

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-505274

(P2005-505274A)

(43) 公表日 平成17年2月24日(2005.2.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	2 G O 4 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	4 B O 6 3
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	4 B O 6 4
		4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 139 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-530854 (P2003-530854)	(71) 出願人	502386053
(86) (22) 出願日	平成14年9月19日 (2002. 9. 19)		バイオノミックス リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月26日 (2004. 3. 26)		オーストラリア, サウス オーストラリ
(86) 国際出願番号	PCT/AU2002/001282		ア 5 0 3 1, セバルトン, ダルグレ
(87) 国際公開番号	W02003/027285		イッシュ ストリート 3 1
(87) 国際公開日	平成15年4月3日 (2003. 4. 3)	(74) 代理人	100103816
(31) 優先権主張番号	PR 7973		弁理士 風早 信昭
(32) 優先日	平成13年9月27日 (2001. 9. 27)	(74) 代理人	100120927
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		弁理士 浅野 典子
(31) 優先権主張番号	PR 7974	(72) 発明者	ガンブル, ジェニファー, ルス
(32) 優先日	平成13年9月27日 (2001. 9. 27)		オーストラリア, サウス オーストラリ
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		ア 5 1 5 2, スティーリング, ブラ
(31) 優先権主張番号	PR 8210		ンチ ロード 8
(32) 優先日	平成13年10月11日 (2001. 10. 11)		
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト血管形成遺伝子に対する DNA 配列

(57) 【要約】

配列番号 1 ~ 2 0 の 1 つに示される配列を含む単離された核酸分子。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 ~ 20 の 1 つに示される配列を含む単離された核酸分子。

【請求項 2】

配列番号 1 ~ 114 の 1 つに示される配列またはそのフラグメントを含み、血管形成プロセスにおいて役割を果たすポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

【請求項 3】

配列番号 1 ~ 114 の 1 つに示される配列を含む核酸分子に対して少なくとも 70 % が同一であり、血管形成プロセスにおいて役割を果たすポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

【請求項 4】

少なくとも 85 % が同一である、請求項 3 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 5】

少なくとも 95 % が同一である、請求項 3 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 6】

配列同一性が、B L O S U M 6 2 デフォルト行列を用いた B L A S T アルゴリズムを使用して決定される、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項に記載の単離された核酸分子。

【請求項 7】

血管形成プロセスにおいて役割を果たすポリペプチドをコードし、かつ配列番号 1 ~ 114 の 1 つに示されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と、ストリンジェントな条件のもとでハイブリダイゼーションする単離された核酸分子。

【請求項 8】

ストリンジェントな条件が、750 mM NaCl、75 mM クエン酸三ナトリウム、2% SDS、50% ホルムアミド、1X デンハルト、10% (w/v) デキストラン硫酸、および 100 μg/ml の変性サケ精子 DNA における 42 °C でのハイブリダイゼーションを含む、請求項 7 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 9】

ガン、慢性関節リウマチ、糖尿病網膜症、乾癬、アテローム性動脈硬化などの心臓血管疾患、虚血性四肢疾患および冠状動脈疾患（これらに限定されない）を含む血管形成関連疾患において役割を果たすポリペプチドをコードする、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の単離された核酸分子。

【請求項 10】

配列番号 1 ~ 20 に示されるヌクレオチド配列のいずれか 1 つからなる単離された核酸分子。

【請求項 11】

配列番号 70、72 ~ 73、78、83 ~ 87、89、160 または 174 に示される配列を有する DNA 分子からなる群から選択される核酸分子の使用であって、血管形成プロセスに関与する全長型ヒト遺伝子を同定および/または取得するための方法。

【請求項 12】

全長型ヒト遺伝子がインシリコデータベース分析によって同定される、請求項 11 に記載の使用。

【請求項 13】

さらなる配列が、前記ヌクレオチド分子の 1 つまたは複数とのハイブリダイゼーション、インバース PCR、制限部位 PCR、PCR ウォーキング技術または RACE を使用して得られる、請求項 11 または 12 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 14】

配列番号 70、72 ~ 73、78、83 ~ 87、89、160 または 174 のいずれか 1 つから選択される DNA 分子の使用によって同定される遺伝子。

【請求項 15】

配列番号 115 ~ 125 の 1 つに示される配列を含む単離されたポリペプチド。

10

20

30

40

50

- 【請求項 16】
配列番号 115 ~ 217 の 1 つに示される配列またはそのフラグメントを含み、血管形成プロセスにおいて役割を果たす単離されたポリペプチド。
- 【請求項 17】
血管形成プロセスにおいて役割を果たし、配列番号 115 ~ 217 に示されるアミノ酸配列との同一性が少なくとも 70 % である単離されたポリペプチド。
- 【請求項 18】
配列同一性が少なくとも 85 % 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】
配列同一性が少なくとも 95 % である、請求項 17 に記載の単離されたポリペプチド。 10
- 【請求項 20】
配列同一性が、B L O S U M 6 2 デフォルト行列を用いた B L A S T アルゴリズムを使用して決定される、請求項 17 ~ 19 のいずれか一項に記載の単離されたポリペプチド。
- 【請求項 21】
ガン、慢性関節リウマチ、糖尿病網膜症、乾癬、アテローム性動脈硬化などの心臓血管疾患、虚血性四肢疾患および冠状動脈疾患（これらに限定されない）を含む血管形成プロセス関連疾患において役割を果たす、請求項 15 ~ 20 のいずれか一項に記載の単離されたポリペプチド。
- 【請求項 22】
配列番号 115 ~ 125 に示されるアミノ酸配列のいずれか 1 つからなる単離されたポリペプチド。 20
- 【請求項 23】
請求項 15 ~ 22 のいずれか一項に記載されるポリペプチドを含む、血管形成プロセスにおいて役割を果たす単離されたポリペプチド複合体。
- 【請求項 24】
請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸分子を含む発現ベクター。
- 【請求項 25】
請求項 24 に記載される発現ベクターで形質転換された細胞。
- 【請求項 26】
真核生物細胞である、請求項 25 に記載の細胞。 30
- 【請求項 27】
ポリペプチドを調製する方法であって、
(1) 請求項 25 ~ 26 のいずれか一項に記載される細胞を、ポリペプチドを産生させるために効果的な条件のもとで培養する工程；および
(2) ポリペプチドを回収する工程
を含む方法。
- 【請求項 28】
請求項 27 に記載される方法によって調製されるポリペプチド。
- 【請求項 29】
血管形成を調節する方法であって、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸分子によってコードされるポリペプチドの発現または活性を細胞において調節することを含む方法。 40
- 【請求項 30】
核酸配列が、配列番号 1 ~ 20 からなる群から選択される、請求項 29 に記載の方法。
- 【請求項 31】
ポリペプチドが、請求項 15 ~ 22 のいずれか一項に記載されるアミノ酸配列またはその活性なフラグメントを含む、請求項 29 に記載の方法。
- 【請求項 32】
ポリペプチドが、配列番号 115 ~ 125 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 31 に記載の方法。 50

【請求項 33】

ポリペプチドがポリペプチド複合体の一部を形成する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 34】

ポリペプチドの発現または活性が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸分子または請求項 15 ~ 22 もしくは請求項 27 のいずれか一項に記載されるポリペプチドのアンタゴニストまたはアゴニストを細胞に導入することによって調節される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 35】

ポリペプチドの発現または活性が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される単離された核酸分子に対するアンチセンスを細胞に導入することによって調節される、請求項 29 に記載の方法。

10

【請求項 36】

ポリペプチドの発現または活性が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸配列の少なくとも一部分の相補体である核酸分子であって、前記核酸配列の発現またはレベルを調節することができる核酸分子を細胞に導入することによって調節される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 37】

核酸分子が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸配列によってコードされる mRNA とハイブリダイゼーションする RNA 分子である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

核酸分子が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸配列に対して標的化される触媒作用核酸分子である、請求項 36 に記載の方法。

20

【請求項 39】

触媒作用核酸分子が DNA ザイムである、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

触媒作用核酸分子が RNA ザイムである、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 41】

ポリペプチドの発現または活性が、該ポリペプチドと結合することができる抗体によって調節される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 42】

抗体が完全なヒト抗体である、請求項 41 に記載の方法。

30

【請求項 43】

抗体が、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、または抗体フラグメント (Fab フラグメント、(Fab')₂ フラグメント、Fv フラグメント、単鎖抗体および単ドメイン抗体を含む) からなる群から選択される、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 44】

ポリペプチドの発現または活性が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸配列を含む核酸分子またはその活性なフラグメントもしくは変化体を細胞に導入することによって調節される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 45】

核酸分子が、請求項 24 に記載される発現ベクターによって導入される、請求項 44 に記載の方法。

40

【請求項 46】

ポリペプチドの発現または活性が、請求項 15 ~ 22 または請求項 27 のいずれか一項に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを細胞に導入することによって調節される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 47】

血管形成が制御されていないか、または増強されている、請求項 29 ~ 46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 48】

50

血管形成が不適切に停止または低下している、請求項 29 ~ 46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

血管形成関連障害を処置するための方法であって、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸配列によってコードされるポリペプチドの発現または活性を調節することを含む方法。

【請求項 50】

核酸配列が、配列番号 1 ~ 20 からなる群から選択される、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

ポリペプチドが、請求項 15 ~ 22 のいずれか一項に記載されるアミノ酸配列またはその活性なフラグメントを含む、請求項 49 に記載の方法。 10

【請求項 52】

ポリペプチドが、配列番号 115 ~ 125 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

ポリペプチドがポリペプチド複合体の一部を形成する、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 54】

ポリペプチドの発現または活性が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸分子のアンタゴニストもしくはアゴニスト、または請求項 15 ~ 22 もしくは 27 のいずれか一項に記載されるポリペプチドのアンタゴニストもしくはアゴニストを細胞に導入することによって調節される、請求項 49 に記載の方法。 20

【請求項 55】

ポリペプチドの発現または活性が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される単離された核酸分子に対するアンチセンスを細胞に導入することによって調節される、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 56】

ポリペプチドの発現または活性が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸配列の少なくとも一部分の相補体である核酸分子であって、前記核酸配列の発現またはレベルを調節することができる核酸分子を細胞に導入することによって調節される、請求項 49 に記載の方法。 30

【請求項 57】

核酸分子が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸配列によってコードされる mRNA とハイブリダイゼーションする RNA 分子である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

核酸分子が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸配列に対して標的化される触媒作用核酸分子である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 59】

触媒作用核酸分子が DNA ザイムである、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

触媒作用核酸分子が RNA ザイムである、請求項 58 に記載の方法。 40

【請求項 61】

ポリペプチドの発現または活性が、該ポリペプチドと結合することができる抗体によって調節される、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 62】

抗体が完全なヒト抗体である、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

抗体が、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、または抗体フラグメント (Fab フラグメント、(Fab')₂ フラグメント、Fv フラグメント、単鎖抗体および単ドメイン抗体を含む) からなる群から選択される、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 64】

ポリペプチドの発現または活性が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸配列を含む核酸分子またはその活性なフラグメントもしくは変化体を細胞に導入することによって調節される、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 65】

核酸分子が、請求項 24 に記載される発現ベクターによって導入される、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

ポリペプチドの発現または活性が、請求項 15 ~ 22 または請求項 27 のいずれか一項に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを細胞に導入することによって調節される、請求項 49 に記載の方法。

10

【請求項 67】

血管形成関連障害が、制御されていない血管形成もしくは増強された血管形成を伴うか、または低下した脈管構造が有益である障害である、請求項 49 ~ 66 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 68】

障害が、ガン、慢性関節リウマチ、糖尿病網膜症、乾癬、および心臓血管疾患（アテローム性動脈硬化など）からなる群から選択される、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

血管形成関連障害が、不適切に停止もしくは低下した血管形成を伴うか、または拡大する脈管構造が有益である障害である、請求項 49 ~ 66 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 70】

障害が、虚血性四肢疾患または冠状動脈疾患からなる群から選択される、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

血管形成関連障害を処置するための医薬品を製造することにおける、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸配列によってコードされるポリペプチドの発現または活性の調節剤の使用。

【請求項 72】

核酸配列が、配列番号 1 ~ 20 からなる群から選択される、請求項 71 に記載の使用。

【請求項 73】

ポリペプチドが、請求項 15 ~ 22 のいずれか一項に記載されるアミノ酸配列またはその活性なフラグメントを含む、請求項 71 に記載の使用。

30

【請求項 74】

ポリペプチドが、配列番号 115 ~ 125 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 73 に記載の使用。

【請求項 75】

ポリペプチドがポリペプチド複合体の一部を形成する、請求項 71 に記載の使用。

【請求項 76】

ポリペプチドの発現または活性が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸分子のアンタゴニストもしくはアゴニスト、または請求項 15 ~ 22 もしくは請求項 27 のいずれか一項に記載されるポリペプチドのアンタゴニストもしくはアゴニストを細胞に導入することによって調節される、請求項 71 に記載の使用。

40

【請求項 77】

ポリペプチドの発現または活性が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される単離された核酸分子に対するアンチセンスを細胞に導入することによって調節される、請求項 71 に記載の使用。

【請求項 78】

ポリペプチドの発現または活性が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸配列の少なくとも一部分の相補体である核酸分子であって、前記核酸配列の発現またはレベルを調節することができる核酸分子を細胞に導入することによって調節される、請求項 71

50

に記載の使用。

【請求項 79】

核酸分子が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸配列によってコードされる mRNA とハイブリダイゼーションする RNA 分子である、請求項 78 に記載の使用。

【請求項 80】

核酸分子が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸配列に対して標的化される触媒作用核酸分子である、請求項 78 に記載の使用。

【請求項 81】

触媒作用核酸分子が DNA ザイムである、請求項 80 に記載の使用。

【請求項 82】

触媒作用核酸分子がリボザイムである、請求項 80 に記載の使用。

【請求項 83】

ポリペプチドの発現または活性が、該ポリペプチドと結合することができる抗体によって調節される、請求項 71 に記載の使用。

【請求項 84】

抗体が完全なヒト抗体である、請求項 83 に記載の使用。

【請求項 85】

抗体が、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、または抗体フラグメント (Fab フラグメント、(Fab')₂ フラグメント、Fv フラグメント、単鎖抗体および単ドメイン抗体を含む) からなる群から選択される、請求項 83 に記載の使用。

【請求項 86】

ポリペプチドの発現または活性が、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸配列を含む核酸分子またはその活性なフラグメントもしくは変化体を細胞に導入することによって調節される、請求項 71 に記載の使用。

【請求項 87】

核酸分子が、請求項 24 に記載される発現ベクターによって導入される、請求項 86 に記載の使用。

【請求項 88】

ポリペプチドの発現または活性が、請求項 15 ~ 22 または請求項 27 のいずれか一項に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを細胞に導入することによって調節される、請求項 71 に記載の使用。

【請求項 89】

血管形成関連障害が、制御されていない血管形成もしくは増強された血管形成を伴うか、または低下した脈管構造が有益である障害である、請求項 71 ~ 88 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 90】

障害が、ガン、慢性関節リウマチ、糖尿病網膜症、乾癬、および心臓血管疾患 (アテローム性動脈硬化など) からなる群から選択される、請求項 89 に記載の使用。

【請求項 91】

血管形成関連障害が、不適切に停止もしくは低下した血管形成を伴うか、または拡大する脈管構造が有益である障害である、請求項 71 ~ 88 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 92】

障害が、虚血性四肢疾患または冠状動脈疾患からなる群から選択される、請求項 91 に記載の使用。

【請求項 93】

血管形成関連障害の処置において有用な候補薬学的化合物をスクリーニングするための、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸分子の使用。

【請求項 94】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸分子の使用によって同定される、血管形成関連障害の処置において有用な化合物。

10

20

30

40

50

【請求項 9 5】

血管形成関連障害の処置において有用な候補薬学的化合物をスクリーニングするための、請求項 1 5 ~ 2 2 もしくは請求項 2 7 のいずれか一項に記載されるポリペプチドまたは請求項 2 3 に記載されるポリペプチド複合体の使用。

【請求項 9 6】

請求項 1 5 ~ 2 2 もしくは請求項 2 7 のいずれか一項に記載されるポリペプチドまたは請求項 2 3 に記載されるポリペプチド複合体の使用によって同定される、血管形成関連障害の処置において有用な化合物。

【請求項 9 7】

血管形成関連障害の処置において有用な候補薬学的化合物をスクリーニングするための、請求項 2 5 または 2 6 のいずれか一項に記載される細胞の使用。 10

【請求項 9 8】

請求項 2 5 または 2 6 のいずれか一項に記載される細胞の使用によって同定される、血管形成関連障害の処置において有用な化合物。

【請求項 9 9】

血管形成関連障害の処置において有用な候補薬学的化合物についてスクリーニングする方法であって、

(1) 請求項 1 5 ~ 2 2 もしくは請求項 2 7 のいずれか一項に記載されるポリペプチドまたは請求項 2 3 に記載されるポリペプチド複合体を提供する工程、

(2) 候補薬学的化合物を前記ポリペプチドに加える工程、および 20

(3) 前記ポリペプチドへの前記候補薬学的化合物の結合を明らかにする工程を含み、

ポリペプチドまたはポリペプチド複合体に結合する化合物が候補薬学的化合物である、方法。

【請求項 1 0 0】

血管形成関連障害の処置において有用な候補薬学的化合物についてスクリーニングする方法であって、

(1) 請求項 2 5 または 2 6 のいずれか一項に記載される細胞を提供する工程、

(2) 候補薬学的化合物を前記細胞に加える工程、および

(3) 前記細胞の機能的性質に対する前記候補薬学的化合物の作用を明らかにする工程 30

を含み、前記細胞の機能的性質を変化させる化合物が候補薬学的化合物である、方法。

【請求項 1 0 1】

血管形成関連障害の処置において有用な候補薬学的化合物についてスクリーニングする方法であって、

(1) 請求項 2 5 または 2 6 のいずれか一項に記載される細胞を提供する工程、

(2) 候補薬学的化合物を前記細胞に加える工程、および

(3) 発現ベクターの一部である核酸分子の前記細胞における発現に対する前記候補薬学的化合物の作用を明らかにする工程

を含み、

発現ベクターの一部である核酸分子の前記細胞における発現を変化させる化合物が候補薬学的化合物である、方法。 40

【請求項 1 0 2】

血管形成関連障害の処置において有用な候補薬学的化合物についてスクリーニングする方法であって、

(1) 請求項 2 5 または 2 6 のいずれか一項に記載される細胞を提供する工程、

(2) 候補薬学的化合物を前記細胞に加える工程、および

(3) 発現ベクターの一部である核酸分子によってコードされるポリペプチドの前記細胞における発現または活性に対する前記候補薬学的化合物の作用を明らかにする工程

を含み、

発現ベクターの一部である核酸分子によってコードされるポリペプチドの前記細胞における発現または活性を変化させる化合物が候補薬学的化合物である、方法。

【請求項 103】

請求項 100 ~ 102 のいずれか一項に記載される方法によって同定される化合物。

【請求項 104】

請求項 103 に記載される化合物と、薬学的に受容可能なキャリアとを含む薬学的組成物。

【請求項 105】

請求項 15 に記載される単離されたポリペプチドとの免疫学的反応性を有する抗体。

【請求項 106】

完全なヒト抗体である、請求項 105 に記載の抗体。

【請求項 107】

モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、または抗体フラグメント (Fab フラグメント、(Fab')₂ フラグメント、Fv フラグメント、単鎖抗体および単ドメイン抗体を含む) からなる群から選択される、請求項 105 に記載の抗体。

【請求項 108】

請求項 1 に記載される核酸配列に対して標的化される触媒作用核酸。

【請求項 109】

DNA ザイムである、請求項 108 に記載の触媒作用核酸。

【請求項 110】

リボザイムである、請求項 108 に記載の触媒作用核酸。

【請求項 111】

血管形成関連障害の診断または予後における、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸分子の使用。

【請求項 112】

血管形成関連障害の診断または予後における、請求項 15 ~ 22 または請求項 27 のいずれか一項に記載されるポリペプチドの使用。

【請求項 113】

血管形成関連障害の診断または予後における、請求項 105 ~ 107 のいずれか一項に記載される抗体または請求項 16 に記載されるポリペプチドに対する抗体の使用。

【請求項 114】

血管形成関連障害を診断するための方法であって、

(1) 請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される遺伝子の正常な発現および / または活性に対するプロフィルを非罹患対象において明らかにする工程、

(2) 前記遺伝子の異常な発現および / または活性が疑われる人における前記遺伝子の発現レベルおよび / または活性レベルを測定する工程、および

(3) 測定された発現レベルおよび / または活性レベルを、正常な発現および / または活性に対するプロフィルと比較する工程

を含み、

前記対象における変化した発現レベルおよび / または活性レベルが血管形成関連障害の徴候であるか、またはそれに対する素因である、方法。

【請求項 115】

逆転写酵素 PCR が、発現レベルを測定するために用いられる、請求項 114 に記載の方法。

【請求項 116】

遺伝子由来のプローブまたはそのフラグメントを使用するハイブリダイゼーションアッセイが、発現レベルを測定するために用いられる、請求項 114 に記載の方法。

【請求項 117】

血管形成関連障害を診断するための方法であって、

(1) 請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される核酸配列に対応する DNA を対象から

10

20

30

40

50

得る工程、および

(2) 前記対象から得られたDNAを、対応する野生型遺伝子のDNAと比較する工程を含み、

前記対象における変化したDNA特性が血管形成関連障害の徴候であるか、またはそれに対する素因である、方法。

【請求項118】

遺伝子のDNAが配列決定され、配列が比較される、請求項117に記載の方法。

【請求項119】

遺伝子のDNAがSSCP分析に供される、請求項117に記載の方法。

【請求項120】

血管形成関連障害を診断するための方法であって、

(1) 請求項15~22のいずれか一項に記載される野生型ポリペプチドの物理的性質を明らかにする工程、

(2) 前記ポリペプチドを、そのポリペプチドの異常が疑われる人から得る工程、および

(3) 前記人によって発現される前記ポリペプチドに対する性質を測定し、その性質を、野生型ポリペプチドに対する明らかにされた性質と比較する工程

を含み、

前記人における変化したポリペプチド性質が血管形成関連障害の徴候であるか、またはそれに対する素因である、方法。

【請求項121】

性質が電気泳動移動度である、請求項120に記載の方法。

【請求項122】

性質がタンパク質分解的切断パターンである、請求項120に記載の方法。

【請求項123】

請求項1~10のいずれか一項に記載される単離された核酸分子で形質転換された遺伝子改変非ヒト動物。

【請求項124】

動物が、ラット、マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、および非ヒト霊長類(サルおよびチンパンジーなど)からなる群から選択される、請求項123に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

【請求項125】

動物がマウスである、請求項123に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

【請求項126】

血管形成関連障害を処置するために有用な候補薬学的化合物についてスクリーニングすることにおける、請求項123~125のいずれか一項に記載される遺伝子改変非ヒト動物の使用。

【請求項127】

血管形成関連障害が、制御されていない血管形成もしくは増強された血管形成を伴うか、または低下した脈管構造が有益である障害である、請求項93~98または請求項126のいずれか一項に記載の使用。

【請求項128】

障害が、ガン、慢性関節リウマチ、糖尿病網膜症、乾癬、および心臓血管疾患(アテローム性動脈硬化など)からなる群から選択される、請求項127に記載の使用。

【請求項129】

血管形成関連障害が、不適切に停止もしくは低下した血管形成を伴うか、または拡大する脈管構造が有益である傷害である、請求項93~98または請求項126のいずれか一項に記載の使用。

【請求項130】

障害が、虚血性四肢疾患または冠状動脈疾患からなる群から選択される、請求項129に記載の使用。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血管形成のプロセスに関与する新規な核酸配列（「血管形成遺伝子」）に関する。これらの血管形成遺伝子のそれぞれにより、血管形成において役割を有するポリペプチドがコードされる。これらの遺伝子が血管形成において役割を果たしているという認識を考慮して、本発明はまた、血管形成に関連する病理の治療、前血管形成活性または抗血管形成活性についての薬物のスクリーニング、血管形成に関連する病理の診断および予後、そして場合により、全長の血管形成関連遺伝子を同定および取得するための核酸配列の使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

既存血管からの新しい血管の形成、すなわち、血管形成と呼ばれるプロセスは、正常な成長には不可欠である。重要な血管形成プロセスには、胚形成、子宮内膜の更新、妊娠期の黄体の形成および成長、創傷治癒、そして傷害後の組織構造および機能の回復において生じる血管形成プロセスが含まれる。

【0003】

新しい毛細血管の形成には、前血管形成活性または抗血管形成活性のいずれかを有し得る多数の遺伝子の発現によって媒介される同調した一連の事象が必要である。このプロセスは、血管内皮細胞増殖因子または塩基性線維芽細胞増殖因子などの増殖因子によって通常の場合には媒介される、存在する血管系に対する血管形成性の刺激とともに始まる。この後には、細胞外マトリックスの分解、細胞接着変化（および破壊）、細胞透過性の増大、内皮細胞（EC）の増殖、そして血管形成部位に向かうECの遊走が続く。その後のプロセスには、毛細管または管腔の形成、遊走ECによる安定化および分化が含まれる。

20

【0004】

（正常な）健康な成人では、血管形成は事実上停止しており、必要とされるときにだけ生じる。しかし、多数の病理学状況が、増強された制御されない血管形成によって特徴づけられている。これらの状態には、ガン、慢性関節リウマチ、糖尿病網膜症、乾癬、そしてアテローム性動脈硬化などの心臓血管疾患が含まれる。虚血性四肢疾患など他の病気および冠状動脈疾患では、拡大する脈管構造を促進することにより新しい血管を成長させることが有益であると考えらる。

30

【0005】

血管形成を模倣すると考えられる数多くのインビトロアッセイが確立されており、これらにより、血管形成プロセスが生じる機構、および関与する可能性が最も高い遺伝子を調べるための重要な手段が提供されている。

【0006】

管腔形成は、血管形成における重要なステップである。血管形成を受けているEC内に小胞が存在することが報告されており、管腔形成におけるそれらの関与が仮定されている（FolkmanおよびHaudenschield、1980；Gamble他、1993）。FolkmanおよびHaudenschield（1980）によって提唱された管腔形成の一般的機構は、小胞が、多数の整列したECの細胞質内に形成され、その後、それらが管に変換されるということである。隣接する管が合体することにより、連続する単一細胞性の毛細管腔の形成をもたらされる。しかしながら、管腔形成をもたらす細胞形態の変化、またはECがこの特徴を構築するために要求されるシグナルについてはほとんど知られていない。

40

【0007】

血管形成のインビトロモデルが、3次元コラーゲンマトリックスに置床されたヒト臍静脈ECから作製されている（Gamble他、1993）。ホルボールミリストアートアセタート（PMA）の存在下、これらの細胞は24時間以内に毛細管を形成する。抗インテグリン抗体を加えた場合、通常は単一細胞性の管（これは、未成熟な、分化が不十分な表現

50

型を反映していると考えられる)が、細胞 - マトリックス相互作用の阻害および細胞 - 細胞相互作用の促進によって多細胞性の管腔を形成するように変換される。このモデルにより、管腔形成において生じる形態学的事象の研究が可能になっている。

【0008】

血管形成に関連する疾患を処置する場合、このプロセスの分子遺伝学的機構を理解することが最も重要である。上記に記載されるインビトロモデル (G a m b l e 他、1993)、すなわち、時間に依存した、そして大まかには同時的な様式でインビボでの血管形成時に生じる重要な事象を反映するモデルの使用により、関与する重要な遺伝子を同定するための手段が提供されている。

【0009】

多数の遺伝子が血管形成プロセス時に示差的に発現されることがこのモデルから同定されている。これらの血管形成遺伝子のサブセットの機能的分析、そして内皮細胞の機能および増殖に対するそれらの影響が下記に詳しく記載される。

【0010】

これらの血管形成遺伝子の単離により、血管形成関連障害を処置するための新規な標的が提供された。

【発明の開示】

【0011】

本発明は、血管形成時に発現が調節されることが示された、単離された核酸分子を提供する (表1および表2を参照のこと)。

【0012】

本発明の第1の局面において、配列番号1~20によって規定され、そして表1に示されるような単離された核酸分子が提供される。

【0013】

これらの分子および表2に列記された分子が血管形成時にそれらの発現において調節されるという認識に従って、本発明は、血管形成プロセスにおいて役割を果たす、配列番号1~114により規定され、そして表1および表2に示されるような単離された核酸分子またはそれらのフラグメントを提供する。そのようなプロセスには、胚形成、月経周期、創傷修復、腫瘍の血管形成、および運動により誘導される筋肉肥大が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0014】

また、本発明は、血管形成プロセスに関連する疾患において役割を果たす、配列番号1~114により規定され、そして表1および表2に示される単離された核酸分子 (これらは、以降、便宜上、「血管形成遺伝子」、「血管形成核酸分子」または「血管形成ポリペプチド」として示される) またはそれらのフラグメントを提供する。疾患には、ガン、慢性関節リウマチ、糖尿病網膜症、乾癬、アテローム性動脈硬化などの心臓血管疾患、虚血性四肢疾患、および冠状動脈疾患が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0015】

本発明にはまた、本発明の血管形成遺伝子のいずれか1つに対する同一性が少なくとも70%であり、かつ血管形成プロセスにおいて役割を果たす単離された核酸分子が包含される。

【0016】

そのような変化体は、血管形成遺伝子に対する配列同一性が好ましくは少なくとも約85%であり、最も好ましくは少なくとも約95%である。上記に記載されるポリヌクレオチド変化体のいずれか1つにより、本発明の当該血管形成遺伝子の少なくとも1つの機能的特徴または構造的特徴を含むアミノ酸配列がコードされ得る。

【0017】

配列同一性は、典型的には、A l t s c h u l 他 (1997) に記載されるB L A S T アルゴリズムをB L O S U M 6 2 デフォルト行列とともに使用して計算される。

【0018】

10

20

30

40

50

本発明にはまた、本発明の血管形成遺伝子のいずれか1つとストリンジェントな条件のもとでハイブリダイゼーションし、かつ血管形成プロセスにおいて役割を果たす単離された核酸分子が包含される。

【0019】

ゲノム配列を含むポリヌクレオチド配列を検出することができるPCRプローブとのハイブリダイゼーションを、当該血管形成遺伝子をコードする核酸配列を同定するために使用することができる。プローブが、非常に特異的な領域、例えば、5'の調節領域から、またはあまり特異的でない領域、例えば、保存されたモチーフから作製されるとしても、プローブの特異性、そしてハイブリダイゼーションまたは増幅のストリンジェンシーは、プローブにより、血管形成遺伝子をコードする天然に存在する配列、対立遺伝子変化体、または関連した配列のみが同定されるかどうかを左右する。

10

【0020】

プローブはまた、関連した配列を検出するためにも使用することができ、従って、好ましくは、本発明の血管形成遺伝子コード配列のいずれかに対して少なくとも50%の配列同一性を有することが望ましい。本発明のハイブリダイゼーションプローブはDNAまたはRNAであってもよく、そして血管形成遺伝子配列のいずれか1つに由来し得るか、または血管形成遺伝子のプロモーターおよびエンハンサーおよびイントロンを含むゲノム配列に由来し得る。

【0021】

血管形成遺伝子のいずれか1つをコードするDNAに対する特異的なハイブリダイゼーションプローブを製造するための手段には、当該血管形成遺伝子をコードするポリヌクレオチド配列またはその誘導体を、mRNAプローブを製造するためのベクターにクローン化することが含まれる。そのようなベクターはこの分野では知られており、市販されている。ハイブリダイゼーションプローブは、³²Pもしくは³⁵Sなどの放射性核種によって、またはアビジン/ビオチン結合系によりプローブに結合されるアルカリホスファターゼなどの酵素標識によって、またはこの分野で知られている他の方法によって標識することができる。

20

【0022】

ストリンジェントな条件のもと、³²P標識プローブとのハイブリダイゼーションが、最も好ましくは、750mM NaCl、75mMクエン酸三ナトリウム、2%SDS、50%ホルムアミド、1Xデンハルト、10%(w/v)デキストラン硫酸、および100μg/mlの変性サケ精子DNAにおいて、42°Cで生じる。これらの条件に対する有用な様々な変化が当業者には容易に明かである。ハイブリダイゼーションに続く洗浄工程は、最も好ましくは、15mM NaCl、1.5mMクエン酸三ナトリウム、および1%SDSにおいて、65°Cで行われる。これらの条件に対するさらなる様々な変化が当業者には容易に明かである。

30

【0023】

本発明のヌクレオチド配列は、血管形成遺伝子をコードする配列を様々な目的のために変化させるように、この分野で受け入れられている様々な方法を使用して操作することができる。これらの目的には、遺伝子産物のクローニングおよび/またはプロセッシングおよび/または発現の改変が含まれるが、これらに限定されない。遺伝子フラグメントのPCR再組立、および合成オリゴヌクレオチドの使用は、血管形成遺伝子ヌクレオチド配列の操作を可能にする。例えば、オリゴヌクレオチド媒介の部位特異的変異誘発により、新しい制限部位をもたらす変異、グリコシル化パターンを変化させる変異、およびスプライス変化体を生じさせる変異などを導入することができる。

40

【0024】

遺伝暗号の縮重性の結果として、本発明の血管形成遺伝子をコードする多数のポリヌクレオチド配列(この場合、いくつかは、任意の知られている天然に存在する遺伝子のポリヌクレオチド配列に対して最小の類似性を有し得る)を製造することができる。従って、本発明には、可能なコドン選択に基づいた組み合わせを選択することにより作製され得るポ

50

リヌクレオチド配列の可能な変化がどれもすべて包含される。これらの組み合わせは、天然に存在する血管形成遺伝子のポリヌクレオチド配列に対して適用されるような標準的なトリプレット遺伝暗号に従って作製され、従って、すべてのそのような変化は具体的に開示されていると見なすことができる。

【0025】

本発明のポリヌクレオチドには、RNA、cDNA、ゲノムDNA、合成された形態、および混合ポリマー（センス鎖およびアンチセンス鎖の両方）が含まれ、そして本発明のポリヌクレオチドは、当業者によって理解されるように、化学的または生化学的に修飾することができる。そのような修飾には、標識、メチル化、インターカレーター、アルキル化剤、および修飾された連結が含まれる。場合により、天然に存在する遺伝子のコドン使用とは実質的に異なるコドン使用を有する血管形成遺伝子をコードするヌクレオチド配列またはその誘導体を製造することが好都合である。例えば、コドンは、特定のコドンが宿主によって利用される頻度と一致させて、特定の原核生物宿主または真核生物宿主におけるペプチドの発現速度を増大させるために選択することができる。コードされるアミノ酸配列を変化させることなく血管形成遺伝子をコードするヌクレオチド配列またはその誘導体を変化させる他の理由には、天然に存在する配列から産生される転写物よりも望ましい性質（より大きい半減期など）を有するRNA転写物を産生させることが含まれる。

10

【0026】

本発明はまた、本発明の核酸分子を完全に合成化学によって製造することを包含する。合成された配列は発現ベクターに挿入することができ、また好適な宿主における挿入されたコード配列の転写および翻訳を制御するための必要なエレメントを含有する細胞システムに挿入することができる。これらのエレメントには、血管形成遺伝子をコードする配列のより効率的な翻訳を可能にする調節配列、プロモーター、5'非翻訳領域および3'非翻訳領域、ならびに特異的な開始シグナル（ATG開始コドンおよびKozakコンセンサス配列など）が含まれ得る。その開始コドンおよび上流の調節配列を含む完全なコード配列が適切な発現ベクターに挿入される場合、さらなる制御シグナルは必要でない場合がある。しかし、コード配列のみ、またはそのフラグメントが挿入される場合、上記に記載されるような外因性の翻訳制御シグナルがベクターによって提供されなければならない。そのようなシグナルは、天然起源および合成起源の両方で、様々な起源に由来し得る。発現効率は、使用される特定の宿主細胞システムに適切なエンハンサーを含めることによって高めることができる（Schart他、1994）。

20

30

【0027】

本明細書中に記載される配列の相補体である核酸分子もまた調製することができる。

【0028】

本発明は、精製されたポリペプチドまたはタンパク質の調製を可能にする。これを行うために、宿主細胞を、上記に記載されるような核酸分子でトランスフェクションすることができる。典型的には、前記宿主細胞は、本発明による核酸分子を含む発現ベクターでトランスフェクションされる。様々な発現ベクター/宿主細胞システムを、配列を含有し、かつ発現させるために利用することができる。これらには、プラスミドDNA発現ベクターまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌などの微生物；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞システム；またはマウスもしくは他の動物もしくはヒトの組織細胞システムが含まれるが、これらに限定されない。哺乳動物細胞もまた、プラスミドシステム、コスミドシステムおよびウイルスシステム（ワクシニアウイルス発現システムなど）を含む様々な発現ベクターを使用して、本発明の特定の血管形成遺伝子によってコードされるタンパク質を発現させるために使用することができる。本発明は、用いられる宿主細胞によって限定されない。

40

【0029】

本発明のポリヌクレオチド配列またはその変化体を、哺乳動物システムにおける組換えタンパク質の長期間の製造を可能にするために細胞株において安定的に発現させることがで

50

きる。本発明の血管形成遺伝子のいずれか1つをコードする配列を、ウイルスの複製起点および/または内因性の発現エレメントを含有し得る発現ベクター、そして同じベクターまたは別個のベクターにおける選択マーカー遺伝子を使用して、細胞株に形質転換することができる。選択マーカーにより、選択薬剤に対する抵抗性が付与され、その存在により、導入された配列を発現することに成功した細胞の成長および回収が可能になる。安定に形質転換された細胞の抵抗性クローンを、細胞タイプに対して適切な組織培養技術を使用して増殖させることができる。

【0030】

形質転換された細胞によって産生されるタンパク質は、使用された配列および/またはベクターに依存して、分泌され得るか、または細胞内に保持され得る。当業者によって理解されるように、タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターは、原核生物または真核生物の細胞膜を介したタンパク質の分泌を行わせるシグナル配列を含有するように設計することができる。

10

【0031】

また、宿主細胞システムを、挿入された配列の発現を調節するその能力、または所望する様式で発現タンパク質をプロセシングするその能力について選ぶことができる。ポリペプチドのそのような修飾には、アセチル化、グリコシル化、リン酸化およびアシル化が含まれるが、これらに限定されない。タンパク質の「プレプロ」形態の翻訳後切断もまた、タンパク質の標的化、折り畳みおよび/または活性を特徴づけるために使用することができる。翻訳後活性のために特定の細胞装置および特徴的な機構を有する種々の宿主細胞（例えば、CHO細胞またはHeLa細胞）をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）から入手することができ、それらは、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセシングを確実にするために選ぶことができる。

20

【0032】

多量のタンパク質が、抗体製造などのために必要とされるときには、高レベルの発現を行わせるベクター、例えば、T5またはT7の誘導性バクテリオファージプロモーターを含有するベクターなどを使用することができる。本発明はまた、タンパク質の重要な機能的ドメインを含有する融合タンパク質を作製および単離することにおける上記に記載される発現システムの使用を包含する。これらの融合タンパク質は、結合、構造および機能に関する研究のために、ならびに適切な抗体を作製するために使用される。

30

【0033】

タンパク質を融合タンパク質として発現および精製するために、本発明の適切なポリヌクレオチド配列が、別のペプチド（例えば、グルタチオンスクシニルトランスフェラーゼ）をコードするヌクレオチドを含有するベクターに挿入される。融合タンパク質は原核生物細胞または真核生物細胞から発現および回収される。その場合、融合タンパク質は、融合ベクター配列に基づくアフィニティークロマトグラフィーによって精製することができ、そして当該タンパク質を、続いて、融合タンパク質の酵素的切断によって得ることができる。

【0034】

本発明のポリペプチドのフラグメントはまた、固相技術を使用する直接的なペプチド合成によって製造することができる。自動化された合成を、ABI431Aペプチド合成機（Perkin-Elmer）を使用することによって達成することができる。ポリペプチドの様々なフラグメントを別々に合成して、その後、組み合わせて、全長の分子を製造することができる。

40

【0035】

本発明の単離された核酸分子が部分的な遺伝子配列のみを表す場合、これらの部分配列は、全長型血管形成遺伝子の対応する配列を得るために使用することができる。従って、本発明はさらに、血管形成プロセスに関与する全長型ヒト遺伝子を同定および/または取得するために、配列番号70、72~73、78、83~87、89、160または174のいずれか1つによって規定されるヌクレオチド配列を含む本発明の部分核酸分子の使用

50

を提供する。全長の血管形成遺伝子は、当業者にそれ自体は知られている方法によって本発明の部分ヌクレオチド配列を使用してクローン化することができる。例えば、国立バイオテクノロジー情報センターにおいて主宰される配列データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) などの配列データベースのインシリコ分析を、重複するヌクレオチド配列を得るために検索することができる。これにより、全長型遺伝子配列を得ることに対する「ウォーキング」法が提供される。このサイトで検索される適切なデータベースには、発現配列タグ (EST) データベース (GenBank 配列、EMBL 配列および DDBJ 配列のそれらの EST 区分に由来するデータベース)、または非冗長 (nr) データベース (GenBank 配列、EMBL 配列、DDBJ 配列および PDB 配列のすべてを含むが、EST 配列、STS 配列、GSS 配列、または第 0 相もしくは第 1 相もしくは第 2 相の HTGS 配列を含まない) が含まれる。典型的には、検索は、Altschul 他 (1997) に記載される BLAST アルゴリズムを BLOSUM 62 デフォルト行列とともに使用して行われる。インシリコ「ウォーキング」法により、完全な遺伝子配列を得ることができない場合、さらなる方法を用いることができる。これらには、配列が知られている DNA の一部に隣接する未知の配列を得ることを可能にする「制限部位 PCR」の使用が含まれる。この技術では、ユニバーサルプライマーが、未知の配列を得るために使用される。インバース PCR もまた使用することができ、この場合には、既知の配列に基づくプライマーが、隣接する未知の配列を増幅するために設計される。これらの上流配列には、プロモーターおよび調節配列が含まれ得る。また、PCR に基づく様々な他の技術を使用することができ、例えば、Clontech (Pal Alto, California) から入手可能なキットはウォーキング PCR 技術を可能にし、5' RACE キット (Gibco-BRL) はさらなる 5' 遺伝子配列の単離を可能にし、一方、さらなる 3' 配列は、巧みな技術を使用して得ることができる (例えば、Gecz 他 (1997) を参照のこと)。

10

20

【0036】

本発明のさらなる局面において、配列番号 115 ~ 125 により規定され、表 1 に示されるような単離されたポリペプチドが提供される。

【0037】

本発明はまた、血管形成時に発現を調節されることが示されている単離されたポリペプチドを提供する (表 1 および表 2 を参照のこと)。

30

【0038】

より具体的には、これらのポリペプチドが血管形成時にその発現において調節されるという認識に従って、本発明は、血管形成プロセスにおいて役割を果たす、配列番号 115 ~ 216 により規定され、表 1 および表 2 に示されるような単離されたポリペプチドまたはそれらのフラグメントを提供する。そのようなプロセスには、胚形成、月経周期、創傷修復、腫瘍の血管形成、および運動により誘導される筋肉肥大が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0039】

また、本発明は、血管形成プロセスに関連する疾患において役割を果たす、配列番号 115 ~ 216 により規定され、そして表 1 および表 2 に示されるような単離されたポリペプチドまたはそれらのフラグメントを提供する。疾患には、ガン、慢性関節リウマチ、糖尿病網膜症、乾癬、アテローム性動脈硬化などの心臓血管疾患、虚血性四肢疾患、および冠状動脈疾患が含まれ得るが、これらに限定されない。

40

【0040】

本発明はまた、配列番号 115 ~ 216 のいずれか 1 つに対する同一性が少なくとも 70% (好ましくは少なくとも 85%、より好ましくは 95%) であり、かつ血管形成プロセスにおいて役割を果たす単離されたポリペプチドを包含する。

【0041】

配列同一性は、典型的には、Altschul 他 (1997) に記載される BLAST アルゴリズムを BLOSUM 62 デフォルト行列とともに使用して計算される。

50

【0042】

本発明のさらなる局面において、上記に記載されるポリヌクレオチドを調製する方法で、下記の工程：

(1) ポリペプチドを産生させるために効果的な条件のもとで宿主細胞を培養する工程；および

(2) ポリペプチドを回収する工程

を含む方法が提供される。

【0043】

本発明のさらに別の局面により、上記に記載されるプロセスの生成物であるポリペプチドが提供される。

10

【0044】

実質的に精製されたタンパク質またはそのフラグメントは、その後、例えば、タンパク質のX線結晶学によって、または核磁気共鳴(NMR)によって二次構造および三次構造を明らかにするために、さらなる生化学的分析において使用することができる。構造を決定することにより、タンパク質と相互作用するための医薬品、またはタンパク質の電荷配置もしくは他のタンパク質との電荷相互作用を変化させるための医薬品、または細胞におけるその機能を変化させるための医薬品の合理的な設計が可能になる。

【0045】

本発明は、血管形成に関与することが考えられる多数の遺伝子を提供する。血管形成は多数の病理学的プロセスにおいて重要であるので、従って、本発明により、すべての血管形成関連障害を処置するための治療的方法が可能になり、そして血管形成遺伝子のいずれか1つの発現および/または機能の異常と関連するすべての血管形成関連障害の診断または予後が可能になる。

20

【0046】

そのような障害の例には、ガン、慢性関節リウマチ、糖尿病網膜症、乾癬、アテローム性動脈硬化などの心臓血管疾患、虚血性四肢疾患、および冠状動脈疾患が含まれるが、これらに限定されない。

【0047】

本発明の別の局面により、上記に記載されるような血管形成関連障害を処置する方法が提供され、この場合、この方法は、そのような処置を必要としている対象に、本発明の血管形成遺伝子または血管形成タンパク質の選択的なアゴニストまたはアンタゴニストを投与することを含む。

30

【0048】

なおさらに、上記に記載されるような血管形成関連障害を処置するための、本発明の血管形成遺伝子または血管形成タンパク質の選択的なアゴニストまたはアンタゴニストの使用が提供される。

【0049】

制御されていない血管形成または増強された血管形成をもたらす血管形成関連障害(これには、ガン、慢性関節リウマチ、糖尿病網膜症、乾癬、そしてアテローム性動脈硬化などの心臓血管疾患が含まれるが、これらに限定されない)を処置する場合、拡大する脈管構造を阻害する治療法が望ましい。これには、血管形成を促進することができる血管形成遺伝子または血管形成タンパク質のいずれか1つを阻害すること、あるいは血管形成を阻害することができる血管形成遺伝子または血管形成タンパク質のいずれか1つを増強または刺激または再活性化することが伴う。

40

【0050】

阻害された血管形成または低下した血管形成を特徴とする血管形成関連障害(これには、虚血性四肢疾患および冠状動脈疾患が含まれるが、これらに限定されない)を処置する場合、血管の拡大を増強または促進する治療法が望ましい。これには、血管形成を制限することができる血管形成遺伝子または血管形成タンパク質のいずれか1つを阻害すること、あるいは血管形成を促進することができる血管形成遺伝子または血管形成タンパク質のい

50

ずれか1つを増強または刺激または再活性化することが伴う。

【0051】

例えば、BNO69およびBNO96のアンチセンス発現は、内皮細胞の成長および増殖を阻害することが示されている。従って、血管形成が制限される必要がある障害の処置では、これらの遺伝子の機能を阻害することが望ましい。あるいは、血管形成が刺激される必要がある障害の処置では、これらの遺伝子の機能を増強することが望ましい場合がある。

【0052】

これらの場合のそれぞれについて、当該治療法は、血管形成遺伝子に損傷があるか否かにかかわらず、血管形成関連障害を処置することにおいて有用である。

10

【0053】

遺伝子またはタンパク質の機能の阻害

遺伝子またはタンパク質の機能を阻害することは様々な方法で達成することができる。アンチセンス核酸法により、変化した発現が障害の原因である遺伝子を不活性化するための1つの方法が表される。本発明の1つの局面において、単離された核酸分子は、上記に記載される当該血管形成核酸分子のいずれか1つの相補体であり、そして本発明の当該血管形成遺伝子によってコードされるmRNAとハイブリダイゼーションするRNA分子をコードしており、そのような処置を必要としている対象に投与することができる。典型的には、血管形成遺伝子の任意の当該遺伝子に対する相補体が、血管形成関連障害を処置または防止するために対象に投与される。

20

【0054】

本発明のさらなる局面において、本発明の当該核酸分子のいずれか1つの相補体である単離された核酸分子であって、本発明の当該血管形成遺伝子によってコードされるmRNAとハイブリダイゼーションするRNA分子をコードする単離された核酸分子の、血管形成関連障害を処置するための医薬品の製造における使用が提供される。

【0055】

典型的には、当該血管形成遺伝子のいずれか1つをコードするポリヌクレオチドの相補体を発現するベクターを、上記に記載される傷害（これに限定されない）を含む血管形成関連障害を処置または防止するために対象に投与することができる。ベクターを細胞または組織に導入するための多くの方法を利用することができる。これらは、インビボ、インビトロおよびエクスピボにおける使用のために等しく好適である。エクスピボ治療の場合、ベクターを、患者から採取され、その同じ患者に戻される自家移植のためにクローン増殖させた幹細胞に導入することができる。トランスフェクションによる送達、リボソーム注射による送達、またはポリカチオン性アミノポリマーによる送達を、この分野で広く知られている方法を使用して達成することができる（例えば、Goldman他（1997）を参照のこと）。

30

【0056】

さらなるアンチセンス法または遺伝子標的化サイレンシング法では、アンチセンスオリゴヌクレオチドの使用、アンチセンスRNAの注入、アンチセンスRNA発現ベクターのトランスフェクション、およびRNA干渉（RNAi）または短い干渉性RNA（siRNA）の使用が含まれ得るが、これらに限定されない。なおさらに、DNAザイムおよびリボザイムなどの触媒作用核酸分子を遺伝子サイレンシングのために使用することができる（BreakerおよびJoyce、1994；HaseloffおよびGerlach、1988）。これらの分子は、従来のアンチセンス法でのように単に結合するのではなく、それらの標的mRNA分子を切断することによって機能する。

40

【0057】

さらなる局面において、本発明による精製されたタンパク質を、本発明の任意の当該血管形成タンパク質と特異的に結合する抗体を製造するために使用することができる。これらの抗体は、アンタゴニストとして直接的に使用することができ、あるいは、当該血管形成タンパク質を発現する細胞または組織に薬学的薬剤を導くための標的化機構または送達機

50

構として間接的に使用することができる。そのような抗体には、当業者によって理解されるように、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体および単鎖抗体が含まれるが、これらに限定されない。

【0058】

抗体を製造するために、ウサギ、ラット、ヤギ、マウスおよびヒトなどを含む様々な宿主を、本発明のタンパク質を注射することによって、または免疫原的性質を有するその任意のフラグメントもしくはオリゴペプチドを注射することによって免疫化することができる。様々なアジュバントを、免疫学的応答を増大させるために使用することができ、これには、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムなどの無機ゲル、およびリソレシチンなどの表面活性物質が含まれるが、これらに限定されない。ヒトにおいて使用されるアジュバントには、BCG(カルメット-ゲラン菌)およびコリネバクテリウム・パルブム(Corynebacterium parvum)が含まれる。

10

【0059】

当該血管形成タンパク質に対する抗体を誘導するために使用されるオリゴペプチドまたはペプチドまたはフラグメントは、少なくとも約5アミノ酸からなるアミノ酸配列、より好ましくは少なくとも約10アミノ酸からなるアミノ酸配列を有することが好ましい。これらのオリゴペプチドまたはペプチドまたはフラグメントは、天然タンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であり、そして、天然に存在する小さい分子のアミノ酸配列全体を含有することもまた好ましい。これらのタンパク質に由来するアミノ酸の短い領域を、KLHなどの別のタンパク質の領域と融合させることができ、そしてこのキメラ分子に対する抗体を製造することができる。

20

【0060】

任意の当該血管形成タンパク質に対するモノクローナル抗体を、培養における連続した細胞株による抗体分子の製造をもたらす任意の技術を使用して調製することができる。これらには、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBVハイブリドーマ技術が含まれるが、これらに限定されない(例えば、Kohler他(1975); Kozbor他(1985); Cote他(1983); Cole他(1984)を参照のこと)。

【0061】

製造されるモノクローナル抗体には、マウス由来抗体、ヒト化抗体、および完全なヒト抗体が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0062】

抗体はまた、文献に開示されるように、リンパ球集団でのインビボ産生を誘導することによって、または免疫グロブリンライブラリー、もしくは非常に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによって製造することができる(例えば、Orlandi他(1989); Winter他(1991)を参照のこと)。

【0063】

任意の当該血管形成タンパク質に対する特異的な結合部位を含有する抗体フラグメントもまた作製することができる。例えば、そのようなフラグメントには、抗体分子をペプシン消化することによって製造されるF(ab')₂フラグメント、およびF(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって作製されるFabフラグメントが含まれる。あるいは、Fab発現ライブラリーを、所望する特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの迅速かつ容易な同定を可能するために構築することができる(例えば、Huse他(1989)を参照のこと)。

40

【0064】

様々な免疫アッセイを、所望する特異性を有する抗体を同定するためのスクリーニングのために使用することができる。明らかにされた特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかを使用する競合的結合アッセイまたは免疫放射測定アッセイのための非常に多数のプロトコルがこの分野では広く知られている。そのような免疫アッセイでは、典型的には、タンパク質とその特異的な抗体との間における複合体形成を測

50

定することが伴う。2つの非妨害性エピトープに対する反応性を有するモノクローナルを利用する二部位モノクローナル型免疫アッセイが好ましく、しかし、競合的結合アッセイもまた用いることができる。

【0065】

さらなる局面において、アンタゴニストには、ペプチド、ホスホペプチド、または小さい有機化合物もしくは無機化合物が含まれ得る。これらのアンタゴニストは、必要な治療効果をもたらすように、本発明の任意の当該血管形成遺伝子の機能を破壊することが望ましい。

【0066】

治療的適用のために好適なペプチド、ホスホペプチド、または小さい有機化合物もしくは無機化合物は、下記に記載されるような薬物スクリーニング適用において本発明の核酸およびポリペプチドを使用して同定することができる。

【0067】

遺伝子またはタンパク質の機能の増強

遺伝子またはタンパク質の機能を増強または刺激または再活性化することは様々な方法で達成することができる。本発明の1つの局面において、上記に記載されるような単離された核酸分子の、そのような処置を必要としている対象に対する投与を開始することができる。典型的には、本発明の任意の当該血管形成遺伝子を、血管形成関連障害を処置または防止するために対象に投与することができる。

【0068】

さらなる局面において、血管形成関連障害を処置するための医薬品の製造における、上記に記載されるような単離された核酸分子の使用が提供される。

【0069】

典型的には、任意の当該血管形成遺伝子またはそのフラグメントもしくは誘導体を発現することができるベクターを、上記に記載される障害（これに限定されない）を含む障害を処置または防止するために対象に投与することができる。形質導入するためのレトロウイルスベクターもまた、感染ならびに安定な組み込みおよび発現のその効率が大きいために、体細胞遺伝子治療のために使用されることが多い。任意の当該全長遺伝子またはその一部をレトロウイルスベクターにクローン化することができ、そして発現を、その内因性プロモーターから、またはレトロウイルスの長末端反復から、または目的とする標的細胞タイプに対して特異的なプロモーターから行わせることができる。他のウイルスベクターを使用することができ、これには、この分野で知られているように、鳥類起源およびネズミ起源およびヒト起源のアデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス、パポバウイルス、レンチウイルスおよびレトロウイルスが含まれる。

【0070】

遺伝子治療を、確立された方法（Friedman、1991；Culver、1996）に従って行うことができる。発現制御エレメントに連結され、そして細胞の内部で複製することができる1コピーの任意の当該血管形成遺伝子を含むベクターが調製される。あるいは、ベクターは複製欠陥型であってもよく、これは、複製のために、そして遺伝子治療における使用のためにヘルパー細胞を要求し得る。

【0071】

インビトロでの非ウイルス感染方法を使用する遺伝子移入もまた使用することができる。これらの方法では、DNAの直接的な注入、リン酸カルシウムの存在下でのネイキッドDNAの取り込み、エレクトロポレーション、プロトプラスト融合またはリポソーム送達が含まれる。遺伝子移入はまた、ヒト人工染色体の一部として送達することによって、または受容体により媒介される遺伝子移入によって達成することができる。これには、特異的な細胞表面受容体に結合して、エンドサイトーシスおよび哺乳動物細胞内へのDNAの移入を誘導させる標的化分子にDNAを連結することが伴う。1つのそのような技術では、ポリ-L-リシンが、アシアロ糖タンパク質をDNAに連結するために使用される。アデノウイルスもまた、リソソームを破壊し、従って、DNAを分解から回避させ、そして核に

10

20

30

40

50

移動させるために複合体に加えられる。これらの粒子の静脈内注入により、肝細胞内への遺伝子移入がもたらされている。

【0072】

今日まで同定されていないが、血管形成関連障害を有するある種の個体は、本発明の血管形成遺伝子のいずれか1つに異常を含むことが考えられる。従って、血管形成遺伝子の発現または活性が低下している罹患した対象では、ダウンレギュレーションの機構は、CpGアイランドを含有する血管形成遺伝子のプロモーター領域の異常なメチル化のためであることがある。従って、治療に対する代替的な方法では、異常なプロモーターメチル化を除去する薬剤の投与により、遺伝子発現を再活性化することができ、そして正常な機能を罹患細胞に回復させることができる。

10

【0073】

本発明の血管形成遺伝子のいずれか1つの変異した形態を発現する罹患した対象では、変異型遺伝子と組み換えられるようにその遺伝子の野生型コピーを罹患細胞に導入することによって障害を防止することが可能である場合がある。これには、遺伝子の変異を訂正するための二重組換え事象が必要である。これらの方法で遺伝子を導入するための様々なベクターがこの分野では知られており、そして任意の好適なベクターを使用することができる。あるいは、遺伝子の別のコピーであって、第2の変異をその遺伝子に有するコピーを導入することを、元の遺伝子変異を無効にし、かつ何らかの負の作用を阻止するために用いることができる。

【0074】

さらにさらなる局面において、血管形成関連障害を処置する方法が提供され、この場合、上記に記載されるようなポリペプチドまたはそのアゴニストを、そのような処置を必要としている対象に投与することを含む。

20

【0075】

別の局面において、本発明は、血管形成関連障害を処置するための医薬品の製造における、上記に記載されるようなポリペプチドまたはそのアゴニストの使用を提供する。そのような障害の例が上記に記載される。

【0076】

さらなる局面において、好適なアゴニストにはまた、任意の当該血管形成遺伝子の機能を模倣し得るペプチド、ホスホペプチド、または小さい有機化合物もしくは無機化合物が含まれ得るか、あるいは機能を正常なレベルに回復させることができる任意の当該血管形成遺伝子に対する抗体が含まれ得る。

30

【0077】

治療的適用のために好適なペプチド、ホスホペプチド、または小さい有機化合物もしくは無機化合物は、下記に記載されるような薬物スクリーニング適用において本発明の核酸およびポリペプチドを使用して同定することができる。

【0078】

さらなる実施形態において、本発明のアゴニスト、アンタゴニスト、相補的配列、核酸分子、タンパク質、抗体またはベクターはいずれも、他の適切な治療剤との組み合わせで投与することができる。適切な薬剤の選択は、従来の薬学原理に従って当業者によって行うことができる。治療剤の組み合わせは相乗的に作用して、上記に記載される様々な障害の処置または防止をもたらし得る、この方法を使用して、それぞれの薬剤のより少ない用量による治療効力を可能にすることができ、従って、有害な副作用に対する可能性を低下させることができる。

40

【0079】

上記に記載された治療方法はいずれも、例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル、そして最も好ましくはヒトなどの哺乳動物を含む、そのような治療を必要としている任意の対象に適用することができる。

【0080】

薬物スクリーニング

50

本発明のさらに別の局面により、本発明の核酸分子、ならびに本発明のペプチド、特に、任意の精製された当該血管形成ポリペプチドまたはそのフラグメント、そしてこれらを発現する細胞は、血管形成関連障害を処置するための様々な技術における候補薬学的化合物のスクリーニングのために有用である。

【0081】

なおさらに、本発明は、ハイスループットスクリーニング技術が用いられる使用を提供する。

【0082】

本発明に従ってスクリーニングされ得る化合物には、ペプチド（可溶性ペプチドなど）、ホスホペプチド、および小さい有機分子または無機分子（天然物または合成されたケミカルライブラリーおよびペプチドミメティクスなど）が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0083】

1つの実施形態において、スクリーニングアッセイには、当該血管形成ポリペプチドまたはフラグメントを発現させる組換え核酸分子で安定的に形質転換されている真核生物宿主細胞または原核生物宿主細胞を競合的結合アッセイにおいて利用する、細胞に基づくアッセイが含まれ得る。結合アッセイでは、当該ポリペプチドまたはそのフラグメントと、試験されている化合物との間における複合体の形成について測定されるか、あるいは、試験されている化合物が、当該ポリペプチドまたはそのフラグメントとその相互作用因子またはリガンドとの間における複合体の形成を妨げる程度が測定される。

20

【0084】

細胞に基づかないアッセイもまた、本発明のポリペプチドとその相互作用因子との間の結合を妨害する化合物を同定するために使用することができる。様々なそのようなアッセイがこの分野では知られており、これらには、例えば、AlphaScreen技術（PerkinElmer Life Sciences、MA、米国）が含まれる。この適用は、それぞれの相互作用パートナーが抗体を介して別個のビーズに結合されるようなビーズの使用に依拠している。各パートナーの相互作用はビーズを近くに接近させ、その結果、レーザー励起により、光シグナルを放射する蛍光基を最終的には生じさせる多数の化学反応が開始させられる。当該血管形成ポリペプチドがその相互作用因子と結合することを妨げる候補化合物は、光放射をもたらさないので、応答性化合物の同定および単離を可能にする。

30

【0085】

ハイスループット薬物スクリーニング技術ではまた、国際特許出願公開WO84/03564に記載されるような方法を用いることができる。固体基体上で合成された小ペプチド試験化合物を当該血管形成ポリペプチドの結合および洗浄によってアッセイすることができる。その場合、結合した当該血管形成ポリペプチドは、この分野で広く知られている方法によって検出される。この技術の1つの変法において、精製された血管形成ポリペプチドを、相互作用する試験化合物を同定するために、プレートに直接コーティングすることができる。

【0086】

薬物スクリーニングに対するさらなる方法では、本発明の任意の当該血管形成遺伝子に変異を有する宿主真核生物細胞株の使用が伴う。宿主細胞株はまた、ポリペプチドレベルで不完全である。当該血管形成遺伝子の遺伝子発現が調節（すなわち、過剰発現または過小発現またはスイッチオフ）され得る他の細胞株を使用することができる。宿主細胞株または宿主細胞は様々な薬物化合物の存在下で成長させられ、そして、その化合物が、不完全な細胞の成長を調節することができるかどうかを明らかにするために、宿主細胞の成長速度が測定される。

40

【0087】

本発明の血管形成ポリペプチドはまた、コンビナトリアルライブラリー技術の結果として開発された化合物をスクリーニングするために使用することができる。これにより、ポリ

50

ペプチドの活性を調節するその能力について非常に多数の異なる物質を試験するための方法が提供される。ペプチドライブラリーの使用が好ましく（国際特許出願公開WO97/02048を参照のこと）、そのようなライブラリーおよびその使用はこの分野では知られている。

【0088】

ポリペプチド機能の調節剤として同定される物質は、本質的にはペプチドまたは非ペプチドであり得る。非ペプチドの「小分子」は、多くの場合、多くのインビボ薬学的適用のために好ましい。また、そのような物質の模倣体または模擬体を薬学的使用のために設計することができる。既知の薬学的に活性な化合物（「リード」化合物）に基づく模擬体の設計は、新規な医薬品を開発するための一般的な方法である。これは、元の活性な化合物が合成困難であるか、もしくは合成に費用がかかる場合、または元の活性な化合物が不適当な投与方法をもたらす場合には望ましいことが多い。模擬体の設計において、標的特性を決定する際に重要である元の活性な化合物の特定の部分が同定される。化合物の活性な領域を構成するこれらの部分または残基はそのファルマコアとして知られている。ファルマコアが見出されると、ファルマコアの構造が、x線回折データおよびNMRを含む様々な情報源から得られるデータを使用してその物理的性質に従ってモデル化される。その場合、ファルマコアを模倣する化学基が付加され得るテンプレート分子が選択される。選択は、模擬体が容易に合成され、かつ薬学的に受容可能であることが考えられ、かつリード化合物の生物学的活性をインビボで分解せず、保持するように行うことができる。さらなる最適化または修飾を、インビボでの試験または臨床試験のために有用な1つ以上の最終的な模擬体を選択するために行うことができる。

10

20

【0089】

標的特異的な抗体を単離し、その後、その結晶構造を解明することもまた可能である。原理的には、この方法により、その後の薬物設計が上記に記載されるように基づき得るファルマコアが得られる。機能的な、薬理的に活性な抗体に対する抗イデオタイプ抗体（anti-id）を作製することによってタンパク質結晶学を完全に回避することが可能である場合がある。鏡像の鏡像として、anti-idの結合部位は、元の結合部位のアナログであることが予想される。その後、anti-idは、化学的または生物学的に製造されたペプチドバンクからペプチドを単離するために使用することができる。

【0090】

薬物スクリーニングに対する別の代替的な方法は、構造に基づく合理的な薬物設計に依拠している。本発明のポリペプチドの三次元構造、またはこれらのポリペプチドを含み得るタンパク質複合体の三次元構造を決定することにより、生物学的に活性なリード化合物を同定するための、構造に基づく薬物設計が可能になる。

30

【0091】

三次元構造モデルは、多数の適用（そのいくつかには、x線結晶学およびNMRなどの実験的モデルが含まれる）によって、かつ/またはタンパク質データバンク（PDB）などの構造データベースから得られる情報を使用するインシリコ研究から作製することができる。また、三次元構造モデルは、ポリペプチドの一次配列に基づく多数の知られているタンパク質構造予測技術（例えば、SYBYL-Triplos Associated、St. Louis、MO）、デノボ（de novo）タンパク質構造設計プログラム（例えば、MODELER（MSI Inc.、San Diego、CA）またはMOE（Chemical Computing Group、Montreal、カナダ）、またはアブイニシオ（ab initio）法（例えば、米国特許第5331573号および同第5579250号を参照のこと）を使用して決定することができる。

40

【0092】

ポリペプチドまたはポリペプチド複合体の三次元構造が決定されると、構造に基づく薬物発見技術を、これらの三次元構造に基づいて生物学的に活性な化合物を設計するために用いることができる。様々なそのような技術がこの分野で知られており、これらには、DOCK（カリホルニア大学、San Francisco）またはAUTODOCK（Sc

50

ripps Research Institute、La Jolla、California)が含まれる。コンピューターによるドッキング(docking)プロトコルにより、予測されたタンパク質モデルに基づいて、タンパク質活性のために重要である考えられる活性部位(1つまたは複数)が同定される。分子データベース、例えば、Available Chemicals Directory(ACD)などが、その後、このタンパク質モデルを補う分子についてスクリーニングされる。

【0093】

これらの方法などの方法を使用して、可能性のある臨床薬物候補を同定することができ、そして典型的な「ウェット・ラボ(wet lab)」薬物スクリーニング方法論に伴う時間および費用を削減するためにコンピューターによりランク付けすることができる。

10

【0094】

上記に記載されるスクリーニング方法から同定された化合物は、これらの化合物および薬学的に受容可能なキャリアを含有する薬学的組成物が本発明の一部を形成するように、本発明の一部を形成する。

【0095】

薬学的調製物

上記に示されるようなスクリーニングアッセイから同定される化合物は、血管形成に関連する障害を処置または改善するために、治療効果的な用量で患者に投与することができる。治療効果的な用量は、障害の症状の改善をもたらすために十分な化合物の量を示す。

【0096】

そのような化合物の毒性および治療効力は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手法によって決定することができる。これらの研究から得られたデータは、その後、ヒトにおいて使用される投薬量の範囲を定める際に使用することができる。

20

【0097】

本発明に従って使用される薬学的組成物は、広く知られている1つ以上の生理学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤または安定化剤を使用して従来の様式で配合することができる。受容可能なキャリアまたは賦形剤または安定化剤は、用いられる投薬量および濃度で非毒性であり、これらには、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量(約10残基未満)のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマーを含む結合剤；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストランを含む、単糖、二糖および他の炭水化物；EDTAなどのキレート化剤；マンニトールまたはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；および/または、ツイーン、プルロニクスもしくはポリエチレングリコール(PEG)などの非イオン性界面活性剤が含まれる。

30

【0098】

本発明に従って使用される薬学的組成物の配合は、提案される投与経路に基づく。投与経路には、吸入、吹入(口腔または鼻のいずれかを介する)、経口投与、口内投与、直腸投与または非経口投与が含まれ得るが、これらに限定されない。

40

【0099】

診断および予後での適用

本発明の血管形成遺伝子のいずれか1つに異常が存在し、これにより、遺伝子の活性および/または発現が変化して、血管形成関連障害を生じさせるならば、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、これらの障害の診断もしくは予後のために使用することができるか、またはそのような障害に対する素因である。そのような障害の例には、ガン、慢性関節リウマチ、糖尿病網膜症、乾癬、アテローム性動脈硬化などの心臓血管疾患、虚血性四肢疾患、および冠状動脈疾患が含まれるが、これらに限定されない。診断または予後は、適切な治療的介入を開始する目的で疾患状態の重篤度またはタイプまたは段階を決定するために使用することができる。

50

【0100】

本発明の別の実施形態において、診断目的または予後目的のために使用され得るポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、ゲノムDNA、ならびに相補的なRNA分子およびDNA分子が含まれる。ポリヌクレオチドは、血管形成遺伝子のいずれか1つにおける異常な発現または変異が疾患と関連し得る生検組織における遺伝子発現を検出および定量するために使用することができる。診断または予後のために使用されるゲノムDNAは、血液、組織生検物、手術標本または解剖材料に存在する細胞などの身体細胞から得ることができる。DNAは、特異的な配列を検出するために単離し、直接的に使用することができる、または分析に先立ってポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅することができる。同様に、RNAまたはcDNAもまた、PCR増幅とともに、またはPCR増幅を用いることなく使用することができる。特異的な核酸配列を検出するために、直接的なヌクレオチド配列決定、逆転写酵素PCR(RT-PCR)、特異的なオリゴヌクレオチドを使用するハイブリダイゼーション、制限酵素消化およびマッピング、PCRマッピング、RNAse保護、ならびに様々な他の方法を用いることができる。特定の配列に対して特異的なオリゴヌクレオチドを化学合成して、放射能標識しまたは非放射能的に標識し、そしてメンブランもしくは他の固体支持体に固定化されている個々のサンプルに対して、または溶液中で個々のサンプルに対してハイブリダイゼーションさせることができる。血管形成遺伝子のいずれか1つの存在もしくは非存在またはその過剰な発現を、その後、オートラジオグラフィ、蛍光測定または比色測定などの方法を使用して可視化することができる。

10

20

【0101】

特定の局面では、本発明のヌクレオチド配列は、関連する障害の存在、特に、前に言及された障害の存在を検出するアッセイにおいて有用であり得る。ヌクレオチド配列は、標準的な方法によって標識されて、ハイブリダイゼーション複合体を形成させるために好適な条件のもとで患者由来の体液サンプルまたは組織サンプルに加えることができる。好適なインキュベーション期間の後、サンプルは洗浄され、シグナルが定量され、そして標準値と比較される。患者サンプルにおけるシグナルの量が、コントロールのサンプルと比較して著しく変化している場合、変化したレベルのヌクレオチド配列がサンプルに存在することにより、関連する障害の存在が示される。そのようなアッセイはまた、動物研究において、臨床試験において特定の治療的処置法の効力を評価するために、または個々の患者の処置をモニターするために使用することができる。

30

【0102】

本発明の血管形成遺伝子のいずれか1つにおける変異に関連する血管形成関連障害の診断または予後のための基礎を提供するために、当該遺伝子のヌクレオチド配列を、患者が変異遺伝子を発現しているかどうかを明らかにするために、正常な組織と疾患組織との間で比較することができる。

【0103】

本発明の血管形成遺伝子のいずれか1つの異常な発現に関連する障害を診断するための基礎を提供するために、発現について正常または標準的なプロファイルが明らかにされる。これは、正常な対象(動物またはヒトのいずれか)から採取された体液または細胞抽出物を、当該血管形成遺伝子をコードする配列またはそのフラグメントと、ハイブリダイゼーションまたは増幅のために好適な条件のもとで一緒にすることによって達成することができる。標準的なハイブリダイゼーションは、正常な対象から得られた値を、既知量の実質的に精製されたポリヌクレオチドが使用される実験から得られた値と比較することによって定量することができる。血管形成遺伝子のいずれか1つの発現について正常または標準的なプロファイルを同定するための別の方法は、定量的RT-PCR研究によって行われる。正常な個体の身体細胞から単離されたRNA、特に、内皮細胞から単離されたRNAが逆転写され、そして当該遺伝子に対して特異的なオリゴヌクレオチドを使用するリアルタイムPCRが、遺伝子の正常な発現レベルを明らかにするために行われる。これらの例の両方で得られた標準値を、障害について症状を示す患者に由来するサンプルから得られた値

40

50

と比較することができる。標準値からのずれが、障害の存在を明らかにするために使用される。

【0104】

障害の存在が明らかにされ、そして処置プロトコルが開始されると、ハイブリダイゼーションアッセイまたは定量的RT-PCR研究を、患者における発現レベルが、正常な対象において観測されるレベルの付近に至るかどうかにするために、定期的に繰り返すことができる。連続したアッセイから得られる結果を、数日から数ヶ月に及ぶ期間にわたる処置の効力を示すために使用することができる。

【0105】

本発明のさらなる局面により、本発明の血管形成遺伝子のいずれか1つに関連する血管形成関連障害の診断もしくは予後における、またはそのような障害に対する素因としての、上記に記載されるような血管形成ポリペプチドの使用が提供される。 10

【0106】

診断アッセイまたは予後アッセイが任意の当該血管形成ポリペプチドに基づくことになる場合、様々な方法が可能である。例えば、診断または予後を、正常なタンパク質または変異タンパク質の電気泳動移動度の違いをモニターすることによって達成することができる。そのような方法は、電荷置換が存在する変異体、または挿入、欠失もしくは置換が、生じるタンパク質の電気泳動移動の著しい変化をもたらしている変異体を同定する際には特に有用である。あるいは、診断または予後は、正常なタンパク質または変異タンパク質のタンパク質分解的切断パターンの違い、様々なアミノ酸残基のモル比の違いに基づくこと 20
ができる、または遺伝子産物の変化した機能を明らかにする機能的アッセイによって行うことができる。

【0107】

別の局面において、当該血管形成遺伝子産物と特異的に結合する抗体を、遺伝子の異常な発現を特徴とする障害の診断または予後のために、あるいは当該血管形成遺伝子もしくは当該血管形成タンパク質、またはアゴニスト、アンタゴニスト、またはその阻害剤で処置されている患者をモニターするためのアッセイにおいて使用することができる。診断目的または予後目的のために有用な抗体は、治療剤に関して上記に記載されたのと同じ様式で調製することができる。診断アッセイまたは予後アッセイには、ヒトの体液における当該タンパク質または細胞もしくは組織の抽出物における当該タンパク質を検出するために抗 30
体および標識を利用する方法が含まれ得る。抗体は、修飾して、または修飾することなく使用することができる、また、レポーター分子を共有結合的または非共有結合的に結合することによって標識することができる。

【0108】

当該血管形成ポリペプチドを測定するための様々なプロトコル（これらには、ELISA、RIAおよびFACSが含まれる）がこの分野では知られており、これらは、変化した発現レベルまたは異常な発現レベルを診断するための基礎を提供する。発現について正常または標準的な値が、正常な哺乳動物対象（好ましくはヒト）から採取された体液または細胞抽出物を、当該タンパク質に対する抗体と、複合体形成のために好適な条件のもとで一緒にすることによって明らかにされる。標準の複合体形成の量を、様々な方法によって 40
、好ましくは、吸光度法手段によって定量することができる。生検組織に由来する対象サンプル、コントロールサンプルおよび疾患サンプルにおいて発現するタンパク質の量が標準曲線と比較される。標準値と対象値との間におけるずれにより、疾患を診断するためのパラメーターが示される。

【0109】

個体が障害に関して診断または予後判定されると、効果的な処置を上記に記載されるように開始することができる。制御されていない血管形成または増強された血管形成を特徴とする血管形成関連疾患の処置では、拡大する脈管構造を阻害する必要がある。これには、血管形成を促進する本発明の当該血管形成遺伝子または当該血管形成タンパク質を阻害す 50
ることが伴う。さらに、処置ではまた、血管形成を阻害することがその正常な役割である

が、その活性が罹患個体において低下しているか、または存在していない本発明の当該血管形成遺伝子または当該血管形成タンパク質の発現または機能を刺激する必要がある場合がある。

【0110】

阻害された血管形成または低下した血管形成を特徴とする血管形成関連疾患の処置では、血管の拡大を増強または促進する方法が望ましい。これは、本質的には上記に記載されるような方法を使用して達成することができ、しかし、血管形成を促進することがその正常な役割であるが、その活性が罹患個体において低下しているか、または存在していない当該血管形成遺伝子または当該血管形成タンパク質の発現または機能を刺激することを伴う。あるいは、血管形成を制限する遺伝子またはタンパク質を阻害することもまた、処置に対する方法であり得る。

10

【0111】

マイクロアレイ

さらなる実施形態において、本明細書中に記載されるポリヌクレオチド配列のいずれかに由来する完全なcDNAまたはオリゴヌクレオチドまたはより長いフラグメントは、マイクロアレイにおけるプローブとして使用することができる。マイクロアレイは、非常に多数の遺伝子の発現レベルを同時にモニターするために、そして遺伝子の変化体および変異および多形を同定するために使用することができる。この情報は、遺伝子の機能を明らかにするために、障害の遺伝的基礎を理解するために、障害を診断または予後判定するために、そして治療剤を開発し、かつその活性をモニターするために使用することができる。マイクロアレイは、この分野で知られている方法を使用して調製し、使用し、そして分析することができる（例えば、Schena他（1996）；Hellier他（1997）を参照のこと）。

20

【0112】

形質転換された宿主

本発明はまた、本発明の核酸分子で形質転換された遺伝子改変（ノックアウト、ノックインおよび遺伝子導入）の非ヒト動物モデルの作製を提供する。これらの動物は、当該血管形成遺伝子の機能を研究するために、これらの遺伝子に関連する疾患の機構を研究するために、候補薬学的化合物をスクリーニングするために、タンパク質または変異タンパク質を発現する外植された哺乳動物細胞培養物を作製するために、そして可能性のある治療的介入を評価するために有用である。

30

【0113】

本発明の動物モデルにおける使用のために好適である動物種には、ラット、マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、および非ヒト霊長類（サルおよびチンパンジーなど）が含まれるが、これらに限定されない。最初の研究のためには、遺伝子改変されたマウスおよびラットが、これらの動物のノックイン体またはノックアウト体または遺伝子導入体を作製することが比較的容易であるために、それらの管理が容易であるために、そしてそれらの寿命がより短いために、非常に望ましい。ある種の研究のためには、遺伝子導入された酵母または非脊椎動物が、迅速なスクリーニングを可能にし、そしてはるかにより容易な取扱いを提供するために、好適であり、かつ好ましい場合がある。より長期間の研究のためには、非ヒト霊長類が、ヒトとのその類似性のために望ましい場合がある。

40

【0114】

本発明の血管形成遺伝子のいずれか1つに基づく動物モデルを作製するために、いくつかの方法を用いることができる。これらには、特異的な変異を相動的な動物遺伝子において生じさせること、野生型のヒト遺伝子および/またはヒト化された動物遺伝子を相動的組換えによって挿入すること、野生型または変異型または人工のプロモーターエレメントを使用するゲノムcDNA構築物またはミニ遺伝子cDNA構築物として変異型ヒト遺伝子（1個または多数）を挿入すること、あるいは内因性遺伝子の人為的に改変されたフラグメントを相動的組換えによって挿入することが含まれる。改変には、変異停止コドン挿

50

入すること、DNA配列を欠失すること、またはCreリコンビナーゼなどの酵素により認識される組換えエレメント (loxP 部位) を含めることが含まれる。

【0115】

インビボでの遺伝子機能の増大を研究する目的で遺伝子導入マウスを作製するために、任意の当該血管形成遺伝子を、卵母細胞顕微注入などの標準的な技術を使用してマウスの生殖系列に挿入することができる。遺伝子機能の増大は、遺伝子およびそのタンパク質産物の過剰発現、または研究中の遺伝子の変異の遺伝的相補を意味し得る。卵母細胞注入の場合、1コピー以上の野生型遺伝子または変異型遺伝子を受精直後のマウス卵母細胞の前核に挿入することができる。この卵母細胞は、その後、偽妊娠の里親に再移植される。その後、生産マウスを、当該ヒト血管形成遺伝子配列の存在についての尾DNAの分析を使用して組み込み体についてスクリーニングすることができる。導入遺伝子は、YACもしくはBACもしくは他の染色体DNAフラグメントとして注入された完全なゲノム配列、または、天然のプロモーターもしくは異種プロモーターのいずれかを有するcDNA、または、コード領域のすべてと、最適な発現のために必要であることが見出されている他のエレメントとを含有するミニ遺伝子のいずれかであり得る。

10

【0116】

ノックアウトマウスまたはノックインマウスを作製する場合、マウスの胚性幹 (ES) 細胞における相同的組換えによる遺伝子標的化を適用することができる。ノックアウトマウスが、遺伝子機能の喪失をインビボで研究するために作製され、一方、ノックインマウスにより、機能の増大の研究、または特異的な遺伝子変異の影響を研究することが可能になる。ノックインマウスは遺伝子導入マウスと類似しているが、組み込み部位およびコピー数が前者では明らかにされる。

20

【0117】

ノックアウトマウスを作製する場合、遺伝子標的化ベクターを、マウスのゲノムにおいて当該血管形成遺伝子のタンパク質コード配列が欠失 (ノックアウト) されるように設計することができる。これに対して、ノックインマウスは、当該血管形成遺伝子を含有する遺伝子標的化ベクターがマウスゲノム内の決められた遺伝子座に組み込まれ得ることによって作製することができる。両方の適用の場合、相同的組換えが、相同的なDNA配列を認識し、それらを二重乗換えによって交換する特異的なDNA修復酵素によって触媒される。

30

【0118】

遺伝子標的化ベクターは、通常的には、エレクトポレーションを使用してES細胞に導入される。ES細胞組み込み体が、その後、標的化ベクターに存在する抗生物質耐性遺伝子によって単離され、続いて、遺伝子型が、研究中の遺伝子が目的とする遺伝子座に組み込まれているES細胞クローンを同定するために決定される。その後、適切なES細胞が、新しいマウス系統を作製するために生殖系列を介して伝達される。

【0119】

遺伝子の除去が早期の胚致死性をもたらす場合には、条件的遺伝子標的化を用いることができる。これにより、遺伝子を時間的かつ空間的に制御された様式で欠失させることができる。上記のように、適切なES細胞は、新しいマウス系統を作製するために生殖系列を介して伝達され、しかしながら、遺伝子の実際の欠失は、組織特異的な様式または時間により制御された様式で成体マウスにおいて行われる。条件的遺伝子標的化は、最も一般的には、cre/loxシステムの使用によって達成される。酵素creは、loxPに接する (またはフロックスする (floxed)) DNAがcreによって認識されて切り出されるように34塩基対のloxP配列を認識することができる。遺伝子導入マウスにおける組織特異的なcre発現により、組織特異的なノックアウトマウスの作製が、遺伝子標的化されたフロックスマウスをcre遺伝子導入マウスと交配することによって可能になる。ノックアウトは、「欠失体」マウスを使用して、または誘導可能なcre遺伝子を有する遺伝子導入マウス (テトラサイクリン誘導性cre遺伝子を有する遺伝子導入マウスなど) を使用して、どの組織でも行うことができ (Schwenk他、1995)、

40

50

あるいは、ノックアウトは、例えば、CD19-creマウスの使用によって組織特異的にすることができる (Ricker 他、1997)。

【0120】

本発明のさらに別の局面により、候補薬学的化合物をスクリーニングするための、遺伝子改変された非ヒト動物の使用が提供される。

【0121】

多数の先行技術刊行物が本明細書中に示されているが、この参照は、これらの文書のいずれかが、この分野またはオーストラリアまたは任意の他国における共通する一般的な知識の一部を形成するということ認めを意味しないことが理解されることは明かである。本明細書および請求項の全体を通して、用語「含む ("comprise"、"comprises" および "comprising")」は、文脈が別に要求する場合を除き、非排他的意味で使用される。

10

図面の簡単な記述

図1はバーチャルノーザン発現分析によって確認されるような、血管形成時における多数の血管形成遺伝子の発現パターンの類別例を示す。各プロットは、同一のcDNA量がアッセイの示された時点の間でのプロット構築において負荷されたことを確認するためにコントロールGAPDH1遺伝子でプローブされた。

図2はBNO69遺伝子の詳細なバーチャルノーザン発現分析を示す。上段のパネルは、ホルボールミリストアセタート(PMA) ± (2 1) 抗体(AC11)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)または腫瘍壊死因子(TNF)でヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)を刺激した後のインビトロモデルにおける様々な時点でのBNO69の発現レベルを示す。下段のパネルは、K562(赤白血病)、KG-1a(急性骨髄性白血病)、Jurkat(急性T細胞白血病)、HeLa(子宮頸部腺ガン)、HepG2(肝臓腫瘍)、L1M12-15(結腸直腸ガン)、MDA-MB-231(乳ガン)、DU145(前立腺ガン)、HEK293(胚性腎臓)、HUSMC(初代臍静脈平滑筋細胞) ± P(PMA)を含む多数のヒト細胞株におけるBNO69の発現レベルを示す。HUVEC T0およびHUVEC T3は、それぞれ、0時間および3時間の時間で血管形成の3-Dモデルから集められたHUVECを表す。

20

図3はBNO96遺伝子の詳細なバーチャルノーザン発現分析を示す。上段のパネルは、ホルボールミリストアセタート(PMA) ± (2 1) 抗体(AC11)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)または腫瘍壊死因子(TNF)でヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)を刺激した後のインビトロモデルにおける様々な時点でのBNO96の発現レベルを示す。下段のパネルは、K562(赤白血病)、KG-1a(急性骨髄性白血病)、Jurkat(急性T細胞白血病)、HeLa(子宮頸部腺ガン)、HepG2(肝臓腫瘍)、L1M12-15(結腸直腸ガン)、MDA-MB-231(乳ガン)、DU145(前立腺ガン)、HEK293(胚性腎臓)、HUSMC(初代臍静脈平滑筋細胞) ± P(PMA)を含む多数のヒト細胞株におけるBNO96の発現レベルを示す。HUVEC T0およびHUVEC T3は、それぞれ、0時間および3時間の時間で血管形成の3-Dモデルから集められたHUVECを表す。

30

40

図4はレトロウイルス媒介による遺伝子移入を使用するヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)機能のBNO69インビトロ調節を示す。HUVECの増殖が直接的な細胞計数によって3日間の期間にわたって測定された。平均 ± SEMが示される。HUVECにおけるアンチセンスBNO69(ASBNO69R)の過剰発現はその増殖を阻害する。EV:空ベクターのコントロール。

図5はアデノウイルス媒介による遺伝子移入を使用するヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)機能のBNO69インビトロ調節を示す。HUVECにおけるアンチセンスBNO69(ASBNO69A)の過剰発現は細胞増殖に対する阻害効果をもたらす。

図6はレトロウイルス媒介による遺伝子移入を使用するヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC

50

機能の B N O 6 9 インビトロ調節を示す。空ベクター (E V) コントロールまたはアンチセンス B N O 6 9 (A S B N O 6 9 R) のいずれかでレトロウイルスによりトランスフェクションされた内皮細胞の細胞形態学が示される。

図 7 はアデノウイルス媒介による遺伝子移入を使用するヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) におけるアンチセンス B N O 9 6 の過剰発現に基づく細胞増殖アッセイを示す。細胞には、ベクターのみのコントロール (E V) またはアンチセンス B N O 9 6 (A S B N O 9 6) のいずれかが感染させられ、細胞が 4 8 時間後に集められた。細胞増殖が、細胞を置床した 3 日後に行われた比色測定法での M T T アッセイによって測定された (平均 \pm S E M 、 n = 4) 。

図 8 はアデノウイルス媒介による遺伝子移入を使用するヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) におけるアンチセンス B N O 9 6 の過剰発現の結果としての細胞遊走に対する影響を示す。細胞には、ベクターのみのコントロール (E V) またはアンチセンス B N O 9 6 (A S B N O 9 6) のいずれかが感染させられ、そして薬剤無し (n i l) または走化性刺激因子フィブロネクチン (F n) のいずれかに向う細胞の遊走が 1 8 時間後 ~ 2 4 時間後に測定された。

図 9 はアデノウイルス媒介による遺伝子移入を使用するヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) におけるアンチセンス B N O 9 6 の過剰発現の結果としての M a t r i g e l 上での毛細管形成に対する影響を示す。細胞は、ベクターのみのコントロール (E V) またはアンチセンス B N O 9 6 (A S B N O 9 6) のいずれかが感染させられ、24 時間の期間にわたって管形成についてアッセイされた。写真が 20 時間後に撮影された。A および B : 管の低倍率写真 ; C および D : 管の高倍率写真。

図 10 はアデノウイルス媒介による遺伝子移入を使用するヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) におけるアンチセンス B N O 9 6 の過剰発現の結果としてのコラーゲンゲル上での毛細管形成に対する影響を示す。細胞は、ベクターのみのコントロール (E V) またはアンチセンス B N O 9 6 (A S B N O 9 6) のいずれかが感染させられ、18 時間 ~ 24 時間の期間にわたって管形成についてアッセイされた。細胞がゲルの中を遊走していたので、写真が 3 時間後に撮影された。M : 遊走細胞。これらは、非遊走細胞よりも平らで、かつ光屈折が少ないようである。N M : 非遊走細胞。これらの細胞は丸く、光屈折性である。

図 11 はアデノウイルス媒介による遺伝子移入を使用するヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) におけるアンチセンス B N O 9 6 の過剰発現の結果としての腫瘍壊死因子 (T N F) 誘導による E - セレクチン発現に対する影響を示す。細胞は、ベクターのみのコントロール (E V) またはアンチセンス B N O 9 6 (A S B N O 9 6) のいずれかが感染させられ、48 時間成長させられた。T N F は、抗 E - セレクチン抗体を使用して細胞表面の E - セレクチン発現について染色する前に 4 時間にわたって加えられた。検出はフィコエリトリンコンジュゲート化抗マウス抗体によって行われた。平均蛍光強度 (M F I) が示される。

【 0 1 2 2 】

発明の実施の形態

実施例 1 : インビトロでの毛細管形成

血管形成のインビトロモデルは、本質的には G a m b l e 他 (1 9 9 3) に記載される通りである。アッセイは、ホルポールミリストアートアセタート (P M A) および抗インテグリン ($\alpha_2 \beta_1$) 抗体 R M A C I I の刺激のもと、コラーゲンにおいて行われた。ヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) が、すべての実験において、2 代 ~ 4 代の継代の間で使用された。

【 0 1 2 3 】

細胞を塊状培養物から集め (t = 0) 、コラーゲンゲルに刺激とともに再置床し、その後、アッセイ開始後の 0 . 5 時間、3 . 0 時間、6 . 0 時間および 2 4 時間でコラーゲンゲルから集めた。これらの時点は、大きな形態学的変化がこれらの段階で生じるために選ばれた。簡単に記載すると、0 . 5 時間までに、細胞はコラーゲンマトリックスに接着し、ゲル内への遊走を開始している。3 . 0 時間までに、小さい細胞内小胞が視認される。6

．0時間までに、これらの小胞は合体して一緒になり、膜に結合した液胞を形成し、そして短い出芽の形態で細胞がゲルに侵入している。この時間以降、これらの液胞は形質膜と融合し、従って、細胞間空間を拡大して、管腔を生じさせる（Meyer他、1997）。これらのより大きい液胞が形成されることが、管腔形成の必須必要条件である（Gamble他、1999）。24時間までに、毛細管の全体的な吻合ネットワークが形成されており、そして退化し始めている。

【0124】

実施例2：RNA単離、cDNAの合成および増幅

示された時点で集められた細胞は、Trizol試薬（Gibco BRL）を製造者の条件に従って使用して総RNAを単離するために使用された。SMART（RNA転写物の5'端でのスイッチング機構）技術を使用して、少量の総RNAを、cDNAサブトラクションを行うことを可能にするために十分なcDNAに変換した（下記参照）。これは、SMART-PCR cDNA合成キット（Clontech使用者マニュアルPT3041-1）を製造者の推奨法に従って使用して達成された。SMART-PCR cDNA合成プロトコルにより、大多数が全長のcDNAが得られ、これらを、続いて、cDNAサブトラクションのためにPCR増幅した。

10

【0125】

実施例3：サブプレッション・サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション（SSH）

SSHを、選択された時点によって規定されるcDNA集団の間においてアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションのいずれかが行われたcDNAについて濃縮するために、SMART増幅されたcDNAに対して行った。この技術によりまた、調節されたcDNAの「正規化」を可能にし、それにより、存在量が少ないcDNA（すなわち、発現が十分でないが重要な遺伝子）をより容易に検出可能にした。これを行うために、PCR-Select cDNA合成キット（Clontech使用者マニュアルPT3041-1）およびPCR-Select cDNAサブトラクションキット（Clontech使用者マニュアルPT1117-1）を製造者の条件に基づいて使用した。これらの手法はサブトラクティブハイブリダイゼーションおよびサブプレッションPCR増幅に依拠した。SSHを下記の集団の間で行った：0時間～0.5時間；0.5時間～3.0時間；3.0時間～6.0時間；6.0時間～24.0時間。

20

【0126】

実施例4：cDNAクローンのディファレンシャルスクリーニング

SSH後、標準的な技術（Sambrook他、1989）を使用して、cDNAフラグメントをEagIで消化し、そしてpBluescriptKS⁺内の適合し得る唯一のNotI部位にクローン化した。これにより、それぞれの時間期間に対するフォワードサブトラクションライブラリーおよびリバースサブトラクションライブラリーが得られた。PCR-Selectディファレンシャルスクリーニングキット（Clontech使用者マニュアルPT3138-1）に概略されるディファレンシャルスクリーニング法を使用して、調節されたcDNAを非調節cDNAから同定した。これを行うために、cDNAアレイを、クローンのプラスミドDNAを四連でナイロンフィルターに配置することによって作製した。約900個の個々のクローンをcDNAアレイによって分析した。これら

30

40

- a) サブトラクションされていない時間1でのcDNA（これは、時間1で存在するmRNAを表す）
 - b) サブトラクションされていない時間2でのcDNA（これは、時間2で存在するmRNAを表す）
 - c) フォワードサブトラクションcDNA（これは、時間2でアップレギュレーションされているmRNAを表す）
 - d) リバースサブトラクションcDNA（これは、時間1でダウンレギュレーションされているmRNAを表す）
- でプローブした。

50

【0127】

すべてのハイブリダイゼーションは42 でExpressHyb溶液(Clontech)において行われた。メンブランは、キットの説明書に従ってハイブリダイゼーション後に洗浄された。

【0128】

cDNAアレイハイブリダイゼーションに基づいて示差的に発現していることが明らかにされたcDNAクローンを続いて配列決定した。その後、インシリコデータベース分析を、配列決定された各クローンについて情報を得る目的で、国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)におけるヌクレオチドデータベースおよび遺伝子データベースに存在する配列に対する相同性を明らかにするために使用した。さらなる分析のためのクローンの選択は、相同性検索から推定されるような予測される機能に基づいた。

10

【0129】

表1および表2には、配列決定された示差的に発現するクローンに対する情報が提供される。表1には、以前には特徴付けられなかった遺伝子または新規な遺伝子を表すクローンが含まれ、一方、表2には、以前には血管形成と関連していない以前に同定された遺伝子に対応するクローンが含まれる。また、血管形成のプロセスに関与することが以前には示されている多数の遺伝子も同定された。これらのクローンが同定されたことは、用いられた血管形成遺伝子同定法が有効であることの原理的な有効性または証拠を提供しており、そして、表1および表2に示されるクローンがさらなる血管形成遺伝子の候補であることを示唆している。

20

【0130】

表1からの一例が、655個のアミノ酸からなる新規なタンパク質をコードするBNO69である。このクローンの全長配列の分析により、GTPase活性化タンパク質(GAP)ドメインの存在が示された。GAPドメインは、Ras GTPase、Rho GTPase、Cdc2 GTPaseおよびRac GTPaseを含む、GTP結合タンパク質の重要な調節因子である一群のタンパク質に見出されている。これらのGTPaseは、細胞の運動性、接着、細胞質分裂、増殖、分化およびアポトーシスを含む多くの生理学的プロセスに関係している(Van AelstおよびD'Souza-Schorey(1997); Ridley(2001)に総説される)。Rho様GTPaseは、不活性なGDP結合状態と活性なGTP結合状態との間で循環する。これらの2つの形態の間における変換は、主に、2つのタイプのタンパク質によって調節される。それらは、結合したGDPをGTPに交換することを増強するグアニン交換因子(GEF)によってアップレギュレーションされ、そして結合したGTPを加水分解する固有速度を増大させるGTPase活性化タンパク質(GAP)によってダウンレギュレーションされる。GTPが負荷されたとき、Rho GTPaseは、一組の下流のエフェクターと結合する能力を獲得し、これにより、例えば、様々な細胞骨格再配置を生じさせる。

30

【0131】

表2からの一例がBNO96遺伝子である。cDNAクローン23(BNO96)を配列決定することにより、このクローンがGタンパク質のガンマ12サブユニット(GNG12)と同一であることが明らかにされた。ヘテロ三量体のGタンパク質は、細胞表面受容体から細胞エフェクターへのシグナル伝達に関与する。Gタンパク質は、アルファ()サブユニット、ベータ()サブユニットおよびガンマ()サブユニットから構成される。刺激されたとき、サブユニットが複合体から解離し、そしてサブユニットおよびサブユニットの両方が多数のエフェクターを活性化して、多くの細胞内シグナルを生じさせることができる。

40

【0132】

現在、6個の異なるサブユニットおよび12個の異なるサブユニットが同定されている。サブユニットは強固に会合し、非常に安定な二量体を形成しているため、それらは、今日まで、機能的ユニットとして見なされている。

【0133】

50

G N G 1 2 は、広く発現し、線維芽細胞および平滑筋細胞に多いことが報告されている (U e d a 他、1 9 9 9)。G N G 1 2 は、プロテインキナーゼ C に対する基質であり、そして、P M A、L P A (リゾホスファチジン酸)、増殖因子および血清などの作用因子で刺激された後、リン酸化される (A s a n o 他、1 9 9 8)。G N G 1 2 はまた、F - アクチンと会合する (U e d a 他、1 9 9 7)。

【 0 1 3 4 】

以前の報告では、G N G 1 2 単独の過剰発現は N I H - 3 T 3 線維芽細胞に対して何ら影響しないことが示されている。しかし、 $1 \quad 1 \quad 2$ 二量体の過剰発現は、細胞の円形化、ストレス繊維の破壊、および細胞遊走の増強を誘導した。G N G 1 2 のリン酸化が、細胞運動性に対するその作用のために要求される (Y a s u d a 他、1 9 9 8)。

10

【 0 1 3 5 】

B N O 6 9 遺伝子および B N O 9 6 遺伝子に関する得られる情報に基づいて、そして、両遺伝子が血管形成時に示差的に発現していることが本発明において示されたということを考えれば、これらの遺伝子は、血管形成と関連する機能をそれらが発揮していることと一致する特徴を有するという示唆がもたらされた。この理由から、これらはさらに分析された。

【 0 1 3 6 】

実施例 5 : パーチャルノーザンプロット分析

選択されたクローンの機能的分析の前に、表 1 および表 2 に示されるクローン (B N O 6 9 および B N O 9 6 を含む) の c D N A アレイ分析から観測される示差的発現をパーチャルノーザン分析によって確認した。

20

【 0 1 3 7 】

各時点に由来する増幅された c D N A をアガロース / E t B r ゲルで電気泳動し、サザン転写を確立された技術 (S a m b r o o k 他、1 9 8 9) に従って c D N A をナイロンメンブランに転写した。すべての c D N A クローン挿入物を、M e g a P r i m e D N A 標識システム (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) を使用して 3 2 P で標識し、ハイブリダイゼーションを製造者の説明書に従って E x p r e s s H y b 溶液 (C l o n t e c h) において行った。

【 0 1 3 8 】

結果に基づき、クローンを調節パターンのそれらのタイプに従って類別化した (図 1 ならびに表 1 および表 2)。今日までに同定された 2 0 個の新規な遺伝子の中で、9 個が血管形成時に調節されることが確認され、4 個が、パーチャルノーザンプロットで検出できないシグナルをもたらし、残りのクローンは、パーチャルノーザンプロットに基づく発現の調節を示さなかった。同様に、以前には血管形成と関連しなかった 9 4 個の既知遺伝子の中で、5 9 個が、血管形成モデルから示差的に調節されることが確認された。示差的な発現を示さなかったクローン (クラス F)、または検出可能な結果をパーチャルノーザンでもたらさなかったクローンは、それでもなお、血管形成に関与すると考えられ、しかしながら、さらなる特徴づけが必要である。

30

【 0 1 3 9 】

実施例 6 : 細胞および刺激の特異性

示差的に発現しているクローンをさらに特徴づけ、そして血管形成におけるそれらの役割を確認するために、パーチャルノーザンプロットを再び使用して、特異的な増殖因子を用いて単層培養物における細胞タイプ発現特異性およびそれらの刺激を明らかにした。内皮細胞を 2 次元 (2 - D) コラーゲンマトリックスに置床し、そして血管内皮細胞増殖因子 (V E G F)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (F G F)、腫瘍壊死因子 (T N F)、P M A + A C I I、または P M A 単独で、0 . 5 時間、3 . 0 時間、6 . 0 時間および 2 4 時間にわたって刺激した。内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞の初代培養物、ならびに腫瘍細胞株を集めた。R N A をすべての細胞から調製し、S M A R T - P C R c D N A 合成キット (C l o n t e c h 使用者マニュアル P T 3 0 4 1 - 1) を使用して、c D N A をパーチャルノーザン調製のために作製した。調製されたプロットを、その後、目的とす

40

50

る特異的な血管形成遺伝子の調節についてプローブした。結果が表 1 および表 2 に示される。

【0140】

これまでに分析されたクローンの中で、すべてが内皮細胞で発現していることが確認された。表 1 に示されたクローンの中で、シグナル特異性について分析された 6 個のクローンのうちの 3 個が、VEGF、FGF および PMA の存在によって影響を受けることが示された。2 個のクローンは、培養中の内皮細胞を刺激した後、応答を全く示さず、そして残りのクローンは、示差的な発現が、2 次元コラーゲンゲルに対してではなく、3 次元コラーゲンゲルに対して特異的であることを示した。表 2 に示されるクローンの中で、シグナル特異性について分析された 6 個のクローンのうちの 2 個が VEGF および FGF の存在によって影響を受けることが示され、1 個のクローンが PMA のみの存在によって影響を受けた。1 個のクローンは、培養中の内皮細胞を刺激した後、応答を全く示さず、そして残る 2 個のクローンは、示差的な発現が、2 次元コラーゲンゲルに対してではなく、3 次元コラーゲンゲルに対して特異的であることを示した。

【0141】

図 2 および図 3 には、それぞれ BNO69 遺伝子および BNO96 遺伝子について、細胞および刺激の特異性の結果の詳細なまとめが示される。これらの結果は、両遺伝子が 3 次元 (3-D) インビトロモデルの 3 時間の時点でアップレギュレーションされていることを示している。BNO69 遺伝子は、FGF、VEGF および PMA に応答して発現される一方で、BNO96 遺伝子の発現は、PMA に応答して生じるのみである。両遺伝子は、内皮細胞を含むいくつかの細胞タイプで発現している。

【0142】

実施例 7：血管形成遺伝子の分析

表 1 および表 2 に示されるような、血管形成プロセスに関係することが本研究によって明らかにされた遺伝子は、インビトロでの血管形成におけるそれらの役割を確認する目的でさらなる研究のために使用することができる。これを行うために、遺伝子の全長のコード配列を、レトロウイルスまたはアデノウイルスなどの好適な発現ベクターにセンス配向およびアンチセンス配向の両方でクローン化し、内皮細胞 (EC) への感染のために使用することができる。レトロウイルス感染は、目的とする遺伝子を発現する長期の EC 株をもたらす。これに対して、アデノウイルス感染は一過性の遺伝子発現をもたらす。感染細胞は、その後、血管形成における各遺伝子の役割を確認するために、増殖および毛細管形成を含む多数の EC アッセイに供することができる。

【0143】

一例として、EC 機能のインビトロ調節に対する BNO69 および BNO96 の作用が明らかにされ、下記に記載される。

【0144】

EC 機能のインビトロ調節 - BNO69

内皮細胞の機能および血管形成に対する BNO69 の作用には、レトロウイルスまたはアデノウイルスにより媒介される遺伝子移入によって BNO69 のアンチセンスを内皮細胞にトランスフェクションすることが伴った。継代数が 1 代または 2 代であるヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) が過剰発現実験のために使用された。最初に、BNO69 遺伝子を複製欠陥レトロウイルス pRufNeo (Rayner および Gonda, 1994) にクローン化した。市販の細胞株 BING を感染およびウイルス上清の製造のために使用した。レトロウイルスを感染させ、アンチセンス BNO69 遺伝子を発現する HUVEC クローンを、G418 を使用して neo 抵抗性について選択し、さらなる増殖および分析のためにまとめてプールした。プールされたクローンの増殖を直接的な細胞計数によって 3 日間の期間にわたって測定した。これらの実験の結果は、BNO69 のアンチセンス構築物を感染させた細胞はその増殖能が低下していることを示した (図 4)。

【0145】

HUVEC におけるアンチセンス BNO69 のアデノウイルス媒介による発現を使用した

その後の実験では、レトロウイルスシステムで観測された作用と類似する、細胞増殖に対する作用が示された。H U V E C を、ベクターのみのコントロールまたはアンチセンス B N O 6 9 のいずれかで感染させ、感染後 2 4 時間で集め、そして完全増殖培地でマイクロタイタープレートに置床した。細胞増殖を、以前の記載 (X i a 他、1 9 9 9) のように、比色測定による M T T アッセイによって測定した。アッセイを、細胞を置床した 3 日後に行った。これらの実験の結果は、H U V E C の増殖が、アンチセンス B N O 6 9 のアデノウイルス媒介による発現によって阻害されることを示した (図 5) 。

【 0 1 4 6 】

また、レトロウイルス感染システムおよびアデノウイルス感染システムではともに、B N O 6 9 に対するアンチセンス構築物を感染させた細胞の大きな特徴は細胞形態学の変化であった。細胞は、サイズが大きくなり、細胞質の範囲が増大しているようであった (図 6) 。細胞サイズの増大が、前方散乱および側方散乱の両方の測定により細胞のサイズおよび粒状性に関する情報がそれぞれ得られる蛍光活性化細胞分取装置での分析によって確認された。レトロウイルスシステムおよびアデノウイルスシステムではともに、これらのパラメーターが変化した。レトロウイルス感染細胞では、前方散乱が 3 8 5 (E V) および 5 2 2 (A S B N O 6 9 R) であり、一方、側方散乱が 2 8 9 (E V) および 5 0 8 (A S B N O 6 9 R) と測定された。アデノウイルス感染細胞では、前方散乱に対する測定値が 4 4 4 (E V) および 5 3 3 (A S B N O 6 9 R) であり、一方、側方散乱が 4 1 7 (E V) および 5 0 0 (A S B N O 6 9 R) と測定された。

【 0 1 4 7 】

E C 機能のインビトロ調節 - B N O 9 6

内皮細胞の機能および血管形成に対する B N O 9 6 の作用には、アデノウイルス遺伝子移入によって B N O 9 6 のアンチセンスを内皮細胞にトランスフェクションすることが伴った。最初に、アンチセンス B N O 9 6 を、(本質的には、<http://coloncancer.org/protocol.html> に概略されるような) 細菌における相同的組換えを用いて組換えアデノウイルスプラスミドとして作製した。得られたプラスミドを、ウイルスを拡大するために哺乳動物パッケージング細胞株 2 9 3 にトランスフェクションし、続いて、ウイルスを塩化セシウムグラジエントによって精製した。トランスフェクション効率を、上記のプロトコルに示されるように、緑色蛍光タンパク質およびブランク形成ユニットによって評価した。

【 0 1 4 8 】

最初に、アンチセンス B N O 9 6 の内皮細胞増殖に対する作用を明らかにした。ヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) をベクターのみのコントロールまたはアンチセンス B N O 9 6 のいずれかで感染させ、4 8 時間後に集めた。細胞増殖を、以前の記載 (X i a 他、1 9 9 9) のように、比色測定による M T T アッセイによって測定した。アッセイを、細胞を置床した 3 日後に行った (平均 \pm S E M、n = 4) 。アンチセンス B N O 9 6 による H U V E C の感染は、細胞が完全増殖培地で培養されたとき、細胞増殖を阻害することが見出された (図 7) 。

【 0 1 4 9 】

血管形成インビトロモデルの別の特徴は、マトリックス内への内皮細胞の遊走である。B N O 9 6 がこのプロセスに対して果たす作用を調べるために、細胞遊走実験を次に行った。ヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) をベクターのみのコントロールまたはアンチセンス B N O 9 6 のいずれかで感染させ、薬剤無しまたは走化性刺激因子フィブロネクチンのいずれかに向う細胞の遊走を測定した。遊走アッセイは以前の記載 (L e a v e s l e y 他、1 9 9 3) のように行われた。簡単に記載すると、5 0 μ g / m l のフィブロネクチンを、走化性グラジエントとして作用させるための 8 . 0 μ m T r a n s w e l l フィルターの下面にコーティングした。細胞遊走を 1 8 時間後 ~ 2 4 時間後に評価した。これらの実験から得られる結果は、アンチセンス B N O 9 6 感染細胞が、走化性刺激因子としてのフィブロネクチンに向かう遊走から阻害されることを示した (図 8) 。

【 0 1 5 0 】

血管形成プロセスの本質的な特徴の1つに、毛細管の形成がある。BNO96がこのプロセスにおいて果たす役割を、Matrigelモデルおよびコラーゲンゲルモデルを使用して測定した。Matrigelシステムでは、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)をベクターのみのコントロールまたはアンチセンスBNO96のいずれかで感染させ、以前の記載(Cockerill他、1994)のように管形成についてアッセイした。簡単に記載すると、140 μ lの3 \times 10⁵細胞/mlをMatrigelに置床し、細胞再編成および管形成を24時間の期間にわたって評価した。アンチセンスBNO96感染細胞は、Matrigel毛細管アッセイでは毛細管を作ることができなかった(図9)。

【0151】

コラーゲンゲルモデルでは、HUVECをベクターのみのコントロールまたはアンチセンスBNO96のいずれかで再び感染させ、以前の記載(Gamble他、1993)のように管形成について18時間~24時間の期間にわたってアッセイした。アンチセンスBNO96の発現は、コラーゲンゲル内への細胞遊走(およびその後の管形成)の障害をもたらした(図10)。

10

【0152】

次の実験では、BNO96の障害が、血管形成に関連する機能に対して特異的である内皮細胞変化を生じさせるかどうかという疑問が検討された。E-セレクチンは、TNFおよびIL-1などの炎症性サイトカインによって誘導され、好中球-内皮細胞の相互作用を媒介する内皮細胞特異的接着分子である。従って、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)におけるアンチセンスBNO96の過剰発現の結果としてのE-セレクチン発現に対する作用を明らかにした。使用された方法は、Litwin他(1997)に記載される通りであった。簡単に記載すると、HUVECをベクターのみのコントロールまたはアンチセンスBNO96のいずれかで感染させ、48時間成長させた。その後、細胞を24ウエルトレーに移し、一晚インキュベーションした。0.5ng/mlで腫瘍壊死因子(TNF)を、抗E-セレクチン抗体を使用して細胞表面のE-セレクチン発現について染色する前に4時間にわたって加えた。検出は、フィコエリトリンコンジュゲート化抗マウス抗体によって行われた。これらの実験の結果は、アンチセンスBNO96遺伝子を過剰発現する細胞は、前炎症性刺激因子である腫瘍壊死因子に対して正常な様式で依然として応答して、接着分子E-セレクチンを誘導することを示した(図11)。このことは、内皮細胞の機能に対するアンチセンスBNO96の作用は選択的であることを示唆している。

20

30

【0153】

アンチセンスBNO96は、細胞増殖、遊走および毛細管形成を阻害することができ、しかし、TNF誘導によるE-セレクチン発現を阻害することができないということは、BNO96遺伝子のノックダウンが内皮細胞の血管形成能に特異的な影響を及ぼすことを示唆し得る。炎症反応に関係するその能力などの他の細胞機能は、(今日までに測定された機能に関する限り)正常であるようである。従って、BNO96遺伝子は、血管形成プロセスにおいて限定的な役割を果たしていると考えられ、血管形成に関連する病理を処置するために治療法を開発するための標的である。

【0154】

タンパク質相互作用研究

本発明の血管形成タンパク質(これには、BNO69およびBNO96が含まれる)のいずれか1つが既知のタンパク質および未知のタンパク質と結合する能力を調べることができる。酵母ツーハイブリッドシステムなどの手法が、何らかの機能的パートナーを発見および同定するために使用される。酵母ツーハイブリッド手法の基礎となる原理は、酵母における転写活性化因子を含めて、真核生物の転写活性化因子の多くが2つの離れたモジュール状ドメインからなるということである。第1のドメインが、特異的なプロモーター配列に結合するDNA結合ドメインであり、第2のドメインが、RNAポリメラーゼII複合体にDNA結合部位の下流の遺伝子を転写させる活性化ドメインである。いずれのドメインもそれ自身では転写を活性化することができないので、両方のドメインが転写活性化のために要求される。酵母ツーハイブリッド手法では、目的とする遺伝子またはその一部

40

50

(餌)が、DNA結合ドメインを有するペプチドに対する融合体として発現されるような方法でクローン化される。第2の遺伝子、または多数の遺伝子、例えば、cDNAライブラリーに由来する遺伝子など(標的)が、活性化ドメインに対する融合体として発現されるようにクローン化される。目的とするタンパク質がその結合パートナーと相互作用することにより、DNA結合ペプチドが活性化ドメインと一緒に、レポーター遺伝子の転写が開始される。第1のレポーター遺伝子は、相互作用タンパク質を含有する酵母細胞について選択される(このレポーターは、通常、選択培地における増殖のために要求される栄養性遺伝子である)。第2のレポーターは確認のために使用され、そして相互作用タンパク質に応答して発現している間は、第2のレポーターは、通常、増殖のために要求されない。

10

【0155】

相互作用する遺伝子およびタンパク質の性質もまた、これらのパートナーもまた薬物発見のための標的であり得るように調べることができる。

【0156】構造研究

本発明の組換え血管形成タンパク質は、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞および/または哺乳動物細胞において製造することができ、そして結晶学研究およびNMR研究で使用することができる。タンパク質の分子モデル化と一緒に、構造から導かれる薬物設計が促進され得る。

【表1】

20

表 1

新規な血管形成遺伝子

遺伝子	経時的サブトランクション ¹	シグナル特異性 ²	細胞タイプ特異性 ³	バーチャルノーザン ⁴	相同性の詳細	UniGeneクラスター番号	配列番号
BNO69	0.5-3	V/F/P	S	B	仮想的なGAPドメイン含有タンパク質	Hs 93589	1, 115
BNO71	3.0-6.0	V/F/P	M	B	LUZP - ロイシンジッパータンパク質。推定的な転写因子	Hs 334673	2, 116
BNO72	0.5-3.0	3-D 非常に弱い		B	EST と一致せず	なし	3
BNO73	0.5-3.0	V/F/P		B	EST	Hs 315562	4
BNO77	0.5-3.0	NR		C	Archease 様タンパク質	Hs 292812	5, 117
BNO79	0.5-0			E ?	CRELDI (EGF 様ドメインを有するシステイン-リッチ 1)	Hs 9383	6, 118
BNO82	0.5-3.0	NR	M	E ?	仮想的なタンパク質	Hs 172069	7, 119
BNO83	3.0-6.0			E (↑6 時間)	EST と一致せず	なし	8
BNO84	3.0-6.0			E (↓6 時間)	EST	なし	9
BNO85	0-0.5			検出できず	EST と一致せず	なし	10
BNO86	0.5-3.0			検出できず	EST	なし	11
BNO87	0-0.5			検出できず	EST と一致せず	なし	12
BNO88	0-0.5			検出できず	仮想的なタンパク質	Hs 4863	13, 120
BNO89	0.5-3.0			F	EST と一致せず	なし	14
BNO90	0-0.5			F	EST	Hs 28893	15, 121
BNO92	3.0-6.0			F	HMGE (GrpE 様タンパク質コジャペロン)	Hs 151903	16, 122
BNO94	0-0.5			F	KIAA0678	Hs 12707	17, 123
BNO95	0-0.5			F	仮想的なタンパク質	Hs 17283	18, 124
BNO160	0-0.5				EST、GAI5_HUMAN 増殖停止および DNA 損傷誘導タンパク質に対してわずかに類似 GADD153 (DNA 損傷誘導転写物 3) (DDIT3) (C/EBP 相対的タンパク質) (CHOP)	Hs 335776	19
BNO174	0-0.5			L	KIAA0251	Hs 343566	20, 125

備考: 単離クローニングが得られた時点およびサブトランクションの方向;¹ 2次元クローニングゲルにおける VEGF (V), bFGF (F), PMA (P) に対する応答。2次元クローニングゲルに対してではなく、3次元 (3-D) クローニングゲルに対して特異的な応答。応答なし (NR);³ 多くの細胞タイプ (M) または数個の細胞タイプ (S) における発現; 4 3次元クローニングゲルでの管および管腔の形成アッセイに対して特異的に関連する。クラス B: 3 時間において増大; クラス C: 0.5 時間において低下; クラス E: 他の調節パターン; クラス F: 非調節; クラス L: 0 時間および 0.5 時間の時点のみに限定されたバーチャルノーザン、しかし無調節。

表 2
血管形成における役割が以前には知られていない遺伝子

BNO #	経時的サブ トランクション ¹	シグナル 特異性 ²	細胞タイプ 特異性 ³	バーチャル ノーザン ⁴	相同性の詳細	UniGene クラスター番号	配列番号
BNO65	0-0.5			A	SDF-2 (間質細胞由来因子-2)	Hs 118684	21, 126
BNO66	0-0.5			A	PRO1992 (アルゼニルRNA 合成酵素に類似)	Hs 15395	22, 127
BNO67	0.5-0			A	推定的タンパク質 (チオレドキシン関連タンパク質)	Hs 6101	23, 128
BNO70	0-0.5	V/F		B	BRG1 結合タンパク質 ELD/OSA1	Hs 73287	24, 129
BNO74	3.0-6.0			B	SET ドメイン含有タンパク質 7	Hs 78521	25, 130
BNO75	3.0-6.0			B? (弱い)	VPS35 (液胞タンパク質ソーティング 35)	Hs 264190	26, 131
BNO76	3.0-6.0			C	EBRP (エモバミル結合関連タンパク質、 $\Delta 8-\Delta 7$ ステロールイソメラーゼ 関連タンパク質)	Hs 298490	27, 132
BNO78	0-0.5			E (\downarrow 24時間)	CPSF2 (切断およびポリアデニル化に特異的な因子 2)	Hs 224961	28, 133
BNO80	0.5-0			E	仮想的なタンパク質	Hs 323193	29, 134
BNO91	3.0-6.0			F	NADH4 (ミトコンドリア遺伝子)	なし	30, 135
BNO93	0-0.5			F	SGPL1 (スフィンゴシン-1-リン酸リアーゼ 1)	Hs 186613	31, 136
BNO381	0-0.5			F	COBW 様タンパク質	Hs 7535	32, 137
BNO96	0.5-0	P	S	B	GNG12 (G 共役受容体タンパク質 γ_{12} サブユニット)	Hs 118520	33, 138
BNO97 ⁵	0-0.5			A	SDRR1 (間質細胞由来因子受容体 1)	Hs 6354	34, 139
BNO98	0-0.5	V/F P?		B	RYBP (Ring1 および YY1 に結合するタンパク質)	Hs 7910	35, 140
BNO99 ⁵	0.5-0	NR		C	BMP2 (骨形態形成タンパク質 2)	Hs 73853	36, 141
BNO101 ^{5,6}	3-6, 0-0.5			A	TCEB1L (転写伸長因子 B (SIII)、ポリペプチド I 様)	Hs 171626	37, 142
BNO102	0-0.5			A	PSME2 (プロテオソーム活性化因子サブユニット 2 - PA28 β)	Hs 179774	38, 143
BNO103 ^{5,6}	0-0.5, 3.0-6.0, 0.5-0			A	FTL (フェリチン、軽ポリペプチド)	Hs 11134	39, 144
BNO104	3-6			A	ITCH (Itchy ホモログ E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ)	Hs 98074	40, 145
BNO105	3-6			A	ENO1- α (エノラーゼ 1 α)	Hs 254105	41, 146
BNO106	0.5-3			A	HNRPH2 (異種核リボ核タンパク質 H2)	Hs 278857	42, 147
BNO107	0-0.5			A	UNR (NRAS 関連遺伝子)	Hs 69855	43, 148
BNO108 ^{5,6}	0-0.5, 0.5-3.0, 6.0-24			A (\uparrow 24時間)	COX-1 (シトクロームオキシダーゼ 1 の小サブユニット-ミトコンドリア遺伝子)	なし	44, 149
BNO111	3-6			A/(B/D)	ZFP36L2 (亜鉛フィンガータンパク質 36、C3H タイプ様 2)	Hs 78909	45, 150
BNO112	6-24			A (\uparrow 24時間)	CALM1 (カルモジュリン-1)	Hs 177656	46, 151

表 2 (続き)

血管形成における役割が以前には知られていない遺伝子

BNO #	経時的サブ トラクション ¹	シグナル 特異性 ²	細胞タイプ 特異性 ³	バーチャル ノーサン ⁴	相同性の詳細	UniGene クラスター番号	配列番号
BNO114	6-24			A	CYP11B1 (シトクロームP450、サブファミリー I (ダイオキシン誘導型)、ポリペプチド1)	Hs 154654	47, 152
BNO115	3-6			A	UGTREL1 (UDP-ガラクトース輸送体関連)	Hs 154073	48, 153
BNO116	0.5-3			A (↑24時間)	MCPR (後期促進複合体 1; 減数分裂チエックポイント調節因子)	Hs 40137	49, 154
BNO120	3-6			B	GLO1 (グリオキセラゼ1)	Hs 75207	50, 155
BNO122	0.5-3			B?	RPL15 (リボソームタンパク質 L15)	Hs 74267	51, 156
BNO123	3-6			B	SF3B1 (スプライシング因子 3b、サブユニット1)	Hs 334826	52, 157
BNO124	0.5-3			B	AKAP12 (Aキナーゼ (PRKA)アンカータンパク質(グラベリン)12)	Hs 788	53, 158
BNO128	6-24			B	HSPA8 (熱ショック70KDタンパク質8)	Hs 180414	54, 159
BNO130	0.5-3			B	LIPG (内皮リパーゼ)	Hs 65370	55, 160
BNO131	0-0.5	3-D		C	PX19 様 (PX19-様タンパク質)	Hs 279529	56, 161
BNO132	0.5-0			C	PDCD6 (プログラム化細胞死6)	Hs 80019	57, 162
BNO133	0.5-3			C	SDPR (血清欠乏応答-ホスファチジルセリン結合タンパク質)	Hs 26530	58, 163
BNO134	0.5-0			C	GPI (グルコースリン酸イソメラーゼ)	Hs 279789	59, 164
BNO135	0.5-0			C	COX-3 (シトクロームオキシダーゼ 3 サブユニット-ミトコンドリア遺伝子)	なし	60, 165
BNO137	3-6	3-D	M	D	PTRF (ポリメラーゼ I および転写物放出因子)	Hs 29759	61, 166
BNO140	3-6			D	CCND2 (サイクリンD2)	Hs 75586	62, 167
BNO141	0.5-0			D	GOLGA2 (ゴルジ自己抗原、ゴルジンサブファミリー a, 2)	Hs 24049	63, 168
BNO142	3-6			E (↑6時間)	RPL11 (リボソームタンパク質 L11)	Hs 179943	64, 169
BNO144 ^b	0.5-0, 0-0.5			E (↓24時間)	EEF1A1 (真核生物翻訳伸長因子 1 α 1)	Hs 181165	65, 170
BNO145	0.5-3			E (↑6時間)	ATPIA1 (ATPase, Na ⁺ /K ⁺ 輸送, α 1 ポリペプチド)	Hs 76549	66, 171
BNO146	0.5-3			E (↑6時間)	TAX1BP1 (Tax1 (ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型) 結合タンパク質 1)	Hs 5437	67, 172
BNO147	0.5-3			E?	KARP-1BP3 (Ku86 自己抗原関連タンパク質結合タンパク質 3)	Hs 25132	68, 173
BNO148	3-6			E (↓24時間)	RPS6 (リボソームタンパク質 S6 サブユニット)	Hs 350166	69, 174
BNO149	6-24			E (↓6時間)	MRPL22 (ミトコンドリアリボソームタンパク質 L22)	Hs 41007	70, 175
BNO150	3-6			E (↑6時間)	BAZZB (亜鉛フィンガードメインに隣接するプロモドメイン, 2B)	Hs 8383	71, 176

表 2 (続き)

血管形成における役割が以前には知られていない遺伝子

BNO #	経時的サブ トランクション ¹	シグナル 特異性 ²	細胞タイプ 特異性 ³	バーチャル ノーザン ⁴	相同性の詳細	UniGene クラスター 番号	配列番号
BNO151	3-6			E (↑24時間)	TEGT (精巢の増強された遺伝子転写物 - BAX 阻害剤 1)	Hs 74637	72, 177
BNO152	0-0.5			E (↑6時間)	TDE1 (腫瘍示差的発現型 1)	Hs 272168	73, 178
BNO153	0-0.5			E (↑24時間)	RPA2 (複製タンパク質 A2)	Hs 79411	74, 179
BNO154	0-0.5			E (↓24時間)	PABPC1 (ポリ(A)結合タンパク質、細胞質型 1)	Hs 172182	75, 180
BNO155	0.5-0			E	RPS13 (リボソームタンパク質 S13)	Hs 165590	76, 181
BNO156	0.5-0			E	TCPI (T複合体 1)	Hs 4112	77, 182
BNO157	0.5-0			E	RNASE1 (リボスクレアーゼ、RNase A ファミリー、1)	Hs 78224	78, 183
BNO158	0-0.5			L	SNX5 (選別性ネキシン 5)	Hs 13794	79, 184
BNO159	0.5-0			L?	NP220 (NP220 核タンパク質)	Hs 169984	80, 185
BNO161	0-0.5				DDX15 (DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) ボックスポリペプチド 15)	Hs 5683	81, 186
BNO162	0.5-3				RPL28 (リボソームタンパク質 L28)	Hs 4437	82, 187
BNO163	0.5-3				UBE2L3 (ユビキチンコンジュゲート化酵素 E2L 3)	Hs 108104	83, 188
BNO164	3-6				CYTB (シトクローム b - ミトコンドリア遺伝子)	None	84, 189
BNO166	0-0.5			?	MPHOSPH6 (M期リンタンパク質 6)	Hs 152720	85, 190
BNO167 ⁵	0-0.5				SSBP2 (一本鎖 DNA 結合タンパク質 2)	Hs 169833	86, 191
BNO168	0.5-0				NADH1 (NADH デヒドロゲナーゼサブユニット 1 - ミトコンドリア遺伝子)	None	87, 192
BNO169	0.5-3			U	PHF3 (PHD フィンガータンパク質 3)	Hs 78893	88, 193
BNO170 ⁵	0-0.5, 0.5-0			U	ICMT (インプレニルシステインカルボキシルメチルシスチオニドリンフェラーゼ)	Hs 183212	89, 194
BNO171	0-0.5			L	HCFC1 (宿主細胞因子 C1 - VP16 アクセサリータンパク質)	Hs 83634	90, 195
BNO173	0-0.5			L	QKI7/7B (マウスクエーキング QKI - KH ドメイン RNA 結合タンパク質の QKI ホモログ)	Hs 15020	91, 196
BNO175	0.5-0			L	S100A13 (S100 カルシウム結合タンパク質 A13)	Hs 14331	92, 197
BNO176	0.5-0			L?	CGI-99 タンパク質	Hs 110803	93, 198
BNO177	0-0.5			L?	EXT1 (外骨腫 (多発性) 1)	Hs 184161	94, 199
BNO179	0.5-0				TL-227H (ミトコンドリア遺伝子)	None	95
BNO180	0.5-0				KPNA2 (カリオフィリン α2 (RAG コホート 1 - インボルチン α1))	Hs 159557	96, 200
BNO181 ⁵	0.5-3				RP99 (リボソームタンパク質 S9)	Hs 180920	97, 201
BNO182	3-6				NCBP2 (核キャップ結合タンパク質サブユニット 2)	Hs 240770	98, 202
BNO183	3-6				S12 rRNA (ミトコンドリア遺伝子)	None	99

表 2 (続き)

血管形成における役割が以前には知られていない遺伝子

BNO #	経時的サブ トラクション ¹	シグナル 特異性 ²	細胞タイプ 特異性 ³	バーチャル ノーザン ⁴	相同性の詳細	UniGene クラスター番号	配列番号
BNO366	3-6			F	ATPシターゼ6(ミトコンドリア遺伝子)	None	100, 203
BNO367	3-6			F	HSP105(熱ショックタンパク質105)	Hs 36927	101, 204
BNO368	0.5-0			L?	PROX1(Prospero関連ホメオボックス1)	Hs 159437	102, 205
BNO369 ⁵	6-24, 0.5-0			C/F?	ACTB(アクトニン, β)	Hs 288061	103, 206
BNO370	6-24			F	TMSB4X(チモシン, β 4 X染色体)	Hs 75968	104, 207
BNO371 ⁵	3-6, 0.5-0			F	16S rRNA(ミトコンドリア遺伝子)	None	105
BNO373	3-6			F	APLP2(アミロイド β (A4)前駆体様タンパク質2)	Hs 279518	106, 208
BNO374	0-0.5			F	EPLIN beta(新生物で失われる上皮タンパク質 β)	Hs 10706	107, 209
BNO375	0-0.5			F	EIF3S9(真核生物翻訳開始因子3サブユニット9)	Hs 57783	108, 210
BNO376	0.5-0			F	PSMCI(プロテオソーム26Sサブユニット, ATPase, 1)	Hs 4745	109, 211
BNO377	0-0.5			F	TCTA(T細胞白血球転座変化遺伝子)	Hs 250894	110, 212
BNO378	0.5-0			F	NTF2(核輸送因子2)	Hs 151734	111, 213
BNO379	3-6			F	MLC-B(ミオシン調節軽鎖)	Hs 180224	112, 214
BNO380	0-0.5			F	CHRNA1(ニコチン性アセチルコリン受容体 α 1サブユニット)	Hs 2266	113, 215
BNO382	0-0.5			F	MAPIB(微小管関連タンパク質1B)	Hs 103042	114, 216

備考: ¹単離クローンが得られた時点およびサブトラクションの方向; ²2次元カラーゲンゲルにおけるVEGF(V), bFGF(F), PMA(P)に対する応答; ³2次元カラーゲンゲルに対する応答; ⁴3次元カラーゲンゲルでの管および管腔の形成アッセイに対して特異的に関連する。クラスA: 0.5時間において増大; クラスB: 3時間において増大; クラスC: 0.5時間において低下; クラスD: 3時間において低下; クラスE: 他の調節パターン; クラスF: 非調節; クラスL: 0時間および0.5時間の時点のみに限定されたバーチャルノーザン、しかし無調節。⁵多数のcDNAクローンがこのBNO遺伝子について同定された。⁶このBNO遺伝子について同定された多数のcDNAクローンは血管形成モデルの2つ以上の時点で発現の調節を示した。

10

20

30

40

参考文献

本願明細書に引用した参考文献は以下のページに列挙され、この参照によって
本願明細書に組み入れられる。

- Altschul, SF. et al. (1997). *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Asano, T. et al. (1998). *Eur. J. Biochem.* 251 : 314-319.
- Breaker, RR. and Joyce, GF. (1995). *Chem. Biol.* 2: 655-600. 10
- Cockerill, GW. et al. (1994). *A Survey of Cell Biol.* 159: 113-160.
- Cole, SP. et al. (1984). *Mol. Cell Biol.* 62: 109-120.
- Cote, RJ. et al. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030.
- Culver, K. (1996). *Gene Therapy : A Primer for Physicians.* Second Edition. (Mary Ann Liebert).
- Folkman, J. and Haudenschild, C. (1980). *Nature (Lond.)* 288: 551-556. 20
- Friedman, T. (1991). In *Therapy for Genetic Diseases.* (T Friedman (Ed) Oxford University Press. pp 105-121.
- Gamble, JR. et al. (1993). *J. Cell Biol.* 121: 931-943.
- Gamble, JR. et al. (1999). *Endothelium* 7: 23-34.
- Gecz, J. et al. (1997). *Genomics* 44: 201-213.
- Goldman, CK. et al. (1997). *Nature Biotechnology* 15: 462-466. 30
- Haseloff, J. and Gerlach, WL. (1988). *Nature* 334: 585-591.
- Heller, RA. et al. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2150-2155.
- Huse, WD. et al. (1989). *Science* 246: 1275-1281.
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975). *Nature* 256: 495-497.
- Kozbor, D. et al. (1985). *J. Immunol. Methods* 81:31-42.
- Leavesley, DI. et al. (1993). *J. Cellular Biol.* 121: 163-170. 40
- Litwin, M. et al. (1997). *J. Cell Biol.* 139: 219-228.
- Meyer, GT. et al. (1997). *The Anatomical Record* 249: 327-340.

Orlandi, R. et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3833-3837.

Rayner, JR. and Gonda, TJ. (1994). *Mol. Cell Biol.* 14: 880-887.

Rickert, RC. et al. (1997). *Nucleic Acids Res.* 25: 1317-1318.

Ridley, AJ. (2001). *Trends Cell Biol.* 11: 471-477.

Sambrook, J. et al. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second Edition. (Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York).

10

Scharf, D. et al. (1994). *Results Probl. Cell Differ.* 20: 125-162.

Schena, M. et al. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10614-10619.

Schwenk, F. et al. (1995). *Nucleic Acids Res.* 23: 5080-5081.

20

Ueda, H. et al. (1997). *J. Cell Sci.* 110 : 1503-1511.

Ueda, H. et al. (1999). *J. Biol. Chem.* 274 : 12124-12128.

Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (1997). *Genes Devel.* 11 : 2295-2322.

Winter, G. et al. (1991). *Nature* 349: 293-299.

Xia, P. et al. (1999). *J. Biological Chem.* 274: 34499-34505.

Yasuda, H. et al. (1998). *J. Biol. Chem.* 273: 21958-21965.

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0158】

【図1】バーチャルノーザン発現分析によって確認されるような、血管形成時における多数の血管形成遺伝子の発現パターンの類別例を示す。

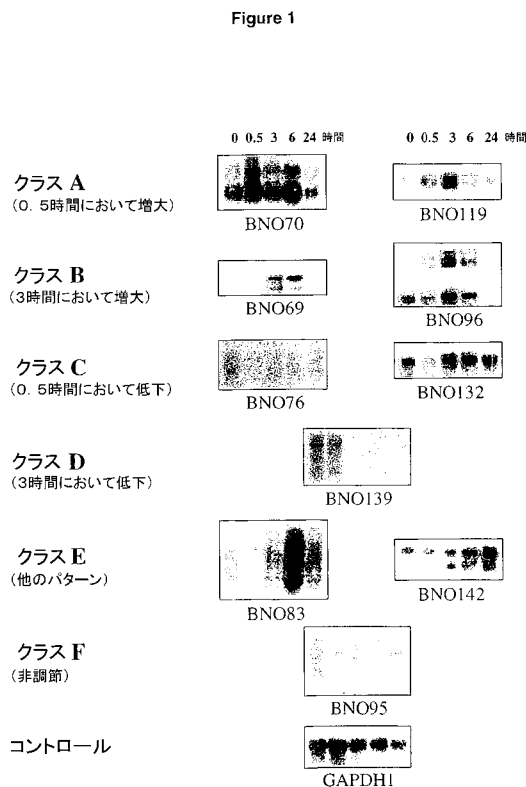
【図2】BNO69遺伝子の詳細なバーチャルノーザン発現分析を示す。

- 【図3】 BNO96 遺伝子の詳細なバーチャルノーザン発現分析を示す。
- 【図4】 レトロウイルス媒介による遺伝子移入を使用するヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) 機能の BNO69 インビトロ調節を示す。
- 【図5】 アデノウイルス媒介による遺伝子移入を使用するヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) 機能の BNO69 インビトロ調節を示す。
- 【図6】 レトロウイルス媒介による遺伝子移入を使用するヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) 機能の BNO69 インビトロ調節を示す。
- 【図7】 アデノウイルス媒介による遺伝子移入を使用するヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) におけるアンチセンス BNO96 の過剰発現に基づく細胞増殖アッセイを示す。
- 【図8】 アデノウイルス媒介による遺伝子移入を使用するヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) におけるアンチセンス BNO96 の過剰発現の結果としての細胞遊走に対する影響を示す。
- 【図9】 アデノウイルス媒介による遺伝子移入を使用するヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) におけるアンチセンス BNO96 の過剰発現の結果としての Matrigel 上での毛細管形成に対する影響を示す。
- 【図10】 アデノウイルス媒介による遺伝子移入を使用するヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) におけるアンチセンス BNO96 の過剰発現の結果としてのコラーゲンゲル上での毛細管形成に対する影響を示す。
- 【図11】 アデノウイルス媒介による遺伝子移入を使用するヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) におけるアンチセンス BNO96 の過剰発現の結果としての腫瘍壊死因子 (T N F) 誘導による E - セレクチン発現に対する影響を示す。

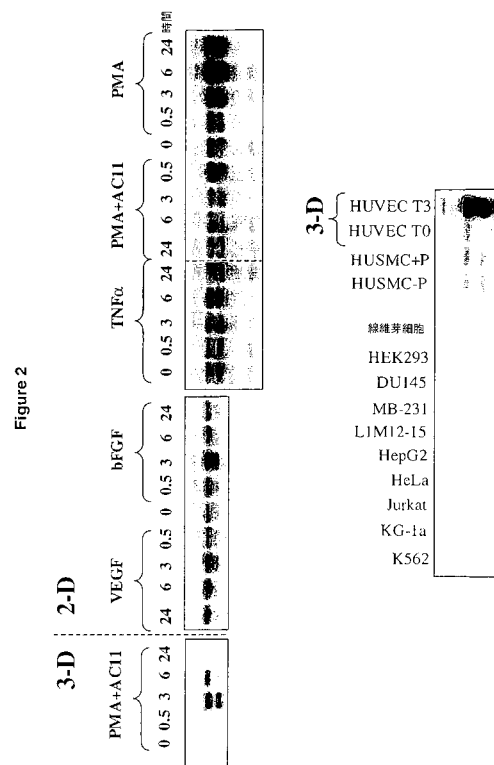
10

20

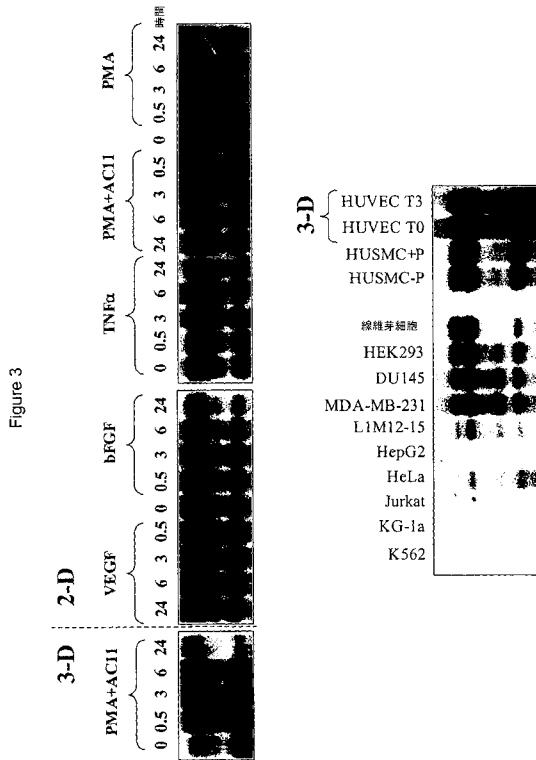
【図1】



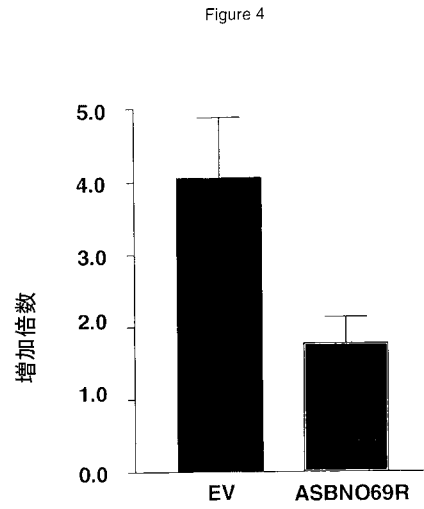
【図2】



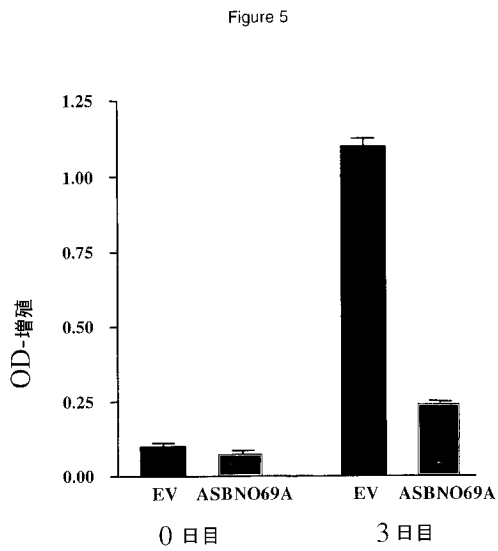
【 図 3 】



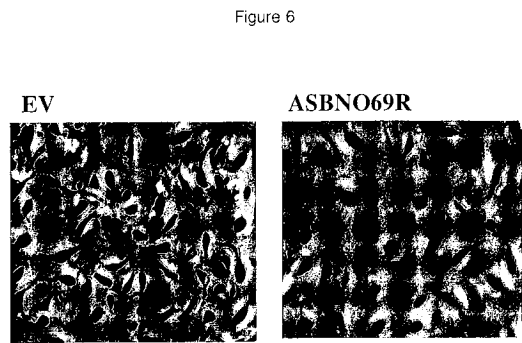
【 図 4 】



【 図 5 】

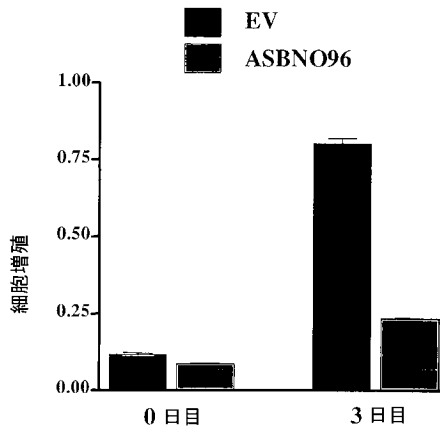


【 図 6 】



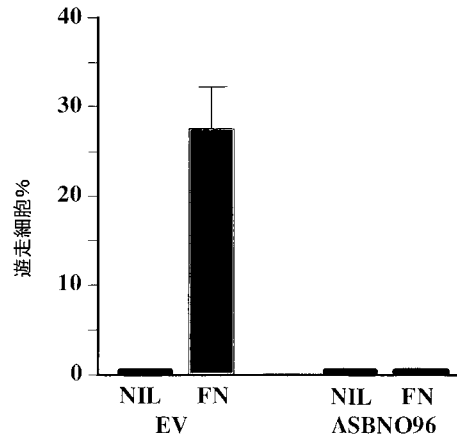
【 図 7 】

Figure 7



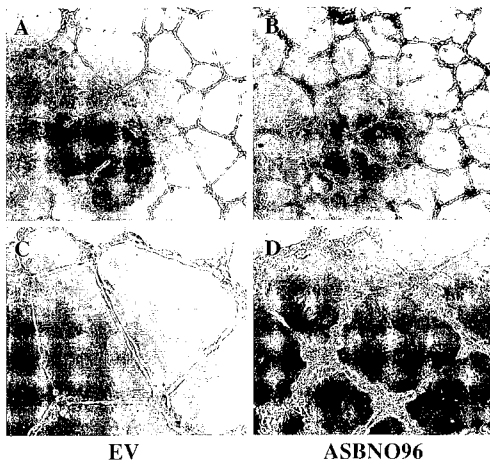
【 図 8 】

Figure 8



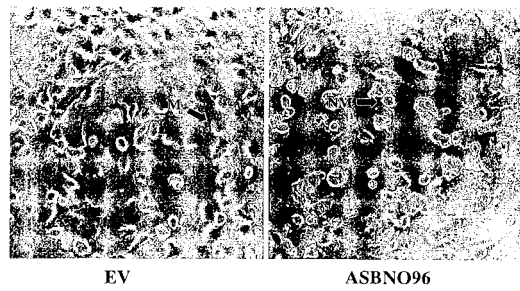
【 図 9 】

Figure 9



【 図 1 0 】

Figure 10



【 図 1 1 】

Figure 11

	基礎のE-セレクトリン (MFI)	4時間のTNF誘導によるE-セレクトリン (MFI)
正常 HUVEC	0.03	26.5
EV	0.6	20.9
ASGNG12	0.9	17.6

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 April 2003 (03.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/027285 A1

- (51) International Patent Classification: C12N 15/11
- (21) International Application Number: PCT/AU02/01282
- (22) International Filing Date:
19 September 2002 (19.09.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
PR 7973 27 September 2001 (27.09.2001) AU
PR 7974 27 September 2001 (27.09.2001) AU
PR 8210 11 October 2001 (11.10.2001) AU
PR 8532 29 October 2001 (29.10.2001) AU
PR 8838 13 November 2001 (13.11.2001) AU
2002951032 28 August 2002 (28.08.2002) AU
- (71) Applicant (for all designated States except US): **BIONOMICS LIMITED** [AU/AU]; 31 Daigleish Street, Thebarton, South Australia 5031 (AU).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **GAMBLE, Jennifer, Ruth** [AU/AU]; 8 Branch Road, Stirling, South Australia 5152 (AU); **HAHN, Christopher, Norman** [AU/AU]; 21 Wedgwood Road, Modbury Heights, South Australia 5092 (AU); **VADAS, Mathew, Alexander** [AU/AU]; 8 Branch Road, Stirling, South Australia 5152 (AU).
- (74) Agent: **GRIFFITH HACK**; 10/167 Eagle Street, GPO Box 3125, Brisbane, Queensland 4001 (AU).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, 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, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UZ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
with international search report
with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/027285 A1

(54) Title: DNA SEQUENCES FOR HUMAN ANGIOGENESIS GENES

(57) Abstract: An isolated nucleic acid molecule comprising the sequence set forth in one of SEQ ID Numbers: 1 to 20.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

DNA SEQUENCES FOR HUMAN ANGIOGENESIS GENESTechnical Field

The present invention relates to novel nucleic acid sequences ("angiogenic genes") involved in the process of angiogenesis. Each of the angiogenic genes encode a polypeptide that has a role in angiogenesis. In view of the realisation that these genes play a role in angiogenesis, the invention is also concerned with the therapy of pathologies associated with angiogenesis, the screening of drugs for pro- or anti-angiogenic activity, the diagnosis and prognosis of pathologies associated with angiogenesis, and in some cases the use of the nucleic acid sequences to identify and obtain full-length angiogenesis-related genes.

Background Art

The formation of new blood vessels from pre-existing vessels, a process termed angiogenesis, is essential for normal growth. Important angiogenic processes include those taking place in embryogenesis, renewal of the endometrium, formation and growth of the corpus luteum of pregnancy, wound healing and in the restoration of tissue structure and function after injury.

The formation of new capillaries requires a co-ordinated series of events mediated through the expression of multiple genes which may have either pro- or anti-angiogenic activities. The process begins with an angiogenic stimulus to existing vasculature, usually mediated by growth factors such as vascular endothelial growth factor or basic fibroblast growth factor. This is followed by degradation of the extracellular matrix, cell adhesion changes (and disruption), an increase in cell permeability, proliferation of endothelial cells (ECs) and migration of ECs towards the site of blood vessel formation. Subsequent processes include capillary tube or lumen formation, stabilisation and differentiation by the migrating ECs.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 2 -

In the (normal) healthy adult, angiogenesis is virtually arrested and occurs only when needed. However, a number of pathological situations are characterised by enhanced, uncontrolled angiogenesis. These conditions include cancer, rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, psoriasis and cardiovascular diseases such as atherosclerosis. In other pathologies such as ischaemic limb disease or in coronary artery disease, growing new vessels through the promotion of an expanding vasculature would be of benefit.

A number of *in vitro* assays have been established which are thought to mimic angiogenesis and these have provided important tools to examine the mechanisms by which the angiogenic process takes place and the genes most likely to be involved.

Lumen formation is a key step in angiogenesis. The presence of vacuoles within ECs undergoing angiogenesis have been reported and their involvement in lumen formation has been postulated (Folkman and Haudenschild, 1980; Gamble et al., 1993). The general mechanism of lumen formation suggested by Folkman and Haudenschild (1980), has been that vacuoles form within the cytoplasm of a number of aligned ECs which are later converted to a tube. The union of adjacent tubes results in the formation of a continuous unicellular capillary lumen. However, little is known about the changes in cell morphology leading to lumen formation or the signals required for ECs to construct this feature.

An *in vitro* model of angiogenesis has been created from human umbilical vein ECs plated onto a 3 dimensional collagen matrix (Gamble et al., 1993). In the presence of phorbol myristate acetate (PMA) these cells form capillary tubes within 24 hours. With the addition of anti-integrin antibodies, the usually unicellular tubes (thought to reflect an immature, poorly differentiated phenotype) are converted to form a multicellular lumen through the inhibition of cell-matrix interactions and promotion of

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 3 -

cell-cell interactions. This model has subsequently allowed the investigation of the morphological events which occur in lumen formation.

5 For the treatment of diseases associated with angiogenesis, understanding the molecular genetic mechanisms of the process is of paramount importance. The use of the *in vitro* model described above (Gamble et al., 1993), a model that reflects the critical events that occur during angiogenesis *in vivo* in a time dependant and
10 broadly synchronous manner, has provided a tool for the identification of the key genes involved.

A number of genes have been identified from this model to be differentially expressed during the angiogenesis process. Functional analysis of a subset of
15 these angiogenic genes and their effect on endothelial cell function and proliferation is described in detail below.

The isolation of these angiogenic genes has provided novel targets for the treatment of angiogenesis-related
20 disorders.

Disclosure of the Invention

The present invention provides isolated nucleic acid molecules, which have been shown to be regulated in their
25 expression during angiogenesis (see Tables 1 and 2).

In a first aspect of the present invention there is provided an isolated nucleic acid molecule as defined by SEQ ID Numbers: 1 to 20 and laid out in Table 1.

Following the realisation that these molecules, and
30 those listed in Table 2, are regulated in their expression during angiogenesis, the invention provides isolated nucleic acid molecules as defined by SEQ ID Numbers: 1 to 114, and laid out in Tables 1 and 2, or fragments thereof, that play a role in an angiogenic process. Such a process
35 may include, but is not restricted to, embryogenesis, menstrual cycle, wound repair, tumour angiogenesis and exercise induced muscle hypertrophy.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 4 -

In addition, the present invention provides isolated nucleic acid molecules as defined by SEQ ID Numbers: 1 to 114, and laid out in Tables 1 and 2 (hereinafter referred to as "angiogenic genes", "angiogenic nucleic acid molecules" or "angiogenic polypeptides" for the sake of convenience), or fragments thereof, that play a role in diseases associated with the angiogenic process. Diseases may include, but are not restricted to, cancer, rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, psoriasis, cardiovascular diseases such as atherosclerosis, ischaemic limb disease and coronary artery disease.

The invention also encompasses an isolated nucleic acid molecule that is at least 70% identical to any one of the angiogenic genes of the invention and which plays a role in the angiogenic process.

Such variants will have preferably at least about 85%, and most preferably at least about 95% sequence identity to the angiogenic genes. Any one of the polynucleotide variants described above can encode an amino acid sequence, which contains at least one functional or structural characteristic of the relevant angiogenic gene of the invention.

Sequence identity is typically calculated using the BLAST algorithm, described in Altschul *et al* (1997) with the BLOSUM62 default matrix.

The invention also encompasses an isolated nucleic acid molecule which hybridises under stringent conditions with any one of the angiogenic genes of the invention and which plays a role in an angiogenic process.

Hybridisation with PCR probes which are capable of detecting polynucleotide sequences, including genomic sequences, may be used to identify nucleic acid sequences which encode the relevant angiogenic gene. The specificity of the probe, whether it is made from a highly specific region, e.g., the 5' regulatory region, or from a less specific region, e.g., a conserved motif, and the stringency of the hybridisation or amplification will

determine whether the probe identifies only naturally occurring sequences encoding the angiogenic gene, allelic variants, or related sequences.

Probes may also be used for the detection of related sequences, and should preferably have at least 50% sequence identity to any of the angiogenic gene encoding sequences of the invention. The hybridisation probes of the subject invention may be DNA or RNA and may be derived from any one of the angiogenic gene sequences or from genomic sequences including promoters, enhancers, and introns of the angiogenic genes.

Means for producing specific hybridisation probes for DNAs encoding any one of the angiogenic genes include the cloning of polynucleotide sequences encoding the relevant angiogenic gene or its derivatives into vectors for the production of mRNA probes. Such vectors are known in the art, and are commercially available. Hybridisation probes may be labelled by radionuclides such as ^{32}P or ^{35}S , or by enzymatic labels, such as alkaline phosphatase coupled to the probe via avidin/biotin coupling systems, or other methods known in the art.

Under stringent conditions, hybridisation with ^{32}P labelled probes will most preferably occur at 42°C in 750 mM NaCl, 75 mM trisodium citrate, 2% SDS, 50% formamide, 1X Denhart's, 10% (w/v) dextran sulphate and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denatured salmon sperm DNA. Useful variations on these conditions will be readily apparent to those skilled in the art. The washing steps which follow hybridisation most preferably occur at 65°C in 15 mM NaCl, 1.5 mM trisodium citrate, and 1% SDS. Additional variations on these conditions will be readily apparent to those skilled in the art.

The nucleotide sequences of the present invention can be engineered using methods accepted in the art so as to alter angiogenic gene-encoding sequences for a variety of purposes. These include, but are not limited to, modification of the cloning, processing, and/or expression

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 6 -

of the gene product. PCR reassembly of gene fragments and the use of synthetic oligonucleotides allow the engineering of angiogenic gene nucleotide sequences. For example, oligonucleotide-mediated site-directed mutagenesis can introduce mutations that create new restriction sites, alter glycosylation patterns and produce splice variants etc.

As a result of the degeneracy of the genetic code, a number of polynucleotide sequences encoding the angiogenic genes of the invention, some that may have minimal similarity to the polynucleotide sequences of any known and naturally occurring gene, may be produced. Thus, the invention includes each and every possible variation of polynucleotide sequence that could be made by selecting combinations based on possible codon choices. These combinations are made in accordance with the standard triplet genetic code as applied to the polynucleotide sequence of the naturally occurring angiogenic gene, and all such variations are to be considered as being specifically disclosed.

The polynucleotides of this invention include RNA, cDNA, genomic DNA, synthetic forms, and mixed polymers, both sense and antisense strands, and may be chemically or biochemically modified, as will be appreciated by those skilled in the art. Such modifications include labels, methylation, intercalators, alkylators and modified linkages. In some instances it may be advantageous to produce nucleotide sequences encoding an angiogenic gene or its derivatives possessing a substantially different codon usage than that of the naturally occurring gene. For example, codons may be selected to increase the rate of expression of the peptide in a particular prokaryotic or eukaryotic host corresponding with the frequency that particular codons are utilized by the host. Other reasons to alter the nucleotide sequence encoding an angiogenic gene or its derivatives without altering the encoded amino acid sequence include the production of RNA transcripts

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 7 -

having more desirable properties, such as a greater half-life, than transcripts produced from the naturally occurring sequence.

The invention also encompasses production of the nucleic acid molecules of the invention, entirely by synthetic chemistry. Synthetic sequences may be inserted into expression vectors and cell systems that contain the necessary elements for transcriptional and translational control of the inserted coding sequence in a suitable host. These elements may include regulatory sequences, promoters, 5' and 3' untranslated regions and specific initiation signals (such as an ATG initiation codon and Kozak consensus sequence) which allow more efficient translation of sequences encoding the angiogenic genes. In cases where the complete coding sequence including its initiation codon and upstream regulatory sequences are inserted into the appropriate expression vector, additional control signals may not be needed. However, in cases where only coding sequence, or a fragment thereof, is inserted, exogenous translational control signals as described above should be provided by the vector. Such signals may be of various origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of enhancers appropriate for the particular host cell system used (Scharf et al., 1994).

Nucleic acid molecules that are complements of the sequences described herein may also be prepared.

The present invention allows for the preparation of purified polypeptides or proteins. In order to do this, host cells may be transfected with a nucleic acid molecule as described above. Typically, said host cells are transfected with an expression vector comprising a nucleic acid molecule according to the invention. A variety of expression vector/host systems may be utilized to contain and express the sequences. These include, but are not limited to, microorganisms such as bacteria transformed with plasmid or cosmid DNA expression vectors; yeast

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 8 -

transformed with yeast expression vectors; insect cell systems infected with viral expression vectors (e.g., baculovirus); or mouse or other animal or human tissue cell systems. Mammalian cells can also be used to express a protein that is encoded by a specific angiogenic gene of the invention using various expression vectors including plasmid, cosmid and viral systems such as a vaccinia virus expression system. The invention is not limited by the host cell employed.

10 The polynucleotide sequences, or variants thereof, of the present invention can be stably expressed in cell lines to allow long term production of recombinant proteins in mammalian systems. Sequences encoding any one of the angiogenic genes of the invention can be transformed into cell lines using expression vectors which may contain viral origins of replication and/or endogenous expression elements and a selectable marker gene on the same or on a separate vector. The selectable marker confers resistance to a selective agent, and its presence allows growth and recovery of cells which successfully express the introduced sequences. Resistant clones of stably transformed cells may be propagated using tissue culture techniques appropriate to the cell type.

25 The protein produced by a transformed cell may be secreted or retained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing polynucleotides which encode a protein may be designed to contain signal sequences which direct secretion of the protein through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane.

30 In addition, a host cell strain may be chosen for its ability to modulate expression of the inserted sequences or to process the expressed protein in the desired fashion. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, glycosylation, phosphorylation, and acylation. Post-translational cleavage of a "prepro" form of the protein may also be

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 9 -

used to specify protein targeting, folding, and/or activity. Different host cells having specific cellular machinery and characteristic mechanisms for post-translational activities (e.g., CHO or HeLa cells), are available from the American Type Culture Collection (ATCC) and may be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein.

When large quantities of protein are needed such as for antibody production, vectors which direct high levels of expression may be used such as those containing the T5 or T7 inducible bacteriophage promoter. The present invention also includes the use of the expression systems described above in generating and isolating fusion proteins which contain important functional domains of the protein. These fusion proteins are used for binding, structural and functional studies as well as for the generation of appropriate antibodies.

In order to express and purify the protein as a fusion protein, the appropriate polynucleotide sequences of the present invention are inserted into a vector which contains a nucleotide sequence encoding another peptide (for example, glutathione succinyl transferase). The fusion protein is expressed and recovered from prokaryotic or eukaryotic cells. The fusion protein can then be purified by affinity chromatography based upon the fusion vector sequence and the relevant protein can subsequently be obtained by enzymatic cleavage of the fusion protein.

Fragments of polypeptides of the present invention may also be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques. Automated synthesis may be achieved by using the ABI 431A Peptide Synthesizer (Perkin-Elmer). Various fragments of polypeptide may be synthesized separately and then combined to produce the full length molecule.

In instances where the isolated nucleic acid molecules of the invention represent only partial gene sequence, these partial sequences can be used to obtain

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 10 -

the corresponding sequence of the full-length angiogenic gene. Therefore, the present invention further provides the use of a partial nucleic acid molecule of the invention comprising a nucleotide sequence defined by any one of SEQ ID Numbers: 70, 72 to 73, 78, 83 to 87, 89, 160 or 174 to identify and/or obtain full-length human genes involved in the angiogenic process. Full-length angiogenic genes may be cloned using the partial nucleotide sequences of the invention by methods known *per se* to those skilled in the art. For example, *in silico* analysis of sequence databases such as those hosted at the National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) can be searched in order to obtain overlapping nucleotide sequence. This provides a "walking" strategy towards obtaining the full-length gene sequence. Appropriate databases to search at this site include the expressed sequence tag (EST) database (database of GenBank, EMBL and DDBJ sequences from their EST divisions) or the non redundant (nr) database (contains all GenBank, EMBL, DDBJ and PDB sequences but does not include EST, STS, GSS, or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences). Typically searches are performed using the BLAST algorithm described in Altschul et al (1997) with the BLOSUM62 default matrix. In instances where *in silico* "walking" approaches fail to retrieve the complete gene sequence, additional strategies may be employed. These include the use of "restriction-site PCR" will allows the retrieval of unknown sequence adjacent to a portion of DNA whose sequence is known. In this technique universal primers are used to retrieve unknown sequence. Inverse PCR may also be used, in which primers based on the known sequence are designed to amplify adjacent unknown sequences. These upstream sequences may include promoters and regulatory elements. In addition, various other PCR-based techniques may be used, for example a kit available from Clontech (Palo Alto, California) allows for a walking PCR technique, the 5'RACE kit (Gibco-BRL) allows isolation of additional 5'

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 11 -

gene sequence, while additional 3' sequence can be obtained using practised techniques (for eg see Gecz et al., 1997).

5 In a further aspect of the present invention there is provided an isolated polypeptide as defined by SEQ ID Numbers: 115 to 125 and laid out in Table 1.

The present invention also provides isolated polypeptides, which have been shown to be regulated in their expression during angiogenesis (see Tables 1 and 2).

10 More specifically, following the realisation that these polypeptides are regulated in their expression during angiogenesis, the invention provides isolated polypeptides as defined by SEQ ID Numbers: 115 to 216, and laid out in Tables 1 and 2, or fragments thereof, that
15 play a role in an angiogenic process. Such a process may include, but is not restricted to, embryogenesis, menstrual cycle, wound repair, tumour angiogenesis and exercise induced muscle hypertrophy.

In addition, the present invention provides isolated
20 polypeptides as defined by SEQ ID Numbers: 115 to 216, and laid out in Tables 1 and 2, or fragments thereof, that play a role in diseases associated with the angiogenic process. Diseases may include, but are not restricted to, cancer, rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy,
25 psoriasis, cardiovascular diseases such as atherosclerosis, ischaemic limb disease and coronary artery disease.

The invention also encompasses an isolated
30 polypeptide having at least 70%, preferably 85%, and more preferably 95%, identity to any one of SEQ ID Numbers: 115 to 216, and which plays a role in an angiogenic process.

Sequence identity is typically calculated using the BLAST algorithm, described in Altschul et al (1997) with the BLOSUM62 default matrix.

35 In a further aspect of the invention there is provided a method of preparing a polypeptide as described above, comprising the steps of:

- (1) culturing the host cells under conditions effective for production of the polypeptide; and
- (2) harvesting the polypeptide.

5 According to still another aspect of the invention there is provided a polypeptide which is the product of the process described above.

Substantially purified protein or fragments thereof can then be used in further biochemical analyses to establish secondary and tertiary structure for example by 10 x-ray crystallography of the protein or by nuclear magnetic resonance (NMR). Determination of structure allows for the rational design of pharmaceuticals to interact with the protein, alter protein charge configuration or charge interaction with other proteins, 15 or to alter its function in the cell.

The invention has provided a number of genes likely to be involved in angiogenesis. As angiogenesis is critical in a number of pathological processes, the invention therefore enables therapeutic methods for the 20 treatment of all angiogenesis-related disorders, and may enable the diagnosis or prognosis of all angiogenesis-related disorders associated with abnormalities in expression and/or function of any one of the angiogenic genes.

25 Examples of such disorders include, but are not limited to, cancer, rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, psoriasis, cardiovascular diseases such as atherosclerosis, ischaemic limb disease and coronary artery disease.

30 According to another aspect of the present invention there is provided a method of treating an angiogenesis-related disorder as described above, comprising administering a selective agonist or antagonist of an angiogenic gene or protein of the invention to a subject 35 in need of such treatment.

Still further there is provided the use of a selective agonist or antagonist of an angiogenic gene or

protein of the invention for the treatment of an angiogenesis-related disorder as described above.

For the treatment of angiogenesis-related disorders which result in uncontrolled or enhanced angiogenesis, including but not limited to, cancer, rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, psoriasis and cardiovascular diseases such as atherosclerosis, therapies which inhibit the expanding vasculature are desirable. This would involve inhibition of any one of the angiogenic genes or proteins that are able to promote angiogenesis, or enhancement, stimulation or re-activation of any one of the angiogenic genes or proteins that are able to inhibit angiogenesis.

For the treatment of angiogenesis-related disorders which are characterised by inhibited or decreased angiogenesis, including but not limited to, ischaemic limb disease and coronary artery disease, therapies which enhance or promote vascular expansion are desirable. This would involve inhibition of any one of the angiogenic genes or proteins that are able to restrict angiogenesis or enhancement, stimulation or re-activation of any one of the angiogenic genes or proteins that are able to promote angiogenesis.

For instance, antisense expression of BNO69 and BNO96 has been shown to inhibit endothelial cell growth and proliferation. Therefore, in the treatment of disorders where angiogenesis needs to be restricted, it would be desirable to inhibit the function of these genes. Alternatively, in the treatment of disorders where angiogenesis needs to be stimulated it may be desirable to enhance the function of these genes.

For each of these cases, the relevant therapy will be useful in treating angiogenesis-related disorders regardless of whether there is a lesion in the angiogenic gene.

Inhibiting gene or protein function

Inhibiting the function of a gene or protein can be achieved in a variety of ways. Antisense nucleic acid methodologies represent one approach to inactivate genes whose altered expression is causative of a disorder. In one aspect of the invention an isolated nucleic acid molecule, which is the complement of any one of the relevant angiogenic nucleic acid molecules described above and which encodes an RNA molecule that hybridises with the mRNA encoded by the relevant angiogenic gene of the invention, may be administered to a subject in need of such treatment. Typically, a complement to any relevant one of the angiogenic genes is administered to a subject to treat or prevent an angiogenesis-related disorder.

In a further aspect of the invention there is provided the use of an isolated nucleic acid molecule which is the complement of any one of the relevant nucleic acid molecules of the invention and which encodes an RNA molecule that hybridises with the mRNA encoded by the relevant angiogenic gene of the invention, in the manufacture of a medicament for the treatment of an angiogenesis-related disorder.

Typically, a vector expressing the complement of a polynucleotide encoding any one of the relevant angiogenic genes may be administered to a subject to treat or prevent an angiogenesis-related disorder including, but not limited to, those described above. Many methods for introducing vectors into cells or tissues are available and equally suitable for use *in vivo*, *in vitro*, and *ex vivo*. For *ex vivo* therapy, vectors may be introduced into stem cells taken from the patient and clonally propagated for autologous transplant back into that same patient. Delivery by transfection, by liposome injections, or by polycationic amino polymers may be achieved using methods which are well known in the art. (For example, see Goldman *et al.*, 1997).

Additional antisense or gene-targeted silencing strategies may include, but are not limited to, the use of antisense oligonucleotides, injection of antisense RNA, transfection of antisense RNA expression vectors, and the use of RNA interference (RNAi) or short interfering RNAs (siRNA). Still further, catalytic nucleic acid molecules such as DNazymes and ribozymes may be used for gene silencing (Breaker and Joyce, 1994; Haseloff and Gerlach, 1988). These molecules function by cleaving their target mRNA molecule rather than merely binding to it as in traditional antisense approaches.

In a further aspect purified protein according to the invention may be used to produce antibodies which specifically bind any relevant angiogenic protein of the invention. These antibodies may be used directly as an antagonist or indirectly as a targeting or delivery mechanism for bringing a pharmaceutical agent to cells or tissues that express the relevant angiogenic protein. Such antibodies may include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric and single chain antibodies as would be understood by the person skilled in the art.

For the production of antibodies, various hosts including rabbits, rats, goats, mice, humans, and others may be immunized by injection with a protein of the invention or with any fragment or oligopeptide thereof, which has immunogenic properties. Various adjuvants may be used to increase immunological response and include, but are not limited to, Freund's, mineral gels such as aluminum hydroxide, and surface-active substances such as lysolecithin. Adjuvants used in humans include BCG (bacilli Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum*.

It is preferred that the oligopeptides, peptides, or fragments used to induce antibodies to the relevant angiogenic protein have an amino acid sequence consisting of at least about 5 amino acids, and, more preferably, of at least about 10 amino acids. It is also preferable that

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 16 -

these oligopeptides, peptides, or fragments are identical to a portion of the amino acid sequence of the natural protein and contain the entire amino acid sequence of a small, naturally occurring molecule. Short stretches of amino acids from these proteins may be fused with those of another protein, such as KLH, and antibodies to the chimeric molecule may be produced.

Monoclonal antibodies to any relevant angiogenic protein may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique. (For example, see Kohler et al., 1975; Kozbor et al., 1985; Cote et al., 1983; Cole et al., 1984).

Monoclonal antibodies produced may include, but are not limited to, mouse-derived antibodies, humanised antibodies and fully human antibodies.

Antibodies may also be produced by inducing in vivo production in the lymphocyte population or by screening immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in the literature. (For example, see Orlandi et al., 1989; Winter et al., 1991).

Antibody fragments which contain specific binding sites for any relevant angiogenic protein may also be generated. For example, such fragments include, F(ab')₂ fragments produced by pepsin digestion of the antibody molecule and Fab fragments generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity. (For example, see Huse et al., 1989).

Various immunoassays may be used for screening to identify antibodies having the desired specificity. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays using either polyclonal or

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 17 -

monoclonal antibodies with established specificities are well known in the art. Such immunoassays typically involve the measurement of complex formation between a protein and its specific antibody. A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes is preferred, but a competitive binding assay may also be employed.

In a further aspect, antagonists may include peptides, phosphopeptides or small organic or inorganic compounds. These antagonists should disrupt the function of any relevant angiogenic gene of the invention so as to provide the necessary therapeutic effect.

Peptides, phosphopeptides or small organic or inorganic compounds suitable for therapeutic applications may be identified using nucleic acids and polypeptides of the invention in drug screening applications as described below.

Enhancing gene or protein function

Enhancing, stimulating or re-activating a gene's or protein's function can be achieved in a variety of ways. In one aspect of the invention administration of an isolated nucleic acid molecule, as described above, to a subject in need of such treatment may be initiated. Typically, any relevant angiogenic gene of the invention can be administered to a subject to treat or prevent an angiogenesis-related disorder.

In a further aspect, there is provided the use of an isolated nucleic acid molecule, as described above, in the manufacture of a medicament for the treatment of an angiogenesis-related disorder.

Typically, a vector capable of expressing any relevant angiogenic gene, or a fragment or derivative thereof, may be administered to a subject to treat or prevent a disorder including, but not limited to, those described above. Transducing retroviral vectors are often used for somatic cell gene therapy because of their high

efficiency of infection and stable integration and expression. Any relevant full-length gene, or portions thereof, can be cloned into a retroviral vector and expression may be driven from its endogenous promoter or from the retroviral long terminal repeat or from a promoter specific for the target cell type of interest. Other viral vectors can be used and include, as is known in the art, adenoviruses, adeno-associated viruses, vaccinia viruses, papovaviruses, lentiviruses and retroviruses of avian, murine and human origin.

Gene therapy would be carried out according to established methods (Friedman, 1991; Culver, 1996). A vector containing a copy of any relevant angiogenic gene linked to expression control elements and capable of replicating inside the cells is prepared. Alternatively the vector may be replication deficient and may require helper cells for replication and use in gene therapy.

Gene transfer using non-viral methods of infection *in vitro* can also be used. These methods include direct injection of DNA, uptake of naked DNA in the presence of calcium phosphate, electroporation, protoplast fusion or liposome delivery. Gene transfer can also be achieved by delivery as a part of a human artificial chromosome or receptor-mediated gene transfer. This involves linking the DNA to a targeting molecule that will bind to specific cell-surface receptors to induce endocytosis and transfer of the DNA into mammalian cells. One such technique uses poly-L-lysine to link asialoglycoprotein to DNA. An adenovirus is also added to the complex to disrupt the lysosomes and thus allow the DNA to avoid degradation and move to the nucleus. Infusion of these particles intravenously has resulted in gene transfer into hepatocytes.

Although not identified to date, it is possible that certain individuals with angiogenesis-related disorders contain an abnormality in any one of the angiogenic genes of the invention. Therefore, in affected subjects that

have decreased expression or activity of an angiogenic gene, a mechanism of down-regulation may be due to abnormal methylation of promoter regions of those angiogenic genes which contain CpG islands. Therefore in an alternative approach to therapy, administration of agents that remove abnormal promoter methylation may reactivate gene expression and restore normal function to the affected cell.

In affected subjects that express a mutated form of any one of the angiogenic genes of the invention it may be possible to prevent the disorder by introducing into the affected cells a wild-type copy of the gene such that it recombines with the mutant gene. This requires a double recombination event for the correction of the gene mutation. Vectors for the introduction of genes in these ways are known in the art, and any suitable vector may be used. Alternatively, introducing another copy of the gene bearing a second mutation in that gene may be employed so as to negate the original gene mutation and block any negative effect.

In a still further aspect, there is provided a method of treating an angiogenesis-related disorder comprising administering a polypeptide, as described above, or an agonist thereof, to a subject in need of such treatment.

In another aspect the invention provides the use of a polypeptide as described above, or an agonist thereof, in the manufacture of a medicament for the treatment of an angiogenesis-related disorder. Examples of such disorders are described above.

In a further aspect, a suitable agonist may also include peptides, phosphopeptides or small organic or inorganic compounds that can mimic the function of any relevant angiogenic gene, or may include an antibody to any relevant angiogenic gene that is able to restore function to a normal level.

Peptides, phosphopeptides or small organic or inorganic compounds suitable for therapeutic applications

may be identified using nucleic acids and polypeptides of the invention in drug screening applications as described below.

In further embodiments, any of the agonists, antagonists, complementary sequences, nucleic acid molecules, proteins, antibodies, or vectors of the invention may be administered in combination with other appropriate therapeutic agents. Selection of the appropriate agents may be made by those skilled in the art, according to conventional pharmaceutical principles. The combination of therapeutic agents may act synergistically to effect the treatment or prevention of the various disorders described above. Using this approach, therapeutic efficacy with lower dosages of each agent may be possible, thus reducing the potential for adverse side effects.

Any of the therapeutic methods described above may be applied to any subject in need of such therapy, including, for example, mammals such as dogs, cats, cows, horses, rabbits, monkeys, and most preferably, humans.

Drug screening

According to still another aspect of the invention, nucleic acid molecules of the invention as well as peptides of the invention, particularly any relevant purified angiogenic polypeptides or fragments thereof, and cells expressing these are useful for screening of candidate pharmaceutical compounds in a variety of techniques for the treatment of angiogenesis-related disorders.

Still further, it provides the use wherein high throughput screening techniques are employed.

Compounds that can be screened in accordance with the invention include, but are not limited to peptides (such as soluble peptides), phosphopeptides and small organic or inorganic molecules (such as natural product or synthetic chemical libraries and peptidomimetics).

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 21 -

In one embodiment, a screening assay may include a cell-based assay utilising eukaryotic or prokaryotic host cells that are stably transformed with recombinant nucleic acid molecules expressing the relevant angiogenic polypeptide or fragment, in competitive binding assays. Binding assays will measure for the formation of complexes between the relevant polypeptide or fragments thereof and the compound being tested, or will measure the degree to which a compound being tested will interfere with the formation of a complex between the relevant polypeptide or fragment thereof, and its interactor or ligand.

Non cell-based assays may also be used for identifying compounds that interrupt binding between the polypeptides of the invention and their interactors. Such assays are known in the art and include for example AlphaScreen technology (PerkinElmer Life Sciences, MA, USA). This application relies on the use of beads such that each interaction partner is bound to a separate bead via an antibody. Interaction of each partner will bring the beads into proximity, such that laser excitation initiates a number of chemical reactions ultimately leading to fluorophores emitting a light signal. Candidate compounds that disrupt the binding of the relevant angiogenic polypeptide with its interactor will result in no light emission enabling identification and isolation of the responsible compound.

High-throughput drug screening techniques may also employ methods as described in WO84/03564. Small peptide test compounds synthesised on a solid substrate can be assayed through relevant angiogenic polypeptide binding and washing. The relevant bound angiogenic polypeptide is then detected by methods well known in the art. In a variation of this technique, purified angiogenic polypeptides can be coated directly onto plates to identify interacting test compounds.

An additional method for drug screening involves the use of host eukaryotic cell lines which carry mutations in

any relevant angiogenic gene of the invention. The host cell lines are also defective at the polypeptide level. Other cell lines may be used where the gene expression of the relevant angiogenic gene can be regulated (i.e. over-expressed, under-expressed, or switched off). The host cell lines or cells are grown in the presence of various drug compounds and the rate of growth of the host cells is measured to determine if the compound is capable of regulating the growth of defective cells.

The angiogenic polypeptides of the present invention may also be used for screening compounds developed as a result of combinatorial library technology. This provides a way to test a large number of different substances for their ability to modulate activity of a polypeptide. The use of peptide libraries is preferred (see WO 97/02048) with such libraries and their use known in the art.

A substance identified as a modulator of polypeptide function may be peptide or non-peptide in nature. Non-peptide "small molecules" are often preferred for many *in vivo* pharmaceutical applications. In addition, a mimic or mimetic of the substance may be designed for pharmaceutical use. The design of mimetics based on a known pharmaceutically active compound ("lead" compound) is a common approach to the development of novel pharmaceuticals. This is often desirable where the original active compound is difficult or expensive to synthesise or where it provides an unsuitable method of administration. In the design of a mimetic, particular parts of the original active compound that are important in determining the target property are identified. These parts or residues constituting the active region of the compound are known as its pharmacophore. Once found, the pharmacophore structure is modelled according to its physical properties using data from a range of sources including x-ray diffraction data and NMR. A template molecule is then selected onto which chemical groups which mimic the pharmacophore can be added. The selection can be

made such that the mimetic is easy to synthesise, is likely to be pharmacologically acceptable, does not degrade *in vivo* and retains the biological activity of the lead compound. Further optimisation or modification can be carried out to select one or more final mimetics useful for *in vivo* or clinical testing.

It is also possible to isolate a target-specific antibody and then solve its crystal structure. In principle, this approach yields a pharmacophore upon which subsequent drug design can be based as described above. It may be possible to avoid protein crystallography altogether by generating anti-idiotypic antibodies (anti-ids) to a functional, pharmacologically active antibody. As a mirror image of a mirror image, the binding site of the anti-ids would be expected to be an analogue of the original binding site. The anti-id could then be used to isolate peptides from chemically or biologically produced peptide banks.

Another alternative method for drug screening relies on structure-based rational drug design. Determination of the three dimensional structure of the polypeptides of the invention, or the three dimensional structure of the protein complexes which may incorporate these polypeptides allows for structure-based drug design to identify biologically active lead compounds.

Three dimensional structural models can be generated by a number of applications, some of which include experimental models such as x-ray crystallography and NMR and/or from *in silico* studies using information from structural databases such as the Protein Databank (PDB). In addition, three dimensional structural models can be determined using a number of known protein structure prediction techniques based on the primary sequences of the polypeptides (e.g. SYBYL - Tripos Associated, St. Louis, MO), *de novo* protein structure design programs (e.g. MODELER - MSI Inc., San Diego, CA, or MOE - Chemical

Computing Group, Montreal, Canada) or *ab initio* methods (e.g. see US Patent Numbers 5331573 and 5579250).

Once the three dimensional structure of a polypeptide or polypeptide complex has been determined, structure-based drug discovery techniques can be employed to design biologically-active compounds based on these three dimensional structures. Such techniques are known in the art and include examples such as DOCK (University of California, San Francisco) or AUTODOCK (Scripps Research Institute, La Jolla, California). A computational docking protocol will identify the active site or sites that are deemed important for protein activity based on a predicted protein model. Molecular databases, such as the Available Chemicals Directory (ACD) are then screened for molecules that complement the protein model.

Using methods such as these, potential clinical drug candidates can be identified and computationally ranked in order to reduce the time and expense associated with typical 'wet lab' drug screening methodologies.

Compounds identified from the screening methods described above form a part of the present invention, as do pharmaceutical compositions containing these and a pharmaceutically acceptable carrier.

Pharmaceutical Preparations

Compounds identified from screening assays as indicated above can be administered to a patient at a therapeutically effective dose to treat or ameliorate a disorder associated with angiogenesis. A therapeutically effective dose refers to that amount of the compound sufficient to result in amelioration of symptoms of the disorder.

Toxicity and therapeutic efficacy of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals. The data obtained from these studies can then be used in the formulation of a range of dosages for use in humans.

Pharmaceutical compositions for use in accordance with the present invention can be formulated in a conventional manner using one or more physiological acceptable carriers, excipients or stabilisers which are well known. Acceptable carriers, excipients or stabilizers are non-toxic at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; binding agents including hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or non-ionic surfactants such as Tween, Pluronic or polyethylene glycol (PEG).

The formulation of pharmaceutical compositions for use in accordance with the present invention will be based on the proposed route of administration. Routes of administration may include, but are not limited to, inhalation, insufflation (either through the mouth or nose), oral, buccal, rectal or parental administration.

Diagnostic and prognostic applications

Should abnormalities in any one of the angiogenic genes of the invention exist, which alter activity and/or expression of the gene to give rise to angiogenesis-related disorders, the polynucleotides and polypeptides of the invention may be used for the diagnosis or prognosis of these disorders, or a predisposition to such disorders. Examples of such disorders include, but are not limited to, cancer, rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, psoriasis, cardiovascular diseases such as atherosclerosis, ischaemic limb disease and coronary

artery disease. Diagnosis or prognosis may be used to determine the severity, type or stage of the disease state in order to initiate an appropriate therapeutic intervention.

5 In another embodiment of the invention, the polynucleotides that may be used for diagnostic or prognostic purposes include oligonucleotide sequences, genomic DNA and complementary RNA and DNA molecules. The polynucleotides may be used to detect and quantitate gene
10 expression in biopsied tissues in which abnormal expression or mutations in any one of the angiogenic genes may be correlated with disease. Genomic DNA used for the diagnosis or prognosis may be obtained from body cells, such as those present in the blood, tissue biopsy,
15 surgical specimen, or autopsy material. The DNA may be isolated and used directly for detection of a specific sequence or may be amplified by the polymerase chain reaction (PCR) prior to analysis. Similarly, RNA or cDNA may also be used, with or without PCR amplification. To
20 detect a specific nucleic acid sequence, direct nucleotide sequencing, reverse transcriptase PCR (RT-PCR), hybridisation using specific oligonucleotides, restriction enzyme digest and mapping, PCR mapping, RNase protection, and various other methods may be employed.
25 Oligonucleotides specific to particular sequences can be chemically synthesized and labelled radioactively or nonradioactively and hybridised to individual samples immobilized on membranes or other solid-supports or in solution. The presence, absence or excess expression of
30 any one of the angiogenic genes may then be visualized using methods such as autoradiography, fluorometry, or colorimetry.

In a particular aspect, the nucleotide sequences of the invention may be useful in assays that detect the
35 presence of associated disorders, particularly those mentioned previously. The nucleotide sequences may be labelled by standard methods and added to a fluid or

tissue sample from a patient under conditions suitable for the formation of hybridisation complexes. After a suitable incubation period, the sample is washed and the signal is quantitated and compared with a standard value. If the amount of signal in the patient sample is significantly altered in comparison to a control sample then the presence of altered levels of nucleotide sequences in the sample indicates the presence of the associated disorder. Such assays may also be used to evaluate the efficacy of a particular therapeutic treatment regimen in animal studies, in clinical trials, or to monitor the treatment of an individual patient.

In order to provide a basis for the diagnosis or prognosis of an angiogenesis-related disorder associated with a mutation in any one of the angiogenic genes of the invention, the nucleotide sequence of the relevant gene can be compared between normal tissue and diseased tissue in order to establish whether the patient expresses a mutant gene.

In order to provide a basis for the diagnosis of a disorder associated with abnormal expression of any one of the angiogenic genes of the invention, a normal or standard profile for expression is established. This may be accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with a sequence, or a fragment thereof, encoding the relevant angiogenic gene, under conditions suitable for hybridisation or amplification. Standard hybridisation may be quantified by comparing the values obtained from normal subjects with values from an experiment in which a known amount of a substantially purified polynucleotide is used. Another method to identify a normal or standard profile for expression of any one of the angiogenic genes is through quantitative RT-PCR studies. RNA isolated from body cells of a normal individual, particularly RNA isolated from endothelial cells, is reverse transcribed and real-time PCR using oligonucleotides specific for the

relevant gene is conducted to establish a normal level of expression of the gene. Standard values obtained in both these examples may be compared with values obtained from samples from patients who are symptomatic for a disorder. Deviation from standard values is used to establish the presence of a disorder.

Once the presence of a disorder is established and a treatment protocol is initiated, hybridisation assays or quantitative RT-PCR studies may be repeated on a regular basis to determine if the level of expression in the patient begins to approximate that which is observed in the normal subject. The results obtained from successive assays may be used to show the efficacy of treatment over a period ranging from several days to months.

According to a further aspect of the invention there is provided the use of an angiogenic polypeptide as described above in the diagnosis or prognosis of an angiogenesis-related disorder associated with any one of angiogenic genes of the invention, or a predisposition to such disorders.

When a diagnostic or prognostic assay is to be based upon any relevant angiogenic polypeptide, a variety of approaches are possible. For example, diagnosis or prognosis can be achieved by monitoring differences in the electrophoretic mobility of normal and mutant proteins. Such an approach will be particularly useful in identifying mutants in which charge substitutions are present, or in which insertions, deletions or substitutions have resulted in a significant change in the electrophoretic migration of the resultant protein. Alternatively, diagnosis or prognosis may be based upon differences in the proteolytic cleavage patterns of normal and mutant proteins, differences in molar ratios of the various amino acid residues, or by functional assays demonstrating altered function of the gene products.

In another aspect, antibodies that specifically bind the relevant angiogenic gene product may be used for the

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 29 -

diagnosis or prognosis of disorders characterized by abnormal expression of the gene, or in assays to monitor patients being treated with the relevant angiogenic gene or protein or agonists, antagonists, or inhibitors thereof. Antibodies useful for diagnostic or prognostic purposes may be prepared in the same manner as described above for therapeutics. Diagnostic or prognostic assays may include methods that utilize the antibody and a label to detect the relevant protein in human body fluids or in extracts of cells or tissues. The antibodies may be used with or without modification, and may be labelled by covalent or non-covalent attachment of a reporter molecule.

A variety of protocols for measuring the relevant angiogenic polypeptide, including ELISAs, RIAs, and FACS, are known in the art and provide a basis for diagnosing altered or abnormal levels of expression. Normal or standard values for expression are established by combining body fluids or cell extracts taken from normal mammalian subjects, preferably human, with antibody to the relevant protein under conditions suitable for complex formation. The amount of standard complex formation may be quantitated by various methods, preferably by photometric means. Quantities of protein expressed in subject, control, and disease samples from biopsied tissues are compared with the standard values. Deviation between standard and subject values establishes the parameters for diagnosing disease.

Once an individual has been diagnosed or prognosed with a disorder, effective treatments can be initiated, as described above. In the treatment of angiogenesis-related diseases which are characterised by uncontrolled or enhanced angiogenesis, the expanding vasculature needs to be inhibited. This would involve inhibiting the relevant angiogenic genes or proteins of the invention that promote angiogenesis. In addition, treatment may also need to stimulate expression or function of the relevant

angiogenic genes or proteins of the invention whose normal role is to inhibit angiogenesis but whose activity is reduced or absent in the affected individual.

5 In the treatment of angiogenesis-related diseases which are characterised by inhibited or decreased angiogenesis, approaches which enhance or promote vascular expansion are desirable. This may be achieved using methods essentially as described above but will involve stimulating the expression or function of the relevant
10 angiogenic gene or protein whose normal role is to promote angiogenesis but whose activity is reduced or absent in the affected individual. Alternatively, inhibiting genes or proteins that restrict angiogenesis may also be an approach to treatment.

15 Microarray

In further embodiments, complete cDNAs, oligonucleotides or longer fragments derived from any of the polynucleotide sequences described herein may be used
20 as probes in a microarray. The microarray can be used to monitor the expression level of large numbers of genes simultaneously and to identify genetic variants, mutations, and polymorphisms. This information may be used to determine gene function, to understand the genetic
25 basis of a disorder, to diagnose or prognose a disorder, and to develop and monitor the activities of therapeutic agents. Microarrays may be prepared, used, and analysed using methods known in the art. (For example, see Schena et al., 1996; Heller et al., 1997).

30 Transformed hosts

The present invention also provides for the production of genetically modified (knock-out, knock-in and transgenic), non-human animal models transformed with
35 the nucleic acid molecules of the invention. These animals are useful for the study of the function of the relevant angiogenic gene, to study the mechanisms of disease as

related to these genes, for the screening of candidate pharmaceutical compounds, for the creation of explanted mammalian cell cultures which express the protein or mutant protein and for the evaluation of potential therapeutic interventions.

5 Animal species which are suitable for use in the animal models of the present invention include, but are not limited to, rats, mice, hamsters, guinea pigs, rabbits, dogs, cats, goats, sheep, pigs, and non-human
10 primates such as monkeys and chimpanzees. For initial studies, genetically modified mice and rats are highly desirable due to the relative ease in generating knock-in, knock-out or transgenics of these animals, their ease of maintenance and their shorter life spans. For certain
15 studies, transgenic yeast or invertebrates may be suitable and preferred because they allow for rapid screening and provide for much easier handling. For longer term studies, non-human primates may be desired due to their similarity with humans.

20 To create an animal model based on any one of the angiogenic genes of the invention, several methods can be employed. These include generation of a specific mutation in a homologous animal gene, insertion of a wild type human gene and/or a humanized animal gene by homologous
25 recombination, insertion of a mutant (single or multiple) human gene as genomic or minigene cDNA constructs using wild type or mutant or artificial promoter elements, or insertion of artificially modified fragments of the endogenous gene by homologous recombination. The
30 modifications include insertion of mutant stop codons, the deletion of DNA sequences, or the inclusion of recombination elements (lox p sites) recognized by enzymes such as Cre recombinase.

To create transgenic mice in order to study gain of
35 gene function *in vivo*, any relevant angiogenic gene can be inserted into a mouse germ line using standard techniques such as oocyte microinjection. Gain of gene function can

mean the overexpression of a gene and its protein product, or the genetic complementation of a mutation of the gene under investigation. For oocyte injection, one or more copies of the wild type or mutant gene can be inserted into the pronucleus of a just-fertilized mouse oocyte. This oocyte is then reimplanted into a pseudo-pregnant foster mother. The liveborn mice can then be screened for integrants using analysis of tail DNA for the presence of the relevant human angiogenic gene sequence. The transgene can be either a complete genomic sequence injected as a YAC, BAC, PAC or other chromosome DNA fragment, a cDNA with either the natural promoter or a heterologous promoter, or a minigene containing all of the coding region and other elements found to be necessary for optimum expression.

To generate knock-out mice or knock-in mice, gene targeting through homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells may be applied. Knock-out mice are generated to study loss of gene function *in vivo* while knock-in mice allow the study of gain of function or to study the effect of specific gene mutations. Knock-in mice are similar to transgenic mice however the integration site and copy number are defined in the former.

For knock-out mouse generation, gene targeting vectors can be designed such that they delete (knock-out) the protein coding sequence of the relevant angiogenic gene in the mouse genome. In contrast, knock-in mice can be produced whereby a gene targeting vector containing the relevant angiogenic gene can integrate into a defined genetic locus in the mouse genome. For both applications, homologous recombination is catalysed by specific DNA repair enzymes that recognise homologous DNA sequences and exchange them via double crossover.

Gene targeting vectors are usually introduced into ES cells using electroporation. ES cell integrants are then isolated via an antibiotic resistance gene present on the targeting vector and are subsequently genotyped to

identify those ES cell clones in which the gene under investigation has integrated into the locus of interest. The appropriate ES cells are then transmitted through the germline to produce a novel mouse strain.

5 In instances where gene ablation results in early embryonic lethality, conditional gene targeting may be employed. This allows genes to be deleted in a temporally and spatially controlled fashion. As above, appropriate ES
10 cells are transmitted through the germline to produce a novel mouse strain, however the actual deletion of the gene is performed in the adult mouse in a tissue specific or time controlled manner. Conditional gene targeting is most commonly achieved by use of the cre/lox system. The enzyme cre is able to recognise the 34 base pair loxP
15 sequence such that loxP flanked (or floxed) DNA is recognised and excised by cre. Tissue specific cre expression in transgenic mice enables the generation of tissue specific knock-out mice by mating gene targeted floxed mice with cre transgenic mice. Knock-out can be
20 conducted in every tissue (Schwenk et al., 1995) using the 'deleter' mouse or using transgenic mice with an inducible cre gene (such as those with tetracycline inducible cre genes), or knock-out can be tissue specific for example through the use of the CD19-cre mouse (Rickert et al.,
25 1997).

According to still another aspect of the invention there is provided the use of genetically modified non-human animals for the screening of candidate pharmaceutical compounds.

30 It will be clearly understood that, although a number of prior art publications are referred to herein, this reference does not constitute an admission that any of these documents forms part of the common general knowledge in the art, in Australia or in any other country.
35 Throughout this specification and the claims, the words "comprise", "comprises" and "comprising" are used in a non-exclusive sense, except where the context requires

otherwise.

Brief Description of the Drawings

5 Figure 1. Examples of the classes of expression patterns of a number of angiogenic genes during angiogenesis as confirmed by Virtual Northern expression analysis. Each blot was probed with the control GAPDH1 gene to confirm loading of uniform cDNA amounts in blot construction between the defined time points of the assay.

10 Figure 2. Detailed Virtual Northern expression analysis of the BNO69 gene. The top panels indicate the level of expression of BNO69 at varying time points in the *in vitro* model following stimulation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) with phorbol myristate acetate (PMA) plus or minus ($\alpha 2\beta 1$) antibody (AC11), vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) or tumour necrosis factor (TNF). The lower panel shows expression levels of BNO69 in a number of human cell lines including K562
20 (erythroleukaemia), KG-1a (acute myelogenous leukaemia), Jurkat (acute T cell leukaemia), HeLa (cervical adenocarcinoma), HepG2 (liver tumour), LIM12-15 (colorectal carcinoma), MDA-MB-231 (breast cancer), DU145 (prostate cancer), HEK293 (embryonic kidney), HUSMC (primary umbilical vein smooth muscle cells) \pm P (PMA). HUVEC T0 and HUVEC T3 represent HUVECs harvested from the 3-D model of angiogenesis at time 0 hours and 3 hours respectively.

30 Figure 3. Detailed Virtual Northern expression analysis of the BNO96 gene. The top panels indicate the level of expression of BNO96 at varying time points in the *in vitro* model following stimulation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) with phorbol myristate acetate (PMA) plus or minus ($\alpha 2\beta 1$) antibody (AC11), vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) or tumour necrosis factor (TNF). The lower panel shows expression levels of BNO69 in
35

a number of human cell lines including K562 (erythroleukaemia), KG-1a (acute myelogenous leukaemia), Jurkat (acute T cell leukaemia), HeLa (cervical adenocarcinoma), HepG2 (liver tumour), LIM12-15 (colorectal carcinoma), MDA-MB-231 (breast cancer), DU145 (prostate cancer), HEK293 (embryonic kidney), HUSMC (primary umbilical vein smooth muscle cells) \pm P (PMA). HUVEC T0 and HUVEC T3 represent HUVECs harvested from the 3-D model of angiogenesis at time 0 hours and 3 hours respectively.

Figure 4. BNO69 *in vitro* regulation of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) function using retroviral-mediated gene transfer. The proliferation of HUVECs was measured over a 3 day period by direct cell counts. The mean \pm SEM is given. Over-expression of antisense BNO69 (ASBNO69R) in HUVECs inhibits their proliferation. EV: Empty vector control.

Figure 5. BNO69 *in vitro* regulation of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) function using adenoviral-mediated gene transfer. Over-expression of antisense BNO69 (ASBNO69A) in HUVECs leads to an inhibitory effect on cell proliferation.

Figure 6. BNO69 *in vitro* regulation of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) function using retroviral-mediated gene transfer. Cell morphology of endothelial cells retrovirally transfected with either empty vector (EV) control or antisense BNO69 (ASBNO69R) is shown.

Figure 7. Cell proliferation assay based on the over-expression of antisense BNO96 in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) using adenoviral-mediated gene transfer. Cells were infected with either vector only control (EV) or antisense BNO96 (ASBNO96), and harvested 48 hours later. Cell proliferation was measured by the colorimetric MTT assay performed 3 days after cell plating (mean \pm SEM, n = 4).

Figure 8. Effect on cell migration as a result of

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 36 -

over-expression of antisense BNO96 in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) using adenoviral-mediated gene transfer. Cells were infected with either vector only control (EV) or antisense BNO96 (ASBNO96) and migration of cells towards either no agent (Nil) or the chemotactic stimulant fibronectin (Fn) was measured after 18-24 hours.

5
10
15
Figure 9. Effect on capillary tube formation on Matrigel as a result of over-expression of antisense BNO96 in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) using adenoviral-mediated gene transfer. Cells were infected with either vector only control (EV) or antisense BNO96 (ASBNO96) and assayed for tube formation over a 24 hour time period. Photos were taken after 20 hours. A and B: Low power photograph of tubes; C and D: High power photograph of tubes.

20
25
Figure 10. Effect on capillary tube formation on collagen gels as a result of over-expression of antisense BNO96 in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) using adenoviral-mediated gene transfer. Cells were infected with either vector only control (EV) or antisense BNO96 (ASBNO96) and assayed for tube formation over an 18-24 hour time period. Photos were taken after 3 hours as the cells were migrating through the gel. M: Migrated cell. These appear flatter and less light refractive than non-migrated cells. NM: Non-migrated cell. These cells are rounded and light refractive.

30
35
Figure 11. Effect on tumour necrosis factor (TNF)-induced E-selectin expression as a result of over-expression of antisense BNO96 in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) using adenoviral-mediated gene transfer. Cells were infected with either vector only control (EV) or antisense BNO96 (ASBNO96) and grown for 48 hours. TNF was added for 4 hours prior to staining for cell surface E-selectin expression using an anti E-selectin antibody. Detection was by phycoerythrin conjugated anti mouse antibody. The mean fluorescence intensity (MFI) is given.

Modes for Performing the InventionExample 1: *In vitro* capillary tube formation

The *in vitro* model of angiogenesis is essentially as described in Gamble et al (1993). The assay was performed in collagen under the stimulation of phorbol myristate acetate (PMA) and the anti-integrin ($\alpha_2\beta_1$) antibody, RMACII. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were used in all experiments between passages 2 to 4.

Cells were harvested from bulk cultures (t=0), replated onto the collagen gels with stimulation and then harvested from the collagen gels at 0.5, 3.0, 6.0 and 24 hours after commencement of the assay. These time points were chosen since major morphological changes occur at these stages. Briefly, by 0.5 hours, cells have attached to the collagen matrix and have commenced migration into the gel. By 3.0 hours, small intracellular vesicles are visible. By 6.0 hours, these vesicles are coalescing together to form membrane bound vacuoles and the cells in the form of short sprouts have invaded the gel. After this time, these vacuoles fuse with the plasma membrane, thus expanding the intercellular space to generate the lumen (Meyer et al., 1997). The formation of these larger vacuoles is an essential requirement of lumen formation (Gamble et al., 1999). By 24 hours, the overall anastomosing network of capillary tubes has formed and has commenced degeneration.

Example 2: RNA isolation, cDNA synthesis and amplification

Cells harvested at the specified time points were used for the isolation of total RNA using the Trizol reagent (Gibco BRL) according to manufacturers conditions. SMART (Switching mechanism at 5' end of RNA transcript) technology was used to convert small amounts of total RNA into enough cDNA to enable cDNA subtraction to be performed (see below). This was achieved using the SMART-PCR cDNA synthesis kit (Clontech-user manual PT3041-1) according to manufacturers recommendations. The SMART-PCR

cDNA synthesis protocol generated a majority of full length cDNAs which were subsequently PCR amplified for cDNA subtraction.

5 Example 3: Suppression subtractive hybridisation (SSH)

SSH was performed on SMART amplified cDNA in order to enrich for cDNAs that were either up-regulated or down-regulated between the cDNA populations defined by the selected time-points. This technique also allowed "normalisation" of the regulated cDNAs, thereby making low abundance cDNAs (ie poorly expressed, but important, genes) more easily detectable. To do this, the PCR-Select cDNA synthesis kit (Clontech-user manual PT3041-1) and PCR-Select cDNA subtraction kit (Clontech-user manual PT1117-1) were used based on manufacturers conditions. These procedures relied on subtractive hybridisation and suppression PCR amplification. SSH was performed between the following populations: 0 - 0.5 hours; 0.5 - 3.0 hours; 3.0 - 6.0 hours; 6.0 - 24 hours.

20

Example 4: Differential screening of cDNA clones

Following SSH, the cDNA fragments were digested with *Eag*I and cloned into the compatible unique *Not*I site in pBluescript KS⁺ using standard techniques (Sambrook et al., 1989). This generated forward and reverse subtracted libraries for each time period. A differential screening approach outlined in the PCR-Select Differential Screening Kit (Clontech-user manual PT3138-1) was used to identify regulated cDNAs from non-regulated ones. To do this, cDNA arrays were generated by spotting clone plasmid DNA onto nylon filters in quadruplicate. Approximately 900 individual clones were analysed by cDNA array. These arrays were subsequently probed with:

35 a) unsubtractd time 1 cDNA (represents mRNAs present at time 1)

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 39 -

- b) unsubtractd time 2 cDNA (represents mRNAs present at time 2)
- c) forward subtracted cDNA (represents mRNAs upregulated at time 2)
- 5 d) reverse subtracted cDNA (represents mRNAs upregulated at time 1)

All hybridisations occurred at 42°C in ExpressHyb solution (Clontech). Membranes were washed post-hybridisation according to kit instructions.

Those cDNA clones identified to be differentially expressed based on cDNA array hybridisations were subsequently sequenced. *In silico* database analysis was then used to identify homology to sequences present in the nucleotide and gene databases at the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) in order to gain information about each clone that was sequenced. Selection of clones for further analysis was based upon the predicted function as deduced from homology searches.

20 Tables 1 and 2 provide information on the differentially expressed clones that were sequenced. Table 1 includes those clones which represent previously uncharacterised or novel genes, while Table 2 includes clones that correspond to previously identified genes which have not before been associated with angiogenesis. Also identified were a number of genes that have previously been shown to be involved in the process of angiogenesis. The identification of these clones provides a validation or proof of principle of the effectiveness of the angiogenic gene identification strategy employed and suggests that the clones listed in Tables 1 and 2 are additional angiogenic gene candidates.

35 An example from Table 1 is BNO69 which encodes a novel protein of 655 amino acids. Analysis of the full-length sequence of this clone indicated the presence of a GTPase Activating Protein (GAP) domain. GAP domains are found in a class of proteins that are key regulators of

GTP binding proteins that include Ras, Rho, Cdc42 and Rac GTPases. These GTPases participate in many physiological processes which include cell motility, adhesion, cytokinesis, proliferation, differentiation and apoptosis (reviewed in Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997; Ridley, 2001). Rho-like GTPases cycle between an inactive GDP bound state and an active GTP bound state. The conversion between the two forms is regulated primarily by two types of proteins. They are up-regulated by the guanine exchange factors (GEFs), which enhance the exchange of bound GDP for GTP, and down-regulated by the GTPase-activating proteins (GAPs) which increase the intrinsic rate of hydrolysis of bound GTP. When loaded with GTP, Rho GTPases gain the ability to bind a set of downstream effectors, leading for example to various cytoskeletal rearrangements.

An example from Table 2 is the BNO96 gene. Sequencing of cDNA clone 23 (BNO96) established that this clone was identical to the gamma12 subunit (GNG12) of the G protein. Heterotrimeric G proteins are involved in signal transduction from cell surface receptors to cellular effectors. The G proteins are composed of alpha (α), beta (β) and gamma (γ) subunits. Upon stimulation the α subunit dissociates from the complex and both the α and the $\beta\gamma$ subunits are able to activate multiple effectors to generate many intracellular signals.

At present 6 different β and 12 different γ subunits have been identified. Since the $\beta\gamma$ subunits are tightly associated and form highly stable dimers, they have been considered as a functional unit to date.

GNG12 has been reported to be widely expressed and rich in fibroblasts and smooth muscle cells (Ueda et al., 1999). GNG12 is a substrate for protein kinase C and is phosphorylated following stimulation with agents such as PMA, LPA (lysophosphatidic acid), growth factors and serum (Asano et al., 1998). GNG12 is also associated with F-actin (Ueda et al., 1997).

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 41 -

Previous reports have shown that over-expression of GNG12 alone has no effect on NIH-3T3 fibroblasts. However, over-expression of the $\beta_{1\gamma_{12}}$ dimer induced cell rounding, disruption of stress fibres and enhancement of cell migration. Phosphorylation of GNG12 is required for its effects on cell motility (Yasuda et al., 1998).

Based on available information regarding the BNO69 and BNO96 genes, and given that both genes have been shown to be differentially expressed during angiogenesis in the present invention, there is the suggestion that these genes have features consistent with them performing functions associated with angiogenesis and for this reason they were analysed further.

Example 5: Virtual Northern Blot Analysis

Before functional analysis of selected clones, the differential expression observed from the cDNA array analysis of the clones listed in Tables 1 and 2 (including BNO69 and BNO96) was confirmed by Virtual Northern analysis.

Amplified cDNA from each time point was electrophoresed on an agarose/EtBr gel and the cDNA was transferred to a nylon membrane using Southern transfer according to established techniques (Sambrook et al., 1989). All cDNA clone inserts were labelled with ^{32}P using the MegaPrime DNA labelling system (Amersham Pharmacia Biotech) and hybridisations were performed in ExpressHyb solution (Clontech) according to manufacturers specifications.

Based on the results, clones were grouped according to their type of regulation pattern (Figure 1, and Tables 1 and 2). Of the 20 novel genes identified to date, 9 were confirmed to be regulated during angiogenesis, 4 gave an undetectable signal on Virtual Northern blots and the remaining clones did not indicate regulation of expression based on the Virtual Northern result. Similarly, of the 94 known genes not previously associated with angiogenesis,

59 were confirmed to be differentially regulated from the angiogenesis model. Those clones that did not display differential expression (Class F) or did not give detectable results on Virtual Northern blots may still be involved in angiogenesis however further characterisation is needed.

Example 6: Cell and stimulation specificity

To further characterise the differentially expressed clones and confirm their role in angiogenesis, virtual Northern blots were again used to determine the cell type expression specificity and their stimulation in monolayer cultures with specific growth factors. Endothelial cells were plated on a 2-dimensional (2-D) collagen matrix and were stimulated for 0.5, 3.0, 6.0 and 24 hours with vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (FGF), tumour necrosis factor α (TNF α), PMA + ACII, or PMA alone. Primary cultures of endothelial cells, fibroblasts, smooth muscle cells, together with tumour cell lines were collected. RNA was prepared from all cells and the SMART-PCR cDNA synthesis kit (Clontech-user manual PT3041-1) was used to generate cDNA for virtual Northern preparation. Prepared blots were then probed for regulation of the specific angiogenic gene of interest. Results are shown in Tables 1 and 2.

Of the clones so far analysed, all were confirmed to be expressed in endothelial cells. Of those clones listed in Table 1, three of the six clones analysed for signal specificity were shown to be influenced by the presence of VEGF, FGF and PMA. Two clones showed no response following the stimulation of endothelial cells in culture and the remaining clone showed that the differential expression was specific for the 3-dimensional and not 2-dimensional collagen gels. Of those clones listed in Table 2, two of the six clones analysed for signal specificity were shown to be influenced by the presence of VEGF and FGF and one clone was influenced by the presence of PMA only. One

clone showed no response following the stimulation of endothelial cells in culture and the remaining two clones showed that the differential expression was specific for the 3-dimensional and not 2-dimensional collagen gels.

5 Figures 2 and 3 provide a detailed summary of the cell and stimulation specificity results for the BNO69 and BNO96 genes respectively. These results indicate that both genes are up-regulated at the 3-hour time-point of the 3-dimensional (3-D) *in vitro* model. While the BNO69 gene is
10 expressed in response to FGF, VEGF and PMA, expression of the BNO96 gene occurs only in response to PMA. Both genes are expressed in several cell types including endothelial cells.

15 **Example 7: Analysis of the angiogenic genes**

 The genes identified by this study to be implicated in the angiogenesis process, as listed in Tables 1 and 2, may be used for further studies in order to confirm their role in angiogenesis *in vitro*. To do this, full-length
20 coding sequences of the genes can be cloned into suitable expression vectors such as retroviruses or adenoviruses in both sense and anti-sense orientations and used for infection into endothelial cells (ECs). Retrovirus
 infection gives long-term EC lines expressing the gene of interest whereas adenovirus infection gives transient gene
25 expression. Infected cells can then be subjected to a number of EC assays including proliferation and capillary tube formation to confirm the role of each gene in angiogenesis.

30 As an example, the effect of BNO69 and BNO96 on *in vitro* regulation of EC function has been determined and is described below.

In vitro regulation of EC function - BNO69

35 The effect of BNO69 on endothelial cell function and angiogenesis involved transfection of the antisense of BNO69 into endothelial cells by retroviral or adenoviral

mediated gene transfer. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) at passage 1 or 2 were used for the overexpression experiments. Initially, the BNO69 gene was cloned into the replication defective retrovirus pRufNeo (Rayner and Gonda, 1994). The commercially available cell line BING was used for transfection and production of viral supernatant. HUVEC clones infected with the retrovirus and expressing the antisense BNO69 gene were selected for neo resistance using G418 and pooled together for further growth and analysis. The proliferation of the pooled clones was measured over a 3 day period by direct cell counts. Results of these experiments indicated that cells that had been infected with the antisense construct of BNO69 showed a decrease in their proliferative potential (Figure 4).

Subsequent experiments using adenoviral-mediated expression of antisense BNO69 in HUVECs showed a similar effect on cell proliferation as that observed in the retroviral system. HUVECs were infected with either vector only control or antisense BNO69 and were harvested 24 hours after infection and plated onto microtitre plates in complete growth medium. Cell proliferation was measured by the colorimetric MTT assay as described previously (Xia et al., 1999). The assay was performed 3 days after cell plating. Results of these experiments showed that the proliferation of HUVECs was inhibited by adenoviral-mediated expression of antisense BNO69 (Figure 5).

In addition, in both the retrovirus and adenovirus infection systems, a major feature of the cells infected with the antisense construct to BNO69 was the change in cell morphology. Cells appeared enlarged in size, with an increase in the extent of the cytoplasm (Figure 6). The increase in cell size was confirmed by analysis on a fluorescence activated cell sorter where a measurement of both the forward scatter and side scatter gives information on the size and granularity of the cells respectively. In both retrovirus and adenovirus systems

these parameters were changed. In retrovirus infected cells, forward scatter was 385 (EV) and 522 (ASBNO69R) while side scatter measured 289 (EV) and 508 (ASBNO69R). In the adenovirus infected cells the measurements for forward scatter were, 444 (EV) and 533 (ASBNO69R) while side scatter measured 417 (EV) and 500 (ASBNO69R).

In vitro regulation of EC function - BNO96

The effect of BNO96 on endothelial cell function and angiogenesis involved transfection of the antisense of BNO96 into endothelial cells by adenoviral gene transfer. Initially, antisense BNO96 was produced as a recombinant adenoviral plasmid employing homologous recombination in bacteria (essentially as outlined in <http://coloncancer.org/protocol.htm>). The resultant plasmids were transfected into the mammalian packaging cell line 293 for expansion of virus, and the virus was subsequently purified by caesium chloride gradients. Transfection efficiency was assessed by green fluorescent protein and plaque forming units as given in the protocol above.

Initially, the effect on endothelial cell proliferation of antisense BNO96 was determined. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were infected with either vector only control or antisense BNO96 and were harvested 48 hours later. Cell proliferation was measured by the colorimetric MTT assay as described previously (Xia et al., 1999). The assay was performed 3 days after cell plating (mean \pm SEM, n = 4). Infection of HUVECs with antisense BNO96 was found to inhibit cell proliferation (Figure 7) when cells were cultured in full growth medium.

Another feature of the angiogenic *in vitro* model is the migration of endothelial cells into the matrix. To test the effect that BNO96 plays on this process, cell migration experiments were next conducted. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were infected with either

vector only control or antisense BNO96 and migration of cells towards either no agent or the chemotactic stimulant fibronectin was measured. The migration assay was performed as previously described (Leavesley et al., 1993). Briefly, fibronectin at 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was coated on the under-side of 8.0 μm Transwell filters to act as a chemotactic gradient. Cell migration was assessed after 18-24 hours. Results from these experiments showed that antisense BNO96-infected cells were inhibited from migrating towards fibronectin as a chemotactic stimulant (Figure 8).

An essential feature of the angiogenic process is the formation of capillary tubes. The role that BNO96 plays in this process was measured using the Matrigel and collagen gel models. In the Matrigel system, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were infected with either vector only control or antisense BNO96 and assayed for tube formation as previously described (Cockerill et al., 1994). Briefly, 140 μl of 3×10^5 cells/ml were plated onto the Matrigel and cell reorganisation and tube formation was assessed over a 24 hour time period. The antisense BNO96-infected cells failed to make capillary tubes in the Matrigel capillary tube assay (Figure 9).

In the collagen gel model, HUVECs were again infected with either vector only control or antisense BNO96 and assayed over an 18-24 hour time period for tube formation as previously described (Gamble et al., 1993). Expression of antisense BNO96 resulted in inhibition of cell migration (and subsequent tube formation) into the collagen gel (Figure 10).

The next experiment addressed the question of whether the inhibition of BNO96 produces endothelial cell changes that are specific for functions associated with angiogenesis. E-selectin is an endothelial specific adhesion molecule that is induced by inflammatory cytokines such as TNF and IL-1 and mediates neutrophil-endothelial cell interactions. The effect on E-selectin

expression as a result of over-expression of antisense BNO96 in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was therefore determined. Methods used were as described in Litwin et al (1997). Briefly, HUVECs were infected with either vector only control or antisense BNO96 and grown for 48 hours. Following this, cells were transferred to 24-well trays and incubated overnight. Tumour necrosis factor (TNF) at 0.5 ng/ml was added for 4 hours prior to staining for cell surface E-selectin expression using an anti E-selectin antibody. Detection was by phycoerythrin conjugated anti mouse antibody. The result of these experiments showed that cells over-expressing the antisense BNO96 gene still responded in a normal fashion to the pro-inflammatory stimulant, tumour necrosis factor, to induce the adhesion molecule E-selectin (Figure 11). This suggests that the effect of antisense BNO96 on endothelial cell function is selective.

The capacity of antisense BNO96 to inhibit cell proliferation, migration and capillary tube formation but not TNF induced E-selectin expression may suggest that knockdown of the BNO96 gene specifically affects the angiogenic capacity of endothelial cells. Other cell functions such as their ability to participate in inflammatory reactions would appear to be normal (as far as those measured to date). The BNO96 gene may therefore play a defining role in the angiogenesis process and is a target for the development of therapeutics for the treatment of angiogenesis-related pathologies.

Protein interaction studies

The ability of any one of the angiogenic proteins of the invention, including BNO69 and BNO96, to bind known and unknown proteins can be examined. Procedures such as the yeast two-hybrid system are used to discover and identify any functional partners. The principle behind the yeast two-hybrid procedure is that many eukaryotic transcriptional activators, including those in yeast,

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 48 -

consist of two discrete modular domains. The first is a DNA-binding domain that binds to a specific promoter sequence and the second is an activation domain that directs the RNA polymerase II complex to transcribe the gene downstream of the DNA binding site. Both domains are required for transcriptional activation as neither domain can activate transcription on its own. In the yeast two-hybrid procedure, the gene of interest or parts thereof (BAIT), is cloned in such a way that it is expressed as a fusion to a peptide that has a DNA binding domain. A second gene, or number of genes, such as those from a cDNA library (TARGET), is cloned so that it is expressed as a fusion to an activation domain. Interaction of the protein of interest with its binding partner brings the DNA-binding peptide together with the activation domain and initiates transcription of the reporter genes. The first reporter gene will select for yeast cells that contain interacting proteins (this reporter is usually a nutritional gene required for growth on selective media). The second reporter is used for confirmation and while being expressed in response to interacting proteins it is usually not required for growth.

The nature of the interacting genes and proteins can also be studied such that these partners can also be targets for drug discovery.

Structural studies

Recombinant angiogenic proteins of the invention can be produced in bacterial, yeast, insect and/or mammalian cells and used in crystallographical and NMR studies. Together with molecular modeling of the protein, structure-driven drug design can be facilitated.

TABLE 1

Novel Angiogenesis Genes

Gene	Time Course Subtraction ¹	Signal Specificity ³	Cell Type Specificity ³	Virtual Northern ⁴	Homology Details	UniGene Cluster Number	SEQ ID Numbers
BNO69	0.5-3	V/FP	S	B	Hypothetical GAP domain containing protein	Hs 93589	1, 115
BNO71	3.0-6.0	V/FP	M	B	LUZP - leucine zipper protein. Putative transcription factor	Hs 334673	2, 116
BNO72	0.5-3.0	3-D v. weak	M	B	No EST matches	None	3
BNO73	0.5-3.0	V/FP	C	B	ESTs	Hs 315562	4
BNO77	0.5-3.0	NR	E ?	C	Arenase-like protein	Hs 292812	5, 117
BNO79	0.5-0	NR	E ?	E ?	CRELD1 (Cysteine-rich with EGF-like domains 1)	Hs 9383	6, 118
BNO82	0.5-3.0	NR	M	E ?	Hypothetical protein	Hs 172069	7, 119
BNO83	3.0-6.0			E (16hr)	No EST matches	None	8
BNO84	3.0-6.0			E (4hr)	EST	None	9
BNO85	0-0.5			undetectable	No EST matches	None	10
BNO86	0.5-3.0			undetectable	No EST matches	None	11
BNO87	0-0.5			undetectable	No EST matches	None	12
BNO88	0-0.5			undetectable	Hypothetical protein	Hs 4863	13, 20
BNO89	0.5-3.0			F	No EST matches	None	14
BNO90	0-0.5			F	ESTs	Hs 28893	15, 121
BNO92	3.0-6.0			F	HMG (GripE-like protein co-chaperone)	Hs 151903	16, 122
BNO94	0-0.5			F	KIAA0678	Hs 12707	17, 123
BNO95	0-0.5			F	Hypothetical protein	Hs 17283	18, 124
BNO160	0-0.5			F	EST. Moderately similar to GALS1 HUMAN Growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD153 (DNA-damage inducible transcript 3) (DDIT3) (CEBP-homologous protein) (CHOP)	Hs 335716	19
BNO174	0-0.5			L	KIAA0251	Hs 345566	20, 125

Note: ¹The time period in which isolated clones were obtained and the direction of subtraction; ²Response to VEGF (V), bFGF (F), bFGF (F), bFGF (F), bFGF (F) on 2-dimensional collagen gels. Response specific to 3-dimensional (3-D) not 2-dimensional collagen gels. No response (NR); ³Expression in many (M) or several (S) cell types; ⁴Specifically relates to the tube and lumen forming assay on 3-dimensional collagen. Class B: up at 3 hours; Class C: down at 0.5 hours; Class E: other regulation patterns; Class F: not regulated; Class L: Virtual Northern: limited to 0 and 0.5 hour time points only, but no regulation.

TABLE 2

Genes with a Previously Unknown Role in Angiogenesis							
BNO #	Time Course Subtraction ¹	Signal Specificity ²	Cell Type Specificity ³	Virtual Northern ⁴	Homology Details	UniGene Cluster Number	SEQ ID Numbers
BNO65	0-0.5		A	SDPE2 (Stromal cell-derived factor 2)	Hs 18684	Hs 18684	21, 126
BNO66	0-0.5		A	PRO1092 (Similar to arinal RNA synthase)	Hs 13995	Hs 13995	22, 127
BNO67	0.5-0		A	Protein tyrosin phosphatase related protein	Hs 6101	Hs 6101	23, 128
BNO70	0-0.5	V/F	B	BFG1-binding protein EL D/GSA1	Hs 73287	Hs 73287	24, 129
BNO74	3.0-6.0		B	SH1 domain-containing protein 7	Hs 78521	Hs 78521	25, 130
BNO75	3.0-6.0		B ? (week)	VP335 (Vascular protein sorting 35)	Hs 264190	Hs 264190	26, 131
BNO76	3.0-6.0		C	EBP2 (Ewing sarcoma binding related protein, delta6-delta7 serot isoenzyme related protein)	Hs 298490	Hs 298490	27, 132
BNO78	0-0.5		E (12hr)	CPSE2 (Cleavease and polyadenylation specific factor 2)	Hs 224961	Hs 224961	28, 133
BNO80	0.5-0		E	Hypothetical protein	Hs 323193	Hs 323193	29, 134
BNO91	3.0-6.0		F	NADH (Mitochondrial gene)	None	None	30, 135
BNO93	0-0.5		F	SGP11 (Sphingosine-1-phosphate base 1)	Hs 186613	Hs 186613	31, 136
BNO94	0-0.5		F	COB9 (Ile protein)	Hs 75335	Hs 75335	32, 137
BNO96	0.5-0	P	B	CNG12 (G-coupled receptor protein 1; subunit)	Hs 118570	Hs 118570	33, 138
BNO97	0-0.5		A	SDPR1 (Stromal cell-derived factor receptor 1)	Hs 6354	Hs 6354	34, 139
BNO98	0-0.5	V/F ?	B	RYBP (Ring and YY binding protein)	Hs 7910	Hs 7910	35, 140
BNO99	0.5-0	NR	C	BNP2 (Bone morphogenic protein 2)	Hs 73853	Hs 73853	36, 141
BNO101 ^{5,6}	5-6, 0-0.5		A	CEB1L (Transcription elongation factor B (SII), polypeptide 1)	Hs 171626	Hs 171626	37, 142
BNO102	0-0.5		A	PSME2 (Proteasome activator subunit 2 - PA28beta)	Hs 179774	Hs 179774	38, 143
BNO103 ^{5,6}	0-0.5, 3.0-6.0, 0.5-0		A	PT1 (Perrin, light polypeptide)	Hs 11134	Hs 11134	39, 144
BNO104	3-6		A	TTC4 (Tuberous sclerosis 3 ubiquitin protein ligase)	Hs 98074	Hs 98074	40, 145
BNO105	3-6		A	ENO1alpha (Enolase 1 alpha)	Hs 254105	Hs 254105	41, 146
BNO106	0-0.5		A	HRBPB2 (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2)	Hs 278857	Hs 278857	42, 147
BNO107	0-0.5		A	USP (Ubiquitin-S1-sected gene)	Hs 69855	Hs 69855	43, 148
BNO108 ^{5,6}	0-0.5, 0.5-3.0, 6.0-24		A (12hr)	COX-1 (Cytochrome oxidase I small subunit - Mitochondrial gene)	None	None	44, 149
BNO111	3-6		A/(BD)	ZFP612 (Zinc finger protein 36, C3H type-like 2)	Hs 78909	Hs 78909	45, 150
BNO112	6-24		A (12hr)	CALM1 (Calmodulin 1)	Hs 177656	Hs 177656	46, 151

TABLE 2 (Continued)

BNO #	Time Course Subtraction ¹	Signal Specificity ²	Cell Type Specificity ³	Virtual Northern ⁴	Homology Details	UniGene Cluster Number	SEQ ID Numbers
BNO114	6-24		A		CYP11B (Cytochrome P450, subfamily 1 (doxim-inducible), polypeptide 1)	Hs 134654	47, 152
BNO115	3-6		A (72hr)		UGTREL1 (UDP-galactose 4-epimerase related)	Hs 154073	48, 153
BNO116	0.5-3		A		MCFR (Anaphase-promoting complex 1, meiotic checkpoint regulator)	Hs 40137	49, 154
BNO120	3-6		B		GLO1 (Glucosylase 1)	Hs 75207	50, 155
BNO122	0.5-3		B ?		RPL15 (Ribosomal protein L15)	Hs 74267	51, 156
BNO123	3-6		B		SEB1 (Splicing factor 3b, subunit 1)	Hs 334826	52, 157
BNO124	0.5-3		B		AKAP12 (A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12)	Hs 788	53, 158
BNO128	6-24		B		HSPA8 (Heat shock 70kD protein 8)	Hs 180414	54, 159
BNO130	0.5-3		B		LIPC (Endothelial lipase)	Hs 65370	55, 160
BNO131	0-0.5	3-D	C		PX19 like (Px19-like protein)	Hs 279529	56, 161
BNO132	0.5-0		C		PDCD6 (Programmed cell death 6)	Hs 80019	57, 162
BNO133	0.5-3		C		SDPR (Serum deprivation response - phosphotyrosine binding protein)	Hs 26530	58, 163
BNO134	0.5-0		C		GPI (Glucose phosphate isomerase)	Hs 279789	59, 164
BNO135	0.5-0		C		COX3 (Cytochrome oxidase 3 subunit - Mitochondrial gene)	None	60, 165
BNO137	3-6	3-D	D		PTRE (Polymerase 1 and transcript release factor)	Hs 29759	61, 166
BNO140	3-6		M		CCND2 (Cyclin D2)	Hs 75586	62, 167
BNO141	0.5-0		D		GOLGA2 (Golgi autotransferin, golgin subfamily a, 2)	Hs 24099	63, 168
BNO142	3-6		D		RPL11 (Ribosomal protein L11)	Hs 179943	64, 169
BNO144 ⁵	0.5-0, 0-0.5		E (16hr)		EEF1A1 (Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1)	Hs 181165	65, 170
BNO145	0.5-3		E (424hr)		ATP1A1 (ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 1 polypeptide)	Hs 76549	66, 171
BNO146	0.5-3		E (16hr)		TAX1BP1 (Tax 1 human T-cell leukemia virus type D binding protein 1)	Hs 5437	67, 172
BNO147	0.5-3		E ?		KARP-1BP3 (Kad6 Autoantigen Related Protein binding protein 3)	Hs 25132	68, 173
BNO148	3-6		E (24hr)		RPS6 (Ribosomal protein S6 subunit)	Hs 350166	69, 174
BNO149	6-24		E (46hr)		MIRL22 (Mitochondrial ribosomal protein L22)	Hs 41007	70, 175
BNO150	3-6		E (16hr)		BAZ2B (Bromodomain adjacent to zinc finger domain 2B)	Hs 8383	71, 176

TABLE 2 (Continued)

BNO #	Time Course Subtraction ¹	Signal Specificity ²	Cell Type Specificity ³	Genes with a Previously Unknown Role in Angiogenesis		Homology Details	UniGene Cluster Number	SEQ ID Numbers
				Virtual Northern ⁴	Virtual Northern ⁴			
BNO151	3-6			E (T24hr)	TEGT (Testis enhanced gene transcript - BAX inhibitor 1)	Hs 74637	72, 177	
BNO152	0-0.5			E (T6hr)	TDE1 (Tumor differentially expressed 1)	Hs 272168	73, 178	
BNO153	0-0.5			E (T24hr)	RPA2 (Replication protein A2)	Hs 79411	74, 179	
BNO154	0-0.5			E (L24hr)	PABPCL (Poly(A) binding protein, cytoplasmic 1)	Hs 172182	75, 180	
BNO155	0.5-0			E	RPS13 (Ribosomal protein S13)	Hs 165590	76, 181	
BNO156	0.5-0			E	TCPI (T-complex 1)	Hs 4112	77, 182	
BNO157	0.5-0			L	RNASEL (Ribonuclease, RNase A family, 1)	Hs 78224	78, 183	
BNO158	0-0.5			L	SNXS (Sorting nexin 5)	Hs 13794	79, 184	
BNO159	0.5-0			L?	NP220 (NP220 nuclear protein)	Hs 169984	80, 185	
BNO161	0-0.5				DUX15 (DUX15/Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 15)	Hs 5683	81, 186	
BNO162	0.5-3				RPL28 (Ribosomal protein L28)	Hs 4437	82, 187	
BNO163	0.5-3				UBE2L3 (Ubiquitin-conjugating enzyme E2L3)	Hs 108104	83, 188	
BNO164	3-6				CYTB (Cytochrome b - Mitochondrial gene)	None	84, 189	
BNO166	0-0.5			?	MPHOSPH6 (M phase phosphoprotein 6)	Hs 152720	85, 190	
BNO167	0-0.5				SSBP2 (Single-strand DNA binding protein 2)	Hs 169833	86, 191	
BNO168	0.5-0				NADH1 (NADH dehydrogenase subunit 1 - Mitochondrial gene)	None	87, 192	
BNO169	0.5-3			U	PHF3 (PHD finger protein 3)	Hs 78893	88, 193	
BNO170	0-0.5, 0.5-0			U	ICMT (Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase)	Hs 83212	89, 194	
BNO171	0-0.5			L	HCFC1 (Hes cell factor C1 - YP16-accessory protein)	Hs 83634	90, 195	
BNO173	0-0.5			L	QRK77B (QRK Homolog of mouse quaking QRK - KH domain RNA binding protein)	Hs 15020	91, 196	
BNO175	0.5-0			L	S100A13 (S100 calcium binding protein A13)	Hs 14331	92, 197	
BNO176	0.5-0			L?	CGI-99 protein	Hs 110803	93, 198	
BNO177	0-0.5			L?	EXT1 (Exostosin (multiple 1))	Hs 184161	94, 199	
BNO179	0.5-0				TT227H (Mitochondrial gene)	None	95	
BNO180	0.5-0				KPNA2 (Karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1 - importin alpha 1))	Hs 159557	96, 200	
BNO181	0.5-3				RPS9 (Ribosomal protein S9)	Hs 180920	97, 201	
BNO182	3-6				NCBP2 (Nuclear cap binding protein subunit 2)	Hs 240770	98, 202	
BNO183	3-6				S12 (RNA (Mitochondrial gene))	None	99	

References

References cited herein are listed on the following pages, and are incorporated herein by this reference.

- 5 Altschul, SF. et al. (1997). *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Asano, T. et al. (1998). *Eur. J. Biochem.* 251 : 314-319.
- Breaker, RR. and Joyce, GF. (1995). *Chem. Biol.* 2: 655-600.
- 10 Cockerill, GW. et al. (1994). *A Survey of Cell Biol.* 159: 113-160.
- Cole, SP. et al. (1984). *Mol. Cell Biol.* 62: 109-120.
- Cote, RJ. et al. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030.
- 15 Culver, K. (1996). *Gene Therapy : A Primer for Physicians.* Second Edition. (Mary Ann Liebert).
- Folkman, J. and Haudenschild, C. (1980). *Nature (Lond.)* 288: 551-556.
- Friedman, T. (1991). In *Therapy for Genetic Diseases.* (T Friedman (Ed) Oxford University Press. pp 105-121.
- 20 Gamble, JR. et al. (1993). *J. Cell Biol.* 121: 931-943.
- Gamble, JR. et al. (1999). *Endothelium* 7: 23-34.
- Gecz, J. et al. (1997). *Genomics* 44: 201-213.
- Goldman, CK. et al. (1997). *Nature Biotechnology* 15: 462-466.
- 25 Haseloff, J. and Gerlach, WL. (1988). *Nature* 334: 585-591.
- Heller, RA. et al. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2150-2155.
- Huse, WD. et al. (1989). *Science* 246: 1275-1281.
- 30 Kohler, G. and Milstein, C. (1975). *Nature* 256: 495-497.
- Kozbor, D. et al. (1985). *J. Immunol. Methods* 81:31-42.
- Leavesley, DI. et al. (1993). *J. Cellular Biol.* 121: 163-170.
- Litwin, M. et al. (1997). *J. Cell Biol.* 139: 219-228.
- 35 Meyer, GT. et al. (1997). *The Anatomical Record* 249: 327-340.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 55 -

- Orlandi, R. et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3833-3837.
- Rayner, JR. and Gonda, TJ. (1994). *Mol. Cell Biol.* 14: 880-887.
- 5 Rickert, RC. et al. (1997). *Nucleic Acids Res.* 25: 1317-1318.
- Ridley, AJ. (2001). *Trends Cell Biol.* 11: 471-477.
- Sambrook, J. et al. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second Edition. (Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York).
- 10 Scharf, D. et al. (1994). *Results Probl. Cell Differ.* 20: 125-162.
- Schena, M. et al. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10614-10619.
- 15 Schwenk, F. et al. (1995). *Nucleic Acids Res.* 23: 5080-5081.
- Ueda, H. et al. (1997). *J. Cell Sci.* 110 : 1503-1511.
- Ueda, H. et al. (1999). *J. Biol. Chem.* 274 : 12124-12128.
- Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (1997). *Genes Devel.* 11 : 2295-2322.
- 20 Winter, G. et al. (1991). *Nature* 349: 293-299.
- Xia, P. et al. (1999). *J. Biological Chem.* 274: 34499-34505.
- Yasuda, H. et al. (1998). *J. Biol. Chem.* 273: 21958-21965.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 56 -

Claims

1. An isolated nucleic acid molecule comprising the sequence set forth in one of SEQ ID Numbers: 1 to 20.
- 5 2. An isolated nucleic acid molecule comprising the sequence set forth in one of SEQ ID Numbers: 1 to 114, or a fragment thereof, and which encodes a polypeptide that plays a role in an angiogenic process.
- 10 3. An isolated nucleic acid molecule that is at least 70% identical to a nucleic acid molecule comprising the sequence set forth in one of SEQ ID Numbers: 1 to 114, and which encodes a polypeptide that plays a role in an angiogenic process.
- 15 4. An isolated nucleic acid molecule as claimed in claim 3 that is at least 85% identical.
5. An isolated nucleic acid molecule as claimed in claim 20 3 that is at least 95% identical.
6. An isolated nucleic acid molecule as claimed in any one of claims 3 to 5 wherein sequence identity is determined using the BLAST algorithm with the BLOSUM 62 25 default matrix.
7. An isolated nucleic acid molecule that encodes a polypeptide that plays a role in an angiogenic process, and which hybridizes under stringent conditions with a 30 nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence set forth in one of SEQ ID Numbers: 1 to 114.
8. An isolated nucleic acid molecule as claimed in claim 7 wherein the stringent conditions comprise hybridization 35 at 42°C in 750 mM NaCl, 75 mM trisodium citrate, 2% SDS, 50% formamide, 1X Denhart's, 10% w/v) dextran sulphate and 100 ug/ml denatured salmon sperm DNA.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 57 -

9. An isolated nucleic acid molecule as claimed in any one of claims 1 to 8, which encodes a polypeptide that plays a role in diseases associated with angiogenesis including but not restricted to cancer, rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, psoriasis, cardiovascular diseases such as atherosclerosis, ischaemic limb disease and coronary artery disease.
10. An isolated nucleic acid molecule consisting any one of the nucleotide sequences set forth in SEQ ID Numbers: 1 to 20.
11. Use of a nucleic acid molecule selected from the group consisting of DNA molecules having the sequence set forth in SEQ ID Numbers: 70, 72 to 73, 78, 83 to 87, 89, 160 or 174 to identify and/or obtain full-length human genes involved in an angiogenic process.
12. Use as claimed in claim 11 wherein a full-length human gene is identified by *in silico* database analysis.
13. Use as claimed in either one of claims 11 or 12 wherein additional sequence is obtained using hybridisation with one or more of said nucleotide molecules, inverse PCR, restriction site PCR, PCR walking techniques or RACE.
14. A gene when identified by the use of a DNA molecule selected from any one of SEQ ID Numbers: 70, 72 to 73, 78, 83 to 87, 89, 160 or 174.
15. An isolated polypeptide comprising the sequence set forth in one of SEQ ID Numbers: 115 to 125.
16. An isolated polypeptide comprising the sequence set forth in one of SEQ ID Numbers: 115 to 217, or a fragment thereof, that plays a role in an angiogenic process.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 58 -

17. An isolated polypeptide that plays a role in an angiogenic process, and having at least 70% identity with the amino acid sequence set forth in SEQ ID Numbers: 115 to 217.
18. An isolated polypeptide as claimed in claim 17 with at least 85% sequence identity.
19. An isolated polypeptide as claimed in claim 17 with at least 95% sequence identity.
20. An isolated polypeptide as claimed in any one of claims 17 to 19 wherein sequence identity is determined using the BLAST algorithm with the BLOSUM 62 default matrix.
21. An isolated polypeptide as claimed in any one of claims 15 to 20 that plays a role in diseases associated with an angiogenic process including but not restricted to cancer, rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, psoriasis, cardiovascular diseases such as atherosclerosis, ischaemic limb disease and coronary artery disease.
22. An isolated polypeptide consisting any one of the amino acid sequences set forth in SEQ ID Numbers: 115 to 125.
23. An isolated polypeptide complex that plays a role in an angiogenic process, said polypeptide complex comprising a polypeptide as defined in any one of claims 15 to 22.
24. An expression vector comprising a nucleic acid molecule as defined in any one of claims 1 to 10.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 59 -

25. A cell transformed with an expression vector of claim 24.
26. A cell as claimed in claim 25 which is an eukaryotic cell.
27. A method of preparing a polypeptide comprising the steps of :
- (1) culturing cells as claimed in either one of claims 25 to 26 under conditions effective for polypeptide production; and
 - (2) harvesting the polypeptide.
28. A polypeptide prepared by the method of claim 27.
29. A method of modulating angiogenesis comprising modulating the expression or activity of a polypeptide in a cell, wherein the polypeptide is encoded by a nucleic acid sequence as claimed in any one of claims 1 to 10.
30. The method of claim 29 wherein the nucleic acid sequence is selected from the group consisting of SEQ ID Numbers: 1 to 20.
31. The method of claim 29 wherein the polypeptide comprises an amino acid sequence as claimed in any one of claims 15 to 22, or an active fragment thereof.
32. The method of claim 31 wherein the polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID Numbers: 115 to 125.
33. The method of claim 29 wherein the polypeptide forms part of a polypeptide complex.
34. The method of claim 29 wherein the expression or activity of the polypeptide is modulated by introducing

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 60 -

- into the cell an antagonist or agonist of a nucleic acid molecule as defined in any one of claims 1 to 10 or a polypeptide as claimed in any one of claims 15 to 22 or claim 27.
- 5
35. The method of claim 29 wherein the expression or activity of the polypeptide is modulated by introducing into the cell an antisense to an isolated nucleic acid molecule as claimed in any one of claims 1 to 10.
- 10
36. The method of claim 29 wherein the expression or activity of the polypeptide is modulated by introducing into the cell a nucleic acid molecule which is the complement of at least a portion of a nucleic acid
- 15
- sequence as claimed in any one of claims 1 to 10 and is capable of modulating expression or levels of said nucleic acid sequence.
37. The method of claim 36 wherein the nucleic acid
- 20
- molecule is an RNA molecule that hybridizes with the mRNA encoded by a nucleic acid sequence as claimed in any one of claims 1 to 10.
38. The method of claim 36 wherein the nucleic acid
- 25
- molecule is a catalytic nucleic acid molecule that is targeted to a nucleic acid sequence as claimed in any one of claims 1 to 10.
39. The method of claim 38 wherein the catalytic nucleic
- 30
- acid molecule is a DNzyme.
40. The method of claim 38 wherein the catalytic nucleic acid molecule is a ribozyme.
- 35
41. The method of claim 29 wherein the polypeptide expression or activity is modulated by an antibody capable of binding the polypeptide.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 61 -

42. The method of claim 41 wherein the antibody is a fully human antibody.
- 5 43. The method of claim 41 wherein the antibody is selected from the group consisting of a monoclonal antibody, a humanised antibody, a chimaeric antibody or an antibody fragment including a Fab fragment, (Fab')₂ fragment, Fv fragment, single chain antibodies and
10 single domain antibodies.
44. The method of claim 29 wherein the polypeptide expression or activity is modulated by introducing into the cell a nucleic acid molecule comprising a nucleic acid
15 sequence as claimed in any one of claims 1 to 10, or an active fragment or variant thereof.
45. The method of claim 44 wherein the nucleic acid molecule is introduced by way of an expression vector as
20 claimed in claim 24.
46. The method of claim 29 wherein the polypeptide expression or activity is modulated by introducing into the cell a polypeptide comprising an amino acid sequence
25 as claimed in any one of claims 15 to 22 or claim 27.
47. The method of any one of claims 29 to 46 wherein angiogenesis is uncontrolled or enhanced.
- 30 48. The method of any one of claims 29 to 46 wherein angiogenesis is inappropriately arrested or decreased.
49. A method for the treatment of an angiogenesis-related disorder, comprising modulating the expression or activity
35 of a polypeptide encoded by a nucleic acid sequence as claimed in any one of claims 1 to 10.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 62 -

50. The method of claim 49 wherein the nucleic acid sequence is selected from the group consisting of SEQ ID Numbers: 1 to 20.
- 5 51. The method of claim 49 wherein the polypeptide comprises an amino acid sequence as claimed in any one of claims 15 to 22, or an active fragment thereof.
52. The method of claim 51 wherein the polypeptide
10 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID Numbers: 115 to 125.
53. The method of claim 49 wherein the polypeptide forms
15 part of a polypeptide complex.
54. The method of claim 49 wherein the expression or
activity of the polypeptide is modulated by introducing
into the cell an antagonist or agonist of a nucleic acid
molecule as defined in any one of claims 1 to 10 or an
20 antagonist or agonist of a polypeptide as claimed in any
one of claims 15 to 22 or claim 27.
55. The method of claim 49 wherein the expression or
activity of the polypeptide is modulated by introducing
25 into the cell an antisense to an isolated nucleic acid
molecule as claimed in any one of claims 1 to 10.
56. The method of claim 49 wherein the expression or
activity of the polypeptide is modulated by introducing
30 into the cell a nucleic acid molecule which is the
complement of at least a portion of a nucleic acid
sequence as claimed in any one of claims 1 to 10 and is
capable of modulating expression or levels of said nucleic
acid sequence.
- 35 57. The method of claim 56 wherein the nucleic acid
molecule is an RNA molecule that hybridizes with the mRNA

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 63 -

- encoded by a nucleic acid sequence as claimed in any one of claims 1 to 10.
58. The method of claim 56 wherein the nucleic acid molecule is a catalytic nucleic acid molecule that is targeted to a nucleic acid sequence as claimed in any one of claims 1 to 10.
59. The method of claim 58 wherein the catalytic nucleic acid molecule is a DNzyme.
60. The method of claim 58 wherein the catalytic nucleic acid molecule is a ribozyme.
61. The method of claim 49 wherein the polypeptide expression or activity is modulated by an antibody capable of binding the polypeptide.
62. The method of claim 61 wherein the antibody is a full human antibody.
63. The method of claim 61 wherein the antibody is selected from the group consisting of a monoclonal antibody, a humanised antibody, a chimaeric antibody or an antibody fragment including a Fab fragment, (Fab')₂ fragment, Fv fragment, single chain antibodies and single domain antibodies.
64. The method of claim 49 wherein the polypeptide expression or activity is modulated by introducing into the cell a nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence as claimed in any one of claims 1 to 10, or an active fragment or variant thereof.
65. The method of claim 64 wherein the nucleic acid molecule is introduced by way of an expression vector as claimed in claim 24.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 64 -

56. The method of claim 49 wherein the polypeptide expression or activity is modulated by introducing into the cell a polypeptide comprising an amino acid sequence as claimed in any one of claims 15 to 22 or claim 27.
- 5
67. The method of any one of claims 49 to 66 wherein the angiogenesis-related disorder involves uncontrolled or enhanced angiogenesis, or is a disorder in which a decreased vasculature is of benefit.
- 10
68. The method of claim 67 wherein the disorder is selected from the group consisting of cancer, rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, psoriasis and cardiovascular diseases such as atherosclerosis.
- 15
69. The method of any one of claims 49 to 66 wherein the angiogenesis-related disorder involves inappropriately arrested or decreased angiogenesis, or is a disorder in which an expanding vasculature is of benefit.
- 20
70. The method of claim 69 wherein the disorder is selected from the group consisting of ischaemic limb disease or coronary artery disease.
- 25
71. Use of a modulator of expression or activity of a polypeptide encoded by a nucleic acid sequence as claimed in any one of claims 1 to 10 in the manufacture of a medicament for the treatment of an angiogenesis-related disorder.
- 30
72. The use of claim 71 wherein the nucleic acid sequence is selected from the group consisting of SEQ ID Numbers: 1 to 20.
- 35
73. The use of claim 71 wherein the polypeptide comprises an amino acid sequence as claimed in any one of claims 15 to 22, or an active fragment thereof.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 65 -

74. The use of claim 73 wherein the polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID Numbers: 115 to 125.
- 5 75. The use of claim 71 wherein the polypeptide forms part of a polypeptide complex.
76. The use of claim 71 wherein the expression or activity of the polypeptide is modulated by introducing into the
10 cell an antagonist or agonist of a nucleic acid molecule as defined in any one of claims 1 to 10 or an antagonist or agonist of a polypeptide as claimed in any one of claims 15 to 22 or claim 27.
- 15 77. The use of claim 71 wherein the expression or activity of the polypeptide is modulated by introducing into the cell an antisense to an isolated nucleic acid molecule as claimed in any one of claims 1 to 10.
- 20 78. The use of claim 71 wherein the expression or activity of the polypeptide is modulated by introducing into the cell a nucleic acid molecule which is the complement of at least a portion of a nucleic acid sequence as claimed in
25 any one of claims 1 to 10 and is capable of modulating expression or levels of said nucleic acid sequence.
79. The use of claim 78 wherein the nucleic acid molecule is an RNA molecule that hybridizes with the mRNA encoded by a nucleic acid sequence as claimed in any one of claims
30 1 to 10.
80. The use of claim 78 wherein the nucleic acid molecule is a catalytic nucleic acid molecule that is targeted to a
35 nucleic acid sequence as claimed in any one of claims 1 to 10.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 66 -

81. The use of claim 80 wherein the catalytic nucleic acid molecule is a DNAzyme.
82. The use of claim 80 wherein the catalytic nucleic acid molecule is a ribozyme.
83. The use of claim 71 wherein the polypeptide expression or activity is modulated by an antibody capable of binding the polypeptide.
84. The use of claim 83 wherein the antibody is a full human antibody.
85. The use of claim 83 wherein the antibody is selected from the group consisting of a monoclonal antibody, a humanised antibody, a chimaeric antibody or an antibody fragment including a Fab fragment, (Fab')₂ fragment, Fv fragment, single chain antibodies and single domain antibodies.
86. The use of claim 71 wherein the polypeptide expression or activity is modulated by introducing into the cell a nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence as claimed in any one of claims 1 to 10, or an active fragment or variant thereof.
87. The use of claim 86 wherein the nucleic acid molecule is introduced by way of an expression vector as claimed in claim 24.
88. The use of claim 71 wherein the polypeptide expression or activity is modulated by introducing into the cell a polypeptide comprising an amino acid sequence as claimed in any one of claims 15 to 22 or claim 27.
89. The use of any one of claims 71 to 88 wherein the angiogenesis-related disorder involves uncontrolled or

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 67 -

enhanced angiogenesis, or is a disorder in which a decreased vasculature is of benefit.

90. The use of claim 89 wherein the disorder is selected
5 from the group consisting of cancer, rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, psoriasis and cardiovascular diseases such as atherosclerosis.

91. The use of any one of claims 71 to 88 wherein the
10 angiogenesis-related disorder involves inappropriately arrested or decreased angiogenesis, or is a disorder in which an expanding vasculature is of benefit.

92. The use of claim 91 wherein the disorder is selected
15 from the group consisting of ischaemic limb disease or coronary artery disease.

93. The use of a nucleic acid molecule as claimed in any
20 one of claims 1 to 10 for the screening of candidate pharmaceutical compounds useful in the treatment of angiogenesis-related disorders.

94. A compound useful in the treatment of angiogenesis-
25 related disorders when identified by the use of a nucleic acid molecule as claimed in any one of claims 1 to 10.

95. The use of a polypeptide as claimed in any one of
30 claims 15 to 22 or claim 27, or a polypeptide complex as claimed in claim 23 for the screening of candidate pharmaceutical compounds useful in the treatment of angiogenesis-related disorders.

96. A compound useful in the treatment of angiogenesis-
35 related disorders when identified by the use of a polypeptide as claimed in any one of claims 15 to 22 or claim 27, or a polypeptide complex as claimed in claim 23.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 68 -

97. The use of a cell as claimed in either one of claims 25 or 26 for the screening of candidate pharmaceutical compounds useful in the treatment of angiogenesis-related disorders.
- 5
98. A compound useful in the treatment of angiogenesis-related disorders when identified by the use of a cell as claimed in either one of claims 25 or 26.
- 10
99. A method of screening for a candidate pharmaceutical compound useful in the treatment of angiogenesis-related disorders comprising the steps of:
- (1) providing a polypeptide as claimed in any one of claims 15 to 22 or claim 27, or a polypeptide complex as claimed in claim 23;
 - 15 (2) adding a candidate pharmaceutical compound to said polypeptide; and
 - (3) determining the binding of said candidate compound to said polypeptide;
- 20 wherein a compound that binds to the polypeptide or polypeptide complex is a candidate pharmaceutical compound.
- 25
100. A method of screening for candidate pharmaceutical compound useful in the treatment of angiogenesis-related disorders comprising the steps of:
- (1) providing a cell, as claimed in either one of claims 25 or 26;
 - (2) adding a candidate pharmaceutical compound to said cell; and
 - 30 (3) determining the effect of said candidate pharmaceutical compound on the functional properties of said cell;
- 35 wherein a compound that alters the functional properties of said cell is a candidate pharmaceutical compound.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 69 -

101. A method of screening for a candidate pharmaceutical compound useful in the treatment of angiogenesis-related disorders comprising the steps of:

- 5 (1) providing a cell, as claimed in either one of claims 25 or 26;
- (2) adding a candidate pharmaceutical compound to said cell; and
- 10 (3) determining the effect of said candidate pharmaceutical compound on the expression of the nucleic acid molecule that is part of the expression vector in said cell;

wherein a compound that alters the expression of the nucleic acid molecule that is part of the expression vector in said cell is a candidate pharmaceutical compound.

15

102. A method of screening for a candidate pharmaceutical compound useful in the treatment of angiogenesis-related disorders comprising the steps of:

- 20 (1) providing a cell, as claimed in either one of claims 25 or 26;
- (2) adding a candidate pharmaceutical compound to said cell; and
- 25 (3) determining the effect of said candidate pharmaceutical compound on the expression or activity of the polypeptide encoded by the nucleic acid molecule that is part of the expression vector in said cell;

wherein a compound that alters the expression or activity of polypeptide encoded by the nucleic acid molecule that is part of the expression vector in said cell is a candidate pharmaceutical compound.

30

103. A compound when identified by the method of any one of claims 100 to 102.

35

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 70 -

104. A pharmaceutical composition comprising a compound as claimed in 103 and a pharmaceutically acceptable carrier.
105. An antibody which is immunologically reactive with an isolated polypeptide as claimed in claim 15.
106. An antibody as claimed in claim 105 which is a fully human antibody.
107. An antibody as claimed in claim 105 which is selected from the group consisting of a monoclonal antibody, a humanised antibody, a chimaeric antibody or an antibody fragment including a Fab fragment, (Fab')₂ fragment, Fv fragment, single chain antibodies and single domain antibodies.
108. A catalytic nucleic acid targeted to a nucleic acid sequence as claimed in claim 1.
109. A catalytic nucleic acid of claim 108 which is a DNAzyme.
110. A catalytic nucleic acid of claim 108 which is a ribozyme.
111. Use of a nucleic acid molecule as claimed in any one of claims 1 to 10 in the diagnosis or prognosis of an angiogenesis-related disorder.
112. Use of a polypeptide as claimed in any one of claims 15 to 22 or claim 27 in the diagnosis or prognosis of an angiogenesis-related disorder.
113. Use of an antibody as claimed in any one of claims 105 to 107 or an antibody to a polypeptide as claimed in claim 16 in the diagnosis or prognosis of an angiogenesis-related disorder.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 71 -

114. A method for the diagnosis of an angiogenesis-related disorder comprising the steps of:

- 5 (1) establishing a profile for normal expression and/or activity of a gene as claimed in any one of claims 1 to 10, in unaffected subjects;
- (2) measuring the level of expression and/or activity of the gene in a person suspected of abnormal expression and/or activity of the gene; and
- 10 (3) comparing the measured level of expression and/or activity with the profile for normal expression and/or activity;

wherein an altered level of expression and/or activity in said subject is an indication of an angiogenesis-related disorder, or a predisposition thereto.

115. A method as claimed in claim 114 wherein reverse transcriptase PCR is employed to measure levels of expression.

116. A method as claimed in claim 114 wherein a hybridisation assay using a probe derived from the gene, or a fragment thereof, is employed to measure levels of expression.

117. A method for the diagnosis of an angiogenesis-related disorder comprising the steps of:

- 30 (1) obtaining DNA from a subject corresponding to a nucleic acid sequence as claimed in any one of claims 1 to 10; and
- (2) comparing the DNA from said to the DNA of the corresponding wild-type gene;

wherein altered DNA properties in said subject is an indication of an angiogenesis-related disorder, or a predisposition thereto.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 72 -

118. A method as claimed in claim 117 wherein the DNA of the gene is sequenced and the sequences compared.

119. A method as claimed in claim 117 wherein the DNA of the gene is subjected to SSCP analysis.

120. A method for the diagnosis of an angiogenesis-related disorder comprising the steps of:

- 10 (1) establishing a physical property of a wild-type polypeptide as claimed in any one of claims 15 to 22;
- (2) obtaining the polypeptide from a person suspected of an abnormality of that polypeptide; and;
- 15 (3) measuring the property for the polypeptide expressed by the person and comparing it to the established property for wild-type polypeptide; wherein altered polypeptide properties in said subject is an indication of an angiogenesis-related disorder, or a predisposition thereto.

121. A method as claimed in claim 120 wherein the property is the electrophoretic mobility.

25 122. A method as claimed in claim 120 wherein the property is the proteolytic cleavage pattern.

123. A genetically modified non-human animal transformed with an isolated nucleic acid molecule as defined in any one of claims 1 to 10.

124. A genetically modified non-human animal as claimed in claim 123 in which the animal is selected from the group consisting of rats, mice, hamsters, guinea pigs, rabbits, dogs, cats, goats, sheep, pigs and non-human primates such as monkeys and chimpanzees.

WO 03/027285

PCT/AU02/01282

- 73 -

125. A genetically modified non-human animal as claimed in claim 123 wherein the animal is a mouse.

5 126. Use of a genetically modified non-human animal as defined in any one of claims 123 to 125 in screening for candidate pharmaceutical compounds useful for the treatment of angiogenesis-related disorders.

10 127. The use of any one of claims 93 to 98 or claim 126 wherein the angiogenesis-related disorder involves uncontrolled or enhanced angiogenesis, or is a disorder in which a decreased vasculature is of benefit.

15 128. The use of claim 127 wherein the disorder is selected from the group consisting of cancer, rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, psoriasis and cardiovascular diseases such as atherosclerosis.

20 129. The use of any one of claims 93 to 98 or claim 126 wherein the angiogenesis-related disorder involves inappropriately arrested or decreased angiogenesis, or is a disorder in which an expanding vasculature is of benefit.

25 130. The use of claim 129 wherein the disorder is selected from the group consisting of ischaemic limb disease or coronary artery disease.

30

Figure 1

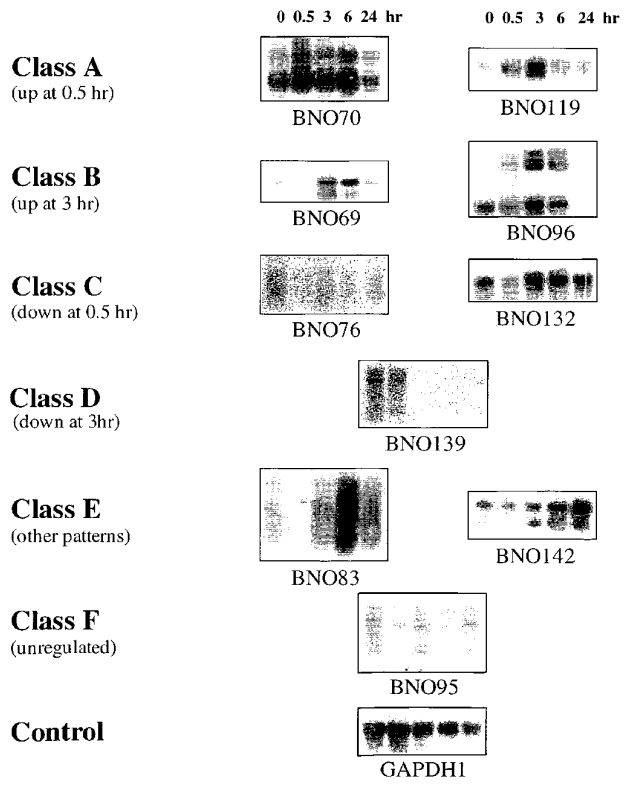


Figure 2

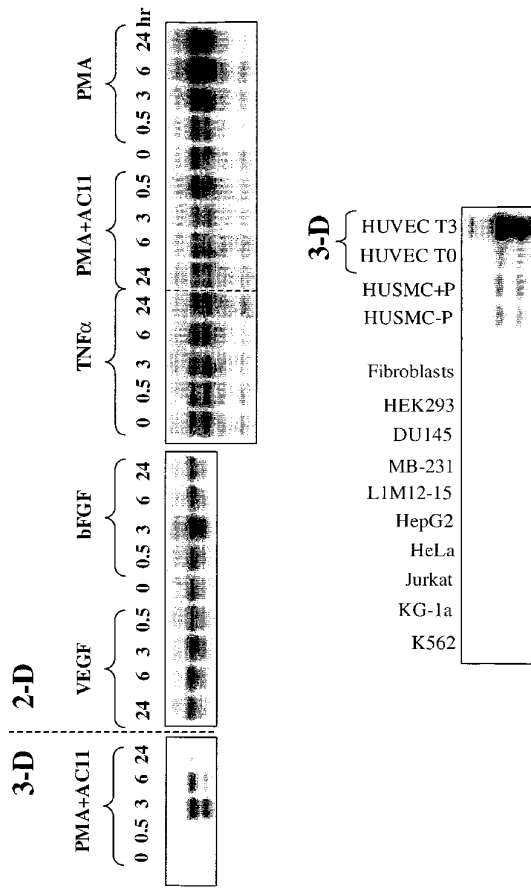
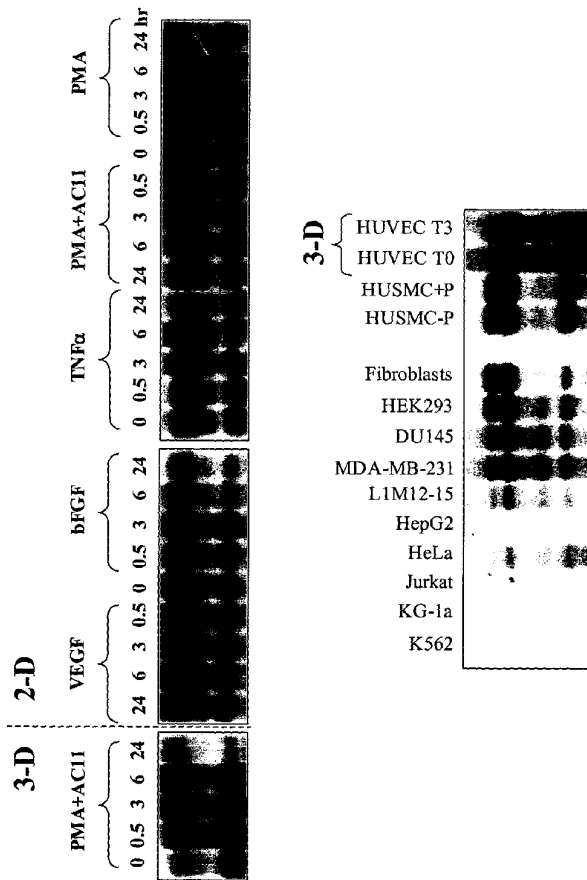


Figure 3

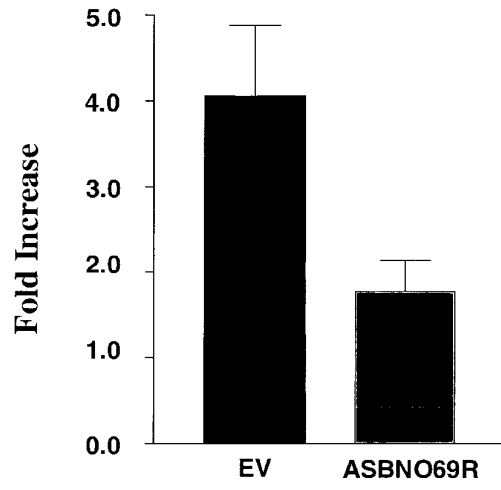


WO 03/027285

PCT/AU02/01282

4/11

Figure 4

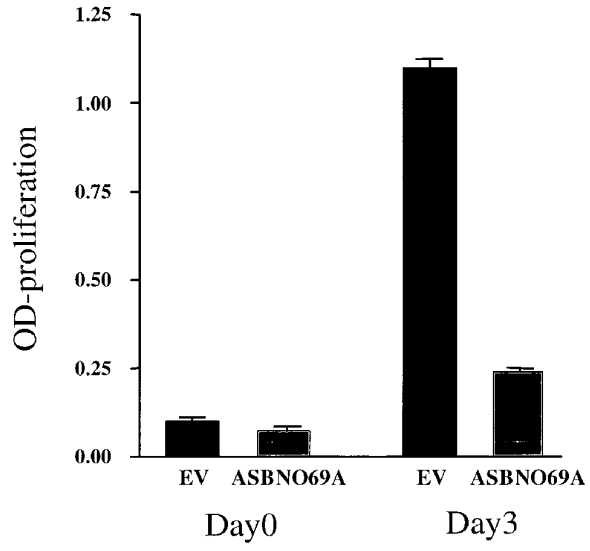


WO 03/027285

PCT/AU02/01282

5/11

Figure 5



WO 03/027285

PCT/AU02/01282

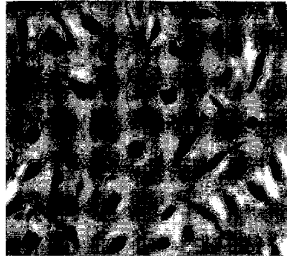
6/11

Figure 6

EV



ASBNO69R

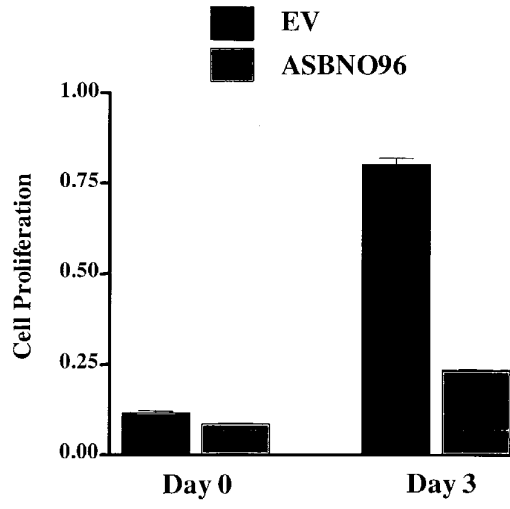


WO 03/027285

PCT/AU02/01282

7/11

Figure 7



WO 03/027285

PCT/AU02/01282

8/11

Figure 8

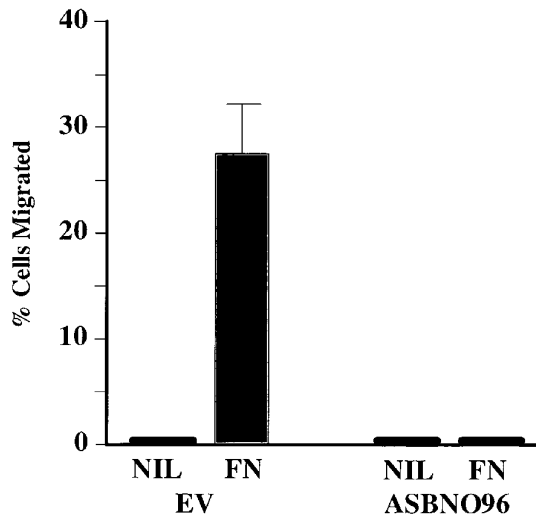
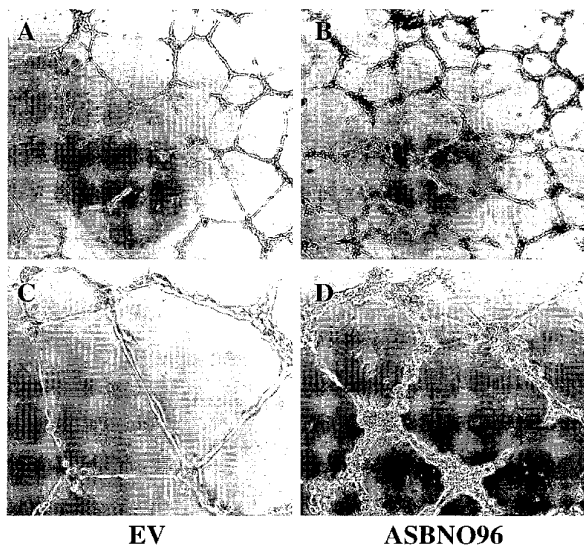


Figure 9

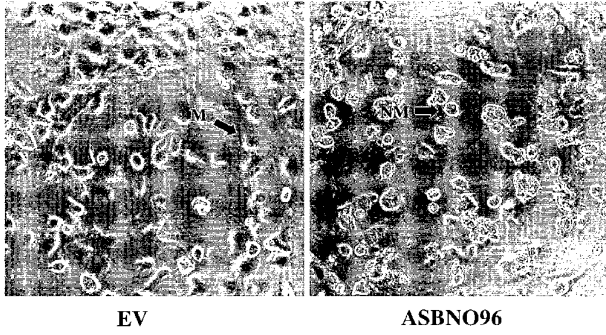


WO 03/027285

PCT/AU02/01282

10/11

Figure 10



WO 03/027285

PCT/AU02/01282

11/11

Figure 11

	Basal E-selectin (MFI)	4-hr TNF Induced E-selectin (MFI)
Normal HUVEC	0.03	26.5
EV	0.6	20.9
ASGNG12	0.9	17.6

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/01282
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ : C12N 15/11		
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) SEE BELOW		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched SEE BELOW		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Swiss Prot: SEQ ID Nos 1-10 GenBank: SEQ ID Nos 1-10		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Genome Res 11, pp 422-435 (2001) Wiemann et al "Towards a catalog of human genes and proteins: sequencing and analysis of 500 novel complete protein coding human cDNAs"; and EMBL Accession No AL136646; 20.03.2002; relevant to SEQ ID No 1	1-10 and 24
X	EMBL Accession Number AL031428 "Human DNA sequence from clone RP-1-18419 on chromosome 1p35.1-36.12". 07.02.2000; relevant to SEQ ID No 2	1-10 and 24
X	Genome Res 8, pp 1097-1108 (1998) "Toward a complete human genome sequence"; and GenBank Accession No AC004892; 21.12.1999; relevant to SEQ ID Nos 3, 5 and 9	1-10 and 24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family annex		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 31 October 2002	Date of mailing of the international search report 08 NOV 2002	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929	Authorized officer MADHU K. JOGIA Telephone No : (02) 6283 2512	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/01282
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EMBL Accession Number AL049796 "Human DNA sequence from clone RP4-561L24 on chromosome 1p22-31.1". 25.05.2000; relevant to SEQ ID No 4	1-10 and 24
F,X	Gene 293, pp 47-57 (2002) Rupp et al "Identification, genetic organization and mRNA expression of <i>CRELD1</i> , the founding member of a unique family of matricellular proteins"; and GenBank AF 452623; 05.07.2002; relevant to SEQ ID No 6	1-10 and 24
F,X	GenBank Accession No AK056493. "NEDO human cDNA sequencing project". 01.08.2002; relevant to SEQ ID No 7	1-10 and 24
P,X	GenBank Accession No AC097639 "Homo sapiens chromosome 3 clone RP11-384L8, complete sequence". 30.04.2002; relevant to SEQ ID No 8	1-10 and 24
P,X	GenBank Accession No AC098482. "Homo sapiens chromosome 3 clone RP11-839L21, complete sequence". 18.05.2002; relevant to SEQ ID no 10	1-10 and 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/01282
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos :	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/> Claims Nos :	because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos :	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
SEQ ID Nos 1-114 constitute 11 different inventions, according to current practice. The applicant on invitation has identified as the first invention SEQ ID Nos 1-10.		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:Related to SEQ ID Nos 1-10; see Supplemental Box
Remark on Protest		
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU02/01282**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of Boxes I to VIII is not sufficient)

Continuation of Box No: II

The international application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. The fundamental test for unity of invention is specified in Rule 13.2 of the Regulations under the PCT.

"Where a group of inventions is claimed in one and the same international application, the requirement of unity of invention referred in Rule 13.1 shall be fulfilled only where there is a technical relationship among those inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. The expression "special technical feature" shall mean those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, make over the prior art."

The problem addressed by the present application is the identification of genes to be differentially expressed during the angiogenesis process. The solution provided by the claims resides in the use of 114 polynucleotide sequences and 101 polypeptide sequences. These sequences fall within a vast number of groups (based on at least 60 different gene type groups) as illustrated in Tables 1 and 2 of the present application.

The general concept underlying the present application appears to reside in the nucleic acid molecules encoding a polypeptide that has a role in angiogenesis. However, these molecules can only be considered to constitute a special technical feature if these molecules, considered as a single group, make a substantial contribution over the prior art. There is no indication in the present application that the isolation of the molecules encoding the proteins or the protein per se is inventive.

The following selection of documents disclose the study of genes and proteins displaying properties associated with angiogenesis:

J Cell Biochem 53(4), pp 360-72 (1993) Mallery et al "Modulation of human microvascular endothelial cell bioenergetic status and glutathione levels during proliferative and differentiated growth"

Int J Cancer 93 (4), pp 497-506 (Aug 2001) Rozic et al "Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis"

Gen Pharmacol 35(5), pp 277-85 (2000) Wahl et al "Effects of microenvironmental extracellular pH and extracellular matrix proteins on angiostatin's activity and on intracellular pH."

These documents disclose genes which are differentially expressed during angiogenesis (Mallery et al), models for determining proteins linked with such processes (Rozic et al) and that angiogenic agents target migratory and proliferative cells (EC) in the process of forming new vessels, resulting in growth inhibition or cell death. While the present invention appears to rely on screening of genes for angiogenesis activity, these techniques are well known in the art and cannot be considered to be an inventive concept. Furthermore, the present invention does not provide any advantage, produce any unexpected result or overcome any difficulty associated with the use of these techniques.

..ctd..

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU02/01282**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of Boxes I to VIII is not sufficient)

Continuation of Box No: II

Since there is no obvious special technical feature, it is appropriate to use the Markush approach to analyse the present set of claims. Claims 1, 2, 11, 15 and 16 in particular define alternatives, in a so-called Markush style of drafting. The application of the test of Markush claims gives the following results:

(A) the common property is molecules encoding proteins or claims to proteins, per se;

(B) (1) no common structure is evident from the disclosure of sequences 1-114;

(B) (2) there is no single recognised class of compounds embracing all of the molecules, as the molecules appear to belong to different classes eg, see Tables 1 and 2, each carrying out different biological functions.

It is contrary to normal classification to group together such different molecules, consisting of a vast number of groups resulting in a vast number of different inventions.

As a service to the applicant, multiple inventions, as specified by the applicant, will be searched for a single search fee with the proviso that the total number of nucleic acid sequences or proteins associated with the combination of inventions is no greater than 10. Examples of such combinations which would be acceptable as these contain no more than 10 molecules would be (with reference to Tables 1 and 2 of the present application):

SEQ ID Nos 1-10, 11-20, 21-30, etc

This offer is independent of unity consideration and is provided solely as a service to the applicant. Included in any such search fee would be the polypeptide encoded by the nucleic acid molecules. All of the 114 nucleic acid sequences would be searched for the payment of 10 additional search fees.

For the initial search fee the following inventions will be searched:

SEQ ID Nos 1-10.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 9/10	1 0 1 4 C 0 8 4
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 17/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
C 0 7 K 14/47	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
// C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 P 21/08	

- (31)優先権主張番号 PR 8532
(32)優先日 平成13年10月29日(2001.10.29)
(33)優先権主張国 オーストラリア(AU)
(31)優先権主張番号 PR 8838
(32)優先日 平成13年11月13日(2001.11.13)
(33)優先権主張国 オーストラリア(AU)
(31)優先権主張番号 2002951032
(32)優先日 平成14年8月28日(2002.8.28)
(33)優先権主張国 オーストラリア(AU)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,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,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 ハーン, クリストファー, ノーマン
オーストラリア, サウス オーストラリア 5 0 9 2, モッドブリー ハイツ, ウェッジウ
ッド ロード 2 1
(72)発明者 ヴァダス, マシュー, アレキサンダー
オーストラリア, サウス オーストラリア 5 1 5 2, スティーリング, ブランチ ロード
8

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 DA11 DA12 EA04 GA11 HA12
HA17
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ43 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34

QX02

4B064 AG01 AG27 CA05 CA06 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA05
DA13 DA15

4B065 AA57X AA72X AA90X AA93Y AB01 BA02 CA23 CA24 CA44 CA46

4C084 AA17 MA13 MA31 MA52 MA55 MA57 MA59 MA60 NA14 ZA332
ZA362 ZA452 ZA892 ZA962 ZB152 ZB262 ZC352

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA23 EA28 EA50
EA51 FA72 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005505274A5	公开(公告)日	2006-01-05
申请号	JP2003530854	申请日	2002-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	生态学有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物卢武铉搭配有限公司		
[标]发明人	ガンブルジェニファールス ハーンクリストファーノーマン ヴァダスマシューアレキサンダー		
发明人	ガンブル, ジェニファー, ルス ハーン, クリストファー, ノーマン ヴァダス, マシュー, アレキサンダー		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K45/00 A61P3/10 A61P9/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P27/02 A61P29/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12N5/10 C12P21/08		
CPC分类号	A61P3/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C07K14/47		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K45/00 A61P3/10 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P17/06 A61P19/02 A61P27/02 A61P29/00.101 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA13 4B064/DA15 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA23 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/MA13 4C084/MA31 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/NA14 4C084/ZA332 4C084/ZA362 4C084/ZA452 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZC352 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA23 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	Kazehaya信明 浅野纪子		
优先权	2001PR7973 2001-09-27 AU 2001PR7974 2001-09-27 AU 2001PR8210 2001-10-11 AU 2001PR8532 2001-10-29 AU 2001PR8838 2001-11-13 AU 2002951032 2002-08-28 AU		
其他公开文献	JP4486815B2 JP2005505274A		

摘要(译)

分离的核酸分子，其包含SEQ ID NO：1-20之一所示的序列。

