

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-244388

(P2007-244388A)

(43) 公開日 平成19年9月27日(2007.9.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
C O 7 K 14/475 (2006.01)	C O 7 K 14/475	4 B O 6 4
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24	4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 5
審査請求 有 請求項の数 39 O L (全 46 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-106593 (P2007-106593)	(71) 出願人	597018381
(22) 出願日	平成19年4月13日 (2007.4.13)		ヒューマン ジノーム サイエンスーズ, インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願平9-501427の分割		Human Genome Sciences, Inc.
原出願日	平成8年6月6日 (1996.6.6)		アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, シャディー グローブ ロード 14200
(31) 優先権主張番号	08/465,968		9410 Key West Avenue, Rockville, Maryland 20850, United States of America
(32) 優先日	平成7年6月6日 (1995.6.6)	(74) 代理人	100107489
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 大塩 竹志
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ヒト血管内皮増殖因子2

(57) 【要約】

【課題】新規な血管内皮細胞増殖因子およびそれをコードするDNAを提供すること。

【解決手段】タンパク質分子の発現に関連する疾患または該疾患に対する感受性を診断するための方法であって、該方法は：患者の細胞からの核酸を入手する工程；および（a）配列番号2を含む単離されたタンパク質分子；

（b）配列番号2のアミノ酸1～373を含む単離されたタンパク質分子；（c）配列番号2のアミノ酸-23～373を含む単離されたタンパク質分子；および（d）配列番号2のアミノ酸-46～373を含む単離されたタンパク質分子からなる群より選択される、タンパク質分子をコードする核酸配列における変異を決定する工程を包含する、方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タンパク質分子の発現に関連する疾患または該疾患に対する感受性を診断するための方法であって、該方法は：

患者の細胞からの核酸を入手する工程；および

(a) 配列番号 2 を含む単離されたタンパク質分子；

(b) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ～ 373 を含む単離されたタンパク質分子；

(c) 配列番号 2 のアミノ酸 - 23 ～ 373 を含む単離されたタンパク質分子；および

(d) 配列番号 2 のアミノ酸 - 46 ～ 373 を含む単離されたタンパク質分子からなる群より選択される、タンパク質分子をコードする核酸配列における変異を決定する工程を包含する、方法。

10

【請求項 2】

宿主に由来するサンプルにおけるタンパク質分子の存在について分析する工程を包含する診断方法であって、該タンパク質分子が、

(a) 配列番号 2 を含む単離されたタンパク質分子；

(b) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ～ 373 を含む単離されたタンパク質分子；

(c) 配列番号 2 のアミノ酸 - 23 ～ 373 を含む単離されたタンパク質分子；および

(d) 配列番号 2 のアミノ酸 - 46 ～ 373 を含む単離されたタンパク質分子からなる群より選択される、

方法。

20

【請求項 3】

(a) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ～ 373 をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド；および

(b) (a) のポリヌクレオチドと少なくとも 95% 同一な核酸配列を含むポリヌクレオチド、
からなる群より選択される、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4】

単離されたポリヌクレオチドであって：

(a) ATCC 受託番号 97149 に含まれる cDNA の核酸配列を含むポリヌクレオチド；

30

(b) ATCC 受託番号 97149 に含まれる cDNA によってコードされる全長タンパク質分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド；

(c) ATCC 受託番号 97149 に含まれる cDNA によってコードされる全長から N 末端メチオニンを除いたタンパク質分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド；

(d) ATCC 受託番号 97149 に含まれる cDNA によってコードされる全長からリーダー配列を除いたタンパク質分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド；

(e) 該 (a) ～ (d) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% 同一である核酸配列を含むポリヌクレオチド；および

(f) 該 (a) ～ (d) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドに対して少なくとも 95% 同一である核酸配列を含むポリヌクレオチド；および

40

からなる群より選択される、ポリヌクレオチド。

【請求項 5】

(a) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ～ 373 のタンパク質分子；および

(b) (a) のタンパク質分子と少なくとも 95% 同一なアミノ酸配列を含むタンパク質分子、

からなる群より選択される、単離されたタンパク質分子。

【請求項 6】

単離されたタンパク質分子であって：

(a) ATCC 受託番号 97149 に含まれる cDNA によってコードされる全長タンパク質を含むタンパク質分子；

50

(b) ATCC 受託番号 97149 に含まれる cDNA によってコードされる全長から N 末端メチオニンを除いたタンパク質を含むタンパク質分子；

(c) ATCC 受託番号 97149 に含まれる cDNA によってコードされる全長からリーダー配列を除いたタンパク質を含むタンパク質分子；

(d) 該 (a) ~ (c) のいずれか 1 つのタンパク質分子に対して少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(e) 該 (a) ~ (c) のいずれか 1 つのタンパク質分子に対して少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド

からなる群より選択される、タンパク質分子。

【請求項 7】

請求項 3, 5 または 6 のいずれか 1 項に記載のタンパク質分子、または請求項 4 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項 8】

患者の内皮細胞の増殖を刺激する方法において使用するための、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

患者の脈管形成を刺激する方法において使用するための、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 10】

VEGF - 2 を必要とする患者の処置において使用するための、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記患者が創傷を有する、請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の組成物であって、ここで、前記創傷が、皮膚の潰瘍、褥瘡、静脈の潰瘍、糖尿病性潰瘍、熱傷、皮膚移植、裂傷、外科手術に関連する切断、または移植からなる群から選択される、組成物。

【請求項 13】

前記患者が血管組織損傷を有する、請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記患者が虚血を有する、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記患者が心筋梗塞を有する、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記患者が冠状動脈疾患を有する、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記患者が末梢血管疾患を有する、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記患者が中枢神経系血管疾患を有する、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記患者が動脈硬化症を有する、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記患者が骨、歯周組織、靱帯または組織の損傷を有する、請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 21】

前記患者がヒトである、請求項 8 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 22】

配列番号 2 のアミノ酸 - 23 ~ 373 からなるアミノ酸配列に対して少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質分子に対する抗体であって、アミノ酸 24 ~ 373 からなるタンパク質分子に結合しない、抗体。

【請求項 23】

配列番号 2 のアミノ酸 - 23 ~ 373 からなるアミノ酸配列に対して少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質分子に対する抗体であって、アミノ酸 24 ~ 373 からなるタンパク質分子に結合しない、抗体。

【請求項 24】

疾患または疾患に対する感受性の診断剤を製造するための、請求項 22 または 23 に記載される抗体の使用。

【請求項 25】

宿主由来のサンプル中のタンパク質分子の存在を分析するためのプロセスにおける、請求項 22 または 23 に記載される抗体の使用。

【請求項 26】

患者における腫瘍の存在を検出するイムノアッセイにおける、請求項 22 または 23 に記載される抗体の使用。

【請求項 27】

VEGF 2 の上昇したレベルを検出するための、請求項 22 または 23 に記載される抗体の使用。

【請求項 28】

癌を診断する薬剤を製造するための、請求項 22 または 23 に記載される抗体の使用。

【請求項 29】

抗体を含有する組成物であって、該抗体が、以下：

- (a) 配列番号 2 からなるタンパク質の成熟部分を含有するタンパク質分子；
- (b) 配列番号 2 からなるタンパク質のプロタンパク質部分を含有するタンパク質分子；
- (c) ヒト VEGF - 2 を含有するタンパク質分子；
- (d) 配列番号 2 のアミノ酸 108 ~ 121 を含有するタンパク質分子；
- (e) 配列番号 2 のアミノ酸 85 ~ 165 を含有するタンパク質分子；
- (f) 配列番号 2 のアミノ酸 24 ~ 373 を含有するタンパク質分子；
- (g) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 373 を含有するタンパク質分子；
- (h) 配列番号 2 のアミノ酸 - 23 ~ 373 を含有するタンパク質分子；
- (i) 配列番号 2 のアミノ酸 - 46 ~ 373 を含有するタンパク質分子；
- (j) 配列番号 2 のポリペプチドフラグメントを含有するタンパク質分子であって、ここで該フラグメントが脈管形成活性を有する、タンパク質分子；
- (k) 配列番号 2 のポリペプチドフラグメントを含有するタンパク質分子であって、ここで該フラグメントが内皮細胞増殖活性を有する、タンパク質分子；
- (l) 配列番号 2 を発現し得る細胞から産生されたタンパク質のアミノ酸配列を有するタンパク質分子；
- (m) 該 (a) ~ (l) のいずれか 1 つに対して少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質分子；および
- (n) 該 (a) ~ (l) のいずれか 1 つに対して少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質分子、

からなる群から選択されるタンパク質分子に特異的に結合する、組成物であって、ここで該抗体は、腫瘍転移、胸部癌、または神経膠腫を処置するために使用される、組成物。

【請求項 30】

抗体を含有する組成物であって、該抗体が、以下：

- (a) ATCC 受託番号 97149 に含まれる cDNA によってコードされるタンパク質の成熟部分を含むタンパク質分子；
- (b) ATCC 受託番号 97149 に含まれる cDNA によってコードされるタンパク質のプロタンパク質部分を含むタンパク質分子；
- (c) ATCC 受託番号 97149 に含まれる cDNA によってコードされる全長タンパク質を含む、タンパク質分子；
- (d) ATCC 受託番号 97149 に含まれる cDNA によってコードされる、タンパク質分子；

10

20

30

40

50

(e) A T C C 受託番号 9 7 1 4 9 に含まれる c D N A によってコードされるタンパク質から N 末端メチオニンを除いた、タンパク質分子；

(f) A T C C 受託番号 9 7 1 4 9 に含まれる c D N A によってコードされるタンパク質からリーダー配列を除いた、タンパク質分子；

(g) A T C C 受託番号 9 7 1 4 9 に含まれる c D N A によってコードされるタンパク質分子のポリペプチドフラグメントを含むタンパク質分子であって、ここで該フラグメントが脈管形成活性を有する、タンパク質分子；

(h) A T C C 受託番号 9 7 1 4 9 に含まれる c D N A によってコードされるタンパク質分子のポリペプチドフラグメントを含む単離されたタンパク質分子であって、ここで該フラグメントが内皮細胞増殖活性を有する、タンパク質分子；

10

(i) A T C C 受託番号 9 7 1 4 9 に含まれる c D N A によってコードされるタンパク質分子を発現し得る細胞から産生されたタンパク質のアミノ酸配列を有する、単離されたタンパク質分子；

(j) 該 (a) ~ (i) のいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む、単離されたタンパク質分子；および

(k) 該 (a) ~ (i) のいずれか 1 つに対して少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を含む、単離されたタンパク質分子、

からなる群から選択されるタンパク質分子に特異的に結合する、組成物であって、ここで該抗体は、腫瘍転移、胸部癌、または神経膠腫を処置するために使用される、組成物。

20

【請求項 3 1】

前記患者がヒトである、請求項 2 9 または 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

前記抗体が抗原結合抗体フラグメントである、請求項 2 9 または 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記抗体が F a b フラグメントである、請求項 2 9 または 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記抗体が単鎖結合フラグメントである、請求項 2 9 または 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

前記抗体が F a b 発現ライブラリーの産物である、請求項 2 9 または 3 0 に記載の組成物。

30

【請求項 3 6】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 2 9 または 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 2 9 または 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

前記抗体がキメラ抗体である、請求項 2 9 または 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記抗体がヒト化抗体である、請求項 2 9 または 3 0 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0 0 0 1】

本発明は、新たに同定されたポリヌクレオチド、そのようなポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、そのようなポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用、ならびにそのようなポリヌクレオチドおよびポリペプチドの産生に関する。本発明のポリペプチドは、血管内皮増殖因子ファミリーのメンバーとして同定された。より詳細には、本発明のポリペプチドは血管内皮増殖因子 2 であり、時折、本明細書中以下で「V E G F 2」という。本発明はまた、そのようなポリペプチドの作用を阻害することに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

50

新たな血管の形成、すなわち脈管形成は、胚の発生、それに続く成長、および組織修復のために必須である。しかし、脈管形成は、新生物（例えば、腫瘍および神経膠腫）のような特定の病的状態に必須な部分である。そして異常な脈管形成は、炎症、慢性関節リウマチ、乾癬、および糖尿病性網膜症のような他の疾患に関連する（Folkman, J. および Klagsbrun, M., *Science* 235: 442 - 447, (1987)）。

【0003】

酸性および塩基性の両方の線維芽細胞増殖因子分子は、内皮細胞および他の細胞タイプについてのマイトジェンである。アングiotropin（angiotropin）およびアングioゲニンは脈管形成を誘導し得るが、これらの機能は不明である（Folkman, J., 1993, *Cancer Medicine* 153 - 170頁, Lea and Febiger Press）。血管内皮細胞に対して高度に選択的なマイトジェンは、血管内皮増殖因子、すなわちVEGFであり（Ferrara, N.ら、*Endocr. Rev.* 13: 19 - 32, (1992)）、血管透過因子（VPF）としても知られる。血管内皮増殖因子は、その標的細胞特異性が血管内皮細胞に制限されているようである、分泌される脈管形成マイトジェンである。

10

【0004】

マウスVEGF遺伝子は、特徴付けられ、そして胚形成におけるその発現パターンが解析された。VEGFの持続的な発現が、有窓内皮に隣接する上皮細胞において（例えば、脈絡叢および腎系球体において）観察された。このデータは、内皮細胞の増殖および分化の多機能性レギュレーターとしてのVEGFの役割に一致した。（Breier, G.ら、*Development*, 114: 521 - 532 (1992)）。

20

【0005】

VEGFは、間葉細胞についてのマイトジェンである血小板由来増殖因子（PDGF）の α 鎖および β 鎖、ならびに内皮細胞マイトジェンである胎盤増殖因子（PLGF）に構造的に関連する。これらの3つのタンパク質は、同一のファミリーに属し、そして保存されたモチーフを共有する。ジスルフィド結合の形成に寄与する8つのシステイン残基は、これらのタンパク質において厳密に保存される。オルタナティブスプライシングされたmRNAが、VEGF、PLGF、およびPDGFのいずれにおいても同定されており、そしてこれらの異なるスプライシング産物は、生物学的活性およびレセプター結合特異性が異なる。VEGFおよびPDGFは、ホモ二量体またはヘテロ二量体として機能し、そしてレセプターに結合する。このレセプターは、レセプターの二量体化の後に内因性のチロシンキナーゼ活性を顕す。

30

【0006】

VEGFは、オルタナティブスプライシングによる、121、165、189、および206アミノ酸の4つの異なる形態を有する。VEGF121およびVEGF165は、可溶性でありそして脈管形成を促進し得る。一方、VEGF189およびVEGF206は、細胞表面中のヘパリン含有プロテオグリカンに結合される。VEGFの時期的および空間的な発現は、血管の生理学的増殖に相関していた（Gajdusek, C.M., および Carbon, S.J., *Cell Physiol.*, 139: 570 - 579, (1989); McNeil, P.L., Muthukrishnan, L., Warden, E., D'Amore, P.A., *J. Cell. Biol.*, 109: 811 - 822, (1989)）。その高親和性結合部位は、組織切片において内皮細胞上にのみ位置付けられる（Jakeman, L.B.ら、*Clin. Invest.* 89: 244 - 253, (1989)）。この因子は下垂体細胞およびいくつかの腫瘍細胞株から単離され得、そして

40

50

ある種のヒト神経膠腫と関係している (Plate, K. H., Nature 359: 845 - 848, (1992))。興味深いことに、VEGF121またはVEGF165の発現は、チャイニーズハムスター卵巣細胞に、ヌードマウス中で腫瘍を形成する能力を与える (Ferrara, N. ら、J. Clin. Invest. 91: 160 - 170, (1993))。抗VEGFモノクローナル抗体によるVEGF機能の阻害は、免疫欠損マウスにおける腫瘍増殖を阻害することが示された (Kim, K. J., Nature 362: 841 - 844, (1993))。さらに、VEGFレセプターのドミナントネガティブ変異体が、マウスにおける膠芽腫増殖を阻害することが示された。

10

【0007】

血管透過因子はまた、傷害の停止後でさえも血漿タンパク質に対する持続的な微小血管の高透過性 (microvascular hyperpermeability) (これは、正常な創傷治癒の特徴的な特性である) を担うことが見出されている。これは、VPFが、創傷治癒における重要な因子であることを示唆する。Brown, L. F. ら、J. Exp. Med., 176: 1375 - 9 (1992)。

【0008】

VEGFの発現は、血管新生した組織 (例えば、肺、心臓、胎盤、および固形腫瘍) において高く、そして時間的および空間的の両方で脈管形成に相関する。VEGFはまた、インビボで脈管形成を誘導することが示されている。脈管形成は正常組織、特に血管組織の修復に必須であるので、VEGFは血管組織修復を促進させることにおける使用が提案されてきた (例えば、アテローム性動脈硬化症において)。

20

【0009】

Chenらに1991年12月17日に発行された米国特許第5,073,492号は、適切な環境において内皮細胞の増殖を相乗的に増強するための方法を開示する。この方法は、環境にVEGF、エフェクター、および血清由来因子を添加する工程を包含する。また、血管内皮細胞増殖因子CサブユニットDNAが、ポリメラーゼ連鎖反応技術により調製された。このDNAは、ヘテロ二量体またはホモ二量体のいずれとしても存在し得るタンパク質をコードする。このタンパク質は、哺乳動物血管内皮細胞マイトジェンであり、そして、1992年9月30日に公開された欧州特許出願第92302750.2号に開示されるように、それ自体が血管の発達および修復の促進のために有用である。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、上記問題点の解決を意図するものであり、新規な血管内皮細胞増殖因子およびそれをコードするDNAを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

40

【0011】

本発明は、単離されたポリヌクレオチドであって：(a)配列番号2に示すポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；(b)該(a)のポリヌクレオチドにハイブリダイズし得、かつこれに対して少なくとも70%同一であるポリヌクレオチド；および(c)該(a)または(b)のポリヌクレオチドのポリヌクレオチドフラグメント、からなる群より選択されるメンバーを含む、ポリヌクレオチドを提供する。1つの実施態様では、上記ポリヌクレオチドはDNAであり得る。これは、配列番号2に示すポリペプチド；配列番号2に示す-46~373を含むポリペプチド；または配列番号2に示す1~373を含むポリペプチドのいずれかをコードし得る。

50

【 0 0 1 2 】

本発明は、単離されたポリヌクレオチドであって：(a) A T C C 受託番号 9 7 1 6 1 に含まれる D N A によってコードされる成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；(b) A T C C 受託番号 9 7 1 6 1 に含まれる D N A によって発現されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；(c) 該 (a) または (b) のポリヌクレオチドにハイブリダイズし得、かつこれに対して少なくとも 7 0 % 同一であるポリヌクレオチド；および (d) (a)、(b)、または (c) のポリヌクレオチドのポリヌクレオチドフラグメント、からなる群より選択されるメンバーを含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 1 3 】

本発明はさらに、上記のいずれかに記載の D N A を含む、ベクターを提供する。

10

【 0 0 1 4 】

本発明はさらに、上記のベクターで遺伝子操作された宿主細胞を提供する。

【 0 0 1 5 】

本発明はまた、ポリペプチドを産生するためのプロセスであって、上記の宿主細胞から上記 D N A によりコードされるポリペプチドを発現させる工程を包含する、プロセスを提供する。

【 0 0 1 6 】

本発明はまた、ポリペプチドを発現し得る細胞を作製するためのプロセスであって、上記のベクターで細胞を形質転換またはトランスフェクトする工程を包含する、プロセスを提供する。

20

【 0 0 1 7 】

本発明はまた、ポリペプチドであって、(i) 配列番号 2 の推定アミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびにそのフラグメント、アナログ、および誘導体；(i i) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ アミノ酸 3 7 3 を含むポリペプチド；および (i i i) A T C C 受託番号 9 7 1 6 1 の c D N A によりコードされるポリペプチド、ならびに該ポリペプチドのフラグメント、アナログ、および誘導体、からなる群より選択される、ポリペプチドを提供する。

【 0 0 1 8 】

本発明はまた、上記のポリペプチドについてのアゴニストとして有効な化合物、および上記のポリペプチドに対するアンタゴニストとして有効な化合物を提供する。

30

【 0 0 1 9 】

本発明はまた、V E G F 2 を必要とする患者の処置方法であって、該患者に上記のポリペプチドの治療有効量を投与する工程を包含する、方法を提供する。1 つの実施態様では、上記治療有効量のポリペプチドは、該ポリペプチドをコードする D N A を上記患者に提供し、そして該ポリペプチドをインビボで発現させることによって投与され得る。

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、V E G F 2 を必要とする患者の処置方法であって、該患者に上記の化合物の治療有効量を投与する工程を包含する、方法を提供する。

40

【 0 0 2 1 】

本発明はまた、V E G F 2 を阻害する必要がある患者の処置方法であって、該患者に上記のアンタゴニストの治療有効量を投与する工程を包含する、方法を提供する。

【 0 0 2 2 】

本発明はまた、上記のポリペプチドの発現に関連する疾患または疾患に対する感受性を診断するためのプロセスであって：該ポリペプチドをコードする核酸配列における変異を決定する工程を包含する、プロセスを提供する。

50

【 0 0 2 3 】

本発明はまた、診断プロセスであって：宿主由来のサンプル中の上記のポリペプチドの存在について分析する工程を包含する、プロセスを提供する。

【 0 0 2 4 】

本発明はまた、上記のポリペプチドについてのレセプターに結合し、そして該レセプターを活性化または阻害する化合物を同定するための方法であって：その表面で該ポリペプチドについてのレセプターを発現している細胞を、該レセプターへの結合を可能にする条件下で、スクリーニングされるべき化合物と接触させる工程であって、該レセプターが、該レセプターへの化合物の結合に応じて検出可能なシグナルを提供し得る第2の成分と結合している、工程；および該化合物と該レセプターとの相互作用によって生じるシグナルの存在または非存在を検出することによって、該化合物が該レセプターに結合し、そして該レセプターを活性化または阻害するかどうかを決定する工程、を包含する、方法を提供する。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 2 5 】

本発明のポリペプチドは、ヒト V E G F に対するアミノ酸配列相同性に基づいて、新規な血管内皮増殖因子として推定的に同定された。

【 0 0 2 6 】

本発明の1つの局面によれば、新規な成熟ポリペプチド、ならびに生物学的に活性な、そして診断的または治療的に有用な、そのフラグメント、アナログ、および誘導体が提供される。本発明のポリペプチドは、ヒト起源のポリペプチドである。

20

【 0 0 2 7 】

本発明の別の局面によれば、本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸分子が提供される。この核酸分子は、m R N A、D N A、c D N A、ゲノム D N A、ならびに生物学的に活性な、そして診断的または治療的に有用な、そのフラグメント、アナログ、および誘導体を含む。

【 0 0 2 8 】

本発明のなお別の局面によれば、組換え技術により、そのようなポリペプチドを産生するためのプロセスが提供される。このプロセスは、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含む、組換え原核生物宿主細胞および/または組換え真核生物宿主細胞を、このタンパク質の発現およびその後のこのタンパク質の回収を促進する条件下で培養する工程を包含する。

30

【 0 0 2 9 】

本発明のなおさらなる局面によれば、治療的目的のため（例えば、脈管形成の刺激のため、創傷治癒の刺激のため、および血管組織の修復の促進のため）に、そのようなポリペプチド、またはそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを利用するためのプロセスが提供される。

【 0 0 3 0 】

本発明のなお別の局面によれば、そのようなポリペプチドに対する抗体が提供される。

40

【 0 0 3 1 】

本発明のなお別の局面によれば、そのようなポリペプチドに対するアンタゴニストが提供され、これは、例えば、腫瘍の増殖を阻害するため、糖尿病性網膜症、炎症、慢性関節リウマチ、および乾癬の処置のために、そのようなポリペプチドの作用を阻害するために使用され得る。

【 0 0 3 2 】

本発明の別の局面によれば、本発明の核酸配列に特異的にハイブリダイズするに十分な長さの核酸分子を含む、核酸プローブが提供される。

【 0 0 3 3 】

50

本発明の別の局面によれば、本発明の核酸配列およびそのような核酸配列にコードされるタンパク質における変異に関する疾患または疾患に対する感受性を診断する方法が提供される。

【0034】

本発明のなおさらなる局面によれば、科学研究、DNAの合成、およびDNAベクターの製造に関連するインピットの目的のために、そのようなポリペプチド、またはそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを利用するプロセスが提供される。

【0035】

本発明のこれらおよび他の局面は、本明細書中の教示から当業者に明らかであるべきである。

10

【0036】

図面は、本発明の実施態様の例示であり、そして請求の範囲により包含される本発明の範囲を限定することを意味しない。

【0037】

用語「遺伝子」は、ポリペプチド鎖の産生に関与するDNAのセグメントを意味する；これは、コード領域に先行する領域および後に続く領域（リーダーおよびトレイラー）、ならびに個々のコードセグメント（エキソン）の間の介在する配列（イントロン）を含む。

【0038】

本発明の1つの局面によれば、図1A～図1Cの推定のアミノ酸配列を有する成熟ポリペプチド、またはATCC受託番号97161として1995年5月24日にアメリカンタイプカルチャーコレクション、10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に寄託されたクローンのcDNAにコードされる成熟ポリペプチド、または図1A～図1Cに示すアミノ酸残基よりも少ないアミノ酸残基を有するポリペプチドをコードする単離された核酸分子（ポリヌクレオチド）が提供される。

20

【0039】

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、初期のヒト胚（8～9週）破骨細胞腫、成人心臓またはいくつかの乳癌細胞株から得られ得る。本発明のポリヌクレオチドは、9週齢の初期のヒト胚由来cDNAライブラリー中に発見された。これは、VEGF/PDGFファミリーに構造的に関連する。VEGF2は、419アミノ酸残基のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む。この最初のおよそ23アミノ酸残基は推定のリーダー配列であり、その結果、成熟タンパク質は396アミノ酸を含む。そしてこのタンパク質は、ヒト血管内皮増殖因子に対して最大のアミノ酸配列相同性（30%の同一性）を示し、PDGF α （23%）およびPDGF β （22%）がそれに続く。

30

【0040】

8つすべてのシステインが、ファミリーの4つのメンバー内すべてで保存されることは特に重要である（図2の四角で囲んだ領域を参照のこと）。さらに、PDGF/VEGFファミリーの特徴であるPXCVXXXRCXGCCN（配列番号3）が、VEGF2において保存される（図2を参照のこと）。

40

【0041】

本発明のVEGF2ポリペプチドは、全長ポリペプチドならびに任意のリーダー配列および全長ポリペプチドの活性フラグメントをコードするポリヌクレオチド配列を含むことが意図される。活性フラグメントは、配列番号2および図2に示す全長アミノ酸配列の419アミノ酸の全てよりも少ないアミノ酸を有するが、図2において保存されることが示される8つのシステイン残基をなお含み、そしてそのようなフラグメントはVEGF2活性をなお含む、全長アミノ酸配列の任意の部分を含むことを意図する。

50

【 0 0 4 2 】

正常組織には、少なくとも2つのオルタナティブスプライシングされたV E G F 2 m R N A配列が存在する。全長および短縮型のそれぞれに対応する2つのV E G F 2 m R N A配列のサイズを、図3に示す。レーン5は、本発明のV E G F 2 ポリペプチドをコードするオルタナティブスプライシングされたm R N Aの存在を示す2本のバンドを示す。

【 0 0 4 3 】

本発明のポリヌクレオチドは、R N Aの形態またはD N Aの形態（このD N Aは、c D N A、ゲノムD N A、および合成D N Aを包含する）であり得る。D N Aは二本鎖または一本鎖であり得、そして一本鎖である場合は、コード鎖または非コード（アンチセンス）鎖であり得る。成熟ポリペプチドをコードするコード配列は、図1 A ~ 図1 C に示すコード配列または寄託したクローンのコード配列と同一であり得るか、あるいはそのコード配列が、遺伝コードの重複性または縮重の結果として、図1 A ~ 図1 C のD N Aまたは寄託したc D N Aと同じ成熟ポリペプチドをコードする、異なるコード配列であり得る。

10

【 0 0 4 4 】

図1 A ~ 図1 C の成熟ポリペプチドまたは寄託したc D N Aによりコードされる成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは以下を包含し得る：成熟ポリペプチドのコード配列のみ；成熟ポリペプチドのコード配列（および随意的さらなるコード配列）および非コード配列（例えば、イントロンまたは成熟ポリペプチドのコード配列の5' および/または3' の非コード配列）。

20

【 0 0 4 5 】

従って、用語「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」は、ポリペプチドのコード配列のみを含むポリヌクレオチド、ならびにさらなるコード配列および/または非コード配列を含むポリヌクレオチドを包含する。

【 0 0 4 6 】

本発明はさらに、図1 A ~ 図1 C の推定のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは寄託したクローンのc D N Aによりコードされるポリペプチドの、フラグメント、アナログ、および誘導体をコードする本明細書中上記のポリヌクレオチドの改変体に関する。ポリヌクレオチドの改変体は、ポリヌクレオチドの天然に存在する対立遺伝子改変体またはポリヌクレオチドの天然に存在しない改変体であり得る。

30

【 0 0 4 7 】

従って本発明は、図1 A ~ 図1 C に示すものと同じ成熟ポリペプチドまたは寄託したクローンのc D N Aによりコードされる同じ成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびにそのようなポリヌクレオチドの改変体を包含する。この改変体は、図1 A ~ 図1 C のポリペプチドまたは寄託したクローンのc D N Aによりコードされるポリペプチドのフラグメント、誘導体、またはアナログをコードする。そのようなヌクレオチド改変体は、欠失改変体、置換改変体、および付加または挿入改変体を包含する。

40

【 0 0 4 8 】

本明細書中上記で示したように、このポリヌクレオチドは、図1 A ~ 図1 C に示すコード配列または寄託したクローンのコード配列の天然に存在する対立遺伝子改変体であるコード配列を有し得る。当該分野で公知なように、対立遺伝子改変体は、1以上のヌクレオチドの置換、欠失、または付加を有し得るポリヌクレオチド配列の別の形態であり、これはコードされるポリペプチドの機能を実質的に変化させない。

【 0 0 4 9 】

本発明のポリヌクレオチドはまた、本発明のポリペプチドの精製を可能にするマーカー配列にインフレームで融合されたコード配列を有し得る。マーカー配列

50

は、細菌宿主の場合にマーカーに融合された成熟ポリペプチドの精製を提供する、pQE-9ベクターにより供給されるヘキサヒスチジンタグであり得る。または、例えばマーカー配列は、哺乳動物宿主（例えば、COS-7細胞）が使用される場合は、ヘマグルチニン（HA）タグであり得る。HAタグはインフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエピトープと一致する（Wilson, I.ら、Cell, 37:767（1984））。

【0050】

用語「遺伝子」は、ポリペプチド鎖の産生に關与するDNAのセグメントを意味する；これは、コード領域に先行する領域および後に続く領域（リーダーおよびトレイラー）、ならびに個々のコードセグメント（エキソン）の間の介在する配列（イントロン）を含む。

10

【0051】

本発明の全長遺伝子のフラグメントは、全長cDNAを単離するため、およびこの遺伝子に対する高い配列類似性または同様の生物学的活性を有する他のcDNAを単離するための、cDNAライブラリーについてのハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。このタイプのプローブは、好ましくは少なくとも30塩基を有し、そして、例えば、50以上の塩基を含み得る。このプローブをまた、全長転写物に対応するcDNAクローン、およびゲノムクローン、または調節領域およびプロモーター領域、エキソンおよびイントロンを含む完全な遺伝子を含むクローンを同定するために使用し得る。スクリーニングの例は、オリゴヌクレオチドプローブを合成するために公知のDNA配列を使用して、遺伝子のコード領域を単離する工程を包含する。本発明の遺伝子の配列に相補的な配列を有する標識したオリゴヌクレオチドを使用して、ヒトのcDNA、ゲノムDNA、またはmRNAのライブラリーをスクリーニングし、このライブラリーのどのメンバーにこのプローブがハイブリダイズするかを決定する。

20

【0052】

本発明はさらに、配列間に少なくとも70%、好ましくは少なくとも90%、そしてより好ましくは少なくとも95%の同一性が存在する場合、本明細書中上記の配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドに關する。本発明は特に、本明細書中上記のポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに關する。本明細書中で用いられる用語「ストリンジェントな条件」は、配列間に少なくとも95%、および好ましくは少なくとも97%の同一性が存在する場合にのみハイブリダイゼーションが生じることを意味する。好ましい実施態様において本明細書中上記のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドは、図1A～図1C（配列番号1）のcDNAまたは寄託したcDNAによりコードされる成熟ポリペプチドと実質的に同じ生物学的機能または活性のいずれかを保持するポリペプチドをコードする。

30

【0053】

あるいは、ポリヌクレオチドは、少なくとも20塩基、好ましくは30塩基、そしてより好ましくは少なくとも50塩基を有し得、これは本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズし、そしてこれは本明細書中上記のように、それらに対する同一性を有し、そしてこれは活性を保持していてもいなくてもよい。例えば、そのようなポリヌクレオチドを、配列番号1のポリヌクレオチドについてのプローブとして、例えばこのポリヌクレオチドの回収のために、または診断プローブとして、またはPCRプライマーとして使用し得る。

40

【0054】

従って、本発明は、配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも90%、そしてより好ましくは少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチド、ならびにそれらのフラグメント（このフラグメントは少なくとも30塩基、そして好ましくは

50

少なくとも50塩基を有する)、そしてそのようなポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドに関する。

【0055】

本明細書中でいう寄託物は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の約定の下に維持される。これらの寄託物は、単に当業者への便宜のために提供されるのみであり、そして米国特許法第112条の下で寄託が必要とされることを認めたわけではない。寄託物に含まれるポリヌクレオチドの配列、ならびにそれによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、本明細書中に参考として援用されており、そして本明細書中の配列の記載とのいかなる矛盾も抑えている。寄託物を製造し、使用し、または販売するためには実施許諾が必要とされ得、そしてそのような実施許諾はこれによって与えられるわけではない。

10

【0056】

本発明はさらに、図1A～図1Cの推定のアミノ酸配列を有するか、または寄託したcDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびにそのようなポリペプチドのフラグメント、アナログ、および誘導体に関する。

【0057】

用語「フラグメント」、「誘導体」、および「アナログ」は、図1A～図1Cのポリペプチドまたは寄託したcDNAにコードされるポリペプチドをいう場合は、図2に示すVEGFタンパク質の保存されたモチーフ、および本質的に同じ生物学的な機能または活性を保持するポリペプチドを意味する。

20

【0058】

本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド、天然のポリペプチド、または合成ポリペプチドであり得、好ましくは組換えポリペプチドであり得る。

【0059】

図1A～図1Cのポリペプチドまたは寄託したcDNAによりコードされるポリペプチドのフラグメント、誘導体、またはアナログは、(i)そこで1以上のアミノ酸残基が保存または非保存アミノ酸残基(好ましくは保存アミノ酸残基)で置換され、そしてそのような置換されるアミノ酸残基がこの遺伝コードによりコードされるアミノ酸残基であり得るかあり得ないもの、または(ii)そこで1以上のアミノ酸残基が置換基を含有するもの、または(iii)そこで成熟ポリペプチドがポリペプチドの半減期を増加させる化合物(例えば、ポリエチレングリコール)のような別の化合物に融合されているもの、または(iv)そこでさらなるアミノ酸が成熟ポリペプチドに融合されているもの、または(v)そこで配列番号2に示すより少ないアミノ酸残基を含み、そして保存されたモチーフを保持し、そしてなお依然としてVEGFファミリーのポリペプチドの特徴的な活性を保持しているものであり得る。そのようなフラグメント、誘導体、およびアナログは、本明細書中の教示から、当業者の範囲内にあると考えられる。

30

【0060】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、好ましくは単離された形態で提供され、そして好ましくは均質に精製される。

40

【0061】

用語「単離された」は、物質がその本来の環境(例えば、それが天然に存在する場合は、天然の環境)から取り出されていることを意味する。例えば、生きている動物の中に存在する天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されているわけではなく、しかし天然の系において共存する物質の幾らかまたは全部と分離されている同一のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されている。そのようなポリヌクレオチドはベクターの一部であり得、および/またはそのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、組成物の一部であり得るが、それにもかかわらずそのようなベクターまたは組成物はその天然の環

50

境の一部ではない、という点で単離されている。

【 0 0 6 2 】

本発明のポリペプチドは、配列番号 2 のポリペプチド（特に成熟ポリペプチド）、ならびに配列番号 2 のポリペプチドに対して少なくとも 70 % の類似性（好ましくは少なくとも 70 % の同一性）を有するポリペプチド、そしてより好ましくは配列番号 2 のポリペプチドに対して少なくとも 90 % の類似性（より好ましくは少なくとも 90 % の同一性）を有するポリペプチド、そしてさらにより好ましくは配列番号 2 のポリペプチドに対して少なくとも 95 % の類似性（さらにより好ましくは少なくとも 95 % の同一性）を有するポリペプチドを含み、そのようなポリペプチドの部分もまた含む（このポリペプチドのそのような部分は、一般に、少なくとも 30 アミノ酸、そしてより好ましくは少なくとも 50 アミノ酸を含む）。

10

【 0 0 6 3 】

当該分野に公知であるように、2つのポリペプチドの間の「類似性」は、1つのポリペプチドのアミノ酸配列およびその保存されたアミノ酸置換を第2のポリペプチド配列に対して比較することによって決定される。

【 0 0 6 4 】

本発明のポリペプチドのフラグメントまたは部分を、ペプチド合成により対応する全長ポリペプチドを産生するために使用し得る；従って、このフラグメントは、全長ポリペプチドを産生するための中間体として使用し得る。本発明のポリヌクレオチドのフラグメントまたは部分を、本発明の全長ポリヌクレオチドを合成するために使用し得る。

20

【 0 0 6 5 】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターを用いて遺伝子操作される宿主細胞、および組換え技術による本発明のポリペプチドの産生に関する。

【 0 0 6 6 】

宿主細胞は、本発明のベクター（これは、例えば、クローニングベクターまたは発現ベクターであり得る）を用いて遺伝子操作（形質導入されるか、または形質転換されるか、またはトランスフェクトされる）される。ベクターは、例えば、プラスミド、ウイルス粒子、ファージなどの形態であり得る。操作された宿主細胞は、プロモーターを活性化し、形質転換体を選択し、または本発明の V E G F 2 遺伝子を増幅するために適切に改変した従来の栄養培地において培養され得る。培養条件（例えば、温度、pH など）は、発現のために選択される宿主細胞に以前使用された条件であり、そして当業者には明らかである。

30

【 0 0 6 7 】

本発明のポリヌクレオチドは、組換え技術によりポリペプチドを産生するために用いられ得る。従って、例えば、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドを発現するための種々の発現ベクターの任意の 1 つに含まれ得る。そのようなベクターは、染色体 DNA 配列、非染色体 DNA 配列、および合成 DNA 配列を包含する。そのようなベクターは、例えば、SV40 の誘導體；細菌性プラスミド；ファージ DNA；バキュロウイルス；酵母プラスミド；プラスミドおよびファージ DNA の組み合わせに由来するベクター、ワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病のようなウイルス DNA を包含する。しかし、宿主中で複製可能で、そして存続可能である限り、他の任意のベクターも使用され得る。

40

【 0 0 6 8 】

適切な DNA 配列は、種々の手順によりベクター中に挿入され得る。一般に、DNA 配列は当該分野で公知の手順により適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。そのような手順および他の手順は、当業者の範囲内であると考えられる。

50

【 0 0 6 9 】

発現ベクター中のDNA配列は、適切な発現制御配列（プロモーター）に作動的に連結され、mRNAの合成を指示する。そのようなプロモーターの代表的な例としては、以下が挙げられる：LTRまたはSV40プロモーター、E. coli lacまたはtrp、 λ ファージP_Lプロモーター、および原核生物細胞または真核生物細胞あるいはそれらのウイルス内で遺伝子の発現を制御することが公知である他のプロモーター。発現ベクターはまた、翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写ターミネーターを含有する。ベクターはまた、発現を増幅するための適切な配列を含有し得る。

【 0 0 7 0 】

さらに、発現ベクターは、好ましくは、形質転換された宿主細胞の選択のための表現型形質（例えば、真核生物細胞培養物についてはジヒドロ葉酸レダクターゼまたはネオマイシン耐性、またはE. coliにおけるテトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性）を提供する1つ以上の選択マーカー遺伝子を含有する。

10

【 0 0 7 1 】

本明細書中上記のような適切なDNA配列ならびに適切なプロモーター配列または制御配列を含有するベクターは、適切な宿主を形質転換して宿主にタンパク質を発現させるために用いられ得る。

【 0 0 7 2 】

適切な宿主の代表的な例としては、以下が挙げられ得る：細菌細胞（例えば、E. coli、Streptomyces、Salmonella typhimurium）；真菌細胞（例えば酵母）；昆虫細胞（例えば、Drosophila S2およびSpodoptera Sf9）；動物細胞（例えば、CHO、COS、またはBowes黒色腫）；アデノウイルス；植物細胞など。適切な宿主の選択は、本明細書の教示により当業者の範囲内であると考えられる。

20

【 0 0 7 3 】

さらに詳細には、本発明はまた、上記で広範に記載した1つ以上の配列を含む組換え構築物を包含する。構築物は、ベクター（例えば、プラスミドベクターまたはウイルスベクター）を包含し、このベクターの中には本発明の配列が正方向または逆方向に挿入されている。この実施態様の好ましい局面によれば、構築物はさらに、配列に作動可能に連結された調節配列（例えば、プロモーターを包含する）を含む。多数の適切なベクターおよびプロモーターが当業者には公知であり、そして購入可能である。以下のベクターが例として提供される。細菌性：pQE70、pQE60、pQE-9（Qiagen）、pBS、pD10、phagescript、psiX174、pBluescript SK、pBSKS、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A（Stratagene）；ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5（Pharmacia）。真核生物性：pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG（Stratagene）；pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL（Pharmacia）。しかし、それらが宿主中で複製可能で、そして存続可能である限り、他の任意のプラスミドまたはベクターも使用され得る。

30

40

【 0 0 7 4 】

プロモーター領域は、CAT（クロラムフェニコールトランスフェラーゼ）ベクターまたは選択マーカーを有する他のベクターを使用して、任意の所望の遺伝子から選択され得る。2つの適切なベクターは、pKK232-8およびpCM7である。特によく知られた細菌性プロモーターは、lacI、lacZ、T3、T7、gpt、 λ P_R、P_Lおよびtrpを包含する。真核生物性プロモーターは、CMV即時型、HSVチミジンキナーゼ、初期SV40および後期SV40

50

、レトロウイルス由来のLTR、およびマウスI型メタロチオネインを包含する。適切なベクターおよびプロモーターの選択は、十分に当業者のレベル内である。

【0075】

さらなる実施態様では、本発明は上記の構築物を含有する宿主細胞に関する。宿主細胞は、高等真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞）または下等真核生物細胞（例えば、酵母細胞）であり得るか、または宿主細胞は原核生物細胞（例えば、細菌細胞）であり得る。宿主細胞内への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、またはエレクトロポレーションにより達成され得る（Davis, L., Digner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)）。

10

【0076】

宿主細胞中の構築物は、組換え配列によりコードされる遺伝子産物を産生するために、従来する方法において使用され得る。あるいは、本発明のポリペプチドは、従来のペプチド合成機により合成的に産生され得る。

【0077】

成熟タンパク質は、哺乳動物細胞、酵母、細菌、または他の細胞中で、適切なプロモーターの制御下で発現され得る。無細胞翻訳系もまた、そのようなタンパク質を産生するために、本発明のDNA構築物に由来するRNAを使用して用いられ得る。原核生物宿主および真核生物宿主で使用される適切なクローニングベクターおよび発現ベクターは、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989)（この開示は、本明細書中に参考として援用される）に記載される。

20

【0078】

本発明のポリペプチドをコードするDNAの高等真核生物による転写は、ベクター内にエンハンサー配列を挿入することにより増大する。エンハンサーはDNAのシス作用性エレメントであり、通常は約10～約300bpであり、これはプロモーターに作用してその転写を増大させる。例としては、複製起点（bp100～270）の後期側のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルスの早期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。

30

【0079】

一般に、組換え発現ベクターは、複製起点および宿主細胞の形質転換を可能とする選択マーカー（例えば、*E. coli*のアンピシリン耐性遺伝子および*S. cerevisiae*のTRP1遺伝子）および下流の構造配列の転写を指示する高発現遺伝子由来のプロモーターを含有する。そのようなプロモーターは、特に解糖酵素（例えば、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK））、 α 因子、酸性ホスファターゼ、または熱ショックタンパク質などをコードするオペロンに由来し得る。異種構造配列は、翻訳開始配列および翻訳終結配列、および好ましくは翻訳されたタンパク質の細胞周辺腔または細胞外培地への分泌を指示し得るリーダー配列と適切な相内で組立てられる。随意に、異種配列は、所望の特徴を与えるN末端同定ペプチド（例えば、発現された組換え産物の安定化または簡略化された精製）を含む融合タンパク質をコードし得る。

40

【0080】

細菌での使用に有用な発現ベクターは、所望のタンパク質をコードする構造DNA配列を、適切な翻訳開始シグナルおよび翻訳終結シグナルと共に、機能的なプロモーターで作動可能な読みとり相で挿入することにより構築される。ベクターは、ベクターの維持を確実にし、そして所望により宿主内での増幅を提供する

50

ために1つ以上の表現型選択マーカー、および複製起点を含有する。形質転換のために適切な原核生物宿主は、E. coli、Bacillus subtilis、Salmonella typhimurium、および *Pseudomonas* 属、*Streptomyces* 属、および *Staphylococcus* 属内の種々の種を包含するが、他の種もまた選択対象に用いられ得る。

【0081】

代表的な、しかし限定しない例として、細菌での使用に有用な発現ベクターは、周知のクローニングベクター pBR322 (ATCC 37017) の遺伝的エレメントを含む市販のプラスミドに由来する選択マーカーおよび細菌性の複製起点を含有し得る。そのような市販のベクターは、例えば、pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) および GEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, USA) を包含する。これらの pBR322 「骨格」部分は、適切なプロモーターおよび発現されるべき構造配列と組み合わせられる。

10

【0082】

適切な宿主系統の形質転換および適切な細胞密度への宿主系統の増殖に続いて、選択されたプロモーターは適切な手段（例えば、温度シフトまたは化学的誘導）により誘導され、そして細胞はさらなる期間培養される。

【0083】

細胞は、代表的には遠心分離により回収され、物理的手段または化学的手段により破碎され、そして得られた粗抽出物はさらなる精製のために保持される。

20

【0084】

タンパク質の発現において用いられる微生物細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破碎、または細胞溶解剤の使用を包含する任意の便利な方法により破碎され得、そのような方法は、当業者に周知である。

【0085】

種々の哺乳動物細胞の培養系もまた、組換えタンパク質を発現するために用いられ得る。哺乳動物発現系の例は、Gluzman, Cell, 23: 175 (1981) に記載されたサル腎臓線維芽細胞の COS-7 株、および適合性のベクターを発現し得る他の細胞株（例えば、C127、3T3、CHO、HeLa、および BHK 細胞株）を包含する。哺乳動物発現ベクターは、複製起点、適切なプロモーターおよびエンハンサーを含み、そして任意の必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位およびスプライスアクセプター部位、転写終結配列、および 5' フランキング非転写配列をも含む。SV40 スプライスに由来する DNA 配列およびポリアデニル化部位は、必要な非転写遺伝エレメントを提供するために使用され得る。

30

【0086】

ポリペプチドは、以下の方法により組換え細胞培養物から回収および精製され得る。これらの方法は、硫酸沈澱またはエタノール沈澱、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水的相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーを包含する。必要に応じて、タンパク質の再折りたたみ (refolding) 工程が、成熟タンパク質を完全な配置とするために使用され得る。最終的に、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) が、最終的な精製工程に用いられ得る。

40

【0087】

本発明のポリペプチドは、天然の精製された産物または化学合成手順の産物であり得るか、または原核生物宿主または真核生物宿主（例えば、培養中の細菌、酵母、高等植物、昆虫、および哺乳動物細胞）から組換え技術により産生される。組換え産生手順に用いられる宿主により、本発明のポリペプチドは、グリコ

50

シル化され得るか、またはグリコシル化され得ない。本発明のポリペプチドはまた、最初のメチオニンアミノ酸残基を含み得る。

【 0 0 8 8 】

図 8 および 9 に示すように、最初の 4 6 アミノ酸を除いた配列番号 2 の V E G F 2 ポリペプチドは、血管内皮細胞についての強力なマイトジェンであり、そしてその増殖および分化を刺激する。このポリペプチドをコードする V E G F 2 核酸配列について行なったノーザンブロット解析（ここで、いくつかのヒト組織由来の 2 0 μ g の R N A を ³² P - V E G F 2 でプローブした）の結果、このタンパク質が心臓および肺において活発に発現し、このことはマイトジェン活性のさらなる証拠であることを示す。

10

【 0 0 8 9 】

従って、V E G F 2 を、脈管形成を促進し、例えば、冠状動脈バイパス外科手術が行なわれる移植組織の増殖を刺激するために使用し得る。V E G F 2 をまた、創傷治癒を促進するため、特に、損傷を受けた組織を血管再生させるか、または虚血の間および新しい毛細管の脈管形成が所望される場所での側副血流を刺激するために使用し得る。V E G F 2 を、皮膚の潰瘍（褥瘡を含む）、静脈の潰瘍、および糖尿病性潰瘍のような全層創傷を処置するために使用し得る。さらに、V E G F 2 を、皮膚移植片または皮弁が全層熱傷および全層損傷を修復するために使用される、このような熱傷および損傷を処置するために使用し得る。V E G F 2 をまた、例えば、外傷による裂傷および外科手術に関連する切断の修復のために、形成外科における使用のために使用し得る。

20

【 0 0 9 0 】

これらと同じようにして、V E G F 2 を、損傷を受けた骨、歯周組織、または靱帯組織の増殖を誘導するために使用し得る。V E G F 2 をまた、疾患および外傷によって損傷を受けた歯の支持組織（セメント質および歯周靱帯を含む）を再生するために使用し得る。

【 0 0 9 1 】

脈管形成は創傷を清潔かつ非感染に保つのに重要であるので、V E G F 2 を、外科手術に関連して、および切断の修復後に使用し得る。V E G F 2 をまた、感染の危険性が高い腹部創傷の処置のために使用し得る。

30

【 0 0 9 2 】

V E G F 2 を、血管移植手術において内皮形成（*endothelialization*）を促進するために使用し得る。移植された材料または合成した材料のいずれかを用いる血管移植片の場合、V E G F 2 を移植片の表面または連結部に適用して血管内皮細胞の増殖を促進し得る。V E G F 2 をまた、心筋梗塞の結果としての心筋組織の損傷を修復するために使用し得る。V E G F 2 をまた、虚血後の心血管系を修復するために使用し得る。V E G F 2 をまた、冠状動脈疾患、ならびに末梢および中枢神経系の血管疾患の結果として損傷を受けた血管組織を処置するために使用し得る。

40

【 0 0 9 3 】

V E G F 2 をまた、身体内に移植されるべき人工の補てつ物または天然の器官を被覆して移植材料の拒絶反応を最少にし、そして移植された材料の血管新生を刺激するために使用し得る。

【 0 0 9 4 】

V E G F 2 をまた、例えば、アテローム性動脈硬化症の間に生じ、そして血管組織が損傷を受けるバルーン血管形成の後に必要とされる、血管組織の修復のために使用し得る。

【 0 0 9 5 】

V E G F 2 核酸配列および V E G F 2 ポリペプチドをまた、科学的研究、D N A の合成、および D N A ベクターの製造に関連するインビトロの目的のため、お

50

よびヒトの疾患を治療するための診断薬および治療薬の産生のために使用し得る。例えば、VEGF2を、血管内皮細胞のインビトロでの培養のために使用し得、ここで、VEGF2は10 pg/ml ~ 10 ng/mlの濃度で条件的培地に添加される。

【0096】

全長VEGF2遺伝子のフラグメントを、cDNAライブラリーのためのハイブリダイゼーションプローブとして使用して、この遺伝子に対する高い配列類似性または同様の生物学的活性を有する他の遺伝子を単離し得る。このタイプのプローブは、一般に、少なくとも50塩基対を有するが、それらはさらに多数の塩基を有し得る。このプローブをまた、全長転写物に対応するcDNAクローン、

10

【0097】

本発明は、VEGF2レセプターの同定のための方法を提供する。このレセプターをコードする遺伝子は、当業者に公知の多くの方法（例えば、リガンドパンニングおよびFACSソーティング（Coliganら、Current Protocols in Immun., 1(2), 第5章、(1991)））によって同定され得る。好ましくは、発現クローニングを使用し、ここで、ポリアダニル化されたRNAをVEGF2に应答する細胞から調製し、そしてこのRNAから作製したcDNAライブラリーをプールに分割し、そしてCOS細胞またはVEGF2に应答しない他の細胞をトランスフェクトするために使用する。ガラススライド上で増殖するトランスフェクトされた細胞を、標識したVEGF2に曝す。VEGF2を、部位特異的タンパク質キナーゼについての認識部位のヨウ素化または封入を含む、種々の手段によって標識し得る。固定およびインキュベーションに続いて、スライドをオートラジオグラフィ分析に供する。陽性のプールを同定し、そしてサブプールを調製し、そして反復サブプール化および再スクリーニングプロセスを用いて再度トランスフェクトし、最終的に推定のレセプターをコードする単一のクローンを生じる。

20

30

【0098】

レセプター同定のための別のアプローチとして、標識したVEGF2は、細胞膜に光学的親和的に結合され得るか、またはレセプター分子を発現する抽出調製物であり得る。架橋した材料をPAGEによって分離し、そしてX線フィルムに曝す。次いで、VEGF2を含有する標識した複合体を取り出し、ペプチドフラグメントに分解し、そしてタンパク質微量配列決定に供する。微量配列決定から得られたアミノ酸配列を使用して、縮重オリゴヌクレオチドプローブの対を設計し、cDNAライブラリーをスクリーニングして推定のレセプターをコードする遺伝子を同定する。

40

【0099】

本発明はまた、VEGF2のアゴニストまたはアンタゴニストである化合物を同定するための化合物のスクリーニング方法に関する。そのような方法の1例は、コマイトジェンCon Aの存在下でヒト内皮細胞の増殖を顕著に刺激するVEGF2の能力を利用する。内皮細胞を得、そしてCon-A (Calbiochem, La Jolla, CA)を補充した反応混合物中で96ウェル平底培養プレート(Costar, Cambridge, MA)で培養する。

50

Con - A、本発明のポリペプチド、およびスクリーニングされるべき化合物を添加する。37 でのインキュベーションの後、 $[^3\text{H}]$ を取り込むに十分な時間、 $1\mu\text{Ci}$ の ^3H チミジン ($5\text{Ci}/\text{mmol}$; $1\text{Ci} = 37\text{BGq}$; NEN) を培養物に適用し、そしてグラスファイバーフィルター (Cambridge Technology, Watertown, MA) 上に回収する。3連の培養物の平均の ^3H チミジン取り込み (cpm) を、液体シンチレーションカウンター (Beckman Instruments, Irvine, CA) を使用して決定する。化合物を除去するコントロールアッセイと比較して有意な $[^3\text{H}]$ チミジン取り込みは、内皮細胞増殖の刺激を示す。

【0100】

10

アンタゴニストについてアッセイするために、上記のアッセイを行ない、そして化合物がVEGF2の存在下での ^3H チミジン取り込みを阻害する能力は、この化合物がVEGF2に対するアンタゴニストであることを示す。あるいは、VEGF2アンタゴニストを、競合阻害アッセイに適切な条件下で、VEGF2および潜在的なアンタゴニストと、膜に結合したVEGF2レセプターまたは組換えレセプターとを組み合わせることによって検出し得る。VEGF2を、例えば、放射能によって標識し得、その結果、レセプターに結合したVEGF2分子の数が潜在的なアンタゴニストの有効性を決定し得る。

【0101】

あるいは、VEGF2とレセプターとの相互作用の後の公知のセカンドメッセンジャーシステムの応答を、この化合物の存在下または非存在下で測定し、そして比較する。そのようなセカンドメッセンジャーシステムは、cAMPグアニル酸シクラーゼ、イオンチャンネル、またはホスホイノシチド加水分解を包含するが、これらに限定されない。別の方法において、VEGF2レセプターを発現する哺乳動物細胞または膜調製物を、この化合物の存在下で、標識したVEGF2と共にインキュベートする。次いで、この相互作用を増強またはブロックする、この化合物の能力を測定し得る。

20

【0102】

潜在的なVEGF2のアンタゴニストは、抗体、またはある場合にはオリゴヌクレオチドを含み、これはこのポリペプチドに結合し、そしてVEGF2の機能を有効に消去させる。あるいは、潜在的なアンタゴニストは、VEGF2レセプターに結合する、密接に関連するタンパク質であり得るが、しかし、それらはこのポリペプチドの不活性な形態であり、それによりVEGF2の作用を妨げる。これらのアンタゴニストの例は、VEGF2ポリペプチドのネガティブドミナント変異体を包含し、例えば、VEGF2のヘテロ二量体形態の一方の鎖は優性であり得、そして生物学的活性を保持しないように変異し得る。ネガティブドミナント変異体の例は、二量体VEGF2の短縮版を包含する。これは別の二量体と相互作用して、野生型VEGF2を形成し得るが、しかし得られるホモ二量体は不活性であり、特徴的なVEGF活性を示すことができない。

30

【0103】

40

別の潜在的なVEGF2アンタゴニストは、アンチセンス技術を使用して調製されるアンチセンス構築物である。アンチセンス技術を、3重らせんの形成またはアンチセンスDNAまたはRNAを介して遺伝子発現を制御するために使用し得る。これらの方法は両方ともDNAまたはRNAへのポリヌクレオチドの結合に基づく。例えば、このポリヌクレオチド配列の5'コード部分は、本発明の成熟ポリペプチドをコードし、約10~40塩基対の長さのアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計するために使用される。DNAオリゴヌクレオチドは、遺伝子の転写に關与する領域に相補的であるように設計され (三重らせん - Leeら、Nucleic Acids Res., 6:3073 (1979); Cooneyら、Science, 241:456 (1988); およびDer

50

vanら、Science, 251:1360(1991)を参照のこと)、それにより、VEGF2の転写および産生を妨げる。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、インビボでmRNAにハイブリダイズし、そしてmRNA分子のVEGF2ポリペプチドへの翻訳をブロックする(アンチセンス - Okano, J. Neurochem., 56:560(1991); 遺伝子発現のアンチセンスインヒビターとしてのオリゴデオキシヌクレオチド、CRC Press, Boca Raton, FL (1988))。上記のオリゴヌクレオチドはまた、細胞に送達され得、その結果、アンチセンスRNAまたはDNAがインビボで発現してVEGF2の産生を阻害し得る。

【0104】

10

潜在的なVEGF2アンタゴニストはまた、ポリペプチドの活性部位に結合し、そしてこの部位を占め、それにより基質が触媒部位に接近できないようにし、その結果、正常な生物学的活性が妨げられる、低分子を含む。低分子の例は、低分子ペプチドまたはペプチド様分子を包含するが、これらに限定されない。

【0105】

アンタゴニストは、固形腫瘍転移に必要な限定的な脈管形成を処置するために使用され得る。

【0106】

VEGF2をコードするmRNAは、少なくとも2種の乳癌細胞株において中程度のレベルで発現されることが見出される。このことは、悪性の表現型におけるVEGF2ポリペプチドの役割を示す。神経膠腫はまた、本発明のアンタゴニストで処置され得る新生物の1つのタイプである。

20

【0107】

アンタゴニストはまた、血管透過性の増大により引き起こされる慢性炎症を処置するために使用され得る。これらの疾患に加えて、アンタゴニストはまた、糖尿病に関連する網膜症、慢性関節リウマチ、および乾癬を処置するために使用され得る。

【0108】

アンタゴニストを、薬学的に受容可能なキャリア(例えば、本明細書中以下に記載するような)を有する組成物中で使用し得る。

30

【0109】

VEGF2ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストは、適切な薬学的キャリアと組み合わせて使用され得る。そのような組成物は、治療的有効量のポリペプチドまたはアゴニストもしくはアンタゴニスト、および薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤を含む。そのようなキャリアは、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの組合せを包含するが、これらに限定されない。処方物は、投与の様式に合わせるべきである。

【0110】

本発明はまた、1つ以上の本発明の薬学的組成物の成分で充填した1つ以上の容器を備えた薬学的パックまたはキットを提供する。そのような容器には、薬剤または生物学的製品の製造、使用、または販売を統制する政府機関によって指定される形式の通知を伴い得、この通知は、ヒトへの投与のための製造、使用、または販売の機関による認可を表す。さらに、薬学的組成物は、他の治療用化合物と組み合わせて使用され得る。

40

【0111】

薬学的組成物は、局所、静脈内、腹腔内、筋肉内、腫瘍内、皮下、鼻腔内、または皮内経路のような便利な方法で投与され得る。薬学的組成物は、特定の適応症を処置および/または予防するのに有効な量で投与される。一般に、薬学的組成物は、少なくとも約10μg/kg体重の量で投与され、そしてほとんどの場

50

合はこれらは一日あたり約 8 mg / kg 体重を超えない量で投与される。ほとんどの場合、投薬は、投与経路、症状などを考慮して、1 日あたり約 10 µg / kg 体重 ~ 約 1 mg / kg 体重である。

【0112】

VEGF2 ポリペプチド、およびポリペプチドであるアゴニストまたはアンタゴニストはまた、インビボでのそのようなポリペプチドの発現により本発明に従って用いられ得、これはしばしば、「遺伝子治療」といわれる。

【0113】

従って、例えば、骨髄細胞のような細胞は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド (DNA または RNA) を用いてエクソビボで操作され得、次いで、操作された細胞はポリペプチドで処置されるべき患者に提供される。そのような方法は当該分野で周知である。例えば、細胞は、本発明のポリペプチドをコードする RNA を含有するレトロウイルス粒子の使用により、当該分野で公知の手順によって操作され得る。

10

【0114】

同様に、細胞は、インビボでのポリペプチドの発現のために、例えば、当該分野で公知の手順によりインビボで操作され得る。当該分野で公知のように、本発明のポリペプチドをコードする RNA を含有するレトロウイルス粒子を産生するためのプロデューサー細胞は、インビボで細胞を操作するため、およびインビボでのポリペプチドの発現のために患者に投与され得る。そのような方法により本発明のポリペプチドを投与するためのこれらの方法および他の方法は、本発明の教示により当業者には明らかであるはずである。例えば、細胞を操作するための発現ビヒクルは、レトロウイルス粒子以外のもの (例えば、アデノウイルス) であり得る。これは、適切な送達ビヒクルと組み合わせた後、インビボで細胞を操作するために使用され得る。

20

【0115】

本明細書中上記で述べたレトロウイルスプラスミドベクターが誘導され得るレトロウイルスは、モロニーマウス白血病ウイルス、脾壊死ウイルス、レトロウイルス (例えば、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、ニワトリ白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全症ウイルス)、アデノウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳癌ウイルスを包含するが、これらに限定されない。1 つの実施態様において、レトロウイルスプラスミドベクターは、モロニーマウス白血病ウイルスに由来する。

30

【0116】

ベクターは 1 つ以上のプロモーターを含む。使用され得る適切なプロモーターは、レトロウイルス LTR; SV40 プロモーター、およびヒトサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (Miller ら、Biotechnology, 第 7 巻、第 9 号, 980 - 990 (1989) に記載される)、または他の任意のプロモーター (例えば、真核生物細胞性プロモーターのような細胞プロモーター (ヒストン、pola III、および β アクチンのプロモーターを包含するが、これらに限定されない)) を包含するが、これらに限定されない。使用され得る他のウイルスプロモーターは、アデノウイルスプロモーター、チミジンキナーゼ (TK) プロモーター、および B19 パルボウイルスプロモーターを包含するが、これらに限定されない。適切なプロモーターの選択は、本明細書中に含まれる教示から、当業者に明らかである。

40

【0117】

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列は、適切なプロモーターの制御下にある。使用され得る適切なプロモーターは、アデノウイルス主要後期プロモーターのようなアデノウイルスプロモーター; またはサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターのような異種プロモーター; RSウイルス (RSV) プロモ-

50

ター；MMTプロモーター、メタロチオネインプロモーターのような誘導性プロモーター；熱ショックプロモーター；アルブミンプロモーター；ApoAⅠプロモーター；ヒトグロビンプロモーター；単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーターのようなウイルスチミジンキナーゼプロモーター；レトロウイルスLTR（本明細書上記の改変したレトロウイルスLTRを含む）； β -アクチンプロモーター；およびヒト成長ホルモンプロモーターを包含するが、これらに限定されない。プロモーターはまた、ポリペプチドをコードする遺伝子を制御する天然のプロモーターであり得る。

【0118】

レトロウイルスプラスミドベクターは、パッケージング細胞株を形質導入してプロデューサー細胞株を形成するために使用される。トランスフェクトされ得るパッケージング細胞の例は、PE501、PA317、 ψ -2、 ψ -AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、 ψ CRE、 ψ CRIP、GP+E-86、GP+envAm12、およびDAN細胞株（その全体が本明細書中で参考として援用される、Miller, Human Gene Therapy, 第1巻、5-14頁（1990）に記載される）を包含するが、これらに限定されない。ベクターは、当該分野で公知の任意の手段を介してパッケージング細胞を形質導入し得る。そのような手段は、エレクトロポレーション、リボソームの使用、およびCaPO₄沈澱を包含するが、これらに限定されない。別のものでは、レトロウイルスプラスミドベクターは、リボソーム中にカプセル化され得るか、または脂質に結合され得、次いで宿主に投与され得る。

10

20

【0119】

プロデューサー細胞株は、ポリペプチドをコードする核酸配列を含む感染性レトロウイルスベクター粒子を産生する。次いで、そのようなレトロウイルスベクター粒子が、インビトロまたはインビボのいずれかで、真核生物細胞を形質導入するために使用され得る。形質導入された真核生物細胞は、ポリペプチドをコードする核酸配列を発現する。形質導入され得る真核生物細胞は、胚性幹細胞、胚性癌細胞、ならびに造血幹細胞、肝細胞、線維芽細胞、筋芽細胞、ケラチノサイト、内皮細胞、および気管支上皮細胞を包含するが、これらに限定されない。

30

【0120】

本発明はまた、VEGF2核酸配列中の変異の存在と関連する疾患または疾患に対する感受性を検出するための診断アッセイの一部としてのVEGF2遺伝子の使用に関する。

【0121】

VEGF2遺伝子に変異を有する個体は、種々の技術によりDNAレベルで検出され得る。診断のための核酸は、患者の細胞（例えば、血液、尿、唾液、組織生検、および剖検材料）から得られ得る。ゲノムDNAは、検出のために直接使用され得るか、または分析の前にPCR（Saikiら、Nature, 324:163-166（1986））を使用して酵素的に増幅され得る。RNAまたはcDNAもまた、同じ目的のために使用され得る。例として、VEGF2をコードする核酸に相補的なPCRプライマーが、VEGF2変異を同定および分析するために使用され得る。例えば、欠失および挿入が、正常な遺伝子型との比較における増幅産物のサイズの変化によって検出され得る。点変異が、増幅されたDNAを放射標識されたVEGF2 RNA、あるいは放射標識されたVEGF2 アンチセンスDNA配列とハイブリダイズすることによって同定され得る。完全にマッチした配列は、RNAse A消化により、または融解温度の違いにより、ミスマッチな二重鎖から区別され得る。

40

【0122】

DNA配列の差異に基づく遺伝的試験は、変性剤を用いるかまたは用いない、ゲル中でのDNAフラグメントの電気泳動移動度の変化の検出によって達成され

50

得る。小さな配列の欠失および挿入は、高分解能ゲル電気泳動によって可視化され得る。異なる配列のDNAフラグメントは、異なるDNAフラグメントの移動度がそれらの特異的融解温度または部分的融解温度に従ってゲル中で異なる位置に遅れる、変性ホルムアミド勾配ゲル上で識別され得る（例えば、Myersら、Science, 230:1242(1985)を参照のこと）。

【0123】

特定の位置での配列の変化はまた、RNaseプロテクション、およびS1プロテクションのようなヌクレアーゼプロテクションアッセイ、または化学的切断法（例えば、Cottonら、PNAS, USA, 85:4397-4401(1985)）によって示され得る。

10

【0124】

従って、特定のDNA配列の検出は、ハイブリダイゼーション、RNaseプロテクション、化学的切断、直接的DNA配列決定、または制限酵素の使用（例えば、制限酵素断片長多型(RFLP)）、およびゲノムDNAのサザンブロットのような方法によって達成され得る。

【0125】

より伝統的なゲル電気泳動およびDNA配列決定に加えて、変異はインサイチュ分析によってもまた検出され得る。

【0126】

本発明はまた、正常なコントロールの組織サンプルと比較したVEGF2タンパク質の過剰発現が、疾患（例えば、異常な細胞分化）の存在または疾患に対する感受性を検出し得るので、種々の組織におけるVEGF2タンパク質のレベルの変化を検出するための診断アッセイに関する。宿主由来のサンプル中のVEGF2タンパク質のレベルを検出するために使用されるアッセイは、当業者に周知であり、そして、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウエスタンブロット分析、ELISAアッセイ、および「サンドイッチ」アッセイを包含する。ELISAアッセイ(Coliganら、Current Protocols in Immunology, 1(2), 第6章、(1991))は、最初に、VEGF2抗原に特異的な抗体、好ましくはモノクローナル抗体、を調製する工程を包含する。さらに、レポーター抗体が、モノクローナル抗体に対して調製される。レポーター抗体に、放射能、蛍光、または本実施例では、西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素のような検出可能な試薬が結合される。サンプルを宿主から取り出し、そしてサンプル中のタンパク質を結合する固体支持体（例えば、ポリスチレンディッシュ）上でインキュベートする。次いで、ディッシュ上の任意の遊離のタンパク質結合部位を、ウシ血清アルブミンのような非特異的タンパク質と共にインキュベートすることによって覆う。次に、モノクローナル抗体をディッシュ内でインキュベートし、その間にモノクローナル抗体がポリスチレンディッシュに結合した任意のVEGF2タンパク質に結合する。全ての結合していないモノクローナル抗体を、緩衝液で洗浄して除去する。西洋ワサビペルオキシダーゼに結合させたレポーター抗体をディッシュ内に入れ、VEGF2に結合した任意のモノクローナル抗体へレポーター抗体を結合させる。次いで、結合していないレポーター抗体を洗浄して除去する。次いで、ペルオキシダーゼ基質をディッシュに添加し、そして標準曲線と比較した場合、所定の時間内の発色の量が、患者のサンプルの所定の容量内に存在するVEGF2タンパク質の量の測定値である。

20

30

40

【0127】

競合アッセイが使用され得、ここではVEGF2に特異的な抗体が固体支持体に結合される。次いで本発明のポリペプチドを、例えば、放射能によって標識し、そして宿主由来のサンプルを固体支持体に通過させ、そして例えば、液体シンチレーションクロマトグラフィーによって検出される標識の量を、サンプル中の

50

V E G F 2 の量に相関付け得る。

【 0 1 2 8 】

「サンドイッチ」アッセイは、E L I S A アッセイに類似する。「サンドイッチ」アッセイにおいて、V E G F 2 を固体支持体に通過させ、そして固体支持体に結合した抗体に結合させる。次いで、第 2 の抗体を V E G F 2 に結合させる。次いで、標識されかつ第 2 の抗体に対して特異的な第 3 の抗体を固体支持体に通過させ、そして第 2 の抗体に結合させ、次いで量を定量し得る。

【 0 1 2 9 】

本発明の配列はまた、染色体の同定に有益であり得る。配列は、個々のヒト染色体の特定の位置を特異的に標的化し、そしてその位置でハイブリダイズし得る。さらに、現在は染色体上の特定の部位を同定する必要がある。現在、染色体位置のマーキングに利用可能な実際の配列データ（反復多型）に基づいた染色体マーキング試薬はほとんどない。本発明による染色体への D N A のマッピングは、これらの配列と疾患に関する遺伝子とを相関させることにおける重要な第 1 段階である。

10

【 0 1 3 0 】

簡略に述べれば、配列は、c D N A から P C R プライマー（好ましくは 1 5 ~ 2 5 b p ）を調製することにより染色体にマッピングされ得る。c D N A のコンピューター解析が、ゲノム D N A 内で 1 より多いエキソンにまたがらず、従って増幅プロセスを複雑にするプライマーを迅速に選択するために使用される。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含有する体細胞ハイブリッドの P C R スクリーニングに使用される。このプライマーに対応するヒト遺伝子を含有するハイブリッドのみが増幅フラグメントを生じる。

20

【 0 1 3 1 】

体細胞ハイブリッドの P C R マッピングは、特定の染色体に特定の D N A を割り当てるための迅速な手順である。本発明を同じオリゴヌクレオチドプライマーと共に使用して、類似の方法において特定の染色体由来のフラグメントのパネルまたは大きなゲノムクローンのプールを用いて下部位置決め（s u b l o c a l i z a t i o n ）が達成され得る。その染色体にマッピングするために同様に使用され得る他のマッピングストラテジーは、インサイチュハイブリダイゼーション、フローサイトメトリーで選別した標識した染色体でのプレスクリーニング、および染色体特異的 c D N A ライブラリーを構築するためのハイブリダイゼーションによる前選択を包含する。

30

【 0 1 3 2 】

中期染色体展開物への c D N A クローンの蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（F I S H ）は、1 工程で正確な染色体位置を提供するために使用され得る。この技術は、5 0 または 6 0 塩基という短い c D N A で使用され得る；この技術の総説としては、V e r m a ら，H u m a n C h r o m o s o m e s : a M a n u a l o f B a s i c T e c h n i q u e s . P e r g a m o n P r e s s , N e w Y o r k （1 9 8 8 ）を参照のこと。

40

【 0 1 3 3 】

一旦配列が正確な染色体位置にマッピングされると、配列の染色体上での物理的な位置を遺伝的地図のデータと相関させ得る。（そのようなデータは、例えば、V . M c K u s i c k , M e n d e l i a n I n h e r i t a n c e i n M a nに見出される（J o h n s H o p k i n s U n i v e r s i t y W e l c h M e d i c a l L i b r a r y からオンラインで入手可能である））。次いで、同一の染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患との関係が、連鎖解析（物理的に隣接した遺伝子の同時遺伝）により同定される。

【 0 1 3 4 】

次に、罹患個体と非罹患個体との間の c D N A またはゲノム配列の差異を決定

50

する必要がある。変異がいくつかまたはすべての罹患個体に観察されるが正常な個体には観察されない場合、この変異は疾患の原因となる因子であると考えられる。

【0135】

物理的マッピング技術および遺伝的マッピング技術の現在の解像度では、疾患に関連する染色体領域に正確に位置決めされたcDNAは、50と500との間の潜在的な原因となる遺伝子の1つであり得る。(これは、1メガ塩基のマッピング解像度で、そして20kbあたり1遺伝子と仮定する。)

このポリペプチド、それらのフラグメントまたは他の誘導体、またはそれらのアナログ、あるいはそれらを発現する細胞は、それらに対する抗体を産生させるための免疫原として使用され得る。これらの抗体は、例えば、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。本発明はまた、キメラ抗体、単鎖抗体、およびヒト化抗体、ならびにFabフラグメント、またはFab発現ライブラリーの産物を包含する。当該分野で公知の種々の手順が、そのような抗体およびフラグメントの産生のために使用され得る。

10

【0136】

本発明の配列に対応するポリペプチドに対して生成される抗体は、動物へのポリペプチドの直接注射により、または動物へのポリペプチドの投与により得られ得る。この動物は、好ましくはヒトでない。次いで、このようにして得られた抗体は、ポリペプチド自体を結合する。このようにして、ポリペプチドのフラグメントのみをコードする配列でさえも、天然のポリペプチド全体を結合する抗体を生成するために使用され得る。次いで、そのような抗体は、そのポリペプチドを発現する組織からポリペプチドを単離するために使用され得る。モノクローナル抗体の調製のために、細胞株の連続培養により産生される抗体を提供する任意の技術が使用され得る。例としては、ハイブリドーマ技術(KohlerおよびMilstein, 1975, Nature, 256: 495-497)、トリオマ(trioma)技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら, 1983, Immunology Today 4: 72)、およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技術(Coleら, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96頁)が挙げられる。

20

30

【0137】

単鎖抗体の産生について記載された技術(米国特許第4,946,778号)を、本発明の免疫原性ポリペプチド産物に対する単鎖抗体を産生するために適合させ得る。また、トランスジェニックマウスを、本発明の免疫原性ポリペプチド産物に対するヒト化抗体を発現させるために使用し得る。

【0138】

本発明を以下の実施例を参照にしてさらに記載する;しかし、本発明はそのような実施例に限定されないことを理解されたい。全ての部または量は、他に明記しない限り重量基準である。

40

【0139】

以下の実施例の理解を容易にするために、現れる頻度の高い所定の方法および/または用語を記載する。

【0140】

「プラスミド」は、大文字および/または数字の前および/または後の小文字のpにより示される。本明細書中の出発プラスミドは、市販であるかまたは制限無く公的に入手可能であるかのいずれかであり、または公開された手順に従って入手可能なプラスミドから構築され得る。さらに、記載されるプラスミドと等価のプラスミドが当該分野で公知であり、そして当業者には明らかである。

50

【0141】

DNAの「消化」は、DNA中の所定の配列でのみ作用する制限酵素でDNAを触媒反的に切断することをいう。本明細書中で使用される種々の制限酵素は、市販されており、そしてそれらの反応条件、補因子、および他の必要条件は当業者に公知のものが使用された。分析目的には、代表的には1 μ gのプラスミドまたはDNAフラグメントが約2単位の酵素とともに約20 μ lの緩衝溶液中で使用される。プラスミド構築のためのDNAフラグメントを単離する目的には、代表的には5 ~ 50 μ gのDNAが20 ~ 250単位の酵素で、より大きな容量中で消化される。特定の制限酵素のための適切な緩衝液および基質量は、製造者により特定される。37 にての約1時間のインキュベーション時間が通常使用されるが、しかしこれは供給者の説明書に従って変動させ得る。消化後、反応物をポリアクリルアミドゲルで直接電気泳動して所望のフラグメントを単離する。

10

【0142】

切断されたフラグメントのサイズ分離は、Goeddel, D.ら, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980)により記載された8%ポリアクリルアミドゲルを使用して行われる。

【0143】

「オリゴヌクレオチド」は、1本鎖ポリデオキシヌクレオチドまたは2つの相補的なポリデオキシヌクレオチド鎖のいずれかをいい、これらは化学的に合成され得る。そのような合成オリゴヌクレオチドは、5'リン酸を有さず、従ってキナーゼの存在下でリン酸とATPとを添加しなければ別のオリゴヌクレオチドに連結しない。合成オリゴヌクレオチドは、脱リン酸化されていないフラグメントに連結する。

20

【0144】

「連結」は、2つの2本鎖核酸フラグメントの間でリン酸ジエステル結合を形成するプロセスをいう(Maniatis, T.ら、前出、146頁)。他に提供されていなければ、連結は公知の緩衝液および条件で、ほぼ等モル量の連結されるべきDNAフラグメント0.5 μ gあたり10単位のT4 DNAリガーゼ(「リガーゼ」)を用いて達成され得る。

【0145】

他に記載しない限り、形質転換はGraham, F.およびVan der Eb, A., Virology, 52: 456-457 (1973)の方法に記載のように実施した。

30

【実施例】

【0146】

(実施例1)

ヒト組織および乳癌細胞株におけるVEGF2の発現パターン

ノーザンブロット解析を、ヒト組織およびヒト乳癌細胞株におけるVEGF2遺伝子の発現レベルを試験するために行なった。全細胞性RNAサンプルを、RNAzolTM Bシステム(Biotecx Laboratories, Inc.)を用いて単離した。各々の特定された乳房組織および細胞株から単離された約10 μ gの全RNAを、1%アガロースゲルで分離し、そしてナイロンフィルター上にブロットした(Molecular Cloning, Sambrook FritschおよびManiatis, Cold Spring Harbor Press, 1989)。標識反応は、Stratagene Cloning Systems, Inc., Prime-Itキットに従って50 ngのDNAフラグメントを用いて行なった。標識したDNAを、5 Prime-3 Prime, Inc., Boulder, CO, USAからのSelect-G-50カラムを用いて精製した。次いで、フィルターを、放射性標識した全長VEGF2遺伝子と、1,000,000 c

40

50

pm/mlで0.5M NaPO₄および7% SDS中で65 で一晩ハイブリダイズした。0.5×SSC、0.1% SDSで、室温で2回および60 で2回洗浄した後、次いでフィルターを増感スクリーンとともに-70 で一晩曝露した。1.6 Kbのメッセージが2つの乳癌細胞株において観察された。

【0147】

(実施例2)

バキュロウイルス発現系を用いるVEGF2のクローニングおよび発現

N末端で46アミノ酸を除いたVEGF2タンパク質をコードするDNA配列(ATCC受託番号97161を参照のこと)を、遺伝子の5'配列および3'配列に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅した：

5'プライマーは、配列TGT AAT ACG ACT CAC TAT
AGG GAT CCC GCC ATG GAG GCC ACG GCT
TAT GC(配列番号4)を有し、そしてBamHI制限酵素部位(下線)、
およびVEGF2(ヌクレオチド150-166)の5'配列に相補的な17ヌクレオチド配列を含む。

【0148】

3'プライマーは、配列GATC TCT AGA TTA GCT CAT
TTG TGG TCT(配列番号5)を有し、制限酵素XbaIの切断部位、
および停止コドンおよび停止コドンの前の15ヌクレオチド配列を含むVEGF2の3'配列に相補的な18ヌクレオチドを含む。

【0149】

増幅された配列を、市販のキット(「Geneclean」, BIO 101, Inc., La Jolla, CA.)を用いて、1%アガロースゲルから単離した。次いで、フラグメントをエンドヌクレアーゼBamHIおよびXbaIで消化し、次いで再び1%アガロースゲル上で精製した。このフラグメントを、BamHIおよびXbaI部位でpAcGP67Aバキュロウイルス移入ベクター(PHarmingen)に連結した。この連結によって、VEGF2 cDNAをバキュロウイルスgp67遺伝子のシグナル配列とともにインフレームでクローン化し、そしてベクター中のシグナル配列の3'末端に配置した。これをpAcGP67A-VEGF2と称する。

【0150】

発現のためにpRG1ベクターにgp67遺伝子のシグナル配列とともにVEGF2をクローン化するために、シグナル配列およびいくつかの上流の配列を有するVEGF2を、XhoIおよびXbaI制限酵素により、VEGF2 cDNAの上流に位置するXho制限エンドヌクレアーゼ部位、およびXbaI制限エンドヌクレアーゼ部位で、pAcGP67A-VEGF2プラスミドから切り出した。このフラグメントを1%アガロースゲル上で残りのベクターから分離し、そして「Geneclean」キットを使用して精製した。このフラグメントを、F2と称した。

【0151】

PRG1ベクター(pVL941ベクターの変異体)をバキュロウイルス発現系を用いるVEGF2タンパク質の発現のために用いる(総説については、Summers, M.D.およびSmith, G.E. 1987, A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555を参照のこと)。この発現ベクターは、Autographa californica核多角体病ウイルス(AcMNPV)の強力なポリヘドリンプロモーター、それに続く制限エンドヌクレアーゼBamHI、SmaI、XbaI、BglII、およびAsp7

10

20

30

40

50

18の認識部位を含む。制限エンドヌクレアーゼXhoIについての部位は、BamHI部位の上流に位置する。XhoIとBamHIとの間の配列は、PacGp67A(テープ上で変化なし)ベクター中のその配列と同じである。シミアンウイルス(SV)40のポリアデニル化部位を、効率的なポリアデニル化のために用いる。組換えウイルスを容易に選択するために、E. coli由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子をポリヘドリン遺伝子のポリアデニル化シグナルが続くポリヘドリンプロモーターと同方向に挿入する。ポリヘドリン配列を、同時トランスフェクトした野生型ウイルスDNAの細胞媒介性相同組換えのためにウイルス配列により両端で隣接させる。多くの他のバキュロウイルスベクターが、pRG1の代わりに用いられ得る。例えば、pAc373、pVL941、およびpAcIM1(Luckow, V.A.およびSummers, M.D., Virology, 170:31-39)。

10

【0152】

プラスミドを制限酵素XboIおよびXbaIで消化し、次いで当該分野で公知の手順により仔ウシ腸ホスファターゼを用いて脱リン酸化した。次いで、市販のキット(「Geneclean」BIO 101 Inc., La Jolla, CA)を使用して、DNAを1%アガロースゲルより単離した。このベクターDNAをV2と称する。

【0153】

フラグメントF2および脱リン酸化プラスミドV2を、T4 DNAリガーゼを用いて連結した。次いで、E. coli HB101細胞を形質転換し、そして酵素BamHIおよびXbaIを用いて、VEGF2遺伝子を有するプラスミド(pBac gp67-VEGF2)を含む細菌を同定した。クローン化フラグメントの配列を、DNA配列決定により確認した。

20

【0154】

5μgのプラスミドpBac gp67-VEGF2を、リポフェクション法(Felgnerら Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7417 (1987))を用いて、1.0μgの市販の線状化したバキュロウイルス(「BaculoGold™ baculovirus DNA», Pharmingen, San Diego, CA.)

30

【0155】

1μgのBaculoGold™ウイルスDNAおよび5μgのプラスミドpBac gp67-VEGF2を、50μlの無血清Grace培地(Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD)を含むマイクロタイタープレートの無菌ウェル中で混合した。その後、10μlリポフェクションおよび90μlのGrace培地を添加し、混合し、そして室温にて15分間インキュベートした。次いで、そのトランスフェクション混合物を、血清を有さないGrace培地1mlを有する35mm組織培養プレート内に播種されたSf9昆虫細胞(ATCC CRL 1711)に滴下して加えた。プレートを、新たに加えられた溶液を混合するために、前後に振盪した。次いでプレートを、27℃で5時間インキュベートした。5時間後、トランスフェクション溶液をプレートから除去し、そして10%ウシ胎児血清を補充した1mlのGrace昆虫培地を添加した。プレートをインキュベーターに戻し、そして27℃で4日間培養を続けた。

40

【0156】

4日後、上清を回収し、そしてSummersおよびSmith(前出)による記載と同様にブランクアッセイを行なった。改変法として、「Blue Gal」(Life Technologies Inc., Gaithersburg)と共にアガロースゲルを用いた。これは、青く染色されたブランクの容

50

易な単離を可能とする。(「ブランクアッセイ」の詳細な記述はまた、Life Technologies Inc.、Gaithersburgにより配布される昆虫細胞培養およびバキュロウイルス学の使用者ガイド(9~10頁)においても見い出され得る)。

【0157】

連続希釈の4日後、ウイルスを細胞に添加し、青く染色されたブランクをエッペンドルフピペットのチップで拾った。次いで、組換えウイルスを含む寒天を、200 μ lのGrace培地を含むエッペンドルフチューブに再懸濁した。寒天を、短時間の遠心分離により除去し、そして組換えバキュロウイルスを含む上清を使用して、35mmディッシュに播種されたSf9細胞に感染させた。4日後、これらの培養ディッシュの上清を回収し、次いで4 で保存した。

10

【0158】

Sf9細胞を、10%熱失活化FBSを補充したGrace培地中で増殖させた。細胞を、感染多重度(MOI)1で組換えバキュロウイルスV-gp67-VEGF2で感染させた。6時間後、培地を除去し、そしてメチオニンおよびシステインを除いたSF900 II培地(Life Technologies Inc., Gaithersburg)に置き換えた。42時間後、5 μ Ciの³⁵S-メチオニンおよび5 μ Ciの³⁵Sシステイン(Amersham)を添加した。細胞を、さらに16時間インキュベートし、その後細胞を遠心分離により回収し、そして標識されたタンパク質をSDS-PAGEおよびオートラジオグラフィにより可視化した。

20

【0159】

培地およびSf9細胞の細胞質由来のタンパク質を、還元条件下または非還元条件下でSDS-PAGEによって分析した。図4を参照のこと。培地を、50 mM MES(pH 5.8)に対して透析した。透析の後に沈澱を得、そして100 mMクエン酸Na(pH 5.0)中に再懸濁した。再懸濁した沈澱を、SDS-PAGEによって再度分析し、そしてクマシーブリリアントブルーで染色した。図5を参照のこと。

【0160】

培地の上清をまた、50 mM MES(pH 5.8)中で1:10に希釈し、そして1ml/分の流速でSP-650Mカラム(1.0 $\times$ 6.6 cm、Toyopearl)に適用した。タンパク質を、200、300、および500 mM NaClでの段階勾配で溶出した。VEGF2を、500 mMでの溶出を用いて得た。溶出物を還元剤 β -メルカプトエタノールの存在下または非存在下で、SDS-PAGEで分析し、そしてクマシーブリリアントブルーで染色した。図6を参照のこと。

30

【0161】

(実施例3)

COS細胞における組換えVEGF2の発現

プラスミドVEGF2-HAの発現を、ベクターpCDNA1/Amp(Invitrogen)から誘導する。ベクターpCDNA1/Ampは以下を含む: 1)SV40複製起点、2)アンピシリン耐性遺伝子、3)E. coli複製起点、4)ポリリンカー領域、SV40イントロン、およびポリアデニル化部位が続くCMVプロモーター。完全なVEGF2前駆体、およびその3'末端にインフレーションで融合されたHAタグをコードするDNAフラグメントを、ベクターのポリリンカー領域にクローン化した。それゆえ、組換えタンパク質発現はCMVプロモーター下で指示される。HAタグは、先に記載されたようなインフルエンザヘマグルチニンタンパク質由来のエピトープに対応する(I. Wilson、H. Niman、R. Heighten、A. Cherenson、M. Connolly、およびR. Lerner、1984、Cell

40

50

37, 767(1984))。標的タンパク質へのHAタグの融合により、HAエピトープを認識する抗体を用いる組換えタンパク質の容易な検出が可能になる。

【0162】

プラスミド構築ストラテジーを以下に記述する：

VEGF2をコードするDNA配列(ATCC受託番号第97161号)を、2つのプライマーを用いるPCRにより構築した：5'プライマー(CGC GGA TCC ATG ACT GTA CTC TAC CCA)(配列番号6)は、BamHI部位、それに続く開始コドンから始まるVEGF2コード配列の18ヌクレオチドを含む；3'配列(CGC TCT AGA TCA AGC GTA GTC TGG GAC GTC GTA TGG GTA CTC GAG GCT CAT TTG TGG TCT 3')(配列番号7)は、XbaI部位、HAタグ、XhoI部位、およびVEGF2コード配列の最後の15ヌクレオチド(停止コドンは含まない)に相補的な配列を含む。それゆえ、PCR産物は、BamHI部位、XhoI制限エンドヌクラーゼ部位およびインフレーム融合したHAタグが続くコード配列、HAタグに隣接する翻訳終結停止コドン、およびXbaI部位を含む。PCR増幅DNAフラグメントおよびベクター(pcdNAI/Amp)を、BamHIおよびXbaI制限酵素で消化し、そして連結した。連結混合物を、E. coli SURE株(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037)に形質転換し、形質転換された培養物をアンピシリン培地プレートにプレーティングし、そして耐性コロニーを選択した。プラスミドDNAを形質転換体より単離し、そして正しいフラグメントの存在を制限分析で試験した。組換えVEGF2の発現のために、COS細胞をDEAE-DEXTRAN法により発現ベクターでトランスフェクトした(J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989))。VEGF2-HAタンパク質の発現を、放射性標識および免疫沈降法により検出した。(E. Harlow, D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988))。細胞を、トランスフェクションの2日後、³⁵S-システインで8時間標識した。次いで培養培地を回収し、そして細胞を界面活性剤(RIPA緩衝液(150mM NaCl、1% NP-40、0.1% SDS、1% NP-40、0.5% DOC、50mM Tris(pH7.5)))で溶解した(Wilson, I.ら、同上 37:767(1984))。細胞溶解物および培養培地の両方を、HA特異的モノクローナル抗体で沈降させる。沈降したタンパク質を15% SDS-PAGEゲルで分析した。

10

20

30

40

【0163】

(実施例4)

血管内皮細胞の増殖への部分精製VEGF2タンパク質の影響

1日目に、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)を、4%ウシ胎児血清(FBS)、16単位/mlのヘパリン、および50単位/mlの内皮細胞増殖補充物(ECGS, Biotechniques, Inc.)を含むM199培地に $2 \sim 5 \times 10^4$ 細胞/35mmディッシュの密度で播種した。2日目に、培地を、10%FBS、8単位/mlのヘパリンを含むM199に置き換えた。最初の45アミノ酸残基を除いた配列番号2のVEGF2タンパク質(VEGF)および塩基性FGF(bFGF)を示した濃度で添加した。4日目および6日目に、培地を置き換えた。8日目に、Coulter Counterで細胞数を決定

50

した（図 8 を参照のこと）。

【0164】

（実施例 5）

血管内皮細胞の増殖への精製 VEGF 2 タンパク質の影響

1 日目に、ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）を、4 % ウシ胎児血清（FBS）、16 単位 / ml のヘパリン、50 単位 / ml の内皮細胞増殖補充物（ECGS, Biotechniques, Inc.）を含む M199 培地に $2 \sim 5 \times 10^4$ 細胞 / 35 mm ディッシュの密度で播種した。2 日目に、培地を、10 % FBS、8 単位 / ml のヘパリンを含む M199 と置き換えた。最初の 45 アミノ酸残基を除いた配列番号 2 の精製 VEGF 2 タンパク質（VEGF）をこの時点で培地に添加した。4 日目および 6 日目に、培地を新鮮な培地および補充物と置き換えた。8 日目に、Coulter Counter で細胞数を決定した（図 9 を参照のこと）。

10

【0165】

（実施例 6）

遺伝子治療を介する発現

線維芽細胞を、被験体から皮膚生検によって得る。得られる組織を組織培養培地中に置き、そして小片に分ける。組織の小塊を、組織培養フラスコの湿った表面上に置き、各フラスコ中におよそ 10 片を置く。フラスコの上下を逆さにし、密閉し、そして室温に一晩放置する。室温で 24 時間後、フラスコを反転させ、そして組織塊をフラスコの底に付着したままにし、そして新鮮な培地（例えば、10 % FBS、ペニシリン、およびストレプトマイシンを有する Ham の F12 培地）を添加する。次いで、これを 37 °C でおよそ 1 週間インキュベートする。この時点で新鮮な培地を添加し、その後数日ごとに取り替える。さらに 2 週間の培養後、線維芽細胞の単層が出現する。単層をトリプシン処理し、そしてより大きなフラスコに大きく（scale）する。

20

【0166】

モロニーマウス肉腫ウイルスの長い末端反復に隣接する pMV-7（Kirschmeier, P.T. ら、DNA, 7: 219-25 (1988)）を EcoRI および HindIII を用いて消化し、続いて仔ウシ腸ホスファターゼで処理する。直鎖状ベクターをアガロースゲル上で分別し、そしてガラスビーズを用いて精製する。

30

【0167】

本発明のポリペプチドをコードする cDNA を、それぞれ 5' 末端配列および 3' 末端配列に対応する PRC プライマーを用いて増幅する。5' プライマーは EcoRI 部位を含み、そして 3' プライマーは HindIII 部位をさらに含む。等量のモロニーマウス肉腫ウイルス直鎖状骨格、ならびに増幅された EcoRI および HindIII フラグメントを、T4 DNA リガーゼの存在下で一緒に加える。得られた混合物を、2 つのフラグメントの連結に適切な条件下で維持する。連結混合物を使用して、細菌 HB101 を形質転換し、次いで、これを適切に挿入された目的の遺伝子をベクターが有することを確認する目的のために、カナマイシン含有寒天上にプレーティングする。

40

【0168】

アントロピック pA317 または GP+am12 パッケージング細胞を、10 % 仔ウシ血清（CS）、ペニシリン、およびストレプトマイシンを有する Dulbecco 改変 Eagle 培地（DMEM）における組織培養物中で、コンフルエントな密度になるまで増殖させる。次いで、遺伝子を含む MSV ベクターを培地に添加し、そしてパッケージング細胞をベクターで形質導入する。この時点でパッケージング細胞は、遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生する（この時点でパッケージング細胞は、プロデューサー細胞と呼ばれる）。

50

【 0 1 6 9 】

新鮮な培地を、形質導入したプロデューサー細胞に添加し、その後、コンフルエントなプロデューサー細胞の10cmプレートから培地を回収する。感染性ウイルス粒子を含む使用済みの培地を、ミリポア(millipore)フィルターを通して濾過して、剥離したプロデューサー細胞を除去し、次いでこの培地を用いて線維芽細胞を感染させる。培地を、線維芽細胞のサブコンフルエントなプレートから除去し、そして直ちにプロデューサー細胞からの培地に置き換える。この培地を除去し、そして新鮮な培地と置き換える。ウイルスの力価が高い場合、事実上全ての線維芽細胞が感染され、そして選択は必要ではない。力価が非常に低い場合、選択マーカー(例えば、neo、またはhis)を有するレトロウイルスベクターを使用することが必要である。

10

【 0 1 7 0 】

次いで、操作された線維芽細胞は、単独で、またはcytodex 3マイクロキャリアービーズ上でコンフルエントになるまで増殖させた後のいずれかで、宿主に注入する。この時点で、線維芽細胞は、タンパク質産物を産生する。

【 0 1 7 1 】

本発明の多くの改変および変形が、上記の教示を考慮すれば可能であり、従って、添付の請求の範囲の範囲内で本発明は特に記載した以外の方法で実施され得る。

【 0 1 7 2 】

ヒトVEGF2ポリペプチドおよびそのようなVEGF2ポリペプチドをコードするDNA(RNA)が開示される。組換え技術によってそのようなポリペプチドを産生するための手順、ならびにそのようなポリペプチドに対する抗体およびアンタゴニストも提供される。創傷治癒を刺激するため、および血管組織の修復のために、そのようなポリペプチドを使用する方法も開示される。腫瘍増殖、炎症を阻害するため、ならびに糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチ、および乾癬を処置するために、このアンタゴニストを使用する方法も提供される。宿主由来のサンプル中の、VEGF2コード配列における変異、およびVEGF2タンパク質の濃度の変化を検出するための診断方法もまた、開示される。

20

【 0 1 7 3 】

(発明の効果)

本発明により、ヒトVEGF2ポリペプチドおよびそのようなVEGF2ポリペプチドをコードするDNA(RNA)が提供される。このようなポリペプチドは、創傷治癒を刺激するため、および血管組織の修復のために有用である。

30

【 0 1 7 4 】

(配列表)

【 数 1 】

配列表

(1) 一般的情報 :

(i) 出願人 : フ, ら

10

(ii) 発明の名称 : ヒト血管内皮増殖因子 2

(iii) 配列数 : 1 0

(iv) 連絡住所 :

(A) 名称 : カレラ, バーン, ペイン, ギルフィラン, ケッチ,
スチュワート アンド オルステイン

(B) 番地 : ベッカー ファーム ロード 6

(C) 市 : ローズランド

(D) 州 : ニュージャージー

(E) 国 : アメリカ合衆国

(F) 郵便番号 : 07068

20

(v) コンピューター読み出し形態 :

(A) 媒体型 : 3.5 インチ ディスケット

(B) コンピューター : IBM PS/2

(C) OS : MS-DOS

(D) ソフトウェア : ワードパーフェクト 5.1

(vi) 現在の出願データ :

(A) 出願番号 : 08/465,968

(B) 出願日 : 1995年6月6日

(C) 分類 :

30

(vii) 先願データ :

(A) 出願番号 : 08/207,550

(B) 出願日 : 1994年3月8日

(viii) 代理人/事務所情報 :

(A) 氏名 : フェラロ, グレゴリー ディー.

(B) 登録番号 : 36,134

(C) 照会/記録番号 : 325800-288

40

(ix) 電話回線情報 :

(A) 電話 : 201-994-1700

(B) テレファックス : 201-994-1744

【数 2】

(2) 配列番号 1 の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 1 6 7 4 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列: 配列番号 1:

```

GTCCTTCCAC CATGCACTCG CTGGGCTTCT TCTCTGTGGC GTGTTCTCTG CTCGCCGCTG 60
CGCTGCTCCC GGGTCCCTCG GAGGCGCCCG CGCCGCGCGC CGCCTTCGAG TCCGGACTCG 120
ACCTCTCGGA CGCGGAGCCC GACGCGGGCG AGGCCACGGC TTATGCAAGC AAAGATCTGG 180
AGGAGCAGTT ACGGTCTGTG TCCAGTGTAG ATGAACTCAT GACTGTACTC TACCCAGAAT 240
ATTGGAAGAT GTACAAGTGT CAGCTAAGGA AAGGAGGCTG GCAACATAAC AGAGAACAGG 300
CCAACCTCAA CTCAGGACA GAAGAGACTA TAAATTTTCG TGCAGCACAT TATAATACAG 360
AGATCTTGAA AAGTATTGAT AATGAGTGGG GAAAGACTCA ATGCATGCCA CGGGAGGTGT 420
GTATAGATGT GGGGAAGGAG TTTGGAGTCG CGACAACAC CTTCTTTTAA CCTCCATGTG 480
TGTCGCTCTA CAGATGTAGG GGTGTCTGCA ATAGTGAGGG GCTGCAGTGC ATGAACACCA 540
GCACGAGCTA CCTCAGCAAG ACGTTATTTG AAATTACAGT GCCTCTCTCT CAAGGCCCCA 600
AACCAGTAAC AATCAGTTTT GCCAATCACA CTTCTCTGCG ATGCATGTCT AAAGTGGATG 660
TTTACAGACA AGTTCATTCC ATTATTAGAC GTTCCCTGCC AGCAACACTA CCACAGTGTC 720
AGGCAGCGAA CAAGACCTGC CCCACCAATT ACATGTGGAA TAATCACATC TGCAGATGCC 780
TGGCTCAGGA AGATTTTATG TTTTCTCTCG ATGCTGGAGA TGAATCAACA GATGGATTCC 840
ATGACATCTG TGGACCAAAC AAGGAGCTGG ATGAAGAGAC CTGTCACTGT GTCTGCAGAG 900
CGGGGCTTCG GCCTGCCAGC TGTGGACCCC ACAAGAAGCT AGACAGAAAC TCATGCCAGT 960
GTGTCTGTAA AAACAACTC TTCCCAGCC AATGRGGGGC CAACCGACAA TTTGATGAAA 1020
ACACATGCCA GTGTGTATGT AAAAGAACCT GCCCCAGAAA TCAACCCCTA AATCCTGGAA 1080
AATGTGCCCTG TGAATGTACA GAAAGTCCAC AGAAATGCTT GTTAAAAGGA AAGAAGTTCC 1140
ACCACCAAAC ATGCAGCTGT TACAGACGGC CATGTACGAA CCGCCAGAAG GCTTGTGAGC 1200
CAGGATTTTC ATATAGTGAA GAAGTGTGTC GTTGTGTCCC TTCATATTGG CAAAGACCAC 1260
AAATGAGCTA AGATTGTACT GTTTTCCAGT TCATCGATTT TCTATTATCG AAAACTGTGT 1320
TGCCACAGTA GAACTGTCTG TGAACAGAGA GACCCTTGTG GGTCCATGCT AACAAAGACA 1380
AAAGTCTGTC TTTCTGAAC CATGTGGATA ACTTTACAGA AATGGACTGG AGCTCATCTG 1440
CAAAAGGCCT CTTGTAAAGA CTGGTTTTCT GCCAATGACC AAACAGCCAA GATTTTCTCTC 1500
TTGTGATTTT TTAAAAGAA TGACTATATA ATTTATTTCC ACTAAAAATA TTGTTTCTGC 1560
ATTCAATTTT ATAGCAACAA CAATTGGTAA AACTCACTGT GATCAATATT TTTATATCAT 1620
GCAAAATATG TTTAAAATAA AATGAAAATT GTATTATAAA AAAAAAAAAA AAAA 1674

```

(2) 配列番号 2 の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 4 1 9 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数:
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

【数 3】

(xi)配列：配列番号2：

```

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

                        55                60                65
His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys
      70                75                80
Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu Phe
      85                90                95
Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
  100                105                110
Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
  115                120                125                130
Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu
      135                140                145
Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
      150                155                160
Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val His Ser Ile
      165                170                175
Ile Arg Arg Ser Leu Pro Ala Thr Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn
  180                185                190
Lys Thr Cys Pro Thr Asn Tyr Met Trp Asn Asn His Ile Cys Arg Cys
  195                200                205                210
Leu Ala Gln Glu Asp Phe Met Phe Ser Ser Asp Ala Gly Asp Asp Ser
      215                220                225
Thr Asp Gly Phe His Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu
      230                235                240
Glu Thr Cys Gln Cys Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys
      245                250                255
Gly Pro His Lys Glu Leu Asp Arg Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys
      260                265                270
Asn Lys Leu Phe Pro Ser Gln Cys Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu
  275                280                285                290
Asn Thr Cys Gln Cys Val Cys Lys Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro
      295                300                305
Leu Asn Pro Gly Lys Cys Ala Cys Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys
      310                315                320

```

10

20

30

40

【数 4】

Cys Leu Leu Lys Gly Lys Lys Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr
 325 330 335
 Arg Arg Pro Cys Thr Asn Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser
 340 345 350
 Tyr Ser Glu Glu Val Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp Gln Arg Pro
 355 360 365 370
 Gln Met Ser

10

(2) 配列番号 3 の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 14 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

20

(xi) 配列: 配列番号 3:

Pro Xaa Cys Val Xaa Xaa Xaa Arg Cys Xaa Gly Cys Cys Asn
 5 10

(2) 配列番号 4 の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 50 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: オリゴヌクレオチド

30

(xi) 配列: 配列番号 4:

TGTAATACGA CTCACTATAG GGATCCCGCC ATGGAGGCCA CGGCTTATGC 50

(2) 配列番号 5 の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 28 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: オリゴヌクレオチド

(xi) 配列: 配列番号 5:

GATCTCTAGA TTAGCTCATT TGTGGTCT 28

40

(2) 配列番号 6 の情報:

(i) 配列の特色:

【数 5】

(A)長さ：27塩基対
(B)型：核酸
(C)鎖の数：一本鎖
(D)トポロジー：直鎖状
(ii)配列の種類：オリゴヌクレオチド
(xi)配列：配列番号6；

10

CGCGGATCCA TGACTGTACT CTACCCA

27

(2) 配列番号 7 の情報：

- (i) 配列の特色：
 - (A) 長さ：60 塩基対
 - (B) 型：核酸
 - (C) 鎖の数：一本鎖
 - (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：オリゴヌクレオチド
- (xi) 配列：配列番号 7：

20

CGCTCTAGAT CAAGCGTAGT CTGGGACGTC GTATGGGTAC TCGAGGCTCA TTTGTGGTCT 60

(2) 配列番号 8 の情報：

- (i) 配列の特色：
 - (A) 長さ：196 アミノ酸
 - (B) 型：アミノ酸
 - (C) 鎖の数：
 - (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：タンパク質
- (xi) 配列：配列番号 8：

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

30

40

【数 6】

Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr
 125 130 135
 Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg Val His His Arg Ser Val
 140 145 150
 Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Lys Pro Lys Leu Lys
 155 160 165
 Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu Cys Ala Cys Ala
 170 175 180
 Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp Thr Asp Val
 185 190 195
 Arg

10

(2) 配列番号 9 の情報 :

(i) 配列の特色 :

(A) 長さ : 241 アミノ酸

20

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(xi) 配列 : 配列番号 9 :

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

30

40

【数 7】

Val	Gln	Val	Arg	Lys	Ile	Glu	Ile	Val	Arg	Lys	Lys	Pro	Ile	Phe			
				155					160				165				
Lys	Lys	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Glu	Asp	His	Leu	Ala	Cys	Lys	Cys			10
				170					175				180				
Glu	Thr	Val	Ala	Ala	Ala	Arg	Pro	Val	Thr	Arg	Ser	Pro	Gly	Gly			
				185					190				195				
Ser	Gln	Glu	Gln	Arg	Ala	Lys	Thr	Pro	Gln	Thr	Arg	Val	Thr	Ile			
				200					205				210				
Arg	Thr	Val	Arg	Val	Arg	Arg	Pro	Pro	Lys	Gly	Lys	His	Arg	Lys			
				215					220				225				
Phe	Lys	His	Thr	His	Asp	Lys	Thr	Ala	Leu	Lys	Glu	Thr	Leu	Gly			
				230					235				240				
Ala																	20

(2) 配列番号 10 の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 231 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 10:

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

【数 8】

[illegible]

30

40

46

【図面の簡単な説明】

【 0 1 7 5 】

50

【図1A】本発明のcDNA配列、および本発明のポリペプチドの対応する推定アミノ酸配列を示す図面である。アミノ酸についての標準的な1文字略号を使用する。配列決定を、373自動化DNAシーケンサー(Applied Biosystems, Inc.)を使用して行なった。配列決定の精度は、97%より大きいことが予測される。

【図1B】図1Aの続きである。

【図1C】図1Bの続きである。

【図2】本発明のポリペプチドとヒトPDGF/VEGFファミリーの他のメンバーとの間のアミノ酸配列相同性の実例を示す図面である。ボックス領域は、保存された配列および8つの保存されたシステイン残基の位置を示す。

【図3】本発明のポリペプチドのインビトロでの転写、翻訳、および電気泳動の後のゲルの写真である。レーン1：¹⁴Cおよびレインボー分子量マーカー；レーン2：FGFコントロール；レーン3：M13逆方向プライマーおよびM13正方向プライマーによって産生されたVEGF2；レーン4：M13逆方向プライマーおよびVEGF-F4プライマーによって産生されたVEGF2；レーン5：M13逆方向プライマーおよびVEGF-F5プライマーによって産生されたVEGF2。 10

【図4】培地および細胞の細胞質由来のタンパク質を、還元条件下および非還元条件下でSDS-PAGEによって分析した結果を示すゲルの写真である。VEGF2ポリペプチドは、Sf9細胞からなるバキュロウイルス系において発現される。

【図5】本発明の核酸配列で感染したSf9細胞由来の培地を沈澱させ、そして再懸濁した沈澱をSDS-PAGEによって分析し、そしてクマシーブリリアントブルーで染色した結果を示すゲルの写真である。 20

【図6】VEGF2を培地上清から精製し、そして還元剤であるβ-メルカプトエタノールの存在下および非存在下でSDS-PAGEによって分析し、そしてクマシーブリリアントブルーで染色した結果を示すゲルの写真である。

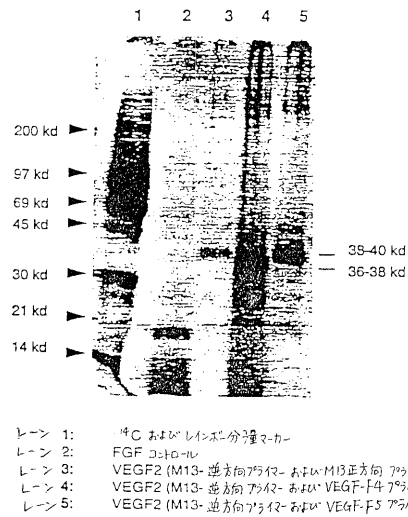
【図7】RP-300カラム(0.21×3cm、Applied Biosystems, Inc.)を使用した精製VEGF2の逆相HPLC分析の結果を示すグラフである。カラムを0.1%のトリフルオロ酢酸(溶媒A)で平衡化し、そしてタンパク質を、0%~60%の溶媒B(0.07%TFAを含むアセトニトリルからなる)の7.5分間の勾配で溶出した。タンパク質溶出を、215nm(赤線)および280nm(青線)の吸光度でモニターした。溶媒Bの%を緑線で示す。 30

【図8】塩基性線維芽細胞増殖因子との比較における、血管内皮細胞の増殖への部分精製VEGF2タンパク質の影響を例示するグラフである。

【図9】血管内皮細胞の増殖への精製VEGF2タンパク質の影響を例示するグラフである。

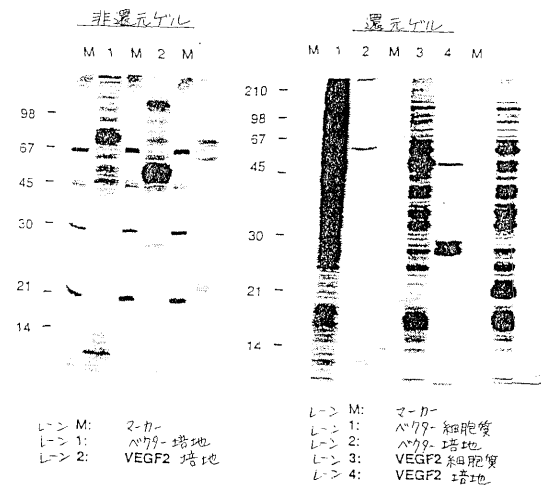
[illegible]

【図 3】



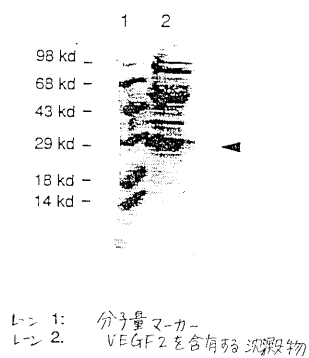
【図 4】

123D7ウイルス系における VEGF 2 の発現



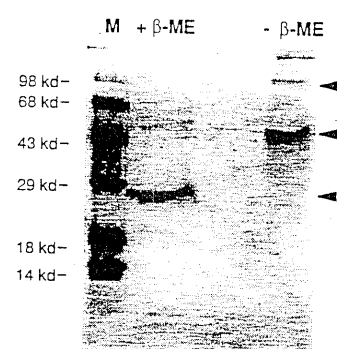
【図 5】

SDS-PAGE による黒化培養地由来の粗 VEGF 2 92kD 質の分析



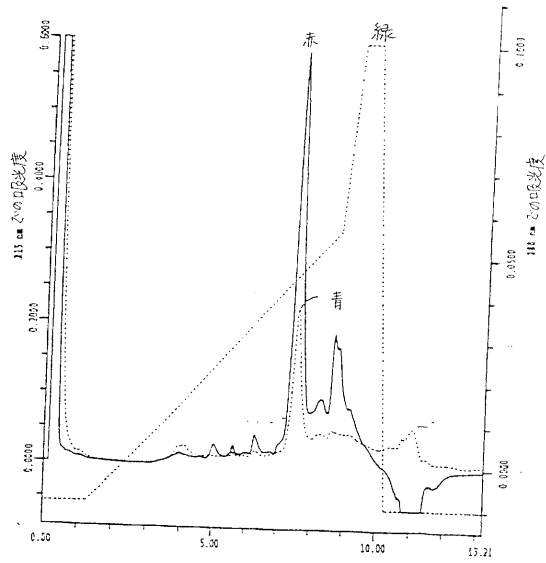
【図 6】

黒化培養地由来の VEGF 2 (HG401-2B) 92kD 質の分析および精製



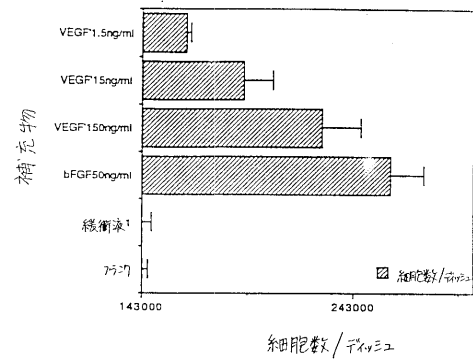
【図 7】

精製 VEGF2 (HG401-2B) の逆相 HPLC 分析



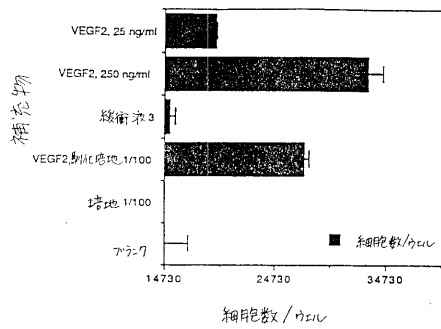
【図 8】

血管内皮細胞の増殖への部分精製 VEGF2 9nH7 質の影響



【図 9】

血管内皮細胞の増殖への精製 VEGF2 9nH7 質の影響



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 H 0 4 5
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/08 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 3	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/08	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
	A 6 1 K 39/395 D	
	A 6 1 K 39/395 N	
	A 6 1 K 39/395 Y	
	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 クレイグ エイ . ローゼン
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 8 2 , レイトンズビル , ローリング ヒル ロード
 2 2 4 0 0

(72)発明者 フ ジン - シャン
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 7 8 , ガイザースバーグ , ホワード ランディング
 ドライブ 1 6 1 2 5

(72)発明者 カオ リアン
 香港 ユニバーシティ オブ ホンコン , デパートメント オブ マイクロバイオロジー , ク
 イーン メアリー ホスpital

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 BA21 BA56 CA02 CA09 DA03 HA12 HA17
 4B063 QA01 QA07 QA13 QA17 QA19 QQ43 QQ79 QR32 QR48 QR55
 QS33 QS34
 4B064 AG13 AG27 CA10 CC24 DA01 DA14
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA01 BA02 BA22 BA23 BA35 BA44
 BA50 CA18 CA53 DB57 MA56 MA59 MA63 MA66 NA14 ZA332
 ZA362 ZA392 ZA402 ZA452 ZA672 ZA892 ZA962 ZB112 ZB152 ZB262
 ZC032 ZC352
 4C085 AA13 AA14 AA16 AA34 BB07 BB41 CC21
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA33 ZA36
 ZA39 ZA40 ZA45 ZA67 ZA89 ZA96 ZB11 ZB15 ZB26 ZC03
 ZC35
 4H045 AA11 AA30 CA40 DA20 DA76 EA20 EA24 EA51 FA72 FA74

专利名称(译)	人血管内皮生长因子2		
公开(公告)号	JP2007244388A	公开(公告)日	2007-09-27
申请号	JP2007106593	申请日	2007-04-13
[标]申请(专利权)人(译)	人类基因科学公司		
申请(专利权)人(译)	人类Jinomu科学公司		
[标]发明人	クレイグエイローゼン フジンシャン カオリアン		
发明人	クレイグ エイ. ローゼン フ ジン-シャン カオ リアン		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C07K14/475 C07K16/24 A61K48/00 A61K38/22 A61K31/7088 A61P1/02 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/08 A61P17/02 A61P19/02 A61P19/08 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00 A61K39/395 C12P21/08 A61K31/00 A61K38/00 A61K38/27 A61K38/55 A61K39/00 A61K49/00 A61P9/14 A61P17/00 A61P17/06 A61P27/00 C07H21/04 C07K14/485 C07K14/515 C07K14/52 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/18 C12P21/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61K48/00 A61P1/02 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/08 A61P25/00 A61P27/00 A61P27/02 A61P29/00 C07K14/52 C07K2319/00 C12N2799/026		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A C07K14/475 C07K16/24 A61K48/00 A61K37/24 A61K31/7088 A61P1/02 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/10.103 A61P9/08 A61P9/10.101 A61P17/02 A61P19/02 A61P19/08 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00.111 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K39/395.Y C12P21/08 A61K38/02 A61K38/22 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA21 4B024/BA56 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/DA03 4B024/HA12 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA07 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG13 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA14 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA35 4C084/BA44 4C084/BA50 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/DB57 4C084/MA56 4C084/MA59 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA332 4C084/ZA362 4C084/ZA392 4C084/ZA402 4C084/ZA452 4C084/ZA672 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZB112 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZC032 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA34 4C085/BB07 4C085/BB41 4C085/CC21 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA39 4C086/ZA40 4C086/ZA45 4C086/ZA67 4C086/ZA89 4C086/ZA96 4C086/ZB11 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZC03 4C086/ZC35 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA20 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA24 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	08/465968 1995-06-06 US		
其他公开文献	JP2007244388A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供新的血管内皮生长因子和编码它的DNA。解决方案：本发明提供了诊断与蛋白质分子的表达或对疾病的敏感性相关的疾病的方法，包括从患者细胞中获取核酸的步骤和确定核酸上的突变的步骤。编码选自 (a) 含有序列号2的分离的蛋白质分

子的蛋白质分子的序列，（b）含有序列号2的氨基酸1至373的分离的蛋白质分子，（c）含有氨基酸的分离的蛋白质分子序列号为2的酸-23至373和（d）含有序列号2的氨基酸-46至373的分离蛋白分子。