

(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2004-267  
(P2004-267A)

(43) 公開日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 H O 4 5
A 6 1 K 49/00	A 6 1 K 49/00 A	
審査請求 有 請求項の数 36 O L (全 40 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-291861 (P2003-291861)	(71) 出願人	597018381
(22) 出願日	平成15年8月11日 (2003. 8. 11)		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7-523422の分割		Human Genome Sciences, Inc.
原出願日	平成6年5月12日 (1994. 5. 12)		アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, キー ウェスト アベニュー 9410
(31) 優先権主張番号	08/207, 550		9410 Key West Avenue, Rockville, Maryland 20850, United States of America
(32) 優先日	平成6年3月8日 (1994. 3. 8)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 血管内皮細胞増殖因子2

(57) 【要約】

【課題】 本発明の課題は、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、および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である。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を課題とする。

【解決手段】 本発明は、図1の推定のアミノ酸配列を有するVEGF2ポリペプチドまたはこのポリペプチドの活性なフラグメント、アナログまたは誘導体；ATCC寄託番号75698番に含まれるcDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するVEGF2ポリペプチドまたは該ポリペプチドの活性なフラグメント、アナログまたは誘導体；をコードするポリヌクレオチドからなる群から選択される、VEGF2をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下：

(a) 配列番号 2 のタンパク質の成熟部分、または A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A によりコードされるタンパク質の成熟部分をコードする核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 2 のタンパク質のプロタンパク質部分、または A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A によりコードされるタンパク質のプロタンパク質部分をコードする核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチド；

(c) A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A によりコードされるタンパク質をコードする、単離されたポリヌクレオチド； 10

(d) ヒト V E G F - 2 をコードする、単離されたポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 2 のアミノ酸 6 1 ~ 7 4 を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチド；

(f) 配列番号 2 のアミノ酸 3 8 ~ 1 1 8 を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチド；

(g) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 3 2 6 を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチド；

(h) 配列番号 2 のアミノ酸 - 2 4 ~ 3 2 6 を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチド； 20

(i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列または配列番号 1 の相補体からなるポリヌクレオチドに、以下の条件：

0 . 5 M  $\text{NaPO}_4$ 、7 % ドデシル硫酸ナトリウム ( S D S ) 中で、6 5 でのハイブリダイゼーション、および 0 . 5 x S S C、0 . 1 % S D S で 6 0 での洗浄、の下でハイブリダイズする、単離されたポリヌクレオチド；

(j) A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A に、以下の条件：

0 . 5 M  $\text{NaPO}_4$ 、7 % ドデシル硫酸ナトリウム ( S D S ) 中で、6 5 でのハイブリダイゼーション、および 0 . 5 x S S C、0 . 1 % S D S で 6 0 での洗浄、の下でハイブリダイズする、単離されたポリヌクレオチド；

(k) 1 . 6 K b m R N A 転写産物に、以下の条件： 30

0 . 5 M  $\text{NaPO}_4$ 、p H 7 . 2、7 % ドデシル硫酸ナトリウム ( S D S )、1 % ウシ血清アルブミン ( B S A ) 中で、6 5 でのハイブリダイゼーション、および 0 . 2 x S S C で 6 5 での洗浄、の下でハイブリダイズする、単離されたポリヌクレオチドであって、ここで、該転写産物はまた、配列番号 2 のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列または A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A へのハイブリダイゼーションにより検出される、単離されたポリヌクレオチド；

(l) 配列番号 2 のポリペプチドフラグメント、または A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A によりコードされるポリペプチドフラグメントをコードする核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチドであって、ここで、該ポリペプチドフラグメントは脈管形成活性を有する、単離されたポリヌクレオチド； 40

(m) 配列番号 2 のポリペプチドフラグメント、または A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A によりコードされるポリペプチドフラグメントをコードする核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチドであって、ここで、該ポリペプチドフラグメントは内皮細胞増殖活性を有する、単離されたポリヌクレオチド；ならびに

(n) 配列番号 2 を発現し得る細胞から産生されるタンパク質のアミノ酸配列を有するタンパク質分子をコードする核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチド、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を含む、組成物。

## 【請求項 2】

前記単離されたポリヌクレオチドが、異種ポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

前記単離されたポリヌクレオチドが、異種ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 4】

以下：

( a ) 配列番号 2 のタンパク質の成熟部分、または A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A によりコードされるタンパク質の成熟部分を含む、単離されたタンパク質分子；

( b ) 配列番号 2 のタンパク質のプロタンパク質部分、または A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A によりコードされるタンパク質のプロタンパク質部分を含む、単離されたタンパク質分子； 10

( c ) ヒト V E G F - 2 を含む、単離されたタンパク質分子；

( d ) A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A によりコードされるタンパク質を含む、単離されたタンパク質分子；

( e ) 配列番号 2 のアミノ酸 6 1 ~ 7 4 を含む、単離されたタンパク質分子；

( f ) 配列番号 2 のアミノ酸 3 8 ~ 1 1 8 を含む、単離されたタンパク質分子；

( g ) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 3 2 6 を含む、単離されたタンパク質分子；

( h ) 配列番号 2 のアミノ酸 - 2 4 ~ 3 2 6 を含む、単離されたタンパク質分子；

( i ) 配列番号 2 のポリペプチドフラグメント、または A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A によりコードされる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、該フラグメントは脈管形成活性を有する、単離されたポリヌクレオチド； 20

( j ) 配列番号 2 のポリペプチドフラグメント、または A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A によりコードされる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、該フラグメントは内皮細胞増殖活性を有する、単離されたポリヌクレオチド；ならびに

( k ) 配列番号 2 を発現し得る細胞から産生される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、

からなる群より選択される、単離されたタンパク質分子を含む、組成物。

## 【請求項 5】

前記タンパク質分子が、異種ポリペプチドをさらに含む、請求項 4 に記載の組成物。 30

## 【請求項 6】

前記タンパク質分子が、ホモダイマーを含む、請求項 4 に記載の組成物。

## 【請求項 7】

前記タンパク質分子が、グリコシル化される、請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 8】

患者における内皮細胞増殖を刺激する方法において使用するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 9】

患者における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 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。 40

## 【請求項 10】

V E G F - 2 の必要性を有する患者の処置において使用するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【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】

前記患者が血管系の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 13】

前記患者が骨および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 14】

前記患者がヒトである、請求項 8 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 15】

抗体を含む組成物であって、該抗体は、以下：

(a) 配列番号 2 のタンパク質の成熟部分、または A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A によりコードされるタンパク質の成熟部分を含む、単離されたタンパク質分子；

(b) 配列番号 2 のタンパク質のプロタンパク質部分、または A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A によりコードされるタンパク質のプロタンパク質部分を含む、単離されたタンパク質分子；

(c) ヒト V E G F - 2 を含む、単離されたタンパク質分子；

(d) A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A によりコードされるタンパク質を含む、単離されたタンパク質分子；

(e) 配列番号 2 のアミノ酸 6 1 ~ 7 4 を含む、単離されたタンパク質分子；

(f) 配列番号 2 のアミノ酸 3 8 ~ 1 1 8 を含む、単離されたタンパク質分子；

(g) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 3 2 6 を含む、単離されたタンパク質分子；

(h) 配列番号 2 のアミノ酸 - 2 4 ~ 3 2 6 を含む、単離されたタンパク質分子；

(i) 配列番号 2 のポリペプチドフラグメント、または A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A によりコードされる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、該フラグメントは、脈管形成活性を有する、単離されたポリヌクレオチド；

(j) 配列番号 2 のポリペプチドフラグメント、または A T C C 寄託番号第 7 5 6 9 8 号に含まれる c D N A によりコードされる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、単離されたポリヌクレオチド；ならびに

(k) 配列番号 2 を発現し得る細胞から産生される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、

からなる群より選択されるタンパク質分子に特異的に結合する、組成物。

## 【請求項 16】

前記抗体が、抗原結合抗体フラグメントである、請求項 15 に記載の組成物。

## 【請求項 17】

前記抗体が、F a b フラグメントである、請求項 15 に記載の組成物。

## 【請求項 18】

前記抗体が、単鎖結合フラグメントである、請求項 15 に記載の組成物。

## 【請求項 19】

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 15 に記載の組成物。

## 【請求項 20】

前記抗体が、ポリクローナルである、請求項 15 に記載の組成物。

## 【請求項 21】

前記抗体が、モノクローナルである、請求項 15 に記載の組成物。

## 【請求項 22】

前記抗体が、キメラである、請求項 15 に記載の組成物。

## 【請求項 23】

前記抗体が、ヒト化されている、請求項 15 に記載の組成物。

## 【請求項 24】

慢性関節リウマチ、乾癬または糖尿病性網膜症の処置のための薬学的組成物の調製のための、請求項 15 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

10

20

30

40

50

## 【請求項 25】

腫瘍の処置のための薬学的組成物の調製のための、請求項 15 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

## 【請求項 26】

固形腫瘍の増殖の予防、遅延、または退縮のための薬学的組成物の調製のための、請求項 15 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

## 【請求項 27】

脈管形成の障害のための薬学的組成物の調製のための、請求項 15 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

## 【請求項 28】

腫瘍脈管形成の障害のための薬学的組成物の調製のための、請求項 15 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

10

## 【請求項 29】

炎症の処置のための薬学的組成物の調製のための、請求項 15 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

## 【請求項 30】

患者における内皮細胞増殖の障害のための薬学的組成物の調製のための、請求項 15 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

## 【請求項 31】

患者における血管内皮細胞増殖の障害のための薬学的組成物の調製のための、請求項 15 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

20

## 【請求項 32】

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における、請求項 15 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

## 【請求項 33】

宿主由来のサンプル中のタンパク質分子の存在について分析するためのプロセスにおける、請求項 15 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

## 【請求項 34】

患者における腫瘍の存在を検出するためのイムノアッセイにおける、請求項 15 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

30

## 【請求項 35】

VEGF2 のレベルの上昇を検出するための、請求項 34 に記載の組成物の使用。

## 【請求項 36】

癌を診断するための、請求項 35 に記載の組成物の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

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、および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。より詳細には、本発明のポリペプチドは、ヒト血管内皮細胞増殖因子 2 (VEGF2) である。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。

40

## 【背景技術】

## 【0002】

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。脈管形成は、ヒト固形ガン (human solid cancer) の成長の必須な部分である。そして異常な脈管形成は、慢性関節リウマチ、乾癬、および糖尿病性網膜症などの他の疾患に関連する (Folkman, J. および Klagsbrun, M., Science 235: 442 - 447, (1987))。

## 【0003】

50

いくつかの因子が脈管形成に関与する。内皮細胞および他の細胞タイプのためのマイトジェンである酸性および塩基性両方の線維芽細胞増殖因子分子。アンジオトロピン (angiotropin) およびアンジオジェニン 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)。高度に選択的な血管内皮細胞のためのマイトジェンは、血管内皮細胞増殖因子すなわち VEGF である (Ferrara, N.ら、Endocr. Rev. 13:19-32, (1992))。血管内皮細胞増殖因子は、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。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、VEGF の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役割に一致する。Breier, G.ら、Development, 114:521-532 (1992)。

10

20

30

40

50

#### 【0004】

VEGF は、脈管形成を促進し得る。VEGF は、ヒト血小板由来増殖因子、PDGF および PDGF と配列相同性を共有する (Leung, D.W.ら、Science, 1306-1309, (1989))。相同性の程度は、それぞれ約 21% および約 24% である。8つのシステイン残基が、これら3つのすべてのメンバーの間で保存されている。これらは類似しているが、VEGF と PDGF との間には特異的な差異がある。PDGF は結合組織のための主要な増殖因子である一方、VEGF は内皮細胞に高度に特異的である。VEGF は、血管透過性因子 (vascular permeability factor) (VPM) および星状細胞由来増殖因子 (follicle stellate-derived growth factor) としても知られる。これはヘパリン結合性二量体ポリペプチドである。

#### 【0005】

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。VEGF 121 および VEGF 165 は、可溶性でありそして脈管形成を促進し得る。一方 VEGF 189 および VEGF 206 は、細胞表面中のヘパリン含有プロテオグリカンに結合している。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., Warder, E., D'Amore, P.A., J. Cell. Biol., 109:811-822, (1989))。その高親和性結合部位は、組織切片中の内皮細胞上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、VEGF 121 または VEGF 165 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))。最後に、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成長を阻害することが示された (Kim, K.J., Nature 362:841-844, (1993))。

#### 【0006】

血管透過性因子 (VEGF としても知られる) はまた、傷害の休止の後でさえも血漿タンパク質に対する持続的な微小血管高透過性 (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 (または VEGF) 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)。

【0007】

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、血管の発達および修復の促進のために有用である。

10

【0008】

本発明の1つの局面に従って、VEGF2ならびにそのフラグメント、アナログおよび誘導体である、新規な成熟ポリペプチドが提供される。本発明のVEGF2は、ヒト起源である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、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、および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である。より詳細には、本発明のポリペプチドは、ヒト血管内皮細胞増殖因子2(VEGF2)である。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を課題とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、VEGF2をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供し、このポリヌクレオチドは、

図1の推定のアミノ酸配列を有するVEGF2ポリペプチドまたはこのポリペプチドの活性なフラグメント、アナログまたは誘導体をコードするポリヌクレオチド；

A T C C 寄託番号75698番に含まれるcDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するVEGF2ポリペプチドまたは該ポリペプチドの活性なフラグメント、アナログまたは誘導体をコードするポリヌクレオチド；

30

からなる群から選択される。

【0011】

1つの実施形態において、上記ポリヌクレオチドはDNAである。

【0012】

1つの実施形態において、上記ポリヌクレオチドはRNAである。

【0013】

1つの実施形態において、上記ポリヌクレオチドはゲノムDNAである。

【0014】

1つの実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、図1の推定のアミノ酸配列を有するVEGF2をコードする。

40

【0015】

1つの実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、A T C C 寄託番号75698番のcDNAによりコードされるVEGF2ポリペプチドをコードする。

【0016】

1つの実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、図1に示されるVEGF2のコード配列を有する。

【0017】

1つの実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、A T C C 寄託番号75698番と

50

して寄託される V E G F 2 のコード配列を有する。

【 0 0 1 8 】

別の局面において、本発明は、上記 D N A を含むベクターを提供する。

【 0 0 1 9 】

別の局面において、本発明は、上記ベクターを用いて遺伝子操作された宿主細胞を提供する。

【 0 0 2 0 】

別の局面において、本発明は、上記宿主細胞から上記 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、このポリペプチドを産生するためのプロセスを提供する。

10

【 0 0 2 1 】

別の局面において、本発明は、上記ベクターを用いて細胞を遺伝子操作する工程を包含する、ポリペプチドを発現し得る細胞を生成するためのプロセスを提供する。

【 0 0 2 2 】

別の局面において、本発明は、上記 D N A にハイブリダイズ可能でありかつ V E G F 2 活性を有するポリペプチドをコードする、単離された D N A を提供する。

【 0 0 2 3 】

別の局面において、本発明は、( i ) 図 1 の推定のアミノ酸配列を有する V E G F 2 ポリペプチドならびにその活性なフラグメント、アナログおよび誘導体、および ( i i ) A T C C 寄託番号 7 5 6 9 8 番の c D N A によりコードされる V E G F 2 ポリペプチドならびに該ポリペプチドの活性なフラグメント、アナログおよび誘導体、からなる群から選択されるポリペプチドを提供する。

20

【 0 0 2 4 】

1 つの実施形態において、上記ポリペプチドは、図 1 の推定のアミノ酸配列を有する V E G F 2 である。

【 0 0 2 5 】

別の局面において、本発明は、上記ポリペプチドに対する抗体を提供する。

【 0 0 2 6 】

別の局面において、本発明は、上記ポリペプチドに対するアンタゴニストを提供する。

【 0 0 2 7 】

別の局面において、本発明は、V E G F 2 を必要とする患者の処置方法を提供し、この方法は、患者に治療有効量の上記ポリペプチドを投与する工程を包含する。

30

【 0 0 2 8 】

別の局面において、本発明は、V E G F 2 を阻害する必要を有する患者の処置方法を提供し、この方法は、患者に上記ポリペプチドに対する治療有効量のアンタゴニストを投与する工程を包含する。

【 0 0 2 9 】

別の局面において、本発明は、上記ポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含有する薬学的組成物を提供する。

【 0 0 3 0 】

1 つの実施形態において、上記治療有効量ポリペプチドが、患者にこのポリペプチドをコードする D N A を提供しそしてこのポリペプチドをインピボで発現させることにより投与される方法が提供される。

40

【 0 0 3 1 】

本発明の別の局面に従って、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 ( D N A または R N A ) が提供される。

【 0 0 3 2 】

本発明のさらに別の局面に従って、そのようなポリペプチドを組換え技術により産生するためのプロセスが提供される。

【 0 0 3 3 】

50

本発明のまたさらなる局面に従って、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、損傷された骨および組織の増殖を促進しそして内皮形成 (endothelialization) を促進するための治療目的 (例えば、創傷治癒剤として)、ならびに腫瘍の診断、ガン治療および VEGF 2 の未知のレセプターを同定および単離するために利用するためのプロセスが提供される。

【0034】

本発明のまた別の局面に従って、VEGF 2 に対する抗体およびそのような抗体を産生するためのプロセスが提供される。

【0035】

本発明のまた別の局面に従って、VEGF 2 に対するアンタゴニスト/インヒビターが提供される。これは、そのようなポリペプチドの作用を阻害するために (例えば、腫瘍脈管形成を防止するために) 使用され得る。

【0036】

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はずである。

【発明の効果】

【0037】

本発明によれば、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、および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が提供される。より詳細には、本発明のポリペプチドは、ヒト血管内皮細胞増殖因子 2 (VEGF 2) である。本発明によれば、そのようなポリペプチドの作用を阻害することもまた提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0038】

本発明の 1 つの局面によれば、図 1 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 \_\_\_\_\_ に対する ATCC 寄託番号 75698 として、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をコードする単離された核酸 (ポリヌクレオチド) が提供される。

【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) 骨巨細胞腫、成人心臓またはいくつかの乳ガン細胞株から得られ得る。本発明のポリヌクレオチドは、初期のヒト 9 週胚由来 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している。これは、約 350 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 24 アミノ酸残基がリーダー配列であるようであり、その結果成熟タンパク質は 326 アミノ酸を含む。そしてこのタンパク質は、血管内皮細胞増殖因子に対する最大の相同性を示し (30% の同一性)、PDGF (23%) および PDGF (22%) がそれに続く (図 3 を参照のこと)。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てい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 PXC VXXXRCXGCCN が、VEGF 2 において保存されている (図 2 参照のこと)。VEGF 2、VEGF および 2 つの PDGF の間の相同性は、タンパク質配列レベルである。ヌクレオチド配列の相同性は検出され得ない。それゆえ、VEGF 2 を低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションのような単純なアプローチで単離することは困難であろう。

【0040】

本発明のポリヌクレオチドは、RNA の形態または DNA (この DNA は cDNA、ゲノム DNA、および合成 DNA を包含する) の形態であり得る。DNA は二本鎖または一本鎖であり得、そして一本鎖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 に示すコード配列または寄託したクロー

10

20

30

40

50

ーンのコード配列と同一であり得、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のDNAまたは寄託したcDNA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。

【0041】

図1の成熟ポリペプチドまたは寄託した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リーダーまたは分泌配列またはプロタンパク質配列のようなさらなるコード配列；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'非コード配列）。

10

【0042】

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および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。

【0043】

本発明はさらに、図1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cDNA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の対立遺伝子改変体またはポリヌクレオチドの非天然の改変体であり得る。

20

【0044】

従って本発明は、図1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cDNA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および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のポリペプチドまたは寄託したクローンの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をコードする。こ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。

【0045】

本明細書中上記で示したように、ポリヌクレオチドは、図1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の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す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。

30

【0046】

本発明はまたポリヌクレオチドを包含し、ここで成熟ポリペプチドのコード配列は宿主細胞からのポリペプチドの発現および分泌を助けるポリヌクレオチド（例えば、細胞からのポリペプチドの制御された輸送のための分泌配列として機能するリーダー配列）に同じ読みとり枠内で融合され得る。リーダー配列を有するポリペプチドは、プレタンパク質であり、そして宿主細胞により切断されてポリペプチドの成熟形態を形成するリーダー配列を有し得る。ポリヌクレオチドはまた、成熟タンパク質およびさらなる5'アミノ酸残基であるプロタンパク質をコードし得る。プロ配列を有する成熟タンパク質はプロタンパク質であり、そしてそれは不活性型のタンパク質である。一旦プロ配列が切断されると、活性な成熟タンパク質が残る。

40

【0047】

従って、例えば、本発明のポリヌクレオチドは、成熟タンパク質、またはプロ配列を有するタンパク質またはプロ配列およびプレ配列（リーダー配列）の両方を有するタンパク質をコードし得る。

【0048】

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同じ読みとり枠で融合されたコード配列を有し得る。マーカー配列は、細菌宿主の

50

場合にマーカ-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。また例えばマーカ-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、血球凝集素(HA)タグであり得る。HAタグはインフルエンザ血球凝集素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))。

**【0049】**

本発明はさらに、配列間に少なくとも50%および好ましくは70%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関する。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関する。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、ハイブリダイゼーションが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のみに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を保持するポリペプチドをコードする。

10

**【0050】**

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下に維持される。これらの寄託物は、単に便宜上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。

20

**【0051】**

本発明はさらに、図1の推定のアミノ酸配列を有するまたは寄託したcDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するVEGF2ポリペプチド、および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。

**【0052】**

用語「フラグメント」、「誘導体」および「アナログ」は、図1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、そのようなポリペプチドと本質的に同じ生物学的機能または活性を保持するポリペプチドを意味する。従ってアナログは、プロタンパク質部分の切断により活性化されて活性化成熟ポリペプチドを生じ得るプロタンパク質を包含する。

30

**【0053】**

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。

**【0054】**

図1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、そしてこ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)そこでリーダー配列または分泌配列もしくは成熟ポリペプチドまたはプロタンパク質の精製に用いられる配列のようなさらなるアミノ酸が成熟ポリペプチドに融合されるフラグメント、誘導体またはアナログであり得る。こ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。

40

**【0055】**

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

50

れ、そして好ましくは均質に精製される。

【0056】

用語「単離された」は、物質がその本来の環境（例えば、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DNA、あるいはポリペプチドは、単離されている。こ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/またはこ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がその天然の環境の一部ではないため単離されている。

10

【0057】

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。

【0058】

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される（形質導入されるまたは形質転換されるまたはトランスフェクトされる）。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VEGF2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中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。

20

【0059】

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、ポリヌクレオチド配列は、種々の発現媒介物のいずれか1つ、特にポリペプチドを発現するためのベクターまたはプラスミドに含まれ得る。こ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。こ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；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、ワクシニアウイルス、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である。しかし、宿主において複製可能で、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

【0060】

上記に記載のように、適切なDNA配列は、種々の手順によりベクターに挿入され得る。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。このような手順および他の手順は、当業者に公知の範囲内であると考えられる。

【0061】

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）に作動可能に連結され、mRNAの合成を指示する。このようなプロモーターの代表的な例としては、以下が挙げられ得る：LTRまたはSV40プロモーター、E. coli lacまたはtrp、ファージPLプロモーター、および原核細胞または真核細胞あるいはそのウイルス内で遺伝子の発現を制御すると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し得る。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。

40

【0062】

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特性（例えば、真核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）を提供する遺伝子を含有する。

50

## 【0063】

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。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、Salmonella typhimurium、Streptomyces）；真菌細胞（例えば酵母）；昆虫細胞（例えば、DrosophilaおよびSf9）；動物細胞（例えば、CHO、COSまたはBowes黒色腫）；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に公知の範囲内であると考えられる。

## 【0064】

さらに詳細には、本発明はまた、上で広範に記載した1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、pQE-9（Qiagen）、pBs、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBsKS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a（Stratagene）；pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5（Pharmacia）。真核性：pWLineo、pSV2cat、pOG44、pXT1、pSG（Stratagene）；pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL（Pharmacia）。しかし、それらが宿主において複製可能で、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。

## 【0065】

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プロモーターは、lacI、lacZ、T3、T7、gpt、P<sub>R</sub>、P<sub>L</sub>およびtrpを包含する。真核プロモーターは、CMV即時型、HSVチミジンキナーゼ、初期SV40および後期SV40、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範囲内である。

## 【0066】

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、高等真核細胞（例えば、哺乳動物細胞）または下等真核細胞（例えば、酵母細胞）であり得るか、または宿主細胞は原核細胞（例えば、細菌細胞）であり得る。構築物の宿主細胞への導入は、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., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, 1986）。

## 【0067】

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、従来の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、従来ペプチド合成機により合成的に産生され得る。

## 【0068】

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、こ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。原核宿主および真核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 50

a 1, 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ている)に記載されている。

【0069】

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、ベクターにエンハンサー配列を挿入することにより増大され得る。エンハンサーはDNAのシス作用因子であり、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を包含する。

【0070】

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プロモーターを含有する。こ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)、因子、酸性ホスファターゼ、または熱ショックタンパク質)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止配列、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。

10

20

【0071】

細菌での使用に有用な発現ベクターは、機能的なプロモーターと作動可能な読みとり相で、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止シグナルと共に挿入することにより構築される。ベクターは、1以上の表現的な選択マーカー、およびベクターの維持を保証するため、そして所望により宿主内での増幅を提供するために複製起点を含有する。形質転換のために適切な原核宿主は、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。

【0072】

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)の遺伝子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。こ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 Biotec, 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。

30

【0073】

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)により脱抑制され、そして細胞はさらなる期間培養される。

40

【0074】

細胞は、代表的には遠心分離により収集され、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。

【0075】

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る。

【0076】

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

50

。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、および任意の必要なりボソーム結合部位、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有する。SV40のウイルスゲノムに由来するDNA配列(例えば、SV40オリジン、初期プロモーター、エンハンサー、スプライス部位、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。

【0077】

VEGF2は、以下で使用される方法により組換え細胞培養物から回収され、そして精製される。これらの方法には、硫酸沈殿またはエタノール沈殿、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、リン酸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が包含される。精製の際に低濃度(約0.1~約5mM)のカルシウムイオンが存在することが好ましい(Priceら、J. Biol. Chem., 244: 917(1969))。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。

10

20

【0078】

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、または原核宿主または真核宿主(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得る。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、哺乳動物または他の真核性の糖質でグリコシル化され得るか、またはグリコシル化され得ない。

【0079】

VEGF2は、創傷治癒剤として、特に損傷した組織を再血管形成させる必要がある場合、または新たな毛細管形成が重要である場合に、有用である。それゆえ、VEGF2はとこずれを包含する皮膚の潰瘍、静脈の潰瘍、および糖尿病性潰瘍のような全層性創傷の処置のために使用され得る。さらにVEGF2は、傷害部位中の熱傷に植皮片および皮膚弁を形成するために脈管形成が所望される場合に、全層性熱傷および傷害の処置において使用され得る。この場合、これは部位に直接適用される。同様に、VEGF2は、熱傷、外傷の後またはさらに美容目的のために再構成が必要な場合に、形成外科において使用され得る。

30

【0080】

VEGF2はまた、損傷した骨、歯周組織または靭帯組織の成長を誘導するために使用され得る。VEGF2がメチルセルロースゲル中で疾患歯の歯根に適用される歯周疾患において使用され得、この処置は新たな骨形成およびコラーゲン繊維内殖を有するセメント質の形成を導き得る。VEGF2は、疾患および外傷によって損傷した歯の支持組織(歯槽骨、セメント質および歯周靭帯を含む)の再生のために使用され得る。

40

【0081】

脈管形成は創傷を清潔にそして非感染に保つことにおいて重要であるので、VEGF2は外科手術に関連しておよびそれに続く切断の修復において使用され得る。VEGF2は、感染の危険性が高い腹部創傷の処置において特に有用であるはずである。

【0082】

VEGF2は、血管移植手術において内皮形成(endothelialization)促進のために使用され得る。移植された物質または合成した物質のいずれかを用いた血管移植片の場合、VEGF2は移植片の表面または連結部に適用されて血管内皮細胞の増殖を促進し得る。これの1つの派生は、VEGF2が心筋梗塞および冠状動脈バイパス

50

外科手術が移植された組織の成長の刺激により必要とされるその他の状況の損傷を修復するために使用され得ることである。これに関しては、VEGF2の虚血後の心血管系を修復するための使用が挙げられる。

【0083】

VEGF2の同定は、血管内皮細胞増殖因子の特定のインヒビターの生成のために使用され得る。脈管形成および血管新生は固形ガン成長における必須の工程であるので、血管内皮細胞増殖因子の脈管形成活性の阻害は、固形ガンのさらなる成長の防止、遅延、または退縮においてすら非常に有用である。VEGF2の発現レベルは乳房を含む正常組織において非常に低いが、VEGF2は悪性腫瘍に由来する少なくとも2つの乳ガン細胞株において中等レベルで発現されていることが見出され得る。それゆえ、VEGF2が腫瘍の脈管形成および成長に關与する可能性がある。

10

【0084】

VEGF2は、血管内皮細胞のインビトロでの培養のために使用され得る。ここでVEGF2は、馴化培地に10 pg/ml ~ 10 ng/mlの濃度で添加され得る。

【0085】

本発明のポリペプチドはまた、インビボでのこ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。

【0086】

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患者に提供される。こ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。

20

【0087】

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産生細胞は、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。このような方法により本発明のポリペプチドを投与するこれらの方法または他の方法は、本発明の教示により当業者には明らかである。例えば、細胞を操作するための発現媒介物は、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、適切な送達媒介物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。

30

【0088】

本発明のポリペプチドは、適切な薬学的キャリアと組み合わせて用いられ得る。このような組成物は、治療有効量のタンパク質、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。こ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、およびそれらの組み合わせを包含するが、これに限定されない。処方は、投与方法に合わせるべきである。

【0089】

本発明はまた、1以上の本発明の薬学的組成物の成分が満たされた1以上の容器を含有する薬学的パックまたはキットを提供する。このような容器は、薬剤または生物製品の製造、使用、または販売を統制する政府機関により規定された形式の通知を伴い得、この通知はヒトへの投与についての製造、使用、または販売における機関による認可を反映する。さらに、本発明のポリペプチドは、他の治療的化合物と併用して用いられ得る。

40

【0090】

薬学的組成物は、経口経路および静脈内経路のような便利な方法で投与され得、これは好ましくは局所的に投与される。被験体に投与されるVEGF2の量および投与方法は、多数の因子(投与方法、処置される症状の性質、処置される被験体の体重および処方する医師の判断など)に依存する。一般的にいえば、これは、例えば少なくとも約10 μg/kg体重の治療有効用量で与えられ、そしてほとんどの場合、1日あたり約8 mg/kg体

50

重を超えない量で投与され、そして好ましくは、投与量は、投与経路、症状などを考慮して、1日あたり約10  $\mu$ g/kg体重～約1mg/kg体重である。

【0091】

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、染色体位置の標識に利用可能な実際の配列データ(反復多型)に基づいた染色体標識試薬はほとんどない。本発明によるDNAの染色体へのマッピングは、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。

【0092】

簡略に述べれば、配列は、cDNAからPCRプライマー(好ましくは15～25bp)を調製することにより染色体にマップされ得る。cDNAのコンピューター解析が、ゲノムDNA内で1より多いエキソンにまたがらない、従って増幅プロセスを複雑化しない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PCRスクリーニングに使用される。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。

【0093】

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定の染色体に特定のDNA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、特定の染色体由来のフラグメントのパネルまたは類似の方法の大きなゲノムクローンのプールを用いて下部位置決め(sublocalization)が達成され得る。染色体にマップするために同様に使用され得る他のマッピング戦略は、インサイチュハイブリダイゼーション、標識したフローサイトメトリーで選別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cDNA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。

【0094】

cDNAクローンの中期染色体展開物への蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)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、500または600塩基という短いcDNAで使用され得る;しかし、2,000bpよりも長いクローンの方が、簡便な検出のために十分なシグナル強度でユニークな染色体位置に結合しやすい。FISHは、ESTが由来するクローンの使用を必要とし、そしてこのクローンはより長いことが好ましい。例えば、2,000bpが良好であり、4,000bpはより良好であり、そして4,000bpを超える長さは、良好な結果に時間の合理的な割合を得るためにおそらく必要でない。この技術の総説としては、Vermaら、Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988)を参照のこと。

【0095】

一旦配列が正確な染色体位置にマップされると、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。(このようなデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Manに見出される(Johns Hopkins University Welch Medical Library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プされる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。

【0096】

次に、罹患個体と非罹患個体との間のcDNAまたはゲノム配列の差異を決定する必要がある。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因子であると思われる。

【0097】

10

20

30

40

50

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との間の潜在的原因遺伝子の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。)

罹患個体と非罹患個体との比較は、一般に、まず染色体の構造変化(例えば、染色体展開物で目視できるか、あるいはそのcDNA配列に基づくPCRを使用して検出可能な欠失または転座)を探す工程を包含する。最終的には、変異の存在を確認し、そして変異を多型から区別するために、数個体由来の遺伝子の完全な配列決定が必要とされる。

#### 【0098】

本発明はさらに、アンチセンス技術の使用によるインビボでのVEGF2の阻害に関する。アンチセンス技術は、3重ヘリックスの形成あるいはアンチセンスDNAまたはアンチセンスRNAにより遺伝子発現を制御するために使用され得る。これらの方法は両方とも、ポリヌクレオチドのDNAまたはRNAへの結合に基づく。例えば、成熟ポリヌクレオチド配列の5'コード部分(これは、本発明のポリペプチドをコードする)が、長さ10塩基対~40塩基対のアンチセンス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、転写に関わる遺伝子の領域に相補的であるように設計され(3重ヘリックス - Leeら, *Nucl. Acids Res.*, 6: 3073 (1979); Cooneyら, *Science*, 241: 456 (1988); および Dervanら, *Science*, 251: 1360 (1991)を参照のこと)、その結果VEGF2の転写および産生を防ぐ。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への翻訳をブロックする(アンチセンス - Okano, *J. Neurochem.*, 56: 560 (1991); *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)を参照のこと)。

#### 【0099】

あるいは、上記のオリゴヌクレオチドは、アンチセンスRNAまたはアンチセンスDNAがインビボで発現されて上記の方法でVEGF2の産生を阻害し得るように、当該分野の手順により細胞に送達され得る。

#### 【0100】

それゆえ、VEGF2に対するアンチセンス構築物は、VEGF2の脈管形成活性を阻害し得、そして固形ガンのさらなる成長を防止するかまたは退縮すらさせ得る。なぜなら、脈管形成および血管新生は固形ガン成長における必須の段階であるからである。これらのアンチセンス構築物はまた、慢性関節リウマチ、乾癬および糖尿病性網膜症(これらはすべて異常な脈管形成により特徴付けられる)を処置するために使用され得る。

#### 【0101】

このポリペプチド、そ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、こ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。

#### 【0102】

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、好ましくは非ヒトである。次いで、このようにして得られた抗体は、ポリペプチド自体に結合する。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に結合する抗体を生成するために使用され得る。次いで、このような抗体は、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)、トリオーマ (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。

**【0103】**

単鎖抗体を産生するために記載された技術 (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生成するために適合させ得る。 10

**【0104】**

中和抗体が同定され得る。そして、血管内皮細胞増殖因子をマスクするために適用され得る。そしてこれは VEGF に対するマウスモデル系において示された。VEGF2 はまた、この遺伝子自身内の特定のドミナントネガティブ変異体によって不活性化され得る。PDGF および の両方がヘテロ二量体またはホモ二量体を形成し、そして VEGF がホモ二量体を形成することが知られている。同様な VEGF2 間の相互作用が予測され得る。それゆえこれらの抗体は、VEGF2 の脈管形成活性をブロックし、そして固形腫瘍の成長を遅延させるために使用され得る。これらの抗体はまた、VEGF2 の存在の結果生じる増加した血管透過性により起こる炎症を処置するために使用され得る。 20

**【0105】**

これらの抗体はさらに、特定の個体における腫瘍の存在を検出するためのイムノアッセイにおいて使用され得る。エンザイムイムノアッセイを、個体の血液サンプルから実施し得る。VEGF2 の上昇したレベルは、ガンの特徴であると考えられ得る。

**【0106】**

本発明はまた、本発明のポリペプチドのアンタゴニスト/インヒビターに関する。アンタゴニスト/インヒビターは、ポリペプチドの機能を阻害または除去するものである。

**【0107】**

従って、例えば、アンタゴニストは本発明のポリペプチドに結合し、そしてその機能を阻害または除去する。このアンタゴニストは、例えば、ポリペプチドまたはある場合ではオリゴヌクレオチドに結合するポリペプチドに対する抗体であり得る。インヒビターの例は、ポリペプチドに結合しそしてその触媒部位を占め、それにより触媒部位を基質に接近不能にし、その結果正常な生物学的活性が妨害される、低分子である。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、それらに限定されない。 30

**【0108】**

VEGF2 の短縮型も産生され得る。この短縮型は野生型 VEGF2 と相互作用して内皮細胞増殖を活性化できない二量体を形成し得、それゆえ内因性 VEGF2 を不活化し得る。あるいは、変異体型の VEGF2 は、それ自身で二量体を形成し、そして標的細胞表面上の適切なチロシンキナーゼレセプターのリガンド結合ドメインを占めるが、細胞増殖を活性化できない。 40

**【0109】**

あるいは、本発明のポリペプチドが正常に結合するレセプターに結合する、本発明のポリペプチドに対するアンタゴニストが用いられ得る。アンタゴニストは、天然のタンパク質のレセプター部位を認識し、そしてそれに結合するが、しかしこれらは天然のタンパク質の不活性形態であり、レセプター部位が占められているのでそれにより VEGF2 の作用を妨害するような近縁のタンパク質であり得る。これらの方法により、VEGF2 の作用が妨害され、そしてアンタゴニスト/インヒビターは VEGF2 により認識される腫瘍のレセプター部位を占めることにより、または VEGF2 自身を不活化することにより、抗腫瘍薬物として治療的に使用され得る。アンタゴニスト/インヒビターはまた、VEGF2 の増加した血管透過性作用に起因する炎症を防止するために使用され得る。アンタゴ 50

ニスト/インヒビターはまた、固形ガン成長、糖尿病性網膜症、乾癬および慢性関節リウマチを処置するために使用され得る。

【0110】

アンタゴニスト/インヒビターは、例えば本明細書中上記のような薬学的に受容可能なキャリアを有する組成物中で用いられ得る。

【0111】

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、本発明はこのような実施例に限定されないことを理解されたい。すべての部または量は、他に明記しない限り重量基準である。

【0112】

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。

【0113】

「プラスミド」は、小文字の p の前および/または後に大文字および/または数字を示すことにより命名される。本明細書中の出発プラスミドは、市販であり、制限無く公的に入手可能であり、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。

【0114】

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その DNA を触媒反応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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

【0115】

切断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。

【0116】

「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。こ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と連結しない。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。

【0117】

「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、大体等モル量の連結されるべき DNA フラグメント 0.5  $\mu$ 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。

【0118】

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。

【実施例 1】

## 【0119】

ヒト組織および乳ガン細胞株における VEGF 2 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組織における乳ガン細胞株における VEGF 2 の発現レベルを試験するために行った。全細胞性 RNA サンプルを、RNAzol<sup>TM</sup> 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 μg 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 Prime-It キットに従って 50 ng の DNA フラグメントを用いて行った。標識した DNA を、5 Prime-3 Prime, Inc. 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、放射性標識全長 VEGF 2 遺伝子を用いて、1,000,000 cpm/ml で 0.5 M NaPO<sub>4</sub> および 7% SDS 中で 65 °C で一晩ハイブリダイズした。0.5 × SSC、0.1% SDS を用いて、室温で 2 回および 60 °C 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 °C で一晩曝露した。1.6 Kb のメッセージが 2 つの乳ガン細胞株において観察された。レーン # 4 は、増殖がエストロゲン非依存性である非常に腫瘍形成性の高い細胞株を表す。図 4 を参照のこと。また、10 のヒト成人組織由来の 10 μg の全 RNA をアガロースゲルで分離し、そしてナイロンフィルターにブロットした。次いでフィルターを放射性標識 VEGF 2 プローブを用いて、7% SDS、0.5 M NaPO<sub>4</sub> (pH 7.2)、1% BSA 中で、65 °C で一晩ハイブリダイズした。0.2 × SSC 中で 65 °C で洗浄した後、フィルターをフィルムに増感スクリーンとともに -70 °C で 24 日間曝露した。図 5 を参照のこと。

## 【実施例 2】

## 【0120】

インビトロでの転写および翻訳による VEGF 2 の発現

VEGF 2 cDNA をインビトロで転写および翻訳して、全長および部分 VEGF 2 cDNA によりコードされる翻訳可能なポリペプチドのサイズを測定した。pBlue script SK ベクター中の VEGF 2 の全長および部分 cDNA 挿入物を、以下の 3 対のプライマーを用いた PCR により増幅した。1) M13 逆方向および正方向プライマー; 2) M13 逆方向プライマーおよび VEGF プライマー F4; 3) M13 逆方向プライマーおよび VEGF プライマー F5。これらのプライマーの配列は以下のとおりである。

M13 - 2 逆方向プライマー:

5' - ATGCTTCCGGCTCGTATG - 3'

この配列は、pBlue script ベクター中の VEGF 2 cDNA 挿入物の 5' 末端の上流に位置し、そして cDNA のアンチセンス方向にある。T3 プロモーター配列がこのプライマーと VEGF 2 cDNA との間に位置する。

M13 - 2 正方向プライマー:

5' GGGTTTCCAGTCACGAC - 3'

この配列は、pBlue script ベクター中の VEGF 2 cDNA 挿入物の 3' 末端の下流に位置し、そして cDNA 挿入物のアンチセンス方向にある。

VEGF プライマー F4:

5' - CCACATGGTTCAGGAAGACA - 3'

この配列は、VEGF 2 cDNA 内にアンチセンス方向で bp 1259 ~ 1239 で位置し、これは終止コドンの 3' 末端から約 169 bp 離れており、そして cDNA の最後のヌクレオチドの約 266 bp 前である。

## 【0121】

3 つすべてのプライマーの対を用いた PCR 反応は、cDNA 挿入物の前の T3 プロモーター配列を有する増幅産物を生成する。第 1 および第 3 のプライマーの対は、VEGF

2の完全なポリペプチドをコードするPCR産物を生成する。第2のプライマーの対は、VEGF2ポリペプチドのC末端の36アミノ酸をコードする配列を欠失するPCR産物を生成する。

【0122】

第1のプライマーの対由来の約0.5μgのPCR産物、第2のプライマーの対由来の1μg、第3のプライマーの対由来の1μgを、インビトロでの転写/翻訳のために使用した。インビトロでの転写/翻訳反応を、25μlの容積中で、T<sub>N</sub>T<sup>T</sup><sup>M</sup>Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega, CAT# L4950)を用いて実施した。詳細には、反応物は12.5μlのT<sub>N</sub>Tウサギ網状赤血球溶解物、2μlのT<sub>N</sub>T反応緩衝液、1μlのT3ポリメラーゼ、1μlの1mMアミノ酸混合物(-メチオニン)、4μlの<sup>35</sup>Sメチオニン(>1000 Ci/mmol、10 mCi/ml)、1μlの40 U/μl; RNasinリボヌクレアーゼインヒビター、0.5または1μgのPCR産物を含有する。ヌクレアーゼなしのH<sub>2</sub>Oを添加して容量を25μlとした。反応物を30℃で2時間インキュベートした。反応産物の5μlを4~20%勾配SDS-PAGEゲルで分析した。25%イソプロパノールおよび10%酢酸中で固定した後、ゲルを乾燥し、そしてX線フィルムに70℃で一晩曝露した。

【0123】

図6に示すように、全長VEGF2 cDNAおよび3'非翻訳領域(3'-UTR)中の266 bpを欠失するcDNAを含有するPCR産物は、同じ長さの翻訳産物を生成し、この分子量は38~40 kdであると見積もられる(レーン1および3)。すべての3'UTRを欠失し、そしてC末端の36アミノ酸をコードする配列を欠失するcDNAは、36~38 kdの概算の分子量を有するポリペプチドに翻訳された(レーン2)。

【図面の簡単な説明】

【0124】

以下の図面は、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。

【図1A】図1Aは、VEGF2をコードするポリヌクレオチド配列、および対応する推定のアミノ酸配列(その最初のおよそ24アミノ酸がリーダー配列を表す350アミノ酸残基を含むVEGF2完全長ポリペプチド)を示す。標準的な3文字略語を、アミノ酸配列を示すために使用した。

【図1B】図1Bは、図1Aの続きである。

【図1C】図1Cは、図1Bの続きである。

【図1D】図1Dは、図1Cの続きである。

【図2A】図2Aは、増殖因子PDGF、PDGF、VEGFおよびVEGF2の間のアミノ酸レベルでの相同性を示す。

【図2B】図2Bは、図2Aの続きである。

【図3】図3は、図表の形式で、PDGF、PDGF、VEGFおよびVEGF2の間の相同性の百分率を示す。

【図4】図4は、乳ガン細胞株におけるVEGF2のmRNAの存在を示す。

【図5】図5は、ヒト成人組織におけるVEGF2のノーザンプロット解析の結果を示す。

【図6】図6は、インビトロ転写/翻訳後に泳動したVEGF2およびSDS-PAGEゲルの結果を示す。完全長および部分VEGF2 cDNAを、<sup>35</sup>Sメチオニンの存在下でのカップルした反応において転写して翻訳した。翻訳された産物を、4~20%勾配SDS-PAGEにより解析し、そしてX線フィルムに曝した。

【0125】

(配列表)

【0126】

10

20

30

40

50

## 【表 1】

## 配列表

出願人氏名又は名称：ヒューマン ジノーム サイエンス、インコーポレイテッド

発明の名称：血管内皮細胞増殖因子 2

10

整理番号：PF112D1

出願国及び番号：JP P1995-523422

出願日：1994-05-12

優先権のもととなった出願をした国名及び出願の番号：08/207,550

20

優先日：1994-03-08

配列の総数：9

ソフトウェア：PatentIn Ver. 2.0

30

配列番号：1

配列の長さ：1525

配列の型：DNA

生物名：Homo sapiens

配列の特徴：

配列の特徴を表す記号：CDS

40

存在位置：(71)..(1120)

配列の特徴：

配列の特徴を表す記号 : sig\_peptide

存在位置 : (71)..(142)

配列の特徴 :

配列の特徴を表す記号 : mat\_peptide

存在位置 : (143)..(1120)

10

配列 : 1

cgaggccacg gcttatgcaa gcaaagatct ggaggagcag ttacggctctg tgtccagtgt 60

agatgaactc atg act gta ctc tac cca gaa tat tgg aaa atg tac aag 109

Met Thr Val Leu Tyr Pro Glu Tyr Trp Lys Met Tyr Lys

-20

-15

20

tgt cag cta agg aaa gga ggc tgg caa cat aac aga gaa cag gcc aac 157

Cys Gln Leu Arg Lys Gly Gly Trp Gln His Asn Arg Glu Gln Ala Asn

-10

-5

-1 1

5

ctc aac tca agg aca gaa gag act ata aaa ttt gct gca gca cat tat 205

Leu Asn Ser Arg Thr Glu Glu Thr Ile Lys Phe Ala Ala Ala His Tyr

10

15

20

30

aat aca gag atc ttg aaa agt att gat aat gag tgg aga aag act caa 253

Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys Thr Gln

25

30

35

40

tgc atg cca cgg gag gtg tgt ata gat gtg ggg aag gag ttt gga gtc 301

Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu Phe Gly Val

40

45

50

gcg aca aac acc ttc ttt aaa cct cca tgt gtg tcc gtc tac aga tgt	349	
Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr Arg Cys		
55 60 65		
ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc atg aac acc agc acg	397	
Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr Ser Thr		10
70 75 80 85		
agc tac etc agc aag acg tta ttt gaa att aca gtg cct etc tct caa	445	
Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu Ser Gln		
90 95 100		
ggc ccc aaa cca gta aca atc agt ttt gcc aat cac act tcc tgc cga	493	20
Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg		
105 110 115		
tgc atg tct aaa ctg gat gtt tac aga caa gtt cat tcc att att aga	541	
Cys Met Ser Lys Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val His Ser Ile Ile Arg		30
120 125 130		
cgt tcc ctg cca gca aca cta cca cag tgt cag gca gcg aac aag acc	589	
Arg Ser Leu Pro Ala Thr Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn Lys Thr		
135 140 145		
tgc ccc acc aat tac atg tgg aat aat cac atc tgc aga tgc ctg gct	637	
Cys Pro Thr Asn Tyr Met Trp Asn Asn His Ile Cys Arg Cys Leu Ala		40
150 155 160 165		

cag gaa gat ttt atg ttt tcc tgc gat gct gga gat gac tca aca gat	685	
Gln Glu Asp Phe Met Phe Ser Ser Asp Ala Gly Asp Asp Ser Thr Asp		
170	175	180
gga ttc cat gac atc tgt gga cca aac aag gag ctg gat gaa gag acc	733	
Gly Phe His Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu Glu Thr		10
185	190	195
tgt cag tgt gtc tgc aga gcg ggg ctt cgg cct gcc agc tgt gga ccc	781	
Cys Gln Cys Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys Gly Pro		
200	205	210
cac aaa gaa cta gac aga aac tca tgc cag tgt gtc tgt aaa aac aaa	829	20
His Lys Glu Leu Asp Arg Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys Asn Lys		
215	220	225
ctc ttc ccc agc caa tgt ggg gcc aac cga gaa ttt gat gaa aac aca	877	
Leu Phe Pro Ser Gln Cys Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu Asn Thr		
230	235	240
245		
tgc cag tgt gta tgt aaa aga acc tgc ccc aga aat caa ccc cta aat	925	
Cys Gln Cys Val Cys Lys Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro Leu Asn		
250	255	260
cct gga aaa tgt gcc tgt gaa tgt aca gaa agt cca cag aaa tgc ttg	973	40
Pro Gly Lys Cys Ala Cys Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys Cys Leu		
265	270	275

tta aaa gga aag aag ttc cac cac caa aca tgc agc tgt tac aga cgg	1021	
Leu Lys Gly Lys Lys Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr Arg Arg		
280	285	290
cca tgt acg aac cgc cag aag gct tgt gag cca gga ttt tca tat agt	1069	
Pro Cys Thr Asn Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser Tyr Ser		10
295	300	305
gaa gaa gtg tgt cgt tgt gtc cct tca tat tgg caa aga cca caa atg	1117	
Glu Glu Val Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp Gln Arg Pro Gln Met		
310	315	320
agc taagattgta ctgttttcca gttcatcgat tttctattat ggaaaactgt	1170	20
Ser		
gttgccacag tagaactgtc tgtgaacaga gagaccettg tgggtccatg ctaacaaaga	1230	
caaaagtctg tctttctga accatgtgga taactttaca gaaatggact ggagctcatc	1290	
tgcaaaaggc ctcttgtaaa gactggtttt ctgccaatga ccaaacagcc aagattttcc	1350	30
tcttgigatt tctttaaaag aatgactata taatttatti ccactaaaaa tatigtittct	1410	
gcattcattt ttatagcaac aacaattggt aaaactcact gtgatcaata tttttatct	1470	
atgcaaaata tgtttaaaat aaaatgaaaa ttgtattata aaaaaaaaaa aaaaa	1525	40

配列番号 : 2

配列の長さ : 350

配列の型 : PRT

生物名 : Homo sapiens

配列 : 2

Met Thr Val Leu Tyr Pro Glu Tyr Trp Lys Met Tyr Lys Cys Gln Leu  
 -20 -15 -10 10

Arg Lys Gly Gly Trp Gln His Asn Arg Glu Gln Ala Asn Leu Asn Ser  
 -5 -1 1 5

Arg Thr Glu Glu Thr Ile Lys Phe Ala Ala Ala His Tyr Asn Thr Glu  
 10 15 20 20

Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro  
 25 30 35 40

Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn  
 45 50 55 30

Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys  
 60 65 70

Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu  
 75 80 85 40

Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys  
 90 95 100

Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser  
 105 110 115 120

Lys Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val His Ser Ile Ile Arg Arg Ser Leu  
 125 130 135

Pro Ala Thr Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn Lys Thr Cys Pro Thr  
 140 145 150

10

Asn Tyr Met Trp Asn Asn His Ile Cys Arg Cys Leu Ala Gln Glu Asp  
 155 160 165

Phe Met Phe Ser Ser Asp Ala Gly Asp Asp Ser Thr Asp Gly Phe His  
 170 175 180

20

Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu Glu Thr Cys Gln Cys  
 185 190 195 200

Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys Gly Pro His Lys Glu  
 205 210 215

30

Leu Asp Arg Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys Asn Lys Leu Phe Pro  
 220 225 230

Ser Gln Cys Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu Asn Thr Cys Gln Cys  
 235 240 245

40

Val Cys Lys Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro Leu Asn Pro Gly Lys  
 250 255 260



配列の特徴：

配列の特徴を表す記号：SITE

存在位置：(10)

他の情報：Xaaは、任意のアミノ酸に等しい

配列：3

Pro Xaa Cys Val Xaa Xaa Xaa Arg Cys Xaa Gly Cys Cys Asn

10

1

5

10

配列番号：4

配列の長さ：18

配列の型：DNA

20

生物名：Homo sapiens

配列：4

atgcttccgg ctcgtaig

18

配列番号：5

30

配列の長さ：19

配列の型：DNA

生物名：Homo sapiens

配列：5

gggtttccc agtcacgac

19

40

配列番号：6

配列の長さ : 21

配列の型 : DNA

生物名 : Homo sapiens

配列 : 6

ccacaiggtt caggaaagac a

21

10

配列番号 : 7

配列の長さ : 196

配列の型 : PRT

生物名 : Homo sapiens

20

配列 : 7

Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala

1

5

10

15

His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg

20

25

30

30

Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu

35

40

45

Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg

50

55

60

40

Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu

65

70

75

80

Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys

85

90

95

Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro

100

105

110

Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg

115

120

125

10

Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg

130

135

140

Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys

145

150

155

160

20

Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu

165

170

175

Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp

180

185

190

30

Thr Asp Val Arg

195

配列番号 : 8

40

配列の長さ : 241

配列の型 : PRT

生物名 : Homo sapiens

配列：8

Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg

1 5 10 15

Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met

20 25 30

10

Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu

35 40 45

His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met

50 55 60

20

Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg

65 70 75 80

Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu

85 90 95

Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp

100 105 110

30

Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln

115 120 125

Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr

130 135 140

40

Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg  
 145 150 155 160

Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu  
 165 170 175

Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser  
 180 185 190

10

Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val  
 195 200 205

Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg  
 210 215 220

20

Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly  
 225 230 235 240

Ala

30

配列番号：9

配列の長さ：232

配列の型：PRT

生物名：Homo sapiens

40

配列：9

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu



Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp  
 165 170 175

Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys  
 180 185 190

His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn  
 195 200 205

Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Lys Asn Glu Arg Thr  
 210 215 220

Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg  
 225 230

10

20

FIG. 1A

1 CGAGCCACGGCTTATCGAAGCAAGNTCTGGAGCAGTTCAGCTGTCTCAGTGT  
 71 AGATGAACTCATGCTGCTACCCAGATATTTGGAATATTCAGCTCAGCTTAG  
 M T V L Y P E Y W K M Y K C Q L R  
 121 GAAAGGCTGTGCAATGAGAGCAAGCCACCTCATCTGAGCAGAGAGAGAC  
 K G G W Q H N R E Q A N L N S R T E E T  
 181 TATTAATTTCTGCGACAGATATATPACAGATCTTAAAGTATTCATATGATG  
 I K F A A A H Y N T E I L K S I D N E W  
 241 GAGAAAGACTCAATGCTCCAGGGCTGTATAGATGTGGGAGAGGATTTGAGT  
 R K T Q C M P R E V C I D V G K E F G V  
 301 CCGCACACACCTCTTTAAACCTCAATGTGCTCCCTACACATGTGGGCTTCG  
 A T N T F F K P C V S V Y R C G G C C  
 361 CANTAGTAGGGCTGCGAGCGAGACAGCCAGCAGCTACCTCCAGAGCTTAT  
 N S E Q L Q C N N T S T S Y L S K T L F  
 421 TGAATTTAGTGCCTCTCTCTGAGGCCCGACAGCAATGATCTGTTGCCATCA  
 FIG. 1B

FIG. 1B

FIG. 1A  
 E I T V P L S Q G P K P V T I S F A N H  
 481 CACTTCGCGGATGCTTAACTGATGTTTTCAGCAGCTTCATTCATTTATG  
 T S C R C M S K L D Y Y R Q V H S I I R  
 541 AGCTTCCTCCAGCAGCTCCAGATGTCAGGCGGACAGAGCTGCCCCACAA  
 R S L P A T L P Q Q A A N K T C P T N  
 601 TTACTGGAATACATCTGAGATGCTGCTCAGAGATTTTATGTTTTCAC  
 Y M W N N H I C R C L A Q E D F M F S S  
 661 GGATCTGAGATGACTCAGCAGATTCATGACATCTGAGCCACCAACAGAGCT  
 D A G D D S T D C F H D I C G P N K E L  
 721 GGATGAGAGCTGTGATGCTGTCAGCGGGCTTCGGCTCCAGCTGTGACC  
 D E E T C Q C V C R A G L R P A S C G P  
 781 CCACAGACTAGAGAACTTCCAGCTGTCTGTATTAACAACTTCTCCCGAG  
 H K E L D R N S C Q C V C K K I L F P S  
 841 CCATTTGGCCACCAGATTTATGAAACACACAGCCAGCTGTGTGTTAAGAAC  
 FIG. 1C

30

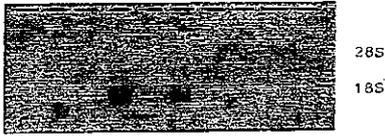


【 図 4 】

FIG. 4

ヒト乳がん細胞株における VEGF2 の発現

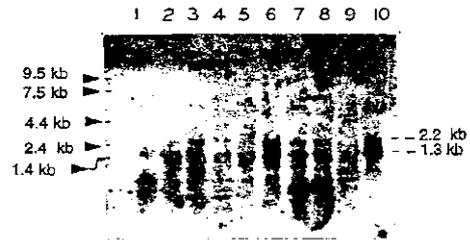
1 2 3 4 5 6 7 8 9



- 1. 正常乳皮
- 2. 乳がん
- 3-9. 乳がん細胞株

【 図 5 】

FIG. 5



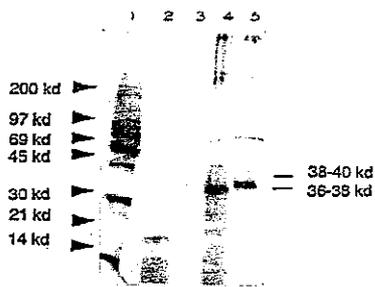
- |    |    |     |     |
|----|----|-----|-----|
| 1. | 脳  | 6.  | 肺   |
| 2. | 精巣 | 7.  | 脾臓  |
| 3. | 胆嚢 | 8.  | 前立腺 |
| 4. | 腎臓 | 9.  | 海馬  |
| 5. | 肝臓 | 10. | 心臓  |

ヒト成人組織における VEGF2 mRNA の発現

【 図 6 】

FIG. 6

VEGF2 タンパク質のインビトロ転写/翻訳



- レーン 1: 14-C カクダリンボ- M.W. マーカー
- レーン 2: FGF コントロール
- レーン 3: VEGF2 (M13- 逆方向) 対して正方向 (プライマー)
- レーン 4: VEGF2 (M13- 逆方向) 対して VEGF-F4 (プライマー)
- レーン 5: VEGF2 (M13- 逆方向) 対して VEGF-F5 (プライマー)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 14/485	A 6 1 P 43/00	1 0 7
C 0 7 K 16/24	C 0 7 K 14/485	
	C 0 7 K 16/24	
	A 6 1 K 37/02	

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ジン - シャン ヒュー

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 リャン カオ

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 7 6, ジャーマンタウン, ウォーターバリー ウェイ  
1 1 4 3 0

(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 5 0, レイトンスビル, ローリング ヒル ロード  
2 2 4 0 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 BA44 CA01 GA11 HA20

4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01 BA02 BA08 BA18 BA20 BA22

BA23 CA53 NA14 ZA36 ZA89 ZB22

4C085 AA13 AA14 BB11 DD61 EE01 HH20 KA03 KA04

4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA20 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	血管内皮细胞增殖因子2		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004000267A</a>	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2003291861	申请日	2003-08-11
[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Jinommu科学公司		
[标]发明人	ジンシャンヒュー リャンカオ クレイグエイローゼン		
发明人	ジン-シャン ヒュー リャン カオ クレイグ エイ. ローゼン		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61K38/27 A61K38/55 A61K39/00 A61K39/235 A61K39/395 A61K48/00 A61K49/00 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/14 A61P17/02 A61P17/06 A61P27/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07H21/00 C07H21/04 C07K14/475 C07K14/485 C07K14/52 C07K16/18 C07K16/24 C12N11/19 C12N11/21 C12N5/10 C12N15/12 C12N15/18 C12N15/63 C12P21/02 C12P21/08 G01N33 /53		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/14 A61P17/02 A61P17/06 A61P27/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/52 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61K49/00.A A61P3/10 A61P9/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P27/02 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P43/00.107 C07K14 /485 C07K16/24 A61K37/02 A61K38/00 A61K38/02 A61K38/03 A61K38/10 A61K38/14 A61K38/16 A61K49/00 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA20 4C084 /AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA20 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA36 4C084/ZA89 4C084 /ZB22 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD61 4C085/EE01 4C085/HH20 4C085/KA03 4C085/KA04 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA20 4H045/EA28 4H045 /EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	08/207550 1994-03-08 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种新鉴定的多核苷酸，由该多核苷酸编码的多肽，该多核苷酸和多肽的用途以及该多核苷酸和多肽的用途。生产。本发明还旨在抑制此类多肽的作用。本发明具有VEGF2多肽，其具有图1推导的氨基酸序列或该多肽的活性片段，类似物或衍生物；具有由ATCC保藏号75698中包含的cDNA编码的氨基酸序列。提供了分离的编码VEGF2的多核苷酸，其选自编码VEGF2多肽的多核苷酸或所述多肽的活性片段，类似物或衍生物。 [选择图]无

