

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 38/18 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480039358.X

[43] 公开日 2007 年 8 月 8 日

[11] 公开号 CN 101014358A

[22] 申请日 2004.10.29

[21] 申请号 200480039358.X

[30] 优先权

[32] 2003.10.29 [33] US [31] 60/515,374

[86] 国际申请 PCT/US2004/036245 2004.10.29

[87] 国际公布 WO2005/041887 英 2005.5.12

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.29

[71] 申请人 约翰·霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 P·童 H·刘

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 程 伟 戈 泊

权利要求书 7 页 说明书 57 页 附图 8 页

[54] 发明名称

色素上皮所衍生因子的生物活性及使用方法

[57] 摘要

本发明是有关于治疗涉及增加血管通透性或增加血管生成的症状的病患的方法，该方法包括对该病患投予 PEDF、PEDF 44AA 胜肽、PEDF 44AA 的同源物的治疗有效量或活化该 PEDF 受体的药剂，PEDF44AA 的同源物其中不变的氨基酸残基是第 101 个氨基酸位置的谷氨酸，第 103 个氨基酸位置的异亮氨酸，第 112 个氨基酸位置的亮氨酸，及第 115 个氨基酸位置的丝氨酸。用于治疗的症状包括但不限于，败血症急性呼吸窘迫综合症、肾病综合症、糖尿病肾病病变和增生性糖尿病视网膜病变、癌症或增生性糖尿病视网膜病变。

1. 一种治疗患有涉及增加血管通透性的症状的病患的方法，包含对该病患投予治疗有效量的 PEDF。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，PEDF 由序列识别号：1 的氨基酸序列所构成。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，该症状为败血症。
4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，该症状为急性呼吸窘迫综合症。
5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，该症状为肾病综合症。
6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，该症状为糖尿病性肾病变。
7. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，该症状为增生前糖尿病视网膜病变。
8. 一种治疗患有涉及增加血管通透性的症状的病患的方法，包含对该病患投予治疗有效量的 PEDF 的 44 个氨基酸肽。
9. 根据权利要求 8 所述的方法，其中，PEDF 的 44 个氨基酸肽由序列识别号：2 的氨基酸序列所构成。
10. 根据权利要求 8 所述的方法，其中，该症状为败血症。

11. 根据权利要求 8 所述的方法, 其中, 该症状为急性呼吸窘迫综合症。
12. 根据权利要求 8 所述的方法, 其中, 该症状为肾病综合症。
13. 根据权利要求 8 所述的方法, 其中, 该症状为糖尿病性肾病变。
14. 根据权利要求 8 所述的方法, 其中, 该症状为增生前糖尿病视网膜病变。
15. 一种治疗患有涉及增加血管通透性的症状的病患的方法, 包含对该病患投予治疗有效量的 PEDF 的 44 个氨基酸肽的同源物, 其中, 氨基酸残基中第 101 个氨基酸位置的谷氨酸、第 103 个氨基酸位置的异亮氨酸、第 112 个氨基酸位置的亮氨酸、及第 115 个氨基酸位置的丝氨酸皆不改变。
16. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中, 该同源物由 PEDF 的 44 个氨基酸肽的同源序列所构成, 该同源序列由序列识别号: 3 的氨基酸序列所构成。
17. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中, 该症状为败血症。
18. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中, 该症状为急性呼吸窘迫综合症。
19. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中, 该症状为肾病综合症。

-
20. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中, 该症状为糖尿病性肾病变。
21. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中, 该症状为增生前糖尿病视网膜病变。
23. 一种治疗患有涉及增加血管通透性的症状的病患的方法, 包含对该病患投予治疗有效量的活化 PEDF 受体的药剂。
24. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中, 该药剂为小分子。
25. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中, 该症状为败血症。
26. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中, 该症状为急性呼吸窘迫综合症。
27. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中, 该症状为肾病综合症。
28. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中, 该症状为糖尿病性肾病变。
29. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中, 该症状为增生前糖尿病视网膜病变。
30. 一种在组织内降低血管通透性的方法, 该方法包含在 PEDF 足以降低该组织内的血管通透性的条件下, 对连接该组织的内皮细胞提供外源的该 PEDF。

31. 一种在组织内降低血管通透性的方法，该方法包含在 PEDF 的 44 个氨基酸肽足以降低该组织内的血管通透性的条件下，对连接该组织的内皮细胞提供外源的该 PEDF 的 44 个氨基酸肽。

32. 一种在组织内降低血管通透性的方法，该方法包含在 PEDF 的 44 个氨基酸肽足以降低该组织内的血管通透性的条件下，对连接该组织的内皮细胞提供外源的该 PEDF 的 44 个氨基酸肽的同源物。

33. 根据权利要求 32 所述的方法，其中，该同源物的氨基酸在下列氨基酸残基处不改变：第 101 个氨基酸位置的谷氨酸、第 103 个氨基酸位置的异亮氨酸、第 112 个氨基酸位置的亮氨酸、及第 115 个氨基酸位置的丝氨酸。

34. 根据权利要求 30 至 33 所述的方法，其中，该组织为眼部组织。

35. 根据权利要求 30 至 33 所述的方法，其中，该组织为肺部组织。

36. 根据权利要求 30 至 33 所述的方法，其中，该组织为肾脏组织。

37. 一种治疗患有涉及增加血管发生的症状的病患的方法，包含对该病患投予治疗有效量的 PEDF 的 44 个氨基酸肽。

38. 根据权利要求 37 所述的方法，其中，PEDF 的 44 个氨基酸肽由序列识别号：2 的氨基酸序列所构成。

39. 根据权利要求 37 所述的方法，其中，该症状为癌症。

40. 根据权利要求 37 所述的方法, 其中, 该症状为增生前糖尿病视网膜膜病变。

41. 一种治疗患有涉及增加血管发生的症状的病患的方法, 包含对该病患投予治疗有效量的 PEDF 的 44 个氨基酸肽的同源物, 其中, 氨基酸残基中第 101 个氨基酸位置的谷氨酸、第 103 个氨基酸位置的异亮氨酸、第 112 个氨基酸位置的亮氨酸、及第 115 个氨基酸位置的丝氨酸皆不改变。

42. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中, 该同源物由 PEDF 的 44 个氨基酸肽的同源序列所构成, 该同源序列由序列识别号: 3 的氨基酸序列所构成。

43. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中, 该症状为癌症。

44. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中, 该症状为增生前糖尿病视网膜膜病变。

45. 一种治疗患有涉及增加血管发生的症状的病患的方法, 包含对该病患投予治疗有效量的活化 PEDF 受体的药剂。

46. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中, 该药剂为小分子。

47. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中, 该症状为癌症。

48. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中, 该症状为增生前糖尿病视网

膜病变。

49. 一种在组织内降低血管发生的方法,该方法包含在 PEDF 的 44 个氨基酸肽足以降低该组织内的血管通透性的条件下 (under conditions sufficient for said PEDF 44 AA peptide to vascular permeability within said tissue), 对连接该组织的内皮细胞提供外来的该 PEDF 的 44 个氨基酸肽。

50. 一种在组织内降低血管发生的方法,该方法包含在 PEDF 的 44 个氨基酸肽足以降低该组织内的血管通透性的条件下 (under conditions sufficient for said PEDF 44 AA peptide to vascular permeability within said tissue), 对连接该组织的内皮细胞提供外源的该 PEDF 的 44 个氨基酸肽的同源物。

51. 根据权利要求 50 所述的方法,其中,该同源物的氨基酸在下列氨基酸残基处不改变:第 101 个氨基酸位置的谷氨酸、第 103 个氨基酸位置的异亮氨酸、第 112 个氨基酸位置的亮氨酸、及第 115 个氨基酸位置的丝氨酸。

52. 根据权利要求 49 至 51 所述的方法,其中,该组织为眼部组织。

53. 根据权利要求 49 至 51 所述的方法,其中,该组织为癌症组织。

54. 一种治疗患有涉及神经病变的症状的病患的方法,包含对该病患投予治疗有效量的 PEDF 的 44 个氨基酸肽。

55. 根据权利要求 8 所述的方法, 其中, PEDF 的 44 个氨基酸肽由序列识别号: 2 的氨基酸序列所构成。

56. 根据权利要求 54 所述的方法, 其中, 该症状为神经退化性疾病。

57. 根据权利要求 54 所述的方法, 其中, 该症状由局部缺血所造成。

色素上皮所衍生因子的生物活性及使用方法

技术领域

本发明的领域是有关用于涉及血管通透性、血管生成与/或神经疾病症状的治疗或预防的组成物和方法。

优先权

本发明申请案所请求的优先权为 2003 年 10 月 29 日当申请的美国临时申请案第 60/515,374 号。

发明背景

血管通透性与其调节控制对体内平衡(homeostasis)相当重要,血管通透性的增加在与败血症(sepsis)相关的低血压、急性呼吸窘迫综合症(acute respiratory distress syndrome)、肾病综合症(nephrotic syndrome)、糖尿病肾病变和糖尿病视网膜病变的发展上扮演一个重要的角色。虽然维持正常血管健全的生理重要性已为众所皆知,但仍难以理解如何维持血管健全,以及血管通透性如何负调控。

已证实血管内皮生长因子(VEGF)的活性能促进血管通透性。除了促进天竺鼠皮肤的血管通透性外,VEGF 为活体内血管生成的一个重要媒介,且具有神经营养性(neurotrophic)/神经保护性的活性。VEGF 透过两个酪氨酸激酶受器, fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1; VEGFR-1) and fetal liver kinase-1 (Flk-1/KDR; VEGFR-2) 致力于内皮细胞。VEGFR-2 为许多 VEGF 生物活性的明显讯号受体,包括血管通透性。

色素上皮所衍生因子(PEDF)有 418 个氨基酸 50 千道尔顿(kDa)的糖蛋白,为丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpin)家族成员的一。虽然 PEDF 具有传说中的对蛋白酶敏感性的环(protease-sensitive loop),不像典型的丝氨酸蛋白酶抑制剂(例如 $\alpha 1$ -抗胰凝乳蛋白酶($\alpha 1$ -antichymotrypsin, ACT)), PEDF 缺乏蛋白酶抑制活性。在丝氨酸蛋白酶抑制剂中,并非只有 PEDF 缺乏抗蛋白酶活性;来自丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的热休克蛋白 47(HSP47)、胶原蛋白特定伴随蛋白(collagen-specific chaperone protein),亦缺乏抗蛋白酶活性。PEDF 原本视为视网膜光感受器细胞间质(interphotoreceptor matrix)的胞外成分。PEDF 的功能在于促进 Y79 视网膜母细胞瘤(retinoblastoma)的轴突生长。最近,已发现 PEDF 为强而有力的抗血管生成因子,有效地抑制缺血所诱发的视网膜病变的鼠科动物模型其血管发生。

在某些实例中 VEGF 和 PEDF 的生物活性十分相似,然而在其它实例中却呈拮抗作用。VEGF 和 PEDF 两者皆在血管生成与运动神经元存活中具有活性。在血管内皮细胞系统中,VEGF 和 PEDF 具有分别对血管生成(proangiogenic)和抗血管生成(antiangiogenic)活性的间具有抗衡的能力。在运动神经元中, PEDF 和 VEGF 两者的功能与神经营养性/神经保护性药剂一致。虽然在血管生成与运动神经元存活中已建立 PEDF 和 VEGF 的间的关系,尚不清楚在血管通透性中 PEDF 对 VEGF 活性有何影响。

在血管通透性与血管生成相关疾病盛行的前提下,仍有需要有效预防和治疗该等疾病,尤其是此等与血管通透性与血管发生并发病相关的疾病,例如增生前(preproliferative)与增生性(proliferative)糖尿病视网膜病变。

发明内容

血管通透性在生命威胁和视力威胁疾病的广大范围中扮演一个重要的角色。血管内皮生长因子(VEGF)可增加血管通透性。根据本发明的发现是有关于发现色素上皮所衍生因子(PEDF)能有效地减少 VEGF 所诱发的血管通透性。尤其是, 44 个氨基酸的 PEDF 给予抗-血管通透性与抗-血管生成的活性。另外, 4 种氨基酸(谷氨酸₁₀₁、异亮氨酸₁₁₃、亮氨酸₁₁₂和丝氨酸₁₁₅)被视为对两者的活性相当重要。PEDF 或衍生物可潜在地减少或恢复来自糖尿病黄斑水肿(macular edema)的视力损失, 以及老年黄斑病变(age-related macular degeneration)的血管发生。再者, PEDF 与/或其 44 个氨基酸(AA)胜肽代表一种新颖的治疗方法, 其由于过度的血管通透性与/或血管生成而导致与败血症(sepsis)相关的低血压、肾病综合症与其它视力威胁和生命威胁疾病。

本发明是有关于治疗与血管通透性增加相关症状的病患的方法, 该方法包括对该病患投予 PEDF、PEDF 44 AA 的治疗有效量、PEDF 的同源物(homolog)、PEDF 44 AA 的相似物或活化该 PEDF 受体的药剂, 其中不变的氨基酸残基是第 101 个氨基酸位置的谷氨酸, 第 103 个氨基酸位置的异亮氨酸, 第 112 个氨基酸位置的亮氨酸, 及第 115 个氨基酸位置的丝氨酸。所治疗的症状包括, 但不限于此, 败血症、急性呼吸衰竭、肾病综合症、增生前糖尿病肾病变和糖尿病视网膜病变, 以及老年黄斑病变的血管发生。

本发明是有关于治疗与血管生成增加相关症状的病患的方法, 该方法包括对该病患投予 PEDF、PEDF 44 AA 的治疗有效量、PEDF 的相似物、PEDF 44 AA 的相似物或活化该 PEDF 受体的药剂, 其中不变的氨基

酸残基是第 101 个氨基酸位置的谷氨酸, 第 103 个氨基酸位置的异亮氨酸, 第 112 个氨基酸位置的亮氨酸, 及第 115 个氨基酸位置的丝氨酸。所治疗的症状包括, 但不限于此, 癌症与增生性糖尿病视网膜病变。

再者, 本发明是有关于辨识候选药剂的筛选法, 该方法可与 PEDF 受体反应并使其活化。此等候选药剂可包括具有模仿或完成 PEDF 生物活性能力的任何分子、蛋白质或医药品(例如小分子化学药剂)。

本发明其它和进一步态样、特征与优点将由下述做为揭示目的的本教示的各种具体实施例清楚可见

附图说明

图 1 说明 PEDF 性质上抑制经 VEGF 诱发的视网膜血管通透性, 其中将重组的老鼠 VEGF₁₆₄(VEGF)注入一眼, 并在另一对侧眼共同注射试剂; 荧光素血管摄影(fluorescein angiography)显示渗漏至视网膜和水晶体的程度, 而经 VEGF 诱发的血管渗漏程度比下述所观察的情况更高: PBS(a); 与 VEGF 共同注射的其它药剂: 重组的人类 PEDF(PEDF)(b); α 1-抗胰凝乳酶(ACT)(c); 及热休克蛋白 47(HSP47)(d); 所有照片皆取自 4 只或 4 只以上老鼠的结果特征。

图 2 说明 PEDF 性质上抑制经 VEGF 诱发的视网膜血管通透性, 其中将重组的老鼠 VEGF₁₆₄(VEGF)以水晶体注射的方式注入一只眼并以试剂注射至另一对侧眼后的 24 小时, 以视网膜伊凡氏蓝(Evans blue)的量描绘血管渗漏, 经 VEGF 诱发的血管渗漏量高于对照组(PBS)为 100%; 注射 PBS 的血管渗漏为 0%(n=29); 与 VEGF 共同注射第二种试剂以测试其在血管通透性的功效; 人类 PEDF(n=26)降低经 VEGF 诱发的血管通透性, 然而 ACT(n=27)与 HSP47(n=28)皆不会降低经 VEGF 诱发的

血管通透性；资料为平均值 $\pm$ SE，n 代表各群组中老鼠数；*，相较于经 VEGF 诱发的血管通透性而言， $P<0.05$ 。

图 3 说明来自人类 PEDF、PEDF_{pep} 的 44 个氨基酸胜肽能有效地抑制经 VEGF 诱发的视网膜血管通透性，其中 (a) PEDF_{pep} 的共同注射能有效地抑制来自视网膜血管分布的经 VEGF 诱发的荧光渗漏(上方)；以 VEGF 和 ACT_{pep} 两者注射老鼠的眼睛，显示无法分辨来自 PEDF_{pep} 相对应区域中 ACT 的胜肽与来自以 VEGF 单独注射眼睛(下方)的不同处；(b) 透过伊凡氏蓝分析法，PEDF_{pep} 的共同注射能在数量上有效地抑制经 VEGF 诱发的血管通透性；伊凡氏蓝分析法中，PEDF_{pep} (n=26) 与 VEGF 的共同注射能有效地抑制经 VEGF 诱发的增加；观察将与 PEDF_{pep} 等莫耳浓度的 ACT_{pep} 做共同注射 (n=28) 并无抑制经 VEGF 诱发的血管通透性；资料为平均值 $\pm$ SE，n 代表各群组中老鼠数；*，相较于经 VEGF 诱发的血管通透性而言， $P<0.05$ 。

图 4 说明以 PEDF_{pep} 4 种氨基酸残基来取代来自 ACT 或 HSP47 相对应的残基，会破坏血管通透性的调节，其中以 4 种氨基酸残基所取代的 PEDF_{pep} 来产生 CHIMERA_{pep}；PEDF_{pep}、CHIMERA_{pep}、ACT_{pep} 与 HSP47 的相对应序列置于(a)；将相异和相同的氨基酸残基分别以深蓝和浅蓝反白表示的，以黄色强调在 PEDF_{pep} 中的氨基酸取代经取代而产生 CHIMERA_{pep}；PEDF (蛋白质数据库序号 1IMV) 与 ACT (蛋白质数据库序号 1QMN) 的结晶化的结构图显示于(b)；以浅蓝带状图强调 PEDF_{pep} 和 ACT_{pep} 分别在 PEDF 和 ACT 的相对应区域；以深蓝强调并以红色标记在 PEDF_{pep} 和 CHIMERA_{pep} 间不同的 4 种氨基酸取代；两个蛋白都是在分泌讯号胜肽处开始编号；以 VEGF 注射一只眼，而以 VEGF+CHIMERA_{pep} 注射另一对侧眼；藉由萤光素血管摄影(c) 与伊凡氏蓝分析法 (n=27) (d) 无法辨识 CHIMERA_{pep} (与图 3a 的 PEDF_{pep} 等莫耳浓度) 在经 VEGF 诱发的血管通透性的效果。

图 5 说明活化 PEDF 的两者-抑制内皮细胞移动与抑制血管通透性-需要相同 4 种氨基酸, 其中(a)在 PEDF、ACT 或 HSP47 的各种浓度存在下测量经 VEGF₁₆₄ 刺激的牛视网膜微血管内皮细胞移动。PEDP 随着剂量而抑制经 VEGF 诱发的移动, Kd 为 0.5 奈莫耳浓度(Nm); ACT 与 HSP47 缺乏此类活性; VEGF₁₆₄ 存在下的移动细胞数减去不存在任何添加试剂的移动细胞数呈现 100%移动最大值; 各点表示 4 组的平均值±SE; (b) 如 a 部分予以量测经 VEGF₁₆₄ 刺激的牛视网膜微血管内皮细胞移动, 然而 ACT_{PEP} 和 CHIMERA_{pep} 的能抑制经 VEGF₁₆₄ 刺激的牛视网膜微血管内皮细胞移动; PEDF_{PEP} 能抑制经 VEGF₁₆₄ 刺激的内皮细胞移动(Kd=Nm)至如同完整长度 PEDF 的相似程度; ACT_{PEP} 和 CHIMERA_{pep} 对经 VEGF 刺激的内皮细胞移动没有影响。

图 6 以一个字母符号来表示完整长度 PEDF 的氨基酸序列(序列识别号: 1)。

图 7 以一个字母符号来表示 PEDF 44 个氨基酸肽的氨基酸序列(序列识别号: 2)。

图 8 以一个字母符号来表示 PEDF 44 个氨基酸肽的氨基酸序列(序列识别号: 3), 其中将下述的氨基酸划底线以说明它们在 PEDF 44 AA 的位置: 谷氨酸在第 101 个氨基酸的位置, 异亮氨酸在第 103 个氨基酸的位置, 亮氨酸在第 112 个氨基酸的位置, 而丝氨酸在第 115 个氨基酸的位置。

具体实施方式

要了解本发明并非限制于本文所述的特定材料与方法。亦要了解本文所使用的术语是为描述特定具体实施例的目的, 而非意图限制被后附申请专利范围所限制的本发明范畴。如本文所述, 除非内容有清楚地说明, 否则单数形式字词" a"、" an" 和" the" 是包括复

数参考涵意。举例而言，熟习此技术领域的人士知道”眼睛组织”意指包括复数个细胞。

除非有特别说明，本文中所用的所有技术上和科学上的术语具有熟习本发明所属的技术领域的人士所一般了解的意义。本文所指的所有公开资料是以引用方式做为描述和揭示可渗透模型、方法、试剂和载体的目的，此等已报导于公开资料且与本发明相关。本文并非用于承认本发明被赋予早于此等藉由先前发明优点的揭示。

PEDF、VEGF 与其生物活性间的关系

PEDF 和 VEGF 的各种活性间的关系并不完全地清楚。最初的研究显示经 PEDF 诱发的轴突生长，以及经 VEGF 所促进的血管生长和血管通透性。PEDF 抗血管生成活性的报告显示 PEDF 和 VEGF 间的血管生成的关系。在神经细胞的各种类型中，PEDF 和 VEGF 共有相似的活性：皆有神经营养性/神经保护性。因此，VEGF 具有三合一的活性，(i)促进血管生成，(ii)促进神经存活与生长，(iii)促进血管通透性。

血管通透性不仅在非增生性糖尿病视网膜病变上，亦在许多其它疾病状况上扮演一个重要的病理生理的角色。视网膜脉管系统 (vasculature) 为研究 PEDF 对血管通透性潜在影响的较佳模型系统，因为透过清楚的眼睛光学系统能轻易地观察视网膜脉管系统。在非增生性糖尿病视网膜病变中，即人类视觉损失最常见的原因的一，血管通透性的增加乃为糖尿病视网膜水肿的必要条件。糖尿病视网膜水肿的诊断试验的黄金定律系为荧光素血管摄影，一个做为证实 VEGF 在糖尿病视网膜病变的病理生理学上的重要角色。以 VEGF 注射老鼠眼睛已

会增加血管通透性而导致荧光渗漏的增加。本发明的发现中,当共同注射 PEDF 时此增加将被对抗,以伊凡氏蓝分析法证实发现。因此,PEDF,像 VEGF,也有三合一的活性。PEDF 不但有做为抗血管生成和神经营养性/神经保护性药剂的功能外,亦能抑制血管通透性病理上地增加。再者,PEDF 以有意义的量自然地存在于眼睛中,因此此等活性可帮助维持眼睛的正常生理。

因为 PEDF 三合一活性的神经营养性/神经保护性功能可能为受体调节,因此抗血管生成和抗血管通透性的活性亦可能为受体调节。已证实 PEDF 以 0.5nM 的 IC_{50} 能抑制经 VEGF 刺激内皮细胞移动,且对整段 PEDF 以相同强度大小下 $PEDF_{pep}$ 具有 3.0nM 的 IC_{50} 。相似的 PEDF 浓度所需的神经或抗血管生成活性的最大值一半的量与假设相符,该假设是为神经营养性/神经保护性与抗血管生成活性共有相同的细胞表面受体。全部 3 个 PEDF 活性的活性部位能局部化为相同的 44 个氨基酸区域(后文中称为"PEDF 44 AA 胜肽",在图标与具体实施例的简单说明中也意指" $PEDF_{pep}$ ",请参见序列识别号:2)暗示此活性是藉由相同或似的受体来调节。

为了进一步纯提出 PEDF 44 AA 胜肽、嵌合(chimeric)胜肽、 $CHIMERA_{pep}$ 中的活性部位的局部,是根据假设来制备,该假设为如果 PEDF 44 AA 胜肽中的重要氨基酸残基被来自 ACT 或 HSP47 的相对应残基取代(图 8 中划底线处),将破坏此生物活性。使 PEDF 44 AA 胜肽中的这 4 个候选氨基酸残基发生突变,将失去生物活性。 $CHIMERA_{pep}$ 除了这 4 个氨基酸残基被来自 ACT 或 HSP47 的相对应残基取代外,与 PEDF 44 AA 胜肽完全相同。 $CHIMERA_{pep}$ 藉由荧光素血管摄影或伊凡氏蓝分析法,在内皮细胞移动分析法中,对于中和血管系统上任何 VEGF 的活性并不

起作用。

除了辨识 PEDF 氨基酸残基 78 至 121 中的神经营养性/神经保护性区域(PEDF 44 AA 胜肽)，在 PEDF 上的许多其它结合部位已以图标的方式标示出：酸性肝素(heparin)结合区域；胶原蛋白与 β -折板 A 链 2(β -sheet A strands 2)和 3 及螺旋体(helix)F 的结合区域；以及丝氨酸蛋白酶抑制剂在残基 367 至 387 的所暴露的环。在本发明中，抗血管生成与抗血管通透性的活性部位将局部化为氨基酸残基谷氨酸₁₀₁、异亮氨酸₁₀₃、亮氨酸₁₁₂和丝氨酸₁₁₅，此指出此两个活性的部位为完全相同或极为相似。此发现暗示单一受体或具有非常相似结合具体性的多个受体供应 2 个或全部 3 个的活性。功能不同但却具有极为相似结合具体性的多个受体的实例为 2 甘露糖-6-磷酸酯受体。

PEDF、PEDF 44 AA 胜肽及使用方法：

本发明亦涵括整段色素上皮所衍生的生长因子(PEDF; Steele 等人,1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (4): 1526-1530)及任何用于抑制血管通透性、抑制血管生成和促进神经保护性的 PEDF 衍生物，包括最佳的是 PEDF 44 AA 胜肽及其相似物。本发明亦涵盖编码整段 PEDF 的核酸的使用，以及任何 PEDF 的血管生成或血管通透性衍生物，包括最佳的是 PEDF 44 AA 胜及其相似物。

本发明方法的内容中，PEDF 对血管通透性和血管生成具有强而有力的抑制活性。PEDF 多肽的一种形式(整段 PEDF)是列于第图 6 (序列识别号：1)；然而，本发明并不限于此示例性序列的使用。更确切地说，此技术领域已知有其它 PEDF 序列(请参见，例如已公开的国际专

利申请案 WO 95/33480 和 WO 93/24529)。再者,可改变不同种与个体间的基因序列是为众所皆知。天然性对偶基因变化的范围包括于本发明的范畴内。额外地或选择性地来说, PEDF 多肽可包括来自示例性序列或其它天然发生于 PEDF 多肽的一个或多个突变点。因此, PEDF 多肽典型地对序列识别号: 1 的全部或部分有至少约 75%的相似度; 较佳为对序列识别号: 1 的全部或部分有至少约 80%的相似度(例如对序列识别号: 1 有至少约 85%的相似度); 更佳为该 PEDF 多肽对序列识别号: 1 的全部或部分有至少约 90%的相似度(例如对序列识别号: 1 的全部或部分有至少约 95%的相似度); 而最佳为对序列识别号: 1 的全部或部分有至少约 97%的相似度。更确切地说, PEDF 多肽亦可包括其它区域, 譬如抗原决定位置卷标和 His 卷标(例如, 此蛋白可为融合蛋白)。

本发明内容中, PEDF 多肽或 PEDF 44 AA 胜肽可为或包括已知的 PEDF 序列或其衍生物的插入、删除或置换突变。较佳地, 任何置换可为半保留, 是在于以最小地方式中断该 PEDF 多肽的生化特性。因此, 引入突变以置换氨基酸残基的突变处, 较佳为以带正电残基(H、K 和 R)置换带正电残基; 较佳为以带负电残基(D 和 E)置换带负电残基; 较佳为以中性极性残基(C、G、N、Q、S、T 和 Y)置换中性极性残基; 较佳为以中性非极性残基(A、F、I、L、M、P、V 和 W)置换中性非极性残基。再者, 该 PEDF 多肽可为已知的 PEDF 蛋白或其片段的活性片段, 最佳为 PEDF 44 AA 胜肽。当然, 因为插入、删除或置换突变可影响蛋白质糖化, 所以 PEDF 多肽在用于本发明方法的血管通透性和血管生成上不需要进行糖化来具有所需的抑制活性。

本发明应进一步推断为包括 PEDF 多肽或 PEDF 44 AA 胜肽的使用, 该 PEDF 44 AA 胜肽可含有一或多个的右旋异构物(D-isomer)型式的

PEDF 的氨基酸。具有右旋型式(retro-inverso)的 D-氨基酸 PEDF 胜肽的制造，是以所揭示的相同氨基酸来制作，然而本发明提供至少一个氨基酸，也许所有氨基酸为 D-氨基酸以做为简明的标的。当胜肽中所有氨基酸为 D-氨基酸时，该分子的 N-和 C-端将被反转，结果为具有相同结构基团的分子在该分子的 L-氨基酸型式的相同位置。然而，该分子对蛋白酶解的降解是较稳定，因此常用于本文所述的许多应用。

本发明的方法亦应推断为包括 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽的用途，如本文所述是以核酸编码具有生物活性 PEDF 的型式或其任何具有 PEDF 生物活性的片段。因此本发明应推断为包括核酸的用途，其编码 PEDF 的片段和其任何衍生物，或其编码具有生物活性 PEDF 的片段。

本文所使用的术语”具有生物活性 PEDF”意指出现在本文所包括的实施例细节/实例部分的任何分析法中，任何 PEDF 多肽、片段或衍生物，最重要地为具有抑制血管通透性和血管生成的 PEDF 44 AA 胜。

本文实例部分所列示的具有生物活性的 PEDF 片段为 PEDF 的 44 个氨基酸片段(44mer)。本文所详尽提供的单离方法和该片段特性是为技术领域所熟习者。因此，随着本文所提供的指示以辨识有助于本发明的具有生物活性的 PEDF 片段，所以本发明如本文所述最被推断为包括任何和所有此等相似物 and 任何修饰及其衍生物。另外，本发明应推断为包括任何和所有核酸，该核酸编码具有生物活性的 PEDF 片段，此是如本文所定义的术语。用于随后所附申请专利范围的术语” PEDF”，应推断为包括如本文所述的所有具有生物活性的 PEDF 型式。

用于本文的术语”外源性”意指 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽，该术语应推断为包括任何和所有非自然地表现于细胞的 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽。举例而言，”外源性 PEDF”应推断为包括利用重组技术导入于细胞的核酸所表现的 PEDF、加入细胞的 PEDF、及其任何与所有组合。因此，该术语不应推断为仅限于将 PEDF 加至细胞本身，然而应延伸为包括导入于细胞的核酸所表现的 PEDF。

PEDF 多和 PEDF 44 AA 胜肽能抑制血管通透性，于某种程度上而言，藉由减少经细胞的液泡运输与/或开窗(fenestration)，及/或藉由内皮细胞中紧密细胞间接合的保护。因此，本发明提供抑制液泡运输、开窗，或藉由提供外源性 PEDF 或 PEDF AA 胜肽来促进紧密接合至此等细胞的方法。除了减少血管通透性外，该方法有助于治疗刺激眼睛中血管通透性相关的疾病，例如黄斑囊样水肿(cystoid macular edema)、葡萄膜炎视网膜水肿(uveitic retinal edema)、血管阻塞疾病(vascular occlusive diseases)。在其它器官系统中，该方法有助于大脑、肺、肠水肿和其它渗出性病理。

PEDF 多和 PEDF44 AA 胜肽能抑制血管生成，于某种程度上而言，藉由减少经活化内皮细胞的迁移与/或收缩，因而还原内皮细胞延伸该组织的能力。因此，本发明提供抑制内皮细胞移动和延伸的方法，是藉由提供外源性 PEDF 多肽和 PEDF44 AA 胜肽至此等细胞。除了减少血管生成外，该方法有助于治疗刺激内皮细胞移动相关的疾病，例如肠性粘附(intestinal adhesions)、克隆氏症(Crohn's disease)、血管粥样硬化、硬皮症和类风湿性关节炎。

关于本发明方法，提供 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽于与肠组织相关

的内皮细胞。此类细胞可为包含肠组织的细胞、导入至该组织的外源性细胞、或非在该组织内的毗邻细胞。因此，举例而言，该细胞可为该组织的细胞，且于原位提供 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽，以使 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽接触该细胞。另外地，该细胞可为导入至该组织的细胞，其中在将 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽导入至该组织前(例如，细胞外)，可将 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽转移至该细胞，以及在导入至该组织后，将 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽进行原位转移。

当 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽导入至细胞因而转移至该哺乳类动物，不应推断本发明为限于将 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽导入至该细胞的方式；亦不应推断本发明为限于将该细胞导入至哺乳类动物的方式。如下文所详述，将 DNA 导入至细胞的方法为将等细胞送至哺乳类动物组织的已知方法。

与内皮细胞相关的组织为任何欲抑制内皮细胞移动或增生的组织，(例如，为抑制血管生成)，及为抑制液泡运输、开窗或穿越紧密结合的渗漏(例如，为抑制血管通透性)。在一应用中，该组织可为眼睛组织，其中 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽的存在将抑制新颖的与各种眼睛疾病相关的血管通透性和血管生成。举例而言，本发明方法有助于治疗眼睛伤害、组织缺氧(hypoxia)、感染、外科手术、雷术手术、糖尿病、视网膜母细胞瘤(retinoblastoma)、肌肉性降解、缺血性视网膜病变，或其它眼睛疾病或疾患。在此方面中，本方法是有助于重建视力、预防失明或延迟各种眼睛疾病相关的视力损耗。绝大部分的糖尿病病患最后都会遭受视力减退，此是由于因应疾病所造成的缺血而使视网膜内血管大量生长。同样地，暴露于高氧量的早产儿所发展的视网膜病变，是因为视网膜静脉或其它血管的阻塞或缺血性异常。如

本文所述，缺血所诱发的视网膜病变可藉由 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽的全身性或局部投予来预防与/或治疗。在雷射手术的例子中，关于眼睛，PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽可用于预防治疗后的血管再生长。雷射用于消除过多的血管，但亦切除具有潜在视力的视网膜，及在视网膜所造成的伤口诱发一些血管生成。以 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽做全身或局部治疗应做为预防此等再生及保存可用的视网膜组织，否则可切除。

利用美国专利第 5,614,404 的方法，藉由建构反转录病毒基因转移载体来完成基因治疗以递送 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽。所描述的重组病毒载体，其共同表现具有组合至有缺陷的非自行增殖病毒颗粒。用于基因转移载体的病毒，包括反转录病毒，其为最常用于人类临床试验的载体。为了产生基因治疗载体，将有兴趣的基因克隆至有复制缺陷的反转录病毒颗粒，该有复制缺陷的反转录病毒颗粒含有二个长端复制区(long terminal repeats, LTR)、引子结合位、包装讯号(packaging signal)及反转录所需的聚嘌呤，注射后的反转录病毒的完成功能。为了制造病毒载体，将载体的质体型式转染至包装细胞株(packaging cell line)，该细胞株制造颗粒组合所需的反转录病毒结构蛋白，Gag、Pol 和 Env。通常利用选择性标记来产生制造者细胞株(producer cell line)，常藉由该反转录病毒载体来携带 G418 抗性基因。所产生的细胞株可经膜套包覆(encapsulated)，如 PCT 国际专利申请案 W097/44065 号所述，其描述含有活体包装细胞(living packaging cells)的生物兼容性胶囊，该活体包装细胞能分泌用于感染标的细胞的病毒载体；以及递送该标的细胞有利感染的方法。

本文所用术语”视网膜病变”意指视网膜内或周围血管异常发展，此等血管可或不可进入玻璃体。受伤、疾病、缺血性事件、雷射或其它医治引起的处理可诱发视网膜病变。

在其它具体实施例中，该组织为肿瘤(例如良性或癌性生长)，此例中的发明方法将抑制肿瘤内和至肿瘤的血管生长，在一些例子中，将诱发肿瘤细胞发生变异，而慢慢区分开。肿瘤内血管生长的抑制将阻断就该肿瘤尺寸所供应给该肿瘤的足够养分和氧气。因此，本发明方法可阻止因遗传性易染病体质(例如，BRCA-1 突变载体、具有 p53 突变的 Li Fraumeni 病患等)或外在致癌源(例如烟草、酒精、工业溶剂等)其已存在于癌性细胞的成核现象(nucleation)。除了阻止癌症生成(tumorigenesis)，本发明方法可延迟存在肿瘤的生长，因此赋予他们较易抑制与兴奋的性质而可造成他们复原。此应用高度有益于治疗难以进行手术的肿瘤(例如脑瘤或前列腺瘤)。另外，本方法有助于治疗孩童时期的肿瘤，包括但不限于，神经母细胞瘤(neuroblastoma)。再者，减少存在于肿瘤内的血管数能减轻肿瘤转移的可能性。在治疗肿瘤中，本方法可单独使用，或组合其它治疗法，以控制肿瘤的生长。更确切地说，使用本发明方法可加强一些肿瘤对其它治疗的反应。举例而言，本发明方法选择性地做为(例如约一星期前的)预处理，且持续期间，可做为化学治疗或放射线支配的预处理。本发明方法亦可配合生物反应调节者的用途而予以使用，例如干扰素，或其它抗血管生成药剂，亦可用于配合诱发抗血管生成药剂于活体内产生的药剂的用途。进一步，本发明方法可用于配合能促进细胞分化的药剂，尤其是，不限于促进脑肿瘤细胞分化的药剂。

本发明方法用于其它组织，能有效地使疾病宿主的新生血管预防

得到处理。因此，举例而言，本发明方法可用于治疗血管疾病(例如，血管瘤和动脉粥样斑块的微血管增生)、肌肉(例如心肌血管生成或平滑肌血管生成)、关节(例如关节炎、血友病的关节等)，以及其它与血管生成(例如 Osler-Webber 综合症、斑块血管生成、毛细血管扩张症(telangiectasia)、伤口颗粒化(telangiectasia)等)相关的疾病。另外，本方法用于治疗鼻息肉(nasal polyps)特别是在囊肿性纤维化(cystic fibrosis)病患、其骨髓来自异常生长的骨髓细胞的血癌，及前列腺癌。本方法可建构于有利于治疗良性肿瘤的通则。

本发明方法亦有利于做为预防与血管通透性或血管生成相关的疾病或疾患发生的手段，例如有利于做为预防在该疾病风险下的病患的预防手段。举例而言，并未限制，PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽可用于预防具有糖尿病病患其糖尿病视网膜的发生；预防在某些已知癌症风险下的病患其癌症的发生；等。因此，本发明方法不应建构为限制在治疗公开疾病，而应建构为用于预防在风险下病患的疾病。

本发明亦应建构为包括癌化前病症的治疗，举例而言，但不限于，鼻息肉，尤其是具有囊肿性纤维化的病患。此等病患的鼻息肉为血管生成，另外，囊肿性纤维化病患的脊髓液含有过多的血管生成因子 VEGF。此等症状的缓解，特别是囊肿性纤维化病患，其中该缓解包含投予包涵于本发明的 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽。

本发明方法的内容中，PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽可单独供应，或配合其它已知的血管生成因子。举例而言，PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽可配合使用阻断整合素(integrin)接合的抗体和胜肽、抑制金属蛋白酶(metalloproteinases)(例如 marmistat)的蛋白质和小分子、阻断内皮

细胞内一连串磷酸化的药剂(例如 herbamycin)、用于已知血管生成诱发者的显性负型受体、抗血管生成诱发者的抗体,或其它阻断他们活性的化合物(例如苏拉明(suramin)),或其它利用其它方法发生作用的化合物(例如维甲酸(retinoid)、IL-4、干扰素等)。更确切地说,当此等因子藉由不同机制来调节血管生成,是使用 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽,并在所欲组织内配合其它可加强更强而有力(和潜在的增效剂)抑制血管生成的抗血管生成药剂。使用 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽与一或多种其它抗血管生成因子。较佳地,可使用至少两种抗血管生成因子,并配合 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽。

如本文所讨论, PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽为蛋白质感染因子。因此,在一方法中,本方法涉及藉由供应 PEDF 多肽或 PEDF 44 AA 胜肽至细胞以提供 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽(例如,在合适的组成物)。可使用任何用于本发明的适当方法以获得 PEDF 多肽或 PEDF 44 AA 胜肽。许多适当的 PEDF 多肽可从自然地产生 PEDF 的组织或具有各种 PEDF-所产生细胞(例如,视网膜母细胞瘤三细胞株 WER127)的条件的介质中纯化得来。举例而言,已知利用各种肌肉、脾脏的巨核细胞(megakaryocyte)、纤维母细胞、肾小管、小脑的 Purkinje 细胞、毛囊的纤毛状油脂(pilosebaceous)线体和视网膜细胞来制造 PEDF。自然产生 PEDF 特别佳的来源为眼睛的水晶体和水状液。从此类蛋白质萃取物中纯化 PEDF 的一方法为利用 30kDa 超过滤膜进行浓缩/透析,再以约 65%至约 95%的硫酸铵进行蛋白沉淀,接着在 0.5M 甲基- α -D 喃甘露糖苷(mannopyranoside)藉由扁豆凝集素(lentil lectin)琼脂糖管柱,再来由 PHARMACIA HiTrap 肝素管柱在 0.5M NaCl 进行梯度/等分洗提。在此技术领域已知其它用来纯化 PEDF 多肽的方法(请参见,例如,已公开的国际专利申请案 W0 95/33480 和 W0 93/24529)。由序列识别号:

1 所表示的原始 PEDF 多肽透过 SDS-PAGE 为约 45 至 50kDa 的蛋白质予以确认。其它 PEDF 多肽或 PEDF 44 AA 胜肽可利用标准直接胜肽合成技术予以合成(例如, Bodanszky, 1984, Principles of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, Heidelberg)所做的概述, 譬如透过固相合成技术(请见, 例如, Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154; Barany 等人, 1987, Int. J. Peptide Protein Res. 30: 705- 739; 及美国专利第 5, 424, 398 号)。当然, 已知的 PEDF 多肽基因(请参见, 例如已公开的国际专利申请案 WO 95/33480 和 WO 93/24529); 亦请参见基因库获准号(GenBank accession)U29953), 或可追溯自本文所讨论的多肽序列, PEDF 多肽或 PEDF 44 AA 胜肽可藉由标准重组 DNA 方法予以制造。

在其它方法中, 可提供 PEDF 多肽或 PEDF 44 AA 胜肽给有兴趣的组织, 是可藉由将包括编码 PEDF 核酸的表现载体转移至与有兴趣的组织相关的细胞。该细胞制造并分泌 PEDF 多肽, 而使得适当地提供该组织中内皮细胞能抑制他们的收缩或移动(用于血管生成), 以及开窗、液泡或经接告运输(用于血管通透性), 因此予以减轻有兴趣的组织或全身性的血管通透性和血管生成。编码 PEDF 多肽的核酸序列是为已知(请参见, 例如已公开的国际专利申请案 WO 95/33480 和 WO 93/24529; 亦请参见基因库获准号 U29953), 其它可追溯至本文所讨论的多肽序列。因此, PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽表现载体典型地包括和 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽序列为同构型的单离的核酸序列, 例如, 他们将与至少一已知片段杂交, 是在至少轻度的严苛条件下, 更佳为在中度的严苛条件下, 最佳为在高度的严苛条件下(轻度、中度和高度的严苛条件的使用定义, 如 Sambrook 等人, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory

Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Press 所述)。

除了编码 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽的核酸外, 本发明内容中尚有包括激活子(promoter)的表现载体, 该激活子必需能驱使细胞内 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽 cDNA 的表现。许多病毒的激活子专用于此等表现区域(例如反转录病毒 ITRs、LTRs、即兴早期病毒激活子(IEp)(例如疹病毒 IEp(例如 ICP4-IEp 和 ICP0-Iep)及巨细胞病毒(CMV) IEp), 以及其它病毒激活子(例如, 晚期病毒激活子、潜伏-活性激活子 (LAPs)、劳斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus, RSV)激活子, 及鼠白血病病毒(Murine Leukemia Virus, MLV)激活子))。其它合适的激活子为含有增强子(enhancer)序列的真核激活子(例如兔子 β -球蛋白调节成分)、基本的活性激活子(例如 P-肌动蛋白激活子等)、讯号与/或组织特异性激活有反应的激活子、子(例如可诱发与/或可抑制激活子, 譬如对 TNF 或 RU486 有反应的激活子、金属硫氨酸(metallothionine)激活子等), 以及肿瘤-特异性激活子。

在表现载体中, PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽 cDNA 与激活子可实行地连接, 使得该激活子能驱使 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽基因的表现。再者, 表现载体可选择性地包括其它成分, 例如拼接位(splice site)、聚腺苷化(polyadenylation)序列、转录调节成分(例如增强子、静默子(silencers)等), 或其它序列。

表现载体必需以一方式导入该细胞, 此方式使得他们能表现本文所述的编码 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽的单离核酸。可使用任何合适的载体, 许多载体皆为此技术领域已知。此类载体的实例包括单纯(naked)DNA 载体(例如寡核苷酸或质体)、病毒载体譬如与腺苷相关的

病毒载体(Berns 等人, 1995, Ann. N. Y. Acad. Sci. 772: 95-104)、腺病毒载体(Bain et al. , 1994, Gene Therapy 1 :S68)、 疹病毒载体(Fink et al. , 1996, Ann. Rev. Neurosci. 19 : 265-287)、经包装的增大子(amplicons)(Federoff et 等人, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1636-1640)、乳突瘤(papilloma)病毒载体、小核糖核酸病毒(picornavirus)载体、多瘤(polyoma)病毒载体、反转录病毒载体、SV40 病毒载体、牛痘病毒载体和其它载体。除了有兴趣的表现载体外, 该载体亦图包括其它其因成分, 例如编码可选择标记的基因(例如 β -gal 或赋予对毒素有抗性的标记)、医药上活性蛋白、转录因子, 或其它生物活性物质。

任何载体选择必需具有在真核细胞产生大量的能力。另外, 该载体必需建构在使其能转移至带有 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽序列的有兴趣的细胞, 而使不包含 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽序列的载体做为控制载体, 包含 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽序列的载体为实验或治疗载体。此技术领域已知用于制造该载体核酸的方法(请参见 Sambrook 等人, supra)以及包括直接克隆、利用重组酶的特定位置重组(site specific recombination)、同源重组(homologous recombination)与其它建构重组载体的合适方法。在此方法中, 可建构表现载体使其成为在任何想要的细胞中复制、在任何想要的细胞表现, 以及甚至可结合至任何想要的细胞基因中。

PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽表现载体导入细胞, 是利用任何适合转移 DNA 至的方法。许多此等方法为此技术领域已知者(Sambrook 等人, supra; 亦请参见 Watson 等人, 1992, Recombinant DNA, Chapter 12, 第二版, Scientific American Books)。因此, 藉由下述方法将质体

转移，譬如磷酸钙沉淀、电穿孔法(electroporation)、脂质体(liposome)媒介的转感染、基因枪、微注射、病毒包膜(capsid)媒介的转移、凝聚胺(polybrene)媒介的转移、原生质体(protoplast)融合等。病毒载体最常藉由直接感染细胞来转移至细胞。然而，该感染模式可视该病毒和该载体正确特性而定。

在可诱发激活子的控制下将 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽 cDNA 转移至细胞，倘若需要可用于本发明方法中做为短暂转换体(transformant)。此等细胞本身可转移至用于其有治疗益处的哺乳动物。典型地，将该细胞转移至哺乳动物体内的位置，使得其所表现并分泌的 PEDF 接触所欲的内皮细胞，为了抑制血管通透性和血管生成。另外，尤其是该载体在体外被加至细胞的例子中，该细胞首先可进行几个周期的克隆性选择(通常藉由使用该载体中的可选择标记予以协助)以选择合适的转换体。此等合适的转换体被转移至用于其有治疗益处的哺乳动物。

亦可提供 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽给予内皮细胞，是藉由转移至其它细胞族群包含编码 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽的单离核酸的载体，其中该 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽在该细胞表现并从其它细胞分泌。其它如此转感染的细胞族群被转移至哺乳动物体内的位置，其中将如此分泌的 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽以接触该内皮细胞，并抑制血管通透性或血管生成。由其它细胞表现和分泌的 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽对该内皮细胞具有益处。不需要将 DNA 编码的 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽稳定地结合至该细胞。PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽可从细胞中非经结合或经结合的 DNA 表现和分泌。

该细胞中，使 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽模型表现，而让该细胞表现和分泌该 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽。该基因成功地表现可利用标准分子生物技术予以评估(例如，北方杂交法、西方墨点法、免疫沉淀法、酵素免疫分析法等)。

根据该有兴趣的组织的位置，可以任何适于将 PEDF 提供至有兴趣组织中的内皮细胞的方式来供应 PEDF。因此，举例而言，包含 PEDF 来源(即如本文所述的 PEDF 多肽或 PEDF 表现载体或 PEDF 的细胞)的组成物可被导至全身循环中，此将分配 PEDF 来源至有兴趣的组织。另外，含有 PEDF 来源的组成物可局部地供应至有兴趣的组织(例如注射、或以连续灌输来唧入、或在肿瘤或经皮或皮下位置以一次投予、滴入眼睛的表面等)。

当 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽的来源为 PEDF 肽时(例如在合适的组成物内)，是以一浓度提供并足以抑制该组织中血管通透性或血管生成的时间。

为了协助本发明方法，本发明提供医药上组成物，其包 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽的来源和合适的稀释剂。除了 PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽的来源外，该组成物包括含有一或多个医药上可接受载体的稀释剂。根据本发明所用的医药上组成物可利用一或多个含有赋形剂医药上或生理上可接受载体以习知方式予以调制，以及视需要帮助活性成分至医药上可用的制品的辅助剂。适当的调制端视所选投药的途径。因此，为了全身性注射，PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽的来源可以水性溶液调制，较佳可使用生理上可兼容的缓冲液，倘若需要，包含稳定剂譬如聚乙二醇。关于经肌肉投药，该调配品使用穿刺物适当地被穿刺至该阻

障。此等穿刺物通常为此技术领域所习知者。关于经口投药，PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽的来源可与适于包含至锭剂、丸剂、糖衣药丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、脂质体、悬浮液等的载体予以合并。关于藉由吸入投药，PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽的来源可便利地从经压缩的包装或喷雾器，同时适当地使用推进器，以气态溶胶喷雾存在的形式递送出。PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽的来源可调制成为利用注射的非经肠投药，例如藉由一次注射或连续灌输。此等组成物可以此等形式，例如悬浮液、溶液或包在油状或水状赋形剂的乳化剂，以及可包含调裂用药剂，譬如悬浮用、稳定用与/或分散用药剂。关于施用于皮肤，PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽的来源可调制成为合适凝胶、乳浆剂(magma)、乳霜、软膏或其它载体。关于施用于眼睛，PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽的来源可以水状液予以调制，较佳为以生理可兼容的缓冲液，除了施用于皮肤所述的方法。PEDF 或 PEDF 44 AA 胜肽的来源亦可调制成为其它譬如此技术领域中所习知的医药组成物。本文另外提供医药组成物和调制品的详述。

除了上述补，本发明亦应推断为包括调节细胞中内源性 PEDF 的表现的方法。举例而言，可能藉由诱发细胞中短暂高氧现象来正调控 PEDF 的产生。此等处理具有使血管生成诱发子受负调控的新增好处。本发明应推断为包括将本方法应用于本文所述各形式的处理。

定义

本文所用术语“毗邻”意指两者直接相连接的核苷酸序列，且无插入的核苷酸。藉由实施例的方式，当两者相连为：5'-AAAACTTT-3' 或 5'-TTTAAAA-3'，但并非两者相连为：5'-AAAACTTT-3'，即为五核苷酸 5'-AAAA-3' 与三核苷酸 5'-TTT-3' 毗邻。

如本文所使用，” 症状缓解” 意指降低该症状的程度。

如本文所使用，藉由其全名、藉由其相对应的三个字母符号、或藉由其相对应的一个字母符号所表达的氨基酸，如下表所述：全名/三个字母符号/一个字母的氨基酸符号：天门冬氨酸 Asp D 谷氨酸 Glu E 离氨酸 Lys K 精氨酸 Arg R 组氨酸 His H 酪氨酸 Tyr Y 半胱氨酸 Cys C 天门冬酰氨 Asn N 谷酰氨 Gln Q 丝氨酸 Ser S 羟丁氨酸 Thr T 甘氨酸 Gly G 丙氨酸 Ala A 缬氨酸 Val V 亮氨酸 Leu L 异亮氨酸 Ile I 甲硫氨酸 Met M 脯氨酸 Pro P 苯丙氨酸 Phe F 色氨酸 Trp W

由基因密码链的核酸残基与基因非密码链的核酸所组成的基因“密码区”，其与藉由基因转译所制造的 mRNA 分子的密码区分别为同源或相对应。

由基因密码链的核酸残基与基因非密码链的核酸所组成的基因的“mRNA-密码区”，其与藉由基因转译所制造的 mRNA 分子分别为同源或相对应。将明了因为 mRNA 修饰是发生在真核细胞的某些例子中，基因的 mRNA-密码区可包括在所发生基因体中单一区域或分散在基因中的复数个区域。当基因的 mRNA-密码区包括在基因体中的分离区域时，“mRNA-密码区”是各别地或组合地意指此等区域的各者。

本文所用的“互补”意指两核酸间次单位序列互补的广大概念，例如与 DNA 分子。当两分子的核酸位置藉由有互相配对碱基的正常能力的核苷酸来填满，而该核酸被视为在此位置上彼此互补。因此，当各分子中相对应位置的连续数量核酸藉由有互相配对碱基的正常能力的核苷酸(例如 A: T 和 G: C 核苷酸对)来填满时，此两核酸互为互补。

“症状”意指动物的健康状态，其中该动物为法维持体内恒定性，且其中倘若该疾病无法改善，则此动物的健康持续恶化。疾病获得”缓解”，意指具有此等症状的病患其症状的严重性获得降低。

“编码”意指在聚核苷酸中的核苷酸特定序列的遗传性质，例如基因、cDNA、或 mRNA，以做为在生物方法中合成其它聚合物和巨分子的模板，该生物方法具有经定义的核苷酸序列(即 rRNA、tRNA 和 mRNA)或经定义的氨基酸序列，以及导致此的生物活性。因此，倘若在细胞中或其它生物系统中相对应于产生该蛋白质的基因质 mRNA 的转录和转译作用，基因将编码蛋白质。该两密码链，其核苷酸序列经辨识为 mRNA 序列，且通常以序列名单提供，而做为基因或 cDNA 转录模板的非密码链，可意指编码此基因或 Cdna 的蛋白质或其它产物。

除非另行指明，否则”核苷酸序列所编码的氨基酸序列”包括能使彼此型式退化且编码相同氨基酸氢列的所有核苷酸序列。编码蛋白质和 RNA 的核苷酸序列可包括插入子(intron)。

本文所用的“同源性”，意指相同的次单元序列存在两聚合分子间，例如在两核酸分子间、例如在两 DNA 分子或两 RNA 分子间、或在两多胜分子间。当存在于两分子的次单元藉由相同单分子构造的次单元所填满，例如倘若在两 DNA 分子的各者的位置藉由腺嘌呤所填满，而使他们在此位置有同源性。两序列间的同源为直接具有相配对或同源性位置数目的功能，例如倘若在两化合物序列的一半位置(例如长度上有十个次单元的聚合物有五个位置)为同源性，则与两个序列为 50%同源性，倘若此位置的 90%，例如 10 个有 9 个，为相配对或同源性，这两个序列分配为 90%同源性。以此实施例的方式而言，该 DNA 序列 3' ATTGCC5 和 3' TATGGC 分配为 50%同源性。

如本文所使用，使用”同源”与”相同”的意义相当。

两核苷酸或氨基酸序列间的相同性百分比的测量可利用数学算法来完成。举例而言，有益于比较两序列的数学算法为 Karlin 和 Altschul (1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268)的算法，是以 Karlin 和 Altschul (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877)

修饰的。此算法被合并至 Altschul 等人(1990, J. Mol. Biol. 215:403-410)的 NBLAST 和 XBLAST 程序,且可被使用,例如在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 的网站上有通用的资源雷达(locator)<http://www.nlm.nih.gov/BLAST>。BLAST 核苷酸研究者可以 NBLAST 程序(在 NCBI 的网站上标示为“blastn”),利用下列参数来进行: gap penalty=5 ; gap extension penalty=2 ; mismatch penalty=3 ; match reward=1 ; expectation value 10.0 ; and word size=11 以获得对本文所述的核酸有同源性的核苷酸序列。BLAST 蛋白质研究者可以 XBLAST 程序(在 NCBI 的网站上标示为“blastn”)或 NCBI 的“blastp”程序,利用下列参数来进行: expectation value 10.0, BLOSUM62 scoring matrix 以获得对本文所述的蛋白质分子有同源性的氨基酸序列。为了获得用于相较目的的差异校正(gapped alignments),可利用在 Altschul 等人(1997, Nucleic Acids Res. 25 : 3389-3402)所述的 Gapped BLAST。此外, PSI-Blast 或 PHI-Blast 可做为进行侦测分子间(Id.)远关联的反复研究,以及分享共同模型的分子间的关联。当利用 BLAST、Gapped BLAST、PSI-Blast 和 PHI-Blast 程序,可使用各别程序的不存在的参数(例如, XBLAST 和 NBLAST) 。请参见 <http://www.ncbi.nlm>。

两分子间的相同性百分比可利用上述所述的类似技术来量测,具有或不具允许的差异。在相同性百分比的计算中,典型地计算出正确的配对。

“单离的核酸”意指在天然发生情况下被来自其两侧的序列所分开的核苷酸区段或片段,例如从正常毗邻于该 DNA 片段的氢列所移除的 DNA 片段、例如毗邻于其天然存在基因体中片段的序列。该术语

亦可用于从其它伴随核酸的成分中具体纯化出的核酸,例如 RNA 或 DNA 或蛋白质,其天然地伴随于细胞中。该术语其包括,例如,合并于载体的重组 DNA、合并于自动复制质体或病毒的重组 DNA、或合并于原核细胞或真核细胞的基因体 DNA 的重组 DNA,或存在于从其它氢列独立出的分离分子(例如 cDNA 或由 PCR 或限制酶分解所制造的基因或 cDNA 片段)。亦可包括能编码额外多肽序列杂交基因的一部分的重组 DNA。

将两聚核苷酸描述为”可实行地连接”单链或双链核酸的部分基团包括两个分列于该核酸部分基团的聚核苷酸,其使得这两个聚核苷酸的至少一者藉由能与其它区分开的特性所使用的生理效果。藉由此实施例的方式,激活子可实行地连接至该基因的密码区,而能促进该密码区的转录。

“聚核苷酸”意指核酸的单链或平行或反平行(anti-parallel)链。因此,聚核苷酸可为单链或双链的核酸。

术语”核酸”典型地意指大的聚核苷酸。

术语”寡核苷酸”典型地意指短的聚核苷酸,通常不超过约 50 个核苷酸。将明了点以 DNA 序列(即 A、T、G、C)来表示核苷酸序列时,此亦包括 RNA 序列(即 A、U、G、C),其中”U”取代”T”。

本文所用的习知符号是描述聚核苷酸序列:单链聚核苷酸序列的左手端为 5 端;双链聚核苷酸序列的左手方向意指 5 端方向。

以 5 端至 3 端的方向增加核苷酸至初期的 RNA 转录体(transcript)

意指转录方向。该具有如 mRNA 相同序列的 DNA 链意指当做”密码链”；位于 5 端的 DNA 链上的序列至 DNA 上的参考点意指”上游序列”；位于 3 端的 DNA 链上的序列至 DNA 上的参考点意指”下游序列”。

如本文所述，术语”激活子/调节序列”意指用于表现可实行地连接至该激活子/调节序列的基因产物所需的核酸序列。在某些例子中，此序列可为中心激活子序列，以及在其它例子中，此序列亦可包括增强子序列和其它基因产物表现所需的调节序列成分。激活子/调节序列，例如可为以特定组织的方式表基因产物者。

“基本的”激活子为在细胞中以一定的方式，能驱动可实行地连接的基因表现的激活子。藉由实施例的方式，激活子能驱动细胞管家基因(housekeeping gene)的表现被视为基本的激活子。

“可诱发的”激活子意指当与聚核苷酸可实行地连接时，使基因产物编码或具体化的核苷酸序列，仅当相对应于该激活子的诱发子存在于细胞时，将造成基因产物在活体细胞被具体地制造。

“特定组织的”激活子意指当与聚核苷酸可实行地连接时，使基因产物编码或具体化的核苷酸序列，仅当细胞为相对应于该激活子的组织类型的细胞时，将造成基因产物在活体细胞被具体地制造。

倘若两寡核苷酸接合(anneal)的条件下，其中仅至少的 75%的寡核苷酸，更佳为至少约 90%或至少约 95%的寡核苷酸，彼此互补相连，则第一寡核苷酸与第二寡核苷酸是”以高度严苛条件”接合。用于接合两寡核苷酸的严苛条件，如为已知，比起其它因素而言，尤其为温

度、接合介质的离子强度、培育期、寡核苷酸的长度、寡核苷酸的 G-C 含量及两寡核苷酸间所预期的非同源程度的函数。调整接合状态的严苛条件是为已知(请参见, 例如, Sambrook 等人, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。

“预防的”处理意指投药给予不显现疾病症状或仅表现该疾病早期症状的主体, 目的在于减少发展成与该疾病相盼的病理风险。

“治疗的”处理意指投药给予显现病理症状的主体, 目的在于减轻或削减此等症状。

化合物的“治疗有效量”意指投予该化合物使足以提供有益效果给予该主体的化合物量。”载体”为包括单离核酸的组成物物质, 且其可用于递送该单离核酸至细胞内部。此技术领域已知的多数载体, 包括但不限于, 线型聚核苷酸、与离子化合物或两性(amphiphilic)化合物、质体和疾毒相关的聚核苷酸。因此, 术语”载体”包括独立的复制质体或病毒。此术语亦应推断为包括与质体和非病毒的化合物, 其有助于将核酸转移至细胞, 例如, 聚离氨基化合物、脂质体等。病毒载体包括但不限于, 腺病毒载体、腺-相关的病毒载体、反转录病毒载体等。

“表现载体”意指包含重组聚核苷酸的载体, 该重组聚核苷酸包含有效地连接至核苷酸序列而被表现出的表现控制序列。表现载体包括用于表现的足够的顺式作用(cis-acting)元素; 其它用于表现的元素可藉由宿主细胞或在活体外的表现系统所供应。表现载体包括此技术领域所习知者, 例如粘粒载体(cosmid)、质体(例如裸露或包含于脂

质体中)，以及合任该重组聚核苷酸的病毒。

胜肽的修饰与合成：

下述部分意指胜肽的修饰及其合成。当然将了解到用于本发明方法的胜肽可合并没有影响活性的氨基酸残基。举例而言，此界线可衍生成包括阻断基团，即适于保护与/或稳定 N 端和 C 端的来自”非所欲的降解”，”非所欲的降解”意指在可能影响该化合物功能的端点位置包涵该化合物的酵素性、化学性或生化性的任何类型崩解，即在该化合物的端点有连续的降解。

阻断基团包括在胜肽化学技术领域已习知使用的保护基团，且将不会有害地影响活体内的胜肽活性。举例而言，适当的 N 端阻断基团可藉由 N 端的烷化或酰化来导入。适当的 N 端阻断基团，包括 C. sub. 1-C. sub. 5 分枝或非分枝烷基、酰基譬如甲酰基和乙酰基，以及其经取代的型式，譬如乙酰氨基甲基 (Acm)。氨基酸的去氨基 (desamino) 衍生物亦有助于 N 端阻断基团，且可偶合至该胜肽的 N 端或用以取代该 N 端残基。适当的 C 端阻断基团，其中合并或不合并该 C 端的羧基，包括酯类、酮类或酰氨类。C 端阻断基团的实例为酯或酮所形成的烷基，尤其是低碳数烷基譬如甲基、乙基和丙基，以及酰胺所形成的氨基譬如一级胺 (-NH- sub. 2)，以及单-与二-烷基氨基譬如甲基氨基、乙基氨基、二甲基氨基、二乙基氨基、甲基乙基氨基等。经去羧基化 (descarboxylated) 的氨基酸类似物譬如精胺 (agmatine) 亦有助于 C 端阻断基团，且可偶合至该胜肽的 N 端或用以取代该 C 端残基。再者，将明了在端点的游离氨基和羧基可从该胜肽一起移除，以产生其去氨基和去羧基的型式而不影响胜肽活性。

亦可合并其它修饰而不影响该胜肽的生物活性，且此等包括但不

限于，一或多个在天然 L 异构物型式的氨基酸的取代，以及在 D 异构物型式的氨基酸的取代。因此，该胜肽可包括一或多个 D-氨基酸残基，或可包含所有在 D-型式的氨基酸。根据本发明亦可包括具有 D-型式 (retro-inverso) 的胜肽，举例而言，插入胜肽 (inverted peptides) 中所有氨基酸为经 D-氨基酸所取代。

本发明的酸性添加盐 (acid addition salt) 亦可预期为功能性相等物 (functional equivalents)。因此，本发明的胜肽是以无机酸 (例如氢氯酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等)，或有机酸 (例如醋酸、丙酸、羧乙酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、丙二酸、琥珀酸、顺丁烯二酸、反丁烯二酸、酒石酸、柠檬酸、桂皮酸、苯乙醇酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等) 来处理，以提供适用于本发明方法的该胜肽的水溶性盐类。

本发明亦提供藉由本文揭示的核酸所编码的蛋白质或胜肽类似物。类似物可异于藉由传统氨基酸序列差异、或藉由非有害影响序列的修饰、或两者所自然地造成的蛋白质或胜肽。

举例而言，可造成传统氨基酸变化，虽然此不改变该蛋白质或胜肽的初级序列，但却不正常地改变其功能。传统氨基酸取代典型地包括下述基团的取代：

甘氨酸、丙氨酸；

缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸；

天门冬氨酸、谷氨酸

天门冬酰氨、谷酰氨；

丝氨酸、羟丁氨酸；

离氨酸、精氨酸；

苯丙氨酸、酪氨酸。

如上所述，修饰 (其不正常地改变初期序列) 包括多肽的在活体

内、或在活体外的化学衍生作用，例如，乙酰化、或羧酸化。亦包括糖化的修饰，例如在合成和制造期间或进一步制造步骤中，由多肽的糖化模型所修饰制造者；例如藉由使该多肽暴露于能影响糖化的酵素；例如哺乳动物的糖化或去糖化酵素。亦接受具有经磷酸化的氨基酸残基的序列，例如磷基酪氨酸、磷基丝氨酸、或磷基羟丁氨酸。

亦包括使用原本分子生物技术所修饰的多肽，以使得增强其对蛋白水解降解的抗性，或有效利用溶解性的抗性，或使其更适于做为治疗药剂。此等多肽类似物包括含有与天然发生于 L-氨基酸的残基者，例如，D-氨基酸或非天然发生的合成氨基酸。本发明的胜肽并不限于本文所述的任何特定的列示性方法的产物。

本发明的胜肽可藉由 Stewart 等人，in Solid Phase Peptide Synthesis, 第二版, 1984, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill 以及 Bodanszky 和 Bodanszky in The Practice of Peptide Synthesis, 1984, Springer-Verlag, New York 所述的标准、已建立的固相胜肽合成 (SPPS) 予以轻易地制备。在开始，适当地经个护氨基酸残基透过其羧基连接至经衍生的、不溶的聚合撑体，例如经交联的聚苯乙烯或聚酰胺树脂。”适当经保护”意指存在于该氨基酸的 α -氨基与在任何官能性侧链上的保护基。侧链保护基通常对溶剂、试剂和透过合成的反应状态皆呈现稳定，且在不影响最终产物的状况下可移除。逐步地合成寡胜肽是藉由将来自起始氨基酸的 N 端保护基移除，并将所欲胜肽序列的下一个氨基酸的羧基端偶合。此氨基酸亦适当地经保护。可将所得氨基酸的羧基藉由形成一反应性基团(例如形成碳化二酰亚胺、合成的酸酐或”活性酯”基譬如羟基苯并三唑或五氟苯基酯)而予以活化，以与撑体相连氨基酸的 N 端发生反应。

固相胜肽合成方法的实例，包括利用第三丁氧基羰基做为 α -氨基酸保护基的 BOC 法，以及利用 9-苄基甲氧基羰基以保护该氨基酸残

基的 α -氨基酸的 Fmoc 法, 及藉由此技术领域中的熟习者将两种已知方法共同操作。亦可利用对固相胜肽合成方法已习知的操作来获得 N 端与/或 C 端阻断基团的合并。关于 C 端阻断基团, 举例而言, 所欲胜肽的合成典型地利用固相、已经化学修饰的支撑树脂来进行, 以使从该树脂的剪切造成具有所欲 C 端阻断基团的胜肽。为了提供具有能忍受一级胺阻断基团的 C 端的胜肽, 举例而言, 当完成胜肽合成时, 利用对甲基苯基羟基胺 (MBHA) 树脂来进行合成, 以氢氟酸处理产生所欲的 C 端经酰胺化的胜肽。同样地, 利用 N-甲基氨基乙基所衍生的 DVB 来获得在 C 端的 N-甲基胺阻断基团的合并, 其在 HF 处理下产生能忍受 N-甲基酰胺化的 C 端的胜肽。藉由酯化的 C 端阻断亦可利用习知方法来获得。树脂/阻断基团合并的必要使用允许从该树脂产生侧链胜肽, 以使所欲的酒精进行连续的反应, 以形成该酯类功能。Fmoc 保护基团, 配合与甲氧基烷氧基苯甲基醇或相等物连结剂所衍生的 DVB 树脂, 可用于此目的, 以来自由二氯甲烷中的 TFA 所影响的剪切。适当地经活化羧基官能基的酯化, 例如以 DCC, 可藉由添加所欲的醇类予以制造, 然后藉由去保护基及该经酯化胜肽产物的单离。

当该经合成胜肽仍连接至树脂, 可获得 N 端阻断基团的合并, 例如藉由以适当的酸酐和胺类来处理。为了合并 N 端的乙酰基阻断基团, 例如, 该经树脂耦合的胜肽可以 20% 乙酸酐的乙腈来处理。N 端阻断胜肽物可从该树脂剪切, 去保护基, 然后分离。

为了确保从化学性或生物性合成技术所获得的胜肽为所欲的胜肽, 该进行该胜肽组成物的分析。此类氨基酸组成物分析可利用高分辨率质谱仪来进行, 以测量该胜肽的分子量。选择性地, 或额外地, 该胜肽的氨基酸含量可藉由水解在酸性水溶液的胜肽、分离、鉴定, 以及利用 HPLC 或氨基酸分析仪来定量该混合物的成分来确定。蛋白质定序仪, 能连续地降解该胜肽, 并鉴定该氨基酸序列, 亦可用于定义

性地测定该胜肽的序列。

在本发明方法的应用前，纯化该胜肽以移除污染物。因此，将了解将纯化该胜肽以达到标准量测机关(regulatory agencies)所设定的标准。许多习知纯化方法的任一者可用于获得纯化所需的标准，举例而言，反相高效层析仪(HPLC)是利用经烷基化的硅管柱譬如 C. sub. 4-, C. sub. C. sub. 18-硅。增加有机含量的渐序移动相通常用于完成纯化，例如乙腈的水性缓冲液，通常含有小量三氟乙酸。离子交换层析法亦可根据胜肽的分子量来分离胜肽。

用于辨识具有 PEDF 生物活性的候选药剂的分析：

本文中使用的术语「药剂」或「化合物」述及任何分子，例如具有仿真或实行 PEDF 生物作用的能力的蛋白质或药剂。一般而言，可将多种分析混合物与不同药剂浓度一起进行，以获得对各种浓度的差别反应。典型地，将此等浓度中的一者作为阴性对照组，亦即，于零浓度或低于检测浓度。

候选药剂(化合物)涵盖许多化学族群，虽然典型地该候选药剂为有机分子，较佳为具有高于 50 且低于约 2,500 道尔顿(dalton)分子量的小有机化合物。候选药剂包含用来与蛋白质进行结构交互作用(特别是氢键结)所需的官能基，且典型地包括至少胺、羰基、羟基或羧基，较佳为该等官能化学基团的至少二者。该候选药剂通常包含经一个或多个上述官能基取代的环状碳或杂环结构及/或芳香族或聚芳香族结构。候选药剂亦于生物分子中发现，包括但非限于：胜肽、多醣类、脂肪酸、胆固醇、嘌呤、嘧啶、衍生物、结构类似物或其组合。

候选药剂是由各种广泛的来源获得，包括合成或天然化合物的数据库。举例而言，可利用许多方法来随机或指定合成各种广泛的有机化合物及生物分子，包括表现随机的寡核苷酸及寡胜肽。或者，可利

用或轻易地制造以细菌、真菌、植物及动物萃取物的形式的天然化合物数据库。此外，天然或合成制造的数据库及化合物乃经由习知的化学、物理及生化方法轻易地改质，且可用于制造组合性数据库。已知的医药药剂可接受指定或或随机化学改质，诸如酰化、烷化、酯化、酰胺化等来制造结构类似物。筛选可针对已知的医药活性化合物及其化学类似物。

筛选分析为利用 PEDF 受体的结合分析(参见申请于 2003 年 8 月 7 日的美国临时申请案第 60/493,713 号)，其内容以参考资料的方式合并于此，可将一种或多种分子加以标定，其中该标定可直接地或间接地提供可侦测的讯号。各种标定包括放射性同位素、萤光剂、化学冷光剂、酵素、专一性结合分子、粒子(如磁性粒子)等。专一性结合分子包括偶分子，例如生物素(biotin)及链霉亲和素(streptavidin)、地高辛(digoxin)及抗地高辛(antidigoxin)等。至于专一性结合成员，可依据已知的程序将互补的成员依惯例标定侦测用的分子。

各种其它试剂可包含于该筛选分析中。此等试剂包括用于促进最佳的蛋白质-蛋白质结合及/或降低非专一性或背景交互作用的试剂，如盐类、中性蛋白质(例如白蛋白、界面活性剂等)。可使用增进分析效果的试剂，如蛋白酶、抑制剂、核酸酶抑制剂、抗微生物剂等。各成分的混合物是以任何能提供必须结合的顺序来添加。于任合适当的温度下培养，典型地介于 4 至 40℃之间。培养时间取决于最佳的活性，但亦可为了促进快速高输出的筛选而最佳化。

医药组成物：

以下将叙述利用本文中所述的任何方法所辨识且可调配及投予至哺乳动物中用于治疗本文中所揭示的疾病的化合物。

本发明涵盖制备及利用包含适用于本发明的方法中作为活性成分的化合物的医药组成物。该等医药组成物可以适用于投予至个体的形

式由单独的活性成分组成，或该医药组成物可包含活性成分及一种或多种医药上可接受的载剂、一种或多种额外的成分、或此等物质的某种组合。活性成分可以生理上可接受的酯或盐的形式存在于医药组成物中，诸如此相关技艺中已知的与生理上可接受的阳离子或阴离子组合。

本文中使用的术语「医药上可接受的载剂」意指活性成分可与其组合，且组合之后可用于将该活性成分投予至个体的化学组成物。

本文中使用的术语「生理上可接受的」酯或盐意指由活性成分形成的酯或盐，其与该医药组成物的任何其它成分兼容，且对于该组成物欲投予的个体无害。

本文中所述的医药组成物的调配物可藉由任何医药技艺中已知的或之后发展出的方法予以制备。一般而言，该等制备方法包括以下步骤：将活性成分与载剂或一种或多种其它附加成分结合，然后若有需要或较适当地，将产物成形或包装成所欲的单一或多剂量单位。

虽然本文中所提供的医药组成物的说明主要是针对适用于依据处方投予至人类的医药组成物，但熟悉此技艺者将了解该等组成物可普遍地适用于投予至所有种类的动物。为了使适用于投予至人类的医药组成物能适用于投予至各种动物的改质为已知的，且一般熟练的兽医药理学者，若需要，可仅利用任何一般的实验加以设计并进行该等改质。本发明医药组成物预期投予的个体包括，但非限于：人类及其它灵长类；哺乳动物，包括商业上重要的哺乳动物，如牛、猪、马、羊、猫及狗；鸟类，包括商业上重要的鸟类，如鸡、鸭、鹅及火鸡。适用于本发明方法的医药组成物可以适用于口服的、直肠的、阴道的、非经肠的、局部的、肺部的、鼻内的、口腔的、眼部的、囊内的或其它投予途径的调配物来制备、包装或贩售。其它预期的调配物包括投射奈米粒子、脂质体制剂、含有活性成分的释放型红血球、及免疫型调配物。

本发明医药组成物可以单一单位剂量或多个单一单位剂量的散装来制备、包装或贩售。本文中使用的「单位剂量」为含有预定量活性成分的医药组成物的分离量。活性成分的量一般等于该活性成分欲投

予至个体的剂量或该等剂量合宜的部分(例如,该剂量的二分之一或三分之一)。

活性成分、医药上可接受的载剂、及任何额外的成分在本发明医药组成物中的相对量会依据特性、尺寸、所治疗个体的症状以及进一步依据该组成物欲投予的途径而有所不同。经由实施例,该组成物可包含 0.1 重量%及 100 重量%之间的活性成分。

除了活性成分之外,本发明组成物可进一步包含一种或多种额外添加的医药活性药剂。尤其考虑的添加剂包括止吐剂及清除剂,如氰化物及氰化物清除剂。

本发明医药组成物的控制型或持续释放型调配物可利用习知技术予以制造。

本发明医药组成物的调配物可以分离固体剂量单位的形式来制备、包装或贩售,该分离固体剂量单位包括,但非限于:各含有预定量活性成分的锭剂、硬或软胶囊、扁囊剂、片剂或口含锭。其它适用于口服投予的调配物包括,但非限于:粉状或粒状调配物、水性或油性悬浮液、水性或油性溶液、或乳剂。

本文中使用的「油性」液体为包含含碳液体分子且显现低于水的极性特性的液体。

含有活性成分的锭剂可藉由例如将该活性成分视需要与一种或多种添加剂进行压缩或模制来制造。压缩锭剂可藉由以适当的装置,视需要与粘结剂、润滑剂、赋形剂、界面活性剂及分散剂中的一种或多种压缩自由流动形式的活性成分(例如粉状或粒状制剂)予以制备。模制锭剂可藉由以适当的装置模制以下成分的混合物而制造:活性成分、医药上可接受的载剂、及至少足够润湿该混合物的液体。用于制造锭剂的医药上可接受的赋形剂包括,但非限于:钝性稀释剂、粒化及崩解剂、粘结剂、及润滑剂。已知的分散剂包括,但非限于:马铃薯淀

粉及淀粉乙醇钠。已知的界面活性剂包括，但非限于：硫酸月桂酯钠。已知的稀释剂包括，但非限于：碳酸钙、碳酸钠、乳糖、微晶纤维素、磷酸钙、磷酸氢钙、及磷酸钠。已知的粒化及崩解剂包括，但非限于：玉米淀粉及藻酸。已知的粘结剂包括，但非限于：明胶、阿拉伯胶(acacia)、预糊化玉米淀粉、聚乙烯吡咯啉酮、及羟丙基甲基纤维素。已知的润滑剂包括，但非限于：硬脂酸镁、硬脂酸、氧化硅及滑石。

锭剂可为未经包覆的，或者其可利用已知的方法包覆，以达到在个体的肠胃道中延迟崩解，藉此提供活性成分的持续释放及吸收。经由实施例，可采用诸如单硬脂酸甘油或二硬脂酸甘油的材料包覆锭剂。进一步经由实施例，锭剂可藉由采用美国专利第 4, 256, 108、4, 106, 452 及 4, 265, 874 号所述的方法进行包覆，以形成渗透控制释放型锭剂。锭剂可进一步包含甜味剂、调味剂、着色剂、防腐剂、或此等添加剂的某种组合，俾以提供医药上精致且美味的制剂。

包含活性成分的硬胶囊可利用生理上可降解的组成物(例如明胶)来制造。该等硬胶囊包含活性成分，且可进一步包含额外的成分，该额外的成分包括例如：钝性稀释剂，如碳酸钙、磷酸钙、或高岭土。

包含活性成分的软胶囊可利用生理上可降解的组成物(例如明胶)来制造。该等软胶囊包含活性成分，其可与水或油性基质(如花生油、液态石蜡或橄榄油)进行混合。

适用于口服投予的本发明医药组成物的液体调配物可以液体形式或以使用前利用水或其它适当媒剂而重新构成的干燥产物的形式予以制备、包装或贩售。

液体悬浮液可利用习知方法制备，以达成将活性成分悬浮于水性或油性媒剂。水性媒剂包括，例如：水及等张性盐水。油性媒剂包括，例如：杏仁油、油性酯类、乙醇、植物油(如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)、分馏植物油、及矿物油(如液态石蜡)。液体悬浮液可进一

步包含一种或多种添加剂,包括,但非限于:悬浮剂、分散或湿润剂、乳化剂、缓和剂、防腐剂、缓冲剂、盐类、调味剂、着色剂、及甜味剂。油性悬浮液可进一步包含硬化剂。已知的悬浮剂包括,但非限于:山梨糖醇浆、氢化食用脂肪、藻酸钠、聚乙烯吡咯啉酮、黄蓍胶(gum tragacanth)、阿拉伯胶、及纤维素衍生物(如羧甲基纤维素、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素)。已知的分散或湿润剂包括,但非限于:天然发生的磷脂类(例如卵磷脂);环氧烷与脂肪酸、与长链脂肪族醇、与衍生自脂肪酸及己糖醇的部分酯、或与衍生自脂肪酸及己糖醇酸酐的部分酯的缩合产物(例如分别为聚氧伸乙基硬脂酸酯、十七伸乙基氧基鲸蜡醇、聚氧伸乙基山梨糖醇单油酸酯、及聚氧伸乙基山梨糖醇酐单油酸酯)。已知的乳化剂包括,但非限于:卵磷脂及阿拉伯胶。已知的防腐剂包括,但非限于:对-羟苯甲酸甲酯、对-羟苯甲酸乙酯、或对-羟苯甲酸正丙酯、抗坏血酸、及山梨酸。已知的甜味剂包括,例如:甘油、丙二醇、山梨糖醇、蔗糖、及糖精。用于油性悬浮液的已知的硬化剂包括,例如:蜂蜡、固体石蜡、及鲸蜡醇。

在水性或油性溶剂中的活性成分的液体溶液可依照实质上类似于液体悬浮液的方式来制备,主要的差别在于该活性成分是溶解的,而非悬浮于溶剂中。本发明医药组成物的液体溶液可包含液体悬浮液中所述的各成分,但应了解在溶剂中不需要悬浮剂辅助该活性成分的溶解。水性溶剂包括,例如:水及等张性盐水。油性溶剂包括,例如:杏仁油、油性酯、乙醇、植物油(如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)、分馏植物油、及矿物油(如液态石蜡)。

本发明医药组成物的粉状及粒状调配物可利用已知的方法来制备。该等调配物可直接投予至个体,可用于例如制成锭剂、填充胶囊、或藉由添加水性或油性媒剂于其中而制备水性或油性悬浮液或溶液。此等调配物的各者可进一步包含一种或多种分散或湿润剂、悬浮剂、

及防腐剂。于此等调配物中亦可包括额外的赋形剂(如填充剂)及甜味剂、调味剂、或着色剂。

本发明医药组成物亦可以水包油乳剂或油包水乳剂的形式来制备、包装或贩售。油相可为植物油(如橄榄油或花生油)、矿物油(如液态石蜡)、或此等油类的组合。该等组成物可进一步包含一种或多种乳化剂,例如天然发生的树胶(如阿拉伯胶或黄蓍胶);天然发生的磷脂类,例如大豆磷脂或卵磷脂;衍生自脂肪酸与己糖醇酸酐的组合的酯类或部分酯类,例如山梨糖醇酐单油酸酯;以及该等部分酯类与环氧乙烷的缩合产物,例如聚氧伸乙基山梨糖醇酐单油酸酯。此等乳剂亦可包含额外的成分,包括,例如:甜味剂或调味剂。

本发明医药组成物可以适用于直肠投予的调配物来制备、包装或贩售。该等组成物可为例如栓剂、保留灌肠(retention enema)制剂、及用于直肠或结肠灌洗的溶液。

栓剂调配物可藉由结合活性成分与非灌洗用的医药上可接受的赋形剂而制造,该赋形剂在一般室温(亦即,约 20℃)下为固体,而在个体的直肠温度(亦即,在健康人体中约为 37℃)下为液体。适当的医药上可接受的赋形剂包括,但非限于:可可脂、聚乙二醇、及各种甘油酯。栓剂调配物可进一步包含各种额外的成分,包括,但非限于:抗氧化剂及防腐剂。

保留灌肠制剂或用于直肠或结肠灌洗的溶液可藉由结合活性成分与医药上可接受的液体载剂来制备。如同此相关技艺中所知,灌肠制剂可利用适应于个体直肠解剖结构的递送装置而进行投予,且该灌肠制剂可包装于其中。灌肠制剂可进一步包含各种额外的成分,包括,但非限于:抗氧化剂及防腐剂。

本发明医药组成物可以适用于阴道投予的调配物来制备、包装或贩售。该等组成物可为例如栓剂、充满或包覆式阴道可插入性材料(如

塞垫)、冲洗制剂、或用于阴道灌洗的凝胶或乳霜或溶液。

以化学组成物充满或包覆材料的方法在相关技艺中为已知的,包括,但非限于:沉积或结合化学组成物于表面上的方法、在材料的合成期间将化学组成物结合至该材料结构中的方法(亦即,例如与医药上可降解的材料)、以及将水性或油性溶液或悬浮液吸收至吸收性材料并进行或不进行后续干燥的方法。

冲洗制剂或用于阴道灌洗的溶液可藉由结合活性成分与医药上可接受的液体载剂来制造。如同此相关技艺中所知,冲洗制剂可利用适应于个体阴道解剖结构的递送装置而进行投予,且该冲洗制剂可包装于其中。冲洗制剂可进一步包含各种额外的成分,包括,但非限于:抗氧化剂、抗生素、抗真菌剂、及防腐剂。

本文中使用的医药组成物的「非经肠式投予」包括任何投予途径,其特征在于个体组织的物理性侵入及透过侵入该组织而进行医药组成物的投予。因此,非经肠式投予包括,但非限于:藉由注射医药组成物而进行该组成物的投予、藉由通过外科手术切口施用该组成物而进行的投予、藉由通过组织穿透性非外科手术伤口施用该组成物而进行的投予等。详言之,非经肠式投予预期包括,但非限于:皮下注射、腹膜内注射、肌肉注射、胸骨内注射、及肾渗透性注入技术。

适用于非经肠式投予的医药组成物的调配物包含与医药上可接受的载剂结合的活性成分,该医药上可接受的载剂诸如无菌水或无菌等张性盐水。该等调配物可以适用于高剂量投予或连续投予的形式来制备、包装或贩售。可注射调配物可以单位剂量形式,例如,于安瓿中或含有防腐剂的多剂量容器中来制备、包装或贩售。用于非经肠式投予的调配物包括,但非限于:悬浮液、溶液、于油性或水性媒剂中的乳剂、糊剂、及植入式持续释放型或生物可降解型调配物。该等调配物可进一步包含一种或多种额外的添加剂,包括,但非限于:悬浮

剂、安定剂、或分散剂。用于非经肠式投予的调配物的一个具体例中，活性成分是以在进行重组式组成物的非经肠式投予之前，利用适当媒剂(例如，不含热原(pyrogen)的无菌水)而重新构成的干燥(亦即，粉末或颗粒)形式提供。

该医药组成物可以无菌注射用水性或油性悬浮液或溶液的形式来制备、包装或贩售。此悬浮液或溶液可依据已知的技艺而予以调配，且除了活性成分以外，可包含额外的成分，如本文中所述的分散剂、湿润剂、或悬浮剂。该等无菌注射调配物可利用无毒性非经肠式可接受的稀释剂或溶剂(例如，水或 1,3-丁二醇)来制备。其它可接受的稀释剂及溶剂包括，但非限于：林格氏溶液(Ringer's solution)、等张性氯化钠溶液、及不挥发油(如单-或二-甘油酯)。其它有用的非经肠式投予调配物包括彼等微晶形式、脂质体制剂中含有活性成分者，或活性成分作为生物可降解性聚合物系统的成分者。用于持续释放或植入的组成物可包含医药上可接受的聚合物型或疏水型材料，例如乳剂、离子交换树脂、略溶性聚合物、或略溶性盐。

适用于局部投予的调配物包括，但非限于：液体或半液体制剂，例如搽剂、洗剂、水包油或油包水乳剂(如乳霜、膏剂或糊剂)、及溶液或悬浮液。可局部投予调配物可包含例如约 1 重量%至约 10 重量%的活性成分，虽然该活性成分的浓度可与该活性成分在溶剂中的溶解度上限一样高。用于局部投予的调配物可进一步包含一种或多种本文中所述的额外成分。

本发明医药组成物可以适用于经由口腔的肺部投予的调配物形式来制备、包装或贩售。该等调配物可包含干燥粒子，该干燥粒子包含活性成分且具有介于约 0.5 至约 0.7 奈米且较佳为约 1 至约 6 奈米的直径。该等组成物方便地呈干燥粉末的形式，以利用含有干燥粉末贮槽的装置进行投予，其中推进剂流可导向该贮槽以分散该粉末；或者

利用自推进溶剂/粉末分散容器进行投予，例如于密封容器中含有溶解或悬浮于低沸点推进剂的活性成分的装置。较佳地，该等粉末包含的粒子中，至少 98 重量%的该粒子具有高于 0.5 奈米的直径且至少 95 数量%的该粒子具有低于 7 奈米的直径。更佳地，至少 95 重量%的该粒子具有高于 1 奈米的直径且至少 90 数量%的该粒子具有低于 6 奈米的直径。干燥粉末组成物较佳包括诸如糖类的固体细微粉末稀释剂，且方便地以单位剂量形式提供。

低沸点推进剂一般包括于大气压力下具有低于 65°F 沸点的液体推进剂。一般而言，推进剂可构成 50 至 99.9 重量%的该组成物，且活性成分可构成 0.1 至 20 重量%的该组成物。推进剂可进一步包含额外的成分，如液态非离子性或固态阴离子性界面活性剂、或固体稀释剂(较佳具有与含有该活性成分的粒子相同规格的粒子尺寸)。

调配成肺部递送的本发明医药组成物亦可以溶液或悬浮液的滴剂形式来提供活性成分。该等调配物可以含有活性成分的水性或烯释酒精溶液或悬浮液(视需要为无菌)形式来制备、包装或贩售，且可方便地利用气化或雾化装置来进行投予。该等调配物可进一步包含一种或多种额外的成分，包括，但非限于：调味剂(例如，糖精钠)、挥发性油、缓冲剂、界面活性剂、或防腐剂(例如，羟苯甲酸甲酯)。藉此投予途径提供的滴剂较佳具有介于约 0.1 至约 200 奈米范围内的平均直径。

本文中所述适用于肺部递送的调配物亦适用于本发明医药组成物的鼻内递送。

另一种适用于鼻内投予的调配物为包含活性成分且具有约 0.2 至 500 微米平均粒子的粗粉末。该等调配物是以吸入方式，亦即藉由通过鼻信道而自保持在鼻孔附近的粉末容器快速吸入的方式来进行投予。

适用于经鼻投予的调配物可包含例如低至约 0.1 重量%及高达 100

重量%的活性成分，且可进一步包含一种或多种本文中所述的额外成分。

本发明医药组成物可以适用于口腔投予的调配物形式来制备、包装或贩售。该等调配物可例如为利用习知方法所制造的锭剂或口含锭的形式，并可例如为 0.1 至 20 重量%活性成分，余量包含口服可溶性或可降解性组成物及视需要地一种或多种本文中所述的额外成分。或者，适用于口腔投予的调配物可包含含有活性成分的粉末、或气化或雾化溶液或悬浮液。当分散该等粉末状、气化或雾化调配物时，其较佳具有介于约 0.1 至约 200 奈米范围内的平均粒子或液滴尺寸，且可进一步包含一种或多种本文中所述的额外成分。

本发明医药组成物可以适用于眼部投予的调配物形式来制备、包装或贩售。该等调配物可例如呈眼部滴剂的形式，其包括例如 0.1 至 1.0 重量%活性成分的溶液或悬浮液于水性或油性液体载剂中。该等滴剂可进一步包含缓冲剂、盐类、或一种或多种其它本文中所述的额外成分。其它适用的眼部可投予式调配物包括彼等于微晶形式或脂质体制剂中含有活性成分者。

本文中使用的「额外的成分」包括，但非限于一种或多种下列物质：赋形剂；界面活性剂；分散剂；钝性稀释剂；粒化或崩解剂；粘结剂；润滑剂；甜味剂；调味剂；着色剂；防腐剂；生理上可降解的组成物，例如明胶；水性媒剂或溶剂；油性媒剂或溶剂；悬浮剂；分散或湿润剂；乳化剂；缓和剂；缓冲剂；盐类；硬化剂；填充剂；乳化剂；抗氧化剂；抗生素；抗真菌剂；安定剂；及医药上可接受的聚合物型或疏水型材料。其它可涵盖于本发明医药组成物的「额外的成分」于此相关技艺中为已知的，且详述于例如 Genaro 编辑，1985，Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 其以参考资料之方式并入本文中。

含有 PEDF 的持续释放型组成物可能为特别有用的。举例而言，持续释放型组成物可用于玻璃体且亦可用于眼睛后面。如本文他处所述，持续释放型组成物亦可用于投予 PEDF 的系统性或其它递送途径。熟悉此技艺者将了解适当的持续释放型组成物可用于治疗所欲疾病达到所欲的结果。

典型地，本发明化合物可投予至动物(较佳为人类)的剂量为该动物每公斤体重投予 1 微克至约 100 克范围的量。但是，精确的投予剂量将依据任意数量的因子而有所不同，该因子包括，但非限于：动物的类型及欲治疗疾病的类型、动物的年龄及投予途径。较佳地，化合物的剂量是在该动物每公斤体重投予约 1 毫克至约 10 克的范围中变化。更佳地，该剂量是在该动物每公斤体重投予约 10 毫克至约 1 克的范围中变化。

该化合物可以每日数次的频率投予至动物，或可以较低频率投予，例如每日一次、每周一次、每二周一次、每月一次，或甚至更低的频率，例如数个月一次或甚至每年一次或更低。剂量的频率对于熟悉此技艺者而言为明显易知的，且取决于任意数量的因子，例如，但非限于：欲治疗疾病的类型或严重度、动物的类型及年龄等。

实施例

本发明将藉由下列实施例而予以进一步说明，该等实施例仅提供说明的目的，本发明不应以任何方式局限于此等实施例，本发明应涵盖本文中所提出的教导内容可得到的任何及所有明显的变化。本申请案全文所引用的所有参考资料、专利、及公开专利申请案，以及图式，皆以参考资料的方式并入本文中。

例示

· 将下列方法及材料用于下列实施例中：

PEDF 的制备：如之前所述¹⁹在人类胚胎肾癌 293 细胞中制造重组

的人类 PEDF。PEDF 蛋白依据之前所述的程序⁴³自条件培养基中予以纯化。利用线性 NaCl 梯度 (20 mM NaH_2PO_4 , pH 6.2, 0 至 500 mM NaCl, 10%甘油) 自 Mono S FPLC 管柱洗提出 PEDF。

合成胜肽的制备：合成三种胜肽(图 4a)。PEDF 胜肽(PEDF_{pep})对应于蛋白质的第 78 至 121 个氨基酸残基(GenBank™ 登录号: P36955)。ACT 胜肽对应于蛋白质的第 73 至 118 个氨基酸残基(登录号: P01011)。嵌合肽($\text{CHIMERA}_{\text{pep}}$)长度为 44 个氨基酸, 具有来自 PEDF 的 40 个氨基酸加上来自 ACT 或 HSP47(登录号: P29043)的 4 个氨基酸残基。

用于评估血管渗透性的生物活性的玻璃体内注射：依照视力及眼科研究学会对于使用动物于眼科及视力研究的报告 (Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research) 来照料 6 至 8 周龄的 C57BL/6J 小鼠。麻醉时, 各动物分别于肌肉给予含有 20 mg/kg 克他命 (ketamine)、20 mg/kg 甲苯噻嗪 (xylazine) 及 800 mg/kg 氨甲酸乙酯 (urethane) 的 0.3 至 0.4 ml 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS、1.06 mM KH_2PO_4 、0.15 M NaCl 及 3.00 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4)。于 10 倍放大率下, 将 1 μl 的鼠 VEGF_{164} (12.6 ng/ μl 于 PBS; R&D 系统, Minneapolis, Minnesota) 经由倾斜 20° 且具有 13 至 20 μm 尖头直径的玻璃吸量管进行递送。对侧的眼睛则给予同样体积单独的 PBS 或含有 12.6 ng VEGF_{164} 的 PBS、以及 20 倍莫耳浓度的过量 PEDF (232 ng)、ACT (278 ng)、HSP47 (278 ng)、 PEDF_{pep} (28.1 ng)、 ACT_{pep} (29.7 ng) 或 $\text{CHIMERA}_{\text{pep}}$ (28.2 ng)。

萤光素血管摄影：于玻璃体内注射 12 小时后, 以 1 滴 1% 硫酸阿托平 (atropine sulfate) 使各瞳孔放大。于玻璃体内注射 0.1 ml 的 25% 萤光素后, 利用 Kowa Genesis 相机拍摄连续的视网膜影像。第一张照片是在玻璃体内注射萤光素的 20 秒以内拍摄。在右眼及左眼的视网膜影像间交替的时间间隔平均为 10 秒。萤光素渗漏会显示出模糊的血管

边界且发展成扩散模糊的萤光。

伊凡氏蓝(Evans Blue)分析：本发明使用 Qaum 等人所述的方法⁴¹的改良。简言之，对每一小鼠给予玻璃体内注射蛋白质与胜肽，以及颈静脉内注射伊凡氏蓝⁴¹。2 小时后，抽取 200 μ l 血液并分析伊凡氏蓝。将视网膜挤出并切开而使其不带有玻璃体或粘连的视网膜色素上皮细胞。

为了分析伊凡氏蓝-白蛋白浓度，于 620 nm 及 740 nm 测量视网膜萃取物及血浆样本的光密度。视网膜的血管通透性藉由利用之前所述的公式^{32, 44}将视网膜的伊凡氏蓝的量对视网膜乾重、血浆伊凡氏蓝浓度、及循环时间进行标准化而计算。由于此报告中的所有动物皆有 1 眼单独注射 VEGF，因此注射 VEGF 的眼睛的视网膜通透性是对有一眼给予 PBS 的动物的组别中该注射 VEGF 的眼睛来进行标准化。

BRCEC 移动分析：如之前所述⁴⁵将牛的视网膜的微血管内皮细胞(BRCEC)单离并培养。以标定有 1, 1'-双十八烷基-3, 3, 3', 3'-四甲基-吲哚羧花青过氯酸盐的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-Ac-LDL; Biomedical Technologies Inc., Stoughton, Massachusetts)处理之后，藉由细胞分选仪将 BRCEC 进一步纯化。将第五和第九传代之间的细胞在含有 D-Val 及 2%胎牛血清的 MEM 中使其饥饿隔夜。将聚碳酸酯过滤器(10 μ m 孔径, PVPF; Osmonics Inc., Minnetonka, Minnesota)以 100 μ g/ml 胶原包覆。将四份含有测试样本的 MEM D-Val (28 μ l) 及含有 10^4 个细胞的 MEM D-Val (50 μ l) 分别置于微趋化箱(microchemotaxis chamber) (NeuroProbe, Gaithersburg, Maryland)的下层孔及上层孔。于 37°C 培养 8 小时后，将过滤器上表面未移动的细胞移除，并将过滤器以哈利氏苏木素(Harris' hematoxylin)染色。对于每一测试样本，于一个 400 倍视野下计算该每一四份的各象限。由 4 个象限的总细胞数，计算该四份孔的平均及标准差。基线移动等

于含有 MEM D-Val 而不添加任何蛋白质或胜肽的移动细胞的数目。基线与含有添加的 VEGF 的移动细胞的数目的差等于最大总移动量。

统计分析：所有结果以平均±标准差表示。使用 Student 的配对 t-检定 (paired Student's t test) 来比较同一动物的眼睛。藉由单因子变异数分析 (one-way ANOVA) 来分析群组的差异。当 $P < 0.05$ 时，则差异被认为具统计显著性。

实施例 1：PEDF 于质量上抑制 VEGF 所诱发的视网膜血管通透性

萤光素血管摄影为一种临床诊断技术，其使得我们能影像化地见到调节 VEGF 所诱发的通透性的因子的影响。相对于对侧的另一眼而言，某一眼下降的萤光可归因于注射至两眼的药剂。由于 VEGF 促进血管通透性²⁸，因此如同预期，相较于注射盐水的对侧眼睛，接受 VEGF₁₆₄（鼠中人类的 VEGF₁₆₅ 的同源基因 (ortholog)）的眼睛出现增加的萤光素渗漏（图 1a）。当 PEDF 与 VEGF₁₆₄ 共同注射时，则无观察到 VEGF 诱发的血管通透性（图 1b）。

为了显现出抗血管通透活性对于 PEDF 具有专一性，我们以相同的分析测试 ACT 及 HSP47 的影响。ACT 及 HSP47 是来自丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serpin) 超家族的两个亚家族²⁹，其与 PEDF 所隶属的亚家族不同。尽管丝氨酸蛋白酶抑制剂之间具有高程度的结构保守性，ACT 及 HSP47 在小鼠视网膜中对 VEGF 诱发的萤光素渗漏不具影响（图 1c、d）。因此，PEDF 对 VEGF 所诱发的血管通透性的抑制效果是专一于 PEDF。

实施例 2：PEDF 于数量上抑制 VEGF 所诱发的视网膜血管通透性

为了量化及证实 PEDF 抑制 VEGF 所诱发的血管通透性的能力，我们采用改良的伊凡氏蓝分析³²。将如同萤光素血管摄影实验中进行玻璃体内注射的小鼠，于 24 小时后经血管内接受伊凡氏蓝。PEDF 几乎终止 ($95.6 \pm 21.2\%$) VEGF 所诱发的血管通透性，而 ACT 及 HSP47 则不具可辨识的影响（分别为 $3.4 \pm 18.2\%$ 及 $19.4 \pm 22.3\%$ 的抑制性）（图 2）。此等

数据于数量上证实我们藉由萤光素血管摄影于质量上所观察到的：PEDF 抑制 VEGF 所诱发的血管通透性。

实施例 3: PEDF_{pep} 抑制 VEGF 所诱发的血管通透性

由于 PEDF 的神经营养/神经保护活性已知是 44 个氨基酸区域所造成^{24, 25}，因此我们欲知此区域是否亦拥有通透性调节的活性。PEDF_{pep} 是由人类 PEDF 的第 78 至 121 个氨基酸残基所构成，将该 PEDF_{pep} 进行玻璃体内注射以等莫耳量代替全长 PEDF。该胜肽于萤光素血管摄影分析中有效地抑制 VEGF 所诱发的血管通透性(图 3a)。来自 ACT 相对应区域的 46 个氨基酸肽(位置 73 至 118, 命名为 ACT_{pep})则对 VEGF 所诱发的血管通透性不具影响。

伊凡氏蓝分析证实萤光素血管摄影的发现(图 3b)。PEDF_{pep} 阻断 $83.7 \pm 17.1\%$ 的 VEGF 所诱发的对于伊凡氏蓝-白蛋白的血管通透性。类似于全长的 ACT，ACT_{pep} 不会抑制 VEGF 所诱发的血管通透性 ($-26.4 \pm 34.3\%$)。全长的 PEDF 与 PEDF_{pep} 在等莫耳浓度下具有相似的效力。单因子变异数分析显示在该二者的功效之间无显著的差异。接近 PEDF 的 N 端的 44 个氨基酸区域赋予 PEDF 对于 VEGF 所诱发的血管通透性的抑制活性。

实施例 4: PEDF_{pep} 中的 4 个氨基酸残基对于抑制 VEGF 所诱发的血管通透性是必要的

为了确认生物活性所需的氨基酸残基，我们比较 ACT、HSP47 及 PEDF 的序列及结晶构造(图 4a、b)，并选出 PEDF 中的 4 个候选氨基酸残基作为关键部分进行评估。先前的研究工作^{24, 25}与我们的初步研究皆针对 PEDF 的第 78 至 121 个残基作为活性位置。由结晶构造可知，44 个氨基酸区域包括完整的二级结构元素 s6B、hB 及 hC；一个 hD 转角(turn)；及连接环(loop)³¹。s6B 及 hB 皆埋于 PEDF 的内部。元素 hC、hD 及连接二者的环则大量地暴露出来，形成易接近的表面。基于此理

由，我们将焦点着重于第 99 至 121 残基，其包含 hC、连接环及一个 hD 转角。

我们推论关键氨基酸应为 PEDF 与该二种缺乏血管通透性的调节活性的丝氨酸蛋白酶抑制剂(ACT 及 HSP47)之间相异的残基(图 4a)。基于此，辨识出 6 个氨基酸。此 6 个氨基酸残基中的二个被排除。精氨酸₉₉被排除的原因在于将其改变成丙氨酸并不会改变 PEDF 的生物活性(未公开的结果)。脯氨酸₁₁₆被排除的原因在于脯氨酸的角色是维持该胜肽骨架的结构。将 PEDF_{pep} 中的其它 4 个残基(谷氨酸盐₁₀₁、异亮氨酸₁₀₃、亮氨酸₁₁₂、丝氨酸₁₁₅)进行改质来创造 CHIMERA_{pep}。类似于丙氨酸扫描(alanine scanning)，将谷氨酸盐₁₀₁置换为丙氨酸(HSP47 中的对应残基)。将异亮氨酸₁₀₃、亮氨酸₁₁₂、丝氨酸₁₁₅以谷氨酸盐(ACT 中的对应残基)取代。在此 3 个残基处，ACT 及 HSP47 共有类似的富含电子的侧链基团(HSP47 中的谷氨酸盐或天冬氨酸盐)。

于萤光素血管摄影分析(图 4c)及伊凡氏蓝分析(图 4d)中，CHIMERA_{pep} 无法抑制 VEGF 所诱发的血管通透性。CHIMERA_{pep} 抑制 VEGF 所诱发的伊凡氏蓝-白蛋白渗漏率仅为 $16.0 \pm 27.8\%$ 。于单因子变异数分析测试中，对于 VEGF 所诱发的血管通透性的抑制性而言，CHIMERA_{pep} 的功效显著地低于 PEDF。

实施例 5: PEDF 的相同区域抑制 VEGF₁₆₄ 所刺激的细胞移动

我们采用微趋化箱分析，以牛的视网膜的微血管内皮细胞(BRCEC)作为用于血管发生活性的代替品。PEDF 以剂量相依的方式抑制 VEGF 所刺激的内皮细胞移动，其具有 0.5 nM 的半数最大抑制浓度(IC₅₀) (图 5a)。ACT 及 HSP47 于相同浓度下对移动活性并不显现出效果。类似于 PEDF，PEDF_{pep} 以剂量相依的方式有效地抑制 VEGF 所刺激的 BRCEC 的移动，其具有 3.0 nM 的 IC₅₀。ACT_{pep} 及 CHIMERA_{pep} 于相同分析中均不显现出任何效果(图 5b)。因此，内皮细胞移动是取决于相同的 4 个氨基酸。

所有本文中所揭示的文献及专利申请案的全部内容皆以参考资料的方式并入本申请案，其可用于本发明中。

熟悉此技艺者将轻易地了解本发明经过良好的修饰而达成目的，并得到如前述的结果及优点，以及其中所固有的优点。熟悉此技艺者将了解在不悖离本发明的精神及范畴的情况下，在实行本发明时可进行各种修改及变化。熟悉此技艺者所发现的其变化及其它用途皆涵盖于且同等于本发明的精神，根据权利要求书的范畴所界定者。

【参考资料】

1. Senger, D. R. et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-5 (1983).
2. Connolly, D. T. et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84, 1470-8 (1989).
3. Keck, P. J. et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246, 1309-12 (1989).
4. Oosthuyse, B. et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 28, 131-8 (2001).
5. Sondell, M., Lundborg, G. & Kanje, M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci* 19, 5731-40 (1999).

6. Wick, A. et al. Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. *J Neurosci* 22, 6401-7 (2002).
7. Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. & Heldin, C. H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269, 26888-95 (1994).
8. Gille, H. et al. Analysis of biology effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 276, 3222-30 (2001).
9. Bernatchez, P.N., Soker, S. & Sirois, M.G. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem* 274, 31047-54 (1999).
10. Steele, F.R., Chader, G.J., Johnson, L.V. & Tombran-Tink, J. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1526-30 (1993).
11. Becerra, S.P., Sagasti, A., Spinella, P. & Notario, V. Pigment epithelium-derived factor behaves like a noninhibitory serpin. Neurotrophic activity does not require the serpin reactive loop. *J Biol Chem* 270, 25992-9 (1995).
12. Dafforn, T.R., Della, M. & Miller, A.D. The molecular

- interactions of heat shock protein 47 (Hsp47) and their implications for collagen biosynthesis. *J Biol Chem* 276, 49310-9 (2001).
13. Tombran-Tink, J. & Johnson, L.V. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30, 1700-7 (1989).
14. Tombran-Tink, J., Chader, G.G. & Johnson, L.V. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res* 53, 411-4 (1991).
15. Becerra, S.P. et al. Overexpression of fetal human pigment epithelium-derived factor in *Escherichia coli*. A functionally active neurotrophic factor. *J Biol Chem* 268, 23148-56 (1993).
16. Seigel, G.M. et al. Differentiation of Y79 retinoblastoma cells with pigment epithelial-derived factor and interphotoreceptor matrix wash: effects on tumorigenicity. *Growth Factors* 10, 289-97 (1994).
17. Dawson, D.W. et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285, 245-8 (1999).
18. Stellmach, V., Crawford, S.E., Zhou, W. & Bouck, N. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 2593-7 (2001).
19. Duh, E.J. et al. Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 821-9 (2002).

-
20. Gao, G. et al. Difference in ischemic regulation of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor in brown norway and sprague dawley rats contributing to different susceptibilities to retinal neovascularization. *Diabetes* 51, 1218-25 (2002).
 21. Gao, G. et al. Down-regulation of vascular endothelial growth factor and up-regulation of pigment epithelium-derived factor: a possible mechanism for the anti-angiogenic activity of plasminogen kringle 5. *J Biol Chem* 277, 9492-7 (2002).
 22. Gao, G. et al. Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. *FEBS Lett* 489, 270-6 (2001).
 23. Ohno-Matsui, K. et al. Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *J Cell Physiol* 189, 323-33 (2001).
 24. Alberdi, E., Aymerich, M. S. & Becerra, S. P. Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor. *J Biol Chem* 274, 31605-12 (1999).
 25. Bilak, M. M. et al. Identification of the neuroprotective molecular region of pigment epithelium-derived factor and its binding sites on motor neurons. *J Neurosci* 22, 9378-86 (2002).
 26. Cao, W. et al. Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurosci Res* 57, 789-800 (1999).

-
27. Taniwaki, T., Becerra, S.P., Chader, G.J. & Schwartz, J.P.
Pigment epithelium-derived factor is a survival factor for cerebellar granule cells in culture. *J Neurochem* 64, 2509-17 (1995).
 28. Derevjaniuk, N.L. et al. Quantitative assessment of the integrity of the blood-retinal barrier in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 2462-7 (2002).
 29. Gettins, P.G. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 102, 4751-804 (2002).
 30. Becerra, S.P. Structure-function studies on PEDF. A noninhibitory serpin with neurotrophic activity. *Adv Exp Med Biol* 425, 223-37 (1997).
 31. Simonovic, M., Gettins, P.G. & Volz, K. Crystal structure of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 11131-5 (2001).
 32. Xu, Q., Qaum, T. & Adamis, A.P. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 789-94 (2001).
 33. Conn, G. et al. Purification of a glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 1323-7 (1990).
 34. Gospodarowicz, D., Abraham, J.A. & Schilling, J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 7311-5 (1989).

-
35. Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V. & Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-9 (1989).
 36. Gettins, P.G., Simonovic, M. & Volz, K. Pigment epithelium-derived factor (PEDF), a serpin with potent anti-angiogenic and neurite outgrowth-promoting properties. *Biol Chem* 383, 1677-82 (2002).
 37. Clermont, A.C., Cahill, M.T., Bursell, S.E., Bouck, N. & Aiello, L.P. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal permeability and blood flow in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, S92 (2001).
 38. Aiello, L.P. & Wong, J.S. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int Suppl* 77, S113-9 (2000).
 39. Meyer, C., Notari, L. & Becerra, S.P. Mapping the type I collagen binding site on pigment epithelium-derived factor. Implications for its antiangiogenic activity. *J Biol Chem* (2002).
 40. Roberts, D.L., Weix, D.J., Dahms, N.M. & Kim, J.J. Molecular basis of lysosomal enzyme recognition: three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *Cell* 93, 639-48 (1998).
 41. Tong, P.Y., Gregory, W. & Kornfeld, S. Ligand interactions of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. The stoichiometry of mannose 6-phosphate binding. *J Biol Chem*

264, 7962-9 (1989).

42. Tong, P.Y. & Kornfeld, S. Ligand interactions of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. J Biol Chem 264, 7970-5 (1989).
43. Stratikos, E., Alberdi, E., Gettins, P.G. & Becerra, S.P. Recombinant human pigment epithelium-derived factor (PEDF): characterization of PEDF overexpressed and secreted by eukaryotic cells. Protein Sci 5, 2575-82 (1996).
44. Qaum, T. et al. VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. Invest Ophthalmol Vis Sci 42, 2408-13 (2001).
45. Gardner, T.W. Histamine, ZO-1 and increased blood-retinal barrier permeability in diabetic retinopathy. Trans Am Ophthalmol Soc 93, 583-621 (1995).

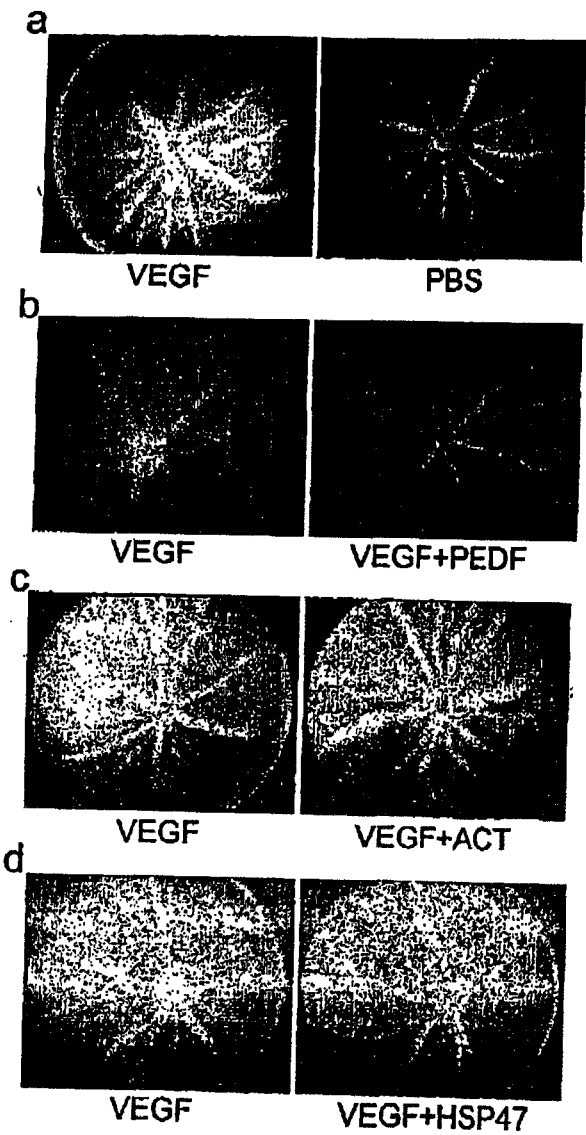


图1

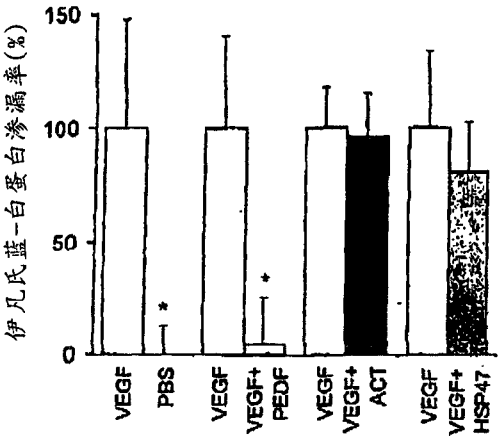


图2

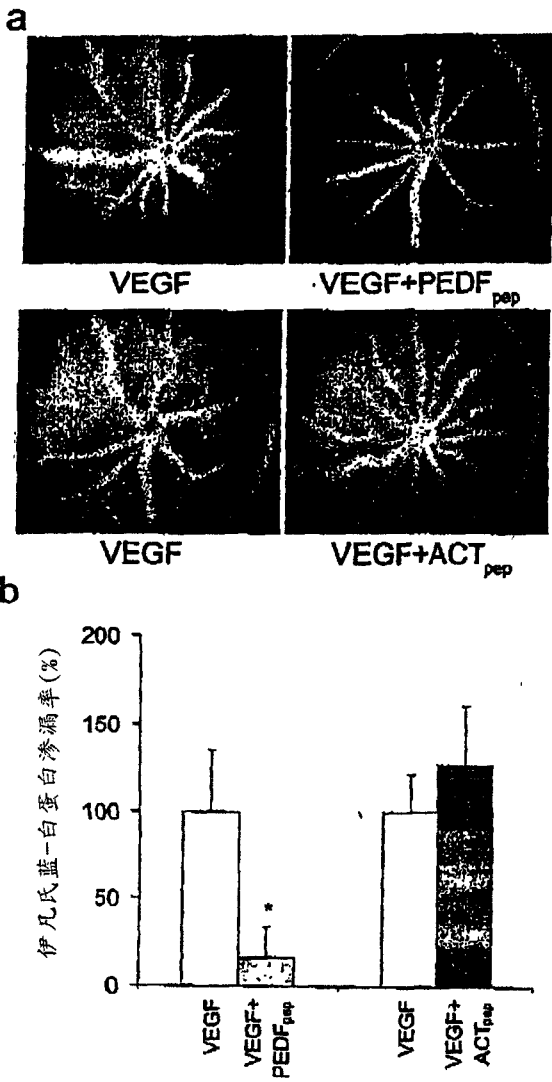


图3

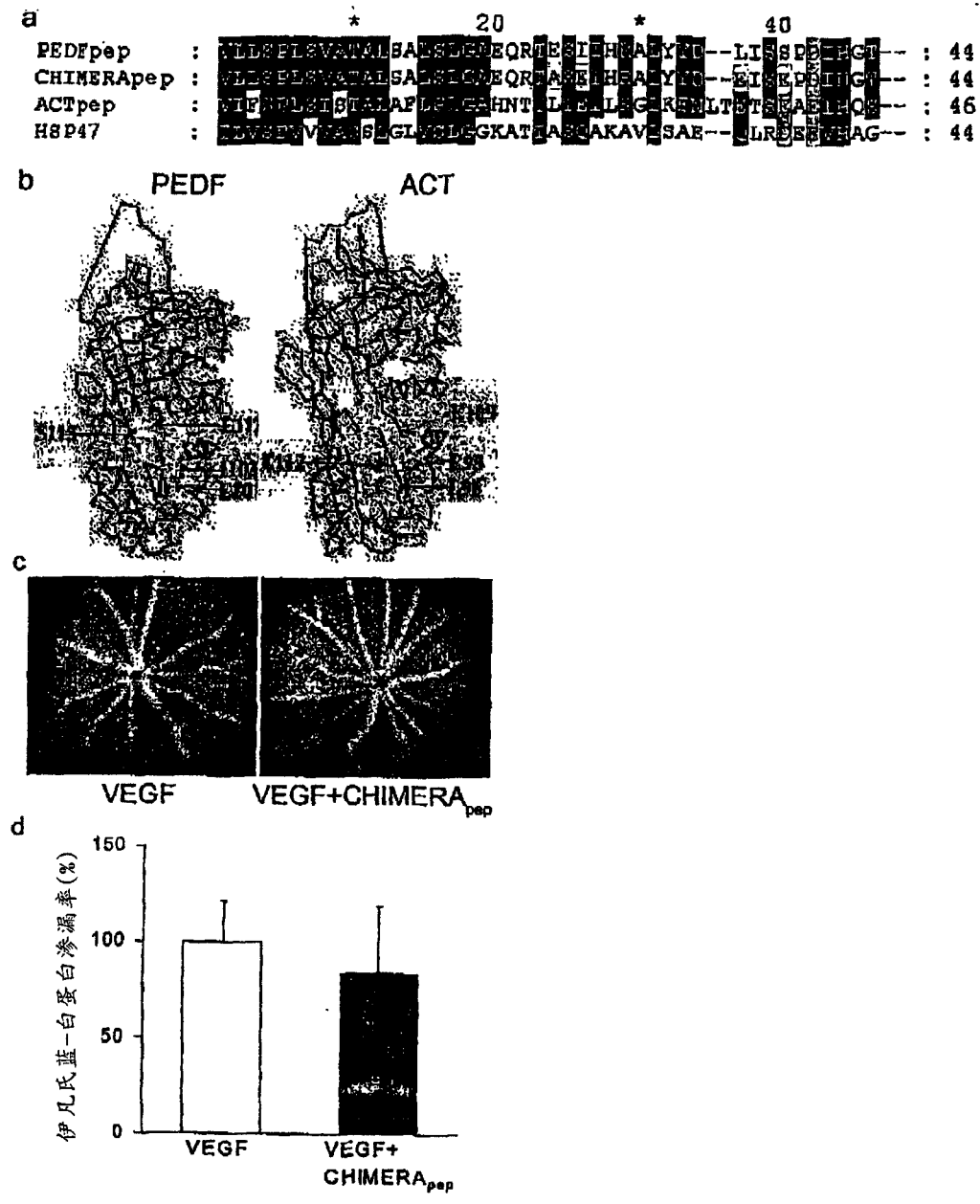


图4

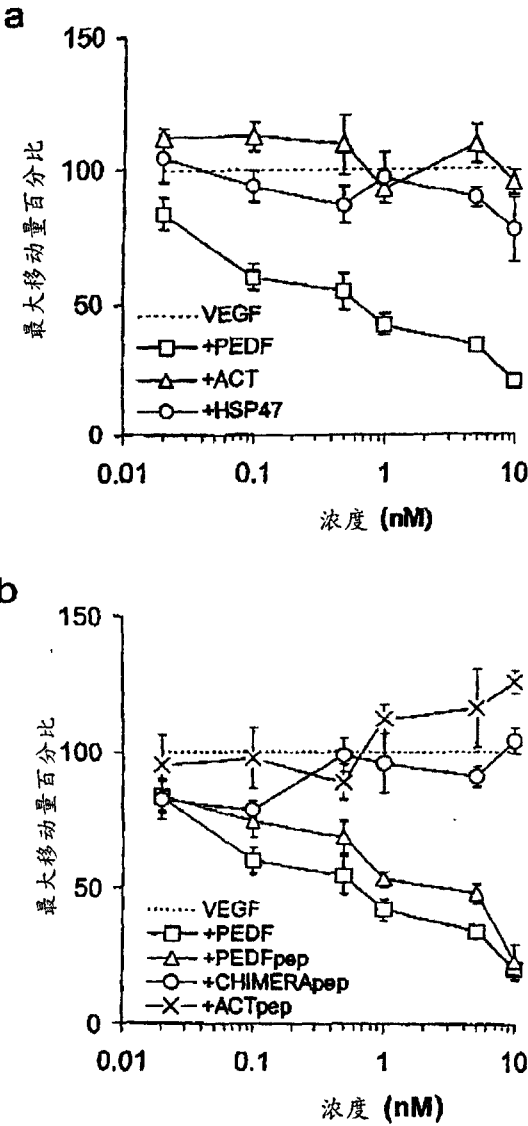


图 5

全长的PEDF序列:

MQALVLLLCIGALLGHSSCQNPASPPEEGSPDPDSTGALVEEEDPFFKVPVNKL
AAVSNFGYDLYRVRSSMSPTTNVLLSPLSVATALSALSLGAEQRTESIHRALY
YDLISSPDHGTYKELLDTVTAPQKNLKSASRIVFEKKLRIKSSFVAPLEKSYGTR
PRVLTGNPRDLQEINNWWQAQMKGKLARSTKEIPDEISILLGVAHFKGQWVT
KFDSRKTSLEDFYLDEERTVRVPMMSDPKAVLRYGLSDLSCKIAQLPLTGSM
SIIFFLPLKVTQNLTLIEESLTSEFIHDIDRELKTVQAVLTVPKLKLSYEGEVTKSLQ
EMKLQSLFDSPDFSKITGKPIKLTQVEHRAGFEWNEDGAGTTPSPGLQPAHLTF
PLDYHLNQPFIFVLRD TDTGALLFIGKILDPRGP

图6
序列识别号1

PEDF_{pep} 序列:

VLLSPLSVATALSALSLGAEQRTEIIHRALYYDLISSPDIHGT

图7
序列识别号2

PEDF_{pep} 中4个重要的氨基酸残基:

VLLSPLSVATALSALSGLGAEQRTESIIHRALYYDLISSPDHGT

图8
序列识别号3