

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15 / 57
C12N 9 / 68 A61K 38 / 48
C12N 1 / 21 C12N 1 / 19

[21] 申请号 96194077.8

[43]公开日 1998年10月7日

[11] 公开号 CN 1195375A

[22]申请日 96.4.26

[30]优先权

[32]95.4.26 [33]US[31]08 / 429,743

[32]96.2.22 [33]US[31]08 / 605,598

[32]96.3.8 [33]US[31]08 / 612,788

[86]国际申请 PCT / US96 / 05856 96.4.26

[87]国际公布 WO96 / 35774 英 96.11.14

[85]进入国家阶段日期 97.11.21

[71]申请人 儿童医学中心公司

地址 美国马萨诸塞州

[72]发明人 M·J·福克曼 M·S·奥赖利

Y·曹林杰

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标

事务所

代理人 李 瑛

权利要求书 9 页 说明书 126 页 附图页数 46 页

[54]发明名称 血管抑制素片段和集合血管抑制素及其使用方法

[57]摘要

本发明提供了内皮细胞增殖抑制剂的片段和集合形式及使用它们的方法。内皮细胞增殖抑制剂是源于纤溶酶原的蛋白质，或者更具体地说是一种血管抑制素片段。血管抑制素片段通常相应于内皮细胞增殖抑制剂内的 krinkle 结构。血管抑制素也以集合形式制备。血管抑制素片段和集合血管抑制素的内皮细胞抑制活性给出了抑制肿瘤的血管生成和治疗血管生成介导的疾病的方法。

∴

权 利 要 求 书

1. 一种抑制内皮细胞增殖的方法，该方法包括对内皮细胞施用增殖抑制量的血管抑制素片段。

2. 权利要求 1 的方法，其中所说的血管抑制素片段具有小于约 500nM 的内皮细胞 ED₅₀。

3. 权利要求 1 的方法，其中所说的血管抑制素片段源于鼠纤溶酶原、人纤溶酶原、恒河猴纤溶酶原、猪纤溶酶原或牛纤溶酶原。

4. 权利要求 1 的方法，其中所说的血管抑制素片段包含选自由下列序列组成的组的氨基酸序列或者它们的组合体或功能性同系物： SEQ ID NO: 7； SEQ ID NO: 8； SEQ ID NO: 9； SEQ ID NO: 10； SEQ ID NO: 11； SEQ ID NO: 12； SEQ ID NO: 13； SEQ ID NO: 14； SEQ ID NO: 15； SEQ ID NO: 16； SEQ ID NO: 17； SEQ ID NO: 18； SEQ ID NO: 19； SEQ ID NO: 20； SEQ ID NO: 21； SEQ ID NO: 22； SEQ ID NO: 23； SEQ ID NO: 24； SEQ ID NO: 25； SEQ ID NO: 26； SEQ ID NO: 27； SEQ ID NO: 28； SEQ ID NO: 29； SEQ ID NO: 30； SEQ ID NO: 31； SEQ ID NO: 32； SEQ ID NO: 33； SEQ ID NO: 34； SEQ ID NO: 35； SEQ ID NO: 36； SEQ ID NO: 37； SEQ ID NO: 38； SEQ ID NO: 39； SEQ ID NO: 40； SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 42。

5. 权利要求 1 的方法，其中所说的血管抑制素片段是 kringle 1 蛋白质。

6. 权利要求 5 的方法，其中所说的 kringle 1 蛋白质具有小于约 350nM 的内皮细胞 ED₅₀。

7. 权利要求 5 的方法，其中所说的 kringle 1 蛋白质包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列或其功能性同系物。

8. 权利要求 1 的方法，其中所说的血管抑制素片段是 kringle 2 蛋白质。

9. 权利要求 8 的方法，其中所说的 kringle 2 蛋白质包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列或其功能性同系物。

10. 权利要求 1 的方法，其中所说的血管抑制素片段是 kringle 3 蛋

白质。

11. 权利要求 10 的方法, 其中所说的 kringle 3 蛋白质具有小于约 475nM 内皮细胞 ED₅₀。

12. 权利要求 10 的方法, 其中所说的 kringle 3 蛋白质包含 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列或其功能性同系物。

13. 权利要求 1 的方法, 其中所说的血管抑制素片段是 kringle 2-3 蛋白质。

14. 权利要求 13 的方法, 其中所说的 kringle 2-3 蛋白质包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列或其功能性同系物。

15. 权利要求 1 的方法, 其中所说的血管抑制素片段是 kringle 1-3 蛋白质。

16. 权利要求 15 的方法, 其中所说的 kringle 1-3 蛋白质具有小于约 100nM 的内皮细胞 ED₅₀。

17. 权利要求 15 的方法, 其中所说的 kringle 1-3 蛋白质包含 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列或其功能性同系物。

18. 权利要求 1 的方法, 其中所说的血管抑制素片段是 kringle 1-2 蛋白质。

19. 权利要求 18 的方法, 其中所说的 kringle 1-2 蛋白质包含 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列或其功能性同系物。

20. 权利要求 1 的方法, 其中所说的血管抑制素片段是 kringle 1-4 蛋白质。

21. 权利要求 20 的方法, 其中所说的 kringle 1-4 蛋白质具有小于约 150nM 的内皮细胞 ED₅₀。

22. 权利要求 20 的方法, 其中所说的 kringle 1-4 蛋白质包含选自由 SEQ ID NO: 39 和 SEQ ID NO: 40 组成的组的氨基酸序列或它们的功能性同系物。

23. 权利要求 1 的方法, 其中所说的血管抑制素片段是 kringle 1-4BKLS 蛋白质。

24. 权利要求 23 的方法, 其中所说的 kringle 1-4BKLS 蛋白质包含 SEQ ID NO: 42 的氨基酸序列或其功能性同系物。

⋮

25. 权利要求 1 的方法, 其中所说的施用步骤包括施用两种或多种血管抑制素片段的组合体。

26. 权利要求 25 的方法, 其中所说的血管抑制素片段的组合体包含 kringle 1 蛋白质和 kringle 2 蛋白质。

27. 权利要求 26 的方法, 其中所说的 kringle 1 蛋白质包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列或其功能性同系物, 所说的 kringle 2 蛋白质包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列或其功能性同系物。

28. 权利要求 25 的方法, 其中所说的血管抑制素片段的组合体包含 kringle 1 蛋白质和 kringle 2-3 蛋白质。

29. 权利要求 28 的方法, 其中所说的 kringle 1 蛋白质包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列或其功能性同系物, 所说的 kringle 2-3 蛋白质包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列或其功能性同系物。

30. 权利要求 25 的方法, 其中所说的血管抑制素片段的组合体包含 kringle 1 蛋白质、kringle 2 蛋白质和 kringle 3 蛋白质。

31. 权利要求 30 的方法, 其中所说的 kringle 1 蛋白质包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列或其功能性同系物, 所说的 kringle 2 蛋白质包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列或其功能性同系物, 所说的 kringle 3 蛋白质包含 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列或其功能性同系物。

32. 权利要求 25 的方法, 其中所说的血管抑制素片段的组合体包含 kringle 2 蛋白质和 kringle 3 蛋白质。

33. 权利要求 32 的方法, 其中所说的 kringle 2 蛋白质包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列或其功能性同系物, 所说的 kringle 3 蛋白质包含 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列或其功能性同系物。

34. 一种治疗哺乳动物血管生成介导的疾病的方法, 该方法包括对哺乳动物施用治疗有效量的血管抑制素片段。

35. 权利要求 34 的方法, 其中所说的哺乳动物是人。

36. 权利要求 34 的方法, 其中所说的血管生成介导的疾病选自癌、风湿性关节炎、黄斑变性和糖尿病视网膜病组成的组。

37. 权利要求 34 的方法, 其中所说的血管抑制素片段选自由 kringle 1 蛋白质、kringle 2 蛋白质、kringle 3 蛋白质、kringle 2-3 蛋白质、

⋮

kringle 1-3 蛋白质、kringle 1-2 蛋白质、kringle 1-4 蛋白质和 kringle 1-4BKLS 蛋白质组成的组或它们的组合体。

38. 权利要求 34 的方法, 其中所说的血管抑制素片段包含选自由下列序列组成的组的氨基酸序列或者它们的组合体或功能性同系物: SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 42。

39. 权利要求 34 的方法, 其中所说的血管抑制素片段具有小于约 500nM 的内皮细胞 ED_{50} 。

40. 血管抑制素片段在制造供抑制血管生成之治疗应用的药物上的用途。

41. 权利要求 40 的用途, 其中所说的血管抑制素片段具有小于约 500nM 的内皮细胞 ED_{50} 。

42. 权利要求 40 的用途, 其中所说的血管抑制素片段源于鼠纤溶酶原、人纤溶酶原、恒河猴纤溶酶原、猪纤溶酶原或牛纤溶酶原。

43. 权利要求 40 的用途, 其中所说的血管抑制素片段包含选自由下列序列组成的组的氨基酸序列或者它们的组合体或功能性同系物: SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 42。

44. 一种抑制内皮细胞增殖的治疗组合物, 该组合物包含实质上分离的血管抑制素片段和药学上可接受的赋形剂。

45. 权利要求 44 的组合物, 其中所说的血管抑制素片段源于鼠纤溶酶原、人纤溶酶原、恒河猴纤溶酶原、猪纤溶酶原或牛纤溶酶原。

46. 权利要求 44 的组合物, 其中所说的血管抑制素片段选自由 kringle 1 蛋白质、kringle 2 蛋白质、kringle 3 蛋白质、kringle 2-3 蛋白质、kringle 1-3 蛋白质、kringle 1-2 蛋白质、kringle 1-4 蛋白质和 kringle 1-4BKLS 组成的组或它们的组合体。

47. 权利要求 44 的组合物, 其中所说的血管抑制素片段包含选自由下列序列组成的组的氨基酸序列的部分或者它们的组合体或功能性同系物:

SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 42。

48. 一种包含分离的 DNA 序列的组合物, 所说 DNA 序列编码具有内皮细胞增殖抑制活性的血管抑制素片段。

49. 权利要求 48 的组合物, 其中所说的血管抑制素片段选自由 kringle 1 蛋白质、kringle 2 蛋白质、kringle 3 蛋白质、kringle 2-3 蛋白质、kringle 1-3 蛋白质、kringle 1-2 蛋白质、kringle 1-4 蛋白质和 kringle 1-4BKLS 组成的组或它们的组合体。

50. 权利要求 48 的组合物, 其中所说的 DNA 序列编码选自由下列序列组成的组的氨基酸序列或者它们的组合体或功能性同系物: SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25;

SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 42。

51. 权利要求 48 的组合物, 该组合物还包含与编码血管抑制素片段的 DNA 序列有关的载体, 其中所说的载体当存在于细胞中能表达血管抑制素片段。

52. 权利要求 51 的组合物, 该组合物还包含含有所说载体的细胞。

53. 一种表达具有内皮细胞增殖抑制活性的血管抑制素片段的方法, 该方法包括把载体转染进细胞, 其中所说的载体包含编码所说的血管抑制素片段的 DNA 序列, 其中所说的载体当存在于细胞中能表达血管抑制素片段。

54. 权利要求 53 的方法, 其中所说的血管抑制素片段选自由 kringle 1 蛋白质、kringle 2 蛋白质、kringle 3 蛋白质、kringle 2-3 蛋白质、kringle 1-3 蛋白质、kringle 1-2 蛋白质、kringle 1-4 蛋白质和 kringle 1-4BKLS 组成的组或它们的组合体。

55. 权利要求 53 的方法, 其中所说的编码包含氨基酸序列的血管抑制素片段的 DNA 序列选自由下列序列组成的组或者它们的组合体或功能性同系物: SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 42。

56. 一种抑制内皮细胞增殖的组合物, 该组合物包含集合血管抑制素。

57. 权利要求 56 的组合物, 其中所说的集合血管抑制素通过还原聚丙烯酰胺凝胶电泳测定具有约 45 至 65 千道尔顿的分子量。

58. 权利要求 56 的组合物, 其中所说的集合血管抑制素源于在约第 98 个氨基酸开始的纤溶酶原片段, 这些纤溶酶原片段源于人纤溶酶、鼠纤溶酶原、牛纤溶酶原、恒河猴纤溶酶原或猪纤溶酶原。

59. 权利要求 58 的组合物, 其中所说的集合血管抑制素包含选自由 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 组成的组的氨基酸序列或它们的功能性同系物。

60. 权利要求 56 的组合物, 其中所说的集合血管抑制素源于重组血管抑制素。

61. 权利要求 56 的组合物, 其中所说的集合血管抑制素能抑制血管生成介导的疾病。

62. 权利要求 61 的组合物, 其中所说的疾病选自由癌、风湿性关节炎、黄斑变性和糖尿病视网膜病组成的组。

63. 一种抑制内皮细胞增殖的方法, 该方法包括对内皮细胞施用增殖抑制量的集合血管抑制素。

64. 权利要求 63 的方法, 其中所说的集合血管抑制素通过还原聚丙烯酰胺凝胶电泳测定具有约 45 至 65 千道尔顿的分子量。

65. 权利要求 63 的方法, 其中所说氨基集合血管抑制素源于在约第 98 个氨基酸开始的纤溶酶原片段, 这些纤溶酶原片段源于人纤溶酶、鼠纤溶酶原、牛纤溶酶原、恒河猴纤溶酶原或猪纤溶酶原。

66. 权利要求 63 的方法, 其中所说的集合血管抑制素包含选自由 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 组成的组的氨基酸序列或它们的功能性同系物。

67. 权利要求 63 的方法, 其中所说的集合血管抑制素源于重组血管抑制素。

68. 权利要求 63 的方法, 其中所说的集合血管抑制素能抑制血管生成介导的疾病。

69. 权利要求 68 的方法, 其中所说的血管生成介导的疾病选自由癌、风湿性关节炎、黄斑变性和糖尿病视网膜病组成的组。

70. 一种治疗患有血管生成介导的疾病的哺乳动物的方法, 该方法包括对哺乳动物施用血管生成介导的疾病治疗有效量的集合血管抑制素。

71. 集合血管抑制素在制造供抑制血管生成之治疗应用的药物上的用途。

72. 权利要求 71 的用途, 其中所说的集合血管抑制素通过还原聚丙烯酰胺凝胶电泳测定具有约 45 至 65 千道尔顿的分子量。

73. 权利要求 71 的方法, 其中所说集合血管抑制素源于在约第 98 个氨基酸开始的纤溶酶原片段, 这些纤溶酶原片段源于人纤溶酶、鼠纤溶酶原、牛纤溶酶原、恒河猴纤溶酶原或猪纤溶酶原。

74. 权利要求 71 的方法, 其中所说的集合血管抑制素包含选自由 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 组成的组的氨基酸序列或它们的功能性同系物。

75. 一种产生用于抑制内皮细胞增殖的集合血管抑制素的方法, 该方法包括:

纯化血管抑制素, 和
集合纯化的血管抑制素。

76. 权利要求 75 的方法, 其中所说的集合步骤通过透析血管抑制素进行。

77. 权利要求 76 的方法, 其中所说的透析步骤进行约 24 小时, 并至少改变三次透析液。

78. 权利要求 77 的方法, 其中所说的透析步骤在约 4 °C 下进行。

79. 权利要求 75 的方法, 其中所说的集合血管抑制素源于重组血管抑制素。

80. 权利要求 79 的方法, 其中所说的重组血管抑制素包含寡组氨酸部分, 所说的纯化步骤使用镍亲和性色谱柱进行。

81. 权利要求 75 的方法, 其中所说的集合血管抑制素通过还原聚丙烯酰胺凝胶电泳测定具有约 45 至 65 千道尔顿的分子量。

82. 由权利要求 75 的方法制备的产物。

83. 一种组合物, 该组合物包含集合血管抑制素和药学上可接受的赋形剂。

84. 权利要求 83 的组合物, 该组合物还包含持久释放基质。

85. 权利要求 83 的组合物, 其中所说的集合血管抑制素通过还原聚丙

烯酰胺凝胶电泳测定具有约 45 至 65 千道尔顿的分子量。

说 明 书

血管抑制素片段和集合血管抑制素及其使用方法

发明所属技术领域

本发明涉及称为血管抑制素的内皮细胞抑制剂，它可逆地抑制内皮细胞的增殖。更具体地说，本发明涉及血管抑制素蛋白质，它可从体液(如血液或尿液)中分离，或可通过重组、酶促或化学方法合成。血管抑制素能够抑制与血管生成有关的疾病并调节血管生成过程。此外，本发明涉及诊断测定法和用于血管抑制素测定的试剂盒、血管抑制素的定位的组织化学试剂盒、编码血管抑制素的DNA序列和监测血管抑制素生物合成的分子探针、对血管抑制素特异性的抗体、血管抑制素受体的蛋白质激动剂和拮抗剂的开发、抗血管抑制素受体-特异性的抗体激动剂和拮抗剂以及连接到血管抑制素蛋白质上的细胞毒素剂。

发明背景

本文使用的术语“血管生成”指新的血管在组织或器官中生成。在正常的生理条件下，人或动物仅在非常特定的情况下进行血管生成。例如，血管生成通常可在创伤愈合、胎儿和胚胎发育以及黄体、子宫内膜和胎盘形成中观察到。术语“内皮细胞层”指扁平上皮细胞薄层，其顺着浆膜腔、淋巴血管和血管排列。

现认为控制的和不受控制的血管生成以类似的方式进行。由基膜围绕的内皮细胞和周皮细胞形成毛细血管。血管生成以内皮细胞和白细胞释放的酶侵蚀基膜开始。然后内皮细胞(顺着血管腔排列)通过基膜突出。血管生成刺激物诱导内皮细胞迁移穿过受侵蚀的基膜。迁移细胞形式“萌芽”脱离亲本血管，其中内皮细胞进行有丝分裂和增殖。内皮细胞萌芽相互融合以形成毛细血管回路，产生了新的血管。

持久的、无规律的血管生成发生于多种疾病状态、通过内皮细胞的肿瘤转移和异常生长之中，并和这些情况下所见的病理破坏一致。多种病理

疾病状态(在其中存在无规律的血管生成)一起作为血管生成依赖性的或血管生成有关的疾病。

肿瘤生长是血管生成依赖性的假说首先在 1971 年提出(Follunan J., 肿瘤血管生成: 治疗暗示, N. Engl. Jour. Med. 285:1182-1186, 1971)。这种假说以其最简单的术语指出: “一旦肿瘤‘发病’出现, 在肿瘤细胞群上的所有增长必须先进行聚集在肿瘤上的新毛细血管的增长”。目前对肿瘤‘发病’的理解是指肿瘤生长的前血管阶段, 其中占据几立方毫米体积并不超过几百万细胞的肿瘤细胞群能在宿主微血管上存活。肿瘤体积在这个阶段以外的扩展需要新的毛细血管的诱导。例如, 在小鼠的早期的前血管阶段中, 肺部的微转移仅可通过高倍显微镜在组织切片上检测到。

支持这个概念的间接证据的例子包括:

(1) 移植在小鼠皮下透明室中的肿瘤的生长速率在新血管形成之前是缓慢的和线性的, 在新血管形成后是快速的和近指数的(Algire GH 等, 体内正常和恶性肿瘤的血管反应. I. 小鼠血管对创伤和正常而致瘤性移植物的反应, J. Natl. Cancer Inst. 6: 73-85, 1945)。

(2) 在分离的灌注器官中的肿瘤生长(其中血管不增殖)限定到 $1-2\text{mm}^3$, 但当它们移植到小鼠中并成为新形成的血管时就迅速扩张至 1000 倍的体积(Follunan J, 等, 在分离的灌注器官中的肿瘤行为: 在兔甲状腺和犬肠片段中的活组织检查材料的体外生长和转移, 手术年报 164: 491-502, 1966)

(3) 在无血管的角膜中的肿瘤生长以线性速率缓慢进行, 但是在新血管形成后转换为指数生长(Gimbrone, M. A., Jr. 等, 肿瘤生长与新血管形成: 使用兔角膜的试验模型. J. Natl. Cancer Institute 52: 41-427, 1974)。

(4) 悬浮在兔眼睛的前房含水液体中的肿瘤是有活力的和无血管的, 而且体积限制在 $<1\text{mm}^3$ 。一旦把它们移植到虹膜血管床上后, 它们形成新血管并迅速生长, 在 2 周内达到它们原来体积的 16,000 倍(Gimbrone MA Jr. 等, 通过预防新血管形成使肿瘤体内休眠, J. Exp. Med. 136: 261-276)。

(5) 当把肿瘤移植在鸡胚绒膜尿囊膜上时, 它们在 <72 小时的无血管阶段生长缓慢, 但不超过 $0.93 \pm 0.29\text{mm}$ 的平均直径。肿瘤的迅速扩展发生在

新血管形成开始后的 24 小时内, 到第 7 天时这些血管形成的肿瘤达到 $8.0 \pm 2.5\text{mm}$ 的平均直径 (Knighton D., 在鸡胚中的肿瘤生长的无血管和血管阶段, 英国癌症杂志, 35: 347-356, 1977)。

(6) 在兔肝脏中的转移的血管模型揭示出转移大小的不均匀性, 但是显示出对于血管形成存在的大小的相对均匀的截止点。肿瘤通常是无血管地达到 1mm 的直径, 但是新血管形成超出了该直径 (Lien W. 等, 试验肝脏转移的血液供应. II. 使用灌注的硅酮橡胶的正常和肿瘤血管的微循环研究, 外科 68: 334-340, 1970)。

(7) 在患胰岛的 β 细胞癌的转基因小鼠中, 前血管增生的胰岛大小限制在 $<1\text{mm}$ 。在 6-7 周时, 胰岛的 4-10% 形成新血管, 从这些胰岛中形成了比前血管胰岛的体积大 1000 倍以上的大血管形成的肿瘤 (Follunan J, 等, 在从瘤形成到增生转变期间血管生成的诱导, 自然 339: 58-61, 1989)。

(8) 抗 VEGF (血管内皮生长因子) 的特异性抗体减少了微血管密度并引起的三个患者肿瘤生长“明显或剧烈的”抑制, 这些肿瘤依赖于 VEGF 作为其血管生成的唯一介质 (在裸小鼠中)。抗体在体外不抑制肿瘤细胞的生长 (Kim KJ, 等, 抑制血管内皮生长因子诱导的血管生成在体内抑制肿瘤生长, 自然 362: 841-844, 1993)。

(9) 抗 bFGF 单克隆抗体造成小鼠肿瘤生长的 70% 抑制, 这种肿瘤生长依赖于 bFGF 的分泌作为其血管生成的唯一介质。抗体在体外不抑制肿瘤细胞的生长 (Hori A, 等, 通过抗人基本成纤维细胞生长因子的免疫中和单克隆抗体抑制固体肿瘤的生长, 癌症研究, 51: 6180-6184, 1991)。

(10) bFGF 的腹膜内注射通过刺激肿瘤中毛细血管内皮细胞的生长提高最初的肿瘤的生长及其转移。肿瘤细胞自身缺乏 bFGF 受体, 在体外 bFGF 不是肿瘤细胞的促细胞分裂剂 (Gross JL, 等, 在体内通过 bFGF 调节固体肿瘤生长, 美国科学院学报, 31: 79, 1990)。

(11) 特异性的血管生成抑制剂 (AGM-1470) 抑制了肿瘤在体内的生长和转移, 但在体外抑制肿瘤细胞增殖的活性却小得多。它在 4 logs 的低浓度下抑制血管内皮细胞增殖为它抑制肿瘤细胞增殖最大值的一半 (Ingber D, 等, 血管抑制素: 抑制血管生成和肿瘤生长的夫马霉素的合成同系物, 自然, 48: 555-557, 1990)。也有肿瘤生长是血管生成依赖性的间接临床

证据。

(12) 转移到玻璃体的人成视网膜细胞瘤发育成无血管的球状体, 尽管这些无血管的球状体是可生存的并掺入进³H-胸腺嘧啶核甙的事实, 它们被限定在不到1mm³(当从摘出的眼中取下并体外分析时)。

(13) 卵巢癌作为微小的无血管白色子瘤(1-3mm³)转移至腹膜。直到它们中的一个或多个形成新血管后, 这些移植体很少生长得更大。

(14) 在胸部癌中(Weidner N, 等, 在入侵性胸部癌中肿瘤血管生成与转移有关, N. Engl. J. Med. 324: 1-8, 1991; Weidner N, 等, 肿瘤血管生成: 在早期胸部癌中的一个新的明显而依赖性的预测指示, J Natl. Cancer Inst. 84: 1875-1887, 1992)和在前列腺癌中(Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Follunan J. 在入侵性前列腺癌中肿瘤血管生成与转移有关, 美国病理学杂志, 143(2): 401-409, 1993)的新血管形成强度和将来转移的风险高度相关。

(15) 在新血管形成之前, 人皮肤黑素瘤很少转移。新血管形成的开始导致了损伤厚度的增加和转移风险的增加(Srivastava A, 等, 在中间厚度(厚0.76-4.0mm)皮肤黑素瘤中肿瘤多血管状态预测的重要性, 美国病理学杂志, 133: 419-423, 1988)。

(16) 在膀胱癌中, 血管生成蛋白质(bFGF)的泌尿水平是比细胞学更敏感的状态和疾病程度的指示(Nguyen M, 等, 在膀胱癌患者的尿液中提高的血管生成蛋白质的水平和基本成纤维细胞生长因子, J. Natl. Cancer Inst. 85: 241-242, 1993)。

这样, 很明显血管生成在癌的转移中起着主要作用。如果可以抑制或消除这种血管生成活性, 肿瘤尽管存在却不能生长。在疾病状态下, 预防血管生成可避免新血管系统的入侵造成的破坏。针对控制血管生成过程的治疗法可导致这些疾病的治愈或减轻。

因此, 需要的是可抑制血管不期望的生长(尤其是生长进肿瘤)的组合物与方法。同时需要的是用于检测、测定和定位的方法和组合物。组合物应能克服在转移性肿瘤中的内源生长因子的活性并预防在肿瘤中的毛细血管的形成, 进而抑制肿瘤的生长。组合物、组合物的部分和对组合物特异性的抗体也应能调节其它血管生成过程中(如创伤治愈和再生)的毛细血管

形成。用于抑制血管生成的组合物与方法优选地应是非毒性的，而且副作用很小。同时需要的是用于检测、测定和定位组合物的结合位点以及组合物生物合成的位点。组合物和组合物的片段应能和其它分子缀合以用于放射性和非放射性标记目的。

发明概述

本发明提供了有效地调节血管生成以及抑制不期望的血管生成(具体来说是与肿瘤生长有关的血管生成)的组合物和方法。本发明包括命名为“血管抑制素”的蛋白质，该蛋白质通过其克服内源生长因子(如 bFGF)在体外的血管生成活性的能力、其氨基酸序列同源性以及约在纤溶酶原氨基酸 98 开始的纤溶酶原的内部部分的结构相似性定义。血管抑制素包含通过还原聚丙烯酰胺凝胶电泳测定具有约 45 至 65 千道尔顿的分子量以及具有和完整的鼠纤溶酶原分子的第 98 个氨基酸开始的鼠纤溶酶原片段实质上类似的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2) 的蛋白质。

血管抑制素的氨基酸序列随物种的变化而稍有变化。例如，在人血管抑制素中，虽然活性人血管抑制素序列可在完整的人纤溶酶原氨基酸序列的第 97 或 99 个氨基酸开始，氨基酸序列实质上类似于上述的鼠纤溶酶原片段的序列。如在小鼠肿瘤模型中所示，人纤溶酶原的片段也有类似的抗血管生成活性。可以理解：在活性血管抑制素分子中氨基酸的数目可以变化，并且具有内皮细胞抑制活性的所有氨基酸序列都包括在本发明内。

本发明提供了用于治疗由不合需要的和不受控制的血管生成介导的疾病和病变的方法和组合物，该方法通过对人和动物施用组合物进行，其中所说的组合物包含实质上纯化的足以抑制血管生成之剂量的血管抑制素、血管抑制素衍生物、血管抑制素片段或集合 (aggregate) 血管抑制素。本发明特别用于治疗并抑制肿瘤的生长。对具有前血管形成的转移瘤的人或动物施用血管抑制素可预防这些肿瘤的生长或扩张。

本发明也包括编码血管抑制素的 DNA 序列、包含编码血管抑制素的 DNA 序列的表达载体以及包含一个或多个含有编码血管抑制素的 DNA 序列的表达载体的细胞。本发明还包括基因疗法，通过此方法把编码血管抑制素的 DNA 序列导入患者中以改善体内血管抑制素的水平。

本发明也包括用于检测和测定生物体液和组织中的血管抑制素以及在组织和细胞中定位血管抑制素的诊断方法和试剂盒。诊断方法和试剂盒可以是本领域普通技术人员已知的任何形态。本发明也包括对血管抑制素分子及其部分特异性的抗体以及对抑制血管抑制素特异性的抗体之结合的抗体。这些抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。对血管抑制素特异性的抗体可用于诊断试剂盒以检测血管抑制素的存在和数量(用于癌或其它血管生成介导的疾病发生或复发的诊断或预测)。对血管抑制素特异性的抗体也可施用给人或动物以被动免疫抗血管抑制素的人或动物, 进而降低血管生成的抑制。

本发明也包括用于检测在体液中结合血管抑制素的抗体的存在和数量的诊断方法和试剂盒。诊断方法和试剂盒可以是本领域普通技术人员已知的任何形态。

本发明也包括抗血管抑制素受体特异性的抗体, 该抗体和血管抑制素受体结合、向细胞传输适当的信号并用作激动剂或拮抗剂。

本发明也包括血管抑制素蛋白质片段和同系物, 其可以经同位素标记或用其他分子和蛋白质标记, 后者是用于以各种技术(包括但不限于正电子成象术、放射自显影法、流式细胞术、放射性受体结合分析以及免疫组织化学)检测和使血管抑制素结合位点可视化的分子和蛋白质。

这些血管抑制素蛋白质和类似物也可作为作为血管抑制素受体的激动剂和拮抗剂, 由此提高或阻断血管抑制素的生物活性。这样的蛋白质可用于血管抑制素受体的分离。

本发明也包括连接到细胞毒素剂以用于治疗 and 研究的血管抑制素、血管抑制素片段、血管抑制素抗血清或血管抑制素受体激动剂和血管抑制素受体拮抗剂。本发明还包括将血管抑制素、血管抑制素片段、血管抑制素抗血清, 血管抑制素受体激动剂和血管抑制素受体拮抗剂与药学上可接受的赋形剂以及可有可无地与持久释放化合物和组合物(如生物可降解的集合物)组合在一起形成治疗组合物。

本发明包括用于参与血管抑制素转录和翻译的核糖核酸和脱氧核糖核酸的分子探针。这些分子探针提供了检测和测定组织和细胞中的血管抑制素生物合成的方法。

因此，提供包含血管抑制素的组合物是本发明的目的。

本发明的另一个目的是提供治疗血管生成介导的疾病和病变的方法。

本发明的另一个目的是提供检测体液或组织中的血管抑制素的存在和含量的诊断或预测方法和试剂盒。

本发明的另一个目的是提供治疗血管生成介导的疾病和病变的方法和组合物，其中疾病和病变包括但不限于血管瘤、固体肿瘤、血生肿瘤、白血病、转移、毛细血管扩张、牛皮癣、硬皮马勃属、生脓肉芽瘤、心肌血管生成、克罗恩氏病、血小板新血管形成、冠状侧突、脑部侧突、动静脉畸形、局部缺血分支血管生成、角膜疾病、发红、新血管青光眼、糖尿病视网膜病、晶状体后纤维组织形成、风湿性关节炎、糖尿病新血管形成、黄斑变性、创伤治愈、胃溃疡、螺杆菌属有关的疾病、骨折、瘢痕瘤、血管发生、血细胞生成、排卵、月经、胎盘形成和猫抓热。

本发明的另一个目的是提供用于治疗或抑制癌生长的组合物。

本发明的目的是提供调节或模拟在体内或体外产生血管抑制素的酶产生或活性的化合物。

本发明的另一个目的是通过直接把血管抑制素 DNA 注射进需要这样的血管抑制素或抗血管抑制素抗体的人或动物以提供血管抑制素或抗血管抑制素抗体。

本发明的目的是提供用于检测和量化体液中对血管抑制素特异性的抗体的存在。

本发明的另一个目的是提供由对血管抑制素特异性的抗体组成的组合物，其中所说的抗体对于不识别纤溶酶原的血管抑制素分子区是选择性的。

本发明的另一个目的是提供用于癌症检测或预测的方法。

本发明的另一个目的是提供用于使体内和体外血管抑制素结合位点可视化量化的组合物。

本发明的另一个目的是提供用于血管抑制素生物合成的检测和定量的组合物。

本发明的另一个目的是提供具有最小的副作用的用于癌症的疗法。

本发明的另一个目的是提供包含连接到细胞毒素剂以用于治疗或抑制

癌症生长的血管抑制素或血管抑制素蛋白质的组合物。

本发明的另一个目的是提供用于把血管抑制素有关的组合物定向施用到特定位点的方法。

本发明的另一个目的是提供用于调节血管生成过程的基因疗法的组合物和方法。

本发明的这些以及其它目的、特征和优点在阅读了下列公开的实施方案和所附的权利要求的详尽描述后会变得很明显。

附图简要描述

图 1 显示了 SEQ ID NO: 1, 即整个鼠纤溶酶原的氨基酸序列。

图 2 显示了鼠的血管抑制素的开始序列 (SEQ ID NO: 2) 并比较了鼠序列与相应的人 (SEQ ID NO: 3)、恒河猴 (SEQ ID NO: 4)、猪 (SEQ ID NO: 5) 和牛 (SEQ ID NO: 6) 的纤溶酶原蛋白质片段。首先列出的是小鼠序列, 其后为人、恒河猴、猪和牛。

图 3 显示了在原发性瘤存在或不存在下在肺脏中肿瘤细胞的 BrdU 标记指数。

图 4 显示了体内 Lewis 肺脏原发性瘤对 bFGF 驱动的血管生成的影响的 Matrigel 分析。

图 5 显示了得自患有 Lewis 小鼠肺脏癌 (LLC-低) 的血清相对于得自正常小鼠血清的剂量反应曲线。在 bFGF-驱动的 72-小时增殖测定中测定牛毛细血管内皮细胞。

图 6 显示了低与高转移性的肿瘤在其腹水中包含内皮促细胞分裂活性, 但是仅仅低转移性肿瘤系在血清中具有内皮抑制活性。

图 7 显示了得自患有肿瘤动物的部分纯化的血清或尿的 C4 反相色谱图。

图 8 显示了在小鼠用完整的纤溶酶原分子、得自人纤溶酶原的赖氨酸结合位点 I 制备物的活性组分、得自患有肿瘤的小鼠的尿液以及得自正常小鼠的尿液处理 13 天后表面的肺脏转移。

图 9 在小鼠用完整的纤溶酶原分子、得自人纤溶酶原的赖氨酸结合位点 I 制备物的活性组分、得自患有肿瘤的小鼠的尿液以及得自正常小鼠的

尿液处理 13 天后表面的肺脏重量。

图 10 是 pTrcHis 载体的图解描述。

图 11 描述了得自 10L 放大发酵的大肠杆菌表达的人血管抑制素的免疫印迹，其中用抗人纤溶酶原 kringle 1-3 区的单克隆抗体探查。箭头显示了重组人血管抑制素。A) 显示了用 0.2M 氨基己酸洗脱的重组血管抑制素；B) 显示了以赖氨酸柱的 1×PBS 的最后洗涤；C) 显示了得自破裂细胞的澄清裂解物。

图 12 是描述作为母液稀释倍数的函数的牛毛细血管内皮细胞的生长抑制百分比图；A1、A2、B1、B2 和 E 是表达人血管抑制素抗血管生成活性的重组克隆；C1、C2、D1 和 D2 对照是仅包含载体无编码血管抑制素的人 DNA 序列的阴性对照克隆。

图 13 显示了体外重组人血管抑制素对牛毛细血管内皮细胞增殖的抑制作用。

图 14 显示了除去原发性瘤并以具有抗血管生成活性的盐或夫马霉素同系物处理后生长增殖指数和编程性细胞死亡指数。

图 15 显示了在小鼠中通过以人血管抑制素体内处理（一次注射 40mg/kg/天）T241 原发性瘤的生长抑制。

图 16 显示了在小鼠中通过以人血管抑制素体内处理（两剂，每剂 40mg/kg/天（80 mg/kg/天））LLC-LM 原发性瘤的生长抑制。

图 17 显示了除去 Lewis 肺脏癌原发性瘤对其肺脏转移生长的作用。

图 18 显示了肿瘤切除后的生长增殖和编程性细胞死亡指数。

图 19 显示了对具有移植的 T241 纤维肉瘤细胞的小鼠施用血管抑制素蛋白质对作为时间的函数的总肿瘤体积的作用。

图 20 显示了对具有移植的 Lewis 肺脏癌 (LM) 细胞的小鼠施用血管抑制素蛋白质对作为时间的函数的总肿瘤体积的作用。

图 21 显示了对具有移植的网状组织细胞肉瘤细胞的小鼠施用血管抑制素蛋白质对作为时间的函数的总肿瘤体积的作用。

图 22 显示了对具有移植的人前列腺癌 PC-3 细胞的免疫缺陷的 SCID 小鼠施用血管抑制素蛋白质对总肿瘤体积作为时间的函数在 24 天的时期内的作用。

图 23 显示了对具有移植的人胸部癌 MDA-MB 细胞的免疫缺陷的 SCID 小鼠施用血管抑制素蛋白质对作为时间的函数的总肿瘤体积在 24 天的时期内的作用。

图 24 是编码源于小鼠纤溶酶原 cDNA 的小鼠血管抑制素蛋白质的小鼠 DNA 序列克隆的图解描述。小鼠血管抑制素包括小鼠纤溶酶原 kringle 1-4 区。PCR 指聚合酶链式反应；P1 是 PCR 的 5-端寡核苷酸引物；P2 是 PCR 的 3-端寡核苷酸引物；SS 指信号序列；ATG 是翻译起始密码子；TAA 是翻译终止密码子；HA 代表血细胞凝集素表位尾端 (CYPYDVPDYASL)；K1、K2、K3 和 K4 分别代表小鼠纤溶酶原 kringle 1、2、3 和 4 区。CMV 是巨细胞病毒启动子；T7 是噬菌体启动子；PA 代表前激活蛋白质；SP6 是 Sp 6 启动子。

图 25 描述了作为非转染细胞 (模拟) 天数的函数的细胞数目；细胞以没有编码血管抑制素的 DNA 序列的载体 (载体 5) 单独以及两个血管抑制素表达克隆 (AST31 和 AST37) 转染。图 (a) 代表 T241 细胞转染的结果。图 (b) 代表 LL2 细胞的结果。

图 26 显示了源于包含血管抑制素克隆的大肠杆菌培养基对细胞数目的结果。非转染细胞 (模拟)；细胞以没有编码血管抑制素的 DNA 序列的载体 (载体 5) 单独以及三个血管抑制素表达克隆 (AST25, AST31 和 AST37) 转染。图 (a) 代表得自对照的培养基 (模拟) 的培养和所有血管抑制素克隆 (表达的和不表达的) 对细胞数目的结果。图 (b) 代表得自对照的培养基 (模拟) 的培养、仅载体 (载体 6) 和表达小鼠血管抑制素的血管抑制素克隆对细胞数目的结果。图 (c) 代表得自对照的纯化培养基 (模拟) 的培养和表达小鼠血管抑制素的血管抑制素克隆对细胞数目的结果，其中所说的培养基在赖氨酸-琼脂糖凝胶柱中纯化以产生赖氨酸结合组分。

图 27 显示了在小鼠中移植的 T241 纤维肉瘤细胞对作为时间函数的整个肿瘤体积的作用，其中纤维肉瘤细胞用包含编码血管抑制素蛋白质的 DNA 序列的载体转染，所说的载体能表达血管抑制素蛋白质。“非转染的”指在小鼠中不变的 T241 纤维肉瘤细胞移植。“载体 6”指仅以不包含编码血管抑制素蛋白质的 DNA 序列的载体转染的、移植进小鼠中的 T241 纤维肉瘤细胞。“克隆 25、克隆 31 和克隆 37”代表以不包含编码血管抑制素蛋白

质的 DNA 序列的载体转染的、移植进小鼠中的 T241 纤维肉瘤细胞的产生血管抑制素的克隆。

图 28 显示了人纤溶酶原及其 kringle 片段结构的图解。人纤溶酶原是包含 791 个氨基酸的单链蛋白质(在 Asn²⁸⁹ 具有 N-连接的葡基的侧链)。由存在于五个分离的结构域中的 N-末端 561 个氨基酸组成的人纤溶酶原的非蛋白酶区域和分离这些结构的蛋白质一起称为 kringles, 如在环(K1、K2、K3、K4 和 K5) 中所示。每个三联的二硫化物结合的 kringle 包含 80 个氨基酸。血管抑制素覆盖这些 kringle 结构域的前四个(K1-4), kringle 3(K1-3) 和 kringle 4(K4) 通过以弹性蛋白酶消化人纤溶酶原获得。其余的 kringle 片段是在大肠杆菌中表达的重组蛋白质。SS=信号序列。PA=前活化蛋白质。

图 29 显示了纤溶酶原的纯化的重组和天然的 kringle 片段在还原条件下的 SDS-PAGE 分析。(A) 把从大肠杆菌细菌裂解物纯化的单个重组 kringle 片段装入 15%SDS 凝胶上, 其后以考马斯蓝染色。每泳道装入约 5 μ g 的每种蛋白质。(泳道 2=kringle 1(K1); 泳道 3=kringle 2(K2); 泳道 4=kringle 3(K3); 泳道 5=kringle 4(K4); 泳道 1=分子量标记)。(B) 纯化的大 kringle 片段以考马斯蓝染色。kringles 1-4(泳道 2) 和 kringles 1-3(泳道 3) 通过以赖氨酸-琼脂糖凝胶色谱纯化的弹性蛋白酶消化人纤溶酶原获得。kringles 2-3(泳道 4) 的重组体片段在大肠杆菌中表达并在体外重新折叠。分子量标记在左边(泳道 1)。

图 30 显示了通过血管抑制素的重组单个 kringle 片段抑制内皮细胞增殖。Kringle 片段于 1ng/ml bFGF 存在下在牛毛细血管内皮细胞上测定 72 小时。(A) 两种赖氨酸-结合的 kringles (rK1 和 rK4) 的抗内皮细胞增殖的作用。高亲和性赖氨酸结合 kringle (K1(-o-)) 以剂量依赖性方式抑制 BCE 细胞的增殖。中间-亲和性赖氨酸结合 kringle (K4 (-●-)) 在高浓度下仅显示了很小的抑制作用。(B) 通过非赖氨酸结合的 K2 和 K3 抑制 BCE 细胞增殖。K2(-■-) 和 K3 (-□-) 以剂量依赖性方式抑制 BCE 细胞的增殖。数据代表三次重复的平均值+/-SEM。

图 31 显示了血管抑制素的大 kringle 片段的抗内皮增殖活性。蛋白酶解片段 K1-4(血管抑制素) (-o-) 和 K1-3(-■-) 以剂量依赖性方式抑制 BCE

细胞的增殖。重组 K2-3 (-●-) 片段比 K1-3 和 K1-4 显示出更有力的抑制。数据代表了以抑制百分比表示的三个测定的平均值 (+/-SEM)。

图 32 显示了重组 kringle 2 和 kringle3 的加性抑制活性。(A) rK2-3 的完整片段(也参见图 31) 仅在 320nM 的浓度时显示出微弱的抑制作用。在相同的浓度下, 当 rK2 突变片段在位置 169 上的半胱氨酸被丝氨酸取代并在 BCE 细胞中一起测定 K3(半胱氨酸被在位置 297 的丝氨酸取代) 时, 可以观察到加性抑制。每个值代表三次重复的平均值 +/-SEM。(B) K2 和 K3 的图解结构和氨基酸序列。曾有报道内链 kringle 二硫键存在于 K2 的半胱氨酸¹⁶⁹ 和 K3 的半胱氨酸²⁹⁷ 之间(Sbhndel, S., Hu, C.-K., Marti, D., Affolter, M., Schaller, J., Llinas, M. 和 Rickli, E.E. (1996) 生物化学, 待出版)。

图 33 显示了通过组合 kringle 片段抑制内皮细胞增殖。测定以每种 kringle 片段 320nM 的浓度进行。数值代表以抑制百分比表示的三个测定的平均值 (+/-SEM)。(A) 各种单个 kringles 的组成的片段的抑制作用。(B) 组合的 kringle 片段的组合抑制活性。

图 34 显示了在还原和烷基化后血管抑制素对内皮细胞的抑制活性。(A) 还原形式(泳道 2) 和非还原形式(泳道 1) 的人血管抑制素的 SDS-PAGE 分析。纯化的人血管抑制素以 DTT 还原, 然后以过量的碘乙酰胺使蛋白质烷基化。透析处理的样品并在 BCE 细胞上测定。(B) 通过还原形式和非还原形式的血管抑制素以 320nM 的浓度抑制 BCE 细胞增殖。数据代表三次重复的抑制平均值 +/-SEM。

图 35 显示了人血管抑制素推定的 kringle 区的氨基酸序列对比。四种 kringle 结构域的序列按照其保守的半胱氨酸对比。相同的和保守的氨基酸加上阴影。在 kringle 4 中加框的氨基酸显示了邻近保守的半胱氨酸残基 22 和 80 的正性荷电的双赖氨酸。

图 36 显示了表达的血管抑制素的赖氨酸结合特征和反应。

图 36A 显示了考马斯染色的凝胶(装样 40μl)。

图 36B 显示了类似凝胶的免疫印迹(装样 20μl)。泳道 1 显示了得自显示约 50kD 和一些其它蛋白质的血管抑制素的诱导的培养物的振荡培养瓶的肉汤。把得自诱导培养物的肉汤以 1:1 和缓冲液稀释并直接装载在赖氨酸-

琼脂糖凝胶上。泳道 2 显示了通过赖氨酸柱的未结合的片段。所有通过巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达的所有血管抑制素蛋白质结合到赖氨酸柱上。泳道 3 显示了用 0.2 M 氨基己酸 (显示巴斯德毕赤酵母特异性表达的血管抑制素蛋白质结合赖氨酸) 洗脱并可在赖氨酸-琼脂糖凝胶上以一步纯化至均一。同时, 巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素蛋白质可通过抗 kringles 1 至 3 产生的构象依赖性的单克隆抗体 (VAP) 识别。

图 37 显示了巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素蛋白质被观察到在变性的非还原 SDS-PAGE 考马斯所染色的凝胶上为迁移 49kD 和 51.5kD 的双重线。从具有对高甘露糖结构特异性的 N-聚糖酶的表达的血管抑制素蛋白质除去单一 N-连接的复合物链导致产生 49.5kD 的单一带。图 A 和图 B 分别显示了考马斯染色的凝胶和类似凝胶的免疫印迹。泳道 1 显示了纯化的巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素蛋白质。泳道 2 显示了在无 N-聚糖酶的消化条件下温育的纯化的巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素蛋白质。泳道 3 显示了以 N-聚糖酶消化的纯化的巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素蛋白质。

图 38A 显示了在考马斯凝胶上作为双重线的 4 μ g 纯化的巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素蛋白质。

图 38B 显示了纯化的重组体抑制 BCE 增殖。下面显示了在 72 小时后获得的 BCE 测定细胞计数: bFGF 存在 (●) 或不存在 (○), 具有 PBS 作为对照的 bFGF 存在下 (Δ), 在具有巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素蛋白质的 bFGF 存在下 (Δ)。

图 38C 显示了抑制是剂量依赖性的。

图 39 显示了巴斯德毕赤酵母表达的纯化血管抑制素以全身 (皮下) 施用给具有原发性瘤的小鼠。

图 39A 和 B 分别显示了使用盐水或巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素或源于纤溶酶原的血管抑制素蛋白质处理的小鼠的转移和肺脏重量数。与使用盐水处理的小鼠的肺脏相比, 使用巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素蛋白质或源于纤溶酶原的血管抑制素蛋白质处理的小鼠肺脏是非血管形成的, 而且转移受到强烈抑制。

图 40 显示了巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素处理的小鼠肺脏是粉红色的, 具有微转移, 而盐水对照组的肺脏由血管化转移的完全覆盖。

:

图 41 显示了于镍亲和柱色谱之下在各种纯化和集合阶段重组小鼠血管抑制素的还原聚丙烯酰胺凝胶电泳照片 (SDS-PAGE) (泳道 1-3 为包含体洗涤物, 泳道 4 为在尿素中不溶性组分, 泳道 5 为亲和柱开始材料, 泳道 6 为柱流通物, 泳道 7 为洗脱的血管抑制素)。

图 42 显示了把集合的重组小鼠血管抑制素施用到牛毛细血管内皮细胞上的作用。

图 43 显示了在以 Lewis 肺癌接种的小鼠中施用 2mg/kg/天的集合血管抑制素对肿瘤体积的作用。

图 44 显示了在以 Lewis 肺癌接种的小鼠中施用 10mg/kg/天的集合血管抑制素对肿瘤体积的作用。

发明详述

本发明包括用于检测并治疗由血管生成介导的或与血管生成有关的疾病和病变的组合物和方法。组合物是血管抑制素, 它从体液中(包括但不限于血清、尿液和腹水)分离或通过化学或生物方法(例如细胞培养物、重组基因表达、蛋白质合成以及纤溶酶原或纤溶酶的体外酶促催化以产生活性血管抑制素)合成。重组技术包括使用聚合酶链式反应(PCR)从 DNA 源扩增基因以及使用逆转录酶/PCR 从 RNA 源扩增基因。血管抑制素抑制血管生长进组织, 如未血管化的或血管化的肿瘤。

本发明也包括包含含有编码血管抑制素的 DNA 序列的载体的组合物(其中所说的载体当存在于细胞中能表达血管抑制素)、包含含有载体的细胞的组合物(其中所说的载体包含编码血管抑制素或其片段或其同系物的 DNA 序列, 其中所说的载体当存在于细胞中能表达血管抑制素)以及把包含载体的细胞移植进入或非人动物中的方法(其中所说的载体包含编码血管抑制素的 DNA 序列, 其中所说的载体当存在于细胞中能表达血管抑制素)。

本发明还包括与药学上可接受的赋形剂和可有可无的持久释放化合物或组合物(如生物可降解的集合物)组合形成治疗组合物的血管抑制素、血管抑制素片段、血管抑制素抗血清、血管抑制素受体激动剂或血管抑制素受体拮抗剂。具体地说, 本发明包括包含与血管抑制素特异性结合的抗体的组合物, 其中所说的抗体不与纤溶酶原结合。

更具体地说，本发明包括称为血管抑制素的蛋白质，它具有约 38 至 45 千道尔顿(kD)的分子量，这种蛋白质在体外可克服内源生长因子(如 bFGF)的血管生成活性。血管抑制素是具有通过还原聚丙烯酰胺凝胶电泳测定的分子量约在 38 千道尔顿至 45 千道尔顿之间的蛋白质，这种蛋白质还具有和在完整的鼠纤溶酶原分子的第 98 个氨基酸开始的鼠纤溶酶原片段实质上类似的氨基酸序列。术语“实质上类似”当用于指血管抑制素氨基酸序列时是指具有抗血管生成活性并具有约 38kD 至 45kD 分子量的氨基酸序列，该序列也与在小鼠纤溶酶原约第 98 个氨基酸开始并且长度为 45kD 至 38kD 的小鼠纤溶酶原的蛋白质片段具有高度的序列同源性。高度的同源性指至少约 60%氨基酸同源，优选地至少约 70%氨基酸同源，更优选地至少约 80%氨基酸同源。本文所使用的术语“内皮细胞抑制活性”指分子在通常情况下抑制血管生成以及，例如，在成纤维细胞生长因子存在下抑制培养的牛毛细血管内皮细胞生长的能力。

完整的鼠纤溶酶原分子的氨基酸序列如图 1 和 SEQ ID NO: 1 所示，血管抑制素的序列约在氨基酸 98 开始。活性人血管抑制素可在完整的人纤溶酶原分子的第 97 或 99 个氨基酸开始。得自小鼠的血管抑制素的前 339 个氨基酸的氨基酸序列在图 2 (SEQ ID NO: 2) 中显示，图 2 中将它与得自人 (SEQ ID NO: 3)、恒河猴 (SEQ ID NO: 4)、猪 (SEQ ID NO: 5) 和牛 (SEQ ID NO: 6) 纤溶酶原的纤溶酶原蛋白质片段比较。假定这些序列有超过其氨基酸的 50% 相同，可以理解为血管抑制素的氨基酸序列在物种间是实质上类似的。在血管抑制素中氨基酸的总数目是未知的，但受活性分子的分子量限制。本发明的血管抑制素的氨基酸序列可随纤溶酶原分子所源于的物种变化。这样，虽然本发明的源于人纤溶酶原的血管抑制素和源于小鼠的血管抑制素具有稍不同的序列，如在小鼠肿瘤模型中显示，它具有抗血管生成活性。

已显示血管抑制素在体外能够抑制内皮细胞的生长。血管抑制素不抑制源于其它细胞类型的细胞系的生长。具体地说，血管抑制素对 Lewis 肺癌细胞系、貂肺脏上皮细胞、3T3 成纤维细胞、牛主动脉平滑肌细胞、牛视网膜色素上皮细胞、MDCk 细胞(犬肾部上皮细胞)、WI38 细胞(人胎肺脏成纤维细胞)、EFN 细胞(鼠胎成纤维细胞)和 LM 细胞(鼠结缔组织)无作用。在患肿瘤的小鼠中，内源血管抑制素以约 10mg 血管抑制素/kg 体重的

全身浓度可有效地抑制转移。

血管抑制素具有由纤溶酶原分子的 kringle 区限定的特定的三维构象 (Robbins, K. C., “纤溶酶原-纤溶酶系统” 止血和血栓形成, 基本原则和实践, 第2版, Colman, R. W. 等编辑, J. B. Lippincott 公司, 340-357, 1987)。有五个这样的 kringle 区, 它是构象有关的基元并在纤溶酶原分子的 NH₂ 末端部分中具有实质上的序列同源性。现在认为血管抑制素的三维构象包括纤溶酶原 kringle 1 至 3 区和 kringle 4 区的一部分。纤溶酶原分子的每个 kringle 区包含约 80 个氨基酸并包含 3 个二硫键。已知半胱氨酸基元存在于其它生物学活性的蛋白质之中。这些蛋白质包括但不限于凝血素、肝细胞生长因子、分散因子和巨噬细胞刺激蛋白质 (Yoshimura, T, 等, “人巨噬细胞刺激蛋白质 (MSP, MST1) 的克隆、测序和表达确证了 MSP 作为 kringle 蛋白质族的成员并把 MSP 基因定位在第 3 染色体上”, 生物化学杂志, 第 268 卷, 21, 15461-15468, 1993)。在体内具有抗血管生成活性的任何分离的蛋白质或具有类似三维的 kringle 构象或半胱氨酸基元的蛋白质都是本发明的一部分。

本发明也包括为了疾病(如癌)的诊断或预测目的检测在体液和组织中的血管抑制素的方法。本发明也包括在细胞和组织中检测血管抑制素结合位点和受体的方法。本发明也包括治疗或预防血管生成疾病和病变的方法, 所述疾病和病变包括但不限于风湿性关节炎和肿瘤, 所述方法是通过刺激血管抑制素和/或通过施用实质上纯化的血管抑制素或激动剂或拮抗剂和/或血管抑制素抗血清或直接抗患者血管抑制素抗血清的抗血清进行的。其它的治疗方法包括施用血管抑制素、血管抑制素片段、血管抑制素同系物、血管抑制素抗血清或和连接到细胞毒素剂的血管抑制素受体激动剂和拮抗剂。可以理解: 血管抑制素可以源于动物或人。血管抑制素也可以通过化学反应或通过重组技术结合表达系统合成产生。血管抑制素也可以通过酶促裂解分离的纤溶酶原或纤溶酶以产生具有抗血管生成活性的蛋白质。血管抑制素也可以通过化合物模拟把血管抑制素裂解成纤溶酶原的内源酶的作用产生。血管抑制素产生也可以通过影响纤溶酶原裂解酶活性的化合物调节。

使用特异性结合血管抑制素的抗体的被动抗体疗法可用于调节血管生

成依赖性的过程，如再生、发育、创伤治愈和组织修复。此外，可以施用直接抗血管抑制素抗体的 Fab 区的抗血清以封闭内源血管抑制素抗血清结合血管抑制素的能力。

本发明也包括这样的基因疗法，通过这种疗法调节在患者中的编码血管抑制素的基因。把 DNA 转移或施用到表达基因产物蛋白质的细胞中的各种方法(其它方式的基因疗法)在以下文献中公开：在体内把基因转移进哺乳动物体细胞中，N. Yang, Crit. Rev. Biotechn. 12(4): 335-356(1992)，本文一并参考。基因疗法包括把 DNA 序列掺入体细胞或胚系细胞中以用于体外或体内治疗。基因疗法在取代基因、加强正常或异常的基因功能、并抗击传染病和其它病理中起作用。

用基因疗法治疗这些医学问题的策略包括：治疗策略，如鉴别缺陷基因，然后添加功能基因以取代缺陷基因的功能或加强微弱功能的基因；或预防策略，如添加产生蛋白质的基因，该蛋白质将治疗疾病或使组织或器官对治疗用药方式更敏感。作为预防策略的例子，可以把一种基因(如血管抑制素)置于患者中，这样预防血管生成的发生；或插入使肿瘤细胞对辐射更敏感的基因，然后肿瘤辐射就可以造成肿瘤细胞杀灭的增加。

本发明提出了许多转移血管抑制素 DNA 或血管抑制素调节序列的方案。启动子序列的转染(不同于人们通常发现的与血管抑制素特异性有关)或其它序列的转染(这将增加血管抑制素蛋白质的产量)也可预见为基因治疗的方法。这种技术的例子在 Transkaryotic 治疗公司(Cambridge, Massachusetts)中可以找到，它使用同源重组以插入打开细胞中红细胞生成素基因的“遗传开关”。参见遗传工程新闻，1994年4月15日。这样的“遗传开关”可用于在不正常表达血管抑制素(或血管抑制素受体)的细胞中活化血管抑制素(或血管抑制素受体)。

用于基因疗法的基因转移方法分成三个大类项-物理的(例如，电穿孔，直接的基因转移和离子轰击)、化学的(基于脂的载体或其它非病毒载体)以及生物学的方法(源于病毒的载体和受体吸收)。例如，可以使用非病毒载体(包括用 DNA 包衣的脂质体)。可以把这样的脂质体/DNA 复合物直接静脉内注射进患者。人们相信：脂质体/DNA 复合物在肝脏中浓缩(在肝脏中它们把 DNA 传送到巨噬细胞和枯否氏细胞中)。这些细胞长期存活，这样就

提供了施用的 DNA 的长期表达。另外，可把载体或基因的“裸” DNA 直接注射进所需要的器官、组织或肿瘤中以用于治疗 DNA 的靶施用。

基因疗法也可以通过施用位点描述。施用基因的基本方法包括体外(ex vivo)基因转移、体内基因转移、体外(in vitro)基因转移。在体外(ex vivo)基因转移中，从患者身上取下细胞并在细胞培养基中培养。把 DNA 转染进细胞，使转染的细胞在数量扩增并重新移植进患者中。在体外基因转移中，转化的细胞是在培养基中生长的细胞，如组织培养细胞，但不是得自特定患者的特定细胞。转染这些“实验细胞”，选择并扩增转染的细胞用于移植进患者或其它用途。

体内基因转移包括当细胞在患者体内时把 DNA 导入患者细胞。该方法包括用非感染性的病毒使用病毒介导的基因转移以把基因施用到患者中或把裸 DNA 注射进患者中的位点，DNA 按照基因产物蛋白质在其中表达的细胞的百分比吸收。另外，本文描述的其它方法(例如使用“基因枪”)可用于体外插入血管抑制素 DNA 或血管抑制素调节序列。

基因治疗的化学方法可包括基于脂的化合物(不是必需是脂质体)以使 DNA 横跨细胞膜。脂转染或细胞转染(结合到阴性荷电的 DNA 的基于脂的阳离子)制做了可穿越细胞膜的复合物并使 DNA 进入细胞内部。另一种化学方法使用基于受体的胞吞作用(它包括把特异性配体结合到细胞表面受体上、包被它并将其转运过细胞膜)。配体和 DNA 结合，整个复合物转运至细胞之中。把配体基因复合物注射血流中，具有受体的靶细胞可特异性地和配体结合并把配体-DNA 复合物转运进细胞。

许多基因治疗方法使用病毒载体把基因插入到细胞中。例如，在来自体内的方法中使用改变的逆转录病毒载体以把基因导入外围的和肿瘤渗透的淋巴细胞、肝细胞、表皮细胞、肌细胞或其它体细胞中。然后把这些改变的细胞导入患者中以提供插入 DNA 的基因产物。

病毒载体也用于使用体内方案把基因插入到细胞中。为了指导外源基因的组织特异性表达，可以使用已知是组织特异性的顺式作用调节单元或启动子。另外，这可以使用在体内把 DNA 或病毒载体原位施用到特异性的结构位点中达到。例如，在体内把基因转移到血管中可通过体外把转导的内皮细胞移植进在动脉壁上的选择的位点中完成。病毒感染周围也表达基

因产物的细胞。病毒载体可直接施用到体内位点中(例如通过导管), 这样使得仅施用到受到病毒感染的一定区域并可提供长期的和位点特异性的基因表达。已经证明在体内使用逆转录病毒载体在乳房组织和肝组织中通过把改变的病毒注射进血管中的基因转移也导致器官。

用于基因疗法方案的病毒载体包括但不限于逆转录病毒、其它 RNA 病毒(如脊髓灰质炎病毒或 Sindbis 病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒、SV40、牛痘)和其它 DNA 病毒。复制缺陷的鼠逆转录病毒载体是最广泛使用的基因转移载体。鼠白血病逆转录病毒由与核核心蛋白质和聚合酶(pol)复合的单链 RNA 组成, 装入蛋白质核心(gag)并由决定宿主范围的糖蛋白被膜(env)包被。逆转录病毒的基因组结构包括被 5 和 3' 长末端重复序列(LTR)包被的 gag、pol 和 env 基因。逆转录病毒载体系统利用了这样的事实: 假定病毒结构蛋白质在包装法细胞系中顺式供给, 包含 5 和 3' LTRs 并包装信号序列的最小载体足以使载体包装、感染并整合进靶细胞中。用于基因转移的逆转录病毒载体的本质优点包括在大多数细胞类型中有效的感染和基因表达、精确的单拷贝载体整合进靶细胞染色体 DNA 以及逆转录病毒基因组易于操作。

腺病毒由与核心蛋白质复合并被衣壳蛋白包被的线性的、双链 DNA 组成。分子病毒学的进步导致了利用这些有机体的生物学创造可在体内把新的遗传序列转导进靶细胞的载体的能力。基于腺病毒的载体以高水平表达基因产物蛋白质。腺病毒载体具有高效的感染率(即使是低滴度的病毒)。另外, 病毒作为无细胞病毒颗粒充分感染以使不必注射产生细胞系。对腺病毒载体来说, 另一种潜在的优点是在体内能完成异源基因的长期表达。

DNA 施用的机械方法包括融合脂小泡(如脂质体或其它膜融合的小泡)、掺入阳离子脂的 DNA 脂颗粒(如脂转染)、聚赖氨酸介导的 DNA 转移、DNA 的直接注射(如把 DNA 微注射进胚细胞或体细胞中)、通过空气作用施用 DNA 包衣的颗粒(如用于“基因枪”的金颗粒)以及无机化学方法(如磷酸钙转染)。另一种方法, 即配体介导的基因疗法, 包括把 DNA 和特异性的配体复合形成配体-DNA 缀合物以指导 DNA 到特异性的细胞或组织。

现已发现: 把质粒 DNA 注射进肌肉细胞产生了高百分比的受转染并可维持标记基因表达的细胞。质粒 DNA 整合或不整合进细胞的基因组。转染

DNA 的非整合形式将使得基因产物蛋白质在末端不同的非增殖组织中转染和表达较长的时间而不怕在细胞或线粒体基因组中有突变性插入、缺失或改变。长期(但不必是永久的)把治疗基因转移进特异性细胞可提供基因疾病的治疗或用于预防。DNA 可周期性地再次注射以保持基因产物水平而在受体细胞的基因组之中没有变化产生。外源 DNA 的非整合形式使得几种不同的外源 DNA 构建体可存在于具有所有表达各种基因产物的构建体的一个细胞内。

颗粒介导的基因转移方法首先用于转化植物组织。用颗粒轰击装置或“基因枪”产生运动力以加速 DNA 包衣的高密度颗粒(如金或钨)至高速度,这种速度使得可以穿透靶器官、组织或细胞。颗粒轰击可用于体外系统或与体外(ex vivo)或体内技术结合把 DNA 导入细胞、组织或器官。

用于基因转移的电穿孔使用电流使细胞或组织对电穿孔介导的基因转移敏感。给定的场强的简短的电冲击可以以 DNA 分子可穿透细胞的方法增加膜的渗透性。这种技术可用于体外系统或与来自体内或体内技术结合把 DNA 导入细胞、组织或器官。

体内载体介导的基因转移可用于把外源 DNA 转染进细胞。载体-DNA 复合物可方便地导入体液或血流中,然后在体内位点特异性地指向靶器官或组织。可以使用脂质体和聚阳离子(如聚赖氨酸、脂转染或细胞转染剂)。可以开发细胞特异性或器官特异性的脂质体,这样脂质体所携带的外源 DNA 可以被靶细胞吸收。在某些细胞中针对特异性受体的免疫脂质体的注射可用作把 DNA 插入具有受体的细胞中的方便方法。使用的另一个载体系统是用于把 DNA 携带进肝细胞以进行体内基因转移的脱唾液酸糖蛋白/聚赖氨酸缀合物系统。

转染的 DNA 可以与其它各种载体复合以使 DNA 携带进受体细胞,然后留在细胞质或核质中。DNA 可以和载体核蛋白质在特异性的工程小泡复合物中进行偶联以直接进入核。

血管抑制素的基因调节可通过施用这样的化合物完成,该化合物和血管抑制素基因结合,或控制与血管抑制素基因有关的区或其相应的 RNA 转录物以修改转录或翻译速率。另外,可以把用编码血管抑制素的 DNA 序列转染的细胞施用到患者中以提供血管抑制素的体内来源。例如,细胞可以

用包含编码血管抑制素的核酸序列的载体转染。本文所使用的术语“载体”这样的载体，它包含在把特异性的核酸序列转运至细胞之中起作用的特异性核酸序列或与其相关的载体。载体的例子包括质粒和感染性微生物(如病毒)或非病毒载体(如配体-DNA 缀合物、脂质体、脂-DNA 复合物)。合乎需要的是：可以把包含血管抑制素 DNA 序列的重组 DNA 分子可操作地连接到表达控制序列以形成能表达血管抑制素的表达载体。转染的细胞可以是源于患者正常组织、患者有病组织的细胞，或可以是非患者的细胞。

例如，可以用能够表达本发明的血管抑制素蛋白质的载体转染从患者中取下的肿瘤细胞并再次导入患者中。转染的肿瘤细胞在患者中产生抑制肿瘤生长水平的血管抑制素。患者可以是人或非人的动物。细胞可通过本领域已知的非载体或物理或化学方法(如电穿孔，离子穿孔(ionoporation))或通过“基因枪”转染。另外，血管抑制素 DNA 可以不用载体的帮助而直接注射进患者。具体地说，可以把血管抑制素 DNA 注射进皮肤、肌肉或血液。

关于把血管抑制素转染进患者的基因治疗方案可以通过把血管抑制素 DNA 整合进细胞的基因组、微型染色体或作为在细胞的细胞质或核质中的分离的复制或非复制 DNA 构建体。血管抑制素表达可长期持续或周期性地再次注射以保持细胞、组织或器官中所需的血管抑制素蛋白质的水平或确定的血液水平。

血管抑制素可以在 HPLC C4 柱上分离(参见表 3)。血管抑制素蛋白质在乙腈浓度梯度的 30 至 35%洗脱。在还原条件下的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)凝胶上，具有活性的蛋白质带作为约 38 千道尔顿的单峰洗脱。

本发明的发明人表明：增长的原发性瘤与内皮细胞增殖的特异性抑制剂释放进血液中有关系，该抑制剂包括血管抑制素(它可抑制转移内的血管生成并由此抑制转移的生长)。与原发性瘤血管抑制素有关的来源还不了解。该化合物可通过蛋白酶特异性地降解纤溶酶原产生，或者，血管抑制素也可以通过编码血管抑制素的特异性基因的表达产生。

原发性瘤的血管生成表型依赖于血管生成蛋白质的产生超过内皮细胞抑制剂(它由正常细胞加工，但被认为在转化至瘤形成期间进行负调节。当

血管抑制素的产生可以相对于其亲本细胞型以单个肿瘤细胞负调节时，通过整个肿瘤加工的抑制剂总量可足以进入循环并在微转移的较远位点抑制内皮细胞生长。与通过原发性瘤释放的血管生成蛋白质相比，血管抑制素在循环中可保持显著更长的时间。这样，血管生成蛋白质看起来是局部作用，而血管抑制素综合作用并以相当长的半衰期在血液中循环。血管抑制素的半衰期约是 12 小时至 5 天。

虽然不想受下列假说的限制，但人们相信当肿瘤进行血管生成时释放一种或多种血管生成蛋白质(例如 aFGF、bFGF、VEGF、IL-8、GM-CSF 等)，该蛋白质局部作用，针对血管外方向的原发性瘤附近的内皮细胞，而且不循环(或以很短的半衰期循环)。这些血管生成蛋白质必须以足以克服用于原发性瘤的内皮细胞抑制剂(血管生成抑制剂)的作用的量产生以持续扩增其群体。一旦这样的原发性瘤充分生长，它持续把内皮细胞抑制剂释放进循环。按照这种假说，这些抑制剂以与原发性瘤一定的距离远程作用，针对血管内方向的转移的毛细血管内皮细胞并持续循环。这样，恰好在远程转移可以开始启动血管生成的时间，在其临近处的毛细血管内皮细胞可通过导入血管抑制素抑制。

一旦原发性瘤达到了足以引起血管抑制素持续释放进循环的大小，就难于进行继发性瘤移植(或微转移)以启动或增加其本身的血管生成。如果继发性瘤移植(例如，移植进皮下空间或角膜或静脉内施用到肺脏中)在原发性瘤移植后不久发生，原发性瘤将不能够抑制继发性瘤(因为在继发性瘤中的血管生成已经适当地进行)。如果两种肿瘤同时进行移植(例如，在相对的侧面)，抑制剂相互具有等同的抑制作用。

本发明的血管抑制素可以：

- (i) 对患有肿瘤的人或动物作为抗血管生成治疗剂施用；
- (ii) 在人或动物血清中、尿或组织中作为预测标记监测；
- (iii) 用作分析癌症患者的血清和尿液中类似的血管抑制分子的基础。

血管抑制素可以从体液(如患者的血液或尿液)中分离，或血管抑制素可通过本领域普通技术人员熟知的重组 DNA 方法或合成蛋白质化学方法产生，这些属于本发明的一部分。蛋白质纯化方法在本领域中是熟知的，用

于纯化血管抑制素并测定抑制剂活性的方法的特定实例在下面的实施例中提供。使用类似的技术可完成人内源血管抑制素的分离。

使用重组 DNA 技术产生血管抑制素的方法的例子包括以下步骤: (1) 如上面和下面更完整的描述鉴别和纯化血管抑制素, (2) 测定纯化的抑制剂的 N-末端氨基酸序列, (3) 合成产生血管抑制素序列的 5' 和 3' DNA 寡核苷酸引物, (4) 使用聚合酶扩增血管抑制素基因序列, (5) 把扩增的序列插入适当的载体(如表达载体)中, (6) 把包含载体的基因插入到能够表达抑制剂基因的微生物或其它表达系统中, (7) 分离重组产生的抑制剂。适当的载体包括病毒、细菌和真核(如酵母)表达载体。上述的技术在实验室手册如“分子克隆: 实验室手册”, 第二版, Sambrook 等, 冷泉港实验室出版社, (1989) 中有更完整的描述。已发表了人纤溶酶原的 DNA 序列 (Browne, M. J. 等, “在 HeLa 细胞中表达重组人纤溶酶原和糖苷配基纤溶酶原 (aglycoplasminogen)”, 纤维蛋白溶解, 第 5 卷 (4). 257-260, 1991), 本文一并参考。

血管抑制素基因也可通过以下方法从表达高水平的血管抑制素的细胞或组织(如肿瘤细胞)中分离: (1) 从组织中分离信使 RNA, (2) 使用逆转录酶产生相应的 DNA 序列, (3) 使用聚合酶链式反应 (PCR) 和适当的引物扩增编码活性血管抑制素氨基酸序列的 DNA 序列。

另一种产生血管抑制素或其生物活性片段的方法是通过蛋白质合成。一旦使用如下更充分描述的测定系统发现了血管抑制素的生物学活性片段, 就可以对其进行测序(例如, 通过自动蛋白质测序方法)。另外, 一旦分离到了编码血管抑制素的基因或 DNA 序列(例如, 通过以上所述的方法), 就可使用本领域熟知的手工或自动测序方法测定 DNA 序列。反过来, 核酸序列又提供了关于氨基酸序列的信息。这样, 如果生物学活性片段通过特异性的方法(如胰蛋白酶消化)产生, 或者如果片段进行 N-末端测序, 余下的氨基酸序列就可从相应的 DNA 序列测定。

一旦知道了蛋白质的氨基酸序列, 就可通过本领域熟知的技术合成该片段, 例如“固体蛋白质合成: 一种实用方法” E. Atherton 和 R. C. Sheppard, IRL 出版社, 牛津大学, 英国。相似地, 可以合成多片段并将其先后连接以形成更大的片段。这些合成的蛋白质片段在特异性位点进行

氨基酸取代以试验体外和体内的促效和拮抗活性。结合到组织的具有高亲和性的蛋白质片段可用于在亲和柱中分离血管抑制素受体。血管抑制素受体的分离和纯化是阐明血管抑制素的作用机制的基本步骤。血管抑制素受体的分离和血管抑制素激动剂和拮抗剂的鉴别有利于开发药物以调节血管抑制素受体的活性，这是至生物活性的最后途径。使用原位和溶液杂交技术进行受体分离使构建核苷酸探针以能监测受体的定位和合成成为可能。还可以分离血管抑制素受体的基因并将其掺入表达载体并转染进细胞(如患者肿瘤细胞)以增加细胞型、组织或肿瘤结合血管抑制素和抑制局部血管生成的能力。

血管抑制素在治疗血管生成介导的或参与血管生成的疾病或病变时是有效的。本发明包括治疗血管生成介导的疾病的方法，该方法使用有效量的具有抗血管生成活性的血管抑制素或其生物学活性片段或血管抑制素片段的组合体或血管抑制素激动剂和拮抗剂。血管生成介导的疾病包括但不限于固体肿瘤；血生肿瘤(如白血病)；肿瘤转移；良性肿瘤(例如血管瘤、听神经瘤、神经纤维瘤、沙眼、生脓风湿性肉芽肿)；风湿性关节炎；牛皮癣；视觉血管生成疾病(例如，糖尿病的视网膜病、早熟视网膜病、黄斑变性、角膜移植排斥、新血管青光眼、晶状体后纤维组织形成、rubeosis)；Osler-Webber 综合症；心肌血管生成；血小板新血管形成；毛细血管扩张；血友病性关节；血管纤维瘤；创伤肉芽发生。血管抑制素可用于治疗内皮细胞过量或异常刺激的疾病。这些疾病包括但不限于肠粘合、克罗恩氏病、动脉粥样硬化、硬皮马勃属和肥大伤疤，即瘢痕。血管抑制素可通过防止胚胎移植所需的血管形成作为生育控制剂。血管抑制素可用于治疗这样的疾病，这些疾病具有作为病理后果的血管生成，如猫抓伤病和溃疡(幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*))。

血管抑制素的合成蛋白质片段有各种用途。以很高的特异性和亲和性结合到血管抑制素受体的蛋白质是放射性标记的并用于使用放射自显影和膜结合技术使结合位点可视化并定量测定。本申请提供了重要的诊断和研究工具。血管抑制素受体的结合性质的知识有利于研究和受体结合的转导机制。

此外，用短放射期的同位素标记血管抑制素蛋白质可以使得可以在体

内使用定位发射断层摄影术或其它现代的放射显影技术受体结合位点可视化以定位具有血管抑制素结合位点的肿瘤。

在这些合成蛋白质内的氨基酸的有系统的取代产生了对血管抑制素受体的高亲和性蛋白质激动剂和拮抗剂，它们可增强或降低血管抑制素对其受体的结合。这样的激动剂用来抑制微转移的生长，进而限制了癌的扩散。血管抑制素的拮抗剂在不适当的血管形成情况下运用以封闭血管抑制素的抑制作用并促进血管生成。例如，这种治疗可具有促进糖尿病患者中创伤治愈的治疗作用。

血管抑制素蛋白质可用于从培养的肿瘤细胞中分离血管抑制素受体的亲和柱。血管抑制素受体的分离和纯化后是氨基酸的测序。使用此信息可以鉴别和分离基因或编码血管抑制素受体的基因。其次，开发了克隆的核酸序列以用于插入能够表达受体的载体。这些技术对本领域技术人员来说是熟知的。把编码血管抑制素受体的核酸序列转染进肿瘤细胞并通过转染的肿瘤细胞表达受体提高了这些细胞对内源或外源血管抑制素的响应，进而减少转移性生长的速率。

细胞毒素剂(如蓖麻毒素)连接到血管抑制素和高亲和性的血管抑制素蛋白质片段上以提供破坏和血管抑制素结合的细胞的工具。这些细胞可在许多位置发现，包括但不限于微转移和原发性瘤。连接到细胞毒素剂的蛋白质以设计用于最大施用到所需的位点的方式注入。例如，连接到蓖麻毒素的高亲和性血管抑制素片段通过套管施用进提供靶位点的血管或直接施用进靶。这样的药剂也可以通过和注入套管偶联的渗透泵以受控制的方式施用。血管抑制素拮抗剂的组合体可以和血管生成刺激剂共同施用以增加组织的血管形成。这种治疗用药制度提供了破坏转移性癌的有效方式。

血管抑制素可用于与其它组合物和治疗疾病的方法结合。例如，肿瘤可使用手术、放射或化疗与血管抑制素结合方便地治疗，然后可以把血管抑制素施用到患者中以扩大微转移的休眠并稳定和抑制任何剩余的原发性瘤的生长。另外，血管抑制素、血管抑制素片段、血管抑制素抗血清、血管抑制素受体激动剂、血管抑制素受体拮抗剂或它们的组合体可与药学上可接受的赋形剂以及可有可无的持久释放基质(如生物可降解的集合物)结合以形成治疗组合物。

本文所使用的持久释放基质是由通常是聚合物的材料制成的基质，这可通过酶促或酸/碱水解或溶解进行降解。一旦将其插入到身体中，基质通过酶和体液作用。持久释放基质合乎需要地选自生物相容的材料如脂质体、聚交酯类(聚乳酸)、聚乙交酯(乙醇酸聚合物)、聚交酯类共乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)、聚酸酐、聚(正)酯、聚蛋白、透明质酸、胶原质、硫酸软骨素、羧酸、脂肪酸、磷酸脂、聚糖、核酸、聚氨基酸、氨基酸(如苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸)、聚核苷酸、聚乙烯基丙烯、聚乙烯吡咯烷酮、硅氧烷。优选的生物可降解的基质是下列基质之一：聚交酯、聚乙交酯或聚交酯共乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)。

本发明的调节血管生成的治疗组合物可以是固体、液体或气雾剂，可以通过任何已知的施用路线施用。固体治疗组合物的例子包括丸剂、乳油和可植入剂量单位。丸剂可以口服施用，治疗乳油可以局部施用。可移植的植入单位可以局部施用，例如在肿瘤位点施用，或者它可以植入以用于治疗的调节血管生成的组合物的全身释放(例如皮下施用)。液态组合物的例子包括适于皮下、静脉内、动脉内、局部和眼球内注射的制剂。气雾剂的例子包括施用到肺脏的吸入剂。

本发明的血管抑制素也可用于产生对抑制剂及其受体特异性的抗体。抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。这些和血管抑制素或血管抑制素受体特异性结合的抗体可用于本领域普通技术人员熟知的诊断方法和试剂盒以检测或定量测定体液或组织中的血管抑制素或血管抑制素受体。这些试验的结果可用于诊断或预测癌症和其它血管生成介导的疾病的发生或复发。

血管抑制素也可用于检测和定量测定能结合血管抑制素的抗体的诊断方法和试剂盒。这些试剂盒可进行循环中的血管抑制素抗体的检测，这些抗体表明在原发性瘤原位分泌的血管抑制素存在下微转移的扩散。具有这样的循环抗血管抑制素抗体的患者更可能患多种肿瘤和癌，更可能在治疗后或减轻期间复发癌。这些抗血管抑制素抗体的 Fab 片段可用作抗原以产生可以用于中和抗血管抑制素抗体的抗血管抑制素 Fab-片段抗血清。这样的方法减少了通过抗血管抑制素抗体除去循环的血管抑制素，由此有效地提高了循环血管抑制素的水平。

本发明的另一个方面是封闭过量内源血管抑制素的作用的方法。这可以通过由对在系统中不合乎需要的血管抑制素特异性的抗体被动免疫人或动物完成。这种处理在治疗异常排卵、月经和胎盘形成以及血管发生中是重要的。这提供了检查在转移过程中血管抑制素除去的效果的有用工具。血管抑制素抗体的 Fab 片段包含血管抑制素的结合位点。该片段使用本领域技术人员已知的技术从血管抑制素抗体分离。血管抑制素抗血清的 Fab 片段可用作抗原以产生抗 Fab 片段血清。抗血管抑制素的 Fab 片段的抗血清的注入阻止了血管抑制素和血管抑制素抗体的结合。治疗作用可通过中和内源抗血管抑制素抗体以封闭血管抑制素和抗血管抑制素 Fab 片段的结合获得。这种治疗的净作用有利于内源循环的血管抑制素到达靶细胞，进而减少转移的扩散。

可以理解：本发明包括任何具有内皮细胞抑制活性的血管抑制素衍生物。本发明包括整个血管抑制素蛋白质、血管抑制素蛋白质衍生物和血管抑制素蛋白质的生物学活性片段。它们包括具有血管抑制素活性的蛋白质，这些蛋白质具有氨基酸取代或具有连接到氨基酸功能基团上的糖或其它分子。本发明也包括编码血管抑制素和血管抑制素受体的基因，以及这些基因表达的蛋白质。

具有如上所述的血管抑制素活性的蛋白质和蛋白质片段可以用本领域普通技术人员已知的制剂方法以药学上可接受的制剂中的分离的和实质上纯化的蛋白质和蛋白质片段提供。这些制剂可通过标准的路线施用。通常，该组合物可通过局部、经眼、腹膜内、颅内、大脑内室、大脑内、阴道内、子宫内、口服、直肠或肠胃外(例如，静脉内、脊柱内、皮下或肌内路线)施用。此外，血管抑制素可掺入使得可以进行化合物持久释放的生物可降解的聚合物，把聚合物移植在需要用药处附近(例如，施用到肿瘤或移植的位点)以使血管抑制素缓慢地释放到全身。微渗透泵也可用于通过套管向兴趣位点提供高浓度的血管抑制素的有控制的施用，如直接施用进转移生长位点或施用进供应肿瘤的血管。生物可降解的聚合物及其用途在，例如，Brem 等，*J. Neurosurg.* 74: 441-446(1991)中有详尽描述，本文一并参考了其全部内容。

本发明的血管抑制素的剂量取决于所治疗的疾病状态或病症以及其它

临床因素，如人或动物的体重和病症以及化合物的施用路线。对于治疗人或动物，可以施用药 0.5mg/kg 至 500mg/kg 之间的血管抑制素。取决于血管抑制素在特定的动物或人中的半衰期，血管抑制素可以每天施用几次到每周一次。可以理解：本发明包括人和兽医两种用途的应用。在可以在同时或延长的时间内施用的情况下，本发明的方法包括单次以及多次施用。

血管抑制素制剂包括适合于口服、直肠、经眼(包括玻璃体内或眼室内(intracameral))、鼻、局部(包括颊内和舌下)、子宫内、阴道或肠胃外(包括皮下、腹膜内、肌内、静脉内、真皮内、颅内、气管内、硬膜外施用的制剂。血管抑制素制剂可方便地以单位剂量形式存在并可方便地通过常规的药学技术制备。这样的技术包括使活性成分和药学上的载体或赋形剂结合的步骤。通常，制剂通过使活性成分和液态载体或精细分裂的固体载体或上述两者一致地和紧密地结合，然后(如果必要)使产物成形来制备。

适于肠胃外施用的制剂包括含水的和不含水的无菌注射液，该溶液中包含抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂、使制剂等渗的溶质以及预期的接收者的血液；含水的和不含水的无菌悬浮液，该悬浮液包括悬浮剂和增稠剂。制剂可以以单剂量或多剂量容器存在(例如，密封的安瓿和药水瓶)并在使用之前可保存在仅需要添加无菌液态载体(例如，注射用水)的冻干的条件下。临时注射溶液和悬浮液可以从上述的无菌粉剂、粒剂和片剂中制备。

优选的单位剂量制剂是包含施用的成分的一日剂量或单位、每日亚剂量或其适当的组分的制剂。可以理解：除成分(具体地说是上述的)之外，本发明的制剂可包括其它相对于所说的制剂类型的本领域常规的药剂。细胞毒素剂可以可有可无地掺入或以其它方式与血管抑制素蛋白质或其生物学功能的蛋白质片段结合以对患者提供双重疗法。

本发明的血管生成抑制蛋白质可以按照标准的微量化学设备合成并以 HPLC 和质谱检查纯度。蛋白质合成、HPLC 纯化以及质谱法是本领域技术人员熟知的。血管抑制素蛋白质和血管抑制素受体蛋白质也在重组大肠杆菌或酵母表达系统中产生，并以柱色谱纯化。

可以合成完整的血管抑制素分子的不同蛋白质片段以用于几种应用，这些应用包括但不限于下列方面：作为抗原用于开发特异性的抗血清，作为在血管抑制素结合位点有活性的激动剂和拮抗剂，作为蛋白质连接到

细胞毒素剂或与其结合使用以用于定向杀灭和血管抑制素结合的细胞。包含这些蛋白质的氨基酸序列基于其在分子的外部区域的位置的基础上选择并可用于和抗血清结合。血管抑制素的氨基与羧基端以及分子的中间区域在合成的片段中分开存在。

使用蛋白质序列数据库(如 GenBank , Brookhaven 蛋白质, SWISS-PROT 和 PIR)使这些蛋白质序列与已知序列比较以确定潜在的序列同源性。该信息有利于除去和其它分子表现出高度序列同源性的序列,进而增强在开发抗血管抑制素的抗血清、激动剂和拮抗剂中高度特异性的潜力。

血管抑制素和源于蛋白质的血管抑制素可以使用标准方法和其它分子偶联。血管抑制素的氨基与羧基端都包含酪氨酸和赖氨酸残基,并可使用许多技术进行同位素和非同位素标记,例如使用常规技术放射性标记(酪氨酸残基-氯胺 T, 碘, 乳过氧化物酶; 赖氨酸残基-Bolton-Hunter 试剂)。这些偶联技术是本领域技术人员熟知的。另外,把酪氨酸或赖氨酸添加到不具有这些残基的片段上以促进蛋白质上的反应的氨基和羟基基团的标记。偶联技术基于氨基酸上可供使用的功能基团的基础上选择,这些基团包括但不限于氨基、巯基、羧基、酰胺基、酚基和咪唑基。实施这些偶联所使用的各种试剂包括戊二醛、重氮化的联苯胺、碳化二亚胺和 p-苯醌。

使血管抑制素蛋白质和各种应用的同位素、酶、载体蛋白质、细胞毒素剂、荧光素分子、化学发光剂、生物发光剂和其它化合物化学偶联。使用适于特异性反应的不同技术测定了偶联反应的效率。例如,血管抑制素蛋白质的用 ^{125}I 放射性标记使用高比活性的氯胺 T 和 Na^{125}I 完成。反应以焦亚硫酸钠终止,混合物在可任意使用的柱上脱盐。从柱中洗脱标记的蛋白质并收集片段。从每种片段中取出等分试样并以 γ 计数器测定放射性。以这种方式,从标记的血管抑制素蛋白质分离未反应的 Na^{125}I 。把具有最高的特定放射性的蛋白质片段保存待用,如分析结合血管抑制素抗血清的能力。

蛋白质缀合的另一个应用是产生多克隆抗血清。例如,包含赖氨酸残基的血管抑制素蛋白质可使用戊二醛和纯化的牛血清蛋白连接。反应的效率通过测定放射性标记的蛋白质的掺入来测定。未反应的戊二醛和蛋白质通过透析分离。缀合物保存待用。

可以产生抗血管抑制素、血管抑制素同系物和血管抑制素蛋白质片段

以及血管抑制素受体的抗血清。在蛋白质合成和纯化后，单克隆和多克隆抗血清使用本领域技术人员已知的已建立的技术产生。例如，多克隆抗血清可在兔、羊、山羊以及其它动物中产生。把和载体分子缀合的血管抑制素蛋白质(如牛血清蛋白或血管抑制素自身)与佐剂混合物结合、乳化并在背部、颈项、胁腹、有时在足垫进行多位点皮下注射。促进剂注射以有规则的间隔(如每2至4周)进行。血液样品在每次注射后约7至10天使用扩张后的边际耳静脉通过静脉穿刺获得。使血液样品在4℃下凝结过夜，在4℃时于约2400×g下离心约30分钟。取下血清，等分试样，立即使用时在4℃下保存，用于随后分析时在-20至-90℃保存。

分析产生多克隆抗血清的所有血清样品或产生单克隆抗血清的培养基样品用于抗体滴度的测定。滴度通过多次平均值建立，例如，使用点印迹和密度分析，也使用蛋白质A、次级抗血清、冷乙醇或炭-葡聚糖用放射性标记的蛋白质-抗体复合物的沉淀，其后用γ计数器测定活性进行。在商业上可得到的亲和柱上纯化最高的滴度抗血清。血管抑制素蛋白质和亲和柱上的凝胶偶联。抗血清样品通过柱，抗血管抑制素抗体和柱结合。随后洗脱这些抗体，收集并评价其滴度和特异性测定。

试验最高滴度的血管抑制素抗血清确定； a) 抗原最高特异性结合和最低的非特异性结合的最优抗血清稀释倍数， b) 在标准的置换曲线中结合增加的量的血管抑制素蛋白质的能力， c) 和有关的蛋白质以及包括纤溶酶原和有关物种的血管抑制素的蛋白质交叉反应的潜力， d) 用于检测在血浆、尿液、组织提取物和细胞培养基中的血管抑制素蛋白质的能力。

测定血管抑制素和血管抑制素受体的试剂盒也是本发明的一部分。本发明也检查了具有最高滴度和特异性的并可检测在血浆、尿液、组织提取物和细胞培养基中的血管抑制素蛋白质的抗血清以建立易于使用的血管抑制素的快速、可靠、灵敏和特异性的测定和定位方法。这些测定试剂盒包括但不限于下列技术：竞争性和非竞争性测定、放射免疫测定、生物发光和化学发光测定、荧光测定、三明治形(sandwich)测定、免疫放射测定、点印迹、酶联测定(包括ELISA、微滴定板、抗体包被的带或用于尿液和血液检测的量油计)以及免疫细胞化学技术。对于每种试剂盒，确定了测定的范围、灵敏度、精度、可靠性、特异性和再现性。在置换或活性的标准曲

线的 20%、50%和 80%点上建立了测定间和测定内的变化。

通常用于研究和临床的测定试剂盒的一个例子是放射免疫测定 (RIA) 试剂盒。血管抑制素 RIA 说明如下。在对血管抑制素或血管抑制素蛋白质成功地放射性碘化和纯化后, 具有最高滴度的抗血清以几种稀释液添加至包含在适合的缓冲液系统中的相对恒定量的放射性 (如 10, 000cpm) 的试管中。其它试管包含测定非特异性结合的缓冲液或预免疫血清。在 4 ℃ 下温育 24 小时后, 添加蛋白质 A 并使试管涡流, 在室温下温育约 90 分钟并于 4 ℃ 下在约 2000-2500×g 离心以沉淀和标记的抗原结合的抗体复合物。通过抽吸取出上清液并在 γ 计数器上计算沉淀中的放射性。在减去非特异性结合后, 进一步确定了结合约 10 至 40% 标记的蛋白质的抗血清稀释液的特征。

接着, 通过向包含放射性标记的蛋白质和抗血清的试管添加已知量的蛋白质以评价用于开发抗血清的血管抑制素蛋白质的稀释范围 (约 0.1pg 至 10ng)。在再次的温育期 (例如, 24 至 48 小时) 后, 添加蛋白质 A 并使试管离心, 取出上清液并计算沉淀中的放射性。通过未标记的血管抑制素蛋白质 (标准的) 置换放射性标记的血管抑制素蛋白质提供标准曲线。把得自不同物种的几种其它血管抑制素蛋白质片段、纤溶酶原、血管抑制素和同源蛋白质的浓度添加到测定试管中并确定血管抑制素抗血清的特异性。

使用成功地用于提取血管抑制素的提取技术制备不同组织的提取物 (包括但不限于原发性和继发性瘤、Lewis 肺癌, 产生血管抑制素的细胞的培养物、胎盘、子宫以及其它组织 (如脑、肝脏和肠))。在组织提取物的冻干或 Speed Vac 后, 添加测定缓冲液, 把不同的等分试样置于 RIA 试管中。已知的产生血管抑制素的细胞的提取物产生了与标准曲线平行的置换曲线, 但是不产生血管抑制素的组织提取物不从血管抑制素抗血清置换放射性标记的血管抑制素。此外, 把得自患 Lewis 肺癌的动物的尿液、血浆和脑液的提取物以增加的量添加到测定试管中。平行的置换曲线表明利用了血管抑制素测定来测定组织和体液中的血管抑制素。

包含血管抑制素的组织提取物另外通过使等分试样进行反相 HPLC 确定其特征。收集洗脱的片段, 在 Speed Vac 中干燥, 在 RIA 缓冲液中重构并在血管抑制素 RIA 中分析。血管抑制素免疫反应性的最大量位于与血管抑制素的洗脱位置相应的组分上。

测定试剂盒提供说明书、抗血清、血管抑制素或血管抑制素蛋白质以及可能的用于沉淀结合的血管抑制素-血管抑制素抗体复合物的放射性标记的血管抑制素和/或试剂。试剂盒可用于测定有或无肿瘤的动物和人的生物体液和组织提取物中的血管抑制素。

另一种试剂盒用于组织和细胞中的血管抑制素的定位。这种血管抑制素免疫组织化学试剂盒提供说明书、血管抑制素抗血清以及可能的与荧光素分子(如异硫氰酸荧光素)或某些用于使初级抗血清可视化的其它试剂连接的封闭血清和次级抗血清。免疫组织化学技术对本领域技术人员来说是熟知的。这种血管抑制素免疫组织化学试剂盒使得可以使用光学和电子显微镜方法在组织切片和培养细胞中定位血管抑制素。它用于研究和临床目的。例如,对肿瘤进行活组织检查或收集肿瘤,用薄切片机对组织进行切片以检查血管抑制素产生的位点。这样的信息对于癌的检测和治疗中的诊断和可能的治疗目的是有用的。使血管抑制素生物合成位点可视化的另一种方法在原位杂交中放射性标记核酸以探查血管抑制素信使RNA。同样地,可以使用免疫组织化学技术定位、可视化并定量测定血管抑制素受体。

本发明进一步通过下列实施例说明,这些实施例无论如何都不能解释为是对本发明的范围的限制。相反,它可以清楚地理解为:在不背离本发明的精神和/或所附的权利要求的范围的情况下,可以将实施方法用于各种其它实施方案、修饰的和其等价的方案中,在阅读了本文的说明书后,上述这些方法本身可以向本领域技术人员提出建议。

实施例 1

选择其中原发性瘤抑制转移生长并在除去原发性瘤后加速转移生长的动物-肿瘤系统。

通过筛选能够抑制其自身转移的各种鼠肿瘤,选择其中原发性瘤最有效地抑制肺脏转移的 Lewis 肺癌。用 1×10^6 个肿瘤细胞注射(皮下背) Syngeneic C57Bl6/J 六周龄的雄性小鼠。在 3-4 天后首先出现可以观察到的肿瘤。当肿瘤约 1500mm^3 大小时,把小鼠随机化成两组。完全除去第一组中的原发性瘤,第二组在一次假(sham)操作后保持完整。虽然从 500mm^3 至 3000mm^3 的肿瘤抑制转移的生长,但 1500mm^3 是可安全地以高的存活率切

除而且无局部复发的最大原发性瘤。

在 21 天后，处死所有小鼠并作尸体解剖。与除去肿瘤的小鼠的五十+5 个转移相比，在具有完整的原发性瘤的小鼠中，有四+2 个可以观察到的转移 ($p < 0.0001$)。这些数据可通过肺脏重量确证，如上述证明，肺脏重量和肿瘤负载密切相关。与肿瘤保持完整的小鼠相比，在除去肿瘤的小鼠中肺脏质量增加了 400%。

这个试验模型给出了可重复的数据，所描述的实验具有可重复性。该肿瘤标记为 Lewis 肺癌-低转移性 (LLC-低)。肿瘤也抑制在 SCID 小鼠中几乎同一方式的转移，这在 B 和 T 淋巴细胞中是缺陷的。

实施例 2

在原发性瘤除去或不除去时高度转移性 Lewis 肺癌肿瘤变体的分离。

从一组小鼠中的实施例 1 的 LLC-低细胞系自发产生 Lewis 肺癌的高转移性变体，按照实施例 1 所述的方法分离并重复移植。该肿瘤 (LLC-高) 形成了超过 30 个可以观察到的肺脏转移 (不论原发性瘤是否存在)。

实施例 3

肿瘤细胞在其内转移和增殖速率的大小。抑制转移的原发性瘤 (LLC-低) 的作用。

在所有的试验中都使用 C57BI6/ J 小鼠。使用 LLC-低细胞对小鼠皮下接种，14 天后，除去一半小鼠中的原发性瘤。在除去肿瘤后的 5、10 和 15 天时，处死小鼠。获得肺脏转移的组织学切片。具有完整的原发性瘤的小鼠在没有新血管形成的肺脏中有微转移。这些转移限制在 12-15 个细胞层的直径内，即使在肿瘤除去 15 天后也没有显示出大小明显的增加。相对地，除去原发性瘤的动物早在上述后 5 天就表现出大的血管形成的转移。在除去肿瘤后 15 天时，这些转移在体积上又经历了 4-倍的增加 (通过肺脏重量和组织学反映)。除去原发性瘤的动物中有约 50% 在实验结束前死于肺脏转移。具有完整的原发性瘤的所有动物在实验结束前均存活。

通过计算以先前注射进小鼠的 BrdU 染色的核确定在转移内的肿瘤细胞的复制速率。在具有完整的原发性瘤的动物中小的、无血管的转移中掺入

Brdu 的肿瘤细胞的高百分比相当于除去原发性瘤的小鼠中大的、血管形成的转移中的肿瘤细胞的 Brdu 掺入(图 3)。这一发现表明原发性瘤的存在对在转移内的肿瘤细胞的复制速率没有直接作用。

在图 3 中, 左面的图显示了在原发性瘤存在或不存在的肺脏中的肿瘤细胞的 Brdu 标记指数。在免疫组织化学染色前, 切片用 0.2M Tris-HCl 浸透 10 分钟并以在 0.2M Tris-HCl、2mM CaCl₂ 中的 1μg/ml 蛋白酶 K(Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, 德国)于 37℃ 下消化 10 分钟。通过在 250 倍下计数阳性核的百分比来估计标记指数。图 3 的右图描述了手术后原发性瘤完整或除去 5、10 和 15 天时的肿瘤的总肺脏重量的分析。在腹膜内注射 Brdu(0.75mg/小鼠)6 小时后处死动物。

实施例 4

在完整的原发性瘤存在下肺脏转移中的血管生成的抑制。

为了测定在肺脏转移中血管生成的程度, 用抗 von Willebrand 因子的抗体(内皮细胞特异性的标记物, 可从 Dako 公司, Carpinteria, CA 得到)对组织染色。在现存的肺部血管周围, 具有完整的肿瘤的动物的转移形成了薄袖口状物(cuff)(8-12 层肿瘤细胞)。除了血管内层的内皮细胞外, 没有或极少有细胞对 von Willebrand 因子是阳性的。相对地, 除去原发性瘤 5 天后的动物的肺脏转移不仅更大, 而且也潜入了包含被 von Willebrand 因子强烈染色的内皮细胞的毛细血管芽(sprouts)。

在肺脏转移中内皮细胞存在的免疫组织化学分析中, 在接种 19 天后的初始肺脏肿瘤保持完整的肺脏转移在肺脏中先前存在的微血管周围具有袖口状的肿瘤细胞。转移限制在 8 至 12 层细胞内。在微血管周围没有新血管形成的证明, 而且它不包含任何新的微血管。这是最大的无血管的前血管生成的转移的典型。

在切除原发性瘤五天后(接种原发性瘤 19 天后)收集的组织的免疫组织化学分析中, 在肺脏转移围绕在先前形成的血管的周围。相对地, 在没有切除原发性瘤的样品中, 肿瘤是新血管化的。这样, 完整的原发性瘤抑制转移中的新的毛细血管的形成, 但在转移内的肿瘤细胞的增殖不受原发性瘤的影响。

实施例 5

原发性瘤抑制移植在小鼠角膜中的继发性瘤的血管生成。这种继发性瘤的生长被抑制。

在第 0 天把 0.25 至 0.5mm² Lewis 肺脏肿瘤 (LLC-低) 移植在小鼠的角膜中 (Muthukkaruppan Vr., 等, 在小鼠角膜中的血管生成, 科学 205 : 1416-1418, 1979)。在角膜移植之前 4 或 7 天时、或在角膜移植的当天、或在角膜移植后的 4 或 7 天时通过在背部皮下接种 1×10^6 个 LLC-低细胞形成原发性瘤。对照小鼠接收角膜移植但无皮下肿瘤。其它的对照小鼠在角膜移植之前 4 天在背部接收角膜移植和 LLC-高肿瘤细胞的接种。每日通过狭缝光体视显微镜评价角膜中角膜肿瘤的生长 (通过目镜测微尺测定) 和新毛细血管从角膜缘的生长。

在不患原发性皮下肿瘤的对照小鼠中, 大多数角膜 (6/8) 在角膜移植 6 至 7 天后并持续到 10 天开始发育新血管形成。至第 10 天时, 血管形成的角膜肿瘤达到了整个眼睛的约四分之一的体积。在初始皮下 LLC-低肿瘤存在下, 如果在角膜移植至少 4 天或更多天之前放置原发性瘤, 角膜移植不形成血管 (表 1)。在无新血管形成的情况下, 角膜肿瘤在角膜内以薄、白、无血管的圆盘缓慢生长。

然而, 如果直到角膜移植 4 天后才移植原发性瘤, 角膜形成血管, 3/3 角膜肿瘤以和没有肿瘤的对照相似的速率生长。在初始皮下 LLC-高肿瘤存在下, 大多数角膜 (2/3) 在角膜移植 7 天后并持续到 10 天开始新血管形成。至第 10 天时, 血管形成的角膜肿瘤达到了整个眼睛的约四分之一的体积。

表 1

通过原发性皮下肿瘤抑制角膜中的肿瘤血管生成 [除了* (其是 LLC-高) 外, 所有原发性瘤是 LLC-低]。

眼睛移植天数	0	0	0	0	0	0	0
原发性瘤移植的天数	-7	-4	-4*	0	无	+4	+7
在第 10 天具有新角膜的小鼠的数目	2/10	0/9	2/3	2/3	6/8	3/3	2/3

可以预期到当眼睛肿瘤移植之前 7 天 (即-7) 初始 LLC-低皮下肿瘤移植

时，有 0/10 的角膜显示出新血管形成。然而，两个肿瘤 (2/10) 因为其太大 ($>3\text{cm}^3$) 而坏死。

实施例 6

通过碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的继发性皮下移植诱导原发性完整肿瘤的血管生成。

虽然在实施例 V 和 VI 中描述的实验显示原发性瘤在继发性转移中抑制血管生成，这些研究不能表明原发性瘤是否：(i) 直接抑制内皮细胞增殖 (或血管生成)，或 (ii) 间接通过负调节转移肿瘤细胞的血管生成活性。要区分这两种可能性，通过包含碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的 matrigel 的移植诱导皮下血管生成的焦点 (Passaniti, A 等，使用重建的基膜、肝素和成纤维细胞生长因子评价血管生成和抗血管生成剂的简单的定量测定方法，实验室研究，67: 519, 1992)。

把在肝素存在下包含 25 或 50ng/ml bFGF 的 Matrigel (基膜蛋白质的提取物) 皮下注射在正常的和患肿瘤的小鼠 (LLC-低) 的腹侧表面。4 天后处死小鼠，测定在凝胶中的血红蛋白浓度以量化血管形成。先前曾显示进入 matrigel 中的新血管的数量与血红蛋白浓度相关 (Folkman J., 血管生成及其抑制剂，在 1985 肿瘤学的重要进展，VT DeVita, S. Hellman 和 S. Rosenberg, 编辑, J.B. Lippincott, 费城 1985)。也制备了某些凝胶用于组织学检查。在正常小鼠中，包含 50ng/ml bFGF 的 matrigel 沉淀完全是红的。它们受到新的毛细血管的严重侵入并包含 2.4g/dl 血红蛋白。无 bFGF 的 Matrigel 是半透明灰色的并仅包含 0.4g/DL 的血红蛋白 (6 倍的差别)。相对地，具有原发性瘤的小鼠的 matrigel 仅包含 0.5g/DL (图 4)。

在该实验中的血管生成的几乎完全抑制表明：Lewis 肺脏原发性瘤的存在可直接抑制 bFGF-诱导的血管生成。

实施例 7

把患肿瘤的动物的血清转移到除去原发性瘤的动物中抑制了转移。

如上所述把 Lewis 肺癌移植到小鼠中。在 15 天后，当肿瘤约为 1500mm^3 时，把小鼠随机分成四组。三组进行原发性瘤的完全手术切除；在一组中

留下肿瘤(在假手术过程后)。然后在三个切除组的小鼠每日接收腹膜内注射盐水、正常的无肿瘤小鼠的血清或具有 1500mm^3 Lewis 肺癌小鼠的血清。肿瘤保持完整的小鼠组接收腹膜内注射盐水。所有小鼠处理 21 天, 然后处死动物并计算肺脏转移(表 2)。

表 2

处理(腹膜内注射)	原发性瘤除去		原发性瘤完整	
	盐水	正常小鼠的血清	患肿瘤小鼠的血清	注射盐水
肺脏转移的数量:	55±5	50±4	7±2	3±1

这些结果可通过肺脏重量确证。两组之间的差异为 $p < 0.0001$ [(55&50) 相对于 (7&3)]。使用得自患肿瘤的动物的尿液中的血管抑制素获得了类似的结果。

实施例 8

牛毛细血管内皮(BCE)细胞测定

仅使用第 9 和 14 代的 BCE 细胞。在第 0 天, 把 BCE 细胞以 12,500 个细胞/孔的浓度平板接种于凝胶化的(在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下 PBS 中的 1.5% 明胶, 在 $10\%\text{CO}_2$ 中保持 24 小时, 然后以 0.5ml PBS 漂洗) 24 孔平板上。使用血细胞计数器进行细胞计数。把细胞平板接种于含 10% 热灭活的 ($56\text{ }^\circ\text{C}$ 下 20 分钟) 小牛血清和 1% 谷氨酰胺-pen-strep (GPS) 的 $500\mu\text{l}$ DMEM 中。

用 BCE 细胞引起免疫反应如下: 除去培养基并以 $250\mu\text{l}$ DMEM/5%BCS/1%GPS 取代。然后把要试验的样品添加至孔中(量依赖于试验的样品变化而变化)。把平板置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ $10\%\text{CO}_2$ 中约 10 分钟。向每个孔添加 $250\mu\text{l}$ 含 2ng/ml bFGF 的 DMEM/5%BCS/1%GPS 中。最终的培养基是 $500\mu\text{l}$ 含有 1ng/ml bFGF 的 DMEM/5%BCS/1%GPS。把平板放回 $37\text{ }^\circ\text{C}/10\%\text{CO}_2$ 的恒温箱中保持 72 小时。

在第 4 天, 通过除去培养基并在其后使所有孔受胰蛋白酶作用 (0.5ml 胰蛋白酶/EDTA) 2 至 3 分钟对细胞计数。然后把悬浮的细胞转移到含 9.5ml Hemetall 的闪烁小瓶中并使用 Coulter 计数器计数。一个活性单位是指当

内皮细胞在 bFGF 1ng/ml 中培养 72 小时能产生毛细血管内皮细胞增殖的最大抑制的一半的包含血管抑制素的血清的量。

实施例 9

得自患低转移性 Lewis 肺脏肿瘤 (LLC-低) 的小鼠的血清在体外抑制毛细血管内皮细胞增殖。

在 72-小时增殖测定中通过碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF 1ng/ml) 刺激牛毛细血管内皮细胞。把患肿瘤的小鼠的血清以剂量依赖性和可逆的方式添加到这些抑制内皮细胞增殖的培养物中。正常的血清无抑制作用 (图 5)。通过得自患肿瘤的 nu/nu 小鼠和 SCID 小鼠的血清以类似的方式 (与对照相比) 抑制内皮细胞增殖。在除去原发性瘤后, 血管抑制素活性从血清中消失 3-5 天。

患肿瘤的血清也抑制牛主动脉内皮细胞和源于自发的小鼠血管内皮瘤的内皮细胞 (Obeso 等, 实验室研究方法, 衍生血管内皮瘤的细胞系; 其作为内皮细胞生物学研究模型的用途, 实验室研究, 63(2), 259-269, 1990), 但不抑制 Lewis 肺脏肿瘤细胞、3T3 成纤维细胞、主动脉平滑肌细胞、貂肺脏上皮细胞或 W138 人胎肺脏成纤维细胞。

实施例 10

不抑制转移的得自患 Lewis 肺脏肿瘤 (LLC-高) 的小鼠的血清在体外不抑制毛细血管内皮细胞增殖。

得自患 LLC-高的原发性瘤的小鼠的血清与对照相比不明显地抑制 bFGF-刺激的牛毛细血管内皮细胞的增殖。同时, 当该血清进行前两步的纯化 (肝素-琼脂糖凝胶色谱和凝胶过滤) 时, 在任何组分中没有发现血管抑制素活性。

实施例 11

得自 Lewis 肺癌 (低转移性) 的腹水也产生血管抑制素血清。

小鼠接受腹膜内注射 LLC-低或 LLC-高肿瘤细胞 (10^6), 一周后, 从 10-20 只小鼠的每只中获得 1-2ml 含血的腹水。观察到了肠系膜的肿瘤子瘤。然

后处死小鼠。通过心穿孔获得血清。同时从正常的、未患肿瘤的小鼠中获得血清作为对照。离心血清和腹水以除去细胞，在受 bFGF (1ng/ml) 刺激的牛毛细血管内皮细胞上测定上层清液 (参见实施例 IX)。源于两种肿瘤类型的腹水在 72 小时后比对照明显地刺激了毛细血管内皮细胞的增殖 (例如, 100%增殖) (图 6)。相对地, 得自低转移小鼠的血清抑制内皮细胞增殖 (抑制为对照的 79%)。得自高转移系的血清的刺激为 200%。

这些数据显示得自低转移系的腹水包含比血管抑制素多的内皮生长刺激剂。这种状况和实体原发性瘤是类似的。而且, 在血清中出现了血管抑制素活性, 尽管它不是预期的刺激活性。这种方式和固体原发性瘤 (LLC-低) 是类似的。得自高转移肿瘤 (LLC-高) 的腹水看来也包含较多的内皮细胞刺激剂, 但是在血清中不能鉴别到血管抑制素。

实施例 12

通过柱色谱从血清中分级分离血管抑制素并通过 SDS-PAGE 分析生长抑制组分。

为了纯化血管抑制素, 从患肿瘤的小鼠收集血清。使用肝素-琼脂糖凝胶, Biogel A0.5mm 琼脂糖以及几次循环的 C4-反相高效液相色谱 (HPLC) 依次层析分离按照上述体外抑制剂测定的抑制活性。包含内皮细胞抑制活性的 HPLC 组分的 SDS-PAGE 显示了 38,000 道尔顿的明显减少的 Mr 的离散的带, 将该带纯化约 1 百万倍 (参见表 3) 至约 2×10^7 的比活性。在纯化的不同阶段, 用特异性抗体试验收集的组分中已知内皮细胞抑制剂存在。在部分纯化的或纯化的片段中没有发现血小板因子-4、糖蛋白 G 或转化生长因子 β 。

表 3

	比活性 (单位*/mg)	纯化倍数
血清	1.69	1
肝素琼脂糖凝胶	14.92	8.8
Bio-gel A0.5m	69.96	41.4
HPLC/C4	2×10^7	1.2×10^6

* 一个活性单位是指当内皮细胞在 bFGF 1ng/ml 中培养 72 小时时能产生毛细血管内皮细胞增殖的最大抑制的一半时的包含血管抑制素的血清的量。

实施例 13

通过柱色谱从尿液中分级分离血管抑制素并通过 SDS-PAGE 分析生长抑制组分。

通过可以从小鼠中获得的少量血清和血清中的大量蛋白质阻碍从血清中纯化内皮细胞抑制剂。

分析得自患肿瘤的小鼠的尿液，发现它包含内皮细胞增殖的抑制剂，这种抑制剂在没有肿瘤的小鼠和患 LLC-高肿瘤患的小鼠的尿液中不存在。通过和用于纯化血清的策略相似的策略(以上所述的)进行内皮细胞抑制活性的纯化(图 7)。

图 7 显示了部分纯化的血清或得自患肿瘤的动物的尿液的 C4 反相色谱。所有组分以如实施例 IX 所述的 72-小时增殖测定在含有 bFGF 的牛毛细血管内皮细胞上测定。在组分 23 于 30-35% 乙腈洗脱的两种情况下观察到了抑制的离散峰。从得自患肿瘤动物的血清的三个循环的 C4 反相色谱获得的抑制组分的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示了约 38,000 道尔顿的单一带。

实施例 14

循环血管抑制素的特征确定。

按照实施例 9 中所描述的方法测定内皮细胞抑制。在 Synchropak HPLC C4 柱上分离血管抑制素(Synchrom 公司, Lafayette, IN)。抑制剂在 30 至 35% 乙腈梯度洗脱。在还原条件(β -巯基乙醇(5%v/v)下的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)凝胶上，具有活性的蛋白质带在 38 千道尔顿洗脱。在非还原条件下，具有活性的蛋白质在 28 千道尔顿洗脱。不论从尿液中或血清中分离初始样品，活性都在类似的点发现。在任何其它的带中没有检测到活性。

当加热(100 °C 下 10 分钟)或使用胰蛋白酶处理时，与所说的带有关的活性失去。当具有活性的带以水/三氯甲烷混合物(1:1)提取时，活性仅在

水相中发现。

实施例 15

从人纤溶酶纯化抑制片段:

从 Sigma 化学公司获得纤溶酶原赖氨酸结合位点 I。制剂是用弹性蛋白酶消化后的纯化的人纤溶酶原。以这种方式获得的赖氨酸结合位点 I 是蛋白质群, 该蛋白质群包含集合形式的纤溶酶 A-链(kringel1+2+3)中的至少前三个三环结构(1 至 3 号)(Sottrup-Jensen, L. 等, 化学纤维蛋白溶解和血栓溶解进展, 第 3 卷, 191, Davidson, J.F. 等, eds. Raven 出版社, 纽约, 1978 和 Wiman, B. 等, 生物化学和生物物理学报, 579, 142(1979))。把纤溶酶原赖氨酸结合位点 I (Sigma 化学公司, St. Louis, MO) 重新悬浮在水中并施用到以 HPLC-级水/0.1%TFA 平衡的 C4-反相柱中。以水/0.1%TFA 至乙腈/0.1%TFA 的梯度洗脱柱。把组分收集进聚丙烯试管中。在增殖测定中, 使每种的等分试样在 speed vac 中蒸发, 用水重新悬浮, 并施用到 BCEs 中。使用类似的洗脱梯度重复该方法两次以洗脱抑制片段。抑制活性在最后进行的 C4 柱中在 30-35%乙腈下洗脱。抑制组分的 SDS-PAGE 显示了 40、42.5 和 45 kd 的明显减少的分子量的 3 条离散的带。在非还原条件下的 SDS-PAGE 显示了分子量分别为 30、32.5 和 35 kd 的三条带。

实施例 16

从 SDS-PAGE 提取抑制活性

将得自人纤溶酶原为基础的纯化物的纯化的抑制组分通过 SDS-PAGE 在非还原条件下分离。从凝胶上割下相应于在以相同样品装载的相邻泳道上通过银染色所看见的带的凝胶区域, 于 4 °C 下在聚丙烯试管中的 1ml 磷酸缓冲盐水中温育凝胶 12 小时。取出上清液, 对盐水透析两次, 每次 6 小时 (MWCO=6-8000), 再对蒸馏水透析两次, 每次 6 小时。通过真空离心蒸发透析液。在 72 小时测定中, 把产物重新悬浮在盐水中并施用于用 1ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子刺激的牛毛细血管内皮细胞上。从三条带的每条提取的蛋白质可抑制毛细血管内皮细胞。

实施例 17

纤溶酶原片段处理研究

把 Lewis 肺癌移植到小鼠中，当肿瘤为 $1500-2000\text{mm}^3$ 时进行切除。在手术当天，把小鼠随机分成 6 个组，每组 6 只小鼠。小鼠每日接收腹膜内注射人纤溶酶原的三次纯化的抑制片段、完整的人纤溶酶原、患肿瘤动物的尿液、正常小鼠的尿液或盐水。使用盐水注射处理仅进行假过程的一组患肿瘤的动物。在除去原发性瘤后，使小鼠立即接收作为装载剂量的 $24\mu\text{g}$ ($1.2\text{mg}/\text{kg}/\text{天}/\text{小鼠}$) 腹膜内注射的抑制纤溶酶原片段。然后使这些小鼠在实验期间每日接收 $12\mu\text{g}$ ($0.6\text{mg}/\text{kg}/\text{天}/\text{小鼠}$) 腹膜内注射的抑制片段。在肿瘤除去后，使对照小鼠接收相同剂量的完整纤溶酶原分子。对于尿液处理，过滤正常或患肿瘤小鼠的尿液，充分透析，冻干，然后悬浮在无菌水中以获得 250 倍的浓度。在除去原发性瘤的当天，对小鼠两次腹膜内注射施用作为装载剂量的得自患肿瘤小鼠或正常小鼠的 0.8ml 透析尿浓缩液。然后在实验过程中使这些小鼠每日腹膜内注射接收 0.4ml 透析并浓缩的尿液。处理持续 13 天，此时处死所有小鼠并作尸体解剖。

实验结果如图 8 和 9 所示。图 8 显示了在 13 天处理后的表面肺脏转移。表面肺脏转移是指在尸体解剖时在小鼠肺脏中看到的转移的数量。使用体视显微镜来对转移进行计数。图 8 显示了计数的表面肺脏转移的平均数量和平均值的标准误差。如图所示，具有原发性瘤的小鼠组没有显示出转移。切除原发性瘤并用盐水处理的小鼠组显示了大量的转移。用源于人的纤溶酶原片段处理的小鼠没有显示出转移。用完整的纤溶酶原处理的小鼠显示出了大量的转移，这表明完整的纤溶酶原分子没有内皮细胞抑制活性。那些用得自患肿瘤的小鼠的透析并浓缩的尿液处理的小鼠没有显示出转移。用得自正常小鼠的浓缩的尿液处理显示了大量的转移。当测定肺脏重量时，获得了类似的结果(图 9)。

实施例 18

鼠和人血管抑制素的氨基酸序列

在 Applied Biosystem 477A 型蛋白质测序仪上测定分离自小鼠尿液的血管抑制素和分离自人赖氨酸结合位点 I 片段制剂的血管抑制素的氨基酸

序列。用联机 ABI 120A 型 HPLC 鉴别苯基硫代乙内酰脲氨基酸片段。从 N-末端序列测定的氨基酸序列与鼠和人血管抑制素的胰蛋白酶消化表明：血管抑制素序列类似于鼠纤溶酶原第 98 个氨基酸开始的序列。这样，血管抑制素的氨基酸序列是这样的分子，该分子通过还原聚丙烯酰胺凝胶电泳测定具有约 45 至 65 千道尔顿的分子量并具有与从完整的鼠纤溶酶原分子的第 98 个氨基酸开始的鼠纤溶酶原片段的序列实质上类似的氨基酸序列。鼠血管抑制素的开始氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2) 如图 1 所示。该氨基酸序列的长度可以比图 1 所示的序列稍长或稍短。

人赖氨酸结合位点 I (参见实施例 15) 的活性片段的 N 末端氨基酸和胰蛋白酶消化显示：该片段的序列在人血管抑制素的约第 97 或 99 个氨基酸开始，人纤溶酶原和鼠血管抑制素是同源的。人血管抑制素的开始氨基酸序列 (在氨基酸 98 开始) 如图 2 (SEQ ID NO: 3) 所示。在图 2 中，比较了鼠和人血管抑制素的氨基酸序列和得自其它物种的纤溶酶原 (包括猪、牛和恒河猴纤溶酶原) 的相应内部氨基酸序列。这表明在这些物种中存在血管抑制素。

实施例 19

人血管抑制素在大肠杆菌中的表达。

使用 pTrcHisA 载体 (Invitrogen) (图 10) 获得高水平的、可调节的从用于在大肠杆菌中增强真核基因翻译效率的 trc 启动子的转录。使用金属亲和性树脂把血管抑制素融合到用于一步纯化的 N-末端镍-结合聚组氨酸尾部表达。在融合蛋白中的肠激酶裂解识别位点使得可以在随后从纯化的重组蛋白质除去 N-末端组氨酸融合蛋白。发现重组人血管抑制素蛋白质结合赖氨酸；和对 kringle 1、2 和 3 区的单克隆抗体特异性有交叉反应并在体外抑制 bFGF-驱动的内皮细胞增殖。

要构建插入序列，从使用聚合酶链式反应 (PCR) 和特异性引物逆转录和扩增的人肝脏 mRNA 获得了编码人血管抑制素的基因片段。1131 个碱基对的产物编码人纤溶酶原的 93 至 470 氨基酸。把扩增的片段克隆进 pTrcHisA 的 XhoI/KpnI 位点，并把产生的构建体转化进 XL-1B (可从 Stratagene 得到) 大肠杆菌宿主细胞。把仅包含质粒载体 pTrcHisA 的对照克隆也转化进 XL-

1B 大肠杆菌宿主细胞。该克隆作为载体对照克隆。两种克隆用如下所述的相同的方法纯化。

以下列方式选择表达菌落。用编码血管抑制素的基因转化的菌落转移在 IPTG 饱和的硝酸纤维素滤膜上生长并在 LB 琼脂平板上覆盖。在 IPTG 诱导表达后，将菌落在硝酸纤维素滤膜上溶解。封闭硝酸纤维素转移、漂洗并以两种分离的单克隆抗体 (mAbs Dcd 和 Vap ; S.G. McCance 和 F.J. Castellino 所赠, Notre Dame 大学) 探查, 该单克隆抗体识别血管抑制素的特异性构象。选择了 mAbs 识别的强烈表达的菌落。

要鉴别最大表达的最优时间, 在 IPTG 诱导前和后的不同时间收集细胞并进行重复冻结-解冻循环, 然后用 SDS-PAGE 分析, 以 mAbs Dcd 和 Vap 进行免疫印迹与探查。

从这些细胞中选择克隆 pTrcHisA/HASH4。以 IPTG 诱导 4 小时, 其后收集细胞沉淀并重新悬浮在 50 mM Tris pH 8.0、2mM EDTA、5%甘油和 200mg/ml 溶菌酶中并在 4 °C 下搅拌 30 分钟。使浆状物在 14,000rpm 下离心 25 分钟。把沉淀重新悬浮在 50mM Tris pH 8.0、2mM EDTA、5%甘油和 0.1%DOC 中。在 4 °C 下搅拌悬浮液 1 小时, 然后在 14,000rpm 下离心 25 分钟。在此步骤的上清液组分包含表达的血管抑制素。发现大肠杆菌表达的人血管抑制素具有天然血管抑制素的物理性质, 即结合赖氨酸的能力。这样大肠杆菌表达的血管抑制素以单一步骤在赖氨酸-琼脂糖凝胶 (Pharmacia 或 Sigma) 柱中纯化。用 0.2M ϵ -氨基-n-己酸 pH 7.5 从柱中洗脱血管抑制素。

在这些实验后, 进行了克隆 pTrcHisA/HASH4 的放大的 10 L 发酵。沉淀从放大诱导中获得的细胞并重新悬浮在 50mM Tris pH 7.5 中, 在过程中于 10 °C 冷却下在 10,000psi 时裂开三次。获得的裂解物通过 4 °C 下 10,000 rpm 离心 30 分钟澄清, 表达的血管抑制素在赖氨酸-琼脂糖凝胶中分离 (图 11)。

使纯化的大肠杆菌表达的人血管抑制素对水充分透析并冻干。把表达的人血管抑制素重新悬浮在培养基 (DMEM, 5%BCS, 1%庆大霉素/青霉素/链霉素) 中至 3 μ g/ml 的估计的浓度, 在体外用于牛毛细血管内皮 (BCE) 细胞测定 (如实施例 8 中所述, 第 39 页)。同样地, 以和克隆 pTrcHisA/HASH4

相同的方式处理仅包含载体的对照克隆。这些克隆以 IPTG 同等诱导，使用细菌裂解物结合赖氨酸，用 0.2M 氨基己酸洗脱，充分透析并冻干。把这种对照制剂也以 3 μ g/ml 的估计的浓度重新悬浮在培养基中。从不同的诱导物和发酵批以及不同的纯化步骤中获得重组血管抑制素和对照的样品，并使所有样品在 Entremed, Maryland 编码。用这些编码的样品以随机的方式在 Children's Hospital, 波士顿进行 BCE 测定。

重组人血管抑制素的 BCE 测定结果表明：在大肠杆菌中表达的人血管抑制素抑制了由于 bFGF (以 1ng/ml 使用) 的 BCE 细胞的增殖 (图 12)。在培养基中的重组血管抑制素母液 (约 3 μ g/ml) 以 1:5、1:10 和 1:20 的稀释液使用。抑制百分率计算如下：

具有血管抑制素的细胞数目-在第 0 天的细胞数目

1-

仅具有 bFGF 的细胞数目-在第 0 天的细胞数目

BCE 细胞增殖的抑制百分率与相似浓度的源于纤溶酶原的血管抑制素的抑制百分率是可比较的或较高。BCE 测定重复进行的结果在图 13 中描述，在母液的 1:5 稀释倍数时，重组血管抑制素产生和源于纤溶酶原的血管抑制素获得的抑制百分率相似的抑制百分率。图 13 显示了惊人的结果：人重组血管抑制素蛋白质抑制超过 60%；在培养基中多达 75% 以上的 BCE 增殖。

实施例 20

血管抑制素以增加编程性细胞死亡速率保持微转移的休眠。

在皮下接种具有 Lewis 肺癌细胞 (1×10^6) 的 C57 BL6/J 小鼠后，发育了约 1.5cm³ 的原发性瘤。使动物进行原发性瘤的外科切除或假手术。在手术后 5、10 和 15 天时处死小鼠，准备其肺脏以用于组织学检查。切除了原发性瘤的动物与假手术的对照相比显示了微转移的大量增殖 (图 14)。这些变化伴随着肺脏重量的明显增加。

通过摄取溴-脱氧尿苷 (BrdU) 测定的肿瘤细胞增殖的分析和具有完整的原发性瘤的动物或在 5、9、13 天切除肿瘤的动物之间没有显示出区别，这表明在肿瘤质量的增加不能通过增加的增殖 (图 15) 解释。因此，在

这些动物中可检查到细胞死亡。通过免疫组织化学标记的片段化的 DNA 用末端脱氧核苷转移酶(TdT)技术检查编程性细胞死亡(依赖于基因表达变化的细胞死亡过程, 它可解释在发育过程中和迅速增殖的组织(如小肠)中细胞的消除)。在每次处死时测定编程性细胞死亡指数。除去原发性瘤在所有检查中造成编程性细胞死亡指数的统计学上明显的增加(约 3 至 4 倍)(图 15)。

通过用除去的具有血管生成的外源抑制剂的原发性瘤处理小鼠获得支持证据。这种物质 TNP-1470(0-氯乙酰甲氨酰夫马霉醇, 以前命名为 AGM-1470)是具有报道的抗血管生成活性的夫马霉素的同系物。TNP-1470 的皮下注射(30mg/kg)产生了和以上所述的具有完整的原发性瘤的动物的结果惊人地类似的结果。这些动物与注射盐水的对照相比显示了更低的肺脏重量, 相当的增殖指数和增加的编程性细胞死亡指数(图 16)。

这些数据表明: 当肿瘤细胞增殖通过相当数量的细胞死亡平衡时转移保持休眠。除去原发性瘤造成转移生长的迅速增加, 这可能是由于除去了通过增加肿瘤细胞中的编程性细胞死亡控制转移生长的血管生成抑制剂(血管抑制素)。这些作用类似于除去原发性瘤并施用血管生成的外源抑制剂后所观察到的作用。这些数据共同表明原发性瘤释放保持转移休眠的血管抑制素。

实施例 21

在体内用血管抑制素处理原发性瘤。

如以上实施例 15 所述通过有限的弹性蛋白酶消化从人纤溶酶原纯化血管抑制素。把血管抑制素重新悬浮在磷酸缓冲盐水中以施用进六周龄的雄性 C57B/16J 小鼠中。以 Lewis 肺癌或 T241 纤维肉瘤的 1×10^6 肿瘤细胞对动物皮下移植。在四天后当肿瘤为 $80-160\text{mm}^3$ 大小时开始用血管抑制素处理。通过腹膜内(ip)或皮下(sc)路线小鼠接受 40mg/kg 血管抑制素的一次注射或 80mg/kg 血管抑制素的两次注射。在处理后的不同时间处死动物。

以 40mg/kg 的每日剂量 ip 施用血管抑制素产生了对 T241 原发性瘤生长的高度明显抑制(图 17)。这种对生长的抑制作用在 2 天内明显可见, 在

∴

整个研究的时程中在数量增加。至第 18 天时，血管抑制素处理的小鼠具有注射盐水对照的体积的约 38% 的肿瘤。这种差异在统计学上是显著的 ($P < 0.001$, t-检验)。

血管抑制素处理 (80mg/kg/天的总剂量, 以 40mg/kg ip 或 sc 每日两次施用) 也明显地减少 LLC-LM 原发性瘤的生长速率 (图 17)。这种抑制作用在 4 天时是明显的, 在尔后检查的次数中数量增加。在实验的最后一天 (第 19 天), 血管抑制素处理的小鼠仅具有仅为注射盐水的对照 20% 的平均肿瘤体积, 它们之间的差异是明显的 ($P < 0.001$, t-检验)。

在另一个系列的实验中, 对以 T241 纤维肉瘤、Lewis 肺癌 (LM) 或网状组织细胞肉瘤细胞移植的小鼠施用血管抑制素 (50mg/kg q12 小时)。对于每种肿瘤细胞类型, 接收血管抑制素的小鼠具有实质上减小的肿瘤大小。图 19 证明了对于 T241 纤维肉瘤, 血管抑制素处理的小鼠具有平均的肿瘤体积, 该体积在第 24 天时仅为未处理小鼠的 15%。图 20 证明了对于 Lewis 肺癌 (LM), 血管抑制素处理的小鼠具有平均的肿瘤体积, 该体积在第 24 天时仅为未处理小鼠的 13%。图 21 证明了对于网状组织肉瘤, 血管抑制素处理的小鼠具有平均的肿瘤体积, 该体积在第 24 天时仅为未处理小鼠的 19%。每点的数据代表 4 只小鼠的平均值。

这些结果表明: 在体内血管抑制素是三种不同的原发性瘤生长的极有效的抑制剂。

实施例 22

在小鼠中以血管抑制素体内处理源于人细胞的原发性瘤。

研究了血管抑制素对两种人肿瘤细胞系 (人前列腺癌 PC-3 和人胸部癌 MDA-MB) 的作用。用人肿瘤细胞移植免疫缺陷的 SCID 小鼠, 小鼠如实施例 21 所述基本上每 12 小时以 50 mg/kg 血管抑制素处理。结果证明: 本发明的血管抑制素蛋白质是人肿瘤细胞生长的有效抑制剂。图 22 显示了对于人前列腺癌 PC-3, 在第 24 天时与未处理的对照小鼠相比血管抑制素处理的小鼠仅有平均肿瘤体积的 2%。图 23 显示了对于人胸部癌 MDA-MB, 在第 24 天时与未处理的对照小鼠相比血管抑制素处理的小鼠仅有平均肿瘤体积的 8%。

实施例 23

基因治疗-血管抑制素基因对肿瘤体积的转染作用。

使用 PCR 产生编码小鼠纤溶酶原氨基酸 1-460 的源于小鼠纤溶酶原 cDNA (从美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 获得) 的血管抑制素的 1380 碱基对 DNA 序列, 并将其插入到表达载体中。把表达载体转染进 T241 纤维肉瘤细胞并把转染的细胞移植进小鼠。对照小鼠接收非转染的 T241 细胞, 或 T241 细胞仅用载体转染 (即非血管抑制素表达转染的细胞)。在实验中使用了三种表达血管抑制素的转染的细胞克隆。从头到尾测定平均肿瘤体积。结果显示出与非转染的和非表达的对照细胞相比, 在表达血管抑制素的细胞克隆的小鼠中平均肿瘤体积惊人地和剧烈地减小。

编码小鼠血管抑制素蛋白质的小鼠 DNA 序列源于小鼠纤溶酶原 cDNA。小鼠血管抑制素包括小鼠纤溶酶原 kringle 区 1-4。构建该克隆的图解在图 24 中显示。

使用 LIPOFECTIN 转染系统 (可从生命技术, Gaithersburg, MD 购得) 把小鼠血管抑制素蛋白质克隆转染进 T241 纤维肉瘤细胞。LIPOFECTIN 试剂是在膜过滤的水中的 1:1 (w/w) 阳离子脂 N-[1-(2, 3-二油酰氧) 丙基]-n, n, n-三甲基氯化铵 (DOTMA) 和二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 的脂质体制剂。

细胞的瞬时转染步骤如下:

1. 在 60cm² 的组织培养皿中培养 T241 细胞, 接种量 ≈ 在 2ml 补充有血清的适当的生长培养基中的 1-2×10⁵ 细胞。

2. 于 37 °C 下在 CO₂ 恒温箱中培养细胞直到细胞 40-70% 融合。这通常需要 18-24 小时, 但是时间随细胞类型的不同而不同。T241 肿瘤细胞融合约是 70%。

3. 在 12×75mm 无菌试管中制备下列溶液:

溶液 A: 对于每次转染, 以 100μl 无血清的 OPTI-MEM I 减少的血清培养基 (可从生命技术得到) (也可以使用组织培养级的去离子水) 稀释 5μg DNA。

溶液 B: 对于每次转染, 以 100μl OPTI-MEM 培养基稀释 30μg

LIPOFECTIN。

4. 在室温下合并两种溶液，轻轻混合并在室温下温育 10-15 分钟。
5. 以无血清培养基洗涤细胞两次。
6. 对于每次转染，把 0.8ml 无血清的培养基添加至每个包含 LIPOFECTIN 试剂-DNA 复合物的试管中。轻轻混合并把复合物覆盖在细胞上。
7. 于 37 °C 下在 CO₂ 恒温箱中培养细胞约 12 小时。
8. 用 1mg/ml 包含血清的选择培养基取代包含 DNA 的培养基，并于 37 °C 下在 CO₂ 恒温箱中培养细胞总共 48-72 小时。
9. 在 48-72 小时转染后测定细胞提取物的基因活性。

可以使用血管抑制素特异性的抗体测定转染细胞的血管抑制素蛋白质的表达。另外，在约 10-14 天后，G418 抗性菌落出现于 CMV-血管抑制素转染的 T241 细胞中。同时，仅在转染克隆的载体中观察到了许多克隆，但在未转染的克隆中没有观察到。使用免疫荧光法选择 G418 抗性克隆的血管抑制素的表达。

令人感兴趣的是，用血管抑制素转染的 241 细胞和 Lewis 肺脏细胞的体外细胞生长没有受到抑制或其它的如图 25 和 26 所显示的负作用。

图 27 描述了转染实验的结果。所有表达血管抑制素的 T241 转染的三个克隆在小鼠中产生相对于对照小鼠的肿瘤体积有实质上减少的平均肿瘤体积。用克隆 37 移植的小鼠的平均肿瘤体积仅为对照小鼠的 13%，而用克隆 31 和克隆 25 移植的小鼠的平均肿瘤体积仅分别为对照的 21% 和 34%。这些结果表明可以把编码血管抑制素的 DNA 序列转染进细胞，该转染的 DNA 序列能够通过移植的细胞表达血管抑制素蛋白质，表达的血管抑制素在体内起作用以降低肿瘤生长。

实施例 24

血管抑制素表达的体内位点的定位

为了确定血管抑制素蛋白质的表达的体内位点，分析了得自新鲜肿瘤或多次继代移植后的细胞培养物的各种细胞类型 (Lewis 肺癌细胞 (小鼠)，T241 纤维肉瘤 (小鼠) 和 Burkitt 淋巴组织瘤细胞 (人)) 的总 RNA 以确定血管

抑制素转录产物的存在。样品的 Northern 分析表明, 除正常小鼠肝脏 RNA 显示出相应于小鼠纤溶酶原的约 2.4kb 的单一信号外, 不存在任何与所有样品的序列杂交的信号。人样品的 Northern 分析表明, 除正常人肝脏 RNA 显示出相应于人纤溶酶原的约 2.4kb 的单一信号外, 不存在任何与所有样品的人血管抑制素序列杂交的信号。

逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 分析显示, 除了正常小鼠肝脏的外, 不存在用小鼠血管抑制素序列探查的所有样品的任何产物。RT-PCR 分析显示, 除正常人肝脏的外, 不存在用人血管抑制素序列探查的所有人样品的任何产物 (小鼠的预期大小为 1050bp, 人的预期的大小为 1134bp)。

这样看起来小鼠血管抑制素转录产物 (假设和小鼠纤溶酶原的 97 到 450 氨基酸相同) 不是由所有上述的小鼠的样品产生, 人血管抑制素转录产物 (假设和人纤溶酶原的 97 到 470 氨基酸相同) 不是由所有上述的人的样品产生。在正常小鼠/人肝脏中所获得的阳性信号来源于和纤溶酶原的杂交。

实施例 25

酵母中血管抑制素的表达

把编码人纤溶酶原的 93 至 470 氨基酸的基因片段克隆进使得可以在巴斯德毕赤酵母中使用 PH01 分泌信号表达分泌蛋白质的 pHIL-SI (Invitrogen) 的 XhoI/EcoRI 位点。同样地, 把编码人纤溶酶原的 93 至 470 氨基酸的基因片段克隆进使得可以在巴斯德毕赤酵母中使用 α -因子分泌信号表达分泌蛋白质的 pPIC9 (Invitrogen) 的 SnaBI/EcoRI 位点。在这些系统中表达的人血管抑制素蛋白质比在大肠杆菌中表达的血管抑制素蛋白质有许多优势, 如蛋白质加工、蛋白质折叠和包括葡基化的翻译后修饰。

在巴斯德毕赤酵母中的基因表达在以下文献中有描述, 本文一并参考: Sreekrishna, K. 等 (1988), 在甲基营养巴斯德毕赤酵母中异源蛋白质的高水平表达, 基础微生物学杂志 29(4): 265-278 和 Clare, J. J. 等 (1991), 酵母中表皮生长因子的产生: 使用包含多个基因拷贝的巴斯德毕赤酵母菌株的高水平分泌, 基因 105: 205-212。

实施例 26

在转基因动物和植物中血管抑制素蛋白质的表达

创造表达血管抑制素基因转录产物的转基因动物(如牛或猪家族的)。转基因动物表达血管抑制素蛋白质(例如在这些动物的奶中表达)。另外构建了表达血管抑制素基因转录产物的可食用的转基因植物。

构建表达外源 DNA 的转基因动物在以下文献中有描述,本文一并参考: Smith H. 植物色素转基因: 功能、生态和生物技术的应用, 细胞生物学研究, 1994 5(5): 315-325。

实施例 27

抑制血管抑制素片段的内皮细胞增殖的特征

下列实施例确定单独的和组合的血管抑制素片段活性的特征。数据表明: 在单独的 kringle 结构和有效的抗内皮细胞中存在功能上的差别, 因而可以从这类血管抑制素的蛋白质片段中得到抗血管生成的活性。

本文所使用的血管抑制素片段指具有内皮细胞增殖抑制活性的血管抑制素或纤溶酶原的蛋白质衍生物。血管抑制素片段可用于治疗血管生成介导的疾病或病症。例如, 血管抑制素片段可用于抑制或降低肿瘤生长。例如, 除非在其使用的上下文中特别指出, 这类血管抑制素片段的氨基酸序列可以从鼠纤溶酶原(SEQ ID NO: 1)、鼠血管抑制素(SEQ ID NO: 2)的部分; 人血管抑制素(SEQ ID NO: 3)、恒河猴血管抑制素(SEQ ID NO: 4)、猪血管抑制素(SEQ ID NO: 5)和牛血管抑制素(SEQ ID NO: 6)的部分中选择。

除非在其所使用的上下文中特别指出, 本文中所使用的 kringle 1 指具有内皮细胞增殖抑制活性或抗血管生成活性并具有包含同源于kringle 1 之序列的氨基酸序列的纤溶酶原的蛋白质衍生物, 例如(但不限于), 鼠 kringle 1 (SEQ ID NO: 7)、人 kringle 1 (SEQ ID NO: 8)、恒河猴 kringle 1 (SEQ ID NO: 9)、猪 kringle 1 (SEQ ID NO: 10)和牛 kringle 1 (SEQ ID NO: 11)。鼠 kringle 1 (SEQ ID NO: 7)相应于 SEQ ID NO: 1 的鼠纤溶酶原的氨基酸位置 103 至 181 (包含), 并相应于 SEQ ID NO: 2 的鼠血管抑制素的氨基酸位置 6 至 84 (包含)。人 kringle 1 (SEQ ID NO: 8)、恒河猴 kringle 1 (SEQ ID NO: 9)、猪 kringle 1 (SEQ ID NO: 10)和牛 kringle 1 (SEQ ID NO: 11)分别相应于 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 的血

∴
∴
∴

管抑制素的氨基酸位置 6 至 84 (包含)。

除非在其所使用的上下文中特别指出, 本文中所使用的 kringle 2 指具有内皮细胞增殖抑制活性或抗血管生成活性并具有包含同源于kringle 2 之序列的氨基酸序列的纤溶酶原的蛋白质衍生物, 例如(但不限于), 鼠 kringle 2 (SEQ ID NO: 12)、人 kringle 2 (SEQ ID NO: 13)、恒河猴 kringle 2 (SEQ ID NO: 14)、猪 kringle 2 (SEQ ID NO: 15) 和牛 kringle 2 (SEQ ID NO: 16)。鼠 kringle 2 (SEQ ID NO: 12) 相应于 SEQ ID NO: 1 的鼠纤溶酶原的氨基酸位置 185 至 262 (包含), 并相应于 SEQ ID NO: 2 的鼠血管抑制素的氨基酸位置 88 至 165 (包含)。人 kringle 2 (SEQ ID NO: 13)、恒河猴 kringle 2 (SEQ ID NO: 14)、猪 kringle 2 (SEQ ID NO: 15) 和牛 kringle 2 (SEQ ID NO: 16) 分别相应于 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 的血管抑制素的氨基酸位置 88 至 165 (包含)。

本文中所使用的 kringle 3 指具有内皮细胞增殖抑制活性或抗血管生成活性并具有包含同源于 kringle 3 之序列的氨基酸序列的纤溶酶原的蛋白质衍生物, 例如(但不限于), 鼠 kringle 3 (SEQ ID NO: 17)、人 kringle 3 (SEQ ID NO: 18)、恒河猴 kringle 3 (SEQ ID NO: 19)、猪 kringle 3 (SEQ ID NO: 20) 和牛 kringle 3 (SEQ ID NO: 21)。鼠 kringle 3 (SEQ ID NO: 17) 相应于 SEQ ID NO: 1 的鼠纤溶酶原的氨基酸位置 275 至 352 (包含), 并相应于 SEQ ID NO: 2 的鼠血管抑制素的氨基酸位置 178 至 255 (包含)。人 kringle 3 (SEQ ID NO: 18)、恒河猴 kringle 3 (SEQ ID NO: 19)、猪 kringle 3 (SEQ ID NO: 20) 和牛 kringle 3 (SEQ ID NO: 21) 分别相应于 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 的血管抑制素的氨基酸位置 178 至 255 (包含)。

除非在其所使用的上下文中特别指出, 本文中所使用的 kringle 4 指具有内皮细胞增殖抑制活性或抗血管生成活性并具有包含同源于kringle 4 之序列的氨基酸序列的纤溶酶原的蛋白质衍生物, 例如(但不限于), 鼠 kringle 4 (SEQ ID NO: 22) 和人 kringle 4 (SEQ ID NO: 23)。鼠 kringle 4 (SEQ ID NO: 22) 相应于 SEQ ID NO: 1 的鼠纤溶酶原的氨基酸位置 377 至 454 (包含)。

除非在其所使用的上下文中特别指出, 本文中所使用的 kringle 2-3

∴
∴
∴

指具有内皮细胞增殖抑制活性或抗血管生成活性并具有包含同源于kringle 2-3 之序列的氨基酸序列的纤溶酶原的蛋白质衍生物, 例如(但不限于), 鼠kringle 2-3(SEQ ID NO: 24)、人kringle 2-3(SEQ ID NO: 25)、恒河猴kringle 2-3(SEQ ID NO: 26)、猪kringle 2-3(SEQ ID NO: 27)和牛kringle 2-3(SEQ ID NO: 28)。鼠kringle 2-3(SEQ ID NO: 24)相应于SEQ ID NO: 1 的鼠纤溶酶原的氨基酸位置 185 至 352(包含), 并相应于SEQ ID NO: 2 的鼠血管抑制素的氨基酸位置 88 至 255(包含)。人kringle 2-3(SEQ ID NO: 25)、恒河猴kringle 2-3(SEQ ID NO: 26)、猪kringle 2-3(SEQ ID NO: 27)和牛kringle 2-3(SEQ ID NO: 28)分别相应于SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和SEQ ID NO: 6 的血管抑制素的氨基酸位置 88 至 255(包含)。

除非在其所使用的上下文中特别指出, 本文中所使用的kringle 1-3 指具有内皮细胞增殖抑制活性或抗血管生成活性并具有包含同源于kringle 1-3 之序列的氨基酸序列的纤溶酶原的蛋白质衍生物, 例如(但不限于), 鼠kringle 1-3(SEQ ID NO: 29)、人kringle 1-3(SEQ ID NO: 30)、恒河猴kringle 1-3(SEQ ID NO: 31)、猪kringle 1-3(SEQ ID NO: 32)和牛kringle 1-3(SEQ ID NO: 33)。鼠kringle 1-3(SEQ ID NO: 29)相应于SEQ ID NO: 1 的鼠纤溶酶原的氨基酸位置 103 至 352(包含), 并相应于SEQ ID NO: 2 的鼠血管抑制素的氨基酸位置 6 至 255(包含)。人kringle 1-3(SEQ ID NO: 30)、恒河猴kringle 1-3(SEQ ID NO: 31)、猪kringle 1-3(SEQ ID NO: 32)和牛kringle 1-3(SEQ ID NO: 33)分别相应于SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和SEQ ID NO: 6 的血管抑制素的氨基酸位置 6 至 255(包含)。

除非在其所使用的上下文中特别指出, 本文中所使用的kringle 1-2 指具有内皮细胞增殖抑制活性或抗血管生成活性并具有包含同源于kringle 1-2 之序列的氨基酸序列的纤溶酶原的蛋白质衍生物, 例如(但不限于), 鼠kringle 1-2(SEQ ID NO: 34)、人kringle 1-2(SEQ ID NO: 35)、恒河猴kringle 1-2(SEQ ID NO: 36)、猪kringle 1-2(SEQ ID NO: 37)和牛kringle 1-2(SEQ ID NO: 38)。鼠kringle 1-2(SEQ ID NO: 34)相应于SEQ ID NO: 1 的鼠纤溶酶原的氨基酸位置 103 至 262(包含), 并相应于SEQ ID NO: 2 的鼠血管抑制素的氨基酸位置 6 至 165(包含)。人kringle 1-2(SEQ ID NO: 35)、恒河猴kringle 1-2(SEQ ID NO: 36)、猪kringle 1-2(SEQ ID NO: 37)

∴
∴
∴

和牛 kringle 1-2 (SEQ ID NO: 38) 分别相应于 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 的血管抑制素的氨基酸位置 6 至 165 (包含)。

除非在其所使用的上下文中特别指出, 本文中所使用的 kringle 1-4 指具有内皮细胞增殖抑制活性或抗血管生成活性并具有包含同源于 kringle 1-4 之序列的氨基酸序列的纤溶酶原的蛋白质衍生物, 例如 (但不限于), 鼠 kringle 1-4 (SEQ ID NO: 39) 和人 kringle 1-4 (SEQ ID NO: 40)。鼠 kringle 1-4 (SEQ ID NO: 39) 相应于 SEQ ID NO: 1 的鼠纤溶酶原的氨基酸位置 103 至 454 (包含)。

kringle 1、kringle 2、kringle 3、kringle 4、kringle 2-3、kringle 1-3、kringle 1-2 和 kringle 1-4 氨基酸序列分别与以上鉴定的特异性 kringle 序列同源。优选地, 氨基酸序列和公开的序列有至少 60%、更优选地为至少 70%、更优选地至少为 80% 的同源性程度。应该理解: 对上述所列片段可以进行各种氨基酸取代、添加、缺失或其它修饰以改进或修饰血管抑制素片段的内皮细胞增殖抑制活性或抗血管生成活性。术语 功能性同系物 指可以按照本发明使用改变的序列, 该改变包括产生编码相同或功能等等的基因产物的序列的不同残基的缺失、添加或取代。基因产物自身可以在血管抑制素序列内包含氨基酸残基的缺失、添加或取代, 这导致静态变化以产生功能等同的血管抑制素蛋白质。这类氨基酸取代可以在涉及的残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性(既亲水又亲油)相似的基础上进行。例如, 带负电的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸; 带正电的氨基酸包括赖氨酸、组氨酸和精氨酸; 具有相似的亲水性值的具有不带电极性头部基团的氨基酸包括下列氨基酸: 甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸; 具有非极性头部基团的氨基酸包括丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、蛋氨酸、色氨酸。这样的修饰不超出权利要求的范围和精神。例如, 要避免通过形成中间 kringle 二硫桥的同二聚作用, 将在重组人 kringle 2 (SEQ ID NO: 13) 中的半胱氨酸残基 C4 和在重组 kringle 3 (SEQ ID NO: 18) 中的 C42 突变为丝氨酸。而且, 可以理解: 在上述鉴定的血管抑制素片段中可以进行各种氨基酸取代、添加、缺失或其它修饰, 这不显著地改变片段的内皮细胞增殖抑制活性, 因此这不超出权利要求的范围。不显著地改变 是指与本文公开的最密切的

同源血管抑制素片段的内皮细胞增殖抑制活性相比，血管抑制素片段有至少 60%、更优选地至少 70%、更优选地至少 80%的内皮细胞增殖抑制活性。

基因构建和表达

使用基于 PCR 的方法产生编码人纤溶酶原(HPg)的 kringle 1(K1)、kringle 2(K2)、kringle 3(K3)、kringle 4(K4)和 kringle 2-3(K2-3)的 cDNA 片段。如上所述在大肠杆菌中表达重组 kringle 1(rK1)、kringle 2(rK2)、kringle 3(rK3)、kringle 2-4(rK4)和 kringle 2-3(rK2-3) (Menhart, N., Shel, L. C., Kelly, R. F. 和 Castellino, F. J. (1991) 生物化学 30, 1948-1957; Marti, D., Schaller, J., Ochensberger, B. 和 Rickli, E. E. (1994) 欧洲生物化学杂志 219, 455-462; Sijhndel, S., Hu, C.-K., Marti, D., Affolter, M., Schaller, J., Llinas, M. 和 Rickli, E. E. (1996) 生物化学 待出版; Rejante, M. R., Byeon, I.-J. L. 和 Llinas, M. (1991) 生物化学 30, 11081-11092)。要避免通过形成如图 32B 所示的通过形成中间 kringle 二硫桥的同二聚作用，分别在位置 4 和 42，如在 SEQ ID NO. 13 和 18 中观察到的，把 rK2 中的半胱氨酸残基 C169 和 rK3 中的 C297 突变为丝氨酸 (Sijhndel, S., Hu, C.-K., Marti, D., Affolter, M., Schaller, J., Llinas, M. 和 Rickli, E. E. (1996) 生物化学 待出版)。rK3 和 rK2-3 包含用于蛋白质纯化的 N-末端的六个组氨酸尾巴(未显示)。

蛋白酶解消化

如前所述通过用猪弹性蛋白酶(Sigma)消化Lys-HPg(Abbott Labs)制备 K1-3、K1-4 和 K4 片段 (Powell, J. R. 和 Castellino, F. J. (1983) 生物化学 22, 923-927)。简言之，将 1.5 mg 弹性蛋白酶在室温下与 200mg 人纤溶酶原在 50mM pH 8.0 的 Tris-HCl 中振荡温育过夜。通过添加异丙氟磷 (DFP) (Sigma) 至 1mM 的最终浓度终止反应。混合物再在室温下振荡 30 分钟，并对 50mM pH 8.0 的 Tris-HCl 透析过夜。

蛋白质纯化

使用 pSTII 质粒载体在 DH5α 大肠杆菌中表达重组体 K1。使用赖氨酸-

琼脂糖凝胶 4B (Pharmacia) 和色谱 Mono Q (BioRad) 柱通过色谱法把蛋白质纯化至均一。把表达 rK2 和 rK3 的大肠杆菌细菌细胞 (菌株 HB101) 于 37 °C 下在包含 100mg/ml 氨苄青霉素和 25mg/ml 卡那霉素的 2×YT 培养基中培养到 OD₆₀₀ 为约 0.8。添加 IPTG (异丙基-β-D-硫代乳吡喃糖苷) 至 1mM 的最终浓度, 把细胞在 37 °C 下再培养 4.5 小时以诱导重组体蛋白质的产生。通过离心收集细胞, 并在 -80 °C 下保存沉淀。把解冻的细胞溶解产物重新悬浮在抽取的缓冲液中 (在 0.1M 磷酸钠中的 6M 盐酸胍, pH 8.0)。以 15,000×g 离心悬浮液 30 分钟, 并向上清液添加 β-巯基乙醇至 10mM 的最终浓度。然后把上清液装载在用抽取缓冲液预平衡的 Ni²⁺-NTA 琼脂糖柱 (1.5cm×5cm) 上。分别以抽取缓冲液在 pH 8.0 和 pH 6.3 连续洗涤柱。用抽取缓冲液在 pH 5.0 洗脱重组 K2 和 K3。

使用 50mM Tris-HCl (pH 8.0) 平衡的赖氨酸-琼脂糖凝胶 4B 柱 (2.5cm×15cm) 纯化蛋白酶解的裂解的 K1-3、K1-4 和 K4 片段, 直到在 180nm 的吸光度达到 0.005。用包含 200mM ε-氨基己酸的 Tris 缓冲液, pH 8.0 洗脱吸收的 kringle 片段。洗脱的样品对 20mM Tris-HCl pH 5.0 透析过夜, 并施用于用相同缓冲液平衡的 BioRad Mono-S 柱中。用 20mM 磷酸盐/1M KCl pH 5.0 的 0-20%、20-50% 和 50-70% 的逐步梯度洗脱 K4、K1-3 和 K1-4 的片段。如通过 SDS-PAGE 测定用 0.5M KCl 从柱中洗脱大多数 K1-3 和 K1-4 片段。将所有的片段对 20mM Tris-HCl pH 8.0 透析过夜。透析后, 使用以 20mM Tris-HCl 缓冲液 pH 8.0 预平衡的肝素-琼脂糖凝胶柱 (5cm×10cm) (Sigma) 进一步纯化 K1-3 和 K1-4 片段。用 350mM KCl 洗脱 K1-3 片段并从柱流通回收 K1-4。在 SDS-凝胶、银染、用抗人 K4 和 K1-3 多克隆抗体的 Western 免疫印迹分析以及氨基末端测序分析来分析纯化的 kringle 片段。

体外重新折叠

按照标准方案进行 rK2、rK3 和 rK2-3 的重新折叠 (Cleary, S., Mulkerrin, M. G. 和 Kelley, R. R. (1989) 生物化学 28, 1884-1891)。将纯化的蛋白质调整至 pH 8.0 并添加谷胱甘肽 (DTT) 至 5mM 的最终浓度。在过夜培养后, 以 4 倍体积的包含 1.25mM 的还原谷胱甘肽的 50mM Tris-HCl pH

8.0 稀释溶液。在培养 1 小时后，添加氧化的谷胱甘肽至 1.25mM 的最终浓度并在 4℃ 下培养 6 小时。使复性的蛋白质首先对 H₂O 透析两天，再对 50mM 磷酸盐缓冲盐水 pH 8.0 透析 2 天。然后把溶液装载在用相同的磷酸盐缓冲盐水平衡的赖氨酸-Bio-Gel 柱 (2cm×13cm) 柱中。以磷酸盐缓冲盐水洗涤柱，以包含 50mM 6-AHA (6-氨基己酸) 的磷酸盐缓冲液洗脱蛋白质。在 Aquapore Butyl 柱 (2.1×100mm，孔宽 30nm，7mm，应用生物系统) 中进行反相 HPLC，使用乙腈梯度的 Hewlett Packard 液相色谱。

还原和烷基化

按照标准方案进行 kringle 片段的还原和烷基化 (Cao, Y. 和 Pettersson, R. F., (1990) 生长因子 3, 1013)。使在无血清的 300-500ml DME 培养基中的约 20-80mg 纯化的蛋白质与 15ml 0.5M DTT 在室温下培养 15 分钟。在培养后，向反应物添加 30ml 的 0.5M 碘乙酰胺。蛋白质溶液首先在 4℃ 下对 20 体积的 DMEM 透析过夜。然后溶液再在 4℃ 下对 20 体积的 DMEM 透析 4 小时。透析后，在 SDS-凝胶上分析样品并测定其对内皮细胞增殖的抑制活性。

内皮细胞增殖测定

如上所述分离牛毛细血管内皮 (BCE) 细胞 (Follunan, J., Haudenschild, C.C. 和 Zetter, B.R. (1979) 美国科学院学报 76, 5217-5121) 并保持在以 10% 热灭活的小牛血清 (BCS)、抗生素和 3ng/ml 重组人 bFGF 补充的 DMEM 中 (Scios Nova, Mountainview, CA)。把在 6-孔平板上培养的单层 BCE 细胞散布在 0.05% 胰蛋白酶溶液中。用包含 10% BCS 的 DMEM 重新悬浮细胞。把在 0.5ml 中的约 12,500 个细胞添加到凝胶化的 24-孔组织培养板上并于 37℃ 下 (在 10% CO₂ 中) 培养 24 小时。用包含 5% BCS 的 500ml 的新鲜 DMEM 代替培养基，把三次重复的单个和组合 kringle 片段的样品添加至每个孔中。30 分钟培养后，添加 bFGF 至 1ng/ml 的最终浓度。培养 72 小时后，细胞受胰蛋白酶作用、重新悬浮在 Hemata11 中 (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) 并用 Coulter 计数器计数。

∴
∴
∴

人纤溶酶原的 Kringle 片段的纯化和特征确定

通过基于 PCR 的方法扩增编码人纤溶酶原的单个 kringles (K1, K2, K3 和 K4) 与 kringles 2-3 (K2-3) 的 cDNA 片段 (图 28)。把 PCR-扩增的 cDNA 片段克隆进细菌表达载体中。把从大肠杆菌表达的重组蛋白质在体外重新折叠并使用 HPLC-偶联的色谱纯化至 >98% 的均一性 (图 29)。在还原条件下, 重组 K2、K3 和 K4 以 12-13kDa 的分子量迁移 (图 29A, 泳道 2-4), 这相应于每种 kringle 片段的预期分子量。通过 SDS-凝胶电泳鉴别以 17kDa 的更高分子量迁移的重组 K1。如上所述通过用弹性蛋白酶蛋白酶解消化人赖氨酸-纤溶酶原 (Lys-HPg) 获得 K1-4 和 K1-3 片段 (Powell, J. R. 和 Castellino, F. J. (1983) 生物化学 22, 923-927; Brockway, W. J. 和 Castellino, F. J. (1972) Arch. Biochem. Biophys)。将分别具有 43kDa 和 35kDa 的预期分子量的这两个片段 (图 29B, 泳道 1 和 2) 纯化至均一。纯化的片段 N-末端氨基酸序列分析产生相同的序列, -YLSE-, 其后分别为 K1-3 和 K1-4 的 SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 40。K4 的 N-末端序列产生具有约 20% -VQD- 的 -VVQD-, 其后为 SEQ ID NO: 23, 预期其中每种序列得自人血管抑制素的缬氨酸¹⁷⁶和缬氨酸¹⁷⁷开始的预期的序列 (SEQ ID NO: 3)。

单个 Kringles 的抗内皮细胞增殖活性

测定血管抑制素的单个重组 kringle 片段对 bFGF 刺激的牛毛细血管内皮 (BCE) 细胞生长的抑制活性。如图 30A 所示, rK1 以剂量依赖性方式抑制 BCE 细胞增殖。达到 50% 抑制率 (ED₅₀) 所需的 rK1 的浓度约是 320nM (表 4)。相反, rK4 对内皮细胞增殖表现出极少或没有抑制效应。重组 K2 和 rK3 (两种无赖氨酸组合的 kringle 片段) 也产生内皮细胞增殖的剂量依赖性抑制 (图 30B)。然而, rK2 的抑制效应实质上远低于 rK1 和 rK3 (ED₅₀=460) (图 30 和表 4)。即使和高浓度这些 kringle 片段培养后, 也可以检测到无细胞毒素或与编程性内皮细胞相关的明显的形态学 (如细胞的倒圆、分离和断裂)。这些数据表明: K1、K2 和 K3 的片段可以共有血管抑制素的抗内皮生长活性, K4 片段具有的活性较小。

表 4

对毛细血管内皮细胞增殖的抑制活性

∴
∴
∴

片段	ED ₅₀ (nM)
Kringle 1	320
Kringle 2	—
Kringle 3	460
Kringle 4	—
Kringle 2-3	—
Kringle 1-3	70
Kringle 1-4 (血管抑制素)	135

K1-3 和 K1-4 片段的抗内皮细胞增殖活性

为评价组合的 kringle 片段的抗内皮细胞增殖作用, 在 BCE 细胞上测定了纯化的人 K1-4、K1-3 和 rK2-3 的蛋白酶解片段。与以前的研究结果 (O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, J., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H. 和 Folkman, J. (1994) 细胞 79, 315-328) 一致, 如图 31 显示的 BCE 细胞增殖明显地受到了类似血管抑制素的片段 K1-4 (ED₅₀=135nM) (表 4) 的抑制。用 K1-3 片段获得了抗内皮生长活性的增加 (ED₅₀=70nM) (表 4)。内皮细胞增殖的抑制以剂量依赖性方式发生。这些结果表明: 从血管抑制素中除去 K4 加强了抗内皮细胞生长活性。

通过 rK2 和 rK3 的其它抑制

rK2-3 的片段仅显示出类似于仅 rK2 片段的活性的微弱的抑制活性 (图 31)。然而, rK2 和 rK3 两者都能够抑制内皮细胞增殖 (图 30B)。这个研究结果表明: K3 的抑制作用隐藏在 K2-3 的结构中。以前的结构研究显示: 中间 kringle 二硫键存在于人纤溶酶原的相应于 SEQ ID NO: 3 的半胱氨酸⁹¹ 和半胱氨酸²¹⁹ 的 K2 (半胱氨酸¹⁶⁹) 和 K3 (半胱氨酸²⁹⁷) 之间 (Sohndel, S., Hu, C.-K., Marti, D., Affolter, M., Schaller, J., Llinas, M. 和 Rickli, E. E. (1996) 生物化学, 待出版) 参见图 32B。试验了组合的 rK2 和 rK3 的抑制作用。令人感兴趣的是, 当把单个的 rK2 和 rK3 片段和 BCE 细胞添加到一起时可看到另外的抑制作用。参见图 32A。这些结果意味着: 为了

获得 K2-3 的最大抑制作用，优选的是打开 K2 和 K3 之间的中间二硫桥。

血管抑制素的抗内皮细胞增殖活性需要 Kringle 结构的适当折叠

为了研究抗内皮细胞增殖活性是否需要 kringle 结构的折叠，用 DTT 还原天然血管抑制素并在牛毛细血管内皮细胞上测定。还原后，血管抑制素用碘乙酰胺进一步烷基化并通过 SDS 凝胶电泳分析。如图 34A 所示，与具有 33 kDa 的分子量的天然血管抑制素(泳道 1)相比，DTT-处理的蛋白质以约 42kDa 的分子量在更高的位置迁移(泳道 2)，这表明了血管抑制素被完全还原。还原后在很大程度上取消了血管抑制素的抗增殖活性(图 34B)。从这些结果中我们可以得出结论：通过内部 kringle 二硫键的血管抑制素的正确折叠对保持其内皮细胞增殖的抑制的有效作用是优选的。

人纤溶酶原的 kringle 区的氨基酸序列对比表明：K1、K2、K3 和 K4 显示了如图 35 中所观察到的相同的大体结构和显著的序列同源性(56-82% 相同)。在这些结构中，高亲和性赖氨酸结合 kringle(K1)最有效的内皮细胞增殖的抑制片段。令人感兴趣的是，中等亲和性的赖氨酸结合片段(K4)缺乏抑制活性。这些数据表明 kringle 结构的赖氨酸结合位点不直接涉及抑制活性。这些 kringle 结构的氨基酸保守和功能不同提供了研究在进化期间通过 DNA 复制造成的作用突变的理想系统。通过一组结构有关的蛋白质表现出的相对于血管生成调节的类似的不同活性在-C-X-C-化学促活和催乳激素生长激素族中发现(Maione, T. E., Gray, G. S., Petro, A. J., Hunt, A. L. 和 Donner, S. I. (1990) 科学 247, 77-79.; Koch, A. E., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Harlow, L. A., DiPietro, L. A., Finer, V. M., Finer, S. J. 和 Strieter, R. M. (1992) 科学 258, 1798-1801.; Cao, Y., Chen, C., Weatherbee, J. A., Tsang, M., 和 Folkman, J. (1995) J. Exp. Med. 182, 2069-2077.; Strieter, R. M., Polverini, P. J., Arenberg, D. A. 和 Kunkel, S. L. (1995) Shock 4, 155-160.; Jackson, D., Volpert, O. V., Bouck, N. 和 Linter, D. I. H. (1994) 科学 266, 1581-1584)。

进一步的序列分析表明：K4 包含与半胱氨酸 22 和 78 邻近的带两个正电荷的赖氨酸残基(图 35)。¹H 核磁共振(NMR)分析显示：这 4 个赖氨酸和赖氨酸 57 一起形成 K4 的带正电的结构域的核心(Llinas M, 未发表的数

据), 而其它的 kringle 结构缺乏这样的带正电的结构域。这类富含赖氨酸的结构域是否有助于人纤溶酶原的 kringle 4 失去抑制活性仍在研究中。以前报导 K4 可刺激其它细胞类型的增殖并增加胞内钙的释放 (Donate, L.E., Gherardi, E., Srinivasan, N., Sowdhamini, R., Aporicio, S. 和 Blundell, T.L. (1994) 蛋白质科学 3, 2378-2394)。从血管抑制素除去 K4 加强其对内皮细胞抑制活性的事实表明这种结构可以防止 K1-3 的某些抑制作用。

血管抑制素及其有关的 kringle 片段如何特异性地抑制内皮细胞生长的机理的特征仍未确定。抑制是否是由在增殖内皮细胞中特异性表达的受体介导, 或血管抑制素是否通过内皮细胞内部化并随后抑制细胞增殖在目前仍不清楚。另外, 血管抑制素可以与内皮细胞粘着受体(如整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$) 相互作用, 封闭整联蛋白介导的血管生成 (Brooks, P.C., Montgomery, A.M., Rosenfeld, M., Reisfeld R.A., Hu, T. Klier, G. 和 Cheresh, D.A. (1994) 细胞 79, 1157-1164)。令人感兴趣的是, Friedlander 等 (Friedlander, M., Brooks, P.C., Shaffer, R.W., Kincaid, C.M., Varner, J.A. 和 Cheresh, D.A. (1995) 270, 1502) 不久前报导体内角膜的血管生成或绒毛膜尿囊膜模型(受 bFGF 和肿瘤坏死因子诱导)是 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白依赖性的。然而, 通过 VEGF、转化生长因子 α 或佛波醇酯刺激的血管生成对 $\alpha_v\beta_3$ 是依赖性的。对单独整联蛋白特异性的抗体封闭这些途径之一, 两种整联蛋白的循环蛋白质拮抗剂封闭了受每种细胞因子诱导的血管生成 (Friedlander, M., Brooks, P.C., Shaffer, R.W., Kincaid, C.M., Varner, J.A. 和 Cheresh, D.A. (1995) 270, 1502)。因为 bFGF-和 VEGF-诱导的血管生成受血管抑制素抑制, 它可以封闭这些整联蛋白-介导的血管生成的通常途径。

在最近十年中鉴定了越来越多的内源血管生成抑制剂 (Folkman, J. (1995) N. Engl. J. Med. 333, 1757-1763)。在九个已确定特征的内皮细胞抑制剂中, 有几个抑制剂是蛋白酶解的片段。例如, 人催乳激素的 16kDa N-末端片段抑制内皮细胞增殖并封闭体内的血管生成 (Clapp, C., Martial, J.A., Guzman, R.C., Rentierdelrue, F. 和 Weiner, R.I. (1993) Endocrinology 133, 1292)。在最近的论文中, D Angelo 等报道抗血管生

成的 16kDa N-末端片段在毛细血管内皮细胞中抑制由 VEGF 和 bFGF 引起的促细胞分裂剂活化的蛋白质激酶(MAPK)的活化(D Angelo, G., Struman, I., Martial, J. 和 Weiner, R. (1995) 美国科学院学报 92, 6374-6378)。类似于血管抑制素, 催乳激素的完整亲本分子不抑制内皮细胞增殖, 它也不是血管生成抑制剂。血小板因子(PF-4)在高浓度下抑制血管生成(Maione, T. E., Gray, G. S., Petro, A. J., Hunt, A. L. 和 Donner, S. I. (1990) 科学 247, 77; Cao, Y., Chen, C., Weatherbee, J. A., Tsang, M. 和 Folkman, J. (1995) J. Exp. Med. 182, 2069-2077)。然而, N-末端截短的蛋白酶解裂解的 PF-4 片段在其抗增殖活性上相对于完整的 PF-4 分子显示出 30-至 50-倍的增长(Gupta, S. K., Hassel, T. 和 Singh, J. P. (1995) 美国科学院学报 92, 7799-7803)。纤连蛋白、鼠表皮生长因子和糖蛋白 G 的更小蛋白质片段也显示出特异性地抑制内皮细胞生长(Homandberg, G. A., Williams, J. E., Grant, D., Schumacher, B. 和 Eisenstein, R. (1985) Am. J. Pathol. 120, 327-332; Nelson, J., Alien, W. E., Scott, W. N., Bailie, J. R., Walker, B., McFerran, N. V. 和 Wilson, D. J. (1995) 癌症研究 55, 3772-3776; Tolsma, S. S., Volpert, O. V., Good, D. J., Frazer, W. A., Polverini, P. J. 和 Bouck, N. (1993) 细胞生物学杂志 122, 497-511)。大蛋白质的蛋白酶解加工可以改变原来分子的构象结构或使抗血管生成的新的表位暴露出来。这样, 在血管生成的调节中蛋白酶可能起关键作用。到目前为止, 对于这些蛋白酶活性在体内的调节知道的很少。

数据也表明: 在血管抑制素中二硫键介导的 kringle 结构的折叠对保持其对内皮细胞生长的抑制活性的优选的。在纤溶酶原中类似于这些结构的 Kringle 结构也在各种其它的蛋白质中发现。例如, 载脂蛋白(a)具有多达 37 个的纤溶酶原 kringle 4 的重复序列(McLean, J. W., Tomlinson, J. E., Kuang, W.-J., Eaten, D. L., Chen, E. Y., Fless, G. M., Scanu, A. M. 和 Lawn, R. M. (1987) 自然 330, 132-137)。凝血酶原的氨基末端也包含和纤溶酶原的 kringles 同源的两个 kringles (Walt, D. A., Hewett-Emmett, D. 和 Seegers, W. H. (1977) 美国科学院学报, 74, 1969-1973)。曾表明尿激酶具有和纤溶酶原有广泛同源性的 kringle 结构(Gunzler, W. A., J., S. A., J., Otting, F., Kim, S.-M. A., Frankus, E., and Flohe, L. (1982)

Hoppe-Seyler S A. 生理化学 363, 1155-1165)。此外, 表面活性剂蛋白质 B 和肝细胞生长因子(HGF)也具有 kringle 结构(Johansson, J., Curstedt, T. 和 Jiirnvall., H. (1991) 生物化学 30, 6917-6921; Lukker, N.A., Presta, L.G., and Godowski, P.J. (1994) Prot. Engin. 7, 895-903)。

实施例 28

通过血管抑制素片段抑制转移和内皮细胞增殖

下列实施例确定了其它的血管抑制素片段活性的特征。数据表明: 可以从血管抑制素的这样的蛋白质片段获得有效的抗内皮和肿瘤抑制活性。

除非在其所使用的上下文中特别指出, 本文所使用的 kringle 1-4BKLS 指具有内皮细胞抑制活性并具有包含同源于 kringle 1-4BKLS 之序列的氨基酸序列的纤溶酶原的蛋白质衍生物, 例如(但不限于), 鼠 kringle 1-4BKLS (SEQ ID NO: 41) 和人 kringle 1-4BKLS (SEQ ID NO: 42)。鼠 kringle 1-4BKLS (SEQ ID NO: 41) 相应于 SEQ ID NO: 1 的鼠纤溶酶原的氨基酸位置 93 至 470 (包含)。本实施例证明: 血管抑制素片段 可以是纤溶酶原片段并包含比在 SEQ ID NO: 3 (例如) 中提出的血管抑制素更大的氨基酸序列, 并具有治疗内皮细胞增殖的抑制活性或抗血管生成活性。

kringle 1-4BKLS 氨基酸序列和上面鉴定的特异性 kringle 1-4BKLS 序列同源。优选地, 氨基酸序列和公开的序列具有至少 60%、更优选地有至少 70%、更优选地有至少 80% 的同源性程度。应该理解: 对上述所列片段可以进行各种氨基酸的取代、添加、缺失或其它修饰以改进或修饰片段的内皮细胞抑制活性。这样的修饰无意于超出权利要求的范围和精神。而且, 可以理解: 在上述鉴定的 kringle 片段中可以进行各种氨基酸的取代、添加、缺失或其它修饰, 这不显著地改变片段的内皮细胞增殖抑制活性, 因此这无意于超出权利要求的范围。

在巴斯德毕赤酵母中克隆血管抑制素

使用 Vent 聚合酶(New England Biolabs)、分别包含接头 XhoI 和 EcoRI 的引物 #154 (5'-ATCGCTCGAGCGTTATTTGAAAAGAAAGTG-3') (SEQ ID NO: 43) 和 #151 (5'-ATCGGAATTCAAGCAGGACAACAGGCGG-3') (SEQ ID NO: 44) 并使用质粒

pTrcHis/HAs 作为模板通过 PCR 扩增编码血管抑制素的序列。该质粒包含编码人纤溶酶原的氨基酸 93 至 470 的序列 (SEQ ID NO: 42)，使用巴斯德毕赤酵母天然分泌信号 PHO 1 将该序列克隆进 pHIL-S1 表达载体的 Xho I/Eco RI 位点。以相同的方式使用分别包含接头 Sna B1 和 Eco RI 的引物 #156 (5-ATCGTACGTATTATTTGAAAAGAAAGT G-3 (SEQ ID NO: 45) 和 #151 扩增相同的序列，用 α -因子分泌信号将该序列克隆进表达载体 pPIC9 的 Sna B1/Eco RI 位点中。凝胶纯化扩增的产物，以适当的酶消化接头，再次使用基因洗涤剂 (gene-clean) (Bio 101) 纯化。把这些基因片段连接进适当的载体中。选择形成的克隆，获得克隆的和质粒制剂，当转化进巴斯德毕赤酵母宿主菌株 GS115 中时线性化以产生 His⁺ Mut^s 和 His⁺ Mut^r 重组菌株。通过 PCR 确认整合。

用甲醇诱导 His⁺ Mut^s 和 His⁺ Mut^r 重组体并使用考马斯染色的 SDS-PAGE 凝胶和使用抗 kringles 1 至 3 小鼠单克隆抗体的免疫印迹筛选血管抑制素的高度表达的重组体 (Castellino, 酶研究实验室公司, South Bend, IN)。从这些重组体中, 选择 GS 115 转化的巴斯德毕赤酵母克隆 pHIL-S1/HAs18 并通过表型确定其特征为 His⁺ Mut^s。

pHIL-S1/HAs18 的表达

对于 His⁺ Mut^s 克隆, 从 PHIL-S1/HAs18 表达血管抑制素是典型的。在挡板振荡的培养瓶中诱导时, 在 1L 的挡板培养瓶中于 150ml 缓冲 metanol 复合物培养基 (包含 1% 酵母提取物、2% 胨、100mM 磷酸钾 pH 6.0、具有硫酸铵的 1.34% 酵母氮碱、0.00004% 生物素和 0.5% 甲醇) 中培养 1L 的 OD₆₀₀ 细胞。细胞在 30 °C、250rpm 下恒定振荡。通过添加甲醇至最终 0.5% 在 24 小时间隔内分批加入无水甲醇。120 小时后, 以 5,000rpm 旋转离心细胞 10 分钟, 把上清液保存在 70 °C 待用。

通过赖氨酸-琼脂糖凝胶色谱从巴斯德毕赤酵母发酵肉汤纯化血管抑制素

所有步骤在 4 °C 下进行。通过以 14,000×g 离心澄清包含血管抑制素的粗发酵肉汤 (典型地是 200ml), 并通过 Centriprep 30 (amicon) 浓缩 30kDa 的分子量, 切掉 (cutoff) 膜至原来体积的约四分之一。一体积的 50mM 磷酸

盐缓冲液 pH 7.5 添加至浓缩的样品中, 该样品再通过 Centriprep 浓缩至原来样品体积的四分之一。用 50 mM 磷酸钠缓冲液 pH 7.5 以体积: 体积再次稀释样品。把 60g 的赖氨酸-琼脂糖凝胶 4B (Pharmacia) 重新悬浮在 500ml 冰冷的 50mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.5 中并用于填充 48×100mm 柱 (~ 180ml 填充的体积)。柱用 7.5 倍柱体积 (CV) 的 50mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 以 1.5 ml/分钟的流速洗涤过夜。把样品以 1.5ml/分钟的流速泵入柱中, 并以 1.5CV 的 50mM 磷酸钠 (pH 7.5) 以 3ml/分钟的流速洗涤柱。然后用 1.5CV 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 以 3ml/分钟的流速洗涤柱: 然后用 0.2M ϵ -氨基-N-己酸 pH 7.4 以 3ml/分钟的流速洗脱血管抑制素。收集包含明显的吸光度的片段、对去离子水透析 24-48 小时并冻干。100mg 总蛋白质装载量典型地回收到 10mg 血管抑制素。使用 5 倍柱体积的 50mM 磷酸钠/1M NaCl (pH 7.5) 再生柱。

牛毛细血管内皮细胞增殖测定

如上所述获得牛毛细血管内皮细胞。把细胞保持在 75cm² 细胞-培养瓶中的用 10% 加热灭活的小牛血清、100U/ml 青霉素、100mg/ml 链霉素以及 0.25mg/ml 两性霉素 B (BioWhittaker) 补加的包含 3mg/ml 的重组人 bFGF (Scios Nova, Mountainview, CA) 的 DMEM 中。如上所述进行测定。

动物研究

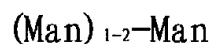
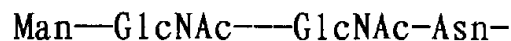
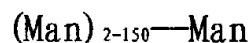
用鼠 Lewis 肺癌低转移性 (LLC-LM) 细胞系 (1×10^6 个细胞/注射) 皮下接种六至八周龄的雄性 C57Bl/6J 小鼠 (Jackson 实验室)。在移植后约 14 天, 当原发性瘤达到 1.5cm³ 时, 用甲氧氟烷麻醉动物并手术切除原发性瘤。以简单的切断缝线缝合切割位点。在手术后该组中的一半动物立即接收装载剂量 (通过皮下路线施用 3mg/kg) 的重组体或源于纤溶酶原的血管抑制素, 其后每日接种 1.5mg/kg, 进行 14 天。对照组小鼠在手术后 14 天内每天接收相等体积的 PBS。在原发性瘤除去后 14 天处死所有小鼠 (在肿瘤移植后 28 天), 切下肺脏并称重, 以体视显微镜计数表面转移。

重组人血管抑制素片段的特征

在巴斯德毕赤酵母 (甲基营养酵母) 中表达编码人血管抑制素的基因片

段(包括人纤溶酶原的 kringle 1 至 4, 总共包含 26 个半胱氨酸)。巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素结合赖氨酸琼脂糖凝胶并可以由 ϵ -氨基己酸特异性地洗脱。这表明: 全功能性的 ϵ -氨基己酸结合的 kringle(s) (这是纤溶酶原的 kringle 1 和 4 的物理性质) (Sottrup-Jensen, L. 等, 化学纤维蛋白溶解和血栓溶解进展, 第 3 卷 (1978) Ravens 出版社, N.Y. 191) 可以通过巴斯德毕赤酵母表达并分泌, 并可以通过不需重新折叠的技术纯化(图 36A 和 B)。通过抗 kringle 1 至 3 构象依赖性的单克隆抗体 (Castellino, 酶研究实验室公司, South Bend, IN) (图 36B) 可识别巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素以及通过用弹性蛋白酶裂解纤溶酶原纯化的血管抑制素。这种抗体不能识别还原形式的纤溶酶原或血管抑制素。

观察到巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素为双重线, 其在变性的非还原 SDS-PAGE 考马斯染色的凝胶上迁移到 49 kDa 和 51.5 kDa。巴斯德毕赤酵母表达的蛋白质以多数高-甘露糖型的 N-连接的葡基化和不明显的 O-连接的葡基化翻译后修饰。为了评价在巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素中葡基化的可能性, 用对高甘露糖结构特异性的内糖苷酶 H 消化重组血管抑制素, 这造成 51.5 kDa 带和 49kDa 带迁移相同(图 37A 和 B)。用预先的神经氨酸苷酶处理 O-聚糖酶消化物以除去唾液酸残基不改变双重线迁移的方式(数据未显示)。这些结果表明巴斯德毕赤酵母以两种形式表达血管抑制素: (1) 具有 N-连接的复合物链, 其可能的结构:



(2) 没有任何葡基化。

体外牛毛细血管内皮细胞的抑制

为了确定重组表达的血管抑制素是否具有抗血管生成活性的潜力, 在 bFGF 存在下培养 BCEs 以确定纯化的重组血管抑制素的添加是否抑制 BCEs 的增殖。纯化的巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素在体外以剂量依赖性方式(图 38C)抑制牛内皮细胞 bFGF-驱动的增殖(图 38B)。在 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的重组血管抑制素时, 抑制率是 80%。50%的抑制率等同于用源于人纤溶酶原的弹性

蛋白酶裂解的血管抑制素获得的抑制率。

体内转移的抑制

使用可移植的鼠 LLC (LM) 细胞系(从该细胞系中首先鉴定出血管抑制素)。当皮下移植进同基因的 C57B1/6J 小鼠中时, 这些肿瘤生长迅速, 在 14 天内产生 $>1.5\text{cm}^3$ 的肿瘤。在切除原发性瘤后, 肺脏中的微转移指数生长, 直到完全覆盖肺脏表面。这些转移到切除原发性瘤后第 14 天时高度血管形成。如果留下原发性瘤, 微转移保持潜伏, 肉眼不能观察到。在原发性瘤切除后对小鼠全身施用重组血管抑制素以试验转移生长的抑制。以 $30\mu\text{g}/\text{小鼠}/\text{天}$ 全身施用巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素抑制了转移的生长, 这可以通过表面转移的擦伤(图 39A)和总肺脏重量(图 39B)定量测定。切除了原发性瘤并接收每日剂量的重组血管抑制素或血管抑制素(从纤溶酶原的弹性蛋白酶裂解获得)的小鼠的肺脏重量和正常小鼠的肺脏重量(190 至 200mg)是可比较的。切除了原发性瘤并在随后使用每日剂量的重组血管抑制素处理的小鼠的肺脏是粉红色的, 具有最小的未血管形成的微转移数量(图 40)。相反, 切除了原发性瘤并使用盐水处理的小鼠的肺脏被血管形成的转移覆盖(图 41)。同时值得注意的重要性是无由巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素在以用于本研究的剂量与用药制度时造成的全身或局部毒性。在所有处理的小鼠中没有发炎或流血的证据。

由巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素蛋白质具有天然蛋白质的两个重要的物理特征: (1) 它可被抗人纤溶酶原的 kringle 1 至 3 产生的构象依赖性的单克隆抗体识别(图 36B), (2) 它结合赖氨酸(图 36A 和 B)。这些性质表明: 重组血管抑制素蛋白质以模仿天然分子的构象表达。巴斯德毕赤酵母表达的血管抑制素蛋白质在体外抑制由 bFGF 刺激的牛毛细血管内皮细胞的增殖(图 38)。当全身施用时, 重组血管抑制素使其它致死的转移性 Lewis 肺癌保持在抑制状态(图 39A 和 B 与图 40)。

初步的数据显示: 在从小鼠中新切除的 Lewis 肺脏肿瘤或 4 次继代培养的 LLC 细胞的体外培养物中无可检测的血管抑制素的转录物。通过肝脏产生的纤溶酶原以 $1.6\pm 0.2\mu\text{M}$ 的稳定的血浆浓度保持在循环中。可能的是: LLC-LM 肿瘤产生裂解纤溶酶原的酶(结合或在循环中)以产生血管抑制

素。另外吸引至肿瘤位点的发炎细胞可以产生这样的酶。

有趣的是：巴斯德毕赤酵母和天然的人纤溶酶原以葡基化和非葡基化的形式产生。在人纤溶酶原的情况下，单个基因的单个转录物可以产生两种形式。人纤溶酶原的有差别的翻译后修饰以及在 TPA 中所观察到的分子机制是未知的。

巴斯德毕赤酵母可高度表达血管抑制素。上清液包含 100mg/L 的蛋白质。因此，临床试验所需的数量应该可以简单地用本领域技术人员熟知的标准技术产生和纯化。这个表达系统的开发和纯化的重组血管抑制素在体外和体内抗转移活性的证明提供了评价这些片段的能力，以抑制肿瘤生长并延长癌症患者和其它患血管生成介导的疾病患者的生命的基础。

实施例 29

集合血管抑制素的产生和施用

本实施例证明了集合血管抑制素的产生与施用抑制内皮细胞增殖和肿瘤生长。通常假定从大肠杆菌产生的重组蛋白质需要冻干并重新折叠(复性、还原并烷基化)以完成体内活性。在该过程中，常失去显著数量的蛋白质。在本实施例中，在纯化后产生集合重组血管抑制素并直接使用(不进一步复性、还原和烷基化)以抑制血管生成和肿瘤生长。因此，本实施例提供了令人惊奇地有效的产生和使用血管抑制素的方法。这种集合血管抑制素和施用方法也提供了血管抑制素的持久释放方式，进而优化了其效率。本文所使用的集合血管抑制素指实质上纯化的但不是人工重新折叠的血管抑制素，这在下面更详细地描述。

血管抑制素的表达

使用大肠杆菌表达系统(有快、多产和廉价的优势)表达小鼠血管抑制素。设计两种寡核苷酸引物(在纤溶酶原 kringles 1-4(纤溶酶原 cDNA 从 ATCC 购得)的 cDNA 序列的侧翼)用于基于 PCR 的构建血管抑制素表达系统的策略(参见,例如, Menhart, N., Shel, L. C., Kelly, R. F., and Castellino, F. J. (1991) 生物化学 30, 1948-1957); Marti, D., Schaller, J., Ochensberger, B., and Rickli, E. E. (1994) 欧洲生物化学杂志 219,

455-462; Sijhndel, S., Hu, C.-K., Marti, D., Affolter, M., Schaller, J., Llinas, M., and Rickli, E.E. (1996) 生物化学 待出版; Rejante, M.R., Byeon, I.-J.L., and Llinas, M. (1991) 生物化学 30, 11081-11092)。把 PCR 产物插入到包含 T7 lac 启动子和寡组氨酸序列的 pET22 载体 (Novogen) 的 Nco I 和 Xho I 位点中。然后把 cDNA 转化进包含 lacUV5 控制下的 T7 RNA 聚合酶基因的染色体拷贝的大肠杆菌 (菌株 BL21 (DE3))。通过添加 IPTG 诱导重组血管抑制素的表达。表达的血管抑制素作为包含体在宿主细胞中积聚并典型地由 40% 以上的总细胞蛋白质组成 (通过考马斯蓝染色估计)。

本发明包括可以在本领域技术人员熟知的各种载体和宿主系统中表达的源于任何适当物种的重组血管抑制素或其片段。

血管抑制素的纯化和集合

通过以 9,000rpm 离心 25 分钟并重复洗涤纯化含有包含体的声处理的宿主细胞的不溶性片段。形成的产物通过考马斯蓝染色估计包含约 80% 血管抑制素。融合蛋白的 N-末端寡组氨酸结构域使得在变性条件下, 通过把包含体溶解于 6M 尿素中, 用 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖柱 (1.5cm×5cm) 上的螯合亲和性色谱方便和经济地纯化重组血管抑制素成为可能。如图 41 泳道 7 所观察到的, 纯化的血管抑制素通过考马斯蓝染色在 SDS-PAGE 上显示出单带, 其具有约 45 kD 至 65 kD, 更优选地是约 55 kD 的迁移率。这一步的色谱可以把蛋白质纯化至实质上均一, 然而, 本发明包括可以使用各种其它本领域技术人员熟知的纯化技术产生这种产物。

然后使在洗脱缓冲液中的蛋白质于 4 °C 下对磷酸缓冲盐水 (PBS) 透析 (15,000 MWCO) 24 小时, 更换 3 次透析液。在透析期间可以观察到白色沉淀。然后从透析袋中取出样品并通过离心除去沉淀。使用涡流把沉淀重新悬浮在 PBS 中以形成在动物模型中使用的良好悬浮液或在 -20 °C 下保存。这种沉淀提供了集合血管抑制素。另外, 例如, 可以使用 20mM tris-HCl pH 7.9/150mM NaCl 作为透析缓冲液。本发明涉及或多或少的透析, 并且其它各种透析缓冲液可以用于产生相应量的集合血管抑制素 (基于本发明的说明书, 在本领域技术人员通常可确定的限制内)。

集合血管抑制素的体外试验

在如实施例 8 概述的测定中使用牛毛细血管内皮 (BCE) 细胞。用如本实施例所述制备的集合重组人血管抑制素刺激细胞以激发免疫反应。结果在图 42 中显示, 该图表明接触集合血管抑制素的内皮细胞的明显抑制。

集合血管抑制素的体内试验

所有的动物工作按照制订的指标在儿童医院的动物设备上进行。

A. 如本实施例中所述制备的集合重组小鼠血管抑制素用鸡 CAM 测定试验。(O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H., and Folkman, 细胞杂志 (1994) 79: 315-328)。以 25 μ g 的剂量, 毛细血管形成的抑制率是 100% (试验的所有五只鸡 CAM 产生 2-3+ 抑制区)。以 100 μ g 的剂量, 毛细血管形成的抑制持续 96 小时。已知其它血管生成抑制剂和源于纤溶酶原的血管抑制素持续约 48 小时。这表明集合血管抑制素提供了持久释放的优势。

B. 把 Lewis 肺癌接种进 C57B16 小鼠的皮下背部中间。把在 0.1ml PBS 中的如上所述制备的 1×10^6 细胞移植进小鼠中, 并以 6 或更少的组笼养。以圆盘测径器测定肿瘤, 使用公式宽度 \times 宽度 \times 长度 $\times 0.52$ 测定肿瘤体积, 在最后一次的上测定处理和对照肿瘤体积的比 (T/C)。

在肿瘤体积是 100-200mm³ 后 (这在 3-5 天内发生), 把小鼠随机化进行两个不同的实验。在第一个实验中, 小鼠接收 2-3mg/kg 在 PBS 中的集合重组小鼠血管抑制素悬浮液 (每 24 小时在远离肿瘤的位点皮下注射 (n=3 只小鼠/组))。对照组接收可比较的盐水注射。在第二个不同的实验中 (n=6 只小鼠/组), 试验小鼠接收 10mg/kg 在 PBS 中的集合重组小鼠血管抑制素悬浮液 (每 24 小时在远离肿瘤的位点皮下注射)。对照组接收可比较的盐水注射。

在任何使用集合重组血管抑制素悬浮液处理的小鼠中都没有观察到毒性或重量损耗。在小鼠中, 注射后观察到集合血管抑制素在皮下聚集, 血管抑制素在几小时的时期内吸收。这表明它逐渐溶解, 也表明集合血管抑制素是持久释放的有效的方式。在两种剂量下, 在处理的小鼠中有明显的

Lewis 肺癌原发性瘤的生长抑制。参见图 43 和 44。通过给出 10mg/kg/天作为 19 天的单一注射获得的 T/C(当盐水对照动物开始死亡和被处死时)是 0.06, 据本发明的发明人所知这是以前从未达到的肿瘤体积减小。

本实施例的体外和体内结果为预期成功地使用所述的在人中的内皮细胞增殖、血管生成和肿瘤生长的抑制的产物与方法提供了合理的基础。不希望受到理论的束缚, 本发明的方法产生的集合重组血管抑制素可以具有与通常复性的弹性蛋白酶产生的血管抑制素或其它纯化的蛋白质不同的构象, 因此具有不同的物理性质。通过使蛋白质溶液对较大体积的缓冲液或水透析, 沉淀纯化的重组血管抑制素以形成集合悬浮液。相信这发生是由于不适当折叠的蛋白质成为不溶性的和集合的。以前没有预料到变性的集合蛋白质在体内有如此显著的效果。所说明的有效的抗肿瘤活性也被认为是由于集合蛋白质从皮下位点缓慢但恒定地溶解和释放。本发明还包括在所述的纯化方法中可以使用天然产生的或重组血管抑制素以及血管抑制素片段以产生集合的天然或重组血管抑制素或血管抑制素的集合片段, 它们可以不需要复性而用于成功地抑制内皮细胞增殖和肿瘤生长。

应该理解: 上面仅涉及本发明的优选的实施方案, 在不背离所附的权利要求的本发明的精神和范围时可以进行许多修饰或改变。本文一并参考了本文所提到的各种参考文献。

序 列 表

(1) 一般信息:

(i) 申请人: Folkman, M. Judah

O Reilly, Micheal

Yihai Cao

Sim, B. Kim Lee

(ii) 发明名称: 血管抑制素片段及其使用方法

(iii) 序列数: 45

(iv) 通讯地址:

(A) 收信人: Jones Askew

(B) 街道: 191 Peachtree 街, 第 37 层

(C) 城市: 亚特兰大

(D) 州: 佐治亚

(E) 国家: 美国

(F) 邮区代码: 30303-1769

(v) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容机

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: 第 1.0 Patent In Release#, 1.30 版#

(vi) 当前申请数据:

(A) 申请号: 美国

(B) 申请日:

(C) 分类号:

(viii) 律师/代理人信息:

(A) 姓名: Warren, William L.

(B) 登记号: 36,714

(C) 参考/档案号: 05213-0126

(ix) 电信信息:

(A) 电话: 404-818-3700

(B) 传真: 404-818-3799

(2) SEQ ID NO: 1 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 812 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 鼠

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: 纤溶酶原

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

```
Met Asp His Lys Glu Val Ile Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Lys Pro
1           5           10           15
Gly Gln Gly Asp Ser Leu Asp Gly Tyr Ile Ser Thr Gln Gly Ala Ser
20           25           30
Leu Phe Ser Leu Thr Lys Lys Gln Leu Ala Ala Gly Gly Val Ser Asp
35           40           45
Cys Leu Ala Lys Cys Glu Gly Glu Thr Asp Phe Val Cys Arg Ser Phe
50           55           60
Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Ser
65           70           75           80
Lys Thr Ser Ser Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Ile Leu Phe Glu Lys
85           90           95
Arg Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Ile Gly Asn Gly Tyr Arg
100          105          110
Gly Thr Met Ser Arg Thr Lys Ser Gly Val Ala Cys Gln Lys Trp Gly
115          120          125
```

⋮

Ala Thr Phe Pro His Val Pro Asn Tyr Ser Pro Ser Thr His Pro Asn
130 135 140

Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Gln
145 150 155 160

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
165 170 175

Asn Ile Pro Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met Tyr Cys Ser Gly Glu Lys
180 185 190

Tyr Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Asp Cys Gln Ala
195 200 205

Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Phe
210 215 220

Pro Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys His Asn Pro Asp Gly Glu
225 230 235 240

Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr
245 250 255

Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Ser Pro Thr
260 265 270

Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser
275 280 285

Val Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro
290 295 300

His Arg His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu
305 310 315 320

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr
325 330 335

Thr Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys
340 345 350

Glu Ser Ser Ala Ser Pro Asp Gln Ser Asp Ser Ser Val Pro Pro Glu
355 360 365

Glu Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Ser Asp Gly Gln Ser
370 375 380

Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
385 390 395 400

Trp Ala Ala Met Phe Pro His Arg His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe
405 410 415

Pro Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp
420 425 430

Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
 435 440 445

Cys Asn Leu Lys Arg Cys Ser Glu Thr Gly Gly Ser Val Val Glu Leu
 450 455 460

Pro Thr Val Ser Gln Glu Pro Ser Gly Pro Ser Asp Ser Glu Thr Asp
 465 470 475 480

Cys Met Tyr Gly Asn Gly Lys Asp Tyr Arg Gly Lys Thr Ala Val Thr
 485 490 495

Ala Ala Gly Thr Pro Cys Gln Gly Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
 500 505 510

His Ser Ile Phe Thr Pro Gln Thr Asn Pro Arg Ala Asp Leu Glu Lys
 515 520 525

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Asn Gly Pro Trp Cys Tyr
 530 535 540

Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Leu Cys
 545 550 555 560

Ala Ser Ala Ser Ser Phe Glu Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys
 565 570 575

Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala Asn Pro His Ser
 580 585 590

Trp Pro Trp Gln Ile Ser Leu Arg Thr Arg Phe Thr Gly Gln His Phe
 595 600 605

Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ala Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His
 610 615 620

Cys Leu Glu Lys Ser Ser Arg Pro Glu Phe Tyr Lys Val Ile Leu Gly
 625 630 635 640

Ala His Glu Glu Tyr Ile Arg Gly Leu Asp Val Gln Glu Ile Ser Val
 645 650 655

Ala Lys Leu Ile Leu Glu Pro Asn Asn Arg Asp Ile Ala Leu Leu Lys
 660 665 670

Leu Ser Arg Pro Ala Thr Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu
 675 680 685

Pro Ser Pro Asn Tyr Met Val Ala Asp Arg Thr Ile Cys Tyr Ile Thr
 690 695 700

Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Arg Leu Lys Glu
 705 710 715 720

Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Val Glu Tyr
 725 730 735

Leu Asn Asn Arg Val Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly Gln Leu Ala
 740 745 750

Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys
755 760 765

Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu
770 775 780

Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg
785 790 795 800

Phe Val Asp Trp Ile Glu Arg Glu Met Arg Asn Asn
805 810

(2) SEQ ID NO: 2 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 339 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 鼠

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: 血管生成素片段

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2:

Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Ile Gly Asn Gly Tyr Arg Gly
1 5 10 15

Thr Met Ser Arg Thr Lys Ser Gly Val Ala Cys Gln Lys Trp Gly Ala
20 25 30

Thr Phe Pro His Val Pro Asn Tyr Ser Pro Ser Thr His Pro Asn Glu
35 40 45

Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Gln Gly
50 55 60

Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asn
65 70 75 80

Ile Pro Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met Tyr Cys Ser Gly Glu Lys Tyr
 85 90 95
 Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Asp Cys Gln Ala Trp
 100 105 110
 Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Phe Pro
 115 120 125
 Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys His Asn Pro Asp Gly Glu Pro
 130 135 140
 Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr Cys
 145 150 155 160
 Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Ser Pro Thr Tyr
 165 170 175
 Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val
 180 185 190
 Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro His
 195 200 205
 Arg His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu
 210 215 220
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr
 225 230 235 240
 Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys Glu
 245 250 255
 Ser Ser Ala Ser Pro Asp Gln Ser Asp Ser Ser Val Pro Pro Glu Glu
 260 265 270
 Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Ser Asp Gly Gln Ser Tyr
 275 280 285
 Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp
 290 295 300
 Ala Ala Met Phe Pro His Arg His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe Pro
 305 310 315 320
 Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Lys
 325 330 335
 Gly Pro Trp

(2) SEQ ID NO: 3 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 339 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: Homo sapiens

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: 血管生成素片段

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

```
Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly
1           5           10           15

Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser
          20           25           30

Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu
          35           40           45

Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly
          50           55           60

Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp
65           70           75           80

Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr
          85           90           95

Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp
          100          105          110

Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro
          115          120          125

Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu
          130          135          140
```


Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys
 145 150 155 160

Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr
 165 170 175

Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val
 180 185 190

Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His
 195 200 205

Thr His Asn Arg Thr Pro Gly Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu
 210 215 220

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr
 225 230 235 240

Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp
 245 250 255

Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro Glu
 260 265 270

Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr
 275 280 285

Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp
 290 295 300

Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro
 305 310 315 320

Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys
 325 330 335

Gly Pro Trp

(2) SEQ ID NO: 4 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 339 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型:
- (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 蛋白质
- (iii) 假设: 否
- (vi) 原始来源:



- (A) 有机体: 恒河猴
(vii) 现在来源:
(B) 克隆: 血管生成素片段
(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4:

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



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

(2) SEQ ID NO: 5 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 339 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型:
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(vi) 原始来源:

- (A) 有机体: 猪

(vii) 现在来源:

- (B) 克隆: 血管生成素片段

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5:

Ile Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly
 1 5 10 15
 Thr Thr Ser Lys Thr Lys Ser Gly Val Ile Cys Gln Lys Trp Ser Val
 20 25 30

Ser Ser Pro His Ile Pro Lys Tyr Ser Pro Glu Lys Phe Pro Leu Ala
 35 40 45

Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Lys Gly
 50 55 60

Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Thr Arg Phe Asp Tyr Cys Asp
 65 70 75 80

Ile Pro Glu Cys Glu Asp Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu His Tyr
 85 90 95

Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Ile Glu Cys Gln Ser Trp
 100 105 110

Gly Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Leu Pro Ser Lys Phe Pro
 115 120 125

Asn Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro
 130 135 140

Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Phe Cys
 145 150 155 160

Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Thr Ser Gly Pro Thr Tyr
 165 170 175

Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val
 180 185 190

Thr Ala Ser Gly His Thr Cys Gln Arg Trp Ser Ala Gln Ser Pro His
 195 200 205

Lys His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu
 210 215 220

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr
 225 230 235 240

Thr Asp Ser Glu Val Arg Trp Asp Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Gly
 245 250 255

Ser Ser Thr Thr Ser Thr Glu His Leu Asp Ala Pro Val Pro Pro Glu
 260 265 270

Gln Thr Pro Val Ala Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Glu Ser Tyr
 275 280 285

Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Arg Lys Cys Gln Ser Trp
 290 295 300

Val Ser Met Thr Pro His Arg His Glu Lys Thr Pro Gly Asn Phe Pro
 305 310 315 320



Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys
325 330 335

Ser Pro Trp

(2) SEQ ID NO: 6 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 339 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 牛

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: 血管生成素片段

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

Ile Tyr Leu Leu Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Gln Thr Tyr Arg Gly
1 5 10 15

Thr Thr Ala Glu Thr Lys Ser Gly Val Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ala
20 25 30

Thr Ser Pro His Val Pro Lys Phe Ser Pro Glu Lys Phe Pro Leu Ala
35 40 45

Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Asn Gly
50 55 60

Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp
65 70 75 80

Ile Pro Glu Cys Glu Asp Lys Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr
85 90 95

Glu Gly Lys Ile Ala Lys Thr Met Ser Gly Arg Asp Cys Gln Ala Trp
100 105 110

Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro
115 120 125



Asn Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro
130 135 140

Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Gln Lys Arg Trp Glu Phe Cys
145 150 155 160

Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Lys Tyr
165 170 175

Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Thr Val Ala Val
180 185 190

Thr Glu Ser Gly His Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro His
195 200 205

Lys His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu
210 215 220

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Lys Ala Pro Trp Cys Tyr Thr
225 230 235 240

Thr Asn Ser Glu Val Arg Trp Glu Tyr Cys Thr Ile Pro Ser Cys Glu
245 250 255

Ser Ser Pro Leu Ser Thr Glu Arg Met Asp Val Pro Val Pro Pro Glu
260 265 270

Gln Thr Pro Val Pro Gln Asp Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr
275 280 285

Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Arg Lys Cys Gln Ser Trp
290 295 300

Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Leu Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro
305 310 315 320

Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys
325 330 335

Ser Pro Trp

(2) SEQ ID NO: 7 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 79 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质



(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 鼠

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K1

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7:

```
Cys Lys Thr Gly Ile Gly Asn Gly Tyr Arg Gly Thr Met Ser Arg Thr
1           5                 10                15
Lys Ser Gly Val Ala Cys Gln Lys Trp Gly Ala Thr Phe Pro His Val
                20             25                 30
Pro Asn Tyr Ser Pro Ser Thr His Pro Asn Glu Gly Leu Glu Glu Asn
            35             40                 45
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
        50             55                 60
Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asn Ile Pro Glu Cys
65             70                 75
```

(2) SEQ ID NO: 8 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 79 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: Homo sapiens

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K1



(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 8:

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr
1 5 10 15
Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg
20 25 30
Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn
35 40 45
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
50 55 60
Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu Glu Cys
65 70 75

(2) SEQ ID NO: 9 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 79 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 恒河猴

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K1

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 9:

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr
1 5 10 15
Arg Thr Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg
20 25 30
Pro Thr Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn
35 40 45



Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Gly Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
50 55 60

Thr Asp Pro Glu Glu Arg Phe Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Glu Cys
65 70 75

(2) SEQ ID NO: 10 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 79 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 猪

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K1

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 10:

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Thr Ser Lys Thr
1 5 10 15

Lys Ser Gly Val Ile Cys Gln Lys Trp Ser Val Ser Ser Pro His Ile
20 25 30

Pro Lys Tyr Ser Pro Glu Lys Phe Pro Leu Ala Gly Leu Glu Glu Asn
35 40 45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
50 55 60

Thr Asp Pro Glu Thr Arg Phe Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Glu Cys
65 70 75

(2) SEQ ID NO: 11 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 79 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:



- (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 蛋白质
- (iii) 假设: 否
- (iv) 反义: 否
- (v) 片段类型: N-末端
- (vi) 原始来源:
 - (A) 有机体: 牛
- (vii) 现在来源:
 - (B) 克隆: K1
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 11:

```
Cys Lys Thr Gly Asn Gly Gln Thr Tyr Arg Gly Thr Thr Ala Glu Thr
1          5          10          15
Lys Ser Gly Val Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ala Thr Ser Pro His Val
          20          25          30
Pro Lys Phe Ser Pro Glu Lys Phe Pro Leu Ala Gly Leu Glu Glu Asn
          35          40          45
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Asn Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
          50          55          60
Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Glu Cys
65          70          75
```

(2) SEQ ID NO: 12 的信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 78 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 蛋白质
- (iii) 假设: 否
- (iv) 反义: 否
- (v) 片段类型: N-末端
- (vi) 原始来源:
 - (A) 有机体: 鼠



(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K2

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 12:

```
Cys Met Tyr Cys Ser Gly Glu Lys Tyr Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr
1          5          10          15
Met Ser Gly Leu Asp Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala
20          25          30
His Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Phe Pro Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn
35          40          45
Tyr Cys His Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr
50          55          60
Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr Cys Asp Ile Pro Arg Cys
65          70          75
```

(2) SEQ ID NO: 13 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 78 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: Homo sapiens

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K2

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 13:

```
Cys Met His Ser Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr
1          5          10          15
Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala
20          25          30
```



His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn
35 40 45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr
50 55 60

Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys
65 70 75

(2) SEQ ID NO: 14 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 78 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 恒河猴

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K2

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 14:

Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala
20 25 30

His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn
35 40 45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr
50 55 60

Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys
65 70 75

(2) SEQ ID NO: 15 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 78 个氨基酸



- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型:
- (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 蛋白质
- (iii) 假设: 否
- (iv) 反义: 否
- (v) 片段类型: N-末端
- (vi) 原始来源:
 - (A) 有机体: 猪
- (vii) 现在来源:
 - (B) 克隆: K2
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 15:

```
Cys Met His Cys Ser Gly Glu His Tyr Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr
1           5           10           15

Met Ser Gly Ile Glu Cys Gln Ser Trp Gly Ser Gln Ser Pro His Ala
          20           25           30

His Gly Tyr Leu Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Met Asn
35           40           45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr
50           55           60

Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Phe Cys Asp Ile Pro Arg Cys
65           70           75
```

- (2) SEQ ID NO: 16 的信息:
 - (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 78 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑结构: 线性
 - (ii) 分子类型: 蛋白质
 - (iii) 假设: 否
 - (iv) 反义: 否
 - (v) 片段类型: N-末端



(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 牛

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K2

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 16:

```
Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Glu Gly Lys Ile Ala Lys Thr
1           5           10           15
Met Ser Gly Arg Asp Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala
20           25           30
His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Met Asn
35           40           45
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr
50           55           60
Asp Pro Gln Lys Arg Trp Glu Phe Cys Asp Ile Pro Arg Cys
65           70           75
```

(2) SEQ ID NO: 17 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 78 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 鼠

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K3

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 17:

```
Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu4Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val Thr
1           5           10           15
```



Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro His Arg
20 25 30

His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu Asn
35 40 45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr
50 55 60

Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys
65 70 75

(2) SEQ ID NO: 18 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 78 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: Homo sapiens

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K3

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 18:

Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val Thr
1 5 10 15

Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr
20 25 30

His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Ser Lys Asn Leu Asp Glu Asn
35 40 45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr Thr
50 55 60

Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
65 70 75

(2) SEQ ID NO: 19 的信息:



(i) 序列特征:

- (A) 长度: 78 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型:
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

- (A) 有机体: 恒河猴

(vii) 现在来源:

- (B) 克隆: K3

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 19:

```
Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asp Val Ala Val Thr
1           5           10           15
Val Ser Gly His Thr Cys His Gly Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr
                20           25           30
His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn
          35           40           45
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Lys Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr
          50           55           60
Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
65           70           75
```

(2) SEQ ID NO: 20 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 78 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型:
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

∴
∴
∴

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 猪

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K3

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 20:

```
Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val Thr
1          5          10          15
Ala Ser Gly His Thr Cys Gln Arg Trp Ser Ala Gln Ser Pro His Lys
          20          25          30
His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu Asn
          35          40          45
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr
          50          55          60
Asp Ser Glu Val Arg Trp Asp Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
65          70          75
```

(2) SEQ ID NO: 21 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 78 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 牛

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K3

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 21:



Cys Leu Lys Gly Thr Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Thr Val Ala Val Thr
1 5 10 15
Glu Ser Gly His Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro His Lys
20 25 30
His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu Asn
35 40 45
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Lys Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr
50 55 60
Asn Ser Glu Val Arg Trp Glu Tyr Cys Thr Ile Pro Ser Cys
65 70 75

(2) SEQ ID NO: 22 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 78 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 鼠

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K4

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 22:

Cys Tyr Gln Ser Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15
Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ala Ala Met Phe Pro His Arg
20 25 30
His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe Pro Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn
35 40 45
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr
50 55 60

∴
∴
∴

Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Arg Cys
65 70 75

(2) SEQ ID NO: 23 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 78 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: Homo sapiens

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K4

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 23:

Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15

Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg
20 25 30

His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn
35 40 45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr
50 55 60

Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Lys Cys
65 70 75

(2) SEQ ID NO: 24 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 168 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

∴
∴
∴

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 鼠

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K2-3

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 24:

```
Cys Met Tyr Cys Ser Gly Glu Lys Tyr Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr
1           5           10           15

Met Ser Gly Leu Asp Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala
20           25           30

His Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Phe Pro Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn
35           40           45

Tyr Cys His Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr
50           55           60

Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr
65           70           75           80

Pro Pro Pro Pro Pro Ser Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly
85           90           95

Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys
100          105          110

Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro His Arg His Asn Arg Thr Pro Glu
115          120          125

Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp
130          135          140

Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp
145          150          155          160

Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys
165
```

(2) SEQ ID NO: 25 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 168 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:



- (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 蛋白质
- (iii) 假设: 否
- (iv) 反义: 否
- (v) 片段类型: N-末端
- (vi) 原始来源:
 - (A) 有机体: Homo sapiens
 - (vii) 现在来源:
 - (B) 克隆: K2-3
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 25 :

```

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

```

(2) SEQ ID NO: 26 的信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 168 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸

∴
∴
∴

- (C) 链型:
- (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 蛋白质
- (iii) 假设: 否
- (iv) 反义: 否
- (v) 片段类型: N-末端
- (vi) 原始来源:
 - (A) 有机体: 恒河猴
- (vii) 现在来源:
 - (B) 克隆: K2-3

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 26:

```
Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr
1          5          10          15

Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala
          20          25          30

His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn
          35          40          45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr
50          55          60

Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr
65          70          75          80

Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly
          85          90          95

Glu Asn Tyr Arg Gly Asp Val Ala Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys
          100          105          110

His Gly Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu
          115          120          125

Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp
          130          135          140

Gly Glu Lys Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp
145          150          155          160

Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
          165
```

(2) SEQ ID NO: 27 的信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 168 个氨基酸

∴
∴
∴

- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型:
- (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 蛋白质
- (iii) 假设: 否
- (iv) 反义: 否
- (v) 片段类型: N-末端
- (vi) 原始来源:

- (A) 有机体: 猪
- (vii) 现在来源:
 - (B) 克隆: K2-3

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 27:

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

(2) SEQ ID NO: 28 的信息:

- (i) 序列特征:

∴
∴
∴

- (A) 长度: 168 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型:
- (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 蛋白质
- (iii) 假设: 否
- (iv) 反义: 否
- (v) 片段类型: N-末端
- (vi) 原始来源:
 - (A) 有机体: 牛
- (vii) 现在来源:
 - (B) 克隆: K2-3

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 28:

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

(2) SEQ ID NO: 29 的信息:

∴
∴
∴

(i) 序列特征:

(A) 长度: 168 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 鼠

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K1-3

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 29:

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

Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr Cys Asp Ile Pro Arg Cys
 145 150 155 160
 Thr Thr Pro Pro Pro Pro Pro Ser Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly
 165 170 175
 Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val Thr Val Ser Gly Lys
 180 185 190
 Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro His Arg His Asn Arg Thr
 195 200 205
 Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn
 210 215 220
 Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Ser Gln Leu
 225 230 235 240
 Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys
 245 250

(2) SEQ ID NO: 30 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 250 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型:
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

- (A) 有机体: Homo sapiens

(vii) 现在来源:

- (B) 克隆: K1-3

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 30:

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr
 1 5 10 15
 Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg
 20 25 30
 Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn
 35 40 45
 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
 50 55 60
 Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu Glu Cys Glu
 65 70 75 80
 Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser
 85 90 95
 Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro
 100 105 110
 His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys
 115 120 125
 Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro Trp Cys Phe
 130 135 140
 Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys
 145 150 155 160
 Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly
 165 170 175
 Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val Thr Val Ser Gly His
 180 185 190
 Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr His Asn Arg Thr
 195 200 205
 Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr Cys Arg Asn
 210 215 220
 Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr Thr Asn Ser Gln Val
 225 230 235 240
 Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
 245 250



- (2) SEQ ID NO: 31 的信息:
- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 250 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑结构: 线性
 - (ii) 分子类型: 蛋白质
 - (iii) 假设: 否
 - (iv) 反义: 否
 - (v) 片段类型: N-末端
 - (vi) 原始来源:
 - (A) 有机体: 恒河猴
 - (vii) 现在来源:
 - (B) 克隆: K1-3
 - (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 31 :

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr
 1 5 10 15
 Arg Thr Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg
 20 25 30
 Pro Thr Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn
 35 40 45
 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Gly Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
 50 55 60
 Thr Asp Pro Glu Glu Arg Phe Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Glu Cys Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser
 85 90 95
 Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro
 100 105 110
 His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys
 115 120 125
 Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe
 130 135 140
 Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys
 145 150 155 160
 Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly
 165 170 175
 Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asp Val Ala Val Thr Val Ser Gly His
 180 185 190
 Thr Cys His Gly Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr His Asn Arg Thr
 195 200 205
 Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr Cys Arg Asn
 210 215 220
 Pro Asp Gly Glu Lys Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Ser Gln Val
 225 230 235 240
 Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
 245 250

- ⋮
- (2) SEQ ID NO: 32 的信息:
- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 250 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑结构: 线性
 - (ii) 分子类型: 蛋白质
 - (iii) 假设: 否
 - (iv) 反义: 否
 - (v) 片段类型: N-末端
 - (vi) 原始来源:
 - (A) 有机体: 猪
 - (vii) 现在来源:
 - (B) 克隆: K1-3
 - (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 32 :

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Thr Ser Lys Thr
 1 5 10 15
 Lys Ser Gly Val Ile Cys Gln Lys Trp Ser Val Ser Ser Pro His Ile
 20 25 30
 Pro Lys Tyr Ser Pro Glu Lys Phe Pro Leu Ala Gly Leu Glu Glu Asn
 35 40 45
 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
 50 55 60
 Thr Asp Pro Glu Thr Arg Phe Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Glu Cys Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu His Tyr Glu Gly Lys Ile Ser
 85 90 95
 Lys Thr Met Ser Gly Ile Glu Cys Gln Ser Trp Gly Ser Gln Ser Pro
 100 105 110
 His Ala His Gly Tyr Leu Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys
 115 120 125
 Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe
 130 135 140
 Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Phe Cys Asp Ile Pro Arg Cys
 145 150 155 160
 Thr Thr Pro Pro Pro Thr Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly
 165 170 175
 Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val Thr Ala Ser Gly His
 180 185 190
 Thr Cys Gln Arg Trp Ser Ala Gln Ser Pro His Lys His Asn Arg Thr
 195 200 205
 Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn
 210 215 220
 Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Ser Glu Val
 225 230 235 240
 Arg Trp Asp Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
 245 250

⋮

(2) SEQ ID NO: 33 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 250 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 牛

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K1-3

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 33:

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Gln Thr Tyr Arg Gly Thr Thr Ala Glu Thr
 1 5 10 15
 Lys Ser Gly Val Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ala Thr Ser Pro His Val
 20 25 30
 Pro Lys Phe Ser Pro Glu Lys Phe Pro Leu Ala Gly Leu Glu Glu Asn
 35 40 45
 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Asn Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
 50 55 60
 Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Glu Cys Glu
 65 70 75 80
 Asp Lys Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Glu Gly Lys Ile Ala
 85 90 95
 Lys Thr Met Ser Gly Arg Asp Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro
 100 105 110
 His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys
 115 120 125
 Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe
 130 135 140
 Thr Thr Asp Pro Gln Lys Arg Trp Glu Phe Cys Asp Ile Pro Arg Cys
 145 150 155 160
 Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Lys Tyr Gln Cys Leu Lys Gly
 165 170 175
 Thr Gly Lys Asn Tyr Gly Gly Thr Val Ala Val Thr Glu Ser Gly His
 180 185 190
 Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro His Lys His Asn Arg Thr
 195 200 205
 Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn
 210 215 220
 Pro Asp Gly Glu Lys Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Ser Glu Val
 225 230 235 240
 Arg Trp Glu Tyr Cys Thr Ile Pro Ser Cys
 245 250



(2) SEQ ID NO: 34 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 160 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 鼠

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K1-2

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 34:

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

Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr Cys Asp Ile Pro Arg Cys
 145 150 155 160

(2) SEQ ID NO: 35 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 160 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: Homo sapiens

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K1-2

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 35:

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr
 1 5 10 15
 Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg
 20 25 30
 Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn
 35 40 45
 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
 50 55 60
 Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu Glu Cys Glu
 65 70 75 80
 Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser
 85 90 95
 Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro
 100 105 110
 His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys
 115 120 125

Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro Trp Cys Phe
 130 135 140

Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys
 145 150 155 160

(2) SEQ ID NO: 36 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 160 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 恒河猴

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K1-2

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 36:

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr
 1 5 10 15

Arg Thr Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg
 20 25 30

Pro Thr Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn
 35 40 45


Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Gly Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
 50 55 60

Thr Asp Pro Glu Glu Arg Phe Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Glu Cys Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser
 85 90 95

Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro
 100 105 110

His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys
 115 120 125



Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe
 130 135 140
 Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys
 145 150 155 160

(2) SEQ ID NO: 37 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 160 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 猪

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K1-2

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 37:

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Thr Ser Lys Thr
 1 5 10 15
 Lys Ser Gly Val Ile Cys Gln Lys Trp Ser Val Ser Ser Pro His Ile
 20 25 30
 Pro Lys Tyr Ser Pro Glu Lys Phe Pro Leu Ala Gly Leu Glu Glu Asn
 35 40 45
 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
 50 55 60
 Thr Asp Pro Glu Thr Arg Phe Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Glu Cys Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu His Tyr Glu Gly Lys Ile Ser
 85 90 95
 Lys Thr Met Ser Gly Ile Glu Cys Gln Ser Trp Gly Ser Gln Ser Pro
 100 105 110
 His Ala His Gly Tyr Leu Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys
 115 120 125

```

Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe
 130                               135                               140

Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Phe Cys Asp Ile Pro Arg Cys
145                               150                               155                               160

```

(2) SEQ ID NO: 38 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 160 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型:
- (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 蛋白质
- (iii) 假设: 否
- (iv) 反义: 否
- (v) 片段类型: N-末端
- (vi) 原始来源:
 - (A) 有机体: 牛
- (vii) 现在来源:
 - (B) 克隆: K1-2

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 38:

```

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Gln Thr Tyr Arg Gly Thr Thr Ala Glu Thr
 1                               5                               10                               15

Lys Ser Gly Val Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ala Thr Ser Pro His Val
 20                               25                               30

Pro Lys Phe Ser Pro Glu Lys Phe Pro Leu Ala Gly Leu Glu Glu Asn
 35                               40                               45

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Asn Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
 50                               55                               60

Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Glu Cys Glu
 65                               70                               75                               80

Asp Lys Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Glu Gly Lys Ile Ala
 85                               90                               95

Lys Thr Met Ser Gly Arg Asp Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro
 100                              105                              110

```

```

His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys
      115                               120                               125
Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe
      130                               135                               140
Thr Thr Asp Pro Gln Lys Arg Trp Glu Phe Cys Asp Ile Pro Arg Cys
      145                               150                               155                               160

```

(2) SEQ ID NO: 39 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 352 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 鼠

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K1-4

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 39:

```

Cys Lys Thr Gly Ile Gly Asn Gly Tyr Arg Gly Thr Met Ser Arg Thr
1                               5                               10                               15
Lys Ser Gly Val Ala Cys Gln Lys Trp Gly Ala Thr Phe Pro His Val
      20                               25                               30
Pro Asn Tyr Ser Pro Ser Thr His Pro Asn Glu Gly Leu Glu Glu Asn
      35                               40                               45
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
      50                               55                               60

```

Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asn Ile Pro Glu Cys Glu
 65 70 75 80
 Glu Glu Cys Met Tyr Cys Ser Gly Glu Lys Tyr Glu Gly Lys Ile Ser
 85 90 95
 Lys Thr Met Ser Gly Leu Asp Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro
 100 105 110
 His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Phe Pro Ser Lys Asn Leu Lys
 115 120 125
 Met Asn Tyr Cys His Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe
 130 135 140
 Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr Cys Asp Ile Pro Arg Cys
 145 150 155 160
 Thr Thr Pro Pro Pro Pro Pro Ser Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly
 165 170 175
 Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val Thr Val Ser Gly Lys
 180 185 190
 Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro His Arg His Asn Arg Thr
 195 200 205
 Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn
 210 215 220
 Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Ser Gln Leu
 225 230 235 240
 Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys Glu Ser Ser Ala Ser Pro
 245 250 255
 Asp Gln Ser Asp Ser Ser Val Pro Pro Glu Glu Gln Thr Pro Val Val
 260 265 270
 Gln Glu Cys Tyr Gln Ser Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser
 275 280 285
 Thr Thr Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ala Ala Met Phe Pro
 290 295 300
 His Arg His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe Pro Asp Ala Gly Leu Glu
 305 310 315 320
 Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Lys Gly Pro Trp Cys Tyr
 325 330 335
 Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Arg Cys
 340 345 350

(2) SEQ ID NO: 40 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 352 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: Homo sapiens

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K1-4

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 40:

```
Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr
1           5           10           15
Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg
20           25           30
Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn
35           40           45
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
50           55           60
Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu Glu Cys Glu
65           70           75           80
Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser
85           90           95
```

Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro
 100 105 110
 His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys
 115 120 125
 Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro Trp Cys Phe
 130 135 140
 Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys
 145 150 155 160
 Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly
 165 170 175
 Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val Thr Val Ser Gly His
 180 185 190
 Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr His Asn Arg Thr
 195 200 205
 Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr Cys Arg Asn
 210 215 220
 Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr Thr Asn Ser Gln Val
 225 230 235 240
 Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp Ser Ser Pro Val Ser
 245 250 255
 Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro Glu Leu Thr Pro Val Val
 260 265 270
 Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser
 275 280 285
 Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr Pro
 290 295 300
 His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Thr
 305 310 315 320
 Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro Trp Cys Phe
 325 330 335
 Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Lys Cys
 340 345 350

(2) SEQ ID NO: 41 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 378 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: 鼠

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K1-4BKLS

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 41:

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

Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Thr Lys
 145 150 155 160
 Arg Trp Glu Tyr Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro
 165 170 175
 Pro Ser Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg
 180 185 190
 Gly Thr Val Ser Val Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser
 195 200 205
 Glu Gln Thr Pro His Arg His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys
 210 215 220
 Lys Asn Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala
 225 230 235 240
 Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu
 245 250 255
 Ile Pro Ser Cys Glu Ser Ser Ala Ser Pro Asp Gln Ser Asp Ser Ser
 260 265 270
 Val Pro Pro Glu Glu Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Ser
 275 280 285
 Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Lys
 290 295 300
 Lys Cys Gln Ser Trp Ala Ala Met Phe Pro His Arg His Ser Lys Thr
 305 310 315 320
 Pro Glu Asn Phe Pro Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg Asn
 325 330 335
 Pro Asp Gly Asp Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Ser Val
 340 345 350
 Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Arg Cys Ser Glu Thr Gly Gly Ser
 355 360 365
 Val Val Glu Leu Pro Thr Val Ser Gln Glu
 370 375

(2) SEQ ID NO: 42 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 378 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型:
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: Homo sapiens

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: K1-4BKLS

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 42:

Leu Phe Glu Lys Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly
1 5 10 15
Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys
20 25 30
Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala
35 40 45
Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp
50 55 60
Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg
65 70 75 80
Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys
85 90 95
Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu
100 105 110
Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile
115 120 125
Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn
130 135 140
Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys
145 150 155 160
Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser
165 170 175
Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg
180 185 190
Gly Asn Val Ala Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser
195 200 205
Ala Gln Thr Pro His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys
210 215 220
Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala
225 230 235 240

Pro Trp Cys His Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys
245 250 255

Ile Pro Ser Cys Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro
260 265 270

Thr Ala Pro Pro Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly
275 280 285

Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys
290 295 300

Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr
305 310 315 320

Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn
325 330 335

Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val
340 345 350

Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser
355 360 365

Val Val Ala Pro Pro Pro Val Val Leu Leu
370 375

(2) SEQ ID NO: 43 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 30 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

- (A) 有机体: Homo sapiens

(vii) 现在来源:

- (B) 克隆: 引物 154

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 43:

ATCGCTCGAG CGTTATTTGA AAAGAAAGTG

(2) SEQ ID NO: 44 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 28 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: Homo sapiens

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: 引物 151

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 44:

ATCGGAATTC AAGCAGGACA ACAGGCGG

28

(2) SEQ ID NO: 45 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 28 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(iii) 假设: 否

(iv) 反义: 否

(v) 片段类型: N-末端

(vi) 原始来源:

(A) 有机体: Homo sapiens

(vii) 现在来源:

(B) 克隆: 引物 156

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 45:

ATCGTACGTA TTATTTGAAA AGAAAGTG

28

说明书附图

图 1

小鼠纤溶酶原序列:

Met Asp His Lys Glu Val Ile Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Lys Pro
Gly Gln Gly Asp Ser Leu Asp Gly Tyr Ile Ser Thr Gln Gly Ala Ser
Leu Phe Ser Leu Thr Lys Lys Gln Leu Ala Ala Gly Gly Val Ser Asp
Cys Leu Ala Lys Cys Glu Gly Glu Thr Asp Phe Val Cys Arg Ser Phe
Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Ser
Lys Thr Ser Ser Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Ile Leu Phe Glu Lys
Gly Thr Met Ser Arg Thr Lys Ser Gly Val Ala Cys Gln Lys Trp Gly
Ala Thr Phe Pro His Val Pro Asn Tyr Ser Pro Ser Thr His Pro Asn
Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Gln
Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Asp Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
Asn Ile Pro Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met Tyr Cys Ser Gly Glu Lys
Tyr Glu Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Asp Cys Gln Ala
Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Phe
Pro Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys His Asn Pro Asp Gly Glu
Pro Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr
Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Ser Pro Thr
Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser
Val Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro
His Arg His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu
Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr
Thr Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys
Glu Ser Ser Ala Ser Pro Asp Gln Ser Asp Ser Ser Val Pro Pro Glu
Glu Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Ser Asp Gly Gln Ser
Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
Trp Ala Ala Met Phe Pro His Arg His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe
Pro Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp
Lys Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
Cys Asn Leu Lys Arg Cys Ser Glu Thr Gly Gly Ser Val Val Glu Leu
Pro Thr Val Ser Gln Glu Pro Ser Gly Pro Ser Asp Ser Glu Thr Asp
Cys Met Tyr Gly Asn Gly Lys Asp Tyr Arg Gly Lys Thr Ala Val Thr
Ala Ala Gly Thr Pro Cys Gln Gly Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
His Ser Ile Phe Thr Pro Gln Thr Asn Pro Arg Ala Asp Leu Glu Lys
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Asn Gly Pro Trp Cys Tyr
Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Leu Cys
Ala Ser Ala Ser Ser Phe Glu Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys
Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala Asn Pro His Ser
Trp Pro Trp Gln Ile Ser Leu Arg Thr Arg Phe Thr Gly Gln His Phe
Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ala Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His
Cys Leu Glu Lys Ser Ser Arg Pro Glu Phe Tyr Lys Val Ile Leu Gly
Ala His Glu Glu Tyr Ile Arg Gly Leu Asp Val Gln Glu Ile Ser Val
Ala Lys Leu Ile Leu Glu Pro Asn Asn Arg Asp Ile Ala Leu Leu Lys
Leu Ser Arg Pro Ala Thr Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu
Pro Ser Pro Asn Tyr Met Val Ala Asp Arg Thr Ile Cys Tyr Ile Thr



Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Arg Leu Lys Glu
Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Val Glu Tyr
Leu Asn Asn Arg Val Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly Gln Leu Ala
Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys
Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu
Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg
Phe Val Asp Trp Ile Glu Arg Glu Met Arg Asn Asn

图 2

小鼠
人
恒河猴
猪
牛

val	tyr	leu	ser	glu	cys	lys	thr	gly	ile	gly	asn	gly	tyr	arg	gly
val	tyr	leu	ser	glu	cys	lys	thr	gly	asn	gly	lys	asn	tyr	arg	gly
val	tyr	leu	ser	glu	cys	lys	thr	gly	asn	gly	lys	asn	tyr	arg	gly
ile	tyr	leu	ser	glu	cys	lys	thr	gly	asn	gly	lys	asn	tyr	arg	gly
ile	tyr	leu	leu	glu	cys	lys	thr	gly	asn	gly	gln	thr	tyr	arg	gly
thr	met	ser	arg	thr	lys	ser	gly	val	ala	cys	gln	lys	trp	gly	ala
thr	met	ser	lys	thr	lys	asn	gly	ile	thr	cys	gln	lys	trp	ser	ser
thr	met	ser	lys	thr	arg	thr	gly	ile	thr	cys	gln	lys	trp	ser	ser
thr	thr	ser	lys	thr	lys	ser	gly	val	ile	cys	gln	lys	trp	ser	val
thr	thr	ala	glu	thr	lys	ser	gly	val	thr	cys	gln	lys	trp	ser	ala
thr	phe	pro	his	val	pro	asn	tyr	ser	pro	ser	thr	his	pro	asn	glu
thr	ser	pro	his	arg	pro	arg	phe	ser	pro	ala	thr	his	pro	ser	glu
thr	ser	pro	his	arg	pro	thr	phe	ser	pro	ala	thr	his	pro	ser	glu
ser	ser	pro	his	ile	pro	lys	tyr	ser	pro	glu	lys	phe	pro	leu	ala
thr	ser	pro	his	val	pro	lys	phe	ser	pro	glu	lys	phe	pro	leu	ala
gly	leu	glu	glu	asn	tyr	cys	arg	asn	pro	asp	asn	asp	glu	gln	gly
gly	leu	glu	glu	asn	tyr	cys	arg	asn	pro	asp	asn	asp	pro	gln	gly
gly	leu	glu	glu	asn	tyr	cys	arg	asn	pro	asp	asn	asp	gly	gln	gly
gly	leu	glu	glu	asn	tyr	cys	arg	asn	pro	asp	asn	asp	glu	lys	gly
gly	leu	glu	glu	asn	tyr	cys	arg	asn	pro	asp	asn	asp	glu	asn	gly
pro	trp	cys	tyr	thr	thr	asp	pro	asp	lys	arg	tyr	asp	tyr	cys	asn
pro	trp	cys	tyr	thr	thr	asp	pro	glu	lys	arg	tyr	asp	tyr	cys	asp
pro	trp	cys	tyr	thr	thr	asp	pro	glu	glu	arg	phe	asp	tyr	cys	asp
pro	trp	cys	tyr	thr	thr	asp	pro	glu	thr	arg	phe	asp	tyr	cys	asp
pro	trp	cys	tyr	thr	thr	asp	pro	asp	lys	arg	tyr	asp	tyr	cys	asp
ile	pro	glu	cys	glu	glu	glu	cys	met	tyr	cys	ser	gly	glu	lys	tyr
ile	leu	glu	cys	glu	glu	glu	cys	met	his	cys	ser	gly	glu	asn	tyr
ile	pro	glu	cys	glu	asp	glu	cys	met	his	cys	ser	gly	glu	asn	tyr
ile	pro	glu	cys	glu	asp	glu	cys	met	his	cys	ser	gly	glu	his	tyr
ile	pro	glu	cys	glu	asp	lys	cys	met	his	cys	ser	gly	glu	asn	tyr
glu	gly	lys	ile	ser	lys	thr	met	ser	gly	leu	asp	cys	gln	ala	trp
asp	gly	lys	ile	ser	lys	thr	met	ser	gly	leu	glu	cys	gln	ala	trp
asp	gly	lys	ile	ser	lys	thr	met	ser	gly	leu	glu	cys	gln	ala	trp
glu	gly	lys	ile	ser	lys	thr	met	ser	gly	ile	glu	cys	gln	ser	trp
glu	gly	lys	ile	ala	lys	thr	met	ser	gly	arg	asp	cys	gln	ala	trp



asp ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ala lys phe pro
asp ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ser lys phe pro
asp ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ser lys phe pro
gly ser gln ser pro his ala his gly tyr leu pro ser lys phe pro
asp ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ser lys phe pro

ser lys asn leu lys met asn tyr cys his asn pro asp gly glu pro
asn lys asn leu lys lys asn tyr cys arg asn pro asp arg glu leu
asn lys asn leu lys lys asn tyr cys arg asn pro asp gly glu pro
asn lys asn leu lys met asn tyr cys arg asn pro asp gly glu pro
asn lys asn leu lys met asn tyr cys arg asn pro asp gly glu pro

arg pro trp cys phe thr thr asp pro thr lys arg trp glu tyr cys
arg pro trp cys phe thr thr asp pro asn lys arg trp glu leu cys
arg pro trp cys phe thr thr asp pro asn lys arg trp glu leu cys
arg pro trp cys phe thr thr asp pro asn lys arg trp glu phe cys
arg pro trp cys phe thr thr asp pro gln lys arg trp glu phe cys

asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro pro pro ser pro thr tyr
asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro ser ser gly pro thr tyr
asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro ser ser gly pro thr tyr
asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro thr ser gly pro thr tyr
asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro ser ser gly pro lys tyr

gln cys leu lys gly arg gly glu asn tyr arg gly thr val ser val
gln cys leu lys gly thr gly glu asn tyr arg gly asn val ala val
gln cys leu lys gly thr gly glu asn tyr arg gly asp val ala val
gln cys leu lys gly arg gly glu asn tyr arg gly thr val ser val
gln cys leu lys gly thr gly lys asn tyr gly gly thr val ala val

thr val ser gly lys thr cys gln arg trp ser glu gln thr pro his
thr val ser gly his thr cys gln his trp ser ala gln thr pro his
thr val ser gly his thr cys his gly trp ser ala gln thr pro his
thr ala ser gly his thr cys gln arg trp ser ala gln ser pro his
thr glu ser gly his thr cys gln arg trp ser glu gln thr pro his

arg his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu glu glu
thr his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu asp glu
thr his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu asp glu
lys his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu glu glu
lys his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu glu glu

asn tyr cys arg asn pro asp gly glu thr ala pro trp cys tyr thr
asn tyr cys arg asn pro asp gly lys arg ala pro trp cys his thr
asn tyr cys arg asn pro asp gly glu lys ala pro trp cys tyr thr
asn tyr cys arg asn pro asp gly glu thr ala pro trp cys tyr thr
asn tyr cys arg asn pro asp gly glu lys ala pro trp cys tyr thr



thr asp ser gln leu arg trp glu tyr cys glu ile pro ser cys glu
thr asn ser gln val arg trp glu tyr cys lys ile pro ser cys asp
thr asn ser gln val arg trp glu tyr cys lys ile pro ser cys glu
thr asp ser glu val arg trp asp tyr cys lys ile pro ser cys gly
thr asn ser glu val arg trp glu tyr cys thr ile pro ser cys glu

ser ser ala ser pro asp gln ser asp ser ser val pro pro glu glu
ser ser pro val ser thr glu gln leu ala pro thr ala pro pro glu
ser ser pro val ser thr glu pro leu asp pro thr ala pro pro glu
ser ser thr thr ser thr glu his leu asp ala pro val pro pro glu
ser ser pro leu ser thr glu arg met asp val pro val pro pro glu

gln thr pro val val gln glu cys tyr gln ser asp gly gln ser tyr
leu thr pro val val gln asp cys tyr his gly asp gly gln ser tyr
leu thr pro val val gln glu cys tyr his gly asp gly gln ser tyr
gln thr pro val ala gln asp cys tyr arg gly asn gly glu ser tyr
gln thr pro val pro gln asp cys tyr his gly asn gly gln ser tyr

arg gly thr ser ser thr thr ile thr gly lys lys cys gln ser trp
arg gly thr ser ser thr thr thr thr gly lys lys cys gln ser trp
arg gly thr ser ser thr thr thr thr gly lys lys cys gln ser trp
arg gly thr ser ser thr thr thr thr gly arg lys cys gln ser trp
arg gly thr ser ser thr thr thr thr gly arg lys cys gln ser trp

ala ala met phe pro his arg his ser lys thr pro glu asn phe pro
ser ser met thr pro his arg his gln lys thr pro glu asn tyr pro
ser ser met thr pro his trp his glu lys thr pro glu asn phe pro
val ser met thr pro his arg his glu lys thr pro gly asn phe pro
ser ser met thr pro his arg his leu lys thr pro glu asn tyr pro

asp ala gly leu glu met asn tyr cys arg asn pro asp gly asp lys
asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys
asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys
asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys
asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys

gly pro trp
gly pro trp
gly pro trp
ser pro trp
ser pro trp

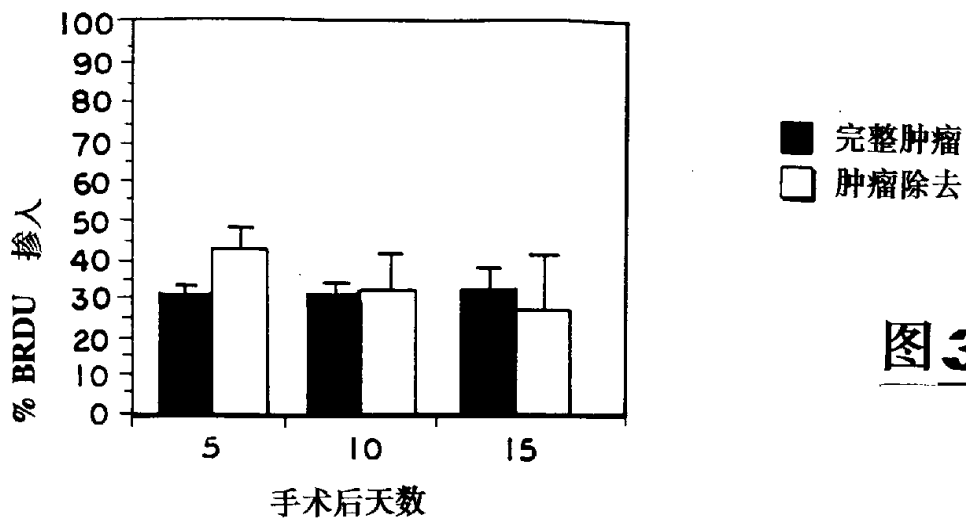


图 3A

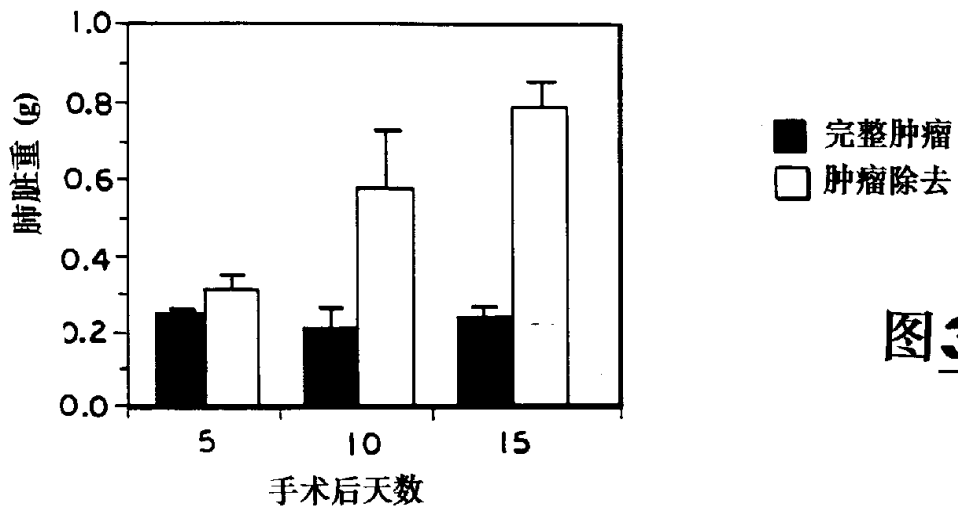


图 3B

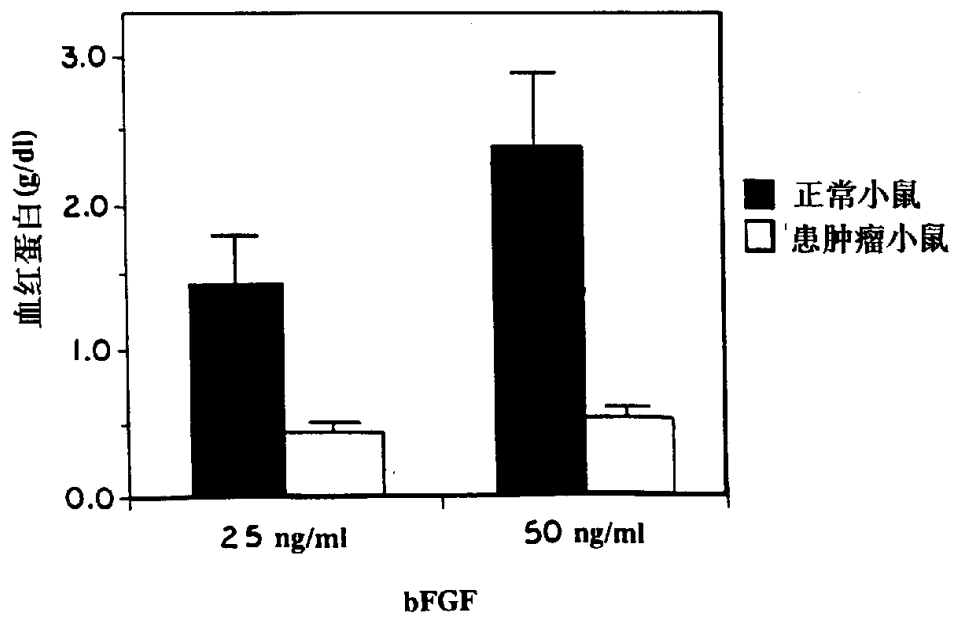


图 4

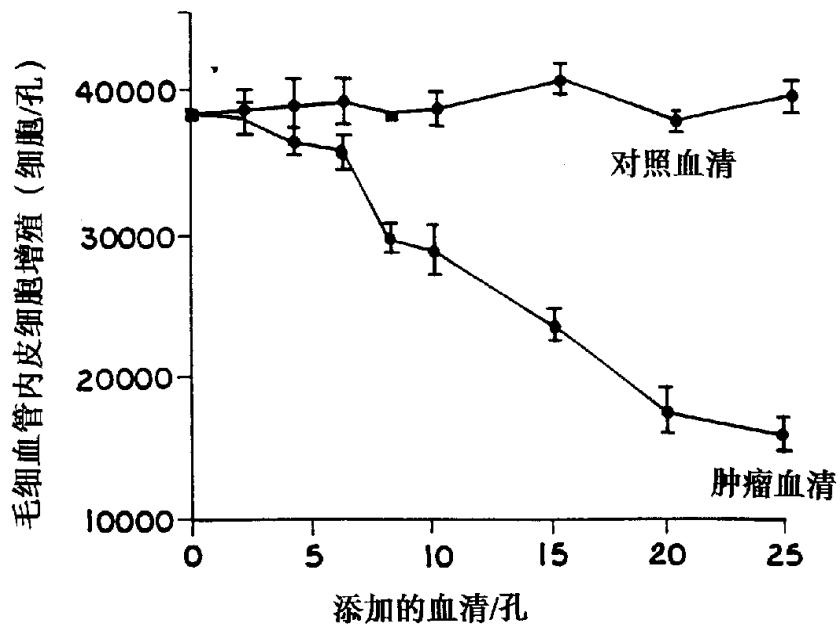
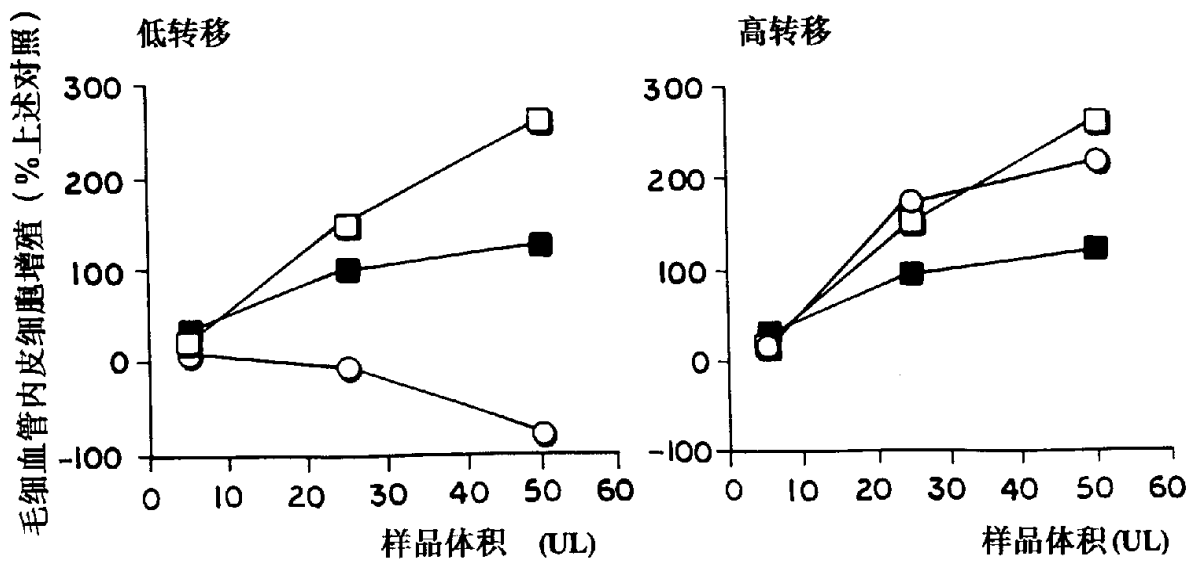


图 5

- 腹水
- 具有腹水的小鼠的血清
- 正常小鼠的血清

图 6



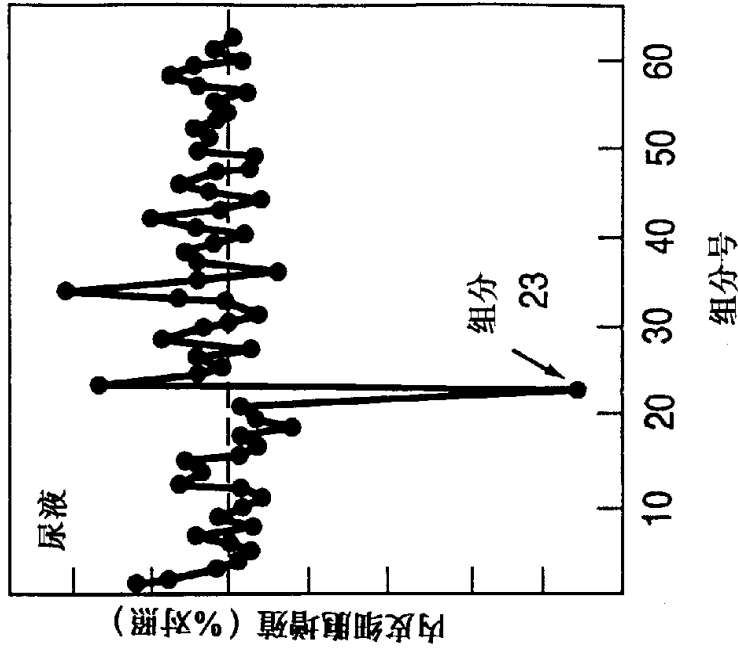


图 7B

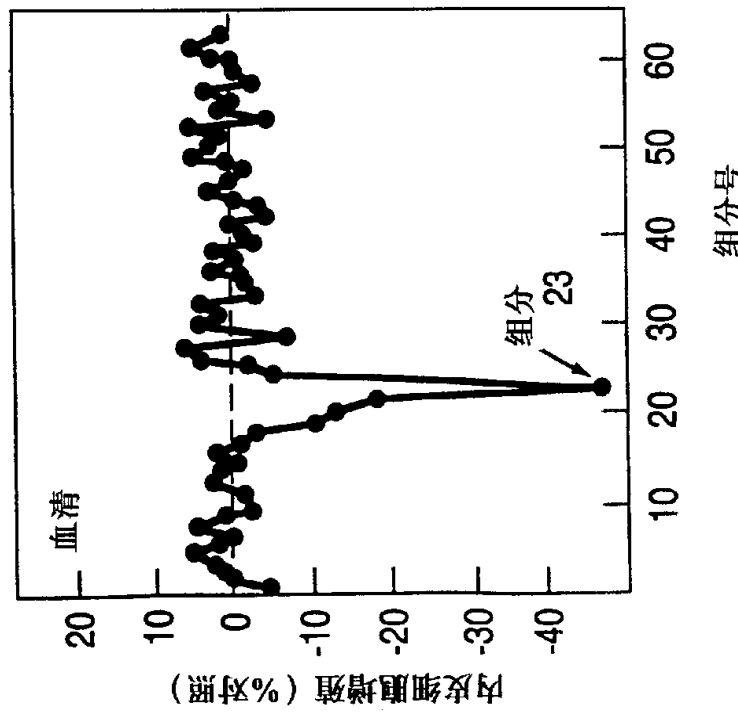


图 7A

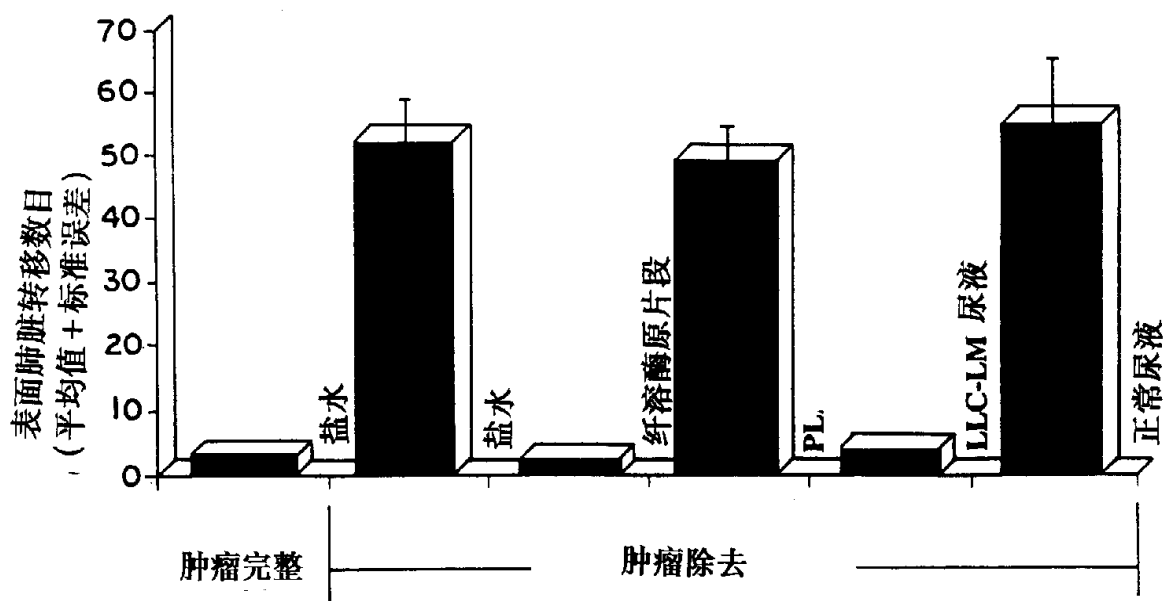


图 8

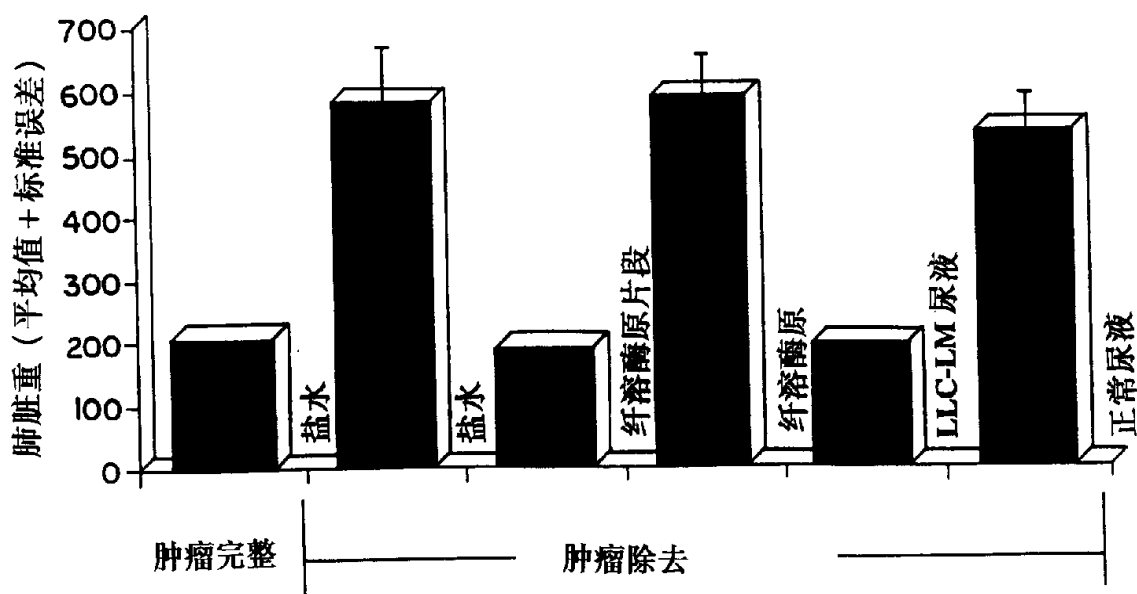
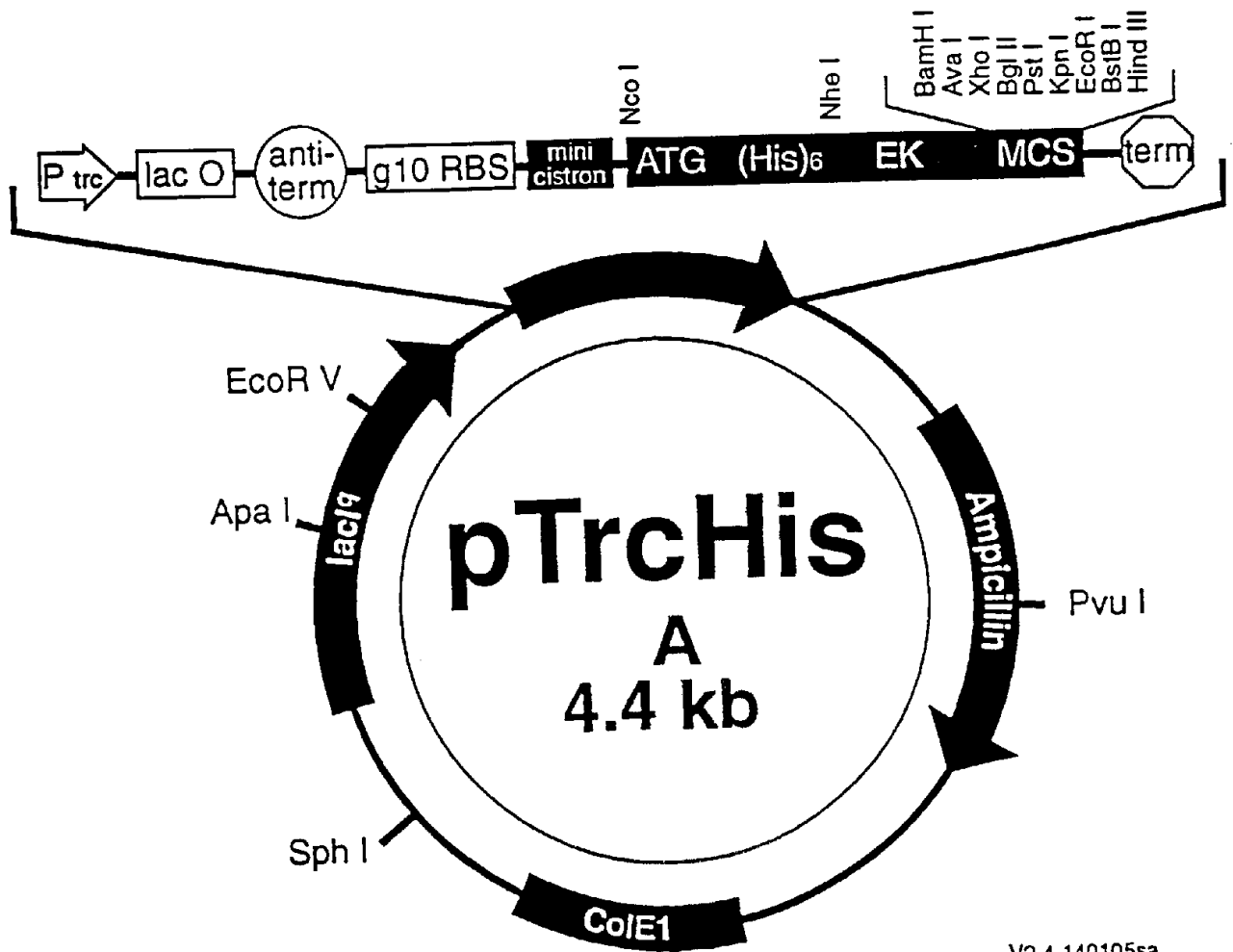


图 9



V2.4-140105sa

图 10

•
•
•
•

A B C

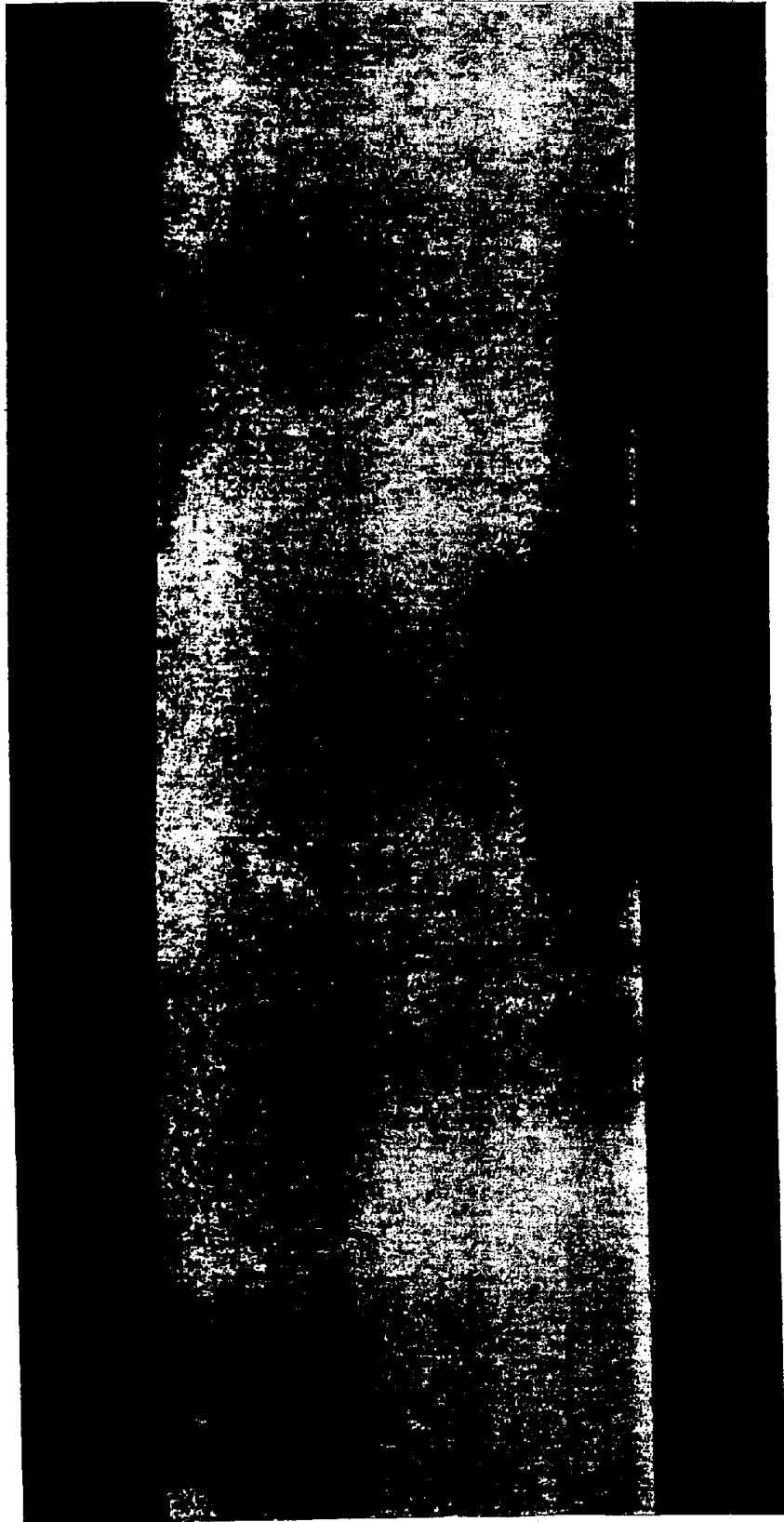


图 11

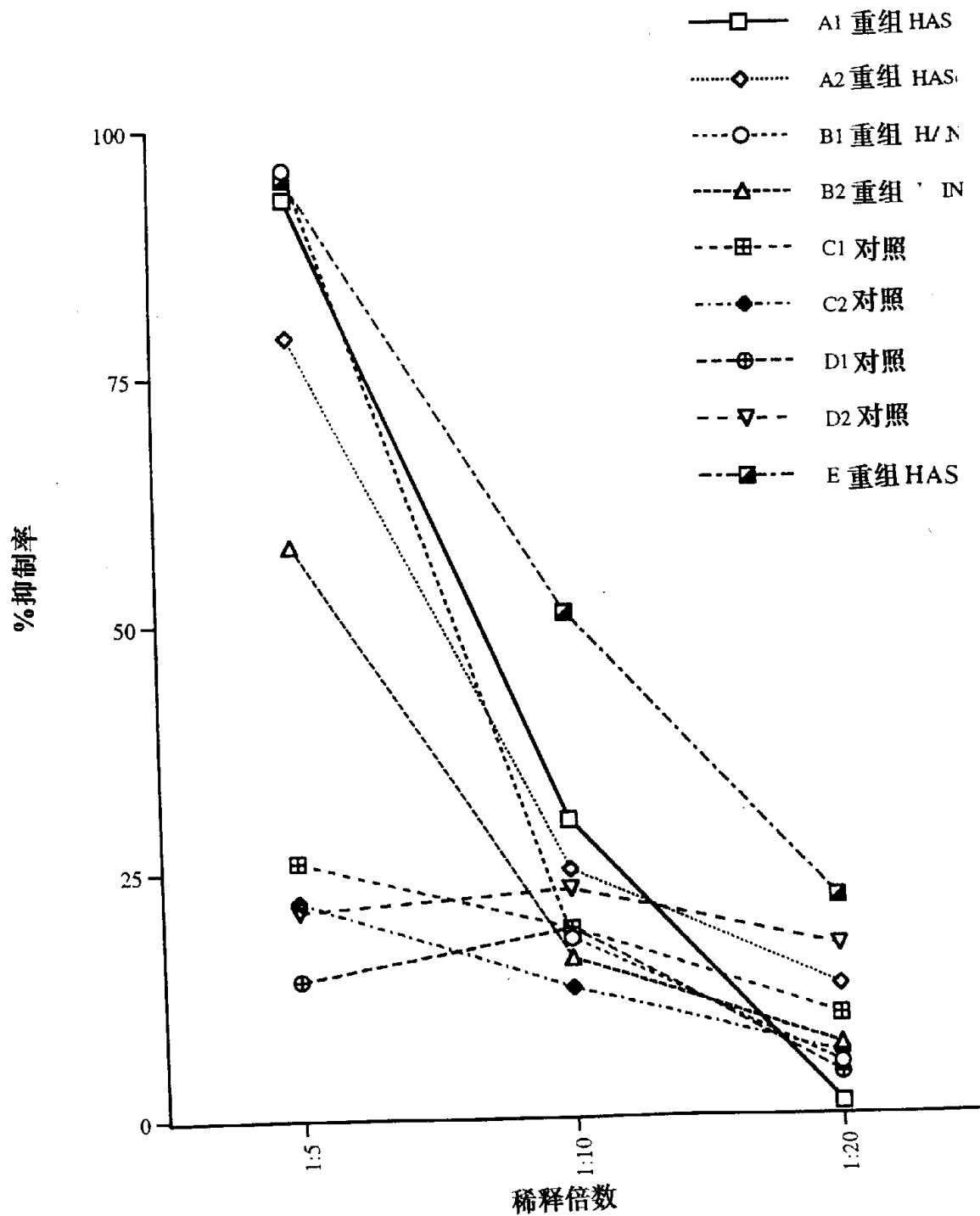


图 12

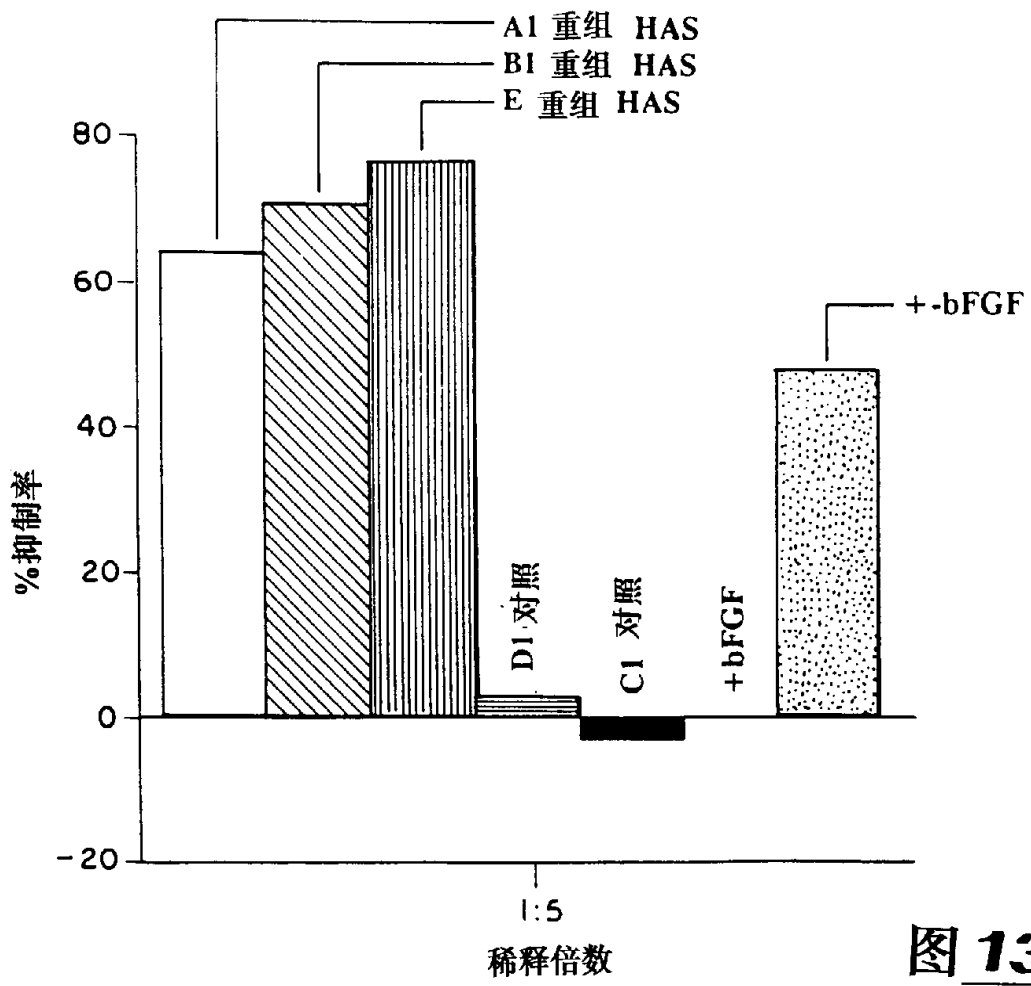


图 13

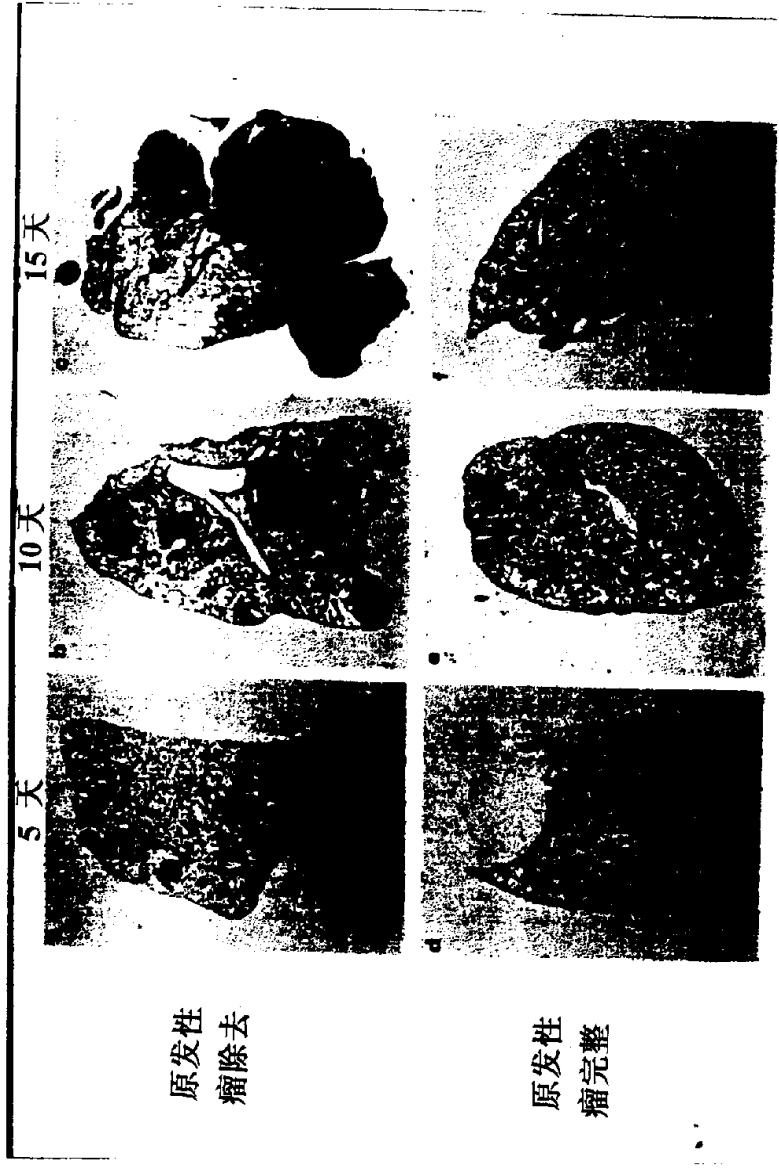


图 14

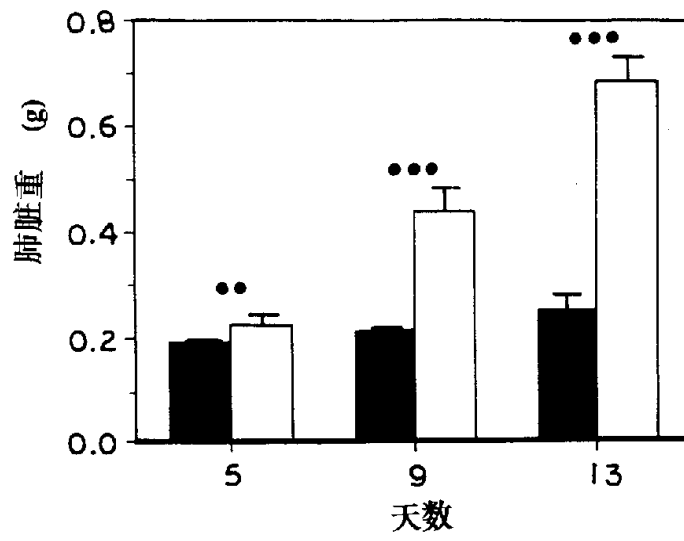


图15A

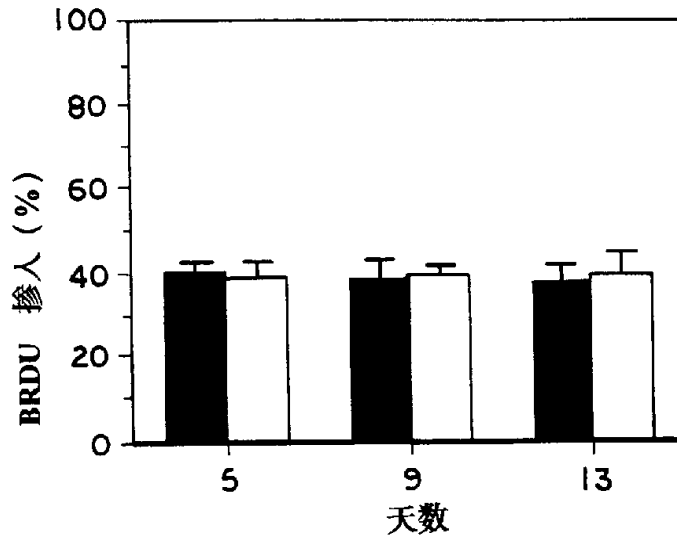


图15B

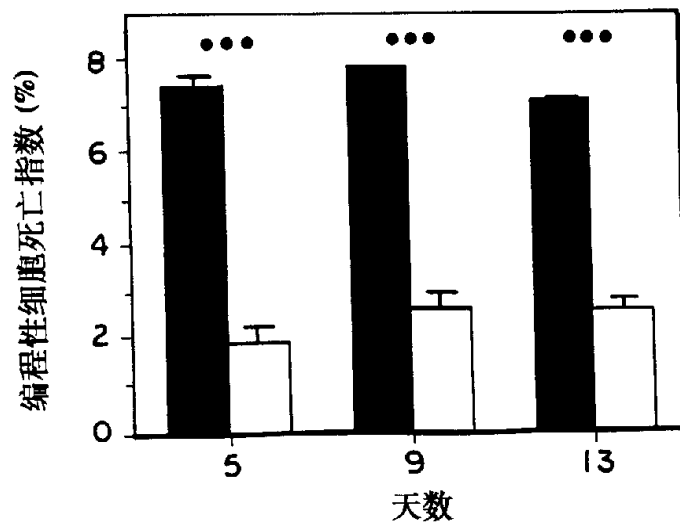


图15C

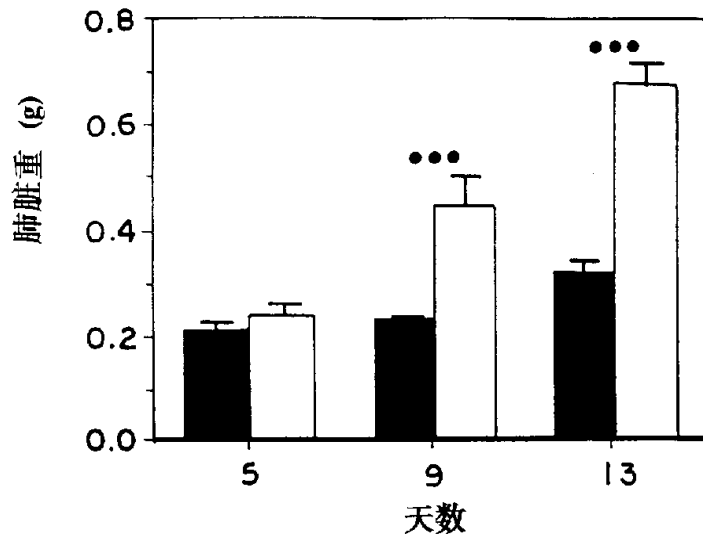


图16A

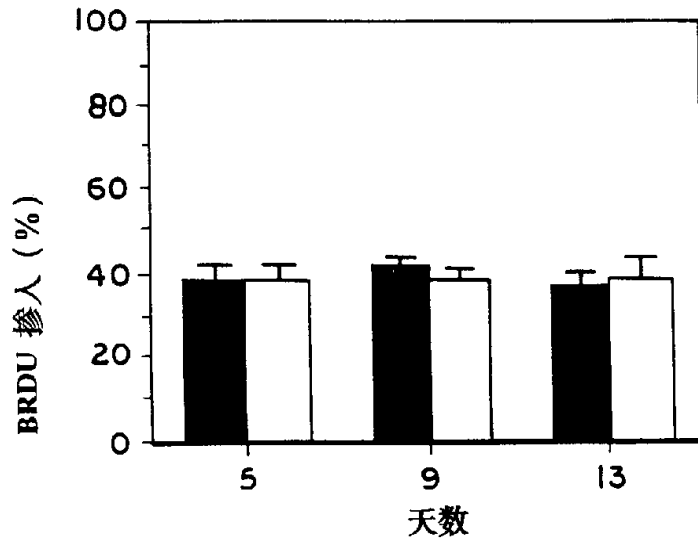


图16B

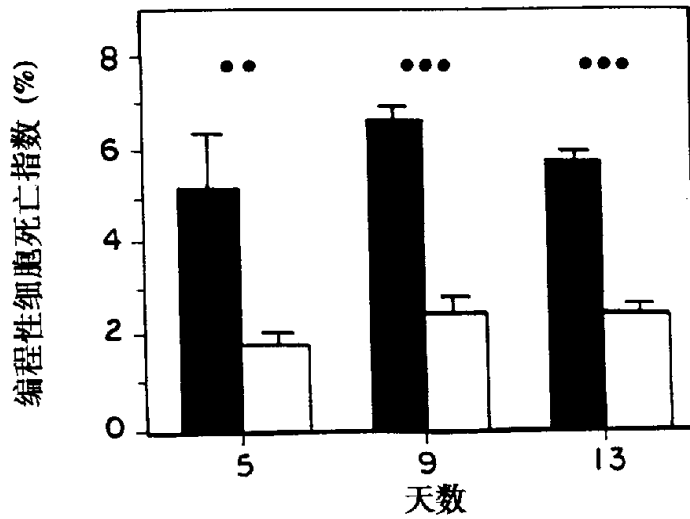


图16C

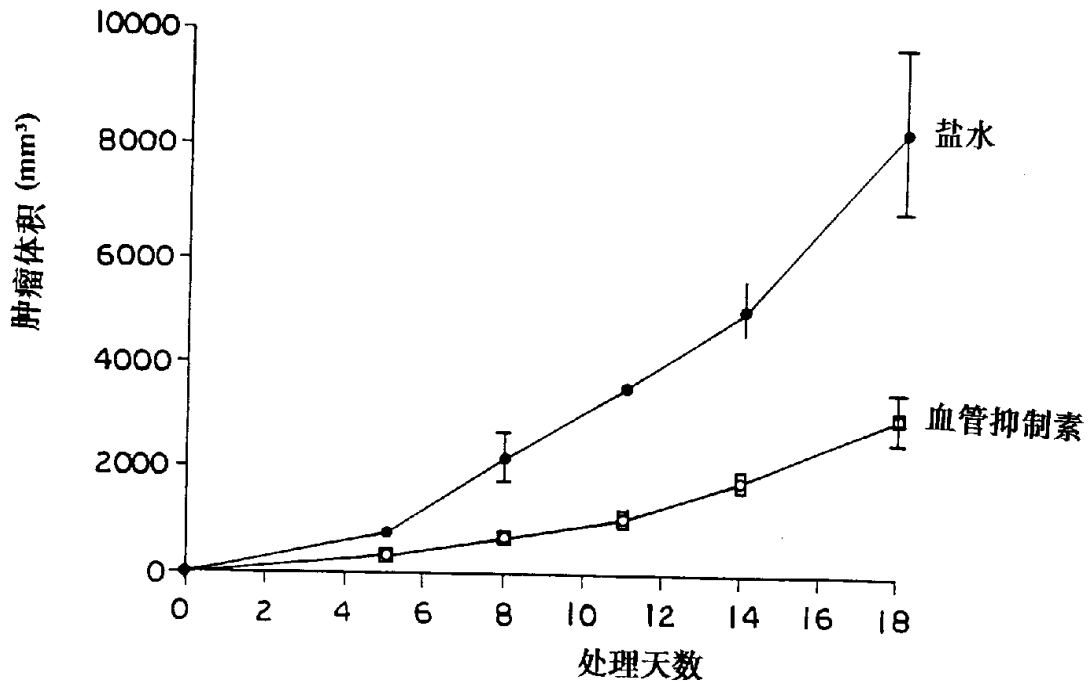


图17

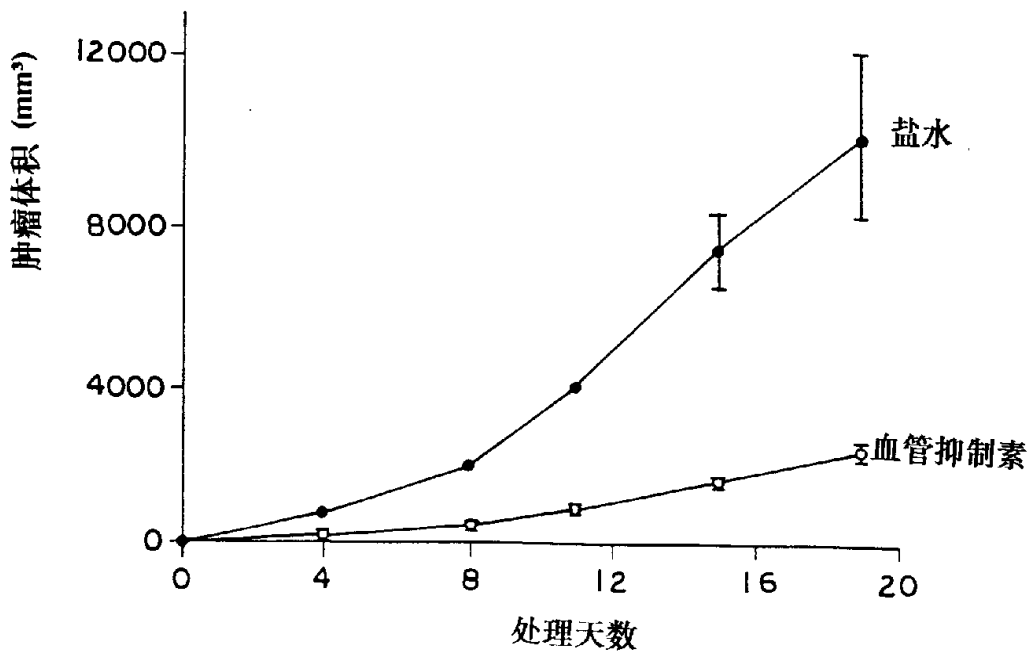


图18

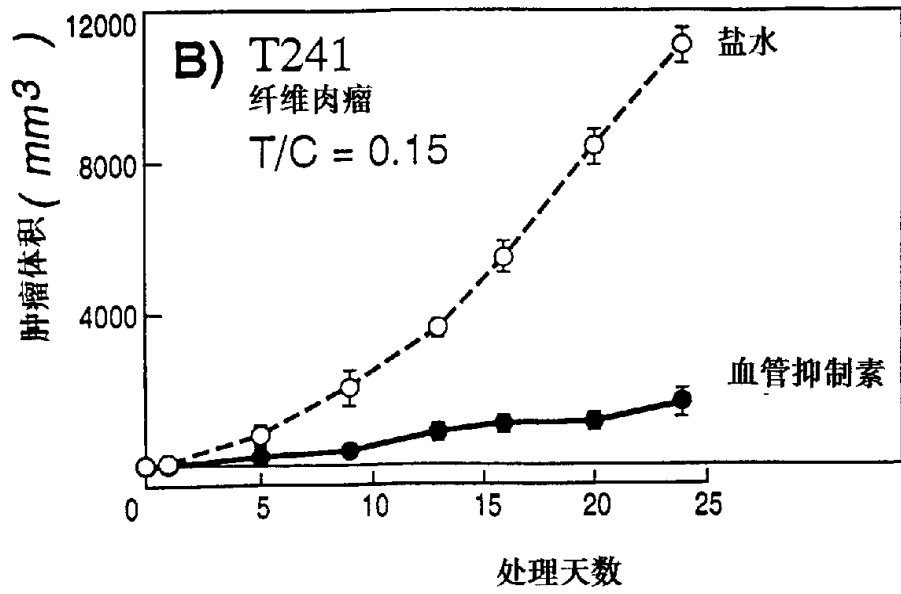


图 19

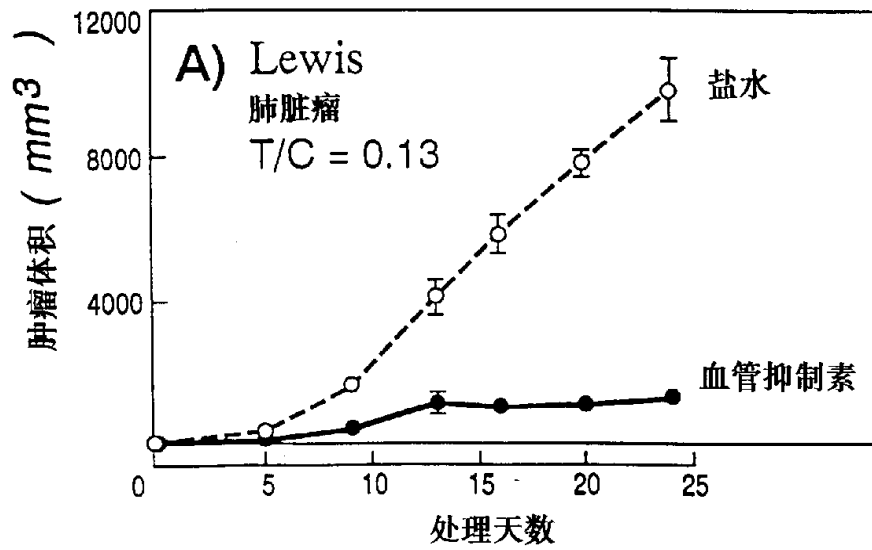


图 20

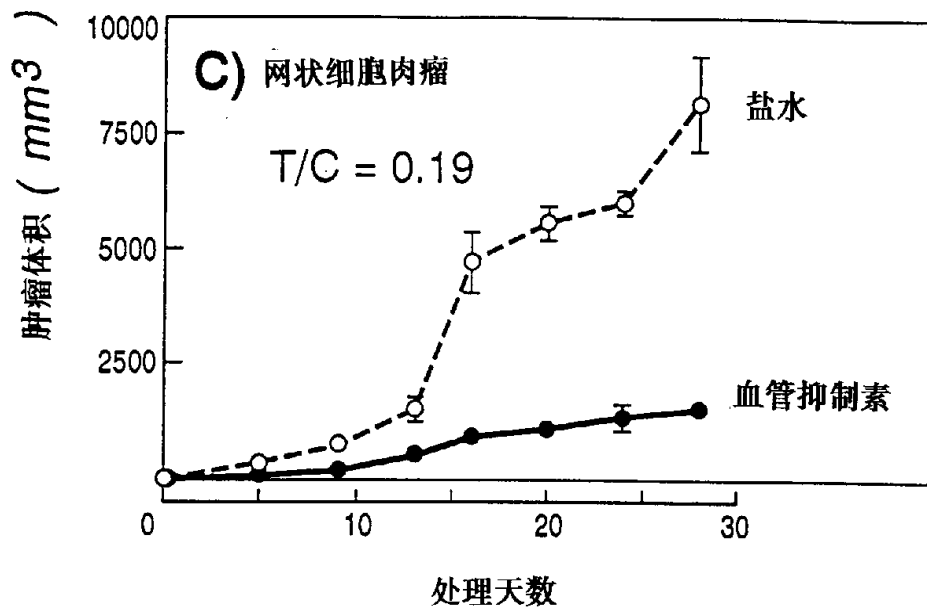


图 21

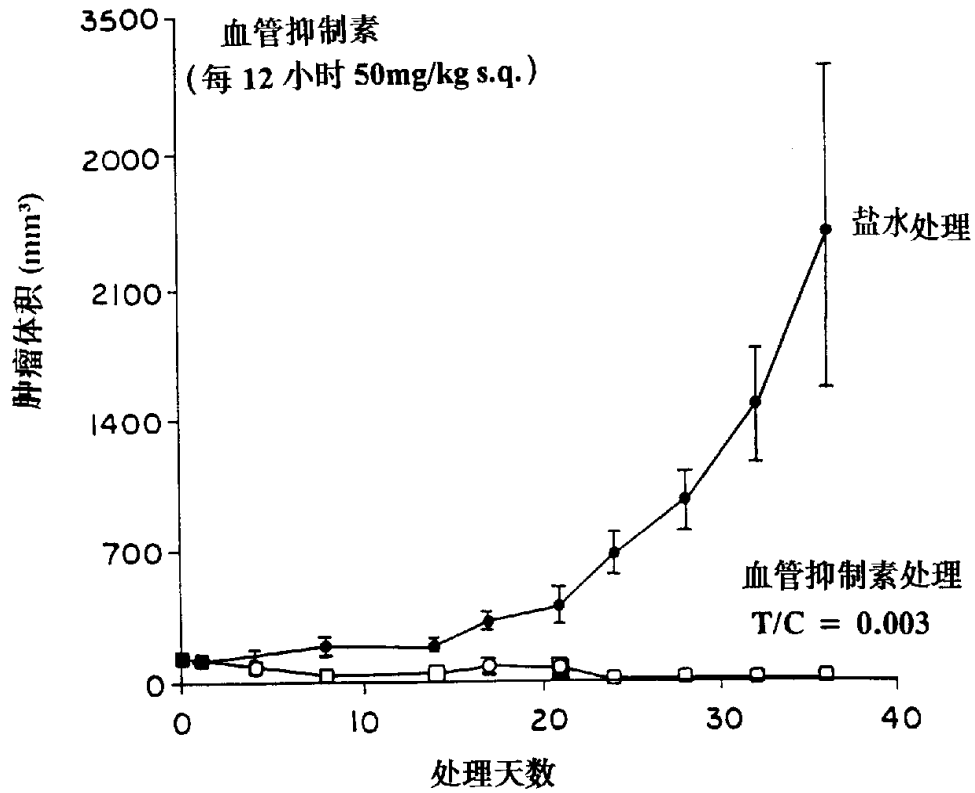


图22

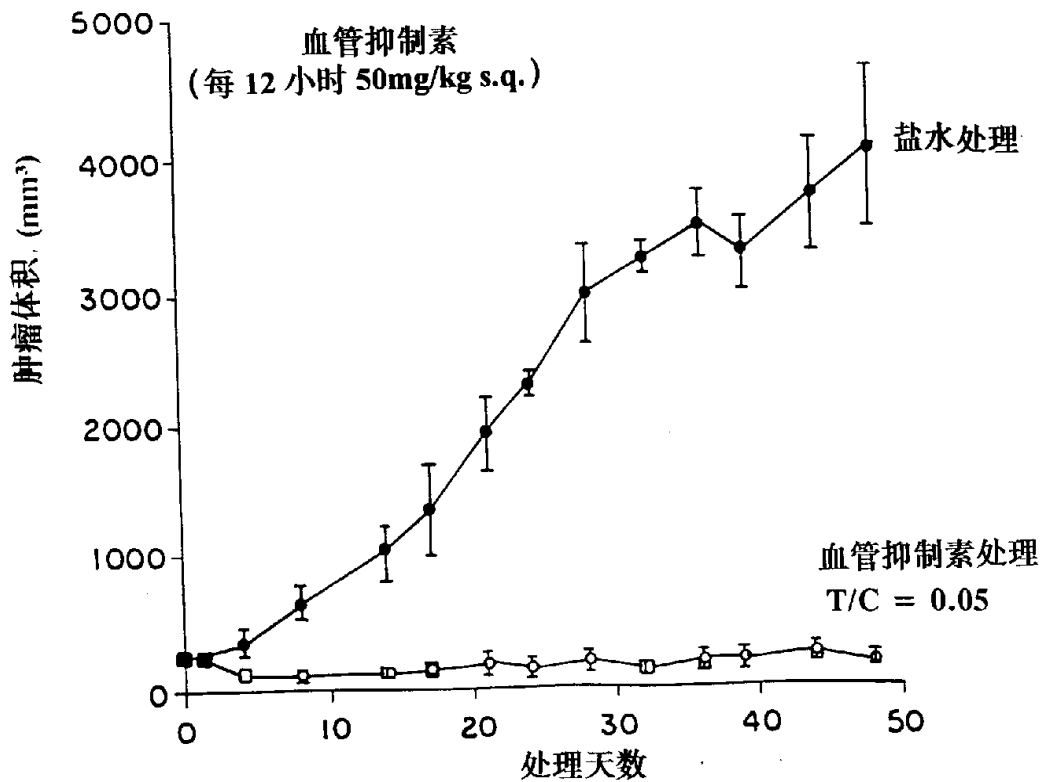


图23

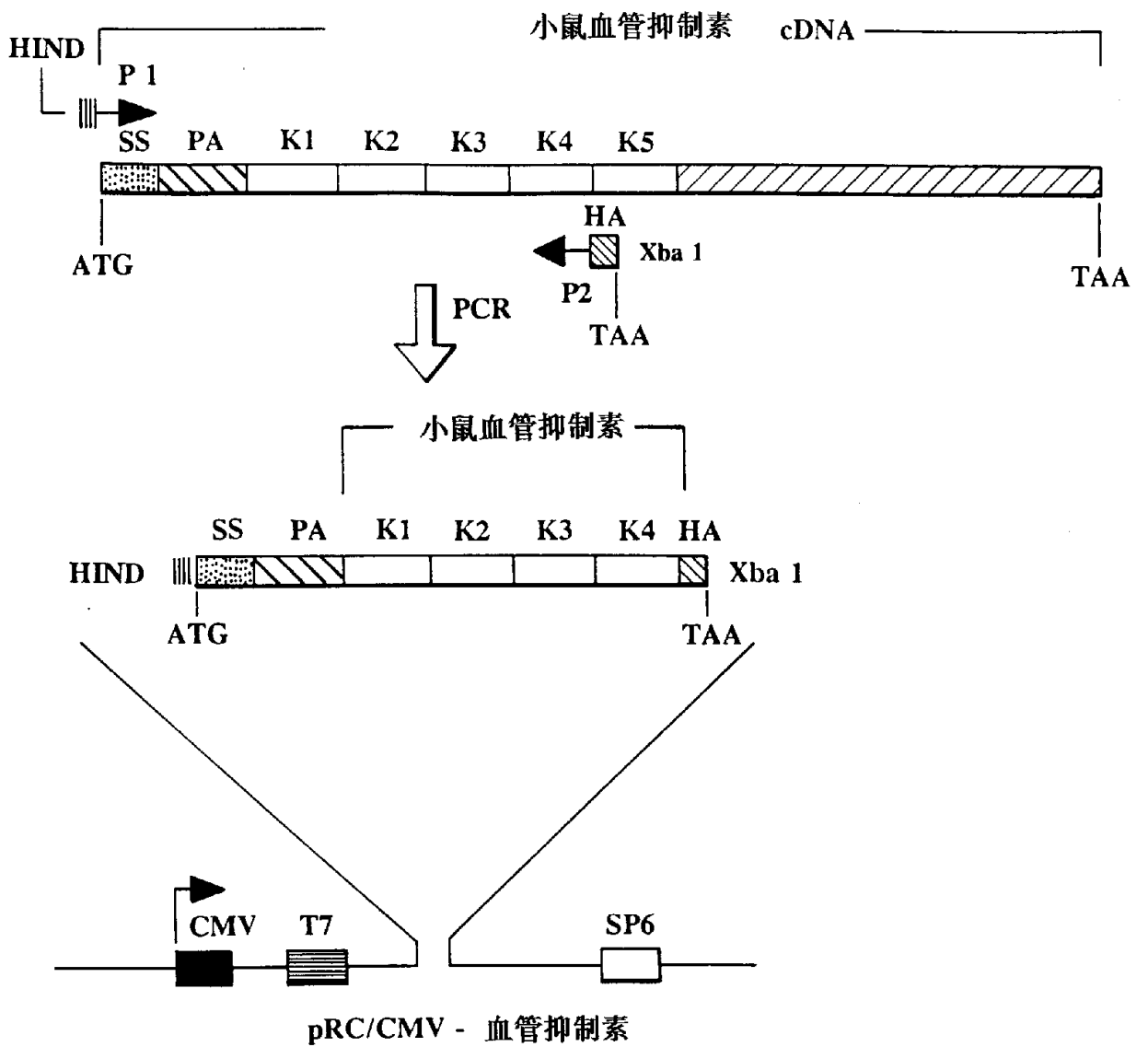


图24

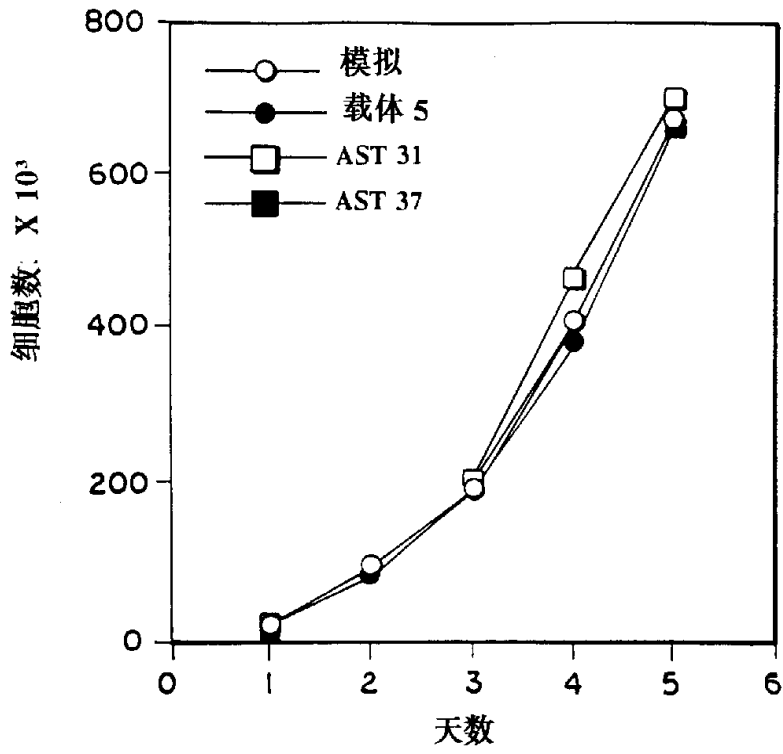


图25A

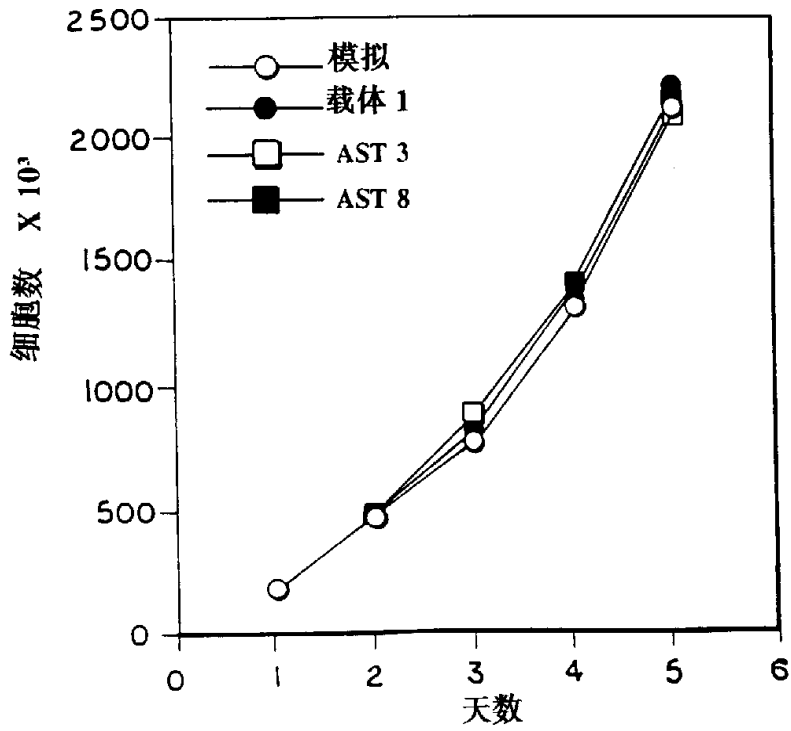


图 25B

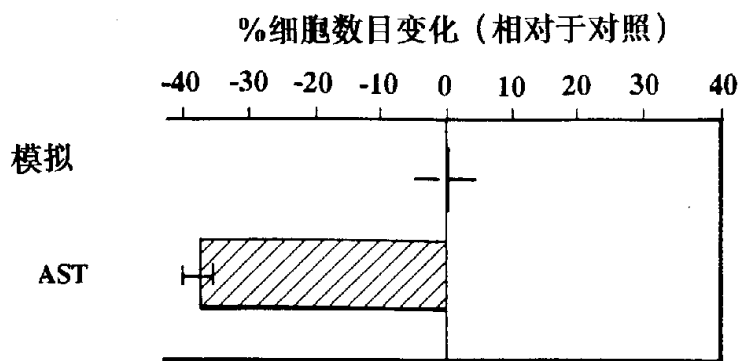


图 26A

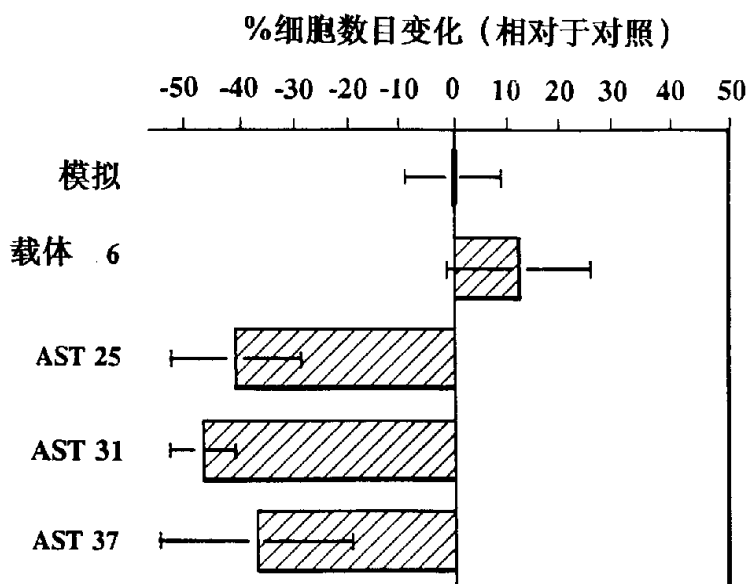


图 26B

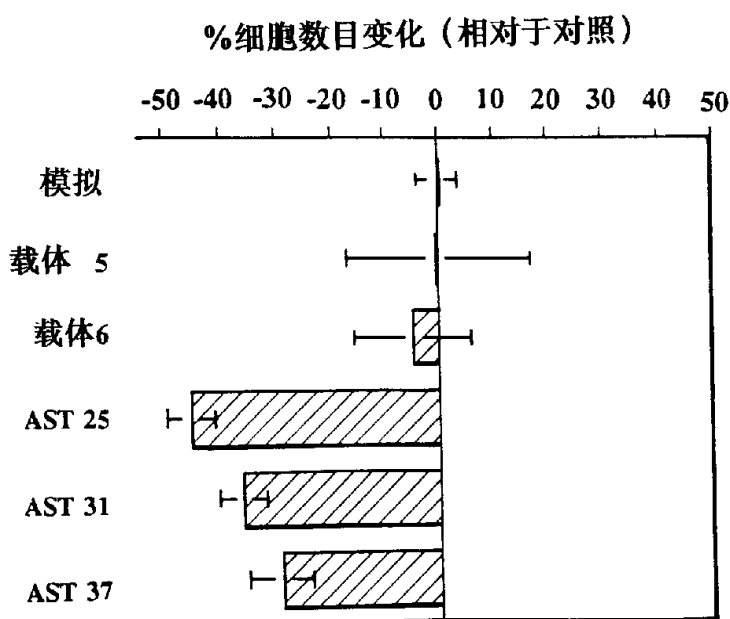


图 26C

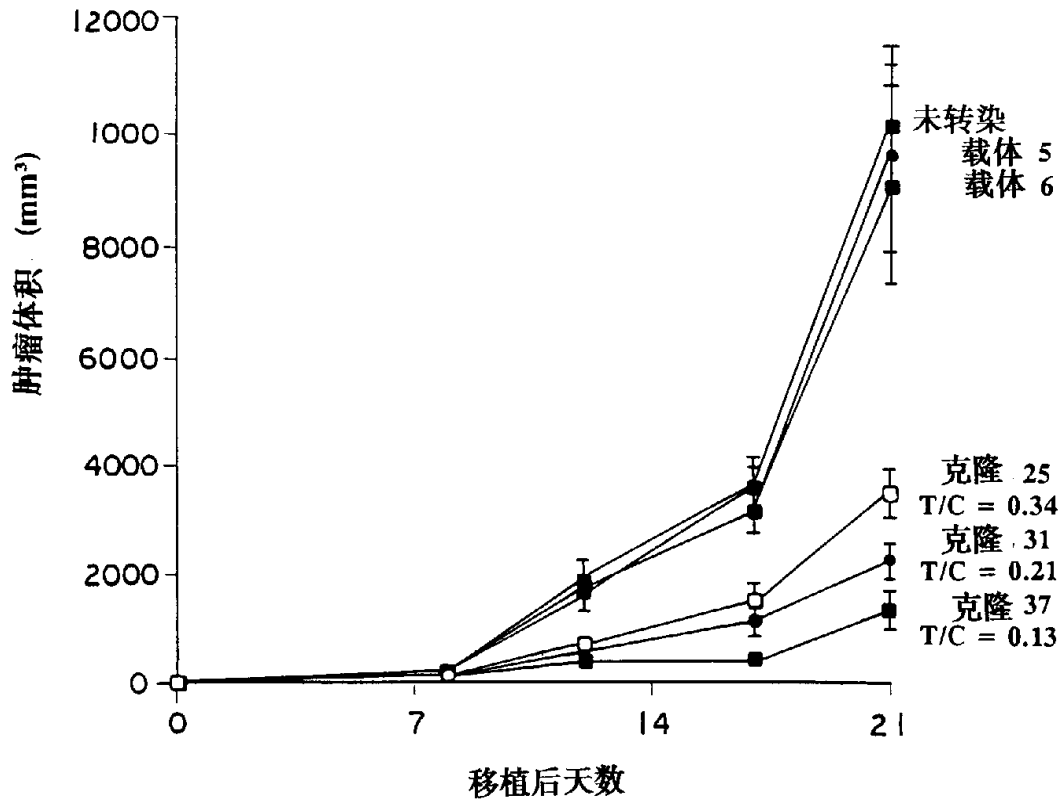


图 27

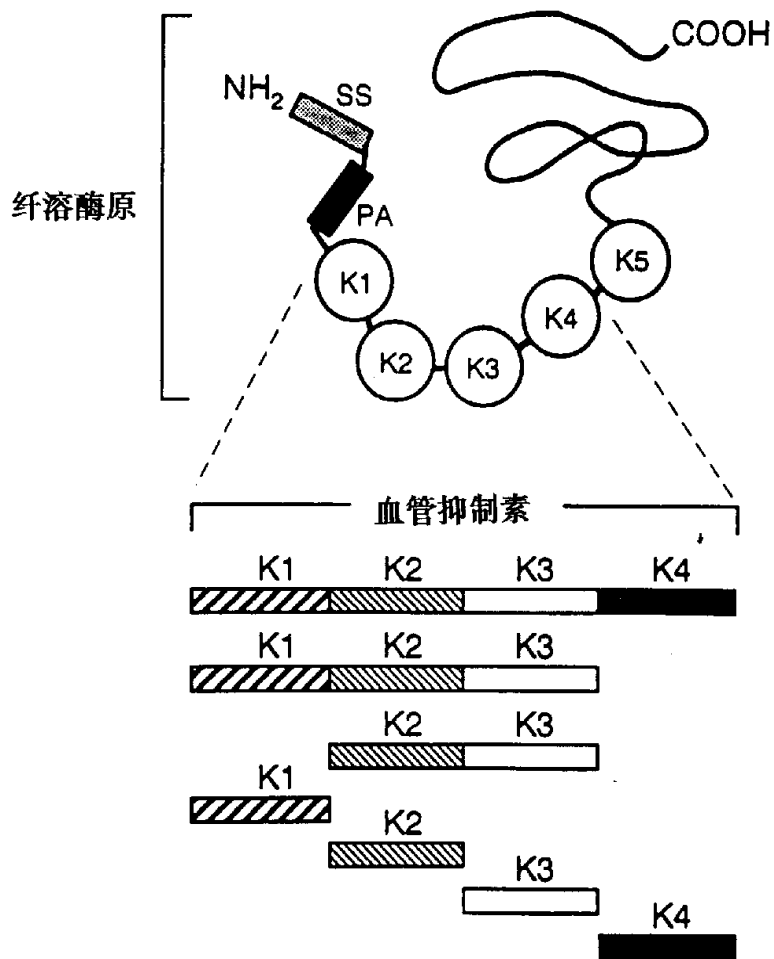


图28

K1 K2 K3 K4

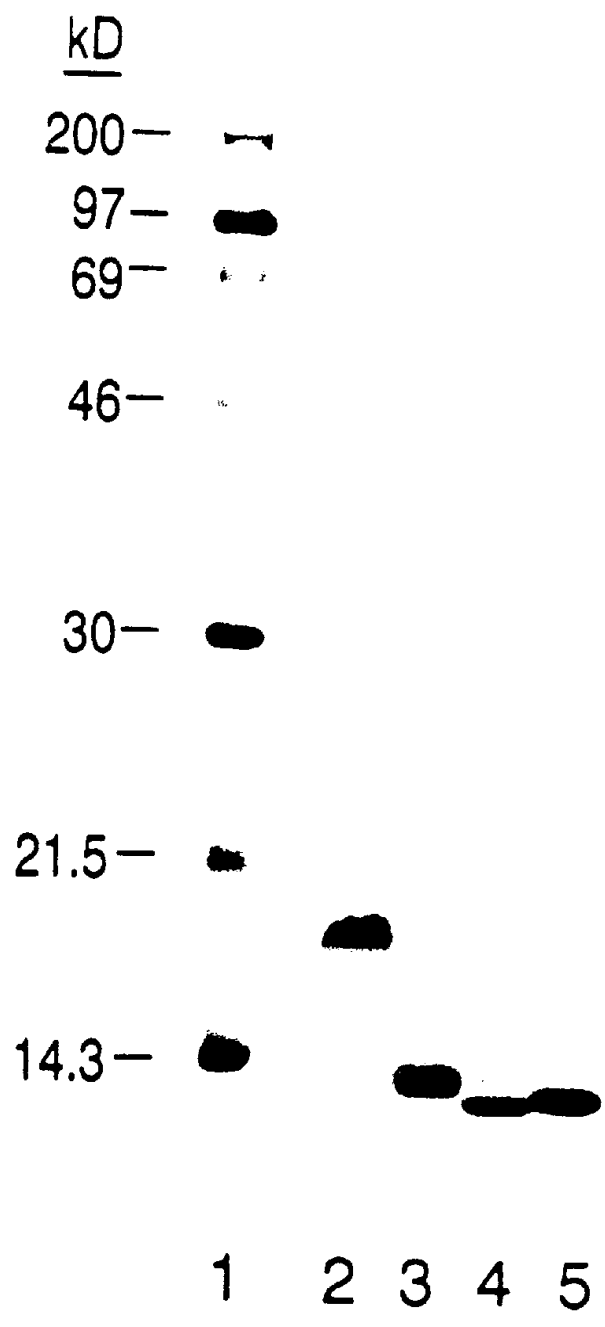


图 29A

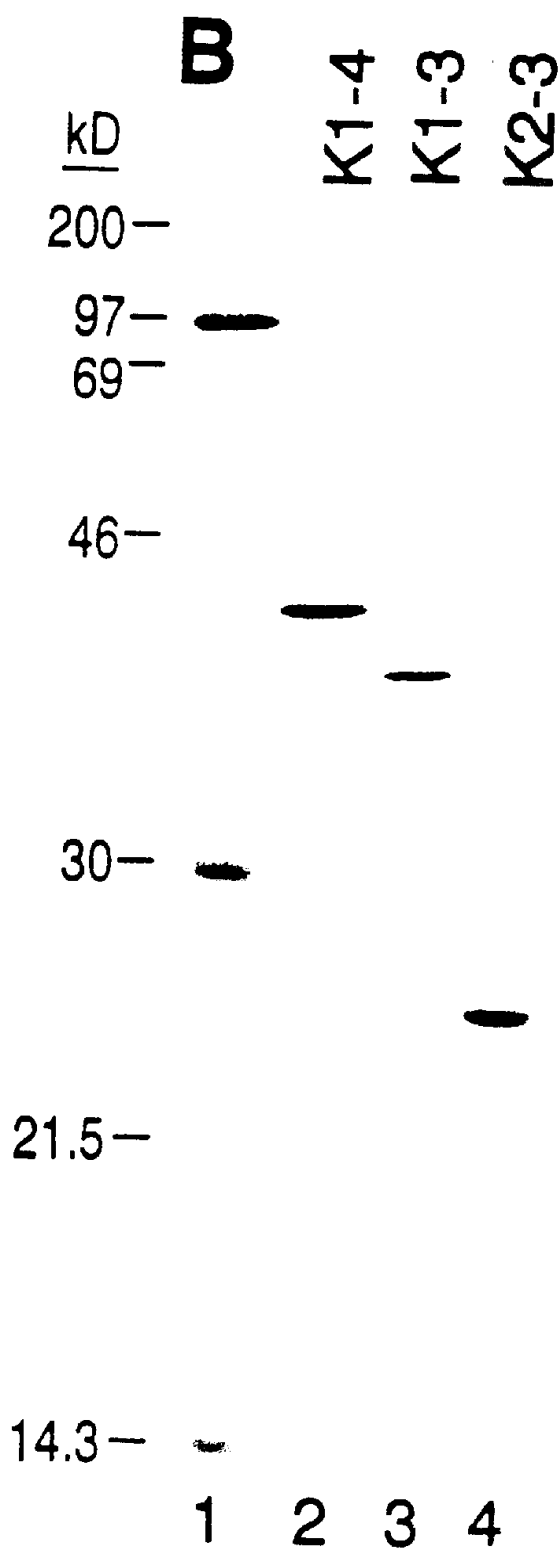


图 29B

图 30A

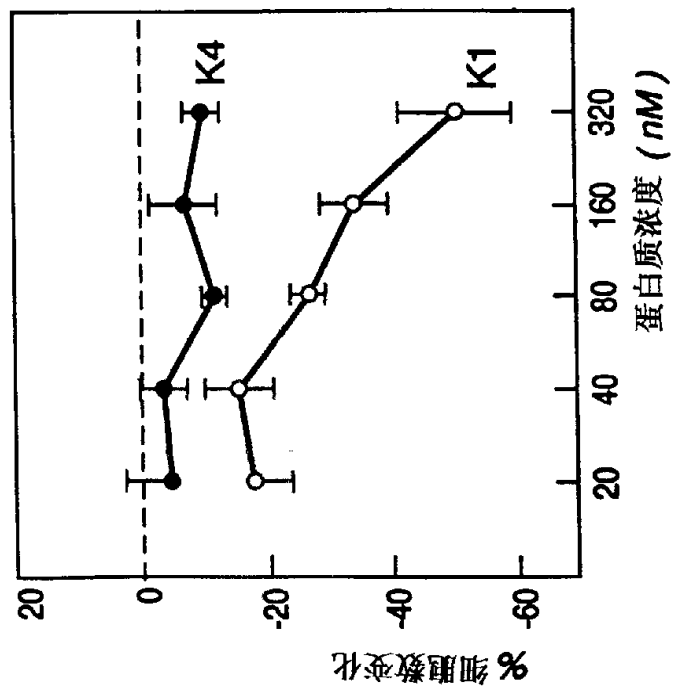
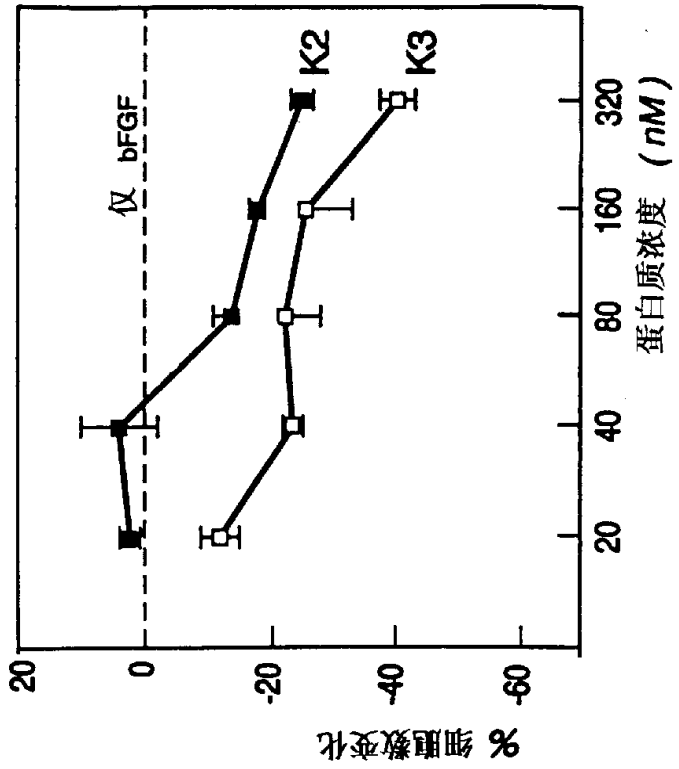


图 30B



11

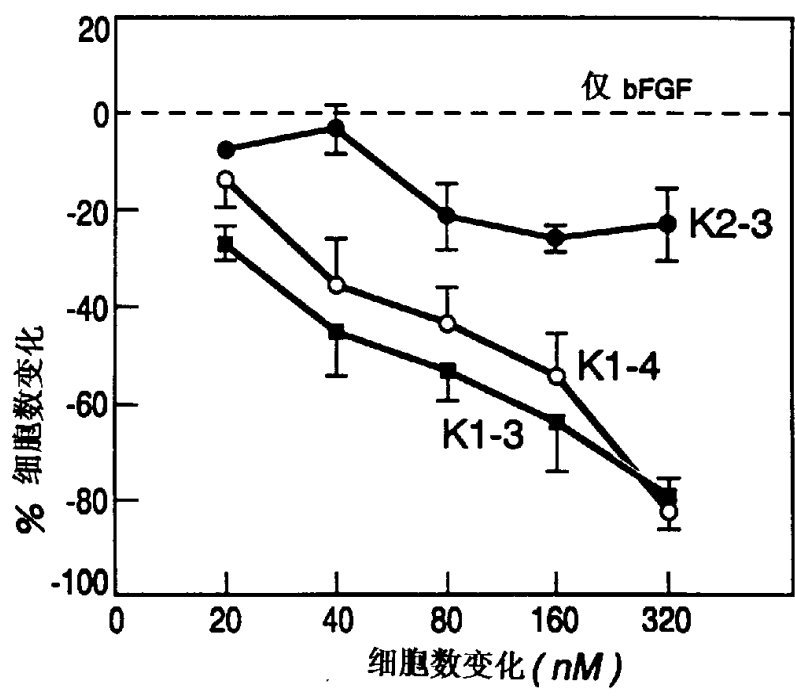


图 31

图 32A

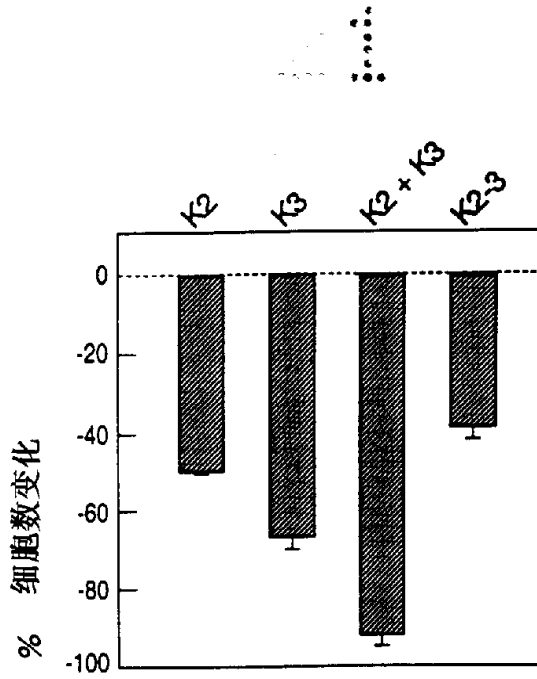
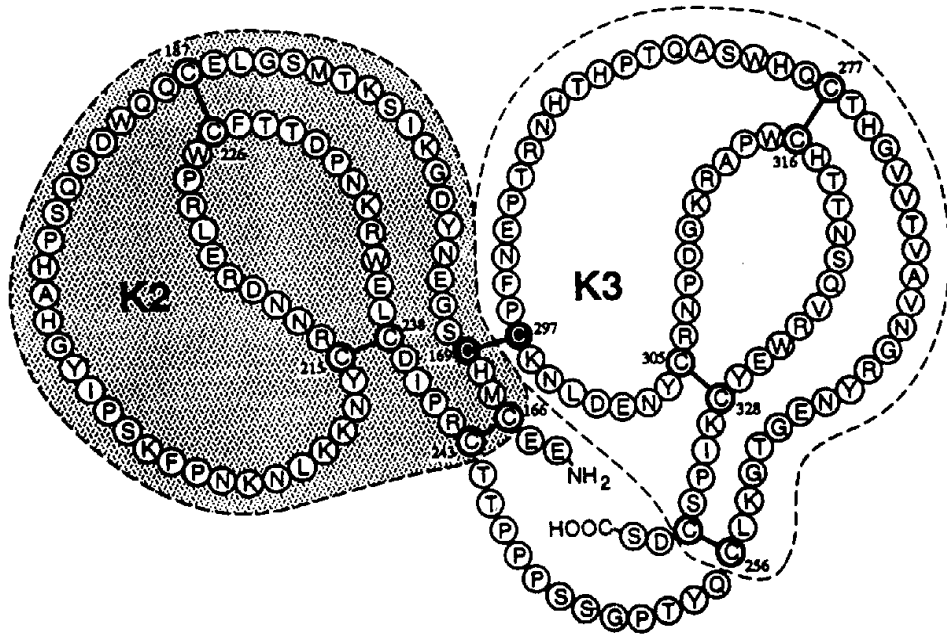


图 32B



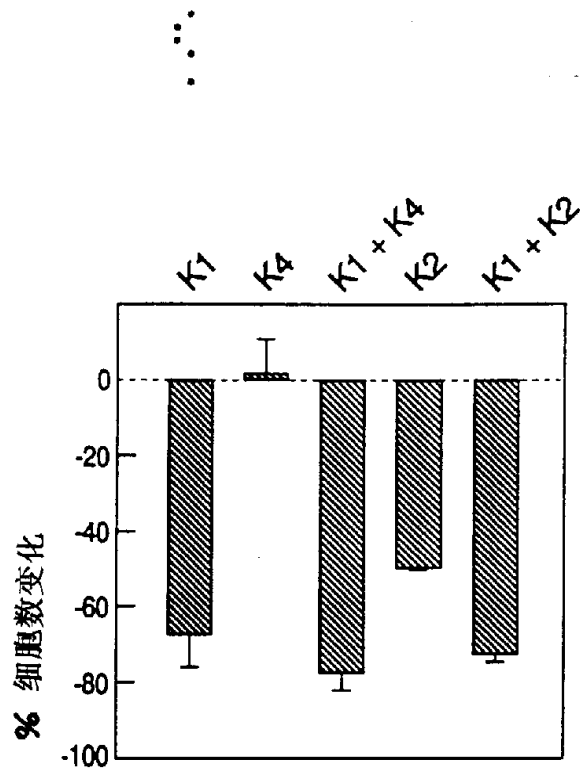


图 33A

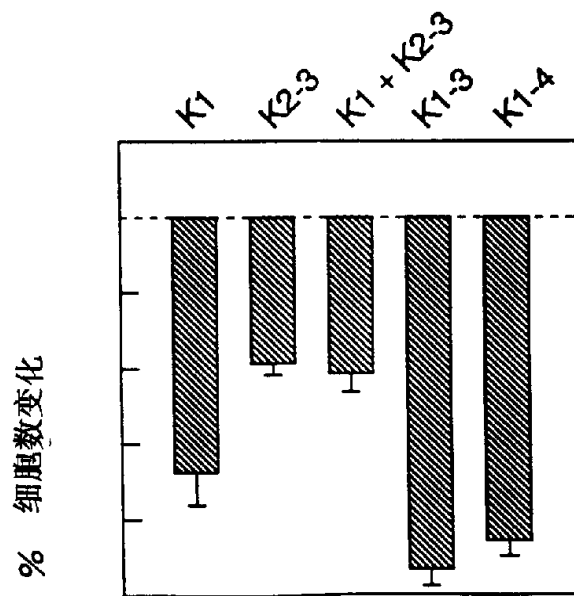


图 33B

A

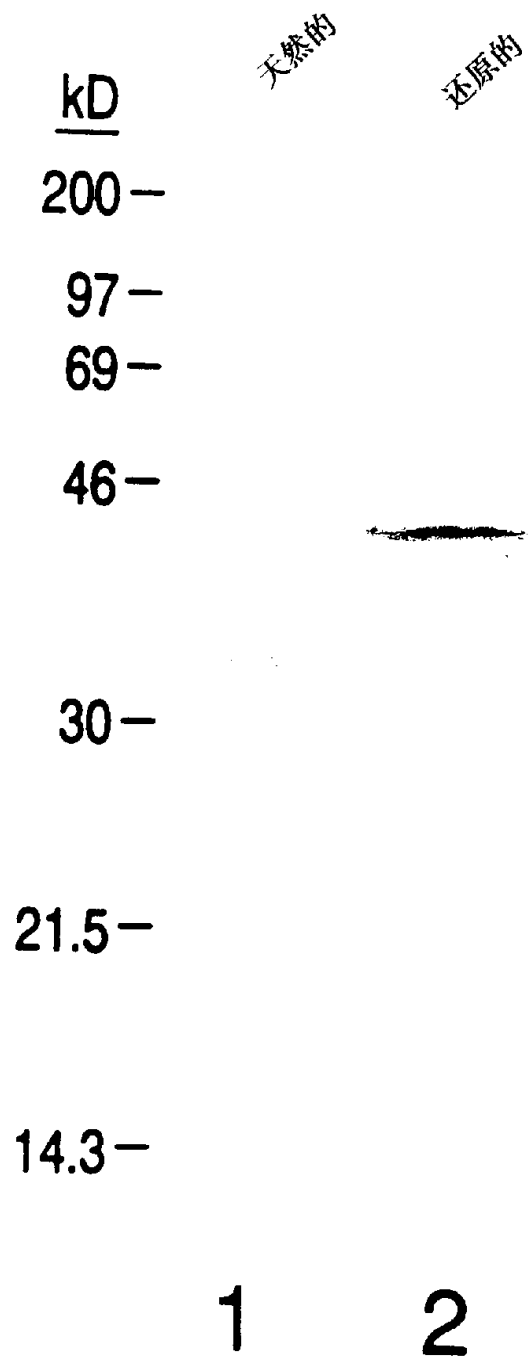


图 34A

B

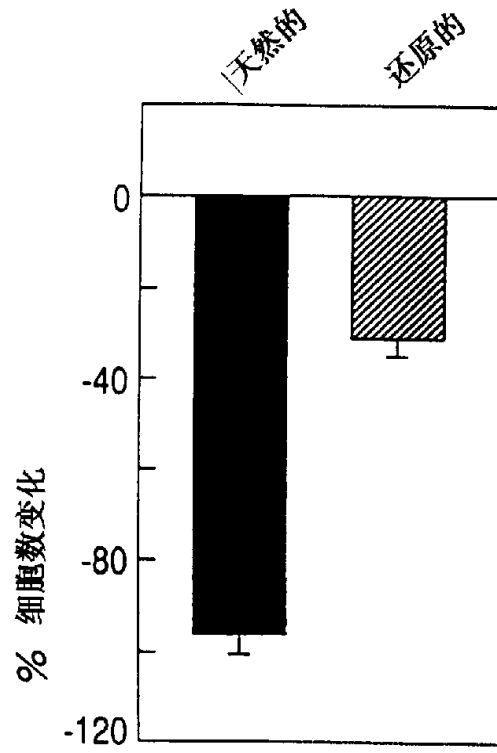


图 34B

		1	20	40
Kring1e1	*	CKTGN	GKNYRGTMSKTKNGITCQKWSSTSPHRP-RFSPAT	
Kring1e2		CMHCS	GENYDGKISKTMSSGLECAWDSQSPHAG-YIPSK	
Kring1e3		CLKGT	GENYRGNVAVTVSGHTCQHWSAQTPHTHNR-TPEN	
Kring1e4		CYHGD	GQSYRGTSSTTTGKKCQSWSSMTPHRHQK-TPEN	
		41	60	80
Kring1e1	*	HPSEGL	EENYCRNPNDPQGPWCYTTPDKRYDYCDILEC	*
Kring1e2		FPNKNL	KKNYCRNPDRERL-RPWCFTTDPNKRWELCDIPRC	
Kring1e3		FPCKNL	DENYCRNPDKGR-APWCHTTNSQVRWEYCKIPSC	
Kring1e4		YFNAGL	TMNYCRNPADAK-GPWCFTTDPNKRWELCDILEC	

图 35

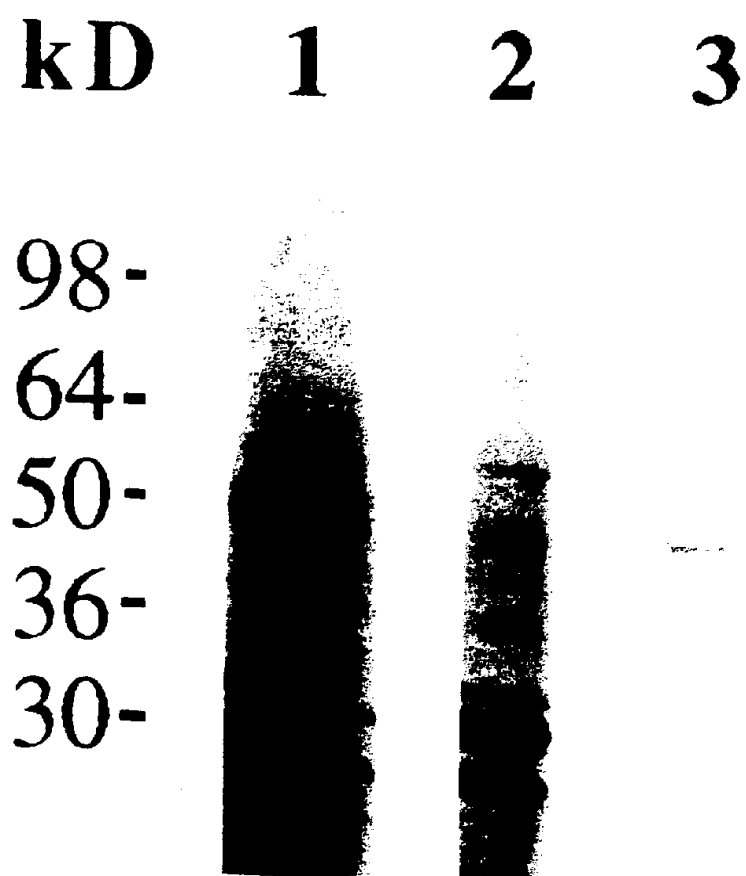


图 36A

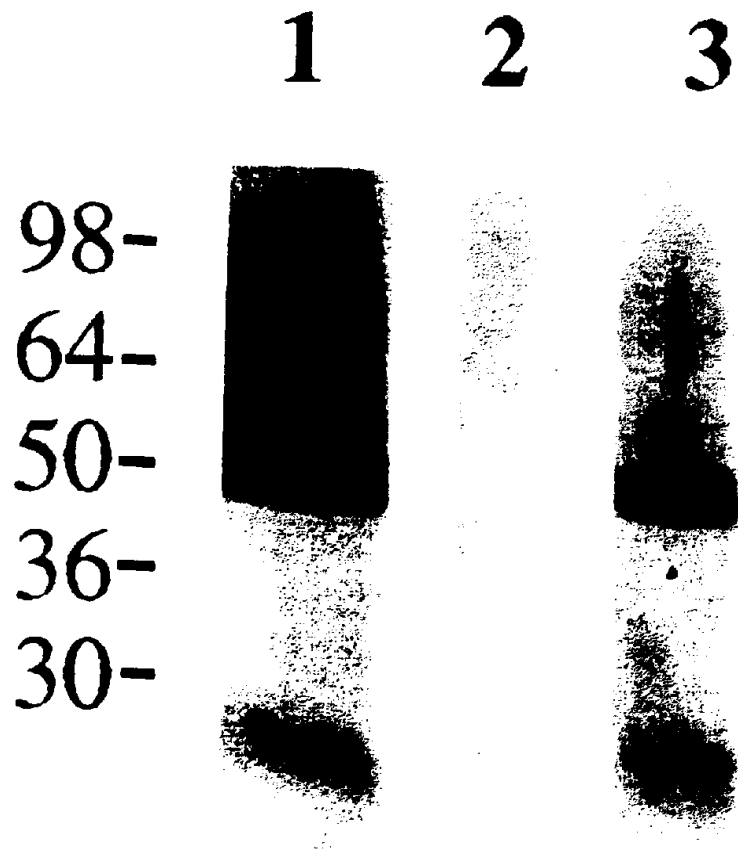


图 36B

kD

1

2

3

50-



图 37A

...

1

2

3

50-

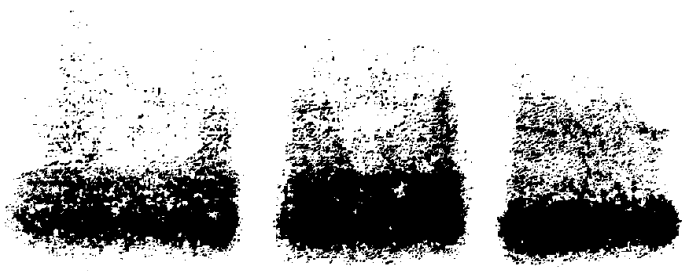


图 37B



图 38A

图 38B

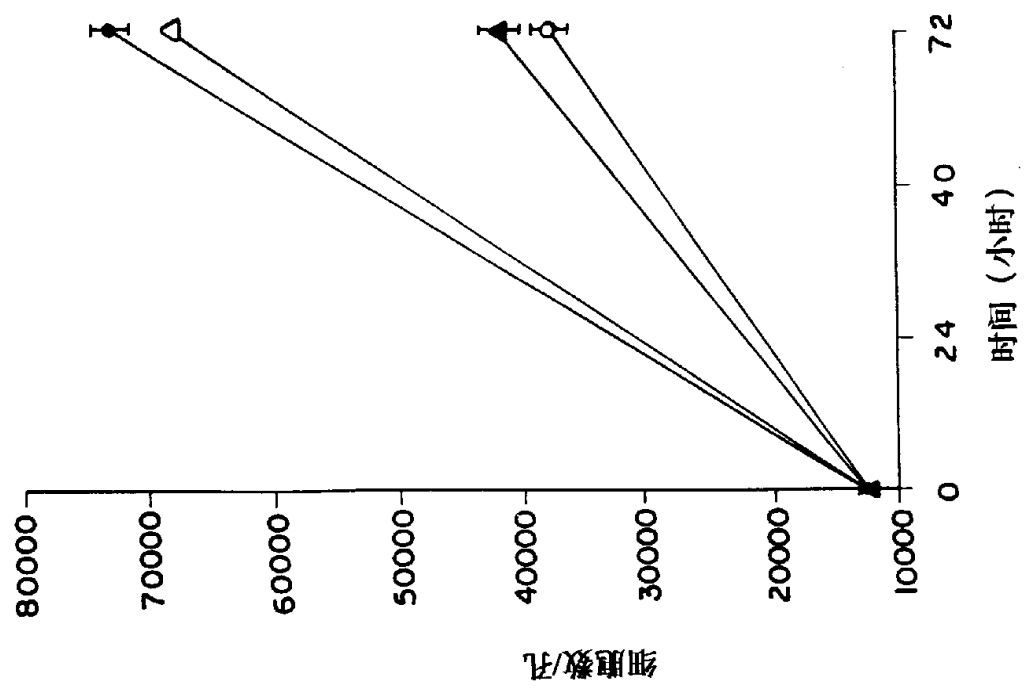
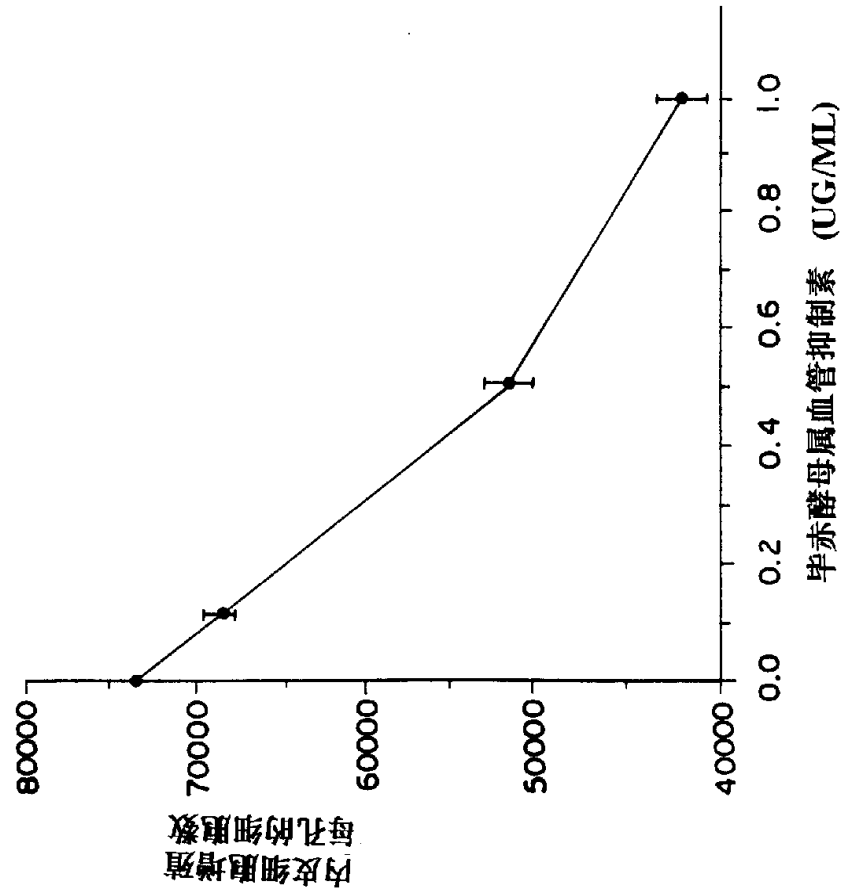


图 38C



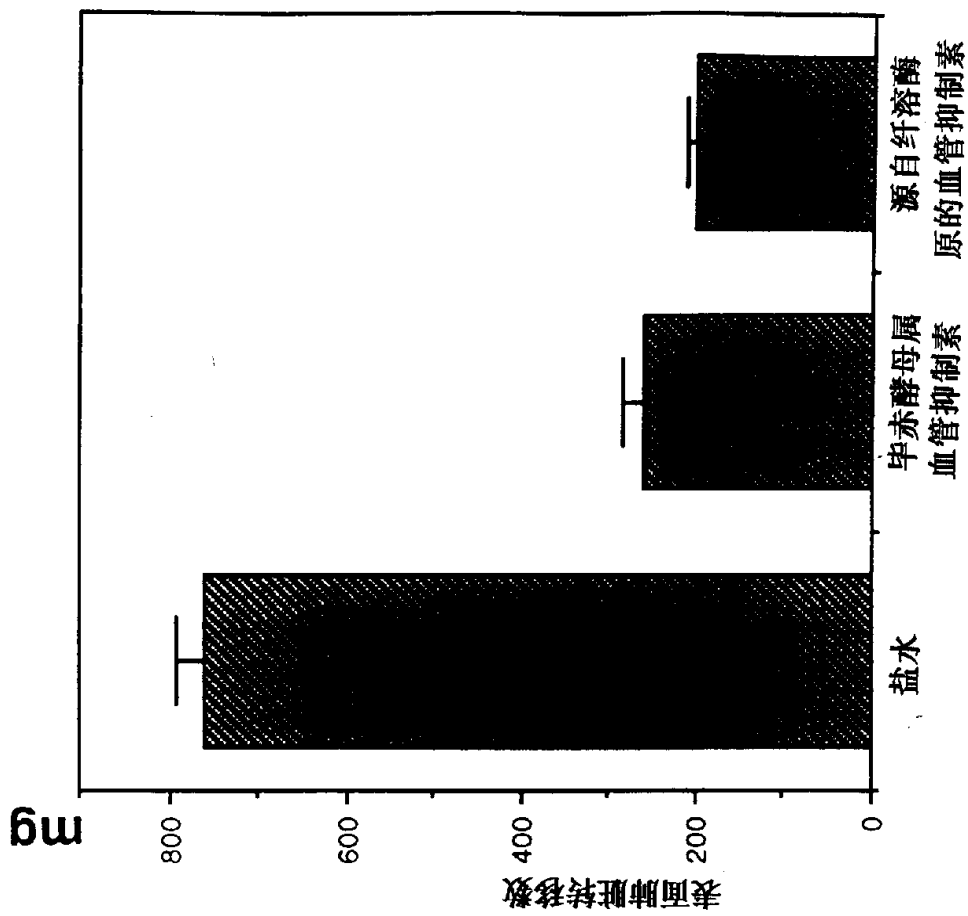


图39B

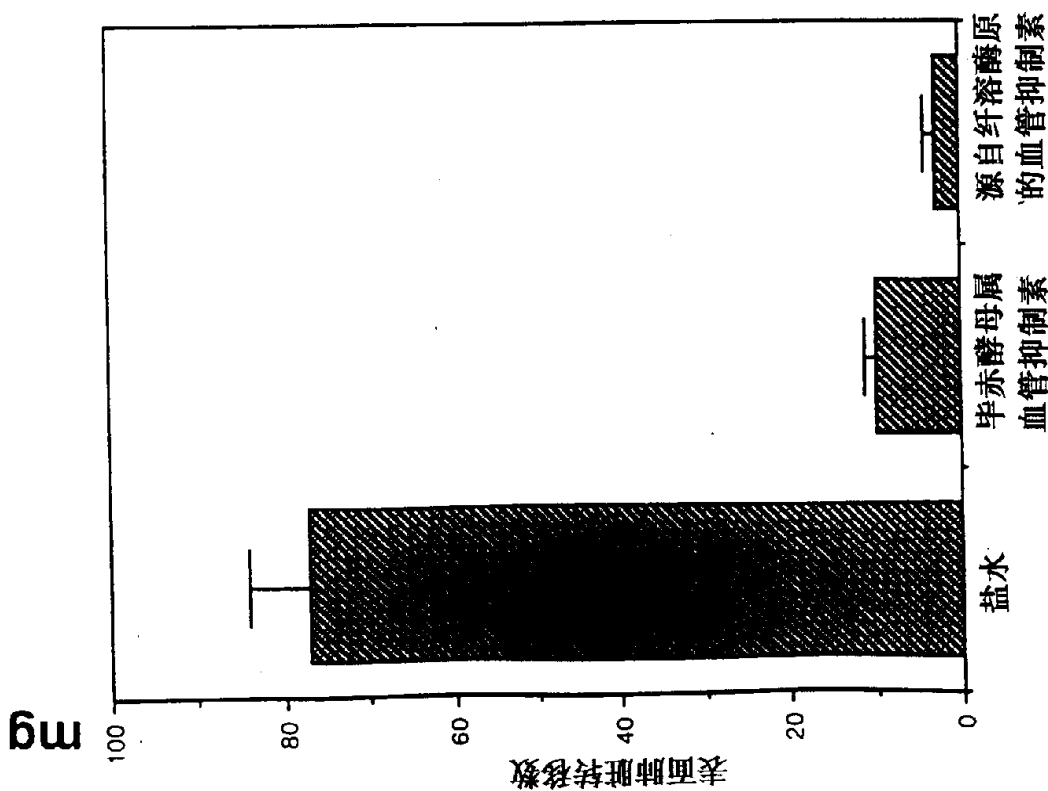


图 39A



图 40

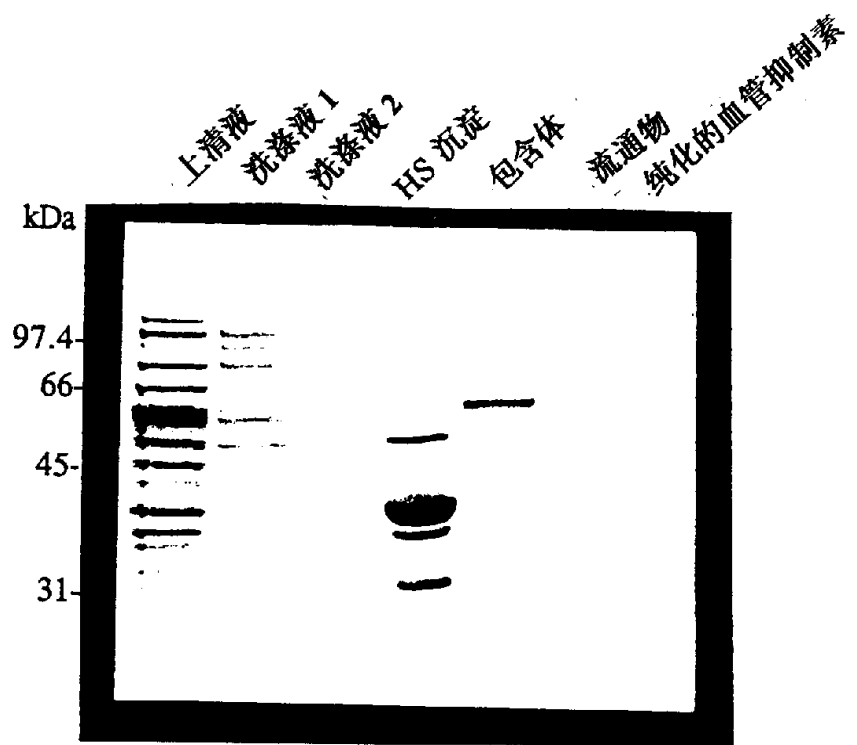
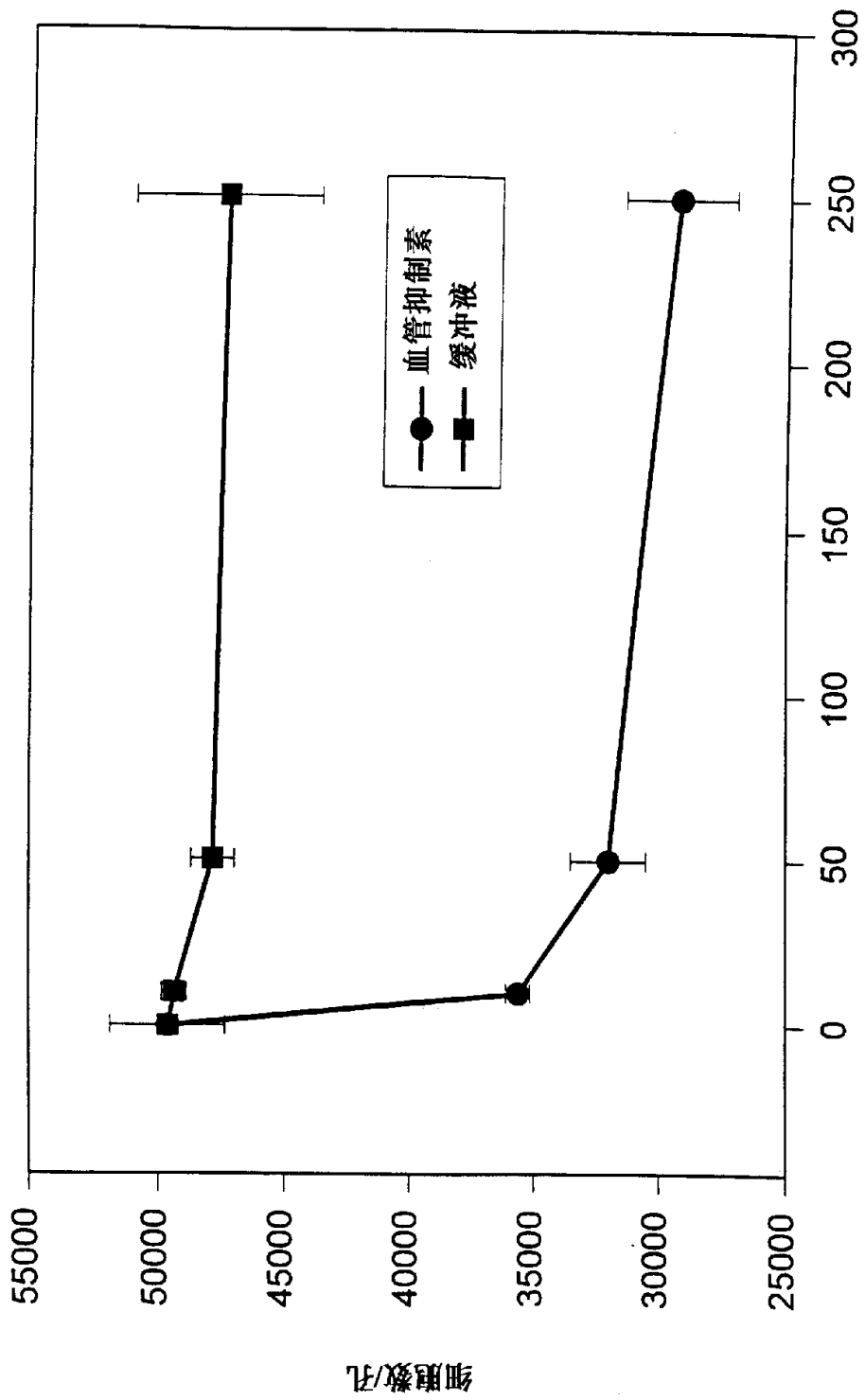


图 41



添加的血管抑制素/孔

图 42

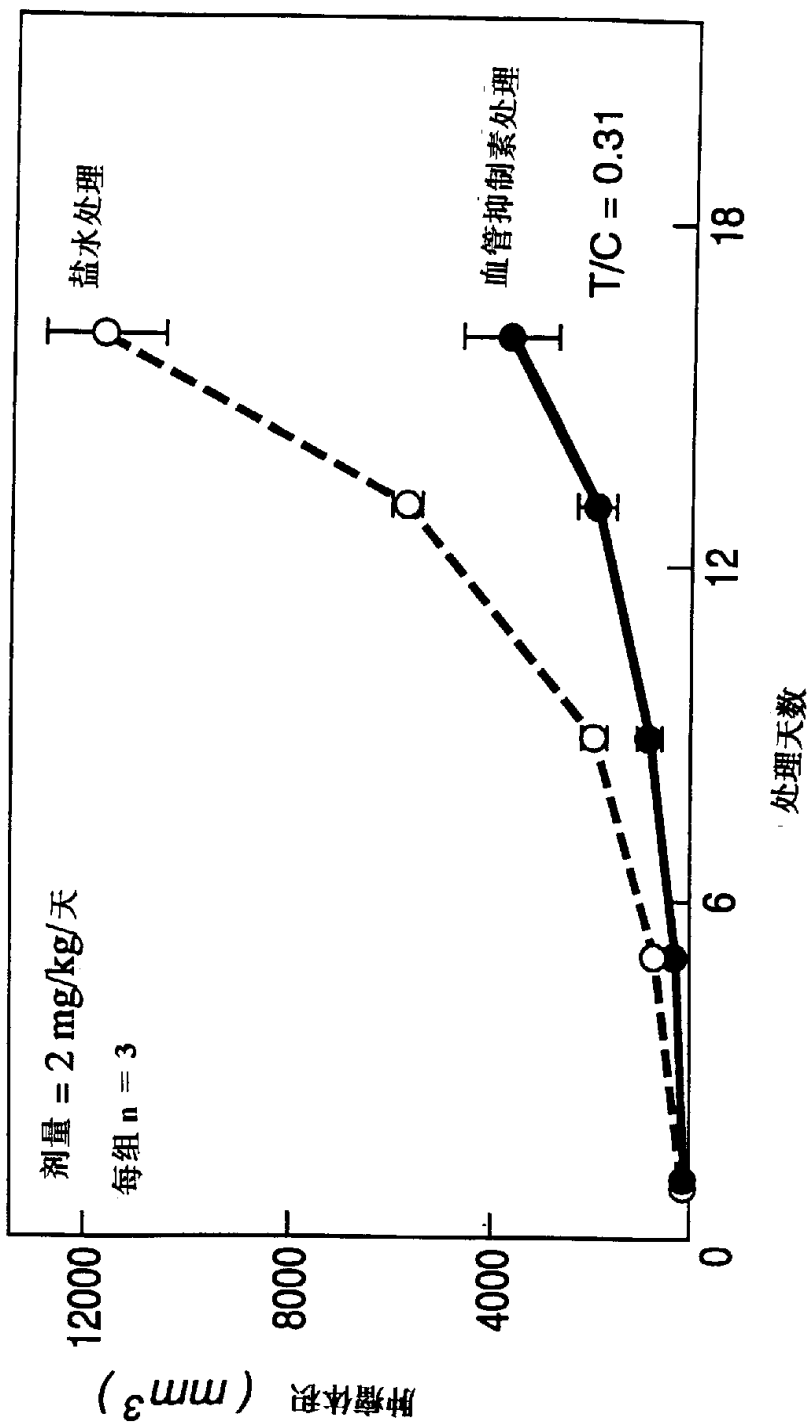


图 43

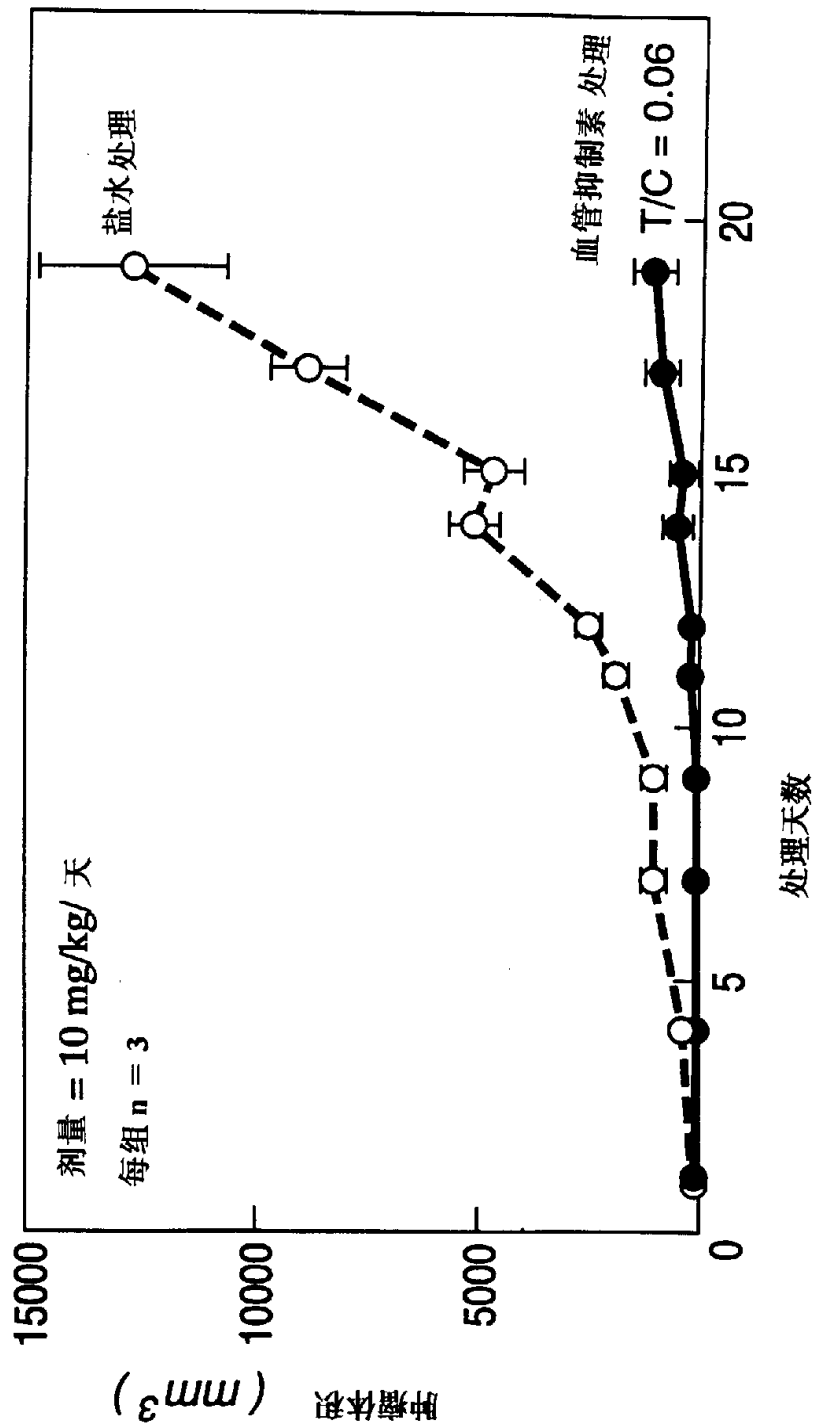


图 44