

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101269214 B

(45) 授权公告日 2013.09.04

(21) 申请号 200810099171.9

A61P 35/00(2006.01)

(22) 申请日 2001.06.22

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

PCT/US00/32678 2000.12.01 US

60/230,978 2000.09.07 US

60/213,637 2000.06.23 US

WO 99/63088 A2, 1999.12.09, 第238页第6行至第240页第5行, 图265-266.

WO 99/06550 A2, 1999.02.11, SEQ ID NO:67,345.

WO 00/53753 A2, 2000.09.14, SEQ ID NO:164,165.

(62) 分案原申请数据

01814600.7 2001.06.22

审查员 潘浩

(83) 生物保藏信息

ATCC 203091 1998.08.04

(73) 专利权人 基因技术股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 N·费拉拉 C·瓦达那伯

W·I·伍德

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张红春

(51) Int. Cl.

A61K 38/18(2006.01)

A61K 31/7088(2006.01)

权利要求书2页 说明书68页 附图43页

(54) 发明名称

EG-VEGF 核酸和多肽及使用方法

(57) 摘要

本发明针对在本文中称为 EG-VEGF 的新颖多肽, 和编码这些多肽的核酸分子。本文还提供了含有这些核酸序列的载体和宿主细胞, 含有与异源多肽序列融合的本发明多肽的嵌合多肽分子, 与本发明多肽结合的抗体和产生本发明多肽的方法。本文还提供了筛选 EG-VEGF 调节剂的方法。另外, 本文还描述了与调节细胞增殖和趋化性有关的方法和相关的治疗方法。

MRGATRVSIMLLLVTVSDCAVITGACERDVQCGAGTCCAISLWLRGLRMCTPLGREGEE
C
HPGSHKVPFFRKRKIHHTCFCLPNLLCSRFPDGRYRCSMDLKNINF

重要特征:

信号肽:
1-19

N-肉豆蔻酰基化位点:
33
35
46

1. EG-VEGF 的拮抗剂在制备治疗表达 EG-VEGF 的内分泌腺中的癌症的药物中的用途, 其中 EG-VEGF 由 SEQ ID NO :2 的氨基酸残基 20-105 组成, 并且诱导衍生自肾上腺皮质的毛细血管内皮细胞增殖, 但不诱导人脐静脉内皮细胞增殖, 其中所述 EG-VEGF 拮抗剂为抗体或反义分子。

2. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述癌症是激素依赖性癌症。

3. 如权利要求 2 所述的用途, 其中所述癌症是雄激素依赖性癌症。

4. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述癌症是卵巢癌、睾丸癌、前列腺癌或子宫癌。

5. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述拮抗剂为抗体。

6. 如权利要求 5 所述的用途, 其中所述抗体为:

a) 单链抗体;

b) 双特异性抗体;

c) 人源化抗体;

d) 人抗体;或

e) 抗体片段。

7. 如权利要求 6 所述的用途, 其中所述抗体片段是 Fab、Fab'、F(ab)₂ 或 Fv 片段。

8. 如权利要求 5 所述的用途, 其中所述抗体是多克隆的。

9. 如权利要求 5 所述的用途, 其中所述抗体是单克隆的。

10. 一种鉴定 EG-VEGF 的拮抗剂的方法, 该方法包括:

a) 使候选 EG-VEGF 抗体或针对 EG-VEGF 的反义分子与 EG-VEGF 接触;

b) 测定 EG-VEGF 诱导衍生自肾上腺皮质的毛细血管内皮细胞增殖的能力的改变,

其中 EG-VEGF 由 SEQ ID NO :2 的氨基酸残基 20-105 组成, 并且诱导衍生自肾上腺皮质的毛细血管内皮细胞增殖, 但不诱导人脐静脉内皮细胞增殖, 且

其中抑制 EG-VEGF 诱导衍生自肾上腺皮质的毛细血管内皮细胞增殖的能力的候选抗体或反义分子被鉴定为 EG-VEGF 的拮抗剂。

11. EG-VEGF 的拮抗剂在制备治疗表达 EG-VEGF 的内分泌腺中的肿瘤的药物中的用途, 其中 EG-VEGF 由 SEQ ID NO :2 的氨基酸残基 20-105 组成, 并且诱导衍生自肾上腺皮质的毛细血管内皮细胞增殖, 但不诱导人脐静脉内皮细胞增殖, 其中所述 EG-VEGF 拮抗剂为抗体或反义分子。

12. 如权利要求 11 所述的用途, 其中所述肿瘤是雄激素依赖性肿瘤。

13. 如权利要求 11 所述的用途, 其中所述肿瘤是卵巢囊肿。

14. 如权利要求 11 所述的用途, 其中所述拮抗剂为抗体。

15. 如权利要求 14 所述的用途, 其中所述抗体为:

a) 单链抗体;

b) 双特异性抗体;

c) 人源化抗体;

d) 人抗体;或

e) 抗体片段。

16. 如权利要求 15 所述的用途, 其中所述抗体片段是 Fab、Fab'、F(ab)₂ 或 Fv 片段。

17. 如权利要求 14 所述的用途, 其中所述抗体是多克隆的。

18. 如权利要求 14 所述的用途,其中所述抗体是单克隆的。
19. 如权利要求 5 或 14 所述的用途,其中所述抗体是单克隆、多克隆、单链、或抗独特型抗体或其片段的嵌合形式。
20. 权利要求 5 或 14 所述的用途,其中所述抗体是嵌合二价抗体,其中所述抗体是通过用非免疫球蛋白多肽取代抗体的恒定区或抗体的一个抗原结合位点的可变区而制备的。

EG-VEGF 核酸和多肽及使用的方法

[0001] 本申请是申请日为2001年6月22日、申请号为01814600.7、发明名称为“EG-VEGF核酸和多肽及使用的方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 发明背景

[0003] 内皮细胞

[0004] 局部微环境对血管内皮细胞的表型和生长特性有组织或器官特异性方式的深刻影响,但局部指令信号的性质基本上是未知的。有令人信服的证据证明,血管内皮生长因子(VEGF)和内皮细胞特异性生长因子的血管生成素家族对于胚胎发育和各种生理和病理环境中的血管生成是必需的[Ferrara和Alitalo, *Nature Medicine*, 5:1359-1364(1999); Carmeliet, *Nature Medicine*, 6:389-395(2000)]。对于内皮细胞表型和生长的局部、组织特异性调节,有强有力的证据[Aird等, *J. Cell. Biol.*, 138:1117-1124(1997); Stewart和Wiley, *Dev. Biol.*, 84:183-192(1981)]。内皮细胞的形态和功能特征在不同器官之间变化很大[Simionescu和Simionescu, *Cell and Tissue Biology*, Urban andSchwarzenberg, Baltimore(1988), pp. 355-398]。另外,给药的位点对新血管性质的决定程度大大超过了测试的血管生成因子的类型[Dellian等, *Am. J. Pathology*, 149:59-71(1996); Roberts等, *Am. J. Pathology*, 153:1239-1248(1998)]。该局部微环境对于脉管系统性质的影响的分子基础未知,但相信特化的间质起了主要作用[Dellian, 见上]。可以理解,可包含组织特异性分泌蛋白和细胞和胞外基质组分的刺激的整合网络,起到了决定结构和功能以及调节固有的内皮生长的作用。

[0005] 因此,目前需要鉴定和表征影响内皮细胞生长和/或分化的新颖生长和分化因子。除了增加我们对于脉管系统发育的知识以外,这些化合物可用于诊断和治疗与脉管组织有关的病症。

[0006] 激素分泌细胞

[0007] 虽然在科学和医疗中已有进展,但对于社会的内科疾病的新疗法仍有需要。一种发现新疗法的方法是研究生物体如何运作。特别是,感兴趣的是信号传递细胞如何控制生物体的行为。例如,内分泌细胞分泌信号传递分子,称为激素,其中这些激素分泌的失常可导致各种疾病。

[0008] 特化而分泌激素的细胞包括生殖腺细胞,分泌睾酮(睾丸的Leydig细胞),雌激素(卵泡的卵泡内膜细胞)和孕酮(破裂卵泡的黄体细胞)。虽然在医学领域中有各种利用外源施用睾酮、雌激素和孕酮的治疗方法,但仍需要调节产生这些激素的细胞。

[0009] 特化而分泌激素的其它细胞包括肾上腺细胞和消化系统的细胞。例如,肾上腺的细胞分泌肾上腺素、去甲肾上腺素和类固醇激素,例如盐皮质激素和糖皮质激素。特别感兴趣的是皮质醇,它是肾上腺的皮质产生的,影响许多细胞类型的代谢。消化系统的细胞包括分泌胰岛素的胰脏的那些细胞。胰岛素是由胰岛分泌的,是糖类代谢必需的。胰岛素用于治疗和控制糖尿病,然而对于有效治疗糖尿病等疾病仍有需要。其它感兴趣的肠和呼吸道激素包括血清素、内啡肽、促生长素抑制素、促胃液素、促胰液素、胆囊收缩素、胰高血糖素和铃蟾肽。

[0010] 有许多疾病和病症与激素分泌细胞有关,特别是内分泌腺内的类固醇生成内皮细胞。因此,需要鉴定特异性影响这些内皮细胞的生长因子。这些内皮细胞特异性生长因子可能是诊断和治疗与这些细胞类型有关的疾病,和鉴定用于诊断和治疗这些疾病的候选药物的有价值的工具。

[0011] 发明简述

[0012] 本发明基于鉴定和表征一种新颖的组织限制性生长和分化因子,它选择性地作用于一种内皮细胞类型。该因子称为内分泌腺衍生的血管内皮生长因子(EG-VEGF),它被发现能诱导衍生自内分泌腺的毛细血管内皮细胞增殖、迁移和开孔(fenestration),但显示对测试的多种其它内皮和非内皮细胞类型没有影响。如本文详细描述,EG-VEGF 核酸和多肽可用于许多测定,和与产激素组织有关的病况的诊断和治疗。

[0013] 在一方面,本发明涉及一种组合物,该组合物含有如本文所述的 EG-VEGF 多肽,或 EG-VEGF 多肽的激动剂或拮抗剂,以及药学上可接受的载体。在一个实施方案中,该组合物还含有血管内皮细胞生长因子(VEGF)或其激动剂或拮抗剂。

[0014] 在另一个方面,本发明提供了一种制品,该制品含有容器,容器上的标签和装在容器内的含有活性剂的组合物。活性剂选自 EG-VEGF 多肽、EG-VEGF 多肽的激动剂和 EG-VEGF 多肽的拮抗剂。容器上的标签表明组合物有效的治疗与产激素内皮组织有关的病况。在本发明该方面的一个实施方案中,病况与内分泌腺内的类固醇生成内皮细胞有关。在第二个实施方案中,组织是卵巢、睾丸、子宫颈、肾上腺、胎盘或前列腺组织。病况可优选是不育、多囊性卵巢综合征或癌。

[0015] 在另一方面,本发明提供了一种鉴定与 EG-VEGF 结合的化合物的方法。该方法包括将候选化合物与 EG-VEGF 接触,并确定候选化合物是否与 EG-VEGF 结合。在一个实施方案中,该测定是竞争性结合测定,即测定候选化合物与已知与 EG-VEGF 结合的分子竞争的能力。该测定可以是例如基于细胞的测定,其中使候选化合物与表达 EG-VEGF 编码序列的全细胞或细胞膜部分接触。

[0016] 本发明还涉及一种鉴定调节 EG-VEGF 生物活性的化合物的方法。该方法包括如下步骤:使候选化合物与 EG-VEGF 接触,并确定 EG-VEGF 的生物活性是否发生改变。在一个实施方案中,化合物抑制 EG-VEGF 的生物活性;在另一个实施方案中,化合物增强 EG-VEGF 的生物活性。生物活性可以是例如诱导与细胞增殖或存活有关的激酶磷酸化的能力。在一个优选实施方案中,激酶是 MAP 激酶,更优选 ERK1 或 ERK2。在其它实施方案中,生物活性是细胞增殖、趋化性的诱导、血管生成、细胞分化的诱导或内皮细胞开孔的诱导。和以前一样,该测定可以是例如基于细胞的测定,其中使候选分子与表达 EG-VEGF 编码序列的全细胞或细胞膜部分接触。在一个优选实施方案中,细胞是工程改造的、表达 EG-VEGF 的重组宿主细胞。另外,可以使候选分子与分离的 EG-VEGF 接触。在一个优选实施方案中,EG-VEGF 被固定在固相支持物上。

[0017] 在另一方面,本发明特别包括用上述测定之一鉴定出具有结合 EG-VEGF 或调节 EG-VEGF 生物活性的能力的化合物。

[0018] 本文还提供了一种鉴定 EG-VEGF 受体的方法。该方法包括将 EG-VEGF 和一种含有细胞膜材料的组合物混合,其中 EG-VEGF 与细胞膜材料上的受体复合,受体被鉴定为 EG-VEGF 受体。在本发明该方面的一个实施方案中,EG-VEGF 与受体结合,EG-VEGF 与受体

交联。

[0019] 本发明的另一个方面涉及一种刺激细胞或组织中生物活性的方法。这包括一种刺激细胞增殖的方法,一种诱导细胞中趋化性的方法,一种诱导产激素组织中血管生成的方法,一种诱导细胞中细胞分化的方法,和一种诱导细胞中开孔的方法。在每一种方法中,通过将细胞或组织与 EG-VEGF 或 EG-VEGF 激动剂以有效诱导所需生物活性的量接触,或通过向细胞或组织中以有效诱导生物活性的量引入编码 EG-VEGF 或 EG-VEGF 激动剂的核酸来刺激生物活性。细胞优选是内皮细胞,特别是产激素内皮细胞或组织。

[0020] 本发明还提供了通过使细胞或产激素组织与 EG-VEGF 拮抗剂以有效抑制生物活性的量接触,或通过向细胞中引入编码 EG-VEGF 拮抗剂的核酸来抑制所有所述生物活性的方法。

[0021] 本发明的另一个方面提供了治疗个体的方法。这些方法包括治疗个体的与产激素的组织有关的病症的方法,调节个体中生育力的方法,治疗个体中响应 EG-VEGF 的细胞中癌症的方法,治疗个体中生殖器官的癌症的方法,和治疗个体卵巢囊肿的方法。在本发明该方面的方法的一个实施方案中,该方法包括对个体以有效治疗病况、调节生育力、治疗癌症或治疗卵巢囊肿的量施用一种含有 EG-VEGF 或其激动剂或拮抗剂的组合物。在另一个实施方案中,方法包括对个体以有效治疗病况的量施用一种组合物,该组合物含有编码 EG-VEGF 或其激动剂或拮抗剂的核酸。在一个具体实施方案中,通过抑制卵泡成熟来调节生育力。在另一个实施方案中,通过抑制排卵来调节生育力。在另一个实施方案中,个体患有或有风险患上多囊性卵巢综合征,并调节生育力以维持生育力。要治疗的癌症可以是例如卵巢癌、睾丸癌、前列腺癌或子宫癌。

[0022] 下文所述的优选实施方案用于本发明的所有方面。

[0023] 在一个实施方案中,EG-VEGF 多肽是天然序列 EG-VEGF。在另一个实施方案中,天然序列 EG-VEGF 是人的。在另一个实施方案中,EG-VEGF 是天然序列 EG-VEGF 的片段。在另一个实施方案中,EG-VEGF 是天然序列 EG-VEGF 的氨基酸序列变体,它优选与图 2 (SEQ ID NO :2) 从约 1 或约 20 到 105 的氨基酸残基序列具有至少约 85% 的序列同一性。在另一个实施方案中,氨基酸序列变体是保守取代变体。在另一个实施方案中,EG-VEGF 是天然序列 EG-VEGF 的氨基酸序列变体的片段。在另一个实施方案中,EG-VEGF 作为融合蛋白存在。

[0024] 上述组合物和方法可进一步涉及 VEGF 多肽的使用。在一个实施方案中,VEGF 多肽是天然序列 VEGF。在另一个实施方案中,天然序列 VEGF 是人的。在另一个实施方案中,VEGF 是天然序列 VEGF 的片段。在另一个实施方案中,VEGF 是天然序列 VEGF 的氨基酸序列变体。在另一个实施方案中,氨基酸序列变体与天然序列 VEGF 的序列具有至少约 85% 的序列同一性。在另一个实施方案中,氨基酸序列变体是保守取代变体。在另一个实施方案中,VEGF 是天然序列 VEGF 的氨基酸序列变体的片段。在另一个实施方案中,VEGF 作为融合蛋白存在。

[0025] 在一个实施方案中,EG-VEGF 激动剂或 VEGF 激动剂分别是抗 EG-VEGF 抗体或抗 VEGF 抗体,特别包括抗体片段。在另一个实施方案中,EG-VEGF 或 VEGF 激动剂是小分子。

[0026] 类似的,EG-VEGF 或 VEGF 拮抗剂可以分别是例如抗 EG-VEGF 或抗 VEGF 抗体,特别包括抗体片段。在另一个实施方案中,EG-VEGF 或 VEGF 拮抗剂是小分子。

[0027] 在一个实施方案中,表达 EG-VEGF 编码序列的全细胞或细胞膜部分是工程改造

过、表达 EG-VEGF 的重组宿主细胞。

[0028] 本发明涉及以下各项：

[0029] 1. 一种组合物，该组合物含有 (a)EG-VEGF 多肽，(b)EG-VEGF 多肽的激动剂，或 (c)EG-VEGF 多肽的拮抗剂，和药物学上可接受的载体。

[0030] 2. 如项 1 所述的组合物，其中所述 EG-VEGF 多肽是天然序列 EG-VEGF。

[0031] 3. 如项 2 所述的组合物，其中所述天然序列 EG-VEGF 是人的。

[0032] 4. 如项 1 所述的组合物，其中所述激动剂或拮抗剂是抗 EG-VEGF 抗体、小分子或反义分子。

[0033] 5. 如项 1 所述的组合物，该组合物还含有血管内皮细胞生长因子 (VEGF)，或其激动剂或拮抗剂。

[0034] 6. 一种制品，该制品包括：

[0035] 容器；

[0036] 容器上的标签；和

[0037] 装在容器中的一种含有活性剂的组合物，

[0038] 其中所述活性剂选自 (a)EG-VEGF 多肽，(b)EG-VEGF 多肽的激动剂，和

[0039] (c)EG-VEGF 多肽的拮抗剂；且容器上的标签表明该组合物有效的治疗与产激素内皮组织有关的病况。

[0040] 7. 如项 6 所述的制品，其中所述病况与内分泌腺中的类固醇生成内皮细胞有关。

[0041] 8. 如项 6 所述的制品，其中所述组织是卵巢、睾丸、子宫颈、肾上腺、胎盘或前列腺组织。

[0042] 9. 如项 6 所述的制品，其中所述病况是不育、多囊性卵巢综合征或癌。

[0043] 10. 一种鉴定与 EG-VEGF 结合的化合物的方法，该方法包括：

[0044] a) 将候选化合物与 EG-VEGF 接触；和

[0045] b) 确定所述候选化合物是否与所述 EG-VEGF 结合。

[0046] 11. 如项 10 所述的方法，其中所述 EG-VEGF 是天然序列 EG-VEGF，或其氨基酸序列变体。

[0047] 12. 如项 11 所述的方法，其中所述氨基酸序列变体与图 2 (SEQ ID NO :2) 从约 1 或约 20-105 的氨基酸残基序列具有至少约 85% 的序列同一性。

[0048] 13. 如项 12 所述的方法，其中所述氨基酸序列变体是保守取代变体。

[0049] 14. 如项 10 所述的方法，其中所述 EG-VEGF 作为融合蛋白存在。

[0050] 15. 如项 10 所述的方法，其中测定所述候选化合物与已知结合 EG-VEGF 的分子竞争的能力。

[0051] 16. 如项 15 所述的方法，其中使所述候选化合物与表达 EG-VEGF 编码序列的全细胞或细胞膜部分接触。

[0052] 17. 一种鉴定调节 EG-VEGF 生物活性的化合物的方法，该方法包括如下步骤：

[0053] a) 使候选化合物与 EG-VEGF 接触，和

[0054] b) 确定所述 EG-VEGF 的生物活性的改变。

[0055] 18. 如项 17 所述的方法，其中所述化合物抑制所述 EG-VEGF 的生物活性。

[0056] 19. 如项 17 所述的方法，其中所述化合物增强所述 EG-VEGF 的生物活性。

- [0057] 20. 如项 17 所述的方法,其中所述生物活性是诱导与细胞增殖或存活有关的激酶磷酸化的能力。
- [0058] 21. 如项 20 所述的方法,其中所述激酶是 MAP 激酶。
- [0059] 22. 如项 21 所述的方法,其中所述 MAP 激酶是 ERK1 或 ERK2。
- [0060] 23. 如项 17 所述的方法,其中所述生物活性是细胞增殖活性、趋化性的诱导、血管生成、细胞分化的诱导或内皮细胞增殖的诱导。
- [0061] 24. 如项 17 所述的方法,其中使所述候选化合物与表达 EG-VEGF 编码序列的全细胞或细胞膜部分接触。
- [0062] 25. 如项 24 所述的方法,其中所述细胞是工程改造过、表达所述 EG-VEGF 的重组宿主细胞。
- [0063] 26. 如项 17 所述的方法,其中使所述候选分子与分离的 EG-VEGF 接触。
- [0064] 27. 如项 26 所述的方法,其中所述 EG-VEGF 固定在固相支持物上。
- [0065] 28. 一种用项 17-27 任一所述的方法鉴定出的化合物。
- [0066] 29. 一种鉴定 EG-VEGF 受体的方法,该方法包括将 EG-VEGF 与一种含有细胞膜材料的组合物混合,其中所述 EG-VEGF 与所述细胞膜材料上的受体复合,和鉴定所述受体为 EG-VEGF 受体。
- [0067] 30. 如项 42 所述的方法,其中 EG-VEGF 与所述受体结合,所述方法还包括使所述 EG-VEGF 与所述受体交联的步骤。
- [0068] 31. 一种诱导细胞增殖的方法,该方法包括将所述细胞与诱导所述细胞增殖的有效量的 EG-VEGF 接触。
- [0069] 32. 如项 31 所述的方法,其中所述细胞是内皮细胞。
- [0070] 33. 如项 32 所述的方法,其中所述内皮细胞是类固醇生成内皮细胞。
- [0071] 34. 如项 33 所述的方法,该方法还包括使所述细胞与 VEGF 接触。
- [0072] 35. 一种诱导细胞增殖的方法,所述方法包括以诱导细胞增殖的有效量将编码 EG-VEGF 的核酸引入所述细胞。
- [0073] 36. 如项 35 所述的方法,其中所述细胞是内皮细胞。
- [0074] 37. 如项 36 所述的方法,其中所述内皮细胞是类固醇生成内皮细胞。
- [0075] 38. 如项 36 所述的方法,该方法还包括将编码 VEGF 的核酸引入所述细胞。
- [0076] 39. 一种在细胞中诱导趋化性的方法,该方法包括使所述细胞与诱导趋化性的有效量的 EG-VEGF 接触。
- [0077] 40. 如项 39 所述的方法,其中所述细胞是内皮细胞。
- [0078] 41. 如项 40 所述的方法,其中所述细胞是类固醇生成内皮细胞。
- [0079] 42. 如项 40 所述的方法,该方法还包括使所述细胞与 VEGF 接触。
- [0080] 43. 一种在细胞中诱导趋化性的方法,该方法包括以诱导趋化性的有效量将编码 EG-VEGF 的核酸引入所述细胞。
- [0081] 44. 如项 43 所述的方法,其中所述细胞是内皮细胞。
- [0082] 45. 如项 44 所述的方法,其中所述细胞是类固醇生成内皮细胞。
- [0083] 46. 如项 45 所述的方法,该方法还包括将编码 VEGF 的核酸引入所述细胞。
- [0084] 47. 一种治疗个体与产激素组织有关的病症的方法,该方法包括对所述个体以治

疗所述病况的有效量施用含有 EG-VEGF 或其激动剂或拮抗剂,或编码 EG-VEGF 或其激动剂或拮抗剂的核酸的组合物。

[0085] 48. 如项 47 所述的方法,该方法还包括对所述个体施用 VEGF 或其激动剂或拮抗剂,或编码 VEGF 或其激动剂或拮抗剂的核酸。

[0086] 49. 一种诱导产激素组织中血管生成的方法,该方法包括使所述组织与 EG-VEGF 或其激动剂接触,或向所述组织中以诱导血管生成的有效量引入编码 EG-VEGF 或其激动剂的核酸。

[0087] 50. 如项 49 所述的方法,该方法还包括使所述组织与 VEGF 或其激动剂接触,或向所述组织中引入编码 VEGF 或其激动剂的核酸。

[0088] 51. 一种诱导细胞中细胞分化的方法,该方法包括使所述细胞与 EG-VEGF 或其激动剂接触,或向所述细胞中以诱导细胞分化的有效量引入编码 EG-VEGF 或其激动剂的核酸。

[0089] 52. 如项 51 所述的方法,该方法还包括使所述细胞与 VEGF 或其激动剂接触。

[0090] 53. 一种诱导细胞开孔的方法,该方法包括使所述细胞与 EG-VEGF 或其激动剂接触,或向所述细胞中以诱导细胞开孔的有效量引入编码 EG-VEGF 或其激动剂的核酸。

[0091] 54. 如项 53 所述的方法,其中所述细胞是内皮细胞。

[0092] 55. 如项 54 所述的方法,其中所述细胞是类固醇生成内皮细胞。

[0093] 56. 如项 54 所述的方法,该方法还包括使所述细胞与 VEGF 或其激动剂接触,或将编码 VEGF 或其激动剂的核酸引入所述细胞。

[0094] 57. 一种抑制内皮细胞增殖的方法,该方法包括将所述细胞与抑制细胞增殖的有效量的 EG-VEGF 拮抗剂接触。

[0095] 58. 一种抑制内皮细胞趋化性的方法,该方法包括将所述细胞与抑制趋化性的有效量的 EG-VEGF 拮抗剂接触。

[0096] 59. 一种抑制产激素组织中血管生成的方法,该方法包括将所述组织与抑制血管生成的有效量的 EG-VEGF 拮抗剂接触。

[0097] 60. 一种抑制细胞分化的方法,该方法包括将所述细胞与抑制细胞分化的有效量的 EG-VEGF 拮抗剂接触。

[0098] 61. 一种调节个体生育力的方法,该方法包括对所述个体施用调节生育力的有效量的 EG-VEGF 拮抗剂。

[0099] 62. 如项 61 所述的方法,其中通过抑制卵泡成熟来调节所述生育力。

[0100] 63. 如项 61 所述的方法,其中通过抑制排卵来调节所述生育力。

[0101] 64. 如项 61 所述的方法,其中所述个体患有或有风险患上多囊性卵巢综合征,并调节生育力以维持生育力。

[0102] 65. 一种治疗个体中响应 EG-VEGF 的细胞中的癌症的方法,所述方法包括对所述个体施用治疗癌症的有效量的 EG-VEGF 拮抗剂。

[0103] 66. 一种治疗个体中生殖器官癌症的方法,所述方法包括对所述个体施用抑制癌症的有效量的 EG-VEGF 拮抗剂。

[0104] 67. 如项 66 所述的方法,其中所述癌症选自卵巢癌、睾丸癌、前列腺癌和子宫癌。

[0105] 68. 如项 67 所述的方法,其中所述癌症是激素依赖性癌症。

[0106] 69. 如项 68 所述的方法,其中所述癌症是雄激素依赖性癌症。

[0107] 70. 如项 69 所述的方法,其中所述癌症是雄激素依赖性前列腺癌。

[0108] 71. 一种治疗个体中卵巢囊肿的方法,该方法包括对所述个体施用抑制囊肿生长的有效量的 EG-VEGF 拮抗剂。

[0109] 72. 一种调节内皮细胞渗透性的方法,该方法包括使所述内皮细胞与有效量的 EG-VEGF 接触。

[0110] 73. 如项 72 所述的方法,所述方法包括使所述内皮细胞接触 VEGF。

[0111] 74. 如项 72 所述的方法,其中所述细胞是肾上腺皮质的内皮细胞。

[0112] 75. 如项 72 所述的方法,其中所述细胞是卵巢的内皮细胞。

[0113] 本发明的其它实施方案和变体通过下面对本发明的详细描述将变得清楚。

[0114] 附图简述

[0115] 图 1 显示含有编码天然序列 EG-VEGF 的核苷酸序列(核苷酸 91-405)的 cDNA 的核苷酸序列(SEQ ID NO:1),其中核苷酸序列(SEQ ID NO:1)是本文中称为“cDNA60621-1516”的一个克隆。粗体和下划线分别是起始和终止密码子的位置。

[0116] 图 2 显示衍生自 SEQ ID NO:1 的编码序列的天然序列 EG-VEGF 多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。还显示了各个其它重要多肽结构域的大致位置。

[0117] 图 3A-D 显示用下述的方法测定氨基酸序列同一性百分数(图 3A-B)和核酸序列同一性百分数(图 3C-D)的假设例,使用 ALIGN-2 序列比较计算机程序,其中“PRO”代表感兴趣的假设 EG-VEGF 多肽的氨基酸序列,“比较蛋白”代表与感兴趣的“PRO”多肽比较的多肽的氨基酸序列,“PRO-DNA”代表感兴趣的假设 EG-VEGF 编码核酸序列,“比较 DNA”代表与感兴趣的“PRO-DNA”核酸分子比较的核酸分子的核苷酸序列,“X”、“Y”和“Z”各代表不同的假设氨基酸残基,“N”、“L”和“V”各代表不同的假设核苷酸。

[0118] 图 4 显示本文称为 DNA56748 的核苷酸序列(SEQ ID NO:3)。

[0119] 图 5A-5F 显示卵巢中的 EG-VEGF 原位表达。图 5A 和 5B 显示 2 岁黑猩猩卵巢,其中图 5A 显示苏木精-曙红染色,图 5B 显示使用 FITC 的 EG-VEGF 表达。图 5C 和 5D 显示猕猴卵巢,其中图 5C 显示苏木精-曙红染色,图 5D 显示使用 FITC 的 EG-VEGF 表达。图 5E 和 5F 显示黑猩猩间质卵巢,其中图 5E 显示苏木精-曙红染色,图 5F 显示使用 FITC 的 EG-VEGF 表达。

[0120] 图 6A-D 显示在冷冻和石蜡包埋的人卵巢中的肌动蛋白和 EG-VEGF 原位表达。图 6A 显示苏木精-曙红染色,图 6B 显示使用 FITC 的 EG-VEGF 表达。图 6C 显示苏木精-曙红染色,图 6D 显示使用 FITC 的 EG-VEGF 表达。

[0121] 图 7A 显示在具有子宫脱垂的 46 岁妇女卵巢中的 EG-VEGF 原位表达的放射自显影图,图 7B 显示同一卵巢的苏木精-曙红染色。

[0122] 图 8A-D 显示肾上腺中的 EG-VEGF 原位表达。图 8A 和 8B 显示使用 DAPI 鉴定核酸,图 8C 和 8D 显示使用 FITC 鉴定蛋白质。

[0123] 图 9 原位杂交研究揭示了在人睾丸中,EG-VEGF 转录限于产睾酮 Leydig 细胞(小图 A-D)。E, F) EG-VEGF 信号在人卵巢间质中被描述为血管周围(K, L)细胞中是普遍的。在黑猩猩卵巢中证明非常相似的模式(数据未显示)。G, H) 在人血体(corpus hemorrhagicum)中检测到强信号。在人(I, J)和黑猩猩(M, N, O, P)正发育的卵泡中,EG-VEGF RNA 在卵泡

膜和粒层细胞 – 都是类固醇生成细胞类型,和卵丘 (cumulus oorphous) 中表达。A、C、E、G、I、K、M、O 是亮视野图像, B、D、F、H、J、L、N、P 是相应的暗视野图像。箭头指向血管路线。

[0124] 图 10A-C 分别是位移图和 scatchard 图,显示牛肾上腺皮质毛细血管内皮细胞 (ACE) 的 ^{125}I -EG-VEGF-his 配体结合分析。

[0125] 图 11A-B 分别是位移图和 scatchard 图,显示 MS-1,衍生自内分泌腺脏的小鼠内皮细胞系的 ^{125}I -EG-VEGF-his 配体结合分析。图 11C 显示人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 中 EG-VEGF-his 配体结合分析。

[0126] 图 12A-E 显示柱状图,表明使用 1nM、10nM 或 25nM 浓度的对照、bFGF、VEGF 或 EG-VEGF 的细胞相对增殖。图 12A 显示用周细胞的结果。图 12B 显示用人主动脉血管平滑肌细胞 (HA-VSMC) 的结果。图 12C 显示用幼仓鼠肾成纤维细胞 (BHK21) 的结果。图 12D 显示用 ACE 的结果。图 12E 显示用牛脑毛细血管内皮细胞 (BBC) 的结果。

[0127] 图 13 显示 EG-VEGF 是特定内皮细胞的促分裂原和化学引诱物。小图 a 显示在 ACE 培养物中,EG-VEGF 在 2nM 时诱导最大有丝分裂反应,ED₅₀ 是 0.2nM。小图 b 显示用几种内皮细胞类型:HUVEC、HMVEC、BBC、ABAE 的增殖测定的结果。小图 c 显示用非内皮细胞类型:人主动脉血管平滑肌细胞 (VSMC)、周细胞和成纤维细胞 (BHK21) 和人新生儿成纤维细胞 (hfb) 和角质形成细胞的增殖测定的结果。基础培养基作为阴性对照 (Ct);bFGF (F)、EGF (E) 或 VEGF (V),分别以 5.5 和 10ng/ml 加入作为阳性对照。以 1、10 和 100nM 测定 EG-VEGF。小图 d 显示 EG-VEGF 在 ACE 细胞、原代狒狒肾上腺内皮细胞 (BAEC) 和 MS-1 中,而不是在 HUVEC 中诱导趋化性反应。各图是代表性实验。数据是平均值,带有表示标准偏差的误差条,增殖或迁移指数相对于任意定为值 1 的阴性对照。小图 e-g 说明 EG-VEGF 诱导肾上腺皮质衍生的毛细血管内皮细胞中的开孔 (fenestration)。用 2.5nM VEGF、10nM EG-VEGF 或两种因子的组合处理在 ECM 上生长到汇合的 ACE。未处理 (小图 e)、用 VEGF (小图 f) 或 EG-VEGF (小图 g) 处理的 ACE 细胞的电子显微镜照片揭示两种分子都能诱导开孔。箭头表示膜孔的位置。表明了放大倍数 (e 和 f 微米;g 纳米)。

[0128] 图 14A 和 14B 显示对照中的相对内皮细胞迁移,VEGF 或 EG-VEGF 的浓度为 0.2nM、0.5nM、1nM 或 5nM。

[0129] 图 15 显示 MAP 激酶 Erk1 和 2 在接触 EG-VEGF 后的磷酸化。

[0130] 图 16A-C 显示 EG-VEGF cDNA 和氨基酸序列,以及与同源蛋白质的对比。图 16A 显示 1.4kb 人 EG-VEGF cDNA 序列。1.4kb 人 EG-VEGF cDNA 编码 105 个氨基酸的蛋白质,具有 19 个氨基酸的经典信号序列 (下划线),和 86 个氨基酸的成熟蛋白质。一级蛋白质结构的惊人特征是半胱氨酸含量,可能形成 5 个二硫键的 10 个残基。图 16B 显示人 EG-VEGF、人 Bv8 同源物 (SEQ ID NO :4) 和蛇 VPRA (SEQ ID NO :5) 的序列对比。加框的残基表示同一性。图 16C 是人 EG-VEGF、人 dickkopf-3 (hdkk3, SEQ ID NO :6)、爪蟾 dkk-1 (xdkk1, SEQ ID NO :7) 和猪辅脂肪酶 (col, SEQ ID NO :8) 的对比。对比表明形成该蛋白质结构域的特征性二硫键键合模式 – 辅脂肪酶折叠的保守半胱氨酸。EG-VEGF 中的该基序与人 dkk-3 富含半胱氨酸的 C-末端结构域有 37% 相同,有 41% 同源;与爪蟾 dkk-1 结构域有 32% 相同,有 42% 同源。数字表示各蛋白质中的氨基酸位置,加框的残基与 EG-VEGF 相同。

[0131] 图 17A-B 说明 EG-VEGF 的缺氧调节。图 17A 显示来自接触正常氧 (22% O₂) 对缺氧 (2% O₂) 条件 18 小时的 SW13 (实心框) 和 H295 (空心框) 肾上腺癌细胞的 RNA 的 Taqman

分析,揭示与正常氧对照相比,SW13和H295R中的EG-VEGF转录分别增加了275%和210%,比较而言VEGF增加了350%和252%。VEGF和EG-VEGF数据对肌动蛋白标准化。图17B显示正常氧(空心框)对缺氧(实心框)条件下的HRE萤光素酶活性。萤光素酶报道子和载体的活性对共转染的Renilla萤光素酶标准化。在缺氧条件下,Epo共有序列和EG-VEGF构建物的诱导比它们各自的正常氧对照高约3.4倍。Epo突变体和EG-VEGF突变体中核心序列的突变消除了对缺氧条件的反应,得到与载体对照相似的活性。

[0132] 图18显示EG-VEGF表达的Northern印迹分析。人RNA样品的Northern印迹分析揭示了约1.4kb的单一转录物。在卵巢和睾丸中表达最高,然后是肾上腺和胎盘。较长接触后明显的较不丰富的信号存在于前列腺中。通过与对照肌动蛋白探针杂交评估了等量的RNA荷载(数据未显示)。印迹上方表明了泳道的内容,右方表明了大小(kb)。

[0133] 图19a-n说明EG-VEGF体内血管生成作用的选择性。小图a-c显示大鼠角膜袋测定的结果。注意VEGF蛋白诱导强的血管生成反应,而EG-VEGF基本无作用。小图d-f显示在裸鼠骨骼肌(sm)中注射adCMV-lacZ、AdCMV-VEGF₁₆₄或AdCMV-EG-VEGF(5×10^8 pfu)得到的结果。楔形指向标记注射位点的微球体,箭头指向新血管。注意VEGF诱导的有大量新血管形成的血管生成反应,而lacZ和EG-VEGF Av都没有可察觉的作用。小图g-h显示VEGF和EG-VEGF Av在小鼠耳中注射的结果。另外,VEGF Av导致强的血管生成反应,它不存在于用EG-VEGF Av注射的动物中(d-h的标尺是100微米)。小图i显示在注射LacZ(ct)VEGF或EG-VEGF Av后7天卵巢(ov)的总体表现(标尺=0.5cm)。注意VEGF和EG-VEGF组中大得多的团块(mass)和浅表血管和出血区域的存在。小图j-n是注射Av载体(5×10^8 pfu)的卵巢的显微照片,如表明的那样。注意j中lacZ卵巢的正常结构和形态。表明了黄体(CL)。相反,VEGF(k)和EG-VEGF(l)组显示非常相似的改变,具有大的充液或出血囊状区域(*) (j-l中的标尺是1毫米)。小图m-n分别是k和l中加框区域的高倍显微照片(标尺=33微米)。在囊性病变区域周围有明显的强血管生成区域。箭头指向血管。

[0134] 图20A-Q提供了ALIGN-2序列比较计算机程序的完整源代码。该源代码可常规汇编用于UNIX操作系统,以提供ALIGN-2序列比较计算机程序。

[0135] 优选例的详述

[0136] I. 定义

[0137] 除非另外说明,本文所用的技术和科学术语与本发明所属技术领域的一般技术人员通常理解的具有相同含义。见例如Singleton等,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 第二版, J. Wiley&Sons (New York, NY1994); Sambrook等, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY 1989)。为了本发明的目的,下文定义了以下术语。

[0138] 当用于本文时,术语“EG-VEGF多肽”、“EG-VEGF蛋白”和“EG-VEGF”(和先前使用的用于描述相同多肽的“VRPA多肽”、“VRPA蛋白”和“VRPA”)包括天然序列EG-VEGF和EG-VEGF多肽变体(在本文中进一步限定)。EG-VEGF多肽可以分离自各种来源,例如人组织类型或其它来源,或通过重组和/或合成方法制备。

[0139] “天然序列EG-VEGF”包括与天然衍生的EG-VEGF具有相同氨基酸序列的多肽。这些天然序列EG-VEGF可分离自天然或可以通过重组和/或合成方法产生。术语“天然序列EG-VEGF”特别包括EG-VEGF的天然存在的截短或分泌的形式(例如胞外结构域序列)、天

然存在的变体形式（例如可变剪切的形式）和天然存在的等位变体。在本发明的一个实施方案中，天然序列EG-VEGF是成熟或全长的天然序列EG-VEGF，其含有图2(SEQ ID NO:2)的氨基酸1-105。另外，虽然图2(SEQ ID NO:2)中公开的EG-VEGF多肽显示从本文称为氨基酸位置1的甲硫氨酸残基开始，可想象和可能图2(SEQ ID NO:2)中位于氨基酸位置1的上游或下游的另一甲硫氨酸残基可以用作EG-VEGF多肽的起始氨基酸残基。

[0140] “EG-VEGF变体多肽”指下文限定的活性EG-VEGF多肽，它与(a)图2(SEQ ID NO:2)中所示的EG-VEGF多肽的残基1或约20-105，(b)图2(SEQ ID NO:2)中所示的EG-VEGF多肽的X-105，其中X是从图2(SEQ ID NO:2)的14-24的任何氨基酸残基，或(c)图2(SEQ ID NO:2)中所示的氨基酸序列的另一特别衍生片段的氨基酸序列具有至少约80%的氨基酸序列同一性。这种EG-VEGF变体多肽包括例如这样的EG-VEGF多肽，其中在图2(SEQ ID NO:2)的序列的N和/或C末端，以及一个或多个内部结构域内，添加或删除一个或多个氨基酸残基。一般，EG-VEGF变体多肽和(a)图2(SEQ ID NO:2)中所示的EG-VEGF多肽的残基1或约20-105，(b)图2(SEQ ID NO:2)中所示的EG-VEGF多肽的X-105，其中X是从图2(SEQ ID NO:2)的14-24的任何氨基酸残基，或(c)图2(SEQ ID NO:2)中所示的氨基酸序列的另一特别衍生片段具有至少约80%的氨基酸序列同一性，更优选至少约81%的氨基酸序列同一性，更优选至少约82%的氨基酸序列同一性，更优选至少约83%的氨基酸序列同一性，更优选至少约84%的氨基酸序列同一性，更优选至少约85%的氨基酸序列同一性，更优选至少约86%的氨基酸序列同一性，更优选至少约87%的氨基酸序列同一性，更优选至少约88%的氨基酸序列同一性，更优选至少约89%的氨基酸序列同一性，更优选至少约90%的氨基酸序列同一性，更优选至少约91%的氨基酸序列同一性，更优选至少约92%的氨基酸序列同一性，更优选至少约93%的氨基酸序列同一性，更优选至少约94%的氨基酸序列同一性，更优选至少约95%的氨基酸序列同一性，更优选至少约96%的氨基酸序列同一性，更优选至少约97%的氨基酸序列同一性，更优选至少约98%的氨基酸序列同一性，更优选至少约99%的氨基酸序列同一性。EG-VEGF变体多肽不包括天然EG-VEGF多肽序列。一般EG-VEGF变体多肽至少长约10个氨基酸，通常至少长约20个氨基酸，更通常至少长约30个氨基酸，更通常至少长约40个氨基酸，更通常至少长约50个氨基酸，更通常至少长约60个氨基酸，更通常至少长约70个氨基酸，更通常至少长约80个氨基酸，更通常至少长约90个氨基酸，更通常至少长约100个氨基酸，更通常至少长约150个氨基酸，更通常至少长约200个氨基酸，更通常至少长约250个氨基酸，更通常至少长约300个氨基酸，或更长。

[0141] 与本文鉴定的EG-VEGF多肽序列有关的“氨基酸序列同一性百分数(%)”定义为在序列对比和必要时引入缺口以实现最大序列同一性百分数后，且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分，候选序列中与EG-VEGF序列中氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分数。可用本领域技术范围内的各种方法实现为测定氨基酸序列同一性百分数而进行的对比，例如使用公开可得到的计算机软件，例如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定适于测定对比的参数，包括任何实现对所比较序列全长的最大对比所需的算法。然而为了本文的目的，如下所述使用序列比较计算机程序ALIGN-2获得%氨基酸序列同一性值，其中图20提供了ALIGN-2程序的完整源代码。ALIGN-2序列比较计算机程序是由Genetech, Inc编写的，图20中所示的源代码已与

用户记录提交给了美国版权局,华盛顿哥伦比亚特区,20559,其中它注册为美国版权登记号 TXU5 10087。ALIGN-2 程序通过 Genetech Inc., South San Francisco, California 可公开得到,或可以从本文所提供的源代码汇编。ALIGN-2 程序应汇编用于 UNIX 操作系统,优选数码 UNIX V4.00。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程序设定,不改变。

[0142] 为了本文的目的,给定氨基酸序列 A 对、与、或相对于给定氨基酸序列 B 的 %氨基酸序列同一性(可另外表述为给定氨基酸序列 A 具有或包含对、与、或相对于给定氨基酸序列 B 的一定的 %氨基酸序列同一性)计算如下:

[0143] X/Y 分数 $\times 100$ 其中 X 是序列对比程序 ALIGN-2 在该程序的 A 和 B 对比中评分为相同匹配的氨基酸残基数,而 Y 是 B 中氨基酸残基总数。应理解,当氨基酸序列 A 的长度不等于氨基酸序列 B 的长度时, A 对 B 的 %氨基酸序列同一性不等于 B 对 A 的 %氨基酸序列同一性。作为 %氨基酸序列同一性计算的例子,图 3A-B 表明如何计算称为“比较蛋白”的氨基酸序列对称为“PRO”的氨基酸序列的 %氨基酸序列同一性。

[0144] 除非另外说明,本文所用的所有 %氨基酸序列同一性值是如上所述用 ALIGN-2 序列比较计算机程序获得的。然而, %氨基酸序列同一性也可用序列比较程序 NCBI-BLAST2(Altschul 等, Nucleic Acids Res. 25:33 89-3402(1997)) 确定。可从 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 下载 NCBI-BLAST2 序列比较程序。NCBI-BLAST2 使用几种检索参数,其中所有检索参数设定为默认值,包括例如未遮掩=是,链=全部,期望发生=10,最小低复杂性长度=15/5,多通过 e 值=0.01,多通过常数=25,最终缺口对比的降低(dropoff)=25,评分矩阵=BLOSUM62。

[0145] 在使用 NCBI-BLAST2 用于氨基酸序列比较的情况中,给定氨基酸序列 A 对、与、或相对于给定氨基酸序列 B 的 %氨基酸序列同一性(可另外表述为给定氨基酸序列 A 具有或包含对、与、或相对于给定氨基酸序列 B 的一定的 %氨基酸序列同一性)计算如下:

[0146] X/Y 分数 $\times 100$ 其中 X 是序列对比程序 NCBI-BLAST2 在该程序的 A 和 B 对比中评分为相同匹配的氨基酸残基数,而 Y 是 B 中氨基酸残基总数。应理解,当氨基酸序列 A 的长度不等于氨基酸序列 B 的长度时, A 对 B 的 %氨基酸序列同一性不等于 B 对 A 的 %氨基酸序列同一性。

[0147] “EG-VEGF 变体多核苷酸”或“EG-VEGF 变体核酸序列”指下文限定的编码活性 EG-VEGF 多肽的核酸分子,它与 (a) 编码图 2(SEQ ID NO:2) 中所示的 EG-VEGF 多肽的残基 1 或约 20-105 的核酸序列, (b) 编码图 2(SEQ ID NO:2) 中所示的 EG-VEGF 多肽的 X-105 的核酸序列,其中 X 是图 2(SEQ ID NO:2) 的 14-24 的任何氨基酸残基,或 (c) 编码图 2(SEQ ID NO:2) 中所示的氨基酸序列的另一特别衍生片段的核酸序列具有至少约 80%的核酸序列同一性。一般,EG-VEGF 变体多核苷酸与 (a) 编码图 2(SEQ ID NO:2) 中所示的 EG-VEGF 多肽的残基 1 或约 20-105 的核酸序列, (b) 编码图 2(SEQ ID NO:2) 中所示的 EG-VEGF 多肽的 X-105 的核酸序列,其中 X 是图 2(SEQ ID NO:2) 的 14-24 的任何氨基酸残基,或 (c) 编码图 2(SEQ ID NO:2) 中所示的氨基酸序列的另一特别衍生片段的核酸序列具有至少约 80%的核酸序列同一性,更优选至少约 81%的核酸序列同一性,更优选至少约 82%的核酸序列同一性,更优选至少约 83%的核酸序列同一性,更优选至少约 84%的核酸序列同一性,更优选至少约 85%的核酸序列同一性,更优选至少约 86%的核酸序列同一性,更优选至少约 87%的核酸序列同一性,更优选至少约 88%的核酸序列同一性,更优选至少约 88%

的核酸序列同一性,更优选至少约 89%的核酸序列同一性,更优选至少约 90%的核酸序列同一性,更优选至少约 91%的核酸序列同一性,更优选至少约 92%的核酸序列同一性,更优选至少约 93%的核酸序列同一性,更优选至少约 94%的核酸序列同一性,更优选至少约 95%的核酸序列同一性,更优选至少约 96%的核酸序列同一性,更优选至少约 97%的核酸序列同一性,更优选至少约 98%的核酸序列同一性,更优选至少约 99%的核酸序列同一性。EG-VEGF 变体多核苷酸不包括天然 EG-VEGF 核苷酸序列。

[0148] 一般,EG-VEGF 变体多核苷酸至少长约 30 个核苷酸,更通常至少长约 60 个核苷酸,更通常至少长约 90 个核苷酸,更通常至少长约 120 个核苷酸,更通常至少长约 150 个核苷酸,更通常至少长约 180 个核苷酸,更通常至少长约 210 个核苷酸,更通常至少长约 240 个核苷酸,更通常至少长约 270 个核苷酸,更通常至少长约 300 个核苷酸,更通常至少长约 450 个核苷酸,更通常至少长约 600 个氨基酸,更通常至少长约 900 个核苷酸,或更长。

[0149] 与本文鉴定的 EG-VEGF 多肽编码核酸序列有关的“核酸序列同一性百分数(%)”定义为在序列对比和必要时引入缺口以实现最大序列同一性百分数后,候选序列中与 EG-VEGF 多肽编码核酸序列中核苷酸相同的核苷酸的百分数。可用本领域技术范围内的各种方法实现为测定核酸序列同一性百分数而进行的对比,例如使用公开可得到的计算机软件,例如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可确定适于测定对比的参数,包括任何实现对所比较序列全长的最大对比所需的算法。然而为了本文的目的,如下所述使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 获得%核酸序列同一性值,其中下文提供了 ALIGN-2 程序的完整源代码。ALIGN-2 序列比较计算机程序是由 Genetech, Inc. 编写的,下文所示的源代码已与用户记录提交给了美国版权局,华盛顿哥伦比亚特区,20559,其中它注册为美国版权登记号 TXU510087。ALIGN-2 程序通过 Genetech Inc., South San Francisco, California 可公开得到,或可以从下文所提供的源代码汇编。ALIGN-2 程序应汇编用于 UNIX 操作系统,优选数码 UNIX V4.00。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程序设定,不改变。

[0150] 为了本文的目的,给定核酸序列 C 对、与、或相对于给定核酸序列 D 的%核酸序列同一性(可另外表述为给定核酸序列 C 具有或包含对、与、或相对于给定核酸序列 D 的一定的%核酸序列同一性)计算如下:

[0151] $W/Z \text{ 分数} \times 100$ 其中 W 是序列对比程序 ALIGN-2 在该程序的 C 和 D 对比中评分为相同匹配的核苷酸数,而 Z 是 D 中核苷酸总数。应理解,当核酸序列 C 的长度不等于核酸序列 D 的长度时,C 对 D 的%核酸序列同一性不等于 D 对 C 的%核酸序列同一性。作为%核酸序列同一性计算的例子,图 3C-D 表明如何计算称为“比较 DNA”的核酸序列对称为“PRO-DNA”的核酸序列的%核酸序列同一性。

[0152] 除非另外说明,本文所用的所有%核酸序列同一性值是如上所述用 ALIGN-2 序列比较计算机程序获得的。然而,%核酸序列同一性也可用序列比较程序 NCBI-BLAST2 (Altschul 等, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)) 确定。可从 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 下载 NCBI-BLAST2 序列比较程序。NCBI-BLAST2 使用几种检索参数,其中所有检索参数设定为默认值,包括例如未遮掩=是,链=全部,期望发生=10,最小低复杂性长度=15/5,多通过 e 值=0.01,多通过常数=25,最终缺口对比的降低=25,评分矩阵=BLOSUM62。

[0153] 在使用 NCBI-BLAST2 用于序列比较的情况中,给定核酸序列 C 对、与、或相对于给定核酸序列 D 的%核酸序列同一性(可另外表述为给定核酸序列 C 具有或包含对、与、或相对于给定核酸序列 D 的一定的%核酸序列同一性)计算如下:

[0154] W/Z 分数 $\times 100$ 其中 W 是序列对比程序 NCBI-BLAST2 在该程序的 C 和 D 对比中评分为相同匹配的核苷酸数,而 Z 是 D 中核苷酸总数。应理解,当核酸序列 C 的长度不等于核酸序列 D 的长度时,C 对 D 的%核酸序列同一性不等于 D 对 C 的%核酸序列同一性。

[0155] 在其它实施方案中,EG-VEGF 变体多核苷酸是编码活性 EG-VEGF 多肽的核酸分子,它能够,优选在严谨杂交和洗涤条件下,与编码图 2(SEQ IDNO :2) 所示的全长 EG-VEGF 多肽的核苷酸序列杂交。EG-VEGF 变体多肽可以是 EG-VEGF 变体多核苷酸编码的。

[0156] 在如上所述进行的氨基酸序列同一性比较的情况下,术语“正”不仅包括所比较序列中相同的氨基酸残基,还包括具有相似性质的氨基酸残基。对于感兴趣的氨基酸残基评分为正直的氨基酸残基,或是与感兴趣的氨基酸残基相同,或是感兴趣的氨基酸残基的优选取代(如下文表 1 所定义的)。

[0157] 为了本文的目的,给定氨基酸序列 A 对、与、或相对于给定氨基酸序列 B 的%正值(可另外表述为给定氨基酸序列 A 具有或包含对、与、或相对于给定氨基酸序列 B 的一定的%正值)计算如下:

[0158] X/Y 分数 $\times 100$ 其中 X 是序列对比程序 ALIGN-2 在该程序的 A 和 B 对比中评分为正直的氨基酸残基数,而 Y 是 B 中氨基酸残基总数。应理解,当氨基酸序列 A 的长度不等于氨基酸序列 B 的长度时,A 对 B 的%正值不等于 B 对 A 的%正值。

[0159] 当用于描述本文公开的各种多肽时,“分离的”指从其天然环境一种成分中已鉴定并分离和/或回收的多肽。优选分离的多肽不与所有其天然相关成分有关。其天然环境的污染成分是通常影响多肽的诊断或治疗用途的物质,可以包括酶、激素、蛋白质或非蛋白质溶质。在优选实施方案中,多肽可纯化到(1)使用转杯式测序仪足够获得至少 15 个残基的 N 末端或内部氨基酸序列的程度,或(2)用考马斯蓝或优选银染色,在非还原或还原条件下通过 SDS-PAGE 到均一。分离的多肽包括重组细胞内的原位多肽,因为 EG-VEGF 天然环境中的至少一种成分不存在。然而,一般通过至少一个纯化步骤制备分离的多肽。

[0160] “分离的”编码 EG-VEGF 多肽的核酸分子是这样的核酸分子,它从一般在 EG-VEGF 编码核酸的天然来源中与之相关的至少一种污染性核酸分子中鉴定和分离出来。优选分离的核酸不与所有其天然相关成分有关。分离的 EG-VEGF 编码核酸分子不是天然发现的形式或背景。因此,分离的核酸分子不同于如其在天然细胞中存在那样的 EG-VEGF 编码核酸分子。然而,编码 EG-VEGF 多肽的分离核酸分子包括原本表达 EG-VEGF 的细胞中所含的 EG-VEGF 编码核酸分子,其中例如,该核酸分子处于与天然细胞不同的染色体位置中。

[0161] 术语“控制序列”指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的 DNA 序列。适合原核细胞的控制序列包括例如启动子,可任选的操纵基因序列,和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。

[0162] 当核酸与另一核酸序列具有功能性关系时,它是“可操作连接”的。例如,前序列或分泌前导序列的 DNA 与多肽的 DNA 可操作连接,如果它作为参与多肽分泌的前蛋白表达;启动子或增强子与编码序列可操作连接,如果它影响序列的转录;或核糖体结合位点与编码序列可操作连接,如果它的定位促进翻译。通常,“可操作性连接”意指连接的 DNA 序列是

邻接的,和在分泌前导序列的情况下,邻接且可读状态的。然而增强子不必要邻接。连接是通过在便利的限制性位点连接实现的。如果不存在这些位点,根据常规实践用合成的寡核苷酸衔接头或接头。

[0163] 术语“抗体”以最广义使用,特别包括例如单一抗 EG-VEGF 单克隆抗体(包括激动性、拮抗性、和中和性抗体),具有多表位特异性的抗 EG-VEGF 抗体组合物,单链抗 EG-VEGF 抗体和抗 EG-VEGF 抗体的片段(见下文)。本文所用的术语“单克隆抗体”指从一群基本同质的抗体(即组成该群的单个抗体是相同的,除了可能有少量存在的天然发生突变)获得的抗体。

[0164] 本领域普通技术人员不难测定杂交反应的“严谨性”,通常是根据探针长度、洗涤温度和盐浓度的经验计算的。一般,较长的探针需要较高的温度用于正确退火,而较短的探针需要较低的温度。杂交通常依赖于在低于其解链温度的环境中存在互补链时,变性的 DNA 重新退火的能力。探针和可杂交序列之间所需同源性的程度越高,可使用的相对温度越高。结果,较高的相对温度可使得反应条件更严谨,而较低的温度严谨性较低。对于杂交反应严谨性的其它细节和解释,见 Ausubel 等, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers(1995)。

[0165] 本文所限定的“严谨条件”或“高严谨条件”可定义为:(1) 洗涤使用低离子强度和高温度,例如 0.015M 氯化钠 /0.0015M 柠檬酸钠 /0.1% 十二烷基硫酸钠, 50°C ;(2) 在杂交过程中使用变性剂,例如甲酰胺,例如 50% (v/v) 甲酰胺和 0.1% 牛血清清蛋白 /0.1% Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯烷酮 /50mM 磷酸钠缓冲液, pH6.5, 具有 750mM 氯化钠, 75mM 柠檬酸钠, 42°C ;或 (3) 使用 50% 甲酰胺, 5×SSC(0.75M NaCl, 0.075M 柠檬酸钠), 50mM 磷酸钠 (pH6.8), 0.1% 焦磷酸钠, 5×Denhardt 氏溶液, 超声处理的鲑鱼精 DNA (50g/ml), 0.1% SDS 和 10% 硫酸葡聚糖, 42°C, 42°C 在 0.2×SSC(氯化钠 / 柠檬酸钠) 和 50% 甲酰胺中洗涤, 55°C, 然后 55°C 在含有 EDTA 的 0.1×SSC 中进行高严谨性洗涤。

[0166] 可如 Sambrook 等, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, New York :Cold Spring Harbor Press, 1989 所述限定“中等严谨条件”,包括使用比上述较不严谨的洗涤溶液和杂交条件(如温度、离子强度和% SDS)。中等严谨条件的例子是 37°C 在溶液中过夜温育,该溶液含有:20% 甲酰胺、5×SSC(150mM NaCl、15mM 柠檬酸三钠)、50mM 磷酸钠 (pH7.6)、5×Denhardt 氏溶液、10% 硫酸葡聚糖和 20mg/ml 变性剪切的鲑鱼精 DNA,然后在约 37-50°C 1×SSC 中洗涤滤膜。技术人员将认识到如何调节温度、离子强度等,这是配合探针长度等因素必需的。

[0167] 本文所用的术语“表位标记的”指嵌合多肽,其含有与“标签多肽”融合的 EG-VEGF 多肽。标签多肽具有足够的残基,以提供可针对其制备抗体的表位,但足够短,从而不影响与其融合的多肽的活性。标签多肽优选还相当独特,使抗体基本不与其它表位起交叉反应。合适的标签多肽通常具有至少 6 个氨基酸残基,通常在约 8-50 个氨基酸残基之间(优选约 10-20 个氨基酸残基之间)。

[0168] 本文所用的术语“免疫粘附素”指抗体样分子,它联合了异源蛋白(“粘附素”)的结合特异性和免疫球蛋白恒定区的效应物功能。结构上免疫粘附素包含具有所需结合特异性(与抗体的抗原识别和结合位点不同(即“异源”))的氨基酸序列,和免疫球蛋白恒定区序列的融合物。免疫粘附素分子的粘附素部分通常是邻接氨基酸序列,其至少含有受体或

配体的结合位点。可从任何免疫球蛋白,例如 IgG-1、IgG-2、IgG-3 或 IgG-4 亚型、IgA (包括 IgA-1 和 IgA-2)、IgE、IgD 或 IgM 中获得免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定区序列。

[0169] 为了本文的目的,“有活性的”或“活性”指 EG-VEGF 保留天然或天然存在 EG-VEGF 的生物和 / 或免疫活性的形式,其中“生物”活性指天然或天然存在 EG-VEGF 除了诱导针对天然或天然存在 EG-VEGF 所具有的抗原性表位的抗体产生的能力外的其它生物学功能(抑制或刺激)，“免疫”活性指诱导针对天然或天然存在 EG-VEGF 所具有的抗原性表位的抗体产生的能力。生物活性特别包括细胞增殖和趋化性的调节。优选的生物活性是调节内皮细胞的产生、生长、分化和 / 或迁移的能力。甚至更优选的,生物活性是诱导内分泌腺中的毛细血管内皮细胞,优选类固醇生成细胞增殖、迁移和 / 或开孔的能力。另一种优选生物活性是在内分泌腺中,尤其在内分泌腺的类固醇生成组织中促进血管生成和 / 或调节血管渗透性的能力。另一种优选生物活性是诱导参与细胞增殖和 / 或存活的信号传递分子,例如 MAP 激酶(如 ERK1 或 ERK2)的磷酸化的能力。

[0170] 术语“血管生成”(angiogenesis)以最广义使用,特别包括从现有血管形成新血管,正如内皮祖细胞通过迁移、增殖、细胞-细胞聚集、装配和形态发生从头装配成血管(也称为“血管发生”(vasculogenesis))。

[0171] 术语“拮抗剂”以最广义使用,包括任何部分或完全阻断、抑制或中和本文公开的天然 EG-VEGF 多肽的生物活性的分子。以类似方式,术语“激动剂”以最广义使用,包括任何模仿本文公开的天然 EG-VEGF 多肽的生物活性的分子。合适的激动剂或拮抗剂分子特别包括激动性或拮抗性抗体或抗体片段,天然 EG-VEGF 多肽的片段或氨基酸序列变体,肽,小有机分子等。鉴定 EG-VEGF 多肽的激动剂或拮抗剂的方法可以包括将 EG-VEGF 多肽与候选激动剂或拮抗剂分子接触,测定与 EG-VEGF 多肽通常有关的一种或多种生物活性中可检测的改变。

[0172] “治疗”指治疗性处理和预防性或防范性措施,其中目标是防止或缓解(减轻)目标病况或疾病。需要治疗的包括已患有疾病的,以及易于患有疾病的或要预防疾病的。例如在肿瘤(如癌症)治疗中,一种治疗剂可直接降低肿瘤细胞的病态,或使肿瘤细胞对于其它治疗剂,例如辐射和 / 或化疗的治疗更敏感。

[0173] “类固醇生成”是“类固醇生成细胞”中类固醇激素生物合成的激素诱导的、CAMP 介导的急性调节,其特征是胆固醇从细胞储藏中移动到线粒体外膜,其转位到内膜,在那里胆固醇转化为孕烯醇酮。

[0174] “类固醇生成组织”指通过类固醇生成的作用产生类固醇激素的组织。例子包括肾上腺、生殖器官、肠和呼吸道组织的组织。

[0175] “长期”给药指相对于急促方式的连续方式给药,从而在较长一段时间内维持最初的疗效(活性)。“间歇”给药指不是连续不间断进行的治疗,但性质通常是循环的。

[0176] 为了治疗目的,“哺乳动物”指任何分类为哺乳动物的动物,包括人,其它高等灵长类、家畜和农畜,和动物园、运动场或宠物动物,例如犬、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、家兔等。优选哺乳动物是人。

[0177] 本文所用的“肿瘤”指所有肿瘤性细胞生长和增殖,不论恶性还是良性,以及所有癌前和癌性细胞和组织。

[0178] 术语“癌症”和“癌性的”指或描述哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长为特征

的生理情况。本文特别感兴趣的癌症的例子包括生殖器官的癌症,例如卵巢癌、睾丸癌、子宫癌、子宫颈癌;前列腺癌;肾上腺癌,包括肾上腺皮质(例如肾上腺皮质癌)和肾上腺髓质的癌;甲状腺癌;甲状旁腺癌;胰腺癌;和子宫内膜癌。

[0179] 疾病的“病理”包括所有影响病人健康的现象。对于癌症,这包括但不限于异常或失控的细胞生长、转移、影响邻近细胞的正常功能、细胞因子或其它分泌产物以异常水平释放、炎症或免疫应答的抑制或强化等。

[0180] 与一种或多种其它治疗剂“联合”给药包括同时和以任何顺序依次施用。

[0181] 本文所用的“载体”包括药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,它们对于与其接触的细胞或哺乳动物在所使用的剂量和浓度是无毒的。通常生理学上可接受的载体是水相 pH 缓冲溶液。生理学上可接受的载体的例子包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(小于约 10 个残基)多肽;蛋白质,例如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它糖类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如 EDTA;糖醇,例如甘露糖醇或山梨糖醇;成盐的反荷离子,例如钠;和/或非离子表面活性剂,例如 TWEEN™、聚乙二醇(PEG)和 PLURONICS™。

[0182] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段;双抗体;线性抗体(Zapata 等, Protein Eng. 8(10):1057-1062[1995]);单链抗体分子;和抗体片段形成的多特异性抗体。

[0183] 用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,各具有一个抗原结合位点,和剩余的“Fc 片段”,该命名反映了容易结晶的能力。木瓜蛋白酶处理得到 F(ab')₂ 片段,它具有两个抗原结合位点,仍然能交联抗原。

[0184] “Fv”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该区域由紧密非共价结合的一个重链可变区和一个轻链可变区的二聚体构成。正是在这种构象中各可变区的三个 CDR 相互作用,在 VH-VL 二聚体的表面上形成抗原结合位点。六个 CDR 共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而,甚至一个可变区(或仅含有对抗原特异的三个 CDR 的半个 Fv)也能识别和结合抗原,虽然比整个结合位点的亲和力要低。

[0185] Fab 片段还含有轻链的恒定区和重链的第一恒定区(CH1)。Fab 片段与 Fab' 片段不同,它加入了重链 CH1 结构域的羧基末端的几个残基,其中包括来自抗体绞链区的一个或多个半胱氨酸。Fab' -SH 在本文中命名其中恒定区的半胱氨酸残基携带一个自由巯基的成对 Fab'。F(ab')₂ 抗体片段最初是作为在彼此之间存在绞链半胱氨酸的 Fab' 片段产生的。还已知抗体片段的其它化学偶联。

[0186] 任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可分为两种完全不同的类型,称为 κ 和 λ,基于其恒定区的氨基酸序列。

[0187] 根据其重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可分为不同的类别。有五大类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,这些中的几类还可以进一步分成亚类(同种型):例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。

[0188] “单链 Fv”或“sFv”抗体片段包含抗体的 VH 和 VL 结构域,其中这些结构域存在于一条多肽链中。优选 Fv 多肽还在 VH 和 VL 结构域之间具有多肽接头,使得 sFv 形成抗原结合所需的结构。有关 sFv 的综述,见 Pluckthun 的 The Pharmacology of

Monoclonal Antibodies, 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编, Spring-Verlag, New York, pp. 269-315(1994)。

[0189] 术语“双抗体”(diabodies)指有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段包含在同一多肽链(V_H-V_L)中与轻链可变区(V_L)连接的重链可变区(V_H)。通过使用短至使同一链上两结构域之间无法配对的接头,结构域被迫与另一链的互补结构域配对,并形成两个抗原结合位点。例如欧洲专利 404,097 ;W093/11161 ;和 Hollinger 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :6444-6448(1993)中对双抗体有更为全面的论述。

[0190] “分离的”抗体是自其天然环境组份鉴定和分离和 / 或回收的抗体。其天然环境中的污染组份是指会干扰所述抗体的诊断或治疗性用途的物质,可包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。在优选实施方案中,抗体纯化至(1)经 Lowry 法测定,按重量计抗体纯度高于 95%,最优选高于 99%,(2)其纯度足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N 末端或内部氨基酸序列,或者(3)用考马斯蓝或最优选银染色法,在还原或非还原条件下 SDS-PAGE 测定达到均一。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为该抗体的天然环境的至少一种组份是不存在的。但是,通常分离的抗体是经至少一个纯化步骤制备的。

[0191] 词语“标记物”在此指直接或间接与抗体偶联的可检测化合物或组合物,以便产生“标记的”抗体。标记物自身可以被检测到(例如放射性同位素标记物或荧光标记物),或者,在酶标记物的情况下,它们可催化化合物或组合物底物发生可检测的化学改变。

[0192] “固相”指本发明抗体可粘附于其上的非水性基质。固相的例子在此包括:部分或完全由玻璃(例如可控孔径玻璃)、多糖(例如琼脂糖)、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇和硅氧烷构成的固相。在某些实施方案中,根据上下文,固相可包括测试板的孔;而在其它实施方案中,可以是纯化柱(例如亲和层析柱)。该术语还包括离散的颗粒构成的不连续固相,如美国专利 No. 4,275,149 中所述的。

[0193] “脂质体”是由各种脂类、磷脂和 / 或表面活性剂构成的小囊泡,通常可用来向哺乳动物投递药物(例如 EG-VEGF 多肽或其抗体)。脂质体的组份通常排列成双层结构,与生物膜的脂排列类似。

[0194] “小分子”在本文中限定为具有低于约 500 道尔顿的分子量。

[0195] 本文所用的术语“血管内皮生长因子”、“VEGF”、“VEGF 多肽”和“VEGF 蛋白”包括天然序列 VEGF 和 VEGF 变体(在本文中进一步限定)。VEGF 多肽可分离自各种来源,例如人组织类型或其它来源,或通过重组和 / 或合成方法制备。

[0196] “天然序列 VEGF”包括与天然衍生的 VEGF 具有相同氨基酸序列的多肽。这种天然序列 VEGF 可分离自天然或可以通过重组和 / 或合成方法产生。术语“天然序列 VEGF”特别包括 VEGF 的天然存在的截短或分泌的形式(例如胞外结构域序列)、天然存在的变体形式(例如可变剪接的形式)和天然存在的等位变体。在本发明的一个实施方案中,天然序列 VEGF 是 5 种已知的同种型之一,分别由 121、145、165、189 和 206 个氨基酸构成,例如美国专利号 5,332,671 和 5,240,848 ;PCT 出版号 W098/10071 ;Leung 等,Science 246 :1306-1309(1989) ;和 Keck 等,Science 246 :1309-1312(1989) 所述。

[0197] “VEGF 变体多肽”意指下文所定义的活性 VEGF 多肽,与天然序列 VEGF 的氨基酸序列具有至少约 80%,优选至少约 85%,更优选至少约 90%,甚至更优选至少约 95%,最优选至少约 98%氨基酸序列同一性。该 VEGF 变体多肽包括例如如下 VEGF 多肽,其中在天然序

列的 N- 和 / 或 C- 末端和一个或多个内部结构域中添加或删除一个或多个氨基酸残基。

[0198] 用对 EG-VEGF 特别描述的方法确定 VEGF 的序列同一性（氨基酸或核酸）。类似的，对于 EG-VEGF 的激动剂和拮抗剂（包括但不限于抗体）提供的定义，也适用于 VEGF 的激动剂和拮抗剂。

[0199] II. 发明的组合物和方法

[0200] A. 全长 EG-VEGF 序列

[0201] 本发明提供了新鉴定和分离的编码如下多肽的核苷酸序列，该多肽在本申请中称为 EG-VEGF（或 UNQ600）。特别是，鉴定和分离了编码 EG-VEGF 多肽的 cDNA，在下文实施例中进一步详细公开。应注意在不同表达轮次中产生的蛋白质可得到不同的 PRO 号，但对于任何给定的 DNA 和编码的蛋白质 UNQ 号是独特的，不会改变。然而为了简便起见，在本说明书中 DNA60621-1516 编码的蛋白质和上述 EG-VEGF 定义中包括的其它天然同源物和变体都称为“EG-VEGF”，不论其来源或制备方式。

[0202] 如下文实施例公开的，本文称作 DNA60621-1516 的 cDNA 克隆已保藏在 ATCC。本领域技术人员使用本领域的常规方法，通过对保藏的克隆测序不难确定克隆的实际核苷酸序列。预测的氨基酸序列可用常规技术从核苷酸序列确定。对于本文所述的 EG-VEGF 多肽和编码核酸，申请人鉴定了认为是用目前可获得的序列信息能最好鉴定出的阅读框。

[0203] 用上述 ALIGN-2 序列对比计算机程序，发现全长天然序列 EG-VEGF（图 2 和 SEQ ID NO :2 所示）具有与 EG-VEGF_DENPO，一种来自黑树眼镜蛇（mambo venom）的蛋白质的某些氨基酸序列同一性。然而未揭示与任何已知哺乳动物蛋白质的显著序列同一性。

[0204] B. EG-VEGF 变体

[0205] 除了本文所述的全长天然序列 EG-VEGF 多肽，考虑可制备 EG-VEGF 变体。通过在 EG-VEGF DNA 中引入合适的核苷酸改变，和 / 或通过合成所需的 EG-VEGF 多肽可制备 EG-VEGF 变体。本领域技术人员应理解氨基酸变动可改变 EG-VEGF 的翻译后加工，例如改变糖基化位点的数目或位置，或改变膜锚定特征。

[0206] 本文所述的在天然全长序列 EG-VEGF 或在 EG-VEGF 各结构域中的变异，可用例如任何列出的保守和非保守突变的技术和指导（例如美国专利号 5,364,934）制备。变异可以是取代、删除或插入一个或多个编码 EG-VEGF 的密码子，导致 EG-VEGF 的氨基酸序列与天然序列 EG-VEGF 相比有改变。可任选的，变异是通过在 EG-VEGF 的一个或多个结构域中用任何其它氨基酸取代至少一个氨基酸。通过比较 EG-VEGF 的序列和同源已知蛋白质分子的序列，并将高度同源区中产生的氨基酸序列改变数减到最少，可得到确定插入、取代或删除哪个氨基酸残基，而所需活性没有不利影响的指导。氨基酸取代可以用另一种具有相似结构和 / 或化学性质的氨基酸取代一种氨基酸，例如用丝氨酸取代亮氨酸，即保守氨基酸置换的结果。插入或删除可任选的在约 1-5 个氨基酸的范围内。可通过在序列中系统地产生插入、删除或取代氨基酸，并对得到的变体测试全长或成熟天然序列所显示的活性，可确定允许的变异。

[0207] 本文提供了 EG-VEGF 多肽片段。例如，当与全长天然蛋白质比较时，这些片段可在 N- 末端或 C- 末端截短，或缺少内部残基。一些片段缺少对于 EG-VEGF 多肽的所需生物活性不必的氨基酸残基。

[0208] 可用许多常规技术的任一种制备 EG-VEGF 片段。可化学合成所需的肽片段。另一

种方法涉及通过酶消化,例如通过用已知在特定氨基酸确定的位点切割蛋白质的酶处理蛋白质,或通过用合适的限制酶消化 DNA,并分离所需的片段,产生 EG-VEGF 片段。另一种合适的技术涉及通过聚合酶链式反应 (PCR) 分离和扩增编码所需多肽片段的 DNA 片段。在 PCR 中,在 5' 和 3' 引物处使用确定 DNA 片段所需末端的寡核苷酸。优选 EG-VEGF 多肽片段与图 2 (SEQ ID NO :2) 所示的天然 EG-VEGF 多肽共享至少一种生物和 / 或免疫活性。

[0209] 在具体实施方案中,表 1 中显示感兴趣的保守取代,题为优选的取代。如果这种取代导致生物活性的改变,那么可引入更显著的变化,即表 1 中指出的“示范的取代”、或进一步按下面氨基酸类型引入取代,然后筛选产物。

[0210] 表 1

[0211]

最初的残基	示范的取代	优选的取代
Ala(A)	val ;leu ;ile	val
Arg(R)	lys ;gln ;asn	lys
Asn(N)	gln ;his ;lys ;arg	gln
Asp(D)	Glu	glu
Cys(C)	Ser	ser
Gln(Q)	Asn	asn
Glu(E)	Asp	asp
Gly(G)	pro ;Ala	ala
His(H)	asn ;gln ;lys ;arg	arg
Ile(I)	leu ;val ;met ;ala ;phe ;正亮氨酸	leu
Leu(L)	正亮氨酸 ;ile ;val ;met ;ala ;phe	ile
Lys(K)	arg ;gln ;asn	arg

[0212]

Met(M)	leu ;phe ;ile	leu
Phe(F)	leu ;val ;ile ;ala ;tyr	leu
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr

Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr ;phe	tyr
Tyr (Y)	trp ;phe ;thr ;ser	phe
Val (V)	ile ;leu ;met ;phe ;ala ;正亮氨酸	leu

[0213] 对 EG-VEGF 的功能或免疫同一性的实质性修饰,可以通过选择在下列方面的效应上差别明显的取代而实现:(a) 维持取代区域中多肽骨架的结构,例如折叠片或螺旋构象,(b) 维持靶位置处分子的电荷或疏水性,或(c) 维持侧链体积。根据共同的侧链特性,天然存在的残基被分成下列几类:

[0214] (1) 疏水的:正亮氨酸,met,ala,val,leu,ile;

[0215] (2) 中性亲水的:cys,ser,thr;

[0216] (3) 酸性的:asp,glu;

[0217] (4) 碱性的:asn,gln,his,lys,arg;

[0218] (5) 影响链取向的残基:gly,pro;和

[0219] (6) 芳香族的:trp,tyr,phe

[0220] 非保守取代需要用这些类别中一类的一个成员替换另一类的。这些取代的残基也可被引入保守取代位点,或更优选的,引入剩余(非保守)位点。

[0221] 可用本领域已知的方法,例如寡核苷酸介导的(定点)诱变、丙氨酸扫描,和 PCR 诱变产生变异。定点诱变 [Carter 等, Nucl. Acids. Res. 13 :4331(1986); Zoller 等, Nucl. Acids. Res. 10 :6487(1987)], 盒式诱变 [Wells 等, Gene, 34 :315(1985)], 限制性选择诱变 [Wells 等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317 :415(1986)] 或其它已知的技术可在克隆的 DNA 上进行,以产生 EG-VEGF 变体 DNA。

[0222] 也可用扫描氨基酸分析来鉴定沿邻接序列的一个或多个氨基酸。在优选的扫描氨基酸中有较小、中性的氨基酸。这些氨基酸包括丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸和半胱氨酸。丙氨酸通常是该组中优选的扫描氨基酸,因为它消除了 β -碳上的侧链,较难改变变体的主链构象 [Cunningham 和 Wells, Science, 244 :1081-1085(1989)]。丙氨酸通常也是优选的,因为它是最常见的氨基酸。另外,它常常在包埋和暴露的位置被发现 [Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N. Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150 :1(1976)]。如果丙氨酸取代不产生足够数量的变体,可使用等排的(isosteric)氨基酸。

[0223] C. EG-VEGF 的修饰

[0224] 在本发明的范围内包括 EG-VEGF 的共价修饰。一类共价修饰包括使 EG-VEGF 多肽的靶氨基酸残基与有机衍生剂反应,该衍生剂能够与 EG-VEGF 中所选的侧链或 N- 或 C- 末端残基反应。用双功能剂衍生用于例如,将 EG-VEGF 与水不溶性支持物基质或表面交联,用于纯化抗 EG-VEGF 抗体的方法,反之亦然。常用的交联剂包括例如 1,1-二(重氮乙酰基)-2-苯乙烷、戊二醛、N-羟基琥珀酰亚胺酯,例如与 4-叠氮水杨酸形成的酯,同双功能亚氨酸酯,包括二琥珀酰亚胺酯,例如 3,3'-二硫代二(琥珀酰亚胺丙酸酯),双功能马来酰亚胺,例如二-N-马来酰亚氨基-1,8-辛烷,和试剂,例如甲基-3-[(对叠氮苯基)二硫

代] 丙酰亚胺酸酯。

[0225] 其它修饰包括谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基残基的脱酰胺, 分别形成相应的谷氨酰基和天冬氨酰基残基, 脯氨酸和赖氨酸的羟化, 丝氨酸或苏氨酸残基的羟基磷酸化, 赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链氨基的甲基化 [T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], N-末端胺的乙酰化和任何 C-末端羧基的酰胺化。

[0226] 包括在本发明范围内的 EG-VEGF 多肽的共价修饰的另一种类型包括改变多肽的天然糖基化模式。“改变天然糖基化模式”在本文中意指去除天然序列 EG-VEGF 中发现的一个或多个糖类部分(通过除去潜在的糖基化位点或通过用化学和/或酶方法去除糖基化), 和/或添加一个或多个在天然序列 EG-VEGF 中不存在的糖基化位点。另外, 该词组包括天然蛋白质糖基化中的定性改变, 涉及存在的各种糖类部分中性质和比例的改变。

[0227] 在 EG-VEGF 多肽中添加糖基化位点, 可通过改变氨基酸序列来实现。可通过例如在天然序列 EG-VEGF 中添加或取代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基而实现改变(对于 O-连接的糖基化位点而言)。可任选通过 DNA 水平的改变, 特别是通过使编码 EG-VEGF 多肽的 DNA 在预选的碱基处突变, 以致产生的密码子将翻译成所需氨基酸, 由此改变 EG-VEGF 氨基酸序列。

[0228] 另一种增加 EG-VEGF 多肽上的糖类部分的数目的方法是通过将糖苷与多肽化学或酶偶联。这些方法在本领域中有所描述, 例如在 W087/05330 (1987 年 9 月 11 日出版) 和 Aplin 和 Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981) 中。

[0229] 可通过化学方法或酶方法, 或通过突变取代编码作为糖基化目标的氨基酸残基的密码子, 实现除去 EG-VEGF 多肽上存在的糖类部分。化学去糖基化技术是本领域已知的, 并且如 Hakimuddin 等, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) 和 Edge 等, *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981) 所述。对多肽上糖类部分的酶切割可用各种内切和外切糖苷酶实现, 如 Thotakura 等, *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987) 所述。

[0230] 另一种类型的 EG-VEGF 共价修饰包括将 EG-VEGF 多肽与各种非蛋白聚合物之一偶联, 例如聚乙二醇 (PEG)、聚丙二醇或聚氧化亚烷基, 其方法描述于美国专利 No. 4, 640, 835; 4, 496, 689; 4, 301, 144; 4, 670, 417; 4, 791, 192; 或 4, 179, 337 中。

[0231] 本发明的 EG-VEGF 还可以通过形成嵌合分子来修饰, 嵌合分子包括与另一种异源多肽或氨基酸序列融合的 EG-VEGF。

[0232] 在一个实施方案中, 这种嵌合分子包括 EG-VEGF 与标记多肽的融合体。标记多肽提供了抗标记抗体可选择性结合的表位。表位标记通常置于 EG-VEGF 的氨基末端或羧基末端。可用针对标记多肽的抗体检测该 EG-VEGF 表位标记形式的存在。另外, 提供表位标记使得易于通过使用抗标记抗体或其它类型的与表位标记结合的亲和基质, 通过亲和纯化来纯化 EG-VEGF。各种标记多肽及其相应的抗体是本领域已知的。例子包括聚组氨酸 (poly-his) 或聚-组氨酸-甘氨酸 (poly-his-gly) 标记; flu HA 标记多肽及其抗体 12CA5 (Field 等, *Mol. Cell. Biol.* 8:2159-2165 (1988)); c-myc 标记及其抗体 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和 9E10 (Evan 等, *Mol. Cell. Biol.* 5:3610-3616 (1985)); 和单纯疱疹病毒糖蛋白 D (gD) 标记及其抗体 (Paborsky 等, *Protein Engineering* 3(6):547-553 (1990))。其它标记多肽包括 Flag-肽 [Hopp 等, *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; KT3 表位肽 [Martin

等, *Science*, 255 :192-194(1992)]; 微管蛋白表位肽 [Skinner 等, *J. Biol. Chem.*, 266 : 15163-15166(1991)]; 和 T7 基因 10 蛋白肽标记 [Lutz-Freyermuth 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 :6393-6397(1990)]。

[0233] 在备选实施方案中, 嵌合分子可包括 EG-VEGF 与免疫球蛋白或免疫球蛋白特定区域的融合体。对于嵌合分子(也称为“免疫粘附素”)的二价形式, 该融合体可以是 IgG 分子的 Fc 区域。Ig 融合体优选包括用 EG-VEGF 多肽的可溶性(跨膜结构域缺失或灭活的)形式取代 Ig 分子内的至少一个可变区。在一个特定优选实施方案中, 免疫球蛋白融合体包括 IgG1 分子的绞链、CH2 和 CH3, 或绞链、CH1、CH2 和 CH3 区。对于免疫球蛋白融合体的产生, 另见 1995 年 6 月 27 日发布的美国专利号 5, 428, 130。

[0234] D. EG-VEGF 的制备

[0235] 下文描述主要涉及通过培养用含有 EG-VEGF 核酸的载体转化或转染的细胞产生 EG-VEGF。当然, 考虑本领域熟知的可用于制备 EG-VEGF 的其它方法。例如, EG-VEGF 序列或其部分, 可通过用固相技术的直接肽合成来产生[见例如 Stewart 等, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA(1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85 :2149-2154(1963)]。可用手工技术或自动化进行体外蛋白质合成。可用例如 Applied Biosystems 肽合成仪 (Foster City, CA), 根据厂商说明书实现自动化合成。可分别化学合成 EG-VEGF 的各部分, 然后用化学或酶方法联合, 以产生全长 EG-VEGF。

[0236] 1. 编码 EG-VEGF 的 DNA 的分离

[0237] 可从认为具有 EG-VEGF mRNA, 并以可检测水平表达它的组织制备的 cDNA 文库中获得编码 EG-VEGF 的 DNA。因此, 可方便地从人组织制备的 cDNA 文库中获得人 EG-VEGF DNA, 如实施例所述。还可从基因组文库或通过已知合成方法(例如自动化核酸合成)获得编码 EG-VEGF 的基因。

[0238] 可用设计用于鉴定感兴趣的基因或其编码的蛋白质的探针(例如 EG-VEGF 的抗体或至少约 20-80 个碱基的寡核苷酸)筛选文库。可用标准方法, 例如 Sambrook 等, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, (New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 所述的, 用所选探针筛选 cDNA 或基因组文库。另一种分离编码 EG-VEGF 的基因的方法是使用 PCR 法 [Sambrook, 见上 ;Dieffenbach 等, *PCR Primer :A Laboratory Manual* (ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

[0239] 下面的例子描述了筛选 cDNA 文库的技术。选择作为探针的寡核苷酸序列应该足够长, 足够明确, 使假阳性最小化。优选标记的寡核苷酸, 从而在与筛选的文库中的 DNA 杂交后能被检测。标记方法是本领域熟知的, 包括使用放射性标记物, 例如 ³²p 标记的 ATP、生物素化或酶标记。Sambrook 等, 见上中提供了杂交条件, 包括中等严谨性和高严谨性。

[0240] 在这些文库筛选方法中鉴定的序列可与保藏并在公众数据库, 例如 GenBank 或其它私人序列数据库中可得的其它已知序列比较和对比。可用本领域已知和本文所述的方法确定分子限定区域内或跨越全长序列上的序列同一性(在氨基酸或核苷酸水平)。

[0241] 可通过用本文首次公开的推测氨基酸序列筛选所选的 cDNA 或基因组文库, 然后如需要, 用 Sambrook 等, 见上所述的常规引物延伸法检测可能未反转录成 cDNA 的 mRNA 前体和加工中间物获得具有蛋白质编码序列的核酸。

[0242] 2. 宿主细胞的选择和转化

[0243] 用为了 EG-VEGF 生产的本文所述的表达和克隆载体转染或转化宿主细胞,并在为了诱导启动子、选择转化子、或扩增编码所需序列的基因适当改变的常规营养培养基中培养。本领域技术人员不需要过度实验就能选择培养条件,例如培养基、温度、pH 等。一般使细胞培养物的生产率最大化的原理、方案和实践技术可在 *Mammalian Cell Biotechnology : a Practical Approach*, M. Butler 编 (IRL Press, 1991) 和 Sambrook, 见上中发现。

[0244] 对于本领域一般技术人员来说,真核细胞转染和原核细胞转化的方法是已知的,例如 CaCl_2 、 CaPO_4 、脂质体介导的和电穿孔。由所用的宿主细胞而定,采用对这些细胞合适的标准技术进行转化。使用氯化钙的钙处理,如 Sambrook 等,见上,或电穿孔通常用于原核细胞。用根瘤土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 感染用于转化一些植物细胞,如 Shaw 等, *Gene*, 23 :315 (1983) 和 1989 年 6 月 29 日公开的 W0 89/05859 所述。对于没有这些细胞壁的哺乳动物细胞,可使用 Graham 和 van der Eb, *Virology* 52 :456-457 (1978) 的磷酸钙沉淀法。哺乳动物细胞宿主系统转染的一般方面在美国专利号 4, 399, 216 中已有描述。通常根据 Van Solingen 等, *J. Bact.*, 130 :946 (1977) 和 Hsiao 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 :3829 (1979) 的方法进行酵母的转化。然而,可使用其它将 DNA 引入细胞的方法,例如核显微注射、电穿孔、细菌原生质体与完整细胞融合,或聚阳离子,例如 polybrene、聚鸟氨酸。对于转化哺乳动物细胞的各种技术,见 Keown 等, *Methods in Enzymology*, 185 :527-537 (1990) 和 Mansour 等, *Nature*, 336 :348-352 (1988)。

[0245] 用于在本文的载体中克隆或表达 DNA 的合适宿主细胞包括原核细胞、酵母或高等真核细胞。合适的原核细胞包括但不限于真细菌,例如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如肠杆菌科如大肠杆菌。各种大肠杆菌菌株是公开可得的,例如大肠杆菌 K12 菌株 MM294 (ATCC 31, 446); 大肠杆菌 X1776 (ATCC 31, 537); 大肠杆菌 W3110 (ATCC 27, 325) 和 K5 772 (ATCC 53, 635)。其它合适的原核宿主细胞包括肠杆菌科,例如如埃希氏杆菌属 (*Escherichia*) (如大肠杆菌)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、克雷伯氏杆菌属 (*Klebsiella*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 如粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*)、和志贺氏菌属 (*Shigella*), 以及芽胞杆菌属 (*Bacilli*) 如枯草杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽胞杆菌 (*B. licheniformis*) (如 1989 年 4 月 12 日出版的 DD 266, 710 中所公开的地衣芽胞杆菌 41P)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 如绿脓假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*)。这些例子仅仅是例示性的,并不起限制作用。菌株 W3110 是一种特别优选的宿主或亲本宿主,因为它是重组 DNA 产物发酵的常用宿主菌株。优选宿主细胞分泌最小量的蛋白水解酶。例如,菌株 W3110 可改变成影响编码对宿主内源的蛋白质的基因中的基因突变,这些宿主的例子是大肠杆菌 W3110 菌株 1A2,它具有完整的基因型 tonA; 大肠杆菌 W3110 菌株 9E4,具有完整的基因型 tonA ptr3; 大肠杆菌 W3110 菌株 27C7 (ATCC 55, 244),具有完整的基因型 tonA ptr3 phoAE15(argF-lac)169 degP ompT kan^r; 大肠杆菌 W3110 菌株 37D6,具有完整的基因型 tonA ptr3 phoAE15(argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r; 大肠杆菌 W3110 菌株 40B4,是具有非卡那霉素抗性 degP 缺失突变的菌株 37D6; 和 1990 年 8 月 7 日发布的美国专利号 4, 946, 783 中公开的具有突变周质蛋白酶的大肠杆菌菌株。另外,克隆的体外方法,例如 PCR 或其它核酸聚合酶反应是合适的。

[0246] 除了原核细胞,真核微生物,例如丝状真菌或酵母也是适用于 EG-VEGF 编码载体的克隆或表达宿主。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是低级真核宿主微生物中常用的。其他包括粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach 和 Nurse, *Nature*, 290 :140[1981]; EP 139,383,1985 年 5 月 2 日出版); 克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 宿主 (美国专利号 4,943,529; Fler 等, *Bio/Technology*, 9 :968-975(1991)), 如乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt 等, *J. Bacteriol.*, 154(2) :737-742[1983])、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克曼氏克鲁维酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、沃尔特氏克鲁维酵母 (*K. waltii*) (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilae*) (ATCC 36,906; Van den Berg 等, *Bio/Technology*, 8 :135(1990))、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*) 和马克斯克鲁维酵母 (*K. marxianus*); 耶罗威亚酵母属 (*Yarrowia*) (EP 402,226); 巴士德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070; Sreekrishna 等, *J. Basic Microbiol.*, 28 :265-278[1988]); 假丝酵母属 (*Candida*); 瑞氏木霉 (*Trichoderma reesia*) (EP244,234); 粗糙脉孢霉 (*Neurospora crassa*) (Case 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 :5259-5263[1979]); 许旺氏酵母属 (*Schwanniomyces*), 如许旺氏酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*) (EP 394,538,1990 年 10 月 31 日出版); 和丝状真菌如链孢霉属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*) (WO 91/00357,1991 年 1 月 10 日出版) 和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主如构巢曲霉 (*A. nidulans*) (Balance 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112 :284-289[1983]; Tilburn 等, *Gene*, 26 :205-221[1983]; Yelton 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 :1470-1474[1984]) 和黑曲霉 (*A. niger*) (Kelly 和 Hynes, *EMBO J.* 4 :475-479[1985])。甲基营养型酵母在本文中是合适的,包括但不限于能在甲醇上生长的酵母,选自汉逊酵母属、假丝酵母属、克勒克酵母属、毕赤酵母属、酵母属、球拟酵母属和红酵母属。该类酵母中示范性的特定物种的一览表可在 C. Anthony, *The Biochemistry of Methylophilic*, 269(1982) 中找到。

[0247] 表达糖基化 EG-VEGF 的合适宿主细胞衍生自多细胞生物。无脊椎动物细胞的例子包括昆虫细胞,例如果蝇 S2 和夜蛾 Sf9 以及植物细胞。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 和 COS 细胞。更具体的例子包括被 SV40 转化的猴肾 CV1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚肾系 (293 细胞或亚克隆的悬浮培养生长的 293 细胞, Graham 等, *J. Gen. Virol.* 36 :59[1977]); 中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO, Urlaub 和 Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 :4216[1980]); 小鼠 Sertoli 细胞 (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23 :243-251[1980]); 人肺细胞 (W138, ATCC CCL75); 人肝细胞 (Hep G2, HB8065); 和小鼠乳房肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL51)。合适的宿主细胞的选择被认为在本领域技术人员能力范围内。

[0248] 3. 可复制的载体的选择和用途

[0249] 编码 EG-VEGF 的核酸 (例如 cDNA 或基因组 DNA) 可插入可复制的载体用于克隆 (扩增 DNA) 或用于表达。各种载体是公开可得的。载体可以是例如质粒、粘粒、病毒颗粒或噬菌体的形式。合适的核酸序列可用各种方法插入载体。一般用本领域已知的技术将 DNA 插入合适的限制性内切核酸酶位点。载体成分通常包括但不限于一个或多个信号序列、复制起始点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。含有一个或多个这

些成分的合适的载体构建使用本领域技术人员已知的标准连接技术。

[0250] 可重组产生 EG-VEGF, 不仅直接的, 还有作为与异源多肽的融合多肽, 该异源多肽可以是信号序列或其它在成熟蛋白或多肽的 N- 末端具有特异性切割位点的多肽。一般信号序列可以是载体的一个组分, 或可以是插入载体的编码 EG-VEGF 的 DNA 的一部分。信号序列可以是原核信号序列, 选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp 或热稳定的肠毒素 II 前导序列。对于酵母分泌, 信号序列可以是例如酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列 (包括酿酒酵母和克鲁维酵母 - 因子前导序列, 后者在美国专利号 5, 010, 182 中有所描述)、或酸性磷酸酶前导序列、白色假丝酵母 (*C. albicans*) 葡糖淀粉酶前导序列 (EP362, 179, 1990 年 4 月 4 日出版)、或 WO 90/13646, 1990 年 11 月 15 日出版所述的信号。在哺乳动物细胞表达中, 哺乳动物信号序列可用于指导蛋白质分泌, 例如来自相同或相关物种的分泌多肽的信号序列, 以及病毒的分泌性前导序列。

[0251] 表达和克隆载体都含有能使载体在一种或多种所选的宿主细胞中复制的核酸序列。对于许多细菌、酵母和病毒这些序列是熟知的。质粒 pBR322 的复制起点适合大多数革兰氏阴性细菌, 2 质粒起始点适合酵母, 各种病毒起点 (SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV 或 BPV) 用于在哺乳动物细胞中克隆载体。

[0252] 表达和克隆载体通常含有选择基因, 也称为可选择的标记。通常选择基因编码的蛋白质 (a) 赋予对抗生素或其它毒素, 例如氨基青霉素、新霉素、氨基蝶呤或四环素的抗性, (b) 补足营养缺陷, 或 (c) 提供复合培养基不能提供的关键营养, 例如杆菌属的编码 D- 丙氨酸消旋酶的基因。

[0253] 哺乳动物细胞合适的可选择标记的例子是那些能鉴定有能力摄取编码 EG-VEGF 的核酸的细胞的标记, 例如 DHFR 或胸苷激酶。当使用野生型 DHFR 时, 合适的宿主细胞是 DHFR 活性缺陷的 CHO 细胞系, 如 Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 :4216 (1980) 所述制备和增殖。用于酵母的合适的选择基因是存在于酵母质粒 YRp7 中的 trp1 基因 [Stinghcomb 等, Nature, 282 :39 (1979) ;Kingsman 等, Gene, 7 :141 (1979) ;Tschemper 等, Gene, 10 :157 (1980)]。trp1 基因提供了不能在色氨酸中生长的酵母突变株, 例如 ATCC No. 44076 或 PEP4-1 [Johns, Genetics, 85-12 (1977)] 的选择标记。

[0254] 表达和克隆载体通常含有与 EG-VEGF 编码核酸序列可操作性连接的启动子, 以指导 mRNA 合成。被许多可能的宿主细胞识别的启动子是熟知的。适用于原核宿主的启动子包括 :- 内酰胺酶和乳糖启动子系统 [Chang 等, Nature, 275 :615 (1978) ;Goeddel 等, Nature, 281 :544 (1979)]、碱性磷酸酶、色氨酸 (trp) 启动子系统 [Goeddel, Nucleic Acids Res, 8 :4057 (1980) ;EP 36, 776] 和杂交启动子, 例如 tac 启动子 [deBoer 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 :21-25 (1983)]。用于细菌系统的启动子还可以含有与编码 EG-VEGF 的 DNA 可操作性连接的 Shine-Dalgarno (S. D.) 序列。

[0255] 与酵母宿主一起使用的合适的启动序列的例子包括 3- 磷酸甘油酸激酶 [Hitzeman 等, J. Biol. Chem. 255 :2073 (1980)] 或其它糖酵解酶 [Hess 等, J. Adv. Enzyme Reg. , 7 :149 (1968) ;Holland, Biochemistry, 17 :4900 (1978)], 例如烯醇酶、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖 -6- 磷酸异构酶、3- 磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、丙糖磷酸异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶的启动子、

[0256] 其它酵母启动子对于生长条件控制的转录具有其它优点的可诱导启动子, 它

们是醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢有关的降解性酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。在 EP 73,657 中进一步描述了用于酵母表达的合适载体和启动子。

[0257] 在哺乳动物宿主细胞中从载体转录 EG-VEGF 受到例如,从病毒,例如多瘤病毒、禽痘病毒 (UK 2,211,504,1989 年 7 月 5 日出版)、腺病毒 (例如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒和猿病毒 40 (SV40) 的基因组,从异源哺乳动物启动子,例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子,或从热休克启动子获得的启动子的控制,条件是这些启动子与宿主细胞系统相容。

[0258] 可通过在载体中插入增强子序列提高高等真核细胞对编码 EG-VEGF 的 DNA 的转录。增强子是 DNA 的顺式作用元件,通常是约 10-300bp,它作用于启动子以提高其转录。现在来自哺乳动物基因 (球蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、胎蛋白和胰岛素) 的许多启动子是已知的。然而一般会使用真核细胞病毒的增强子。例子包括在复制起始点的晚期一侧 (bp100-270) 上的 SV40 增强子、巨细胞早期启动子增强子、复制起点的晚期一侧上的多瘤病毒增强子和腺病毒增强子。增强子可剪接入载体,在 EG-VEGF 编码序列的 5' 或 3' 位置,但优选位于启动子的 5' 位点。

[0259] 用于真核宿主细胞 (酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其它多细胞生物的有核细胞) 的表达载体也可含有终止转录和稳定 mRNA 所需的序列。这些序列通常可来自真核或病毒 DNA 或 cDNA 的 5', 偶尔 3' 非翻译区。这些区域含有在编码 EG-VEGF 的 mRNA 的未翻译部分中转录为聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。

[0260] Gething 等, Nature, 293 :620-625 (1981); Mantei 等, Nature, 281 :40-46 (1979); EP 117,060; 和 EP 117,058 中描述了适合改变成在重组脊椎动物细胞培养物中合成 EG-VEGF 的其它方法、载体和宿主细胞。

[0261] 4. 检测基因扩增 / 表达

[0262] 可在样品中直接,例如通过常规 Southern 印迹、Northern 印迹来定量 mRNA 的转录 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 :5201-5205 (1980)], 斑点印迹 (DNA 分析) 或原位杂交,使用合适的标记探针,基于本文提供的序列来测定基因扩增和 / 或表达。另外,可使用能识别特定双链体,包括 DNA 双链体、RNA 双链体和 DNA-RNA 杂交双链体或 DNA-蛋白质双链体的抗体。抗体继而可以被标记,并可进行试验,其中双链体与表面结合,从而在表面上形成双链体后,可检测与双链体结合的抗体的存在。

[0263] 另外,可用免疫学方法,例如免疫组织化学染色细胞或组织切片,和细胞培养物或体液的试验,来直接定量基因产物的表达,从而测定基因表达。用于免疫组织化学染色和 / 或样品液试验的抗体可以是单克隆或多克隆的抗体,可在任何哺乳动物中制备。方便的,可针对天然序列 EG-VEGF 多肽,或针对基于本文提供的 DNA 序列的合成肽,或针对与 EG-VEGF DNA 融合并编码特定的抗体表位的外源序列制备抗体。

[0264] 5. 多肽的纯化

[0265] 可从培养基或从宿主细胞裂解物中回收 EG-VEGF 形式。如果是膜结合的,可用合适的去污剂溶液 (例如 Triton-X 100) 或通过酶切割从膜释放。可通过各种物理或化学方法,例如冻融循环、超声处理、机械破裂或细胞裂解剂破裂用于表达 EG-VEGF 的细胞。

[0266] 可能需要从重组细胞蛋白质或多肽纯化 EG-VEGF。下列方法是合适的纯化方法的

例子：通过在离子交换柱上分级分离；乙醇沉淀；反相 HPLC；在硅土或阳离子交换树脂，例如 DEAE 上层析；层析聚焦；SDS-PAGE；硫酸铵沉淀；使用例如 Sephadex G-75 的凝胶过滤；蛋白 A Sepharose 柱，用于除去 IgG 等污染物；和金属螯合柱，以结合 EG-VEGF 的表位标记形式。可使用蛋白质纯化的各种方法，这些方法在本领域是已知的，在例如 Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182(1990)；Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York(1982)。所选的纯化步骤根据例如所用的生产方法的性质和产生的具体 EG-VEGF 而定。

[0267] E. EG-VEGF 的用途

[0268] 编码 EG-VEGF 的核苷酸序列（或其互补序列）在分子生物学领域中具有许多用途，包括在染色体和基因作图和产生反义 RNA 和 DNA 中用作杂交探针。EG-VEGF 核酸还可用于通过本文所述的重组技术制备 EG-VEGF 多肽。

[0269] 全长天然序列 EG-VEGF 基因 (SEQ ID NO :1) 或其部分可用作 cDNA 文库的杂交探针，分离全长 EG-VEGF cDNA 或分离其它与图 1 (SEQ ID NO :1) 中所述的 EG-VEGF 序列具有所需的序列同一性的 cDNA（例如，那些编码天然存在的 EG-VEGF 变体或其它物种的 EG-VEGF 的 cDNA）。可任选的，探针长度约 20 个 - 约 50 个碱基。杂交探针可衍生自 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列的至少部分新区域，其中那些区域可以不经过度实验，或从包括天然序列 EG-VEGF 的启动子、增强子元件和内含子的基因组序列确定。例如，筛选方法可包括用已知的 DNA 序列分离 EG-VEGF 基因的编码区，合成约 40 个碱基的所选的探针。杂交探针可以用各种标记物的标记，包括放射性核苷酸例如 ³²P 或 ³⁵S，或酶标记物，例如与探针通过亲和素 / 生物素偶联系统偶联的碱性磷酸酶。具有与本发明的 EG-VEGF 基因互补的序列的标记探针可用于筛选人 cDNA、基因组 DNA 或 mRNA 文库，以确定探针与这些文库中的哪些成员杂交。在下文实施例中更详细的描述了杂交技术。

[0270] 本申请中公开的任何 EST 序列可类似地用作探针，使用本发明公开的方法。

[0271] 其它有用的 EG-VEGF 核酸的片段包括反义或有义寡核苷酸，包括单链核酸序列 (RNA 或 DNA)，能与靶 EG-VEGF mRNA (有义) 或 EG-VEGF DNA (反义) 序列结合。根据本发明，反义或有义寡核苷酸包括 EG-VEGF DNA 的编码区片段。该片段通常含有至少约 14 个核苷酸，优选约 14-30 个核苷酸。在例如 Stein 和 Cohen (*Cancer Res.* 48 :2659, 1988) 和 van der Krol 等 (*BioTechniques* 6 :958, 1988) 中描述了基于编码给定蛋白质的 cDNA 序列衍生反义或有义寡核苷酸的能力。

[0272] 反义或有义寡核苷酸与靶核酸序列结合导致形成双链体，该双链体通过多种途径之一，包括增强双链体的降解、转录或翻译的提前终止，或通过其它途径阻断靶序列的转录或翻译。因此反义寡核苷酸可用于阻断 EG-VEGF 蛋白的表达。反义或有义寡核苷酸进一步包括具有修饰的糖-磷酸二酯骨架（或其它糖键，例如 W091/06629 中所述的）的寡核苷酸，其中这些糖键对于内源核酸酶是有抗性的。这些具有抗性糖键的寡核苷酸在体内是稳定的（即能抵抗酶降解），但保留能与靶核苷酸序列结合的序列特异性。

[0273] 其它有义或反义寡核苷酸的例子包括与有机部分，诸如 W090/10048 所述的，和其它提高寡核苷酸对靶核酸序列的亲力的部分，诸如聚-(L-赖氨酸)，共价连接的寡核苷酸。另外，嵌入剂，诸如椭圆玫瑰树碱，和烷基化试剂或金属复合物可以附着于有义或反义寡核苷酸，以改变反义或有义寡核苷酸对靶核苷酸序列的结合特异性。

[0274] 反义或有义寡核苷酸可通过任何基因转移方法,包括例如 CaPO_4 介导的 DNA 转染、电穿孔,或通过使用诸如 EB 病毒等基因转移载体,引入含有靶核酸序列的细胞。在优选方法中,反义或有义寡核苷酸被插入合适的逆转录病毒载体。含有靶核酸序列的细胞与重组逆转录病毒载体在体内或回体接触。合适的逆转录病毒载体包括但不限于衍生自鼠逆转录病毒 M-MuLV, N2 (衍生自 M-MuLV 的逆转录病毒) 或双拷贝载体,称为 DCT5A、DCT5B 和 DCT5C (见 W090/13641)。

[0275] 有义或反义寡核苷酸还可以通过与配体结合分子形成缀合物 (如 W091/04753 所述) 引入含有靶核酸序列的细胞。合适的配体结合分子包括但不限于细胞表面受体、生长因子、其它细胞因子、或其它与细胞表面受体结合的配体。优选的是,配体结合分子的缀合基本不影响配体结合分子与其对应的分子或受体结合的能力,或阻断有义或反义寡核苷酸或其缀合形式进入细胞。

[0276] 或者,有义或反义寡核苷酸可通过形成寡核苷酸-脂质复合物 (如 W090/10448 所述) 引入含有靶核酸序列的细胞。有义和反义寡核苷酸-脂质复合物优选在细胞内通过内源脂肪酶解离。

[0277] 还可在 PCR 技术中使用探针,以产生序列库用于鉴定密切相关的 EG-VEGF 编码序列。

[0278] 还可用编码 EG-VEGF 的核苷酸序列构建杂交探针,用于编码 EG-VEGF 的基因作图,和具有遗传紊乱的个体的遗传分析。本文提供的核苷酸序列可对染色体和染色体的特定区域,使用已知技术,例如原位杂交、针对已知染色体标记的连锁分析,和与文库杂交筛选作图。

[0279] 本发明还提供了在试验中使用 EG-VEGF 的方法,以鉴定可与 EG-VEGF 蛋白结合的其它蛋白质或分子。通过这些方法,可鉴定受体/配体结合相互作用的抑制剂。参与这些结合相互作用的蛋白质还可用于筛选结合相互作用的肽或小分子抑制剂或激动剂。另外,受体 EG-VEGF 可用于分离相关的配体。可设计筛选试验以寻找模拟天然 EG-VEGF 或 EG-VEGF 受体的生物学活性的领先化合物。这些筛选试验可包括适合高通量筛选化学文库的试验,使其特别适用于鉴定小分子药物候选物。考虑的小分子包括合成的有机或无机化合物。可以各种形式,包括蛋白质-蛋白质结合试验、生物化学筛选试验、免疫试验和基于细胞的试验进行试验,它们在本领域中有明确描述。

[0280] 编码 EG-VEGF 或其修改的形式的核酸还可用于产生转基因动物或“基因敲除”动物,这些动物继而可用于开发和筛选治疗上有用的试剂。转基因动物 (例如小鼠或大鼠) 是具有含转基因的细胞的动物,这些转基因引入动物或出生前,例如胚胎阶段的动物祖先 (ancestor)。转基因是整合入细胞基因组的 DNA,从该细胞产生转基因动物。在一个实施方案中,可用编码 EG-VEGF 的 cDNA 根据建立的技术克隆编码 EG-VEGF 的基因组 DNA,并用基因组序列产生含表达编码 EG-VEGF 的 DNA 的细胞的转基因动物。产生转基因动物,特别是诸如小鼠或大鼠等动物的方法是本领域常规的,在例如美国专利号 4,736,866 和 4,870,009 中有所描述。典型的是,用组织特异性增强子将 EG-VEGF 转基因的掺入靶向特定细胞。可用在胚胎阶段有编码 EG-VEGF 的转基因拷贝引入动物生殖系的转基因动物检测提高编码 EG-VEGF 的 DNA 表达的作用。可用这些动物作为测试动物来检测认为赋予对例如与其过表达有关的病理状况有保护的试剂。根据本发明的该方面,用试剂处理动物,与携带该转基因

的未处理的动物相比,病理状况发病率降低,表明对该病理状况有潜在治疗干预。

[0281] 或者,可用 EG-VEGF 的非人同源物构建 EG-VEGF “基因敲除”动物,由于编码 EG-VEGF 的内源基因和引入动物胚胎干细胞中的改变的编码 EG-VEGF 的基因组 DNA 之间的同源重组,它具有缺陷或改变的编码 EG-VEGF 的基因。例如,编码 EG-VEGF 的 cDNA 可用于根据建立的技术克隆编码 EG-VEGF 的基因组 DNA。一部分编码 EG-VEGF 的基因组 DNA 可删除或用另一种基因取代,诸如编码可用于检测整合的可选择标记的基因。通常,在载体中包括数千碱基的未改变的侧翼 DNA (5' 和 3' 端都有) [见例如 Thomas 和 Capecchi, *Cell*, 51 : 503 (1987) 对于同源重组载体的描述]。将载体引入胚胎干细胞系 (例如通过电穿孔), 选择其中引入的 DNA 与内源 DNA 同源重组的细胞 [见例如 Li 等, *Cell*, 69 : 915 (1992)]。然后将所选的细胞注射入动物 (例如小鼠或大鼠) 的胚泡以形成聚集嵌合体 (见例如 Bradley, 于 *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells : A Practical Approach*, E. J. Robertson 编 (IRL, Oxford, 1978), pp. 113-152)。然后嵌合胚胎可植入合适的假孕雌性代孕动物,使胚胎足月产生 “基因敲除”动物。可用标准技术鉴定在其生殖细胞中携带同源重组 DNA 的后代,并用于繁殖动物,在这些动物的所有细胞中含有同源重组 DNA。基因敲除动物可以通过例如,其由于不存在 EG-VEGF 多肽而抵抗某些病理状况和发生病理情况的能力来确定特征。

[0282] 还可在基因治疗中使用编码 EG-VEGF 多肽的核酸。在基因治疗应用中,基因被引入细胞,以实现体内合成治疗有效的基因产物,例如用于替换缺陷基因。“基因治疗”包括常规基因治疗方法,其中通过一次治疗获得持续的作用,和施用基因治疗剂,包括一次或重复施用治疗有效的 DNA 或 mRNA。反义 RNA 和 DNA 可用作治疗剂,用于阻断体内某些基因的表达。还已经显示可在细胞中引入短的反义寡核苷酸,它们起抑制剂的作用,尽管细胞膜有限的吸收导致其低胞内浓度 (Zamecnik 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 4143-4146 [1986])。可修饰寡核苷酸以增强其摄取,例如通过用不带电荷的基团取代其带负电荷的磷酸二酯基团。

[0283] 有许多技术能将核酸引入活细胞。根据核酸是在体外转移入培养的细胞还是在体内转移入预期宿主的细胞中,所述技术有所变化。适合将核酸转移入体外哺乳动物细胞的技术包括使用脂质体、电穿孔、显微注射、细胞融合、DEAE-葡聚糖、磷酸钙沉淀法等。目前优选的体内基因转移技术包括用病毒 (通常是逆转录病毒) 载体转染和病毒外壳蛋白-脂质体介导的转染 (Dzau 等, *Trends in Biotechnology* 11, 205-210 [1993])。在一些情况下,希望提供核酸来源和靶向靶细胞的试剂,诸如对细胞表面膜蛋白或靶细胞特异性的抗体,靶细胞上受体的配体等。当使用脂质体时,结合与胞吞作用有关的细胞表面膜蛋白的蛋白质可用于靶向和 / 或促进摄取,例如,对于特定细胞类型有向性的衣壳蛋白或其片段,对于在循环中经历内在化作用的蛋白质的抗体,靶向胞内定位和增强胞内半衰期的蛋白质。例如, Wu 等, *J. Biol. Chem.* 262, 4429-4432 (1987) ; 和 Wagner 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3410-3414 (1990) 描述了受体介导的胞吞作用的技术。对于基因标记和基因治疗方案的综述见 Anderson 等, *Science*, 256, 808-813 (1992)。

[0284] 本文所述的 EG-VEGF 多肽还可用作蛋白质电泳的分子量标记。

[0285] 编码本文所述的 EG-VEGF 多肽或其片段的核酸分子可用于染色体鉴定。在这方面,对于鉴定新染色体标记存在持续的需要,因为目前可得到的基于实际序列数据的染色

体标记试剂很少。本发明的各 EG-VEGF 核酸分子可用作染色体标记。

[0286] 本发明的 EG-VEGF 多肽和核酸分子还可用于组织分型,其中本发明的 EG-VEGF 多肽可在一种组织中与另一种组织相比有差异性表达。EG-VEGF 核酸分子可用于产生 PCR、Northern 分析、Southern 分析和 Western 分析的探针。

[0287] 本文所述的 EG-VEGF 多肽及其调节物还可用作治疗剂。本发明的 EG-VEGF 多肽和 EG-VEGF 调节物可根据已知方法配制,用于制备药学上有用的组合物,其中 EG-VEGF 产物与药学上可接受的载体混合。通过将具有所需纯度的活性成分与任选的生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 编 (1980)) 以冻干制剂或水溶液的形式混合,制备治疗制剂。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所使用的剂量和浓度对接受者是无毒的,包括诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸的缓冲剂;包括抗坏血酸的抗氧化剂;低分子量(少于约 10 个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如 EDTA;糖醇,诸如甘露糖醇或山梨糖醇;成盐的反荷离子,诸如钠;和/或非离子表面活性剂,诸如 TWEEN™、PLURONICS™ 或 PEG。

[0288] 用于体内给药的制剂必须是无菌的。这通过在冻干和重建之前或之后滤过无菌滤膜不难实现。

[0289] 本文中的治疗组合物通常置于具有无菌进口的容器中,例如有塞子的静脉输液袋或小瓶,该塞子可用皮下注射针头穿透。

[0290] 给药途径根据已知方法,例如通过静脉内、腹膜内、脑内、肌肉内、眼内、动脉内或损伤内途径的注射或输液、局部给药或通过持续释放系统。

[0291] 本发明药物组合物的剂量和所需药物浓度可根据预想的具体用途改变。确定合适的剂量或给药途径在普通医生的能力范围内。动物实验提供了确定人治疗有效剂量的可靠指导。有效剂量的种间定标可用 Mordenti, J. 和 Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" (种间定标在毒物动力学中的用途) 于 Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi 编, Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96 制定的原理进行。

[0292] 当体内施用 EG-VEGF 多肽或其激动剂或拮抗剂时,正常剂量可从约 10ng/kg 至高达 100mg/kg 哺乳动物体重或更多/天,优选约 1g/kg/天-10mg/kg/天,视给药途径而定。在文献中提供了投递的特定剂量和方法的指南;见例如美国专利号 4,657,760;5,206,344;或 5,225,212。可以预料不同剂型对于不同治疗化合物和不同紊乱是有效的,例如靶向一种器官或组织的给药可能需要不同方式的投递。

[0293] 在需要 EG-VEGF 多肽或调节物的持续释放给药,且剂型的释放特性适合需要施用 EG-VEGF 多肽的任何疾病或紊乱的治疗时,可考虑 EG-VEGF 多肽的微胶囊化。用人生长激素 (rhGH)、干扰素 (rhIFN- γ)、白细胞介素 -2 和 MN rgp120 已成功地进行重组蛋白的微胶囊化供持续释放。Johnson 等, Nat. Med. 2:795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27:1221-1223 (1993); Hora 等, Bio/Technology, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere System" (使用聚交酯聚乙交酯微球体系统的单次免疫疫苗的设计和生

产), 于 Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman 编 (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; 和美国专利号 5,654,010。

[0294] 用聚-乳酸-共-乙醇酸 (PLGA) 聚合物开发这些蛋白质的持续释放剂型, 因为其具有生物相容性和广范的生物可降解特性。PLGA 的降解产物乳酸和乙醇酸在人体内可迅速地清除。另外, 可根据其分子量和组成从几个月到几年的范围内调节该聚合物的可降解性。Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer" (从交酯/乙交酯聚合物受控释放生物活性剂), 于 M. Chasin and R. Langer (编), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41。

[0295] 可在许多治疗中使用本文提供的治疗剂。治疗包括治疗患有与产激素组织或内分泌腺有关的病况的个体。在一个方面, 对需要 EG-VEGF 或 EG-VEGF 激动剂的个体施用治疗病况的有效量的 EG-VEGF 或 EG-VEGF 激动剂。可以多肽或核酸形式施用 EG-VEGF。优选, 病况是需要增加产生特定激素的细胞数目的病况。该病况的例子包括糖尿病。其它病况包括那些需要增加生殖器官, 诸如卵巢、睾丸、子宫、前列腺和胎盘中细胞数目的病况。

[0296] 优选, 对患有与产激素组织或内分泌腺有关的病况的个体施用 EG-VEGF 拮抗剂。当施用 EG-VEGF 拮抗剂时, 优选病况是需要减少产生特定激素的数目或减少细胞增殖的病况。例如, 本文提供了调节个体生育力的方法, 包括对个体施用调节生育力的有效量的 EG-VEGF 拮抗剂。在一个实施方案中, 通过抑制卵泡成熟和 / 或排卵调节生育力。或者, 当个体患有或有危险患上多囊性卵巢综合征时, 对个体施用 EG-VEGF 拮抗剂, 通过防止通常由于不治疗该综合征导致的不育来维持生育力。如果该病况是先天性的, 在家族中常见, 或具有病况的早期症状, 个体有患上该病况的危险。还可施用 EG-VEGF 拮抗剂, 以治疗囊肿和其它与产激素组织中过度增殖、炎症和过度血管生成有关的病况。

[0297] 可用本发明的组合物和方法解决的一类固醇激素依赖性紊乱还包括先天性的肾上腺类脂组织增生 (lipoid congenital adrenal hyperplasia)、不育、性成熟、雄激素依赖性肿瘤、性早熟、麦-奥二氏 (McCune-Albright) 综合征、先天性肾上腺发育不全、或低促性腺素性腺功能减退。

[0298] 可用本文提供的药剂和组合物治疗的特定病况是癌症, 特别是类固醇依赖性癌, 例如雄激素依赖性癌。如本文提供的治疗癌症的优选方法包括对患有或有危险患上癌症的个体以治疗癌症的有效量施用 EG-VEGF 拮抗剂。在一个实施方案中, 癌症是选自卵巢、睾丸、前列腺和子宫的组织。

[0299] 应理解可在体内或体外进行细胞增殖、细胞增殖抑制、趋化性的方法, 和抑制趋化性的方法。在一些情况下, 可能希望在体外在细胞样品中加入 EG-VEGF, 从而刺激特定细胞类型的增殖。然后可在筛选试验中使用 EG-VEGF 处理的样品, 或移植到需要治疗的个体或动物模型中。

[0300] 本发明还包括筛选化合物, 鉴定模拟或增强 EG-VEGF 多肽 (激动剂) 或防止 EG-VEGF 多肽的作用 (拮抗剂) 的化合物的方法。EG-VEGF 激动剂和拮抗剂在本文中还称为 EG-VEGF 调节剂。设计了拮抗剂候选药物的筛选试验以鉴定与本文鉴定的基因所编码的 EG-VEGF 多肽结合或复合, 或以其它方式影响编码的多肽与其它细胞蛋白质相互作用的化

合物。本文提供的筛选实验包括适合高通量筛选化合物文库,使其特别适用于鉴定小分子候选药物的试验。通常,提供了结合试验和活性试验。

[0301] 可用各种形式进行试验,包括蛋白-蛋白结合试验、生物化学筛选试验、免疫试验和基于细胞的试验,它们是本领域中特征明确的。

[0302] 所有拮抗剂试验的相同之处在于它们都需要将候选药物与本文鉴定的核酸编码的 EG-VEGF 多肽接触,接触的条件时间足以使这两种成分相互作用。

[0303] 在结合试验中,相互作用是结合,形成的复合物可分离或在反应混合物中检测。在一个具体实施方案中,本文鉴定的基因编码的 EG-VEGF 多肽或候选药物通过共价或非共价附着固定在固相,例如微量滴定板上。非共价附着通常是通过用 EG-VEGF 多肽的溶液包被固体表面并干燥实现的。或者,可用对于要固定化的 EG-VEGF 多肽特异性的固定化抗体,例如单克隆抗体将其锚定在固相表面上。通过向固定化成分,例如含有锚定成分的包被表面添加可能被可检测标记物标记的非固定化成分来进行试验。当反应完成时,通过例如洗涤除去非反应成分,检测锚定在固相表面的复合物。当最初非固定化成分携带可检测标记时,检测出固定在表面上的标记表明发生复合。当最初非固定化成分不携带标记时,可通过例如使用与固定化复合物特异性结合的标记抗体检测复合。

[0304] 如果候选化合物与本文所鉴定的基因编码的特定 EG-VEGF 多肽相互作用,但不结合,可通过对于检测蛋白-蛋白相互作用熟知的方法检测其与多肽的相互作用。这些试验包括传统方法,诸如例如交联、免疫共沉淀、和通过梯度或层析柱的共纯化。另外,可如 Chevray 和 Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 :5789-5793 (1991) 所公开的,用 Fields 和同事 (Fields 和 Song, Nature (London), 340 :245-246 (1989) ;Chien 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 :9578-9582 (1991)) 所述的基于酵母的遗传系统来监测蛋白-蛋白相互作用。许多转录激活物,诸如酵母 GAL4,由两个物理上离散的组件结构域构成,一个作为 DNA 结合域,另一个作为转录激活域。在上述出版物中描述的酵母表达系统(一般称为“双杂交系统”)利用此特性,并使用二种杂合蛋白,在一个中靶蛋白与 GAL4 的 DNA 结合域融合,在另一个中候选激活蛋白与激活域融合。GAL1-lacZ 报道基因在 GAL4 激活的启动子控制下的表达依赖于通过蛋白-蛋白相互作用重建 GAL4 活性。用半乳糖苷酶的显色底物检测含有相互作用的多肽的菌落。可从 Clontech 购得使用双杂交技术鉴定两种特定蛋白质的蛋白-蛋白相互作用的完整试剂盒 (MATCHMAKER™)。该系统还可以延伸到绘制与特定蛋白质相互作用有关的蛋白结构域,和指出对于这些相互作用关键的氨基酸残基。

[0305] 可如下检测影响本文所述基因编码的 EG-VEGF 多肽与其它胞内或胞外成分相互作用的化合物:在允许两种产物相互作用和结合的条件和时间下,通常制备一种反应混合物,它含有基因产物和胞内或胞外成分。为了检测候选化合物抑制结合的能力,该反应在测试化合物存在或不存在的条件下进行。另外,可在第三种反应混合物中加入安慰剂,作为阳性对照。如上所述监测 EG-VEGF 多肽和胞内或胞外成分之间的结合(复合物形成)。在对照反应而不是在含有测试化合物的反应混合物中复合物的形成表明测试化合物影响 EG-VEGF 多肽与其反应配偶体的相互作用。

[0306] 为了测试激动剂和拮抗剂,可在细胞中加入 EG-VEGF 多肽和要筛选的化合物。观察到已知由 EG-VEGF 调节的特定活性,化合物在 EG-VEGF 多肽存在下增强或抑制该活性的能力,表明化合物分别是 EG-VEGF 多肽的激动剂或拮抗剂。或者,可通过将 EG-VEGF 多肽和

候选化合物与膜结合的 EG-VEGF 多肽受体或重组受体在竞争性抑制试验的合适条件下混合,检测激动剂或拮抗剂。可用诸如放射性标记 EG-VEGF 多肽,这样与受体结合的 EG-VEGF 多肽分子的数目可用于测定潜在激动剂或拮抗剂的效力。

[0307] 可用本领域技术人员已知的许多方法鉴定编码 EG-VEGF 受体的基因,例如配体淘选和 FACS 分拣。Coligan 等, *Current Protocols in Immun.*, 1(2):第 5 章 (1991)。优选使用表达克隆,其中从响应 EG-VEGF 多肽的细胞制备聚腺苷酸化 RNA,将从该 RNA 产生的 cDNA 文库分成集合,用于转染 COS 细胞或其它不响应 EG-VEGF 多肽的细胞。在载玻片上培养的转染细胞暴露于标记的 EG-VEGF 多肽。可用各种方法,包括碘化或包含位点特异性蛋白质激酶的识别位点,标记 EG-VEGF 多肽。在固定和培育后,对载玻片进行放射性自显影分析。鉴定阳性集合并制备子集,用相互作用的子集进行再次转染和再次筛选过程,最终得到编码推定受体的单个克隆。

[0308] 作为另一种鉴定受体的方法,可将标记的 EG-VEGF 多肽与表达受体分子的细胞膜或抽提制备物光亲和连接。用 PAGE 解析交联材料,并对 X 光胶片曝光。可切下含有受体的标记复合物,分解成肽片段,并进行蛋白质微量测序。从微量测序获得的氨基酸序列可用于设计一套简并寡核苷酸探针,以筛选 DNA 文库来鉴定编码推定受体的基因。

[0309] 在拮抗剂的另一个试验中,可在候选化合物的存在下培育表达受体的哺乳动物细胞或膜制备物以及标记的 EG-VEGF 多肽。然后可测定化合物增强或阻断此相互作用的能力。

[0310] 潜在拮抗剂的更具体的例子包括与免疫球蛋白和 EG-VEGF 多肽的融合物结合的寡核苷酸,更具体的有抗体,包括但不限于多和单克隆抗体和抗体片段、单链抗体、抗独特型抗体、和这些抗体或片段的嵌合或人源化的形式,以及人抗体和抗体片段。或者,潜在拮抗剂可以是紧密相关的蛋白质,例如识别受体但无作用,从而竞争性抑制 EG-VEGF 多肽的作用的突变形式的 EG-VEGF 多肽。

[0311] 另一种潜在 EG-VEGF 多肽拮抗剂是用反义技术制备的反义 RNA 或 DNA 构建物,其中例如反义 RNA 或 DNA 分子通过与靶 mRNA 杂交并阻止蛋白质翻译起到直接阻断 mRNA 翻译的作用。可用反义技术通过三股螺旋形成或反义 DNA 或 RNA 来控制基因表达,这两种方法都基于多核苷酸与 DNA 或 RNA 的结合。例如,多核苷酸序列的 5' 编码部分(在本文中编码成熟 EG-VEGF 多肽)用于设计长约 10-40 个碱基对的反义 RNA 寡核苷酸。设计 DNA 寡核苷酸与基因中牵涉转录的区域互补(三股螺旋-见例如 Lee 等, *Nucl. Acids. Res.*, 6:3073(1979);Cooney 等, *Science*, 241:456(1988);Dervan 等, *Science*, 251:1360(1991)),从而防止转录和产生 EG-VEGF 多肽。反义 RNA 寡核苷酸与 mRNA 在体内杂交,阻断 mRNA 分子翻译成 EG-VEGF 多肽(反义 -Okano, *Neurochem.*, 56:560(1991);*Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*(CRC Press:Boca Raton,FL,1988))。上述寡核苷酸也可投递到细胞,使体内可表达反义 RNA 或 DNA,以抑制 EG-VEGF 多肽的产生。当使用反义 DNA 时,优选衍生自翻译起始位点的寡脱氧核糖核苷酸,例如靶基因核苷酸序列的约 -10 到 +10 位置。

[0312] 潜在拮抗剂包括结合 EG-VEGF 多肽的活性位点、受体结合位点或生长因子或其它相关结合位点,从而阻断 EG-VEGF 多肽的正常生物学活性的小分子。小分子的例子包括但不限于小肽或肽样分子,优选可溶性肽,和合成的非肽基有机或无机化合物。

- [0313] 在另一个实施方案中,当活性受到正反馈调节时,激动剂的过表达可作为拮抗剂。
- [0314] 核酶是能催化对 RNA 的特异性切割的酶性 RNA 分子。核酶通过与互补的靶 RNA 序列特异性杂交,后续内切核酸水解切割起作用。可用已知的技术鉴定在潜在 RNA 靶内的特定核酶切割位点。进一步的详述见例如 Rossi, *Current Biology*, 4:469-471 (1994), 和 PCT 出版号 W0 97/33551 (1997 年 9 月 18 日出版)。
- [0315] 用于抑制转录的三股螺旋形成中的核酸分子应该是单链,由脱氧核苷酸构成。设计这些寡核苷酸的碱基组成使它通过 Hoogsteen 碱基配对原则促进三股螺旋形成,一般在螺旋的一条链上需要大段嘌呤或嘧啶。进一步的细节见例如 PCT 出版号 W097/33551, 见上。
- [0316] 可通过本文所述的一种或多种筛选试验和 / 或通过本领域技术人员熟知的任何其它筛选技术来鉴定这些小分子。
- [0317] 应理解本文提供的所有试验可用于筛选各种候选生物活性剂。本文所用的术语“候选生物活性剂”、“候选试剂”或“候选药物”或语法上的对应词描述了要测试能直接或间接改变细胞活性表型或 EG-VEGF 序列,包括核酸序列或蛋白质序列表达的生物活性剂的任何分子,例如蛋白质、寡肽、小有机分子、多糖、多核苷酸、嘌呤类似物等。
- [0318] 候选试剂可包括许多化合物种类,虽然通常它们是有机分子,优选分子量大于 100 小于 2,500 道尔顿的小有机化合物。本文进一步将小分子限定为具有 50kD-2000kD 之间的分子量。在另一个实施方案中,小分子具有小于 1500,或小于 1200,或小于 1000,或小于 750,或小于 500kD 的分子量。在一个实施方案中,本文所用的小分子具有约 100-200kD 的分子量。候选试剂包括与蛋白质的结构性相互作用,特别是形成氢键所必需的官能团,通常包括至少胺、羰基、羟基或羧基,优选至少两种功能性化学基团。候选试剂通常含有被一个或多个上述官能团取代的环状碳或杂环结构和 / 或芳族或多芳族结构。还在生物分子,包括肽、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、吡啶、其衍生物、结构类似物或组合之中发现了候选试剂。特别优选的是肽。
- [0319] 从各种来源,包括合成或天然化合物的文库获得了候选试剂。例如,有许多方法可用于随机和定向合成各种有机化合物和生物分子,包括表达随机化寡核苷酸。或者,可得到或不难产生细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物文库。另外,通过常规化学、物理和生物化学方法容易改变天然或合成产生的文库和化合物。已知的药剂可进行定向或随机化学修饰,例如酰基化、烷基化、酯化、酰胺化以产生结构类似物。
- [0320] 在优选实施方案中,候选生物活性剂是蛋白质。本文中的“蛋白质”意指至少两个共价连接的氨基酸,包括蛋白质、多肽、寡肽和肽。蛋白质可由天然存在的氨基酸和肽键,或合成的拟肽结构构成。因此本文所用的“氨基酸”或“肽残基”意指天然存在和合成的氨基酸。例如,同苯丙氨酸、瓜氨酸和正亮氨酸被认为是用于本发明目的的氨基酸。“氨基酸”还包括亚氨基酸残基诸如脯氨酸和羟脯氨酸。侧链可以是 (R) 或 (S) 构型。在优选实施方案中,氨基酸是 (S) 或 L- 构型。如果用非天然存在的侧链,可用非氨基酸取代基,例如防止或推迟体内降解。
- [0321] 在优选实施方案中,候选生物活性剂是天然存在蛋白质或天然存在蛋白质的片段。因此例如,可使用含有蛋白质的细胞提取物、或蛋白性细胞提取物的随机或定向消化物。用这种方法可制备原核和真核蛋白质文库,用于本发明的筛选方法。该实施方案中特别优选的是细菌、真菌、病毒和哺乳动物蛋白质文库,后者是优选的,人蛋白质是特别优选的。

[0322] 在一个优选实施方案中,候选生物活性剂是约 5 个 - 约 30 个氨基酸,优选约 5 个 - 约 20 个氨基酸,特别优选约 7 个 - 约 15 个氨基酸的肽。肽可以是如上所述的天然存在蛋白质的消化物,随机肽或“偏向的”随机肽。本文“随机化”或语法上的对应词意指各核酸和肽分别基本上由随机核苷酸和氨基酸构成。由于这些随机肽(或核酸(如下所述))通常是化学合成的,它们可以在任何位置掺入任何核苷酸或氨基酸。可设计合成方法以产生随机化蛋白质或核酸,以在整个序列长度上形成所有或大多数可能的组合,从而形成随机化候选生物活性蛋白质性制剂的文库。

[0323] 在一个实施方案中,文库是完全随机的,在任何位置没有序列偏爱或常量。在一个优选实施方案中,文库是偏向的。即序列内的一些位置保持不变,或选自有限数目的可能性。例如,在一个优选实施方案中,核苷酸或氨基酸残基在限定的类别内随机化,例如疏水性氨基酸、亲水性残基、立体偏向(小或大)残基、为了产生核酸结合域、产生半胱氨酸、交联、SH-3 结构域的脯氨酸、磷酸化位点的丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸或组氨酸等、或嘌呤等。

[0324] 在一个优选实施方案中,候选生物活性剂是核酸。本文中的“核酸”或“寡核苷酸”或语法上的对应词意指至少两个共价连接在一起的核苷酸。本发明的核酸通常含有磷酸二酯键,虽然在一些情况下,如下文所述,可以包括具有交替骨架的核酸类似物,包括例如磷酸酰胺(Beaucage 等, *Tetrahedron* 49(10):1925(1993) 和其中的参考文献; Letsinger, *J. Org. Chem.* 35:3800(1970); Sprinzl 等, *Eur. J. Biochem.* 81:579(1977); Letsinger 等, *Nucl. Acids Res.* 14:3487(1986); Sawai 等, *Chem. Lett.* 805(1984), Letsinger 等, *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470(1988); 和 Pauwels 等, *Chemica Scripta* 26:141(1986)), 硫代磷酸酯(Mag 等, *Nucleic Acid Res.* 19:1437(1991); 和美国专利号 5,644,048), 二硫代磷酸酯(Briu 等, *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321(1989)), 0-甲基氨基磷酸酯键(见 Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), 和肽核酸骨架和键(见 Egholm, *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895(1992); Meier 等, *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008(1992); Nielsen, *Nature*, 365:566(1993); Carlsson 等, *Nature* 380:207(1996), 所有在此引入以供参考)。其它类似核酸包括具有正骨架(positive backbone)(Denpcy 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097(1995)); 非离子骨架(美国专利号 5,386,023、5,637,684、5,602,240、5,216,141 和 4,469,863; Kiedrowski 等, *Angew. Chem. Intl. Ed. English* 30:423(1991); Letsinger 等, *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470(1988); Letsinger 等, *Nucleoside&Nucleotide* 13:1597(1994); 第二和第三章, ASC Symposium Series 580, “Carbohydrate Modifications in Antisense Research”, Ed. Y. S. Sanghui 和 P. Dan Cook; Mesmaeker 等, *Bioorganic&Medicinal Chem. Lett.* 4:395(1994); Jeffs 等, *J. Biomolecular NMR* 34:17(1994); *Tetrahedron Lett.* 37:743(1996)) 和非核糖骨架, 包括美国专利号 5,235,033 和 5,034,506, 和第 6 和 7 章, ASC Symposium Series 580, “Carbohydrate Modifications in Antisense Research”, Ed. Y. S. Sanghui 和 P. Dan Cook 中描述的。含有一个或多个碳环糖的核酸也包括在核酸的定义内(见 Jenkins 等, *Chem. Soc. Rev.* (1995) pp169-176)。在 Rawls, *C&E News* June 2, 1997, p. 35 中描述了几种核酸类似物。所有这些文献在此明确引入以供参考。可进行核糖-磷酸酯骨架的这些修饰便于添加其它的部分, 诸如标记, 或增加这些分子在生理环境中的稳定性和半衰期。另外, 可制备天然存在的模酸和类似物的混合物。或者, 可制备不同核酸类似物的混合物和天然存在的

核酸和类似物的混合物。核酸可以是单链或双链,如所述的,或含有双链或单链两种序列的部分。核酸可以是 DNA,基因组和 cDNA, RNA 或杂合体,其中核酸含有脱氧核糖和核糖核苷酸的任意组合,和碱基的任意组合,包括尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、异胞嘧啶、异鸟嘌呤等。

[0325] 如上对于蛋白质一般所述的,核酸候选生物活性剂可以是天然存在的核酸,随机核酸或“偏向的”随机核酸。例如,可如上对于蛋白质所述使用原核或真核基因组的消化物。

[0326] 在优选实施方案中,候选生物活性剂是文献中可得到的各种有机化学部分。

[0327] 在优选实施方案中,如上所述,可对各个基因和基因产物(蛋白质)进行筛选。在优选实施方案中,可如下在实施例中将基因或蛋白质鉴定为与特定组织及与这些组织相关的病况有关的差异表达的基因。因此,在一个实施方案中,设计筛选用于首先寻找能与 EG-VEGF 结合的候选试剂,然后这些试剂可用于评估候选试剂调节 EG-VEGF 活性的能力的试验。因此,如本领域技术人员应理解的,可进行许多不同试验。

[0328] 在一个实施方案中,EG-VEGF,优选固定在固相支持物上,与多种候选生物活性剂接触,选择与 EG-VEGF 结合的候选活性剂用于进一步研究。如果标记了候选生物活性剂,可直接测定候选生物活性剂的结合。候选生物活性剂可优选用放射性标记。或者,可以用荧光标记。如果候选生物活性剂未被标记,可基于测定的对结合的反应间接测定结合。或者,可基于候选生物活性化合物抑制已知的标记配体的结合的能力,评估与候选生物活性化合物的相互作用。

[0329] 还可以进行调节 EG-VEGF 活性的试剂的筛选。在优选实施方案中,筛选能调节 EG-VEGF 活性的生物活性剂的方法包括步骤:在 EG-VEGF 样品中加入候选生物活性剂,并确定 EG-VEGF 生物活性的改变。“调节 EG-VEGF 活性”包括活性增加、活性下降、或存在的活性类型或种类的变化。因此在该实施方案中,候选试剂应与 EG-VEGF 结合(虽然这可能不是必需的)并改变其本文所述的生物学或生物化学活性。方法包括体外筛选方法,如上面描述的,和体内筛选细胞中 EG-VEGF 的存在、分布、活性或数量的改变。

[0330] 因此在该实施方案中,方法包括合并样品和候选生物活性剂,并评估对 EG-VEGF 活性的作用。通过“EG-VEGF 蛋白活性”或本文中语法上的对应词意指 EG-VEGF 蛋白的生物学活性中的至少一种包括但不限于细胞增殖、趋化性/迁移活性、血管生成、细胞分化和细胞开孔。这些活性优选在产激素组织和细胞中,更优选在产类固醇细胞中是特异的。为特异性活性优选的细胞类型包括那些生殖系统的细胞,包括卵巢、睾丸、前列腺、子宫和胎盘的细胞。特别优选的细胞类型包括卵巢的基质和卵泡膜内层,以及睾丸的 Leydig 细胞。还优选胰和肾上腺皮质的细胞。EG-VEGF 活性的抑制剂抑制任何一种或多种 EG-VEGF 蛋白活性。

[0331] 在一个优选实施方案中,提高 EG-VEGF 蛋白的活性;在另一个优选实施方案中,降低 EG-VEGF 蛋白的活性。因此,作为拮抗剂的生物活性剂在一些实施方案中是优选的,作为激动剂的生物活性剂在其它实施方案中是优选的。

[0332] 在本发明的一个方面,含有 EG-VEGF 序列的细胞通过评估候选药物对 EG-VEGF 的作用而用于药物筛选试验。细胞类型包括正常细胞,和更优选具有异常增殖速率的细胞,包括肿瘤细胞,最优选人肿瘤细胞。

[0333] 评估 EG-VEGF 活性的方法是本领域已知的,包括用培养或原代细胞的生长和存

活率试验。在这些试验中,通常在一段时间内监测细胞群的生长和 / 或存活率,并比较在生物活性剂的不同浓度下或没有生物活性剂下培育的样品。可用诸如 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物 (MTT)、3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑 (MTS) [美国专利号 5,185,450] 和 Alamar Blue 等试剂对细胞数定量,这些试剂在代谢活性细胞存在下转变成显色或荧光化合物。或者,可用结合细胞蛋白的染料(诸如硫代罗丹明 B(SRB) 或结晶紫)对细胞数定量。或者,可用颗粒计数器,诸如 Beckman Coulter 制造的 Coulter Counter™ 直接对细胞计数,或用显微镜观察血细胞计数器上的细胞以计数。优选在锥虫蓝溶液中观察用血细胞计数器计数的细胞,以区别活的和死的细胞。其它对细胞数定量的方法对于本领域技术人员是已知的。这些试验可在任何细胞,包括那些坏死状态下的细胞上进行。

[0334] 一种蛋白质对特定细胞群具有趋化活性,如果它可以直接或间接刺激细胞群的定向取向或运动的话。优选蛋白质有能力直接刺激细胞的定向运动。如下所述,EG-VEGF 具有趋化性。EG-VEGF 的趋化活性不难通过使用细胞趋化性的已知实验(例如下文实施例中所述的迁移试验)确定。

[0335] 在一个优选实施方案中,方法包括在含有 EG-VEGF 的细胞中加入如上所述的候选生物活性剂。优选细胞类型包括几乎任何细胞。细胞含有编码 EG-VEGF 蛋白的核酸(优选重组的)。在一个优选实施方案中,在多种细胞上测试候选试剂的文库。

[0336] 在一个方面,在存在或不存在或先前或随后暴露于生理信号(例如激素、抗体、肽、抗原、细胞因子、生长因子、动作电位、药剂,包括化疗剂、辐射、致癌物、或其它细胞(即细胞-细胞接触))下评估试验。在另一个实施例中,在细胞周期过程的不同阶段进行测定。

[0337] 本文提供的 EG-VEGF 序列还可用于诊断方法。EG-VEGF 的过表达可表明生殖器官中的囊肿或癌。另外,可分析来自病人样品的突变或功能异常的 EG-VEGF。通常,这些方法包括与对照比较来自病人的样品和比较 EG-VEGF 表达。

[0338] F. 抗 EG-VEGF 抗体

[0339] 本发明还提供了抗 EG-VEGF 抗体。示范性抗体包括多克隆、单克隆、人源化、双特异性和异源偶联抗体。

[0340] 1. 多克隆抗体

[0341] 抗 EG-VEGF 抗体可包括多克隆抗体。制备多克隆抗体的方法是技术人员已知的。可在哺乳动物中,例如通过一次或多次注射免疫剂和如需要,佐剂产生多克隆抗体。通常免疫剂和 / 或佐剂通过多次皮下或腹膜内注射而注射到哺乳动物中。免疫剂可包括 EG-VEGF 多肽或其融合蛋白。将免疫剂与已知在被免疫的哺乳动物中有免疫原性的蛋白质偶联可能是有用的。这些免疫原性蛋白质的例子包括但不限于匙孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。可使用的佐剂的例子包括弗式完全佐剂和 MPL-TDM 佐剂(单磷酸脂质 A,合成的二柯立诺麦克酸海藻糖 (synthetic trehalose dicorynomycolate))。免疫方案可由本领域技术人员不经过度实验而选择。

[0342] 2. 单克隆抗体

[0343] 或者,抗 EG-VEGF 抗体还可以是单克隆抗体。单克隆抗体可以用诸如 Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975) 描述的杂交瘤方法制得。在杂交瘤方法中,小鼠、仓鼠或其它合适的宿主动物,通常用免疫剂免疫以引发产生或能够产生特异性结合免疫剂的抗体

的淋巴细胞。或者,可以体外免疫淋巴细胞。

[0344] 免疫剂通常包括 EG-VEGF 多肽或其融合蛋白。通常用外周血淋巴细胞 (“PBL”), 如果需要人来源的细胞,或用脾细胞或淋巴结细胞,如果需要非人哺乳动物来源。然后用合适的融合剂,诸如聚乙二醇融合淋巴细胞和永生化细胞系,以形成杂交瘤细胞 [Goding, *Monoclonal Antibodies :Principles and Practic*, pp. 59-103, Academic Press, 1986]。永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿类、牛和人来源的骨髓瘤细胞。通常使用大鼠或小鼠的骨髓瘤细胞系。将杂交瘤细胞培养在合适的培养基中,培养基中优选含有一种或多种抑制非融合的永生化细胞生长或存活物质。例如,如果亲本细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT), 杂交瘤培养基中一般含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷这些阻止 HGPRT 缺陷型细胞生长的物质 (HAT 培养基)。

[0345] 优选的永生化细胞系是那些融合效率高、支持选定的抗体产生细胞稳定且高水平表达抗体、而且对诸如 HAT 培养基敏感的细胞。更优选的永生化细胞系是鼠骨髓瘤细胞系,例如可从索尔克研究所细胞分配中心 (Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA) 和美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia USA) 获得的。也有用人骨髓瘤细胞系和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系来生产人单克隆抗体 (Kozbor, *J. Immunol.* 133 :3001 (1984) ;Brodeur 等,《单克隆抗体的生产技术和应用》(*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*), pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0346] 然后可对生长有杂交瘤细胞的培养液进行分析,检测针对 EG-VEGF 的单克隆抗体的存在。优选免疫沉淀法或诸如放射免疫分析 (RIA) 或酶联免疫吸附分析 (ELISA) 的体外结合分析法,来测定由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。这些技术和测定法在本领域是已知的。例如,单克隆抗体的结合亲和力可以用 Scatchard 分析 (Munson and Pollard, *Anal. Biochem.* 107 :220 (1980)) 来测定。

[0347] 在鉴定所需的杂交瘤细胞后,可以用有限稀释程序将克隆亚克隆化,并用标准方法培养 (Goding, 见上)。就此目的而言,合适的培养基包括例如 Dulbecco 氏改良的 Eagles 氏培养基和 RPMI-1640 培养基。或者,杂交瘤细胞可以腹水瘤的形式在哺乳动物体内培养。

[0348] 利用常规免疫球蛋白纯化技术,诸如蛋白 A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析,可从培养液、腹水液中分离或纯化由亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0349] 通过重组 DNA 方法,诸如美国专利号 4, 816, 567 中所述可制备单克隆抗体。使用常规方法,可以方便地分离出编码本发明单克隆抗体的 DNA 并进行测序 (例如,使用能与编码鼠抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。本发明的杂交瘤细胞是作为 DNA 的优选来源。一旦被分离,可以将 DNA 置于表达载体中,表达载体然后被转染到诸如猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞等并不另外产生免疫球蛋白的宿主细胞内,从而在重组宿主细胞内获得合成的单克隆抗体。可例如通过用人重链和轻链恒定区的编码序列取代同源鼠序列 [美国专利号 4, 816, 567 ;Morrison 等, 见上], 或通过将免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列共价连接来修饰 DNA。可用这样的非免疫球蛋白多肽取代本发明抗体的恒定区,或可取代本发明抗体的一个抗原结合位点的可变区,以建立嵌合二价抗体。

[0350] 抗体可以是单价抗体。制备单价抗体的方法是本领域熟知的。例如,一种方法涉

及免疫球蛋白轻链和修饰的重链的重组表达。重链通常在 Fc 区的任何点被截短,从而防止重链交联。或者,用另一种氨基酸残基取代相关的半胱氨酸残基,或删除半胱氨酸残基,以防止交联。

[0351] 体外方法也适合制备单价抗体。可用本领域已知的常规技术完成抗体的消化产生其片段,特别是 Fab 片段。

[0352] 3. 人和人源化抗体

[0353] 本发明的抗 EG-VEGF 抗体还可包括人源化抗体或人抗体。非人(例如鼠)的抗体的人源化形式是嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或抗体的其它抗原结合序列),它含有极少量衍生自非人免疫球蛋白的序列。人源化抗体包括人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种(供体抗体),诸如小鼠、大鼠或家兔的具有所需特异性、亲和力和能力的 CDR 的残基取代。在有些例子中,人免疫球蛋白的 Fv 框架残基被相应的非人残基取代。人源化抗体还可含有既不在受体抗体也不在输入的 CDR 或框架序列中发现的残基。一般人源化抗体基本包含至少一个,通常两个可变区的全部,其中全部或基本全部 CDR 区对应于非人免疫球蛋白的区域,全部或基本全部 FR 区是人免疫球蛋白共有序列。人源化抗体还任选含有至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白 [Jones 等, Nature, 321 : 522-525(1986); Riechmann 等, Nature, 332 : 323-329(1988); 和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2 : 593-596(1992)]。

[0354] 人源化非人抗体的方法是本领域已知的。通常人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称作“输入”残基,它们通常取自“输入”可变区。人源化基本可用 Winter 和同事的方法进行 [Jones 等, Nature, 321 : 522-525(1986); Reichmann 等, Nature, 332 : 323-327(1988); Verhoeyen 等, Science, 239 : 1534-1536(1988)], 通过用啮齿类动物 CDR 或 CDR 序列取代人抗体的相应序列。因此,这种“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利号 4,816,567),其中基本小于完整人可变区被相应的来自非人物种的序列取代。在实践中,人源化抗体通常是人抗体,其中一些 CDR 残基和可能一些 FR 残基被啮齿类动物抗体中类似位点的残基取代。

[0355] 也可用各种本领域已知的技术制备人抗体,包括噬菌体展示文库 [Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol., 227 : 381(1991); Marks 等, J. Mol. Biol., 222 : 581(1991)]。Cole 等和 Boerner 等的技术也可用于制备人单克隆抗体 (Cole 等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77(1985) 和 Boerner 等, J. Immunol., 147(1) : 86-95(1991))。类似的,可通过在转基因动物,例如小鼠中引入人免疫球蛋白基因座来制备人抗体,其中内源免疫球蛋白基因被部分或完全灭活。在攻击后,观察到人抗体产生,它在所有方面都非常像在人中所见到的,包括基因重排、装配和抗体全集。在例如美国专利号 5,545,807 ; 5,545,806 ; 5,569,825 ; 5,625,126 ; 5,633,425 ; 5,661,016 和下列科学出版物中: Marks 等, Bio/Technology 10, 779-783(1992); Lonberg 等, Nature 368 856-859(1994); Morrison, Nature 368, 812-13(1994); Fishwild 等, Nature Biotechnology 14, 845-51(1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826(1996); Lonberg 和 Huszar, Intern. Rev. Immunol. 1365-93(1995) 中描述了该方法。

[0356] 4. 双特异性抗体

[0357] 双特异性抗体是单克隆, 优选人或人源化抗体, 它具有至少两种不同抗原的结合特异性。在目前的情况下, 结合特异性之一是 EG-VEGF, 另一种是任何其它抗原, 优选是细胞表面蛋白或受体或受体亚基。

[0358] 制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。传统上双特异性抗体的重组产生基于两对免疫球蛋白重链 / 轻链的共表达, 其中两条重链具有不同的特异性 [Milstein 和 Cuello, *Nature*, 305 :537-539(1983)]。由于免疫球蛋白重和轻链的随机分类, 这些杂交瘤 (四体杂交瘤 quadroma) 产生 10 种不同抗体分子的可能混合物, 其中仅 1 种有正确的双特异性结构。正确分子的纯化通常通过亲和层析步骤完成。类似的方法在 W0 93/08829, 1993 年 5 月 13 日出版和 Traunecker 等, *EMBO J.*, 10 :3655-3659(1991) 中公开。

[0359] 具有所需结合特异性 (抗体-抗原结合位点) 的抗体可变区可与免疫球蛋白恒定区序列融合。融合优选是和免疫球蛋白重链恒定区, 包括至少一部分绞链、CH2 和 CH3 区。优选在至少一种融合体中具有第一重链恒定区 (CH1), 其含有轻链结合必需的位点。编码免疫球蛋白重链融合体的 DNA 和如需要, 免疫球蛋白轻链被插入分开的表达载体, 在合适宿主生物中共转染。对于产生双特异性抗体的进一步细节见例如 Suresh 等, *Methods in Enzymology*, 121 :210(1986)。

[0360] 根据在 W096/27011 中描述的另一种方法, 可在一对抗体分子之间的界面进行工程改造, 使从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比最大化。优选的界面含有抗体恒定区的至少一部分 CH3 区。在该方法中, 第一抗体分子的界面上的一个或多个小氨基酸侧链用较大的侧链 (如酪氨酸或色氨酸) 替换。与大侧链大小相同或相似的、补偿性的“空穴”可在第二抗体分子的界面上形成, 即将大的氨基酸侧链用较小的侧链 (如丙氨酸或苏氨酸) 替换。这提供了一种机理, 提高了异二聚体的产量超过其它不需要的终产物 (诸如同二聚体)。

[0361] 可作为全长抗体或抗体片段 (例如 F(ab)₂ 双特异性抗体) 制备双特异性抗体。文献中已记载了从抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如, 双特异性抗体可用化学连接方法制备。Brennan 等, *Science* 229 :81(1985) 描述了一种方法, 其中完整的抗体被蛋白水解切开, 产生 F(ab')₂ 片段。这些片段在二硫醇络合剂亚砷酸钠存在下被还原, 从而稳定了邻近的二硫醇并防止形成分子间的二硫键。产生的 Fab' 片段然后被转变成硫代硝基苯甲酸酯 (TNB) 衍生物。Fab' -TNB 衍生物中的一种然后通过用巯基乙胺还原而被再转变成 Fab' -巯基, 再与等摩尔量的另一种 Fab' -TNB 衍生物混合, 从而形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作选择性固定酶的试剂。

[0362] 从大肠杆菌中直接回收 Fab' 片段, 并化学偶联形成双特异性抗体。Shalaby 等, *J. Exp. Med.*, 175 :217-225(1992) 描述了完全人源化的双特异性抗体 F(ab')₂ 分子的产生。分别从大肠杆菌分泌各 Fab' 片段, 进行体外定向化学偶联, 形成双特异性抗体。因此, 形成的双特异性抗体能够与过表达 ErbB2 受体的细胞和正常人 T 细胞结合, 并触发人细胞毒性淋巴细胞针对人乳房肿瘤靶标的裂解作用。

[0363] 各种直接从重组细胞培养物制备和分离双特异性抗体片段的技术已有描述。例如, 已用亮氨酸拉链产生了双特异性抗体。Kostelny 等, *J. Immunol.* 148(5) : 1547-1553(1992)。来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两个不同抗体的 Fab' 部分连接。该抗体同二聚体在绞链区被还原形成单体, 然后重新氧化成抗体异

二聚体。该方法还可以用来产生抗体同二聚体。Hollinger 等在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448(1993) 中所述的“双抗体”技术,提供了另一种制备双特异性抗体片段的机制。所述片段包含通过接头而连接在一起的轻链可变区 (V_L) 和重链可变区 (V_H), 接头很短以致于同一链上的两个结构域之间无法配对。所以,一个片段的 V_H 和 V_L 结构域被迫与另一个片段的互补性 V_L 和 V_H 结构域配对,由此形成两个抗原结合位点。利用单链 Fv (sFv) 二聚体制备双特异性抗体片段的其它方法也已有报道。参见 Gruber 等, J. Immunol. 152 :5368(1994)。考虑了具有多于二价的抗体。例如,可制备三特异性抗体。Tutt 等, J. Immunol. 147 :60(1991)。

[0364] 示范性双特异性抗体可与本文的给定 EG-VEGF 多肽上的两个不同表位结合。或者,抗 EG-VEGF 多肽臂可与一条臂结合,它与白细胞上的触发性分子,诸如 T-细胞受体分子(例如 CD2、CD3、CD28 或 B7),或 IgG 的 Fc 受体 (Fc R), 诸如 Fc RI (CD64)、Fc RII (CD32) 和 Fc RIII (CD16) 结合,从而将细胞防御机制集中于表达特定 EG-VEGF 多肽的细胞。还可用双特异性抗体将细胞毒性剂定位到表达特定 EG-VEGF 多肽的细胞上。这些抗体具有 EG-VEGF 结合臂和一条臂,它结合细胞毒性剂或放射性核素螯合剂,诸如 EOTUBE、DPTA、DOTA 或 TETA。感兴趣的另一种双特异性抗体与 EG-VEGF 多肽结合,还与组织因子 (TF) 结合。

[0365] 5. 异源偶联物

[0366] 异源偶联抗体也在本发明范围内。异源偶联抗体由两个共价结合的抗体组成。例如这些抗体建议用于将免疫系统细胞靶向到不需要的细胞 [美国专利 No. 4, 676, 980], 治疗 HIV 感染 [W091/00360 ;W092/00373 ;EP 03089]。考虑到抗体可用合成蛋白质化学中已知的方法体外制备,包括那些涉及交联剂的方法。例如免疫毒素可以用二硫键交换反应或通过形成硫醚键制备。用于该目的合适试剂的例子包括亚氨基硫醇酯 / 盐和 4- 巯基丁酰亚胺酸甲酯,和例如美国专利号 4, 676, 980 中公开的。

[0367] 6. 效应子功能改造

[0368] 可能在效应子功能方面需要对本发明抗体进行修饰,从而增强抗体在例如治疗癌症中的效果。例如,可在 Fc 区内引入半胱氨酸残基,由此允许在该区形成链间二硫键。由此形成的同源二聚体抗体可以具有改善的内在化能力和 / 或提高的补体介导的细胞杀伤性和抗体依赖性细胞细胞毒性 (ADCC)。参见 Caron 等, J. Exp. Med 176 :1191-1195(1992) 和 Shopes, J. Immunol. 148 :2918-2922(1992)。抗肿瘤活性增强的同源二聚体抗体还可以如 Wolff 等在 Cancer Research 53 :2560-2565(1993) 中所述使用异双功能交联剂来制备。或者,抗体可以经工程改造后具有两个 Fc 区,并由此加强补体裂解和 ADCC 能力。参见 Stevenson 等, Anti-Cancer Drug Design 3 :219-230(1989)。

[0369] 7. 免疫偶联物

[0370] 本发明还涉及包含与细胞毒剂偶联的所述抗体的免疫偶联物,细胞毒剂诸如化疗剂、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(即放射性偶联物)。

[0371] 可用于产生所述免疫偶联物的化疗剂已在前文论述过。可以使用的酶活性毒素及其片段包括:白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、莨菪根毒素 A 链、 α -帚曲霉素 (α -sarcin)、油桐 (*Aleutites fordii*) 毒蛋白、香石竹 (*dianthin*) 毒蛋白、美洲商

陆 (*Phytolaca americana*) 毒蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制物、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草 (*sapaonaria officinalis*) 抑制物、白树毒素、米托菌素 (mitogellin)、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、伊诺霉素 (enomycin) 和单端孢菌素 (tricothecenes)。有多种放射性核素可用产生成放射性偶联的抗体。例子包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

[0372] 抗体与细胞毒剂的偶联物可用各种双官能蛋白偶联剂制备, 诸如 N-琥珀酰亚基-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯 (SPDP)、亚氨基硫烷 (IT)、亚氨酸酯 (例如盐酸己二酰亚胺酸二甲酯)、活泼酯 (诸如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛 (诸如戊二醛)、二叠氮化合物 (诸如二(对叠氮基苯甲酰)己二胺)、二重氮衍生物 (诸如二-(对重氮苯甲酰)-己二胺)、二异氰酸酯 (诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯) 和二活性氟化合物 (诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯) 的双官能衍生物。例如, 蓖麻毒蛋白免疫毒素可以如 Vitetta 等在 Science 238:1098(1987) 中所述的方法来制备。碳 14 标记的 1-异硫氰酰苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是一种例示性的用于将放射性核素与抗体偶联的螯合剂。参见 W094/11026。

[0373] 在另一实施方案中, 为了用于肿瘤预靶向, 抗体可以与“受体” (诸如链霉亲合素) 偶联, 并给患者施用抗体-受体偶联物, 接着用清除剂去除循环系统中未结合的偶联物, 然后施用与细胞毒剂 (例如放射性核素) 偶联的“配体” (例如亲合素)。

[0374] 8. 免疫脂质体

[0375] 本处所公开的抗体还可以制成免疫脂质体。含有抗体的脂质体是用本领域已知方法制备的, 诸如以下所述: Epstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 和美国专利 4,485,045 和 4,544,545。美国专利 5,013,556 公开了具有增加循环时间的脂质体。

[0376] 特别有用的脂质体可以通过含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生的磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的脂质组合物, 用反相蒸发法生成。将脂质体挤压通过一定孔径的滤器形成具有所需直径的脂质体。如 Martin 等在 J. Biol. Chem. 257:286-288(1982) 中所述, 可通过二硫键互换反应将本发明的抗体的 Fab' 片段与脂质体偶联。脂质体内可以任选地包含化疗剂 (例如多柔比星 (Doxorubicin))。参见 Gabizon 等, J. National Cancer Inst. 81(19)1484(1989)。

[0377] 9. 抗体的药物组合物

[0378] 可施用与本文所述的 EG-VEGF 多肽特异性结合的抗体, 或通过上文公开的筛选试验鉴定的其它分子, 以药物组合物形式的治疗各种疾病。

[0379] 如果在胞内靶向 EG-VEGF 多肽, 而且全抗体用作抑制剂, 优选内在化抗体。然而也可用脂转染或脂质体将抗体或抗体片段投递到细胞内。当使用抗体片段时, 优选与靶蛋白的结合结构域特异性结合的最小抑制性片段。例如, 基于抗体的可变区序列, 可设计肽分子, 它保留与靶蛋白序列结合的能力。这些肽可化学合成和/或通过重组 DNA 技术产生。见例如 Marasco 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893(1993)。本发明制剂还可以包含一种以上治疗特定适应症所需的活性化合物, 它们优选具有互补的活性但不相互产生不利影响。或者/另外, 组合物可含有增强其功能的制剂, 诸如例如细胞毒性剂、细胞因子、化疗剂、或生长抑制剂。所述分子以适合预定目的所需的有效量相互组合。

[0380] 活性成份还可以包载在分别通过凝聚法或界面聚合法制备的例如羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊中,胶态药物投递系统(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)中或粗乳状液中。在 Remington's Pharmaceutical Sciences(见上)中叙述了此类技术。

[0381] 用于体内施用的制剂必须是无菌的。通过灭菌滤膜过滤可以方便地做到这一点。

[0382] 可以制备持续释放制剂。合适的持续释放制剂包括包含所述抗体的固体疏水聚合物的半渗透基质体,所述的基质体是有形的物体,例如膜或微胶囊。合适的持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚乙烯醇)、聚交酯(美国专利 3,773,919)、L-谷氨酸和 L-谷氨酸乙酯的共聚物、非降解性乙烯-乙酸乙烯、诸如 Lupron Depot™(由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林组成的可注射微球体)的可降解乳酸-乙醇酸共聚物和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。诸如乙烯-乙酸乙烯和乳酸-乙醇酸的聚合物能够使分子释放 100 天以上,有些水凝胶在较短时间内释放蛋白质。当胶囊化的抗体在体内保留长时间时,它们可能会因为在 37°C 暴露于水分而变性或凝聚,导致生物活性丧失并可能造成免疫原性改变。根据有关的机制可以设计出合理的稳定化策略。例如,如果发现凝聚机制是通过硫-二硫键互换而形成分子间的 S-S 键,可以通过修饰巯基残基、冻干酸性溶液、控制含水量、使用合适的添加剂和开发特殊的聚合物基质组合物达到稳定化。

[0383] G. 抗 EG-VEGF 抗体的使用

[0384] 本发明的抗 EG-VEGF 抗体具有许多用途。例如,抗 EG-VEGF 抗体可用于 EG-VEGF 的诊断试验,例如检测其在特定细胞、组织或血清中的表达。可使用本领域已知的各种诊断试验技术,诸如以异源或同源状态进行的竞争性结合试验,直接或间接夹层试验和免疫沉淀试验[Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158(CRC Press, Inc., 1987)]。可用可检测部分标记用于诊断试验的抗体。可检测部分应能直接或间接产生可检测信号。例如,可检测部分可以是放射性同位素,诸如 ³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、或 ¹²⁵I, 荧光或化学发光化合物,诸如异硫氰酸荧光素、罗丹明或萤光素,或酶,诸如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶。可使用任何本领域已知的方法将抗体与可检测部分偶联,包括 Hunter 等, Nature, 144:945(1962); David 等, Biochemistry, 13:1014(1974); Pain 等, J. Immunol. Meth., 40:219(1981); 和 Nygren, J. Histochem and Cytochem, 30:407(1982) 所述的方法。

[0385] 抗 EG-VEGF 抗体还可用于从重组细胞培养物或天然来源亲和纯化 EG-VEGF。在该过程中,用本领域熟知的方法将针对 EG-VEGF 的抗体固定在合适的支持物上,诸如 Sephadex 树脂或滤纸上。然后使固定化抗体与含有要纯化的 EG-VEGF 的样品接触,然后用合适的溶剂洗涤支持物,基本上除去样品中的所有物质,除了 EG-VEGF,它与固定化抗体结合。最后,用从抗体释放 EG-VEGF 的另一种合适溶剂洗涤支持物。另外,抗 EG-VEGF 抗体可用作治疗 and 诊断试剂,可用于治疗和 / 或诊断先前关于 EG-VEGF 和 EG-VEGF 拮抗剂讨论的病况。

[0386] 提供下列实施例仅为了说明,而不是要以任何形式限制本发明的范围。

[0387] 本说明书所引用的全部专利和文献在此完整引入以供参考。

[0388] 实施例

[0389] 除非另外说明,根据厂商说明书使用实施例中所提到的市售试剂。在下列实

施例和整篇说明书中,用 ATCC 登录号鉴别的细胞的来源是美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA。

[0390] 实施例 1

[0391] 编码人 EG-VEGF 的 cDNA 克隆的分离

[0392] 用 Genetech, Inc. (South San Francisco, CA) 开发的专利 (proprietary) 信号序列搜寻算法 (图 20A-Q) 从公众 (例如 GenBank) 和 / 或私人 (LIFESEQ™, IncytePharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA) 数据库的 EST 及成簇和装配好的 EST 片段鉴定 DNA60621-1516。信号序列算法根据围绕考虑中的序列或序列片段 5' 末端的第一和任选的第二个甲硫氨酸密码子 (ATG) 的 DNA 核苷酸的特征,计算出分泌信号评分。在第一个 ATG 后的核苷酸必须编码至少 35 个明确的氨基酸,而没有任何终止密码子。如果第一个 ATG 具有所需氨基酸,就不检测第二个。如果都不符合要求,就不对候选序列评分。为了确定 EST 序列是否含有真的信号序列,用一组 7 个已知与分泌信号有关的传感器 (评估参数) 对围绕 ATG 密码子的 DNA 和相应氨基酸序列评分。

[0393] 上述信号序列算法的使用能够鉴定出来自 LIFESEQ™ 数据库, IncytePharmaceuticals, Palo Alto 的 EST 簇序列,本文中称为 DNA157032。然后将此 EST 簇序列与各种表达序列标签 (EST) 数据库比较,其中包括公开的 EST 数据库 (例如 GenBank) 和专利 EST DNA 数据库 (LIFESEQ™, IncytePharmaceuticals, Palo Alto, CA) 以鉴定存在的同源性。用计算机程序 BLAST 或 BLAST2 (Altschul 等, Methods in Enzymology 266 : 460-480 (1996)) 进行同源性检索。在 BLAST 评分中得到 70 (有时 90) 或更高的比较不编码已知的蛋白质,它们用程序“phrap” (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington) 成簇并装配成一条共有 DNA 序列。从其中得到的共有序列如图 4 (SEQ ID NO : 3) 所示,其中本文中的共有序列被称为 DNA56748。

[0394] 根据 DNA56748 序列和 Incyte 数据库的克隆号 3476792 中包含的 EST 序列之间观察到的序列同源性,购买克隆号 3476792,得到 cDNA 插入物并测序。从卵巢组织文库中分离到克隆号 3476792。组织切片发现后浆膜 (posterior serosa) 含有子宫内膜异位症的病灶。相关肿瘤组织的病理学显示大小不等的多个平滑肌瘤。本文发现 cDNA 插入物编码全长蛋白。此 cDNA 插入物的序列如图 1 所示,在本文中称为 DNA60621-1516。

[0395] 克隆 DNA60621-1516 含有一个开放阅读框,它在核苷酸 91-93 位具有表观翻译起始位点,在核苷酸 406-408 位的终止密码子终止 (图 1)。预测的多肽前体长 105 个氨基酸 (图 2)。图 2 所示的全长 EG-VEGF 蛋白具有约 11715 道尔顿的估计分子量,和约 9.05 的 pI。成熟 EG-VEGF 是 8600 道尔顿的蛋白质,由从人卵巢文库克隆的 cDNA 编码。1.4kb cDNA 编码具有明确的信号序列的 105 个氨基酸的蛋白质。EG-VEGF 是富含半胱氨酸的蛋白质,它由共脂肪酶折叠基序构成。在成熟蛋白质预期的 86 个氨基酸中,10 个是半胱氨酸 (图 1 5a 和 b)。蛋白质含有一系列具有大连接环的短 β 链,它们通过二硫键保持在一起,得到具有指状突起的平面折叠,作为相互作用的表面。图 2 (SEQ ID NO : 2) 所示的全长 EG-VEGF 序列的分析证明如图 2 所示存在各种重要的多肽结构域,其中这些重要多肽结构域提供的位置大约是如上所述的。克隆 DNA60621-1516 于 1998 年 8 月 4 日保藏在 ATCC,指定的 ATCC 保藏号 203091。

[0396] 用 ALIGN-2 序列对比分析图 2 (SEQ ID NO : 2) 所示的全长序列,分析 Dayhoff 数据

库 (35.45 版, SwissProt 35), 证明 EG-VEGF 氨基酸序列和下列 Dayhoff 序列之间的序列同一性: VRPA_DENPO、LFE4_CHICK、AF034208_1、AF030433_1、A55035、COL_RABIT、CELBO507_9、S67826_1、S34665 和 CRU73817_1。

[0397] 值得注意的是, EG-VEGF 与从黑树眼镜蛇 (*Dendroaspis polylepsis*) 纯化的无毒的蛋白, 称为毒液蛋白 A (VRPA) [Joubert 和 Strydom, *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Phys. Chemie*, 361:1787-1794 (1980)] 显示高度的同源性 (80%) 和同一性 (63%), 和与铃蟾 (*Bombina variegata*) 分离的肽, 称为“Bv8” [Wechselberger 等, *FEBS Lett.*, 462:177-181 (1999)] 密切相关的人分子具有高度同源性 (76%) 和同一性 (58%)。图 15b 说明了该同源性。在图 15b 中, 加框的残基表示同一性, 标出了人 EG-VEGF、蛇 VRPA 和人 BV8 同系物 (Bv8hom) 氨基酸序列。应注意的, EG-VEGF 的半胱氨酸的数目和间距是完全保守的。因此 EG-VEGF 是 VRPA 和 Bv8 的人直向同系物或密切相关的同系物。EG-VEGF 显示与爪蟾 (*Xenopus*) 头部形成体 (head organizer) dickkopf, (一种 wnt 信号传递的抑制剂) 的富含半胱氨酸的羧基序列和共脂肪酶具有更有限但显著的同源性, 如图 15c 所见 [Glinka 等, *Nature*, 391:357-362; Aravind 和 Koonin, *Curr. Biology*, 8:477-478 (1998)]。图 15c 是人 EG-VEGF、人 dickkopf-3 (hdkk3) [Krupnik 等, *Gene*, 238:301-313 (1999)]、爪蟾 dkk-1 (xdkk1) [Glinka 等, *Nature*, 391:357-362 (1998)] 和猪共脂肪酶 (col) 的序列对比。这图示了形成共脂肪酶折叠域的特征性二硫键键合模式的保守半胱氨酸 [van Tilbeurgh 等, *Nature*, 359:159-162 (1992)]。EG-VEGF 中的该基序与人 dkk-3 的富含半胱氨酸的 C-末端结构域具有 37% 同一性和 41% 同源性, 与爪蟾 dkk-1 结构域具有 32% 同一性和 42% 同源性。数字表示各蛋白中的氨基酸位置, 加框的残基与 EG-VEGF 相同。

[0398] 实施例 2

[0399] 用 EG-VEGF 作为杂交探针

[0400] 下列方法描述了用编码 EG-VEGF 的核苷酸序列作为杂交探针。

[0401] 用含有全长或成熟 EG-VEGF 的编码序列的 DNA 作为探针筛选人组织 cDNA 文库中或人组织基因组文库中的同源 DNA (诸如那些编码 EG-VEGF 的天然存在的变体)。

[0402] 在下列高严谨条件下进行含有任一文库 DNA 的滤膜杂交和洗涤。在 50% 甲酰胺、5×SSC、0.1% SDS、0.1% 焦磷酸钠、50mM 磷酸钠、pH6.8、2×Denhardt 氏溶液和 10% 硫酸葡聚糖的溶液中, 于 42°C 将放射性标记的 EG-VEGF 衍生的探针与滤膜杂交 20 小时。在 42°C, 在 0.1×SSC 和 0.1% SDS 的水溶液中洗涤滤膜。

[0403] 然后可用本领域已知的标准技术鉴定与编码全长天然序列 EG-VEGF 的 DNA 具有所需序列同一性的 DNA。

[0404] 实施例 3

[0405] 大肠杆菌中 EG-VEGF 的表达

[0406] 该实施例说明在大肠杆菌中通过重组表达制备非糖基化形式的 EG-VEGF。

[0407] 用所选的 PCR 引物最初扩增了编码 EG-VEGF 的 DNA 序列。引物应该含有限制性酶位点, 它们对应于所选表达载体上的限制性酶位点。可使用各种表达载体。合适的载体的例子是 pBR322 (衍生自大肠杆菌, 见 Bolivar 等, *Gene*, 2:95 (1977)), 它含有氨苄青霉素和四环素抗性的基因。用限制性酶消化载体并去磷酸化。然后将 PCR 扩增的序列连接入载体。载体优选包括编码抗生素抗性基因、trp 启动子、polyhis 前导序列 (包括开始的 6 个 STII

密码子、polyhis 序列和肠激酶切割位点)、EG-VEGF 编码区、 λ 转录终止子和 argU 基因的序列。

[0408] 然后使用 Sambrook 所述的方法(见上),用连接混合物转化所选的大肠杆菌菌株。通过其在 LB 平板上生长的能力鉴定转化子,然后选择抗生素抗性菌落。可分离质粒 DNA 并用限制性分析和 DNA 测序确定。

[0409] 所选的克隆可在补加抗生素的液体培养基(诸如 LB 肉汤)中培养过夜。然后可用过夜培养物接种大规模培养物。然后使细胞长到所需的光密度,在这段时间中表达启动子被启动。

[0410] 再培养细胞数小时后,可离心收集细胞。可用本领域已知的各种试剂溶解离心获得的细胞沉淀,可用金属螯合柱在使蛋白质紧密结合的条件下纯化溶解的 EG-VEGF 蛋白。

[0411] 可在大肠杆菌中以 poly-His 标记的形式用下列方法表达 EG-VEGF。用所选的 PCR 引物最初扩增编码 EG-VEGF 的 DNA。引物含有限制性酶位点(对应于所选表达载体上的限制性酶位点),和其它有用的序列用于有效和可靠的启动翻译,在金属螯合柱上快速纯化,和用肠激酶蛋白水解去除。PCR 扩增的 poly-his 标记的序列然后连接入表达载体,用于转化基于菌株 52 的大肠杆菌宿主(W3110 fuhA(tonA)lon galE rpoHts(htpRts)clpP(lacIq))。转化株首先在含有 50mg/ml 羧苄青霉素的 LB 中 30°C 振荡培养,直到达到 3-5 的 OD600。然后在 CRAP 培养基(在 500ml 水中混合 3.57g(NH₄)₂SO₄、0.71g 柠檬酸钠·2H₂O、1.07g KCl、5.36g Difco 酵母提取物、5.36g Sheffield hycase SF 和 110mM MPOS, pH7.3, 0.55% (w/v) 葡萄糖和 7mM MgSO₄ 制备)中将培养物稀释 50-100 倍,并在 30°C 振荡培养约 20-30 小时。移去样品,用 SDS-PAGE 分析验证表达,离心大量培养物沉淀细胞。冷冻细胞沉淀直到纯化和重折叠。

[0412] 将 0.5-1L 发酵的大肠杆菌浆(6-10g 沉淀)重悬浮于 10 倍体积(w/v)的 7M 胍, 20mM Tris, pH8 缓冲液中。加入固体硫酸钠和连四硫酸钠分别使最终浓度为 0.1M 和 0.02M, 4°C 搅拌溶液过夜。此步骤导致由亚硫酸化(sulfitolization)封闭所有半胱氨酸残基的变性蛋白质。在 Beckman 超速离心机中 40,000rpm 离心溶液 30 分钟。用 3-5 倍体积的金属螯合柱缓冲液(6M 胍, 20mM Tris, pH7.4)稀释上清液,并滤过 0.22 微米滤膜以澄清。将澄清的提取物加到用金属螯合柱缓冲液平衡的 5 毫升 Qiagen Ni-NTA 金属螯合柱上。用含有 50mM 咪唑(Calbiochem, Utrol grade), pH7.4 的另外缓冲洗涤柱。用含有 250mM 咪唑的缓冲液洗脱蛋白质。合并含所需蛋白的级分并在 4°C 储藏。用根据其氨基酸序列计算的消光系数,用其在 280nm 的吸光度估计蛋白质浓度。

[0413] 通过缓慢地将样品稀释入新鲜制备的重折叠缓冲液(含有 20mM Tris, pH8.6, 0.3M NaCl, 2.5M 胍、5mM 半胱氨酸、20mM 甘氨酸和 1mM EDTA)来重新折叠蛋白质。选择重折叠体积使最终蛋白浓度在 50-100 微克/毫升之间。在 4°C 温和搅拌重折叠溶液 12-36 小时。加入最终浓度为 0.4% (pH 约 3) 的 TFA 以淬灭重折叠反应。在进一步纯化蛋白质之前,溶液滤过 0.22 微米滤膜,并加入最终浓度为 2-10% 的乙腈。在 Poros R1/H 反相柱上用流动缓冲液 0.1% TFA 层析重折叠的蛋白质,用 10-80% 的乙腈梯度洗脱。在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上分析具有 A280 吸光度的级分等份,合并含有同质重折叠蛋白质的级分。通常在最低浓度的乙腈洗脱出大多数蛋白质的正确重折叠形式,因为这些物质最紧密,其疏水的内部不与反相层析树脂相互作用。在较高的乙腈浓度通常洗脱出聚集物质。除了将错误折叠形式的

蛋白质与所需形式分开,反相步骤还从样品中除去了内毒素。

[0414] 合并含有所需折叠的 EG-VEGF 多肽的级分,对溶液通温和氮气流除去乙腈。蛋白质通过透析或通过凝胶过滤(用在制剂缓冲液中平衡的 G25Superfine (Pharmacia) 树脂)配制到 20mM Hepes, pH6.8 和 0.14M 氯化钠和 4%甘露醇中,并无菌过滤。

[0415] 实施例 4

[0416] EG-VEGF 在哺乳动物细胞中的表达

[0417] 该实施例说明用哺乳动物细胞中的重组表达制备可能糖基化形式的 EG-VEGF。

[0418] 用载体 pRK5(见 EP307,247,1989 年 3 月 15 日出版)作为表达载体。任选的,用诸如 Sambrook 等,见上所述的连接方法将 EG-VEGF DNA 连接入用所选限制性酶消化的 pRK5,以插入 EG-VEGF DNA。得到的载体称为 pRK5-EG-VEGF。

[0419] 在一个实施方案中,所选的宿主细胞可以是 293 细胞。人 293 细胞(ATCCCL 1573)在组织培养皿中的培养基(诸如补充胎牛血清和任选的营养成分和/或抗生素的 DMEM)中生长至汇合。将约 10g pRK5-EG-VEGF DNA 与约 1g 编码 VA RNA 基因的 DNA[Thimmappaya 等,Cell,31:543(1982)]混合并溶于 500 升 1mM Tris-HCl、0.1mM EDTA、0.227M CaCl₂ 中。在混合物中滴加 500 升 50mM HEPES(pH7.35)、280mM NaCl、1.5mM NaPO₄,在 25°C 形成沉淀 10 分钟。悬浮沉淀物并加到 293 细胞中,37°C 放置约 4 小时。吸去培养液,加入 2mL 含 20%甘油的 PBS 达 30 秒。然后用无血清培养液洗涤 293 细胞,加入新鲜培养基,培养细胞约 5 天。

[0420] 转染后约 24 小时,移去培养基,并用培养基(单独)或含有 200Ci/ml³⁵S- 半胱氨酸和 200Ci/ml³⁵S- 甲硫氨酸的培养基替换。培养 12 小时后,收集条件培养基,在旋转滤器上浓缩,并加到 15% SDS 凝胶上。处理的凝胶可以被干燥并使胶片曝光一段时间,以揭示 EG-VEGF 多肽的存在。含有转染细胞的培养物可经过进一步培养(在无血清培养基中),在所选的生物测定中测试培养基。

[0421] 在另一种技术中,EG-VEGF 可以用 Sompanyrac 等,Proc. Natl. Acad. Sci.,12:7575(1981)所述的硫酸葡聚糖方法瞬时引入 293 细胞。293 细胞在旋转烧瓶中培养到最大密度,加入 700 克 pRK5-EG-VEGF DNA。首先通过离心从旋转烧瓶浓缩细胞,并用 PBS 洗涤。在细胞沉淀上保温 DNA- 葡聚糖沉淀物 4 小时。用 20%甘油处理细胞 90 秒钟,用组织培养基洗涤,重新引入含有组织培养基、5g/ml 牛胰岛素和 0.1g/ml 牛转铁蛋白的旋转烧瓶。约 4 天后,离心条件培养基并过滤除去细胞和碎片。然后可浓缩含有表达的 EG-VEGF 的样品,用任何所选的方法,诸如透析和/或柱层析纯化。

[0422] 在另一个实施方案中,可以在 CHO 细胞中表达 EG-VEGF。可用已知试剂,诸如 CaPO₄ 或 DEAE- 葡聚糖将 pRK5-EG-VEGF 转染入 CHO 细胞。如上所述,可培养细胞培养物,用培养基(单独)或含有放射性标记,诸如³⁵S- 甲硫氨酸的培养基替换培养基。在确定 EG-VEGF 多肽的存在后,可用无血清培养基替换培养基。优选培养培养物约 6 天,然后收集条件培养基。可用任何所选的方法浓缩并纯化含有表达的 EG-VEGF 的培养基。

[0423] 还可在宿主 CHO 细胞中表达表位标记的 EG-VEGF。EG-VEGF 可从 pRK5 载体中亚克隆出。亚克隆插入物可经过 PRC,在阅读框中与所选表位标记,诸如 poly-his 标记融合入杆状病毒表达载体。然后可将 poly-his 标记的 EG-VEGF 插入物亚克隆入含有选择标记(诸如 DHFR)的 SV40 驱动载体,用于选择稳定的克隆。最后可用 SV40 驱动载体转染 CHO 细胞(如上所述)。可如上所述进行标记以证实表达。然后可用任何所选方法,诸如用 Ni²⁺- 螯

合亲和层析,浓缩并纯化含表达的 poly-His 标记的 EG-VEGF 的培养基。

[0424] 还可通过瞬时表达方法在 CHO 和 / 或 COS 细胞中,或用其它稳定的表达方法在 CHO 细胞中表达 EG-VEGF。

[0425] 用下列程序进行 CHO 细胞的稳定表达。蛋白质是作为 IgG 构建体(免疫粘附素)表达的,其中各蛋白质的可溶性形式(例如胞外结构域)的编码序列与含有绞链区、CH2 和 CH2 结构域的 IgG1 恒定区序列融合和 / 或是 poly-His 标记的形式。

[0426] PCR 扩增后,用 Ausubel 等,Current Protocols of Molecular Biology, Unit3.16, John Wiley&Sons, (1997) 所述的标准技术将各 DNA 亚克隆在 CHO 表达载体中。构建 CHO 表达载体,使感兴趣的 DNA 的 5' 和 3' 具有相容的限制性位点,从而使 cDNA 能方便的穿梭。用于 CHO 细胞中表达的载体如 Lucas 等, Nucl. Acids. Res. 24 :9 (1774-1779 (1996)) 所述,用 SV40 早期启动子 / 增强子驱动感兴趣的 cDNA 和二氢叶酸还原酶 (DHFR) 的表达。DHFR 表达允许在转染后选择质粒的稳定维持。

[0427] 用市售转染试剂 Superfect™ (Qiagen)、Dospert™ 或 Fugene™ (BoehringerMannheim) 将 12 微克所需质粒 DNA 引入约 10×10^6 CHO 细胞。细胞如 Lucas 等所述(见上)培养。在安瓿中冷冻约 3×10^7 细胞,如下所述进一步生长并生产。

[0428] 通过置于水浴并旋转混合融化含有质粒 DNA 的安瓿。将内含物吸移到含有 10ml 培养基的离心试管中,1000rpm 离心 5 分钟。吸取上清液,将细胞重悬浮在 10ml 选择性培养基 (0.2 μM 滤过的 PS20 和 5% 0.2 μm 渗滤的胎牛血清) 中。然后将细胞分成等份,置于含有 90ml 选择性培养基的 100ml 转瓶中。1-2 天后,将细胞转移到 250ml 的转瓶中,其中装有 150ml 选择性培养基,在 37℃ 培养。再过 2-3 天后,用 3×10^5 细胞 / 毫升接种 250ml、500ml 和 2000ml 转瓶。通过离心和重悬浮在生产培养基中用新鲜培养基替换细胞培养基。虽然可使用任何合适的 CHO 培养基,实际可使用 1992 年 6 月 16 日提交的美国专利号 5,122,469 所述的生产培养基。以 1.2×10^6 细胞 / ml 接种 3L 生产转瓶。在第 0 天,确定细胞数。在第 1 天,对旋转器采样,开始喷入滤过的空气。在第 2 天,对转瓶采样,将温度切换到 33℃,加入 30ml 500g/L 葡萄糖和 0.6ml 10% 消泡剂(例如 35% 聚二甲基硅氧烷乳液, Dow Corning 365 医用级乳液)。在整个生产过程中,根据需要调节 pH 至约 7.2。在 10 天后,或直到存活率跌到 70% 以下,离心收集细胞培养物并滤过 0.22 微米滤膜。将滤液储藏在 4℃ 或直接上柱纯化。

[0429] 对于 poly-His 标记的构建体,用 Ni-NTA 柱 (Qiagen) 纯化蛋白质。在纯化前,在条件培养基中加入咪唑至浓度为 5mM。将条件培养基泵送至用 20mM HEPES, pH7.4 平衡的 6ml Ni-NTA 柱上,缓冲液含有 0.3M NaCl 和 5mM 咪唑,流速为 4-5ml/min, 4℃。上样后,用额外的平衡缓冲液洗涤柱,用含有 0.25M 咪唑的平衡缓冲液洗脱蛋白质。高度纯化的蛋白质随后用 25ml G25 Superfine (Pharmacia) 柱脱盐入含有 10mM HEPES、0.14M NaCl 和 4% 甘露醇, pH6.8 的缓冲液中,储藏在 -80℃。

[0430] 如下从条件培养基纯化免疫粘附素(含 Fc) 的构建体。将条件培养基泵送入 5ml 蛋白质 A 柱 (Pharmacia), 它已用 20mM 磷酸钠缓冲液, pH6.8 平衡。在上样后,在用 100mM 柠檬酸 (pH3.5) 洗脱前用平衡缓冲液充分洗涤柱。洗脱的蛋白质立即通过将 1ml 级分收集入含有 275 升 1M Tris 缓冲液, pH9 的试管中中和。随后如上对于 poly-His 标记的蛋白质所述,将高度纯化的蛋白质脱盐入储藏缓冲液中。通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶和用 Edman 降

解的 N- 末端氨基酸测序评估均一性。

[0431] 实施例 5

[0432] EG-VEGF 在酵母中的表达

[0433] 下列方法描述了 EG-VEGF 在酵母中的重组表达。

[0434] 首先, 构建酵母表达载体用于胞内产生或分泌来自 ADH2/GAPDH 启动子的 EG-VEGF。编码 EG-VEGF 和启动子的 DNA 被插入所选质粒中合适的限制性酶位点, 以指导 EG-VEGF 的胞内表达。为了分泌, 编码 EG-VEGF 的 DNA 可与编码 ADH2/GAPDH 启动子、天然 EG-VEGF 信号肽或其它哺乳动物信号肽, 或例如酵母 α 因子或转化酶分泌信号 / 前导序列、或接头序列 (如需要) 的 DNA 克隆入所选质粒, 用于表达 EG-VEGF。

[0435] 然后可用上述表达质粒转化酵母细胞, 诸如酵母菌株 AB110, 并在所选的发酵培养基中培养。可通过用 10% 三氯乙酸沉淀并用 SDS-PAGE 分离, 然后用考马斯蓝染色凝胶, 分析转化的酵母上清液。

[0436] 然后通过离心从发酵培养基除去酵母细胞, 然后用所选的过滤筒浓缩培养基, 从而分离和纯化重组 EG-VEGF。可用所选的柱层析树脂进一步纯化含有 EG-VEGF 的浓缩液。

[0437] 实施例 6

[0438] EG-VEGF 在杆状病毒感染的昆虫细胞中的表达。

[0439] 下列方法描述了 EG-VEGF 在杆状病毒感染的昆虫细胞中的重组表达。

[0440] 编码 EG-VEGF 的序列融合于杆状病毒表达载体中所含表位标记的上游。这些表位标记包括 poly-His 标记和免疫球蛋白标记 (像 IgG 的 Fc 区)。可使用各种质粒, 包括衍生自市售质粒, 诸如 pVL1393 (PharMingen) 的质粒。简单地说, 用与 5' 和 3' 区域互补的引物 PCR 扩增编码 EG-VEGF 的序列或 EG-VEGF 编码序列的所需部分, 诸如编码跨膜蛋白的胞外域的序列, 或编码成熟蛋白的序列 (如果蛋白质是胞外的话)。5' 引物可以掺入侧翼 (所选) 的限制性酶位点。然后用那些所选的限制性酶消化产物, 并亚克隆入表达载体。

[0441] 例如, 用 PCR 扩增人 EG-VEGF 的编码序列, 并亚克隆入 pBPH. IgG 的 EcoRI 和 StuI 位点, 产生与人 IgG1 的 Fc 区的 C- 末端融合体, 或将其亚克隆入 pBPH. His. c 的 EcoRI 和 SmaII 位点, 产生 C- 末端 GHHHHHHHHH 标记。载体 pBPH. IgG 和 pBPH. His. c 是杆状病毒表达载体 pVL1393 (PharMingen) 的衍生物。

[0442] 通过将上述质粒和 BaculoGold™ 病毒 DNA (PharMingen) 用 lipofectin (购自 GIBCO-BRL) 共转染入草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (“Sf9”) 细胞 (ATCC CRL 1711) 中产生重组杆状病毒。28°C 培养 2-4 天后, 收集释放的病毒并用于进一步扩增。如 O' Reilley 等, *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994) 所述进行病毒感染和蛋白质表达。

[0443] 然后可通过用于 Fc 融合蛋白的蛋白 A-Sepharose 珠 (Pharmacia) 或用于 His- 标记蛋白的 Ni-NTA 琼脂糖珠 (Qiagen) 纯化表达的 poly-his 标记的 EG-VEGF。对于 His- 标记的蛋白质, 如 Rupert 等, *Nature*, 362: 175-179 (1993) 所述从重组病毒感染的 Sf9 细胞中制备提取物。简单地说, 洗涤 Sf9 细胞, 重悬浮在超声处理缓冲液 (25mL HEPES, pH7.9; 12.5mM MgCl₂; 0.1mM EDTA; 10% 甘油; 0.1% NP-40; 0.4M KCl) 中, 并在冰上超声处理 20 秒两次。离心澄清超声处理产物, 用加样缓冲液 (50mM 磷酸盐、300mM NaCl、10% 甘油, pH7.8) 稀释上清液 50 倍, 并滤过 0.45 微米滤膜。制备床体积为 5mL 的 Ni²⁺-NTA 琼脂糖柱 (购自 Qiagen), 用

25mL 水洗涤,并用 25mL 加样缓冲液平衡。将滤过的细胞提取物以每分钟 0.5ml 加到柱上。用加样缓冲液将柱洗到 A_{280} 的基线,此时开始收集级分。接着,用第二种洗涤缓冲液 (50mM 磷酸盐、300mM NaCl、10% 甘油, pH6.0) 洗涤柱,它洗脱非特异性结合的蛋白质。在再次达到 A_{280} 基线时,用 0-500mM 咪唑在第二种洗涤缓冲液中梯度展开柱。收集一毫升级分并用 SDS 和银染色,或用与碱性磷酸酶 (Qiagen) 偶联的 Ni^{2+} -NTA 的 Western 印迹分析。合并含有洗脱的 His₁₀- 标记的 EG-VEGF 的级分,并对加样缓冲液透析。

[0444] 或者,可用已知的层析技术,包括例如蛋白质 A 或蛋白质 G 柱层析进行 IgG 标记 (或 Fc 标记) 的 EG-VEGF 的纯化。

[0445] 为了检测蛋白质表达,在亲和纯化的重组蛋白质上,在非还原和还原条件下进行 SDS/PAGE 分析,然后染色。蛋白质常规进行 N- 末端测序和内毒素检测,低于 1eu/mg。

[0446] 实施例 7

[0447] 制备与 EG-VEGF 结合的抗体

[0448] 该实施例说明可与 EG-VEGF 特异性结合的单克隆抗体的制备。

[0449] 产生单克隆抗体的技术是本领域已知的,如 Goding, 见上中所述。可使用的免疫原包括纯化的 EG-VEGF、含有 EG-VEGF 的融合蛋白、和在细胞表面上表达重组 EG-VEGF 的细胞。本领域技术人员可不经过度的实验即可选择免疫原。

[0450] 用在完全弗氏佐剂中乳化的 EG-VEGF 免疫原免疫接种小鼠,诸如 Balb/c, 以 1-100 微克的量在皮下或腹膜内注射。或者,将免疫原乳化在 MPL-TDM 佐剂 (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) 中,并注射入动物的后爪垫。然后在 10-12 天后用在所选佐剂中乳化的额外的免疫原增强免疫的小鼠。此后,还可用额外的免疫注射加强小鼠达几周。可通过眼眶后采血从小鼠定期获得血清样品,用于在 ELISA 测定中检测抗 EG-VEGF 抗体。

[0451] 在检测到合适的抗体滴度后,可用 EG-VEGF 最后一次静脉内注射注射给对抗体“阳性”的动物。3-4 天后,杀死小鼠,收集脾细胞。然后将脾细胞与所选的鼠骨髓瘤细胞系 (诸如得自 ATCC 号 CRL1597 的 P3X63AgU. 1) 融合 (使用 35% 聚乙二醇)。融合产生杂交瘤细胞,它然后可以被铺在含有 HAT (次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶) 培养基的 96 孔组织培养板上,以抑制未融合细胞、骨髓瘤杂交体和脾细胞杂交体的增殖。

[0452] 可在 ELISA 中筛选杂交瘤细胞针对 EG-VEGF 的反应性。确定分泌所需的针对 EG-VEGF 的单克隆抗体的“阳性”杂交瘤细胞是在本领域技术人员的能力范围内。

[0453] 可将阳性杂交瘤细胞腹膜内注射给同系的 Balb/c 小鼠,以产生含有抗 EG-VEGF 单克隆抗体的腹水。或者,可在组织培养瓶或转瓶中培养杂交瘤细胞。用硫酸铵沉淀,然后用凝胶排阻层析,纯化在腹水中产生的单克隆抗体。或者,可使用基于抗体与蛋白质 A 或蛋白质 G 结合的亲和层析。

[0454] 实施例 8

[0455] 用特异性抗体纯化 EG-VEGF 多肽

[0456] 可用蛋白质纯化领域中的各种标准技术纯化天然或重组的 EG-VEGF 多肽。例如,用对于感兴趣的 EG-VEGF 多肽特异性的抗体通过免疫亲和层析纯化原 EG-VEGF 多肽、成熟 EG-VEGF 多肽或前 EG-VEGF 多肽。通常,通过将抗 EG-VEGF 多肽抗体与活化的层析树脂共价偶联来构建免疫亲和柱。

[0457] 通过用硫酸铵沉淀,或通过用固定化的蛋白质 A (Pharmacia LKBBiotechnology,

Piscataway, N. J.) 上纯化,从免疫血清制备多克隆免疫球蛋白。类似的,通过硫酸铵沉淀或在固定化的蛋白 A 上层析,从小鼠腹水制备单克隆抗体。部分纯化的免疫球蛋白共价附着于层析树脂,诸如 CnBr 活化的 SEPHAROSE™ (Pharmacia LKB Biotechnology)。根据厂商说明书将抗体与树脂偶联,封闭树脂,洗涤衍生的树脂。

[0458] 利用这样的免疫亲和柱纯化 EG-VEGF 多肽,即从含有可溶性形式的 EG-VEGF 多肽的细胞制备级分。通过溶解全细胞或溶解加入去污剂或其它本领域熟知的方法差异离心获得的亚细胞级分,衍生该制备物。或者,含有信号序列的可溶性 EG-VEGF 多肽可以有用量分泌入细胞生长的培养基中。

[0459] 含有可溶性 EG-VEGF 多肽的制备物通过亲和层析柱,在允许 EG-VEGF 多肽优选吸附的条件下(例如去污剂存在下高离子强度缓冲液)洗涤柱。然后在破坏抗体/EG-VEGF 多肽结合的条件下(例如低 pH 缓冲液,诸如约 pH2-3,或高浓度的离液剂,诸如脲或硫氢酸离子)洗脱柱,收集 EG-VEGF 多肽。

[0460] 实施例 9

[0461] 药物筛选

[0462] 本发明特别可用于在任一种各种药物筛选技术中通过 EG-VEGF 多肽或其结合片段筛选化合物。该测试中使用的 EG-VEGF 多肽或片段可以是溶液中游离的,附着在固相支持物上的,细胞表面携带的,位于胞内的。一种药物筛选方法利用真核或原核宿主细胞,它被表达 EG-VEGF 多肽或片段的重组核酸稳定地转化。在竞争性结合测定中针对这种转化细胞筛选药物。这些细胞(以活的或固定形式)可用于标准结合试验。可以测定例如 EG-VEGF 多肽或片段与测试的试剂之间复合物的形成。或者,可检测 EG-VEGF 多肽与其靶细胞或靶受体之间复合物形成由测试的试剂导致的减少。

[0463] 因此,本发明提供了筛选药物或任何其它能影响 EG-VEGF 多肽有关疾病或障碍的试剂。这些方法包括将所述试剂与 EG-VEGF 多肽或其片段接触,并用本领域熟知的方法检测 (i) 试剂与 EG-VEGF 多肽或片段之间复合物的存在,或 (ii) EG-VEGF 多肽或片段与细胞之间复合物的存在。在该竞争性结合测定中,通常标记 EG-VEGF 多肽或片段。在合适温育后,将游离的 EG-VEGF 多肽或片段与以结合形式存在的分开,游离或未复合标记的量是特定试剂与 EG-VEGF 多肽结合,或影响 EG-VEGF 多肽/细胞复合物能力的量度。

[0464] 药物筛选的另一种技术提供了具有对多肽合适的结合亲和力的化合物的高通量筛选,在 1984 年 9 月 13 日出版的 WO 84/03564 中详述。简单地说,在固相底物上,诸如塑料针或一些其它表面上合成大量不同的小肽测试化合物。在应用于 EG-VEGF 多肽时,肽测试化合物与 EG-VEGF 多肽反应并洗涤。用本领域熟知的方法检测结合的 EG-VEGF 多肽。还可直接在平板上包被纯化的 EG-VEGF 多肽,用于上述药物筛选技术。另外,可用非中和性抗体捕获肽并将其固定在固相支持物上。

[0465] 本发明还考虑竞争性药物筛选试验的用途,其中能结合 EG-VEGF 多肽的中和性抗体与测试化合物特异性竞争与 EG-VEGF 多肽或其片段结合。这样,可用抗体检测与 EG-VEGF 多肽共有一个或多个抗原性定簇的任何肽的存在。

[0466] 本发明还提供了筛选能调节 EG-VEGF 活性的生物活性剂的方法。在这些方法中,在 EG-VEGF 样品中加入候选生物活性剂,确定是否导致 EG-VEGF 的生物学活性有所改变。这些改变可以是关于 EG-VEGF 刺激细胞增殖,诱导趋化性,刺激血管生成,诱导细胞分化或磷

酸化 ERK1 和 ERK2 的能力。

[0467] 实施例 10

[0468] 合理的药物设计

[0469] 合理的药物设计的目标是产生感兴趣的生物活性多肽（即 EG-VEGF 多肽），或与其相互作用的小分子（例如激动剂、拮抗剂或抑制剂）的结构类似物。可用这些例子的任何一个制备药物，这些药物是 EG-VEGF 多肽的更活跃或更稳定形式，或增强或影响 EG-VEGF 多肽体内功能（参见 Hodgson, *Bio/Technology*, 9 :19-21 (1991)）。

[0470] 在一种方法中，通过 x 光晶体照像术，计算机建模，或最典型的，通过这两种方法的组合确定 EG-VEGF 多肽或 EG-VEGF 多肽 - 抑制剂复合物的三维结构。必须确定 EG-VEGF 多肽的形状和电荷，以阐明结构并确定分子的活性位点。较少见的，可通过基于同源蛋白结构建模获得与 EG-VEGF 多肽的结构有关的有用信息。在这两种情况下，用相关结构信息设计类似 EG-VEGF 多肽样分子，或鉴定有效抑制剂。合理的药物设计的有用例子可包括如 Braxton 和 Wells, *Biochemistry*, 31 :7796-7801 (1992) 所述的具有改善的活性或稳定性的分子，或如 Athauda 等, *J. Biochem.*, 113 :742-746 (1993) 所述作为天然肽的抑制剂、激动剂或拮抗剂的分子。

[0471] 还可能如上所述分离用功能性试验筛选的靶特异性抗体，然后分辨其晶体结构。该方法原则上产生药物核心，可作为随后药物设计的根据。有可能通过产生对功能性药物活性抗体的抗 - 独特型抗体（抗 -id）来绕过蛋白质晶体照像术。作为镜像的镜像，抗 -id 的结合位点预期是原始受体的类似物。然后可用抗 -id 从化学或生物学产生的肽的库中鉴定和分离肽。然后分离的肽用作药物核心。

[0472] 根据本发明，可得到足量的 EG-VEGF 多肽以进行分析研究，诸如 X 光晶体照像术。另外，本文提供的 EG-VEGF 多肽氨基酸序列的知识将对使用计算机建模技术代替或补充 X 光晶体照像术的方法提供指导。

[0473] 实施例 11

[0474] Northern 印迹分析

[0475] 为了阐明 EG-VEGF 的表达模式，用来自各种人组织的 RNA 进行 Northern 印迹分析。将人 RNA 印迹与基于 EG-VEGF cDNA 的 ³²P- 标记的 DNA 探针杂交。人多组织 polyA+RNA 阵列和人 polyA+RNA 多组织 Northern 印迹购自 Clontech。其它所用的 Northern 印迹包括人胎 RNA 印迹 MTN (Clontech) 和人成人 RNA 印迹 MTN-II (Clontech)。

[0476] 根据本领域熟知的方法进行 Northern 印迹分析。例如，用 30-50ng 人或小鼠 cDNA 片段和 Redi-Prime II 试剂盒 (Amersham)，使用 ³²P-dCTP3000Ci/mmol (Amersham) 制备 cDNA 探针。在 Sephadex G50 旋转柱 (Pharmacia) 上纯化探针，并在 68°C，在 ExpressHyb 杂交溶液 (Stratagene) 中进行杂交。在另一个例子中，在杂交缓冲液中 (5XSSPE ;2X Denhardt 氏溶液 ;100mg/ml 变性剪切的鲑精 DNA ;50% 甲酰胺 ;2% SDS) 中 42°C 温育印迹和探针 60 小时。印迹在 2×SSC ;0.05% SDS 中在室温洗涤数次达 1 小时，然后在 0.1×SSC ;0.1% SDS 中 50°C 洗涤 30 分钟。印迹用感光成像仪分析 (Fuji) 过夜曝光后显影。通过与对照肌动蛋白探针杂交评估等量 RNA 负荷。

[0477] 检测 EG-VEGF mRNA 转录物。图 18 显示在几个独立实验中，按照强度下降的顺序，在卵巢、睾丸、肾上腺和胎盘中表达了 1.4kb 的一条 mRNA。在任何其它组织中没有检测到表

达,除了在前列腺中延长曝光后有非常弱的信号(图18)。通过在人多组织列阵中原位杂交获得类似发现(数据未显示)。这些发现表明产类固醇内分泌腺是EG-VEGF mRNA表达的主要部位。

[0478] 实施例 12

[0479] 原位配体结合

[0480] 为了鉴定表达EG-VEGF的细胞类型,用一系列来自人和其它灵长类动物的睾丸和卵巢标本进行原位杂交研究。进行了几组实验,一组用荧光,一组用标记的探针。

[0481] 在第一组实验中,将包埋在OCT中的未固定的新鲜组织切成10微米,储藏在 -20°C 4天不用干燥剂。所有步骤在室温进行,除了固定在 4°C 进行。切片在35mM乙酸(pH3.5)、3mM CaCl_2 、3mM MgSO_4 、5mM KCl、1M NaCl中温育4分钟。用加了阳离子缓冲液(25mM HEPES(pH7.2)、150mM NaCl、3mM CaCl_2 、3mM MgSO_4 、5mM KCl和32mM蔗糖)的HEPES缓冲盐水洗涤载玻片3次,然后用HBS-C加蛋白酶抑制剂(Boehringer Mannheim)中的1.5%小鼠血清封闭20分钟。用来自Vector Laboratories的亲合素/生物素封闭试剂盒进一步封闭。最初实验使用从成年大鼠制备的肝脏、肾上腺和卵巢。如下所述,分析了其它组织。这些切片与配体(0-1.5nM EG-VEGF-Fc)温育60分钟。用过量EG-VEGF-his标记的蛋白质实现替换。用含0.1% BSA的HBS-C洗涤切片3次,并在4%低聚甲醛中固定10分钟。在切片中加入1:4000稀释的二抗、生物素化的山羊抗人Fc(jackson Laboratories)和HBS-C中的1.5%小鼠血清30分钟。洗涤后,切片在低聚甲醛中后固定10分钟。用TBS(100mM Tris-HCl(pH8.0)、150mM NaCl)洗涤载玻片两次,然后用含3% H_2O_2 的TBS处理10分钟。在用TBS洗涤后,切片与Dupond TSA试剂盒组分HRP-链霉亲合素以1:1000,和生物素化的酪酰胺以1:50在扩增稀释剂中反应。最后,偶联有FITC的链霉亲合素(DAKO)(在TBS中1:1000稀释)反应30分钟。在含有0.05% Tween-20的TBS中充分洗涤后,用Vectashield封固剂施加盖玻片。用荧光显微镜的FITC通道获得图像。在一些情况下,使用DAPI(例如Molecular Probes),一种核酸染料。可用汞弧灯或用氩离子激光的紫外线激发DAPI。另外,根据先前所述的标准方法使用苏木精-曙红染色,以显示证实有表达的组织的结构。

[0482] 在黑猩猩和猴卵巢中,最强的信号在粒层细胞上,尤其是在初级滤泡中最靠近卵母细胞的细胞。较弱的信号存在于原始滤泡和卵丘中的粒层细胞上。显著信号存在于卵巢皮质中,尤其在小、内卷的黄体周围(猕猴样品)和卵巢的血管极的不好确定的细胞簇中,结果如图5A-F所示(全部在55微米)。图5A显示苏木精-曙红染色,图5B显示2岁的黑猩猩卵巢中用FITC的EG-VEGF表达。图5C显示苏木精-曙红染色,图5D显示在猕猴卵巢中用FITC的EG-VEGF表达。图5E显示苏木精-曙红染色,图5F显示在黑猩猩卵巢基质中用FITC的EG-VEGF表达。

[0483] 在人卵巢中,在皮质基质(cortical stroma)中有扩散中等表达。在围绕红体的外膜中信号强烈。另外,在黄体中有中等集中的阳性信号。结果如图6A-D所示。图6A显示苏木精-曙红染色,图6B显示用FITC的EG-VEGF表达(25微米)。图6C显示苏木精-曙红染色,图6D显示用FITC的EG-VEGF表达(115微米)。

[0484] 还对具有子宫脱垂的46岁妇女的卵巢进行了原位杂交研究。在此例中,用先前所述的标准技术放射性标记EG-VEGF。图7A显示了显示EG-VEGF表达的放射自显影图。图

7B 显示同一卵巢的苏木精 - 曙红染色。

[0485] 另外,还对大鼠肾上腺皮质组织切片进行了原位杂交研究。图 8A 和 8B 显示用 DAPI 鉴定 EG-VEGF 核酸,图 8C 和 8D 显示用 FITC 鉴定 EG-VEGF 蛋白质。

[0486] 另外,在下列组织中发现了阳性原位杂交结果:卵巢癌,乳头浆液;卵巢,正常皮质;卵巢囊肿,简单囊肿;睾丸,慢性炎症;正常卵巢;卵巢肿瘤,乳头浆液;肾上腺腺瘤;和正常睾丸。在第二组实验中,根据本领域已知方法产生 ^{33}P -UTP 标记的 RNA 探针。例如,根据 Melton, D. A. 等, *Nucleic Acids Res.*, 12:7035-7056 (1984) 所述的方法。从对应于人 EG-VEGF 序列的核苷酸 219-958 的 cDNA 片段合成有义和反义探针。根据本领域已知的方法进行原位杂交。图 9 显示这组实验的结果。小图 A、C、E、G、I、K、M 和 O 是亮视野图像,小图 B、D、F、H、J、L、N 和 P 是对应的暗视野图像。箭头表明血管的位置。

[0487] 在睾丸中,检测到强杂交信号(图 9,小图 A-E)。图 9,小图 A-E 显示该信号限于产睾酮 Leydig 细胞。值得注意的是睾丸内皮具有惊人的高周转率:高达 3% 的内皮细胞被 BrdU 标记,可能与精子发生和类固醇发生的相关强代谢活性有关 [Collin 和 Bergh, *Int. J. Androl.*, 19:221-228 (1996)]。关于这一点,已知 Leydig 细胞是血管生成和渗透性增强因子诸如 VEGF 的来源 [Collin, 见上]。感兴趣的是,在这些实验中 VEGF 杂交信号比 EG-VEGF 信号弱得多(数据未显示)。在卵巢中,强 EG-VEGF mRNA 表达定位在产雄激素的皮质基质、卵丘,形成卵泡的膜和粒层中(图 9,小图 F-P)。膜内 EG-VEGF mRNA 的强表达与滤泡发育和类固醇激素产生有关的毛细血管网络的发育一致 [Basset, *Am. J. Anat.*, 73:251-278 (1943)],并与 EG-VEGF 的促血管生成的作用一致。该表达模式在其它检测的灵长类物种,猕猴和黑猩猩中也是基本相似的(图 9,小图 G-I,数据未显示)。而 VEGF 在特化的基质中表达非常低 [Ravindranath 等, *Endocrinology*, 131:254-260 (1992)],EG-VEGF 表达非常强(图 9,小图 F, G)。有趣的是,这些基质在多囊性卵巢综合征中,变成强的增生的和血管生成性的,产生过量雄激素 [Goldziher 和 Green, *J. Clin. Endocrinol. Meta.*, 22:325-332 (1962)]。在卵丘中,EG-VEGF 的表达模式(图 9,小图 N-P)与 VEGF 非常相似 [Ravindranath 等, 见上;Philips 等, *Endocrinology*, 127:965-967 (1990)]。在黄体 (CL) 中,EG-VEGF 表达定位于离散的细胞巢中(数据未显示)。而 EG-VEGF 在卵巢基质和发育的卵泡内高度表达(图 9,小图 D-I,数据未显示),VEGF 以最高水平在 CL 中表达 [Ravindranath 等, 见上]。在啮齿动物 [Ferrara 等, *Nat. Med.*, 4:336-340 (1998)] 中,或在灵长类动物 [Ryan 等, *Toxicol. Pathol.*, 27:78-86 (1999);Fraser 等, *Endocrinology*, 141:995-1000 (2000)] 中 VEGF 的灭活导致 CL 发育的剧烈抑制。然而卵泡发育几乎不受损的进行(未出版的观察结果),表明其它因子对卵泡血管生成有作用。似乎 EG-VEGF 对该 VEGF 依赖性血管生成有作用。因此,VEGF 和 EG-VEGF 的部分互补表达模式表明这些分子可以协同或互补的方式起作用,以促进卵巢中和可能其它共表达这些因子的组织中的血管生成。

[0488] 实施例 13

[0489] ^{125}I EG-VEGF 细胞结合试验

[0490] 用 EG-VEGF 进行 ^{125}I 配体结合研究,以确定受体在各种细胞类型上的分布。在一种情况下,用 Pierce 的碘珠制备物,用 0.5mCi ^{125}I 标记 EG-VEGF 标记的蛋白质,500 克。在 C18 Sep Pak 上,在 50% 乙腈、0.1% TFA 中纯化标记的蛋白质。在第二组实验中,用乳过氧化物酶方法,用 Na^{125}I (Amersham) 碘化 EG-VEGF,随后用反相层析,使用预充填的 SynChropak RP

HPLC C4 柱 (Micra Scientific, Inc.) 纯化标记的蛋白质。分子的比活力为 49-70 Ci/g。对各种细胞类型,包括 Cos 细胞进行竞争性结合测定。在 24 孔皿中培养细胞 2-3 天,然后结合。

[0491] 在一组实验中,用 0.2-0.4nM 标记的配体和未标记的 EG-VEGF-his 作为竞争剂进行试验。试验中使用的未标记 EG-VEGF-his 的最高浓度是 270nM,对于下面 10 种浓度的竞争剂使用 3 倍稀释系列。还用 bFGF 和 VEGF 作为竞争剂(约 500 倍摩尔过量),配体都不置换标记的 EG-VEGF-his。

[0492] 在另一组实验中,以 3 倍系列稀释加入未标记、标记的 EG-VEGF,从 270nM 开始,至少一式两份进行 12 个浓度,进行竞争性测定。在其它实验中,加入 200 摩尔过量的无关的配体,包括 bFGF 和 VEGF,以确证特异性结合。用 New Ligand 程序分析配体结合数据。

[0493] 竞争性分析揭示 EG-VEGF 对 ACE 细胞的高亲和力和特异性结合, K_d 为 0.9-1.0nM, $ED_{50} = 10nM$ (图 10A、10B 和 10C)。类似的高亲和力结合在 MS-1 细胞中被得到证明(图 11A 和 B)。然而,其它非响应性细胞,包括 HUVEC,显示低亲和力结合成分 ($K_d > 80nM$) 或几乎不显著的结合,明显的非特异性、低亲和力结合仅在高于 270nM 的竞争剂浓度被置换(图 11C,数据未显示)。类似的,试验的 5 种其它非响应性细胞类型不显示高亲和力结合成分。蛋白质交联实验和膜蛋白磷酸化分析表明,EG-VEGF 受体成分限于特定 EG-VEGF 响应性细胞(数据未显示)。

[0494] 实施例 14

[0495] 细胞增殖试验

[0496] 为了确定响应 EG-VEGF 的细胞类型的范围,分析了一组内皮和非内皮细胞类型的增殖性应答。细胞在一系列浓度的 Fc- 标记和 His- 标记的 EG-VEGF 配体的存在下培养 5-8 天。试验的细胞类型包括牛肾上腺皮质毛细内皮细胞 (ACE)、牛脑毛细内皮细胞 (BBC)、人脐静脉内皮细胞 (HUVEC)、人皮肤微血管内皮细胞 (HMVEC)、成年牛主动脉内皮细胞 (ABAE)、牛周细胞、人主动脉血管平滑肌细胞 (HA-VSMC)、幼仓鼠肾成纤维细胞 (BHK-21) 和人新生儿成纤维细胞 hFb。细胞以 4000-6000 细胞 / 毫升的密度铺在 6 或 12 孔平皿中。在铺板时,在孔中不加入配体,加入 5ng/ml bFGF (GIBCO BRL)、5ng/ml VEGF 或一定范围的从 1nM-100nM 的 EG-VEGF-Fc 或 -His 标记的蛋白质。对于各细胞类型铺一式两份或三份样品。每天监测汇合和形态。在试验第 5-7 天,在 0.01% 胰蛋白酶 (Gibco BRL) 中胰蛋白酶消化细胞,用 Coulter 计数器评估细胞数目。培养基和其它细胞培养试剂是从 Life Technologies, Inc. 获得的。从 Clonetics 购得 HUVEC、HMVEC 和人角质形成细胞。牛周细胞和人新生儿成纤维细胞是 M. Gerritsen 的礼物。对于试验的性能,另见 Aravind 和 Koonin, *Curr. Biol.* 8 :477-478 (1998)。

[0497] 图 12A-E 中显示几个初步结果,它们在纵轴上显示细胞 / 孔。各图表示用对照、bFGF、VEGF 或 EG-VEGF 以 1nM、10nM 或 25nM 的浓度细胞的相对增殖。图 12A 显示使用周细胞的结果。图 12B 显示用人主动脉血管平滑肌细胞 (HA-VSMC) 的结果。图 12C 显示用幼仓鼠肾成纤维细胞 (BHK21) 的结果。图 12D 显示使用 ACE 的结果。图 12E 显示使用牛脑毛细内皮细胞 (BBC) 的结果。

[0498] 在实验中获得相似结果,如图 13 所示。在这些实验中,基础培养基作为阴性对照 (Ct), bFGF (F) 或 VEGF (V) 作为阳性对照。以各种浓度测试 EG-VEGF。如小图 a 中所示,

EG-VEGF 刺激 ACE 细胞增殖, ED50 是 0.2nM。在约 2nM 观察到最大效果。细胞数中的倍数增加与 VEGF 诱导的非常相似。杆状病毒产生的 his- 和 Fc- 标记的 EG-VEGF 蛋白质在所有实验中表现非常相似。与促有丝分裂功能一致, EG-VEGF 在 ACE 细胞中诱导迅速和显著的 MAP 激酶 ERK1 和 2, 以及其它增殖和存活信号分子的磷酸化。施用在 50-1000ng/ml 浓度范围内测试的 VEGF 可溶性受体 (mFlt-IgG) 不阻断 EG-VEGF 的促有丝分裂活性, 表明这种作用不是由 VEGF 释放介导的。这些发现明显不排除在更复杂的体内系统中有相互诱导作用的可能性。

[0499] 为了确定响应 EG-VEGF 增殖的细胞类型的范围, 我们测试了各种其它内皮和非内皮细胞类型。测试的内皮细胞类型包括人脐静脉 (HUVEC)、人皮肤微血管 (HMVEC)、牛脑毛细血管 (BBC) 和成年牛主动脉 (ABAE) 内皮细胞。

[0500] 如图 13 小图 b 所见, BBC 细胞仅显示用 VEGF 所见的增殖反应的约 10%, 而其它内皮细胞类型在施用 EG-VEGF 后在所有测试的浓度不显示任何作用。因此, 相信 EG-VEGF 是具有这种限制的靶细胞特异性的内皮细胞促分裂原的第一个例子。其它内皮细胞促分裂原, 诸如 VEGF 和 bFGF 对于各种内皮细胞类型不显示任何显著的选择性 [Leung 等, *Science*, 246 :1306-1309 (1989)]。

[0501] 图 13 小图 c 显示发现 EG-VEGF 在血管平滑肌细胞、周细胞、成纤维细胞或角质形成细胞的培养物中不引起任何增殖反应。因此, EG-VEGF 不仅是内皮细胞特异性促分裂原, 还选择性的作用于限定的内皮细胞类型。

[0502] 在图 13 小图 b 和 c 中, 纵轴上的增殖指数是相对于阴性对照, 它随意定为 1。

[0503] 实施例 15

[0504] 细胞迁移 (趋化性) 试验

[0505] 血管生成级联的一个重要方面是趋化性 [Zetter, *Nature*, 285 :41-43 (1980)]。VEGF 或 bFGF 能作为化学引诱剂, 刺激内皮细胞迁移。先前描述了趋化活性的试验 (鉴定诱导或防止趋化性的蛋白质), 见例如 *Current Protocols in Immunology*, Coligan、Kruisbeek、Margulies、Shevach 和 Strober 编, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience 出版, 6.12 章 :6.12.1-6.12.28; Taub 等, *J. Clin. Invest.* 95 :1370-1376, 1995; Lind 等, *APMIS* 103 :140-146, 1995; Mueller 等, *Eur. J. Immunol.* 25 :1744-1748; Gruber 等, *J. Immunol.* 152 :5860-5867, 1994; Johnson 等, *J. Immunol.* 153 :1762-1994。为了确定 EG-VEGF 的生物学活性, 我们评估了 ACE 细胞和几种其它细胞类型在改良的 Boyden 槽试验中是否对该分子显示趋化性应答。

[0506] 具体地说, ACE 细胞、狒狒肾上腺内皮细胞 (BAEC)、MS-1 细胞和 HUVEC 用于迁移试验。MS-1 细胞系来自 ATCC。原代狒狒内皮细胞是从早产的或胎儿狒狒的肾上腺中分离的 (R. Clyman, UCSF 的赠品)。基本按 Mesiano 等, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76 :968-976, 1993 中所述解离组织。简单地说, 除去被膜, 将剩余的组织用无菌刀片切成约 2mm³ 见方的片段。片段随后在 37°C 在 0.1% 胶原酶 (Sigma) 的 50 : 50 Ham 氏 F10 : DMEM 培养基, 10% FCS, 加入 DNase I (Life Technologies Inc.) 中温育 30-40 分钟。洗涤单细胞悬液, 重悬浮在含 5% FCS 的 PBS 中, 与 1 克抗 KDR 的单克隆抗体一起温育 10⁷ 个细胞, 洗涤, 然后与偶联有异硫氰酸荧光素 (Sigma) 的山羊抗小鼠抗体一起温育。用 EPICS ELITE 细胞分选仪 (Coulter Corporation) 分选出 KDR 阳性与阴性群。内皮细胞群维持在含有 10% 血清和

生长因子 (Cell Systems, Kirkland, WA) 的 CSC 培养基中。用 1% 明胶包涂 Falcon 8.0m 滤膜插入物 (Falcon 3097)。在如上所述试验前培养细胞。用胰蛋白酶消化细胞, 转移到含有 0.1% BSA 的 EBM (内皮基础培养基, Clonetics) 中用于试验。细胞以 $1-5 \times 10^4$ / 上槽铺板, 将生长因子置于下槽中。试验是在 37°C 常规进行 16 小时。完成时, 从膜的上面一侧用聚氨基甲酸酯拭子刮, 除去细胞, 然后用甲醇固定膜底部上剩余的细胞。用碘化丙啶染色细胞, 并在低功率下用 Image-Pro 程序计数。图 14A、14B 和图 13 小图 d 的 y 轴代表迁移指数, 相对于阴性对照, 任意定为 1。

[0507] 图 14A 和 14B 显示初步结果。各图显示在对照中, VEGF 存在下, 或 EG-VEGF 存在下, 在 0.2nM、0.5nM、1nM 或 5nM 浓度下的相对内皮细胞迁移。图 14B 显示使用 ACE 的结果。

[0508] 这些观察由图 13 小图 d 所示的进一步实验的结果加强。ACE 培养物中引发了强和可复制的趋化应答, 在 0.5nM EG-VEGF 有峰应答。效果的数量级与 VEGF 诱导的相似。为了将我们的结果延伸到其它原代细胞类型, 我们通过荧光活化的细胞分拣, 用识别 VEGF 受体 -2 或 KDR 的单克隆抗体从狒狒肾上腺皮质 (BAEC) 纯化了内皮细胞。在 BAEC 培养物中, 0.5-5nM EG-VEGF 诱导与 VEGF 诱导的相同数量级的趋化应答。另外, EG-VEGF 在 MS-1 内皮细胞中诱导甚至比 VEGF 程度大的迁移。从鼠内分泌腺的微血管分离的 MS-1 细胞系, 维持高分化性质, 诸如 VEGF 受体表达 [Arbiser 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 861-866 (1997)]。然而, 从 HUVEC 没有引发应答, 即使这些细胞显示对 VEGF 有强的应答。因此, 除了其促有丝分裂活性, EG-VEGF 也作为化学引诱剂, 但仅对特定的内皮细胞类型。

[0509] 这些发现完全符合实施例 13 中所述的结合研究, 揭示碘化的 EG-VEGF 在可与膜蛋白交联的 ACE 细胞中显示高亲和力、特异性结合。然而在非响应性细胞, 诸如 HUVEC 中未检测到高亲和力结合。

[0510] 实施例 16

[0511] 磷酸化分析

[0512] 根据本领域已知的方法进行磷酸化分析。简单地说, 在 0.1% FCS 中 14-16 小时对肾上腺皮质衍生的毛细血管内皮 (ACE) 细胞剥夺血清 (serum-deprived), 然后在 0.05% BSA 中再过 90 分钟。然后用 2.5mM VEGF (诱导最大应答) 或 20nM EG-VEGF 处理细胞, 在含有 0.1mM 的原钒酸钠的冰冷的 PBS 中洗涤一次。细胞在含有 0.1mM 原钒酸钠、5mM 对硝基苯基磷酸盐、10mM 氟化钠、0.5mM 黑海绵酸和蛋白酶抑制剂混合物 (Roche MB 1836145) 的 0.5ml RIPA 缓冲液中裂解细胞。从 Promega 购得抗磷酸 ERK 抗血清。

[0513] 与促有丝分裂功能一致, EG-VEGF 在 ACE 细胞中诱导 MAP 激酶 ERK1 和 ERK2 (图 15), 以及其它增殖和存活信号分子 (数据未显示) 的迅速和显著的磷酸化。具体说, 图 15 显示 20nM EG-VEGF 诱导 ERK1 和 2 的显著和迅速磷酸化。无因子 (Ct) 和 VEGF (V) 刺激 5 分钟作为对照, 在泳道上方表明了 EG-VEGF 刺激的时间过程。在下面的免疫印迹中显示总 ERK1 和 2 水平。另外, 施用在 50-1000ng/ml 的浓度范围内测试的 VEGF 可溶性受体 (mFlt-IgG) 不阻断 EG-VEGF 的促有丝分裂活性, 表明这种作用不是由 VEGF 释放介导的。

[0514] 实施例 17

[0515] 开孔试验

[0516] 肾上腺皮质内的内皮细胞显示在也包括其它内分泌腺的限制部位, 脉络丛、胃肠道和许多肿瘤发现的非常独特的开孔表型 [Simionescu, 见上]。膜孔是特化的质膜

微结构域或窗,直径约 60nm,通常成簇 [Palade 等, *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 463 : 11-32(1979)]。膜孔对于液体和小溶质是高度可渗透的,被认为促进物质在间质液和原生质之间大量交换,诸如在类固醇产生和其它内分泌腺像胰岛中发生的。我们测试了 EG-VEGF 单独还是与 VEGF 联合诱导内皮细胞中的开孔。

[0517] 根据本领域已知的方法,基本上如 Gospodarowicz 等, *J. Cell Biol.* 99 :947-961, 1984 中所述制备了 ECM。简单地说,从牛眼 (Pel Freez, Arkansas) 分离角膜内皮细胞,将其在补充有 15% FCS、青霉素 / 链霉素、两性霉素 B 的 50 : 50 Ham 氏 F10 : DMEM 培养基中扩增。为了制备 ECM 包被的平板,在 6 孔板的每孔中铺 4×10^4 个细胞,在补充有 10% FCS、2.5% 葡聚糖 (Sigma4133) 和青霉素 / 链霉素的低葡萄糖 DMEM 中培养约 10 天。在 10 天结束时,在 0.02M NH_4OH 的水溶液中快速裂解细胞,用 PBS 漂洗几次,4°C 储藏在含抗生素的 PBS 中。以 $1-2 \times 10^5$ 密度铺 ACE 或 MS-1 细胞,并培养到汇合。在各孔中至少一式两份,不加入,加入 2.5nM VEGF、10nM EG-VEGF、或 2.5nM VEGF 加 10nM EG-VEGF。开孔试验重复 3 次。用 PBS 漂洗细胞,并用 2% 甲醛、2.5% 戊二醛在 0.1M 二甲胍酸盐缓冲液固定 2 小时。洗涤后,在 1% 锇水溶液中后固定样品 2 小时,用水洗涤,通过梯度乙醇和环氧丙烷脱水,并包埋在 EPONATE 12 (Ted Pella, Inc., Redding CA) 中。在 Reichert UltracutE 切片机上切超薄切片,用乙酸双氧铀和柠檬酸铅反染色,在 Philips CM12 透射电子显微镜下,以 80kV 监测,并用 GATAN 收缩式多扫描数码相机捕获图像。对于各样品至少检测 100 个细胞图案。

[0518] 图 13 显示这些实验的代表性电镜照片。小图 e 显示未处理的 ACE 细胞。图 13 小图 f 显示用 VEGF 处理的 ACE 细胞。图 13 小图 g 显示用 EG-VEGF 处理的 ACE 细胞。箭头表明膜孔的位置,表明了放大倍数。

[0519] 值得注意的是,目前仅报道过 VEGF 显示在体外和体内诱导开孔的能力 [Roberts 和 Palade, *Cancer Res.*, 57 :765-772(1997); Esser 等, *J. Cell Biol.*, 140 : 947-959(1998)]。ACE 或 MS-1 细胞在用牛角膜内皮细胞产生的胞外基质上培养至汇合,然后用配体处理 24-72 小时。与先前的研究 [Esser 等, 见上] 一致,VEGF 在 $4.33 \pm 1.53\%$ ACE 细胞图案中诱导开孔 (图 13 小图 f)。MS-1 培养物获得了对 VEGF 应答的类似数量的开孔 (未显示)。EG-VEGF 的作用在两种细胞类型中与 VEGF 的非常相似 (图 13, 小图 g 为 ACE)。这两种因子的组合产生叠加或协同的反应,在 $11 \pm 1\%$ ACE 细胞图案中诱导开孔。在 VEGF 或 EG-VEGF 不存在时观察不到开孔。该发现支持假设,即这些因子可能在体内诸如肾上腺皮质或卵巢的背景中协作,以诱导驻留的内皮细胞的开孔表型。

[0520] 实施例 18

[0521] EG-VEGF 的缺氧调节

[0522] A. EG-VEGF 表达的 Taqman 分析

[0523] 缺氧是生理和病理条件中血管生成的关键诱因。通过激活缺氧可诱导因子 (HIF) 1, 已知低氧张力除了促红细胞生成素 (Epo) 和一些糖酵解酶以外,还通过顺式作用调控元件诱导 VEGF 的表达 [Semenza, *J. Appl. Physiol.* 88 :1474-1480(2000)]。因此,我们要确定缺氧是否调节内皮细胞中的 EG-VEGF mRNA 表达。

[0524] 对于表达分析,用 Rneasy 试剂盒 (Qiagen) 如厂商所述制备正常氧处理对缺氧处理的 SW13 和 H295R 细胞 (均来自 ATCC) 的一式多份匹配样品的 RNA 分离物。对于实时定

量性 RT-PCR,一式三份用 Perkin Elmer Taqman 试剂盒试剂和 ABI prism 7700 序列检测仪分析 50ng 总 RNA。使用的寡聚物和探针如下:

[0525] 正向 EG-VEGF PCR 引物 :5' -CCGGCAGCCACAAGGTC-3' (SEQ IDNO :9)

[0526] 反向 EG-VEGF PCR 引物 :5' -TGGGCAAGCAAGGACAGG-3' (SEQ IDNO :10)

[0527] EG-VEGF 探针 :5' -CCTTCTTCAGGAAACGCAAGCACCAC-3' (SEQ IDNO :11)

[0528] 正向 VEGF PCR 引物 5' -AATGACGAGGGCCTGGAGT-3' (SEQ IDNO :12)

[0529] 反向 VEGF PCR 引物 5' -TTGATCCGCATAATCTGCATG-3' (SEQ IDNO :13)

[0530] VEGF 探针 5' -TGTGCCACTGAGGAGTCCAACATCA-3' (SEQ IDNO :14)

[0531] 作为阴性对照,如上所述用厂商提供的引物和探针 (Perkin-Elmer) 类似地进行 -肌动蛋白的表达分析。

[0532] 图 17A 小图 a 说明发现人肾上腺癌细胞系 SW13 和 H295R 暴露于缺氧条件 (约 2% 氧气) 导致 EG-VEGF mRNA 水平对于正常氧分别上升了 $275 \pm 15\%$ 和 $210 \pm 12\%$, 而 VEGF mRNA 分别上升了 $352 \pm 30\%$ 和 $266 \pm 14\%$ 。对于 EG-VEGF 启动子序列检索核心 HIF-1 结合位点,根据共有序列 (5' TACGTGCGGC3', 黑体字代表不变的序列) 揭示在转录起始位点的开始 2450 个核苷酸内具有推定的元件。

[0533] B. HRE 萤光素酶活性分析

[0534] 为了确定 EG-VEGF 基因的缺氧调节是否由 HIF-1 介导,分析了推定的 EG-VEGF 元件控制下萤光素酶报道基因的表达。通过将相容的、退火的寡聚物克隆入 pGL3- 启动子载体 (Promega) 的 BglIII 位点,产生萤光素酶报道分子构建体:

[0535] HRE_ 共有 (Epo) 有义 :5' -AGGCCCTACGTGCGGCCTCACACAGCCTGTTCTGA-3' (SEQ ID NO :15)

[0536] HRE_ 突变体 (EPO) 有义 :5' -AGGCCCTAATTGCGGCCTCACACAGCCTGTTCTGA-3' (SEQ ID NO :16)

[0537] HRE_EG-VEGF 有义 :5' -GCTAAGGACGTGCTATTCATGGGGTGCAGGAAGAT-3' (SEQ ID NO :17)

[0538] HRE_EG-VEGF 突变有义 :5' -GCTAAGGAATTGCTATTCATGGGGTGCAGGAAGAT-3' (SEQ ID NO :18)

[0539] 在 6 孔板中用 Effectene 转染试剂 (Qiagen) 将萤光素酶报道分子构建体瞬时转染入 HeLa 细胞。对每孔,0.75g 报道分子与 0.25g pRL-SV40 对照质体一起转染。在平行的正常氧对缺氧培养中使用一式三份的成对转染,在转染后 24 小时开始板暴露于缺氧 18-24 小时。裂解细胞,用双萤光素酶报道分子试验系统 (Promega) 分析细胞。萤光素酶活性标定到对照载体值,图 17B 中显示代表性实验,误差条代表标准偏差。

[0540] 缺氧条件培养 18-24 小时后,含有推定的 EG-VEGF 元件的萤光素酶报道分子构建体赋予正常氧条件 3.3 ± 0.8 倍增加。该水平与缺氧反应元件 (HRE) Epo 共有序列赋予的相当, 3.4 ± 1.2 倍 (图 17, 小图 b)。使共有或推定的 EG-VEGF HRE 核心序列突变取消对缺氧的反应,证实该反应的特异性。虽然我们不能排除其它机制,但是这些发现表明多半 HIF-1 是 EG-VEGF 基因的缺氧调节的关键介体。

[0541] 因此,惊人的是尽管缺乏序列同源性,EG-VEGF 和 VEGF 基因不仅在响应性内皮细胞中具有相似的作用,例如缺氧可诱导的表达,而且还可能通过共同的机制调节。

[0542] 实施例 19

[0543] 肝素结合试验

[0544] 血管生成因子,包括 bFGF 和 VEGF 与胞外基质成分,诸如硫酸肝素蛋白聚糖相互作用。提示血管生成因子与胞外基质成分之间的相互作用能调节这些分子的生物利用度和活性 (Klagsburn, Semin Cancer Biol. 3 :81-7(1992))。因此,我们测试了 EG-VEGF 是否与肝素结合。

[0545] 在 10mM Tris, pH7.4, 0.1M NaCl 中的 Hi-Trap 肝素-sepharose 柱 (Pharmacia) 中加入 15g 未标记的蛋白质。用 NaCl (0.1-2.0M) 的线性梯度洗脱柱。用人 VEGF₁₆₅ 作为参比。

[0546] 当用于肝素 sepharose 柱时,EG-VEGF 在 0.5M NaCl 存在下洗脱,而相同层析条件下 VEGF₁₆₅ 在 0.7M NaCl 下洗脱。该发现表明 EG-VEGF 是肝素结合生长因子,可能隔离在体内的胞外区室中。

[0547] 实施例 20

[0548] 体内血管生成作用的选择性

[0549] A. 大鼠角膜袋血管生成试验

[0550] 用成年大鼠角膜袋试验检测 EG-VEGF 的体内活性,如前所述 (Gille 等, J. Biol. Chem. 276 :3222-3230 (2001))。将含有 200ng VEGF₁₆₅ 或 500ngEG-VEGF,加上甲基纤维素和硫糖铝的 Hydron 包被的沉淀被插入角膜袋的基底中 (n = 6)。对照沉淀含有 500ng CD4-IgG。在第 6 天,使动物安乐死并注射高分子量 FITC-葡聚糖,使脉管系统可见。用计算机辅助影像分析 (Image-Pro Plus) 进行完整角膜标本中新生血管面积的测量。

[0551] 在大鼠角膜试验中,纯化的 EG-VEGF 在所有测试的眼睛中不显示显著的应答,而 VEGF 诱导预期的血管生成效果 (图 19,小图 a-c)。用兔角膜观察到类似的结果。注意到 VEGF 蛋白质诱导强血管生成反应,而 EG-VEGF 基本无作用。

[0552] B. EG-VEGF 定点腺病毒注射的血管生成作用

[0553] 为了进一步研究 EG-VEGF 的体内活性,检测了局部和持续形式的 EG-VEGF 投递的作用。为了实现局部和持续方式的 EG-VEGF 投递,产生腺病毒 (Av) 载体,注射入无胸腺裸大鼠或小鼠的各个部位。表达 LacZ 或 VEGF 的重组 Av 载体作为对照。

[0554] 用异氟烷麻醉无胸腺裸大鼠,在背部左侧切开 2-2.5cm。提起卵巢,用无创伤钳固定。通过装有 31G 针 (Hamilton) 的气密性 Hamilton 针筒注射 5-10 升盐水中 10^8 或 5×10^8 pfu 的剂量。所有工作在具有 BSL2 实验操作的生物安全箱中进行。对于骨骼肌 (左腓肠肌) 或皮下耳部注射,用异氟烷麻醉无胸腺裸小鼠或大鼠,清洁部位,在各部位注射 50 升体积中 5×10^8 pfu 各病毒制备物的剂量。在所有 Av 研究中的动物在 Av 施用后一周安乐死。在尸体剖检时,切下组织并冷冻或固定,用于组织学分析。

[0555] 当在裸大鼠的骨骼肌中注射时, lacZ 和 EG-VEGF AV 的作用基本不可分辨,有极少的炎症渗出液,不存在血管生成,具有大量的有丝分裂内皮细胞、水肿和肉芽形成组织 (图 19,小图 d-f)。在小鼠耳部注射相同的 Av 载体后获得非常类似的结果 (图 19,小图 g 和 h)。再次,VEGF Av 导致强的血管生成反应,不存在于注射 EG-VEGF Av 的动物中。然而,EG-VEGF 或 VEGFAv 的卵巢内投递在一周内导致注射的卵巢剧烈增大,具有明显可见的血管和出血区域 (图 19,小图 i)。在裸大鼠的代表性实验中,卵巢湿重在 LacZ 组中是 33 ± 3 mg,

在 EG-VEGF 组中是 $489 \pm 30\text{mg}$, 在 VEGF 组是 191 ± 91 ($n = 4$)。未注射卵巢 ($37 \pm 7\text{mg}$) 的重量与 LacZ 组没有不同。虽然与 VEGF 组比较, 在 EG-VEGF 中有质量较大的趋势, 组织学照片非常相似。在两种情况下, 存在破坏卵巢结构的充满液体或血液的大囊肿区域 (图 19, 小图 j-n)。高倍检测揭示囊肿的周围有强血管生成 (图 19, 小图 m-n)。LacZ 卵巢的形态是正常的。因此, VEGF 和 EG-VEGF 能触发响应性组织中相同事件链, 包括诱导除了血管生成外液体外渗的能力。

[0556] 材料保藏

[0557] 下列材料被保藏在美国典型培养物保藏中心, 10801 University Blvd., Manassas, VA20110-2209, USA (ATCC) :

[0558]

材料	ATCC 保藏号	保藏日期
----	----------	------

[0559]

DNA60621-1516	203091	1998 年 8 月 4 日
---------------	--------	----------------

[0560] 该保藏是根据关于用于专利程序的微生物保藏国际认可的布达佩斯条约和细则 (布达佩斯条约) 的规定而作出的。这确保将活的保藏培养物自其保藏之日起维持 30 年。保藏物可从 ATCC 根据布达佩斯条约获得, 并服从 Genentech Inc. 和 ATCC 的协议, 在相应的美国专利授权后或任何美国或外国专利申请公开后, 两种在先者, 确保保藏培养物的后代对于公众是永久和无限制可得到的, 确保后代对于美国专利和商标官员根据 35 USC 122 和依据其官员规则 (包括 37CFR 1.14, 特别根据 886 OG 638) 决定的人是可得到的。

[0561] 本申请的受让人同意, 如果在合适条件下培养时保藏的材料培养物会死亡、丢失或破坏, 材料将在收到通知后立即用相同的替换。保藏的材料的可得性不被视为允许在违反任何政府根据其专利法所授权利实施本发明的许可。

[0562] 上述说明书被认为足够使本领域技术人员实施本发明。本发明不限于保藏的构建体的范围, 因为保藏的实施方式仅说明本发明的某些方面, 任何功能上等价的构建体在本发明的范围内。本文中材料的保藏并不是承认本文所含的书面描述不足以实施本发明的任何方面, 包括其最佳模式, 也不是认为限制权利要求为其代表的特定描述的范围。事实上, 除了本文所示和描述的, 本发明的各种修改对于本领域技术人员来说, 根据上面的描述是清楚的, 并且在权利要求的范围内。

[0563] 序列表

[0564] <110> 基因技术公司 (Genentech, Inc.)

[0565] <120> EG-VEGF 核酸和多肽及其使用方法

[0566] <130> GENENT. 1516QPC

[0567] <150> 60/130, 978

[0568] <151> 2000-09-07

[0569] <150> 60/213, 637

[0570] <151> 2000-06-23

[0571] <150> PCT/US00/32678

[0572] <151> 2000-12-01

[0573] <150>PCT/US00/08439
 [0574] <151>2000-03-30
 [0575] <150>PCT/US00/04914
 [0576] <151>2000-02-24
 [0577] <150>PCT/US00/00219
 [0578] <151>2000-01-02
 [0579] <160>18
 [0580] <170>FastSEQ for Windows Version 4.0
 [0581] <210>1
 [0582] <211>1415
 [0583] <212>DNA
 [0584] <213>人 (Homo sapiens)
 [0585] <220>
 [0586] <400>1
 [0587] tggcctcccc agcttgccag gcacaaggct gagcgggagg aagcgagagg catctaagca 60
 [0588] ggcagtgttt tgccttcacc ccaagtgacc atgagagggtg ccacgcgagt ctcaatcatg 120
 [0589] ctctctctag taactgtgtc tgactgtgct gtgatcacag gggcctgtga gcgggatgtc 180
 [0590] cagtgtgggg caggcacctg ctgtgccatc agcctgtggc ttcgagggtc gcggatgtgc 240
 [0591] accccgctgg ggcgggaagg cgaggagtgc caccccggca gccacaaggc ccccttcttc 300
 [0592] aggaaacgca agcaccacac ctgtccttgc ttgcccaacc tgctgtgctc caggttccccg 360
 [0593] gacggcaggt accgctgtc catggacttg aagaacatca atttttagc gcttgccctgg 420
 [0594] tctcaggata cccaccatcc ttttctgag cacagcctgg atttttatct ctgccaatgaa 480
 [0595] acccagctcc catgactctc ccagtcctta cactgactac cctgatctct cttgtctagt 540
 [0596] acgcacatat gcacacagge agacatacct cccatcatga catgggtccc aggctggcct 600
 [0597] gaggatgtca cagcttgagg ctgtggtgtg aaagggtggc agcctggttc tcttccctgc 660
 [0598] tcaggctgcc agagaggtgg taaatggcag aaaggacatt cccctcccc tccccaggtg 720
 [0599] acctgctctc tttctgggc cctgcccctc tccccatg tatecctcgg tctgaattag 780
 [0600] acattcctgg gcacaggctc ttgggtgcat tgctcagagt cccaggctct ggccctgacct 840
 [0601] tcaggccctt cacgtgaggt ctgtgaggac caatttgtgg gtagttcate ttcctcagat 900
 [0602] tggttaacte cttagtttca gaccacagac tcaagattgg ctcttcccag agggcagcag 960
 [0603] acagtcacce caaggcaggt gtagggagcc cagggagccc aatcagcccc ctgaagactc
 1020
 [0604] tggteccagt cagcctgtgg cttgtggcct gtgacctgtg accttctgcc agaattgtca
 1080
 [0605] tgccctctgag gccccctctt accacacttt accagttaac cactgaagcc cccaattccc
 1140
 [0606] acagcttttc cattaaaatg caaatggtgg tggttcaate taatctgata ttgacatatt
 1200
 [0607] agaaggcaat tagggtgttt ccttaaacaa ctcttttcca aggatcagcc ctgagagcag

1260

[0608] gttggtgact ttgaggaggg cagtcctctg tccagattgg ggtgggagca agggacaggg

1320

[0609] agcagggcag gggctgaaag gggcactgat tcagaccagg gaggcaacta cacaccaaca

1380

[0610] t g c t g g c t t t a g a a t a a a a g c a c c a a c t g a a a a a

1415

[0611] <210>2

[0612] <211>105

[0613] <212>PRT

[0614] <213>人 (Homo sapiens)

[0615] <220>

[0616] <400>2

[0617] Met Arg Gly Ala Thr Arg Val Ser Ile Met Leu Leu Leu Val Thr Val

[0618] 1 5 10 15

[0619] Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys

[0620] 20 25 30

[0621] Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg

[0622] 35 40 45

[0623] Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser

[0624] 50 55 60

[0625] His Lys Val Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys

[0626] 65 70 75 80

[0627] Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys

[0628] 85 90 95

[0629] Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe

[0630] 100 105

[0631] <210>3

[0632] <211>374

[0633] <212>DNA

[0634] <213>人 (Homo sapiens)

[0635] <220>

[0636] <221>unsure

[0637] <222>(0)... (0)

[0638] <223>n = A, T, C 或 G

[0639] <400>3

[0640] tggctcecca gcttgccagg cacaaggctg agctggagga agcgagange atctaagcag 60

[0641] gcagtgtttt gccttcaccc caagtgacca tgagaggtgc cacgcgagtc tcaatcatgc 120

[0642] tctctctagt aactgtgtct gactgtgctg tgatcacagg ggctgtgag cgggatgtcc 180

[0643] agtgtggggc aggcacctgc tgtgccaatca gcctgtggct tcgagggctg cggatgtgca 240
 [0644] ccccgctggg gcggaagge gaggagtgc accccggcag ccacaaggtc cccttcttca 300
 [0645] ggaaacgcaa gcaccacacc tgttctgttg cccaacctgc tgtgctccag ttccggacgg 360
 [0646] cagtacgctg ctca 374
 [0647] <210>4
 [0648] <211>100
 [0649] <212>PRT
 [0650] <213>人 (Homo sapiens)
 [0651] <400>4
 [0652] Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu Pro Arg Ala
 [0653] 1 5 10 15
 [0654] Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys
 [0655] 20 25 30
 [0656] Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg
 [0657] 35 40 45
 [0658] Ile Cys Thr Pro Met Gly Lys Leu Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr
 [0659] 50 55 60
 [0660] Arg Lys Val Pro Phe Phe Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro Cys
 [0661] 65 70 75 80
 [0662] Leu Pro Gly Leu Ala Cys Leu Arg Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys
 [0663] 85 90 95
 [0664] Leu Ala Gln Lys
 [0665] 100
 [0666] <210>5
 [0667] <211>79
 [0668] <212>PRT
 [0669] <213>蛇
 [0670] <400>5
 [0671] Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Leu Gln Cys Gly Lys Gly
 [0672] 1 5 10 15
 [0673] Thr Cys Cys Ala Val Ser Leu Trp Ile Lys Ser Val Arg Val Cys Thr
 [0674] 20 25 30
 [0675] Pro Val Gly Thr Ser Gly Glu Asp Cys His Pro Ala Ser His Lys Ile
 [0676] 35 40 45
 [0677] Pro Phe Ser Gly Gln Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Ala Pro Asn
 [0678] 50 55 60
 [0679] Leu Ala Cys Val Gly Thr Pro Lys Lys Phe Lys Cys Leu Ser Lys
 [0680] 65 70 75
 [0681] <210>6

[0682] <211>83
 [0683] <212>PRT
 [0684] <213>人 (Homo sapiens)
 [0685] <400>6
 [0686] Cys Asp Asn Gln Arg Asp Cys Gln Pro Gly Leu Cys Cys Ala Phe Gln
 [0687] 1 5 10 15
 [0688] Arg Gly Leu Leu Phe Pro Val Cys Thr Pro Leu Pro Val Glu Gly Glu
 [0689] 20 25 30
 [0690] Leu Cys His Asp Pro Ala Ser Arg Leu Leu Asp Leu Ile Thr Trp Glu
 [0691] 35 40 45
 [0692] Leu Glu Pro Asp Gly Ala Leu Asp Arg Cys Pro Cys Ala Ser Gly Leu
 [0693] 50 55 60
 [0694] Leu Cys Gln Pro His Ser His Ser Leu Val Tyr Val Cys Lys Pro Thr
 [0695] 65 70 75 80
 [0696] Phe Val Gly
 [0697] <210>7
 [0698] <211>79
 [0699] <212>PRT
 [0700] <213>爪蟾 (Xenopus)
 [0701] <400>7
 [0702] Cys Leu Arg Ser Thr Asp Cys Ala Pro Gly Leu Cys Cys Ala Arg His
 [0703] 1 5 10 15
 [0704] Phe Trp Ser Lys Ile Cys Lys Pro Val Leu Asp Glu Gly Gln Val Cys
 [0705] 20 25 30
 [0706] Thr Lys His Arg Arg Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe Gln Arg
 [0707] 35 40 45
 [0708] Cys His Cys Gly Ala Gly Leu Ser Cys Arg Leu Gln Lys Gly Glu Phe
 [0709] 50 55 60
 [0710] Thr Thr Val Pro Lys Thr Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His
 [0711] 65 70 75
 [0712] <210>8
 [0713] <211>79
 [0714] <212>PRT
 [0715] <213>猪 (Porcine)
 [0716] <400>8
 [0717] Cys Leu Asn Ser Ala Gln Cys Lys Ser Asn Cys Cys Gln His Asp Thr
 [0718] 1 5 10 15
 [0719] Ile Leu Ser Leu Ser Arg Cys Ala Leu Lys Ala Arg Glu Asn Ser Glu
 [0720] 20 25 30

- [0721] Cys Ser Ala Phe Thr Leu Tyr Gly Val Tyr Tyr Lys Cys Pro Cys Glu
 [0722] 35 40 45
 [0723] Arg Gly Leu Thr Cys Glu Gly Asp Lys Ser Leu Val Gly Ser Ile Thr
 [0724] 50 55 60
 [0725] Asn Thr Asn Phe Gly Ile Cys His Asp Val Gly Arg Ser Ser Asp
 [0726] 65 70 75
 [0727] <210>9
 [0728] <211>17
 [0729] <212>DNA
 [0730] <213> 人工序列
 [0731] <220>
 [0732] <223> 人工序列=合成寡核苷酸
 [0733] <400>9
 [0734] ccggcagcca caaggtc 17
 [0735] <210>10
 [0736] <211>18
 [0737] <212>DNA
 [0738] <213> 人工序列
 [0739] <220>
 [0740] <223> 人工序列=合成寡核苷酸
 [0741] <400>10
 [0742] tgggcaagca aggacagg 18
 [0743] <210>11
 [0744] <211>26
 [0745] <212>DNA
 [0746] <213> 人工序列
 [0747] <220>
 [0748] <223> 人工序列=合成寡核苷酸
 [0749] <400>11
 [0750] cettettcag gaaacgcaag caccac 26
 [0751] <210>12
 [0752] <211>19
 [0753] <212>DNA
 [0754] <213> 人工序列
 [0755] <220>
 [0756] <223> 人工序列=合成寡核苷酸
 [0757] <400>1 2
 [0758] aatgacgagg gcctggagt 19
 [0759] <210>13

- [0760] <211>21
- [0761] <212>DNA
- [0762] <213> 人工序列
- [0763] <220>
- [0764] <223> 人工序列=合成寡核苷酸
- [0765] <400>13
- [0766] ttgatccgca taatctgcat g 21
- [0767] <210>14
- [0768] <211>26
- [0769] <212>DNA
- [0770] <213> 人工序列
- [0771] <220>
- [0772] <223> 人工序列=合成寡核苷酸
- [0773] <400>14
- [0774] tgtgccact gaggagcca acatca 26
- [0775] <210>15
- [0776] <211>35
- [0777] <212>DNA
- [0778] <213> 人工序列
- [0779] <220>
- [0780] <223> 人工序列=合成寡核苷酸
- [0781] <400>15
- [0782] aggcctacg tgcggcctca cacagcctgt tctga 35
- [0783] <210>16
- [0784] <211>35
- [0785] <212>DNA
- [0786] <213> 人工序列
- [0787] <220>
- [0788] <223> 人工序列=合成寡核苷酸
- [0789] <400>16
- [0790] aggcctaat tgcggcctca cacagcctgt tctga 35
- [0791] <210>17
- [0792] <211>35
- [0793] <212>DNA
- [0794] <213> 人工序列
- [0795] <220>
- [0796] <223> 人工序列=合成寡核苷酸
- [0797] <400>17
- [0798] gctaaggacg tgctattcat ggggtgcagg aagat 35

-
- [0799] <210>18
[0800] <211>35
[0801] <212>DNA
[0802] <213>人工序列
[0803] <220>
[0804] <223>人工序列=合成寡核苷酸
[0805] <400>18
[0806] gctaaggaat tgctattcat ggggtgcagg aagat 35

TGGCCTCCCCAGCTTGCCAGGCACAAGGCTGAGCGGGAGGAAGCGAGAGGCATCTA
AGCAGGCAGTGTTTTGCCCTCACCCCAAGTGACCATGAGAGGTGCCACGCGAGTCTC
AATCATGCTCCTCCTAGTAACTGTGTCTGACTGTGCTGTGATCACAGGGGCCTGTGA
GCGGGATGTCCAGTGTGGGGCAGGCACCTGCTGTGCCATCAGCCTGTGGCTTCGAGG
GCTGCGGATGTGCACCCCGCTGGGGCGGGAAGGCGAGGAGTGCCACCCCGGCAGCC
ACAAGGTCCCCTTCTTCAGGAAACGCAAGCACACACCTGTCTTGTGCTTGCCCAACC
TGCTGTGCTCCAGGTTCCCGGACGGCAGGTACCGCTGCTCCATGGACTTGAAGAACA
TCAATTTTTAGGGCGCTTGCCTGGTCTCAGGATACCCACCATCCTTTTCTGAGCACAG
CCTGGATTTTTATTTCTGCCATGAAACCCAGCTCCCATGACTCTCCAGTCCCTACAC
TGACTACCCTGATCTCTTGTCTAGTACGCACATATGCACACAGGCAGACATACT
CCCATCATGACATGGTCCCCAGGCTGGCCTGAGGATGTACAGCTTGAGGCTGTGGT
GTGAAAGGTGGCCAGCCTGGTTCTCTTCCCTGCTCAGGCTGCCAGAGAGGTGGTAAA
TGCCAGAAAGGACATTCCCCCTCCCCTCCCAGGTGACCTGCTCTTTTCTGGGCCC
TGCCCTCTCCCCACATGTATCCCTCGGTCTGAATTAGACATTCTGGGCACAGGCTC
TTGGGTGCATTGCTCAGAGTCCCAGGTCCTGGCCTGACCCTCAGGCCCTTACGTGA
GGTCTGTGAGGACCAATTTGTGGGTAGTTCATCTTCCCTCGATTGGTTAACTCCTTAG
TTTCAGACCACAGACTCAAGATTGGCTCTTCCCAGAGGGGCAGCAGACAGTCACCCCA
AGGCAGGTGTAGGGAGCCCAGGGAGGCCAATCAGCCCCCTGAAGACTCTGGTCCA
GTCAGCCTGTGGCTTGTGGCCTGTGACCTGTGACCTTCTGCCAGAATTGTCATGCCTC
TGAGGCCCCCTCTTACCACACTTACCAGTTAACCCTGAAGCCCCCAATTCCACA
GCTTTTCCATTAATAATGCAAATGGTGGTGGTTCAATCTAATCTGATATTGACATATTA
GAAGGCAATTAGGGTGTTCCTTAAACAACCTCTTCCAAGGATCAGCCCTGAGAGC
AGGTTGGTGACTTTGAGGAGGGCAGTCTCTGTCCAGATTGGGGTGGGAGCAAGGG
ACAGGGAGCAGGGCAGGGGCTGAAAGGGGCACTGATTGAGACCAGGGAGGCAACT
ACACACCAACATGCTGGCTTTAGAATAAAAGCACCAACTGAAAAA

图 1

MRGATRVSIMLLLVTVSDCAVITGACERDVQCGAGTCCCAISLWLRGLRMCTPLGREGEE
C
HPGSHKVPFFRKRKHHHTCPCLPNLLCSRFPDGRYRCSMDLKNINF

重要特征:

信号肽:
1-19

N-肉豆蔻酰基化位点:
33
35
46

图 2

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(长度=14 个核苷酸)
比较 DNA	NNNNNNLLLLLLLL	(长度=16 个核苷酸)

% 核酸序列同一性 =

(ALIGN-2 确定的两种核酸序列之间相同匹配核苷酸数)/(PRO-DNA 核酸序列的核苷酸总数)=
6/14=42.9%

图 3C

PRO-DNA NNNNNNNNNNNN (长度=12 个核苷酸)
 比较 DNA NNNNLLL VV (长度=9 个核苷酸)

%核苷酸序列同一性 =

(ALIGN-2 确定的两种核苷酸序列之间相同匹配核苷酸数)除以(PRO-DNA 核苷酸序列的核苷酸总数)=
 4/12=33.3%

图 3D

TGGTCCCCAGCTTGCCAGGCACAAGGCTGAGCTGGAGGAAGCGAGANGCATCTAA
GCAG
GCAGTGTTTTGCCCTTCACCCCAAGTGACCATGAGAGGTGCCACGCCGAGTCTCAATCA
TGC
TCCTCCTAGTAACTGTGTCTGACTGTGTGTGATCACAGGGGCCCTGTGAGCGGGATG
TCC
AGTGTGGGGCAGGCACCTGTGTGCCATCAGCCCTGTGGCTTCGAGGGCTGCGGATGT
GCA
CCCCGCTGGGGGGGAAGCGGAGGAGTGCCACCCCGGCAGCCACAAGGTCCCCCTTC
TTCA
GGAAACGCAAGCACACACCTGTCTTGTGGCCCAACCTGTGTGCTCCAGTTCGGGA
CGG
CAGTACGCTGCTCA

图 4

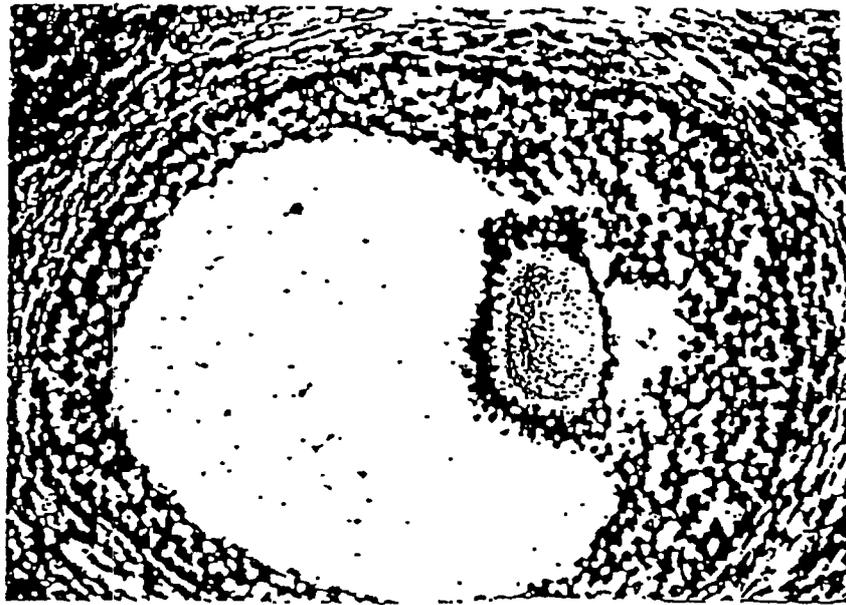


图 5A

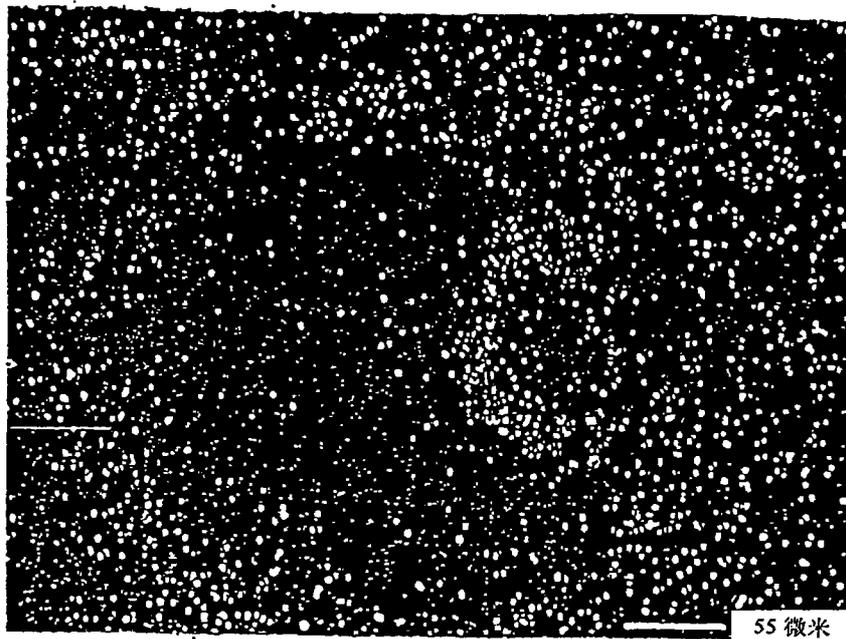


图 5B

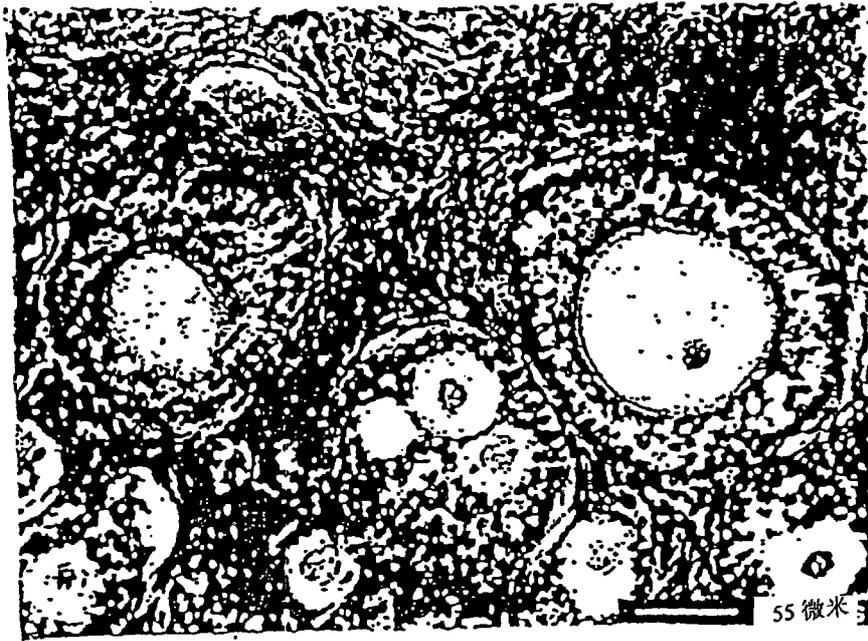


图 5C

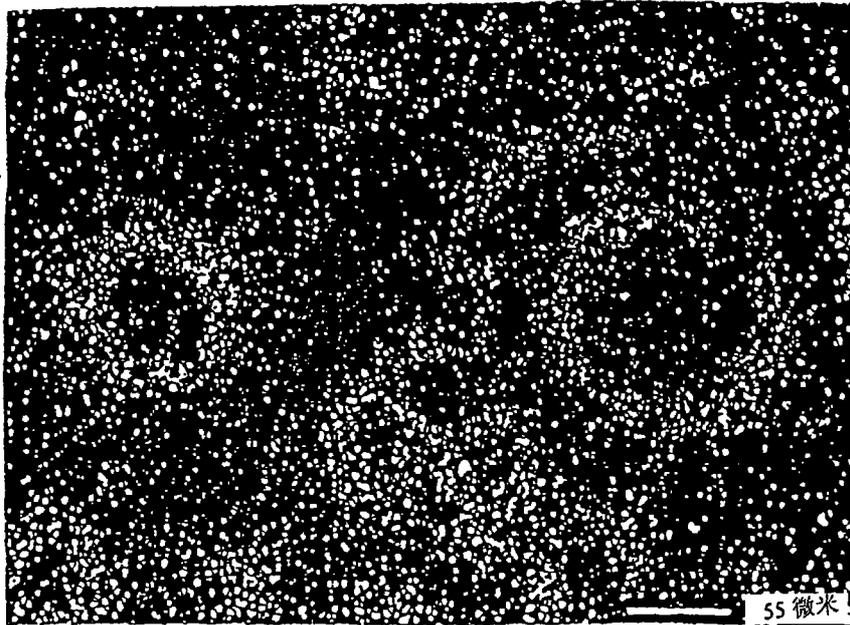


图 5D

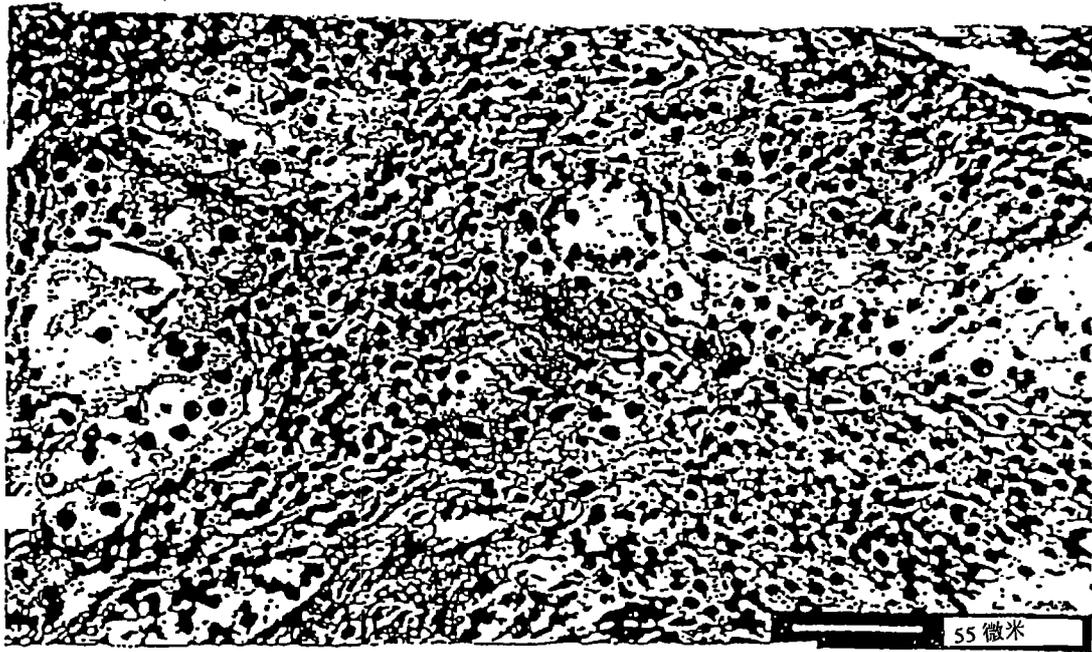


图 5E

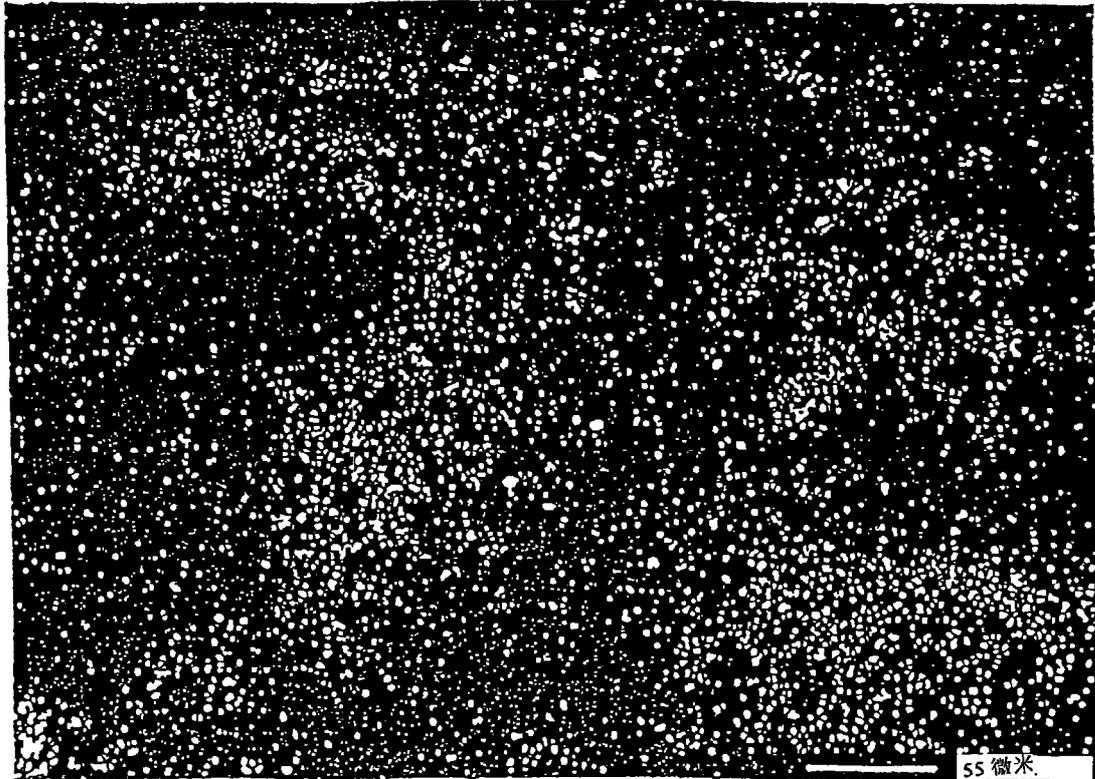


图 5F



6A



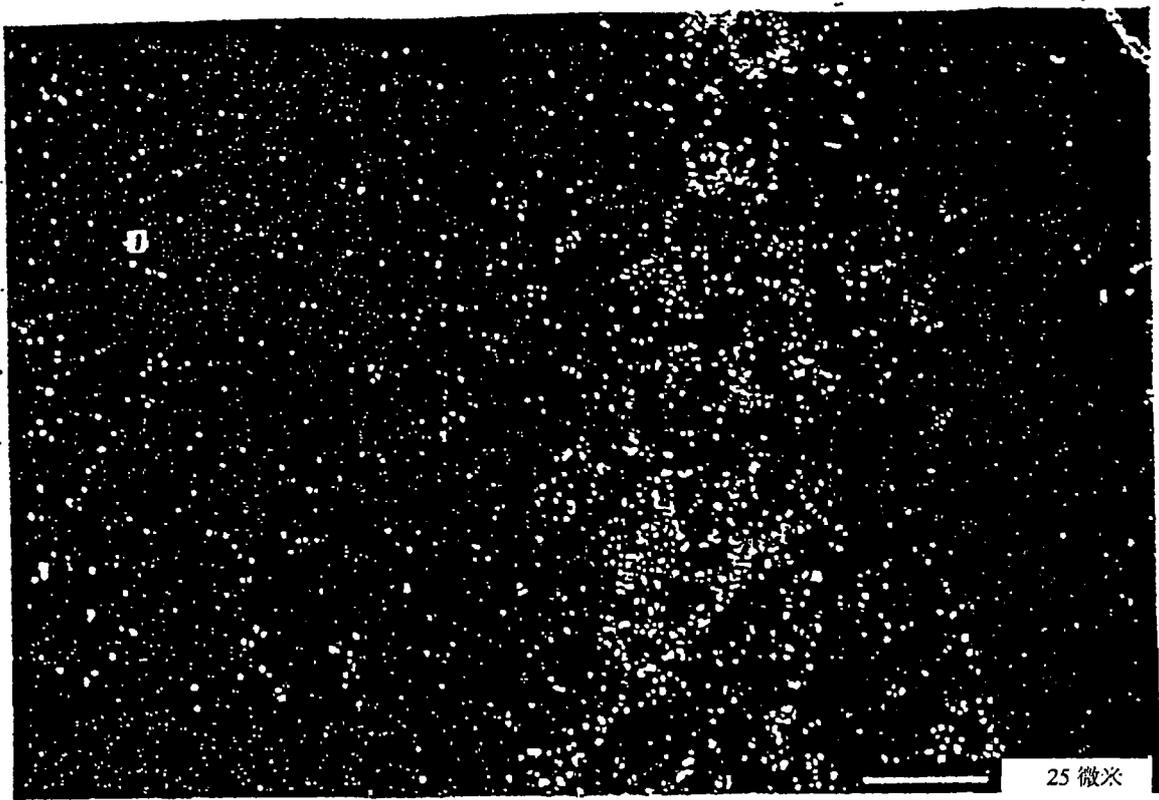


图 6B

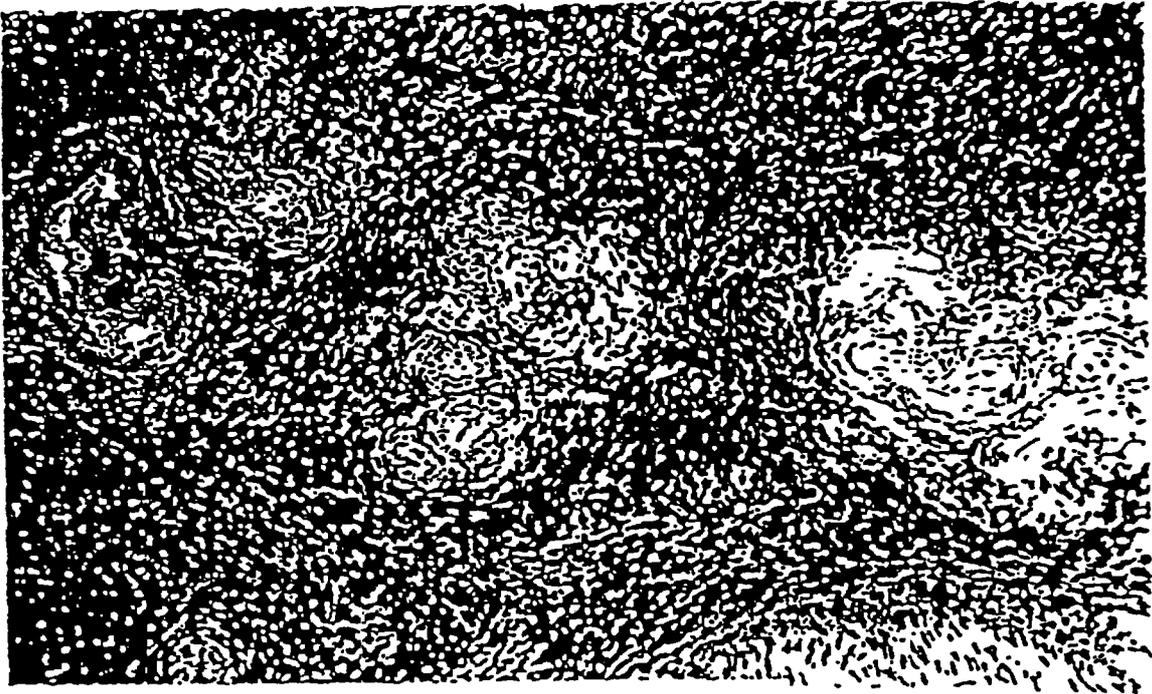
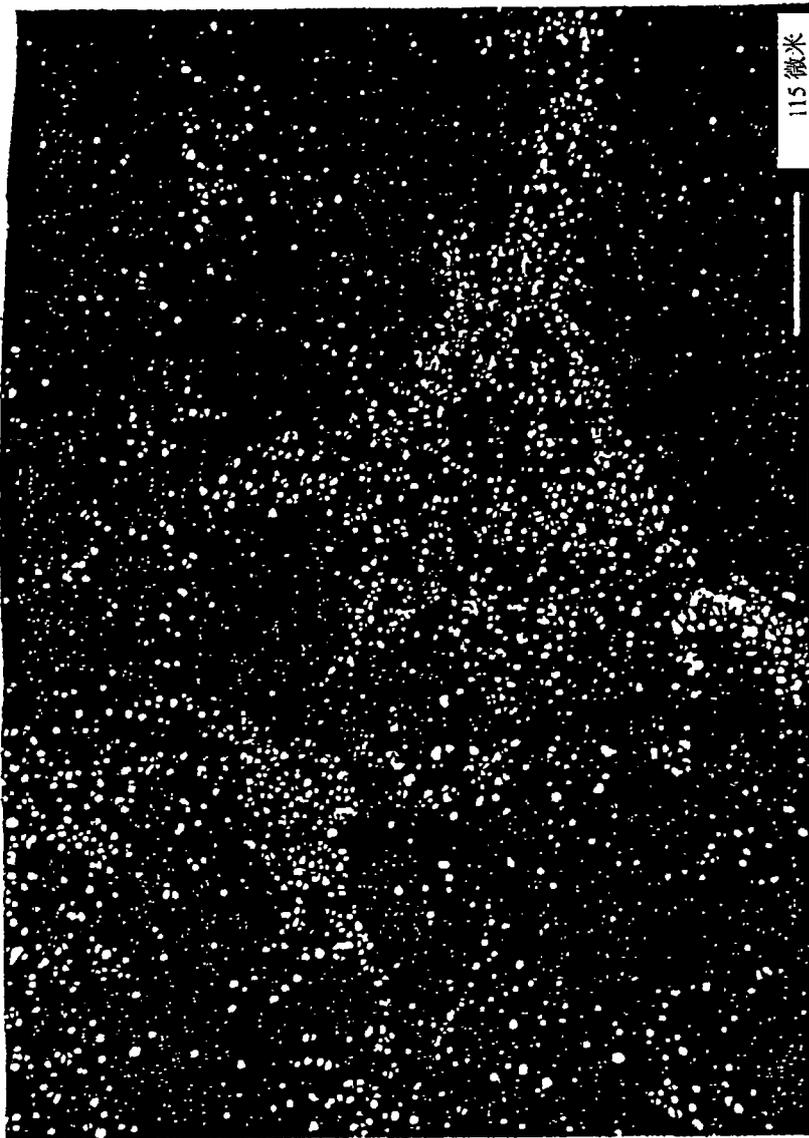
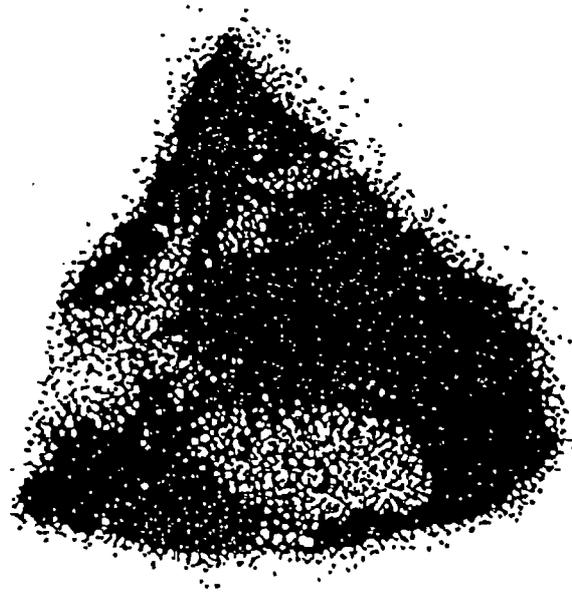


图 6C



6D





A



B

图 7A-B

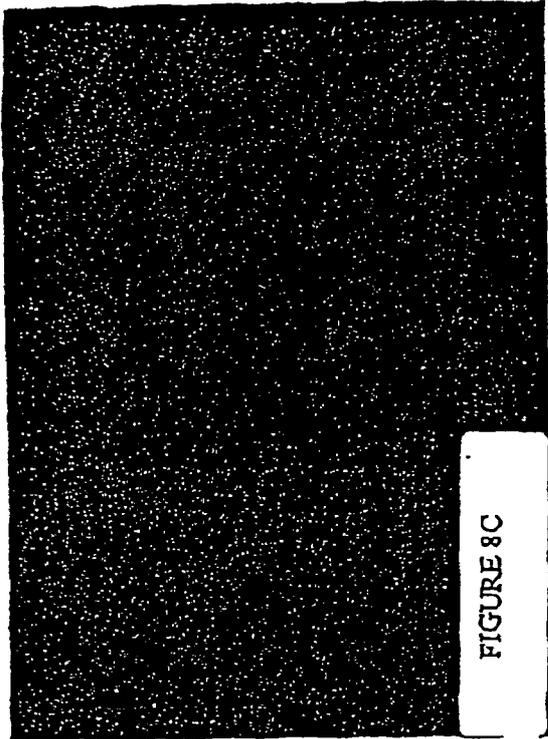


FIGURE 8C

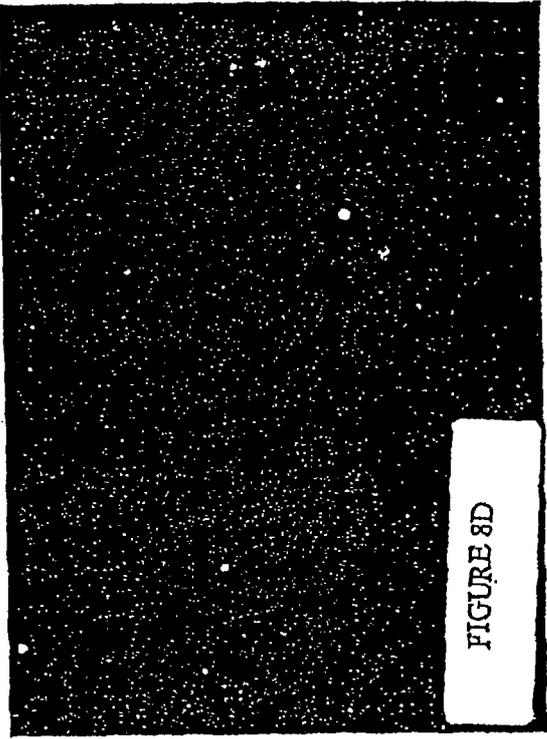


FIGURE 8D

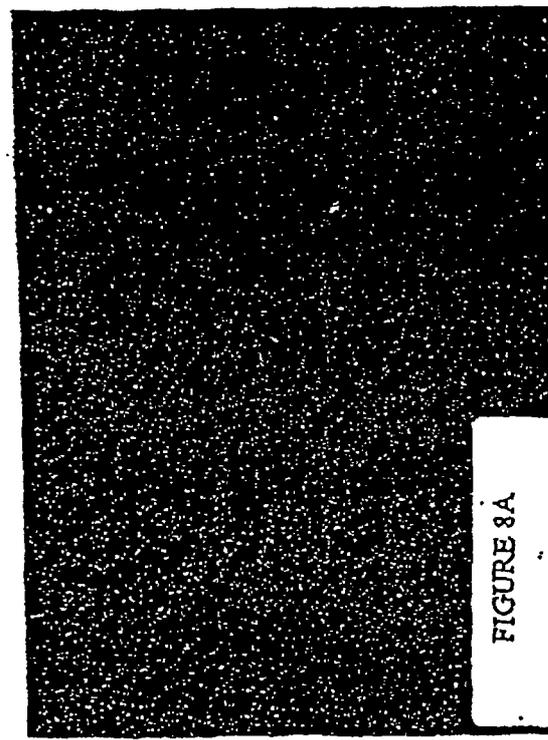


FIGURE 8A

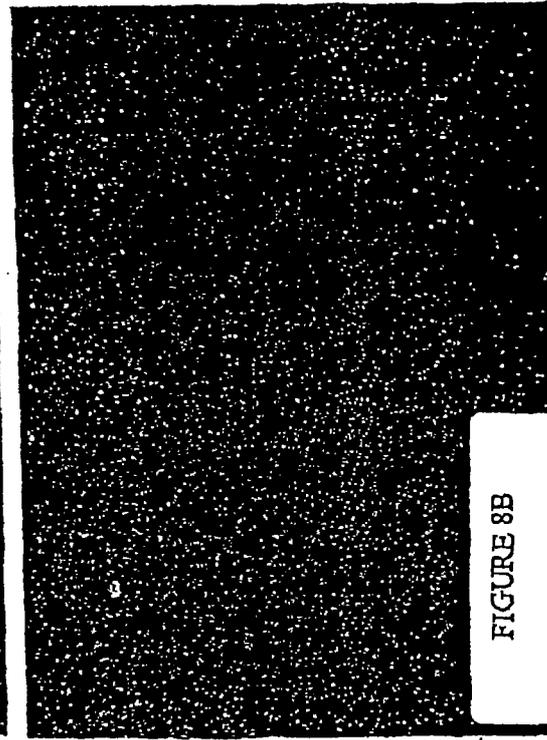


FIGURE 8B

8



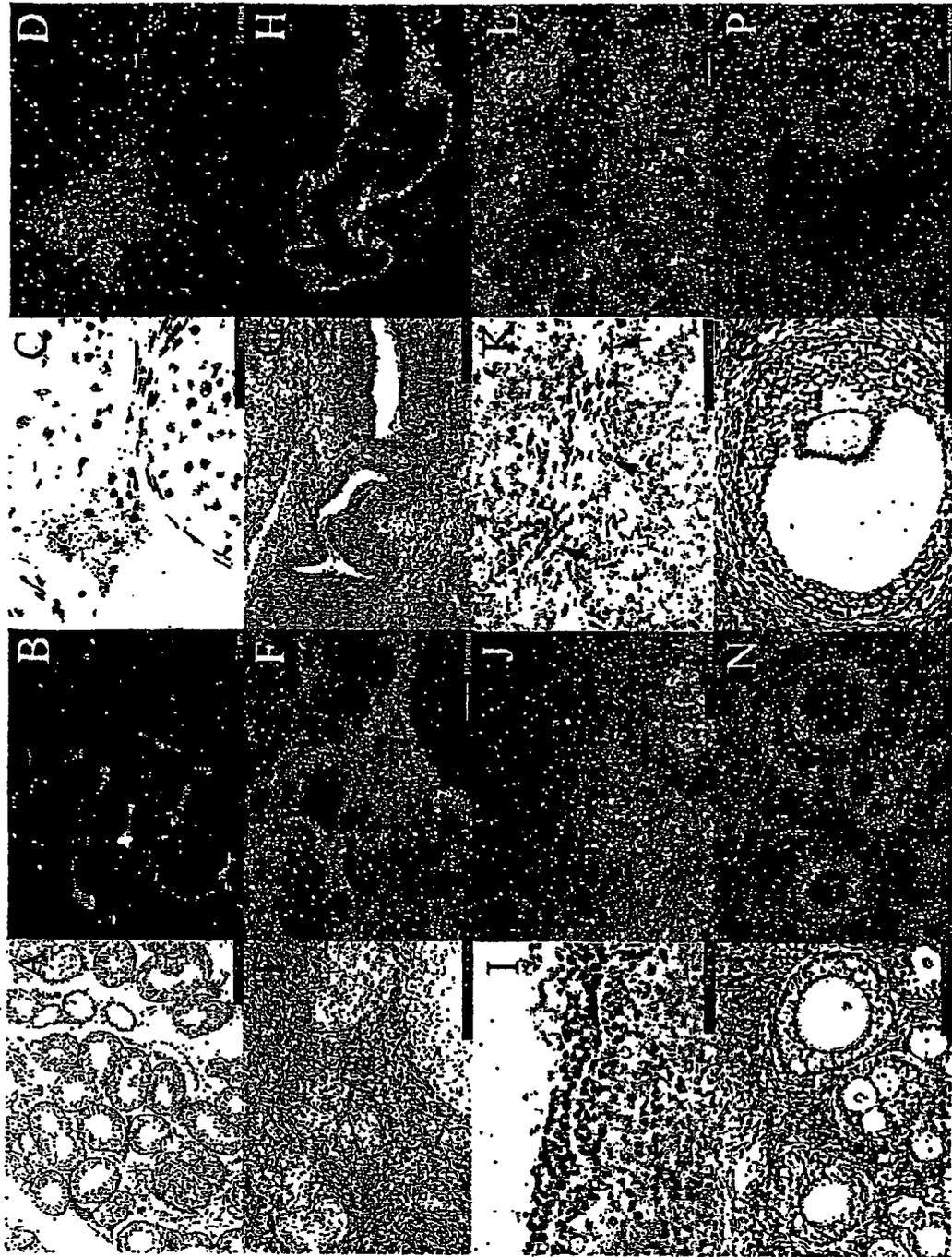
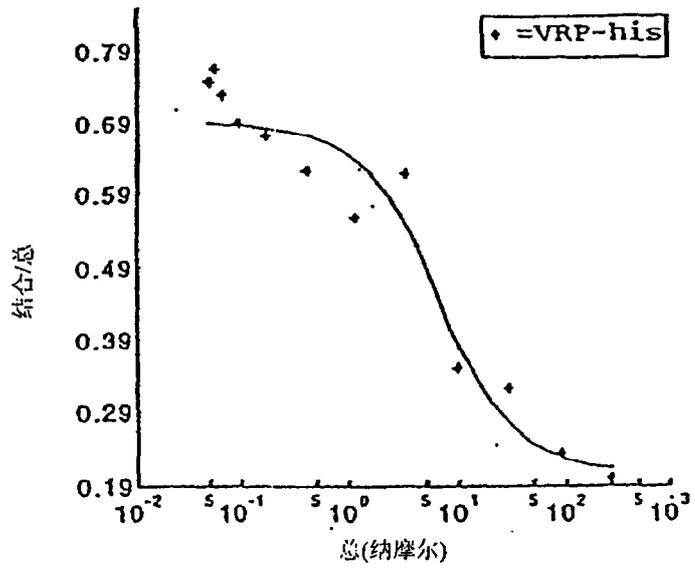


图 9



$K_d = 1.43 \pm 0.4 \text{ nM}$

图 10A

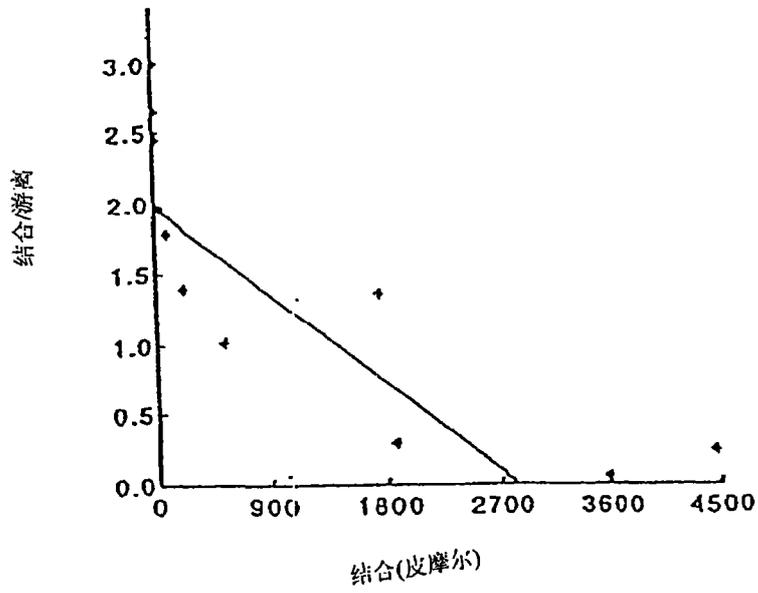


图 10B

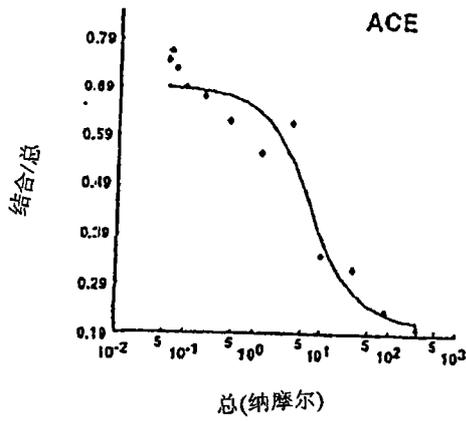
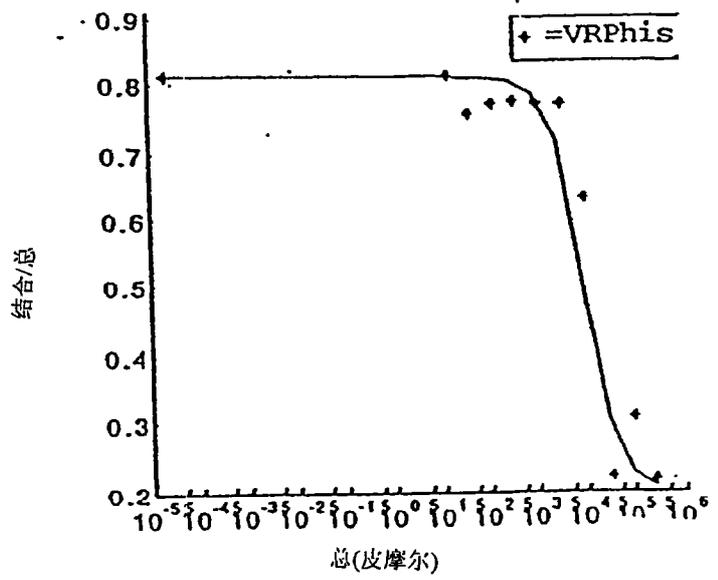


图 10C



$K_d = 0.95 \pm 0.6 \text{ nM}$

图 11A

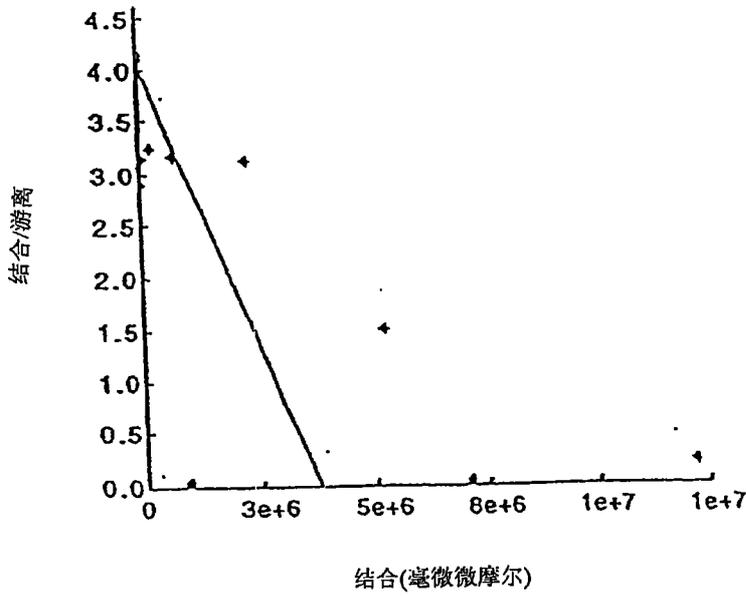


图 11B

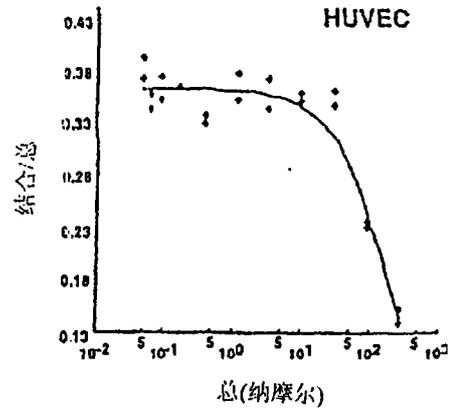


图 11C

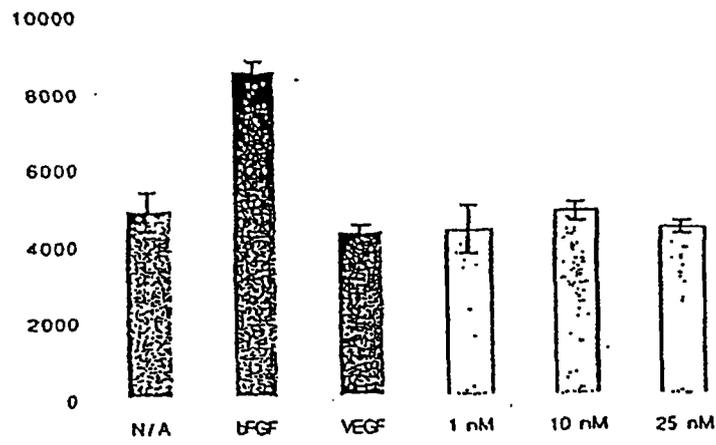


图 12A

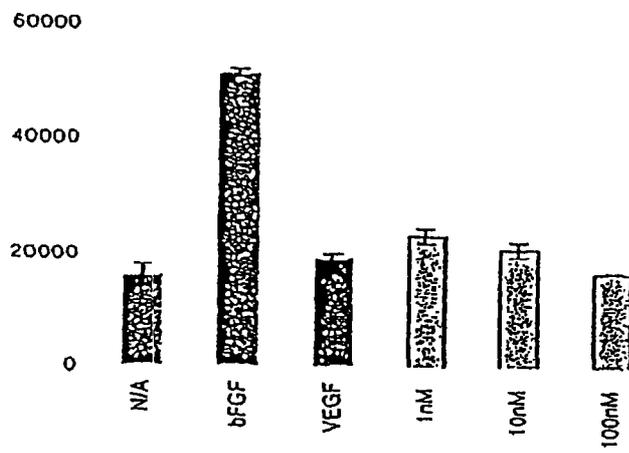


图 12B

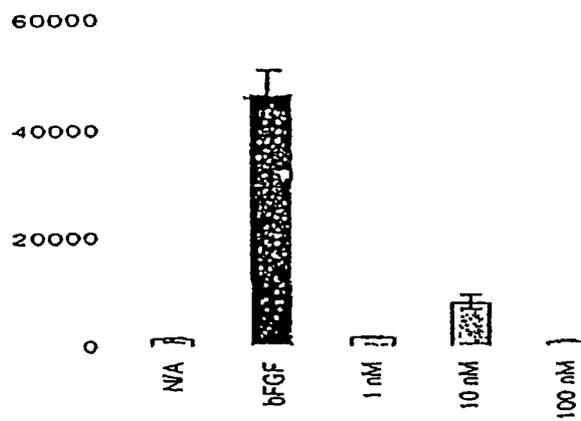


图 12C

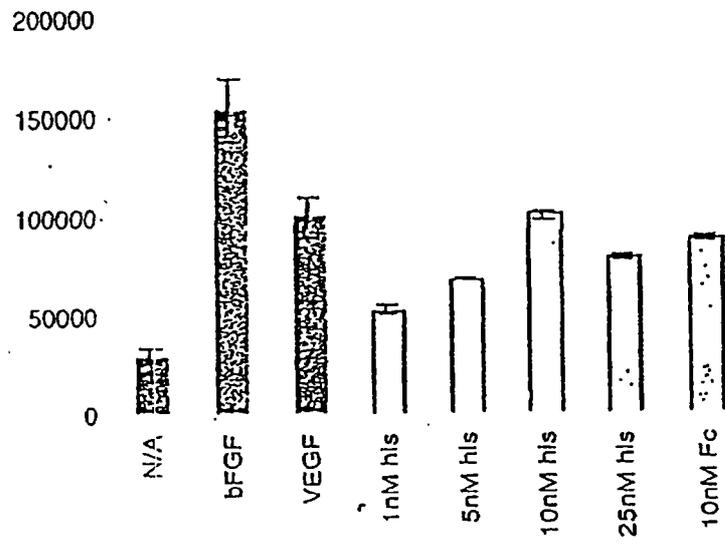


图 12D

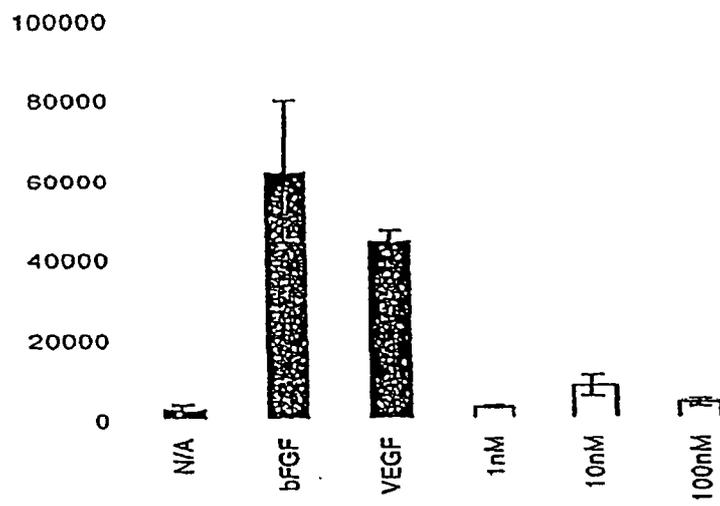


图 12E

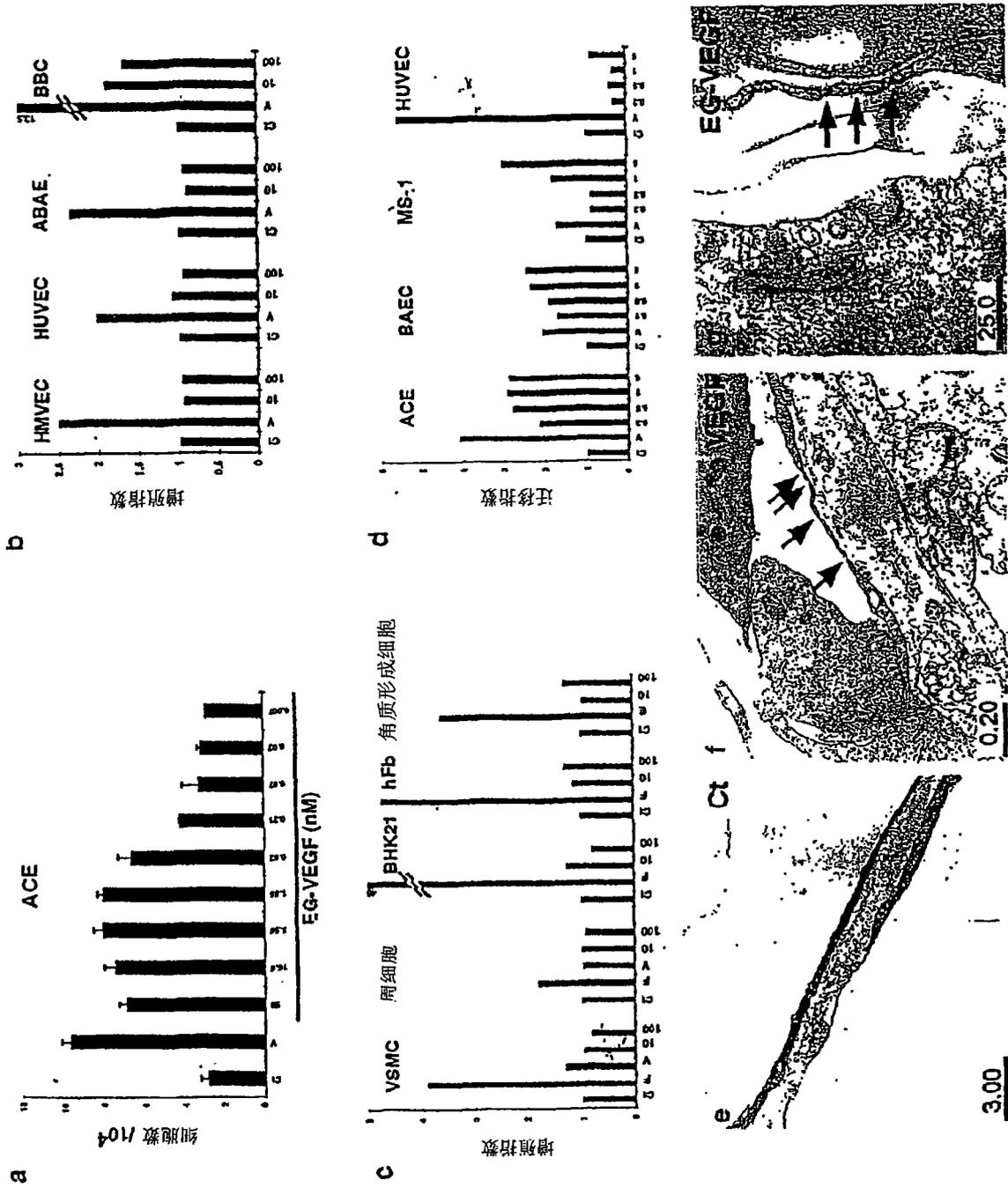


图 13

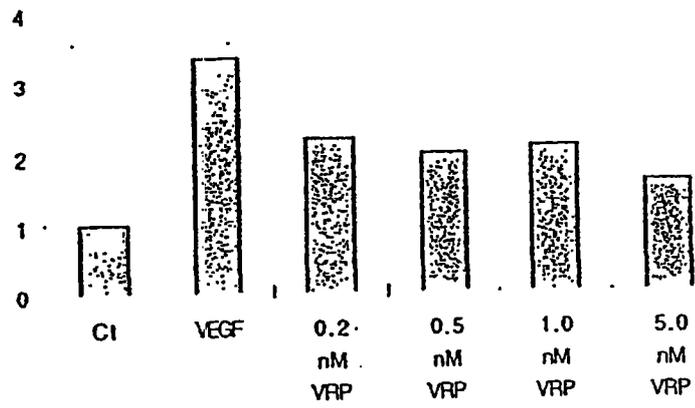


图 14A

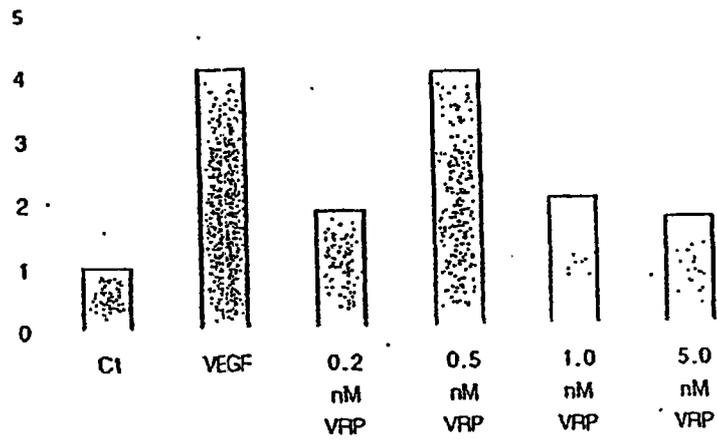


图 14B

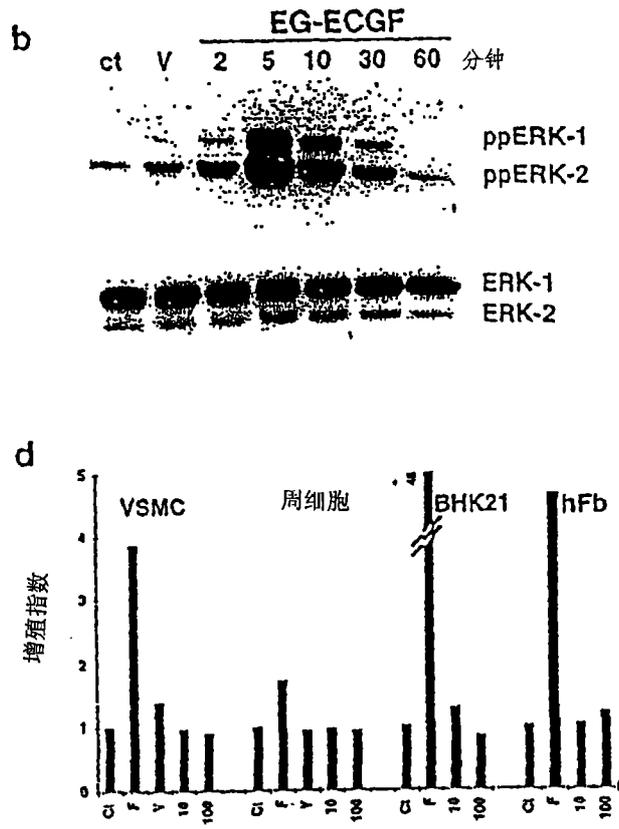


图 15

a

```

TGGCCTCCCCAGCTTGCCAGGCACAAGGCTGAGCGGGAGGAAGCGAGAGG 50
CATCTAAGCAGGCAGTGTGTTTGCCTTCACCCCAAGTGACCATGAGAGGTTG
M R G
CCACGGGAGTCTCAATCATGCTCCTCCTAGTAAGTGTGCTGACTGTGCT
A T R V S I M L L L V T V S D C A
GTGATCACAGGGCCGTGTGAGCGGGATGTCCAGTGTGGGGCAGGCACCTG 200
V I T G A C E R D V Q C G A G T C
CTGTGCCATCAGCCTGTGGCTTCGAGGGCTCCGGATGTGCACCCCGCTGG
C A I S L W L R G L R M C T P L
GGCGGAAGGGCAGGAGTGCCACCCCGGCAGCCACAAGGTCCCCTTCTTC
G R E G E E C H P G S H K V P F F
AGGAAACGCAAGCACACACCTGTCTTGTCTGCCCCAACCTGTCTGTGCT
R K R K H H T C P C L P N L L C S
CAGGTTCCCGGACGGCAGGTACCGCTGCTCCATGGACTGAAGAACATCA 400
R F P D G R Y R C S M D L K N I
ATTTTAGGCGCTTGCCCTGGTCTCAGGATACCCACCATCTTTTCTCTGAG
N F *
CACAGCCTGGATTTTATTTCTGCCATGAAACCCAGCTCCCATGACTCTC
CCAGTCCCTACATGACTACCCGTATCTCTTGTCTAGTACGCACATAT
GCACACAGGCAGACATACCTCCCATCATGACATGGTCCCCAGGCTGGCCT 600
GAGGATGTACAGCTTGAGGCTGTGGTGTGAAAGGTGGCCAGCCTGGTTC
TCTTCCCTGCTCAGGCTGCCAGAGAGGTGGTAAATGGCAGAAAGGACAT
CCCCCTCCCTCCCAAGGTGACCTGCTCTCTTTCCTGGGCGCTGCCCTC
TCCCCACATGATCCCTCGGTCGAATTAGACATTCCTGGGCACAGGCTC
TTGGGTGCATTTGCTCAGAGTCCAGGTCCTGGCTGACCCTCAGGCCCTT
CACGTGAGGTCGTGAGGACCAATTTGTGGTAGTTTCACTTCCCTCGAT
TGGTTAACTCCTTAGTTTTCAGACACAGACTCAAGATTGGCTCTTCCCAG 1000
AGGCAGCAGACAGTCAACCCCAAGGCAGGTGTAGGGAGCCAGGGAGGCC
AATCAGCCCCCTGAAGACTCTGGTCCCAGTCAGCCTGTGGCTGTGGCCT
GTGACCTGTGACCTTCTGCCAGAATTGTCAATGCTCTGAGGCCCCCTCTT
ACCACACTTTACCAGTTAACCACTGAAGCCCCCAATTCCACAGCTTTTC
CATTAAAAATGCAAAATGTTGGTGGTTCAATCTAATCTGATATTGACATAT 1200
AGAAGGCAATTAGGGTGTTCCTTAAACAACCTCTTCCAGGATCAGCC
CTGACAGCAGGTTGGTACTTTGAGGAGGGCAGTCTCTGTCCAGATTGG
GGTGGCAGCAAGGCAGGGAGCAGGGCAGGGCTGAAAGGGGCAGTGTAT
TCAGACCAGGGAGGCAACTACACCAACAATGCTGGCTTTAGAATAAAAG 1400
CACCAACTGAAAAA

```

b

```

MRGATRVSIIMLLLVTVSDCAVITGACERIDVQCGAGTCCATISLWLRGLRMC 50 EG-VEGF
MLLLLLLLPPLLPRAGDAAVITGACDIDSQCGGCMCAVSIWVKSIRITC 48 Bv8 同源
AVITGACERIDLCGKGTCCAVSLWIKSMRVC 31 VPRA

TFLREGGEECHPESHKVPFFRKRKHHTCPCLPNLLCSRHEIDGRYRCSMDL 100 EG-VEGF
TPMSEKLGDSCHPLTRKVPFFGRMHHTCPCLPGLACLRISFNRFICLAOK 95 Bv8 同源
TEVSTSGEDCHEASHKIPFSGDRMHHTCPDNPNLACVGTGR-KEKCLSK 79 VPRA

KNINF 105 EG-VEGF

```

c

```

ERDVOGAGTCCALSLWLRGLR--MCTPLREGGEEC--HFGSHKVPFF 70 EG-VEGF
QDNQRDQPGLCFAFQ---RGLLFPVCTPLPVEGELC--HDEASRLLDLI 252 hdck3
CLRSTDCAPGLCCA----RHFWSKIKHEVLDEGOVCTKRRKGS----- 215 xdkk1
CLNSAOCKSN--CQHDTHLSLSR---CALKARENSECSAFTLYG----- 55 col

RKRKH----HTCPCLPNLLCSR-----FPDGRYRCSMDLKNINF 105 EG-VEGF
TWELEPDGALDRCPASGLLCP-----HSHSLVYVCKPTFVG 290 hdck3
--HGLE---IFQRCFCAGLSRRLQKGEFTTVPKTSRLHTCQRH 254 xdkk1
-----VYYKCPFERGLIICGDKSLV--CSITNTNFGICHDVGRSSD 94 col

```

图 16A-C

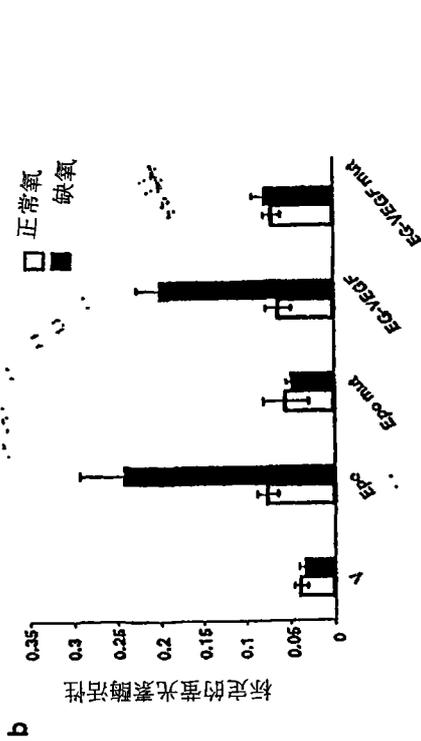


图 17A

AGGCCCTACGIGGGGCTCACACAGCCTGTTCTGA Epo
 AGCCCTAAIIGCGGCTCACACAGCCTGTTCTGA Epo 突变
 GCTAAGGACGIGCTATTTCATGGGTGCAGGAAGAT EG-VEGF
 GCTAAGGAAIIGCTATTTCATGGGTGCAGGAAGAT EG-VEGF 突变

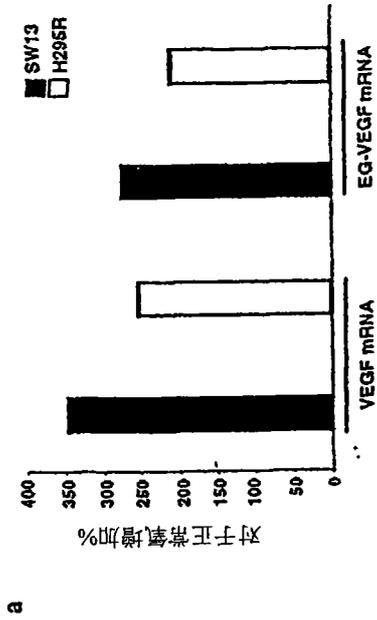


图 17B

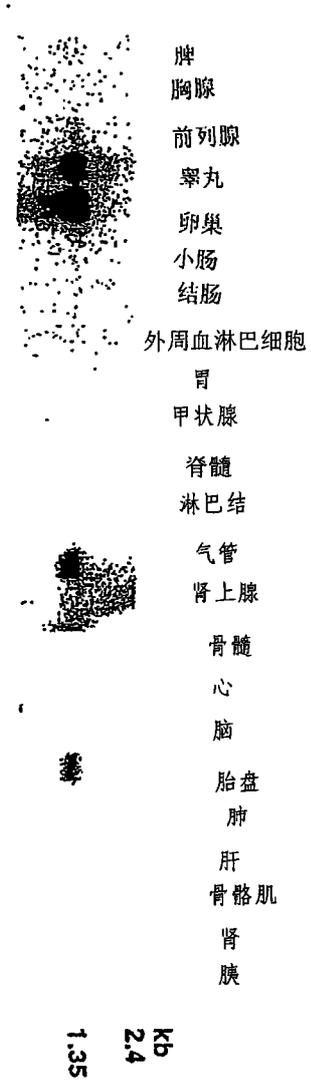


图 18

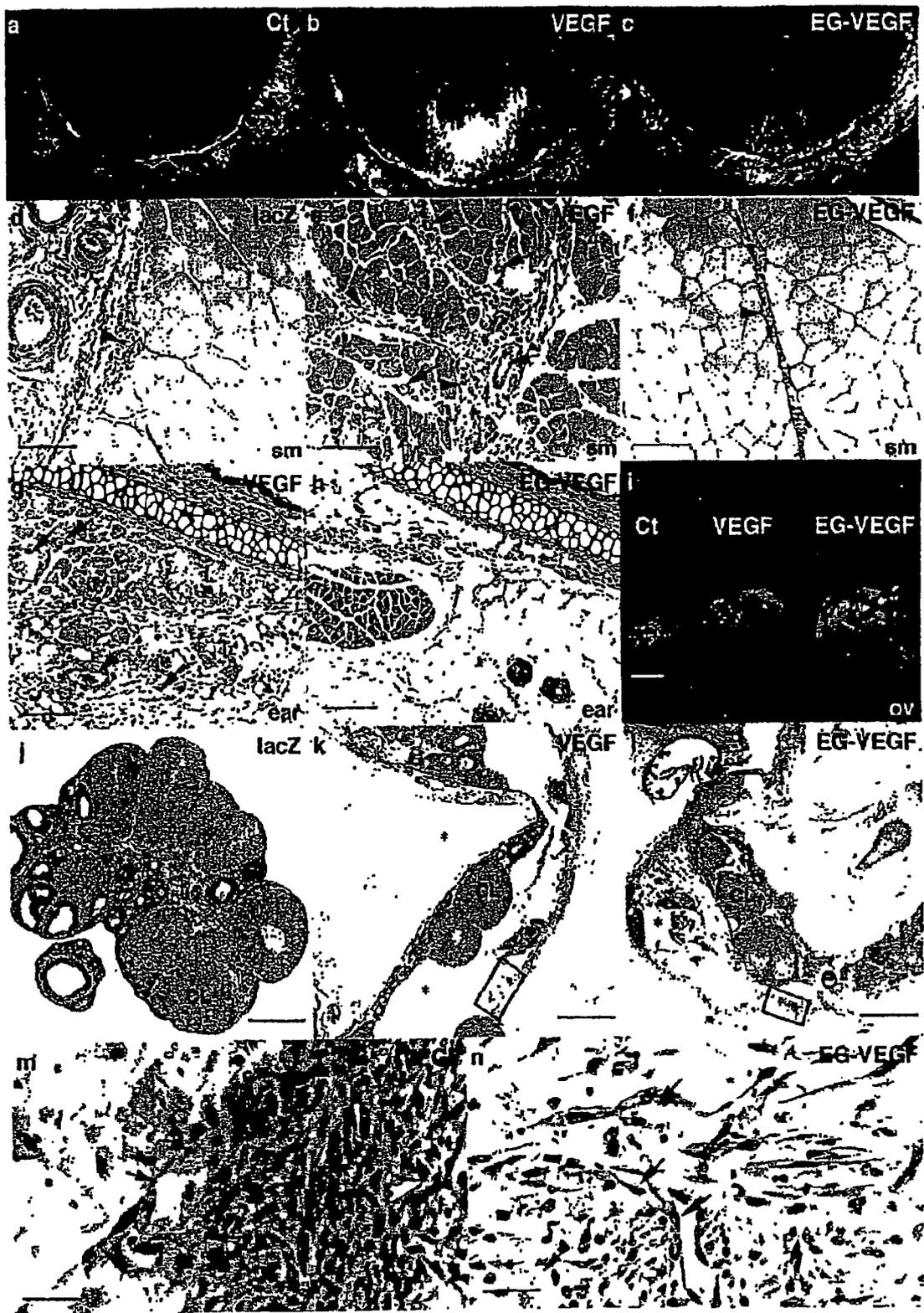


图 19A-N

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M -8 /* value of a match with a stop */

int _day[26][26] = {
/* A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ { _M, _M},
/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

图 20A

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP     24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS       1024    /* max jmps in an path */
#define MX         4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT       3       /* value of matching bases */
#define DMIS       0       /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0      8       /* penalty for a gap */
#define DINS1      1       /* penalty per base */
#define PINS0      8       /* penalty for a gap */
#define PINS1      4       /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP];      /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP];     /* base no. of jmp in seq x */
};

struct diag {
    int            score;          /* score at last jmp */
    long           offset;        /* offset of prev block */
    short          ijmp;          /* current jmp index */
    struct jmp     jp;            /* list of jmps */
};

struct path {
    int            spc;           /* number of leading spaces */
    short          n[JMPS];       /* size of jmp (gap) */
    int            x[JMPS];       /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char             *ofile;         /* output file name */
char             *namex[2];      /* seq names: getseqs() */
char             *prog;          /* prog name for err msgs */
char             *seqx[2];       /* seqs: getseqs() */
int              dmax;           /* best diag: nw() */
int              dmax0;          /* final diag */
int              dna;            /* set if dna: main() */
int              endgaps;        /* set if penalizing end gaps */
int              gapx, gapy;      /* total gaps in seqs */
int              len0, len1;     /* seq lens */
int              ngapx, ngapy;    /* total size of gaps */
int              smax;           /* max score: nw() */
int              *xbm;           /* bitmap for matching */
long             offset;        /* current offset in jmp file */
struct           diag           *dx;      /* holds diagonals */
struct           path           pp[2];    /* holds path for seqs */
char             *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char             *getseq(), *g_calloc();

```

Page 1 of nw.h

图 20B

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: prog file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
int ac;
char *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0; /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out"; /* output file */

    nw(); /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps(); /* get the actual jmps */
    print(); /* print stats, alignment */

    cleanup(0); /* unlink any tmp files */
}

```

Page 1 of nw.c

图 20C

```

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/
nw0
{
    char          *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int           *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int           ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int           *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int           mis;               /* score for each type */
    int           ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register      id;                /* diagonal index */
    register      ij;                /* jmp index */
    register      *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
    register      xx, yy;            /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_malloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_malloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_malloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_malloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_malloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
    */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

Page 2 of nw.c

图 20D

```

...nw
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (x[bm[*px-'A']&x[bm[*py-'A']]? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongong del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

    /* update penalty for del in y seq;
     * favor new del over ongong del
     */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else {
            delx -= ins1;
            ndelx++;
        }
    } else {
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
            ndelx++;
    }

    /* pick the maximum score; we're favoring
     * mis over any del and delx over dely
     */
}

```

Page 3 of nw.c

图 20E

```

...nw

    id = xx - yy + len1 - 1;
    if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
        coll[yy] = mis;
    else if (delx > dely[yy]) {
        coll[yy] = delx;
        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
            && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejmps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
    else {
        coll[yy] = dely[yy];
        ij = dx[id].ijmp;

if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
    dx[id].ijmp++;
    if (++ij >= MAXJMP) {
        writejmps(id);
        ij = dx[id].ijmp = 0;
        dx[id].offset = offset;
        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
    }
}
        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
    }
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (coll[yy] > smax) {
        smax = coll[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)coll);

```

Page 4 of nw.c

图 20F

```

/*
- *
* print() -- only routine visible outside this module
*
* static:
* getmat() -- trace back best path, count matches: print()
* pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
* dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
* numns() -- put out a number line: dumpblock()
* putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
* stars() -- put a line of stars: dumpblock()
* stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
*/

#include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE  256    /* maximum output line */
#define P_SPC   3      /* space between name or num and seq */

extern  _day[26][26];
int     olen;          /* set output line length */
FILE    *fx;           /* output file */

print()
{
    int     lx, ly, firstgap, lastgap;    /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

print

Page 1 of nwprint.c

图 20G

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;                /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;     /* leading trailing overlap */
{
    int    nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char    outx[32];
    double    pct;
    register    n0, n1;
    register char    *p0, *p1;

    /* get total matches, score
    */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
    * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
    * else, knock off overhangs and take shorter core
    */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

Page 2 of nwprint.c

图 20H

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "\n<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "\n<endgaps not penalized\n");
}

static nm; /* matches in core -- for checking */
static lmax; /* lengths of stripped file names */
static ij[2]; /* jmp index for a path */
static nc[2]; /* number at start of current line */
static ni[2]; /* current elem number -- for gapping */
static siz[2];
static char *ps[2]; /* ptr to current element */
static char *po[2]; /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int nm; /* char count */
    int more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nm = stripname(namex[i]);
        if (nm > lmax)
            lmax = nm;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}
Page 3 of nwprint.c

```

pr_align

图 20I

```

for (nm = nm = 0, more = 1; more;) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nm == olen || !more && nm) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nm = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

dumpblock

Page 4 of nwprint.c

图 20J

```

                                ...dumpblock
(void)putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                nums
{
    int    ix;        /* index in out[] holding seq line */

    char    nline[P_LINE];
    register    i, j;
    register char    *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0) ? -i : i;
                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void)putc(*pn, fx);
    (void)putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)                                putline
{
    int    ix;

    Page 5 of nwprint.c
}

```

图 20K

```

                                                                    ...putline
int          i;
register char *px;
for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbrm[*p0-'A']&xbrm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nna++;
            }
            else if (ldna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = ':';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

Page 6 of nwprint.c

图 20L

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)                                stripname
char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}
```

Page 7 of nwprint.c

图 20M

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_malloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nwo
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

int cleanup();                               /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                   cleanup
{
    int i;
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)                             getseq
{
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */

    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
}

```

Page 1 of nwsubr.c

图 20N

```

...getseq
py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_alloc(msg, nx, sz)
char *msg; /* program, calling routine */
int nx, sz; /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
* get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
*/
readjmps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;
        }
    }
}

```

Page 2 of nwsubr.c

图 200

```

...readjumps
    if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].jimp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}
/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--, j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--, j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}
}

```

Page 3 of nwsubr.c

图 20P

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                writejmps
int      ix;
{
    char  *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

Page 4 of nwsubr.c

图 20Q

专利名称(译)	EG-VEGF核酸和多肽及使用方法		
公开(公告)号	CN101269214B	公开(公告)日	2013-09-04
申请号	CN200810099171.9	申请日	2001-06-22
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	基因技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	基因技术股份有限公司		
[标]发明人	N费拉拉 C瓦达那伯 WI伍德		
发明人	N·费拉拉 C·瓦达那伯 W·I·伍德		
IPC分类号	A61K38/18 A61K31/7088 A61P35/00 C12N15/09 A61K38/19 A61K38/22 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P15/00 A61P43/00 C07H21/04 C07K14/475 C07K14/515 C07K14/52 C07K16/24 C12N15/11 C12N15/12 C12N15/62 C12Q1/00 C12Q1/02 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	A61K39/395 G01N33/74 G01N2500/04 A61K38/1866 C07K14/52 C07K14/475 G01N2333/515 G01N33/50 C12N15/113 A61P15/00		
代理人(译)	张红春		
审查员(译)	潘浩		
优先权	PCT/US2000/032678 2000-12-01 WO 60/230978 2000-09-07 US 60/213637 2000-06-23 US		
其他公开文献	CN101269214A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明针对在本文中称为EG-VEGF的新颖多肽，和编码这些多肽的核酸分子。本文还提供了含有这些核酸序列的载体和宿主细胞，含有与异源多肽序列融合的本发明多肽的嵌合多肽分子，与本发明多肽结合的抗体和产生本发明多肽的方法。本文还提供了筛选EG-VEGF调节剂的方法。另外，本文还描述了与调节细胞增殖和趋化性有关的方法和相关的治疗方法。

MRGATRVSIMLLLVTVSDCAVITGACERDVQCGAGTCCAISLWLRGLRMCTPLGREGEE

C
HPGSHKVPFFRKRKHHTCPCLPNLLCSRFPDGRYRCSMDLKNINF

重要特征:

信号肽:

1-19

N-肉豆蔻酰基化位点:

33

35

46