

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3891306号  
(P3891306)

(45) 発行日 平成19年3月14日(2007.3.14)

(24) 登録日 平成18年12月15日(2006.12.15)

(51) Int. Cl.	F I
<b>C O 7 K 14/705 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/705
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21

請求項の数 8 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-297146 (P2005-297146)	(73) 特許権者	000003034 東亜合成株式会社 東京都港区西新橋1丁目14番1号
(22) 出願日	平成17年10月12日(2005.10.12)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(62) 分割の表示	特願平8-211892の分割	(72) 発明者	渋谷 正史 埼玉県川口市芝5374-18-601
原出願日	平成8年7月23日(1996.7.23)	(72) 発明者	岡本 雅次 茨城県つくば市大久保2番東亜合成株式会 社つくば研究所内
(65) 公開番号	特開2006-94861 (P2006-94861A)	(72) 発明者	丹羽 幹夫 茨城県つくば市大久保2番東亜合成株式会 社つくば研究所内
(43) 公開日	平成18年4月13日(2006.4.13)		
審査請求日	平成17年11月10日(2005.11.10)		
(31) 優先権主張番号	特願平7-286476		
(32) 優先日	平成7年10月7日(1995.10.7)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 V E G F 結合性ポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

V E G F に結合して V E G F の活性を阻害することができる、配列番号：1 のアミノ酸番号-22から246までのアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項2】

V E G F に結合して V E G F の活性を阻害することができる、配列番号：1 のアミノ酸番号1から214までのアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項3】

請求項1または2に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換及びノ又は付加されているポリペプチドであって、V E G F に結合して V E G F の活性を阻害することができる、ポリペプチド。

【請求項4】

ヒト I g G 1 の F c 領域と融合している、請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項5】

請求項1～4のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする D N A 。

【請求項6】

請求項5に記載の D N A を含むベクター。

【請求項7】

請求項6に記載のベクターを保持する形質転換体。

## 【請求項 8】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリペプチドからなる分析試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、血管新生阻害剤として有用なポリペプチド、およびその製造方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

幾つかの疾病では、その症状や病因と密接に関連した病理的血管新生を伴うことが知られている。中でも代表的な疾病は固形ガンで、ガン組織が直径 1 ~ 2 mm を越えて増殖するためには、既存血管から新生血管が伸びてガン組織まで到達することが必要であり (J. Folkman, J. Natl. Cancer Inst., 82:4 (1990))、また血管がガン組織に到達するとガン組織の増殖が爆発的に加速される。また、糖尿病性網膜症では網膜に病理的血管新生を伴い、それが原因でしばしば失明することがある。更に慢性関節リウマチ、乾癬、血管腫、強皮症、血管新生緑内障などの疾病においても病理的血管新生を伴い、それが主な症状の一つとなっている (J. Folkman, N. Engle. J. Med., 320:1211 (1989))。従って血管新生を阻害する物質はガンや前述の疾病の治療に利用できる可能性がある。

10

## 【0003】

血管内皮細胞は血管の最も内側の層を形成している細胞である。血管新生は血管内皮細胞が成長因子や生理活性物質または機械的損傷などの刺激を受けて、増殖することによって行われる。直接または間接的に血管内皮細胞の増殖を刺激する成長因子として、bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)、aFGF (acidic Fibroblast Growth Factor)、VEGF (Vascular Endothelial cell Growth Factor)、PD-ECGF (Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor)、TNF- (Tumour Necrosis Factor- )、PDGF (Platelet Derived Growth Factor)、EGF (Epidermal Growth Factor)、TGF- (Transforming Growth Factor- )、TGF- (Transforming Growth Factor- )、HGF (Hepatocyte Growth Factor) が知られている (L. Diaz-Flores et al., Histol. Histopath., 9:807 (1994))。特に VEGF は、血管内皮細胞に極めて特異的に作用する点で他の成長因子と区別できる。言い換えれば、VEGF のレセプターは、血管内皮細胞以外ではごく限られた細胞でしか発現していない。

20

30

## 【0004】

VEGF は分子量 4 万 ~ 4 万 5 千の糖タンパク質で 2 量体として存在する (P. W. Leung et al., Science 246:1306 (1989)、P. J. Keck et al., Science:246:1319(1989))。VEGF は VEGF レセプターに結合することによって作用し、細胞の増殖を促進し、また膜透過性を促進する。

## 【0005】

VEGF とガンとの関係を示唆する以下のような報告がある。多くのガン細胞は VEGF を分泌する (S. Kondo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 194:1234(1993))。ガン組織切片を抗 VEGF 抗体で染色するとガン組織およびその周辺の新生血管が強く染色される (H. F. Dvorak et al., J. Exp. Med. 174:1275(1991)、L. F. Brown et al., Cancer Res., 53:4727 (1993))。VEGF レセプターの一つが遺伝的に不活化されたマウスでは移植されたガンの増殖が抑制される (B. Millauer et al., Nature, 367:576 (1994))。抗 VEGF 中和抗体が担ガンマウスに対して抗腫瘍活性を示す (K. J. Kim et al., Nature, 362:841 (1993)、S. Kondo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 194:1234(1993))。以上の事実から、ガン細胞が分泌する VEGF が腫瘍血管新生において主要な役割を果していると考えられる。

40

## 【0006】

VEGF のレセプターは、ヒトでは FLT (M. Shibuya, et al., Oncogene, 5:519 (1990)) と KDR (B. I. Terman et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 187:1579 (1992)) の 2 種類が知られている。FLT の細胞外領域は、図 1 に示されるような 7 つのイ

50

ムノグロブリン様ドメインからなる構造を有している (C. DeVries et al., Science, 255:989 (1992))。FLT に関しては、可溶性型レセプターの cDNA がクローニングされている (R. L. Kendal and K. A. Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90:10705 (1993))。この cDNA によりコードされるポリペプチドは、FLT の細胞外領域の 7 つあるイムノグロブリン様ドメインのうち、第 1 ~ 第 6 イムノグロブリン様ドメインと対応しており、本来の FLT と同程度の親和性で VEGF と結合し VEGF 活性を阻害した。また、KDR についても遺伝子工学的に発現させた細胞外領域の第 1 ~ 第 6 ドメインが VEGF に結合することが知られている (R. L. Kendal et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 201:326 (1994))。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

マウスの抗 VEGF 中和モノクローナル抗体は抗腫瘍性を示すことから、抗ガン剤として利用可能であると期待できる。しかしながら、マウスの抗体を人に投与するとマウス抗体に対するヒト抗体が産生され、中和されたりアナフィラキシーショックを引き起こしたりする可能性がある。このようなことを回避するためには、マウス抗体のキメラ化 (S. L. Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81:6851 (1989)) やヒト化を行い、中和能を損なわないようにしながらマウス抗体のアミノ酸配列をヒト抗体のアミノ酸配列に近づける必要がある。そのためには高度の技術と知識、経験、労力が必要であり、成果はケースバイケースで必ずしも成功するとは限らない。またこの方法でも 100% はヒト化できない。他の方法としてはヒト抗体そのものを産生するトランスジェニックマウスを用いて免疫する方法があるが (S. Wagner et al., Nucleic Acid Res., 22:1389 (1994))、やはり高度の専門的な技術が必要である。

【0008】

前述のように、VEGF レセプターの細胞外領域は、VEGF に対し特異的に高親和性で結合し VEGF 活性を阻害できるので、血管新生阻害剤として利用することが考えられる。しかも元々ヒト由来のポリペプチドであるために人に投与しても抗体出現率は低いことが期待できる。しかしながら本来体内に多量に存在しないポリペプチドを投与すると極めて速やかに代謝されてしまうことが報告されている。例えば、HIV のレセプターである CD4 の可溶性型の血中半減期は 15 分であり (D. J. Capon et al., Nature, 337:525 (1989))、インターフェロンの場合は血中半減期は 30 分であった (I. Rutenfranz and H. Kirchner, J. Interferon Res., 8:573 (1988))。

【0009】

血中半減期を延長する方法として、抗体分子のような血中半減期の長い分子との融合ポリペプチドを遺伝子工学的に作成し利用する方法が知られている。CD4 の例では抗体 IgG1 の Fc 領域とのキメラにした場合に血中半減期が 15 分から 48 時間に延長された (D. J. Capon et al., Nature, 337:525 (1989))。また抗体の Fc 領域との融合ポリペプチドにすることによって抗体が持っているエフェクター機能、即ち捕体依存性細胞障害活性 (D. B. Amos et al., Transplantation, 7:220 (1969)) および抗体依存性細胞障害活性 (A. Y. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84:3439 (1987)) を誘導できる効果も期待できる。更に Fc 領域を介して 2 量体化されるので、1 分子が 2 箇所ですり結合できるようになるため、膜表面や細胞外マトリクスなどの固相上のリガンドに結合する場合には親和性が見かけ上、格段に向上する効果も期待できる。

【0010】

抗体との融合ポリペプチドを利用する場合には、融合により分子量が大きくなるので、元のポリペプチドは分子量が小さいことが望ましい。何故なら、分子量が大きいと遺伝子操作で融合ポリペプチドを生産する組換え宿主を作成する際に、扱う DNA の分子量が大きくなるからである。一般に導入する DNA の分子量が大きい程、宿主への導入効率が悪くなり、組換え体が得られる頻度が低下する。また一般に生産させようとする組換えポリペプチドの分子量が大きい程、産生量が低くなる傾向がある。更に固形ガンの治療に利用

10

20

30

40

50

する場合には、分子量の大きいポリペプチドは患部への浸潤性が悪いことが報告されている (D. M. Lane et al., Br. J. Cancer, 70:521 (1994))。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、VEGFを特異的に阻害することにより血管新生を阻害できるポリペプチド、特にVEGFレセプターの細胞外領域に関するポリペプチドのうち分子量が小さいポリペプチドを見いだすことを目的として鋭意努力した。その結果、FLTの細胞外領域の第1イムノグロブリン様ドメインおよび第2イムノグロブリン様ドメインを含むポリペプチドがVEGFに特異的かつ高親和性で結合し、VEGF活性を阻害できることを見いだした。なお、本明細書において「ポリペプチド」とは、アミノ酸同士がペプチド結合によって共有結合しているもの一般を指し、長さの制限はないものとする。

10

【0012】

本発明のポリペプチドには、FLTの細胞外領域の第1イムノグロブリン様ドメインおよび第2イムノグロブリン様ドメインのみからなるものの他に、他のドメインを含んでいるものも含まれる。例えば、第1イムノグロブリン様ドメイン～第4イムノグロブリン様ドメインの全てを含むポリペプチド、第1イムノグロブリン様ドメイン～第5イムノグロブリン様ドメインの全てを含むポリペプチドも本発明のポリペプチドに含まれる。なお、第1イムノグロブリン様ドメイン～第6イムノグロブリン様ドメインの全てを含むポリペプチドまたは第1イムノグロブリン様ドメイン～第7イムノグロブリン様ドメインの全てを含むポリペプチドは、分子量が大きすぎるので「組換えDNA技術による発現が行い易く、患部への浸潤も速やかである」という本願発明の効果を十分に奏し得ないものであると考えられ、本願発明のポリペプチドからは除外される。なお、FLTの各ドメインの境界は明確に区別されるものではないが、本明細書においては各ドメインは、それぞれ、以下の残基番号のアミノ酸配列を含むドメインと定義される。[なお、残基番号は、配列番号：1のものと同じである。即ち、成熟FLTのN末端(配列番号1の1位の「Ser」)から数えた残基番号を示す。]

20

第1イムノグロブリン様ドメイン 1～110  
 第2イムノグロブリン様ドメイン 111～208  
 第3イムノグロブリン様ドメイン 209～311  
 第4イムノグロブリン様ドメイン 312～407  
 第5イムノグロブリン様ドメイン 408～535  
 第6イムノグロブリン様ドメイン 536～640  
 第7イムノグロブリン様ドメイン 641～736

30

更に本発明は、上記FLTの細胞外領域と他のタンパク質(例えば、イムノグロブリンのFc領域)とが融合したポリペプチドも含む。

【発明の効果】

【0013】

本発明のポリペプチドはVEGF刺激による血管新生を阻害することができるので固形ガンその他の病理的血管新生を伴う疾病の治療に利用できる。また、ヒト由来のアミノ酸からなるのでヒトに長期投与しても抗体ができにくい。更に、従来のポリペプチド(R. L . Kendal and K. A. Thomas, Proc. Natl., Acad. Sci., U. S. A., 90:10705 (1993))より分子量が小さいので組換えDNAによる発現が行い易く、患部への浸潤も速やかである。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

これらのペプチドは次のような手順を経て生産することができる。ヒト血管内皮細胞、例えばヒト臍帯由来血管内皮細胞(岩城硝子、森永乳業、クラボウなどから販売)を培養し酸性フェノール法(P. Chomzynski and N. Sacchi, Anal. Biochem., 162:156 (1987))により全RNAを抽出し、オリゴdTセルロースによってポリ(A)<sup>+</sup>RNAを調製する。これを鋳型として逆転写酵素とオリゴdT(12～16)プライマーを用いて1本

50

鎖 cDNA または 2 本鎖 cDNA を合成する。ポリ (A)<sup>+</sup>RNA の調製法、cDNA の調製法については「J. Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989」に従って行うことができる。また市販のポリ (A)<sup>+</sup>RNA 調製試薬 (Oligotex-dT30、宝酒造製) や cDNA 合成キット (ファルマシアバイオシステム社製) を用いても行うことができる。既に cDNA ライブラリーからクローニングされた flt cDNA がある場合は、直接、発現させようとする領域の DNA を適当な制限酵素で切り出し、発現ベクターに導入してもよい。

#### 【0015】

次に得られた cDNA を鋳型として PCR 法 (「PCR Protocols», Academic Press Inc., 1990 参照) により目的部分の DNA を増幅することができる。例えば、以下のよ  
10  
うなプライマーを使用すればよい。プライマー DNA は DNA 合成機 (アプライドバイオシステムズ製、日本ミリポアリミテッド製など) で合成するか、カスタム DNA を注文することができる (サワディテクノロジー社)。例えば第 1 イムノグロブリン様ドメイン ~ 第 4 イムノグロブリン様ドメインをコードする cDNA を得る場合は、  
上流プライマー : 5'-N(3~5)X(6)CGTCGCGCTCACCATGGTCAG-3' (配列番号 : 2)  
下流プライマー : 5'-N(3~5)Y(6)TTATTCGTAATCTGGGGTTTCAC-3' (配列番号 : 3) を用  
いればよい。

#### 【0016】

配列中、N は A、C、G、T の何れか、X または Y は制限酵素認識配列、括弧内の数字  
20  
は塩基数を表す。具体的には、N(3~5) は A、C、G、T の何れかが 3 ~ 5 個存在する  
ことを示し、X(6) または Y(6) は、6 塩基を認識する制限酵素の認識部位を示す。これらの  
制限酵素認識配列は、増幅しようとする DNA 断片およびそれを挿入しようとするベク  
ターには存在しない配列にすることが望ましい。配列番号 : 1 に記載の塩基配列を参考にし  
て適宜下流プライマーを設計し、所望の C 末端をコードする DNA 断片を増幅するこ  
とができる。また発現ベクターに組み込まれた時には、ポリペプチドのコーディング配列はプ  
ロモーターに対して順方向に配置していなければならない。プライマー配列中、flt  
DNA 配列と対応する部分は必ずしも 21 塩基に限定する必要はなく 17 ~ 25 塩基程度  
でもよい。PCR の条件は前述の「PCR Protocols」記載の標準的条件でよいが、鋳型の量  
30  
やプライマー配列によって反応の進み方が異なるので、効率よく行うために、各パラメ  
ター (例えば Mg<sup>++</sup> 濃度、アニーリング温度、延長反応時間、サイクル数など) を適宜変  
更し、至適化することができる。PCR に使用する DNA ポリメラーゼは、Taq ポリメ  
ラーゼよりプルーフリーディング (3' エクソヌクレアーゼ) 活性のある Pfu ポリメ  
ラーゼ (Stratagene 社) か Taq ポリメラーゼに Pfu ポリメラーゼを添加したものを  
用いた方が、PCR 増幅時の信頼性 (Fidelity) が増す (W. M. Barnes, Proc. Natl. Acad.  
Sci. U. S. A., 91:2216 (1994))。

#### 【0017】

この場合の PCR で増幅しようとする DNA 断片は配列が既知なので、増幅後アガロ  
スゲル電気泳動でサイズを確認し、またゲルより回収して、適当な制限酵素で消化し、そ  
の電気泳動パターンを調べることにより目的の DNA 断片が得られたかどうか判断するこ  
とができる。アガロースゲル電気泳動、DNA 断片のゲルからの回収、制限酵素による切  
40  
断は前述の「Molecular Cloning」に従って行うことができる。また DNA のゲルからの  
回収には市販のグラスビーズを利用したキット (例えば Prep-A-Gene、パイオラッド社)  
を使用することができる。

#### 【0018】

回収した DNA 断片は、X(6) および Y(6) を切断できる制限酵素で断片の両端を消化し  
、フェノール処理により除タンパクを行い、エタノール沈澱し、適当なバッファー、例  
えば TE (10mM Tris-HCl (pH7.5) / 1 mM EDTA) に溶かす。同様にして適当な発現ベクターの  
クローニング用部位を、X(6) および Y(6) を切断できる制限酵素で切断し、アガロースゲ  
ル電気泳動を行い、ベクター DNA を回収する。このようにすることによって X(6) およ  
び Y(6) 切断部位間の小さな断片を除くことができる。これらの挿入しようとする DNA  
50

断片および切断したベクターDNAを例えば、ベクターDNA：挿入DNA断片の比が1：5～1：10になるように加え、T4DNAリガーゼを用いてライゲーション反応を行う。ライゲーション産物を大腸菌コンピテント細胞に加え、形質転換を行い、ベクターにコードされた選択マーカー（例えば、アンピシリン耐性、カナマイシン耐性など）に対応する抗生物質を含む培地でまず抗生物質耐性の形質転換体を選択する。

#### 【0019】

発現ベクターにDNA断片が挿入された組換え体は、抗生物質耐性の各形質転換体を持つプラスミドの制限酵素切断パターンを調べて選択する。または各形質転換体を菌体ごと鑄型として、挿入しようとするDNA断片を増幅したプライマーを用いてPCRすることにより、目的とするDNA断片が増幅されるか否かで組換え体かどうか調べることができる。これらの大腸菌の組換え体を得る一連の操作は前述の「Molecular Cloning」に従って行うことができる。

10

#### 【0020】

本発明のポリペプチドを生産させるために様々な宿主を利用することができる。例えば *Escherichia coli*、*Pseudomonas*属細菌、*Bacillus subtilis*、*Bacillus brevis*、*Bacillus liqueniformis*、*Bacillus thuringensis*などのグラム陰性 またはグラム陽性細菌、*Pichia pastoris*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Saccharomyces cerevisiae*などのような酵母、*Aspergillus*属のような真菌類、Sf9 (*Spodoptera frugiperda*由来)、Sf21、TN5 (*Trichoplusia ni*由来)、BN4 (*Bombyx mori*由来) などのような昆虫細胞、CHO (Chinese hamster ovary由来)、COS細胞 (サル腎臓由来) などのようなほ乳類細胞が利用できる。ベクターは宿主の種によってそれぞれ適したベクターを利用すればよい。最終的な形質転換細胞を得る前に、本発明のポリペプチドを生産しようとする宿主と大腸菌とのシャトルベクターを用い、一度大腸菌で組換えDNAを得るのがより容易であろう。本発明のポリペプチドを生産する組換え宿主を得るための形質転換方法は、大腸菌ではコンピテント細胞、*Bacillus*属ではコンピテント細胞法 (K. Bott and G. A. Willson, *J. Bacteriol.*, 94:562 (1967))、プロトプラスト法 (M. Mandel and A. Higa, *J. Mol. Biol.*, 53:159 (1970))、酵母ではプロトプラスト法 (M. Broker et al., *BioTechniques*, 5:516 (1987))、昆虫細胞およびほ乳類細胞ではリポフェクシン法 (R. W. Malone et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86:6077 (1989))、リン酸カルシウム法 (F. L. Graham and A. J. van der Eb, *Virology*, 52:456 (1973)) により行うことができる。またエレクトロポレーション法 (BIORAD社パンフレット等参照) は前述の全ての細胞に応用可能である。

20

30

#### 【0021】

基本的には使用する宿主内で複製可能なプラスミドまたはウイルスDNAを用い、発現させたい部分をコードするDNAをその宿主内で機能する強力なプロモーターの下流に組み入れればよい。発現させようとする遺伝子に翻訳開始コドンがない場合にはこれを付加する必要がある。また原核細胞を宿主に用いる場合はリボソーム結合配列が (J. R. MacLaughlin et al., *J. Biol. Chem.*, 256:11283 (1981)) 必要である。宿主染色体DNAの一部を有し、宿主内で複製できないベクターを用いて宿主染色体と相同組換えを起こさせ、宿主染色体内にベクターごと組込む方法も利用することができる (特開平4-278092号公報、D. J. King et al., *Biochem. J.*, 281:317 (1992))。また培養細胞ではなく、動物または植物固体を宿主とする方法も利用可能である。例えばカイコのウイルスであるBmNPVの組換えウイルスを作成しカイコに接種することにより、培養細胞を宿主とする場合に比べ、より高い生産性でカイコ体液からポリペプチドが得られるであろう (河合秀樹、下群洋一郎、*バイオインダストリー*、8:39 (1991))。pSV系ベクターの組換え体で形質転換したマウスミエロマ細胞をSCIDマウスやヌードマウスの腹腔に移植し腹水から、組換えポリペプチドを回収することも可能であろう。本発明のDNAを用いたトランスジェニック動物 (G. Wright et al., *Bio/Technology*, 9:830 (1991)) またはトランスジェニック植物 (M. Owen et al., *Bio/Technology*, 10:790 (1992)) を宿主として利用することも可能であろう。

40

50

## 【 0 0 2 2 】

本発明のポリペプチドを細胞外に分泌させるには、真核細胞を宿主に用いる場合は F L T のシグナルペプチドコーディング部分をそのまま使用すればよい。細菌では使用する宿主の分泌ポリペプチドのシグナルペプチドをコードする D N A を利用することができるであろう。例えば、大腸菌では外膜タンパク質である OmpA、OmpF、フォスファターゼである PhoA、マルトース結合タンパク質である MalB、Bacillus 属では塩基配列が既知のアミラーゼ、アルカリフォスファターゼ、セリンプロテアーゼなどのシグナルペプチドをコードする D N A を利用することができる。また細胞内に発現させる場合には開始コドン以外のシグナルペプチドコーディング部分を除いて利用すればよい。細菌の細胞内で外来性のポリペプチドを高発現させた場合にはしばしば封入体の形成が起こるが、その場合は 8 M 尿素で可溶化後、数  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のポリペプチド濃度まで希釈し透析により徐々に尿素を除くことで活性の何割かが回収できるであろう。また、大腸菌内で、大腸菌チオレドキシンを同時に高発現させることにより、封入体を生じさせにくくさせることも可能である。

10

## 【 0 0 2 3 】

前述のような方法で得られた本発明のポリペプチドは、一般的な生化学的方法により精製することができる。例えば硫酸アンモニウム沈澱、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、疎水性クロマトグラフィーなどを利用することができる。本発明のポリペプチドはヘパリン親和性を有するので、ヘパリン樹脂によるアフィニティクロマトグラフィーを利用することができる。他のポリペプチドとの融合ポリペプチドの場合は、相手のポリペプチドが有する特性を利用して精製することが可能である (M. Uhlen et al., Methods Enzymol., 185:129 (1990))。例えば融合ポリペプチドの相手が抗体の F c 領域である場合にはプロテイン A セファロースまたはプロテイン G セファロース (E. Harlow and D. Lane, "Antibodies", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)、グルタチオントランスフェラーゼ (G S T) である場合にはグルタチオンセファロース (D. B. Smith and F. S. Johnson, Gene, 67:31 (1988))、クロラムフェニコールトランスフェラーゼである場合にはクロラムフェニコールセファロース、ヒスチジンオリゴマーである場合には  $\text{Ni}^{++}$ -NTA (nitrilotriacetic acid) アガロースを用いたアフィニティクロマトグラフィー (F. H. Arnold, Bio/Technology, 9:151 (1991)) を利用することができる。

20

## 【 0 0 2 4 】

本発明のポリペプチドを含む画分は本ポリペプチドに反応する抗体を用いた E I A またはウェスタン解析によって検出することができる。本発明のポリペプチドと反応する抗体は、N 末端より 2 4 番目 ~ 3 0 番目にアミノ酸配列に対応するオリゴペプチドを合成し、牛血清アルブミンまたは K L H (keyhole limpet hemocyanine) などのキャリアタンパク質とのコンジュゲイトを作成しウサギなどに標準的な方法で免疫することで得られる (E. Harlow and D. Lane, "Antibodies", Cold Spring Harbor Press, 1988)。また本発明のポリペプチドと他のポリペプチドとの融合ポリペプチドを大腸菌で生産し、前述のように融合相手のポリペプチドの特性を利用して精製して免疫原として用いても本発明のポリペプチドに反応する抗体は得られる。

30

## 【 0 0 2 5 】

本発明のポリペプチドは V E G F に結合するので、その活性を指標として精製することもできる。例えば E I A 用に抗体固相化プレートを調製するのと同様の要領で、精製前の本発明のポリペプチドを含む溶液を適当に希釈し、96 穴のポリスチレン製マイクロタイタープレートをコートしてブロッキング処理したプレートを作成する。このプレートは V E G F を特異的に結合するので、 $^{125}\text{I}$  標識 V E G F を使用すればウェルに残る放射活性から結合が確認できる。本発明のポリペプチドを精製するために行ったクロマトグラフィーの画分と  $^{125}\text{I}$ -V E G F をブレインキュベートしてからこのプレートのウェルに移し、残る放射活性を測定する。その画分に本発明のポリペプチドが存在すればブレインキュベーション中に V E G F に結合し、プレート上の本発明のポリペプチドと拮抗してプレートに結合しにくくなることで存在が確認できる。

40

50

## 【 0 0 2 6 】

本発明のポリペプチドはVEGFに高い親和性 ( $K_d=5 \times 10^{-11}$  程度) で結合してVEGFがVEGFレセプターに結合することを阻害する。従って本発明のポリペプチドは低濃度でVEGF活性を阻害することができる。本発明のポリペプチドはVEGF活性を阻害するのでVEGF刺激による血管内皮細胞の増殖を阻害する。また、本発明のポリペプチドはVEGFによる血管透過性促進を阻害する。更に、本発明のポリペプチドはインビボでVEGFによる血管新生を阻害し、本腫瘍の増殖を阻害する。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 2 7 】

I. 第1～第4イムノグロブリン様ドメインおよび第1～第5イムノグロブリン様ドメインからなるポリペプチドに関する実施例

10

[ 実施例 1 ] FLT細胞外領域を発現する組換えバキュロウイルスの作成

1) FLTの第1～第4イムノグロブリン様ドメインを発現する組換えウイルスの作成  
 基本的にはサンプルック (J. Sambrook) らの「Molecular Cloning」に記載された方法に従い図2に示す手順でベクターの構築を行った。FLTの第1～第4イムノグロブリン様ドメインを発現する組換えウイルスを得るために、プラスミドpflt3-7 (M. Shibuya et al., Oncogene, 5:519 (1990)) のDNAを制限酵素EcoRIおよびNdeIで消化し、アガロースゲル電気泳動により分離した約1.6kbpのEcoRI-NdeI DNA断片を調製した。一方プラスミドpME18SNeoのDNAを制限酵素EcoRIおよびXhoIで消化し、アガロースゲル電気泳動により分離した約5.5kbpのEcoRI-XhoI DNA断片を調製した。NdeI末端をXhoI末端に変換するためにアダプターとして、「5'TATTAATGATCTAGATGAC 3'」(配列番号: 4) と「5'TCGAGTCATTCTAGATCATTA 3'」(配列番号: 5) のオリゴヌクレオチドを室温で混合し、更に前記「1.6kbpのEcoRI-NdeI DNA断片」と「5.5kbpのEcoRI-XhoI DNA断片」とを混合してT4 DNAリガーゼを用いて連結反応を行い、大腸菌に導入した。得られた組換えプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIで消化し、得られた1.6kbpのDNA断片を回収し、pVL1393 (PharMingen社) のEcoRI/NotI部位に導入した。このプラスミドDNAを精製し、ポヘドリンコード領域を欠失したバキュロウイルスDNAであるBaculoGold (PharMingen社) を用いてマニュアルに従って組換えウイルスを得た。この組換えバキュロウイルスを「B4N」と名付けた。組換えバキュロウイルス「B4N」をSf9細胞を用いてマニュアルに従って増幅し、以降の実験に使用した。なお、「B4N」はFLTのN末端から457残基までのアミノ酸配列をコードするDNAを含んでいる。

20

30

## 【 0 0 2 8 】

2) FLTの第1～第5イムノグロブリン様ドメインを発現する組換えウイルスの作成  
 基本的にはサンプルック (J. Sambrook) らの「Molecular Cloning」に記載された方法に従い図3に示す手順でベクターの構築を行った。プラスミドpflt3-7 DNAをEcoRIおよびHindIIIで切断し、1.9kbpのEcoRI-HindIII DNA断片を調製した。HindIII末端をXhoIに変換するためにアダプターとして、オリゴヌクレオチド「5'AGCTTTAATGATCTAGAATGAC 3'」(配列番号: 6) と「5'TCGAGTCATTCTAGATCATTA 3'」(配列番号: 7) とを混合して加え、前述のプラスミドpME18SNeoの5.5kbpのEcoRI-XhoI DNA断片と連結し、これを用いて大腸菌を形質転換し、組換えプラスミドを得た。得られた組換えプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIで消化し、得られた1.9kbpのDNA断片を回収し、pVL1393 (PharMingen社) のEcoRI/NotI部位に導入した。このプラスミドDNAを精製し、ポヘドリンコード領域を欠失したバキュロウイルスDNAであるBaculoGold (PharMingen社) を用いてマニュアルに従って組換えウイルスを得た。この組換えバキュロウイルスを「B5N」と名付けた。組換えバキュロウイルス「B5N」をSf9細胞を用いてマニュアルに従って増幅し、以降の実験に使用した。なお、「B5N」はFLTのN末端から560残基までのアミノ酸配列をコードするDNAを含んでいる。

40

50

## 【 0 0 2 9 】

## [ 実施例 2 ] 発現産物の免疫化学的解析

昆虫細胞 *H i F i v e* (Invitrogen Corp.製) を *E x C e l l 1 4 0 0* 培地 (岩城硝子社製) で培養し、組換えバキュロウイルス「*B 4 N*」または「*B 5 N*」を感染させ培養上清を回収した。このサンプルを *S D S* - ポリアクリルアミドゲル電気泳動しウェスタンブロッティングを行った。1次抗体にウサギ抗 *F L T* 細胞外領域ポリクローナル抗体を用い、2次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ *I g G* 使用し、*N T B* (Nitroblue tetazolium chrolide) / *B C I P* (5-Bromo-4-chrolo-3-indolyphosphate p-toluidine salt) (Gibco BRL製) で発色させた。その結果この抗体との特異的な反応性が確認された (図 4)。レーン 1 は *B 4 N* 感染細胞培養上清  $2 \mu l$ 、レーン 2 は *B 4 N* 感染細胞抽出液  $1 0 \mu l$ 、レーン 3 は *B 5 N* 感染細胞培養上清  $2 \mu l$ 、レーン 4 は *B 5 N* 感染細胞抽出液  $1 0 \mu l$  を泳動したものである。免疫化学的に反応したバンドの移動度は予想される分子量と一致した。以後これらの産物を「*4 N - F L T*」および「*5 N - F L T*」と称する。また培養上清サンプル中におよそ  $2 \mu g / m l$  の「*4 N - F L T*」または「*5 N - F L T*」が含まれていると判定された。

10

## 【 0 0 3 0 】

[ 実施例 3 ] 発現産物の *V E G F* との親和性

*H i F i v e* 細胞に組換えウイルス「*B 4 N*」または「*B 5 N*」を感染させ、得られた培養上清を *P B S* で 4 倍に希釈しマイクロタイタープレート (「イムロン 2」ダイナテック社製) のウェルに  $1 0 0 \mu l$  入れ 4 で一夜置き、ウェルから除去した。ウェルを *P B S* -  $0 . 1 \% B S A$  で 3 回洗浄し、次に *P B S* -  $1 \% B S A$  を  $2 5 0 \mu l$  入れ、室温で 2 時間放置しブロッキングした。ウェルの中の液を捨て、 $1 0 0 \mu l$  中に比活性  $66,000 cpm / ng$  の  $^{125} I - V E G F_{165}$  (*V E G F* の *N* 末端から 165 番目までの残基からなるペプチド / アマシャム社製)  $20280 cpm$  に非標識の *V E G F\_{165}* を  $0 \sim 15000 pg$  混合した溶液を入れ室温で 3 時間放置した。ウェルの中の液を捨て *P B S* -  $0 . 1 \% B S A$  で 3 回洗浄し、各ウェルに残った放射活性をカウンターで測定しスカッチャード解析を行った (図 5)。図 5 A、B はそれぞれ「*B 4 N*」「*B 5 N*」発現培養上清をコートしたプレートを用いた結果である。この時にコントロールウイルス感染 *S f 9* 細胞の培養上清でコートしたプレートには  $^{125} I - V E G F_{165}$  はほとんど結合しないので、結合放射活性は挿入遺伝子からの発現産物への  $^{125} I - V E G F_{165}$  の結合であると考えられる。「*B 4 N*」または「*B 5 N*」感染細胞の培養上清中の発現産物の *V E G F\_{165}* に対する親和性は共に *K d* (解離定数) がおよそ  $3 \sim 4 . 5 \times 1 0^{-11}$  であり *F L T* (J. Waltenberger, et al., J. Biol. Chem., 269:26988 (1994)) または可溶性型 *F L T* (R. L. Kendal and K. A. Thomas, P roc. Natl., Acad. Sci., U. S. A., 90:10705 (1993)) について報告されている値に近かった。

20

30

## 【 0 0 3 1 】

[ 実施例 4 ] 発現産物による *V E G F* の生物活性の阻害1) *V E G F* の透過性促進活性の阻害

*V E G F* の透過性促進活性に対する「*4 N - F L T*」または「*5 N - F L T*」の阻害効果を調べた。モルモットの心臓内に  $0 . 5 m l$  の  $1 \%$  エバンスブルー色素液を注入し、30分後に *V E G F* と共に  $0 . 2 m l$  の「*4 N - F L T*」または「*5 N - F L T*」発現培養上清を剃毛した皮下に注入し、更に 30分後に色素の漏出を観察した (表 1)。この結果から「*4 N - F L T*」および「*5 N - F L T*」は *V E G F* の透過性促進活性を阻害することが明らかになった。

40

## 【 0 0 3 2 】

【表 1】

4N-FLTおよび5N-FLTのVEGF透過性促進活性に対する阻害効果

サンプル	色素漏出 (相対値)	
PBS	0 %	
10 ng VEGF/0.2 ml	100 %	
10 ng VEGF+Ca. 400 ng 4N-FLT/0.2 ml	5 %	10
10 ng VEGF+Ca. 400 ng 5N-FLT/0.2 ml	< 5 %	

## 2) ラット類洞壁内皮細胞のVEGF依存性増殖の阻害

VEGF依存性の増殖に対する「4N-FLT」または「5N-FLT」の阻害効果を調べた。ラットの肝臓より記載の方法で類洞壁内皮細胞を調製し、24穴プレートに10<sup>4</sup>/ウェルで撒き、表2に示したサンプル存在下で4日間培養し、ウェル内の細胞数を測定した。表2の細胞数の欄の数値は撒いた直後の細胞数を100と表した時の相対値である。「4N-FLT」「5N-FLT」のサンプルはそれぞれの組換えウイルス感染Hifive培養上清を使用し、含有量はウェスタン解析の結果を元に算出した。この結果から「4N-FLT」および「5N-FLT」はVEGFの内皮細胞増殖活性を投与量依存的に阻害することがわかる。

【0033】

【表 2】

「4N-FLT」および「5N-FLT」のラット肝類洞壁内皮細胞の

VEGF依存性増殖阻害活性

VEGF濃度 (ng/ml)	4N-FLT濃度 (ng/ml)	5N-FLT濃度 (ng/ml)	細胞数	
0	0	0	0	10
1	0	0	260	
1	40	0	40	
1	100	0	44	
1	0	40	27	
1	0	100	28	20
3	0	0	300	
3	40	0	191	
3	100	0	69	
3	0	40	221	
3	0	100	83	

## II. 第1～第2イムノグロブリン様ドメインからなるポリペプチドに関する実施例

[実施例5] FLT細胞外領域(EDF)と反応するポリクローナル抗体の作成 30

1) ヒト臍帯由来血管内皮細胞(HUVEC) cDNAの調製

HUVEC(クラボウ製)約 $1 \times 10^7$ 個の細胞に1mlのISOGEN(和光純薬工業製)を加えペッスルで細胞を破碎し更に9mlのISOGENを加え5分間振とうした。この溶液に1mlのクロロフォルムを添加し1分間振とうし、10,000rpmで10分間遠心し、上清液を回収し、1/10容の3M酢酸ナトリウム(pH5.2)を添加して混合し更に2.5容のエタノールを添加した。遠心して沈澱を回収し、75%エタノールで沈澱を洗浄し乾燥して100 $\mu$ lの加熱滅菌した純水に溶解した。102 $\mu$ gのRNAが得られた。この溶液に10%SDSを1 $\mu$ l添加し100 $\mu$ lの「Oligotex-dT30(宝酒造製)」を添加し65 $^{\circ}$ Cで5分間保温した後、氷中にて急冷した。この溶液に20 $\mu$ lの5M塩化ナトリウムを混合し37 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。この懸濁液を15,000rpmで15分間遠心し、沈澱を100 $\mu$ lの加熱滅菌した純水に懸濁し65 $^{\circ}$ Cで5分間保温した。この懸濁液を15,000rpmで15分間遠心した上清を回収してエタノール沈澱を行った。乾燥した沈澱を20 $\mu$ lの加熱滅菌した純水に溶解し、HUVECポリ(A)<sup>+</sup>RNAとした。以下この溶液を用いファルマシアのcDNA合成キットを用い、マニュアルに従ってオリゴdTでプライミングされたHUVEC2重鎖cDNA溶液100 $\mu$ lを得た。

【0034】 40

2) FLT細胞外領域(EDF)コーディングDNAのクローニング

1) で得たHUVEC由来cDNAを鋳型として、以下の条件でPCRを行った。

## 【表3】

反応液組成 (100 $\mu$ l 中)	PCRの反応条件
10 $\mu$ l Taq buffer (Promega社製)	1) 95 $^{\circ}$ C、1分を1サイクル
2.5 mM MgCl <sub>2</sub>	2) 94 $^{\circ}$ C、1分、56 $^{\circ}$ C、1分、
4 $\mu$ l HUVEC cDNA	72 $^{\circ}$ C、2.5分を34サイクル
各0.1 mM dNTPs	3) 72 $^{\circ}$ C、7分を1サイクル
200 nM プライマー1	
200 nM プライマー2	
2.5 U Taq ポリメラーゼ (Promega社製)	

10

プライマー配列は、以下の通りである。

プライマー1: 5'-CTCGGATCCGGATCTAGTTTCAGGTTCAAAA-3' (配列番号: 8)

プライマー2: 5'-CTCGAATTCACTCCAGATTAGACTTGTCCGA-3' (配列番号: 9)

「プライマー1」の下線部は成熟FLTのN末端コーディング配列に、「プライマー2」の下線部は、FLT細胞外領域C末端コーディング配列に対応する。

20

## 【0035】

反応液200  $\mu$ lをミネラルオイルを除くために等量のクロロフォルムで処理し、水層を回収し、10% SDSを4  $\mu$ l添加し、60 で5分間保温した。この溶液を等量のTE飽和フェノールで処理した水層を回収し、エタノール沈澱しDNA断片を回収した。乾燥した沈澱を30  $\mu$ lのTEに溶解し、アガロースゲル電気泳動にかけた。およそ2.2 kbpのDNA断片を切り出し、「Prep-A-Gene」(BIORAD製)を使用しマニュアルに従いDNAを回収した。回収したDNA断片をHincII、HindIII、HhaIまたはPstIで消化し、切断パターンがFLT細胞外領域コーディングDNAの塩基配列から予想されるパターンと一致することを確認した。次にこのDNA断片をEcoRIおよびBamHIで消化し、その反応液を等量のTE飽和フェノールで処理し、水層から「Prep-A-Gene」を用いてEcoRI、Ba 30

## 【0036】

このようにして得られたDNA断片とプラスミドDNAを10:1のモル比で混合し、ライゲーション(ライゲーションキット、宝酒造製)を行った。このライゲーション溶液を用いて大腸菌JM109のコンピテントセル(宝酒造製)を形質転換し、75  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む2xTY培地(1l中16gトリプトン、10g酵母エキス、5g塩化ナトリウム、1.5g寒天)にプレーティングし37 で一夜培養した。出現する 40

アンピシリン耐性コロニーを爪楊枝で突き、前述のPCR反応液から鑄型を除いた溶液15  $\mu$ lに移し、サイクル数を30回にして前述と同様にPCRを行った。PCR後の反応液をアガロースゲル電気泳動し、2.2 kbpのバンドを与えるコロニーから更にシングルコロニーを単離し、少量の培養液からプラスミドDNAを調製した。(「J. Sambrook, et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989」の方法に従った。)これらのプラスミドDNAをBamHIおよびEcoRIで消化し、2.2 kbpのDNA断片が生じることを確認した。これらのプラスミドDNAの一つを前記「primer1」または「primer2」を用いて配列決定を行い(「J. Sambrook, et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

」の方法に従った)、上流および下流から約150塩基の配列を調べたところ、FLT細 50

胞外領域 ( E D F ) コーディング D N A の塩基配列と一致した。

【 0 0 3 7 】

3 ) G S T - E D F 融合ポリペプチドの調製

前述の塩基配列の一部を確認したプラスミドを有する大腸菌クローンを 5 0 0 m l の 5 0 μ g / m l アンピシリンを含む 2 × T Y 培地で、3 0 で振とう培養を行い、波長 6 0 0 n m の吸光度が 1 . 0 に達した時に I P T G を 0 . 1 m M となるように添加し、更に 2 0 時間培養した。遠心して細胞を回収し、グルタチオンセファロース ( フアルマシアバイオシステム ) を用いてマニュアルに記載された方法に従って、純度 6 0 % 程度の G S T - E D F 融合ポリペプチドを約 7 . 1 m g 調製した。レムリ法で S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動した結果、この融合ポリペプチドは分子量 6 0 , 0 0 0 であり、G S T の分子量 2 8 , 0 0 0 を差し引くと融合ポリペプチドの相手の分子量は 3 2 , 0 0 0 程度である。グルタチオンセファロースに結合することから G S T 部分はほとんど分解していないと考えられるので、E D F の N 末端側が分子量 3 2 , 0 0 0 程度残り、E D F の後半部が欠失していると考えられた。

10

【 0 0 3 8 】

4 ) G S T - E D F 融合ポリペプチドに対する抗体の調製

上記 3 ) で調製した G S T - E D F 融合ポリペプチドをフロイントコンブリートアジュバントと混合し、ウサギ 1 羽につき G S T - E D F 融合ポリペプチドを初回 2 0 0 μ g 、以後 2 週間ごとに 1 0 0 μ g ずつ、7 回皮下に免疫した。抗原をコートしたプレートによって力価測定を行った結果、血清を 6 4 , 0 0 0 倍以上希釈しても十分な免疫反応があった。ウサギ 2 羽の血清から「E. Harlow and D. Lane」の「Antibodies」に記載された方法に従い、1 5 0 m g の I g G 画分を得た。

20

【 0 0 3 9 】

[ 実施例 6 ]

E D F およびその部分断片を発現する組換えバキュロウイルスの作成

1 ) E D F およびその部分断片を発現する組換えバキュロウイルスの作成用組換えトランスファクターの構築

プラスミド p f l t 3 - 7 ( M. Shibuya et al., Oncogene, 5:519 (1990) ) を鋳型として以下の条件で P C R を行った。

【 0 0 4 0 】

30

【表 4】

反応液組成 ( 1 0 0 μ l 中 ) :	反応条件
10 μ l Pfu buffer#1 (Stratagene社製)	1) 9 5 ° C 1 分 3 サイクル
1 μ g pfl3-7	5 5 ° C 1 分
0.1 mM dNTPs	7 5 ° C 2 . 5 分
200 nM プライマー-3	2) 9 4 ° C 1 分 3 0 サイクル
200 nM プライマー-4	5 5 ° C 1 分
5 U Pfu polymerase (Stratagene社製)	7 5 ° C 2 . 5 分
	3) 7 5 ° C 5 分 1 サイクル

40

上記反応に用いたプライマー配列は、以下の通りである。

プライマー-3: 5'-TTTCTCGGATCCTATAAAATATGGTCAGCTACTGGGACACC-3' (配列番号: 1 0 )

プライマー-4: 5'-GTGGTGGTGGTGGTGGTGACGCTCCAGATTAGACTTGTCCGA-3' (配列番号: 1 1 )

「プライマー-3」の下線部は成熟 F L T の N 末端コーディング配列に、「プライマー-4」の下線部は、F L T 細胞外領域 C 末端コーディング配列に対応する。

50

## 【 0 0 4 1 】

またポリアデニレーションシグナルを含むDNA断片を得るために、プラスミドpRc/RSV (Invitrogen corp.製)を鋳型として牛成長ホルモン遺伝子由来のポリアデニレーションシグナルを含むDNA (0.3 kbp)を得るために以下の条件でPCRを行った。

## 【 0 0 4 2 】

## 【表 5】

反応液組成 (100 μl 中) :	反応条件	
10 μl Pfu buffer#1 (Stratagene)	1) 95 °C 1分	3 サイクル
1 μg pRc/RSV	55 °C 1分	
0.1 mM dNTPs	75 °C 0.5分	
200 nM プライマー-5	2) 94 °C 1分	30 サイクル
200 nM プライマー-6	55 °C 1分	
5 U Pfu polymerase (Stratagene)	75 °C 0.5分	
	3) 75 °C 5分	1 サイクル

10

20

上記反応に用いたプライマー配列は、以下の通りである。

プライマー-5: 5'-CACCACCACCACCACCACTAAGCTAGAGCTGGCTGATC-3' (配列番号: 12)

プライマー-6: 5'-TTCTCGAATTCTCCCCAGCATGCCTGC-3' (配列番号: 13)

「プライマー-5」「プライマー-6」の下線部は、pRc/RSVのウシ成長ホルモン遺伝子由来のポリアデニレーションシグナルの前後に対応する。

## 【 0 0 4 3 】

得られた各々の反応液 200 μl を等量のクロロフォルムで処理し、水層を回収し、0.5% SDS、0.1M Tris-HCl (pH6.8)、5 mM EDTA、200 μg/ml プロテナーゼ K (proteinase K) となるように各試薬を添加し、37 °C で30分間保温した。これらの溶液をTE飽和フェノールで処理し、水層をエタノール沈澱し、EDFをコードするDNA断片およびポリアデニレーションシグナルを含むDNAをTEに溶解した。これらのDNA溶液をアガロースゲル電気泳動にかけ、各々から2.2 kbp、0.3 kbpのDNA断片を回収し、各々50 μlのTE溶液とした。次にこれらのDNA断片をPCRにより融合させる (R. Higuchi, "PCR Protocols", Academic Press Inc., 177 (1990) 参照) ために以下の条件でPCRを行った。

30

## 【 0 0 4 4 】

【表6】

反応液組成 (100 $\mu$ l 中) :	反応条件
10 $\mu$ l Pfu buffer #1 (Stratagene)	1) 95 $^{\circ}$ C 1分 3 サイクル
4 $\mu$ l EDF coding DNA	58 $^{\circ}$ C 1分
0.25 $\mu$ l poly A signal DNA	75 $^{\circ}$ C 0.5分
0.1 mM dNTPs	2) 94 $^{\circ}$ C 1分 30 サイクル
200 nM プライマー-3	55 $^{\circ}$ C 1分
200 nM プライマー-6	75 $^{\circ}$ C 0.5分 1 サイクル
5 U Pfu polymerase (Stratagene)	3) 75 $^{\circ}$ C 5分

10

得られた反応液 200  $\mu$ l を等量のクロロフォルムで処理し、水層を回収し、0.5% SDS、0.1M Tris-HCl (pH6.8)、5 mM EDTA、200  $\mu$ g/ml プロテナーゼ K となるように各試薬を添加し、37  $^{\circ}$ C で30分間保温した。この溶液をTE飽和フェノールで処理し、水層をエタノール沈澱し、DNAをTEに溶解した。このDNA溶液をアガロースゲル電気泳動にかけ、EDFをコードするDNA断片とポリアデニンシグナルを含むDNA断片が融合したと考えられる2.5 kbpのDNA断片を回収し50  $\mu$ lのTE溶液として調製した。このDNA断片の両端をBamHIおよびEcoRIで消化したDNA断片を調製した。一方組換えバキュロウイルス用トランスファーベクターであるプラスミドpVL1393 (PharMingen社)の1  $\mu$ gをBamHIおよびEcoRIで切断したものを実施例5の2)に記載したのと同様の方法で調製した。このプラスミドDNAとプラスミドpfl3-7からPCRにより増幅したEDFをコードするDNA断片をBamHIおよびEcoRIで消化したDNA断片をモル比およそ1:5で混合し、ライゲーションキット(宝酒造製)で処理し、大腸菌JM109のコンピテントセルに形質転換し、実施例5の2)に記載したのと同様の方法で組換えプラスミドを有するクローンを6種選択した。各クローンの3mlの培養液からアルカリ法でプラスミドDNAを調製し、塩基配列の決定を行い、挿入断片の上流約300塩基と下流約500塩基を調べたところ正しい配列は2種類のクローン由来のプラスミドであった。これらのプラスミドを「pEDFH10」および「pEDFH11」と名付けた。これらのプラスミドを持つ大腸菌を50  $\mu$ g/mlのアmpiシリンを含む100mlの2xTY培地で37  $^{\circ}$ Cで1夜培養し、回収した菌体からアルカリ法(「J. Sambrook, et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989」の記載に従う)でプラスミドDNAを抽出し、マニュアルに従ってイオン交換カラム(Diagen GmbH, QIAGEN社製)で精製し、各々200  $\mu$ lのTEに溶解した約100  $\mu$ gのプラスミドDNAを得た。

20

30

## 【0045】

2) EDFおよびその部分断片を発現する組換えバキュロウイルスの作成

40

TMN-FH培地(PharMingen社製)で培養した80%コンフルエンスの状態のSf9細胞(Invitrogen Corp.社製)をピペティングで剥し、2x10<sup>6</sup>個の細胞を直径60mmのディッシュに撒き30分放置して表面に吸着させた後、培地を無血清培地であるEx-Cell400(岩城硝子製)2mlに置換した。「pEDFH10」または「pEDFH11」を8  $\mu$ l(4  $\mu$ g)、欠失バキュロウイルスDNA(BaculoGold、PharMingen社製)2  $\mu$ l(40 ng)を16  $\mu$ l中に混合した溶液と、リポフェクチンを滅菌純水で2倍希釈した溶液16  $\mu$ lとを混合し15分放置した後、全量32  $\mu$ lを前述のディッシュに添加し混合した。このディッシュを湿潤箱に入れ27  $^{\circ}$ Cで6時間30rpmで振とう培養した後、培地を2.5mlのTMN-FHに置換し27  $^{\circ}$ Cで5日間静置培養した。培地を回収し遠心した上清をオリジナルウイルスストック(それぞれ「BEDFH10」、「

50

「BEDFH11」と称する)とした。「Invitrogen corp.」のマニュアルに従いプラークアッセイを行った結果、これらのウイルスタイターは共におよそ $3 \times 10^6$ であった。各々のウイルスについて2クローンずつ(「BEDFH10」からは「BEDFH101」「BEDFH102」、「BEDFH11」からは「BEDFH111」「BEDFH112」)プラーク単離を行い、Invitrogen corp.のマニュアルに従って4段階に増幅したウイルス溶液約200ml(タイターはおよそ $5 \times 10^7$ /ml)を得た。

#### 【0046】

[実施例7]組換えウイルス感染Sf9細胞発現産物の解析

##### 1)<sup>125</sup>I-VEGF<sub>121</sub>との共有結合架橋産物

上記の組換えウイルスをm.o.i.0.3(m.o.i.とはウイルス粒子:細胞数の比のこと)で感染させたSf9細胞 $2 \times 10^5$ に、<sup>125</sup>I-VEGF<sub>121</sub>(150,000cpm/ng)を180,000cpm添加し、100 $\mu$ lのPBS-0.1%BSA中で室温で1時間置いた。遠心により2回、同バッファーで洗浄し、再度100 $\mu$ lのPBS-0.1%BSAに懸濁した。この溶液に50mMジサクシニルスベレート(disuccinylsuberate)/ジメチルスルホキシド(dimethylsulfoxide)を1/10容混合し室温で40分間置いた後、1M Tris-HCl(pH6.8)を1/10容混合した。このサンプルをレムリ法で還元条件でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、オートラジオグラフィによりシグナルを検出した(図7)。プラスミド「pEDFH10」を用いて作成した組換えウイルスである「BEDFH10」から分離した2クロンの感染細胞では、分子量130,000の共有結合架橋産物が検出できた(図7A、レーン1、2)のに対して、プラスミド「pEDFH11」を用いて作成した組換えウイルスである「BEDFH11」から分離した2クロンの感染細胞では分子量50,000の共有結合架橋産物が観察された(図7A、レーン3、4)。一方、EDFをコードするDNAをプロモーターとは逆向きに挿入した組換えトランスファーベクターを用いて作成したコントロールウイルス感染細胞では共有結合架橋産物は検出できなかった。図7Bのレーン1はコントロールウイルス感染細胞を使用し、レーン2は「BEDFH11」感染細胞を使用し、レーン3はレーン2の反応に214倍の非標識VEGFを添加したサンプルである。VEGF<sub>121</sub>モノマーの分子量が20,000であるので、それぞれの共有結合架橋産物の分子量から差し引くと、110,000と30,000である。このことから「BEDFH10」感染細胞はEDFの全長を生産しており「BEDFH11」感染細胞はEDFの断片を発現していると考えられた。「BEDFH11」から発現されるEDFの断片を「EDF11」と名付けた。

#### 【0047】

##### 2)VEGFとの親和性

Sf9細胞に組換えウイルス「BEDFH10」または「BEDFH11」をm.o.i.5で感染させ、7日間培養した培養上清をマイクロタイタープレート(イムロン2、ダイナテック社製)のウェルに100 $\mu$ l入れ4で一夜置いた。その後ウェルの中の液を捨て、PBS-0.1%BSAで3回洗浄し、次にPBS-1%BSAを250 $\mu$ l入れ、室温で2時間放置しブロッキングした。ウェルの中の液を捨て、100 $\mu$ l中に比活性78,000cpm/ngの<sup>125</sup>I-VEGF<sub>165</sub>(アマシャム社製)11300cpmに非標識のVEGF<sub>165</sub>を0~12500pg混合した溶液を入れ室温で3時間放置した。ウェルの中の液を捨てPBS-0.1%BSAで3回洗浄し、各ウェルに残った放射活性をカウンターで測定しスカッチャード解析を行った(図8)。図8A、BはそれぞれEDFまたは「EDF11」の発現培養上清をコートしたプレートを用いた結果である。この時にコントロールウイルス感染Sf9細胞の培養上清でコートしたプレートには<sup>125</sup>I-VEGF<sub>165</sub>ほとんど結合しないので、結合放射活性は挿入遺伝子からの発現産物への<sup>125</sup>I-VEGF<sub>165</sub>の結合であると考えられる。「BEDFH10」または「BEDFH11」感染細胞の培養上清中の発現産物のVEGF<sub>165</sub>に対する親和性は共にKd(解離定数)がおよそ $5 \times 10^{-11}$ でありFLT(J. Waltenberger, et al., J. Biol. Chem., 269:26988 (1994))または可溶性型FLT(R. L. Kendal and K. A. Thomas, Proc. Natl., Acad. Sci., U. S. A., 90:10705 (1993))について報告されている値に近かった。

## 【 0 0 4 8 】

## 3) 組換えトランスファーベクターへの挿入DNAの塩基配列解析

プラスミド「pEDFH10」および「pEDFH11」にクローニングしたDNAの塩基配列を確認するために塩基配列の決定を行った結果、「pEDFH10」の挿入DNAのFLT細胞外領域と対応する領域の塩基配列はFLTと完全に一致していた。「pEDFH11」の挿入DNAのFLT細胞外領域と対応する領域の塩基配列はFLTと比較して、配列番号：1で1053番目のCが欠失していた。その結果、オープンリーディングフレームが配列番号：1のFLTアミノ酸配列の-22番から246番までに対応するようになっていた。この部分はFLTの第一ドメインと第二ドメインを含んでいる。

## 【 0 0 4 9 】

## 4) 発現産物の精製

100mlの三角フラスコに30mlTMN-FHを入れ27、70rpmで培養したSf9細胞90ml( $1.5 \times 10^6 / \text{ml}$ )に組換えウイルス「BEDFH10」または「BEDFH11」をm.o.i.5で感染させ、20時間後に遠心して培地を60ml( $30 \text{ml} \times 2$ )のEx-cell405(岩城硝子製)に置換して48時間培養し、1/100容の330mMフェニルメチルスルフォニルフルオライド(phenylmethylsulfonyl fluoride)/エタノールと1/1000容の100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンチパイン(antipain)、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アプロチニン(aprotinin)、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ロイペプチン(leupeptin)を添加し上清を回収した。「BEDFH10」感染細胞の培養上清は「Immercible CX-10」(日本ミリポアリミテッド製)で8倍濃縮し、20mM Tris-HCl(pH7.8)/50mM KCl/0.1% ノニデット(Nonidet)P-40/1mM イミダゾール-塩酸(pH7.8)で平衡化した $\text{Ni}^{++}$ -NTA(QIAGEN、Diagen GmbH)を添加して4で1時間混合した。10,000rpmで遠心して沈澱に30mlの150mM KCl/0.1% ノニデット P-40/40mM イミダゾール-塩酸(pH7.8)を添加し4で15分間混合し、遠心して沈澱を回収し、更に2回同バッファーで洗浄した。沈澱に0.2mlの250mM イミダゾール-塩酸(pH7.8)を添加し室温で15分間混合し遠心して上清を回収した。再度沈澱に0.2mlの250mMイミダゾール-塩酸(pH7.8)を添加し同様にして上清を回収し、前回の上清と併せて精製EDFサンプルとした。「BEDFH11」感染細胞の培養上清は0.3MになるようNaClを添加してFPLC(ファルマシアバイオシステム製)でヘパリンカラム(ファルマシアバイオシステム製)を用いて分画した。サンプル負荷のあと0.1Mリン酸バッファー(pH7.0)-0.3M NaClで280nmの吸光度が十分下がるまで洗浄し、0.3-1.0M NaClのリニアグラデーションで溶出した。280nmの吸収がある画分を回収しVEGFアフィニティークロマトグラフィーを行った。PBSでサンプルを2倍に希釈して、1.4mgのVEGFをセファロース4Bに共有結合したカラム0.4mlに負荷した。20mlのPBS-0.5M NaClでカラムを洗浄し、10mM酢酸ナトリウム(pH4.0)で、0.05mlの2M Tris-HCl(pH8.0)を入れたチューブに0.5ml/チューブで溶出した。各フラクションをレムリ法でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、銀染色した(図9A、レーン番号はフラクション番号と一致)。また各フラクションをPBS-0.1%BSAで10倍希釈して、等容の $^{125}\text{I}$ -VEGF<sub>165</sub>と混合し、1時間後に100 $\mu\text{l}$ の混合液を実施例3の2)で使用したマイクロタイタープレートでVEGFの結合を調べた。その結果、電気泳動で共有結合架橋実験での予想とほぼ一致する分子量35,000バンドが観察されたフラクションにVEGFの結合阻害が見られた(図9B)。

## 【 0 0 5 0 】

## 5) 免疫化学的解析

EDFまたは「EDF 11」をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、「E. Harlow and D. Lane」の「Antibodies」に記載の方法に従ってウェスタンブロッティングを行った。1次抗体として実施例1の4)の抗体を2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で使用し、2次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgG(E. Y. Laboratories)を5000倍希釈して使用し、NTB(Nitroblue tetazolium chloride)/BCIP(5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt)(Gibco BRL社製)で発色させた。その結果、約35kd

10

20

30

40

50

の単一バンドが観察され、この抗体との特異的な反応性が確認された(図10B)。以上のことから「EDF 11」はFLTのN末端268アミノ酸に相当するポリペプチドであることがわかった。図10Aにおいてレーン1はヘパリンカラム後のサンプル、レーン2はVEGFアフィニティークロマトグラフィー後のサンプルを電気泳動して銀染色したものである。図10Bは、図10Aと同じサンプルでウェスタンブロットを行った図である。

#### 【0051】

##### 6) VEGFの生物活性の阻害

VEGFによるヒト臍帯由来血管内皮細胞(HUVEC)のチミジン取り込み促進に対する「EDF」発現培養上清、「4N-FLT」発現培養上清または「EDF 11」発現培養上清による阻害を調べた。HUVEC(クラボウ社製)を96穴コラーゲンコートプレート(岩城硝子製)に3000個/ウェル/100 $\mu$ l(EGM-UV培地、クラボウ製)で撒き、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>で24時間培養する。PBSで2回洗浄し、20ng/mlのVEGF<sub>165</sub>を50 $\mu$ lとサンプル50 $\mu$ lをウェルに添加して4日間培養した。50 $\mu$ Ci/2nmol/Lの<sup>3</sup>H-チミジンを10 $\mu$ lウェルに添加して更に24時間培養した。PBSで2回洗浄した後、トリプシン/EDTAで細胞を剥し、セルハーパースター(Cambridge Technology Inc.製)でガラスフィルターに回収し液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した(図6)。対照として用いた野生株(wt)ウイルス感染培養上清をサンプルとして添加した場合に比べ、組換えウイルスを用いた「EDF」「4N-FLT」「EDF 11」発現培養上清を添加した場合は、有意にVEGF依存性チミジン取り込みが阻害された。この結果から「EDF」「4N-FLT」または「EDF 11」は、VEGFによるHUVECのチミジン取り込みの促進、即ちDNA合成の促進を阻害することが明らかになった。

#### 【0052】

III. 第1~第2イムノグロブリン様ドメインとヒトIgG<sub>1</sub>-Fc領域との融合タンパク質に関する実施例

##### [実施例8]

##### 1) ヒトIgG<sub>1</sub>-Fc cDNAの単離

IgG生産株であるヒトリンフォブラストーマ、IM9(大日本製薬)をRPMI1640培地で培養した上清を、Human IgG subclass profile kit(Zymed)を用いて調べたところ、ヒトIgG<sub>1</sub>を生産していることがわかった。4 $\times$ 10<sup>7</sup>個のIM9細胞から、IIの[実施例5](1)記載と同様の方法でcDNA溶液を調製した。このcDNAから、表7に示す条件で2段階のPCRによりヒトIgG<sub>1</sub>-Fc cDNA断片を増幅した。

#### 【0053】

##### 【表7】

反応液組成(100 $\mu$ l中)	PCR反応条件
10 $\mu$ l LA-PCR buffer(宝酒造)	1) 95 $^{\circ}$ C、1分を1サイクル
各 0.1 mM dNTPs	2) 94 $^{\circ}$ C、1分、56 $^{\circ}$ C、1分
2 $\mu$ l cDNA溶液	72 $^{\circ}$ C、1分を20サイクル
200 nM プライマー7	3) プライマー9、10を200 $\mu$ M
200 nM プライマー8	添加し、94 $^{\circ}$ C、1分、56
5.0 U ExTaq ポリメラーゼ(宝酒造)	$^{\circ}$ C、1分、72 $^{\circ}$ C、1分を
	15サイクル
	4) 72 $^{\circ}$ C、7分を1サイクル

10

20

30

40

50

プライマー配列は、以下の通りである。

プライマー 7 : 5'-TCTTGTGACAAAACCTCACACATGC-3' (配列番号 : 14)

プライマー 8 : 5'-CGGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTG-3' (配列番号 : 15)

プライマー 9 : 5'-GAGCCCAAATCTTGTGACAAA-3' (配列番号 : 16)

プライマー 10 : 5'-TTCTCGGATCCTTATTTACCCGGAGACAGGGA-3' (配列番号 : 17)

Bam STP hlgG1-Fc term

プライマー 10 の「Bam」は制限酵素 BamHI 認識配列、「STP」は終止コドン、「hlgG1-Fc term」はヒト IgG<sub>1</sub>-Fc コーディング領域の C 末端部分を意味する。ただしプライマー 8 とプライマー 10 はアンチセンス鎖である。ヒト IgG<sub>1</sub>-Fc コーディング領域とプライマー位置の対応を図 11 に示した。PCR 反応液を II の [実施例 5] (2) の記載と同様の方法で処理し、アガロースゲル電気泳動にかけ、約 700 bp の DNA 断片を切り出し、フィルターチューブ SUPEREC-01 (宝酒造) で遠心し DNA を回収した。この DNA 断片の Aval、HpaII、RsaI、SmaI の各制限酵素切断パターン (表 8) を調べ、既報のヒト IgG<sub>1</sub>-Fc cDNA 配列 (J.W. Ellison, B. J. Berson and L. E. Hood, Nucleic Acid Res., 10:4071 (1982)) と合致することを確認した。

【0054】

【表 8】

生じた DNA 断片のサイズ (bp)

Intact	700
AvaI	380, 280
HpaII	300, 190, 110, 110
RsaI	300, 200, 75, 75
SmaI	480, 280

【0055】

[実施例 9]

第 1 ~ 第 2 イムノグロブリン様ドメインとヒト IgG<sub>1</sub>-Fc 領域との融合タンパク質の発現系の構築

1) 大腸菌外膜タンパク質 OmpA のシグナルペプチドコーティング DNA の単離

大腸菌株 HB101 を 3 ml の 2xTY 培地で 37℃、一夜培養し、遠心して菌体を回収し、0.5 ml の TE バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.5) / 1 mM EDTA) に懸濁した。20 mg/ml の卵白リゾチームを 25 µl 加えて室温に 15 分置き、溶菌させた後、50 µl の 10% SDS と 0.5 ml TE 飽和フェノールを加え、5 分間激しく振とうし、遠心して水層を回収し、当量のクロロホルムで処理し、フェノールを除いた。2 容のエタノールを加え DNA を沈澱させ、70% エタノールで洗浄し、乾燥後、沈澱を 200 µl の 20 µg/ml の RNase A 溶液に溶解し、大腸菌ゲノム DNA 溶液とした。これを鋳型として表 9 の条件で PCR を行い、OmpA のシグナルペプチドコーティング DNA を増幅した。

【0056】

## 【表 9】

反応液組成 (100 μl 中)	PCR 反応条件
10 μl LA-PCR buffer (宝酒造)	1) 95℃、1分を1サイクル
各 0.1 mM dNTPs	2) 94℃、1分、56℃、1分
2 μl 大腸菌ゲノム DNA	72℃、1分を35サイクル
200 nM プライマー-11	3) 72℃、7分を1サイクル
200 nM プライマー-12	
5.0 U ExTaq ポリメラーゼ (宝酒造)	

10

プライマー配列は、以下の通りである。

プライマー-11: 5'-TAACCTGGCGATAACGAGGCGCAAATAATGAAAAAG-3' (配列番号: 18)

                  trx term                  SD                  omp init

プライマー-12: 5'-CTGAACTAGATTTTCGGAGCGGCCTGCGCTA-3' (配列番号: 19)

                  mflt                  omp SP term

プライマー-11の「*trx term*」は大腸菌チオレドキシソ遺伝子 (*trxA*) コーディング末端部分、「*SD*」は、*omp A*のリボソーム結合配列、「*omp init*」は、*omp A*の開始コドン周辺を意味する。プライマー-12の「*mflt*」は成熟 FLT の N 末端コーディング領域、「*omp SP term*」は、*Omp A*シグナルペプチドコーディング領域末端部分を意味する。ただし、プライマー-12はアンチセンス鎖である。なおチオレドキシソ遺伝子に関する配列は、「B. J. Wallace and S. R. Kushner, *Gene* 32:399 (1984)」を、*omp A*に関する配列は「E. Beck and E. Bremner, *Nucleic Acid Res.*, 8:3011(1980)」を参考とした。この PCR 反応液を前述と同様に処理し、得られた DNA 断片を *Omp A*シグナルペプチド DNA とした (図 12、図 14)。

20

## 【0057】

## (2) 大腸菌チオレドキシソ遺伝子の増幅と単離

前述のように、大腸菌で外来性タンパク質を高発現させると不溶性の封入体となり易いことが知られている。封入体を変性・可溶化・再活性化するのは回収率が悪く労力を要する。このような場合に大腸菌内で、大腸菌チオレドキシソを同時に高発現させると、外来性タンパク質が正常なフォールディング構造をとることができ、封入体が生じにくくなることが報告されている (T. Yasukawa et al., *J. Biol. Chem.* 270:25328(1995))。そこでチオレドキシソを同時に高発現させるために遺伝子を単離した。

30

## 【0058】

以下の条件で PCR を行い、大腸菌チオレドキシソ遺伝子を増幅した。

## 【0059】

## 【表 10】

反応液組成 (100 μl 中)	PCR 反応条件
10 μl LA-PCR buffer (宝酒造)	1) 95℃、1分を1サイクル
各 0.1 mM dNTPs	2) 94℃、1分、56℃、1分
2 μl 大腸菌ゲノムDNA	72℃、1分を35サイクル
200 nM プライマー13	3) 72℃、7分を1サイクル
200 nM プライマー14	
5.0 U ExTaq ポリメラーゼ (宝酒造)	

10

プライマー配列は、以下の通りである。

プライマー13: 5'-TTCTCGAATTCCTGTGGAGTTATATATGAGC-3' (配列番号: 20)

Eco SD trx init

プライマー14: 5'-GCCTCGTTATCGCCAGGTTAGCGTCGAGGA-3' (配列番号: 21)

ompSD trx term

プライマー13の「Eco」は制限酵素 EcoRI の認識切断部位、「SD」は、大腸菌チオレドキシシン遺伝子のリボソーム結合配列、「trx init」は、trxAの開始コドン周辺を意味する。プライマー14の「ompSD」は、omp Aのリボソーム結合配列を意味する。プライマー14はアンチセンス鎖である。このPCR反応液を前述と同様に処理し、得られたDNA断片をチオレドキシシンDNAとした(図12、図14)。

20

## 【0060】

(3) FLT第1~第2イムノグロブリン様ドメインコーディングDNAとヒトIgG<sub>1</sub>-Fc領域コーディングDNAの融合

EDF 11バキュロ発現ベクターpEDFH11を鋳型として表11の条件でPCRを行い、FLT第1~第2イムノグロブリン様ドメインコーディングDNAを増幅し、前述と同様にして精製し、EDF12 DNAとした(図13)。

## 【表 11】

反応液組成 (100 μl 中)	PCR 反応条件
10 μl LA-PCR buffer (宝酒造)	1) 95℃、1分を1サイクル
各 0.1 mM dNTPs	2) 94℃、1分、56℃、1分
0.8 μg pEDFH10 DNA	72℃、1分を20サイクル
200 nM プライマー15	3) 72℃、7分を1サイクル
200 nM プライマー16	
5.0 U ExTaq ポリメラーゼ (宝酒造)	

30

プライマー配列は、以下の通りである。

プライマー15: 5'-CGCTCCGAAA TCTAGTTCAGGTTCAAATT-3' (配列番号: 22)

ompSP term mFLT

プライマー16: 5'-TTTgTCACAAgATTTgggCTCT gTgCTTATTTggACATCTAT-3'

hIgG-Fc hinge 214-FLT-208

(配列番号: 23)

プライマー16の「hIgG-Fc hinge」はヒトIgG<sub>1</sub>のヒンジコーディングDNA、「214-FLT-208」はFLTの208位~214位のアミノ酸コーディングDNAを意味する。プ

40

50

ライマー-16はアンチセンス鎖である。

【0061】

このようにして得たFLT第1～第2イムノグロブリン様ドメインコーディングDNA (EDF12 DNA)と[実施例8]の(1)で得られたIgG<sub>1</sub>-Fc cDNAを鋳型として用い、表12の条件で組換えPCR (R. Higuchi, In "PCR Protocols", ed. by M. A. Innis et al., Academic Press Inc. (1990))を行い、両DNA断片を融合・増幅し、これまでと同様に精製し、EDF12Fc DNAとした(図13、図14)。

【0062】

【表12】

反応液組成 (100 μl 中)	PCR反応条件	
10 μl LA-PCR buffer (宝酒造)	1) 95℃、1分を1サイクル	10
各 0.1 mM dNTPs	2) 94℃、1分、56℃、1分	
0.1 μg EDF12 DNA	72℃、1分を25サイクル	
0.1 μg hIgG Fc cDNAFc DNA	3) 72℃、7分を1サイクル	
200 nM プライマー-15		
200 nM プライマー-10		20
5.0 U ExTaq ポリメラーゼ (宝酒造)		

(4) 発現ベクターの作製

[実施例9]の(1)のOmp AシグナルペプチドDNAと[実施例9]の(2)のチオレドキシンドNAと[実施例9]の(3)のEDF12Fc DNAを鋳型として用い、表13の条件で組換えPCRを行い、3つのDNA断片を融合・増幅し精製した(図13、図14)。図13においてレーンM、1、2、3はそれぞれ、分子量スタンダード、EDF12 DNA、IgG<sub>1</sub> Fc DNA、EDF12Fc DNAである。図14の「Ec」、「Bm」はそれぞれ、制限酵素EcoRI、BamHIの認識配列の存在箇所を表す。

【0063】

【表13】

反応液組成 (100 μl 中)	PCR反応条件	
10 μl LA-PCR buffer (宝酒造)	1) 95℃、1分を1サイクル	
各 0.1 mM dNTPs	2) 95℃、1分、15分間か	
0.1 μg Omp A シグナルペプチド DNA	けて55℃まで下げ、更に	
0.1 μg チオレドキシンドNA	55℃、2分、72℃、	40
0.1 μg EDF12Fc DNA	2. 5分を3サイクル	
200 nM プライマー-13	3) 94℃、1分、56℃、1分	
200 nM プライマー-10	72℃、2. 5分を	
5.0 U ExTaq ポリメラーゼ (宝酒造)	22サイクル	
	4) 72℃、7分を1サイクル	

このようにして得られた約1.7 KbpのDNA断片は、プライマー-10とプライマー-13 50

に含められた EcoRI と BamHI 認識切断配列を末端に持つ。この 1.7 K b p の融合 DNA 断片を EcoRI と BamHI で消化した。一方、大腸菌発現ベクター pTTQ18 (株)アマシャムジャパン製) を EcoRI と BamHI で消化した。これらの制限酵素消化反応液を [実施例 5] の (2) と同様の方法で処理し、DNA を回収した。ライゲーションキット (宝酒造製) を用い、ベクター : インサートのモル比 3 : 1 で連結反応を行った。この反応液と大腸菌 JM109 のコンピテントセル (宝酒造製) を用いて形質転換を行い、アンピシリン含有寒天培地にて生育する形質転換体を選択した。更にこの中から [実施例 5] の (2) と同様の方法で、1.7 K b p の挿入 DNA を持つ組換え体が数クローン得られ、その一つを JM109(pEDF12Fc) とした。

#### 【0064】

図 12 レーン M、1、2、3、4、5、6 はそれぞれ、分子量スタンダード、チオレドキシンド DNA、Omp A シグナルペプチド DNA、EDF12Fc DNA、チオレドキシンド DNA - Omp A シグナルペプチド DNA - EDF12Fc DNA 融合断片、pEDF12Fc DNA の EcoRI + BamHI 消化、pTTQ18 DNA の EcoRI + BamHI 消化である。(丸印は未消化プラスミドである。)

#### 【0065】

[実施例 10] 発現した融合タンパク質の解析

##### (1) 粗抽出液の調製

JM109(pEDF12Fc) を 70 ml の 100  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む 2 x TY 培地で、37 で振とう培養をおこない、波長 600 nm の吸光度が 1.0 に達した時に IPTG を 0.5 mM 添加し、更に 12 時間培養した。培養終了後、培養液を急冷し、培養液にプロテアーゼインヒビターとして、33  $\mu$ M pAPMSF (和光純薬工業) を 70  $\mu$ l を添加し、遠心して菌体を回収した。菌体を 5 ml の 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 33 nM pAPMSF に懸濁し、ソニケーターを用いて菌体の 95% 以上を超音波破碎した。これを 10,000 x g で 20 分遠心し、沈澱を 5 ml の 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) / 1 M KCl / 33 nM pAPMSF / 5 mM EDTA / 1% Triton X100 / 0.1% Nonidet-P40 に溶解し、20,000 x g で遠心して不溶成分を除いた上清を粗抽出液として以下の解析に用いた。同時に対照としてベクター部分のみを持つ JM109(pTTQ18) から同様にして粗抽出液を調製した。

#### 【0066】

##### (2) EIA による融合タンパク質発現の確認

VEGF と抗ヒト IgG 抗体を用いたサンドイッチ EIA によって確認した。VEGF コートプレートを作成するために、VEGF<sub>165</sub> (R&D 社製) を 50 ng/ml になるように PBS で希釈し、イムロン 2 マイクロタイタープレートに 1 ウェル当たり 100  $\mu$ l 分注し、4 で一夜置いた後、[実施例 7] の (2) と同様にしてブロッキングした。JM109(pTTQ18) および JM109(pEDF12Fc) の粗抽出液を PBS / 0.1% BSA で 20 倍希釈した溶液 100  $\mu$ l を、ウェルに加え室温で 1 時間置いた後、ウェルを PBS / 0.1% BSA で 6 回洗浄した。次に PBS / 0.1% BSA で 1000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体 (MBL 製 #IM-0837) を 100  $\mu$ l、ウェルに加え室温で 1 時間放置し、上述のようにウェルを 6 回洗浄した。この後、ペルオキシダーゼ基質溶液 (20 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.2)、0.01% 過酸化水素、オルトフェニレンジアミンタブレット (和光純薬製) 1 錠 / 20 ml) 100  $\mu$ l をウェルに加え、室温で 30 分呈色反応を行い、更に 100  $\mu$ l の 2 N 硫酸を加えて反応を停止し、492 nm の吸光度を測定した。その結果、組換え体 JM109(pEDF12Fc) 抽出液は対照と比較して強く発色した (表 14)。これは VEGF と抗ヒト IgG 抗体とのサンドイッチ EIA であるので、この結果から組換え体抽出液中に、VEGF に結合し、かつ抗ヒト IgG 抗体と結合する分子が含まれることが示唆された。

#### 【0067】

10

20

30

40

【表 1 4】

20倍希釈粗抽出液	JM109(pTTQ18)	JM109(pEDF12Fc)
吸光度(492nm)	0.118	1.056

## (3) 組換えタンパク質の分子量の確認

10

組換えタンパク質の分子量を調べるため、[実施例7]の(5)と同様の方法で粗抽出液をウェスタンブロットにかけた。粗抽出液をレムリ法でSDS-ポリアクリルアミド電気泳動し、PDVF膜にエレクトロブロットし、ブロッキングした後、1次抗体として、抗ヒトIgG<sub>1</sub>-Fcモノクローナル抗体(MBL#IM-0280)0.4μg/mlで、2次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG(Zymed製)を4000倍希釈して使用した。

その結果、JM109(pEDF12Fc)粗抽出液のレーンにのみ、還元条件でおよそ分子量6000の免疫化学的に反応するバンドが検出された(図15)。図15においてレーン1、2のサンプルはそれぞれ、JM109(pTTQ18)粗抽出液、JM109(pEDF12Fc)粗抽出液である。予想される組換え体は446アミノ酸残基であるので、妥当なサイズである。

20

## 【0068】

(4) <sup>125</sup>VEGF<sub>165</sub>との共有結合架橋産物の解析

組換えタンパク質とVEGFとの結合複合体の分子量を調べるため、各粗抽出液100μlと<sup>125</sup>VEGF<sub>165</sub> 140,000cpmを混合し、2時間室温で置いた後、サンプルからの「Molecular Cloning」記載の方法で、プロテインAセファロース(ファルマシア製)を用いて免疫沈降し、[実施例7]の(1)と同様の方法で架橋反応を行った。沈澱物をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動し、オートラジオグラフィーによりシグナルを検出した(図16)。その結果、対照抽出液ではVEGFの弱いシグナルのみが検出される(レーン2)のに対し、組換え体JM109(pEDF12Fc)の抽出液では、還元条件で分子量がおよそ152万の架橋産物が検出された(レーン1)。この結果から、組換えタンパク質はVEGFに結合し安定な複合体を形成でき、プロテインAとも結合することがわかる。

30

## 【0069】

## (5) 組換えタンパク質のVEGF親和性の測定

組換えタンパク質のVEGFに対する結合親和性を知るために[実施例7]の(1)と同様の方法でスカッチャード解析(N=3)を行った(図17A、B)。イムロン2にプロテインA(カッセル製)20μg/mlを1ウェル当たり150μlでコートし、ブロッキングした後、粗抽出液を1ウェル当たり150μl加え、室温で1時間置いた。PBS/0.1%BSA/1mMEDTA/0.25%ジェラチン/0.1%Nonidet-P40で3回洗浄した。<sup>125</sup>VEGF<sub>165</sub>を洗浄する時も同じバッファーで洗浄した。その結果、組換えタンパク質はEDFと同程度のVEGF親和性を有していることが示された。

40

## 【0070】

以上の結果から本実施例の組換えタンパク質であるFLT第1~第2イムノグロブリン様ドメイン-ヒトIgG<sub>1</sub>Fc融合タンパク質は、EDFと同程度に高親和的にVEGFと結合し、ヒトIgG<sub>1</sub>Fc特異的なモノクローナル抗体によって認識され、またプロテインAとも結合するというヒトIgG<sub>1</sub>Fcの生化学的特性を有していることが示された。また本融合タンパク質は、EDFのVEGF親和性という生化学的特性が、融合によっても損なわれていないことから、EDFと同様にVEGFに結合し、VEGFの活性を阻害できると考えられる。

50

## 【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】FLT細胞外領域のドメインの構成を表す模式図である。

【図2】4N-FLTを発現する組換えバキュロウイルスの構築過程の概要を示す図である。

【図3】5N-FLTを発現する組換えバキュロウイルスの構築過程の概要を示す図である。

【図4】B4NまたはB5N組換えバキュロウイルスを感染させた細胞の培養上清および抽出液のウェスタンブロットを示す図である。

【図5】4N-FLTまたは5N-FLTとVEGF断片との相互作用に関するスカッチャード解析を示す図である。 10

【図6】HUVECのVEGF依存性チミジン取り込み促進のEDF、4N-FLTまたはEDF 11発現培養上清による阻害を示す図である。

【図7】EDFまたはEDF 11を発現する組換えバキュロウイルスを感染させた細胞と<sup>125</sup>I-VEGF<sub>121</sub>との共有結合架橋産物の電気泳動後のオートラジオグラフィーを示す図である。

【図8】EDFまたはEDF 11とVEGF断片との相互作用に関するスカッチャード解析を示す図である。

【図9】EDF 11の精製過程のVEGFアフィニティークロマトグラムと各フラクションの電気泳動パターンを示す図である。 20

【図10】精製EDF 11の電気泳動パターンとウェスタン解析を示す図である。

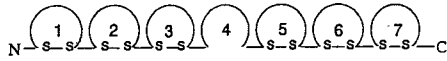
【図11】ヒトイムノグロブリンIgG<sub>1</sub>のFc領域の模式図と、単離するのに用いたプライマーの位置の対応を示す図である。

【図12】PCRで増幅・精製したDNAと制限酵素切断した組換えプラスミドのアガロースゲル電気泳動パターンを示す図である。

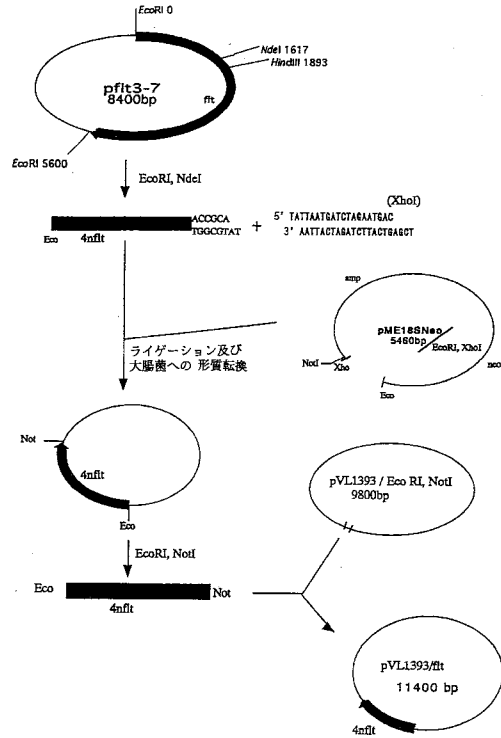
【図13】PCRで増幅・精製したDNAのアガロースゲル電気泳動パターンを示す図である。

【図14】各DNA断片の単離からFLT第1～第2-ヒトIgG<sub>1</sub>-Fc発現組換えプラスミド構築までの過程の概略を示す図である。【図15】組換え大腸菌粗抽出液の抗ヒトIgG<sub>1</sub>-Fcモノクローナル抗体によるウェスタンブロットを示す図である。 30【図16】組換え大腸菌粗抽出液と<sup>125</sup>I-VEGF<sub>165</sub>の共有結合架橋産物のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンを示す図である。【図17】Aは組換え大腸菌粗抽出液と<sup>125</sup>I-VEGF<sub>165</sub>結合曲線、Bはそのスカッチャード解析を示す図である。

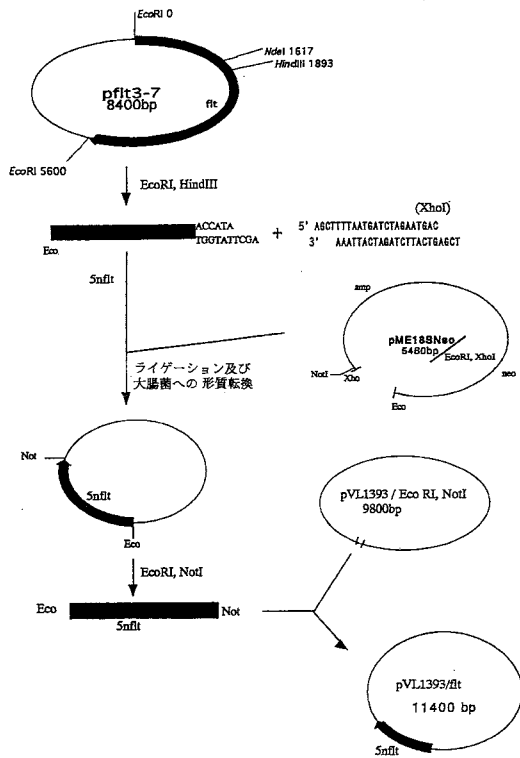
【 図 1 】



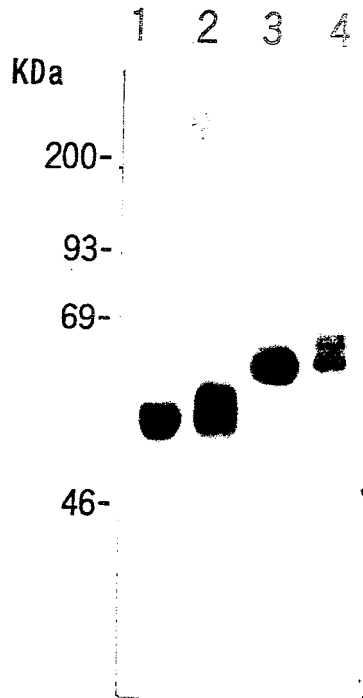
【 図 2 】



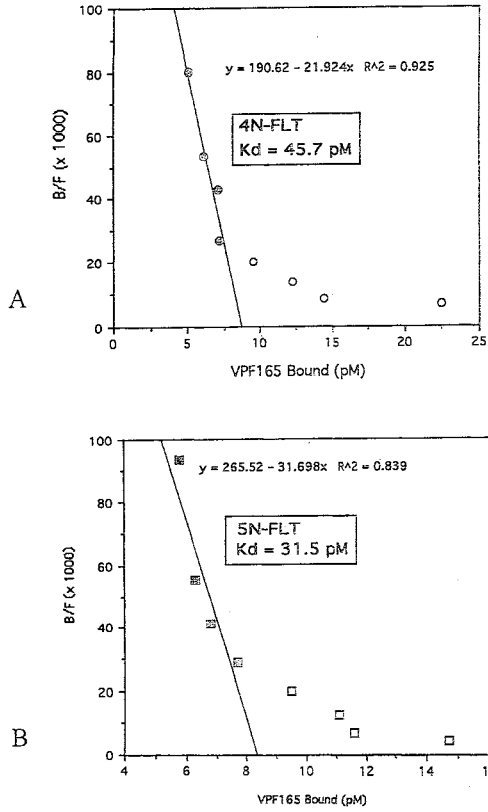
【 図 3 】



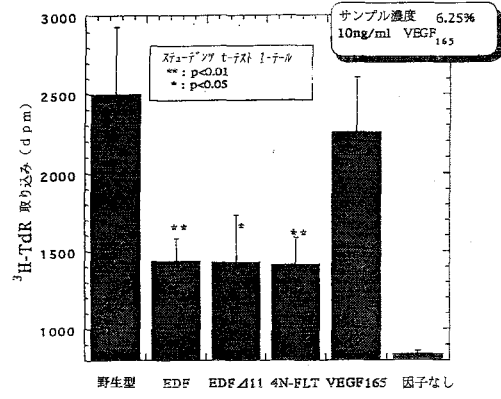
【 図 4 】



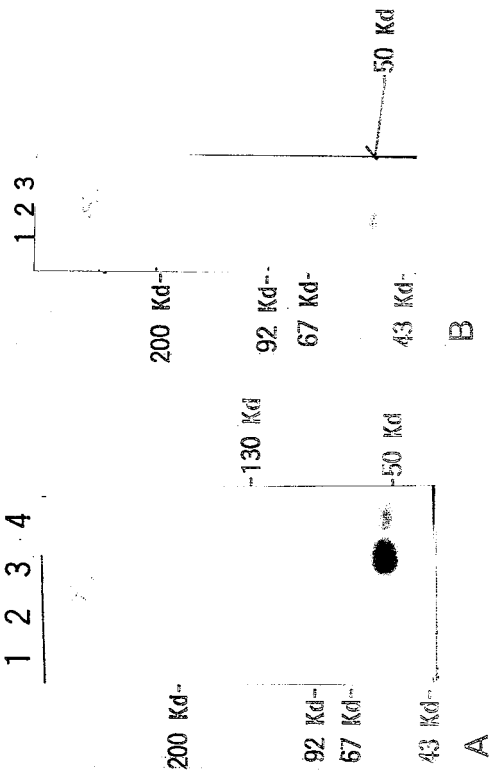
【 図 5 】



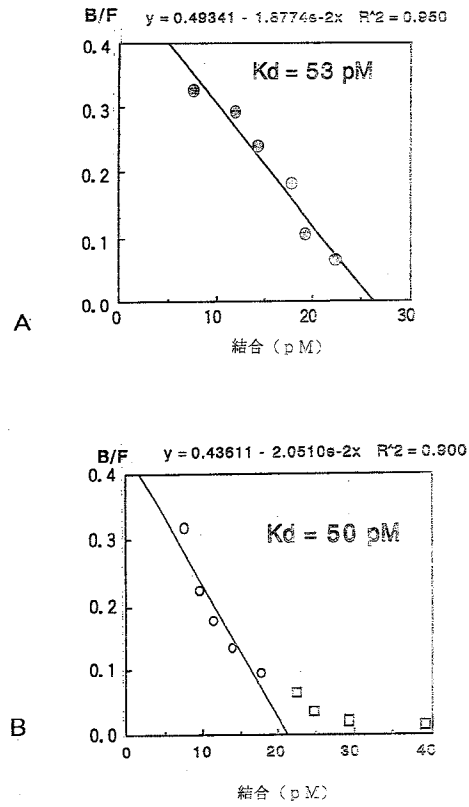
【 図 6 】



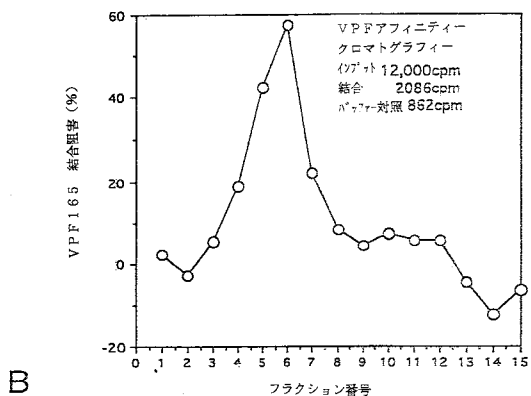
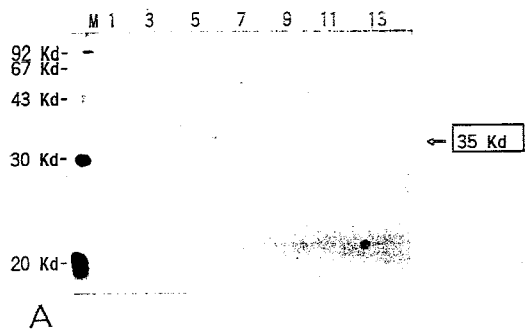
【 図 7 】



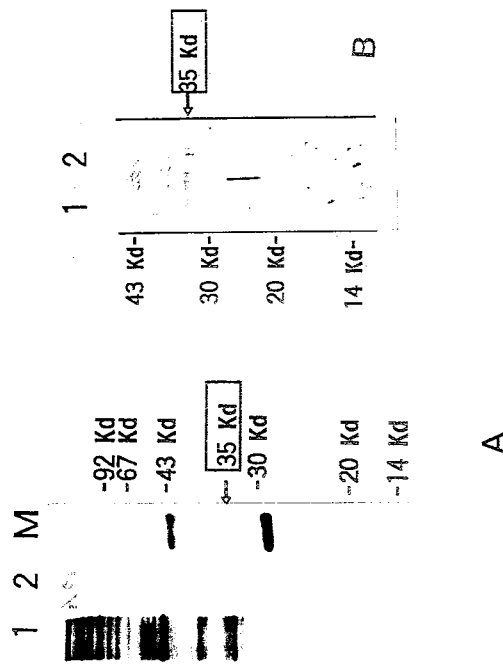
【 図 8 】



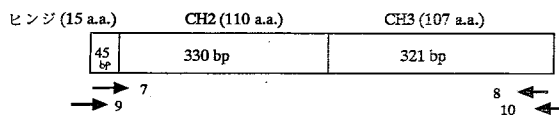
【 図 9 】



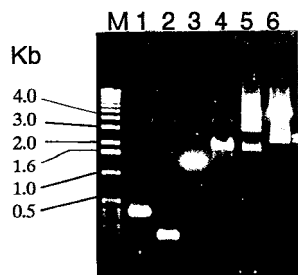
【 図 10 】



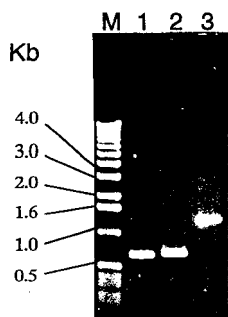
【 図 11 】



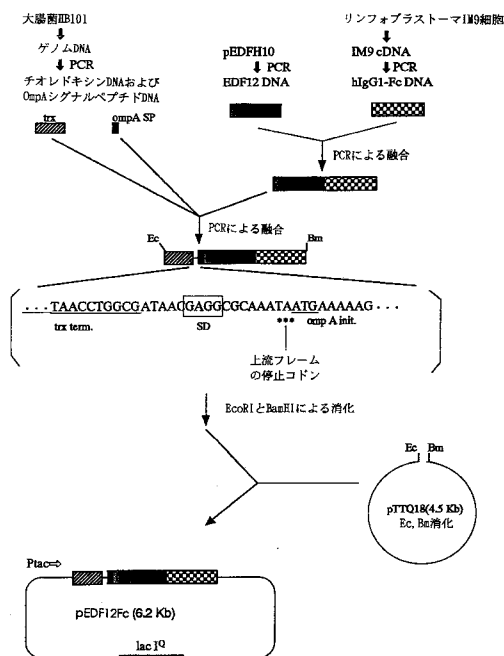
【 図 12 】



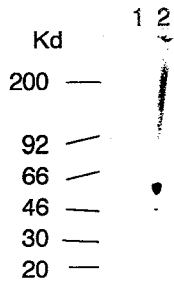
【 図 13 】



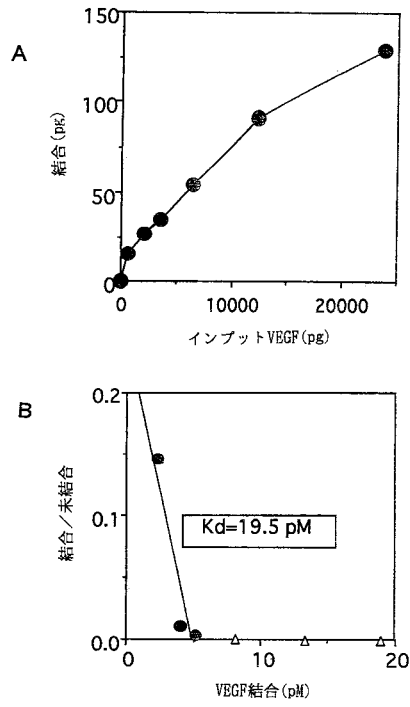
【 図 14 】



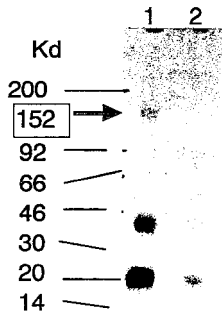
【 図 1 5 】



【 図 1 7 】



【 図 1 6 】



【 配列表 】

000389130600001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	5/00 A
<b>G 0 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53 D
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00

(72)発明者 松本 友恵  
茨城県つくば市大久保 2 番東亜合成株式会社つくば研究所内

(72)発明者 浅野 誠  
茨城県つくば市大久保 2 番東亜合成株式会社つくば研究所内

(72)発明者 瀬川 俊章  
茨城県つくば市大久保 2 番東亜合成株式会社つくば研究所内

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特表平 1 0 - 5 0 4 1 8 3 ( J P , A )  
国際公開第 9 4 / 1 0 2 0 2 ( W O , A 1 )  
国際公開第 9 4 / 2 1 6 7 9 ( W O , A 1 )  
国際公開第 9 5 / 3 3 0 5 0 ( W O , A 1 )  
Proc.NatI .Acad.Sci .USA, 1993, Vol .90, p.10705-10709  
J .Biol .Chem ., 1994, Vol .269, No.20, p.14841-14848  
J .Virol ., 1991, Vol .65, No.11, p.6015-6023  
Biochem.Biophys.Res.Commun ., 1994, Vol .201, No.1, p.326-330

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)  
C 0 7 K 1 4 / 7 0 5  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
B I O S I S / W P I ( D I A L O G )  
J S T P l u s ( J D r e a m 2 )

专利名称(译)	VEGF结合多肽		
公开(公告)号	<a href="#">JP3891306B2</a>	公开(公告)日	2007-03-14
申请号	JP2005297146	申请日	2005-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	东亚合成株式会社		
申请(专利权)人(译)	东亚合成株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	东亚合成株式会社		
[标]发明人	渋谷正史 岡本雅次 丹羽幹夫 松本友恵 浅野誠 瀬川俊章		
发明人	渋谷 正史 岡本 雅次 丹羽 幹夫 松本 友恵 浅野 誠 瀬川 俊章		
IPC分类号	C07K14/705 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53 A61K38/00 A61P35/00 A61P9/00		
FI分类号	C07K14/705 C12N15/00.ZNAA C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A G01N33/53.D A61K37/02 A61P35/00 A61P9/00 A61K37/43 A61K38/00 A61K38/02 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB01 4B065/BC01 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/DB70 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZB262 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	1995286476 1995-10-07 JP		
其他公开文献	JP2006094861A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供低分子量VEGF抑制剂，其可用于治疗伴随新血管形成的疾病，例如实体瘤。解决方案：发现含有免疫球蛋白样结构域1和免疫球蛋白样结构域2的多肽，但VEGF受体FLT的细胞外结构域的免疫球蛋白样主要6和免疫球蛋白样结构域7都具有VEGF抑制活性。Ž

