

(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2006-506043

(P2006-506043A)

(43) 公表日 平成18年2月23日(2006.2.23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 B O 2 9
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	4 B O 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 105 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-584112 (P2003-584112)  
 (86) (22) 出願日 平成15年4月11日 (2003.4.11)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年11月25日 (2004.11.25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/011088  
 (87) 国際公開番号 W02003/087157  
 (87) 国際公開日 平成15年10月23日 (2003.10.23)  
 (31) 優先権主張番号 60/372,173  
 (32) 優先日 平成14年4月12日 (2002.4.12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501370244  
 ファルマシア・コーポレイション  
 PHARMACIA CORPORATI  
 ON  
 アメリカ合衆国63006ミズーリ州セン  
 ト・ルイス、ポスト・オフィス・ボックス  
 1027  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100106231  
 弁理士 矢野 正樹  
 (72) 発明者 エドワード・ジェイ・ウェINSTAイン  
 アメリカ合衆国63017ミズーリ州チェ  
 スターフィールド、マイクロフト・ドライ  
 ブ15449番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脈管形成に関与する異なって発現された遺伝子、それによりコードされる蛋白質、およびそれを用いる方法

(57) 【要約】

本発明は、一般に、核酸およびそれらがコードするポリペプチド、特に、その発現が脈管形成において変調されるVCC-1の同定に関する。これらの核酸および蛋白質が、脈管形成において生物学的役割を有するものとしては従前には同定されていない。本発明は、さらに、VCC-1の発現および/または活性を変調する化合物に関する。VCC-1発現の変調のための、およびVCC-1の発現に関連する病気の治療のためのこれらの化合物を用いる方法が提供される。また、VCC-1関連脈管形成性障害の診断方法も含まれる。

```

GATTCOCATBAAGCACATGGTCTAATCTGTTACGTAAACAGCAAGCAGGCTCACTCAGCTGTCT 66
CGCCCTCAATGGGAACGCTGGCTGGGACTAAAGCATAGACCACAGGCTAGTATCCTGACTGACTCATCC 141
CAGGATCAGAGGCTCCAGCAGGGAACTCCATATATCTCAAGCACTTACAGCTGCACCCAGCTGGG 216
ATGAAAGTCTAATCTCTCCCTCCCTCTGCTGCGCCACTAATGCTGATGCTCATGGTCTCTAGCAGCCTGAAT 291
M K V L I S S L L L L L P L M L M S M V S S S L N 25
CGAGGGTCCCAAGGCCACAGGGACAGGCTCCAGGCTTACAGAGTGGCTCCAGGAGGCCGCCAAGATGT 366
P G V A R G H R D R G Q A S R R W L Q E G G Q B C 350
GAGTCAAGATGGTCTCCAGAGCCCGAGAGAAATTCATGACAGTGTGGGCTGCCAAGAGCAGTGC 441
E C K D W F L R A P R R K F M T V S G L F K K Q C 75
CCCTGTGATCATTCAGGGCAATGAGAGAAACAAGACACCAAGGCCACCAAGAAAGCCAAACAGCATTC 516
P C D B F K G H V K K T R H Q R H H R K P N K H S 100
AGAGCTCCAGCAATTTCTCAAAATGTCAGCTAAGAGCTTTGCTCTGCTTCTGAGGAGCTCTGAGGCGCC 119
R A C Q Q F L K Q C Q L R S F A L P L * SEQ ID NO:2
ACTCTCCAAATTAACATTCCTCAGCAGAGACAGTGTAGCAGACTACAGACACTCTCTCTCCCACTCAC 666
TCTCCACTGTACCCACCCCTAAATCATCTCCAGTGTCTCAAAAAGCATGTTTCAAGATCATTTTCTTTGTTG 741
CTCTCTAGTGTCTCTCTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 816
GAAAGATTCAGGAACTGTAGCTTCTAGCTAGTGTCTCAATTAACCTTAAATGCAATCAGGAAATGAGCAACAG 891
AAGTCAATAAATATTTTAAATGTCAAGCTCAAAATTTGTTCTTCAAAATGGGTTCTGCAATTCACAAACAG 956
TACCCCTTTACCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1041
TGTCTCCATTTGGCTACTTGTCTCTCTCTCAATTCAGCAATCTTCTGAGTAAAGAGCCAGGTGGGCAAA 1116
AAAAAAGCAATCCAAATCAACAGCACAGCTCTTATTAAGAGATATATAGGTTT SEQ ID NO:1 1172

```

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 配列番号：2 および配列番号：5 よりなる群から選択される配列を含むアミノ酸配列；

(b) 配列番号：2 および配列番号：5 よりなる群から選択される配列を含むアミノ酸配列の変種、ここに、該変種における 1 以上のアミノ酸残基は成熟形態のアミノ酸配列とは異なり、但し、該変種は該アミノ酸配列から 30% 以下のアミノ酸残基において異なり；

(c) 配列番号：3 および配列番号：6 よりなる群から選択されるアミノ酸配列の成熟形態；

(d) 配列番号：3 および配列番号：6 よりなる群から選択されるアミノ酸配列の成熟形態の変種、ここに、該変種における 1 以上のアミノ酸残基は該成熟形態のアミノ酸配列とは異なり、但し、該変種は該成熟形態のアミノ酸配列とは約 30% 以下のアミノ酸残基において異なり；および

(e) 配列番号：3 および配列番号：6 よりなる群から選択されるアミノ酸配列の断片；  
よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離された V C C - 1 ポリペプチド。

10

## 【請求項 2】

該ポリペプチドが配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5 および配列番号：6 よりなる群から選択されるアミノ酸配列の天然に生じる対立遺伝子変種のアミノ酸配列を含む請求項 1 記載の V C C - 1 ポリペプチド。

20

## 【請求項 3】

該対立遺伝子変種が、配列番号：1 および配列番号：4 よりなる群から選択される核酸配列とは単一のヌクレオチドだけ異なる核酸配列の翻訳であるアミノ酸配列を含む請求項 2 記載の V C C - 1 ポリペプチド。

## 【請求項 4】

該変種のアミノ酸配列が保存的アミノ酸置換を含む請求項 1 記載のポリペプチド。

## 【請求項 5】

配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5 および配列番号：6 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含む請求項 1 記載の単離された V C C - 1 ポリペプチド。

30

## 【請求項 6】

請求項 1 記載のポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離された核酸分子。

## 【請求項 7】

該核酸配列が、

a) ストリンジェントな条件下で配列番号：1 または配列番号：4 の D N A 配列にハイブリダイズすることができるか、あるいは遺伝子暗号の縮重を除いては該条件下で該 D N A 配列にハイブリダイズすることができる核酸配列；

b) 配列番号：1 または配列番号：4 の D N A 配列に対して少なくとも約 80% の相同性を有する核酸配列；および

c) 配列番号：1 または配列番号：4 の相補体；

40

よりなる群から選択される配列を含む請求項 6 記載の単離された核酸配列。

## 【請求項 8】

該核酸分子が天然に生じる対立遺伝子核酸変種のヌクレオチド配列を含む請求項 6 記載の核酸分子。

## 【請求項 9】

該核酸分子が配列番号：1 および配列番号：4 よりなる群から選択される請求項 6 記載の核酸分子。

## 【請求項 10】

該核酸分子が、配列番号：1 または配列番号：4 よりなる群から選択される核酸配列とは単一のヌクレオチドだけ異なる請求項 8 記載の核酸分子。

50

- 【請求項 1 1】  
 該核酸分子が、ストリンジェントな条件下で、配列番号：1または配列番号：4よりなる群から選択されるヌクレオチド配列、または該ヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズする請求項 6 記載の核酸分子。
- 【請求項 1 2】  
 請求項 6、7、8、9、10または11の核酸分子を含むベクター。
- 【請求項 1 3】  
 該核酸分子に操作可能に連結したプロモーターをさらに含む請求項 1 2 記載のベクター。
- 【請求項 1 4】 10  
 請求項 1 3 記載のベクターを含む宿主細胞。
- 【請求項 1 5】  
 該 V C C - 1 ポリペプチドの発現をもたらす条件下で、請求項 1 4 記載の宿主細胞を適当な栄養条件下で増殖させることを特徴とする V C C - 1 を生産する方法。
- 【請求項 1 6】  
 請求項 6 記載の核酸配列を含むマイクロアレイ。
- 【請求項 1 7】  
 該核酸配列が、配列番号：1および配列番号：4よりなる群から選択される核酸配列を含む請求項 1 6 記載のマイクロアレイ。
- 【請求項 1 8】 20  
 配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5、および配列番号：6よりなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含むマイクロアレイ。
- 【請求項 1 9】  
 請求項 1 記載の V C C - 1 ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体。
- 【請求項 2 0】  
 該抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 9 記載の抗体。
- 【請求項 2 1】  
 該抗体が抗体断片である請求項 1 9 記載の抗体。
- 【請求項 2 2】  
 該抗体断片が F v 断片、F a b 断片、( F a b )<sub>2</sub> 断片、および単鎖抗体よりなる群 30  
 から選択される請求項 2 1 記載の抗体。
- 【請求項 2 3】  
 該抗体がアンタゴニストである請求項 1 9 記載の抗体。
- 【請求項 2 4】  
 該抗体がヒト抗体である請求項 1 9、20、21、22または23記載の抗体。
- 【請求項 2 5】  
 該抗体が全長ヒト抗体である請求項 1 9、20、21、22または25記載の抗体。
- 【請求項 2 6】  
 ( a ) 試料を供し；  
 ( b ) 請求項 1 記載の V C C - 1 ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体と該試料と 40  
 を接触させ；次いで  
 ( c ) 該 V C C - 1 ポリペプチドに結合した抗体の存在または量を測定する工程を含み、  
 それにより、該試料中の V C C - 1 ポリペプチドの存在または量を決定することを特徴とする、請求項 1 記載の V C C - 1 ポリペプチドの存在または量を決定する方法。
- 【請求項 2 7】  
 ( a ) 試料を供し；  
 ( b ) 請求項 6 記載の核酸分子に結合するプローブと該試料とを接触させ；次いで、  
 ( c ) 該核酸分子に結合したプローブの存在または量を決定する工程を含み、  
 それにより、該試料中の核酸分子の存在または量を決定することを特徴とする、試料中 50

の請求項 6 記載の核酸分子の存在または量を決定する方法。

【請求項 28】

請求項 1 記載の VCC - 1 ポリペプチドに結合する剤を同定する方法であって、

(a) 該ポリペプチドと該剤と接触させ；次いで

(b) 該ポリペプチドに該剤が結合したか否かを判断する工程を含む該方法。

【請求項 29】

請求項 1 記載の VCC - 1 ポリペプチドの発現または活性を変調する剤を同定する方法であって、

(a) 操作可能に該ポリペプチドを発現する細胞を供し；

(b) 該細胞と該剤とを接触させ；次いで

(c) 該ポリペプチドの発現または活性を該剤が変調するか否かを判断する工程を含み

、それにより、該ペプチドの発現または活性における改変が、該剤が該ポリペプチドの発現または活性を変調すること示すことを特徴とする該方法。

【請求項 30】

請求項 1 記載の VCC - 1 ポリペプチドを発現する細胞試料と、該ポリペプチドの活性を変調するのに十分な量の該ポリペプチドに結合する化合物とを接触させることを特徴とする請求項 1 記載の VCC - 1 ポリペプチドの活性を変調する方法。

【請求項 31】

治療または予防が望まれる対象に、該対象において脈管形成関連障害を治療または予防するのに十分な量の請求項 1 記載の VCC - ポリペプチドを投与することを特徴とする脈管形成関連障害を治療または予防する方法。

【請求項 32】

治療または予防が望まれる対象に、該対象において脈管形成関連障害を治療または予防するのに有効な量の請求項 19 記載の抗体を投与することを特徴とする脈管形成関連障害を治療または予防する方法。

【請求項 33】

請求項 1 記載の VCC - 1 ポリペプチドおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物

【請求項 34】

請求項 19 記載の抗体および医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 35】

請求項 33 または 34 記載の医薬組成物を含むキット。

【請求項 36】

癌であることが疑われる細胞に由来するテスト試料中の少なくとも 1 つの異なって発現された遺伝子産物を検出する工程を含み、ここに、該遺伝子産物は核酸配列配列番号：1 または配列番号：4 によってコードされ、ここに、異なって発現された産物の検出は、テスト試料が由来する細胞の癌状態と関係付けることを特徴とする哺乳動物細胞の癌状態と関連する異なって発現された遺伝子を検出する方法。

【請求項 37】

試料中の請求項 6 記載の核酸分子の存在を検出する方法であって、

(a) 該試料を、該核酸分子と選択的にハイブリダイズする核酸プローブまたはプライマーと接触させ；次いで、

(b) 該核酸プローブまたはプライマーが該試料中の核酸分子に結合するか否かを判断して、それにより、試料中の請求項 1 記載の核酸分子の存在を検出する工程を含む該方法

【請求項 38】

患者において脈管形成性障害の進行をモニターする方法であって、

(a) 第一の時点で患者試料中にてマーカーの発現を検出し、ここに、該マーカーは請求項 1 記載の VCC - 1 ポリペプチドであり；

10

20

30

40

50

(b) 引き続いての時点において工程 a) を反復し ; 次いで

(c) 工程 a) および b) において検出された発現のレベルを比較し、それより、脈管形成性障害の進行をモニターする工程を含む該方法。

【請求項 39】

脈管形成を阻害するテスト化合物の効率を評価する方法であって、

a) テスト化合物に暴露された患者から得られた第一の試料中のマーカの発現、ここに、該マーカは請求項 1 記載の VCC - 1 ポリペプチドであり、および

b) 患者から得られた第二の試料中のマーカの発現、ここに、該試料はテスト化合物に暴露されず、ここに、第二の試料に対する第一の試料におけるマーカの発現の有意に低いレベルは、テスト化合物が患者において癌を阻害するのに効果的である指標である ; を比較することを特徴とする該方法。 10

【請求項 40】

患者において脈管形成を阻害する療法の効率を評価する方法であって、

a) 患者に療法の少なくとも一部を供するに先立って患者から得られた第一の試料中のマーカの発現、ここに、該マーカは請求項 1 記載の VCC - 1 ポリペプチドであり、および

b) 該療法の一部の提供に続いて患者から得られた第二の試料中のマーカの発現、ここに、第一の試料に対する第二の試料中のマーカの発現の有意に低いレベルは、該療法が患者において癌を阻害するのに効果的である指標である ; を比較することを特徴とする該方法。 20

【請求項 41】

患者において脈管形成を阻害するための組成物を選択する方法であって、

(a) 患者からの癌細胞を含む試料を得 ;

(b) 複数のテスト組成物の存在下で該試料のアリコットを別々に暴露し ;

(c) 該アリコットの各々におけるマーカの発現を比較し、ここに、該マーカは配列番号 : 2、配列番号 : 3、配列番号 : 5、および配列番号 : 6 のマーカよりなる群から選択され ; 次いで、

(d) 他のテスト組成物に対する、そのテスト組成物を含むアリコット中のマーカの発現のレベルを改変するテスト組成物を選択する ; 工程を含む該方法。 30

【請求項 42】

VCC - 1 ポリペプチドアンタゴニスト。

【請求項 43】

該アンタゴニストがアンチセンス分子である請求項 41 記載のアンタゴニスト。

【請求項 44】

請求項 1 記載の VCC - 1 ポリペプチドを含むキメラ分子。

【請求項 45】

調節エレメントに操作可能に連結した VCC - 1 をコードする核酸をそのゲノムに組み込まれたトランスジェニック非 - ヒト哺乳動物であって、ここに、該コーディング配列の発現は同一種 of 非 - トランスジェニック哺乳動物に対して該哺乳動物の VCC - 1 のレベルおよび骨密度を増加させ、ここに、該コーディング配列は請求項 6 記載の核酸から選択されることを特徴とする該トランスジェニック非 - ヒト哺乳動物。 40

【請求項 46】

該哺乳動物がマウスである請求項 45 記載のトランスジェニック哺乳動物。

【請求項 47】

その内因性 VCC - 1 遺伝子中にホモ接合性破壊を含むトランスジェニックノックアウト非 - ヒト哺乳動物であって、該破壊は機能的 VCC - 1 蛋白質の発現を妨げることを特徴とする該非 - ヒト哺乳動物。

【請求項 48】

VCC - 1 の発現または活性の変調と関連付けられたバイオマーカ。

## 【請求項 49】

K I A A 0 7 5 8、V E G F - A、A n g - 2、u P A R、u P A、および b F G F よりなる群から選択される請求項 1 記載のバイオマーカー。

## 【請求項 50】

変調された V C C - 1 の発現レベルまたは活性を有することが疑われるテスト試料中の少なくとも 1 つの異なって発現されたバイオマーカーを検出する工程を含む、請求項 1 または 2 記載の異なって発現されたバイオマーカーを検出する方法。

## 【請求項 51】

哺乳動物テスト対象から検体を供して、バイオマーカー診断剤を供し、  
バイオマーカー参照パネルと比較し、次いで、  
該比較によって示された該対象についての診断を同定することを特徴とする、哺乳動物  
テスト対象における V C C - 1 関連障害を診断するためにバイオマーカーを用いる方法。

10

## 【請求項 52】

該バイオマーカーが K I A A 0 7 5 8、V E G F - A、A n g - 2、u P A R、u P A、および b F G F よりなる群から選択される請求項記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本出願は、引用してその全体をあたかもここに記載されているごとく一体化させる、2  
0 0 2 年 4 月 1 2 日に出願された米国仮出願第 6 0 / 3 7 2 , 1 7 3 号に対して米国特許  
法第 1 1 9 条の下で優先権を主張する。

20

## 【0002】

## 発明の分野

本出願は、一般、その発現が脈管形成において変調させる、核酸およびそれらがコード  
するポリペプチドの同定に関する。これらの核酸および蛋白質は、以前、脈管形成におい  
て生物学的役割を有することは同定されていない。また、本発明は、該ポリペプチドに対  
して特異性を有する抗体に関する。また、本発明はアンチセンス分子に関する。本発明は  
、さらに、そのような生物学的効果を必要とする哺乳動物において脈管形成を治療または  
変調するのに有用な方法に関する。これは、限定されるものではないが、創傷治癒および  
癌を含めた脈管形成の診断または治療を含むが、それらに限定されるものではない。さら  
に、本発明は、診断プローブまたは治療剤としての本発明のポリペプチドに対する抗体の  
使用、ならびに心血管、脈管形成、腫瘍学および内皮障害を含めた広い範囲の病理学的  
状態の治療用の診断プローブまたは治療剤としての本発明のポリペプチドをコードするポ  
リヌクレオチド配列の使用に関する。

30

## 【0003】

## 発明の背景

脈管形成は、予め存在する血管からの新しい毛細血管の成長であり、毛細血管は、創傷  
修復、胚発生、および固体腫瘍の成長のような非常に多数のプロセスにおいて非常に重要  
である。血管新生において、内皮細胞は移動、伸長、増殖および配向を受け、ルーメンの  
形成、基底膜の再確立、および他の血管との最終的な吻合に導かれる (Patan, 2000)。

40

## 【0004】

サイトカインは、細胞表面受容体に結合して、種々の細胞の活性を変調する小さな蛋白  
質である。V C C - 1 は C X C ケモカインのよう見え、これは、当該蛋白質の N - 末端  
近くのその保存された C y s - X a a - C y s 配列のため命名された、サイトカインのサブ  
ファミリーである。ファミリーのメンバーは 2 つのさらなる保存されたシステイン残基  
を含み、おおまか、サイズは 7 0 ないし 1 3 0 アミノ酸である。それらは分泌された蛋白  
質であり、2 0 ないし 2 5 アミノ酸のリーダー配列が伴い、これは放出される前に切り離  
される。サイトカインの特徴的な三次元折り畳みは、保存されたシステイン 1 およびシス  
테인 2 の間、およびシステイン 3 およびシステイン 4 の間で形成されるジスルフィド結

50

合によって安定化される (Baggiolini, 2001にレビューされている)。

【0005】

公知のCXCケモカインの中には、インターロイキン-8 (IL-8)、 $\gamma$ -インターフェロン-誘導性蛋白質10 (IP-10)、血小板第4因子 (PF4)、 $\delta$ -インターフェロンによって誘導されたモノカイン (MIG)、上皮好中球活性化蛋白質-78 (ENA-78)、増殖関連オンコジーンペプチド (GRO) GRO- $\alpha$ 、GRO- $\beta$  および GRO- $\gamma$  その他である。これらの蛋白質は好中球の活性化、化学走性の誘導、脈管形成および腫瘍形成の誘導、ならびに脈管形成および腫瘍形成の阻害を含めた多様な多数の活性を媒介する (Belperioら, 2000)。

【0006】

ケモカインの生物学的効果の全ては、細胞表面受容体とのその相互作用を介して発揮される。現在、同定された6つのCXCケモカイン受容体 (CXCR) がある (Horuk, 2001によってレビューされている)。CXCRは、ヘテロトリマーG-プロテインを介してシグナリグを行うセルペンチン蛋白質のスーパーファミリーのメンバーである。これらの蛋白質は、高い親和性を持って多数のケモカインに結合する能力を保有することが示されている。

【0007】

脈管形成の調節は、部分的には、脈管形成抑止性および脈管形成性サイトカインによって少なくとも制御される。IL-8は内皮細胞化学走性および増殖活性をイン・ビトロで媒介することが示されている (Strieterら, 1992およびKochら, 1992)。対称的に、IP-10、MIGおよびPF4は、イン・ビトロおよびイン・ビボ双方において脈管形成抑止特性を有することが判明している (Maioneら, 1990; Strieterら, 1995およびArenbergら, 1997)。

【0008】

腫瘍増殖は脈管形成に依存するので、CXCケモカインは腫瘍の増殖および転移において役割を演じることとなる。腫瘍形成および増殖を変調する脈管形成性ケモカインの最も明瞭な例はヒトメラノサイトにおけるGRO- $\alpha$  および  $\beta$  の過剰発現によって示されており、これは、インビトロでのアンコラジ-非依存性増殖表現型およびヌードマウスにおけるインビボで腫瘍を形成する能力に導く (Luanら, 1997およびOwenら, 1997)。さらに、非-小細胞肺癌腫 (NSCLC) におけるIL-8およびENA-78双方の発現は腫瘍脈管形成と関連付けられている (Yatsunamiら, 1997およびArenbergら, 1998)。

【0009】

他のCXCケモカインは、腫瘍細胞の増殖を阻害するか、または腫瘍細胞の壊死を誘導するよう見える。パーキット腫瘍が皮下移植されたヌードマウスに毎日組換えMIGを接種した。これは執拗に血管損傷を伴う腫瘍壊死を引き起こした (Sgadariら, 1997)。それはパーキット腫瘍を担うIP-10で処理されたマウスで観察された (Sgadariら, 1996)。NSCLC腫瘍を担い、MIGで処理したSCIDマウスは、増殖阻害を示し、転移の数および腫瘍-由来血管密度の低下を減少させた (Addisonら, 2000)。

【0010】

発明の概要

1つの態様において、本発明は、対象において脈管形成障害治療の効率を評価する方法を含み、ここに、該方法は、本発明の核酸配列の1以上を発現することができるテスト細胞集団を供し；これらの核酸配列の1以上の発現を検出し；その癌段階が知られている参照細胞集団における核酸配列のそれと該発現とを比較し；もし存在すれば、テスト細胞集団および参照細胞集団の間の発現レベルの差を同定する工程を含む。種々の具体例において、対象は哺乳動物、またはより好ましくはヒトであり得る。他の具体例において、テスト細胞集団は哺乳動物対象からイン・ビトロ、エクス・ビボ、あるいは哺乳動物対象においてイン・ビボで供することができる。核酸配列の発現は、参照細胞集団と比較して、テスト細胞集団で増加または減少させることができる。

【0011】

10

20

30

40

50

さらなる態様において、本発明は脈管形成障害を診断する方法を含み、ここに、該方法は本発明の核酸配列の1以上を発現させることができるテスト細胞集団を供し；これらの核酸配列の1以上の発現を検出し；その脈管形成段階が知られている参照細胞集団における核酸配列のそれと該発現とを比較し；次いで、もし存在すればテスト細胞集団および参照細胞集団の間の発現レベルの差を同定することを含む。種々の具体例において、対象は哺乳動物またはより好ましくはヒトであり得る。他の具体例において、テスト細胞集団は哺乳動物対象からイン・ビトロ、エクス・ビボ、あるいは哺乳動物対象においてイン・ビボで供することができる。核酸配列の発現は、参照細胞集団と比較してテスト細胞集団で増加または減少させることができる。

#### 【0012】

もう1つの態様において、本発明は、本発明の核酸配列の1以上を発現することができるテスト細胞集団を供し；該テスト細胞集団をテスト治療剤と接触させ；これらの核酸配列の1以上の発現を検出し；その脈管形成段階が知られている参照細胞集団における核酸配列のそれと該発現とを比較し；次いで、もし存在すれば、テスト細胞集団および参照細胞集団の間の発現レベルの差を同定する工程を含む、対象において脈管形成障害を治療するためのテスト治療剤を同定する方法を含む。異なる具体例において、対象は哺乳動物、またはより好ましくはヒトであり得る。加えて、テスト治療剤は公知の脈管形成障害剤または未知の脈管形成障害剤いずれかであり得る。アンタゴニストは、本発明のポリペプチドの少なくとも1つに対して選択性を有する抗体であり得る。治療すべき脈管形成障害は以下の病気または障害から選択することができる：乳癌腫、肺癌腫、胃癌腫、食道癌腫、結直腸癌腫、肝臓癌腫、卵巣癌腫、莖膜腫、男性胚腫、子宮頸部癌腫、子宮内膜癌腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、線維肉芽腫、絨毛癌腫、頭頸部癌、上咽頭癌腫、喉頭癌腫、肝芽細胞腫、カポジ肉腫、黒色腫、皮膚癌腫、血管腫、海綿状血管腫、血管芽細胞腫、脾臓癌腫、網膜芽細胞腫、星状細胞腫、膠芽腫、シュワン細胞腫、乏突起細胞腫、髄芽腫、神経芽腫、横紋筋肉腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、尿路癌腫、甲状腺癌腫、ウィルム腫瘍、腎細胞癌腫、前立腺癌腫、母斑症 (phakomatoses) と関連した異常血管増殖、(脳腫瘍と関連した)浮腫およびメージュ症候群。

#### 【0013】

さらなる態様において、本発明は、対象において脈管形成障害に対する罹患性、病気素因、またはその存在を同定または判断する方法を含む。この態様において、該方法は、本発明の核酸配列の1以上を発現することができるテスト細胞集団を供し；これらの核酸配列の1以上の発現を検出し；その癌段階が知られている参照細胞集団において該核酸配列のそれと該発現とを比較し；もし存在すれば、テスト細胞集団および参照細胞集団の間の発現レベルの差を同定する工程を含む。

#### 【0014】

別の態様において、本発明は、本発明の核酸配列の1以上の発現または活性を変調する剤を、脈管形成に罹った、または脈管形成障害を発生する危険性がある患者に投与することによって脈管形成障害を治療する方法を含む。この剤は、癌組織において上昇調節される本発明の配列の1以上の発現を低下させるものであり得る。別法として、それは、下降調節される本発明の配列の1以上の発現を増加させるものであり得る。加えて、該剤は、該核酸配列によってコードされるポリペプチドに対する抗体、アンチセンス核酸分子、ペプチド、ポリペプチドアゴニスト、ポリペプチドアンタゴニスト、ペプチドミメティック、小分子、またはその他の薬物であり得る。

#### 【0015】

本発明は、VCC-1をコードする核酸を標的とする、およびVCC-1の発現を変調するアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドに指向される。本発明のアンチセンス化合物を含む医薬および他の組成物も提供される。さらに、細胞または組織を本発明のアンチセンス化合物または組成物の1以上と接触させることを含む細胞または組織においてVCC-1の発現を変調する方法が提供される。さらに、治療上または予防上有効量の1以上の本発明のアンチセンス化合物または組成物を投与することによって、VCC-1の

10

20

30

40

50

発現に関連する病気または疾患を有する、または該病気または疾患に対して素因があることが疑われる動物、特にヒトを治療する方法が提供される。

【0016】

また、本発明は、本発明の2以上の核酸配列を検出するための1以上の試薬を含むキットを含む。加えて、本発明は、本発明の2以上の核酸を検出することができるプローブ核酸のアレイを含む。

【0017】

本発明のポリペプチド、核酸および抗体を用いて、対象において脈管形成障害を治療することができる。脈管形成障害の治療は哺乳動物、好ましくはヒトにおけるものであり得る。種々の具体例において、本発明のポリペプチドおよび核酸を含有する治療組成物を用いて、脈管形成障害を治療することができる。これらの治療組成物は医薬上許容される担体および、さらに、抗-脈管形成剤または抗炎症剤のごとき有効成分を含むことができる。また、医薬上許容される担体と共に脈管形成障害の治療で用いられる治療組成物を含むキットも提供され、ここに、該治療組成物は本発明のポリペプチド、本発明のポリペプチドのアゴニスト、または本発明のポリペプチドのアンタゴニストである。

10

【0018】

また、本発明のポリペプチドをコードする核酸に対して少なくとも80%同一である単離された核酸分子、または核酸配列の相補体ならびにこの核酸配列を含むベクターまたは宿主細胞も本発明に含まれる。また、当該ベクターによってコードされる蛋白質の発現に適した条件下で、本明細書中に記載する1以上のベクターで形質転換された宿主細胞を培養することによるポリペプチドの生産方法も提供される。

20

【0019】

もう1つの態様において、本明細書中に記載する単離された核酸配列またはオリゴヌクレオチドによってコードされる単離されたポリペプチドが提供される。いくつかの態様において、単離された蛋白質、その機能的変種または断片。もう1つの具体例において、本発明の蛋白質の変種または断片は各活性を保持する。

【0020】

本発明のさらなる具体例は、生物学的試料中の本発明の核酸またはポリペプチドのレベルをモニタリングすることに基づいて、抗脈管形成治療の効果を評価するためのバイオマーカーおよび方法である。

30

【0021】

本発明のさらなる具体例は、VCC-1機能の変調の下流バイオマーカーである。これらのバイオマーカーの発現は、VCC-1の変調の結果として変化する。好ましいバイオマーカーはAng-2、uPAR、uPA、およびbFGFである。また、具体化されるものは、テスト試料中において、VCC-1関連障害の、またはVCC-1の発現または活性の変調に関連した、異なって発現されたバイオマーカーを検出する方法である。さらなる具体例はVCC-1関連障害を診断する方法である、ここに、該診断はVCC-1の発現または活性に関連するバイオマーカーの検出に基づく。もう1つの具体例は、VCC-1関連バイオマーカーを含むキットである。

【0022】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な記載から、および請求の範囲から明らかであろう。

40

【0023】

発明の詳細な記載

脈管形成は、存在する毛細血管からの新しい血管の発生である。このプロセスが、多数のヒトの病気、ならびに固体腫瘍の増殖および転移に関連付けられてきた。関節炎のいくつかの形態において、新しい毛細管が関節中で形成され、関節は徐々に破壊される。また、固体腫瘍は新しい血管の形成を刺激して、それらの増殖に必要な栄養および酸素を得、かくして、腫瘍が遠くの部位に転移することができる経路を供するに違いない。

【0024】

50

実験的証拠は、悪性腫瘍が、酸性線維芽細胞成長因子 (aFGF)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)；血小板由来成長因子 (PDGF)、トランスフォーミング増殖因子 - アルファ (TNF - アルファ)、および多くのその他のものごととき種々の因子の精密性を通じて脈管形成を誘導することができる (Liottaら, 1991, Cell 64:327-336; Hanahanら, Cell 86:353-364)。

#### 【0025】

本明細書中で用いるごとく、用語「脈管形成」は、組織または器官への新しい血管の発生を意味し、内皮細胞増殖を含む。通常の生理学的条件下では、ヒトまたは動物は非常に特殊な限定された条件下でのみ脈管形成を受ける。例えば、脈管形成は、通常は、創傷治癒、胎児および胚発生、黄体、子宮内膜および胎盤の形成で観察される。用語「内皮」は、漿液腔、リンパ系血管、および血管を覆う平坦な上皮細胞の薄い層を意味する。 10

#### 【0026】

制御されたおよび制御されない脈管形成は同様に進行すると考えられる。基底膜によって囲まれた内皮細胞および周皮細胞は毛細血管を形成する。脈管形成は、内皮細胞および白血球によって放出された酵素による基底膜のびらんで開始する。次いで、血管のルーメンを覆う内皮細胞は基底膜を貫通する。脈管形成刺激剤は、内皮細胞を誘導して、びらんした基底膜を通して移動させる。移動する細胞は親血管を離れて「新芽」を形成し、そこで、内皮細胞は細胞分裂を受け、増殖する。内皮細胞新芽は、相互に合体して、毛細血管ループを形成し、新しい血管を作り出す。

#### 【0027】

執拗な調製されていない脈管形成が、多数の病気状態、腫瘍転移、および内皮細胞による異常な増殖で起こり、これらの疾患で観察される病理学的損傷を裏付ける。調製されない脈管形成が存在する多様な病理学的病気状態は、脈管形成依存性または脈管形成関連病として一緒にグループ分けされてきた。 20

#### 【0028】

腫瘍増殖が脈管形成 - 依存性であるという仮定はまず1971年に提案された (Follum an J., N.Engl. Jour. Med. 285:1182-1186, 1971)。その最も簡単な事項においては、それは：「一旦腫瘍「獲得」が起これば、腫瘍細胞集団における毎回の増加には、腫瘍に集まる新しい毛細血管の増加が先行するに違いない」と述べている。腫瘍「獲得」は、現在、腫瘍増殖のプレ血管相を示すと理解されており、そこでは、数立法ミリメートルの容量を占め、数百万細胞を超えない腫瘍細胞の集団が存在する宿主微細血管で生存し得る。この相を超えての腫瘍容量の拡大には、新しい毛細血管の誘導が必要である。例えば、マウスにおける初期のプレ血管相における肺ミクロ転移は、組織学的切片に対する高パワー顕微鏡による以外は理解できないであろう。 30

#### 【0029】

この概念を裏付ける間接的証拠の例は以下のものを含む：

マウスにおける皮下透明チャンパーに移植された腫瘍の増殖速度は、血管新生の前には遅く、かつ直線的であって、血管新生後には迅速かつほとんど指数関数的である (Algire G H,ら Vascular reactions of normal and malignant tumors in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. J. Natl. Cancer Inst. 6:73-85, 19455)。 40

#### 【0030】

血管が増殖しない単離された灌流器官で増殖した腫瘍は1ないし2 mm<sup>3</sup>に制限されるが、それがマウスに移植され、血管新生された場合には、この容量の千倍を超えて迅速に拡大する (Folkman Jら, Tumor behavior in isolated perfused organs: In vitro growth and metastasis of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segments. Annals of Surgery 164:491-502, 1966)。

#### 【0031】

無血管皮質における腫瘍増殖はゆっくりとしており、かつ直線的速度で進行するが、血管新生の後には指数関数的増殖にスイッチする (Gimbrone, M.A., Jr.ら, Tumor growth 50

and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. *J. Natl. Cancer Institute* 52:41-427,1974)。

【 0 0 3 2 】

ウサギ目の前室の水性流体に懸濁させた腫瘍は生きており、無血管で、かつサイズは  $1 \text{ mm}^3$  未満に制限される。一旦それが光彩血管床に移植されると、それは血管新生され、迅速に増殖し、2週間以内にその元の容量の16,000倍に達する (Gimbrone M A Jr. ら, Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J. Exp. Med.* 136:261-276)。

【 0 0 3 3 】

腫瘍をニワトリ胚漿尿に移植すると、それは72時間を超える無血管相の間はゆっくりと増殖するが、0.93ないし0.29mmの平均直径を超えない。迅速な腫瘍拡大は、血管新生の開始から24時間後内に起こり、7日までには、これらの血管化腫瘍は  $8.0 + 2.5 \text{ mm}$  の平均直径に到達する (Knighton D., Avascular and vascular phases of tumor growth in the chick embryo. *British J Cancer*, 35:347-356,1977)。

【 0 0 3 4 】

ウサギ肝臓における転移の血管円柱は、転移のサイズの不均一性を明らかとするが、血管化が存在するサイズでは比較的均一なカットオフ点を示す。腫瘍は直径が1mmまでは一般に無血管であるが、その直径を超えると血管新生される (Lien W. ら, The blood supply of experimental liver metastases. II. A microcirculatory study of normal and tumor vessels of the liver with the use of perfused silicone rubber. *Surgery* 68:334-340,1970)。

【 0 0 3 5 】

脾臓島のベータ細胞において癌腫を生じるトランスジェニックマウスにおいては、プレ-血管過形成島はサイズが1mm未満に制限される。6ないし7週齢においては、該島の4ないし10%未満は血管新生されこれらの島からプレ-血管島の容量の千倍を超える大きな血管化腫瘍が生じる (Follicman J ら, Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339:58-61,1989)。

【 0 0 3 6 】

VEGF (血管内皮細胞成長因子) に対する特異的な抗体は微少血管密度を低下させ、3つのヒト腫瘍の増殖の「有意なまたは劇的な」阻害を引き起こし、これは、(ヌードマウスにおける) 脈管形成のその唯一のメディエーターとしてのVEGFに頼る。該抗体はイン・ビトロでは主要細胞の増殖を阻害しない (Kim K J ら, Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 362:841-844, 1993)。

【 0 0 3 7 】

抗-bFGFモノクローナル抗体はマウス腫瘍の増殖の70%阻害を引き起こし、これは、その唯一の脈管形成のメディエーターとしてのbFGFの分泌に依存する。該抗体はイン・ビトロでは腫瘍細胞の増殖を阻害しない (Hori A ら, Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Research*, 51:6180-6184,1991)。

【 0 0 3 8 】

bFGFの腹腔内注射は、腫瘍において毛細血管内皮細胞を刺激することによって一次腫瘍の増殖およびその転移を増強させる。腫瘍細胞それ自体はbFGFに対する受容体を欠くbFGFはイン・ビトロにおいては腫瘍細胞に対するマイトジェンではない (Gross J L ら, Modulation of solid tumor growth in vivo by bFGF. *Proc. Amer. Assoc. Canc. Res.* 31:79,1990)。

【 0 0 3 9 】

特異的脈管形成阻害剤 (AGM-1470) は、イン・ビボで腫瘍増殖および転移を阻害するが、イン・ビトロでは腫瘍細胞増殖を阻害するのにかなり活性が低い。それは、腫瘍細胞増殖を阻害するよりも4log低い濃度で半最大に血管内皮細胞を阻害する (Ingb

er Dら, Angioinhibins : Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature*, 48:555-557,1990)。また、腫瘍増殖が脈管形成依存性であるという間接的臨床証拠がある。

【0040】

硝子体へ転移するヒト網膜芽腫は無血管回転楕円体に進展し、(摘出目から取り出し、イン・ビトロで分析した場合)これは、それが生きており、<sup>3</sup>H-チミジンに取り込まれるという事実にもかかわらず1mm<sup>3</sup>未満に制限される。

【0041】

卵巣の癌腫は微細な無血管白色シード(1ないし3mm<sup>3</sup>)として腹膜に転移する。これらのインプラントは、それらの1以上が血管新生されるまで大きく増殖するのは稀である。

10

【0042】

乳癌(Weidner N.ら, Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive breast carcinoma. *N.Engl.J.Med.* 324:1-8,1991, および Weidner N.ら, Tumor angiogenesis : A new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma, *J Natl. Cancer Inst.* 84: 1875-1887,1992) および前立腺癌(Weidner N, Canoll P R, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *American. Journal of Pathology*, 143 (2):401-409,1993)における血管新生の強度は、将来の転移の危険性と多いに相関している。

20

【0043】

ヒト皮下メラノーマからの転移は血管新生に先立っては稀である。血管新生の開始は病巣の増大した厚みおよび転移の増大した危険性に導かれる(Srivastava Aら, The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate thickness (0.76-4.0mm thick) skin melanoma. *Amer. J.Pathol.* 133:419-423,1988)。

【0044】

膀胱癌においては、脈管形成性ペプチドbFGFの尿中レベルは、細胞学よりも病気の状態および程度のより感受性のよいインジケータである(Nguyen Mら, Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in urine of bladder cancer patients. *J.Natl. Cancer Inst.* 85:241-242,1993)。

30

【0045】

かくして、脈管形成は癌の転移において重要な役割を演じることは明らかである。もし脈管形成活性が退行または排除されれば、あるいは制御され変調されれば、腫瘍は、存在したとしても、増殖はしないであろう。病気状態においては、脈管形成の防止は新しい微小血管系の侵入によって引き起こされる損傷を回避し得る。脈管形成プロセスの制御に向けられた療法は、これらの病気の阻止または軽減に導き得る。

【0046】

多数のマイクロアレイ実験についての遺伝子ネットワーク分析を用いて、3つの遺伝子と共調節される転写体が同定され、その全ては、脈管形成経路に関与することが知られている; インターロイキン-8(IL-8)、増殖関連オンコジーンペプチド(GRO1)、および血管内皮細胞成長因子(VEGF)(Lazar-Molnarら, 2000)。この転写体についての全長遺伝子は単離され、新規なケモカインとして同定されており、VCC-1(VEGF共調節ケモカイン)と命名された。

40

【0047】

遺伝子ネットワークについての1つの定義は、それらの蛋白質産物を介しての他の遺伝子による遺伝子の調節である(SomogyiおよびSniegowski, 1996)。多数の従来の研究は、マイクロアレイ技術から得られた遺伝子共発現からのネットワーク推論を示している(D'haeseleerら, 2000; Somogyiら, 1997; ThieffryおよびThomas, 1998)。ネットワーク分析の基礎となる過程は、遺伝子の対が異なる条件または状態(例えば、細胞型、薬物処理、増殖条件、病気状態)下で関連発現を有することがより頻繁になれば、これらの遺伝子

50

がより共調節されるようである。共調節は、しばしば、共通の関連する生物学的プロセスを意味する (Akutsura, 2000; Robertsら, 2000)。

#### 【0048】

いずれの遺伝子がヒトゲノムにおいて共調節されているらしいかを調べるために、種々の正常な組織、癌腫瘍、経時的薬物処理、病気組織および種々の条件下で培養された細胞系からの非常に多数の転写マイクロアレイ実験を利用して、遺伝子ネットワーク分析が行われた。この分析から、いくつかの異なる機能的プロセスを含む遺伝子の1つの大きなネットワークが共調節されるのが観察された (図1)。VEGFは3つの遺伝子と共調節され、2つは脈管形成経路に関与することが知られており (IL-8およびGRO1)、1つは新規なものであった (VCC-1)。これらの遺伝子 (IL-8, GRO1およびVEGF) の発現は、炎症、アポトーシスおよび細胞周期経路と脈管形成経路をリンクさせる多数の他の遺伝子に連鎖している。さらに、これらの結果は、これらの見かけ上区別される経路は全て基本的なメカニズムにおいて関連していることを示唆する。

10

#### 【0049】

VCC-1 EST (配列番号: 7および配列番号: 8) の、脈管形成のプロセスで役割を演じることが知られている3つの遺伝子との発現の連鎖により、我々は、完全なヒトcDNA配列を決定するに至った。該配列は全ての私的なおよび公的なEST配列のアセンブリ、およびヒトゲノミックCelera配列データの解析から決定した。次いで、このヒトcDNA配列を鋳型として用いて、マウスゲノミックおよびESTデータからマウスcDNA配列を決定した。

20

#### 【0050】

次いで、ヒトHT29結腸癌細胞系またはヒト肺組織、およびマウス胚RNAからのPCRによるVCC-1 cDNAのクローンによって、これらの予測の正確さを確認した。次いで、増幅された産物をpCRII-Topoベクターに結び、細菌クローンを単離下。次いで、クローンを配列決定し、予測された核酸配列を確認した。

#### 【0051】

ヒトおよびマウスVCC-1 cDNA配列の分析は、ヒト遺伝子の転写体はマウス遺伝子のそれよりも大きい、双方は119アミノ酸の蛋白質をコードすることを示す (図2および3)。その結果、ヒトおよびマウス遺伝子の予測される前駆体蛋白質は、サイズが似ており、各々、13,820ダルトンおよび13,628ダルトンである。ヒト転写体は5'および3'非翻訳領域双方でより長いようであり、ポリA付加部位からの推定非-カノニカルポリアデニル化シグナル(AATGAA)40塩基を含む。推定マウスポリアデニル化シグナルは、状況的に関連する配列が見出されないため不明瞭であった。Signal Programによる蛋白質の解析は、高い確率 (>93%) をもって、双方の種における蛋白質は切断された22アミノ酸のシグナルペプチド配列を含み、その結果、11,418ダルトンの予測された成熟ヒト蛋白質および11,164ダルトンの推定成熟マウス蛋白質がもたらされることを示す (図4)。前駆体ヒトおよびマウス蛋白質の配列の比較は、72.3%同一であり、保存的アミノ酸置換を考慮した場合に85.7%同様であることを示す (図5)。ヒト配列のより詳細な調査は、それが6つのシステイン残基を含み、そのうち4つが2つのCXCモチーフで起こり、これは、ケモカインファミリーの蛋白質に特徴的であることを明らかとする。これらのシステイン残基の重要性は、それらがマウス配列で絶対的に保存されているという事実によってさらに理解される。

30

40

#### 【0052】

配列アライメントおよびモデリング (SAN) ソフトウェアシステムを用い、Swissprotデータベースに存在する全ての配列ファミリーにつき、線形Hidden Markov Model (HMM) を構築した。ファミリーは少なくとも65%配列同一性を示す配列の組によって定義された。VCC-1とこれらのファミリーとの比較により、相同な2-メンバー群が同定された (図7)。VCC-1とこのファミリーとのアライメントはそれが公知のケモカインSCYA17 (GenBank受け入れ番号 NN02987, Imaiら, 1996) に対して19.4%同一であって、29.8%同様で

50

あり、公知のケモカインSCYA16 (GenBank受け入れ番号NN 004590, Fukudaら, 1999) に対して10.9%同一であって、24.0%同様であることを示す。これらのケモカインと1つの他のケモカインとの比較は、それらが、25%同一であって、33.1%同様であり、かくして、VCC-1に対するよりもわずかに相互により関連していることを示す。

【0053】

Celeraゲノム配列の、および物理的にVCC-1遺伝子に連結した染色体マーカーの調査は、それが19q11に位置し、それは紡錘体でテロメア方向に転写される(図6)。該遺伝子は約15kbにわたる4つのエクソンよりなる。第一のエクソンは5'非翻訳領域ならびにイニシエーターのメチオニンを含む(表1)。第二および第三のエクソンは2つの最も小さなエクソンであり、全部が、当該遺伝子についてのコーディング領域よりなる。第四および最後のエクソンは当該蛋白質のC-末端領域をコードする、約~365塩基の3'非翻訳配列を含む。

10

【0054】

【表1】

表1.VCCIエクソン構造

エクソン	アクセプター部位	ドナー部位	サイズ
1	GATTC 配列番号:15	TCCAGgtaaa 配列番号:19	295
2	gacagGGGTC 配列番号:16	CAAAGgtcag 配列番号:20	81
3	tccagATTGG 配列番号:17	AACAagtaag 配列番号:21	102
4	cctagGACAC 配列番号:18	GGTTT 配列番号:22	694

20

【0055】

マウスおよびヒトの組織におけるVCC-1の正常な内因性発現プロフィールを測定するために、ノーザンブロットを放射性標識VCC-1プローブとハイブリダイズさせた。これらのプローブは全長マウスおよびヒトオープンリーディングフレームよりなるものであった。ヒト組織RNAのノーザンブロットは肺および骨格筋からの試料中でほぼ1kbにおいて単一のバンドを示す。脳、心臓、結腸、胸腺、脾臓、腎臓、肝臓、小腸、胎盤または末梢血液リンパ球からのRNAではシグナルは観察されなかった(図8)。マウス組織RNAのブロットは肺、甲状腺、下顎腺、精巣上体および子宮からの試料でシグナルを生じ、卵巣および前立腺ではシグナルはより弱かった(図9)。

30

【0056】

腫瘍形成の間におけるVCC-1の発現レベルの変化はマイクロアレイ分析によって評価した(表2)。Incyte HGチップでの1つの部分的VCC-1クローンを種々の段階の病気進行にわたる4つの異なる腫瘍タイプ(乳房、結腸、腎臓および肺)の1つに罹った患者の10組で調べた。同一方向では常ではなかったが、VCC-1は腫瘍サンプルの全ての40において有意に異なる発現を示した。該遺伝子は乳房および結腸患者からの全ての10の腫瘍において有意に上昇調節される。対称的に、VCC-1は10の腎臓腫瘍のうち6つ、および10の肺腫瘍のうち7つにおいて有意に下降調節され、他方、各腫瘍タイプを持つ残りの患者では上昇調節される。

40

【0057】

## 【表 2】

表 2. マイクロアレイ分析による種々の腫瘍における発現のVCC-1変化倍数

腫瘍 <sup>a</sup>	患者 1	患者 2	患者 3	患者 4	患者 5	患者 6	患者 7	患者 8	患者 9	患者 10	AVE
乳房	2.18	2.26	2.31	2.38	2.39	2.39	2.52	2.53	2.69	12.41	3.41
結腸	2.03	2.13	2.18	2.24	2.27	2.34	2.36	2.40	2.49	2.52	2.30
腎臓	-2.60	-2.52	-2.44	-2.34	-2.26	-2.14	2.06	2.13	2.28	4.23	-0.36
肺	-12.86	-4.64	-3.49	-2.94	-2.81	-2.28	-2.17	2.07	2.15	2.79	-2.42

<sup>a</sup>各腫瘍タイプは異なる組の患者を表す。

## 【0058】

次いで、マイクロアレイ観察を、定量的リアルタイム逆転写ポリメラーゼ鎖反応(RT-RT-PCR)によって、乳癌および結腸癌の場合に行った。4つの結腸腫瘍のうち1つは、正常な結腸組織のプールで観察されたレベルと比較して、ヒトVCC-1の有意な過剰発現を示した(図10)。7つの乳癌のうち5つもまた、正常な組織のプールと比較してヒトVCC-1 RNAの有意な上昇調節を示した。乳癌における過剰発現のレベルは3倍ないし24倍を超える範囲であった(図10)。

## 【0059】

RT-RT-PCRを、ヒトVCC-1を発現する細胞型を決定する目的で、内皮細胞および上皮細胞系のアレイで行った。非-形質転換上皮細胞のプールと比較して、フィブロネクチンで増殖させたヒト微小血管内皮細胞(HMVEC)はVCC-1のほぼ100倍の過剰発現を呈した。Sephranose血管内皮細胞(SPVEC)およびヒト臍帯血管内皮細胞(HUVEC)も有意ではあるが、中程度の遺伝子の過剰発現を呈した(図11)。

## 【0060】

RT-RT-PCRを利用して、増殖または管-形成を受けている内皮細胞でVCC-1レベルが異なるかを決定した。RNAをマウス血管腫内皮細胞系PY4.1(Dubois N.A.ら Exp. Cell Res. 196:302-313(1991))から種々のバイオ条件下で収穫した。静止性vs活動的増殖細胞の間でネズミVCC-1の差は見られなかった。しかしながら、二次元アッセイで管を形成するように誘導されて6時間後には、これらの細胞からのRNAにおいて28倍だけVCC-1は過剰発現されるようである(図12)。

## 【0061】

腫瘍形成を誘導または強調するVCC-1の能力を評価するために、該遺伝子をCMVプロモーター-駆動発現構築体の間を行き来させ、NIH3T3細胞にトランスフェクトした。NIH3T3細胞の安定なプールをVCC-1トランスジーン発現につきアッセイした(図13)。次いで、細胞を雌CD-1 nu/nuマウスに皮下注射し、増殖につき経時的に評価した。VCC-1遺伝子を過剰発現するNIH3T3細胞は、ベクター対照で形質転換された同一細胞と比較して増殖の有意な増強を示し(図13)、これは、VCC-1が線維芽細胞の増殖を増強させるように働くことができるのを示す。

## 【0062】

本発明の1つの具体例はVCC-1ポリペプチドをコードする核酸配列である。好ましくは、核酸配列は：

ストリンジェントな条件下で、配列番号：1または配列番号：4のDNA配列にハイブリダイズすることができるか、あるいは遺伝子暗号の縮重を除いて該条件下で該DNA配列にハイブリダイズすることができる核酸配列；

配列番号：1または配列番号：4のDNA配列に対して少なくとも約80%相同性を有する核酸配列；

配列番号：1または配列番号：4の相補的配列；

よりなる群から選択される。

## 【0063】

本発明のもう1つの具体例はVCC-1アミノ酸配列である。該アミノ酸配列は：

10

20

30

40

50

配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：6のアミノ酸に対して少なくとも約70%相同性を有するアミノ酸配列；

配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：6のアミノ酸配列の置換、欠失または挿入変種；および

配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：6の対立遺伝子変種；よりなる群から選択することができる。

#### 【0064】

##### 配列変種

VCC-1のアミノ酸配列変種をコードするDNAは、当該分野で公知の種々の方法によって調製することができる。これらの方法は、限定されるものではないが、（天然に生じるアミノ酸配列変種の場合には）天然源からの単離、またはオリゴヌクレオチド-媒介（部位-特異的）突然変異誘発による調製、PCR突然変異誘発、およびVCC-1の調製された変種または非-変種バージョンいずれかのカセット突然変異を含む。これらの技術はVCC-1核酸（DNAまたはRNA）、あるいはVCC-1核酸に相補的な核酸を利用することができる。

10

#### 【0065】

オリゴヌクレオチド-媒介突然変異はVCC-1 DNAの置換、欠失および挿入変種を調製するための好ましい方法である。この技術は、例えば、Adelmanら、DNA, 2:183(1983)によって記載されているごとく、当該分野でよく知られている。簡単に述べると、VCC-1 DNAは、所望の突然変異をコードするオリゴヌクレオチドをDNA鋳型にハイブリダイズさせることによって改変され、ここに、該鋳型はVCC-1の改変されていないまたは天然DNA配列を含むプラスミドまたはバクテリオファージ一本鎖形態である。ハイブリダイゼーションの後、DNAポリメラーゼを用いて、かくして、オリゴヌクレオチドプライマーを取り込み、VCC-1 DNAにおける選択された改変をコードする鋳型の第二の相補的ストランドを合成する。

20

#### 【0066】

一般に、長さが少なくとも25ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを用いる。最適なオリゴヌクレオチドは、当該突然変異をコードするヌクレオチドのいずれかの側の鋳型に完全に相補的な12ないし15のヌクレオチドを有するであろう。これは該ヌクレオチドが一本鎖DNA鋳型分子に適切にハイブリダイズすることを保証する。該オリゴヌクレオチドは、Creaら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:5765, 1978）によって記載されたもののごとき当該分野で公知の技術を用いて容易に合成される。また、一本鎖DNA鋳型は、標準的な技術を用いて二本鎖プラスミド（または他の）DNAを変性させることによって作り出すこともできる。

30

#### 【0067】

（例えば、アミノ酸配列変種を作り出すための）天然DNA配列の改変では、適当なハイブリダイゼーションの条件下でオリゴヌクレオチドを一本鎖鋳型にハイブリダイズさせる。次いで、DNA重合酵素、通常はDNAポリメラーゼのクレノウ断片を添加して、合成用のプライマーとしてオリゴヌクレオチドを用いて鋳型の相補的ストランドを合成する。ヘテロデュプレックス分子は、1つのDNAストランドがVCC-1の突然変異形態をコードし、他のストランド（元の鋳型）がVCC-1の天然の改変されていない配列をコードするように形成される。次いで、このヘテロデュプレックス分子を適当な宿主細胞、通常はE. coli JM101のごとき原核生物に形質転換する。細胞をアガロースプレートで平板培養し、32-ホスフェートで放射性標識したオリゴヌクレオチドプライマーを用いてスクリーニングして、突然変異DNAを含む細菌コロニーを同定する。次いで、突然変異した領域を取り出し、蛋白質生産用の適当なベクター、一般には、適切な宿主の形質転換で典型的には使用されるタイプの発現ベクターに入れる。

40

#### 【0068】

直前に記載した方法は、プラスミドの双方のストランドが突然変異を含むホモデュプレックス分子が作り出されるように修飾することができる。該修飾は以下の通りである：一

50

本鎖オリゴヌクレオチドを前記したごとく一本鎖鋳型にアニールする。3つのデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボアデノシン (dATP)、デオキシリボグアノシン (dGTP)、およびデオキシリボチミジン (dTTP) の混合物を (Amersham Corporationから入手することができる) dCTP - (35S) と呼ばれる修飾されたチオ - デオキシリボシトシンと合わせる。この混合物を鋳型 - オリゴヌクレオチド複合体に加える。DNAポリメラーゼのこの混合物への添加に際し、突然変異した塩基を除いて鋳型と同一なDNAのストランドが生じる。加えて、DNAのこの新しいストランドはdCTPの代わりにdCTP - (35S) を含み、これは、それを制限エンドヌクレアーゼ消化から保護するよう働く。二本鎖ヘテロデュプレックスの鋳型ストランドを適当な制限酵素でニックした後、鋳型ストランドをExo IIIヌクレアーゼまたはもう1つの適当なヌクレアーゼで、突然変異誘発すべき部位を含む領域を過ぎて消化することができる。次いで、反応を停止させて、部分的に一本鎖のみの分子が得られる。次いで、全ての4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸、ATP、およびDNAリガーゼの存在下で、DNAポリメラーゼを用い、完全な二本鎖DNAホモデュプレックスが形成される。次いで、前記したごとく、このホモデュプレックス分子をE. coli JM101のごとき適当な宿主細胞に形質転換することができる。

10

#### 【0069】

置換すべき1を超えるアミノ酸を持つVCC-1突然変異体をコードするDNAはいくつかの方法のうちの一つで生じさせることができる。もしアミノ酸が当該ポリペプチド鎖において近くに位置すれば、それらは、所望のアミノ酸置換の全てをコードする1つのオリゴヌクレオチドを用いて同時に突然変異させることができる。しかしながら、アミノ酸が相互に幾分離れていれば(約10以上のアミノ酸によって分離されていれば)、所望の変化の全てをコードする単一のオリゴヌクレオチドを得るのはより困難である。その代わり、2つの代替法のうち1つの使用することができる。

20

#### 【0070】

第一の方法においては、別のオリゴヌクレオチドを置換すべき各アミノ酸の代わりに生じさせる。次いで、オリゴヌクレオチドを一本鎖鋳型DNAに同時にアニールし、鋳型から合成されるDNAの第二のストランドは所望のアミノ酸置換の全てをコードするのである。

#### 【0071】

代替法は、所望の突然変異体を生じさせるための2ラウンド以上の突然変異誘発を含む。第1のラウンドは単一突然変異体について記載する通りである：野生型DNAを鋳型で用い、第1の所望のアミノ酸置換をコードするオリゴヌクレオチドをこの鋳型にアニールし、次いで、ヘテロデュプレックスDNA分子が生じる。第2ラウンドの突然変異誘発は、鋳型として第1ラウンドの突然変異誘発で生じた突然変異したDNAを利用する。かくして、この鋳型は既に1以上の突然変異を含む。次いで、さらなる所望のアミノ酸置換をコードするオリゴヌクレオチドをこの鋳型にアニールし、DNAの得られたストランドは、今や、第1および第2の双方のラウンドの突然変異誘発からの突然変異をコードする。この得られたDNAが第3ラウンドの突然変異誘発において鋳型として用いることができる。

30

40

#### 【0072】

PCR突然変異誘発も、VCC-1のアミノ酸変種を作成するのに適当である。以下の議論はDNAに言及するが、該技術はRNAでの適用も可能であることが理解される。該PCR技術は、一般に、以下の手法をいう(Erlich, supra, the chapter by R.Higuchi, p.61-70)：少量の鋳型DNAをPCRにおいて出発物質として用いると、鋳型DNAにおいて対応する領域から配列がわずかに異なるプライマーを用いて、該プライマーが鋳型とは異なる位置においてのみ鋳型配列とは異なる比較的大量の特異的DNA断片を生じさせることができる。プラスミドDNAへの突然変異の導入のためには、プライマーの1つを、突然変異の一部と重複し、突然変異を含むように設計する；他のプライマーの配列はプラスミドの対向ストランドの配列のストレッチと同一でなければならないが、この配列

50

はプラスミドDNAに沿ってどこかへ位置させることができる。しかしながら、第二のプライマーの配列は、プライマーと境界を接するDNAの全増幅領域の端部においてプライマーが容易に配列決定できるように、第一のものから200ヌクレオチド内に位置させるのが好ましい。丁度記載したもののようなプライマー対を用いるPCR増幅の結果、鋳型コピーイングは幾分エラー傾向があるので、プライマーによって特定される突然変異の位置、および恐らくは他の位置において異なるDNA断片の集団が得られる。

#### 【0073】

生成物物質に対する鋳型の比率が極端に低ければ、生成物DNA断片のほとんど大部分は所望の突然変異を取り込む。この生成物物質を用いて、標準的DNA技術を用いてPCR鋳型として働くプラスミド中の対応する領域を置き換える。別の位置における突然変異は、突然変異体第二プライマーを用い、または異なる突然変異体プライマーで第二のPCRを行い、2つの得られたPCR断片を3つの（またはそれ以上の）-連結においてベクター断片に同時に連結させることによって同時に導入することができる。

#### 【0074】

変種を調製するためのもう1つの方法であるカセット突然変異誘発はWellsら (Gene, 34:315, 1985) によって記載された技術に基づいている。出発物質は、突然変異すべきVCC-1 DNAを含むプラスミド（または他のベクター）である。突然変異すべきVCC-1 DNA中のコドンが同定される。同定された突然変異部位の各側に唯一の制限エンドヌクレアーゼ部位がなければならない。もしそのような制限部位が存在しなければ、前記オリゴヌクレオチド-媒介突然変異誘発方法を用いてそれを生じさせて、それをVCC-1 DNA中の適当な位置に導入することができる。制限部位がプラスミドに導入された後、プラスミドをその部位で切断して、それを線状化する。制限部位の間のDNAの配列をコードするが、所望の突然変異を含む二本鎖オリゴヌクレオチドは、標準的な手法を用いて合成される。2つのストランドを別々に合成し、次いで、標準的な技術を用いて一緒にハイブリダイズさせる。この二本鎖オリゴヌクレオチドをカセットという。このカセットは、それがプラスミドに直接連結されるように、線状化プラスミドの端部と適合する3'および5'末端を有するように設計される。このプラスミドは、今や、突然変異したVCC-1 DNA配列を含む。

#### 【0075】

##### 蛋白質の共有結合修飾

本発明の蛋白質または抗体の共有結合修飾は、本発明の範囲内に含まれる。共有結合修飾の1つのタイプは、本発明の蛋白質の側鎖またはN-もしくはC-末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と、ポリペプチドの標的アミノ酸残基と反応させることを含む。二官能性剤での誘導体化は、例えば、蛋白質を、抗体を精製する方法で用いるために、水不溶性支持体マトリックスまたは表面に架橋するのに有用であり、その逆も有用である。通常に使用される架橋剤は、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタングルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)のようなジスクシンイミジルエステルを含めた、4-アジドサリチル酸とのエステル、ホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタンのごとき二官能性マレイミド、およびメチル-3-[ (パジドフェニル)ジチオ]プロピオイミデートのような剤を含む。

#### 【0076】

他の修飾は、各々、対応するグルタミルおよびアスパルチル残基へのグルタミニルおよびアスパラギニル残基の脱アミド化、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖のアミノ基のメチル化 (Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983))、N-末端アミノアセチル化、およびいずれかのC-末端カルボキシル基のアミド化を含む。

#### 【0077】

本発明の範囲内に含まれるポリペプチドのもう1つのタイプの共有結合修飾は、ポリペ

10

20

30

40

50

プチドの天然グリコシル化パターンを改変することを含む。「天然グリコシル化パターンを改変する」は、本明細書中での目的では、(基礎となるグリコシル化部位を除去することによって、または化学的および/または酵素的手段によってグリコシル化を欠失することによって)天然配列で見出される1以上の炭水化物部位を欠失すること、および/または天然配列に存在しない1以上のグリコシル化部位を付加することを意味する。加えて、該フレーズは、天然蛋白質のグリコシル化の定量的変化を含み、これは、存在する種々の炭水化物部位の性質および割合の変化を含む。グリコシル化部位のポリペプチドへの付加は、アミノ酸配列を改変することによって達成することができる。該改変は、例えば、1以上のセリンまたはスレオニン残基の天然配列への付加または置換によってなすことができる(結合グリコシル化部位用)。アミノ酸配列は、所望により、特に、所望のアミノ酸配列に翻訳されるコドンが生じるように、予め選択された塩基におけるポリペプチドをコードするDNAを突然変異させることによって、DNAレベルでの変化を通じて改変することもできる。

10

#### 【0078】

ポリペプチド上の炭水化物部位の数を増加させるためのもう1つの手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的または酵素的カップリングによる。そのような方法は、当該分野において、例えば、1987年9月11日に公開されたWO87/05330、およびAplinおよびWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp.259-306 (1981)に記載されている。

#### 【0079】

ポリペプチドに存在する炭水化物部位の除去は、化学的にまたは酵素的に、あるいはグリコシル化のための標的として働くアミノ酸残基をコードするコドンの突然変異的置換によって達成することができる。化学的脱グリコシル化技術は当該分野で知られており、例えば、Hakimuddinら, Arch. Biochem. Biophys, 259:52 (1987)およびEdgeら, Anal. Biochem., 118:131 (1981)に記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部位の酵素的切断は、Thotakuraら, Meth. Enzymol., 138:350 (1987)によって記載されているとき種々のエンド-およびエキソ-グリコシダーゼの使用によって達成することができる。本発明の蛋白質または抗体のもう1つのタイプの共有結合修飾は、米国特許第4,640,835号;第4,496,689号;第4,301,144号;第4,670,417号;第4,791,192号または第4,179,337号に記載されている方法で、ポリペプチドまたは抗体を種々の非-蛋白質性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンに結合させることを含む。

20

30

#### 【0080】

VCC-1、アゴニスト、アンタゴニスト、または抗体で見出されるリシンのアミノ末端-アミノ基または-アミノ基いずれかと反応することができる官能基は:p-ニトロフェニルまたはスクシンイミジルのごときカルボネート;カルボニルイミダゾール;アズラクトン;環状イミドチオン;イソシアネートまたはイソチオシアネート;塩化トレスル(EP 714 402、EP 439 508);およびアルデヒドを含む。VCC-1、アゴニスト、アンタゴニスト、または抗体上のカルボン酸基、反応性カルボニル基および酸化された炭水化物部位と反応することができる官能基は;第一級アミン;およびアシルヒドラジド、カルバザート、セミカルバメート、チオカルバザート等のごときヒドラジンおよびヒドラジド官能基を含む。VCC-1、アゴニスト、アンタゴニスト、または抗体上のもし利用できるならばメルカプト基も、チオールのごとき反応性基;マレイミド、スルホンおよびフェニルグリオキサルとの適切に活性化されたポリマー用の結合部位として用いることもできる;例えば、ここに引用してその開示を援用する米国特許第5,093,531号参照。親電子中心と反応することができる他の求核試薬は、限定されるものではないが、ヒドロキシル、アミノ、カルボキシル、チオール、活性メチレンを含む。

40

#### 【0081】

本発明の1つの好ましい具体例において、第一級アミンまたはアミド結合は、VCC-

50

1、アゴニスト、アンタゴニストまたは抗体のリシンのN-末端アミノ基または -アミノ基および活性化されたPEGを用いて形成される。本発明のもう1つの好ましい態様において、第二級アミン結合は、Chamowら, Bioconjugate Chem. 5: 133-140 (1994)および米国特許第5, 824, 784に記載されているごとく、NaCNBH<sub>3</sub>、NaBH<sub>3</sub>、ピリジンボラン等のごとき適当な還元剤での還元によって、VCC-1、アゴニスト、アンタゴニストまたは抗体のN-末端第一級アミノ基と単一または分岐鎖PEGアルデヒドの間に形成される。

#### 【0082】

本発明のもう1つの好ましい具体例は、スクシンイミジルエステル、環状イミドチオン等のごときアミド-形成性リンカーで活性化されたポリマーを用いて、VCC-1、アゴニスト、アンタゴニストまたは抗体とポリマーとの間に結合を生じさせる。ここに引用して援用する米国特許第5, 349, 001号；米国特許第5, 405, 877号；およびGreenwaldら, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 17:101-161, 2000参照。VCC-1、アゴニスト、アンタゴニストまたは抗体の遊離アミノ基に結合することができる1つの好ましい活性化されたポリ(エチレングリコール)は、単一または分岐鎖N-ヒドロキシスクシンイミドポリ(エチレングリコール)を含み、これは、ポリ(エチレングリコール)のコハク酸エステルをN-ヒドロキシスクシンイミドで活性化することによって調製することができる。

10

#### 【0083】

本発明の他の好ましい具体例は、 -アミノまたは他の基を介してVCC-1、アゴニスト、アンタゴニストまたは抗体とのポリマーの共有結合を形成するために他の活性化されたポリマーを用いることを含む。例えば、末端が活性化されたポリマーのイソシアネートまたはイソチオシアネート形態を用いて、リシンアミノ基とで尿素またはチオ尿素-ベースの結合を形成することができる。

20

#### 【0084】

本発明のもう1つの好ましい態様において、カルバメート(ウレタン)結合が、ここに引用して援用する米国特許第5, 122, 614号、第5, 324, 844号および第5, 612, 640号に記載されているごとく、蛋白質アミノ基とで形成される。その例は、N-スクシンイミジルカルボネート、パラ-ニトロフェニルカルボネート、およびカルボニルイミダゾール活性化ポリマーを含む。本発明のもう1つの好ましい具体例において、PEGのベンゾトリアゾールカルボネート誘導体を、VCC-1、アゴニスト、アンタゴニストまたは抗体上のアミノ基に結合させる。

30

#### 【0085】

クローニングベクターへのDNAの挿入

天然または変種VCC-1をコードするcDNAまたはゲノミックDNAを、さらなるクローニング(DNAの増幅)のため、または発現のため複製可能なベクターに挿入する。多くのベクターは入手可能であり、適当なベクターの選択は、1)DNA増幅またはDNA発現でそれが使用されるべきか否か、2)ベクターに挿入されるべきDNAのサイズ、および3)ベクターで形質転換すべき宿主細胞に依存するであろう。各ベクターは、その機能(DNAの増幅またはDNAの発現)およびそれに適合すべき宿主細胞に応じて種々の成分を含む。ベクター成分は、一般に、限定されるものではないが、以下の：シグナル配列、複製起点、1以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーターおよび転写終止配列の1以上を含む。

40

#### 【0086】

複製起点成分

発現およびクローニングベクターは、共に、1以上の選択された宿主細胞内でベクターを複製できるようにする核酸配列を含む。一般に、クローニングベクターにおいては、この配列は、ベクターが宿主染色体DNAとは独立して複製できるようにするものであり、これは、複製起点または自律複製配列を含む。そのような配列は種々の細菌、酵母およびウイルスでよく知られている。プラスミドpBR322からの複製起点はほとんどのグラ

50

ム陰性菌で適当であり、2 μプラスミド起点は酵母で適当であり、種々のウイルス起点 (SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSVまたはBPV) は哺乳動物細胞においてクローニングベクターで有用である。一般に、複製起点成分は哺乳動物発現ベクターでは必要でない (SV40起点は、典型的には、それが初期プロモーターを含む理由のみで用いることができる)。

#### 【0087】

ほとんどの発現ベクターは「シャトル」ベクターであり、すなわち、それらは少なくとも1つのクラスの生物において複製することができるが、発現用のもう1つの生物にトランスフェクトすることができる。例えば、ベクターをE. coliでクローン化し、次いで、それは宿主細胞染色体と独立して複製することができないが、発現用の酵母または哺乳動物細胞に同ベクターをトランスフェクトする。

10

#### 【0088】

また、DNAは宿主ゲノムへの挿入によって増幅させることもできる。これは、例えば、BacillusゲノミックDNAで見出される配列に対して相補的であるDNA配列をベクターに含めることによって、宿主としてBacillus種を用いて容易に達成される。このベクターでのBacillusのトランスフェクションの結果、当該ゲノムで相同組換えが起こり、またVCC-1 DNAが挿入される。しかしながら、VCC-1をコードするゲノムDNAの回収は、外因的に複製されるベクターのそれよりも複雑である。なぜならば、制限酵素消化がVCC-1 DNAを切り出すのに必要だからである。

#### 【0089】

##### 選択遺伝子成分

発現およびクローニングベクターは、選択マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含むべきである。この遺伝子は、選択培培基中で増殖した形質転換宿主細胞の生存または増殖に必要な蛋白質をコードする。選択遺伝子を含むベクターで形質転換されない宿主細胞は、該培培基中で生存できない。典型的な選択遺伝子は (a) 抗生物質または他のトキシン、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートまたはテトラサイクリンに対する抵抗性を付与する、(b) 栄養因子欠乏を補う、または (c) 複雑な培地から利用できない非常に重要な栄養素を供給する蛋白質をコードする (例えば、BacilliについてのD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子)。

20

#### 【0090】

選択スキームの1つの例は、宿主細胞の増殖を阻止する薬物を利用する。異種遺伝子で首尾よく形質転換された細胞は、薬物抵抗性を付与する蛋白質を発現し、かくして、選択方法から生き残る。そのような優性選択の例は薬物ネオマイシン (Southernら, J. Molec. Appl. Genet., 1: 327 1982)。ミコフェノール酸 (Mulliganら, Science, 209: 1422 1980) またはヒグロマイシン (Sugdenら, Mol. Cell. Biol., 5: 410-413 1985) を用いる。前記で与えられた3つの例は、真核生物制御下で細菌遺伝子を使用して、各々、適当な薬物G418またはネオマイシン (ゲネチシン)、xgpt (ミコフェノール酸) またはヒグロマイシンに対する抵抗性を運ぶ。

30

#### 【0091】

哺乳動物細胞用の適当な選択マーカーのもう1つの例は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) またはチミジンキナーゼのごとき、VCC-1核酸を取り込む能力がある細胞の同定を可能とするものである。哺乳動物細胞形質転換体を、該形質転換体がマーカーを取り込んだことによってユニークに生存するのに適合する選択圧下に置く。選択圧は、培地中の選択剤の濃度が首尾よく変化され、それにより、選択遺伝子およびVCC-1をコードするDNA双方の増幅に導く条件下で形質転換体を培養することによって課される。増幅は、増殖に非常に重要な蛋白質の生産をかなり必要とする遺伝子が、組換え細胞の継続的世代の染色体内でタンデムに反復するプロセスである。増加した量のVCC-1は、増幅したDNAから合成される。

40

#### 【0092】

例えば、DHFR選択遺伝子で形質転換された細胞は、まず、DHFRの競合アンタゴ

50

ニストであるメトトレキセート (Mtx) を含む培養基中で形質転換体の全てを培養することによってまず同定される。野生型 DHFR を使用する場合、適切な宿主細胞は、Urlaub および Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 1980 によって調製され、増殖された、DHFR が欠乏するチャニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞系である。次いで、形質転換された細胞を増加したレベルのメトトレキセートに暴露する。これは、DHFR 遺伝子の複数コピーおよび、同時に、PF4A 受容体をコードする DNA のごとき、他の DNA を含む発現ベクターの複数コピーの合成に導く。この増幅技術は、もし、例えば、Mtx に対して高度に抵抗性である突然変異 DHFR 遺伝子を使用すれば、内因性 DHFR の存在にもかかわらず、いずれの他の適当な宿主、例えば、ATCC 番号 CCL 61 CHO-K1 でも用いることができる。あるいは、PF4A 受容体、野生型 DHFR 蛋白質、およびアミノグリコシド 3' ホスホトランスフェラーゼ (APH) のごときもう 1 つの選択マーカーで形質転換された、または共形質転換された宿主細胞 (例えば、内因性 DHFR を含む野生型宿主) は、アミノグリコシド抗生物質、例えば、カナマイシン、ネオマイシンまたは G418 のごとき選択マーカー用の選択剤を含む培地中での細胞増殖によって選択することができる。米国特許第 4, 965, 199 号参照。

10

#### 【0093】

酵母で用いられる適当な選択遺伝子は酵母プラスミド YRp7 に存在する trp1 遺伝子である。(Stinchcombら, Nature, 282: 39 1979; Kingsmanら, Gene, 7: 141 1979; または Tschemperら, Gene, 10: 157 1980)。該 trp1 遺伝子は、トリプトファン中で増殖する能力を欠く酵母の突然変異体株、例えば、ATCC 番号 44076 または PEP4 - 1 (Jones, Genetics, 85: 12 1977) のための選択マーカーを提供する。次いで、酵母宿主細胞ゲノム中での trp1 損傷の存在により、トリプトファンの不存在下での増殖により、形質転換を検出するための効果的な環境が提供される。同様に、Leu2 - 欠乏酵母株 (ATCC 20, 622 または 38, 626) は、Leu2 遺伝子を担う公知のプラスミドによって補われる。

20

#### 【0094】

##### プロモーター成分

発現およびクローニングベクターは、宿主生物によって認識され、かつ、通常、VCC - 1 核酸に操作可能に連結したプロモーターを含む。プロモーターは、それに操作可能に連結した、VCC - 1 のごとき特定の核酸配列の転写および翻訳を制御する (一般に、約 100 ないし 1000 bp 内の) 構造遺伝子の開始コドンに対して上流 (5' 側) に位置する非翻訳配列である。そのようなプロモーターは、典型的には、2 つのクラス、誘導性および構成性に分けられる。誘導プロモーターは、培養条件のある変化、例えば、栄養物の存在または不存在、または温度の変化に対して応答する、その制御下で DNA からの増大したレベルの転写を開始させるプロモーターである。今日、種々の優れた宿主細胞によって認識される非常に多数のプロモーターがよく知られている。これらのプロモーターは、制限酵素消化によって源 DNA からプロモーターを取り出し、単離されたプロモーター配列をベクターに挿入することによって、VCC - 1 をコードする DNA に操作可能に連結される。天然 VCC - 1 プロモーター配列および多くの異種プロモーター双方を用いて、増幅および/または VCC - 1 DNA の発現を指令することができる。しかしながら、異種プロモーターは、一般に、天然 VCC - 1 プロモーターと比較して、より程度の高い転写、および発現された VCC - 1 のより高い収率を可能とするので好ましい。

30

40

#### 【0095】

原核生物宿主で用いるのに適したプロモーターは、 $\lambda$ -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系 (Changら, Nature, 275: 615 1978; および Goeddelら, Nature, 281: 54 4 1979)、アルカリ性ホスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーター系 (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 1980 および EP 36, 776) および tac プロモーターのごときハイブリッドプロモーター (deBoerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 20: 21-25 1983) を含む。しかしながら、他の公知の細菌プロモーターは適している。それらのヌクレオチド配列は公表されており、それにより、いずれかの必要な制限部位を供

50

給するためにリンカーまたはアダプターを用い、当業者であればVCC-1をコードするDNAにそれを連結させることができる(Siebenlistら, Cell, 20: 269 1980)。また、細菌系で用いるプロモーターは、一般に、VCC-1をコードするDNAに操作可能に連結したシャイン-ダルガルノ(S.D.)配列含む。

【0096】

酵母宿主で用いる適当なプロモーター配列は、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼおよびグルコキナーゼのごとき、3-ホスホグリセレートキナーゼ(Hitzemanら, J. Biol. Chem., 255: 2073 1980)または他の解糖系酵素(Hessら, J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 1968;およびHolland, Biochemistry, 17: 4900 1978)用のプロモーターを含む。

10

【0097】

増殖条件によって制御された転写のさらなる利点を有する誘導性プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、およびマルトースおよびガラクトース資化を担う酵素である。酵母発現で用いられる適当なベクターおよびプロモーターは、さらに、HitzemanのEP 73, 657Aに記載されている。酵母エンハンサーは酵母プロモーターと共に有利に用いられる。

20

【0098】

プロモーター配列は真核生物で知られている。実質的に全ての真核生物遺伝子は、転写が開示する部位からほぼ25ないし30塩基上流に位置するHT-リッチ領域を有する。多くの遺伝子の転写の開始から70ないし80塩基上流に見出されるもう1つの配列は、Xがいずれかのヌクレオチドであり得るCXCAAT領域である。ほとんどの真核生物遺伝子の3'末端には、コーディング配列の3'末端へのポリAテイルの付加のためのシグナルであり得るAATAA配列がある。これらの配列の全ては、哺乳動物発現ベクターに適当に挿入される。

【0099】

哺乳動物宿主細胞中のベクターからのVCC-1転写は、ポリオマーウイルス、鶏痘ウイルス(1989年7月5日に公開されたUK 2, 211, 504)、(アデノウイルス2のごとき)アデノウイルス、ウシパピロウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましくはシミアンウイルス40(SV40)のごときウイルスのゲノムから、異種哺乳動物プロモーター、例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーターから、ヒートショックプロモーターから、およびVCC-1配列に通常関連するプロモーターから得られるプロモーターによって制御されるが、そのようなプロモーターは宿主細胞系に適合するものとする。

30

【0100】

SV40ウイルスの初期および後期プロモーターは、便宜には、SV40ウイルス複製起点を含むSV40制限断片として得られる。Fiersら, Nature, 273:113 (1978); MulliganおよびBerg, Science, 209: 1422-1427 (1980); Pavlakisら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 7398-7402 (1981)。ヒト・サイトメガロウイルスの即時型プロモーターは、便宜には、HindIII制限断片から得られる。Greenawayら, Gene, 18: 355-360 (1982)。ベクターとしてウシパピロウイルスを用いて哺乳動物宿主でDNAを発現させるための系は米国特許第4, 419, 446号に開示されている。この系の修飾は米国特許第4, 601, 978号に記載されている。サル細胞での免疫インターフェロンをコードするdDNA発現についてはGrayら, Nature, 295: 503-508 (1982);単純疱疹ウイルスからのチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞におけるヒト-インターフェロンcDNAの発現についてはReyesら, Nature, 297: 598-601 (1982)、培養されたマウスおよびウサギ細胞におけるヒトインターフェロン-1遺伝子の発現については

40

50

CanaaniおよびBerg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 5166-5170 (1982)、およびプロモーターとしてラウス肉腫ウイルスロングターミナルリピートを用いる、CV-1サル腎臓細胞、ニワトリ胚線維芽細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、およびマウスM1H-3T3細胞における細菌CAT配列の発現についてはGormanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 6777-6781 (1982)参照。

#### 【0101】

##### エンハンサーエレメント成分

高等真核生物による本発明のVCC-1をコードするDNAの転写は、しばしば、エンハンサー配列をベクターに挿入することによって増大する。エンハンサーは、プロモーターに作用してその転写を増大させる通常は約10ないし300bpのDNAのシス-作用性エレメントである。エンハンサーは比較的向きおよび位置独立性であり、イントロン内(Banerjiら, Cell, 33: 729 1983)、ならびにコーディング配列それ自体内(Osborneら, Mol. Cell Bio., 4: 1293 1984)の、転写単位に対して5'側(Laiminsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 993 1981)および3'側(Luskyら, Mol. Cell Bio., 3: 1108 983)に見出されている。多くのエンハンサー配列は、今日、哺乳動物遺伝子(プロビン、エラストラーゼ、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテインおよびインスリン)から知られている。しかしながら、典型的には、真核生物細胞ウイルスからのエンハンサーを用いるであろう。その例は、複製起点の後期側SV40エンハンサー(bp100ないし270)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマーエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーを含む。真核生物プロモーターの活性化用の増強エレメントについてはYaniv, Nature, 297: 17-18 (1982)参照。エンハンサーはVCC-1 DNAに対して5'または3'側の位置にてベクターにスプライシングすることができるが、好ましくはプロモーターから5'の部位に位置させる。

#### 【0102】

##### 転写終止成分

真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、または他の多核細胞生物からの脱核細胞)は、転写の終止に、およびmRNAを安定化させるのに必要な配列も含む。そのような配列は、真核生物またはウイルスのDNAまたはcDNAの5'および、場合によっては、3'非翻訳領域から通常は入手できる。これらの領域は、VCC-1をコードするmRNAの非翻訳部分に、ポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。3'非翻訳領域は転写終止部位を含む。

#### 【0103】

前記リストの成分の1以上を含む適当なベクターの構築(所望のコーディングおよび対照配列)は標準的連結技術を使用する。単離されたプラスミドまたはDNA断片を切断し、仕つらえ、必要なプラスミドを生じさせるのに所望の形態で再度連結する。

#### 【0104】

構築されたプラスミド中の正しい配列を確認するための分析では、連結混合物を用いて、E. coli K12株294(ATCC 31,446)を形質転換し、成功した形質転換体を、適切であれば、アンピシリンまたはテトラサイクリン抵抗性によって選択する。形質転換体からのプラスミドを調製し、制限エンドヌクレアーゼ消化によって分析し、および/またはMessingら, Nucleic Acids Res., 9: 309 (1981)の方法によって、またはMaxamら, Methods in Enzymology, 65: 499 (1980)の方法によって、配列決定する。

#### 【0105】

本発明の実施で特に有用なのは、VCC-1をコードするDNAの哺乳動物細胞における一過性発現を供する発現ベクターである。一般に、一過性発現は、宿主細胞が発現ベクターの多くのコピーを蓄積し、今度は、発現ベクターによってコードされる高レベルの所望のポリペプチドを合成するように、宿主細胞で効果的に複製することができる発現ベクターを用いることを含む。適当な発現ベクターおよび宿主細胞を含む一過性発現系は、クローン化DNAによってコードされるポリペプチドの便宜な陽性同定、ならびに所望の生物学的または生理学的特性につきそのようなポリペプチドを迅速にスクリーニングするこ

とを可能とする。かくして、一過性発現系は、VCC-1-様活性を有するVCC-1のアナログおよび変種を同定する目的で本発明で特に有用である。

#### 【0106】

組換え脊椎動物細胞培養におけるVCC-1の合成への適合に適した他の方法、ベクターおよび宿主細胞はGethingら, Nature, 293: 620-625 1981; Manteiら, Nature, 281: 40-46 1979; Levinsonら; EP 117,060; およびEP 117,058. に記載されている。PF4A受容体の哺乳動物細胞培養発現のための特に有用なプラスミドはpRK5 (EP公開番号307,247) またはpSVI6B (ここに引用してその開示を援用する1989年11月22日に出願された米国特許出願第07/441,574号) である。

10

#### 【0107】

##### 宿主細胞の選択および形質転換

ここに、ベクターをクローニングし、または発現させるための適当な宿主細胞は前記した原核生物、酵母、または高等真核生物細胞である。適当な原核生物細胞はグラム陰性またはグラム陽性生物、例えば、E. coli、B. subtilis のとき Bacilli、P. aeruginosa のとき Pseudomonas 種、Salmonella typhimurium、または Serratia marcescens のような真核生物を含む。1つの好ましいE. coliクローニング宿主はE. coli 294 (ATCC 31,446) であるが、E. coli B、E. coli カイ-1776 (ATCC 31,537)、およびE. coli W3110 (ATCC 27,325) のような他の株も適当である。これらの例は限定的というよりもむしろ説明的である。好ましくは、宿主細胞は最小量の蛋白質分解酵素を分泌するものである。あるいは、クローニングのイン・ピトロ方法において、例えば、PCRまたは他の核酸ポリメラーゼ反応が適切である。

20

#### 【0108】

原核生物に加え、繊維状真菌または酵母のような真核生物微生物はVCC-1 DNAを含むベクターで適切な宿主である。Saccharomyces cerevisiae、または通常のパン酵母は、下等真核生物宿主微生物の中で最も通常に用いられる。しかしながら、S. pombe, Beach and Nurse, Nature, 290: 140 (1981), Kluyveromyces lactis, Louvencourtら, J. Bacteriol., 737 (1983), yarrowia, EP 402,226, Pichia pastoris, EP 183,070, Trichoderma reesia, EP 244,234, Neurospora crassa, Caseら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 (1979), およびA. nidulansのときAspergillus宿主, Ballanceら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 (1983); Tilburnら, Gene, 26: 205-221 (1983); Yeltonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 (1984) およびA. niger, Kelly and Hynes, EMBO J., 4: 475-479 (1985) のような多数の他の属、種、および株が通常は入手でき、ここでは有用である。

30

#### 【0109】

グリコシル化VCC-1ポリペプチドの発現用の適当な宿主細胞は多細胞生物に由来する。そのような宿主細胞は複雑なプロセッシングおよびグリコシル化活性が可能である。原理的には、脊椎動物または無脊椎動物培養かを問わず、いずれの高等真核生物細胞培養も用いることができる。無脊椎動物細胞の例は植物および昆虫細胞を含む。多数のバキュロウイルス株および変種、ならびにSpodoptera frugiperda (caterpillar), Aedes aegypti (mosquito), Aedes albopictus (mosquito), Drosophila melanogaster (fruit fly), およびBombyx moriのとき宿主からの対応する許容的昆虫宿主細胞が同定されている。例えば、Luckowら, Bio Technology, 6: 47-55 (1988); Millerら, in Genetic Engineering, Setlow, J. K.ら, eds., Vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), pp. 277-279; およびMaedaら, Nature, 315: 592-594 (1985) 参照。種々のそのようなウイルス株は公に入手可能であり (例えば、Autographa californica NPVのL-1変種およびBombyx mori NPVのBm-5株)、そのようなウイルスは、特に、Spodoptera frugiperda細胞のトランスフェクションのために、本発明に従ってウイルスとして用いることが

40

50

できる。綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマトおよびタバコの植物細胞培養を宿主として利用することができる。典型的には、植物細胞は、VCC-1 DNAを含むように以前操作された細菌 *Agrobacterium tumefaciens* のある株とのインキュベーションによってトランスフェクトされている。A. tumefaciens との植物細胞培養のインキュベーションの間に、それが転写され、適当な条件下で VCC-1 DNA を発現するように、VCC-1 をコードする DNA は植物細胞宿主に導入される。加えて、ノパリンシンターゼプロモーターおよびポリアデニル化シグナル配列のような植物細胞に適合する調節およびシグナル配列が入手できる。Depickerら, J. Mol. Appl. Gene, 1: 561 (1982)。加えて、T-DNA 780 遺伝子の上流領域から単離された DNA セグメントは、組換え DNA 含有植物組織において植物-発現可能遺伝子の転写レベルを活性化し、または増加させることができる。1989年6月21日に公開された EP 321, 196 参照。

#### 【0110】

しかしながら、注目されるのは脊椎動物細胞におけるものであり、培養（組織培養）における脊椎動物細胞の増殖は近年ではルーチン的手法となった（Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, editors (1973)）。有用な哺乳動物宿主細胞系の例は SV40 によって形質転換されたサル腎臓 CV1 系（COS-7、ATCC CRL 1651）；ヒト胚腎臓系（浮遊培養において増殖につきサブクローンされた 293 または 293 細胞（Grahamら, J. Gen Virol., 36: 59 (1977)））；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK、ATCC CCL 10）；チャニーズハムスター卵巣細胞 / DHFR（CHO、Urlaub および Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216, 1980）；マウスセルトリー細胞（TM4、Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251, 1980）；サル腎臓細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76、ATCC CRL-1587）；ヒト子宮頸癌種細胞（HELA、ATCC CCL2）；イヌ腎臓細胞（MDCK、ATCC CCL 34）；バッファローラット肝臓細胞（BRL 3A、ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138、ATCC CCL 75）；ヒト肝臓細胞（Hep G2、HB 8065）；サル乳房腫瘍（MMT 060562、ATCC CCL 51）；TR1 細胞（Matherら, Annals N.Y. Acad. Sci., 383: 44-68, 1982）；MRC 5 細胞；FS4 細胞；およびヒト肝癌細胞系（Hep G2）である。好ましい宿主細胞はヒト胚腎臓 293 およびチャニーズハムスター卵巣細胞である。

#### 【0111】

宿主細胞をトランスフェクトし、本発明の前記発現またはクローニングベクターで形質転換し、次いで、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅させるのに適したように修飾した慣用的栄養培地中で培養する。

#### 【0112】

トランスフェクションとは、いずれのコーディング配列が事実発現されるか否かにかかわらず、宿主細胞による発現ベクターの取り込みをいう。例えば、CaPO<sub>4</sub> およびエレクトロポレーションのごときトランスフェクションの多数の方法が当業者に知られている。成功したトランスフェクションは、このベクターも操作のいずれかの指標が宿主細胞内で起こる場合に、一般に認識される。

#### 【0113】

形質転換は、染色体外エレメントとして、あるいは染色体組込体によって、DNA が複製可能なように DNA を生物に導入することを意味する。用いる宿主細胞に応じて、形質転換はそのような細胞に適した標準的技術を用いてなされる。Sambrookら（前掲）のセクション 1.8 に記載されたごとく、塩化カルシウムを使用するカルシウム処理は、一般に、原核生物、またはかなりの細胞壁バリアーを含む他の細胞で用いられる。Agrovacterium tumefaciens での感染は、Shawら, Gene, 23: 315 (1983) および 1989年6月29日に公開された WO 89/05859 によって記載されているごとく、ある種の植物細胞の形質転換で用いられる。そのような細胞壁がない哺乳動物細胞では、Sambrookら（前掲）

のセクション 16.30 ないし 16.37 に記載されたリン酸カルシウム沈殿法が好ましい。哺乳動物細胞宿主系の形質転換の一般的な態様は、1983年8月16日に発行された米国特許第 4,399,216 号において Axel によって記載されている。酵母への形質転換は、典型的には、Van Solingen ら, J. Bact., 130: 946 (1977) および Hsiao ら, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979) の方法に従って行われる。しかしながら、核注入、エレクトロポレーションによる、またはプロトプラスト融合によるような DNA を導入する方法も用いることもできる。

#### 【0114】

##### 宿主細胞の培養

本発明の VCC-1 ポリペプチドを生産するのに用いられる原核生物細胞は、Sambrook らに一般的に記載されているごとく適当な培地中で培養される。 10

#### 【0115】

本発明の VCC-1 を生産するのに用いられる哺乳動物宿主細胞は種々の培地中で培養することができる。ハムの F10 (Sigma)、最小必須培地 (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) およびダルベッコウの修飾イーグル培地 (DMEM, Sigma) のごとき商業的に入手可能な培地が、宿主細胞を培養するのに適している。加えて、Ham および Wallace, Meth. Enz., 58: 44 (1979), Barnes および Sato, Anal. Biochem., 102: 255 (1980), 米国特許第 4,767,704 号; 第 4,657,866 号; 第 4,927,762 号; または第 4,560,655 号; WO 90/03430; WO 87/00195; 米国再発行特許第 30,985 号; またはその全ての開示をここに引用して援用する、共に 1990年10月3日に出願された同時係属米国出願第 07/592,107 号または第 07/592,141 号に記載された培地のいずれも、宿主細胞用の培養基として用いることができる。これらの培地のいずれも、必要に応じて、(インスリン、トランスフェリン、または表皮成長因子のごとき) ホルモンおよび/または他の成長因子、(塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、リン酸塩のごとき) 塩、(HEPESのごとき) 緩衝液、(アデノシンおよびチミジンのごとき)ヌクレオシド、(ゲンタマイシン(商標名)のごとき) 抗生物質、(マイクロモラー範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物として定義される) 微量元素、およびグルコースまたは同等のエネルギー源を補充することができる。いずれかの他の必要な補足物も、当業者に知られている適切な濃度にて含めることができる。温度、pH 等のごとき培養条件は、発現用に選択される宿主細胞で以前に使用されたものであり、当業者に明らかであろう。 20 30

#### 【0116】

本開示でいう宿主細胞は、インビトロ培養の細胞、ならびに宿主動物内にある細胞を含む。

#### 【0117】

本発明の VCC-1 は、相同組換えによって、または VCC-1 をコードする DNA を既に含む細胞に導入された制御エレメントを利用する組換え生産方法によって生産することができると考えられる。例えば、強力なプロモーター/エンハンサーエレメント、サブレッサー、または外因性転写モジュレーターエレメントを、所望の VCC-1 をコードする DNA の転写に影響するのに十分に近接し、かつ十分な向きで、意図した宿主細胞のゲノムに挿入される。制御エレメントは本発明の VCC-1 をコードしないが、該 DNA は宿主細胞ゲノムに存在する。次に、所望により、本発明の VCC-1 を作り出す細胞、または発現の増大したまたは減少したレベルをスクリーニングする。 40

#### 【0118】

##### 治療組成物および VCC-1 の投与

VCC-1 の治療処方、凍結乾燥ケーキまたは水性溶液の形態で、任意の生理学的に許容される担体、賦形剤または安定化剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 前掲) を所望の純度を有する VCC-1 と混合することによって貯蔵用に調製される。許容される担体、賦形剤または安定化剤は、使用される投与量および濃度において受容者に対して非毒性であり、それは、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸のごとき緩衝液; ア 50

スコルビン酸を含む抗酸化剤；(約10残基未満の)低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブミンのごとき蛋白質；ポリビニルピロリドンのごとき親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシンのごときアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストリンを含めた、単糖、二糖、および他の炭水化物；DDTAのごときキレート化剤；マンニトールまたはソルビトールのごとき糖アルコール；ナトリウムのごとき塩-形成対イオン；および/またはTween、Pluronicまたはポリエチレングリコール(TEG)のごときノニオン性界面活性剤を含む。

#### 【0119】

心血管、内皮細胞、腫瘍学的、および脈管形成性障害の治療で有用な組成物は、限定されるものではないが、標的遺伝子産物の発現および/または活性を阻害する抗生物質、小さな有機および無機分子、ペプチド、ホスホペプチド、アンチセンスおよびリボザイム分子、三重ラセン分子等を含む。

10

#### 【0120】

有効成分は生化学物質単独で投与できるが、それは医薬処方として提供するのが好ましい。本発明は、少なくとも一種の医薬上供用される担体、アジュバントまたは希釈剤と組み合わせ、治療上有効量の本発明の化合物を含む医薬組成物を含む。また、本発明は、対象において炎症または炎症関連障害を治療する方法を含み、該方法はそのような炎症または障害を有する対象に、治療上有効量の本発明の化合物を投与することを含む。また、本発明の化合物のファミリーには、その医薬上許容される塩が含まれる。用語「医薬上供用される塩」は、アルカリ金属塩を形成するのに、および遊離酸または遊離塩基の付加塩を形成するのに通常用いられる塩を含む。該塩の性質は非常に重要だというのではないが、それは医薬上許容されるものとする。本発明の化合物の適当な医薬上許容される酸付加塩は、無機酸または有機酸から調製することができる。そのような無機酸の例は塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、炭酸、硫酸およびリン酸を含む。適当な有機酸は有機酸の脂肪族、シクロ脂肪族、芳香族、アル脂肪族、複素環、カルボン酸およびスルホン酸のクラスから選択することができ、その例はギ酸、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、グルコン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、グルクロン酸、マレイン酸、フマル酸、ピルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、安息香酸、アントラニル酸、メシル酸、サリチル酸、p-ヒドロキシ安息香酸、フェニル酢酸、マンデル酸、エンボン(パモ)酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、パントテン酸、トルエンスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、スルファニル酸、ステアリン酸、シクロヘキシルアミノスルホン酸、アルゲン酸、-ヒドロキシ酪酸、サリチル酸、ガラクトール酸およびガラクトン酸である。本発明の適当な医薬上許容される塩基付加塩は、アルミニウム、カルシウム、リチウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウムおよび亜鉛から作られる金属塩、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグルミン(N-メチル-グルカミン)およびプロカインから作られる有機塩を含む。これらの塩の全ては、例えば、適当な酸または塩基を本発明の化合物と反応させることによって、本発明の対応する化合物から慣用的手段によって調製することができる。

20

30

40

#### 【0121】

また、1以上の非毒性の医薬上許容される担体および/または希釈剤および/またはアジュバントおよび/または賦形剤(ここでは、集合的に「担体」物質という)および、所望により、他の有効成分と組み合わせ、1以上の本発明の化合物を含む医薬組成物が本発明に含まれる。従って、本発明の化合物は、医薬の製造で用いることができる。本明細書中にて、前記した本発明の化合物の医薬組成物は、非経口投与用の溶液または凍結乾燥粉末として処方することができる。粉末は、使用に先立って、適当な希釈剤または他の医薬上許容される担体を添加することによって復元することができる。液状処方では、緩衝化された等張水性溶液とすることができる。本発明の化合物は、いずれかの適当な経路によって、好ましくは、そのような経路に適合した医薬組成物の形態にて、かつ意図した治療

50

に効果的な容量で投与することができる。化合物および組成物は、例えば、血管内、腹腔内、静脈内、皮下、筋肉内、骨髄内、経口または局所投与することができる。経口投与では、医薬組成物は、例えば、錠剤、カプセル剤、懸濁液または液体の形態であり得る。有効成分は、例えば、通常の等張生理食塩水、水中の標準的5%デキストロースまたは緩衝化酢酸ナトリウムまたはアンモニウム溶液を適当な担体として用いることができる組成物として注射することができる。そのような処方は、非経口投与で特に適当であるが、経口投与で用いることもできるか、あるいは計量された用量の吸入器または吹込用のネブライザーに含ませることもできる。ポリビニルピロピドン、ゼラチン、ヒドロキシセルロース、アカシア、ポリエチレングリコール、マンニトール、塩化ナトリウム、またはクエン酸ナトリウムのごとき賦形剤を添加するのが望ましいであろう。医薬組成物は、好ましくは、特定量の有効成分を含有する投与単位の形態で作成される。そのような投与単位の例は錠剤またはカプセル剤である。投与される治療上活性な化合物の量、および本発明の化合物および/または組成物で病気状態を治療するための投与方法は、対象の年齢、体重、性別および医学的状态、病気の重症度、投与の経路および頻度、および使用する特定の化合物を含めた種々の因子に依存し、かくして、広く変化させることができる。医薬組成物は、約0.1ないし2000mgの範囲、好ましくは約0.5ないし500mgの範囲、最も好ましくは約1および100mgの間の有効成分を含むことができる。約0.01ないし100mg/kg体重、好ましくは約0.1および約50mg/kg体重の間、最も好ましくは約1ないし20mg/kg体重の日用量が適当であろう。該日用量は1日当たり1ないし4用量で投与することができる。治療目的では、本発明の化合物を、示した投与経路に適当な1以上のアジュバントと通常は組み合わせる。もし経口投与するならば、化合物は、ラクトース、スクロース、澱粉粉末、アルカン酸のセルロースエステル、セルロースアルキルエステル、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、酸化マグネシウム、リン酸および硫酸のナトリウムおよびカルシウム塩、ゼラチン、アカシアガム、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドンおよび/またはポリビニルアルコールと混合し、次いで、便宜な投与のために錠剤化、またはカプセル化することができる。モノステアリン酸グリセリル、ジステアリン酸グリセリル、ヒドロキシプロピルメチルセルロース単独またはワックスを含むごとき徐放性物質中の活性化合物の分散物にて提供することができるように、そのようなカプセルまたは錠剤は制御放出处方を含むことができる。非経口投与用の処方は、水性または非水性等張滅菌注射溶液または懸濁液の形態とすることができる。これらの溶液および懸濁液は、経口投与用の処方で用いられる1以上の担体または希釈剤を有する滅菌粉末または顆粒から調製することができる。化合物は水、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、エタノール、トウモロコシ油、綿実油、落花生油、ゴマ油、ベンジルアルコール、塩化ナトリウムおよび/または種々の緩衝液に溶解させることができる。医薬製剤は、粉碎、混合、造粒、および錠剤形態で必要であれば圧縮；ハードゼラチンカプセル形態では粉碎、混合および充填を含めた慣用的製薬技術に従って製造される。液状担体を用いる場合、製剤はシロップ、エリキシル、エマルジョン、または水性または非-水性懸濁液の形態とされる。そのような液状処方経口投与できるか、あるいはソフトゼラチンカプセルに充填することができる。直腸投与では、本発明の化合物は、カカオバター、グリセリン、ゼラチンまたはポリエチレングリコールのごとき賦形剤と組み合わせることもでき、成形して坐薬とすることもできる。本発明の方法は、本発明の化合物の局所投与を含む。局所投与とは、表皮への本発明の化合物の外用適用、口腔への適用、およびそのような化合物の耳、目および鼻への吸入を含めた非-全身投与を意味し、ここに、化合物は血流には有意には侵入しない。全身投与とは経口、静脈内、腹腔内および筋肉内投与を意味する。局所投与に際して治療または予防効果に必要な本発明の化合物(以後、有効成分という)の量は、もちろん、選択された化合物、治療すべき疾患の性質および重症度、および治療を受けつつある動物に応じて変化し、結局は、医師の裁量に従う。

#### 【0122】

動物およびヒト治療用途では、本発明の局所処方、1以上の許容される担体、および

従って所望によりいずれかの他の治療成分と共に有効成分を含む。担体は、処方他の成分に適合するという意味で「許容できる」ものでなければならず、その受容者に対して有害であってはならない。局所投与に適した処方は、目、耳または鼻への投与に適したリニメント、ローション、クリーム、軟膏またはペーストおよび滴剤が治療に必要な部位への皮膚を介しての浸透に適した液状または半液状製剤を含む。有効成分は、局所投与では、処方の0.01ないし5.0重量%を含むことができる。

#### 【0123】

本発明による滴剤は滅菌水性または油性の溶液または懸濁液を含むことができ、これは、有効成分を、抗菌剤および/または殺真菌剤および/または好ましくは界面活性剤を含めた他の適当な保存剤の適当な水性溶液に有効成分を溶解させることによって調製することができる。次いで、得られた溶液は濾過によって清澄化し、適当な容器に移し、次いで、密封し、オートクレーブ処理することによりまたは90または100にて半時間維持することによって滅菌することができる。別法として溶液は濾過によって滅菌し、無菌技術によって溶液に移すことができる。滴剤に含ませるのに適した抗菌剤および殺真菌剤の例は硝酸または酢酸フェニル水銀(0.00217c)、塩化ベンザルコニウム(0.01%)および酢酸クロルヘキシジン(0.01%)である。油性溶液の調製用の適当な溶媒はグリセロール、希釈されたアルコール、およびプロピレングリコールを含む。

10

#### 【0124】

本発明によるローションは、皮膚または目への適用に適したものを含む。目ローションは殺菌剤を所望により含有してもよい滅菌水性溶液を含むことができ、これは、滴剤の調製と同様な方法によって調製することができる。皮膚への適用のためのローションまたはリニメントは、アルコールまたはアセトンのごとき乾燥を速め、皮膚を冷却するための剤、および/またはグリセロールのごときモイスチャライザー、ヒマシ油または落花生油のごとき油を含むこともできる。本発明によるクリーム、軟膏またはペーストは、外用のための有効成分の半固体処方である。それらは、適当なマシンの助けを借りて、脂肪性または非脂肪性基剤にて、単独、あるいは水性または非水性流体中の溶液または懸濁液にて、微粉碎されたまたは粉碎された形態の有効成分を混合することによって作成することができる。基剤はハード、ソフトまたは流動パラフィン、グリセロール、蜜蝋、金属石鹼のような炭化水素；粘質物；アーモンド、トウモロコシ、落花生、ヒマシ油またはオリーブ油のごとき天然起源の油；羊毛脂またはその誘導体、またはステアリン酸またはオレイン酸のごとき脂肪酸を、プロピレングリコールまたはマクロゴールのようなアルコールと共に含むことができる。該処方は、ソルビタンエステルまたはそのポリオキシエチレン誘導体のごときアニオン性、カチオン性、ノニオン性、界面活性剤のようないずれかの適当な界面活性剤を配合することができる。天然ガムのような懸濁化剤、ケイ酸質シリカのようなセルロース誘導体または無機物質、およびラノリンのごとき他の成分を含めることもできる。他のアジュバントおよび投与形態は、製薬分野でよく知られている。

20

30

#### 【0125】

本発明を特定の具体例に関して記載してきたが、これらの具体例の詳細は限定的なものと解釈されるべきではない。

#### 【0126】

イン・ビボ投与で用いるべきVCC-1または断片は滅菌されていなければならない。これは、凍結乾燥および復元に先立って、またはその後、滅菌濾過膜を通す濾過によって、容易に達成される。

40

#### 【0127】

治療VCC-1組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器、例えば、静脈内溶液バッグ、または皮下注射針で刺すことができるストッパーを有するバイアルに入れる。

#### 【0128】

VCC-1またはVCC-1抗体の投与経路は、公知の方法、例えば、後記するとき静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内、または病巣内経路による、または徐放シ

50

ステムによる注射または注入に従う。VCC-1または断片は注入またはボラス注射によって継続的に投与される。VCC-1抗体は、同様にして、あるいは血流またはリンパ系への投与によって投与される。

#### 【0129】

徐放製剤の適当な例は、成形品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態の半透性ポリマーマトリックスを含む。徐放マトリックスは、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許3,773,919号、EP 58,481）、L-グルタミン酸およびガンマエチル-L-グルタメート（Sidmanら, Biopolymers, 22: 547-556, 1983）、ポリ(2-ヒドロキシエチルメチクリレート)（Langerら, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277, 1981およびLanger, Chem. Tech., 12: 98-105, 1982）、エチレン酢酸ビニル（Langerら, 前掲）またはポリ-D-( )-3-ヒドロキシ酪酸（EP 133,988）を含む。また、徐放VCC-1組成物は、リポソームに捕獲されたVCC-1を含む。VCC-1を含むリポソームは自体公知の方法によって調製される：DE 3,218,121; Epsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985); Hwangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 日本特許出願83-118008; 米国特許第4,485,045号および4,544,545号; およびEP 102,324。通常、リポソームは、小さな（約200ないし800オングストローム）の単層タイプであり、そこでは、脂質含有量は約30%コレステロールを超え、選択された割合は最適なVCC-1療法に調製される。

10

20

#### 【0130】

治療で使用すべきVCC-1の有効量は、例えば、治療目的、投与経路および患者の状態に依存する。従って、治療者は、最適な治療効果を得るのに必要な投与量を測定し、かつ投与経路を修飾する必要がある。典型的には、所望の効果を達成する用量に到達するまで臨床医はVCC-1または断片を投与することになる。この療法の進行は慣用的アッセイによって容易にモニターされる。

#### 【0131】

VCC-1またはその抗体のための分析方法は以下の試薬の1以上を用いる：標識された分析物アナログ、固定化された分析物アナログ、標識された結合パートナー、固定化された結合パートナーおよび立体的コンジュゲート。標識された試薬は、「トレーサー」としても知られている。用いる標識（これは、プローブとして用いられるVCC-1核酸を標識するのに有用である）は、分析物とその結合パートナーとの結合に干渉しないいずれかの検出可能な機能である。イムノアッセイで用いるための多数の標識が知られており、その例は、フルオロクローム、ケミルミネセントおよび放射性標識のごとき直接検出できる部位、ならびに反応し、または誘導体化して検出しなければならない酵素のごとき部位を含む。そのような標識の例は放射性同位体<sup>32</sup>P、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H、および<sup>131</sup>I、希土類キレートまたはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ（米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリ性ホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチウム、サッカライドオキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、過酸化水素を使用してHRPのごとき染料前駆体を酸化する酵素とカップリングさせた、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼのごとき複素環オキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼまたはミクロペルオキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテオリオファージ標識、安定なフリーラジカル等を含む。

30

40

#### 【0132】

これらの標識を蛋白質またはポリペプチドに共有結合させるのに慣用的方法が利用できる。例えば、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビス-イミデート、ビス-

50

ジアゾ化ベンジジン等のごときカップリング剤を用いて、前記蛍光、ケミルミネセントおよび酵素標識で抗体をタグすることができる。例えば、米国特許第3,940,475号(フルオリメトリー)および第3,645,090(酵素); Hunterら, *Nature*, 144: 945 (1962); Davidら, *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Painら, *J. Immunol. Methods*, 40: 219-230 (1981); およびNygren, *J. Histochem. Cytochem.*, 30: 407-412 (1982)参照。好ましい標識はホースラディッシュペルオキシラーゼおよびアルカリ性ホスファターゼのごとき酵素である。該酵素を含めたそのような標識の抗体へのコンジュゲーションは、イムノアッセイ技術における当業者にとって標準的な操作手法である。例えば、O'Sullivanら, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in *Methods in Enzymology*, ed. J. J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166参照。そのような結合方法は、その全ては蛋白質性であるVCC-1またはその抗体で用いるのに適当である。

#### 【0133】

ある種のアッセイ方法では試薬の固定化が必要である。固定化は、溶液中で遊離したままであるいずれかの分析物からの結合パートナーを分離することを含む。これは、便宜には、水不溶性マトリックスまたは表面(Bennichら, 米国特許第3,720,760号)への吸着によって、共有結合カップリングによって(例えば、グルタルアルデヒド架橋を使用)、またはパートナーまたはアナログをその後不溶化することによって、例えば、免疫沈殿によってのように、アッセイ手法の前に結合パートナーまたは分析物アナログを不溶化させることによって達成される。

#### 【0134】

競合またはサンドイッチアッセイとして知られている他のアッセイ方法はよく確立されており、商業的診断剤産業で広く用いられている。

#### 【0135】

競合アッセイは、共通の結合パートナーに対する限定された数の結合部位につきテスト試料分析物と競合するトレーサーアナログの能力に依拠する。結合パートナーは、一般的には、競合の前または後に不溶化され、次いで、結合パートナーに結合したトレーサーおよび分析物を未結合トレーサーおよび分析物から分離する。この分離はデカンテーション(ここに、結合パートナーは予め不溶化されている)によって、または遠心(ここでは、結合パートナーは競合反応後に沈殿する)によって達成される。テスト試料分析物の量は、マーカ物質の量によって測定して結合したトレーサーの量に反比例する。既知量の分析物での用量-応答曲線を作成し、テスト結果と比較して、テスト試料中に存在する分析物の量を定量的に決定する。これらのアッセイは、酵素を検出マーカとして用いる場合、ELISAシステムと呼ばれる。

#### 【0136】

「均一」アッセイと呼ばれるもう1つの種の競合アッセイは相分離を必要としない。ここに、酵素と分析物とのコンジュゲートを調製し、抗-分析物は分析物に結合した場合に抗-分析物の存在が酵素活性を修飾するように用いる。この場合、VCC-1またはその免疫学的に活性な断片を二官能性有機ブリッジでペルオキシダーゼのごとき酵素にコンジュゲートさせる。抗-VCC-1の結合が標識の酵素活性を阻害し、または増強するように、コンジュゲートは抗-VCC-1で用いるために選択される。この方法それ自体はEMITの名称下で広く実施されている。

#### 【0137】

立体的コンジュゲートは、均一アッセイのために立体障害方法で用いられる。抗-分析物と同時にコンジュゲートにハプテンに対する抗体が実質的に結合できないように、低分子量のハプテンを小分析物に共有結合させることによって、これらのコンジュゲートは合成される。このアッセイ手法の下では、テスト試料中に存在する分析物は抗-分析物に結合し、それにより、抗-ハプテンをコンジュゲートに結合させ、その結果、コンジュゲートハプテンの特性の変化、例えば、ハプテンがフルオロフォアである場合には蛍光の変

化がもたらされる。

【0138】

VCC-1またはVCC-1抗体の測定では、サンドイッチアッセイが特に有用である。連続サンドイッチアッセイにおいては、固定化された結合パートナーを用いてテスト試料分析物を吸着させ、洗浄によってテスト試料を除去し、結合した分析物を用いて標識された結合パートナーを吸着させ、次いで、結合した物質を残存するトレーサーから分離する。結合したトレーサーの量はテスト試料分析物に直接比例する。「同時」サンドイッチアッセイにおいては、標識された結合パートナーを添加する前には、テスト試料を分離しない。1つの抗体として抗-VCC-1モノクローナル抗体、およびもう1つの抗体としてポリクローナル抗-VCC-1抗体を用いる連続サンドイッチアッセイは、VCC-1 10  
活性につき試料をテストするのに有用である。

【0139】

これまで記載したのは、VCC-1および抗体についての単なる例示的診断アッセイである。これらの分析物の測定用に開発された現在または後の他の方法は本発明の範囲内に含まれ、それは、前記したバイオアッセイを含む。

【0140】

細胞移動アッセイ

細胞移動についてのイン・ビトロモデルは、細胞（移動する細胞）を含む第一の細胞外マトリックスおよび該第一の細胞外マトリックスと物理的に接触した第二の細胞外マトリックスを含む。該細胞は線維芽細胞（例えば、皮膚線維芽細胞または皮下線維芽細胞）、 20  
内皮細胞、単球/マクロファージ、または腫瘍細胞のごときいずれの適当な細胞であつてもよい。

【0141】

第一の細胞外マトリックスは、細胞が天然に存在する第一の天然環境を刺激し、第二の細胞外マトリックスは、細胞が第一の天然環境からそこへ移動する第二の天然環境を刺激する。例えば、創傷修復においては、移動する細胞は皮膚線維芽細胞であつてよく、その第一の天然環境はコラーゲン質の間質である。創傷修復の間に、皮膚線維芽細胞はコラーゲン質の間質からフィブリン血餅に移動し、これが該創傷を満たす。かくして、皮膚線維芽細胞の第一の天然環境はコラーゲン質の間質であつて、皮膚線維芽細胞の第二の天然環境はフィブリン血餅である。イン・ビトロモデルの第一の細胞外マトリックスを選択して 30  
、皮膚線維芽細胞でコラーゲン質の間質を刺激する。イン・ビトロモデルの第二の細胞外マトリックスを選択して、フィブリン血餅を刺激する。例えば、第二の細胞外マトリックスはフィブリンゲルまたは人工の細胞外マトリックスであつてよい。また、フィブロネクチンまたはヒアルロン酸のごとき、第一および/または第二の細胞外マトリックスにおいて他の成分を供するのにも有用であらう。

【0142】

該イン・ビトロモデルは、第二の細胞外マトリックスに物理的に位置した細胞を含む、第一の細胞外マトリックスと交わった、（マイクロタイタープレート、ペトリ皿等のごとき）表面にコートされた第二の細胞外マトリックスを供することによって二次元とすることができ 40  
る。第一の細胞外マトリックスからの細胞は第二の細胞外マトリックスの表面に「流出」する。別法として、該モデルは、第一の細胞外マトリックスを第二の細胞外マトリックスで囲うことによって三次元とすることができ（フィブリン細胞外マトリックスをゲルとしてコラーゲンゲル細胞外マトリックスの周りにキャストした図1参照）。第一の細胞外マトリックスからの細胞は第二の細胞外マトリックスに「移動」する。

【0143】

細胞の移動はイン・ビトロモデルを用いてモニターし、または調べることができる。もし細胞が検出可能であれば、細胞の移動をモニターし、または調べることができるのは当業者に容易に明らかにはずである。これはいくつかの方法で達成することができる。その中に細胞が移動するフィブリンゲルを含む1つの具体例において、フィブリンゲルは透明であつて、細胞を光学顕微鏡で可視化することができる。別法として、第一の細胞外マト 50

リックスに供した細胞は検出マーカーで標識することができる。そのような検出マーカーは当該分野で知られており、それは、例えば、放射性標識、蛍光標識、性能のよい色素（これらの非毒性色素は生きた細胞を染色する）、および（gal 遺伝子のごとき）分子操作によって加えられた標識を含む。標識された細胞の第一の細胞外マトリックスから第二の細胞外マトリックスへの移動は、かくして、モニターすることができる。

#### 【0144】

該イン・ビボモデルは、細胞を含む天然に生じる第一の細胞外マトリックス、および該第一の細胞外マトリックスに物理的に接触した第二の細胞外マトリックスを有する動物モデルを含む。細胞および第一および第二の細胞外マトリックスは、一般に、第一の細胞外マトリックスが動物モデルの一部であることを除き、イン・ビトロモデルにつき前記した通りである。例えば、全厚みの皮膚創傷が（ヨークシャーまたはミニピッグのごとき）動物中に作成する。動物のコラーゲン質の間質はイン・ビボモデルの第一の細胞外マトリックスであって、第二の細胞外マトリックスはフィブリンゲルまたは何らかの人工的細胞外マトリックスとして供される。また、第一の細胞外マトリックスおよび第二の細胞外マトリックスの間に（動物の第一の細胞外マトリックスに存在する細胞、または天然で動物に存在する細胞とは固有に異なる細胞のような）さらなる細胞を供するのはイン・ビボモデルで望ましいであろう。次いで、それらのさらなる細胞の移動をモニターして、第二の細胞外マトリックスへの細胞移動を測定することができる。

#### 【0145】

該モデルの用途は多数ある。第一の用途は、細胞移動に対するそれらの効果について物質をスクリーニングするため、および細胞移動に対するそれらの効果について細胞外マトリックスをスクリーニングするためである。該方法は：前記した細胞移動用のイン・ビトロモデルを供し；第一の細胞外マトリックスから第二の細胞外マトリックスへの細胞の第一の移動速度を測定し；イン・ビトロモデルへ物質を添加し；次いで、物質の添加の後に、第一の細胞外マトリックスから第二の細胞外マトリックスへの細胞の第二の移動速度を測定することを含み、第二の移動速度に対する第一の移動速度の増加は、該物質が細胞移動を増加させることを示し、第二の移動速度に対する第一の移動速度の減少は、該物質が細胞移動を低下させることを示す。前記したごとく、モニターすべき細胞移動は（第二の細胞外マトリックスを表面にコートする二次元様式においては）流出であり得、あるいは（第二の細胞外マトリックスを、例えば、第一の細胞外マトリックスの周りにゲルとしてキャストする三次元様式においては）移動であり得る。最初に、イン・ビトロモデルを用いて細胞移動に対する効果について物質をスクリーニングすれば、次いで、前記したごとく細胞移動用のイン・ビボモデルを供し、イン・ビボモデルにおいて、第一の細胞外マトリックスから第二の細胞外マトリックスへの細胞の第一の移動速度を測定し；イン・ビボモデルに物質添加し；次いで、イン・ビボモデルへの物質の添加の後に、第一の細胞外マトリックスから第二の細胞外マトリックスへの細胞の第二の移動速度を測定することによってさらに物質をスクリーニングすることができ、ここに、第二の移動速度に対する第一の移動速度の増加は、該物質が細胞移動を増加させることを示し、第二の移動速度に対する第一の移動速度の減少は、該イン・ビボモデルにおいて該物質が細胞移動を減少させることを示す。かくして、物質をスクリーニングするためにイン・ビトロおよびイン・ビボモデルを一緒に用いると、2つのレベルのスクリーニングが提供される。前記したごとく、それは、イン・ビボモデルを用いて、イン・ビボモデルの第一の細胞外マトリックスおよび第二の細胞外マトリックスの間に位置した複数の細胞を供する場合に望ましいであろう。従って、該方法は、さらに、第一の細胞外マトリックスおよび第二の細胞外マトリックスの間からの複数の細胞の、イン・ビボモデルにおける第二の細胞外マトリックスへのもう一つの第一の移動速度を測定し；次いで、イン・ビボモデルへの物質の添加の後に、第一の細胞外マトリックスおよび第二の細胞外マトリックスの間からの複数の細胞の第二の細胞外マトリックスへのもう一つの第二の移動速度を測定することを含み、ここに、もう一つの第二の移動速度に対するもう一つの第一の移動速度の増加は、物質が細胞移動を増加させることを示し、もう一つの第二の移動速度に対するもう一つの第一の移動速度の

10

20

30

40

50

減少は、該イン・ビポモデルにおいて該物質が細胞移動を減少させることを示す。これらのさらなる細胞は、天然に生じる第一の細胞外マトリックスに存在する細胞の量が限定的であるか、あるいは容易には検出されない場合に特に有用な、細胞の第二の細胞外マトリックスへの移動を測定するためのさらなる手段を提供する。さらなる細胞は、それらを第一および第二の細胞外マトリックスの間に位置させる前に容易に標識することができ、かくして、容易に検出することができる。あるいは、動物に天然に存在する細胞とは固有に異なり、その差に基づいて検出可能なさらなる細胞を添加することができる。

【0146】

また、前記したイン・ビポモデルは、イン・ビトロモデルなくして用いて、細胞移動に影響する物質につきそれ自体スクリーニングすることができる。そのような方法は、前記したごとき細胞移動用のイン・ビポモデルを供し、イン・ビポモデルにおいて、第一の細胞外マトリックスから第二の細胞外マトリックスへの細胞の移動速度を測定し；物質をイン・ビポモデルに添加し；次いで、物質のイン・ビポモデルへの添加の後に、第一の細胞外マトリックスから第二の細胞外マトリックスへの細胞の第二の移動速度を測定することを含み、ここに、第二の移動速度に対する第一の移動速度の増加は、イン・ビポモデルにて、物質が細胞移動を増加させることを示し、第二の移動速度に対する第一の移動速度の減少は、該物質が細胞移動を減少させることを示す。

10

【0147】

もう一つの可能性は予備的スクリーニングにあり、それは、細胞および第一および第二の細胞外マトリックスを供し、該細胞が第一の細胞外マトリックスおよび第二の細胞外マトリックスに移動できるかを測定することを含む。この予備的スクリーニングが、問題の細胞が選択された細胞外マトリックスに移動できるかを測定する手段として、イン・ビトロまたはイン・ビポ方法で物質および/または細胞外マトリックスへのスクリーニングに先立ってできる。もし細胞が選択された細胞外マトリックスに移動できないならば、細胞移動は起こらず、細胞移動に影響する物質または細胞外マトリックスにつきスクリーニングする方法は意味がないであろう。

20

【0148】

移動アッセイにおけるもう一つの可能性は、細胞移動に対するそのような細胞外マトリックスにつき細胞外マトリックスをスクリーニングする方法である。該方法は、前記したごとき細胞移動用のイン・ビトロモデルを供し；第一の細胞外マトリックスから第二の細胞外マトリックスへの細胞の第一の移動の速度を測定し；イン・ビトロモデルにおいて第二の細胞外マトリックスの代わりに人工的細胞外マトリックスで置き換え；次いで、第一の細胞外マトリックスから人工的細胞外マトリックスへの細胞の第二の移動速度を測定することを含み、ここに、第二の移動速度に対する第一の移動速度の増加は、人工的細胞外マトリックスが細胞移動を増加させることを示し、第二の移動速度に対する第一の移動速度の減少は人工的細胞外マトリックスが細胞移動を減少させることを示す。好ましくは、第二の細胞外マトリックスは、該モデルを用いて創傷修復を調べる場合にはフィブリンゲルである。

30

【0149】

物質をスクリーニングする方法に関しては、細胞外マトリックスをスクリーニングする方法はイン・ビポモデルを利用することもできる。そのような方法は、前記したごとき細胞移動用のイン・ビポモデルを供し（再度、第二の細胞外マトリックスは、該モデルを用いて創傷修復を調べる場合には好ましくはフィブリンゲルである）；第一の細胞外マトリックスから第二の細胞外マトリックスへの細胞の第一の移動速度を測定し；イン・ビポモデルにおいて第二の細胞外マトリックスの代わりに人工的細胞外マトリックスで置き換え；第一の細胞外マトリックスから人工的細胞外マトリックスへの細胞の第二の移動速度を測定することを含み、ここに、第二の移動速度に対する第一の移動速度の増加は、人工的細胞外マトリックスは細胞移動を増加させることを示し、第二の移動速度に対する第一の移動速度の減少は、人工的細胞外マトリックスが細胞移動を減少させることを示す。

40

【0150】

50

## 抗体

VCC-1ポリペプチドを免疫源を用いて、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体調製のために標準的技術を用いて抗体を生じさせることができる。全長ポリペプチドまたは蛋白質を用いることができるか、あるいは本発明は免疫源として用いられる抗原性ペプチド断片を提供する。本発明の蛋白質の抗原性ペプチドはアミノ酸配列の少なくとも8つ（好ましくは、10、15、20または30の）アミノ酸残基を含み、これは、ペプチドに対して生起した抗体が蛋白質とで特異的免疫複合体を形成するような蛋白質のエピトープを含む。

### 【0151】

抗原性ペプチドに含まれる好ましいエピトープは、蛋白質の表面に位置する領域、例えば、親水性領域である。ヒドロパシープロットまたは同様の分析を用いて、疎水性領域を同定することができる。

### 【0152】

免疫原は、典型的には、適当な対象（例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の哺乳動物）を免疫化することによって抗体を調製するのに用いる。

### 【0153】

適当な免疫原調製物は、例えば、組換えにより発現された化学合成ポリペプチドを含むことができる。該調製物は、さらに、フロイントの完全または不完全アジュバントのごときアジュバント、または同様な免疫刺激剤を含むことができる。

### 【0154】

本明細書中で用いられる用語「抗体」とは、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、本発明のポリペプチドのごとき抗原に特異的に結合する抗原-結合部位を含む分子をいう。本発明の与えられたポリペプチドに特異的に結合する分子は該ポリペプチドに結合するが、試料、例えば、該ポリペプチドを天然で含有する生物学的試料中の、他の分子には実質的に結合しない分子である。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例は、ペプシンのごとき酵素で抗体を処理することによって生じさせることができるF(ab)およびF(ab')<sub>2</sub>断片を含む。本発明は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を提供する。本明細書中で用いられる用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」とは、特定のエピトープと免疫反応することができる抗原-結合性の部位の唯一の種を含む抗体分子の集団をいう。

### 【0155】

ポリクローナル抗体は、免疫原としての本発明のポリペプチドで適当な対象を免疫化することによって前記したごとく調製することができる。免疫化対象における抗体力価は、固定化ポリペプチドを用い、酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)のごとき標準的な技術によって経時的にモニターすることができる。

### 【0156】

所望であれば、抗体分子は、哺乳動物から（例えば血液から）単離することができ、さらに、プロテインAクロマトグラフィーのごときよく知られた技術によって精製してIgG画分を得ることができる。免疫化から適当な時間の後、例えば、特異的抗体の力価が最大となると、KohlerおよびMilstein(1975) (Nature 256:495-497, the human B cell hybridoma technique (Kozborら (1983) Immunol. Today 4:72) によって元来は記載されたハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら (1983) Immunol. Today 4:72)、EBV-ハイブリドーマ技術(Coleら (1985), Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)またはトリオーマ技術のごとき標準的技術によって、対象から抗体-生産細胞を得ることができ、それを用いてモノクローナル抗体を調製することができる。本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞は、例えば、標準的なELISAアッセイを用い、注目するポリペプチドに結合する抗体につき、ハイブリドーマ培養上澄みをスクリーニングすることによって検出される。

### 【0157】

モノクローナル抗体-分泌ハイブリドーマを調製するための代替法として、注目するポ

10

20

30

40

50

リペプチドで組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージ提示ライブラリー）をスクリーニングすることによって、VCC-1ポリペプチドに向けられたモノクローナル抗体を同定することができる。ファージ提示ライブラリーを生じさせ、それをスクリーニングするための方法は、商業的に入手可能である（例えば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号27-9400-01；およびStratagene SurfZAPJ Phage Display Kit、カタログ番号240612）。加えて、抗体提示ライブラリーを生じさせ、それをスクリーニングするのに特別に用いることができる方法および試薬は。例えば、米国特許第5,223,409号、PCT国際公開番号WO 92/18619；PCT国際公開番号WO 91/17271；PCT国際公開番号WO 92/20791；PCT国際公開番号WO 92/15679；PCT国際公開番号WO 93/01288；PCT国際公開番号WO 92/01047；PCT国際公開番号WO 92/09690；PCT国際公開番号WO 90/02809；Fuchsら(1991) Bio Technology 9:1370-1372；Hayら(1992) Hum. Antibody Hybridomas 3:81-85；Huseら(1989) Science 246:1275-1281；Griffithsら(1993) EMBO J. 12:725-734に見出すことができる。

#### 【0158】

##### VCC-1抗体の調製

VCC-1に対するポリクローナル抗体は、一般に、VCC-1およびアジュバントの複数の皮下(sc)または腹腔内(IT)注射によって動物において生起する。VCC-1または標的アミノ酸配列を含有する断片を、免疫化すべき種において免疫原性である蛋白質、例えば、キーホールリンベットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチオグロブリンまたはトリプシン阻害剤に二官能性または誘導体化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介するコンジュゲーション)、(リシン残基を介する)N-ヒドロキシスクシンイミド、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、SOCl<sub>2</sub>、またはRおよびR<sup>1</sup>が異なるアルキル基であるR<sup>1</sup>N=C=N Rを用いてコンジュゲートさせるのが有用であろう。

#### 【0159】

動物は、通常、(各々、ウサギまたはマウスについて)1mgまたは1μgのコンジュゲートを3容量のフロイントの完全アジュバントと合わせ、該溶液を複数部位にて皮内に注射することによって、免疫原性コンジュゲートまたは誘導体に対して免疫化される。一ヶ月後、複数部位における皮下注射によって、フロイントの不完全アジュバント中のコンジュゲートの元の量の1/5ないし1/10を動物にブースター注射する。7ないし14日後、動物から採血し、血清を抗-VCC-1力価につきアッセイする。力価がプラトーとなるまで動物をブースター注射する。好ましくは、異なる蛋白質にコンジュゲートしたおよび/または異なる架橋剤を介する以外は同一のVCC-1のコンジュゲートを動物にブースター注射する。また、コンジュゲートは、蛋白質融合として組換え体細胞培養中で作成することもできる。また、ミョウバンのごとき凝集剤を用いて、免疫反応を増強させる。形質転換されて、もう1つの種の標的受容体を発現する類似の宿主細胞で動物を免疫化するのは便宜であろう。

#### 【0160】

モノクローナル抗体は、免疫化された動物から脾臓細胞を回収し、例えば、骨髓腫との融合によって、またはエプスタイン-バール(EB)-ウイルス形質転換によって、慣用的方法によって該細胞を不滅化し、所望の抗体を発現する抗体をスクリーニングすることによって調製される。モノクローナル抗体は、好ましくは、他の公知のVCC-1ポリペプチドと交差反応しないものとする。

#### 【0161】

加えて、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、例えば、PCT公開番号WO 87/02671；欧州特許出願第184,187号；欧州特許出願第171,496号；欧州特許出願第173,494号；PCT公開WO 86/01533；米国特許第4,816,567号；欧州特許出願第125,023；Betterら(1988) Science 240:1041

-1043; Liuら (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liuら (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sunら (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimuraら (1987) Canc. Res. 47:999-1005; Woodら (1985) Nature 314:446-449; および Shawら (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Oiら (1986) Bio/Techniques 4:214; 米国特許第 5, 225, 539号; Jonesら (1986) Nature 321:552-525; Verhoeyanら (1988) Science 239:1534; および Beidlerら (1988) J. Immunol. 141:4053-4060に記載された方法を用い、当該分野で公知の組換え DNA 技術によって生産することができる。

#### 【0162】

完全なヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置で特に望ましい。そのような抗体は、内因性免疫グロブリンの重鎖および軽鎖遺伝子を発現させることができないが、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子を発現させることができる。そのような抗体は、トランスジェニックマウスを用いて生産することができる。トランスジェニックマウスは、選択された抗原、例えば、VCC-1ポリペプチドの全てまたは一部で通常の方法により免疫化される。該抗原に向けられたモノクローナル抗体は、慣用的ハイブリドーマ技術を用いて得ることができる。トランスジェニックマウスが保有するヒト免疫グロブリントランスジーンはB細胞の分化の間に再編成し、引き続いて、クラススイッチングおよび体細胞突然変異を受ける。かくして、そのような技術を用い、治療的に有用なIgG、IgAおよびIgE抗体を生産することが可能である。ヒト抗体を生産するためのこの技術の概観については、LonbergおよびHuszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93) 参照。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を生産するためのこの技術、およびそのような抗体を生産するためのプロトコルの詳細な議論については、米国特許第 5, 625, 126号; 米国特許第 5, 633, 425; 米国特許第 5, 569, 825; 米国特許第 5, 661, 016; および米国特許第 5, 545, 806 参照。加えて、Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) のごとき会社は、前記したのと同様な技術を用いて選択された抗原に向けられたヒト抗体を提供する業務を行っている。

#### 【0163】

また、ヒト抗体は、ブランク提示ライブラリー (HomogenousおよびWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marksら, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)) を含めた当該分野で知られた種々の技術を用いて生産することもできる。また、ヒトモノクローナル抗体の調製については、ColeらおよびBoernerらの技術も利用できる (Coleら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) およびBoernerら, J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991))。同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を、トランスジェニック動物、例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的にまたは完全に不活化されているマウスに導入することによって作成することができる。攻撃に際し、ヒト抗体の生産が観察され、これは、遺伝子の再編成、組立ておよび抗体のレパートリーを含めた全ての点においてヒトで観察されるものによく似ている。このアプローチは、例えば、米国特許第 5, 545, 807号; 第 5, 545, 806号; 第 5, 569, 825号; 第 5, 625, 126号; 第 5, 633, 425号; 第 5, 661, 016号、および以下の科学出版物; Marksら, Bio Technology 10, 779783 (1992); Lonbergら, Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwildら, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); LonbergらおよびHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)に記載されている。

#### 【0164】

##### 二特異的抗体

二特異的抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル、好ましくはヒトまたはヒト化抗体である。この場合、結合特異性のうちの1つはPAに対するものであり; 他のものはいずれかの他の抗原に対するもの、好ましくは細胞-表面蛋白質または受容体または受容体サブユニットに対するものである。

#### 【0165】

10

20

30

40

50

二特異的抗体を作成する方法は当該分野で知られている。伝統的には、二特異的抗体の組換え生産は、2つの重鎖が異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の共発現に基づく(MilsteinおよびCuellar, Nature, 305:537-539 (1983))。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな分類のため、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10の異なる抗体分子の潜在的混合物を生産し、そのうち、ただ1つが正しい二特異的構造を有する。正しい分子の精製は、通常、アフィニティークロマトグラフィーの工程によって達成される。同様な手法は1993年5月13日に公開されたWO 93/08829、およびTrauneckerら, EMBO J., 10:3655-3659 (1991)に開示されている。

#### 【0166】

所望の結合特異性を持つ抗体可変ドメイン(抗体-抗原組合せ部位)を免疫グロブリンの定常ドメイン配列に融合させることができる。該融合は、好ましくは、ヒンジの少なくとも1つ、CH2およびCH3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。それは、融合の少なくとも1つに存在する軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)を有するのが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合および、所望であれば、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に共トランスフェクトする。二特異的抗体の創製のさらなる詳細については、例えば、Sureshら, Methods in Enzymology, 121:210 (1986)参照。

#### 【0167】

WO 96/27011に記載されたもう1つのアプローチによると、一对の抗体分子の間の界面を、組換え細胞培養から回収されたヘテロダイマーのパーセンテージを最大化するように作成することができる。好ましい界面は抗体定常ドメインのCH3領域の少なくとも一部を含む。この方法においては、第一の抗体分子の界面からの1以上の小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)で置き換える。より大きなサイズの鎖と同一または類似のサイズの補充「キャビティー」が、より大きなアミノ酸側鎖をより小さな側鎖(例えば、アラニンまたはスレオニン)で置き換えることによって第二の抗体分子の界面に作り出される。これは、ホモダイマーのごとき他の望まない最終産物に対してヘテロダイマーの収率を増大させるメカニズムを提供する。

#### 【0168】

二特異的抗体は、全長抗体または抗体断片(例えば、F(ab')<sub>2</sub>二特異的抗体)として調製することができる。抗体断片から二特異的抗体を作り出すための技術は文献に記載されている。例えば、二特異的抗体は化学的結合を用いて調製することができる。Brennanら, Science 229:81 (1985)は、無傷抗体を蛋白質分解により切断してF(ab')<sub>2</sub>断片を得る手法を記載している。これらの断片はジチオール錯化剤亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元して、近傍のジチオールを安定化させ、分子内ジスルフィド形成を妨げる。次いで、生じたFab'断片をチオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に変換する。次いで、Fab'-TNBのうちの1つを、メルカプトエチルアミンでの還元によってFab'-チオールに再度変換し、等モル量の他のFab'-TNB誘導体と混合して、二特異的抗体を形成する。生産された二特異的抗体は、酵素の選択的固定化のための剤として用いることができる。

#### 【0169】

Fab'断片はE. coliから直接回収し、化学的にカップリングさせて二特異的抗体を形成することができる。Shalabyら, J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)は、十分にヒト化された二特異的抗体F(ab')<sub>2</sub>分子の生産を記載している。各Fab'断片をE. coliから別々に分泌させ、インピトロで部位特異的的化学カップリングに付して、二特異的抗体を形成させた。各形成された二特異的抗体は、Erbb2受容体および正常なヒトT細胞を過剰発現する細胞に結合することができ、ならびにヒト乳癌標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性をトリガーすることができた。

#### 【0170】

組換え細胞培養から直接二特異的抗体断片を作成し、それを単離する種々の技術はやはり記載されている。例えば、ロイシンジッパーを用いて二特異的抗体が生産されている。

10

20

30

40

50

Kostelnyら, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。F o s および J u n 蛋白質からのロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合によって、2つの異なる抗体のF a b '蛋白質に連結させた。抗体ホモダイマーをヒンジ領域において還元してモノマーを形成させ、次いで、再度酸化して、抗体ヘテロダイマーを形成させた。この方法は、抗体ホモダイマーの生産で利用することもできる。Hollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)によって記載された「ダイアポディー」技術は、二特異的抗体断片を作成するための別のメカニズムを提案している。該断片は、同一鎖上の2つのドメインの間で対形成するには余りにも短いリンカーによって軽鎖可変ドメイン(V L)に連結した重鎖可変ドメイン(V H)を含む。従って、1つの断片のV HおよびV Lドメインを、もう1つの断片の相補的V LおよびV Hドメインと対形成させ、それにより、2つの抗原 - 結合部位を形成する。一本鎖F v ( s F v )ダイマーを用いることによって二特異的抗体断片を作成するためのもう1つの戦略も報告されている。Gruberら, J. Immunol. 152:5368 (1994)参照。

10

#### 【0171】

2を超える価数を持つ抗体が考えられる。例えば、三特異的抗体を調製することができる(Tuttら, J. Immunol. 147:60 (1991))。例示的な二特異的抗体をここに与えられたポリペプチド上の2つの異なるエピトープに結合させることができる。別法として、アームを、T - 細胞受容体分子(例えば、C D 2、C D 3、C D 2 8、またはB 7)のごとき白血球上のトリガリング分子、またはF c R I ( C D 6 4 )、F c R I I ( C D 3 2 )およびF c R I I I ( C D 1 6 )のごときI g G ( F c R )に対するF cに結合するアームと組み合わせて、本発明の特定の蛋白質を発現する細胞に細胞防御メカニズムを集中することができる。また、二特異的抗体を用いて、本発明の特定の蛋白質を発現する細胞に対して細胞傷害性剤を局所化することもできる。これらの抗体は、本発明の蛋白質に対する結合性アーム、およびE O T U B E、D P T A、D O T AまたはT E T Aのごとき細胞傷害性剤または放射性核種キレーターに結合するアームを保有する。注目するもう1つの二特異的抗体は該ポリペプチドに結合し、さらに組織因子(T F)に結合する。

20

#### 【0172】

##### 抗体の医薬組成物

本明細書中で同定されたポリペプチドに特異的に結合する抗体、ならびに本明細書中で開示されたスクリーニングアッセイによって同定された他の分子は、医薬組成物の形態で種々の障害の治療のために投与することができる。

30

#### 【0173】

もしポリペプチドが細胞内にあり、かつ全抗体を阻害剤として用いるならば、内部化抗体が好ましい。しかしながら、リポフェクションまたはリポソームを用いて抗体または抗体断片を細胞に送達することもできる。抗体断片を用いる場合、標的蛋白質の結合ドメインに特異的に結合する最小の阻害性断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域の配列に基づき、標的蛋白質配列に結合する能力を保有するペプチド分子を設計することができる。そのようなペプチドは化学的に合成することができるか、および/または組換えD N A技術によって生産することができる。例えば、Marascoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)参照。また、本明細書中における処方方は、治療すべき特定の兆候に対して必要な1以上の活性化化合物、好ましくは、相互に悪影響しない補充的活性を持つものを含むことができる。別法として、あるいは、組成物は例えば細胞傷害性剤、サイトカイン、化学療法剤、または成長阻害剤のごとき、その機能を増進させる剤を含むことができる。そのような分子は、適当には、意図した目的に効果的な量で組み合わせて存在させる。

40

#### 【0174】

有効成分は、例えば、コアセルベーション技術によって、または界面重合、例えば、各々、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ - 粒子、およびナノカプセル)において、またはマクロエマルジョンにおいて、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン - マイクロカプセルおよびポ

50

リ - (メチルメタクリレート) マイクロカプセルによって調製されたマイクロカプセル中に捕獲することもできる。そのような技術はRemington's Pharmaceutical Sciences (前掲) に記載されている。

【0175】

イン・ビボ投与で用いるべき処方滅菌されていなければならない。これは、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

【0176】

徐放製剤を調製することができる。徐放製剤の適当な例は抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、そのマトリックスは、成型品の形態、例えば、フィル間またはマイクロカプセルである。徐放マトリックスの例はポリエステル、ヒドロゲル (例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸およびエチル-L-グルタメートのコポリマー、非-分解性エチレン-酢酸ビニル、LLTRON DEPET (商標)(乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸リユーブレリドから構成される注射用マイクロスフィア)のごとき分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、およびポリ-D-( )-3-ヒドロキシ酪酸を含む。エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸のごときポリマーは100日にわたって分子の放出を可能とするが、ある種のヒドロゲルはより短い時間で蛋白質を放出する。長期間カプセル化抗体を身体中に留まらせると、それは37の水分への暴露の結果として変性し、または凝集しかねず、その結果、生物学的活性が喪失し、おそらくは免疫原性が変化する。合理的なストラタジーは、関係するメカニズムに応じて安定化のために工夫することができる。例えば、もし凝集メカニズムがチオ-ジスルフィド交換を介する分子内S-S結合形成であることが判明すれば、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥し、適当な添加剤を用いて水分の含有量を制御し、次いで、特異的ポリマーマトリックスの組成を開発することによって達成することができる。

【0177】

VCC-1およびその抗体の使用

VCC-1をコードする核酸は、組織特異的タイピングで診断剤として用いることができる。例えば、イン・サイチュハイブリダイゼーション、およびノーザンブロッティング、およびPCR分析のごとき手法を用いて、VCC-1をコードするDNAおよび/またはRNAが評価すべき細胞型に存在するか否かを判断することができる。

【0178】

VCC-1受容体抗体は、特異的細胞または組織におけるVCC-1発現用の診断アッセイで有用である。抗体は前記したVCC-1と同様にして標識し、および/または不溶性マトリックスに固定化される。

【0179】

VCC-1抗体は、組換え細胞培養または天然源からのVCC-1のアフィニティー精製で有用である。

【0180】

VCC-1およびその抗体についての適当な診断アッセイはそれ自体よく知られている。そのようなアッセイは、競合およびサンドイッチアッセイ、および立体的阻害アッセイを含む。競合およびサンドイッチアッセイは、該方法の一体化部分として相-分離工程を使用し、他方、立体的阻害アッセイは単一の反応混合物中で行う。基本的には、同一の手法が、VCC-1のアッセイで、およびVCC-1に結合する物質について用いられるが、アッセイすべき物質の分子量に応じてある種の分子が好都合である。従って、分析物に結合する抗原または抗体としてのその状態にかかわらず、テストすべき物質を分析物とここではいい、該分析物に結合する蛋白質は、それが抗体、細胞表面受容体、または抗原であるかを問わず、命名された結合蛋白質である。

【0181】

VCC-1に向けられた抗体を用いて、(例えば、細胞溶解物または細胞上澄み中の)

蛋白質を検出し、ポリペプチドの発現の豊富さおよびパターンを評価することができる。また、抗体を診断で用いて、臨床試験手法の一部として組織中の蛋白質レベルをモニターし、例えば、与えられた治療方法の効果を判断することができる。検出は、抗体を検出可能な物質にカップリングすることによって容易とすることができる。検出可能な物質の例は、種々の酵素、補欠分子基、蛍光物質、ルミネセント物質、バイオルミネセント物質、および放射性物質を含む。適当な酵素の例はホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含み；適当な補欠分子基複合体の例はストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンを含み；適当な蛍光物質の例はウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリスリンを含み；ルミネセント物質の例はルミノールを含み；バイオルミネセント物質の例はルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンを含み、および適当な放射性物質の例は<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>35</sup>Sまたは<sup>3</sup>Hを含む。

10

## 【0182】

心血管、内皮細胞、および脈管形成活性についてのアッセイ

種々のアッセイを用いて心血管、内皮細胞、および脈管形成活性につきVCC-1をテストすることができる。そのような例は後記実施例で提供するものを含む。

## 【0183】

米国特許第5,773,414号に開示されたエンドセリンアンタゴニスト活性についてテストするアッセイは、受容体アッセイにおいてヨウ素化エンドセリン-1結合を阻害するその能力につきVCC-1をテストするラット心臓心室結合アッセイ、ウサギ腎臓動脈血管平滑筋細胞を用いて放射性標識エンドセリン-1の無傷細胞結合についてテストするエンドセリン受容体結合アッセイ、二次メッセンジャーの細胞内レベルを測定することによって機能活性をラット-I細胞において測定するイノシトールリン酸蓄積アッセイ、培養された血管平滑筋においてエンドセリン-刺激アラキドン酸放出を低下させる添加化合物の能力を測定するアラキドン酸放出アッセイ、雄ニューージーランドウサギからの内皮細胞を用いるイン・ビボ(摘出血管)実験、および雄Sprague-Dawleyラットを用いるイン・ビボ実験を含む。

20

## 【0184】

組織生成活性についてのアッセイは、限定されるものではないが、WO 95/16035(骨、軟骨、腱)、WO 95/05846(神経、ニューロン)、およびWO 91/07491(皮膚、内皮)に記載されたものを含む。

30

## 【0185】

創傷-治癒活性についてのアッセイは、例えば、EaglsteinおよびMertz, J. Invest. Dermatol., 71: 382-384 (1978)の論文によって修飾されたWinter, Epidermal Wound Healing, Maibach, HI and Rovee, DT, Eds. (Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago), pp. 71-112に記載されたものを含む。

## 【0186】

いくつかの心臓肥大アッセイがある。イン・ビトロアッセイは、成体ラット真菌細胞の拡大の誘導を含む。このアッセイにおいて、心室真菌細胞は、Piperら, "Adult ventricular rat heart muscle cells" in Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research, H.M. Piper, ed. (Berlin: Springer-Verlag, 1990), pp. 36-60によって詳細に記載された手法の修飾に実質的に従って、単一(雄Sprague-Dawley)ラットから摘出される。この手法は、成体心室真菌細胞の摘出、およびロッド-形状の表現型におけるこれらの細胞の長期培養を行う。フェニレフリンおよびプロスタグランジンF<sub>2</sub>(PGF<sub>2</sub>)は、これらの成体細胞における拡大応答を誘導することが示されている。次いで、心臓肥大の種々の潜在的阻害剤によるPGF<sub>2</sub>またはPGF<sub>2</sub>アナログ(例えば、フルプロステノール)およびフェニレフリンによって誘導される真菌細胞拡大の阻害をテストする。

40

## 【0187】

50

### 腫瘍学的活性についてのアッセイ

癌については、種々のよく知られた動物モデルを用いて、腫瘍の発生および病理における V C C - 1 の役割をさらに理解し、および抗体、および小分子アンタゴニストのごとき V C C - 1 の他のアンタゴニストを含めた候補治療剤の効率をテストすることができる。

#### 【 0 1 8 8 】

そのようなモデルのイン・ビトロ性質は、それを、ヒト患者における応答を予測できるものとする。腫瘍および癌（たとえば、乳癌、結腸癌、前立腺癌、肺癌など）の動物モデルは、非 - 組換えおよび組換え（トランスジェニック）動物の双方を含む。非 - 組換え動物は、例えば、齧歯類、例えば、ネズミモデルを含む。そのようなモデルは、標準的な技術、例えば、皮下注射、尾静脈注射、脾臓移植、腹腔内移植、腎臓カプセル下での移植、またはオルトピン移植、たとえば結腸組織に移植された結腸癌細胞を用い、腫瘍細胞を同系マウスに導入することによって作り出すことができる。例えば、1997年9月18日に公開された P C T 公開番号 W O 9 7 / 3 3 5 5 1 参照。おそらくは、腫瘍学的研究で最もしばしば使用される動物種は、免疫欠損マウス、特にヌードマウスである。胸腺形成不全を持つヌードマウスは、成功してヒト腫瘍移植片用の宿主として働き得るという観察は、この目的でのその普及した用途に導く。常染色体劣性 *n u* 遺伝子は、例えば、A S W、A / H e、A K R、B A L B / c、B I O . L P、C 1 7、C M、C 5 7 B L、C 5 7、C B A、D B A、D D D、I / s t、N C、N F R、N F S、N F S 1 N、N Z B、N Z C、N Z W、P、R I I I、および S J L を含めた非常に多数のヌードマウスの区別される同系株に導入されている。加えて、ヌードマウス以外の固有の免疫学的欠陥を持つ 10  
20  
広く種々の他の動物が移植され、腫瘍移植片の受容体として用いられてきた。さらに詳細については例えば、*The Nude Mouse in Oncology*, Rese E. Boven and B. Winograd, Eds. (CRC Press, Inc., 1991) 参照。

#### 【 0 1 8 9 】

そのような動物に導入された細胞は、前記リストの腫瘍細胞系、例えば、B 1 0 4 - 1 - 1 細胞系（*n e u* プロトオンコジーンでトランスフェクトされた安定な N I H - 3 T 3 細胞系）；*r a s* - トランスフェクト N I H - 3 T 3 細胞；C a c o - 2（A T C C H T B - 3 7）；または中程度によく分化してグレード I I ヒト結腸腺癌腫細胞系 H T - 2 9（A T C C H T B - 3 8）；または腫瘍および癌からのいずれかのごとき公知の腫瘍 / 癌細胞系に由来することができる。 30

#### 【 0 1 9 0 】

腫瘍または癌細胞の試料は、液体窒素中での凍結および貯蔵を含めた標準的な条件を用い、外科処置を受けつつある患者から得ることができる。Kannaliら、*Br. J. Cancer*, 48 : 689-696(1983)。

#### 【 0 1 9 1 】

腫瘍細胞は、種々の手法によってヌードマウスのごとき動物に導入することができる。マウスにおける皮下（*s . c .*）空間は腫瘍の移植に非常に適している。腫瘍は、固体ブロックとしてトロカールの使用による針バイオプシーとして、または細胞懸濁液として移植することができる。固体 - ブロックまたはトロカール移植では、適当なサイズの腫瘍組織断片を *s . c .* 空間に導入する。細胞懸濁液は、新鮮には、初代腫瘍または安定な腫瘍細胞系から調製され、皮下注射される。腫瘍細胞は、皮下移植として注入することもできる。この場所においては、接種物は、皮膚結合組織の下部および皮下組織の間に沈積する。 40

#### 【 0 1 9 2 】

乳癌の動物モデルは、例えば、実質的に Drebinら、*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83: 9129-9133 (1986) によって記載されているごとく、（それから *i 7 e u* オンコジーンが最初に単離された）ラット神経芽腫細胞、または *n e u* - 形質転換 N I H - 3 T 3 細胞をヌードマウスに移植することによって得ることができる。

#### 【 0 1 9 3 】

同様に、結腸癌の動物モデル、動物、例えば、ヌードマウスにおいて結腸癌細胞を継代 50

することによって造ることができ、これらの動物における腫瘍の出現に導く。ヌードマウスにおけるヒト結腸癌の正常位移植片モデルは、例えば、Wangら, *Cancer Research*, 54: 4726-4728 (1994)およびToo et al. *Cancer Research*, 55: 681-684 (1995)によって記載されている。このモデルは、AntiCancer, Inc.(San Diego, California)によって販売されているいわゆる「METAMOUS5」に基づく。

#### 【0194】

動物で生起する腫瘍を取り出し、イン・ビトロで培養することができる。次いで、イン・ビトロ培養からの細胞を動物に継代する。そのような腫瘍は、さらなるテストまたはスクリーニングのための標的として働かせることができる。別法として、継代に由来する腫瘍を単離し、レ・継代細胞からの、および1以上のラウンドの継代後に単離した細胞のRNAを注目する遺伝子の異なる発現につき分析する。そのような継代技術はいずれかの公知の腫瘍または癌細胞系で行うことができる。例えば、Meth A、CNS4、CNS5、CMS21、およびWEHI-164がBALB/c雌マウス(DeLeoら, *J. Exp. Med.*, 146: 720 (1977))の化学的に誘導された線維肉腫であり、これは、種々の剤の抗腫瘍活性を調べるための高度に制御可能なモデル系を提供するPalladinoら, *J. Immunol.*, 138: 4023-4032 (1987)。簡単に述べれば腫瘍細胞をイン・ビトロにて細胞培養で増殖させる。動物への注入に先立ち、細胞系を洗浄し、約 $10 \times 10^6$ ないし $10 \times 10^7$ 細胞/mlの細胞密度にて緩衝液中で懸濁させる。次いで、動物を細胞懸濁液で皮下感染させ、1ないし3週間で腫瘍を出現させる。

10

#### 【0195】

加えて、最も徹底的に調べられた実験的腫瘍の1つであるマウスのLewis肺(3LL)癌腫を、調査腫瘍モデルとして用いることができる。この腫瘍モデルにおける効率は、肺の小肺細胞癌腫と診断された患者の治療における有益な効果と関連付けられている。この腫瘍は悪影響を受けたマウスからの腫瘍断片のまたは培養で維持された細胞の注射に際して、正常なマウスに導入することができる。Zupiら, *Br. J. Cancer*, 41: suppl. 4, 30 (1980)。腫瘍を単一の細胞さへの注入から開始させることができ、非常に高い割合の感染腫瘍細胞が生き残ることを示す証拠がある。この腫瘍についてのさらなる情報については、Zacharski, *Haemostasis*, 16:300-320 (1986)。

20

#### 【0196】

移植された腫瘍を持つ動物モデルにおけるテスト化合物の効率を評価する1つの方法は、処理の前および後に腫瘍のサイズを測定することである。伝統的には、移植された腫瘍のサイズは、二次元または三次元の滑りカリパスで測定されてきた。二次元に限定された測定が腫瘍のサイズを正確には反映せず；従って、それは、通常、数式を用いることによって対応する容量に変換される。しかしながら、腫瘍サイズの測定は非常に不正確なものである。薬物候補の治療効果は、処置-誘導増殖遅延および特異的増殖遅延として良好に記載することができる。腫瘍増殖の記載においてもう1つの重要な変数は腫瘍容量倍加時間である。RygaardおよびSpang-Thomsen, *Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals* Wu and Sheng Ed. (Basel, 1989), p. 301によって報告されたプログラムのごとき腫瘍増殖の計算および記載のためのコンピュータープログラムも利用することができる。

30

40

#### 【0197】

しかしながら、処置に続く壊死および炎症反応の結果、現実には、少なくとも初期には腫瘍サイズは増加する。従って、形態学的方法およびフローサイトメトリー分析の組合せによって注意深くこれらの変化をモニターする必要がある。

#### 【0198】

さらに、ここに同定されたVCC-1遺伝子のコーディング部分は、トランスジェニック動物を生産するための標準的な技術を用いて注目する動物のゲノムに導入することによって、組換え(トランスジェニック)動物モデルを作成することができる。トランスジェニック操作のための標的として供することができる動物は、限定されるものではないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、非-ヒト霊長類、例えば、

50

ヒヒ、チンパンジーおよびサルを含む。そのような動物にトランスジーンを導入するための当該分野で公知の技術は前核マイクロインジェクション（米国特許第4,873,191号）；生殖系へのレトロウイルス-媒介遺伝子導入（例えば、Van der Puttenら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 6148-615 (1985)）；胚幹細胞における遺伝子標的化（Thompsonら, Cell, 56: 313-321 (1989)）；胚のエレクトロポレーション（Lo, Mol. Cell. Biol., 3: 1803-1814 (1983)）；および精子-媒介遺伝子導入を含む。Lavitranoら, Cell, 57: 717-73 (1989)。レビューについては、例えば、米国特許第4,736,866号参照。

#### 【0199】

本発明の目的では、トランスジェニック動物は、それらの細胞の一部にのみトランスジーンを運ぶもの（「モザイク動物」）を含む。該トランスジーンは単一のトランスジーンとして、またはコンカテマーにて、例えば、ヘッド-ヘッドまたはヘッド-テイルタンデムにて導入することができる。また、特定の細胞型へのトランスジーンを選択的導入は、例えば、Laskoら, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89: 6232-636 (1992)の技術に従って可能である。トランスジェニック動物におけるトランスジーンの発現は、標準的な技術によってモニターすることができる。サザンブロット分析またはPCR増幅を用いて、トランスジーンを取り込みを証明することができる。次いで、イン・サイチュハイブリダイゼーション、ノーザンブロット分析、PCR、または免疫細胞化学のごとき技術を用いてmRNAの発現のレベルを分析することができる。さらに、動物を腫瘍または癌の発生の兆候につき調べる。

10

20

#### 【0200】

別法として、VCC-1をコードする内因性遺伝子および動物の胚細胞に導入された同一のポリペプチドをコードする改変されたゲノムDNAの間の相同組換えの結果として、ここに同定されたVCC-1をコードする欠陥のあるまたは改変された遺伝子を有する「ノックアウト」動物を構築することができる。VCC-1をコードするゲノムDNAの一部を欠失させ、または取り込みをモニターするのに用いることができる選択マーカーをコードする遺伝子のごときもう1つの遺伝子で置き換えることができる。典型的には、（5'および3'両末端において）数千ベースの未改変フランキングDNAをベクターに含ませる。相同組換えベクターの記載についてはThomasおよびCapecchi, Cell, 51: 503 (1987)参照。該ベクターは（例えば、エレクトロポレーションによって）胚幹細胞系に導入し、導入されたDNAが内因性DNAと相同組換えした細胞を選択する。例えば、Liら, Cell, 69: 915 (1992)参照。次いで、選択された細胞を動物（例えば、マウスまたはラット）の胚盤胞に注入して、凝集キメラを形成させる。例えば、Bradley, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. I. Robertson, ed. (IRL: Oxford, 1987), pp. 113-152参照。次いで、キメラ胚を適当な偽妊娠雌仮親動物に移植し、胚を出産まで持って行ってとして「ノックアウト」マウスを作り出す。その生殖系に相同組換えDNAを保有する子孫は、標準的な技術によって同定し、当該動物の全ての細胞が相同組換えDNAを含む動物を育種することができる。ノックアウト動物は、例えば、ある種の病理学的疾患に対して防御するその能力によって、およびVCC-1の不存在による病理学的疾患のその発生によって特徴付けることができる。

30

40

#### 【0201】

VCC-1、および他の薬物候補に特異的に結合する抗体の効力は、自然発生動物腫瘍の治療でテストすることもできる。対照群と比較した生存、応答および毒性における差についてデータを評価する。好ましくは、生命の質の改良および/または増加した寿命スパンを持つ陽性応答は、腫瘍退化の証拠を必要とするであろう。

#### 【0202】

加えて、イヌ、ネコおよびヒヒの、線維肉腫、腺癌腫、リンパ腫、軟骨腫または平滑筋腫のごとき自然発生動物腫瘍をテストすることもできる。これらのうち、イヌおよびネコにおける乳腺癌腫は、その出現および挙動がヒトにおけるものと非常に似ているので好ましいモデルである。しかしながら、このモデルの使用は、動物におけるこのタイプの腫瘍

50

の稀な発生によって制限される。

【0203】

大動脈リングアッセイを用いて、脈管形成におけるVCC-1の役割をテストすることもできる。大動脈組織のリングをコラーゲン、フィブリンまたは他のマトリックス蛋白質のゲルに埋め込み、続いて、分岐微小血管を外植する(NicosiaおよびOttinetti, Lab. Invest. 63:115, 1990)。微小血管増殖は、精製された蛋白質または抽出物、条件培地、抗体、アンチセンス阻害剤、小分子、および遺伝子-導入ウイルスベクターを含めた標的の発現または機能を変調する外因性剤の存在下または不存在下で定量することができる。

【0204】

また、角膜マイクロポケットアッセイを用いて、脈管形成におけるVCC-1の役割をテストすることもできる。脈管形成誘導因子またはテスト分子をヒドロソニ(hydron)(または同様な物質の)ペレットに導入し、縁からいくらか距離をおいた無血管角膜のポケットに外科的に移植する。該モデルは、マウス、ラットおよびウサギを含めたいくらかの種のいずれに適用することもできる。新しい血管は、縁血管系からインデューサーに向けて成長し、その際、角膜を取り出し、多数の変数の定量のために顕微鏡のスライドグラス上に置くことができる。血管の成長は、精製された蛋白質または抽出物、条件培地、抗体、アンチセンス阻害剤、小分子、および遺伝子-変換ウイルスベクターを含めた標的の発現または機能を変調する外因性剤の存在および不存在下で分析することができる。そのような剤は経口、全身または局所投与することができる。

【0205】

また、マトリゲルプラグアッセイを利用して、脈管形成におけるVCC-1の役割をテストすることもできる。脈管形成誘導因子またはテスト分子を4の液体マトリゲルに導入し、次いで、テスト動物に皮下注射し、その際、マトリゲルは、その中へ新しい血管が成長する細胞-浸透性プラグを形成する。血管の内植は、組織学的方法によって直接に、またはヘモグロビン含有量または内皮-特異的マーカーの測定によって間接的に測定することができる。結果は、精製された蛋白質または抽出物、条件培地、抗体、アンチセンス阻害剤、小分子、および遺伝子-変換ウイルスベクターを含めた標的の発現または機能を変調する外因性剤の存在下および不存在下で結果を分析する。そのような剤は、経口、全身、あるいはマトリゲルインプラント中の懸濁液による局所投与することができる。

【0206】

また、イン・オボ・ニワトリ漿尿膜(CAM)アッセイを利用して、脈管形成におけるVCC-1の役割をテストすることもできる。10日齢胚形成ニワトリ卵の殻および殻の膜中に開口を作る。脈管形成誘導因子またはテスト物質を含有するスポンジ、組織移植片または濾紙ディスクをCAMの上にのせ、窓を粘着テープでシールする。数日後、新生血管成長が実験部位で目で観察され、これは、血管分岐点を含めた多数のパラメーターによって定量することができる。結果は、そのような系、精製された蛋白質または抽出物、条件培地、抗体、アンチセンス阻害剤、小分子、および遺伝子-変換ウイルスベクターから由来するトランスフェクトされた細胞系または組織を含めた標的の発現または機能を変調する剤の存在下および不存在下で分析する。そのような剤は全身または局所投与することができる。

【0207】

また、さらなる腫瘍増殖および脈管形成アッセイを用いて、脈管形成におけるVCC-1の役割を突き止めることができる。1つのアプローチにおいて、野生型、突然変異またはアンチセンス遺伝子を過剰発現させるトランスフェクトされた細胞系を、腫瘍の形成または増殖に影響するその能力につき分析する。そのような細胞は内皮機能に影響する因子を分泌することができるか、あるいはそうでなければ、以前に証明されているごとく(Imら, Brit. J. Can. 84:1252, 2001)、新生血管形成に直接的にまたは間接的に影響する改変された表現型を呈することができる。腫瘍における脈管形成活性の程度は、微小血管密度の直接的組織学的定量によって、腫瘍-関連内皮細胞の定量によって、または内皮発現に、または血管機能に関連したmRNAまたは蛋白質の定量によって、推定することが

10

20

30

40

50

できる。また、陽電子射出断層撮影法 (PET) のごとき非侵入性技術を使用して、腫瘍における血流、血液の容量、または血管の浸透性の変化を検出することもできる。第二のアプローチにおいて、遺伝子の野生型、突然変異またはアンチセンス形態を運ぶウイルスベクターを、静脈内投与によって、または直接的腫瘍内注入、あるいはその組合せによって腫瘍を担う動物に導入し、それにより、腫瘍および血管エレメント双方の変換を可能とする。このアプローチはいくつかの遺伝子で成功したことが示されている (Regulierら, *Can. Gene Ther.* 8:45, 2001; Kuo et al., *PNAS* 98:4605, 2001)。

#### 【0208】

また、当該分野で知られた他のイン・ビトロおよびイン・ビボ心血管、内皮および脈管形成テストもここでは適切である。

#### 【0209】

さらに、抗体結合実験によって、心血管、内皮および脈管形成実験の結果を証明することができ、そこでは、心血管、内皮および脈管形成アッセイで用いられる内皮細胞または他の細胞に対する VCC-1 の効果を阻害する抗-VCC-1 抗体の能力がテストされる。抗体の例はポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二特異的、およびヘテロコンジュゲート抗体を含む。

#### 【0210】

##### 細胞 - ベースの腫瘍アッセイ

腫瘍のごとき、心血管、内皮および脈管形成障害についての細胞 - ベースのアッセイおよび動物モデルを用いて、本明細書中に記載する、心血管、内皮、脈管形成アッセイの知見を確認し、さらに、本明細書中で同定された遺伝子と、望ましくない心血管、内皮および脈管形成細胞増殖の発生および病理学との間の関係を理解することができる。望ましくない心血管、内皮および脈管形成細胞増殖、例えば、腫瘍細胞の発生および病理学における VCC-1 の役割は、VCC-1 によって刺激され、または阻害されることが同定された細胞または細胞系を用いることによってテストすることができる。

#### 【0211】

異なるアプローチにおいて、特定の心血管、内皮および脈管形成障害に関与することが知られている細胞型の細胞を VCC-1 でトランスフェクトし、過剰増殖を誘導し、または増殖を阻害する VCC-1 の能力を分析する。もし心血管、内皮および脈管形成障害が癌であれば、適当な腫瘍は、例えば、所望の遺伝子でトランスフェクトすることができ、腫瘍形成性増殖につきモニターすることができる、B 104-1-1 細胞系 (neuプロトオンコジーンでトランスフェクトされた安定な NIH-3T3 細胞系)、ras-トランスフェクト NIH-3T3 細胞のごとき安定な腫瘍細胞を含む。次いで、そのようなトランスフェクトされた細胞系を用いて、トランスフェクトされた細胞の増殖に対する細胞増殖抑制性または細胞傷害性活性を発揮させることによって、または抗体 - 依存性細胞の細胞傷害性 (ADCC) を媒介することによって、腫瘍形成性細胞増殖に対するポリ - またはモノクローナル抗体または抗体組成物の能力をテストすることができる。本明細書中で同定された遺伝子のコーディング配列でトランスフェクトされた細胞をさらに用いて、癌のごとき心血管、内皮および脈管形成障害の治療のための薬物候補を同定することができる。

#### 【0212】

加えて、トランスジェニック動物 (前記) において腫瘍から誘導された一次培養をここでの細胞 - ベースのアッセイで用いることができるが、安定な細胞系が好ましい。トランスジェニック動物から連続的細胞系を誘導する技術は当該分野でよく知られている。例えば Smallら, *Mol. Cell. Biol.*, 5: 642-648 (1985) 参照。

#### 【0213】

##### 薬物候補のためのスクリーニングアッセイ

本発明は、化合物をスクリーニングして VCC-1 を模倣する (アゴニスト) または VCC-1 の効果を妨げる (アンタゴニスト) ものを同定する方法を含む。アンタゴニスト候補のためのスクリーニングアッセイは、VCC-1 に結合するか、またはそれと複合化

10

20

30

40

50

し、あるいはそうでなければ他の細胞蛋白質とVCC-1の相互作用に干渉するように設計される。そのようなスクリーニングアッセイは、化学ライブラリーの高スループットスクリーニングに使用できるアッセイを含み、それは、それらを小分子薬物候補を同定するのに特に適切なものとする。

#### 【0214】

該アッセイは、当該分野でよく特徴付けられている蛋白質-蛋白質結合アッセイ、生化学スクリーニングアッセイ、免疫アッセイ、および細胞-ベースのアッセイを含めた種々の様式で実施することができる。

#### 【0215】

アンタゴニストについての全てのアッセイは、それらが、これらの2つの成分が相互作用するのを可能とする条件下で、かつそれに十分な時間にて、同定された核酸によってコードされたVCC-1を該候補とを接触させることを必要とする点で共通している。 10

#### 【0216】

結合アッセイにおいては、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離することができるか、あるいは反応混合物中で検出することができる。特別な具体例において、VCC-1または薬物候補は固相に、例えば、マイクロタイタープレートに、共有結合または非共有結合付着によって固定化される。

#### 【0217】

非共有結合付着は、一般に、固体の表面をVCC-1の溶液で被覆し、次いで乾燥することによって達成される。別法として、固定化すべきVCC-1に対して特異的な固定化抗体、例えば、モノクローナル抗体を用いて、それを固体の表面に係留することができる。該アッセイは、検出可能な標識によって標識することができる非-固定化成分を固定化された成分、例えば、係留された成分を含有する被覆表面に添加することによってなされる。反応が完了すると、未反応成分を、例えば、洗浄によって除去し、固体表面に係留された複合体を検出する。 20

#### 【0218】

元の非-固定化成分が検出可能な標識を担う場合、表面に固定化された標識の検出は、複合体化が起こったことを示す。元の非-固定化成分が標識を担わない場合、複合体化は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識された抗体を用いることによって検出することができる。 30

#### 【0219】

もし候補化合物がVCC-1と相互作用するが、それに結合しなければ、そのポリペプチドとのその相互作用が、蛋白質-蛋白質相互作用を検出するためのよく知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、例えば、架橋、共免疫沈殿、およびグラジエントまたはクロマトグラフィーカラムを介する共精製のごとき伝統的なアプローチを含む。加えて、蛋白質相互作用は、ChevrayおよびNathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5789-5793 (1991)によって開示されているごとき、Fieldsおよび共同研究者 (FieldsおよびSong, Nature (London), 340: 245-246 (1989); Chien et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 88: 9578-9582 (1991)) によって記載された酵母-ベースの遺伝子系によってモニターすることができる。酵母GAL4のごとき多くの転写アクチベーターは、2つの物理的に区別されるモジュラードメインよりなり、1つはDNA-結合ドメインとして作用し、他方は転写-活性化ドメインとして機能する。(一般に「2-ハイブリッド系」といわれる)以前の刊行物に記載された酵母発現系はこの特性を利用し、2ハイブリッド蛋白質を使用し、1つは、標的蛋白質をGAL4のDNA-結合ドメインに融合させるものであり、もう1つは、候補活性化蛋白質を活性化ドメインに融合させるものである。GAL4-活性化プロモーターの制御下にあるGAL1-lacZレポーター遺伝子の発現は、蛋白質-蛋白質相互作用を介するGAL4活性の復元に依存する。相互作用ポリペプチドを含有するコロニーは、p-ガラクトシダーゼに対する発色性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いる2つの特異的蛋白質の間の蛋白質-蛋白質相互作用を同定するための完全なキット(MATCHMAKER)がClontechが 40 50

ら商業的に入手可能である。

【0220】

また、この系を拡大して、特異的蛋白質相互作用に關与する蛋白質ドメインをマッピングし、ならびにこれらの相互作用に非常に重要なアミノ酸残基を突き止めることもできる。

【0221】

VCC-1 および他の細胞内または細胞外成分の相互作用に干渉する化合物は以下のごとくにテストすることができる：通常、2つの産物の相互作用および結合を可能とする条件下にて、かつそれを可能とする時間、遺伝子の産物および細胞内または細胞外成分を含有する反応混合物を調製する。結合を阻害する候補化合物の能力をテストするために、テスト化合物の不存在下および存在下で反応を行う。加えて、プラセボを第3の反応混合物に添加して、陽性対照として働かせることができる。テスト化合物および混合物中に存在する細胞内または細胞外成分の間の結合（複合体形成）は、前記したごとくモニターされる。テスト化合物を含有する反応混合物中ではなく、対照反応物における複合体の形成は、テスト化合物がテスト化合物とその反応パートナーとの相互作用に干渉することを示す。

10

【0222】

もしVCC-1が、共マイトジェンConAの存在下で内皮細胞の増殖を刺激する能力を有するならば、スクリーニング方法の1つの例はこの能力を利用する。具体的には、増殖アッセイにおいて、ヒト臍静脈内皮細胞を入手し、細胞の増殖を促進するのに適した反応混合物を補足した96-ウエルの平坦底培養プレート(Costar, Cambridge, MA)中で培養し、該混合物はCon-A(Calbiochem, La Jolla, CA)を含有する。Con-Aおよびスクリーニングすべき化合物を添加し、37°Cでのインキュベーションの後、培養を3-(H)-チミジンでパルスし、ガラス繊維フィルター(Cambridge Technology, Watertown, MA)上に収穫する。三連培養の平均3-(H)チミジン取込み(cpm)を液体シンチレーションカウンター(Beckman Instruments, Irvine, CA)を用いて測定する。有意な3-(H)チミジン取込みは、内皮細胞増殖の刺激を示す。

20

【0223】

アンタゴニストについてアッセイするには、前記したアッセイを行う；しかしながら、このアッセイにおいては、スクリーニングすべき化合物と共にVCC-1を添加し、VCC-1の存在下で3-(H)チミジン取込みを阻害する化合物の能力は、該化合物がVCC-1に対してアンタゴニストであることを示す。別法として、VCC-1および潜在的アンタゴニストとを、膜結合VCC-1受容体または組換え受容体とを組み合わせることによって、競合阻害アッセイに適した条件下でアンタゴニストを検出することができる。VCC-1の数ように、放射能によって標識することができる。受容体に結合した分子を用いて潜在的アンタゴニストの効果を測定することができる。

30

【0224】

潜在的アンタゴニストのより特異的な例は、免疫グロブリンとVCC-1との融合、および限定されるものではないがポリ-モノクローナル抗体および抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、およびそのような抗体または断片のキメラまたはヒト化バージョンならびにヒト抗体または抗体断片を含めた抗体に結合するオリゴヌクレオチドを含む。

40

【0225】

別法として、潜在的アンタゴニスト、密接に関連した蛋白質、例えば、受容体を認識するが、そのような効果を付与せず、それによりVCC-1の作用を競合的に阻害するVCC-1の突然変異形態であり得る。

【0226】

アンタゴニストについてのもう1つのアッセイにおいては、受容体を発現する哺乳動物細胞または膜調製物を、候補化合物の存在下で標識されたVCC-1と共にインキュベートする。次いで、この相互作用を増強またはブロックする化合物の能力を測定することが

50

できる。

【0227】

もう1つの潜在的ポリペプチドアンタゴニストはアンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンス構築体であり、ここでは、例えば、アンチセンス分子は標的化mRNA（またはゲノムDNA）にハイブリダイズさせ、本発明の蛋白質の翻訳またはmRNA転写を妨げることによってアンチセンス分子はmRNAの翻訳（または転写）を直接ブロックするように働く。アンチセンス技術を用いて三重ラセン形成またはアンチセンスDNAまたはRNAを通じて遺伝子発現を制御することができ、その方法は共に、ポリヌクレオチドのDNAまたはRNAへの結合に基づく。ここに成熟ポリペプチドをコードするポリペプチド配列の5'コーディング部分を用いて、長さが10ないし100塩基対のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計する。DNAオリゴヌクレオチドは転写に關与する遺伝子の領域に相補的となるように設計され（三重ラセン - - Leeら, Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooneyら, Science, 241: 456 (1988); Dervanら, Science, 251:1360 (1991)参照）、それにより、ポリペプチドの転写および生産を妨げるアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはイン・ビボでmRNAにハイブリダイズし、mRNA分子のポリペプチドへの翻訳をブロックする（アンチセンス - - Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)。また、前記したオリゴヌクレオチドはアンチセンスRNAまたはDNAをイン・ビボで発現させてポリペプチドの生産を阻害するように細胞に送達することもできる。アンチセンスDNAを用いる場合、翻訳開始部位から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチド部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の約-10および+10位置の間が好ましい。

【0228】

アンチセンスRNAまたはDNA分子は一般に、長さが少なくとも約5塩基、長さが約10塩基、長さが約15塩基、長さが約20塩基、長さが約25塩基、長さが約30塩基、長さが約35塩基、長さが約40塩基、長さが約45塩基、長さが約50塩基、長さが約55塩基、長さが約60塩基、長さが約65塩基、長さが約70塩基、長さが約75塩基、長さが約80塩基、長さが約85塩基、長さが約90塩基、長さが約95塩基、長さが約100塩基である。

【0229】

好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、長さが約5、10、15、20、25、30、35、40、45または50ヌクレオチドであり得る。アンチセンス核酸は、当該分野で公知の手法を用いる化学的合成および酵素的連結反応を用いて構築することができる。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に生じるヌクレオチド、あるいは分子の生物学的安定性を増加させるように、またはアンチセンスおよびセンス核酸の間で形成されたデュプレックス物理的安定性を増加させるように設計された種々に修飾されたヌクレオチドを用いて化学的に合成することができ、例えば、ホスホロチオエーテル誘導體およびアクリジン置換ヌクレオチドを用いることができる。アンチセンス核酸を生じさせるのに用いることができる修飾されたヌクレオチドの例は、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルケオシン、イノシン、N6-イソペンチルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルケオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、wyプトキソシン、シウドウラシル、ケオシン、2-チオシトシン、5-メチル-

2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、5 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および 2, 6 - ジアミノピリジンを含む。別法として、アンチセンス核酸を、そこへ核酸がアンチセンス向きにサブクローンされた発現ベクターを用いて生物学的に生産することができる(すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、後のサブセクションでさらに記載される注目する標的核酸に対してアンチセンス向きであろう)。

#### 【0230】

本発明のアンチセンス核酸分子は、典型的には、対象に投与されるか、あるいはそれが、本発明の選択されたポリペプチドをコードする細胞mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズする、またはそれに結合するように、イン・サイチュで作り出され、それにより、例えば、転写および/または翻訳を阻害することによって発現を阻害する。該ハイブリダイゼーションは、二重ラセンの主要溝での特異的相互作用を介して、例えば、DNAデュプレックスに結合するアンチセンス核酸分子の場合には、安定なデュプレックスを形成するための慣用的ヌクレオチド相補性によるものであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例は組織部位における直接的注入を含む。別法として、アンチセンス核酸分子は選択された細胞に標的化するように修飾することができ、次いで、全身投与することができる。例えば、全身投与では、アンチセンス分子は、例えば、細胞表面受容体または抗原に結合する、ペプチドまたは抗体に対してアンチセンス核酸分子を連結させることによって、選択された細胞表面で発現された受容体または抗原に特異的に結合するように修飾することができる。また、アンチセンス核酸分子は、本明細書中に記載したベクターを用いて細胞に送達することもできる。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するためには、アンチセンス核酸分子が強力なpolIIまたはpolIIIプロモーターの制御下におかれたベクター構築体が好ましい。

#### 【0231】

本発明のアンチセンス核酸分子はアノマー核酸分子であり得る。アノマー核酸分子は、通常のコニットとは対照的に、ストランドが相互に平行に走る(Gaultierら(1987) Nucleic Acids Res. 15:6625-6641)相補的RNAとの特異的二本鎖ハイブリッドを形成する。またはアンチセンス核酸分子は2' - o - メチルリボヌクレオチド(Inoueら(1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148)またはキメラRNA - DNAアナログ(Inoueら(1987) FEBS Lett. 215:327-330)を含むこともできる。

#### 【0232】

受容体をコードする遺伝子は、当業者に知られた多数の方法、例えば、リガンドパニング、およびFACSソーティングによって同定することができる。Coliganら, Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991)。好ましくは、発現クローニングが使用され、そこでは、ポリアデニル化RNAがVCC - 1に対して応答性の細胞から調製され、このRNAから作られたcDNAライブラリーをプールに分割し、それを用いて、COS細胞、またはVCC - 1に対して応答性ではない他の細胞をトランスフェクトする。スライドガラス上で増殖させたトランスフェクト細胞を標識されたVCC - 1に暴露する。VCC - 1は、ヨウ素化、または部位 - 特異的プロテインキナーゼ用の認識部位を含ませることを含めた種々の手段によって標識することができる。固定化およびインキュベーションに続き、該スライドをオートラジオグラフィに付す。陽性プールが同定され、サブ - プールが調製され、相互作用性のサブ - プーリングおよび再 - スクリーニングプロセスを用いて再度トランスフェクトし、結局は、推定受容体をコードする単一のクローンが得られる。受容体同定用の別のアプローチとして、VCC - 1を、受容体分子を発現する細胞膜または抽出物調製物とを光親和性結合させることができる。架橋した物質は、PAGEによって96に分解され、X - 線フィルムに露出される。受容体を含む標識された複合体を切り出し、ペプチド断片に分解し、蛋白質ミクロ配列決定に付す。ミクロ配列決定から得られたアミノ酸配列を用いて、cDNAライブラリーをスクリーニングして、推定受容体をコードする遺伝子を同定するための縮重オリゴヌクレオチドプローブの組を

設計することができる。

【0233】

治療すべき心血管、内皮および脈管形成障害のタイプ

本明細書中に記載した心血管、脈管形成および内皮アッセイにおいて活性を有する、および/またはその遺伝子産物が心血管系に局所化することが見出されているVCC-1、またはそれに対するアゴニストまたはアンタゴニストは、糖尿病のごとき血管に影響する全身疾患を含めた、種々の心血管、内皮および脈管形成障害において治療的用途を有するようである。その治療的用途は、動脈、毛細血管、静脈および/またはリンパ系の病気を含む。治療の例は、筋肉浪費病の治療、骨粗鬆症の治療、インプラントの周りの細胞の増殖を刺激し、従って、その意図した部位へのその付着を促進するインプラント固定の援助、組織または血清中でのIGF安定性の増加、もし適用可能であれば、IGF受容体への結合の増加を含む(というのは、IGFは、ヒト骨髄赤血球および顆粒球先祖細胞増殖をインビトロで増強することが示されているからである)。

10

【0234】

VCC-1またはそれに対するアゴニストまたはアンタゴニストを使用して、造血または造顆粒球を刺激し、創傷治癒または組織再生および結合組織、皮膚、骨、軟骨、筋肉、肺または腎臓のごとき組織の再成長に関連する治療を促進し、脈管形成を促進し、内皮細胞の移動を刺激し、または阻害し、血管平滑筋の成長および内皮細胞の生産を増殖させることもできる。VCC-1またはアゴニストによって媒介される脈管形成の増加は、虚血性組織、および冠動脈狭窄に引き続いての心臓における副行冠動脈発生に有益である。

20

【0235】

アンタゴニストを用いてそのようなポリペプチドの作用を阻害して、例えば、創傷治癒の間に過剰結合組織の生産、またはもしVCC-1がそのような生産を促進するならば肺線維症を制限する。これは、急性心筋梗塞および心疾患の治療を含む。

【0236】

さらに、本発明は、治療上有効量のVCC-1、またはそれに対するアゴニストまたはアンタゴニストを投与することによる、基礎となる原因にかかわらず、心臓肥大の治療を提供する。

【0237】

もし目的がヒト患者の治療であれば、VCC-1は、好ましくは、組換えヒトVCC-1ポリペプチド(rhVCC-1ポリペプチド)である。心臓肥大に対する治療は、心筋梗塞、高血圧、肥大性心筋障害、および弁逆流を含めた、種々の多様な病理学的疾患に由来し得る、その種々の段階のいずれかで行うことができる。該治療は、基礎となる心疾患にかかわらず、心筋の構造的損傷を伴う、または伴わない心臓肥大の進行の全ての段階まで拡大される。

30

【0238】

当該分子に対するアンタゴニストとは反対に、いずれかの特定の適応症につき当該分子それ自体またはそのアゴニストを使用するか否かの判断は、主として、本明細書中に記載した分子が心血管形成、内皮細胞の形成、または脈管形成を促進するか、またはこれらの疾患を阻害するかに依存するであろう。例えば、もし分子が脈管形成を促進するならば、そのアンタゴニストは、脈管形成を制限または阻害するのが望ましい障害の治療で有用であろう。そのような障害の例は血管腫、腫瘍脈管形成、糖尿病性網膜障害または未成熟幼児網膜障害または黄斑変性に関連した網膜、脈絡膜、または角膜における血管新生、慢性関節リウマチ、クローン病、アテローム性動脈硬化症、卵巣過剰刺激、乾癬、血管新生に関連する子宮内膜症、バルーン血管形成に引き続いての狭窄、傷跡組織過剰生産、例えば、外科処理後に形成されるケロイド、心筋梗塞後の線維症、または肺線維症に関連する線維症巣で観察されるものを含む。

40

【0239】

しかしながら、分子が脈管形成を阻害するならば、前記疾患の治療で直接的に使用されることが期待される。

50

## 【0240】

他方、もし分子が脈管形成を刺激するならば、それは、末梢血管病、高血圧、炎症性脈管炎、レイナード病およびレイナード現象、動脈瘤、動脈狭窄、血栓性静脈炎、創傷治癒および組織修復、虚血性再灌流負傷、狭心症、急性心筋梗塞のごとき心筋梗塞、慢性心臓疾患、鬱血性心不全のごとき心不全、および骨粗鬆症のような、脈管形成が望まれる適応症でそれ自体（またはそのアゴニスト）が用いられるであろう。

## 【0241】

しかしながら、もし分子が脈管形成を阻害すれば、そのアンタゴニストは、脈管形成が望まれる疾患の治療で用いられるであろう。

## 【0242】

VCC-1またはそのアゴニストまたはアンタゴニストが血管-関連薬物標的化で、または障害の治療または予防用の治療標的として働くことができる特定のタイプの病気を以下に記載する。

## 【0243】

アテローム性動脈硬化症は、脂質の蓄積、平滑筋細胞の増殖、および動脈壁内の繊維状組織の形成による、動脈中に内膜厚化のプラークの蓄積によって特徴付けられる病気である。該病気はいずれの器官においても大きい、中程度、および小さな動脈に影響し得る。内皮および血管平滑筋細胞機能の変化は、これらのプラークの蓄積および退行を変調するにおいて重要な役割を演じることが知られている。

## 【0244】

高血圧は、全身動脈、肺動脈、または門静脈系における上昇した血管の圧力によって特徴付けられる。上昇した圧力は、損なわれた内皮機能および/または血管病に由来するか、またはその結果であり得る。

## 【0245】

炎症性血管炎は、巨細胞性動脈炎、高安動脈炎、(微小血管症性形態を含めた)結節性多発性動脈炎、川崎病、顕微鏡的多発血管炎(microscopic polyarthritis)、ウェグナー肉芽腫症、および(ヘノッホ-シェンライン紫斑病を含めた)種々の101の感染関連の血管障害を含む。改変された内皮細胞機能は、これらの病気において重要であることが示されている。レイノー病およびレイノー現象は、寒気への暴露に際して四肢を通じての循環の間欠的異常損傷によって特徴付けられる。改変された内皮細胞機能はこの病気で重要であることが示されている。

## 【0246】

動脈瘤は、改変された内皮細胞および/または血管平滑筋細胞に関連する動脈または静脈系の嚢状または紡錘状の拡張である。

## 【0247】

動脈再狭窄(動脈壁の再狭窄)は、内皮および血管平滑筋細胞の機能および増殖の変化の結果として血管形成後に起こり得る。

## 【0248】

血栓性静脈炎およびリンパ管炎は、各々、静脈およびリンパ系の炎症性障害であり、それは改変された内皮細胞機能に由来する、および/または内皮細胞機能を改変する。同様に、リンパ浮腫は、内皮細胞機能に由来する損なわれたリンパ管に関連する疾患である。

## 【0249】

良性および悪性血管腫瘍のファミリーは、血管系の異常な増殖および細胞エレメントの成長によって特徴付けられる。例えば、リンパ管腫はリンパ系の良性腫瘍であり、それは新生児において通常発生するリンパ管の先天性の、多くの場合に嚢胞性の先天性異常である。

## 【0250】

嚢腫は、隣接する組織に増殖する傾向がある。嚢腫は、通常、頸部および腋窩領域で起こる。また、それらは四肢の軟組織で起こり得る。主な症状は結合組織によって囲まれた膨張した、時々細網状構造のリンパ管およびリンパ嚢腫である。

10

20

30

40

50

## 【0251】

リンパ管腫は、不適切に連結した胚のリンパ管またはそれらの欠損によって引き起こされると推測される。その結果は障害された局所的なリンパ排液である。

## 【0252】

このプロセスは新しい血管の増殖に依存する。腫瘍血管形成に関与する新生物および関連する疾患の例には、乳癌腫、肺癌腫、胃癌腫、食道癌腫、結直腸癌腫、肝臓癌腫、卵巣癌腫、莖膜腫、男性胚腫、子宮頸部癌腫、子宮内膜癌腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、線維肉芽腫、絨毛癌腫、頭頸部癌、上咽頭癌腫、喉頭癌腫、肝芽細胞腫、カポジ肉腫、黒色腫、皮膚癌腫、血管腫、海綿状血管腫、血管芽細胞腫、脾臓癌腫、網膜芽細胞腫、星状細胞腫、膠芽腫、シュワン細胞腫、乏突起細胞腫、髄芽腫、神経芽腫、横紋筋肉腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、尿路癌腫、甲状腺癌腫、ウィルム腫瘍、腎細胞癌腫、前立腺癌腫、母斑症と関連した異常血管増殖、(脳腫瘍と関連した)浮腫およびメージュ症候群が含まれる。

10

## 【0253】

また、該化合物は、網膜炎、結膜炎、(糖尿病性網膜症を含めた)網膜症、ブドウ膜炎、眼の羞明、(緑内障を含めた)眼内圧上昇に関連した疾患、サルコイドーシス、(湿潤型の黄斑変性および乾燥型の変性を含めた)黄斑変性、眼の新血管新生、(創傷または感染後の新血管新生を含めた)網膜新生血管、角膜移植後拒絶反応、水晶体後線維増殖、(白内障手術、網膜剥離手術、レンズ移植手術、角膜移植手術および屈折矯正手術を含めた)眼手術後の炎症、眼瞼炎、眼内炎、上鞏膜炎、角膜炎、角結膜炎、乾性角結膜炎、モーレン潰瘍、黄斑浮腫、手術中の縮瞳、眼疼痛、および眼組織への急性損傷のものごとき眼疾患の治療において有用となるであろう。

20

## 【0254】

加齢黄斑変性症(AMD)は、高齢者集団の重度の視覚的損失の主要原因である。AMDの浸出性形態は、脈絡膜の新血管新生および網膜色素上皮細胞の分離により特徴付けられる。脈絡膜の新血管新生が予後における劇的な悪化と関連付けられるために、それに対するVCC-1アゴニストは、AMDの重症度の低下に有用であると期待される。

## 【0255】

また、創傷治癒および組織修復のごとき外傷の治癒は、VCC-1またはそのアゴニストについて標的とされる用途である。新しい血管の形成および後退は組織治療および修復に不可欠である。このカテゴリーには、創傷治癒ならびに組織の修復および置換と同様に、骨、軟骨、腱、靭帯および/または神経組織の増殖もしくは再生、ならびにバムス(bu ms)、切開および潰瘍の処置が含まれる。

30

## 【0256】

骨が通常形成されない環境下で軟骨および/または骨の成長を誘導するVCC-1アゴニストまたはそのアンタゴニストは、ヒトおよび他の動物における骨折ならびに軟骨の傷害もしくは欠損の治癒において適用を有する。VCC-1またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを使用するかかる製剤は、皮下骨折ならびに開放骨折の減少において、および人工関節の固定の改善においも予防的な用途を有する。骨形成薬剤によって誘導された新たな骨形成は、先天性の外傷性に誘導されたか、あるいは腫瘍学的な切除で誘導された頭蓋顔面の欠損の修復に寄与し、また、美容形成外科において有用である。

40

## 【0257】

また、VCC-1またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、限定なくして、圧潰瘍、血管不全と関連した潰瘍、外科的および外傷性の創傷等を含めた治癒していない創傷のより良好または速い閉鎖を促すのに有用であり得る。

## 【0258】

VCC-1アゴニストまたはそのアンタゴニストは、(例えば、脾臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚または内皮を含めた)器官、筋肉(平滑筋、骨格筋、心筋)ならびに(血管内皮を含めた)血管組織のごとき他の組織の生成または再生、あるいはかかる組織を含めた細胞の増殖を促すための活性を阻害することが期待される。所望の効果の一部は、正常組織が

50

再生することを可能にするような線維性の瘢痕の阻害または変調によるものであり得る。

【0259】

また、VCC-1アゴニストまたはそのアンタゴニストは、腸の保護もしくは再生および肺または肝臓の線維症、ならびに種々の組織における再灌流傷害および全身性のサイトカイン損傷に起因する疾患の治療に有用であり得る。また、VCC-1またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、前駆体の組織または細胞からの前記の組織の分化を促すかまたは阻害する、あるいは前記の組織増殖を阻害するのに有用であり得る。

【0260】

また、VCC-1アゴニストまたはそのアンタゴニストは、歯周病の治療および他の歯修復プロセスに用いることができる。かかる剤は、骨形成 (bone-forming) 細胞を引き付け、骨形成細胞の増殖を刺激するか、あるいは骨形成細胞の前駆体の分化を誘導するための環境を提供できる。また、VCC-1またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、血管が骨のターンオーバーおよび増殖の調節に重要な役割を演じるので、骨および/または軟骨の修復の刺激を介して、または炎症性プロセスにより媒介された組織破壊 (コラゲナーゼ活性、破骨細胞活性等) の炎症もしくはプロセスをブロックすることによって、骨粗鬆症または変形関節炎の治療において有用であり得る。

【0261】

VCC-1またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストに起因し得る他のカテゴリーの組織再生活性は、腱/靭帯形成である。かかる組織が通常形成されない環境下で腱/靭帯様組織または他の組織形成を誘導する蛋白質は、ヒトおよび他の動物において、腱または靭帯の断裂、変形および他の腱もしくは靭帯欠損の治療における適用を有する。かかる製剤は、腱または靭帯組織への損傷を防止するための予防的用途ならびに、腱または靭帯の骨または他の組織へ固定の改善および腱または靭帯組織への欠損の修復における用途を有する。VCC-1またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストの組成物により誘導された新たな腱/靭帯様組織形成は、先天性の外傷性に誘導された、もしくは他の腱または他の起源の靭帯欠損の修復に寄与し、また、腱もしくは靭帯の付着または修復のための美容形成外科においても有用である。本明細書の組成物は、組織修復を達成するような *in vivo* でのリターンのために生体外にて、腱 または靭帯 形成細胞を誘引する、腱

または靭帯 形成細胞の増殖を刺激する、腱 または靭帯 形成細胞の前駆体の分化を誘導する、あるいは腱/靭帯細胞もしくは前駆体の増殖を誘導する環境を提供できる。また、本明細書中の組成物は、腱炎、手根管症候群および他の腱の治療または靭帯の欠損に有用であり得る。また、該組成物は、当該技術分野においてよく知られた担体として、適当なマトリックスおよび/または金属イオン封鎖剤 (sequestering agent) を含むことができる。

【0262】

また、VCC-1またはそのアゴニストは、神経細胞の増殖ならびに神経および脳組織の再生、すなわち、中枢および末梢神経系疾患ならびに神経障害、ならびに神経細胞または神経組織に対する変性、死滅または外傷を含む機械的および外傷性の障害の治療のために有用であり得る。より詳細には、VCC-1またはそのアゴニストは、末梢神経系の疾患、例えば、末梢神経損傷、末梢神経障害および局在性神経障害の治療、および中枢神経系疾患、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症およびシャイ-ドレーガー症候群の治療に用いることができる。本発明に従い治療できるさらなる疾患には、脊髄障害、頭部外傷、および脳卒中のごとき脳血管障害のような機械的および外傷性の疾患が含まれる。また、化学療法または他の薬物療法に起因する末梢神経ニューロパシーはVCC-1アゴニストまたはそのアンタゴニストを用いて治療可能であり得る。

【0263】

乏血再灌流傷害はもう一つの適応症である。内皮細胞機能不全は、乏血再灌流傷害後に生じた事象の後遺症の開始および調節の双方において重要であり得る。

【0264】

10

20

30

40

50

慢性関節リウマチはさらなる適応症である。血管増殖および脈管構造を介する炎症性細胞のターゲティングは、リウマチ様および血清 - 陰性形態の関節炎の発病において重要な成分である。

【0265】

また、VCC-1またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、無症候性患者の死亡を含めて、心臓肥大の患者に予防的に投与でき、該疾患の進行を防止し、突然死を回避できる。かかる予防的な治療は、広範囲の左心室心肥大（成人における35mm以上の最大壁厚、または小児において匹敵する値）と診断された患者のケースにおいて、あるいは例えば、心臓における血行力学的負担が特に強力である場合に特に保証される。

【0266】

また、VCC-1またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、肥大型心筋症と診察された患者のかなりの部分において発生する心房細動の管理にも有用であり得る。さらなる適応症には、狭心症、急性心筋梗塞のごとき心筋梗塞、およびうっ血性心不全のごとき心不全が含まれる。新生物ではないさらなる疾患には、乾癬、未熟児網膜症を含めた糖尿病および他の増殖性網膜症、水晶体後繊維増殖、血管新生緑内障、（グレーヴス病を含めた）甲状腺過形成、角膜および他の組織移植、慢性炎症、肺炎症、ネフローゼ症候群、子癇前症、腹水、（心膜炎に関連した）心外膜液および胸水が含まれる。

【0267】

上記を考慮すると、内皮細胞の機能、増殖および/または形態を改変するまたはそれに影響することが示された本明細書に記載されたVCC-1またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、多数または全ての前記の障害の病因学および病原論において重要な役割を演じるようであり、それ自体がこれらの障害におけるこれらのプロセスを増強もしくは阻害するためまたは血管関連薬物ターゲティングのための治療標的として機能できる。

【0268】

診断アッセイ

生物学的試料中の本発明のポリペプチドまたは核酸の存在または不存在を検出するための例示的な方法は、テスト対象から生物学的試料を入手し、該生物学的試料を、本発明のポリペプチドまたは核酸の存在が生物学的試料中で検出されるように、本発明のポリペプチドまたは核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）を検出できる化合物または剤と接触させることを含む。VCC-1ポリペプチドをコードするmRNAまたはゲノムDNAを検出するための好ましい剤は、VCC-1ポリペプチドをコードするmRNAまたはゲノムDNAにハイブリダイズすることができる標識された核酸プローブである。核酸プローブは、例えば、配列番号：1の核酸のごとき全長cDNA、または長さが少なくとも15、30、50、100、250または500ヌクレオチドであって、VCC-1ポリペプチドをコードするmRNAまたはゲノムDNAにストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチドのようなその部分であり得る。本発明の診断アッセイで用いられる他の適当なプローブは本明細書中に記載する。

【0269】

VCC-1ポリペプチドを検出するための好ましい剤は、VCC-1ポリペプチドに結合することができる抗体、好ましくは、検出可能な標識を持つ抗体である。抗体は、ポリクローナルまたはより好ましくはモノクローナルであり得る。無傷抗体、またはその断片（例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>）を用いることができる。プローブまたは抗体に関連して、用語「標識された」とは、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリングさせる（すなわち、物理的に連結される）ことによるプローブまたは抗体の直接的標識、ならびに直接的に標識されるもう1つの試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接的標識を含むことを意図する。間接的標識の例は、それが蛍光標識ストレプトアビジンで検出することができるように、蛍光標識二次抗体を用いる一次抗体、およびビオチンでのDNAプローブの末端 - 標識の検出を含む。用語「生物学的試料」は、対象から単離された組織、細胞および生物学的流体、ならびに対象内に存在する組織、細胞および流体を含むことを意図する。すなわち、本発明の検出方法を用いて、イン・ビトロならびにイン・ビ

10

20

30

40

50

ボにて生物学的試料中の mRNA、蛋白質またはゲノム DNA を検出することができる。例えば、mRNA の検出用のイン・ビトロ技術は、ノーザンハイブリダイゼーションおよびイン・サイチュハイブリダイゼーションを含む。VCC-1 ポリペプチドの検出用のイン・ビトロ技術は酵素結合イムノソルベント検定 (ELISA)、ウェスタンブロット、免疫沈殿および免疫蛍光を含む。ゲノム DNA の検出用のイン・ビトロ技術はサザンハイブリダイゼーションを含む。さらに、VCC-1 ポリペプチドの検出用のイン・ビボ技術は、ポリペプチドに向けられた標識抗体を対象に導入することを含む。例えば、抗体は、対象におけるその存在および位置が標準的なイメージング技術によって検出することができる放射性マーカーで標識することができる。

**【0270】**

1つの具体例において、生物学的試料はテスト対象からの蛋白質分子を含む。あるいは、生物学的試料は、テスト対象からの mRNA 分子、またはテスト対象からのゲノム DNA 分子を含むことができる。好ましい生物学的試料は、対象から慣用的な手段によって分離された抹消血液リンパ球試料である。

**【0271】**

もう1つの具体例において、該方法は、さらに、対照対象から対照生物学的試料を入手し、該対照試料を、ポリペプチド、またはポリペプチドをコードする mRNA またはゲノム DNA の存在が生物学的試料中で検出されるように、VCC-1 ポリペプチド、または VCC-1 ポリペプチドをコードする mRNA またはゲノム DNA を検出することができる化合物または剤と接触させ、次いで、対照試料におけるポリペプチド、またはポリペプチドをコードする mRNA またはゲノム DNA の存在を、テスト試料中のポリペプチド、またはポリペプチドをコードするゲノム DNA の存在と比較することを含む。

**【0272】**

また、本発明は、生物学的試料 (テスト試料) 中の本発明のポリペプチドまたは核酸の存在を検出するためのキットも含む。そのようなキットを用いて、対象が、VCC-1 ポリペプチドの異常な発現に関連する疾患 (例えば、アンドロゲン - 非依存性前立腺癌) に罹患しているか、またはそれを発症する危険性が増大しているかを判断することができる。例えば、該キットは、生物学的試料中のポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする mRNA を検出することができる標識された化合物または剤、および試料中のポリペプチドまたは mRNA の量を測定するための手段 (例えば、ポリペプチドに結合する抗体、またはポリペプチドをコードする DNA または mRNA に結合するオリゴヌクレオチドプローブ) を含むことができる。また、キットは、もしポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする mRNA の量が正常レベルを超えるまたはそれ未満であるならば、テストする対象が、ポリペプチドの異常な発現に関連する障害に罹患しているか、またはそれを発症する危険性があることが観察するための指令書を含むこともできる。

**【0273】**

抗体 - ベースのキットのためには、該キットは、例えば、(1) VCC-1 ポリペプチドに結合する (例えば、固体支持体に結合した) 第一の抗体; および、所望により、(2) ポリペプチドまたは第一の抗体いずれかに結合し、検出可能な剤にコンジュゲートする第二の異なる抗体を含むことができる。

**【0274】**

オリゴヌクレオチド - ベースのキットについては、該キットは、例えば、(1) VCC-1 ポリペプチドをコードする核酸配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、例えば、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチド、または (2) VCC-1 ポリペプチドをコードする核酸分子を増幅するのに有用なプライマーの対を含むことができる。

**【0275】**

また、該キットは、例えば、緩衝剤、保存剤、または蛋白質安定化剤も含むことができる。また、該キットは、検出可能な剤 (例えば、酵素または基質) を検出するのに必要な成分を含むこともできる。また、該キットは、アッセイすることができ、含まれるテスト試料と比較することができる対照試料または一連の対照試料を含むこともできる。キット

10

20

30

40

50

の各成分は、通常、個々の容器内に含まれ、種々の容器の全ては、テストされる対象がポリペプチドの異常な発現に関連する障害に罹っているか、またはそれを発症する危険性があるか否かを観察するための指令書と共に単一のパッケージ内にある。

#### 【0276】

##### 予後アッセイ

本明細書中に記載される方法は、さらに、診断または予後アッセイとして利用して、VCC-1ポリペプチドの異常な発現または活性に関連する病気または障害を有する、またはそれを発症する危険性がある対象を同定することができる。例えば、これまでの診断アッセイまたは後に述べるアッセイのごとき本明細書中に記載したアッセイを利用して、VCC-1ポリペプチドの異常な発現または活性に関連した障害を有する、またはそれを発症する危険性がある対象を同定することができる。別法として、予後アッセイを利用して、そのような病気または障害を有する、それを発症する危険性がある対象を同定することができる。かくして、本発明は、テスト試料が対象から得られ、本発明のポリペプチドまたは核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）が検出される方法を提供し、ここに、ポリペプチドまたは核酸の存在は、該ポリペプチドの異常な発現または活性に関連する病気または障害を有する、またはそれを発症する危険性のある対象に対する診断である。本明細書中で用いるごとく、「テスト試料」とは、注目する対象から得られた生物学的試料をいう。例えば、テスト試料は生物学的流体（例えば、血清）、細胞試料または組織であり得る。

#### 【0277】

さらに、本明細書中に記載された予後アッセイを用いて、VCC-1ポリペプチドの異常な発現または活性に関連した病気または障害を治療するために、対象に剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメティック、蛋白質、ペプチド、核酸、小分子、または他の薬物候補）を投与できるか否かを判断することができる。例えば、そのような方法を用いて、対象を特異的な剤または剤のクラス（例えば、ポリペプチドの活性を減少させるタイプの剤）で効果的に治療できるか否かを判断することができる。かくして、本発明は、VCC-1ポリペプチドの異常な発現または活性に関連した障害につき対象を剤で効果的に治療できるか否かを判断する方法を提供し、そこでは、テスト試料が得られ、ポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする核酸が検出される（例えば、剤を投与して、ポリペプチドの異常な発現または活性に関連する障害を治療できるポリペプチドまたは核酸の存在は対象についての診断である）。

#### 【0278】

また、本発明の方法を用いて、遺伝的損傷、または本発明の遺伝子中の突然変異を検出し、それにより、損傷遺伝子を持つ対象が、VCC-1ポリペプチドの異常な発現または活性で特徴付けられる障害について危険性があるかを判断する。好ましい具体例においては、該方法は、対象からの細胞の試料中にて、VCC-1ポリペプチドをコードする遺伝子の完全性に影響する改変、またはVCC-1ポリペプチドをコードする遺伝子の誤発現の少なくとも1つによって特徴付けられる遺伝子損傷または突然変異の存在または不存在を検出することを含む。例えば、そのような遺伝子損傷または突然変異は、1) 遺伝子からの1以上のヌクレオチドの欠失；2) 遺伝子への1以上のヌクレオチドの付加；3) 遺伝子の1以上のヌクレオチドの置換；4) 遺伝子の染色体再配列；5) 遺伝子のメッセンジャーRNA転写体のレベルの改変；6) ゲノムDNAのメチル化パターンのごとき遺伝子の異常な修飾；7) 遺伝子のメッセンジャーRNA転写体の非-野生型スプライシングパターンの存在；8) 遺伝子によってコードされた蛋白質の非-野生型レベル；9) 遺伝子の対立遺伝子喪失；および10) 遺伝子によってコードされる蛋白質の不適切な翻訳後修飾のうちの少なくとも1つの存在を確認することによって検出することができる。本明細書中に記載するごとく、遺伝子中の損傷を検出するのに用いることができる、当該分野で知られた非常に多数のアッセイ技術がある。

#### 【0279】

ある具体例においては、病巣の検出は、アンカーPCRまたはRACE PCRのごと

きポリメラーゼ鎖反応 (PCR) (例えば、米国特許第 4, 683, 195 号および第 4, 683, 202 号参照) における、あるいは別法として、連結鎖反応 (LCR) (例えば、Landegranら (1988) *Science* 241:1077-1080; および Nakazawaら (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:360-364 参照) におけるプローブ/プライマーの使用を含む、その後者は遺伝子中の突然変異を検出するのに特に有用であり得る (Abravayaら (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:675-682 参照)。この方法は、患者から細胞の試料を収集し、試料の細胞から核酸 (例えば、ゲノム、mRNA または双方) を単離し、核酸試料を、(もし存在すれば) 遺伝子のハイブリダイゼーションおよび増幅が起こるような条件下で選択された遺伝子に特異的にハイブリダイズする 1 以上のプライマーと接触させ、次いで、増幅産物の存在または不存在を検出するか、あるいは増幅産物のサイズを検出し、次いで、長さを対照試料と比較する工程を含むことができる。PCR および/または LCR は、本明細書中に記載した突然変異を検出するのに用いる技術のいずれかと組み合わせて予備的増幅工程として用いるのが望ましいであろう。

10

**【0280】**

別の増幅方法は：自己保持配列複製 (Guatelliら (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878)、転写増幅システム (Kwohら (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177)、Q-ベータレプリカーゼ (Lizardiら (1988) *Bio Technology* 6:1197)、またはいずれかの他の核酸増幅方法、続いての、当業者によく知られた技術を用いての増幅された分子の検出を含む。これらの検出スキームは、もしそのような分子が非常に少数で存在するならば、核酸分子の検出で特に有用である。

20

**【0281】**

別の具体例において、試料細胞からの選択された遺伝子中の突然変異は、制限酵素切断パターンにおける改変によって同定することができる。例えば、試料および対照 DNA を単離し、所望により増幅し、1 以上の制限エンドヌクレアーゼで消化し、次いで、断片の長さサイズをゲル電気泳動によって測定し、比較する。試料および対照 DNA の間の断片長さサイズの差は、試料 DNA 中の突然変異を示す。さらに、配列特異的リボザイム (例えば、米国特許第 5, 498, 531 号参照) の使用を用いて、リボザイム切断部位の発生または喪失によって特異的突然変異の存在につきスコア取りすることができる。

**【0282】**

他の具体例において、遺伝子突然変異は、試料および対照核酸、DNA または RNA を、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含有する高密度アレイにハイブリダイズさせることによって同定することができる (Croninら (1996) *Human Mutation* 7:244-255; Kozalら (1996) *Nature Medicine* 2:753-759)。例えば、遺伝子突然変異は、Croninら (前掲) に記載された光-発生 DNA プローブを含有する二次元アレイで同定することができる。簡単に述べれば、プローブの第一のハイブリダイゼーションアレイを用いて、試料および対照中の DNA の長いストレッチを通じてスキャンして、連続的重複プローブの線状アレイを作成することによって配列間の塩基変化を同定することができる。この工程は、点突然変異の同定を可能とする。この工程に続いて、検出される全ての変種または突然変異に対して相補的なより小さく特殊化されたプローブアレイを用いる特異的突然変異の特徴付けを可能とする第二のハイブリダイゼーションアレイを行う。各突然変異アレイは平行プローブ組よりなり、1 つは野生型遺伝子に相補的であって、他方は突然変異体遺伝子に対して相補的である。

30

40

**【0283】**

さらにもう 1 つの具体例において、当該分野で公知の種々の配列決定反応のうちのいずれかを用いて、選択された遺伝子を直接配列決定し、試料の核酸の配列を対応する野生型 (対照) 配列と比較することによって突然変異を検出することができる。配列決定反応の例は、Maxim および Gilbert (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560) または Sanger (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463) によって開発された技術に基づくものを含む。また、種々の自動配列決定手法のいずれかを、質量分析による配列決定を含めた診断アッセイを行う場合に利用することができると考えられる (1995) *Bio Techniques*

50

19:448) (例えば、PCT出願公開番号WO 94/16101; Cohenら (1996) Adv. Chromatogr. 36:127-162; およびGriffinら (1993) Appl. Biochem. Biotechnol. 38:147-159)。

#### 【0284】

選択された遺伝子において突然変異を検出するための他の方法は、切断剤からの保護を用いて、RNA/RNAまたはRNA/DNAヘテロデュプレックスにおけるミスマッチ塩基を検出する方法を含む(Myersら (1985) Science 230:1242)。一般に、ミスマッチ切断の技術は、野生型配列を含む(標識された)RNAまたはDNAを、組織試料から得られた潜在的な突然変異体RNAまたはDNAとハイブリダイズさせることによって形成されたヘテロデュプレックスを供することを含む。二本鎖デュプレックスを、対照および試料ストランドの間の塩基対ミスマッチにより存在するときデュプレックスの一本鎖領域を切断する剤で処理する。RNA/DNAデュプレックスをRNaseで処理してミスマッチ領域を消化することができ、DNA/DNAハイブリッドをS1ヌクレアーゼで処理して、ミスマッチ領域を消化することができる。他の具体例において、DNA/DNAまたはRNA/DNAデュプレックスをヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウム、およびピペリジンで処理して、ミスマッチ領域を消化することができる。ミスマッチ領域の消化の後に、次いで、変性ポリアクリルアミドゲルでのサイズによって得られた物質を分離して、突然変異の部位を決定する。例えば、Cottonら (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397; Saleebaら (1992) Methods Enzymol. 217:286-295参照。好ましい具体例において、対照DNAまたはRNAを検出のために標識することができる。

10

20

#### 【0285】

さらにもう1つの具体例において、ミスマッチ切断反応は、細胞の試料から得られたcDNA中の点突然変異を検出し、それをマッピングするための規定されたシステムにおいて、二本鎖DNAにおけるミスマッチ塩基対を認識する1以上の蛋白質を使用する(いわゆるADNAミスマッチ修復酵素)。例えば、E. coliのmutY酵素はG/AミスマッチのAを切断し、HeLa細胞からのチミジンDNAグリコシラーゼはG/TのTを切断する(Hsuら (1994) Carcinogenesis 15:1657-1662)。例示的具體例に従うと、選択された配列、例えば、野生型配列に基づくプローブを、テスト細胞からのcDNAまたは他のDNA産物にハイブリダイズさせる。該デュプレックスをDNAミスマッチ修復酵素で処理し、もしあれば、切断産物を、電気泳動プロトコル等から検出することができる。例えば、米国特許第5,459,039号参照。

30

#### 【0286】

他の具体例において、電気泳動移動度の変化を用いて、遺伝子中の突然変異を同定する。例えば、一本鎖立体配座多形(SSCP)を用いて、突然変異体および野生型核酸の間の電気泳動移動度の差を検出することができる(Oritaら (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2766; Cotton (1993) Mutat. Res. 285:125-144; Hayashi (1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9:73-79)。試料および対照核酸の一本鎖DNA断片を変性し、再生させる。一本鎖核酸の二次構造は配列に従って変化し、電気泳動移動度における得られた変化は、単一塩基の変化さえも検出を可能とする。DNA断片を標識し、標識されたプローブで検出することができるアッセイの感度は(DNAよりはむしろ)RNAを用いることによって増強することができ、ここに、二次構造は配列の変化に対してより感受性である。好ましい具体例において、主題の方法はヘテロデュプレックス分析を利用して、電気泳動移動度における変化に基づいて二本鎖ヘテロデュプレックス分子を分離する(Keenら (1991) Trends Genet. 7:5)。

40

#### 【0287】

さらにもう1つの具体例において、変性剤のグラジエントを含むポリアクリルアミドゲルにおける突然変異体または野生型断片の移動を、変性グラジエント電気泳動(DGGE)を用いてアッセイする(Myersら (1985) Nature 313:495)。DGGEを分析の方法として用いる場合、DNAを修飾して、例えば、PCRによって高融点GC-リッチのDNAのほぼ40bpの'GCクランプを付加することによって、それが完全に変性しないこ

50

とを保証する。さらなる具体例において、温度グラジエントを、変性グラジエントの代わりに用いて、対照および試料 D N A の移動度における差を同定する (Rosenbaum and Reissner (1987) Biophys. Chem. 265:12753)。

【0288】

点突然変異を検出するための他の技術の例は、限定されるものではないが、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー延長を含む。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーを調製することができ、そこでは、公知の突然変異を中央に置き、次いで、もし完全なマッチが見出される場合にのみハイブリダイゼーションを可能とする条件下で標的 D N A にハイブリダイズさせる (Saikiら (1986) Nature 324:163); Saikiら (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230)。そのような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを、該オリゴヌクレオチドがハイブリダイジング膜に付着し、標識された標的 D N A にハイブリダイズすると、P C R 増幅標的 D N A または多数の異なる突然変異にハイブリダイズする。

10

【0289】

別法として、選択的 P C R 増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術を、本発明と組み合わせる用いることができる。特異的増幅のためのプライマーを用いるオリゴヌクレオチドは、(増幅が異なるハイブリダイゼーションに依存するように)分子の中央に (Gibbsら (1989) Nucleic Acids Res. 17:2437-2448)、または適当な条件下で、ポリメラーゼ延長を妨げるか、または低下させることができる1つのプライマーの極端な3'末端に (Prossner (1993) Tibtech 11:238) 注目する突然変異を運ぶことができる。加えて、新規な制限部位を突然変異の領域に導入して、切断 - ベースの検出を作り出すのが望ましいであろう (Gaspariniら (1992) Mol. Cell Probes 6:1)。ある種具体例においては、増幅用の T a q リガーゼを用いて増幅を行うこともできるのは予測される (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189)。そのような場合、もし5'配列の3'末端に完全なスナッチがあって、増幅の存在または不存在につき検査することによって特定の部位に公知の突然変異の存在を検出できるようにする場合のみ、連結が起こるのである。

20

【0290】

本明細書中に記載された方法は、例えば、V C C - 1 ポリペプチドをコードする遺伝子に関連する病気または障害の兆候または家族の履歴を呈する患者を診断する、例えば、臨床的状况において、便宜に使用することができる、本明細書中に記載された少なくとも1つのプローブ核酸または抗体試薬を含むプレ - パックド診断キットを利用することによって行うことができる。

30

【0291】

さらに、V C C - 1 ポリペプチドが発現されるいずれかの細胞型または組織、好ましくは、末梢血液白血球を、本明細書中に記載した予後アッセイで利用することができる。

【0292】

ファルマコゲノミックス

本明細書中に記載されたスクリーニングアッセイによって同定された、V C C - 1 ポリペプチドの活性または発現に対して刺激的または阻害性効果を有する剤またはモジュレーターを個体に投与して、ポリペプチドの異常な活性に関連する障害を (予防的にまたは治療的に) 処置することができる。

40

【0293】

そのような治療と組み合わせ、個体のファルマコゲノミックス (すなわち、個体の遺伝子型と外来性化合物または薬物に対するその個体の応答との間の関係の研究) が考えられる。治療剤の代謝の差は、薬理学的に活性な用量および血中濃度の間の関係を改変することによって、ひどい毒性または治療の失敗に至り得る。かくして、個体のファルマコゲノミックスは、個体の遺伝子型の考慮に基づいて、予防的または治療的処置についての効果的な剤 (例えば、薬物) の選択を可能とする。そのようなファルマコゲノミックスをさらに用いて、適当な投与および治療方法を決定することができる。従って、V C C - 1 ポリペプチドの活性、本発明の核酸の発現、または個体における本発明の遺伝子の突然変異

50

含有量を決定して、それにより、個体の治療的または予防的処置のための適切な剤を選択することができる。

【0294】

ファルマコゲノミックスは、罹患した個体における改変された薬物の性質および異常な作用により、薬物に対して応答する重要な遺伝的変位を臨床的に取り扱う。例えば、Linder (1997) Clin. Chem. 43(2):254-266参照。一般に、2つのタイプの薬理学的遺伝学的条件は異なり得る。身体に薬物が作用する方法を改変する単一因子として伝達される遺伝的条件を「改変された薬物作用」という。身体が薬物に作用する方法を改変する単一の因子として伝達される遺伝的条件を「改変された薬物代謝」という。これらの薬理学的遺伝学的条件は稀な欠陥または多形いずれかとして起こり得る。

10

【0295】

かくして、VCC-1ポリペプチドの活性、該ポリペプチドをコードする核酸の発現、または個体における該ポリペプチドをコードする遺伝子の突然変異含有量を測定し、それにより、個体の治療的または予防的処置のための適切な剤を選択することができる。加えて、薬理学的遺伝学的実験を用いて、薬物-代謝酵素をコードする多形対立遺伝子の遺伝子型分けを、個体の薬物応答性表現型の同定に適用することができる。この知識は、投与または薬物選択に適用されると、有害な反応または治療の失敗を回避し、かくして、本明細書中に記載された例示的スクリーニングアッセイの1つによって同定されたモジュレーターのごとき、ポリペプチドの活性または発現のモジュレーターで対象を治療する場合に、治療的または予防的効果を増強することができる。

20

【0296】

臨床試験の間における効果のモニタリング

VCC-1ポリペプチドの発現または活性に対する剤（例えば、薬物、化合物）の影響（例えば、異常な細胞増殖および/または分化を変調する能力）のモニタリングは、基本的な薬物スクリーニングのみならず、臨床試験においても適用することができる。例えば、遺伝子発現、蛋白質レベルまたは蛋白質活性を増加させる、本明細書中に記載したスクリーニングアッセイによって測定された、剤の有効性は、低下した遺伝子発現、蛋白質レベルまたは蛋白質活性を呈する対象の臨床試験でモニターすることができる。あるいは、遺伝子発現、蛋白質レベル、または蛋白質活性を減少させる、スクリーニングアッセイによって測定された、剤の有効性は、増大した遺伝子発現、蛋白質レベルまたは蛋白質活性を呈する対象の臨床試験でモニターすることができる。そのような臨床試験においては、VCC-1ポリペプチドの発現または活性、好ましくは、前立腺癌に関連付けられてきた他のポリペプチドのそれをマーカーとして用いることができる。

30

【0297】

例えば、限定するものではないが、（例えば、本明細書中に記載されたスクリーニングアッセイで同定された）VCC-1ポリペプチドの活性または発現を変調する剤（例えば、化合物、薬物または小分子）での治療によって細胞中で変調される本発明の遺伝子を含めた遺伝子を同定することができる。かくして、例えば、臨床試験において前立腺癌、例えば、アンドロゲン-非依存性前立腺癌に対する剤の効果を調べるために、細胞を単離し、RNAを調製し、本発明の遺伝子および障害において関連付けられてきた他の遺伝子の発現のレベルについて分析することができる。遺伝子発現のレベル（すなわち、遺伝子発現パターン）は本明細書中に記載されたノーザンブロット分析またはRT-PCRによって、あるいは本明細書中に記載された方法の1つにより生産された蛋白質の量を測定することによって、あるいは本発明の遺伝子または他の遺伝子の活性のレベルを測定することによって定量することができる。このように遺伝子発現パターンは、剤に対する細胞の生理学的応答を示すマーカーとして働くことができる。従って、この応答状態は、個体の剤での処置の前、および処置の間の種々の時点において測定することができる。

40

【0298】

好ましい具体例においては、本発明は、(i) 剤の投与に先立って対象からプレ-投与試料を得；(ii) (所望により、アンドロゲンの存在下および不存在下において) 該プレ

50

- 投与試料中の本発明のポリペプチドまたは核酸のレベルを検出し；(iii) 対象から1以上のポスト-投与試料を得；(iv) (所望により、アンドロゲンの存在下および不存在下において) 該ポスト-投与試料中の本発明のポリペプチドまたは核酸のレベルを検出し；(v) 該プレ-投与試料中の本発明のポリペプチドまたは核酸のレベル(またはアンドロゲン誘導性)を該ポスト-投与試料または複数試料中の本発明のポリペプチドまたは核酸のレベルと比較し；次いで、(vi) それに応じて、該剤の対象への投与を変更する工程を含む、剤(例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメティック、蛋白質、ペプチド、核酸、小分子、または本明細書中に記載したスクリーニングアッセイによって同定された他の薬物候補)での対象の処置の有効性をモニターする方法を提供する。例えば、剤の増加させた投与は、ポリペプチドの発現または活性を低下させるのに、すなわち、剤の有効性を増加させるのに望ましいであろう。

10

## 【0299】

## 核酸導入

現在好ましいイン・ビトロ核酸導入技術は、(アデノウィルス、レンチウィルス、単純疱疹ウィルス、またはアデノ-関連ウィルス(AAV)のごとき)ウィルス、または非-ウィルスベクターおよび脂質-ベースの系(遺伝子の脂質-媒介導入用の有用な脂質、例えば、DOTMA、DOPEおよびDC-Chol；例えば、Tonkinsonら, Cancer Investigation, 11M: 54-65 (1996)参照)での感染を含む。遺伝子治療で用いられる最も好ましいベクターはウィルス、最も好ましくはアデノウィルス、AAV、レンチウィルスまたはレトロウィルスである。レトロウィルスベクターのごときウィルスベクターは、少なくとも1つの転写プロモーター/エンハンサーまたは遺伝子座-規定エレメント、または交互スプライシング、核RNA輸出、またはメッセンジャーの翻訳後修飾のごとき他の手段によって遺伝子発現を制御する他のエレメントを含む。加えて、レトロウィルスベクターのごときウィルスベクターは、VCC-1をコードする遺伝子の存在下で転写されると、それに操作可能に連結し、転写開始配列として作用する核酸分子を含む。そのようなベクター構築体は、パッケージングシグナル、ロングターミナルリピート(LTR)またはその部分、および(もしこれらがウィルスベクターに既に存在しないのであれば)用いるウィルスに適切な正および負ストランドプライマー結合部位も含む。加えて、そのようなベクターは、典型的には、それが入れられる宿主細胞からのVCC-1の分泌用のシグナル配列を含む。好ましくは、この目的のシグナル配列は哺乳動物シグナル配列、最も好ましくはVCC-1用の天然シグナル配列である。所望により、ベクター構築体は、ポリアダニル化を指令するシグナル、ならびに1以上の制限部位および翻訳終止配列も含むことができる。その例として、そのようなベクターは、典型的には、5'LTR、tRNA結合部位、パッケージングシグナル、第二-ストランドDNA合成の起点、およびYLTRまたはその部分を含むであろう。カチオン性脂質、ポリリシンおよびデンドリマーのごとき非-ウィルス性である他のベクターを用いることができる。

20

30

## 【0300】

いくつかの状況においては、核酸源に、細胞-表面膜蛋白質または標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上の受容体に対するリガンド等のような標的細胞を標的化する剤を供するのが望ましい。リボソームを使用する場合、エンドサイトーシスに関連する細胞-表面膜蛋白質に結合する蛋白質を、標的化のためにおよび/または、例えば、キャプシド蛋白質または特定の細胞型に親和性のその断片、周期において内部化を受ける蛋白質に対する抗体、および細胞内局所化を標的とし、細胞内半減期を増強する蛋白質を摂取するのを容易とするために用いることができる。受容体-媒介エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wuら, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432 (1987); およびWagnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 3410-3414 (1990)によって記載されている。現在知られている遺伝子作成および遺伝子治療プロトコルのレビューについては、Andersonら, Science, 256: 808-813 (1992)参照。また、WO 93/25673およびそこに引用された文献も参照されたし。

40

## 【0301】

50

適当な遺伝子治療、およびレトロウイルス粒子および構造蛋白質を作成する方法は、例えば、米国特許第 5, 681, 746 号に見出すことができる。

#### 【0302】

##### 治療的投与

VCC-1 またはそれに対するアンタゴニストの治療上有効量は、もちろん、( 予防を含めた ) 治療すべき病理学的状態、投与の方法、治療で用いられる化合物のタイプ、関連するいずれかの共治療、患者の年齢、体重、一般的な医学的状态、医療履歴等のような因子に応じて変化し、その決定は医師の技量内のものである。従って、治療者が、投与量を決定し、最大治療効果を得るのに必要な投与経路を修飾する必要がある。もし VCC-1 が、ヒト患者の治療に対して狭い宿主範囲を有すれば、ヒト VCC-1 を含む処方、より好ましくは天然 - 配列ヒト VCC-1 を用いる。臨床家は、問題とする疾患の治療につき所望の効果を達成する用量に到達するまで、VCC-1 を投与することとなる。例えば、もし目的が CHF の治療であれば、該量は、この疾患に関連する進行性心臓肥大を阻害するものであろう。この療法の進行は心電図測定によって容易にモニターされる。同様に、肥大心筋障害を持つ患者においては、VCC-1 は経験に基づき投与することができる。

10

#### 【0303】

##### 組合せ療法

問題とする障害を予防または治療するにおける VCC-1 またはそのアゴニストまたはアンタゴニストの有効性は、系列的に活性剤を、または同一組成物中にて、または別の組成物として、それらの目的に効果的なもう 1 つの剤と組み合わせて投与することによって改良することができる。例えば、心臓肥大の治療では、VCC-1 療法は、公知の心臓筋細胞肥大因子の阻害剤、例えば、フェニレフリンのごとき cc-アドレナリン作動性アゴニストの阻害剤；BOSENTAN<sup>T M</sup> および MOXONODIN<sup>T M</sup> のごときエンドセリン-1 阻害剤；CT-I に対する阻害剤 ( 米国特許第 5, 679, 545 号 ) ；LIF に対する阻害時亜；ACE 阻害剤；デス-アスパルテート-アンジオテンシン I 阻害剤 ( 米国特許第 5, 773, 415 号 ) 、およびアンジオテンシン II 阻害剤の投与と組み合わせることができる。

20

#### 【0304】

高血圧に関連する心臓肥大の治療では、VCC-1 は P-アドレナリン作動性受容体遮断剤、例えば、プロプラノロール、チモロール、テルタロロール、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブタロール、アセトブトロール、アテノロール、メトプロロール、またはカルベジロール；ACE 阻害剤、例えば、キナプリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル、またはリソノプリル；利尿剤、例えば、クロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメチアジド、メチルクロチアジド、ベンズチアジド、ジクロルフェナミド、アセタゾラミド、またはインダパミド；および/またはカルシウムチャンネルブロッカー、例えば、ジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル、またはニカルジピンと組み合わせて投与することができる。それらの一般的名称によって本明細書中で確認される治療剤を含む医薬組成物は商業的に入手可能であって、用量、投与、副作用、禁忌等についての製造業者の指令に従って投与されるべきである。例えば、Physicians' Desk Reference (Medical Economics Data Production Co.: Montvale, N.J., 1997)、第 51 版参照。肥大心筋障害の治療における組合せ療法のための好ましい候補は P-アドレナリン作動性 - 遮断剤 ( 例えば、プロプラノロール、チモロール、テルタロロール、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール、アテノロール、メトプロロール、またはカルベジロール ) 、ベラパミル、ジフェジピン、またはジルチアゼムである。高い血圧に関連する肥大の治療は、カルシウムチャンネルブロッカー、例えば、ジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル、またはニカルジピン；P-アドレナリン作動性遮断剤；利尿剤、例えば、クロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメチアジド、メチルクロチアジド、ベンズチアジド、ジクロルフェナミド、アセタゾラミド、またはインダパミド；および/または ACE-阻害

30

40

50

剤、例えば、キナプリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル、またはリソノプリルを用いる、抗高血圧薬物療法の使用を必要とするであろう。

【0305】

他の適応症では、VCC-1またはそのアンタゴニストは、問題とする骨および/または軟骨の欠陥、創傷、または組織の治療に役に立つ剤と組み合わせることができる、これらの剤はEGF、PDGF、TGF-またはTGF-、IGF、FGFおよびCTGFのごとき種々の成長因子を含む。

【0306】

加えて、癌を治療するのに用いられるVCC-1またはそのアンタゴニストは、前記にて確認される細胞傷害性、化学療法、または増殖-阻害性剤と組み合わせることができる。また、癌の治療では、VCC-1またはそのアンタゴニストは、適当には、放射線照射、または放射性物質の投与に関連するかを問わず、系列的に投与し、または放射線学的治療と組み合わせて投与される。

10

【0307】

VCC-1またはそのアンタゴニストと組み合わせて投与される治療剤の有効量は、医師または獣医の裁量によるであろう。用量の投与および調整は、治療すべき疾患の最大管理を達成するようになされる。例えば、高血圧を治療するには、これらの量は、理想的には、利尿剤またはジギタリスの使用、および高血圧または低血圧、腎臓の損傷等のごとき疾患を考慮に入れる。該用量は、加えて、使用すべき治療剤のタイプ、および治療されるべき具体的患者のごとき因子に依存するであろう。典型的には、使用される量は、もし与えられた治療剤がPAポリペプチドなくして投与されれば用いられるのと同じの用量であろう。

20

【0308】

乳癌腫の治療では、VCC-1またはそのアンタゴニストは、限定されるものではないが、化学療法でのトラスツズマブ(Trastuzumab)(ヘルセプチン(Herceptin))、パクリタキセル、ドセタキセル、エプルビシン、モトキサントロン、トポテカン、カペシタビン、ビノレルピン、チオテパ、ピンクリスチン、ピンプラスチン、カルボプラチンまたはシスプラチン、プリカミシン、アナストロゾール、レトロゾール、エキセミスタン、トレミフィン、またはプロゲスチンと組み合わせて投与することができる。

30

【0309】

急性リンパ性白血病の治療では、VCC-1またはそのアンタゴニストは、限定されるものではないが、ドキソルビシン、シタラビン、シクロホスファミド、エトポシド、テニポシド、アロプリノールまたは自己骨髄移植と組み合わせて投与することができる。

【0310】

急性骨髄球および骨髄単球白血病の治療では、VCC-1またはそのアンタゴニストは、限定されるものではないが、急性前骨髄球白血病用の、ゲムツズマブオゾガミシン(Mylotarg)、ミトキサントロン、イダルビシン、エトポシド、メルカプトプリン、チオグアニン、アザシチジン、アムサクリン、メトトレキセート、ドキソルビシン、トレチノイン、アロプリノール、ロイカフェレシス、プレドニゾンまたは三酸化ヒ素と組み合わせて投与することができる。

40

【0311】

慢性骨髄球白血病の治療では、VCC-1またはそのアンタゴニストは、限定されるものではないが、ブスルファン、メルカプトプリン、チオグアニン、シタラビン、プリカミシン、メルファラン、自己骨髄移植、またはアロプリノールと組み合わせて投与することができる。

【0312】

慢性リンパ性白血病の治療では、VCC-1またはそのアンタゴニストは、限定されるものではないが、ピンクリスチン、シクロホスファミド、ドキソルビシン、クラドリリン

50

(2 - クロロデオキシアデノシン ; C d A )、同種異系骨髄移植、アンドロゲンまたはアルプリノールと組み合わせて投与することができる。

【0313】

多発性骨髄腫の治療では、VCC - 1またはそのアンタゴニストは、限定されるものではないが、エトポシド、シタラビン、アルファインターフェロン、デキサメタゾン、または自己骨髄移植と組み合わせて投与することができる。

【0314】

肺（小細胞および非 - 小細胞）の癌腫の治療では、VCC - 1またはそのアンタゴニストは、限定されるものではないが、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、エトポシド、マイトマイシン、イフォスファミド、パクリタキセル、イリノテカンまたは放射線療法と組み合わせて投与することができる。

10

【0315】

結腸および直腸の癌腫の治療では、VCC - 1またはそのアンタゴニストは、限定されるものではないが、カベシタビン、メトトレキセート、マイトマイシン、カルムスチン、シスプラチン、イリノテカンまたはフロクスリジンと組み合わせて投与することができる。

【0316】

腎臓の癌腫の治療では、VCC - 1またはそのアンタゴニストは、限定されるものではないが、アルファインターフェロン、プロゲスチン、注入FUDR、またはフルオロウラシルと組み合わせて投与することができる。

20

【0317】

前立腺の癌腫の治療では、VCC - 1またはそのアンタゴニストは、限定されるものではないが、ケトコナゾール、ドキソルビシン、アミノグルテチミド、プロゲスチン、シクロホスファミド、シスプラチン、ピンブラスチン、エトポシド、スラミン、PC - SPE S、またはエストラムスチンホスフェートと組み合わせて投与することができる。

【0318】

黒色腫の治療では、VCC - 1またはそのアンタゴニストは、限定されるものではないが、カルムスチン、ロムスチン、メルファラン、チオテパ、シスプラチン、パクリタキセル、タモキシフェンまたはビンクリスチンと組み合わせて投与することができる。

【0319】

卵巣の癌腫の治療では、VCC - 1またはそのアンタゴニストは、限定されるものではないが、ドセタキセル、ドキソルビシン、トポテカン、シクロホスファミド、ドキソルビシン、エトポシドまたはリボソームドキソルビシンと組み合わせて投与することができる。

30

【0320】

本発明の組合せのもう1つの成分はシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤である。本明細書中では相互交換的に用いることができる用語「シクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤」、または「Cox - 2 選択的阻害剤」は、シクロオキシゲナーゼ - 1 よりも選択的にシクロオキシゲナーゼ - 2 を阻害する化合物を含み、またはそれらの化合物の医薬上許容される塩も含む。

40

【0321】

実践的には、Cox - 2 阻害剤の選択性は、テストを行う条件、およびテストすべき阻害剤に応じて変化する。しかしながら、本明細書の目的では、Cox - 2 阻害剤の選択性は、Cox - 1 の阻害に対するイン・ビトロまたはイン・ビボIC<sub>50</sub> 値を、Cox - 2 の阻害についてのIC<sub>50</sub> の値で割った比率として測定することができる (Cox - 1 IC<sub>50</sub> / Cox - 2 IC<sub>50</sub>)。Cox - 2 選択的阻害剤は、Cox - 2 IC<sub>50</sub> に対するCox - 1 IC<sub>50</sub> の比率が1 よりも大きくないずれかの阻害剤である。好ましい具体例においては、この比率は2 よりも大きく、より好ましくは5 よりも大きく、なおより好ましくは10 よりも大きく、さらにより好ましくは50 よりも大きく、より好ましくはなお約100 よりも大きい。

50

## 【0322】

本明細書中で用いる、用語「 $IC_{50}$ 」は、シクロオキシゲナーゼ活性の50%阻害を生じるのに必要な化合物の濃度をいう。本発明の好ましいシクロオキシゲナーゼ-2選択的阻害剤は、約 $1\mu M$ 未満、より好ましくは約 $0.5\mu M$ 未満、なおより好ましくは約 $0.2\mu M$ 未満のシクロオキシゲナーゼ-2  $IC_{50}$ を有する。

## 【0323】

好ましいシクロオキシゲナーゼ-2選択的阻害剤は約 $1\mu M$ よりも大きな、より好ましくは $20\mu M$ よりも大きなシクロオキシゲナーゼ-1  $IC_{50}$ を有する。そのような好ましい選択性は、通常のMSAIA-誘導副作用の発生を低下される能力を示すことができる。

10

## 【0324】

また、シクロオキシゲナーゼ-2-選択的阻害剤のプロドラッグとして作用する化合物は本発明の範囲内に含まれる。Cox-2選択的阻害剤で本明細書中で用いられるごとく用語「プロドラッグ」とは対象身体内で代謝または単純な化学的プロセスによって活性化Cox-2選択的阻害剤に変換され得る化学化合物をいう。Cox-2選択的阻害剤に対するプロドラッグの1つの例は、パレコキシブであり、これは、三環シクロオキシゲナーゼ-2選択的阻害剤であるパルデコキシブの治療上有効なプロドラッグである。好ましいCox-2選択的阻害剤の例はパレコキシブナトリウムである。Cox-2阻害剤であるクラスのプロドラッグは米国特許5,932,598号に記載されている。

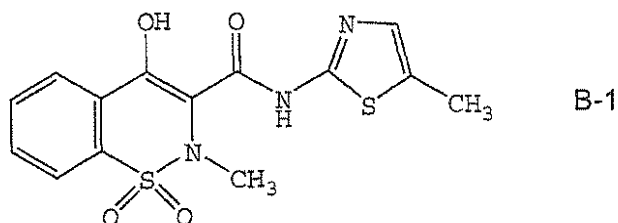
20

## 【0325】

本発明のシクロオキシゲナーゼ-2選択的阻害剤は例えば、式B-1のCox-2選択的阻害剤メロキシカム(CAS登録番号71125-38-7)、またはその医薬上許容される塩またはプロドラッグであり得る。

## 【0326】

## 【化1】



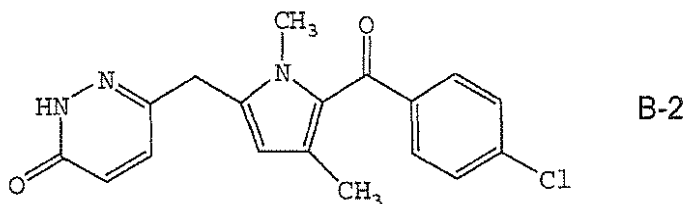
30

## 【0327】

本発明のもう1つの具体例においてシクロオキシゲナーゼ選択的阻害剤はCox-2選択的阻害剤RS57067、6-[[5-(4-シクロベンゾイル)-1,4-ジメチル-1H-ピロール-2-イル]メチル]-3(2H)-ピリダジノン、式B-2(CAS登録番号179382-91-3)またはその医薬上許容される塩またはプロドラッグであり得る。

## 【0328】

## 【化2】



40

## 【0329】

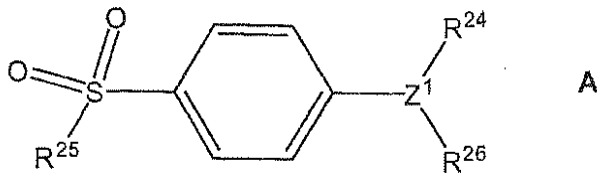
本発明のもう1つの具体例においてシクロオキシゲナーゼ-2選択的阻害剤は、置換されたベンゾピランまたは置換されたベンゾピランアナログ、なおより好ましくは置換され

50

たベンゾチオピラン、ジヒドロキノリン、またはジヒドロナフタレンよりなる群から選択されるクロメン/クロマン構造のクラスのものである。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができるベンゾピランは米国特許第 6, 271, 253 号に記載された置換されたベンゾピラン誘導体を含む。本発明の実施で言うような他のベンゾピラン C o x - 2 選択的阻害剤は米国特許第 6, 034, 256 号および第 6, 077, 850 号に記載されている。本発明のさらに好ましい具体例においては、シクロオキシゲナーゼ阻害剤は、式 A :

【0330】

【化3】



10

【0331】

(式中、Z<sup>1</sup> は部分的に不飽和のまたは不飽和のヘテロシクリルおよび部分的に不飽和のまたは不飽和の炭素環よりなる群から選択され；ここに、R<sup>2,4</sup> はヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニルおよびアリールよりなる群から選択され、ここに R<sup>2,4</sup> は所望により、アルキル、ハロアルキル、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、ヒドロキシル、ヒドロキシルアルキル、ハロアルコキシ、アミノ、アルキルアミノ、アリールアミノ、ニトロ、アルコシアルキル、アルキルスルフェニル、ハロ、アルコキシおよびアルキルチオから選択される 1 以上の基で置換可能な位置が置換されていていてもよく、R<sup>2,5</sup> はメチルまたはアミノよりなる群から選択され；および R<sup>2,6</sup> は H、ハロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、オキソ、シアノ、カルボキシル、シアノアルキル、ヘテロシクリルオキシ、アルキルオキシ、アルキルチオ、アルキルカルボニル、シクロアルキル、アリール、ハロアルキル、ヘテロシクリル、シクロアルケニル、アラキル、ヘテロシクリルアルキル、アシル、アルキルチオアルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシカルボニル、アリールカルボニル、アラキルカルボニル、アラケニル、アルコシアルキル、アリールチオアルキル、アリールオシアルキル、アラキルチオアルキル、アラコシアルキル、アルコシアラコシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、アミノカルボニル、アミノカルボニルアルキル、アルキルアミノカルボニル、N - アリールアミノカルボニル、N - アルキル - N - アリールアミノカルボニル、アルキルアミノカルボニルアルキル、カルボシアルキル、アルキルアミノ、N - アリールアミノ、N - アラキルアミノ、N - アルキル - N - アラキルアミノ、N - アルキル - N - アリールアミノ、アミノアルキル、アルキルアミノアルキル、N - アリールアミノアルキル、N - アラキルアミノアルキル、N - アルキル - N - アラキルアミノアルキル、N - アルキル - N - アリールアミノアルキル、アリールオキシ、アラコキシ、アリールチオ、アラキルチオ、アルキルスルフェニル、アルキルスルホニル、アミノスルホニル、アルキルアミノスルホニル、N - アリールアミノスルホニル、アリールスルホニル、N - アルキル - N - アリールアミノスルホニルから選択される基よりなる群から選択される)

の一般構造式によって表される三環シクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤またはそのプロドラッグのクラスから選択することができる。

20

30

40

【0332】

本発明の好ましい具体例において、前記式 I によって表されるシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤は、セレコキシブ (B - 3)、バルデコキシブ (B - 4)、デラコキシブ (D - 5)、ロフェコキシブ (B - 6)、エトリコキシブ (MK - 663; B - 7)、JTE - 522 (B - 8) を含む表 3 に示される化合物またはそのプロドラッグの群から選択される。

【0333】

50

前記したCox-2選択的阻害剤の選択された例についてのさらなる情報は以下のごとく見出すことができる：

【0334】

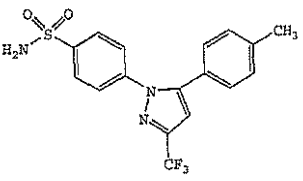
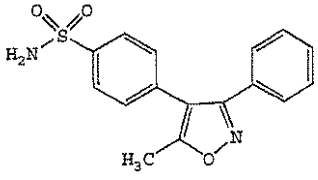
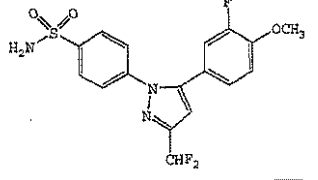
セレコキシブ(CAS RN 169590-42-5, C-2779, SC-58653, 米国特許第5,466,823号)；デラコキシブ(CAS RN 169590-41-4)；ロフェコキシブ(CAS RN 162011-90-7) 化合物B-24(米特許第5,840,924号)；化合物B-26(WO00/25779)；およびエトリコキシブ(CAS RN 202409-33-4, MK 663, SC-86218, WO98/030484)。

【0335】

【表3-1】

10

表3

化合物番号	構造式
B-3	
B-4	
B-5	

20

30

【0336】

【表 3 - 2】

化合物番号	構造式
B-6	
B-7	
B-8	

10

20

## 【0337】

本発明のより好ましい具体例においては、Cox-2 選択的阻害剤はセレコキシブ、ロフェコキシブおよびエトリコキシブよりなる群から選択される。

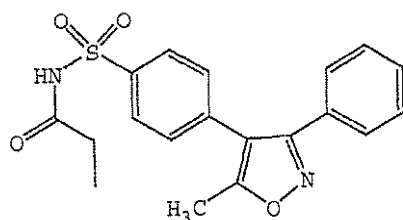
## 【0338】

本発明の好ましい具体例において、三環シクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤バルデコキシル B - 4 (例えば、米国特許第 5,633,272 号参照) の治療上有効なプロドラッグである、B - 9 に示される構造式を有するパレコキシル (例えば、米国特許第 5,932,598 号参照) は、有利には、シクロオキシゲナーゼ阻害剤の源として使用することができる。

30

## 【0339】

## 【化 4】



B-9

40

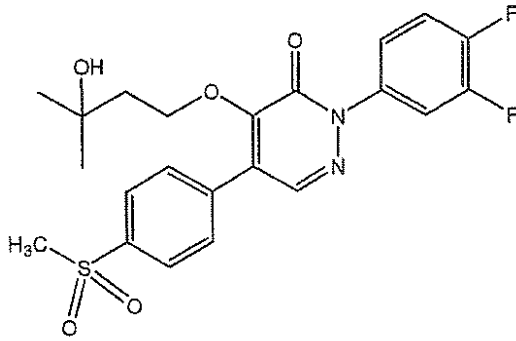
## 【0340】

パレコキシブの好ましい形態はナトリウムパレコキシブである。

本発明のもう一つの好ましい具体例において、国際公開番号 WO 00/24719 に以前に記載された式 B - 10 を有する化合物 A B T - 963 は、有利に使用することができるもう一つの三環シクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤である。

## 【0341】

## 【化5】



B-10

10

## 【0342】

本発明のさらなる具体例において、シクロオキシゲナーゼ阻害剤は、CAS登録番号220991-20-8を有する、(ルミラコキシルともいわれる)COX-189と呼ばれる化合物である、WO 99/11605、WO 02/20090に記載されたフェニル酢酸誘導体シクロオキシゲナーゼ-2選択的阻害剤のクラスから選択することができる。

## 【0343】

米国特許第6,310,099号、第6,291,523号および第5,958,978号に記載された同様な構造を有する化合物は、本発明のCOX-2選択的阻害剤として供することができる。

20

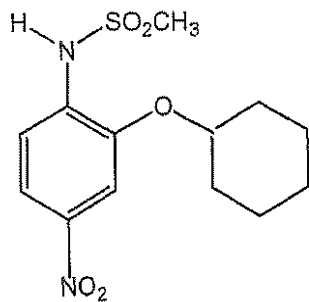
## 【0344】

式B-11に示された構造を有する、COX-2選択的阻害剤N-(2-シクロヘキシルオキシニトロフェニル)メタンスルホンアミド(NS-398、CAS RN 123653-11-2)の適用についてのさらなる情報は、例えば、Yoshimi, N.ら, in Japanese J. Cancer Res., 90(4):406-412 (1999); Falguyret, J.P.ら, in Science Spectra, available at: [http://www.gbhap.com/Science\\_Spectra/20-1-article.htm](http://www.gbhap.com/Science_Spectra/20-1-article.htm) (06/06/2001); and Iwata, K.ら, in Jpn. J. Pharmacol., 75(2):191-194 (1997)によって記載されている。

30

## 【0345】

## 【化6】



B-11

40

## 【0346】

炎症のイヌモデルにおける、シクロオキシゲナーゼ-2選択的阻害剤RWJ63556の抗炎症活性の評価は、Kirchnerら, in J Pharmacol Exp Ther 282, 1094-1101 (1997)によって記載された。

## 【0347】

本発明のシクロオキシゲナーゼ-2選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第6,180,651号に記載されたジアリールメチリデンフラン誘導体を含む。

## 【0348】

化合物のこのファミリーに含まれ、かつ本発明におけるシクロオキシゲナーゼ-2選択

50

的阻害剤として供することができる特別の物質は、N - ( 2 - シクロヘキシルオキシニトロフェニル ) メタンスルホンアミド、および ( E ) - 4 - [ ( 4 - メチルフェニル ) ( テトラヒドロ - 2 - オキソ - 3 - フラニリデン ) メチル ] ベンゼンスルホンアミドを含む。

【 0 3 4 9 】

本発明で有用なシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤はダルブフェロン ( P f i z e r )、CS - 5 0 2 ( S a n k y o )、LAS 3 4 4 7 5 ( A l m i r a l l P r o f e s f a r m a )、LAS 3 4 5 5 5 ( A l m i r a l l P r o f e s f a r m a )、S - 3 3 5 1 6 ( S e r v i e r )、SD 8 3 8 1 ( P h a r m a c i a、米国特許第 6 , 0 3 4 , 2 5 6 号に記載)、BMS - 3 4 7 0 7 0 ( B r i s t o l M y e r s S q u i b b、米国特許第 6 , 1 8 0 , 6 5 1 号に記載)、MK - 9 6 6 ( M e r c k )、L - 7 8 3 0 0 3 ( M e r c k )、T - 6 1 4 ( T o y a m a )、D - 1 3 6 7 ( C h i r o s c i e n c e )、L - 7 4 8 7 3 1 ( M e r c k )、CT3 ( A t l a n t i c P h a r m a c e u t i c a l )、CGP - 2 8 2 3 8 ( N o v a r t i s )、BF - 3 8 9 ( B i o f o r / S c h e r e r )、GR - 2 5 3 0 3 5 ( G l a x o W e l l c o m e )、6 - ジオキソ - 9H - プリン - 8 - イル - 桂皮酸 ( G l a x o W e l l c o m e )、および S - 2 4 7 4 ( S h i o n o g i ) を含む。

10

【 0 3 5 0 】

前記した S - 3 3 5 1 6 についての情報は Current Drugs Headline News、<http://www.current-drugs.com/NEWS/Inflam1.htm>、10/04/2001に見出すことができ、そこでは、S - 3 3 5 1 6 が、各々、シクロオキシゲナーゼ - 1 およびシクロオキシゲナーゼ - 2 に対して 0 . 1 および 0 . 0 0 1 m M の  $IC_{50}$  値を有するテトラヒドロイソインデ誘導体であることが報告されている。ヒト全血においては、S - 3 3 5 1 6 は  $ED_{50} = 0 . 3 9 m g / k g$  を有すると報告されている。

20

【 0 3 5 1 】

シクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として作用することができる化合物は、米国特許第 6 , 3 9 5 , 7 2 4 号に記載されているとき、1 以上のリンカーに共有結合した 2 ないし 1 0 のリガンドを含有する多重結合化合物を含む。シクロオキシゲナーゼ - 2 阻害剤として作用することができる化合物は、米国特許第 6 , 0 7 7 , 8 6 8 号に記載された共役リノレン酸を含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 5 , 9 9 4 , 3 8 1 号および第 6 , 3 6 2 , 2 0 9 号に記載された複素環芳香族オキサゾール化合物を含む。主題の方法および組成物で有用な Cox - 2 選択的阻害剤は、米国特許第 6 , 0 8 0 , 8 7 6 号および第 6 , 1 3 3 , 2 9 2 号に記載された化合物を含むことができる。シクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6 , 3 6 9 , 2 7 5 号、第 6 , 1 2 7 , 5 4 5 号、第 6 , 1 3 0 , 3 3 4 号、第 6 , 2 0 4 , 3 8 7 号、第 6 , 0 7 1 , 9 3 6 号、第 6 , 0 0 1 , 8 4 3 号および第 6 , 0 4 0 , 4 5 0 号に記載されたピリジンを含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6 , 3 4 0 , 6 9 4 号に記載されたジアリールベンゾピラン誘導体を含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6 , 3 7 6 , 5 1 9 号に記載された 1 - ( 4 - スルファモイルアリール ) - 3 - 置換 - 5 - アリール - 2 - ピラゾリンを含む。

30

40

【 0 3 5 2 】

本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6 , 1 5 3 , 7 8 7 号に記載された複素環を含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6 , 0 4 6 , 2 1 7 号に記載された 2 , 3 , 5 - トリ置換ピリジンを含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6 , 3 2 9 , 4 2 1 号に記載されたジアリール二環複素環を含む。シクロオキシゲナーゼ - 2 阻害剤として作用することができる化合物は、米国特許第 6 , 2 3 9 , 1 3 7 号に記載された 5 - アミノまたは置換されたアミノ 1 , 2 , 3 - トリアゾール化合物の塩を含む。

50

## 【0353】

本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6, 136, 831 号に記載されたピラゾール誘導体を含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6, 297, 282 号に記載されたベンゾスルホンアミドの置換された誘導体を含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6, 303, 628 号に記載された二環性カルボニルインドール化合物を含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6, 310, 079 号に記載されたベンズイミダゾール化合物を含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6, 300, 363 号に記載されたインドール化合物を含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6, 077, 869 号に記載されたアリールフェニルヒドラジドを含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6, 140, 515 号に記載された 2 - アリールオキシ, 4 - アリールフラン - 2 - オンを含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 5, 994, 379 号に記載されたビスアリール化合物を含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6, 028, 202 号に記載された 1, 5 - ジアリールピラゾールを含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6, 040, 320 号に記載された 2 - 置換イミダゾールを含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6, 083, 969 号に記載された 1, 3 - および 2, 3 - ジアリールシクロアルカノおよびシクロアルケノピラゾールを含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6, 306, 860 号に記載されたインドールアルカノールから誘導されるエステルおよびインドールアルキルアミドから誘導される新規なアミドを含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6, 307, 047 号に記載されたピリダジノン化合物を含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6, 004, 948 号に記載されたベンゾスルホンアミド誘導体を含む。本発明のシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤として供することができる物質は、米国特許第 6, 169, 188 号、第 6, 020, 343 号、第 5, 981, 576 号 (メチルスルホニル) フェニルフラノン); 米国特許第 6, 222, 048 号 (ジアリール - 2 - (5H) - フラノン); 米国特許第 6, 057, 319 号 (3, 4 - ジアリール - 2 - ヒドロキシ - 2, 5 - ジヒドロフラン); 米国特許第 6, 046, 236 号 (炭素環スルホンアミド); 米国特許第 6, 002, 014 号および第 5, 945, 539 号 (オキサゾール誘導体) および米国特許第 6, 359, 182 号 (C - ニトロソ化合物) に記載された化合物を含むことができる。

## 【0354】

本発明で有用なシクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤は、シクロオキシゲナーゼ - 2 選択的阻害剤が医薬上許容される限り、いずれかの源によっても供給され得る。シクロオキシゲナーゼ - 2 - 選択的阻害剤は天然源から単離し、精製することができるか、あるいは合成することができる。シクロオキシゲナーゼ - 2 - 選択的阻害剤は、医薬製品で用いられる商業で慣用的な品質および純度のものとすべきである。

## 【0355】

## 【表 4 - 1】

参考文献

Addison C.L., Arenberg D.A., Morris S.B., Xue Y.Y., Burdick M.D., Mulligan M.S., Iannettoni M.D., and Strieter R.M. (2000). The CXC chemokine, monokine induced by interferon- $\gamma$ , inhibits non-small cell lung carcinoma tumor growth and metastasis. *Hum. Gene Ther.* **11**: 247-261.

Arenberg D.A., Poverini P.J., Kunkel S.L., Shanafelt A., and Strieter R.M. (1997). In vitro and in vivo systems to assess the role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis. *Methods Enzymol* **283**: 190-220. 10

Arenberg D.A., Keane M.P., DiGiovine B., Kunkel S.L., Morris S.B., Xue Y.Y., Burdick M.D., Glass M.C., Iannettoni M.D., and Strieter R.M. (1998). Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer. *J. Clin. Invest.* **102**: 465-472.

Akutsu T., Miyano S., and Kuhara S. (2000). Inferring qualitative relations in genetic networks and metabolic pathways. *Bioinformatics* **16**(8): 727-734. 20

Baggiolini, M. (2001). Chemokines in pathology and medicine. *J. Int. Med.* **250**: 91-104.

Belperio J.A., Keane M.P., Arenberg D.A., Addison C.L., Ehlert J.E., Burdick M.D., and Strieter R. M. (2000). CXC chemokines in angiogenesis. *J. Leuk. Bio.* **68**: 1-8.

D'haeseleer P., Liang S., and Somogyi R. (2000). Genetic network inference: from co-expression clustering to reverse engineering. *Bioinformatics* **16**(8): 707-726. 30

【 0 3 5 6 】

## 【表 4 - 2】

Fukuda S., Hanano Y., Iio M., Miura R., Yoshie O., and Nomiyama H. (1999). Genomic organization of the genes for human and mouse CC chemokine LEC. *DNA Cell Biol.* **18**: 275-283.

Gordon D., Abajian C, and Green P. (1998). Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* **8**: 195-202.

Horuk, R. (2001). Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **12**: 313-335. 10

Imai T., Yoshida T., Baba M., Nishimura M., Kakizaki M., and Yoshie O. (1996). Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector. *J. Biol. Chem.* **271**: 21514-21521.

Kock A.E., Pulverini P.J., Kunkel S.L., Harlow L.A., DiPietro L.A., Elner V.M., Elner S.G., and Strieter R.M. (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258**:1798-1801. 20

Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **234**: 187-208.

Krogh A., Brown M., Mian I.S., Sjolander K., and Haussler D. (1994). Hidden Markov models in computational biology: Applications to protein modeling. *J. Mol. Biol.* **235**:1501-1531.

Laun J., Shattuck-Brandt R., Haghnegahdar H., Owen J.D., Strieter R., Burdick M., Nirodi C., Beauchamp D., Johnson K.N., Richmond A. (1997). Mechanism and biological significance to constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J. Leukoc. Bio.* **62**: 588-597. 30

Lazar-Molnar E., Hegyesi H., Toth S., and Falus A. (2000). Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* **12**(6): 547-554.

Maione T.E., Gray G.S., Petro J., Hunt A.J., Donner A.L., Bauer S.I., Carson H.F., and Sharpe R.J. (1990). Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* **247**: 77-79. 40

Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S., and von Heijne G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**: 1-6.

## 【表 4 - 3】

- Owen J.D., Strieter R., Burdick M., Haghnegahdar H., Nanney L., Shattuck-Brandt R., and Richmond A. (1997). Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine beta and gamma proteins. *Int. J. Cancer* **73**: 94-103.
- Patan S. (2000). Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J. Neurooncol.* **50**(1-2): 1-15. 10
- Roberts C.J., Nelson B, Marton M.J., Stoughton R., Meyer M.R., Bennett H.A., He Y.D., Dai H, Walker W.L., Hughes T.R., Tyers M, Boone C, and Friend S.H. (2000). Signaling and Circuitry of Multiple MAPK Pathways Revealed by Matrix of Global Gene Expression Profiles. *Science* **287**(4): 873-880.
- Sgadari C., Angiolillo A.L., Cherney B.W., Pike S.E., Farber J.M., Koniaris L.G., Vanguri P., Burd P.R., Sheikh N., Gupta G., Teruya-Feldstein J., and Tosato G. (1996) Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor necrosis *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**:13791-13796. 20
- Sgadari C., Farber J.M., Angiolillo A.L., Liao F., Teruya-Feldstein J., Burd P.R., Yao L., Gupta G., Kanegane C., and Tosato G. (1997). Mig, the monokine induced by interferon- $\gamma$ , promotes tumor necrosis *in vivo*. *Blood* **89**(8): 2635-2643.
- Smit A.F. (1999). Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 657-663. 30
- Somogyi R. and Sniegowski C.A. (1996). Modeling the Complexity of Genetic Networks: Understanding Multigenic and Pleiotropic Regulation. *Complexity* **1**(6): 45-63.
- Somogyi R., Fuhrman S., Askenazi M., and Wuensche A. (1997). The gene expression matrix: towards the extraction of the genetic network architectures. Nonlinear Analysis, Proc. of Second World Cong. Of Nonlinear Analysis (WCNA96), **30**(3): 1815-1824. 40
- Strieter R.M., Kunkel S.L., Elnor V.M., Martonyi C.L., Koch A.E., Polverini P.J., Elnor S.G. (1992). Interleukin-8: A corneal factor that induces neovascularization. *Am. J. Pathol.* **141**: 1279-1284.
- Strieter R.M., Kunkel S.L., Arenberg D.A., Burdick M.D., and Polverini P.J. (1995). Interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10), a member of the C-X-C

## 【表 4 - 4】

chemokine family, is an inhibitor of angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**(1): 51-57.

Thieffry D., and Thomas R. (1998). Qualitative Analysis of Gene Networks. Pacific Symposium on *Biocomputing* **3**: 77-88.

Venter J. C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Yandell M., Evans C.A., Holt R.A. *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science*, **291**: 1304-1351. 10

Womble, D.D. (2000). GCG: The Wisconsin Package of sequence analysis programs. *Methods Mol Biol.* **132**: 3-22.

Yatsunami J., Tsuruta N., Ogata K., Wakamatsu K., Takayama K., Kawasaki M., Nakanishi Y., Hara N., and Hayashi S. (1997). Interleukin-8 participates in angiogenesis in non-small cell, but not small cell carcinoma of the lung. *Cancer Lett.* **120**: 101-108.

Yue H., Eastman P.S., Wang B.B., Minor J., Doctolero M.H., Nuttall R.L., Stack R., Becker J.W., Montgomery J.R., Vainer M., and Johnston. R. (2001). An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression. *Nucleic Acids Res.*, **29**: 41. 20

## 【 0 3 5 9 】

本明細書中で引用された全ての文献、特許または出願は、あたかも本明細書中に記載されたごとくその全体を引用により援用する。

## 【 0 3 6 0 】

以下の実施例を参照することによって、本発明をさらに説明するが、それが本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。 30

## 【 0 3 6 1 】

実施例

実施例 1

マイクロアレイ分析

RNA 試料 (Incyte Genomics) から、蛍光標識された (Cy3, Cy5) cDNA プローブを生じさせた。Incyte HG マイクロアレイチップは、癌性腫瘍 (乳癌、結腸癌、肺癌または腎臓癌) に罹った 10 人の個体の 4 つの組の各々に対する (Yue ら, 2001 によって記載された) 競合ハイブリダイゼーションによって分析し、6 人の突然死個体から構築された正常な組織プールと比較した。誤差修正および正規化の後、腫瘍組織発現 / 正常組織の増加または減少倍数を評価した。 40

## 【 0 3 6 2 】

実施例 2

遺伝子ネットワーク分析

この分析においては、異なる発現ベクターを、与えられた実験についてのマイクロアレイで表されるすべての遺伝子につき構築した。実験は、一般に、共通コンパレーターにて関連疾患の組として定義される。公知の関数の与えられた遺伝子を選択し、この場合、VEGF および Pearson 相関係数を、与えられた遺伝子および実験内の全ての他の遺伝子の間で計算した。Pearson 相関係数は： 50

【 0 3 6 3 】

【 数 1 】

$$\bar{r}_{pearson} = \frac{\left( \sum_{x=1}^{N_{\text{クラスター-1}}} \sum_{y=1}^{N_{\text{クラスター-2}}} r_{x,y} \right)}{N_{\text{クラスター-1}} * N_{\text{クラスター-2}}}$$

【 0 3 6 4 】

ここに、

【 0 3 6 5 】

【 数 2 】

$$r_{x,y} = \frac{\sum_k (x_k - \bar{x})(y_k - \bar{y})}{\sqrt{\sum_k (x_k - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_k (y_k - \bar{y})^2}}$$

【 0 3 6 6 】

によって与えられる。

【 0 3 6 7 】

この分析を全ての実験について反復する。複数実験において0.01未満の値によって定義される有意な相関係数を有する遺伝子を、局所的ネットワークのメンバーと考えた。次いで、このプロセスを、局所的ネットワークのメンバーについて反復して、ネットワークを拡大することができる。

10

20

【 0 3 6 8 】

実施例 3

シグナル配列分析

SignalP 2.0 分析プログラムを用い、シグナル配列の予測を行った。SignalP は異なる原核生物および真核生物のアミノ酸配列におけるシグナルペプチド切断部位の存在および位置を予測する。該方法は、いくつかの人工神経ネットワークおよび隠れた Markov モデル (Nielsen ら, 1997) の組合せに基づいて、切断部位の予測およびシグナルペプチド / 非シグナルペプチドの予測を取り込む。

30

【 0 3 6 9 】

実施例 4

配列分析

Crossmatch および Phrap program (Gordon ら, 1998) を利用し、EST 遺伝子組み立てを行った。配列の比較および分子量の予測は、GCG Wisconsin 配列分析パッケージ (Womble, 2000) から決定した。ゲノム配列の分析は、全ての既知の反復エレメントを Repeatmasker (Smit, 1999) でマスクすることによって行った。VCC-1 のヒトゲノム構造は、Celera Human Genome Assembly Release R26 からの配列データを利用して決定した。この放出は、Celera および公の配列データ双方よりなる見積もられた 98% 合計ゲノム適用範囲およびほぼ 4.7x 配列深さを表す (Venter ら, 2001)。蛋白質データベースの Markov モデルは SAM3.2 を利用して構築した (Krogh ら, 1994)。

40

【 0 3 7 0 】

実施例 5

VCC-1 cDNA の単離

360塩基対全長ヒトVCC-1は、製造業者のプロトコルに従い、SuperScript II 試薬 (Invitrogen、カタログ番号 11904-018) で生じさせた cDNA からクローン化した。HT29 ヒト結腸癌細胞を RNA の源として供し、(ATC、カタログ番号 HTB-38)、これは、培養中の増殖する細胞から、製造業

50

者の試料により Qiagen RNeasy Miniprep カラム (Qiagen、カタログ番号 71404) を用いて単離した。用いた順方向プライマー hvccf1 は、ATGAAAGTTCTAATCTCTTCCCTC (配列番号: 9) であった。

#### 【0371】

2つの逆方向プライマーを用い、一つはイン・フレイム停止コドンを含み、一つは停止コドンを含むまないものだった。プライマー hvccr1、CTACAAAGGCAGAGCAAAGCTTC (配列番号: 10) は停止コドンを含み、他方、プライマー hvccr2、CAAAGGCAGAGCAAAGCTTCTTAGC (配列番号: 11) は停止コドンを含まず、myc/HIS タグへのイン・フレイム融合のために設計された。ポリメラーゼ鎖反応は以下の条件: 25  $\mu$ M の濃度における 1  $\mu$ l の順方向プライマー、25  $\mu$ M における逆方向プライマー hvcc1 または 25  $\mu$ M における逆方向プライマー hvccr2 いずれかの 1  $\mu$ l、0.5  $\mu$ l の Taq、1.5  $\mu$ l の 50 mM の MgCl<sub>2</sub>、5  $\mu$ l の 10 $\times$  PCR 緩衝液 (Invitrogen、カタログ番号 10342-053)、1  $\mu$ l の dNTP ミックス (Invitrogen、カタログ番号 18427-013)、および 50  $\mu$ l までの水にて、0.8  $\mu$ l の cDNA を用いて行った。サイクリングパラメーターは: 熱い開始用の 94 における 4 分間、続いて 35 サイクルの 94 における 1 分間、55 における 1 分間、および 72 における 3 分間、ならびに 72 における 10 分間の最後の延長であった。増幅は、1.5% アガロースゲルで 10  $\mu$ l の PCR 反応を行うことによって決定した。

10

#### 【0372】

360塩基対マウス (VCC-1) はマウス胚 cDNA (Ambion、カタログ番号 7800) から PCR によって単離した。ネズミ順方向プライマー mvccf1 は ATGAAAGCTTCTAGCCTCTCC (配列番号: 12) であった。

20

#### 【0373】

2つの逆方向プライマーを用い、1つは停止コドンを含むものであり、1つは停止コドンを含むまないものである。逆方向プライマー mvccr1 CTATAAGGCAGCGCAAAGCTTG (配列番号: 13) は停止コドンを含む。

#### 【0374】

逆方向プライマー mvccr2、配列 TAAGGCAGCGCAAAGCTTG (配列番号: 14) は停止コドンを含まない。マウス VCC-1 の増幅用の PCR 条件は、1  $\mu$ l の鋳型を用いた以外は前記と同じであった。サイクリングパラメーターは: 熱い開始用の 94 における 4 分間、続いての 30 サイクルの 94 における 1 分間、57 における 1 分間、72 における 3 分間、ならびに 72 における 10 分間の最後の延長であった。

30

#### 【0375】

製造業者の指示 (Invitrogen、カタログ番号 K4600-40) に従い、2  $\mu$ l の PCR 産物および 1  $\mu$ l のベクターを用い、マウスおよびヒト VCC-1 双方を pCRII-Topo ベクターに連結した。潜在的クローンを制限酵素 EcoRI で消化して、インサートの存在を測定し、候補を配列決定した。

#### 【0376】

##### 実施例 6

##### 発現構築体の生成

停止コドンを含む、および含まないヒトおよびマウス VCC-1 を pcDNA3.1 (Invitrogen、カタログ番号 V800-20) に導入した。pCRII-Topo にクローン化された VCC-1 構築体を EcoRI で消化し、Qiagen ゲル抽出物からの (Qiagen、カタログ番号 28704) を用い、製造業者の指示に従って、インサートをゲル精製した。また、ベクター pcDNA3.1 を EcoRI で消化し、子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼ (CIAP) (Promega、カタログ番号 M182A) で脱リン酸化した。ベクターおよびインサートを 20 にて連結し、コンピテント DH5 細胞 (Invitrogen、カタログ番号 44-0098) に導入した。アンピシ

40

50

リン (Sigma、カタログ番号 A9393) を補足した LB プレート上で、細菌を 37 にて一晩増殖させた。次いで、クローンを拾い、アンピシリンを含む LB 中で、37 にて一晩増殖させた。クローンからの DNA を、Qiagen DNA MiniPrep キット (Qiagen、カタログ番号 27106) を用いて単離し、制限酵素 EcoRI で消化して、インサートおよび HindIII の存在を決定して、向きを判断した。

#### 【0377】

##### 実施例 7

##### ノーザン分析

放射性プローブを生じさせるために、全長マウスまたはヒト VCC-1 クローンを鋳型として用いた。標識は PRIME-IT 試薬 (Stratagene、カタログ番号 300385) を利用して [ $^{32}$ P] dATP で行い、プローブを NucTrap カラム (Stratagene、カタログ番号 400701) で精製した。次いで、Multiple Tissue ノーザンプロット (Clontech Laboratories, Inc.、カタログ番号 7780-1) を用いて複数ヒト RNA 試料のいずれかを分析し、あるいはマウス RNA 試料を Mouse RNA Master Blot フィルター (Clontech Laboratories, Inc.、カタログ番号 7771-1) を用いて分析した。ハイブリダイゼーションは 68 にて一晩行った。フィルムに暴露する前に、 $2 \times$  SSC / 0.05% SDS 中で、フィルターを 68 にて 1 時間洗浄した。

#### 【0378】

##### 実施例 8

##### NIH3T3 細胞のトランスフェクションおよび選択

製造業者の指示に従い、myc/HIS タグを含む発現ベクター pcDNA3.1、または発現ベクター単独にクローン化された VCC-1 の  $4 \mu\text{g}$  を利用し、CalPhos トランスフェクションキット (Clontech Laboratories, Inc.、カタログ番号 K2051) を用いて NIH3T3 細胞をトランスフェクトした。37 および 5% CO<sub>2</sub> にて、10% 加熱不活化 FBS (Gibco BRL、カタログ番号 26140-079) および 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco BRL、カタログ番号 15140-122) を補足した DMEM (Gibco BRL、カタログ番号 11995-040) 中に細胞を維持した。800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418 (Gibco BRL、カタログ番号 11811-031) を補足した同一培地中に細胞を 17 日間選択した。次いで、クローン細胞をプールし、トランスフェクトされた細胞を安定なものとする。

#### 【0379】

##### 実施例 9

##### チューブ形成アッセイ

組織培養皿 (Falcon、100 mm  $\times$  20 mm) を 4 ml のマトリゲル基礎膜マトリックスで被覆し、濃厚なコーティング方法のために、37 にて 45 分間、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中でのインキュベーションによってゲル化させた。薄いコーティング方法では、マトリゲルを無血清培地で  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  まで希釈し、さらに添加した。次いで、皿を室温にて 1 時間インキュベートし、使用前に培地を吸引した。次いで、プレートを、10% 胎児ウシ血清 (Gibco BRL) を補足した DMEM 中の皿当たり  $1.6 \times 10^6$  細胞の濃度にて、(Victoria Bautch、Chepel Hill のノースカロライナ大学からの) PY4-1 細胞で覆った。6 時間後、チューブ-様構造が薄い被服プレートではなく厚く被覆したプレートで形成されると、細胞を収穫し、製造業者の指令に従い、RNeasy MiniPrep キット (Qiagen) を用いて RNA を生成させた。

#### 【0380】

##### 実施例 10

##### イン・ビボ腫瘍形成アッセイ

細胞を 0.05% トリプシン/EDTA で収穫し、PBS 中で洗浄し、PBS 中の 60% 冷マトリゲルに  $1 \times 10^7$  細胞/ml に再懸濁させた。次いで、27 ゲージの針にて、

注射当たり  $1 \times 10^6$  細胞の濃度で、細胞を雌 CD-1 nu/nu マウスの側腹部に皮下注射した。皮下腫瘍の直径をベニエール・キャリパ (venier caliper) を用いて一週間に 3 回測定した。

#### 【0381】

##### 実施例 11

リアルタイム定量的逆転写ポリメラーゼ鎖反応

Primer Express ソフトウェア (Perkin-Elmer) を用いてプライマーを選択した。RNA 試料を単離し、RNeasy Miniprep キット (Qiagen) で処理し、Taqman 逆転写試薬 (Applied Biosystems) を用いて、製造業者のプロトコルにより個々に cDNA に転写した。反応は、20 における 5 分間、48 における 30 分間、95 における 5 分間の熱サイクリング条件下で、PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) にて、100  $\mu$ l の最終容量で行う。次いで、製造業者のプロトコルにより、100 mM のプライマー、および SYBR-Green Mix (ABI) からの酵素を備えた ABI PRISM 7700 配列検出システムにて、RT-PCR を 1  $\mu$ l の cDNA で行う。サイクリング条件は：95 における 10 分間、続いての 40 サイクルの 95 における 15 秒および 60 における 1 分である。反応についての蛍光シグナルを収集し、サイクル閾値 ( $C_T$ ) として特徴付ける。

10

#### 【0382】

##### 実施例 12

イン・サイチュハイブリダイゼーション

順方向プライマー

ATGAAAGTTCTAATCTCTTCCCT (配列番号：9) および逆方向プライマー hvccr1、CTACAAAGGCAGAGCAAAGCTTC (配列番号：10) を用い、VCC-1 についてのプローブを HT29 結腸癌腫細胞から単離し、354 bp (全長) プローブを得た。それを pCRII/Topo ベクター (Invitrogen) に挿入し、制限消化に付して、向きを決定し、配列分析によって確認した。プラスミドを SpeI で消化し、センス対照プローブのために T7 で標識し、EcoRV で消化し、SP6 で標識して、アンチセンスプローブを生じさせた。組織試料を収穫し、フラッシュ凍結し (ヒト試料)、または 20 にて 4 ないし 8 時間 10% ホルマリン中に固定した (nu/nu 正常マウス試料)。フラッシュ凍結試料を、-80 フリーザーから取り出し、4 にて一晩中程度に揺りつつ、各試料を氷冷 10% ホルマリンに添加することによって、さらに処理した。凍結試料を 4 から取り出し、20 にてさらに 4 時間揺らせた。

20

30

#### 【0383】

Tissue Tek VIP プロセッサを用い、標準的なパラフィン包埋手法によって、パラフィン組織ブロックを各試料につき作成した。簡単に述べると、35 の一連のエタノール洗浄液 70%、95% および 100%、続いて 2 つの 35 キシレン洗浄液を用い、試料を脱水した。58 の 4 の別々のパラフィン交換、続いてパラフィンブロックを用い、試料をパラフィンに包埋した。

40

#### 【0384】

5 ないし 10 ミクロンの厚みの系列的セクションに切断することによって、組織スライドを調製し、20 にて一晩風乾した。スライドを標準的キシレン、エタノールおよび水和プロトコル、続いて 4% パラホルムアルデヒド固定を用いて再度水和した。固定された組織セクションを PBS Tween-20 (PBT) 中で洗浄し、37 にてプロテイナーゼ K (20  $\mu$ g/ml) で 15 分間消化し、続いて、2 回 PBT 洗浄し、4% パラホルムアルデヒド中で第二の固定工程を行った。プロテイナーゼ K 消化 / パラホルムアルデヒド固定組織セクションのアセチル化を 20 にて 15 分間行い、続いて、2 回 PBT 洗浄を行い、素早く RNA se フリーの水ですすいだ。スライドをプレハイブリダイゼーション緩衝液中で 42 にて 1 時間インキュベートした。VCC センスおよびアンチセン

50

スプローブを、ハイブリダイゼーション緩衝液中で 85 °C にて 5 分間熱変性し、湿った氷上で迅速に冷却した。プレハイブリダイゼーションの後、適当に変性されたジゴキシゲニン RNA 標識プローブと共に 42 °C にて一晩インキュベートした。

#### 【0385】

センスおよびアンチセンス標識スライドを 5 × 5 mm SS C (生理食塩水クエン酸ナトリウム緩衝液) 中で別々にすすぎ、続いて、20 °C にて、1 × 5 mm SS C / 50 %ホルムアミド中で 30 分間インキュベートした。全てのスライドを T N E 緩衝液 (10 mM トリス pH 7.6、500 mM NaCl および 1 mM EDTA) 中で 10 分間洗浄することによって、ホルムアミドを除去し、続いて、2 × 5 mm SS C 中で 1 × 20 分間洗浄し、0.2 × 5 mm SS C 中で 2 × 20 分間洗浄した。全ての洗浄は 20 °C にて行った。スライドを 1 × 5 mm M A B T 抗体希釈緩衝液中で 2 × 5 分間平衡化し、20 °C にて、1 × 5 mm M A B T 中で 20 % ヒツジ血清中で予め 1.5 時間ブロックした。4 °C にて、2 % ヒツジ血清 / 1 × 5 mm M A B T 中に 1 : 2000 希釈したロバ抗ジゴキシゲニンアルカリ性ホスファターゼ結合検出抗体の添加の前に、全てのスライドを 1 × 5 mm M A B T 中で一晩すすいだ。スライドを 1 × 5 mm M A B T 中ですすいで、プラットフォームシェーカー上にて、20 °C の 4 × 5 分間の洗浄で過剰な抗体を排除した。2 回のさらなる 10 分間の洗浄を N T M T (2 mM レバミソールを含有する 100 mM NaCl、100 mM トリス HCl pH 9.5、50 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 % Tween-20) 中で行った。N B T および B C I P 基質を N T M T 中で 1 : 200 希釈し、20 °C にてインキュベートした。1 日中、スライドを発色させて、最適な基質変換を達成した。一旦発色されると、全てのスライドを N T M T 中ですすぎ、続いて P B S 中で 1 × 5 分間洗浄した。20 °C にて 4 % パラホルムアルデヒド中に 30 分間で固定し、P B S 中でさらに 1 回 5 分間洗浄した。設置し、風乾し、シールした。

#### 【0386】

図 14 ないし 16 は、正常および癌腫組織における、VCC-1 対照プローブおよびアンチセンスプローブを用いるイン・サイチュハイブリダイゼーションの結果を示す。

#### 【0387】

##### 実施例 13

##### VCC-1 変調のバイオマーカー

内皮細胞 (H U V E C) を 2 × 10<sup>3</sup> 細胞 / ウエルにて 6 - ウエルプレートに接種し、37 °C にて一晩インキュベートした。VCC-1 遺伝子、または対照の空の対照アデノウイルスを含有する P E R . C 6<sup>T M</sup> / A d A p t<sup>T M</sup> 技術 (C r u c e l l - L e i d e n、オランダ国) を用い、組換えアデノウイルス - 5 発現構築体を新鮮な培地に添加した (感染の多重度 = 30)。4 時間後、アデノウイルスを取り出し、新鮮な培地を添加した。24 時間後、Q i a g e n R N e a s y キットを用いて細胞を処理して全 RNA を単離した。1 μg の精製された RNA を用いて、cDNA (逆転写キット; A p p l i e d B i o s y s t e m s I n c) を生じさせ、各 23 遺伝子についての T a q m a n 技術によって cDNA を分析した。遺伝子 - 特異的シグナルを、各試料に含まれる参照対照 cDNA、ハウスキーピング遺伝子シクロフィリンのそれに正規化させた。対照 - および VCC-1 - 感染試料調製物の間の mRNA の相対的量の差を、2<sup>-ddct</sup> 方法 [Livak, Methods (2001), 25(4), 402-408] によって計算した。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0388】

【図 1】図 1 は、VEGF についての相関データ図である。Pearson 相関係数は VEGF と実験内の全ての他の遺伝子との間で計算される。複数の実験において 0.01 未満の p - 値によって定義される、有意な相関係数を有する遺伝子は、局所的ネットワークのメンバーであると考えられる。VEGF 発現は、IL-8、GRO1、および VCC-1 に対して正の相関を有することが示される。

【図 2】図 2 は、ヒト VCC-1 cDNA 配列図である。決定されたヒト cDNA 配列および推定された蛋白質配列はヌクレオチドで示され、アミノ酸配列番号は各線の右側に

10

20

30

40

50

示される。矢印はシグナル配列切断の予測される部位を示し、推定されるポリアデニル化シグナルには下線を施し、星印は蛋白質の停止コドンを示す。

【図3】図3は、マウスVCC-1 cDNA配列図である。決定されたマウスcDNA配列および推定される蛋白質配列が示される。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列番号は各線の右側に示される。シグナル配列切断の予測される部位は矢印によって示され、蛋白質の停止コドンは星印によって示される。

【図4】図4は、ヒトおよびマウスVCC-1蛋白質のシグナルP神経ネットワーク分析図である。ヒトVCC-1(パネルA、頂部)およびマウスVCC-1(パネルB、底部)の最初の70アミノ酸のシグナル配列が示される。この分析は、双方の蛋白質が、各々、ヒトおよびマウスに対して95%および93.4%の確率でもって22アミノ酸切断シグナル配列を含むことを示す。

10

【図5】図5は、ヒトおよびマウスVCC-1蛋白質の比較を示す図である。双方の蛋白質における同一の領域は黒いボックスによって表され、他方、相同領域は灰色のボックスとして示される。アミノ酸番号は各配列の右側に示される。

【図6】図6は、新規なVCC-1遺伝子の染色体位置およびエクソン-イントロン構造の図である。VCC-1は染色体19の動原体近くの19q11に位置する。該遺伝子は上方DNAストランドの4エクソンによってコードされ、かくして、動原体から19qter方向に転写される。

【図7】図7は、VCC-1蛋白質vs2つのケモカインファミリーのメンバーの複数整列を示す図である。新規な遺伝子VCC-1ならびに2つの公知のケモカインSCYA17およびSCYA16のTZアルゴリズムを用いるHMMを基礎にした複数整列。黒色のボックスは同一の領域を示し、他方、灰色のボックスは配列のうち少なくとも2つに見出される同様な領域を表す。ギャップを配列に導入して、整列した領域を最大化し、それは、ダッシュによって示される。

20

【図8】図8は、ヒトVCC-1のノーザンプロットの図である。全長VCC-1遺伝子に対応する放射性標識プローブでプローブされた複数組織のノーザンプロット。分子量マーカーのサイズは右側の組織源についてのものであり、プロットの頂部にリストされる。

【図9】図9は、マウスVCC-1のドットプロット図である。全長マウスVCC-1遺伝子に対応する放射性標識プローブでプローブされた複数マウス組織のドットプロット。RNAが単離された組織を右側のパネルに示す。

30

【図10】図10は、腫瘍試料におけるVCC-1の発現図である。複数患者からプールされた腫瘍および正常組織で行われた定量的リアルタイム逆転写ポリメラーゼ鎖反応。VCC-1の発現を測定し、ハウスキーピング遺伝子GUSの発現に対して正規化する。次いで、正常組織プールについてのVCC-1発現のレベルを1として示す。頂部パネルは、結腸腫瘍試料におけるVCC-1の発現の相対的レベルを示す。下方パネルは、乳癌のパネルにおけるVCC-1発現の相対レベルを示す。下方パネルにおいては、腫瘍番号1の相対的発現は24.25である。

【図11】図11は、培養中のヒト内皮細胞におけるVCC-1の発現図である。培養中の内皮細胞で行われた定量的リアルタイム逆転写ポリメラーゼ鎖反応。VCC-1の発現を全ての試料で測定し、ハウスキーピング遺伝子シクロフィリンの発現に対して正規化する。(ヒト滑膜線維芽細胞、正常なヒト皮膚線維芽細胞およびヒト包皮線維芽細胞から単離されたRNAよりなる)一次線維芽細胞プールについてのVCC-1発現のレベルの値を1として示す。過剰発現倍数の値を各欄上方にリストする。

40

【図12】図12は、培養中のマウスPY4.1内皮細胞におけるmVCC-1の発現図である。ネズミVCC-1プライマーを用いての種々の条件下でのPY4.1細胞で行った定量的リアルタイム逆転写ポリメラーゼ鎖反応。VCC-1の発現を全ての試料で測定し、ハウスキーピング遺伝子シクロフィリンの発現に対して正規化させる。休止細胞におけるVCC-1発現のレベルの値を1として示し、次いで、増殖する細胞におけるVCC-1発現のレベルの値を休止細胞のそれと比較する。同様に、非-チューブ形成性細胞におけるVCC-1発現のレベルの値を、チューブ形成性細胞におけるVCC-1のレベル

50

の比較のために1として示した。

【図13】図13は、nu/nu雌マウスにおけるNIH3T3細胞形質転換を示す図である。ベクター、CMVプロモーターの制御下にあるVCC-1遺伝子でトランスフェクトされたNIH3T3細胞を、定量的リアルタイム逆転写ポリメラーゼ鎖反応によってVCC-1 RNAのレベルにつきアッセイした。VCC-1の発現は、ハウスキーピング遺伝子GUSの発現に対して正規化する。ベクター-トランスフェクト細胞におけるVCC-1発現のレベルの値を1として示し、次いで、VCC-1トランスフェクト細胞におけるVCC-1発現のレベルの値をそれと比較した。相対的発現レベルを棒線の上方に示す。腫瘍塊は14日において犠牲にした動物から摘出し、秤量した。各個々の腫瘍の重量は、NIH3T3/VCC-1トランスフェクト細胞と比較したNIH3T3/ベクタートランスフェクト細胞につき表す。

10

【図14】図14は、ヒト乳房からの正常および癌腫組織のイン・サイチュハイブリダイゼーションを示す図である。VCC-1センス制御プローブを用いるイン・サイチュハイブリダイゼーションは、正常な乳房組織(A)、または乳癌腫(D)では染色を示さず、他方、アンチセンスVCC-1プローブは、正常な乳腺(B)の管上皮細胞、および(E)乳癌腫からの腫瘍細胞のほとんど全てにおいて淡い染色を示す。正常および癌腫双方の組織の系列的切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色する(CおよびF)。

【図15】図15は、肺癌腫および正常な肺組織のイン・サイチュハイブリダイゼーションを示す図である。VCC-1アンチセンスプローブを用いるイン・サイチュハイブリダイゼーションは、肺腫瘍(A)の全体でVCC-1メッセージの染色を示す。VCC-1アンチセンスでプローブされた正常なヒト肺組織の切片は、いずれのシグナルも示さなかった(C)。組織の系列的切片をヘマトキシリンおよびエオシン(BおよびD)で染色する。

20

【図16】図16は、ネズミ乳腺のイン・サイチュハイブリダイゼーションを示す図である。VCC-1センス制御(A)およびアンチセンス(B)プローブを用いるイン・サイチュハイブリダイゼーションは、マウス乳腺の管上皮の染色を示す。

【図17】図17は、他の遺伝子のmRNAレベルに対する内皮細胞におけるVCC-1過剰発現の効果を示す図である。ヒトVCC-1遺伝子を含むアデノウイルス、またはいずれのcDNA挿入も欠く対照アデノウイルスでHUVEC細胞を感染させた。継続した培養の24時間後、RNAを調製し、定量的リアルタイム逆転写ポリメラーゼ鎖反応によってmRNAレベルを比較した。ハウスキーピング遺伝子シクロフィリンを用いて、テストしたRNAの量の差を正規化した。点線は、対照で感染させた細胞を用いて各遺伝子につき得られた相対的値を示す。示された値は、2つの独立したアッセイの平均±STDを表す。ここに示された5つの遺伝子は、テストされた24内の最大示差発現を持つものを表す。

30

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Pharmacia

<120> DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES INVOLVED IN ANGIOGENESIS, THE PROTEINS ENCODED THEREBY, AND METHODS OF USING THE SAME

<130> 01055/2/PCT

<150> 60/372,173

<151> 2002-04-12

<160> 24

<170> PatentIn version 3.2 10

<210> 1

<211> 1172

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gattcccata aagcacatgg tctaactctgt tacgtaacag caagacagcg tcacctcacc 60

tgtttctgcc ctcaaattggg aacgctggcc tgggactaaa gcatagacca ccaggctgag 120

tactctgacc tgagtcattc ccagggatca ggagcctcca gcagggaacc ttccattata 180

ttcttcaagc aacttacagc tgcaccgaca gttgcgatga aagttctaat ctcttcctc 240

ctctgtttgc tgcactaat gctgatgtcc atggtctcta gcagcctgaa tccaggggtc 300 20

gccagaggcc acagggaccg aggccaggct tctaggagat ggctccagga aggcggccaa 360

gaatgtgagt gcaaagattg gttcctgaga gccccagaa gaaaattcat gacagtgtct 420

gggctgccaa agaagcagtg ccctgtgat catttcaagg gcaatgtgaa gaaaacaaga 480

caccaaaggc accacagaaa gccaaacaag cattccagag cctgccagca atttctcaaa 540

caatgtcagc taagaagctt tgetctgect ttgtaggagc tctgagcgcc cactcttcca 600

attaaacatt cttagccaag aagacagtga gcacacctac cagacactct tcttctccca 660

cctcactctc ccaactgtacc caccctaaa tcattccagt gctctcaaaa agcatgtttt 720 30

tcaagatcat ttgttttgtt gctctctcta gtgtcttctt ctctcgtcag tcttagcctg 780

tgccctccc ttaccaggc ttaggcttaa ttacctgaaa gattccagga aactgtagct 840

tcctagctag tgtcatttaa ccttaaatgc aatcaggaaa gtagcaaca gaagtcaata 900

aatattttta atgtcacag atcaaaattg tttccttcaa atggggctg ccaattcaca 960

accagatgac ccattttacc ctattcactg cagactgaat ccagattcta cacatactta 1020

tcccaccaa gacctcact ctgtctccat tggcctactt gttcatcttt cactcattcg 1080

acaaatcttt ctgaggtaag agcgaggtgg gacaaaaaaa aaaaagcata ccaatgaacc 1140

agacacgggc ttattaaaga taatataggt tt

1172

<210> 2  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Val Leu Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Met Leu  
 1 5 10 15

Met Ser Met Val Ser Ser Ser Leu Asn Pro Gly Val Ala Arg Gly His  
 20 25 30

10

Arg Asp Arg Gly Gln Ala Ser Arg Arg Trp Leu Gln Glu Gly Gly Gln  
 35 40 45

Glu Cys Glu Cys Lys Asp Trp Phe Leu Arg Ala Pro Arg Arg Lys Phe  
 50 55 60

Met Thr Val Ser Gly Leu Pro Lys Lys Gln Cys Pro Cys Asp His Phe  
 65 70 75 80

Lys Gly Asn Val Lys Lys Thr Arg His Gln Arg His His Arg Lys Pro  
 85 90 95

20

Asn Lys His Ser Arg Ala Cys Gln Gln Phe Leu Lys Gln Cys Gln Leu  
 100 105 110

Arg Ser Phe Ala Leu Pro Leu  
 115

<210> 3  
 <211> 97  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30

<400> 3

Ser Leu Asn Pro Gly Val Ala Arg Gly His Arg Asp Arg Gly Gln Ala  
 1 5 10 15

Ser Arg Arg Trp Leu Gln Glu Gly Gly Gln Glu Cys Glu Cys Lys Asp  
 20 25 30

Trp Phe Leu Arg Ala Pro Arg Arg Lys Phe Met Thr Val Ser Gly Leu  
 35 40 45

40

Pro Lys Lys Gln Cys Pro Cys Asp His Phe Lys Gly Asn Val Lys Lys  
 50 55 60

Thr Arg His Gln Arg His His Arg Lys Pro Asn Lys His Ser Arg Ala  
 65 70 75 80

Cys Gln Gln Phe Leu Lys Gln Cys Gln Leu Arg Ser Phe Ala Leu Pro  
 85 90 95

Leu

10

<210> 4  
 <211> 829  
 <212> DNA  
 <213> Musca sp.

<400> 4  
 gtaggattaa attgtagaca ctactccacc tgagcagtta caagaaatca gaagcctcta 60  
 agctggtgac aatccacaca gcctttaaga accaacagac agccacaatg aagcttctag 120  
 cctctccctt ccttctgttg cttccagtga tgctcatgtc catggctctc agcagcccga 180  
 acccaggggt cgccagaagc cacggggacc aacacctggc tcctaggagg tggctcttgg 240  
 aagtgggcca agaatgtgaa tgcaaagatt gggtcctgca agcccaaaag agaaaagcca 300  
 cagcagtgtc ggggccacca aggaagcagt gtcctgtgta tcacgtcaag ggcagggaga 360  
 aaaaaaacag acacaaaag caccacagga agtcgcaaag accctccaga gctgcccagc 420  
 aatttctcaa acgatgtcac ctggcaagct ttgcgctgcc cttatagtac tgagactctg 480  
 ctctctagt tagactctct cagtggaaaag gaggtgacca gccctagcac ggttcttatt 540  
 ctcccaacc ccctcctcac caagagcacc ccagtgtctc ctgaaggcac tgcctcaaca 600  
 gtgtatctat gactgtgccc ctagtgcggg ctgcacttga ccaactctgt cttatgcctt 660  
 ctgtttacc tacaaagatg caggacacc tcggactccc tgtgggcctc acattgcaat 720  
 cagaaaactt gcatgaacat acttaatcac atagtgccta cgtgacacca acacatcaca 780  
 cttcacacca ccataaactc aacacaaaag ggagcgccac taaacaccg 829

20

30

<210> 5  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Musca sp.

<400> 5

Met Lys Leu Leu Ala Ser Pro Phe Leu Leu Leu Leu Pro Val Met Leu

40



Leu

<210> 7  
 <211> 524  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 7  
 gttcctgaga gccccgagaa gaaaattcat gacagtgtct gggctgccaa agaagcagtg 60  
 cccctgtgat catttcaagg gcaatgtgaa gaaaacaaga caccaaaggc accacagaaa 120  
 gccaaacaag cattccagag cctgccagca atttctcaaa caatgtcagc taagaagctt 180  
 tgctctgcct ttgtaggagc tctgagcgcc cactcttcca attaaacatt ctcagccaag 240  
 aagacagtga gcacacctac cagacactct tcttctccca cctcactctc ccactgtacc 300  
 caccctaaa tcattccagt gctctcaaaa agcatgtttt tcaagatcat tttgtttgtt 360  
 gctctctcta gtgtcttctt ctctcgtcag tcttagctgt gcctcccct taccaggct 420  
 taggettaat tacctgaaag attccaggaa actgtagttc ctagtagtgt catttacctt 480  
 aaatgcatca ggaagtagca acagagtcaa taatattttt aatg 524

10

<210> 8  
 <211> 373  
 <212> DNA  
 <213> Rattus sp.

20

<400> 8  
 ctcagatgtc cctgcaggct tcccctcagc acgaggaggt ggcagggcct gcctgggagt 60  
 ggtgaccaga tctccatggt taaactgcag tgatactttt aggtgggggtg ggctcaagac 120  
 cagactgagg ctggcataca gacacctgtg gcctccggga cacactaagc ttggaaggag 180  
 gcagcaatgg agacaggagc cccacctgg ctctgagctc aggttgccct gactgcccc 240  
 cgtcacagct cctcttgtgc ttctgcctgg cccccaagac tgcctctgtc atggtaacta 300  
 tttattcctt gttccctttt ctttttgtaa gaaacagtca cagaaaaaaaa aaaccaaaac 360  
 attgagaacg gaa 373

30

<210> 9  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 9  
 atgaaagttc taatctcttc cctc 24

<210> 10		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 10		
ctacaaaggc agagcaaagc ttc	23	
<210> 11		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		10
<400> 11		
caaaggcaga gcaaagcttc ttagc	25	
<210> 12		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Musca sp.		
<400> 12		
atgaagcttc tagcctctcc c	21	
<210> 13		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Musca sp.		20
<400> 13		
ctataagggc agcgcaaagc ttgc	24	
<210> 14		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Musca sp.		
<400> 14		
taagggcagc gcaaagcttg c	21	
<210> 15		
<211> 5		
<212> DNA		
<213> homo sapien		30
<400> 15		
gattc	5	
<210> 16		
<211> 10		
<212> DNA		
<213> homo sapien		40

<400> 16 gacaggggtc	10	
<210> 17 <211> 10 <212> DNA <213> homo sapien		
<400> 17 tccagattgg	10	
<210> 18 <211> 10 <212> DNA <213> homo sapien		10
<400> 18 cctaggacac	10	
<210> 19 <211> 10 <212> DNA <213> homo sapien		
<400> 19 tccaggtaaa	10	20
<210> 20 <211> 10 <212> DNA <213> homo sapien		
<400> 20 caaaggtcag	10	
<210> 21 <211> 10 <212> DNA <213> homo sapien		30
<400> 21 aacaagtaag	10	
<210> 22 <211> 5 <212> DNA <213> homo sapien		
<400> 22 ggttt	5	
<210> 23 <211> 92		40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapien

&lt;400&gt; 23

Met Ala Pro Leu Met Leu Leu Val Thr Leu Leu Leu Gly Ala Ser Leu  
 1 5 10 15

Gln His Ile His Ala Ala Arg Gly Thr Asn Val Gly Arg Glu Cys Cys  
 20 25 30

Leu Glu Tyr Phe Lys Gly Ala Ile Pro Leu Arg Lys Leu Leu Thr Trp  
 35 40 45

10

Tyr Gln Thr Ser Glu Asp Cys Ser Arg Asp Ala Ile Val Phe Val Thr  
 50 55 60

Val Gln Gly Arg Ala Ile Cys Ser Asp Pro Asn Asn Lys Arg Val Lys  
 65 70 75 80

Asn Ala Val Lys Tyr Leu Gln Ser Leu Glu Arg Ser  
 85 90

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapien

&lt;400&gt; 24

Met Lys Val Ser Glu Ala Ala Leu Ser Leu Leu Val Leu Ile Leu Ile  
 1 5 10 15

Ile Thr Ser Ala Ser Arg Ser Gln Pro Lys Val Pro Glu Trp Val Asn  
 20 25 30

Thr Pro Ser Thr Cys Cys Leu Lys Tyr Tyr Glu Lys Val Leu Pro Arg  
 35 40 45

30

Arg Leu Val Val Gly Tyr Arg Lys Ala Leu Asn Cys His Leu Pro Ala  
 50 55 60

Ile Ile Phe Val Thr Lys Arg Asn Arg Glu Val Cys Thr Asn Pro Asn  
 65 70 75 80

Asp Asp Trp Val Gln Glu Tyr Ile Lys Asp Pro Asn Leu Pro Leu Leu  
 85 90 95

40

Pro Thr Arg Asn Leu Ser Thr Val Lys Ile Ile Thr Ala Lys Asn Gly  
 100 105 110

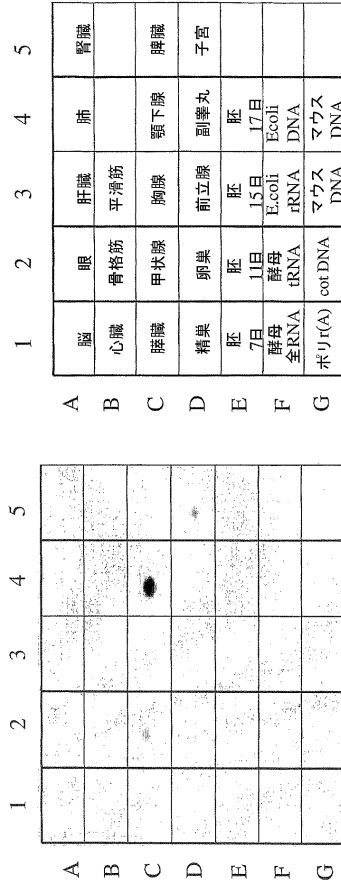
Gln Pro Gln Leu Leu Asn Ser Gln  
 115 120





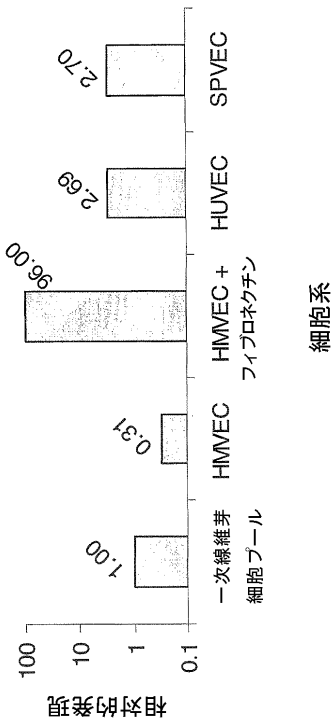
【 図 9 】

Figure 9



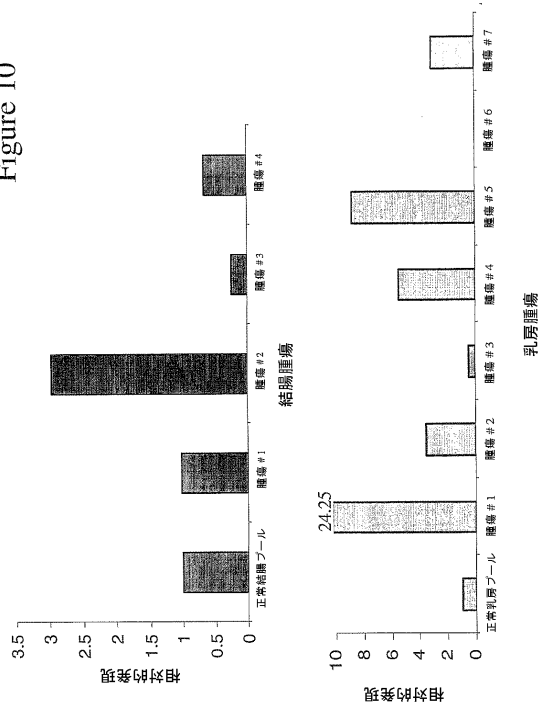
【 図 1 1 】

Figure 11



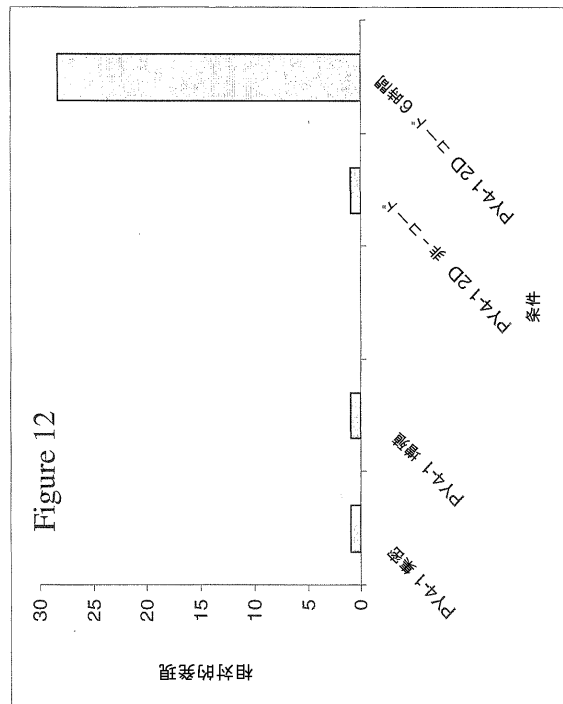
【 図 1 0 】

Figure 10



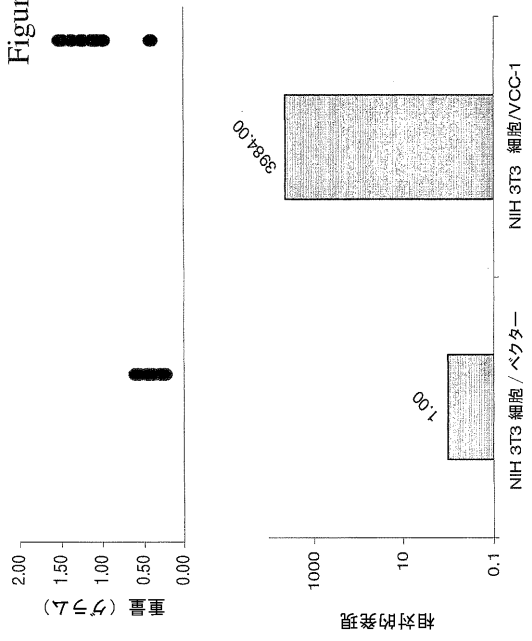
【 図 1 2 】

Figure 12



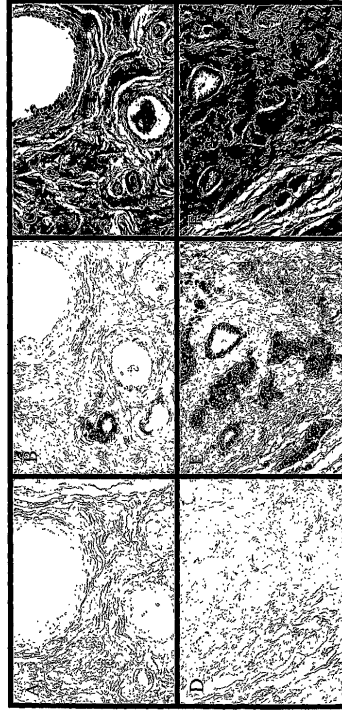
【 図 1 3 】

Figure 13



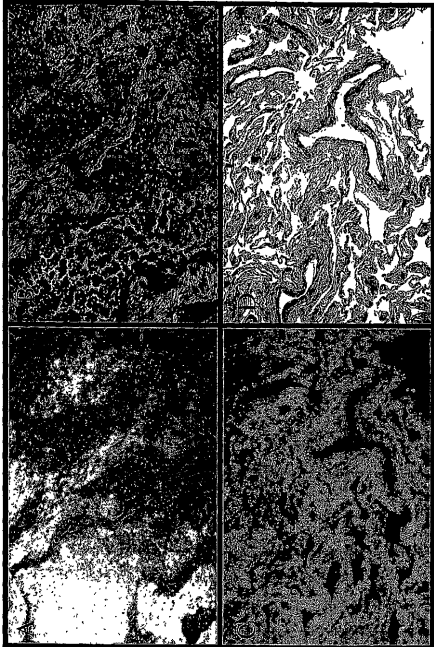
【 図 1 4 】

Figure 14



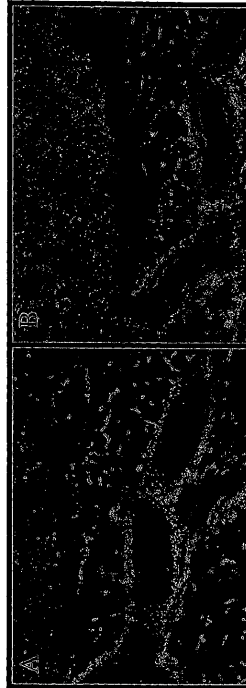
【 図 1 5 】

Figure 15

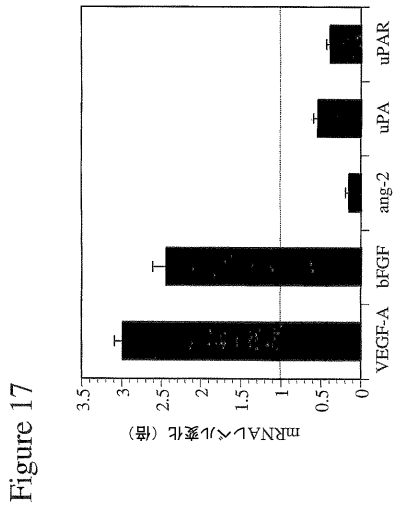


【 図 1 6 】

Figure 16



【 図 1 7 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成 16 年 11 月 25 日 (2004.11.25)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 配列表 】

[2006506043000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 03/11088
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/52 C12N5/10 C12N15/63 C07K16/24 A61K38/19 G01N33/53 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 61055 A (DIADEXUS INC) 23 August 2001 (2001-08-23)  *whole document: in particular abstract claims and SEQ ID NOs:4 and 6*	1-30, 33-35, 37, 42-47
X	-& DATABASE EMBL 'Online! 13 November 2001 (2001-11-13) retrieved from EBI Database accession no. AAG63977 XP002259277	1-14
X	*100% identity with SEQ ID NOs:2 and 3* -& DATABASE EMBL 'Online! 13 November 2001 (2001-11-13) retrieved from EBI Database accession no. AAH77951 XP002259278 *99,8% identity with SEQ ID NO:1*	1-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *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 *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 *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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 October 2003		Date of mailing of the international search report 02.01.04
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 657 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer BULCAO DE MELO ..., T

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 03/11088**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 42  
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:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
  
3.  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 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  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.  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.:  
1-30, 33-35, 37 and 42-47 (all partially)

Remark on Protest

 The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IS 03 11088

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 42

Present claim 42 relates to an extremely large number of possible antagonists. Support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the antagonists claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to antisense molecules of the VCC-1 nucleic acid having SEQ ID NO:1.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

International Application No. PCT/US 03 A1088

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-30, 33-35, 37 and 42-47 (all partially)

Invention 1 concerns a human VCC-1 polypeptide having SEQ ID NOs:2 or 3 and being encoded by a nucleic acid having SEQ ID NO:1. Invention 1 further concerns a vector, a host cell, antibodies, pharmaceutical compositions, a kit, a microarray and a transgenic non-human mammal, all related to said polypeptide/nucleic acid and several general methods of detection of said polypeptide/nucleic acid or of identification of binding/modulating agents of said polypeptide.

2. Claims: 1-30, 33-35, 37 and 42-47 (all partially)

Invention 2 concerns a mouse VCC-1 polypeptide having SEQ ID NOs:5 or 6 and being encoded by a nucleic acid having SEQ ID NO:4. Invention 2 further concerns a vector, a host cell, antibodies, pharmaceutical compositions, a kit, a microarray and a transgenic non-human mammal, all related to said polypeptide/nucleic acid and several general methods of detection of said polypeptide/nucleic acid or of identification of binding/modulating agents of said polypeptide.

3. Claims: 31, 32 and 38-41

Invention 3 concerns a method of treating or preventing an angiogenesis associated disorder by using the VCC-1 polypeptides having SEQ ID NOs:2, 3, 5 or 6, or antibodies against said polypeptides. Invention 3 further concerns methods of selecting a composition for inhibiting angiogenesis, of assessing the efficacy of a test compound for inhibiting angiogenesis, of monitoring the progression of an angiogenic disorder and of assessing the efficacy of a therapy for inhibiting angiogenesis, all comprising the use said polypeptides.

4. Claim : 36

Invention 4 concerns a method of detecting differentially expressed genes correlated with a cancerous state of a mammalian cell comprising the use of the VCC-1 nucleic acid molecules having SEQ ID NOs:1 or 4.

5. Claims: 48-52

Invention 5 concerns several biomarkers correlated with the modulation of VCC-1 expression or activity. Invention 5

International Application No. PCT/US 03 11088

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

further concerns a method of detecting a differentially expressed biomarker and a method of using said biomarker to diagnose a VCC-1 associated disorder.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 03/11088

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0161055 A	23-08-2001	AU 4165601 A	27-08-2001
		EP 1259647 A2	27-11-2002
		JP 2003525599 T	02-09-2003
		WO 0161055 A2	23-08-2001
		US 2003049617 A1	13-03-2003

---

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	4 B 0 6 5
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	4 C 0 8 4
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	4 C 0 8 5
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	5/14	4 H 0 4 5
A 6 1 P	9/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P	9/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/06	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	9/14	(2006.01)	A 6 1 P	9/14	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	19/08	
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/02	
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	27/06	(2006.01)	A 6 1 P	27/06	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/04	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
C 0 7 K	14/52	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
C 0 7 K	16/24	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 0 7 K	14/52	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 0 7 K	16/24	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	37/00	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	G 0 1 N	37/00	1 0 2

C 1 2 N 15/00 F  
 C 1 2 N 5/00 A  
 A 6 1 K 37/02  
 C 1 2 P 21/08

(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,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,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,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 リチャード・ディ・ヘッド

アメリカ合衆国 6 3 0 3 1 ミズーリ州フローリサント、リバティ・ビルッジ・ドライブ 8 3 7 番

(72)発明者 リチャード・マザーレラ

アメリカ合衆国 6 3 1 1 9 ミズーリ州ウェブスター・グローブズ、ドーネル・ドライブ 1 3 5 番

(72)発明者 デイビッド・ダブリュー・グリッグス

アメリカ合衆国 6 3 0 2 1 ミズーリ州ボールウィン、オーク・バーロウ・ドライブ 1 2 3 7 番

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 CB17 DA12 DA13 DA14 DA36 DA77 FB02 FB03  
 4B024 AA01 AA11 BA21 BA41 CA04 CA09 CA11 CA20 DA01 DA02  
 DA05 DA11 EA04 GA11 HA01 HA14  
 4B029 AA07 CC02 CC08 FA15  
 4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ43 QQ79 QR32 QR55 QR62  
 QS25 QS34 QX02  
 4B064 AG02 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA91X AA93Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA25 CA44 CA46  
 4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01 BA20 BA21 CA36 DA01 DA58  
 NA14 ZA011 ZA021 ZA151 ZA161 ZA201 ZA331 ZA361 ZA441 ZA591  
 ZA661 ZA671 ZA681 ZA751 ZA811 ZA891 ZA941 ZA961 ZA971 ZB011  
 ZB081 ZB111 ZB131 ZB151 ZB211 ZB261 ZC021 ZC061 ZC351  
 4C085 AA14 BB01 BB11 CC03 DD62 EE01  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA01 DA76 EA20 EA50  
 FA74

专利名称(译)	参与血管生成的差异表达基因，由其编码的蛋白质，以及使用它们的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006506043A</a>	公开(公告)日	2006-02-23
申请号	JP2003584112	申请日	2003-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	法马西亚公司		
申请(专利权)人(译)	法玛西亚公司		
[标]发明人	エドワードジェイウエインスタイン リチャードディヘッド リチャードマザーレラ デイビッドダブリューグリッグス		
发明人	エドワード・ジェイ・ウエインスタイン リチャード・ディ・ヘッド リチャード・マザーレラ デイビッド・ダブリュー・グリッグス		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K39/395 A61K48/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/14 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/52 C07K16/24 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N37/00 C12N5/10 A61K38/00 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P29/00 C07K14/522		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K39/395.T A61K48/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/14 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/00 A61P37/02 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C07K14/52 C07K16/24 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.F C12N5/00.A A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/BA41 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/CC02 4B029/CC08 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/CA36 4C084/DA01 4C084/DA58 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA021 4C084/ZA151 4C084/ZA161 4C084/ZA201 4C084/ZA331 4C084/ZA361 4C084/ZA441 4C084/ZA591 4C084/ZA661 4C084/ZA671 4C084/ZA681 4C084/ZA751 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZA941 4C084/ZA961 4C084/ZA971 4C084/ZB011 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB151 4C084/ZB211 4C084/ZB261 4C084/ZC021 4C084/ZC061 4C084/ZC351 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/CC03 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		

代理人(译) 田中，三夫  
矢野正树

优先权 60/372173 2002-04-12 US

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)

本发明一般涉及鉴定其表达在血管生成中被调节的核酸及其编码的多肽，特别是VCC1。这些核酸和蛋白质先前未被鉴定为在血管生成中具有生物学作用。本发明进一步涉及调节VCC1表达和/或活性的化合物。提供了使用这些化合物调节VCC-1表达和治疗与VCC-1表达有关的疾病的方法。还包括诊断VCC1相关血管生成性疾病的方法。

エクソン	アクセプター部位	ドナー部位	サイズ
1	GATTC 配列番号:15	TCCAGgtaaa 配列番号:19	295
2	gacagGGGTC 配列番号:16	CAAAGgtcag 配列番号:20	81
3	tccagATTGG 配列番号:17	AACAagtaag 配列番号:21	102
4	cctagGACAC 配列番号:18	GGTTT 配列番号:22	694