



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I675844 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：105107330

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 03 月 10 日

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

A61K38/16 (2006.01)

(30)優先權：2015/03/11 美國

62/131,261

(71)申請人：新源生物科技股份有限公司 (中華民國) ALLGENESIS BIOTHERAPEUTICS INC.
(TW)

臺北市松山區八德路 4 段 760 號 7 樓之 1

圓祥生命科技股份有限公司 (中華民國) AP BIOSCIENCES, INC. (TW)

臺北市南港區園區街 3 號 17 樓

(72)發明人：曾國輝 ZEN, KEVIN (TW)；吳佩姿 WU, PEI TZU (TW)；何正宏 HER, JENG HORNG (TW)；陳皇慈 CHEN, HUANG TSU (TW)；柳鈞翔 LEOU, JIUN SHYANG (TW)；徐靜軒 HSU, CHING HSUAN (TW)

(74)代理人：陳翠華

(56)參考文獻：

CN 102311502B

US 20060234347A1

WO 2014160507A1

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：8 共 167 頁

(54)名稱

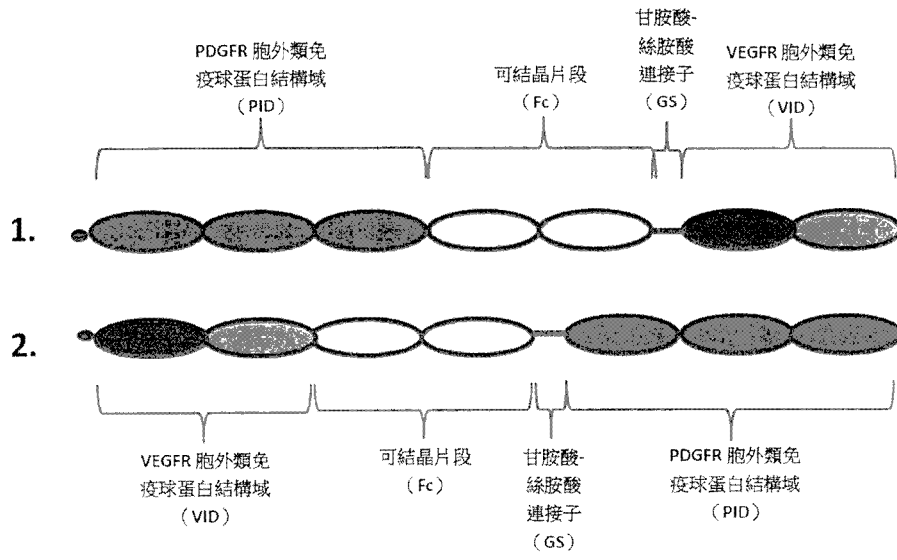
多靶向融合蛋白及其應用

(57)摘要

本發明係關於融合蛋白，其係含有 PDGF 結合部分(binding portion)、VEGF 結合部分、及 Fc 抗體區。本發明亦關於編碼該融合蛋白之核酸、包含該融合蛋白之組合物、及使用該融合蛋白以治療或預防臨床症狀之方法，該臨床症狀之特徵在於異常的血管生成，例如血管滲透性、水腫、或發炎。

Fusion proteins containing a PDGF binding portion, a VEGF binding portion, and an Fc antibody region are described. Also described are nucleic acids encoding the fusion proteins, compositions comprising the fusion proteins, and methods of using the fusion proteins for treating or preventing clinical conditions characterized by abnormal angiogenesis, such as vascular permeability, edema or inflammation.

指定代表圖：



第 1 圖

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

多靶向融合蛋白及其應用/MULTI-TARGETING FUSION PROTEINS
AND USES THEREOF

【優先權聲明】

【0001】 本申請案依美國專利法35 U.S.C. § 119(e)主張於2015年3月11日提出申請之美國臨時專利申請案第62/131,261號之權益，該美國臨時專利申請案之全文併於此處以供參考。

【技術領域】

【0002】 本發明係關於融合蛋白（其係包含PDGF結合部分（binding portion）、VEGF結合部分、及Fc抗體區）、編碼該融合蛋白之核酸及表現載體（expression vector）、其重組細胞、及包含該融合蛋白之組合物。亦提供使用該融合蛋白以抑制PDGF及VEGF功能的方法。

【先前技術】

【0003】 血管生成（自既存血管形成新血管）在胎兒發育及組織修復中係正常且重要之程序。血管生成係受血管生成及抗血管生成二種因子所高度調控，且其參與內皮細胞之遷移及增生、血管成熟及重塑、及胞外基質之分解。雖然其在正常生長及發育中係一重要之程序，血管生成亦在腫瘤生長、局部缺血、及發炎中扮演關鍵之角色。

【0004】 在快速之未受控眼部血管生成過程中，血管滲透性增加，導致血管脆弱及漏洩，因而造成出血及液體與蛋白質滲出物之累積，最終並造成血管功能不全或血管過度生長。眼部血管生成可發生在一系列之眼部病症中，例如老年性黃斑退化（age-related macular degeneration, AMD）、增生

性糖尿病神經病變 (proliferative diabetic neuropathy, PDR)、及角膜血管新生 (corneal neovascularization)。AMD及PDR二者皆可造成視網膜神經結構及功能之損傷，最終造成視力喪失。如果不處理，該不正常之血管可導致纖維性結疤，對視網膜功能造成不可逆損傷，其最後可造成失明 (Zhang及Ma, Prog Retin Eye Res. 2007 Jan; 26(1):1-37)。角膜血管新生可類似地導致角膜透明度降低及視力喪失。

【0005】 血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在血管生成中扮演一重要之角色。人類VEGF家族含有6種成員：VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、及胎盤生長因子 (placental growth factor, PlGF)。另外，VEGF-A、VEGF-B、及PlGF之多種同功體係透過選擇性RNA剪接來產生 (Sullivan及Brekken, MAbs. 2010 Mar-Apr; 2(2):165-75)。VEGF-A係該家族中的原型成員且定性最為清楚。已顯示VEGF-A作為內皮細胞之細胞分裂因子，促進內皮細胞生存及增生，誘導細胞遷移及增加微血管滲透性。VEGF家族之蛋白係藉由結合至細胞表面VEGF受體 (VEGFR) 之胞外區來活化VEGF訊息路徑。

【0006】 有三種型態之VEGFR蛋白：VEGFR1、VEGFR2、及VEGFR3，且其各含有包含七個類免疫球蛋白 (Ig) 結構域之胞外區。該VEGFR之胞外區結合至不同的VEGF蛋白。舉例而言，VEGFR-1 (Flt-1) 結合至VEGF-A、VEGF-B、及PlGF，且可作為用於VEGF之誘餌受體 (decoy receptor)，或作為VEGFR-2之調節子。VEGFR-2 (KDR/Flt-1) 與所有VEGF同功體結合，且係VEGF誘導之血管生成訊息的主要介質。VEGFR-3 (Flt-4) 與VEGF-C及VEGF-D結合，但不與VEGF-A結合，且係作為淋巴管生成 (lymphangiogenesis) 之介質。

【0007】 高分子量變異體VEGF₂₀₆及VEGF_{189K}係緊密地結合至胞外

膜，且不與VEGF受體交互作用。而VEGF₁₆₅係主要之可溶性變異體，VEGF₁₂₁及VEGF₁₄₅亦係結合至VEGFR1及VEGFR2受體之可溶性變異體，和分解產物VEGF₁₁₀一樣（Bhisitkuk，Br J Ophthalmol. 2006 Dec；90(12):1542-7）。

【0008】 以抗體、可溶性VEGF受體、或VEGF酪胺酸激酶活性之抑制劑來阻斷VEGF活性，係已被用於治療血管生成型病症（angiogenic-type disorder）（例如AMD）的策略。雖然抗VEGF療法一般可穩定或改善視覺功能，其已被報告在抗VEGF治療兩年內，在所有經治療之眼睛中大約半數產生次視網膜結疤或纖維化（Daniel等人，Ophthalmology. 2014 Mar；121(3):656-66）。另外，僅靶向VEGF雖可避免新生血管之形成，但其對已建立之血管沒有效果。

【0009】 最近之數據暗示周細胞（pericyte）可在抗VEGF抗性、新血管之穩定、及結疤中扮演一角色。周細胞與內皮細胞交互作用，並幫助血液-視網膜屏障之建立。重要的是，周細胞提供存活訊息至新生血管內皮細胞，使其抵抗VEGF耗竭療法（Benjamin等人，Development. 1998 May；125(9):1591-8；Patel，Retina. 2009 Jun；29(6 Suppl):S45-8）。血小板衍生生長因子（platelet-derived growth factor，PDGF）控制周細胞，驅使其補充、增生、存活及調控新血管之成熟。

【0010】 人類PDGF家族含有四種成員：PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、及PDGF-D。該四種PDGF蛋白形成同二聚體或異二聚體（例如，PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC、及PDGF-DD），且其在單體型時係無活性的。該二聚蛋白結合至細胞表面PDGF受體（PDGFR）之胞外區，以活化PDGF訊息路徑。

【0011】 有二種型態之PDGF受體，PDGFR- α 及PDGFR- β ，其形成同二聚體或異二聚體（例如，PDGFR- $\alpha\alpha$ 、PDGFR- $\beta\beta$ 、及PDGFR- $\alpha\beta$ ）且含有

包含五個類免疫球蛋白結構域之胞外區。該受體之配體結合位係位在前三個類免疫球蛋白結構域（D1至D3）。

【0012】 該PDGFR二聚體之胞外區結合至不同的PDGF蛋白。舉例而言，PDGFR- $\alpha\alpha$ 專一性地與PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、及PDGF-CC交互作用。PDGFR- $\alpha\beta$ 專一性地與PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC、及PDGF-DD交互作用。PDGFR- $\beta\beta$ 專一性地與PDGF-BB及PDGF-DD交互作用。PDGF-BB係唯一可以高親合力結合至所有三種受體二聚體型之PDGF，其在體外及體內兩者皆已被顯示可以誘導周細胞增生及遷移。先前已顯示由PDGFR- β 之所有五個類免疫球蛋白結構域（D1至D5）組成的胞外區，拮抗經由PDGF-B所刺激之反應（Duan等人，*J Biol Chem.* 1991 Jan 5；266(1):413-8；Ueno等人，*Science.* 1991 May 10；252(5007):844-8）。使用PDGFR β -Fc嵌合蛋白（chimeric protein）之研究，證明人類PDGFR- β 之D1至D3對高親合力PDGF-BB配體結合係足夠的（Heidaran等人，*FASEB J.* 1995 Jan；9(1):140-5；Lokker等人，*J Biol Chem.* 1997 Dec 26；272(52):33037-44）。另外，融合至麩胱甘肽S-轉移酶（glutathione S-transferase，GST）之PDGFR- β D1至D3蛋白的預二聚化（pre-dimerization），相較於重組PDGFR- β D1至D3，其改善至PDGF-BB配體的結合親合力（Leppanen等人，*Biochemistry.* 2000 Mar 7；39(9):2370-5）。

【0013】 雖現行之抗VEGF療法係高度有效的，然而為達成最佳的結果仍需要加強患者監測及頻繁地治療。另外，因為這些藥劑係靶向疾病之症狀而非根本之病因，因而須無限期地持續治療。進行次最佳（suboptimal）治療，現存之脈絡膜血管新生病變（choroidal neovascular lesions，CNVs）將繼續生長且最後成熟成為纖維性疤痕，其導致不可逆之視覺喪失（Martin等人，*Ophthalmology* 2012；119:1388-1398；Bloch等人，*Am J Ophthalmol.*

2013 Jul ; 156(1):116-124 ; Daniel等人Ophthalmology. 2014 Mar ; 121(3):656-66)。可以阻斷血管新生及造成脈絡膜血管新生病變中未成熟血管退化之藥劑，具有排除血管漏洩及纖維化之來源的潛力，降低或排除患者密集性監測及持續性治療之需要。

【0014】 最近，包含（從N端至C端）PDGF受體之胞外部分、VEGF受體之胞外部分、及多聚化域之融合蛋白係被描述（美國專利申請公開號2014/0315804）。該融合蛋白與PDGF及VEGF二者結合，並抑制彼等之活性。

【0015】 儘管在本技術領域中述及對PDGF及VEGF之雙重抑制劑的進展，在本技術領域中，針對血管生成型病症仍有改善調配物（formulation）及治療的需求。

【發明內容】

【0016】 本發明藉由提供新穎之融合蛋白來滿足此需求，該融合蛋白同時結合至VEGF及PDGF二者，同時靶向該二者訊息路徑。該融合蛋白已藉由融合衍生自VEGF受體及PDGF受體之胞外配體結合域，至來自IgG1之半衰期延長Fc域來產生。在本發明特定實施態樣中，所有該融合蛋白組分係源自人類，且因此預期其對於人類為有用的非免疫性療法。該融合蛋白可以在體外抑制VEGF依賴及PDGF依賴之二者的細胞生長，且在動物模式中其可以降低VEGF誘導之視網膜漏洩。

【0017】 有增加的證據顯示在不存在VEGF訊息下血管生成可發生，且周細胞供應VEGF及其他細胞存活因子至增生之內皮細胞，給予其抗VEGF抗性（Reinmuth等人，FASEB J. 2001 May ; 15(7):1239-41）。周細胞源亦使人聯想到在結疤組織及腫瘤中之纖維母細胞。PDGF訊息路徑係負責周細胞補充、存活、及成熟（Andrae等人，Genes Dev. 2008 May 15 ; 22(10):1276-312）。在多種眼部血管新生之小鼠模式中，藉由抗體來抑制PDGF受體訊息，

顯示增強抗VEGF治療之治療效果 (Jo等人, Am J Pathol. 2006 Jun ; 168(6):2036-53)。抗PDGF藥劑E10030與抗VEGF藥劑之組合的大型第2期臨床試驗, 顯示比抗VEGF單一藥物治療為優之結果 (Dugel, Retina Today, March 2013, 65-71)。因此, 本發明融合蛋白可有效地治療血管生成型病症 (例如, AMD及癌症)。該融合蛋白之額外的好處係不需要注射二種分開之組合物, 即, 一種抗PDGF藥劑及一種抗VEGF藥劑。取而代之, 係允許單一注射包含兩種藥劑之融合蛋白的單一組合物, 因此降低患者感染之風險及因注射所造成之外傷。

【0018】 在一普遍方面中, 本發明係關於一種融合蛋白, 其係包含(a) 第一胜肽, 該第一胜肽係包含VEGF受體之胞外配體結合域 (binding domain), (b) 抗體之Fc區 (Fc region), 以及 (c) 第二胜肽, 該第二胜肽係包含PDGF受體之胞外配體結合域; 其中, 該融合蛋白從N端至C端係依選自由以下所組成之群組的次序排列: (a) - (b) - (c) 及 (c) - (b) - (a); 以及其中, 該融合蛋白係可以結合至VEGF-A分子及PDGF-BB分子, 並抑制VEGFR1、VEGFR2之活性及PDGFR之活性。

【0019】 在本發明之一實施態樣中, VEGF受體之胞外配體結合域可以結合至VEGF配體, 並包含一或多種VEGF受體之一或多個類免疫球蛋白結構域D1至D7。較佳地, VEGF受體之胞外配體結合域係包含第一VEGF受體之類免疫球蛋白結構域D2、及第二VEGF受體之類免疫球蛋白結構域D3, 其中該第一及第二VEGF受體係相同或不同之VEGF受體。在一實施態樣中, VEGF受體之胞外配體結合域係包含VEGFR1之類免疫球蛋白結構域D2、及VEGFR2之類免疫球蛋白結構域D3。在另一實施態樣中, VEGF受體之胞外配體結合域係包含與SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性之胺基酸序列。更佳地, VEGF受體之胞外配體結合域係包含選自由以下所組成之群組的胺基酸

序列：SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO:10。

【0020】 在本發明之一實施態樣中，PDGF受體之胞外配體結合域可以結合至PDGF配體，並包含一或多種PDGF受體之一或多個類免疫球蛋白結構域D1至D5。較佳地，PDGF受體之胞外配體結合域係包含一或多種PDGF受體之類免疫球蛋白結構域D1至D3。在一實施態樣中，PDGF受體之胞外配體結合域係包含與SEQ ID NO: 2具有至少90%同一性之胺基酸序列。更佳地，PDGF受體之胞外配體結合域係呈現包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 2及SEQ ID NO: 5。

【0021】 在本發明之一實施態樣中，抗體之Fc區係包含IgG1之CH2及CH3區。較佳地，抗體之Fc區係包含一與SEQ ID NO: 12具有至少90%同一性之胺基酸序列。更佳地，抗體之Fc區係包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 12及SEQ ID NO: 15。

【0022】 在本發明之一較佳實施態樣中，融合蛋白係包含（a）VEGFR1之類免疫球蛋白結構域D2、及VEGFR2之類免疫球蛋白結構域D3，（b）抗體之Fc區，其係包含IgG1之CH2及CH3區，以及（c）PDGFR β 之類免疫球蛋白結構域D1至D3，其中該融合蛋白從N端至C端係依選自由以下所組成之群組的次序排列：（a）-（b）-（c）及（c）-（b）-（a），更佳係依（c）-（b）-（a）的次序。

【0023】 在本發明之一實施態樣中，融合蛋白更包含連接胜肽（linker peptide），其係位於該融合蛋白之C端處之第一或第二胜肽與該Fc區之間，以及視需要包含第二連接胜肽，其係位於該融合蛋白之N端處之第二或第一胜肽與該Fc區之間。

【0024】 在本發明之一實施態樣中，融合蛋白更包含訊息胜肽，其係可行地連接至融合蛋白之N端。

【0025】 在另一普遍方面中，本發明係關於一種分離核酸分子 (isolated nucleic acid molecule)，其係編碼本發明融合蛋白。

【0026】 在另一普遍方面中，本發明係關於一種表現載體，其係包含編碼本發明融合蛋白之核酸分子。

【0027】 在另一普遍方面中，本發明係關於一種重組宿主細胞，該重組細胞係包含編碼本發明融合蛋白之核酸分子。

【0028】 在另一普遍方面中，本發明係關於一種獲得本發明融合蛋白之方法。該方法係包含：(1) 在製造該融合蛋白之條件下培養宿主細胞，其係包含編碼該融合蛋白的核酸分子；以及 (2) 回收該宿主細胞所製造之融合蛋白。

【0029】 在另一普遍方面中，本發明係關於一種醫藥組合物，其係包含本發明融合蛋白、及醫藥上可接受之載體 (carrier)。

【0030】 在另一普遍方面中，本發明係關於一種醫藥組合物，其係包含編碼本發明融合蛋白之核酸分子、及醫藥上可接受之載體。

【0031】 在另一普遍方面中，本發明係關於一種降低VEGFR之活性及PDGFR之活性的方法，該方法包含對有需要之個體投予有效量之本發明融合蛋白。

【0032】 在另一普遍方面中，本發明係關於一種治療或預防臨床症狀 (clinical condition) 的方法，該臨床症狀係選自由以下所組成之群組：組織血管形成、血管滲透性、水腫、及發炎，該方法係包含對有需要之個體投予有效量之根據本發明一實施態樣的融合蛋白。

【0033】 在另一普遍方面中，本發明係關於一種治療或預防臨床症狀的方法，該臨床症狀係選自由以下所組成之群組：脈絡膜血管新生 (choroidal neovascularization, CNV)、濕性老年性黃斑退化 (AMD)、及地圖樣萎縮

過夜培養；使用定量三明治酵素免疫檢定法（quantitative sandwich enzyme-linked immunoassay (ELISA) assay）測定游離之VEGF₁₆₅或PDGF-BB的濃度，並對融合蛋白1之濃度作圖；

【0046】 第6A圖及第6B圖分別顯示在競爭性結合檢定中，融合蛋白2分別對VEGF₁₆₅及PDGF-BB在溶液中之親合力評估。多種濃度之融合蛋白2係與固定濃度之VEGF₁₆₅或PDGF-BB在溶液中過夜培養；使用定量三明治酵素免疫檢定法測定游離之VEGF₁₆₅或PDGF-BB的濃度，並對融合蛋白2之濃度作圖；

【0047】 第7圖顯示正對照組1（●）、融合蛋白3（▲）、及融合蛋白5（■）在HUVEC細胞之VEGF依賴性生長上的抑制效果。OD₄₉₀讀數係對測試樣品濃度作圖；以及

【0048】 第8圖顯示正對照組2（●）、融合蛋白3（▲）、及融合蛋白5（■）在BALB/3T3細胞之PDGF依賴性生長上的抑制效果。OD₄₉₀讀數係對測試樣品濃度作圖。

【實施方式】

【0049】 在先前技術及整篇說明書中引用或闡述了許多出版品、文章、及專利；此等文獻之全文係各自併於此處以供參考。包括在本發明說明書中之文件、技術、材料、裝置、文章或諸如此類之討論係為了提供本發明之內容。此等討論並非承認任意或所有這些材料成為任何所揭露或請求之發明的先前技術。

【0050】 除非另外定義，此處所用之所有技術及科學術語係具有與本發明所屬技術領域中一般知識者通常所了解之相同意義。否則，此處所用之該等術語具有如本發明說明書所定之意義。本文所引用之所有專利、已公開專利申請案、及出版品係併於此處以供參考如全文闡述於此。須注意除非內

文另外明確指出，否則本文及後述申請專利範圍所用之單數型式之「一」、「該」係包括複數型式。

【0051】 本發明係關於一種融合蛋白，其係包含 (a) 第一胜肽，該第一胜肽係包含VEGF受體之胞外配體結合域，(b) 抗體之Fc區，以及 (c) 第二胜肽，該第二胜肽係包含PDGF受體之胞外配體結合域；其中，該融合蛋白從N端至C端係依選自由以下所組成之群組的次序排列：(a)-(b)-(c) 及 (c)-(b)-(a)；以及其中，該融合蛋白可以結合至VEGF-A及PDGF-BB 以及抑制VEGFR1、VEGFR2之活性及PDGFR之活性。

【0052】 在本發明過程中驚訝地發現，VEGF及PDGF受體之胞外配體結合域相對於在融合蛋白中其他組分（例如，抗體Fc區）的定位（orientation），會影響融合蛋白對VEGF及PDGF配體之結合親合力。根據本發明一實施態樣之融合蛋白，該融合蛋白對該二種配體皆具有最適親合力，且可增加該融合蛋白之效果。

【0053】 如本文所用，詞語「融合蛋白」意指具有二或更多共價連接在一起之部分的蛋白，其中該各部分係衍生自不同蛋白。

【0054】 如本文所用，術語「VEGF」意指調控VEGF訊息路徑之任意血管內皮生長因子蛋白。因此術語VEGF可意指VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、PlGF、或其同功體。

【0055】 如本文所用，術語「VEGF受體」及「VEGFR」意指結合至VEGF配體之任意受體。因此，術語VEGF受體可意指VEGFR1、VEGFR2、或VEGFR3。

【0056】 如本文所用，詞語「胞外配體結合域」意指位於細胞外側且可結合至其配體之受體蛋白的任意區。

【0057】 因此，存在本發明融合蛋白中的VEGF受體之胞外配體結合

域可來自任意VEGFR，包括，但不限於，VEGFR1、VEGFR2、及VEGFR3。VEGFR蛋白的七個胞外類免疫球蛋白結構域從胞外區之N端至C端係編號為1、2、3、4、5、6、及7，且作為另一選擇可稱為D1、D2、D3、D4、D5、D6、及D7。存在本發明融合蛋白中的VEGFR之胞外配體結合域，可包含來自一或多種任意VEGFR蛋白之胞外配體結合域的七個類免疫球蛋白結構域中之任意一或多者。舉例而言，存在本發明融合蛋白中的VEGF受體之胞外配體結合域可係來自VEGFR1、VEGFR2、或VEGFR3中之一或多者的一或多個D1、D2、D3、D4、D5、D6、或D7。

【0058】 在一較佳實施態樣中，存在本發明融合蛋白中的VEGF受體之胞外配體結合域係包含VEGFR1之類免疫球蛋白結構域D2、及VEGFR2之類免疫球蛋白結構域D3。較佳地，VEGFR之胞外配體結合域係包含可增加其結合至VEGF的一或多個突變。在一更佳實施態樣中，存在本發明融合蛋白中的VEGF受體之胞外配體結合域係包含與SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性之胺基酸序列。在一甚至更佳之實施態樣中，存在本發明融合蛋白中的VEGF受體之胞外配體結合域係包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO:10。

【0059】 存在本發明融合蛋白中的VEGF受體之胞外配體結合域可來自任意動物，例如人類或其他適合之哺乳類（例如小鼠、兔子、大鼠、豬、狗、或靈長動物）。在一較佳實施態樣中，VEGFR係來自人類。

【0060】 如本文所用，術語「PDGF」意指調控PDGF訊息路徑之任意血漿衍生（plasma-derived）生長因子蛋白。因此，術語PDGF可意指PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、或PDGF-D。

【0061】 如本文所用，術語「PDGF受體」及「PDGFR」意指結合至PDGF配體之任意受體。

【0062】 存在本發明融合蛋白中的PDGF受體之胞外配體結合域可來自任意PDGFR，包括，但不限於，PDGFR- α 及PDGFR- β 。PDGFR蛋白的五個胞外類免疫球蛋白結構域從胞外區之N端至C端係編號為1、2、3、4、及5，且作為另一選擇可稱為D1、D2、D3、D4、及D5。存在本發明融合蛋白中的PDGFR之胞外配體結合域，可包含來自一或多種任意PDGFR蛋白之胞外配體結合域的五個類免疫球蛋白結構域中之任意一或多者。舉例而言，存在本發明融合蛋白中的PDGF受體之胞外配體結合域可係來自PDGFR- α 或PDGFR- β 中之一或多者的一或多個D1、D2、D3、D4、或D5。

【0063】 在一較佳實施態樣中，存在該融合蛋白中的PDGF受體之胞外配體結合域係包含PDGFR β 之類免疫球蛋白結構域D1至D3。較佳地，PDGFR之胞外配體結合域係包含增加其結合至PDGF的一或多個突變。在一更佳實施態樣中，存在該融合蛋白中的PDGF受體之胞外配體結合域係包含與SEQ ID NO: 2具有至少90%同一性之胺基酸序列。在一甚至更佳之實施態樣中，存在該融合蛋白中的PDGF受體之胞外配體結合域係包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 2及SEQ ID NO: 5。

【0064】 存在本發明融合蛋白中的PDGF受體之胞外配體結合域可來自任意動物，例如人類或其他適合之哺乳類（例如小鼠、兔子、大鼠、豬、狗、或靈長動物）。在一較佳實施態樣中，PDGFR係來自人類。

【0065】 如本文所用，術語抗體之「Fc區」，根據抗體分類意指由二條包含二或三個不變域（constant domain）之重鏈所組成的抗體之「可結晶片段（fragment, crystallizable）」區。該術語係用以定義含有至少一部分之不變區之免疫球蛋白重鏈的C端區。該術語包括天然及變異Fc區二者。抗體之Fc區可作為多聚域，其係促進次單元結合成多聚體（例如，二聚體、三聚體、四聚體等）之域。較佳地，Fc區係包含促進次單元結合成多聚體的一或多個突

變。

【0066】 存在本發明融合蛋白中的抗體之Fc區可來自任意同功體(例如，IgG、IgM、IgA、IgD、或IgE)、任意次型(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2等)、任意異型、或任意工程突變型(例如，凸凹(knob and hole) Fc片段)。在一較佳實施態樣中，存在本發明融合蛋白中的抗體之Fc區係包含IgG1之CH2及CH3區。在一更佳實施態樣中，存在本發明融合蛋白中的抗體之Fc區係包含與SEQ ID NO: 12具有至少90%同一性之胺基酸序列。在一甚至更佳實施態樣中，存在本發明融合蛋白中的抗體之Fc區係包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 12及SEQ ID NO: 15。

【0067】 存在本發明融合蛋白中的抗體之Fc區可來自任意動物，例如人類或其他適合之哺乳類(例如小鼠、兔子、大鼠、豬、狗、或靈長動物)。在一較佳實施態樣中，Fc區係來自人類抗體。

【0068】 根據本發明之實施態樣，融合蛋白之組分可藉由連接部分(linking moiety)連接，例如胜肽連接子(peptide linker)。較佳地，連接子增加融合蛋白組分之撓性，幫助確保正確地摺疊，最小化立體阻礙及不會顯著地干擾融合蛋白內各功能性組分之結構。在一些實施態樣中，胜肽連接子係包含2至20個胺基酸。在一些實施態樣中，胜肽連接子係包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20個胺基酸。較佳地，融合蛋白係包含第一連接胜肽，其係位於該融合蛋白之C端處之第一或第二胜肽與該Fc區之間，以及視需要包含第二連接胜肽，其係位於該融合蛋白之N端處之第二或第一胜肽與該Fc區之間。在本發明之較佳實施態樣中，該第一連接胜肽係包含一或多種選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26、

SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、及SEQ ID NO: 32，以及該第二連接胜肽係包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列。

【0069】 根據本發明之實施態樣，融合蛋白更包含連接至該融合蛋白之N端的訊息胜肽，以確保融合蛋白自細胞中分泌。可以使用任意被宿主細胞所辨識及處理之訊息胜肽。在較佳實施態樣中，該訊息胜肽係包括，但不限於，SEQ ID NO: 34或SEQ ID NO: 36之胺基酸序列。

【0070】 在一較佳實施態樣中，本發明融合蛋白係包含與SEQ ID NO: 38具有至少90%同一性、或與SEQ ID NO: 40具有至少90%同一性之胺基酸序列，較佳地，與SEQ ID NO: 42之胺基酸20至766、SEQ ID NO: 44之胺基酸21至769、或SEQ ID NO: 50之胺基酸20至768具有至少90%同一性。融合蛋白在VEGF受體域及／或PDGF受體域中，可包括一或多個突變或單核苷酸多型性（single nucleotide polymorphism，SNP）。根據本發明實施態樣，其亦可包括發生在抗體之Fc區的一或多個突變或SNP。

【0071】 在一更佳實施態樣中，本發明融合蛋白係包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 42之胺基酸20-766、SEQ ID NO: 44之胺基酸21-769、及SEQ ID NO: 50之胺基酸20-768。

【0072】 在一普遍方面中，本發明融合蛋白結合至VEGF及PDGF並抑制VEGF受體及PDGF受體之活性。如本文所用，術語「結合至」意指受體蛋白之胞外域結合至配體，其造成配體活性的抑制、阻斷、中和、降低、廢除或干擾中之一或多種。在某些實施態樣中，VEGF受體蛋白或PDGF受體蛋白之胞外域係藉由分別結合至配體（即，VEGF或PDGF）來抑制配體活性，並將配體隔離使其不能結合至其他分子，例如其他VEGF受體及PDGF受體。在某些其他實施態樣中，VEGF受體蛋白或PDGF受體蛋白之胞外域

藉由分別結合至配體（即，VEGF或PDGF）來抑制配體活性，並預防該配體在細胞中誘發下游訊息事件。

【0073】 如本文所用，術語「抑制」在如本文所用之配體活性之上下文中，意指受體蛋白之胞外域降低配體活性之性質，如藉由多種功能性檢定所分析，包括，但不限於，結合檢定、細胞生長檢定、競爭性結合檢定、及體內檢定。

【0074】 本文所揭露之融合蛋白或融合蛋白之組分可以生物活性加以表徵（characterized）或評估，該生物活性包括，但不限於，對目標結合伴侶（例如，PDGF及／或VEGF家族蛋白）之親合力、競爭性結合（例如，阻斷PDGF或VEGF結合至PDGFR或VEGFR）、抑制性活性（例如，抑制PDGF或VEGF訊息路徑之活化）、抑制細胞增生、抑制腫瘤生長、及抑制血管生成（例如，抑制脈絡膜血管新生）。在一些實施態樣中，本文所揭露之融合蛋白或融合蛋白之組分可以體內或體外生物活性評估。

【0075】 本發明亦提供編碼融合蛋白之分離核酸分子，該融合蛋白係包含：（a）第一胜肽，該第一胜肽係包含VEGF受體之胞外配體結合域，（b）抗體之Fc區，以及（c）第二胜肽，該第二胜肽係包含PDGF受體之胞外配體結合域；其中，該融合蛋白從N端至C端係依選自由以下所組成之群組的次序排列：（a）-（b）-（c）及（c）-（b）-（a）。根據本發明之實施態樣，編碼融合蛋白之核酸分子可為一優化的密碼子，其可在特定型態之宿主細胞（例如，中國倉鼠卵巢細胞（Chinese hamster ovary cell））中表現。根據本發明之較佳實施態樣，編碼融合蛋白之核酸分子係包含選自由以下所組成之群組的核苷酸序列：SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43、及SEQ ID NO: 49。

【0076】 根據本發明之其他實施態樣，編碼融合蛋白之核酸分子可在

表現載體中。表現載體包括，但不限於，用於重組蛋白表現之載體、及用於遞送核酸進入個體以在該個體之組織內表現的載體（例如，病毒載體）。適合用於本發明之病毒載體的例子包括，但不限於，腺病毒載體、腺相關病毒載體、慢病毒載體等。載體亦可係非病毒載體，非病毒載體的例子包括，但不限於，質體、細菌人工染色體、酵母菌人工染色體、噬菌體等。載體可包括任意元件以建立表現載體之習用功能，例如，啟動子、核醣體結合元件、終止子、強化子、選擇標記、或複製起點。

【0077】 根據本發明之其他實施態樣，鑒於現呈揭露內容，可使用本技術領域已知之方法，對編碼融合蛋白之核酸分子進行密碼子優化，以改善所需宿主細胞中重組體之表現。

【0078】 本發明亦提供一種宿主細胞，其係包含編碼融合蛋白之核酸分子，該融合蛋白係包含（a）第一胜肽，該第一胜肽係包含VEGF受體之胞外配體結合域，（b）抗體之Fc區，以及（c）第二胜肽，該第二胜肽係包含PDGF受體之胞外配體結合域；其中，該融合蛋白從N端至C端係依選自由以下所組成之群組的次序排列：（a）-（b）-（c）及（c）-（b）-（a）。宿主細胞包括，但不限於，用於重組蛋白表現之宿主細胞、及用於遞送核酸進入個體以在該個體之組織內表現的宿主細胞。適合用於本發明之宿主細胞的例子包括，但不限於，中國倉鼠卵巢（Chinese hamster ovary，CHO）細胞、人類胚胎腎293（Human Embryonic Kidney 293，HEK-293）等。

【0079】 本發明亦提供一種用於製造融合蛋白之方法，該融合蛋白包含（a）第一胜肽，該第一胜肽係包含VEGF受體之胞外配體結合域，（b）抗體之Fc區，以及（c）第二胜肽，該第二胜肽係包含PDGF受體之胞外配體結合域；其中，該融合蛋白從N端至C端係依選自由以下所組成之群組的次序排列：（a）-（b）-（c）及（c）-（b）-（a）。在一普遍方面中，該方法包含

(1) 在製造該融合蛋白之條件下培養宿主細胞，其係包含編碼該融合蛋白的核酸分子；以及(2) 回收該宿主細胞所製造之融合蛋白。可更使用本技術領域已知之方法純化該融合蛋白。

【0080】 在一些實施態樣中，融合蛋白係在宿主細胞中表現，並使用一或多種標準純化技術的組合自其中純化，該標準純化技術包括，但不限於，蛋白A親合性層析、蛋白G親合性層析、緩衝液置換、尺寸排除層析、超過濾、及透析。

【0081】 本發明亦提供一種包含融合蛋白之醫藥組合物，該融合蛋白係包含(a)第一胜肽，該第一胜肽係包含VEGF受體之胞外配體結合域，(b) 抗體之Fc區，以及(c) 第二胜肽，該第二胜肽係包含PDGF受體之胞外配體結合域；其中，該融合蛋白從N端至C端係依選自由以下所組成之群組的次序排列：(a) - (b) - (c) 及 (c) - (b) - (a)。本發明組合物包含治療有效量之融合蛋白。

【0082】 術語「治療有效量」意指治療活性化合物引出所需之生物或臨床效果所需要之量。根據本發明之實施態樣，「治療有效量」係對有利影響或所需結果(包括臨床結果)而言足夠之量。治療有效量可在一或多次投予中投予。依照疾病狀態，有效量係足夠改善、穩定、或延緩疾病發展的量。根據本發明之特定實施態樣，治療有效量係治療或預防特徵係不正常血管生成之病症(例如特徵係血管滲透性、水腫、發炎、視網膜病變、纖維化或癌症之疾病)所需之融合蛋白量。

【0083】 在一些實施態樣中，包含融合蛋白之醫藥組合物係包含在緩衝液中調配的融合蛋白，其蛋白質濃度自約0.5至約100毫克/毫升，較佳約40至約80毫克/毫升，例如約40、50、60、70或80毫克/毫升，最佳係約40±約5毫克/毫升。在其他較佳實施態樣中，融合蛋白係以高於約40毫克/毫

升之蛋白濃度在緩衝液中調配，較佳約80±約10毫克／毫升。

【0084】 在具體實施態樣中，緩衝液係具有約6.5至8、更佳約7至7.5、甚至更佳約7.2之pH值的磷酸鹽緩衝液。該磷酸鹽緩衝液係包含約5至20 mM之磷酸鈉，例如5、10、15、或20 mM之磷酸鈉，更佳係約10 mM之磷酸鈉；約20至60 mM之氯化鈉，更佳係約40 mM之氯化鈉；約1至10%重量／體積之蔗糖，更佳係約5%重量／體積之蔗糖；以及約0.01至0.05%重量／體積之界面活性劑，更佳係約0.03%重量／體積之聚山梨醇酯20。

【0085】 在其他具體實施態樣中，緩衝液係具有約5至8、更佳約6至7、最佳約6.8之pH值的組胺酸緩衝液。該組胺酸緩衝液係包含約10至50 mM之組胺酸，例如10、20、30、40、或50 mM之組胺酸，更佳係約25 mM之組胺酸；約10至30 mM之氯化鈉，例如10、20、或30 mM之氯化鈉，更佳係約20 mM之氯化鈉；約1至10%重量／體積之蔗糖，例如1、2、4、6、8、或10%重量／體積之蔗糖，更佳係約6%重量／體積之蔗糖；以及約0.01至0.05%重量／體積之界面活性劑，更佳係約0.03%重量／體積之聚山梨醇酯20。

【0086】 本發明亦提供包含一種編碼融合蛋白之核酸分子的組合物，該融合蛋白係包含(a)第一胜肽，該第一胜肽係包含VEGF受體之胞外配體結合域，(b)抗體之Fc區，以及(c)第二胜肽，該第二胜肽係包含PDGF受體之胞外配體結合域；其中，該融合蛋白從N端至C端係依選自由以下所組成之群組的次序排列：(a) - (b) - (c)及(c) - (b) - (a)，較佳係依(c) - (b) - (a)之次序。

【0087】 包含編碼本發明融合蛋白之核酸分子的組合物，可包含用於引導核酸分子進入細胞以表現該融合蛋白的遞送媒介物(delivery vehicle)。核酸遞送媒介物之例子包括脂質體、生物可相容聚合物(包括天然聚合物及合成聚合物)、脂蛋白、多胜肽、多醣、脂多醣、人工病毒套膜、金屬顆粒、

及細菌、病毒（例如，桿狀病毒、腺病毒、及反轉錄病毒）、噬菌體、黏質體（cosmid）、質體、真菌載體、及其他常用於本技術領域之重組媒介物，該等媒介物係已被描述用於在多種真核宿主中表現。

【0088】 本發明亦係關於本文所述之醫藥組合物在治療或預防特徵係不正常血管生成之症狀、疾病或病症（例如特徵係血管新生、血管滲透性、水腫、發炎、視網膜病變、纖維化或癌症之疾病）中的用途。根據本發明之實施態樣，用於在一個體中治療特徵係不正常血管生成之症狀、疾病或病症的方法係包含，對該有需要治療之個體投予本發明醫藥組合物。本文所述之任意醫藥組合物可使用在本發明之方法中，包括包含融合蛋白之醫藥組合物、或包含編碼該融合蛋白之核酸的醫藥組合物。較佳地，本發明醫藥組合物係透過玻璃體、結膜、坦諾囊（tenon）、眼後、或鞏膜（用於眼科相關疾病）及進入血液或組織（用於系統性疾病）來投予至個體。

【0089】 如本文所用，「個體」意指將被或已被根據本發明施實態樣之方法治療的任意動物，較佳係哺乳類，最佳係人類。如本文所用，術語「哺乳類」包括任意哺乳類。哺乳類的例子包括，但不限於，牛、馬、羊、豬、貓、狗、小鼠、大鼠、兔子、天竺鼠、非人類靈長類（non-human primates, NHP）（例如猴子或人猿）、人類等，更佳係人類。

【0090】 如本文所用，「特徵係不正常血管生成之症狀、疾病或病症」或「血管生成型病症」應具有相同意義，並意指任意有關不正常血管製造之病症，包括過量、不足、或不正常血管生成。可根據本發明方法治療之血管生成型病症的例子包括，但不限於，特徵係血管新生、血管滲透性、水腫、或發炎之疾病。這些包括，但不限於，眼部發炎及／或眼部血管生成，其包括老年性黃斑退化（例如濕性AMD、乾性AMD、或地圖樣萎縮）、增生性及非增生性糖尿病視網膜病變、特徵係血管新生之眼部疾病（例如，角膜血管

新生、或脈絡膜血管新生)、眼色素層炎(例如前眼色素層炎或後眼色素層炎)、色素性視網膜炎、糖尿病視網膜病變、虹膜發紅、血管新生性青光眼、發炎性疾病、類風溼性關節炎、炎症性關節炎、骨關節炎、自體免疫性疾病、及癌症。在本發明之較佳實施態樣中，欲治療之血管生成型病症係視網膜病變、纖維化、或癌症。

【0091】 在其他實施態樣中，可根據本發明方法治療之血管生成型病症包括，但不限於，腦水腫、中風、牛皮癬、氣喘、燒傷相關之全身性水腫、腫瘤相關之腹水及胸膜積水、發炎或創傷、慢性呼吸道發炎、微血管漏洩症候群、敗血症、蛋白質漏洩增加相關之腎臟疾病。

【0092】 如本文所用，術語「治療」意指對個體投予組合物，以在該個體內達到所需治療或臨床結果。在一實施態樣中，術語「治療」意指投予本發明醫藥組合物以降低、緩和或減慢血管生成型病症(例如血管滲透性、水腫、或發炎)之進程或發展。在又另一實施態樣中，術語「治療」意指投予本發明醫藥組合物以抑制或降低角膜血管新生及/或眼中漏洩性血管分佈。在又另一實施態樣中，術語「治療」意指投予本發明醫藥組合物以減緩角膜或有興趣之點中新血管之進程或發展(即，角膜血管新生)。在本發明之具體實施態樣中，當有關AMD之使用時，術語「治療」意指預防或降低VEGF所誘導之視網膜漏洩，及預防或降低與血管生成有關之眼部結疤及纖維化。在本發明之具體實施態樣中，當有關癌症之使用時，術語「治療」意指降低癌細胞之增生、去分化、或散布。根據本發明治療腫瘤係包括降低腫瘤尺寸、降低腫瘤生長、及降低腫瘤遷移。如本文所用，術語「腫瘤」意指不正常組織團塊，並包括良性及惡性團塊兩者。

【0093】 根據本發明實施態樣，鑒於現呈揭露內容，醫藥組合物可藉由熟習此項技術者所知之任意方法投予，例如藉由局部投予、玻璃體內注

射、脈絡膜上或結膜下注射。在一較佳實施態樣中，該眼部調配物係經玻璃體內投予。醫藥組合物可投予至眼睛之任何部位，且對治療血管生成型病症而言較佳係投予至眼睛之玻璃體。醫藥組合物可投予至身體的任意部位，且對治療血管生成型病症而言較佳係投予至血液或組織／器官。

【0094】 根據本發明實施態樣投予醫藥組合物至個體的參數，例如劑量、投予頻率、及投予長度，並不被任意具體方式所限制。該等參數之最適值可依據數種因子，例如欲治療之個體、欲治療之具體血管生成型疾病、疾病之嚴重性等，且本技術領域中具通常知識者將可決定該等參數之最適值，以達到所需之治療或臨床結果。舉例而言，醫藥組合物可係一天投予一次、或一天投予多次（例如，兩次、三次、四次等）。一示例性及非限制性給藥方案係包含在一個月的期間中經玻璃體內投予一次醫藥組合物。

【0095】 在其他實施態樣中，本發明可係與其他抗血管生成藥劑（例如抗肝細胞生長因子(hepatocyte growth factor, HGF)、抗HGF受體(HGFR)、抗纖維母細胞生長因子(fibroblast growth factor, FGF)、抗FGF受體(FGFR)、抗發炎（皮質類固醇、非類固醇抗發炎藥物）、免疫調節劑、抗生素、及抗癌藥劑）共同投予。

【0096】 在一普遍方面，本發明提供對PDGF及VEGF之二聚體拮抗劑，其係包含本發明融合蛋白。在二聚體中之各融合蛋白係包含本文所揭露之任意融合蛋白。在一實施態樣中，該二聚體融合蛋白係包含二相同之本發明融合蛋白。在另一實施態樣中，該二聚體融合蛋白係包含二不同之本發明融合蛋白。在另一實施態樣中，該二聚體融合蛋白係包含至少一融合蛋白，該融合蛋白包含選自由以下所組成之群組之胺基酸序列：SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 42之胺基酸20-766、SEQ ID NO: 44之胺基酸21-769、及SEQ ID NO: 50之胺基酸20-768，或包含與選自由以下所組成之

群組的胺基酸序列具有至少90%序列同一性之胺基酸序列：SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 42之胺基酸20-766、SEQ ID NO: 44之胺基酸21-769、或SEQ ID NO: 50之胺基酸20-768。

【0097】 在另一普遍方面中，本發明提供一種蛋白共軛體，其係包含結合至選自由以下所組成之群組中之至少一配體的本發明融合蛋白：PDGF及VEGF。

實施態樣

【0098】 實施態樣1係一種融合蛋白，其係包含(a)第一胜肽，該第一胜肽係包含VEGF受體之胞外配體結合域，(b)抗體之Fc區，以及(c)第二胜肽，該第二胜肽係包含PDGF受體之胞外配體結合域；其中，該融合蛋白從N端至C端係依選自由以下所組成之群組的次序排列：(a) - (b) - (c)及(c) - (b) - (a)；以及其中，該融合蛋白係可以結合至VEGF及PDGF以及抑制VEGF之活性及PDGF之活性。

【0099】 實施態樣2係一種根據實施態樣1之融合蛋白，其中該VEGF受體之胞外配體結合域可以結合至VEGF配體，及包含一或多個選自由以下所組成之群組的類免疫球蛋白結構域：VEGF受體之類免疫球蛋白結構域D1至D7。

【0100】 實施態樣3係一種根據實施態樣1之融合蛋白，其中該PDGF受體之胞外配體結合域可以結合至PDGF配體，及包含一或多個選自由以下所組成之群組的類免疫球蛋白結構域：PDGF受體之類免疫球蛋白結構域D1至D5。

【0101】 實施態樣4係一種根據實施態樣1之融合蛋白，其中(a) VEGF受體之胞外配體結合域係包含第一VEGFR(較佳係VEGFR1)之類免疫球蛋白結構域D2、及第二VEGFR(較佳係VEGFR2)之類免疫球蛋白結

構域D3；(b) 抗體之Fc區係包含IgG1之CH2及CH3區；及(c) PDGF受體之胞外配體結合域係包含PDGFR(較佳係PDGFR β)之類免疫球蛋白結構域D1至D3。

【0102】 實施態樣5係一種根據實施態樣4之融合蛋白，其中(a) VEGF受體之胞外配體結合域係包含與SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性之胺基酸序列；(b) 抗體之Fc區係包含與SEQ ID NO: 12具有至少90%同一性之胺基酸序列；以及(c) PDGF受體之胞外配體結合域係包含與SEQ ID NO: 2具有至少90%同一性之胺基酸序列。

【0103】 實施態樣6係一種根據實施態樣5之融合蛋白，其中(a) VEGF受體之胞外配體結合域係包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO:10；(b) 抗體之Fc區係包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 12及SEQ ID NO:15；以及(c) PDGF受體之胞外配體結合域係包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 2及SEQ ID NO:5。

【0104】 實施態樣7係一種根據實施態樣1至6中任一者之融合蛋白，其更包含第一連接胜肽，其係位於該融合蛋白之C端處之第一或第二胜肽與該Fc區之間，以及視需要包含第二連接胜肽，其係位於該融合蛋白之N端處之第二或第一胜肽與該Fc區之間。

【0105】 實施態樣8係一種根據實施態樣7之融合蛋白，其中該第一連接胜肽係包含一或多種選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、及SEQ ID NO: 32，以及該第二連接胜肽係包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列。

【0106】 實施態樣9係一種根據實施態樣1至8之融合蛋白，其中該融

合蛋白更包含連接至該融合蛋白之N端的訊息胜肽。

【0107】 實施態樣10係一種根據實施態樣9之融合蛋白，其中該訊息胜肽係包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 34及SEQ ID NO: 36。

【0108】 實施態樣11係一種根據實施態樣1至10中任一者之融合蛋白，其中該融合蛋白從N端至C端係依(c) - (b) - (a)之次序排列。

【0109】 實施態樣12係一種融合蛋白，其係包含與SEQ ID NO: 38或SEQ ID NO: 40具有至少90%同一性之胺基酸序列，或與SEQ ID NO: 42之胺基酸20-766、SEQ ID NO: 44之胺基酸21-769、或SEQ ID NO: 50之胺基酸20-768具有至少90%同一性之胺基酸序列。

【0110】 實施態樣13係一種根據實施態樣12之融合蛋白，其係包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 42之胺基酸20-766、SEQ ID NO: 44之胺基酸21-769、及SEQ ID NO: 50之胺基酸20-768。

【0111】 實施態樣14係一種編碼如實施態樣1至13中任一者之融合蛋白的分離核酸分子。

【0112】 實施態樣15係一種根據實施態樣14之分離核酸分子，其中該融合蛋白更包含連接至該融合蛋白之N端的訊息胜肽。

【0113】 實施態樣16係一種根據實施態樣15之分離核酸分子，其中該訊息胜肽係包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 34及SEQ ID NO: 36。

【0114】 實施態樣17係一種根據實施態樣14至16中任一者之分離核酸分子，其中該核酸分子係包含選自由以下所組成之群組的核苷酸序列：SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43、及SEQ

ID NO: 49。

【0115】 實施態樣18係一種表現載體，其係包含編碼如實施態樣1至13中任一者之融合蛋白的核酸分子。

【0116】 實施態樣19係一種根據實施態樣18之表現載體，其中該核酸分子係包含選自由以下所組成之群組的核苷酸序列：SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43、及SEQ ID NO: 49。

【0117】 實施態樣20係一種宿主細胞，其係包含編碼如實施態樣1至13中任一者之融合蛋白的核酸分子。

【0118】 實施態樣21係一種用於製造如實施態樣1至13中任一者之融合蛋白的方法，其係包含：(1) 在製造該融合蛋白之條件下培養宿主細胞，其係包含編碼如實施態樣1至13中任一者之融合蛋白的核酸分子；以及(2) 回收該宿主細胞所製造之融合蛋白。

【0119】 實施態樣22係一種醫藥組合物，其係包含如實施態樣1至13中任一者之融合蛋白、及醫藥上可接受之載體。

【0120】 實施態樣23係一種根據實施態樣22之醫藥組合物，其中該組合物係包含40至80毫克/毫升之在緩衝液中調配的融合蛋白，該緩衝液係包含5至100 mM之組胺酸、約1至10%重量/體積之蔗糖、及約0.005至0.1%重量/體積之聚山梨醇酯20，pH值約6.3至7.3。

【0121】 實施態樣24係一種醫藥組合物，其係包含編碼如實施態樣1至13中任一者之融合蛋白的核酸分子、及醫藥上可接受之載體，例如脂質載體（例如，Lipofectamine）、化學物質（例如，聚乙烯亞胺）、或電穿孔緩衝液。

【0122】 實施態樣25係一種根據實施態樣24之醫藥組合物，其中該組合物係包含具有表現卡匣（expression cassette）之質體、及醫藥上可接受之

載體，例如脂質載體（例如，Lipofectamine）、化學物質（例如，聚乙烯亞胺）、或電穿孔緩衝液。

【0123】 實施態樣26係一種治療或預防臨床症狀的方法，該臨床症狀係選自由以下所組成之群組：血管新生、血管滲透性、水腫、及發炎，該方法係包含對有需要之個體投予有效量之如實施態樣1至13中任一者之融合蛋白、或如實施態樣22至25中任一者之醫藥組合物。

【0124】 實施態樣27係實施態樣26之方法，其中在實施態樣22至23中任一者之醫藥組合物中，該融合蛋白係作為分離蛋白來投予。

【0125】 實施態樣28係實施態樣26之方法，其中該融合蛋白係在實施態樣24及25中任一者之醫藥組合物中投予。

【0126】 實施態樣29係實施態樣26至28中任一者之方法，其中該臨床症狀係選自由以下所組成之群組：腦水腫、中風、癌症、牛皮癬、關節炎、氣喘、燒傷相關之全身性水腫、腫瘤相關之腹水及胸膜積水、發炎或創傷、慢性呼吸道發炎、微血管漏洩症候群、敗血症、蛋白質漏洩增加相關之腎臟疾病、眼部發炎及／或眼部血管生成，其係包括老年性黃斑退化、糖尿病視網膜病變、眼色素層炎、及角膜血管新生。

【0127】 實施態樣30係一種治療或預防臨床症狀的方法，該臨床症狀係選自由以下所組成之群組：脈絡膜血管新生（CNV）、濕性老年性黃斑退化（AMD）、及地圖樣萎縮，該方法係包含對有需要之個體投予有效量之如實施態樣1至13中任一者之融合蛋白、或如實施態樣22至25中任一者之醫藥組合物。

【0128】 實施態樣31係實施態樣30之方法，其中在實施態樣22至23中任一者之醫藥組合物中，該融合蛋白係作為分離蛋白來投予。

【0129】 實施態樣32係實施態樣30之方法，其中該融合蛋白係在實施

態樣24及25中任一者之醫藥組合物中投予。

【0130】 實施態樣33係一種對PDGF及VEGF之二聚體拮抗劑，其係包含如實施態樣1至13中任一者之融合蛋白。

【0131】 實施態樣34係一種蛋白共軛體，其係包含如實施態樣1至13中任一者之結合至選自由以下所組成之群組中之至少一配體的融合蛋白：PDGF及VEGF。

實施例

【0132】 以下本發明之實施例係為進一步說明本發明之本質。應了解以下實施例並非用以限制本發明，且本發明之保護範圍係由後附申請專利範圍來界定。

【0133】 實施例1-融合蛋白之產生、表現、純化及分析

【0134】 PDGFR胞外類免疫球蛋白結構域 (PID) (SEQ ID NO:2) (Heidaran等人, FASEB J. 1995 Jan; 9(1):140-5; Lokker等人, J Biol Chem. 1997 Dec 26; 272(52):33037-44) 及VEGFR胞外類免疫球蛋白結構域 (VID) (SEQ ID NO:7), 係併入融合蛋白中, 其中該PDGFR胞外類免疫球蛋白結構域係具有PDGFR β 之類免疫球蛋白結構域D1至D3, 該VEGFR胞外類免疫球蛋白結構域係具有VEGFR-1之類免疫球蛋白結構域D2 (VEGFR-1_D2) 及VEGFR-2之類免疫球蛋白結構域D3 (VEGFR-2_D3) (Holash, J.等人, PNAS, 2002, 99 (17): 11393 – 98)。短的撓性胜肽連接子GGGGGS (SEQ ID NO: 20) 係放置在Fc區 (SEQ ID NO:12) 之C端及N端模組 (PID或VID) 之間, 以確保正確地摺疊及最小化立體阻礙。訊息胜肽 (例如, SEQ ID NO: 34或SEQ ID NO: 36) 係包括在內以確保所製造之融合蛋白2或融合蛋白1被分泌。將人類IgG1之Fc區併入以使融合蛋白二聚化, 模仿體內受體二聚化, 並使該表現之融合蛋白可輕易純化。

【0135】 融合蛋白1及2之編碼序列分別具有SEQ ID NO: 38及SEQ ID NO: 40之胺基酸序列，其係被轉染進人類胚胎腎細胞株（HEK293F）中，並在其中表現。使用一步驟蛋白G層析（one-step Protein G chromatography）自細胞培養上清液中純化分泌之融合蛋白。該蛋白係藉由蛋白G親合性管柱（賽默飛世爾科技）捕捉，以低pH值（3.5）緩衝液洗提，並以三（羥甲基）胺基甲烷-鹽酸（Tris-HCl）中和。如第2A至2C圖所示，使用單一步驟純化方法可達到大於90%之純度。第2A至2C圖亦顯示，經純化融合蛋白1、2、3、及5具有預測之重量（分子量~180千道爾頓），及當在哺乳類細胞中表現時恰當地二聚化。

【0136】 在發展之過程中，融合蛋白1之編碼序列SEQ ID NO: 37係併入表現載體中。經純化融合蛋白1對PDGF之競爭性結合檢定、及融合蛋白1之PDGF依賴型BALB/3T3細胞生長抑制檢定的結果表示，在融合蛋白1之結合能力上具有位置效應，例如其以較低之親合力結合PDGF-BB（見，例如，表4及6）。

【0137】 因此，融合蛋白2係藉由重新安排VID及PID之定位來建構。融合蛋白2之編碼序列SEQ ID NO: 39係併入表現載體中。使用合適量之表現載體DNA，以表現載體轉染HEK293F宿主細胞。依據抗Fc ELISA評估之蛋白表現程度來選取一穩定細胞株，且研究細胞庫（research cell bank, RCB）係自具有最適之融合蛋白表現程度的細胞株中產生。融合蛋白2之RCB係用於搖瓶蛋白製造，及使用蛋白A親合性樹脂自培養物上清液中純化該蛋白。該蛋白係使用賦形劑而將緩衝液更換成磷酸鹽緩衝液。經純化融合蛋白2之最終濃度係大約20毫克/毫升。

【0138】 對融合蛋白2進行突變誘發以產生融合蛋白2之變異體，即，融合蛋白3，其係包含位於IgG1 Fc之C端的經刪除離胺酸的殘基（K528）、

及位在融合蛋白2之PID的苯丙胺酸至絲胺酸 (F150S) 突變。2步驟PCR突變誘發方法為，首先刪除離胺酸，然後將苯丙胺酸變為絲胺酸。最終結構係包含SEQ ID NO: 43之編碼序列。使用合適量之表現載體DNA，以表現載體轉染CHO-S宿主細胞。依據抗Fc ELISA評估之蛋白表現程度來選取一第一穩定細胞株。此係用於製造具有SEQ ID NO: 44之21-769胺基酸之胺基酸序列的融合蛋白3 (SEQ ID NO: 44之1-20胺基酸係訊息胜肽序列，其係在蛋白合成過程中被切掉)。藉由FACS偵測單株性 (monoclonality)，以進行一輪之重新選殖 (re-cloning)。依據表現程度選取一第二穩定細胞株，且該細胞株係用以產生融合蛋白4之RCB。該融合蛋白4之RCB係用於搖瓶研究及生物反應器製造兩者。解凍一小瓶之融合蛋白4之RCB，並在1升搖瓶中擴充以製造融合蛋白4，其具有與融合蛋白3一樣之胺基酸序列。使用蛋白A親合性樹脂 (一步驟純化) 製備六批次經純化蛋白。該蛋白係使用賦形劑而將緩衝液更換成組胺酸緩衝液。融合蛋白4之最終濃度係大約20毫克/毫升。

【0139】 為獲得足夠量之融合蛋白4，7升之生物反應器 (bioreactor, BR) 係以約5升之最終工作體積運轉。使用平台操作程序、參數設定、及控制策略，接續使用基質種類及進料列表。最終產物滴定濃度係0.21克/升。

【0140】 該經純化融合蛋白樣品係藉由淨化作用、蛋白A親合力層析、第一超過濾步驟、尺寸排除層析、第二超過濾步驟、透析及第三超過濾步驟來進一步加工，以獲得最終產物。

【0141】 為產生具有SEQ ID NO:50之20-768胺基酸 (SEQ ID NO: 50之1-19胺基酸係訊息胜肽序列，其係在蛋白合成過程中被切掉) 之胺基酸序列的融合蛋白5，編碼融合蛋白5之DNA序列為優化的密碼子，其係在CHO細胞中表現。經密碼子優化之合成DNA具有SEQ ID NO:49之核酸序列，其係選殖入表現載體中。在轉染前72小時，CHO K1宿主細胞係以 2×10^5 個細

胞／毫升接種於CD CHO (Gibco 12490-003) 中，該CD CHO含有4 mM麩醯胺酸 (J.T貝克2078-06) 及1% HT補充液 (Gibco 11067-030)。宿主細胞係培養於Infors震盪培養箱中 (36.5°C、75%濕度、6% CO₂、110 RPM)，並在使用前計數細胞密度。添加適合量之表現質體DNA至宿主細胞內 (1升或5升工作體積)，並添加聚合物基底 (polymer-based) 之轉染劑。轉染之培養物係培養於Infors震盪培養箱中 (36.5°C、75%濕度、6% CO₂、110 RPM) 4小時，並添加專用料液。然後將轉染之培養物培養於Infors震盪培養箱中 (32°C、75%濕度、6% CO₂、110 RPM)。在轉染後第10天收穫轉染之培養物。純化上清液以產生研究材料。純化程序包括：淨化、蛋白A親合力層析、藉由Amicon Ultracel濃縮、尺寸排除層析、藉由Slide-A-Lyzer透析及藉由Amicon Ultracel在調配物緩衝液中獲致最終濃縮物。

【0142】 具有SEQ ID NO: 42之20-766胺基酸的融合蛋白6，其係衍生自刪除首二個胺基酸 (QG) 的融合蛋白5，其中SEQ ID NO: 42之1-19胺基酸係訊息胜肽序列，其係在蛋白合成過程中被切掉。DNA插入片段係使用融合蛋白5表現載體作為模板藉由PCR產生，及具有SEQ ID NO: 41之胺基酸序列的編碼融合蛋白6之DNA序列，其係選殖入表現載體中。培養及純化程序係與融合蛋白5一樣。在指定之調配物緩衝液中，融合蛋白6之最終濃度係大約80毫克／毫升 (依據280奈米之吸光值)。

【0143】 綜合地，這些數據表示具有同時抗VEGF及抗PDGF活性之融合蛋白已被建構、表現、純化及表徵。

【0144】 實施例2：融合蛋白對VEGF₁₆₅之結合親合力

【0145】 使用直接結合酵素免疫檢定法 (ELISA) 以測量本發明融合蛋白對VEGF₁₆₅ (VEGF-A之接合變異體) 之結合親合力。合成之VEGF誘捕劑 (VEGF Trap) 係用來作為正對照組1。

【0146】 VEGF誘捕劑係可溶之VEGF受體，其係設計用於治療用途，最近被FDA批准用來治療AMD。VEGF誘捕劑含有VEGFR1之第二類免疫球蛋白結構域（D2）融合至VEGFR2之第三類免疫球蛋白結構域（D3）融合至人類IgG1之Fc區（Holash, J.，等人Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Aug 20；99(17):11393-8）。VEGF誘捕劑靶向VEGF-A、VEGF-B及PlGF。

【0147】 添加100微升之塗佈溶液（1微克／毫升VEGF₁₆₅在1倍磷酸鹽緩衝生理食鹽水（PBS）中、pH7.2）至96孔ELISA盤之各孔中，且將該盤於4°C下過夜培養。以400微升之1倍PBS緩衝液清洗該些孔二次，並以紙巾小心地移除過量液體。

【0148】 添加400微升之阻斷液（5克脫脂乳在100毫升1倍PBS中）至各孔中，並將該盤於室溫下培養1小時。該些孔係以1倍PBS緩衝液清洗二次。

【0149】 融合蛋白及對照組樣品以阻斷液依序稀釋三倍，最高蛋白濃度係10 mM。添加100微升之系列稀釋樣品至各孔中。將該盤加蓋並於室溫下在盤震盪器（~100 rpm）上培養1小時。以清洗緩衝液（1倍PBS、0.05%聚山梨醇酯20）清洗該些孔三次。

【0150】 添加100微升的山葵過氧化酶共軛之山羊抗人類IgG Fc專一性抗體至各孔中，該抗體係以阻斷液以1：2500稀釋。密封該盤並於室溫下在盤震盪器上培養1小時。以清洗緩衝液清洗該盤三次。

【0151】 添加100微升之3, 5, 3', 5'-四甲基聯苯胺（tetramethylbenzidine, TMB）至各孔中，將該盤培養3至5分鐘以使反應進行。為停止反應，添加100微升之停止液（1N HCl）至各孔中。

【0152】 各孔之光學密度（optical density, OD），係使用ELISA盤讀取器在吸收波長450奈米下測定。該吸光值對融合蛋白或對照組之蛋白濃度作圖，且該濃度係以半最大有效濃度（half the maximal effective

concentration, EC₅₀) 的訊號決定。

【0153】 經測試之本發明融合蛋白的結合親合力，以EC₅₀值表現，係在0.22 nM及0.93 nM之間。ELISA之結果係顯示於表1中。

表1

測試材料	EC ₅₀ (nM)
正對照組 1	0.087
融合蛋白 1 (SEQ ID NO: 38)	0.220
融合蛋白 2 (SEQ ID NO: 40)	0.928
融合蛋白 3 (胺基酸 21-769 SEQ ID NO: 44)	0.477
融合蛋白 4 (胺基酸 21-769 SEQ ID NO: 44)	0.384
融合蛋白 5 (胺基酸 20-768 SEQ ID NO: 50)	0.388

【0154】 來自本實施例之結果顯示根據本發明實施態樣之融合蛋白，例如融合蛋白1至5，以高親合力與VEGF₁₆₅結合。亦可見於第3圖。

【0155】 實施例3-融合蛋白對PDGF之結合親合力

【0156】 使用直接結合ELISA以測量本發明融合蛋白對PDGF之結合親合力。合成之PDGF誘捕劑 (PDGF Trap) 係用來作為正對照組2。

【0157】 PDGF誘捕劑係可溶之PDGF受體，其係設計用於當作正對照組。PDGF誘捕劑含有PDGFRβ之第二類免疫球蛋白結構域 (D1至D3) 融合至人類IgG1之Fc區 (Lu等人, Am J Obstet Gynecol., 2008, 198(4): 477.e1-e10)。PDGF誘捕劑靶向PDGF-BB、PDGF-DD及PDGF-AB。

【0158】 添加100微升之塗佈溶液 (1微克/毫升PDGF-BB在1倍磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (PBS) 中、pH 7.2) 至96-孔ELISA盤之各孔中，並將該盤於4°C下過夜培養。以400微升之1倍PBS緩衝液清洗該些孔二次，並以紙巾小心地移除過量液體。

【0159】 添加400微升之阻斷液 (1克牛血清白蛋白在100毫升1倍PBS

中)至各孔中，並將該盤於室溫下培養1小時。該些孔係以1倍PBS緩衝液清洗二次。

【0160】 融合蛋白及對照組樣品係以阻斷液依序稀釋三倍，最高蛋白濃度係10 mM。添加100微升之系列稀釋樣品至各孔中。將該盤加蓋並於室溫下在盤震盪器 (~100 rpm) 上培養1小時。以清洗緩衝液 (1倍PBS、0.05% 聚山梨醇酯20) 清洗該些孔三次。

【0161】 添加100微升山葵過氧化酶共軛之山羊抗人類IgG Fc專一性抗體至各孔中，該抗體係以阻斷液以1：2500稀釋。密封該盤並於室溫下在盤震盪器上培養1小時。以清洗緩衝液清洗該盤三次。

【0162】 添加100微升之3,5,3',5'-四甲基聯苯胺 (TMB) 至各孔中，將該盤培養3至5分鐘以使反應進行。為停止反應，添加100微升之停止液(1N HCl) 至各孔中。

【0163】 各孔之光學密度 (OD)，係使用ELISA盤讀取器在吸收波長450奈米下測定。該吸光值對融合蛋白或對照組之蛋白濃度作圖，且該濃度係以半最大有效濃度 (EC₅₀) 的訊號決定。

【0164】 經測試之本發明融合蛋白的結合親合力，以EC₅₀值表現，係大約0.16 nM至2.5 nM。ELISA之結果係顯示於表2中。

表2

測試材料	EC ₅₀ (nM)
正對照組 2	1.354
融合蛋白 1	0.160
融合蛋白 2	0.939
融合蛋白 3	2.285
融合蛋白 4	2.538
融合蛋白 5	2.286

【0165】 來自本實施例之結果顯示根據本發明實施態樣之融合蛋白，例如融合蛋白1至5，以高親合力與PDGF結合。亦可見於第4圖。

【0166】 實施例4-融合蛋白對VEGF₁₆₅之競爭性結合

【0167】 使用競爭性結合檢定以評估本發明融合蛋白對VEGF₁₆₅之結合親合力。合成之VEGF誘捕劑係用來作為正對照組1。

【0168】 融合蛋白及對照組樣品以阻斷液依序稀釋三倍，最高蛋白濃度係10 mM。為了最終濃度係5 pM之VEGF-A (R&D系統)，等量之稀釋樣品係與10 pM之VEGF₁₆₅在室溫下過夜培養。

【0169】 添加Quantikine ELISA人類VEGF套組 (R&D系統，有限公司) 之50微升檢定稀釋劑至96-孔盤之各孔中。添加200微升之標準品、對照組、或融合蛋白至相應之孔中，每份兩個平行樣。密封該盤並於室溫下培養2小時，然後以清洗緩衝液清洗三次。

【0170】 添加套組中所提供之200微升VEGF₁₆₅共軛體至各孔中，密封該盤並於室溫下培養2小時。清洗該盤三次。

【0171】 添加套組中所提供之200微升受質溶液至各孔中，密封該盤並於室溫下培養20分鐘。為停止反應，添加套組中所提供之50微升停止液至各孔中。

【0172】 各孔之OD值，係使用ELISA盤讀取器在吸收波長450奈米及540奈米 (或570奈米) 下測定。未結合之VEGF₁₆₅ (游離VEGF₁₆₅) 的濃度對融合蛋白或對照組之蛋白濃度作圖，且該融合蛋白濃度係以游離VEGF₁₆₅的半抑制濃度 (IC₅₀) 訊號決定。

【0173】 本發明融合蛋白之IC₅₀值係測得約3.78 pM至4.67 pM。競爭性結合檢定之結果係顯示於表3中。

表3

測試材料	IC ₅₀ (pM)
正對照組 1	5.173
融合蛋白 1	4.670
融合蛋白 2	3.780
融合蛋白 3	3.775

【0174】 本實施例之結果證實本發明融合蛋白，例如融合蛋白1、2及3，以高親合力與VEGF₁₆₅結合。亦可見於第5A及6A圖。

【0175】 **實施例5-融合蛋白對PDGF-BB之競爭性結合**

【0176】 使用競爭性結合檢定以評估本發明融合蛋白對PDGF-BB之結合親合力。合成之PDGF誘捕劑係用來作為正對照組2。

【0177】 融合蛋白及對照組樣品以阻斷液依序稀釋三倍，最高蛋白濃度係10 mM。等體積之稀釋樣品係與20 pM之PDGF-BB在室溫下過夜培養，使其最終濃度係10 pM。

【0178】 添加來自Quantikine ELISA人類PDGF-BB套組之100微升檢定稀釋劑至96-孔盤之各孔中。100微升之標準品、對照組、或融合蛋白係添加至相應之孔中，每份兩個平行樣。密封該盤並於室溫下培養2小時，然後以清洗緩衝液清洗四次。

【0179】 添加在套組中所提供之200微升PDGF-BB共軛體至各孔中，密封該盤並於室溫下培養1.5小時。清洗該盤四次。

【0180】 添加在套組中所提供之200微升受質溶液至各孔中，密封該盤並於室溫下培養20分鐘。為停止反應，添加套組中所提供之50微升停止液至各孔中。

【0181】 各孔之OD值，係使用ELISA盤讀取器在吸收波長450奈米及540奈米（或570奈米）下測定。未結合之PDGF-BB的濃度係對融合蛋白或

對照組之蛋白濃度作圖，且該融合蛋白濃度係以游離PDGF-BB的半抑制濃度（IC₅₀）訊號決定。

【0182】 本發明融合蛋白之IC₅₀值測得約為0.125 nM至200 nM。競爭性結合檢定之結果係顯示於表4中。

表4

測試材料	IC ₅₀ (nM)
正對照組 2	1.015
融合蛋白 1	200
融合蛋白 2	0.125
融合蛋白 3	1.371

【0183】 本實施例之結果證實本發明融合蛋白，例如融合蛋白2及3，以高親合力與PDGF結合。亦可見於第5B及6B圖。

【0184】 實施例6-藉由融合蛋白抑制HUVEC增生

【0185】 實施人類臍靜脈內皮細胞（HUVEC）增生檢定以測試本發明融合蛋白之功能。合成之VEGF誘捕劑係用來作為正對照組1。

【0186】 添加100微升之塗佈溶液（1%明膠在二次蒸餾水中）至96-孔ELISA盤之各孔中，該盤係於37°C下培養2小時或過夜。孔係以1倍PBS緩衝液清洗二次。

【0187】 添加3500計數之在內皮細胞生長基中的人類臍靜脈內皮細胞至各孔中，並將該盤於37°C下過夜培養。

【0188】 融合蛋白樣品以檢定緩衝液（培養基-199 1倍厄爾鹽（Earle's Salts）、10%胎牛血清、10 mM HEPES、1倍抗生素／抗黴劑）稀釋，其最高蛋白濃度係300 nM。融合蛋白樣品係與VEGF₁₆₅（8奈克／毫升）混合，且該混合物係在室溫下過夜培養。然後該些孔係以200微升之1倍PBS清洗。

【0189】 添加100微升之VEGF₁₆₅／樣品混合物至各孔中，且該盤係在37°C下與5%之CO₂培養72小時。在培養後，添加10微升之MTS偵測試劑（3-（4,5-二甲基噁唑-2-基）-5-（3-羧甲氧苯基）-2-（4-磺苯基）-2H-四唑）+吩嗪硫酸甲酯在蒸餾之PBS中）至各孔中，並將該盤於37°C下培養2.5小時。

【0190】 各孔之OD，係使用ELISA盤讀取器在吸收波長490奈米下測定。吸光值係對融合蛋白或對照組之蛋白濃度作圖，且確定細胞增生被抑制50%時的濃度（IC₅₀）。

【0191】 對經測試之本發明融合蛋白而言，細胞增生之抑制（IC₅₀）係測得於0.058 nM及0.285 nM之間。增生檢定之結果係顯示於表5中。

表5

測試材料	IC ₅₀ (nM)
正對照組 1	0.068
融合蛋白 1	0.058
融合蛋白 2	0.202
融合蛋白 3	0.153
融合蛋白 4	0.285
融合蛋白 5	0.112

【0192】 本實施例之結果顯示本發明融合蛋白，例如融合蛋白1至5，抑制HUVEC細胞之VEGF依賴性生長。亦可見於第7圖。

【0193】 實施例7-藉由融合蛋白抑制BALB／3T3增生

【0194】 使用衍生自BALB小鼠之3T3纖維母細胞來實施細胞增生檢定，以測試本發明融合蛋白之功能。合成之PDGF誘捕劑係用來作為正對照組2。

【0195】 添加4000計數之在DMEM（1 mM丙酮酸鈉、4 mM L-麩醯胺酸、10%牛血清白蛋白、1倍抗生素／抗黴劑）中的小鼠3T3纖維母細胞至各

孔中，且將該盤於37°C下過夜培養。

【0196】 融合蛋白樣品以檢定緩衝液（1 mM丙酮酸鈉、4 mM L-麩醯胺酸、0.5%牛血清白蛋白、1倍抗生素／抗黴劑）稀釋，其最高蛋白濃度係300 nM。融合蛋白樣品係與PDGF（8奈克／毫升）混合，且將該混合物於室溫下過夜培養。然後以200微升之1倍PBS清洗。

【0197】 細胞係以檢定緩衝液在37°C與5%之CO₂下挨餓4小時。添加100微升之PDGF／樣品混合物至各孔中，並將該盤於37°C下與5%之CO₂培養72小時。在培養後，添加10微升之MTS偵測試劑至各孔中，並將該盤於37°C下培養2.5小時。

【0198】 各孔之OD，係使用ELISA盤讀取器在吸收波長490奈米下測定。吸光值係對融合蛋白或對照組之蛋白濃度作圖，且確定細胞增生被抑制50%時的濃度（IC₅₀）。

【0199】 對測試之本發明融合蛋白而言，IC₅₀係經計算確定在0.45 nM及1000 nM之間。增生檢定之結果係顯示於表6中。

表6

測試材料	IC ₅₀ (nM)
正對照組 2	0.260
融合蛋白 1	1000
融合蛋白 2	0.669
融合蛋白 3	0.1992
融合蛋白 4	0.708
融合蛋白 5	0.275

【0200】 本實施例之結果顯示本發明融合蛋白，例如融合蛋白1至5，抑制BALB／3T3細胞之PDGF依賴性生長。亦可見於第8圖。

【0201】 實施例8-藉由融合蛋白在荷蘭黑帶兔中抑制VEGF誘導之

漏洩

【0202】 本發明融合蛋白係在視網膜血管新生之體內模式中測試，以測定其在預防血管漏洩中之功效。在此模式中，將VEGF以玻璃體內注射之方式，注射至兔眼之玻璃體中，以誘導不受控之視網膜血管新生及隨後之漏洩。癌思停 (Avastin®) 係一重組人化單株抗體，其藉由抑制VEGF-A來阻斷血管生成；及采視明 (Eylea)，其係一由人類VEGFR1及VEGFR2之部分融合至人類IgG1之Fc部分所組成的重組融合蛋白，這二者係用來作為正對照組3及4。

【0203】 使用活寧液 (isoflurane) (3至5%) 麻醉荷蘭黑帶兔，且以眼用必達淨 (betadine) 溶液處理其眼睛。然後以滅菌生理食鹽水清洗兔眼，施用鹽酸利多卡因 (Lidocaine hydrochloride) (2%注射液) 或丙對卡因 (proparacaine) 至眼睛表面。

【0204】 第1天，荷蘭黑帶兔係使用BD 300微升胰島素注射器 (31線規x 5/16英吋)，經玻璃體內注射預決定劑量之本發明融合蛋白、媒介物 (負) 對照組、或參考 (正) 對照組。該針係穿過眼之背顛象限 (dorsotemporal quadrant)，大約在緣後3至4毫米及上直肌側3至4毫米，遞送50微升之液體。第3天，對相同眼睛注射VEGF₁₆₅。

【0205】 經VEGF誘導3天後 (第6天)，對所有給藥之組別進行螢光血管攝影 (fluorescein angiogram, FA)，並使用從0 (正常) 至4 (嚴重) 之量尺評估其漏洩及曲折度。

【0206】 在以融合蛋白給藥之前、VEGF誘導之前及FA評估之前，使用德萊茲 (Draize) 評分系統來評分眼部刺激之徵象。根據德萊茲分析，在開始給藥之前所有兔子的眼睛皆係正常的，且在研究過程中並未發現明顯的藥物相關結果。使用德萊茲系統進行評分，發現其在所有給藥組別中皆觀

察到短暫地評分結果，因此有可能係玻璃體內投藥相關之程序所造成。

【0207】 媒介物對照組相關之FA具有最高之視網膜血管分佈漏洩及曲折度相關的平均分數（2.58）。二參考正對照組具有0.25及0之平均分數，顯示視網膜血管分佈漏洩及曲折度顯著降低。經測試之本發明融合蛋白具有0.167之平均分數，顯示其比得上正對照組之降低VEGF所誘導視網膜漏洩及曲折度的效果。體內檢定之結果係顯示於表7中。

表7

測試材料	劑量（微克）	分數之總數	第6天之平均漏洩分數
媒介物	0	12	2.583
正對照組 3 （Avastin®）	1250	12	0.250
正對照組 4（Eylea®）	625	12	0
融合蛋白 4	1000	12	0.167
融合蛋白 5	1000	12	0.167

【0208】 實施例9-藉由融合蛋白在荷蘭黑帶兔中對於VEGF誘導之漏洩的劑量-反應抑制

【0209】 本發明融合蛋白係以多種劑量在視網膜血管新生之體內模式中測試，以測定其在預防血管漏洩中之劑量反應功效。在此模式中，將VEGF₁₆₅以玻璃體內注射之方式，注射至兔眼之玻璃體中，以誘導不受控之視網膜血管新生及隨後之漏洩。

【0210】 第1天，荷蘭黑帶兔係經玻璃體內注射多種濃度之根據本發明實施態樣的融合蛋白5、媒介物（負）對照組、或參考（正）對照組。在第3天進行VEGF誘導。

【0211】 經VEGF誘導3天後（第6天），對所有給藥之組別進行FA，並

使用從0（正常）至4（嚴重）之量尺評估其漏洩及曲折度。

【0212】 在以融合蛋白給藥之前、VEGF誘導之前、及FA評估之前，使用德萊茲評分系統來記錄眼部刺激之徵象。根據德萊茲分析，在開始給藥之前所有兔子的眼睛皆係正常的，且在研究過程中並未發現明顯的藥物相關結果。使用德萊茲系統進行評分，發現其在所有給藥組別中皆觀察到短暫地評分結果，因此有可能係玻璃體內投藥相關之程序所造成。

【0213】 對第一次的VEGF誘導而言，媒介物對照組相關之FA具有最高之視網膜血管分佈漏洩及曲折度相關的平均分數（3.4）。二參考正對照組具有0之平均分數，顯示視網膜血管分佈漏洩及曲折度顯著降低。經測試之本發明融合蛋白（融合蛋白5）在100微克、500微克、及1000微克之劑量下分別具有0.08、0.42、及0.17之分數，顯示其比得上正對照組之降低VEGF所誘導視網膜漏洩及曲折度的效果。

【0214】 體內檢定之劑量反應結果係顯示於表8中。

表8

測試材料	劑量（微克）	分數之總數	第6天之平均漏洩分數
媒介物	0	12	3.400
正對照組 3 （Avastin®）	1250	10	0
正對照組 4 （Eylea®）	625	12	0
融合蛋白 5	1000	12	0.167
融合蛋白 5	500	12	0.417
融合蛋白 5	100	12	0.083

【0215】 實施例10-藉由融合蛋白在大鼠中降低雷射誘導之脈絡膜血管新生（CNV）的損傷尺寸

【0216】 棕色挪威大鼠之眼睛係以睫體痺露 (Cyclogyl, 1%) 溶液放大，並避光。在放大後，使用K他命及甲苯噻嗪 (xylazine) 之混合物來麻醉大鼠。在第1天，各眼之視網膜利用532奈米之雷射產生三處燒傷。

【0217】 第3天以K他命及甲苯噻嗪之混合物麻醉動物，放大其眼，並以漢彌爾頓注射器 (Hamilton syringe) 配合33線規針頭，經玻璃體內注射預決定劑量之5微升根據本發明實施態樣的融合蛋白、媒介物 (負) 對照組、或參考 (正) 對照組至動物之兩眼中。

【0218】 第22天，動物接受1微升/克體重之10%螢光素鈉的IP注射。眼底影像 (fundus image) 係在引入損傷前、燒傷後拍攝以確認成功損傷、及在第22天使用Micron III小動物眼底鏡 (Phoenix Research) 拍攝。測定損傷尺寸，並交叉比對給藥組別。

【0219】 實施例11-藉由融合蛋白在猴子中降低雷射誘導之CNV的損傷尺寸

【0220】 在猴子中建立雷射誘導之CNV模式。在各眼之黃斑部周圍使用532奈米二極體雷射光凝來產生6至9處燒傷，並在同一天經玻璃體內注射0.5毫克之本發明融合蛋白。

【0221】 20天後，以靜脈注射2.5%可溶性戊巴比妥 (pentobarbitone, 1毫升/公斤) 來鎮靜動物。固定眼皮使眼睛保持打開，並使用眼底相機拍攝彩色照片。

【0222】 然後注射螢光染劑 (20%之螢光素鈉; 0.05毫升/公斤) 至下肢靜脈中。在注射染劑後數個時間點拍攝照片，包括動脈階段、動靜脈階段早期、及數個動靜脈階段晚期，以監測與CNV損傷相關之螢光素漏洩。

【0223】 實施例12-藉由融合蛋白在異種移植小鼠中抑制人類腫瘤生長

(geographic atrophy)，該方法係包含對有需要之個體投予有效量之根據本發明實施態樣的融合蛋白。

【0034】 在本發明之一實施態樣中，融合蛋白係作為分離蛋白或作為表現載體來投予。

【0035】 在本發明之一實施態樣中，臨床症狀係選自由以下所組成之群組：腦水腫、中風、癌症、牛皮癬、關節炎、氣喘、燒傷相關之全身性水腫、腫瘤相關之腹水及胸膜積水、發炎或創傷、慢性呼吸道發炎、微血管漏洩症候群 (capillary leak syndrome)、敗血症、蛋白質漏洩增加相關之腎臟疾病、類風溼性關節炎 (rheumatoid arthritis)、炎症性關節炎 (inflammatory arthritis)、骨關節炎、動脈粥樣硬化、牛皮癬、眼部發炎及／或眼部血管生成 (其係包括老年性黃斑退化、增生性及非增生性糖尿病視網膜病變 (proliferative and nonproliferative diabetic retinopathy)、角膜血管新生、虹膜發紅 (rubeosis iridis)、及血管新生性青光眼 (neovascular glaucoma))。

【0036】 在另一普遍方面中，本發明係關於一用於PDGF及VEGF之二聚體拮抗劑，其係包含本發明融合蛋白。




【0037】 在另一普遍方面中，本發明係關於一種蛋白共軛體，其係包含結合至選自由以下所組成之群組中至少一配體的本發明融合蛋白：PDGF-BB及VEGF-A。

【0038】 本發明之其他方面、特徵及優點，將因下列揭露內容而變得明顯，包括本發明實施方式及其較佳實施態樣、及後附之申請專利範圍。

【圖式簡單說明】

【0039】 上述發明內容及以下本發明實施方式應搭配附圖閱讀以獲得更清楚的理解。應了解，本發明不限於圖式所示之明確實施態樣。

【0040】 在圖式中：

【0041】 第1圖顯示根據本發明實施態樣之例示性雙功能融合蛋白的結構設計，融合蛋白2(上方)及融合蛋白1(下方)被設計來同時抑制PDGF及VEGF兩者之路徑：其中，● 係訊息胜肽； 係PDGFR胞外類免疫球蛋白結構域(PID)，代表PDGFR β 之胞外類免疫球蛋白結構域D1至D3； 係Fc，代表IgG1的CH2及CH3區；- 係GS，代表甘胺酸-絲胺酸連接子； 係VEGFR胞外類免疫球蛋白結構域(VID)，代表VEGFR1之類免疫球蛋白結構域D2(●)、及VEGFR2之類免疫球蛋白結構域D3(○)；

【0042】 第2A圖及第2B圖分別顯示經純化之雙功能Fc融合蛋白1及2之SDS-PAGE膠體分析；第2C圖顯示非還原性及還原性經純化之雙功能Fc融合蛋白之分別的SDS-PAGE膠體分析：泳道M=標準液(marker)，泳道1(非還原性)及泳道2(還原性)=正對照組2；泳道3(非還原性)及泳道4(還原性)=融合蛋白5；泳道5(非還原性)及泳道6(還原性)=融合蛋白3；

【0043】 第3圖顯示三種測試樣品針對VEGF₁₆₅之直接配體結合檢定(direct ligand binding assay)結果：純化的正對照組1(●)、融合蛋白3(▲)、及融合蛋白5(■)。孔係以VEGF₁₆₅預塗佈且與多種濃度之測試樣品一同培養；使用HRP共軛之山羊抗人IgG1 Fc專一性抗體來偵測結合之測試樣品的量，及將OD₄₅₀讀數對測試樣品濃度作圖；

【0044】 第4圖顯示三種測試樣品針對PDGF-BB之直接配體結合檢定結果：純化的正對照組2(●)、融合蛋白3(▲)、及融合蛋白5(■)。孔係以PDGF-BB預塗佈且與多種濃度之測試樣品一同培養；使用HRP共軛之山羊抗人IgG1 Fc專一性抗體來偵測測試樣品的量，及將OD₄₅₀讀數對測試樣品濃度作圖；

【0045】 第5A圖及第5B圖分別顯示在競爭性結合檢定(competitive binding assay)中，融合蛋白1分別對VEGF₁₆₅及PDGF-BB在溶液中之親合力評估。多種濃度之融合蛋白1係與固定濃度之VEGF₁₆₅或PDGF-BB在溶液中

【0224】 多種人類癌症細胞，例如人類肝細胞癌 Hep3B 細胞 (ATCC#HB-8064) 及人類大腸直腸癌 LoVo 細胞 (ATCC#CCL-229)，可用來在裸鼠中建立異種移植模式。

【0225】 為了評估本發明融合蛋白對腫瘤生長之抑制效果，腫瘤細胞係移植入裸鼠內，且多種濃度之根據本發明實施態樣的融合蛋白（範圍從 0.1 至 10 毫克／公斤）係每週二次經靜脈內投予至小鼠。每週測量腫瘤之生長，達 7 週。

【0226】 實施例 13-融合蛋白在大鼠及猴子中之藥物動力學評估

【0227】 本發明融合蛋白之藥物動力學係在動物體中評估。透過皮下注射或靜脈注射投予根據本發明實施態樣的融合蛋白至大鼠或猴子，該融合蛋白之範圍係從 10 毫克／公斤至 300 毫克／公斤。在注射後至達第 15 天之中的不同時間點獲取血液樣品。使用 ELISA 方法測定血液樣品中融合蛋白之濃度，並計算藥物動力學參數。

【0228】 實施例 14-融合蛋白在兔子及猴子中之眼部藥物動力學評估

【0229】 本發明融合蛋白之藥物動力學係在動物體中評估。透過玻璃體內注射投予根據本發明實施態樣的融合蛋白至兔子或猴子，該融合蛋白之範圍係從每眼 0.1 毫克至 4 毫克。在注射後至達第 28 天之中的不同時間點獲取眼部組織及血液樣品。使用 ELISA 方法測定眼部組織及血液樣品中融合蛋白之濃度，並計算藥物動力學參數。

【0230】 雖然已詳述本發明細節，且參照其特定實施態樣，然而對本技術領域中具通常知識者而言，在不背離其精神與範圍下可在其中作多種變化及修飾。

【符號說明】

無。

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無。

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無。

【序列表】

<110> 新源生物科技股份有限公司
圓祥生命科技股份有限公司

<120> 多靶向融合蛋白及其應用

<130> 688947.3WO

<140> 105107330

<141> 2016年3月10日

<150> US 62/131,261

<151> 2015年3月11日

<160> 50

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 897

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

cagggcctgg tcgtcacacc cccggggcca gagcttgtcc tcaatgtctc cagcaccttc	60
gttctgacct gctcgggttc agctccgggtg gtgtgggaac ggatgtccca ggagccccc	120
caggaaatgg ccaaggccca ggatggcacc ttctccagcg tgctcacact gaccaacctc	180
actgggctag acacgggaga atacttttgc acccacaatg actcccgtgg actggagacc	240
gatgagcgga aacggctcta catcttttg ccagatccca ccgtgggctt cctccctaat	300
gatgccgagg aactattcat ctttctcag gaaataactg agatcacat tccatgccga	360
gtaacagacc cacagctggt ggtgacactg cacgagaaga aaggggacgt tgcactgcct	420
gtcccctatg atcaccaacg tggcttttt ggtatctttg aggacagaag ctacatctgc	480
aaaaccacca ttggggacag ggaggtggat tctgatgcct actatgtcta cagactccag	540
gtgtcatcca tcaactctc tgtgaacgca gtgcagactg tggccgcca ggtgagaac	600
atcacctca tgtgcattgt gatcgggaat gaggtggta acttcgagtg gacatacccc	660
cgcaaagaaa gtgggcggct ggtggagccg gtgactgact tctcttga tatgccttac	720

cacatccgct ccacctgca catccccagt gccgagttag aagactcggg gacctacacc 780

tgcaatgtga cggagagtgt gaatgacat caggatgaaa aggccatcaa catcacctg 840

gttgagagcg gctacgtgcg gctcctggga gaggtgggca cactacaatt tgctgag 897

<210> 2

<211> 299

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Gln Gly Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val

1 5 10 15

Ser Ser Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp

 20 25 30

Glu Arg Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp

35 40 45

Gly Thr Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp

50	55	60	
Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr			
65	70	75	80
Asp Glu Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly			
	85	90	95
Phe Leu Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile			
	100	105	110
Thr Glu Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val			
	115	120	125
Thr Leu His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp			
	130	135	140
His Gln Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys			
	145	150	155
Lys Thr Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val			
	165	170	175
Tyr Arg Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln			

180

185

190

Thr Val Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile

195

200

205

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

210

215

220

Gly Arg Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr

225

230

235

240

His Ile Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser

245

250

255

Gly Thr Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp

260

265

270

Glu Lys Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val Arg Leu

275

280

285

Leu Gly Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu

290

295

<210> 3

<211> 891

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 經修飾PID之編碼序列

<400> 3

ctggctgtga cacctcccgg acccgagctg gtgctcaacg tctcctccac ctttgtgctg 60

acatgcagcg gcagcgctcc tgtggtctgg gaacggatgt cccaggagcc tccccaggaa 120

atggccaagg cccaggacgg caccttttcc agcgtctca cactcaccaa cctgacaggc 180

ctggacaccg gcgagtactt ttgcaccac aatgactcca ggggactgga aaccgatgag 240

cggaagcggc tctacattt cgtccccgac cccaccgtcg gatttctgcc taatgacgct 300

gaagagctgt ttatcttct gacagagatc accgaaatca ccaccccctg tcgggtcacc 360

gatccccagc tgggtgtcac actgcacgag aagaaggag atgtcgccct gcctgtgcct 420

tatgaccatc agaggggctt ttccggcatt ttcgaggaca ggagctacat ctgcaaaacc 480

accatcggag accgggaggt cgacagcga gcctattacg tctaccggct ccaggctcc 540

tccatcaatg tgagcgtgaa tgctgtccag acagtgggcc ggcagggcga gaatatcaca 600

ctgatgtgca ttgtcattgg caacgaggtg gtcaacttcg agtggaccta tcctaggaag 660

gagagcggcc ggctcgtcga acctgtgacc gacttctcc tggacatgcc ttaccacatt 720

cggccatcc tgcacattcc tagcggcag ctggaggaca gcggaacctc cacctgcaac 780

gtgaccgagt ccgtgaatga ccaccaggat gagaaggcca tcaacatcac agtcgtggag 840

agcggatacg tcaggctgct cggagaagtc ggcacactgc agttcgccga g 891

<210> 4

<211> 891

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 經修飾PID之編碼序列

<400> 4

ctggctgca cccccggg gccagagctt gtcctcaatg tctccagcac cttcgttctg	60
acctgctcgg gttcagctcc ggtggtgtgg gaacggatgt cccaggagcc cccacaggaa	120
atggccaagg cccaggatgg caccttctcc agcgtgctca cactgaccaa cctcactggg	180
ctagacacgg gagaatactt ttgcaccac aatgactccc gtggactgga gaccgatgag	240
cggaaacggc tctacatctt tgtgccagat cccaccgtgg gcttctccc taatgatgcc	300
gaggaactat tcattttct cacggaaata actgagatca ccattccatg ccgagtaaca	360
gaccacagc tgggtgtgac actgcacgag aagaaagggg acgttgact gcctgtcccc	420
tatgatcacc aacgtggctt ttccggtatc ttgaggaca gaagctacat ctgcaaaacc	480
accattgggg acaggagggt ggattctgat gcctactatg tctacagact ccaggtgtca	540
tccatcaacg tctcttgaa cgcagtgcag actgtgtgcc gccagggtga gaacatcacc	600
ctcatgtgca ttgtgatcgg gaatgaggtg gtcaacttcg agtggacata cccccgaaa	660
gaaagtgggc ggctggtgga gccggtgact gacttctct tggatatgcc ttaccacatc	720

cgctccatcc tgcacatccc cagtgccgag ttagaagact cggggaccta cacctgcaat 780

gtgacggaga gtgtgaatga ccatcaggat gaaaaggcca tcaacatcac cgtggttgag 840

agcggctacg tgcggctcct gggagaggtg ggcacactac aatttgctga g 891

<210> 5

<211> 297

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 經修飾PID序列

<400> 5

Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr

35

40

45

Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly

50

55

60

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

65

70

75

80

Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu

85

90

95

Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu

100

105

110

Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu

115

120

125

His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln

130

135

140

Arg Gly Phe Ser Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr

145

150

155

160

Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg

165

170

175

Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val

180

185

190

Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn

195

200

205

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

210

215

220

Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile

225

230

235

240

Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr

245

250

255

Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys

260

265

270

Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val Arg Leu Leu Gly

275

280

285

Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu

290

295

<210> 6

<211> 612

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VID之編碼序列

<400> 6.

gacactggta gacctttgt tgaaatgat tctgaaattc ctgaaattat tcatatgact 60

gaaggaagag aacttgttat tccttgtaga gttacttctc ctaatattac tgttactctt 120

aagaagttc ctcttgatac tcttattcct gatggaaaga gaattattg ggattctaga 180

aagggattta ttatttctaa tgctacttat aaggaaattg gacttcttac ttgtgaagct 240

actgtaatg gacatcttta taagactaat tatcttactc atagacaaac taataccatc 300

atcgacgtgg ttctgagtcc gtctcatgga attgaactat ctgttgagaga aaagcttgtc 360

ttaaattgta cagcaagaac tgaactaat gtggggattg acttcaactg ggaatacct 420

tcttgaagc atcagcataa gaaacttgta aaccgagacc taaaaccca gtctgggagt 480

gagatgaaga aattcttgag caccctgact atagatggtg taaccggag tgaccaagga 540

ttgtacacct gtgcagcatc cagtgggctg atgaccaaga agaacagcac atttgtcagg 600

gtccatgaaa aa 612

<210> 7

<211> 204

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VID序列

<400> 7

Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile

1

5

10

15

Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr

20

25

30

Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu

35

40

45

Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile

50

55

60

Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala

65

70

75

80

Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln

85

90

95

Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu

100

105

110

Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu

115

120

125

Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His

130

135

140

Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser

145 150 155 160

Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg

165 170 175

Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr

180 185 190

Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys

195 200

<210> 8

<211> 609

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 經修飾VID之編碼序列

<400> 8

ggaaggccct tcgtggagat gtacagcgag attcctgaga ttatccacat gaccgaggga 60

cgggaaactgg tgattccctg ccgggtcacc agccccaaca tcaccgtgac cctcaagaag 120

ttccccctgg acaccctgat ccctgacggc aaaaggatta tctgggacag ccggaagggc 180

tttatcatca gcaatgccac atacaaggag attggactcc tgacctgca ggctacagtc 240

aacggacacc tgtacaagac caactacctg acccaccggc agaccaatac catcatcgac 300

gtggtgctga gccccagcca cggaattgag ctgagcgtgg gagaaaaact cgtgctcaac 360

tgcacagccc ggaccgaact caatgtcggga atcgactca actgggaata ccccagctcc 420

aagcaccagc acaagaagct ggtcaaccgg gatctcaaga ccagtcctgg cagcgaaatg 480

aagaagtcc tcagcacct gaccatcgat ggcgtcaca ggagcgatca gggactctac 540

acctgcgccg ctagctccgg actcatgacc aagaagaact ccacattgt ccgggtgcac 600

gaaaagtga 609

<210> 9

<211> 606

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 經修飾VID之編碼序列

<400> 9

ggtagacctt ttgtgaaat gtattctgaa attcctgaaa ttattcatat gactgaagga 60

agagaacttg ttattccttg tagagttact tctcctaata ttactgttac tcttaagaag 120

ttcctcttg atactcttat tctgatgga aagagaatta ttgggattc tagaaaggga 180

ttattattt ctaatgtac ttataaggaa attggacttc ttacttgta agctactgtt 240

aatggacatc ttataagac taattatctt actcatagac aaactaatac catcatcgac 300

gtggttctga gtccgtctca tggaattgaa ctatctgttg gagaaaagct tgtcttaaat 360

tgtacagcaa gaactgaact aatgtgggg attgacttca actgggaata ccttctctcg 420

aagcatcagc ataagaaact tgtaaaccga gacctaaaaa ccagctctgg gaggtagatg 480

aagaaattct tgagcaccct gactatagat ggtgtaacc ggagtgacca aggattgtac 540

acctgtgcag catccagtgg gctgatgacc aagaagaaca gcacattgt cagggtccat 600

gaaaa a

606

<210> 10

<211> 202

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 經修飾VID序列

<400> 10

Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His

1

5

10

15

Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro

20

25

30

Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro

35

40

45

Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser

50

55

60

Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val

65

70

75

80

Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn

85

90

95

Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser

100

105

110

Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn

115

120

125

Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His

130

135

140

Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met

145

150

155

160

Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp

165

170

175

Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys

第 105107330 號專利申請案
序列表替換本(106 年 5 月)

180

185

190

Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys

195

200

<210> 11

<211> 681

<212> DNA

<213> 智人

<400> 11

gacaaaactc acacatgtcc accgtgtcca gcacctgaac tcttgggtgg accgtcagtc 60

ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240

cgtgtggtea gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300

tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 420

aaccagggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540

gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactaac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 12

<211> 227

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1

5

10

15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20

25

30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35

40

45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50

55

60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65

70

75

80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85

90

95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100

105

110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115

120

125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130

135

140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145	150	155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
	165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	210	215	220

Pro Gly Lys

225

<210> 13

<211> 678

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白6之Fc序列的編碼序列

<400> 13

gataagacc acacctgtcc tccttgcct gctcctgagc tcctcggcgg acctagcgtg	60
ttcctgttc ccctaagcc taaagacacc ctcatgatca gccggacccc cgaggtcaca	120
tgcgtggagg tcgacgtctc ccatgaggat cccgaggatga agttcaattg gtacgtcgac	180
ggcgtcgagg tccacaatgc caaaacaaa ccccgaggagg agcagtacaa cagcacctat	240
agggtggatca gctcctgac cgtgctgac caagactggc tgaacggcaa ggagtacaaa	300
tgcaaagtca gcaataaggc cctccccgcc cccattgaga agaccatctc caaggctaag	360
ggccaaccta gggagcccca ggtgtacacc ctgcctcca gccgggatga gctgacaaag	420
aaccaggatga gctcacctg tctggtgaag ggctttacc cctccgatat tgccgtggag	480
tgggaaagca acggacagcc tgagaacaac tacaagaaa cccccctgt cctggacagc	540
gatggctcct tcttctgta cagcaagctg acagtggata agagccgggtg gcagcaggga	600
aacgtcttta gctgcagcgt gatgcatgag gccctgcaca atcactacac ccagaagtcc	660

ctgtccctga gccctggc 678

<210> 14

<211> 678

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白4之Fc序列的編碼序列

<400> 14

gacaaaactc acacatgtcc accgtgtcca gcacctgaac tctgggtgg accgtcagtc 60

ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcgtgggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240

cgtgtgggtca gcgtctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

第 105107330 號專利申請案
序列表替換本(106 年 5 月)

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 420

aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 540

gacggctct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggt 678

<210> 15

<211> 226

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白之經修飾Fc序列

<400> 15

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130

135

140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145

150

155

160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165

170

175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180

185

190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195

200

205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210

215

220

Pro Gly

225

<210> 16

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列之編碼序列

<400> 16

gccagc

6

<210> 17

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列之編碼序列

<400> 17

gctagc

6

<210> 18

<211> 2

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列

<400> 18

Ala Ser

1

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列之編碼序列

<400> 19

ggaggaggcg gtggatct

18

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 21

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列之編碼序列

<400> 21

ggaggc

6

<210> 22

<211> 2

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列

<400> 22

Gly Gly

1

<210> 23

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列之編碼序列

<400> 23

ggcggcgggcgc gcagcggcgg aggcggatcc ggcggaggcg gctcc

45

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15

<210> 25

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列之編碼序列

<400> 25

ggagacacc

9

<210> 26

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列

<400> 26

Gly Asp Thr

1

<210> 27

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列之編碼序列

<400> 27

ggtgga

6

<210> 28

<211> 2

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列

<400> 28

Gly Gly

1

<210> 29

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列之編碼序列

<400> 29

ggaggcggtg gatctggtgg cggtggaagc ggaggtggag gttcc

45

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15

<210> 31

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列之編碼序列

<400> 31

ggagacact

9

<210> 32

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列

<400> 32

Gly Asp Thr

1

<210> 33

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 訊息胜肽序列之編碼序列

<400> 33

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgcttcttt gggttcccgg atccactggc

60

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 訊息胜肽序列

<400> 34

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1

5

10

15

Gly Ser Thr Gly

20

<210> 35

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 訊息胜肽序列之編碼序列

<400> 35

atggagtttg gcctgtcctg gctcttcctc gtggetatcc tgaagggcgt gcagtgt

57

<210> 36

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

第 105107330 號專利申請案
序列表替換本(106 年 5 月)

<220>

<223> 訊息胜肽序列

<400> 36

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 37

<211> 2217

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白1序列之編碼序列

<400> 37

gacactggaa gaccttttgt tgaaatgtat tctgaaattc ctgaaattat tcatatgact 60

gaaggaagag aacttgttat tccttgtaga gttacttctc ctaatattac tgttactctt 120

aagaagttc ctcttgatac tcttattcct gatggaaaga gaattattg ggattctaga	180
aagggattta ttatttctaa tgctacttat aaggaaattg gacttcttac ttgtgaagct	240
actgtaatg gacatcttta taagactaat tatcttactc atagacaaac taataccatc	300
atcgacgtgg ttctgagtcc gtctcatgga attgaactat ctgttgaga aaagctgtc	360
ttaaattgta cagcaagaac tgaactaaat gtggggattg acttcaactg ggaataccct	420
tcttgaagc atcagcataa gaaacttgta aaccgagacc taaaaacca gtctgggagt	480
gagatgaaga aattcttgag caccctgact atagatgggtg taaccggag tgaccaagga	540
ttgtacacct gtgcagcatc cagtgggctg atgaccaaga agaacagcac atttgtcagg	600
gtccatgaaa aagacaaaac tcacacatgt ccaccgtgc cagcacctga actcctgggt	660
ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc	720
cctgaggta catgctgtgt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	780
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac	840

第 105107330 號專利申請案
序列表替換本(106年5月)

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	900
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc	960
tccaaagcca aagggcagcc cggagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat	1020
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgca aaggcttcta tcccagcgac	1080
atgcccgtag agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1140
gtgctggact cggacggctc cttctcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1200
tggcagcagg ggaacgtctt ctcctgctcc gtgatgatg aggctctgca caaccactac	1260
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaaggtggag gaggcggtag atccggatct	1320
cagggcctgg tcgtcacacc cccggggcca gagcttgctc tcaatgtctc cagcacctc	1380
gttctgacct gctcgggtc agctccggtg gtgtgggaac ggatgtccca ggagccccca	1440
caggaaatgg ccaaggcca ggatggcacc ttctccagcg tgctcacact gaccaacctc	1500
actgggctag acacgggaga atactttgc acccacaatg actcccgtgg actggagacc	1560

第 105107330 號專利申請案
序列表替換本(106 年 5 月)

gatgagcgga aacggctcta catctttgtg ccagatccca ccgtgggctt cctcccta	1620
gatgccgagg aactattcat ctttctcacg gaaataactg agatcaccaat tccatgccga	1680
gtaacagacc cacagctggt ggtgacactg cacgagaaga aaggggacgt tgcactgcct	1740
gtcccctatg atcaccaacg tggcttttt ggtatctttg aggacagaag ctacatctgc	1800
aaaaccacca ttggggacag ggaggtggat tctgatgcct actatgtcta cagactccag	1860
gtgtcatcca tcaacgtctc tgtgaacgca gtgcagactg tggcccgcca gggtgagaac	1920
atcacctca tgtgcattgt gatcgggaat gaggtggca acttcgagtg gacatacccc	1980
cgcaaagaaa gtgggcggtt ggtggagccg gtgactgact tcctcttga tatgccttac	2040
cacatccgct ccatcctgca catccccagt gccgagttag aagactcggg gacctacacc	2100
tgcaatgtga cggagagtgt gaatgacat caggatgaaa aggccatcaa catcaccgtg	2160
gttgagagcg gctacgtgcg gctcctggga gaggtgggca cactacaatt tgctgag	2217

<210> 38

<211> 739

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白1序列

<400> 38

Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile

1 5 10 15

Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr

20 25 30

Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu

35 40 45

Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile

50 55 60

Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala

65 70 75 80

Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln

85

90

95

Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu

100

105

110

Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu

115

120

125

Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His

130

135

140

Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser

145

150

155

160

Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg

165

170

175

Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr

180

185

190

Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr His

195

200

205

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 210 215 220

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 225 230 235 240

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 245 250 255

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 260 265 270

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 275 280 285

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 290 295 300

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 305 310 315 320

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 325 330 335

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

340

345

350

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

355

360

365

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

370

375

380

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

385

390

395

400

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

405

410

415

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly

420

425

430

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gln Gly Leu Val Val Thr Pro Pro

435

440

445

Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser Thr Phe Val Leu Thr Cys

450

455

460

Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg Met Ser Gln Glu Pro Pro

465 470 475 480

Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr Phe Ser Ser Val Leu Thr

485 490 495

Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Thr His

500 505 510

Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr Asp Glu Arg Lys Arg Leu Tyr Ile

515 520 525

Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu Pro Asn Asp Ala Glu Glu

530 535 540

Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu Ile Thr Ile Pro Cys Arg

545 550 555 560

Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu His Glu Lys Lys Gly Asp

565 570 575

Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln Arg Gly Phe Phe Gly Ile

580 585 590

Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr Thr Ile Gly Asp Arg Glu

595

600

605

Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg Leu Gln Val Ser Ser Ile

610

615

620

Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val Val Arg Gln Gly Glu Asn

625

630

635

640

Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn Glu Val Val Asn Phe Glu

645

650

655

Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg Leu Val Glu Pro Val Thr

660

665

670

Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile Arg Ser Ile Leu His Ile

675

680

685

Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr Tyr Thr Cys Asn Val Thr

690

695

700

Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys Ala Ile Asn Ile Thr Val

705

710

715

720

第 105107330 號專利申請案
序列表替換本(106年5月)

Val Glu Ser Gly Tyr Val Arg Leu Leu Gly Glu Val Gly Thr Leu Gln

725

730

735

Phe Ala Glu

<210> 39

<211> 2250

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白2序列之編碼序列

<400> 39

cagggcctgg tcgtcacacc cccggggcca gagctgtcc tcaatgtctc cagcaccttc 60

gttctgacct gctcgggttc agctccggtg gtgtgggaac ggatgtccca ggagccccc 120

caggaaatgg ccaaggccca ggatggcacc ttctccagcg tgctcacact gaccaacctc 180

actgggctag acacgggaga atacttttgc acccacaatg actcccgtgg actggagacc 240

gatgagcggg aacggctcta catcttttg ccagatccca ccgtgggctt cctccetaat 300

gatgccgagg aactattcat ctttctcacg gaaataactg agatcacat tccatgccga	360
gtaacagacc cacagctggt ggtgacactg cacgagaaga aaggggacgt tgcactgcct	420
gtcccctatg atcaccaacg tggctttttt ggtatctttg aggacagaag ctacatctgc	480
aaaaccacca ttggggacag ggaggtggat tctgatgcct actatgtcta cagactccag	540
gtgtcatcca tcaacgtctc tgtgaacgca gtcagactg tggccgcca gggtgagaac	600
atcacctca tgtgcattgt gatcgggaat gaggtggtca acttcgagtg gacataccc	660
cgcaaagaaa gtgggcggtt ggtggagccg gtgactgact tcctcttga tatgccttac	720
cacatccgct ccacctgca catccccagt gccgagtag aagactcggg gacctacacc	780
tgcaatgtga cggagagtgt gaatgaccat caggatgaaa aggccatcaa catcaccgtg	840
gttgagagcg gctacgtgcg gctcctggga gaggtgggca cactacaatt tgctgaggct	900
agcgacaaaa ctacacatg tccaccgtgt ccagcacctg aactcctggg tggaccgtca	960
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac acctcatga tctcccggac ccctgaggtc	1020

acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	1080
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	1140
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	1200
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	1260
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catccggga tgagctgacc	1320
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	1380
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1440
tccgacggct cttcttctct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1500
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag	1560
agcctctccc tgtctccggg taaagggtgga ggaggcggtg gatctggtgg cgggtggaagc	1620
ggaggtggag gttccggaga cactggtaga cttttgttg aaatgtattc tgaattctct	1680
gaaattattc atatgactga aggaagagaa ctgttattc cttgtagagt tacttctct	1740

aatattactg ttactcttaa gaagttcct cttgatactc ttattcctga tggaaagaga 1800

attatttggg attctagaaa gggatttatt atttctaag ctacttataa ggaaattgga 1860

cttcttactt gtgaagctac tgtaaatgga catctttata agactaatta tcttactcat 1920

agacaaacta ataccatcat cgacgtgggt ctgagtcctg ctcatggaat tgaactatct 1980

gttgagaaaa agcttgtctt aaattgtaca gcaagaactg aactaaatgt ggggattgac 2040

ttcaactggg aatacccttc ttcgaagcat cagcataaga aactgtaaa ccgagaccta 2100

aaaaccagtg ctgggagtg gatgaagaaa ttcttgagca cctgactat agatggtgta 2160

accggagtg accaaggatt gtacacctgt gcagcatcca gtgggctgat gaccaagaag 2220

aacagcacat ttgtcagggt ccatgaaaaa 2250

<210> 40

<211> 750

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白2序列

<400> 40

Gln Gly Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val

1 5 10 15

Ser Ser Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp

20 25 30

Glu Arg Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp

35 40 45

Gly Thr Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly

85 90 95

Phe Leu Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile

100

105

110

Thr Glu Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val

115

120

125

Thr Leu His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp

130

135

140

His Gln Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys

145

150

155

160

Lys Thr Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val

165

170

175

Tyr Arg Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln

180

185

190

Thr Val Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile

195

200

205

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

210

215

220

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

355

360

365

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

370

375

380

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

385

390

395

400

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

405

410

415

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

420

425

430

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

435

440

445

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

450

455

460

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

465

470

475

480

第 105107330 號專利申請案
序列表替換本(106年5月)

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

485

490

495

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

500

505

510

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

515

520

525

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

530

535

540

Ser Gly Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro

545

550

555

560

Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg

565

570

575

Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp

580

585

590

Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly

595

600

605

Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys

610

615

620

Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His

625

630

635

640

Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly

645

650

655

Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg

660

665

670

Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser

675

680

685

Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser

690

695

700

Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val

705

710

715

720

Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu

725

730

735

第 105107330 號專利申請案
序列表替換本(106 年 5 月)

Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys

740

745

750

<210> 41

<211> 2301

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白6序列之編碼序列

<400> 41

atggagttg gcctgtcctg gctcttcctc gtggctatcc tgaagggcgt gcagtgtctg 60

gtcgtgacac ctcccggacc cgagctggcg ctcaacgtct cctccacctt tgtgctgaca 120

tgcagcggca gcgctcctgt ggtctgggaa cggatgtccc aggagcctcc ccaggaaatg 180

gccaaggccc aggacggcac ctttccagc gtctcacac tcaccaacct gacaggcctg 240

gacaccggcg agtacttttg caccacaat gactccaggg gactggaaac cgatgagcgg 300

aagcggctct acatttcgt ccccgacccc accgtcggat ttctgcctaa tgacgtgaa 360

第 105107330 號專利申請案
序列表替換本(106 年 5 月)

gagctgttta tcttctgac agagatcacc gaaatcacca tcccctgtcg ggtcaccgat	420
ccccagctgg tggtcacact gcacgagaag aaggagatg tcgccctgcc tgtgccttat	480
gaccatcaga ggggcttttc cggcattttc gaggacagga gctacatctg caaaaccacc	540
atcggagacc gggaggtcga cagcgatgcc tattacgtct accggctcca ggtctcctcc	600
atcaatgtga gcgatgaatgc tgtccagaca gtgggccggc agggcgagaa tatcacactg	660
atgtgcattg tcattggcaa cgaggtggtc aacttcgagt ggacctatcc taggaaggag	720
agcggccggc tcgtgaacc tgtgaccgac ttctctctgg acatgcctta ccacattcgg	780
tccatcctgc acattcctag cgccgagctg gaggacagcg gaacctacac ctgcaacgtg	840
accgagtccg tgaatgacca ccaggatgag aaggccatca acatcacagt cgtggagagc	900
ggatacgtca ggctgctcgg agaagtcggc aactgcagt tcgccgaggc cagcgataag	960
accacacct gtctccttg tctgctctct gagctcctcg gcggacctag cgtgttctctg	1020
tttccccta agcctaaaga caccctcatg atcagccgga cccccgaggt cacatgcgtg	1080

第 105107330 號專利申請案
序列表替換本(106年5月)

gtggtcgacg tctcccatga ggatcccgag gtgaagtca attggtacgt cgacggcgtc	1140
gaggtccaca atgccaaaac caaaccccgg gaggagecgt acaacagcac ctatagggtg	1200
gtcagcgtcc tgaccgtgct gcaccaagac tggctgaacg gcaaggagta caaatgcaa	1260
gtcagcaata aggccctccc cgccccatt gagaagacca tctccaagge taagggcaa	1320
cctagggagc cccaggtgta caccctgcct cccagccggg atgagctgac aaagaaccag	1380
gtgagcctca cctgtctggt gaagggttt taccctccg atattgccgt ggagtgggaa	1440
agcaacggac agcctgagaa caactacaag acaaccccc ctgtcctgga cagcgatggc	1500
tccttctcc tgtacagcaa gctgacagtg gataagagcc ggtggcagca gggaaacgtc	1560
tttagctgca gcgtgatgca tgaggccctg cacaatcact acaccagaa gtcctgtcc	1620
ctgagccctg gcggaggcgg cggcggcggc agcggcggag gcggatccgg cggaggcggc	1680
tccggagaca ccggaaggcc ctctgtggag atgtacagcg agattcctga gattatccac	1740
atgaccgagg gacgggaact ggtgattccc tgccgggtca ccagcccaa catcaccgtg	1800

第 105107330 號專利申請案
序列表替換本(106 年 5 月)

accctcaaga agtccccct ggacacctg atccctgacg gcaaaaggat tatctgggac	1860
agccggaagg gctttatcat cagcaatgcc acatacaagg agattggact cctgacctgc	1920
gaggctacag tcaacggaca cctgtacaag accaactacc tgaccaccg gcagaccaat	1980
accatcatcg acgtggtgct gagccccagc cacggaattg agctgagcgt gggagaaaa	2040
ctcgtgctca actgcacagc ccggaccgaa ctcaatgtcg gaatcgactt caactgggaa	2100
taccagct ccaagcacca gcacaagaag ctggtcaacc gggatctcaa gaccagctcc	2160
ggcagcgaag tgaagaagt cctcagcacc ctgacctcg atggcgctac aaggagcgt	2220
cagggactct acacctgcgc cgctagctcc ggactcatga ccaagaagaa ctccacattt	2280
gtccgggtgc acgaaaagtg a	2301

<210> 42

<211> 766

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白6序列

<400> 42

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn

20 25 30

Val Ser Ser Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val

35 40 45

Trp Glu Arg Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln

50 55 60

Asp Gly Thr Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Asp Glu Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val

100

105

110

Gly Phe Leu Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu

115

120

125

Ile Thr Glu Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val

130

135

140

Val Thr Leu His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr

145

150

155

160

Asp His Gln Arg Gly Phe Ser Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile

165

170

175

Cys Lys Thr Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr

180

185

190

Val Tyr Arg Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val

195

200

205

Gln Thr Val Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val

210

215

220

Ile Gly Asn Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu

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

	355	360	365	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
Gly	Val	Glu	Val	His
Asn				
370		375		380
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
Val				
385		390		395
Val	Ser	Val	Leu	Thr
Val	Leu	His	Gln	Asp
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
Glu				
405		410		415
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
Lys				
420		425		430
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
Thr				
435		440		445
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
Asn	Gln	Val	Ser	Leu
Thr				
450		455		460
Cys	Leu	Val	Lys	Gly
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
Ile	Ala	Val	Glu	Trp
Glu				
465		470		475
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
Thr	Thr	Pro	Pro	Val
Leu				

485

490

495

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

500

505

510

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

515

520

525

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

530

535

540

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

545

550

555

560

Ser Gly Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro

565

570

575

Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg

580

585

590

Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp

595

600

605

Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly

610	615	620	
Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys			
625	630	635	640
Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His			
	645	650	655
Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly			
	660	665	670
Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg			
675	680	685	
Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser			
690	695	700	
Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser			
705	710	715	720
Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val			
	725	730	735
Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu			

740

745

750

Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys

755

760

765

<210> 43

<211> 2307

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白3及4序列之編碼序列

<400> 43

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgcttcttt gggttcccgg atccactggc 60

cagggcctgg tcgtcacacc cccggggcca gagcttgcc tcaatgtctc cagcaccttc 120

gttctgacct gctcgggttc agctccggtg gtgtgggaac ggatgtccca ggagccccc 180

caggaaatgg ccaaggccca ggatggcacc ttctccagcg tgctcacact gaccaacctc 240

actgggctag acacgggaga atacttttgc acccacaatg actcccgtgg actggagacc 300

gatgagcggg aacggctcta catctttgig ccagatccca ccgtgggctt cctccctaat	360
gatgccgagg aactattcat ctttctcacg gaaataactg agatcacat tccatgccga	420
gtaacagacc cacagctggt ggtgacactg cacgagaaga aaggggacgt tgcactgcct	480
gtcccctatg atcaccaacg tggcttttcc ggtatctttg aggacagaag ctacatctgc	540
aaaaccacca ttggggacag ggaggtggat tctgatgcct actatgtcta cagactccag	600
gtgtcatcca tcaacgtctc tgtgaacgca gtgcagactg tggtcgccca gggtgagaac	660
atcacctca tgtgcattgt gatcgggaat gaggtggtca acttcgagtg gacatacccc	720
cgcaaagaaa gtgggaggct ggtggagccg gtgactgact tctcttggga tatgccttac	780
cacatccgt ccatcctgca catccccagt gccgagttag aagactcggg gacctacacc	840
tgcaatgtga cggagagtgt gaatgacat caggatgaaa aggccatcaa catcaccgtg	900
gtgagagcg gctacgtgcg gctcctggga gaggtgggca cactacaatt tgctgaggct	960
agcgacaaaa ctacacatg tccaccgtgt ccagcacctg aactcctggg tggaccgtca	1020

gtttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc	1080
acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	1140
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	1200
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	1260
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	1320
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc	1380
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	1440
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1500
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1560
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag	1620
agcctctccc tgtctccggg tggaggagga ggccgtggat ctggtggcgg tggaagcgga	1680
ggtggaggtt ccggagacac tggtagacct ttgttgaat tgattctga aattcctgaa	1740

attattcata tgactgaagg aagagaactt gttattcctt gtagagttac ttctcctaatt 1800

attactgtta ctcttaagaa gtttctctt gatactctta ttctgatgg aaagagaatt 1860

attgggatt ctgaaaggg atttattatt tctaattgcta cttataagga aattggactt 1920

cttactgtg aagctactgt taatggacat cttataaga ctaattatct tactcataga 1980

caaactaata ccatcatcga cgtggttctg agtccgtctc atggaattga actatctgtt 2040

ggagaaaagc ttgtcttaaa ttgtacagca agaactgaac taaatgtggg gattgacttc 2100

aactgggaat acccttcttc gaagcatcag cataagaaac ttgtaaaccg agacctaaaa 2160

accagctctg ggagtgagat gaagaaattc ttgagcacc ctgactataga tgggtgaacc 2220

cggagtgacc aaggattgta cacctgtgca gcatccagtg ggctgatgac caagaagaac 2280

agcacattg tcagggtcca tgaaaaa 2307

<210> 44

<211> 769

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白3或4加上一訊息胜肽序列

<400> 44

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Gly Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu

20 25 30

Val Leu Asn Val Ser Ser Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala

35 40 45

Pro Val Val Trp Glu Arg Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala

50 55 60

Lys Ala Gln Asp Gly Thr Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu

65 70 75 80

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

85

90

95

Gly Leu Glu Thr Asp Glu Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp

100

105

110

Pro Thr Val Gly Phe Leu Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe

115

120

125

Leu Thr Glu Ile Thr Glu Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro

130

135

140

Gln Leu Val Val Thr Leu His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro

145

150

155

160

Val Pro Tyr Asp His Gln Arg Gly Phe Ser Gly Ile Phe Glu Asp Arg

165

170

175

Ser Tyr Ile Cys Lys Thr Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp

180

185

190

Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val

195

200

205

Asn Ala Val Gln Thr Val Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met

340

345

350

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

355

360

365

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

370

375

380

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

385

390

395

400

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

405

410

415

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

420

425

430

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

435

440

445

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

450

455

460

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

465	470	475	480
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
	485	490	495
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			
	500	505	510
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
	515	520	525
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
	530	535	540
Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly			
545	550	555	560
Gly Gly Gly Ser Gly Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser			
	565	570	575
Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile			
	580	585	590
Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe			

	595	600	605
Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser			
610	615	620	
Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu			
625	630	635	640
Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr			
	645	650	655
Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro			
	660	665	670
Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys			
	675	680	685
Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr			
	690	695	700
Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys			
705	710	715	720
Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile			

第 105107330 號專利申請案
序列表替換本(106 年 5 月)

725

730

735

Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser

740

745

750

Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu

755

760

765

Lys

<210> 45

<211> 1353

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VEGF誘捕劑序列之編碼序列

<400> 45

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg gtcgactggc 60

gacactggaa gacctttgt tgaaatgtat tctgaaattc ctgaaattat tcatatgact 120

gaaggaagag aacttggtat tccttgtaga gttacttctc ctaatattac tgttactctt	180
aagaagttc ctctgatac tcttattcct gatggaaaga gaattattg ggattctaga	240
aagggattta ttattctaa tgctacttat aaggaaattg gacttcttac ttgtgaagct	300
actgtaatg gacatcttta taagactaat tatcttactc atagacaaac taataccatc	360
atcgacgtgg ttctgagtcc gtctcatgga attgaactat ctgttgagaa aaagcttgtc	420
ttaaattgta cagcaagaac tgaactaat gtggggattg acttcaactg ggaataccct	480
tcttgaagc atcagcataa gaaacttgta aaccgagacc taaaaccca gtctgggagt	540
gagatgaaga aattcttgag caccctgact atagatggtg taaccggag tgaccaagga	600
ttgtacacct gtgcagcatc cagtgggctg atgaccaaga agaacagcac attgtcagg	660
gtccatgaaa aagacaaaac tcacacatgt ccaccgtgtc cagcacctga actcctgggt	720
ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctccggacc	780
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	840

第 105107330 號專利申請案
序列表替換本(106 年 5 月)

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac	900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc	1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat	1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac	1140
atgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcagtctcc gtgatgatg aggctctgca caaccactac	1320
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa	1353

<210> 46

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VEGF誘捕劑序列加上一訊息序列

<400> 46

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu

20 25 30

Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro

35 40 45

Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro

50 55 60

Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg

65 70 75 80

Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu

85 90 95

Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu

100

105

110

Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser

115

120

125

His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr

130

135

140

Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro

145

150

155

160

Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr

165

170

175

Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp

180

185

190

Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser

195

200

205

Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys

210

215

220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

第 105107330 號專利申請案
序列表替換本(106年5月)

355

360

365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370

375

380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385

390

395

400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

405

410

415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420

425

430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435

440

445

Pro Gly Lys

450

<210> 47

<211> 1644

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGF誘捕劑序列之編碼序列

<400> 47

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgcttcttt gggttcccgg atccactggc 60

cagggcctgg tcgtcacacc cccggggcca gagcttgtcc tcaatgtctc cagcaccttc 120

gttctgacct gctcgggttc agctccggtg gtgtgggaac ggatgtccca ggagccccc 180

caggaaatgg ccaaggcca ggatggcacc ttctccagcg tgctcacact gaccaacctc 240

actgggctag acacgggaga atacttttgc acccacaatg actcccgtgg actggagacc 300

gatgagcgga aacggctcta catctttgtg ccagatccca ccgtgggctt cctccctaat 360

gatgccgagg aactattcat ctttctcag gaaataactg agatcacat tccatgccga 420

gtaacagacc cacagctggt ggtgacactg cacgagaaga aaggggacgt tgcactgcct 480

gtcccctatg ataccaacg tggctttttt ggatctttg aggacagaag ctacatctgc 540

第 105107330 號專利申請案
序列表替換本(106 年 5 月)

aaaaccacca ttggggacag ggaggtggat tctgatgcct actatgtcta cagactccag	600
gtgtcatcca tcaacgtctc tgtgaacgca gtgcagactg tgggccgcca gggtgagaac	660
atcacctca tgtgcattgt gatcgggaat gaggtggta acttcgagtg gacatacccc	720
cgcaaagaaa gtgggaggct ggtggagccg gtgactgact tctcttga tatgccttac	780
cacatccgct ccacctgca catccccagt gccgagtag aagactcggg gacctacacc	840
tgcaatgtga cggagagtgt gaatgacat caggatgaaa aggccatcaa catcacctg	900
gttgagagcg gctacgtgcg gctcctggga gaggtgggca cactacaatt tgctgaggct	960
agcgacaaaa ctacacatg tccaccgtgt ccagcacctg aactcctggg tggaccgtca	1020
gttttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc	1080
acatgcgtgg tggggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttaa ctggtacgtg	1140
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgagg aggagcagta caacagcagc	1200
taccgtgtgg tcagctcct caccgtctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	1260

第 105107330 號專利申請案
序列表替換本(106 年 5 月)

aagtcaagg tccaacaa agccctcca gcccctcg agaaaacct ctcaaagcc 1320

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac acctgcccc catcccggga tgagctgacc 1380

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1440

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1500

tccgacggct ctttctct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1560

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1620

agcctctccc tgtctccggg taaa 1644

<210> 48

<211> 548

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGF誘捕劑序列加上一訊息序列

<400> 48

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Gly Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu

20 25 30

Val Leu Asn Val Ser Ser Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala

35 40 45

Pro Val Val Trp Glu Arg Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala

50 55 60

Lys Ala Gln Asp Gly Thr Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Leu Glu Thr Asp Glu Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp

100 105 110

Pro Thr Val Gly Phe Leu Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe

115 120 125

Leu Thr Glu Ile Thr Glu Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro

130

135

140

Gln Leu Val Val Thr Leu His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro

145

150

155

160

Val Pro Tyr Asp His Gln Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg

165

170

175

Ser Tyr Ile Cys Lys Thr Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp

180

185

190

Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val

195

200

205

Asn Ala Val Gln Thr Val Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met

210

215

220

Cys Ile Val Ile Gly Asn Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro

225

230

235

240

Arg Lys Glu Ser Gly Arg Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu

245

250

255

Asp Met Pro Tyr His Ile Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu

260

265

270

Leu Glu Asp Ser Gly Thr Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn

275

280

285

Asp His Gln Asp Glu Lys Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly

290

295

300

Tyr Val Arg Leu Leu Gly Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu Ala

305

310

315

320

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

325

330

335

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

340

345

350

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

355

360

365

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

370	375	380	
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr			
385	390	395	400
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
	405	410	415
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro			
	420	425	430
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
	435	440	445
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val			
	450	455	460
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
465	470	475	480
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
	485	490	495
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			

500

505

510

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phè Ser Cys Ser Val

515

520

525

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

530

535

540

Ser Pro Gly Lys

545

<210> 49

<211> 2250

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白5序列之編碼序列

<400> 49

cagggcctgg tcgtgacacc tcccggacce gagctggtgc tcaacgtctc ctccaccttt 60

gtgctgacat gcagcggcag cgctcctgtg gtctgggaac ggatgtccca ggagcctccc 120

caggaaatgg ccaaggccca ggacggcacc tttccagcg tctcacact caccaacctg	180
acaggcctgg acaccggcga gtacttttgc acccacaatg actccagggg actggaacc	240
gatgagcggga agcggctcta catttcgtc cccgaccca cgtcggatt tctgctaata	300
gacgctgaag agctgttat ctctcgaca gagatcaccg aatcacat cccctgtcgg	360
gtcaccgatc cccagctggt ggtcacactg cacgagaaga agggagatgt cgcctgcct	420
gtgccttatg accatcagag gggctttcc ggcatcttcg aggacaggag ctacatctgc	480
aaaaccacca tcggagaccg ggaggtcgac agcgatgcct attacgtcta ccggtccag	540
gtctctcca tcaatgtgag cgtgaatgct gtccagacag tggccggca gggcgagaat	600
atcacactga tgtgcattgt cattggcaac gaggtggtca acttcgagtg gacctatct	660
aggaaggaga gcggccggct cgtcgaacct gtgaccgact tctcctgga catgccttac	720
cacattcggc ccatcctgca cattcctagc gccgagctgg aggacagcgg aacctacacc	780
tgcaactgga ccgagtcctg gaatgaccac caggatgaga aggccatcaa catcacagtc	840

gtggagagcg gatacgtcag gctgctcgga gaagtcggca cactgcagtt cgccgaggcc 900

agcgataaga cccacacctg tctccttgt cctgctcctg agctcctcgg cggacctagc 960

gtgtcctgt ttccccctaa gcctaaagac acctcatga tcagccggac ccccgaggtc 1020

acatgcgtgg tggtcgacgt ctcccatgag gatcccagg tgaagtcaa ttggtacgtc 1080

gacggcgtcg aggtccacaa tgccaaaacc aaaccccgagg aggagcagta caacagcacc 1140

tatagggtgg tcagcgtcct gaccgtgctg caccaagact ggctgaacgg caaggagtac 1200

aatgcaaag tcagcaataa ggccctcccc gccccattg agaagacat ctccaaggct 1260

aaggccaac ctaggagcc ccaggtgtac acctgcctc ccagccggga tgagctgaca 1320

aagaaccagg tgagcctcac ctgtctggtg aagggtttt acccctccga tattgccgtg 1380

gagtgggaaa gcaacggaca gcctgagaac aactacaaga caaccccc tgtcctggac 1440

agcgatggct ccttcttct gtacagcaag ctgacagtgg ataagagccg gtggcagcag 1500

ggaaacgtct ttagctgcag cgtgatgcat gaggccctgc acaatcacta cacccagaag 1560

tcctgtccc tgagccctgg cggaggcggc ggcggcggca gcggcggagg cggatccggc 1620

ggaggcggct ccggagacac cggaaggccc ttcgtggaga tgtacagcga gattcctgag 1680

attatccaca tgaccgaggg acgggaactg gtgattccct gccgggtcac cagccccaac 1740

atcacctga cctcaagaa gttccccctg gacaccctga tccctgacgg caaaaggatt 1800

atctgggaca gccggaaggg ctttatcatc agcaatgccca catacaagga gattggactc 1860

ctgacctgag aggctacagt caacggacac ctgtacaaga ccaactacct gaccaccgg 1920

cagaccaata ccatcatcga cgtggtgctg agccccagcc acggaattga gctgagcgtg 1980

ggagaaaaac tcgtgctcaa ctgcacagcc cggaccgaac tcaatgtcgg aatcgacttc 2040

aactgggaat accccagctc caagcaccag cacaagaagc tggtaaccg ggatctcaag 2100

accagtcgg gcagcgaat gaagaagttc ctgaccacc tgaccatcga tggcgtcaca 2160

aggagcgatc agggactcta cacctgcgcc gctagctccg gactcatgac caagaagaac 2220

tccacattg tccgggtgca cgaaaagtga 2250

<210> 50

<211> 768

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白5加上一訊息胜肽序列

<400> 50

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Gly Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val

20 25 30

Leu Asn Val Ser Ser Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro

35 40 45

Val Val Trp Glu Arg Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys

50 55 60

Tyr Tyr Val Tyr Arg Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn

195

200

205

Ala Val Gln Thr Val Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys

210

215

220

Ile Val Ile Gly Asn Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg

225

230

235

240

Lys Glu Ser Gly Arg Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp

245

250

255

Met Pro Tyr His Ile Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu

260

265

270

Glu Asp Ser Gly Thr Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp

275

280

285

His Gln Asp Glu Lys Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr

290

295

300

Val Arg Leu Leu Gly Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu Ala Ser

305

310

315

320

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

325

330

335

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

340

345

350

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

355

360

365

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

370

375

380

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

385

390

395

400

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

405

410

415

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

420

425

430

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

435

440

445

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

450 455 460

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

465 470 475 480

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

485 490 495

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

500 505 510

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

515 520 525

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

530 535 540

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

545 550 555 560

Gly Gly Ser Gly Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu

565 570 575

Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro

580

585

590

Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro

595

600

605

Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg

610

615

620

Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu

625

630

635

640

Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu

645

650

655

Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser

660

665

670

His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr

675

680

685

Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro

690

695

700

Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr

705

710

715

720

Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp

725

730

735

Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser

740

745

750

Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys

755

760

765

I675844

發明摘要

※ 申請案號：105107330

※ 申請日：2016年3月10日

※IPC 分類：**C07K 14/71** (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

多靶向融合蛋白及其應用/MULTI-TARGETING FUSION PROTEINS AND
USES THEREOF

【中文】

本發明係關於融合蛋白，其係含有PDGF結合部分 (binding portion)、VEGF結合部分、及Fc抗體區。本發明亦關於編碼該融合蛋白之核酸、包含該融合蛋白之組合物、及使用該融合蛋白以治療或預防臨床症狀之方法，該臨床症狀之特徵在於異常的血管生成，例如血管滲透性、水腫、或發炎。

【英文】

Fusion proteins containing a PDGF binding portion, a VEGF binding portion, and an Fc antibody region are described. Also described are nucleic acids encoding the fusion proteins, compositions comprising the fusion proteins, and methods of using the fusion proteins for treating or preventing clinical conditions characterized by abnormal angiogenesis, such as vascular permeability, edema or inflammation.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第1圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無。

申請專利範圍

1. 一種融合蛋白，其係包含：
 - a. 一第一胜肽，其係包含一VEGF受體之胞外配體結合域 (binding domain)，且該VEGF受體之胞外配體結合域係包含一VEGFR1之類免疫球蛋白結構域D2 (Ig-like domain D2)、及一VEGFR2之類免疫球蛋白結構域D3；
 - b. 一抗體之Fc區 (Fc region)，其係包含IgG1之一CH2及一CH3區；
以及
 - c. 一第二胜肽，其係包含一PDGF受體之胞外配體結合域，且該PDGF受體之胞外配體結合域係由PDGFR β 之類免疫球蛋白結構域D1至D3所組成；

其中，該融合蛋白從N端至C端係依選自由以下所組成之群組的次序排列：(a) - (b) - (c) 及 (c) - (b) - (a)；以及

其中，該融合蛋白係可以結合至一VEGF及一PDGF以及抑制該VEGF之活性及該PDGF之活性。

2. 如請求項1所述之融合蛋白，其中：
 - a. 該VEGF受體之胞外配體結合域係包含一與SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性之一胺基酸序列；
 - b. 該抗體之Fc區係包含一與SEQ ID NO: 12具有至少90%同一性之胺基酸序列；以及
 - c. 該PDGF受體之胞外配體結合域係包含一與SEQ ID NO: 2具有至少90%同一性之胺基酸序列。
3. 如請求項2所述之融合蛋白，其中：
 - a. 該VEGF受體之胞外配體結合域係包含選自由以下所組成之群

- 組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO:10；
- b. 該抗體之Fc區係包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：
SEQ ID NO: 12及SEQ ID NO:15；以及
- c. 該PDGF受體之胞外配體結合域係包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 2及SEQ ID NO:5。
4. 如請求項1至3中之任一項所述之融合蛋白，其更包含一第一連接胜肽（linker peptide），其係位於該融合蛋白之C端處之第一或第二胜肽與該Fc區之間，以及視需要包含一第二連接胜肽，其係位於該融合蛋白之N端處之第二或第一胜肽與該Fc區之間。
5. 如請求項4所述之融合蛋白，其中該第一連接胜肽係包含一或多個選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、及SEQ ID NO: 32，以及該第二連接胜肽係包含一SEQ ID NO: 18之胺基酸序列。
6. 如請求項1至3中任一項所述之融合蛋白，其中該融合蛋白更包含一連接至該融合蛋白之N端的訊息胜肽（signal peptide）。
7. 如請求項4所述之融合蛋白，其中該融合蛋白更包含一連接至該融合蛋白之N端的訊息胜肽。
8. 如請求項5所述之融合蛋白，其中該融合蛋白更包含一連接至該融合蛋白之N端的訊息胜肽。
9. 一種融合蛋白，其係包含一與SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 42之胺基酸20-766、SEQ ID NO: 44之胺基酸21-769、或SEQ ID NO: 50之胺基酸20-768具有至少90%序列同一性之胺基酸序列。
10. 一種融合蛋白，其係包含一選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：

SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 42之胺基酸20-766、SEQ ID NO: 44之胺基酸21-769、及SEQ ID NO: 50之胺基酸20-768。

11. 一種分離核酸分子 (isolated nucleic acid molecule)，其係編碼如請求項1至10中任一項之融合蛋白。
12. 一種宿主細胞，其係包含一編碼如請求項1至10中任一項之融合蛋白的核酸分子。
13. 一種用於製造如請求項1至10中任一項之融合蛋白的方法，其係包含：
 - (1)在製造該融合蛋白之條件下培養一宿主細胞，其係包含一編碼如請求項1至8中任一項之融合蛋白的核酸分子；以及
 - (2)回收該宿主細胞所製造之融合蛋白。
14. 一種醫藥組合物，其係包含如請求項1至10中任一項之融合蛋白、及一醫藥上可接受之載體。
15. 一種醫藥組合物，其係包含一編碼如請求項1至10中任一項之融合蛋白之核酸分子、及一醫藥上可接受之載體。
16. 一種使用如請求項1至10中任一項之融合蛋白於製備治療或預防一臨床症狀之藥劑的用途，該臨床症狀係選自由以下所組成之群組：血管新生、血管滲透性、水腫、纖維化及發炎。
17. 一種使用如請求項1至10中任一項之融合蛋白於製備治療或預防一臨床症狀之藥劑的用途，該臨床症狀係選自由以下所組成之群組：脈絡膜血管新生 (choroidal neovascularization, CNV)、視網膜血管新生、老年性黃斑退化 (age-related macular degeneration, AMD)、地圖樣萎縮 (geographic atrophy)、糖尿病視網膜病變 (diabetic retinopathy)、虹膜發紅 (rubeosis iridis)、血管新生性青光眼 (neovascular glaucoma)、眼色素層炎、及色素性視網膜炎。

18. 一種使用如請求項1至10中任一項之融合蛋白於製備治療一臨床症狀之藥劑的用途，該臨床症狀係癌症。