

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2002 - 542825**

(P2002 - 542825A)

(43)公表日 平成14年12月17日(2002.12.17)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 1/02	4 B 0 6 3
45/00		1/04	4 B 0 6 4
A 6 1 P 1/02		1/16	4 B 0 6 5
1/04		3/10	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全193数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 615760(P2000 - 615760)

(86)(22)出願日 平成12年5月3日(2000.5.3)

(85)翻訳文提出日 平成13年11月5日(2001.11.5)

(86)国際出願番号 PCT/US00/40047

(87)国際公開番号 W000/66736

(87)国際公開日 平成12年11月9日(2000.11.9)

(31)優先権主張番号 09/304,216

(32)優先日 平成11年5月3日(1999.5.3)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/164,463

(32)優先日 平成11年11月10日(1999.11.10)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ザイモジェネティクス, インコーポレイテ  
イド  
アメリカ合衆国,ワシントン 98102,シアト  
ル,イーストレイク アベニュー イースト  
1201

(72)発明者 ギルバート, テレサ  
アメリカ合衆国,ワシントン 98002,シアト  
ル,トゥエルフス ストリート サウスイー  
スト 246

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 増殖因子同族体 Z V E G F 4

(57)【要約】

ポリペプチド増殖因子、それらの製造方法、それらをコードするポリヌクレオチド、それらに対する抗体およびそれらの使用方法が開示される。ポリペプチドは、配列番号2の残基52~179または配列番号2の残基258~370と少なくとも70%同一であるアミノ酸セグメントを含む。ポリペプチドの多量体も開示される。ポリペプチド、多量体タンパク質およびポリヌクレオチドは、細胞培地の構成成分として、ならびに診断薬として、細胞および組織発達の研究および調節に用いられ得る。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 配列番号2のタンパク質のエピトープ担持部分を含む少なくとも15のアミノ酸残基の単離されたポリペプチド。

【請求項2】 前記ポリペプチドが、

(a) 配列番号2の残基52~179; および

(b) 配列番号2の残基258~370;

から成る群から選択される配列と少なくとも70%同一であるセグメントを含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】 前記ポリペプチドが、

配列番号2の残基19~179;

配列番号2の残基52~179;

配列番号2の残基19~253;

配列番号2の残基52~253;

配列番号2の残基19~255;

配列番号2の残基52~255;

配列番号2の残基19~257;

配列番号2の残基52~257;

配列番号2の残基19~253;

配列番号2の残基52~253;

配列番号2の残基19~370;

配列番号2の残基52~370;

配列番号2の残基180~370; および

配列番号2の残基258~370

から成る群から選択される請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項4】 式  $R_1 - R_2 - R_3$

(式中、 $R_1$ は長さ100~130残基のポリペプチドであり、配列番号2の残基52~179と少なくとも70%同一であり、そして配列番号2の残基109~131に対応する配列モチーフC[KR]Y[DNE][WYF]X{11,15}G[KR][WYF]C(配列番号4)を含み、

$R_2$ は、配列番号2の残基180~257と少なくとも90%同一であるポリペプ

チドであり、

R 3 は配列番号 2 の残基258～370とアミノ酸配列と少なくとも70%同一であるポリペプチドであり、そして配列番号 2 の残基272、302、306、318、360および362に対応する位置にシステイン残基を、配列番号 2 の残基304に対応する位置にグリシン残基を、そして配列番号 2 の残基272～362に対応する配列モチーフ  $CX\{18,33\}CXGXCX\{6,33\}CX\{20,50\}CXC$  (配列番号 3) を含み、

x、y および z は各々別々に 0 または 1 であり、以下の制限：

x および z の少なくとも一方は 1 であり、そして

x および z が各々 1 である場合には、y は 1 である、

を受ける)

のアミノ酸の配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 5】 x = 1 である請求項 4 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 6】 R 1 が配列番号 2 に記載の残基52～179と少なくとも90%同一である請求項 5 の単離されたポリペプチド。

【請求項 7】 R 1 が配列番号 2 に記載の残基52～179を含む請求項 5 の単離されたポリペプチド。

【請求項 8】 R 1 が配列番号 2 の残基19～179と少なくとも90%同一である請求項 5 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 9】 y = 1 である請求項 5 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 10】 z = 1 である請求項 9 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 11】 R 3 が配列番号 2 の残基258～370と少なくとも90%同一である請求項 10 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 12】 前記ポリペプチドが配列番号 2 の残基52～253、配列番号 2 の残基180～370または配列番号 2 の残基52～370を含む請求項 4 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 13】 z = 1 である請求項 4 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 14】 R 3 が配列番号 2 の残基258～370と少なくとも90%同一である請求項 13 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 15】 R 3 が配列番号 2 の残基258～370を含む請求項 13 に記載

の単離されたポリペプチド。

【請求項16】  $y = 1$ である請求項13に記載の単離されたポリペプチド

。

【請求項17】  $x = 1$ であり、そしてR1が配列番号2の残基52~179と少なくとも90%同一である請求項16に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項18】 R3が配列番号2の残基258~370と少なくとも90%同一である請求項17に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項19】 配列番号2の残基308~316に対応する位置にシステイン残基をさらに含む請求項13に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項20】 アフィニティータグをさらに含む請求項4に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項21】 免疫グロブリン定常ドメインをさらに含む請求項4に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項22】 二次ポリペプチドと作用可能に連結された一次ポリペプチドを含む単離されたタンパク質であって、前記一次ポリペプチドが式  $R_1_x - R_2_y - R_3_z$

(式中、R1は長さ100~130残基のポリペプチドであり、配列番号2の残基52~179と少なくとも70%同一であり、そして配列番号2の残基109~131に対応する配列モチーフC[KR]Y[DNE][WYF]X{11,15}G[KR][WYF]C(配列番号4)を含み、

R2は、配列番号2の残基180~257と少なくとも90%同一であるポリペプチドであり、

R3は配列番号2の残基258~370とアミノ酸配列と少なくとも70%同一であるポリペプチドであり、そして配列番号2の残基272、302、306、318、360および362に対応する位置にシステイン残基を、配列番号2の残基304に対応する位置にグリシン残基を、そして配列番号2の残基272~362に対応する配列モチーフCX{25,33}CXGXCX{10,33}CX{20,50}CXC(配列番号3)を含み、

$x$ 、 $y$ および $z$ は各々別々に0または1であり、以下の制限：

$x$ および $z$ の少なくとも一方は1であり、そして

$x$ および $z$ が各々1である場合には、 $y$ は1である、

を受ける)

のアミノ酸の配列を含み、そして前記タンパク質が細胞増殖、アポトーシス、分化、代謝または移動を調整する単離されたタンパク質。

【請求項23】 前記タンパク質がヘテロ二量体である請求項22に記載の単離されたタンパク質。

【請求項24】  $z$ が1であり、そして前記二次ポリペプチドがVEGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、 $zvegf3$ 、PDGF-AおよびPDGF-Bから成る群から選択される請求項23に記載の単離されたタンパク質。

【請求項25】  $x = 1$ 、 $z = 1$ であり、前記二次ポリペプチドが配列番号32の残基46~345を含み、

$x = 1$ であり、前記二次ポリペプチドが配列番号32の残基46~170を含み、

$z = 1$ であり、前記二次ポリペプチドが配列番号32の残基235~345を含む請求項23に記載の単離されたタンパク質。

【請求項26】 前記タンパク質がホモ二量体である請求項22に記載の単離されたタンパク質。

【請求項27】  $z = 1$ である請求項26に記載の単離されたタンパク質。

【請求項28】 前記一次および二次ポリペプチドの各々が配列番号2の残基258~370を含む請求項27に記載の単離されたタンパク質。

【請求項29】  $x = 1$ である請求項26に記載の単離タンパク質。

【請求項30】 前記一次および二次ポリペプチドが配列番号2の残基52~179を含む請求項29に記載の単離されたタンパク質。

【請求項31】 以下の：

(a) 以下の作用可能に連結された要素：

転写プロモーター、

以下の：

i) 配列番号2の残基52~370、

ii) 配列番号2の残基52~253、

iii) 配列番号2の残基180~370、および

i v ) 配列番号 2 の残基258 ~ 370

から成る群から選択されるアミノ酸残基の配列を含むポリペプチドをコードするDNAセグメント、

転写ターミネーター、

を含む発現ベクターを含有する宿主細胞をDNAセグメントが発現される条件下で培養し、

( b ) DNA構築物の発現のタンパク質産物を細胞から回収する、過程を包含する方法により産生される単離されたタンパク質。

【請求項 3 2】 長さが約4.4 Kbまでの単離されたポリヌクレオチドであって、式  $R_1^x - R_2^y - R_3^z$

( 式中、  $R_1$  は長さ100 ~ 130残基のポリペプチドであり、配列番号 2 の残基52 ~ 179と少なくとも70%同一であり、そして配列番号 2 の残基109 ~ 131に対応する配列モチーフC[KR]Y[DNE][WYF]X{11,15}G[KR][WYF]C ( 配列番号 4 ) を含み、

$R_2$  は、配列番号 2 の残基180 ~ 257と少なくとも90%同一であるポリペプチドであり、

$R_3$  は配列番号 2 の残基258 ~ 370とアミノ酸配列が少なくとも70%同一であるポリペプチドであり、そして配列番号 2 の残基272、302、306、318、360および362に対応する位置にシステイン残基を、配列番号 2 の残基304に対応する位置にグリシン残基を、そして配列番号 2 の残基272 ~ 362に対応する配列モチーフCX{25,33}CXGXCX{10,33}CX{20,50}CXC ( 配列番号 3 ) を含み、

x、y および z は各々別々に 0 または 1 であり、以下の制限：

x および z の少なくとも一方は 1 であり、そして

x および z が各々 1 である場合には、y は 1 である、

を受ける)

のアミノ酸の配列を含むポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 3 3】 DNAである請求項 3 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 4】 配列番号 6 のヌクレオチド1 ~ 1110を含む請求項 3 3 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 5】 配列番号 1 のヌクレオチド226 ~ 1335を含む請求項 3 3 に

記載のポリヌクレオチド。

【請求項36】 以下の作用可能に連結された要素：

転写プロモーター、

請求項32に記載のDNAポリヌクレオチド、および

転写ターミネーター、

を含む発現ベクター。

【請求項37】 DNAポリヌクレオチドに作用可能に連結された分泌シグナル配列をさらに含む請求項36に記載の発現ベクター。

【請求項38】 請求項36に記載の発現ベクターを導入された培養細胞であって、DNAポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを発現する細胞。

【請求項39】 請求項22に記載のタンパク質を製薬上許容可能なビヒクルと組合せて含む製剤組成物。

【請求項40】  $x = 1$ である請求項39の製剤組成物。

【請求項41】  $z = 1$ である請求項39の製剤組成物。

【請求項42】 請求項36の発現ベクターを導入された細胞であって、DNAセグメントによりコードされるポリペプチドを発現する細胞を培養し、そして

発現タンパク質を回収する

過程を包含するタンパク質の製造方法。

【請求項43】 請求項4に記載のポリペプチドのエピトープと特異的に結合する抗体。

【請求項44】 モノクローナル抗体である請求項43に記載の抗体。

【請求項45】 一本鎖抗体である請求項43に記載の抗体。

【請求項46】 レポーター分子に作用可能に連結された請求項43に記載の抗体。

【請求項47】 患者における遺伝子異常の検出方法であって、

患者から遺伝子試料を得て、

配列番号1または配列番号1の相補体の少なくとも14連続ヌクレオチドを含む

ポリヌクレオチドとともに、遺伝子試料を、前記ポリヌクレオチドが相補的ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズして一次反応産物を生成する条件下でインキュベートし、

前記一次反応産物を対照反応産物と比較するが、この場合、前記一次反応産物および前記対照反応産物間の差が患者の遺伝子異常を示す、過程を包含する方法。

【請求項48】 配列番号2の残基258～370に作用可能に連結された配列番号33の残基46～234、

配列番号2の残基180～370に作用可能に連結された配列番号33の残基46～170、

配列番号33の残基235～345に作用可能に連結された配列番号2の残基52～257、

配列番号33の残基171～345に作用可能に連結された配列番号2の残基52～179、

から成る群から選択される配列を含むポリペプチド。

【請求項49】 細胞表面PDGF受容体の活性化方法であって、請求項1～31のいずれか1項に記載のポリペプチドまたはタンパク質に細胞表面PDGF受容体を含む細胞を曝露し、それによりポリペプチドまたはタンパク質が受容体と結合しそれを活性化する方法。

【請求項50】 受容体がPDGF受容体である請求項49に記載の方法。

【請求項51】 受容体がPDGF受容体である請求項49に記載の方法。

【請求項52】 PDGF受容体媒介性細胞過程の抑制方法であって、受容体との請求項1～31のいずれか1項に記載のポリペプチドまたはタンパク質の結合を抑制する化合物に細胞表面PDGF受容体を含む細胞を曝露することを包含する方法。

【請求項53】 骨組織の増殖の刺激方法であって、増殖刺激量の請求項1～31のいずれか1項に記載のポリペプチドまたはタンパク質を骨に適用するこ

とを包含する方法。

【請求項54】 骨細胞の増殖、分化、移動または代謝の調整方法であって、有効量の請求項1～31のいずれかのポリペプチドまたはタンパク質に骨細胞を曝露することを包含する方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

## 発明の背景

多細胞動物においては、細胞の増殖、分化および移動は、ポリペプチド増殖因子により制御される。これらの増殖因子は、正常発達および疾病の成り立ち、例えば固形腫瘍の発達の両方において一役を演じる。

ポリペプチド増殖因子は、その多くがチロシンキナーゼである細胞表面受容体との結合により細胞事象に影響を及ぼす。結合は、シグナリング事象の連鎖を開始し、これが最後に表現型変化、例えば細胞分裂、プロテアーゼ産生および細胞移動を引き起こす。

**【0002】**

増殖因子は、構造類似性に基づいてファミリーに分類され得る。このようなファミリーの1つであるPDGF（血小板由来増殖因子）は、ジスルフィド結合により安定化される二量体構造を特徴とする。このファミリーには、PDGF、胎盤増殖因子（PlGF）および血管内皮細胞増殖因子（VEGF）が含まれる。これらのタンパク質の個々のポリペプチド鎖は、システイン残基対間のジスルフィド結合により形成されるシスチンノットについて蝶ネクタイ様形状を有する特徴的高次構造を形成する。

**【0003】**

ループ間の疎水性相互作用は、2つの単量体の二量体化に寄与する（Daopin et al., Science 257:369, 1992; Lapthon et al., Nature 369:455, 1994参照）。このファミリーの成員は、ホモ二量体およびヘテロ二量体としてともに活性である（例えば、Heldin et al., EMBO J. 7:1387-1393, 1988; Cao et al., J. Biol. Chem. 271:3154-3162, 1996参照）。シスチンノットモチーフおよび「蝶ネクタイ」折り畳みは、増殖因子トランスフォーミング増殖因子 - （TGF - ）および神経成長因子（NGF）、ならびに糖タンパク質ホルモンの特徴を示す。それらのアミノ酸配列は非常に異なるが、しかし、これらのタンパク質はすべて、シスチンノットの6つの保存システイン残基を含有する。

**【0004】**

5つの血管内皮増殖因子が同定されている：血管透過性因子としても既知のV E G F (Dvorak et al., Am. J. Pathol. 146:1029-1039, 1995) ; V E G F - B (Olofsson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2567-2581, 1996; Hayward et al., WIPO Publication WO 96/27007) ; V E G F - C (Joukov et al., EMBO J. 15:290-298, 1996) ; V E G F - D (Oliviero, WO 97/12972; Achen et al., WO 98/07832) および *z v e g f 3* (配列番号32および33; 同時係属中米国特許出願60/111,173、60/142,576および60/161,653)。5つのV E G F ポリペプチド(121、145、165、189および206アミノ酸)は、V E G F m R N Aの代替的スプライシングから生じる。

#### 【0005】

V E G Fは、新血管形成として知られている過程による血管系の発達を刺激するが、この場合、血管内皮細胞は細胞周期に再加入し、下層にある基底膜を退化させ、移動して新規の毛管芽を形成する。次にこれらの細胞は分化し、成熟血管が形成される。この成長および分化過程は、プロ血管新生促進因子および抗血管新生促進因子の平衡により調節される。新血管形成は、組織の正常形成および修復の中心であり、胚発生および創傷治癒において起こる。新血管形成は、ある種の疾患、例えば固形腫瘍、慢性関節リウマチ、糖尿病性網膜症、黄斑変性およびアテローム硬化症の発症における一因子でもある。

#### 【0006】

脊椎動物および無脊椎動物からの多数のタンパク質が、ニューロン発達に影響を及ぼすと同定されている。それらの分子の中でも、ニューロピリンファミリーおよびセマフォリン/コラプシンファミリーの成員である。

V E G Fに関する3つの受容体が同定されている：K D R / F l k - 1 (Matthews et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9026-9030, 1991)、F l t - 1 (de Vries et al., Science 255:989-991, 1992) およびニューロピリン - 1 (Soker et al., Cell 92:735-745, 1998)。ニューロピリンは、P l G F - 2に関する受容体でもある (Migdal et al., J. Biol. Chem. 273:22272-22278, 1998)。

#### 【0007】

ニューロピリン - 1 は、アフリカツメガエルのオタマジャクシの神経組織で最初に、そしてニワトリ、マウスおよびヒトで同定された細胞表面糖タンパク質である。ニューロピリン - 1 の一次構造は、これらの脊椎動物種の間で高度に保存される。ニューロピリン - 1 は、セマフォリン III (Kolodkin et al., Cell 90:753-762, 1997)、セマSemaEおよびセマIV (Chen et al., Neuron 19:547-559, 1997) を含めたセマフォリンファミリーの種々の成員に関する受容体であることが実証されている。種々の活性は、そのリガンドとのニューロピリン - 1 の結合に関連している。

#### 【0008】

例えば、ニューロピリン - 1 とのセマフォリン III の結合は、ニューロン成長錐体崩壊およびin vitroでの神経突起の相反を誘導し得る (Kitsukawa et al., Neuron 19: 995-1005, 1997)。トランスジェニックマウスを用いた実験は、心臓血管系、神経系および四肢の発達におけるニューロピリン - 1 の関与を示す (例えば、Kitsukawa et al., Development 121:4309-4318, 1995; およびTakasima et al., American Heart Association 1998 Meeting, Abstract #3178参照)。

#### 【0009】

セマフォリンは、約500アミノ酸の限定セマフォリンドメインを共有する分子の大ファミリーである。二量化は、機能的活性のために重要であると考えられる (Klostermann et al., J. Biol. Chem. 273:7326-7331, 1998)。軸索ガイダンスタンパク質のセマフォリンファミリーうちの最初に同定された脊椎動物成員であるコラプシン - 1 は、崩壊活性に必要な二量体化に伴い、共有二量体を構成することも示されている (Koppel et al., J. Biol. Chem. 273:15708-15713, 1998)。セマフォリン III は、増殖クローン崩壊および神経突起の化学相反の調節にin vitroに関連した。

#### 【0010】

セマフォリンは、感覚求心性神経支配、骨格および心臓発達 (Fehar et al., Nature 383:525-528, 1996)、サイトカインの阻害を介した免疫抑制 (Mangasser-Stephan et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 234:153-156, 1997) ならび

にB細胞凝集および分化の促進 (Hall et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11780-11785, 1996) を含めた種々の発達作用に關与することが示されている。CD100は、多数のT細胞リンパ腫において発現されることも示されており、悪性T細胞新生物のマーカーであり得る (Dorfman et al., Am. J. Pathol. 153:255-262, 1998)。マウスセマフォリン遺伝子M - s e m a Hの転写は、マウス主要細胞株の転移能力と相関する (Christensen et al., Cancer Res. 58:1238-1244, 1998)。

#### 【0011】

細胞過程の制御における増殖因子、その他の調節分子およびそれらの受容体の役割により、それらは療法的介入のための有望な候補および標的となり得る。例えば血小板由来増殖因子は、歯周病 (米国特許第5,124,316号)、胃腸性潰瘍 (米国特許第5,234,908号) および皮膚潰瘍 (Robson et al., Lancet 339:23-25, 1992) の治療に關して開示されている。PDGF受容体活性の抑制は、損傷ヒト動脈における内膜過形成を低減することが示されている (Giese et al., Restenosis Summit VIII, Poster Session #23, 1996; 米国特許第5,620,687号)。

#### 【0012】

PDGFは、骨細胞複製を刺激し (Canalis et al., Endocrinology and Metabolism Clinics of North America 18:903-918, 1989 により検討されている)、骨細胞によるコラーゲンの産生を刺激し (Centrella et al., Endocrinology 125:13-19, 1989)、そして歯周組織の再生に有用である (米国特許第5,124,316号; Lynch et al., J. Clin. Periodontol. 16:545-548, 1989) ことも示されている。

#### 【0013】

血管内皮増殖因子 (VEGF) は、虚血性四肢における血管の成長を促進することが示されており (Isner et al., The Lancet 348:370-374, 1996)、歯周病の治療のための、血管移植手術における内皮化を促進するためのそして心筋梗塞後の側副循環を促すための創傷治癒薬としての使用が提唱されている (WIPO公告 WO 95/24473; 米国特許第5,219,739号)。VEGFは、培養中の血管内皮細胞の増殖を促すためにも有用である。可溶性VEGF受容体 (可溶性f i t - 1) は

、細胞表面受容体とのVEGFの結合を遮断し、in vitroでの血管組織の増殖を抑制するということが判明している (Biotechnology News 16 (17) :5-6, 1996)。

#### 【0014】

ポリペプチド増殖因子の立証済み臨床的実用性の点からみて、治療薬、診断薬および研究道具および試薬として用いるためのさらなるこのような分子に対する必要性が当業界には存在する。

本発明は、本明細書中の教示から当業者には明らかであるこれらのおよびその他の使用のためのこのようなポリペプチドを提供する。

#### 【0015】

##### 発明の説明

本発明は、配列番号2のタンパク質のエピトープ担持部分を含む少なくとも15のアミノ酸残基の単離ポリペプチドを提供する。ある種の実施態様内では、ポリペプチドは、配列番号2の残基52~179または配列番号2の残基258~370と少なくとも70%同一であるセグメントを含む。その他の実施態様内では、ポリペプチドは、配列番号2の残基19~179、配列番号2の残基52~179、配列番号2の残基19~257、配列番号2の残基52~257、配列番号2の残基19~253、配列番号2の残基52~253、配列番号2の残基19~370、配列番号2の残基52~370、配列番号2の残基258~370および配列番号2の残基180~370から成る群から選択される。

#### 【0016】

本発明は、式  $R_1_x - R_2_y - R_3_z$  (式中、 $R_1$  は長さ100~130残基のポリペプチドであり、配列番号2の残基52~179と少なくとも70%同一であり、そして配列番号2の残基109~131に対応する配列モチーフ  $C[KR]Y[DNE][WYF]X\{11,15\}G[KR][WYF]C$  (配列番号4) を含み、 $R_2$  は、配列番号2の残基180~257と少なくとも90%同一であるポリペプチドであり、 $R_3$  は配列番号2の残基258~370とアミノ酸配列が少なくとも70%同一であるポリペプチドであり、そして配列番号2の残基272、302、306、318、360および362に対応する位置にシステイン残基を、配列番号2の残基304に対応する位置にグリシン残基を、ならびに配列番号2の残基272~362に対応する配列モチーフ  $CX\{18,33\}CXGX\{6,33\}CX\{20,50\}CXC$  (配

列番号3)を含み、 $x$ 、 $y$ および $z$ は各々別々に0または1であって、 $x$ および $z$ の少なくとも一方は1であり、そして $x$ が各々1である場合には、 $y$ は1であるという制限を受ける)のアミノ酸の配列を含む単離ポリペプチドも提供する。

【0017】

したがって、(a)  $x = 1$ 、(b)  $z = 1$ および(c)  $x = 1$ および $z = 1$ である本明細書中に開示した式の単離ポリペプチドが提供される。ある種の実施態様内では、 $x = 1$ であり、R1は配列番号2の残基52~179または配列番号2の残基19~179と少なくとも90%同一である。関連実施態様内では、 $x = 1$ であり、R1は配列番号2の残基52~179を含む。その他の実施態様内では、 $z = 1$ であり、そしてR3は配列番号2の残基258~370と少なくとも90%同一であるか、またはR3は配列番号2の残基258~370を含む。

【0018】

その他の実施態様内では、 $x = 1$ 、 $z = 1$ であり、そしてR3は配列番号2の残基258~370と少なくとも90%同一であり、ならびに $x = 1$ 、および $z = 1$ で、R1は配列番号2の残基52~179と少なくとも90%同一であり、ならびにR2は配列番号2の残基180~257と少なくとも90%同一である。さらに別の実施態様内では、 $x = 1$ 、 $z = 1$ であり、そしてポリペプチドは配列番号2の残基19~370または配列番号2の残基52~370を含む。単離ポリペプチドは、配列番号2の残基308~316に対応する位置にシステイン残基をさらに含み得る。その他の実施態様内では、単離ポリペプチドは、アフィニティータグをさらに含む。関連実施態様内では、単離ポリペプチドは、免疫グロブリン定常ドメインを含む。

【0019】

本発明は、二次ポリペプチドと作用可能に連結された一次ポリペプチドであって、本明細書中に開示したような式 $R_1_x - R_2_y - R_3_z$ のアミノ酸配列を含む一次ポリペプチドを含む単離タンパク質も提供する。タンパク質は、細胞増殖、アポトーシス、分化、代謝または移動を調整する。一実施態様内では、タンパク質はヘテロ二量体である。関連実施態様内では、二次ポリペプチドは、VEGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、 $z\text{ vegf }3$ (配列番号33)、P1GF、PDGF-AおよびPDGF-Bから成る群から選択される。その

他の関連実施態様内では、 $x = 1$ 、 $z = 1$ であり、そして二次ポリペプチドは配列番号33の残基46~345を含み、 $x = 1$ であり、そして二次ポリペプチドは配列番号33の残基46~170を含み、あるいは $z = 1$ であり、そして二次ポリペプチドは配列番号33の残基235~345を含む。

#### 【0020】

別の実施態様内では、タンパク質はホモ二量体である。

(a)以下の作用可能に連結された要素：転写プロモーター；i)配列番号2の残基52~370、ii)配列番号2の残基52~253、iii)配列番号2の残基180~370、およびiv)配列番号2の残基258~370から成る群から選択されるアミノ酸残基の配列を含むポリペプチドをコードするDNAセグメント；転写ターミネーターを含む発現ベクターを含有する宿主細胞をDNAセグメントが発現される条件下で培養し、そして(b)DNA構築物の発現のタンパク質産物を細胞から回収する過程を包含する方法により産生される単離タンパク質も提供される。

本発明の別の局面内では、長さが約4.4 Kbまでの単離ポリヌクレオチドであって、前記に開示したようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。本発明の一実施態様内では、ポリヌクレオチドはDNAである。

#### 【0021】

本発明のさらに別の局面内では、以下の作用可能に連結された要素：(a)転写プロモーター、(b)本明細書中に開示したようなDNAポリヌクレオチド、および(c)転写ターミネーターを含む発現ベクターが提供される。ベクターは、DNAポリヌクレオチドに作用可能に連結される分泌シグナル配列をさらに含み得る。

本明細書中に開示した発現ベクターを導入された培養細胞であって、DNAポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを発現する細胞も本発明により提供される。培養細胞は、細胞を培養し、そして発現ポリペプチドを回収することを包含するポリペプチドの製造方法内で用いられ得る。

#### 【0022】

本明細書中で提供されるタンパク質は、製薬上許容可能なビヒクルと組み合わせられて、製剤組成物を提供し得る。

本発明は、本明細書中に開示したポリペプチドのエピトープと特異的に結合する抗体も提供する。本発明の抗体は、中でもモノクローナル抗体および一本鎖抗体を含み、レポーター分子に連結され得る。

【0023】

本発明は、患者における遺伝子異常の検出方法であって、(a)患者から遺伝子試料を得て、(b)配列番号1または配列番号1の相補体の少なくとも14連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドとともに遺伝子試料を、ポリヌクレオチドが相補的ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズして一次反応産物を生成する条件下でインキュベートし、そして(c)一次反応産物を対照反応産物と比較するが、この場合、一次反応産物および対照反応産物間の差が患者の遺伝子異常を示す過程を包含する方法をさらに提供する。

【0024】

本発明は、配列番号2の残基258~370に作用可能に連結された配列番号33の残基46~234、配列番号2の残基180~370に作用可能に連結された配列番号33の残基46~170、配列番号33の残基235~345に作用可能に連結された配列番号2の残基52~257、および配列番号33の残基171~345に作用可能に連結された配列番号2の残基52~179から成る群から選択される配列を含むポリペプチドも提供する。

【0025】

本発明は、細胞表面PDGF受容体の活性化方法であって、本明細書中に開示したポリペプチドまたはタンパク質に細胞表面PDGF受容体を含む細胞を曝露し、それによりポリペプチドまたはタンパク質が受容体と結合し受容体を活性化する方法も提供する。

本発明は、PDGF受容体媒介性細胞過程の抑制方法であって、受容体との本明細書中に開示したポリペプチドまたはタンパク質の結合を抑制する化合物に細胞表面PDGF受容体を含む細胞を曝露することを包含する方法も提供する。

本発明は、骨組織の増殖の刺激方法であって、増殖刺激量の本明細書中に開示したポリペプチドまたはタンパク質を骨に適用することを包含する方法も提供する。

## 【0026】

本発明は、骨細胞の増殖、分化、移動または代謝の調整方法であって、有効量の本明細書中に開示したポリペプチドまたはタンパク質に骨細胞を曝露することを包含する方法も提供する。

本発明のこれらのおよびその他の局面は、以下の本発明の詳細な説明および添付の図面を参照すれば明らかになる。

## 【0027】

「親和性タグ」という用語は、二次ポリペプチドの精製または検出を提供するために、あるいは二次ポリペプチドの基質との結合のための部位を提供するために二次ポリペプチドに取り付けられ得るポリペプチドセグメントを示すために本明細書中で用いられる。主に、抗体またはその他の特異的結合物質が利用可能である任意のペプチドまたはタンパク質が親和性タグとして用いられ得る。

## 【0028】

親和性タグとしては、ポリヒスチジン索、プロテインA (Nilsson et al., EMBO J.4:1075, 1985; Nilsson et al., Methods Enzymol. 198:3, 1991)、グルタチオンSトランスフェラーゼ (Smith and Johnson, Gene 67:31, 1988)、マルトース結合タンパク質 (Kellerman and Ferenci, Methods Enzymol. 90:459-463, 1982; Guan et al., Gene 67:21-30, 1987)、Glu-Glu親和性タグ (Grussenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952-4, 1985; 配列番号5参照)、サブスタンスP、フラッグ<sup>TM</sup>ペプチド (Hopp. et al., Biotechnology 6:1204-10, 1988)、ストレプトアビジン結合ペプチド、チオレドキシン、ユビキチン、セルロース結合タンパク質、T7ポリメラーゼ、あるいはその他の抗原性エピトープまたは結合ドメインが挙げられる (全般に、Ford et al., Protein Expression and Purification 2:95-107, 1991参照)。DNAコード親和性タグおよびその他の試薬は、商業的供給元 (例えば、Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; New England Biolabs, Beverly, MA; およびEastman Kodak, New Haven, CT) から入手可能である。

## 【0029】

「対立遺伝子変異体」という用語は、同一染色体遺伝子座を占める遺伝子の任

意の2つまたはそれ以上の代替的形態を示すために本明細書中で用いられる。対立遺伝子変異は、突然変異により天然に起こり、集団内に表現型多型性を生じ得る。遺伝子突然変異は無症候性である(コード化ポリペプチドに変化なし)か、またはアミノ酸配列変化を有するポリペプチドをコードし得る。対立遺伝子変異体という用語は、遺伝子の対立遺伝子変異体によりコードされるタンパク質を意味するためにも本明細書中で用いられる。

#### 【0030】

「アミノ末端」および「カルボキシル末端」という用語は、ポリペプチド内の位置を示すために本明細書中で用いられる。状況が許す場合には、これらの用語は、近接または相対的位置を示すためにポリペプチドの特定の配列または位置に関連して用いられる。例えば、ポリペプチド内の参照配列に対してカルボキシル末端に位置するある配列は、参照配列のカルボキシル末端に近位に置かれるが、しかし必ずしも完全ポリペプチドのカルボキシル末端ではない。

#### 【0031】

「 $\phi$ -鎖様領域」とは、ポリペプチド主鎖二面角ファイ( )およびブサイ( )のある種の組合せにより特性化されるタンパク質の領域である。  $\phi$ が $-60^\circ$ 未満であり、  $\psi$ が $90^\circ$ より大きい領域は、 $\phi$ -鎖様である。鎖の限界はやや不明確であり、それらを限定するために用いられる判定規準に伴って変わり得る、と当業者は認識する(例えば、Richardson and Richardson in Fasman, ed., Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation, Plenum Press, New York, 1989;およびLesk, Protein Architecture: A Practical Approach, Oxford University Press, New York, 1991参照)。

#### 【0032】

ポリヌクレオチド分子の「相補体」という用語は、参照配列と比較した場合の、相補的塩基配列および逆配向を有するポリヌクレオチド分子である。例えば、配列5' ATGCACGGG3' は、5' CCCGTGCAT3' と相補的である。

「~に対応する」とは、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列に関連して用いられる場合、2つの配列が最適に整列される場合に参照位置と並列する二次配列中の位置を示す。

## 【0033】

「縮重ヌクレオチド配列」という用語は、1つ又はそれ以上の縮重コドンを含むヌクレオチドの配列を意味する（ポリペプチドをコードする参照ポリヌクレオチド分子と比較して）。縮重コドンは、ヌクレオチドの異なるトリプレットを含有するが、しかし同一アミノ酸残基をコードする（即ち、GAUおよびGACTトリプレットは各々Aspをコードする）。

## 【0034】

「発現ベクター」という用語は、その転写に備える付加的セグメントと作用可能に連結される当該ポリペプチドをコードするセグメントを包含する線状または環状のDNA分子を意味する。このような付加的セグメントはプロモーターおよびターミネーター配列を含み、そして1つ又はそれ以上の複製の起点、1つ又はそれ以上の選択可能マーカ、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル等も含み得る。発現ベクターは一般にプラスミドまたはウイルスDNAに由来するか、あるいは両方の素子を含有し得る。

## 【0035】

「単離された」という用語は、ポリヌクレオチドに適用される場合、ポリヌクレオチドがその天然遺伝子環境から除去された、したがって他の外来のまたは望ましくないコード配列を含有せず、遺伝子工学処理タンパク質産生系内で用いるのに適した形態であることを意味する。このような単離分子はそれらの天然環境から分離されるものであり、cDNAおよびゲノムクローンを含む。本発明の単離ポリヌクレオチド分子は、それらが普通では会合される他の遺伝子を含有しないが、しかし天然5'および3'非翻訳領域、例えばプロモーターおよびターミネーターを含み得る。会合領域の同定は、当業者には明らかである（例えば、Dy nan and Tijan, Nature 316:774-78, 1985参照）。

## 【0036】

「単離された」ポリペプチドまたはタンパク質は、その生来の環境以外の、例えば血液および動物組織とは別の条件中に見出されるポリペプチドまたはタンパク質である。位置実施態様内では、単離ポリペプチドまたはタンパク質は、他のポリペプチドまたはタンパク質、特に動物起源の他のポリペプチドまたはタンパ

ク質を実質的に含有しない。ポリペプチドまたはタンパク質は、高精製形態、即ち95%より高い純度の、さらに好ましくは99%より高い純度で提供され得る。この状況で用いられる場合、「単離された」という用語は、代替的物理的形態の、例えば二量体あるいはグリコシル化または誘導化形態の同一ポリペプチドまたはタンパク質の存在を排除しない。

【0037】

「モチーフ」とは、ある種のアミノ酸残基が必要とされるタンパク質配列中の一連のアミノ酸位置である。モチーフは、各々のこのような位置で考え得る残基組を限定する。

「作用可能に連結された」とは、それらがその意図された目的と共同して機能するよう、2つまたはそれ以上の存在物が一緒に連結されることを意味する。DNAセグメントに言及する場合、この語句は、例えば、コード配列が正しい読取枠で連結され、転写がプロモーターにおいて開始し、コードセグメント（単数または複数）を介してターミネーターに進行することを示す。ポリペプチドに言及する場合、「作用可能に連結される」という用語は、共有的に（例えばジスルフィド結合により）および非共有的に（例えば、水素結合、疎水性相互作用または塩架橋相互作用により）連結された配列の両方を含み、この場合、配列の所望の機能（単数または複数）は保持される。

【0038】

「オルトログ」という用語は、異なる種からのポリペプチドまたはタンパク質の機能的同等物であるある種から得られるポリペプチドまたはタンパク質を指す。オルトログ間の配列差は、種分化の結果である。

【0039】

「ポリヌクレオチド」とは、5'から3'末端まで読み取られるデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド塩基の一本または二本鎖ポリマーである。ポリヌクレオチドとしてはRNAおよびDNAが挙げられ、天然供給源から単離され、in vitroで合成されるか、または天然および合成分子の組合せから調製され得る。ポリペプチドのサイズは、塩基対（略号「bp」）、ヌクレオチド（「nt」）またはキロ塩基（「kb」）として表される。

## 【0040】

情況が許す場合、後者2つの用語は、一本鎖または二本鎖化されるポリヌクレオチドを説明し得る。用語が二本鎖分子に適用される場合、それは全長を意味するために用いられ、「塩基対」という用語と等価であると理解される。二本鎖ポリヌクレオチドの2本の鎖は長さがわずかに異なり、そしてその末端は酵素的切断の結果としてずれて並べられ、したがって二本鎖化ポリペプチド分子内のすべてのヌクレオチドが対合されるわけではない、と当業者に認識される。このような非対合化末端は、概して、長さが20 ntを超えない。

## 【0041】

「ポリペプチド」とは、天然に産生されたかまたは合成的に産生されたかにかかわらず、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基のポリマーである。約10アミノ酸残基未満のポリペプチドは、一般に「ペプチド」と呼ばれる。

「プロモーター」という用語は、RNAポリメラーゼの結合および転写の開始に備えるDNA配列を含有する遺伝子の一部を意味するためのその当業界認識意図に関して、本明細書中で用いられる。プロモーター配列は一般に遺伝子の5'非コード領域中に見出されるが、必ずというわけではない。

## 【0042】

「タンパク質」とは、1つ又はそれ以上のポリペプチド鎖を包含する高分子である。タンパク質は、非ペプチド構成成分、例えば炭水化物基も包含し得る。炭水化物およびその他の非ペプチド置換基は、タンパク質が産生される細胞によりタンパク質に付加され得るし、そして細胞の種類に伴って変わる。タンパク質は、それらのアミノ酸主鎖構造に関して本明細書中で定義される。炭水化物基のような置換基は一般に特定されないが、しかしそれでもなお存在し得る。

## 【0043】

「分泌シグナル配列」という用語は、大型ポリペプチドの一構成成分として、それが合成される細胞の分泌経路を介して大型ポリペプチドを指図するポリペプチド（「分泌ペプチド」）をコードするDNA配列である。大型ポリペプチドは一般に、切断されて、分泌経路を通過中に分泌ペプチドを除去する。

「セグメント」とは、特殊化属性を有する大型分子（例えば、ポリヌクレオチ

ドまたはポリペプチド)の一部である。例えば、特殊化ポリペプチドをコードするDNAセグメントは、5'から3'方向に読み取る場合に特殊化ポリペプチドのアミノ酸の配列をコードするプラスミドまたはプラスミド断片のような長いDNA分子の一部である。

#### 【0044】

不正確な分析法(例えばゲル電気泳動)により決定されるポリマーの分子量および長さは、およその値であると理解される。このような値が「約」Xまたは「およそ」Xとして表される場合、Xの記述された値は±20%の精度であると理解される。

本明細書中に引用された参考文献はすべて、その記載内容が参照により本明細書中に含まれる。

#### 【0045】

本発明は、増殖因子ドメインおよびCUBドメインを含むポリペプチドをコードする新規のDNA配列の発見に一部基づいている。増殖因子ドメインは、システイン残基と、PDGFファミリーの「シスチンノット」構造を特徴とする鎖との配置により特性化される。CUBドメインは、ニューロピリン(Takagi et al., Neuron 7:295-307, 1991; Soker et al., 同上)、ヒト骨形態形成タンパク質-1(Wozney et al., Science 242:1528-1534, 1988)、ブタ精液プラスマタンパク質およびウシ酸性精液流体タンパク質(Romero et al., Nat. Struct. Biol. 4:783-788, 1997)、ならびにアフリカツメガエル*X. laevis*トロイド様タンパク質(Lin et al., Dev. Growth Differ. 39:43-51, 1997)中のCUBドメインと配列相同を示す。この新規のDNAに対応するmRNAの組織分布の分析は、発現が成人ヒト組織中で一般的であることを示した。ポリペプチドは、増殖因子ドメインにおけるVEGFとのその相同性の点から見て、「zveg f 4」と呼ばれた。

#### 【0046】

zveg f 4配列およびその他の増殖因子とのその相同性に基づいた構造予測は、細胞の増殖、移動、分化または代謝を調整することにより器官発生を制御するよう組織に作用するホモ多量体またはヘテロ多量体をポリペプチド形成し得る

、ということを示唆する。実験的証拠は、これらの予測を支持する。z v e g f 4ヘテロ多量体は、V E G F、V E G F - B、V E G F - C、V E G F - D、z v e g f 3、P l G F (Maglione et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9267-9271, 1991)、P D G F - A (米国特許第4,899,919号 (Murray等) ; 米国特許第5,219,579号 (Heldin等) ) またはP D G F - B (Chiu et al., Cell 37:123-129, 1984; Johnsson et al., EMBO J. 3:921-928, 1984) を含めたP D G F / V E G Fファミリーのタンパク質の別の成員からのポリペプチドを含み得る。このファミリーのポリペプチドの成員は、器官発生および再生、発生後器官成長および器官保持、ならびに組織保持および修復過程を調節する。

#### 【0047】

これらの因子は、治療的処置が必要な病理学的過程、例えば癌、慢性関節リウマチ、糖尿病性網膜症、虚血性四肢疾患、末梢血管性疾患、心筋虚血、血管内膜過形成、アテローム硬化症および血管腫形成にも関与する。これらの病状を治療するために、P D G F / V E G Fファミリーのタンパク質の成員またはそれらのそれぞれの受容体を中和する化合物を開発することがしばしば必要となる。これは、中和抗体、小分子アンタゴニスト、受容体結合活性は保持するが、しかし活性を活性化する受容体を欠く修飾化形態の増殖因子、可溶性受容体 (受容体 - 免疫グロブリン融合タンパク質を含む) あるいはポリペプチド産生を遮断するアンチセンスまたはリボザイム分子の開発を含み得る。

#### 【0048】

代表的ヒトz v e g f 4ポリペプチド配列は、配列番号2で示され、そして代表的マウスz v e g f 4ポリペプチド配列は、配列番号53で示される。これらのポリペプチドをコードするDNAは、それぞれ配列番号1および52で示される。配列番号2で示されるアミノ酸配列の分析は、残基1~18が分泌ペプチドを形成することを示す。CUBドメインは、残基52から残基179まで延びる。ポリペプチド様配列は、残基180から、残基245、残基249または残基257まで延び、そのカルボキシル末端の4つの考え得る切断部位、残基245および残基249での一塩基部位、残基254~255での二塩基部位、ならびに残基254~257でのフェーリン様プロテアーゼのための標的部位を含む。

## 【0049】

バキュウロウイルス発現系で産生されるタンパク質は、残基250～259間の開裂を示し、ならびにより長い種は残基19および35でアミノ末端を有した。増殖因子ドメインは残基258から残基370まで延び、N末端に付加的残基を含み得る（例えば、このドメインは残基250～370または残基246～370を含み得る）。ドメイン境界はやや不明確であり、特定位置から±5残基まで変わると予測され得る、と当業者は認識する。プラスミンによる全長 z v e g f 4 の切断は、z v e g f 4 ポリペプチドの活性化を生じた。ウエスタン分析により、増殖因子ドメインとほぼ同サイズで移動する帯域が観察された。適合化非開裂化全長 z v e g f 4 試料は、活性化を実証しなかった。

## 【0050】

シグナルペプチド切断は、残基18(±3残基)後にヒト z v e g f 4 で起こると予測される。ヒトおよびマウス z v e g f 4 配列の比較においては、残基23および/または残基24後に、代替的シグナルペプチド切断部位が予測される。z v e g f 4 ポリペプチド鎖は切断されて複数の単量体種を生成する、ということはこの分析は示唆する。そのいくつかを表1に示す。ある種の宿主細胞では、L y s - 255後の切断は、残基254～255のその後の除去を生じると予測されるが、しかし残基255にカルボキシル末端を有するポリペプチドも調製され得る。L y s - 257後の切断は、残基257のその後の除去を生じると予測される。これらの切断部位は修飾されてタンパク質分解を防止し、したがって非切断化 z v e g f 4 ポリペプチドおよびそれらを含む多量体の産生を提供する。実際の切断パターンは、宿主細胞間で変わると予測される。

## 【0051】

## 【表1】

表 1

	<u>モノマー</u>	<u>残基(配列番号: 2)</u>
Cubドメイン		19-179
		35-179
		52-179
CUBドメイン+インタードメイン		19-257
		35-257
		52-257
		19-255
		35-255
		52-255
		19-253
		35-253
		52-253
		19-249
		35-249
		52-249
		19-245
	35-245	
	52-245	
Cubドメイン+インタードメイン領域+ 増殖因子ドメイン		19-370
		35-370
		52-370
増殖因子ドメイン		246-370
		250-370
		258-370
増殖因子ドメイン+インタードメイン領域		180-370

## 【0052】

表1に開示したポリペプチドと少なくとも70%、80%、90%および95%同一であるポリペプチドも本発明内に含まれ、この場合、これらの付加的ポリペプチドは、以下に開示されるようなある種の特徴的配列を保持する。

zvegf4ポリペプチドは、本明細書中では、アミノ酸残基を示す下付文字を伴って示される。例えば、表1に開示されたCUBドメインポリペプチドは、「zvegf4<sub>19-179</sub>」、「zvegf4<sub>35-179</sub>」および「zvegf4<sub>52-1</sub>

7.9」 と示される。

【0053】

z v e g f 4 ポリペプチドのより高次構造は、既知の相同体との配列アラインメントおよび利用可能なソフトウェア（例えば、Insight II（商標）viewer and homology modeling tools; MSI, San Diego, CA）を用いたコンピューター分析により予測され得る。配列番号2の分析は、可変性 鎖様領域を一緒に結び付け、輪を作って蝶ネクタイ様構造にするシスチンノットにより増殖因子ドメインの二次構造が支配されることを予測する。配列アラインメントは、位置272、302、306、318、360および362の増殖因子ドメイン内のC y s 残基、ならびにG l y 304がファミリー内で高度に保存されることを示す。さらなる分析は、シスチンノットを形成するためのC y s 残基272および318、302および360、ならびに306および362の対合を示唆する。

【0054】

保存残基のこのアラインメントは、式CX{18,33}CXGXCX{6,33}CX{20,50}CXC（配列番号3）により表され得るが、式中、アミノ酸残基は慣用的一文字コードで表され、Xは任意のアミノ酸残基であり、そして[y, z]は、yからzまでの長さの可変残基(X)の領域を示す。コンセンサス蝶ネクタイ構造は、以下のように形成される：シスチンノットに対するアミノ末端 鎖様領域1 可変ループ1 鎖様領域2 シスチンノット 鎖様領域3 可変ループ2 鎖様領域4 シスチンノット 鎖様領域5 可変ループ3 鎖様領域6 シスチンノット。

【0055】

可変ループ1および2は、蝶ネクタイの一側を形成し、可変ループ3は他側を形成する。z v e g f 4 増殖因子ドメインの構造は、ループ2ならびに 鎖様領域3および4における他のファミリー成員のコンセンサス構造から分岐すると思われるが、この場合、すべてが短縮され、残基307(G l y)~317(T h r)を含むシステイン群により本質的には置換されるが、これは、配列番号2の位置308および316にC y s 残基を含む。配列番号2中の 鎖様領域のおよその境界を以下に示す：領域1、残基273~281；領域2、残基297~301；領域5、残基319~3

24；領域6、残基355～358。ループは領域1と2，ならびに領域5と6を分離する。

#### 【0056】

zvegf4のCUBドメインは、9つの異なる鎖様領域を有する胸部構造を形成すると考えられる。これらの領域は、配列番号2の残基54～57、61～65、79～84、90～95、97～99、112～115、126～130、146～150および163～170を含む。アフリカツメガエル*Xenopus laevis*ニューロピリン前駆体のCUBドメインの多重アラインメント(Takagi et al., 同上)、ヒトBMP-1(Wozney et al., 同上)およびアフリカツメガエルトロイド様タンパク質(Lin et al., 同上)は、配列番号2の残基109～131に対応する保存モチーフの存在を示す。このモチーフは、式C[KR]Y[DNE][WYF]X{11,15}G[KR][WYF]C(配列番号4)により表され得るが、式中、四角括弧は所定位置の許容可能な残基を示し、そしてX{y,z}は前記と同様である。

#### 【0057】

本発明のタンパク質は、zvegf4のCUBドメインと相同のCUBドメインを含むタンパク質を包含する。これらの相同ドメイン100～120残基長であり、配列番号2の残基109～131に対応する配列C[KR]Y[DNE][WYF]X{11,15}G[KR][WYF]C(配列番号4)のモチーフを含む。これらの相同CUBドメインは、配列番号2の残基52～179と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%同一である。

#### 【0058】

本発明のCUBドメイン含有タンパク質は、zvegf4ドメイン間領域またはその相同体をさらに含み得る。ドメイン間領域は、配列番号2の残基180～253と少なくとも70%同一である。

前記のように、配列番号2の残基254～257は、フューリンまたはその他のプロテアーゼのための切断部位を提供すると考えられる。しかしながら、C末端ドメイン間領域を含むポリペプチド(例えば、zvegf4<sub>52-257</sub>)は、アミノ末端に1つ又はそれ以上の残基254～257を有してまたは有さずに調製され得る。さらに、別のC末端ドメイン間領域を含むポリペプチド(例えば、zvegf4<sub>52-2</sub>)

4.5) が調製され得る。

【0059】

本発明の付加的タンパク質は、z v e g f 4 増殖因子ドメインまたはその相同体を含む。これらのタンパク質は、したがって、配列番号2の残基258~370と少なくとも70%、80%、90%または95%同一であるポリペプチドセグメントを含み、この場合、ポリペプチドセグメントは、配列番号2の残基272、302、306、318、360および362に対応する位置にシステイン残基を、配列番号2の残基304に対応する位置にグリシン残基を、ならびに配列番号2の残基272~362に対応する配列モチーフCX{18,33}CXGXCX{6,33}CX{20,50}CXC (配列番号3)を含む。

【0060】

CUBドメイン、ドメイン間領域および増殖因子ドメインの組合せを含む付加的タンパク質は、表1に前記されている。各々の場合、本発明は、前記のような相同ドメインを含む相同タンパク質も包含する。特に、ヒトz v e g f 4 タンパク質中のドメインまたは領域に対応するマウスz v e g f 4 タンパク質中のドメインまたは領域は、本発明内に含まれる。

【0061】

構造分析および相同は、z v e g f 4 ポリペプチドが二次ポリペプチドと複合して多量体タンパク質を形成することを予測する。これらのタンパク質は、ホモ二量体およびヘテロ二量体を含む。後者の場合には、二次ポリペプチドは切頭化またはその他の変異体z v e g f 4 ポリペプチドまたは別のポリペプチド、例えばP1GF、PDGF-A、PDGF-B、VEGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-Dまたはz v e g f 3 ポリペプチドであり得る。

【0062】

本発明内の二量体タンパク質は、二次z v e g f 4 ポリペプチドまたはその他の二次サブユニットである二次サブユニットとの非共有的会合(例えば疎水性相互作用)により、あるいは構成成分単量体のシステイン残基間の分子間ジスルフィド結合により安定化される共有的会合により形成される二量体である。配列番号2内では、位置296、308、316および364のC y s 残基は、分子内または分子間ジスルフィド結合を形成し得る。

## 【0063】

したがって、本発明は、前記のようなzvegf4ポリペプチドを含む種々の多量体タンパク質を提供する。これらのzvegf4ポリペプチドとしては、zvegf4<sub>19-179</sub>、zvegf4<sub>35-179</sub>、zvegf4<sub>52-179</sub>、zvegf4<sub>19-245</sub>、zvegf4<sub>35-245</sub>、zvegf4<sub>52-245</sub>、zvegf4<sub>19-249</sub>、zvegf4<sub>35-249</sub>、zvegf4<sub>52-249</sub>、zvegf4<sub>19-253</sub>、zvegf4<sub>35-253</sub>、zvegf4<sub>52-253</sub>、zvegf4<sub>19-255</sub>、zvegf4<sub>35-255</sub>、zvegf4<sub>52-255</sub>、zvegf4<sub>19-257</sub>、zvegf4<sub>35-257</sub>、zvegf4<sub>52-257</sub>、zvegf4<sub>19-370</sub>、zvegf4<sub>35-370</sub>、zvegf4<sub>52-370</sub>、zvegf4<sub>246-370</sub>、zvegf4<sub>250-370</sub>およびzvegf4<sub>258-370</sub>、ならびに本明細書中に開示されるようなこれらのポリペプチドの変異体および誘導体が挙げられる。

## 【0064】

これらのzvegf4ポリペプチドは、関連ファミリー成員の対応する領域とのホモ二量体として、またはヘテロ二量体として調製され得る。例えば、zvegf4CUBドメインポリペプチドは、配列番号33の残基46~170を含むポリペプチドを用いて二量体化され、zvegf4増殖因子ドメインポリペプチドは、配列番号33の残基235~345を含むポリペプチドで二量体化され、そして、zvegf4CUBドメイン-ドメイン間-増殖因子ドメインポリペプチドは、配列番号33の残基46~345を含むポリペプチドで二量体化され得る。

## 【0065】

配列同一性%は、慣用的方法により確定される(例えば、Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48:603-616, 1986およびHenikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992参照)。要するに、2つのアミノ酸配列は、表2(アミノ酸は標準一文字コードで示されている)に示したように、gapオープンニングペナルティ=10、gapエクステンションペナルティ=1および「BLOSUM62」を用いてHenikoff and Henikoff(同上)のマトリックスを採点することによりアラインメントスコアを最適化するよう整列される。次に、同一性パーセントが以下のように算出される:

## 【0066】

【数1】

$$\frac{\text{〔同一適合の総数〕}}{\text{〔長い方の配列の長さ+2つの配列を整列させるために長い方の配列中に導入されるギャップの数〕}} \times 100$$

【0067】

【表2】

表 2

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6							
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-1	-2	-4	7						
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-2	-1	1	5				
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

## 【0068】

アミノ酸配列間の同一性のレベルは、PearsonとLipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988) およびPearson (Meth. Enzymol. 183:63, 1990) の「FASTA」類似性検索アルゴリズムを用いて確定され得る。要するに、FASTAは先ず、保存アミノ酸置換、挿入または欠失を考慮せずに、疑問配列（例えば配列番号2）と、最高密度の同一性（ktupが1である場合）または同一性対（ktup = 2の場合）を有する被験配列により共有される領域を同定することにより

配列類似性を特性化する。

#### 【0069】

最高密度の同一性を有する10の領域は次に、アミノ酸置換マトリックスを用いてすべての対合化アミノ酸の類似性を比較することにより再評価され、領域の末端は、最高スコアに寄与する残基のみを含むよう「刈り込まれ」る。「カットオフ」値（配列の長さおよびktup値に基づいた予定式により算定）より大きいスコアを有するいくつかの領域が存在する場合には、その領域が連結されてギャップと近似アラインメントを生成し得るか否かを確定するために、刈込み初期領域が検査される。

#### 【0070】

最後に、アミノ酸挿入および欠失を可能にするNeedleman-Wunsch-Sellersアルゴリズム（Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444, 1970; Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26:787, 1974）の変法を用いて、2つのアミノ酸配列の最高スコアリング領域が整列される。FASTA分析のための例証的パラメーターを以下に示す：ktup=1、gapオープニングペナルティー=10、gapエクステンションペナルティー=1および置換マトリックス=BLOSUM62。これらのパラメーターは、Pearson, 1990（同上）の付録2に説明されているように、スコアリングマトリックスファイル（「SMATRIX」）を修正することによりFASTAプログラムに導入され得る。

#### 【0071】

FASTAは、前記のような比を用いて核酸分子の配列同一性を確定するためにも用いられ得る。ヌクレオチド配列比較のために、ktup値は1～6、好ましくは4～6の間の範囲であり得る。

本発明のある種の実施態様内では、配列番号2または配列番号53のアミノ酸配列と比較した場合のアミノ酸置換は、保存的置換である。BLOSUM62マトリックス（表2）は、タンパク質配列セグメントの約2,000の局所的多重アラインメントから得られるアミノ酸置換マトリックスであって、500群より多い関連タンパク質の高度保存領域を表している（Henikoff and Henikoff、同上）。

#### 【0072】

したがって、BLOSUM62置換頻度を用いて、本発明のアミノ酸配列中に導入され得る保存的アミノ酸置換を限定し得る。本明細書中で用いる場合、「保存的アミノ酸置換」という用語は、-1より大きいBLOSUM62値により表される置換を指す。例えば、アミノ酸置換は、置換が0、1、2または3のBLOSUM62値により特性化される場合には、保存的である。さらなる保存的アミノ酸置換は少なくとも1（例えば1、2または3）のBLOSUM62値により特性化されるが、一方さらなる保存的アミノ酸置換は、少なくとも2（例えば2または3）のBLOSUM62値により特性化される。

#### 【0073】

本発明のポリペプチドは、配列番号2または配列番号53と比較した場合、1つ又はそれ以上のアミノ酸置換、欠失または付加を用いて調製され得る。これらの変化は小特質を有するものであり、即ち保存的アミノ酸置換ならびにタンパク質またはポリペプチドの折り畳みまたは活性に有意に影響しないその他の変化であり得る。その例としては、アミノ-またはカルボキシル末端延長、例えばマレイミド活性化カギアナカサガイヘモシアニン、約20~25残基までの小リンカーペプチドまたは前記のようなアフィニティータグとのその後の連結を促すアミノ末端メチオニン残基、アミノまたはカルボキシル末端システイン残基が挙げられる。

#### 【0074】

2つまたはそれ以上のアフィニティータグが、組合せて用いられ得る。アフィニティータグを含むポリペプチドは、ポリペプチドリンカーおよび/またはzvegf4ポリペプチドとアフィニティータグとの間のタンパク質分解的切断部位をさらに含み得る。切断部位の例としては、トロンビン切断部位およびXa因子切断部位が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0075】

本発明は、種々のその他のポリペプチド融合および1つ又はそれ以上のポリペプチド融合を含む関連多量体タンパク質をさらに提供する。例えば、zvegf4ポリペプチドは、米国特許第5,155,027号および第5,567,584号に開示されているように二量体化タンパク質との融合体として調製され得る。この点における二

量体化タンパク質の例としては、免疫グロブリン定常部ドメインが挙げられる。二量体化は、z v e g f 4 ポリペプチドをロイシンジッパー配列と融合することによっても安定化され得る (Riley et al., Protein Eng. 9:223-230, 1996; Mohamed et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 51:241-250, 1994)。

#### 【0076】

免疫グロブリン - z v e g f 4 ポリペプチド融合体およびロイシンジッパー融合体は、遺伝子工学処理細胞中で発現されて、種々の多量体 z v e g f 4 類似体を産生し得る。補助ドメインは、z v e g f 4 ポリペプチドと融合されてそれらを特定の細胞、組織または高分子 (例えばコラーゲン) に対して標的化し得る。例えば、z v e g f 4 ポリペプチドまたはタンパク質は、標的細胞の表面で受容体と特異的に結合するリガンドと z v e g f 4 ポリペプチドを融合することにより、予定細胞型に対して標的化され得る。

#### 【0077】

このようにして、ポリペプチドおよびタンパク質は、治療的または診断的のために標的化され得る。z v e g f 4 ポリペプチドは、2つまたはそれ以上の部分、例えば精製用アフィニティータグおよび標的化ドメインと融合され得る。ポリペプチド融合体は、特にドメイン間に、1つ又はそれ以上の切断部位も含み得る (Tuan et al., Connective Tissue Research 34:1-9, 1996参照)。

#### 【0078】

z v e g f 4 ポリペプチド融合体は、一般に約1,500以下のアミノ酸残基、しばしば約1,200以下の残基、さらにしばしば約1,000以下の残基を含有し、多くの場合、相対的に小さい。例えば、352残基 (配列番号2の残基19~370) の z v e g f 4 ポリペプチドは、大腸菌 - ガラクトシダーゼ (1,021残基; Casadaban et al., J. Bacteriol. 143:971-980, 1980参照)、10残基スペーサーおよび4 - 残基 X a 因子切断部位と融合されて、1,387残基のポリペプチドを産生し得る。台にの例では、配列番号2の残基250~370は、マルトース結合タンパク質 (約370残基)、4 - 残基切断部位および6 - 残基ポリヒスチジンタグと融合され得る。

#### 【0079】

z v e g f 4 増殖因子ドメインを含むポリペプチド ( z v e g f 4<sub>258-370</sub> または z v e g f 4<sub>180-370</sub> ) は、非 z v e g f 4 C U B ドメインと融合され得る。本発明の関連実施態様内では、z v e g f 4 増殖因子および C U B ドメインを含む z v e g f 4 ポリペプチドは、非 z v e g f 4 C U B ドメイン、例えば C U B ドメイン含有ニューロピリンポリペプチドと融合される。

#### 【0080】

本発明はさらに、z v e g f 4 C U B ドメインを含むポリペプチド融合体 ( 例えば z v e g f 4<sub>52-179</sub> ) を提供する。ニューロピリン - 1 とのその相同性を有する C U B ドメインを用いて、細胞表面セマフォリンを含有する細胞、例えば内皮細胞、神経細胞、リンパ球および腫瘍細胞に対して、z v e g f 4 またはそれを含有するその他のタンパク質を標的化し得る。したがって、z v e g f 4 C U B ドメインは、他の部分、例えばポリペプチド ( 例えばその他の増殖因子、抗体および酵素 ) および非ペプチド部分 ( 例えば放射性核種、造影剤等 ) と連結されて、細胞表面セマフォリンを発現する細胞に対してそれらを標的化し得る。z v e g f 4 の C U B および増殖因子ドメイン間の切断部位は、組織内の既存の局所的プロテアーゼを介して、または外因性供給源から付加されたプロテアーゼにより、増殖因子ドメインまたはその他の部分のタンパク質分解的放出を可能にし得る。標的化部分の放出は、より局所化された生物学的作用を提供し得る。

#### 【0081】

本発明のポリペプチド融合体は、z v e g f 4 および z v e g f 3 間の融合体をさらに含むが、この場合、z v e g f 4 のドメインは、z v e g f 3 の対応するドメインまたはその変異体に置換される。代表的ヒト z v e g f 3 ポリペプチド配列は配列番号 33 で示され、代表的マウス配列は配列番号 35 で示される。配列番号 33 内では、C U B ドメインは残基 46 ~ 170 を含み、ドメイン間領域は残基 171 ~ 234 を含み、そして増殖因子ドメインは残基 235 ~ 345 を含む ( すべて、 $\pm 5$  残基 ) 。分泌ペプチドは、残基 14 (  $\pm 3$  残基 ) 後でポリペプチドから切断されると予測される。切断部位は、残基 249、残基 254 ~ 255 および残基 254 ~ 257 で予測される。

#### 【0082】

マウス z v e g f 3 およびその他のオルトログ配列中のドメイン境界は、本明細書中に開示されたヒト配列を用いたアラインメントにより、当業者によって容易に確定され得る。特に興味深いのは、z v e g f 3 C U B ドメインが z v e g f 4 増殖因子ドメインと組合せられる融合体、および z v e g f 4 C U B ドメインが z v e g f 3 増殖因子ドメインと組合せられる融合体である。これらのポリペプチド融合体内では、ドメイン間領域は z v e g f 3 または z v e g f 4 に由来し得る。z v e g f 3 および z v e g f 4 配列を含むポリペプチド融合体は、全長および切頭化配列、例えば前記の表 1 に開示されたものと類似する配列をともに含む。

#### 【0083】

野生型 z v e g f 4 C U B ドメインおよびその変異体を含むタンパク質を用いて、細胞表面セマフォリンにより媒介される活性を調整し得る。理論的に結びつけたくはないが、z v e g f 4 はその C U B ドメインを介してセマフォリンと結合し得る。セマフォリン I I I が血管発生に関与するという観察は、特にニューロピリン - 1 との V E G F およびセマフォリンの同時結合活性のために、血管増殖因子ファミリーのタンパク質の成員も関与し得ることを示唆する。したがって、z v e g f 4 は、ニューロピリン - 1 - セマフォリン相互作用のアゴニストおよびアンタゴニストを設計するために用いられ得る。

#### 【0084】

例えば、本明細書中に開示した z v e g f 4 配列は、セマフォリン刺激性活性、例えば神経突起成長、心臓血管性発達、軟骨および四肢発達ならびに T および B 細胞機能を中和する分子の設計のための出発点を提供する。付加的用途としては、種々の病状、例えば慢性関節リウマチ、種々の形態の癌、自己免疫疾患、炎症、網膜症、血管腫、心臓、腎臓および末梢動脈を含めた組織内の虚血性事象、ニューロパシー、急性神経損傷、ならびに卒中を含めた中枢および末梢神経系の疾患における介入が挙げられる。

#### 【0085】

マウスまたはヒト z v e g f 4 ( およびその多量体 ) の単離 C U B ドメインは、細胞表面分子および / または細胞外結合 V との他の z v e g f 4 分子 ( 例えば

、全長ポリペプチド、単離増殖因子ドメインまたはその多量体)の結合を、それ自体このような分子または部位と結合することにより、遮断するのにも有用であり得る。さらに、マウスまたはヒト *zvegf4* の単離 CUBドメインは、ニューロピリン-1との *zvegf4* 結合および/またはさらに一般的には血管内皮増殖因子結合を遮断するのに有用であり得る (M.L. Gagnon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:2573-78, 2000参照)。

#### 【0086】

さらに、*zvegf4* の第二主要ループ (残基308~316) は、*zvegf4* の受容体結合ループを表し (例えば、WO 99/13329; WO 98/10795およびW.J. LaRochelle et al., J. Biol. Chem. 267:17074-77, 1992参照)、したがって、*zvegf4* 活性のアンタゴニストとして有用であり得る。このペプチド (*zvegf4* 残基308~316) 内では、Cys 308およびCys 316はジスルフィド結合され得ることもあり、そうでないこともある。さらに、このペプチドの二量体は、残基Cys 308がホモ二量体相手ペプチドのCys 308またはCys 316にジスルフィド結合されるように構築され得る。

#### 【0087】

アミノ酸配列変化は、生物学的活性に不可欠な高次構造の崩壊を最小限にするために *zvegf4* ポリペプチド中になされる。前記のように、保存的アミノ酸変化は一般に、非保存的变化より活性を無効にすることが少ないと思われる。アミノ酸残基の変化は、タンパク質ファミリーの特徴を示す増殖因子ドメインにおけるループのシスチンノットおよび「蝶ネクタイ」配置を崩壊しないようなされる。保存モチーフも保持される。アミノ酸配列変化の作用は、前記のようなコンピューターモデリングにより予測され、あるいは結晶構造の分析により確定され得る (例えば、Lapthorn et al., 同上参照)。

#### 【0088】

配列番号2の親水性度プロファイルは、図1に示されている。この親水性度は、全体的プロファイルを崩壊しないよう、*zvegf4* ポリペプチドのアミノ酸配列における変化を意図する場合に考慮される、と当業者は認識する。アミノ酸置換を選択するに際してのさらなる指針は、マウス (配列番号53) およびヒト

(配列番号2) z v e g f 4配列の比較により提供される。アミノ酸配列は、マウスおよびヒト z v e g f 4間で高度に保存され、全体的アミノ酸配列同一性は85.1%である。

#### 【0089】

本発明のポリペプチドは、非天然アミノ酸残基も含み得る。非天然アミノ酸としては、トランス-3-メチルプロリン、2,4-メタノプロリン、シス-4-ヒドロキシプロリン、トランス-4-ヒドロキシプロリン、N-メチルグリシン、アロ-トレオニン、メチルトレオニン、ヒドロキシエチルシステイン、ヒドロキシエチルホモシステイン、ニトログルタミン、ホモグルタミン、ピペコリン酸、tert-ロイシン、ノルバリン、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニンおよび4-フルオロフェニルアラニンが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0090】

タンパク質中に非天然アミノ酸残基を組み入れるためのいくつかの方法が、当業界で既知である。例えば、化学的アミノアシル化サプレッサー tRNAを用いてナンセンス突然変異が抑制されるin vitro系が用いられ得る。アミノ酸を合成し、tRNAをアミノアシル化するための方法は、当業界で既知である。ナンセンス突然変異を含有するプラスミドの転写および翻訳は、大腸菌S30抽出物ならびに市販酵素およびその他の試薬を包含する無細胞系で実行される。

#### 【0091】

タンパク質は、クロマトグラフィーにより精製される(例えば、Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113:2722, 1991; Ellman et al., Methods Enzymol. 202:301, 1991; Chung et al., Science 259:806-809, 1993;およびChung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10145-10149, 1993参照)。第二の方法では、翻訳は、突然変異化mRNAおよび化学的アミノアシル化サプレッサー tRNAのマイクロインジェクションにより、アフリカツメガエル卵細胞で実行される(Turcatti et al., J. Biol. Chem. 271:19991-19998, 1996)。

#### 【0092】

第三の方法内では、置換される天然アミノ酸(例えばフェニルアラニン)の非

存在下で且つ所望の非天然アミノ酸（単数または複数）（例えば、2 - アザフェニルアラニン、3 - アザフェニルアラニン、4 - アザフェニルアラニンまたは4 - フルオロフェニルアラニン）の存在下で、大腸菌細胞が培養される。非天然アミノ酸は、その天然の片方の代わりにタンパク質中に組み入れられる（Koide et al., Biochem. 33:7470-7476, 1994参照）。天然アミノ酸残基は、in vitro化学修飾により非天然種に転換され得る。化学修飾は、部位特異的突然変異誘発と組合されて、置換の範囲をさらに拡大し得る（Wynn and Richards, Protein Sci. 2:395-403, 1993）。

#### 【0093】

本発明のポリペプチド中の必須アミノ酸は、当業界で既知の手法により、例えば部位特異的突然変異誘発またはアラニンスキャニング突然変異誘発により同定され得る（Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085, 1989; Bass et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4498-4502, 1991）。後者の技法では、単一アラニン突然変異が分子中のすべての残基に導入され、その結果生じる突然変異体分子は、他の特性の生物学的活性に関して試験されて、分子の活性に重要なアミノ酸残基を同定する。

#### 【0094】

多重アミノ酸置換は、突然変異誘発およびスクリーニングの既知の方法、例えばReidhaar-Olsonと Sauer（Science 241:53-7, 1988）またはBowieとSauer（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-2156, 1989）により開示された方法を用いて作製され、試験され得る。要するに、これらの著者等は、ポリペプチド中の2またはそれ以上の位置を同時的に無作為化し、機能的ポリペプチドを選択し、次に突然変異化ポリペプチドをシーケンシングして、各位置での許容可能な置換の範囲を確定するための方法を開示する。

#### 【0095】

用いられ得るその他の方法としては、ファージ表示（例えば、Lowman et al., Biochem. 30:10832-10837, 1991; Ladner et al., 米国特許第5,223,409号; Huse, WIPO公告WO 92/06204）、および領域特異的突然変異誘発（Derbyshire et al., Gene 46:145, 1986; Ner et al., DNA 7:127, 1988）が挙げられる。

## 【0096】

開示された *zvegf4* DNA およびポリペプチド配列の変異体は、Stemmer, Nature 370:389-91, 1994 および Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751, 1994 に開示されたような DNA シャッフリングにより生成され得る。要するに、変異体遺伝子は、親遺伝子の無作為断片化とその後の PCR を用いた再アッセンブリーによる *in vivo* 相同組換えにより生成されて、無作為導入化点突然変異を生じる。この技法は、工程に付加の変異性を導入するために、親遺伝子のファミリー、例えば対立遺伝子変異体または異なる種からの遺伝子を用いることにより修飾され得る。所望の活性のための選択またはスクリーニングと、その後の突然変異誘発および検定の付加的相互作用は、有害変化に対して同時的に選択しながら、所望の突然変異を選択することにより配列の迅速「進化」に備える。

## 【0097】

前記に開示したような突然変異誘発方法は、細胞増殖または細胞分化を調整する場合の特定の生物学的活性における、*zvegf4* 変異体ポリペプチドの生物学的活性を検出するために、高容積または高スループットスクリーニング法と組合せられ得る。例えば、染料取込みまたは  $^3\text{H}$ -チミジン取込みを測定する有糸分裂検定は、レポーター遺伝子（例えばルシフェラーゼ遺伝子）の発現を検出する細胞ベースの検定と同様に、多数の試料に関して実行され得る。CUB ドメインの突然変異誘発を用いて、選定ファミリー成員との結合の増強または抑制を含めて、セマフォリンファミリーの成員とのその結合を調整し得る。

## 【0098】

結合活性の修飾化範囲は、*zvegf4* CUB ドメインを含むタンパク質の治療的および/または診断的実用性を最適化するために望ましい。標識化 CUB タンパク質を利用する直接結合は、選定セマフォリンファミリー成員との CUB ドメイン結合活性の変化をモニタリングするために用いられ得る。この点で興味深いセマフォリンには、単離タンパク質、細胞膜中に存在するタンパク質および細胞表面に存在するタンパク質が含まれる。CUB ドメインは、アイソトープ、例えば  $^{125}\text{I}$  による放射能標識、酵素、例えばアルカリ性ホスファターゼまたはホ

ーラディッシュペルオキシダーゼとの連結、ビオチンとの連結、ならびにFITCを含めた種々の蛍光マーカールとの連結を含めた種々の方法により標識され得る。

#### 【0099】

これらのおよびその他の検定は、以下でさらに詳細に開示される。活性zvegf4ポリペプチドをコードする突然変異誘発化DNA分子は宿主細胞から回収され、現代装置を用いて迅速にシーケンシングされ得る。これらの方法は、当該ポリペプチド中の個々のアミノ酸残基の重要性の迅速な決定を可能にし、そして未知の構造のポリペプチドに適用され得る。

#### 【0100】

前記で考察した方法を用いて、当業者は、表1に前記したzvegf4ポリペプチドと相同であり、そして野生型タンパク質の生物学的特性を保持する種々のポリペプチドを同定しおよび/または調製し得る。このようなポリペプチドは、前記で一般的に開示されたような付加的ポリペプチドセグメントも含み得る。

#### 【0101】

本発明は、前記のzvegf4ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子、例えばDNAおよびRNA分子も提供する。本発明のポリヌクレオチドとしては、センス鎖、アンチセンス鎖、ならびに水素結合により一緒にアニーリングされたセンスおよびアンチセンス鎖をともに有する二本鎖化されたようなDNAを含む。ヒトzvegf4ポリペプチドをコードする代表的DNA配列は配列番号1で記述され、そしてマウスzvegf4ポリペプチドをコードする代表的DNA配列は配列番号52で記述される。zvegf4ポリペプチドをコードする付加的DNA配列は、遺伝子コードに基づいて、当業者により容易に生成され得る。等価物RNA配列は、UをTの代わりに置換することにより生成され得る。

#### 【0102】

遺伝子コードの縮重の点から見て、相当の配列変異がzvegf4ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子の間で可能であるということ、当業者は容易に認識する。配列番号6は、配列番号2のzvegf4ポリペプチドをコードするすべてのDNAを包含する縮重DNA配列である。配列番号6の縮重配列

は、UをTの代わりに置換することにより配列番号2をコードするすべてのRNA配列も提供するということを、当業者は認識する。

【0103】

したがって、配列番号6のヌクレオチド1~1110、1~537、55~537、103~537、154~537、55~771、103~771、154~771、55~765、103~765、154~765、55~759、103~759、154~759、55~747、103~747、154~747、55~735、103~735、154~735、55~1110、103~1110、154~1110、772~1110、748~1110、736~1110および538~1110ならびにそれらのRNA等価物を含むzvegf4ポリペプチドコードポリヌクレオチドが、本発明により意図される。

【0104】

表3は、縮週ヌクレオチド位置を示すために配列番号6内に用いられる一文字コードを記述する。「分解体」とは、コード文字により示されるヌクレオチドである。「相補体」とは、相補的ヌクレオチド(単数または複数)に対するコードを示す。例えば、コードYはCまたはTを意味し、そしてその相補体RはAまたはGを意味し、AはTと相補的であり、そしてGはCと相補的である。

【0105】

【表3】

表 3

ヌクレオチド	解	相補体	解
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T
Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T
B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T

所定のアミノ酸に対するすべての考え得るコドンを含む配列番号6で用いられる縮重コドン、以下の表4に記述する。

【0106】

【表4】

表 4

アミノ酸	1文字 コード	コドン	縮重 コドン
Cys	C	TGC TGT	TGY
Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
Thr	T	ACA ACC ACG ACT	CAN
Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN
Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN
Gly	G	GGA GGC GGG GGT	GGN
Asn	N	AAC AAT	AA Y
Asp	D	GAC GAT	GAY
Glu	E	GAA GAG	GAR
Gln	Q	CAA CAG	CAR
His	H	CAC CAT	CAY
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
Lys	K	AAA AAG	AAR
Met	M	ATG	ATG
Ile	I	ATA ATC ATT	ATH
Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
Val	V	GTA GTC GTG GTT	GTN
Phe	F	TTC TTT	TTY
Tyr	Y	TAC TAT	TAY
Trp	W	TGG	TGG
Ter	.	TAA TAG TGA	TRR
Asn Asp	B		RAY
Glu Gln	Z		SAR
いずれか	X		NNN
Gap	-	---	

## 【0107】

縮重コドンを確定する場合には多少の多義性が導入され、すべての考え得るコドンの代表は各アミノ酸をコードする、と当業者は理解する。例えば、セリンの縮重コドン(WSN)は、いくつかの状況では、アルギニン(AGR)をコードし、アルギニンに対する縮重コドン(MGN)は、いくつかの状況では、セリン(AGY)を

コードする。同様の関係は、フェニルアラニンおよびロイシンをコードするコード間に存在する。したがって、縮重配列により包含されるいくつかのポリヌクレオチドは変異体アミノ酸配列をコードし得るが、しかし、配列番号2のそして配列番号53のアミノ酸配列を参照することにより、当業者はこのような変異体配列を容易に同定し得る。変異体配列は、本明細書中に記載したような機能性に関して容易に試験され得る。

#### 【0108】

本発明のある種の実施態様内では、単離ポリヌクレオチドは、緊縮条件下で、配列番号1または配列番号52の同様サイズの領域あるいはそれと相補的な配列とハイブリダイズする。概して、緊縮条件は、限定イオン強度およびpHで、特定の配列に関する熱融点( $T_m$ )より約5 低い温度であるよう選択される。 $T_m$ は、標的配列の50%が、完全適合化プローブとハイブリダイズする温度(限定イオン強度およびpH下)である。典型的緊縮条件は、塩濃度がpH7で約0.03 Mであり、そして温度が少なくとも約60 である条件である。

#### 【0109】

前記のように、本発明の単離ポリヌクレオチドは、DNAおよびRNAを含む。DNAおよびRNAの製造方法は、当業者には周知である。相補的DNA(cDNA)クローンは、大量のzevf4RNAを産生する組織または細胞から単離されるRNAから調整される。このような組織および細胞は、ノーザンブロットティングにより同定され(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201, 1980)、心臓、膵臓、胃および副腎を含む。全RNAは、グアニジンHCl抽出とその後のCsCl勾配中での遠心分離による単離を用いて調製され得る(Chirgwin et al., Biochemistry 18:52-94, 1979)。

#### 【0110】

ポリ(A)<sup>+</sup>RNAは、AvivとLeder(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:1408-1412, 1972)の方法を用いて全RNAから調製される。相補的DNA(cDNA)は、既知の方法を用いてポリ(A)<sup>+</sup>RNAからから調製される。代替的方法では、ゲノムDNAが単離され得る。いくつかの用途(例えば、トランスジェニック動物中での発現)に関しては、ゲノムクローンをを用いるのが、またはcDN

Aクローンを修飾して少なくとも1つのゲノムイントロンを含むのが有益であり得る。

【0111】

cDNAおよびゲノムクローンの同定および単離方法は、当業者には周知であり、彼等のレベル内である。例としては、ライブラリーをプローブまたはプライムするための本明細書中に開示した配列またはその一部の使用が挙げられる。zvegf4ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、例えばハイブリダイゼーションまたはポリメラーゼ連鎖反応(「PCR」、米国特許第4,683,202号(Mullis))により同定および単離される。発現ライブラリーは、zvegf4に対する抗体、受容体断片またはその他の特異的結合相手を用いてプローブされ得る。

【0112】

配列番号1および2で開示された配列はヒトzvegf4の単一对立遺伝子を表し、そして配列番号52および53で開示された配列はマウスzvegf4の単一对立遺伝子を表す、と当業者は認識する。これらの配列の対立遺伝子変異体は、標準手法により異なる個体からcDNAまたはゲノムライブラリーをプローブすることによりクローン化され得る。あるいは、zvegf4のスプライス化形態が存在することも予測される。

【0113】

本明細書中に開示されたzvegf4ポリヌクレオチドは、その他のzvegf4タンパク質をコードするポリヌクレオチドを単利するために用いられ得る。このようなその他のポリヌクレオチドとしては、対立遺伝子変異体、代替的スプライス化cDNAおよび他の種からの片方のポリヌクレオチド(オルトログ)が挙げられる。これらのオルトログポリヌクレオチドは、とりわけ、それぞれのオルトログタンパク質を調製するために用いられ得る。その他の当該種としては、哺乳類、鳥類、両生類、爬虫類、魚類、昆虫およびその他の脊椎動物ならびに無脊椎動物種が挙げられるが、これらに限定されない。

【0114】

特に興味深いのは、その他の哺乳類種からのzvegf4ポリヌクレオチドお

よびタンパク質、例えば非ヒト霊長類、ネズミ、ブタ、ヒツジ、ウシ、イヌ、ネコおよびウマポリヌクレオチドおよびタンパク質である。ヒト z v e g f 4 のオルトログは、本発明により提供される情報および組成物を、慣用的クローニング技術と組合せて用いて、クローン化され得る。例えば、cDNAは、本明細書中に開示したような z v e g f 4 を発現する種類の組織または細胞から得られる mRNA を用いてクローン化され得る。mRNA の適切な供給源は、本明細書中に開示した配列から設計されるプローブを用いてノーザンブロットをプロービングすることにより同定され得る。

#### 【0115】

次にライブラリーは、陽性組織または細胞株の mRNA から調製される。次に z v e g f 4 コード cDNA は、種々の方法により、例えば完全または部分ヒト cDNA を用いて、あるいは開示配列を基礎にした1つ又はそれ以上の組の縮重プローブを用いてプロービングすることにより単離され得る。ハイブリダイゼーションは一般に、低緊縮条件下で実行されるが、この場合、洗浄は 1 x S S C 中で、最初に 40 で洗浄し、その後 5 で、高間隔で、バックグラウンドが適切に低減されるまで実行される。

#### 【0116】

cDNA は、ポリメラーゼ連鎖反応または PCR (Mullis、米国特許第4,683,202号) を用いて、本明細書中に開示した代表的ヒト z v e g f 4 配列から設計されたプライマーを用いてもクローン化され得る。さらに別の方法内では、cDNA ライブラリーを用いて宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトし得るし、当該 cDNA の発現は、z v e g f 4 ポリペプチドに対する抗体を用いて検出され得る。同様の技法は、ゲノムクローンの単離にも適用され得る。

#### 【0117】

変異体および融合タンパク質を含めた任意の z v e g f 4 ポリペプチドに関しては、前記の表3および4に記載した情報を用いて、その変異体をコードする完全縮重ポリヌクレオチド配列を、当業者は容易に生成し得る。

他のファミリー成員の配列を用いたアラインメントにより同定される z v e g f 4 の保存領域は、関連ポリヌクレオチドおよびタンパク質を同定するために用

いられ得る。例えば、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) および当業界で既知のその他の技法を用いて、種々の組織供給源から得られたRNAからの z v e g f 4 中に存在する保存モチーフをコードする配列を増幅し得る。

【0118】

特に、表5で以下に示されるような高度縮重プライマー (PDGF AおよびB鎖、VEGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-Dおよびz v e g f 3を有するz v e g f 4のアラインメントから設計) は、相同性増殖因子ドメインをコードするポリヌクレオチドをクローニングするために有用である。アフリカツメガエルニューロピリン前駆体、ヒトBMP-1、ヒトz v e g f 3およびアフリカツメガエルトロイド様タンパク質を用いたz v e g f 4のアラインメントから設計される表6に示されたプライマーは、CUBドメインをコードするポリヌクレオチドをクローニングするために有用である。したがって、表5および6のプライマーを用いて、配列番号1および配列番号2のz v e g f 4配列の相同体をコードする付加的ポリヌクレオチドを生成し得る。

【0119】

【表5】

表 5

zveg4残基301-305	
縮重:	MGN TGY GGN GGN AAY TG(配列番号:7)
コンセンサス:	MGN TGY DSN GGN WRY TG(配列番号:8)
相補体:	CAR YWN CCN SHR CAN CK(配列番号:9)
zveg4残基292-297	
縮重:	TTY TTY CCN MGN TGY YT(配列番号:10)
コンセンサス:	NTN DDN CCN NSN TGY BT(配列番号:11)
相補体:	AVR CAN SNN GGN HHN AN(配列番号:12)
zveg4残基357-362	
縮重:	CAY GAR MGN TGY GAY TG(配列番号:13)
コンセンサス:	CAY NNN NVN TGY VVN TG(配列番号:14)
相補体:	CAN BBR CAN BNN NNR TG(配列番号:15)
zveg4残基250-255	
縮重:	TGY ACN CCN MGN AAY TA(配列番号:16)
コンセンサス:	TGY HNN MCN MKN RMN DH(配列番号:17)
相補体:	DHN KYN MKN GKN NDR CA(配列番号:18)

【0120】

【表6】

表 6

zveg4残基110-115	
コンセンサス:	N TAY GAY TWY GTN GAR GT(配列番号:19)
相補体:	N ATR CTR AWR CAN CTY CA(配列番号:20)
zveg4残基68-73	
コンセンサス:	GN TDB CCN MAN DVN TAY C(配列番号:21)
相補体:	CN AHV GGN KTN HBN ATR G(配列番号:22)
zveg4残基126-131	
コンセンサス:	TN HDN GGN MRN TDB TGY G(配列番号:23)
相補体:	AN DHN CCN KYN AHV ACR C(配列番号:24)

## 【0121】

本明細書中に開示した z v e g f 4 ポリヌクレオチド配列は、プロモーター配列を含めた z v e g f 4 遺伝子の 5' 非コード領域をクローン化するためのプロンプまたはプライマーとしても用いられ得る。5' 非コードおよびコード配列を含むヒト z v e g f 4 ゲノム断片は、配列番号 36 で示される。これらのフランキング配列は、z v e g f 4 およびその他の組換え体タンパク質の発現を指図するために用いられ得る。さらに、5' フランキング配列は、米国特許第 5,641,670 号 (Trecó 等) により開示されたような内因性 z v e g f 4 遺伝子の発現を活性化または増大するための調節構築物のための標的化部位として用いられ得る。5' 非コード配列および約 100 ヌクレオチドのコード配列を含むヒト z v e g f 4 ゲノム配列は、配列番号 36 に示される。

## 【0122】

本発明のポリヌクレオチドは、自動合成によっても調製され得る。短い二本鎖セグメント (60~80 bp) の産生は、技術的に簡単であり、相補鎖を合成紙、次にそれらをアニーリングすることにより成し遂げられ得る。長いセグメント (典型的には >300 bp) は、長さ 20~100 ヌクレオチドの一本鎖断片からモジュール形態でアッセンブルされる。ポリヌクレオチドの自動合成は当業者のレベル内であり、適切な装置および試薬は商業的供給元から入手可能である (概して、Glick and Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principle & Applications of Recombinant DNA*, ASM Press, Washington, D.C. 1994; Itakura et al., *Annu. Rev. Biochem.* 53:323-56, 1984 および Climie et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:633-7, 1990 参照)。

## 【0123】

本発明のポリペプチドは、全長ポリペプチド、生物学的活性断片および融合ポリペプチドを含めて、慣用的技法により遺伝子工学処理宿主細胞中で生成され得る。適切な宿主細胞は、外因性 DNA で形質転換またはトランスフェクトされ、培養中で増殖され得る種類の細胞であって、その例としては、細菌、真菌細胞および培養高等真核生物細胞、例えば多細胞生物体の培養細胞が挙げられる。クローン化 DNA 分子を操作し、外因性 DNA を種々の宿主細胞中に導入するための

技法は、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989およびAusubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green and Wiley and Sons, NY, 1993により開示されている。

#### 【0124】

概して、z v e g f 4ポリペプチドをコードするDNA配列は、発現ベクター内で、一般的に転写プロモーターおよびターミネーターを含めて、その発現に必要なその他の遺伝素子と作用可能に連結される。ベクターは、一般的に1つ又はそれ以上の選択可能マーカーおよび1つ又はそれ以上の複製の起点も含有するが、しかし、ある種の系内では、選択可能マーカーは別個のベクター上に提供され、外因性DNAの複製は宿主細胞ゲノム中への組込みにより提供され得る、と当業者は認識する。プロモーター、ターミネーター、選択可能マーカー、ベクターおよびその他の素子の選択は、当業者のレベル内のルーチン設計の事柄である。多数のこのような素子が文献中には記載されており、商業的供給元を介して入手可能である。

#### 【0125】

宿主細胞の分泌経路にz v e g f 4ポリペプチドを向けるために、分泌シグナル配列（リーダー配列、プレプロ配列またはプレ配列としても知られている）が発現ベクター中に提供される。分泌シグナル配列はz v e g f 4の配列であり得るし、または別の分泌タンパク質（例えば、t - P A ; 米国特許第5,641,655号参照）から得られるか、またはde novoに合成され得る。分泌シグナル配列は、z v e g f 4 DNA配列と作用可能に連結され、即ち2つの配列は、正確な読取枠中で連結され、宿主細胞の分泌経路中に新規に合成されたポリペプチドを向けるように置かれる。分泌シグナル配列は一般に、当該ポリペプチドをコードするDNA配列に対して5'に位置するが、しかしある種のシグナル配列は、当該DNA配列中の別の場所に置かれ得る（例えば、Welch et al. 米国特許第5,037,743号 ; Holland et al. 米国特許第5,143,830号参照）。

#### 【0126】

宿主細胞分泌経路を介したz v e g f 4ポリペプチド発現は、多量体タンパク

質の産生を生じると予測される。前記のように、このような多量体としては、ホモ多量体およびヘテロ多量体の療法が挙げられ、後者は、z v e g f 4 ポリペプチドのみを含むタンパク質と、z v e g f 4 および異種ポリペプチドを含むタンパク質を含有する。例えば、z v e g f 4 ポリペプチドおよび関連ファミリー成員（例えば、V E G F、V E G F - B、V E G F - C、V E G F - D、z v e g f 3、P 1 G F、P D G F - A または P D G F - B）からのポリペプチドを含むヘテロ多量体は、宿主細胞中での2つのポリペプチドの同時発現により産生され得る。

#### 【0127】

これらのその他のファミリー成員をコードする配列は既知である（例えば、Dvorak et al.、同上；Olofsson et al.、同上、Hayward et al.、同上、Joukov et al.、同上、Oliviero et al.、同上、Achen et al.、同上、Maglione et al.、同上、Heldin et al.、米国特許第5,219,759号およびJohnsson et al.、同上参照）。タンパク質の混合物が発現に起因する場合、個々の種は慣用的方法により単離される。単量体、二量体および高次多量体は、例えばサイズ排除クロマトグラフィーにより分離される。ヘテロ多量体は、慣用的クロマトグラフィーにより、または個々の二量体に特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーにより、または個々の構成成分ポリペプチドに特異的な抗体を用いる逐次イムノアフィニティー過程により、ホモ多量体から分離され得る（概して、米国特許第5,094,941号参照）。

#### 【0128】

培養哺乳類細胞は、本発明内で用いるための適切な宿主である。外因性DNAを哺乳類宿主細胞中に導入するための方法としては、リン酸カルシウム介在性トランスフェクション（Wigler et al., Cell 14:725, 1978; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603, 1981; Graham and Van der Eb, Virology 52:456, 1973）、エレクトロポレーション（Neumann et al., EMBO J. 1:841-5, 1982）、D E A E - デキストラン介在性トランスフェクション（Ausbel et al.、同上）、およびリポソーム介在性トランスフェクション（Hawley-Nelson et al., Focus 15:73, 1993; Ciccarone et al., Focus 15:80, 1993）が挙げられる。

## 【0129】

培養哺乳類細胞中の組換え体ポリペプチドの産生は、例えばLevinson et al. 米国特許第4,713,339号 ; Hagen et al. 米国特許第4,784,950号 ; Palmiter et al. 米国特許第4,579,821号 ; およびRingold、米国特許第4,656,134号により開示されている。適切な培養哺乳類細胞としては、COS - 1 (ATCC No. CRL 1650)、COS - 7 (ATCC No. CRL 1651)、BHK (ATCC No. CRL 1632)、BHK570 (ATCC No. CRL 10314)、293 (ATCC No. CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977) およびチャイニーズハムスター卵巣 (例えば、CHO - K1 ; ATCC No. CCL 61) 細胞株が挙げられる。

## 【0130】

さらに別の適切な細胞株が当業界で既知であり、アメリカ培養細胞コレクション (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia) のような公的貯蔵所から入手可能である。強力な転写プロモーター、例えばSV - 40またはサイトメガロウイルスからのプロモーターが用いられ得る (例えば、米国特許第4,956,288号参照)。その他の適切なプロモーターとしては、メタロチオネイン遺伝子 (米国特許第4,579,821号および第4,601,978号) からのものおよびアデノウイルス主要後期プロモーターが挙げられる。哺乳類細胞中で用いるための発現ベクターとしては、pZP - 1 および pZP - 9 が挙げられるが、これらはそれぞれ寄託番号98669および98668としてアメリカ培養細胞コレクション (American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA, USA) に寄託されている。

## 【0131】

薬剤選択は一般に、外来DNAが挿入された培養哺乳類細胞に関して選択するために用いられる。このような細胞は、一般に、「トランスフェクタント」と呼ばれる。選択性物質の存在下で培養された、そしてそれらの子孫に当該遺伝子を受け渡し得る細胞は、「安定トランスフェクタント」と呼ばれる。選択可能マーカーの一例は、抗生物質ネオマイシンに対する耐性をコードする遺伝子である。選択は、ネオマイシン型薬剤、例えばG - 418等の存在下で実行される。

## 【0132】

選択系は、「増幅」と呼ばれる過程である当該遺伝子の発現レベルを増大するためにも用いられ得る。増幅は、低レベルの選択的物質の存在下でトランスフェクタントを培養し、次に選択的物質の量を増大して、導入遺伝子の高レベル生成物を生成する細胞を選択することにより実行される。増幅性選択可能マーカーの好例は、メトトレキセートに対する耐性を付与するジヒドロフォレートレダクターゼである。他の薬剤耐性遺伝子（例えば、ヒグロマイシン耐性、多剤耐性、ブロマイシンアセチルトランスフェラーゼ）も用いられ得る。

#### 【0133】

その他の高等真核生物細胞、例えば昆虫細胞、植物細胞および鳥類細胞も宿主として用いられ得る。植物細胞中で遺伝子を発現するためのベクターとしての土壌細菌アグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) の使用は、Sinkar et al., *J. Biosci (Bangalore)* 11:47-58, 1987により検討されている。昆虫細胞の形質転換およびそこでの外来ポリペプチドの産生は、Guarino et al. 米国特許第5,162,222号およびWIPO公告W094/06463により開示されている。

#### 【0134】

昆虫細胞は、一般にアウトグラフィ・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (AcNPV) に由来する組換えバキュロウイルスに感染され得る (King and Possee, *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, London, Chapman & Hall; O'Reilly et al., *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, New York, Oxford University Press, 1994; および Richardson, Ed., *Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology*, Totowa, NJ, Humana Press, 1995参照)。組換えバキュロウイルスは、Luckow等 (*J. Virol.* 67:4566-4579, 1993) により記載されたトランスポゾンベース系を利用する。

#### 【0135】

トランスファーベクターを利用するこの系は、キット形態 (Bac-to-Bac™ キット; Life Technologies, Rockville, MD) で販売されている。トランスファーベクター (例えば、pFastBac1™; Life Technologies) は、「バクミド」と呼ばれる大型プラスミドとして大腸菌中に保持されるバキュロウイルスゲ

ノム中に当該タンパク質をコードするDNAを移動させるためにTn7トランスポゾンを含む( Hill-Perkins and Possee, J. Gen. Virol. 71:971-6, 1990; Bonning et al., J. Gen. Virol. 75:1551-6, 1994; および Chazenbalk and Rapoport, J. Biol. Chem. 270:1543-9, 1995 参照)。さらに、トランスファーベクターは、前記のようなポリペプチド延長またはアフィニティタグをコードするDNAとの枠内融合物を含み得る。

#### 【0136】

当業界で既知の技法を用いて、zvegf4コード配列を含むトランスファーベクターが大腸菌宿主細胞中で形質転換され、組換えバキュロウイルスを示す中断lacZ遺伝子を含むバクミドに関して細胞がスクリーニングされる。組換えバキュロウイルスゲノムを含むバクミドDNAは、一般的技法を用いて単離され、ヨトウガSpodoptera frugiperda細胞、例えばSf9細胞をトランスフェクトするために用いられる。その後、zvegf4タンパク質を発現する組換えウイルスが産生される。組換えウイルスストックは、当業界で一般的に用いられる方法により作製される。

#### 【0137】

タンパク質産生のために、組換えウイルスは、昆虫宿主細胞、典型的にはスポドプテラ・フルギペルダ(Spodoptera frugiperda)(例えば、Sf9またはSf21細胞)またはTrichoplusia ni(例えば、ハイファイブHigh Five™細胞; Invitrogen, Carlsbad, CA)由来の細胞株を感染させるために用いられる(一般的に、Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, ASM Press, Washington, D.C., 1994 参照)(米国特許第5,300,435号も参照)。血清無含有培地は、細胞を増殖および保持するために用いられる。

#### 【0138】

適切な培地処方物は当業界で既知であり、商業的供給元から入手され得る。細胞は、約 $2 \sim 5 \times 10^5$ 細胞の接種密度から $1 \sim 2 \times 10^6$ 細胞の密度に増殖され、この時点で、組換えウイルスストックが0.1~10、さらに典型的にはほぼ3の感染多重度(MOI)で付加される。用いられる手法は一般に、利用可能な実験室マニユ

アルに記載されている（例えば、King and Possee同上；O'Reilly et al.同上；Richardson同上）。

#### 【0139】

真菌細胞、例えば酵母細胞も、本発明内で用いられ得る。これに関する特定の当該酵母種としては、ビール酵母菌、子囊菌類のピキア・パストリス *Pichia pastoris* およびピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*) が挙げられる。外因性DNAでビール酵母菌を形質転換し、それから組換えポリペプチドを産生するための方法は、例えば米国特許第4,599,311号 (Kawasaki)、米国特許第4,931,373号 (Kawasaki)、米国特許第4,870,008号 (Brake)、米国特許第5,037,743号 (Welch等) および米国特許第4,845,075号 (Murray等) に開示されている。形質転換細胞は、選択可能マーカー、市販薬剤耐性または特定の栄養素（例えばロイシン）の非存在下で増殖する能力により確定される表現型により選択される。

#### 【0140】

ビール酵母菌で用いるための好例のベクター系は、米国特許第4,931,373号 (Kawasaki) に開示されているPOT1ベクター系であって、これはグルコース含有培地中での増殖により形質転換細胞を選択させ得る。酵母菌中で用いるための適切なプロモーターおよびターミネーターとしては、解糖酵素遺伝子（例えば、米国特許第4,599,311号 (Kawasaki)、米国特許第4,615,974号 (Kingsman等) および米国特許第4,977,092号 (Bitter) 参照) およびアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子からのものが挙げられる（米国特許第4,990,446号、第5,063,154号、第5,139,936号および第4,661,454号も参照）。

#### 【0141】

他の酵母菌、例えば *Hansenula polymorpha*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces lactis*、*Kluyveromyces fragilis*、*Ustilago maydis*、*Pichia pastoris*、*Pichia methanolica*、*Pichia guilliermondii* および *Candida maltosa* のための形質転換系が当業界で既知である（例えば、Gleeson et al., *J. Gen. Microbiol.* 132:3459-3465, 1986；米国特許第4,882,279号 (Cregg)；および Raymond et al., *Yeast* 14, 11-23, 1998参照）。

#### 【0142】

アスペルギルス細胞は、米国特許第4,935,349号 (McKnight等)の方法により利用され得る。アクレモニウム属の *Acremonium chrysogenum* を形質転換するための方法は、米国特許第5,162,228号 (Sumino等)に開示されている。アカパンカビ *Neurospora* を形質転換するための方法は、米国特許第4,486,533号 (Lambowitz)に開示されている。 *Pichia methanolica* における組換えタンパク質の産生は、米国特許第5,716,808号、第5,736,383号、第5,854,039号および第5,888,768号に開示されている。

#### 【0143】

原核生物宿主細胞、例えば大腸菌、バチルス属およびその他の属の細菌株も、本発明内の有用な宿主細胞である。これらの宿主を形質転換し、その中でクローン化された外来DNA配列を発現するための技法は、当業界で周知である (例えば、Sambrook等、同上参照)。大腸菌のような細菌中で *zvegf4* ポリペプチドを発現する場合、ポリペプチドは、典型的には不溶性顆粒として細胞質中に保持され得るか、または細菌分泌配列により細胞周辺腔に向けられる。前者の場合、細胞は溶解され、顆粒が回収されて、例えば、グアニジンイソチオシアネートまたは尿素を用いて変性される。次に変性ポリペプチドは再フォールディングされ、変性体を稀釈することにより、例えば尿素の溶液に対する透析により、還元および酸化グルタチオンとその後の緩衝化食塩水溶液に対する透析を組合せることにより、二量体化される。

#### 【0144】

後者の場合、タンパク質は、可溶性形態で細胞質から回収され、変性体を用いずに単離され得る。多pは、例えばリン酸塩緩衝化生理食塩水中で水性抽出物として細胞から回収される。当該タンパク質を捕獲するために、抽出物はクロマトグラフィー媒質、例えば固定化抗体またはヘパリン-セファロースカラムに直接適用される。分泌ポリペプチドは、細胞周辺腔の内容物を放出するために細胞を破裂させ (例えば、音波処理または浸透性ショックにより)、タンパク質を回収し、それにより変性および再フォールディングの必要性をなくすることにより、可溶性および機能的形態で細胞周辺腔から回収され得る。

#### 【0145】

形質転換化またはトランスフェクト化宿主細胞は、栄養素および選定宿主細胞の増殖に必要なその他の構成成分を含有する培地中で、慣用的手法により培養される。種々の適切な培地、例えば限定培地および複合培地は当業界で既知であり、一般的に炭素源、窒素源、必須アミノ酸、ビタミンおよびミネラルを含む。培地は、必要な場合には、増殖因子または血清のような構成成分も含有し得る。

【0146】

増殖培地は、一般的に、例えば薬剤選択または必須栄養素の欠損により、外因的付加DNAを含有する細胞に関して選択するが、これは、例えば発現ベクター上に保有されまたは宿主細胞中に同時トランスフェクトされる選択可能マーカーにより補足される。例えば*P. methanolica*細胞は、約25 ~ 35 の温度で、炭素、窒素および微量栄養素の適切な供給源を含む培地中で培養される。液体培地は、慣用的手段により、例えば小フラスコの振盪または発酵器の散布により十分な曝気を提供される。

【0147】

z v e g f 4 ポリペプチドまたはその断片は、当業界で既知の方法による化学合成より、例えば排除的固相合成、部分固相法、断片縮合または古典的溶液合成によっても調製され得る（例えば、Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149, 1963; Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis* (2nd edition), Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1984; Bayer and Rapp, *Chem. Pept. Prot.* 3:3, 1986;およびAtherton et al., *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1989参照）。

【0148】

共有的多量体複合体は、所望の構成成分ポリペプチドを単離子、それらを *in vitro* で組合せることにより製造され得る。この方法で調製され得る共有複合体としては、z v e g f 4 ポリペプチドのホモ二量体、2つの異なるz v e g f 4 ポリペプチドのヘテロ二量体およびz v e g f 4 ポリペプチドとタンパク質のVEGF/PDGFファミリーの別のファミリー成員からのポリペプチドのヘテロ二量体が挙げられる。

【0149】

2つのポリペプチドは、変性および還元条件下で一緒に混合され、その後、変性体の除去によりタンパク質を再生する。除去は、例えば透析またはサイズ排除クロマトグラフィーにより実行されて、緩衝液交換を提供する。2つの異なるポリペプチドを組合せる場合、その結果生じる再生タンパク質は個々の構成成分のホモ二量体、ならびに2つのポリペプチド構成成分のヘテロ二量体を形成し得る (Cao et al., J. Biol. Chem. 271:3154-3162, 1996参照)。

#### 【0150】

z v e g f 4を含む非共有複合体は、z v e g f 4ポリペプチドおよび二次ポリペプチド(例えば、z v e g f 4ポリペプチドまたはPDGF/VEGFファミリーの別のペプチド)をほぼ生理学的pHでインキュベートすることにより調製され得る。典型的反応では、約0.1~0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度のポリペプチドは、弱緩衝液(例えば、0.01 Mリン酸塩または酢酸塩緩衝液)中でpH 7.4でインキュベートされる。塩化ナトリウムは、約0.1 Mの濃度で含まれる。37 $^{\circ}\text{C}$ で、反応は本質的には4~24時間で完了する(例えば、Weintraub et al., Endocrinology 101:225-235, 1997参照)。

#### 【0151】

意図される用途によって、本発明のポリペプチドおよびタンパク質は、高分子、特にその他のタンパク質および核酸の夾雑に関して、純度 80%、純度 90%、純度 95%に、または製薬上純粋な状態に、即ち純度99.9%より高くまで精製され、感染性および発熱性作用物質を含有しない。

#### 【0152】

z v e g f 4タンパク質(キメラポリペプチドおよびポリペプチド多量体を含む)は、分別および/または慣用的精製方法ならびに培地を用いて、例えばクロマトグラフィー技法の組合せにより、精製され得る(概して、Affinity Chromatography:Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988; およびScopes, Protein Purification:Principles and Practice, Springer-Verlag, New York, 1994参照)。ポリヒスチジンアフィニティータグ(典型的には、約6ヒスチジン残基)を含むタンパク質は、ニッケルまたはコバルトキレート樹脂上でのアフィニティークロマトグラフィーにより精製される(例

例えば、Houchuli et al., Bio/Technol. 6:1321-1325, 1988参照)。

#### 【0153】

G l u - G l u タグを含むタンパク質は、慣用的手法にしたがってイムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製され得る(例えば、Grussenmeyer et al., 同上参照)。マルトース結合タンパク質融合体は、当業界で既知の方法にしたがってアミロースカラム上で精製される。

当業界で既知の方法を用いて、z v e g f 4 タンパク質は、単量体または多量体として調製され、グルコシル化または非グルコシル化、ペギル化または非ペギル化去れ、そして最初のメチオニンアミノ酸残基を含む場合も含まない場合もある。

#### 【0154】

本発明はさらに、配列番号2で示されるようなタンパク質のエピトープ担持部分を含むポリペプチドを提供する。「エピトープ」は、抗体が結合し得るタンパク質の領域である(例えば、Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002, 1984参照)。エピトープは線状または配座的であり、後者はタンパク質のフォールディング時にエピトープを形成するタンパク質の不連続領域で構成される。線状エピトープは一般に、少なくとも6アミノ酸残基長である。タンパク質配列の一部がよく似ている相対的に短い合成ペプチドは、部分的によく似たタンパク質と反応する抗血清をルーチンに引き出し得る(Sutcliffe et al., Science 219:660-666, 1983参照)。

#### 【0155】

短い線状のエピトープを認識する抗体は、変性タンパク質を用いる分析的および診断的用途、例えばウエスタンブロッティングに特に有用である(Tobin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4356, 1979)。抗ペプチド抗体は、配座依存性でなく、体液または細胞培地中で起こり得るような、断片化形態またはそうでない場合には変化形態のタンパク質を検出するために用いられ得る(Niman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7924-7928, 1985)。短いペプチドに対する抗体は、ネイティブ配座のタンパク質も認識し得るし、したがって、タンパク質発現およびタンパク質単離をモニタリングするのに、そしてE L I S Aのよう

な溶液中での z v e g f 4 タンパク質の検出に、あるいは免疫沈降試験に有用である。

#### 【0156】

本発明の抗原性エピトープ担持ポリペプチドは、z v e g f 4 タンパク質と特異的に結合する抗体、例えばモノクローナル抗体を産生するのに有用である。抗原性エピトープ担持ポリペプチドは、z v e g f 4 タンパク質（例えば配列番号2）の少なくとも6つの、他の実施態様内では少なくとも9つの、その他の実施態様内では15～約30の連続アミノ酸残基の配列を含有する。z v e g f 4 タンパク質の大きい部分、即ち30～50または100残基あるいは全配列までを含むポリペプチドが包含される。

#### 【0157】

エピトープ担持ポリペプチドのアミノ酸配列は、水溶性溶媒中で実質的可溶性を提供するよう選択されるのが好ましく、即ち、配列は、相対的に親水性の残基を含み、疎水性残基は実質的に回避される。配列番号2のこのような領域としては、例えば残基39～44、252～257、102～107、264～269および339～344が挙げられる。長いペプチド免疫原の好例としては、配列番号2の残基(i)131～148、(ii)230～253または(iii)333～355を含むペプチドが挙げられる。ペプチド(ii)は、付加的C末端c y s残基を用いて調製され、ペプチド(iii)は付加的N末端c y s残基を用いて調製されて、カップリングを促し得る。

#### 【0158】

本明細書中で用いる場合、「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、アフィニティー精製ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体および抗原結合断片、例えば、F(a b ' )<sub>2</sub>およびF a b タンパク質分解性断片を含む。遺伝子工学処理無傷抗体または断片、例えばキメラ抗体、F v 断片、一本鎖抗体等、ならびに合成抗原結合ペプチドおよびポリペプチドも含まれる。

#### 【0159】

非ヒト抗体は、非ヒトC D Rをヒト枠組み構造および定常部上に移植することにより、または非ヒト可変ドメインを組み入れることにより、ヒト化され得る（任意に、曝露残基の置換によりヒト様表面でそれらを「被う」が、この場合、結

果は「張り合わせ」抗体である)。いくつかの場合には、ヒト化抗体は、ヒト可変部枠組み構造ドメイン内に非ヒト残基を保持して、適正結合特性を増強し得る。抗体をヒト化することにより、生物学的半減期は増大され、ヒトへの投与時の悪免疫反応の可能性は低減され得る。モノクローナル抗体は、ヒト構造を有する抗体を産生するよう遺伝的に変更されたマウスにおいても産生され得る。

#### 【0160】

ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の調製および単離方法は、当業界で周知である(例えば、Cooligan, et al. (eds.), *Current Protocols in Immunology*, National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition, Cold Spring Harbor, NY, 1989; およびHurrell, J. G. R. (ed.), *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982参照)。

#### 【0161】

当業者に明らかなように、ポリクローナル抗体は、種々の温血動物、例えばウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ニワトリ、ウサギ、マウスおよびラットに z v e g f 4 ポリペプチドまたはその断片を接種することにより生成され得る。z v e g f 4 ポリペプチドの免疫原性は、亜襦袢後、例えばアルム(水酸化アルミニウム)またはフロイント完全または不完全アジュバントの使用により増大され得る。免疫感作に有用なポリペプチドとしては、融合ポリペプチド、例えば z v e g f 4 またはその一部と免疫グロブリンポリペプチドとのまたはマルトース結合タンパク質との融合体も挙げられる。ポリペプチド部分が「ハプテン様」である場合、このような部分は、免疫感作のために、高分子担体(例えばカギアナカサガイヘモシアニン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)または破傷風トキソイド)と有益に接合されるかまたは連結され得る。

#### 【0162】

本明細書中で有用な抗体を産生または選択するための代替的技法としては、z v e g f 4 タンパク質またはペプチドへのリンパ球のin vitro曝露、およびファージまたは同様のベクター中の抗体表示ライブラリーの選択(例えば、固定化ま

たは標識化 z v e g f 4 タンパク質またはペプチドの使用による) が挙げられる。考え得る z v e g f 4 ポリペプチド結合ドメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子は、ファージ上に表示される(ファージ表示)、または細菌、例えば大腸菌上に表示される無作為ペプチドライブラリーをスクリーニングすることにより得られる。

#### 【0163】

ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、多数の方法で、例えば無作為突然変異誘発および無作為ポリヌクレオチド合成により得られる。これらの無作為ペプチド表示ライブラリーを用いて、リガンドまたは受容体、生物学的または剛性高分子、あるいは有機または無機物質であり得る既知の標的と相互作用するペプチドに関してスクリーニングし得る。このような無作為ペプチド表示ライブラリーの作製およびスクリーニング技法は、当業界で既知であり(米国特許第5,223,409号(Ladner等)、米国特許第4,946,778号(Ladner等)、米国特許第5,403,484号(Ladner等)および米国特許第5,571,698号(Ladner等))、無作為ペプチド表示ライブラリーおよびこのようなライブラリーをスクリーニングするためのキットは、例えば、Clontech(Palo Alto, CA)、Invitrogen(San Diego, CA)、New England Biolabs, Inc.(Beverly, MA)およびPharmacia LKB Biotechnology Inc.(Piscataway, NJ)から商業的に入手可能である。

#### 【0164】

無作為ペプチド表示ライブラリーは、本明細書中に開示した z v e g f 4 配列を用いてスクリーニングして、z v e g f 4 と結合するタンパク質を同定し得る。z v e g f 4 ポリペプチドと相互作用するこれらの「結合タンパク質」は、細胞をタグするために、またはアフィニティ精製により相同体ポリペプチドを単離するために用いられ得るし、あるいはそれらは、直接または間接的に、薬剤、毒素、放射能核種等に連結され得る。

#### 【0165】

結合タンパク質は、分析方法に、例えば発現ライブラリーをスクリーニングするために、z v e g f 4 活性の中和するために、例えば配位子と受容体との間の相互作用を遮断するために、あるいはポリペプチドの循環レベルを確定するため

の、根元的病態または疾患のマーカーとしての可溶性ポリペプチドを検出または定量するための診断的検定のために、そしてin vitroおよびin vivoでのzvegf4結合およびシグナル伝達を遮断するためのzvegf4アンタゴニストとして用いられ得る。

#### 【0166】

対照(非zvegf4)ポリペプチドまたはタンパク質との結合親和性より少なくとも10倍高い親和性を有するzvegf4ポリペプチド、ペプチドまたはエピトープと結合する場合、抗体は特異的に結合すると決定される。この点で、「非zvegf4ポリペプチド」は、関連分子VEGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、zvegf3、PlGF、PDGF-AおよびPDGF-Bを含むが、しかし非ヒト種からのzvegf4ポリペプチドを排除する。zvegf4オルトログ間で予測される高レベルのアミノ酸配列同一性のために、ヒトzvegf4に特異的な抗体は他の種からのzvegf4とも結合し得る。抗体の結合親和性は、例えばScatchard分析(Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51:660-672, 1949)により、当業者に容易に確定され得る。

#### 【0167】

特異的抗体のスクリーニングおよび単離方法は、当業界で周知である(例えば、Paul(ed.), Fundamental Immunology, Raven Press, 1993; Getzoff et al., Adv. in Immunol. 43:1-98, 1988; Goding, J.W.(ed.), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Ltd., 1996; Benjamin et al., Ann. Rev. Immunol. 2:67-101, 1984参照)。

#### 【0168】

当業界で既知の種々の検定は、zvegf4タンパク質またはペプチドと特異的に結合する抗体を検出するために利用され得る。検定の好例は、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane(Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988に詳細に記載されている。このような検定の代表例としては、同時免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ、放射性免疫沈降法、酵素結合イムノソルベント検定(ELISA)、ドットプロットまたはウエスタンプロット検定、阻害または競合検定、ならびにサンドイッチ検定が挙げられる。さらに、抗体

は、野生型対突然変異体 z v e g f 4 タンパク質またはポリペプチドとの結合に関してスクリーニングされ得る。

#### 【0169】

特に興味深いのは、中和抗体、即ち、z v e g f 4 生物学的活性を遮断する抗体である。本発明内では、抗体は、1000倍モル過剰量で存在する場合に、z v e g f 4 タンパク質の生物学的活性を少なくとも50%遮断すると、中和するとみなされる。本発明のある種の実施態様内では、抗体は、100倍モル過剰量でまたは10倍モル過剰量で存在する場合、生物学的活性の50%を中和する。その他の実施態様内では、抗体は、z v e g f 4 活性の少なくとも60%、z v e g f 4 活性の少なくとも70%、z v e g f 4 活性の少なくとも80%、またはz v e g f 4 活性の少なくとも90%を中和する。

#### 【0170】

z v e g f 4 に対する抗体は、z v e g f 4 を発現する細胞をタグするために、アフィニティー精製によりz v e g f 4 を単離するために、z v e g f 4 ポリペプチドの循環レベルを確定するための診断検定のために、根元的病態または疾患のマーカーとしての可溶性z v e g f 4 を検出または定量するために、F A C Sを用いた分析的方法に、発現ライブラリーをスクリーニングするために、抗イディオタイプ抗体を生成するために、そして中和抗体として、またはz v e g f 4 活性を遮断するためのアンタゴニストとして、in vitroおよびin vivoで用いられ得る。適切な直接タグまたは標識としては、放射性核種、酵素、基質、コファクター、阻害剤、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子等が挙げられる。

#### 【0171】

間接的タグまたは標識は、中間体としてのビオチン - アビジンまたはその他の補体 / 抗補体対の使用を特徴とし得る。抗体は、薬剤、毒素、放射性核種等と直接または間接的に共役され得るし、そしてこれらの共役体は、in vivo診断または治療用途に用いられる。さらに、z v e g f 4 またはその断片に対する抗体は、検定において、例えばウエスタンブロットまたは当業界で既知のその他の検定において、変性z v e g f 4 またはその断片を検出するためにin vitroで用いら

れ得る。抗体は、z v e g f 4またはz v e g f 4に対する受容体を発現する細胞に対して結合里長的または診断的部分を標的化するためにも用いられ得る。z v e g f 4はPDGF および/または 受容体を結合し得る、ということを実験データは示唆する。

#### 【0172】

抗z v e g f 4抗体は、骨増殖または分化の低減から利益を受けるレシピエント、例えば骨肉腫または大理石骨病に罹患したレシピエントに投与され得る。z v e g f 4を過剰発現する動物においては、組織学的分析は、いくつかの場合に、骨髄のほとんどに取って代わる骨内膜骨（特に海綿質中の）の増殖、ならびに骨中の基質細胞の増殖を示した。抗z v e g f 4抗体はこれらの過程を妨げ、および/または骨芽細胞増殖および骨成長刺激を減少する。抗z v e g f 4抗体は、軟骨細胞の発達または増殖を刺激するz v e g f 4の能力を妨害することにより軟骨の生成を相殺するためにも用いられ得る。

#### 【0173】

さらに、抗z v e g f 4抗体は、前繊維症性応答を減少するために用いられ得る。z v e g f 4を過剰発現する動物の組織学的分析は、ある種の器官、特に肝臓、腎臓および肺における前繊維症性応答を検出した。いくつかの疾患または症状は、肝臓、肺および腎臓における繊維症を包含する。特に、アルコール中毒およびウイルス性肝炎は一般に肝臓繊維症を包含するが、これはしばしば肝硬変への前駆症状であって、これは次に冠不全の不可逆的状态へと進み得る。環境的作用物質への曝露に起因する肺繊維症（例えば石綿肺症、珪肺症）はしばしば、肺炎または間隙性炎症として発現する。

#### 【0174】

さらに、肺繊維症は、いくつかの癌療法、例えば電離放射線または化学療法薬の副作用として起こり得る。さらに、膠原病、例えば強皮症および狼瘡も肺繊維症を生じ得る。腎臓においては、膜性増殖性糸球体腎炎のヒト症状は、z v e g f 4を過剰発現する動物において観察される前繊維症性応答に対応し得る。狼瘡、B型およびC型肝炎で観察されるような慢性免疫複合体沈着、ならびに慢性膿瘍も、腎臓における前繊維症性応答を生じ得る。抗z v e g f 4抗体の投与は、

z v e g f 4 刺激性前繊維症性応答を有益に妨害し得る。このような応答としては、硬化性腹膜炎、手術、特に腹腔鏡手術後の癒着、および再狭窄が挙げられる。

#### 【0175】

z v e g f 4 タンパク質の活性は、培養細胞を用いて *in vitro* で、または適切な動物モデルに本発明の分子を投与することにより *in vivo* で、測定され得る。

z v e g f 4 活性検定で用いるための標的細胞としては、血管細胞（特に内皮細胞、血管周囲細胞および平滑筋細胞）、造血性（骨髄性およびリンパ系）細胞、肝細胞（例えば肝実質細胞、有窓性内皮細胞、クップファー細胞および伊東細胞）、繊維芽細胞（例えば、ヒト皮膚繊維芽細胞および肺繊維芽細胞）、神経突起細胞（星状細胞、グリア細胞、樹状細胞および P C - 12 細胞）、胎児肺細胞、関節滑膜細胞、周皮細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、腎臓メサンギウム細胞、骨髄基質細胞（K. Satomura et al., J. Cell. Physiol. 177:426-38, 1998 参照）ならびに細胞表面 P D G F 受容体を有するその他の細胞が挙げられる。

#### 【0176】

z v e g f 4 タンパク質は、当業界で周知の種々の方法、例えば受容体競合検定（Bowen-Pope and Ross, Methods Enzymol. 109:69-100, 1985）、可溶性受容体の使用および I g G 融合タンパク質として産生される受容体の使用（米国特許第5,750,375号）により、受容体結合活性に関して分析され得る。受容体結合検定は、評価のための既知の細胞表面受容体を含有する細胞株に関して実施され得る。受容体は細胞中に天然に存在し得る化、または遺伝子工学処理細胞により発現される組換え体受容体であり得る。z v e g f 4 を結合し得る細胞型は、サイトトキシンまたはその他の検出可能分子に連結された z v e g f 4 ポリペプチドの使用により同定され得る。

#### 【0177】

適切な検出可能分子としては、放射性核種、酵素、基質、コファクター、阻害剤、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子等が挙げられる。適切な細胞傷害性分子としては、細菌または植物毒素（例えばジフテリア毒素、シュードモナス外毒素、リシン、アブリン、サポリン等）、ならびに治療的放射性核種、例え

ばヨウ素 - 131、レニウム - 188またはイットリウム - 90が挙げられる。これらは、ポリペプチドに直接結合されるか、または既知の方法により、例えばキレート部分を介して間接的に結合され得る。ポリペプチドは、細胞傷害性薬剤、例えばアドリアマイシンとも連結され得る。

#### 【0178】

検出可能または細胞傷害性分子の間接的結合のためには、検出可能または細胞傷害性分子は、相補的 / 抗相補的対の一員と連結され、この場合、他方の成員はポリペプチドまたは抗体部分に結合される。これらの目的のために、ビオチン / ストレプタビジン、相補的 / 抗相補的対の好例である。組織培養における、器官培養における、または *in vivo* での、細胞による *z v e g f 4* - 毒素複合体の結合は、細胞中への複合体の取込みを可能にし、細胞死を引き起こす。この活性は、*z v e g f 4* を結合し、インターナライズし得る細胞型を同定するために用いられ得る。応答性細胞型の同定を可能にする他に、毒素複合体は、複合体の注入後の動物体内の病態を探ることにより、*z v e g f 4* が生物学的活性を有する器官および細胞を同定するための *in vivo* 試験に用いられ得る。

#### 【0179】

*z v e g f 4* タンパク質の活性は、培養細胞を用いて *in vitro* で測定され得る。有糸分裂活性は、既知の検定、例えば<sup>3</sup>H - チミジン取込み検定（例えば、Raines and Ross, *Methods Enzymol.* 109:749-773, 1985およびWahl et al., *Mol. Cell Biol.* 8:5016-5025, 1988により開示されているような）、染料取込み検定（例えば、Mosman, *J. Immunol. Meth.* 65:55-63, 1983およびRaz et al., *Acta Trop.* 68:139-147, 1997に開示されているような）または細胞計数を用いて測定され得る。

#### 【0180】

有糸分裂検定例は、(1) 増殖中の細胞をさらに刺激する *z v e g f 4* タンパク質の能力を求めるための20%集密培養、および(2) 接触誘導性増殖抑制を克服する *z v e g f 4* タンパク質の能力を求めるための48時間集密に保持された休止細胞への<sup>3</sup>H - チミジンの取込みを測定する (Gospodarowicz et al., *J. Cell Biol.* 70:395-405, 1976; Ewton and Florini, *Endocrinol.* 106:577-583, 19

80;およびGospodarowicz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7311-7315, 1989も参照)。細胞分化は、さらなる成熟表現型に分化するよう誘導され得る適切な前駆体を用いて検定され得る。

#### 【0181】

例えば、内皮細胞および造血細胞は、共通先祖細胞である血管芽細胞に由来する(Choi et al., Development 125:725-732, 1998)。間葉性幹細胞も、骨芽細胞への分化を刺激するzvegf4タンパク質の能力を測定するために用いられ得る。分化は、オステオカルシンの発現、鉱化する細胞の能力およびアルカリ性ホスファターゼの発現により示され、これらはすべて、当業界で既知のルーチン法により測定され得る。腫瘍細胞増殖および転移に及ぼすzvegf4タンパク質の作用は、例えば、Cao et al., J. Exp. Med. 182:2069-2077, 1995に記載されているように、ルイス肺癌モデルを用いて分析され得る。神経起源の細胞に及ぼすzvegf4タンパク質の活性は、神経突起発達に及ぼす作用を測定する検定を用いて分析され得る。zvegf4は、大動脈輪外方成長検定においても検定され得る(Nicosia and Ottinetti, Laboratory Investigation 63:115, 1990; Villaschi and Nicosia, Am. J. Pathology 143:181-190, 1993)。

#### 【0182】

zvegf4活性は、1つ又はそれ以上の付加的増殖因子またはその他の高分子のzvegf4誘導性産生を測定するよう意図された検定を用いても検出され得る。このような検定としては、肝細胞増殖因子(HGF)、上皮増殖因子(EGF)、トランスフォーミング増殖因子(TGF)、インターロイキン-6(IL-6)、VEGF、酸性繊維芽細胞増殖因子(aFGF)およびアンギオゲニンの存在を確定するものが挙げられる。適切な検定としては、当該高分子に応答する標的細胞を用いた有糸分裂検定、受容体結合検定、競合結合検定、免疫学的検定(例えば、ELISA)および当業界で既知のその他のフォーマットが挙げられる。

#### 【0183】

メタロプロテアーゼ分泌は、処置済一次ヒト皮膚繊維芽細胞、滑膜細胞および軟骨細胞から測定される。zvegf4タンパク質の存在下での培養に応答して

産生されるコラーゲナーゼ、ゼラチナーゼおよびストロマリシンの相対レベルは、ザイモグラムゲルを用いて測定される (Loita and Stetler-Stevenson, *Cancer Biology* 1:96-106, 1990)。被験タンパク質に応答する皮膚繊維芽細胞および軟骨細胞によるプロコラーゲン/コラーゲン合成は、発生期分泌コラーゲンへの<sup>3</sup>H-プロリン取込みを用いて測定される。

#### 【0184】

<sup>3</sup>H-標識コラーゲンは、SDS-PAGEとその後のオートラジオグラフィにより可視化される (Unemori and Amento, *J. Biol. Chem.* 265:10681-10685, 1990)。皮膚繊維芽細胞および軟骨細胞からのグリコサミノグリカン (GAG) 分泌は、1,9-ジメチルメチレンブルー染料結合検定を用いて測定される (Farndale et al., *Biochim. Biophys. Acta* 883:173-177, 1986)。コラーゲンおよびGAG検定は、IL-1 またはTGF- $\beta$  の存在下でも実行されて、これらのサイトカインに対する確立された応答を変更するzvegf4タンパク質の能力を検査し得る。

#### 【0185】

単球活性化検定は、(1)単球活性化をさらに刺激するzvegf4タンパク質の能力を求め、そして(2)付着誘導性または内毒素誘発性単球活性化を調整するzvegf4タンパク質の能力を検査するために実行される (Fuhlbrigge et al., *J. Immunol.* 138:3799-3802, 1987)。活性化に応答して産生されるIL-1 およびTNF- $\alpha$  レベルは、ELISAにより測定される (Biosource, Inc. Camarillo, CA)。単球/マクロファージ細胞は、CD14 (LPS受容体) の点から見て、内毒素に非常に感受性であり、中等度レベルの内毒素様活性を有するタンパク質は、これらの細胞を活性化する。

#### 【0186】

zvegf4タンパク質の造血活性は、培養中の種々の造血細胞に関して検定され得る。適切な検定としては、一次骨髄または末梢血白血球コロニー検定および後期血統制限コロニー検定が挙げられるが、これらは当業界で既知である (例えば、Holly et al., WIPO公告WO 95/21920)。適切な半固体培地 (例えば、15%ウシ胎仔血清、10%ウシ血清アルブミンおよび0.6%PSN抗生物質ミックス

を含有する50%メチルセルロース)上にプレート化された骨髓細胞は、ポリペプチドの存在下でインキュベートされ、次にコロニー形成に関して顕微鏡的に検査される。既知の造血因子は、対照として用いられる。

#### 【0187】

造血細胞株に及ぼす *zvegf4* ポリペプチドの有糸分裂活性は、 $^3\text{H}$ -チミジン取込み検定、染料取込み検定または細胞計数を用いて測定され得る (Raines and Ross, *Methods Enzymol.* 109:749-773, 1985およびFoster et al., 米国特許第5,641,655号)。例えば、細胞は、多重ウエル微小滴定プレート中で培養される。被験試料および $^3\text{H}$ -チミジンが付加され、細胞は37℃で一夜インキュベートされる。

#### 【0188】

ウエルの内容物はフィルターに移されて、乾燥され、標識の取込みを確定するために計数される。細胞増殖は、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT)の代謝分解を基礎にした比色検定を用いても測定され得る (Mosman、同上)。要するに、MTTの溶液が100  $\mu\text{l}$ の検定細胞に付加され、細胞は37℃でインキュベートされる。4時間後、イソプロパノール中の0.04 N HCl 200  $\mu\text{l}$ が付加され、溶液が混合されて、思慮の吸光度が570 nmで測定される。

#### 【0189】

細胞移動は、Kahler等 (*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17:932-939, 1997)により開示されたのと本質的には同様に検定される。タンパク質は、低タンパク質濃度の領域から高タンパク質濃度の領域への細胞の移動を誘導する場合、走化性であるとみなされる。検定は、2つの小室を分離するポリスチレン膜を有する変法ボイデン小室を用いて実施される (Transwell; Corning Costar Corp.)。

#### 【0190】

1% BSAを含有する培地中に希釈された被験試料は、Transwellを含む24ウエルプレートの低い方の小室に付加される。細胞は次に、0.2%ゼラチンで予備処理されたTranswell挿入物上に置かれる。細胞移動は、37℃で4時間のイン

キュベーション後に測定される。非移動細胞はTranswell膜の上部から拭い取られ、膜の低表面に付着された細胞が固定され、0.1%クリスタルバイオレットで染色される。次に、染色細胞を顕微鏡を用いて直接計数されるか、または10%酢酸で抽出して、600 nmで吸光度を測定される。次に、標準検量線から移動が算定される。

#### 【0191】

細胞付着活性は、LaFleur等 (J. Biol. Chem. 272:32798-32803, 1997) により開示されたのと本質的に同様に検定される。要するに、微小滴定プレートは被験タンパク質で被覆され、非特異的部位がBSAで遮断され、そして細胞（例えば平滑筋細胞、白血球または内皮細胞）は、約 $10^4 \sim 10^5$ 細胞/ウエルの密度でプレート化される。ウエルは37 で（典型的には約60分間）インキュベートされ、次に、静かに洗浄することにより、付着細胞が除去される。付着細胞は、慣用的方法により（例えば、クリスタルバイオレットで染色し、細胞を溶解し、そして溶解物の光学濃度を確定することにより）定量される。対照ウエルは、既知の付着性タンパク質、例えばフィブロネクチンまたはビトロネクチンで被覆される。

#### 【0192】

血管新生活性に関する検定も、当業界で既知である。例えば、新血管形成における原基内皮細胞に及ぼす *z v e g f 4* タンパク質の作用は、ヒヨコ漿尿膜血管新生検定で検定され得る (Leung, Science 246:1306-1309, 1989; Ferrara, Ann. NY Acad. Sci. 752:246-256, 1995)。要するに、8日齢孵化卵のからに小窓が開けられて、被験物質が漿尿膜に適用される。72時間後、膜は新生血管形成に関して検査される。その他の適切な検定としては、Drake等 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7657-7661, 1995) が開示したような初期ウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) 胚のマイクロインジェクション、MuthukkaruppanおよびAuerbach (Science 205:1416-1418, 1979) が開示したような角膜新生血管形成の齧歯類モデル（この場合、被験物質は近交系マウスの角膜のポケットに挿入される）、およびハムスター頬袋検定 (Hockel et al., Arch. Surg. 128:423-429, 1993) が挙げられる。

#### 【0193】

血管形成活性を示す血管透過性の誘導は、被験化合物の投与後の被験動物（例えばマウスまたはモルモット）の血管系からのタンパク質の漏出を検出するよう意図された検定で測定される（Miles and Miles, *J. Physiol.* 118:228-257, 1952; Feng et al., *J. Exp. Med.* 183:1981-1986, 1996）。血管新生活性に関する *in vitro* 検定は、微小血管内皮細胞による管様構造の形成を測定する三次元コーゲンゲルマトリックスモデル（Pepper et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189:824-831, 1992およびFerrara et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 732:246-256, 1995）、ならびにラミニン（Matrigel（商標）；Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ）を濃化した基底膜抽出物中に植え付けられた内皮細胞による細胞移動および管形成に及ぼす作用を確定するために用いられる基底膜マトリックスモデル（Grant et al., “Angiogenesis as a component of epithelial-mesenchymal interactions” in Goldberg and Rosen, *Epithelial-Mesenchymal Interaction in Cancer*, Birkhauser Verlag, 1995, 235-248; Baatout, *Anticancer Research* 17:451-456, 1997）を含む。血管新生検定は、VEGFの存在下および非存在下で実行して、考え得る組合せ作用を査定し得る。VEGFは、*in vivo* 検定内では対照として用いられ得る。

#### 【0194】

本発明の *zvegf4* タンパク質、アゴニスト、アンタゴニストおよび抗体の活性が測定され、軸索指針および成長を測定する検定を用いて、アゴニストおよびアンタゴニストを同定するために化合物がスクリーニングされる。特に興味深いのは、ニューロン成長パターンの変化を示す検定であって、これはHastings, WIPO公告W0 97/29189およびWalter et al., *Development* 101:685-96, 1987に開示されている。ニューロン成長に及ぼす作用を測定するための検定は、当業界で周知である。例えば、C検定（例えば、Raper and Kapfhammer, *Neuron* 4:21-9, 1990およびLuo et al., *Cell* 75:217-27, 1993）は、成長中のニューロンに及ぼす *zvegf4* の崩壊活性を確定するために用いられ得る。神経突起伸長の *zvegf4* 誘導性抑制を査定するかまたはこのような伸長を牽制し得るその他の方法も既知である（Goodman, *Annu. Rev. Neurosci.* 19:341-77, 1996参照）。

#### 【0195】

z v e g f 4 タンパク質、z v e g f 4 アゴニストまたはz v e g f 4 アンタゴニストを発現する細胞あるいはこのような細胞の集塊からの状態調節培地は、神経成長因子と同時培養された脊髄神経節 ( D R G ) または交感神経節外植片のような適切な神経細胞に接してゲルマトリックス中に入れる。対照細胞と比較して、ニューロン成長のz v e g f 4 誘導性変化が測定され得る ( 例えば、Messer smith et al., Neuron 14:949-59, 1995およびPuschel et al., Neuron 14:941-8, 1995に開示されているように)。同様に、神経突起外方成長は、本発明の分子の存在下で成長したニューロン細胞懸濁液を用いて測定され得る ( 例えば、O'Shea et al., Neuron 7:231-7, 1991およびDeFreitas et al., Neuron 15:333-43, 1995参照)。

#### 【0196】

P C 12クロム親和性細胞腫細胞 ( Banker and Goslin, in Culturing Nerve Cells, chapter 6, " Culture and experimental use of the PC12 rat Pheochromocytoma cell line " 参照 ; さらにRydel and Greene, J. Neuroscience 7 ( 11 ) :3639-53, November 1987参照) は、神経突起外方成長に及ぼす作用を調べるためにz v e g f 4 の存在下で増殖され得る。ニューロン集団への分化を誘導するためにN G F で前処理したP C 12細胞も、ニューロン細胞の生存を促進するz v e g f 4 の能力を確定するために、z v e g f 4 に曝露され得る。

#### 【0197】

z v e g f 4 タンパク質の生物学的活性は、外因性タンパク質の投与により、z v e g f 4 コードポリヌクレオチドの発現により、そしてアンチセンスまたはノックアウト技法を介した内因性z v e g f 4 発現の抑制により、非ヒト動物で試験され得る。z v e g f 4 タンパク質は、別々に、他のz v e g f 4 タンパク質と組合せて、あるいは非v e g f 3 タンパク質、例えばその他の増殖因子 ( 例えば、その他のV E G F、P 1 G F またはP D G F ) と組合せて投与されまたは発現され得る。例えば、z v e g f 4 ポリペプチドの組合せ ( 例えばz v e g f 4<sub>19-179</sub> およびz v e g f 4<sub>258-370</sub> の組合せ ) は、被験動物に投与されるかまたは動物中で発現され得る。被験動物は、臨床症状、体重、血球数、臨床化学、組織病理学などのようなパラメーターの変化に関してモニタリングされる。

## 【0198】

冠状動脈側副成長の刺激は、既知の動物モデル、例えば末梢四肢虚血および後肢虚血のウサギモデルおよび慢性心筋虚血のブタモデルで測定され得る (Ferrara et al., *Endocrine Reviews* 18:4-25, 1997)。zvegf4タンパク質は、VEGF、アングリオポイエチンおよび塩基性FGFの存在下および非存在下で検定されて、組合せ作用に関して試験する。これらのモデルは、下記でさらに詳細に開示されるような遺伝子送達のためのアデノウイルスまたは裸DNAの使用により修飾されて、被験タンパク質(単数または複数)の局所発現を生じ得る。

## 【0199】

創傷治癒を促す場合のzvegf4ポリペプチドの効力は、動物モデルで検定され得る。このようなモデルの1つは、Mustoe等 (*Science* 237:1333, 1987)の線状皮膚切開モデルである。典型的な手法では、6-cm切開が成体ラットの背中毛皮に作製され、その後それは創傷クリップで閉じられる。被験物質および対照(溶液、ゲルまたは粉末形態で)が初回閉鎖前に適用される。投与は一般に1回適用に限定されるが、しかし、切開したのいくつかの部位での注意深い注入により、後日、付加的適用がなされ得る。創傷裂け目強度は、創傷後3~21日目に評価される。

## 【0200】

第二モデルでは、多数の小さい全厚切除が、ウサギの耳になされる。耳の軟骨は創傷を副木のように固定して、閉鎖の評価から創傷収縮の変数を除外する。実験的処置および対照処置が適用される。創傷部位の幾何学および解剖学的構造は、細胞内方成長および上皮移動の信頼できる定量、ならびに創傷の生化学的定量分析(例えば、コラーゲン含量)を可能にする (Mustoe et al., *J. Clin. Invest.* 87:694, 1991参照)。ウサギ耳モデルは、臨床症状に非常によく似た虚血性創傷環境を作製するよう修正され得る (Ahn et al., *Ann. Plast. Surg.* 24:17, 1990)。

## 【0201】

第三モデル内では、ブタまたはモルモットにおける部分厚皮膚創傷の治癒が評価される (LeGrand et al., *Growth Factors* 8:307, 1993)。実験的処置が、包

帯上または下に毎日適用される。創傷後数日目に、顆粒形成組織厚が確定される。このモデルは、創傷治癒の他のin vivoモデルより定量できであるので、一般に用量-応答試験のために用いられる。全厚切除モデルも用いられ得る。このモデル内では、上皮および真皮は、齧歯類においては皮筋層まで、またはブタにおいては皮下脂肪まで除去される。実験的処置は、包帯の上または下に局所的に適用され、所望により毎日適用され得る。

#### 【0202】

創傷は、収縮と細胞内方成長および増殖の組合せにより閉鎖する。測定可能終点としては、創傷閉鎖までの時間、組織学的スコアおよび創傷組織の生化学的パラメーターが挙げられる。創傷治癒欠陥モデルも当業界で既知である（例えば、Cromack et al., Surgery 113:36, 1993; Pierce et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2229, 1989; Greenhalgh et al., Amer. J. Pathol. 136:1235, 1990）。創傷治癒過程の遅延または延長は、ステロイドによる処置、創傷部位の刺激により薬理的に、または併在疾患状態（例えば糖尿病）により誘導され得る。線状切開または全厚切除は、実験的創傷として最も一般的に用いられる。

#### 【0203】

終点は、各種類の創傷に関して前記のようである。皮下移植片は、創傷治癒の各段階に作用する化合物を査定するために用いられ得る（Broadley et al., Lab. Invest. 61:571, 1985; Sprugel et al., Amer. J. Pathol. 129:601, 1987）。移植片は、多孔質の相対的に非炎症性容器（例えば、ウシコラーゲンを充填したポリエチレンスポンジまたは発泡ポリテトラフルオロエチレン移植片）中に調製され、マウスまたはラットの皮下に配置される。移植片の内部は、細胞を欠いており、十分に限定された、そして先在組織から分離可能な「創傷間隙」を生じる。この配置は、細胞流入および細胞型の査定、ならびに脈管形成/血管新生および細胞外マトリックス産生の測定を可能にする。

#### 【0204】

動物体内のzvegf4タンパク質の発現は、in vivoでのタンパク質活性の過剰生成または抑制の生物学的作用の試験のためのモデルを提供する。zvegf4コードポリヌクレオチドは、ウイルスベクターまたは裸DNAを用いて被験

動物、例えばマウス中に導入され得るし、あるいはトランスジェニック動物が産生され得る。z v e g f 4タンパク質は一般に、分泌ペプチドを用いて発現される。適切な分泌ペプチドとしては、z v e g f 4分泌ペプチド（例えば、配列番号2の残基1~18）および異種分泌ペプチドが挙げられる。異種分泌ペプチドの好例は、ヒト組織プラスミノゲン活性剤（t - P A）のものである。t - P A分泌ペプチドは、米国特許第5,641,655号に開示されているように所望のタンパク質分解的切断を低減するよう修飾され得る。

#### 【0205】

本発明のタンパク質を検定するためのin vivoアプローチの1つは、ウイルス送達系を利用する。この目的のためのウイルスの齢としては、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルスおよびアデノ随伴ウイルス（A A A）が挙げられる。二本鎖DNAウイルスであるアデノウイルスは、今日、異種核酸の送達のための最もよく研究された遺伝子導入ベクターである（再検討のためには、Becker et al., Meth. Cell Biol. 43:161-89, 1994; およびDouglas and Curiel, Science & Medicine 4:44-53, 1997参照）。アデノウイルス系は、いくつかの利点を提供する。

#### 【0206】

アデノウイルスは、（i）相対的に大型のDNA挿入物を収容し、（ii）高力価に増殖され、（iii）広範囲の哺乳類細胞型に感染し、そして（iv）多数の異なるプロモーター、例えば遍在する、組織特異的なおよび調節可能なプロモーターとともに用いられ得る。アデノウイルスは血流中で安定であるため、それらは静脈内注入により投与され得る。

アデノウイルスゲノムの一部が欠失されたアデノウイルスを用いて、直接連結によりまたは同時トランスフェクト化プラスミドとの同種組換えにより、挿入物はウイルスDNA中に取り込まれる。

#### 【0207】

例示的系では、必須E1遺伝子はウイルスベクターから欠失されており、E1遺伝子が宿主細胞（ヒト293細胞株が好例である）により提供されない限り、ウイルスは複製しない。無傷動物に静脈内投与した場合、アデノウイルスは主に肝

臓を標的にする。アデノウイルス送達系がE 1 遺伝子欠失を有する場合、ウイルスは宿主細胞中で複製できない。しかしながら、宿主の組織（例えば肝臓）は、異種タンパク質を発現し、加工処理する（そして、分泌シグナル配列が存在する場合には、分泌する）。分泌タンパク質は、高血管新生化肝臓中の循環に進入し、感染動物に及ぼす作用が確定され得る。

#### 【0208】

z v e g f 4 を発現するアデノウイルスの鼻腔内送達は、肺組織に対して z v e g f 4 タンパク質を標的化する。さらに、z v e g f 4 を発現するアデノウイルスは、脳組織に直接投与され得る。ウイルス遺伝子の種々の欠失を含有するアデノウイルスベクターは、ベクターに対する免疫応答を低減または排除するための試みに用いられ得る。このようなアデノウイルスは、E 1 欠失性であり、さらに、E 2 A または E 4 の欠失を含有する (Lusky et al., J. Virol. 72:2022-2032, 1998; Raper et al., Human Gene Therapy 9:671-679, 1998)。

#### 【0209】

さらに、免疫応答を低減するための E 2 b の欠失が報告されている (Amalfitano, et al., J. Virol. 72:926-933, 1998)。すべてのウイルス転写単位が欠失されたいわゆる「中身の無い」アデノウイルスの生成は、異種 DNA の大型挿入物の挿入のために特に有益である (再検討のためには、Yeh and Perricaudet, FASEB J. 11:615-623, 1997 参照)。

#### 【0210】

別の実施態様では、z v e g f 4 遺伝子は、例えば米国特許第5,399,346号 (Anderson等) ; Mann et al., Cell 33:153, 1983 ; 米国特許第4,650,764号 (Temin等) ; 米国特許第4,980,289号 (Temin等) ; Markowitz et al., J. Virol. 62:1120, 1988 ; 米国特許第5,124,263号 (Temin等) ; WIPO公告W095/07358 (Dougherty等、1995年3月16日公開) ; および Kuo et al., Blood 82:845, 1993 に記載されているように、レトロウイルスベクター中に導入され得る。

#### 【0211】

代替的方法では、ベクターは、リポソームを用いた in vivo での「リポフェクション」により導入され得る。合成陽イオン性脂質は、マーカーをコードする遺

伝子の *in vivo* トランスフェクションのためのリポソームを調製するために用いられ得る (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7, 1987; Mackey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8027-31, 1988)。特定器官に *in vivo* で外因性遺伝子を導入するためのリポフェクションの使用は、ある種の実際の利点を有する。

#### 【0212】

特定細胞に対するリポソームの分子ターゲティングは、利点の一領域を示す。例えば、特定の細胞型にトランスフェクションを向けることは、細胞不均一性を有する組織、例えば脾臓、肝臓、腎臓および脳において特に有益である。脂質は、ターゲティングの目的のために他の分子と化学的にカップリングされ得る。標的化ペプチド (例えばホルモンまたは神経伝達物質)、抗体のようなタンパク質、あるいは非ペプチド分子は、リポソームに化学的に結合され得る。

#### 【0213】

別の実施態様内では、標的細胞は動物から取り出され、DNA が裸 DNA プラスミドとして導入される。次に動物の身体中に形質転換化細胞が再移植される。裸 DNA ベクターは、当業界で既知の方法により、例えばトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAE デキストラン、リン酸カルシウム沈澱、遺伝子銃の使用または DNA ベクター運搬体の使用により、所望の宿主細胞中に導入され得る (例えば、Wu et al., J. Biol. Chem. 267:963-7, 1992; Wu et al., J. Biol. Chem. 263:14621-4, 1988 参照)。

#### 【0214】

「トランスジェニックマウス」と呼ばれる *zvegf4* 遺伝子を発現するよう工学処理されたマウス、および「ノックアウトマウス」と呼ばれる *zvegf4* 遺伝子機能の完全非存在を示すマウスも生成され得る (Snouwaert et al., Science 257:1083, 1992; Lowell et al., Nature 366:740-42, 1993; Capecchi, Science 244:1288-1292, 1989; Palmiter et al., Ann. Rev. Genet. 20:465-499, 1986)。トランスゲネシス実験は、正常マウスおよび遺伝子疾患またはその他の表現型変更を有するマウスを用いて実施され得る。遍在的、あるいは組織特異

的または組織制限性プロモーター下で、*zvegf4*を過剰発現するトランスジェニックマウスは、過剰発現が表現型変化を生じるか否かを確定ために用いられ得る。

#### 【0215】

プロモーターの例としては、メタロチオネイン、アルブミン、ApoA1およびエノラーゼ遺伝子プロモーターが挙げられる。メタロチオネイン-1 (MT-1) プロモーターは、肝臓およびその他の組織における発現を提供し、しばしば高レベルの循環タンパク質をもたらす。野生型*zvegf4*ポリペプチド、ポリペプチド断片またはその突然変異体の過剰発現は、正常細胞過程を変えて、*zvegf4*発現が機能的に関連する組織を同定する表現型を生じ得るし、*zvegf4*、そのアゴニストまたはアンタゴニストに対する治療的標的を示し得る。例えば、トランスジェニックマウスは、全長*zvegf4*配列を過剰発現するよう工学処理され、これがヒト疾患との類似性を示す表現型を生じ得る。

#### 【0216】

同様に、ノックアウト*zvegf4*マウスは、*zvegf4*が*in vivo*で絶対に必要であるか否かを確定するために用いられ得る。ノックアウトマウスの表現型は、*zvegf4*アンタゴニストの*in vivo*作用を予測する。ノックアウトマウスは、例えば癌、アテローム硬化症、慢性関節リウマチ、虚血および心臓血管性疾患を含めた疾患のモデルにおける*zvegf4*タンパク質の作用を試験するためにも用いられ得る。ヒト*zvegf4* DNAは、その後ノックアウトマウスを生成するために用いられる前記のようなネズミ*zvegf4* mRNA、cDNAおよびゲノムDNAを単離するために用いられ得る。

#### 【0217】

これらのマウスは、*zvegf4*遺伝子およびそれによりコードされるタンパク質を*in vivo*系で調べるために用いられ得るし、対応するヒト疾患に対する*in vivo*モデルとして用いられ得る。さらに、本明細書中に記載した*zvegf4*アンチセンスポリヌクレオチドまたは*zvegf4*に対して向けられるリボザイムを発現するトランスジェニックマウスは、前記のノックアウトマウスと同様に用いられ得る。

## 【0218】

アンチセンス法は、zvegf4遺伝子転写を抑制して、このような抑制のin vivoでの作用を調べるために用いられ得る。zvegf4コードポリヌクレオチド（例えば、配列番号1で記述されるようなポリヌクレオチド）のセグメントと相補的であるポリヌクレオチドは、zvegf4コードmRNAと結合し、このようなmRNAの翻訳を抑制するよう意図される。このようなアンチセンスポリヌクレオチドは、細胞培養中のzvegf4ポリペプチドコード遺伝子の発現を抑制するためにも用いられ得る。

## 【0219】

zvegf4タンパク質は、ヒト医学および獣医学に療法的に用いて、組織の発達または修復を、あるいは細胞分化または増殖を刺激し得る。特定の用途としては、全厚皮膚創傷、例えば静脈うっ滞性潰瘍および、その他の、特に真正糖尿病のための弱体化創傷治癒の場合における慢性非治癒性創傷、結合組織性疾患、喫煙、熱傷およびその他の悪化性症状の治療；骨折修復；皮膚移植；新生血管形成を促し、皮膚フラップ生存を増大するための再構成的手術内；移植細胞および組織、例えば移植ランゲルハンス島における血管網を確立するため；女性生殖器性疾患、例えば急性または慢性胎盤不全（周産期病的状態および死亡を引き起こす重要因子）および長期出血を治療すること；歯周病により損傷された組織の増殖を促すため；

## 【0220】

血管移植片およびステントの内皮化を促すため；微小血管の欠損を特徴とする消化管の急性および慢性病変、例えば十二指腸潰瘍の治療に；血管新生を促し、急性または慢性脳虚血によるニューロン変性を防止するため；虚血性四肢における側副血管の形成を促進するため；バルーン血管形成およびステント留置のような侵襲性手法後の血管再内皮化を促し、内膜過形成を低減するため；虚血性損傷を限定するよう、心筋梗塞後の側副循環の血管修復および発達を促すため；そして造血を刺激するための用途が挙げられるが、これらに限定されない。ポリペプチドは、治癒組織の再血管形成を促すための組織接着における有用な添加剤でもある。

## 【0221】

特に興味深いのは、慢性活動性肝炎および多数の他の種類の肝硬変を含めた慢性肝臓疾患のための損傷を含めた肝臓損傷の治療または修復のための z v e g f 4 の使用である。ほとんど全部の肝臓の破壊を含めた広範な塊状壊死は、とりわけ、激症ウイルス性肝炎；鎮痛薬アセトアミノフェンの過剰投与；他の薬剤および化学物質、例えばハロタン、モノアミンオキシダーゼ阻害剤、結核の治療に用いられる作用物質、リン、四塩化炭素、ならびにその他の工業的化学品への曝露により引き起こされ得る。

## 【0222】

明白な肝細胞壊死を必ずしも生じない微細構造病変に関連した症状としては、小児におけるライ症候群、テトラサイクリン中毒および妊娠の急性脂肪肝が挙げられる。肝硬変、繊維症により特性化される散在性過程、および構造的異常小結節への正常構造物の変換は、アルコール乱用、壊死後肝硬変（通常は慢性活動性肝炎による）、胆汁性肝硬変、色素肝硬変、特発性肝硬変、ウィルソン病および - 1 - アンチトリプシン欠損症を含めた種々の理由のために起こり得る。z v e g f 4 は、右側心不全において現れる連続対を示す2つの循環性変化である肝性慢性受動性うっ血（CPC）および中心出血性壊死（CHN）の治療のためにも有用であり得る。z v e g f 4 により治療され得るその他の循環性障害としては、肝静脈血栓症および心臓硬化症が挙げられる。

## 【0223】

肝臓繊維症の場合、繊維症性肝臓における細胞外マトリックスの産生に関与した星状細胞の活性化を抑制するために z v e g f 4 アンタゴニストを投与するのが有益であり得る（Li and Friedman, J. Gastroenterol. Hepatol. 14:618-633, 1999）。一般的に、z v e g f 4 は抗繊維症薬として有益に用いられ得る。前繊維症性応答により特性化される症状としては、硬化性腹膜炎；手術（特に腹腔鏡手術）後癒着（これらは小腸閉塞、再手術時の困難性、骨盤癒着および骨盤痛を引き起こし得る）（N. Panay and A.M. Lower, Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 11:379-85, 1999参照）；肺性繊維症；ならびに再狭窄が挙げられる。

## 【0224】

z v e g f 4 ポリペプチドは、単独でまたはその他の脈管形成または血管形成剤、例えばV E G F およびアンジオポイエチン1 および2 と組合せて投与され得る。例えば、塩基性および酸性F G F、A n g - 1、A n g - 2 およびV E G F は、側副循環の発達に一役を演じることが判明しており、1つ又はそれ以上のこれらの因子とのz v e g f 4 の併用は、有益であり得る。V E G F は、移植島細胞の生存にも関連があった (Gorden et al., Transplantation 63:436-443, 1997; Pepper, Arteriosclerosis, Throm. and Vascular Biol.17:605-619, 1997)。

#### 【0225】

塩基性F G F は、実験動物において、血管新生を誘導し、潰瘍の治癒を促進することが示されている (Folkman, Nature Medicine 1:27-31, 1995により再検討)。V E G F は、再狭窄の動物モデルにおいて、脈管再内皮化を促し、内膜過形成を低減することが示されている (Asahara et al., Circulation 91:2802-2809, 1995; Callow et al., Growth Factors 10:223-228, 1994)。z v e g f 4 ポリペプチドの効力は、これらのそしてその他の既知のモデルにおいて試験され得る。付加的作用物質と組合せてz v e g f 4 を用いる場合、2つの化合物は、特定の症状が治療されるのに適した時に同時にまたは順次投与され得る。

#### 【0226】

z v e g f 4 タンパク質は、単独で、またはその他の造血因子、例えばI L - 3、G - C S F、G M - C S F または幹細胞因子と組合せて用いて、内皮前駆体幹細胞を含めた造血性幹細胞の拡張および可動化を増強し得る。この方法で増殖され得る細胞としては、骨髓から単離される細胞、例えば骨髓基質細胞 (K. Satomura et al., J. Cell. Physiol. 177:426-38, 1998参照)、または血液から単離される細胞が挙げられる。z v e g f 4 タンパク質は、固体に直接投与されて、処置固体内の内皮性幹細胞酸性および分化を増強し得る。幹細胞は、患者体内で発生したのも、あるいは患者に提供し戻されたのも、その後、身体内の虚血領域を調整するのに一役を演じ、それにより治療作用を提供し得る。

#### 【0227】

これらの細胞は、血管移植片、血管ステントのような内皮到達範囲を欠く領域

、ならびに内皮到達範囲が損傷されるかまたは除去されていた領域（例えば、血管形成術領域）の再内皮かを増強するのにも有用であり得る。z v e g f 4タンパク質は、虚血（心臓または末梢虚血）、器官移植片、創傷治癒および組織移植の領域を含めた新生血管形成を必要とする領域における新規の血管形成を作製し、安定化するのに役立つために、その他の増殖および分化因子、例えばアンギオポイエチン - 1（Davis et al., Cell 87:1161-1169, 1996）と組合せて用いられ得る。

#### 【0228】

z v e g f 4タンパク質、アゴニストおよびアンタゴニストは、神経突起増殖および発達を調整し、そして神経系構造を区分するために用いられ得る。このようなものとして、z v e g f 4タンパク質、アゴニストおよびアンタゴニストは、脊髄および感覚神経突起外方成長を増大することにより、末梢ニューロパシーの治療として有用である。z v e g f 4アンタゴニストは、卒中、頭部損傷により引き起こされる脳損傷、および脊髄損傷により引き起こされる麻痺後の神経突起外方成長の再生のための療法的処置の一部であり得る。適用は、神経変性疾患、例えば多発性硬化症、アルツハイマー病およびパーキンソン病を治療する場合にもなされ得る。適用は、胃組織の発達および神経支配パターンを媒介する場合にもなされ得る。

#### 【0229】

z v e g f 4は、PDGF様活性、例えば繊維芽細胞、血管平滑筋細胞および周皮細胞に及ぼす有糸分裂活性を有することが判明している。z v e g f 4は、動物モデルにおける骨成長を刺激することも判明している。これらの結果は、z v e g f 4タンパク質が骨および靭帯の成長を促進するのに有用である、ということを示唆する。このような用途としては、例えば歯周病、骨折（非融合性骨折を含む）、移植片受容部位、骨移植片ならびに軟骨および/または靭帯損傷を包含する関節損傷の治療が挙げられる。z v e g f 4は、その他の骨刺激因子、例えばIGF - 1、EGF、TGF - 、PDGFおよびBMPと組合せて用いられ得る。歯周病の治療に増殖因子を用いるための方法は、当業界で既知である（例えば、米国特許第5,124,316号およびLynch et al.同上、参照）。

## 【0230】

製薬的使用のために、z v e g f 4タンパク質、アンタゴニストおよび抗体は、慣用的方法にしたがって、局所的または非経口的、特に静脈内または皮下送達のために処方される。概して、製剤処方物は、製薬上許容可能なビヒクル、例えば生理食塩水、緩衝化生理食塩水、水中の5%デキストロース等と組合せて、z v e g f 4ポリペプチドを含む。処方物は、1つ又はそれ以上の賦形剤、防腐剤、可溶化剤、緩衝剤、バイアル表面のタンパク質損失を防止するためのアルブミン、増粘剤、ゲル化剤等をさらに含み得る。

## 【0231】

処方方法は、当業界で周知であり、例えばRemington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 19<sup>th</sup> ed., 1995に開示されている。z v e g f 4は、普通は約10~100 µg/ml総容量の濃度で用いられるが、しかし1 ng/ml~1000 µg/mlの範囲の濃度も用いられ得る。局所適用のために、例えば創傷治癒の促進のために、タンパク質は、0.1~10 µg/cm<sup>2</sup>創傷面積の範囲で適用される。的確な用量は、治療される症状の性質および重症度、患者の体質等を考慮しながら、容認された標準にしたがって臨床医により確定される。用量の決定は、当業者のレベル内である。

## 【0232】

治療的処方物は一般に、新生血管形成に要する期間中、典型的には1~数ヶ月間、そして慢性症状の治療の場合には1年またはそれ以上、投与される。投与は、治療期間中、毎日または間欠的になされる。静脈内投与は、1~数時間の典型的期間中のボラス注射または注入による。持放性処方物も用いられ得る。概して、z v e g f 4の治療的有効量は、処置症状における臨床的有意変化、例えば創傷閉鎖に必要とされる時間の臨床的に有意の低減、創傷面積の有意の低減、血管新生の有意の改善、病的状態の有意の低減または組織学的スコアの有意の増大を生じるのに十分な量である。

## 【0233】

本発明のタンパク質は、始原細胞および培養細胞株の両方を含む応答性細胞型の増殖、分化、移動または代謝を調整するために有用である。この点で特に興味

深いのは、造血細胞（幹細胞および成熟骨髄およびリンパ様細胞を含む）、内皮細胞、神経細胞、間葉細胞（繊維芽細胞、周皮細胞、星状細胞、糸球体間質細胞、軟骨細胞および平滑筋細胞を含む）、および骨由来細胞（骨芽細胞および破骨細胞前駆体を含む）である。z v e g f 4 ポリペプチドは、約10 pg/ml ~ 約1000 ng/mlの濃度で、これらの細胞型のための組織培地に付加される。z v e g f 4 タンパク質は培地中でその他の増殖因子と有益に組合され得る、と当業者は認識する。

#### 【0234】

実験室研究分野内では、z v e g f 4 タンパク質は、分子量標準として、タンパク質の循環レベルを決定するための検定における、例えばz v e g f 4 タンパク質の過剰 - または過小酸性により特性化される障害の診断における試薬として、または細胞表現型の分析における標準としても用いられ得る。

#### 【0235】

z v e g f 4 タンパク質は、それらの活性の阻害剤を同定するためにも用いられ得る。被験化合物は、前記の検定に付加されて、z v e g f 4 タンパク質の活性を抑制する化合物を同定する。前記の検定の他に、試料は、受容体結合あるいはz v e g f 4 依存性細胞応答の刺激 / 抑制を測定するよう意図された種々の検定内のz v e g f 4 活性の抑制に関して試験され得る。例えば、z v e g f 4 応答性細胞株は、z v e g f 4 刺激性細胞経路に応答性であるレポーター遺伝子構築物でトランスフェクト化され得る。

#### 【0236】

この型のレポーター遺伝子構築物は当業界で既知であり、検定可能タンパク質、例えばルシフェラーゼをコードする遺伝子と作用可能に連結されるz v e g f 4 活性化血清応答素子 (SRE) を一般に含む。候補化合物、溶液、混合物または抽出物は、レポーター遺伝子発現のz v e g f 4 刺激の低減により立証されるような標的細胞上のz v e g f 4 の活性を抑制する能力に関して試験される。この種類の検定は、細胞表面受容体と結合するz v e g f 4 を直接遮断する化合物、ならびに受容体 - リガンド結合後の細胞経路における過程を遮断する化合物を検出する。

## 【0237】

代替的検定では、化合物およびその他の試料は、検出可能標識（例えば<sup>125</sup>I、ビオチン、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、FITC等）でタグされたzvegf4を用いて受容体に結合するzvegf4の直接遮断に関して検定され得る。この種の検定内では、受容体との標識化zvegf4の結合を抑制する被験試料の能力は、抑制活性を示し、これは、二次検定により確認され得る。結合検定内で用いられる受容体は、細胞性受容体または単離固定化受容体であり得る。

## 【0238】

zvegf4タンパク質の活性は、受容体結合およびその後の生理学的細胞応答に関連した細胞外酸性化速度または陽子排出を測定するシリコンベースのバイオセンサーマイクロフィジオメーターで測定され得る。このような装置の例は、Molecular Devices, Sunnyvale, CA製造のサイトセンサー™マイクロフィジオメーターである。種々の細胞応答、例えば細胞増殖、イオン輸送、エネルギー産生、炎症性応答、調節および受容体活性化等は、この方法で測定され得る（例えば、McConnell et al., Science 257:1906-1912, 1992; Pitchford et al., Meth. Enzymol. 228:84-108, 1997; Arimilli et al., J. Immunol. Meth. 212:49-59, 1998;およびVan Liefde et al., Eur. J. Pharmacol. 346:87-95, 1998参照）。

## 【0239】

マイクロフィジオメーターは、接着性または非接着性真核生物または原核生物細胞を検定するために用いられ得る。細胞培地中の細胞外酸性化変化を長時間測定することにより、マイクロフィジオメーターは、zvegf4タンパク質、それらのアゴニストおよびアンタゴニストを含めた種々の刺激に対する細胞応答を直接測定する。マイクロフィジオメーターは、zvegf4ポリペプチドに反応しない対照真核生物細胞と比較した場合の、zvegf4反応性真核生物細胞の応答を測定するために用いられ得る。zvegf4反応性真核生物細胞は、zvegf4に対する受容体がトランスフェクトされてzvegf4に反応する細胞を作製する細胞、ならびに血管または神経組織由来の細胞のようにzvegf4

に天然に応答する細胞を含む。

#### 【0240】

対照と比較して z v e g f 4 ポリペプチドに曝露された細胞の応答における、細胞外酸性化の変化により測定される差は、z v e g f 4 調整細胞応答の直接測定値である。さらに、このような z v e g f 4 調整応答は、種々の刺激下で検定され得る。したがって本発明は、z v e g f 4 タンパク質のアゴニストおよびアンタゴニストの同定方法であって、z v e g f 4 ポリペプチドに応答性の細胞を提供し、被験化合物の非存在下で細胞の第一部分を培養し、被験化合物の存在下で細胞の第二部分を培養し、そして細胞の第一部分と比較した場合の細胞の第二部分の細胞応答の変化を検出することを包含する方法を提供する。

#### 【0241】

細胞応答の変化は、細胞外酸性化速度の測定可能変化として示される。z v e g f 4 の存在下および被験化合物の非存在下での細胞の第三部分の培養は、z v e g f 4 応答性細胞に関する陽性対照を、そして z v e g f 4 ポリペプチドの活性を有する被験化合物のアゴニスト活性を比較するための対照を提供する。z v e g f 4 のアンタゴニストは、被験化合物の存在下および非存在下で z v e g f 4 タンパク質に細胞を曝露することにより同定され得るが、それによる z v e g f 4 刺激性活性の低減は被験化合物のアンタゴニスト活性を示す。

#### 【0242】

z v e g f 4 タンパク質は、z v e g f 4 刺激性経路に応答する細胞、組織または細胞株を同定するためにも用いられ得る。前記のマイクロフィジオメーターは、リガンド応答性細胞、例えば z v e g f 4 タンパク質に応答する細胞を迅速に同定するために用いられ得る。細胞は、z v e g f 4 ポリペプチドの存在下または非存在下で培養される。z v e g f 4 の存在下で細胞外酸性化の測定可能変化を引き出す s ばは、z v e g f 4 に応答性である。応答細胞は、次に、前記のような z v e g f 4 ポリペプチドのアンタゴニストおよびアゴニストを同定するために用いられ得る。

#### 【0243】

z v e g f 4 活性の阻害剤 ( z v e g f 4 アンタゴニスト ) としては、抗 z v

e g f 4 抗体および可溶性 z v e g f 4 受容体、ならびにその他のペプチドおよび非ペプチド作用物質、例えばリボザイム、小分子阻害剤、および z v e g f 4 ポリペプチドの血管新生的または有糸分裂的不活性受容体結合断片が挙げられる。このようなアンタゴニストは、有糸分裂性、走化性または血管新生性作用を含めた z v e g f 4 の生物学的活性を遮断するために用いられ得る。

#### 【0244】

これらのアンタゴニストは、したがって、発達中の腫瘍の新生血管形成を抑制することにより、または腫瘍細胞増殖を直接遮断することにより、固形腫瘍の増殖を低減するのに、糖尿病性網膜症、乾癬、関節炎および強皮症の治療に、ならびに瘢痕形成を含めた繊維症を低減するのに有用である。z v e g f 4 の阻害剤は、z v e g f 4 活性が病原性である増殖性血管性疾患の治療にも有用であり得る。このような障害としては、血管形成術、動脈内膜切除術、血管移植、器官移植または血管ステント留置後のアテローム硬化症および内膜過形成性再狭窄が挙げられる。これらの症状は、ある種の因子が臨床結果に有用であり、他のものは病原性である複合増殖因子媒介性応答を包含する。

#### 【0245】

z v e g f 4 の阻害剤は、眼の新生血管形成、例えば糖尿病性網膜症および年齢関連黄斑変性の治療にも有用であることも立証し得る。実験的証拠は、これらの書状が網膜における低酸素症により誘導される血管軽視絵因子の発現に起因する、ということを示唆する。

z v e g f 4 アンタゴニストは、炎症性障害、例えば慢性関節リウマチおよび乾癬の治療においても興味深い。慢性関節リウマチにおいては、V E G F は、軟骨に侵襲し、破壊する広範血管化組織であるパックスの形成に重要な役割を演じることを、試験は示唆する。乾癬性病変は、血管過多であり、血管新生性ポリペプチド I L - 8 を過剰発現する。

#### 【0246】

z v e g f 4 アンタゴニストは、増殖期中の V E G F および b F G F の過剰発現を示す乳児期血管腫の治療にゆうようであることも立証し得る。

阻害剤の正確な化学的および物理的性質ならびに処置される症状を考慮しながら

ら、一般的に前記に開示されたような製薬的使用のために、阻害剤は処方される。関連する決定は、処方業界の当業者のレベル内である。その他の血管新生および脈管形成性因子、例えばVEGFおよびbFGFは、病理学的新生血管形成に関係があった。このような場合、これらのその他の因子の1つ又はそれ以上の阻害剤とzvegf4阻害剤を併用するのが有益であり得る。

#### 【0247】

本発明のポリペプチド、核酸および抗体は、細胞損失または異常細胞増殖（癌を含む）、例えば損傷性または過剰脈管形成または血管新生、ならびに神経系の疾患の診断または治療に用いられ得る。標識化zvegf4ポリペプチドは、腫瘍または異常細胞増殖のその他の部位をイメージングするために用いられ得る。成体動物における血管新生は一般に創傷治癒および女性生殖周期に限定されるため、それは病理学的過程の非常に特異的な指標である。血管新生は、例えば発達中の固形腫瘍、網膜症および関節炎を示す。

#### 【0248】

zvegf4ポリペプチドおよび抗zvegf4抗体は、薬剤、毒素、放射性核種等と直接または間接的に連結され得るし、そしてこれらの連結体は、in vivo診断または治療用途に用いられる。例えば、本発明のポリペプチドまたは抗体は、対応する抗相補的分子（例えば、それぞれ受容体または抗原）を発現する組織または器官を同定または治療するために用いられ得る。さらに、zvegf4ポリペプチドまたは抗zvegf4抗体、あるいはその生物活性断片または部分は、検出可能または細胞傷害性分子と結合され、そして抗相補的分子を発現する細胞、組織または器官を有する哺乳類に送達され得る。

#### 【0249】

例えば、zvegf4のCUBドメインは、前記の湯なセマフォリンに対してペプチドおよび非ペプチド部分を標的にするために用いられ得る。別の実施態様では、ポリペプチド-毒素融合タンパク質または抗体/断片-毒素融合タンパク質は、標的化細胞あるいは組織抑制または除去のために、例えば癌療法において、用いられ得る。この点で特に興味深いのは、zvegf4ポリペプチドとサイトトキシンの連結体であり、これは、腫瘍、あるいは望ましくない血管新生また

は新脈管形成が進行中のその他の組織に対してサイトキシンを標的にするために用いられ得る。

#### 【0250】

別の実施態様では、z v e g f 4 - サイトカイン融合タンパク質または抗体 / 断片 - サイトカイン融合タンパク質は、in vitro細胞傷害性（例えば、腫瘍標的に対するモノクローナル抗体により媒介される）を増強するために、そして標的組織（例えば、血液および骨髄癌）のin vivo殺害を増強するために用いられ得る（全般的に、Hornick et al., Blood 89:4437-4447, 1997参照）。概して、サイトカインは、全身投与される場合、毒性である。

#### 【0251】

記載された融合タンパク質は、所望の作用部位、例えばz v e g f 4に関する結合部位を有する細胞に対するサイトカインのターゲッティングを可能にし、それによりサイトカインの局所濃度増大を提供する。この目的のための適切なサイトカインとしては、例えばインターロイキン2および顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子（GM - CSF）が挙げられる。このような融合タンパク質は、腫瘍および血管新生または新脈管形成が進行中のその他の組織のサイトカイン誘導性殺害を引き起こすために用いられ得る。

#### 【0252】

さらに別の実施態様では、z v e g f 4ポリペプチドまたは抗z v e g f 4抗体は、放射性核種と、特に 放射性放射能核種と共役されて、再狭窄を低減し得る。例えば、必要な放射線量が送達されるまで患者のステント処置血管中に置かれるイリジウム - 192含浸リボンは、血管中での組織増殖低減、ならびにプラセボリボンを施された対照群より大きい管腔直径を示した。さらに、再血管形成およびステント血栓症は、治療群では有意に低かった。同様の結果は、本明細書中に記載したように、放射性核種を含有する生物活性共役体のターゲッティングに関して予測される。

#### 【0253】

本明細書中に記載した生物活性ポリペプチドまたは抗体共役体は、静脈内、動脈内または導管内的に送達され得るし、あるいは意図された作用部位に局所的に

導入され得る。

z v e g f 4 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、z v e g f 4 活性を増大または抑制するのが望ましい遺伝子療法用途内で有用である。例えば、Isner等 (The Lancet (同上)) は、V E G F 遺伝子療法が虚血四肢の血管成長を促進すると報告した。z v e g f 4 遺伝子療法のさらに別の用途としては、創傷治癒の刺激、血管移植片の再集団化、神経突起成長の刺激、ならびに癌増殖および転移の抑制が挙げられる。この点で有用な遺伝子送達系としては、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスおよび裸DNAベクターが挙げられる。

#### 【0254】

本発明は、診断的使用のためのポリヌクレオチドも提供する。例えば、z v e g f 4 遺伝子、z v e g f 4 DNAまたはRNAを含むプローブ、あるいはその亜配列は、突然変異がヒト第11染色体上のz v e g f 4 遺伝子座で起きているか否かを確定するために用いられ得る。z v e g f 4 遺伝子座での検出可能染色体異常としては、異数性、遺伝子コピー数変化、挿入、欠失、制限部位変化、および再配列が挙げられるが、これらに限定されない。このような異常は、分子遺伝子技法、例えば制限断片長多型性 (RFLP) 分析、PCR法を用いる短タンDEM反復 (STR) 分析、および当業界で既知のその他の遺伝子連鎖分析技法を用いることにより、本発明のポリヌクレオチドを用いて検出され得る (Sambrook et al. 同上; Ausubel et al. 同上; A.J.Marian, Chest 108:255-265, 1995)。

以下の実施例により本発明をさらに説明するが、本発明はこれらに限定されない。

#### 【0255】

##### 実施例

##### 実施例 1 .

ヒト多組織ノーザンプロットI、II、IIIおよびヒトRNAマスタープロット (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) をプローブして、z v e g f 4 の組織発現を確定した。5分間沸騰させ、次に1分間氷冷させた、1 mgのサケ精子DNAを含有するハイブリダイゼーション溶液 (ExpressHyb™ハイブリダイゼーション溶液: Clontech Laboratories, Inc.) 10 ml中で65 °Cで3時間、ブ

ロットを予備ハイブリダイズした。

#### 【0256】

用いたプローブは、市販のキット (Marathon™ cDNA増幅キット (Clontech Laboratories, Inc.)) を用いて、各々20 pmolのプライマーZC21,119 (配列番号25) およびZC21,120 (配列番号26) ならびに心臓RNAから調製した5 μlの心臓cDNAライブラリーを用いて生成した251-bp PCR断片であった。反応は以下のように実行した: 94 °Cで1分; 次に94 °Cで20秒、67 °Cで1分を30サイクル; そして72 °Cで5分で終了した。PCR産物をゲル精製し、シリカゲル膜を含有するスピンカラム (QIAquick™ Gel Extraction Kit; Qiagen, Inc., Valencia, CA) を用いてゲルスラブからDNAを溶離した。

#### 【0257】

その結果生じたzvegf4断片51 ngを、市販キット (Rediprime™ II無作為プライム標識系; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.) を用いて<sup>32</sup>Pで標識した。プッシュカラム (Nuc Trap (商標) カラム; Stratagene, La Jolla, CA; 米国特許第5,336,412号参照) を用いて非取込み放射能を除去した。10 × 10<sup>6</sup> cpmのその結果生じた標識化プローブおよび1 mgのサケ精子DNAを5分間沸騰させ、1分間氷冷して、次に10 mlのハイブリダイゼーション溶液 (ExpressHyb™) と混合し、プロットに付加した。ハイブリダイゼーションは、65 °Cで一夜実施し、その後2XSSC、0.1% SDS中で、室温で、次に50 °Cで0.1XSSC、0.1% SDS中で起きた。プロットを-80 °Cで一夜、フィルムに露出させた。

骨髄以外のすべての組織中に、約4.4 kbの転写体が存在した。心臓、膵臓、胃および副腎は、ノーザンプロット上に最強zvegf4発現を示し、ドットプロットはさらに、下垂体および卵巣中の強発現を示した。

#### 【0258】

##### 実施例2.

VEGFファミリーとのその相同により、ヒト慢性骨髄性白血病細胞 (K562) ライブラリーからのクローンの配列から、zvegf4を同定した。下垂体ライブラリーからのクローンの長配列読み取りから、付加的配列を解明した。zvegf4に関するアンチセンス発現配列タグ (EST) を見出し、それに関して

、その5'相手を同定した。この5'EST (EST448186; GenBank) は、zvegf4に関する5'非翻訳化配列を含有すると思われた。EST448186からプライマーを設計し、配列中のギャップを閉じた。

#### 【0259】

各々20 pmのZC21,987 (配列番号27) およびZC21,120 (配列番号26) ならびに1.93 µgの甲状腺ライブラリーをPCR反応に用いた。それは、5% DMSOおよび1/10容積の市販試薬 (GC-Melt™; Clontech Laboratories, Inc.) を用いた変法PCR反応であった。反応を94 °Cで1分間実行し、次に94 °Cで20秒、67 °Cで1分を30サイクル;そして72 °Cで最終5分のインキュベーションを実行した。その結果生じた833-bp産物をシーケンシングし、開始METコドン、上流終止コドンおよび5'非翻訳化配列を有するコード配列の残りを含有するzvegf4断片であることが判明した。複合配列は、1,110 bp (配列番号1) の開放読取枠を包含した。

#### 【0260】

##### 実施例3.

zvegf4遺伝子を発現するトランスジェニック動物を作製するためには、成体の生殖能力のある雄(種牡)(B6C3f1、2~8か月齢(Taconic Farms, Germantown, NY))、精管切除雄(非種牡)(B6D2f1、2~8か月齢(Taconic Farms))、前思春期の生殖能力のある雌(ドナー)(B6C3f1、4~5週齢(Taconic Farms))および成体の生殖能力のある雌(レシピエント)(B6D2f1、2~4か月齢(Taconic Farms))を要する。

#### 【0261】

ドナーを1週間順化させた後、約8 IU / マウスの妊娠雌ウマ血清ゴナドトロピン (Sigma, St. Louis, MO) を腹腔内注射し、46~47時間後、8 IU / マウスのヒト絨毛膜ゴナドトロピン (hCG (Sigma)) を腹腔内投与して、過剰排卵を誘導する。ホルモン注射後にドナーを種牡と交配させた。排卵は一般に、hCG注射の13時間以内に起こる。交配翌朝、膣栓の存在により交尾を確証する。

#### 【0262】

手術鏡 (Leica MZ12 Stereo Microscope; Leica, Wetzlar, Germany) 下で受

精卵を収集する。卵管を収集し、ヒアルロニダーゼ (Sigma Chemical Co.) を含入する検尿スライドに卵を放出させる。卵をヒアルロニダーゼ中で1回、5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub> および90% N<sub>2</sub> とともに37 °C でインキュベートさせておいたWhittenのW640培地 (氷7 ; 試薬はすべて、Sigma Chemical Co. から入手可能) で2回洗浄する。マイクロインジェクションまで、卵を37 °C / 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中に保存する。

【0263】

【表7】

表 7

	<u>mgs/200ml</u>	<u>mgs/500ml</u>
NaCl	1280	3200
KCl	72	180
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	32	80
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	60	150
グルコース	200	500
Ca <sup>2+</sup> 乳酸塩	106	265
ベンジルペニシリン	15	37.5
ストレプトマイシンSO <sub>4</sub>	10	25
NaHCO <sub>3</sub>	380	950
Naピルビン酸	5	12.5
H <sub>2</sub> O	200ml	500ml
500mM EDTA	100 μl	250 μl
5%フェノールレッド	200 μl	500 μl
BSA	600	1500

【0264】

zvegf4 DNAを発現ベクターpHB12-8に挿入する (図2参照)。ベクターpHB12-8は、Nrui部位へのラットインスリンIIイントロン (約200 bp) およびポリリンカー (FleI/PmeI/AscI) の挿入により、p2999B4 (Palmiter et al., Mol. Cell Biol. 13:5266-5275, 1993) から得た。ベクターは、マウスメタロチオネイン (MT-1) プロモーター (約750 bp) およびヒト成長ホルモン (hGH) 非翻訳化領域および10 kbのMT-15'フランキング配列および7 kbのMT-13'フランキング配列に挟まれたポリA

デニル化シグナル(約650 bp)を含む。cDNAをインスリンIIおよびhGH配列間に挿入する。

#### 【0265】

10~20 $\mu$ gのプラスミドDNAを線状化し、ゲル精製して、10 mMトリスpH7.4、0.25mMEDTA pH8.0中に再懸濁させて、マイクロインジェクション用に最終濃度を5~10 ng/ $\mu$ lとする。

温CO<sub>2</sub>平衡化鉱油を上に被せた一滴のW640培地中に含入された収穫した卵にプラスミドDNAをマイクロインジェクトする。DNAを注射針(内径0.75mm、外径1mmのホウケイ酸ガラス毛管から引き込まれる)中に引き入れて、個々の卵に注入する。各卵に注射針を突き刺して、一倍体前核の一方または両方に入れる。

#### 【0266】

ピコリットルのDNAを前核中に注入し、核小体と接触することなく注射針を引き抜く。すべての卵に注入するまで、操作を反復する。首尾よくマイクロインジェクト処理された卵を、予備ガス処理したW640培地を含入する器官組織培養皿に移して、37 /5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で一夜保存する。

翌日、2細胞胚を偽妊娠レシピエントに移す。精管切除生殖不能牡との交尾後、交尾栓の存在により、レシピエントを同定する。レシピエントを麻酔処置し、背左側部を剃毛して、手術顕微鏡に移す。胸郭、鞍状部および後足、膝と脾臓の間の中程で輪郭された腹部領域の中央で、筋壁を経て皮膚中に小切開を作製する。生殖器官を小外科用布上に外出させる。脂肪パッドを外科用布上に延ばして、止血小鉗子(Roboz, Rockville, MD)を脂肪パッドに取り付形質転換、マウスの背中上に吊したままにして、器官が滑り戻るのを防止する。

#### 【0267】

鉱油、その後に交互にW640および気泡を含入する細い移入用ピペットを用いて、前日の注入からの12~17個の健常2細胞胚をレシピエントに移す。腫脹膨大部を突き止め、膨大部と包との間の卵管を保持し、包の知覚に28 g針を用いて卵管の切れ目を作り、膨大部または包を引き裂かないよう確かめる。

ピペットを卵管の切れ目に移して、胚を吹き出して、最初の気泡をピペットか

ら逃がす。脂肪パッドを静かに腹膜に押しつ形質転換、生殖器官を滑り込ませる。腹壁を一本の縫い糸で閉じて、皮膚を創傷クリップで塞ぐ。37 スライドウォーマー上で最低4時間、マウスを回復させる。

レシピエントを対でケージに戻し、19~21日間妊娠させる。出産後、産後19~21日経過後に、離乳させる。離乳仔を雌雄鑑別し、性別ケージに分けて入れ、0.5 cm生検（遺伝子型分類に用いる）を清潔な鋏で尾部から切り取る。

#### 【0268】

メーカーの使用説明書にしたがって市販キット（DNeasy™ 96組織キット；Qiagen, Valencia, CA）を用いて、尾部小片からゲノムDNAを調製する。トランスジェニックベクターのヒト成長ホルモン（hGH）3' UTR部分に指示されたプライマーを用いてPCRにより、ゲノムDNAを分析する。ヒト配列に独特の領域（ヒトおよびマウス成長ホルモン3' UTR DNA配列のアラインメントから同定）の使用は、PCR反応がマウス配列を増幅しないことを確認する。

#### 【0269】

プライマーZC17,251（配列番号28）およびZC17,252（配列番号29）は、hGHの368塩基対断片を増幅する。さらに、ベクター配列とハイブリダイズし、cDNA挿入物を増幅するプライマーZC17,156（配列番号30）およびZC17,157（配列番号31）は、hGHプライマーとともに用いられ得る。これらの実験では、導入遺伝子に対して陽性である動物からのDNAは、2つの帯域、即ちhGH 3' UTR断片に対応する368塩基対帯域およびcDNA挿入物に対応する可変サイズの帯域を生じる。

#### 【0270】

動物がトランスジェニック（TG）であることが確認されれば、TG雌に野生型雄を、あるいはTG雄に1匹または2匹の野生型雌を手配することより、それらは純系系統に戻し交配される。仔を産ませ、離乳させたら、性別に分けて、遺伝子型分類のためにそれらの尾を切り取る。

生きている動物中の導入遺伝子の発現に関して調べるために、部分肝切除を実施する。剣状突起真下の上腹部の手術準備をする。滅菌技法を用いて、1.5~2 cmの小切開を胸骨下に作製し、肝臓の左側葉を外出させる。4-0絹糸を用いて、下

葉周囲に結び目を作って、体腔の外側にそれをしっかり確保する。

#### 【0271】

非外傷性鉗子を用いて結び目を保持し、一方で吸収性Dexon (American Cyanamid, Wayne, N.J.) の第二ループを最初の結び目の近位におく。Dexon結び目から遠位切断をおこなって、約100 mgの切除肝組織を滅菌ペトリ皿に入れる。切除肝切片を14 mlポリプロピレン丸底管に移して、液体窒素中で急速凍結させ、ドライアイス上に保存する。手術部位を縫い糸および創傷クリップで閉じて、動物のケージを37 加熱パッド上に術後24時間載せる。動物を術後毎日点検し、術後7~10日目に創傷クリップをはずす。

メーカーの説明書にしたがって、RNA溶液ハイブリダイゼーション検定、またはABI Prism 7700 (PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) 上でのリアルタイムPCRを用いて、各導入遺伝子のmRNA発現レベルの分析を実行する。

#### 【0272】

##### 実施例4.

相同組換えにより、zvegf4をコードするポリヌクレオチドの全部または一部を含有する発現プラスミドを構築する。zvegf4挿入点を挟むベクター配列に対応する5' および3' 末端にフランキング領域を有する配列番号1のポリヌクレオチド配列を用いるPCRにより、zvegf4cDNAの断片を単利する。PCRのためのプライマーは、各々、5' ~ 3' 末端：ベクターからの40 bpのフランキング配列、ならびにzvegf4の開放読取枠からのアミノおよびカルボキシル末端に対応する17 bpを含む。

#### 【0273】

10 µlの100 µl PCR反応液を、分析のために1 x TBE緩衝液を含有する0.8 % LMPアガロースゲル (Seaplaque GTG) 上で実行する。残りの90 µlのPCR反応液を、5 µlの1M NaClおよび250 µlの無水エタノールの付加により沈澱させる。SmaIで切断させておいたプラスミドpZMP6を、PCR断片を用いる組換えのために使用する。

#### 【0274】

p R S 316 ( 寄託番号77145でアメリカ培養細胞コレクションAmerican Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に寄託) から採取した酵母遺伝子要素、ポリオウイルスからの内部リボソーム進入部位 ( I R E S ) 素子、および膜貫通ドメインのC末端で切頭化されたCD8の細胞外ドメインを用いて、p Z P 9 ( 寄託番号98668でアメリカ培養細胞コレクションAmerican Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に寄託) からプラスミドp Z M P 6を構築する。p Z M P 6は、マウスメタロチオネイン - 1プロモーター、コード配列の挿入のための多制限部位、終止コドンおよびヒト成長ホルモントーミネーターを有する発現カセットを含有する哺乳類発現ベクターである。

#### 【0275】

プラスミドは、大腸菌の複製起点；SV40プロモーター、エンハンサーおよび複製起点を含む哺乳類選択可能マーカー発現単位、DHFR遺伝子およびSV40ターミネーター；ならびにサッカロミセス・セレビスエー (*S. cerevisiae*) における選択および複製に必要なURA3およびCEN-ARS配列も含有する。

#### 【0276】

100  $\mu$ lのコンピテントサッカロミセス・セレビスエー (*S. cerevisiae*) を別々に、前記からの10  $\mu$ lの種々のDNA混合物と併合し、0.2 cm電気穿孔キュベットに移す。酵母/DNA混合物を0.75 kV (5 kV/cm)、オーム、25  $\mu$ Fで電気穿孔処理する。各キュベットに、600  $\mu$ Lの1.2Mソルビトールを付加し、2つのURA-Dプレート上の2つの300  $\mu$ lアリコートに酵母を入れて、30 でインキュベートする。約48時間後、1つのプレートからのUra<sup>+</sup>酵母形質転換体をH<sub>2</sub>O中に再懸濁して、短時間回転させて酵母細胞をペレット化する。

#### 【0277】

細胞ペレットを1 mlの溶解緩衝液 (2%トリトンX-100、1%SDS、100mM NaCl、10mMトリス、pH8.0、1mMEDTA) 中に再懸濁する。300  $\mu$ lの酸洗浄済ガラスビーズおよび200  $\mu$ lのフェノール-クロロホルムを含有するエッペンドルフ管に500  $\mu$ lの溶解混合物を付加し、1分間隔で2または3回掻き混ぜて、エッペンドルフ遠心管中で最大速度で5分間、回転させる。300  $\mu$ lの水性相を新しい

管に移して、600  $\mu$ lのエタノール ( E t O H ) でDNAを沈澱させた後、4 で10分間遠心分離する。DNAペレットを10  $\mu$ lのH<sub>2</sub>O中に再懸濁する。

#### 【0278】

0.5~2 mlの酵母DNAプレップおよび40  $\mu$ lの細胞を用いて、エレクトロコンピテント大腸菌宿主細胞 ( Electormax DH10B™細胞 ; Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MDから入手 ) の形質転換を実行する。1.7 Kv、25  $\mu$ Fおよび400 ohmで細胞を電気パルス処理する。電気穿孔後、1 ml SOC ( 2%Bacto™ トリプトン ( Difco, Detroit, MI )、0.5%酵母抽出物 ( Difco )、10mM NaCl、2.5mMKCl、10mMMgCl<sub>2</sub>、10mMMgSO<sub>4</sub>、20mMグルコース ) を、4つのLBAMPプレート ( LBブロス ( Lennox )、1.8% Bacto™ 寒天 ( Difco )、100 mg/Lのアンプシリン ) 上の250  $\mu$ lアリコート中に入れる。

#### 【0279】

制限消化により z v e g f 4 に関する正しい発現構築物を保有する個々のクローンを同定して、前駆体不挿入物の存在を立証し、種々のDNA配列が互いに正しく連結されていたことを確認する。陽性クローンの挿入物に配列分析を施す。メーカーの使用説明書にしたがって、市販キット ( QIAGENプラスミドマキシキット、Qiagen, Valencia, CA ) を用いて、大型プラスミドDNAを単離する。正しい構築物は、z v e g f 4 / p Z M P 6 と呼ばれる。

#### 【0280】

##### 実施例5 .

CHO DG44細胞 ( Chasin et al., Som. Cell. Molec. Genet. 12:555-566, 1986 ) を10 cm組織培養皿に入れ、HamのF12 / FBS培地 ( HamのF12培地、Life Technologies )、5%ウシ胎仔血清 ( Hyclone, Logan, UT )、1%L-グルタミン ( JRH Biosciences, Lenexa, KS )、1%ピルビン酸ナトリウム ( Life Technologies ) 中で、37 / 5%CO<sub>2</sub>で一夜、約50%~70%集密に増殖させる。

#### 【0281】

次に、血清無含有 ( S F ) 培地処方物 ( HamのF12、10 mg/mlトランスフェリン、5 mg/mlインスリン、2 mg/mlフェチイン、1%L-グルタミンおよび1%ピルビン酸ナトリウム ) 中の膜濾過水 ( Lipofectamine™試薬、Life Technologies

)中のポリ陽イオン性脂質2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スぺルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンイミニウム-トリフルオロアセテートおよび中性脂質ジオレイルホスファチジルエタノールアミンの3:1(w/w)リポソーム処方物を用いて、リポソーム媒介性トランスフェクションにより、細胞をプラスミドzvegf4/pZMP6でトランスフェクトする。

#### 【0282】

zvegf4/pZMP6を15 ml管中で、SF培地により最終総容量640 $\mu$ lに希釈する。35 $\mu$ lのリポフェクタミン<sup>TM</sup>を605 $\mu$ lのSF培地と混合する。リポフェクタミン<sup>TM</sup>混合物をDNA混合物に付加し、室温で約30分間インキュベートさせる。5 mlのSF培地をDNA:リポフェクタミン<sup>TM</sup>混合物に付加する。細胞を5 mlのSF培地で1回すすぎ、吸引して、DNA:リポフェクタミン<sup>TM</sup>混合物を付加する。細胞を37 $^{\circ}$ Cで5時間インキュベートし、次に6.4 mlのHamのF12/10%FBS、1%PSN培地を各プレートに付加する。

#### 【0283】

プレートを37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートし、翌日、DNA:リポフェクタミン<sup>TM</sup>混合物を新鮮な5%FBS/Ham培地に取り換える。トランスフェクション後3日目に、細胞をT-175フラスコ中の増殖培地に滑り込ませる。トランスフェクション後7日目に、FITC-抗CD8モノクローナル抗体(Pharmacia, San Diego, CA)で、その後抗FITC連結磁気ビーズ(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)で染色する。メーカーの指示にしたがって市販カラム(MiniMACS分離ユニット; Miltenyi Biotec)を用いてCD8陽性細胞を分離し、ヌクレオシドを含有しないが、50 nMメトトレキサートを含有するDMEM/HamのF12/5%FBS(選択培地)中に入れる。

#### 【0284】

選択培地中の96ウエル皿中に0.5、1および5細胞/ウエルの密度で、サブクロニングのために、細胞をプレート化し、約2週間増殖させる。培地の蒸発に関してウエルを点検し、この過程中、必要な場合には200 $\mu$ l/ウエルに足し戻す。プレート中の大きいパーセンテージのコロニーがほぼ集密になったら、ドットブ

ロットによる分析のために100  $\mu$ lの培地を各ウエルから収集して、新鮮な選択培地を供給する。上清をドットプロット装置中のニトロセルロースフィルターに適用し、フィルターを真空炉中で100 で処理してタンパク質を変性させる。フィルターを625mMトリス - グリシン、pH9.1、5mM -メルカプトエタノール中で65 で10分間インキュベートし、次に2.5%脱脂粉乳ウエスタンA緩衝液(0.25%ゼラチン、50mMトリス - HCl、pH7.4、150mMNaCl、5mMEDTA、0.05%イゲパルCA-630)中で、回転振盪器上で4 で一夜、インキュベートする。

#### 【0285】

フィルターを抗CD8抗体 - HRP連結体とともに2.5%脱脂粉乳ウエスタンA緩衝液中で、回転振盪器上で室温で1時間、インキュベートする。次に、PBS+0.01%トゥイーン20中で、フィルターを室温で3回、1回当たり15分間洗浄する。メーカーの指示にしたがって化学発光試薬(ECL™直接標識キット; Amersham Corp., Arlington Heights, IL)を用いてフィルターを発現させて、約5分間、フィルム(Hyperfilm ECL, Amersham)に曝露させる。陽性クローンをトリプシン処理して、96ウエル皿からスケールアップのために選択培地中の6ウエルさらに移し、ウエスタンプロットにより分析する。

#### 【0286】

##### 実施例6 .

FseIおよびAscI制限Vをそれぞれ5'および3'末端に付加するプライマーを用いて、PCRによりzvegf4のタンパク質コード領域を増幅する。PCRプライマーを、以下のようにPCR反応液中の全長zvegf4cDNAを含有する鋳型とともに用いる: 95 で5分間を1サイクル; その後、95 で1分間、58 で1分間および72 で1.5分間を15サイクル; その後72 で7分間; その後、4 で浸漬。PCR反応産物を、TAE緩衝液中の1.2%(低溶融)(SeaPlaque GTG™; FMC, Rockland, ME)ゲル上に載せる。zvegf4PCR産物をゲルから切り出して、シリカゲル膜(QIAquick™ゲル抽出キット; Qiagen, Inc., Valencia, CA)を含有する回転カラムを用いて、キット使用説明書にしたがって精製する。

#### 【0287】

次にPCR産物を消化し、フェノール/クロロホルム抽出して、EtOH沈澱処理し、20 ml TE (トリス/EDTA、pH8) 中で再水和させる。次にzvegf4断片をトランスジェニックベクターpHB12-8のクローニング部位に連結して、電気穿孔により大腸菌宿主細胞 (Electromax DH10B™細胞; Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MDから入手) 中で形質転換させる。制限分析により、zvegf4 DNAを含有するクローンを同定する。直接シーケンシングにより、陽性クローンを確認する。

#### 【0288】

FseIおよびAscI酵素を用いて、pTG12-8ベクターからzvegf4 cDNAを放出させる。1%低溶融アガロースゲル上でcDNAを単離し、次にゲルから切り出す。ゲル薄片を70℃で溶融させて、等容量のトリス緩衝化フェノールで2回抽出し、EtOH沈澱させる。DNAを10 μl H<sub>2</sub>O中に再懸濁させる。

#### 【0289】

修飾pAdTrack CMVのFseI - AscI部位にzvegf4 cDNAをクローン化する (He et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2509-2514, 1998)。この構築物は、GFPマーカージン遺伝子を含有する。GFP発現を駆動するCMVプロモーターをSV40プロモーターに置き換えておき、そしてSV40ポリアダニル化シグナルはヒト成長ホルモンポリアダニル化シグナルに置き換えておいた。さらに、ネイティブポリリンカーはFseI、EcoRVおよびAscI部位に置き換えておいた。この修飾化形態のpAdTrack CMVは、pZyTrackと命名した。DNA連結およびスクリーニングキット (Fast-Link™; Epicentre Technologies, Madison, WI) を用いて、連結を実施する。

#### 【0290】

プラスミドを線状化するために、約5 μgのpZyTrack zvegf4プラスミドをPmeIで消化する。約1 μgの線状化プラスミドを、200ngの超らせん化pAdEasy (He et al., 同上) とともにBJ5183細胞中で同時形質転換する。同時形質転換は、2.5kV、200 ohmおよび25 μFでBio-Rad遺伝子パルサーを用いて実行する。25 μg/mlカナマイシンを含有する4 LBプレート上で、全同

時形質転換をプレート化する。最小コロニーを摘出して、LB/カナマイシン中で拡大させて、標準DNAミニプレプ手法により組換えアデノウイルスDNAを同定する。FseI-AscIによる組換えアデノウイルスDNAの消化は、zvegf4DNAの存在を確認する。組換えアデノウイルスミニプレプDNAを大腸菌DH10Bコンピテント細胞中で形質転換させて、DNAをそれから調製する。

#### 【0291】

約5 $\mu$ gの組換えアデノウイルスDNAを、20~30UのPacIを含有する100 $\mu$ lの反応容量中で、PacI酵素(New England Biolabs)で37 $^{\circ}$ Cで3時間消化する。消化DNAを等容量のフェノール/クロロホルムで2回抽出して、エタノールで沈澱させる。DNAペレットを10 $\mu$ lの蒸留水中に再懸濁させる。前日に植え付け、60~70%集密まで増殖させたQBI-293A細胞(Quantum Biotechnologies, Inc., Montreal, Canada)のT25フラスコを、PacI消化DNAでトランスフェクトした。PacI消化DNAを、滅菌HBSS(150mMNaCl、20mMHEPES)で50 $\mu$ lの総容量まで希釈する。分離管中で、20 $\mu$ lの1mg/mlN-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルスルフェート(DOTAP;Boehringer Mannheim)を、HBSSで100 $\mu$ lの総容量に希釈する。

#### 【0292】

DNAをDOTAPに付加し、上下にピペティングすることにより静かに混合し、15分間室温で放置する。293A細胞から培地を除去し、1mMピルビン酸ナトリウム(Life Technologies)、0.1mMEM非必須アミノ酸(Life Technologies)および25mMHEPES緩衝液(Life Technologies)を含有する5ml血清無含有MEM-(Life Technologies, Gaithersburg, MD)で洗浄する。5mlの血清無含有MEMを293A細胞のT25フラスコに滴下し、静かに混合して、37 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベートする。4時間後、DNA/脂質混合物を含有する培地を吸引し、5%ウシ胎仔血清を含有する5mlの完全MEMに置き換える。グリーン蛍光タンパク質(GFP)発現および病巣の形成(ウイルスプラーク)に関して、トランスフェクト化細胞をモニタリングする。

## 【0293】

組換えアデノウイルスDNAによる293A細胞のトランスフェクションの数日後に、GFPタンパク質を発現する細胞は病巣を形成し始める。これらの病巣は、ウイルス「ブランク」であり、細胞スクレーパーにより粗いウイルス溶解物を収集して、すべての293A細胞を収集する。溶解物を50 ml円錐管に移す。細胞からのウイルス粒子のほとんどを放出するために、ドライアイス/エタノール浴中および37℃水浴中で、3回の凍結/解氷サイクルを実行する。

## 【0294】

ほぼ集密(80~90%)293A細胞の10 cmプレートを感染前に20時間置く。粗溶解物を増幅(一次増幅)させて、zvegf4 rAdV溶解物の作業用「ストック」を生成する。200 mlの粗rAdV溶解物を各10 cmプレートに付加し、プレートを48~72時間モニタリングして、白色顕微鏡下での細胞障害作用(CPE)および蛍光顕微鏡下でのGFPの発現を探す。すべての293A細胞がCPEを示す場合、この1°ストック溶解物を収集し、前記と同様に凍結/解氷サイクルを実施する。

## 【0295】

80~90%集密293A細胞の20の15 cm組織培養皿から、zvegf4 rAdVの二次(1°)増幅を得る。すべてのしかし20 mlの5%MEM培地を取り出し、各皿に300~500mlの1°増幅rAdV溶解物を接種する。48時間後、293A細胞をウイルス産生から溶解させて、溶解物を250 mlポリプロピレン遠心分離瓶中に収集し、rAdVを精製する。

## 【0296】

全細胞を溶解するために粗溶解物の瓶にNP-40洗剤を付加して、最終濃度を0.5%とする。瓶を回転プラットフォーム上に10分間載せて、できるだけ速く掻き混ぜる。20,000 XGで15分間の遠心分離により、破砕屑をペレット化する。上清を250 mlポリカルボネート遠心分離瓶に移して、0.5容積の20%PEG800/2.5MNaCl溶液を付加する。瓶を氷上で一夜振盪させる。瓶を20,000 XGで15分間、遠心分離して、女性を漂白剤溶液中に廃棄する。白色沈澱(沈澱ウイルス/PEG)は、回転マークのいずれかの側の瓶の壁に沿って、2つの垂直線で生成

する。

#### 【0297】

滅菌細胞スクレーパーを用いて、2つの瓶からの沈殿物を2.5 ml P B S中に再懸濁させる。ウイルス溶液を2 ml微小遠心分離管に入れて、微小遠心分離器中で14,000 XGで10分間遠心分離して、付加的細胞破砕屑を除去する。2 ml微小遠心分離管からの上清を15 mlポリプロピレンスナップカップ管中に移して、C s C lで密度を1.34 g/mlに調整する。ウイルス溶液の容量を概算して、0.55 g/mlのC s C lを付加する。C s C lを溶解し、1 mlのこの溶液を計量する。溶液をポリカルボネート厚壁3.2 ml遠心管 ( Beckman ) に移して、348,000 XGで25 で3~4時間、回転させる。ウイルスは、白色帯域を形成する。広口ピペット先端を用いて、ウイルス帯域を収集する。

#### 【0298】

勾配からのウイルスは、細胞に用いられ得る前に除去しなければならない多量のC s C lを有する。セファデックスSephadex ( 商標 ) G-25M ( Pharmacia ) で事前包装されたPharmacia PD-10カラムを用いて、ウイルス製剤を脱塩する。カラムを20 mlのP B Sで平衡させる。ウイルスを負荷し、カラム中で走行させる。5 mlのP B Sをカラムに付加し、8~10滴の分画を収集する。各分画の1:50稀釈液の光学濃度を分光光度計で260 nmで測定し、明白な吸光度ピークを同定する。これらの分画をプールし、1:25稀釈液の光学濃度 ( O D ) を測定する。式 ( 260 nmでのO D ) ( 25 ) (  $1.1 \times 10^{12}$  ) = ビリオン / mlを用いて、O Dをウイルス濃度に変換する。

#### 【0299】

ウイルスを保存するために、グリセロールを精製ウイルスに付加して最終濃度を15%とし、静かに混合して、-80 でアリコートで保存する。

Quantum Biotechnologie, Inc. ( Montreal, Canada ) により開発されたプロトコールにしたがって、組換えウイルス感染性を測定する。要するに、検定される各組換えウイルスに関して、2%ウシ胎仔血清を含有するM E M中の $1 \times 10^4$ の293A細胞 / ウェルを2つの96ウェル組織培養プレートに植え付ける。24時間後、 $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-14}$ の各ウイルスの10倍稀釈液を、2%ウシ胎仔血清を含有する

MEM中に作る。100  $\mu$ lの各希釈液を20のウエルの各々に入れる。37  $^{\circ}$ Cで5日後、ウエルをCPEに対する陽性または陰性を読み取って、PFU/mlを算定する。

### 【0300】

使用するTCID<sub>50</sub>処方は、前記のQuantum Biotechnologie, Inc.にしたがう。用いられるウイルスが $10^{-2} \sim 10^{-14}$ に希釈されたプレートから力価(T)を測定し、感染5日後に読み取る。各希釈液で、CPEに関する陽性ウエル比(R)/ウエル総数を確定する。非希釈試料の力価は $T = 10^{(1+F)} = \text{TCID}_{50} / \text{ml}$  (式中、 $F = 1 + d(S - 0.5)$ で、Sは比(R)の合計であり、dは希釈シリーズのLog<sub>10</sub> (例えば、10倍希釈シリーズに関しては $d = 1$ )である。TCID<sub>50</sub>/mlをpfu/mlに変換するために、力価(T)に関する算定における指数から0.7を引く。

### 【0301】

#### 実施例7.

慣用的方法によりバキュウロウイルス発現系で、カルボキシル末端Glu-Gluアフィニティータグを有する組換えzev4を産生した。培養を収穫し、0.02 Mトリス-HCl、pH8.3、1 mM EDTA、1 mM DTT、1 mM 4-(2-アミノエチル)-ベンゼンスルホニルフルオリドヒドロクロリド (Pefabloc (商標) SC; Boehringer-Mannheim)、0.5  $\mu$ M アプロチニン、4 mM ロイペプチン、4 mM E-64、1% NP-40の溶液を用いて、ローター上で4  $^{\circ}$ Cで15分間、細胞を溶解させた。溶液を遠心分離し、上清を回収した。20 mlの抽出物を、50  $\mu$ l緩衝液中のセファローズSepharose (商標) ビーズに連結された50  $\mu$ lの抗Glu-Glu抗体と併合した。混合物をローター上で4  $^{\circ}$ Cで一夜インキュベートした。

### 【0302】

遠心分離によりビーズを回収し、4  $^{\circ}$ Cで3 x 15分間洗浄した。ペレットを還元剤を含有する試料緩衝液と併合し、98  $^{\circ}$ Cで5分間加熱した。還元条件下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動と、その後のアフィニティータグに対する抗体を用いたPVDF膜上でのウエスタンブロッティングにより、タンパク質を分析した。2つの帯域を検出した。一方はM<sub>r</sub> 49 kDであり、他方はM<sub>r</sub> 21 kDであった。

。配列分析は、一方が配列番号2のArg - 19で開始し、他方が配列番号2のAsn - 35で開始する2つの配列を含む大帯域を示した。アスパラギン残基は、アスパラギン酸に脱アミド化されていたようであった。小さい方の帯域は、配列番号2のSer - 250で開始した。

### 【0303】

#### 実施例8 .

修飾pAdTrack CMVのEcoRV - AscI部位にzvegf4 cDNAをクローン化する(He et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2509-2514, 1998)。この構築物は、グリーン蛍光タンパク質(GFP)マーカー遺伝子を含む。GFP発現を駆動するCMVプロモーターをSV40プロモーターに置き換え、そしてSV40ポリアデニル化シグナルをヒト成長ホルモンポリアデニル化シグナルに置き換えた。さらに、ネイティブポリリンカーをFseI、EcoRVおよびAscI部位に置き換えた。この修飾化形態のpAdTrack CMVをpZyTrackと命名した。市販DNA連結およびスクリーニングキット(Fast-Link™; Epicentre Technologies, Madison, WI)を用いて、連結を実施した。

### 【0304】

大動脈輪外方成長検定(Nicosia and Ottinetti、同上; Villaschi and Nicosia、同上)で、zvegf4を検定した。1~2か月齢SD雄ラットから胸大動脈を単離し、ハクス緩衝塩溶液を含むペトリ皿に移した。付加的ハクス緩衝塩溶液で大動脈の血液を洗い流し、大動脈周囲の血管外膜組織を注意深く除去した。きれいになった大動脈を、血清無含有のEBM基本培地(Clonetics, San Diego, CA)を含入するペトリ皿に移した。メスの刃を用いて約1 mm切片に薄切することにより、大動脈輪を得た。適所に大動脈を保持するために用いられる大動脈の末端は、用いなかった。

### 【0305】

輪を新鮮なEBM基本培地ですすぎ、基底膜マトリックス(Matrigel (商標); Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)で被覆した24ウェルプレートのウェル中に別々に入れた。輪を付加的50 μlマトリックス溶液で覆い、37 °Cで30分間

置いて、マトリックスをゲルにさせた。100単位/mlペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシンおよびH E P E S緩衝液を補給したE B M基本血清無含有培地中に被験試料を稀釈し、1 ml/ウエルで付加した。バックグラウンド対照は、E B M基本血清無含有培地単独であった。陽性対照として、基本F G F ( R & D Systems, Minneapolis, MN ) を20 ng/mlで用いた。

#### 【0306】

z v e g f 4 アデノウイルスをウエルに付加し、細胞数を500,000、感染多重性5000粒子/細胞と想定した。ゼロアデノウイルス(「z P a r」と呼ばれる)を対照として用いた。試料は、最小四重項で付加した。輪を37 で5~7日間インキュベートし、増殖に関して分析した。成長なしの0から最大成長の4までのスコアを用いて、多数の盲検観察者により、大動脈外方成長を採点した。z v e g f 4 アデノウイルスは外方成長の有意の増大を生じ、これは最も有効な対照(b F G F)に匹敵した。

#### 【0307】

##### 実施例9.

雌ニュージーランドシロウサギをペプチドhuzveg4-1 (CGHKEVPPRIKSRTNQIK: 配列番号39)、huzveg4-2 (ESWQEDLENMYLDTPRYRGRSYHDC: 配列番号40)またはhuzveg4-3 (CFEPGHIKRRGRAKTMALVDIQLD: 配列番号41)で免疫感作することにより、ポリクローナル抗ペプチド抗体を調製した。メーカーの使用説明書にしたがって、Applied Biosystemsモデル431Aペプチド合成機(Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)を用いて、ペプチドを合成した。

#### 【0308】

ペプチドを、マレイミド活性化カギアナカサガイヘモシアニン(K L H)と連結させた。ウサギに、完全フロイントアジュバント中の200 µgのペプチドの初回腹腔内(i p)注射とその後の不完全フロイントアジュバント中の100 µgペプチドのブースターi p注射を3週間毎に投与した。第2回追加免疫注射(計3回注射)の投与後7~10日後に、動物を採血して、血清を収集した。次に動物を追加免疫して、3週間毎に採血した。

#### 【0309】

抗体標的として抗体を作製するために用いられる1 $\mu$ g/mlのペプチドを用いて、E L I S A力価検査により、z v e g f 4ペプチド特異的ウサギ血清を特性化した。huzveg4-1ペプチドに対する2つのウサギ血清は、1:5,000,000の希釈で、それらの特異的ペプチドに対して力価を有した。huzveg4-2ペプチドに対する2つのウサギ血清は、1:5,000,000の希釈で、それらの特異的ペプチドに対して力価を有した。huzveg4-3ペプチドに対する2つのウサギ血清は、1:500,000の希釈で、それらの特異的ペプチドに対して力価を有した。

#### 【0310】

10 mgの特定のペプチド / C N B r - セファロース1gを用いて調製されたC N B r - セファロース4 Bタンパク質カラム (Pharmacia LKB) を用いて、z v e g f 4ペプチド特異的ポリクローナル抗体をアフィニティー精製し、その後、P B S中で一夜20X透析した。1 $\mu$ g/mlの適切なペプチド抗原を抗体標的として用いるE L I S A力価検査により、z v e g f 4特異的抗体を特性化した。その特異的抗原 (huzveg4-1ペプチド) に関する抗huzveg4-1アフィニティー精製抗体の検出下限 (L L D) は、0.1 pg/mlの希釈であった。その特異的抗原 (huzveg4-2ペプチド) に関する抗huzveg4-2アフィニティー精製抗体のL L Dは、5 ng/mlの希釈であった。その特異的抗原 (huzveg4-3ペプチド) に関する抗huzveg4-3アフィニティー精製抗体のL L Dは、5 ng/mlの希釈であった。

#### 【0311】

##### 実施例10.

組換えバキュウロウイルス感染昆虫細胞から、組換えカルボキシル末端G l u - G l uタグ化z v e g f 4 (z v e g f 4 - c e e) を産生した。2リットル培養を収穫し、0.2 $\mu$ mフィルターを用いて培地を滅菌濾過した。

抗G l u - G l u (抗E E) ペプチド抗体アフィニティークロマトグラフィーおよびS - 200ゲル排除クロマトグラフィーの組合せにより、状態調節培地からタンパク質を精製した。培地 (p H6.0, 伝導率7 mS) を20 x 80 mm (25 ml床容積) 抗E E抗体アフィニティークラム上に6 ml / 分の流速で直接負荷した。

#### 【0312】

10カラム容量のP B Sでカラムを洗浄した後、結合タンパク質を2カラム容量

の0.4 mg/ml E Y M P T D ペプチド (配列番号 4 2 ) (Princeton BioMolecules Corp., Langhorne, PA) で溶離した。5 ml 分画を収集した。銀染色を用いる S D S - P A G E およびウエスタンブロットイング (下記) により、z v e g f 4 - c e e の存在に関して抗 E E 抗体アフィニティーカラム空の試料を分析した。

#### 【0313】

z v e g f 4 - c e e 含有分画をプールし、Biomax™-5濃縮機 (Millipore Corp., Bedford, MA) を用いて濾過により3.8 ml に濃縮し、16 x 1000 mm ゲル濾過カラム (Sephacryl™ S-200 HR; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 上に負荷した。精製 z v e g f 4 - c e e を含有する分画をプールし、0.2 μm フィルターを通して濾過し、各々100 μl にアリコート化し、-80 °C で凍結させた。比色検定 (BCA検定試薬; Pierce, Rockford, IL) および H P L C - アミノ酸分析により、最終精製タンパク質の濃度を確定した。

#### 【0314】

銀染色 (FAST銀™, Geno Technology, Inc., Maplewood, MO) を用いる S D S - P A G E (NuPAGE™4 ~ 12%ゲル; Novex, San Diego, CA) および huzveg4-1、huzveg4-2 および huzveg4-3 ペプチドに対する抗体ならびに抗 E E 抗体を用いるウエスタンブロットイングにより、組換え z v e g f 4 - c e e を分析した。電気泳動ミニセル (XCell II™ミニセル; Novex, San Diego, CA) を用いて状態調節培地または精製タンパク質を電気泳動処理し、計器マニュアルに示された指示にしたがって攪拌しながら XCell II™ プロットモジュール (Novex) を用いて室温で、ニトロセルロース (0.2 μm; Bio Rad Laboratories, Hercules, CA) に移した。

#### 【0315】

25mM トリス塩基、200mM グリシン および 20% メタノールを含有する緩衝液中で 500 mA で 1 時間、移動を実行させた。次にフィルターを、室温で 10 分間、P B S 中の 10% 脱脂粉乳で遮断した。ニトロセルロースを迅速にすすぎ、次に第一抗体を、2.5% 脱脂粉乳を含有する P B S 中で付加した。静かに振盪しながら、室温で 2 時間または 4 時間で一夜、プロットをインキュベートした。インキュベーション後、プロットを P B S 中で 3 回、各々 10 分間洗浄した。2.5% 脱脂粉乳を含有する P

B S中に1:2000で希釈された第二抗体（ホースラディッシュペルオキシダーゼと連結されたヤギ抗ウサギIgG；Rockland Inc., Gilbertsville, PAから入手）を付加し、静かに振盪しながら室温で2時間、プロットをインキュベートした。

#### 【0316】

次にプロットをPBS中で3回、各々10分間洗浄し、次にH<sub>2</sub>O中で迅速にすすいだ。市販化学発光基質試薬（SuperSignal（商標）ULTRA試薬1および2（1:1で混合）；試薬はPierceから入手）を用いてプロットを発現させて、画像分析ソフトウェア（Lumi-Imager™ Lumiアナライザー3.0；Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN）を用いて、10秒～5分間または必要に応じた範囲の時間、シグナルを捕獲した。

精製zvegf4-CEEは、還元条件下で約85 kDaの単一帯域として出現したが、これは、非還元条件下での二量体形態のzvegf4-CEEを示唆した。

#### 【0317】

4-1、4-3または抗EE抗体を用いた場合、精製zvegf4-CEEは銀染色ゲルと同一結果を示した；4-3抗体は、非常に弱いシグナルを生じた。しかしながら、非還元条件下での85 kDa帯域および還元条件下での50 kDaを認識するほかに、4-2抗体は35kDaおよび32 kDaで2つの帯域を、そして還元条件下で38kDaおよび35 kDaで2つの帯域を認識した。理論と結びつけたくはないが、小さい方の帯域は4-1抗体により認識されるタンパク質のN末端部分を失った切断形態のzvegf4-CEEであると思われる。

#### 【0318】

##### 実施例11.

ラット肝臓星状細胞（N. Fausto, University of Washingtonから入手）、ヒト大動脈平滑筋細胞（Clonetics Corp., Walkersville, MD）、ヒト網膜周皮細胞（Clonetics Corp.）、およびヒト肝臓繊維芽細胞（Clonetics Corp.）において、有糸分裂活性に関して組換えzvegf4を分析した。被験試料は、全長zvegf4を発現するアデノウイルス感染HaCaTヒトケラチノサイト細胞（Boukamp et al., J. Cell. Biol. 106:761-771, 1988; Skobe and Fusenig, Proc

. Natl. Acad. Sci. USA 95:1050-1055, 1998; Dr. Norbert E. Fusenig, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Germanyから入手)からの条件調節培地(CM)から成った。

#### 【0319】

対照CMは、親GFP発現アデノウイルス(zPar)に感染させたHaCAT細胞から生成した。10K膜フィルター(Ultrafree(商標); Millipore Corp., Bedford, MA)を含有する15 ml遠心分離フィルター装置を用いて、CMを10倍濃縮し、次にITS培地(5 µg/mlインスリン、20 µg/mlトランスフェリンおよび16 pg/mlセレンを含有する血清無含有DME M / HamのF-12培地)で1 xに希釈し戻した。96ウエル培養プレート中で2,000細胞/ウエルの密度で細胞をプレート化し、10%ウシ胎仔血清を含有するDME M中で37 °Cで約42時間、細胞を増殖させた。

#### 【0320】

インスリン(5 µg/ml)、トランスフェリン(20 µg/ml)およびセレン(16 pg/ml)を含有する血清無含有DME M / HamのF-12培地(ITS)中で約20時間それらをインキュベートすることにより、細胞を休止させた。検定時に、培地を除去し、被験試料のウエル付加を3操作実施した。[<sup>3</sup>H]チミジン取込みの測定のために、DME M中の50 µCi/mlストック20 µlを細胞に直接付加し、最終活性を1 µCi/ウエルとした。さらに24時間後、培地を除去し、細胞を0.1mlのトリプシンとともに細胞が分離するまでインキュベートした。

#### 【0321】

試料収穫器(FilterMate™収穫器; Packard Instrument Co., Meriden, CT)を用いて、96ウエルフィルタープレート上で細胞を収穫した。次にプレートを65 °Cで15分間乾燥し、40 µl/ウエルシンチレーションカクテル(Microscint™0; Packard Instrument Co.)付加後に密封し、マイクロプレートシンチレーションカウンター(Topcount(商標); Packard Instrument Co.)で計数した。表8に示した結果は、zvegf4CMが、周皮細胞に関して対照CMの約7倍の有糸分裂活性を、そして試験したその他の細胞型に関しては約1.5~2.4倍の有糸分裂活性を有することを実証した。

## 【0322】

## 【表8】

表 8

サンプル	取り込まれたCPM			
	Zveg4 (1×CM)		zPar (1×CM)	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差
ヒト網膜周囲細胞	3621	223	523	306
ヒト肝繊維芽細胞	7757	753	3232	264
ヒト大動脈SMC	2009	37	1263	51
ラット肝星細胞	34707	1411	14413	1939

## 【0323】

## 実施例12.

ヒト大動脈平滑筋細胞 (H A o S M S) (Clonetics)、ヒト網膜周皮細胞 (Clonetics)、およびヒト大動脈外膜繊維芽細胞 (A o A F) (Clonetics) において、有糸分裂活性に関して組換え体C末端glu-gluタグ化z v e g f 4を分析した。96ウエル培養プレート中で2,000細胞/ウエルの密度で細胞をプレート化し、10%ウシ胎仔血清を含有するD M E M中で37 で約72時間、細胞を増殖させた。I T S培地中で約20時間それらをインキュベートすることにより、細胞を休止させた。検定時に、培地を除去し、被験試料のウエル付加を3操作実施した。

## 【0324】

被験試料は、バキュウロウイルス感染細胞中で発現した精製全長タグ化z v e g f 4から成った。0.1% B S Aを含有する緩衝液中の精製タンパク質を、1 μg/ml ~ 1 ng/mlの濃度でI T S培地中に連続希釈し、試験プレートに付加した。0.1% B S Aの対照緩衝液を同様にz v e g f 4タンパク質の最高濃度に希釈し、プレートに付加した。[<sup>3</sup>H]チミジン取込みの測定のために、D M E M中の50 μCi/mlストック20 μlを細胞に直接付加し、最終活性を1 μCi/ウエルとした。さらに24時間後、[<sup>3</sup>H]チミジン取込みを測定することにより、有糸分裂活性を査定した。

## 【0325】

培地を除去し、細胞を0.1mlのトリプシンとともに細胞が分離するまでインキュベートした。試料収穫器 (FilterMate™収穫器; Packard Instrument Co., Meriden, CT) を用いて、96ウェルフィルタープレート上で細胞を収穫した。次にプレートを65℃で15分間乾燥し、40 µl / ウェルシンチレーションカクテル (Microscint™0; Packard Instrument Co.) 付加後に密封し、マイクロプレートシンチレーションカウンター (Topcount (商標); Packard Instrument Co.) で計数した。表9に示した結果は、80 ng/mlのzvegf4が、周皮細胞に関して対照CMの約1.7倍の有糸分裂活性を、大動脈SMCに関しては3.2倍の、そして大動脈繊維芽細胞に関しては約2.6倍の有糸分裂活性を有することを実証した。

## 【0326】

【表9】

表 9

サンプル	取り込まれたCPM					
	周皮細胞		HAoSMC		AoAF	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
Zvegf4, 80ng/ml	96.7	18.2	488.7	29.6	177.0	1.0
Zvegf4, 20ng/ml	81.7	11.7	211.7	50.8	107.7	20.1
Zvegf4, 5ng/ml	67.3	6.7	191.7	4.5	123.7	10.5
緩衝液対照	58.7	8.5	152.3	40.1	68.7	8.3

## 【0327】

## 実施例13.

マウス (C57BL/6) にzvegf4コードアデノウイルスベクター (AdZyvegf4) を感染させて、血清化学作用、全血球数 (CBC)、体重および器官重量変化ならびに組織学的知見を確定した。1日目に、マウスをタグ化し、個々に計量して、処置群 (4匹/ケージ) に分けるために群を標準化した。群1マウス (n = 雌8匹、雄7匹) には、GFP (対照) アデノウイルス  $1 \times 10^{11}$  粒子を投与した。群2マウス (n = 雌8匹、雄6匹) には、zvegf4アデノウ

イルス $1 \times 10^{11}$ 粒子を投与した。群3マウス(n = 雌8匹、雄8匹)には、非処置対照を投与した。0日目に、適切なアデノウイルス溶液の注射をマウスに施した。10日目に、CBCおよび臨床化学測定のために血液を採取した(エーテル麻酔下)。組織病理学的検査のように組織を採取した。観察結果を以下に示す：

【0328】

血清化学変化：AdZyvegf4処置マウスは低血糖であった。この作用は、経時的に大きさが増大した(10日目対20日目)。血清コレステロールレベルは、両時点で有意に増大した(2倍)。アルブミンおよび酵素ALT、ASTおよびアルカリ性ホスファターゼの血清レベルは、AdZyvegf4処置マウスにおいてはすべて有意に増大した。血清カルシウムおよび総ビリルビンも有意に増大し、時間を追ってさらに上昇した。

【0329】

CBC変化：AdZyvegf4処置マウスは、両時点で有意に高いリンパ球数を有した(平均>10)。血小板数は、20日目に有意に低下した。赤血球数は10日目の雌で有意に高く、20日目の雄で有意に高かった。

体重/器官重量：AdZyvegf4処置雄は、実験経過中、体重を損失した。この結果は、体重が増加した対照動物とは有意に異なった。雌マウス間に差は認められず、全軍で同様に体重増加した。脾臓重量は、全AdZyvegf4処置マウスで有意に大きかった(約4倍)。肝臓重量も全AdZyvegf4処置マウスで有意に大きかった。腎臓重量の群間の有意差は認められなかった。

【0330】

組織学的知見：肝臓では、洞様毛細血管内皮細胞の増殖が観察された。脾臓では、細網内皮細胞の増殖が観察された。腎臓では、増殖性糸球体症が観察された。理論に結びつけたくはないが、この糸球体症は毛細血管内皮細胞の増殖によるものであった。大腿骨では、骨内膜骨の増殖が認められ(ほとんど小柱骨)、いくつかの場合には、骨髄のほとんどに取って代わっていた。基質細胞の増殖も骨において観察された。肺では、気管支肺胞リンパ様組織の出現頻度が増大した。

【0331】

実施例14.

2 mCi Na -  $^{125}$ I (Amersham Corp.) を含有する500  $\mu$ l のPBS中に90  $\mu$ gの組換え z v e g f 4 タンパク質を溶解させた。一誘導化非多孔質ポリスチレンビーズ (IODO-Beads (商標); Pierce, Rockford, IL) を付加し、反応混合物を氷上で1時間インキュベートした。10%酢酸、150mM NaCl および0.25%ゼラチンの溶離緩衝液を用いて、ゲル濾過によりヨウ素化タンパク質を非取込み  $^{125}$ I から分離した。活性分画は、29  $\mu$ g/mlの  $^{125}$ I - z v e g f 4 を含有し、 $3.0 \times 10^4$  cpm/ngの特異的活性を有した。

#### 【0332】

以下の細胞株を24ウェル組織培養皿に入れ、増殖培地中で3日間培養した：

1. ヒト網膜周皮細胞、継代数6 (周皮細胞)
2. ラット星状細胞、継代数8
3. ヒト臍帯静脈内皮細胞、継代数4 (H U V E C)
4. ヒト大動脈外膜繊維芽細胞、継代数5 (A o A F)
5. ヒト大動脈平滑筋細胞、継代数2 (A o S M C)

#### 【0333】

細胞を氷冷結合緩衝液 (2.5 mg/ml B S A、20mM H E P E S、pH7.2を含有するHAM ' S F-12) で1回洗浄し、次に250  $\mu$ lの以下の溶液を、被験細胞を含有する培養皿の3つのウェルの各々に付加する。250 pMの  $^{125}$ I - z v e g f 4 を含有する結合緩衝液5 ml中に結合溶液を調製する：

1. 付加なし
2. 25 nM z v e g f 4
3. 25 nM z v e g f 3
4. 25 nM P D G F - A A
5. 25 nM P D G F - B B

#### 【0334】

反応混合物を氷上で2時間インキュベートして、次に1 mlの氷冷結合緩衝液で3回洗浄した。細胞のトリトンX - 100抽出物をガンマ計数することにより結合  $^{125}$ I - z v e g f 4 を定量した。

表10に示した結果は、z v e g f 4 は周皮細胞、星状細胞、A o A Fおよび

AoSMCとは結合するが、HUVECとは結合しないことを示す。第一カラムは、結合した総CPM<sup>125</sup>I-zveg f 4 / ウエルを表す。第二カラムは、冷リガンドで遮断した場合の結合した<sup>125</sup>I-zveg f 4 / ウエルである。2つの数値間の差は、特異的結合を表す。

【0335】

【表10】

表 10

細胞型	結合した <sup>125</sup> I-zveg f 4 (CPM)	結合した <sup>125</sup> I-zveg f 4 w/cold zveg f 4 (CPM)
1. 周囲細胞	3083±864	623±60
2. 星細胞	2131±450	413±164
3. HUVEC	485±91	227±13
4. AoAF	1544±131	300±15
5. AoSMC	1628±203	440±46

【0336】

実施例15.

市販バージョンのStanfordG3放射線ハイブリッドマッピングパネル (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL) を用いて、ヒト第11染色体に対してzveg f 4をマッピングした。このパネルは、全ヒトゲノムの83の放射線ハイブリッドクローンの各々からのPCR可能DNA + 2つの対照DNA (RMドナーおよびA3レシピエント) を含有する。公的利用可能なWWWサーバー (<http://shgc-www.stanford.edu>) は、マーカーの染色体位置決定を可能にする。20μl反応混合物を96ウエル微小滴定プレート (Stratagene, La Jolla, CA) 中に用意して、加熱サイクラー (RoboCycler (商標) Gradient 96; Stratagene) 中で用いた。

【0337】

85個のPCR混合物の各々は、2μlの緩衝液 (10X KlenTaq PCR反応緩衝液、Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)、1.6μlのdNTPミックス

(各2.5 mM、PERKIN-ELMER, Foster City, CA)、1  $\mu$ lのセンスプライマー、Z C 22,685 (配列番号37)、1  $\mu$ lのアンチセンスプライマー、Z C 22,6869 (配列番号38)、2  $\mu$ lの濃度増加剤およびトラッキング染料 (RediLoad、Research Genetics, Inc., Huntsville, AL)、0.4  $\mu$ lの市販DNAポリメラーゼ/抗体ミックス (50X Advantage™ KlenTaqポリメラーゼミックス、Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CAから入手)、個々のハイブリッドクローンまたは対照からの25 ngのDNA、ならびに総容量を20  $\mu$ lとするためのx  $\mu$ lのddH<sub>2</sub>Oで構成された。

### 【0338】

反応混合物に等量の鉱油を被せて、密封した。PCRサイクラー条件を以下に示す：94 で5分間の変性を最初に1サイクル；94 で45秒間の変性、64 で45秒間のアニーリングおよび72 で75秒間の伸長を35サイクル；その後最後に、72

で7分間の伸長を1サイクル。2%アガロースゲル上での電気泳動により、反応生成物を分離した。結果は、z v e g f 4が第11染色体枠組み構造マーカーSHGC - 34226との連鎖を示し、LODスコアは14.90、そしてマーカーからの距離は0 c R 10000であった。周囲遺伝子/マーカーの使用は、11q22.3 q23.1染色体領域にz v e g f 4を突き止める

### 【0339】

#### 実施例16.

慣用的技法を用いたウエスタンブロッティングにより、組換えz v e g f 4の構造を分析した。HaCaTヒトケラチノサイト細胞株中に産生されたタンパク質を、還元および非還元条件下で電気泳動処理し、フィルターに移して、タンパク質のドメイン間およびCUBドメイン領域に対する抗体を用いてプローブした。還元化タンパク質は、グリコシル化単量体タンパク質と一致する約53 kDの明白なM<sub>r</sub>を有する単一帯域として出現した。非還元化タンパク質は、ジスルフィド連結二量体と一致する約85 kDの明白なM<sub>r</sub>を有する単一帯域として出現した。

### 【0340】

#### 実施例17.

発現ベクター pEZE2 を用いて、全長 zvegf4 を含有する発現プラスミドを構築した。pEZE2 は、多クローニング部位へのさらに別の制限酵素認識部位の付加により pDC312 から得られる。pDC312 および pEZE2 は、WO 97/25420 に記載されているような EASE セグメントを含有し、これが哺乳類細胞、好ましくはチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞における組換えタンパク質の発現を 2~8 倍に改善し得る。

#### 【0341】

pEZE2 発現単位は、CM 部位エンハンサー / プロモーター、アデノウイルス 3 粒子リーダー配列、組換えタンパク質のためのコード領域の挿入のための多クローニング部位、脳心筋炎ウイルス内部リボソーム進入部位、マウスジヒドロフォレートレダクターゼに関するコードセグメントおよび SV40 転写ターミネーターを含有する。さらに、pEZE2 は、大腸菌複製起点および細菌 - ラクタマーゼ遺伝子を含有する。

#### 【0342】

発現ベクターへの直接クローニングのための 5' FseI および 3' AscI 部位を用いた PCR ( Advantage2 PCR キット、Clontech, Palo Alto, CA ) により、zvegf4 DNA 断片を生成した。5' プライマーは、FseI 部位、Kozak 配列および zvegf4 に関するネイティブリーダー配列の最初の 21 塩基対を含有した ( ZC26,136; 配列番号 43 )。3' プライマーは、zvegf4 の最後の 21 塩基対、終止コドンおよび AscI 部位を含有した ( ZC26.137; 配列番号 44 )。PCR 反応は、1 L の鋳型 ( ESTEP プラスミド zvegf4 pcrf1 # 3 ) を含み、以下のように実行した：94 で 1 分を 1 サイクル；次に 94 で 30 秒、55 で 30 秒、68 で 1 分間を 25 サイクル；最後に 72 で 7 分間の伸長。

#### 【0343】

ESTEP プラスミド zvegf4 pcrf1 # 3 は、全長ヒト zvegf4 断片を含有する。各々 20 pm の ZC22,341 ( 配列番号 45 ) および ZC22,342 ( 配列番号 46 ) プライマー、ならびに 3 L の甲状腺ライブラリーを用いた PCR により、この断片を生成した。反応は以下のように実行した：94 で 1 分を 1 サイ

クル；次に94 で20秒、66 で1.5分間を30サイクル；最後に72 で5分間の伸長。1% T B E ゲル上で1,272 bp生成物をゲル精製し、QIAquickゲル抽出キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いてゲルスラブからDNAを抽出した。この1,272 bp断片をp C R 2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中にサブクローニングし、z v e g f 4 p c r f 1 # 3 と命名した。

#### 【0344】

P C R 生成断片を精製し (Qiaquick P C R クリーンアップキット、Qiagen, Valencia, CA)、単一100 L 反応液中の制限酵素 A s c I および F s e I (New England Biolabs, Beverly, MA) で消化した。5 µg の発現ベクター p E Z E 2 も単一100 L 反応液中の F s e I および A s c I で消化した。アガロースゲル電気泳動により消化DNAを分別し、DNA断片を単離して、精製した (QIAquickゲル抽出キット、Qiagen)。

#### 【0345】

5 µl の z v e g f 4 DNA断片および1Lのp E Z E 2 ベクター断片を室温で一晩、連結した (New England Biolabs高濃縮リガーゼおよび供給緩衝液)。1 µl の連結反応物を、0.2 cmキュベット中の25 Lのエレクトロコンピテント大腸菌 D H 10 B 株 (Life Technologies) に付加した。1mLのL B ブロスを付加し、100 L のミックスをL B / アンピリシン寒天プレート上に載せた。プレートを37 で一晩インキュベートし、8つの単離コロニーをDNAミニプレップ (QIAquickミニプレップキット、Qiagen) 用に摘み取った。前記のプライマーを用いて、z v e g f 4 DNAの存在に関して、P C Rにより個々のクローンをスクリーニングした。クローン # 1 ~ 6 でDNAシーケンシングを実施して、正しい全長配列を立証した。一クローンは、正しい予測配列を含有し、DNAのMaxi prepが作製された (Qiagenプラスミドマキシキット、Qiagen)。

#### 【0346】

C H O D G 4 4 (Chasin et al., Som. Cell. Molec. Genet. 12:555-666, 1986) をプレート化し、M E M 培地 (JRH Bioscience, Lenexa, KS)、7.5% ウシ胎仔血清 (Hyclone, Logan, UT)、1% L - グルタミン (Life Technologies)、1% ピルビン酸ナトリウム (Life Technologies)、1% H T 溶液 (Life Tec

hnologies) および1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Life Technologies) 中で、37 °C で一夜、約50%~70%集密に増殖させた。

#### 【0347】

次に、血清無含有 (S F) 培地処方物 (D M E M / F 12 (Life Technologies)、非必須アミノ酸 (Life Technologies)、1% L - グルタミンおよび1%ピルビン酸ナトリウム) 中のポリ陽イオン性脂質ジオクタールデシルアミドグリシルスペルミンの10:1 (w/w) リポソーム処方物を用いて、リポソーム媒介性トランスフェクションにより、細胞をプラスミド p E Z E 2 / z v e g f 4 でトランスフェクトした。プラスミド p E Z E 2 / z v e g f 4 を15 ml円錐管中で、S F 培地により最終総容量500 µlに希釈し、20 Lのトランスフェクタム Transfectam (Promega, Madison, WI) 試薬を付加し、十分に混合して、室温で10分間インキュベートした。

#### 【0348】

35 µlのリポフェクタミン™を605 µlのS F 培地と混合した。インキュベーション後、4.5 mlのS F 培地をDNA混合物に付加し、5 mlピペットを用いてよく混合した。細胞をS F 培地で3回すすぎ、5mlのDNA溶液を細胞単一層上に被せた。細胞を37 °C、5% CO<sub>2</sub>で2時間インキュベートした。次に6 mlの完全培地 (M E M、7.5% F B S、1% L - グルタミン、1%ピルビン酸ナトリウム、1% H T、1% P e n / S t r e p) および細胞をさらに48時間インキュベートした。

#### 【0349】

48時間後、0.25%トリプシン/1mM E D T A (Life Technologies) を用いてプレートから細胞をトリプシン処理し、ヌクレオシドを含有しない完全培地 (M E M、7.5%透析 F B S、1% L - グルタミン、1%ピルビン酸ナトリウム、1% P e n / S t r e p) 4mlを用いて抑制した。500 µlの細胞懸濁液を、ヌクレオシドを含有しない10mlの完全培地を含入するプレートに移した。直径約0.25 cmの単一コロニーが出現するまで、14日間培養を増殖させた。クローニング環 (Be llco Glass, Inc., Vineland, NJ) を用いて24の単一コロニーを単離し、これをトリプシンで除去して、6 ウェル細胞集団プレート (Costar, Corning, NY) に

移し、4日間インキュベートした。

【0350】

S F 培地で細胞ウエルをすすぎ、2mLのS F 培地を付加し、培養を24時間インキュベートした。10K遠心装置 ( Millipore Corporation, Bedford, MA ) を用いて、状態調節S F 培地を約20倍に濃縮した。25  $\mu$  l の濃縮物を、50mMの  $\beta$ -メルカプトエタノールを含有する4X試料緩衝液 ( Novex, San Diego, CA ) 15 L に付加し、混合物を4~12% N u P A G E ゲル ( Novex ) 上で走行させた。ゲルからのタンパク質をニトロセルロース膜 ( Novex ) に移し、ウエスタンA緩衝液 ( 0.25%ゼラチン、50mMトリス - H C l、p H 7.4、150mM N a C l、5mM E D T A、0.05% イゲパルC A - 630 ) 中の10%脱脂粉乳で、回転振盪器台上で室温で一夜、プロットを遮断した。

【0351】

膜をウエスタンA中で3回すすいだ。z v e g f 4 タンパク質のN末端に対する抗体を、ウエスタンA中の5%脱脂粉乳50mL中で1:3000に希釈した。抗体溶液を膜の上に被せ、揺動台上で室温で1時間、インキュベートした。1時間インキュベーション後、溶液を廃棄し、膜をウエスタンAで3回、ウエスタンB ( 50mMトリス、p H 7.4、5mM E D T A、0.05% イゲパルC A - 630、1 M N a C l、0.25%ゼラチン ) で1回すすいだ。第二抗体、即ちロバ - 抗ウサギ - H R P ( Amersham Corp., Arlington Heights, IL ) のF ( a b ' )<sub>2</sub>断片をウエスタンA中で1:3000に希釈して、膜上に被せ、揺動台上で室温で1時間インキュベートした。

【0352】

第二抗体溶液を廃棄し、膜をウエスタンA中で3回、ウエスタンB中で3回洗浄した。化学発光を用いて、メーカーの使用説明書 ( Pierce, Rockford, IL ) にしたがって、z v e g f 4 の全長またはプロテアーゼ消化N末端を検出し、Lumi分析機 ( Roche/Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany ) により分析した。12のクローンのうちの4つはz v e g f 4 に対して陽性で、第7番と第12番をトリプシン処理し、ヌクレオシドを含有しない完全培地中でT175フラスコ ( Costar, Corning, NY ) に移した。

【0353】

### 実施例18.

zvegf4の増殖因子ドメインをコードする発現構築物を調製する。5' BamHI制限部位、N末端EEタグおよびzvegf4アミノ酸残基258~381(終止コドンを含む)を含有するPCR断片を生成した(Clontech Advantage 2PCRキット)。5'オリゴプライマーは、BamHI部位、N末端EEタグ配列、および増殖因子ドメインのN末端に対応するzvegf4塩基対を含有する(ZC27,116;配列番号47)。3'オリゴプライマーは、zvegf4の少なくとも21塩基対(終止コドンを含む)を含有する(ZC27,137;配列番号48)。

#### 【0354】

CMV極初期プロモーター、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座の可変部からのコンセンサイントロン、Kozak配列、最適化t-P A分泌シグナル配列(米国特許第5,641,655号)、コード配列の挿入のための多制限部位、終止コドンおよびヒト成長ホルモントーミネーターを含有する発現ベクターpZMP20を用いた。

#### 【0355】

プラスミドは、ポリオウイルスからのIRES素子、膜貫通ドメインのC末端で切頭化されたCD8の細胞外ドメイン、大腸菌の複製起点、DHFR遺伝子、SV40ターミネーター、ならびにビール酵母菌*S. cerevisiae*における複製に必要なURA3およびCEN-ARS配列も含有する。その結果生じるプラスミドは、pZMP20/GFD.NEEと呼ばれる。CHO DG44細胞における発現のためのpEZE2発現ベクター(5'FseI、3'AscI)との連結のために、5'FseI部位および3'AscI部位を有する504塩基対断片をこのプラスミドから単離する。

#### 【0356】

### 実施例19.

#### A. マウスゲノムライブラリースクリーン

完全コード配列を含有するヒトzvegf4制限消化断片でマウスゲノムライブラリーをプローブすることにより、部分マウスzvegf4配列を得た。EcoRI(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)で8gの全長ヒトzvegf4プラスミ

ドを消化することにより、プローブを生成した。2.3% TBEゲル上で1,289 bp断片をゲル精製し、QIAquickゲル抽出キット (Qiagen) を用いてアガローススラブからDNAを抽出した。マウスゲノムライブラリーは、24NZYプレート上のK802宿主芝上にプレート化された emb13 SP6/T7 BamHIクローン化ライブラリー (Clontech, Palo Alto, CA) であって、 $7.2 \times 10^5$  pfusに相当した。

#### 【0357】

5分間沸騰させ、その後冷却しておいた0.1 mg/mlのサケ精子DNAを含有するEXPRESSHYB溶液中で24のフィルターリフトを予備ハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションは50 で一夜実施した。63 ngの前記のヒト断片を、Rediprime I I無作為プライム標識系 (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England) を用いて $^{32}$ Pで標識した。Nuc Trapプッシュカラム (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて非取込み放射能を除去した。 $10 \times 10^6$  cpm/ml zvegf4プローブ、0.1 mg/mlサケ精子DNAおよび0.5 g/mlネズミcot-1DNA (5分間沸騰させ、その後冷却しておいた) を含有するEXPRESSHYB溶液中で、フィルターをハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは50 で一夜実施した。フィルターリフトを $2 \times$  SSC、0.1% SDS中で、室温で2時間洗浄し、次に1時間、温度を60 に上げた。-80 での一夜曝露は、7つの推定主要ヒットを示した。

#### 【0358】

K802宿主培養を調製して、二次スクリーンのための主ヒットをプレート化した。パストツールピペットで7つの主要ヒットを摘出し、2~3滴のクロロホルムを含有する1 ml SM (0.1 M NaCl、50mM トリス、pH 7.5、10mM  $gSO_4$ 、0.02%ゼラチン) 中で4 で一夜溶離した。力価を確定するためのプレート化後、オリジナルpfuの10倍の数のプラークを、10mM  $gSO_4$  / NZYトッパアガロースおよび4つの主ヒットに関するK802細胞の芝を含有するNZYmaxiプレート上でプレート化し、37 で一夜増殖させた。Hybond-Nフィルター (Amersham Pharmacia) を用いて、リフトを実行した。

#### 【0359】

熱針を用いて、配向に関してフィルターに印を付形質転換、1.5 M NaClお

よび0.5 M NaOH中で10分間変性させた後、1.5 M NaClおよび0.5 M トリス-HCl、pH7.2中で10分間中和させた。STRATALINKER UV架橋剤 (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて、1200 jouleでDNAをフィルターに固定し、0.25 x SSC、0.25% SDSおよび1mM EDTAからなる予洗緩衝液中で65 °Cで予洗し、溶液を3回、合計45分間変えて、細胞破砕屑を除去した。5つのリフトを合計3つの各バイアルに入れた。5分間沸騰させ、その後冷却しておいた1.3 mgのサケ精子DNAと混合したEXPRESSHYBハイブリダイゼーション溶液 (Clontech) 13 ml中で50 °Cで一夜、各バイアルのリフトを予備ハイブリダイズした。

#### 【0360】

63 ngのヒトzvegf4断片を、前記のようなプローブに関して標識した。0.99~1.1 x 10<sup>6</sup> ヒトzvegf4プローブ、0.5 g/mlネズミcot-1 DNAおよび0.9 mg/mlサケ精子DNA (5分間沸騰させ、その後冷却しておいた) と混合させたEXPRESSHYBハイブリダイゼーション溶液9 ml中で、各バイアルのフィルターをハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは50 °Cで一夜実施した。主要スクリーンに関する前記の洗浄条件を、この二次スクリーンのために反復した。試験した4つの主要推定ヒットが-80 °Cでの一夜曝露後、陽性となった。

#### 【0361】

200 lのSM中で単離プラーク#7c1および#18b2を4 °Cで溶離し、新鮮な宿主K802細胞を調製した。10<sup>-2</sup> ~ 10<sup>-3</sup>の範囲の連続希釈液をプレート化して、力価概算を得た。#18b2のみがあらゆるプラークを生じ(2.6~ 3.0 x 10<sup>3</sup> ファージ/lに関して)、このプラークをさらに追跡した。プレート溶解物から、ファージDNAに関して、10<sup>5</sup> pfu/プレートを含有する2つのプレートを調製した。ファージが集密に達し始めるまで、プレートを37 °Cで6時間増殖させ、次に12 mlのSM/プレートを付加して、4 °Cで一夜、ファージを溶離させた。この時点で、プレートを室温で1時間浸透し、上清を取り出して、1%クロロホルムを付加し、上清を15分間浸透させた。Wizard プレップDNA精製系 (Promega)、セクションIVおよびVIを用いて、DNAを調製した。

#### 【0362】

プラーク#18b2 DNAをいくつかの制限酵素で切断して、断片を精製し、サ

ザンゲル上を走行させた。消化物を1% T B E アガロースゲル上を走行させた。ゲルを0.25 M H C l 中に30分間浸漬し、蒸留水ですすぎ、0.5 M N a O H および0.5 M N a C l 中に40分間浸漬しながら、溶液を1回取り換え、1.5 M N a C l および0.5 M トリス - H C l ( p H 7.2 ) 中で溶液を1回取り換えながら40分間中和した。TURBOBLOTTER迅速下方移動系 (Schleicher & Schuell, Keene, NH) を用意して、Nytran/BA-S膜 (Schleicher & Schuell) 上で一夜、D N A を移動させた。STRATALINKER U V 架橋剤 (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて、1200 joule で D N A を Nytran に固定した。

### 【0363】

5分間沸騰させ、その後冷却しておいた1.2 mgのサケ精子D N A と混合したEXPRESSHYBハイブリダイゼーション溶液 (Clontech) 12 ml 中で50 °C で一夜、プロットを予備ハイブリダイズした。69 ngのヒト z v e g f 4 断片を、前記のようなプローブに関して標識した。市販プッシュカラム (NUCTRAPカラム ; Stratagene) を用いてクロマトグラフィーにより、非取込み放射能を除去した。EXPRESSHYBハイブリダイゼーション溶液10 mlを、 $1.0 \times 10^6$  cpmのヒト z v e g f 4 プローブ、0.5 g/mlネズミ c o t - 1 D N A および0.1 mg/mlサケ精子D N A (5分間沸騰させ、その後冷却しておいた) と混合させた後、プロットに付加した。ハイブリダイゼーションは50 °C で一夜実施した。前記と同様にプロットを洗浄し、-80 °C で一夜、フィルムに曝露した。

### 【0364】

サザンゲルは、2.0~2.9 kbの範囲のサイズのプローブとハイブリダイズした B a m H I / P s t I 消化物からの断片を有し、これを追跡した。プラーク # 18 b 2 D N A (28 g) を20単位のBamHI (Boehringer Mannheim, Indianapolis, I N) および20 lのP s t I (Life Technologies) で、37 °C で2時間切断した。消化物を1% T B E アガロースゲル上を走行させ、2.0 kb二重項、ならびに2.7 kb/2.9 kb帯域をゲルから切り出した。QIAquickゲル抽出キット (Qiagen) を用いてアガロースからD N A を抽出した。18 b 2断片を、B a m H I、P s t I および B a m H I / P s t I で切断したpbluescript I I K S + ベクター (Stratagene) に連結した。

## 【0365】

これらの連結物からのPst I挿入物を含有する3つのクローンおよびBam HI/Pst I挿入物を有する4つのクローンを、別のサザンロットのためにそれらのそれぞれの挿入物部位制限酵素で消化して、オリジナルハイブリダイズ断片であったモノを確定した。1%TBEゲルを処理し、DNAを前記と同様にNytranロットに移した。13 mlのハイブリダイゼーション溶液中で前記と同様にロットを予備ハイブリダイズさせた。前記と同様に69 ngのヒトzvegf 4断片を標識し、非取込み放射能を除去した。

## 【0366】

ヒトzvegf 4プローブ ( $8.4 \times 10^5$  /ml cpm)、0.1 mg/mlのサケ精子DNAおよび0.5 g/mlネズミcot-1 DNAを5分間沸騰させ、その後冷却して、EXPRESSHYBハイブリダイゼーション溶液7 mlと混合させた後、ロットに付加した。ハイブリダイゼーションは50 で一夜実施した。前記と同一の洗浄手法を用いた。ロットを-80 で3時間、フィルムに曝露した。両2.0 kb帯域挿入物はプローブと強力にハイブリダイズした。これらのクローンをシーケンシングした結果、ネズミzvegf 4 cubドメインの一部を含有することが判明した。PCR cDNAスクリーニングのために、この配列からプライマーを消化した。

## 【0367】

B. マウスcDNAパネルのPCRスクリーニング

家および商業的マウスcDNAにおいて利用可能なパネルを、各々20 pmのZG26,317 (配列番号49) およびZG26,318 (配列番号50) プライマーを用いてスクリーニングした。PCR反応条件を以下に示す: 94 で2分; 次に94 で10秒、65 で20秒、72 で30秒を35サイクル; そして72 で5分の伸長で終了した。胚、唾腺、新生児皮膚および精巣は、予測された200 bpサイズの強度の生成物を示した。

## 【0368】

C. 全長マウスzvegf 4配列

前記の条件にしたがってプライマーZG26,317 (配列番号49) およびZG26,318 (配列番号50) を用いたPCRにより、 $9.6 \times 10^5$ クローンを表示する家

マウス精巣整列ライブラリーをスクリーニングした。このライブラリーを250クローンの陽性プールにほどいた。メーカーのプロトコールにしたがって、電気穿孔により、このプールを用いて大腸菌DH10B細胞(Gibco BRL)を形質転換させた。形質転換化培養を滴定して、~20細胞/ウエルで96ウエルに整列させた。

#### 【0369】

LB + amp中で37℃で一夜、細胞を増殖させた。細胞のアリコートペレット化して、PCRを用いて陽性プールを同定した。サーモサイクラー条件は、前記と同様であった。陽性プールからの残りの細胞をプレート化し、PCRによりコロニーをスクリーニングして、陽性クローンを同定した。配列分析は、「zveg f4mpzp7x-6」と呼ばれるこのクローンが5'末端で不完全で、5'末端にイントロンを含有すると思われる、ということを示した。

#### 【0370】

前記の条件にしたがってプライマーZG26,317(配列番号49)およびZG26,318(配列番号50)を用いたPCRにより、 $9.6 \times 10^5$ クローンを表示するマウス唾腺ライブラリーをスクリーニングした。ライブラリーを250クローンの陽性プールにほどいた。この250クロンプールは、RACEにより、5'末端を有すると立証された。各々20 pmのZG26,318(配列番号50)およびZG14,063(配列番号51)プライマーおよび3:1のそのプールを用いた。反応は以下のように実行した: 94℃で2分; 次に94℃で15秒、70℃で30秒を5サイクル; 94℃で15秒、62℃で20秒、72℃で30秒を30サイクル; そして最後に72℃で7分の伸長。

#### 【0371】

シーケンシング時に得られたRACE生成物は、このプールが開始Metを含有することを確認した。前記と同一プロトコールを実行して、プールから単一クローンを単離した。配列分析は、「zveg f4mpzp7x-7」と呼ばれるこのクローンが、クローン#6(最終配列中の塩基対865~塩基対1079)と比較した場合、コード中に225 bpの欠失を有することを明示した。

zveg f4mpzp7x-6由来および zveg f4mpzp7x-7由来配列を組合せて、全長マウス z v e g f 4 ポリヌクレオチド配列(配列番号52)およびマウス z v e g f 4 ポリペプチド配列(配列番号53)を得た。

## 【0372】

D. 全長マウス z v e g f 4 クローン

前記のクローン # 6 およびクローン # 7 からの断片の二段階連結により、全長 c D N A クローンを生成した。まず、E c o R 1 / H i n d 3 の 3 プライム断片をクローン # 6 から生成した。9 g のクローン # 6 を 15 単位の E c o R 1 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) および 15 単位の H i n d 3 (Gibco BRL) を用いて、37 °C で 2 時間消化した。1% T B E ゲル上で 528 bp 断片をゲル精製し、QIAquick ゲル抽出キット (Qiagen) を用いてゲルスラブから c D N A を抽出した。

## 【0373】

それを、R c o R 1 および H i n d 3 で消化した pbluescript I I K S + (Stratagene) に連結した。この z v e g f 4 挿入物を含有する 3 g のクローンを、15 単位の E c o R 1 (Gibco BRL) で消化し、1% T B E ゲル上でゲル精製して、前記のキットを用いて D N A を抽出した。クローン # 7 からの 5 ' E c o R 1 z v e g f 4 断片を前記の E c o R 1 消化クローンと連結した。この E c o R 1 断片は、8 g のクローン # 7 を 30 単位の E c o R 1 (Gibco BRL) で 37 °C で 2 時間消化することにより生成した。前記と同様に 1% T B E ゲル上で 754 bp 断片をゲル精製し、ゲルスラブから D N A を抽出した。

## 【0374】

実施例 20.A. z v e g f 4 条件調節培地によるネイティブ P C 12 細胞の処理

H a C a t 細胞を、対照としてゼロアデノウイルス (z P a r) に感染させるか、またはアデノウイルス発現 z v e g f 4 に感染させた。これらのトランスフェクト化細胞からの状態調節培地 (C M) を、P C 12 クロム親和性細胞腫細胞 (Banker and Goslin, in Culturing Nerve Cells, chapter 6, "Culture and experimental use of the PC12 rat Pheochromocytoma cell line" 参照; さらに Rydel and Greene, J. Neuroscience 7 (11) :3639-53, November 1987 参照) において神経突起外方成長を誘導するその能力に関して検定した。

## 【0375】

要するに、R P M I 1640 培地 (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD)、10% ウマ血

清 (Sigma, St. Louis, MO) および5%ウシ胎仔血清 (FBS; Hyclone, Logan, UT) を用いて、PC12細胞培養 (ATCC#CRL 1721) を増殖させた。プラスチック培養皿 (Beckton Dickinson, Bedford, MA) をラット尾I型コラーゲンで被覆し、PC12細胞を24ウェルプレート中に $2 \times 10^4$ 細胞/mlでRPMI + 1% FBS中でプレート化し、5%CO<sub>2</sub>中で37℃で一晩インキュベートした。

#### 【0376】

次にPC12培地を除去し、zvegf4-CMまたは対照-CMに入れ替えて、2倍希釈液中に付加した(5x希釈で開始)。組換えヒトNGF (R+D, Minneapolis, MN) を陽性対照として100または30 ng/mlの濃度で付加した。陰性対照として、ゼロアデノウイルス (zpar) のCMを用いた。zvegf4およびNGFの共働作用を調べるために、PC12細胞の付加的ウェルを、亜最適濃度のNGF (3 ng/ml) と組合せたzvegf4-CMで処理した。インキュベーションの全長が7日に達するまで、第2日毎に培地をRPMI + 1% FBSに取り換えた。

#### 【0377】

NGF処理PC12細胞は、安定した神経突起外方成長およびニューロン分化を示した。zvegf4-CMに曝露したPC12細胞は、細胞平板化、ならびに短い突起を有する細胞外観といった形態学的変化を示したが、これは、神経細胞系統への分化を示唆する。亜最適量のNGF + zvegf4とともにインキュベートされたPC12細胞に関しては、短い突起を有する細胞の集団の増大が観察された。

#### 【0378】

B. zvegf4状態調節培地によるプライム化神経突起保有PC12細胞の処理

zvegf4-CMおよび対照-CM (zpar) (前記の実施例20Aに記載) を、分化したPC12ニューロンの生存を促すそれらの能力に関して検定した (Banker and Goslin、上記、Rydel and Greene、上記参照)。

要するに、前記の実施例20Aに記載されたようにPC12を保持し、適量のNGFで処理して、有糸分裂後交感神経の特性を発現する細胞への分化を誘導した

。特に、組換えヒトNGF (R+D, Minneapolis, MN) を50 ng/mlの濃度で用いて6日間、PC12細胞を処理し、翌日には培地を取り換えた。細胞を24ウェルプレート中に一夜プレート化して、培地をzvegf4-CMまたは対照-CM(2倍希釈液中、5xで開始)と、あるいは陽性対照としてNGF(3倍希釈液中100 ng/mlで開始)と取り換えた。

#### 【0379】

1% FBSまたは血清無含有培養(SF)培地を用いて、培養を用意した。細胞を9日間増殖させて、第2日目毎に培地を取り換えた。NGFによる連続処理は、全神経細胞集団の生存を促し、神経突起外方成長増大を生じた。zvegf4-CMは神経細胞の亜集団の生存を促したが、しかし付加的神経突起外方成長を誘導しなかった。対照-CM中で培養された細胞は、変性した。

前記から、説明のために本発明の特定の実施態様を本明細書中に記載したが、本発明の精神および範囲を逸脱しない限り、種々の修正が成され得る、と理解される。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲による以外には限定されない。

#### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> ZymoGenetics, Inc.

<120> GROWTH FACTOR HOMOLOG ZVEGF4

<130> 99-19PC

<150> US 09/304,216

<151> 1999-05-03

<150> US 60/164,463

<151> 1999-11-10

<150> US 60/180,169

<151> 2000-02-04

<160> 53

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 1882

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (226)...(1338)

<400> 1

```

ccgtcaccat ttatcagctc agcaccacaa ggaagtgcgg caccacacag cgctcggaaa      60
gttcagcatg caggaagttt ggggagagct cggcgattag cacagcgacc cgggccagcg      120
cagggcgagc gcaggcggcg agagcgcagg gcggcgcggc gtcggtcccg ggagcagaac      180
ccggcttttt cttggagcga cgctgtctct agtcgctgat cccaa atg cac cgg ctc      237
                                         Met His Arg Leu
                                         1

```

```

atc ttt gtc tac act cta atc tgc gca aac ttt tgc agc tgt cgg gac      285
Ile Phe Val Tyr Thr Leu Ile Cys Ala Asn Phe Cys Ser Cys Arg Asp
 5              10              15              20

```

act tct gca acc ccg cag agc gca tcc atc aaa gct ttg cgc aac gcc Thr Ser Ala Thr Pro Gln Ser Ala Ser Ile Lys Ala Leu Arg Asn Ala 25 30 35	333
aac ctc agg cga gat gag agc aat cac ctc aca gac ttg tac cga aga Asn Leu Arg Arg Asp Glu Ser Asn His Leu Thr Asp Leu Tyr Arg Arg 40 45 50	381
gat gag acc atc cag gtg aaa gga aac ggc tac gtg cag agt cct aga Asp Glu Thr Ile Gln Val Lys Gly Asn Gly Tyr Val Gln Ser Pro Arg 55 60 65	429
ttc ccg aac agc tac ccc agg aac ctg ctc ctg aca tgg cgg ctt cac Phe Pro Asn Ser Tyr Pro Arg Asn Leu Leu Leu Thr Trp Arg Leu His 70 75 80	477
tct cag gag aat aca cgg ata cag cta gtg ttt gac aat cag ttt gga Ser Gln Glu Asn Thr Arg Ile Gln Leu Val Phe Asp Asn Gln Phe Gly 85 90 95 100	525
tta gag gaa gca gaa aat gat atc tgt agg tat gat ttt gtg gaa gtt Leu Glu Glu Ala Glu Asn Asp Ile Cys Arg Tyr Asp Phe Val Glu Val 105 110 115	573
gaa gat ata tcc gaa acc agt acc att att aga gga cga tgg tgt gga Glu Asp Ile Ser Glu Thr Ser Thr Ile Ile Arg Gly Arg Trp Cys Gly 120 125 130	621
cac aag gaa gtt cct cca agg ata aaa tca aga acg aac caa att aaa His Lys Glu Val Pro Pro Arg Ile Lys Ser Arg Thr Asn Gln Ile Lys 135 140 145	669
atc aca ttc aag tcc gat gac tac ttt gtg gct aaa cct gga ttc aag Ile Thr Phe Lys Ser Asp Asp Tyr Phe Val Ala Lys Pro Gly Phe Lys 150 155 160	717
att tat tat tct ttg ctg gaa gat ttc caa ccc gca gca gct tca gag Ile Tyr Tyr Ser Leu Leu Glu Asp Phe Gln Pro Ala Ala Ala Ser Glu 165 170 175 180	765
acc aac tgg gaa tct gtc aca agc tct att tca ggg gta tcc tat aac Thr Asn Trp Glu Ser Val Thr Ser Ser Ile Ser Gly Val Ser Tyr Asn 185 190 195	813

tct cca tca gta acg gat ccc act ctg att gcg gat gct ctg gac aaa	861
Ser Pro Ser Val Thr Asp Pro Thr Leu Ile Ala Asp Ala Leu Asp Lys	
200 205 210	
aaa att gca gaa ttt gat aca gtg gaa gat ctg ctc aag tac ttc aat	909
Lys Ile Ala Glu Phe Asp Thr Val Glu Asp Leu Leu Lys Tyr Phe Asn	
215 220 225	
cca gag tca tgg caa gaa gat ctt gag aat atg tat ctg gac acc cct	957
Pro Glu Ser Trp Gln Glu Asp Leu Glu Asn Met Tyr Leu Asp Thr Pro	
230 235 240	
cgg tat cga ggc agg tca tac cat gac cgg aag tca aaa gtt gac ctg	1005
Arg Tyr Arg Gly Arg Ser Tyr His Asp Arg Lys Ser Lys Val Asp Leu	
245 250 255 260	
gat agg ctc aat gat gat gcc aag cgt tac agt tgc act ccc agg aat	1053
Asp Arg Leu Asn Asp Asp Ala Lys Arg Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn	
265 270 275	
tac tcg gtc aat ata aga gaa gag ctg aag ttg gcc aat gtg gtc ttc	1101
Tyr Ser Val Asn Ile Arg Glu Glu Leu Lys Leu Ala Asn Val Val Phe	
280 285 290	
ttt cca cgt tgc ctc ctc gtg cag cgc tgt gga gga aat tgt ggc tgt	1149
Phe Pro Arg Cys Leu Leu Val Gln Arg Cys Gly Gly Asn Cys Gly Cys	
295 300 305	
gga act gtc aac tgg agg tcc tgc aca tgc aat tca ggg aaa acc gtg	1197
Gly Thr Val Asn Trp Arg Ser Cys Thr Cys Asn Ser Gly Lys Thr Val	
310 315 320	
aaa aag tat cat gag gta tta cag ttt gag cct ggc cac atc aag agg	1245
Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Gln Phe Glu Pro Gly His Ile Lys Arg	
325 330 335 340	
agg ggt aga gct aag acc atg gct cta gtt gac atc cag ttg gat cac	1293
Arg Gly Arg Ala Lys Thr Met Ala Leu Val Asp Ile Gln Leu Asp His	
345 350 355	

cat gaa cga tgc gat tgt atc tgc agc tca aga cca cct cga taa 1338  
 His Glu Arg Cys Asp Cys Ile Cys Ser Ser Arg Pro Pro Arg \*  
                   360                                  365                                  370

gagaatgtgc acatccttac attaagcctg aaagaacctt tagttaaagg agggtgagat 1398  
 aagagacctt tttcctacca gcaaccaaac ttactactag cctgcaatgc aatgaacaca 1458  
 agtggttgct gagtctcagc cttgcttgt taatgccatg gcaagtagaa aggtatatca 1518  
 tcaacttcta tacctaagaa tataggattg catttaataa tagtgtttga gggtatatat 1578  
 gcacaaacac acacagaaat atattcatgt ctatgtgtat atagatcaaa tgtttttttt 1638  
 ttttgggtata tataaccagg tacaccagag gttacatatg tttgagttag actcttaaaa 1698  
 tcctttgccca aaataaggga tgggtcaata tatgaaacat gtcttttagaa aatttaggag 1758  
 ataaatttat ttttaaattt tgaacacga aacaattttg aatcttgctc tcttaagaa 1818  
 agcatcttgt atattaaaaa tcaaaagatg aggccttctt acatatacat cttagttgat 1878  
 tatt 1882

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 370

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

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

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

<210> 3

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> polypeptide motif

<221> VARIANT

<222> (2)...(19)

<223> Xaa = Any Amino Acid

<221> VARIANT

<222> (20)...(34)

<223> Xaa = Any Amino Acid or is not present

<221> VARIANT  
 <222> (36)...(45)  
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<221> VARIANT  
 <222> (46)...(72)  
 <223> Xaa = Any Amino Acid or is not present

<221> VARIANT  
 <222> (74)...(93)  
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<221> VARIANT  
 <222> (94)...(123)  
 <223> Xaa = Any Amino Acid or is not present

<221> VARIANT  
 <222> (125)...(125)  
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 3

Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5						10					15
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				20						25					30
Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Gly	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				35						40					45
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				50						55					60
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
65								70							75
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
															80
															85
															90
															95
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
															100
															105
															110
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Cys	
															115
															120
															125

<210> 4  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; polypeptide motif

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (2)...(2)

&lt;223&gt; Xaa = Lys or Arg

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (4)...(4)

&lt;223&gt; Xaa = Asp, Asn or Glu

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (5)...(5)

&lt;223&gt; Xaa = Trp, Tyr or Phe

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (6)...(16)

&lt;223&gt; Xaa = Any Amino Acid

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (17)...(20)

&lt;223&gt; Xaa = Any Amino Acid or is not present

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (22)...(22)

&lt;223&gt; Xaa = Lys or Arg

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (23)...(23)

&lt;223&gt; Xaa = Trp, Tyr or Phe

&lt;400&gt; 4

Cys	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10					15	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Xaa	Cys								
				20											

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> polypeptide tag

<400> 5

Glu Tyr Met Pro Met Glu  
1 5

<210> 6

<211> 1110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> degenerate sequence

<221> misc\_feature

<222> (1)...(1110)

<223> n = A,T,C or G

<400> 6

atgcaymgny tnathttygt ntayacnytn athtgygcna aytttygyws ntgymngay	60
acnwsngcna cncncarws ngcnwnath aargcnytnm gnaaygcnaa yytnmgmgn	120
gaygarwsna aycaytnac ngayytntay mgnmgngayg aracnathca rgtnaarggn	180
aayggntayg tncarwsncc nmgnttyccn aaywsntayc cnmgnaayt nytnytnacn	240
tggmgnytnc aywsncarga raayacnmgn athcarytng tnttygayaa ycarttyggn	300
ytnrgargarg cngaraayga yathtgymgn taygayttyg tngargtnga rgayathwsn	360
garacnwsna cnathathmg nggnmgntgg tgyggncaya argargtncc nccnmgnath	420
aarwsnmgna cnaaycarat haarathacn ttyaarwsng aygaytaytt ygtngcnaar	480
ccnggnttya arathtayta ywsnytnytn gargayttyc arccngcngc ngcnwsngar	540
acnaaytggg arwsngtnac nwsnwnath wsgngngtnw sntayaayws nccnwsngtn	600
acngayccna cnytnathgc ngaygcnytn gayaaraara thgcngartt ygayacngtn	660
gargayytny tnaartaytt yaayccngar wsntggcarg argayytnga raayatgtay	720
ytnrgayacnc cnmgntaymg nggnmgnwsn taycaygaym gnaarwsnaa rgtngayytn	780
gaymgnytna aygaygaygc naarmgntay wsntgyacnc cnmgnaayta ywsngtnaay	840
athmgngarg arytnaaryt ngcnaaygtn gtnttyttyc cnmgntgyt nytngtncar	900
mgntgyggng gnaaytgygg ntgyggnacn gtnaaytggm gnwsntgyac ntgyaaywsn	960
ggnaaraeng tnaaraarta ycaygargtn ytncarttyg arccnggnca yathaarmgn	1020
mgnggnmgng cnaaraacnat ggchnyngtn gayathcary tngaycayca ygarmgntgy	1080
gaytgyatht gywsnwsnmg nccnccnmgn	1110

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> oligonucleotide primer  
 .  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A,T,C or G  
  
 <400> 7  
 mgntgyggng gnaaytg 17  
  
 <210> 8  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer  
  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A,T,C or G  
  
 <400> 8  
 mgntgydsng gnwrytg 17  
  
 <210> 9  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer  
  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A,T,C or G  
  
 <400> 9  
 carywnccns hrcanck 17  
  
 <210> 10  
 <211> 17

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer  
  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A,T,C or G  
  
 <400> 10  
 ttyttyccnm gntgyt 17  
  
 <210> 11  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer  
  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A,T,C or G  
  
 <400> 11  
 ntnddnccnn sntgyt 17  
  
 <210> 12  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer  
  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A,T,C or G  
  
 <400> 12  
 avrcansng gnhhnan 17

<210> 13  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer  
  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A,T,C or G  
  
 <400> 13  
 caygarmgnt gygaytg 17  
  
 <210> 14  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer  
  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A,T,C or G  
  
 <400> 14  
 caynnnnvnt gyvvntg 17  
  
 <210> 15  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer  
  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A,T,C or G  
  
 <400> 15

canbbrcanb nnnrntg	17
<210> 16 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence  <220> <223> oligonucleotide primer  <221> misc_feature <222> (1)...(17) <223> n = A,T,C or G  <400> 16	
tgyacnccnm gnaayta	17
<210> 17 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence  <220> <223> oligonucleotide primer  <221> misc_feature <222> (1)...(17) <223> n = A,T,C or G  <400> 17	
tgyhnmcmn knrmdh	17
<210> 18 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence  <220> <223> oligonucleotide primer  <221> misc_feature <222> (1)...(17) <223> n = A,T,C or G	

<400> 18 dhnkynmkng knndrca	17
<210> 19 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> oligonucleotide primer	
<221> misc_feature <222> (1)...(18) <223> n = A,T,C or G	
<400> 19 ntaygaytwy gtngargt	18
<210> 20 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> oligonucleotide primer	
<221> misc_feature <222> (1)...(18) <223> n = A,T,C or G	
<400> 20 natrcdrawr canctyca	18
<210> 21 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> oligonucleotide primer	
<221> misc_feature	

<222> (1)...(18)  
 <223> n = A,T,C or G

<400> 21  
 gntdbccnma ndvntayc 18

<210> 22  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> oligonucleotide primer

<221> misc\_feature  
 <222> (1)...(18)  
 <223> n = A,T,C or G

<400> 22  
 cnahvggnkt nhbnatrg 18

<210> 23  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> oligonucleotide primer

<221> misc\_feature  
 <222> (1)...(18)  
 <223> n = A,T,C or G

<400> 23  
 tnhdnggnmr ntdbtgyg 18

<210> 24  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> oligonucleotide primer

<221> misc\_feature  
 <222> (1)...(18)  
 <223> n = A,T,C or G

<400> 24  
 andhncnky nahvacrc 18

<210> 25  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC21.119

<400> 25  
 aggacgatgg tgtggacaca agga 24

<210> 26  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC21.120

<400> 26  
 tccagagcat ccgcaatcag agtg 24

<210> 27  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC21.987

<400> 27  
 caacctgttg tttgtcccgt cacc 24

<210> 28  
 <211> 25

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC17.251  
  
 <400> 28  
 tctggacgtc ctctgctgg tatag 25  
  
 <210> 29  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC17.252  
  
 <400> 29  
 ggtatggagc aaggggcaag ttggg 25  
  
 <210> 30  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC17.156  
  
 <400> 30  
 gagtggcaac ttccagggcc aggagag 27  
  
 <210> 31  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC17.157  
  
 <400> 31  
 cttttgctag cctcaaccct gactatc 27  
  
 <210> 32

&lt;211&gt; 1760

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (154)...(1191)

&lt;400&gt; 32

attatgtgga aactaccctg cgattctctg ctgccagagc aggetcggcg ctccacccc	60
agtcagcct tcccctggcg gtggtgaaag agactcggga gtcgctgctt ccaaagtgcc	120
cgccgtgagt gagctctcac cccagtcagc caa atg agc ctc ttc ggg ctt ctc	174
Met Ser Leu Phe Gly Leu Leu	
1 5	
ctg ctg aca tct gcc ctg gcc ggc cag aga cag ggg act cag gcg gaa	222
Leu Leu Thr Ser Ala Leu Ala Gly Gln Arg Gln Gly Thr Gln Ala Glu	
10 15 20	
tcc aac ctg agt agt aaa ttc cag ttt tcc agc aac aag gaa cag aac	270
Ser Asn Leu Ser Ser Lys Phe Gln Phe Ser Ser Asn Lys Glu Gln Asn	
25 30 35	
gga gta caa gat cct cag cat gag aga att att act gtg tct act aat	318
Gly Val Gln Asp Pro Gln His Glu Arg Ile Ile Thr Val Ser Thr Asn	
40 45 50 55	
gga agt att cac agc cca agg ttt cct cat act tat cca aga aat acg	366
Gly Ser Ile His Ser Pro Arg Phe Pro His Thr Tyr Pro Arg Asn Thr	
60 65 70	
gtc ttg gta tgg aga tta gta gca gta gag gaa aat gta tgg ata caa	414
Val Leu Val Trp Arg Leu Val Ala Val Glu Glu Asn Val Trp Ile Gln	
75 80 85	
ctt acg ttt gat gaa aga ttt ggg ctt gaa gac cca gaa gat gac ata	462
Leu Thr Phe Asp Glu Arg Phe Gly Leu Glu Asp Pro Glu Asp Asp Ile	
90 95 100	
tgc aag tat gat ttt gta gaa gtt gag gaa ccc agt gat gga act ata	510
Cys Lys Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu Glu Pro Ser Asp Gly Thr Ile	
105 110 115	

tta ggg cgc tgg tgt ggt tct ggt act gta cca gga aaa cag att tct Leu Gly Arg Trp Cys Gly Ser Gly Thr Val Pro Gly Lys Gln Ile Ser 120 125 130 135	558
aaa gga aat caa att agg ata aga ttt gta tct gat gaa tat ttt cct Lys Gly Asn Gln Ile Arg Ile Arg Phe Val Ser Asp Glu Tyr Phe Pro 140 145 150	606
tct gaa cca ggg ttc tgc atc cac tac aac att gtc atg cca caa ttc Ser Glu Pro Gly Phe Cys Ile His Tyr Asn Ile Val Met Pro Gln Phe 155 160 165	654
aca gaa gct gtg agt cct tca gtg cta ccc cct tca gct ttg cca ctg Thr Glu Ala Val Ser Pro Ser Val Leu Pro Pro Ser Ala Leu Pro Leu 170 175 180	702
gac ctg ctt aat aat gct ata act gcc ttt agt acc ttg gaa gac ctt Asp Leu Leu Asn Asn Ala Ile Thr Ala Phe Ser Thr Leu Glu Asp Leu 185 190 195	750
att cga tat ctt gaa cca gag aga tgg cag ttg gac tta gaa gat cta Ile Arg Tyr Leu Glu Pro Glu Arg Trp Gln Leu Asp Leu Glu Asp Leu 200 205 210 215	798
tat agg cca act tgg caa ctt ctt ggc aag gct ttt gtt ttt gga aga Tyr Arg Pro Thr Trp Gln Leu Leu Gly Lys Ala Phe Val Phe Gly Arg 220 225 230	846
aaa tcc aga gtg gtg gat ctg aac ctt cta aca gag gag gta aga tta Lys Ser Arg Val Val Asp Leu Asn Leu Leu Thr Glu Glu Val Arg Leu 235 240 245	894
tac agc tgc aca cct cgt aac ttc tca gtg tcc ata agg gaa gaa cta Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn Phe Ser Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu 250 255 260	942
aag aga acc gat acc att ttc tgg cca ggt tgt ctc ctg gtt aaa cgc Lys Arg Thr Asp Thr Ile Phe Trp Pro Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg 265 270 275	990
tgt ggt ggg aac tgt gcc tgt tgt ctc cac aat tgc aat gaa tgt caa Cys Gly Gly Asn Cys Ala Cys Cys Leu His Asn Cys Asn Glu Cys Gln 280 285 290 295	1038

tgt gtc cca agc aaa gtt act aaa aaa tac cac gag gtc ctt cag ttg 1086  
 Cys Val Pro Ser Lys Val Thr Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Gln Leu  
 300 305 310

aga cca aag acc ggt gtc agg gga ttg cac aaa tca ctc acc gac gtg 1134  
 Arg Pro Lys Thr Gly Val Arg Gly Leu His Lys Ser Leu Thr Asp Val  
 315 320 325

gcc ctg gag cac cat gag gag tgt gac tgt gtg tgc aga ggg agc aca 1182  
 Ala Leu Glu His His Glu Glu Cys Asp Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr  
 330 335 340

gga gga tag ccgcatcacc accagcagct cttgccaga gctgtgcagt 1231  
 Gly Gly \*  
 345

gcagtggctg attctattag agaacgtatg cgttatctcc atccttaatc tcagttgttt 1291  
 gcttcaagga cctttcatct tcaggattta cagtgcatc tgaagagga gacatcaaac 1351  
 agaattagga gttgtgcaac agctcttttg agaggaggcc taaaggacag gagaaaaggt 1411  
 cttcaatcgt ggaaagaaaa ttaaatgttg tattaatatg atcaccagct agtttcagag 1471  
 ttaccatgta cgtattccac tagctgggtt ctgtatttca gttctttcga tacggcttag 1531  
 ggtaatgtca gtacaggaaa aaaactgtgc aagtgagcac ctgattccgt tgccttgctt 1591  
 aactctaaag ctccatgtcc tggcctaaa atcgtataaa atctggattt tttttttttt 1651  
 tttttgctca tattcacata tgtaaaccag aacattctat gtactacaaa cctggttttt 1711  
 aaaaaggaac tatgttgcta tgaattaac ttgtgtcgtg ctgatagga 1760

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 345

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 33

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



<400> 34										
gaattcccgg	gtcgaccac	gcgtccggc	gcccaggga	aaggaagctg	ggggccgct					60
ggcggcattc	ctcgccgag	tgtgggtcc	gtctgccgcg	ggcccgcag	tgccccctgt					120
ctgcgccagc	acctgttggc	ccgccagctg	gcgcccgcg	ccccccgcg	cccccgccc					180
cgccggccg	ccagccccgc	gccccgcg	ccgcccctg	gggaaagtg	gagacggga					240
ggggacaaga	gcatcctcc	aggccagcca	ggccttcct	tagccgccg	tgcttagccg					300
ccacctctcc	tcagccctgc	gtcctgccct	gccttagggc	aggcatccga	gcgctcgga					360
ctccgagccg	cccaagctct	cccggcttc	cgcagcactt	cgccggtacc	cgagggaact					420
tcggtggcca	ccgactgcag	caaggaggag	gtcccgcggt	ggatccgggc	cagtcccag					480
tcgtccccgc	ggcctctctg	cccgccggg	accgcgcg	cactcgcagg	gcacggtccc					540
ctccccccag	gtgggggtg	ggcggccct	gcccggcga	tcagcagctt	tgtcattgat					600
cccaaggtgc	tcgctcgct	gccgacctg	ctccagctt	ggcttggcg	gaccccgagt					660
cctcgcctgt	gtcctgtccc	ccaaactgac	aggtgctccc	tcgagtcgc	cacgactcat					720
cgccgctccc	ccgctcccc	acccctctt	tctccctcg	ctaccccc	cccccgcac					780
ttcggcacag	ctcaggattt	gtttaaact	tgggaaactg	gttcaggctc	aggttttgct					840
ttgatccttt	tcaaaaactg	gagacacaga	agagggctct	aggaaaaact	tttgatggg					900
attatgtgga	aactaccctg	cgattctctg	ctgccagagc	cgccaggcg	cttccaccgc					960
agcgcagcct	ttccccggct	gggctgagcc	ttggagtctg	cgcttcccc	gtgcccggc					1020
cgagtgagcc	ctcgccccag	tcagccaa	atg ctc ctc ctc	ggc ctc ctc ctg						1072
			Met Leu Leu Leu Gly Leu Leu Leu							
			1		5					
ctg aca tct gcc ctg gcc ggc caa aga acg ggg act cgg gct gag tcc										1120
Leu Thr Ser Ala Leu Ala Gly Gln Arg Thr Gly Thr Arg Ala Glu Ser										
10		15			20					
aac ctg agc agc aag ttg cag ctc tcc agc gac aag gaa cag aac gga										1168
Asn Leu Ser Ser Lys Leu Gln Leu Ser Ser Asp Lys Glu Gln Asn Gly										
25		30			35				40	
gtg caa gat ccc cgg cat gag aga gtt gtc act ata tct ggt aat ggg										1216
Val Gln Asp Pro Arg His Glu Arg Val Val Thr Ile Ser Gly Asn Gly										
		45			50				55	
agc atc cac agc ccg aag ttt cct cat aca tac cca aga aat atg gtg										1264
Ser Ile His Ser Pro Lys Phe Pro His Thr Tyr Pro Arg Asn Met Val										
		60			65				70	
ctg gtg tgg aga tia gtt gca gta gat gaa aat gtg cgg atc cag ctg										1312
Leu Val Trp Arg Leu Val Ala Val Asp Glu Asn Val Arg Ile Gln Leu										
		75			80				85	

aca ttt gat gag aga ttt ggg ctg gaa gat cca gaa gac gat ata tgc	1360
Thr Phe Asp Glu Arg Phe Gly Leu Glu Asp Pro Glu Asp Asp Ile Cys	
90 95 100	
aag tat gat ttt gta gaa gtt gag gag ccc agt gat gga agt gtt tta	1408
Lys Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu Glu Pro Ser Asp Gly Ser Val Leu	
105 110 115 120	
gga cgc tgg tgt ggt tct ggg act gtg cca gga aag cag act tct aaa	1456
Gly Arg Trp Cys Gly Ser Gly Thr Val Pro Gly Lys Gln Thr Ser Lys	
125 130 135	
gga aat cat atc agg ata aga ttt gta tct gat gag tat ttt cca tct	1504
Gly Asn His Ile Arg Ile Arg Phe Val Ser Asp Glu Tyr Phe Pro Ser	
140 145 150	
gaa ccc gga ttc tgc atc cac tac agt att atc atg cca caa gtc aca	1552
Glu Pro Gly Phe Cys Ile His Tyr Ser Ile Ile Met Pro Gln Val Thr	
155 160 165	
gaa acc acg agt cct tcg gtg ttg ccc cct tca tct ttg tca ttg gac	1600
Glu Thr Thr Ser Pro Ser Val Leu Pro Pro Ser Ser Leu Ser Leu Asp	
170 175 180	
ctg ctc aac aat gct gtg act gcc ttc agt acc ttg gaa gag ctg att	1648
Leu Leu Asn Asn Ala Val Thr Ala Phe Ser Thr Leu Glu Glu Leu Ile	
185 190 195 200	
cgg tac cta gag cca gat cga tgg cag gtg gac ttg gac agc ctc tac	1696
Arg Tyr Leu Glu Pro Asp Arg Trp Gln Val Asp Leu Asp Ser Leu Tyr	
205 210 215	
aag cca aca tgg cag ctt ttg ggc aag gct ttc ctg tat ggg aaa aaa	1744
Lys Pro Thr Trp Gln Leu Leu Gly Lys Ala Phe Leu Tyr Gly Lys Lys	
220 225 230	
agc aaa gtg gtg aat ctg aat ctc ctc aag gaa gag gta aaa ctc tac	1792
Ser Lys Val Val Asn Leu Asn Leu Leu Lys Glu Glu Val Lys Leu Tyr	
235 240 245	
agc tgc aca ccc cgg aac ttc tca gtg tcc ata cgg gaa gag cta aag	1840
Ser Cys Thr Pro Arg Asn Phe Ser Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys	
250 255 260	



aagcacgtcc ccagaaacct cgaccatttc taggcacagt gttctgggct atgctgcgct 3276  
 gtatggacat atcctattha ttcaataact agggttttat taccittaaa ctctgctcca 3336  
 tacacttgta ttaatacatg gatattttta tgtacagaag tatatcattt aaggagtcca 3396  
 cttattatac tctttggcaa ttgcaaagaa aatcaacata atacattgct tgtaaagtct 3456  
 taatctgtgc ccaagttttg tggtagctat ttgaattaaa atgtattgaa tcatcaaata 3516  
 aaataatctg gctattttgg ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaggcg gcccgc 3571

<210> 35

<211> 345

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

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



tcc atc aaa gct t gattatc 600  
 Ser Ile Lys Ala  
 30

<210> 37  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC22.685

<400> 37  
 gccgtcacca ttatcag 18

<210> 38  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC22.686

<400> 38  
 cgggtcgctg tgctaac 18

<210> 39  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> peptide

<400> 39  
 Cys Gly His Lys Glu Val Pro Pro Arg Ile Lys Ser Arg Thr Asn Gln  
 1 5 10 15  
 Ile Lys

<210> 40  
 <211> 25



<220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC26136  
  
 <400> 43  
 taatataggc cggccgcat catgcaccgg ctcatctttg tc 42  
  
 <210> 44  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC26137  
  
 <400> 44  
 attatatggc gcgccattatc gaggtggtct ttagct 36  
  
 <210> 45  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC22341  
  
 <400> 45  
 cttggagcga cgctgtctct agtc 24  
  
 <210> 46  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC22342  
  
 <400> 46  
 ccacttgtgt tcattgcatt gca 23  
  
 <210> 47  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC27116  
  
 <400> 47  
 attataggat ccgagtatat gcctatggag gttgacctgg ataggctcaa tgatgatgcc 60  
  
 <210> 48  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC26137  
  
 <400> 48  
 attatattggc ggcgcttatac gaggtgttct tgagct 36  
  
 <210> 49  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC26317  
  
 <400> 49  
 atcacctcac agacttgtac cagag 25  
  
 <210> 50  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide primer ZC26318  
  
 <400> 50  
 cctacaaatg tcattttctg ctcc 25  
  
 <210> 51  
 <211> 25  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer ZC14063

<400> 51  
caccagacat aatagctgac agact 25

<210> 52  
<211> 1472  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (93)...(1205)

<400> 52  
agggactgtg cagtagaaat ccgccgactc aaccctttgg gctttattta tttacttttg 60  
gagcaacgcg atccctaggt cgctgagccc aa atg caa cgg ctc gtt tta gtc 113  
Met Gln Arg Leu Val Leu Val  
1 5

tcc att ctc ctg tgc gcg aac ttt agc tgc tat ccg gac act ttt gcg 161  
Ser Ile Leu Leu Cys Ala Asn Phe Ser Cys Tyr Pro Asp Thr Phe Ala  
10 15 20

act ccg cag aga gca tcc atc aaa gct ttg cgc aat gcc aac ctc agg 209  
Thr Pro Gln Arg Ala Ser Ile Lys Ala Leu Arg Asn Ala Asn Leu Arg  
25 30 35

aga gat gag agc aat cac ctc aca gac ttg tac cag aga gag gag aac 257  
Arg Asp Glu Ser Asn His Leu Thr Asp Leu Tyr Gln Arg Glu Glu Asn  
40 45 50 55

att cag gtg aca agc aat ggc cat gtg cag agt cct cgc ttc ccg aac 305  
Ile Gln Val Thr Ser Asn Gly His Val Gln Ser Pro Arg Phe Pro Asn  
60 65 70

agc tac cca agg aac ctg ctt ctg aca tgg tgg ctc cgt tcc cag gag 353  
Ser Tyr Pro Arg Asn Leu Leu Leu Thr Trp Trp Leu Arg Ser Gln Glu  
75 80 85

aaa aca cgg ata caa ctg tcc ttt gac cat caa ttc gga cta gag gaa Lys Thr Arg Ile Gln Leu Ser Phe Asp His Gln Phe Gly Leu Glu Glu 90 95 100	401
gca gaa aat gac att tgt agg tat gac ttt gtg gaa gtt gaa gaa gtc Ala Glu Asn Asp Ile Cys Arg Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu Glu Val 105 110 115	449
tca gag agc agc act gtt gtc aga gga aga tgg tgt ggc cac aag gag Ser Glu Ser Ser Thr Val Val Arg Gly Arg Trp Cys Gly His Lys Glu 120 125 130 135	497
atc cct cca agg ata acg tca aga aca aac cag att aaa atc aca ttt Ile Pro Pro Arg Ile Thr Ser Arg Thr Asn Gln Ile Lys Ile Thr Phe 140 145 150	545
aag tct gat gac tac ttt gtg gca aaa cct gga ttc aag att tat tat Lys Ser Asp Asp Tyr Phe Val Ala Lys Pro Gly Phe Lys Ile Tyr Tyr 155 160 165	593
tca ttt gtg gaa gat ttc caa ccg gaa gca gcc tca gag acc aac tgg Ser Phe Val Glu Asp Phe Gln Pro Glu Ala Ala Ser Glu Thr Asn Trp 170 175 180	641
gaa tca gtc aca agc tct ttc tct ggg gtg tcc tat cac tct cca tca Glu Ser Val Thr Ser Ser Phe Ser Gly Val Ser Tyr His Ser Pro Ser 185 190 195	689
ata acg gac ccc act ctc act gct gat gcc ctg gac aaa act gtc gca Ile Thr Asp Pro Thr Leu Thr Ala Asp Ala Leu Asp Lys Thr Val Ala 200 205 210 215	737
gaa ttc gat acc gtg gaa gat cta ctt aag cac ttc aat cca gtg tct Glu Phe Asp Thr Val Glu Asp Leu Leu Lys His Phe Asn Pro Val Ser 220 225 230	785
tgg caa gat gat ctg gag aat ttg tat ctg gac acc cct cat tat aga Trp Gln Asp Asp Leu Glu Asn Leu Tyr Leu Asp Thr Pro His Tyr Arg 235 240 245	833
ggc agg tca tac cat gat cgg aag tcc aaa gtg gac ctg gac agg ctc Gly Arg Ser Tyr His Asp Arg Lys Ser Lys Val Asp Leu Asp Arg Leu 250 255 260	881

aat gat gat gtc aag cgt tac agt tgc act ccc agg aat cac tct gtg Asn Asp Asp Val Lys Arg Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn His Ser Val 265 270 275	929
aac ctc agg gag gag ctg aag ctg acc aat gca gtc ttc ttc cca cga Asn Leu Arg Glu Glu Leu Lys Leu Thr Asn Ala Val Phe Phe Pro Arg 280 285 290 295	977
tgc ctc ctc gtg cag cgc tgt ggt ggc aac tgt ggt tgc gga act gtc Cys Leu Leu Val Gln Arg Cys Gly Gly Asn Cys Gly Cys Gly Thr Val 300 305 310	1025
aac tgg aag tcc tgc aca tgc agc tca ggg aag aca gtg aag aag tat Asn Trp Lys Ser Cys Thr Cys Ser Ser Gly Lys Thr Val Lys Lys Tyr 315 320 325	1073
cat gag gta ttg aag ttt gag cct gga cat ttc aag aga agg ggc aaa His Glu Val Leu Lys Phe Glu Pro Gly His Phe Lys Arg Arg Gly Lys 330 335 340	1121
gct aag aat atg gct ctt gtt gat atc cag ctg gat cat cat gag cga Ala Lys Asn Met Ala Leu Val Asp Ile Gln Leu Asp His His Glu Arg 345 350 355	1169
tgt gac tgt atc tgc agc tca aga cca cct cga taa aacactatgc Cys Asp Cys Ile Cys Ser Ser Arg Pro Pro Arg * 360 365 370	1215
acatctgtac ttgattatg aaaggacctt taggttaca aaaccctaag aagcttctaa tctcagtgca atgaatgcat atggaaatgt tgctttgtta gtgcatggc aagaagaagc aaatatcatt aatttctata tacataaaca taggaattca cttatcaata gtatgtgaag atatgtatat atacttatat acatgactag ctctatgtat gtaaatagat taaatacttt attcagtata ttactg	1275 1335 1395 1455 1472
<210> 53 <211> 370 <212> PRT <213> Mus musculus	
<400> 53 Met Gln Arg Leu Val Leu Val Ser Ile Leu Leu Cys Ala Asn Phe Ser 1 5 10 15	

Cys Tyr Pro Asp Thr Phe Ala Thr Pro Gln Arg Ala Ser Ile Lys Ala  
 20 25 30  
 Leu Arg Asn Ala Asn Leu Arg Arg Asp Glu Ser Asn His Leu Thr Asp  
 35 40 45  
 Leu Tyr Gln Arg Glu Glu Asn Ile Gln Val Thr Ser Asn Gly His Val  
 50 55 60  
 Gln Ser Pro Arg Phe Pro Asn Ser Tyr Pro Arg Asn Leu Leu Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Trp Trp Leu Arg Ser Gln Glu Lys Thr Arg Ile Gln Leu Ser Phe Asp  
 85 90 95  
 His Gln Phe Gly Leu Glu Glu Ala Glu Asn Asp Ile Cys Arg Tyr Asp  
 100 105 110  
 Phe Val Glu Val Glu Glu Val Ser Glu Ser Ser Thr Val Val Arg Gly  
 115 120 125  
 Arg Trp Cys Gly His Lys Glu Ile Pro Pro Arg Ile Thr Ser Arg Thr  
 130 135 140  
 Asn Gln Ile Lys Ile Thr Phe Lys Ser Asp Asp Tyr Phe Val Ala Lys  
 145 150 155 160  
 Pro Gly Phe Lys Ile Tyr Tyr Ser Phe Val Glu Asp Phe Gln Pro Glu  
 165 170 175  
 Ala Ala Ser Glu Thr Asn Trp Glu Ser Val Thr Ser Ser Phe Ser Gly  
 180 185 190  
 Val Ser Tyr His Ser Pro Ser Ile Thr Asp Pro Thr Leu Thr Ala Asp  
 195 200 205  
 Ala Leu Asp Lys Thr Val Ala Glu Phe Asp Thr Val Glu Asp Leu Leu  
 210 215 220  
 Lys His Phe Asn Pro Val Ser Trp Gln Asp Asp Leu Glu Asn Leu Tyr  
 225 230 235 240  
 Leu Asp Thr Pro His Tyr Arg Gly Arg Ser Tyr His Asp Arg Lys Ser  
 245 250 255  
 Lys Val Asp Leu Asp Arg Leu Asn Asp Asp Val Lys Arg Tyr Ser Cys  
 260 265 270  
 Thr Pro Arg Asn His Ser Val Asn Leu Arg Glu Glu Leu Lys Leu Thr  
 275 280 285  
 Asn Ala Val Phe Phe Pro Arg Cys Leu Leu Val Gln Arg Cys Gly Gly  
 290 295 300  
 Asn Cys Gly Cys Gly Thr Val Asn Trp Lys Ser Cys Thr Cys Ser Ser  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Thr Val Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Lys Phe Glu Pro Gly  
 325 330 335  
 His Phe Lys Arg Arg Gly Lys Ala Lys Asn Met Ala Leu Val Asp Ile  
 340 345 350

Gln Leu Asp His His Glu Arg Cys Asp Cys Ile Cys Ser Ser Arg Pro  
 355 360 365  
 Pro Arg  
 370

**【図面の簡単な説明】****【図1】**

図1は、配列番号2で示されるアミノ酸配列のHopp/Woods親水性度プロフィールである。プロフィールは、スライディング6残基ウインドウを基礎にする。隠されたG、SおよびT残基ならびに露呈されたH、YおよびW残基は無視された。これらの残基は、低い法の事例文字により図面に示される。

**【図2】**

図2は、トランスジェニック動物におけるcDNAの発現に用いるためのベクターpHB12-8の図である。

【図1-1】

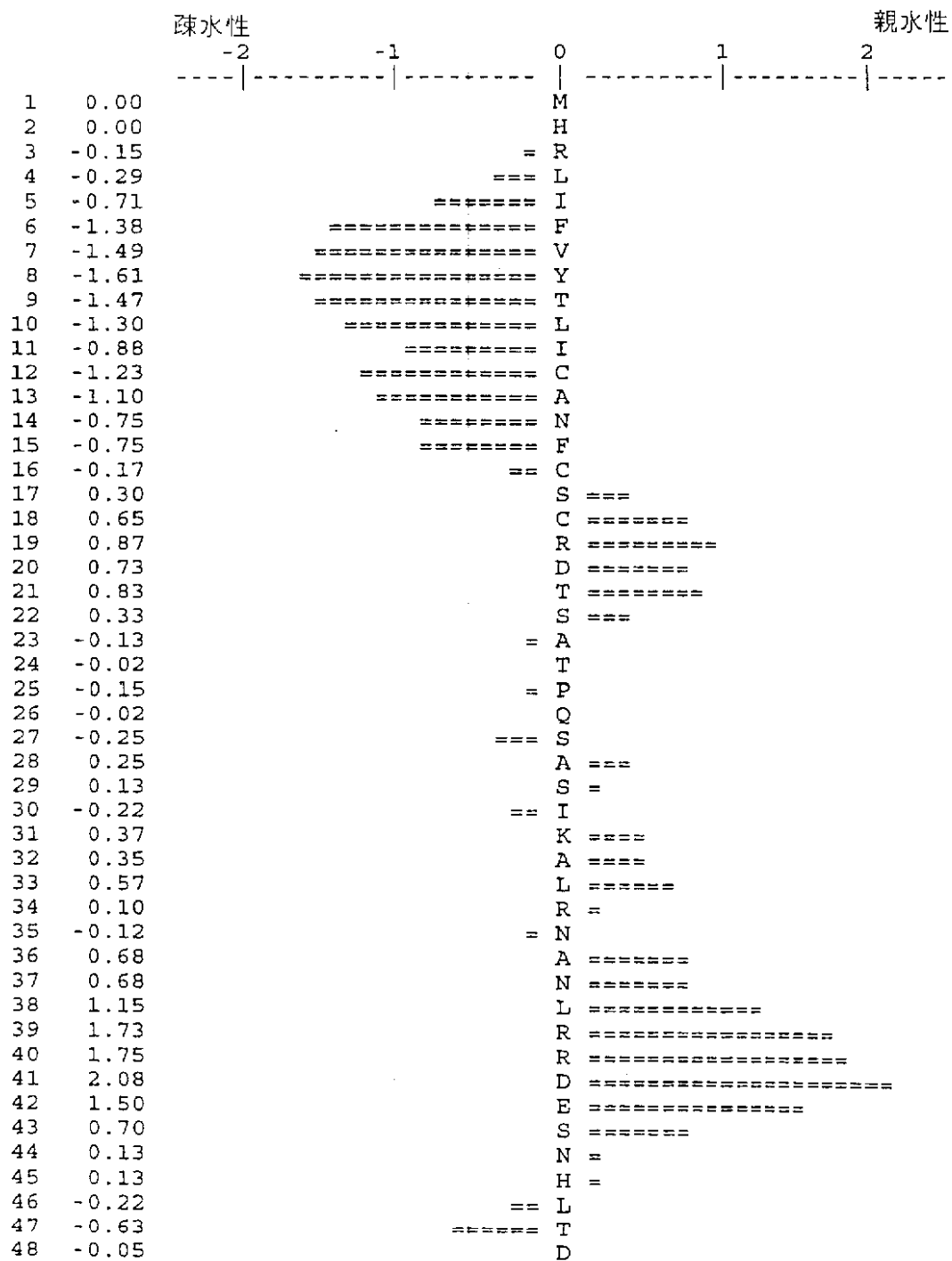


Fig. 1

【图1-2】

49	0.75	L	=====
50	1.32	Y	=====
51	1.32	R	=====
52	1.55	R	=====
53	1.63	D	=====
54	1.17	E	=====
55	0.42	T	=====
56	0.42	I	=====
57	-0.08	= Q	
58	0.02	V	
59	0.32	K	=====
60	-0.10	= G	
61	-0.10	= N	
62	-0.57	===== G	
63	-0.52	===== Y	
64	-0.55	===== V	
65	-0.05	Q	
66	-0.08	= S	
67	0.17	P	=====
68	0.17	R	=====
69	0.17	F	=====
70	0.18	P	=====
71	-0.32	==== N	
72	0.60	S	=====
73	0.63	Y	=====
74	0.30	P	=====
75	-0.05	R	
76	-0.37	==== N	
77	-0.43	==== L	
78	-1.50	===== L	
79	-1.03	===== L	
80	-1.03	===== T	
81	-0.82	===== W	
82	-0.47	===== R	
83	-0.37	==== L	
84	0.70	H	=====
85	0.23	S	=====
86	0.47	Q	=====
87	1.05	E	=====
88	0.70	N	=====
89	0.70	T	=====
90	-0.10	= R	
91	-0.38	==== I	
92	-0.73	===== Q	
93	-0.73	===== L	
94	-0.40	==== V	
95	-0.40	==== F	
96	-0.52	===== D	
97	-0.27	==== N	
98	-0.15	= Q	
99	-0.15	= F	
100	0.32	G	=====
101	0.20	L	=====
102	1.12	E	=====
103	1.15	E	=====

【图1-3】

104	1.95	A	=====
105	1.15	E	=====
106	0.48	N	=====
107	1.07	D	=====
108	0.18	I	==
109	0.65	C	=====
110	-0.27	== R	
111	-0.22	== Y	
112	0.45	D	=====
113	-0.30	=== F	
114	0.58	V	=====
115	0.58	E	=====
116	0.70	V	=====
117	1.00	E	=====
118	1.00	D	=====
119	1.18	I	=====
120	0.73	S	=====
121	0.17	E	==
122	0.17	T	==
123	-0.18	== S	
124	-0.18	== T	
125	-0.12	= I	
126	0.33	I	===
127	-0.17	== R	
128	-0.03	G	
129	0.27	R	===
130	-0.32	=== W	
131	0.18	C	==
132	0.18	G	==
133	0.50	H	=====
134	0.67	K	=====
135	0.67	E	=====
136	1.25	V	=====
137	0.45	P	=====
138	0.45	P	=====
139	0.75	R	=====
140	1.25	I	=====
141	1.18	K	=====
142	0.72	S	=====
143	1.05	R	=====
144	0.25	T	===
145	0.70	N	=====
146	-0.10	= Q	
147	-0.10	= I	
148	-0.55	===== K	
149	-0.08	= I	
150	0.27	T	===
151	0.27	F	===
152	1.07	K	=====
153	0.75	S	=====
154	0.75	D	=====
155	0.00	D	
156	-0.13	= Y	
157	-0.13	= F	
158	-0.63	===== V	

【图1-4】

159	-0.25	===	A
160	-0.25	===	K
161	0.50		P =====
162	0.28		G ===
163	-0.60	=====	F
164	-0.98	=====	K
165	-0.93	=====	I
166	-0.82	=====	Y
167	-1.62	=====	Y
168	-0.82	=====	S
169	0.07		L =
170	0.03		L
171	0.02		E
172	0.32		D ===
173	0.53		F =====
174	-0.05	=	Q
175	-0.63	=====	P
176	-0.17	==	A
177	0.30		A ===
178	0.23		A ==
179	0.35		S =====
180	0.27		E ===
181	0.85		T =====
182	0.85		N =====
183	0.10		w ≈
184	0.10		E =
185	0.12		S =
186	0.33		V ===
187	-0.47	=====	T
188	-1.08	=====	S
189	-0.83	=====	S
190	-1.02	=====	I
191	-1.02	=====	s
192	-1.45	=====	G
193	-1.12	=====	V
194	-0.50	=====	S
195	-0.50	=====	Y
196	-0.20	==	N
197	-0.50	=====	S
198	-0.18	==	P
199	0.28		S ===
200	0.23		V ==
201	0.17		T ==
202	-0.18	==	D
203	-0.23	==	P
204	-0.25	===	T
205	-0.25	===	L
206	-0.33	===	I
207	-0.57	=====	A
208	0.23		D ==
209	1.03		A =====
210	1.62		L =====
211	0.82		D =====
212	0.82		K =====
213	1.62		K =====

【图1-5】

214 0.70  
 215 0.70  
 216 0.13  
 217 0.18  
 218 0.77  
 219 0.77  
 220 0.88  
 221 0.08  
 222 0.65  
 223 0.52  
 224 -0.40  
 225 -0.87  
 226 -0.57  
 227 0.23  
 228 -0.22  
 229 0.00  
 230 0.45  
 231 0.92  
 232 1.42  
 233 0.62  
 234 1.07  
 235 1.27  
 236 1.02  
 237 0.13  
 238 -0.67  
 239 0.13  
 240 -0.43  
 241 -0.47  
 242 0.25  
 243 0.65  
 244 1.45  
 245 0.95  
 246 1.52  
 247 1.57  
 248 1.08  
 249 0.98  
 250 0.98  
 251 1.48  
 252 1.48  
 253 1.48  
 254 1.97  
 255 1.80  
 256 1.80  
 257 1.00  
 258 1.00  
 259 1.45  
 260 0.65  
 261 0.93  
 262 0.93  
 263 1.73  
 264 1.15  
 265 1.15  
 266 1.95  
 267 1.93  
 268 1.48

I =====  
 A =====  
 E =  
 F ==  
 D =====  
 T =====  
 V =====  
 E =  
 D =====  
 L =====  
 ===== L  
 ===== K  
 ===== Y  
 F ==  
 == N  
 P  
 E =====  
 S =====  
 w =====  
 Q =====  
 E =====  
 D =====  
 L =====  
 E =  
 ===== N  
 M =  
 ===== Y  
 ===== L  
 D ===  
 T =====  
 P =====  
 R =====  
 Y =====  
 R =====  
 G =====  
 R =====  
 S =====  
 Y =====  
 H =====  
 D =====  
 R =====  
 K =====  
 S =====  
 K =====  
 V =====  
 D =====  
 L =====  
 D =====  
 R =====  
 L =====  
 N =====  
 D =====  
 D =====  
 A =====  
 K =====

【图1-6】

269	0.82		R	=====
270	0.83		Y	=====
271	0.33		S	===
272	0.33		C	===
273	0.35		T	=====
274	0.32		P	===
275	0.53		R	=====
276	0.35		N	=====
277	0.38		Y	=====
278	-0.42		====	S
279	0.05		V	=
280	0.53		N	=====
281	0.98		I	=====
282	0.93		R	=====
283	1.40		E	=====
284	1.40		E	=====
285	0.82		L	=====
286	0.35		K	=====
287	-0.40		====	L
288	-0.35		====	A
289	-1.27		=====	N
290	-1.38	=====	V	
291	-1.30	=====	V	
292	-0.83	=====	F	
293	-0.75	=====	F	
294	-0.80	=====	P	
295	-0.68	=====	R	
296	-0.52	=====	C	
297	-0.48	=====	L	
298	-0.48	=====	L	
299	-0.48	=====	V	
300	-0.18		--	Q
301	0.12		R	=
302	0.40		C	=====
303	0.20		G	==
304	-0.30		====	G
305	-0.30		====	N
306	-0.87	=====	C	
307	-0.93	=====	G	
308	-1.22	=====	C	
309	-1.02	=====	g	
310	-1.58	=====	T	
311	-0.92	=====	V	
312	-0.30		====	N
313	-0.40		=====	W
314	-0.22		==	R
315	-0.42		=====	S
316	0.18		C	==
317	-0.27		====	T
318	-0.32		====	C
319	0.35		N	=====
320	0.35		S	=====
321	0.27		G	=====
322	0.73		K	=====
323	1.18		T	=====



【図2】

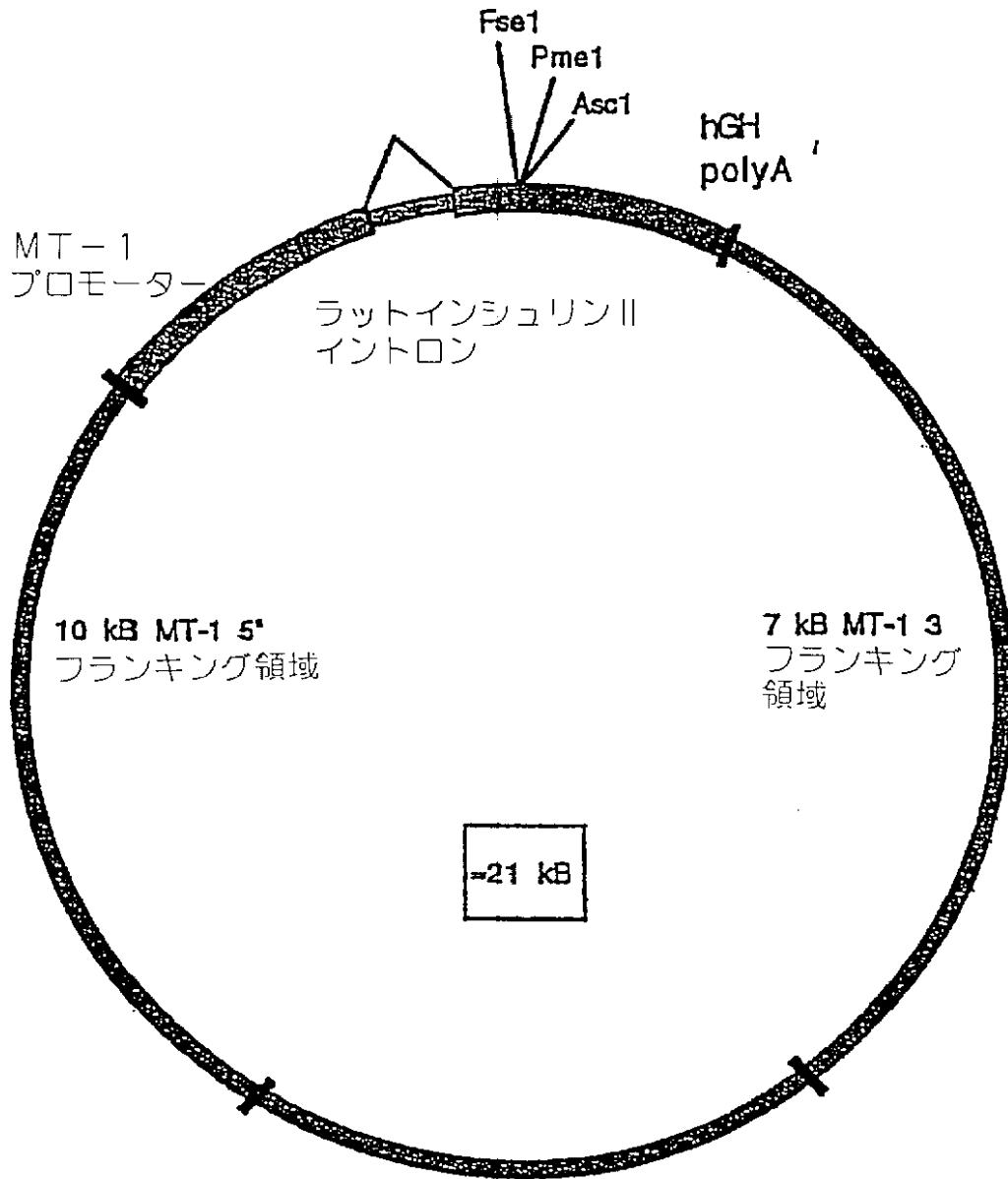


Fig. 2

**【手続補正書】****【提出日】**平成13年11月27日(2001.11.27)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**特許請求の範囲**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** 配列番号2の少なくとも15の連続アミノ酸残基を含む単離されたポリペプチド。

**【請求項2】** 配列番号2の30連続アミノ酸残基を含む請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

**【請求項3】** 前記ポリペプチドが、

配列番号2の残基19～179；

配列番号2の残基52～179；

配列番号2の残基19～253；

配列番号2の残基52～253；

配列番号2の残基19～255；

配列番号2の残基52～255；

配列番号2の残基19～257；

配列番号2の残基52～257；

配列番号2の残基19～253；

配列番号2の残基52～253；

配列番号2の残基19～370；

配列番号2の残基52～370；

配列番号2の残基180～370；

配列番号2の残基246～370；

配列番号2の残基250～370；または

配列番号2の残基258～370

を含む請求項1または請求項2に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項4】 アフィニティータグをさらに含む請求項1～3のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項5】 免疫グロブリン定常ドメインをさらに含む請求項1～3のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項6】 二次ポリペプチドと作用可能に連結された一次ポリペプチドを含む単離されたタンパク質であって、前記一次ポリペプチドが配列番号2の残基258～370を含み、そして前記タンパク質が細胞増殖、アポトーシス、分化、代謝または移動を調整する、単離されたタンパク質。

【請求項7】 前記一次ポリペプチドが、  
配列番号2の残基19～370；  
配列番号2の残基52～370；  
配列番号2の残基180～370；  
配列番号2の残基246～370；または  
配列番号2の残基250～370；  
を含む請求項6に記載の単離されたタンパク質。

【請求項8】 前記一次ポリペプチドが113～120アミノ酸残基長である請求項6に記載の単離されたタンパク質。

【請求項9】 前記タンパク質がヘテロ二量体である請求項6～8のいずれかの単離されたタンパク質。

【請求項10】 前記二次ポリペプチドがVEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, zvegf3, P1GF, PDGF-AおよびPDGF-Bから成る群から選択される請求項9の単離されたタンパク質。

【請求項11】 前記タンパク質がホモ二量体である請求項6～8のいずれか1項の単離されたタンパク質。

【請求項12】 (a)以下の作用可能に連結された要素：  
転写プロモーター、  
以下の：

i) 配列番号2の残基52～370、

ii) 配列番号2の残基52～253、

iii) 配列番号2の残基180～370、および

iv) 配列番号2の残基258～370

から成る群から選択されるアミノ酸残基の配列を含むポリペプチドをコードするDNAセグメント、

転写ターミネーター、

を含む発現ベクターを含有する宿主細胞をDNAセグメントが発現される条件下で培養し、

(b) DNA構築物の発現のタンパク質産物を細胞から回収する、工程を含む方法により産生される単離されたタンパク質。

【請求項13】 長さが約4.4 kbまでの単離されたポリヌクレオチドであって、配列番号2の残基258～370を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項14】 DNAである請求項13に記載のポリヌクレオチド。

【請求項15】 配列番号6のヌクレオチド1～1110を含む請求項14に記載のポリヌクレオチド。

【請求項16】 配列番号1のヌクレオチド226～1335を含む請求項14に記載のポリヌクレオチド。

【請求項17】 以下の作用可能に連結された要素：

転写プロモーター、

請求項14のDNAポリヌクレオチド、および

転写ターミネーター、

を含む発現ベクター。

【請求項18】 DNAポリヌクレオチドに作用可能に連結された分泌シグナル配列をさらに含む請求項17の発現ベクター。

【請求項19】 請求項17または請求項18の発現ベクターを導入された培養細胞であって、DNAポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを発現する細胞。

【請求項20】 請求項6～12のいずれか1項に記載のタンパク質を製薬

上許容可能なビヒクルと組合せて含む製剤組成物。

【請求項21】 請求項17または請求項18の発現ベクターを導入された細胞であって、DNAポリヌクレオチドを発現してポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を産生する細胞を培養し、そして

タンパク質を回収する、  
工程を含むタンパク質の製造方法。

【請求項22】 請求項12に記載のポリペプチドのエピトープと特異的に結合する抗体。

【請求項23】 モノクローナル抗体である請求項22に記載の抗体。

【請求項24】 一本鎖抗体である請求項22に記載の抗体。

【請求項25】 レポーター分子に作用可能に連結された請求項22に記載の抗体。

【請求項26】 遺伝子異常の検出方法であって、

配列番号1または配列番号1の相補体の少なくとも14連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドとともに遺伝子試料を、前記ポリヌクレオチドが相補的ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズして一次反応産物を生成する条件下でインキュベートし、

前記一次反応産物を対照反応産物と比較し、この場合、前記一次反応産物および前記対照反応産物間の差が遺伝子異常を示す、  
工程を含む方法。

【請求項27】 配列番号2の残基258～370に作用可能に連結された配列番号33の残基46～234、

配列番号2の残基180～370に作用可能に連結された配列番号33の残基46～170、

配列番号33の残基235～345に作用可能に連結された配列番号2の残基52～257、

配列番号33の残基171～345に作用可能に連結された配列番号2の残基52～179

から成る群から選択される配列を含むポリペプチド。

【請求項28】 請求項1～12のいずれかのポリペプチドまたはタンパク質を含んで成る細胞表面PDGF受容体の活性化剤。

【請求項29】 受容体がPDGF - 受容体である請求項28に記載の活性化剤。

【請求項30】 受容体がPDGF - 受容体である請求項28に記載の活性化剤。

【請求項31】 請求項1～12のいずれか1項に記載のポリペプチドまたはタンパク質を含んで成るPDGF受容体媒介性細胞過程の抑制剤。

【請求項32】 請求項1～12のいずれかのポリペプチドまたはタンパク質を含んで成る骨組織の増殖の刺激剤。

【請求項33】 請求項1～12のいずれかのポリペプチドまたはタンパク質を含んで成る骨細胞の増殖、分化、移動または代謝の調整剤。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0049

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0049】

バキュウロウイルス発現系で産生されるタンパク質は、残基250～249間の開裂を示し、ならびにより長い種は残基19および35でアミノ末端を有した。増殖因子ドメインは残基258から残基370まで延び、N末端に付加的残基を含み得る（例えば、このドメインは残基250～370または残基246～370を含み得る）。ドメイン境界はやや不明確であり、特定位置から±5残基まで変わると予測され得る、と当業者は認識する。プラスミンによる全長zvegf4の切断は、zvegf4ポリペプチドの活性化を生じた。ウエスタン分析により、増殖因子ドメインとほぼ同サイズで移動する帯域が観察された。適合化非開裂化全長zvegf4試料は、活性化を実証しなかった。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0342

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0342】

発現ベクターへの直接クローニングのための5' F s e Iおよび3' A s c I部位を用いたPCR (Advantage2 PCRキット、Clontech, Palo Alto, CA)により、z v e g f 4 DNA断片を生成した。5' プライマーは、F s e I部位、Kozak配列およびz v e g f 4に関するネイティブリーダー配列の最初の21塩基対を含有した (Z C 26,136;配列番号43)。3' プライマーは、z v e g f 4の最後の21塩基対、終止コドンおよびA s c I部位を含有した (Z C 26.137;配列番号44)。PCR反応は、1μLの鋳型 (E S T E Pプラスミドz v e g f 4 p c r f 1 # 3) を含み、以下のように実行した: 94 で1分を1サイクル; 次に94 で30秒、55 で30秒、68 で1分間を25サイクル; 最後に72 で7分間の伸長。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0343

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0343】

E S T E Pプラスミドz v e g f 4 p c r f 1 # 3は、全長ヒトz v e g f 4断片を含有する。各々20 pmのZ C 22,341 (配列番号45) およびZ C 22,342 (配列番号46) プライマー、ならびに3μLの甲状腺ライブラリーを用いたPCRにより、この断片を生成した。反応は以下のように実行した: 94 で1分を1サイクル; 次に94 で20秒、66 で1.5分間を30サイクル; 最後に72 で5分間の伸長。1% T B Eゲル上で1,272 bp生成物をゲル精製し、QIAquickゲル抽出キット (Q i a g e n, Valencia, CA) を用いてゲルスラブからDNAを抽出した。この1,272 bp断片をp C R 2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中にサブクローニングし、z v e g f 4 p c r f 1 # 3と命名した。

## 【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0345

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0345】

5 $\mu$ lのzvegf4DNA断片および1 $\mu$ LのpEZE2ベクター断片を室温で一夜、連結した(New England Biolabs高濃縮リガーゼおよび供給緩衝液)。1 $\mu$ lの連結反応物を、0.2 cmキューベット中の25 $\mu$ Lのエレクトロコンピテント大腸菌DH10B株(Life Technologies)に付加した。1mLのLBプロスを付加し、100 $\mu$ LのミックスをLB/アンピリシン寒天プレート上に載せた。プレートを37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートし、8つの単離コロニーをDNAミニプレップ(QIAquickミニ-プレップキット、Qiagen)用に摘み取った。前記のプライマーを用いて、zvegf4DNAの存在に関して、PCRにより個々のクローンをスクリーニングした。クローン#1~6でDNAシーケンシングを実施して、正しい全長配列を立証した。一クローンは、正しい予測配列を含有し、DNAのMaxi prepが作製された(Qiagenプラスミドマキシキット、Qiagen)。

## 【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0347

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0347】

次に、血清無含有(SF)培地処方物(DMEM/F12(Life Technologies)、非必須アミノ酸(Life Technologies)、1%L-グルタミンおよび1%ピルビン酸ナトリウム)中のポリ陽イオン性脂質ジオクタリルデシルアミドグリシルスペルミンの10:1(w/w)リポソーム処方物を用いて、リポソーム媒介性トランスフェクションにより、細胞をプラスミドpEZE2/zvegf4でトランスフェクトした。プラスミドpEZE2/zvegf4を15 ml円錐管中で、SF培

地により最終総容量500 $\mu$ lに希釈し、20 $\mu$ LのトランスフェクタムTransfectam (Promega, Madison, WI) 試薬を付加し、十分に混合して、室温で10分間インキュベートした。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0350

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0350】

S F 培地で細胞ウエルをすすぎ、2mLのS F 培地を付加し、培養を24時間インキュベートした。10K遠心装置 ( Millipore Corporation, Bedford, MA ) を用いて、状態調節S F 培地を約20倍に濃縮した。25 $\mu$ lの濃縮物を、50Mmの -メルカプトエタノールを含有する4X試料緩衝液 ( Novex, San Diego, CA ) 15 $\mu$ Lに付加し、混合物を4~12% N u P A G E ゲル ( Novex ) 上で走行させた。ゲルからのタンパク質をニトロセルロース膜 ( Novex ) に移し、ウエスタンA緩衝液 ( 0.25%ゼラチン、50mMトリス - H C l、p H7.4、150mM N a C l、5mM E D T A、0.05%イゲパルC A - 630 ) 中の10%脱脂粉乳で、回転振盪器台上で室温で一夜、プロットを遮断した。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0356

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0356】

実施例19.

A. マウスゲノムライブラリースクリーン

完全コード配列を含有するヒト z v e g f 4 制限消化断片でマウスゲノムライブラリーをプローブすることにより、部分マウス z v e g f 4 配列を得た。E c o R I ( Gibco BRL, Gaithersburg, MD ) で8 $\mu$ gの全長ヒト z v e g f 4 プラス

ミドを消化することにより、プローブを生成した。2.3% T B E ゲル上で1,289 b p断片をゲル精製し、QIAquickゲル抽出キット (Qiagen) を用いてアガローススラブからDNAを抽出した。マウスゲノムライブラリーは、24N Z Yプレート上のK802宿主芝上にプレート化されたemb l 3 S P 6 / T 7 B a m H I クロオン化ライブラリー (Clontech, Palo Alto, CA) であって、 $7.2 \times 10^5$  pfusに相当した。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0357

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0357】

5分間沸騰させ、その後冷却しておいた0.1 mg/mlのサケ精子DNAを含有するEXPRESSHYB溶液中で24のフィルターリフトを予備ハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションは50 で一夜実施した。63 ngの前記のヒト断片を、Rediprime I I無作為プライム標識系 (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England) を用いて $^{32}$ Pで標識した。Nuc Trapプッシュカラム (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて非取込み放射能を除去した。 $10 \times 10^6$  cpm/ml z v e g f 4 プローブ、0.1 mg/mlサケ精子DNAおよび0.5  $\mu$ g/mlネズミc o t - 1 DNA (5分間沸騰させ、その後冷却しておいた) を含有するEXPRESSHYB溶液中で、フィルターをハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは50 で一夜実施した。フィルターリフトを2 x S S C、0.1% S D S 中で、室温で2時間洗浄し、次に1時間、温度を60 に上げた。-80 での一夜曝露は、7つの推定主要ヒットを示した。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0360

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0360】

63 ngのヒト z v e g f 4 断片を、前記のようなプローブに関して標識した。0.99~1.1 x 10<sup>6</sup> ヒト z v e g f 4 プローブ、0.5 μg/ml ネズミ c o t - 1 D N A および0.9 mg/ml サケ精子 D N A (5分間沸騰させ、その後冷却しておいた)と混合させたEXPRESSHYBハイブリダイゼーション溶液9 ml中で、各バイアルのフィルターをハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは50 °C で一夜実施した。主要スクリーンに関する前記の洗浄条件を、この二次スクリーンのために反復した。試験した4つの主要推定ヒットが-80 °C で一夜曝露後、陽性となった。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0361

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0361】

200 lのSM中で単離プラーク#7c1および#18b2を4 °C で溶離し、新鮮な宿主K802細胞を調製した。10<sup>-2</sup>~10<sup>-3</sup>の範囲の連続希釈液をプレート化して、力価概算を得た。#18b2のみがあらゆるプラークを生じ(2.6~3.0 x 10<sup>3</sup>ファージ/μLに関して)、このプラークをさらに追跡した。プレート溶解物から、ファージDNAに関して、10<sup>5</sup> pfu/プレートを含有する2つのプレートを調製した。ファージが集密に達し始めるまで、プレートを37 °C で6時間増殖させ、次に12 mlのSM/プレートを付加して、4 °C で一夜、ファージを溶離させた。この時点で、プレートを室温で1時間浸透し、上清を取り出して、1%クロロホルムを付加し、上清を15分間浸透させた。Wizard プレップDNA精製系(Promega)、セクションIVおよびVIを用いて、DNAを調製した。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0363

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0363】

5分間沸騰させ、その後冷却しておいた1.2 mgのサケ精子DNAと混合したEXPRESSHYBハイブリダイゼーション溶液(Clontech) 12 ml中で50℃で一夜、プロットを予備ハイブリダイズした。69 ngのヒトzvegf4断片を、前記のようなプローブに関して標識した。市販プッシュカラム(NUCTRAPカラム; Stratagene)を用いてクロマトグラフィーにより、非取込み放射能を除去した。EXPRESSHYBハイブリダイゼーション溶液10 mlを、 $1.0 \times 10^6$  cpmのヒトzvegf4プローブ、0.5 µg/mlネズミcot-1 DNAおよび0.1 mg/mlサケ精子DNA(5分間沸騰させ、その後冷却しておいた)と混合させた後、プロットに付加した。ハイブリダイゼーションは50℃で一夜実施した。前記と同様にプロットを洗浄し、-80℃で一夜、フィルムに曝露した。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0364

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0364】

サザンゲルは、2.0~2.9 kbの範囲のサイズのプローブとハイブリダイズしたBamHI/PstI消化物からの断片を有し、これを追跡した。プラーク#18b2 DNA(28 µg)を20単位のBamHI(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)および20 µlのPstI(Life Technologies)で、37℃で2時間切断した。消化物を1%TBEアガロースゲル上を走行させ、2.0 kb二重項、ならびに2.7 kb/2.9 kb帯域をゲルから切り出した。QIAquickゲル抽出キット(Qiagen)を用いてアガロースからDNAを抽出した。18b2断片を、BamHI、PstIおよびBamHI/PstIで切断したpbluescriptIIKS+ベクター(Stratagene)に連結した。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0366

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0366】

ヒト *zvegf4* プローブ ( $8.4 \times 10^5$  /ml cpm)、0.1 mg/mlのサケ精子DNAおよび0.5  $\mu$ g/mlネズミ *cot-1* DNAを5分間沸騰させ、その後冷却して、EXPRESSHYBハイブリダイゼーション溶液7 mlと混合させた後、プロットに付加した。ハイブリダイゼーションは50 °Cで一晩実施した。前記と同一の洗浄手法を用いた。プロットを-80 °Cで3時間、フィルムに曝露した。両2.0 kb帯域挿入物はプローブと強力にハイブリダイズした。これらのクローンをシーケンシングした結果、ネズミ *zvegf4* cubドメインの一部を含有することが判明した。PCR cDNAスクリーニングのために、この配列からプライマーを消化した。

## 【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0370

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0370】

前記の条件にしたがってプライマー ZG26,317 (配列番号49) および ZG26,318 (配列番号50) を用いたPCRにより、 $9.6 \times 10^5$  クローンを表示するマウス唾腺ライブラリーをスクリーニングした。ライブラリーを250クローンの陽性プールにほどいた。この250クローンプールは、RACEにより、5'末端を有すると立証された。各々20 pmの ZG26,318 (配列番号50) および ZG14,063 (配列番号51) プライマーおよび3  $\mu$ Lのそのプールを用いた。反応は以下のように実行した：94 °Cで2分；次に94 °Cで15秒、70 °Cで30秒を5サイクル；94 °Cで15秒、62 °Cで20秒、72 °Cで30秒を30サイクル；そして最後に72 °Cで7分の伸長。

## 【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0372

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0372】

D. 全長マウス z v e g f 4 クローン

前記のクローン#6およびクローン#7からの断片の二段階連結により、全長 cDNA クローンを生成した。まず、E c o R 1 / H i n d 3 の 3 プライム断片をクローン#6から生成した。9 $\mu$ gのクローン#6を15単位のE c o R 1 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) および15単位のH i n d 3 (Gibco BRL) を用いて、37 で2時間消化した。1% T B E ゲル上で528 bp断片をゲル精製し、QIAquickゲル抽出キット (Qiagen) を用いてゲルスラブから cDNA を抽出した。

## 【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0373

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0373】

それを、R c o R 1 およびH i n d 3 で消化したpbluescriptIIKS+ (Stratagene) に連結した。このz v e g f 4 挿入物を含有する3 $\mu$ gのクローンを、15単位のE c o R 1 (Gibco BRL) で消化し、1% T B E ゲル上でゲル精製して、前記のキットを用いてDNAを抽出した。クローン#7からの5' E c o R 1 z v e g f 4 断片を前記のE c o R 1 消化クローンと連結した。このE c o R 1 断片は、8 $\mu$ gのクローン#7を30単位のE c o R 1 (Gibco BRL) で37 で2時間消化することにより生成した。前記と同様に1% T B E ゲル上で754 bp断片をゲル精製し、ゲルスラブからDNAを抽出した。

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/40047
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/12 C12Q1/68	C12N15/62 A61K38/18
	C12N5/10	C07K14/52 C07K16/22
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7	C12N	C07K C12Q A61K
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, STRAND, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, L	WO 00 34474 A (ZYMOGENETICS INC) 15 June 2000 (2000-06-15) the whole document seq. ID 37 L: priorities	1-54
X	DATABASE GENBANK 'Online! Accession No. AA488780, 15 August 1997 (1997-08-15) STRAUSBERG R.: "EST; H. sapiens cDNA clone IMAGE:824754" XP002144644 encodes amino acids 305-370 of seq. ID 2.	1-3, 22, 31-33, 36-38, 42
P, X	WO 99 37671 A (NA SONGQING ; SONG HO YEONG (US); DOU SHENSHEN (US); LILLY CO ELI ( ) 29 July 1999 (1999-07-29) the whole document	4-54
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"Z" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 September 2000		25/09/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2016		Authorized officer  Galli, I

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 00/40047

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 24811 A (ZYMOGENETICS INC) 11 June 1998 (1998-06-11) the whole document -----	1-54

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 00/40047

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0034474 A	15-06-2000	NONE	
WO 9937671 A	29-07-1999	AU 2562199 A EP 0984063 A	09-08-1999 08-03-2000
WO 9824811 A	11-06-1998	AU 5439998 A	29-06-1998

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 P	1/16	A 6 1 P	7/00	4 H 0 4 5
	3/10		9/00	
	7/00		9/10	
	9/00		9/14	
	9/10		15/06	
	9/14		17/02	
	15/06		19/00	
	17/02		25/00	
	19/00		25/16	
	25/00		25/28	
	25/16		43/00	1 0 5
	25/28			1 1 1
	43/00	C 0 7 K	14/49	
			16/24	
C 0 7 K	14/49	C 1 2 N	1/15	
	16/24		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 P	21/02	C
	1/21	C 1 2 Q	1/02	
	5/06		1/68	A
	5/10	G 0 1 N	33/53	M
C 1 2 P	21/02		33/566	
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 P	21/08	
	1/68	C 1 2 N	15/00	Z N A A
G 0 1 N	33/53		5/00	A
	33/566			E
// C 1 2 P	21/08	A 6 1 K	37/02	
(31)優先権主張番号	6 0 / 1 8 0 , 1 6 9			
(32)優先日	平成12年2月4日(2000.2.4)			
(33)優先権主張国	米国( U S )			

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ハート, チャールズ イー.  
アメリカ合衆国, ワシントン 98072, ウッディンビル, ワンハンドレッドエイティースード プレイス ノースイースト 20114

(72)発明者 シェパード, ポール オー.  
アメリカ合衆国, ワシントン 98252, グラニット フォールズ, トゥーハンドレッドセブンティーフティエイス ドライブ ノースイースト 13532

(72)発明者 ギルバートソン, デブラ ジー.  
アメリカ合衆国, ワシントン 98155, シアトル, ノースイースト ワンハンドレッドナインティーフティス プレイス 4025

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 CA04 DA02  
EA02 GA11 HA01 HA12 HA15  
4B063 QA01 QA12 QA18 QA19 QQ02  
QQ43 QR32 QR40 QR56 QS25  
QS34  
4B064 AG02 AG27 AG31 CA10 CA19  
CC24 DA01 DA13  
4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14  
BA02 CA24 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA06 AA07 AA17 BA01  
BA02 BA08 BA18 BA19 BA20  
BA21 BA22 BA23 CA53 CA56  
DB55 NA14 ZA012 ZA162  
ZA362 ZA442 ZA512 ZA672  
ZA682 ZA752 ZA812 ZA892  
ZA962 ZB212 ZC022 ZC352  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
CA40 DA01 DA76 DA86 EA24  
EA27 EA50 FA74

专利名称(译)	生长因子同源物ZVEGF 4		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002542825A</a>	公开(公告)日	2002-12-17
申请号	JP2000615760	申请日	2000-05-03
[标]申请(专利权)人(译)	津莫吉尼蒂克斯公司		
申请(专利权)人(译)	ZymoGenetics公司, 股份有限公司雷开球德		
[标]发明人	ギルバートテレサ ハートチャールズイー シェパードポールオー ギルバートソンデブラジー		
发明人	ギルバート,テレサ ハート,チャールズ イー. シェパード,ポール オー. ギルバートソン,デブラ ジー.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K38/18 A61K38/19 A61K45/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/14 A61P15/06 A61P17/02 A61P19/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P43/00 C07K14/49 C07K14/52 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N5/10 C12N5/09 C12N5/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/1858 A61K38/1866 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P15/06 A61P17/02 A61P19/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 C07K14/52 C07K2319/00 A61K2300/00		
FI分类号	A61K45/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/14 A61P15/06 A61P17/02 A61P19/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C07K14/49 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N5/00.E A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR40 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG02 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/DB55 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA162 4C084/ZA362 4C084/ZA442 4C084/ZA512 4C084/ZA672 4C084/ZA682 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZB212 4C084/ZC022 4C084/ZC352 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA24 4H045/EA27 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	09/304216 1999-05-03 US 60/164463 1999-11-10 US 60/180169 2000-02-04 US		
其他公开文献	JP2002542825A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

公开了多肽生长因子, 其制备方法, 编码它们的多核苷酸, 针对它们的抗体和使用它们的方法。该多肽包含与SEQ ID NO : 2的残基52-179或SEQ ID NO : 2的残基258-370至少70%相同的氨基酸区段。还公开了聚合物多聚体。多肽, 多聚体蛋白质和多核苷酸可用于细胞和组织的发育研究和调节, 作为细胞培养基的成分和诊断试剂。

表 3

ヌクレオチド	解	相補体	解
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T
Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T
B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T