Ala Asp Ala Glu Asp
 1205 1210 1215

Ser Pro Pro Ser Leu Gln Arg His Ser Leu Ala Ala Arg Tyr Tyr Asn
 1220 1225 1230

Trp Val Ser Phe Pro Gly Cys Leu Ala Arg Gly Ala Glu Thr Arg Gly
 1235 1240 1245

Ser Ser Arg Met Lys Thr Phe Glu Glu Phe Pro Met Thr Pro Thr Thr
 1250 1255 1260

Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val Leu Ala
 1265 1270 1275 1280

Ser Glu Glu Phe Glu Gln Ile Glu Ser Arg His Arg Gln Glu Ser Gly
 1285 1290 1295

Phe Arg

<210> 3
 <211> 4795
 <212> DNA
 <213> 人

<220>
 <221> CDS
 <222> (20).. (4108)

<400> 3
 ccacgcgcag cggccggag atg cag cgg ggc gcc gcg ctg tgc ctg cga ctg 52
 Met Gln Arg Gly Ala Ala Leu Cys Leu Arg Leu
 1 5 10
 tgg ctc tgc ctg gga ctc ctg gac ggc ctg gtg agt ggc tac tcc atg 100
 Trp Leu Cys Leu Gly Leu Leu Asp Gly Leu Val Ser Gly Tyr Ser Met
 15 20 25
 acc ccc ccg acc ttg aac atc acg gag gag tca cac gtc atc gac acc 148
 Thr Pro Pro Thr Leu Asn Ile Thr Glu Glu Ser His Val Ile Asp Thr
 30 35 40
 ggt gac agc ctg tcc atc tcc tgc agg gga cag cac ccc ctc gag tgg 196
 Gly Asp Ser Leu Ser Ile Ser Cys Arg Gly Gln His Pro Leu Glu Trp
 45 50 55
 gct tgg cca gga gct cag gag gcg cca gcc acc gga gac aag gac agc 244
 Ala Trp Pro Gly Ala Gln Glu Ala Pro Ala Thr Gly Asp Lys Asp Ser
 60 65 70 75
 gag gac acg ggg gtg gtg cga gac tgc gag ggc aca gac gcc agg ccc 292
 Glu Asp Thr Gly Val Val Arg Asp Cys Glu Gly Thr Asp Ala Arg Pro
 80 85 90

tac tgc aag gtg ttg ctg ctg cac gag gta cat gcc aac gac aca ggc	340
Tyr Cys Lys Val Leu Leu Leu His Glu Val His Ala Asn Asp Thr Gly	
95 100 105	
agc tac gtc tgc tac tac aag tac atc aag gca cgc atc gag ggc acc	388
Ser Tyr Val Cys Tyr Tyr Lys Tyr Ile Lys Ala Arg Ile Glu Gly Thr	
110 115 120	
acg gcc gcc agc tcc tac gtg ttc gtg aga gac ttt gag cag cca ttc	436
Thr Ala Ala Ser Ser Tyr Val Phe Val Arg Asp Phe Glu Gln Pro Phe	
125 130 135	
atc aac aag cct gac acg ctc ttg gtc aac agg aag gac gcc atg tgg	484
Ile Asn Lys Pro Asp Thr Leu Leu Val Asn Arg Lys Asp Ala Met Trp	
140 145 150 155	
gtg ccc tgt ctg gtg tcc atc ccc ggc ctc aat gtc acg ctg cgc tcg	532
Val Pro Cys Leu Val Ser Ile Pro Gly Leu Asn Val Thr Leu Arg Ser	
160 165 170	
caa agc tcg gtg ctg tgg cca gac ggg cag gag gtg gtg tgg gat gac	580
Gln Ser Ser Val Leu Trp Pro Asp Gly Gln Glu Val Val Trp Asp Asp	
175 180 185	
cgg cgg ggc atg ctc gtg tcc acg cca ctg ctg cac gat gcc ctg tac	628
Arg Arg Gly Met Leu Val Ser Thr Pro Leu Leu His Asp Ala Leu Tyr	
190 195 200	
ctg cag tgc gag acc acc tgg gga gac cag gac ttc ctt tcc aac ccc	676
Leu Gln Cys Glu Thr Thr Trp Gly Asp Gln Asp Phe Leu Ser Asn Pro	
205 210 215	
ttc ctg gtg cac atc aca ggc aac gag ctc tat gac atc cag ctg ttg	724
Phe Leu Val His Ile Thr Gly Asn Glu Leu Tyr Asp Ile Gln Leu Leu	
220 225 230 235	
ccc agg aag tcg ctg gag ctg ctg gta ggg gag aag ctg gtc ctg aac	772
Pro Arg Lys Ser Leu Glu Leu Leu Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn	
240 245 250	
tgc acc gtg tgg gct gag ttt aac tca ggt gtc acc ttt gac tgg gac	820
Cys Thr Val Trp Ala Glu Phe Asn Ser Gly Val Thr Phe Asp Trp Asp	
255 260 265	
tac cca ggg aag cag gca gag cgg ggt aag tgg gtg ccc gag cga cgc	868
Tyr Pro Gly Lys Gln Ala Glu Arg Gly Lys Trp Val Pro Glu Arg Arg	
270 275 280	
tcc cag cag acc cac aca gaa ctc tcc agc atc ctg acc atc cac aac	916
Ser Gln Gln Thr His Thr Glu Leu Ser Ser Ile Leu Thr Ile His Asn	
285 290 295	
gtc agc cag cac gac ctg ggc tcg tat gtg tgc aag gcc aac aac ggc	964
Val Ser Gln His Asp Leu Gly Ser Tyr Val Cys Lys Ala Asn Asn Gly	

300	305	310	315	
atc cag cga ttt cgg gag agc acc gag gtc att gtg cat gaa aat ccc				1012
Ile Gln Arg Phe Arg Glu Ser Thr Glu Val Ile Val His Glu Asn Pro				
320	325	330		
ttc atc agc gtc gag tgg ctc aaa gga ccc atc ctg gag gcc acg gca				1060
Phe Ile Ser Val Glu Trp Leu Lys Gly Pro Ile Leu Glu Ala Thr Ala				
335	340	345		
gga gac gag ctg gtg aag ctg ccc gtg aag ctg gca gcg tac ccc ccg				1108
Gly Asp Glu Leu Val Lys Leu Pro Val Lys Leu Ala Ala Tyr Pro Pro				
350	355	360		
ccc gag ttc cag tgg tac aag gat gga aag gca ctg tcc ggg cgc cac				1156
Pro Glu Phe Gln Trp Tyr Lys Asp Gly Lys Ala Leu Ser Gly Arg His				
365	370	375		
agt cca cat gcc ctg gtg ctc aag gag gtg aca gag gcc agc aca ggc				1204
Ser Pro His Ala Leu Val Leu Lys Glu Val Thr Glu Ala Ser Thr Gly				
380	385	390	395	
acc tac acc ctc gcc ctg tgg aac tcc gct gct ggc ctg agg cgc aac				1252
Thr Tyr Thr Leu Ala Leu Trp Asn Ser Ala Ala Gly Leu Arg Arg Asn				
400	405	410		
atc agc ctg gag ctg gtg gtg aat gtg ccc ccc cag ata cat gag aag				1300
Ile Ser Leu Glu Leu Val Val Asn Val Pro Pro Gln Ile His Glu Lys				
415	420	425		
gag gcc tcc tcc ccc agc atc tac tcg cgt cac agc cgc cag gcc ctc				1348
Glu Ala Ser Ser Pro Ser Ile Tyr Ser Arg His Ser Arg Gln Ala Leu				
430	435	440		
acc tgc acg gcc tac ggg gtg ccc ctg cct ctc agc atc cag tgg cac				1396
Thr Cys Thr Ala Tyr Gly Val Pro Leu Pro Leu Ser Ile Gln Trp His				
445	450	455		
tgg cgg ccc tgg aca ccc tgc aag atg ttt gcc cag cgt agt ctc cgg				1444
Trp Arg Pro Trp Thr Pro Cys Lys Met Phe Ala Gln Arg Ser Leu Arg				
460	465	470	475	
cgg cgg cag cag caa gac ctc atg cca cag tgc cgt gac tgg agg gcg				1492
Arg Arg Gln Gln Gln Asp Leu Met Pro Gln Cys Arg Asp Trp Arg Ala				
480	485	490		
gtg acc acg cag gat gcc gtg aac ccc atc gag agc ctg gac acc tgg				1540
Val Thr Thr Gln Asp Ala Val Asn Pro Ile Glu Ser Leu Asp Thr Trp				
495	500	505		
acc gag ttt gtg gag gga aag aat aag act gtg agc aag ctg gtg atc				1588
Thr Glu Phe Val Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Lys Leu Val Ile				
510	515	520		
cag aat gcc aac gtg tct gcc atg tac aag tgt gtg gtc tcc aac aag				1636

Gln	Asn	Ala	Asn	Val	Ser	Ala	Met	Tyr	Lys	Cys	Val	Val	Ser	Asn	Lys	
525						530					535					
gtg	ggc	cag	gat	gag	cgg	ctc	atc	tac	ttc	tat	gtg	acc	acc	atc	ccc	1684
Val	Gly	Gln	Asp	Glu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Phe	Tyr	Val	Thr	Thr	Ile	Pro	
540					545					550				555		
gac	ggc	ttc	acc	atc	gaa	tcc	aag	cca	tcc	gag	gag	cta	cta	gag	ggc	1732
Asp	Gly	Phe	Thr	Ile	Glu	Ser	Lys	Pro	Ser	Glu	Glu	Leu	Leu	Glu	Gly	
				560						565				570		
cag	ccg	gtg	ctc	ctg	agc	tgc	caa	gcc	gac	agc	tac	aag	tac	gag	cat	1780
Gln	Pro	Val	Leu	Leu	Ser	Cys	Gln	Ala	Asp	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Glu	His	
			575					580						585		
ctg	cgc	tgg	tac	cgc	ctc	aac	ctg	tcc	acg	ctg	cac	gat	gcg	cac	ggg	1828
Leu	Arg	Trp	Tyr	Arg	Leu	Asn	Leu	Ser	Thr	Leu	His	Asp	Ala	His	Gly	
		590					595					600				
aac	ccg	ctt	ctg	ctc	gac	tgc	aag	aac	gtg	cat	ctg	ttc	gcc	acc	cct	1876
Asn	Pro	Leu	Leu	Leu	Asp	Cys	Lys	Asn	Val	His	Leu	Phe	Ala	Thr	Pro	
605						610					615					
ctg	gcc	gcc	agc	ctg	gag	gag	gtg	gca	cct	ggg	gcg	cgc	cac	gcc	acg	1924
Leu	Ala	Ala	Ser	Leu	Glu	Glu	Val	Ala	Pro	Gly	Ala	Arg	His	Ala	Thr	
620					625					630				635		
ctc	agc	ctg	agt	atc	ccc	cgc	gtc	gcg	ccc	gag	cac	gag	ggc	cac	tat	1972
Leu	Ser	Leu	Ser	Ile	Pro	Arg	Val	Ala	Pro	Glu	His	Glu	Gly	His	Tyr	
				640					645					650		
gtg	tgc	gaa	gtg	caa	gac	cgg	cgc	agc	cat	gac	aag	cac	tgc	cac	aag	2020
Val	Cys	Glu	Val	Gln	Asp	Arg	Arg	Ser	His	Asp	Lys	His	Cys	His	Lys	
			655					660					665			
aag	tac	ctg	tcg	gtg	cag	gcc	ctg	gaa	gcc	cct	cgg	ctc	acg	cag	aac	2068
Lys	Tyr	Leu	Ser	Val	Gln	Ala	Leu	Glu	Ala	Pro	Arg	Leu	Thr	Gln	Asn	
		670					675					680				
ttg	acc	gac	ctc	ctg	gtg	aac	gtg	agc	gac	tcg	ctg	gag	atg	cag	tgc	2116
Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Val	Asn	Val	Ser	Asp	Ser	Leu	Glu	Met	Gln	Cys	
685						690					695					
ttg	gtg	gcc	gga	gcg	cac	gcg	ccc	agc	atc	gtg	tgg	tac	aaa	gac	gag	2164
Leu	Val	Ala	Gly	Ala	His	Ala	Pro	Ser	Ile	Val	Trp	Tyr	Lys	Asp	Glu	
700					705					710				715		
agg	ctg	ctg	gag	gaa	aag	tct	gga	gtc	gac	ttg	gcg	gac	tcc	aac	cag	2212
Arg	Leu	Leu	Glu	Glu	Lys	Ser	Gly	Val	Asp	Leu	Ala	Asp	Ser	Asn	Gln	
			720					725						730		
aag	ctg	agc	atc	cag	cgc	gtg	cgc	gag	gag	gat	gcg	gga	cgc	tat	ctg	2260
Lys	Leu	Ser	Ile	Gln	Arg	Val	Arg	Glu	Glu	Asp	Ala	Gly	Arg	Tyr	Leu	
			735					740						745		

tgc agc gtg tgc aac gcc aag ggc tgc gtc aac tcc tcc gcc agc gtg Cys Ser Val Cys Asn Ala Lys Gly Cys Val Asn Ser Ser Ala Ser Val 750 755 760	2308
gcc gtg gaa ggc tcc gag gat aag ggc agc atg gag atc gtg atc ctt Ala Val Glu Gly Ser Glu Asp Lys Gly Ser Met Glu Ile Val Ile Leu 765 770 775	2356
gtc ggt acc ggc gtc atc gct gtc ttc ttc tgg gtc ctc ctc ctc ctc Val Gly Thr Gly Val Ile Ala Val Phe Phe Trp Val Leu Leu Leu Leu 780 785 790 795	2404
atc ttc tgt aac atg agg agg ccg gcc cac gca gac atc aag acg ggc Ile Phe Cys Asn Met Arg Arg Pro Ala His Ala Asp Ile Lys Thr Gly 800 805 810	2452
tac ctg tcc atc atc atg gac ccc ggg gag gtg cct ctg gag gag caa Tyr Leu Ser Ile Ile Met Asp Pro Gly Glu Val Pro Leu Glu Glu Gln 815 820 825	2500
tgc gaa tac ctg tcc tac gat gcc agc cag tgg gaa ttc ccc cga gag Cys Glu Tyr Leu Ser Tyr Asp Ala Ser Gln Trp Glu Phe Pro Arg Glu 830 835 840	2548
cgg ctg cac ctg ggg aga gtg ctc ggc tac ggc gcc ttc ggg aag gtg Arg Leu His Leu Gly Arg Val Leu Gly Tyr Gly Ala Phe Gly Lys Val 845 850 855	2596
gtg gaa gcc tcc gct ttc ggc atc cac aag ggc agc agc tgt gac acc Val Glu Ala Ser Ala Phe Gly Ile His Lys Gly Ser Ser Cys Asp Thr 860 865 870 875	2644
gtg gcc gtg aaa atg ctg aaa gag ggc gcc acg gcc agc gag cac cgc Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu His Arg 880 885 890	2692
gcg ctg atg tcg gag ctc aag atc ctc att cac atc ggc aac cac ctc Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly Asn His Leu 895 900 905	2740
aac gtg gtc aac ctc ctc ggg gcg tgc acc aag ccg cag ggc ccc ctc Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gln Gly Pro Leu 910 915 920	2788
atg gtg atc gtg gag ttc tgc aag tac ggc aac ctc tcc aac ttc ctg Met Val Ile Val Glu Phe Cys Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Phe Leu 925 930 935	2836
cgc gcc aag cgg gac gcc ttc agc ccc tgc gcg gag aag tct ccc gag Arg Ala Lys Arg Asp Ala Phe Ser Pro Cys Ala Glu Lys Ser Pro Glu 940 945 950 955	2884
cag cgc gga cgc ttc cgc gcc atg gtg gag ctc gcc agg ctg gat cgg Gln Arg Gly Arg Phe Arg Ala Met Val Glu Leu Ala Arg Leu Asp Arg 960 965 970	2932

agg cgg ccg ggg agc agc gac agg gtc ctc ttc gcg cgg ttc tcg aag	2980
Arg Arg Pro Gly Ser Ser Asp Arg Val Leu Phe Ala Arg Phe Ser Lys	
975 980 985	
acc gag ggc gga gcg agg cgg gct tct cca gac caa gaa gct gag gac	3028
Thr Glu Gly Gly Ala Arg Arg Ala Ser Pro Asp Gln Glu Ala Glu Asp	
990 995 1000	
ctg tgg ctg agc ccg ctg acc atg gaa gat ctt gtc tgc tac agc ttc	3076
Leu Trp Leu Ser Pro Leu Thr Met Glu Asp Leu Val Cys Tyr Ser Phe	
1005 1010 1015	
cag gtg gcc aga ggg atg gag ttc ctg gct tcc cga aag tgc atc cac	3124
Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile His	
1020 1025 1030 1035	
aga gac ctg gct gct cgg aac att ctg ctg tcg gaa agc gac gtg gtg	3172
Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Ser Asp Val Val	
1040 1045 1050	
aag atc tgt gac ttt ggc ctt gcc cgg gac atc tac aaa gac cct gac	3220
Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro Asp	
1055 1060 1065	
tac gtc cgc aag ggc agt gcc cgg ctg ccc ctg aag tgg atg gcc cct	3268
Tyr Val Arg Lys Gly Ser Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro	
1070 1075 1080	
gaa agc atc ttc gac aag gtg tac acc acg cag agt gac gtg tgg tcc	3316
Glu Ser Ile Phe Asp Lys Val Tyr Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser	
1085 1090 1095	
ttt ggg gtg ctt ctc tgg gag atc ttc tct ctg ggg gcc tcc ccg tac	3364
Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro Tyr	
1100 1105 1110 1115	
cct ggg gtg cag atc aat gag gag ttc tgc cag cgg ctg aga gac ggc	3412
Pro Gly Val Gln Ile Asn Glu Glu Phe Cys Gln Arg Leu Arg Asp Gly	
1120 1125 1130	
aca agg atg agg gcc ccg gag ctg gcc act ccc gcc ata cgc cgc atc	3460
Thr Arg Met Arg Ala Pro Glu Leu Ala Thr Pro Ala Ile Arg Arg Ile	
1135 1140 1145	
atg ctg aac tgc tgg tcc gga gac ccc aag gcg aga cct gca ttc tcg	3508
Met Leu Asn Cys Trp Ser Gly Asp Pro Lys Ala Arg Pro Ala Phe Ser	
1150 1155 1160	
gag ctg gtg gag atc ctg ggg gac ctg ctc cag ggc agg ggc ctg caa	3556
Glu Leu Val Glu Ile Leu Gly Asp Leu Leu Gln Gly Arg Gly Leu Gln	
1165 1170 1175	
gag gaa gag gag gtc tgc atg gcc ccg cgc agc tct cag agc tca gaa	3604
Glu Glu Glu Glu Val Cys Met Ala Pro Arg Ser Ser Gln Ser Ser Glu	

1180	1185	1190	1195	
gag ggc agc ttc tgc cag gtg tcc acc atg gcc cta cac atc gcc cag				3652
Glu Gly Ser Phe Ser Gln Val Ser Thr Met Ala Leu His Ile Ala Gln				
1200		1205	1210	
gct gac gct gag gac agc ccg cca agc ctg cag cgc cac agc ctg gcc				3700
Ala Asp Ala Glu Asp Ser Pro Pro Ser Leu Gln Arg His Ser Leu Ala				
1215		1220	1225	
gcc agg tat tac aac tgg gtg tcc ttt ccc ggg tgc ctg gcc aga ggg				3748
Ala Arg Tyr Tyr Asn Trp Val Ser Phe Pro Gly Cys Leu Ala Arg Gly				
1230		1235	1240	
gct gag acc cgt ggt tcc tcc agg atg aag aca ttt gag gaa ttc ccc				3796
Ala Glu Thr Arg Gly Ser Ser Arg Met Lys Thr Phe Glu Glu Phe Pro				
1245		1250	1255	
atg acc cca acg acc tac aaa ggc tct gtg gac aac cag aca gac agt				3844
Met Thr Pro Thr Thr Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gln Thr Asp Ser				
1260		1265	1270	1275
ggg atg gtg ctg gcc tgc gag gag ttt gag cag ata gag agc agg cat				3892
Gly Met Val Leu Ala Ser Glu Glu Phe Glu Gln Ile Glu Ser Arg His				
1280		1285	1290	
aga caa gaa agc ggc ttc agc tgt aaa gga cct ggc cag aat gtg gct				3940
Arg Gln Glu Ser Gly Phe Ser Cys Lys Gly Pro Gly Gln Asn Val Ala				
1295		1300	1305	
gtg acc agg gca cac cct gac tcc caa ggg agg cgg cgg cgg cct gag				3988
Val Thr Arg Ala His Pro Asp Ser Gln Gly Arg Arg Arg Arg Pro Glu				
1310		1315	1320	
cgg ggg gcc cga gga ggc cag gtg ttt tac aac agc gag tat ggg gag				4036
Arg Gly Ala Arg Gly Gly Gln Val Phe Tyr Asn Ser Glu Tyr Gly Glu				
1325		1330	1335	
ctg tgc gag cca agc gag gag gac cac tgc tcc ccg tct gcc cgc gtg				4084
Leu Ser Glu Pro Ser Glu Glu Asp His Cys Ser Pro Ser Ala Arg Val				
1340		1345	1350	1355
act ttc ttc aca gac aac agc tac taagcagcat cggacaagac cccagcact				4138
Thr Phe Phe Thr Asp Asn Ser Tyr				
1360				
tggggggttca ggcccggcag ggcgggcaga gggctggagg cccaggctgg gaactcatct				4198
ggttgaactc tgggtggcaca ggagtgtcct ctccctctc tgcagacttc ccagctagga				4258
agagcaggac tccaggccca aggctccgg aattccgtca ccacgactgg ccagggcacg				4318
ctccagctgc cccggccccct cccctgaga ttcagatgtc atttagttca gcatccgcag				4378
gtgctgggtcc cggggccagc acttccatgg gaatgtctct ttggcgacct cctttcatca				4438

cactgggtgg tggcctggtc cctgttttcc cacgaggaat ctgtgggtct gggagtcaca 4498
 cagtgttggg ggtaaggca tacgagagca gaggtctccc aaacgccctt tcctcctcag 4558
 gcacacagct actctcccca cgagggtctgg ctggcctcac ccaccctgc acagttgaag 4618
 ggaggggctg tgtttccatc tcaaagaagg catttgcagg gtcctcttct gggcctgacc 4678
 aaacagccaa ctagcccttg ggggtggccac cagtatgaca gtattatacg ctggcaacac 4738
 agaggcagcc cgcacacctg cgcctgggtg ttgagagcca tcctgcaagt ctttttc 4795

<210> 4

<211> 1363

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

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

89

Asp Leu Met Pro Gln Cys Arg Asp Trp Arg Ala Val Thr Thr Gln Asp
 485 490 495

Ala Val Asn Pro Ile Glu Ser Leu Asp Thr Trp Thr Glu Phe Val Glu
 500 505 510

Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Lys Leu Val Ile Gln Asn Ala Asn Val
 515 520 525

Ser Ala Met Tyr Lys Cys Val Val Ser Asn Lys Val Gly Gln Asp Glu
 530 535 540

Arg Leu Ile Tyr Phe Tyr Val Thr Thr Ile Pro Asp Gly Phe Thr Ile
 545 550 555 560

Glu Ser Lys Pro Ser Glu Glu Leu Leu Glu Gly Gln Pro Val Leu Leu
 565 570 575

Ser Cys Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Tyr Glu His Leu Arg Trp Tyr Arg
 580 585 590

Leu Asn Leu Ser Thr Leu His Asp Ala His Gly Asn Pro Leu Leu Leu
 595 600 605

Asp Cys Lys Asn Val His Leu Phe Ala Thr Pro Leu Ala Ala Ser Leu
 610 615 620

Glu Glu Val Ala Pro Gly Ala Arg His Ala Thr Leu Ser Leu Ser Ile
 625 630 635 640

Pro Arg Val Ala Pro Glu His Glu Gly His Tyr Val Cys Glu Val Gln
 645 650 655

Asp Arg Arg Ser His Asp Lys His Cys His Lys Lys Tyr Leu Ser Val
 660 665 670

Gln Ala Leu Glu Ala Pro Arg Leu Thr Gln Asn Leu Thr Asp Leu Leu
 675 680 685

Val Asn Val Ser Asp Ser Leu Glu Met Gln Cys Leu Val Ala Gly Ala
 690 695 700

His Ala Pro Ser Ile Val Trp Tyr Lys Asp Glu Arg Leu Leu Glu Glu
 705 710 715 720

Lys Ser Gly Val Asp Leu Ala Asp Ser Asn Gln Lys Leu Ser Ile Gln
 725 730 735

Arg Val Arg Glu Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys Ser Val Cys Asn
 740 745 750

Ala Lys Gly Cys Val Asn Ser Ser Ala Ser Val Ala Val Glu Gly Ser
 755 760 765

Glu Asp Lys Gly Ser Met Glu Ile Val Ile Leu Val Gly Thr Gly Val
 770 775 780
 Ile Ala Val Phe Phe Trp Val Leu Leu Leu Leu Ile Phe Cys Asn Met
 785 790 795 800
 Arg Arg Pro Ala His Ala Asp Ile Lys Thr Gly Tyr Leu Ser Ile Ile
 805 810 815
 Met Asp Pro Gly Glu Val Pro Leu Glu Glu Gln Cys Glu Tyr Leu Ser
 820 825 830
 Tyr Asp Ala Ser Gln Trp Glu Phe Pro Arg Glu Arg Leu His Leu Gly
 835 840 845
 Arg Val Leu Gly Tyr Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Ser Ala
 850 855 860
 Phe Gly Ile His Lys Gly Ser Ser Cys Asp Thr Val Ala Val Lys Met
 865 870 875 880
 Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu His Arg Ala Leu Met Ser Glu
 885 890 895
 Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly Asn His Leu Asn Val Val Asn Leu
 900 905 910
 Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gln Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu
 915 920 925
 Phe Cys Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Phe Leu Arg Ala Lys Arg Asp
 930 935 940
 Ala Phe Ser Pro Cys Ala Glu Lys Ser Pro Glu Gln Arg Gly Arg Phe
 945 950 955 960
 Arg Ala Met Val Glu Leu Ala Arg Leu Asp Arg Arg Arg Pro Gly Ser
 965 970 975
 Ser Asp Arg Val Leu Phe Ala Arg Phe Ser Lys Thr Glu Gly Gly Ala
 980 985 990
 Arg Arg Ala Ser Pro Asp Gln Glu Ala Glu Asp Leu Trp Leu Ser Pro
 995 1000 1005
 Leu Thr Met Glu Asp Leu Val Cys Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg Gly
 1010 1015 1020
 Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala
 1025 1030 1035 1040
 Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Ser Asp Val Val Lys Ile Cys Asp Phe
 1045 1050 1055

Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly
 1060 1065 1070

Ser Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp
 1075 1080 1085

Lys Val Tyr Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu
 1090 1095 1100

Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro Tyr Pro Gly Val Gln Ile
 1105 1110 1115 1120

Asn Glu Glu Phe Cys Gln Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Met Arg Ala
 1125 1130 1135

Pro Glu Leu Ala Thr Pro Ala Ile Arg Arg Ile Met Leu Asn Cys Trp
 1140 1145 1150

Ser Gly Asp Pro Lys Ala Arg Pro Ala Phe Ser Glu Leu Val Glu Ile
 1155 1160 1165

Leu Gly Asp Leu Leu Gln Gly Arg Gly Leu Gln Glu Glu Glu Val
 1170 1175 1180

Cys Met Ala Pro Arg Ser Ser Gln Ser Ser Glu Glu Gly Ser Phe Ser
 1185 1190 1195 1200

Gln Val Ser Thr Met Ala Leu His Ile Ala Gln Ala Asp Ala Glu Asp
 1205 1210 1215

Ser Pro Pro Ser Leu Gln Arg His Ser Leu Ala Ala Arg Tyr Tyr Asn
 1220 1225 1230

Trp Val Ser Phe Pro Gly Cys Leu Ala Arg Gly Ala Glu Thr Arg Gly
 1235 1240 1245

Ser Ser Arg Met Lys Thr Phe Glu Glu Phe Pro Met Thr Pro Thr Thr
 1250 1255 1260

Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val Leu Ala
 1265 1270 1275 1280

Ser Glu Glu Phe Glu Gln Ile Glu Ser Arg His Arg Gln Glu Ser Gly
 1285 1290 1295

Phe Ser Cys Lys Gly Pro Gly Gln Asn Val Ala Val Thr Arg Ala His
 1300 1305 1310

Pro Asp Ser Gln Gly Arg Arg Arg Arg Pro Glu Arg Gly Ala Arg Gly
 1315 1320 1325

Gly Gln Val Phe Tyr Asn Ser Glu Tyr Gly Glu Leu Ser Glu Pro Ser
 1330 1335 1340

Glu Glu Asp His Cys Ser Pro Ser Ala Arg Val Thr Phe Phe Thr Asp
1345 1350 1355 1360

Asn Ser Tyr

<210> 5

<211> 1311

<212> PRT

<213> 人 (FLT1)

<400> 5

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
1 5 10 15

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro
20 25 30

Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr
35 40 45

Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys Trp Ser Leu Pro
50 55 60

Glu Asn Asn Asn Asn Asn Asn Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu
65 70 75 80

Ser Ile Thr Lys Ser Ala Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser
85 90 95

Thr Leu Thr Leu Asn Thr Ala Gln Ala Asn His Thr Gly Phe Tyr Ser
100 105 110

Cys Lys Tyr Leu Ala Val Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr Glu Ser
115 120 125

Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met
130 135 140

Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu
145 150 155 160

Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys
165 170 175

Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp
180 185 190

Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile
195 200 205

Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr
210 215 220

Asn Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln
225 230 235 240

Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val
245 250 255

Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr
260 265 270

Trp Ser Tyr Pro Asp Asn Asn Asn Glu Lys Asn Lys Arg Ala Ser Val
275 280 285

Arg Arg Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser
290 295 300

Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr
305 310 315 320

Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser Val
325 330 335

His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val Lys His Arg Lys Gln Gln
340 345 350

Val Leu Glu Thr Val Ala Gly Lys Arg Ser Tyr Arg Leu Ser Met Lys
355 360 365

Val Lys Ala Phe Pro Ser Pro Glu Val Val Trp Leu Lys Asp Gly Leu
370 375 380

Pro Ala Thr Glu Lys Ser Ala Arg Tyr Leu Thr Arg Gly Tyr Ser Leu
385 390 395 400

Ile Ile Lys Asp Val Thr Glu Glu Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Ile Leu
405 410 415

Leu Ser Ile Lys Gln Ser Asn Val Phe Lys Asn Leu Thr Ala Thr Leu
420 425 430

Ile Val Asn Val Lys Pro Gln Ile Tyr Glu Lys Ala Val Ser Ser Phe
435 440 445

Pro Asp Pro Ala Leu Tyr Pro Leu Gly Ser Arg Gln Ile Leu Thr Cys
450 455 460

Thr Ala Tyr Gly Ile Pro Gln Pro Asn Thr Ile Lys Trp Phe Trp His
465 470 475 480

Pro Cys Asn His Asn His Ser Glu Ala Arg Cys Asp Phe Cys Ser Asn
485 490 495

Asn Glu Glu Ser Phe Ile Leu Asp Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ala
500 505 510

Asp Ser Asn Met Gly Asn Arg Ile Glu Ser Ile Thr Gln Arg Met Ala
 515 520 525

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

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Tyr Ile Cys Ile Ala Ser Asn Lys Val Gly
 545 550 555 560

Thr Val Gly Arg Asn Ile Ser Phe Tyr Ile Thr Asp Val Pro Asn Gly
 565 570 575

Phe His Val Asn Leu Glu Lys Met Pro Thr Asn Asn Glu Gly Glu Asp
 580 585 590

Leu Lys Leu Ser Cys Thr Val Asn Lys Phe Leu Tyr Arg Asp Val Thr
 595 600 605

Trp Ile Leu Leu Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn
 610 615 620

Asn Asn Asn Asn Asn Arg Thr Val Asn Asn Arg Thr Met His Tyr Ser
 625 630 635 640

Ile Ser Lys Gln Lys Met Ala Ile Thr Lys Glu His Ser Ile Thr Leu
 645 650 655

Asn Leu Thr Ile Met Asn Val Ser Leu Gln Asp Ser Gly Thr Tyr Ala
 660 665 670

Cys Arg Ala Arg Asn Val Tyr Thr Gly Glu Glu Ile Leu Gln Lys Lys
 675 680 685

Glu Ile Thr Ile Arg Asp Gln Glu Ala Pro Tyr Leu Leu Arg Asn Leu
 690 695 700

Ser Asp His Thr Val Ala Ile Ser Ser Ser Thr Thr Leu Asp Cys His
 705 710 715 720

Ala Asn Gly Val Pro Glu Pro Gln Ile Thr Trp Phe Lys Asn Asn His
 725 730 735

Lys Ile Gln Gln Glu Pro Gly Ile Ile Leu Gly Pro Gly Ser Ser Thr
 740 745 750

Leu Phe Ile Glu Arg Val Thr Glu Glu Asp Glu Gly Val Tyr His Cys
 755 760 765

Lys Ala Thr Asn Gln Lys Gly Ser Val Glu Ser Ser Ala Tyr Leu Thr
 770 775 780

Val Gln Gly Thr Ser Asp Lys Ser Asn Leu Glu Leu Ile Thr Leu Thr
 785 790 795 800

Cys Thr Cys Val Ala Ala Thr Leu Phe Trp Leu Leu Leu Thr Leu Leu
 805 810 815

Ile Arg Lys Met Lys Arg Ser Ser Asn Ser Glu Ile Lys Thr Asp Tyr
 820 825 830

Leu Ser Ile Ile Met Asp Pro Asp Glu Val Pro Leu Asp Glu Gln Cys
 835 840 845

Glu Arg Leu Pro Tyr Asp Ala Ser Lys Trp Glu Phe Ala Arg Glu Arg
 850 855 860

Leu Lys Leu Gly Lys Ser Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Lys Val Val
 865 870 875 880

Gln Ala Ser Ala Phe Gly Ile Lys Lys Ser Pro Thr Cys Arg Thr Val
 885 890 895

Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu Tyr Lys Ala
 900 905 910

Leu Met Thr Glu Leu Lys Ile Leu Thr His Ile Gly His His Leu Asn
 915 920 925

Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Gln Gly Gly Pro Leu Met
 930 935 940

Val Ile Val Glu Tyr Cys Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Tyr Leu Lys
 945 950 955 960

Ser Lys Arg Asp Leu Phe Phe Leu Asn Lys Asp Ala Ala Leu His Met
 965 970 975

Glu Pro Lys Lys Glu Lys Met Glu Pro Gly Leu Glu Gln Gly Lys Lys
 980 985 990

Pro Arg Leu Asp Ser Val Thr Ser Ser Glu Ser Phe Ala Ser Ser Gly
 995 1000 1005

Phe Gln Glu Asp Lys Ser Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Asp Ser
 1010 1015 1020

Asp Gly Phe Tyr Lys Glu Pro Ile Thr Met Glu Asp Leu Ile Ser Tyr
 1025 1030 1035 1040

Ser Phe Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Phe Leu Ser Ser Arg Lys Cys
 1045 1050 1055

Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Asn Asn
 1060 1065 1070

Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn
 1075 1080 1085

Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly Asp Thr Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met
1090 1095 1100

Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp Lys Ile Tyr Ser Thr Lys Ser Asp Val
1105 1110 1115 1120

Trp Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Gly Ser
1125 1130 1135

Pro Tyr Pro Gly Val Gln Met Asp Glu Asp Phe Cys Ser Arg Leu Arg
1140 1145 1150

Glu Gly Met Arg Met Arg Ala Pro Glu Tyr Ser Thr Pro Glu Ile Tyr
1155 1160 1165

Gln Ile Met Leu Asp Cys Trp His Arg Asp Pro Lys Glu Arg Pro Arg
1170 1175 1180

Phe Ala Glu Leu Val Glu Lys Leu Gly Asp Leu Leu Gln Ala Asn Val
1185 1190 1195 1200

Gln Gln Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Pro Ile Asn Ala Ile Leu Thr Gly
1205 1210 1215

Asn Ser Gly Phe Thr Tyr Ser Thr Pro Ala Phe Ser Glu Asp Phe Phe
1220 1225 1230

Lys Glu Ser Ile Ser Ala Pro Lys Phe Asn Ser Gly Ser Ser Asp Asp
1235 1240 1245

Val Arg Tyr Val Asn Ala Phe Lys Phe Met Ser Leu Glu Arg Ile Lys
1250 1255 1260

Thr Phe Glu Glu Leu Leu Pro Asn Ala Thr Ser Met Phe Asp Asp Tyr
1265 1270 1275 1280

Gln Gly Asp Ser Ser Thr Leu Leu Ala Ser Pro Met Leu Lys Arg Phe
1285 1290 1295

Thr Trp Thr Asp Ser Lys Pro Lys Ala Ser Leu Lys Ile Glu Val
1300 1305 1310

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221>

<222>

<223> 第1位和第2位的氨基酸分别选自天冬氨酸和谷氨酸

<220>

<221>

<222>

<223> 第4位的氨基酸选自甲硫氨酸和缬氨酸

<220>

<221>

<222>

<223> 第5位的氨基酸选自脯氨酸、天冬氨酸和谷氨酸

<220>

<221>

<222>

<223> 人工序列的描述：共有序列

<400> 6

Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Met

1

5

<210> 7

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：寡核苷酸探针

<400> 7

acatgcatgc caccatgcag cggggcgccg cgctgtgcct gcgactgtgg ctctgcctgg 60

gactcctgga

70

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：寡核苷酸探针

<400> 8

acatgcatgc cccgccggtc atcc

24

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：寡核苷酸探针

<400> 9

cggaattccc catgacccca ac 22

<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸探针

<400> 10
ccatcgatgg atcctacctg aagccgcttt ctt 33

<210> 11
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸探针

<400> 11
cccaagcttg gatccaagtg gctactccat gacc 34

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸探针

<400> 12
gttgctgtg atgtgcacca 20

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸探针

<400> 13
ctggagtga cttggcggac t 21

<210> 14
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：寡核苷酸探针

<400> 14

cgcggatccc tagtgatggt gatggtgatg tctaccttcg atcatgctgc ccttatcctc 60

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：寡核苷酸探针

<400> 15

ctggagtcga cttggcggac t 21

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：寡核苷酸探针

<400> 16

cgggatccct ccatgctgcc cttatcct 28

<210> 17

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：寡核苷酸探针

<400> 17

ggcaagcttg aattcgccac catgcagcgg ggcgcc 36

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：寡核苷酸探针

<400> 18

gttgctgtg atgtgcacca 20

<210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：寡核苷酸探针

<400> 19
 ctggagtcga cttggcggac t 21

<210> 20
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：寡核苷酸探针

<400> 20
 cgcggatcca agcttactta cttccatgc tgcccttata ctcg 44

<210> 21
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 21
 Met His Leu Leu Gly Phe Phe Ser Val Ala Cys Ser Leu Leu Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Gly Pro Arg Glu Ala Pro Ala Ala Ala Ala Phe
 20 25 30

Glu Ser Gly Leu Asp Leu Ser Asp Ala Glu Pro Asp Ala Gly Glu Ala
 35 40 45

Thr Ala Tyr Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu Arg Ser Val Ser
 50 55 60

Ser Val Asp Glu Leu Met Thr Val Leu Tyr Pro Glu Tyr Trp Lys Met
 65 70 75 80

Tyr Lys Cys Gln Leu Arg Lys Gly Gly Trp Gln His Asn Arg Glu Gln
 85 90 95

Ala Asn Leu Asn Ser Arg Thr Glu Glu Thr Ile Lys Phe Ala Ala Ala
 100 105 110

His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys

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

	405	410	415
Gln Met Ser			
<210> 22			
<211> 354			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 22			
Met Tyr Arg Glu Trp Val Val Val Asn Val Phe Met Met Leu Tyr Val			
1 5 10 15			
Gln Leu Val Gln Gly Ser Ser Asn Glu His Gly Pro Val Lys Arg Ser			
20 25 30			
Ser Gln Ser Thr Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser			
35 40 45			
Ser Leu Glu Glu Leu Leu Arg Ile Thr His Ser Glu Asp Trp Lys Leu			
50 55 60			
Trp Arg Cys Arg Leu Arg Leu Lys Ser Phe Thr Ser Met Asp Ser Arg			
65 70 75 80			
Ser Ala Ser His Arg Ser Thr Arg Phe Ala Ala Thr Phe Tyr Asp Ile			
85 90 95			
Glu Thr Leu Lys Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Thr Gln Cys Ser			
100 105 110			
Pro Arg Glu Thr Cys Val Glu Val Ala Ser Glu Leu Gly Lys Ser Thr			
115 120 125			
Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg Cys Gly Gly			
130 135 140			
Cys Cys Asn Glu Glu Ser Leu Ile Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr			
145 150 155 160			
Ile Ser Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro			
165 170 175			
Glu Leu Val Pro Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu			
180 185 190			
Pro Thr Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln			
195 200 205			
Ile Pro Glu Glu Asp Arg Cys Ser His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile			
210 215 220			
Asp Met Leu Trp Asp Ser Asn Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Glu Glu			

225	230	235	240
Asn Pro Leu Ala Gly Thr Glu Asp His Ser His Leu Gln Glu Pro Ala			
	245	250	255
Leu Cys Gly Pro His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val			
	260	265	270
Cys Lys Thr Pro Cys Pro Lys Asp Leu Ile Gln His Pro Lys Asn Cys			
	275	280	285
Ser Cys Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Thr Cys Cys Gln Lys His			
	290	295	300
Lys Leu Phe His Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe			
305	310	315	320
His Thr Arg Pro Cys Ala Ser Gly Lys Thr Ala Cys Ala Lys His Cys			
	325	330	335
Arg Phe Pro Lys Glu Lys Arg Ala Ala Gln Gly Pro His Ser Arg Lys			
	340	345	350
Asn Pro			

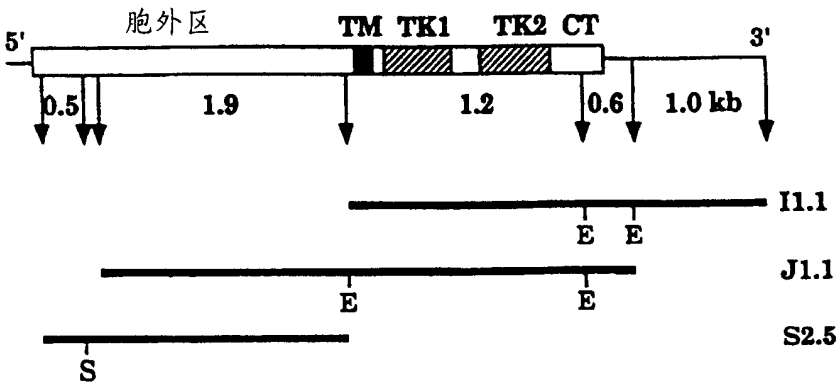
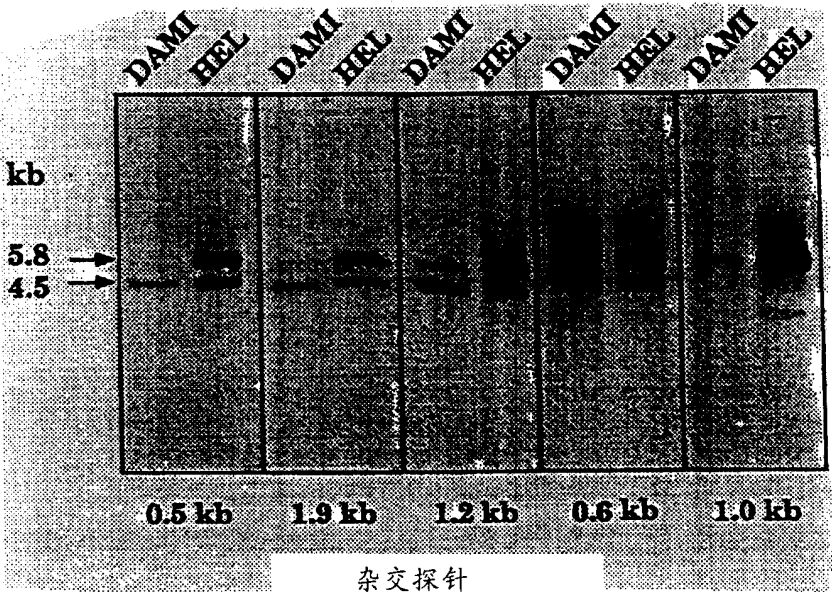


图 1A



杂交探针

图 1B

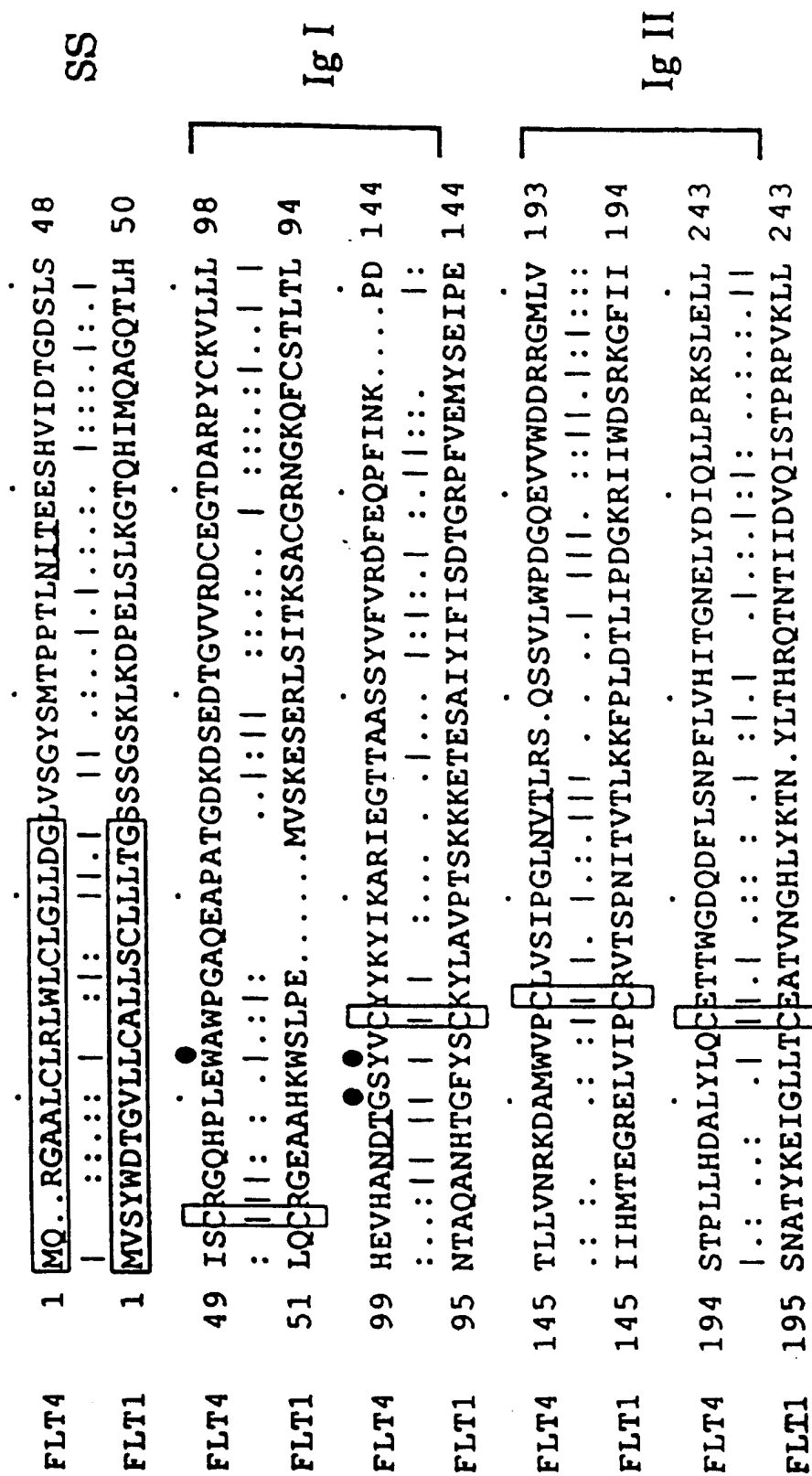


图 2A

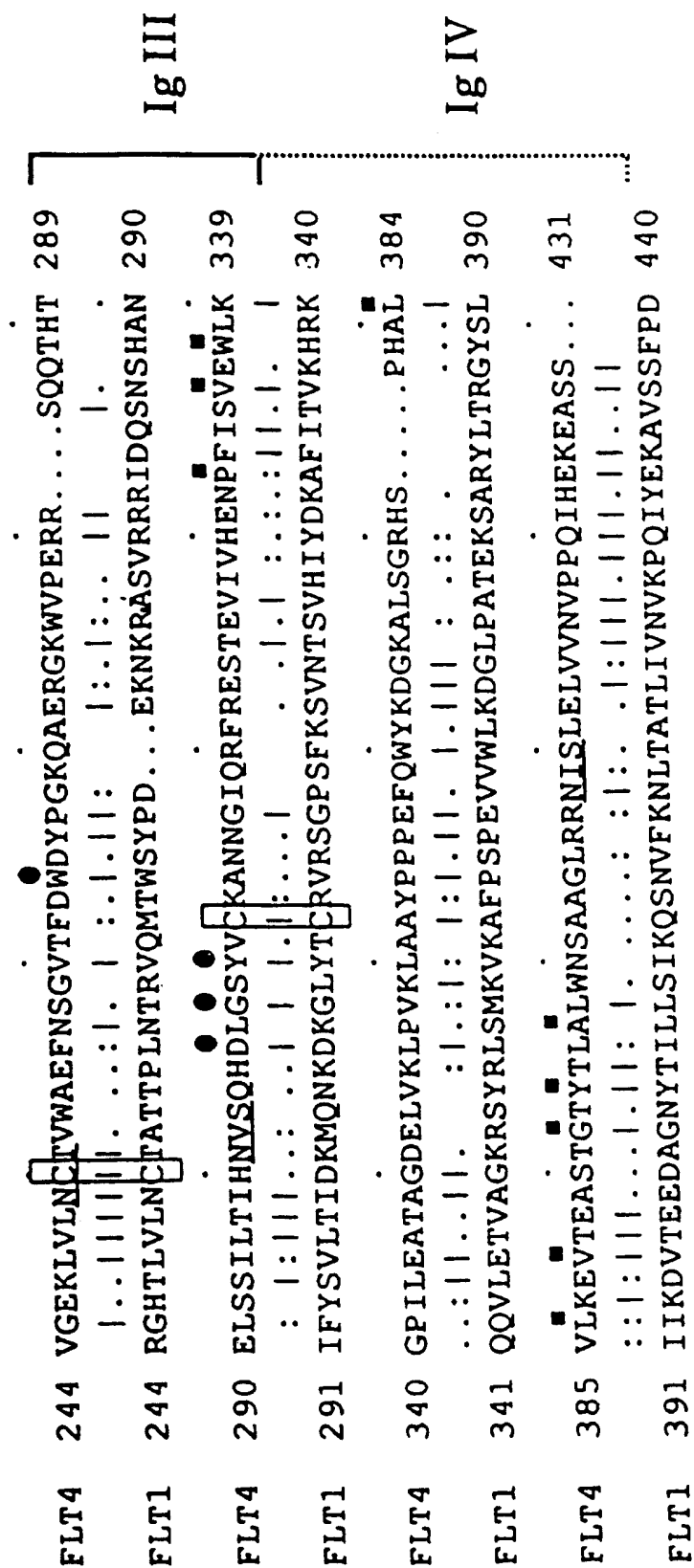


图 2B

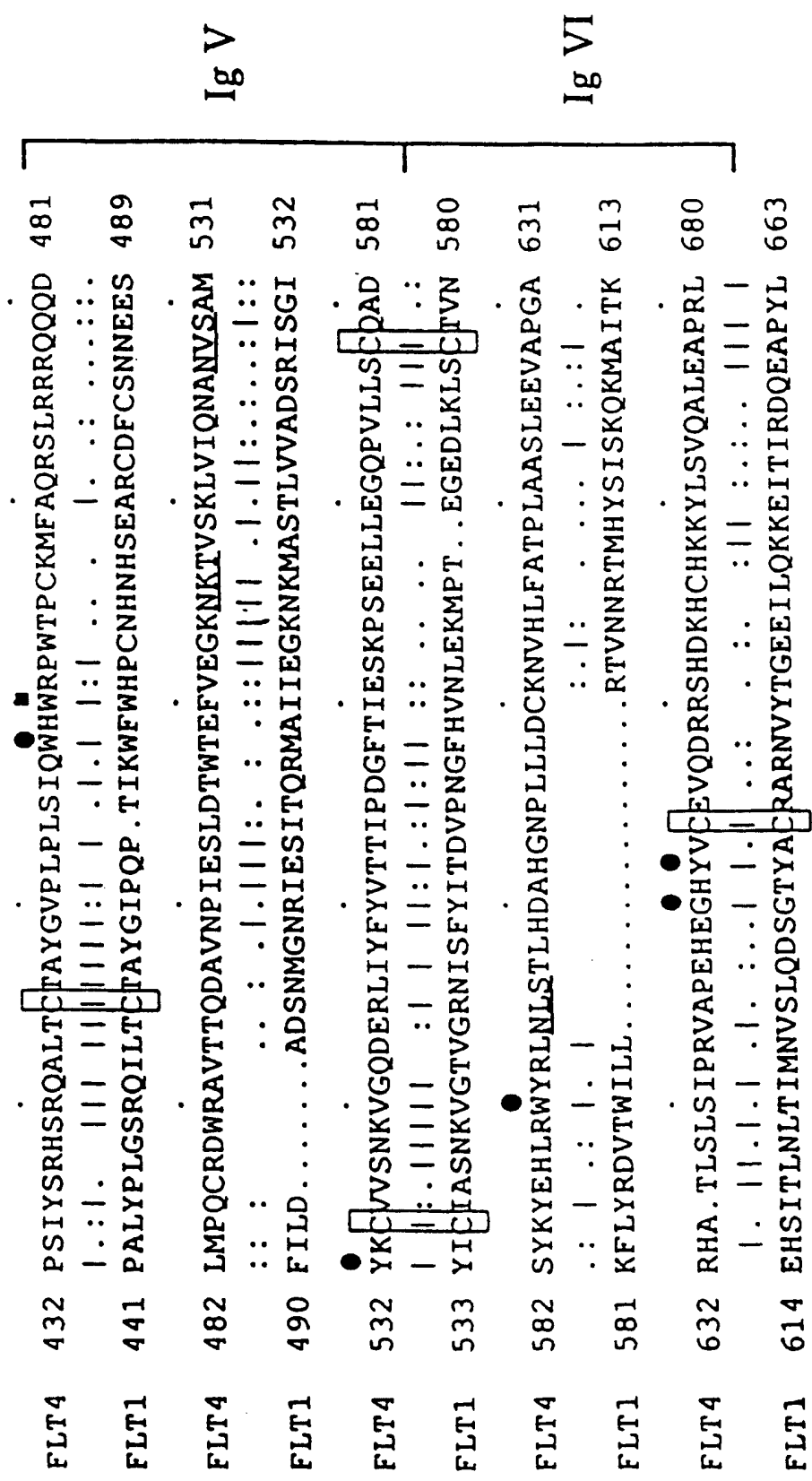


图 2C

FLT4	681	TONLTDLLVNVSDSLEMQCLVAGAHAPSI VWYKDERLLEEKSGVDLADSN	730	
		. .		
FLT1	664	LRNLSDH TVAISSSTTLDCHANGVPEPQITWFKNNHKIQOEPGIILPGCS	713	
FLT4	731	QKLSIQRVREEDAGRYLBSVCNAKGCVNSSASVAVEGSEDKGSMEIVILV	780	
		. .		
FLT1	714	STLFIERVTEDEGVYHCKATNQKGSVESSAYLTVQGTSDKSNLELITLT	763	
FLT4	781	GTGVIAVFFWVLLLLIFCNMRRPAHADIKTGYSIIMDPGEVPLEEQCEY	830	
		. .		
FLT1	764	CTCVAATLFWLLLTLLIRKMKRSS.SEIKTDYLSIIMDPDEVPLDEQCER	812	
FLT4	831	LSYDASQWEFFRERLHGRVLGYGAFGKVVEASAFGIHKSSCDTVAVKM	880	
		. .		
FLT1	813	LPYDASKWEFARERLKLKSLGRGAFGKVQASAFGIKKSPCTCRTVAVKM	862	
FLT4	881	LKEGATASEHRALMSELKILIHIGNHLNVNLLGACTKPQGPLMVIVEFC	930	
		. .		
FLT1	863	LKEGATASEYKALMTELKILTHIGHHLNVNLLGACTKQGGPLMVIVEYC	912	
FLT4	931	KYGNLSNFLRAKRDAF...SPCAEKSPEQGRFRAMVELARLDRRRPGSS	977	
		. .		
FLT1	913	KYGNLSNYLKSQRDLFFLNKDAALHMEPKKEKMEPGLEQKKPRLDSVTS	962	

图 2D

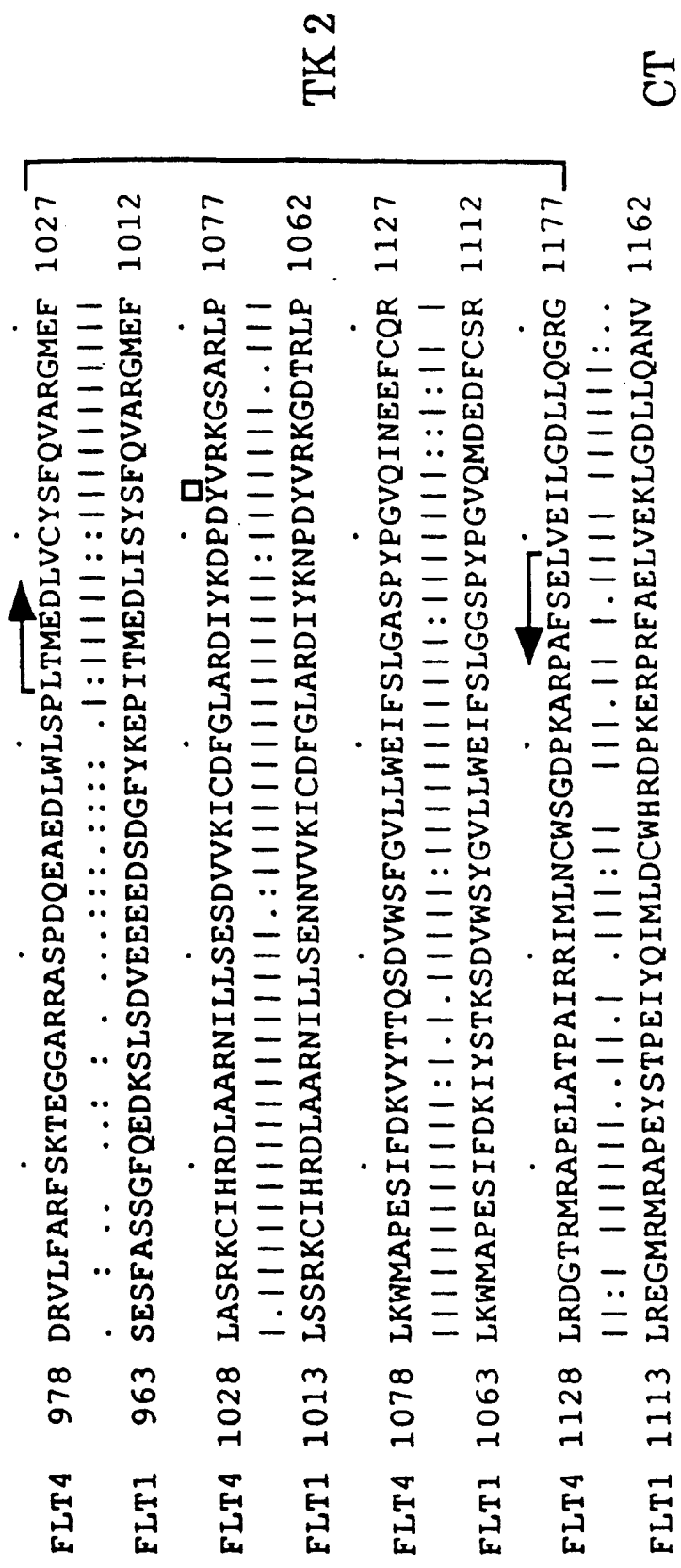


图 2E

FLT4 1178 LQEEEEVCMAPRSSQSSEEGFSQVSTMALHIAQADAEDSPPSLQRHSLA 1227
FLT1 1163 QQDGKDYIPINAILTGNSTYSTPAFSEDFFKESISAPKFNSGSSDDVR 1212
FLT4 1228 ARYYNWVSFPGCLARGAETRGSSRMKTFFEEFPMPTTYKGSVDNQTDSCM 1277
FLT1 1213 YVNAFKFMSLERIKTFEELLPNATSMFDDDYQGDSSSTLLASPMMLKRFTWTD 1262
FLT4 1278 VLASEEFEQIESRHRQESGFR 1298
FLT1 1263 SKPKASLKIEV 1273

图 2F

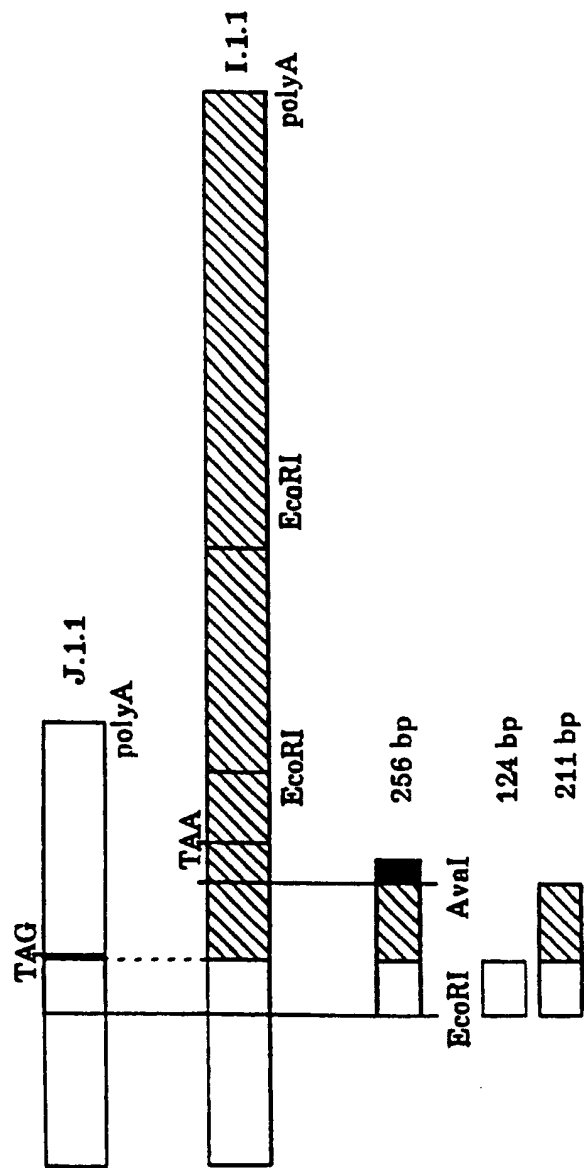


图 3A

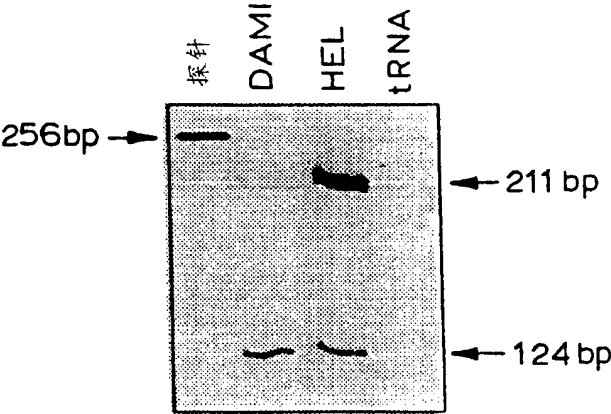


图 3B

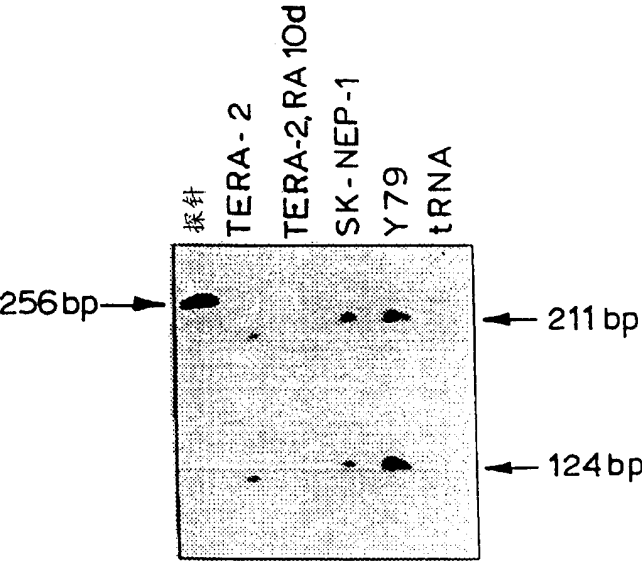


图 3C

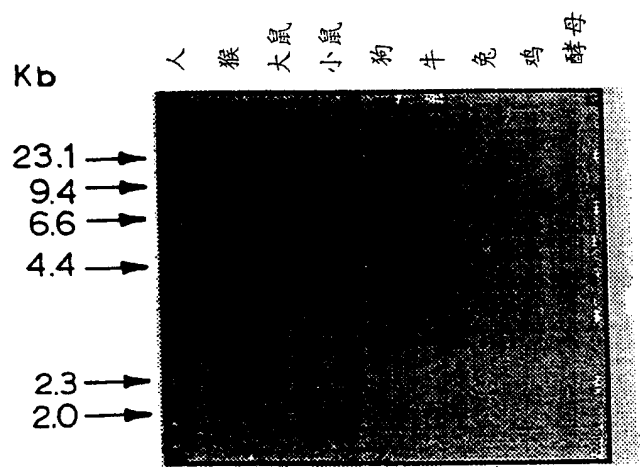


图 4



图 5A

图 5B

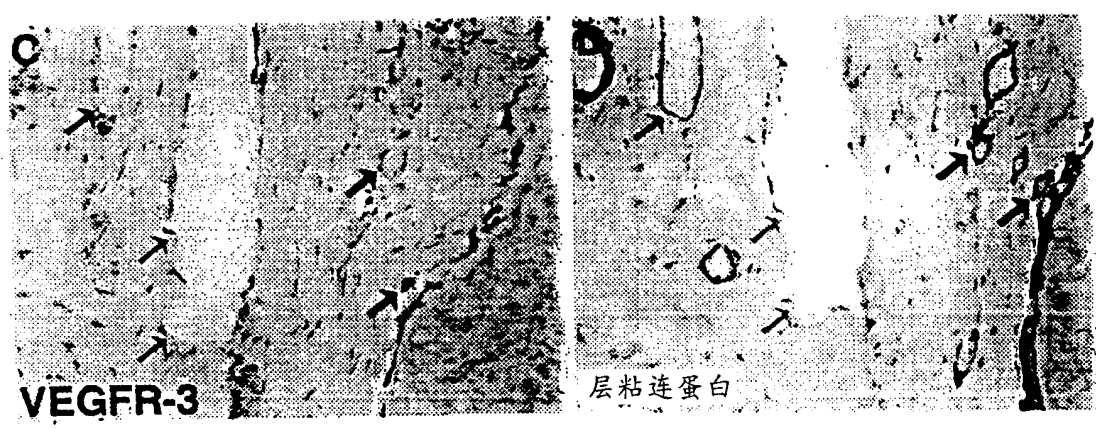


图 5C

图 5D



图 5E

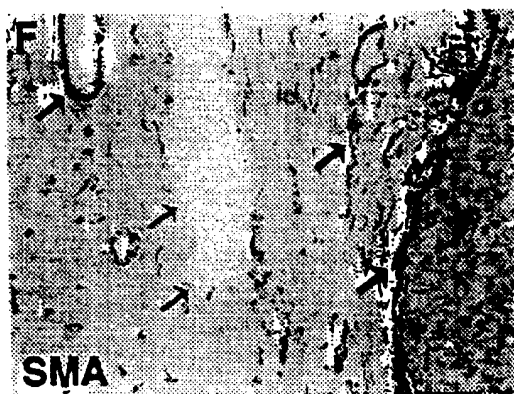


图 5F

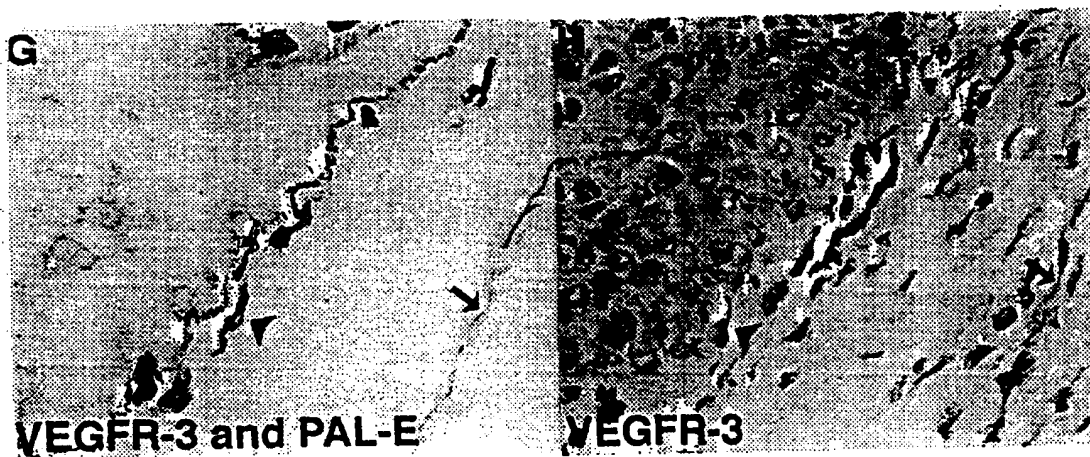


图 5G

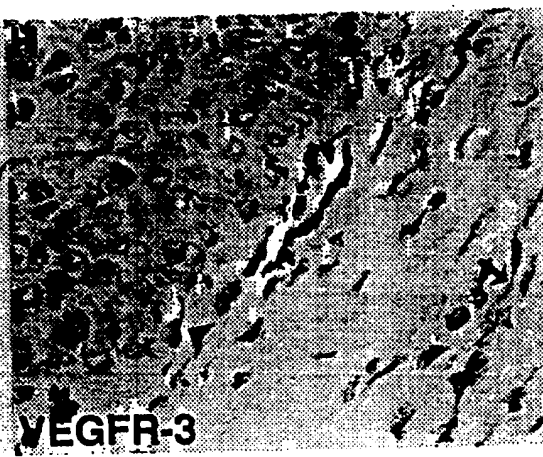


图 5H