

四、聲明事項：

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

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2003年08月27日；60/498,407

2. 美國；2004年03月26日；60/556,837

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於眼科學及醫學領域。更特定言之，本發明係關於利用抑制血小板衍生生長因子(PDGF)及血管內皮生長因子(VEGF)之藥劑的組合來治療眼睛新血管形成失調。

【先前技術】

血管生成亦稱為新血管形成，其涉及幼芽自先在血管之形成及其侵入至周圍組織中。相關過程即血管發生涉及已遍佈於組織內之內皮細胞及成血管細胞之分化及其隨後連接在一起形成血管。

血管生成廣泛地發生於發展期間，且亦於傷口癒合期間發生在健康體內，以便在受傷或受損後恢復流向組織之血流。然而，血管生成亦牽涉癌症及腫瘤形成。事實上，腫瘤組織中之血管數量係乳腺癌(Weidner等人(1992) *J. Natl. Cancer Inst.* 84:1875-1887)、前列腺癌(Weidner等人(1993) *Am. J. Pathol.* 143:401-409)、腦腫瘤(Li等人(1994) *Lancet* 344:82-86)及黑素瘤(Foss等人(1996) *Cancer Res.* 56: 2900-2903)之強負預後性指示。血管生成最近亦牽涉包括風濕病學、皮膚病學、心臟病學及眼科學之許多醫學領域內的其它疾病狀態。特定言之，不良或病態組織特定血管生成與某些特定疾病狀態相關聯，包括類風濕性關節炎、動脈粥樣硬化及牛皮癬(例如，參見Fan等人(1995) *Trends Pharmacol. Sci.* 16:57；及Folkman(1995) *Nature Med.* 1:27)。此外，吾人認為血管滲透性之改變可在正常

及病態生理過程中起作用 (Cullinan-Bove 等人 (1993) *Endocrinol.* 133:829 ; Senger 等人 (1993) *Cancer and Metastasis Reviews* 12:303)。儘管在每一該等疾病中之血管生成過程皆可能與發展型血管生成及腫瘤血管生成共有許多特徵，但每一該等疾病中之血管生成過程亦可具有因周圍細胞之影響而獨有的方面。

若干眼睛失調涉及血管生成之改變。例如，糖尿病視網膜病變係成人失明的第三主導原因(在美國，佔近7%的失明)，其與廣泛的血管生成事件相關。非增生性視網膜病變伴隨有視網膜內周皮細胞之選擇性損耗，且其損耗導致相關毛細血管擴張及導致的血流增加。在擴張的毛細血管中，內皮細胞增生且形成外囊(outpouching)，該等外囊變成微動脈瘤，且相鄰毛細血管受阻而使得環繞該等微動脈瘤之視網膜區域未注滿。最終，分流血管出現在微動脈瘤的相鄰區域之間，且觀察到具有微動脈瘤及未經注滿之視網膜區域之早期糖尿病視網膜病變之臨床圖像。微動脈瘤會滲漏，且毛細血管會流血，從而引起滲出及出血。一旦確定為背景型糖尿病視網膜病變之初始階段，則該病症進展了數年的時期，大約5%的病例發展為增生性糖尿病視網膜病變及失明。增生性糖尿病視網膜病變發生時，視網膜之某些區域持續損耗其毛細血管且變得未經注滿，從而導致新血管出現在盤上及視網膜上之其它地方。該等新血管生長成玻璃體且容易流血，從而導致視網膜前出血。在進行型增生性糖尿病視網膜病變中，大量玻璃體出血可填

充玻璃體腔的主要部分。另外，新血管伴隨有纖維組織增生，其可導致牽引性視網膜剝離。

糖尿病視網膜病變主要與糖尿病之持續時間相關；因此，隨著人口年齡及糖尿病患者更長壽，糖尿病視網膜病變之流行度將增加。目前，在非增生性及增生性糖尿病視網膜病變中都使用雷射療法。環繞黃斑區之滲漏微動脈瘤的焦點雷射治療減少了50%的患有臨床上顯著的黃斑水腫的患者之視覺損耗。在增生性糖尿病視網膜病變中，全視網膜光凝固法導致分散遍佈於視網膜內(除去黃斑區)之數千個微小灼傷；該治療使失明率減少60%。早期治療黃斑水腫及增生性糖尿病視網膜病變防止95%患者在5年內失明，而晚期治療僅防止50%患者失明。因此，早期診斷及治療係必需的。

涉及新血管形成之另一眼睛失調係年齡相關之黃斑退化(AMD)，此係一種影響著近十分之一的年齡在65歲以上之美國人的疾病。AMD之特徵為黃斑(視網膜之中心區域)之一系列的病理改變，其伴隨有視覺敏銳度之降低，且特別影響中心視力。AMD涉及稱為視網膜色素上皮之單層細胞，其直接位於感覺視網膜下方。該等細胞滋養及支持與其接觸的視網膜部分，即含有視色素之光感受細胞。視網膜色素上皮位於布魯克膜(Bruch membrane)上，布魯克膜為一基底膜錯合物，其會在AMD中變厚且變硬。新血管可自下面的含有豐富血管床之脈絡膜穿透布魯克膜。該等血管又可在視網膜色素上皮下方及在視網膜色素上皮與感覺

視網膜之間滲漏流體或流血。隨後的纖維狀癥疤形成破壞了光感應細胞之滋養且導致其死亡，從而引起中心視覺敏銳度之損耗。由於滲漏血管及視網膜下水腫或出血，所以將該類型之年齡相關的黃斑病稱為"濕"型。濕型僅佔年齡相關的黃斑病病例之10%，但卻導致90%的法定(legal)失明病例來自中老年人的黃斑退化。"幹"型年齡相關之黃斑病涉及視網膜色素上皮之崩解連同上面的光感應細胞之損耗。幹型降低了視力，但通常僅降低至20/50至20/100之程度。

AMD伴隨有中心視力失真，物體看似更大或更小，或直線看似失真、彎曲，或無中心段。在濕型AMD中，感覺視網膜之小型剝離在黃斑區內顯著，但視網膜下新血管形成膜之確定診斷需要螢光素血管造影術。在幹型中，脈絡膜疣可干擾黃斑區內之色素沈著模式。脈絡膜疣係視網膜色素上皮之基底膜的贅生物，其突入細胞中，從而引起其在前突出；其在年齡相關之黃斑病中起危險因素之作用並不清楚。目前沒有針對幹型年齡相關之黃斑病之治療。雷射治療係用於濕型年齡相關之黃斑病，且最初除去新血管形成膜，並防止約50%的患者在18個月時之進一步的視覺損耗。然而，到了60個月，僅20%的患者仍實質受益。

已識別血管生成之多種分子介體，包括鹼性及酸性成纖維細胞生長因子(aFGF、bFGF)、轉換生長因子 α 及 β (TGF α 、TGF β)、血小板衍生生長因子(PDGF)、血管生成素(angiogenin)、血小板衍生內皮細胞生長因子(PD-

ECGF)、介白素-8(IL-8)及血管內皮生長因子(VEGF)。牽涉血管生成之其它刺激劑包括促血管生成素-1、Del-1、卵泡抑制素、粒細胞集落刺激因子(G-CSF)、肝細胞生長因子(HGF)、瘦體素、中期因子(midkine)、胎盤生長因子、多效素(PTN)、前粒素(progranulin)、多育麴菌素及腫瘤壞死因子- α (TNF- α)。另外，血管生成之控制進一步藉由身體所產生的大量血管生成負調控劑來調節，包括 angioarrestin，血管生成抑制素(胞漿素原片斷)、抗血管生成抗凝血酶III、軟骨衍生抑制劑(CDI)、CD59補體片斷、內皮抑制素(膠原XVIII片斷)、黏連蛋白片斷、gro- β 、肝素酶、肝素己糖片斷、人體絨膜促性腺激素(hCG)、干擾素 $\alpha/\beta/\gamma$ 、干擾素可誘發蛋白(IP-10)、介白素-12、三環域5(kringle 5)(胞漿素原片斷)、金屬蛋白酶抑制劑(TIM P)、2-甲氧雌甾二醇、胎盤核糖核酸酶抑制劑、胞漿素原活化劑抑制劑、血小板因子-4(PF4)、催乳激素16kD片斷、多育麴菌素相關蛋白(PRP)、類視色素、四氫皮質醇-S、凝血栓蛋白-1(TSP-1)、血管抑制素(vasculostatin)及血管新生抑制素(vasostatin)(鈣網蛋白片斷)。

在該等血管生成調控劑中，VEGF似乎起著作為伴隨腫瘤生長之異常血管生成的正調節劑之關鍵作用(參見Brown等人(1996) **Control of Angiogenesis** (Goldberg及Rosen, eds.), Birkhauser、Basel及Thomas(1996) **J. Biol. Chem.** 271:603-606)。此外，最近已在研究PDGF族訊號分子的PDGF-B組員之作用，因為其似乎在血管周圍細胞之形

成、擴張及適當功能中起作用，有時亦將該等血管周圍細胞稱為壁細胞，例如血管平滑肌、系膜細胞及周皮細胞。

雖然吾人已對血管生成或新血管形成、伴隨性發展、傷口癒合及腫瘤形成有很多瞭解，但仍未確定在該等形式之血管生成與眼睛血管生成之間是否存在差異。顯著地，雖然伴隨(例如)心臟中的側枝血管形成之血管生成可能有益於且適於生物體，但病態眼睛新血管形成伴隨症(例如，AMD)無已知益處，且常常會導致失明(參見Campochiaro (2000) J. Cell. Physiol. 184:301-10)。因此，儘管已提高了對伴隨新血管形成之分子事件的認識，但仍需要利用該認識來進一步發展用於治療新血管形成疾病失調之方法，包括治療眼睛新血管形成疾病及失調(諸如伴隨AMD及糖尿病視網膜病變發生的脈絡膜新血管形成)之方法。

【發明內容】

已發現抗VEGF及抗PDGF藥劑之組合對治療眼睛新血管形成疾病具有增效治療之益處。

因此，本發明係關於一種用於治療診斷患有新血管形成失調或有發展新血管形成失調危險之患者的方法。該方法包括向患者投予抗VEGF藥劑及抗PDGF藥劑以作為初步或輔助治療處理。

在一態樣中，本發明提供一種用於壓製需要其之患者的新血管形成失調之方法，其係藉由向患者同時或於彼此的90天內投予足以壓製該患者之新血管形成失調的量之PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑。

在另一態樣中，本發明提供一種用於治療診斷患有新血管形成失調或有發展新血管形成失調之危險的需要其之患者的方法，其係藉由向該患者同時或於彼此的90天內投予足以治療該患者的量之PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑。

在該等態樣之特殊實施例中，本發明之方法涉及在彼此的約10天內投予PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑。在另一實施例中，本發明之方法涉及在彼此的約5天內投予PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑。在本發明方法之另一實施例中，PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑係在彼此的約5天內投予。在本發明方法之另一實施例中，PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑係在彼此的約24小時內投予。在本發明方法之一特殊實施例中，PDGF拮抗劑及該VEGF拮抗劑係同時投予。

在另一實施例中，本發明方法涉及具體為PDGF-B拮抗劑的PDGF拮抗劑之投予。在另一實施例中，本發明方法涉及具體為VEGF-A拮抗劑的VEGF拮抗劑之投予。

在某些實施例中，本發明之方法涉及具體為以下物質之PDGF拮抗劑之投予：核酸分子、適體、反義RNA分子、核糖酶、RNAi分子、蛋白質、肽、環肽、抗體、抗體片斷之結合片斷、糖、聚合物或小型有機化合物。在另一實施例中，本發明之方法涉及具體為以下物質之VEGF拮抗劑之投予：核酸分子、適體、反義RNA分子、核糖酶、RNAi分子、蛋白質、肽、環肽、抗體、抗體片斷之結合片斷、糖、聚合物或小型有機化合物。

在一特殊實施例中，本發明之方法涉及具體為適體(諸

如EYE001適體)的VEGF拮抗劑之投予。在另一實施例中，本發明之方法涉及具體為抗體或其結合片斷的VEGF拮抗劑之投予。

在一特殊實施例中，本發明之方法涉及具體為適體、抗體或其結合片斷之PDGF拮抗劑之投予。在另一特殊實施例中，本發明之方法涉及具體為反義寡核苷酸的PDGF拮抗劑之投予。

在本發明此態樣的另一實施例中，PDGF拮抗劑及/或VEGF拮抗劑係前藥。

在一實施例中，本發明之方法提供一種用於壓製或治療眼睛新血管形成失調之手段。在某些實施例中，順應藉由本發明之方法的治療或壓製之眼睛新血管形成失調包括缺血性視網膜病變、虹膜新血管形成、眼內新血管形成、年齡相關之黃斑退化、角膜新血管形成、視網膜新血管形成、脈絡膜新血管形成、糖尿病視網膜缺血或增生性糖尿病視網膜病變。在另一實施例中，本發明之方法提供一種用於壓製或治療需要其之患者或診斷患有此失調或有發展此失調之危險的患者的牛皮癬或類風濕性關節炎之手段。

本發明亦提供一種醫藥組合物，其包括PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑以及醫藥上可接受的載劑。在該態樣中，PDGF及VEGF拮抗劑以足以壓製患者之新血管形成失調之量存在。

在該態樣之一實施例中，該醫藥組合物包括具體為PDGF-B拮抗劑之PDGF拮抗劑。在另一實施例中，該醫藥

組合物包括具體為 VEGF-A 拮抗劑之 VEGF 拮抗劑。

在某些實施例中，本發明之醫藥組合物包括具體為以下物質之 PDGF 拮抗劑：核酸分子、適體、反義 RNA 分子、核糖酶、RNAi 分子、蛋白質、肽、環肽、抗體、抗體片斷之結合片斷、糖、聚合物或小型有機化合物。在另一實施例中，本發明之醫藥組合物包括具體為以下物質之 VEGF 拮抗劑：核酸分子、適體、反義 RNA 分子、核糖酶、RNAi 分子、蛋白質、肽、環肽、抗體、抗體片斷之結合片斷、糖、聚合物或小型有機化合物。

在其它特殊實施例中，本發明之醫藥組合物包括具體為適體（諸如，EYE001 適體）之 VEGF 拮抗劑。在一實施例中，本發明之醫藥組合物包括具體為抗體或其結合片斷之 VEGF 拮抗劑。

在一特殊實施例中，本發明之醫藥組合物包括具體為抗體或其結合片斷之 PDGF 拮抗劑。在另一特殊實施例中，本發明之醫藥組合物包括具體為反義寡核苷酸之 PDGF 拮抗劑。

本發明之醫藥組合物可包括醫藥上可接受的載劑，該載劑包括微球或水凝膠調配物。

在另一實施例，PDGF 拮抗劑及 / 或 VEGF 拮抗劑係前藥。

在另一實施例中，本發明之醫藥組合物提供一種用於壓製或治療眼睛新血管形成失調之手段。在某些實施例中，順應藉由本發明之醫藥組合物的治療或壓製之眼睛新血管

形成失調包括缺血性視網膜病變、虹膜新血管形成、眼內新血管形成、年齡相關之黃斑退化、角膜新血管形成、視網膜新血管形成、脈絡膜新血管形成、糖尿病視網膜缺血或增生性糖尿病視網膜病變。在其它實施例中，本發明之醫藥組合物提供一種用於壓製或治療需要其之患者或診斷患有此失調或有發展此失調之危險的患者的牛皮癬或類風濕性關節炎之手段。

本發明亦提供一種醫藥包，其包括PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑。在該態樣之一實施例中，該醫藥包包括具體為PDGF-B拮抗劑之PDGF拮抗劑。在該態樣之另一實施例中，該醫藥包包括具體為VEGF-A拮抗劑之VEGF拮抗劑。

在另一實施例中，該醫藥包之PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑以個別的劑量獨立調配。在另一實施例中，該醫藥包之PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑調配在一起。

在某些特殊實施例中，本發明之醫藥包包括具體為適體(諸如EYE001適體)之VEGF拮抗劑。在其它實施例中，本發明之醫藥包包括具體為抗體或其結合片斷之VEGF拮抗劑。

在某些實施例中，本發明之醫藥包包括具體為抗體或其結合片斷之PDGF拮抗劑。在其它特殊實施例中，本發明之醫藥包包括具體為反義寡核苷酸之PDGF拮抗劑。在該態樣之另一實施例中，PDGF拮抗劑及/或VEGF拮抗劑係前藥。

【實施方式】

在本說明書中所提及的所有公開案、專利及專利申請案皆以引用的方式併入本文中。

定義

本文所使用的以下術語及短語應具有以下所陳述的含義。除非另外定義，否則本文所用的所有技術及科學術語均具有與熟悉本發明所屬技術領域的人員所熟知的相同的含義。

"拮抗劑"意味部分或完全抑制目標分子之活性或產生之藥劑。特定言之，選擇性地用於本文之術語"拮抗劑"意味能夠降低PDGF、PDGFR、VEGF或VEGFR基因表現量、mRNA含量、蛋白質含量或蛋白質活性之藥劑。拮抗劑之示範性形式包括(例如)蛋白質、多肽、肽(諸如，環肽)、抗體或抗體片斷、肽模擬劑(mimetics)、核酸分子、反義分子、核糖酶、適體、RNAi分子及小型有機分子。拮抗劑抑制VEGF/VEGFR及PDGF/PDGFR配位體/受體目標之示範性非限制機制包括：壓抑配位體合成及/或穩定性(例如，使用以配位體基因/核酸為目標之反義、核糖酶或RNAi組合物)，阻斷配位體結合至其同族受體(例如，使用抗配位體適體、抗體或可溶的誘餌同族受體)，壓抑受體合成及/或穩定性(例如，使用以配位體基因/核酸為目標之反義、核糖酶或RNAi組合物)，阻斷受體結合至其同族受體(例如，使用受體抗體)，及阻斷其同族配位體對受體之活化(例如，使用受體酪胺酸激酶抑制劑)。另外，拮抗劑可直接或間接抑制目標分子。

本文所使用的術語"抗體"意欲包括全部抗體，例如任何同型抗體(IgG、IgA、IgM、IgE等)，且包括其辨別並亦可特定地與脊椎動物(例如，哺乳動物)蛋白質、碳水化合物等反應之片斷。使用習知技術可將抗體分段，並可以上文所述之用於全部抗體之相同方式來篩選該等片斷以進行應用。因此，該術語包括抗體分子經解蛋白裂解或重組製備的部分之區段，其能夠選擇性地與特定蛋白質反應。該等解蛋白及/或重組片斷之非限制實例包括Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv及含有V[L]及/或V[H]域之藉由肽連接物接合的單鏈抗體(scFv)。scFv可共價或非共價連接以形成具有兩個或兩個以上結合位置之抗體。本發明包括抗體及重組抗體之多株、單株或其它純化製劑。

本文所使用的術語"適體"可與術語"核酸配位體"互換，其意味藉由其採用特定三維構型之能力而結合至一目標並對該目標產生對抗(即，抑制)作用之核酸。本發明之目標係PDGF或VEGF(或其同族受體PDGFR或VEGFR中的一種)，因此使用術語PDGF適體或核酸配位體或VEGF適體或核酸配位體(或PDGFR適體或核酸配位體或VEGFR適體或核酸配位體)。藉由適體來抑制目標可藉由如下方式發生：結合目標、催化改變目標、以修改/改變目標或目標之功能活性之方式與目標反應、如同自殺型抑制劑一樣共價附著至目標、促進目標與另一分子之間的反應。適體可包含多個核糖核苷酸單元、脫氧核糖核苷酸單元或兩種類型的核苷酸殘基之混合物。如本文之進一步描述，適體可

進一步包含一或多個改質鹼基、糖或磷酸酯主鏈單元。

"抗體拮抗劑"意味如本文所定義之抗體分子，其能夠阻礙或顯著降低目標PDGF或VEGF之一或多種活性。例如，VEGF抑制抗體可抑制或降低VEGF刺激血管生成之能力。

若兩個核苷酸序列之每一鹼基均匹配，即能夠形成Watson Crick鹼基對，則其中一核苷酸序列與另一核苷酸序列"互補"。本文中，術語"互補股"與術語"補體"互換使用。核酸股之補體可為編碼股之補體或非編碼股之補體。

短語"守恆殘基"或"守恆胺基酸取代基"係指以某些共同特性為基礎之胺基酸組群。一種界定各個胺基酸之間之共同特性之功能方式係分析同系生物體之對應蛋白質之間的胺基酸變化之標準化頻率。根據此等分析，可界定胺基酸組群，其中在一組內之胺基酸優先地彼此進行交換，並因此在其對整個蛋白質結構之影響上彼此類似(Schulz, G. E. 及 R. H. Schirmer, **Principles of Protein Structure**, Springer-Verlag)。以此方式界定的胺基酸組群之實例包括：

- (i)帶電組群，由Glu及Asp、Lys、Arg及His組成，
- (ii)帶正電組群，由Lys、Arg及His組成，
- (iii)帶負電組群，由Glu及Asp組成，
- (iv)芳族組群，由Phe、Tyr及Trp組成，
- (v)氮環組群，由His及Trp組成，
- (vi)較大的脂族非極性組群，由Val、Leu及Ile組成，
- (vii)弱極性組群，由Met及Cys組成，

(viii)小殘基組群，由Ser、Thr、Asp、Asn、Gly、Ala、Glu、Gln及Pro組成，

(ix)脂族組群，由Val、Leu、Ile、Met及Cys組成，以及

(x)小羥基組群，由Ser及Thr組成。

除了上文所述之組群外，每一胺基酸殘基可形成其自己的組群，且由個別胺基酸所形成之組群可藉由此項技術中常用的彼胺基酸之一及/或三個字母的縮寫來簡稱。

本文所使用之術語"交互作用"意味包括分子之間可偵測的關係或締合(例如，生物化學交互作用)，諸如蛋白質-蛋白質、蛋白質-核酸、核酸-核酸及蛋白質-小分子或核酸-小分子之間的實質交互作用。

術語"交互作用之蛋白質"係指能夠交互作用、結合、及/或另外締合至相關蛋白質(例如，PDGF或VEGF蛋白質或其相應的同族受體)之蛋白質。

本文關於核酸(諸如DNA或RNA)，使用之術語"單離"係指分別自存在於天然大分子源中之其它DNA或RNA分離的分子。類似地，本文關於多肽使用之術語"單離"係指自存在於多肽源中之其它蛋白質分離的蛋白質分子。本文所使用之術語"單離"亦係指在藉由重組DNA技術製造時大體上不含細胞物質、病毒物質或培養基或在化學合成時大體上不含化學前驅體或其它化學物質之核酸或肽。

"單離核酸"意味包括並非以片斷形式天然存在且不會在自然狀態中發現的核酸片斷。本文中術語"單離"亦用於指自其它細胞蛋白質單離之多肽，並意味涵蓋經純化及重組

之多肽。

本文所使用之術語"標記"及"可偵測標記"係指能夠偵測的分子，包括(但不限於)放射性同位素、螢光團、化學發光部分、酶、酶基質、酶輔助因子、酶抑制劑、染料、金屬離子、配位體(例如，生物素或半抗原)等。術語"螢光劑"係指能夠在可偵測範圍內展示螢光性之物質或其部分。可在本發明中使用之標記的特殊實例包含螢光素、若丹明、丹醯、傘形酮、得克薩斯紅、魯米諾(luminol)、NADPH、 α - β -半乳糖苷酶及辣根過氧化物酶。

"細胞中之基因表現量"係指 mRNA 以及前 mRNA 新生轉錄產物、轉錄處理中間物、成熟 mRNA 及藉由細胞中之基因編碼的降解產物之含量，以及自該基因所轉譯的蛋白質的含量。

本文所使用之術語"核酸"係指多核苷酸，諸如脫氧核糖核酸(DNA)，且若適當，則亦係指核糖核酸(RNA)。應將該術語理解為包括自核苷酸類似物製成的 RNA 或 DNA 之等效物、類似物，且如可適用於所描述的實施例，單股(正義或反義)及雙股多核苷酸、EST、染色體、cDNA、mRNA 及 rRNA 係可稱為核酸之分子的代表性實例。

術語"寡核苷酸"係指由天然存在的鹼基、糖及交互糖(主鏈)鍵組成的核苷酸之寡聚物或聚合物或核苷單體。該術語亦包括經改質或取代的寡聚物，包含功能相似的非天然存在的單體或其部分。經取代的寡聚物之併入係基於包括增強的細胞攝取或增加的核酸酶抗性在內之多個因子，且

其選擇為此項技術所知。完整的寡核苷酸或僅其部分可含有經取代的寡聚物。

術語"百分比等同性"係指兩個胺基酸序列之間或兩個核苷酸序列之間的序列等同性。等同性可藉由比較基於比較之目的而比對的每一序列中之位置來各自確定。當所比較的序列中之相等位置由相同的鹼基或胺基酸佔據時，則該等分子在彼位置上等同；當該相等位置由相同或相似胺基酸殘基(例如，立體及/或電子性質相似)佔據時，則該等分子可認為在彼位置上類同(相似)。類同性、相似性或等同性之百分比表現係所比較之序列所共用的位置上之等同或相似胺基酸的數目之函數。可使用各種比對演算法及/或程式，包括 Hidden Markov 模型 (HMM)、FASTA 及 BLAST。HNIIM、FASTA及BLAST可藉由美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information)、美國國家醫學圖書館 (National Library of Medicine)、美國國家衛生研究院 (National Institutes of Health) (Bethesda, Md.)及歐洲生物資訊研究院 (European Bioinformatic Institute) EBI獲得。在一實施例中，藉由該等 GCG 程式確定具有 1 間隙重量 (gap weight) (例如，每一胺基酸間隙經稱重似乎其係單胺基酸或核苷酸) 之兩個序列之百分比等同性在該等兩個序列之間不匹配。其它比對技術描述於 **Methods in Enzymology** 第 266 卷：**Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis** (1996), Doolittle 編著，Academic Press, Inc., Harcourt Brace & Co.

分部，San Diego, California, USA。若需要，利用允許在序列中有間隙之比對程式來比對序列。Smith Waterman係一類允許序列比對中有間隙之演算法(參見(1997) **Meth. Mol. Biol.** 70:173-187)。使用 Needleman及 Wunsch比對方法之GAP程式亦可用以比對序列。包括HMM之使用在內的更多技術及演算法描述於牛津大學出版社所編的 **Sequence, Structure and Databanks: A Practical Approach** (2000)中，其包含在 Kluwer Academic 出版商所編的 **Bioinformatics: Databases and Systems** (1999)中。一替代搜索策略使用 MPSRCH軟體，該軟體係在 MASPAR電腦上運行。MPSRCH使用 Smith-Waterman演算法來在整體並行之電腦上計算序列。該途徑改良了獲得遠距離相關匹配之能力，且其尤其容許小間隙及核苷酸序列誤差。核酸編碼之胺基酸序列可用以搜索蛋白質及DNA資料庫。具有各序列之資料庫描述於上述 Doolittle 所編的 **Methods in Enzymology** 中。資料庫包括 Genbank、EMBL及日本DNA資料庫(DDBJ)。

關於雙鏈(duplex)之"完全匹配"意味組成雙鏈之多或寡核苷酸股彼此形成雙股結構以使得每一股中之每一核苷酸均經歷與另一股中之核苷酸的 Watson-Crick鹼基配對。該術語亦包含核苷類似物(諸如，脫氧肌苷核苷)與可採用的 2-胺基嘌呤鹼基及其類似物之配對。目標多核苷酸與寡核苷酸或多核苷酸之間的雙鏈中之不匹配意味該雙鏈中之一對核苷酸未能經歷 Watson-Crick鍵結。關於三鏈，該術語

意味該三鏈係由一完全匹配之雙鏈及一第三股組成，其中每一核苷酸均經歷與完全匹配的雙鏈之鹼基對之Hoogsteen或逆Hoogsteen締合。

術語"RNA干擾"、"RNAi"或"siRNA"均係指任何藉由將與相關基因(特別是相關基因之信使RNA，例如PDGF或VEGF)同源之一或多個雙股RNA引入目標細胞中來降低基因或基因產物之表現的方法。

多態變體亦可涵蓋"單核苷酸多態"(SNP)，其中多核苷酸序列藉由一鹼基而改變(例如，在PDGF或VEGF中之一鹼基變化)。SNP之存在可預示(例如)特定人群、疾病狀態或疾病狀態之傾向。

異常"概況"，例如腫瘤細胞的生物狀態係指響應疾病狀態而發生改變的各種細胞成份的含量。細胞成份包括RNA含量、蛋白質充足程度、或蛋白質活性等級。

本文中，術語"蛋白質"可與術語"肽"及"多肽"互換使用。術語"重組蛋白質"係指藉由重組DNA技術製成的本發明之蛋白質，其中通常將編碼經表現的蛋白質或RNA之DNA插入適當表現載體中，而該表現載體又用於轉換宿主細胞以產生異質蛋白質或RNA。此外，關於編碼重組蛋白質之重組基因之短語"衍生自"意味包括在"重組蛋白質"含義內彼等具有天然蛋白質之胺基酸序列、或其相似的藉由天然存在之蛋白質之突變(包括取代及刪除)所產生的胺基酸序列之蛋白質。

本文使用之術語"轉基因"意味已引入細胞中之核酸序列

(例如，編碼一目標核酸或轉錄至其之反義轉錄產物)。轉基因可部分或整體地與其所引入之轉基因動物或細胞異質，即相異(foreign)，或者其可與其所引入之轉基因動物或細胞之內源基因同源，但以改變其所插入的細胞之基因組之方式將其設計為插入或將其插入該動物之基因組中(例如，將其插入在與天然基因之位置不同的位置上，或其插入導致剔除)。轉基因亦可以游離體形式存在於細胞中。轉基因可包括一或多個轉錄調控序列及選定核酸之最佳表現所必需的任何其它核酸，諸如內含子。

"新血管形成失調"意味除伴隨致癌或腫瘤轉換之病症(即癌症)外具有改變或未經調控的血管生成之特徵的失調。新血管形成失調之實例包括牛皮癬、類風濕性關節炎及包括糖尿病視網膜病變及年齡相關之黃斑退化在內之眼睛新血管形成失調。

本文所使用之術語"新血管形成"及"血管生成"可互換使用。新血管形成及血管生成係指細胞、組織或器官中之新血管產生。血管生成之控制通常在某些疾病狀態中發生改變，且在許多情況下，與該疾病相關之病態損害與發生改變、未經調控或不受控制的血管生成有關。持久的未經調控的血管生成以多種疾病狀態發生，包括彼等特徵為內皮細胞之異常生長之疾病狀態，且其支持在該等病症中所見的病態損害，包括血管滲漏及滲透。

"眼睛新血管形成失調"意味特徵為在患者眼部發生改變或未經調控的血管生成之失調。示範性眼睛新血管形成失

調包括：視神經盤新血管形成、虹膜新血管形成、視網膜新血管形成、脈絡膜新血管形成、角膜新血管形成、玻璃體新血管形成、青光眼、角膜翳、翼狀胬肉眼、黃斑水腫、糖尿病視網膜病變、糖尿病黃斑水腫、血管視網膜病變、視網膜退化、葡萄膜炎、視網膜炎性疾病、及增生性玻璃體視網膜病變。

術語"治療"受測者之新血管疾病或"治療"患有新血管疾病之受測者係指使該受測者經受醫藥治療，例如投予藥物，以降低該新血管疾病之至少一症狀。因此，本文所使用之術語"治療"意欲涵蓋治癒以及改善新血管病症或疾病之至少一症狀。因此，本文所使用之"治療"包括投予用於治療或預防眼睛新血管形成失調之醫藥組合物或開出(prescribe)該醫藥組合物之藥方。

"患者"意味著任何動物。術語"動物"包括哺乳動物，包括(但不限於)人類及其它靈長類動物。該術語亦包括家養動物，諸如牛、豬、羊、馬、狗及貓。

"PDGF"或"血小板衍生生長因子"意味影響血管生成或血管生成過程之哺乳動物的血小板衍生生長因子。本文所使用之術語"PDGF"包括PDGF之各種亞類PDGF，包括PDGF-B(參見圖1(A)及(B))，及PDGF-A(參見圖1(C)及(D))。進一步而言，本文所使用之術語"PDGF"係指PDGF相關的血管生成因子，諸如PDGF-C及PDGF-D，其藉由同族PDGF受體起作用來刺激血管生成或血管生成過程。特定言之，術語"PDGF"意味具有如下作用的該類生長因子

的任何組員：(i)結合至PDGF受體，諸如PDGFR-B(參見圖3(A)及(B))、或PDGFR-A(參見圖3(C)及(D))；(ii)活化與VEGF受體相關之酪胺酸激酶活性；以及(iii)由此影響血管生成或血管生成過程。本文所使用之術語"PDGF"通常係指彼等藉由響應細胞類型上之血小板衍生長因子細胞表面受體(即，PDGFR)的結合及活化來誘導DNA合成及有絲分裂之該類生長因子組員。PDGF實現了特定的生物效應，例如包括：定向細胞遷移(趨化性)及細胞活化；磷脂酶活化；增加的磷脂醯肌醇轉變及前列腺素代謝；藉由響應細胞來刺激膠原及膠原酶合成；細胞代謝活性之改變，包括母質合成、細胞激素產生及脂蛋白攝取；缺少PDGF受體之細胞的增生性響應之間接感應；及有效的血管收縮劑活性。術語"PDGF"意味包括"PDGF"多肽及其相應的"PDGF"編碼基因或核酸。

"PDGF-A"意味PDGF之A鏈多肽及其相應的編碼基因或核酸。

"PDGF-B"意味PDGF之B鏈多肽及其相應的編碼基因或核酸。

"VEGF"或"血管內皮生長因子"意味影響血管生成或血管生成過程之哺乳動物的血管內皮生長因子。本文所使用之術語"VEGF"包括藉由(例如)VEGF-A/VPF基因之替代性性拼接所產生的各種亞型VEGF(亦稱為血管滲透因子(VPF)及VEGF-A)(參見圖2(A)及(B))，包括VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅及VEGF₁₈₉。進一步而言，本文所使用之術語"VEGF"係指

VEGF相關的血管生成因子，諸如PIGF(胎盤生長因子)、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D及VEGF-E，其藉由同族VEGF受體起作用以刺激血管生成或血管生成過程。特定言之，術語"VEGF"意味具有下列作用之該類生長因子的任何組員：(i)結合至VEGF受體，諸如VEGFR-1(Flt-1)(參見圖4(A)及(B))、VEGFR-2(KDR/Flk-1)(參見圖4(C)及(D))、或VEGFR-3(FLT-4)；(ii)活化與VEGF受體相關之酪胺酸激酶活性；及(iii)由此影響血管生成或血管生成過程。術語"VEGF"意味包括"VEGF"多肽及其相應的"VEGF"編碼基因或核酸。

"PDGF拮抗劑"意味部分或完全降低或抑制PDGF之活性或產生之藥劑。PDGF拮抗劑可直接或間接降低或抑制特定PDGF，諸如PDGF-B。此外，符合"拮抗劑"之上述定義之"PDGF拮抗劑"可包括對PDGF配位體或其同族受體起作用以降低或抑制PDGF相關受體訊號之藥劑。因此，該等"PDGF拮抗劑"之實例包括(例如)：以PDGF核酸為目標之反義、核糖酶或RNAi組合物；防止PDGF結合至其同族受體之抗-PDGF適體、抗-PDGF抗體或可溶PDGF受體誘餌；以同族PDGF受體(PDGFR)核酸為目標之反義、核糖酶或RNAi組合物；結合至同族PDGFR受體之抗-PDGFR適體或抗-PDGFR抗體；及PDGFR酪胺酸激酶抑制劑。

"VEGF拮抗劑"意味部分或完全降低或抑制VEGF之活性或產生的藥劑。VEGF拮抗劑可直接或間接降低或抑制特定VEGF，諸如VEGF₁₆₅。此外，符合"拮抗劑"之上述定義

的"VEGF拮抗劑"可包括在VEGF配位體或其同族受體上起作用以降低或抑制VEGF相關受體訊號之藥劑。因此，該等"VEGF拮抗劑"之實例包括(例如)：以VEGF核酸為目標之反義、核糖酶或RNAi組合物；防止VEGF結合至其同族受體之抗-VEGF適體、抗-VEGF抗體或可溶VEGF受體誘餌；以同族VEGF受體(VEGFR)核酸為目標之反義、核糖酶或RNAi組合物；結合至同族VEGFR受體之抗-VEGFR適體或抗-VEGFR抗體；及VEGFR酪胺酸激酶抑制劑。

"足以壓製新血管形成失調之量"意味在本發明之組合中治療或預防新血管形成失調或其症狀所需的拮抗劑之有效量。用於實踐本發明以治療性處理藉由新血管形成失調所引起或促進新血管形成失調的病症之活性拮抗劑的"有效量"視投予方式、新血管形成失調之解剖位置、患者的年齡、體重及總的健康狀態而變化。最終，醫生或獸醫將決定適當量及劑量服法。該量稱為足以壓製新血管形成失調之量。

自以下詳細描述及申請專利範圍將明瞭本發明之其它特徵及優勢。

多肽X之"變體"係指具有在一或多個胺基酸殘基上發生改變的肽X之胺基酸序列的多肽。該變體可具有"守恆"改變，其中經取代的胺基酸具有相似結構或化學特性(例如，以異白胺酸置換白胺酸)。更少見地，變體可具有"非守恆"改變(例如，以色胺酸置換甘胺酸)。類似的較小變化亦可包括胺基酸刪除或插入或兩者。使用此項技術中所熟

知的電腦程式，例如 LASERGENE 軟體 (DNASTAR)，可找到判定哪些胺基酸殘基可經取代、插入或刪除而不會消除生物或免疫活性之指導。

術語 "變體" 在針對多核苷酸序列使用時可涵蓋與基因之多核苷酸序列或其編碼序列相關的多核苷酸序列。該定義亦可包括 (例如) "等位"、"拼接"、"種" 或 "多態" 變體。拼接變體可與參考分子具有明顯的等同性，但在 mRNA 處理期間，由於外顯子之替代性拼接，所以其通常會具有更多或更少數目的多核苷酸。相應的多肽可佔有另外的功能域或缺少域。種變體係種與種之間變化的多核苷酸序列。所得多肽相對於彼此通常會具有明顯的胺基酸等同性。多態變體係既定種之個體間的特定基因之多核苷酸序列變體。

術語 "載體" 係指能夠轉運其已連接之另一核酸之核酸分子。一類有用載體係游離體，即能夠染色體外複製之核酸。有用載體係彼等能夠自主複製及 / 或表現其所連接之核酸之載體。本文將能夠引導其可操作性地連接之基因的表現之載體稱為 "表現載體"。一般而言，用於重組 DNA 技術之表現載體常為 "質體" 形式，其一般係指作為其載體形式時未鍵結至染色體之圓形雙股 DNA 環。在本說明書中，由於質體係最常用的載體形式，所以 "質體" 與 "載體" 可互換使用。然而，本發明意欲包括此等其它形式的表現載體，其提供等效功能並隨後成為此項技術所知。

組合療法

本發明部分地基於使用適當的生長因子拮抗劑來特定抑

制 VEGF 及 PDGF 活性以作為對患有新血管形成失調的患者之有效治療。PDGF 拮抗劑與 VEGF 拮抗劑之組合投予提供了多於單獨投予任一拮抗劑之治療眼睛新血管形成失調之治療益處。不曾預料抗-VEGF 及抗-PDGF 藥劑之組合作用，因為研究證明在刺激視網膜內皮細胞系統中之血管生成方面兩因子之間並無明顯的協同作用(參見 Castellon 等人(2001) *Exp. Eye Res.* 74:523-35)。

PDGF 及 VEGF 對於遍佈身體(尤其在眼部)的新血管之生長而言係重要刺激物。針對抑制 PDGF 及 VEGF 生物活性之組合療法提供了一種用於治療或預防新血管形成失調之方法。

因此，本發明係關於使用組合療法來壓製新血管形成失調之方法及組合物。特定言之，本發明利用在血管細胞中操作之兩個不同的細胞間通信訊號路徑(即，PDGF 及 VEGF 訊號)作為治療新血管形成失調(諸如眼睛新血管形成失調)之治療目標。該組合方法尤其可用於治療任何數目的以眼睛新血管形成之發展為特徵的眼炎(ophthamalogical)疾病及失調，包括(但不限於)視神經盤新血管形成、虹膜新血管形成、視網膜新血管形成、脈絡膜新血管形成、角膜新血管形成、玻璃體新血管形成、青光眼、角膜翳、翼狀胬肉眼、黃斑水腫、糖尿病黃斑水腫、血管視網膜病變、視網膜退化、葡萄膜炎、視網膜炎性疾病及增生性玻璃體視網膜病變。該組合療法係由抑制 PDGF(諸如，PDGF-B)及 VEGF(諸如，VEGF-A)訊號之拮

抗劑組成，其與獨立使用的兩種療法中之任一療法相比導致了增加的治療效力。雖然下文所討論之實例描述了單一PDGF拮抗劑及單一VEGF拮抗劑之組合，但應瞭解可能需要多種拮抗型藥劑之組合。

根據本發明之抗-PDGF及抗-VEGF組合療法可單獨執行或與另一療法結合執行，並可在家、醫務室、診所、醫院門診部或醫院提供。治療通常在醫院開始以便醫生可密切觀察治療效果並作出所需調整。組合療法之持續時間取決於所治療的新血管形成失調之類型、患者之年齡及狀態、患者之疾病的階段及類型以及患者對該治療之響應。另外，具有更大的發展新血管形成失調之危險的人(例如，糖尿病患者)可接受抑制或延遲症狀發作之治療。本發明所提供的一明顯優勢係用於治療新血管形成失調的PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑之組合允許投予較小劑量之每一拮抗劑及更少的總活性拮抗劑，藉此以更小的毒性及副作用以及降低的費用來提供相似效力。

可獨立控制該組合的每一組份之投予劑量及頻率。例如，一拮抗劑可每天投予三次，而第二拮抗劑可每天投予一次。可採用包括休息期之斷斷續續的週期來給予組合療法以使得患者之身體有機會自任何尚無法預見的副作用恢復。拮抗劑亦可一起調配以便一次投予傳遞兩種拮抗劑。

PDGF及VEGF拮抗劑目標

PDGF最初係單離自血小板溶離產物，且其識別為存在於血清而非血漿中的主要生長促進活性因子。PDGF之促

有絲分裂活性首先表現為在結締組織細胞(諸如成纖維細胞及平滑肌細胞)上以及在培養中的神經膠質細胞中起作用。已識別兩種同源PDGF異型，PDGF A及B，其藉由獨立基因編碼(在染色體7及22上)。儘管所有三種可能的二聚物(AA、AB及BB)均天然存在，但來血小板之最豐富的種類係AB異質二聚物。轉譯之後，將PDGF二聚物處理為近似30 kDa分泌性蛋白質。

已識別結合具有高親合力的PDGF之兩種細胞表面蛋白質， α 及 β 。(Heldin等人(1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 78:3664；Williams等人(1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79:5867)。兩物種均含有五個免疫球蛋白類胞外域、單個橫跨膜域及一由激酶插入域分開的胞內酪胺酸激酶域。在最近若干年，已闡明了三種受體二聚物(α/α 、 α/β 、及 β/β)之三種PDGF異型的特異性。 α -受體同型二聚物結合所有三種具有高親合力的PDGF異型， β -受體同型二聚物僅結合具有高親合力的PDGF BB及具有約10倍低的親合力的PDGF AB，且 α/β -受體異質二聚物結合具有高親合力的PDGF BB及PDGF AB (Westermarck & Heldin (1993) *Acta Oncologica* 32:101)。特異性模式似乎是由A-鏈僅結合至 α -受體及B-鏈結合至具有高親合力的 α 及 β -受體亞單元之能力產生。

一般而言，本發明提供了抑制一或多種PDGF活性之藥劑。該等PDGF-抑制藥劑或PDGF拮抗劑可對一或多種形式之PDGF配位體作用。血小板衍生生長因子包括A-鏈

(PDGF-A)及B-鏈(PDGF-B)之同型或異質二聚物，其經由結合至兩種相關的受體酪胺酸激酶[α]-受體(PDGFR-[α])及[β]-受體(PDGFR-[β])並使其二聚而發揮其作用。另外，已識別PDGF-C及PDGF-D，其為PDGFR錯合物之兩種新穎蛋白酶活化配位體(參見Li等人(2000) *Nat. cell. Biol.* 2:302-9；Bergsten等人(2001) *Nat. Cell. Biol.* 3:512-6；及Uutele等人(2001) *Circulation* 103: 2242-47)。由於結合PDGFR之特異性之不同配位體，所以瞭解PDGFR-[α][α]結合PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB及PDGF-CC；PDGFR-[β][β]結合PDGF-BB及PDGF-DD；而PDGFR-[α][β]結合PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC及PDGF-DD(參見Betsholtz等人(2001)*BioEssays* 23:494-507)。

VEGF係分泌性二硫化物連接的同型二聚物，其選擇性地刺激內皮細胞以增生、遷移及產生母質降解酶(Conn等人(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87:1323-1327)；Ferrara及Henzel (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161: 851-858)；Pepper等人(1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 902-906；Unemori等人(1992) *J. Cell. Physiol.* 153: 557-562)，所有該等過程均係形成新血管所需的過程。由於VEGF基因之替代性拼接，所以VEGF存在四種形式(VEGF-121、VEGF-165、VEGF-189、VEGF-206)(Houck等人(1991) *Mol. Endocrinol.* 5:1806-1814；Tischer等人(1991) *J. Biol. Chem.* 266:11947-11954)。兩種較小形式可擴散，而較大的兩種形式因其對肝素之高親合力而仍

主要侷限於細胞膜。VEGF-165亦結合至肝素，且其為最豐富的形式。VEGF-121係唯一的不結合至肝素之形式，其似乎具有對VEGF受體之較低的親合力(Gitay-Goren等人(1996) **J. Biol. Chem.** 271:5519-5523)及較低的促有絲分裂效力(Keyt等人(1996) **J. Biol. Chem.** 271:7788-7795)。VEGF之生物效應藉由兩種表現受到內皮源之細胞的高度限制之酪胺酸激酶受體(Flt-1及Flk-1/KDR)調節(de Vries等人(1992) **Science** 255:989-991；Millauer等人(1993) **Cell** 72:835-846；Terman等人(1991) **Oncogene** 6:519-524)。雖然對高親合力結合而言需要表現兩種功能受體，但內皮細胞中之趨化性及促有絲分裂訊號似乎主要藉由KDR受體產生(Park等人(1994) **J. Biol. Chem.** 269:25646-25654；Seetharam等人(1995) **Oncogene** 10:135-147；Waltenberger等人(1994) **J. Biol. Chem.** 269:88-26995)。最近已在缺少VEGF基因之單個等位基因(Carmeliet等人(1996) **Nature** 380:435-439；Ferrara等人(1996) **Nature** 380:439-442)或者缺少Flt-1(Fong等人(1995) **Nature** 376:66-70)或Flk-1基因(Shalaby等人(1995) **Nature** 376:62-66)之兩個等位基因的小鼠中論證了VEGF及VEGF受體對血管發展之重要性。在每一情況下，均觀察到導致胚胎致死的血管形成之明顯異常性。

現已知藉由組織低氧所誘導的補償性血管生成係藉由VEGF來調節(Levy等人(1996) **J. Biol. Chem.** 271:2746-2753)；Shweiki等人(1992) **Nature** 359:843-845)。對人類的研究已

顯示高濃度 VEGF 存在於血管生成視網膜失調之玻璃體中而非惰性或新血管形成疾病狀態中。在實驗性摘除手術後所切離的人類脈絡膜組織亦顯示出高 VEGF 含量。

除了是唯一已知的內皮細胞特定促細胞分裂素外，VEGF 亦因其誘導血管滲透大分子之滲透性瞬時增加的能力而成為血管生成生長因子中的獨特因子(因此其最初及替代名稱為血管滲透因子 VPF)(參見 Dvorak 等人(1979) *J. Immunol.* 122:166-174; Senger (1983) *Science* 219: 983-985; Senger 等人(1986) *Cancer Res.* 46: 5629-5632)。增加的血管滲透性及所導致的血漿蛋白質在血管外空間的沈積藉由向內皮細胞遷移提供臨時母質而輔助新血管形成(Dvorak 等人(1995) *Am. J. Pathol.* 146: 1029-1039)。高滲透性實際上係新血管(包括彼等與腫瘤相關之血管)之特有特徵。

PDGF 及 VEGF 拮抗劑

總則

本發明提供在新血管形成失調之組合療法中一起使用的 PDGF 及 VEGF 拮抗劑(即，抑制劑)。此項技術中已知特定 PDGF 拮抗劑及 VEGF 拮抗劑，且以下段落將對其進行簡要描述。熟練技術人員現在可獲得或已經可獲得之其它 PDGF 拮抗劑及 VEGF 拮抗劑包括可使用此項技術中常用的實踐結合本說明書(包括進一步提供的出現在下文中的段落)之教示及指導來識別及製造的抗體、適體、反義寡聚物、核糖酶及 RNAi 組合物。

PDGF拮抗劑

一般而言，PDGF(例如，PDGF-B)之抑制可以多種方式來實現。例如，抑制PDGF之活性或產生之多種PDGF拮抗劑可獲得且可用於本發明之方法。示範性PDGF拮抗劑包括PDGF之核酸配位體或適體，例如彼等以下所述之物質。或者，PDGF拮抗劑可為(例如)抗-PDGF抗體或抗體片斷。因此，藉由抑制PDGF分子結合至受體來使該PDGF分子呈惰性。另外，在核酸含量下抑制PDGF表現之核酸分子(諸如，反義RNA、核糖酶及RNAi分子)可用作本發明中之拮抗劑。其它PDGF拮抗劑包括肽、蛋白質、環肽或小型有機化合物。此外，PDGF之訊號活性可藉由破壞其下游訊號(例如，藉由使用大量小分子酪胺酸激酶抑制拮抗劑，包括彼等以下所描述之物質)而得以抑制。化合物或藥劑用作PDGF拮抗劑之能力可根據此項技術所知之方法來確定，此外，該等方法亦可如以下文獻所述：例如，Dai等人(2001) **Genes & Dev.** 15:1913-25；Zippel等人(1989) **Eur. J. Cell Biol.** 50(2):428-34；及Zwiller等人(1991) **Oncogene** 6:219-21。

本發明進一步包括此項技術中已知及下文支持的PDGF拮抗劑及在一般製造技術範圍內之任何所有等價物。例如，此項技術中已知針對PDGF之抑制抗體，例如彼等在美國專利第5,976,534號、第5,833,986號、第5,817,310號、第5,662,904號、第5,620,687號、第5,468,468號中所描述的物質，該等案之內容皆以全文引用的方式併入本文

中。另外，本發明包括作為PDGF拮抗劑之N-苯基-2-嘧啶-胺衍生物，諸如彼等在美國專利第5,521,184號中所揭示的物質，該案之全文以引用的方式併入本中。

此項技術中已知阻礙PDGF作用的小分子，例如彼等在如下美國專利中所描述的分子：第6,528,526號(PDGFR酪胺酸激酶抑制劑)、第6,524,347號(PDGFR酪胺酸激酶抑制劑)、第6,482,834號(PDGFR酪胺酸激酶抑制劑)、第6,472,391號(PDGFR酪胺酸激酶抑制劑)、第6,331,555號、第6,251,905號、第6,245,760號、第6,207,667號、第5,990,141號、第5,700,822號、第5,618,837號及第5,731,326號，該等案之全文以引用的方式併入本文中。

此項技術中已知阻礙PDGF作用的蛋白質及多肽，例如彼等在美國專利第6,350,731號(PDGF肽類似物)、第5,952,304號中所描述的物質，該等案之全文以引用的方式併入本文中。

此項技術中已知用於抑制PDGF之反義寡核苷酸，例如彼等在美國專利第5,869,462號及第5,821,234號中所描述的物質，該等案之全文以引用的方式併入本文中。

此項技術中已知用於抑制PDGF的適體(亦稱為核酸配位體)，例如彼等在(例如)美國專利第6,582,918號、第6,229,002號及第6,207,816號中所描述的物質，該等案之全文以引用的方式併入本文中。

VEGF拮抗劑

VEGF(例如，VEGF-A)之抑制可以多種方式來實現。例

如，抑制VEGF的活性或產生之多種VEGF拮抗劑包括核酸分子，諸如適體、反義RNA、核糖酶、RNAi分子及VEGF抗體，其可獲得且可用於本發明之方法中。示範性VEGF拮抗劑包括VEGF之核酸配位體或適體，例如彼等以下所述之物質。對VEGF-A特別有用的拮抗劑係EYE001(先前稱為NX1838)，其為以高及特定親合力結合至主要的可溶人類VEGF異型的經改質之聚乙二醇化適體(參見美國專利第6,011,020號；第6,051,698號；及第6,147,204號)。該適體以一相似於針對VEGF之高親合力抗體之方式結合及減活化VEGF。另一有用VEGF適體係非聚乙二醇化形式之EYE001。或者，VEGF拮抗劑可為(例如)抗-VEGF抗體或抗體片斷。因此，藉由抑制VEGF分子結合至受體而使該VEGF分子呈惰性。另外，在核酸含量下抑制VEGF表現或RNA穩定性之核酸分子(諸如反義RNA、核糖酶及RNAi分子)係本發明之方法及組合物中的有用拮抗劑。其它VEGF拮抗劑包括肽、蛋白質、環肽及小型有機化合物。例如，結合至VEGF受體而無伴隨訊號活性之可溶的截斷形式之VEGF亦可用作拮抗劑。此外，VEGF之訊號活性可藉由破壞其下游訊號(例如，藉由使用大量拮抗劑，包括VEGF受體酪胺酸激酶活性之小分子抑制劑)而得以抑制，如下文進一步所述。

化合物或藥劑用作VEGF拮抗劑之能力可根據此項技術中熟知的任何數目之標準方法來確定。例如，VEGF生物活性中的一種生物活性係藉由特定結合至血管內皮細胞上

的受體來增加血管滲透性。該交互作用導致緊張的內皮接合鬆弛並隨後出現血管流體滲漏。VEGF所誘導的血管滲漏可藉由跟隨由VEGF之皮內注射所引起的Evans Blue Dye自天竺鼠之脈管系統之滲漏來進行活體內量測(Dvorak等人 **Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor, Microvascular Hyperpermeability, and Angiogenesis**; 及(1995) *Am. J. Pathol.* 146:1029)。類似地，可使用該檢定來量測拮抗劑阻礙VEGF之該生物活性之能力。

在血管滲透性檢定之一有用實例中，活體外預混合VEGF₁₆₅(20-30 nM)與EYE001(30 nM至1 μ M)或候選VEGF拮抗劑，且隨後藉由皮內注射在天竺鼠背部上刮下的皮膚中來投予。注射三十分鐘後，根據標準方法藉由使用電腦化形態量測分析系統來量化在注射部位周圍的Evans Blue dye滲漏。抑制VEGF誘導的示蹤染料自脈管系統之滲漏的化合物被視為是本發明之方法及組合物中的有用拮抗劑。

用於判定一化合物是否是VEGF拮抗劑之另一檢定係所謂的角膜血管生成檢定。在該檢定中，將含有VEGF₁₆₅(3 pmol)之甲基丙烯酸酯聚合物丸粒植入大鼠的角膜基質中以誘導血管生長進入通常無血管之角膜中。然後，將候選VEGF拮抗劑每天一次或兩次以1 mg/kg、3 mg/kg及10 mg/kg之劑量靜脈內投予該等大鼠，共投予5天。在治療期結束時，對所有該等各個角膜顯微拍照。接著，藉由顯微照片之標準化形態量測分析來量化角膜組織中新血管發展

的程度及其因候選化合物所引起之抑制。與磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)之治療相比，抑制角膜中視VEGF而定之血管生成的化合物被視為是本發明之方法及組合物中的有用拮抗劑。

亦使用具有早熟視網膜病變之小鼠模型識別候選VEGF拮抗劑。在一有用的實例中，分別將幾窩(litter)9、8、8、7及7只小鼠留在室內空氣中或使其含高氧量，並用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)或候選VEGF拮抗劑(例如，每日1 mg/kg、3 mg/kg或10 mg/kg)進行腹膜內處理。接著，藉由顯微識別及計數來自所有經治療及對照小鼠之每個眼部的20個組織切片中的新血管芽來評定該檢定之端點，即穿過視網膜之內界膜進入玻璃體液中之新毛細管之生長物。相對於未經治療之對照組，在經治療之小鼠中的視網膜新脈管系統之減少被視為是識別了有用的VEGF拮抗劑。

在另一示範性篩選檢定中，使用活體內人類腫瘤異種移植植物檢定來識別候選VEGF拮抗劑。在該篩選檢定中，測試候選VEGF拮抗劑在植入於裸鼠中之人類腫瘤異種移植植物(A673橫紋肌肉瘤及Wilms腫瘤)中的活體內效力。接著，用候選VEGF拮抗劑(例如，在已形成的腫瘤(200 mg)發展後每天一次經腹膜內給予10 mg/kg)治療小鼠。以對照藥劑治療對照組。相對於對照組識別為抑制A673橫紋肌肉瘤腫瘤生長及Wilms腫瘤之候選化合物被視為是本發明之方法及組合物中之有用拮抗劑。

VEGF拮抗劑活性之額外的檢定方法在此項技術中已為

吾人所知，且在下文將對其進行進一步的詳細描述。

本發明進一步包括此項技術中已知及下文所支持的 VEGF 拮抗劑及在普通製造技術範圍內的任何所有等價物。例如，此項技術中已知針對 VEGF 之抑制抗體，例如彼等描述於美國專利第 6,524,583 號、第 6,451,764 號 (VRP 抗體)、第 6,448,077 號、第 6,416,758 號、第 6,403,088 號 (針對 VEGF-C)、第 6,383,484 號 (針對 VEGF-D)、第 6,342,221 號 (抗-VEGF 抗體)、第 6,342,219 號、第 6,331,301 號 (VEGF-B 抗體) 及第 5,730,977 號之物質，該等案之內容以全文引用的方式併入本文中。

此項技術中已知藉由 (例如) 抑制 VEGFR 相關之酪胺酸激酶活性來阻礙 VEGF 作用之小分子，例如彼等描述於以下美國專利中之物質：第 6,514,971 號、第 6,448,277 號、第 6,414,148 號、第 6,362,336 號、第 6,291,455 號、第 6,284,751 號、第 6,177,401 號、第 6,071,921 號及第 6,001,885 號 (VEGF 表現之類視色素抑制劑)，該等案之內容以全文引用的方式併入本文中。

此項技術中已知阻礙 VEGF 作用之蛋白質及多肽，例如彼等描述於以下美國專利中之物質：第 6,576,608 號、第 6,559,126 號、第 6,541,008 號、第 6,515,105 號、第 6,383,486 號 (VEGF 誘餌受體)、第 6,375,929 號 (VEGF 誘餌受體)、第 6,361,946 號 (VEFG 肽類似物抑制劑)、第 6,348,333 號 (VEGF 誘餌受體)、第 6,559,126 號 (結合 VEGF 及阻礙結合至 VEGFR 之多肽)、第 6,100,071 號 (VEGF 誘餌

受體)及第5,952,199號，該等案之內容以全文引用的方式併入本文中。

此項技術中已知用於抑制VEGF之反義寡核苷酸，例如彼等描述於(例如)美國專利第6,410,322號及第6,291,667號中之物質，該等案之內容以全文引用的方式併入本文中。

此項技術中已知用於抑制VEGF之適體(亦稱為核酸配位體)，例如彼等描述於(例如)美國專利第6,426,335號、第6,168,778號、第6,051,698號及第5,859,228號中之物質，該等案之內容以全文引用的方式併入本文中。

抗體拮抗劑

本發明包括針對PDGF及VEGF以及其同族受體PDGFR及VEGFR之拮抗劑抗體。本發明之抗體拮抗劑阻礙配位體與其同族受體結合。因此，本發明之PDGF拮抗劑抗體包括針對PDGF以及PDGFR目標之抗體。

本發明之拮抗劑抗體包括單株抑制抗體。單株抗體或其片斷涵蓋所有免疫球蛋白種類(諸如IgM、IgG、IgD、IgE、IgA)或其亞類(諸如IgG亞類)或其混合物。IgG及其亞類係有用的，諸如IgG₁、IgG₂、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃或IgG_M。包括IgG亞型IgG_{1/kappa}及IgG_{2b/kappa}以作為有用實施例。可提及的片斷係所有具有一或兩個抗原互補結合位置之經截去或改質的抗體片斷，其顯示較高的對哺乳動物PDGF或VEGF(或其同族受體)的結合及中和活性，諸如具有一對應於該抗體且藉由輕及重鏈形成之結合位置的抗體部分，諸如Fv、Fab或F(ab')₂片斷或單股片斷。所截去的

雙股片斷，諸如 Fv、Fab 或 F(ab')₂ 特別有用。該等片斷可藉由以下方式獲得：例如，藉由除去具有酶（諸如木瓜酶或胃蛋白酶）之抗體之 Fc 部分的酶手段，藉由化學氧化或藉由基因操縱抗體基因。使用基因操縱的非截去片斷亦可能且有利。可單獨或混合使用該等抗 PDGF 或 VEGF 抗體或其片斷。

該等新穎抗體、抗體片斷、其混合物或衍生物有利地具有在自 1×10^{-7} M 至 1×10^{-12} M、或自 1×10^{-8} M 至 1×10^{-11} M、或自 1×10^{-9} M 至 5×10^{-10} M 範圍內的對 PDGF 或 VEGF（或其同族受體）之結合親合力。

用於基因操縱之抗體基因可以熟練工作人員所知之方式自（例如）雜交瘤細胞單離獲得。基於該目的，培養抗體產生細胞，且當該等細胞之光密度足夠時，以一已知方式藉由以硫氰酸胍溶離、以乙酸鈉酸化、以苯酚、氯仿/異戊醇萃取、以異丙醇沈澱及以乙醇沖洗該等細胞自該等細胞單離 mRNA。接著，使用逆轉錄酶自該 mRNA 合成 cDNA。藉由（例如）定位突變、引入插入、反轉、刪除或鹼基交換，直接或在基因操縱後將所合成的 cDNA 插入適當動物、真菌、細菌或病毒載體中，並表現在適當宿主生物體中。有用的細菌或酵母載體係用於選殖基因及在細菌（諸如，大腸桿菌）或酵母（諸如，酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*)) 中表現的 pBR322、pUC18/19、pACYC184、 λ 或酵母 mu 載體。

此外，本發明係關於合成 PDGF 或 VEGF 抗體之細胞。其

包括在如上所述的轉換後之動物、真菌、細菌細胞或酵母細胞。其有利地係雜交瘤細胞或三瘤(trioma)細胞，通常為雜交瘤細胞。該等雜交瘤細胞可藉由(例如)以下步驟以一已知方式自經PDGF或VEGF(或其同族受體)免疫之動物產生：單離其抗體產生B細胞，為PDGF或VEGF結合抗體選擇該等細胞，及隨後將該等細胞融合至(例如)人類或動物(例如，小鼠)骨髓瘤細胞、人體類成淋巴細胞(lymphoblastoid)或異質雜交瘤細胞(例如，參見Koehler等人(1975) *Nature* 256: 496)或藉由以適當的病毒感染該等細胞以產生永生細胞株。藉由融合所產生的雜交瘤細胞株係有用的，且小鼠雜交瘤細胞株尤其有用。本發明之雜交瘤細胞株會分泌有用的IgG型抗體。本發明之mAb抗體之結合以高親合力結合且降低或中和PDGF或VEGF之生物(例如，血管生成)活性。

本發明進一步包括該等抗-PDGF或VEGF抗體之衍生物，其仍保持其PDGF或VEGF-抑制活性，同時改變一或多種與其作為醫藥藥劑之用途相關的其它特性，例如血清穩定性或產生效率。該等抗-PDGF或VEGF抗體衍生物之實例包括：肽；衍生自抗體之抗原結合區域之肽模擬劑；及結合至固態或液態載劑(諸如聚乙二醇、玻璃、合成聚合物(諸如聚丙稀鹽胺、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯)或天然聚合物(諸如纖維素、瓊脂糖凝膠(Sepharose)或瓊脂糖))之抗體、抗體片斷或肽；或與酶、毒素或放射性或非放射性標識物(諸如 ^3H 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、

^{51}Cr 、 ^{36}Cl 、 ^{57}Co 、 ^{55}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{75}Se)之共軛體；或共價鍵結至螢光/化學發光標記(諸如若丹明、螢光素、異硫氰酸鹽、藻紅蛋白、藻藍蛋白、螢光胺、金屬螯合物、抗生物素、抗生蛋白鏈菌素或生物素)之抗體、片斷或肽。

該等新穎抗體、抗體片斷、其混合物及衍生物可直接、在乾燥(例如，冷凍乾燥)後、在附著至上述載劑後或在與用於製造醫藥製劑之其它醫藥活性及輔助物質一起調配後使用。可提及的活性及輔助物質之實例係其它抗體、具有微生物或微生物靜力學作用之抗菌活性物質(諸如通常的抗生素或磺醯胺)、抗腫瘤藥劑、水、緩衝劑、鹽水、醇類、脂類、蠟、惰性媒劑或其它常用於非經腸產物之物質(諸如胺基酸)、增稠劑或糖。該等醫藥製劑係用以控制疾病，且有助於控制眼睛新血管形成失調及疾病，包括AMD及糖尿病視網膜病變。

該等新穎抗體、抗體片斷、其混合物或衍生物可直接或在偶合至如上文所述之固態或液態載劑、酶、毒素、放射性或非放射性標記或螢光/化學發光標記後用於治療或診斷。

本發明之人類PDGF或VEGF單株抗體可藉由此項技術中所知的任何手段來獲得。例如，以人類PDGF或VEGF(或其同族受體)來免疫哺乳動物。純化人類PDGF及VEGF可購得(例如，自Cell Sciences, Norwood, MA以及其它商業賣主購得)。或者，可自人類胎盤組織容易地純化獲得人

類PDGF或VEGF(或其同族受體)。用於提昇抗-人類PDGF或VEGF抗體之哺乳動物不受限制，且可為靈長類動物、齧齒動物(諸如，小鼠、大鼠或兔子)、牛、綿羊、山羊或狗。

接著，自經免疫的動物取出抗體產生細胞，諸如脾細胞，且將其與骨髓瘤細胞融合。骨髓瘤細胞在此項技術中已熟知(例如，可使用p3x63-Ag8-653、NS-0、NS-1或P3U1細胞)。細胞融合操作可藉由此項技術中所知的任何習知方法來執行。

在經受細胞融合操作後，接著在HAT選擇培養基中培養細胞以選擇雜交瘤。接著，篩選產生抗人類單株抗體之雜交瘤。該篩選可藉由(例如)夾心酶連接免疫吸附檢定(ELISA)或類似方法來進行，其中所產生的單株抗體結合至固定人類PDGF或VEGF(或其同族受體)的孔。在該情況下，可採用對經免疫之動物的免疫球蛋白具有特效之抗體作為二級抗體，該抗體以酶作標記，諸如過氧化物酶、鹼性磷酸酶、葡糖氧化酶、 β -D-半乳糖苷酶及其類似物。該標記可藉由使標記酶與其基質反應並量測所產生的顏色來偵測。作為基質，可產生3,3'-二胺基聯苯胺、2,2'-二胺基雙-鄰-聯茴香胺、4-氯萘酚、4-胺基安替比林、鄰-苯二胺或其類似物。

藉由上述操作，可選擇產生抗-人類PDGF或VEGF抗體之雜交瘤。接著，藉由習知限制稀釋方法或軟瓊脂方法來選殖所選擇的雜交瘤。若需要，可使用含有血清或不含血

清之培養基來大規模培養所選殖的雜交瘤，或可將其接種至小鼠之腹腔內，並自腹水回收，藉此可獲得大量選殖的雜交瘤。

接著，自所選擇的抗-人類 PDGF 或 VEGF 單株抗體中，選擇彼等具有防止相應配位體/受體對結合及活化之能力之抗體(例如，在基於細胞之 PDGF 或 VEGF 檢定系統(見上文)中)，以用於進一步分析及操縱。若該抗體阻礙受體/配位體結合及/或活化，則其意味所測試的單株抗體具有降低或中和人類 PDGF 或 VEGF 之 PDGF 或 VEGF 活性之能力。即，該單株抗體特定地辨別及/或干擾人類 PDGF 或 VEGF(或其同族受體)之關鍵結合位置。

本文中，單株抗體進一步包括：藉由將抗 PDGF 或 VEGF 抗體之可變(包括超可變)域與恆定域(例如，"人源化"抗體)、或將輕鏈與重鏈、或將來自一物種的鏈與來自另一物種的鏈拼接在一起所產生的雜交及重組抗體；或與異質蛋白質之融合體，而不管原始物種或免疫球蛋白種類或亞類編號；以及抗體片斷[例如，Fab、F(ab)₂及 Fv]，只要其展示所要生物活性。[例如，參見美國專利第 4,816,567 號及 Mage & Lamoyi 的 **Monoclonal Antibody Production Techniques and Application**, pp.79-97(Marcel Dekker, Inc.),紐約(1987)]。

因此，術語"單株"表示所獲得之抗體之特徵係來自大體上同源的抗體群，且不應將其視為需要藉由任何特殊方法產生抗體。例如，待根據本發明使用的單株抗體可藉由

Kohler & Milstein, *Nature* 256:495(1975)首次描述的雜交瘤方法來製備，或可藉由重組DNA方法來製備(美國專利第4,816,567號)。“單株抗體”亦可(例如)自使用McCafferty等人*Nature* 348:552-554(1990)中所描述的技術所產生的噬菌體庫中單離。

“人源化”形式之非人類(例如，鼠科動物)抗體係特定嵌合(chimeric)免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其片斷(諸如Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂或抗體之其它抗原結合子序列)，其含有衍生自非人類免疫球蛋白之最小序列。在極大程度上，人源化抗體係人類免疫球蛋白(接受抗體)，其中來自該接受抗體之互補決定區域(CDR)的殘基由來自具有所要特異性、親合力及能力之非人類物種(供體抗體)(諸如小鼠、大鼠或兔子)之CDR之殘基取代。在某些情況下，人類免疫球蛋白之Fv框架區域(FR)殘基由相應的非人類FR殘基取代。此外，人源化抗體可包含未在接受抗體或所導入的CDR或FR序列中發現的殘基。做出該等修改以進一步改進及優化抗體效能。一般而言，人源化抗體將包含實質上所有的至少一個且通常兩個可變域，其中所有或大體上所有的CDR區域對應於非人類免疫球蛋白之CDR區域，且所有或大體上所有的FR殘基係人類免疫球蛋白一致序列之FR殘基。人源化抗體最佳亦包含免疫球蛋白恆定區域(Fc)(通常係人類免疫球蛋白之免疫球蛋白恆定區域(Fc))之至少一部分。

用於人源化非人類抗體之方法在此項技術中已為吾人所

知。一般而言，人源化抗體具有自非人類源引入的一或多個胺基酸殘基。該等非人類胺基酸殘基通常稱為"導入"殘基，其通常取自"導入"可變域。人源化可基本上按照 Winter及合作者之方法(Jones等人(1986) *Nature* 321:522-525；Riechmann等人(1988) *Nature* 332:323-327；及 Verhoeyen等人(1988) *Science* 239:1534-1536)藉由用齧齒動物 CDR或 CDR序列取代人類抗體之相應序列而得以執行。因此，該等"人源化"抗體係嵌合抗體，其中大體上小於完整人類可變域經來自非人類物種之相應序列取代。實際上，人源化抗體通常係人類抗體，其中某些 CDR殘基及可能某些 FR殘基經來自齧齒動物抗體中之類似位置的殘基取代。

待用於製備人源化抗體的人類可變域(輕及重)之選擇對降低抗原性非常重要。根據所謂的"最佳擬合"方法，相對於完整的已知人類可變域序列庫篩選齧齒動物抗體之可變域的序列。接著，接受最接近該齧齒動物之序列的人類序列作為人源化抗體之人類框架(FR)(Sims等人(1993) *J. Immunol.*, 151:2296；及 Chothia及 Lesk(1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901)。另一方法使用自特殊子群的輕或重鏈之所有人類抗體的一致序列衍生之特殊框架。相同框架可用於若干不同的人源化抗體(Carter等人(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 89:4285；及 Presta等人(1993) *J. Immunol.*, 151:2623)。

此外，抗體經人源化保留抗原之高親合力及其它有利生

物特性亦重要。為了達成該目標，根據一有用方法，藉由一種使用親本及人源化序列之三維模型來分析親本序列及各種概念人源化產物之方法來製備人源化抗體。通常可利用三維免疫球蛋白模型，且熟悉此項技術者熟悉該等模型。可利用電腦程式，其例示及顯示所選的候選免疫球蛋白序列之可能的三維構型結構。該等顯示之檢測允許分析殘基在候選免疫球蛋白序列之功能中之可能的作用，即分析影響候選免疫球蛋白結合其抗原的能力之殘基。以此方式，可自一致及導入序列選擇及組合FR殘基以達成所要抗體特徵，諸如對目標抗原之增加的親合力。一般而言，CDR殘基直接且最實質上涉及影響抗原結合。

針對PDGF或VEGF之人類單株抗體亦包括在本發明中。該等抗體可藉由雜交瘤方法來製備。用於製造人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類雜骨髓瘤細胞株已在諸如下列之文獻中有描述：Kozbor(1984) *J. Immunol.*, 133, 3001；Brodeur等人 *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., 紐約，1987)；及Boerner等人(1991) *J. Immunol.*, 147: 86-95。

現在有可能製造能夠在免疫後於缺少內源性免疫球蛋白產物的情況下產生一整套人類抗體的轉基因動物(例如，小鼠)。例如，已描述了在嵌合及種系突變小鼠中純合地刪除抗體重鏈接合區域(J_H)基因會導致完全抑制內源抗體產物。在該等種系突變小鼠中人類種系免疫球蛋白基因陣

列之轉移將導致一經抗原挑釁(challenge)即產生人類抗體(例如, 參見Jakobovits等人(1993) **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, 90:2551 ; Jakobovits等人(1993) **Nature**, 362:255-258 ; 及 Bruggermann等人(1993) **Year in Immuno.**, 7:33)。

或者, 可使用噬菌體顯示技術(McCafferty等人(1990) **Nature**, 348:552-553)自來自未經免疫的供體之免疫球蛋白可變(V)域基因目錄(repertoire)活體外產生人類抗體及抗體片斷(例如, 參見Johnson等人(1993) **Current Opinion in Structural Biology**, 3:564-571)。V-基因區段區段之若干源可用於噬菌體顯示。例如, Clackson等人((1991) **Nature**, 352:624-628)自衍生自經免疫的小鼠的脾之小隨機組合V基因庫單離了抗噁唑酮抗體之多樣陣列。可建構一套來自未經免疫的人類供體之V基因, 且基本上可按照Marks等人((1991) **J. Mol. Biol.**, 222:581-597或Griffith等人(1993) **EMBO J.**, 12:725-734)所描述的技術來單離多樣陣列抗原(包括, 自體抗原)的抗體。

在自然免疫響應中, 抗體基因以一高速率積聚突變(體細胞超突變)。所引入的某些改變將具有更高親合力, 且顯示高親合力表面免疫球蛋白之B細胞在隨後的抗原挑釁期間優先得以複製及分化。該自然過程可藉由採用稱為"鏈改組"之技術來模擬(參見Marks等人(1992) **Bio. Technol.**, 10:779-783)。在該方法中, 藉由噬菌體顯示所獲得的"初級"人類抗體之親合力可藉由以自未經免疫的供

體獲得的V域基因之天然存在的變體(目錄)之目錄來接續替換重及輕鏈V區域基因而得以改良。該技術允許製造具有在nM範圍內的親和力的抗體及抗體片斷。Waterhouse等人((1993) *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266)已描述了用於製備很大噬菌體抗體目錄之策略。

基因改組亦可用於自齧齒動物抗體衍生人類抗體，其中該人類抗體具有相似於起始齧齒動物抗體之親合力及特異性。該方法亦稱為"抗原決定部位印刻"，根據該方法，用一套人類V域基因來替換藉由噬菌體顯示技術獲得的齧齒動物抗體之重或輕鏈V域基因，從而產生齧齒動物-人類嵌合體。抗原之選擇導致能夠恢復功能抗原結合位置(即，抗原決定部位支配(印刻)夥伴之選擇)的人類變體之單離。當重複該過程以替換剩餘的齧齒動物V域時，獲得人類抗體(參見1993年4月1日公開的PCT WO 93/06213)。不同於藉由CDR接種的齧齒動物抗體之傳統人源化，該技術完全提供了人類抗體，其不具有齧齒動物源之框架或CDR殘基。

適體拮抗劑

本發明提供針對PDGF及/或VEGF(或其同族受體)之適體拮抗劑。適體亦稱為核酸配位體，其係結合至且一般而言對抗(即，抑制)預選目標之非天然存在的核酸。

適體可藉由任何已知的製造寡聚物或寡核苷酸之方法來製備。許多合成方法係在此項技術中已知。例如，含有殘留嘌呤核糖核苷酸且帶有合適的3'-末端(諸如，反胸腺嘧

啉核苷殘基)(Ortigao 等人 *Antisense Research and Development*, 2:129-146(1992))或在3'-末端上帶有兩個硫逐磷酸酯鍵用以防止藉由3'-核酸外切酶之可能降解的2'-O-烯丙基改質的寡聚物可藉由固相醯胺基亞磷酸 β -氰乙基酯化學處理(Sinha 等人 *Nucleic Acids Res.*, 12:4539-4557(1984))在任何市售DNA/RNA合成器上來合成。一方法係用於核糖核苷酸之2'-O-第三丁基二甲基甲矽烷基(TBDMS)保護策略(Usman 等人 *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845-7854 (1987)), 且所有所需的3'-O-醯胺基亞磷酸酯均可購得。另外, 胺甲基聚苯乙烯因其有利特性而可用作支撐材料(McCollum及Andrus(1991) *Tetrahedron Lett.*, 32:4069-4072)。在藉由使用市售螢光素醯胺基亞磷酸酯之合成過程中, 可將螢光素加至基質RNA之5'-端。一般而言, 適體寡聚物可使用標準RNA環來合成。在完成組合後, 藉由在密封瓶中於55°C下以濃氨水/乙醇(3:1 v/v)進行8小時處理來移除所有的鹼基不穩定保護基。乙醇壓製了2'-O-TBDMS基團之過早移除, 否則在鹼性去保護條件下其會導致所得核糖核苷酸位置上之明顯的股裂解(Usman等人(1987) *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845-7854)。在凍乾後, 於60°C下用三氫氟化三乙胺/三乙胺/N-甲基吡咯啉酮之混合物處理TBDMS保護之寡聚物歷時2小時, 以在中性條件下快速及有效的移除甲矽烷基保護基(參見Wincott等人(1995) *Nucleic Acids Res.*, 23:2677-2684)。接著, 可根據Cathala及Brunel((1990) *Nucleic Acids Res.*, 18:201)之程

序，以丁醇沈澱完全去保護的寡聚物。可藉由變性聚丙烯醯胺凝膠电泳法或藉由離子交換HPLC(Sproat等人(1995) **Nucleosides and Nucleotides**, 14:255-273)與反相HPLC之組合來執行純化。為用於細胞，藉由以在丙酮中的高氯酸鈉沈澱，將所合成的寡聚物轉化為其鈉鹽。接著，可使用市售的小型拋棄式凝膠過濾管柱來移除痕量殘餘鹽。作為最後一個步驟，可藉由母質輔助雷射解吸質譜法(Pieles等人(1993) **Nucleic Acids Res.**, 21:3191-3196)及藉由核苷鹼基組成分析來檢驗所單離的寡聚物之確實性。

當核苷酸亞單元可用於酶操縱時，所揭示的適體亦可藉由酶方法來產生。例如，RNA分子可藉由活體外RNA聚合酶T7反應來製備。其亦可由表現T7之細菌株或細胞株來製備且接著隨後自該等細胞單離。如下文所述，所揭示的適體亦可直接使用載體及啟動子表現在細胞中。

類似於本發明之其它核酸分子，適體可進一步含有經化學改質的核苷酸。在核酸之診斷或治療用途中一有待解決的問題係在所要效果明瞭前藉由胞內及胞外酶(諸如，核酸內切酶及核酸外切酶)所引起的體液中磷酸二酯形式之寡核苷酸之潛在的快速降解。可進行核酸配位體之某些化學改質以增加核酸配位體之活體內穩定性或者增強或調節核酸配位體之傳遞(例如，參見題為"High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides"的美國專利申請案第5,660,985號，其特別地以引用的方式併入本文中)。

本發明中所涵蓋的核酸配位體之改質包括(但不限於)如下改質：將含有額外電荷、極化性、疏水性、氫鍵結、靜電交互作用及不定性(fluxionality)之其它化學基團提供給核酸配位體鹼基或整個核酸配位體。該等改質包括(但不限於)：2'-位糖改質，5-位嘧啶改質，8-位嘌呤改質，環外胺之改質，4-硫尿嘧啶核苷之取代，5-溴或5-碘-尿嘧啶之取代；主鏈改質，硫逐磷酸酯或磷酸烷酯改質，甲基化，諸如異鹼基(isobase)、異胞嘧啶核苷及異胍等之異常鹼基配對組合。改質亦可包括3'及5'改質，諸如以糖部分進行封端或改質。在本發明之某些實施例中，核酸配位體係在嘧啶殘基之糖部分上經2'-氟(2'-F)改質之RNA分子。

適體之穩定性可藉由引入該等改質以及藉由沿RNA之磷酸酯主鏈之改質及取代而大大增加。另外，可在抑制降解且可增加所要核苷酸交互作用或降低不良核苷酸交互作用之核酸鹼基本身上做出各種改質。因此，一旦知道了適體之序列，便可藉由下文描述之合成程序或藉由熟悉此項技術者所知的程序做出改質或取代。

其它改質包括經改質的鹼基(或經改質的核苷或經改質的核苷酸)之併入，其係存在於核糖核酸(即，A、C、G及U)及脫氧核糖核酸(即，A、C、G及T)中之標準鹼基、糖及/或磷酸酯主鏈化學結構之變體。包含於該範圍內的是，例如：Gm(2'-甲氧基鳥嘌呤核苷酸)、Am(2'-甲氧基腺苷酸)、Cf(2'-氟胞嘧啶核苷酸)、Uf(2'-氟尿苷酸)、Ar(核糖腺苷酸)。該等適體亦可包括胞嘧啶或任何胞嘧啶相關

之鹼基，包括5-甲基胞嘧啶、4-乙醯基胞嘧啶、3-甲基胞嘧啶、5-羥甲基胞嘧啶、2-硫胞嘧啶、5-鹵基胞嘧啶(例如，5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-氯胞嘧啶及5-碘胞嘧啶)、5-丙炔基胞嘧啶、6-氮胞嘧啶、5-三氟甲基胞嘧啶、N4,N4-乙醇胞嘧啶、吩噁嗪胞嘧啶核苷、硫噻嗪胞嘧啶核苷、噻唑胞嘧啶核苷或吡啶並吡咯胞嘧啶核苷。該適體可進一步包括鳥嘌呤或任何鳥嘌呤相關之鹼基，包括6-甲基鳥嘌呤、1-甲基鳥嘌呤、2,2-二甲基鳥嘌呤、2-甲基鳥嘌呤、7-甲基鳥嘌呤、2-丙基鳥嘌呤、6-丙基鳥嘌呤、8-鹵基鳥嘌呤(例如，8-氟鳥嘌呤、8-溴鳥嘌呤、8-氯鳥嘌呤及8-碘鳥嘌呤)、8-胺基鳥嘌呤、8-巰基鳥嘌呤、8-硫烷基鳥嘌呤、8-羥基鳥嘌呤、7-甲基鳥嘌呤、8-氮鳥嘌呤、7-去氮鳥嘌呤或3-去氮鳥嘌呤。該適體仍可進一步包括腺嘌呤或任何腺嘌呤相關之鹼基，包括6-甲基腺嘌呤、N6-異戊烯基腺嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基硫-N6-異戊烯基腺嘌呤、8-鹵基腺嘌呤(例如，8-氟腺嘌呤、8-溴腺嘌呤、8-氯腺嘌呤及8-碘腺嘌呤)、8-胺基腺嘌呤、8-巰基腺嘌呤、8-硫烷基腺嘌呤、8-羥基腺嘌呤、7-甲基腺嘌呤、2-鹵基腺嘌呤(例如，2-氟腺嘌呤、2-溴腺嘌呤、2-氯腺嘌呤及2-碘腺嘌呤)、2-胺基腺嘌呤、8-氮腺嘌呤、7-去氮腺嘌呤或3-去氮腺嘌呤。亦包括尿嘧啶或任何尿嘧啶相關之鹼基，包括5-鹵基尿嘧啶(例如，5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶)、5-(羧基羥甲基)尿嘧啶、5-羧甲基胺甲基-2-硫尿嘧

啉、5-羧甲基胺甲基尿嘧啶、二氫尿嘧啶、1-甲基假尿嘧啶、5-甲氧基胺甲基-2-硫尿嘧啶、5'-甲氧基羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸、假尿嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、3-(3-胺基-3-N-2-羧基丙基)尿嘧啶、5-甲基胺甲基尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、6-氫尿嘧啶或4-硫尿嘧啶。

此技術中已知的其它經改質的鹼基變體之實例包括(但不限於)彼等在37 C.F.R. §1.822(p)(1)中所列的物質，例如：4-乙醯基胞嘧啶核苷、5-(羧基羥甲基)尿嘧啶核苷、2'-甲氧基胞嘧啶核苷、5-羧甲基胺甲基-2-硫尿嘧啶核苷、5-羧甲基胺甲基尿嘧啶核苷、二氫尿嘧啶核苷、2'-O-甲基假尿嘧啶核苷、b-D-半乳糖queosine、次黃嘌呤核苷、N6-異戊烯基腺苷、1-甲基腺苷、1-甲基假尿嘧啶核苷、1-甲基鳥嘌呤核苷、1-甲基次黃嘌呤核苷、2,2-二甲基鳥嘌呤核苷、2-甲基腺苷、2-甲基鳥嘌呤核苷、3-甲基胞嘧啶核苷、5-甲基胞嘧啶核苷、N6-甲基腺苷、7-甲基鳥嘌呤核苷、5-甲基胺甲基尿嘧啶核苷、5-甲氧基胺甲基-2-硫尿嘧啶核苷、b-D-甘露糖基queosine、5-甲氧基羰基甲基尿嘧啶核苷、5-甲氧基尿嘧啶核苷、2-甲基硫-N6-異戊烯基腺苷、N-((9-b-D-核糖呋喃基-2-甲基硫嘌呤-6-基)胺甲醯基)酰胺酸、N-((9-b-D-核糖呋喃基嘌呤-6-基)N-甲基-胺甲醯基)酰胺酸、尿嘧啶核苷-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶核苷-5-氧基乙酸(v)、wybutoxosine、尿假嘧啶核苷、queosine、

2-硫胞嘧啶核苷、5-甲基-2-硫尿嘧啶核苷、2-硫尿嘧啶核苷、4-硫尿嘧啶核苷、5-甲基尿嘧啶核苷、N-((9-b-D-核糖呋喃基嘌呤-6-基)胺甲鹽基)酰胺酸、2'-O-甲基-5-甲基尿嘧啶核苷、2'-O-甲基尿嘧啶核苷、wybutosine、3-(3-胺基-3-羧丙基)尿嘧啶核苷。

亦包括以下美國專利中所描述之改質核酸鹼基：第3,687,808號、第3,687,808號、第4,845,205號、第5,130,302號、第5,134,066號、第5,175,273號、第5,367,066號、第5,432,272號、第5,457,187號、第5,459,255號、第5,484,908號、第5,502,177號、第5,525,711號、第5,552,540號、第5,587,469號、第5,594,121號、第5,596,091號、第5,614,617號、第5,645,985號、第5,830,653號、第5,763,588號、第6,005,096號及第5,681,941號。此項技術中已知的改質核苷及核苷酸糖主鏈變體之實例包括(但不限於)彼等具有(例如)諸如下列之2'核糖基取代基之物質：F、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂、CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、OCH₂CH₂OCH₃、O(CH₂)₂ON(CH₃)₂、OCH₂OCH₂N(CH₃)₂、O(C1-10烷基)、O(C2-10烯基)、O(C2-10炔基)、S(C1-10烷基)、S(C2-10烯基)、S(C2-10炔基)、NH(C1-10烷基)、NH(C2-10烯基)、NH(C2-10炔基)及O-烷基-O-烷基。理想的2'核糖基取代基包括2'-甲氧基(2'-OCH₃)、2'-胺基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)、2'-烯丙基(2'-CH₂-CH=CH₂)、2'-O-烯丙基(2'-O-CH₂-CH=CH₂)、2'-胺基(2'-NH₂)及2'-氟(2'-F)。2'-取代基可在阿拉伯糖

(arabino)(上)位或核糖(ribo)(下)位。

本發明之適體可由諸如上文所述之核苷酸及/或核苷酸類似物或兩者之組合組成，或者其為寡核苷酸類似物。本發明之適體可在不影響寡聚物結合PDGF或VEGF(或其同族受體)之功能之位置上含有核苷酸類似物。

存在若干調適用於改進或加強核酸配位體結合至特殊目標分子或選擇額外適體之技術。一種通常稱為"活體外遺傳學"(參見Szostak(1992) *TIBS*, 19:89)之技術涉及藉由自隨機序列池(pool)進行選擇來單離適體拮抗劑。可自其單離所揭示的適體之核酸分子池可包括側接一大約二十至四十核苷酸的可變序列之不變序列。該方法稱為藉由指數富集的配位體之選擇性進化(Selective Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)。用於藉由SELEX及相關方法產生本發明之適體拮抗劑之組合物及方法在此項技術中已知，教示於(例如)題為"Nucleic Acid Ligands"的美國專利第5,475,096號及題為"Methods for Identifying Nucleic Acid Ligands"的美國專利第5,270,163號，每一案之全文皆以引用的方式併入本文中。在(例如)以下美國專利中進一步描述了一般的SELEX方法，及特定地VEGF及PDGF適體及調配物：第5,668,264號、第5,696,249號、第5,670,637號、第5,674,685號、第5,723,594號、第5,756,291號、第5,811,533號、第5,817,785號、第5,958,691號、第6,011,020號、第6,051,698號、第6,147,204號、第6,168,778號、第6,207,816號、第6,229,002號、第6,426,335號、第

6,582,918號中，每一案的內容皆以引用的方式特定地併入本文中。

簡要而言，SELEX方法涉及：自候選寡核苷酸混合物進行選擇及逐步疊代地結合至選定目標，劃分及擴增，使用相同的總選擇機制，以實際上達成任何所要的結合親合力及選擇性之準則。由通常包含一段隨機序列之核酸之混合物開始，SELEX方法包括以下步驟：在有利於結合之條件下使混合物與目標接觸，自彼等已特異地結合至目標分子之核酸劃分出未結合的核酸，離解核酸-目標錯合物，擴增自核酸-目標錯合物所離解之核酸以得到核酸之配位體富集混合物，接著反覆執行結合、劃分、離解及擴增之步驟達到產生對目標分子高特異性、高親合力之核酸配位體所需的多次循環。

已修改基本的SELEX方法以達成許多特定目標。例如，題為"Method for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure"之美國專利第5,707,796號描述了結合凝膠電泳法使用該SELEX方法來選擇具有特定結構特徵的核酸分子，諸如彎曲DNA。題為"Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX"之美國專利第5,763,177號描述了一種基於SELEX之方法，其用於選擇含有能夠結合及/或光交聯至及/或光滅活化目標分子之光反應基團的核酸配位體。題為"High-Affinity Nucleic Acid Ligands That Discriminate Between Theophylline and Caffeine,"的美國專

利第5,580,737號描述了一種用於識別能夠區分緊密相關之分子的高特異性核酸配位體(可為非肽)之方法，該方法稱為Counter-SELEX。題為"Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Solution SELEX,"之美國專利第5,567,588號描述了一種基於SELEX之方法，其達成了高效劃分具有對目標分子的高及低親合力之寡核苷酸。

SELEX方法包括：識別含有在配位體上具有改良特徵(諸如，改良的活體內穩定性或改良的傳遞特徵)之改質核苷酸之高親合力核酸配位體。該等改質之實例包括在核糖及/或磷酸酯及/或鹼基位置上之化學取代。SELEX方法所識別的含有改質核苷酸之核酸配位體描述於題為"High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides,"的美國專利第5,660,985號中，其描述了含有在嘧啶之5-及2'-位上經化學改質的核苷酸衍生物之寡核苷酸。上述美國專利第5,580,737號描述了含有一或多個經2'-胺基(2'-NH₂)、2'-氟(2'-F)及/或2'-O-甲基(2'-OMe)改質的核苷酸之高特異性核酸配位體。於1994年6月22日申請的題為"Novel Method of Preparation of Known and Novel 2' Modified Nucleosides by Intramolecular Nucleophilic Displacement,"之美國專利申請案第08/264,029號(現已放棄)描述了含有多種2'-改質嘧啶之寡核苷酸。

SELEX方法包括：組合選定的寡核苷酸與其它選定的寡核苷酸及非寡核苷酸功能單元，分別如題為"Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Chimeric

SELEX," 的美 國 專 利 第 5,637,459 號 及 題 為 "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Blended SELEX," 的美 國 專 利 第 5,683,867 號 所 述 。 該 等 專 利 允 許 寡 核 苷 酸 之 寬 系 列 的 形 狀 及 其 它 特 性 及 有 效 擴 增 及 複 製 特 性 與 其 它 分 子 之 所 要 特 性 的 組 合 。

SELEX 方 法 進 一 步 包 括 ： 將 所 選 擇 的 核 酸 配 位 體 與 親 脂 性 化 合 物 或 非 致 免 疫 的 高 分 子 量 化 合 物 組 合 在 診 斷 或 治 療 錯 合 物 中 ， 如 題 為 "Nucleic Acid Ligand Complexes" 的 美 國 專 利 第 6,011,020 號 所 述 ， 該 案 之 全 文 以 引 用 的 方 式 特 定 併 入 本 文 中 。

適 體 拮 抗 劑 亦 可 藉 由 使 用 電 腦 模 型 化 技 術 來 精 製 。 分 子 模 型 化 系 統 之 實 例 係 Polygen Corporation(Waltham, Mass.) 的 CHARMm 及 QUANTA 程 式 。 CHARMm 執 行 能 量 最 小 化 及 分 子 動 力 學 的 功 能 。 QUANTA 執 行 分 子 結 構 之 建 構 、 圖 形 模 型 化 及 分 析 。 QUANTA 容 許 分 子 彼 此 間 之 行 為 的 交 互 建 構 、 修 改 、 可 視 化 及 分 析 。 該 等 應 用 可 調 適 用 於 界 定 及 顯 示 RNA 及 DNA 分 子 之 二 級 結 構 。

接 著 ， 可 使 用 任 何 合 適 的 用 於 檢 定 吾 人 感 興 趣 的 PDGF 或 VEGF 功 能 之 檢 定 法 ， 諸 如 PDGF 細 胞 基 的 增 生 活 性 檢 定 法 ， 來 測 試 具 有 該 等 多 種 改 質 的 適 體 。

改 質 可 為 預 先 或 後 SELEX 方 法 改 質 。 預 先 SELEX 方 法 改 質 產 生 具 有 對 其 SELEX 目 標 之 特 異 性 及 改 良 的 活 體 內 穩 定 性 之 核 酸 配 位 體 。 對 2'-OH 核 酸 配 位 體 所 做 的 後 SELEX 方 法 改 質 可 導 致 改 良 的 活 體 內 穩 定 性 而 不 會 不 利 地 影 響 該 核

酸配位體之結合能力。

可用於製造本發明之適體之其它改質已為熟悉此項技術者所知。該等改質可藉由後SELEX方法(改質先前所識別的未經改質的配位體)或藉由併入至SELEX方法中來進行。

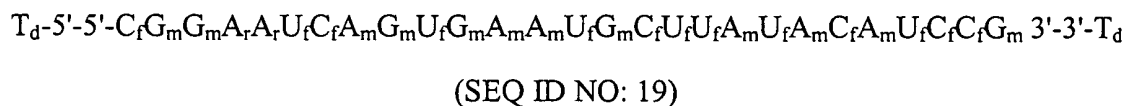
已觀察到，當以一降低對核酸外切酶的易感性及增加整體穩定性之方式5'-封端及3'-封端時，一般而言適體或核酸配位體且特定言之VEGF適體最穩定，且因此有效。因此，在一實施例中，一般而言，本發明係基於封端適體，且特定言之，係基於封端在5'端上具有5'-5'反核苷封端結構及在3'端上具有3'-3'反核苷封端結構之抗-VEGF適體。因此，本發明提供了抗-VEGF及/或抗-PDGF適體，即核酸配位體，其在5'端上經5'-5-反核苷封端基(cap)封端，且在在3'端上經3'-3'反核苷封端基封端。

本發明之某些特別有用的適體係抗-VEGF適體組合物，包括(但不限於)彼等在其端上具有5'-5'及3'-3'反核苷酸封端結構之物質。該等抗-VEGF封端適體可為RNA適體、DNA適體或具有混合(即，RNA及DNA兩者)組成之適體。本發明之合適的抗-VEGF適體序列包含核苷酸序列GAAGAAUUGG(SEQ ID NO:15)；或核苷酸序列UUGGACGC(SEQ ID NO:16)；或核苷酸序列GUGAAUGC(SEQ ID NO:17)。特別有用的係具有如下序列的本發明之封端抗-VEGF適體：

X-5'-5'-CGGAAUCAGUGAAUGCUUAUACAUCG-3'-3'-X (SEQ ID NO: 18)

其中，每一C、G、A及U分別代表天然存在的核苷酸：胞嘧啶核苷、胍、腺嘌呤及尿嘧啶核苷或其相應的改質核苷酸；X-5'-5'係封端適體之5'末端的反核苷酸；3'-3'-X係封端適體之3'末端的反核苷酸；且其餘的核苷酸或改質核苷酸經由5'-3'磷酸二酯鍵接續地連接。在某些實施例中，封端抗-VEGF適體之每一核苷酸單獨帶有2'核糖基取代基，諸如-OH(其係核糖核酸(RNA)之標準)、或-H(其係脫氧核糖核酸(DNA)之標準)。在其它實施例中，2'核糖基位置經O(C₁₋₁₀烷基)、O(C₁₋₁₀烯基)、F、N₃或NH₂取代基取代。

在一更特殊之非限制實例中，5'-5'封端的抗-VEGF適體可具有如下結構：



其中，"G_m"代表2'-甲氧基鳥嘌呤核苷酸，"A_m"代表2'-甲氧基腺嘌呤核苷酸，"C_f"代表2'-氟胞嘧啶核苷酸，"U_f"代表2'-氟尿嘧啶核苷酸，"A_r"代表核糖核酸，且"T_d"代表脫氧核糖核酸。

反義、核糖酶及DNA酶拮抗劑

以PDGF及VEGF為目標之反義寡核苷酸及核糖酶藉由抑制自該等信使RNA之蛋白質轉譯或藉由旨在(target)分別降解相應PDGF或VEGF mRNA來實現PDGF/VEGF抑制。上文所述的該等以PDGF-及VEGF為目標之核酸提供了用於設計及合成該等PDGF及VEGF核糖酶及反義寡核苷酸之有用

序列。反義寡核苷酸及核糖酶之設計及合成方法在此項技術中已知。本文提供了額外的指導。

在設計特異性及有效的 mRNA 為目標之寡核苷酸(反義 ODN)及核糖酶及反義中之一問題係識別在目標 mRNA(其本身折疊成部分地自配對之二級結構)內配對的反義的可及(accessible)位置。用於預測 RNA 配對可及性之電腦輔助演算法與分子篩選之組合允許製造針對大多數 mRNA 目標的特異性及有效核糖酶及/或反義寡核苷酸。事實上,已描述了若干途徑用以確定目標 RNA 分子對反義或核糖酶抑制劑之可及性。一途徑使用一施用盡可能多的反義寡脫氧核苷酸之活體外篩選檢定法(參見 Monia 等人(1996) *Nature Med.*, 2:668-675 ; 及 Milner 等人 (1997) *Nature Biotechnol.*, 15:537-541)。另一途徑利用 ODN 隨機庫(Ho 等人(1996) *Nucleic Acids Res.*, 24:1901-1907 ; Birikh 等人 (1997) *RNA* 3:429-437 ; 及 Lima 等人(1997) *J. Biol. Chem.*, 272:626-638)。該等可及位置可藉由 RNase H 裂解來監控(參見上述 Birikh 等人 ; 及 Ho 等人 (1998) *Nature Biotechnol.*, 16:59-63)。RNase H 催化 DNA-RNA 雙鏈之 RNA 股的磷酸二酯主鏈水解性裂解。

在涉及半隨機池之使用的另一途徑中,使用嵌合化學合成的 ODN 來識別在活體外合成的 RNA 目標上之藉由 RNase H 所裂解的可及位置。接著,使用引子延伸分析來識別在目標分子中的該等位置(參見上述 Lima 等人)。其它用於在 RNA 中設計反義目標之途徑係基於 RNA 之電腦輔助折疊模

型。已公開了關於使用隨機核糖酶庫來篩選有效裂解之若干報導(參見Campbell等人(1995) *RNA* 1:598-609; Lieber等人(1995) *Mol. Cell Biol.*, 15:540-551; 及Vaish等人(1997) *Biochem.*, 36: 6459-6501)。

利用ODN及RNase H之隨機或半隨機庫之其它活體外途徑可能比電腦模擬更有用(上述Lima等人)。然而, 使用活體外合成的RNA並不能預測活體內反義ODN之可及性, 因為最近的觀察表明多核苷酸之黏接(anneal)交互作用會受到RNA-結合蛋白質之影響(參見Tsuchihashi等人(1995) *Science*, 267:99-102; Portman等人(1994) *EMBO J.*, 13: 213-221; 及Bertrand及Rossi (1994) *EMBO J.*, 13:2904-2912)。全文內容以引用的方式併入本文中之美國專利第6,562,570號提供了用於確定在模擬活體內條件之細胞提取物的存在下在mRNA內之可及位置之組合物及方法。

簡而言之, 該方法涉及: 在包括含有內源性RNA-結合蛋白質之細胞提取物或因一或多種RNA-結合蛋白質之存在而模擬細胞提取物的反應媒體中之雜交條件下, 以界定的反義ODN、核糖酶或DNA酶或以隨機或半隨機ODN、核糖酶或DNA酶庫來培育天然或活體外合成的RNA。作為目標RNA中之可及位置的互補之任何反義ODN、核糖酶或DNA酶都將雜交至彼位置。當使用界定的ODN或ODN庫時, RNase H出現於雜交期間或在雜交後添加以在雜交發生處裂解RNA。當使用核糖酶或DNA酶時, 可存在RNase H, 但此並非必要, 因為核糖酶及DNA酶會在雜交發生處

裂解RNA。在某些情況下，使用在含有內源性mRNA、RNA-結合蛋白質及RNase H之細胞提取物中的隨機或半隨機ODN庫。

接著，可使用各種方法以識別在反義ODN、核糖酶或DNA酶所結合及裂解所發生之目標RNA上之彼等位置。例如，依末端脫氧核苷酸基移轉酶而定之聚合酶鏈反應(TDPCR)可用於該目的(參見Komura及Riggs (1998) *Nucleic Acids Res.*, 26:1807-11)。使用逆轉錄步驟以將RNA模板轉化至DNA，接著進行TDPCR。在本發明中，TDPCR方法所需的3'末端係藉由以任何適合的依RNA而定之DNA聚合酶(例如，逆轉錄酶)逆轉錄有關的目標RNA而產生。此係藉由在研究中的目標RNA分子之部分的下流(即，以RNA分子上的5'至3'之方向)區域中第一ODN引子(P1)雜交至RNA來實現。在dNTP存在下，聚合酶自P1之3'端將RNA複製成DNA，且在藉由反義ODN/RNase H、核糖酶或DNA酶所產生的裂解位置終止複製。該新的DNA分子(稱為第一股DNA)充當TDPCR方法之PCR部分之第一模板，其用以識別存在於RNA上之相應的可及目標序列。

例如，接著可使用TDPCR程序，即，使經鳥嘌呤核苷三磷酸酯(rGTP)逆轉錄之DNA在末端脫氧核苷酸基移轉酶(TdT)之存在下反應，以在該等DNA分子之3'末端上添加(rG)2-4尾部。接著綁一具有懸在一與該(rG)2-4尾部鹼基配對之股上的3'2-4的雙股ODN連接物。接著，添加兩個PCR引子。第一個係與綁至(rG)2-4尾部之TDPCR連接股

(有時稱為較低股)互補的連接引子(LP)。另一引子(P2)可與P1相同，但可相對於P1巢套，即其在P1所結合之區域的至少部分地上游區域(即，以在RNA分子之3'至5'方向)與目標RNA互補，但其係研究中的目標RNA分子之部分之下游。即，在研究中用以判定其是否具有可及結合位置之目標RNA分子部分係與P2互補之區域的上游部分。接著，以已知方式在DNA聚合酶及dNTP存在下執行PCR以擴增藉由引子LP及P2所界定的DNA區段。接著，可藉由任何各種已知方法捕獲所擴增的產物，且隨後在自動DNA序列產生器上定序列，以提供裂解位置之精確的識別。一旦確定此識別(identity)，便可合成界定序列的反義DNA或核糖酶以用於活體外或活體內。

在特異性基因之表現中之反義干擾可藉由使用合成反義寡核苷酸序列來達成(例如，參見Lefebvre-d'Hellencourt等人(1995) *Eur. Cytokine Netw.*, 6:7 ; Agrawal (1996) *TIBTECH.*, 14:376 ; 及 Lev-Lehman等人(1997) *Antisense Therap.* Cohen及 Smicek編著(Plenum Press, New York))。簡而言之，反義寡核苷酸序列可為DNA之短序列，通常為15-30 mer，但可小至7 mer(參見Wagner等人(1994) *Nature.* 372:333)，其設計補充了有關目標mRNA且形成了RNA:AS雙鏈。該雙鏈形成可防止相關mRNA之處理、拼接、傳輸或轉譯。此外，當與其目標mRNA雜交時，某些AS核苷酸序列可發出細胞RNase H活性，從而導致mRNA降解(參見Calabretta等人(1996) *Semin. Oncol.*, 23:78)。

在該情況下，RNase H會裂解該雙鏈之RNA組份，且可潛在地釋放AS以進一步與目標RNA之額外分子雜交。額外的作用模式係由AS與基因組DNA交互作用以形成轉錄惰性之三鏈螺旋所導致。

在作為如上文所述之反義序列的添加或替代的一非限制實例中，可使用核糖酶來壓製基因功能。此在反義療法受限於化學計量考慮之情況下特別必要。接著，可使用以相同序列為目標之核糖酶。核糖酶係具備裂解目標RNA中的特異位置之RNA催化能力的RNA分子。藉由核糖酶所裂解之RNA分子的數目大於由1:1化學計算比所預測的數目(參見 Hampel 及 Tritz (1989) **Biochem.**, 28:4929-33 ; 及 Uhlenbeck (1987) **Nature**, 328:596-600)。因此，本發明亦允許使用以PDGF或VEGF mRNA種之可及域為目標且含有適當催化中心之核糖酶序列。核糖酶係以此項技術中已知且本文所進一步討論的方式來製備及傳遞。核糖酶可與反義序列組合使用。

核糖酶催化RNA之磷酸二酯鍵裂。已識別若干核糖酶結構族，包括組I內含子、RNase P、肝炎 δ 病毒核糖酶、錘頭狀核糖酶及最初衍生自煙草環斑病毒隨體RNA(sTRSV)之負股的發針形核糖酶(參見 Sullivan(1994) **Investig. Dermatolog.**, (Suppl.)103:95S ; 及美國專利第5,225,347號)。後兩個族係衍生自類病毒及擬病毒，其中據信該核糖酶可在滾動循環複製期間自所產生的寡聚物分離單體(參見 Symons (1989) **TIBS**, 14:445-50 ; Symons (1992)

Ann. Rev. Biochem., 61:641-71)。錘頭狀及發針形核糖酶之花紋最常適用於基因療法之mRNA的反式裂解。如此項技術所知地選擇本發明中所利用的核糖酶類型。現今，發針形核糖酶正進行臨床試驗，且其係特別有用之類型。一般而言，該核糖酶係來自長度為30-100之核苷酸。

設計成催化裂解目標mRNA轉錄之核糖酶分子係此項技術中已知(例如，PDGF(SEQ ID NO:1)或VEGF (SEQ ID NO:3))，且其可用以防止mRNA轉譯(例如，參見PCT International Pub. WO 90/11364；Sarver等人(1990) **Science**, 247:1222-1225及美國專利第5,093,246號)。當使用在位置特異辨別序列上裂解mRNA的核糖酶來破壞特殊mRNA時，錘頭狀核糖酶之使用特別有用。錘頭狀核糖酶在由與該目標mRNA形成互補鹼基對之側接區域所指示的位置裂解mRNA。唯一的要求係目標mRNA具有兩個鹼基之如下序列：5'-UG-3'。錘頭狀核糖酶之建構及產生係此項技術中所熟知，且在Haseloff及Gerlach((1988) **Nature**, 334:585)中進行了更全面的描述。

本發明之核糖酶亦包括RNA核糖核酸內切酶(下文稱為"Cech-型核糖酶")，諸如天然存在於四膜蟲(*Tetrahumena thermophila*)中的RNA核糖核酸內切酶(稱為IVS或L-19 IVS RNA)，且其已由Thomas Cech及合作者廣泛地進行了描述(參見Zaug等人(1984) **Science**, 224:574-578；Zaug及Cech(1986) **Science**, 231:470-475；Zaug等人(1986) **Nature**, 324:429-433；國際專利申請案第WO88/04300號；Been及

Cech (1986) *Cell*, 47:207-216)。Cech型核糖酶具有八鹼基對活性位置，其在目標RNA發生裂解後的位置雜交至目標RNA序列。本發明涵蓋彼等以八鹼基對活性位置序列為目標之Cech型核糖酶。儘管本發明不受操作機制之特定理論的限制，但在本發明中使用錘頭狀核糖酶可具有優於使用PDGF/VEGF-定向反義的優勢，因為最近的報導顯示錘頭狀核糖酶可藉由阻礙RNA轉譯及/或mRNA目標之特定裂解起作用。

如在反義途徑中，核糖酶可包含由改質寡核苷酸(例如，用於改良的穩定性、目標性(targeting)等)，且其傳遞至表現目標mRNA的細胞。一有用的傳遞方法涉及：在強構成型pol III或pol II啟動子之控制下使用DNA構造"編碼"核糖酶，以使轉染細胞產生足以破壞目標訊息並抑制轉譯的量之核糖酶。因為核糖酶不同於反義分子，其具有催化性，所以為了效率需要更低的胞內濃度。

如上文所述，若需要，核酸酶抵抗性可藉由此項技術中已知的任何方法來提供，其大體上不會干擾使用該方法所需的反義寡脫氧核苷酸或核糖酶之生物活性及傳遞(Iyer等人(1990) *J. Org. Chem.*, 55:4693-99；Eckstein (1985) *Ann. Rev. Biochem.*, 54: 367-402；Spitzer及Eckstein(1988) *Nucleic Acids Res.*, 18:11691-704；Woolf等人(1990) *Nucleic Acids Res.*, 18:1763-69；及Shaw等人(1991) *Nucleic Acids Res.*, 18:11691-704)。如上文有關適體之描述，為了增強核酸酶抵抗性，可對反義寡核苷酸或

核糖酶進行改質，其非限制的代表性改質改質包括改質在磷酸酯主鏈、短鏈烷基或環烷基交互糖鍵或短鏈雜原子或雜環交互糖鍵中之磷或氧雜原子。例如，其包括製備2'-氟化、O-甲基化甲基磷酸酯、硫逐磷酸酯、二硫逐磷酸酯及嗎啉基寡聚物。例如，反義寡核苷酸或核糖酶可具有連接於四至六個3'-末端核苷酸鹼基之間的硫逐磷酸酯鍵結。或者，硫逐磷酸酯鍵結可連接所有核苷酸鹼基。硫逐磷酸酯反義寡核苷酸通常不會在有效濃度下顯示明顯的毒性，且在動物中顯示足夠的藥效半衰期(參見Agarwal等人(1996) **TIBTECH**, 14: 376)，且具有核酸酶抵抗性。或者，AS-ODN之核酸酶抵抗性可藉由在3'-末端上包含具有核苷酸序列CGCGAAGCG之9核苷酸環形成序列來提供。抗生物素-生物素共軛反應之使用亦可用於改良地保護AS-ODN以免於血清核酸酶降解(參見Boado及Pardridge(1992) **Bioconj. Chem.**, 3:519-23)。根據該概念，將AS-ODN藥劑在其3'端上單生物素基化(monobiotinylate)。當與抗生物素反應時，其形成具有非共軛ODN之6倍改良穩定性的緊密的抗核酸酶錯合物。

其它研究已顯示了反義寡脫氧核苷酸之活體內延伸(Agarwal等人(1991) **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)** 88: 7595)。該方法假定可用作自循環移除異類AS-寡核苷酸之清除機制，其取決於在所附著的其上發生延伸之寡核苷酸中的游離3'末端之存在。因此，偏硫逐磷酸酯，在該重要位置上之環保護或生物素-抗生物素應足以確保該等AS-寡

脫氧核苷酸之穩定性。

除了使用如上文所述之改質鹼基外，可製備核苷酸之類似物，其中該核苷酸之結構發生根本改變，且其更適合作為治療或實驗試劑。核苷酸類似物之一實例係肽核酸(PNA)，其中DNA(或RNA)中的脫氧核糖(或核糖)磷酸酯主鏈由類似於肽中所發現的聚醯胺主鏈替代。已顯示，PNA類似物具有對由酶所引起之降解的抵抗性，且其具有延長的活體內及活體外壽命。此外，已顯示PNA比DNA分子更強地結合至互補DNA序列。該觀察歸因於缺乏PNA股與DNA股之間的電荷排斥。可對寡核苷酸進行的其它改質包括聚合物主鏈、嗎啉基聚合物主鏈(例如，參見美國專利第5,034,506號，其全文內容以引用的方式併入本文)、環狀主鏈或非環主鏈、糖模擬劑或任何其它改質，包括可改良寡核苷酸之藥效特性之改質。

本發明之另一態樣係關於使用DNA酶來降低目標mRNA(例如，PDGF或VEGF)之表現。DNA酶含有反義及核糖酶技術之某些機械特徵。將DNA酶設計成使得其與反義寡核苷酸非常相似辨別特殊目標核酸序列，然而與核糖酶非常相似，其具有催化性且特異地裂解目標核酸。

目前，存在兩種基本類型的DNA酶，且該等兩種均係由Santoro及Joyce識別(例如，參見美國專利第6,110,462號)。10-23 DNA酶包含連接兩臂之環結構。該等兩臂藉由辨別特殊目標核酸序列提供了特異性，而該環結構在生理條件下提供了催化功能。

簡而言之，為了設計特定識別及裂解目標核酸之DNA酶，熟悉此項技術者首先必須識別獨特的目標序列。此可藉由使用與反義寡核苷酸所概述的相同途徑來實現。在某些情況下，獨特的或實質序列係富有大約18至22核苷酸的G/C。高G/C含量有助於確保DNA酶與目標序列之間更強的交互作用。

當合成DNA酶時，將使酶以訊息為目標之特異反義辨別序列分成使其包含DNA酶之兩臂，且將該DNA酶環置於該等兩個特異臂之間。

例如，可在U.S. 6110462中找到製備及投予DNA酶之方法。相似地，活體外或活體內傳遞DNA核糖酶之方法包括如本文所概述的傳遞RNA核糖酶之方法。此外，熟悉此項技術者將瞭解：如同反義寡核苷酸，DNA酶可視情況經改質以改良穩定性並改良對降解之抵抗性。

RNAi拮抗劑

本發明之某些實施例利用藉由RNA干擾(RNAi)實現VEGF及PDGF之壓抑的材料及方法。RNAi係一種序列特異後轉錄基因壓抑方法，其可發生於真核細胞中。大體而言，該方法涉及一特殊序列的mRNA之降解，其係由與該序列同源的雙股RNA(dsRNA)誘導。例如，對應於特殊單股mRNA(ss mRNA)序列的長dsRNA之表現將使彼訊息不穩定，由此"干擾"對應基因之表現。因此，任何選定的基因均可藉由引入一對應於彼基因之所有或實質上一部分mRNA之dsRNA來壓抑。看來當長dsRNA得以表現時，其

最初係藉由核糖核酸酶III處理為長度短至21至22個鹼基對的更短的dsRNA寡核苷酸。因此，RNAi可藉由引入或表現相對較短的同源dsRNA來實現。事實上，使用相對較短的同源dsRNA可具有下文所述之某些優勢。

哺乳動物細胞具有至少兩種受雙股RNA(dsRNA)影響的路徑。在RNAi(序列特異)路徑中，首先將起始dsRNA破裂成短的干擾(si)RNA，如上文所述。siRNA具有約21個核苷酸之正義及反義股，該等核苷酸形成在每一3'端上具有兩個核苷酸懸掛物之大約19個核苷酸siRNA。吾人認為短的干擾RNA提供了允許以特異信使RNA為降解目標之序列資訊。相比之下，非特異路徑係由任何序列的dsRNA觸發，只要其具有至少約30個鹼基對之長度。非特異效應之所以發生是因為dsRNA活化了兩種酶：PKR(雙股RNA活化的蛋白質激酶)，活性形式之PKR磷酸化轉譯起始因子eIF2以停止所有蛋白質合成；以及2', 5'寡腺苷酸合成酶(2', 5'-AS)，其合成了活化RNase L(以所有mRNA為目標之非特異性酶)之分子。非特異路徑可代表對應激或病毒感染之宿主響應，且一般而言，非特異路徑之影響藉由本發明之尤其有用之方法而得以最小化。明顯地，似乎需要更長的dsRNA以誘導非特異路徑，且因此，短於約30個鹼基對的dsRNA尤其可用於藉由RNAi來實現基因壓抑(例如，參見Hunter等人(1975) *J. Biol. Chem.*, 250:409-17；Manche等人(1992) *Mol. Cell Biol.*, 12:5239-48；Minks等人(1979) *J. Biol. Chem.*, 254:10180-3；及Elbashir等人(2001) *Nature*,

411: 494-8)。

用以實現RNAi之某些雙股寡核苷酸具有小於30個鹼基對之長度，且可包含約25、24、23、22、21、20、19、18或17個核糖核酸鹼基對。視情況，本發明之dsRNA寡核苷酸可包括3'懸掛端。非限制的示範性2-核苷酸3'懸掛物可包含任何類型的核糖核苷酸殘基，且甚至可包含2'-脫氧胸腺嘧啶核苷殘基，此降低了RNA合成的成本且可增強在細胞培養基中及在受轉染細胞內之siRNA的核酸酶抵抗性(參見Elbashi等人(2001) *Nature*, 411:494-8)。

在本發明之某些實施例中亦可利用具有50、75、100或甚至500個鹼基對或更多鹼基對之更長的dsRNA。用於實現RNAi之dsRNA的示範性濃度為約0.05 nM、0.1 nM、0.5 nM、1.0 nM、1.5 nM、25 nM或100 nM，但亦可利用其它濃度，此取決於所處理的細胞之本性、基因目標及熟悉此項技術者可容易辨識的其它因子。示範性dsRNA可化學合成或使用適當的表現載體在活體外或活體內製造。示範性合成RNA包括使用此項技術中已知的方法化學合成的21個核苷酸RNA(例如，Expedite RNA醯胺基亞磷酸酯及胸腺嘧啶核苷醯胺基亞磷酸酯(Proligo, Germany))。合成寡核苷酸可藉由使用此項技術中已知的方法去保護及凝膠純化(例如，參見Elbashir等人(2001) *Genes Dev.*, 15: 188-200)。更長的RNA可轉錄自多種啟動子，諸如此項技術中已知的T7 RNA聚合酶啟動子。置於活體外啟動子之兩種可能定向的下游之單一RNA目標將轉錄該目標之兩股以產

生所要目標序列之dsRNA寡核苷酸。

在寡核苷酸之設計中所利用的特異序列可為目標(例如，PDGF(例如，SEQ ID NO:2)或VEGF(例如，SEQ ID NO:4))之經表現的基因訊息內所含有的核苷酸之任何鄰近序列可使用此項技術中已知的程式及演算法來選擇適當的目標序列。另外，如上文額外所述，可利用設計成用以預測特定性單股核酸序列之二級結構且允許選擇彼等可能出現於折疊mRNA之暴露單股區域中之序列之程式，選擇最佳序列。可在(例如)美國專利第6,251,588號中找到用於設計適當寡核苷酸之方法及組合物，該案之內容以全文引用的方式併入本文中。一般認為mRNA係在核糖核苷酸序列內含有用於引導蛋白質合成之資訊的線性分子。然而，研究已披露許多二級及三級結構存在於大多數mRNA中。RNA中的二級結構要素主要係藉由相同RNA分子之不同區域之間的Watson-Crick型交互作用形成。重要的二級結構要素包括分子內雙股區域、發針形環、雙鏈RNA中之膨脹部及內部環。當二級結構要素開始彼此接觸或與單股區域接觸時，形成了三級結構要素，從而產生更複雜的三維結構。許多研究者已量測了大量RNA雙鏈結構之結合能量，且已得出一套可用以預測RNA之二級結構的規則(例如，參見Jaeger等人(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86:7706 (1989)；及Turner等人(1988) *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 17:167)。該等規則可用於識別RNA結構要素，且特定言之，用於識別可代表mRNA中旨在扼制

RNAi、核糖酶或反義技術之特別有用的區段之單股RNA區域。因此，可識別mRNA目標之特殊區段以用於設計調節dsRNA寡核苷酸之RNAi以及用於設計本發明之適當的核糖酶及錘頭狀核糖酶組合物。

使用載劑組合物，諸如此項技術中已知的脂質體，例如黏附細胞株之製造商所描述的Lipofectamine 2000(Life Technologies, Rockville MD)，以異質目標基因進行轉染，可將dsRNA寡核苷酸引入細胞中。用於使得以內源基因為目標的dsRNA寡核苷酸之轉染可使用Oligofectamine(Life Technologies)來執行。轉染效率可在共轉染hGFP編碼pAD3後對哺乳動物細胞株使用螢光顯微法來進行檢測(Kehlenback等人(1998) J. Cell. Biol., 141:863-74)。RNAi之有效性可在引入dsRNA後藉由大量檢定法中的任何一種檢定法來評定。其包括(但不限於)：使用抗體之西方轉漬(Western blot)分析，該等抗體在新蛋白質合成得以壓抑且內源池轉變充足時間後辨別目標基因產物；及用以確定存在目標mRNA之含量的北方轉漬(Northern blot)分析。

用於本發明之RNAi技術的其它組合物、方法及應用提供於美國專利第6,278,039號、第5,723,750號及第5,244,805號中，該等案以引用的方式併入本文中。

受體酪胺酸激酶抑制劑拮抗劑

本發明中亦包括此項技術中已知的酪胺酸激酶拮抗劑，及其可使用此項技術中常用的技術及以引用的方式併入本

文中之教示獲得的變體及替代物。經由受到PDGF受體(及VEGF受體)影響且影響結合訊號錯合物之細胞膜之基質蛋白質下游的酪胺酸激酶調節之磷酸化事件，PDGF(及VEGF)之胞外訊號與該細胞之其它部分通信。因此，在PDGF(及/或VEGF)發訊號之受體激酶階段起作用的拮抗劑亦在本發明之方法中有效。

吾人已知對酪胺酸激酶受體酶(諸如PDGFR或VEGFR)具有選擇性之許多類型的酪胺酸激酶抑制劑(例如，參見Spada及Myers((1995) **Exp. Opin. Ther. Patents**, 5:805)及Bridges((1995) **Exp. Opin. Ther. Patents**, 5:1245))。此外，Law及Lydon已概括了酪胺酸激酶抑制劑之抗癌潛力((1996) **Emerging Drugs: The Prospect For Improved Medicines**, 241-260)。例如，美國專利第6,528,526號描述了展示選擇性地抑制血小板衍生生長因子受體(PDGFR)酪胺酸激酶活性之經取代的喹喔啉化合物。PDGFR酪胺酸激酶活性之已知抑制劑包括由Maguire等人((1994) **J. Med. Chem.**, 37:2129)及由Dolle等人((1994) **J. Med. Chem.**, 37:2627)所報導的基於喹啉之抑制劑。最近，Traxler等人在EP 564409中及Zimmerman等人((1996) **Biorg. Med. Chem. Lett.**, 6:1221-1226)及Buchdunger等人((1995) **Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)**, 92:2558)報導了一類基於苯基胺基嘧啶之抑制劑。可用以抑制PDGF受體酪胺酸激酶活性之喹唑啉衍生物包括：雙單及二環芳基化合物及雜芳基化合物(例如，參見WO 92/20642)、喹喔啉衍生物(參見(1994)

Cancer Res., 54:6106-6114)、嘧啶衍生物(日本公開專利申請案第 87834/94 號)及二甲氧基喹啉衍生物(參見 **Abstracts of the 116th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan (Kanazawa)**, (1996), 2, p. 275, 29(C2) 15-2)。

VEGFR酪胺酸激酶抑制劑之實例包括噻啉衍生物，例如美國專利第 6,514,971 號所描述之彼等物質，該案之內容以全文引用的方式併入本文中。其它該等噻啉衍生物亦已知。例如，(1995) **J. Med Chem.**, 38:3482-7 揭示了 4-(3-溴苯胺基)噻啉；(1968) **J. Chem. Soc. C**, (9):1152-5 揭示了 6-氯-4-苯氧基噻啉；(1984) **J. Karnatak Univ., Sci.**, 29:82-6 揭示了某些 4-苯胺基噻啉；且(1973) **Indian J. Chem.**, 11: 211-13 揭示了某些 4-苯基硫噻啉。此外，(1973) **J. Karnatak Univ.**, 18:25-30 揭示了某些 4-苯氧基噻啉，(1984) **J. Karnatak Univ., Sci.**, 29:82-6 揭示了兩種化合物：4-(4-甲氧基苯胺基)-6,7-二甲氧基噻啉及 4-(3-氯苯胺基)-6,7-二甲氧基噻啉。此外，在美國專利第 5,017,579 號、美國專利第 4,957,925 號、美國專利第 4,994,474 號及 EP 0302793 A2 中描述了在 4-位上具有一經由選自 --O--、--S--、--NH-- 及 --CH₂-- 的基團連接的苯環之某些噻啉。

用於抑制 VEGFR 及 / 或 PDGFR 之其它相關化合物可藉由使用習知檢定法根據其對吾人感興趣的受體酪胺酸激酶活性之影響篩選新穎化合物來得到。藉由候選 PDGFR 或 VEGFR 小分子有機抑制劑所引起之有效抑制可使用基於細

胞的檢定系統以及此項技術中已知的其它檢定系統來監控。

例如，一項用於對抗VEGF受體酪胺酸激酶之活性的測試如下。該測試係使用Flt-1 VEGF受體酪胺酸激酶進行。詳細程序如下：將30 μ l激酶溶液(10 ng Flt-I之激酶域(參見Shibuya等人(1990) **Oncogene**, 5:519-24)在20 mM Tris.HCl (pH 7.5)中)、3 mM二氯化錳(MnCl_2)、3 mM氯化鎂(MgCl_2)、10 μ M鈣酸鈉、0.25 mg/ml聚乙二醇(PEG)20000、1 mM二硫蘇糖醇及3 μ g/ μ l聚(Glu,Tyr)4:1(Sigma, Buchs, Switzerland)、8 μ M [^{33}P]-ATP (0.2 uCi)、1%二甲亞砷中及0至100 μ M待測試化合物在室溫下一起培育10分鐘。接著，藉由添加10 μ l 0.25 M乙二胺四乙酸酯(EDTA)(pH 7)終止反應。使用多通道分配器(LAB SYSTEMS, 美國)，藉由微滴定量過濾器歧管將20 μ l的等分試樣施加至PVDF(=聚二氟化乙烯)止動劑P膜(Millipore, USA)，並將其連接至真空裝置。在完成液體除去後，接續在含有0.5%磷酸(H_3PO_4)的浸泡劑中清洗該膜4次及以乙醇清洗一次，每次在搖動的同時培養膜10分鐘，接著將其安裝在Hewlett Packard TopCount歧管中，且在添加10 μ l Microscint. RTM.之(β -閃爍計數液體)後量測放射性。藉由線性回歸分析三種濃度(照例為0.01 μ mol、0.1 μ mol及1 μ mol)的每一化合物的抑制百分比來確定 IC_{50} 值。活性酪胺酸抑制劑化合物之 IC_{50} 值可在0.01 μ M至100 μ M範圍內。

此外，可藉由細胞上之另一實驗來確認 VEGF 誘導之 VEGFR 酪胺酸激酶/自動磷酸化活性之抑制。簡而言之，將在 6 孔細胞培養皿中的完全培養基(具有 10% 胎牛血清(FCS))中種菌永久表現人類 VEGF 受體(VEGFR/KDR)的轉染 CHO 細胞，且在 5% CO₂、37°C 下培育直至其展示約 80% 之集合度。接著，在培養基(無 FCS，具有 0.1% 牛血清白蛋白)中稀釋待測試之化合物，並將其添加至細胞。(對照組包含無測試化合物之媒體)。於 37°C 下培育兩小時後，添加重組 VEGF；最終的 VEGF 濃度為 20 ng/ml。在 37°C 下進一步培育五分鐘後，以冰冷的 PBS 清洗該等細胞兩次，且立即以每孔 100 µl 的溶離緩衝劑將其溶離。接著，將溶離產物離心以移除細胞核，並使用商用蛋白質檢定(BIORAD)來測定上層清液之蛋白質濃度。接著，可立即使用溶離產物，或若必要將其儲存在 -200°C 下。

接著，執行夾心 ELISA 以量測 KDR 受體磷酸化：將 KDR 之單株抗體固定在黑色 ELISA 皿(來自 Packard 之 OptiPlate™, HTRF-96)上。接著，清洗該等皿，並使剩餘的游離蛋白質結合位置飽和充滿 PBS 中的 1% BSA。接著，將該等細胞溶離產物(每孔 20 µg 蛋白質)連同與鹼性磷酸酶(例如，來自 Transduction Laboratories, Lexington, KY 之 PY20:AP)偶合之抗磷酸酪胺酸抗體在該等皿中於 4°C 下培育整夜。再次清洗該等皿，接著使用發光 AP 基質(CDP-Star，即用型，Emerald II；Applied-Biosystems TROPIX Bedford, MA)來證實抗磷酸酪胺酸抗體對所捕獲的磷酸化

受體之結合。以Packard Top Count微板閃爍計數器量測發光度。正控制訊號(以VEGF或PDGF刺激)與負控制訊號(未以VEGF或PDGF刺激)之間的差值對應於VEGF-誘導之KDR-受體磷酸化(=100%)。計算所測試物質之活性作為VEGF-誘導之KDR-受體磷酸化之%抑制，其中將誘導最大抑制之一半的物質濃度定義為ED₅₀(50%抑制之有效劑量)。活性酪胺酸抑制劑化合物具有在0.001 μ M至6 μ M、通常0.005 μ M至0.5 μ M範圍內的ED₅₀值。

醫藥調配物及治療投予

抗VEGF及抗PDGF藥劑可用以治療新血管形成失調，包括牛皮癬、類風濕性關節炎及眼睛新血管形成失調。吾人特別感興趣的是使用PDGF-B拮抗劑化合物與VEGF-A拮抗劑之組合來壓製眼睛新血管形成失調(諸如黃斑退化或糖尿病視網膜病變)之療法。因此，一旦患者診斷為處於發展或患有新血管形成失調之危險中，則該患者接受以下治療：投予PDGF拮抗劑與VEGF拮抗劑之組合以分別阻礙PDGF及VEGF之消極作用，藉此壓製新血管形成失調之發展並減輕與新血管形成相關的有害作用。如上所述，廣泛的各種PDGF及VEGF拮抗劑可用於本發明。

根據本發明之抗PDGF及抗VEGF組合療法可單獨執行或與另一療法結合執行，且其可在家、醫務室、診所、醫院門診部或醫院提供。治療通常開始於醫院以便醫生可密切觀察治療效果並作出所需調整。組合療法之持續時間取決於所治療的新血管形成失調之類型、患者之年齡及狀態、

患者之疾病的階段及類型、以及患者對治療之響應。另外，有更大的發展新血管形成失調之危險的人(例如，糖尿病患者)可接受抑制或延遲症狀發作之治療。本發明所提供的一明顯優勢係：用於治療新血管形成失調的PDGF拮抗劑與VEGF拮抗劑之組合允許投予較低劑量之每一拮抗劑及更少的總活性拮抗劑，藉此以更少毒性及副作用以及降低的成本提供相似效力。

組合療法之每一拮抗劑的投予可藉由致使與其它拮抗劑組合之拮抗劑的濃度可有效治療新血管形成失調之之任何合適方式。例如，每一拮抗劑可與合適的載劑物質混合，且其通常以組合物之總重量之1-95重量%的量存在。組合物可以適合於經眼、經口、非經腸(例如，靜脈內、肌肉內、皮下)、經直腸、經皮、經鼻或吸入投予之劑型提供。因此，組合物可為(例如)錠劑、膠囊、丸粒、粉劑、顆粒、懸浮液、乳液、溶液、包括水凝膠在內之凝膠、糊劑、軟膏、乳劑、膏藥、傳遞裝置、栓劑、灌腸劑、注射劑、植入物、噴霧劑或氣霧劑之形式。含有單一拮抗劑或兩種或兩種以上拮抗劑之醫藥組合物可根據習知醫藥實踐來調配(例如，參見Remington: **The Science and Practice of Pharmacy**, (20th ed.) A.R. Gennaro 編著，2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.; 及 **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**, eds., J. Swarbrick及J. C. Boylan, 1988-2002, Marcel Dekker, New York)。

在一有用態樣中，PDGF及VEGF拮抗劑之組合係非經腸（例如，藉由肌肉內、腹膜內、靜脈內、眼內、玻璃體內、眼球後、結膜下、眼球下(subtenon)或皮下注射或植入)或全身性投予。用於非經腸或全身性投予之調配物包括無菌水溶液或非水溶液、懸浮液或乳液。可使用各種含水載劑，例如水、緩衝水、鹽水及類似物。其它合適媒劑之實例包括聚丙二醇、聚乙二醇、植物油、明膠、水凝膠、氫化萘及可注射的有機酯，諸如油酸乙酯。該等調配物亦可含有輔助物質，諸如防腐劑、潤濕劑、緩衝劑、乳化劑及/或分散劑。可使用可生物相容、可生物降解的丙交酯聚合物、丙交酯/乙交酯共聚物、或聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物以控制活性成分的釋放。

或者，PDGF及VEGF拮抗劑之組合可藉由口服攝取來投予。根據製造醫藥組合物之技術中已知的任何方法，欲經口使用的組合物可製備為固態或液態形式。

經口投予的固態劑型包括膠囊、錠劑、丸粒、粉劑及顆粒。一般而言，該等醫藥製劑含有活性成分（諸如，PDGF小有機分子拮抗劑及VEGF小有機分子拮抗劑）與無毒的醫藥上可接受的賦形劑之混合物。例如，其可包括惰性稀釋劑，諸如碳酸鈣、碳酸鈉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、纖維素、澱粉、磷酸鈣、磷酸鈉、高嶺土及類似物。亦可使用黏合劑、緩衝劑及/或潤滑劑（例如，硬脂酸鎂）。另外，錠劑及丸粒可製備成具有腸溶衣。組合物可視情況含有甜味劑、調味劑、著色劑、加香劑及防腐藥劑以提供

更美味的製劑。

例如，PDGF及VEGF拮抗劑可藉由玻璃體內注射入眼部以及結膜下及眼球下注射來眼內投予。其它投予途徑包括經鞏膜、眼球後、腹膜內、肌肉內及靜脈內。或者，拮抗劑之組合可使用藥物傳遞裝置或眼內植入物(參見下文)來傳遞。

用於經口投予之液態劑型包括醫藥上可接受的乳液、溶液、懸浮液、糖漿及軟明膠膠囊。該等形式含有此項技術中普遍使用的惰性稀釋劑，諸如水或油媒體，且亦可包括佐劑，諸如潤濕劑、乳化劑及懸浮劑。

在某些情況下，PDGF及VEGF拮抗劑之組合亦可局部投予，例如藉由貼片、或藉由直接施用至易受新血管形成失調感染或受到新血管形成失調影響之區域(諸如表皮或眼部)、或藉由離子電滲療法。

用於眼部使用的調配物包括含有活性成分與無毒的醫藥上可接受的賦形劑之混合物之錠劑。該等賦形劑可為(例如)惰性稀釋劑或填充劑(例如，蔗糖及山梨醇)、潤滑劑、助流劑及抗黏著劑(例如，硬脂酸鎂、硬脂酸鋅、硬脂酸、二氧化矽、氫化植物油或滑石)。

可將PDGF及VEGF拮抗劑一起混入錠劑或其它媒劑中，或可將其劃分。在一實例中，第一拮抗劑含在錠劑之內，且第二拮抗劑位於外部，從而使得第二拮抗劑之實質部分在第一拮抗劑釋放之前釋放。若需要，錠劑形式之拮抗劑可使用藥物傳遞裝置來傳遞(參見下文)。

一般而言，應投予足以壓製或降低或消除有毒作用或新血管形成失調之症狀之量的每一拮抗劑。與載劑物質組合以產生單一劑量之活性拮抗劑成分的量將視正接受治療的受測者及特殊投予模式而變化。

所主張的組合中之每一拮抗劑的劑量取決於若干因素，包括病症之嚴重性、該病症是待治療或是待預防、及待治療之患者的年齡、體重及健康狀況。另外，有關特殊患者之藥物基因組(基因型對治療的藥物動力學、藥效或效力概況之影響)資訊可能影響所使用的劑量。此外，熟悉此項技術者將瞭解，精確的個別劑量可根據各種因素做略微調整，包括正投予的PDGF及VEGF拮抗劑之特定組合、投予時間、投予途徑、調配物的性質、排泄率、正治療的特殊新血管形成失調、該失調的嚴重性及新血管形成失調的解剖位置(例如，眼部相對於體腔)。鑒於各種投予途徑的不同效率，應預期所需劑量之廣泛變化。例如，一般將預期經口投予比藉由靜脈內或玻璃體內注射之投予需要更高的劑量含量。該等劑量含量之變化可使用此項技術中熟知的最優化之標準經驗常規方式來調整。精確的治療有效劑量含量及模式通常係藉由主治醫生(諸如眼科醫師)考慮上文所識別的因素來確判定。

一般而言，當經口投予人類時，PDGF拮抗劑或VEGF拮抗劑之劑量通常為約0.001 mg至約200 mg每天，理想地為約1 mg至100 mg每天，且更理想地為約5 mg至約50 mg每天。可能必需高達約200 mg每天的劑量。對於藉由注射之

PDGF拮抗劑或VEGF拮抗劑投予而言，劑量通常為約0.1 mg至約250 mg每天，理想地為約1 mg至約20 mg每天，或約3 mg至約5 mg每天。可每日注射高達約四次。一般而言，當非經腸或全身性投予人類時，與PDGF拮抗劑組合使用的VEGF拮抗劑之劑量通常為約0.1 mg至約1500 mg每天，或約0.5 mg至約10 mg每天，或約0.5 mg至約5 mg每天。可能必需高達約3000 mg每天的劑量。

當經眼投予人類時，與PDGF拮抗劑組合使用的VEGF拮抗劑之劑量通常為約0.15 mg至約3.0 mg每天，或約0.3 mg至約3.0 mg每天，或約0.1 mg至1.0 mg每天。

例如，就眼科使用而言，將PDGF-B及VEGF-A適體藥物物質調配在pH值為5-7的磷酸鹽緩衝鹽水中。可添加氫氧化鈉或鹽酸以調整pH值。在一運用的調配物中，個別地將PDGF-B適體及VEGF-A適體(諸如EYE001)調配成包裝在裝配有無菌27-規格針之無菌1 ml USP I型分度玻璃注射器中的三種不同濃度：3 mg/100 μ l、2 mg/100 μ l及1 mg/100 μ l。該組合藥物產物不含防腐劑，且欲僅藉由玻璃體內注射來單次使用。活性成分為30 mg/ml、20 mg/ml及10 mg/ml濃度之PDGF-B及VEGF-A藥物物質。賦形劑為氯化鈉，USP；磷酸二氫鈉單水化合物，USP；磷酸氫二鈉七水合物，USP；氫氧化鈉，USP；鹽酸，USP；及注射用水，USP。在該形式中，PDGF-B及VEGF-A適體藥物產物係在一次性玻璃注射器中所提供的即用無菌溶液中。在使用之前至少30分鐘(但不要超過4小時)自冷藏庫取出注射器

以使溶液達到室溫。注射器內含物之投予涉及將有螺紋的塑料活塞桿附著至注射器之筒內的橡膠塞。接著，移除橡膠端蓋以允許投予產物。以28天的時間間隔三次投予作為100 μ l玻璃體內注射液之PDGF-B及VEGF-A適體。患者每次檢查接受3 mg/注射液。若需要，將劑量降低至2 mg或1 mg，及進一步至0.1 mg。

所投予之藥物之特定量視組份之特定組合而定。在一所要劑量組合中，PDGF拮抗劑與VEGF拮抗劑之比為約50:1重量比約20:1重量比，約10:1重量比，或約4:1重量比，約2:1重量比，或約1:1重量比。

有用的組合療法包括PDGF-B適體拮抗劑及VEGF-A適體拮抗劑。該等拮抗劑以自約0.1比約5.0至約5.0比0.1的重量比範圍內的PDGF-B適體拮抗劑與VEGF-A適體拮抗劑之組合形式使用。該等兩種拮抗劑(PDGF-B比VEGF-A拮抗劑)之有用範圍為約0.5比約2.0，或約2.0比0.5，而另一有用的比率為約1.0比約1.0，其最終視PDGF-B適體拮抗劑及VEGF-A適體拮抗劑之選擇而定。

組合療法中的每一藥物之投予均可獨立地為每天一至四次歷時一天至一年，且甚至可為患者之終生。在許多情況下將指示慢性的長期投予。該劑量可作為單劑量投予或分為多劑量投予。一般而言，所要劑量應以設定間隔投予歷時一延長期，通常至少經若干週，但亦可能需要若干月或更久的更長投予時期。

除了治療先存在的新血管形成失調外，可預防性地投予

包括PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑之組合療法以預防或減緩該等失調之發作。在預防性應用中，將PDGF及VEGF拮抗劑投予至易受特殊新血管形成失調感染或另外有特殊新血管形成失調之危險之患者。此外，精確的投予定時及投予量視各種因素而定，諸如患者的健康狀態、體重等。

在一運用的實例中，PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑之組合通常以可注射的醫藥組合物之形式投予需要用其治療的哺乳動物。在組合態樣中，例如，PDGF-B適體及VEGF-A適體可分開投予或以含有兩者之醫藥組合物投予。一般而言較佳地，該投予係藉由注射或藉由使用藥物傳遞裝置。非經腸、全身性或經皮投予亦可接受。

如上所述，當PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑一起投予時，該投予可為及時地相繼進行或同時進行，其中該相繼方法係一投予模式。當相繼投予PDGF及VEGF拮抗劑時，每一投予均可藉由相同或不同的方法進行。然而，對於相繼投予而言，該方法採用在約五秒內投予PDGF拮抗劑(達約三次注射)隨後每六週持續投予VEGF拮抗劑達每年約九次注射係有用的。PDGF拮抗劑可在每次VEGF拮抗劑注射時投予，或可根據醫生決定較不頻繁地給予。相繼投予亦包括一組合，其中各拮抗劑可以不同次數或藉由不同途徑或兩者結合的方式投予，但其組合起作用提供一有益效果，例如壓製新血管形成失調。亦注意，藉由注射之投予特別有用。

將根據本發明之醫藥組合物調配成一經投予即大體上立

即釋放或可使用受控釋放的調配物調配成在投予後的任何預定時期內釋放活性PDGF及VEGF拮抗劑。例如，可在持續釋放組合物中提供包括各PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑中之至少一種的醫藥組合物。立即或持續釋放的組合物之使用視欲治療之病症性質而定。若該病症係由急性或過急性失調組成，則通常將越過延長釋放的組合物利用立即釋放形式之治療。對於某些預防性或長期治療而言，持續釋放的組合物亦可能適當。

當單獨投予或組合投予之拮抗劑具有：(i)窄的治療指數（例如，導致有害副作用或有毒反應之血漿濃度與導致治療效果的血漿濃度之間的差值較小；一般而言，將治療指數TI定義為中值致死劑量(LD₅₀)與中值有效劑量(ED₅₀)之比率)；(ii)在胃腸道中的窄的吸收窗；或(iii)較短的生物學半衰期，從而在一天內需要頻繁地定量給藥以將血漿含量維持在一治療水平時，在受控釋放之調配物中的每一拮抗劑投予均有用。

可尋求許多策略以獲得其中釋放速率超過治療拮抗劑的降解速率或代謝速率之受控釋放。例如，受控釋放可藉由適當選擇調配參數及成分來獲得，例如，包括選擇適當的受控釋放之組合物及包衣。實例包括單或多單元錠劑或膠囊組合物、油溶液、懸浮液、乳液、微膠囊、微球、奈米粒子、貼片及脂質體。用於製備該等持續或受控釋放之調配物之方法在此項技術中已眾所周知。

包括PDGF拮抗劑及/或VEGF拮抗劑或兩者之醫藥組合

物亦可使用藥物傳遞裝置(諸如，植入物)來傳遞。該等植入物可為可生物降解及/或可生物相容的植入物，或可為非可生物降解的植入物。該等植入物可滲透或不可滲透活性劑。可將眼科藥物傳遞裝置插入眼睛腔室內，諸如前部或後部腔室，或者可將其植入或植在鞏膜、脈絡膜空間或玻璃體外部的驅血(avasascularized)區域上。在一實施例中，可將植入物置於無血管區域上方，諸如鞏膜上，以使藥物跨鞏膜擴散至所要治療部位，例如眼內空間及眼睛黃斑部。此外，跨鞏膜擴散之部位可接近於新血管形成之部位，諸如最接近於黃斑之部位。

如上所述，本發明係關於將分開的醫藥組合物組合在醫藥包中。因此，本發明之組合係作為醫藥包的組份而提供。可以個別劑量一起或分開調配至少兩種拮抗劑。當調配為鹽時，本發明之拮抗劑亦有用。

醫藥包一般包括：(1)第一單位劑型之一一定量的PDGF拮抗劑及醫藥上可接受的載劑、媒劑或稀釋劑；(2)第二單位劑型之一一定量的VEGF拮抗劑及醫藥上可接受的載劑、媒劑或稀釋劑；及(3)容器。容器係用於分離各組份，可包括(例如)分區瓶或分區箔包。若需要，分開的拮抗劑組合物亦可包含在單個的未經分區的容器內。醫藥包亦可包括分開的PDGF及VEGF拮抗劑之投予指導。當以不同劑型、不同的劑量投予分開的組份時，或當處方醫師要求滴定組合之個別組份時，醫藥包特別有利。在一實施例中，將醫藥包設計成按其所欲之用途的次序一次一種地分配PDGF及

VEGF拮抗劑的劑量。在另一實例中，將醫藥包設計成含有數列並排置於包中的PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑，並在包上具有說明書用以向使用者傳達待投予一對拮抗劑。一示範性醫藥包係在醫藥包裝工業中所熟知的所謂發泡包。

效力

藉由任何公認的量測血管生成是得以減緩或減少之方法來評估新血管形成失調之壓製。其包括直接觀察及間接評估，諸如藉由評估主觀症狀或客觀生理指示。例如，治療效力可基於新血管形成、微血管病、血管滲漏或血管水腫或其任何組合的防止或逆轉來評估。用於評估眼睛新血管形成失調之壓製的治療效力亦可根據穩定或改良視覺敏銳度來界定。

在確定特殊組合療法在治療或防止眼睛新血管形成失調中的效力時，亦可在注射後的若干天及下次注射前的至少一個月，由眼科醫師臨床評估患者。亦根據眼科醫師的要求，在前4個月每月一次執行ETDRS視覺敏銳度、柯達彩色膠片照相及螢光素血管造影術。

例如，為了評定組合PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑療法用以治療眼睛新血管形成之效力，進行涉及如下步驟之研究：根據眼科技術中熟知的標準方法，在罹患次於年齡相關之黃斑退化之窩下鱗脈絡膜新血管形成之患者中投予PDGF-B適體與VEGF-A適體（例如，聚乙二醇化形式的EYE001）之組合的單或多玻璃體內注射液。在一運用的研究中，患有次於年齡相關之黃斑退化（AMD）之窩下鱗脈絡

膜新血管形成(CNV)之患者接受PDGF-B適體及VEGF-A適體的單一玻璃體內注射。藉由(例如)眼科評估來監控該組合之效力。在治療後的三個月展示穩定或改良的視力的患者，例如在ETDRS圖表上展示3-線或更大視力改良之患者，被視為是接受了壓製眼睛新血管形成失調的PDGF-B適體及VEGF-A適體之有效劑量組合。

在一運用的研究實例中，患有次於年齡相關之黃斑退化之窩下鱗CNV且視覺敏銳度差於ETDRS圖表上之20/200的患者接受PDGF-B適體及VEGF-A適體之單一玻璃體內注射。起始劑量為玻璃體內一次注射的0.25 mg每一拮抗劑。亦測試了0.5 mg、1 mg、2 mg及3 mg每一拮抗劑之劑量。亦執行了藉由眼底照相及螢光素血管造影術之完全的眼科檢查。組合藥物產品係即用型無菌溶液，其包含溶解在無菌及無致熱原的1 cc玻璃體注射器筒中的10 mM磷酸鈉及0.9%氯化鈉緩衝注射液中的PDGF-B適體及VEGF-A適體，在該注射器筒中，有一經塗覆之塞子附著至塑料活塞，且在預附著的27規格針上有一橡膠端蓋。供應PDGF-B及VEGF-A適體使每一適體之藥物濃度達到1 mg/ml、2.5 mg/ml、5 mg/ml、10 mg/ml、20 mg/ml或30 mg/ml(表示為寡核苷酸之含量)以提供100 μ l傳遞容積。在注射PDGF-B及VEGF-A適體後的約3個月，執行敏銳度研究以評估該治療之效力。在治療後展示穩定或改良的視力之患者，例如彼等展示ETDRS圖表上之3-線或更大的視力增加之患者，被視為是接受了壓製眼睛新血管形成失調之PDGF-B及

VEGF-A適體的有效劑量組合。

實例

以下實例說明製備及實踐本發明的某些模式，但無意欲限制本發明的範疇，因為可使用替代方法來獲得相似結果。

實例1: 角膜新血管形成(角膜NV)

角膜新血管形成係一種允許清晰地可視化眼部的異常血管生長的廣泛使用的動物模型。生長入正常的無血管角膜中之血管可變得非常確實，從而使其成為研究血管衰退之有吸引力的模型。為了誘導實驗性角膜NV，用肌肉內鹽酸氯胺酮(25 mg/kg)及甲苯噻嗪(10 mg/kg)麻醉雄性C57BL/6小鼠(18-20 g; Charles River, Wilmington, MA)。局部施用NaOH(2 μ l of 0.2 mM)。藉由使用#21刀片(Feather, 大阪, 日本)平行於緣施加旋轉運動來移除角膜及緣上皮細胞。在7天之後，藉由一天兩次腹膜內注射25 mg/kg的pegaptanib鈉(Magugen, 及抗-VEGF適體藥劑)或藉由一天兩次藉由強飼法經口投予50 mg/kg的Gleevec/STI57((亦稱為CGP57148B)，來自瑞士Basel之Novartis Pharma AG的2-苯基氨基嘧啶相關的酪胺酸激酶抑制抗-PDGF藥劑)或兩者共持續7天來治療小鼠。在誘導角膜NV後14天，小鼠靜脈內接受偶合伴刀豆球蛋白A凝集素(Vector Laboratories, Burlingame, CA)之20 μ g/g螢光素-異硫氰酸，同時用鹽酸甲苯噻嗪及鹽酸氯胺酮深度麻醉。三十分鐘後，摘出小鼠眼部，並將角膜平放。使用螢光顯

微法來觀測角膜NV，並使用Openlab軟體將其量化。將血管所覆蓋的角膜之百分比計算為總角膜面積的百分比。

研究在施用NaOH後pegaptanib鈉及Gleevec對角膜新血管形成的影響及對緣及角膜之上皮細胞的傷害。與未經治療及經Gleevec治療的眼部兩者相比，以pegaptanib鈉(Macugen)治療的動物展示出19.6%($p=0.0014$)的血管生長之降低(圖5)。與對照組及單獨以Gleevec治療的動物相比，以pegaptanib鈉及Gleevec(Mac+Glee)治療的動物展示出明顯更少的角膜上的新血管生長(35.6%， $p<0.0001$)(圖5)。組合治療亦比單獨pegaptanib鈉(Macugen)更有效地減少了血管生長(16%， $p<0.0145$)。

代表性角膜新血管形成實驗的結果亦展示於圖6及圖7中。圖6(D)係一螢光顯微影像的照片表示，其展示了與Macugen(圖6(C))或Gleevec(圖6(B))之個別治療相比經組合(Mac+Gleevec)治療的角膜中的新血管形成之有效抑制。圖6(A)係螢光顯微影像的照片表示，其展示了對照(PEG治療)角膜中的新血管形成之程度。圖7係螢光顯微影像的照片表示，其顯示：個別(圖7(A))((APB5治療)及圖7(B)(Gleeve治療))及組合治療(圖7(C))僅抑制了新血管生長，且不會影響已形成的血管。圖7(D)係一螢光顯微影像的照片表示，其展示了在對照(PEG治療)角膜中新血管形成的程度。

實例2：脈絡膜新血管形成(CNV)

實驗性CNV常用作年齡相關之黃斑退化(AMD)之模型。

在該模型中，脈絡膜血管生長穿過Bruch膜的破裂處並進入視網膜，此類似於AMD患者中之觀察。為了誘導實驗性CNV，用肌肉內鹽酸氯胺酮(25 mg/kg)及甲苯噻嗪(10 mg/kg)麻醉雄性C57BL/6小鼠(18-20 g；Charles River, Wilmington, MA)，且以1%托品醯胺擴張瞳孔。使用二極體雷射凝固(75- μ m光斑尺寸，0.1秒持續時間，90 mW，Oculight SL雷射，IRIDEX，Mountain View，CA)及手提式蓋玻片(cover slide)作為接觸透鏡來產生四處灼傷。將灼傷定位至視網膜之後極的3、6、9及12點的位置。在雷射時產生指示Bruch膜破裂的氣泡係獲得脈絡膜新血管形成的重要因素，因而在研究中僅包括所有四處灼傷均產生氣泡的小鼠。在7天之後，藉由一天兩次腹膜內注射25 mg/kg pegaptanib鈉或藉由強飼法一天兩次50 mg/kg Gleevec/STI57(Novartis Pharma AG，Basel，瑞士)或兩者來治療小鼠歷時7天。在使用APB5(來自eBioscience，San Diego，CA的抗小鼠PDGFRb(CD140b)抗體(抗-PDGF藥劑))的實驗中，利用一天兩次的腹膜內注射來投予5 mg/kg抗體。在染有PECAM的平放脈絡膜中量測脈絡膜NV病變面積。藉由螢光顯微法檢查平放物，並使用Openlab軟體來量化。

與未經治療的對照組相比，經pegaptanib鈉(Macugen)治療的眼部展示了24%($p=0.007$)的CNV面積的減小(圖8)。相比之下，APB5治療的眼部並未明顯不同於對照組(相較於對照組有6.5%的CNV面積的降低)。與對照組眼部或單獨

以 pegaptanib 鈉 (22% , $p=0.011$) 或 APB5 (39.5% , $p<0.0001$) 治療的眼部相比 , 經 pegaptanib 鈉 及 APB5 兩者治療的眼部展示了明顯更小的 (46% $p=0.001$) CNV 面積 (圖 8)。

當使用 PDGFR β 抑制劑 Gleevec 時 , 觀察到類似趨勢。經 Gleevec 治療的眼部並未展示出明顯不同於對照組眼部 (4.2%) (圖 9)。然而 , 在經 pegaptanib 鈉 (Macugen) 治療的眼部中的 CNV 面積明顯不同於對照組的 CNV 面積 (小 27% , $p=0.0034$)。重要地 , 經 pegaptanib 鈉 及 Gleevec (Mac+Glee) 治療的動物相較於對照組眼部展示了最小量的 CNV (46% , $p<0.0001$) , 且相較於單獨經 pegaptanib 鈉 治療的眼部展示了 19% 的 CNV 面積之減小 ($p=0.0407$) (圖 9)。

等效物

在不脫離本發明之範疇及精神下 , 熟習此項技術者將明瞭本發明所描述之方法及系統的各種修改及變化。儘管已配合特定需要的實施例描述了本發明 , 但應瞭解所主張之本發明不應過度地限於該等特定實施例。熟習此項技術者將瞭解或能夠僅僅使用常用實驗法來探知本文所描述的發明之特定實施例的許多等效物。該等均等物欲涵蓋在本發明之範疇內。

【圖式簡單說明】

圖 1(A) 係人類 PDGF-B 之核酸序列 (GenBank 寄存號 : X02811) (SEQ ID NO:1) 的示意表示。

圖 1(B) 係人類 PDGF-B 之胺基酸序列 (GenBank 寄存號 : CAA26579) (SEQ ID NO:2) 的示意表示。

圖 1(C)係人類 PDGF-A 之核酸序列 (GenBank 寄存號 : X06374)(SEQ ID NO:11)的示意表示。

圖 1(D)係人類 PDGF-A 之多肽序列 (GenBank 寄存號 : CAA29677)(SEQ ID NO:12)的示意表示。

圖 2(A)係人類 VEGF 之核酸序列 (GenBank 寄存號 : NM_003376)(SEQ ID NO:3)的示意表示。

圖 2(B)係人類 VEGF 多肽之胺基酸序列 (GenBank 寄存號 : NP_003367)(SEQ ID NO:4)的示意表示。

圖 3(A)係人類 PDGFR-B 之核酸序列 (GenBank 寄存號 : NM_002609)(SEQ ID NO:5)的示意表示。

圖 3(B)係人類 PDGFR-B 之多肽序列 (GenBank 寄存號 : NP_002600)(SEQ ID NO:6)的示意表示。

圖 3(C)係人類 PDGFR-A 之核酸序列 (GenBank 寄存號 : NM_006206)(SEQ ID NO:13)的示意表示。

圖 3(D)係人類 PDGFR-A 之多肽序列 (GenBank 寄存號 : NP_006197)(SEQ ID NO:14)的示意表示。

圖 4(A)係人類 VEGFR-1(Flt-1)之核酸序列 (GenBank 寄存號 : AF063657)(SEQ ID NO:7)的示意表示。

圖 4(B)係人類 VEGFR-1(Flt-1)之多肽序列 (GenBank 寄存號 :)(SEQ ID NO: 8)的示意表示。

圖 4(C)係人類 VEGFR-2(KDR/Flk-1)之核酸序列 (GenBank 寄存號 : AF035121)(SEQ ID NO:9)的示意表示。

圖 4(D)係人類 VEGFR-2(KDR/Flk-1)之多肽序列 (GenBank 寄存號 : AAB88005)(SEQ ID NO:10)的示意表

示。

圖 5 係將對照治療(cont)、Gleevec 治療(抗 PDGF 藥劑)及 Macugen 治療(即 pegaptanib 治療，抗 VEGF 藥劑)與 Macugen 及 Gleevec 之組合治療(抗 PDGF/抗 VEGF 組合療法)之結果進行比較的角膜新血管形成檢定之結果的圖形表示。

圖 6(A)係發生在對照(以 PEG 治療)小鼠角膜中之角膜新血管形成的螢光顯微影像之照片表示。

圖 6(B)係發生在以 Gleevec 治療的小鼠角膜中之角膜新血管形成的螢光顯微影像之照片表示。

圖 6(C)係發生在以 Macugen 治療的小鼠角膜中之角膜新血管形成的螢光顯微影像之照片表示。

圖 6(D)係發生在以 Macugen 及 Gleevec 兩者治療的小鼠角膜中之角膜新血管形成的螢光顯微影像之照片表示。

圖 7(A)係展示正常角膜脈管系統未受 APB5(PDGFR 抗體，抗 PDGF 藥劑)之投予影響的螢光顯微影像之照片表示。

圖 7(B)係展示正常角膜脈管系統未受 Gleevec 投予影響之螢光顯微影像之照片表示。

圖 7(C)係展示正常角膜脈管系統未受 Macugen(Mac)及 Gleevec 共同投予影響之螢光顯微影像之照片表示。

圖 7(D)係展示正常角膜脈管系統未受 PEG 投予影響之螢光顯微影像之照片表示。

圖 8 係將對照治療(cont)、Gleevec 治療(抗 PDGF 藥劑)及 Macugen 治療(即 pegaptanib 治療，抗 VEGF 藥劑)與 Macugen

及 Gleevec 之組合治療(抗 PDGF/抗 VEGF 組合療法)的結果進行比較之雷射誘導之脈絡膜新血管形成檢定結果之圖形表示。

圖 9 係將對照治療(cont)、APB5 治療(抗 PGFR 抗體，其充當抗 PDGF 藥劑)及 Macugen 治療(即 pegaptanib 治療，抗 VEGF 適體)與 Macugen 及 APB5 之組合治療(Mac+APB5)的結果進行比較之雷射誘導之脈絡膜新血管形成檢定結果之圖形表示。

五、中文發明摘要：

本發明係關於藉由向診斷患有新血管形成失調或有發展新血管形成失調之危險的患者投予PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑來治療該患者的方法。本發明亦係關於一種含有PDGF拮抗劑及VEGF拮抗劑以用於治療或預防新血管形成失調之醫藥組合物。

六、英文發明摘要：

十一、圖式：

PDGF-B 核酸序列 (GenBank 寄存號：X02811) (SEQ ID NO: 1)

1 CCCTGCCTGC CTCCCTGCGC ACCCGCAGCC TCCCCCGCTG CCTCCCTAGG GCTCCCCCTCC
61 GGCCGCCAGC GCCCATTTTT CATTCCCTAG ATAGAGATAC TTTGCGCGCA CACACATACA
121 TACGCGCGCA AAAAGGAAAA AAAAAAAAAA AAGCCCACCC TCCAGCCTCG CTGCAAAGAG
181 AAAACCGGAG CAGCCGAGC TCGCAGCTCG CAGCCCGCAG CCCGCAGAGG ACGCCCAGAG
241 CGGCGAGCGG GCGGGCAGAC GGACCGACGG ACTCGCGCCG CGTCCACCTG TCGGCCGGGG
301 CCAGCCGAGC GCGCAGCGGG CACGCCGCGC GCGCGGAGCA GCCGTGCCCG CCGCCCGGGC
361 CCGCCGCCAG GGCGCACACG CTCCCGCCCC CCTACCCGGC CCGGGCGGGA GTTTCACCT
421 CTCCCTGCCC GGGTGCTCGA GCTGCCGTTG CAAAGCCAAC TTTGAAAAA GTTTTTTGGG
481 GGAGACTTGG GCCTTGAGGT GCCCAGCTCC GCGCTTTCCG ATTTTGGGGG CCTTTCCAGA
541 AAATGTTGCA AAAAAGCTAA GCCGGCGGGC AGAGGAAAAAC GCCTGTAGCC GGCAGGTGAA
601 GACGAACCAT CGACTGCCGT GTTCCTTTTC CTCTTGAGG TTGGAGTCCC CTGGGCGCCC
661 CCACACGGCT AGACGCCTCG GCTGGTTCGC GACGCAGCCC CCCGGCCGTG GATGCTGCAC
721 TCGGGCTCGG GATCCGCCCA GGTAGCGGCC TCGGACCCAG GTCCTGCGCC CAGGTCTCC
781 CCTGCCCCC AGCGACGGAG CCGGGGCCGG GGGCGGCGGC GCCGGGGGCA TCGGGGTGAG
841 CCGCGGCTGC AGAGGCCTGA GCGCCTGATC GCCGCGGACC CGAGCCGAGC CCACCCCCCT
901 CCCCAGCCCC CCACCCTGGC CGCGGGGGCG GCGCGCTCGA TCTACGCGTT CGGGGCCCCG
961 CGGGGCCGGG CCCGGAGTCG GCATGAATCG CTGCTGGGCG CTCTTCCTGT CTCTCTGCTG
1021 CTACCTGCGT CTGGTCAGCG CCGAGGGGGA CCCCATTTCC GAGGAGCTTT ATGAGATGCT
1081 GAGTGACCAC TCGATCCGCT CCTTTGATGA TCTCCAACGC CTGCTGCACG GAGACCCCG
1141 AGAGGAAGAT GGGGCCGAGT TGGACCTGAA CATGACCCGC TCCCACTCTG GAGGCGAGCT
1201 GGAGAGCTTG GCTCGTGGA GAAGGAGCCT GGGTTCCCTG ACCATTGCTG AGCCGGCCAT
1261 GATCGCCGAG TGCAAGACGC GCACCGAGGT GTTCGAGATC TCCGCGGCC TCATAGACCG
1321 CACCAACGCC AACTTCCTGG TGTGGCCGCC CTGTGTGGAG GTGCAGCGCT GCTCCGGCTG
1381 CTGCAACAAC CGCAACGTGC AGTGCCGCCC CACCCAGGTG CAGCTGCGAC CTGTCCAGGT
1441 GAGAAAGATC GAGATTGTGC GGAAGAAGCC AATCTTTAAG AAGGCCACGG TGACGCTGGA
1501 AGACCACCTG GCATGCAAGT GTGAGACAGT GGCAGCTGCA CGGCCTGTGA CCCGAAGCCC

圖 1(A)

1561 GGGGGGTTCC CAGGAGCAGC GAGCCAAAAC GCCCCAACT CGGGTGACCA TTCGGACGGT
1621 GCGAGTCCGC CGGCCCCCA AGGGCAAGCA CCGGAAATTC AAGCACACGC ATGACAAGAC
1681 GGCAGTGAAG GAGACCCCTG GAGCCTAGGG GCATCGGCAG GAGAGTGTGT GGGCAGGGTT
1741 ATTTAATATG GTATTGCTG TATTGCCCC ATGGGGCCTT GGAGTAGATA ATATTGTTTC
1801 CCTCGTCCGT CTGTCTCGAT GCCTGATTCG GACGGCCAAT GGTGCCTCCC CCACCCCTCC
1861 ACGTGTCCGT CCACCCCTCC ATCAGCGGGT CTCCTCCAG CGGCCTCCGG CTCTTGCCCA
1921 GCAGCTCAAG AAGAAAAAGA AGGACTGAAC TCCATCGCCA TCTTCTTCCC TTAAGTCCAA
1981 GAACTTGGGA TAAGAGTGTG AGAGAGACTG ATGGGGTCGC TCTTTGGGG AAACGGGTTC
2041 CTTCCCCTGC ACCTGGCCTG GGCCACACCT GAGCGCTGTG GACTGTCCTG AGGAGCCCTG
2101 AGGACCTCTC AGCATAGCCT GCCTGATCCC TGAACCC

PDGF-B 前肽序列 (GenBank 寄存號 : CAA26579) (SEQ ID NO: 2)

1 MNRCWALFLS LCCYLRLVSA EGDPIPEELY EMLSDHSIRS FDDLQRL LHG DPGEEDGAEL
61 DLNMTRSHSG GELESLARGR RSLGSLTIAE PAMIAECKTR TEVFEISRRL IDRTNANFLV
121 WPPCVEVQRC SGCCNNRNVQ CRPTQVQLRP VQVRKIEIVR KKPIFKKATV TLEDHLACKC
181 ETVAAARPVT RSPGGSQEQR AKTPQTRVTI RTVRVRRPPK GKHRKFKHTH DKTALKETLG
241 A

圖 1(B)

PDGF-A 核酸序列 (GenBank 寄存號 : X06374) (SEQ ID NO: 11)

1 TTCTTGGGGC TGATGTCCGC AAATATGCAG AATTACCGGC CGGGTCGCTC CTGAAGCCAG
61 CGCGGGGAGC GAGCGCGGCG GCGGCCAGCA CCGGGAACGC ACCGAGGAAG AAGCCCAGCC
121 CCCGCCCTCC GCCCCTCCG TCCCCACCCC CTACCCGGCG GCCCAGGAGG CTCCCCGGCT
181 GCGGCGCGCA CTCCCTGTTT CTCCTCCTCC TGGCTGGCGC TGCCTGCCTC TCCGCACTCA
241 CTGCTCGCCG GGCGCCGTCC GCCAGCTCCG TGCTCCCCGC GCCACCCTCC TCCGGGCGCG
301 GCTCCCTAAG GGATGGTACT GAATTTGCGC GCCACAGGAG ACCGGCTGGA GCGCCCGCCC
361 CGCGCCTCGC CTCTCCTCCG AGCAGCCAGC GCCTCGGGAC GCGATGAGGA CCTTGGCTTG
421 CCTGCTGCTC CTCGGCTGCG GATACCTCGC CCATGTTCTG GCCGAGGAAG CCGAGATCCC
481 CCGCGAGGTG ATCGAGAGGC TGGCCCGCAG TCAGATCCAC AGCATCCGGG ACCTCCAGCG
541 ACTCCTGGAG ATAGACTCCG TAGGGAGTGA GGATTCTTTG GACACCAGCC TGAGAGCTCA
601 CGGGGTCCAC GCCACTAAGC ATGTGCCCGA GAAGCGGCCC CTGCCCATTG GGAGGAAGAG
661 AAGCATCGAG GAAGCTGTCC CCGCTGTCTG CAAGACCAGG ACGGTCATTT ACGAGATTCC
721 TCGGAGTCAG GTCGACCCCA CGTCCGCCAA CTCCTGATC TGGCCCCCGT GCGTGGAGGT
781 GAAACGCTGC ACCGGCTGCT GCAACACGAG CAGTGTCAGG TGCCAGCCCT CCCGCGTCCA
841 CCACCGCAGC GTCAAGGTGG CCAAGGTGGA ATACGTCAGG AAGAAGCCAA AATTAAAAGA
901 AGTCCAGGTG AGGTTAGAGG AGCATTTGGA GTGCGCCTGC GCGACCACAA GCCTGAATCC
961 GGATTATCGG GAAGAGGACA CGGATGTGAG GTGAGGATGA GCCGCAGCCC TTTCTTGGGA
1021 CATGGATGTA CATGGCGTGT TACATTCCTG AACCTACTAT GTACGGTGCT TTATTGCCAG
1081 TGTGCGGTCT TTGTTCTCCT CCGTGAAAAA CTGTGTCCGA GAACACTCGG GAGAACAAAG
1141 AGACAGTGCA CATTTGTTTA ATGTGACATC AAAGCAAGTA TTGTAGCACT CGGTGAAGCA

圖 1(C)

1201 GTAAGAAGCT TCCTTGTC AAAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAAAA CAAAACCACA
1261 AATGACAAAA ACAAACGGA CTCACAAAA TATCTAACT CGATGAGATG GAGGGTCGCC
1321 CCGTGGGATG GAAGTGCAGA GGTCTCAGCA GACTGGATTT CTGTCCGGGT GGTCACAGGT
1381 GCTTTTTTGC CGAGGATGCA GAGCCTGCTT TGGGAACGAC TCCAGAGGGG TGCTGGTGGG
1441 CTCTGCAGGG CCCGCAGGAA GCAGGAATGT CTTGGAAACC GCCACGCGAA CTTTAGAAAC
1501 CACACCTCCT CGCTGTAGTA TTTAAGCCCA TACAGAAACC TTCCTGAGAG CCTTAAGTGG
1561 TTTTTTTTTT TGTTTTTGTT TTGTTTTTTT TTTTTTTGTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
1621 TTACACCATA AAGTGATTAT TAAGCTTCCT TTTACTCTTT GGCTAGCTTT TTTTTTTTTT
1681 TTTTTTTTTT TTTTTTTTAA TTATCTCTTG GATGACATTT ACACCGATAA CACACAGGCT
1741 GCTGTAAGTG TCAGGACAGT GCGACGGTAT TTTTCCTAGC AAGATGCAAA CTAATGAGAT
1801 GTATTAAAT AAACATGGTA TACCTACCTA TGCATCATTT CCTAAATGTT TCTGGCTTTG
1861 TGTTTCTCCC TTACCCTGCT TTATTTGTTA ATTTAAGCCA TTTTGAAAGA ACTATGCGTC
1921 AACCAATCGT ACGCCGTCCT TGCGGCACCT GCCCCAGAGC CCGTTTGTGG CTGAGTGACA
1981 ACTTGTTCCC CGCAGTGCAC ACCTAGAATG CTGTGTTCCC ACGCGGCACG TGAGATGCAT
2041 TGCCGCTTCT GTCTGTGTTG TTGGTGTGCC CTGGTGCCGT GGTGGCGGTC ACTCCCTCTG
2101 CTGCCAGTGT TTGGACAGAA CCCAAATTCT TTATTTTGG TAAGATATTG TGCTTTACCT
2161 GTATTAACAG AAATGTGTGT GTGTGGTTTG TTTTTTTGTA AAGGTGAAGT TTGTATGTTT
2221 ACCTAATATT ACCTGTTTTG TATACCTGAG AGCCTGCTAT GTTCTTCTTT TGTGATCCA
2281 AAATTAAAAA AAAAATACCA CCAAC

PDGF-A 多肽序列 (GenBank 寄存號 : CAA29677) (SEQ ID NO: 12)

1 MRTLACLLLL GCGYLAHVLA EEAEIPREVI ERLARSQIHS IRDLQRLEI DSVGSEDSLD
61 TSLRAHGVHA TKHVPEKRPL PIRRKRSIEE AVPAVCKTRT VIYEIPRSQV DPTSANFLIW
121 PPCVEVKRCT GCCNTSSVKC QPSRVHHRVS KVAKVEYVRK KPKLKEVQVR LEEHLECACA
181 TTSLNPDYRE EDTDVR

圖 1(D)

VEGF 核酸序列 (GenBank 寄存號 : NM_003376) (SEQ ID NO: 3)

1 TCGCGGAGGC TTGGGGCAGC CGGGTAGCTC GGAGGTCGTG GCGCTGGGGG CTAGCACCAG
61 CGCTCTGTCG GGAGGCGCAG CGGTTAGGTG GACCGGTCAG CGGACTCACC GGCCAGGGCG
121 CTCGGTGCTG GAATTTGATA TTCATTGATC CGGGTTTTAT CCCTCTTCTT TTTTCTTAAA
181 CATTTTTTTT TAAAACTGTA TTGTTTCTCG TTTTAATTTA TTTTGCTTG CCATTCCCCA
241 CTTGAATCGG GCCGACGGCT TGGGGAGATT GCTCTACTTC CCCAAATCAC TGTGGATTTT
301 GGAAACCAGC AGAAAGAGGA AAGAGGTAGC AAGAGCTCCA GAGAGAAGTC GAGGAAGAGA
361 GAGACGGGGT CAGAGAGAGC GCGCGGGCGT GCGAGCAGCG AAAGCGACAG GGGCAAAGTG
421 AGTGACCTGC TTTTGGGGGT GACCGCCGGA GCGCGGCGTG AGCCCTCCCC CTTGGGATCC
481 CGCAGCTGAC CAGTCGCGCT GACGGACAGA CAGACAGACA CCGCCCCCAG CCCCAGCTAC
541 CACCTCCTCC CCGGCCGGCG GCGGACAGTG GACGCGGCGG CGAGCCGCGG GCAGGGGCCG
601 GAGCCCGCGC CCGGAGGCGG GGTGGAGGGG GTCGGGGCTC GCGGCGTCGC ACTGAAACTT
661 TTCGTCCAAC TTCTGGGCTG TTCTCGCTTC GGAGGAGCCG TGGTCCGCGC GGGGGAAGCC
721 GAGCCGAGCG GAGCCGCGAG AAGTGCTAGC TCGGGCCGGG AGGAGCCGCA GCCGGAGGAG
781 GGGGAGGAGG AAGAAGAGAA GGAAGAGGAG AGGGGGCCGC AGTGCGGACT CGGCGCTCGG
841 AAGCCGGGCT CATGGACGGG TGAGGCGGCG GTGTGCGCAG ACAGTGCTCC AGCCGCGCGC
901 GCTCCCCAGG CCCTGGCCCC GGCCTCGGGC CGGGGAGGAA GAGTAGCTCG CCGAGGCGCC
961 GAGGAGAGCG GGCCGCCCCA CAGCCCAGC CGGAGAGGGA GCGCGAGCCG CGCCGGCCCC
1021 GGTCGGGCCT CCGAAACCAT GAACTTTCTG CTGTCTTGGG TGCATTGGAG CCTTGCCTTG
1081 CTGCTCTACC TCCACCATGC CAAGTGGTCC CAGGCTGCAC CCATGGCAGA AGGAGGAGGG
1141 CAGAATCATC ACGAAGTGGT GAAGTTCATG GATGTCTATC AGCGCAGCTA CTGCCATCCA
1201 ATCGAGACCC TGGTGGACAT CTTCCAGGAG TACCCTGATG AGATCGAGTA CATCTTCAAG
1261 CCATCCTGTG TGCCCCTGAT GCGATGCGGG GGCTGCTGCA ATGACGAGGG CCTGGAGTGT
1321 GTGCCCACTG AGGAGTCCAA CATCACCATG CAGATTATGC GGATCAAACC TCACCAAGGC
1381 CAGCACATAG GAGAGATGAG CTTCTACAG CACAACAAAT GTGAATGCAG ACCAAAGAAA
1441 GATAGAGCAA GACAAGAAAA AAAATCAGTT CGAGGAAAGG GAAAGGGGCA AAAACGAAAG
1501 CGCAAGAAAT CCCGGTATAA GTCCTGGAGC GTTCCCTGTG GGCCTTGCTC AGAGCGGAGA

圖 2(A)

I414300

1561 AAGCATTGT TTGTACAAGA TCCGCAGACG TGTAATGTT CCTGCAAAA CACAGACTCG
1621 CGTTGCAAGG CGAGGCAGCT TGAGTTAAAC GAACGTACTT GCAGATGTGA CAAGCCGAGG
1681 CGGTGAGCCG GGCAGGAGGA AGGAGCCTCC CTCAGGGTTT CGG

VEGF 多肽序列 (GenBank 寄存號 : NP_003367) (SEQ ID NO: 4)

1 MNFLLSWVHW SLALLLYLHH AKWSQAAPMA EGGGQNHHEV VKFMDVYQRS YCHPIETLVD
61 IFQEYPDEIE YIFKPSCVPL MRCGGCCNDE GLECVPTES NITMQIMRIK PHQGQHIGEM
121 SFLQHNKCEC RPKKDRARQE KKSVRGKGKG QKRKRKKSRY KWSVPCGPC SERRKHLFVQ
181 DPQTCKCSCK NTDSRCKARQ LELNERTCRC DKPRR

圖 2(B)

PDGFR-B 核酸序列 (GenBank 寄存號 : NM_002609) (SEQ ID NO: 5)

1 GGCCCCTCAG CCCTGCTGCC CAGCACGAGC CTGTGCTCGC CCTGCCCAAC GCAGACAGCC
61 AGACCCAGGG CGGCCCTCT GCGGGCTCTG CTCCTCCCGA AGGATGCTTG GGGAGTGAGG
121 CGAAGCTGGG CGCTCCTCTC CCCTACAGCA GCCCCCTTCC TCCATCCCTC TGTTCTCCTG
181 AGCCTTCAGG AGCCTGCACC AGTCCTGCCT GTCCTTCTAC TCAGCTGTTA CCCACTCTGG
241 GACCAGCAGT CTTTCTGATA ACTGGGAGAG GGCAGTAAGG AGGACTTCCT GGAGGGGGTG
301 ACTGTCCAGA GCCTGGAAC TGTCCACAC CAGAAGCCAT CAGCAGCAAG GACACCATGC
361 GGCTTCCGGG TCGATGCCA GCTCTGGCCC TCAAAGGCGA GCTGCTGTTG CTGTCTCTCC
421 TGTTACTTCT GGAACCACAG ATCTCTCAGG GCCTGGTCGT CACACCCCCG GGGCCAGAGC
481 TTGTCTCAA TGTCTCCAGC ACCTTCGTTT TGACCTGCTC GGGTTCAGCT CCGGTGGTGT
541 GGAACGGAT GTCCCAGGAG CCCCACAGG AAATGGCCAA GGCCAGGAT GGCACCTTCT
601 CCAGCGTGCT CACACTGACC AACCTCACTG GGCTAGACAC GGGAGAATAC TTTTGACCCC
661 ACAATGACTC CCGTGGACTG GAGACCGATG AGCGGAAACG GCTCTACATC TTTGTGCCAG
721 ATCCCACCGT GGGCTTCCTC CCTAATGATG CCGAGGAACT ATTCATCTTT CTCACGGAAA
781 TAACTGAGAT CACCATTCCA TGCCGAGTAA CAGACCCACA GCTGGTGGTG AACTGCACG
841 AGAAGAAAGG GGACGTTGCA CTGCCTGTCC CCTATGATCA CCAACGTGGC TTTTCTGGTA
901 TCTTTGAGGA CAGAAGCTAC ATCTGCAAAA CCACCATTGG GGACAGGGAG GTGGATTCTG
961 ATGCCTACTA TGTCTACAGA CTCCAGGTGT CATCCATCAA CGTCTCTGTG AACGCAGTGC
1021 AGACTGTGGT CCGCCAGGGT GAGAACATCA CCCTCATGTG CATTGTGATC GGAATGAGG
1081 TGGTCAACTT CGAGTGGACA TACCCCGCA AAGAAAGTGG GCGGCTGGTG GAGCCGGTGA
1141 CTGACTTCCT CTTGGATATG CCTTACCACA TCCGCTCCAT CCTGCACATC CCCAGTGCCG
1201 AGTTAGAAGA CTCGGGGACC TACACCTGCA ATGTGACGGA GAGTGTGAAT GACCATCAGG
1261 ATGAAAAGGC CATCAACATC ACCGTGGTTG AGAGCGGCTA CGTGCGGCTC CTGGGAGAGG
1321 TGGGCACACT ACAATTTGCT GAGCTGCATC GGAGCCGGAC ACTGCAGGTA GTGTTTCAGG
1381 CCTACCCACC GCCCACTGTC CTGTGGTTCA AAGACAACCG CACCCTGGGC GACTCCAGCG
1441 CTGGCGAAAT CGCCCTGTCC ACGCGCAACG TGTCGGAGAC CCGGTATGTG TCAGAGCTGA

圖 3(A)

1501 CACTGGTTCG CGTGAAGGTG GCAGAGGCTG GCCACTACAC CATGCGGGCC TTCCATGAGG
1561 ATGCTGAGGT CCAGCTCTCC TTCCAGCTAC AGATCAATGT CCCTGTCCGA GTGCTGGAGC
1621 TAAGTGAGAG CCACCCTGAC AGTGGGGAAC AGACAGTCCG CTGTCGTGGC CGGGGCATGC
1681 CCCAGCCGAA CATCATCTGG TCTGCCTGCA GAGACCTCAA AAGGTGTCCA CGTGAGCTGC
1741 CGCCCACGCT GCTGGGGAAC AGTTCCGAAG AGGAGAGCCA GCTGGAGACT AACGTGACGT
1801 ACTGGGAGGA GGAGCAGGAG TTTGAGGTGG TGAGCACACT GCGTCTGCAG CACGTGGATC
1861 GGCCACTGTC GGTGCGCTGC ACGCTGCGCA ACGCTGTGGG CCAGGACACG CAGGAGGTCA
1921 TCGTGGTGCC ACACTCCTTG CCCTTTAAGG TGGTGGTGAT CTCAGCCATC CTGGCCCTGG
1981 TGGTGCTCAC CATCATCTCC CTTATCATCC TCATCATGCT TTGGCAGAAG AAGCCACGTT
2041 ACGAGATCCG ATGGAAGGTG ATTGAGTCTG TGAGCTCTGA CGGCCATGAG TACATCTACG
2101 TGGACCCCAT GCAGCTGCCC TATGACTCCA CGTGGGAGCT GCCGCGGGAC CAGCTTGTC
2161 TGGGACGCAC CCTCGGCTCT GGGGCCTTTG GGCAGGTGGT GGAGGCCACG GCTCATGGCC
2221 TGAGCCATTC TCAGGCCACG ATGAAAGTGG CCGTCAAGAT GCTTAAATCC ACAGCCCGCA
2281 GCAGTGAGAA GCAAGCCCTT ATGTCGGAGC TGAAGATCAT GAGTCACCTT GGGCCCCACC
2341 TGAACGTGGT CAACCTGTTG GGGGCCTGCA CCAAAGGAGG ACCCATCTAT ATCATCACTG
2401 AGTACTGCCG CTACGGAGAC CTGGTGGACT ACCTGCACCG CAACAAACAC ACCTTCCTGC
2461 AGCACCCTC CGACAAGCGC CGCCCGCCCA GCGCGGAGCT CTACAGCAAT GCTCTGCCCCG
2521 TTGGGCTCCC CCTGCCCAGC CATGTGTCTT TGACCGGGGA GAGCGACGGT GGCTACATGG
2581 ACATGAGCAA GGACGAGTCG GTGGACTATG TGCCCATGCT GGACATGAAA GGAGACGTCA
2641 AATATGCAGA CATCGAGTCC TCCAACCTACA TGGCCCCTTA CGATAACTAC GTTCCCTCTG
2701 CCCCTGAGAG GACCTGCCGA GCAACTTTGA TCAACGAGTC TCCAGTGCTA AGCTACATGG
2761 ACCTCGTGGG CTTAGCTAC CAGGTGGCCA ATGGCATGGA GTTTCTGGCC TCCAAGAACT
2821 GCGTCCACAG AGACCTGGCG GCTAGGAACG TGCTCATCTG TGAAGGCAAG CTGGTCAAGA
2881 TCTGTGACTT TGGCCTGGCT CGAGACATCA TGCGGGACTC GAATTACATC TCCAAAGGCA
2941 GCACCTTTTT GCCTTTAAAG TGGATGGCTC CGGAGAGCAT CTTCAACAGC CTCTACACCA
3001 CCCTGAGCGA CGTGTGGTCC TTCGGGATCC TGCTCTGGGA GATCTTCACC TTGGGTGGCA
3061 CCCCTTACCC AGAGCTGCCC ATGAACGAGC AGTTCTACAA TGCCATCAAA CGGGGTACC
3121 GCATGGCCCA GCCTGCCCAT GCCTCCGACG AGATCTATGA GATCATGCAG AAGTGCTGGG

3181 AAGAGAAGTT TGAGATTCGG CCCCCCTTCT CCCAGCTGGT GCTGCTTCTC GAGAGACTGT
3241 TGGGCGAAGG TTACAAAAAG AAGTACCAGC AGGTGGATGA GGAGTTTCTG AGGAGTGACC
3301 ACCCAGCCAT CCTTCGGTCC CAGGCCCGCT TGCCTGGGTT CCATGGCCTC CGATCTCCCC
3361 TGGACACCAG CTCCGTCCTC TATACTGCCG TGCAGCCCAA TGAGGGTGAC AACGACTATA
3421 TCATCCCCCT GCCTGACCCC AAACCCGAGG TTGCTGACGA GGGCCCCACTG GAGGGTTCCC
3481 CCAGCCTAGC CAGCTCCACC CTGAATGAAG TCAACACCTC CTCAACCATC TCCTGTGACA
3541 GCCCCCTGGA GCCCCAGGAC GAACCAGAGC CAGAGCCCCA GCTTGAGCTC CAGGTGGAGC
3601 CGGAGCCAGA GCTGGAACAG TTGCCGGATT CGGGGTGCCC TGCGCCTCGG GCGGAAGCAG
3661 AGGATAGCTT CCTGTAGGGG GCTGGCCCCCT ACCCTGCCCT GCCTGAAGCT CCCCCCTGC
3721 CAGCACCAG CATCTCCTGG CCTGGCCTGA CCGGGCTTCC TGTGAGCCAG GCTGCCCTTA
3781 TCAGCTGTCC CCTTCTGGAA GCTTTCTGCT CCTGACGTGT TGTGCCCCAA ACCCTGGGGC
3841 TGGCTTAGGA GGCAAGAAAA CTGCAGGGGC CGTGACCAGC CCTCTGCCTC CAGGGAGGCC
3901 AACTGACTCT GAGCCAGGGT TCCCCAGGG AACTCAGTTT TCCCATATGT AAGATGGGAA
3961 AGTTAGGCTT GATGACCCAG AATCTAGGAT TCTCTCCCTG GCTGACAGGT GGGGAGACCG
4021 AATCCCTCCC TGGGAAGATT CTTGGAGTTA CTGAGGTGGT AAATTAAGTT TTTTCTGTTC
4081 AGCCAGCTAC CCCTCAAGGA ATCATAGCTC TCTCCTCGCA CTTTTTATCC ACCCAGGAGC
4141 TAGGGAAGAG ACCCTAGCCT CCCTGGCTGC TGGCTGAGCT AGGGCCTAGC CTTGAGCAGT
4201 GTTGCCCTCAT CCAGAAGAAA GCCAGTCTCC TCCCTATGAT GCCAGTCCCT GCGTCCCTG
4261 GCCCAGCTG GTCTGGGGCC ATTAGGCAGC CTAATTAATG CTGGAGGCTG AGCCAAGTAC
4321 AGGACACCCC CAGCCTGCAG CCCTTGCCCA GGGCACTTGG AGCACACGCA GCCATAGCAA
4381 GTGCCTGTGT CCCTGTCCTT CAGGCCCATC AGTCCTGGGG CTTTTTCTTT ATCACCTCA
4441 GTCTTAATCC ATCCACCAGA GTCTAGAAGG CCAGACGGGC CCCGCATCTG TGATGAGAAT
4501 GTAAATGTGC CAGTGTGGAG TGGCCACGTG TGTGTGCCAG TATATGGCCC TGGCTCTGCA
4561 TTGGACCTGC TATGAGGCTT TGGAGGAATC CCTCACCTC TCTGGGCCTC AGTTTCCCCT
4621 TCAAAAAATG AATAAGTCGG ACTTATTAAC TCTGAGTGCC TTGCCAGCAC TAACATTCTA
4681 GAGTATTCCA GGTGGTTGCA CATTTGTCCA GATGAAGCAA GGCCATATAC CCTAAACTTC
4741 CATCCTGGGG GTCAGCTGGG CTCCTGGGAG ATTCCAGATC ACACATCACA CTCTGGGGAC
4801 TCAGGAACCA TGCCCCCTCC CCAGGCCCCC AGCAAGTCTC AAGAACACAG CTGCACAGGC

4861 CTTGACTTAG AGTGACAGCC GGTGTCCTGG AAAGCCCCAA GCAGCTGCCC CAGGGACATG
4921 GGAAGACCAC GGGACCTCTT TCACTACCCA CGATGACCTC CGGGGGTATC CTGGGCAAAA
4981 GGGACAAAGA GGGCAAATGA GATCACCTCC TGCAGCCCAC CACTCCAGCA CCTGTGCCGA
5041 GGTCTGCGTC GAAGACAGAA TGGACAGTGA GGACAGTTAT GTCTTGTAAG AGACAAGAAG
5101 CTTGAGATGG TACCCCAAGA AGGATGTGAG AGGTGGCCGC TTGGAGTTTG CCCCTCACCC
5161 ACCAGCTGCC CCATCCCTGA GGCAGCGCTC CATGGGGGTA TGGTTTTGTC ACTGCCCAGA
5221 CCTAGCAGTG ACATCTCATT GTCCCCAGCC CAGTGGGCAT TGGAGGTGCC AGGGGAGTCA
5281 GGGTTGTAGC CAAGACGCCC CCGCACGGGG AGGGTTGGGA AGGGGGTGCA GGAAGCTCAA
5341 CCCCTCTGGG CACCAACCCT GCATTGCAGG TTGGCACCTT ACTTCCCTGG GATCCCCAGA
5401 GTTGGTCCAA GGAGGGAGAG TGGGTCTCA ATACGGTACC AAAGATATAA TCACCTAGGT
5461 TTACAAATAT TTTTAGGACT CACGTAACT CACATTTATA CAGCAGAAAT GCTATTTTGT
5521 ATGCTGTAA GTTTTTCTAT CTGTGTACTT TTTTAAAGG GAAAGATTTT AATATTAAAC
5581 CTGGTGCTTC TCACTCAC

PDGFR-B 多肽序列 (GenBank 寄存號 : NP_002600) (SEQ ID NO: 6)

1 MRLPGAMPAL ALKGELLLLS LLLLLLEPQIS QGLVVTTPGP ELVLNVSTF VLTCSGSAPV
 61 VWERMSQEPP QEMAKAQDGT FSSVLTLTNL TGLDTGEYFC THNDSRGLET DERKRLYIFV
 121 PDPTVGFLPN DAEELFIFLT EITEITIPCR VTDPQLVVTL HEKKGDAVALP VPDHQRGFS
 181 GIFEDRSYIC KTTIGDREVD SDAYYVYRLQ VSSINVSVA VQTVVRQGEN ITLMCIVIGN
 241 EVVNFWEYTP RKESGRLVEP VTDFLLDMPY HIRSILHIPS AELEDSTGYT CNVTESVNDH
 301 QDEKAINITV VESGYVRLG EVGTLQFAEL HRSRTLQVVF EAYPPPTVLW FKDNRTLGDG
 361 SAGEIALSTR NVSETRYVSE LTLVRVKVAE AGHYTMRAFV EDAEVQLSFQ LQINVPVRVL
 421 ELSHSHPDG EQTVRCRGRG MPQPNIIWSA CRDLKRCPRE LPPTLLGNSS EEESQLETNV
 481 TYWEEQEFE VVSTLRLQHV DRPLSVRCTL RNAVGQDTQE VIVVPHSLPF KVVVISAILA
 541 LVVLTIIISLI ILIMLWQKKP RYEIRWKVIE SVSSDGHEYI YVDPMLQPYD STWELPRDQL
 601 VLGRTLGSAG FGQVVEATAH GLSHSQATMK VAVKMLKSTA RSSEKQALMS ELKIMSHLGP
 661 HLNVVNLLGA CTKGGPIYII TEYCRYGDLV DYLRNKHTF LQHHSDKRRP PSAELYSNAL
 721 PVGLPLPSHV SLTGESDGGY MDMKDESVD YVPLDMKGD VKYADIESSN YMAPYDNYVP
 781 SAPERTCRAT LINEPVLSY MDLVGFSYQV ANGMEFLASK NCVHRDLAAR NVLICEGKLV
 841 KICDFGLARD IMRDSNYISK GSTFLPLKWM APESIFNSLY TTLSDVWSFG ILLWEIFTLG
 901 GTPYPELPMN EQFYNAIKRG YRMAQPAHAS DEIYEIMQKC WEEKFEIRPP FSQVLVLLER
 961 LLGEGYKKKY QQVDEEFLRS DHPAILRSQA RLPGFHGLRS PLDTSSVLYT AVQPNEGDN
 1021 YIIPLPDPKP EVADEGPLEG SPSLASSTLN EVNTSSTISC DSPLEPQDEP EPEPQLELQV
 1081 EPEPELEQLP DSGCPAPRAE AEDSFL

圖 3 (B)

PDGFR-A 核酸序列 (GenBank 寄存號 : NM_006206) (SEQ ID NO: 13)

1 TTCTCCCCGC CCCCCAGTTG TTGTCGAAGT CTGGGGGTTG GGACTGGACC CCCTGATTGC
61 GTAAGAGCAA AAAGCGAAGG CGCAATCTGG ACACTGGGAG ATTCTGGAGCG CAGGGAGTTT
121 GAGAGAACT TTTATTTTGA AGAGACCAAG GTTGAGGGGG GGCTTATTTT CTGACAGCTA
181 TTTACTTAGA GCAAATGATT AGTTTTAGAA GGATGGACTA TAACATTGAA TCAATTACAA
241 AACGCGGTTT TTGAGCCCAT TACTGTTGGA GCTACAGGGA GAGAAACAGG AGGAGACTGC
301 AAGAGATCAT TTGGGAAGGC CGTGGGCACG CTCTTTACTC CATGTGTGGG ACATTCATTG
361 CGGAATAACA TCGGAGGAGA AGTTTCCCAG AGCTATGGGG ACTTCCCATC CGGCGTTTCT
421 GGTCTTAGGC TGTCTTCTCA CAGGGCTGAG CCTAATCCTC TGCCAGCTTT CATTACCCTC
481 TATCCTTCCA AATGAAAATG AAAAGGTTGT GCAGCTGAAT TCATCCTTTT CTCTGAGATG
541 CTTTGGGGAG AGTGAAGTGA GCTGGCAGTA CCCCATGTCT GAAGAAGAGA GCTCCGATGT
601 GGAAATCAGA AATGAAGAAA ACAACAGCGG CCTTTTGTG ACGGTCTTGG AAGTGAGCAG
661 TGCCTCGGCG GCCCACACAG GGTGTACAC TTGCTATTAC AACCACACTC AGACAGAAGA
721 GAATGAGCTT GAAGGCAGGC ACATTTACAT CTATGTGCCA GACCCAGATG TAGCCTTTGT
781 ACCTCTAGGA ATGACGGATT ATTTAGTCAT CGTGGAGGAT GATGATTCTG CCATTATACC
841 TTGTCGCACA ACTGATCCCG AGACTCCTGT AACCTTACAC AACAGTGAGG GGGTGGTACC
901 TGCCTCCTAC GACAGCAGAC AGGGCTTTAA TGGGACCTTC ACTGTAGGGC CCTATATCTG
961 TGAGGCCACC GTCAAAGGAA AGAAGTTCCA GACCATCCCA TTTAATGTTT ATGCTTTAAA
1021 AGCAACATCA GAGCTGGATC TAGAAATGGA AGCTCTTAAA ACCGTGTATA AGTCAGGGGA
1081 AACGATTGTG GTCACCTGTG CTGTTTTTAA CAATGAGGTG GTTGACCTTC AATGGACTTA
1141 CCCTGGAGAA GTGAAAGGCA AAGGCATCAC AATGCTGGAA GAAATCAAAG TCCCATCCAT
1201 CAAATTGGTG TACACTTTGA CGGTCCCCGA GGCCACGGTG AAAGACAGTG GAGATTACGA
1261 ATGTGCTGCC CGCCAGGCTA CCAGGGAGGT CAAAGAAATG AAGAAAGTCA CTATTTCTGT
1321 CCATGAGAAA GGTTTCATTG AAATCAAACC CACCTTCAGC CAGTTGGAAG CTGTCAACCT
1381 GCATGAAGTC AAACATTTTG TTGTAGAGGT GCGGGCCTAC CCACCTCCCA GGATATCCTG
1441 GCTGAAAAAC AATCTGACTC TGATTGAAAA TCTCACTGAG ATCACCCTG ATGTGGAAAA

圖 3(C)

1501 GATTGAGGAA ATAAGGTATC GAAGCAAATT AAAGCTGATC CGTGCTAAGG AAGAAGACAG
1561 TGGCCATTAT ACTATTGTAG CTCAAATGA AGATGCTGTG AAGAGCTATA CTTTGAAC
1621 GTTAACTCAA GTTCCTTCAT CCATTCTGGA CTTGGTCGAT GATCACCATG GCTCAACTGG
1681 GGGACAGACG GTGAGGTGCA CAGCTGAAGG CACGCCGCTT CCTGATATTG AGTGGATGAT
1741 ATGCAAAGAT ATTAAGAAAT GTAATAATGA AACTTCCTGG ACTATTTTGG CCAACAATGT
1801 CTCAAACATC ATCACGGAGA TCCACTCCCG AGACAGGAGT ACCGTGGAGG GCCGTGTGAC
1861 TTTCGCCAAA GTGGAGGAGA CCATCGCCGT GCGATGCCTG GCTAAGAATC TCCTTGGAGC
1921 TGAGAACCGA GAGCTGAAGC TGGTGGCTCC CACCCTGCGT TCTGAACTCA CGGTGGCTGC
1981 TGCAGTCCTG GTGCTGTTGG TGATTGTGAT CATCTCACTT ATTGTCCTGG TTGTCATTTG
2041 GAAACAGAAA CCGAGGTATG AAATTCGCTG GAGGGTCATT GAATCAATCA GCCCGGATGG
2101 ACATGAATAT ATTTATGTGG ACCCGATGCA GCTGCCTTAT GACTCAAGAT GGGAGTTTCC
2161 AAGAGATGGA CTAGTGCTTG GTCGGGTCTT GGGGTCTGGA GCGTTTGGGA AGGTGGTTGA
2221 AGGAACAGCC TATGGATTAA GCCGGTCCCA ACCTGTCATG AAAGTTGCAG TGAAGATGCT
2281 AAAACCCACG GCCAGATCCA GTGAAAAACA AGCTCTCATG TCTGAACTGA AGATAATGAC
2341 TCACCTGGGG CCACATTTGA ACATTGTAAA CTTGCTGGGA GCCTGCACCA AGTCAGGCCC
2401 CATTTACATC ATCACAGAGT ATTGCTTCTA TGGAGATTTG GTCAACTATT TGCATAAGAA
2461 TAGGGATAGC TTCCTGAGCC ACCACCCAGA GAAGCCAAAG AAAGAGCTGG ATATCTTTGG
2521 ATTGAACCTT GCTGATGAAA GCACACGGAG CTATGTTATT TTATCTTTTG AAAACAATGG
2581 TGAATACATG GACATGAAGC AGGCTGATAC TACACAGTAT GTCCCCATGC TAGAAAGGAA
2641 AGAGGTTTCT AAATATTCCG ACATCCAGAG ATCACTCTAT GATCGTCCAG CCTCATATAA
2701 GAAGAAATCT ATGTTAGACT CAGAAGTCAA AAACCTCCTT TCAGATGATA ACTCAGAAGG
2761 CCTTACTTTA TTGGATTTGT TGAGCTTCAC CTATCAAGTT GCCCGAGGAA TGGAGTTTTT
2821 GGCTTCAAAA AATTGTGTCC ACCGTGATCT GGCTGCTCGC AACGTCTCC TGGCACAAGG
2881 AAAAATTGTG AAGATCTGTG ACTTTGGCCT GGCCAGAGAC ATCATGCATG ATTCGAACCTA
2941 TGTGTCGAAA GGCAGTACCT TTCTGCCCCG GAAGTGGATG GCTCCTGAGA GCATCTTTGA
3001 CAACCTCTAC ACCACACTGA GTGATGTCTG GTCTTATGGC ATTCTGCTCT GGGAGATCTT
3061 TTCCCTTGGT GGCACCCCTT ACCCCGGCAT GATGGTGGAT TCTACTTTCT ACAATAAGAT
3121 CAAGAGTGGG TACCGGATGG CCAAGCCTGA CCACGCTACC AGTGAAGTCT ACGAGATCAT

3181 GGTGAAATGC TGGAACAGTG AGCCGGAGAA GAGACCCTCC TTTTACCACC TGAGTGAGAT
3241 TGTGGAGAAT CTGCTGCCTG GACAATATAA AAAGAGTTAT GAAAAAATTC ACCTGGACTT
3301 CCTGAAGAGT GACCATCCTG CTGTGGCAGC CATGCGTGTG GACTCAGACA ATGCATACAT
3361 TGGTGTCAAC TACAAAAACG AGGAAGACAA GCTGAAGGAC TGGGAGGGTG GTCTGGATGA
3421 GCAGAGACTG AGCGCTGACA GTGGCTACAT CATTCTCTG CCTGACATTG ACCCTGTCCC
3481 TGAGGAGGAG GACCTGGGCA AGAGGAACAG ACACAGCTCG CAGACCTCTG AAGAGAGTGC
3541 CATTGAGACG GGTTCAGCA GTTCCACCTT CATCAAGAGA GAGGACGAGA CCATTGAAGA
3601 CATCGACATG ATGGACGACA TCGGCATAGA CTCTTCAGAC CTGGTGGAAG ACAGCTTCCT
3661 GTAACGGCG GATTGAGGG GTTCTTCCA CTTCTGGGGC CACCTCTGGA TCCCGTTCAG
3721 AAAACCACTT TATTGCAATG CGGAGGTTGA GAGGAGGACT TGGTTGATGT TTAAAGAGAA
3781 GTTCCCAGCC AAGGGCCTCG GGGAGCGTTC TAAATATGAA TGAATGGGAT ATTTTGAAAT
3841 GAACTTTGTC AGTGTTCCT CTCGCAATGC CTCAGTAGCA TCTCAGTGGT GTGTGAAGTT
3901 TGGAGATAGA TGGATAAGGG AATAATAGGC CACAGAAGGT GAACTTTGTG CTTCAAGGAC
3961 ATTGGTGAGA GTCCAACAGA CACAATTTAT ACTGCGACAG AACTTCAGCA TTGTAATTAT
4021 GTAAATAACT CTAACCAAGG CTGTGTTTAG ATTGTATTAA CTATCTTCTT TGGACTTCTG
4081 AAGAGACCAC TCAATCCATC CATGTACTTC CCTCTTGAAA CCTGATGTCA GCTGCTGTTG
4141 AACTTTTTAA AGAAGTGCAT GAAAAACCAT TTTTGAACCT TAAAAGGTAC TGGTACTATA
4201 GCATTTTGCT ATCTTTTTTA GTGTTAAGAG ATAAAGAATA ATAATTAACC AACCTTGTTT
4261 AATAGATTTG GGTCAATTTAG AAGCCTGACA ACTCATTTTC ATATTGTAAT CTATGTTTAT
4321 AATACTACTA CTGTTATCAG TAATGCTAAA TGTGTAATAA TGTAACATGA TTTCCCTCCA
4381 GAGAAAGCAC AATTTAAAAC AATCCTTACT AAGTAGGTGA TGAGTTTGAC AGTTTTTGAC
4441 ATTTATATTA AATAACATGT TTCTCTATAA AGTATGGTAA TAGCTTTAGT GAATTAAATT
4501 TAGTTGAGCA TAGAGAACAA AGTAAAAGTA GTGTTGTCCA GGAAGTCAGA ATTTTAACT
4561 GTAAGTAATA GGTTCCTCAA TCCATCGTAT TAAAAACAA TTAAGTCCC TCTGAAATAA
4621 TGGGATTAGA AACAAACAAA ACTCTTAAGT CCTAAAAGTT CTCAATGTAG AGGCATAAAC
4681 CTGTGCTGAA CATAACTTCT CATGTATATT ACCCAATGGA AAATATAATG ATCAGCAAAA
4741 AGACTGGATT TGCAGAAGTT TTTTTTTTTT TTCTTCATGC CTGATGAAAG CTTTGGCAAC
4801 CCCAATATAT GTATTTTTTG AATCTATGAA CCTGAAAAGG GTCAGAAGGA TGCCCAGACA

4861 TCAGCCTCCT TCTTTCACCC CTTACCCCAA AGAGAAAGAG TTTGAACTC GAGACCATAA
4921 AGATATTCTT TAGTGGAGGC TGGATGTGCA TTAGCCTGGA TCCTCAGTTC TCAAATGTGT
4981 GTGGCAGCCA GGATGACTAG ATCCTGGGTT TCCATCCTTG AGATTCTGAA GTATGAAGTC
5041 TGAGGGAAAC CAGAGTCTGT ATTTTCTAA ACTCCCTGGC TGTCTGATC GGCCAGTTTT
5101 CGGAAACACT GACTTAGGTT TCAGGAAGTT GCCATGGGAA ACAAATAATT TGAACCTTGG
5161 AACAGGGTTG GAATTCAACC ACGCAGGAAG CCTACTATTT AAATCCTTGG CTTCAGGTAA
5221 GTGACATTTA ATGCCATCTA GCTAGCAATT GCGACCTTAA TTAACTTTC CAGTCTTAGC
5281 TGAGGCTGAG AAAGCTAAAG TTTGGTTTTG ACAGGTTTTT CAAAAGTAAA GATGCTACTT
5341 CCCACTGTAT GGGGGAGATT GAACTTTCCC CGTCTCCCGT CTTCTGCCTC CCACTCCATA
5401 CCCCGCCAAG GAAAGGCATG TACAAAAATT ATGCAATTCA GTGTTCCAAG TCTCTGTGTA
5461 ACCAGCTCAG TGTTTTGGTG GAAAAACAT TTTAAGTTTT ACTGATAATT TGAGGTTAGA
5521 TGGGAGGATG AATTGTCACA TCTATCCACA CTGTCAAACA GGTGGTGTG GGTTCATTGG
5581 CATTCTTTC AATACTGCTT AATTGCTGAT ACCATATGAA TGAAACATGG GCTGTGATTA
5641 CTGCAATCAC TGTGCTATCG GCAGATGATG CTTTGGAAGA TGCAGAAGCA ATAATAAAGT
5701 ACTTGACTAC CTACTGGTGT AATCTCAATG CAAGCCCCAA CTTTCTTATC CAACTTTTTT
5761 ATAGTAAGTG CGAAGACTGA GCCAGATTGG CCAATTAAAA ACGAAAACCT GACTAGGTTT
5821 TGTAGAGCCA ATTAGACTTG AAATACGTTT GTGTTTCTAG AATCACAGCT CAAGCATTCT
5881 GTTTATCGCT CACTCTCCCT TGTACAGCCT TATTTTGTTG GTGCTTTGCA TTTTGATATT
5941 GCTGTGAGCC TTGCATGACA TCATGAGGCC GGATGAACT TCTCAGTCCA GCAGTTTCCA
6001 GTCCTAACAA ATGCTCCAC CTGAATTTGT ATATGACTGC ATTTGTGGGT GTGTGTGTGT
6061 TTTAGCAAA TTCCAGATTT GTTTCCTTTT GGCCTCCTGC AAAGTCTCCA GAAGAAAATT
6121 TGCCAATCTT TCCTACTTTC TATTTTATG ATGACAATCA AAGCCGGCCT GAGAAACACT
6181 ATTTGTGACT TTTTAAACGA TTAGTGATGT CCTTAAAATG TGGTCTGCCA ATCTGTACAA
6241 AATGGTCCTA TTTTGTGAA GAGGGACATA AGATAAAATG ATGTTATACA TCAATATGTA
6301 TATATGTATT TCTATATAGA CTTGGAGAAT ACTGCCAAAA CATTTATGAC AAGCTGTATC
6361 ACTGCCTTCG TTTATATTTT TTAACTGTG ATAATCCCCA CAGGCACATT AACTGTTGCA
6421 CTTTGAATG TCCAAAATTT ATATTTTAGA AATAATAAAA AGAAAGATAC TTACATGTTC
6481 CCAAACAAT GGTGTGGTGA ATGTGTGAGA AAAACTAACT TGATAGGGTC TACCAATACA

I414300

6541 AAATGTATTA CGAATGCCCC TGTTTCATGTT TTTGTTTTAA AACGTGTAAA TGAAGATCTT

6601 TATATTTCAA TAAATGATAT ATAATTTAAA GTT

PDGFR-A 多肽序列 (GenBank 寄存號 : NP_006197) (SEQ ID NO: 14)

1 MGTSHPAFLV LGCLLTGLSL ILCQLSLPSI LPNENEKVQ LNSSFSLRCF GESEVSWQYP
61 MSEEESDVE IRNEENNSGL FVTVLEVSSA SAAHTGLYTC YYNHTQTEEN ELEGRHIYIY
121 VDPDPVAFVP LGMTDYLIVV EDDDSAIIPC RTTDPETPVT LHNSEGVVPA SYDSRQGFNG
181 TFTVGPIYCE ATVKGKKFQT IPFENVYALKA TSELDLEMEA LKTVYKSGET IVVTCVFNEN
241 EVVDLQWYTP GEVKGKGITM LEEIKVPSIK LVTTLTVPEA TVKDSGDYEC AARQATREVK
301 EMKKVTISVH EKGFIKPT FSQLEAVNLH EVKHFVVEVR AYPPPRISWL KNNLTLIENL
361 TEITTDVEKI QEIRYRSLK LIRAKEEDSG HYTIVAQNE AVKSYTFELL TOVPSSILDL
421 VDDHHGSTGG QTVRCTAEGT PLPDIEWMIC KDIKKCNNT SWTILANNVS NIITEIHSRD
481 RSTVEGRVTF AKVEETIAVR CLAKNLLGAE NRELKLVAPT LRSELTVAAL VLVLLVIVII
541 SLIVLVVIWK QKPRYEIRWR VIESISPDGH EYIYVDPML PYDSRWEFPR DGLVLGRVLG
601 SGAFGKVVEG TAYGLSRSQP VMKVAVKMLK PTARSSEKQA LMSELKIMTH LGPHLNIVNL
661 LGACTKSGPI YIITEYCFYG DLVNYLHKNR DSFLSHHPEK PKKELDIFGL NPADESTRSY
721 VILSFENNGD YMDMKQADTT QYVPMLEKE VSKYSIDIQS LYDRPASYKK KSMLESEVKN
781 LLSDDNSEGL TLLDLLSFTY QVARGMEFLA SKNCVHRDLA ARNVLLAQGK IVKICDFGLA
841 RDMHDSNYV SKGSTFLPVK WMAPESIFDN LYTTLSDVWS YGILLWEIFS LGGTPYPGMM
901 VDSTFYNNIK SGYRMAKPDH ATSEVEIMV KCWNSEPEKR PSFYHLSEIV ENLLPGQYKK
961 SYEKIHLDFL KSDHPAVARM RVDSDNAYIG VTYKNEEDKL KDWEGGLDEQ RLSADSGYII
1021 PLPDIDPVPE EEDLGKRRH SSQTSEESAI ETGSSSSTFI KREDETIEDI DMMDDIGIDS
1081 SOLVEDSFL

圖 3(D)

VEGFR(Flt-1) 核酸序列 (GenBank 寄存號 : AF063657) (SEQ ID NO: 7)

1 ATGGTCAGCT ACTGGGACAC CGGGGTCTCTG CTGTGCGCGC TGCTCAGCTG TCTGCTTCTC
61 ACAGGATCTA GTTCAGGTTC AAAATTAAAA GATCCTGAAC TGAGTTTAAA AGGCACCCAG
121 CACATCATGC AAGCAGGCCA GACACTGCAT CTCCAATGCA GGGGGGAAGC AGCCCATAAA
181 TGGTCTTTGC CTGAAATGGT GAGTAAGGAA AGCGAAAGGC TGAGCATAAC TAAATCTGCC
241 TGTGGAAGAA ATGGCAAACA ATTCTGCAGT ACTTTAACCT TGAACACAGC TCAAGCAAAC
301 CACACTGGCT TCTACAGCTG CAAATATCTA GCTGTACCTA CTTCAAAGAA GAAGGAAACA
361 GAATCTGCAA TCTATATATT TATTAGTGAT ACAGGTAGAC CTTTCGTAGA GATGTACAGT
421 GAAATCCCCG AAATTATACA CATGACTGAA GGAAGGGAGC TCGTCATTCC CTGCCGGGTT
481 ACGTCACCTA ACATCACTGT TACTTTAAAA AAGTTTCCAC TTGACACTTT GATCCCTGAT
541 GGAAAACGCA TAATCTGGGA CAGTAGAAAG GGCTTCATCA TATCAAATGC AACGTACAAA
601 GAAATAGGGC TTCTGACCTG TGAAGCAACA GTCAATGGGC ATTTGTATAA GACAAACTAT
661 CTCACACATC GACAAACCAA TACAATCATA GATGTCCAAA TAAGCACACC ACGCCCAGTC
721 AAATTACTTA GAGGCCATAC TCTTGTCTC AATTGTACTG CTACCACTCC CTTGAACACG
781 AGAGTTCAAA TGACCTGGAG TTACCCTGAT GAAAAAATA AGAGAGCTTC CGTAAGGCGA
841 CGAATTGACC AAAGCAATTC CCATGCCAAC ATATTCTACA GTGTTCTTAC TATTGACAAA
901 ATGCAGAACA AAGACAAAGG ACTTTATACT TGTCGTGTAA GGAGTGGACC ATCATTCAAA
961 TCTGTTAACA CCTCAGTGCA TATATATGAT AAAGCATTCA TCACTGTGAA ACATCGAAAA
1021 CAGCAGGTGC TTGAAACCGT AGCTGGCAAG CGGTCTTACC GGCTCTCTAT GAAAGTGAAG
1081 GCATTTCCCT CGCCGGAAGT TGTATGGTTA AAAGATGGGT TACCTGCGAC TGAGAAATCT
1141 GCTCGCTATT TGACTCGTGG CTACTCGTTA ATTATCAAGG ACGTAACTGA AGAGGATGCA
1201 GGAATTATA CAATCTTGCT GAGCATAAAA CAGTCAAATG TGTTTAAAAA CCTCACTGCC
1261 ACTCTAATTG TCAATGTGAA ACCCCAGATT TACGAAAAGG CCGTGTCTAT GTTTCCAGAC
1321 CCGGCTCTCT ACCCACTGGG CAGCAGACAA ATCCTGACTT GTACCGCATA TGGTATCCCT
1381 CAACCTACAA TCAAGTGGTT CTGGCACCCC TGTAACCATA ATCATTCCGA AGCAAGGTGT
1441 GACTTTTGTT CCAATAATGA AGAGTCCTTT ATCCTGGATG CTGACAGCAA CATGGGAAAC

圖 4(A)

1501 AGAATTGAGA GCATCACTCA GCGCATGGCA ATAATAGAAG GAAAGAATAA GATGGCTAGC
1561 ACCTTG GTTG TGGCTGACTC TAGAATTTCT GGAATCTACA TTTGCATAGC TTCCAATAAA
1621 GTTGGGACTG TGGGAAGAAA CATAAGCTTT TATATCACAG ATGTGCCAAA TGGGTTTCAT
1681 GTTAACTTGG AAAAAATGCC GACGGAAGGA GAGGACCTGA AACTGTCTTG CACAGTTAAC
1741 AAGTTCTTAT ACAGAGACGT TACTTGGATT TTA CTGCGGA CAGTTAATAA CAGAACAATG
1801 CACTACAGTA TTAGCAAGCA AAAAATGGCC ATCACTAAGG AGCACTCCAT CACTCTTAAT
1861 CTTACCATCA TGAATGTTTC CCTGCAAGAT TCAGGCACCT ATGCCTGCAG AGCCAGGAAT
1921 GTATACACAG GGAAGAAAT CCTCCAGAAG AAAGAAATTA CAATCAGAGA TCAGGAAGCA
1981 CCATACCTCC TGCGAACCT CAGTGATCAC ACAGTGGCCA TCAGCAGTTC CACCACTTTA
2041 GACTGTCATG CTAATGGTGT CCCCAGCCT CAGATCACTT GGTTTAAAAA CAACCACAAA
2101 ATACAACAAG AGCCTGGAAT TATTTTAGGA CCAGGAAGCA GCACGCTGTT TATTGAAAGA
2161 GTCACAGAAG AGGATGAAGG TGTCTATCAC TGCAAAGCCA CCAACCAGAA GGGCTCTGTG
2221 GAAAGTTCAG CATACTCAC GTTCAAGGA ACCTCGGACA AGTCTAATCT GGAGCTGATC
2281 ACTCTAACAT GCACCTGTGT GGCTGCGACT CTCTTCTGGC TCCTATTAAC CCTCTTTATC
2341 CGAAAAATGA AAAGGTCTTC TTCTGAAATA AAGACTGACT ACCTATCAAT TATAATGGAC
2401 CCAGATGAAG TTCCTTTGGA TGAGCAGTGT GAGCGGCTCC CTTATGATGC CAGCAAGTGG
2461 GAGTTTGCCC GGGAGAGACT TAAACTGGGC AAATCACTTG GAAGAGGGGC TTTTGAAAAA
2521 GTGGTTCAAG CATCAGCATT TGGCATTAG AAATCACCTA CGTGCCGGAC TGTGGCTGTG
2581 AAAATGCTGA AAGAGGGGGC CACGGCCAGC GAGTACAAAG CTCTGATGAC TGAGCTAAAA
2641 ATCTTGACCC ACATTGGCCA CCATCTGAAC GTGGTTAACC TGCTGGGAGC CTGCACCAAG
2701 CAAGGAGGGC CTCTGATGGT GATTGTTGAA TACTGCAAAT ATGGAAATCT CTCCAAC TAC
2761 CTCAAGAGCA AACGTGACTT ATTTTTTCTC AACAAGGATG CAGCACTACA CATGGAGCCT
2821 AAGAAAGAAA AAATGGAGCC AGGCCTGGAA CAAGGCAAGA AACCAAGACT AGATAGCGTC
2881 ACCAGCAGCG AAAGCTTTGC GAGCTCCGGC TTTCAGGAAG ATAAAAGTCT GAGTGATGTT
2941 GAGGAAGAGG AGGATTCTGA CGGTTTCTAC AAGGAGCCCA TCACTATGGA AGATCTGATT
3001 TCTTACAGTT TTCAAGTGGC CAGAGGCATG GAGTTCCTGT CTTCCAGAAA GTGCATT CAT
3061 CGGGACCTGG CAGCGAGAAA CATTCTTTTA TCTGAGAACA ACGTGGTGAA GATTTGTGAT
3121 TTTGGCCTTG CCCGGGATAT TTATAAGAAC CCCGATTATG TGAGAAAAGG AGATACTCGA

3181 CTTCTCTGA AATGGATGGC TCCTGAATCT ATCTTTGACA AAATCTACAG CACCAAGAGC
3241 GACGTGTGGT CTTACGGAGT ATTGCTGTGG GAAATCTTCT CCTTAGGTGG GTCTCCATAC
3301 CCAGGAGTAC AAATGGATGA GGACTTTTGC AGTCGCCTGA GGGAAAGGCAT GAGGATGAGA
3361 GCTCCTGAGT ACTCTACTCC TGAAATCTAT CAGATCATGC TGGACTGCTG GCACAGAGAC
3421 CCAAAAGAAA GGCCAAGATT TGCAGAACTT GTGGAAAAAC TAGGTGATTT GCTTCAAGCA
3481 AATGTACAAC AGGATGGTAA AGACTACATC CCAATCAATG CCATACTGAC AGGAAATAGT
3541 GGGTTTACAT ACTCAACTCC TGCCTTCTCT GAGGACTTCT TCAAGGAAAG TATTTAGCT
3601 CCGAAGTTTA ATTCAGGAAG CTCTGATGAT GTCAGATATG TAAATGCTTT CAAGTTCATG
3661 AGCCTGGAAA GAATCAAAAC CTTTGAAGAA CTTTACCAG ATGCCACCTC CATGTTTGAT
3721 GACTACCAGG GCGACAGCAG CACTCTGTTG GCCTCTCCCA TGCTGAAGCG CTTACCTGG
3781 ACTGACAGCA AACCCAAGGC CTCGCTCAAG ATTGACTTGA GAGTAACCAG TAAAAGTAAG
3841 GAGTCGGGGC TGTCTGATGT CAGCAGGCCC AGTTTCTGCC ATTCCAGCTG TGGGCACGTC
3901 AGCGAAGGCA AGCGCAGGTT CACCTACGAC CACGCTGAGC TGGAAAGGAA AATCGCGTGC
3961 TGCTCCCCGC CCCAGACTA CAACTCGGTG GTCCTGTACT CCACCCCACC CATCTAG

VEGFR-1 (Flt-1) 多肽序列 (GenBank 寄存號 :) (SEQ ID NO: 8)

1 MVSYWDTGVL LCALLSCLLL TGSSSGSKLK DPESLKGTO HIMQAGQTLH LQCRGEAAHK
 61 WSLPEMVSKE SERLSITKSA CGRNGKQFCS TLTLNTAQAN HTGFYSCKYL AVPTSKKKET
 121 ESAIYIFISD TGRPFVEMYS EIPETIHMTE GRELVIPCRV TSPNITVTLK KEPLDTLIPD
 181 GKRIIWDNRK GFIISNATYK EIGLLTCEAT VNGHLYKTNV LTHRQNTNII DVQISTPRPV
 241 KLLRGHTLVL NCTATTPLNT RVQMTWSYPD EKNKRASVRR RIDQSNCHAN IFYSVLTIDK
 301 MQNKDKGLYT CRVRSGPSFK SVNTSVHIYD KAFITVKHRK QOVLETVAGK RSYRLSMKVK
 361 AFPSPEVVWL KDGLPATEKS ARYLTRGYSL IIKDVTEEDA GNYTILLSIK QSNVFNKLT
 421 TLIVNVKQPI YEKAVSSFPD PALYPLGSRQ ILTCTAYGIP OPTIKWFVHP CNHNHSEARC
 481 DFCSNNEESF ILDADSNMGN RIESITQMA IIEGKNKMAS TLVVADSRIS GIYICIASNK
 541 VGTVGRNISF YITDVPNGFH VNLEKMPTEG EDLKLSTVN KFLYRDVTWI LLRTVNNRTM
 601 HYSISKQKMA ITKEHSITLN LTIMNVSLQD SGTYACRARN VYTGEELQK KEITIRDQEA
 661 PYLLRNLSDH TVAISSSTTL DCHANGVPEP QITWFKNNHK IQQEPGIILG PGSSTLFIER
 721 VTEDEGVYH CKATNQKGSV ESSAYLTVQG TSDKSNLELI TLCTCTVAAT LFWLLTLFI
 781 RKMKRSSSEI KTDYLSIIMD PDEVPLDEQC ERLPYDASKW EFARERLKLK KSLGRGAFGK
 841 VVQASAFGIK KSPTCRTVAV KMLKEGATAS EYKALMTELK ILTHIGHHLN VVNLLGACTK
 901 QGGPLMVIVE YCKYGNLSNY LKSKRDLFFL NKDAALHMEP KKEKMEPGLE QGKKPRLDSV
 961 TSSESFASSG FQEDKSLSDV EEEEDSDGFY KEPITMEDLI SYSFQVARGM EFLSSRCKIH
 1021 RDLAARNILL SENNVVKICD FGLARDIYKN PDYVRKGDTR LPLKWMAPES IFDKIYSTKS
 1081 DVWSYGVLLW EIFSLGGSPY PGVQMDDEFC SRLREGMRMR APEYSTPEIY QIMLDCWHRD
 1141 PKERPRFAEL VEKLGDLLQA NVQQDGKDYI PINAILTGNS GFTYSTPAFS EDDFKESISA
 1201 PKFNSGSSDD VRYVNAFKFM SLERIKTFEE LLPNATSMFD DYQGDSTLL ASPMLKRFTW
 1261 TDSKPKASLK IDLRVTSKSK ESGLSDVSRP SFCHSSCGHV SEGKRRFTYD HAELEKRIAC
 1321 CSPPPDYNV VLYSTPPI

圖 4(B)

VEGFR-2 (KDR/Flk-1) 核酸序列 (GenBank 寄 存 號 : AF035121)
(SEQ ID NO: 9)

1 ACTGAGTCCC GGGACCCCGG GAGAGCGGTC AGTGTGTGGT CGCTGCGTTT CCTCTGCCTG
61 CGCCGGGCAT CACTTGCGCG CCGCAGAAAG TCCGTCTGGC AGCCTGGATA TCCTCTCCTA
121 CCGGCACCCG CAGACGCCCC TGCAGCCGCC GGTGCGCGCC CGGGCTCCCT AGCCCTGTGC
181 GCTCAACTGT CCTGCGCTGC GGGGTGCCGC GAGTTCCACC TCCGCGCCTC CTTCTCTAGA
241 CAGGCGCTGG GAGAAAGAAC CGGCTCCCGA GTTCTGGGCA TTTCGCCCCG CTCGAGGTGC
301 AGGATGCAGA GCAAGGTGCT GCTGGCCGTC GCCCTGTGGC TCTGCGTGGA GACCCGGGCC
361 GCCTCTGTGG GTTTGCCTAG TGTTTCTCTT GATCTGCCCA GGCTCAGCAT ACAAAAAGAC
421 ATACTTACAA TTAAGGCTAA TACAACTCTT CAAATTACTT GCAGGGGACA GAGGGACTTG
481 GACTGGCTTT GGCCCAATAA TCAGAGTGGC AGTGAGCAAA GGGTGGAGGT GACTGAGTGC
541 AGCGATGGCC TCTTCTGTAA GACACTCACA ATTCCAAAAG TGATCGGAAA TGACACTGGA
601 GCCTACAAGT GCTTCTACCG GGAAACTGAC TTGGCCTCGG TCATTTATGT CTATGTTCAA
661 GATTACAGAT CTCCATTTAT TGCTTCTGTT AGTGACCAAC ATGGAGTCGT GTACATTACT
721 GAGAACA AAAA ACAA AACTGT GGTGATTCCA TGTCTCGGGT CCATTTCAA TCTCAACGTG
781 TCACTTTGTG CAAGATACCC AGAAAAGAGA TTTGTTCCCTG ATGGTAACAG AATTTCCCTGG
841 GACAGCAAGA AGGGCTTTAC TATTCCCAGC TACATGATCA GCTATGCTGG CATGGTCTTC
901 TGTGAAGCAA AAATTAATGA TGAAAGTTAC CAGTCTATTA TGTACATAGT TGTCGTTGTA
961 GGGTATAGGA TTTATGATGT GGTTCTGAGT CCGTCTCATG GAATTGAACT ATCTGTTGGA
1021 GAAAAGCTTG TCTTAAATTG TACAGCAAGA ACTGAACTAA ATGTGGGGAT TGA CTTC AAC
1081 TGGAATACC CTTCTTCGAA GCATCAGCAT AAGAACTTG TAAACCGAGA CCTAAAAACC
1141 CAGTCTGGGA GTGAGATGAA GAAATTTTGT AGCACCTTAA CTATAGATGG TGTAAACCCG
1201 AGTGACCAAG GATTGTACAC CTGTGCAGCA TCCAGTGGGC TGATGACCAA GAAGAACAGC
1261 ACATTTGTCA GGGTCCATGA AAAACCTTTT GTTGCTTTTG GAAGTGGCAT GGAATCTCTG
1321 GTGGAAGCCA CGGTGGGGGA GCGTGTGAGA ATCCCTGCGA AGTACCTTGG TTACCCACCC
1381 CCAGAAATAA AATGGTATAA AAATGGAATA CCCCTTGAGT CCAATCACAC AATTAAAGCG
1441 GGGCATGTAC TGACGATTAT GGAAGTGAGT GAAAGAGACA CAGGAAATTA CACTGTCATC

圖 4(C)

1501 CTTACCAATC CCATTTCAAA GGAGAAGCAG AGCCATGTGG TCTCTCTGGT TGTGTATGTC
1561 CCACCCCAGA TTGGTGAGAA ATCTCTAATC TCTCCTGTGG ATTCCTACCA GTACGGCACC
1621 ACTCAAACGC TGACATGTAC GGTCTATGCC ATTCCTCCCC CGCATCACAT CCACTGGTAT
1681 TGGCAGTTGG AGGAAGAGTG CGCCAACGAG CCCAGCCAAG CTGTCTCAGT GACAAACCCA
1741 TACCCTTGTG AAGAATGGAG AAGTGTGGAG GACTTCCAGG GAGGAAATAA AATTGAAGTT
1801 AATAAAAAATC AATTTGCTCT AATTGAAGGA AAAAACAAAA CTGTAAGTAC CCTTGTTATC
1861 CAAGCGGCAA ATGTGTCAGC TTTGTACAAA TGTGAAGCGG TCAACAAAGT CGGGAGAGGA
1921 GAGAGGGTGA TCTCCTTCCA CGTGACCAGG GGTCTGAAA TTACTTTGCA ACCTGACATG
1981 CAGCCCACTG AGCAGGAGAG CGTGTCTTTG TGGTGCACTG CAGACAGATC TACGTTTGAG
2041 AACCTCACAT GGTACAAGCT TGGCCACAG CCTCTGCCAA TCCATGTGGG AGAGTTGCCC
2101 ACACCTGTTT GCAAGAACTT GGATACTCTT TGGAAATTGA ATGCCACCAT GTTCTCTAAT
2161 AGCACAAATG ACATTTTGAT CATGGAGCTT AAGAATGCAT CCTTGCAGGA CCAAGGAGAC
2221 TATGTCTGCC TTGCTCAAGA CAGGAAGACC AAGAAAAGAC ATTGCGTGGT CAGGCAGCTC
2281 ACAGTCCTAG AGCGTGTGGC ACCCACGATC ACAGGAAACC TGGAGAATCA GACGACAAGT
2341 ATTGGGGAAA GCATCGAAGT CTCATGCACG GCATCTGGGA ATCCCCCTCC ACAGATCATG
2401 TGGTTTAAAG ATAATGAGAC CCTTGTAGAA GACTCAGGCA TTGTATTGAA GGATGGGAAC
2461 CGGAACCTCA CTATCCGCAG AGTGAGGAAG GAGGACGAAG GCCTCTACAC CTGCCAGGCA
2521 TGCAGTGTTT TTGGCTGTGC AAAAGTGGAG GCATTTTTC TAATAGAAGG TGCCCAGGAA
2581 AAGACGAACT TGGAAATCAT TATTCTAGTA GGCACGGCGG TGATTGCCAT GTTCTTCTGG
2641 CTACTTCTTG TCATCATCCT ACGGACCGTT AAGCGGGCCA ATGGAGGGGA ACTGAAGACA
2701 GGCTACTTGT CCATCGTCAT GGATCCAGAT GAACTCCCAT TGGATGAACA TTGTGAACGA
2761 CTGCCTTATG ATGCCAGCAA ATGGGAATTC CCCAGAGACC GGCTGAAGCT AGGTAAGCCT
2821 CTTGGCCGTG GTGCCTTTGG CCAAGTGATT GAAGCAGATG CCTTTGGAAT TGACAAGACA
2881 GCAACTTGCA GGACAGTAGC AGTCAAAATG TTGAAAGAAG GAGCAACACA CAGTGAGCAT
2941 CGAGCTCTCA TGTCTGAACT CAAGATCCTC ATTCATATTG GTCACCATCT CAATGTGGTC
3001 AACCTTCTAG GTGCCTGTAC CAAGCCAGGA GGGCCACTCA TGGTGATTGT GGAATTCTGC
3061 AAATTTGGAA ACCTGTCCAC TTACCTGAGG AGCAAGAGAA ATGAATTTGT CCCCTACAAG
3121 ACCAAAGGGG CACGATTCCG TCAAGGGAAA GACTACGTTG GAGCAATCCC TGTGGATCTG

3181 AAACGGCGCT TGGACAGCAT CACCAGTAGC CAGAGCTCAG CCAGCTCTGG ATTTGTGGAG
3241 GAGAAGTCCC TCAGTGATGT AGAAGAAGAG GAAGCTCCTG AAGATCTGTA TAAGGACTTC
3301 CTGACCTTGG AGCATCTCAT CTGTTACAGC TTCCAAGTGG CTAAGGGCAT GGAGTTCTTG
3361 GCATCGCGAA AGTGATATCCA CAGGGACCTG GCGGCACGAA ATATCCTCTT ATCGGAGAAG
3421 AACGTGGTTA AAATCTGTGA CTTTGGCTTG GCCCGGGATA TTTATAAAGA TCCAGATTAT
3481 GTCAGAAAAG GAGATGCTCG CCTCCCTTTG AAATGGATGG CCCCAGAAAC AATTTTTGAC
3541 AGAGTGATACA CAATCCAGAG TGACGTCTGG TCTTTTGGTG TTTTGCTGTG GGAAATATTT
3601 TCCTTAGGTG CTTCTCCATA TCCTGGGGTA AAGATTGATG AAGAATTTTG TAGGCGATTG
3661 AAAGAAGGAA CTAGAATGAG GGCCCTGAT TATACTACAC CAGAAATGTA CCAGACCATG
3721 CTGGACTGCT GGCACGGGGA GCCCAGTCAG AGACCCACGT TTCAGAGTT GGTGGAACAT
3781 TTGGGAAATC TCTTGCAAGC TAATGCTCAG CAGGATGGCA AAGACTACAT TGTCTCTCCG
3841 ATATCAGAGA CTTTGAGCAT GGAAGAGGAT TCTGGACTCT CTCTGCCTAC CTCACCTGTT
3901 TCCTGTATGG AGGAGGAGGA AGTATGTGAC CCCAAATTCC ATTATGACAA CACAGCAGGA
3961 ATCAGTCAGT ATCTGCAGAA CAGTAAGCGA AAGAGCCGGC CTGTGAGTGT AAAAACATTT
4021 GAAGATATCC CGTTAGAAGA ACCAGAAGTA AAAGTAATCC CAGATGACAA CCAGACGGAC
4081 AGTGGTATGG TTCTTGCCTC AGAAGAGCTG AAAACTTTGG AAGACAGAAC CAAATTATCT
4141 CCATCTTTTG GTGGAATGGT GCCCAGCAAA AGCAGGGAGT CTGTGGCATC TGAAGGCTCA
4201 AACCAGACAA GCGGCTACCA GTCCGGATAT CACTCCGATG ACACAGACAC CACCGTGTAC
4261 TCCAGTGAGG AAGCAGAACT TTAAAGCTG ATAGAGATTG GAGTGCAAAC CGGTAGCACA
4321 GCCCAGATTC TCCAGCCTGA CTCGGGGACC AACTGAGCT CTCCTCCTGT TTAAAGGAA
4381 GCATCCACAC CCCAACTCCC GGACATCACA TGAGAGGTCT GCTCAGATTT TGAAGTGTG
4441 TTCTTTCCAC CAGCAGGAAG TAGCCGCATT TGATTTTCAT TTCGACAACA GAAAAAGGAC
4501 CTCGGACTGC AGGGAGCCAG TCTTCTAGGC ATATCCTGGA AGAGGCTTGT GACCCAAGAA
4561 TGTGTCTGTG TCTTCTCCA GTGTTGACCT GATCCTCTTT TTTCATTCTT TTAAAAAGCA
4621 TTATCATGCC CCTGCTGCGG GTCTACCAT GGGTTTAGAA CAAAGAGCTT CAAGCAATGG
4681 CCCCATCCTC AAAGAAGTAG CAGTACCTGG GGAGCTGACA CTTCTGTAAA ACTAGAAGAT
4741 AAACCAGGCA ACGTAAGTGT TCGAGGTGTT GAAGATGGGA AGGATTTGCA GGGCTGAGTC
4801 TATCCAAGAG GCTTTGTTTA GGACGTGGGT CCCAAGCCAA GCCTTAAGTG TGGAAATCGG

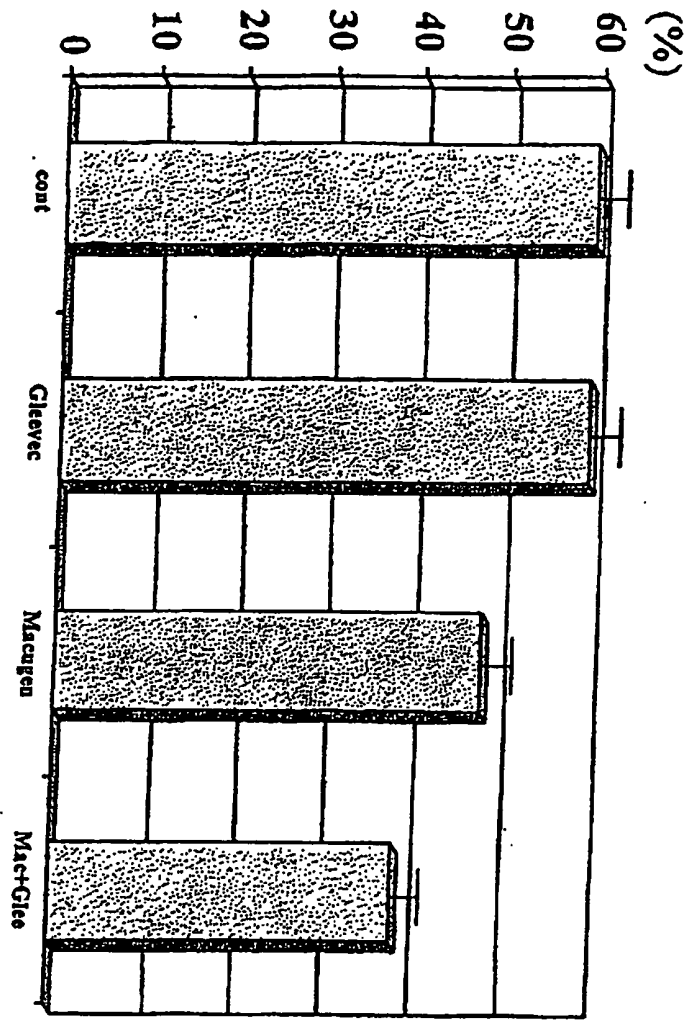
4861 ATTGATAGAA AGGAAGACTA ACGTTACCTT GCTTTGGAGA GTACTGGAGC CTGCAAATGC
4921 ATTGTGTTTG CTCTGGTGGA GGTGGGCATG GGGTCTGTTC TGAAATGTAA AGGGTTCAGA
4981 CGGGGTTTCT GGTTTTAGAA GGTTCGTGT TCTTCGAGTT GGGCTAAAGT AGAGTTCGTT
5041 GTGCTGTTTC TGACTCCTAA TGAGAGTTCC TTCCAGACCG TTAGCTGTCT CCTTGCCAAG
5101 CCCCAGGAAG AAAATGATGC AGCTCTGGCT CCTTGTCTCC CAGGCTGATC CTTTATTCAG
5161 AATACCACAA AGAAAGGACA TTCAGCTCAA GGCTCCCTGC CGTGTGGAAG AGTTCTGACT
5221 GCACAAACCA GCTTCTGGTT TCTTCTGGAA TGAATACCTT CATATCTGTC CTGATGTGAT
5281 ATGTCTGAGA CTGAATGCGG GAGGTTCAAT GTGAAGCTGT GTGTGGTGTC AAAGTTTCAG
5341 GAAGGATTTT ACCCTTTTGT TCTTCCCCCT GTCCCCAACC CACTCTCACC CCGCAACCCA
5401 TCAGTATTTT AGTTATTTGG CCTCTACTCC AGTAAACCTG ATTGGGTTTG TTCACTCTCT
5461 GAATGATTAT TAGCCAGACT TCAAAATTAT TTTATAGCCC AAATTATAAC ATCTATTGTA
5521 TTATTTAGAC TTTTAACATA TAGAGCTATT TCTACTGATT TTTGCCCTTG TTCTGTCCTT
5581 TTTTTCAAAA AAGAAAATGT GTTTTTTGTT TGGTACCATA GTGTGAAATG CTGGGAACAA
5641 TGACTATAAG ACATGCTATG GCACATATAT TTATAGTCTG TTTATGTAGA AACAAATGTA
5701 ATATATTAAA GCCTTATATA TAATGAACTT TGTACTATTC ACATTTTGTA TCAGTATTAT
5761 GTAGCATAAC AAAGGTCATA ATGCTTTCAG CAATTGATGT CATTTTATTA AAGAACATTG
5821 AAAA ACTTGA

VEGFR-2 (KDR/Flk-1) 多肽序列 (GenBank 寄存號 : AAB088005)
(SEQ ID NO: 10)

1 MQSKVLLAVA LWLCVETRAA SVGLPSVSLD LPRLSIQKDI LTIKANTTLQ ITCRGQRDLQ
 61 WLWPNNQSGS EQRVEVTECS DGLFCKTLTI PKVIGNDTGA YKCFYRETDL ASVIYVYVQD
 121 YRSPFIASVS DQHGCVVYITE NKNKTVVIPC LGSISNLNVS LCARYPEKRF VPDGNRISWD
 181 SKKGFTIPSY MISYAGMVFC EAKINDESYQ SIMYIVVVVG YRIYDVVLSP SHGIELSVGE
 241 KLVLNCTART ELNVGIDFNW EYPSSKHQHK KLVNRDLKTQ SGSEMKKFLS TLTIDGVTRS
 301 DQGLYTCAAS SGLMTKKNST FVRVHEKPFV AFGSGMESLV EATVGERVRI PAKYLGYPVP
 361 EIKWYKNGIP LESNHTIKAG HVLTIMEVSE RDTGNYTVIL TNPISKEKQS HVVSLVYVYP
 421 PQIGEKSLIS PVDSYQYGTQ QTLTCTVYAI PPPHHIHWYQ QLEEECANEP SQAVSVTNPY
 481 PCEEWRSEVD FQGGNKIEVN KNQFALIEGK NKTVSTLVIQ AANVSALYKC EAVNKVGRGE
 541 RVISFHVTRG PEITLQPDQ PTEQESVSLW CTADRSTFEN LTWYKLGPPQ LPIHVGELPT
 601 PVCKNLDTLW KLNATMFSNS TNDILIMELK NASLQDQGDY VCLAQDRKTK KRHCVVRQLT
 661 VLERVAPTIT GNLENQTTSI GESIEVSCTA SGNPPPQIMW FKDNELTVED SGIVLKDGNR
 721 NLTIRVRKE DEGLYTCQAC SVLGCAKVEA FFIIEGAQEK TNLEIILVG TAVIAMFFWL
 781 LLVIILRTVK RANGGELKTG YLSIVMDPDE LPLDEHCERL PYDASKWEFP RDRLKLGKPL
 841 GRGAFGQVIE ADAFGIDKTA TCRTVAVKML KEGATHSEHR ALMSELKILI HIGHHLNVVN
 901 LLGACTKPGG PLMVIVEFCK FGNLSTYLRN KRNEFVPYKT KGARFRQGKD YVGAIPVDLK
 961 RRLDSITSSQ SSASSGFVEE KSLSDVEEEE APEDLYKDFL TLEHLICYSF QVAKGMEFLA
 1021 SRKCIHRDLA ARNILLSEKN VVKICDFGLA RDIYKDPDYV RKGDLARLPLK WMAPETIFDR
 1081 VYTIQSDVWS FGVLLWEIFS LGASPYPGVK IDEEFCRRLK EGTRMRAPDY TTPEMYQTML
 1141 DCWHGEPSQR PTFSELVEHL GNLLQANAQQ DGKDYIVLPI SETLSMEEDS GLSLPTSPVS
 1201 CMEEEVCDP KFHYDNTAGI SQYLQNSKRK SRPVSVKTFE DIPLEEPEVK VIPDDNQDTS
 1261 GMVLASEELK TLEDRTKLSP SFGGMVPSKS RESVASEGSN QTSGYQSGYH SDDTDTTVYS
 1321 SEEAELLKLI EIGVQTGSTA QILQPDSTT LSSPPV

圖 4 (D)

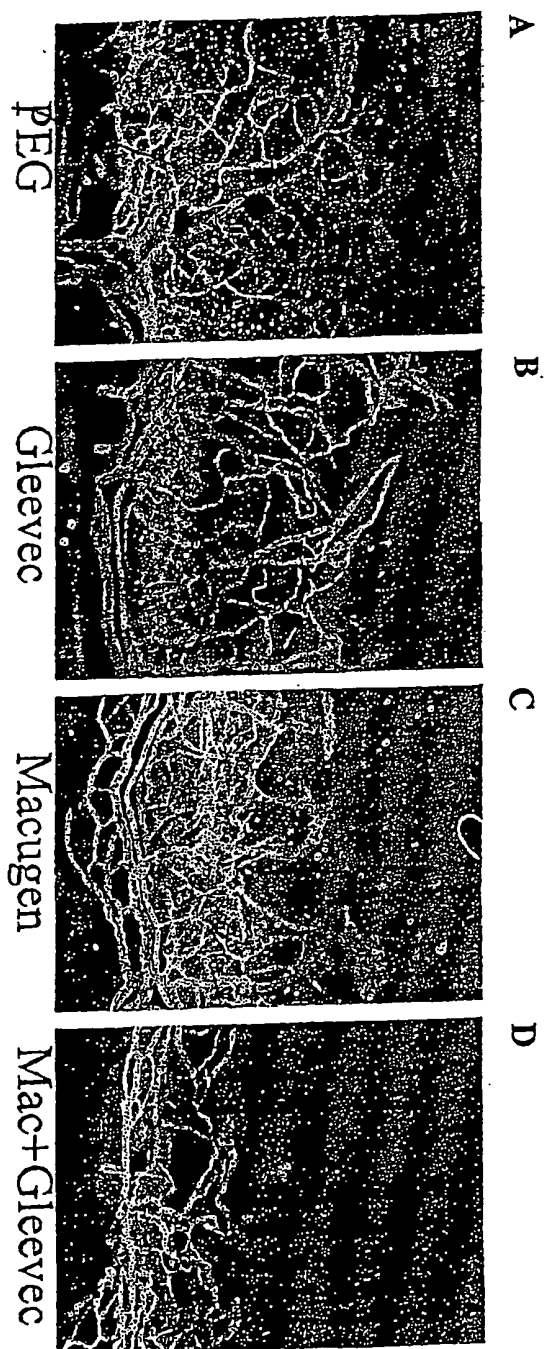
阻礙 PDGFR β 及 VEGF 訊號對角膜新血管形成之影響



■ CNV 面積

在誘導角膜新血管形成 7 天後，
治療動物 1 週

圖 5



6

PDGFR β 及 VEGF 訊號抑制劑對正常脈管系統之影響
 對照眼部的脈管系統未受 Gleevec、APB5、PEG 或 Macugen 之投予的影響，
 此表明阻礙 PDGFR β 或 VEGF 訊號或兩者係以新的未形成的血管為目標

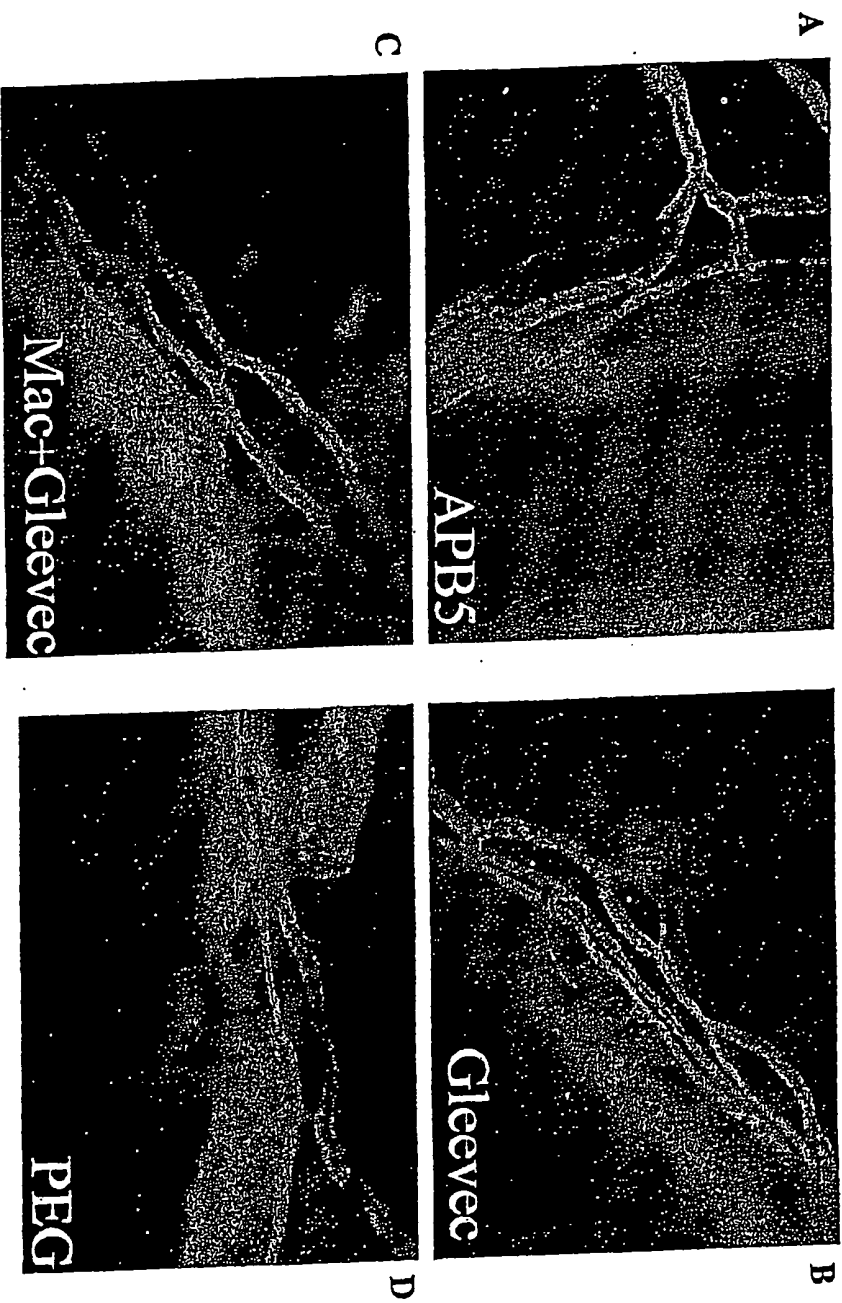


圖 7

在以 APB5 抗體及 Macugen 治療後脈絡膜新血管形成之面積
所有治療持續一週，在雷射灼燒後第 7 天開始
藉由 IP 一天兩次注射 25 mg/kg 的 Macugen 及 5 mg/kg 的 APB5

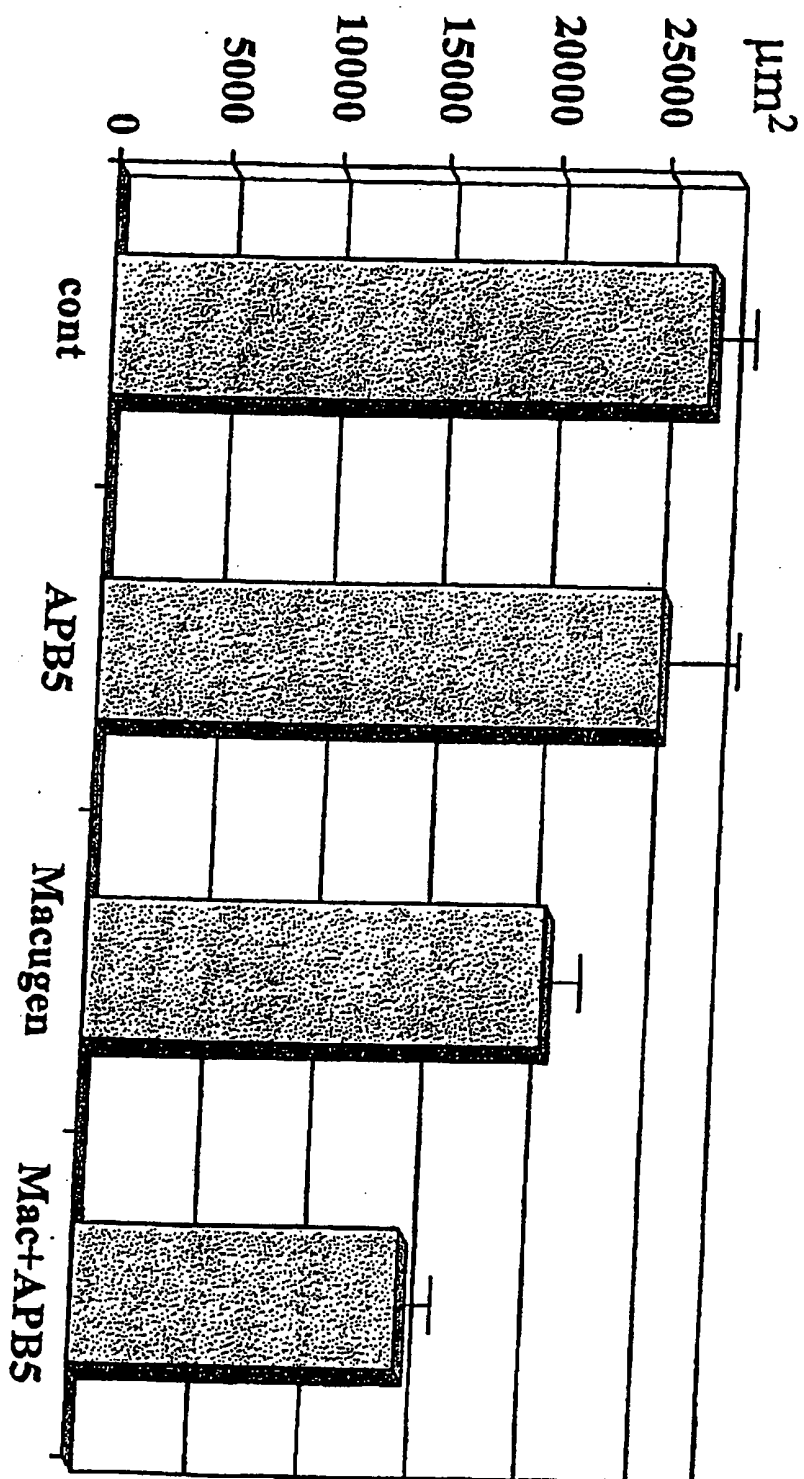


圖 8

在以 Gleevec 及 Macugen 治療後脈絡膜新血管形成之面積
所有治療持續一週，在雷射灼燒後的第 7 天開始
藉由 IP 一天兩次注射 25 mg/kg 的 Macugen
藉由強飼法一天兩次投予 50 mg/kg 的 Gleevec

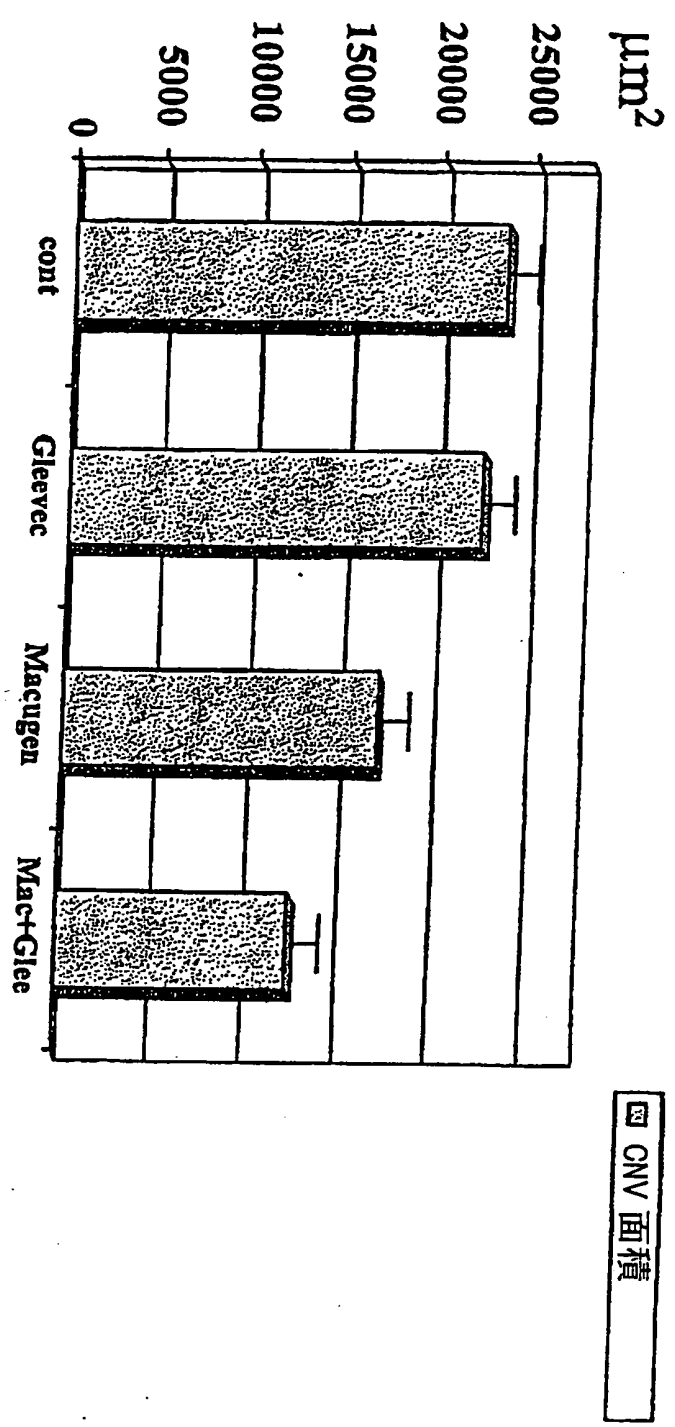


圖 9

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(5)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

發明專利說明書

102.10.18

中文說明書替換頁(102年10月)

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：093125925

※ 申請日期：93.08.27

※IPC 分類：A01K; C12

一、發明名稱：(中文/英文)

抑制濕型年齡相關之黃斑退化 (AMD) 之醫藥組合

PHARMACEUTICAL COMBINATION FOR SUPPRESSING WET-TYPE
AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION (AMD)

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商奧普多科技公司

OPHTHOTECH CORPORATION

代表人：(中文/英文)

山摩 派泰爾

PATEL, SAMIR

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國紐澤西州普林斯頓市福華根德來福街106室

VAUGHN DRIVE, SUITE 106, PRINCETON, NJ 08540, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 大衛 T 旭馬

SHIMA, DAVID T.

2. 佩瑞 卡里亞斯

CALIAS, PERRY

3. 安東尼 P 亞達米

ADAMIS, ANTHONY P.

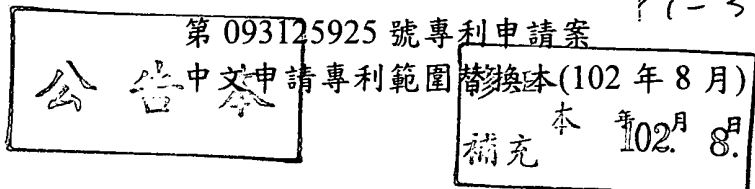
國 籍：(中文/英文)

1-3.均美國 U.S.A.

102.10.18

陳一敏

102.10.18



十、申請專利範圍：

1. 一種抑制患者之濕型年齡相關之黃斑退化(AMD)之醫藥組合，其包含：

(i) PDGF-B拮抗劑，其中該PDGF-B拮抗劑係為聚乙二醇化適體，其具有 CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT之序列，該序列於第6、20及30位置具有2'-氟-2'-去氧尿嘧啶核苷，於第8、21、28及29位置具有2'-氟-2'-去氧胞核苷，於第9、15、17及31位置具有2'-O-甲基-2'-去氧鳥苷，於第22位置具有2'-O-甲基-2'-去氧腺苷，於第10及23位置之N係來自六伸乙基-乙二醇亞胺基磷酸酯，及於第32位置之T為反向；及

(ii) VEGF-A拮抗劑，其中該VEGF-A拮抗劑係為抗體或抗體的結合片斷；

其中該PDGF-B拮抗劑及該VEGF-A拮抗劑以足以抑制該患者的濕型AMD之量依序或同時投與該患者。

2. 如請求項1之醫藥組合，其中該PDGF-B拮抗劑及該VEGF-A拮抗劑係依序投與。
3. 如請求項1之醫藥組合，其中該PDGF-B拮抗劑及該VEGF-A拮抗劑係同時投與。
4. 如請求項1至3中任一項之醫藥組合，其中投與該PDGF-B拮抗劑及該VEGF-A拮抗劑改善病人之視覺敏銳度。
5. 如請求項1至3中任一項之醫藥組合，其中投與該PDGF-B拮抗劑及該VEGF-A拮抗劑降低脈絡膜新血管形成。
6. 如請求項1之醫藥組合，

其中該PDGF-B拮抗劑及該VEGF-A拮抗劑係存在於同一醫藥組合物中。

7. 一種抑制需要之患者之濕型年齡相關之黃斑退化(AMD)之醫藥包，其包含：

(i) PDGF-B拮抗劑，其中該PDGF-B拮抗劑係為聚乙二醇化適體，其具有 CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT之序列，該序列於第6、20及30位置具有2'-氟-2'-去氧尿嘧啶核苷，於第8、21、28及29位置具有2'-氟-2'-去氧胞核苷，於第9、15、17及31位置具有2'-O-甲基-2'-去氧鳥苷，於第22位置具有2'-O-甲基-2'-去氧腺苷，於第10及23位置之N係來自六伸乙基-乙二醇亞胺基磷酸酯，及於第32位置之T為反向；及

(ii) VEGF-A拮抗劑，其中該VEGF-A拮抗劑係為抗體或抗體的結合片斷。

8. 如請求項7之醫藥包，其中該PDGF-B拮抗劑存在於第一單位劑型中及該VEGF-A拮抗劑存在於第二單位劑型中。
9. 如請求項7之醫藥包，其中該PDGF-B拮抗劑及該VEGF-A拮抗劑存在於相同醫藥組合物中。
10. 如請求項7至9中任一項之醫藥包，其中投與該PDGF-B拮抗劑及該VEGF-A拮抗劑改善病人之視覺敏銳度。
11. 如請求項7至9中任一項之醫藥包，其中投與該PDGF-B拮抗劑及該VEGF-A拮抗劑降低脈絡膜新血管形成。
12. 一種抑制患者之濕型年齡相關之黃斑退化(AMD)之醫藥

組合物，其包含：

(i) PDGF-B拮抗劑，其中該PDGF-B拮抗劑係為聚乙二醇化適體，其具有CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT之序列，該序列於第6、20及30位置具有2'-氟-2'-去氧尿嘧啶核苷，於第8、21、28及29位置具有2'-氟-2'-去氧胞核苷，於第9、15、17及31位置具有2'-O-甲基-2'-去氧鳥苷，於第22位置具有2'-O-甲基-2'-去氧腺苷，於第10及23位置之N係來自六伸乙基-乙二醇亞胺基磷酸酯，及於第32位置之T為反向；及

(ii) VEGF-A拮抗劑，其中該VEGF-A拮抗劑係為抗體或抗體的結合片斷。

13. 如請求項12之醫藥組合物，其中投與該PDGF-B拮抗劑及該VEGF-A拮抗劑改善病人之視覺敏銳度。
14. 如請求項12之醫藥組合物，其中投與該PDGF-B拮抗劑及該VEGF-A拮抗劑降低脈絡膜新血管形成。