



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102380098 A

(43) 申请公布日 2012. 03. 21

(21) 申请号 201110271111. 2

A61P 9/10(2006. 01)

(22) 申请日 2004. 08. 26

(30) 优先权数据

60/498407 2003. 08. 27 US

60/556837 2004. 03. 26 US

(62) 分案原申请数据

200480031700. 1 2004. 08. 26

(71) 申请人 奥普索特克公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 D·施马 P·卡利亚斯

A·P·亚当米斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 郭文洁

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

A61K 31/7088(2006. 01)

A61K 45/00(2006. 01)

A61P 27/02(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 45 页

序列表 41 页 附图 37 页

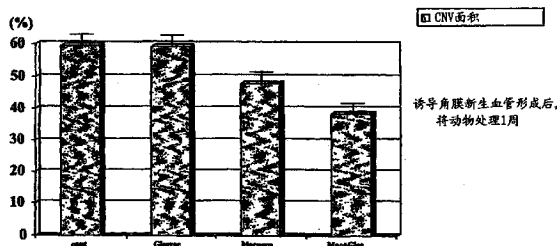
(54) 发明名称

用于治疗眼新血管疾病的组合治疗

(57) 摘要

本发明特征在于用于治疗被诊断患有或有危险发展为新血管疾病的患者的方法,其通过给所述患者施用 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂来实现。本发明特征也在于用于治疗或预防新血管疾病的含有 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂的药用组合物。

阻断PDGFR β和VEGF信号传导对角膜新生血管形成的作用



1. 一种药用组合物,其包括:(i)PDGF拮抗剂;(ii)VEGF拮抗剂;和(iii)可药用的载体,其中,所述的PDGF拮抗剂是PEG化或非PEG化的下述抗-PDGF适体:

(a) 序列如CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT所示,其在6、20和30号位置上具有2'-氟-2'-脱氧尿苷,在8、21、28和29号位置上具有2'-氟-2'-脱氧胞苷,在9、15、17和31号位置上具有2'-O-甲基-2'-脱氧鸟苷,在22号位置上具有2'-O-甲基-2'-脱氧腺苷,在10和23号位置的“N”来自六甘醇亚磷酸胺,并且在32号位置上具有颠倒方向即,3'-3'-连接的T;或

(b) 序列如CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT所示,其在8号位置的C上具有O-甲基-2-脱氧胞苷,在9、17和31号位置的G上具有2-O-甲基-2-脱氧鸟苷,在22号位置的A上具有2-O-甲基-2-脱氧腺嘌呤,在30号位置上具有2-O-甲基-2-脱氧尿苷,在6和20号位置的U上具有2-氟-2-脱氧尿苷,在21、28和29号位置的C上具有2-氟-2-脱氧胞苷,在10和23号位置的间隔基N来自五甘醇亚磷酸胺,并且在32号位置上具有颠倒方向即,3'-3'-连接的T,

所述的VEGF拮抗剂是抗体或其片段,

所述PDGF拮抗剂和VEGF拮抗剂的量足以抑制患者的眼新血管疾病。

2. (i)PDGF拮抗剂和(ii)VEGF拮抗剂在制备用于治疗或预防眼新血管疾病的药物中的用途,其中,所述的PDGF拮抗剂是PEG化或非PEG化的下述抗-PDGF适体:

(a) 序列如CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT所示,其在6、20和30号位置上具有2'-氟-2'-脱氧尿苷,在8、21、28和29号位置上具有2'-氟-2'-脱氧胞苷,在9、15、17和31号位置上具有2'-O-甲基-2'-脱氧鸟苷,在22号位置上具有2'-O-甲基-2'-脱氧腺苷,在10和23号位置的“N”来自六甘醇亚磷酸胺,并且在32号位置上具有颠倒方向即,3'-3'-连接的T;或

(b) 序列如CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT所示,其在8号位置的C上具有O-甲基-2-脱氧胞苷,在9、17和31号位置的G上具有2-O-甲基-2-脱氧鸟苷,在22号位置的A上具有2-O-甲基-2-脱氧腺嘌呤,在30号位置上具有2-O-甲基-2-脱氧尿苷,在6和20号位置的U上具有2-氟-2-脱氧尿苷,在21、28和29号位置的C上具有2-氟-2-脱氧胞苷,在10和23号位置的间隔基N来自五甘醇亚磷酸胺,并且在32号位置上具有颠倒方向即,3'-3'-连接的T,

所述的VEGF拮抗剂是抗体或其片段,

其中,所述的PDGF拮抗剂和所述的VEGF拮抗剂分别或单独剂量制备。

3. 如权利要求2的用途,其中,所述眼新血管疾病是缺血性视网膜病、虹膜新生血管形成、眼内新生血管形成、年龄相关性黄斑变性、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性视网膜缺血或增殖性糖尿病性视网膜病。

4. 如权利要求1的组合物,其中所述PDGF拮抗剂是PEG化抗-PDGF适体。

5. 如权利要求2的用途,其中,所述PDGF拮抗剂是PEG化的抗-PDGF适体。

6. 一种药物包,其包括:(i)具有PDGF拮抗剂的制剂;(ii)具有VEGF拮抗剂的制剂;其中,所述的PDGF拮抗剂是PEG化或非PEG化的下述抗-PDGF适体:

(a) 序列如CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT所示,其在6、20和30号位置上具有2'-氟-2'-脱氧尿苷,在8、21、28和29号位置上具有2'-氟-2'-脱氧胞苷,在

9、15、17 和 31 号位置上具有 2'-O-甲基-2'-脱氧鸟苷,在 22 号位置上具有 2'-O-甲基-2'-脱氧腺苷,在 10 和 23 号位置的“N”来自六甘醇亚磷酸胺,并且在 32 号位置上具有颠倒方向即,3'-3'-连接的 T;或

(b) 序列如 CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT 所示,其在 8 号位置的 C 上具有 O-甲基-2-脱氧胞苷,在 9、17 和 31 号位置的 G 上具有 2-O-甲基-2-脱氧鸟苷,在 22 号位置的 A 上具有 2-O-甲基-2-脱氧腺嘌呤,在 30 号位置上具有 2-O-甲基-2-脱氧尿苷,在 6 和 20 号位置的 U 上具有 2-氟-2-脱氧尿苷,在 21、28 和 29 号位置的 C 上具有 2-氟-2-脱氧胞苷,在 10 和 23 号位置的间隔基 N 来自五甘醇亚磷酸胺,并且在 32 号位置上具有颠倒方向即,3'-3'-连接的 T,

所述的 VEGF 拮抗剂是抗体或其片段。

7. 药物包,其包含:具有 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂的制剂,

其中,所述的 PDGF 拮抗剂是 PEG 化或非 PEG 化的下述抗-PDGF 适体:

(a) 序列如 CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT 所示,其在 6、20 和 30 号位置上具有 2'-氟-2'-脱氧尿苷,在 8、21、28 和 29 号位置上具有 2'-氟-2'-脱氧胞苷,在 9、15、17 和 31 号位置上具有 2'-O-甲基-2'-脱氧鸟苷,在 22 号位置上具有 2'-O-甲基-2'-脱氧腺苷,在 10 和 23 号位置的“N”来自六甘醇亚磷酸胺,并且在 32 号位置上具有颠倒方向即,3'-3'-连接的 T;或

(b) 序列如 CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT 所示,其在 8 号位置的 C 上具有 O-甲基-2-脱氧胞苷,在 9、17 和 31 号位置的 G 上具有 2-O-甲基-2-脱氧鸟苷,在 22 号位置的 A 上具有 2-O-甲基-2-脱氧腺嘌呤,在 30 号位置上具有 2-O-甲基-2-脱氧尿苷,在 6 和 20 号位置的 U 上具有 2-氟-2-脱氧尿苷,在 21、28 和 29 号位置的 C 上具有 2-氟-2-脱氧胞苷,在 10 和 23 号位置的间隔基 N 来自五甘醇亚磷酸胺,并且在 32 号位置上具有颠倒方向即,3'-3'-连接的 T,

所述的 VEGF 拮抗剂是抗体或其片段。

8. 如权利要求 6 或 7 的用途,其中,所述 PDGF 拮抗剂是 PEG 化抗-PDGF 适体。

用于治疗眼新血管疾病的组合治疗

[0001] 本申请是申请日为 2004 年 8 月 26 日, 申请号为 200480031700.1 的、发明名称和本发明相同的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求 2003 年 8 月 27 日提交的美国临时申请序号 60/498,407, 律师档案号 EYE-013P, 和 2004 年 3 月 26 日提交的美国临时申请序号 60/556,837, 律师档案号 EYE-013P2 的优先权, 所述文献都被以全文形式收作本文参考。

发明领域

[0004] 本发明涉及眼科学和医学领域。更具体地讲, 本发明涉及采用能抑制血小板衍生生长因子 (PDGF) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的试剂的组合治疗眼的新血管疾病。

[0005] 发明背景

[0006] 血管发生, 又被称作新生血管形成, 包括由现存的血管形成新枝 (sprout), 以及它们侵入周围的组织。一种相关的过程, 血管发生 (vasculogenesis) 包括业已存在于整个组织中的内皮细胞和成血管细胞的分化, 以及它们随后连接在一起以便形成血管。

[0007] 血管发生广泛出现在发育期间, 并且还出现在创伤愈合期间的健康身体内, 以便在损伤或伤害之后恢复血液流向组织。不过, 血管发生也与癌和肿瘤形成相关。实际上, 肿瘤组织中血管的量是乳腺癌 (Weidner 等, (1992) *J. Natl. Cancer Inst.* 84 :1875-1887)、前列腺癌 (Weidner 等, (1993) *Am. J. Pathol.* 143 :401-409)、脑肿瘤 (Li 等, (1994) *Lancet* 344 :82-86) 和黑素瘤 (Foss 等, (1996) *Cancer Res.* 56 :2900-2903) 的有力的消极预后指标。最近发现, 血管发生与许多医学领域的其他疾病状态相关, 包括风湿病学、皮肤病学、心脏病学和眼科学。具体地讲, 不希望的或病理学组织特异性血管发生与某些特殊疾病状态相关, 包括类风湿性关节炎、动脉粥样硬化和银屑病 (参见例如, Fan 等, (1995) *Trends Pharmacol. Sci.* 16 :57 ;和 Folkman (1995) *Nature Med.* 1 :27)。另外, 血管通透性的改变被认为在正常和病理学生理过程中起着作用 (Cullinan-Bove 等, (1993) *Endocrinol.* 133 :829 ;Senger 等, (1993) *Cancer and Metastasis Reviews* 12 :303)。尽管血管生成过程在上述每一种疾病中都可能与发育血管发生和肿瘤血管发生共有很多特征, 但是各自可能具有由于周围细胞的影响产生的特殊的特征。

[0008] 若干眼疾病涉及血管发生的改变。例如, 糖尿病性视网膜病, 是导致成年人失明的第三大原因 (在美国占失明人数的几乎 7%), 与广泛的血管生成事件相关。非增殖性视网膜病伴随着视网膜内的周细胞的选择性丧失, 并且它们的丧失导致了相关毛细血管的扩张, 并且导致了血流的增加。在扩张的毛细血管中, 内皮细胞增殖, 并且形成外翻, 它形成微动脉瘤, 并且相邻的毛细血管被阻塞, 从而微动脉瘤周围的视网膜区域没有被灌注。最终, 支路血管出现在相邻的微动脉瘤区域之间, 并且可以看到具有微动脉瘤的早期糖尿病性视网膜病和无灌注的视网膜区域的临床图像。微动脉瘤泄漏, 并且毛细血管可能出血, 导致渗出物和出血。一旦确定了背景糖尿病性视网膜病的起始阶段, 所述状况会发展数年时间段, 发展成增殖性糖尿病性视网膜病, 并且导致大约 5% 的失明病例。当视网膜的某些区域持续

丧失它们的毛细血管并变得不能灌注,从而导致在视网膜盘和其他地方出现新血管时,发生增殖性糖尿病性视网膜病。这些新血管生长成玻璃体,并且容易出血,从而导致视网膜前出血。在晚期增殖性糖尿病性视网膜病中,大量的玻璃体出血可能填充玻璃体腔的大部分。另外,新血管伴随着纤维组织增殖,它可能导致牵引视网膜脱离。

[0009] 糖尿病性视网膜病主要与糖尿病的持续时间相关;因此,随着人群年龄和糖尿病患者生活的更长,糖尿病性视网膜病的流行率将增加。激光治疗目前被用于非增殖性和增殖性糖尿病性视网膜病。黄斑区周围的泄漏性微动脉瘤的病灶激光治疗使患有临床上显著的黄斑水肿的患者视力的丧失降低了 50%。在增殖性糖尿病性视网膜病中,全视网膜光凝固导致了在整个视网膜上散布数千个微小的灼伤(避开黄斑区);这种治疗能降低失明比例 60%。黄斑水肿和增殖性糖尿病性视网膜病的早期治疗能预防 95%的患者在五年时间内失明,而晚期治疗只能防止 50%的患者失明。因此,早期诊断和治疗是重要的。

[0010] 涉及新生血管形成的另一种眼疾病是年龄相关性黄斑变性(AMD),这是一种影响 65 岁以上的大约 1/10 的美国人的疾病。AMD 的特征是黄斑,即视网膜中心区的一系列病理学变化,这种变化伴随着降低的视敏度,特别是影响中心视力。AMD 涉及被称为视网膜色素上皮的单层细胞,它紧位于感觉视网膜下面。这些细胞滋养并且支持与它们接触的视网膜部分,即,包含视色素的感光细胞。视网膜色素上皮位于玻璃膜上,它是基底膜复合物,在 AMD 患者中,它会增厚并且硬化。新血管可能从下脉络膜穿透玻璃膜,它包括丰富的血管床。这些血管可能会泄漏流体或者在视网膜色素上皮下面出血,并且还可能在视网膜色素上皮和感觉视网膜之间出血。随后的纤维状瘢痕形成会破坏感光细胞的营养,并且导致这些细胞死亡,从而导致中央视敏度的丧失。这种类型的年龄相关性黄斑病变被称作“潮湿”类型的,这是因为泄漏的血管和视网膜下水肿或血液。潮湿类型只占年龄相关性黄斑病变病例的 10%,但是导致了老年人中 90%的病例因为黄斑变性而为法定盲。“干燥”类型的年龄相关性黄斑病变涉及视网膜色素上皮的分解,以及上面感光细胞的丧失。干燥类型的病变会降低视力,但是通常只有 20/50-20/100 的水平。

[0011] AMD 伴随着中心视力的失真,使目标变大或变小或直线出现扭曲、弯曲或没有中心段。在潮湿类型的 AMD 中,在黄斑区可能注意到感觉视网膜的小的脱离,不过,视网膜下新生血管膜的最终诊断需要荧光素血管造影术。在所述干燥类型中,玻璃疣可能干扰黄斑区的色素沉着模式。玻璃疣是视网膜色素上皮的基底膜的赘疣,它能突出进入细胞,从而导致所述细胞前部膨胀;它们作为年龄相关性黄斑病变的危险因素的原因尚不清楚。目前还没有用于治疗干燥类型的年龄相关性黄斑病变的方法。激光治疗被用于潮湿类型的年龄相关性黄斑病变,并且最初消除了新生血管膜,并且在 18 个月时阻止了大约 50%患者的进一步视力丧失。不过,到 60 个月时,只有 20%的患者仍然有显著效果。

[0012] 业已鉴定了血管发生的多种分子介体,包括碱性和酸性成纤维细胞生长因子(aFGF, bFGF)、转化生长因子 α 和 β (TGF α , TGF β)、血小板衍生生长因子(PDGF)、血管生成素、血小板衍生内皮细胞生长因子(PD-ECGF)、白细胞介素-8(IL-8)和血管内皮生长因子(VEGF)。参与血管发生的其他刺激物包括血管生成素(angiotropin)-1、Del-1、卵泡抑素(follistatin)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、肝细胞生长因子(HGF)、苗条蛋白、midkine、胎盘生长因子、多效蛋白(PTN)、progranulin、增殖蛋白和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。另外,血管发生的控制还可以通过由身体产生的血管发生的多种负调节剂

介导,包括 angioarrestin、血管抑素(血纤蛋白溶酶原片段)、抗血管生成抗凝血酶 III、软骨-衍生的抑制剂(CDI)、CD59 补体片段、内皮抑制素(endostatin)(胶原 XVIII 片段)、纤连蛋白片段、gro- β 、肝素酶、肝素多聚己糖片段、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、干扰素 $\alpha/\beta/\gamma$ 、干扰素诱导型蛋白(IP-10)、白细胞介素-12、kringle 5(血纤蛋白溶酶原片段)、金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)、2-甲氧雌甾二醇、胎盘核糖核酸酶抑制剂、血纤蛋白溶酶原激活物抑制剂、血小板因子-4(PF4)、促乳素 16kD 片段、增殖蛋白-相关蛋白(PRP)、类视黄醇、四氢皮质醇-S、血小板反应蛋白-1(TSP-1)、脉管抑素(vasculostatin)和血管抑制因子(vasostatin)(钙网蛋白片段)。

[0013] 在上述血管生成调节剂中,VEGF 似乎作为伴随着肿瘤生长的异常血管发生的正调节剂发挥关键作用(综述参见 Brown 等,(1996)Control of Angiogenesis(Goldberg and Rosen, eds.)Birkhauser, Basel, 和 Thomas(1996)J. Biol. Chem. 271 :603-606)。另外,最近业已研究了信号传导分子的 PDGF 家族的 PDGF-B 成员的作用,因为它似乎在血管周围细胞的形成、扩增和正常功能方面发挥作用,所述血管周围细胞有时被称作壁细胞,例如,血管平滑肌、肾小球膜细胞和周细胞。

[0014] 尽管对与发育、伤口愈合和肿瘤形成伴随的血管发生或新生血管形成的了解较多,但仍然需要确定在血管发生和眼血管发生之间是否存在差异。很显然,尽管伴随着,例如,心脏上的侧支血管形成的血管发生可能对生物有利并且适应生物,但伴随着例如 AMD 的病理性眼新生血管形成没有已知的好处,并且通常会导致失明(有关综述参见 Campochiaro(2000)J. Cell. Physiol. 184 :301-10)。因此,尽管对伴随新生血管形成的分子事件的理解业已取得了进展,但仍然需要利用这些理解去开发用于治疗新血管疾病的其他方法,所述疾病包括眼新血管疾病和诸如与 AMD 和糖尿病性视网膜病伴随出现的脉络膜新生血管形成的疾病。

[0015] 发明概述

[0016] 业已惊奇地发现,抗-VEGF 和抗-PDGF 剂的组合,在治疗眼新血管疾病时能提供协同治疗效果。

[0017] 因此,本发明特征在于用于治疗被诊断患有或有危险发展为新血管疾病的患者的方法。该方法包括给所述患者施用抗-VEGF 剂和抗-PDGF 剂,作为主要或辅助治疗。

[0018] 一方面,本发明提供了用于抑制有所述需要的患者的新血管疾病的方法,其通过同时或相互间隔约 90 天之内给患者施用 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂来实现,使用量足以抑制所述患者的新血管疾病。

[0019] 另一方面,本发明提供了用于治疗有所述需要的患者的方法,所述患者被诊断患有或有危险发展为新血管疾病,其通过同时或相互间隔 90 天之内给患者施用 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂来实现,以足以治疗患者的用量施用。

[0020] 在这些方面的特定实施方案中,本发明的方法包括在相互间隔大约 10 天内施用 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂。在本发明方法的另一种实施方案中,所述 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂是在相互间隔 5 天内施用的。在本发明方法的另一种实施方案中,所述 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂是在相互间隔约 24 小时内施用的。在本发明方法的特定实施方案中,所述 PDGF 拮抗剂和所述 VEGF 拮抗剂是同时施用的。

[0021] 在另一种实施方案中,本发明的方法包括施用 PDGF 拮抗剂,它是 PDGF-B 拮抗剂。

在另一种实施方案中,本发明的方法包括施用 VEGF 拮抗剂,它是 VEGF-A 拮抗剂。

[0022] 在某些实施方案中,本发明的方法包括施用 PDGF 拮抗剂,它是核酸分子、适体、反义 RNA 分子、核酶、RNAi 分子、蛋白、肽、环肽、抗体、抗体片段的结合片段、糖、聚合物或小有机化合物。在另一种实施方案中,本发明的方法包括施用 VEGF 拮抗剂,它是核酸分子、适体、反义 RNA 分子、核酶、RNAi 分子、蛋白、肽、环肽、抗体、抗体片段的结合片段、糖、聚合物或小有机化合物。

[0023] 在特定实施方案中,本发明的方法包括施用 VEGF 拮抗剂,它是适体,如 EYE001 适体。在另一种实施方案中,本发明的方法包括施用 VEGF 拮抗剂,它是抗体或其结合片段。

[0024] 在特定实施方案中,本发明的方法包括施用 PDGF 拮抗剂,它是适体、抗体或其结合片段。在另一种具体实施方案中,本发明的方法包括施用 PDGF 拮抗剂,它是反义寡核苷酸。

[0025] 在本发明这一方面的另一种实施方案中,所述 PDGF 拮抗剂和 / 或所述 VEGF 拮抗剂是前药。

[0026] 在一种实施方案中,本发明的方法提供了用于抑制或治疗眼新血管疾病的手段。在某些实施方案中,适合通过本发明的方法治疗或抑制的眼新血管疾病包括缺血性视网膜病、虹膜新生血管形成、眼内新生血管形成、年龄相关性黄斑变性、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性视网膜缺血或增殖性糖尿病性视网膜病。在另一种实施方案中,本发明的方法提供了用于抑制或治疗有所述需要的患者或被诊断患有或有危险发展为这种疾病的患者的银屑病或类风湿性关节炎的手段。

[0027] 本发明还提供了包括 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂的,以及可以药用的载体的药用组合物。在这一方面,PDGF 和 VEGF 拮抗剂的使用量都足以抑制所述患者的新血管疾病。

[0028] 在这一方面的一种实施方案中,所述药用组合物包括 PDGF 拮抗剂,它是 PDGF-B 拮抗剂。在另一种实施方案中,所述药用组合物包括 VEGF 拮抗剂,它是 VEGF-A 拮抗剂。

[0029] 在某些实施方案中,本发明的药用组合物包括 PDGF 拮抗剂,它是核酸分子、适体、反义 RNA 分子、核酶、RNAi 分子、蛋白、肽、环肽、抗体、抗体片段的结合片段、糖、聚合物或小有机化合物。在另一种实施方案中,本发明的药用组合物包括 VEGF 拮抗剂,它是核酸分子、适体、反义 RNA 分子、核酶、RNAi 分子、蛋白、肽、环肽、抗体、抗体片段的结合片段、糖、聚合物或小有机化合物。

[0030] 在其他特定实施方案中,本发明的药用组合物包括 VEGF 拮抗剂,它是适体,如 EYE001 适体。在一种实施方案中,本发明的药用组合物包括 VEGF 拮抗剂,它是抗体或其结合片段。

[0031] 在特定实施方案中,本发明的药用组合物包括 PDGF 拮抗剂,它是抗体或其结合片段。在另一种具体实施方案中,本发明的药用组合物包括 PDGF 拮抗剂,它是反义寡核苷酸。

[0032] 本发明的药用组合物可以包括可以药用的载体,它包括小球体或水凝胶制剂。

[0033] 在另一种实施方案中,所述 PDGF 拮抗剂和 / 或所述 VEGF 拮抗剂是前药。

[0034] 在另一种实施方案中,本发明的药用组合物提供了用于抑制或治疗眼新血管疾病的手段。在某些实施方案中,适合通过本发明的药用组合物治疗或抑制的眼新血管疾病包括缺血性视网膜病、虹膜新生血管形成、眼内新生血管形成、年龄相关性黄斑变性、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性视网膜缺血或增殖性糖

尿病性视网膜病。在其他实施方案中,本发明的药用组合物提供用于在有所述需要的患者,或被诊断患有或有危险发展为这种疾病的患者中抑制或治疗银屑病或类风湿性关节炎的手段。

[0035] 本发明还提供了包括 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂的药物包 (pharmaceutical pack)。在这一方面的一种实施方案中,所述药物包包括 PDGF 拮抗剂,它是 PDGF-B 拮抗剂。在这一方面的另一种实施方案中,所述药物包包括 VEGF 拮抗剂,它是 VEGF-A 拮抗剂。

[0036] 在另一种实施方案中,所述药物包的 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂是分别且以单独剂量形式制备的。在另一种实施方案中,所述药物包的 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂是一起制备的。

[0037] 在某些特定实施方案中,本发明的药物包包括 VEGF 拮抗剂,它是适体,如 EYE001 适体。在其他实施方案中,本发明的药物包包括 VEGF 拮抗剂,它是抗体或其结合片段。

[0038] 在某些实施方案中,本发明的药物包包括 PDGF 拮抗剂,它是抗体或其结合片段。在其他特定实施方案中,本发明的药物包包括 PDGF 拮抗剂,它是反义寡核苷酸。在这一方面的另一种实施方案中,所述 PDGF 拮抗剂和 / 或所述 VEGF 拮抗剂是前药。

[0039] 附图简述

[0040] 图 1(A) 是人 PDGF-B 的核酸序列 (GenBank 编号 X02811) (SEQ ID NO :1) 的示意图。

[0041] 图 1(B) 是人 PDGF-B 的氨基酸序列 (GenBank 编号 CAA26579) (SEQ ID NO :2) 的示意图。

[0042] 图 1(C) 是人 PDGF-A 的核酸序列 (GenBank 编号 X06374) (SEQ ID NO :11) 的示意图。

[0043] 图 1(D) 是人 PDGF-A 的多肽序列 (GenBank 编号 CAA29677) (SEQ ID NO :12) 的示意图。

[0044] 图 2(A) 是人 VEGF 的核酸序列 (GenBank 编号 :NM_003376) (SEQ ID NO :3) 的示意图。

[0045] 图 2(B) 是人 VEGF 多肽氨基酸序列 (GenBank 编号 NP_003367) (SEQ ID NO :4) 的示意图。

[0046] 图 3(A) 是人 PDGFR-B 核酸序列 (GenBank 编号 NM_002609) (SEQ ID NO :5) 的示意图。

[0047] 图 3(B) 是人 PDGFR-B 多肽序列 (GenBank 编号 NP_002600) (SEQ ID NO :6) 的示意图。

[0048] 图 3(C) 是人 PDGFR-A 核酸序列 (GenBank 编号 NM_006206) (SEQ ID NO :13) 的示意图。

[0049] 图 3(D) 是人 PDGFR-A 多肽序列 (GenBank 编号 NP_006197) (SEQ ID NO :14) 的示意图。

[0050] 图 4(A) 是人 VEGFR-1 (Flt-1) 核酸序列 (GenBank 编号 AF063657) (SEQ ID NO :7) 的示意图。

[0051] 图 4(B) 是人 VEGFR-1 (Flt-1) 多肽序列 (GenBank 编号) (SEQ ID NO :8) 的示意图。

[0052] 图4(C) 是人 VEGFR-2 (KDR/F1k-1) 核酸序列 (GenBank 编号 AF035121) (SEQ ID NO : 9) 的示意图。

[0053] 图4(D) 是人 VEGFR-2 (KDR/F1k-1) 多肽序列 (GenBank 编号 AAB88005) (SEQ ID NO : 10) 的示意图。

[0054] 图5 是比较对照处理 (cont)、Gleevec 处理 (抗 -PDGF 剂) 和 Macugen™ 处理 (即 pegaptanib 处理, 抗 -VEGF 剂) 的角膜新生血管形成测定结果, 与用 Macugen™ 和 Gleevec 的组合处理结果 (抗 -PDGF/ 抗 -VEGF 组合治疗) 的图示。

[0055] 图6(A) 是出现在对照 (PEG- 处理的) 小鼠角膜上的角膜新生血管形成的荧光显微镜图像的照片图示。

[0056] 图6(B) 是出现在 Gleevec- 处理的小鼠角膜上的角膜新生血管形成的荧光显微镜图像的照片图示。

[0057] 图6(C) 是出现在 Macugen™- 处理的小鼠角膜上的角膜新生血管形成的荧光显微镜图像的照片图示。

[0058] 图6(D) 是出现在用 Macugen™ 和 Gleevec 两者处理的小鼠角膜上的角膜新生血管形成的荧光显微镜图像的照片图示。

[0059] 图7(A) 是荧光显微镜图像的照片图示, 表示正常的角膜脉管系统不会受到施用 APB5 (PDGFR 抗体, 抗 -PDGF 剂) 的影响。

[0060] 图7(B) 是荧光显微镜图像的照片图示, 表示正常的角膜脉管系统不受施用 Gleevec 的影响。

[0061] 图7(C) 是荧光显微镜图像的照片图示, 表示正常的角膜脉管系统不受同时施用 Macugen™ (Mac) 和 Gleevec 的影响。

[0062] 图7(D) 是荧光显微镜图像的照片图示, 表示正常的角膜脉管系统不受施用 PEG 的影响。

[0063] 图8 是激光诱导的脉络膜新生血管形成测定结果的图示, 比较了对照处理 (cont)、Gleevec 处理 (抗 -PDGF 剂) 和 Macugen™ 处理 (即 pegaptanib 处理, 抗 -VEGF 剂) 与用 Macugen™ 和 Gleevec 组合处理的结果 (抗 -PDGF/ 抗 -VEGF 组合治疗)。

[0064] 图9 是激光诱导的脉络膜新生血管形成测定结果的图示, 比较了对照 - 处理的 (cont)、APB5- 处理的 (抗 -PGFR 抗体, 它起着抗 -PDGF 剂的作用) 和 Macugen 处理 (即 pegaptanib 处理, 抗 -VEGF 适体) 与用 Macugen 和 APB5 (Mac+APB5) 组合处理的结果。

[0065] 图10 是视网膜发育模型结果的图示, 比较了对照处理 (cont)、ARC-127 处理 (抗 -PDGF 剂) 和 Macugen 处理 (即 pegaptanib 处理, 抗 -VEGF 剂) 与用 Macugen 和 ARC-127 组合处理 (抗 -PDGF/ 抗 -VEGF 组合治疗) 的结果。

[0066] 图11 是角膜新生血管形成测定结果的图示, 比较了对照处理 (cont)、ARC-127 处理 (抗 -PDGF 剂) 和 Macugen 处理 (即 pegaptanib 处理, 抗 -VEGF 剂) 与用 Macugen 和 ARC-127 组合处理 (抗 -PDGF/ 抗 -VEGF 组合治疗) 的结果。

[0067] 图12(A) 是出现在对照小鼠角膜中的角膜新生血管形成的荧光显微镜图像的照片图示。

[0068] 图12(B) 是出现在 ARC-127- 处理的小鼠角膜中的角膜新生血管形成的荧光显微镜图像的照片图示。

[0069] 图 12(C) 是出现在 Macugen- 处理的小鼠角膜中的角膜新生血管形成的荧光显微镜图像的照片图示。

[0070] 图 12(D) 是出现在用 Macugen 和 ARC-127 处理的小鼠角膜中的角膜新生血管形成的荧光显微镜图像的照片图示。

[0071] 图 13 是角膜新生血管形成测定结果的图示,比较了对照处理 (cont)、APB-5 处理 (抗 -PDGF 剂) 和 Macugen 处理 (即 pegaptanib 处理,抗 -VEGF 剂) 与用 Macugen 和 APB-5 组合处理 (抗 -PDGF/ 抗 -VEGF 组合治疗) 的结果。

[0072] 图 14 是角膜新生血管形成测定结果的图示,比较了对照处理 (cont)、APB-5 处理 (抗 -PDGF 剂) 和 Macugen- 处理 (即 pegaptanib 处理,抗 -VEGF 剂) 与用 Macugen 和 APB-5 组合处理 (抗 -PDGF/ 抗 -VEGF 组合治疗) 的结果。

[0073] 发明详述

[0074] 在本说明书中所提到的所有文献、专利和专利申请都被收作本文参考。

[0075] 定义

[0076] 在本文中,以下术语和短语具有下面所具有的含义。除非另有说明,本文所使用的所有技术和科学术语具有本发明所属技术领域普通技术人员所普遍了解的含义。

[0077] “拮抗剂”表示能部分或完全抑制靶分子的活性或产生的试剂。具体地讲,术语“拮抗剂”,在本文中选择性地使用时,表示能够降低 PDGF、PDGFR、VEGF 或 VEGFR 基因表达水平、mRNA 水平、蛋白水平或蛋白活性的试剂。拮抗剂的示例性形式包括,例如,蛋白、多肽、肽 (如环肽)、抗体或抗体片段、肽模拟物、核酸分子、反义分子、核酶、适体、RNAi 分子和小有机分子。拮抗剂抑制 VEGF/VEGFR 和 PDGF/PDGFR 配体 / 受体靶的示例性的非限定性机制包括抑制配体合成和 / 或稳定性 (例如,使用靶定配体基因 / 核酸的反义、核酶或 RNAi 组合物)、阻断配体与它的同源受体的结合 (例如,使用抗 - 配体适体、抗体或可溶性引诱同源受体)、抑制受体合成和 / 或稳定性 (例如,使用靶定配体受体基因 / 核酸的反义、核酶或 RNAi 组合物)、阻断受体与它的同源受体的结合 (例如,使用受体抗体) 和阻断受体被它的同源配体的激活 (例如,使用受体酪氨酸激酶抑制剂)。另外,所述拮抗剂可以直接或间接抑制靶分子。

[0078] 在本文中,术语“抗体”意在包括完整的抗体,例如,任何同种型的抗体 (IgG、IgA、IgM、IgE 等),并且包括能够识别并且还能与脊椎动物 (例如,哺乳动物) 蛋白、糖类等特异性起反应的它们的片段。抗体可以使用常规技术片段化,并且以上述完整抗体相同的方式筛选这些片段的用途。因此,该术语包括抗体分子的蛋白酶剪切的片段或重组制备的部分,它能够与某些蛋白选择性地起反应。所述蛋白酶解和 / 或重组片段的非限定性例子包括 Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv 和单链抗体 (scFv),它包括通过肽接头结合的 V[L] 和 / 或 V[H] 结构域。所述 scFv' s 可以共价或非共价连接,以便形成具有两个或两个以上结合位点的抗体。本发明包括多克隆抗体、单克隆抗体或抗体的其他纯化制剂和重组抗体。

[0079] 在这里,术语“适体”,可以与术语“核酸配体”互换使用,它表示核酸,所述核酸通过它适应特殊的三维构象的能力,能结合靶分子并且对它具有拮抗作用 (即,抑制)。本发明的靶是 PDGF 或 VEGF (或它们的同源受体 PDGFR 或 VEGFR 之一),因此,使用了术语 PDGF 适体或核酸配体或 VEGF 适体或核酸配体 (或 PDGFR 适体或核酸配体或 VEGFR 适体或核酸配体)。所述适体对靶的抑制可以通过下述方式进行:靶的结合,催化性改变靶,以修饰 / 改

变靶或靶的功能活性的方式与靶起反应,作为自杀抑制剂与靶共价附着,促进靶和其他分子之间的反应。适体可以包括多个核糖核苷酸单位、脱氧核糖核苷酸单位或这两种类型核苷酸残基的混合物。适体还可以包括一个或多个修饰过的碱基、糖或磷酸酯主链单位,正如在本文中进一步描述的。

[0080] “抗体拮抗剂”表示本文所定义的抗体分子,它能阻断或显著减弱靶 PDGF 或 VEGF 的一种或多种活性。例如,VEGF 抑制抗体可以抑制或减弱 VEGF 刺激血管发生的能力。

[0081] 如果两个序列的每一个碱基都匹配,即能够形成沃森-克里克 (Watson Crick) 碱基对,那么一种核苷酸序列就是与另一种核苷酸序列“互补的”。术语“互补链”在这里可以与术语“互补体”互换使用。核酸链的互补体可以是编码链的互补体或非编码链的互补体。

[0082] 短语“保守残基”或“保守性氨基酸取代”表示基于某些共同特性的氨基酸分组。确定独立氨基酸之间的共同特性的功能性途径是分析同源生物的相应蛋白之间的氨基酸变化的归一化频率。根据所述分析,可以确定氨基酸的组,其中,一组中的氨基酸优选能够彼此交换,因此,它们在对总的蛋白结构的影响上最彼此类似 (Schulz, G. E. 和 R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag)。以这种方式确定的氨基酸组的例子包括:

[0083] (i) 带电荷的组,由 Glu 和 Asp、Lys、Arg 和 His 组成,

[0084] (ii) 带正电荷的组,由 Lys、Arg 和 His 组成,

[0085] (iii) 带负电荷的组,同 Glu 和 Asp 组成,

[0086] (iv) 芳族组,由 Phe、Tyr 和 Trp 组成,

[0087] (v) 氮环组,由 His 和 Trp 组成,

[0088] (vi) 大的脂族非极性组,由 Val、Leu 和 Ile 组成,

[0089] (vii) 略微极性组,由 Met 和 Cys 组成,

[0090] (viii) 小残基组,由 Ser、Thr、Asp、Asn、Gly、Ala、Glu、Gln 和 Pro 组成,

[0091] (ix) 脂族组,由 Val、Leu、Ile、Met 和 Cys 组成,和

[0092] (x) 小羟基组,由 Ser 和 Thr 组成。

[0093] 除上面所列举的组之外,每一种氨基酸残基可以形成它自身的组,并且由单独的氨基酸形成的组可以简单地通过本领域常用的氨基酸的单字母和 / 或三字母的缩写来表示。

[0094] 在本文中,术语“相互作用”实际上表示包括分子之间的可检测的关系或结合(例如,生物化学相互作用),如蛋白-蛋白、蛋白-核酸、核酸-核酸和蛋白-小分子或核酸-小分子之间的相互作用。

[0095] 术语“相互作用的蛋白”表示能够与目标蛋白相互作用、结合和 / 或以其他方式结合的蛋白,例如,PDGF 或 VEGF 蛋白,或它们的相应的同源受体。

[0096] 在本文中,与核酸,如 DNA 或 RNA 相应的术语“分离的”,表示与存在于所述大分子天然来源中的其他 DNAs 或 RNAs 分别分离的分子。类似的,在本文中,与多肽相应的术语“分离的”表示与所述多肽的来源中存在的其他蛋白分离的蛋白分子。在本文中,术语分离的还表示在通过重组 DNA 技术生产时基本上不含细胞材料、病毒材料或培养基的核酸或肽,或者在通过化学合成时基本上不含化学前体或其他化学试剂。

[0097] “分离的核酸”表示包括核酸片段,它不是作为片段天然存在的,并且不会以天然

状态被发现。术语“分离的”在这里还用于表示多肽,它是从其他细胞蛋白中分离的,并且表示包括纯化的和重组多肽两者。

[0098] 在本文中,术语“标记”和“可检测标记”表示能够检测的分子,包括,但不局限于,放射性同位素、荧光团、化学发光部分、酶、酶底物、酶辅因子、酶抑制剂、染料、金属离子、配体(例如,生物素或半抗原)等。术语“荧光剂”表示能够表现出可检测范围的荧光的物质或它的部分。可以在本发明中使用的标记的具体例子包括荧光素、若丹明、丹酰、伞形酮、德克萨斯红、鲁米诺、NADPH、 α - β -半乳糖苷酶和辣根过氧化物酶。

[0099] “基因在细胞中的表达水平”表示由所述细胞中的基因编码的 mRNA,以及前-mRNA 新生转录物,转录物加工中间物,成熟 mRNA 和降解产物的水平,以及由所述基因翻译的蛋白的水平。

[0100] 在本文中,术语“核酸”表示多核苷酸,如脱氧核糖核酸(DNA),且如果合适的话,还表示核糖核酸(RNA)。该术语还应当被理解成包括由核苷酸类似物制备的 RNA 或 DNA 类似物作为等同物,以及在用于所述实施方案时,单链(有义或反义)和双链多核苷酸、ESTs、染色体、cDNAs、mRNAs 和 rRNAs 是可以被称作核酸的分子的代表性例子。

[0101] 术语“寡核苷酸”表示核苷酸或核苷单体的寡聚体或多聚体,它是由天然存在的碱基糖类和糖间(主链)键组成的。该术语还包括修饰过的或取代过的寡聚体,包括非天然存在的单体或它的部分,它们起着类似的作用。取代过的寡聚体的整合是基于多种因素的,包括增强了的细胞摄取,或增强了的核酸酶抗性,并且是根据本领域公知方法选择的。完整的寡核苷酸或者仅是它的一部分可以包括取代过的寡聚体。

[0102] 术语“百分比同一性”表示两种氨基酸序列或两种核苷酸序列之间的序列同一性。同一性可以通过比较在每一种序列上的位置确定,它们可以是为了比较而进行比对的。当比较的序列上的相同位置被相同的碱基或氨基酸所占据时,所述分子在该位置上是相同的;当相同的位点被相同或类似的氨基酸残基(例如,在空间和/或电子性质方面类似)所占据时,所述分子可以被称作在该位置上是同源的(类似的)。同源性、相似性或同一性的百分比表示由比较序列所共有的位置上相同或相似氨基酸的数目的函数。可以使用各种比对算法和/或程序,包括 Hidden Markov Model(HMM)、FASTA 和 BLAST。HMM、FASTA 和 BLAST 可以从以下机构获得:the National Center for Biotechnology Information、National Library of Medicine、National Institutes of Health, Bethesda, Md. 和 the European Bioinformatic Institute EBI。在一种实施方案中,两种序列的百分比同一性可以通过所述 GCG 程序确定,其缺口权重为 1,例如,对每一个氨基酸缺口进行加权,就如同它是两个序列之间的单个氨基酸或核苷酸错配。用于比对的其它技术描述于以下文献中:Methods in Enzymology, vol. 266:Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis(1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, California, 美国。如果需要的话,将允许序列中存在缺口的比对程序用于比对所述序列。Smith Waterman 是一种类型的允许在序列比对中存在缺口的算法(参见(1997)Meth. Mol. Biol. 70:173-187)。同样,采用 Needleman 和 Wunsch 比对方法的 GAP 程序可用于比对序列。包括使用 HMM 的更多的技术和算法描述于以下文献中:Sequence, Structure, and Databanks: A Practical Approach(2000), ed. Oxford University Press, Incorporated and in Bioinformatics: Databases and Systems (1999) ed. Kluwer

Academic Publishers。另一种检索策略使用了 MPSRCH 软件,该软件在 MASPAR 计算机上运行。MPSRCH 使用 Smith-Waterman 算法在大量并行计算机上对序列进行评分。这种方法改善了挑选关系较远的匹配的能力,并且特别能耐受小的缺口和核苷酸序列错误。可以将核酸编码的氨基酸序列用于检索蛋白和 DNA 数据库。具有独立序列的数据库描述于以下文献中: *Methods in Enzymology*, ed. Doolittle, 同上。数据库包括 Genbank、EMBL 和日本的 DNA 数据库 (DDBJ)。

[0103] “完全匹配的”在表示双链体时,表示由形成所述双链体的多核苷酸或寡核苷酸彼此形成了双链结构,以便在每一条链上的每一个核苷酸都与另一条链上的核苷酸发生了沃森-克里克碱基配对。该术语还可以包含可以应用的核苷类似物的配对,如脱氧肌苷、具有 2-氨基嘌呤碱基的核苷等。靶多核苷酸和寡核苷酸或多核苷酸之间的双链体的错配表示所述双链体上的一对核苷酸不能进行沃森-克里克结合。在提到三链体时,该术语表示三链体由完全配对的双链体和第三条链组成,其中,每一个核苷酸都与完全匹配的双链体上的碱基对发生了 Hoogsteen 或反向 Hoogsteen 结合。

[0104] 术语“RNA 干扰”、“RNAi”或“siRNA”都表示通过将一个或多个双链 RNAs 导入靶细胞中来减弱基因或基因产物的表达的任何方法,所述 RNA 与目标基因同源(特别是与目标基因,例如,PDGF 或 VEGF 的信使 RNA 同源)。

[0105] 多态变体还可以包括“单核苷酸多态性”(SNPs),其中,所述多核苷酸序列有一个碱基的改变(例如,在 PDGF 或 VEGF 中的一个碱基的改变)。SNPs 的存在可以是,例如,某些群体、疾病状态或出现疾病状态的倾向的指标。

[0106] 异常“特征(profile)”,例如,肿瘤细胞的生物学状态表示因为疾病状态而改变的细胞的各种成分的含量。细胞成分包括 RNA 水平、蛋白丰度水平或蛋白活性水平。

[0107] 在这里,术语“蛋白”可以与术语“肽”和“多肽”互换使用。术语“重组蛋白”表示通过重组 DNA 技术生产的本发明的蛋白,其中,一般将编码表达的蛋白或 RNA 的 DNA 插入合适的表达载体,该表达载体又被用于转化宿主细胞,以便产生异源蛋白或 RNA。另外,短语“源于”,在关于编码重组蛋白的重组基因时,是指在“重组蛋白”的含义内,包括具有天然蛋白的氨基酸序列,或与它类似的通过突变产生的氨基酸序列的蛋白,所述突变包括天然存在的蛋白的取代和缺失。

[0108] 在本文中,术语“转基因”表示核酸序列(编码例如,靶核酸之一,或它的反义转录物),业已将所述核酸序列导入了细胞。对于导入了它的转基因动物或细胞来说,转基因可以是部分或完全异源的,即,外源的,或者与导入了它的转基因动物或细胞的内源基因同源,不过,它们被设计成或已经以这样的方式插入所述动物的基因组,以便改变插入了它的细胞的基因组(例如,它被插入的位置不同于天然基因的位置,或者它的插入导致了敲除)。转基因还能够以附加体的形式存在于细胞中。转基因可以包括一个或多个转录调控序列,以及任何其他核酸,如内含子,它们可能是所选核酸的最佳表达所必需的。

[0109] “新血管疾病”表示以改变了的或不受调控的血管发生为特征的疾病,其中伴随着致癌性或致瘤性转化的疾病,即,癌症除外。新血管疾病的例子包括银屑病、类风湿性关节炎和眼新血管疾病,包括糖尿病性视网膜病和年龄相关性黄斑变性。

[0110] 在本文中,术语“新生血管形成”和“血管发生”可以互换使用。新生血管形成和血管发生表示产生新血管进入细胞、组织或器官。血管发生的控制通常在某些疾病状态中

发生改变,并且,在很多场合下,与所述疾病相关的病理学损伤与改变了的、不受调控的或不受控制的血管发生相关。持久的、不受调控的血管发生出现在多种疾病状态中,包括以内皮细胞异常生长为特征的疾病,并且支持在这些状况中出现的病理学损伤,包括血管的泄漏和通透性。

[0111] “眼新血管疾病”是以患者眼中改变了的或不受调控的血管发生为特征的疾病。实例性的眼新血管疾病包括视神经盘新生血管形成、虹膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、角膜新生血管形成、玻璃体新生血管形成、绿内障、血管翳、翼状胬肉、黄斑水肿、糖尿病性视网膜病、糖尿病性黄斑水肿、血管原性视网膜病、视网膜变性、葡萄膜炎、视网膜炎性疾病和增殖性玻璃体视网膜病变。

[0112] 术语“治疗”受试者的新血管疾病或“治疗”患有新血管疾病的受试者表示让所述受试者接受药物治疗,例如,施用药物,以便减弱新血管疾病的至少一种症状。因此,在本文中,术语“治疗”意在包括治愈和改善新血管状况或疾病的至少一种症状。因此,在本文中,“治疗”包括施用或开处药用组合物,用于治疗或预防眼新血管疾病。

[0113] “患者”表示任何动物。术语“动物”包括哺乳动物,包括,但不局限于人和其他灵长类。该术语还包括家畜,如牛、猪、羊、马、狗和猫。

[0114] “PDGF”或“血小板衍生生长因子”表示能影响血管发生或血管生成过程的哺乳动物血小板衍生生长因子。在本文中,术语“PDGF”包括PDGF的各种亚型,包括PDGF-B(参见图1(A)和(B))和PDGF-A(参见图1(C)和(D))。另外,在本文中,术语“PDGF”表示PDGF-相关的血管生成因子,如PDGF-C和PDGF-D,它们通过同源PDGF受体起作用,刺激血管发生或血管生成过程。具体地讲,术语“PDGF”表示生长因子种类的任何成员,它能够(i)与诸如PDGFR-B(参见图3(A)和(B))或PDGFR-A(参见图3(C)和(D))的PDGF受体结合;(ii)激活与VEGF受体相关的酪氨酸激酶活性;和(iii)从而影响血管发生或血管生成过程。在本文中,术语“PDGF”一般表示生长因子种类的以下成员,它能通过结合并且激活反应性细胞类型上的血小板衍生生长因子细胞表面受体(即,PDGFR)来诱导DNA合成和有丝分裂发生。PDGFs能实现的特殊生物学作用包括,例如:定向细胞迁移(趋化性)和细胞激活;磷脂酶激活;增强了的磷脂酰肌醇周转和前列腺素代谢;刺激反应性细胞的胶原和胶原酶合成;改变细胞代谢活性,包括基质合成,细胞因子产生,和脂蛋白吸收;在缺少PDGF受体的细胞中增殖性反应的间接诱导;和有效的血管收缩活性。术语“PDGF”表示包括“PDGF”多肽及其相应的“PDGF”编码基因或核酸。

[0115] “PDGF-A”表示PDGF的A链多肽及其相应的编码基因或核酸。

[0116] “PDGF-B”表示PDGF的B链多肽及其相应的编码基因或核酸。

[0117] “VEGF”或“血管内皮生长因子”表示能影响血管发生或血管生成过程的哺乳动物血管内皮生长因子。在本文中,术语“VEGF”包括VEGF的各种亚型(又被称作血管通透因子(VPF)和VEGF-A)(参见图2(A)和(B)),它们是通过例如,VEGF-A/VPF基因的可变剪接产生的,包括VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅和VEGF₁₈₉。另外,在本文中,术语“VEGF”表示VEGF-相关的血管生成因子,如PlGF(胎盘生长因子)、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D和VEGF-E,它们通过同源VEGF受体起作用,刺激血管发生或血管生成过程。具体地讲,术语“VEGF”表示生长因子种类的任何成员,它能(i)与诸如VEGFR-1(F1t-1)(参见图4(A)和(B))、VEGFR-2(KDR/F1k-1)(参见图4(C)和(D))或VEGFR-3(FLT-4)的VEGF受体结合;(ii)激活与VEGF受体相关的酪氨酸

酸激酶活性；和 (iii) 从而影响血管发生或血管生成过程。术语“VEGF”意在包括“VEGF”多肽及其相应的“VEGF”编码基因或核酸。

[0118] “PDGF 拮抗剂”表示能够部分或完全减弱，或抑制 PDGF 活性或产生的试剂。PDGF 拮抗剂能够直接或间接减少或抑制特殊的 PDGF，如 PDGF-B。另外，与上述“拮抗剂”的定义一致的“PDGF 拮抗剂”可以包括能够作用于 PDGF 配体或它的同源受体，从而减弱或抑制 PDGF- 相关的受体信号的试剂。因此，所述“PDGF 拮抗剂”的例子包括，例如：靶定 PDGF 核酸的反义、核酶或 RNAi 组合物；抗 -PDGF 适体、抗 -PDGF 抗体或可溶性 PDGF 受体诱饵，其能防止 PDGF 与它的同源受体结合；靶定同源 PDGF 受体 (PDGFR) 核酸的反义、核酶或 RNAi 组合物；抗 -PDGFR 适体或抗 -PDGFR 抗体，其能结合同源 PDGFR 受体；和 PDGFR 酪氨酸激酶抑制剂。

[0119] “VEGF 拮抗剂”表示能部分或完全减弱或抑制 VEGF 活性或产生的试剂。VEGF 拮抗剂能够直接或间接减弱或抑制特殊的 VEGF，如 VEGF₁₆₅。另外，与上述“拮抗剂”定义一致的“VEGF 拮抗剂”可以包括能够作用于 VEGF 配体或它的同源受体，从而减弱或抑制 VEGF- 相关的受体信号的试剂。因此，所述“VEGF 拮抗剂”的例子包括，例如：靶定 VEGF 核酸的反义、核酶或 RNAi 组合物；抗 -VEGF 适体、抗 -VEGF 抗体或可溶性 VEGF 受体诱饵，其能防止 VEGF 与它的同源受体结合；靶定同源 VEGF 受体 (VEGFR) 核酸的反义、核酶或 RNAi 组合物；能结合同源 VEGFR 受体的抗 -VEGFR 适体或抗 -VEGFR 抗体；和 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂。

[0120] “足以抑制新血管疾病的量”表示在本发明组合中用于治疗或预防新形成疾病或它的症状所必需的拮抗剂的有效量。用于实施本发明用来治疗性治疗由新血管疾病导致或造成所述新血管疾病的状况的活性拮抗剂的“有效量”根据施用方式、新血管疾病的解剖学部位、患者的年龄、体重和一般健康状况而改变。最后，医生或兽医决定合适的量和剂量方案。所述量被称作足以抑制新血管疾病的量。

[0121] 通过以下详细说明和权利要求书，可以了解本发明的其他特征和优点。

[0122] 多肽 X 的“变体”表示具有肽 X 的氨基酸序列的多肽，其中，有一个或多个氨基酸残基发生了改变。所述变体可以具有“保守性”改变，其中，取代的氨基酸具有类似的结构或化学特性（例如，用异亮氨酸取代亮氨酸）。更罕见的是，变体可能具有“非保守性”改变（例如，用色氨酸取代甘氨酸）。类似的微小变化还可以包括氨基酸缺失或插入，或这两者。决定哪些氨基酸残基可以被取代、插入或缺失而又不消除生物学或免疫学活性的指南可以使用本领域所熟知的计算机程序发现，例如，LASERGENE 软件 (DNASTAR)。

[0123] 术语“变体”，在用于表示多核苷酸序列时，可以包括与基因或它的编码序列相关的多核苷酸序列。该定义还可以包括，例如，“等位基因的”、“剪接”、“物种”或“多态”变体。剪接变体可以与参考分子具有显著同一性。不过，由于在 mRNA 加工期间外显子的可变剪接，一般具有更多或更小数目的多核苷酸。相应的多肽可以具有额外的功能结构域，或者缺少所述结构域。物种变体是在物种之间不同的多核苷酸序列。一般，所得到的多肽彼此具有显著的氨基酸同一性。多态变体是特定物种的个体之间特定基因的多核苷酸序列的变化。

[0124] 术语“载体”表示能够转运与它连接的其他核酸的核酸分子。一种类型的有用的载体是附加体，即，能够进行染色体外复制的核酸。有用的载体是能够自主复制和 / 或表达与它连接的核酸的载体。能够指导可操作地与它连接的基因的表达的载体在本文中被称作“表达载体”。一般，可用于重组 DNA 技术中的表达载体通常是“质粒”形式的，它一般表示环

状双链 DNA 环,在它们的载体形式中,它们不与染色体结合。在本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换使用,因为质粒是载体的最常使用的形式。不过,本发明意在包括这样的其他形式的表达载体,它们发挥等同的功能,并且它们随后为本领域所公知。

[0125] 组合治疗

[0126] 本发明部分基于 VEGF 和 PDGF 活性的特殊抑制作用,其中使用合适的生长因子拮抗剂作为有效的治疗手段,用于治疗患有新血管疾病的患者。PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂的组合施用,提供了治疗眼新血管疾病的比单独施用任意一种拮抗剂更高的治疗益处。鉴于证明这两种因子在刺激视网膜内皮细胞系统的血管发生方面没有表现出显著的协同作用的研究,抗-VEGF 和抗-PDGF 剂的组合作用是出乎意料的(参见 Castellon 等,(2001)Exp. Eye Res. 74 :523-35)。

[0127] PDGF 和 VEGF 是新血管在身体,特别是在眼中生长的重要刺激物。为了抑制 PDGF 和 VEGF 生物学活性而进行的组合治疗提供了用于治疗或预防新血管疾病的方法。

[0128] 因此,本发明涉及使用组合治疗抑制新血管疾病的方法和组合物。具体地讲,本发明利用在血管细胞中起作用的两种不同的细胞间通讯信号传导途径,即 PDGF 和 VEGF 信号传导,作为新血管疾病,如眼新血管疾病的治疗靶。这种组合方法特别可用于治疗任何数目的以眼新生血管形成的发展为标志的眼科学疾病或病症,包括,但不局限于,视神经盘新生血管形成、虹膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、角膜新生血管形成、玻璃体新生血管形成、绿内障、血管翳、翼状胬肉、黄斑水肿、糖尿病性黄斑水肿、血管原性视网膜病、视网膜变性、黄斑变性、葡萄膜炎、视网膜炎性疾病和增殖性玻璃体视网膜病变。所述组合治疗,由抑制 PDGF(如 PDGF-B)和 VEGF(如 VEGF-A)信号传导的拮抗剂组成,与单独使用这两种治疗相比,产生了增强的治疗功效。尽管在下面讨论的例子,描述了单一 PDGF 拮抗剂和单一 VEGF 拮抗剂的组合,但可以理解的是,多种拮抗剂的组合可能是所需的。

[0129] 根据本发明的抗-PDGF 和抗-VEGF 组合治疗可以单独进行,或者与其他治疗组合进行,并且可以在家庭、医务室、诊所、医院门诊室或医院提供。治疗一般在医院开始,从而医生能够密切观察治疗效果,并且进行任何需要的调整。组合治疗持续时间取决于接受治疗的新血管疾病的类型、患者的年龄和状况、患者疾病的阶段和类型以及患者对治疗的反应。另外,有发展为新血管疾病的较大风险的人(例如,糖尿病患者)可以接受治疗,以抑制或延缓症状的发作。本发明所提供的显著优点是,将 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂的组合用于治疗新血管疾病,使得能够施用低剂量的每一种拮抗剂,和较少的总的活性拮抗剂,因此以较低的毒性和副作用以及低成本提供了相似的功效。

[0130] 所述组合的每一种成分的施用剂量和频率可以独立地控制。例如,一种拮抗剂可以每天施用三次,而第二种拮抗剂可以每天施用一次。组合治疗能够以断断续续的循环形式提供,它包括静止时间段,以便患者身体有机会从任何尚无法预料的副作用中恢复。所述拮抗剂还可以一起制备,以便一次施用能够送递两种拮抗剂。

[0131] PDGF 和 VEGF 拮抗剂靶

[0132] PDGF 最初是从血小板裂解物分离的,并且被确定为存在于血清而不是血浆中的主要生长促进活性。首先显示 PDGF 的促有丝分裂活性作用在结缔组织细胞上,如成纤维细胞和平滑肌细胞,并且存在于培养物中的神经胶质细胞中。业已鉴定了两种同源 PDGF 同工

型, PDGF A 和 B, 它们是由独立的基因 (位于 7 号和 22 号染色体上) 编码的。来自血小板的最主要的种类是 AB 异源二聚体, 尽管所有三种可能的二聚体 (AA、AB 和 BB) 都是天然存在的。在翻译之后, PDGF 二聚体被加工成大约 30kDa 的分泌蛋白。

[0133] 业已鉴定了以高亲和力结合 PDGF 的两种细胞表面蛋白, α 和 β (Heldin 等, (1981)Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78 :3664 ;Williams 等, (1981)Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79 :5867)。这两个种类都包括五个免疫球蛋白 - 样细胞外结构域、一个跨膜结构域和细胞内酪氨酸激酶结构域, 该结构域是由激酶插入结构域隔开的。在过去几年中, 业已阐明了三种 PDGF 同工型对三种受体二聚体 (α/α 、 α/β 和 β/β) 的特异性。 α -受体同源二聚体能以高的亲和力结合所有三种 PDGF 同工型, β -受体同源二聚体只能以高的亲和力结合 PDGF BB, 而结合 PDGF AB 的亲和力低大约 10 倍, 并且 α/β -受体异源二聚体能够以高亲和力结合 PDGF BB 和 PDGF AB (Westermarck & Heldin (1993)Acta Oncologica 32 : 101)。所述特异性模式似乎是由于 A-链只能结合 α -受体, 而 B-链能以高亲和力结合 α 和 β -受体亚基两者的能力造成的。

[0134] 总的来说, 本发明提供了能够抑制一种或多种 PDGF 活性的试剂。这些 PDGF-抑制剂, 或 PDGF 拮抗剂能够作用于一种或多种形式的所述 PDGF 配体。血小板衍生长因子包括 A-链 (PDGF-A) 和 B-链 (PDGF-B) 的同源或异源二聚体, 它们通过结合两种相关的受体酪氨酸激酶, [α]-受体 (PDGFR- $[\alpha]$) 和 [β]-受体 (PDGFR- $[\beta]$) 并且使其二聚化发挥作用。另外, 业已鉴定了所述 PDGFR 复合物的两种新的蛋白酶激活配体, PDGF-C 和 PDGF-D (参见 Li 等, (2000)Nat. Cell. Biol. 2 :302-9 ;Bergsten 等, (2001)Nat. Cell. Biol. 3 :512-6 ;和 Utele 等, (2001)Circulation 103 :2242-47)。由于所述 PDGFRs 的不同的配体结合特异性, 已知 PDGFR- $[\alpha]$ [α] 能结合 PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB 和 PDGF-CC ;PDGFR- $[\beta]$ [β] 能结合 PDGF-BB 和 PDGF-DD ;而 PDGFR- $[\alpha]$ [β] 能结合 PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC 和 PDGF-DD (参见 Betsholtz 等, (2001)BioEssays 23 :494-507)。

[0135] VEGF 是分泌的二硫键连接的同源二聚体, 它能选择性地刺激内皮细胞增殖, 迁移, 并且产生基质降解酶 (Conn 等, (1990)Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87 :1323-1327) ; Ferrara 和 Henzel (1989)Biochem. Biophys. Res. Commun. 161 :851-858) ;Pepper 等, (1991)Biochem. Biophys. Res. Commun. 181 :902-906 ;Unemori 等, (1992)J. Cell. Physiol. 153 : 557-562), 它们都是形成新血管所需要的过程。VEGF 以四种形式 (VEGF-121、VEGF-165、VEGF-189、VEGF-206) 存在, 这是由于 VEGF 基因的可变剪接产生的 (Houck 等, (1991)Mol. Endocrinol. 5 :1806-1814 ;Tischer 等, (1991)J. Biol. Chem. 266 :11947-11954)。两种较小的形式是可扩散的, 而较大的两种形式保持主要位于细胞膜上, 这是它们对肝素高亲和力的结果。VEGF-165 还能与肝素结合, 并且是最丰富的形式。VEGF-121, 即不能与肝素结合的唯一形式, 似乎对 VEGF 受体具有较低的亲和力 (Gitay-Goren 等, (1996)J. Biol. Chem. 271 :5519-5523) 以及较低的促有丝分裂效力 (Keyt 等, (1996)J. Biol. Chem. 271 : 7788-7795)。VEGF 的生物学作用是由两种酪氨酸激酶受体 (Flt-1 和 Flk-1/KDR) 介导的, 它们的表达在很大程度上局限于内皮来源的细胞 (de Vries 等, (1992)Science 255 :989-991 ;Millauer 等, (1993)Cell 72 :835-846 ;Terman 等, (1991)Oncogene 6 : 519-524)。尽管两种功能性受体的表达都是高亲和力结合所必需的, 但内皮细胞内的趋化性和促有丝分裂信号传导似乎主要是通过 KDR 受体进行的 (Park 等, (1994)J. Biol.

Chem. 269 :25646-25654 ;Seetharam 等, (1995)Oncogene 10 :135-147 ;Waltenberger 等, (1994)J. Biol. Chem. 269:88-26995)。最近业已在缺少 VEGF 基因的单个等位基因 (Carmeliet 等, (1996)Nature 380 :435-439 ;Ferrara 等, (1996)Nature 380 :439-442) 或 Flt-1 的两个等位基因 (Fong 等, (1995)Nature 376 :66-70) 或 Flk-1 基因 (Shalaby 等, (1995)Nature 376 :62-66) 的小鼠体内证实了 VEGF 和 VEGF 受体对血管发育的重要性。在每一种场合下, 都发现血管形成的明显的异常导致了胚胎致死。

[0136] 现在已知由组织缺氧诱导的补偿性血管生成是通过 VEGF 介导的 (Levy 等, (1996) J. Biol. Chem. 274:6-2753) ;Shweiki 等, (1992)Nature 359 :843-845)。在人类中所做的研究业已表明, 在血管生成性视网膜疾病的玻璃体中存在高浓度的 VEGF, 但是在无活性的或非-新生血管形成疾病状态中不存在所述高浓度的 VEGF。在实验黄斑下手术之后切断的人类脉络膜组织同样表现出高的 VEGF 水平。

[0137] 除了是唯一的已知内皮细胞特异性有丝分裂原之外, VEGF 是血管生成生长因子中独特的, 表现在它在诱导血管对大分子的通透性瞬时增加的能力方面 (因此, 它的最初的和替代的名称是血管通透因子, VPF) (参见 Dvorak 等, (1979)J. Immunol. 122 :166-174 ;Senger 等, (1983)Science 219 :983-985 ;Senger 等, (1986)Cancer Res. 46 :5629-5632)。增加了的血管通透性和所导致的血浆蛋白在血管外间隙的沉积, 有助于通过提供内皮细胞迁移的临时基质形成新血管 (Dvorak 等, (1995)Am. J. Pathol. 146 :1029-1039)。通透性过高确实是新血管的特有特征, 包括与肿瘤相关的血管。

[0138] PDGF 和 VEGF 拮抗剂

[0139] 概要

[0140] 本发明提供了一起用于新血管疾病的组合治疗的 PDGF 和 VEGF 的拮抗剂 (即, 抑制剂)。特异性 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂为本领域所公知, 并且简单地描述于以下部分。现在或者已经是技术人员能够得到的其他 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂包括抗体、适体、反义寡聚体、核酶和 RNAi 组合物, 它们能够通过本领域的常规实践结合本说明书的教导和指导鉴定和生产, 包括在下面进一步提供的部分。

[0141] PDGF 拮抗剂

[0142] 一般, PDGF (例如, PDGF-B) 的抑制可以通过多种方式实现。例如, 可以获得能抑制 PDGF 的活性或产生的多种 PDGF 拮抗剂, 并且可将其用于本发明的方法。示例性的 PDGF 拮抗剂包括 PDGF 的核酸配体或适体, 如在下文中所描述的。另外, 所述 PDGF 拮抗剂可以是, 例如, 抗-PDGF 抗体或抗体片段。因此, 通过抑制它与受体的结合可以使所述 PDGF 分子失活。另外, 能在核酸水平上抑制 PDGF 表达的诸如反义 RNA、核酶和 RNAi 分子的核酸分子可用作本发明的拮抗剂。其他 PDGF 拮抗剂包括肽、蛋白、环肽或小有机化合物。另外, 通过破坏它的下游信号传导, 能够抑制 PDGF 的信号传导活性, 例如, 通过使用多种小分子酪氨酸激酶抑制性拮抗剂, 包括下面所描述的拮抗剂。化合物或试剂起着 PDGF 拮抗剂作用的能力可以按照本领域已知的方法确定, 且另外, 可以参见以下文献, 例如, Dai 等, (2001)Genes & Dev. 15 :1913-25 ;Zippel, 等, (1989)Eur. J. Cell Biol. 50(2) :428-34 ;和 Zwiller, 等, (1991)Oncogene 6 :219-21。

[0143] 本发明还包括本领域所公知的 PDGF 拮抗剂, 以及下文所支持的, 以及属于普通技术人员知识范围内的任何和所有等同试剂。例如, 抗 PDGF 的抑制性抗体为本领域所公

知,例如,描述于美国专利号 5,976,534、5,833,986、5,817,310、5,882,644、5,662,904、5,620,687、5,468,468 和 PCT WO 2003/025019 中的那些,所述文献内容被以全文形式收作本文参考。另外,本发明包括 N- 苯基 -2- 咪啉 - 胺衍生物,它是 PDGF 拮抗剂,例如公开于美国专利号 5,521,184 和 WO2003/013541、WO 2003/078404、WO 2003/099771、WO 2003/015282 和 WO 2004/05282 中的那些,所述文献被以全文形式收作本文参考。

[0144] 能阻断 PDGF 作用的小分子为本领域所公知,例如,描述于美国专利号 6,528,526 (PDGFR 酪氨酸激酶抑制剂)、6,524,347 (PDGFR 酪氨酸激酶抑制剂)、6,482,834 (PDGFR 酪氨酸激酶抑制剂)、6,472,391 (PDGFR 酪氨酸激酶抑制剂)、6,696,434、6,331,555、6,251,905、6,245,760、6,207,667、5,990,141、5,700,822、5,618,837 和 5,731,326 中的那些,所述文献内容被以全文形式收作本文参考。

[0145] 能阻断 PDGF 作用的蛋白和多肽为本领域所公知,例如,描述于美国专利号 6,350,731 (PDGF 肽类似物)、5,952,304 中的那些,所述文献内容被以全文形式收作本文参考。

[0146] 能抑制 EGF 和 / 或 PDGF 受体酪氨酸激酶的双单 - 和双环芳基和杂芳基化合物为本领域所公知,例如,描述于例如美国专利号 5,476,851、5,480,883、5,656,643、5,795,889 和 6,057,320 中的那些,所述文献内容被以全文形式收作本文参考。

[0147] 用于抑制 PDGF 的反义寡核苷酸为本领域所公知,例如,描述于美国专利号 5,869,462 和 5,821,234 中的那些,每一份文献的内容都以全文形式收作本文参考。

[0148] 用于抑制 PDGF 的适体 (又被称作核酸配体) 为本领域所公知,例如,描述于例如美国专利号 6,582,918、6,229,002、6,207,816、5,668,264、5,674,685 和 5,723,594 中的那些,每一份文献的内容都以全文形式收作本文参考。

[0149] 本领域所公知的用于抑制 PDGF 的其他化合物包括,描述于美国专利号 5,238,950、5,418,135、5,674,892、5,693,610、5,700,822、5,700,823、5,728,726、5,795,910、5,817,310、5,872,218、5,932,580、5,932,602、5,958,959、5,990,141、6,358,954、6,537,988 和 6,673,798 中的那些,每一份文献的内容都以全文形式收作本文参考。

[0150] VEGF 拮抗剂

[0151] VEGF (例如, VEGF-A) 的抑制是通过多种方式实现的。例如,能抑制 VEGF 活性或产生的多种 VEGF 拮抗剂,包括核酸分子,如适体、反义 RNA、核酶、RNAi 分子和 VEGF 抗体可以获得,并且能够用于本发明的方法中。示例性的 VEGF 拮抗剂包括 VEGF 的核酸配体或适体,正如下文所描述的。对 VEGF-A 的特别有用的拮抗剂是 EYE001 (以前称为 NX1838),它是修饰过的、PEG 化的适体,它能以高的和特异性亲和力结合主要的可溶性人 VEGF 同工型 (参见,美国专利号 6,011,020 ;6,051,698 ;和 6,147,204)。所述适体能够以与针对 VEGF 的高亲和力抗体类似的方式结合并且使 VEGF 失活。另一种有用的 VEGF 适体是 EYE001,它是非 -PEG 化的形式的。另外,所述 VEGF 拮抗剂可以是,例如,抗 -VEGF 抗体或抗体片段。因此,通过抑制它与受体结合使 VEGF 分子失活。另外,能在核酸水平上抑制 VEGF 表达或 RNA 稳定性的诸如反义 RNA、核酶和 RNAi 分子的核酸分子可用作本发明的方法和组合物中的拮抗剂。其他 VEGF 拮抗剂包括肽、蛋白、环肽和小有机化合物。例如,能结合 VEGF 受体而又无伴随的信号传导活性的可溶性截短形式的 VEGF 也可用作拮抗剂。另外,VEGF 的信号传

导活性可以通过破坏它的下游信号传导抑制,例如,通过使用多种拮抗剂,包括 VEGF 受体酪氨酸激酶活性的小分子抑制剂,正如下文所进一步描述的。

[0152] 化合物或试剂起着 VEGF 拮抗剂作用的能力,可以按照本领域所熟知的多种标准方法确定。例如,VEGF 的生物学活性之一是通过与血管内皮细胞上的受体结合来增强血管通透性。所述相互作用导致了紧密的内皮连接的松弛,其后果是造成血管流体的泄漏。通过 VEGF 诱导的血管泄漏可以在体内测量,其通过跟踪由于皮内注射 VEGF 导致的伊文思蓝染料从豚鼠脉管系统的泄漏来进行 (Dvorak 等, in *Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor, Microvascular Hyperpermeability, and Angiogenesis*, 和 (1995) *Am. J. Pathol.* 146 :1029)。类似地,可以将所述测定方法用于测量拮抗剂阻断 VEGF 的这种生物学活性的能力。

[0153] 在血管通透性测定的有用的例子中,VEGF₁₆₅ (20–30nM) 与 EYE001 (30nM–1 μ M) 或候选 VEGF 拮抗剂离体 (*ex vivo*) 预混合,并且随后通过皮内注射施用到豚鼠背部的剔毛的皮肤中。在注射之后 30 分钟,按照标准方法对注射部位周围的伊文思蓝染料泄漏进行定量,其通过使用计算机化的形态度量分析系统实现。能抑制 VEGF- 诱导的指示染料从脉管系统中泄漏的化合物被认为是本发明的方法和组合物的有用拮抗剂。

[0154] 用于确定化合物是否是 VEGF 拮抗剂的另一种测定方法是所谓的角膜血管发生测定。在该测定方法中,将含有 VEGF₁₆₅ (3pmol) 的 methacrylate 聚合物沉淀植入大鼠的角膜基质中,以诱导血管生长进入正常的无血管角膜。然后将候选 VEGF 拮抗剂通过静脉内途径施用于大鼠体内,剂量为 1mg/kg、3mg/kg 和 10mg/kg,每天一次或两次,施用 5 天时间。在治疗时间段结束时,对所有个体的角膜进行显微照相。新血管在角膜组织中发育的程度,以及候选化合物对它们的抑制作用,随后通过显微照片的标准化形态度量分析进行定量。与用磷酸缓冲盐水 (PBS) 处理相比,能抑制角膜中 VEGF- 依赖型血管发生的化合物被认为是本发明的方法和组合物的有用的拮抗剂。

[0155] 还使用早熟性视网膜病的小鼠模型鉴定了候选 VEGF 拮抗剂。在一个有用的例子中,分别将 9、8、8、7 和 7 只小鼠同窝崽放置在室内空气中或者增加含氧量,并且通过腹膜内用磷酸缓冲盐水 (PBS) 或候选 VEGF 拮抗剂进行处理 (例如,以 1mg/kg、3mg/kg 或 10mg/kg/天进行处理)。然后通过来自所有处理过的和对照小鼠的每只眼的 20 个组织学切片中进行显微镜鉴定和新血管芽计数来估计测定终点,即新毛细血管通过角膜的内界膜长出到玻璃体液中。相对未处理过的对照而言处理过的小鼠的视网膜新脉管系统的减少被确定为鉴定有用的 VEGF 拮抗剂。

[0156] 在另一种示例性的筛选测定方法中,使用体内人类肿瘤异种移植测定鉴定候选 VEGF 拮抗剂。在这种筛选测定中,在植入裸鼠中的人类肿瘤异种移植体 (A673 横纹肌肉瘤和 Wilms 肿瘤) 中检测候选 VEGF 拮抗剂的体内功效。然后用候选 VEGF 拮抗剂处理小鼠 (例如,10mg/kg,每天腹膜内施用一次,然后发展为确定的肿瘤 (200mg))。用对照试剂处理对照组。被确定为相对对照而言能抑制 A673 横纹肌肉瘤生长和 Wilms 肿瘤的候选化合物被认为是本发明的方法和组合物的有用的拮抗剂。

[0157] 测定 VEGF 拮抗剂活性的其他方法为本领域所公知,并且在下文进一步描述。

[0158] 本发明还包括本领域所公知的 VEGF 拮抗剂,以及下面所支持的那些,和普通技术人员知识范围内的任何和所有等同试剂。例如,针对 VEGF 的抑制抗体为本领域所公

知,例如,描述于美国专利号 6,524,583、6,451,764(VRP 抗体)、6,448,077、6,416,758、6,403,088(针对 VEGF-C)、6,383,484(针对 VEGF-D)、6,342,221(抗-VEGF 抗体)、6,342,219、6,331,301(VEGF-B 抗体)和 5,730,977,和 PCT 公开号 WO 96/30046、WO 97/44453 和 WO 98/45331 中的那些,所述文献内容被以全文形式收作本文参考。

[0159] VEGF 受体的抗体同样为本领域所公知,例如,描述于例如美国专利号 5,840,301、5,874,542、5,955,311、6,365,157 和 PCT 公开号 WO 04/003211 中的那些,所述文献内容被以全文形式收作本文参考。

[0160] 通过例如抑制 VEGFR- 相关的酪氨酸激酶活性阻断 VEGF 的作用的小分子为本领域所公知,例如,描述于美国专利号 6,514,971、6,448,277、6,414,148、6,362,336、6,291,455、6,284,751、6,177,401、6071,921 和 6001,885(VEGF 表达的类视黄醇抑制剂)中的那些,每一份文献的内容都以全文形式收作本文参考。

[0161] 能阻断 VEGF 的作用的蛋白和多肽为本领域所公知,例如,描述于美国专利号 6,576,608、6,559,126、6,541,008、6,515,105、6,383,486(VEGF 引诱受体)、6,375,929(VEGF 引诱受体)、6,361,946(VEGF 肽类似物抑制剂)、6,348,333(VEGF 引诱受体)、6,559,126(能结合 VEGF 并且阻断与 VEGFR 结合的多肽)、6,100,071(VEGF 引诱受体)和 5,952,199 中的那些,每一份文献的内容都以全文形式收作本文参考。

[0162] 能够介导对 VEGF 和 / 或 VEGFR 基因表达和 / 或活性的 RNA 干扰 (RNAi) 的短的干扰核酸 (siNA)、短的干扰 RNA (siRNA)、双链 RNA (dsRNA)、微型 RNA (miRNA) 和短的发夹 RNA (shRNA) 为本领域所公知,例如,描述于 PCT 公开号 WO 03/070910 中的那些,所述文献的内容以全文形式收作本文参考。

[0163] 用于抑制 VEGF 的反义寡核苷酸为本领域所公知,例如,描述于,例如,美国专利号 5,611,135、5,814,620、6,399,586、6,410,322 和 6,291,667 中的那些,每一份文献的内容都以全文形式收作本文参考。

[0164] 用于抑制 VEGF 的适体(又被称作核酸配体)为本领域所公知,例如,描述于,例如,美国专利号 6,762,290、6,426,335、6,168,778、6,051,698 和 5,859,228 中的那些,每一份文献的内容都以全文形式收作本文参考。

[0165] 抗体拮抗剂

[0166] 本发明包括针对 PDGF 和 VEGF 以及它们的同源受体 PDGFR 和 VEGFR 的拮抗剂抗体。本发明的抗体拮抗剂能够阻断配体与它的同源受体结合。因此,本发明的 PDGF 拮抗剂抗体包括针对 PDGF 以及 PDGFR 靶的抗体。

[0167] 本发明的拮抗剂抗体包括单克隆抑制抗体。单克隆抗体,或其片段,包括所有免疫球蛋白类型,如 IgM、IgG、IgD、IgE、IgA 或其亚型,如 IgG 亚型或其混合物。IgG 及其亚型是有用的,如 IgG₁、IgG₂、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃ 或 IgG_M。所述 IgG 亚型 IgG_{1/kappa} 和 IgG_{2b/kappa} 被作为有用的实施方案。可以提到的片段都是截短的或修饰过的抗体片段,具有一个或两个抗原互补结合部位,它表现出针对哺乳动物 PDGF 或 VEGF(或它们的同源受体)的高的结合和中和活性,如部分抗体具有相当于所述抗体的结合部位,并且是由轻链和重链形成的,如 Fv、Fab 或 F(ab')₂ 片段,或单链片段。截短的双链片段,如 Fv、Fab 或 F(ab')₂ 是特别有用的。例如,所述片段可以通过酶促方法通过用诸如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶的酶消除所述抗体的 Fc 部分,通过化学氧化或通过对抗体基因进行遗传学操作获得。同样可能并且有利的

是使用遗传学操作的、非截短的片段。所述抗 -PDGF 或 VEGF 抗体或其片段可以单独使用或以混合物使用。

[0168] 所述新型抗体、抗体片段、它们的混合物或衍生物对 PDGF 或 VEGF (或它们的同源受体) 的结合亲和力有利地在 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ - $1 \times 10^{-12} \text{M}$, 或 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ - $1 \times 10^{-11} \text{M}$, 或 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ - $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 范围内。

[0169] 例如, 用于遗传操作的抗体基因可以以本领域技术人员公知的方式从杂交瘤细胞中分离, 为此, 培养抗体生产性细胞, 并且当细胞的光密度足够时, 用已知方式从所述细胞中分离 mRNA, 其通过用硫氰酸胍裂解细胞, 用乙酸钠酸化, 用苯酚、氯仿 / 异戊醇提取, 用异丙醇沉淀, 并且用乙醇洗涤来实现。然后用 mRNA 通过使用逆转录酶合成 cDNA。合成的 cDNA 可以直接或者在遗传操作之后插入合适的动物、真菌、细菌或病毒载体中, 并且在合适的宿主生物中表达, 所述遗传操作例如, 定点诱变, 导入插入、倒位、缺失或碱基交换。有用的细菌或酵母载体是 pBR322、pUC18/19、pACYC184、 λ 或酵母 μ 载体, 用于克隆所述基因, 并且在诸如大肠杆菌 (*E. coli*) 的细菌或诸如啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的酵母中表达。

[0170] 本发明还涉及能合成 PDGF 或 VEGF 抗体的细胞。所述细胞包括按上述方法转化过的动物、真菌、细菌细胞或酵母细胞。它们有利地是杂交瘤细胞或三体瘤 (trioma) 细胞, 通常是杂交瘤细胞。例如, 所述杂交瘤细胞可以通过已知方式从用 PDGF 或 VEGF (或它们的同源受体) 免疫的动物生产, 并且分离它们的产生抗体的 B 细胞, 筛选这些细胞的 PDGF 或 VEGF- 结合抗体, 并且随后使这些细胞与, 例如, 人或动物, 例如, 小鼠骨髓瘤细胞、人类淋巴瘤细胞或异种杂交瘤细胞融合 (参见, 例如, Koehler 等, (1975) *Nature* 256 :496), 或通过用合适的病毒感染所述细胞, 以便产生无限增殖化细胞系。通过融合产生的杂交瘤细胞系是有用的, 并且小鼠杂交瘤细胞系是特别有用的。本发明的杂交瘤细胞系能分泌 IgG 类型的有用抗体。本发明的 mAb 抗体能够以高亲和力结合, 并且减弱或中和 PDGF 或 VEGF 的生物学 (例如, 血管生成) 活性。

[0171] 本发明还包括所述抗 -PDGF 或 VEGF 抗体的衍生物, 它们保留了它们的 PDGF 或 VEGF- 抑制活性, 同时改变了与将它们用作药物试剂相关的一种或多种其他特性, 例如, 血清稳定性或生产的效力。所述抗 -PDGF 或 VEGF 抗体衍生物的例子包括肽, 由抗体的抗原结合区衍生的肽模拟物 (peptidomimetics), 和与固体或液体载体结合的抗体、抗体片段或肽, 所述载体如聚乙二醇, 玻璃, 合成聚合物, 如聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯或天然聚合物, 如纤维素、Sepharose 或琼脂糖, 或与酶、毒素或放射性或非放射性标记, 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 的缀合物或与荧光 / 化学发光标记共价结合的抗体、片段或肽, 所述标记如若丹明、荧光素、异硫氰酸盐、藻红蛋白、藻蓝蛋白、荧光胺、金属螯合物、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或生物素。

[0172] 所述新型抗体、抗体片段、其混合物及衍生物可以直接地, 在干燥之后, 例如冷冻干燥之后, 在与上述载体附着之后或在与其他药用活性和辅助物质配制之后用于生产药用制剂。可以提及的活性和辅助物质的例子是其他抗体, 具有杀微生物或抑微生物作用的抗微生物活性物质, 一般如抗生素或磺胺、抗肿瘤剂、水、缓冲剂、盐水、醇、脂肪、蜡、惰性媒介物或其他常规用于肠胃外产品的其他物质, 如氨基酸、增稠剂或糖。所述药用制剂可用于控制疾病, 并且可用于控制眼新血管疾病和包括 AMD 和糖尿病性视网膜病的疾病。

[0173] 所述新型抗体、抗体片段、其混合物或衍生物可以直接或者在与上述固体或液体载体、酶、毒素、放射性或非放射性标记或与荧光 / 化学发光标记结合之后用于治疗或诊断。

[0174] 本发明的人 PDGF 或 VEGF 单克隆抗体可以通过本领域已知的任何方法获得。例如,用人 PDGF 或 VEGF (或它们的同源受体)对哺乳动物进行免疫。纯化的人 PDGF 和 VEGF 可以通过商业渠道获得(例如,从 Cell Sciences, Norwood, MA, 以及其他供应商那里购买)。另外,人 PDGF 或 VEGF (或它们的同源受体)可以用人胎盘组织方便地纯化。用于产生抗 - 人 PDGF 或 VEGF 抗体的哺乳动物不受限制,并且可以是灵长类、啮齿类(如小鼠、大鼠或兔子)、牛、绵羊、山羊或狗。

[0175] 然后,将产生抗体的细胞,如脾细胞从免疫的动物体内取出,并且与骨髓瘤细胞融合。所述骨髓瘤细胞为本领域所熟知(例如,可以使用 p3x63-Ag8-653、NS-0、NS-1 或 P3U1 细胞)。细胞融合操作可以通过本领域所公知的任何常规方法完成。

[0176] 在进行了细胞融合操作之后的细胞随后在 HAT 选择培养基中培养,以选择杂交瘤。然后筛选能产生抗人单克隆抗体的杂交瘤。例如,这种筛选可以通过夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)或类似方法进行,其中,让产生的单克隆抗体与固定了人 PDGF 或 VEGF (或它们的同源受体)的孔结合。在这种场合下,可以采用对免疫过的动物的免疫球蛋白特异的抗体作为第二抗体,所述抗体是用酶,如过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡糖氧化酶、 β -D-半乳糖苷酶等标记过的。可以通过让所述标记酶与它的底物起反应并且测量所产生的颜色来检测所述标记。作为底物,可以生产 3,3'-二氨基联苯胺、2,2'-二氨基双邻联茴香胺、4-氯萘酚,4-氨基安替比林、邻苯二胺等。

[0177] 通过上述操作,可以筛选能产生抗 - 人 PDGF 或 VEGF 抗体的杂交瘤。然后通过常规有限稀释方法或软琼脂方法克隆所选择的杂交瘤。如果需要的话,可以使用含血清的或不含血清的培养基大规模培养所述克隆的杂交瘤,或者可以接种到小鼠腹腔内,并且从腹水中回收,从而可以获得大量的克隆的杂交瘤。

[0178] 然后从所述选择的抗 - 人 PDGF 或 VEGF 单克隆抗体中选择具有防止相应的配体 / 受体对的结合和激活(例如,在基于细胞的 PDGF 或 VEGF 测定系统中(参见上文))的能力的单克隆抗体用于进一步分析和操作。如果所述抗体阻断受体 / 配体结合和 / 或激活的话,这意味着实验的单克隆抗体具有减弱或中和人 PDGF 或 VEGF 的 PDGF 或 VEGF 活性的能力。就是说,所述单克隆抗体能特异性地识别和 / 或干扰人 PDGF 或 VEGF (或它们的同源受体)的关键结合部位。

[0179] 本发明的单克隆抗体还包括通过如下方法产生的杂交和重组抗体:剪接抗 - PDGF 或 VEGF 抗体的可变(包括高变)结构域与恒定结构域(例如,“人源化的”抗体),或轻链与重链,或来自一种物种的链与来自另一种物种的链,或融合体与异源蛋白,而不管来源物种或免疫球蛋白类型或亚型的名称,以及抗体片段[例如, Fab、F(ab)₂ 和 Fv],只要它们具有希望的生物学活性就行。[参见例如,美国专利号 4,816,567 和 Mage&Lamoyi, in Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, PP. 79-97 (Marcel Dekker, Inc.), New York (1987)]。

[0180] 因此,术语“单克隆的”表示所获得的抗体的性质是来自抗体的基本上均匀的群体,并且不被理解成必须通过任何特定方法生产抗体。例如,要用于本发明中的单克隆抗

体可以通过最初由 Kohler & Milstein, Nature 256 :495 (1975) 描述的杂交瘤方法制备, 或者可以通过重组 DNA 方法 (美国专利号 4,816,567) 制备。”单克隆抗体“还可以从利用在以下文献中描述的技术制备的噬菌体文库中分离:例如, McCafferty 等, Nature 348 :552-554 (1990)。

[0181] 非人 (例如, 鼠类) 抗体的“人源化的”形式是特殊的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段 (如 Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂ 或抗体的其他抗原结合亚序列), 它包括来自非人免疫球蛋白的最小序列。人源化抗体的大部分是人免疫球蛋白 (受体抗体), 其中, 来自受体抗体的互补决定区 (CDRs) 的残基被来自非人物种 (供体抗体) 如小鼠、大鼠或兔子的 CDRs 的残基所取代, 它具有所需要的特异性、亲和力和能力。在某些场合下, 人免疫球蛋白的 Fv 构架区 (FR) 残基被相应的非人 FR 残基所取代。另外, 人源化抗体可以包括既不存在于受体抗体中, 又不存在于输入的 CDR 或 FR 序列中的残基。进行上述修饰是为了进一步改进并且最优化抗体的特性。一般, 人源化抗体基本上包括至少一种, 通常两种可变结构域的全部, 其中, CDR 区的全部或基本上全部都相当于非人免疫球蛋白的 CDR 区, 而 FR 残基的全部或基本上全部都相当于人免疫球蛋白共有序列的 FR 残基。所述人源化抗体最优地还包括免疫球蛋白的恒定区 (Fc) 的至少一部分, 通常是人免疫球蛋白的恒定区。

[0182] 人源化非人抗体的方法为本领域所熟知。一般, 将来自非人来源的一个或多个氨基酸残基导入人源化抗体。所述非人氨基酸残基通常被称作“输入”残基, 它通常来自“输入”可变结构域。人源化基本上可以按照 Winter 及其同事的方法进行 (Jones 等, (1986) Nature 321 :522-525 ; Riechmann 等, (1988) Nature 332 :323-327 ; 和 Verhoeven 等, (1988) Science 239 :1534-1536), 其中用啮齿类 CDRs 或 CDR 序列取代人类抗体的相应序列。因此, 所述“人源化的”抗体是嵌合抗体, 其中, 业已用来自非人物种的相应序列取代了明显小于完整的人类可变结构域的序列。实践中, 人源化抗体通常是人类抗体, 其中, 某些 CDR 残基, 及可能的某些 FR 残基被来自啮齿类抗体的类似位点的残基所取代。

[0183] 选择轻链和重链人可变结构域用于制备人源化抗体对于减弱抗原性来说是非常重要的。按照所谓的“最佳配合”方法, 用啮齿类抗体的可变结构域序列对已知人类可变 - 结构域序列的整个文库进行筛选。然后与啮齿类序列最接近的人类序列被用作人源化抗体的人构架 (FR) (Sims 等, (1993) J. Immunol., 151 :2296 ; 和 Chothia 和 Lesk (1987) J. Mol. Biol., 196 :901)。另一种方法使用来自轻链或重链的特定亚型的所有人类抗体共有序列的特定构架。相同的构架可用于几种不同的人源化抗体 (Carter 等, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 89 :4285 ; 和 Presta 等, (1993) J. Immunol., 151 :2623)。

[0184] 另外, 重要的是将抗体人源化, 其中保留对抗原的高亲和力, 以及其他有利的生物学特性。为了实现这一目的, 根据一种有用的方法, 通过利用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念的人源化的产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是可以普遍获得的, 并且为本领域技术人员所熟悉。可以获得用于说明和展示选定的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序。检查所述展示允许分析有关残基在候选免疫球蛋白序列发挥功能中的作用, 即, 分析能影响候选免疫球蛋白与它的抗原结合的能力的残基。这样, 可以从共有序列和输入序列中选择并且组合 FR 残基, 从而获得需要的抗体特性, 如增强了的对靶抗原的亲和力。一般, CDR 残基直接并且最主要地参与影响抗原结合。

[0185] 本发明还包括针对 PDGF 或 VEGF 的人类单克隆抗体。所述抗体可以通过杂交瘤方法制备。业已描述了用于生产人单克隆抗体的人类骨髓瘤和小鼠-人异种骨髓瘤细胞系,例如,参见 Kozbor (1984) *J. Immunol.*, 133, 3001; Brodeur, 等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, PP. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 和 Boerner 等, (1991) *J. Immunol.*, 147 :86-95。

[0186] 现在可能生产转基因动物(例如,小鼠),它在免疫后能够在不存在内源免疫球蛋白产生的前提下产生所有的人类抗体谱。例如,业已发现,在嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合缺失,导致了内源抗体产生的完全抑制。将人类种系免疫球蛋白基因阵列转移到种系突变型小鼠体内,会导致在受到抗原攻击后产生人类抗体(参见,例如, Jakobovits 等, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 90 :2551; Jakobovits 等, (1993) *Nature*, 362 :255-258; 和 Bruggermann 等, (1993) *Year in Immuno.*, 7 :33)。

[0187] 另外,可以将噬菌体展示技术 (McCafferty 等, (1990) *Nature*, 348 :552-553) 用于由来自未免疫过的供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因谱体外生产人类抗体和抗体片段(有关综述可以参见例如, Johnson 等, (1993) *Current Opinion in Structural Biology*. 3 :564-571)。V-基因片段的若干来源可用于噬菌体展示。例如, Clackson 等 ((1991) *Nature*, 352 :624-628) 从来自免疫过的小鼠脾脏的 V 基因的小型随机组合文库中分离了多样性的抗-噁唑酮抗体阵列。可以构建来自未免疫过的人类供体的 V 基因谱,并且可以基本上按下文所描述的技术分离针对多样性抗原阵列(包括自身抗原)的抗体: Marks 等, ((1991) *J. Mol. Biol.*, 222 :581-597, 或 Griffith 等, (1993) *EMBO J.*, 12 :725-734)。

[0188] 在天然免疫反应中,抗体基因以高比例积累突变(体细胞高变)。所导入的某些变化可能产生较高的亲和力,并且,表现出高亲和力表面免疫球蛋白的 B 细胞优选在随后的抗原攻击中复制并分化。通过采用被称作“链改组”的技术可以模拟这种自然过程(参见 Marks 等, (1992) *Bio. Technol.*, 10 :779-783)。在该方法中,通过噬菌体展示获得的“第一”人类抗体的亲和力能够通过用从未免疫过的供体内获得的 V 结构域基因的天然存在的变体谱(所有组成成分)依次取代重链和轻链 V 区基因进行改良。这种技术能够产生亲和力在 nM 范围内的抗体和抗体片段。Waterhouse 等业已描述了用于制备非常大的噬菌体抗体谱的策略 ((1993) *Nucl. Acids Res.*, 21 :2265-2266)。

[0189] 还可将基因改组用于从啮齿类抗体生产人类抗体,其中,所述人类抗体对起始啮齿类抗体具有类似亲和力和特异性。根据该方法,它又被称作“表位印记”,通过噬菌体展示技术获得的啮齿类抗体的重链或轻链 V 结构域基因被人类 V 结构域基因谱所取代,从而产生了啮齿类-人类嵌合体。选择抗原,导致了能够恢复功能性抗原结合部位的人类可变结构域的分离,即表位控制(印记)配偶体的选择。在重复所述过程,以便取代其余的啮齿类 V 结构域时,获得了人类抗体(参见 PCT WO 93/06213, 1993 年 4 月 1 日公开)。与通过 CDR 嫁接进行啮齿类抗体的传统人源化不同,这种技术提供了完整的人类抗体,它不具备来自啮齿类的构架或 CDR 残基。

[0190] 适体拮抗剂

[0191] 本发明提供了针对 PDGF 和 / 或 VEGF (或它们的同源受体)的适体拮抗剂。适体,又被称作核酸配体,是非天然存在的核酸,它能够结合,并且一般拮抗(即,抑制)预先选择的靶。

[0192] 适体可以通过生产寡聚体或寡核苷酸的任何已知方法制备。很多合成方法为本领域所公知。例如,包括残余的嘌呤核糖核苷酸,并且具有合适的3′-末端,如颠倒的胸苷残基(Ortigao等, *Antisense Research and Development*, 2:129-146(1992))或位于3′-末端的两个硫代磷酸酯键以防止最终被3′-外切核酸酶降解的2′-O-烯丙基修饰过的寡聚体,可以通过固相β-氰乙基亚磷酰胺化学方法(Sinha等, *Nucleic Acids Res.*, 12:4539-4557(1984))在任何可以通过商业渠道获得的DNA/RNA合成仪上合成。一种方法是核糖核苷酸的2′-O-叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)保护策略(Usman等, *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845-7854(1987)),并且所有需要的3′-O-亚磷酰胺是通过商业渠道获得的。另外,氨基甲基聚苯乙烯可以用作支持材料,这是因为它的有利特性(McCollum和Andrus(1991) *Tetrahedron Lett.*, 32:4069-4072)。可以在合成期间通过使用由商业渠道获得的荧光素亚磷酰胺,将荧光素添加到底物RNA的5′-末端。一般,可以通过标准的RNA循环合成适体寡聚体。在组装结束时,通过在密封的小瓶中在55℃下用浓氨水-乙醇(3:1v/v)处理8小时除去所有碱不稳定的保护基团。乙醇能抑制2′-O-TBDMS基团的过早除掉,该基团的过早除掉会在去保护的碱性条件下,在所得到的核糖核苷酸位置上导致明显的链裂解(Usman等, (1987) *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845-7854)。在冷冻干燥之后,用三乙胺三氢氟化物/三乙胺/N-甲基吡咯烷酮的混合物在60℃下处理TBDMS保护的寡聚体2小时,以在中性条件下快速并且有效地除掉甲硅烷基保护基团(参见Wincott等, (1995) *Nucleic Acids Res.*, 23:2677-2684)。然后可以用丁醇沉淀完全去保护的寡聚体,其中按照Cathala和Brunel的方法进行((1990) *Nucleic Acids Res.*, 18:201)。纯化可以通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳或通过离子交换HPLC(Sproat等, (1995) *Nucleosides and Nucleotides*, 14:255-273)和反相HPLC的组合进行。为了在细胞中使用,通过在丙酮中用高氯酸钠沉淀将合成的寡聚体转化成它们的钠盐。然后使用小型的一次性的凝胶过滤柱除掉痕量的残余盐,所述柱可以通过商业渠道获得。作为最后的步骤,可以通过基质辅助的激光解吸质谱分析法(Pieles等, (1993) *Nucleic Acids Res.*, 21:3191-3196)以及通过核苷碱基组成分析检查所分离的寡聚体的真实性。

[0193] 当所述核苷酸亚单位可用于酶促操作时,所公开的适体可以通过酶促方法生产。例如,可以通过体外RNA聚合酶T7反应制备RNA分子。所述分子还可以通过能表达T7的细菌菌株或细胞系制备,随后从所述细胞中分离。正如下文所讨论的,所公开的适体还可以使用载体和启动子直接在细胞中表达。

[0194] 所述适体,与本发明的其他核酸分子类似,还可以包括化学修饰过的核苷酸。在核酸的诊断或治疗用途中要处理的一个问题是,磷酸二酯形式的寡核苷酸在体液中在表现出所需效果之前可能被细胞内和细胞外酶,如内切核酸酶和外切核酸酶快速降解。可以对核酸配体进行某些化学修饰,以提高核酸配体的体内稳定性,或者增强或者介导核酸配体的送递(参见例如,美国专利申请号5,660,985,标题为“High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides”),所述文献被专门收作本文参考。

[0195] 本发明所预期的核酸配体的修饰包括,但不局限于提供了其他化学基团的修饰,它向核酸配体碱基或向总体上的核酸配体整合了额外的电荷、可极化性、疏水性、氢键结合、静电相互作用和不确定性(fluxionality)。所述修饰包括,但不局限于,2′号位置的糖修饰,5′号位置的嘧啶修饰,8′号位置的嘌呤修饰,在环外胺上的修饰,4-硫尿苷的取代,

5- 溴或 5- 碘 - 尿嘧啶的取代 ; 主链修饰, 硫代磷酸酯或磷酸烷基酯修饰, 甲基化, 不常见的碱基对组合, 如异碱基 (isobase) 异胞苷 (isocytidine) 和异胍 (isoguanidine) 等。修饰还可以包括 3' 和 5' 修饰, 如用糖部分加帽或修饰。在本发明的某些实施方案中, 所述核酸配体是 RNA 分子, 它是在嘧啶残基的糖部分上 2' - 氟 (2' -F) 修饰的。

[0196] 通过导入这种修饰, 以及通过沿 RNA 的磷酸酯主链修饰和取代, 可以大大加强所述适体的稳定性。另外, 可以在核碱基 (nucleobase) 本身上进行多种修饰, 这种修饰能抑制降解, 并且能够增强需要的核苷酸相互作用或减弱不需要的核苷酸相互作用。因此, 一旦知道了适体的序列, 就可以通过下文所描述的合成方法或通过本领域技术人员所公知的方法进行修饰或取代。

[0197] 其他修饰包括整合修饰过的碱基 (或修饰过的核苷或修饰过的核苷酸), 它们是存在于核糖核酸 (即, A、C、G 和 U) 和脱氧核糖核酸 (即, A、C、G 和 T) 的标准碱基、糖和 / 或磷酸酯主链化学结构的变化形式。所述范围内包括, 例如 :Gm(2' - 甲氧基鸟嘌呤核苷酸)、Am(2' - 甲氧基腺苷酸)、Cf(2' - 氟胞嘧啶核苷酸)、Uf(2' - 氟尿苷酸)、Ar(核糖腺嘌呤核苷酸)。所述适体还可以包括胞嘧啶或任何胞嘧啶 - 相关的碱基, 包括 5- 甲基胞嘧啶、4- 乙酰胞嘧啶、3- 甲基胞嘧啶、5- 羟甲基胞嘧啶、2- 硫胞嘧啶、5- 卤代胞嘧啶 (例如, 5- 氟代胞嘧啶、5- 溴代胞嘧啶、5- 氯代胞嘧啶和 5- 碘代胞嘧啶)、5- 丙炔基胞嘧啶、6- 偶氮胞嘧啶、5- 三氟甲基胞嘧啶、N4, N4- 桥亚乙基胞嘧啶 (ethanocytosine)、吩噻嗪胞苷、吩噻嗪胞苷、咪唑胞苷或吡啶并咪唑胞苷。所述适体还可以包括鸟嘌呤或任何鸟嘌呤 - 相关的碱基, 包括 6- 甲基鸟嘌呤、1- 甲基鸟嘌呤、2, 2- 二甲基鸟嘌呤、2- 甲基鸟嘌呤、7- 甲基鸟嘌呤、2- 丙基鸟嘌呤、6- 丙基鸟嘌呤、8- 卤代鸟嘌呤 (例如, 8- 氟代鸟嘌呤、8- 溴代鸟嘌呤、8- 氯代鸟嘌呤和 8- 碘代鸟嘌呤)、8- 氨基鸟嘌呤、8- 巯基鸟嘌呤、8- 硫代烷基鸟嘌呤、8- 羟基鸟嘌呤、7- 甲基鸟嘌呤、8- 氮杂鸟嘌呤、7- 脱氮鸟嘌呤或 3- 脱氮鸟嘌呤。所述适体还可以包括腺嘌呤或任何腺嘌呤 - 相关的碱基, 包括 6- 甲基腺嘌呤、N6- 异戊烯腺嘌呤、N6- 甲基腺嘌呤、1- 甲基腺嘌呤、2- 甲基腺嘌呤、2- 甲基硫代 -N6- 异戊烯腺嘌呤、8- 卤代腺嘌呤 (例如, 8- 氟代腺嘌呤、8- 溴代腺嘌呤、8- 氯代腺嘌呤和 8- 碘代腺嘌呤)、8- 氨基腺嘌呤、8- 巯基腺嘌呤、8- 硫代烷基腺嘌呤、8- 羟基腺嘌呤、7- 甲基腺嘌呤、2- 卤代腺嘌呤 (例如, 2- 氟代腺嘌呤、2- 溴代腺嘌呤、2- 氯代腺嘌呤和 2- 碘代腺嘌呤)、2- 氨基腺嘌呤、8- 氮杂腺嘌呤、7- 脱氮腺嘌呤或 3- 脱氮腺嘌呤。还包括尿嘧啶或任何尿嘧啶 - 相关的碱基, 包括 5- 卤代尿嘧啶 (例如, 5- 氟代尿嘧啶、5- 溴代尿嘧啶、5- 氯代尿嘧啶、5- 碘代尿嘧啶)、5-(羧基羟甲基) 尿嘧啶、5- 羧甲基氨基甲基 -2- 硫尿嘧啶、5- 羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、1- 甲基假尿嘧啶、5- 甲氧基氨基甲基 -2- 硫尿嘧啶、5' - 甲氧羰基甲基尿嘧啶、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- 羟基乙酸甲酯、尿嘧啶 -5- 羟基乙酸、假尿嘧啶、5- 甲基 -2- 硫尿嘧啶、2- 硫尿嘧啶、3-(3- 氨基 -3-N-2- 羧丙基) 尿嘧啶、5- 甲基氨基甲基尿嘧啶、5- 丙炔基尿嘧啶、6- 偶氮尿嘧啶或 4- 硫尿嘧啶。

[0198] 本领域所公知的其他修饰过的碱基变体的例子包括, 但不局限于在 37C. F. R. § 1. 822(p) (1) 中所列举的, 例如, 4- 乙酰胞苷、5-(羧基羟甲基) 尿苷、2' - 甲氧基胞苷、5- 羧甲基氨基甲基 -2-thioridine、5- 羧甲基氨基甲基尿苷、二氢尿苷、2' -O- 甲基假尿嘧啶核苷、b-D- 半乳糖基 Q 核苷 (queosine)、肌苷、N6- 异戊烯腺苷、1- 甲基腺苷、1- 甲

基假尿嘧啶核苷、1-甲基鸟苷、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟苷、2-甲基腺苷、2-甲基鸟苷、3-甲基胞苷、5-甲基胞苷、N6-甲基腺苷、7-甲基鸟苷、5-甲基氨基甲基尿苷、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿苷、b-D-甘露糖基Q核苷(mannosylqueosine)、5-甲氧羰基甲基尿苷、5-甲氧基尿苷、2-甲基硫代N6-异戊烯腺苷、N-((9-b-D-呋喃核糖基-2-甲基硫代嘌呤-6-基)氨基甲酰基)苏氨酸、N-((9-b-D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)N-甲基-氨基甲酰基)苏氨酸、尿苷-5-羧基乙酸甲酯、尿苷-5-羧基乙酸(v)、wybutoxosine、假尿嘧啶核苷、Q核苷、2-硫代胞苷、5-甲基-2-硫尿苷、2-硫尿苷、4-硫尿苷、5-甲基尿苷、N-((9-b-D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)氨基甲酰基)苏氨酸、2'-O-甲基-5-甲基尿苷、2'-O-甲基尿苷、wybutosine、3-(3-氨基-3-羧丙基)尿苷。

[0199] 还包括在以下文献中描述的修饰过的核碱基：美国专利号 3,687,808、3,687,808、4,845,205、5,130,302、5,134,066、5,175,273、5,367,066、5,432,272、5,457,187、5,459,255、5,484,908、5,502,177、5,525,711、5,552,540、5,587,469、5,594,121、5,596,091、5,614,617、5,645,985、5,830,653、5,763,588、6,005,096 和 5,681,941。本领域所公知的修饰过的核苷和核苷酸糖主链变体的例子包括，但不局限于这样的变体，它具有，例如，2' 核糖基取代基，如 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 链烯基)、O(C2-10 炔基)、S(C1-10 烷基)、S(C2-10 链烯基)、S(C2-10 炔基)、NH(C1-10 烷基)、NH(C2-10 链烯基)、NH(C2-10 炔基)和 O-烷基-O-烷基。所需的 2' 核糖基取代基包括 2' -甲氧基(2' -OCH₃)、2' -氨基丙氧基(2' -OCH₂CH₂CH₂NH₂)、2' -烯丙基(2' -CH₂-CH=CH₂)、2' -O-烯丙基(2' -O-CH₂-CH=CH₂)、2' -氨基(2' -NH₂)和 2' -氟(2' -F)。所述 2' -取代基可以在阿糖基(上游)位置或核糖基(下游)位置上。

[0200] 本发明的适体可以由上文所述的核苷酸和/或核苷酸类似物或者这两者的组合组成，或者是寡核苷酸类似物。本发明的适体可以在不影响该寡聚体与 PDGF 或 VEGF(或它们的同源受体)结合的功能的位置上包括核苷酸类似物。

[0201] 有若干种技术可适用于改善或加强核酸配体对特定靶分子的结合或对其他适体的选择。一种技术，一般称作“体外遗传学”(参见 Szostak(1992)TIBS,19:89)，涉及通过从随机序列库中选择来分离适体拮抗剂。可以分离所公开的适体的核酸分子库可以包括与大约二十到四十个核苷酸的可变序列侧接的不变序列。该方法业已被称作通过指数富集进行的配体选择进化(Selective Evolution of Ligands by EXponential Enrichment)(SELEX)。通过 SELEX 和相关方法制备本发明的适体拮抗剂的组合物和方法为本领域所公知，并且教导于以下文献中，例如，美国专利号 5,475,096，标题为“Nucleic Acid Ligands”，和美国专利号 5,270,163，标题为“Methods for Identifying Nucleic Acid Ligands”，每一份文献都被专门以全文形式收作本文参考。一般，所述 SELEX 方法，以及具体地讲，VEGF 和 PDGF 适体和制剂进一步描述于以下文献中，例如，美国专利申请号 5,668,264、5,696,249、5,670,637、5,674,685、5,723,594、5,756,291、5,811,533、5,817,785、5,958,691、6,011,020、6,051,698、6,147,204、6,168,778、6,207,816、6,229,002、6,426,335、6,582,918，每一份文献的内容都被专门收作本文参考。

[0202] 简单地讲，SELEX 方法涉及从候选寡核苷酸的混合物中选择，并且使用相同的通用

选择方法逐步重复与所选择的靶的结合、分开和扩增,以便获得实际上任何需要的结合亲和力和选择性标准。从通常包括随机化序列片段的核酸混合物开始,所述 SELEX 方法包括让所述混合物在有利于结合的条件下与靶接触,从业已特异性地结合到靶分子的核酸中分开未结合的核酸,解离所述核酸-靶复合物,扩增从核酸-靶复合物上解离的核酸,以得到核酸的富含配体的混合物,然后重复结合、分开、解离和扩增步骤多达需要的循环次数,以得到对靶分子具有高度特异性高亲和力的核酸配体。

[0203] 业已为实现多种特殊目的对基本 SELEX 方法进行了改进。例如,美国专利号 5,707,796,标题为“Method for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure”,描述了利用 SELEX 方法与凝胶电泳组合选择具有特殊结构特征的核酸分子,如弯曲的 DNA。美国专利号 5,763,177,标题为“Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment:Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX”描述了用于选择含有光反应性基团的核酸配体的基于 SELEX 的方法,所述基团能够结合和/或光交联和/或光灭活靶分子。美国专利号 5,580,737,标题为“High-Affinity Nucleic Acid Ligands That Discriminate Between Theophylline and Caffeine”,描述了用于鉴定高特异性核酸配体的方法,所述配体能够区别密切相关的分子,所述方法可能是非肽的,被称作 Counter-SELEX。美国专利号 5,567,588,标题为“Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment:Solution SELEX”,描述了一种基于 SELEX 的方法,它能够高效分开对靶分子具有高亲和力和低亲和力的寡核苷酸。

[0204] SELEX 方法包括鉴定包含修饰过的核苷酸的高亲和力核酸配体,所述修饰过的核苷酸能赋予配体改善了的特征,如改善了的体内稳定性或改善了的递送特征。所述修饰的例子包括在核糖和/或磷酸酯和/或碱基位置上的化学取代。SELEX 方法鉴定的包括修饰过的核苷酸的核酸配体描述于美国专利号 5,660,985 中,标题为“High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides”,该文献描述了含有在嘧啶的 5-和 2'-位置上进行过化学修饰的核苷酸衍生物的寡核苷酸。美国专利号 5,580,737,同上,描述了高特异性核酸配体,它包括一个或多个用 2'-氨基(2'-NH₂)、2'-氟(2'-F)和/或 2'-O-甲基(2'-OMe)修饰过的核苷酸。美国专利申请号 08/264,029,于 1994 年 6 月 22 日提交,标题为“Novel Method of Preparation of Known and Novel 2' Modified Nucleosides by Intramolecular Nucleophilic Displacement”,现已放弃,描述了包括各种 2'-修饰过的嘧啶的寡核苷酸。

[0205] SELEX 方法包括将选择的寡核苷酸与其他选择的寡核苷酸和非寡核苷酸功能单位组合,分别如美国专利号 5,637,459,标题为“Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment:Chimeric SELEX”,和美国专利号 5,683,867,标题为“Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment:Blended SELEX”所述。上述专利允许将寡核苷酸的多种形状和其他特性,以及有效扩增和复制特性与其他分子的所需特性组合在一起。

[0206] SELEX 方法还包括将选定的核酸配体与亲脂性化合物或非免疫原性、高分子量化合物在诊断性或治疗性复合物中组合,如美国专利号 6,011,020,标题为“Nucleic Acid Ligands Complexes”所述,所述文献以全文形式收作本文参考。

[0207] 所述适体拮抗剂可以通过使用计算机模拟技术改良。分子模拟系统的例子为

CHARMm 和 QUANTA 程序, Polygen Corporation (Waltham, Mass.)。CHARMm 执行能量最小化和分子动力学功能。QUANTA 执行分子结构的构建、图形模拟和分析。QUANTA 能够相互构建、修饰、显示并且分析分子相互之间的表现。上述应用可适用于确定并且显示 RNA 和 DNA 分子的二级结构。

[0208] 然后可以检验具有上述各种修饰的适体的功能, 其中使用适合目标 PDGF 或 VEGF 功能的任何合适的测定方法, 如 PDGF 基于细胞的增殖活性测定。

[0209] 修饰可以在 SELEX 方法之前或之后进行。SELEX 方法之前的修饰得到了具有对它们的 SELEX 靶的特异性以及改善的体内稳定性的核酸配体。在 SELEX 方法之后对 2' -OH 核酸配体进行修饰, 能够导致体内稳定性的改善, 而又不会对核酸配体的结合能力产生负面影响。

[0210] 可用于生产本发明的适体的其他修饰为本领域普通技术人员所公知。所述修饰可以在 SELEX 方法之后进行 (以前鉴定的未修饰过的配体的修饰) 或者通过整合到 SELEX 方法中进行。

[0211] 业已发现, 一般来说适体或核酸配体, 和具体地讲 VEGF 适体是最稳定的, 并因此当 5' - 加帽和 3' - 加帽时是有效的, 能够减弱对外切核酸酶的易感性, 并且提高整体稳定性。因此, 在一种实施方案中, 本发明是基于一般来说对适体的加帽的, 以及具体地讲对抗 -VEGF 适体的加帽的, 其中使用位于 5' 末端的 5' -5' 反向核苷帽结构和位于 3' 末端的 3' -3' 反向核苷帽结构。因此, 本发明提供了抗 -VEGF 和 / 或抗 -PDGF 适体, 即, 核酸配体, 它在 5' 末端带有 5' -5' - 反向核苷帽, 并且在 3' 末端带有 3' -3' 反向核苷帽。

[0212] 某些特别有用的本发明的适体是抗 -VEGF 适体组合物, 包括, 但不局限于在它们的末端具有 5' -5' 和 3' -3' 反向核苷酸帽结构的组合物。所述抗 -VEGF 加帽的适体可以是 RNA 适体、DNA 适体或具有混合的 (即, RNA 和 DNA) 组合物的适体。本发明的合适的抗 -VEGF 适体序列包括核苷酸序列 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)。特别有用的是本发明的加帽的抗 -VEGF 的适体, 它具有以下序列:

[0213] X-5' -5' -CGGAAUCAGUGAAUGCUUAUACAUCG-3' -3' -X (SEQ ID NO :18)

[0214] 其中每一个 C、G、A 和 U 分别表示天然存在的核苷酸胞苷、胍、腺嘌呤和尿苷, 或与它相应的修饰过的核苷酸; X-5' -5' 是在所述适体的 5' 末端加帽的反向核苷酸; 3' -3' -X 是在所述适体的 3' 末端加帽的反向核苷酸; 而其余的核苷酸或修饰过的核苷酸依次通过 5' -3' 磷酸二酯键连接。在某些实施方案中, 加帽的抗 -VEGF 适体的每一个核苷酸单独具有 2' 核糖基取代, 如 -OH (它是核糖核酸 (RNAs) 的标准), 或 -H (它是脱氧核糖核酸 (DNAs) 的标准)。在其他实施方案中, 2' 核糖基位置被 O(C₁₋₁₀ 烷基)、O(C₁₋₁₀ 链烯基)、F、N₃ 或 NH₂ 取代基所取代。

[0215] 在更具体的非限定性例子中, 5' -5' 加帽的抗 -VEGF 适体可能具有以下结构:

[0216] T_d-5' -5' -C_fG_mG_mA_rU_fC_fA_mG_mU_fG_mA_mU_fG_mC_fU_fA_mU_fA_mC_fA_mU_fC_fG_m3' -3' -T_d

[0217] (SEQ ID NO :19) 其中, “G_m”表示 2' - 甲氧基鸟嘌呤核苷酸, “A_m”表示 2' - 甲氧基腺苷酸, “C_f”表示 2' - 氟胞嘧啶核苷酸, “U_f”表示 2' - 氟尿苷酸, “A_r”表示核糖腺嘌呤核苷酸, 而 “T_d”表示脱氧核糖胸苷酸。

[0218] 反义、核酶和 DNA 酶拮抗剂

[0219] 靶定 PDGF 和 VEGF 的反义寡核苷酸和核酶,通过抑制从这些信使 RNAs 的蛋白翻译或通过分别靶定相应的 PDGF 或 VEGF mRNAs 的降解实现 PDGF/VEGF 的抑制作用。上述 PDGF 和 VEGF- 靶定的核酸提供了用于设计和合成 PDGF 和 VEGF 核酶和反义寡核苷酸的有用的序列。设计和合成反义寡核苷酸和核酶的方法为本领域所公知。本发明提供了其他指导。

[0220] 在设计特异性和有效的 mRNA- 靶定的寡核苷酸 (反义 ODNs) 和核酶和反义中的一个问题是鉴定靶 mRNA 内的反义配对的接近位点 (它本身折叠成部分自我配对的二级结构)。计算机辅助的预测 RNA 配对可接近性的算法和分子筛选的组合,能够制备针对大部分 mRNA 靶的特异性和有效的核酶和 / 或反义寡核苷酸。实际上,业已描述了若干种确定靶 RNA 分子对反义或核酶抑制剂的可接近性的方法。一种方法利用体外筛选测定,其中使用尽可能多的反义寡聚脱氧核苷酸 (参见 Monia 等, (1996) *Nature Med.*, 2 :668-675 ;和 Milner 等, (1997) *Nature Biotechnol.*, 15 :537-541)。另一种方法使用 ODNs 的随机文库 (Ho 等, (1996) *Nucleic Acids Res.*, 24 :1901-1907 ;Birikh 等, (1997) *RNA* 3 :429-437 ;和 Lima 等, (1997) *J. Biol. Chem.*, 272 :626-638)。可以通过 RNA 酶 H 切割监控可接近的位点 (参见 Birikh 等,同上 ;和 Ho 等, (1998) *Nature Biotechnol.*, 16 :59-63)。RNA 酶 H 能够催化 DNA-RNA 双链体的 RNA 链的磷酸二酯主链的水解切割。

[0221] 在另一种方法中,涉及使用半随机、嵌合的化学合成的 ODNs 的库,它被用于鉴定被 RNA 酶 H 切割的在体外合成的 RNA 靶上的可接近的位点。然后利用引物延伸分析鉴定靶分子中的这些位点 (参见 Lima 等,同上)。用于设计 RNA 中的反义靶的其他方法基于计算机辅助的 RNA 折叠模型。若干报导业已公开了利用随机核酶文库筛选有效的切割 (参见 Campbell 等, (1995) *RNA* 1 :598-609 ;Lieber 等, (1995) *Mol. Cell Biol.*, 15 :540-551 ;和 Vaish 等, (1997) *Biochem.*, 36 :6459-6501)。

[0222] 利用 ODNs 和 RNA 酶 H 的随机或半随机文库的其他体外方法可能比计算机模拟更有效 (Lima 等,同上)。不过,体外合成的 RNA 的使用不能预测反义 ODNs 在体内的可接近性,因为最近的观察表明了多核苷酸的退火相互作用受 RNA- 结合蛋白的影响 (参见 Tsuchihashi 等, (1993) *Science*, 267 :99-102 ;Portman 等, (1994) *EMBO J.*, 13 :213-221 ;和 Bertrand 和 Rossi (1994) *EMBO J.*, 13 :2904-2912)。内容被收作本文参考的美国专利号 6,562,570,提供了用于在存在细胞提取物的条件下确定 mRNA 内的可接近位点的组合物和方法,所述提取物模拟了体内条件。

[0223] 简单地讲,该方法涉及在杂交条件下在反应培养基中,该培养基包括含有内源 RNA- 结合蛋白的细胞提取物,或者由于存在一种或多种 RNA- 结合蛋白而模仿细胞提取物,使天然的或体外合成的 RNAs 与特定的反义 ODNs、核酶或 DNAzymes,或与随机或半随机 ODN、核酶或 DNAzyme 文库一起温育。与靶 RNA 中的可接近位点互补的任何反义 ODN、核酶或 DNAzyme,能够与所述位点杂交。在使用特定的 ODNs 或 ODN 文库时, RNA 酶 H 是在杂交期间存在的,或者是在杂交之后添加的,以切割业已发生了杂交的 RNA。在使用核酶或 DNAzymes 时,可能存在 RNA 酶 H,但不一定是必需的,因为当发生了杂交时所述核酶和 DNAzymes 能切割 RNA。在某些场合下,使用了在细胞提取物中的随机或半随机 ODN 文库,其含有内源 mRNA、RNA- 结合蛋白和 RNA 酶 H。

[0224] 然后,可以用各种方法鉴定靶 RNA 上的业已结合了反义 ODNs、核酶或 DNAzymes 并且发生了切割的位点。例如,可以将依赖于末端脱氧核苷酸转移酶的聚合酶链反应 (TDPCR)

用于这一目的（参见 Komura 和 Riggs(1998) *Nucleic Acids Res.*, 26 :1807-11）。通过逆转录步骤将 RNA 模板转化成 DNA, 然后进行 TDPCR。在本发明中, TDPCR 方法需要的 3' 末端是通过使用任何合适的依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶（例如, 逆转录酶）对目标靶 RNA 进行逆转录产生的。这一目的是通过让第一种 ODN 引物 (P1) 与所述 RNA 的位于接受研究的靶 RNA 分子部分下游的区域（即, 沿 RNA 分子上的 5' → 3' 方向）杂交。在存在 dNTPs 的情况下, 所述聚合酶从 P1 的 3' 末端将 RNA 拷贝成 DNA, 并且在通过反义 ODN/RNA 酶 H、核酶或 DNAzyme 产生的切割位点终止拷贝。新的 DNA 分子（被称作第一链 DNA）起着 TDPCR 方法的 PCR 部分的第一模板的作用, 它被用于鉴定存在于 RNA 上的相应的可接近的靶序列。

[0225] 例如, 然后可以使用 TDPCR 方法, 即, 具有鸟苷三磷酸 (rGTP) 的逆转录 DNA 在存在末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT) 的条件下起反应, 以在 DNA 分子的 3' 末端添加 (rG) 2-4 尾巴。然后连接双链 ODN 接头, 其在一股链上具有 3' 2-4 突出端, 它与 (rG) 2-4 尾巴碱基配对。然后添加两个 PCR 引物。第一个是接头引物 (LP), 它与 TDPCR 接头的链互补, 该接头连接在 (rG) 2-4 尾巴上（有时称作下部链）。另一个引物 (P2) 可能与 P1 相同, 不过可以是相对 P1 嵌套的, 即, 它与靶 RNA 在至少部分位于由 P1 结合的区域上游的区域互补（即, 在 RNA 分子上的 3' → 5' 方向）, 不过, 它位于接受研究的靶 RNA 分子的部分的下游。就是说, 接受研究以确定它是否具有可接近的结合位点的靶 RNA 分子的部分, 是互补于 P2 的区域上游的部分。然后在存在 DNA 聚合酶和 dNTPs 的条件下用已知方式进行 PCR, 以扩增由引物 LP 和 P2 限定的 DNA 片段。然后通过多种已知方法中的任何一种捕获扩增的产物, 并且随后用自动化 DNA 测序仪测序, 从而提供对切割位点的精确鉴定。一旦确定了所述性质, 就可以合成确定序列的反义 DNA 或核酶, 以在体外和体内使用。

[0226] 在表达特定基因中的反义干预可以通过使用合成的反义寡核苷酸序列实现（参见, 例如, Lefebvre-d' Hellencourt 等, (1995) *Eur. Cytokine Netw.*, 6 :7 ;Agrawal (1996) *TIBTECH*, 14 :376 ;和 Lev-Lehman 等, (1997) *Antisense Therap.* Cohen and Smicek, eds. (Plenum Press, New York))。简单地讲, 反义寡核苷酸序列可以是短的 DNA 序列, 通常为 15-30 聚体, 不过, 可以小到 7 聚体（参见 Wagner 等, (1994) *Nature* 372 :333）, 它被设计成与目标靶 mRNA 互补, 并且形成 RNA :AS 双链体。这种双链体的形成能够防止相关 mRNA 的加工、剪接、转运或翻译。另外, 某些 AS 核苷酸序列在与它们的靶 mRNA 杂交时能够引起细胞 RNA 酶 H 活性, 从而导致 mRNA 降解（参见 Calabretta 等, (1996) *Semin. Oncol.*, 23 :78）。在这种场合下, RNA 酶 H 会切割所述双链体的 RNA 成分, 并且能够潜在地释放 AS, 以进一步与靶 RNA 的其他分子杂交。通过 AS 与基因组 DNA 相互作用产生的另一种作用模式, 所述相互作用形成了三重螺旋, 它能够转录失活。

[0227] 作为上文所讨论的反义序列的非限定性、补充性或替代性例子, 可以将核酶用于抑制基因功能。当反义治疗受到化学计量的因素限制时, 这是特别必要的。然后可以使用靶定相同序列的核酶。核酶是具有 RNA 催化能力的 RNA 分子, 它能够切割靶 RNA 上的特定位点。由核酶切割的 RNA 分子的数目大于由 1 : 1 化学计量推测的数目（参见 Hampel 和 Tritz (1989) *Biochem.*, 28 :4929-33 ;和 Uhlenbeck (1987) *Nature*, 328 :596-600）。因此, 本发明还可以利用核酶序列, 所述序列靶定 PDGF 或 VEGF mRNA 种类的可接近的结构域, 并且包括合适的催化中心。按照本领域所公知的以及本文中所进一步讨论的方法制备和递送核酶。核酶可以与反义序列组合使用。

[0228] 核酶能催化 RNA 的磷酸二酯键切割。业已鉴定了若干种核酶结构家族,包括 I 组内含子、RNA 酶 P、丁型肝炎病毒核酶、锤头核酶和发夹核酶,其最初来自烟草环斑病毒卫星 RNA (sTRSV) 的负链 (参见 Sullivan(1994) *Investig. Dermatolog (Suppl.)* 103 :95S ;和美国专利号 5, 225, 347)。后两个家族来自类病毒和拟病毒,其中,核酶被认为能够分离单体和在滚环复制期间产生的寡聚体 (参见 Symons(1989) *TIBS*, 14 :445-50 ;Symons(1992) *Ann. Rev. Biochem.* ,61 :641-71)。锤头和发夹核酶基序通常最适合用于基因治疗的 mRNAs 的反式切割。用于本发明的核酶类型是按照本领域已知方法选择的。发夹核酶现在用于临床实验,并且是特别有用的类型。一般,核酶的长度为 30-100 核苷酸。

[0229] 被设计用于催化切割靶 mRNA 转录物的核酶分子为本领域所公知 (例如, PDGF (SEQ ID NO :1) 或 VEGF (SEQ ID NO :3), 并且还可用于防止 mRNA 的翻译 (参见, 例如, PCT 国际公开号 WO 90/11364 ;Sarver 等, (1990) *Science*, 247 :1222-1225 和美国专利号 5, 093, 246)。尽管能够在位点特异性识别序列切割 mRNA 的核酶可用于破坏特定的 mRNAs, 但锤头核酶的使用是特别有用的。锤头核酶能在由旁侧区限定的位置切割 mRNAs, 所述旁侧区形成了与靶 mRNA 的互补碱基配对。唯一的要求是, 靶 mRNA 具有两个碱基的以下序列 :5' -UG-3'。锤头核酶的构建和生产是本领域所公知的, 并且更全面地描述于以下文献中 :Haseloff 和 Gerlach((1988) *Nature*, 334 :585)。

[0230] 本发明的核酶还包括 RNA 内切核糖核酸酶 (以下称之为“Cech- 型核酶”), 如在嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 中天然存在的酶 (被称作 IVS, 或 L-19IVS RNA), 并且其在以下文献中业已被 Thomas Cech 及同事进行过充分的介绍 (参见 Zaug 等, (1984) *Science*, 224 :574-578 ;Zaug 和 Cech(1986) *Science*, 231 :470-475 ;Zaug, 等, (1986) *Nature*, 324 :429-433 ;国际专利申请号 W088/04300 ;Been 和 Cech(1986) *Cell*, 47 :207-216)。Cech- 型核酶具有八个碱基对的活性位点, 它能与靶 RNA 序列杂交, 然后发生靶 RNA 的切割。本发明包括所述 Cech- 型核酶, 它靶定八个碱基对的活性位点序列。尽管本发明不局限于操作机制的特定理论, 但锤头核酶在本发明中的使用, 与使用 PDGF/VEGF- 定向的反义相比具有优点, 因为最新的报导表明, 锤头核酶通过阻断 RNA 翻译和 / 或 mRNA 靶的特异性切割起作用。

[0231] 正如在反义方法中那样, 核酶可以由修饰过的寡核苷酸构成 (例如, 用于改善的稳定性、靶定等), 并且被递送到能表达靶 mRNA 的细胞。有用的递送方法涉及使用“编码”所述核酶的 DNA 构建体, 它受强组成型 pol III 或 pol II 启动子的控制, 从而受感染的细胞能产生足够量的核酶, 以破坏靶定的信使并且抑制翻译。由于核酶与反义分子不同, 是催化性的, 所以需要较低的细胞内浓度实现它的效力。

[0232] 如上文所述, 如果需要的话, 核酸酶抗性是通过本领域所公知的任何方法提供的, 它大体上不会干扰反义寡脱氧核苷酸或核酶的生物学活性, 正如使用和递送方法所需要的 (Iyer 等, (1990) *J. Org. Chem.* , 55 :4693-99 ;Eckstein(1985) *Ann. Rev. Biochem.* , 54 :367-402 ;Spitzer 和 Eckstein(1988) *Nucleic Acids Res.* , 18 :11691-704 ;Woolf 等, (1990) *Nucleic Acids Res.* , 18 :1763-69 ;和 Shaw 等, (1991) *Nucleic Acids Res.* , 18 :11691-704)。正如上文对适体所描述的, 可以对反义寡核苷酸或核酶进行非限定性代表性修饰, 以增强核酸酶抗性, 包括修饰磷酸酯主链上的亚磷或氧杂原子、短链烷基或环烷基糖间键或短链杂原子或杂环糖间键。这些包括, 例如制备 2' - 氟化的、0- 甲基化的、磷酸甲

酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯和吗啉代寡聚体。例如,所述反义寡核苷酸或核酶可以具有硫代磷酸酯键,其连接在四-六个3'-末端核苷酸碱基之间。另外,硫代磷酸酯键可以连接所有的核苷酸碱基。硫代磷酸酯反义寡核苷酸在有效并且在动物体内表现出足够的药物动力学半衰期的浓度下通常不表现出明显的毒性(参见Agarwal等,(1996)TIBTECH,14:376)并且是核酸酶抗性的。另外,对AS-ODN的核酸酶抗性可以通过在3'-末端具有形成环的九核苷酸序列提供,它的核苷酸序列为CGCGAAGCG。抗生物素蛋白-生物素缀合反应的使用,还可用于改善AS-ODNs对血清核酸酶降解的保护作用(参见Boado和Pardridge(1992)Bioconj. Chem.,3:519-23)。根据这种概念,在它们的3'-末端对AS-ODN试剂进行单一生物素化。在与抗生物素蛋白起反应时,它们形成了紧密的、核酸酶抗性复合物,其与未缀合的ODNs相比,具有6倍高的稳定性。

[0233] 其他研究业已表明了反义寡脱氧核苷酸的体内延伸(Agarwal等,(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)88:7595)。据推测,该方法可用作从循环中排除外来AS-寡核苷酸的清除机制,这取决于在发生了延伸的附着的寡核苷酸中游离的3'-末端的存在。因此,在所述重要位置上的部分硫代磷酸酯、环保护或生物素-抗生物素蛋白应当足以确保所述AS-寡脱氧核苷酸的稳定性。

[0234] 除了使用上述修饰过的碱基之外,可以制备核苷酸的类似物,其中,核苷酸的结构发生了根本的改变,并且,所述核苷酸类似物更适合作为治疗剂或实验试剂。核苷酸类似物的例子是肽核酸(PNA),其中DNA(或RNA)中的脱氧核糖(或核糖)磷酸酯主链被聚酰胺主链所取代,它与在肽上出现的情况类似。业已显示PNA类似物能够抗酶的降解作用,并且在体内和体外具有延长的寿命。另外,业已显示PNAs与互补DNA序列的结合比DNA分子更强。这种观察是由于PNA链和DNA链之间的电荷排斥的缺乏造成的。可以对寡核苷酸进行的其他修饰包括聚合物主链、吗啉代聚合物主链(参见,例如,美国专利号5,034,506,所述文献的内容被收作本文参考)、环状主链或无环主链、糖模拟物或任何其他修饰,包括能够改善寡核苷酸的药物动力学特性的修饰。

[0235] 本发明的另一方面涉及利用DNA酶减弱靶mRNA的表达,例如,PDGF或VEGF。DNA酶整合了反义和核酶技术的某些机制特征。设计DNA酶,从而它们能识别特定的靶核酸序列,这点更像是反义寡核苷酸,不过,它们能催化并且特异性地切割靶核酸这点更像是核酶。

[0236] 目前有两种基本类型的DNA酶,并且,这两种酶都是由Santoro和Joyce鉴定的(参见,例如,美国专利号6,110,462)。10-23DNA酶包括环状结构,该结构连接两个臂。这两个臂通过识别特定靶核酸序列提供了特异性,而所述环状结构提供了在生理学条件下的催化功能。

[0237] 简单地讲,为了设计能特异性地识别并且切割靶核酸的DNA酶,本领域技术人员首先必须鉴定独特的靶序列。这可以使用与反义寡核苷酸相同的方法实现。在某些例子中,所述独特的或重要的序列是富含G/C的大约18-22个核苷酸。高G/C含量有助于确保DNA酶和靶序列之间的较强的相互作用。

[0238] 在合成DNA酶时,能将所述酶靶向信使的特异性反义识别序列是分开的,从而它构成DNA酶的两个臂,并且将DNA酶的环放在这两个特殊的臂之间。

[0239] 制备和施用DNA酶的方法可以参见,例如,U.S. 6110462。类似地,体外或体内递送DNA核酶的方法包括本文所阐述的递送RNA核酶的方法。另外,本领域技术人员可以认识

到,与反义寡核苷酸类似,可以对 DNA 酶进行任选地修饰,以提高稳定性并且改善对降解的抗性。

[0240] RNAi 拮抗剂

[0241] 本发明的某些实施方案利用了用于通过 RNA 干扰 (RNAi) 实现 VEGF 和 PDGF 的抑制的材料和方法。RNAi 是序列特异性的转录后基因抑制方法,它可在真核细胞中发生。一般,该方法涉及通过与所述序列同源的双链 RNA (dsRNA) 诱导的特定序列的 mRNA 的降解。例如,相当于特定单链 mRNA (ss mRNA) 的序列的长的 dsRNA 的表达,会使所述信使不稳定,从而“干扰”相应基因的表达。因此,通过导入 dsRNA 能够抑制任何选定的基因,所述 dsRNA 相当于所述基因的 mRNA 的全部或主要部分。看来,当长的 dsRNA 表达时,首先通过核糖核酸酶 III 将它加工成长度为少至 21-22 个碱基对的较短的 dsRNA 寡核苷酸。因此, RNAi 可以通过相对较短的同源 dsRNAs 的导入或表达实现。实际上,相对较短的同源 dsRNAs 的使用,可能具有某些优点,正如下文所讨论的。

[0242] 哺乳动物细胞具有受双链 RNA (dsRNA) 影响的至少两个途径。在 RNAi (序列特异性) 途径上,首先将最初的 dsRNA 分解成短的干扰 (si) RNAs,如上文所述。siRNAs 具有大约 21 个核苷酸的有义和反义链,它在各自的 3' 末端与两个核苷酸的突出端形成大约 19 个核苷酸的 si RNAs。短的干扰 RNAs 被认为提供了允许靶定特定信使 RNA 进行降解的序列信息。相反,非特异性途径是通过具有任何序列的 dsRNA 触发的,只要它的长度至少为大约 30 个碱基对就行。非特异性作用的发生是因为 dsRNA 激活了两种酶:PKR (双链 RNA-激活的蛋白激酶),在它的活性形式下能对翻译起始因子 eIF2 进行磷酸化,以关闭所有的蛋白合成,以及 2',5' 寡腺苷酸合成酶 (2',5' -AS),它合成的分子能激活 RNA 酶 L,即一种靶定所有 mRNAs 的非特异性酶。所述非特异性途径可能代表了宿主对应激或病毒感染的反应,并且,一般,所述非特异性途径的影响在本发明的特别有用的方法中得到了最小化。值得注意的是,似乎需要较长的 dsRNAs 来诱导非特异性途径,因此,短于大约 30 个碱基对的 dsRNAs 在通过 RNAi 实现基因抑制方面是特别有用的 (参见,例如, Hunter 等, (1975) *J. Biol. Chem.*, 250 :409-17; Manche 等, (1992) *Mol. Cell Biol.*, 12 :5239-48; Minks 等, (1979) *J. Biol. Chem.*, 254 :10180-3; 和 Elbashir 等, (2001) *Nature*, 411 :494-8)。

[0243] 用于实现 RNAi 的某些双链寡核苷酸的长度小于 30 个碱基对,并且可能包括核糖核酸的大约 25、24、23、22、21、20、19、18 或 17 个碱基对。本发明的 dsRNA 寡核苷酸任选地包括 3' 突出端。非限定性的示例性的 2-核苷酸 3' 突出端可以由任何类型的核糖核苷酸残基组成,并且甚至可以由 2' -脱氧胸苷残基组成,这降低了 RNA 合成的成本,并且可以提高 siRNAs 在细胞培养基以及在转染过的细胞中的核酸酶抗性 (参见 Elbashi 等, (2001) *Nature*, 411 :494-8)。

[0244] 具有 50、75、100 或者甚至 500 个碱基对或更多的较长的 dsRNAs 还可用于本发明的某些实施方案中。用于实现 RNAi 的 dsRNAs 的示例性浓度为大约 0.05nM、0.1nM、0.5nM、1.0nM、1.5nM、25nM 或 100nM,尽管根据处理过的细胞的性质、基因靶和本领域技术人员能够方便地认识的其他因素可以使用其他浓度。示例性的 dsRNAs 可以化学合成或者使用合适的表达载体在体外或体内生产。示例性的合成的 RNAs 包括使用本领域已知方法化学合成的 21 个核苷酸的 RNAs (例如,加速 RNA 亚磷酰胺和胸苷亚磷酰胺 (Proligo, 德国))。合成的寡核苷酸可以使用本领域公知的方法脱保护,并且凝胶纯化 (参见例如, Elbashir 等,

(2001) *Genes Dev.*, 15:188-200)。较长的 RNAs 可以从启动子转录,如本领域公知的 T7RNA 聚合酶启动子。沿两种可能的方向放置在体外启动子下游的单一 RNA 靶能够转录所述靶的两股链,以形成具有需要的靶序列的 dsRNA 寡核苷酸。

[0245] 用于设计寡核苷酸的特定序列可以是包含在表达的靶基因信使中的任何连续的核苷酸序列(例如,PDGF 的序列(例如,SEQ ID NO:2)或 VEGF 的序列(例如,SEQ ID NO:4)。可以用本领域已知的程序和算法选择合适的靶序列。另外,可以按上文另外所述选择最佳序列,其中使用为了预测特定单链核酸序列的二级结构,并且允许选择有可能出现在折叠的 mRNA 的暴露的单链区的那些序列而设计的程序。用于设计合适的寡核苷酸的方法和组合物可以参见,例如,美国专利号 6,251,588,所述文献的内容被收作本文参考。一般,mRNA 被认为是线性分子,它包括指导蛋白在核糖核苷酸序列内合成的信息。不过,研究业已揭示在大部分 mRNAs 中存在大量二级和三级结构。RNA 中的二级结构元件大部分是通过相同 RNA 分子的不同区域之间的沃森-克里克类型的相互作用形成的。重要的二级结构元件包括分子内双链区、发夹环、双链体 RNA 中的凸起和内部环。三级结构元件是在二级结构元件彼此接触或者与单链区接触时形成的,以产生更复杂的三维结构。很多研究人员业已测量了大量 RNA 双链体结构的结合能,并且已推导出可用于预测 RNA 二级结构的一系列规则(参见例如,Jaeger 等,(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86:7706(1989);和 Turner 等,(1988) *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 17:167)。所述规则可用于鉴定 RNA 结构元件,并且具体地讲,用于鉴定单链 RNA 区,它可能代表了 mRNA 的靶向沉默 RNAi、核酶或反义技术的特别有用的片段。因此,可以鉴定 mRNA 靶的特定片段,以用于设计介导 RNAi 的 dsRNA 寡核苷酸,以及用于设计本发明的合适的核酶和锤头核酶组合物。

[0246] 可以通过用异源靶基因转染将 dsRNA 寡核苷酸导入细胞,其中使用本领域所公知的诸如脂质体的载体组合物,例如 Lipofectamine2000 (Life Technologies, Rockville MD),正如生产商对于贴壁细胞系所描述的。靶定内源基因的 dsRNA 寡核苷酸的转染可以使用 Oligofectamine (Life Technologies) 进行。对于哺乳动物细胞系来说,在共转染编码 hGFP 的 pAD3 之后,可以通过荧光显微镜术检查转染效力 (Kehlenback 等,(1998) *J. Cell. Biol.*, 141:863-74)。RNAi 的效力可以在导入 dsRNAs 之后通过多种测定方法中的任意一种评估。所述方法包括,但不局限于使用抗体的蛋白印迹分析,所述抗体在新蛋白合成抑制之后使内源库周转足够时间后识别靶定的基因产物,以及 RNA 印迹分析,用于测定现有靶 mRNA 的水平。

[0247] 用于本发明的 RNAi 技术的其他组合物、方法和应用提供于以下文献中:美国专利号 6,278,039、5,723,750 和 5,244,805,所述文献的被收作本文参考。

[0248] 受体酪氨酸激酶抑制剂拮抗剂

[0249] 本发明还包括本领域所公知的酪氨酸激酶拮抗剂以及它的变体和替代物,这些变体和替代物可以使用本领域的常规技术获得,并且将现有技术的教导收作本文参考。PDGF(和 VEGF)的细胞外信号通过由所述 PDGF 受体(和 VEGF 受体)实现的酪氨酸激酶介导的磷酸化事件与细胞的其他部分联系,并且它影响了细胞膜结合的信号传导复合物下游的底物蛋白。因此,作用于 PDGF(和/或 VEGF)信号传导的受体激酶阶段的拮抗剂也可用于实施本发明的方法。

[0250] 对于诸如 PDGFR 或 VEGFR 的酪氨酸激酶受体酶来说具有选择性的多种类型的酪

氨酸激酶抑制剂是已知的（参见，例如，Spada 和 Myers ((1995)Exp. Opin. Ther. Patents, 5 :805) 和 Bridges ((1995)Exp. Opin. Ther. Patents, 5 :1245)。另外，Law 和 Lydon 业已归纳了酪氨酸激酶抑制剂的抗癌潜力 ((1996)Emerging Drugs :The Prospect For Improved Medicines, 241-260)。例如，美国专利号 6, 528, 526 描述了取代过的喹啉化合物，它能选择性地抑制血小板衍生生长因子 - 受体 (PDGFR) 酪氨酸激酶活性。PDGFR 酪氨酸激酶活性的已知抑制剂包括基于喹啉的抑制剂，其由 Maguire 等，((1994)J. Med. Chem. , 37 :2129) 和 Dollé, 等，((1994)J. Med. Chem. , 37 :2627) 报道。一种类型的基于苯基氨基 - 嘧啶的抑制剂最近由 Traxler 等，在 EP 564409, 由 Zimmerman 等，((1996)Biorg. Med. Chem. Lett. , 6 :1221-1226), 以及由 Buchdunger 等，((1995)Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 92 :2558) 报道。可用于抑制 PDGF 受体酪氨酸激酶活性的喹啉衍生物包括双单 - 和双环芳基化合物和杂芳基化合物（参见，例如，WO 92/20642）、喹啉衍生物（参见 (1994)Cancer Res. , 54 :6106-6114）、嘧啶衍生物（日本公开专利申请 No. 87834/94）和二甲氧基喹啉衍生物（参见 Abstracts of the 116th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan (Kanazawa) (1996), 2, p. 275, 29 (C2) 15-2）。

[0251] VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂的例子包括喹啉衍生物，例如，描述于美国专利号 6, 514, 971 中的那些，该专利的内容以它们的全文形式收作本文参考。其他这样的喹啉衍生物同样是已知的，例如，(1995)J. Med. Chem. , 38 :3482-7 公开了 4-(3- 溴苯胺基) 喹啉；(1968)J. Chem. Soc. C, (9) :1152-5 公开了 6- 氯 -4- 苯氧基喹啉；(1984)J. Karnatak Univ. , Sci. , 29 :82-6 公开了某些 4- 苯胺基喹啉；和 (1973)Indian J. Chem. , 11 :211-13 公开了某些 4- 苯基硫代喹啉。另外，(1973)J. Karnatak Univ. , 18 :25-30 公开了某些 4- 苯氧基喹啉，(1984)J. Karnatak Univ. , Sci. , 29 :82-6 公开了两种化合物：4-(4- 甲氧基苯胺基) -6, 7- 二甲氧基喹啉和 4-(3- 氯苯胺基) -6, 7- 二甲氧基喹啉。另外，在 4- 号位置上具有通过选自 --O--、--S--、--NH-- 和 --CH₂-- 的基团连接的苯环的某些喹啉描述于以下文献中：美国专利号 5, 017, 579、美国专利号 4, 957, 925、美国专利号 4, 994, 474 和 EP 0302793A2。

[0252] 用于抑制 VEGFR 和 / 或 PDGFR 的其他相关的化合物可以通过筛选新型化合物对目标受体酪氨酸激酶活性的影响获得，其中使用常规测定方法。候选 PDGFR 或 VEGFR 小分子有机抑制剂的有效抑制作用，可以使用基于细胞的测定系统监控，以及使用本领域所公知的其他测定系统。

[0253] 例如，对于针对 VEGF- 受体酪氨酸激酶的活性的一种检测如下。所述检测是使用 Flt-1/VEGF- 受体酪氨酸激酶进行的。详细过程如下：在室温下将溶于 20mM Tris.HCl pH 7.5、3mM 二氯化锰 (MnCl₂)、3mM 氯化镁 (MgCl₂)、10 μ M 钒酸钠、0.25mg/ml 聚乙二醇 (PEG) 20000、1mM 二硫苏糖醇和 3 μ g/.mu. l poly(Glu, Tyr) 4 : 1 (Sigma, Buchs, 瑞士)、8 μ M [³³P]-ATP (0.2 μ Ci)、1% 二甲基亚砷和 0-100 μ M 的要检测的化合物中的 30 μ l 激酶溶液 (10ng 的 Flt-1 的激酶结构域 (参见 Shibuya, 等, (1990)Oncogene, 5 :519-24) 一起温育 10 分钟。然后通过添加 10 μ l 的 0.25M 乙二胺四乙酸 (EDTA) pH 7 终止所述反应。使用多通道分配器 (LAB SYSTEMS, 美国)，将 20 μ l 的等分试样应用到 PVDF (= 聚二氟乙烯 (polyvinyl difluoride)) Immobilon P 膜 (Millipore, 美国) 上，通过微量滴定过滤器歧管并且与真空连接。在完全消除液体之后，在含有 0.5% 磷酸 (H₃PO₄) 的水浴中连续洗涤

所述膜四次,并且用乙醇洗涤一次,每次振荡温育 10 分钟,然后安装在 Hewlett Packard TopCount Manifold 上,并且在添加 10 μ l Microscint.RTM. (β -闪烁计数器液体)之后测量放射性。通过对三种浓度的每一种化合物的抑制百分比的线性回归分析测定 IC_{50} -值(浓度通常为 0.01 μ mol、0.1 μ mol 和 1 μ mol)。活性酪氨酸抑制剂化合物的 IC_{50} -值可以在 0.01 μ M-100 μ M 范围内。

[0254] 另外, VEGF-诱导的 VEGFR 酪氨酸激酶/自身磷酸化活性可以用其他实验在细胞上证实。简单地讲,将能永久性表达人 VEGF 受体 (VEGFR/KDR) 的转染过的 CHO 细胞接种到六孔细胞培养平板中的完全培养基中(含有 10%胎牛血清 (FCS)),并在 37°C 下,在 5% CO_2 中温育,直到表现出大约 80%的汇合。在培养基(不含 FCS,含有 0.1%牛血清清蛋白)中稀释要检测的化合物,并且添加到细胞中(对照包括不含实验化合物的培养基)。在 37°C 下温育 2 小时之后,添加重组 VEGF,最终的 VEGF 浓度为 20ng/ml)。在 37°C 下再温育 5 分钟之后,用冰冷的 PBS 洗涤细胞两次,并且马上在每孔 100 μ l 的裂解缓冲液中裂解。然后对裂解液进行离心,以除去细胞核,并且使用商业化蛋白测定 (BIORAD) 来测定上清液的蛋白浓度。所述裂解液随后可以直接使用,或者需要的话在 -200°C 下保存。

[0255] 然后进行夹心 ELISA,以测量 KDR-受体磷酸化:将 KDR 的单克隆抗体固定在黑色 ELISA 平板上(购自 Packard 的 OptiPlate™, HTRF-96)。然后洗涤所述平板,并且用溶于 PBS 的 1% BSA 饱和其余的游离蛋白结合位点。然后将细胞裂解液(20 μ g 蛋白/孔)与和碱性磷酸酶偶联的抗磷酸酪氨酸抗体(例如, PY20 :AP 购自 Transduction Laboratories, Lexington, KY)一起在 4°C 下在所述平板上温育过夜。再次洗涤所述平板,然后使用发光 AP 底物 (CDP-Star, ready to use, with Emerald II ;Applied-Biosystems TROPIX Bedford, MA) 证实抗磷酸酪氨酸抗体与捕获的磷酸化受体的结合。用 Packard Top Count Microplate Scintillation Counter 测量发光。正对照(用 VEGF 或 PDGF 刺激的)和负对照(不用 VEGF 或 PDGF 刺激)信号之间的差异,相当于 VEGF-诱导的 KDR-受体磷酸化(= 100%)。测试物质的活性是作为 VEGF-诱导的 KDR-受体磷酸化的%抑制计算的,其中,诱导最大抑制作用 1/2 的所述物质的浓度被定义为 ED_{50} (50%抑制作用的有效剂量)。活性酪氨酸抑制剂化合物的 ED_{50} 值在 0.001 μ M-6 μ M 范围内,通常在 0.005 μ M-0.5 μ M 范围内。

[0256] 药用制剂和治疗施用

[0257] 所述抗-VEGF 和抗-PDGF 剂可用于治疗新血管疾病,包括银屑病、类风湿性关节炎和眼新血管疾病。特别感兴趣的是使用 PDGF-B 拮抗剂化合物与 VEGF-A 拮抗剂的组合抑制诸如黄斑变性或糖尿病性视网膜病的眼新血管疾病的治疗方法。因此,一旦诊断患者有危险发展为新血管疾病或患有这种疾病,就通过施用 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂的组合对所述患者进行治疗,以分别阻断 PDGF 和 VEGF 的消极作用,从而抑制新血管疾病的发展,并且减轻与新生血管形成相关的有害作用。本发明方法的实施,不会导致角膜水肿。正如上文所讨论的,可以将多种 PDGF 和 VEGF 拮抗剂用于本发明中。

[0258] 根据本发明的抗-PDGF 和抗-VEGF 组合治疗可以单独进行或者与其他治疗组合进行,并且可以在家庭、医务室、诊所、医院门诊部或医院提供。一般,治疗是在医院开始的,从而医生能够密切观察治疗效果,并且进行任何需要的调整。组合治疗的持续时间取决于要治疗的新血管疾病的类型、患者的年龄和状况、患者疾病的阶段和类型以及患者对治疗的反应。另外,有发展为新血管疾病的较大风险的人(例如,糖尿病患者)可以接受治疗,以

抑制或延缓症状的发作。本发明所提供的一个显著优点是，将 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂组合用于治疗新血管疾病，使得能够施用低剂量的每一种拮抗剂，以及较少的总的活性拮抗剂，因此以较低毒性和副作用以及低成本提供了类似的功效。

[0259] 组合治疗的每一种拮抗剂的施用都可以通过任何合适的方法进行，它导致了与其他拮抗剂组合的所述拮抗剂的浓度能有效治疗新血管疾病。例如，每一种拮抗剂都可以与合适的载体物质混合，并且一般它的使用量占组合物总重量的 1-95%。所述组合物还能够以适合眼、口、肠胃外（例如，静脉内、肌内、皮下）、直肠、经皮、鼻或吸入施用的剂量形式提供。因此，所述组合物可以是以下形式的，例如，片剂、胶囊、丸剂、粉末、颗粒、悬浮液、乳剂、溶液、凝胶（包括水凝胶）、糊剂、软膏、乳膏、药膏、递送装置、栓剂、灌肠剂、可注射的、植入物、喷雾剂或气溶胶。含有一种拮抗剂或两种或两种以上拮抗剂的所述药用组合物可以按照常规制药方法制备（参见，例如，Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (20th ed.) ed. A. R. Gennaro, 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 和 Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds., J. Swarbrick 和 J. C. Boylan, 1988-2002, Marcel Dekker, New York）。

[0260] 在一个有用的方面，将 PDGF 和 VEGF 拮抗剂的组合进行肠胃外施用（例如，通过肌内、腹膜内、静脉内、眼内、玻璃体内、眼球后、结膜下、subtenon 或皮下注射或植入）或全身性施用。用于肠胃外或全身性施用的制剂包括无菌水溶液或非水溶液、悬浮液或乳剂。可以使用多种含水载体，例如，水、缓冲过的水、盐水等。其他合适媒介物的例子包括聚丙二醇、聚乙二醇、植物油、明胶、水凝胶、氢化 naphalenes 和可注射的有机酯，如油酸乙酯。所述制剂还可以包括辅助物质，如防腐剂、湿润剂、缓冲剂、乳化剂和 / 或分散剂。生物相容的、生物可降解的丙交酯聚合物、丙交酯 / 乙交酯共聚物或聚氧乙烯 - 聚氧丙烯共聚物可用于控制活性成分的释放。

[0261] 另外，可以通过口摄入施用 PDGF 和 VEGF 拮抗剂的组合。用于口服使用的组合物能够以固体或液体形式制备，其按照药用组合物生产领域的任何已知方法进行。

[0262] 用于口服施用的固体剂量形式包括胶囊、片剂、丸剂、粉末和颗粒。一般，所述药用制剂包括与无毒的可以药用的赋形剂混合的活性成分（如 PDGF 小有机分子拮抗剂和 VEGF 小有机分子拮抗剂）。所述赋形剂可以包括，例如，惰性稀释剂，如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇、纤维素、淀粉、磷酸钙、磷酸钠、高岭土等。还可以使用粘合剂、缓冲剂和 / 或润滑剂（例如，硬脂酸镁）。片剂和丸剂还可以使用肠溶衣制备。所述组合物可任选地包括增甜剂、增香剂、着色剂、加香剂和防腐剂，以提供更可口的制剂。

[0263] 例如，所述 PDGF 和 VEGF 拮抗剂可以通过玻璃体内注射进行眼内施用，进入眼，以及进行结膜下和 subtenon 注射。其他施用途径包括经巩膜、眼球后、腹膜内、肌内和静脉内。另外，拮抗剂的组合可以使用药物递送装置或眼内植入物递送（参见下文）。

[0264] 用于口服施用的液体剂量形式包括可以药用的乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和软的胶囊。这些形式包括本领域常用的惰性稀释剂，如水或油介质，并且还可以包括佐剂，如湿润剂、乳化剂和悬浮剂。

[0265] 在某些场合下，PDGF 和 VEGF 拮抗剂的组合还可以局部施用，例如，通过贴剂或通过直接施用于区域，如容易患或患有新血管疾病的表皮或眼，或通过离子电渗疗法。

[0266] 用于眼使用的与无毒的可以药用的赋形剂混合的制剂包括含有活性成分

所述赋形剂可以是,例如,惰性稀释剂或填料(例如,蔗糖和山梨糖醇)、润滑剂、助流剂和抗结合剂(例如,硬脂酸镁、硬脂酸锌、硬脂酸、二氧化硅、氢化植物油或滑石)。

[0267] 所述 PDGF 和 VEGF 拮抗剂可以在片剂或其他媒介物中混合,或者可以分隔。在一种例子中,第一种拮抗剂包含在片剂的内侧,而第二种拮抗剂在外侧,从而第二种拮抗剂的大部分是在第一种拮抗剂释放之前释放的。如果需要的话,片剂形式的拮抗剂可以使用药用递送装置递送(参见下文)。

[0268] 一般,每一种拮抗剂的使用量应当足以抑制或减弱或消除新血管疾病的有害作用或症状。与载体材料混合以生产单一剂量的活性拮抗剂成分的用量可以根据要治疗的受试者和特定的施用模式改变。

[0269] 请求保护的组合的每一种拮抗剂的剂量取决于若干因素,包括状况的严重性,所述状况是要治疗的还是要预防的,以及接受治疗的人的年龄、体重和健康。另外,有关特定患者的药物基因组学(pharmacogenomic)(基因型对治疗的药物代谢动力学、药物动力学或效力特征的影响)信息可能影响使用的剂量。另外,本领域技术人员可以理解能够根据多种因素稍微调整确切的单一剂量,所述因素包括要施用的特定的 PDGF 和 VEGF 拮抗剂的组合、施用时间、施用途径、制剂的性质、排泄速度、要治疗的特定的新血管疾病、疾病的严重性以及新血管疾病的解剖学位置(例如,眼相对体腔)。考虑到多种施用途径的不同的效力,预计需要的剂量有较大的波动。例如,一般,预计口服施用需要比通过静脉内或玻璃体内注射施用更高的剂量水平。可以通过标准经验的最优化途径调整所述剂量水平的变化,所述途径为本领域所熟知。确切的治疗有效剂量水平和模式通常是通过主治医师,如眼科医生考虑上述因素确定的。

[0270] 一般,在给人口服施用时,所述 PDGF 拮抗剂或 VEGF 拮抗剂的剂量通常在大约 0.001mg- 大约 200mg/天范围内,理想地为大约 1mg-100mg/天,更理想地为大约 5mg- 大约 50mg/天。最高达大约 200mg/天的剂量可能是必要的。为了通过注射施用所述 PDGF 拮抗剂或 VEGF 拮抗剂,所述剂量通常大约为 0.1mg- 大约 250mg/天,理想地为大约 1mg- 大约 20mg/天,或大约 3mg- 大约 5mg/天。注射可以每天进行最多约四次。一般,在通过肠胃外途径或全身地给人施用时,与所述 PDGF 拮抗剂组合使用的 VEGF 拮抗剂的剂量通常为大约 0.1mg- 大约 1500mg/天,或大约 0.5mg- 大约 10mg/天,或大约 0.5mg- 大约 5mg/天。最高达大约 3000mg/天的剂量可能是必要的。

[0271] 在给人眼施用时,与所述 PDGF 拮抗剂组合使用的 VEGF 拮抗剂的剂量通常为大约 0.15mg- 大约 3.0mg/天,或大约 0.3mg- 大约 3.0mg/天,或大约 0.1mg-1.0mg/天。

[0272] 例如,为了眼的使用,PDGF-B 和 VEGF-A 适体药物物质是在 pH 5-7 的磷酸缓冲盐水中配制的。可以添加氢氧化钠或盐酸进行 pH 调节。在一种工作制剂中,PDGF-B 适体和 VEGF-A 适体,如 EYE001 是以三种不同的浓度单独配制的:3mg/100 μ l, 2mg/100 μ l 和 1mg/100 μ l, 包装在装有无菌的 27 号针头的无菌的 1ml, USP I 型等级玻璃注射器中。药物产品的组合是不含防腐剂的,并且只可用于玻璃体内一次注射使用。所述活性成分是 PDGF-B 和 VEGF-A 药物物质,浓度为 30mg/ml, 20mg/ml 和 10mg/ml。所述赋形剂是氯化钠, USP; 磷酸二氢钠, 一水合物, USP; 磷酸氢二钠, 七水合物, USP; 氢氧化钠, USP; 盐酸, USP; 和注射用水, USP。这种形式下,所述 PDGF-B 和 VEGF-A 适体药物产物是可直接使用的无菌溶液形式的,它是在一次性使用的玻璃注射器中提供的。在使用之前至少 30 分钟(不过不超

过 4 小时) 将注射器从冷藏中取出, 以使溶液达到室温。注射器内容物的施用, 涉及将带螺纹的塑料柱塞杆连接在注射器筒内的橡胶塞子。然后取出所述橡胶端帽, 以施用所述产品。PDGF-B 和 VEGF-A 适体是以 100 μ l 的玻璃体内注射液形式施用的, 施用三次, 间隔 28 天。患者每次就诊接受 3mg/ 注射。如果必要, 将剂量降低到 2mg 或 1mg, 并进一步到 0.1mg。

[0273] 所施用的药物的具体量取决于成分的具体组合。在需要的剂量组合中, PDGF 拮抗剂与 VEGF 拮抗剂的重量比为大约 50 : 1, 大约 20 : 1, 大约 10 : 1, 或大约 4 : 1, 大约 2 : 1, 或大约 1 : 1。

[0274] 有用的组合治疗包括 PDGF-B 适体拮抗剂和 VEGF-A 适体拮抗剂。所述拮抗剂是以所述 PDGF-B 适体拮抗剂与 VEGF-A 适体拮抗剂的重量比为从大约 0.1 比大约 5.0 至大约 5.0 比 0.1 组合使用的。这两种拮抗剂 (PDGF-B 与 VEGF-A 拮抗剂) 的有用范围为从大约 0.5 至大约 2.0, 或从大约 2.0 至 0.5, 不过, 另一种有用的比例为从大约 1.0 至大约 1.0, 最终取决于所述 PDGF-B 适体拮抗剂和 VEGF-A 适体拮抗剂的选择。

[0275] 在组合治疗中每一种药物的施用可独立地为每天 1-4 次, 施用一天至一年时间, 并且甚至可以使患者终生施用。慢性的、长期施用在很多情况下需要指出。所述剂量可以作为单剂施用或者分成多剂。一般, 需要的剂量应当以设定的间隔时间施用较长时间, 通常至少用几周时间, 尽管几个月或更长的施用时间可能是必要的。

[0276] 除了治疗以前存在的新血管疾病之外, 包括 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂的组合治疗可以预防性地进行施用, 以预防或延缓所述疾病的发作。在预防性应用中, 给易患或另外有风险患特定新血管疾病的患者施用所述 PDGF 和 VEGF 拮抗剂。另外, 施用的确切时间选择和施用的量取决于多种因素, 如患者的健康状态、体重等。

[0277] 在一种工作实例中, 给需要用它治疗的哺乳动物施用所述 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂的组合, 通常以可以注射的药用组合物形式施用。在所述组合方面, 例如, PDGF-B 适体和 VEGF-A 适体可以单独施用或者以包括这两种成分的药用组合物形式施用。一般, 优选的是, 所述施用可以通过注射或通过使用药物递送装置进行。肠胃外、全身性或经皮施用也是可以接受的。

[0278] 如上文所讨论的, 当所述 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂同时施用时, 所述施用可以是在时间上依次进行的或者同时进行的, 依次施用的方法是一种施用模式。当所述 PDGF 和 VEGF 拮抗剂依次施用时, 每一种成分的施用可以通过相同或不同的方法进行。不过, 对于依次施用来说, 可以使用以下方法: 在大约五秒钟时间内施用所述 PDGF 拮抗剂 (最多达大约三次注射), 然后每六周时间持续施用 VEGF 拮抗剂, 最多达每年注射大约九次。所述 PDGF 拮抗剂可以在每一次 VEGF 拮抗剂注射的同时施用, 或者可以使用的次数更少, 这由医生决定。依次施用还包括组合, 其中, 单独的拮抗剂可以以不同次数施用, 或者通过不同的途径施用, 或者为上述两者, 但它们组合起作用以提供有利的效果, 例如, 抑制新血管疾病。还要指出的是, 通过注射施用是特别有用的。

[0279] 可以将本发明的药用组合物配制成基本上在施用之后马上或者在施用之后任何预定时间段释放活性 PDGF 和 VEGF 拮抗剂, 其中使用控释制剂。例如, 包括 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂中的至少一种的药用组合物能够以持续释放组合物的形式提供。马上或持续释放组合物的使用取决于要治疗的状况的性质。如果所述状况由急性或超急性疾病组成的话, 一般用马上释放形式进行治疗优于长时间释放组合物。对某些预防性或长期治疗来说,

持续释放组合物也可能是合适的。

[0280] 在控释制剂中施用每一种拮抗剂是有用的,其中,所述拮抗剂单独或组合具有 (i) 窄的治疗指数(例如,导致有害副作用或毒性反应的血浆浓度和导致治疗效果的血浆浓度之间的差异较小;一般,治疗指数 TI 被定义为半致死剂量 (LD_{50}) 与半有效剂量 (ED_{50}) 的比例);(ii) 在胃肠道中的窄的吸收窗口;或 (iii) 短的生物学半衰期,从而在一天内需要经常服药,以便将血浆水平维持在治疗水平上。

[0281] 可以采用多种策略获得控释,其中,释放速度超过了治疗性拮抗剂的降解或代谢速度。例如,控释可以通过适当选择制剂参数和成分获得,包括例如,合适的控释组合物和包衣。其例子包括单一或多个单位片剂或胶囊组合物、油溶液、悬浮液、乳剂、微型胶囊剂、小球体、纳米颗粒 (nanoparticle)、贴剂和脂质体。用于制备所述持续释放或控释制剂的方法为本领域所熟知。

[0282] 包括 PDGF 拮抗剂和 / 或 VEGF 拮抗剂或这两者的药用组合物还可以使用药物递送装置,如植入物递送。所述植入物可以是生物可降解的或生物相容性植入物,或者可以是不能生物降解的植入物。所述植入物可以是活性剂能够渗透或不能渗透的。眼用药物递送装置可以插入眼的腔室,如前部或后部腔室,或者在巩膜、脉络膜间隙或者玻璃体外部的无血管区之中或之上植入。在一种实施方案中,所述植入物可以放置在没有血管部位上面,如巩膜上,从而能够进行药物的经巩膜扩散,使药物到达需要的部位,例如,眼内间隙和眼的黄斑。另外,经巩膜扩散的部位可以靠近新生血管形成部位,如接近黄斑的部位。

[0283] 如上文所述,本发明涉及将独立的药用组合物组合在药物包中。因此,本发明的组合是以药物包的成分形式提供的。可以将至少两种拮抗剂配制在一起,或者单独配制,并且以独立的剂量使用。本发明的拮抗剂在以盐的形式制备时也是有用的。

[0284] 一般,所述药物包包括 (1) 一定量的 PDGF 拮抗剂,和可以药用的载体、媒介物或稀释剂,它在第一种单位剂量形式中;(2) 一定量的 VEGF 拮抗剂,和可以药用的载体、媒介物或稀释剂,它在第二种单位剂量形式中;和 (3) 容器。所述容器可用于分隔成分,并且可以包括,例如,分隔开的瓶子或分隔开的箔包装。如果需要,所述独立的拮抗剂组合物还可以容纳在单一的、未分开的容器中。所述药物包还可以包括施用独立的 PDGF 和 VEGF 拮抗剂的指南。当独立的成分是以不同的剂量形式施用时,以不同的剂量水平施用的,或者需要由处方医生决定所述组合的单独成分的效价时,所述药物包是特别有利的。在一种实施方案中,将所述药物包设计成每次分配一个所述 PDGF 和 VEGF 拮抗剂的剂量,以用于它们预期的用途。在另一种例子中,将药物包设计成包括在包装中并排放置的一排 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂,通过包装上的说明告知用户要施用的一对拮抗剂。一种示例性的药物包是所谓的气泡 (blister) 包装,这种包装为药物包装工业所熟知。

[0285] 效力

[0286] 新血管疾病的抑制是通过任何可接受的测量血管生成是否延缓或减弱的方法评估的。这包括直接观察和间接评估,如通过评估主观症状或客观生理学指标。例如,治疗效力,可以根据新生血管形成、微血管病、血管泄漏或血管水肿或它们的任何组合的预防或恢复评估。用于评估眼新血管疾病的抑制作用的治疗效力还可以以稳定或改善视敏度的形式确定。

[0287] 在确定特定组合治疗在治疗或预防眼新血管疾病时的效力时,还可以由眼科医生

在注射之后几天以及紧在下一次注射前的至少一个月后对患者进行临床评估。还可以根据眼科医生的要求在前四个月每个月一次地进行 ETDRS 视敏度、柯达彩色胶片照相术和荧光素血管造影术。

[0288] 例如,为了评估 PDGF 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂组合治疗眼新生血管形成的效力,进行的研究涉及施用一次或多次的玻璃体内注射 PDGF-B 适体与 VEGF-A 适体的组合(例如, EYE001 的 PEG 化的形式),用于患有对于年龄相关性黄斑变性继发的凹窝下(subfoveal)脉络膜新生血管形成的患者,其按照眼科学领域所熟知的标准方法进行。在一种工作研究中,患有对于年龄相关性黄斑变性(AMD)继发的凹窝下脉络膜新生血管形成(CNV)的患者接受 PDGF-B 适体和 VEGF-A 适体的一次玻璃体内注射。监控所述组合的效力,例如,通过眼科评估。在治疗之后三个月患者表现出稳定的或改善的视力,例如,在 ETDRS 图表上表现出视力的 3-线或更多改善被认为接受了有效剂量的 PDGF-B 适体和 VEGF-A 适体的组合,该剂量能抑制眼新生血管疾病。

[0289] 在工作研究例子中,患有对于年龄相关性黄斑变性继发的凹窝下 CNV 并且在 ETDRS 图表上视敏度低于 20/200 的患者接受 PDGF-B 适体和 VEGF-A 适体的一次玻璃体内注射。起始剂量为每次在玻璃体内注射 0.25mg 的每一种拮抗剂。还实验了每一种拮抗剂的 0.5mg、1.2mg 和 3mg 的剂量。还通过眼底照相和荧光素血管造影术进行了全面的眼科检查。组合的药物产品是可直接使用的无菌溶液,它由溶解在 10mM 磷酸钠和 0.9%氯化钠缓冲液注射液中的所述 PDGF-B 适体和 VEGF-A 适体组成,所述注射液处于无菌的、无致热原的 1cc 玻璃注射器筒中,将包衣的塞子连接在塑料柱塞上,并且将橡胶端盖连接在预先连接的 27 号针头上。所述 PDGF-B 和 VEGF-A 适体是以每一种适体 1mg/ml、2.5mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、20mg/ml 或 30mg/ml 的药物浓度提供的(用寡核苷酸含量表示),以提供 100 μ l 的送递体积。在注射所述 PDGF-B 和 VEGF-A 适体之后大约 3 个月,进行敏度研究,以便评估治疗效果。在治疗之后,患者表现出稳定的或改善的视力,例如,在 ETDRS 图表上表现出 3-线或以上的视力增加的患者被认为接受了有效剂量的组合的 PDGF-B 和 VEGF-A 适体,它们抑制眼新生血管疾病。

实施例

[0290] 以下实施例说明了制备和实施本发明的某些方式,但是,并不意味着限定本发明的范围,因为可以用其他方法获得类似结果。

[0291] 实施例 1:角膜新生血管形成(角膜 NV)

[0292] 角膜新生血管形成是广泛使用的动物模型,它允许明确显现眼中的异常血管生长。生长成正常无血管角膜的血管可以很好地建立,使它成为研究血管退化的有吸引力的模型。为了诱导实验角膜 NV,通过肌肉施用盐酸氯胺酮(25mg/kg)和甲苯噻嗪(10mg/kg)对雄性 C57BL/6 小鼠(18-20g;Charles River, Wilmington, MA)进行麻醉。局部施用 NaOH(2 μ l, 0.2mM)。通过使用 #21 刀片(Feather, Osaka, 日本)施加平行于角膜缘的旋转运动,取出角膜和角膜缘上皮。7 天之后,通过每天两次腹膜内注射 25mg/kg 的 pegaptanib sodium(Macugen™(Eyetechnopharmaceuticals, New York, NY), 抗-VEGF 适体试剂,又被称作 EYE001),或通过每天两次管饲法口服施用 50mg/kg 的 **Gleevec®/STI57**((又被称作 CGP57148B), 2-苯基氨基嘧啶-相关的酪氨酸激酶-抑制性抗-PDGF 剂,购自 Novartis

Pharma AG, Basel, 瑞士) 或这两者, 共处理小鼠 7 天时间。在角膜 NV 诱导之后 14 天, 使小鼠静脉内接受 $20 \mu\text{g/g}$ 的异硫氰酸荧光素偶联的伴刀豆凝集素 A 凝集素 (Vector Laboratories, Burlingame, CA), 同时用盐酸甲苯噻嗪和盐酸氯胺酮进行深度麻醉。30 分钟之后, 摘出小鼠眼, 并且对角膜进行扁平封固 (flat-mounted)。通过荧光显微镜术显现角膜 NV, 并且使用 Openlab 软件定量。由血管覆盖的角膜的百分比是以角膜总面积的百分比形式计算的。

[0293] 研究了在应用 NaOH 之后 pegaptanib sodium 和 Gleevec 对角膜新生血管形成的影响, 以及对角膜缘和角膜上皮的损伤。与未处理过的和 Gleevec 处理的眼相比, 用 pegaptanib sodium (Macugen) 处理过的动物表现出血管生长的 19.6% 的降低 ($p = 0.0014$) (图 5)。与对照和用 Gleevec 单独处理的动物相比, 用 pegaptanib sodium 和 Gleevec (Mac+Glee) 处理的动物在角膜上表现出新血管生长的显著减弱 ($35.6\% p < 0.0001$) (图 5)。在减弱血管生长方面, 组合治疗同样比 pegaptanib sodium (Macugen) 单独治疗更有效 ($16\% p < 0.0145$)。

[0294] 在图 6 和 7 中还示出了代表性的角膜新生血管形成实验的结果。图 6(D) 是荧光显微镜图像的照片图示, 表明与用 Macugen (图 6(C)) 或 Gleevec (图 6(B)) 处理的个体相比, 组合 (Mac+Gleevec)-处理的角膜表现出新血管形成的有效抑制。图 6(A) 是荧光显微镜图像的照片图示, 示出了在对照 (PEG-处理的) 角膜上新血管形成的程度。图 7 是荧光显微镜图像的照片图示, 表示单独 (图 7(A) (APB5-处理的) 和图 7(B) (Gleevec-处理的)) 和组合处理 (图 7(C)) 只能抑制新血管生长, 而不能影响形成的血管。图 7(D) 是荧光显微镜图像的照片图示, 示出了在对照 (PEG-处理的) 角膜上新血管形成的程度。

[0295] 实施例 2: 脉络膜新生血管形成 (CNV)

[0296] 实验 CNV 通常被用作年龄相关性黄斑变性 (AMD) 的模型。在该模型中, 脉络膜的血管生长突破玻璃膜, 并且进入视网膜, 与 AMD 患者体内观察到的类似。为了诱导实验 CNV, 通过肌肉施用盐酸氯胺酮 (25mg/kg) 和甲苯噻嗪 (10mg/kg) 对雄性 C57BL/6 小鼠 ($18\text{--}20\text{g}$; Charles River, Wilmington, MA) 进行麻醉, 并且用 1% 托品酰胺扩张瞳孔。使用二极管激光凝固 ($75\text{--}\mu\text{m}$ 斑点大小, 0.1-- 秒持续时间, 90mW , Oculight SL laser, IRIDEX, Mountain View, CA) 和作为接触透镜的手持式盖玻片产生四个灼伤。灼伤位于视网膜后极的 3、6、9 和 12 点钟的位置。在激光时产生的气泡, 表明了玻璃膜的破裂, 它是获得脉络膜新生血管形成的重要因素, 因此, 仅将在所有四个灼伤上都产生气泡的小鼠用在本研究中。7 天之后, 通过每天两次腹膜内注射 25mg/kg 的 pegaptanib sodium 或通过每天两次管饲 50mg/kg 的 **Gleevec®/STI57** (Novartis Pharma AG, Basel, 瑞士) 或同时进行这两者来处理小鼠 7 天时间。在使用 APB5 (抗-小鼠 PDGFRb (CD140b) 抗体 (抗-PDGF 剂), 购自 eBioscience, San Diego, CA) 的实验中, 通过腹膜内注射每天两次施用 5mg/kg 抗体, 在用 PECAM 染色的扁平封固的脉络膜中测量脉络膜 NV 损伤的面积。通过荧光显微镜术检查扁平封固, 并且通过 Openlab 软件定量。

[0297] 与未处理过的对照相比, 用 pegaptanib sodium (Macugen™) 处理的眼表现出 CNV 面积降低了 24% ($p = 0.007$) (图 8)。相反, APB5-处理的眼与对照相比没有明显的差别 (与对照相比 CNV 面积减少了 6.5%)。与对照眼或用 pegaptanib sodium ($22\% p = 0.011$) 或 APB5 ($39.5\% p < 0.0001$) 单独处理的眼相比, 用 pegaptanib sodium 和 APB5 二者处理

的眼表现出 CNV 面积的明显减少 (46% $p = 0.001$) (图 8)。

[0298] 在使用 PDGFR β 抑制剂时,观察到了类似的倾向。**Gleevec®**处理的眼与对照眼相比没有表现出显著差别 (4.2%) (图 9)。不过,用 pegaptanib sodium (Macugen™) 处理的眼的 CNV 面积与对照明显不同 (少 27%, $p = 0.0034$)。重要的是,用 pegaptanib sodium 和 Gleevec 处理过的动物 (Macugen+Gleevec) 与对照眼相比表现出最小量的 CNV (46% $p < 0.0001$),且与 pegaptanib sodium 单独处理的眼相比表现出 CNV 面积减少了 19% ($p = 0.0407$) (图 9)。

[0299] 实施例 3:新生小鼠模型

[0300] 研究了施用 pegaptanib sodium (Macugen™) 和 ARC-127 (Archemix Corp., Cambridge, MA),即具有序列 CAGGCUACGNCGTAGAGCAU CANTGATCCU GT (SEQ ID NO:20) (参见来自 U. S. 6, 582, 918 的 SEQ ID NO:146,所述文献被以全文形式收作本文参考) 的 PEG 化的抗 -PDGF 适体或这两者对视网膜血管发育的影响,所述序列在 6、20 和 30 号位置上具有 2' - 氟 -2' - 脱氧尿苷,在 8、21、28 和 29 号位置上具有 2' - 氟 -2' - 脱氧胞苷,在 9、15、17 和 31 号位置上具有 2' -O- 甲基 -2' - 脱氧鸟苷,在 22 号位置上具有 2' -O- 甲基 -2' - 脱氧腺苷,在 10 和 23 号位置的“N”上具有六甘醇亚磷酸胺,并且在 32 号位置上具有颠倒方向的 T (即,3' -3' - 连接的)。新生的 C57BL/6 小鼠每天一次注射 (腹腔腔内) 100 μ g 的 ARC-127 或 100 μ g 的 Macugen 或这两者,在出生后当天 0 (P0) 开始。在 P4 摘出小鼠眼。在扁平封固的视网膜上显现视网膜脉管系统,其通过用 PECAM 和 NG-2 免疫染色,或者通过用 ConA-FITC 灌注,并且通过荧光显微镜术分析实现。

[0301] 注射 ARC-127,能完全阻断壁细胞被招募用于发育视网膜的血管。另外,与对照未 - 处理的视网膜相比,在 P4 观察到了较少的血管生长。相反,Macugen 不会干扰正常的血管发育。不过,与单独使用 ARC-127 处理的小鼠相比,用 Macugen 和 ARC-127 两者处理的小鼠表现出类似的,但是明显更严重的缺陷。

[0302] 在图 10 中示出的结果表明,Macugen 对发育中的视网膜的血管没有影响。PDGFR-B 拮抗剂 ARC-127 能影响血管长出和形态学。不过,Macugen 与 ARC-127 组合,比它们单独对血管的影响更严重。

[0303] 实施例 4:用抗 -PDGF 适体和抗 -VEGF 抗体的组合治疗

[0304] 在本实施例中,用上述角膜新生血管形成模型,用抗 -PDGF 适体和抗 -VEGF 抗体证实了组合治疗的效力。为了诱导实验角膜 NV,通过肌内施用盐酸氯胺酮 (25mg/kg) 和甲苯噻嗪 (10mg/kg) 对雄性 C57BL/6 小鼠 (18-20g; Charles River, Wilmington, MA) 进行麻醉。局部应用 NaOH (2 μ l, 0.2mM)。通过使用 #21 刀片 (Feather, Osaka, 日本) 施加平行于角膜缘的旋转运动取出角膜和角膜缘上皮。7 天之后,通过腹膜内注射 25mg/kg 具有以下结构 40kdPEG-5' -CAGGCTACGCGTAG-AGCATCATGATCCTG (iT)-3' (SEQ ID NO:21) 的抗 -PDGF 适体 (其中, iT 表示最后的核苷酸是沿反方向的 (3' -3' 连接的)) 和描述于 U. S. 6, 342, 221 (被收作本文参考) 中的 100 μ g 的抗 -VEGF 抗体 2C3 组合处理所述小鼠。在角膜 NV 诱导之后 14 天,小鼠静脉内接受 20 μ g/g 的异硫氰酸荧光素偶联的伴刀豆凝集素 A 凝集素 (Vector Laboratories, Burlingame, CA),同时用盐酸甲苯噻嗪和盐酸氯胺酮深度麻醉。30 分钟之后,摘出小鼠眼,并且对角膜进行扁平封固。通过荧光显微镜术观察角膜 NV,并且通过 Openlab 软件定量。由血管覆盖的角膜的百分比是作为总角膜面积的百分

比计算的。结果表明,组合治疗的效力优于用抗 -PDGF 适体或抗 -VEGF 抗体单独治疗的结果。

[0305] 在单独实验中,检验了两种相关的抗 -PDGF 适体与 U. S. 6, 342, 221 中所描述的 100 μ g 的抗 -VEGF 抗体 2C3 组合的效果。检验了 PEG 化的和未 -PEG 化的的形式的以下两种抗 -PDGF 适体:

[0306] (i) CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT (SEQ ID NO:20) (参见 U. S. 6, 582, 918 的 SEQ ID NO:146, 所述文献被以全文形式收作本文参考), 其在 6、20 和 30 号位置上具有 2' - 氟 -2' - 脱氧尿苷, 在 8、21、28 和 29 号位置上具有 2' - 氟 -2' - 脱氧胞苷, 在 9、15、17 和 31 号位置上具有 2' -O- 甲基 -2' - 脱氧鸟苷, 在 22 号位置上具有 2' -O- 甲基 -2' - 脱氧腺苷, 在 10 和 23 号位置的“N”上具有六甘醇亚磷酰胺, 并且在 32 号位置上具有颠倒方向的 T (即, 3' -3' - 连接的); 和

[0307] (ii) CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT (SEQ ID NO:22) (参见 U. S. 5, 723, 594 的 SEQ ID NO:87, 所述文献被以全文形式收作本文参考), 其在 8 号位置的 C 上具有 O- 甲基 -2- 脱氧胞苷, 在 9、17 和 31 号位置的 Gs 上具有 2-O- 甲基 -2- 脱氧鸟苷, 在 22 号位置的 A 上具有 2-O- 甲基 -2- 脱氧腺嘌呤, 在 30 号位置上具有 2-O- 甲基 -2- 脱氧尿苷, 在 6 和 20 号位置的 U 上具有 2- 氟 -2- 脱氧尿苷, 在 21、28 和 29 号位置的 C 上具有 2- 氟 -2- 脱氧胞苷, 在 10 和 23 号位置的 N 上具有五甘醇 (pentaethylene glycol) 亚磷酰胺间隔基, 并且在 32 号位置上具有颠倒方向的 T (即, 3' -3' - 连接的)。提供适当的对照, 以便检测与单独的抗 -PDGF 适体或抗 -VEGF 抗体的治疗相比, 组合治疗的改善了抗新血管作用。以上结果证实了组合治疗的效力好于单独使用抗 -PDGF 适体或抗 -VEGF 抗体的治疗的效力。

[0308] 实施例 5: 抗 -PDGF 适体和抗 -VEGF 适体的组合能阻断脉络膜新生血管形成 (CNV)

[0309] 在本实施例中, 利用上述脉络膜新生血管形成模型证实了用抗 -PDGF 适体和抗 -VEGF 适体在阻断脉络膜新生血管形成方面的组合治疗效力。实验性的 CNV 通常被用作年龄相关性黄斑变性 (AMD) 的模型。在该模型中, 脉络膜的血管生长突破玻璃膜, 并且进入视网膜, 与在 AMD 患者中观察到的类似, 为了诱导实验 CNV, 通过肌肉施用盐酸氯胺酮 (25mg/kg) 和甲苯噻嗪 (10mg/kg) 对雄性 C57BL/6 小鼠 (18-20g; Charles River, Wilmington, MA) 进行麻醉, 并且用 1% 托品酰胺扩张瞳孔。使用二极管激光凝固 (75- μ m 斑点大小, 0.1-秒持续时间, 90mW, Oculight SL laser, IRIDEX, Mountain View, CA) 和作为接触透镜的手持式盖玻片产生四个灼伤。所述灼伤位于视网膜后极的 3、6、9 和 12 点钟的位置上。在激光时产生气泡, 表明了玻璃膜的破裂, 它是获得脉络膜新生血管形成的重要因素, 因此, 仅将在所有四个灼伤都产生了气泡的小鼠用于本研究。7 天之后, 通过每天两次腹膜内注射 25mg/kg 的 pegaptanib sodium 处理小鼠。在使用抗 -PDGF 适体的实验中, 将具有以下结构 40kdPEG-5' -CAGGCTACGCGTAGAGCATCATGA-TCCTG(iT)-3' (SEQ ID NO:21) (其中 iT 表示最后的核苷酸是颠倒方向的 (3' -3' 连接的)) 的 25mg/kg 的抗 -PDGF 适体与 pegaptanib sodium 共施用。在用 PECAM 染色的扁平封固的脉络膜中测量脉络膜 NV 损伤的面积。通过荧光显微镜术检查扁平封固, 并且通过 Openlab 软件定量。结果表明, 用组合治疗处理的眼与对照眼或与单独使用 pegaptanib sodium 或抗 -PDGF 适体处理的眼相比表现出明显更小的 CNV 面积。

[0310] 在独立实验中,与抗-VEGF 治疗组合检验了两种相关的抗-PDGF 适体的效果,其通过每天两次腹膜内注射 25mg/kg 的 pegaptanib sodium 实现。实验了 PEG 化的和未-PEG 化的形式的以下两种抗-PDGF 适体:

[0311] (i) CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT (SEQ ID NO:20) (参见 U. S. 6, 582, 918 的 SEQ ID NO:146, 所述文献被以全文形式收作本文参考), 在 6、20 和 30 号位置上具有 2'-氟-2'-脱氧尿苷, 在 8、21、28 和 29 号位置上具有 2'-氟-2'-脱氧胞苷, 在 9、15、17 和 31 号位置上具有 2'-O-甲基-2'-脱氧鸟苷, 在 22 号位置上具有 2'-O-甲基-2'-脱氧腺苷, 在 10 和 23 号位置的“N”上具有六甘醇亚磷酰胺, 并且在 32 号位置上具有颠倒方向的 T (即, 3'-3' 连接的); 和

[0312] (ii) CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT (SEQ ID NO:22) (参见 U. S. 5, 723, 594 的 SEQ ID NO:87, 所述文献被以全文形式收作本文参考), 在 8 号位置的 C 上具有 O-甲基-2-脱氧胞苷, 在 9、17 和 31 号位置的 Gs 上具有 2-O-甲基-2-脱氧鸟苷, 在 22 号位置的 A 上具有 2-O-甲基-2-脱氧腺嘌呤, 在 30 号位置上具有 2-O-甲基-2-脱氧尿苷, 在 6 和 20 号位置的 U 上具有 2-氟-2-脱氧尿苷, 在 21、28 和 29 号位置的 C 上具有 2-氟-2-脱氧胞苷, 在 10 和 23 号位置的 N 上具有五甘醇亚磷酰胺间隔基, 且在 32 号位置上具有颠倒方向的 T (即, 3'-3' 连接的)。提供了合适的对照, 以便检测与单独的抗-PDGF 适体或抗-VEGF 适体治疗相比, 组合治疗具有改善了的抗-新血管作用。结果表明, 组合治疗在阻断脉络膜新生血管形成方面的效力, 好于用抗-PDGF 适体或抗-VEGF 适体单独治疗的效力。

[0313] 实施例 6: 角膜新生血管形成 (角膜 NV) - 退化

[0314] 将实施例 1 的角膜 NV 模型用于研究抗-VEGF 适体和抗-PDGF 适体的组合。10 天之后, 通过每天两次腹膜内注射 25mg/kg 的 pegaptanib sodium (Macugen™, Eyetech Pharmaceuticals, New York, NY), 抗-VEGF 适体试剂) 和 / 或每天一次施用 50mg/kg 的 ARC-127 (Archemix Corp., Cambridge, MA, 抗-PDGF 适体, 具有以下结构 40KdPEG-5'-CAG GCTACGCGTAGAGCATCATGA-TCCTG (iT)-3' (SEQ ID NO:21) (其中 iT 表示最后的核苷酸是颠倒方向的 (3'-3' 连接的)) 处理小鼠 10 天时间。在角膜 NV 诱导之后第 20 天, 摘出眼, 并且对角膜进行扁平封固。使用 CD31 染色 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) 显现角膜 NV, 并且用 Metamorph 软件进行定量。由血管覆盖的角膜的百分比是以角膜总面积的百分比形式计算的。

[0315] 在图 11 和 12 中示出了 pegaptanib sodium 和 / 或 ARC-127 对于在应用 NaOH 之后使角膜新生血管形成退化和对角膜缘和角膜的上皮损伤方面的作用。与第 20 天的对照相比, 用 ARC-127 处理的动物没有表现出血管生长的明显减弱。与第 10 天的对照相比, 第 20 天的对照表现出角膜新生血管形成增加了 12.92%。与第 20 天的对照相比, 单独使用 pegaptanib sodium (Macugen) 处理过的动物表现出血管生长减弱了 13.81% ($p \leq .016$)。与对照相比, 用 pegaptanib sodium 和 ARC-127 处理的动物表现出角膜新血管生长的明显减弱 (26.85%, $p \leq .002$)。

[0316] 实施例 7: 角膜新生血管形成 (角膜 NV) - 退化

[0317] 将实施例 1 的角膜 NV 模型用于研究抗-VEGF 适体和抗所述 PDGFB 受体的抗体的组合。在 14 天后, 通过每天两次腹膜内注射 25mg/kg 的 pegaptanib sodium (Macugen, 抗-VEGF

适体试剂)和/或每天两次通过管饲口服施用 50mg/kg 的 APB5(抗所述 PDGFB 受体的多克隆抗体)处理小鼠 14 天。在角膜 NV 诱导之后第 28 天,小鼠通过静脉内途径接受 20 μ g/g 的异硫氰酸荧光素偶联的伴刀豆凝集素 A 凝集素(Vector Laboratories, Burlingame, CA),同时用盐酸甲苯噻嗪和盐酸氯胺酮进行深度麻醉。30 分钟之后,摘出小鼠眼,并且对角膜进行扁平封固。通过荧光显微镜术显现角膜 NV,并且通过 Openlab 软件定量。由血管覆盖的角膜的百分比是以角膜总面积的百分比形式计算的。

[0318] 在图 13 中示出了 pegaptanib sodium 和/或 APB5 对在应用 NaOH 之后使角膜新生血管形成退化,以及对角膜缘和角膜上皮损伤的影响。与对照相比,用 pegaptanib sodium(Macugen)处理过的动物表现出血管生长减弱了 8.3%。与对照相比,用 pegaptanib sodium 和 APB5 处理的动物在角膜上表现出显著更少的新血管生长(21.4%)。

[0319] 实施例 8:角膜新生血管形成(角膜 NV)-退化(添加治疗剂的顺序)

[0320] 将实施例 1 的角膜 NV 模型用于研究使用抗 -VEGF 适体和抗所述 PDGFB 受体的抗体进行组合治疗的添加顺序的影响。14 天之后,通过每天两次腹膜内注射 25mg/kg 的 pegaptanib sodium(Macugen,抗 -VEGF 适体试剂)和/或通过每天两次管饲口服施用 50mg/kg 的 APB5(eBioscience, San Diego, CA),即抗所述 PDGFB 受体的多克隆抗体,在不同的时间点处理小鼠 7 天时间。在角膜 NV 诱导之后第 28 天,小鼠通过静脉内途径接受 20 μ g/g 的异硫氰酸荧光素偶联的伴刀豆凝集素 A 凝集素(Vector Laboratories, Burlingame, CA),同时用盐酸甲苯噻嗪和盐酸氯胺酮深度麻醉。30 分钟之后,摘出小鼠眼,并且对角膜进行扁平封固。通过荧光显微镜术显现角膜 NV,并且通过 Openlab 软件定量。由血管覆盖的角膜的百分比是以角膜总面积的百分比形式计算的,并且结果如图 14 所示。

[0321] 与对照相比,在应用 NaOH 之后对角膜新生血管形成的退化和对角膜缘和角膜上皮的损伤方面,在第 21-28 天单独使用 pegaptanib sodium 或在第 14-21 天单独使用 APB5 随后不进行处理的作用具有很小的影响。与对照相比,从第 14-21 天用 APB5 处理,以及从 21-28 天用 pegaptanib sodium 处理的动物在角膜上表现出更少的新血管生长(13.4%)。

[0322] 等同方案

[0323] 在不超出本发明的范围和精神的前提下,对本发明上述方法和体系所进行的各种修饰和改变对本领域技术人员来说是显而易见的。尽管业已结合特定的理想实施方案对本发明进行了说明,但应当理解的是,所请求保护的发明不应当过分局限于所述具体实施方案。本领域技术人员可以理解或者能够在只进行常规实验的情况下确定,本文所描述的本发明的具体实施方案的许多等同方案。所述等同方案意在包括在本发明的范围内。

[0001]

序列表

<110> EYETECH PHARMACEUTICALS, INC.

<120> 用于治疗眼新血管疾病的组合治疗

<130> EYE-013PCT

<140> PCT/US04/027612

<141> 2004-08-26

<150> 60/556, 837

<151> 2004-03-26

<150> 60/498, 407

<151> 2003-08-27

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 2137

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

ccctgctgc ctccctgcgc acccgcagcc tccccctgt cctccctagg gctcccctcc 60
ggccgccagc gccatTTTT cattccctag atagagatac ttTgcgcga cacacataca 120
tacgcgcgca aaaaggaaaa aaaaaaaaaa aagcccacc tccagcctcg ctgcaaagag 180
aaaaccggag cagccgcagc tcgagctcg cageccgeag cccgcagagg acgcccagag 240
cggcgagcgg gcgggcagac ggaccgacgg actcgcgccg cgtccacctg tcggccgggc 300
ccagccgagc gcgcagcggg cacgccgcgc gcgcggagca gccgtgcccg ccgcccgggc 360
ccgccgccag ggcgcacacg ctcccgcgcc cctaccggc ccgggcggga gtttgacct 420
ctccctgcc gggtgctcga gctgccgtt caaagccaac ttTgaaaaa gtttttggg 480
ggagacttgg gccttgaggt gcccagctcc gcgcttccg attttggggg ctttccaga 540
aaatgttgca aaaagctaa gccggcgggc agaggaaaac gcctgtagcc ggcgagtga 600
gacgaaccat cgactgccgt gttccttTt ctcttgagg ttggagtccc ctgggcgcc 660
ccacacggct agacgcctcg gctggttcg gacgcagccc cccggccgtg gatgctgca 720
tcgggctcgg gatccgcca ggtagcggcc tcggaccag gtcctgcgcc caggctctcc 780
ctgcccccc agcgacggag ccggggccgg gggcggcggc gccgggggca tcggggtgag 840
ccgcggctgc agaggcctga gcgcctgatc gccgcggacc cgagccgagc ccacccccct 900
ccccagccc ccaccctg gcggggggcg gcgcctcga tctacgctt cggggccccg 960
cggggccggg cccggagtgc gcatgaatc ctgctgggcg ctcttctgt ctctctgctg 1020

```

[0002]

```

ctacctgcgt ctggtcagcg ccgaggggga cccattccc gaggagcttt atgagatgct 1080
gagtgaccac tcgatccgct cctttgatga tctccaacgc ctgctgcacg gagaccccg 1140
agaggaagat ggggccgagt tggacctgaa catgaccgcg tcccactctg gaggcgagct 1200
ggagagcttg gctcgtgaa gaaggagcct gggttccctg accattgctg agccggccat 1260
gatcgccgag tgcaagacgc gcaccgaggt gttcgagatc tccggcgcc tcatagaccg 1320
caccaacgcc aacttctggt tgtggccgcc ctgtgtggag gtgcagcgct gctccggctg 1380
ctgcaacaac cgcaacgtgc agtgccgcc caccaggtg cagctgcgac ctgtccaggt 1440
gagaaagatc gagattgtgc ggaagaagcc aatctttaag aaggccacgg tgacgctgga 1500
agaccacctg gcatgcaagt gtgagacagt ggcagctgca cggcctgtga cccgaagccc 1560
ggggggttcc caggagcagc gagccaaaac gccccaaact cgggtgacca ttcggacggt 1620
gcgagtccgc cggccccca agggcaagca ccgaaattc aagcacacgc atgacaagac 1680
ggcactgaag gagacccttg gaccctaggg gcatcggcag gagagtgtgt gggcagggtt 1740
athtaatatg gtatttgctg tattgcccc atggggcctt ggagtagata atattgtttc 1800
cctcgctcgt ctgtctgat gcctgattcg gacggccaat ggtgcctccc ccaccctcc 1860
acgtgtccgt ccacccttcc atcagcgggt ctctcccag cggcctccgg ctcttgcca 1920
gcagctcaag aagaaaaaga aggactgaac tccatgcca tcttcttccc ttaactcaa 1980
gaacttggga taagagtgtg agagagactg atggggtcgc tctttggggg aaacgggttc 2040
ctcccctgc acctggcctg ggccacacct gacgctgtg gactgtcctg aggagcctg 2100
aggacctctc agcatagcct gcctgatccc tgaaccc 2137

```

<210> 2

<211> 241

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met
20 25 30

Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu
35 40 45

His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met
50 55 60

Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg
65 70 75 80

Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu
85 90 95

[0003]

Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp
 100 105 110

Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln
 115 120 125

Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr
 130 135 140

Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg
 145 150 155 160

Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu
 165 170 175

Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser
 180 185 190

Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val
 195 200 205

Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg
 210 215 220

Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly
 225 230 235 240

Ala

<210> 3

<211> 1723

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

tgcggaggc ttggggcagc cgggtagctc ggaggctcgtg gcgctggggg ctagcaccag 60
 cgctctgtcg ggaggcgcag cggttaggctg gaccggctcag cggactcacc ggccagggcg 120
 ctcggtgctg gaatttgata ttcattgatc cgggttttat cctcttctt tttctttaa 180
 ctttttttt taaaactgta ttgtttctcg ttttaattta tttttgcttg ccattcccca 240
 cttgaatcgg gccgacgct tggggagatt gctctacttc cccaaatcac tgtggatttt 300
 ggaaaccagc agaaagagga aagaggtagc aagagctcca gagagaagtc gaggaagaga 360

[0004]

gagacggggt cagagagagc gcgcgggctg gcgagcagcg aaagcgacag gggcaaagtg 420
agtgacctgc ttttgggggt gaccgccgga gcgcggcgtg agccctcccc cttgggatcc 480
cgcagctgac cagtcgcgct gacggacaga cagacagaca ccgccccag cccagctac 540
cacctctccc ccggccggcg gcggacagtg gacgcggcgg cgagcccgcg gcagggggcg 600
gagccccgcg ccggaggcgg ggtggagggg gtcggggctc gcggcgctcg actgaaactt 660
ttcgtccaac ttctgggctg ttctcgcttc ggaggagccg tggctccgcg gggggaagcc 720
gagccgagcg gaccgcgag aagtgtctagc tcgggccggg aggagccgca gccggaggag 780
ggggaggagg aagaagagaa ggaagaggag agggggccgc agtggcgact cggcgctcgg 840
aagccgggct catggacggg tgaggcggcg gtgtgcgag acagtgtccc agccgcgcg 900
gtccccagg ccctggcccg ggcctcgggc cggggaggaa gagtagctcg ccgaggcgcc 960
gaggagagcg ggccgcccc aagcccagc cggagaggga gcgcgagccg cgccggcccc 1020
ggtcgggctt ccgaaacct gaactttctg ctgtcttggg tgcattggag ccttgcttg 1080
ctgctctacc tccacctgc caagtgtcc caggctgcac ccatggcaga aggaggaggg 1140
cagaatcctc acgaagtggg gaagtctatg gatgtctatc agcgcagcta ctgccatcca 1200
atcgagacc tggtggacat cttccaggag taccctgatg agatcgagta catcttcaag 1260
ccatcctgtg tgcccctgat gcgatcggg ggctgtctca atgacgaggg cctggagtgt 1320
gtcccactg aggagtcca catcaccatg cagattatgc ggatcaaacc tcaccaagc 1380
cagcacatag gagagatgag cttctacag cacaacaaat gtgaatgcag accaaagaaa 1440
gatagagcaa gacaagaaaa aaaatcagtt cgaggaaaag gaaaggggca aaaacgaaag 1500
cgcaagaaat cccgtataa gtcctggagc gttccctgtg ggccttgctc agagcggaga 1560
aagcatttgt ttgtacaaga tccgcagacg tgtaaattgt cctgcaaaaa cacagactcg 1620
cgttgcaagg cgaggcagct tgagttaaac gaacgtactt gcagatgtga caagccgagg 1680
cggtgagccg ggcaggagga aggagcctcc ctcagggttt cgg 1723

<210> 4

<211> 215

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu

1

5

10

15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly

20

25

30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln

35

40

45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu

50

55

60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu

[0005]

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

<210> 5

<211> 5598

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 5

```

ggccctcag ccctgctgcc cagcagagc ctgtgctcgc cctgcccac gcagacagcc 60
agaccaggg eggccctct ggcgctctg ctctcccga aggatgcttg gggagtgagg 120
cgaagctggg cgtcctctc ccctacagca gcccccttc tccatccctc tgttctctg 180
agccttcagg agcctgcacc agtctgcct gtccttctac tcagctgta cccactctgg 240
gaccagcagt ctttctgata actgggagag ggcagtaagg aggacttctt ggagggggtg 300
actgtccaga gcttggaact gtgccacac cagaagccat cagcagcaag gacaccatgc 360
ggettccggg tgcgatgcea gctctggccc tcaaaggcga gctgctgttg ctgtctctcc 420
tgttacttct ggaaccacag atctctcagg gcttggtcgt cacacccccg gggccagagc 480

```

[0006]

```

ttgtcctcaa tgtctccagc accttcgttc tgacctgctc gggttcagct ccggtggtgt 540
gggaacggat gtcccaggag cccccacagg aaatggccaa ggcccaggat ggcaccttct 600
ccagcgtgct cacactgacc aacctcactg ggctagacac gggagaatac ttttgacccc 660
acaatgactc ccgtggactg gagaccgatg agcggaaacg gctctacatc tttgtgccag 720
atcccaccgt gggcttcctc cctaataatg cgaggaactc attcatcttt ctcacggaaa 780
taactgagat caccattcca tgccgagtaa cagaccaca gctggtggtg aactgacagc 840
agaagaaagg ggacgttgca ctgcctgtcc cctatgatca ccaacgtggc tttctggtg 900
tctttgagga cagaagctac atctgcaaaa ccaccattgg ggacagggag gtggattctg 960
atgctacta tgtctacaga ctccaggtgt catccatcaa cgtctctgtg aacgcagtgc 1020
agactgtggt ccgccagggt gagaacatca cctcatgtg cattgtgatc gggaatgagg 1080
tggtaactt cgagtgagca tacccccgca aagaaagtgg gcggtggtg gagccggtga 1140
ctgacttctt cttggatatg ccttaccaca tccgctccat cctgcacatc cccagtgccg 1200
agttagaaga ctgggggacc tacacctgca atgtgacgga gactgtgaat gaccatcagg 1260
atgaaaaggc catcaacatc accgtggttg agagcggcta cgtgcggctc ctgggagagg 1320
tgggcacact acaatttctt gagctgcatc ggagccggac actgcaggta gtgttcgagg 1380
cctaccacc gccactgtc ctgtggttca aagacaaccg caccctgggc gactccagcg 1440
ctggcgaaat cgccctgtcc acgcgcaacg tgcggagac ccggtatgtg tcagagctga 1500
cactggttgc cgtgaagggt gcagaggctg gccactacac catgcccggc ttccatgagg 1560
atgctgaggt ccagctctcc ttccagctac agatcaatgt cctgtccga gtgctggagc 1620
taagtgagag ccacctgac agtggggaac agacagtccg ctgtcgtggc cggggcatgc 1680
cccagccgaa catcatctgg tctgcctgca gagacctcaa aagggttcca cgtgagctgc 1740
cgcccacgtc gctggggaac agttccgaag aggagagcca gctggagact aacgtgacgt 1800
actgggagga ggagcaggag tttgaggtgg tgagcacact gcgtctgag cacgtggatc 1860
ggccactgtc ggtgcgctgc acgctgcgca acgctgtggg ccaggacacg caggaggtca 1920
tcgtggtgcc acactccttg ccttttaagg tgggtggtgat ctcagccatc ctggccctgg 1980
tgggtgctac catcatctcc cttatcatcc tcatcatgct ttggcagaag aagccacgtt 2040
acgagatccg atggaagggt attgagtctg tgagctctga cggccatgag tacatctacg 2100
tggaccatc catgactgcc tatgactcca cgtgggagct gcccggggac cagcttgtgc 2160
tgggacgcac cctcggctct ggggcctttg ggcaggtggt ggagccacg gctcatggcc 2220
tgagccattc tcaggecacg atgaaagtgg ccgtcaagat gcttaaatcc acagcccgca 2280
gcagtgagaa gcaagccctt atgtcggagc tgaagatcat gactcacctt gggccccacc 2340
tgaactggt caacctgtg ggggcctgca ccaaaggagg acctatctat atcatcactg 2400
agtactgccg ctacggagac ctggtggact acctgcacc caacaaacac accttctgc 2460
agcaccactc cgacaagcgc cgcccgccca gcgcggagct ctacagcaat gctctgcccg 2520
ttgggctccc cctgcccagc catgtgtcct tgaccgggga gagcgacggt ggctacatgg 2580
acatgagcaa ggacgagtcg gtggactatg tgcccattgt ggacatgaaa ggagacgtca 2640
aatatgcaga catcgagtcc tccaactaca tggcccctta cgataactac gttccctctg 2700
cccctgagag gacctgccga gcaacttga tcaacgagtc tccagtgcta agctacatgg 2760
acctcgtggg cttcagctac caggtggcca atggcatgga gtttctggcc tccaagaact 2820
gcgtccacag agacctggcg gctaggaacg tgctcatctg tgaaggcaag ctggtcaaga 2880
tctgtgactt tggcctggct cgagacatca tgcgggactc gaattacatc tccaaaggca 2940
gcacctttt gcctttaaag tggatggctc cggagagcat cttcaacagc ctctacacca 3000
ccctgagcga cgtgtgttcc ttggggatcc tgctctggga gatcttcacc ttgggtgcca 3060
cccttacc agagctgccc atgaacgagc agttctacaa tgccatcaaa cggggttacc 3120

```

[0007]

gcatggccca gcctgccat gcctccgacg agatctatga gatcatgcag aagtgtctggg 3180
 aagagaagtt tgagattcgg ccccccttct cccagctggt gctgcttctc gagagactgt 3240
 tgggcgaagg ttacaaaaag aagtaccagc aggtggatga ggagtttctg aggagtgacc 3300
 acccagccat ccttcggctc caggcccgtc tgcctgggtt ccatggcctc cgatcctccc 3360
 tggacaccag ctccgtctc tatactgccg tgcagcccaa tgagggtgac aacgactata 3420
 tcatccccct gcctgacccc aaaccgagg ttgctgacga gggcccactg gagggttccc 3480
 ccagcctagc cagctccacc ctgaatgaag tcaacacctc ctcaaccatc tcctgtgaca 3540
 gccccctgga gcccaggac gaaccagagc cagagcccca gcttgagctc cagggtggagc 3600
 cggagccaga gctggaacag ttgccggatt cggggtgccc tgcgcctcgg gcggaagcag 3660
 aggatagctt cctgtagggg gctggcccct accctgcctt gcctgaaget cccccctgc 3720
 cagcaccagc catctcctgg cctggcctga cgggcttcc tgtcagccag gctgcctta 3780
 tcagctgtcc cttctggaa gctttctgct cctgacgtgt tgtgccccea accctggggc 3840
 tggcttagga ggcaagaaa ctgcaggggc cgtgaccagc cctctgcctc cagggaggcc 3900
 aactgactct gagccagggt tccccaggg aactcagttt tcccatatgt aagatgggaa 3960
 agttaggctt gatgaccagc aatctaggat tctctccctg gctgacaggt ggggagaccg 4020
 aatccctccc tgggaagatt cttggagtta ctgaggtggt aaattaactt ttttctgttc 4080
 agccagctac cctcaagga atcatagctc tctcctcgca cttttatcc acccaggagc 4140
 tagggaagag accctagcct ccctggctgc tggtgagct agggcctagc cttgagcagt 4200
 gttgcctcat ccagaagaaa gccagctcc tccctatgat gccagtcct gcgttcctg 4260
 gcccagctg gtctggggcc attaggcagc ctaattaatg ctggaggctg agccaagtac 4320
 aggacacccc cagcctgcag cccttgccea gggcacttgg agcacacgca gccatagcaa 4380
 gtgcctgtgt ccctgtcctt caggcccac agtctgggg cttttcttt atcacctca 4440
 gtcttaatcc atccaccaga gtctagaagg ccagacgggc cccgcactctg tgatgagaat 4500
 gtaaatgtgc cagtgtggag tggccacgtg tgtgtgccag tatatggccc tggctctgca 4560
 ttggacctgc tatgaggctt tggaggaatc cctcaccctc tctggcctc agtttccct 4620
 tcaaaaaatg aataagtcgg acttattaac tctgagtgcc ttgccagcac taacattcta 4680
 gagtattcca ggtggttgca catttgcca gatgaagcaa ggccatatac cctaaacttc 4740
 catcctgggg gtcagctggg ctccctgggag attccagatc acacatcaca ctctggggac 4800
 tcaggaacca tgccccttc ccaggccccc agcaagtctc aagaacacag ctgcacaggc 4860
 cttgacttag agtgacagcc ggtgtcctgg aaagcccaa gcagctgcc cagggacatg 4920
 ggaagaccac gggacctctt tcaactacca cgatgacctc cgggggtatc ctgggcaaaa 4980
 gggacaaaaga gggcaaatga gatcacctc tgcagcccac cactccagca cctgtgccga 5040
 ggtctgcgtc gaagacagaa tggacagtga ggacagttat gtcttgtaa agacaagaag 5100
 cttcagatgg tacccaaga aggatgtgag aggtggccgc ttggagttg cccctcacc 5160
 accagctgcc ccatcctga ggcagcgctc catgggggta tggttttgtc actgcccaga 5220
 cctagcagtg acatctcatt gtccccagcc cagtgggcat tggaggtgcc aggggagtca 5280
 gggttgtagc caagacgccc ccgcacgggg agggttggga agggggtgca ggaagctcaa 5340
 cccctctggg caccaacct gcattgcagg ttggcacctt acttccctgg gatccccaga 5400
 gttgttccaa ggaggagag tgggttctca atacgggtacc aaagatataa tcacctaggt 5460
 ttacaaatat ttttaggact cacgttaact cacatttata cagcagaaat gctatttgt 5520
 atgctgtaa gttttctat ctgtgtactt tttttaagg gaaagatttt aatattaac 5580
 ctggtgcttc tcactcac 5598

[0008]

<210> 6
 <211> 1106
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 6
 Met Arg Leu Pro Gly Ala Met Pro Ala Leu Ala Leu Lys Gly Glu Leu
 1 5 10 15

 Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Leu Leu Glu Pro Gln Ile Ser Gln Gly
 20 25 30

 Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser
 35 40 45

 Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg
 50 55 60

 Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr
 65 70 75 80

 Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly
 85 90 95

 Glu Tyr Phe Cys Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr Asp Glu
 100 105 110

 Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu
 115 120 125

 Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu
 130 135 140

 Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu
 145 150 155 160

 His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln
 165 170 175

 Arg Gly Phe Ser Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr
 180 185 190

 Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg
 195 200 205

[0009]

Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val
 210 215 220

Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn
 225 230 235 240

Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg
 245 250 255

Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile
 260 265 270

Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr
 275 280 285

Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys
 290 295 300

Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val Arg Leu Leu Gly
 305 310 315 320

Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu Leu His Arg Ser Arg Thr Leu
 325 330 335

Gln Val Val Phe Glu Ala Tyr Pro Pro Pro Thr Val Leu Trp Phe Lys
 340 345 350

Asp Asn Arg Thr Leu Gly Asp Ser Ser Ala Gly Glu Ile Ala Leu Ser
 355 360 365

Thr Arg Asn Val Ser Glu Thr Arg Tyr Val Ser Glu Leu Thr Leu Val
 370 375 380

Arg Val Lys Val Ala Glu Ala Gly His Tyr Thr Met Arg Ala Phe His
 385 390 395 400

Glu Asp Ala Glu Val Gln Leu Ser Phe Gln Leu Gln Ile Asn Val Pro
 405 410 415

Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Glu Ser His Pro Asp Ser Gly Glu Gln
 420 425 430

Thr Val Arg Cys Arg Gly Arg Gly Met Pro Gln Pro Asn Ile Ile Trp

[0010]

435	440	445
Ser Ala Cys Arg Asp Leu Lys Arg Cys Pro Arg Glu Leu Pro Pro Thr		
450	455	460
Leu Leu Gly Asn Ser Ser Glu Glu Glu Ser Gln Leu Glu Thr Asn Val		
465	470	475
Thr Tyr Trp Glu Glu Glu Gln Glu Phe Glu Val Val Ser Thr Leu Arg		
485	490	495
Leu Gln His Val Asp Arg Pro Leu Ser Val Arg Cys Thr Leu Arg Asn		
500	505	510
Ala Val Gly Gln Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu		
515	520	525
Pro Phe Lys Val Val Val Ile Ser Ala Ile Leu Ala Leu Val Val Leu		
530	535	540
Thr Ile Ile Ser Leu Ile Ile Leu Ile Met Leu Trp Gln Lys Lys Pro		
545	550	555
Arg Tyr Glu Ile Arg Trp Lys Val Ile Glu Ser Val Ser Ser Asp Gly		
565	570	575
His Glu Tyr Ile Tyr Val Asp Pro Met Gln Leu Pro Tyr Asp Ser Thr		
580	585	590
Trp Glu Leu Pro Arg Asp Gln Leu Val Leu Gly Arg Thr Leu Gly Ser		
595	600	605
Gly Ala Phe Gly Gln Val Val Glu Ala Thr Ala His Gly Leu Ser His		
610	615	620
Ser Gln Ala Thr Met Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala		
625	630	635
Arg Ser Ser Glu Lys Gln Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser		
645	650	655
His Leu Gly Pro His Leu Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr		
660	665	670

[0011]

Lys Gly Gly Pro Ile Tyr Ile Ile Thr Glu Tyr Cys Arg Tyr Gly Asp
 675 680 685

Leu Val Asp Tyr Leu His Arg Asn Lys His Thr Phe Leu Gln His His
 690 695 700

Ser Asp Lys Arg Arg Pro Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ser Asn Ala Leu
 705 710 715 720

Pro Val Gly Leu Pro Leu Pro Ser His Val Ser Leu Thr Gly Glu Ser
 725 730 735

Asp Gly Gly Tyr Met Asp Met Ser Lys Asp Glu Ser Val Asp Tyr Val
 740 745 750

Pro Met Leu Asp Met Lys Gly Asp Val Lys Tyr Ala Asp Ile Glu Ser
 755 760 765

Ser Asn Tyr Met Ala Pro Tyr Asp Asn Tyr Val Pro Ser Ala Pro Glu
 770 775 780

Arg Thr Cys Arg Ala Thr Leu Ile Asn Glu Ser Pro Val Leu Ser Tyr
 785 790 795 800

Met Asp Leu Val Gly Phe Ser Tyr Gln Val Ala Asn Gly Met Glu Phe
 805 810 815

Leu Ala Ser Lys Asn Cys Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val
 820 825 830

Leu Ile Cys Glu Gly Lys Leu Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala
 835 840 845

Arg Asp Ile Met Arg Asp Ser Asn Tyr Ile Ser Lys Gly Ser Thr Phe
 850 855 860

Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asn Ser Leu Tyr
 865 870 875 880

Thr Thr Leu Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile
 885 890 895

Phe Thr Leu Gly Gly Thr Pro Tyr Pro Glu Leu Pro Met Asn Glu Gln
 900 905 910

[0012]

Phe Tyr Asn Ala Ile Lys Arg Gly Tyr Arg Met Ala Gln Pro Ala His
 915 920 925

Ala Ser Asp Glu Ile Tyr Glu Ile Met Gln Lys Cys Trp Glu Glu Lys
 930 935 940

Phe Glu Ile Arg Pro Pro Phe Ser Gln Leu Val Leu Leu Leu Glu Arg
 945 950 955 960

Leu Leu Gly Glu Gly Tyr Lys Lys Lys Tyr Gln Gln Val Asp Glu Glu
 965 970 975

Phe Leu Arg Ser Asp His Pro Ala Ile Leu Arg Ser Gln Ala Arg Leu
 980 985 990

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

Tyr Thr Ala Val Gln Pro Asn Glu Gly Asp Asn Asp Tyr Ile Ile Pro
 1010 1015 1020

Leu Pro Asp Pro Lys Pro Glu Val Ala Asp Glu Gly Pro Leu Glu Gly
 1025 1030 1035 1040

Ser Pro Ser Leu Ala Ser Ser Thr Leu Asn Glu Val Asn Thr Ser Ser
 1045 1050 1055

Thr Ile Ser Cys Asp Ser Pro Leu Glu Pro Gln Asp Glu Pro Glu Pro
 1060 1065 1070

Glu Pro Gln Leu Glu Leu Gln Val Glu Pro Glu Pro Glu Leu Glu Gln
 1075 1080 1085

Leu Pro Asp Ser Gly Cys Pro Ala Pro Arg Ala Glu Ala Glu Asp Ser
 1090 1095 1100

Phe Leu
 1105

<210> 7

<211> 4017

<212> DNA

[0013]

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 7

```

atggtcagct actgggacac cggggctctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgcttctc 60
acaggatcta gttcaggttc aaaattaaaa gatcctgaac tgagtttaaa aggcacccag 120
cacatcatgc aagcaggcca gacactgcat ctccaatgca ggggggaagc agcccataaa 180
tggtctttgc ctgaaatggt gagtaaggaa agcgaaggc tgagcataac taaatctgcc 240
tgtggaagaa atggcaaca attctgcagt actttaacct tgaacacagc tcaagcaaac 300
cactctggct tctacagctg caaatatcta gctgtacctt cttcaaagaa gaaggaaaca 360
gaactgcaa tctatatatt tattagtgat acaggtagac ctttcgtaga gatgtacagt 420
gaaatccccg aaattataca catgactgaa ggaagggagc tcgtcattcc ctgccgggtt 480
acgtcaccta acatcactgt tactttaaaa aagtttcac ttgacacttt gatccctgat 540
ggaaaacgca taatctggga cagtagaaag ggcttcatca tatcaaatgc aacgtacaaa 600
gaaatagggc ttctgacctg tgaagcaaca gtcaatgggc atttgtataa gacaaactat 660
ctcacacatc gacaaacca tacaatcata gatgtccaaa taagcacacc acgccagtc 720
aaattactta gaggccatac tcttgctctc aattgtactg ctaccactcc cttgaacacg 780
agagttcaaa tgacctggag ttaccctgat gaaaaaata agagagcttc cgtaaggcga 840
cgaattgacc aaagcaattc ccatgccaac atattctaca gtgttcttac tattgacaaa 900
atgcagaaca aagacaaagg actttatact tgctcgtgtaa ggagtggacc atcattcaaa 960
tctgttaaca cctcagtgca tatatatgat aaagcattca tcaactgtgaa acatcgaaaa 1020
cagcaggtgc ttgaaaccgt agctggcaag cggctctacc ggctctctat gaaagtgaag 1080
gcatttcctt cgccggaagt tgtatggtta aaagatgggt tacctgcgac tgagaaatct 1140
gctcgtctatt tgactcgtgg ctactcgtta attatcaagg acgtaactga agaggatgca 1200
gggaattata caatcttgct gagcataaaa cagtcaaatg tgtttaaaaa cctcactgcc 1260
actctaattg tcaatgtgaa accccagatt tacgaaaagg ccgtgtcacc gtttcagac 1320
ccggtctctt acccactggg cagcagacaa atcctgactt gtaccgata tggatccct 1380
caacctacaa tcaagtggtt ctggcaccct tgtaaccata atcattccga agcaaggtgt 1440
gacttttggt ccaataatga agagtccttt atcctggatg ctgacagcaa catgggaaac 1500
agaattgaga gcatcactca gcgcattgca ataatagaag gaaagaataa gatggctagc 1560
accttggttg tggtgactc tagaatttct ggaatctaca tttgcatagc ttccaataaa 1620
gttgggactg tgggaagaaa cataagcttt tatatcacag atgtgcaaaa tgggtttcat 1680
gttaacttgg aaaaaatgcc gacggaagga gaggacctga aactgtcttg cacagttaac 1740
aagttcttat acagagacgt tacttgatt ttactgcgga cagttaataa cagaacaatg 1800
cactacagta ttagcaagca aaaaatggcc atcactaagg agcactccat cactcttaat 1860
cttaccatca tgaatgtttc cctgcaagat tcaggcacct atgcctgcag agccaggaat 1920
gtatacacag gggaagaaat cctccagaag aaagaaatta caatcagaga tcaggaagca 1980
ccatacctcc tgcgaaacct cagtgatcac acagtggcca tcagcagttc caccacttta 2040
gactgtcatg ctaatggtgt ccccagcct cagatcactt ggtttaaaaa caaccacaaa 2100
atacaacaag agcctggaat tattttagga ccaggaagca gcacgctgtt tattgaaaga 2160
gtcacagaag aggatgaagg tgtctatcac tgcaaaagca ccaaccagaa gggctctgtg 2220
gaaagttcag catacctcac tgttcaagga acctcggaca agtctaactt ggagctgatc 2280
actctaocat gcacctgtgt ggctgcgact ctcttctggc tcctattaac cctctttatc 2340
cgaaaaatga aaaggtcttc ttctgaaata aagactgact acctatcaat tataatggac 2400
ccagatgaag ttctttgga tgagcagtggt gagcggctcc cttatgatgc cagcaagtgg 2460

```

[0014]

gagtttcccc gggagagact taaactgggc aaatcacttg gaagaggggc ttttgaaaa 2520
 gtggttcaag catcagcatt tggcattaag aaatcaccta cgtgccggac tgtggctgtg 2580
 aaaatgtcga aagagggggc cacggccagc gagtacaag ctctgatgac tgagctaaaa 2640
 atcttgacc acattggcca ccatctgaac gtggtaacc tgctgggagc ctgcaccaag 2700
 caaggagggc ctctgatggt gattgttgaa tactgcaaat atggaaatct ctccaactac 2760
 ctcaagagca aacgtgactt atttttctc aacaaggatg cagcactaca catggagcct 2820
 aagaaagaaa aaatggagcc aggcctggaa caaggcaaga aaccaagact agatagcgtc 2880
 accagcagcg aaagctttgc gagctccggc tttcaggaag ataaaagtct gagtgatgtt 2940
 gaggaagagg aggattctga cggtttctac aaggagccca tcaactatga agatctgatt 3000
 tcttacagtt tccaagtggc cagaggcatg gagttcctgt cttccagaaa gtgcattcat 3060
 cgggacctgg cagcgagaaa cattctttta tctgagaaca acgtggtgaa gatttgtgat 3120
 tttggccttg cccgggatat ttataagaac cccgattatg tgagaaaagg agatactcga 3180
 ctctctctga aatggatggc tcctgaatct atctttgaca aaatctacag caccaagagc 3240
 gacgtgtggt cttacggagt attgctgtgg gaaatcttct ccttaggtgg gtctccatac 3300
 ccaggagtac aaatggatga ggacttttgc agtcgcctga gggaaggcat gaggatgaga 3360
 gctctgagt actctactcc tgaatctat cagatcatgc tggactgctg gcacagagac 3420
 ccaaaagaaa ggccaagatt tgcagaactt gtggaaaaac taggtgattt gcttcaagca 3480
 aatgtacaac aggatggtaa agactacatc ccaatcaatg ccatactgac aggaaatagt 3540
 gggtttacat actcaactcc tgccttctct gaggacttct tcaaggaaag tatttcagct 3600
 ccgaagtta attcaggaag ctctgatgat gtcagatag taaatgcttt caagttcatg 3660
 agcctggaaa gaatcaaac ctttgaagaa cttttaccga atgccacctc catgtttgat 3720
 gactaccagg ggcacagcag cactctgttg gcctctccca tgctgaagcg cttcacctgg 3780
 actgacagca aacccaagcg ctcgctcaag attgacttga gagtaaccag taaaagtaag 3840
 gagtcggggc tgtctgatgt cagcaggccc agtttctgcc attccagctg tgggcacgtc 3900
 agcgaaggca agcgcaggtt cacctacgac cacgctgagc tggaaaggaa aatcgcgtgc 3960
 tgctccccgc cccagacta caactcgggt gtcctgtact ccaccccacc catctag 4017

<210> 8

<211> 1338

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 8

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser

1 5 10 15

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro

20 25 30

Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr

35 40 45

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

[0015]

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

[0016]

Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys
 290 295 300

Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys
 305 310 315 320

Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val
 325 330 335

Lys His Arg Lys Gln Gln Val Leu Glu Thr Val Ala Gly Lys Arg Ser
 340 345 350

Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe Pro Ser Pro Glu Val Val
 355 360 365

Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu Lys Ser Ala Arg Tyr Leu
 370 375 380

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

Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys Gln Ser Asn Val Phe Lys
 405 410 415

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

Lys Ala Val Ser Ser Phe Pro Asp Pro Ala Leu Tyr Pro Leu Gly Ser
 435 440 445

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

Lys Trp Phe Trp His Pro Cys Asn His Asn His Ser Glu Ala Arg Cys
 465 470 475 480

Asp Phe Cys Ser Asn Asn Glu Glu Ser Phe Ile Leu Asp Ala Asp Ser
 485 490 495

Asn Met Gly Asn Arg Ile Glu Ser Ile Thr Gln Arg Met Ala Ile Ile
 500 505 510

Glu Gly Lys Asn Lys Met Ala Ser Thr Leu Val Val Ala Asp Ser Arg
 515 520 525

[0017]

Ile Ser Gly Ile Tyr Ile Cys Ile Ala Ser Asn Lys Val Gly Thr Val
530 535 540

Gly Arg Asn Ile Ser Phe Tyr Ile Thr Asp Val Pro Asn Gly Phe His
545 550 555 560

Val Asn Leu Glu Lys Met Pro Thr Glu Gly Glu Asp Leu Lys Leu Ser
565 570 575

Cys Thr Val Asn Lys Phe Leu Tyr Arg Asp Val Thr Trp Ile Leu Leu
580 585 590

Arg Thr Val Asn Asn Arg Thr Met His Tyr Ser Ile Ser Lys Gln Lys
595 600 605

Met Ala Ile Thr Lys Glu His Ser Ile Thr Leu Asn Leu Thr Ile Met
610 615 620

Asn Val Ser Leu Gln Asp Ser Gly Thr Tyr Ala Cys Arg Ala Arg Asn
625 630 635 640

Val Tyr Thr Gly Glu Glu Ile Leu Gln Lys Lys Glu Ile Thr Ile Arg
645 650 655

Asp Gln Glu Ala Pro Tyr Leu Leu Arg Asn Leu Ser Asp His Thr Val
660 665 670

Ala Ile Ser Ser Ser Thr Thr Leu Asp Cys His Ala Asn Gly Val Pro
675 680 685

Glu Pro Gln Ile Thr Trp Phe Lys Asn Asn His Lys Ile Gln Gln Glu
690 695 700

Pro Gly Ile Ile Leu Gly Pro Gly Ser Ser Thr Leu Phe Ile Glu Arg
705 710 715 720

Val Thr Glu Glu Asp Glu Gly Val Tyr His Cys Lys Ala Thr Asn Gln
725 730 735

Lys Gly Ser Val Glu Ser Ser Ala Tyr Leu Thr Val Gln Gly Thr Ser
740 745 750

Asp Lys Ser Asn Leu Glu Leu Ile Thr Leu Thr Cys Thr Cys Val Ala

[0018]

755	760	765
Ala Thr Leu Phe Trp Leu Leu Leu Thr Leu Phe Ile Arg Lys Met Lys		
770	775	780
Arg Ser Ser Ser Glu Ile Lys Thr Asp Tyr Leu Ser Ile Ile Met Asp		
785	790	795
Pro Asp Glu Val Pro Leu Asp Glu Gln Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp		
	805	810
		815
Ala Ser Lys Trp Glu Phe Ala Arg Glu Arg Leu Lys Leu Gly Lys Ser		
	820	825
		830
Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Gln Ala Ser Ala Phe Gly		
	835	840
		845
Ile Lys Lys Ser Pro Thr Cys Arg Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys		
850	855	860
Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu Tyr Lys Ala Leu Met Thr Glu Leu Lys		
865	870	875
		880
Ile Leu Thr His Ile Gly His His Leu Asn Val Val Asn Leu Leu Gly		
	885	890
		895
Ala Cys Thr Lys Gln Gly Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu Tyr Cys		
	900	905
		910
Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Tyr Leu Lys Ser Lys Arg Asp Leu Phe		
915	920	925
Phe Leu Asn Lys Asp Ala Ala Leu His Met Glu Pro Lys Lys Glu Lys		
930	935	940
Met Glu Pro Gly Leu Glu Gln Gly Lys Lys Pro Arg Leu Asp Ser Val		
945	950	955
		960
Thr Ser Ser Glu Ser Phe Ala Ser Ser Gly Phe Gln Glu Asp Lys Ser		
	965	970
		975
Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Asp Ser Asp Gly Phe Tyr Lys Glu		
	980	985
		990

[0019]

Pro Ile Thr Met Glu Asp Leu Ile Ser Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg
 995 1000 1005
 Gly Met Glu Phe Leu Ser Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala
 1010 1015 1020
 Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val Val Lys Ile Cys Asp
 1025 1030 1035 1040
 Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Pro Asp Tyr Val Arg Lys
 1045 1050 1055
 Gly Asp Thr Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe
 1060 1065 1070
 Asp Lys Ile Tyr Ser Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Leu
 1075 1080 1085
 Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Val Gln
 1090 1095 1100
 Met Asp Glu Asp Phe Cys Ser Arg Leu Arg Glu Gly Met Arg Met Arg
 1105 1110 1115 1120
 Ala Pro Glu Tyr Ser Thr Pro Glu Ile Tyr Gln Ile Met Leu Asp Cys
 1125 1130 1135
 Trp His Arg Asp Pro Lys Glu Arg Pro Arg Phe Ala Glu Leu Val Glu
 1140 1145 1150
 Lys Leu Gly Asp Leu Leu Gln Ala Asn Val Gln Gln Asp Gly Lys Asp
 1155 1160 1165
 Tyr Ile Pro Ile Asn Ala Ile Leu Thr Gly Asn Ser Gly Phe Thr Tyr
 1170 1175 1180
 Ser Thr Pro Ala Phe Ser Glu Asp Phe Phe Lys Glu Ser Ile Ser Ala
 1185 1190 1195 1200
 Pro Lys Phe Asn Ser Gly Ser Ser Asp Asp Val Arg Tyr Val Asn Ala
 1205 1210 1215
 Phe Lys Phe Met Ser Leu Glu Arg Ile Lys Thr Phe Glu Glu Leu Leu
 1220 1225 1230

[0020]

Pro Asn Ala Thr Ser Met Phe Asp Asp Tyr Gln Gly Asp Ser Ser Thr
 1235 1240 1245

Leu Leu Ala Ser Pro Met Leu Lys Arg Phe Thr Trp Thr Asp Ser Lys
 1250 1255 1260

Pro Lys Ala Ser Leu Lys Ile Asp Leu Arg Val Thr Ser Lys Ser Lys
 1265 1270 1275 1280

Glu Ser Gly Leu Ser Asp Val Ser Arg Pro Ser Phe Cys His Ser Ser
 1285 1290 1295

Cys Gly His Val Ser Glu Gly Lys Arg Arg Phe Thr Tyr Asp His Ala
 1300 1305 1310

Glu Leu Glu Arg Lys Ile Ala Cys Cys Ser Pro Pro Pro Asp Tyr Asn
 1315 1320 1325

Ser Val Val Leu Tyr Ser Thr Pro Pro Ile
 1330 1335

<210> 9

<211> 5830

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 9

actgagtccc gggaccccgg gagagcggtc agtgtgtggt cgctgcgttt cctctgcctg 60
 cgccgggcat cacttgcgcg ccgcagaaag tccgtctggc agcctggata tcctctccta 120
 ccggcacccg cagacgcccc tgcagccgcc ggtcggcgcc cgggctccct agccctgtgc 180
 gctcaactgt cctgcgctgc ggggtgccgc gattccacc tccgcgctc cttctctaga 240
 caggcgctgg gagaagaac cggctcccga gttctgggca tttcgcccgg ctcgagggtc 300
 aggatgcaga gcaagggtgt gctggccgtc gcctgtggc tctgcgtgga gacccgggcc 360
 gcctctgtgg gtttgccctag tgtttctctt gatctgccc ggctcagcat acaaaaagac 420
 ataactacaa ttaaggctaa tacaactctt caaattactt gcaggggaca gagggacttg 480
 gactggcttt ggccaataa tcagagtggc agtgagcaaa gggaggaggt gactgagtgc 540
 agcgatggcc tcttctgtaa gacactcaca attccaaaag tgatcgaaa tgactgga 600
 gcctacaagt gttctaccg ggaaactgac ttggcctcgg tcatttatgt ctatgttcaa 660
 gattacagat ctccatttat tgcttctgtt agtgaccaac atggagtcgt gtacattact 720
 gagaacaaaa acaaaactgt ggtgattcca tgtctcgggt ccatttcaa tctcaactgt 780
 tcactttgtg caagataccc agaaaagaga tttgttctg atggtaacag aatttctctg 840
 gacagcaaga agggctttac tattcccagc tacatgatca gctatgctgg catggtcttc 900

[0021]

tgtgaagcaa aaattaatga tgaagttac cagtctatta tglacatagt tgtcgttgta 960
gggtatagga tttatgatgt ggttctgagt ccgtctcatg gaattgaact atctgttgga 1020
gaaaagcttg tcttaaattg tacagcaaga actgaactaa atgtggggat tgacttcaac 1080
tgggaatacc cttcttcgaa gcatcagcat aagaaacttg taaaccgaga cctaaaaacc 1140
cagtctggga gtgagatgaa gaaatthttg agcaccttaa ctatagatgg tgtaaccg 1200
agtgaccaag gattgtacac ctgtgcagca tccagtgggc tgatgacca gaagaacagc 1260
acatttgtca gggctcatga aaaacctttt gttgcttttg gaagtggcat ggaatctctg 1320
gtggaagcca cgggtgggga gctgtcaga atccctgcga agtaccttg ttaccaccc 1380
ccagaaataa aatggtataa aatggaata ccccttgagt ccaatcacac aattaaagc 1440
gggcatgtac tgacgattat ggaagtgagt gaaagagaca caggaaatta cactgtcatc 1500
cttaccaatc ccatttcaa ggagaagcag agccatgtgg tctctctggt tgtgtatgtc 1560
ccacccaga ttggtgagaa atctctaac tctctgtgg attcctacca gtacggcacc 1620
actcaaagc tgacatgtac ggtctatgcc attcctccc cgcacacat ccactggtat 1680
tggcagttg aggaagagtg cgccaacgag cccagccaag ctgtctcagt gacaaacca 1740
tacccttg aagaatggag aagtgtggag gacttccagg gagaaataa aattgaagtt 1800
aataaaaaatc aatttgcctt aattgaagga aaaaacaaa ctgtaagtac cttgttatc 1860
caagcggcaa atgtgtcagc tttgtacaaa tgtgaagcgg tcaacaaagt cgggagagga 1920
gagagggtga tctcctcca cgtgaccagg ggtcctgaaa ttactttgca acctgacatg 1980
cagcccactg agcaggagag cgtgtcttg tgggtcactg cagacagatc tacgtttgag 2040
aacctcacat ggtacaagct tggcccacag cctctgcaa tccatgtggg agagttgcc 2100
acacctgtt gcaagaactt ggatactctt tggaaatga atgccacat gttctctaat 2160
agcacaaatg acattttgat catggagctt aagaatgcat ccttgcaagga ccaaggagac 2220
tatgtctgcc ttgctcaaga caggaagacc aagaaaagac attgctgtgt caggcagctc 2280
acagctctag agcgtgtggc acccagatc acaggaaacc tggagaatca gacgacaagt 2340
attggggaaa gcatcgaagt ctcatgcacg gcatctggga atccccctc acagatcatg 2400
tggtttaag ataatgagac cctttagaa gactcaggca ttgtattgaa ggatgggaac 2460
cggaaacctc atatccgag agtgaggaag gaggacgaag gcctctacac ctgccaggca 2520
tgcagtgtt ttgctgtgc aaaagtggag gcattttca taatagaagg tgcccaggaa 2580
aagacgaact tggaaatcat tattctagta ggcacggcgg tgattgcat gttctcttg 2640
ctactcttg tcatcatcct acggaccgtt aagcgggcca atggagggga actgaagaca 2700
ggctacttgt ccatcgtcat ggatccagat gaactccat tggatgaaca ttgtgaacga 2760
ctgccttatg atgccagaa atgggaattc cccagagacc ggctgaagct aggtaagcct 2820
cttggcgtg gtgcctttg ccaagtatt gaagcagatg cctttggaat tgacaagaca 2880
gcaacttgca ggacagtagc agtcaaatg ttgaaagaag gagcaacaca cagtgagcat 2940
cgagctctca tgtctgaact caagatctc attcatattg gtcacatct caatgtgtc 3000
aaccttctag gtgcctgtac caagccagga gggccactca tgggtattgt ggaattctgc 3060
aaatttgaa acctgtccac ttacctgagg agcaagagaa atgaatttgt ccctacaag 3120
accaaagggg cacgattccg tcaagggaaa gactacgttg gagcaatccc tgtgatctg 3180
aaacggcgt tggacagcat caccagtagc cagagctcag ccagctctg atttgggag 3240
gagaagtccc tcagtatgt agaagaagag gaagctctg aagatctgta taaggactc 3300
ctgaccttg agcatctcat ctgttacagc ttccaagtgg ctaagggcat ggattcttg 3360
gcatcgcgaa agtgtatcca caggacctg gcggcacgaa atatcctctt atcggagaag 3420
aacgtggtta aaatctgtga ctttggcttg gcccgata ttataaaga tccagattat 3480
gtcagaaaag gagatgctcg cctccttg aatggatgg cccagaaac aattttgac 3540

[0022]

```

agagtgtaca caatccagag tgacgtctgg tcttttgggtg ttttgcctgtg ggaaatattt 3600
tccttaggtg cttctccata tcctggggta aagattgatg aagaattttg taggcgattg 3660
aaagaaggaa ctagaatgag ggcccctgat tatactacac cagaaatgta ccagaccatg 3720
ctggactgct ggcacgggga gccacgtcag agaccacgt ttcagagtt ggtggaacat 3780
ttgggaaatc tcttgaagc taatgctcag caggatggca aagactacat tgttcttccg 3840
atatcagaga ctttgagcat ggaagaggat tctggactct ctctgcctac ctcacctgtt 3900
tcctgtatgg aggaggagga agtatgtgac cccaaattcc attatgacaa cacagcagga 3960
atcagtcagt atctgcagaa cagtaagcga aagagccggc ctgtgagtgt aaaaacattt 4020
gaagatatcc cgtagaaga accagaagta aaagtaatcc cagatgacaa ccagacggac 4080
agtggtatgg ttctgcctc agaagagctg aaaactttgg aagacagaac caaattatct 4140
ccatcttttg gtggaatggt gccagcaaaa agcagggagt ctgtggcatc tgaaggtca 4200
aaccagacaa gggctacca gtccgatat cactccgatg acacagacac caccgtgtac 4260
tccagtgagg aagcagaact tttaaagctg atagagattg gagtgcaaac cggtagcaca 4320
gccagattc tccagcctga ctccgggacc aactgagct ctctcctgt ttaaaaggaa 4380
gcatccacac cccaactccc ggacatcaca tgagaggtct gctcagattt tgaagtgttg 4440
ttctttccac cagcaggaag tagccgcatt tgattttcat ttcgacaaca gaaaaaggac 4500
ctcggactgc agggagccag tcttctagggc atatcctgga agaggcttgt gaccaagaa 4560
tgtgtctgtg tcttctccca gtgttgacct gatcctctt ttcattcat ttaaaaagca 4620
ttatcatgcc cctgctgagg gtctcaccat gggtttagaa caaagagctt caagcaatgg 4680
ccccatcctc aaagaagtag cagtacctgg ggagctgaca cttctgtaaa actagaagat 4740
aaaccaggca acgtaagtgt tcgaggtgtt gaagatggga aggatttgca gggctgagtc 4800
tatccaagag gctttgttta ggacgtgggt cccaagccaa gccttaagtg tgaattcgg 4860
attgatagaa aggaagacta acgttacctt gctttggaga gtactggagc ctgcaaatgc 4920
attgtgtttg ctctgggtgga ggtgggcatg ggtctgttc tgaatgtaa agggttcaga 4980
cggggtttct ggttttagaa ggttgcgtgt tcttcagatt gggctaaagt agagttcgtt 5040
gtgctgtttc tgactcctaa tgagagtcc ttcagaccg ttagctgtct ccttgccaag 5100
cccaggaag aaaatgatgc agctctggct cctgtctcc caggctgatc ctttattcag 5160
aataccacaa agaaaggaca ttcagctcaa ggtccctgc cgtgttgaag agttctgact 5220
gcacaaacca gcttctggtt tcttctggaa tgaataccct catactgtc ctgatgtgat 5280
atgctgaga ctgaatgagg gaggttcaat gtgaagctgt gtgtgggtgc aaagtttcag 5340
gaaggatttt accctttgt tcttcccct gtecccaacc cactctcacc ccgcaacca 5400
tcagtatttt agttatttgg cctctactcc agtaaacctg attgggtttg ttcactctct 5460
gaatgattat tagccagact tcaaaattat tttatagccc aaattataac atctattgta 5520
ttatttagac ttttaacata tagagctatt tctactgatt tttgcccttg ttctgtcctt 5580
ttttcaaaa aagaaaatgt gtttttgtt tggtagcata gtgtgaaatg ctgggaacaa 5640
tgactataag acatgctatg gcacatatat ttatagtctg tttatgtaga aacaaatgta 5700
atatattaaa gccttatata taatgaactt tgtactattc acattttgta tcagtattat 5760
gtagcataac aaaggtcata atgctttcag caattgatgt cattttatta aagaacattg 5820
aaaaacttga 5830

```

<210> 10

<211> 1356

<212> PRT

[0023]

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 10

```

Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu
  1             5             10             15

Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro
             20             25             30

Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr
             35             40             45

Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro
  50             55             60

Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser
  65             70             75             80

Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn
             85             90             95

Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser
             100            105            110

Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser
             115            120            125

Val Ser Asp Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys
  130            135            140

Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser
  145            150            155            160

Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg
             165            170            175

Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile
             180            185            190

Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser
             195            200            205

Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr
  210            215            220

```

[0024]

```

Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
225                     230                     235                     240

Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
                     245                     250                     255

Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
                     260                     265                     270

Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
                     275                     280                     285

Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
290                     295                     300

Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
305                     310                     315                     320

Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met
                     325                     330                     335

Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala
                     340                     345                     350

Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly
355                     360                     365

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

Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu
385                     390                     395                     400

Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val
                     405                     410                     415

Val Tyr Val Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val
                     420                     425                     430

Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr
435                     440                     445

Ala Ile Pro Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu

```

[0025]

450		455		460
Glu Cys Ala Asn Glu Pro Ser Gln Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr				
465		470		480
Pro Cys Glu Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys				
	485		490	495
Ile Glu Val Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys				
	500		505	510
Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr				
	515		520	525
Lys Cys Glu Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser				
	530		535	540
Phe His Val Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln				
	545		555	560
Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser				
	565		570	575
Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro				
	580		585	590
Ile His Val Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr				
	595		600	605
Leu Trp Lys Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile				
	610		615	620
Leu Ile Met Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr				
	625		630	640
Val Cys Leu Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val				
	645		650	655
Arg Gln Leu Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn				
	660		665	670
Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys				
	675		680	685

[0026]

Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn
 690 695 700

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

Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr
 725 730 735

Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe
 740 745 750

Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu Ile Ile Ile Leu
 755 760 765

Val Gly Thr Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Leu Val Ile
 770 775 780

Ile Leu Arg Thr Val Lys Arg Ala Asn Gly Gly Glu Leu Lys Thr Gly
 785 790 795 800

Tyr Leu Ser Ile Val Met Asp Pro Asp Glu Leu Pro Leu Asp Glu His
 805 810 815

Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp Ala Ser Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp
 820 825 830

Arg Leu Lys Leu Gly Lys Pro Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Gln Val
 835 840 845

Ile Glu Ala Asp Ala Phe Gly Ile Asp Lys Thr Ala Thr Cys Arg Thr
 850 855 860

Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr His Ser Glu His Arg
 865 870 875 880

Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly His His Leu
 885 890 895

Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gly Gly Pro Leu
 900 905 910

Met Val Ile Val Glu Phe Cys Lys Phe Gly Asn Leu Ser Thr Tyr Leu
 915 920 925

[0027]

Arg Ser Lys Arg Asn Glu Phe Val Pro Tyr Lys Thr Lys Gly Ala Arg
 930 935 940

Phe Arg Gln Gly Lys Asp Tyr Val Gly Ala Ile Pro Val Asp Leu Lys
 945 950 955 960

Arg Arg Leu Asp Ser Ile Thr Ser Ser Gln Ser Ser Ala Ser Ser Gly
 965 970 975

Phe Val Glu Glu Lys Ser Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Ala Pro
 980 985 990

Glu Asp Leu Tyr Lys Asp Phe Leu Thr Leu Glu His Leu Ile Cys Tyr
 995 1000 1005

Ser Phe Gln Val Ala Lys Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys
 1010 1015 1020

Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Lys Asn
 1025 1030 1035 1040

Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp
 1045 1050 1055

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

Ala Pro Glu Thr Ile Phe Asp Arg Val Tyr Thr Ile Gln Ser Asp Val
 1075 1080 1085

Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala Ser
 1090 1095 1100

Pro Tyr Pro Gly Val Lys Ile Asp Glu Glu Phe Cys Arg Arg Leu Lys
 1105 1110 1115 1120

Glu Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro Asp Tyr Thr Thr Pro Glu Met Tyr
 1125 1130 1135

Gln Thr Met Leu Asp Cys Trp His Gly Glu Pro Ser Gln Arg Pro Thr
 1140 1145 1150

Phe Ser Glu Leu Val Glu His Leu Gly Asn Leu Leu Gln Ala Asn Ala

[0028]

1155	1160	1165
Gln Gln Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Val Leu Pro Ile Ser Glu Thr Leu		
1170	1175	1180
Ser Met Glu Glu Asp Ser Gly Leu Ser Leu Pro Thr Ser Pro Val Ser		
1185	1190	1195
Cys Met Glu Glu Glu Glu Val Cys Asp Pro Lys Phe His Tyr Asp Asn		
	1205	1210
Thr Ala Gly Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Asn Ser Lys Arg Lys Ser Arg		
	1220	1225
Pro Val Ser Val Lys Thr Phe Glu Asp Ile Pro Leu Glu Glu Pro Glu		
	1235	1240
Val Lys Val Ile Pro Asp Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val Leu		
	1250	1255
Ala Ser Glu Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp Arg Thr Lys Leu Ser Pro		
	1265	1270
Ser Phe Gly Gly Met Val Pro Ser Lys Ser Arg Glu Ser Val Ala Ser		
	1285	1290
Glu Gly Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln Ser Gly Tyr His Ser Asp		
	1300	1305
Asp Thr Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Glu Glu Ala Glu Leu Leu Lys		
	1315	1320
Leu Ile Glu Ile Gly Val Gln Thr Gly Ser Thr Ala Gln Ile Leu Gln		
	1330	1335
Pro Asp Ser Gly Thr Thr Leu Ser Ser Pro Pro Val		
	1345	1350
		1355

<210> 11

<211> 2305

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

[0029]

<400> 11.

```

ttcttggggc tgatgtccgc aaatatgcag aattaccggc cgggtcgctc ctgaagccag 60
cgcgggggagc gagcgcggcg gcggccagca ccgggaacgc accgaggaag aagcccagcc 120
cccgcctcc gcccttccg tcccacccc ctaccggcg gcccaggagg ctccccgct 180
gcggcgcgca ctccctgtt ctctctctcc tggttggegc tgectgcctc tccgactca 240
ctgctcgccg ggcgccgtcc gccagctccg tgetccccgc gccaccctcc tccgggccgc 300
gtccctaag ggatgtact gaatttcgcc gccacaggag accggctgga gcgcccgcc 360
cgcgcctcgc ctctctccg agcagccagc gcctcgggac gcgatgagga ccttgcttg 420
cctgctgctc ctggctgcg gatacctcgc ccatgttctg gccgaggaag ccgagatccc 480
ccgcgaggtg atcgagaggc tggcccgcag tcagatccac agcatccggg acctccagcg 540
actcctggag atagactccg tagggagtga ggattctttg gacaccagcc tgagagctca 600
cggggtccac gccactaagc atgtgccga gaagcggccc ctgccattc ggaggaagag 660
aagcatcgag gaagctgtcc ccgctgtctg caagaccagg acggtcattt acgagattcc 720
tcggagtcag gtcgaccca cgtccgcaa cttcctgatc tggccccgt gcgtggaggt 780
gaaacgctgc accggctgct gcaacacgag cagtgtcaag tgccagccct cccgcgtcca 840
ccaccgcagc gtcaaggtgg ccaaggtgga atacgtcagg aagaagccaa aattaaaga 900
agtccaggtg aggttagagg agcatttggg gtgcgctgc gcgaccaca gcctgaatcc 960
ggattatcgg gaagaggaca cggatgtgag gtgaggatga gccgcagccc tttcctggga 1020
catggatgta catggcgtgt tacattcctg aacctactat gtacggtgct ttattgccag 1080
tgtcgggtct ttgttctct ccgtgaaaa ctgtgtccga gaacactcgg gagaacaaag 1140
agacagtgca catttgttta atgtgacatc aaagcaagta ttgtagcact cggatgaagca 1200
gtaagaagct tcctgtcaa aaagagagag agagagagag agagagaaaa caaaaccaca 1260
aatgacaaaa acaaacgga ctacaaaaa tatctaaact cgatgagatg gagggtcggc 1320
ccgtgggatg gaagtgcaga ggtctcagca gactggattt ctgtccgggt ggtcacaggt 1380
gcttttttgc cgaggatgca gagcctgctt tgggaacgac tccagagggg tgctggtggg 1440
ctctcgaggc cccgcaggaa gcaggaatgt cttggaaacc gccacgcgaa ctttagaac 1500
cacacctct cgctgtagta ttaagccca tacagaaacc ttcctgagag ccttaagtgg 1560
ttttttttt tgttttggt ttgtttttt tttttttgt ttttttttt ttttttttt 1620
ttacaccata aagtgattat taagttcct tttactctt ggctagctt ttttttttt 1680
ttttttttt tttttttta ttatctctg gatgacatt acaccgata cacacaggct 1740
gctgtaactg tcaggacagt gcgacggtat tttcctagc aagatgcaa ctaatgagat 1800
gtattaaat aaacatggta tacctaccta tgcacattt cctaaatgt tctggcttg 1860
tgtttctccc ttaccctgct ttatttgta atttaagcca tttgaaaga actatgcgtc 1920
aaccaatcgt acgcccctcc tgcggcacct gcccagagc ccgtttgtg ctgagtgaca 1980
acttgttccc cgcagtgcac acctagaatg ctgtgtccc acgcgcacg tgagatgcat 2040
tgccgcttct gtctgtgtg ttggtgtgcc ctggtgccg ggtggcggtc actccctctg 2100
ctgccagtgt ttggacagaa ccaaatctt ttatttttg taagatattg tgctttacct 2160
gtattaacag aaatgtgtgt gtgtggttg ttttttgta aaggtgaagt ttgtatggtt 2220
acctaattt acctgtttg tatacctgag agcctgctat gttcttctt tgttgatcca 2280
aaattaaaaa aaaaatacca ccaac 2305

```

<210> 12

<211> 196

[0030]

<212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 12
 Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala
 1 5 10 15
 His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg
 20 25 30
 Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu
 35 40 45
 Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg
 50 55 60
 Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu
 65 70 75 80
 Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys
 85 90 95
 Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro
 100 105 110
 Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg
 115 120 125
 Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg
 130 135 140
 Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys
 145 150 155 160
 Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu
 165 170 175
 Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp
 180 185 190
 Thr Asp Val Arg
 195

[0031]

<210> 13

<211> 6633

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 13

```

ttctccccgc cccccagttg ttgtcgaagt ctggggggtg ggactggacc ccctgattgc 60
gtaagagcaa aaagcgaagg cgcaatctgg aactggggag attcggagcg cagggagttt 120
gagagaaact tttatTTTga agagaccaag gttgaggggg ggcttatttc ctgacagcta 180
tttacttaga gcaaatgatt agttttagaa ggatggacta taacattgaa tcaattacaa 240
aacgcggttt ttgagcccat tactgttggg gctacaggga gagaacagg aggagactgc 300
aagagatcat ttgggaaggc cgtgggcacg ctctttactc catgtgtggg acattcattg 360
cggaataaca tcggaggaga agtttcccag agctatgggg acttcccata cggcgttcc 420
ggctcttagc tgtcttctca cagggtgag cctaactcct tgccagcttt cattaccctc 480
tactcttcca aatgaaaatg aaaaggttgt gcagctgaat tcatctttt ctctgagatg 540
ctttggggag agtgaagtga gctggcagta ccccatgtct gaagaagaga gctccgatgt 600
ggaaatcaga aatgaagaaa acaacagcgg cctttttgtg acggtcttgg aagtgagcag 660
tgcctcggcg gccacacag gttgtacac ttgctattac aaccacactc agacagaaga 720
gaatgagctt gaagcagcg acatttacct ctatgtgcca gaccagatg tagcctttgt 780
acctctagga atgacggatt atttagtcat cgtggaggat gatgattctg ccattatacc 840
ttgtcgcaca actgatcccg agactcctgt aaccttacac aacagtgagg ggggtgtacc 900
tgcctcctac gacagcagac agggctttaa tgggaccttc actgtagggc cctatatctg 960
tgaggccacc gtcaaaggaa agaagtcca gaccatccca tttaatgttt atgctttaa 1020
agcaacatca gagctggatc tagaaatgga agctctttaa accgtgtata agtcagggga 1080
aacgattgtg gtcacctgtg ctgtttttaa caatgaggtg gttgaccttc aatggactta 1140
ccctggagaa gtgaaaggca aaggcatcac aatgctgga gaaatcaaag tcccatccat 1200
caaattggtg tacactttga cggccccga ggccacgggt aaagacagtg gagattacga 1260
atgtgctgcc cgccaggcta ccaggagggt caaagaaatg aagaaagtca ctatttctgt 1320
ccatgagaaa ggttctattg aatcaaacc cacctcagc cagttggaag ctgtcaacct 1380
gcatgaagtc aaacattttg ttgtagaggt gcgggacctc ccacctccca ggatattctg 1440
gctgaaaaac aatctgactc tgattgaaaa tctactgag atcaccactg atgtgaaaa 1500
gattcaggaa ataaggtatc gaagcaaat aaagtgatc cgtgctaagg aagaagacag 1560
tggccattat actattgtag ctcaaatga agatgctgtg aagagctata cttttgaact 1620
gttaactcaa gttccttcat ccattctgga cttggtgat gatccatg gctcaactgg 1680
gggacagacg gtgaggtgca cagctgaagg cacgcccgtt cctgatattg agtggatgat 1740
atgcaaagat attaagaaat gtaataatga aacttctgg actattttgg ccaacaatgt 1800
ctcaaacatc atcacggaga tccactcccg agacaggagt accgtggagg gccgtgtgac 1860
tttcgcaaaa gtggaggaga ccatcgccgt gcgatgcctg gctaagaatc tccttgagc 1920
tgagaaccga gagctgaage tgggtgctcc caccctgcgt tctgaactca cgggtgctgc 1980
tgcagtctg gtgctgttgg tgattgtgat catctcactt attgtcctgg ttgtcattg 2040
gaaacagaaa ccgaggtatg aaatcgctg gaggtcatt gaatcaatca gcccgatgg 2100
acatgaatat atttatgtgg acccgatgca gctgccttat gactcaagat gggagtttcc 2160
aagagatgga ctagtcttg gtcgggtctt ggggtctgga gcgtttggga aggtggttga 2220
aggaacagcc tatggattaa gccggtccca acctgtcatg aaagttgcag tgaagatgct 2280

```

[0032]

aaaaccacg gccagatcca gtgaaaaaca agctctcatg tctgaactga agataatgac 2340
 tcacctgggg ccacatttga acattgtaaa cttgctggga gcctgcacca agtcaggccc 2400
 catttacatc atcacagagt attgcttcta tggagatttg gtcaactatt tgcataagaa 2460
 tagggatagc ttctgagcc accaccaga gaagccaaag aaagagctgg atatctttgg 2520
 attgaacctt gctgatgaaa gcacacggag ctatgttatt ttatcttttg aaaacaatgg 2580
 tgactacatg gacatgaagc aggctgatac tacacagtat gtcccatgc tagaaaggaa 2640
 agaggtttct aatatattccg acatccagag atcactctat gatcgtccag cctcatataa 2700
 gaagaaatct atgttagact cagaagtcaa aaacctcctt tcagatgata actcagaagg 2760
 ccttacttta ttggatttgt tgagcttcaac ctatcaagtt gcccgaggaa tggagttttt 2820
 ggcttcaaaa aattgtgtcc accgtgatct ggctgctcgc aacgtcctcc tggcacaagg 2880
 aaaaattgtg aagatctgtg actttggcct gccagagac atcatgcatg attcgaacta 2940
 tgtgtcgaag ggcagtaacct ttctgccgt gaagtggatg gctcctgaga gcatctttga 3000
 caacctctac accacactga gtgatgctg gtcttatggc attctgctct gggagatctt 3060
 ttcccttggg ggcaccctt accccggcat gatggtggat tctactttct acaataagat 3120
 caagagtggg taccggatgg ccaagcctga ccacgctacc agtgaagtct acgagatcat 3180
 ggtgaaatgc tggaacagtg agccggagaa gagaccctcc tttaccacc tgagtggatg 3240
 tgtggagaat ctgctgcctg gacaataaa aaagagttat gaaaaaatc acctggactt 3300
 cctgaagagt gaccatcctg ctgtggcacg catgcgtgtg gactcagaca atgcatacat 3360
 tgggtgcacc taaaaaacg aggaagacaa gctgaaggac tgggagggtg gtctggatga 3420
 gcagagactg agcgtgaca gtggctacat cattcctctg cctgacattg acctgtccc 3480
 tgaggaggag gacctgggca agaggaacag acacagctcg cagacctctg aagagagtgc 3540
 cattgagacg gttccagca gttccacctt catcaagaga gaggacgaga ccatgaaga 3600
 catcgacatg atggacgaca tcggcataga ctcttcagac ctggtggaag acagcttctt 3660
 gtaactggcg gattcagagg gttccttcca cttctggggc cacctctgga tcccgttcag 3720
 aaaaccactt tattgcaatg cggaggttga gaggaggact tggttgatgt ttaaagagaa 3780
 gttcccagcc aagggcctcg gggagcgttc taaatatgaa tgaatgggat attttgaat 3840
 gaactttgtc agtgttgctt ctcgcaatgc ctcagtagca tctcagtgtt gtgtgaagt 3900
 tggagataga tggataaggg aataataggc cacagaaggg gaactttgtg cttcaaggac 3960
 attggtgaga gtccaacaga cacaatttat actgcgacag aacttcagca ttgtaattat 4020
 gtaaataact ctaaccaagg ctgtgtttag attgtattaa ctatcttctt tggacttctg 4080
 aagagaccac tcaatccatc catgtacttc cctcttgaag cctgatgtca gctgctgttg 4140
 aactttttaa agaagtgcac gaaaaacct ttttgaacct taaaaggtag tggactata 4200
 gcattttgct atctttttta gtgttaagag ataaagaata ataattaacc aaccttgtt 4260
 aatagatttg ggtcatttag aagcctgaca actcatttc atattgtaat ctatgtttat 4320
 aatactacta ctgttatcag taatgctaaa tgtgtaataa tgtaacatga tttccctcca 4380
 gagaaagcac aatttaaac aatccttact aagtaggtga tgagtttgac agtttttgac 4440
 atttatatta aataacatgt ttctctataa agtatggtaa tagctttagt gaattaaatt 4500
 tagttgagca tagagaacaa agtaaaagta gtgttgcca ggaagtcaga atttttaaact 4560
 gtactgaata ggttcccaa tccatcgtat taaaaacaa ttaactgcc tctgaaataa 4620
 tgggattaga aacaaacaaa actcttaagt cctaaaagtt ctcaatgtag aggcataaac 4680
 ctgtgctgaa cataacttct catgtatatt acccaatgga aatatataat atcagcaaaa 4740
 agactggatt tgcagaagt tttttttttt ttcttcatgc ctgatgaaag ctttgcaac 4800
 cccaatataat gtattttttg aatctatgaa cctgaaaagg gtcagaagga tgcccagaca 4860
 tcagcctcct tctttcacc cttaccctaa agagaaagag tttgaaactc gagaccataa 4920

[0033]


```

agatattctt tagtggaggc tggatgtgca ttagcctgga tcctcagttc tcaaatgtgt 4980
gtggcagcca ggatgactag atcctgggtt tccatccttg agattctgaa gtatgaagtc 5040
tgagggaaac cagagtctgt atttttctaa actccctggc tgttctgac gccagtttt 5100
cggaaacact gacttaggtt tcaggaagt gccatgggaa acaataatt tgaactttgg 5160
aacagggttg gaattcaacc acgcaggaag cctactatth aaatccttgg cttcaggtta 5220
gtgacattta atgcatccta gctagcaatt gcgacctaa tttactttc cagtcttagc 5280
tgaggctgag aaagctaaag tttggtttg acaggttttc caaaagtaaa gatgctactt 5340
cccactgtat gggggagatt gaactttccc cgtctcccgt cttctgcctc cactccata 5400
ccccccaag gaaaggcatg tacaaaaatt atgcaattca gtgttccaag tctctgtgta 5460
accagctcag tgttttggtg gaaaaaacat ttttaagttt actgataatt tgaggttaga 5520
tgggaggatg aattgtcaca tctatccaca ctgtcaaca ggttggtgtg ggttcattgg 5580
cattctttgc aatactgctt aattgctgat accatagaa tgaacatgg gctgtgatta 5640
ctgcaatcac tgtgctatcg gcagatgat ctttggaaga tgcagaagca ataataaagt 5700
acttgactac ctactggtgt aatctcaatg caagcccaaa ctttcttacc caacttttc 5760
atagtaagt cgaagactga gccagattgg ccaattaaaa acgaaaacct gactaggttc 5820
tgtagagcca attagacttg aaatacgtt gtgtttctag aatcacagct caagcattct 5880
gtttatcgct cactctocct tgtacagcct tttttgttg gtgctttgca tttgatatt 5940
gctgtgagcc ttgcatgaca tcatgaggcc ggatgaaact tctcagtcca gcagtttcca 6000
gtcctaacaa atgctcccac ctgaatttgt atatgactgc atttgtgggt gtgtgtgtgt 6060
tttcagcaaa ttccagattt gtttctttt gcctcctgc aaagtctcca gaagaaaatt 6120
tgccaatctt tctactttc ttttttatg atgacaatca aagccggcct gagaacact 6180
atgtgtgact ttttaacga ttagtgatgt ccttaaaatg tggctgcca atctgtacaa 6240
aatggtccta tttttgtgaa gagggacata agataaaatg atgttataca tcaatatgta 6300
tatatgtatt tctatataga cttggagaat actgccaaaa catttatgac aagctgtatc 6360
actgccttgc tttatatttt tttactgtg ataatccca caggcacatt aactgttgca 6420
cttttgaatg tccaaaattt atattttaga aataataaaa agaagatac ttacatgttc 6480
ccaaaacaat ggtgtggtga atgtgtgaga aaaactaact tgatagggtc taccaatata 6540
aatgtatta cgaatgcccc tttcatgtt tttgtttta aacgtgtaa tgaagatctt 6600
tatatttcaa taaatgatataaataataaa gtt 6633

```

<210> 14

<211> 1089

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 14

```

Met Gly Thr Ser His Pro Ala Phe Leu Val Leu Gly Cys Leu Leu Thr
  1             5             10             15

```

```

Gly Leu Ser Leu Ile Leu Cys Gln Leu Ser Leu Pro Ser Ile Leu Pro
          20             25             30

```

```

Asn Glu Asn Glu Lys Val Val Gln Leu Asn Ser Ser Phe Ser Leu Arg

```

[0034]

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

[0035]

Tyr Thr Leu Thr Val Pro Glu Ala Thr Val Lys Asp Ser Gly Asp Tyr
 275 280 285

Glu Cys Ala Ala Arg Gln Ala Thr Arg Glu Val Lys Glu Met Lys Lys
 290 295 300

Val Thr Ile Ser Val His Glu Lys Gly Phe Ile Glu Ile Lys Pro Thr
 305 310 315 320

Phe Ser Gln Leu Glu Ala Val Asn Leu His Glu Val Lys His Phe Val
 325 330 335

Val Glu Val Arg Ala Tyr Pro Pro Pro Arg Ile Ser Trp Leu Lys Asn
 340 345 350

Asn Leu Thr Leu Ile Glu Asn Leu Thr Glu Ile Thr Thr Asp Val Glu
 355 360 365

Lys Ile Gln Glu Ile Arg Tyr Arg Ser Lys Leu Lys Leu Ile Arg Ala
 370 375 380

Lys Glu Glu Asp Ser Gly His Tyr Thr Ile Val Ala Gln Asn Glu Asp
 385 390 395 400

Ala Val Lys Ser Tyr Thr Phe Glu Leu Leu Thr Gln Val Pro Ser Ser
 405 410 415

Ile Leu Asp Leu Val Asp Asp His His Gly Ser Thr Gly Gly Gln Thr
 420 425 430

Val Arg Cys Thr Ala Glu Gly Thr Pro Leu Pro Asp Ile Glu Trp Met
 435 440 445

Ile Cys Lys Asp Ile Lys Lys Cys Asn Asn Glu Thr Ser Trp Thr Ile
 450 455 460

Leu Ala Asn Asn Val Ser Asn Ile Ile Thr Glu Ile His Ser Arg Asp
 465 470 475 480

Arg Ser Thr Val Glu Gly Arg Val Thr Phe Ala Lys Val Glu Glu Thr
 485 490 495

Ile Ala Val Arg Cys Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gly Ala Glu Asn Arg
 500 505 510

[0036]

Glu Leu Lys Leu Val Ala Pro Thr Leu Arg Ser Glu Leu Thr Val Ala
 515 520 525

Ala Ala Val Leu Val Leu Leu Val Ile Val Ile Ile Ser Leu Ile Val
 530 535 540

Leu Val Val Ile Trp Lys Gln Lys Pro Arg Tyr Glu Ile Arg Trp Arg
 545 550 555 560

Val Ile Glu Ser Ile Ser Pro Asp Gly His Glu Tyr Ile Tyr Val Asp
 565 570 575

Pro Met Gln Leu Pro Tyr Asp Ser Arg Trp Glu Phe Pro Arg Asp Gly
 580 585 590

Leu Val Leu Gly Arg Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Lys Val Val
 595 600 605

Glu Gly Thr Ala Tyr Gly Leu Ser Arg Ser Gln Pro Val Met Lys Val
 610 615 620

Ala Val Lys Met Leu Lys Pro Thr Ala Arg Ser Ser Glu Lys Gln Ala
 625 630 635 640

Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Thr His Leu Gly Pro His Leu Asn
 645 650 655

Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Ser Gly Pro Ile Tyr Ile
 660 665 670

Ile Thr Glu Tyr Cys Phe Tyr Gly Asp Leu Val Asn Tyr Leu His Lys
 675 680 685

Asn Arg Asp Ser Phe Leu Ser His His Pro Glu Lys Pro Lys Lys Glu
 690 695 700

Leu Asp Ile Phe Gly Leu Asn Pro Ala Asp Glu Ser Thr Arg Ser Tyr
 705 710 715 720

Val Ile Leu Ser Phe Glu Asn Asn Gly Asp Tyr Met Asp Met Lys Gln
 725 730 735

Ala Asp Thr Thr Gln Tyr Val Pro Met Leu Glu Arg Lys Glu Val Ser

[0037]

	740		745		750
Lys Tyr Ser Asp Ile Gln Arg Ser Leu Tyr Asp Arg Pro Ala Ser Tyr					
	755		760		765
Lys Lys Lys Ser Met Leu Asp Ser Glu Val Lys Asn Leu Leu Ser Asp					
	770		775		780
Asp Asn Ser Glu Gly Leu Thr Leu Leu Asp Leu Leu Ser Phe Thr Tyr					
	785		790		800
Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Lys Asn Cys Val His					
		805		810	815
Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Ala Gln Gly Lys Ile Val					
	820		825		830
Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Met His Asp Ser Asn					
	835		840		845
Tyr Val Ser Lys Gly Ser Thr Phe Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro					
	850		855		860
Glu Ser Ile Phe Asp Asn Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Asp Val Trp Ser					
	865		870		875
Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Gly Thr Pro Tyr					
		885		890	895
Pro Gly Met Met Val Asp Ser Thr Phe Tyr Asn Lys Ile Lys Ser Gly					
		900		905	910
Tyr Arg Met Ala Lys Pro Asp His Ala Thr Ser Glu Val Tyr Glu Ile					
	915		920		925
Met Val Lys Cys Trp Asn Ser Glu Pro Glu Lys Arg Pro Ser Phe Tyr					
	930		935		940
His Leu Ser Glu Ile Val Glu Asn Leu Leu Pro Gly Gln Tyr Lys Lys					
	945		950		955
Ser Tyr Glu Lys Ile His Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp His Pro Ala					
		965		970	975

[0038]

Val Ala Arg Met Arg Val Asp Ser Asp Asn Ala Tyr Ile Gly Val Thr
980 985 990

Tyr Lys Asn Glu Glu Asp Lys Leu Lys Asp Trp Glu Gly Gly Leu Asp
995 1000 1005

Glu Gln Arg Leu Ser Ala Asp Ser Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Pro Asp
1010 1015 1020

Ile Asp Pro Val Pro Glu Glu Glu Asp Leu Gly Lys Arg Asn Arg His
1025 1030 1035 1040

Ser Ser Gln Thr Ser Glu Glu Ser Ala Ile Glu Thr Gly Ser Ser Ser
1045 1050 1055

Ser Thr Phe Ile Lys Arg Glu Asp Glu Thr Ile Glu Asp Ile Asp Met
1060 1065 1070

Met Asp Asp Ile Gly Ile Asp Ser Ser Asp Leu Val Glu Asp Ser Phe
1075 1080 1085

Leu

<210> 15

<211> 10

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的抗-VEGF 适体

<400> 15

gaagaaugg

10

<210> 16

<211> 8

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的抗-VEGF 适体

[0039]

<400> 16 uuggacgc	8
<210> 17 <211> 8 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列描述: 合成的抗-VEGF 适体	
<400> 17 gugaaugc	8
<210> 18 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列描述: 合成的抗-VEGF 适体	
<400> 18 cggaaucagu gaaugcuuau acauccg	27
<210> 19 <211> 27 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列描述: 合成的抗-VEGF 适体	
<400> 19 cggaaucagu gaaugcuuau acauccg	27
<210> 20 <211> 32 <212> DNA	

[0040]

- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 组合的 DNA/RNA 分子描述: 合成的抗-PDGF 适体
- <220>
- <223> 人工序列描述: 合成的抗-PDGF 适体
- <220>
- <221> modified_base
- <222> (10)
- <223> 六甘醇亚磷酸胺
- <220>
- <221> modified_base
- <222> (23)
- <223> 六甘醇亚磷酸胺
- <400> 20
caggcuacgn cgtagagcau cantgatccu gt 32
- <210> 21
- <211> 30
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 人工序列描述: 合成的抗-PDGF 适体
- <400> 21
caggctacgc gtagagcatc atgacctgt 30
- <210> 22
- <211> 32
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 人工序列描述: 合成的抗-PDGF 适体
- <220>

[0041]

<221> modified_base
<222> (10)
<223> 五甘醇亚磷酰胺

<220>
<221> modified_base
<222> (23)
<223> 五甘醇亚磷酰胺

<400> 22
caggcuacgn cgtagagcau cantgatccu gt

32

FDGF-B 核酸序列 (GenBank Accession No. X92811) (SEQ ID NO: 1)

1 CCCTGCCTGC CTCCCTGCGC ACCCGCAGCC TCCCCGCTG CCTCCCTAGG GCTCCCTCC
61 GGCCGCCAGC GCCATTTTT CATTCCCTAG ATAGAGATAC TTTGCGCGCA CACACATACA
121 TACGGCGCGA AAAAGGAAA AAAAAAAAAA AAGCCCACCC TCCAGCCTCG CTGCAAAGAG
181 AAAACCGGAG CAGCCGAGC TCGCAGCTCG CAGCCCGCAG CCCGCAGAGG ACGCCAGAG
241 CGGCGAGCGG GCGGGCAGAC GGACCGACGG ACTCGCGCCG CGTCCACCTG TCGGCCGGGC
301 CCAGCCGAGC GCGCAGCGG CACGCCGCGC GCGCGGAGCA GCCGTGCCCG CGCCCCGGC
361 CCGCCGCCAG GCGGCACAGC CTCCCGCCCC CCTACCGGC CCGGGCGGGA GTTTGCACCT
421 CTCCCTGCCC GGGTGTCTGA GCTGCCGTTG CAAAGCCAAC TTTGGAAAA GTTTTTTGGG
481 GGAGACTTGG GCCTTGAGGT GCCCAGCTCC GCGCTTCCG ATTTTGGGGG CCTTTCCAGA
541 AAATGTTGCA AAAAGCTAA GCGGGCGGGC AGAGGAAAAC GCCTGTAGCC GCGGAGTGAA
601 GACGAACCAT CGACTGCCGT GTTCCTTTC CTCTTGAGG TTGGATCCC CTGGGCGCCC
661 CCACACGGCT AGACGCCTCG GCTGTTCCG GACGCAGCCC CCGGCCGCTG GATGCTGCAC
721 TCGGGCTCGG GATCCGCCA GGTAGCGGCC TCGGACCCAG GTCCTGCGCC CAGGTCTCC
781 CCTGCCCCCC AGCGACGGAG CCGGGGCGG GGGCGGGGC GCCGGGGCA TCGGGGTGAG
841 CCGCGGCTGC AGAGGCCTGA GCGCCTGATC GCGCGGACC CGAGCCGAGC CCACCCCOCT
901 CCCCAGCCCC CCACCTGGC CCGGGGGCG GCGCGCTCGA TCTACGCTT CCGGGCCCCG
961 CCGGGCCGGG CCGGAGTCG GCATGAATCG CTGCTGGGG CTCTTCTGT CTCTCTGCTG
1021 CTACCTGCGT CTGGTCAGCG CCGAGGGGA CCCCATTCCC GAGGAGCTT ATGAGATGCT
1081 GAGTGACCAC TCGATCCGCT CCTTTGATGA TCTCCAACGC CTGCTGCAGG GAGACCCCGG
1141 AGAGGAAGAT GGGGCCGAGT TGGACCTGAA CATGACCCGC TCCACTCTG GAGGCGAGCT
1201 GGAGAGCTTG GCTCGTGGAA GAAGGAGCCT GGGTCCCTG ACCATTGCTG AGCCGGCCAT
1261 GATCGCCGAG TGCAAGACGC GCACCGAGT GTTCGAGATC TCCCGGCCC TCATAGACCG
1321 CACCAACGCC AACTTCTG TGTGGCCGC CTGTGTGGAG GTGCAGCGT GCTCCGCTG
1381 CTGCAACAAC CGCAACGTC AGTCCGCCC CACCCAGGTG CAGCTGCGAC CTGTCCAGGT

图 1A

1441 GAGAAAGATC GAGATTGTGC GGAAGAAGCC AATCTTTAAG AAGGCCACGG TGACCCTGGA
 1501 AGACCACCTG GCATGCAAGT GTGAGACAGT GGCAGCTGCA CGGCTGTGA CCCGAAGCCC
 1561 GGGGGGTTCC CAGGAGCAGC GAGCCAAAAC GCCCCAACT CGGGTGACCA TTCGGACGGT
 1621 GCGAGTCCGC CGGCCCCCA AGGGCAAGCA CCGGAAATC AAGCACACGC ATGACAAGAC
 1681 GGCCTGAAG GAGACCCTTG GAGCCTAGGG GCATCGGCAG GAGAGTGTGT GGGCAGGGTT
 1741 ATTTAATATG GTATTGCTG TATTGCCCC ATGGGGCCTT GGAGTAGATA ATATTGTTTC
 1801 CCTCGTCCGT CTGTCTCGAT GCCTGATTCG GACGGCCAAT GGTGCTCCC CCACCCTCC
 1861 ACGTGTCCGT CCACCCTTC ATCAGCGGGT CTCCTCCAG CGGCCTCCG CTCTGCCCA
 1921 GCAGCTCAAG AAGAAAAGA AGGACTGAAC TCCATCGCCA TCTTCTTCC TTAATCCAA
 1981 GAAGTGGGA TAAGAGTGTG AGAGAGACTG ATGGGGTCCG TCTTTGGGG AAACGGGTTT
 2041 CTTCCCTGC ACCTGGCCTG GGCCACACCT GAGCGCTGTG GACTGTCTG AGGAGCCCTG
 2101 AGGACCTCTC AGCATAGCCT GCCTGATCCC TGAACCC

PDGF-B前肽序列(GenBank Accession No. CAA26579) (SEQ ID NO: 2)

1 MNRCALEFLS LCCYLRLVSA EGDPIPEELY EMLSDHSIRS FDDLQRLHNG DPGGEDGAEI
 61 DLNTRSHSG GELESLARGR RSLGSLTIAN PAMLANCKSR TEVFEISRL IDRIANFLV
 121 WPCVEVQRC SGCCEWVQ CRPTQVLRP VQVRIEIVR KVFIFKATV TLEDHLACK
 181 ETVAAARFVT RSPGGSQEQR AKTPQTRVTI RIVRVRPPK GHRKFKHTH DKTALKETLG
 241 A

图 1B

FDGF-A 核酸序列 (GenBank Accession No. XM6374) (SEQ ID NO: 11)

1 TTCTTGGGGC TGATGTCCGC AAATATGCAG AATTACCGGC CGGGTCGCTC CTGAAGCCAG
61 CGCGGGGAGC GAGCGCGGCG GCGGCCAGCA CCGGGAACGC ACCGAGGAAG AAGCCCAGCC
121 CCCGCCCTCC GCCCCTTCCG TCCCCACCCC CTACCCGGCG GCCCAGGAGG CTCCCCGGCT
181 GCGGCGCGCA CTCCCTGTTT CTCCTCCTCC TGGCTGGGCG TGCTGCCTC TCCGCACTCA
241 CTGCTCGCCG GCGCCCGTCC GCCAGTCCG TGCTCCCCG GCCACCTCC TCCGGGCGCG
301 GCTCCCTAAG GGATGGTACT GAATTCGCC GCCACAGGAG ACCGGCTGGA GCGCCC GCCC
361 CGCGCCTCGC CTCTCCTCCG AGCAGCCAGC GCCTCGGGAC GCGATGAGGA CCTTGGCTTG
421 CCTGCTGCTC CTCGGCTGCG GATACCTCGC CCATGTCTG GCCGAGGAAG CCGAGATCCC
481 CCGCGAGGTG ATCGAGAGGC TGGCCCGCAG TCAGATCCAC AGCATCCGGG ACCTCCAGCG
541 ACTCCTGGAG ATAGACTCCG TAGGGAGTGA GGATTCTTTG GACACCAGCC TGAGAGCTCA
601 CGGGGTCCAC GCCACTAAGC ATGTGCCCGA GAAGCGGCCC CTGCCCATTC GGAGGAAGAG
661 AAGCATCGAG GAAGCTGTCC CCGCTGTCTG CAAGACCAGG ACGGTCATT TACGAGATTCC
721 TCGGAGTCAG GTCGACCCCA CGTCCGCCAA CTTCTGATC TGGCCCCCGT GCGTGGAGGT
781 GAAACGCTGC ACCGGCTGCT GCAACACGAG CAGTGTCAAG TGCCAGCCCT CCCGCGTCCA
841 CCACCGCAGC GTCAGGTGG CCAAGGTGGA ATACGTCAGG AAGAAGCCAA AATTAAAAGA
901 AGTCCAGGTG AGGTTAGAGG AGCATTGGA GTGCGCCTGC GCGACCACAA GCCTGAATCC
961 GGATTATCGG GAAGAGGACA CGGATGTGAG GTGAGGATGA GCCGAGCCC TTTCTGGGA
1021 CATGGATGTA CATGGCGTGT TACATTCTG AACCTACTAT GTACGGTGTCT TTATTGCCAG
1081 TGTGCGGTCT TTGTTCTCCT CCGTGA AAAA CTGTGTCCGA GAACACTCGG GAGAACA AAG

图 1C

1141 AGACAGTGCA CATTGTGTTA ATGTGACATC AAAGCAAGTA TTGTAGCACT CGGTGAAGCA
1201 GTAAGAAGCT TCCTTGTCAA AAAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAAAA CAAAACCACA
1261 AATGACAAAA ACAAACGGGA CTCACAAAAA TATCTAAACT CGATGAGATG GAGGGTCGCC
1321 CCGTGGGATG GAAGTGCAGA GGTCTCAGCA GACTGGATT TGTGCCGGT GGTACAGGT
1381 GCTTTTTTGC CGAGGATGCA GAGCCTGCTT TGGGAACGAC TCCAGAGGGG TGCTGGTGGG
1441 CTCTGCAGGG CCCGCAGGAA GCAGGAATGT CTTGGAACC GCCACGCGAA CTTTAGAAGC
1501 CACACCTCCT CGCTGTAGTA TTTAAGCCCA TACAGAAACC TTCCTGAGAG CTTAAGTGG
1561 TTTTTTTTTT TGTTTTGTT TGTTTTTTT TTTTTTTGTT TTTTTTTTT TTTTTTTTT
1621 TTACACCATA AAGTGATTAT TAAGCTCCT TTTACTCTT GGCTAGCTT TTTTTTTTT
1681 TTTTTTTTT TTTTTTTAA TTATCTCTG GATGACATT ACACCGATAA CACACAGGCT
1741 GCTGTAACG TCAGGACAGT GCGACGGTAT TTTTCTAGC AAGATGCAA CTAATGAGAT
1801 GTATTAAAT AAACATGGTA TACCTACCTA TGCATCATT CCTAAATGT TCTGGCTTG
1861 TGTTTCTCCC TTACCCTGCT TTATTTGTTA APTTAAGCCA TTTGAAAGA ACTATGCGTC
1921 AACCAATCGT ACGCGTCCC TCGGCACCT GCCCAGAGC CCGTTGTGG CTGAGTGACA
1981 ACTGTGCC CCGAGTGCAC ACCTAGAATG CTGTGTCCC ACGCGGCAG TGAGATGCAT
2041 TGCCGCTTCT GTCTGTGTTG TTGGTGTGCC CTGGTGCCG GGTGGCGGC ACTCCCTCTG
2101 CTGCCAGTGT TTGGACAGAA CCCAATTCT TTATTTTGG TAAGATATTG TGCTTACCT
2161 GTATTACAG AAATGTGTGT GTGTGTTT TTTTTTTGTA AAGGTGAAGT TTGTATGTT
2221 ACCTAATATT ACCTGTTTTG TATACCTGAG AGCCTGCTAT GTTCTTCTT TGTGATCCA
2281 AATTAAAAA AAAATACCA CCAAC

FDGF-A 多肽序列 (GenBank Accession No. CAA28577) (SEQ ID NO: 12)

1 MRTLACL LLL GCGYLAHVLA EEAEIPREVI ERLARQIHS IRDLQRLEI DSVGSEDSLD
61 TSLRANGVHA TKHVFEKRPL PIRKRSIEE AVPAVCKTAT VIYEIPRSQV DPTSANFLIN
121 PPCVEVKRCT GCCNTSSVKC QPSRVHRSV KVAKVEYVAK KFKLKEVQVR LEEHLECACA
181 TTSLNPDYRE EOTDVR

图 1D

VEGF 核酸序列 (GenBank Accession No: NM_003376) (SEQ ID NO: 3)

1 TCGCGGAGGC TTGGGGCAGC CGGGTAGCTC GGAGGTCGTG GCGCTGGGGG CTAGCACCAG
61 CGCTCTGTCC GGAGGCGCAG CGGTTAGGTG GACCGGTCCG CGGACTCACC GGCCAGGGCG
121 CTCGGTGCTG GAATTTGATA TTCATTGATC CGGGTTTTAT CCCTCTTCTT TTTTCTTAAA
181 CTTTTTTTTT TAAACTGTA TTGTTTCTCG TTTTAATTA TTTTGTCTG 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 GACCGCCCGA GCGCGGCGTG AGCCCTCCCG CTTGGGATCC
481 CGCAGCTGAC CAGTCGCGCT GACGGACAGA CAGACAGACA CCGCCCCCAG CCCAGCTAC
541 CACCTCCTCC CCGGCCGGCG GCGGACAGTG GACGCGGCGG CGAGCCGCGG GCAGGGGGCG
601 GAGCCCGCGC CCGGAGGCCG GGTGGAGGGG GTCGGGGCTC GCGGCGTCCG ACTGAAACTT
661 TTCGTCCAC TTCTGGGCTG TTCTCGCTTC GGAGGAGCCG TGGTCCGCGC GGGGGAAGCC
721 GAGCCGAGCG GAGCCGCGAG AAGTGTAGC TCGGGCCGGG ABGAGCCGCA GCCGGAGGAG
781 GGGGAGGAGG AAGAGAGAA GGAAGAGGAG AAGGGGCCCG AGTGGCGACT CGGCGCTCGG
841 AAGCCGGGCT CATGGACGGG TGAGGCGGCG GTGTGCGCAG ACAGTGCTCC AGCCGCGCGC
901 GCTCCCAGG CCCTGGCCCG GGCCTCGGGC CGGGGAGGAA GAGTAGCTCG CCGAGGGCGC
961 GAGGAGAGCG GCGCCGCCCA CAGCCCGAGC CGGAGAGGGA GCGCGAGCCG CGCCGGCCCC
1021 GGTGCGGCCT CCGAAACCAT GAACTTTCTG CTGTCTTGGG TGCATTGGAG CCTTGCCTTG
1081 CTGCTCTACC TCCACCATGC CAAGTGGTCC CAGGCTGCAC CCATGGCAGA AGGAGGAGGG
1141 CAGAATCATC ACGAAGTGGT GAATTCATG GATGTCTATC AGCSCAGTA CTGCCATCCA
1201 ATCGAGACCC TGGTGGACAT CTTCCAGGAG TACCCTGATG AGATCGAGTA CATCTTCAAG
1261 CCATCCTGTG TGCCCTGAT GCGATGCGGG GGCTGCTGCA ATGACGAGGG CCTGGAGTGT
1321 GTGCCCACTG AGGAGTCCAA CATCACCATG CAGATTATGC GGATCAAACC TCACCAAGGC
1381 CAGCACATAG GAGAGATGAG CTTCTACAG CACAACAAAT GTGAATGCAG ACCAAAGAAA

图 2A

1441 GATAGAGCAA GACAAGAAA AAAATCAGTT CGAGGAAAGG GAAAGGGCA AAAACGAAAG
1501 CGCAAGAAAT CCCGGTATAA GTCCTGGAGC GTTCCCTGTG GGCCTTGCTC AGAGCCGAGA
1561 AAGCATTGTG TTGTACAAGA TCCGCAGACG TGTAATGTT CCTGCAAAA CACAGACTCG
1621 CGTTGCAAGG CGAGGCAGCT TGAGTTAAAC GAACGTACTT GCAGATGTGA CAAGCCGAGG
1681 CGGTGAGCCG GGCAGGAGGA AGGAGCCTCC CTCAGGGTTT CGG

YEGF 多肽序列 (GenBank Accession No. NP_083367) (SEQ ID NO: 4)

1 MNFLLSNVHW SLALLLYLHH AKWSQAAPMA EGGGQNHHEV VKFNDVYQRS YCHPIETLVD
61 IFQEYPDEIE YIFKPSVPL MRCGGCCNDE GLECVPTES NITMQIMRIK PHQGQHIGEM
121 SFLQHNKCEC RPKKDRARQE IKSVRGKKGQ QKRKRKRSRY KSWSVFCGFC SERRKHLFVQ
181 DPQTKCKSCK NTDSCKARQ LELNERTCRC DKPRR

图 2B

FDGFR-B 核酸序列 (GenBank Accession No. NM_002692) (SEQ ID NO: 5)

1 GGCCCTCAG CCTGCTGCC CAGCAGGAGC CTGTGCTCGC CCTGCCAAC GCAGACAGCC
61 AGACCCAGGG CGGCCCTCT GCGGGCTCTG CTCCTCCGA AGGATGCTTG GGGAGTGGG
121 CGAAGCTGGG CGCTCCTCTC CCTACAGCA GCCCCCTTC TCCATCCTC TGTTCCTCTG
181 AGCCTTCAGG AGCCTGCACC AGTCTGCCT GTCCTTCTAC TCAGCTGTTA CCCACTCTGG
241 GACCAGCAGT CTTTCTGATA ACTGGGAGAG GGCAGTAAGG AGGACTTCTT GGAGGGGGTG
301 ACTGTCCAGA GCCTGGAACT GTGCCACAC CAGAAGCCAT CAGCAGCAAG GACACCATGC
361 GGCTTCCGGG TCGATGCCA GCTCTGGCCC TCAAAGGCGA GCTGCTGTTG CTGTCTCTCC
421 TGTTACTTCT GGAACCACAG ATCTCTCAGG GCCTGGTCTT CACACCCCG GGGCCAGAGC
481 TTGTCTCAA TGTCTCAGC ACCTTGTTT TGACCTGCTC GGGTTCAGCT CCGTGTGT
541 GGAACGGAT GTCCAGGAG CCCCCACAG AAATGGCAA GGCCCAGGAT GGCACCTTCT
601 CCAGCGTCT CACTGACC AACCTACTG GGCTAGACAC GGGAGAATAC TTTTGCACCC
661 ACAATGACTC CCGTGGACTG GAGACCGATG AGCGGAAACG GCTCTACATC TTTGTCCAG
721 ATCCCACCGT GGGCTTCTC CTAATGATG CCGAGGAAC ATTCACTTT CTCACGGAA
781 TAACTGAGAT CACCATTC A TGCCGAGTAA CAGACCACA GCTGGTGGTG AACTGCACG
841 AGAAGAAAGG GGACGTGCA CTGCTGTCC CCTATGATCA CCAACGTGGC TTTTCTGGTA
901 TCTTTGAGGA CAGAAGTAC ATCTCAAAA CCACCATTGG GGACAGGGAG GTGGATTCTG
961 ATGCCTACTA TGTCTACAGA CTCCAGGTGT CATCCATCAA CGTCTCTGTG AACGCAGTGC
1021 AGACTGTGGT CCGCCAGGT GAGAATCA CCCTCATGTG CATTGTGATC GGAATGAGG
1081 TGGTCAACTT CGAGTGGACA TACCCCGCA AAGAAAGTGG GCGGCTGGTG GAGCCGGTGA
1141 CTGACTTCTT CTTGGATATG CCTTACCACA TCCGCTCCAT CCTGCACATC CCCAGTCCG
1201 AGTTAGAAGA CTCGGGACC TACACCTGCA ATGTGACGGA GAGTGTGAAT GACCATCAGG
1261 ATGAAAAGGC CATCAACATC ACCGTGGTTG AGAGCGGCTA CGTCCGGCTC CTGGGAGAGG
1321 TGGGCACACT ACAATTGCT GAGCTGCATC GGAGCCGGAC ACTGCAGGTA GTGTTGAGG
1381 CCTACCCACC GCCACTGTC CTGTGGTTCA AAGACAACCG CACCCTGGG GACTCCAGCG

图 3A

1441 CTGGCGAAT CGCOCTGTCC ACGCGCAACG TGTGGGAGAC CCGGTATGTG TCAGAGCTGA
1501 CACTGGTTCC CGTGAAGGTG GCAGAGGCTG GCCACTACAC CATGCGGGCC TTCCATGAGG
1561 ATGCTGAGGT CCAGCTCTCC TTCCAGCTAC AGATCAATGT COCTGTCCGA GTGCTGGAGC
1621 TAAGTGAGAG CCACCCTGAC AGTGGGGAAC AGACAGTCCG CTGTGCTGCC CGGGGCATGC
1681 CCCAGCCGAA CATCATCTGG TCTGCCTGCA GAGACCTCAA AAGGTGTCCA CGTGAGCTGC
1741 CGCCACGCT GCTGGGGAAC AGTTCCGAAG AGGAGAGCCA GCTGGAGACT AACGTGACGT
1801 ACTGGGAGGA GGAGCAGGAG TTTGAGGTGG TGAGCACACT GCGTCTGCAG CAGGTGGATC
1861 GGCCACTGTC GGTGCGCTGC ACGCTGCGCA ACGCTGTGGG CCAGGACACG CAGGAGGTCA
1921 TCGTGGTCC ACACTCCTTG CCTTTAAGG TGGTGGTGAT CTCAGCCATC CTGGCCCTGG
1981 TGGTGCTCAC CATCATCTCC CTTATCATCC TCATCATGCT TTGGCAGAAG AAGCCACGTT
2041 ACGAGATCCG ATGGAAGGTG APTGAGTCTG TGAGCTCTGA CGGCCATGAG TACATCTAGG
2101 TGGACCCCAT GCAGCTGCC TATGACTCCA CGTGGGAGCT GCCGCGGAC CAGCTTGTGC
2161 TGGGACGCAC CCTCGGCTCT GGGGCCCTTG GGCAGGTGGT GGAGGCCACG GCTCATGGCC
2221 TGAGCCATTC TCAGGCCACG ATGAAAGTGG CCGTCAAGAT GCTTAAATCC ACAGCCCGCA
2281 GCAGTGAGAA GCAAGCCCTT ATGTCCGAGC TGAAGATCAT GAGTCACCTT GGGCCCCACC
2341 TGAACGTGGT CAACCTGTTG GGGGCCTGCA CCAAAGGAGG ACCCATCTAT ATCATCACTG
2401 AGTACTGCCG CTACGGAGAC CTGGTGGACT ACCTGCACCG CAACAACAC ACCTTCTGCG
2461 AGCACCACTC CGACAAGCGC CGCCCGCCA GCGCGGAGCT CTACAGCAAT GCTCTGCGCG
2521 TTGGGCTCCC CCTGCCAGC CATGTGTCTT TGACCGGGGA GAGCGACGCT GGCTACATGG
2581 ACATGAGCAA GGACGAGTCG GTGGACTATG TGCCCATGCT GGACATGAAA GGAGACGTCA
2641 AATATGCAGA CATCGAGTCC TCCAACCTACA TGGCCCTTA CGATAACTAC GTTCCCTCTG
2701 CCCTGAGAG GACCTGCCGA GCAACTTTGA TCAACGAGTC TCCAGTGCTA AGCTACATGG
2761 ACCTCGTGGG CTTGAGCTAC CAGGTGGCCA ATGGCATGGA GTTCTGCGCC TCCAAGAACT
2821 GCGTCCACAG AGACCTGGCG GCTAGGAACG TGCTCATCTG TGAAGGCAAG CTGGTCAAGA
2881 TCTGTGACTT TGGCCTGGCT CGAGACATCA TCGGGGACTC GAATTACATC TCCAAGGCA

2941 GCACCTTTT GCCTTAAAG TGGATGGCTC CGGAGAGCAT CTTCAACAGC CTCTACACCA
3001 CCTGAGCGA CGTGTGGTCC TTCGGGATCC TGCTCTGGGA GATCTTCACC TTGGGTGGCA
3061 CCOCTTACCC AGAGCTGCCC ATGAACGAGC AGTTCTACAA TGCCATCAAA CGGGGTACC
3121 GCATGGCCCA GCCTGCCCAT GCCTCCGACG AGATCTATGA GATCATGCAG AAGTGCTGGG
3181 AAGAGAGTT TGAGATTGGG CCCCCCTTCT CCGAGCTGGT GCTGCTTCTC GAGAGACTGT
3241 TGGGCGAAGG TTACAAAAG AAGTACCAGC AGGTGGATGA GGAGTTTCTG AGGAGTGACC
3301 ACCCAGCCAT CCTTCGGTCC CAGGCCCGCT TGCCTGGGT CCATGGCCTC CGATCTCCCC
3361 TGGACACCAG CTCCTCCTC TATACTGCG TGCCAGCCAA TGAGGGTGAC AACGACTATA
3421 TCATCCCCCT GCCTGACCCC AAACCCGAGG TTGCTGACGA GGGCCACTG GAGGGTTCCC
3481 CCAGCCTAGC CAGCTCCACC CTGAATGAG TCAACACCTC CTCAACCATC TCCTGTGACA
3541 GCCCCCTGGA GCCCCAGGAC GAACCAGAGC CAGAGCCCA GCTTGAGCTC CAGGTGGAGC
3601 CGGAGCCAGA GCTGGAACAG TTGCCGGATT CGGGGTGCC TCCGCCTCGG GCGGAAGCAG
3661 AGGATAGCTT CCTGTAGGGG GCTGGCCCT ACCCTGCCCT GCCTGAAGCT CCCCCCTGC
3721 CAGCACCAG CATCTCTGG CCTGGCCTGA CCGGGCTTCC TGTGAGCCAG GCTGCCCTTA
3781 TCAGCTGTCC CTTCTGGAA GCTTCTGCT CCGTACGTGT TGTGCCCAA ACCCTGGGGC
3841 TGCTTAGGA GGCAAGAAA CTGCAGGGC CGTGACCAGC CCTCTGCCTC CAGGGAGGCC
3901 AACTGACTCT GAGCCAGGT TCCCCAGGG AACTCAGTTT TCCATATGT AAGATGGGAA
3961 AGTTAGGCTT GATGACCAG AATCTAGGAT TCTCTCCCTG GCTGACAGGT GGGGAGACCG
4021 AATCCCTCC TGGGAAGATT CTTGGAGTA CTGAGGTGGT AAATTAAGTT TTTTCTGTTT
4081 AGCCAGCTAC CCTCAAGGA ATCATAGCTC TCTCTGCA CTTTTATCC ACCCAGGAGC
4141 TAGGGAAGAG ACCCTAGCCT CCCTGGCTGC TGGCTGAGCT AGGGCCTAGC CTTGAGGAGT
4201 GTTGCCTCAT CCAGAAGAA GCCAGTCTC TCCTATGAT GCCAGTCCCT GCGTCCCTG
4261 GCCCAGCTG GTCTGGGGCC ATTAGGCAGC CTAATTAATG CTGGAGGCTG AGCCAAGTAC
4321 AGGACACCC CAGCCTGCAG CCCTGCCCA GGGCACTTG AGCACACGCA GCCATAGCAA
4381 GTGCCTGTGT CCCTGTCTT CAGGCCCATC AGTCTGGGG CTTTTCTTT ATCACCTCA

4441 GTCTTAATCC ATCCACCAGA GTCTAGAAGG CCAGACGGGC CCCGCATCTG TGATGAGAAT
4501 GTAAATGTGC CAGTGTGGAG TGGCCACGTG TGTGTGCCAG TATATGGCCC TGGCTCTGCA
4561 TTGGACCTGC TATGAGGCTT TGGAGGAATC CCTCACCCCTC TCTGGGCCTC AGTTTCCOCT
4621 TCAAAAAATG AATAAGTCGG ACTTATTAAC TCTGAGTGCC TTGCCAGCAC TAACATTCTA
4681 GAGTATTCCA GGTGGTTGCA CATTGTGCA GATGAAGCAA GGCCATATAC CCTAAACTTC
4741 CATCCTGGGG GTCAGCTGGG CTCCTGGGAG ATTCCAGATC ACACATCACA CTCGGGGGAC
4801 TCAGGAACCA TGCCCCCTCC CCAGGCCCCC AGCAAGTCTC AAGAACACAG CTCACAGGC
4861 CTTGACTTAG AGTGACAGCC GGTGTCTGG AAAGCCCCAA GCAGCTGCCC CAGGGACATG
4921 GGAGACCAC GGGACCTCTT TCACTACCCA CGATGACCTC CGGGGTATC CTGGGCAAAA
4981 GGGACAAGA GGGCAATGA GATCACCTCC TGCAGCCAC CACTCCAGCA CCTGTGCCGA
5041 GGTCTGCCGC GAAGACAGAA TGGACAGTGA GGACAGTTAT GTCTTGTAAA AGACAAGAAG
5101 CTTAGATGG TACCCAAGA AGGATGTGAG AGGTGGCCGC TTGGAGTTG CCOCTCACCC
5161 ACCAGCTGCC CCATCCCTGA GGCAGGCTC CATGGGGTA TGGTTTTGTC ACTGCCCAGA
5221 CCTAGCAGTG ACATCTCATT GTCCCCAGCC CAGTGGGCAT TGGAGGTGCC AGGGGAGTCA
5281 GGGTTGTAGC CAAGACGCCC CCGCACGGGG AGGGTTGGGA AGGGGTGCA GGAAGCTCAA
5341 CCCCTCTGGG CACCAACCCT GCATTGCAGG TTGGCACTT ACTTCCCTGG GATCCCAGA
5401 GTTGGTCCAA GGAGGGAGAG TGGGTTCTCA ATACGTTACC AAGATATAA TCACCTAGGT
5461 TTACAAATAT TTTTAGGACT CACGTAACT CACATTATA CAGCAGAAAT GCTATTTGT
5521 ATGCTGTTAA GTTTTCTAT CTGTGACTT TTTTTAAGG GAAAGATTT ANTATTAAC
5581 CTGGTGCTTC TCACTCAC

FIGURE B 多肽序列 (GenBank Accession No. NP_002690) (SEQ ID NO: 6)

1 MRLPGAMPAL ALKGE LLLLS LLLLLLQIS QGLVVTPPGP ELVLNVSSTF VLTCGSAFV
 61 VWERMSQEPF QEMAKAQDT FSSVLTLTNL TGLDTGEYFC THNDSRGLET DERKRLYIFV
 121 PDPTVGFLPN DAELFIFLT EITEITIPCR VTDPOLVVTL HEKKGDAALP VPYDHQRGFS
 181 GIFEDRSYIC KTTIGDREVD SOAYYVYRLQ VSSINVSUNA VQTVVRQGEN ITLNCIVIGN
 241 EVVNFENTYP RKESGRLVEP VTFLLDMPY HIRSIHIPS AELEDSGTYT CNVTESVNDH
 301 QDEKAINITV VESGYVRLG EVGTLQFAEL HRSRTLQVVF EAYPPPTVLW FKONRTLGDG
 361 SAGEIALSTR NVSETRYVSE LTLVRVKVAE AGHYTMRAFH EDAEVQLSFQ LQINVPVRVL
 421 ELSHSPDSG EQTVRCRGRG MPQFNIIWSA CRDLKRCPRE LPPTLLGNSS EESOLETNV
 481 TYWEEEQEFE VVSTLRQLHV DRPLSVRCTL RNAVQDQTQE VIVVPHSLPF KVVVISAILA
 541 LVVLTIIISLI ILINLWQKP RYEIRWKVIE SVSSDGHEYI YVDPNQLEYD STWELPRDQL
 601 VIGRTLGSQA FGQVVEATAH GLSHSQATMK VAVKMLKSTA RSEKQALMS ELKIMSHLGP
 661 HLNVVNLLGA CTKGGPIYII TEYCRYGDLV DYLRNKHTF LQHRSDKRRP PSAELYSNAL
 721 FVGLPLPSHV SLTGESDGGY MDMSKDESVD YVPLDMKGD VKYADIESSN YMAPYDNVVP
 781 SAPERTCRAT LINESPVLSY MDLVGFSYQV ANGMEFLASK NCVHRDLAAR NVLICEGKLV
 841 KICDFGLARD INRDSNYISK GSTELFLKMM APESIFNSLY TTLSOVNSFG ILLWEIFTLG
 901 GTPYPELPMN EQFYNAIKRG YRNAQPARAS DEIYEIMQKC WEEKFEIRPP FSQLVLLER
 961 LLGEGYKKNY QQVDEEFLRS DHPAILRSQA RLPGFHGLRS PLDTSSVLYT AVQPNEGND
 1021 YIIFLPDPKP EVADEGPLEG SPSLASSTLN EVNTSSTISC DSPLEPQDEP EPEPQLELQV
 1081 EPEFELEQLP DSGCPAPRAE AEDSFL

图 3B

FDGFR-A 核酸序列 (GenBank Accession No. NM_006200 (SEQ ID NO: 13))

1 TTCTCCCCG CCCCCAGTTG TTGTCGAAGT CTGGGGGTTG GGA CTGGACC CCCTGATTGC
61 GTAAGAGCAA AAAGCGAAGG CGCAATCTGG AACTGGGAG ATTCCGAGCG CAGGGAGTTT
121 GAGAGAAACT TTTATTTTGA AGAGACCAAG GTTGAGGGGG GCCTTATTTT CTGACAGCTA
181 TTTACTTAGA GCAAATGATT AGTTT TAGAA GGATGGACTA TAACATTGAA TCAATTACAA
241 AACCGGTTTT TTGAGCCCAT TACTGTTGGA GCTACAGGGA GAGAAACAGG AGGAGACTGC
301 AAGAGATCAT TTGGGAAGGC CGTGGGCACG CTCTTTACTC CATGTGTGGG ACATTTCATTG
361 CGGAATAACA TCGGAGGAGA AGTTTCCAG AGCTATGGGG ACTTCCCATC CGGCGTTCCT
421 GGTCTTAGGC TGTCTTCTCA CAGGGCTGAG CCTAATCCTC TGCCAGCTTT CATTACCCCT
481 TATCCTTCCA AATGAAAATG AAAAGTTGT 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 AGGGCTTAA TGGGACCTTC ACTGTAGGGC CCTATATCTG
961 TGAGGCCACC GTCMAAGGAA AGAAGTCCA GACCATCCCA TTTAATGTTT ATGCTTTAA
1021 AGCAACATCA GAGCTGGATC TAGAAATGGA AGCTCTTAA ACCGTGTATA AGTCAGGGGA
1081 AACGATGTG GTCACCTGTG CTGTTTTTAA CAATGAGGTG GTTGACCTTC AATGGACTTA
1141 CCCTGGAGAA GTGAAAGGCA AAGGCATCAG AATGCTGGAA GAAATCAAAG TCCCATCCAT
1201 CAAATGGTG TACACTTTGA CGGTCCCGA GGCACGGTG AAGACAGTG GAGATTACGA
1261 ATGTGCTGCC CGCCAGGCTA CCAGGGAGGT CAAAGAAATG AAGAAAGTCA CTATTTCTGT
1321 CCATGAGAAA GGTTCATTG AAATCAAACC CACCTCAGC CAGTTGGAAG CTGTCAACCT

图 3C

1381 GCATGAAGTC AAACATTTTG TTGTAGAGGT GCGGGCCTAC CCACCTCCCA GGATATCCTG
1441 GCTGAAAAAC AATCTGACTC TGATTGAAAA TCTCACTGAG ATCACCCTG ATGTGGAAAA
1501 GATTCAGGAA ATAAGGTATC GAAGCAAATT AAAGCTGATC CGTGCTAAGG AAGAAGACAG
1561 TGGCCATTAT ACTATTGTAG CTCAAAATGA AGATGCTGTG AAGAGCTATA CTTTGAAC
1621 GTTAACTCAA GTTCCTTCAT CCATTCTGGA CTGGTGGAT GATCACCATG GCTCAACTGG
1681 GGGACAGACG GTGAGGTGCA CAGCTGAAGG CACGCCGCTT CCTGATATTG AGTGGATGAT
1741 ATGCAAAGAT ATTAAGAAAT GTAATAATGA AACTTCCTGG ACTATTTTGG CCAACAATGT
1801 CTCAAACATC ATCACGGAGA TCCACTCCCG AGACAGGAGT ACCGTGGAGG GCCGTGTGAC
1861 TTTCCGCAAA GTGGAGGAGA CCATCGCCGT GCGATGCCTG GCTAAGAATC TCCTGGAGC
1921 TGAGAACCGA GAGCTGAAGC TGGTGGCTCC CACCCTGCGT TCTGAACTCA CGGTGGCTGC
1981 TGCACTCCTG GTGCTGTTGG TGATTGTGAT CACTCACTT ATTGTCTGG TTGTCATTG
2041 GAAACAGAAA CCGAGGTATG AAATTCGCTG GAGGGTCATT GAATCAATCA GCCCGATGG
2101 ACATGAATAT ATTTATGTGG ACCCGATGCA GCTGCCTTAT GACTCAAGAT GGGAGTTCC
2161 AAGAGATGGA CTAGTCTGTG GTCGGGCTTT GGGGTCTGGA GCGTTTGGGA AGGTGGTTGA
2221 AGGAACAGCC TATGGATTAA GCGGGTCCCA ACCTGTCTAT AAAGTTGCAG TGAAGATGCT
2281 AAAACCCACG GCCAGATCCA GTGAAAACA AGCTCTCATG TCTGAACTGA AGATAATGAC
2341 TCACCTGGGG CCACATTTGA ACATTGTAAA CTGCTGGGA GCCTGCACCA AGTCAGGCCC
2401 CATTACATC ATCACAGAGT ATGCTTCTA TGGAGATTG GTCAACTATT TGATAAGAA
2461 TAGGGATAGC TTCCTGAGCC ACCACCCAGA GAAGCCAAAG AAAGAGCTGG ATATCTTTGG
2521 ATTGAACCCG GCTGATGAAA GCACACGGAG CTATGTTATT TTATCTTTG AAAACAATGG
2581 TGACTACATG GACATGAAGC AGGCTGATAC TACACAGTAT GTCCCCATGC TAGAAGGAA
2641 AGAGGTTTCT AAATATTCG ACATCCAGAG ATCACTCTAT GATCGTCCAG CCTCATATA
2701 GAGAAATCT ATGTTAGACT CAGAAGTCAA AAACCTCCTT TCAGATGATA ACTCAGAAGG
2761 CCTACTTTA TTGATTTGT TGAGCTTCAC CTATCAAGTT GCCCGAGGAA TGGAGTTTTT
2821 GGCTTCAAAA AATTGTGTCC ACCGTGATCT GGCTGCTCGC AACGTCTCC TGGCACAAGG

2881 AAAAATTGTG AAGATCTGTG ACTTTGGCCT GGCCAGAGAC ATCATGCATG ATTCGAACTA
2941 TGTGTCGAAA GGCAGTACCT TTCTGCCCGT 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 TGGACAGTG AGCCGGAGAA GAGACCTCC TTTTACCACC TGAGTGAGAT
3241 TGTGGAGAAT CTGCTGCCCTG GACAAATAA AAAGAGTTAT GAAAAATTC ACCTGGACTT
3301 CCTGAAGAGT GACCATCCTG CTGTGGCAGG CATGCGTGTG GACTCAGACA ATGCATACAT
3361 TGGTGTCAAC TACAAAAACG AGGAAGACAA GCTGAAGGAC TGGGAGGGTG GTCTGGATGA
3421 GCAGAGACTG AGCGCTGACA GTGGCTACAT CATTCCCTCTG OCTGACATTG ACCCTGTCCC
3481 TGAGGAGGAG GACCTGGGCA AGAGGAACAG ACACAGCTCG CAGACCTCTG AAGAGAGTGC
3541 CATTGAGACG GGTTCAGCA GTTCCACCTT CATCAAGAGA GAGGACGAGA CCATTGAAGA
3601 CATCGACATG ATGGACGACA TCGGCATAGA CTCTCAGAC CTGGTGGAG ACAGCTTCCT
3661 GTAACGGCG GATTCGAGGG GTTCCCTTCCA CTTCTGGGGC CACCTCTGGA TCCCGTTCAG
3721 AAAACCACTT TATTGCAATG CGGAGGTGA GAGGAGGACT TGGTTGATGT TTAAGAGAA
3781 GTTCCAGCC AAGGGCCTCG GGGAGCGTTC TAAATATGAA TGAATGGAT ATTTTGAAT
3841 GAACTTTGTC AGTGTGCCT CTCGCAATGC CTCAGTAGCA TCTCAGTGGT GTGTGAAGTT
3901 TGGAGATAGA TGGATAAGGG AATAATAGGC CACAGAAGGT GAACTTTGTG CTTCAAGGAC
3961 ATTGGTGAGA GTCCAACAGA CACAATTTAT ACTGCGACAG AACTTCAGCA TTGTAATTAT
4021 GTAATAACT CTAACCAAGG CTGTGTTTAG ATTGTATTAA CTATCTTCTT TGGACTTCTG
4081 AAGAGACCAC TCAATCCATC CATGTACTTC CCTCTGAAA CCTGATGCA GCTGCTGTTG
4141 AACTTTTTAA AGAAGTGCAT GAAAACCAT TTTTGAACCT TAAAGGTAC TGGTACTATA
4201 GCATTTTGTCT ATCTTTTTA GTGTTAAGAG ATAAGAATA ATAATTAAACC AACCTTGT
4261 AATAGATTG GGTCAATTAG AAGCCTGACA ACTCATTTTC ATATTGTAAT CTATGTTTAT
4321 AATACTACTA CTGTTATCAG TAATGCTAAA TGTGTAATAA TGTAACATGA TTTCCCTCCA

4381 GAGAAAGCAC AATTTAAAAC AATCCTTACT AAGTAGGTGA TGAGTTTGAC AGTTTTTGAC
4441 ATTTATATTA AATAACATGT TTCTCTATAA AGTATGGTAA TAGCTTTAGT GAATTAATTT
4501 TAGTTGAGCA TAGAGAACAA AGTAAAAGTA GTGTTGTCCA GGAAGTCAGA ATTTTAACT
4561 GTACTGAATA GGTTCGCCAA TCCATCGTAT TAAAAACAA TTAAGTGCC TCTGAAATAA
4621 TGGGATTAGA AACAAACAA ACTCTTAAGT CCTAAAAGT CTCATGTAG AGGCATAAAC
4681 CTGTGCTGAA CATAACTTCT CATGTATATT ACCCAATGGA AATATAATG ATCAGCAAAA
4741 AGACTGGATT TGCAGAAGTT TTTTTTTTTT TTCTTCATGC CTGATGAAAG CTTTGGCAAC
4801 CCCAATATAT GTATTTTTTG AATCTATGAA OCTGAAAAGG STCAGAAGGA TGCCAGACA
4861 TCAGCCTCCT TCTTTCACCC CTTACCCCAA AGAGAAAGAG TTTGAAACTC GAGACCATAA
4921 AGATATTCTT TAGTGGAGGC TGGATGTGCA TTAGCCTGGA TCCTCAGTTC TCAAATGTGT
4981 GTGGCAGCCA GGATGACTAG ATCCTGGGTT TCCATCCTG AGATTCTGAA GTATGAAGTC
5041 TGAGGGAAAC CAGAGTCTGT ATTTTTCTAA ACTCCCTGGC TGTCTGATC GGCCAGTTTT
5101 CGGAAACACT GACTTAGGTT TCAGGAAGTT GCCATGGGAA ACAATAAATT TGAACTTTGG
5161 AACAGGGTTG GAATTCACC ACGCAGGAAG CCTACTATTT AAATCCTTGG CTTCAGGTTA
5221 GTGACATTA ATGCCATCTA GCTAGCAATT GCGACCTTA TTTAACTTTC CAGTCTTAGC
5281 TGAGGCTGAG AAAGCTAAG TTTGGTTTTG ACAGGTTTTC CAAAAGTAAA GATGCTACTT
5341 CCCACTGTAT GGGGGAGATT GAACTTTOCC CGTCTCCGT CTCTGCCTC CCACTCCATA
5401 CCCCGCCAAG GAAAGGCATG TACAAAATT ATGCAATTCA GTGTTCCAAG TCTCTGTGTA
5461 ACCAGCTCAG TGTTTTGGTG GAAAAACAT TTTAAGTTTT ACTGATAATT TGAGGTTAGA
5521 TGGGAGGATG AATTGTCACA TCTATCCACA CTGTCAAACA GGTGGGTGTG GGTTCATGG
5581 CATTCTTTGC AATACTGCTT AATTGCTGAT ACCATATGAA TGAACATGG GCTGTGATTA
5641 CTGCAATCAC TGTGCTATCG GCAGATGATG CTTTGAAGA TGCAGAAGCA AATAATAAGT
5701 ACTTGACTAC CTAAGGTTGT AATCTCAATG CAAGCCCCAA CTTTCTTATC CAACTTTTTC
5761 ATAGTAAGTG CGAAGACTGA GCCAGATTGG CCAATTAAAA ACGAAAACCT GACTAGGTTT
5821 TGTAGAGCCA ATTAGACTTG AAATACGTTT GTGTTTCTAG AATCACAGCT CAGCATTTCT

5881 GTTATCGCT CACTCCCT TGTACAGCCT TATTTGTG GTGCTTGCA TTTGATATT
5941 GCTGTGAGCC TTGCATGACA TCATGAGGCC GGATGAACT TCTCAGTCCA GCAGTTTCCA
6001 GTCCTAACAA ATGCTCCAC CTGAATTTGT ATATGACTGC AATTGTGGGT GTGTGTGTGT
6061 TTTGAGCAA TTCCAGATT GTTCCCTTTT GGCTCCTGC AAAGTCTCCA GAAGAAATT
6121 TGCCAATCTT TCCTACTTC TATTTTATG ATGACAATCA AAGCCGGCCT GAGAAACT
6181 AATTGTGACT TTTTAAACGA TTAGTGATGT CCTTAAATG TGGTCTGCCA ATCTGTACAA
6241 AATGGTCCTA TTTTGTGAA GAGGACATA AGATAAATG ATGTATACA TCAATATGTA
6301 TATATGATT TCTATATAGA CTGGAGAAT ACTGCCAAA CATTATGAC AAGCTGTATC
6361 ACTGCCTTCG TTTATATTT TTTAACTGTG ATAATCCCA CAGGCACATT AACTGTTGCA
6421 CTTTGAATG TCCAAAATT ATATTTAGA AATAATAAA AGAAGATAC TTACATGTC
6481 CCAAACAAT GGTGTGGTGA ATGTGTGAGA AANAATACT TGATAGGTC TACCAATACA
6541 AAATGTATTA CGAATGCCCC TGTTCATGTT TTTGTTTAA AACGTGTAAA TGAGATCTT
6601 TATATTTCAA TAAATGATAT ATAATTTAAA GTT

人 PDGFR- α 多肽序列(GenBank Accession No. NP_006127) (SEQ ID NO: 14)

1 NGTSHPAFLV LGCLLTGLSL ILCQLSLPSI LPWENEKVVQ LNSSFSLRCF GESEVSWQYP
 61 MSEEESDVE IRNEENNSGL FVTVLEVSSA SAARTGLYTC YYNHTQTEEM ELEGRHIYYI
 121 VPDPDVAFVP LGMTDYLIV EDDSAIIPC RTTDPETPVT LNSEGVVPA SYDSRQGFNG
 181 TFTVGPYICE ATVKGKKFQT IPFNVYALKA TSELDLEHA LKTVYKSGET IVVTCVFN
 241 EVVDLQWYTP GEVKGKGITM LREIKVPSIK LVYTLVPEA TVKDSGDYEC AARQATREVK
 301 EMKKVTISVH EKGFIKFT FSQLEAVNLH EVKHFVVEVR AYPPFRISNL KNMLTLIENL
 361 TEITTDVEKI QEIRYRSLK LIRAKEEDSG HYTIVAQNE AVKSYTFELL TQVPSSILD
 421 VDDHHGSTGG QTVRCTAEGT PDPDIEMNIC KDIIKCNNET SWTILANNVS NIITEIHSRD
 481 RSTVEGRVTF AKVEETIAVR CLAKNLGAE NRELKLVAPT LRSELTVAAL VLVLIVIVII
 541 SLIVLVVIWK QKPRYEIRWR VIESISPDGH EYIYVDFMQL FYDSRWEFFR DGLVLRVGLG
 601 SGAFGKVVVEG TAYGLSRSPQ VMKVAVKMLK PTARSSEKQA LMSSELKIMTH LGPHLNIVNL
 661 LGACTKSGPI YIITEYCFYG DLVNYLHNR DSFLSHRPEK PKKELDIFGL NPADESTRSY
 721 VILSFENNGD YDMKQADTT QYVPMLEKKE VSKYSDIQRS LYDRPASYKK KSMLOSEVKN
 781 LLSODNSEGL TLLDLSFTY QVARGMEFLA SKNCVHRDLA ARNVLLAQGK IVKICDFGLA
 841 RDMHDSNYV SKGSTFLPVK WMAPESITON LYTTLSOVMS YGILLWEIFS LGGTFYPGNM
 901 VDSTFYNKIK SGYRMAKPDH ATSEVYEIMV KWNSEPEKR PBFYHLSEIV ENLLPGQYKK
 961 SYEKIHLDFL KSDHPAVARM RVDSNAYIG VTYKNEEDKL KWEGLDEQ RLSADSGYII
 1021 PLPDIDFVPE EEDLGKRRRH SSQTSESAI ETGSSSSTFI KREDETIEDI DMDDIGIOS
 1081 SDLVEDSFL

图 3D

VEGFR-1 (Flt-1) 核酸序列**(GenBank Accession No. AF063657) (SEQ ID NO: 7)**

1 ATGGTCAGCT ACTGGGACAC CGGGGTCCTG CTGTGCGCGC TGCTCAGCTG TCTGCTTCTC
61 ACAGGATCTA GTTCAGGTTT AAAATTAAAA GATCCTGAAC TGAGTTTAAA AGGCACCCAG
121 CACATCATGC AAGCAGGCCA GACTCTGCAT CTCCAATGCA GGGGGGAAGC AGCCCATAAA
181 TGGTCTTTGC CTGAAATGGT GAGTAAGGAA AGCGAAAGGC TGAGCATAAC TAAATCTGCC
241 TGTGGAAGAA ATGGCAACA ATTCTGCAGT ACTTTAACCT TGAACACAGC TCAAGCAAAC
301 CACTCTGGCT TCTACAGCTG CAAATATCTA GCTGTACCTA CTTCAAAGAA GAAGGAAACA
361 GAATCTGCAA TCTATATATT TATTAGTGAT ACAGGTAGAC CTTTCGTAGA GATGTACAGT
421 GAAATCCCGG AAATTATACA CATGACTGAA GGAAGGGAGC TCGTCATTCC CTGCCGGGTT
481 ACCTCACCTA ACATCACTGT TACTTTAAAA AAGTTTCCAC TTGACTCTTT GATCCCTGAT
541 GGAACACGCA TAATCTGGGA CAGTAGAAAG GGCTTCATCA TATCAAATGC AACGTACAAA
601 GAAATAGGGC TTCTGACCTG TGAAGCAACA GTCATGGGC ATTTGTATAA GACAACTAT
661 CTCACACATC GACAAACCAA TACAATCATA GATGTCCAAA TAAGCACACC ACGCCAGTCC
721 AAATTACTTA GAGGCCATAC TCTTGTCTC AATTGTACTG CTACCACTCC CTTGAACACG
781 AGAGTTCAA TGAACCTGAG TTACCTGAT GAAAAAATA AGAGAGCTTC CGTAAGGCGA
841 CGAATGACC AAAGCAATTC CCATGCCAAC ATATTCTACA GTGTTCTTAC TATTGACAAA
901 ATGCAGAACA AAGACAAAGG ACTTTATACT TGTCGTGTA GAGTGGACC ATCATTCAA
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 CCGTGTCTC GTTCCAGAC
1321 CCGGCTCTCT ACCCACTGGG CAGCAGACAA ATCCTGACTT GTACCGCATA TGGTATCCCT

图 4A

1381 CAACCTACAA TCAAGTGGTT CTGGCACCCC TGTAACCATA ATCATTCCGA AGCAAGGTGT
1441 GACTTTTGT CCAATAATGA AGAGTCCTTT ATCCTGGATG CTGACAGCAA CATGGGAAAC
1501 AGAATTGAGA GCATCACTCA GCGCATGGCA ATAATAGAAG GAAAGAATAA GATGGCTAGC
1561 ACCTTGGTTC TGGCTGACTC TAGAATTTCT GGAATCTACA TTGTCATAGC TTCCAATAAA
1621 GTTGGGACTG TGGGAAGAAA CATAAGCTTT TATATCACAG ATGTGCCAAA TGGGTTTCAT
1681 GTTAACTTGG AAAAAATGCC GACGGAAGSA GAGGACCTGA AACTGTCTTG CACAGTTAAC
1741 AAGTTCTTAT ACAGAGAGCT TACTTGGATT TTACTGCGGA CAGTTAATAA CAGAACAATG
1801 CACTACAGTA TTAGCAAGCA AAAAATGGCC ATCACTAAGG AGCACTCCAT CACTCTTAAT
1861 CTTACCATCA TGAATGTTTC CCTGCAAGAT TCAGGCACCT ATGCCTGCAG AGCCAGGAAT
1921 GTATACACAG GGGAGAAAT CCTCCAGAAG AAGAAATTA CAATCAGAGA TCAGGAAGCA
1981 CCATACCTCC TCGAAACCT CAGTGATCAC ACAGTGGCCA TCAGCAGTTC CACCCTTA
2041 GACTGTCAAG CTAATGGTGT CCCCAGCCT CAGATCACTT GGTAAAAA CAACCACAAA
2101 ATACAACAAG AGCCTGGAAT TATTTTAGGA CCAGGAAGCA GCACGCTGTT TATTGAAGA
2161 GTCACAGAAG AGGATGAAG TGTCTATCAC TGCAAAGCCA CCAACCAGAA GGGCTCTGTG
2221 GAAAGTTCAG CATACCTCAC TGTCAAGGA ACCTCGGACA AGTCTAATCT GGAGCTGATC
2281 ACTCTAACAT GCACCTGTGT GGCTCGGACT CTCTTCTGGC TCCTATTAAC CCTCTTATC
2341 CGAAAAATGA AAGGTCTTC TTGTGAATA AAGACTGACT ACCTATCAAT TATAATGGAC
2401 CCAGATGAAG TTCCTTTGGA TGAGCAGTGT GAGCGGCTCC CTTATGATGC CAGCAAGTGG
2461 GAGTTTGCCC GGGAGAGACT TAACTGGGC AAATCACTTG GAAGAGGGGC TTTTGGAAAA
2521 GTGGTTCAAG CATCAGCATT TGGCATTAAAG AAATCACCTA CGTGCCGGAC TGTGGCTGTG
2581 AAAATGCTGA AAGAGGGGC CACGGCCAGC GAGTACAAAG CTCTGATGAC TGAGCTAAAA
2641 ATCTTGACCC ACATTGGCCA CCATCTGAAC GTGGTTAACC TGCTGGGAGC CTGCACCAAG
2701 CAAGGAGGGC CTCTGATGGT GATTGTTGAA TACTGCAAT ATGGAAATCT CTCCAACCTAC
2761 CTCAGAGCA AACGTGACTT ATTTTTCTC AACAAAGGATG CAGCACTACA CATGGAGCCT
2821 AAGAAAGAAA AATGGAGCC AGGCCTGGAA CAAGGCAAGA AACCAAGACT AGATAGCGTC

2881 ACCAGCAGCG AAAGCTTGC GAGCTCCGC TTCAGGAAG ATAAAAGTCT GAGTGATGTT
2941 GAGGAAGAGG AGGATTCTGA CGGTTTCTAC AAGGAGCCCA TCACTATGGA AGATCTGATT
3001 TCTTACAGTT TTCAAGTGGC CAGAGGCATG GAGTTCCTGT CTCCAGAAA GTGCATTCAT
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 GGGAAGGCAT GAGGATGAGA
3361 GCTCCTGAGT ACTCTACTCC TGAATCTAT CAGATCATGC TGGACTGCTG GCACAGAGAC
3421 CCAAAGAAA GGCCAAGATT TGCAGAACTT GTGGAAAAC TAGGTGATTT GCTTCAAGCA
3481 AATGTACAAC AGGATGGTAA AGACTACATC CCAATCAATG CCATACTGAC AGGAAATAGT
3541 GGGTTTACAT ACTCAACTCC TGCCTTCTCT GAGGACTTCT TCAAGGAAAG TATTCAGCT
3601 CCGAAGTTTA ATTCAGGAAG CTCTGATGAT GTCAGATATG TAAATGCTTT CAAGTTCATG
3661 AGCCTGGAAA GAATCAAAAC CTTTGAAGAA CTTTACC GA ATGCCACCTC CATGTTTGAT
3721 GACTACCAGG GCGACAGCAG CACTCTGTTG GCCTCTCCA TGCTGAAGCG CTTACCTGG
3781 ACTGACAGCA AACCCAAGGC CTCGCTCAAG ATTGACTTGA GAGTAACCAG TAAAAGTAAG
3841 GAGTCGGGGC TGTCTGATGT CAGCAGGCC AGTTTCTGCC ATTCCAGCTG TGGGCACGTC
3901 AGCGAAGGCA AGCGCAGGTT CACCTACGAC CACGCTGAGC TGGAAAGGAA AATCGCGTGC
3961 TGCTCCCCGC CCCAGACTA CAACTCGGTG GTCCTGTACT CCACCCACC CATCTAG

VEGFR-1 (Flt-1) 多肽序列 (GenBank Accession No.) (SEQ ID NO: 8)

1 MVSYNWDTGVL LCALLSCLLL TGSSSGSKLK DPESLSLKGTO HINQAGQTLH LQCRGEAAHK
61 WBLPEMVSKE SERLSITKSA CGRNGKQFCS TLTNTAQAN RTGFYSCKYL AVPTSKKKET
121 ESAIYIFISD TGRPFVEMYS EIPFIIHMTG GRELVIPCRV TSPNITVTLK KPFLDTLIPD
181 GKRIIWSRK GFIIISNATYK EIGLLTCEAT VNGHLYKTNV LTHRQNTII DVQISTPRPV
241 KLLRGHTLVL NCTATTPLNT RVQMTWSYFD EKNKRASVRR RIDQSNSHAN IFYSVLTIDK
301 MOKKDKGLYT CRVRSGPSFK SVNTSVHIYD KAFITVKHRK QQVLETVAGK RSYRLSMKVK
361 AAFPSPVVWL KDGLPATEKS ARYLTRGYSL IIKDVTEEDA GNYTILLSIK QSNVFNKTLA
421 TLIVNVKPOI YEKAVSSFPD PALYPLGSRQ ILTCTAYGIP OPTIKWFVHP CNHNSSEARC
481 DFCSNNEESF ILOADSNMGN RIESITQMA IIEGKNMAS TLVVADSRIS GIYICIASNK
541 VGTVGRNISF YITDVPNGFH VNLEKMPTEG EDLKLCTVM KFLYRDVTWI LLRTVNNRTM
601 HYSISKQMA ITKEHSITLN LTIMNVSLQD SGTYACRARN VYTGEELQK KEITIRDQEA
661 PYLLRNLSDH TVAISSSTTL DCHANGVPEP QITWPKNNHK IQQEPGIIIG PGSSTLFIER
721 VTEDEGVYH CKATNQKGSV ESSAYLTVQG TSDKSNLELI TLTCTCVAAT LFWLLLTLPF
781 RKNKRSSSEI KTDYLSIIND PDEVPLDEQC ERLPYDASKW EFAERLKLK KSLGRGAFGK
841 VVQASAFGIK KSPTCRTVAV KMLKEGATAS EYKALMTELK ILTHIGHHLN VVNLGACTK
901 QGGPLMVIVE YCKYGNLSNY LKSKRDLFFL NKDAALHMEP KKEKMEPGLK QGKKPRLDSV
961 TSSESFASSG PQEDKSLSDV EKEEDSDGFY KEPITMEDLI SYSPQVARGM EPLSSRKCIH
1021 RDLAARNILL SENNVVKICD FGLARDIYKN PDYVRKGDTR LPLKWMAPES IFDKIYSTKS
1081 DVMSYGVLLW EIFSLGGSPY PGVQNDDEFC SRLREGMRMR APEYSTPEIY QINLDCNHRD
1141 PKERPRFAEL VEKLGOLLQA NVQQDGKDYI PINAILTGNS GFTYSTPAFS EDFPKESISA
1201 PKFNSGSSDD VRYVNAFKFM SLERIKTFEE LLPNATSMFD DYQGDSTLL ASPMLKRFTW
1261 TDSKPKASLK IDLRVTSKSK ESGLSDVSRP SFCHSSCGHV SEGKRRFTYD HAELERKIAC
1321 CSPPPDYNSV VLYSTFPI

图 4B

VEGFR-2 (KDR/Flk-1) 核酸序列**(GenBank Accession No. AF035121) (SEQ ID NO: 2)**

1 ACTGAGTCCC GGGACCCCGG GAGAGCGGTC AGTGTGTGGT CGCTGCGTTT CCTCTGCCTG
61 CGCCGGGCAT CACTTGC GCGCAGAAAG TCCGTCTGGC AGCCTGGATA TCCTCTCCTA
121 CCGGCACCCG CAGACGCCCC TGCAGCCGCC GGTCCGGGCC CGGGCTCCCT AGCCCTGTGC
181 GCTCAACTGT CCTGCGCTGC GGGGTGCCGC GAGTTCACC TCCGCGCCTC CTTCTCTAGA
241 CAGGCGCTGG GAGAAAGAAC CGGCTCCCGA GTTCTGGGCA TTTCGCCCGG CTCGAGGTGC
301 AGGATGCAGA GCAAGGTGCT GCTGGCCGTC GCCCTGTGGC TCTGCGTGGG GACCCGGGCC
361 GCCTCTGTGG GTTTGCCTAG TGTTCTCTT GATCTGCCA GGCTCAGCAT ACAAAAAGAC
421 ATACTTACAA TTAAGGCTAA TACAACCTT CAAATACTT GCAGGGGACA GAGGGACTTG
481 GACTGGCTTT GGCCCAATAA TCAGAGTGGC AGTGAGCAAA GGGTGGAGGT GACTGAGTGC
541 AGCGATGGCC TCTTCTGTAA GACTCACA ATTCCAAAAG TGATCGGAAA TGACTGGA
601 GCCTACAAGT GCTTCTACCG GGAACTGAC TTGGCCTCGG TCATTATGT CTATGTTCAA
661 GATTACAGAT CTCCATTTAT TGCTTCTGTT AGTGACCAAC ATGGAGTCGT GTACATTACT
721 GAGAACA AAAA ACAAACCTGT GGTGATTCCA TGTCTCGGGT CCATTTCAAA TCTCAACGTG
781 TCACCTTTGTG CAAGATACCC AGAAAAGAGA TTTGTTCTCG ATGGTAACAG AATTCCTGG
841 GACAGCAAGA AGGGCTTTAC TATTCCAGC TACATGATCA GCTATGCTGG CATGGTCTTC
901 TGTGAAGCAA AAATTAATGA TGAAAGTTAC CAGTCTATTA TGTACATAGT TGTGCTGTGA
961 GGGTATAGGA TTTATGATGT GGTCTGAGT CCGTCTCATG GAATGAACT ATCTGTTGGA
1021 GAAAAGCTTG TCTTAAATTG TACAGCAAGA ACTGAACTAA ATGTGGGGAT TGACTTCAAC
1081 TGGGAATACC CTTCTTCGAA GCATCAGCAT AAGAACTTG TAAACCGAGA CCTAAAACC
1141 CAGTCTGGGA GTGAGATGAA GAAATTTTG AGCACCTTAA CTATAGATGG TGTAAACCGG
1201 AGTGACCAAG GATTGTACAC CTGTGCAGCA TCCAGTGGGC TGATGACCAA GAAGAACAGC
1261 ACATTTGTCA GGGTCCATGA AAAACCTTTT GTTGCTTTTG GAAGTGGCAT GGAATCTCTG
1321 GTGGAAGCCA CGGTGGGGGA GCGTGTGAGA ATCCCTGCGA AGTACCTTGG TTACCCACCC

图 4C

1381 CCAGAAATAA AATGGTATAA AAATGGAATA CCCCTGAGT CCAATCACAC AATTAAAGCG
1441 GGGCATGTAC TGACGATTAT GGAAGTGAGT GAAAGAGACA CAGGAAATTA CACTGTATC
1501 CTTACCAATC CCATTTCAAA GGAGAAGCAG AGCCATGTGG TCTCTCTGGT TGTGTATGTC
1561 CCACCCAGAA TTGGTGAGAA ATCTCTAATC TCTCCTGTGG ATTCCTACCA GTACGGCACC
1621 ACTCAAACGC TGACATGTAC GGTCTATGCC ATTCCTCOCC CGCATCACAT CCACTGGTAT
1681 TGGCAGTTGG AGGAAGAGTG CGCCAACGAG CCCAGCCAAG CTGTCTCAGT GACAAACCCA
1741 TACCCTTGTG AAGAATGGAG AAGTGTGGAG GACTTCCAGG GAGGAAATAA AATTGAAGTT
1801 AATAAAAATC AATTTGCTCT AATTGAAGGA AAAAACAAA CTGTAAAGTAC CCTTGTATC
1861 CAAGCGGCAA ATGTGTACAG TTTGTACAAA TGTGAAGCGG TCAACAAGT CGGGAGAGGA
1921 GAGAGGGTGA TCTCCTTCCA CGTGACCAGG GGTCCGAAA TACTTTGCA ACCTGACATG
1981 CAGCCCACTG AGCAGGAGAG CGTGTCTTTG TGGTGCCTG CAGACAGATC TACGTTTGG
2041 AACCTCACAT GGTACAGCT TGGCCACAG CCTCTGCCAA TCCATGTGGG AGAGTTGCC
2101 ACACCTGTTT GCAAGAACTT GGATACTCTT TGGAAATTGA ATGCCACCAT GTTCTCTAAT
2161 AGCACAAATG ACATTTTAT CATGGAGCTT AAGAATGCAT CCTGTCAGGA CCAAGGAGAC
2221 TATGTCTGCC TTGCTCAAGA CAGGAAGACC AAAAAAGAC ATTGCGTGGT CAGGCAGCTC
2281 ACAGTCTTAG AGCGTGTGGC ACCCAGATC ACAGGAAACC TGGAGAATCA GACGACAAGT
2341 ATTGGGGAAA GCATCGAAGT CTCATGCAGG GCATCTGGGA ATCCCCCTCC ACAGATCATG
2401 TGSTTTAAG ATAATGAGAC CCTGTAGAA GACTCAGGCA TTGTATTGAA GGATGGGAAC
2461 CGGAACCTCA CTATCCGAG AGTGAGGAAG GAGGACGAAG GCCTCTACAC CTGCCAGGCA
2521 TGCAAGTTC TTGGCTGTGC AAAAGTGGAG GCATTTTCA TAATAGAAGG TGCCAGGAA
2581 AAGACGAAT TGGAAATCAT TATCTAGTA GGCACGGGGG TGATTGCCAT GTTCTTCTGG
2641 CTACTTCTTG TCATCATCCT ACGGACCGTT AAGCGGGCCA ATGGAGGGGA ACTGAAGACA
2701 GGCTACTTGT CCATCGTCAT GGATCCAGAT GAACTCCCAT TGGATGAACA TTGTGAACGA
2761 CTGCCTTATG ATGCCAGCAA ATGGGAATC CCCAGAGACC GGCTGAAGCT AGGTAAAGCT
2821 CTTGGCCGTG GTGCCTTTGG CCAAGTGATT GAAGCAGATG CCTTTGGAAT TGACAAGACA

2881 GCAACTTGCA GGACAGTAGC AGTCAAATG TTGAAGAAG GAGCAACACA CAGTGAGCAT
2941 GGAGCTCTCA TGTCTGAAC CAAGATCCTC ATTCAATTTG GTCACCATCT CAATGTGGTC
3001 AACCTTCTAG GTGCTGTAC CAAGCCAGGA GGGCCACTCA TGSTGATTGT GGAATCTGC
3061 AAATTTGGAA ACCTGTCCAC TTACCTGAGG AGCAAGAGAA ATGAATTTGT CCCCTACAAG
3121 ACCAAAGGGG CACGATCCG TCAGGGAAA GACTACGTTG GAGCAATCCC TGTGGATCTG
3181 AAACGGCGCT TGGACAGCAT CACCAGTAGC CAGAGCTCAG CCAGCTCTGG ATTTGTGGAG
3241 GAGAAGTCCC TCAGTGATGT AGAAGAAGAG GAAGCTCCTG AAGATCTGTA TAAGGACTTC
3301 CTGACCTTGG ASCATCTCAT CTGTTACAGC TTCCAAGTGG CTAAGGGCAT GGATTTCTTG
3361 GCATCGCGAA AGTGTATCCA CAGGGACCTG GCGGCACGAA ATATCCTCTT ATCGGAGAAG
3421 AACGTGGTTA AAATCTGTGA CTTTGGCTTG GCCCGGATA TTTATAAAGA TCCAGATTAT
3481 GTCAGAAAAG GAGATGCTCG CCTCCCTTG AAATGGATGG CCCAGAAAC AATTTTGAC
3541 AGAGTGATCA CAATCCAGAG TGACGTCTGG TCTTTGGTG TTTGCTGTG GGAATATTT
3601 TCCTTAGGTG CTTCTCCATA TCCTGGGTA AAGATTGATG AAGAATTTG TAGGCGATTG
3661 AAAGAAGGAA CTAGAATGAG GCCCCCTGAT TATACTACAC CAGAAATGTA CCAGACCATG
3721 CTGGACTGCT GGCACGGGA GCCCAGTCAG AGACCCAGT TTTCAGATT GGTGGACAT
3781 TTGGGAAATC TCTTGCAAGC TAATGCTCAG CAGGATGGCA AAGACTACAT TGTTCTCCG
3841 ATATCAGAGA CTTTGAGCAT GGAAGAGGAT TCTGGACTCT CTCTGCTAC CTCACCTGT
3901 TCCTGTATGG AGGAGGAGGA AGTATGTGAC CCCAATTC ATTATGACAA CACAGCAGGA
3961 ATCAGTCAGT ATCTGCAGAA CAGTAAGCGA AAGAGCCGGC CTGTGAGTGT AAAACATTT
4021 GAAGATATCC CGTTAGAAGA ACCAGAAGTA AAAGTAATCC CAGATGACAA CCAGACGGAC
4081 AGTGGTATGG TTCTTGCTC AGAAGAGCTG AAAACTTTGG AAGACAGAAC CAAATTATCT
4141 CCATCTTTTG GTGGAATGGT GCCCAGCAA AGCAGGGAGT CTGTGGCATC TGAAGGCTCA
4201 AACCAGACAA GCGGCTACCA GTCCGGATAT CACTCCGATG ACACAGACAC CACCGTGTAC
4261 TCCAGTGAGG AAGCAGAACT TTTAAAGCTG ATAGAGATTG GAGTGCAAAC CCGTAGCACA
4321 GCCCAGATTC TCCAGCCTGA CTCGGGGACC AACTGAGCT CTCCTCTGT TTTAAAGGAA

4381 GCATCCACAC CCCAACTCCG GGACATCACA TGAGAGGTCT GCTCAGATT TGAAGTGTG
4441 TTCTTTCCAC CAGCAGGAAG TAGCCGCATT TGATTTTCAT TTCGACAACA GAAAAAGGAC
4501 CTCGGACTGC AGGGAGCCAG TCTTCTAGGC ATATCCTGGA AGAGGCTTGT GACCCANGAA
4561 TGTGTCTGTG TCTTCTCCCA GTGTTGACCT GATCCTCTTT TTTCATTCA TTA AAAAGCA
4621 TTATCATGCC CCTGCTGCGG GTCTCACCAT GGGTTTAGAA CAAAGAGCTT CAAGCAATGG
4681 CCCCATCCTC AAAGAAGTAG CAGTACCTGG GGAGCTGACA CTCTGTAAA ACTAGAAGAT
4741 AAACCAGGCA ACGTAAGTGT TCGAGGTGTT GAAGATGGGA AGGATTTGCA GGGCTGAGTC
4801 TATCCAAGAG GCTTTGTTTA GGACGTGGGT CCCAAGCCAA GCCTTAAGTG TGAARTCGG
4861 ATTGATAGAA AGGAAGACTA ACGTTACCTT GCTTTGAGAA GTACTGGAGC CTGCAAATGC
4921 ATTGTGTTTG CTCTGTGGA GGTGGGCATG GGGTCTGTTT TGA AATGTA AGGGTTGAGA
4981 CGGGGTTTCT GGTTTTAGAA GGTTCGTGT TCTTCGAGTT GGGCTAAGT AGAGTTCTTT
5041 GTGCTGTTT TGA CTCTAA TGAGAGTCC TTCCAGACCG TTAGCTGTCT CTTGCCAAG
5101 CCCCAGGAAG AAAATGATGC AGCTCTGGCT CTTTGTCTCC CAGGCTGATC CTTTATTCAG
5161 AATACCACAA AGAAGGACA TTCAGCTCAA GGCTCCTGC CGTGTGAAG AGTCTGACT
5221 GCACAAACCA GCTTCTGTT TCTTCTGGA TGAATACCCT CATATCTGTC CTGATGTGAT
5281 ATGCTGAGA CTGAATCCGG GAGGTTCAAT GTGAAGCTGT GTGTGTGTC AAGTTTCAG
5341 GAAGGATTTT ACCCTTTTGT TCTCCCOCT GTCCCAACC CACTCTCACC CCGCAACCA
5401 TCAGTATTTT AGTTATTGG CCTCTACTCC AGTAAACCTG ATTGGSTTG TCACTCTCT
5461 GAATGATTAT TAGCCAGACT TCAAATAT TTTATAGCCC AAATTATAAC ATCTATTGTA
5521 TTATTTAGAC TTTAACATA TAGAGCTATT TCTACTGATT TTTGCCCTG TCTGTCTCT
5581 TTTTCAAAA AAGAAATGT GTTTTTGTT TGGTACCATA GTGTGAATG CTGGGAACAA
5641 TGA CTATAAG ACATGCTATG GCACATATAT TTATAGCTG TTTATGTAGA AACAAATGA
5701 ATATATTAAG GCCTTATATA TAATGACTT TGTACTATTC ACATTTGTA TCAGTATTAT
5761 GTAGCATAAC AAGGTCATA ATGCTTTCAG CAATGATGT CATTTTATA AAGAACATTG
5821 AAAAACTGA

VEGFR-2 (KDR/Tie-1) 多肽序列
(GenBank Accession No. AA88004) (SEQ ID NO: 10)

1 MQSKVLLAVA LNLCVETRAA SVGLPSVSLD LPRLSIQKDI LTIKANTTLQ ITCRGQRDLQ
61 WLWPNNQSGS EQRVEVTECS DGLFCKILTI PKVIGNDTGA YKCFYRETDL ASVIYVYVQD
121 YRSPFIASVS DQHGCVVYTE NKNKTVVIPC LGSISNLNVS LCARYPEKRF VPDGNRISWD
181 SKKGFTIPSY MISOYAGVFC EAKINDESYQ SIMYIVVVVG YRIYDVVLSF SHGIELSVGE
241 KLVLNCTART ELNVGIDFNW EYPSSKHQHK KLVNRDLKTQ SGSEMKKFLS TLTIDGVTRS
301 DQGLYTCAAS SGLMTKKNSI FVRVHEKPFV AFGSGMESLV EATVGERVRI PAKYLGYPFP
361 EIKWYKNGIP LESNHTIKAG HVLTIMEVSE RDTGNYTVIL TNPISKEKQS HVVSLVVVYP
421 PQIGEKSLIS PVDSYQYGTI QTLTCTVYAI PPPHHIHWY QLEEECANEP SQAVSVTNFY
481 PCEENRSVED FQGGNKIEVN KNQFALIEGK NKTVSTLVIO AANVSALYKC EAVNKVGRGE
541 RVISFHVTRG PEITLQPDNQ PTEQESVSLN CTADRSTFEN LTWYKLGPOF LPIHVGELPT
601 PVCKNLDTLW KLNATMFSNS TNDILIMELK NASLQDQGDY VCLAQDRKTK KRHCVVRLT
661 VLERVAPTIT GNLENQTTSI GESIEVSCTA SGNPPFQIMW FKDNETLVED SGIVLKDGNR
721 NLTIRVRKE DEGLYTQAC SVLQCARVEA FFIIEGAQEK TNLEIILVIG TAVIAMFFWL
781 LLVIILRTVK RANGGELKTG YLSIVMDPDE LPLDHCERL PYDASKWEFF RDRLKLGKPL
841 GRGAFGOVIE ADAPGIDKTA TCRTVAVIML KEGATHSEER ALMSELKILI HIGHHLNVVN
901 LLGACTKPGG PLMVIVEFCK FGNLSTYLSR KRNEFVYKTK KGARFRQGD YVGAIPVDLK
961 RRLDSITSSQ SSASSGFVEE KSLSDVEEEE APEDLYKDFL TLEHLICYSF QVAKGMEFLA
1021 SRRCIHRDLA ARNILLSEKN VVKICDFGLA RDIYKDPDYV RKG DARLPLK WMAPETIFOR
1081 VYTIQSDVWS FGVLLWEIFS LGASFYPGVK IDEEFCRLK EGTRMRAPDY TTPEMYQTML
1141 DCNHGEPQR PTPSELVEHL GNLLQANAQQ DGRDYIVLPI SETLSMEEDS GLSLPTSEVS
1201 CMEEEEVCDP KFHYDNTAGI SQYLQNSKRR SRPVSVKTFE DIPLEPEVK VIPDDNQDTS
1261 GMVLASEELK TLEDRTKLSF SFGGMVPSKS RESVASEGSN QTSQYQSGYH SDDTDTTVYS
1321 SEEAELLKLI EIGVOTGSTA QILOPDSGTT LSSPFV

图 4D

阻断PDGFR β 和VEGF信号传导对角膜新生血管形成的作用

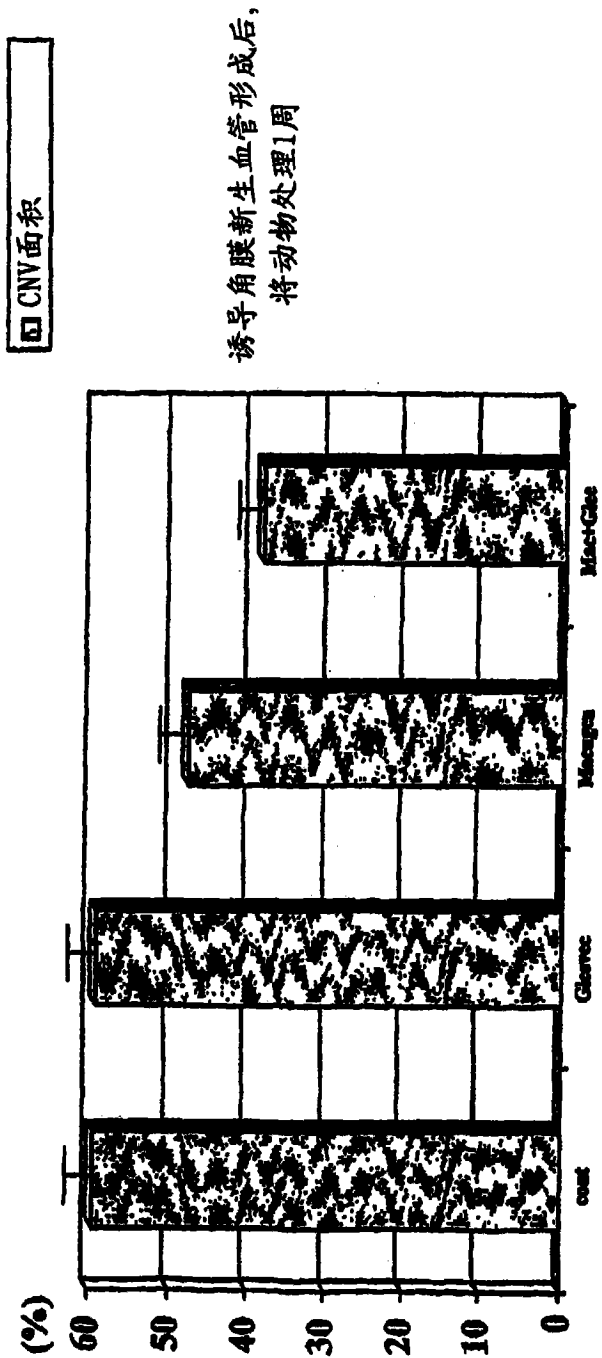


图 5

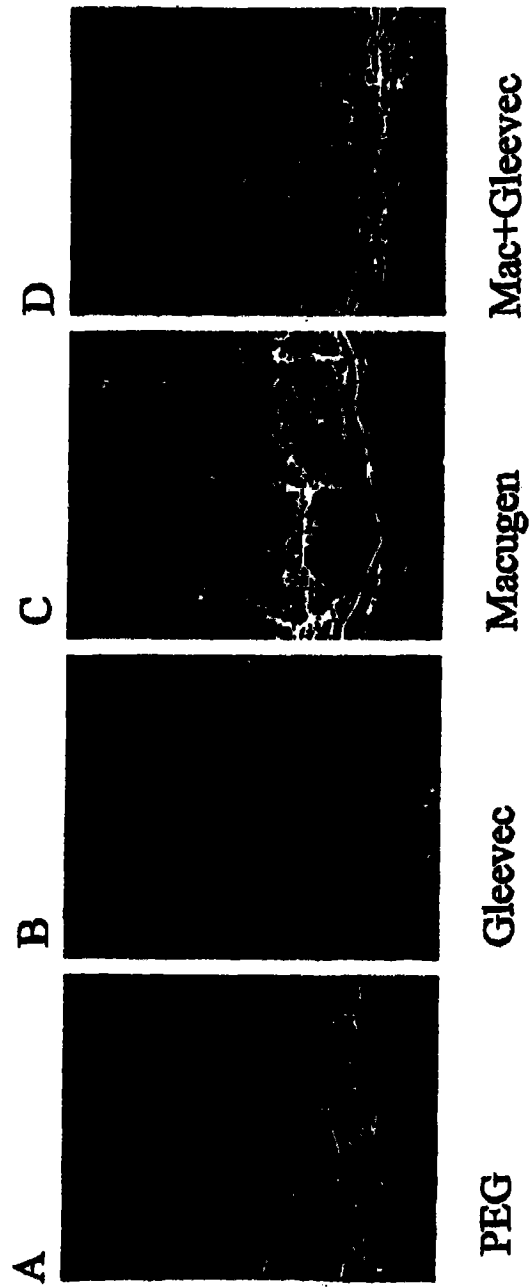


图 6

PDGFR β 和 VEGF 信号传导抑制剂对正常脉管系统的作用

施用 Gleevec, APBS, PEG 或 Macugen 对对照眼脉管系统没有影响, 表明阻断 PDGFR β 或 VEGF 信号传导或两者靶定新的且尚未形成的血管

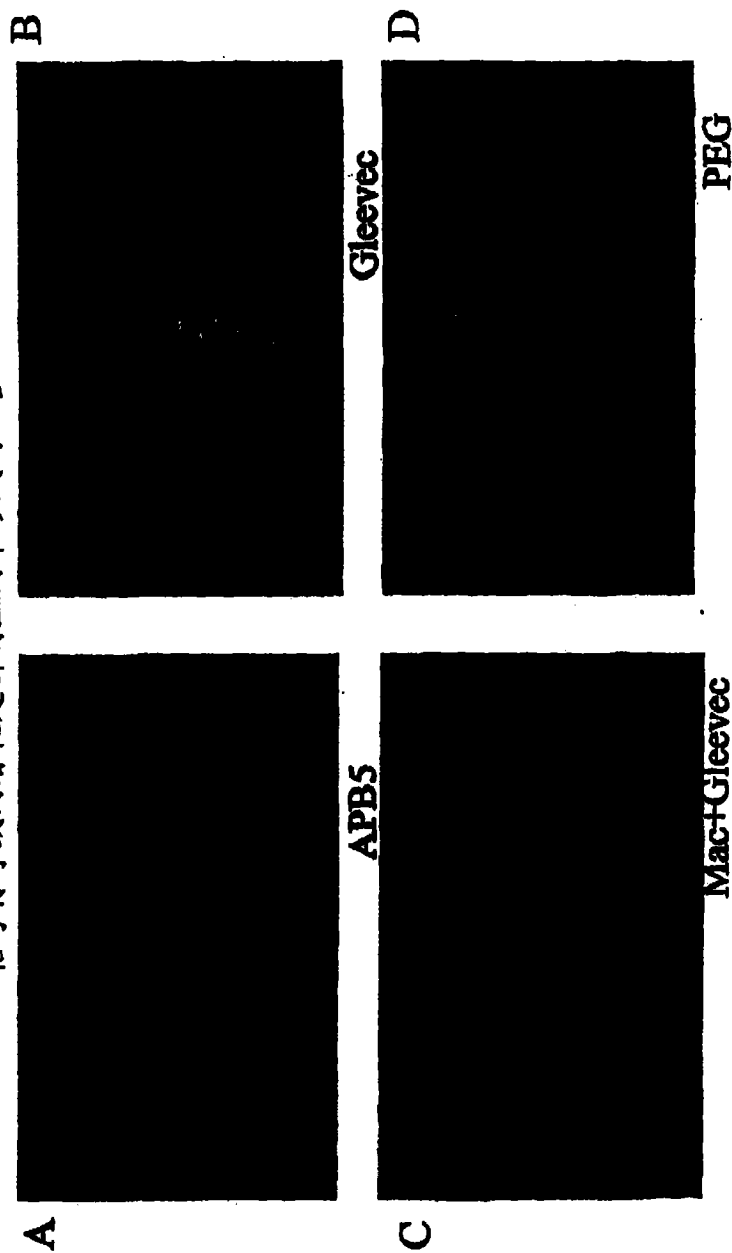


图 7

用APB5抗体和Macugen处理后脉络膜新生血管形成的面积

所有处理从激光灼伤后第7天开始进行1周, 每日2次通过腹膜内注射25mg/kg的Macugen
和5mg/kg的APB5

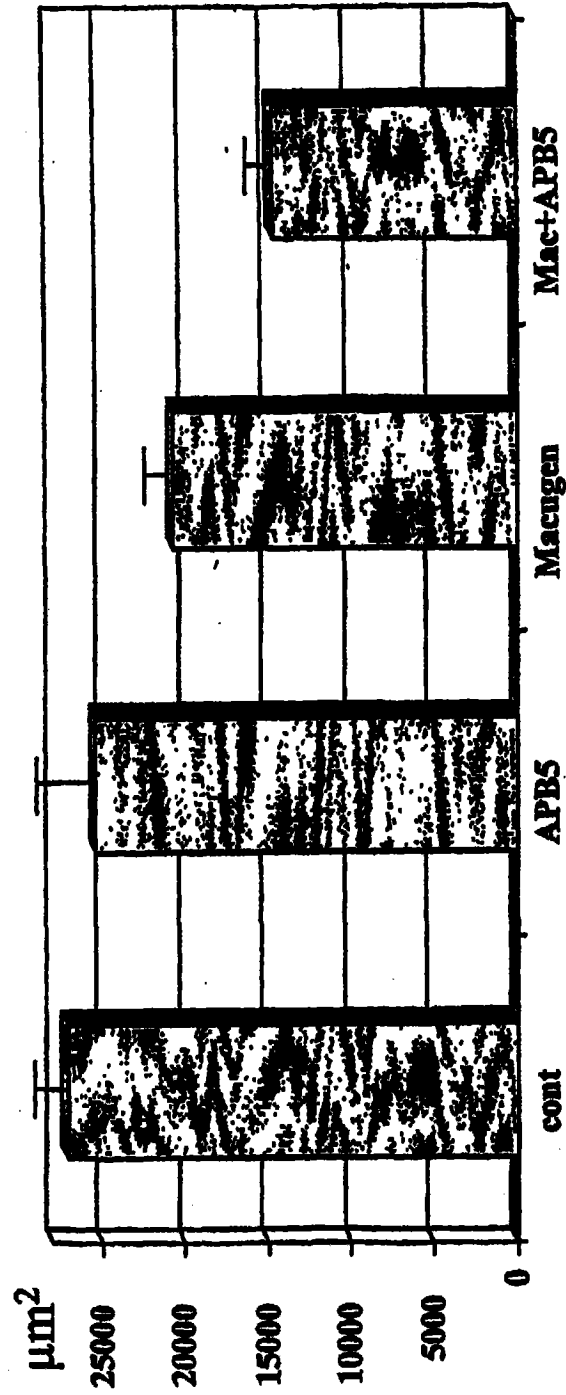


图 8

用Gleevec和Macugen处理后脉络膜新生血管形成的面积

所有处理从激光灼伤后第7天开始进行1周,每日2次通过腹腔内注射25mg/kg的Macugen,
每天2次管饲施用50mg/kg的Gleevec

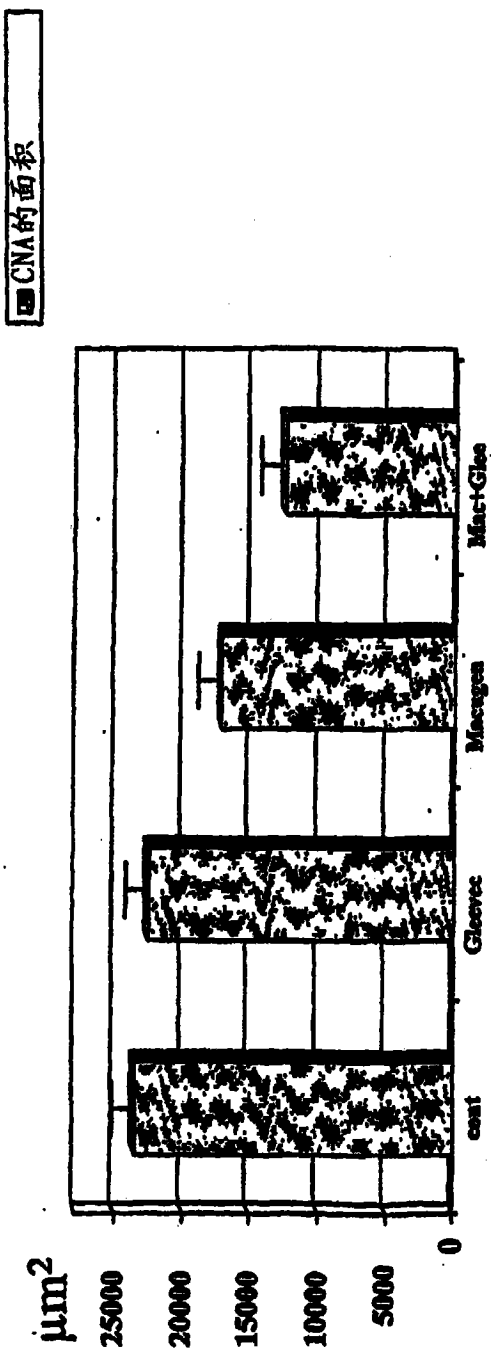


图 9

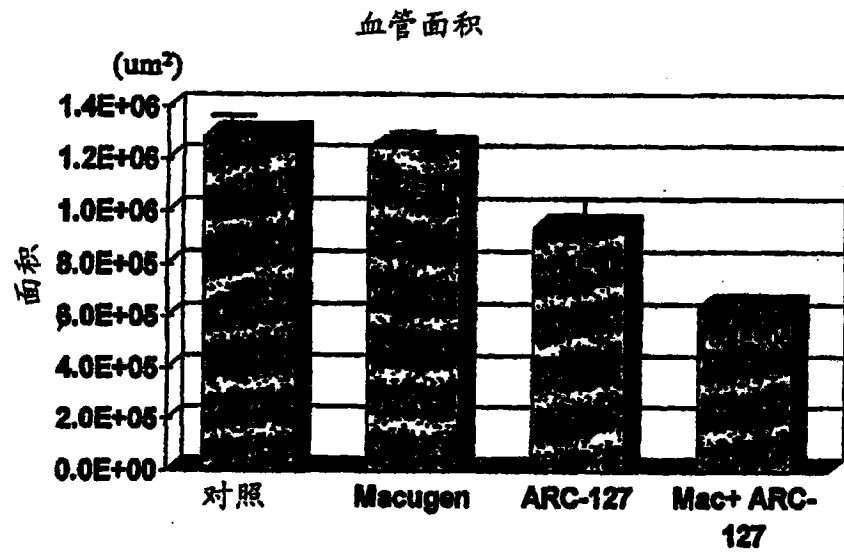


图 10

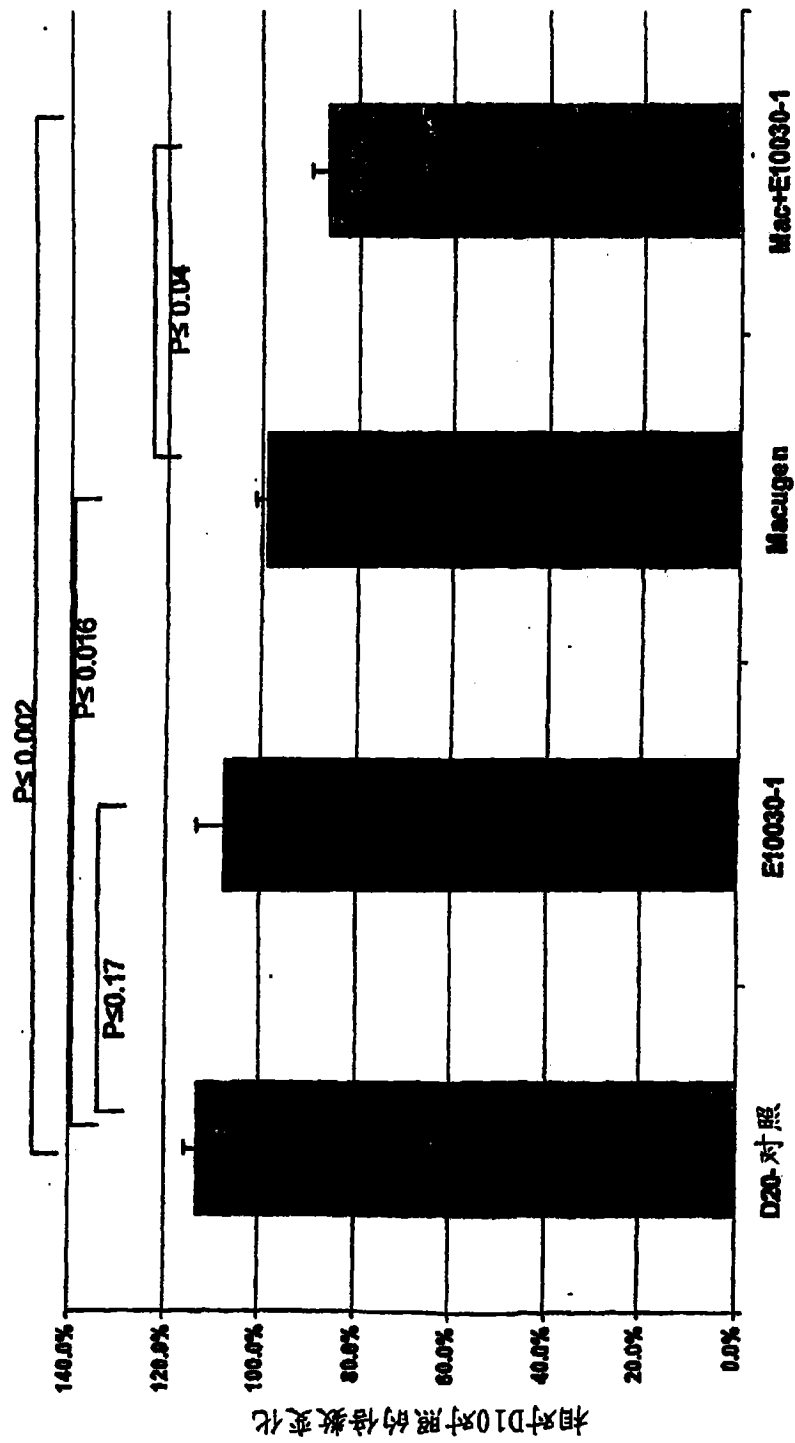


图 11

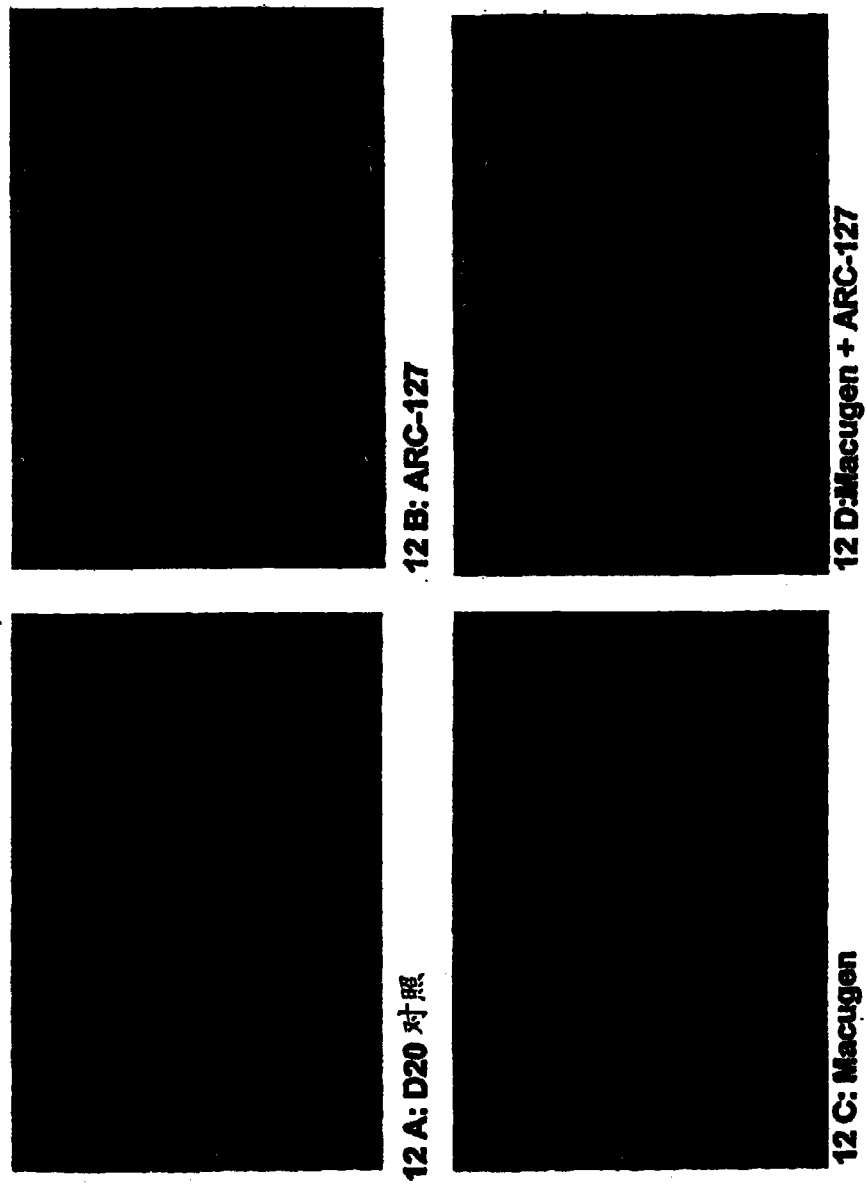


图 12

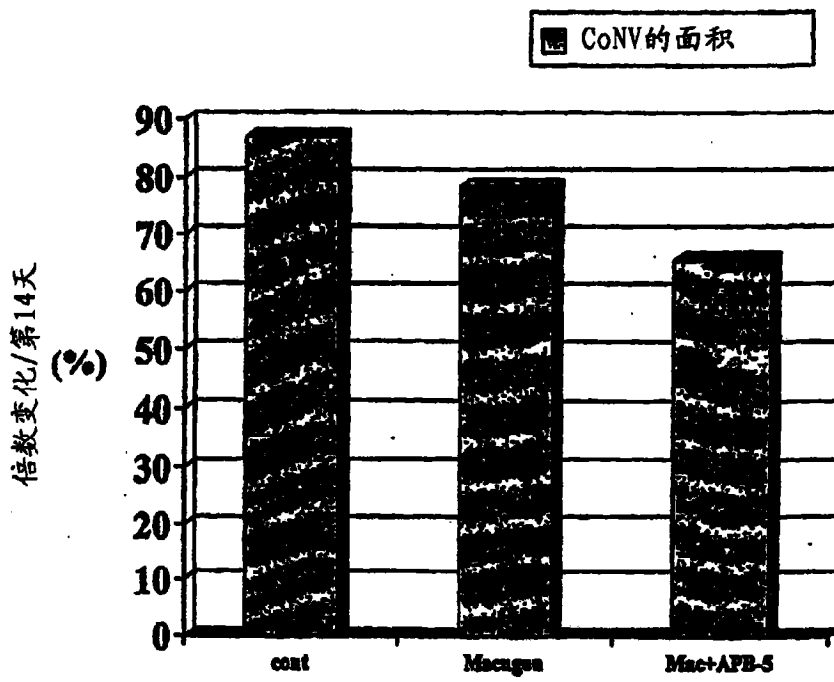


图 13

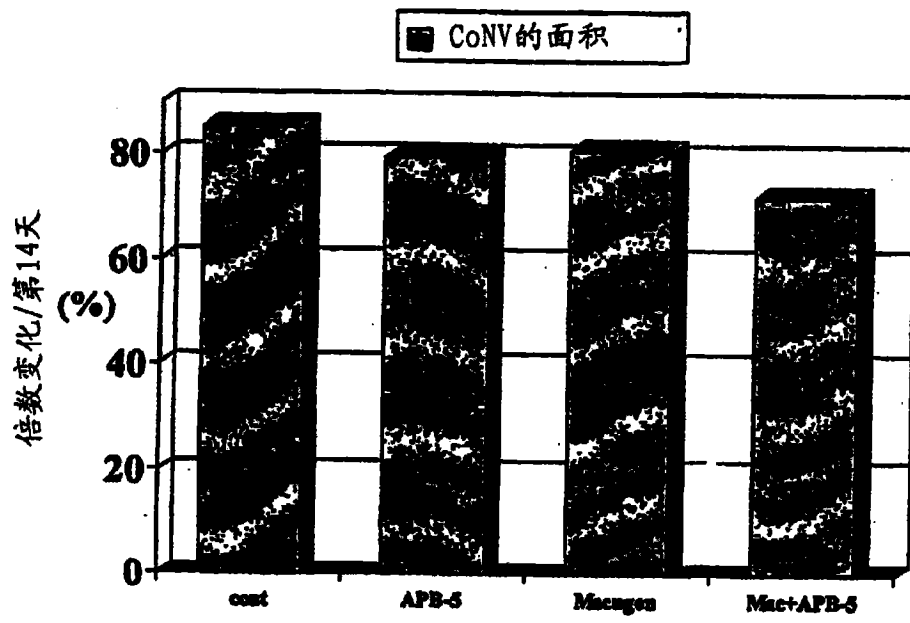


图 14