

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5132008号  
(P5132008)

(45) 発行日 平成25年1月30日(2013.1.30)

(24) 登録日 平成24年11月16日(2012.11.16)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 27/02
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
請求項の数 21 (全 239 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2012-58538 (P2012-58538)  
 (22) 出願日 平成24年3月15日(2012.3.15)  
 (62) 分割の表示 特願2009-166187 (P2009-166187) の分割  
 原出願日 平成14年4月12日(2002.4.12)  
 (65) 公開番号 特開2012-165745 (P2012-165745A)  
 (43) 公開日 平成24年9月6日(2012.9.6)  
 審査請求日 平成24年3月15日(2012.3.15)  
 (31) 優先権主張番号 60/283,385  
 (32) 優先日 平成13年4月13日(2001.4.13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/350,366  
 (32) 優先日 平成14年1月24日(2002.1.24)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 597018381  
 ヒューマン ジノーム サイエンスーズ,  
 インコーポレイテッド  
 Human Genome Sciences, Inc.  
 アメリカ合衆国 メリーランド 2085  
 O, ロックビル, シャディー グローブ  
 ロード 14200  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

微生物の受託番号 ATCC 97149

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管内皮増殖因子2

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト被験体における角膜新生血管形成の処置のための組成物であって、該組成物は、ヒト血管内皮増殖因子因子-2 (VEGF-2) ポリペプチドに特異的に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントの有効量を含み、ヒト被験体の眼に投与されるものであり、該投与によって、該ヒト被験体における新たな血管形成が阻害され、該抗体またはその抗原結合フラグメントは、

(a) ATCC 寄託番号 PTA-4095 として寄託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のVHドメインのアミノ酸配列に少なくとも99%同一な第一のアミノ酸配列であって、該第一のアミノ酸配列は、ATCC 寄託番号 PTA-4095 として寄託されたハイブリドーマによって発現される抗体のVHCDR1、VHCDR2、およびVHCDR3領域を含む、第一のアミノ酸配列、および

ATCC 寄託番号 PTA-4095 として寄託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のVLドメインのアミノ酸配列を含む第二のアミノ酸配列、または

(b) 配列番号79で示される69D09 ScFvのVHドメインのアミノ酸配列に少なくとも99%同一な第一のアミノ酸配列であって、該第一のアミノ酸配列は、配列番号79のアミノ酸残基26~35のアミノ酸配列からなるVHCDR1、配列番号79のアミノ酸残基50~66のアミノ酸配列からなるVHCDR2、および配列番号79のアミノ酸残基99~107のアミノ酸配列からなるVHCDR3を含む、第一のアミノ酸配列、ならびに

配列番号 79 に示される 69D09 ScFv の VL ドメインのアミノ酸配列を含む第二のアミノ酸配列を含む、組成物。

**【請求項 2】**

前記角膜新血管形成が、角膜感染、免疫学的プロセス、アルカリやけど、外傷、炎症、毒性状態、栄養欠乏状態、またはコンタクトレンズを装着することの合併症に関連したものである、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 3】**

前記角膜感染が、トラコーマ、単純ヘルペス角膜炎、リーシュマニア症またはオンコセルカ症である、請求項 2 に記載の組成物。

10

**【請求項 4】**

前記免疫学的プロセスが、角膜移植片拒絶またはスティーヴンズ - ジョンソン症候群である、請求項 2 に記載の組成物。

**【請求項 5】**

前記組成物が生理食塩水を含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 6】**

前記組成物が、前記ヒト被験体の眼に局所投与されるものである、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 7】**

前記組成物が、注射によって、前記ヒト被験体の眼へ投与されるものである、請求項 1 に記載の組成物。

20

**【請求項 8】**

前記組成物が、角膜支質内への注射によって、前記ヒト被験体の眼へ投与されるものである、請求項 7 に記載の組成物。

**【請求項 9】**

前記組成物が、縁周囲角膜注射によって、前記ヒト被験体の眼へ投与されるものである、請求項 7 に記載の組成物。

**【請求項 10】**

前記組成物が、徐放性形態での注射によって、前記ヒト被験体の眼へ投与されるものである、請求項 7 に記載の組成物。

30

**【請求項 11】**

前記組成物が、ステロイドとともに投与されるものである、請求項 7 に記載の組成物。

**【請求項 12】**

前記組成物が、点眼剤形態で、前記ヒト被験体の眼へ投与されるものである、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 13】**

前記組成物が、角膜に結合する粘膜接着性ポリマーを含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 14】**

前記組成物が、前記ヒト被験体の眼の、眼の異常な血管新生の領域と角膜との間に投与されるものである、請求項 1 に記載の組成物。

40

**【請求項 15】**

前記組成物は、従来のステロイド療法の補助剤として、前記ヒト被験体に投与されるものである、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 16】**

前記組成物は、前記ヒト被験体の体重に対して、 $0.1 \text{ mg} / \text{kg} \sim 100 \text{ mg} / \text{kg}$  の前記単離抗体またはその抗原結合フラグメントの用量で投与されるものである、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 17】**

前記単離抗体はモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 18】**

50

前記単離抗体はヒト抗体またはヒト化抗体である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記抗原結合フラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、単鎖Fv、またはジスルフィド結合Fvである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

(a) ATCC 寄託番号 PTA - 4095 として寄託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体の VH ドメインのアミノ酸配列に少なくとも 99% 同一な第一のアミノ酸配列であって、該第一のアミノ酸配列は、ATCC 寄託番号 PTA - 4095 として寄託されたハイブリドーマによって発現される抗体の VHCDR1、VHCDR2、および VHCDR3 領域を含む、第一のアミノ酸配列、および

ATCC 寄託番号 PTA - 4095 として寄託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体の VL ドメインのアミノ酸配列を含む第二のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

(b) 配列番号 79 で示される 69D09 ScFv の VH ドメインのアミノ酸配列に少なくとも 99% 同一な第一のアミノ酸配列であって、該第一のアミノ酸配列は、配列番号 79 のアミノ酸残基 26 ~ 35 のアミノ酸配列からなる VHCDR1、配列番号 79 のアミノ酸残基 50 ~ 66 のアミノ酸配列からなる VHCDR2、および配列番号 79 のアミノ酸残基 99 ~ 107 のアミノ酸配列からなる VHCDR3 を含む、第一のアミノ酸配列、ならびに

配列番号 79 に示される 69D09 ScFv の VL ドメインのアミノ酸配列を含む第二のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

(発明の背景)

本発明は、新たに同定されたポリヌクレオチド、そのようなポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、そのようなポリヌクレオチドに特異的な抗体、そのような抗体の使用、ならびにそのような抗体の産生に関する。本発明のポリペプチドは、血管内皮増殖因子ファミリーのメンバーとして同定された。より詳細には、本発明のポリペプチドは、ヒト血管内皮増殖因子 2 (VEGF-2) である。本発明の抗体は、そのような VEGF-2 ポリペプチドに対して特異的である。本発明はまた、そのようなポリペプチドの作用を阻害することに関する。

【0002】

新たな血管の形成、すなわち新脈管形成は、胚の発生、それに続く成長、および組織修復のために必須である。新脈管形成はまた、新生物(すなわち、腫瘍および神経膠腫)のような特定の病理学的状態に必須な部分である。異常な新脈管形成は、炎症、慢性関節リウマチ、乾癬、および糖尿病性網膜症のような他の疾患に関連する(Folkman, J. および Klagsbrun, M., Science 235: 442 - 447, (1987))。

【0003】

酸性および塩基性の両方の線維芽細胞増殖因子分子は、内皮細胞および他の細胞タイプについてのマイトジェンである。アンギオトロピン(angiotropin)およびアンギオゲニン、新脈管形成を誘導し得るが、これらの機能は不明である(Folkman, J., Cancer Medicine, Lea and Febiger Press (153 - 170 頁) (1993))。血管内皮細胞に対して高度に選択的なマイトジェンは、血管内皮増殖因子、すなわち VEGF であり(Ferrara, N.ら、En

10

20

30

40

50

docr. Rev. 13: 19-32, (1992)), これは血管透過因子 (VPF) としても公知である。

【0004】

血管内皮増殖因子は、その標的細胞特異性が血管内皮細胞に制限されているようである、分泌型脈管形成マイトゲンである。マウスVEGF遺伝子は、特徴付けられ、そして胚形成におけるその発現パターンが解析されている。VEGFの持続的な発現が、有窓内皮に隣接する上皮細胞において(例えば、脈絡叢および腎糸球体において)観察された。このデータは、内皮細胞の増殖および分化の多機能性レギュレーターとしてのVEGFの役割に一致した(Breier, G.ら、Development 114: 521-532 (1992))。

10

【0005】

VEGFは、ヒト血小板由来増殖因子PDGFaおよびPDGFbとの配列相同性を共有する(Leung, D.W.ら、Science 246: 1306-1309, (1989))。相同性の程度は、それぞれ、約21%および23%である。ジスルフィド結合の形成に寄与する8つのシステイン残基は、これらのタンパク質において厳密に保存される。これらは類似するが、VEGFとPDGFとの間の特異的な相違が存在する。PDGFは結合組織についての主要な増殖因子であるが、VEGFは、内皮細胞に高度に特異的である。あるいは、スプライシングされたmRNAが、VEGF、PLGF、およびPDGFのいずれにおいても同定されており、そしてこれらの異なるスプライシング産物は、生物学的活性およびレセプター結合特異性が異なる。VEGFおよびPDGFは、ホモ二量体またはヘテロ二量体として機能し、そしてレセプターに結合し、これはレセプターの二量体化の後に内因性のチロシンキナーゼ活性を誘発する。

20

【0006】

VEGFは、選択的スプライシングによる、121、165、189、および206アミノ酸の4つの異なる形態を有する。VEGF121およびVEGF165は、可溶性でありそして新脈管形成を促進し得る。一方、VEGF189およびVEGF-206は、細胞表面におけるヘパリン含有プロテオグリカンに結合される。VEGFの時期的および空間的な発現は、血管の生理学的増殖に相関していた(Gajdusek, C.M., およびCarbon, S.J., Cell Physiol. 139: 570-579, (1989); McNeil, P.L.ら、J. Cell Biol. 109: 811-822, (1989))。その高親和性結合部位は、組織切片において内皮細胞上のみ位置付けられる(Jakeman, L.B.ら、Clin. Invest. 89: 244-253, (1989))。この因子は、下垂体細胞およびいくつかの腫瘍細胞株から単離され得、そしていくつかのヒト神経膠腫と関係している(Plate, K.H. Nature 359: 845-848 (1992))。興味深いことに、VEGF121またはVEGF165の発現は、チャイニーズハムスター卵巣細胞に、ヌードマウス中で腫瘍を形成する能力を与える(Ferrara, N.ら、J. Clin. Invest. 91: 160-170 (1993))。抗VEGFモノクローナル抗体によるVEGF機能の阻害は、免疫不全マウスにおける腫瘍増殖を阻害することが示された(Kim, K.J., Nature 362: 841-844 (1993))。さらに、VEGFレセプターのドミナントネガティブ変異体が、マウスにおける神経膠芽腫増殖を阻害することが示された。

30

40

【0007】

血管透過因子 (VPF) はまた、傷害の停止後でさえも血漿タンパク質に対する持続的な微小血管の高透過性 (microvascular hyperpermeability) (これは、正常な創傷治癒の特徴的な特性である) を担うことが見出されている。このことは、VPFが、創傷治癒における重要な因子であることを示唆する。Brown, L.F.ら、J. Exp. Med. 176: 1375-1379 (1992)。

【0008】

VEGFの発現は、血管新生した組織(例えば、肺、心臓、胎盤、および固形腫瘍)に

50

において高く、そして時間的および空間的の両方で新脈管形成に相関する。VEGFはまた、インビボで脈管形成を誘導することが示されている。新脈管形成は正常組織、特に血管組織の修復に必須であるので、VEGFは血管組織修復を促進させる際の使用が提案されてきた(例えば、アテローム性動脈硬化症において)。

【0009】

Chenらに1991年12月17日に発行された米国特許第5,073,492号は、適切な環境において内皮細胞の増殖を相乗的に増強するための方法を開示する。この方法は、環境に、VEGF、エフェクター、および血清由来因子を添加する工程を包含する。また、血管内皮細胞増殖因子CサブユニットDNAが、ポリメラーゼ連鎖反応技術により調製された。このDNAは、ヘテロ二量体またはホモ二量体のいずれとしても存在し得るタンパク質をコードする。このタンパク質は、哺乳動物血管内皮細胞マイトジェンであり、そして、1992年9月30日に公開された欧州特許出願第92302750.2号に開示されるように、それ自体が血管の発達および修復の促進のために有用である。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

(発明の要旨)

本発明のポリペプチドは、ヒトVEGFに対するアミノ酸配列相同性に基づいて、新規な血管内皮増殖因子として推定的に同定された。

【0011】

本発明の1つの局面によれば、新規な成熟ポリペプチド、ならびに生物学的に活性であり、かつ診断的または治療的に有用な、そのフラグメント、アナログ、および誘導体が提供される。本発明のポリペプチドは、ヒト起源のポリペプチドである。

20

【0012】

本発明の別の局面によれば、それぞれ配列番号2または4に示されるアミノ酸配列を有する、全長型または短縮型のVEGF-2ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子、あるいはATCC受託番号97149(1995年5月12日に寄託)またはATCC受託番号75698(1994年3月4日に寄託)として細菌宿主中で寄託されたcDNAクローンによってコードされるアミノ酸配列が提供される。

【0013】

本発明はまた、生物学的に活性であり、かつ診断的または治療的に有用な、VEGF-2のフラグメント、アナログ、および誘導体に関する。

30

【0014】

本発明のなお別の局面によれば、組換え技術により、そのようなポリペプチドを産生するためのプロセスが提供される。このプロセスは、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含む、組換え原核生物宿主細胞および/または組換え真核生物宿主細胞を、このタンパク質の発現およびその後のこのタンパク質の回収を促進する条件下で培養する工程を包含する。

【0015】

本発明のなおさらなる局面によれば、治療的目的のため(例えば、新脈管形成、創傷治療、損傷した骨および組織の増殖を刺激するため、ならびに血管組織を修復する促進のため)に、そのようなポリペプチド、またはそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを利用するためのプロセスが提供される。特に、末梢動脈疾患(例えば、重大な四肢虚血および冠状動脈疾患)の処置のために、そのようなポリペプチドまたはそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを利用するためのプロセスが提供される。

40

本発明のなお別の局面によれば、そのようなポリペプチドに対する抗体、およびそのようなポリペプチドを産生するためのプロセスが提供され、そして、このような抗体を利用するためのプロセスが提供される。

【0016】

ファージディスプレイ技術を使用して、本発明者らは、VEGF-2に免疫特異的に結

50

合する単鎖抗体分子（「s c F v」）（例えば、全長 V E G F - 2 に免疫特異的に結合する s c F v、V E G F - 2 ポリペプチドの成熟形態に免疫特異的に結合する s c F v、V E G F - 2 のプロタンパク質形態に免疫特異的に結合する s c F v、V E G F - 2 の分泌形態に免疫特異的に結合する s c F v、および/または V E G F - 2 の全長形態および分泌形態の両方に免疫特異的に結合する s c F v）を同定した。これらの s c F v のフラグメントまたは改変体を含む分子、あるいはこれらの s c F v のフラグメントまたは改変体からなる分子（例えば、表 2 で言及されるアミノ酸配列いずれか 1 つを有する、V H ドメイン、V H C D R、V L ドメイン、または V L C D R が挙げられる）は、全長 V E G F - 2、V E G F - 2 ポリペプチドの成熟形態、V E G F - 2 のプロタンパク質形態、V E G F - 2 の分泌形態ならびに/または V E G F - 2 の全長形態および分泌形態の両方に免疫特異的に結合し、これらの分子はまた、これらの s c F v をコードする核酸分子および/または分子と同様に、本発明に含まれる。

10

## 【 0 0 1 7 】

特に、本発明は、以下の表 2 において言及される配列番号 7 2 ~ 配列番号 8 3 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むか、または、これらのアミノ酸配列からなる s c F v に関する。これらの s c F v のフラグメントまたは改変体を含む分子、またはこれらからなる分子（例えば、例えば、表 2 で言及されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを有する、V H ドメイン、V H C D R、V L ドメイン、または V L C D R が挙げられる）は、全長 V E G F - 2、V E G F - 2 のプロタンパク質形態、V E G F - 2 の分泌形態および/または V E G F - 2 の全長形態および分泌形態の両方に免疫特異的に結合し、これらの分子はまた、これらの s c F v をコードする核酸分子および/または分子と同様に、本発明に含まれる。

20

## 【 0 0 1 8 】

本発明は、V E G F - 2 ポリペプチドまたは V E G F - 2 ポリペプチドフラグメントもしくは V E G F - 2 の改変体に免疫特異的に結合する、抗体（抗体フラグメントまたはそれらの改変体を含む分子、またはそれらからなる分子を含む）を包含する。特に、本発明は、ヒト V E G F - 2 のポリペプチド（例えば、配列番号 2 または配列番号 4、配列番号 1 8）またはポリペプチドフラグメントもしくは改変体、全長 V E G F - 2、V E G F - 2 ポリペプチドのプロタンパク質形態、成熟 V E G F - 2 ポリペプチド、または V E G F - 2 ポリペプチドの分泌形態に免疫特異的に結合する抗体（抗体フラグメントまたはそれらの改変体を含む分子、またはそれらからなる分子を含む）を包含する。

30

## 【 0 0 1 9 】

好ましい実施形態において、本発明は、全長 V E G F - 2 に免疫特異的に結合する、抗体（抗体フラグメントまたはそれらの改変体を含む分子、またはそれらからなる分子を含む）を包含する。他の好ましい実施形態において、本発明は、分泌形態の V E G F - 2 に免疫特異的に結合する抗体（抗体フラグメントまたはそれらの改変体を含む分子、またはそれらからなる分子を含む）を包含する。

## 【 0 0 2 0 】

本発明は、疾患または障害を予防、処置、または改善するための方法および組成物に関連し、この方法は、V E G F - 2 ポリペプチドまたはそれらのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する、有効量の、1 以上の抗体またはそれらのフラグメントもしくは改変体あるいは関連する分子を、動物、好ましくはヒトに投与する工程を包含する。特定の実施形態において、本発明は、V E G F - 2 機能または V E G F - 2 レセプター（例えば、f l t - 4 または f l k - 1）機能あるいは異常な、V E G F - 2 発現または V E G F - 2 レセプター（例えば、f l t - 4 または f l k - 1）発現に関連する、疾患または障害を予防、処置、または改善するための方法または組成物に関連し、この方法は、V E G F - 2 またはそれらのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する、有効量の、1 以上の抗体またはそれらのフラグメントもしくは改変体あるいは関連する分子を、動物、好ましくはヒトに投与する工程を包含する。非常に好ましい実施形態において、本発明は、腫瘍および腫瘍転移、特に乳癌、脳腫瘍、結腸癌、または前立腺癌あるいはリンパ

40

50

管腫に関連する腫瘍および腫瘍転移を予防、処置、または改善するための、抗体に基づく方法および組成物に関連する。本発明の抗体を使用して、処置、予防、そして/または回復され得る、他の疾患および障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：炎症性疾患、慢性関節リウマチ、乾癬、糖尿病性網膜症および増殖障害。

【0021】

本発明はまた、疾患または障害を検出、診断、または予後診断するための方法および組成物を包含し、この方法は、VEGF-2またはそれらのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する、有効量の、1以上の抗体またはそれらのフラグメントもしくは改変体あるいは関連する分子を動物、好ましくは、ヒトに投与する工程を包含する。特定の実施形態において、本発明はまた、VEGF-2機能またはVEGF-2レセプター機能あるいは異常な、VEGF-2発現またはVEGF-2レセプター発現の発現に関連する、疾患または障害を検出、診断、または予後診断するための方法および組成物を包含し、この方法は、VEGF-2またはそれらのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する、有効量の、1以上の抗体またはそれらのフラグメントもしくは改変体あるいは関連する分子を動物、好ましくはヒトに投与する工程を包含する。

10

【0022】

非常に好ましい実施形態において、本発明は、腫瘍および腫瘍転移、特に乳癌、脳腫瘍、結腸癌、または前立腺癌あるいはリンパ管腫に関連する腫瘍および腫瘍転移を検出、診断、または予後診断するための、抗体に基づく方法および組成物に関連する。本発明の抗体を使用して、処置、予防、そして/または予後診断され得る、他の疾患および障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：炎症性疾患、慢性関節リウマチ、乾癬、糖尿病性網膜症および増殖障害。

20

【0023】

本発明の別の実施形態は、生物学的サンプルの中のVEGF-2発現をモニターする診断ツールとして本発明の抗体を使用することを包含する。

【0024】

本発明はまた、検出可能標識（例えば、酵素、蛍光標識、発光標識、または生物発光標識）に結合している1つ以上のVEGF-2ポリペプチドに結合する抗体を提供する。本発明はまた、治療剤または細胞傷害性因子に結合している1つ以上のVEGF-2ポリペプチドに結合する抗体を提供する。本発明はまた、放射性物質に結合している1つ以上のVEGF-2ポリペプチドに結合する抗体を提供する。

30

【0025】

本発明はまた、VEGF-2ポリペプチドに結合して、そしてVEGF-2アゴニストまたはVEGF-2アンタゴニストのいずれかとして作用する抗体を提供する。

【0026】

本発明はさらに、VEGF-2レセプター（例えば、flt-1および/またはflk-4）に結合するVEGF-2を阻害または破壊する抗体を提供する（例えば、実施例33を参照のこと）。他の実施形態において、本発明の抗体は、E1k-1のVEGF-2誘導性リン酸化を阻害する（例えば、実施例35参照のこと）。なお他の実施形態において、本発明の抗体は、脈管のVEGF-2誘導性増殖および/または内非細胞増殖を阻害する（例えば、実施例34を参照のこと）。なお好ましい他の実施形態において、本発明の抗体は、脈管形成を阻害する（例えば、実施例16または実施例23参照のこと）。

40

【0027】

非常に好ましい実施形態において、VEGF-2抗体は、腫瘍または腫瘍転移を処置、予防、改善するために使用される。他の非常に好ましい実施形態において、本発明のVEGF-2抗体は、単独で、または他の治療化合物（特に、抗癌剤）と併用して、個体に投与され、腫瘍および腫瘍転移を処置、予防、または改善する。なお他の非常に好ましい実施形態において、本発明のVEGF-2抗体は、単独で、または他の抗癌処置（例えば、放射線療法、または外科手術）と併用して、個体に投与され、腫瘍および腫瘍転移を処置、予防、または改善する。

50

## 【 0 0 2 8 】

本発明はまた、本発明の抗体（抗体フラグメントまたは抗体改変体を含むか、またはこれらからなる、分子（例えば、s c F v、V Hドメイン、またはV Lドメイン）を含む）をコードする単離された核酸分子を提供する。本発明はまた、本発明の抗体（抗体フラグメントまたは抗体改変体を含むか、またはこれらからなる、分子（例えば、s c F v、V HドメインまたはV Lドメイン）を含む）をコードする核酸分子で形質転換された宿主細胞およびそれらの子孫を提供する。本発明はまた、本発明の抗体（抗体フラグメントまたはそれらの改変体を含む分子、またはそれらからなる分子を含む）を産生するための方法を提供する。本発明はさらに、核酸分子から、本発明の抗体（抗体フラグメントまたはそれらの改変体を含む分子、またはそれらからなる、分子を含む）を発現する方法を提供する。本発明のこれらおよび他の局面は、以下にさらに詳細に記載されている。

10

## 【 0 0 2 9 】

本発明のさらなる別の局面に従って、このようなポリペプチドに対するアンタゴニストが提供され、このアンタゴニストは、このようなポリペプチドの作用を阻害するために、例えば、腫瘍の脈管形成を妨げるために使用され得、従って、糖尿病性網膜症、炎症、慢性関節リウマチおよび乾癬を処置するために、腫瘍増殖を阻害する。

## 【 0 0 3 0 】

本発明の別の局面に従って、本発明の核酸配列に特異的にハイブリダイズするのに十分な長さの核酸分子を含む核酸プローブが提供される。

## 【 0 0 3 1 】

本発明の別の局面に従って、本発明の核酸配列およびこのような核酸配列によってコードされるタンパク質における変異に関連する、疾患または疾患に対する感受性を、診断する方法が提供される。

20

## 【 0 0 3 2 】

本発明のなおさらなる局面に従って、自然科学研究、DNA合成、およびDNAベクターの製造に関連するインピトロの目的のための、このようなポリペプチドまたはこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを使用するためのプロセスが提供される。

## 【 0 0 3 3 】

本発明はまた、以下の項目を提供する。

## (項目1)

1次抗体をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、該1次抗体は、2次抗体に少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%同一であり、該2次抗体は、以下：

- (a) 69D09 s c F vのV Hドメインの少なくとも1つのC D R領域；
- (b) 69D09 s c F vのV Hドメインの少なくとも2つのC D R領域；
- (c) 69D09 s c F vのV Hドメインの少なくとも3つのC D R領域；
- (d) 69D09 s c F vのV Lドメインの少なくとも1つのC D R領域；
- (e) 69D09 s c F vのV Lドメインの少なくとも2つのC D R領域；および
- (f) 69D09 s c F vのV Lドメインの少なくとも3つのC D R領域

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、該1次抗体が、V E G F - 2ポリペプチドを免疫特異的に阻害する、ポリヌクレオチド。

40

## (項目2)

項目1に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、上記V E G F - 2ポリペプチドが以下：

- (a) 配列番号18のアミノ酸1 - 419を含むV E G F - 2ポリペプチド；
- (b) 配列番号18のアミノ酸32 - 419を含むV E G F - 2ポリペプチド；
- (c) 配列番号18のアミノ酸103 - 227を含むV E G F - 2ポリペプチド；
- (d) 配列番号18のアミノ酸112 - 227を含むV E G F - 2ポリペプチド；
- (e) 配列番号18のアミノ酸103 ~ 227からなる各々2つからなるポリペプチド

二量体V E G F - 2；

50



( f ) 各々が配列番号 18 のアミノ酸 103 ~ 227 からなる 2 つのポリペプチドからなる二量体 V E G F - 2 ポリペプチド ;

( g ) A T C C 寄託番号 97149 に含まれる c D N A によりコードされる全長 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;

( h ) A T C C 寄託番号 97149 に含まれる c D N A によりコードされるプロタンパク質 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;

( i ) A T C C 寄託番号 97149 に含まれる c D N A によりコードされる分泌 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;

( j ) A T C C 寄託番号 75698 に含まれる c D N A によりコードされる全長 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;

10

( k ) A T C C 寄託番号 75698 に含まれる c D N A によりコードされるプロタンパク質 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;

( l ) A T C C 寄託番号 75698 に含まれる c D N A によりコードされる分泌 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ; および

( m ) 配列番号 18 の V E G F - 2 ポリペプチドの分泌形態のアミノ酸配列、からなる群より選択される、単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 3 )

項目 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、該 1 次抗体が、69D09 s c F v の V H ドメインを含む 2 次抗体に少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または少なくとも 100 % 同一である、単離されたポリヌクレオチド。

20

( 項目 4 )

項目 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、該 1 次抗体が、69D09 s c F v の V H ドメインを含む 2 次抗体に少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または少なくとも 100 % 同一である、単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 5 )

項目 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、該 1 次抗体が、69D09 s c F v の V H ドメインおよび定常ドメインを含む 2 次抗体に少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または少なくとも 100 % 同一である、単離されたポリヌクレオチド。

30

( 項目 6 )

項目 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、該 1 次抗体が、69D09 s c F v の V L ドメインおよび定常ドメインを含む 2 次抗体に少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または少なくとも 100 % 同一である、単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 7 )

項目 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、該 1 次抗体が、69D09 s c F v の V H ドメインおよび V H ドメインを含む 2 次抗体に少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または少なくとも 100 % 同一である、単離されたポリヌクレオチド。

40

( 項目 8 )

項目 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、該 1 次抗体が、69D09 s c F v の V H ドメインおよび定常ドメインならびに V L ドメインおよび定常ドメインを含む 2 次抗体に少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または少なくとも 100 % 同一である、単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 9 )

上記定常ドメインが I g G 定常ドメインまたは I g A 定常ドメインである、項目 5 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

50

(項目10)

上記定常ドメインが 定常ドメインまたは 定常ドメインである、項目6に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目11)

上記第1の定常ドメインが I g G 定常ドメインまたは I g A 定常ドメインであって、上記第2定常ドメインが 定常ドメインまたは 定常ドメインである、項目8に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目12)

上記1次抗体が F a b フラグメント、F a b ' フラグメント、F ( a b ' )<sub>2</sub>、F v、一本鎖 F v、またはジスルフィド結合 F v である、項目1~2のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

10

(項目13)

上記1次抗体がモノクローナル抗体である、項目1~12のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目14)

上記1次抗体がヒト抗体である、項目1~13のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目15)

上記1次抗体がヒト化抗体である、項目1~13のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

20

(項目16)

上記ポリヌクレオチドが、異種ポリヌクレオチドに融合されている、項目1~15のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目17)

項目1~16のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、ベクター。

(項目18)

項目17に記載のベクターを含む、宿主細胞。

(項目19)

項目1~16のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、宿主細胞。

(項目20)

30

抗体を作製するための方法であって、以下：

(a) 項目1~16のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチドによりコードされる抗体を発現させる工程；および

(b) 該抗体を回収する工程を包含する、方法。

(項目21)

項目20に記載の方法により作製される抗体。

(項目22)

1次抗体をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、該1次抗体は、以下：

(a) 72D09 scFvのVHドメインの少なくとも1つのCDR領域；

(b) 25A07 scFvのVHドメインの少なくとも1つのCDR領域；

40

(c) 32G10X scFvのVHドメインの少なくとも1つのCDR領域；

(d) 30E06X scFvのVHドメインの少なくとも1つのCDR領域；

(e) 17D06 scFvのVHドメインの少なくとも1つのCDR領域；

(f) 16C10 scFvのVHドメインの少なくとも1つのCDR領域；

(g) 16B06 scFvのVHドメインの少なくとも1つのCDR領域；

(h) 19B09 scFvのVHドメインの少なくとも1つのCDR領域；

(i) 20D05 scFvのVHドメインの少なくとも1つのCDR領域；

(j) 20G02 scFvのVHドメインの少なくとも1つのCDR領域；

(k) 20G11 scFvのVHドメインの少なくとも1つのCDR領域；

(l) 72D09 scFvのVHドメインの少なくとも2つのCDR領域；

50

(m)	25A07	scFvのVHドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(n)	32G10X	scFvのVHドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(o)	30E06X	scFvのVHドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(p)	17D06	scFvのVHドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(q)	16C10	scFvのVHドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(r)	16B06	scFvのVHドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(s)	19B09	scFvのVHドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(t)	20D05	scFvのVHドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(u)	20G02	scFvのVHドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(v)	20G11	scFvのVHドメインの少なくとも2つのCDR領域；	10
(w)	72D09	scFvのVHドメインの少なくとも3つのCDR領域；	
(x)	25A07	scFvのVHドメインの少なくとも3つのCDR領域；	
(y)	32G10X	scFvのVHドメインの少なくとも3つのCDR領域；	
(z)	30E06X	scFvのVHドメインの少なくとも3つのCDR領域；	
(aa)	17D06	scFvのVHドメインの少なくとも3つのCDR領域；	
(ab)	16C10	scFvのVHドメインの少なくとも3つのCDR領域；	
(ac)	16B06	scFvのVHドメインの少なくとも3つのCDR領域；	
(ad)	19B09	scFvのVHドメインの少なくとも3つのCDR領域；	
(ae)	20D05	scFvのVHドメインの少なくとも3つのCDR領域；	
(af)	20G02	scFvのVHドメインの少なくとも3つのCDR領域；	20
(ag)	20G11	scFvのVHドメインの少なくとも3つのCDR領域；	
(ah)	72D09	scFvのVLドメインの少なくとも1つのCDR領域；	
(ai)	25A07	scFvのVLドメインの少なくとも1つのCDR領域；	
(aj)	32G10X	scFvのVLドメインの少なくとも1つのCDR領域；	
(ak)	30E06X	scFvのVLドメインの少なくとも1つのCDR領域；	
(al)	17D06	scFvのVLドメインの少なくとも1つのCDR領域；	
(am)	16C10	scFvのVLドメインの少なくとも1つのCDR領域；	
(an)	16B06	scFvのVLドメインの少なくとも1つのCDR領域；	
(ao)	19B09	scFvのVLドメインの少なくとも1つのCDR領域；	
(ap)	20D05	scFvのVLドメインの少なくとも1つのCDR領域；	30
(aq)	20G02	scFvのVLドメインの少なくとも1つのCDR領域；	
(ar)	20G11	scFvのVLドメインの少なくとも1つのCDR領域；	
(as)	72D09	scFvのVLドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(at)	25A07	scFvのVLドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(au)	32G10X	scFvのVLドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(av)	30E06X	scFvのVLドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(aw)	17D06	scFvのVLドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(ax)	16C10	scFvのVLドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(ay)	16B06	scFvのVLドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(az)	19B09	scFvのVLドメインの少なくとも2つのCDR領域；	40
(ba)	20D05	scFvのVLドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(bb)	20G02	scFvのVLドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(bc)	20G11	scFvのVLドメインの少なくとも2つのCDR領域；	
(bd)	72D09	scFvのVLドメインの少なくとも3つのCDR領域；	
(be)	25A07	scFvのVLドメインの少なくとも3つのCDR領域；	
(bf)	32G10X	scFvのVLドメインの少なくとも3つのCDR領域；	
(bg)	30E06X	scFvのVLドメインの少なくとも3つのCDR領域；	
(bh)	17D06	scFvのVLドメインの少なくとも3つのCDR領域；	
(bi)	16C10	scFvのVLドメインの少なくとも3つのCDR領域；	
(bj)	16B06	scFvのVLドメインの少なくとも3つのCDR領域；	50

( b k ) 1 9 B 0 9 s c F v の V L ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域 ;  
 ( b l ) 2 0 D 0 5 s c F v の V L ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域 ;  
 ( b m ) 2 0 G 0 2 s c F v の V L ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域 ; および  
 ( b n ) 2 0 G 1 1 s c F v の V L ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む 2 次抗体に少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 1 0 0 % 同一であり、ここで、該 1 次抗体が、免疫特異的に V E G F - 2 ポリペプチドを阻害する、単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 2 3 )

項目 2 3 に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、上記 V E G F - 2 ポリペプチドは、以下： 10

- ( a ) 配列番号 1 8 のアミノ酸 1 - 4 1 9 を含む V E G F - 2 ポリペプチド ;
- ( b ) 配列番号 1 8 のアミノ酸 3 2 - 4 1 9 を含む V E G F - 2 ポリペプチド ;
- ( c ) 配列番号 1 8 のアミノ酸 1 0 3 - 2 2 7 を含む V E G F - 2 ポリペプチド ;
- ( d ) 配列番号 1 8 のアミノ酸 1 1 2 - 2 2 7 を含む V E G F - 2 ポリペプチド ;
- ( e ) 各々が配列番号 1 8 のアミノ酸 1 0 3 ~ 2 2 7 からなる 2 つのポリペプチドからなる二量体 V E G F - 2 ポリペプチド ;
- ( f ) 各々が配列番号 1 8 のアミノ酸 1 0 3 ~ 2 2 7 からなる 2 つのポリペプチドからなる二量体 V E G F - 2 ポリペプチド ;
- ( g ) A T C C 寄託番号 9 7 1 4 9 に含まれる c D N A によりコードされる全長 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ; 20
- ( h ) A T C C 寄託番号 9 7 1 4 9 に含まれる c D N A によりコードされるプロタンパク質 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;
- ( i ) A T C C 寄託番号 9 7 1 4 9 に含まれる c D N A によりコードされる分泌 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;
- ( j ) A T C C 寄託番号 7 5 6 9 8 に含まれる c D N A によりコードされる全長 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;
- ( k ) A T C C 寄託番号 7 5 6 9 8 に含まれる c D N A によりコードされるプロタンパク質 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;
- ( l ) A T C C 寄託番号 7 5 6 9 8 に含まれる c D N A によりコードされる分泌 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ; および 30
- ( m ) 配列番号 1 8 の V E G F - 2 ポリペプチドの分泌形態のアミノ酸配列からなる群より選択される、単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 2 4 )

項目 2 2 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、上記 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 1 0 0 % 同一であり、該 2 次抗体は、以下：

- ( a ) 7 2 D 0 9 ;
  - ( b ) 2 5 A 0 7 ; 40
  - ( c ) 3 2 G 1 0 X ;
  - ( d ) 3 0 E 0 6 X ;
  - ( e ) 1 7 D 0 6 ;
  - ( f ) 1 6 C 1 0 ;
  - ( g ) 1 6 B 0 6 ;
  - ( h ) 1 9 B 0 9 ;
  - ( i ) 2 0 D 0 5 ;
  - ( j ) 2 0 G 0 2 ; および
  - ( k ) 2 0 G 1 1
- からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株により発現される抗体の V H ドメインを 50

含む、単離されたポリヌクレオチド。

(項目 2 5)

項目 2 2 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、上記 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 1 0 0 % 同一であり、該 2 次抗体は、以下：

- ( a ) 7 2 D 0 9 ;
- ( b ) 2 5 A 0 7 ;
- ( c ) 3 2 G 1 0 X ;
- ( d ) 3 0 E 0 6 X ;
- ( e ) 1 7 D 0 6 ;
- ( f ) 1 6 C 1 0 ;
- ( g ) 1 6 B 0 6 ;
- ( h ) 1 9 B 0 9 ;
- ( i ) 2 0 D 0 5 ;
- ( j ) 2 0 G 0 2 ; および
- ( k ) 2 0 G 1 1

10

からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株により発現される抗体の V L ドメインを含む、単離されたポリヌクレオチド。

(項目 2 6)

20

項目 2 2 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、上記 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 1 0 0 % 同一であり、該 2 次抗体は、以下：

- ( a ) 7 2 D 0 9 ;
- ( b ) 2 5 A 0 7 ;
- ( c ) 3 2 G 1 0 X ;
- ( d ) 3 0 E 0 6 X ;
- ( e ) 1 7 D 0 6 ;
- ( f ) 1 6 C 1 0 ;
- ( g ) 1 6 B 0 6 ;
- ( h ) 1 9 B 0 9 ;
- ( i ) 2 0 D 0 5 ;
- ( j ) 2 0 G 0 2 ; および
- ( k ) 2 0 G 1 1

30

からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株により発現される抗体の V H ドメインおよび定常ドメインを含む、単離されたポリヌクレオチド。

(項目 2 7)

項目 2 2 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、上記 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 1 0 0 % 同一であり、該 2 次抗体は、以下：

40

- ( a ) 7 2 D 0 9 ;
- ( b ) 2 5 A 0 7 ;
- ( c ) 3 2 G 1 0 X ;
- ( d ) 3 0 E 0 6 X ;
- ( e ) 1 7 D 0 6 ;
- ( f ) 1 6 C 1 0 ;
- ( g ) 1 6 B 0 6 ;
- ( h ) 1 9 B 0 9 ;

50

- ( i ) 2 0 D 0 5 ;
- ( j ) 2 0 G 0 2 ; および
- ( k ) 2 0 G 1 1

からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株により発現される抗体のV Lドメインおよび定常ドメインを含む、単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 2 8 )

項目 2 2 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、上記 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 1 0 0 % 同一であり、該 2 次抗体は、以下：

- ( a ) 7 2 D 0 9 ;
- ( b ) 2 5 A 0 7 ;
- ( c ) 3 2 G 1 0 X ;
- ( d ) 3 0 E 0 6 X ;
- ( e ) 1 7 D 0 6 ;
- ( f ) 1 6 C 1 0 ;
- ( g ) 1 6 B 0 6 ;
- ( h ) 1 9 B 0 9 ;
- ( i ) 2 0 D 0 5 ;
- ( j ) 2 0 G 0 2 ; および
- ( k ) 2 0 G 1 1

10

からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株により発現される抗体のV HドメインおよびV Lドメインを含む、単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 2 9 )

項目 2 2 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、上記 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 1 0 0 % 同一であり、該 2 次抗体は、以下：

- ( a ) 7 2 D 0 9 ;
- ( b ) 2 5 A 0 7 ;
- ( c ) 3 2 G 1 0 X ;
- ( d ) 3 0 E 0 6 X ;
- ( e ) 1 7 D 0 6 ;
- ( f ) 1 6 C 1 0 ;
- ( g ) 1 6 B 0 6 ;
- ( h ) 1 9 B 0 9 ;
- ( i ) 2 0 D 0 5 ;
- ( j ) 2 0 G 0 2 ; および
- ( k ) 2 0 G 1 1

30

からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株により発現される抗体のV Hドメインおよび定常ドメインならびにV Lドメインおよび定常ドメインを含む、単離されたポリヌクレオチド。

40

( 項目 3 0 )

上記定常ドメインが、I g G 定常ドメインまたは I g A 定常ドメインである、項目 2 6 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 3 1 )

上記定常ドメインが、定常ドメインまたは 定常ドメインである、項目 2 7 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 3 2 )

上記第 1 の定常ドメインが I g G 定常ドメインまたは I g A 定常ドメインであって、上記第 2 定常ドメインが 定常ドメインまたは 定常ドメインである、項目 2 9 に記載の単

50

離されたポリヌクレオチド。

(項目 3 3)

上記抗体が F a b フラグメント、F a b ' フラグメント、F ( a b ' ) 2、F v、一本鎖 F v、またはジスルフィド結合 F v である、請求 2 2 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 3 4)

上記 1 次抗体がモノクローナル抗体である、項目 2 2 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 3 5)

上記 1 次抗体がヒト抗体である、項目 2 2 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

10

(項目 3 6)

上記 1 次抗体がヒト化抗体である、項目 2 2 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 3 7)

上記ポリヌクレオチドが、異種ポリヌクレオチドに融合されている、項目 2 2 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 3 8)

項目 2 2 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、ベクター。

20

(項目 3 9)

項目 3 8 に記載のベクターを含む、単離された宿主細胞。

(項目 4 0)

項目 2 2 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、単離された宿主細胞。

(項目 4 1)

抗体を作製するための方法であって、以下：

( a ) 項目 2 2 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドによりコードされる抗体を発現させる工程；および

( b ) 該抗体を回収する工程を包含する、方法。

30

(項目 4 2)

項目 4 1 に記載の方法により作製される抗体。

(項目 4 3)

2 次抗体に少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 1 0 0 % 同一な 1 次抗体であって、該 2 次抗体が、以下：

( a ) 6 9 D 0 9 s c F v の V H ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；

( b ) 6 9 D 0 9 s c F v の V H ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域；

( c ) 6 9 D 0 9 s c F v の V H ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域；

( d ) 6 9 D 0 9 s c F v の V L ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；

40

( e ) 6 9 D 0 9 s c F v の V L ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域；および

( f ) 6 9 D 0 9 s c F v の V L ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、該 1 次抗体が V E G F - 2 ポリペプチドを免疫特異的に阻害する、単離された 1 次抗体。

(項目 4 4)

項目 4 3 に記載の単離された 1 次抗体であって、上記単離された 1 次抗体が、以下：

( a ) 配列番号 1 8 のアミノ酸 1 - 4 1 9 を含む V E G F - 2 ポリペプチド；

( b ) 配列番号 1 8 のアミノ酸 3 2 - 4 1 9 を含む V E G F - 2 ポリペプチド；

( c ) 配列番号 1 8 のアミノ酸 1 0 3 - 2 2 7 を含む V E G F - 2 ポリペプチド；

( d ) 配列番号 1 8 のアミノ酸 1 1 2 - 2 2 7 を含む V E G F - 2 ポリペプチド；

50

( e ) 各々が配列番号 18 のアミノ酸 103 ~ 227 からなる 2 つのポリペプチド二量体 VEGF - 2 ;

( f ) 各々が配列番号 18 のアミノ酸 103 ~ 227 からなる 2 つのポリペプチドからなる二量体 VEGF - 2 ポリペプチド ;

( g ) ATCC 寄託番号 97149 に含まれる cDNA によりコードされる全長 VEGF - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;

( h ) ATCC 寄託番号 97149 に含まれる cDNA によりコードされるプロタンパク質 VEGF - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;

( i ) ATCC 寄託番号 97149 に含まれる cDNA によりコードされる分泌 VEGF - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;

( j ) ATCC 寄託番号 75698 に含まれる cDNA によりコードされる全長 VEGF - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;

( k ) ATCC 寄託番号 75698 に含まれる cDNA によりコードされるプロタンパク質 VEGF - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;

( l ) ATCC 寄託番号 75698 に含まれる cDNA によりコードされる分泌 VEGF - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ; および

( m ) 配列番号 18 の VEGF - 2 ポリペプチドの分泌形態のアミノ酸配列からなる群より選択される VEGF - 2 ポリペプチドに免疫特異的に結合する、単離された 1 次抗体。

( 項目 45 )

項目 43 ~ 44 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体であって、該 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または少なくとも 100 % 同一であり、該 2 次抗体が、69D09 scFv の VH ドメインを含む、単離された 1 次抗体。

( 項目 46 )

項目 43 ~ 44 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体であって、該 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または少なくとも 100 % 同一であり、該 2 次抗体が、69D09 scFv の VH ドメインを含む、単離された 1 次抗体。

( 項目 47 )

項目 43 ~ 44 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体であって、該 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または少なくとも 100 % 同一であり、該 2 次抗体が、69D09 scFv の VH ドメインおよび定常ドメインを含む、単離された 1 次抗体。

( 項目 48 )

項目 43 ~ 44 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体であって、該 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または少なくとも 100 % 同一であり、該 2 次抗体が、69D09 scFv の VL ドメインおよび定常ドメインを含む、単離された 1 次抗体。

( 項目 49 )

項目 43 ~ 44 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体であって、該 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または少なくとも 100 % 同一であり、該 2 次抗体が、69D09 scFv の VH ドメインおよび VH ドメインを含む、単離された 1 次抗体。

( 項目 50 )

項目 43 ~ 44 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体であって、該 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または少なくとも 100 % 同一であり、該 2 次抗体が、69D09 scFv の VH ドメインおよび定常ドメインならびに VL ドメインおよび定常ドメインを含む、単離された 1 次抗体。

10

20

30

40

50



(項目51)

上記定常ドメインが、I g G定常ドメインまたはI g A定常ドメインである、項目47に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目52)

上記定常ドメインが、定常ドメインまたは定常ドメインである、項目48に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目53)

上記第1の定常ドメインがI g G定常ドメインまたはI g A定常ドメインであって、上記第2定常ドメインが定常ドメインまたは定常ドメインである、項目50に記載の単離されたポリヌクレオチド。

10

(項目54)

上記単離された1次抗体がF a bフラグメント、F a b 'フラグメント、F ( a b ' )<sub>2</sub>、F v、一本鎖F v、またはジスルフィド結合F vである、請求43~44のいずれか1項に記載の単離された1次抗体。

(項目55)

上記1次抗体がモノクローナル抗体である、項目43~54のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目56)

上記単離された1次抗体がヒト抗体またはヒト化抗体である、項目43~55のいずれか1項に記載の単離された1次抗体。

20

(項目57)

項目43~56のいずれか1項に記載の単離された1次抗体であって、該単離された1次抗体は、以下：

- (a)  $10^{-7}$  M以下の解離定数 ( $K_D$ ) ;
- (b)  $10^{-8}$  M以下の解離定数 ( $K_D$ ) ;
- (c)  $10^{-9}$  M以下の解離定数 ( $K_D$ ) ;
- (d)  $10^{-10}$  M以下の解離定数 ( $K_D$ ) ;
- (e)  $10^{-11}$  M以下の解離定数 ( $K_D$ ) ;
- (f)  $10^{-12}$  M以下の解離定数 ( $K_D$ ) ;

からなる群より選択される解離定数 ( $K_D$ ) を有する、単離された1次抗体。

30

(項目58)

項目43~57のいずれか1項に記載の単離された1次抗体であって、該単離された1次抗体は、以下：

- (a)  $10^{-3}$  / s e c以下のオフレート
- (b)  $10^{-4}$  / s e c以下のオフレート
- (c)  $10^{-5}$  / s e c以下のオフレート
- (d)  $10^{-6}$  / s e c以下のオフレート
- (e)  $10^{-7}$  / s e c以下のオフレート

からなる群より選択されるオフレートを有する、単離された1次抗体。

40

(項目59)

上記単離された1次抗体が、V E G F - 2ポリペプチドのアゴニストである、項目43~58のいずれか1項に記載の単離された1次抗体。

(項目60)

上記単離された1次抗体が、V E G F - 2ポリペプチドのアンタゴニストである、項目43~58のいずれか1項に記載の単離された1次抗体。

(項目61)

項目43~60のいずれか1項に記載の単離された1次抗体であって、該単離された1次抗体が、以下：

- (a) V E G F - 2の中和 ;
- (b) f l k - 1へのV E G F - 2の結合の阻害 ;

50

- ( c ) f l k - 4 への V E G F - 2 の結合の阻害 ;  
 ( d ) f l k - 1 の V E G F - 2 誘導性リン酸化の阻害 ;  
 ( e ) 血管内皮細胞の V E G F - 2 誘導性増殖の阻害 ;  
 ( f ) リンパ球内皮細胞の V E G F - 2 誘導性増殖の阻害 ;  
 ( g ) 新脈管形成の阻害 ; および  
 ( h ) V E G F - 2 活性の増強、  
 からなる群より選択される活性を有する、単離された 1 次抗体。  
 ( 項目 6 2 )  
 項目 4 3 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体であって、該抗体が以下 :  
 ( a ) 腫瘍増殖の阻害 ; 10  
 ( b ) 腫瘍転移の阻害、  
 からなる群より選択される活性を有する、単離された 1 次抗体。  
 ( 項目 6 3 )  
 項目 4 3 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体であって、該単離された 1 次抗体が、検出可能な標識または放射性標識にカップリングされているか、または結合体化されている、単離された 1 次抗体。  
 ( 項目 6 4 )  
 上記検出可能な標識が、酵素、蛍光標識、発光標識、または生物発光標識である、項目 6 3 に記載の単離された 1 次抗体。  
 ( 項目 6 5 ) 20  
 異種ポリペプチドにカップリングされているか、または結合体化している、項目 4 3 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体。  
 ( 項目 6 6 )  
 治療的薬剤に結合体化している、項目 4 3 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体。  
 ( 項目 6 7 )  
 上記治療的薬剤が、代謝拮抗物質、アルキル化剤、抗生物質、増殖因子、サイトカイン、または抗新脈管形成剤である、項目 6 6 に記載の単離された 1 次抗体。  
 ( 項目 6 8 )  
 上記治療的薬剤が、抗有糸分裂薬、アントラシクリン、毒素、またはアポトーシス剤である、項目 6 6 に記載の単離された 1 次抗体。 30  
 ( 項目 6 9 )  
 上記単離された 1 次抗体が細胞傷害性薬剤に結合体化している、項目 4 3 ~ 6 8 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体。  
 ( 項目 7 0 )  
 単離された 1 次抗体であって、該単離された 1 次抗体が、 V E G F - 2 ポリペプチド上の、項目 4 3 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体が結合するエピトープと同一エピトープに結合する、単離された 1 次抗体。  
 ( 項目 7 1 )  
 薬学的に受容可能なキャリア中の、項目 4 3 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体。 40  
 ( 項目 7 2 )  
 項目 4 3 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体を発現するように操作された、細胞株。  
 ( 項目 7 3 )  
 項目 7 2 に記載の細胞株から発現された、単離された 1 次抗体。  
 ( 項目 7 4 )  
 上記細胞が N S O 細胞または C H O 細胞である、項目 7 2 に記載の細胞株。  
 ( 項目 7 5 )  
 項目 7 4 に記載の細胞株から発現された、単離された 1 次抗体。 50

(項目 76)

上記単離された1次抗体が、ウェスタンブロットにおいてVEGF-2レセプターに免疫特異的に結合する、項目43~70のいずれか1項に記載の単離された1次抗体。

(項目 77)

上記単離された1次抗体が、ELISAにおいてVEGF-2レセプターに免疫特異的に結合する、項目43~70のいずれか1項に記載の単離された1次抗体。

(項目 78)

疾患または障害を処置、予防、または改善するための方法であって、動物に、項目43~70のいずれか1項に記載の単離された1次抗体を投与する工程を包含する、方法。

(項目 79)

上記動物がヒトである、項目78に記載の方法。

10

(項目 80)

上記疾患または障害が、以下：

(a) 炎症性疾患または炎症性障害；

(b) 増殖性障害；

(c) 腫瘍；

(d) 腫瘍転移；

(e) 乳癌；

(f) 脳癌；

(g) 前立腺癌；

(h) 結腸癌；

(i) リンパ管腫；

(j) 感染症；

(k) カボージ肉腫；

(l) 自己免疫疾患；

(m) 慢性関節リウマチ；

(n) 乾癬；

(o) 糖尿病性網膜症；

(p) VEGF-2の異常発現に関連する疾患または障害；

(q) VEGF-2機能の欠失に関連する疾患または障害；

(r) VEGF-2レセプターの異常発現に関連する疾患または障害；および

(s) VEGF-2レセプター機能の欠失に関連する疾患または障害；

からなる群より選択される、項目78~79のいずれか1項に記載の方法。

20

30

(項目 81)

上記単離された1次抗体が、化学療法剤と組み合わせて投与される、項目78~80のいずれか1項に記載の方法。

(項目 82)

上記単離された1次抗体が、放射線療法と組み合わせて投与される、項目78~81のいずれか1項に記載の方法。

(項目 83)

上記単離された1次抗体が、予防的に動物に投与される、項目78~82のいずれか1項に記載の方法。

40

(項目 84)

VEGF-2ポリペプチドの発現を検出するための方法であって、該方法が、以下：

(a) 項目43~70のいずれか1項に記載の単離された1次抗体を用いて、個体由来の生物学的サンプル中のVEGF-2ポリペプチドの発現をアッセイする工程；および

(b) VEGF-2ポリペプチドのレベルを、VEGF-2ポリペプチドの標準レベル(例えば、正常な生物学的サンプルにおけるレベル)と比較する工程、を包含する、方法。

(項目 85)

50

癌または他の過剰増殖性障害を検出、診断、予後、またはモニターする方法であって、該方法は、以下：

( a ) 項目 4 3 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体を用いて、個体由来の生物学的サンプル中の V G E F - 2 ポリペプチドの発現をアッセイする工程；および  
( b ) V E G F - 2 ポリペプチドのレベルを、V E G F - 2 ポリペプチドの標準レベルと比較する工程、  
を包含する、方法。

( 項目 8 6 )

項目 4 3 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体を備える、キット。

( 項目 8 7 )

コントロールの抗体を備える、項目 8 6 に記載のキット。

( 項目 8 8 )

単離された 1 次抗体であって、該 1 次抗体は、以下：

- ( a ) 7 2 D 0 9    s c F v の V H ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；
- ( b ) 2 5 A 0 7    s c F v の V H ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；
- ( c ) 3 2 G 1 0 X    s c F v の V H ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；
- ( d ) 3 0 E 0 6 X    s c F v の V H ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；
- ( e ) 1 7 D 0 6    s c F v の V H ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；
- ( f ) 1 6 C 1 0    s c F v の V H ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；
- ( g ) 1 6 B 0 6    s c F v の V H ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；
- ( h ) 1 9 B 0 9    s c F v の V H ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；
- ( i ) 2 0 D 0 5    s c F v の V H ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；
- ( j ) 2 0 G 0 2    s c F v の V H ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；
- ( k ) 2 0 G 1 1    s c F v の V H ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；
- ( l ) 7 2 D 0 9    s c F v の V H ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域；
- ( m ) 2 5 A 0 7    s c F v の V H ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域；
- ( n ) 3 2 G 1 0 X    s c F v の V H ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域；
- ( o ) 3 0 E 0 6 X    s c F v の V H ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域；
- ( p ) 1 7 D 0 6    s c F v の V H ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域；
- ( q ) 1 6 C 1 0    s c F v の V H ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域；
- ( r ) 1 6 B 0 6    s c F v の V H ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域；
- ( s ) 1 9 B 0 9    s c F v の V H ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域；
- ( t ) 2 0 D 0 5    s c F v の V H ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域；
- ( u ) 2 0 G 0 2    s c F v の V H ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域；
- ( v ) 2 0 G 1 1    s c F v の V H ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域；
- ( w ) 7 2 D 0 9    s c F v の V H ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域；
- ( x ) 2 5 A 0 7    s c F v の V H ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域；
- ( y ) 3 2 G 1 0 X    s c F v の V H ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域；
- ( z ) 3 0 E 0 6 X    s c F v の V H ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域；
- ( a a ) 1 7 D 0 6    s c F v の V H ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域；
- ( a b ) 1 6 C 1 0    s c F v の V H ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域；
- ( a c ) 1 6 B 0 6    s c F v の V H ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域；
- ( a d ) 1 9 B 0 9    s c F v の V H ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域；
- ( a e ) 2 0 D 0 5    s c F v の V H ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域；
- ( a f ) 2 0 G 0 2    s c F v の V H ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域；
- ( a g ) 2 0 G 1 1    s c F v の V H ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域；
- ( a h ) 7 2 D 0 9    s c F v の V L ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；
- ( a i ) 2 5 A 0 7    s c F v の V L ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；
- ( a j ) 3 2 G 1 0 X    s c F v の V L ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；
- ( a k ) 3 0 E 0 6 X    s c F v の V L ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域；

10

20

30

40

50

- ( a l ) 1 7 D 0 6 s c F v の V L ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域 ;
- ( a m ) 1 6 C 1 0 s c F v の V L ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域 ;
- ( a n ) 1 6 B 0 6 s c F v の V L ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域 ;
- ( a o ) 1 9 B 0 9 s c F v の V L ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域 ;
- ( a p ) 2 0 D 0 5 s c F v の V L ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域 ;
- ( a q ) 2 0 G 0 2 s c F v の V L ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域 ;
- ( a r ) 2 0 G 1 1 s c F v の V L ドメインの少なくとも 1 つの C D R 領域 ;
- ( a s ) 7 2 D 0 9 s c F v の V L ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域 ;
- ( a t ) 2 5 A 0 7 s c F v の V L ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域 ;
- ( a u ) 3 2 G 1 0 X s c F v の V L ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域 ; 10
- ( a v ) 3 0 E 0 6 X s c F v の V L ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域 ;
- ( a w ) 1 7 D 0 6 s c F v の V L ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域 ;
- ( a x ) 1 6 C 1 0 s c F v の V L ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域 ;
- ( a y ) 1 6 B 0 6 s c F v の V L ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域 ;
- ( a z ) 1 9 B 0 9 s c F v の V L ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域 ;
- ( b a ) 2 0 D 0 5 s c F v の V L ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域 ;
- ( b b ) 2 0 G 0 2 s c F v の V L ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域 ;
- ( b c ) 2 0 G 1 1 s c F v の V L ドメインの少なくとも 2 つの C D R 領域 ;
- ( b d ) 7 2 D 0 9 s c F v の V L ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域 ;
- ( b e ) 2 5 A 0 7 s c F v の V L ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域 ; 20
- ( b f ) 3 2 G 1 0 X s c F v の V L ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域 ;
- ( b g ) 3 0 E 0 6 X s c F v の V L ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域 ;
- ( b h ) 1 7 D 0 6 s c F v の V L ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域 ;
- ( b i ) 1 6 C 1 0 s c F v の V L ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域 ;
- ( b j ) 1 6 B 0 6 s c F v の V L ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域 ;
- ( b k ) 1 9 B 0 9 s c F v の V L ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域 ;
- ( b l ) 2 0 D 0 5 s c F v の V L ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域 ;
- ( b m ) 2 0 G 0 2 s c F v の V L ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域 ; および
- ( b n ) 2 0 G 1 1 s c F v の V L ドメインの少なくとも 3 つの C D R 領域、
- からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む 2 次抗体に少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 1 0 0 同一である、ここで、該 1 次抗体が、 V E G F - 2 ポリペプチドを免疫特異的に阻害する、単離された 1 次抗体。

( 項目 8 9 )

項目 8 8 に記載の単離された 1 次抗体であって、該単離された 1 次抗体は、以下 :

- ( a ) 配列番号 1 8 のアミノ酸 1 - 4 1 9 を含む V E G F - 2 ポリペプチド ;
- ( b ) 配列番号 1 8 のアミノ酸 3 2 - 4 1 9 を含む V E G F - 2 ポリペプチド ;
- ( c ) 配列番号 1 8 のアミノ酸 1 0 3 - 2 2 7 を含む V E G F - 2 ポリペプチド ;
- ( d ) 配列番号 1 8 のアミノ酸 1 1 2 - 2 2 7 を含む V E G F - 2 ポリペプチド ;
- ( e ) 各々配列番号 1 8 のアミノ酸 1 0 3 ~ 2 2 7 からなる 2 つのポリペプチドからなる二量体 V E G F - 2 ポリペプチド ; 40
- ( f ) 各々が配列番号 1 8 のアミノ酸 1 0 3 ~ 2 2 7 からなる 2 つのポリペプチドからなる二量体 V E G F - 2 ポリペプチド ;
- ( g ) A T C C 寄託番号 9 7 1 4 9 に含まれる c D N A によりコードされる全長 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;
- ( h ) A T C C 寄託番号 9 7 1 4 9 に含まれる c D N A によりコードされるプロタンパク質 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;
- ( i ) A T C C 寄託番号 9 7 1 4 9 に含まれる c D N A によりコードされる分泌 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ;
- ( j ) A T C C 寄託番号 7 5 6 9 8 に含まれる c D N A によりコードされる全長 V E G 50

F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列；

(k) A T C C 寄託番号 7 5 6 9 8 に含まれる c D N A によりコードされるプロタンバク質 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列；

(1) A T C C 寄託番号 7 5 6 9 8 に含まれる c D N A によりコードされる分泌 V E G F - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列；および

(m) 配列番号 1 8 の V E G F - 2 ポリペプチドの分泌形態のアミノ酸配列、からなる群より選択される V E G F - 2 ポリペプチドに免疫特異的に結合する、単離された 1 次抗体。

(項目 9 0)

項目 8 8 ~ 8 9 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、上記 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 1 0 0 % 同一であり、該 2 次抗体は、以下：

(a) 7 2 D 0 9 ；

(b) 2 5 A 0 7 ；

(c) 3 2 G 1 0 X ；

(d) 3 0 E 0 6 X ；

(e) 1 7 D 0 6 ；

(f) 1 6 C 1 0 ；

(g) 1 6 B 0 6 ；

(h) 1 9 B 0 9 ；

(i) 2 0 D 0 5 ；

(j) 2 0 G 0 2 ；および

(k) 2 0 G 1 1

からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株により発現される抗体の V H ドメインを含む、単離されたポリヌクレオチド。

(項目 9 1)

項目 8 8 ~ 8 9 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、上記 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 1 0 0 % 同一であり、該 2 次抗体は、以下：

(a) 7 2 D 0 9 ；

(b) 2 5 A 0 7 ；

(c) 3 2 G 1 0 X ；

(d) 3 0 E 0 6 X ；

(e) 1 7 D 0 6 ；

(f) 1 6 C 1 0 ；

(g) 1 6 B 0 6 ；

(h) 1 9 B 0 9 ；

(i) 2 0 D 0 5 ；

(j) 2 0 G 0 2 ；および

(k) 2 0 G 1 1

からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株により発現される抗体の V L ドメインを含む、単離されたポリヌクレオチド。

(項目 9 2)

項目 8 8 ~ 8 9 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、上記 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 1 0 0 % 同一であり、該 2 次抗体は、以下：

(a) 7 2 D 0 9 ；

10

20

30

40

50

- ( b ) 2 5 A 0 7 ;
- ( c ) 3 2 G 1 0 X ;
- ( d ) 3 0 E 0 6 X ;
- ( e ) 1 7 D 0 6 ;
- ( f ) 1 6 C 1 0 ;
- ( g ) 1 6 B 0 6 ;
- ( h ) 1 9 B 0 9 ;
- ( i ) 2 0 D 0 5 ;
- ( j ) 2 0 G 0 2 ; および
- ( k ) 2 0 G 1 1

10

からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株により発現される抗体のVHドメインおよび定常ドメインを含む、単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 9 3 )

項目 8 8 ~ 8 9 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、上記 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 1 0 0 % 同一であり、該 2 次抗体は、以下：

- ( a ) 7 2 D 0 9 ;
- ( b ) 2 5 A 0 7 ;
- ( c ) 3 2 G 1 0 X ;
- ( d ) 3 0 E 0 6 X ;
- ( e ) 1 7 D 0 6 ;
- ( f ) 1 6 C 1 0 ;
- ( g ) 1 6 B 0 6 ;
- ( h ) 1 9 B 0 9 ;
- ( i ) 2 0 D 0 5 ;
- ( j ) 2 0 G 0 2 ; および
- ( k ) 2 0 G 1 1

20

からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株により発現される抗体のVLドメインおよび定常ドメインを含む、単離されたポリヌクレオチド。

30

( 項目 9 4 )

項目 8 8 ~ 8 9 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、上記 1 次抗体が、2 次抗体に少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 1 0 0 % 同一であり、該 2 次抗体は、以下：

- ( a ) 7 2 D 0 9 ;
- ( b ) 2 5 A 0 7 ;
- ( c ) 3 2 G 1 0 X ;
- ( d ) 3 0 E 0 6 X ;
- ( e ) 1 7 D 0 6 ;
- ( f ) 1 6 C 1 0 ;
- ( g ) 1 6 B 0 6 ;
- ( h ) 1 9 B 0 9 ;
- ( i ) 2 0 D 0 5 ;
- ( j ) 2 0 G 0 2 ; および
- ( k ) 2 0 G 1 1

40

からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株により発現される抗体のVHドメインおよびVLドメインを含む、単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 9 5 )

項目 8 8 ~ 8 9 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、上記 1

50

次抗体が、2次抗体に少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%同一であり、該2次抗体は、以下：

- (a) 72D09；
- (b) 25A07；
- (c) 32G10X；
- (d) 30E06X；
- (e) 17D06；
- (f) 16C10；
- (g) 16B06；
- (h) 19B09；
- (i) 20D05；
- (j) 20G02；および
- (k) 20G11

10

からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株により発現される抗体のVHドメインおよび定常ドメインならびにVLドメインおよび定常ドメインを含む、単離されたポリヌクレオチド。

(項目96)

項目88～89のいずれか1項に記載の単離された1次抗体であって、該1次抗体が、2次抗体に少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、

20

少なくとも99%、または少なくとも100%同一であり、該2次抗体は、以下：

- (a) 72D09；
- (b) 25A07；
- (c) 32G10X；
- (d) 30E06X；
- (e) 17D06；
- (f) 16C10；
- (g) 16B06；
- (h) 19B09；
- (i) 20D05；
- (j) 20G02；および
- (k) 20G11

30

からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株により発現される抗体のVHドメインを含む、単離された1次抗体。

(項目97)

上記定常ドメインがIgG定常ドメインまたはIgA定常ドメインである、項目93に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目98)

上記定常ドメインが定常ドメインまたは定常ドメインである、項目94に記載の単離されたポリヌクレオチド。

40

(項目99)

上記第1の定常ドメインがIgG定常ドメインまたはIgA定常ドメインであって、上記第2定常ドメインが定常ドメインまたは定常ドメインである、項目96に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目100)

上記単離された1次抗体がFabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、一本鎖Fv、またはジスルフィド結合Fvである、項目88～89のいずれか1項に記載の単離された1次抗体。

(項目101)

上記1次抗体がモノクローナル抗体である、項目88～100のいずれか1項に記載の

50



単離されたポリヌクレオチド。

(項目102)

上記1次抗体がヒト抗体またはヒト化抗体である、項目88～101のいずれか1項に記載の単離された1次抗体。

(項目103)

項目88～102のいずれか1項に記載の単離された1次抗体であって、該単離された1次抗体は、以下：

- (a)  $10^{-7}$  M以下の解離定数 ( $K_D$ ) ;
- (b)  $10^{-8}$  M以下の解離定数 ( $K_D$ ) ;
- (c)  $10^{-9}$  M以下の解離定数 ( $K_D$ ) ;
- (d)  $10^{-10}$  M以下の解離定数 ( $K_D$ ) ;
- (e)  $10^{-11}$  M以下の解離定数 ( $K_D$ ) ; および
- (f)  $10^{-12}$  M以下の解離定数 ( $K_D$ ) ;

10

からなる群より選択される解離定数 ( $K_D$ ) を有する、単離された1次抗体。

(項目104)

項目88～103のいずれか1項に記載の単離された1次抗体であって、該単離された1次抗体は、以下：

- (a)  $10^{-3}$  / sec以下のオフレート
- (b)  $10^{-4}$  / sec以下のオフレート
- (c)  $10^{-5}$  / sec以下のオフレート
- (d)  $10^{-6}$  / sec以下のオフレート
- (e)  $10^{-7}$  / sec以下のオフレート

20

からなる群より選択されるオフレートを有する、単離された1次抗体。

(項目105)

上記単離された1次抗体が、VEGF-2ポリペプチドのアゴニストである、項目88～104のいずれか1項に記載の単離された1次抗体。

(項目106)

上記単離された1次抗体が、VEGF-2ポリペプチドのアンタゴニストである、項目88～104のいずれか1項に記載の単離された1次抗体。

(項目107)

項目88～106のいずれか1項に記載の単離された1次抗体であって、該単離された1次抗体が、以下：

- (a) VEGF-2の中和；
- (b) flk-1へのVEGF-2の結合の阻害；
- (c) flk-4へのVEGF-2の結合の阻害；
- (d) flk-1のVEGF-2誘導性リン酸化の阻害；
- (e) 血管内皮細胞のVEGF-2誘導性増殖の阻害；
- (f) リンパ球内皮細胞のVEGF-2誘導性増殖の阻害；
- (g) 新脈管形成の阻害；および
- (h) VEGF-2活性の増強、

40

からなる群より選択される活性を有する、単離された1次抗体。

(項目108)

項目88～107のいずれか1項に記載の単離された1次抗体であって、該抗体が以下：

- (a) 腫瘍増殖の阻害；および
- (b) 腫瘍転移の阻害、

からなる群より選択される活性を有する、単離された1次抗体。

(項目109)

項目88～108のいずれか1項に記載の単離された1次抗体であって、該単離された1次抗体が、検出可能な標識または放射性標識にカップリングされているか、または結合

50

体化されている、単離された 1 次抗体。

(項目 1 1 0)

上記検出可能な標識が、酵素、蛍光標識、発光標識、または生物発光標識である、項目 1 0 9 に記載の単離された 1 次抗体。

(項目 1 1 1)

異種ポリペプチドにカップリングされているか、または結合体化している、項目 8 8 ~ 1 1 0 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体。

(項目 1 1 2)

治療的薬剤に結合体化している、項目 8 8 ~ 1 1 1 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体。

10

(項目 1 1 3)

上記治療的薬剤が、代謝拮抗物質、アルキル化剤、抗生物質、増殖因子、サイトカイン、または抗新脈管形成剤である、項目 1 1 2 に記載の単離された 1 次抗体。

(項目 1 1 4)

上記治療的薬剤が、抗有糸分裂薬、アントラシクリン、毒素、またはアポトーシス剤である、項目 1 1 2 に記載の単離された 1 次抗体。

(項目 1 1 5)

上記単離された 1 次抗体が細胞傷害性薬剤に結合体化している、項目 8 8 ~ 1 1 4 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体。

(項目 1 1 6)

単離された抗体であって、該単離された抗体が、VEGF - 2 ポリペプチド上の、項目 8 8 ~ 1 1 5 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する、単離された抗体。

20

(項目 1 1 7)

薬学的に受容可能なキャリア中の、項目 8 8 ~ 1 1 6 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体。

(項目 1 1 8)

項目 8 8 ~ 1 1 6 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体を発現するように操作された、細胞株。

(項目 1 1 9)

項目 1 1 8 に記載の細胞株から発現された、単離された 1 次抗体。

30

(項目 1 2 0)

上記細胞が NSO 細胞または CHO 細胞である、項目 1 1 8 に記載の細胞株。

(項目 1 2 1)

項目 1 2 0 に記載の細胞株から発現された、単離された 1 次抗体。

(項目 1 2 2)

上記単離された 1 次抗体が、ウェスタンブロットにおいて VEGF - 2 レセプターに免疫特異的に結合する、項目 8 8 ~ 1 1 6 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体。

(項目 1 2 3)

上記単離された 1 次抗体が、ELISA において VEGF - 2 レセプターに免疫特異的に結合する、項目 8 8 ~ 1 1 6 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体。

40

(項目 1 2 4)

疾患または障害を処置、予防、または改善するための方法であって、動物に、項目 8 8 ~ 1 1 6 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体を投与する工程を包含する、方法。

(項目 1 2 5)

上記動物がヒトである、項目 1 2 4 に記載の方法。

(項目 1 2 6)

上記疾患または障害が、以下：

(a) 炎症性疾患または炎症性障害；

(b) 増殖性障害；

50

- ( c ) 腫瘍 ;
  - ( d ) 腫瘍転移 ;
  - ( e ) 乳癌 ;
  - ( f ) 脳癌 ;
  - ( g ) 前立腺癌 ;
  - ( h ) 結腸癌 ;
  - ( i ) リンパ管腫 ;
  - ( j ) 感染症 ;
  - ( k ) カボージ肉腫 ;
  - ( l ) 自己免疫疾患 ; 10
  - ( m ) 慢性関節リウマチ ;
  - ( n ) 乾癬 ;
  - ( o ) 糖尿病性網膜症 ;
  - ( p ) V E G F - 2 の異常発現に関連する疾患または障害 ;
  - ( q ) V E G F - 2 機能の欠失に関連する疾患または障害 ;
  - ( r ) V E G F - 2 レセプターの異常発現に関連する疾患または障害 ; および
  - ( s ) V E G F - 2 レセプター機能の欠失に関連する疾患または障害 ;
- からなる群より選択される、項目 1 2 4 ~ 1 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。
- ( 項目 1 2 7 )
- 上記単離された 1 次抗体が、化学療法剤と組み合わせて投与される、項目 1 2 4 ~ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。 20
- ( 項目 1 2 8 )
- 上記単離された 1 次抗体が、放射線療法と組み合わせて投与される、項目 1 2 4 ~ 1 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。
- ( 項目 1 2 9 )
- 上記単離された 1 次抗体が、予防的に動物に投与される、項目 1 2 4 ~ 1 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。
- ( 項目 1 3 0 )
- V E G F - 2 ポリペプチドの発現を検出するための方法であって、該方法が、以下 :
- ( a ) 項目 8 8 ~ 1 1 6 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体を用いて、個体由来の生物学的サンプル中の V E G F - 2 ポリペプチドの発現をアッセイする工程 ; および
  - ( b ) V E G F - 2 ポリペプチドのレベルを、V E G F - 2 ポリペプチドの標準レベル (例えば、正常な生物学的サンプルにおけるレベル) と比較する工程、
- を包含する、方法。 30
- ( 項目 1 3 1 )
- 癌または他の過剰増殖性障害を検出、診断、予後、またはモニターする方法であって、該方法は、以下 :
- ( a ) 項目 8 8 ~ 1 1 6 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体を用いて、個体由来の生物学的サンプル中の V E G F - 2 ポリペプチドの発現をアッセイする工程 ; および
  - ( b ) V E G F - 2 ポリペプチドのレベルを、V E G F - 2 ポリペプチドの標準レベル
- と比較する工程、 40
- を包含する、方法。
- ( 項目 1 3 2 )
- 項目 8 8 ~ 1 1 6 のいずれか 1 項に記載の単離された 1 次抗体を備える、キット。
- ( 項目 1 3 3 )
- コントロールの抗体を備える、項目 1 3 2 に記載のキット。
- 【 0 0 3 4 】
- 以下の図面は、本発明の実施形態の例示であり、そして特許請求の範囲により包含される本発明の範囲を限定することを意味しない。
- 【 図面の簡単な説明 】 50

## 【 0 0 3 5 】

【図 1 A】図 1 A は、V E G F - 2 の全長ヌクレオチド（配列番号 1）配列および推定アミノ酸（配列番号 2）配列を示す。このポリペプチドは、およそ 23 個がリーダー配列を表す、およそ 419 個のアミノ酸残基を含む。アミノ酸の標準的な一文字の略語を使用する。配列決定を、モデル 373 自動化 DNA シーケンサー（Applied Biosystems, Inc.）を使用して行なった。配列決定の精度は、97% より大きいことが予測される。

【図 1 B】図 1 B は、V E G F - 2 の全長ヌクレオチド（配列番号 1）配列および推定アミノ酸（配列番号 2）配列を示す。このポリペプチドは、およそ 23 個がリーダー配列を表す、およそ 419 個のアミノ酸残基を含む。アミノ酸の標準的な一文字の略語を使用する。配列決定を、モデル 373 自動化 DNA シーケンサー（Applied Biosystems, Inc.）を使用して行なった。配列決定の精度は、97% より大きいことが予測される。

10

【図 1 C】図 1 C は、V E G F - 2 の全長ヌクレオチド（配列番号 1）配列および推定アミノ酸（配列番号 2）配列を示す。このポリペプチドは、およそ 23 個がリーダー配列を表す、およそ 419 個のアミノ酸残基を含む。アミノ酸の標準的な一文字の略語を使用する。配列決定を、モデル 373 自動化 DNA シーケンサー（Applied Biosystems, Inc.）を使用して行なった。配列決定の精度は、97% より大きいことが予測される。

【図 1 D】図 1 D は、V E G F - 2 の全長ヌクレオチド（配列番号 1）配列および推定アミノ酸（配列番号 2）配列を示す。このポリペプチドは、およそ 23 個がリーダー配列を表す、およそ 419 個のアミノ酸残基を含む。アミノ酸の標準的な一文字の略語を使用する。配列決定を、モデル 373 自動化 DNA シーケンサー（Applied Biosystems, Inc.）を使用して行なった。配列決定の精度は、97% より大きいことが予測される。

20

【図 1 E】図 1 E は、V E G F - 2 の全長ヌクレオチド（配列番号 1）配列および推定アミノ酸（配列番号 2）配列を示す。このポリペプチドは、およそ 23 個がリーダー配列を表す、およそ 419 個のアミノ酸残基を含む。アミノ酸の標準的な一文字の略語を使用する。配列決定を、モデル 373 自動化 DNA シーケンサー（Applied Biosystems, Inc.）を使用して行なった。配列決定の精度は、97% より大きいことが予測される。

30

【図 2 A】図 2 A は、V E G F - 2 の短縮した、生物学的に活性な形態のヌクレオチド（配列番号 3）配列および推定アミノ酸（配列番号 4）配列を示す。このポリペプチドは、最初のおよそ 24 個のアミノ酸がリーダー配列を表す、およそ 350 個のアミノ酸残基を含む。

【図 2 B】図 2 B は、V E G F - 2 の短縮した、生物学的に活性な形態のヌクレオチド（配列番号 3）配列および推定アミノ酸（配列番号 4）配列を示す。このポリペプチドは、最初のおよそ 24 個のアミノ酸がリーダー配列を表す、およそ 350 個のアミノ酸残基を含む。

【図 2 C】図 2 C は、V E G F - 2 の短縮した、生物学的に活性な形態のヌクレオチド（配列番号 3）配列および推定アミノ酸（配列番号 4）配列を示す。このポリペプチドは、最初のおよそ 24 個のアミノ酸がリーダー配列を表す、およそ 350 個のアミノ酸残基を含む。

40

【図 2 D】図 2 D は、V E G F - 2 の短縮した、生物学的に活性な形態のヌクレオチド（配列番号 3）配列および推定アミノ酸（配列番号 4）配列を示す。このポリペプチドは、最初のおよそ 24 個のアミノ酸がリーダー配列を表す、およそ 350 個のアミノ酸残基を含む。

【図 3 A】図 3 A は、P D G F a（配列番号 5）と、P D G F b（配列番号 6）と、V E G F（配列番号 7）と V E G F - 2（配列番号 4）の間のアミノ酸配列の相同性の例示である。枠で囲った領域は、保存された配列および 8 個の保存されたシステイン残基の位置

50

を示す。

【図3B】図3Bは、PDGFa（配列番号5）と、PDGFb（配列番号6）と、VEGF（配列番号7）とVEGF-2（配列番号4）の間のアミノ酸配列の相同性の例示である。枠で囲った領域は、保存された配列および8個の保存されたシステイン残基の位置を示す。

【図4】図4は、表の形式において、PDGFaと、PDGFbと、VEGFとVEGF-2との間の相同性の百分率を示す。

【図5】図5は、ヒト乳房腫瘍細胞株におけるVEGF-2 mRNAの存在を示す。

【図6】図6は、ヒト成体組織におけるVEGF-2のノーザンプロット分析の結果を示す。

10

【図7】図7は、本発明のポリペプチドのインビトロでの転写、翻訳、および電気泳動後のSDS-PAGEゲルの写真を示す。レーン1：<sup>14</sup>Cおよびレインボー分子量(M.W.)マーカー；レーン2：FGFコントロール；レーン3：M13逆方向プライマーおよびM13順方向プライマーによって産生されたVEGF-2；レーン4：M13逆方向プライマーおよびVEGF-F4プライマーによって産生されたVEGF-2；レーン5：M13逆方向プライマーおよびVEGF-F5プライマーによって産生されたVEGF-2。

【図8A】図8Aは、SDS-PAGEゲルの写真を示す。VEGF-2ポリペプチドは、Sf9細胞からなるバキュロウイルス系において発現された。細胞の培地および細胞質由来のタンパク質を、非還元条件下でSDS-PAGEによって分析した。

20

【図8B】図8Bは、SDS-PAGEゲルの写真を示す。VEGF-2ポリペプチドは、Sf9細胞からなるバキュロウイルス系において発現された。細胞の培地および細胞質由来のタンパク質を、還元条件下でSDS-PAGEによって分析した。

【図9】図9は、SDS-PAGEゲルの写真を示す。本発明の核酸配列で感染したSf9細胞由来の培地を沈澱させた。再懸濁した沈澱物を、SDS-PAGEによって分析し、そしてクマシーブリリアントブルーで染色した。

【図10】図10は、SDS-PAGEゲルの写真を示す。VEGF-2を培地上清から精製し、そして還元剤であるβ-メルカプトエタノールの存在下および非存在下でSDS-PAGEによって分析し、そしてクマシーブリリアントブルーで染色した。

【図11】図11は、RP-300カラム(0.21×3cm、Applied Biosystems, Inc.)を使用する精製VEGF-2の逆相HPLC分析を示す。カラムを0.1%のトリフルオロ酢酸(溶媒A)で平衡化し、そしてタンパク質を、0%~60%の溶媒B(0.07% TFAを含むアセトニトリルからなる)の7.5分間の勾配で溶出した。タンパク質溶出を、215nm(「赤」線)および280nm(「青」線)の吸光度によってモニターした。溶媒Bの百分率を「緑」線によって示す。

30

【図12】図12は、塩基性線維芽細胞増殖因子との比較における、血管内皮細胞の増殖に対する部分精製VEGF-2タンパク質の効果を例示する棒グラフである。

【図13】図13は、血管内皮細胞の増殖に対する精製VEGF-2タンパク質の効果を例示する棒グラフである。

【図14A】図14Aは、ヒト胎児組織およびヒト成体組織におけるVEGF-2 mRNAの発現を示す。

40

【図14B】図14Bは、ヒト胎児組織およびヒト成体組織におけるVEGF-2 mRNAの発現を示す。

【図15】図15は、ヒト初代培養細胞におけるVEGF-2 mRNAの発現を示す。

【図16A】図16Aは、COS-7細胞中でのVEGF-2タンパク質の一過性発現を示す。

【図16B】図16Bは、COS-7細胞中でのVEGF-2タンパク質の一過性発現を示す。

【図17】図17は、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)のVEGF-2で刺激した増殖を示す。

50

【図18】図18は、皮膚微小血管内皮細胞のVEGF-2で刺激した増殖を示す。

【図19】図19は、微小血管、臍帯、子宮内膜、およびウシ大動脈内皮細胞の増殖に対するVEGF-2の刺激効果を示す。

【図20A】図20Aは、PDGFで誘導した血管（ヒト大動脈）平滑筋細胞の増殖の阻害を示す。

【図20B】図20Bは、PDGFで誘導した血管（ヒト大動脈）平滑筋細胞の増殖の阻害を示す。

【図21A】図21Aは、VEGF-2によるHUVECの遊走の刺激を示す。

【図21B】図21Bは、VEGF-2によるウシ微小血管内皮細胞（BMEC）の遊走の刺激を示す。

10

【図22】図22は、VEGF-2およびVEGF-1によるHUVECの一酸化窒素放出の刺激を示す。

【図23】図23は、VEGF-2による微小血管内皮細胞（CADMEC）の索形成の阻害を示す。

【図24】図24は、CAMアッセイにおいて、VEGF、VEGF-2、およびbFGFによる、新脈管形成の刺激を示す。

【図25A】図25Aは、VEGF-2タンパク質（図25A）および裸の発現プラスミド（図25B）による虚血性四肢における特定のパラメータの修復を示す：BP比（図25A～図25C）；血流およびフロー貯蔵（図25D～図25I）；血管造影的スコア（図25J～図25L）；毛細血管の密度（図25M～図25O）。

20

【図25B】図25Bは、VEGF-2タンパク質（図25A）および裸の発現プラスミド（図25B）による虚血性四肢における特定のパラメータの修復を示す：BP比（図25A～図25C）；血流およびフロー貯蔵（図25D～図25I）；血管造影的スコア（図25J～図25L）；毛細血管の密度（図25M～図25O）。

【図25C】図25Cは、VEGF-2タンパク質（図25A）および裸の発現プラスミド（図25B）による虚血性四肢における特定のパラメータの修復を示す：BP比（図25A～図25C）；血流およびフロー貯蔵（図25D～図25I）；血管造影的スコア（図25J～図25L）；毛細血管の密度（図25M～図25O）。

【図25D】図25Dは、VEGF-2タンパク質（図25A）および裸の発現プラスミド（図25B）による虚血性四肢における特定のパラメータの修復を示す：BP比（図25A～図25C）；血流およびフロー貯蔵（図25D～図25I）；血管造影的スコア（図25J～図25L）；毛細血管の密度（図25M～図25O）。

30

【図25E】図25Eは、VEGF-2タンパク質（図25A）および裸の発現プラスミド（図25B）による虚血性四肢における特定のパラメータの修復を示す：BP比（図25A～図25C）；血流およびフロー貯蔵（図25D～図25I）；血管造影的スコア（図25J～図25L）；毛細血管の密度（図25M～図25O）。

【図25F】図25Fは、VEGF-2タンパク質（図25A）および裸の発現プラスミド（図25B）による虚血性四肢における特定のパラメータの修復を示す：BP比（図25A～図25C）；血流およびフロー貯蔵（図25D～図25I）；血管造影的スコア（図25J～図25L）；毛細血管の密度（図25M～図25O）。

40

【図25G】図25Gは、VEGF-2タンパク質（図25A）および裸の発現プラスミド（図25B）による虚血性四肢における特定のパラメータの修復を示す：BP比（図25A～図25C）；血流およびフロー貯蔵（図25D～図25I）；血管造影的スコア（図25J～図25L）；毛細血管の密度（図25M～図25O）。

【図25H】図25Hは、VEGF-2タンパク質（図25A）および裸の発現プラスミド（図25B）による虚血性四肢における特定のパラメータの修復を示す：BP比（図25A～図25C）；血流およびフロー貯蔵（図25D～図25I）；血管造影的スコア（図25J～図25L）；毛細血管の密度（図25M～図25O）。

【図25I】図25Iは、VEGF-2タンパク質（図25A）および裸の発現プラスミド（図25B）による虚血性四肢における特定のパラメータの修復を示す：BP比（図25A～図25C）；血流およびフロー貯蔵（図25D～図25I）；血管造影的スコア（図25J～図25L）；毛細血管の密度（図25M～図25O）。

50

5 A ~ 図 2 5 C ) ; 血流およびフロー貯蔵 ( 図 2 5 D ~ 図 2 5 I ) ; 血管造影的スコア ( 図 2 5 J ~ 図 2 5 L ) ; 毛細血管の密度 ( 図 2 5 M ~ 図 2 5 O ) 。

【図 2 5 J】図 2 5 J は、VEGF - 2 タンパク質 ( 図 2 5 A ) および裸の発現プラスミド ( 図 2 5 B ) による虚血性四肢における特定のパラメータの修復を示す：BP 比 ( 図 2 5 A ~ 図 2 5 C ) ; 血流およびフロー貯蔵 ( 図 2 5 D ~ 図 2 5 I ) ; 血管造影的スコア ( 図 2 5 J ~ 図 2 5 L ) ; 毛細血管の密度 ( 図 2 5 M ~ 図 2 5 O ) 。

【図 2 5 K】図 2 5 K は、VEGF - 2 タンパク質 ( 図 2 5 A ) および裸の発現プラスミド ( 図 2 5 B ) による虚血性四肢における特定のパラメータの修復を示す：BP 比 ( 図 2 5 A ~ 図 2 5 C ) ; 血流およびフロー貯蔵 ( 図 2 5 D ~ 図 2 5 I ) ; 血管造影的スコア ( 図 2 5 J ~ 図 2 5 L ) ; 毛細血管の密度 ( 図 2 5 M ~ 図 2 5 O ) 。

10

【図 2 5 L】図 2 5 L は、VEGF - 2 タンパク質 ( 図 2 5 A ) および裸の発現プラスミド ( 図 2 5 B ) による虚血性四肢における特定のパラメータの修復を示す：BP 比 ( 図 2 5 A ~ 図 2 5 C ) ; 血流およびフロー貯蔵 ( 図 2 5 D ~ 図 2 5 I ) ; 血管造影的スコア ( 図 2 5 J ~ 図 2 5 L ) ; 毛細血管の密度 ( 図 2 5 M ~ 図 2 5 O ) 。

【図 2 5 M】図 2 5 M は、VEGF - 2 タンパク質 ( 図 2 5 A ) および裸の発現プラスミド ( 図 2 5 B ) による虚血性四肢における特定のパラメータの修復を示す：BP 比 ( 図 2 5 A ~ 図 2 5 C ) ; 血流およびフロー貯蔵 ( 図 2 5 D ~ 図 2 5 I ) ; 血管造影的スコア ( 図 2 5 J ~ 図 2 5 L ) ; 毛細血管の密度 ( 図 2 5 M ~ 図 2 5 O ) 。

【図 2 5 N】図 2 5 N は、VEGF - 2 タンパク質 ( 図 2 5 A ) および裸の発現プラスミド ( 図 2 5 B ) による虚血性四肢における特定のパラメータの修復を示す：BP 比 ( 図 2 5 A ~ 図 2 5 C ) ; 血流およびフロー貯蔵 ( 図 2 5 D ~ 図 2 5 I ) ; 血管造影的スコア ( 図 2 5 J ~ 図 2 5 L ) ; 毛細血管の密度 ( 図 2 5 M ~ 図 2 5 O ) 。

20

【図 2 5 O】図 2 5 O は、VEGF - 2 タンパク質 ( 図 2 5 A ) および裸の発現プラスミド ( 図 2 5 B ) による虚血性四肢における特定のパラメータの修復を示す：BP 比 ( 図 2 5 A ~ 図 2 5 C ) ; 血流およびフロー貯蔵 ( 図 2 5 D ~ 図 2 5 I ) ; 血管造影的スコア ( 図 2 5 J ~ 図 2 5 L ) ; 毛細血管の密度 ( 図 2 5 M ~ 図 2 5 O ) 。

【図 2 6 A】図 2 6 A は、自然発症高血圧ラット ( SHR ) において拡張期血圧に影響する VEGF - 2 の能力を示す。図 2 6 A は、VEGF - 2 で達成された拡張期血圧の用量依存性の低下を示す。

【図 2 6 B】図 2 6 B は、自然発症高血圧ラット ( SHR ) において拡張期血圧に影響する VEGF - 2 の能力を示す。図 2 6 B は、VEGF - 2 で達成された拡張期血圧の用量依存性の低下を示す。

30

【図 2 6 C】図 2 6 C は、自然発症高血圧ラット ( SHR ) において拡張期血圧に影響する VEGF - 2 の能力を示す。図 2 6 C は、VEGF - 2 で観察された平均動脈圧 ( MAP ) の減少を示す。

【図 2 6 D】図 2 6 D は、自然発症高血圧ラット ( SHR ) において拡張期血圧に影響する VEGF - 2 の能力を示す。図 2 6 D は、VEGF - 2 で観察された平均動脈圧 ( MAP ) の減少を示す。

【図 2 6 E】図 2 6 E は、自然発症高血圧ラット ( SHR ) において拡張期血圧に影響する VEGF - 2 の能力を示す。パネル E は、SHR ラットの平均動脈圧 ( MAP ) に対する漸増用量の VEGF - 2 の効果を示す。

40

【図 2 6 F】図 2 6 F は、自然発症高血圧ラット ( SHR ) において拡張期血圧に影響する VEGF - 2 の能力を示す。パネル F は、SHR ラットの拡張期血圧に対する VEGF - 2 の効果を示す。

【図 2 6 G】図 2 6 G は、自然発症高血圧ラット ( SHR ) において拡張期血圧に影響する VEGF - 2 の能力を示す。パネル G は、SHR ラットの拡張期血圧に対する VEGF - 2 の効果を示す。

【図 2 7】図 2 7 は、VEGF - 2 N = および VEGF - 2 誘導性増殖の阻害を示す。

【図 2 8】図 2 8 は、pHE4a 発現ベクター ( 配列番号 16 ) の模式的な描写を示す。カナマイシン耐性マーカー遺伝子、複数のクローニング部位のリンカー領域、oriC 配

50

列、およびlacIqコード配列の位置を示す。

【図29】図29は、pHE4aプロモーター（配列番号17）の調節エレメントのヌクレオチド配列を示す。2つのlacオペレーター配列である、シャイン-ダルガルノ配列（S/D）、ならびに末端HindIIIおよびNdeIの制限酵素切断部位（イタリック体）を示す。

【図30A】図30Aは、腫瘍の、サイズ、重量および転移におけるVEGF-2抗体の効果を示す。図30Aは、ヌードマウスにおけるMDA-MB-231ヒト胸部癌腫増殖に対するVEGF-2抗体の効果を示す。

【図30B】図30Bは、腫瘍の、サイズ、重量および転移におけるVEGF-2抗体の効果を示す。図30Bは、VEGF-2抗体に曝露してから42日後の、PC-3腫瘍の対するVEGF-2抗体の効果を示す。

【図30C】図30Cは、腫瘍の、サイズ、重量および転移におけるVEGF-2抗体の効果を示す。図30Cは、リンパ節の転移頻度に対するVEGF-2抗体の効果を示す。

【図30D】図30Dは、腫瘍の、サイズ、重量および転移におけるVEGF-2抗体の効果を示す。図30Dは、VEGF-2抗体に曝露してから43日後の、PC-3腫瘍の重量に対するVEGF-2抗体の効果を示す。

【図30E】図30Eは、腫瘍の、サイズ、重量および転移におけるVEGF-2抗体の効果を示す。図30Eは、丁度、40日間におよび、PC-3腫瘍の増殖速度に対するVEGF-2抗体の効果を示す。

【図30F】図30Fは、腫瘍の、サイズ、重量および転移におけるVEGF-2抗体の効果を示す。図30Fは、VEGF-2抗体への曝露後42日の、PC-3腫瘍体積に対するVEGF-2抗体の効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0036】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

本発明の1つの局面に従って、図1の推定アミノ酸配列（配列番号2）（これは、クローン化されたcDNAを配列決定することによって決定された）を有するVEGF-2ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子を提供する。cDNAクローン（これは、1995年5月12日に、American Type Tissue Collection (ATCC)、10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に寄託され、そしてATCC受託番号97149を与えられた）を配列決定することによって、配列番号1に示されるヌクレオチド配列を得た。

【0037】

本発明の別の局面に従って、図2の推定アミノ酸配列（配列番号4）（これは、クローン化されたcDNAを配列決定することによって決定された）を有する短縮型VEGF-2ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子を提供する。cDNAクローン（これは、1994年3月4日に、American Type Tissue Collection (ATCC)、10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に寄託され、そしてATCC受託番号75698を与えられた）を配列決定することによって、配列番号3に示されるヌクレオチド配列を得た。

【0038】

別に示されない限り、本明細書中のDNA分子を配列決定することにより決定された全てのヌクレオチド配列は、自動化DNAシーケンサー（例えば、Applied Biosystems, Inc.からのモデル373）を使用することによって決定され、そして本明細書中で決定されたDNA分子によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、上記の決定されたDNA配列の翻訳によって予測された。従って、この自動化アプローチにより決定される任意のDNA配列について当該分野で公知であるように、本明細書中で決定される任意のヌクレオチド配列は、いくつかのエラーを含み得る。自動化により決

10

20

30

40

50



定されるヌクレオチド配列は、配列決定されたDNA分子の実際のヌクレオチド配列に対して、代表的には少なくとも約90%の同一性、より代表的には少なくとも約95%~少なくとも約99.9%の同一性である。実際の配列は、当該分野で周知の手動のDNA配列決定方法を含む他のアプローチによって、より正確に決定され得る。また当該分野で公知のように、実際の配列と比較して、決定されたヌクレオチド配列中の単一の挿入または欠失が、ヌクレオチド配列の翻訳においてフレームシフトを生じ、その結果、決定されたヌクレオチド配列によりコードされる予測されたアミノ酸配列は、配列決定されたDNA分子により実際にコードされるアミノ酸配列とは完全に異なり、これは、このような挿入または欠失の位置で開始する。

#### 【0039】

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、初期のヒト胚(8~9週)破骨細胞腫、成体心臓またはいくつかの乳癌細胞株から得られ得る。本発明のポリヌクレオチドは、9週齢の初期のヒト胚由来cDNAライブラリー中に発見された。それは、VEGF/PDGFファミリーに構造的に関連する。それは、約419アミノ酸残基のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含み、この最初のおよそ23個のアミノ酸残基は推定のリーダー配列であり、その結果、成熟タンパク質は396個のアミノ酸を含む。そしてこのタンパク質は、ヒト血管内皮増殖因子に対して最も高いアミノ酸配列相同性(30%の同一性)を示し、PDGFa(24%)およびPDGFb(22%)がそれに続く。(図4を参照のこと)。8つ全てのシステインが、ファミリーの4つのメンバー内全てで保存されることは特に重要である(図3のボックスで囲んだ領域を参照のこと)。さらに、PDGF/VEGFファミリーの特徴であるPXC V X X X R C X G C C N(配列番号8)が、VEGF-2において保存される(図3を参照のこと)。VEGF-2と、VEGFと2つのPDGFとの間の相同性は、タンパク質配列レベルにおいてである。ヌクレオチド配列の相同性は、全く検出され得ず、従って、単純なアプローチ(例えば、低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション)を介してVEGF-2を単離することは困難である。

#### 【0040】

本発明のVEGF-2ポリペプチドは、全長ポリペプチドならびに任意のリーダー配列および全長ポリペプチドの活性フラグメントをコードするポリヌクレオチド配列を含むことを意味する。活性フラグメントは、配列番号2に示す全長アミノ酸配列の全419アミノ酸よりも少ないアミノ酸を有するが、図3において保存されることが示される8つのシステイン残基をなお含み、そしてVEGF-2活性をなお有する、全長アミノ酸配列の任意の部分を含むことを意味する。

#### 【0041】

正常組織には、少なくとも2つの交互にスプライシングされたVEGF-2 mRNA配列が存在する。図7、レーン5における2つのバンドは、本発明のVEGF-2ポリペプチドをコードする交互にスプライシングされたmRNAの存在を示す。

#### 【0042】

本発明のポリヌクレオチドは、RNAの形態またはDNAの形態(このDNAは、cDNA、ゲノムDNA、および合成DNAを包含する)であり得る。DNAは二本鎖または一本鎖であり得、そして一本鎖である場合は、コード鎖または非コード(アンチセンス)鎖であり得る。成熟ポリペプチドをコードするコード配列は、図1または図2に示すコード配列または寄託したクローンのコード配列と同一であり得るか、あるいはそのコード配列が、遺伝コードの重複性または縮重の結果として、図1、図2のDNAまたは寄託したcDNAと同じ成熟ポリペプチドをコードする、異なるコード配列であり得る。

#### 【0043】

図1もしくは図2の成熟ポリペプチドまたは寄託したcDNAによりコードされる成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは以下を包含し得る:成熟ポリペプチドのコード配列のみ;成熟ポリペプチドについてのコード配列およびリーダー配列もしくは分泌配列またはプロタンパク質配列のような、さらなるコード配列;成熟ポリペプチドのコー

10

20

30

40

50

ド配列（および必要に応じてさらなるコード配列）ならびに非コード配列（例えば、イントロンまたは成熟ポリペプチドのコード配列の 5' および / または 3' の非コード配列）。

【0044】

従って、用語「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」は、ポリペプチドのコード配列のみを含むポリヌクレオチド、ならびにさらなるコード配列および / または非コード配列を含むポリヌクレオチドを包含する。

【0045】

本発明はさらに、図 1 もしくは図 2 の推定のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または寄託したクローンの cDNA によりコードされるポリペプチドの、フラグメント、アナログ、および誘導体をコードする本明細書中上記のポリヌクレオチドの改変体に関する。ポリヌクレオチドの改変体は、ポリヌクレオチドの天然に存在する対立遺伝子改変体またはポリヌクレオチドの天然に存在しない改変体であり得る。

10

【0046】

従って、本発明は、図 1 もしくは図 2 に示されるような同じ成熟ポリペプチドまたは寄託したクローンの cDNA によりコードされる同じ成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびにそのようなポリヌクレオチドの改変体を包含する。この改変体は、図 1 もしくは図 2 のポリペプチドまたは寄託したクローンの cDNA によりコードされるポリペプチドのフラグメント、誘導体、またはアナログをコードする。このようなヌクレオチド改変体は、欠失改変体、置換改変体、および付加または挿入改変体を包含する。

20

【0047】

本明細書中上記で示したように、このポリヌクレオチドは、図 1 もしくは図 2 に示されるコード配列、または寄託したクローンのコード配列の天然に存在する対立遺伝子改変体であるコード配列を有し得る。当該分野で公知なように、対立遺伝子改変体は、1 以上のヌクレオチドの置換、欠失、または付加を有するポリヌクレオチド配列の別の形態であり、これはコードされるポリペプチドの機能を実質的に変化させない。

【0048】

本発明はまた、ポリヌクレオチドを含み、ここで成熟ポリペプチドのコード配列は、宿主細胞からのポリペプチドの発現および分泌において補助するポリヌクレオチド（例えば、細胞からのポリペプチドの輸送を制御するための分泌配列として機能するリーダー配列）に同じリーディングフレームで融合され得る。リーダー配列を有するポリペプチドは、プレタンパク質であり、そしてポリペプチドの成熟形態を形成するために、宿主細胞により切断されるリーダー配列を有し得る。このポリヌクレオチドはまた、さらなる 5' アミノ酸残基を付加されている成熟タンパク質であるプロタンパク質をコードし得る。プロ配列を有する成熟タンパク質は、プロタンパク質であり、そしてタンパク質の不活性形態である。一旦プロ配列が切断されると、活性成熟タンパク質が残存する。

30

【0049】

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

40

【0050】

本発明のポリヌクレオチドはまた、本発明のポリペプチドの精製を可能にするマーカー配列にインフレームで融合されたコード配列を有し得る。マーカー配列は、細菌宿主の場合にマーカーに融合された成熟ポリペプチドの精製を提供する、pQE-9 ベクターにより供給されるヘキサヒスチジンタグであり得る。または、例えばマーカー配列は、哺乳動物宿主（例えば、COS-7 細胞）が使用される場合は、血球凝集素（HA）タグであり得る。HA タグは、インフルエンザ血球凝集素タンパク質に由来するエピトープと対応する（Wilson, I.ら、Cell, 37: 767 (1984)）。

【0051】

本発明のさらなる実施形態は、以下のヌクレオチド配列に対して、少なくとも 95% 同

50

一、そしてより好ましくは少なくとも96%、97%、98%または99%同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子を含む：(a)配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(b)配列番号2のアミノ酸配列を有するが、N末端メチオニンを欠損するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(c)配列番号2の約1～約396の位置のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(d)ATCC寄託番号97149に含まれるcDNAクローンによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(e)ATCC寄託番号97149に含まれるcDNAクローンによりコードされるアミノ酸配列を有する、成熟VEGF-2ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；または(f)(a)、(b)、(c)、(d)、もしくは(e)のヌクレオチド配列のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

10

## 【0052】

本発明のさらなる実施形態は、以下のヌクレオチド配列に対して、少なくとも95%同一であり、そしてより好ましくは少なくとも96%、97%、98%または99%同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子を含む：(a)配列番号4のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(b)配列番号4のアミノ酸配列を有するが、N末端メチオニンを欠損するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(c)配列番号4の約1～約326の位置のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(d)ATCC寄託番号75698に含まれるcDNAクローンによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(e)ATCC寄託番号75698に含まれるcDNAクローンによりコードされるアミノ酸配列を有する、成熟VEGF-2ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；または(f)(a)、(b)、(c)、(d)、もしくは(e)のヌクレオチド配列のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

20

## 【0053】

VEGF-2ポリペプチドをコードする参照ヌクレオチド配列に、少なくとも、例えば、95%「同一」なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドは、このポリヌクレオチド配列がVEGF-2ポリペプチドをコードする参照ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチド当たり5個までの点変異を含み得ることを除いて、このポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が参照配列に同一であることを意図する。換言すると、参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るために、参照配列中のヌクレオチドの5%までを、欠失し得るかまたは別のヌクレオチドで置換し得、あるいは参照配列中の全ヌクレオチドの5%までの多数のヌクレオチドを参照配列中に挿入し得る。参照配列のこれらの変異は、参照ヌクレオチド配列の5'末端位置または3'末端位置で、あるいはこれらの末端位置の間どこかに、参照配列中のヌクレオチドの間に個々に分散してかまたは参照配列中に1以上の連続した群で分散してかのいずれかで生じ得る。

30

## 【0054】

現実的な問題として、任意の特定の核酸分子が、例えば、配列番号1または3に示されるヌクレオチド配列にか、あるいは寄託されたcDNAクローンのヌクレオチド配列に少なくとも95%、96%、97%、98%、99%同一であるか否かは、公知のコンピュータプログラム(例えば、Bestfitプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix (登録商標)、Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711))を使用して従来的に決定され得る。Bestfitは、2つの配列間の相同性の最も優れたセグメントを見出すために、SmithおよびWaterman(Advances in Applied Mathematics 2:482~489(1981))の局所的相同性アルゴリズムを使用する。特定の配列が、例えば、本発明に従う参照配列に95%同一であるか否かを決定するために、Bestfitま

40

50

たは任意の他の配列整列プログラムを使用する場合、当然、同一性の百分率が参照ヌクレオチド配列の全長にわたって計算され、そして参照配列中のヌクレオチドの総数の5%までの相同性におけるギャップが許容されるように、パラメータを設定する。

**【0055】**

以下に詳細に記載されるように、本発明のポリペプチドを使用し、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を惹起し得、これらは、以下に記載されるようにVEGF-2タンパク質の発現を検出するための診断アッセイにおいて、あるいはVEGF-2タンパク質の機能を増強または阻害し得るアゴニストおよびアンタゴニストとして有用である。さらに、このようなポリペプチドは、本発明に従う候補アゴニストおよび候補アンタゴニストでもある、VEGF-2タンパク質結合タンパク質を「捕捉」する酵母ツーハイブリッド系において使用され得る。酵母ツーハイブリッド系は、FieldsおよびSong、Nature 340:245~246(1989)に記載される。

10

**【0056】**

別の局面において、本発明は、本発明のポリペプチドのエピトープ保有部分を含む、ペプチドまたはポリペプチドを提供する。抗原性エピトープを保有するペプチドまたはポリペプチド(すなわち、抗体が結合し得るタンパク質分子の領域を含む)の選択に関して、タンパク質配列の一部を模倣する比較的短い合成ペプチドは、部分的に模倣されたタンパク質と反応する抗血清を慣用的に惹起し得ることが当該分野で周知である。例えば、Sutcliffe, J. G., Shinnick, T. M., Green, N. および Learner, R. A. (1983) Antibodies that react with predetermined sites on proteins. Science 219:660~666を参照のこと。Science 219:660-666。タンパク質反応性血清を惹起し得るペプチドは、しばしば、タンパク質の一次配列で示され、一連の単純な化学法則により特徴付けられ得、そしてインタクトなタンパク質の免疫優性領域(すなわち免疫原性エピトープ)またはアミノ末端もしくはカルボキシ末端のいずれにも制限されない。極端に疎水性であるペプチドおよびそれらの6以下の残基は、一般に、模倣されたタンパク質に結合する抗体を誘導する際に非効果的であり;より長い可溶性ペプチド、特にプロリン残基を含む可溶性ペプチドは、通常、効果的である。Sutcliffeら、前出第661頁。例えば、インフルエンザウイルス血球凝集素HA1ポリペプチド鎖の配列の75%をカバーする8~39個の残基を含む、このガイドラインに従って設計された20個のペプチドのうち18個は、HA1タンパク質またはインタクトなウイルスと反応する抗体を誘導し;そしてMuLVポリメラーゼ由来の12/12ペプチドおよび狂犬病糖タンパク質由来の18/18は、それぞれのタンパク質を沈降させた抗体を誘導した。

20

30

**【0057】**

従って、本発明の抗原性エピトープ保有ペプチドおよび抗原性エピトープ保有ポリペプチドは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体(モノクローナル抗体を含む)を惹起するために有用である。従って、抗原エピトープ保有ペプチドで免疫されたドナー由来の脾臓細胞の融合により得られた、高い割合のハイブリドーマは、一般に、ネイティブなタンパク質と反応する抗体を分泌する。Sutcliffeら、前出、第663頁。抗原性エピトープ保有ペプチドまたは抗原性エピトープ保有ポリペプチドにより惹起された抗体は、模倣されたタンパク質を検出するために有用であり、そして異なるペプチドに対する抗体は、翻訳後プロセッシングを受けるタンパク質前駆体の種々の領域の運命をたどるために使用され得る。ペプチドおよび抗ペプチド抗体は、模倣されたタンパク質についての種々の定性的アッセイまたは定量的アッセイにおいて、例えば、競合的アッセイにおいて使用され得る。なぜなら、短いペプチド(例えば、約9個のアミノ酸)でさえ、免疫沈降アッセイにおいて、より大きいペプチドを結合および置換し得ることが示されているからである。例えば、Wilsonら、Cell 37:767~778(1984)777を参照のこと。本発明の抗ペプチド抗体はまた、例えば、当該分野で周知である方法を使用する吸着クロマトグラフィーによる、模倣されたタンパク質の精製に有用である。

40

50

## 【 0 0 5 8 】

上記のガイドラインに従って設計される本発明の抗原性エピトープ保有ペプチドおよび抗原性エピトープ保有ポリペプチドは、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列内に含まれる、好ましくは少なくとも7個、より好ましくは少なくとも9個、そして最も好ましくは約15個～約30個の間のアミノ酸の配列を含む。しかし、約30、40、50、60、70、80、90、100、または150個のアミノ酸を含む、あるいは本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の全体までの任意の長さ、およびその全体を含む、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列のより大きい部分を含む、ペプチドまたはポリペプチドはまた、本発明のエピトープ保有ペプチドまたはエピトープ保有ポリペプチドとみなされ、そしてまた、模倣されたタンパク質と反応する抗体を誘導するために有用である。好ましくは、エピトープ保有ペプチドのアミノ酸配列は、水性溶媒中での実質的可溶性を提供するように選択され(すなわち、この配列は、比較的親水性の残基を含み、そして非常に疎水性の配列は、好ましくは回避される)；そしてプロリン残基を含む配列が、特に好ましい。

10

## 【 0 0 5 9 】

VEGF-2特異的抗体を産生するために使用され得る、抗原性ポリペプチドまたは抗原性ペプチドの非限定的な例には、以下が含まれる：配列番号2の約Leu-37から約glu-45まで、配列番号2の約Tyr-58から約Gly-66まで、配列番号2の約Gln-73から約Glu-81まで、配列番号2の約Asp-100から約Cys-108まで、配列番号2の約Gly-140から約Leu-148まで、配列番号2の約Pro-168から約Val-176まで、配列番号2の約His-183から約Lys-191まで、配列番号2の約Ile-201から約Thr-209まで、配列番号2の約Ala-216から約Tyr-224まで、配列番号2のAsp-244から約His-254まで、配列番号2の約Gly-258から約Glu-266まで、配列番号2の約Cys-272から約Ser-280まで、配列番号2の約Pro-283から約Ser-291まで、配列番号2の約Cys-296から約Gln-304まで、配列番号2の約Ala-307から約Cys-316まで、配列番号2の約Val-319からCys-335まで、配列番号2の約Cys-339から約Leu-347まで、配列番号2の約Cys-360から約Glu-373まで、配列番号2の約Tyr-378から約Val-386まで、および配列番号2の約Ser-388から約Ser-396まで、のアミノ酸残基を含むポリペプチド。これらのポリペプチドフラグメントは、VEGF-2タンパク質の抗原性エピトープを保有することが、Jameson-Wolf抗原性指数の分析により決定されている。

20

30

## 【 0 0 6 0 】

本発明のエピトープ保有ペプチドおよびエピトープ保有ポリペプチドは、本発明の核酸分子を使用する組換え手段を含む、ペプチドまたはポリペプチドを作製するための任意の従来の手段により産生され得る。例えば、短いエピトープ保有アミノ酸配列は、組換え産生および精製の間、ならびに抗ペプチド抗体を産生するための免疫の間のキャリアとして作用する、より大きなポリペプチドに融合され得る。エピトープ保有ペプチドはまた、化学合成の公知の方法を使用して合成され得る。例えば、Houghtenは、多数のペプチド(例えば、4週間未満で(ELISA型結合研究により)調製されそして特徴づけられたHA1ポリペプチドのセグメントの1アミノ酸改変体を表す248個の異なる13残基ペプチドを10～20mg)の合成のための簡便な方法を記載している。Houghten, R. A. (1985) General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5131-5135。この「同時多数ペプチド合成(Simultaneous Multiple Peptide Synthesis)(SMPS)」プロセスは、Houghtenら(1986)に対する米国特許第4,631,211号にさらに記載

40

50

されている。この手順において、種々のペプチドの固相合成のための個々の樹脂は、別々の溶媒透過性パッケージに入れられ、固相法に包含される多くの同一の反復工程の最適な使用を可能にしている。完全に手動の手順により、500～1000以上の合成を、同時に行わせることが可能である。Houghtenら、前出、第5134頁。

#### 【0061】

本発明のエピトープ保有ペプチドおよびエピトープ保有ポリペプチドは、当該分野で周知の方法に従って抗体を誘導するために使用される。例えば、Sutcliffeら、前出；Wilsonら、前出；Chow, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:910-914；およびBittle, F. J.ら、J. Gen. Virol. 66:2347-2354(1985)を参照のこと。一般的に、動物は、遊離のペプチドで免疫され得る；しかし、抗ペプチド抗体力価は、ペプチドを高分子キャリア（例えば、キーホールリンベットヘモシアニン（KLH）または破傷風トキソイド）に結合させることによってブーストされ得る。例えば、システインを含有するペプチドは、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）のようなリンカーを使用してキャリアに結合され得、一方、他のペプチドは、グルタルアルデヒドのようなより一般的な連結剤を使用してキャリアに結合させ得る。ウサギ、ラット、およびマウスのような動物は、例えば、約100mgのペプチドまたはキャリアタンパク質およびフロイントアジュバントを含有するエマルジョンの腹腔内注射および/または皮内注射により遊離ペプチドまたはキャリアに結合したペプチドのいずれかで免疫される。例えば、いくつかのブースター注射は、約2週間の間隔で、例えば、ELISAアッセイにより、固相表面に吸着させた遊離のペプチドを使用して検出され得る抗ペプチド抗体の有用な力価を提供するために必要とされ得る。免疫した動物由来の血清中の抗ペプチド抗体の力価は、例えば、当該分野で周知の方法に従って、固相上のペプチドへ吸着させ、そして選択された抗体を溶出することによる、抗ペプチド抗体の選択により増大され得る。

#### 【0062】

本発明の免疫原性エピトープ保有ペプチド、すなわち、タンパク質全体が免疫原である場合、そのタンパク質のうちの抗体応答を誘発する部分は、当該分野で公知の方法に従って、同定される。例えば、Geysenら（前出）は、酵素結合免疫吸着アッセイにおいて反応するに十分な純度の数百のペプチドの固相支持体上での、迅速な同時合成のための手順を開示する。次いで、合成されたペプチドと抗体との相互作用は、支持体からそれらを除去せずに容易に検出される。このようにして、所望のタンパク質の免疫原性エピトープを保有するペプチドが、当業者により慣用的に同定され得る。例えば、口蹄疫ウイルスの外被タンパク質における免疫学的に重要なエピトープは、Geysenらによって、そのタンパク質の213アミノ酸配列全体をカバーする全208の可能なヘキサペプチドの重複セットの合成により、7アミノ酸の解像度で位置づけられた。次いで、エピトープ内の全ての位置で全20アミノ酸で次々と置換されたペプチドの完全な置換セットが合成され、そして抗体との反応に対して特異性を付与する特定のアミノ酸が決定された。従って、本発明のエピトープ保有ペプチドのペプチドアナログは、この方法によって慣用的に作製され得る。Geysen(1987)に対する米国特許第4,708,781号は、所望のタンパク質の免疫原性エピトープを保有するペプチドを同定するこの方法をさらに記載する。

#### 【0063】

さらになお、Geysenに対する米国特許第5,194,392号(1990)は、目的の抗体の特定のパラトープ（抗原結合部位）に相補的なエピトープの幾何学的等価物（すなわち、アミモトープ（Amimotope））であるモノマー（アミノ酸または他の化合物）の配列を検出または決定する一般的な方法を記載する。より一般的には、Geysenに対する米国特許第4,433,092号(1989)は、目的の特定のレセプターのリガンド結合部位に対して相補的であるリガンドの幾何学的等価物であるモノマーの配列を検出または決定する方法を記載する。同様に、ペルアルキル化オリゴペプチド混合物（Peralkylated Oligopeptide Mixtures）に関

10

20

30

40

50

する Houghten, R. A. に対する米国特許第 5,480,971 号 (1996) は、直線状 C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> アルキルペルアルキル化オリゴペプチドならびにこのようなペプチドのセットおよびライブラリー、ならびに目的のアクセプター分子に優先的に結合するペルアルキル化オリゴペプチドの配列を決定するために、このようなオリゴペプチドのセットおよびライブラリーを使用するための方法を開示する。従って、本発明のエピトープ保有ペプチドの非ペプチドアナログはまた、これらの方法により慣用的に作製され得る。

【0064】

当業者に理解されるように、上記の本発明の VEGF-2 ポリペプチドおよびそのエピトープ保有フラグメントは、免疫グロブリン (IgG) の定常ドメインの一部と組み合わせられ、キメラポリペプチドを生じ得る。これらの融合タンパク質は、精製を容易にし、そしてインビボでの増大した半減期を示す。これは、例えば、ヒト CD4 ポリペプチドの第一の 2 つのドメインおよび哺乳動物免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質について示されている (EPA 394, 827; Trauncker ら、Nature 331: 84-86 (1988))。

【0065】

本発明に従って、VEGF-2 の新規な改変体がまた記載される。これらは VEGF-2 の一つ以上のアミノ酸を欠失または置換することによって産生され得る。天然の変異は、対立遺伝子バリエーションと呼ばれる。対立遺伝子バリエーションは、サイレント (コードされるポリペプチドにおける変化がない) であり得るか、または変化したアミノ酸配列を有し得る。

【0066】

ネイティブの VEGF-2 の特徴を改善または変更するための試みにおいて、タンパク質操作が使用され得る。当業者に公知の組換え DNA 技術は、新規のポリペプチドを作製するために使用され得る。ムテインおよび欠失は、例えば、増強された活性または増大した安定性を示し得る。さらに、それらはより高収量で精製され得、そしてより良好な可溶性を少なくとも特定の精製および保存条件下で示す。以下に示すのは、構築され得る変異の例である。

【0067】

(アミノ末端およびカルボキシ末端欠失)

さらに、VEGF-2 は、SDS-PAGE ゲルにおいて泳動した場合、発現の際にタンパク質分解的に切断され、以下のサイズのポリペプチドフラグメントを生じるようである (サイズはおよそである) (例えば、図 6~8 を参照のこと): 80、59、45、43、41、40、39、38、37、36、31、29、21、および 15 kDa。これらのポリペプチドフラグメントは、そのタンパク質の N 末端部分および C 末端部分の両方でタンパク質分解切断された結果である。これらのタンパク質分解的に生成されたフラグメント、特に 21 kDa のフラグメントは、活性を有するようである。

【0068】

さらに、タンパク質操作は、ネイティブの VEGF-2 の一つ以上の特徴を改善または変更するために使用され得る。カルボキシ末端のアミノ酸の欠失は、タンパク質の活性を増強し得る。1 つの例は、タンパク質のカルボキシ末端からの 10 アミノ酸残基の欠失により、10 倍までのより高い活性を示すインターフェロン である (Doebeli ら、J. of Biotechnology 7: 199-216 (1988))。従って、本発明の 1 つの局面は、ネイティブの VEGF-2 ポリペプチドに対して増強された安定性 (例えば、代表的な pH、熱条件、または他の保存条件に曝露された場合) を示す VEGF-2 のポリペプチドアナログおよびそのようなアナログをコードするヌクレオチド配列を提供することである。

【0069】

特に好ましい VEGF-2 ポリペプチドは、以下に示される (番号付けは、タンパク質 (図 1 (配列番号 18)) 中の第一のアミノ酸 (Met) で始まる): Ala (残基 24) ~ Ser (残基 419); Pro (25) ~ Ser (419); Ala (26) ~ Se

10

20

30

40

50

r ( 4 1 9 ) ; A l a ( 2 7 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; A l a ( 2 8 ) ~ S e r ( 4 1 9 )  
; A l a ( 2 9 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; A l a ( 3 0 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; P h e ( 3  
1 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; G l u ( 3 2 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; S e r ( 3 3 ) ~ S e r  
( 4 1 9 ) ; G l y ( 3 4 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; L e u ( 3 5 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ;  
A s p ( 3 6 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; L e u ( 3 7 ) ~ ( S e r ( 4 1 9 ) ; S e r ( 3  
8 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; A s p ( 3 9 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; A l a ( 4 0 ) ~ S e r  
( 4 1 9 ) ; G l u ( 4 1 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; P r o ( 4 2 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ;  
A s p ( 4 3 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; A l a ( 4 4 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; G l y ( 4 5  
) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; G l u ( 4 6 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; A l a ( 4 7 ) ~ S e r ( 10  
4 1 9 ) ; T h r ( 4 8 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; A l a ( 4 9 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; T  
y r ( 5 0 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; S e r ( 5 2 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; A s p ( 5 4 )  
~ S e r ( 4 1 9 ) ; V a l ( 6 2 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; V a l ( 6 5 ) ~ S e r ( 4  
1 9 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~ M e t ( 4 1 8 ) ; M  
e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~ G l n ( 4 1 7 ) ; M e t ( 1 )  
、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~ P r o ( 4 1 6 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 2  
3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~ A r g ( 4 1 5 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 ま  
たは A l a ( 2 4 ) ~ G l n ( 4 1 4 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a  
( 2 4 ) ~ T r p ( 4 1 3 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~  
T y r ( 4 1 2 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~ S e r ( 4  
1 1 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~ P r o ( 4 1 0 ) ; M 20  
e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~ V a l ( 4 0 9 ) ; M e t ( 1 )  
、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~ C y s ( 4 0 8 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 2  
3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~ A r g ( 4 0 7 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 ま  
たは A l a ( 2 4 ) ~ C y s ( 4 0 6 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a  
( 2 4 ) ~ V a l ( 4 0 5 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~  
G l u ( 4 0 4 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~ G l u ( 4  
0 3 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~ S e r ( 4 0 2 ) ; M  
e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~ G l y ( 3 9 8 ) ; M e t ( 1 )  
、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~ P r o ( 3 9 7 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 30  
2 3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~ L y s ( 3 9 3 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 ま  
たは A l a ( 2 4 ) ~ M e t ( 2 6 3 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a  
( 2 4 ) ~ A s p ( 3 1 1 ) ; M e t ( 1 ) 、 G l u ( 2 3 ) 、 または A l a ( 2 4 ) ~  
P r o ( 3 6 7 ) ; M e t ( 1 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; M e t ( 1 ) ~ S e r ( 2 2 8 )  
; G l u ( 4 7 ) ~ S e r ( 4 1 9 ) ; A l a ( 1 1 1 ) ~ L y s ( 2 1 4 ) ; A l a ( 1  
1 2 ) ~ L y s ( 2 1 4 ) ; H i s ( 1 1 3 ) ~ L y s ( 2 1 4 ) ; T y r ( 1 1 4 )  
~ L y s ( 2 1 4 ) ; A s n ( 1 1 5 ) ~ L y s ( 2 1 4 ) ; T h r ( 1 1 6 ) ~ L y s  
( 2 1 4 ) ; T h r ( 1 0 3 ) ~ L e u ( 2 1 5 ) ; G l u ( 1 0 4 ) ~ L e u ( 2 1 5  
) ; G l u ( 1 0 5 ) ~ L e u ( 2 1 5 ) ; T h r ( 1 0 6 ) ~ L e u ( 2 1 5 ) ; I l  
e ( 1 0 7 ) ~ L e u ( 2 1 5 ) ; L y s ( 1 0 8 ) ~ L e u ( 2 1 5 ) ; P h e ( 1 0  
9 ) ~ L e u ( 2 1 5 ) ; A l a ( 1 1 0 ) ~ L e u ( 2 1 5 ) ; A l a ( 1 1 1 ) ~ L 40  
e u ( 2 1 5 ) ; A l a ( 1 1 2 ) ~ L e u ( 2 1 5 ) ; H i s ( 1 1 3 ) ~ L e u ( 2  
1 5 ) ; T y r ( 1 1 4 ) ~ L e u ( 2 1 5 ) ; A s n ( 1 1 5 ) ~ L e u ( 2 1 5 ) ;  
T h r ( 1 1 6 ) ~ L e u ( 2 1 5 ) ; T h r ( 1 0 3 ) ~ S e r ( 2 2 8 ) ; G l u ( 1  
0 4 ) ~ S e r ( 2 2 8 ) ; G l u ( 1 0 5 ) ~ S e r ( 2 2 8 ) ; T h r ( 1 0 6 )  
~ S e r ( 2 2 8 ) ; I l e ( 1 0 7 ) ~ S e r ( 2 2 8 ) ; L y s ( 1 0 8 ) ~ S e r  
( 2 2 8 ) ; P h e ( 1 0 9 ) ~ S e r ( 2 2 8 ) ; A l a ( 1 1 0 ) ~ S e r ( 2 2 8 )  
; A l a ( 1 1 1 ) ~ S e r ( 2 2 8 ) ; A l a ( 1 1 2 ) ~ S e r ( 2 2 8 ) ; H i  
s ( 1 1 3 ) ~ S e r ( 2 2 8 ) ; T y r ( 1 1 4 ) ~ S e r ( 2 2 8 ) ; A s n ( 1 1  
5 ) ~ S e r ( 2 2 8 ) ; T h r ( 1 1 6 ) ~ S e r ( 2 2 8 ) ; T h r ( 1 0 3 ) ~ L  
e u ( 2 2 9 ) ; G l u ( 1 0 4 ) ~ L e u ( 2 2 9 ) ; T h r ( 1 0 3 ) ~ A r g ( 2 50



27); Glu(104) ~ Arg(227); Glu(105) ~ Arg(227); Thr(106) ~ Arg(227); Ile(107) ~ Arg(227); Lys(108) ~ Arg(227); Phe(109) ~ Arg(227); Ala(110) ~ Arg(227); Ala(111) ~ Arg(227); Ala(112) ~ Arg(227); His(113) ~ Arg(227); Tyr(114) ~ Arg(227); Asn(115) ~ Arg(227); Thr(116) ~ Arg(227); Thr(103) ~ Ser(213); Glu(104) ~ Ser(213); Glu(105) ~ Ser(213); Thr(106) ~ Ser(213); Ile(107) ~ Ser(213); Lys(108) ~ Ser(213); Phe(109) ~ Ser(213); Ala(110) ~ Ser(213); Ala(111) ~ Ser(213); Ala(112) ~ Ser(213); His(113) ~ Ser(213); Tyr(114) ~ Ser(213); Asn(115) ~ Ser(213); Thr(116) ~ Ser(213); Thr(103) ~ Lys(214); Glu(104) ~ Lys(214); Glu(105) ~ Lys(214); Thr(106) ~ Lys(214); Ile(107) ~ Lys(214); Lys(108) ~ Lys(214); Phe(109) ~ Lys(214); Ala(110) ~ Lys(214); Glu(105) ~ Leu(229); Thr(106) ~ Leu(229); Ile(107) ~ Leu(229); Lys(108) ~ Leu(229); Phe(109) ~ Leu(229); Ala(110) ~ Leu(229); Ala(111) ~ Leu(229); Ala(112) ~ Leu(229); His(113) ~ Leu(229); Tyr(114) ~ Leu(229); Asn(115) ~ Leu(229); Thr(116) ~ Leu(229)。

10

20

## 【0070】

好ましい実施形態には、以下の欠失変異体が含まれる：図1（配列番号18）の

## 【0071】

## 【化1】

Thr(103) --

Arg(227); Glu(104) -- Arg(227); Ala(112) -- Arg(227); Thr(103) -- Ser(213); Glu(104)

-- Ser(213); Thr(103) -- Leu(215); Glu(47) -- Ser(419); Met(1), Glu(23),またはAla(24) --

Met(263); Met(1), Glu(23),またはAla(24) -- Asp(311); Met(1), Glu(23),またはAla(24) --

Pro(367); Met(1) -- Ser(419); および Met(1) -- Ser(228) .

30

本発明にはまた、N末端とC末端の両方からのアミノ酸欠失を有する欠失変異体が含まれる。このような変異体には、上記のN末端欠失変異体およびC末端欠失変異体の全ての組み合わせが含まれる。これらの組み合わせは、当業者に公知の組換え技術を使用して作製され得る。

## 【0072】

特に、VEGF-2ポリペプチドのN末端欠失は、一般式m-396により記載され得、ここでmは、-23~388の整数であり、mは、配列番号2に同定されるアミノ酸残基の位置に対応する。好ましくは、N末端欠失は、図3の保存されたボックスで囲んだ領域(PXC VXXXRCXGCCN)（配列番号8）を保持する。配列番号2に示す本発明のポリペプチドのN末端欠失は、以下の残基のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む：配列番号2の

40

## 【0073】

【化 2】

E-1 ~ S-396; A-2 ~ S-396; P-3 ~ S-396; A-4 ~ S-396; A-5 ~ S-396; A-6 ~ S-396; A-7 ~ S-396; A-8 ~ S-396; F-9 ~ S-396; E-10 ~ S-396; S-11 ~ S-396; G-12 ~ S-396; L-13 ~ S-396; D-14 ~ S-396; L-15 ~ S-396; S-16 ~ S-396; D-17 ~ S-396; A-18 ~ S-396; E-19 ~ S-396; P-20 ~ S-396; D-21 ~ S-396; A-22 ~ S-396; G-23 ~ S-396; E-24 ~ S-396; A-25 ~ S-396; T-26 ~ S-396; A-27 ~ S-396; Y-28 ~ S-396; A-29 ~ S-396; S-30 ~ S-396; K-31 ~ S-396; D-32 ~ S-396; L-33 ~ S-396; E-34 ~ S-396; E-35 ~ S-396; Q-36 ~ S-396; L-37 ~ S-396; R-38 ~ S-396; S-39 ~ S-396; V-40 ~ S-396; S-41 ~ S-396; S-42 ~ S-396; V-43 ~ S-396; D-44 ~ S-396; E-45 ~ S-396; L-46 ~ S-396; M-47 ~ S-396; T-48 ~ S-396; V-49 ~ S-396; L-50 ~ S-396; Y-51 ~ S-396; P-52 ~ S-396; E-53 ~ S-396; Y-54 ~ S-396; W-55 ~ S-396; K-56 ~ S-396; M-57 ~ S-396; Y-58 ~ S-396; K-59 ~ S-396; C-60 ~ S-396; Q-61 ~ S-396; L-62 ~ S-396; R-63 ~ S-396; K-64 ~ S-396; G-65 ~ S-396; G-66 ~ S-396; W-67 ~ S-396; Q-68 ~ S-396; H-69 ~ S-396; N-70 ~ S-396; R-71 ~ S-396; E-72 ~ S-396; Q-73 ~ S-396; A-74 ~ S-396; N-75 ~ S-396; L-76 ~ S-396; N-77 ~ S-396; S-78 ~ S-

10

20

【 0 0 7 4 】

## 【化 3】

396; R-79 ~ S-396; T-80 ~ S-396; E-81 ~ S-396; E-82 ~ S-396; T-83 ~ S-396; I-84  
 ~ S-396; K-85 ~ S-396; F-86 ~ S-396; A-87 ~ S-396; A-88 ~ S-396; A-89 ~ S-396;  
 H-90 ~ S-396; Y-91 ~ S-396; N-92 ~ S-396; T-93 ~ S-396; E-94 ~ S-396; I-95 ~ S-  
 396; L-96 ~ S-396; K-97 ~ S-396; S-98 ~ S-396; I-99 ~ S-396; D-100 ~ S-396; N-  
 101 ~ S-396; E-102 ~ S-396; W-103 ~ S-396; R-104 ~ S-396; K-105 ~ S-396; T-106  
 ~ S-396; Q-107 ~ S-396; C-108 ~ S-396; M-109 ~ S-396; P-110 ~ S-396; R-111 ~  
 S-396; E-112 ~ S-396; V-113 ~ S-396; C-114 ~ S-396; I-115 ~ S-396; D-116 ~ S-  
 396; V-117 ~ S-396; G-118 ~ S-396; K-119 ~ S-396; E-120 ~ S-396; F-121 ~ S-  
 396; G-122 ~ S-396; V-123 ~ S-396; A-124 ~ S-396; T-125 ~ S-396; N-126 ~ S-  
 396; T-127 ~ S-396; F-128 ~ S-396; F-129 ~ S-396; K-130 ~ S-396; P-131 ~ S-396;  
 P-132 ~ S-396; C-133 ~ S-396; V-134 ~ S-396; S-135 ~ S-396; V-136 ~ S-396; Y-  
 137 ~ S-396; R-138 ~ S-396; C-139 ~ S-396; G-140 ~ S-396; G-141 ~ S-396; C-142  
 ~ S-396; C-143 ~ S-396; N-144 ~ S-396; S-145 ~ S-396; E-146 ~ S-396; G-147 ~  
 S-396; L-148 ~ S-396; Q-149 ~ S-396; C-150 ~ S-396; M-151 ~ S-396; N-152 ~ S-  
 396; T-153 ~ S-396; S-154 ~ S-396; T-155 ~ S-396; S-156 ~ S-396; Y-157 ~ S-396;  
 L-158 ~ S-396; S-159 ~ S-396; K-160 ~ S-396; T-161 ~ S-396; L-162 ~ S-396; F-  
 163 ~ S-396; E-164 ~ S-396; I-165 ~ S-396; T-166 ~ S-396; V-167 ~ S-396; P-168  
 ~ S-396; L-169 ~ S-396; S-170 ~ S-396; Q-171 ~ S-396; G-172 ~ S-396; P-173 ~  
 S-396; K-174 ~ S-396; P-175 ~ S-396; V-176 ~ S-396; T-177 ~ S-396; I-178 ~ S-  
 396; S-179 ~ S-396; F-180 ~ S-396; A-181 ~ S-396; N-182 ~ S-396; H-183 ~ S-396;  
 T-184 ~ S-396; S-185 ~ S-396; C-186 ~ S-396; R-187 ~ S-396; C-188 ~ S-396; M-  
 189 ~ S-396; S-190 ~ S-396; K-191 ~ S-396; L-192 ~ S-396; D-193 ~ S-396; V-194  
 ~ S-396; Y-195 ~ S-396; R-196 ~ S-396; Q-197 ~ S-396; V-198 ~ S-396; H-199 ~  
 S-396; S-200 ~ S-396; I-201 ~ S-396; I-202 ~ S-396; R-203 ~ S-396; R-204 ~ S-  
 396; S-205 ~ S-396; L-206 ~ S-396; P-207 ~ S-396; A-208 ~ S-396; T-209 ~ S-396;  
 L-210 ~ S-396; P-211 ~ S-396; Q-212 ~ S-396; C-213 ~ S-396; Q-214 ~ S-396; A-  
 215 ~ S-396; A-216 ~ S-396; N-217 ~ S-396; K-218 ~ S-396; T-219 ~ S-396; C-220  
 ~ S-396; P-221 ~ S-396; T-222 ~ S-396; N-223 ~ S-396; Y-224 ~ S-396; M-225 ~  
 S-396; W-226 ~ S-396; N-227 ~ S-396; N-228 ~ S-396; H-229 ~ S-396; I-230 ~ S-  
 396; C-231 ~ S-396; R-232 ~ S-396; C-233 ~ S-396; L-234 ~ S-396; A-235 ~ S-  
 396; Q-236 ~ S-396; E-237 ~ S-396; D-238 ~ S-396; F-239 ~ S-396; M-240 ~ S-  
 396; F-241 ~ S-396; S-242 ~ S-396; S-243 ~ S-396; D-244 ~ S-396; A-245 ~ S-396;  
 G-246 ~ S-396; D-247 ~ S-396; D-248 ~ S-396; S-249 ~ S-396; T-250 ~ S-396; D-

10

20

30

40

【 0 0 7 5 】

## 【化4】

251 ~ S-396; G-252 ~ S-396; F-253 ~ S-396; H-254 ~ S-396; D-255 ~ S-396; I-256 ~ S-396; C-257 ~ S-396; G-258 ~ S-396; P-259 ~ S-396; N-260 ~ S-396; K-261 ~ S-396; E-262 ~ S-396; L-263 ~ S-396; D-264 ~ S-396; E-265 ~ S-396; E-266 ~ S-396; T-267 ~ S-396; C-268 ~ S-396; Q-269 ~ S-396; C-270 ~ S-396; V-271 ~ S-396; C-272 ~ S-396; R-273 ~ S-396; A-274 ~ S-396; G-275 ~ S-396; L-276 ~ S-396; R-277 ~ S-396; P-278 ~ S-396; A-279 ~ S-396; S-280 ~ S-396; C-281 ~ S-396; G-282 ~ S-396; P-283 ~ S-396; H-284 ~ S-396; K-285 ~ S-396; E-286 ~ S-396; L-287 ~ S-396; D-288 ~ S-396; R-289 ~ S-396; N-290 ~ S-396; S-291 ~ S-396; C-292 ~ S-396; Q-293 ~ S-396; C-294 ~ S-396; V-295 ~ S-396; C-296 ~ S-396; K-297 ~ S-396; N-298 ~ S-396; K-299 ~ S-396; L-300 ~ S-396; F-301 ~ S-396; P-302 ~ S-396; S-303 ~ S-396; Q-304 ~ S-396; C-305 ~ S-396; G-306 ~ S-396; A-307 ~ S-396; N-308 ~ S-396; R-309 ~ S-396; E-310 ~ S-396; F-311 ~ S-396; D-312 ~ S-396; E-313 ~ S-396; N-314 ~ S-396; T-315 ~ S-396; C-316 ~ S-396; Q-317 ~ S-396; C-318 ~ S-396; V-319 ~ S-396; C-320 ~ S-396; K-321 ~ S-396; R-322 ~ S-396; T-323 ~ S-396; C-324 ~ S-396; P-325 ~ S-396; R-326 ~ S-396; N-327 ~ S-396; Q-328 ~ S-396; P-329 ~ S-396; L-330 ~ S-396; N-331 ~ S-396; P-332 ~ S-396; G-333 ~ S-396; K-334 ~ S-396; C-335 ~ S-396; A-336 ~ S-396; C-337 ~ S-396; E-338 ~ S-396; C-339 ~ S-396; T-340 ~ S-396; E-341 ~ S-396; S-342 ~ S-396; P-343 ~ S-396; Q-344 ~ S-396; K-345 ~ S-396; C-346 ~ S-396; L-347 ~ S-396; L-348 ~ S-396; K-349 ~ S-396; G-350 ~ S-396; K-351 ~ S-396; K-352 ~ S-396; F-353 ~ S-396; H-354 ~ S-396; H-355 ~ S-396; Q-356 ~ S-396; T-357 ~ S-396; C-358 ~ S-396; S-359 ~ S-396; C-360 ~ S-396; Y-361 ~ S-396; R-362 ~ S-396; R-363 ~ S-396; P-364 ~ S-396; C-365 ~ S-396; T-366 ~ S-396; N-367 ~ S-396; R-368 ~ S-396; Q-369 ~ S-396; K-370 ~ S-396; A-371 ~ S-396; C-372 ~ S-396; E-373 ~ S-396; P-374 ~ S-396; G-375 ~ S-396; F-376 ~ S-396; S-377 ~ S-396; Y-378 ~ S-396; S-379 ~ S-396; E-380 ~ S-396; E-381 ~ S-396; V-382 ~ S-396; C-383 ~ S-396; R-384 ~ S-396; C-385 ~ S-396; V-386 ~ S-396; P-387 ~ S-396; S-388 ~ S-396; Y-389 ~ S-396; W-390 ~ S-396; Q-391 ~ S-396

10

20

30

。1つの好ましい実施形態には、配列番号2のアミノ酸S - 205 ~ S - 396が含まれる。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた好ましい。

## 【0076】

40

さらに、VEGF - 2ポリペプチドのC末端欠失はまた、一般式 - 23 - nにより記載され得、ここでnは - 15 ~ 395の整数であり、nは、配列番号2で同定されるアミノ酸残基の位置に対応する。好ましくは、C末端欠失は、図3の保存されたボックスで囲んだ領域(PXC VXXXR CXGCCN)(配列番号8)を保持する。配列番号2に示される本発明のポリペプチドのC末端欠失は、以下の残基のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む：配列番号2の

## 【0077】

【化5】

E-1 ~ M-395; E-1 ~ Q-394; E-1 ~ P-393; E-1 ~ R-392; E-1 ~ Q-391; E-1 ~ W-390; E-1 ~ Y-389; E-1 ~ S-388; E-1 ~ P-387; E-1 ~ V-386; E-1 ~ C-385; E-1 ~ R-384; E-1 ~ C-383; E-1 ~ V-382; E-1 ~ E-381; E-1 ~ E-380; E-1 ~ S-379; E-1 ~ Y-378; E-1 ~ S-377; E-1 ~ F-376; E-1 ~ G-375; E-1 ~ P-374; E-1 ~ E-373; E-1 ~ C-372; E-1 ~ A-371; E-1 ~ K-370; E-1 ~ Q-369; E-1 ~ R-368; E-1 ~ N-367; E-1 ~ T-366; E-1 ~ C-365; E-1 ~ P-364; E-1 ~ R-363; E-1 ~ R-362; E-1 ~ Y-361; E-1 ~ C-360; E-1 ~ S-359; E-1 ~ C-358; E-1 ~ T-357; E-1 ~ Q-356; E-1 ~ H-355; E-1 ~ H-354; E-1 ~ F-353; E-1 ~ K-352; E-1 ~ K-351; E-1 ~ G-350; E-1 ~ K-349; E-1 ~ L-348; E-1 ~ L-347; E-1 ~ C-346; E-1 ~ K-345; E-1 ~ Q-344; E-1 ~ P-343; E-1 ~ S-342; E-1 ~ E-341; E-1 ~ T-340; E-1 ~ C-339; E-1 ~ E-338; E-1 ~ C-337; E-1 ~ A-336; E-1 ~ C-335; E-1 ~ K-334; E-1 ~ G-333; E-1 ~ P-332; E-1 ~ N-331; E-1 ~ L-330; E-1 ~ P-329; E-1 ~ Q-328; E-1 ~ N-327; E-1 ~ R-326; E-1 ~ P-325; E-1 ~ C-324; E-1 ~ T-323; E-1 ~ R-322; E-1 ~ K-321; E-1 ~ C-320; E-1 ~ V-319; E-1 ~ C-318; E-1 ~ Q-317; E-1 ~ C-316; E-1 ~ T-315; E-1 ~ N-314; E-1 ~ E-313; E-1 ~ D-312; E-1 ~ F-311; E-1 ~ E-310; E-1 ~ R-309; E-1 ~ N-308; E-1 ~ A-307; E-1 ~ G-306; E-1 ~ C-305; E-1 ~ Q-304; E-1 ~ S-303; E-1 ~ P-302; E-1 ~ F-301; E-1 ~ L-300; E-1 ~ K-299; E-1 ~ N-298; E-1 ~ K-297; E-1 ~ C-296; E-1 ~ V-295; E-1 ~ C-294; E-1 ~ Q-293; E-1 ~ C-292; E-1 ~ S-291; E-1 ~ N-290; E-1 ~ R-289; E-1 ~ D-288; E-1 ~ L-287; E-1 ~ E-286; E-1 ~ K-285; E-1 ~ H-284; E-1 ~ P-283; E-1 ~ G-282; E-1 ~ C-281; E-1 ~ S-280; E-1 ~ A-279; E-1 ~ P-278; E-1 ~ R-277; E-1 ~ L-276; E-1 ~ G-275; E-1 ~ A-274; E-1 ~ R-273; E-1 ~ C-272; E-1 ~ V-271; E-1 ~ C-270; E-1 ~ Q-269; E-1 ~ C-268; E-1 ~ T-267; E-1 ~ E-266; E-1 ~ E-265; E-1 ~ D-264; E-1 ~ L-263; E-1 ~ E-262; E-1 ~ K-261; E-1 ~ N-260; E-1 ~ P-259; E-1 ~ G-258; E-1 ~ C-257; E-1 ~ I-256; E-1 ~ D-255; E-1 ~ H-254; E-1 ~ F-253; E-1 ~ G-252; E-1 ~ D-251; E-1 ~ T-250; E-1 ~ S-249; E-1 ~ D-248; E-1 ~ D-247; E-1 ~ G-246; E-1 ~ A-245; E-1 ~ D-244; E-1 ~ S-243; E-1 ~ S-242; E-1 ~ F-241; E-1 ~ M-240; E-1 ~ F-239; E-1 ~ D-238; E-1 ~ E-237; E-1 ~ Q-236; E-1 ~ A-235; E-1 ~ L-234; E-1 ~ C-233; E-1 ~ R-232; E-1 ~ C-231; E-1 ~ I-230; E-1 ~ H-229; E-1 ~ N-228; E-1 ~ N-227; E-1 ~ W-226; E-1 ~ M-225; E-1 ~ Y-224; E-1 ~ N-223; E-1 ~ T-222; E-1 ~ P-221; E-1 ~ C-220; E-1 ~ T-219; E-1 ~ K-218; E-1 ~

10

20

30

40

【0078】

## 【化6】

N-217; E-1 ~ A-216; E-1 ~ A-215; E-1 ~ Q-214; E-1 ~ C-213; E-1 ~ Q-212; E-1 ~ P-211; E-1 ~ L-210; E-1 ~ T-209; E-1 ~ A-208; E-1 ~ P-207; E-1 ~ L-206; E-1 ~ S-205; E-1 ~ R-204; E-1 ~ R-203; E-1 ~ I-202; E-1 ~ I-201; E-1 ~ S-200; E-1 ~ H-199; E-1 ~ V-198; E-1 ~ Q-197; E-1 ~ R-196; E-1 ~ Y-195; E-1 ~ V-194; E-1 ~ D-193; E-1 ~ L-192; E-1 ~ K-191; E-1 ~ S-190; E-1 ~ M-189; E-1 ~ C-188; E-1 ~ R-187; E-1 ~ C-186; E-1 ~ S-185; E-1 ~ T-184; E-1 ~ H-183; E-1 ~ N-182; E-1 ~ A-181; E-1 ~ F-180; E-1 ~ S-179; E-1 ~ I-178; E-1 ~ T-177; E-1 ~ V-176; E-1 ~ P-175; E-1 ~ K-174; E-1 ~ P-173; E-1 ~ G-172; E-1 ~ Q-171; E-1 ~ S-170; E-1 ~ L-169; E-1 ~ P-168; E-1 ~ V-167; E-1 ~ T-166; E-1 ~ I-165; E-1 ~ E-164; E-1 ~ F-163; E-1 ~ L-162; E-1 ~ T-161; E-1 ~ K-160; E-1 ~ S-159; E-1 ~ L-158; E-1 ~ Y-157; E-1 ~ S-156; E-1 ~ T-155; E-1 ~ S-154; E-1 ~ T-153; E-1 ~ N-152; E-1 ~ M-151; E-1 ~ C-150; E-1 ~ Q-149; E-1 ~ L-148; E-1 ~ G-147; E-1 ~ E-146; E-1 ~ S-145; E-1 ~ N-144; E-1 ~ C-143; E-1 ~ C-142; E-1 ~ G-141; E-1 ~ G-140; E-1 ~ C-139; E-1 ~ R-138; E-1 ~ Y-137; E-1 ~ V-136; E-1 ~ S-135; E-1 ~ V-134; E-1 ~ C-133; E-1 ~ P-132; E-1 ~ P-131; E-1 ~ K-130; E-1 ~ F-129; E-1 ~ F-128; E-1 ~ T-127; E-1 ~ N-126; E-1 ~ T-125; E-1 ~ A-124; E-1 ~ V-123; E-1 ~ G-122; E-1 ~ F-121; E-1 ~ E-120; E-1 ~ K-119; E-1 ~ G-118; E-1 ~ V-117; E-1 ~ D-116; E-1 ~ I-115; E-1 ~ C-114; E-1 ~ V-113; E-1 ~ E-112; E-1 ~ R-111; E-1 ~ P-110; E-1 ~ M-109; E-1 ~ C-108; E-1 ~ Q-107; E-1 ~ T-106; E-1 ~ K-105; E-1 ~ R-104; E-1 ~ W-103; E-1 ~ E-102; E-1 ~ N-101; E-1 ~ D-100; E-1 ~ I-99; E-1 ~ S-98; E-1 ~ K-97; E-1 ~ L-96; E-1 ~ I-95; E-1 ~ E-94; E-1 ~ T-93; E-1 ~ N-92; E-1 ~ Y-91; E-1 ~ H-90; E-1 ~ A-89; E-1 ~ A-88; E-1 ~ A-87; E-1 ~ F-86; E-1 ~ K-85; E-1 ~ I-84; E-1 ~ T-83; E-1 ~ E-82; E-1 ~ E-81; E-1 ~ T-80; E-1 ~ R-79; E-1 ~ S-78; E-1 ~ N-77; E-1 ~ L-76; E-1 ~ N-75; E-1 ~ A-74; E-1 ~ Q-73; E-1 ~ E-72; E-1 ~ R-71; E-1 ~ N-70; E-1 ~ H-69; E-1 ~ Q-68; E-1 ~ W-67; E-1 ~ G-66; E-1 ~ G-65; E-1 ~ K-64; E-1 ~ R-63; E-1 ~ L-62; E-1 ~ Q-61; E-1 ~ C-60; E-1 ~ K-59; E-1 ~ Y-58; E-1 ~ M-57; E-1 ~ K-56; E-1 ~ W-55; E-1 ~ Y-54; E-1 ~ E-53; E-1 ~ P-52; E-1 ~ Y-51; E-1 ~ L-50; E-1 ~ V-49; E-1 ~ T-48; E-1 ~ M-47; E-1 ~ L-46; E-1 ~ E-45; E-1 ~ D-44; E-1 ~ V-43; E-1 ~ S-42; E-1 ~ S-41; E-1 ~ V-40; E-1 ~ S-39; E-1 ~ R-38; E-1 ~ L-37; E-1 ~ Q-36; E-1 ~ E-35; E-1 ~ E-34; E-1 ~ L-33; E-1 ~ D-32; E-1 ~ K-31; E-1 ~ S-30; E-1 ~ A-29; E-1 ~ Y-28; E-1 ~ A-27; E-1 ~ T-26; E-1 ~ A-25; E-1 ~ E-24; E-1 ~ G-23; E-1 ~ A-22; E-1 ~ D-21; E-1 ~ P-20; E-1 ~ E-19; E-1 ~ A-18; E-1 ~ D-17; E-1 ~ S-16; E-1 ~ L-15; E-1 ~ D-14; E-1 ~ L-13; E-1 ~ G-12; E-1 ~ S-

10

20

30

40

## 【0079】

## 【化7】

11; E-1 ~ E-10; E-1 ~ F-9; E-1 ~ A-8; E-1 ~ A-7

。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた好ましい。

## 【0080】

50

さらに、本発明はまた、アミノ末端およびカルボキシル末端の両方からの1つ以上のアミノ酸欠失を有するポリペプチドを提供し、それらは一般に、配列番号2において残基m - nを有するとして記載され得、ここで、nおよびmは、上記のような整数である。

## 【0081】

同様に、配列番号2に示される本発明のVEGF-2ポリペプチドのC末端欠失もまた好ましく、これらは以下の残基のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む：配列番号2

## 【0082】

## 【化8】

F-9 ~ M-395; F-9 ~ Q-394; F-9 ~ P- 10

393; F-9 ~ R-392; F-9 ~ Q-391; F-9 ~ W-390; F-9 ~ Y-389; F-9 ~ S-388; F-9 ~ P-  
387; F-9 ~ V-386; F-9 ~ C-385; F-9 ~ R-384; F-9 ~ C-383; F-9 ~ V-382; F-9 ~ E-  
381; F-9 ~ E-380; F-9 ~ S-379; F-9 ~ Y-378; F-9 ~ S-377; F-9 ~ F-376; F-9 ~ G-  
375; F-9 ~ P-374; F-9 ~ E-373; F-9 ~ C-372; F-9 ~ A-371; F-9 ~ K-370; F-9 ~ Q-  
369; F-9 ~ R-368; F-9 ~ N-367; F-9 ~ T-366; F-9 ~ C-365; F-9 ~ P-364; F-9 ~ R-  
363; F-9 ~ R-362; F-9 ~ Y-361; F-9 ~ C-360; F-9 ~ S-359; F-9 ~ C-358; F-9 ~ T-  
357; F-9 ~ Q-356; F-9 ~ H-355; F-9 ~ H-354; F-9 ~ F-353; F-9 ~ K-352; F-9 ~ K-  
351; F-9 ~ G-350; F-9 ~ K-349; F-9 ~ L-348; F-9 ~ L-347; F-9 ~ C-346; F-9 ~ K- 20

345; F-9 ~ Q-344; F-9 ~ P-343; F-9 ~ S-342; F-9 ~ E-341; F-9 ~ T-340; F-9 ~ C-  
339; F-9 ~ E-338; F-9 ~ C-337; F-9 ~ A-336; F-9 ~ C-335; F-9 ~ K-334; F-9 ~ G-  
333; F-9 ~ P-332; F-9 ~ N-331; F-9 ~ L-330; F-9 ~ P-329; F-9 ~ Q-328; F-9 ~ N-  
327; F-9 ~ R-326; F-9 ~ P-325; F-9 ~ C-324; F-9 ~ T-323; F-9 ~ R-322; F-9 ~ K-  
321; F-9 ~ C-320; F-9 ~ V-319; F-9 ~ C-318; F-9 ~ Q-317; F-9 ~ C-316; F-9 ~ T-  
315; F-9 ~ N-314; F-9 ~ E-313; F-9 ~ D-312; F-9 ~ F-311; F-9 ~ E-310; F-9 ~ R-  
309; F-9 ~ N-308; F-9 ~ A-307; F-9 ~ G-306; F-9 ~ C-305; F-9 ~ Q-304; F-9 ~ S-  
303; F-9 ~ P-302; F-9 ~ F-301; F-9 ~ L-300; F-9 ~ K-299; F-9 ~ N-298; F-9 ~ K- 30

297; F-9 ~ C-296; F-9 ~ V-295; F-9 ~ C-294; F-9 ~ Q-293; F-9 ~ C-292; F-9 ~ S-  
291; F-9 ~ N-290; F-9 ~ R-289; F-9 ~ D-288; F-9 ~ L-287; F-9 ~ E-286; F-9 ~ K-  
285; F-9 ~ H-284; F-9 ~ P-283; F-9 ~ G-282; F-9 ~ C-281; F-9 ~ S-280; F-9 ~ A-  
279; F-9 ~ P-278; F-9 ~ R-277; F-9 ~ L-276; F-9 ~ G-275; F-9 ~ A-274; F-9 ~ R-  
273; F-9 ~ C-272; F-9 ~ V-271; F-9 ~ C-270; F-9 ~ Q-269; F-9 ~ C-268; F-9 ~ T-  
267; F-9 ~ E-266; F-9 ~ E-265; F-9 ~ D-264; F-9 ~ L-263; F-9 ~ E-262; F-9 ~ K-  
261; F-9 ~ N-260; F-9 ~ P-259; F-9 ~ G-258; F-9 ~ C-257; F-9 ~ I-256; F-9 ~ D-  
255; F-9 ~ H-254; F-9 ~ F-253; F-9 ~ G-252; F-9 ~ D-251; F-9 ~ T-250; F-9 ~ S- 40

## 【0083】

## 【化 9】

249; F-9 ~ D-248; F-9 ~ D-247; F-9 ~ G-246; F-9 ~ A-245; F-9 ~ D-244; F-9 ~ S-243; F-9 ~ S-242; F-9 ~ F-241; F-9 ~ M-240; F-9 ~ F-239; F-9 ~ D-238; F-9 ~ E-237; F-9 ~ Q-236; F-9 ~ A-235; F-9 ~ L-234; F-9 ~ C-233; F-9 ~ R-232; F-9 ~ C-231; F-9 ~ I-230; F-9 ~ H-229; F-9 ~ N-228; F-9 ~ N-227; F-9 ~ W-226; F-9 ~ M-225; F-9 ~ Y-224; F-9 ~ N-223; F-9 ~ T-222; F-9 ~ P-221; F-9 ~ C-220; F-9 ~ T-219; F-9 ~ K-218; F-9 ~ N-217; F-9 ~ A-216; F-9 ~ A-215; F-9 ~ Q-214; F-9 ~ C-213; F-9 ~ Q-212; F-9 ~ P-211; F-9 ~ L-210; F-9 ~ T-209; F-9 ~ A-208; F-9 ~ P-207; F-9 ~ L-206; F-9 ~ S-205; F-9 ~ R-204; F-9 ~ R-203; F-9 ~ I-202; F-9 ~ I-201; F-9 ~ S-200; F-9 ~ H-199; F-9 ~ V-198; F-9 ~ Q-197; F-9 ~ R-196; F-9 ~ Y-195; F-9 ~ V-194; F-9 ~ D-193; F-9 ~ L-192; F-9 ~ K-191; F-9 ~ S-190; F-9 ~ M-189; F-9 ~ C-188; F-9 ~ R-187; F-9 ~ C-186; F-9 ~ S-185; F-9 ~ T-184; F-9 ~ H-183; F-9 ~ N-182; F-9 ~ A-181; F-9 ~ F-180; F-9 ~ S-179; F-9 ~ I-178; F-9 ~ T-177; F-9 ~ V-176; F-9 ~ P-175; F-9 ~ K-174; F-9 ~ P-173; F-9 ~ G-172; F-9 ~ Q-171; F-9 ~ S-170; F-9 ~ L-169; F-9 ~ P-168; F-9 ~ V-167; F-9 ~ T-166; F-9 ~ I-165; F-9 ~ E-164; F-9 ~ F-163; F-9 ~ L-162; F-9 ~ T-161; F-9 ~ K-160; F-9 ~ S-159; F-9 ~ L-158; F-9 ~ Y-157; F-9 ~ S-156; F-9 ~ T-155; F-9 ~ S-154; F-9 ~ T-153; F-9 ~ N-152; F-9 ~ M-151; F-9 ~ C-150; F-9 ~ Q-149; F-9 ~ L-148; F-9 ~ G-147; F-9 ~ E-146; F-9 ~ S-145; F-9 ~ N-144; F-9 ~ C-143; F-9 ~ C-142; F-9 ~ G-141; F-9 ~ G-140; F-9 ~ C-139; F-9 ~ R-138; F-9 ~ Y-137; F-9 ~ V-136; F-9 ~ S-135; F-9 ~ V-134; F-9 ~ C-133; F-9 ~ P-132; F-9 ~ P-131; F-9 ~ K-130; F-9 ~ F-129; F-9 ~ F-128; F-9 ~ T-127; F-9 ~ N-126; F-9 ~ T-125; F-9 ~ A-124; F-9 ~ V-123; F-9 ~ G-122; F-9 ~ F-121; F-9 ~ E-120; F-9 ~ K-119; F-9 ~ G-118; F-9 ~ V-117; F-9 ~ D-116; F-9 ~ I-115; F-9 ~ C-114; F-9 ~ V-113; F-9 ~ E-112; F-9 ~ R-111; F-9 ~ P-110; F-9 ~ M-109; F-9 ~ C-108; F-9 ~ Q-107; F-9 ~ T-106; F-9 ~ K-105; F-9 ~ R-104; F-9 ~ W-103; F-9 ~ E-102; F-9 ~ N-101; F-9 ~ D-100; F-9 ~ I-99; F-9 ~ S-98; F-9 ~ K-97; F-9 ~ L-96; F-9 ~ I-95; F-9 ~ E-94; F-9 ~ T-93; F-9 ~ N-92; F-9 ~ Y-91; F-9 ~ H-90; F-9 ~ A-89; F-9 ~ A-88; F-9 ~ A-87; F-9 ~ F-86; F-9 ~ K-85; F-9 ~ I-84; F-9 ~ T-83; F-9 ~ E-82; F-9 ~ E-81; F-9 ~ T-80; F-9 ~ R-79; F-9 ~ S-78; F-9 ~ N-77; F-9 ~ L-76; F-9 ~ N-75; F-9 ~ A-74; F-9 ~ Q-73; F-9 ~ E-72; F-9 ~ R-71; F-9 ~ N-70; F-9 ~ H-69; F-9 ~ Q-68; F-9 ~ W-67; F-9 ~ G-66; F-9 ~ G-65; F-9 ~ K-64; F-9 ~ R-63; F-9 ~ L-62; F-9 ~ Q-61; F-9 ~ C-60; F-9 ~ K-59; F-9 ~ Y-58; F-9 ~ M-57; F-9 ~ K-56; F-9 ~ W-55; F-9 ~ Y-54; F-9 ~ E-53; F-9 ~ P-52; F-9 ~ Y-51; F-9 ~ L-50; F-9 ~ V-49; F-9 ~ T-48; F-9 ~ M-47; F-9 ~ L-46; F-9 ~ E-45; F-9

10

20

30

40

## 【 0 0 8 4 】



## 【化 1 0】

～ D-44; F-9 ~ V-43; F-9 ~ S-42; F-9 ~ S-41; F-9 ~ V-40; F-9 ~ S-39; F-9 ~ R-38;  
 F-9 ~ L-37; F-9 ~ Q-36; F-9 ~ E-35; F-9 ~ E-34; F-9 ~ L-33; F-9 ~ D-32; F-9 ~ K-  
 31; F-9 ~ S-30; F-9 ~ A-29; F-9 ~ Y-28; F-9 ~ A-27; F-9 ~ T-26; F-9 ~ A-25; F-9 ~  
 E-24; F-9 ~ G-23; F-9 ~ A-22; F-9 ~ D-21; F-9 ~ P-20; F-9 ~ E-19; F-9 ~ A-18; F-9  
 ~ D-17; F-9 ~ S-16; F-9 ~ L-15

。配列番号 2 のアミノ酸残基 F - 9 から R - 2 0 3 を含むポリペプチドフラグメント、な  
 らびにこのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが特に好ましい。配列番号 2 のポリ  
 ペプチドのこの F - 9 ~ R - 2 0 3 は、好ましくは、配列番号 2 のポリペプチドの S -  
 2 0 5 ~ S - 3 9 6 と結合する。結合は、ジスルフィド、共有相互作用、もしくは非共有  
 相互作用、リンカー（例えば、セリン、グリシン、プロリン連結）を介した連結による、  
 または抗体によるものであり得る。

10

## 【 0 0 8 5】

多くのポリヌクレオチド配列（例えば、E S T 配列）は、配列データベースを介して公  
 に利用可能であり、そしてアクセス可能である。これらの配列のいくつかは、配列番号 1  
 に関連し、そして本発明の着想の前に公に利用可能であったかもしれない。好ましくは、  
 このような関連するポリヌクレオチドは、本発明の範囲から特に除外される。全ての関連  
 配列を列挙することは煩わしい。従って、一般式 a - b により記載されるヌクレオチド配  
 列（ここで、a は配列番号 1 の 1 ~ 1 6 6 0 の間の任意の整数であり、b は 1 5 ~ 1 6 7  
 4 の整数であり、ここで a および b の両方は配列番号 1 に示されるヌクレオチド残基の位  
 置に対応し、そしてここで b は a + 1 4 以上である）を含む 1 つ以上のポリヌクレオチド  
 が、本発明からは好ましくは、除外される。

20

## 【 0 0 8 6】

従って、1 つの局面において、本発明により N 末端欠失変異体が提供される。このよう  
 な変異体には、図 1（配列番号 1 8）の少なくとも最初の 2 4 個の N 末端アミノ酸残基の  
 欠失（すなわち、少なくとも M e t（1） - - G l u（2 4）の欠失）であるか、少なく  
 とも最初の 1 1 5 個以下の N 末端アミノ酸残基以外の、図 1（配列番号 1 8）に示される  
 アミノ酸配列を含むものが含まれる。あるいは、最初の 2 4 個の N 末端アミノ酸残基（す  
 なわち、図 1（配列番号 1 8）の少なくとも M e t（1） - - G l u（2 4）の欠失）で  
 あるが、最初の 1 0 3 個以下の N 末端アミノ酸残基などである。

30

## 【 0 0 8 7】

別の局面において、本発明により、C 末端欠失変異体が提供される。このような変異体  
 には、少なくとも最後の C 末端アミノ酸残基（S e r（4 1 9））の欠失であるが、最後  
 の 2 2 0 個以下の C 末端アミノ酸残基（すなわち、図 1（配列番号 1 8）のアミノ酸残基  
 V a l（1 9 9） - S e r（4 1 9）の欠失）以外の、図 1（配列番号 1 8）に示される  
 アミノ酸配列を含むものが含まれる。あるいは、欠失は、図 1（配列番号 1 8）の少なく  
 とも最後の C 末端アミノ酸残基を含むが、最後の 2 1 6 個以下の C 末端アミノ酸残基で  
 ある。あるいは、欠失は、図 1（配列番号 1 8）の少なくとも最後の C 末端アミノ酸残基を  
 含むが、最後の 2 0 4 個以下の C 末端アミノ酸残基である。あるいは、欠失は、図 1（配  
 列番号 1 8）の少なくとも最後の C 末端アミノ酸残基を含むが、最後の 1 9 2 個以下の C  
 末端アミノ酸残基である。あるいは、欠失は、図 1（配列番号 1 8）の少なくとも最後の  
 C 末端アミノ酸残基を含むが、最後の 1 5 6 個以下の C 末端アミノ酸残基である。ある  
 いは、欠失は、図 1（配列番号 1 8）の少なくとも最後の C 末端アミノ酸残基を含むが、最  
 後の 1 0 8 個以下の C 末端アミノ酸残基である。あるいは、欠失は、図 1（配列番号 1 8  
 ）の少なくとも最後の C 末端アミノ酸残基を含むが、最後の 5 2 個以下の C 末端アミノ酸  
 残基である。

40

## 【 0 0 8 8】

50

なお別の局面において、本発明には、N末端およびC末端残基の両方からのアミノ酸欠失を有する欠失変異体もまた含まれる。このような変異体には、上記のN末端欠失変異体およびC末端欠失変異体の全ての組み合わせが含まれる。

## 【0089】

用語「遺伝子」は、ポリペプチド鎖を産生することに関与するDNAのセグメントを意味する；それは、コード領域の前および後の領域（リーダーおよびトレイラー）、ならびに個々のコードセグメント（エキソン）間の介在配列（イントロン）を含む。

## 【0090】

本発明はさらに、本明細書中に記載される単離された核酸分子のフラグメントに関する。寄託されたcDNAまたは配列番号1もしくは配列番号3に示されるヌクレオチド配列のヌクレオチド配列を有する単離された核酸分子のフラグメントにより、少なくとも15 nt、そしてより好ましくは、少なくとも約20 nt、なおより好ましくは、少なくとも約30 nt、そしてさらにもっと好ましくは、少なくとも約40 ntの長さのフラグメントが意図され、これらは本明細書で議論したように診断プローブおよびプライマーとして有用である。当然に、

## 【0091】

## 【数1】

50, 75, 100, 125, 150, 175,

200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600,

625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1025,

1050, 1075, 1100, 1125, 1150, 1175, 1200, 1225, 1250, 1275, 1300, 1325, 1350, 1375,

1400, 1425, 1450, 1475, 1500, 1525, 1550, 1575, 1600, 1625, 1650または1674 nt

長の大きなフラグメントもまた、本発明に従って、寄託されたcDNAのヌクレオチド配列あるいは配列番号1または配列番号3に示されるヌクレオチド配列の、全てではないが、ほとんどに対応するフラグメントと同様に有用である。例えば、少なくとも20 ntの長さのフラグメントにより、寄託されたcDNAのヌクレオチド配列または配列番号1もしくは3に示されるヌクレオチド配列からの20以上の連続する塩基を含むフラグメントが意図される。

## 【0092】

さらに、VEGF-2ポリヌクレオチドフラグメントの代表的な例には、例えば、ヌクレオチド数約

## 【0093】

## 【数2】

1-50,

51-100, 101-150, 151-200, 201-250, 251-300, 301-350, 351-400, 401-450, 451-500,

501-550, 551-600, 651-700, 701-750, 751-800, 800-850, 851-900, 901-950, もしくは 951

から配列番号1の最後まで配列、または寄託されたクローンに含まれるcDNAを有するフラグメントが含まれる。この状況において、「約」には、特に列挙した範囲と、いずれかの末端または両方の末端においていくつかのヌクレオチド（5、4、3、2、または1）大きいかもしれないかもしくは小さい範囲とが含まれる。好ましくは、これらのフラグメントは、生物学的活性を有するポリペプチドをコードする。

## 【0094】

本発明の全長遺伝子のフラグメントは、全長cDNAを単離するため、および遺伝子に対して高い配列類似性もしくは類似の生物学的活性を有する他のcDNAを単離するための、cDNAライブラリーについてのハイブリダイゼーションプローブとして使用される。この型のプローブは、好ましくは、少なくとも30塩基を有し、そして例えば、50以上の塩基を含み得る。プローブはまた、全長転写物に対応するcDNAクローン、そし

て調節領域およびプロモーター領域、エキソン、ならびにイントロンを含有する完全遺伝子を含むゲノムクローンを同定するために使用され得る。スクリーニングの例には、オリゴヌクレオチドプローブを合成するために公知のDNA配列を使用することによって遺伝子のコード領域を単離することが含まれる。本発明の遺伝子の配列と相補的な配列を有する標識されたオリゴヌクレオチドは、どのライブラリーのメンバーにプローブがハイブリダイズするかを決定するために、ヒトcDNA、ゲノムDNA、またはmRNAのライブラリーをスクリーニングするために使用される。

【0095】

VEGF-2「ポリヌクレオチド」はまた、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1に含まれる配列にハイブリダイズし得るポリヌクレオチド、または、例えば、ATCC受託番号97149または75698、およびその相補体に含まれるcDNAクローンを含む。「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、50%ホルムアミド、5×SSC(750mM NaCl、75mM クエン酸ナトリウム)、50mM リン酸ナトリウム(pH7.6)、5×Denhardt's溶液、10%デキストラン硫酸、および20μg/ml変性切断サケ精子DNAを含む溶液中での、42℃での一晚のインキュベーション、続く0.1×SSCにおける約65℃でのフィルター洗浄をいう。

【0096】

低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下でVEGF-2ポリヌクレオチドにハイブリダイズする核酸分子もまた意図される。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーおよびシグナル検出における変化は、主に、ホルムアミド濃度(ホルムアミドの低い割合は低ストリンジェンシーを生じる);塩条件、または温度を操作することによって達成される。例えば、より低いストリンジェンシー条件には、6×SSPE(20×SSPE=3M NaCl;0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;0.02M EDTA、pH7.4)、0.5%SDS、30%ホルムアミド、100μg/mlサケ精子ブロッキングDNAを含む溶液中での37℃での一晚のインキュベーション;続いて50℃での1×SSPE、0.1%SDSでの洗浄が含まれる。さらに、さらに低いストリンジェンシーを達成するために、ストリンジェントなハイブリダイゼーションに続いて行われる洗浄は、より高い塩濃度(例えば、5×SSC)で行われ得る。

【0097】

上記の条件の改変が、ハイブリダイゼーション実験におけるバックグラウンドを抑えるために使用される代替のブロッキング試薬を含ませること、および/またはそれで置換することにより、達成され得ることに注意されたい。代表的なブロッキング試薬には、Denhardt's試薬、BLOTTO、ヘパリン、変性サケ精子DNA、および市販の特許処方物が含まれる。特定のブロッキング試薬を含ませることは、適合性の問題により、上記のハイブリダイゼーション条件を改変することを必要とし得る。

【0098】

当然、ポリA+配列(例えば、配列表に示されるcDNAの任意の3'末端ポリA+領域)、またはT(もしくはU)残基の相補ストレッチに対してのみハイブリダイズするポリヌクレオチドは、ポリ(A)ストレッチまたはそれらの相補体を含む任意の核酸分子(例えば、実際の任意の二重鎖cDNAクローン)にハイブリダイズするので、「ポリヌクレオチド」の定義に含まれない。

【0099】

ポリヌクレオチドの「部分」にハイブリダイズするポリヌクレオチドとは、参照ポリヌクレオチドの少なくとも約15ヌクレオチド(nt)、より好ましくは少なくとも約20nt、なおより好ましくは少なくとも約30nt、そしてなおより好ましくは少なくとも約30~70ntにハイブリダイズするポリヌクレオチド(DNAまたはRNAのいずれか)を意図する。上記および以下でより詳細に議論されるように、これらは、診断的なプローブおよびプライマーとして有用である。

【0100】

10

20

30

40

50

「長さが少なくとも約20nt」のポリヌクレオチド部分とは、例えば、参照ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列（例えば、寄託されたcDNAもしくは配列番号1に示されるようなヌクレオチド配列）に由来する20以上の連続したヌクレオチドを意図する。当然、ポリA配列（例えば、配列番号1もしくは3に示されるVEGF-2 cDNAの3'末端ポリ(A)領域）、またはT（もしくはU）残基の相補ストレッチに対してのみハイブリダイズするポリヌクレオチドは、ポリ(A)ストレッチまたはそれらの相補体を含む任意の核酸分子（例えば、実際には任意の二重鎖cDNAクローン）にハイブリダイズするので、本発明の核酸の一部分にハイブリダイズさせるために使用する本発明のポリヌクレオチドに含まれない。

#### 【0101】

本出願は、核酸分子がVEGF-2活性を有するポリペプチドをコードするか否かに関わらず、配列番号1もしくは3に示される核酸配列または寄託されたcDNAの核酸配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一な核酸分子に関する。なぜならこれは、特定の核酸分子がVEGF-2活性を有するポリペプチドをコードしない場合でさえ、当業者が、この核酸分子の使用方法を依然として理解しているからである（例えば、ハイブリダイゼーションのプロブまたはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のプライマーとして）。VEGF-2活性を有するポリペプチドをコードしない本発明の核酸分子の使用は、特に以下を含む：（1）cDNAライブラリー中のVEGF-2遺伝子もしくはそれらの対立遺伝子改変体の単離；（2）VEGF-2遺伝子の正確な染色体位置を規定するための、分裂中期染色体展開物へのインサイチュハイブリダイゼーション（例えば、「FISH」）（Vermaら、Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988)に記載される）；および特定の組織におけるVEGF-2のmRNA発現を検出するためのノーザンブロット分析。

#### 【0102】

しかし、配列番号1もしくは3に示される核酸配列または寄託されたcDNAの核酸配列（これらは実際に、VEGF-2タンパク質活性を有するポリペプチドをコードする）に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一な配列を有する核酸分子が好ましい。「VEGF-2活性を有するポリペプチド」とは、特定の生物学的アッセイにおいて、VEGF-2活性を提示するポリペプチドを意図する。例えば、VEGF-2タンパク質活性は、例えば、マイトジェンアッセイおよび内皮細胞遊走アッセイを使用して測定され得る。例えば、Olssonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2576-2581 (1996)およびJoukovら、EMBO J. 5:290-298 (1996)を参照のこと。

#### 【0103】

当然、遺伝暗号の縮重に起因して、当業者は、寄託されたcDNAの核酸配列または配列番号1もしくは配列番号3に示される核酸配列に対して、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%または99%同一な配列を有する多くの核酸分子が、「VEGF-2タンパク質活性を有する」ポリペプチドをコードすることを即座に認識する。事実、これらの核酸配列の縮重改変体は全て同じポリペプチドをコードするので、このことは、上記した比較アッセイを行わなくても当業者にとって明らかである。縮重改変体でないそのような核酸分子について、合理的な数がまた、VEGF-2タンパク質活性を有するポリペプチドをコードすることがさらに当業者に認識される。なぜならこれは、当業者が、タンパク質機能に有意に影響を及ぼしそうにないかまたは及ぼさないかのいずれかであるアミノ酸置換を十分に認識しているからである（例えば、脂肪族アミノ酸と第2の脂肪族アミノ酸との置換）。

#### 【0104】

例えば、表現型的にサイレントなアミノ酸置換をいかにして行うかに関するガイダンスが、Bowie, J.U.ら、「Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino A

10

20

30

40

50

cid Substitutions」, Science 247:1306-1310 (1990)において提供され、ここでこの筆者らは、タンパク質がアミノ酸置換に対して驚くほど寛容であることを示している。

【0105】

従って、本発明は、配列番号2もしくは4のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびそれらのフラグメント(これらのフラグメントは、少なくとも30塩基対、好ましくは50塩基対を有する)に対して、少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも90%およびより好ましくは少なくとも95%、96%、97%、または98%の同一性を有するポリヌクレオチド、ならびにこのようなポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドに関する。

10

【0106】

配列(se)あたりの「同一性」は、当該分野で認識される意味を有し、そして出版された技術を使用して算出され得る(例えば、COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A.M.編, Oxford University Press, New York, (1988); BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, Smith, D.W.編, Academic Press, New York, (1993); COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A.M.およびGriffin, H.G.編, Human Press, New Jersey, (1994); SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, (1987); ならびにSEQUENCE ANALYSIS PRIMER, Gribnikov, M.およびDevereux, J.編, M Stockton Press, New York, (1991)を参照のこと。)2つのポリヌクレオチド配列間もしくは2つのポリペプチド配列間の同一性を測定するための多くの方法が存在する一方で、用語「同一性」は当業者に周知である。(Carillo, H.およびLipton, D., SIAM J. Applied Math. 48:1073 (1988)。)2つの配列間の同一性もしくは類似性を決定するために通常使用される方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:これらの方法は「Guide to Huge Computers,」Martin J. Bishop編, Academic Press, San Diego, (1994), ならびにCarillo, H.およびLipton, D., SIAM J. Applied Math. 48:1073 (1988)に開示される。ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドを整理するための方法は、コンピュータプログラム内に集成され、これらとしては、以下が挙げられる: GCGプログラムパッケージ(Devereux, J.ら, Nucleic Acid Reseach 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA(Atschul, S.F.ら, J. Molec. Biol. 215:403 (1990)), Bestfitプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, ユニックス対応バージョン8, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711 (SmithおよびWatermanの局所相同性アルゴリズムを使用する, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981))。本発明の参照ヌクレオチド配列に対して、少なくとも、例えば、95%「同一な」ヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドとは、ポリヌクレオチド配列が、VEGF-2ポリペプチドをコードする参照ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチドあたり5つまでの点変異を含み得ることを除いて、このポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が参照配列に対して同一であることを意図する。すなわち、参照ヌクレオチド配列に対して、少なくとも95%同一な核酸配列を有するポリヌクレオチドを得るために、参照配列内の5%までのヌクレオチドが欠失または別のヌクレオチドで置換され得るか、あるいは参照配列内の全ヌクレオチドの5%までのヌク

20

30

40

50

レオチド数が参照配列中に挿入され得る。問い合わせ配列は、配列番号1の全配列、ORF（オープンリーディングフレーム）、または本明細書中に記載される任意の特定のフラグメントであり得る。

【0107】

実際問題として、任意の特定の核酸分子またはポリペプチドが、本発明のヌクレオチド配列に対して、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか否かは、公知のコンピュータプログラムを使用して従来通りに決定され得る。問い合わせ配列（本発明の配列）と対象配列との間の最良な全体的な一致（全体配列アラインメント（global sequence alignment）とも称される）を決定するための好ましい方法は、Brutlagら（Comp. App. Biosci. 6:237-245（1990））のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを使用して決定され得る。配列アラインメントにおいて、問い合わせ配列および対象配列は、両方ともにDNA配列である。RNA配列は、UをTに変換することによって比較され得る。この全体配列アラインメントの結果は、同一性パーセント（%）で示される。同一性パーセントを算出するためにDNA配列のFASTDBアラインメントにおいて使用される好ましいパラメータは：Matrix=Unitary、k-tuple=4、Mismatch Penalty=1、Joining Penalty=30、Randomization Group Length=0、Cutoff Score=1、Gap Penalty=5、Gap Size Penalty 0.05、Window Size=500または対象ヌクレオチド配列の長さ（どちらかより短い方）、である。

【0108】

対象配列が、5'または3'欠失のために（内部欠失のためではなく）問い合わせ配列より短い場合、手動での補正が結果に対してなされなければならない。これは、同一性パーセントを計算する場合に、FASTDBプログラムが対象配列の5'および3'の短縮を考慮しないからである。5'末端または3'末端で短縮された対象配列について、問い合わせ配列に対しての同一性パーセントは、問い合わせ配列の総塩基のパーセントとして一致/整列されない対象配列の5'および3'にある問い合わせ配列の塩基の数を計算することによって補正される。ヌクレオチドが一致/整列されるか否かは、FASTDB配列アラインメントの結果によって決定される。次いで、このパーセントは、同一性パーセントから差し引かれ、特定のパラメータを用いて上記のFASTDBプログラムによって算出され、最終的な同一性パーセントのスコアに達する。この補正されたスコアが、本発明の目的に使用される。FASTDBアラインメントによって示されるように、問い合わせ配列と一致/整列されない、対象配列の5'および3'塩基の外側の塩基のみが、同一性パーセントのスコアを手動で調整する目的で算出される。

【0109】

例えば、90塩基の対象配列は、同一性パーセントを決定するために100塩基の問い合わせ配列に整列される。欠失は、対象配列の5'末端で生じ、従って、FASTDBアラインメントは、5'末端で最初の10塩基の一致/整列を示さない。10個の不对合塩基は、この配列の10%（一致していない5'および3'末端での塩基の数/問い合わせ配列の塩基の総数）を表し、従って10%は、FASTDBプログラムによって算出される同一性パーセントのスコアから差し引かれる。残りの90塩基が完全に一致する場合は、最終的な同一性パーセントは90%である。別の例では、90塩基の対象配列は、100塩基の問い合わせ配列と比較される。この場合、欠失は、内部欠失であり、その結果、問い合わせ配列と一致/整列しない対象配列の5'または3'に塩基は存在しない。この場合、FASTDBによって算出される同一性パーセントは手動で補正されない。繰り返すが、問い合わせ配列と一致/整列しない対象配列の5'および3'の塩基のみが手動で補正される。本発明の目的では、他の手動の補正はなされない。

【0110】

本発明の問い合わせアミノ酸配列に、例えば、少なくとも95%「同一」であるアミノ

10

20

30

40

50

酸配列を有するポリペプチドとは、対象ポリペプチドのアミノ酸配列が、対象ポリペプチド配列が問い合わせアミノ酸配列の各100個のアミノ酸あたり5つまでのアミノ酸の変更を含み得ることを除いて、問い合わせ配列に同一であることを意図する。換言すれば、問い合わせアミノ酸配列に少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るために、対象配列におけるアミノ酸残基の5%までが、挿入、欠失、(消えない(indels))または別のアミノ酸で置換され得る。参照配列のこれらの変更は、参照アミノ酸配列のアミノ末端部位もしくはカルボキシ末端部位で生じ得るか、またはそれらの末端部位間のどこにでも生じ得、参照配列中の残基間で個々に、または参照配列内の1つ以上の連続する群においてのいずれかに分散される。

#### 【0111】

実際問題として、任意の特定のポリペプチドが、例えば、配列番号2、配列番号4、配列番号18に示されるアミノ酸配列に対して、または寄託されたDNAクローンによってコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか否かは、従来通りに、公知のコンピュータプログラムを使用して決定され得る。問い合わせ配列(本発明の配列)と対象配列との間での最良の全体的な一致(全体配列アラインメントとも称される)を決定するための好ましい方法は、Brutlagら(Comp. App. Biosci. (1990) 6: 237-245)のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを使用して決定される。配列アラインメントにおいて、問い合わせ配列および対象配列は、両方ともヌクレオチド配列であるかまたは両方ともアミノ酸配列であるかのいずれかである。上記の全体配列アラインメントの結果は、同一性パーセントで示される。FASTDBアミノ酸アラインメントに用いられる好ましいパラメータは: Matrix = PAM 0、k-tuple = 2、Mismatch Penalty = 1、Joining Penalty = 20、Randomization Group Length = 0、Cutoff Score = 1、Window Size = 配列の長さ、Gap Penalty = 5、Gap Size Penalty = 0.05、Window Size = 500または対象アミノ酸配列の長さ(どちらかより短い方)、である。

#### 【0112】

対象配列が、N末端またはC末端欠失により(内部の欠失のためではなく)問い合わせ配列よりも短い場合、手動での補正が結果に対してなされなければならない。これは、FASTDBプログラムが、全体的な同一性パーセントを算出する場合に、対象配列のN末端およびC末端の短縮を考慮しないからである。N末端およびC末端で短縮された対象配列について、問い合わせ配列に対する同一性パーセントは、問い合わせ配列の総塩基のパーセントとして、対応する対象残基と一致/整列しない対象配列のN末端およびC末端側にある問い合わせ配列の残基の数を計算することによって補正される。残基が一致/整列されているか否かは、FASTDB配列アラインメントの結果によって決定される。次いで、このパーセントは、同一性パーセントから差し引かれ、上記のFASTDBプログラムによって特定のパラメータを使用して計算され、最終的な同一性パーセントのスコアに達する。この最終的な同一性パーセントのスコアが、本発明の目的で使用される。問い合わせ配列と一致/整列しない対象配列のN末端およびC末端側の残基のみが、同一性パーセントのスコアを手動で調整する目的で考慮される。すなわち、対象配列の最も遠いN末端およびC末端残基の外側の問い合わせ残基位置のみである。

#### 【0113】

例えば、90アミノ酸残基の対象配列は、同一性パーセントを決定するために100残基の問い合わせ配列と整列される。欠失は、対象配列のN末端で生じ、従って、FASTDB整列は、N末端の最初の10残基の一致/整列を示さない。10個の不对合残基は、この配列の10%(一致していないN末端およびC末端での残基の数/問い合わせ配列中の残基の総数)を表し、従って、FASTDBプログラムによって計算される同一性パーセントのスコアから10%が差し引かれる。残りの90残基が完全に一致した場合、最終的な同一性パーセントは90%である。別の例において、90残基の対象配列が、100

10

20

30

40

50

残基の問い合わせ配列と比較される。この場合、欠失は、内部欠失であり、従って問い合わせ配列と一致/整列しない対象配列のN末端またはC末端に残基は存在しない。この場合、FASTDBによって算出される同一性パーセントは、手動で補正されない。繰り返すが、FASTDBアラインメントにおいて示されるような、問い合わせ配列と一致/整列しない対象配列のN末端およびC末端の外の残基位置のみが手動で補正される。他の手動の補正は、本発明の目的のためにはなされない。

【0114】

(VEGF-2ポリペプチド)

本発明はさらに、図1もしくは図2の推定アミノ酸配列を有するか、または寄託されたcDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびにそのようなポリペプチドのフラグメント、アナログ、および誘導体に関する。

10

【0115】

用語「フラグメント」、「誘導体」、および「アナログ」は、図1もしくは図2のポリペプチドまたは寄託されたcDNAにコードされるポリペプチドをいう場合は、図3に示すようなVEGFタンパク質の保存されたモチーフ、および本質的に同一の生物学的機能または活性を保持するポリペプチドを意味する。

【0116】

本発明において、「ポリペプチドフラグメント」は、配列番号2に含まれる短いアミノ酸配列または寄託されたクローンに含まれるcDNAによってコードされる短いアミノ酸配列をいう。タンパク質フラグメントは、「独立して存在(free-standing)」し得るか、またはそのフラグメントが一部もしくは領域を形成するより大きなポリペプチド内に含まれ得る(最も好ましくは、単一の連続する領域として)。本発明のポリペプチドフラグメントの代表的な例としては、例えば、おおよそのアミノ酸番号1~20、21~40、41~60、61~80、81~100、102~120、121~140、141~160、161~180、181~200、201~220、221~240、241~260、261~280、または281からコード領域末端までのフラグメントが挙げられる。さらに、ポリペプチドフラグメントは、約20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、または150アミノ酸長であり得る。この脈絡において、「約」は、いずれかの末端もしくは両方の末端で、具体的に示される範囲よりいくつか(5、4、3、2、もしくは1個)のアミノ酸だけ大きいかまたは小さい範囲を含む。

20

30

【0117】

好ましいポリペプチドフラグメントは、分泌されたVEGF-2タンパク質(好ましくは、配列番号18の残基101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、または114で始まり、配列番号18のアミノ酸残基221、222、223、224、225、226、227、228、または229で終了するアミノ酸の二量体、プロタンパク質形態(好ましくは、配列番号18のアミノ酸約32~419))ならびに成熟形態を含む。他の好ましいポリペプチドフラグメントは、アミノ末端もしくはカルボキシ末端、またはその両方から、連続した一連の欠失された残基を有する成熟形態を含む。例えば、任意の数のアミノ酸(1~60の範囲)が、分泌されたVEGF-2ポリペプチドまたはその成熟形態のいずれかのアミノ末端から欠失され得る。同様に、任意の数のアミノ酸(1~30の範囲)が、分泌されたVEGF-2タンパク質またはその成熟形態のカルボキシ末端から欠失され得る。さらに、上記のアミノ末端およびカルボキシ末端の欠失の任意の組み合わせが好ましい。同様に、これらのVEGF-2ポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドフラグメントもまた好ましい。

40

【0118】

構造ドメインまたは機能ドメイン(例えば、ヘリックスおよびヘリックス形成領域、シートおよびシート形成領域、ターンおよびターン形成領域、コイルおよびコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、両親媒性領域、可変領域、表面

50



形成領域、基質結合領域、ならびに高抗原性指標領域を含むフラグメント)によって特徴付けられる V E G F - 2 ポリペプチドフラグメントおよびポリヌクレオチドフラグメントもまた、好ましい。保存されたドメイン内に存在する配列番号 2 のポリペプチドフラグメントは、本発明によって具体的に意図される(表 2 を参照のこと)。さらに、これらのドメインをコードするポリヌクレオチドフラグメントもまた、意図される。

【 0 1 1 9 】

他の好ましいフラグメントは、生物学的に活性な V E G F - 2 フラグメントである。生物学的に活性なフラグメントは、V E G F - 2 ポリペプチドの活性に対して類似の活性を示す(しかし、必ずしも同一である必要はない)フラグメントである。このフラグメントの生物学的活性としては、改善された所望の活性、または減少された所望されない活性が挙げられ得る。

10

【 0 1 2 0 】

本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド、天然ポリペプチド、または合成ポリペプチドであり得、好ましくは組換えポリペプチドである。

【 0 1 2 1 】

V E G F - 2 ポリペプチドのいくつかのアミノ酸配列が、タンパク質の構造または機能の有意な影響を伴わずに変更され得ることが当該分野で認識されている。配列におけるこのような差異が考慮される場合、タンパク質上に活性を決定する重要な領域が存在することを記憶しておかなければならない。

【 0 1 2 2 】

従って、本発明はさらに、実質的な V E G F - 2 ポリペプチド活性を示すか、または V E G F - 2 タンパク質の領域(例えば、以下で議論されるタンパク質部分)を含む V E G F - 2 ポリペプチドの改変体を含む。このような変異としては、欠失、挿入、逆位、反復、および型置換が挙げられる。上記で示したように、表現型的にサイレントであるようなアミノ酸変更に関する指針は、Bowie, J. U. ら、「Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions」, Science 247: 1306 - 1310 (1990) において見出され得る。

20

【 0 1 2 3 】

従って、図 1 もしくは 2 のポリペプチド、または寄託された c D N A によってコードされるポリペプチドのフラグメント、誘導體、またはアナログは: ( I ) 1 つ以上のアミノ酸残基が保存されたアミノ酸残基または非保存アミノ酸残基(好ましくは保存されたアミノ酸残基)で置換されたもの(そのような置換されたアミノ酸残基は、この遺伝コードによりコードされるアミノ酸残基であってもなくてもよい); または ( i i ) 1 つ以上のアミノ酸残基が置換基を含有するもの; または ( i i i ) 成熟ポリペプチドが、別の化合物(例えば、ポリペプチドの半減期を増加させる化合物(例えば、ポリエチレングリコール))に融合されているもの; または ( i v ) さらにアミノ酸(例えば、リーダー配列もしくは分泌配列または成熟ポリペプチド配列もしくはプロタンパク質配列の精製に使用される配列)が成熟ポリペプチドに融合されているもの; あるいは ( v ) 配列番号 2 もしくは 4 に示すより少ないアミノ酸残基を含み、そして保存されたモチーフを保持し、そしてなお依然として V E G F ファミリーのポリペプチドの活性特徴を保持しているものであり得る。そのようなフラグメント、誘導體、およびアナログは、本明細書中の教示から、当業者の範囲内にあると思われる。

30

40

【 0 1 2 4 】

荷電アミノ酸の、別の荷電アミノ酸との置換、および中性アミノ酸または負電荷アミノ酸との置換が、特に興味深い。後者の結果により、正電荷が減少し、V E G F - 2 タンパク質の特性が改善されたタンパク質が得られる。凝集の防止は、非常に好ましい。タンパク質の凝集は、活性の減少を生じるだけではなく、それらは免疫原性であり得ることが理由で、薬学的処方物を調製する際の問題も有し得る。(Pinckard ら、Clin. Exp. Immunol. 2: 331 - 340 (1967); Robbins ら、Dia

50

betes 36:838-845 (1987); Cleelandら、Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377 (1993)。

【0125】

アミノ酸の置換はまた、細胞表面レセプターへの結合の選択性を変更し得る。Ostadeら、Nature 361:266-268 (1993)は、特定の変異体が、2つの公知のTNFレセプター型の1つのみへのTNF-aの選択的な結合を生じることを記載する。従って、本発明のVEGF-2は、天然の変異体または人為的操作のいずれかに由来する、1つ以上のアミノ酸の置換、欠失または付加を含み得る。

【0126】

示されるように、変更は、好ましくは、小さな性質の変更(例えば、タンパク質の折り畳みまたは活性に有意に影響しない保存的アミノ酸置換(表1を参照のこと))である。

【0127】

【表1】

表1. 保存的アミノ酸置換

芳香族	フェニルアラニン トリプトファン チロシン
疎水性	ロイシン イソロイシン バリン
極性	グルタミン アスパラギン
塩基性	アルギニン リジン ヒスチジン
酸性	アスパラギン酸 グルタミン酸
小型	アラニン セリン スレオニン メチオニン グリシン

当然、当業者の行うアミノ酸置換の数は、上記の因子を含む、多くの因子に依存する。一般的にいうと、任意の所定のVEGF-2ポリペプチドについての置換の数は、50、40、30、25、20、15、10、5、または3より多くない。

【0128】

本発明のVEGF-2タンパク質における機能に必須のアミノ酸は、部位特異的変異誘発またはアラニン走査型変異誘発(CunninghamおよびWells, Science 244:1081-1085 (1989))のような当該分野で公知の方法により同定され得る。後者の手順は、分子内の残基毎に単一のアラニン変異を導入する。次いで、得られた変異分子は、生物学的活性(例えば、レセプター結合活性またはインビトロモ

10

20

30

40

50

しくはインビトロでの増殖活性)について試験される。リガンド-レセプター結合に重要な部位はまた、結晶化、核磁気共鳴、または光親和性標識のような構造分析により決定され得る(Smithら、J. Mol. Biol. 224: 899-904 (1992)およびde Vosら、Science 255: 306-312 (1992))。

【0129】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、好ましくは、単離された形態で提供され、そして好ましくは、均質にまで精製される。

【0130】

用語「単離された」は、その物質が、その本来の環境(例えば、それが天然に存在する場合は天然の環境)から取り出されていることを意味する。例えば、生きている動物中に存在する、天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されていないが、天然の系において共存する物質の一部または全てから分離されている同じポリヌクレオチドまたはDNAまたはポリペプチドは、単離されている。このようなポリヌクレオチドは、ベクターの一部であり得るか、および/またはこのようなポリヌクレオチドもしくはポリペプチドは、組成物の一部であり得、そしてこのようなベクターまたは組成物はその天然の環境の一部ではないという点で、なおも単離されている。

【0131】

特定の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、300 kb、200 kb、100 kb、50 kb、15 kb、10 kb、または7.5 kb未満の長さである。さらなる実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、VEGF-2コード配列のうちの少なくとも15の連続するヌクレオチドを含むが、任意のVEGF-2イントロンの全てまたはその一部は含まない。別の実施形態では、VEGF-2コード配列を含む核酸は、ゲノム隣接遺伝子(すなわち、このゲノムにおけるVEGF-2遺伝子に対して5'側または3'側)のコード配列を含まない。

【0132】

本発明のポリペプチドは、配列番号2および4のポリペプチド(特に成熟ポリペプチド)、ならびに配列番号2および4のポリペプチドに対して少なくとも70%の類似性(好ましくは少なくとも70%の同一性)、そしてより好ましくは配列番号2および4のポリペプチドに対して少なくとも90%の類似性(より好ましくは少なくとも95%の同一性)、そしてさらにより好ましくは配列番号2および4のポリペプチドに対して少なくとも95%の類似性(さらにより好ましくは少なくとも90%の同一性)を有するポリペプチドを含み、そしてこれはまた、このようなポリペプチドの部分を含み、このポリペプチドのこのような部分は、一般に少なくとも30のアミノ酸、より好ましくは少なくとも50のアミノ酸を含む。

【0133】

当該分野で公知のように、2つのポリペプチド間の「類似性」は、一方のポリペプチドのアミノ酸配列およびその保存されたアミノ酸置換物を、第2のポリペプチドの配列と比較することにより決定される。

【0134】

本発明のポリペプチドのフラグメントまたは部分は、対応する全長ポリペプチドをペプチド合成によって生成するために用いられ得る;それゆえ、このフラグメントは、全長ポリペプチドを生成するための中間体として用いられ得る。本発明のポリヌクレオチドのフラグメントまたは部分を用いて、本発明の全長ポリヌクレオチドを合成し得る。

【0135】

本発明のポリペプチドは、リーダーを含む、寄託されたcDNAによりコードされるポリペプチド;リーダーを含まない、寄託されたcDNAによりコードされる成熟ポリペプチド(すなわち、成熟タンパク質);配列番号2におけるアミノ酸約-23~約396を含むポリペプチド;配列番号2におけるアミノ酸約-22~約396を含むポリペプチド;配列番号2におけるアミノ酸約1~約396を含むポリペプチド;ならびに上記のポリペプチドに対して少なくとも95%同一、そしてより好ましくは少なくとも96%、97

10

20

30

40

50

%、98%、もしくは99%同一のポリペプチドを含み、そしてまた、少なくとも30アミノ酸、そしてより好ましくは少なくとも50アミノ酸を有するこのようなポリペプチドの部分を含む。

【0136】

(融合タンパク質)

任意のVEGF-2ポリペプチドは、融合タンパク質を産生するために使用され得る。例えば、VEGF-2ポリペプチドは、第2のタンパク質に融合される場合、抗原性タグとして使用され得る。VEGF-2ポリペプチドに対して惹起される抗体は、VEGF-2に結合することによって、この第2のタンパク質を間接的に検出するために使用され得る。さらに、分泌タンパク質は、細胞の位置を輸送シグナルに基づいて標的とするので、VEGF-2ポリペプチドは、他のタンパク質に一旦融合されると標的化分子として使用され得る。

10

【0137】

VEGF-2ポリペプチドに融合され得るドメインの例は、異種シグナル配列のみならず、また他の異種機能性領域をも含む。融合は、必ずしも直接的である必要はないが、リンカー配列を介して起こり得る。

【0138】

さらに、融合タンパク質はまた、VEGF-2ポリペプチドの特徴を改善するために操作され得る。例えば、さらなるアミノ酸、特に荷電アミノ酸の領域が、宿主細胞からの精製または続く操作および貯蔵の間の安定性および持続性を改善するためにVEGF-2ポリペプチドのN末端に付加され得る。また、ペプチド部分は、精製を容易にするためにVEGF-2ポリペプチドに付加され得る。このような領域は、VEGF-2ポリペプチドの最終調製の前に除去され得る。ポリペプチドの操作を容易にするためのペプチド部分の付加は、当該分野でよく知られており、そして慣用技術である。

20

【0139】

当業者に理解されるように、および上で議論されるように、本発明のポリペプチド(例えば、免疫原性エピトープまたは抗原性エピトープを含むポリペプチド)は、異種ポリペプチド配列と融合され得る。例えば、本発明のポリペプチド(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、免疫グロブリン(IgA、IgE、IgG、IgM)の定常ドメインまたはそれらの一部分(CH1、CH2、CH3、またはそれらの任意の組み合わせおよびそれらの一部分)と融合され得、キメラポリペプチドを生じる。別の非制限的な例としては、本発明のポリペプチドおよび/または抗体(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、アルブミン(組換えヒト血清アルブミンまたはそのフラグメントもしくは改変体(例えば、1999年3月2日発行の米国特許第5,876,969号、欧州特許第0413622号、および1998年6月16日発行の米国特許第5,766,883号(これらは、本明細書によってその全体において参考として援用される)を参照のこと)を含むが、限定はされない)と融合され得る。好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/または抗体(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、ヒト血清アルブミンの成熟形態(すなわち、欧州特許第0322094号(これは、本明細書中にその全体が参考として援用される)の図1および2に示されるようなヒト血清アルブミンのアミノ酸1~585)と融合される。別の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/または抗体(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、ヒト血清アルブミンのアミノ酸残基1~xを含むかあるいはそれらからなるポリペプチドフラグメントと融合され、ここで、xは、1~585の整数であり、このアルブミンフラグメントは、ヒト血清アルブミン活性を有する。別の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/または抗体(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、米国特許第5,766,883号(本明細書中にその全体が参考として援用される)に記載されるように、ヒト血清アルブミンのアミノ酸残基1~zを含むか、あるいはそれらからなるポリペプチドフラグメントと融合され、ここで、zは、369~419の整数である。本発明のポリペプチドおよび/または抗体(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、異種タンパク質(例えば

30

40

50

、免疫グロブリンFcポリペプチドまたはヒト血清アルブミンポリペプチド)のN末端またはC末端のいずれかに融合され得る。本発明の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、本発明に含まれる。

#### 【0140】

上記のような融合タンパク質は、精製を容易にし得、そしてインビボでの半減期を増大させ得る。これは、ヒトCD4-ポリペプチドの最初の2つのドメインおよび哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質について示されている。例えば、EP 394,827; Traunckerら、Nature, 331: 84~86 (1988)を参照のこと。上皮の障壁を横切る抗原の免疫系への増強された送達は、IgGまたはFcフラグメントのようなFcRn結合パートナーに結合された抗原(例えば、インシュリン)について実証されている(例えば、PCT公開WO96/22024および同WO99/04813を参照のこと)。IgG部分のジスルフィド結合に起因するジスルフィド結合二量体構造を有するIgG融合タンパク質はまた、単量体分泌ポリペプチドまたはそれらのフラグメント単独よりも、他の分子の結合および中和においてより効果的であることが見出されている。例えば、Fountoulakisら、J. Biochem., 270: 3958-3964 (1995)を参照のこと。上記のポリペプチドをコードする核酸はまた、エピトープタグ(例えば、赤血球凝集素(「HA」)タグまたはフラッグ(flag)タグ)として目的の遺伝子と組換えられ、発現されたポリペプチドの検出および精製を補助し得る。例えば、Janknechtらによって記載された系は、ヒト細胞株中で発現される非変性融合タンパク質の容易な精製を可能にする(Janknechtら、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972-897)。この系において、目的の遺伝子はワクシニア組換えプラスミドへサブクローニングされ、その結果、この遺伝子のオープンリーディングフレームが、6つのヒスチジン残基からなるアミノ末端タグへ翻訳により融合される。このタグは、融合タンパク質についてのマトリクス結合ドメインとしての機能を果たす。組換えワクシニアウイルスを用いて感染された細胞からの抽出物は、Ni<sup>2+</sup>ニトリロ酢酸-アガロースカラムにロードされ、そしてヒスチジンタグ化タンパク質は、イミダゾール含有緩衝液を用いて選択的に溶出され得る。

#### 【0141】

同様に、EP-A-O 464 533(カナダ国対応特許第2045869号)は、別のヒトタンパク質またはその一部と共に免疫グロブリン分子の定常領域の種々の部分を含む融合タンパク質を開示する。多くの場合、融合タンパク質のFc部分は、治療および診断において有益であり、従って、例えば、改善された薬物動態学的な特性を生じ得る(EP-A 0232 262)。あるいは、融合タンパク質が発現され、検出され、そして精製された後に、Fc部分を欠失させることが望まれる。例えば、融合タンパク質が免疫化のための抗原として使用される場合、Fc部分は、治療および診断を妨害し得る。例えば、薬物の発見において、hIL-5のようなヒトタンパク質は、hIL-5のアンタゴニストを同定するための高スループットスクリーニングアッセイの目的のためにFc部分と融合される(D. Bennettら、J. Molecular Recognition 8: 52~58 (1995); K. Johansonら、J. Biol. Chem. 270: 9459~9471 (1995)を参照のこと)。

#### 【0142】

さらに、VEGF-2ポリペプチドは、マーカー配列(例えば、VEGF-2の精製を容易にするペプチド)に融合され得る。好ましい実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、とりわけ、ヘキサヒスチジンペプチド(例えば、pQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)において提供されるタグ)であり、これらの多くが市販されている。Gentzら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821~824 (1989)に記載されるように、例えば、ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質の都合の良い精製を提供する。精製のために有用な別のペプチドタグである「HA」タグは、インフルエンザ赤

10

20

30

40

50

血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する (Wilsonら、Cell 37: 767 (1984))。

【0143】

従って、これら上記の融合物のいずれかが、VEGF-2ポリヌクレオチドまたはVEGF-2ポリペプチドを使用して操作され得る。

【0144】

(VEGF-2の生物学的活性)

VEGF-2ポリヌクレオチドおよびVEGF-2ポリペプチドは、1つ以上の生物学的活性について試験するためのアッセイに用いられ得る。VEGF-2ポリヌクレオチドおよびVEGF-2ポリペプチドが、特定のアッセイにおいて活性を示す場合、VEGF-2が、その生物学的活性に関連した疾患に関与し得る可能性がある。従って、VEGF-2またはVEGF-2抗体を用いて、この関連する疾患を処置し得る。

10

【0145】

(抗新脈管形成活性)

新脈管形成の内因性の、刺激因子とインヒビターとの間の天然に存在する平衡は、阻害の影響が勝っている平衡である。Rastinejadら、Cell 56: 345~355 (1989)。新生血管形成が正常な生理学的条件下(例えば、創傷治癒、器官再生、胚発生、および雌性生殖プロセス)において生じる、それらの稀な例において、新脈管形成は、厳密に調節され、そして空間的および時間的に定められる。病的な新脈管形成の条件(例えば、固形腫瘍増殖に特徴的)の下において、これらの調節は制御することができない。調節されない新脈管形成は病原化し、そして多くの新生物性疾患および非新生物性疾患の進行を維持する。多くの重篤な疾患は、固形腫瘍の増殖および転移、関節炎、いくつかの型の眼内障害ならびに乾癬を含む異常な新生血管形成により支配される。例えば、Mosesら、Biotech. 9: 630~634 (1991); Folkmanら、N. Engl. J. Med., 333: 1757~1763 (1995); Auerbachら、J. Microvasc. Res. 29: 401~411 (1985); Folkman, Advances in Cancer Research編、KleinおよびWeinhouse編、Academic Press、New York、175~203頁(1985); Patz、Am. J. Ophthalmol. 94: 715~743 (1982); ならびにFolkmanら、Science 221: 719~725 (1983)による概説を参照のこと。多くの病的状態において、新脈管形成のプロセスは、その疾患状態に寄与する。例えば、固形腫瘍の増殖が新脈管形成に依存することを示唆する有意なデータが蓄積されている。FolkmanおよびKlagsbrun、Science 235: 442~447 (1987)。

20

30

【0146】

本発明は、本発明の抗体の投与による新生血管形成に関連する疾患または障害の処置を提供する。本発明の抗体を用いて処置され得る悪性状態および転移性状態としては、本明細書に記載される悪性疾患、固形腫瘍、および癌、ならびに当該分野で公知の他の状態が挙げられるが、これらに限定されない(このような障害の総説については、Fishmanら、Medicine、第2版、J. B. Lippincott Co., Philadelphia (1985)を参照のこと)。従って、本発明は、新脈管形成関連疾患および/または障害の処置方法を提供し、この方法は、治療有効量の本発明の抗体を、その処置に必要な個体に投与する工程を包含する。例えば、抗体は、癌または腫瘍を治療的に処置するために、種々のさらなる方法において利用され得る。抗体により処置され得る癌としては、固形腫瘍(前立腺癌、肺癌、乳癌、脳癌、卵巣癌、胃癌、膵臓癌、喉頭癌、食道癌、精巣癌、肝臓癌、耳下腺癌、胆管癌、結腸癌、直腸癌、頸部癌、子宮癌、子宮内臓癌、腎臓癌、膀胱癌、甲状腺癌が挙げられる); 原発性腫瘍および転移性腫瘍; 黒色腫; 神経膠芽細胞腫; カポージー肉腫; 平滑筋肉腫; 非小細胞肺癌; 結腸直腸癌; 進行した(advanced)悪性疾患; および血液から生じる腫瘍(例えば、白血病)が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、抗体は、皮膚癌、頭頸部腫瘍、乳房腫瘍およびカボ

40

50

ージ肉腫のような、癌を処置するために、局所送達され得る。

【0147】

なお他の局面において、抗体は、例えば膀胱内投与によって膀胱癌の表面形態を処置するために利用され得る。抗体は、腫瘍に直接的にか、または注射もしくはカテーテルを介して腫瘍部位付近に送達され得る。当然のことながら、当業者が理解するように、適切な投与様式は、処置される癌によって変化する。他の送達様式は本明細書中において議論される。

【0148】

抗体は、癌に加えて、新脈管形成に關与する他の障害を処置するのに有用であり得る。これらの障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：良性腫瘍（例えば、血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、および化膿性肉芽腫）；動脈硬化プラーク；眼の脈管形成疾患（例えば、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、黄斑変性、角膜移植拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖、ルベオーシス、網膜芽細胞腫、ブドウ膜炎（*uveitis*）および眼の翼状片（*Pterygia*）（異常な血管増殖））；慢性関節リウマチ；乾癬；遅延性創傷治癒；子宮内膜症；脈管形成；顆粒化；過形成性癬痕（ケロイド）；偽関節骨折；強皮症；トラコーマ；血管接着；心筋の新脈管形成；冠状側副枝（*coronary collaterals*）；大脳側副枝；動静脈奇形；虚血性四肢新脈管形成；オスラー-ウェーバー（*Oslер-Webber*）症候群；プラーク新生血管形成；毛細血管拡張症；血友病性関節；血管線維腫；線維筋性形成異常；創傷顆粒化；クローン病；およびアテローム性動脈硬化症。

【0149】

例えば、本発明の1つの局面において、本発明の抗体を過形成性癬痕またはケロイドに投与する工程を包含する、過形成性癬痕およびケロイドを処置するための方法が提供される。

【0150】

本発明の1つの実施形態において、本発明の抗体は、過形成性癬痕またはケロイドに、これらの病変の進行を妨げるために直接注射される。この治療は、過形成性癬痕およびケロイド（例えば、やけど）の発生を生じることが知られている状態の予防処置において特に価値があり、そして好ましくは、増殖期が進行する時間（最初の傷害の約14日後）が経過した後であるが、過形成性癬痕またはケロイドの発生の前に開始される。上述のように、本発明はまた、眼の新生血管形成疾患（例えば、角膜新生血管形成、血管新生緑内障、増殖性糖尿病網膜症、水晶体後線維増殖および黄斑変性を含む）を処置するための方法を提供する。

【0151】

さらに、本発明の抗体を用いて処置され得る新生血管形成に關連する眼の障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：血管新生緑内障、糖尿病網膜症、網膜芽細胞腫、水晶体後線維増殖症、ブドウ膜炎、未熟児網膜症、黄斑変性、角膜移植新生血管形成、ならびに他の眼の炎症性疾患、眼の腫瘍、および脈絡膜または虹彩の新生血管形成に關連する疾患。例えば、*Waltmanら、Am. J. Ophthalmol. 85: 704-710 (1978)* および *Gartnerら、Surv. Ophthalmol. 22: 291-312 (1978)* による総説を参照のこと。

【0152】

従って、本発明の1つの局面において、治療有効量の化合物（上記（抗体を含む））を患者に対して、血管の形成が阻害されるように角膜に投与する工程を包含する、角膜新生血管形成（角膜移植新生血管形成を含む）のような眼の新生血管形成疾患を処置するための方法が提供される。簡潔には、角膜は、通常には血管を欠く組織である。しかし、特定の病的状態において、毛細血管は、縁の角膜周囲脈管叢から角膜に伸長し得る。角膜が血管化される場合、角膜はまた混濁され、患者の視力の衰えを生じる。角膜が完全に不透明になる（*opaque*）場合に、完全に視力喪失になり得る。広範な種々の障害は、例えば、以下を含む角膜新生血管形成を生じ得る：角膜感染（例えば、トラコーマ、単

10

20

30

40

50

純ヘルペス角膜炎、リーシュマニア症およびオンコセルカ症)、免疫学的プロセス(例えば、移植片拒絶およびスティーヴンズ-ジョンソン症候群)、アルカリやけど、外傷、炎症(任意の原因による)、毒性および栄養欠乏状態、ならびにコンタクトレンズを装着することの合併症として。

【0153】

本発明の特に好ましい実施形態において、生理食塩水(眼科用調製物において一般に使用される任意の保存剤および抗菌剤と組合せて)中で局所投与のために調製され得、そして点眼剤形態で投与され得る。溶液または懸濁液は、純粋な形態で調製され、そして1日に数回投与され得る。あるいは、上記のように調製される抗脈管形成組成物はまた、角膜に直接投与され得る。好ましい実施形態において、抗脈管形成組成物は、角膜に結合する粘膜炎接着性ポリマーとともに調製される。さらなる実施形態において、抗脈管形成因子または抗脈管形成組成物は、従来のステロイド治療に対する補助剤として利用され得る。局所治療はまた、脈管形成応答(例えば、化学的やけど)を誘導する高い可能性を有することが公知の角膜病変において予防的に有用であり得る。これらの場合において、処置(おそらくステロイドと組み合わせられる)は、その後の合併症を予防するのを補助するために直ちに開始され得る。

10

【0154】

他の実施形態において、上記の抗体は、角膜支質に直接、顕微鏡下での誘導のもとで眼科医によって注入され得る。好ましい注射部位は、個々の病巣の形態で変化し得るが、投与の目標は、脈管構造の前進している面に組成物を置くこと(すなわち、血管と正常な角膜との間に分散される)である。ほとんどの場合において、これは、前進している血管から角膜を「防御」するための縁周囲(perilimbal)角膜注射を含む。この方法はまた、角膜新生血管形成を予防的に防ぐために、角膜傷害の直後に利用され得る。この状況において、この物質は、角膜病巣とその所望されない潜在的な血液供給の縁との間に分散して縁周囲角膜に注射され得る。このような方法はまた、類似の様式で、移植された角膜の毛細血管侵入を予防するために利用され得る。徐放形態において、注入は、1年に2~3回のみ必要とされ得る。ステロイドもまた、注入溶液に添加され、その注射自体から生じる炎症を低減し得る。

20

【0155】

本発明の別の局面において、患者に、血管の形成を阻害するように、治療有効量の抗体を眼に投与する工程を包含する、血管新生緑内障を処置するための方法が提供される。1つの実施形態において、化合物は、血管新生緑内障の早期形態を処置するために、眼に局所投与され得る。他の実施形態において、化合物は、前眼房角(anterior chamber angle)の領域への注入によって移植され得る。他の実施形態において、化合物はまた、化合物が眼房水に連続的に放出されるように、任意の位置に配置され得る。本発明の別の局面において、患者に、血管の形成が阻害されるように、治療有効量の抗体を眼に投与する工程を包含する、増殖性糖尿病性網膜症を処置するための方法が提供される。

30

【0156】

本発明の特に好ましい実施形態において、増殖性糖尿病性網膜症は、網膜における抗体の局所濃度を増加させるために、眼房水または硝子体への注入によって処置され得る。好ましくは、この処置は、光凝固を必要とする重篤な疾患の獲得の前に開始されるべきである。

40

【0157】

本発明の別の局面において、患者に、血管の形成が阻害されるように、治療有効量の抗体を眼に投与する工程を包含する、水晶体後線維増殖症を処置するための方法が、提供される。化合物は、硝子体内注射を介して、および/または眼内移植を介して局所投与され得る。

【0158】

さらに、この抗体で処置、予防および/あるいは疾患され得る障害としては、以下が挙

50



げられるが、それらに限定されない：血管腫、関節炎、乾癬、血管線維腫、アテローム性動脈硬化症斑、遅延型創傷治癒、顆粒化、血友病性関節、過形成性癬痕、偽関節骨折、オースラー-ウェーバー（Osler-Weber）症候群、化膿性肉芽腫、強皮症、トラコーマ、および血管接着。

#### 【0159】

さらに本発明の抗体で処置、予防、診断および/または予後診断され得る障害および/または状態としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：固形腫瘍、血液由来の（blood born）腫瘍（例えば、白血病）、腫瘍転移、カポジ肉腫、良性腫瘍（例えば、血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、および化膿性肉芽腫）、慢性関節リウマチ、乾癬、眼の脈管形成疾患（例えば、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、黄斑変性、角膜移植拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖症、ルベオシス、網膜芽細胞腫、およびブドウ膜炎（uveitis））、遅延型創傷治癒、子宮内膜症、脈管形成、顆粒化、過形成性癬痕（ケロイド）、偽関節骨折、強皮症、トラコーマ、血管接着、心筋の新脈管形成、冠状側副枝（coronary collaterals）、大脳側副枝、動静脈奇形、虚血性四肢新脈管形成、オースラー-ウェーバー症候群、ブランク新生血管形成、毛細血管拡張症、血友病性関節、血管線維腫、線維筋性形成異常、創傷顆粒化、クローン病、アテローム性動脈硬化症、産児制限薬剤（月経を制御する、胎芽着床のために必要な血管新生を予防することによる）、病原性の結果（例えば、引っかけ病（Rochelminimaliaquintosa）、潰瘍（Helicobacter pylori）、バルトネラ症および細菌性血管腫症状）のような新脈管形成を有する疾患。

#### 【0160】

出産制限方法の1つの局面において、胎芽着床をブロックするに十分な化合物の量は、性交および受精が起こる前またはその後に投与され、このようにして出産制限の有効な方法、おそらく「事後用（morning after）」方法を提供する。抗体はまた、月経を制御することにおいて使用され得るか、または子宮内膜症の処置における腹膜洗浄液として、もしくは腹膜移植のためのいずれかで投与され得る。

#### 【0161】

本発明の抗体は、縫合（stitch）肉芽腫を予防するために、外科縫合に組み込まれ得る。

#### 【0162】

抗体は、広範な種々の外科手順において利用され得る。例えば、本発明の1つの局面において、組成物（例えば、スプレーまたはフィルムの形態において）は、悪性組織から正常な周囲の組織を分離するため、そして/または周囲の組織への疾患の広がりを予防するために、腫瘍の除去の前に、領域をコートまたはスプレーするために利用され得る。本発明の他の局面において、組成物（例えば、スプレーの形態において）は、腫瘍をコートするため、または所望の場所において新脈管形成を阻害するために、内視鏡手順を介して送達され得る。本発明のなお他の局面において、本発明の抗脈管形成組成物でコートされている外科メッシュが、外科メッシュが利用され得る任意の手順において利用され得る。例えば、本発明の1つの実施形態において、抗脈管形成組成物を有した外科メッシュレーデン（laden）は、構造に対する支持を提供するため、そして一定の量の抗脈管形成因子を放出するために、腹部癌切除手術の間（例えば、結腸切除の後）に利用され得る。

#### 【0163】

本発明のさらなる局面において、腫瘍切除部位を処置するための方法が提供される。この方法は、抗体を、切除後に腫瘍の切除縁に投与して、その部位での、癌の局所的再発および新血管形成を阻害するようにする工程を包含する。本発明の1つの実施形態において、この抗脈管形成化合物（例えば、VEGF-2抗体）は、腫瘍切除部位に直接投与される（例えば、このVEGF-2抗体を用いて、腫瘍の切除縁に綿棒で塗るか、ブラシで塗るか、または他の方法でコーティングすることによって塗布される）。あるいは、このVEGF-2抗体は、投与の前に、公知の手術用ペーストに組み込まれ得る。本発明の特に

10

20

30

40

50

好ましい実施形態において、この V E G F - 2 抗体は、悪性疾患の肝切除の後、および神経外科的手術の後に塗布される。

【 0 1 6 4 】

本発明の 1 つの局面において、 V E G F - 2 抗体は、広範な種々の腫瘍（例えば、胸部腫瘍、結腸腫瘍、脳腫瘍、および肝腫瘍を含む）の切除縁に投与され得る。例えば、本発明 1 つの実施形態において、 V E G F - 2 抗体が、神経学的腫瘍の部位に、切除の後に投与され得、その結果、その部位での新規な血管の形成が阻害される。

【 0 1 6 5 】

本発明の抗体はまた、他の抗脈管形成因子とともに投与され得る。他の抗脈管形成因子の代表例としては、以下が挙げられる：抗侵襲性（ i n v a s i v e ）因子、レチン酸およびその誘導体、パクリタキセル、スラミン、メタロプロテイナーゼ - 1 の組織インヒビター、メタロプロテイナーゼ 2 の組織インヒビター、プラスミノゲン活性化因子インヒビター 1、プラスミノゲン活性化因子インヒビター 2、および種々の形態の軽い方の（ l i g h t e r ）「 d 群」遷移金属。

【 0 1 6 6 】

軽い方の「 d 群」遷移金属としては、例えば、バナジウム、モリブデン、タングステン、チタン、ニオブ、およびタンタル種が、挙げられる。このような遷移金属種は、遷移金属錯体を形成し得る。上記の遷移金属種の適切な錯体は、オキソ遷移金属錯体を含む。

【 0 1 6 7 】

バナジウム錯体の代表的例は、オキソバナジウム錯体（例えば、バナジン酸塩錯体およびバナジル錯体）を含む。適切なバナジン酸塩錯体は、メタバナジン酸塩錯体およびオルトバナジン酸塩錯体（例えば、メタバナジン酸アンモニウム、メタバナジン酸ナトリウム、およびオルトバナジン酸ナトリウム）を含む。適切なバナジル錯体は、例えば、バナジルアセチルアセトネートおよび硫酸バナジル（硫酸バナジル水和物（例えば、硫酸バナジルー水和物および硫酸バナジル三水和物）を含む）を含む。

【 0 1 6 8 】

タングステン錯体およびモリブデン錯体の代表的例もまた、オキソ錯体を含む。適切なオキソタングステン錯体は、タングステン酸塩錯体および酸化タングステン錯体を含む。適切なタングステン酸塩錯体は、タングステン酸アンモニウム、タングステン酸カルシウム、タングステン酸ナトリウム二水和物、およびタングステン酸を含む。適切な酸化タングステンは、酸化タングステン（ I V ）および酸化タングステン（ V I ）を含む。適切なオキソモリブデン錯体は、モリブデン酸塩錯体、酸化モリブデン錯体、およびモリブデニル錯体を含む。適切なモリブデン酸塩錯体は、モリブデン酸アンモニウムおよびその水和物、モリブデン酸ナトリウムおよびその水和物、ならびにモリブデン酸カリウムおよびその水和物を含む。適切な酸化モリブデンは、酸化モリブデン（ V I ）、酸化モリブデン（ V I ）、およびモリブデン酸を含む。適切なモリブデニル錯体は、例えば、モリブデニルアセチルアセトネートを含む。他の適切なタングステン錯体およびモリブデン錯体は、例えば、グリセロール、酒石酸および糖から誘導された、ヒドロキソ誘導体を含む。

【 0 1 6 9 】

広範な種々の他の抗脈管形成因子もまた、本発明の状況において利用され得る。代表的な例は、以下を含む：血小板第 4 因子；硫酸プロタミン；硫酸化キチン誘導体（クイーンクラブ（ q u e e n c r a b ）の殻から調製される）（ M u r a t a ら、 C a n c e r R e s . 5 1 : 2 2 ~ 2 6 、 1 9 9 1 ）；硫酸化多糖ペプチドグリカン複合体（ S P - P G ）（この化合物の機能は、ステロイド（例えば、エストロゲンおよびクエン酸タモキシフェン）の存在によって、増強され得る）；スタウロスポリン；基質代謝の調節因子（例えば、プロリンアナログ、シスヒドロキシプロリン、 d , L - 3 , 4 - デヒドロプロリン、チアプロリン、 - ジピリジル、アミノプロピオニトリルフマレートを含む）； 4 - プロピル - 5 - ( 4 - ピリジニル ) - 2 ( 3 H ) - オキサゾロン；メトトレキサート；ミトザントロン；ヘパリン；インターフェロン； 2 マクログロブリン - 血清； C h I M P - 3 ( P a v l o f f ら、 J . B i o . C h e m . 2 6 7 : 1 7 3 2 1 ~ 1 7 3 2 6 、

10

20

30

40

50

1992); キモスタチン (Tomkinsonら、Biochem J. 286: 475~480、1992); シクロデキストリンテトラデカサルフェート; エポネマイシン; カンプトテシン; フマギリン (Ingberら、Nature 348: 555~557、1990); チオリンゴ酸金ナトリウム (「GST」; MatsubaraおよびZiff、J. Clin. Invest. 79: 1440~1446、1987); アンチコラゲナーゼ - 血清; 2 - 抗プラスミン (Holmesら、J. Biol. Chem. 262 (4): 1659~1664、1987); ピサントレン (National Cancer Institute); ロベンザリットニナトリウム (N - (2) - カルボキシフェニル - 4 - クロロアントロニル酸 (chloroanthronilic acid) ニナトリウム、または「CCA」; Takeuchiら、Agents Actions 36: 312~316、1992); サリドマイド; Angostaticステロイド; AGM - 1470; カルボキシアミノイミダゾール (carboxynaminolimidazole); およびメタロプロテインナーゼインヒビター (例えば、BB94)。

10

## 【0170】

(免疫活性)

VEGF - 2抗体は、免疫細胞の増殖、分化、または動員 (走化性) を活性化または阻害することによって、免疫系の不全または障害を処置するのに有用であり得る。免疫細胞は、造血と称されるプロセス、すなわち、多能性幹細胞から骨髄性細胞 (血小板、赤血球、好中球、およびマクロファージ) およびリンパ系細胞 (Bリンパ球およびTリンパ球) を産生するプロセスを介して発生する。これらの免疫不全または免疫障害の病因は、遺伝性、体細胞性 (例えば、ガンまたはいくつかの自己免疫障害)、後天性 (例えば、化学治療または毒素による)、または感染性であり得る。さらに、VEGF - 2抗体は、特定の免疫系疾患または免疫系障害のマーカーまたは検出因子として使用され得る。

20

## 【0171】

VEGF - 2抗体は、造血細胞の不全または障害を処置または検出する際に有用であり得る。特定の (または多くの) 型の造血細胞の減少に関連する障害を処置するための取り組みにおいて、VEGF - 2抗体を使用して、多能性幹細胞を含む、造血細胞の分化および増殖を増加させ得る。免疫不全症候群の例としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない: 血液タンパク質障害 (例えば、無ガンマグロブリン血症、低ガンマグロブリン血症)、毛細血管拡張性運動失調、分類不能型免疫不全、ディ・ジョージ (Digeorge) 症候群、HIV感染、HTLV - BLV感染、白血球接着不全症候群、リンパ球減少、食細胞殺菌機能不全、重症複合型免疫不全 (SCID)、ヴィスコット - オールドリッチ障害、貧血、血小板減少症、または血色素尿。

30

## 【0172】

さらに、VEGF - 2抗体はまた、止血活性 (出血を停止する) または血栓崩壊活性 (血餅の形成) を調節するために使用され得る。例えば、止血活性または血栓崩壊活性を増加させることによって、VEGF - 2抗体は、血液凝固障害 (例えば、無フィブリノーゲン血症、因子欠乏)、血液血小板障害 (例えば、血小板減少症)、または外傷、手術もしくは他の原因から生じる創傷を処置するために使用され得る。あるいは、止血活性または血栓崩壊活性を減少させ得る、VEGF - 2抗体を用いて、凝固を阻害または溶解し得る。これらの分子は、心臓発作 (梗塞)、発作、または瘢痕の処置に重要であり得る。

40

## 【0173】

VEGF - 2抗体はまた、自己免疫障害を処置または検出する際に有用であり得る。多くの自己免疫障害は、免疫細胞によって、自己を外來物質として不適切に認識することからもたらされる。この不適切な認識は、宿主組織の破壊を導く免疫応答を生じる。それゆえ、免疫応答、特にT細胞の増殖、分化、または走化性を阻害し得るVEGF - 2抗体の投与は、自己免疫障害を予防する際に有効な治療であり得る。

## 【0174】

VEGF - 2抗体によって処置または検出され得る自己免疫障害の例としては、以下が

50

挙げられるが、それらに限定されない：アディソン病、溶血性貧血、抗リン脂質症候群、慢性関節リウマチ、皮膚炎、アレルギー性脳脊髄炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、グレーブズ病、多発性硬化症、重症筋無力症、神経炎、結膜炎、水疱性類天疱瘡、天疱瘡、多発性内分泌腺症、紫斑、ライター病、スティッフマン症候群、自己免疫性甲状腺炎、全身性エリテマトーデス、自己免疫性肺炎症、ギャンバレー症候群、インスリン依存性真性糖尿病、および自己免疫炎症性眼病。

【 0 1 7 5 】

同様に、例えば、喘息（特にアレルギー性喘息）または他の呼吸問題のようなアレルギー性反応および状態はまた、VEGF-2抗体により処置され得る。さらに、VEGF-2抗体を用いてアナフィラキシー、抗原性分子に対する過敏症、または血液型不適合性を処置し得る。

10

【 0 1 7 6 】

VEGF-2抗体はまた、器官拒絶または対宿主性移植片病（GVHD）を処置および/または予防するために用いられ得る。器官拒絶は、宿主免疫細胞が免疫応答を介して移植された組織を破壊することにより生じる。同様に、免疫応答はまた、GVHDに関与するが、この場合、外来の移植された免疫細胞は宿主組織を破壊する。免疫応答、特にT細胞の増殖、分化、または走化性を阻害するVEGF-2抗体の投与は、器官拒絶またはGVHDを予防する際に有効な治療であり得る。

【 0 1 7 7 】

同様に、VEGF-2抗体はまた、炎症を調節するために用いられ得る。例えば、VEGF-2抗体は、炎症性応答に関与する細胞の増殖および分化を阻害し得る。これらの分子は、以下を含む炎症状態（慢性および急性の両方の状態）を処置するために使用され得る：感染に関連した炎症（例えば、敗血症性ショック、敗血症、または全身性炎症応答症候群（SIRS））、虚血性再灌流傷害、内毒素死亡、関節炎、補体媒介性超急性拒絶、腎炎、サイトカインまたはケモカイン誘導性肺傷害、炎症性腸疾患、クローン病、またはサイトカイン（例えば、TNFまたはIL-1）の過剰産生からもたらされる状態。

20

【 0 1 7 8 】

（過剰増殖性障害）

本発明のVEGF-2抗体を用いて、過剰増殖性障害（新生物を含む）を処置または検出し得る。VEGF-2抗体は、直接的または間接的な相互作用によって障害の増殖を阻害し得る。あるいは、VEGF-2抗体は、過剰増殖性障害を阻害し得る他の細胞を増殖させ得る。

30

【 0 1 7 9 】

例えば、免疫応答を増加させることにより、特に、過剰増殖性障害の抗原性の質を増加させるか、またはT細胞を増殖させるか、分化させるか、もしくは動員させるかにより、過剰増殖性障害は処置され得る。この免疫応答は、既存の免疫応答を増強することによってか、または新たな免疫応答を開始することによってかのいずれかによって、上昇し得る。あるいは、免疫応答を減少させることはまた、過剰増殖性障害（例えば、化学療法剤）を処置する方法であり得る。

【 0 1 8 0 】

VEGF-2抗体によって処置または検出され得る過剰増殖性障害の例としては、以下に位置する新生物を含むがこれらに限定されない：腹部、骨、胸部、消化器系、肝臓、膵臓、腹膜、内分泌腺（副腎、上皮小体、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺）、眼、頭部および頸部、脳、神経（中枢および末梢）、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、前立腺、脾臓、胸郭、および尿生殖器。好ましい実施形態において、VEGF-2抗体は、乳癌を処置、予防または回復するために使用され得る。他の好ましい実施形態において、VEGF-2抗体は、脳の癌を処置、予防または回復するために使用され得る。他の好ましい実施形態において、VEGF-2抗体は、前立腺癌を処置、予防または回復するために使用され得る。他の好ましい実施形態において、VEGF-2抗体は、結腸癌を処置、予防または回復するために使用され得る。他の好ましい実施形態において、VEGF-2抗体は、

40

50

カポージ肉腫を処置、予防または回復するために使用され得る

同様に、他の過剰増殖性障害はまた、VEGF-2抗体によって処置または検出され得る。このような過剰増殖性障害の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：高ガンマグロブリン血症、リンパ増殖性障害、パラプロテイン血症、紫斑、サルコイドーシス、セザリー症候群、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、ゴシェ病、組織球増殖、および上記に列挙した器官系に位置する、新生物以外の任意の他の過剰増殖性疾患。

#### 【0181】

(結合活性)

VEGF-2ポリペプチドは、VEGF-2に結合する分子について、またはVEGF-2が結合する分子についてスクリーニングするために使用され得る。VEGF-2とその分子の結合は、VEGF-2または結合した分子の活性を、活性化(アゴニスト)、増大、阻害(アンタゴニスト)あるいは減少し得る。このような分子の例としては、抗体、オリゴヌクレオチド、タンパク質(例えば、レセプター)または小さい分子が挙げられる。

10

#### 【0182】

好ましくは、この分子は、VEGF-2の天然のリガンド(例えば、そのリガンドのフラグメント)、あるいは天然の基質、リガンド、構造的模倣物または機能的模倣物に密接に関連する。(Coliganら、Current Protocols in Immunology 1(2):第5章(1991)を参照のこと)。同様に、この分子は、VEGF-2が結合する天然のレセプター(すなわち、flk-1またはflk-4)または、少なくとも、VEGF-2に結合され得るレセプターのフラグメント(例えば、活性部位)に密接に関連し得る。いずれの場合においても、この分子は、公知の技術を使用して合理的に設計され得る。好ましくは、これらの分子についてのスクリーニングは、分泌タンパク質としてか、または細胞膜上にのいずれかで、VEGF-2を発現する適切な細胞を生成する工程を含む。好ましい細胞は哺乳動物、酵母、Drosophila、またはE.coli由来の細胞を含む。次いで、VEGF-2を発現する細胞(またはこの発現されたポリペプチドを含む細胞膜)が、好ましくは、VEGF-2かまたはこの分子のいずれかの活性の結合、刺激、あるいは阻害を観察するために、この分子を含んでいる可能性のある試験化合物と接触される。

20

30

#### 【0183】

このアッセイは、VEGF-2との候補化合物の結合を簡単に試験し得る。ここで、結合は、標識によってか、標識された競合物質との競合を含むアッセイにおいて検出される。さらに、このアッセイは、この候補化合物が、VEGF-2との結合によって生成されるシグナルを生じるかどうかを試験し得る。

#### 【0184】

あるいは、このアッセイは、無細胞調製物、固体支持体に固定されたポリペプチド/分子、化学物質ライブラリー、または天然産物の混合物を使用して実行され得る。このアッセイはまた、候補化合物を、VEGF-2を含む溶液と混合する工程、VEGF-2/分子活性またはVEGF-2分子結合を測定する工程、およびこのVEGF-2/分子活性またはVEGF-2分子結合を標準と比較する工程を単に包含し得る。

40

#### 【0185】

好ましくは、ELISAアッセイは、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を使用して、サンプル(例えば、生物学的サンプル)中のVEGF-2レベルまたはVEGF-2活性を測定し得る。この抗体は、VEGF-2に直接もしくは間接的に結合することによってか、または基質についてVEGF-2と競合することによってのいずれかで、VEGF-2レベルあるいはVEGF-2活性を測定し得る。

#### 【0186】

これら上記のアッセイ全てが、診断マーカーまたは予後マーカーとして使用され得る。これらのアッセイを使用して発見された分子は、このVEGF-2/分子を活性化または

50

阻害することにより、疾患を処置するために、あるいは患者に生じる特定の結果（例えば、血管成長）を引き起こすために使用され得る。さらに、このアッセイは、VEGF-2の産生を阻害または増強し得る因子を、適切に操作された細胞あるいは組織から発見し得る。

【0187】

従って、本発明は、VEGF-2に結合する化合物を同定する方法を含む。この方法は、以下の工程を包含する：(a)候補の結合化合物をVEGF-2とともにインキュベートする工程；および(b)結合が生じたかどうかを決定する工程。さらに、本発明は、以下の工程を包含する、アゴニスト/アンタゴニストを同定する方法を含む：(a)候補化合物をVEGF-2とともにインキュベートする工程、(b)生物学的活性をアッセイする工程、および(b)VEGF-2の生物学的活性が変化されたかどうかを決定する工程。

10

【0188】

(標的化された送達)

別の実施形態において、本発明は、組成物を、VEGF-2ポリペプチドについてのレセプターを発現する標的化細胞、またはVEGF-2ポリペプチドの細胞結合形態を発現する細胞に送達する方法を提供する。

【0189】

本明細書中で議論される場合、本発明の抗体は、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素またはプロドラッグと、疎水性、親水性、イオン性および/または共有結合性の相互作用を介して会合し得る。1つの実施形態において、本発明は、異種ポリペプチドまたは核酸と会合した本発明の抗体を投与することによる、本発明の組成物の細胞への特異的な送達のための方法を提供する。1つの例において、本発明は、治療タンパク質を標的化細胞中へ送達するための方法を提供する。別の例において、本発明は、一本鎖核酸（例えば、アンチセンスまたはリボザイム）あるいは二本鎖核酸（例えば、細胞のゲノムに組み込まれるか、またはエピソームにて複製し得、そして転写され得る、DNA）を、標的化細胞に送達するための方法を提供する。

20

【0190】

別の実施形態において、本発明は、毒素または細胞傷害性プロドラッグと会合した本発明のVEGF-2抗体を投与することによる細胞の特異的破壊（例えば、腫瘍細胞の破壊）のための方法を提供する。

30

【0191】

「毒素」とは、内因性の細胞傷害性エフェクター系、放射性同位体、ホロ毒素(holotoxin)、改変型毒素、毒素の触媒サブユニット、または規定の条件下で細胞死を引き起こす細胞中もしくは細胞表面には通常存在しない任意の分子もしくは酵素を、結合および活性化する化合物を意味する。本発明の方法に従って使用され得る毒素としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：当該分野で公知の放射性同位体、固有のまたは誘導された内因性の細胞傷害性エフェクター系を結合する化合物（例えば、抗体（またはその一部を含む補体固定）、チミジンキナーゼ、エンドヌクレアーゼ、RNAse、毒素、リシン、アブリン、Pseudomonas内毒素A、ジフテリア毒素、サボリン、モモルジン(momordin)、ゲロニン(gelonin)、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、-サルシン(sarcin)およびコレラ毒素。「細胞傷害性プロドラッグ」とは、通常細胞内に存在する酵素によって、細胞傷害性化合物へと変換される非毒性の化合物を意味する。本発明の方法に従って使用され得る細胞傷害性プロドラッグとしては、安息香酸マスタードアルキル化剤のグルタミル誘導體、エトポシドまたはマイトマイシンCのリン酸誘導體、シトシンアラビノシド、ダウノルビシン、およびドキシソルビシンのフェノキシアセトアミド誘導體が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0192】

(薬物スクリーニング)

VEGF-2ポリペプチドの活性を改変する分子についてスクリーニングするための、

50

本発明のポリペプチド、またはこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用が、さらに意図される。このような方法は、本発明のポリペプチドを、アンタゴニスト活性またはアゴニスト活性を有することが疑われる選択された化合物と接触させる工程、および結合に続いてこれらのポリペプチドの活性をアッセイする工程を包含する。

【0193】

本発明は、種々の薬物スクリーニング技術のいずれかにおいて、VEGF-2ポリペプチドまたはそれらの結合フラグメントを使用することによって、治療用化合物をスクリーニングするために特に有用である。このような試験に用いられるポリペプチドまたはフラグメントは、固体支持体に固定化され得、細胞表面上に発現され得、溶液中で遊離であり得、または細胞内に局在化され得る。薬物スクリーニングの1つの方法は、ポリペプチドまたはフラグメントを発現する組換え核酸を用いて安定に形質転換される真核生物宿主細胞または原核生物宿主細胞を利用する。薬物は、競合結合アッセイにおいて、このような形質転換細胞に対してスクリーニングされる。例えば、試験されている薬剤と本発明のポリペプチドとの間の複合体の形成 ( f o r m u l a t o n ) を測定し得る。

10

【0194】

従って、本発明は、VEGF-2ポリペプチドによって媒介される活性に影響を及ぼす薬物または任意の他の薬剤についてのスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、当該分野で周知の方法によって、このような薬剤をVEGF-2ポリペプチドもしくはそのフラグメントと接触させる工程、およびこの薬剤とこのポリペプチドもしくはそのフラグメントとの間の複合体の存在についてアッセイする工程を包含する。このような競合結合アッセイにおいて、スクリーニングされる薬剤は、代表的に、標識化される。インキュベーション後に、遊離の薬剤は、結合形態中に存在する薬剤から分離され、そして遊離または複合体化されていない標識の量は、特定の薬剤がVEGF-2ポリペプチドに結合する能力の尺度である。

20

【0195】

薬物スクリーニングについての別の技術は、VEGF-2ポリペプチドに対する適切な結合親和性を有する化合物に対するハイスループットスクリーニングを提供し、そして欧州特許出願84/03564(1984年9月13日公開)(これは、本明細書中で参考として援用される)に非常に詳細に記載される。簡潔にいうと、大量の異なる小さなペプチド試験化合物は、固体基材(例えば、プラスチックピンまたはいくつかの他の表面)上で合成される。ペプチド試験化合物を、本発明のポリペプチドと反応させ、そして洗浄する。次いで、結合したポリペプチドは、当該分野で周知の方法によって検出される。精製されたポリペプチドは、前述の薬物スクリーニング技術での使用のためにプレート上に直接コーティングされる。さらに、非中和抗体を使用して、このペプチドを捕捉し得、そして固体支持体上にそれを固定し得る。

30

【0196】

本発明はまた、競合薬物スクリーニングアッセイの使用を意図し、ここで、VEGF-2ポリペプチドを結合し得る中和抗体は、VEGF-2ポリペプチドまたはそのフラグメントへの結合について試験化合物と特異的に競合する。この様式において、抗体を使用して、本発明のポリペプチドと1つ以上の抗原性エピトープを共有する任意のペプチドの存在を検出する。

40

【0197】

(結合ペプチドおよび他の分子)

本発明はまた、VEGF-2ポリペプチドに結合するポリペプチドおよび非ポリペプチドを同定するためのスクリーニング方法、ならびにそれによって同定された結合分子を含む。これらの結合分子は、例えば、VEGF-2ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニスト(例えば、VEGF-2抗体)として有用である。そのような抗体は、本発明に従って、以下に詳細に記載される治療実施形態において使用され得る。

【0198】

この方法は、以下の工程を包含する：VEGF-2ポリペプチドを多数の分子と接触さ

50

せる工程；および、VEGF-2ポリペプチドに結合する分子を同定する工程。

【0199】

VEGF-2ポリペプチドを多数の分子と接触させる工程は、多数の方法によってもたらされ得る。例えば、VEGF-2ポリペプチドを固体支持体上に固定化させ、そして多数の分子の溶液をこの固定したVEGF-2ポリペプチドと接触させることを企図し得る。このような手順は、固定した本発明のポリペプチドから構成される親和性マトリックスを用いるアフィニティークロマトグラフィープロセスに類似している。次いで、VEGF-2ポリペプチドに対して選択的な親和性を有する分子が、親和性選択によって精製され得る。固体支持体の性質、ポリペプチドのこの固体支持体への付着に関するプロセス、溶媒、および親和性単離または親和性選択の条件は、大部分が慣用的であり、そして当業者に周知である。

10

【0200】

あるいは、多数のポリペプチドはまた、ポリペプチドのサブセットまたは個々のポリペプチドを含む実質的に別々の分画へ分離され得る。例えば、多数のポリペプチドは、ゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィーなどポリペプチドの分離に関して当業者に公知の方法によって、分離され得る。個々のポリペプチドはまた、宿主細胞の外部表面上またはほぼ外部表面に発現されるような様式で、形質転換された宿主細胞（例えば、組換えファージ）によって産生され得る。次いで、個々の単離物は、本発明のポリペプチドによって「プローブ化」され得、必要に応じて発現に必要とされるはずのインデューサーの存在下で、本発明のポリペプチドと個々のクローンとの間で任意の選択的親和性相互作用が起こったか否かが決定される。VEGF-2ポリペプチドを個々のポリペプチドを含む各分画と接触させる前に、これらのポリペプチドはまず、さらなる簡便性のために固体支持体に移され得る。そのような固体支持体は、単に、例えばニトロセルロースまたはナイロンでできたフィルター膜の断片であり得る。この様式において、陽性クローンは、形質転換宿主細胞の発現ライブラリーの集団（これらは、本発明のポリペプチドに対して選択的親和性を有するポリペプチドをコードするDNA構築物を持つ）から同定され得る。さらに、本発明のポリペプチドに対して選択的親和性を有するポリペプチドのアミノ酸配列が、従来手段によって直接決定され得るか、またはこのポリペプチドをコードするDNAのコード配列が、頻繁により簡便に決定され得る。次いで、一次配列が、対応するDNA配列から推定され得る。アミノ酸配列がポリペプチド自身から決定されるものである場合、微小配列決定技術を使用し得る。この配列決定技術は、質量分析法を含み得る。

20

30

【0201】

特定の状況において、選択的親和性相互作用の存在を決定または検出しようと試みる前に、任意の未結合のポリペプチドを、VEGF-2ポリペプチドおよび多数のポリペプチドの混合物から洗浄除去することが望ましくあり得る。このような洗浄工程は、VEGF-2ポリペプチドまたは多数のポリペプチドが固体支持体に結合している場合に、特に望ましくあり得る。

【0202】

本方法に従って提供される多数の分子は、多様性ライブラリー（例えば、VEGF-2ポリペプチドに特異的な分子をスクリーニングし得る無作為またはコンビナトリアルの、ペプチドライブラリーまたは非ペプチドライブラリー）として提供され得る。使用され得る多くのライブラリー（例えば、化学合成ライブラリー、組換えライブラリー（例えば、ファージディスプレイライブラリー）、およびインビトロ翻訳ベースのライブラリー）が、当該分野で公知である。化学合成ライブラリーの例は、以下に記載される：Fodorら、1991、*Science* 251:767-773；Houghtenら、1991、*Nature* 354:84-86；Lamら、1991、*Nature* 354:82-84；Medynski、1994、*Bio/Technology* 12:709-710；Gallopら、1994、*J. Medicinal Chemistry* 37(9):1233-1251；Ohlmeyerら、1993、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10922-10926；Erbら、1994、

40

50



Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422-11426; Houghtenら、1992, Biotechniques 13:412; Jayawickremeら、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1614-1618; Salmonら、1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11708-11712; PCT公開番号WO93/20242; ならびにBrennerおよびLerner、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5381-5383。

【0203】

ファージディスプレイライブラリーの例は、以下に記載される: ScottおよびSmith、1990, Science 249:386-390; Devlinら、1990, Science, 249:404-406; Christian, R. B.ら、1992, J. Mol. Biol. 227:711-718); Lenstra、1992, J. Immunol. Meth. 152:149-157; Kayら、1993, Gene 128:59-65; ならびにPCT公開番号WO94/18318(1994年8月18日)。

10

【0204】

インビトロ翻訳ベースのライブラリーとしては、以下:PCT公開番号WO91/05058(1991年4月18日); およびMattheakisら、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022-9026に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0205】

非ペプチドライブラリーの例として、ベンゾジアゼピンライブラリー(例えば、Buninら、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4708-4712を参照のこと)が、使用のために適応され得る。ペプチドライブラリー(Simonら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367-9371)がまた使用され得る。使用され得るライブラリーの別の例は、Ostreshら(1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11138-11142)によって記載され、ここでは、ペプチド中のアミド官能基が、過剰にメチル化(permethylation)されて、化学的に形質転換されたコンビナトリアルライブラリーを生成する。

30

【0206】

本発明において有用である種々の非ペプチドライブラリーは、大きい。例えば、EckerおよびCrooke(1995, Bio/Technology 13:351-360)は、種々のライブラリーの基礎を形成する化学種の中で、ベンゾジアゼピン、ヒダントイン、ピペラジンジオン、ピフェニル、糖アナログ、 $\alpha$ -メルカプトケトン、アリアル酢酸、アシルピペリジン、ベンゾピラン、キューバン(cubane)、キサントン、アミンイミドおよびオキサゾロンを列挙している。

【0207】

非ペプチドライブラリーは、2つの型に大きく分類され得る: 修飾されたモノマーおよびオリゴマー。修飾モノマーライブラリーは、比較的単純な骨格構造を使用し、この上に種々の官能基が付加される。しばしば、骨格は、既知の有用な薬理的活性を有する分子である。例えば、骨格は、ベンゾジアゼピン構造であり得る。

40

【0208】

非ペプチドオリゴマーライブラリーは、モノマーの順序に依存して新規な形状を作製する様式で共にアSEMBLされる、多数のモノマーを使用する。使用されているモノマー単位のうちで、カルバメート、ピロリノン(pyrrrolinone)およびモルホリノがある。ペプチド(側鎖が炭素よりもアミノ基に結合するペプチド様オリゴマー)は、非ペプチドオリゴマーライブラリーの別のバージョンの基礎を形成する。最初の非ペプチドオリゴマーライブラリーは、単一型のモノマーを使用し、従って、反復骨格を含んだ。近年のライブラリーは、1つより多くのモノマーを使用し、自由度が添加されたライブ

50

ラリーを与える。

【0209】

ライブラリーをスクリーニングすることは、多様な一般的に公知の方法のいずれかによって達成され得る。例えば、ペプチドライブラリーのスクリーニングを開示する以下の参考文献：ParmleyおよびSmith、1989、*Adv. Exp. Med. Biol.* 251:215-218；ScottおよびSmith、1990、*Science* 249:386-390；Fowlkesら、1992；*BioTechniques* 13:422-427；Oldenburgら、1992、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5393-5397；Yuら、1994、*Cell* 76:933-945；Staudtら、1988、*Science* 241:577-580；Bockら、1992、*Nature* 355:564-566；Tuerkら、1992、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6988-6992；Ellingtonら、1992、*Nature* 355:850-852；米国特許第5,096,815号、米国特許第5,223,409号、および米国特許第5,198,346号（全てLadnerらに対して）；RebarおよびPabo、1993、*Science* 263:671-673；ならびにPCT公開番号WO94/18318を参照のこと。

10

【0210】

特定の実施形態において、VEGF-2ポリペプチドを結合する分子を同定するためのスクリーニングは、ライブラリーのメンバーを固相に固定化された本発明のポリペプチドと接触させ、そしてVEGF-2ポリペプチドに結合するライブラリーメンバーを収集することによって実行され得る。そのようなスクリーニング方法の例の、「パニング」と呼ばれる技術は、例として、ParmleyおよびSmith、1988、*Gene* 73:305-318；Fowlkesら、1992、*BioTechniques* 13:422-427；PCT公開番号WO94/18318；ならびにその中に引用される参考文献に記載される。

20

【0211】

別の実施形態において、酵母中で相互作用タンパク質を選択するためのツーハイブリッドシステム（FieldsおよびSong、1989、*Nature* 340:245-246；Chienら、1991、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9578-9582）が、VEGF-2ポリペプチドに特異的に結合する分子を同定するために使用され得る。

30

【0212】

結合している分子がポリペプチドである場合、このポリペプチドは、任意のペプチドライブラリー（ランダムペプチドライブラリー、コンビナトリアルペプチドライブラリー、またはバイアスペプチドライブラリーを含む）から簡便に選択され得る。用語「バイアス（biased）」は、ライブラリーを作製する方法が、生じる分子（この場合には、ペプチド）の収集の多様性を支配する1つ以上のパラメーターを制限するように操作されることを意味するために本明細書中に使用される。

【0213】

従って、本当にランダムなペプチドライブラリーは、ペプチドの所定の位置に特定のアミノ酸を見出す可能性が20全てのアミノ酸に関して同じである、ペプチドの収集物を作製する。しかし、例えば、リジンが5番目のアミノ酸毎に生じることを特定するかまたはデカペプチドライブラリーの4位、8位および9位がアルギニンのみを含むように固定されることを特定することによって、バイアスがライブラリーに導入され得る。明らかに、多くの型のバイアスは、意図され得、そして本発明は、いずれの特定のバイアスにも制限されない。さらに、本発明は、特定の型のペプチドライブラリー（例えば、ファージディスプレイペプチドライブラリーおよびDNA挿入物と共にファージベクターを含むDNA構築物を使用するライブラリー）を意図する。

40

【0214】

50

上記のように、ポリペプチドである結合分子の場合、このポリペプチドは、約 6 から約 60 より少ないアミノ酸残基を有し、好ましくは約 6 ~ 約 10 アミノ酸残基、そして最も好ましくは約 6 ~ 約 22 アミノ酸であり得る。別の実施形態において、結合ポリペプチドは、15 ~ 100 の範囲のアミノ酸、または 20 ~ 50 の範囲のアミノ酸を有する。

【0215】

選択された結合ポリペプチドは、化学合成または組換え発現によって得られ得る。

【0216】

(ベクター、宿主細胞、およびタンパク質生成)

本発明はまた、本発明の単離された核酸分子を含む組換えベクター、およびこの組換えベクターを含む宿主細胞、ならびにこのようなベクターおよび宿主細胞を作製する方法、ならびに組換え技術による VEGF-2 ポリペプチドまたはペプチドの生成のためにこれらを使用する方法に関する。

10

【0217】

宿主細胞は、本発明のベクター(これは、例えば、クローニングベクターまたは発現ベクターであり得る)を用いて遺伝子操作(形質導入されるか、形質転換されるか、またはトランスフェクトされる)される。このベクターは、例えば、プラスミド、ウイルス粒子、ファージなどの形態であり得る。操作された宿主細胞は、プロモーターを活性化し、形質転換体を選択し、または本発明の VEGF-2 遺伝子を増幅するために適切に改変された従来の栄養培地において培養され得る。培養条件(例えば、温度、pH など)は、発現のために選択される宿主に以前使用された条件であり、そして当業者には明らかである。

20

【0218】

本発明のポリヌクレオチドは、組換え技術によりポリペプチドを産生するために用いられ得る。従って、例えば、このポリヌクレオチド配列は、ポリペプチドを発現するための種々の発現ベクターの任意の 1 つに含まれ得る。そのようなベクターは、染色体 DNA 配列、非染色体 DNA 配列、および合成 DNA 配列を含む。そのようなベクターは、例えば、SV40 の誘導体；細菌性プラスミド；ファージ DNA；酵母プラスミド；プラスミド DNA およびファージ DNA の組み合わせに由来するベクター；ワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病のようなウイルス DNA を含む。しかし、宿主中で複製可能で、そして存続可能である限り、他の任意のプラスミドまたはベクターも使用され得る。

30

【0219】

適切な DNA 配列が、種々の手順によりベクター中に挿入され得る。一般に、その DNA 配列は当該分野で公知の手順により適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。そのような手順および他の手順は、当業者の範囲内であると考えられる。

【0220】

発現ベクター中の DNA 配列は、適切な発現制御配列(プロモーター)に作動的に連結され、mRNA の合成を指向する。そのようなプロモーターの代表的な例としては、以下が挙げられ得る：LTR または SV40 プロモーター、E. coli. lac プロモーターまたは trp プロモーター、ファージ P<sub>L</sub> プロモーター、および原核生物細胞または真核生物細胞あるいはそれらのウイルス内で遺伝子の発現を制御することが公知である他のプロモーター。発現ベクターはまた、翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写ターミネーターを含む。ベクターはまた、発現を増幅するための適切な配列を含み得る。

40

【0221】

さらに、発現ベクターは、好ましくは、形質転換された宿主細胞の選択のための表現型形質を提供する少なくとも 1 つの選択マーカー遺伝子を含む。このようなマーカーとしては、真核生物細胞培養物についてはジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)またはネオマイシン耐性、ならびに E. coli および他の細菌における培養についてはテトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性が挙げられる。

【0222】

本明細書中上記のような適切な DNA 配列ならびに適切なプロモーター配列または制御

50

配列を含むベクターは、適切な宿主を形質転換してその宿主にタンパク質を発現させるために用いられ得る。適切な宿主の代表的な例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：細菌細胞(例えば、*E. coli*、*Salmonella typhimurium*および*Streptomyces*)；真菌細胞(例えば酵母)；昆虫細胞(例えば、*Drosophila S2*および*Spodoptera Sf9*)；動物細胞(例えば、CHO、COS、およびBowes黒色腫)；ならびに植物細胞。適切な宿主の選択は、本明細書の教示により当業者の範囲内であると考えられる。

#### 【0223】

さらに詳細には、本発明はまた、上記で広範に記載した1つ以上の配列を含む組換え構築物を含む。これらの構築物は、ベクター(例えば、プラスミドベクターまたはウイルスベクター)を含み、このベクターの中には本発明の配列が正方向または逆方向に挿入されている。この実施形態の好ましい局面において、この構築物はさらに、上記配列に作動可能に連結された調節配列(例えば、プロモーターを含む)を含む。多数の適切なベクターおよびプロモーターが当業者には公知であり、そして市販されている。以下のベクターが例として提供される。細菌性：pQE70、pQE60、およびpQE-9(Qiagenから入手可能)；pBSベクター、Phagescriptベクター、Bluescriptベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A(Stratageneから入手可能)；ならびにptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmaciaから入手可能)。好ましい真核生物性ベクターのうちには以下がある：pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、およびpSG(Stratageneから入手可能)；ならびにpSVK3、pBPV、pMSG、pSVL(Pharmaciaから入手可能)。他の適切なベクターが、当業者に容易に明らかである。

#### 【0224】

本発明の実施における発現ベクターの使用に加えて、本発明は、目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたオペレーターおよびプロモーターエレメントを含む、新規な発現ベクターをさらに含む。このようなベクターの1例は、以下に詳細に記載されるpHE4aである。

#### 【0225】

図28および図29に要約されるように、pHE4aベクター(配列番号16)の構成成分としては、以下が含まれる：1)選択マーカーとしてネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、2)*E. coli*複製起点、3)T5ファージプロモーター配列、4)2つのlacオペレーター配列、5)シャイン-ダルガーノ配列、6)ラクトースオペロンプレッサ-遺伝子(lacIq)、ならびに7)マルチクローニング部位リンカー領域。複製起点(oriC)は、pUC19(LTI、Gaithersburg、MD)由来である。プロモーター配列およびオペレーター配列は、合成により作製された。核酸配列の合成的作製は、当該分野で周知である。CLONTECH 95/96カタログ、215~216頁、CLONTECH、1020 East Meadow Circle、Palo Alto、CA 94303。pHE4aベクターは、1998年2月25日にATCCに寄託され、そして受託番号209645を与えられた。

#### 【0226】

VEGF-2をコードするヌクレオチド配列(配列番号1)は、NdeI、およびXbaI、BamHI、XhoI、またはAsp718のいずれかでベクターを制限し、そしてゲル上で大きい方のフラグメント(マルチクローニング部位領域は約310ヌクレオチド)を単離することにより、pHE4aのプロモーターおよびオペレーターに作動可能に連結される。適切な制限部位を有する、VEGF-2をコードするヌクレオチド配列(配列番号1)は、例えば、実施例1に記載のPCRプロトコールに従って、NdeIに関する制限部位(5'プライマーとして)、およびXbaI、BamHI、XhoI、またはAsp718のいずれかに関する制限部位(3'プライマーとして)を有するPCRプライマーを使用して作製される。このPCR挿入物は、ゲル精製され、そして適合可能な酵

10

20

30

40

50

素で制限される。この挿入物およびベクターは、標準的プロトコールに従って連結される。

【0227】

上記のように、pHE4aベクターは、lacIq遺伝子を含む。LacIqは、lacオペレーターの強固な調節を付与するlacI遺伝子の対立遺伝子である。Amann, E.ら、Gene 69:301~315(1988); Stark, M., Gene 51:255~267(1987)。lacIq遺伝子は、lacオペレーター配列に結合し、そして下流(すなわち、3')配列の転写を阻止するレプレッサ-タンパク質をコードする。しかし、lacIq遺伝子産物は、ラクトースまたは特定のラクトースアナログ(例えば、イソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG))のいずれかの存在下でlacオペレーターから解離する。従って、VEGF-2は、pHE4aベクターを含む誘導されていない宿主細胞において、測定可能な量で産生されない。しかし、IPTGのような薬剤の添加によるこれらの宿主細胞の誘導は、VEGF-2コード配列の発現を生じる。

10

【0228】

pHE4aベクターのプロモーター/オペレーター配列(配列番号17)は、T5ファージプロモーターおよび2つのlacオペレーター配列を含む。1つのオペレーターは、転写開始部位の5'側に位置し、そしてもう一方は、同部位の3'側に位置する。これらのオペレーターは、lacIq遺伝子産物と組合せて存在する場合、lacオペロン誘導物質(例えば、IPTG)の非存在下で、下流配列の強固な抑制を付与する。lacオペレーターの下流に位置する、作動的に連結された配列の発現は、lacオペロン誘導物質(例えば、IPTG)の添加によって誘導され得る。lacIqタンパク質へのlac誘導物質の結合は、lacオペレーター配列からのそれらの遊離、および作動可能に連結された配列の転写の開始を生じる。遺伝子発現のlacオペロン調節は、Devlin, T., TEXTBOOK OF BIOCHEMISTRY WITH CLINICAL CORRELATIONS、第4版(1997)、802~807頁に概説されている。

20

【0229】

pHE4シリーズのベクターは、VEGF-2コード配列を除いて、全てのpHE4aベクターの構成成分を含む。pHE4aベクターの特徴は、最適化された合成T5ファージプロモーター、lacオペレーター、およびシャイン-ダルガーノ配列を含む。さらに、これらの配列はまた、最適に間隔を空けられており、その結果、挿入された遺伝子の発現は、強固に調節され得、そして誘導の際に高レベルの発現が生じる。

30

【0230】

本発明のタンパク質の産生における使用に適切な公知の細菌性プロモーターのうちには以下が挙げられる: E. coli lacIプロモーターおよびlacZプロモーター、T3プロモーターおよびT7プロモーター、gptプロモーター、PRプロモーターおよびPLプロモーター、ならびにtrpプロモーター。適切な真核生物プロモーターとしては、以下が挙げられる: CMV前初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、初期SV40プロモーターおよび後期SV40プロモーター、レトロウイルスLTRのプロモーター(例えば、ラウス肉腫ウイルス(RSV)のプロモーター)、ならびにメタロチオネインプロモーター(例えば、マウスメタロチオネインIプロモーター)。

40

【0231】

pHE4aベクターはまた、AUG開始コドンの5'側にシャイン-ダルガーノ配列を含む。シャイン-ダルガーノ配列は、一般に、AUG開始コドンの約10ヌクレオチド上流(すなわち、5')に位置する短い配列である。これらの配列は、原核生物リボソームをAUG開始コドンへと本質的に指向する。

【0232】

従って、本発明はまた、本発明のタンパク質の産生に有用な発現ベクターに関する。本発明のこの局面は、pHE4aベクター(配列番号16)によって例証される。

50

## 【0233】

プロモーター領域は、CAT（クロラムフェニコールトランスフェラーゼ）ベクター、または選択マーカーを有する他のベクターを使用して、任意の所望の遺伝子から選択され得る。2つの適切なベクターは、pKK232-8およびpCM7である。特に有名な細菌性プロモーターには、lacIプロモーター、lacZプロモーター、T3プロモーター、T7プロモーター、gptプロモーター、P<sub>R</sub>プロモーター、P<sub>L</sub>プロモーターおよびtrpプロモーターが挙げられる。真核生物プロモーターとしては、CMV前初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、初期SV40プロモーターおよび後期SV40プロモーター、レトロウイルス由来のLTRプロモーター、ならびにマウスメタロチオネイン-Iプロモーターが挙げられる。適切なベクターおよびプロモーターの選択は、十分当該分野の技術レベルの範囲内である。

10

## 【0234】

さらなる実施形態において、本発明は上記の構築物を含有する宿主細胞に関する。宿主細胞は、高等真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞）または下等真核生物細胞（例えば、酵母細胞）であり得るか、あるいは宿主細胞は原核生物細胞（例えば、細菌細胞）であり得る。宿主細胞内への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染、または他の方法により達成され得る（Davis, L.ら、Basic Methods in Molecular Biology (1986)）。

## 【0235】

宿主細胞中の構築物は、組換え配列によりコードされる遺伝子産物を産生するために、従来の方法において使用され得る。あるいは、本発明のポリペプチドは、従来のペプチド合成機により合成的に産生され得る。

20

## 【0236】

成熟タンパク質は、哺乳動物細胞、酵母、細菌、または他の細胞中で、適切なプロモーターの制御下で発現され得る。無細胞翻訳系もまた、そのようなタンパク質を産生するために、本発明のDNA構築物に由来するRNAを使用して用いられ得る。原核生物宿主および真核生物宿主で使用される適切なクローニングベクターおよび発現ベクターは、Sambrookらによって、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)（この開示は、本明細書中に参考として援用される）に記載される。

30

## 【0237】

本発明のポリペプチドをコードするDNAの高等真核生物による転写は、ベクター内にエンハンサー配列を挿入することにより増大される。エンハンサーはDNAのシス作用性エレメントであり、通常は約10~300bpであり、これはプロモーターに作用してその転写を増大させる。例としては、複製起点(bp100~270)の後期側のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルスの早期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。

## 【0238】

一般に、組換え発現ベクターは、複製起点および宿主細胞の形質転換を可能とする選択マーカー（例えば、E. coliのアンピシリン耐性遺伝子およびS. cerevisiaeのTRP1遺伝子）および下流の構造配列の転写を指示する高発現遺伝子由来のプロモーターを含有する。このようなプロモーターは、特に解糖酵素（例えば、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)）、因子、酸ホスファターゼ、または熱ショックタンパク質などをコードするオペロンに由来し得る。異種構造配列は、翻訳開始配列および翻訳終結配列、ならびに好ましくは翻訳されたタンパク質の細胞周辺腔または細胞外培地への分泌を指示し得るリーダー配列と適切な相内で組立てられる。必要に応じて、異種配列は、所望の特徴を与えるN末端同定ペプチド（例えば、発現された組換え産物の安定化または簡略化された精製）を含む融合タンパク質をコードし得る。

40

50

## 【0239】

細菌での使用に有用な発現ベクターは、所望のタンパク質をコードする構造DNA配列を、適切な翻訳開始シグナルおよび翻訳終結シグナルと共に、機能的なプロモーターと作動可能な読み取り相で挿入することにより構築される。ベクターは、ベクターの維持を確実にし、そして所望により宿主内での増幅を提供するために1つ以上の表現型選択マーカー、および複製起点を含有する。形質転換のために適切な原核生物宿主は、*E. coli*、*Bacillus subtilis*、*Salmonella typhimurium*、および*Pseudomonas*属、*Streptomyces*属、および*Staphylococcus*属内の種々の種を包含するが、他の種もまた選択対象に用いられ得る。

10

## 【0240】

代表的な、しかし限定しない例として、細菌での使用に有用な発現ベクターは、周知のクローニングベクターpBR322 (ATCC 37017)の遺伝的エレメントを含む市販のプラスミドに由来する選択マーカーおよび細菌性の複製起点を含有し得る。そのような市販のベクターは、例えば、pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)およびGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, USA)を包含する。これらのpBR322「骨格」部分は、適切なプロモーターおよび発現されるべき構造配列と組み合わせられる。

## 【0241】

適切な宿主株の形質転換および適切な細胞密度への宿主株の増殖に続いて、選択されたプロモーターは適切な手段(例えば、温度シフトまたは化学的誘導)により抑制解除され、そして細胞はさらなる期間培養される。

20

## 【0242】

細胞は、代表的には遠心分離により回収され、物理的手段または化学的手段により破碎され、そして得られた粗抽出物はさらなる精製のために保持される。

## 【0243】

タンパク質の発現において用いられる微生物細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破碎、または細胞溶解剤の使用を包含する任意の便利な方法により破碎され得、そのような方法は、当業者に周知である。

## 【0244】

種々の哺乳動物細胞の培養系もまた、組換えタンパク質を発現するために用いられ得る。哺乳動物発現系の例は、Gluzman, Cell 23:175 (1981)に記載されたサル腎臓線維芽細胞のCOS-7株、および適合性のベクターを発現し得る他の細胞株(例えば、C127、3T3、CHO、HeLa、およびBHK細胞株)を包含する。哺乳動物発現ベクターは、複製起点、適切なプロモーターおよびエンハンサーを含み、そして任意の必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位およびスプライサクセプター部位、転写終結配列、および5'隣接非転写配列をも含む。SV40ウイルスゲノムに由来するDNA配列(例えば、SV40起源、早期プロモーター、エンハンサー、スプライスおよびポリアデニル化部位)は、必要な非転写遺伝エレメントを提供するために使用され得る。

30

40

## 【0245】

本明細書中で議論されるベクター構築物を含む宿主細胞を包含することに加えて、本発明はまた、内因性遺伝物質(例えば、VEGF-2配列)を欠失もしくは置換するように、ならびに/または本発明のVEGF-2配列に作動可能に結合され、そして内因性VEGF-2ポリヌクレオチドを活性化し、変更し、および/もしくは増幅する遺伝物質(例えば、異種プロモーター)を含むように操作されている初代の、二代目の、および不死化された、脊椎動物起源(特に、哺乳動物起源)の宿主細胞を含む。例えば、当該分野で公知の技術を使用して、異種制御領域および内因性ポリヌクレオチド配列(例えば、VEGF-2をコードする)を相同組換えを介して作動可能に結合し得る(例えば、1997年6月24日に発行された、米国特許第5,641,670号;1996年9月26日に公

50

開された、国際公開番号WO96/29411; 1994年8月4日に公開された、国際公開番号WO94/12650; Kollerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932~8935(1989); およびZijlstraら、Nature 342:435~438(1989)を参照のこと(これらの開示の各々は、これら全体が参考として援用される)。

【0246】

宿主細胞は、哺乳動物細胞(例えば、ヒト由来細胞)のような高等真核生物細胞、もしくは下等真核生物細胞(例えば、酵母細胞)であり得るか、または宿主細胞は原核生物細胞(例えば、細菌細胞)であり得る。挿入された遺伝子配列の発現を調節するか、または所望される特定の様式において遺伝子産物を改変およびプロセッシングする宿主株を選択し得る。特定のプロモーターからの発現は、特定の誘発因子の存在下で増大され得る; 従って、遺伝子操作されたポリペプチドの発現が、制御され得る。さらに、異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳時および翻訳後のプロセッシングおよび改変(例えば、グリコシル化、リン酸化、切断)の、特徴および特定の機構を有する。適切な細胞株は、発現されるタンパク質の、所望の改変およびプロセッシングを保証するために選択され得る。

10

【0247】

ポリペプチドは、以前に使用された方法によって、組換え細胞培養物から回収および精製され得る。これらの方法は、硫酸アンモニウム沈澱またはエタノール沈澱、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーを包含する。低濃度(約0.1~5mM)のカルシウムイオンが、精製の間が存在することが好ましい(Priceら、J. Biol. Chem. 244:917(1969))。必要に応じて、タンパク質の再折りたたみ(refolding)工程が、成熟タンパク質を完全な立体配置とするために使用され得る。最終的に、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が、最終的な精製工程に用いられ得る。

20

【0248】

本発明のポリペプチドは、天然から精製された産物もしくは化学合成手順の産物であり得るか、または原核生物宿主もしくは真核生物宿主(例えば、培養中の細菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞によって)から組換え技術により産生され得る。組換え産生手順に用いられる宿主に依存して、本発明のポリペプチドは、哺乳動物または他の真核生物の炭水化物でグリコシル化されてもよいし、あるいはグリコシル化されなくてもよい。本発明のポリペプチドはまた、開始メチオニンアミノ酸残基を含み得る。

30

【0249】

さらに、本発明のポリペプチドは、当該分野で公知の技術を使用して、化学的に合成され得る(例えば、Creighton、1983、Proteins: Structures and Molecular Principles、W. H. Freeman & Co.、N. Y.、およびHunkapiller、M.ら、1984、Nature 310:105~111を参照のこと)。例えば、本発明のVEGF-2ポリペプチドのフラグメントに対応するペプチドは、ペプチド合成機の使用によって合成され得る。さらに、所望であれば、非古典的アミノ酸または化学的アミノ酸アナログは、VEGF-2ポリヌクレオチド配列への置換または付加として導入され得る。非古典的アミノ酸としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: 一般的なアミノ酸のD異性体、2,4-ジアミノ酪酸、 $\alpha$ -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、g-Abu、e-Ahx、6-アミノヘキサ酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、b-アラニン、フルオロアミノ酸、設計された(designer)アミノ酸(例えば、b-メチルアミノ酸、Ca-メチ

40

50



ルアミノ酸、Na-メチルアミノ酸)、ならびに一般的なアミノ酸アナログ。さらに、アミノ酸は、D(右旋性)またはL(左旋性)であり得る。

【0250】

本発明は、翻訳の間、または翻訳後に差次的に改変(例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解性の切断、抗体分子または他の細胞性リガンドへの結合などによって)されたVEGF-2ポリペプチドを包含する。任意の多くの化学的改変は、以下を含むがこれらに限定されない公知の技術によって実行され得る:臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、 $\text{NaBH}_4$ による特異的な化学的切断;アセチル化、ホルミル化、酸化、還元;ツニカマイシンの存在下での代謝合成;など。

10

【0251】

本発明に包含されるさらなる翻訳後改変としては、例えば、N結合型炭水化物鎖またはO結合型炭水化物鎖、N末端またはC末端のプロセッシング、アミノ酸骨格に対する化学的部分の付着、N結合型炭水化物鎖またはO結合型炭水化物鎖の化学的改変、および原核生物宿主細胞発現の結果としてのN末端メチオニン残基の付加または欠失が挙げられる。ポリペプチドはまた、タンパク質の検出および単離を可能にするために、酵素標識、蛍光標識、同位体標識またはアフィニティー標識のような検出可能な標識で改変され得る。

【0252】

本発明によってはまた、VEGF-2の化学的に改変された誘導体が提供される。これは、ポリペプチドの可溶性、安定性、および循環時間の増加、または免疫原性の減少のようなさらなる利点を提供し得る(米国特許第4,179,337号を参照のこと)。誘導体化のための化学的部分は、ポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールなどのような水溶性ポリマーから選択され得る。このポリペプチドは、分子内の無作為な位置で改変されてもよいし、または分子内の予め決定された位置で改変されてもよいし、そして1つ、2つ、3つ以上の付着された化学的部分を含んでもよい。

20

【0253】

このポリマーは、任意の分子量であり得、そして分岐していてもよいし、または分岐していなくてもよい。ポリエチレングリコールに関して、操作および製造の容易さのために、好ましい分子量は、約1kDaと約100kDaとの間である(用語「約」は、ポリエチレングリコールの調製物において、いくつかの分子が言及された分子量よりも大きく、いくつかは小さいことを示す)。他のサイズは、所望の治療的プロフィール(例えば、所望される徐放性の持続時間、(もしあるとすれば、生物学的活性に対する)効果、操作の容易性、抗原性の程度または欠損、および治療的タンパク質またはアナログに対するポリエチレングリコールの他の公知の効果)に依存して使用され得る。

30

【0254】

ポリエチレングリコール分子(または他の化学的部分)は、タンパク質の機能性もしくは抗原性ドメインに対する効果を考慮して、このタンパク質に付着されるべきである。当業者に利用可能な多くの付着方法が存在する(例えば、本明細書中で参考として援用される、EP 0 401 384(PEGのG-CSFへの結合)、また、Malikら、Exp.Hematol.20:1028~1035(1992)(トレスルクロリド(tresyl chloride)を使用するGM-CSFのペグ化(pegylation)を報告している)を参照のこと)。例えば、ポリエチレングリコールは、反応性基(例えば、遊離のアミノ基またはカルボキシル基)を介して、アミノ酸残基を通じて共有結合され得る。反応性基は、活性化されたポリエチレングリコール分子が結合され得る基である。遊離のアミノ基を有するアミノ酸残基としては、リジン残基およびN末端アミノ酸残基が挙げられ得る;遊離のカルボキシル基を有するアミノ酸残基としては、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、およびC末端アミノ酸残基が挙げられ得る。スルフヒドリル基はまた、ポリエチレングリコール分子を付着させるための反応性基として使用され得る。治療目的について好ましいのは、N末端またはリジン基での付着のような、アミノ

40

50

基での付着である。

【0255】

N末端で化学的に改変されるタンパク質を、特に所望し得る。本発明の組成物の例示としてポリエチレングリコールを用いて、種々のポリエチレングリコール分子（分子量、分岐などによる）から、反応混合物中のタンパク質（またはペプチド）分子に対するポリエチレングリコール分子の割合、実行されるべきペグ化反応の型、および選択されるN末端がペグ化されたタンパク質を得る方法を選択し得る。N末端がペグ化された調製物を得る（すなわち、必要であれば、他のモノペグ化（monopeglylated）された部分からこの部分を分離する）方法は、ペグ化されたタンパク質分子の集団からN末端がペグ化された物質を精製することにより得る。N末端の改変において化学的に改変される選択的タンパク質は、特定のタンパク質の誘導体化に利用可能な異なる型の一級アミノ基（N末端に対するリジン）の差示的な反応性を利用する、還元性のアルキル化によって達成され得る。適切な反応条件下において、カルボニル基を含むポリマーを用いるN末端でのタンパク質の実質的に選択的な誘導体化が、達成される。

10

【0256】

本発明のVEGF-2ポリペプチドは、単量体または多量体（すなわち、二量体、三量体、四量体、およびより高次の多量体）であり得る。従って、本発明は、本発明のVEGF-2ポリペプチドの単量体および多量体、これらの調製、およびこれらを含む組成物（好ましくは、薬学的組成物）に関する。特定の実施形態において、本発明のポリペプチドは、単量体、二量体、三量体、または四量体である。さらなる実施形態において、本発明の多量体は、少なくとも二量体、少なくとも三量体、または少なくとも四量体である。

20

【0257】

本発明によって含まれる多量体は、ホモマーまたはヘテロマーであり得る。本明細書中で使用される場合、用語、ホモマーは、本発明のVEGF-2ポリペプチドのみを含む多量体をいう（本明細書中に記載されるような、VEGF-2フラグメント、改変体、スプライス改変体、および融合タンパク質を含む）。これらのホモマーは、同一の、または異なるアミノ酸配列を有するVEGF-2ポリペプチドを含み得る。特定の実施形態において、本発明のホモマーは、同一のアミノ酸配列を有するVEGF-2ポリペプチドのみを含む多量体である。別の特定の実施形態において、本発明のホモマーは、異なるアミノ酸配列を有するVEGF-2ポリペプチドを含む多量体である。特定の実施形態において、本発明の多量体は、ホモ二量体（例えば、同一の、または異なるアミノ酸配列を有するVEGF-2ポリペプチドを含む）、またはホモ三量体（例えば、同一の、および/または異なるアミノ酸配列を有するVEGF-2ポリペプチドを含む）である。さらなる実施形態において、本発明のホモマーの多量体は、少なくともホモ二量体、少なくともホモ三量体、または少なくともホモ四量体である。

30

【0258】

本明細書中で使用される場合、用語、ヘテロマーは、本発明のVEGF-2ポリペプチドに加えて、1つ以上の異種ポリペプチド（すなわち、異なるタンパク質のポリペプチド）を含む多量体をいう。特定の実施形態において、本発明の多量体は、ヘテロ二量体、ヘテロ三量体、またはヘテロ四量体である。さらなる実施形態において、本発明のホモマーの多量体は、少なくともホモ二量体、少なくともホモ三量体、または少なくともホモ四量体である。

40

【0259】

本発明の多量体は、疎水性、親水性、イオン性、および/もしくは共有結合性の会合の結果であり得、そして/または、例えば、リボソーム形成によって間接的に連結され得る。従って、1つの実施形態において、例えばホモ二量体またはホモ三量体のような本発明の多量体は、本発明のポリペプチドが溶液中で互いに接触する場合に形成される。別の実施形態において、例えばヘテロ三量体またはヘテロ四量体のような本発明のヘテロ多量体は、本発明のポリペプチドが、溶液中で本発明のポリペプチドに対する抗体（本発明の融合タンパク質における異種ポリペプチド配列に対する抗体を含む）と接触する場合に形成

50

される。他の実施形態において、本発明の多量体は、本発明の V E G F - 2 ポリペプチドとの共有結合的会合、および/または V E G F - 2 ポリペプチド間の共有結合的会合によって形成される。このような共有結合的会合は、(例えば、配列番号 2 に示される、または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドに含まれる)ポリペプチド配列に含まれる 1 つ以上のアミノ酸残基を含み得る。1 つの例において、この共有結合的な会合は、ネイティブ(すなわち、天然に存在する)ポリペプチド中で相互作用するポリペプチド配列内に位置するシステイン残基間の架橋である。別の例において、この共有結合的な会合は、化学的、または組換え的操作の結果である。あるいは、このような共有結合的な会合は、V E G F - 2 融合タンパク質中の異種ポリペプチド配列に含まれる 1 つ以上のアミノ酸残基を含み得る。1 つの例において、共有結合的な会合は、本発明の融合タンパク質に含まれる異種配列間にある(例えば、米国特許第 5, 478, 925 号を参照のこと)。特定の例において、この共有結合的な会合は、本発明の V E G F - 2 - Fc 融合タンパク質に含まれる異種配列間にある(本明細書中に記載される通り)。別の特定の例において、本発明の融合タンパク質の共有結合的な会合は、共有結合的に会合する多量体を形成し得る別の T N F ファミリーリガンド/レセプターメンバーなど(例えば、オセテオプロテゲリン(*o s e t e o p r o t e g e r i n*))(例えば、国際公開番号 W O 98 / 49305 を参照のこと。この内容は、その全体が、本明細書中に参考として援用される))からの異種ポリペプチド配列間にある。

#### 【0260】

本発明の多量体は、当該分野で公知の化学的技術を使用して生成され得る。例えば、本発明の多量体に含まれることが所望されるポリペプチドは、当該分野で公知のリンカー分子およびリンカー分子長の最適化技術を使用して、化学的に架橋され得る(例えば、米国特許第 5, 478, 925 号(これは、その全体が、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。さらに、本発明の多量体は、この多量体に含まれることが所望されるポリペプチドの配列内に位置するシステイン残基間での 1 つ以上の分子間架橋を形成するために、当該分野で公知の技術を使用して生成され得る(例えば、米国特許第 5, 478, 925 号(これは、その全体が、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。さらに、本発明のポリペプチドは、このポリペプチドの C 末端または N 末端に対して、システインまたはピオチンを付加することによって慣用的に改変され得、そして当該分野で公知の技術を適用して、1 つ以上のこれらの改変されたポリペプチドを含む多量体を生成し得る(例えば、米国特許第 5, 478, 925 号(これは、その全体が、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。さらに、当該分野で公知の技術を適用して、本発明の多量体に含まれることが所望されるポリペプチド成分を含むリボソームを生成し得る(例えば、米国特許第 5, 478, 925 号(これは、その全体が、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。

#### 【0261】

あるいは、本発明の多量体は、当該分野で公知の遺伝子操作技術を使用して生成され得る。1 つの実施形態において、本発明の多量体に含まれるポリペプチドは、本明細書中に記載されるか、またはさもなくば当該分野で公知の融合タンパク質技術を使用して、組換え的に生産される(例えば、米国特許第 5, 478, 925 号(これは、その全体が、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。特定の実施形態において、本発明のホモ二量体をコードするポリヌクレオチドは、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を、リンカーポリペプチドをコードする配列に、次いで、さらに本来の C 末端から N 末端という逆方向で(リーダー配列を含まない)ポリペプチドの翻訳産物をコードする合成ポリヌクレオチドに連結することによって生成される(例えば、米国特許第 5, 478, 925 号(これは、その全体が、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。別の実施形態において、本明細書中に記載されるか、またはさもなくば当該分野で公知の組換え技術を適用して、膜貫通ドメイン(または疎水性もしくはシグナルペプチド)を含み、かつ膜再構築技術によってリボソームへ取り込まれ得る、本発明の組換えポリペプチドを生成する(例えば、米国特許第 5, 478, 925 号(これは、その全

10

20

30

40

50

体が、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。

【0262】

(治療的使用)

本発明のVEGF-2ポリペプチドは、血管内皮細胞およびリンパ内皮細胞についての強力なマイトジェンである。図12および13において示されるように、配列番号2のVEGF-2のポリペプチド(最初の46アミノ酸を差し引く)は、血管内皮細胞についての強力なマイトジェンであり、そしてそれらの成長および増殖を刺激する。このポリペプチドをコードするVEGF-2核酸配列について実施されたノーザンブロット分析の結果(ここでは、いくつかのヒト組織由来の20mgのRNAを<sup>32</sup>P-VEGF-2でプローブした)は、このタンパク質が心臓および肺において活性に発現されることを例示する。これはマイトジェン活性のさらなる証拠である。

10

【0263】

VEGF-2アゴニスト抗体(これはVEGF-2の活性を増強する)は、血管形成を促進することによって、血管外傷を処置するために用いられ得る。例えば、冠状動脈バイパス手術が実施される移植組織の成長を刺激である。VEGF-2アゴニスト抗体はまた、創傷治癒を促進するため、特に、損傷した組織を再血管新生するか、または虚血の間および新しい毛細血管形成が所望される場合に側副枝の血流を刺激するために、用いられ得る。このような抗体は、全層性創傷(例えば、皮膚潰瘍(褥瘡、静脈潰瘍、および糖尿病性潰瘍を含む))を処置するために用いられ得る。さらに、VEGF-2アゴニスト抗体は、皮膚移植片および皮膚弁が熱傷または損傷を修復するために用いられる場合の全層性熱傷および損傷を処置するために用いられ得る。さらに、本発明のVEGF-2アゴニスト抗体は、形成外科、例えば、裂傷、熱傷または他の外傷の回復のために、用いられ得る。本発明のVEGF-2アゴニスト抗体はまた、眼に対する創傷および損傷の治癒を促進するため、および眼疾患を処置するために使用され得る。

20

【0264】

これらの同じ方向に沿って、アゴニスト抗体はまた、損傷した骨、歯周組織または靭帯組織の増殖を誘導するために使用され得る。このようなVEGF-2アゴニスト抗体はまた、例えば、歯周病または外傷により損傷した歯の支持組織(セメント質および歯周靭帯を含む)を再生するために用いられ得る。

【0265】

新脈管形成は、創傷を清潔にかつ感染しないまま保つことが重要であるので、VEGF-2この活性を増大するアゴニスト抗体は、外科手術と組み合わせて、そして切開術および切除の修復の後に用いられ得る。これらのVEGF-2抗体はまた、感染の危険性の高い異常な創傷の処置のために用いられ得る。

30

【0266】

VEGF-2アゴニスト抗体は、血管移植手術における内皮形成の促進のために用いられ得る。移植材料または合成材料のいずれかを使用する血管移植片の場合、これらの抗体は、血管内皮細胞の増殖を促進するために、移植片の表面にかまたは接合部に適用され得る。VEGF-2のアゴニストとして作用する抗体は、心筋梗塞の結果としての心筋組織の損傷を修復するために用いられ得、そしてまた、虚血後の心血管系を修復するために用いられ得る。VEGF-2アゴニスト抗体はまた、冠状動脈疾患、ならびに末梢血管疾患およびCNS血管疾患の結果としての損傷血管組織を処置するために用いられ得る。

40

【0267】

VEGF-2アゴニスト抗体はまた、移植材料の拒絶を最小限にするため、および移植材料の血管形成を刺激するために身体内に移植される人工プロテーゼまたは天然器官を被覆するために用いられ得る。

【0268】

VEGF-2のアゴニスト抗体はまた、例えば、動脈硬化の間に生じる損傷の血管組織修復のために用いられ得、そして血管組織が損傷している場合には、バルーン血管形成の後に必要とされる。

50

## 【 0 2 6 9 】

V E G F - 2 アゴニスト抗体はまた、末梢動脈疾患を処置するために用いられ得る。従って、さらなる局面において、末梢動脈血管を処置するために V E G F - 2 アゴニスト抗体を使用するためのプロセスが提供される。好ましくは、V E G F - 2 アゴニスト抗体は、末梢動脈疾患を軽減または処置するために、個体に投与される。適切な用量、処方物および投与経路は、以下に記載される。

## 【 0 2 7 0 】

V E G F - 2 アゴニスト抗体は、リンパ組織またはリンパ管の内皮機能を促進し得、例えば、リンパ管の損失およびリンパ管の閉塞を処置する。V E G F - 2 のアゴニスト抗体はまた、リンパ球産生を刺激するために用いられ得る。アンタゴニスト V E G F - 2 抗体は、リンパ管腫を処置するために用いられ得る。

10

## 【 0 2 7 1 】

アゴニスト抗体はまた、新生児における血管腫を処置するために使用され得る。従って、さらなる局面において、新生児における血管腫を処置するために V E G F - 2 抗体を使用するためのプロセスが提供される。好ましくは、抗体は、新生児における血管腫を軽減または処置するために、個体に投与される。適切な用量、処方物および投与経路は、以下に記載される。

## 【 0 2 7 2 】

V E G F - 2 アゴニスト抗体はまた、早産新生児における異常な網膜発生を予防または処置するために使用され得る。従って、さらなる局面において、早産新生児における異常な網膜発生を処置するために V E G F - 2 抗体を使用するためのプロセスが提供される。好ましくは、V E G F - 2 抗体は、早産新生児における異常な網膜発生を軽減または処置するために、個体に投与される。適切な用量、処方物および投与経路は、以下に記載される。

20

## 【 0 2 7 3 】

V E G F - 2 アゴニスト抗体は、原発性（突発性）リンパ水腫（ミルロイ病および早発性リンパ水腫を含む）を処置するために使用され得る。好ましくは、V E G F - 2 抗体は、原発性（突発性）リンパ水腫（ミルロイ病および早発性リンパ水腫を含む）を軽減または処置するために、個体に投与される。V E G F - 2 抗体はまた、水腫を処置するため、および動物において血圧に作用するために使用され得る。適切な用量、処方物および投与経路は、以下に記載される。

30

## 【 0 2 7 4 】

V E G F - 2 アゴニスト抗体はまた、( i ) リンパ節およびリンパ管の除去、( i i ) 癌の処置における放射線治療および手術、ならびに( i i i ) 外傷および感染から生じるものを含む二次的（閉塞性）リンパ水腫を処置するために使用され得る。好ましくは、V E G F - 2 抗体は、( i ) リンパ節およびリンパ管の除去、( i i ) 癌の処置における放射線治療および手術、ならびに( i i i ) 外傷および感染から生じるものを含む二次的（閉塞性）リンパ水腫の目的のために、個体に投与される。適切な用量、処方物および投与経路は、以下に記載される。

## 【 0 2 7 5 】

V E G F - 2 アゴニスト抗体はまた、カポジ肉腫を処置するために使用され得る。好ましくは、V E G F - 2 抗体は、カポジ肉腫を軽減または処置するために、個体に投与される。適切な用量、処方物および投与経路は、以下に記載される。

40

## 【 0 2 7 6 】

V E G F - 2 抗体は、癌および腫瘍増殖を支援するのに必要な脈管形成を阻害することによって、癌を処置するために使用され得る。

## 【 0 2 7 7 】

( 心臓血管障害 )

本発明者らは、V E G F - 2 が、血管内皮細胞の増殖を刺激し、内皮細胞移動を刺激し、C A M アッセイにおいて脈管形成を刺激し、突発性高血圧ラットにおいて血圧を下げ、

50

そしてウサギにおける虚血性四肢への血流を増加することを示した。従って、VEGF-2の活性を高めるアゴニスト抗体は、心臓血管障害（四肢虚血のような末梢動脈疾患を含む）を処置するために使用され得る。

【0278】

心臓血管障害としては、動脈動脈瘻（arterio-arterial fistula）、動静脈瘻、大脳動静脈先天異常、先天性心欠陥（congenital heart defects）、肺動脈弁閉鎖症、およびシミター症候群のような心臓血管異常が挙げられる。先天性心欠陥としては、大動脈縮窄、三房心、冠状脈管奇形（coronary vessel anomalies）、交差心、右胸心、開存性動脈管（patent ductus arteriosus）、エプスタイン奇形、アイゼンメンガー複合体、左心室發育不全症候群、左胸心、ファロー四徴症、大血管転位症、両大血管右室起始症、三尖弁閉鎖症、動脈管遺残、および心中隔欠損症（heart septal defects）（例えば、大動脈肺動脈中隔欠損症（aortopulmonary septal defect）、心臓内突起欠損症、リュタンバッシュエ症候群、ファロー三徴症、心室心中隔欠損症（ventricular heart septal defects））が挙げられる。

10

【0279】

心臓血管障害としてはまた、不整脈、カルチノイド心臓病、高心拍出量（high cardiac output）、低心拍出量（low cardiac output）、心タンポナーデ、心内膜炎（細菌性を含む）、心臓動脈瘤、心停止、うっ血性心不全、うっ血性心筋症、発作性呼吸困難、心臓水腫、心肥大、うっ血性心筋症、左心室肥大、右心室肥大、梗塞後心破裂（post-infarction heart rupture）、心室中隔破裂、心臓弁疾患、心筋疾患、心筋虚血、心内膜液浸出、心外膜炎（梗塞性および結核性を含む）、気心膜症、心膜切開後症候群、右心疾患、リウマチ性心疾患、心室機能不全、充血、心臓血管妊娠合併症（cardiovascular pregnancy complications）、シミター症候群、心血管梅毒、および心血管結核（cardiovascular tuberculosis）のような心臓病が挙げられる。

20

【0280】

不整脈としては、洞性不整脈、心房性細動、心房粗動、徐脈、期外収縮、アダムズ-ストークス症候群、脚ブロック、洞房ブロック、長QT症候群（long QT syndrome）、副収縮、ローン-ギャノング-レヴァイン症候群、マヘーム型早期興奮症候群（Mahaim-type pre-excitation syndrome）、ウルフ-パーキンソン-ホワイト症候群、洞不全症候群、頻拍、および心室性細動が挙げられる。頻拍としては、発作性頻拍、上室性頻拍、心室固有調律促進、房室結節性再入頻拍（atrioventricular nodal reentry tachycardia）、異所心房性頻拍、異所接合部頻拍、洞房結節性再入頻拍（sinoatrial nodal reentry tachycardia）、洞性頻拍、トルサード・ポワント、および心室性頻拍が挙げられる。

30

【0281】

心臓弁疾患としては、大動脈弁機能不全症、大動脈弁狭窄症、心雑音（heart murmurs）、大動脈弁逸脱症、僧帽弁逸脱症、三尖弁逸脱症、僧帽弁機能不全、僧帽弁狭窄症、肺動脈弁閉鎖症、肺動脈弁機能不全、肺動脈弁狭窄症、三尖閉鎖症、三尖弁機能不全、および三尖弁狭窄症が挙げられる。

40

【0282】

心筋疾患としては、アルコール性心筋症、うっ血性心筋症、肥大型心筋症、弁下部性大動脈狭搾症、弁下部性肺動脈狭搾症、拘束型心筋症、シャーガス心筋症、心内膜線維弾性症、心内膜心筋線維症、キーンズ症候群、心筋再灌流障害、および心筋炎が挙げられる。

【0283】

心筋性虚血としては、狭心症、冠動脈瘤、冠動脈硬化、冠動脈血栓症、冠動脈血管痙攣

50

、心筋梗塞、および心筋気絶 (myocardial stunning) のような冠動脈疾患が挙げられる。

【0284】

心臓血管疾患としてはまた、動脈瘤、血管形成異常、血管腫症、細菌性血管腫症状、ヒッペル-リンダウ疾患、クリベル-トルノー-ウェーバー症候群、スタージ-ウェーバー症候群、血管運動神経性水腫、大動脈疾患、高安動脈炎、大動脈炎、ルリーシュ症候群、動脈閉塞疾患、動脈炎、動脈内膜炎 (enarteritis)、結節性多発性動脈炎、脳血管障害、糖尿病性血管障害、糖尿病性網膜症、塞栓症、血栓症、先端紅痛症、痔、肝静脈閉塞障害、高血圧、低血圧、虚血、末梢血管疾患、静脈炎、肺静脈閉塞疾患、レーノー病、CREST症候群、網膜静脈閉塞、シミター症候群、上大静脈症候群、毛細血管拡張症、毛細血管拡張性運動失調 (ataxia telangiectasia)、遺伝性出血性毛細管拡張症、精索静脈瘤、拡張蛇行静脈、静脈瘤性潰瘍、脈管炎、および静脈機能不全のような血管疾患が挙げられる。

10

【0285】

動脈瘤としては、解離性動脈瘤、偽動脈瘤、感染した動脈瘤、破裂した動脈瘤、大動脈性動脈瘤、大脳性動脈瘤、冠動脈瘤、心動脈瘤、および腸骨性動脈瘤が挙げられる。

【0286】

動脈閉塞疾患としては、動脈硬化症、間欠性跛行、頸動脈狭窄症、線維筋性形成異常、腸間膜性血管閉塞、モヤモヤ病、腎動脈閉塞、網膜動脈閉塞、および閉塞性血栓性血管炎が挙げられる。

20

【0287】

脳血管障害としては、頸動脈疾患、脳のアミロイドアンギオパチー、大脳動脈瘤、大脳無酸素症、大脳動脈硬化、大脳動静脈先天異常、大脳動脈疾患、大脳の塞栓症および血栓症、頸動脈血栓症、洞血栓症、ヴァレンベルク症候群、大脳出血、硬膜上血腫、硬膜下血腫、クモ膜下出血 (subarachnoid hemorrhage)、大脳梗塞、大脳虚血 (一過性を含む)、鎖骨下動脈盗血症候群、室周白軟化症 (periventricular leukomalacia)、血管性頭痛、群発性頭痛、片頭痛、および椎骨基部 (vertebrobasilar) 機能不全が挙げられる。

【0288】

塞栓症としては、空気塞栓症、羊水塞栓症、コレステロール塞栓症、爪先チアノーゼ症候群、脂肪塞栓症、肺動脈塞栓症、および血栓塞栓症が挙げられる。血栓症としては、冠状動脈血栓症、肝静脈血栓症、網膜静脈閉塞、頸動脈血栓症、洞血栓症、ヴァレンベルク症候群、および血栓性静脈炎が挙げられる。

30

【0289】

虚血としては、大脳虚血、虚血性大腸炎、仕切り症候群 (compartment syndrome)、前仕切り症候群 (anterior compartment syndrome)、心筋虚血、再灌流傷害、および末梢四肢虚血が挙げられる。脈管炎としては、大動脈炎、動脈炎、ベーチェット (Behcet) 症候群、チャージ-ストラウス症候群、粘膜皮膚リンパ節症候群、閉塞性血栓性血管炎、過敏性血管炎、シェーンライン-ヘーノホ紫斑病 (Schoenlein-Henoch purpura)、アレルギー性皮膚血管炎およびヴェーゲナー肉芽腫症が挙げられる。

40

【0290】

VEGF-2の活性を増大するVEGF-2抗体は、重症の四肢虚血および冠状動脈疾患の処置のために特に有効である。実施例18に示されるように、実験的に誘導された虚血ウサギの後脚へのVEGF-2ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの投与は、血圧比、血流、血管造影的スコアおよび毛細血管密度を回復した。

【0291】

抗体は、当該分野で公知である任意の方法を使用して投与され得、これらの方法としては、送達部位における直接的針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、微粒子銃 (biolistic) 注射、粒子加速器、ゲルフォームスポンジデポ、他の市販デポ

50

ー物質、浸透圧ポンプ、経口または坐剤の固形薬学的処方物、手術中のデカンティングまたは局所適用、エアロゾル送達が挙げられるが、これらに限定されない。そのような方法は当該分野で公知である。VEGF-2抗体は、下記でより詳細に記載される、薬学的組成物の一部として投与され得る。VEGF-2抗体を送達する方法は本明細書中でより詳細に記載される。

#### 【0292】

(遺伝子治療方法)

本発明の別の局面は、障害、疾患、および状態を処置するための遺伝子治療方法に関する。この遺伝子治療法は、本発明のVEGF-2ポリペプチドの発現を達成するために、核酸(DNA、RNA、およびアンチセンスDNAまたはRNA)配列を動物へ導入することに関する。この方法は、プロモーター、および標的組織によるこのVEGF-2ポリペプチドの発現のために必要な任意の他の遺伝的エレメントに作動可能に連結された、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを必要とする。このような遺伝子治療および送達の技術は、当該分野で公知であり、例えば、本明細書中に参考として援用されるWO90/11092を参照のこと。

#### 【0293】

従って、例えば、患者由来の細胞は、エキソビポでVEGF-2ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含むポリヌクレオチド(DNAまたはRNA)を用いて操作され得、この操作された細胞は次いで、このポリペプチドで処置されるべき患者に提供される。このような方法は、当該分野で周知である。例えば、Belldegrun, A.ら, J. Natl. Cancer Inst., 85:207-216(1993); Ferrantini, M.ら, Cancer Research, 53:1107-1112(1993); Ferrantini, M.ら, J. Immunology 153:4604-4615(1994); Kaido, T.ら, Int. J. Cancer 60:221-229(1995); Ogura, H.ら, Cancer Research 50:5102-5106(1990); Santodonato, L.ら, Human Gene Therapy 7:1-10(1996); Santodonato, L.ら, Gene Therapy 4:1246-1255(1997); および Zhang, J.-F.ら, Cancer Gene Therapy 3:31-38(1996)を参照のこと。これらの文献は、本明細書中に参考として援用される。1つの実施形態では、操作される細胞は、動脈細胞である。この動脈細胞は、動脈、動脈周囲の組織への直接注射によって、またはカテーテル注射によって患者に再度導入される。

#### 【0294】

以下でより詳細に考察するように、このVEGF-2ポリヌクレオチド構築物は、注射可能な物質を動物の細胞へ送達する任意の方法(例えば、組織(心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓など)の間隙空間への注射)によって送達され得る。このVEGF-2ポリヌクレオチド構築物は、薬学的に受容可能な液体または水性キャリアにて送達され得る。

#### 【0295】

1つの実施形態では、VEGF-2ポリヌクレオチドは、裸のポリヌクレオチドとして送達される。用語「裸の」ポリヌクレオチド、DNAまたはRNAは、細胞への侵入を補助、促進または容易にするように作用するいかなる送達ビヒクル(ウイルス配列、ウイルス粒子、リボソーム処方物、リポフェクチン、または沈殿剤などを含む)も含まない配列をいう。しかし、本発明のVEGF-2ポリヌクレオチドはまた、リボソーム処方物中で送達され得、そしてリポフェクチン処方物などは、当業者に周知の方法によって調製され得る。このような方法は、例えば、本明細書中に参考として援用される、米国特許第5,593,972号、同第5,589,466号および同第5,580,859号に記載される。

#### 【0296】

遺伝子治療方法において使用されるVEGF-2ポリヌクレオチドベクター構築物は好



ましくは、宿主ゲノムに組み込まれず、複製を可能にする配列を含まない、構築物である。適切なベクターとしては、Stratageneから入手可能なpWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG; Pharmaciaから入手可能なpSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL;ならびにInvitrogenから入手可能なpEF1/V5、pcDNA3.1、およびpRc/CMV2が挙げられる。他の適切なベクターは、当業者に容易に明白である。

#### 【0297】

当業者に公知の任意の強力なプロモーターは、VEGF-2 DNAの発現を駆動するために用いられ得る。適切なプロモーターとしては、アデノウイルスプロモーター（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター）；または異種プロモーター（例えば、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター）；RSウイルス（RSV）プロモーター；誘導性プロモーター（例えば、MMTプロモーター、メタロチオネインプロモーター）；熱ショックプロモーター；アルブミンプロモーター；ApoAIプロモーター；ヒトグロビンプロモーター；ウイルスチミジンキナーゼプロモーター（例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター）；レトロウイルスLTR；b-アクチンプロモーター；およびヒト成長ホルモンプロモーターが挙げられる。このプロモーターはまた、VEGF-2についてネイティブなプロモーターであり得る。

#### 【0298】

他の遺伝子治療技術とは異なり、裸の核酸配列を標的細胞に導入する1つの主要な利点は、その細胞におけるポリヌクレオチド合成の一過性の性質である。研究によって、非複製DNA配列が細胞に導入されて、6ヶ月までの期間の間、所望のポリペプチドの産生を提供し得ることが示された。

#### 【0299】

VEGF-2ポリヌクレオチド構築物は、動物内の組織（筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺、および結合組織を包含する）の間隙空間に送達され得る。この組織の間隙空間は、器官組織の細網線維間の、細胞間の液体ムコ多糖類マトリクス、血管または室の壁における弾性線維、線維性組織のコラーゲン線維、あるいは筋肉細胞を外筒で覆っている接続組織内にまたは骨間隙中の同等のマトリクスを包含する。これは、同様に、循環の血漿およびリンパチャンネルのリンパ液により占められる空間である。筋肉組織の間隙空間への送達は、以下で議論される理由のために好ましい。本発明のポリヌクレオチド構築物は、これらの細胞を含む組織への注射によって、好都合に送達され得る。本発明のポリヌクレオチド構築物は、好ましくは、分化した持続性の非分裂細胞に送達され、そしてその細胞において発現されるが、送達および発現は、非分化細胞または完全には分化していない細胞（例えば、血液の幹細胞または皮膚線維芽細胞）において達成され得る。インビボでの筋肉細胞は、ポリヌクレオチドを取り込み、そして発現する能力において、特に適格である。

#### 【0300】

裸の核酸配列注射のために、DNAまたはRNAの有効投薬量は、約0.05mg/kg体重から約50mg/kg体重の範囲にある。好ましくは、この投薬量は、約0.005mg/kgから約20mg/kgであり、そしてより好ましくは約0.05mg/kgから約5mg/kgである。もちろん、当業者が認識するように、この投薬量は、注射の組織部位に応じて変化する。核酸配列の適切かつ有効な投薬量は、当業者によって容易に決定され得、そして処置される状態および投与経路に依存し得る。

#### 【0301】

好ましい投与経路は、組織の間隙空間への非経口注射経路による。しかし、他の非経口経路もまた用いられ得、これには、例えば、特に、肺または気管支の組織、咽喉または鼻の粘膜への送達のためのエアロゾル処方物の吸入が挙げられる。さらに、裸のVEGF-2 DNA構築物が、血管形成術の間にこの手順において用いられるカテーテルによって動脈に送達され得る。

## 【0302】

裸のポリヌクレオチドは、送達部位での直接の針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、およびいわゆる「遺伝子銃」を含むがこれらに限定されない、当該分野で公知の任意の方法によって送達される。これらの送達方法は、当該分野で公知である。

## 【0303】

実施例18により証明されるように、裸のVEGF-2配列のインビボ投与は、ウサギの大腿動脈におけるVEGF-2ポリペプチドの首尾良い発現を生じる。

## 【0304】

この構築物はまた、ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方物、リポフェクチン、沈殿剤などのような送達ビヒクルを用いて送達され得る。このような送達方法は、当該分野で公知である。

10

## 【0305】

特定の実施形態において、VEGF-2ポリヌクレオチド構築物は、リポソーム調製物中で複合体化している。本発明にて使用するためのリポソーム調製物は、カチオン性（正に荷電した）、アニオン性（負に荷電した）および中性の調製物を包含する。しかしながら、カチオン性リポソームとポリアニオン性核酸との間で強固な荷電複合体を形成し得るので、カチオン性リポソームが特に好ましい。カチオン性リポソームは、機能的形態において、プラスミドDNA（本明細書中で参考として援用される、Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84:7413~7416(1987)）；mRNA（本明細書中で参考として援用される、Maloneら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86:6077~6081(1989)）；および精製された転写因子（本明細書中で参考として援用される、Debsら、J. Biol. Chem.、265:10189~10192(1990)）の細胞内送達を媒介することが示されている。

20

## 【0306】

カチオン性リポソームは容易に入手可能である。例えば、N[1-2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリエチルアンモニウム(DOTMA)リポソームは特に有用であり、そして登録商標LipofectinのもとにGIBCO BRL, Grand Island, N.Y.（本明細書中で参考として援用される、Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84:7413~7416(1987)をもまた参照のこと、）より入手可能である。他の市販のリポソームとしては、トランスフェクテース(transfectace)(DDAB/DOPE)およびDOTAP/DOPE(Boehringer)が挙げられる。

30

## 【0307】

当該分野で周知の技術を使用して、他のカチオン性リポソームを、容易に入手可能な物質より調製し得る。DOTAP(1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン)リポソームの合成の記述に関して、例えばPCT公開第WO 90/11092号（本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。DOTMAリポソームの調製は文献にて説明されており、例えば、本明細書中で参考として援用される、P. Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84:7413~7417を参照のこと。類似した方法を使用して、他のカチオン性脂質物質よりリポソームを調製し得る。

40

## 【0308】

同様に、アニオン性リポソームおよび中性リポソームは、例えば、Avanti Polar Lipids(Birmingham, Ala.)から容易に入手可能であり、または容易に入手可能な物質を使用して簡単に調製され得る。そのような物質としてはとりわけ、ホスファチジルコリン、コレステロール、ホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)が挙げられる。これらの物質はまた、DOTMA出発物質およびDOTAP出発物質と適切な割合に

50

において混合され得る。これらの物質を使用してリポソームを生成する方法は、当該分野で周知である。

【0309】

例えば、商業的に、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、およびジオレオイルホスファチジエタノールアミン(DOPE)を種々の組み合わせにおいて使用し、コレステロールを添加してもしなくても、従来のリポソームを生成し得る。従って、例えば、超音波処理バイアル中への窒素ガス流下で、DOPGおよびDOPCの各50mgを乾燥することにより、DOPG/DOPC小胞を調製し得る。このサンプルを一晚真空ポンプ下に置き、そして次の日、脱イオン水で水和する。次いで、浴が、15ECで循環している間、最大設定にて、逆位カップ(浴タイプ)プローブを装備したHeat Systems モデル350超音波処理器を使用して、このサンプルを栓をしたバイアル中にて2時間超音波処理する。あるいは、負に荷電した小胞を、超音波処理なしで調製して多重膜小胞を生成し得るか、または核孔膜(nucleopore membrane)を通して押し出すことにより別々の大きさの単膜小胞を生成し得る。他の方法は、当業者に公知でありそして利用可能である。

10

【0310】

このリポソームとしては、多重膜リポソーム(MLV)、小さな単膜リポソーム(SUV)または大きな単膜リポソーム(LUV)が挙げられ得、SUVが好ましい。当該分野で周知の方法を使用して、種々のリポソーム-核酸複合体が調製される。例えば、本明細書中で参考として援用される、Straubingerら、Methods of Immunology、101:512~527(1983)を参照のこと。例えば、核酸を含有するMLVは、ガラスチューブの壁面にリン脂質の薄膜を堆積させ、そしてその後、カプセル化される物質の溶液で水和することによって調製され得る。SUVはMLVの長期超音波処理により調製され、単膜リポソームの均質集団を生成する。封入されるべき物質を、予め形成されたMLVの懸濁液に添加し、次いで、超音波処理する。カチオン性脂質を含むリポソームを使用する場合、乾燥した脂質膜を、滅菌水または10mM Tris/NaClのような等張性緩衝溶液のような適切な溶液中に再懸濁し、超音波処理し、次いで、予め形成されたリポソームをDNAと直接混合する。正に荷電したリポソームのカチオン性DNAへの結合に起因して、リポソームおよびDNAは非常に安定な複合体を形成する。SUVは、小核酸フラグメントを用いての用途を見出す。LUVは、当該分野で周知の多くの方法により調製される。一般に使用される方法としては、Ca<sup>2+</sup>-EDTAキレート化(Papahadjopoulosら、Biochim. Biophys. Acta、394:483(1975); Wilsonら、Cell、17:77(1979)); エーテル注入(Deamer, D.およびBangham, A., Biochim. Biophys. Acta、443:629(1976); Ostroら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 76:836(1977); Fraleyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、76:3348(1979)); 界面活性剤透析(Enoch, H.およびStrittmatter, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA、76:145(1979)); および逆相エバポレーション(REV)(Fraleyら、J. Biol. Chem., 255:10431(1980); Szoka, F.およびPapahadjopoulos, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA、75:145(1978); Schaefer-Ridderら、Science、215:166(1982))が挙げられ、これらの文献は本明細書中で参考として援用される。

20

30

40

【0311】

一般に、DNA 対 リポソームの割合は約10:1から約1:10までである。好ましくは、その割合(ratio)は約5:1から約1:5までである。より好ましくは、その割合は約3:1から約1:3までである。さらにより好ましくは、その割合は約1:1である。

50

## 【0312】

米国特許第5,676,954号(本明細書中で参考として援用される)はカチオン性リポソームキャリアと複合体化された遺伝物質のマウスへの注入について報告する。米国特許第4,897,355号、同第4,946,787号、同第5,049,386号、同第5,459,127号、同第5,589,466号、同第5,693,622号、同第5,580,859号、同第5,703,055号および国際公開第WO94/9469号(これらは本明細書中で参考として援用される)は、DNAを細胞および哺乳動物にトランスフェクトする際に使用するためのカチオン性脂質を提供する。米国特許第5,589,466号、同第5,693,622号、同第5,580,859号、同第5,703,055号および国際公開第WO94/9469号(これらは本明細書中で参考として

10

## 【0313】

特定の実施形態において、VEGF-2をコードする配列を含むRNAを含むレトロウイルス粒子を使用して、エキソピボまたはインピボで細胞を操作する。レトロウイルスプラスミドベクターを誘導し得るレトロウイルスとしては、モロニー Maus 白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、ニワトリ白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳癌ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0314】

このレトロウイルスプラスミドベクターを使用して、パッケージング細胞株を形質導入し、プロデューサー細胞株を形成する。トランスフェクトされ得るパッケージング細胞の例としては、その全体が本明細書中で参考として援用される、Miller, Human Gene Therapy, 1:5~14(1990)にて記載されるようなPE501、PA317、R-2、R-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、RCRE、RCRIP、GP+E-86、GP+envAm12およびDAN細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。このベクターは、当該分野で公知の任意の手段により、パッケージング細胞を形質導入し得る。そのような手段としては、エレクトロポレーション、リポソームの使用、およびCaPO<sub>4</sub>沈殿が挙げられるが、それらに限定されない。1つの代替法において、このレトロウイルスプラスミドベクターをリポソームにカプセル化するか、または脂質に結合して、次いで宿主に投与し得る。

20

30

## 【0315】

このプロデューサー細胞株は、VEGF-2をコードするポリヌクレオチドを含む感染性レトロウイルスベクター粒子を産生する。次いで、そのようなレトロウイルスベクター粒子を使用して、インピトまたはインピボのどちらかにおいて、真核生物細胞を形質導入し得る。この形質導入された真核生物細胞は、VEGF-2を発現する。

## 【0316】

特定の他の実施形態において、アデノウイルスベクター中に含まれるVEGF-2ポリヌクレオチドを用いて、エキソピボまたはインピボで細胞を操作する。アデノウイルスは、それがVEGF-2をコードし、そして発現し、それと同時に通常の溶解性ウイルス生活環にて複製するその能力に関して不活性化されるように操作され得る。アデノウイルス発現は、そのウイルスDNAの宿主細胞染色体への組み込み無しに達成され、その結果、挿入性変異誘発についての心配が軽減される。さらに、アデノウイルスは、何年もの間、腸の生ワクチンとして優れた安全特性を伴って使用されている(Schwartz, A. R.ら、Am. Rev. Respir. Dis., 109:233-238(1974))。最終的に、アデノウイルス媒介性遺伝子移入が、コトナットの肺への-1-アンチトリプシンおよびCFTRの移入を含む多くの例において実証されている(Rosenfeld, M. A.ら、Science, 252:431~434(1991); Rosenfeldら、Cell, 68:143~155(1992))。さらに、ヒト癌における原因物質としてアデノウイルスを確立しようとする広範な研究は、一様に否定的であった(Green, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:

40

50

6606(1979))。

【0317】

本発明において有用である適切なアデノウイルスベクターが、例えば、KozarskyおよびWilson、Curr. Opin. Genet. Devel., 3:499~503(1993); Rosenfeldら、Cell, 68:143~155(1992); Engelhardtら、Human Genet. Ther., 4:759~769(1993); Yangら、Nature Genet., 7:362~369(1994); Wilsonら、Nature, 365:691~692(1993); および米国特許第5,652,224号に記載されており、これらは本明細書中で参考として援用される。例えば、アデノウイルスベクターAd2が有用であり、そしてヒト293細胞にて増殖され得る。これらの細胞は、アデノウイルスのE1領域を含み、そして構成的にE1aおよびE1bを発現し、このことは、このベクターから欠失している遺伝子の産物を提供することによって欠損アデノウイルスを補完する。Ad2に加えて、他の多様なアデノウイルス(例えば、Ad3、Ad5、およびAd7)もまた、本発明において有用である。

10

【0318】

好ましくは、本発明において使用されるアデノウイルスは、複製欠損性である。複製欠損アデノウイルスは、感染性粒子を形成するために、ヘルパーウイルスおよび/またはパッケージング細胞株の助けを必要とする。得られたウイルスは、細胞に感染する能力があり、そしてプロモーター(例えば、本発明のHARPプロモーター)に作動可能に連結された目的のポリヌクレオチドを発現し得るが、ほとんどの細胞にて複製し得ない。複製欠損アデノウイルスは、次の遺伝子: E1a、E1b、E3、E4、E2aまたはL1からL5までのすべてまたは一部のうちの1つ以上にて欠失され得る。

20

【0319】

特定の他の実施形態において、アデノ随伴ウイルス(AAV)を使用して、エキソビボまたはインビボでこの細胞を操作する。AAVは、感染性粒子を生成するためにヘルパーウイルスを必要とする、天然に存在する欠損ウイルスである(Muzyczka.N., Curr. Topics in Microbiol. Immunol., 158:97(1992))。AAVはまた、分裂中ではない細胞の中にそのDNAを組み込み得る数少ないウイルスの中の1つである。300塩基対程度の小さいAAVを含むベクターがパッケージされ得、そして組み込み得るが、外来性DNAのためのスペースは約4.5kbに限られる。そのようなAAVの生成および使用の方法は当該分野で公知である。例えば、米国特許第5,139,941号、同第5,173,414号、同第5,354,678号、同第5,436,146号、同第5,474,935号、同第5,478,745号および同第5,589,377号を参照のこと。

30

【0320】

例えば、本発明において使用するために適切なAAVベクターは、DNA複製、キャプシド形成、および宿主細胞組み込みに必要な配列すべてを含む。Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press(1989)において見出される方法のような、標準的クローニング方法を使用して、VEGF-2ポリヌクレオチド構築物を、このAAVベクターに挿入する。次いで、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿などを含む、任意の標準的技術を使用して、この組み換えAAVベクターを、ヘルパーウイルスに感染しているパッケージング細胞にトランスフェクションする。適切なヘルパーウイルスとしては、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、ワクシニアウイルス、またはヘルペスウイルスが挙げられる。一旦パッケージング細胞がトランスフェクトおよび感染されると、それらはVEGF-2ポリヌクレオチド構築物を含む感染性AAVウイルス粒子を生成する。次いで、エキソビボまたはインビボのいずれかで、これらのウイルス粒子を使用して真核生物細胞を形質導入する。この形質導入細胞は、そのゲノムに組み込まれたVEGF-2ポリヌクレオチド構築物を含み、そしてVEGF-

40

50

2を発現する。

【0321】

遺伝子治療の別の方法は、相同組み換え（例えば、米国特許第5,641,670号、1997年6月24日発行；国際公開第WO96/29411号、1996年9月26日公開；国際公開第WO94/12650号、1994年8月4日公開；Kollerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86:8932~8935(1989)；およびZijlstraら、Nature、342:435~438(1989)を参照のこと）を介して、異種制御領域および内在性ポリヌクレオチド配列（例えば、VEGF-2をコードしている配列）を作動可能に連結する工程を含む。この方法は、標的細胞中に存在しているが、通常はその細胞中で発現しないかまたは所望するよりも低いレベルで発現する、遺伝子の活性化を含む。

10

【0322】

当該分野で既知の標準的技術を使用して、ポリヌクレオチド構築物を作製する。この構築物は、プロモーターを、そのプロモーターに隣接した標的化配列とともに含む。適切なプロモーターが、本明細書中に記載されている。標的化配列は、内在性配列に対して十分に相補的であり、プロモーター-標的化配列と内在性配列との相同組換えを可能にする。標的化配列は、VEGF-2の所望の内在性ポリヌクレオチド配列の5'末端の十分近くに存在し、それゆえ、相同組換えに際して、プロモーターは、内在性配列に作動可能に連結される。

【0323】

プロモーターおよび標的化配列を、PCRを用いて増幅し得る。好ましくは、増幅されるプロモーターは、5'末端および3'末端上に異なる制限酵素部位を含む。好ましくは、第1の標的化配列の3'末端は、増幅されるプロモーターの5'末端と同じ制限酵素部位を含み、そして第2の標的化配列の5'末端は、増幅されるプロモーターの3'末端と同じ制限部位を含む。増幅されるプロモーターおよび標的化配列を消化し、そして共に連結する。

20

【0324】

プロモーター-標的化配列構築物を、裸のポリヌクレオチドとして、またはリポソーム、ウイルス配列、ウイルス粒子、全ウイルス、リポフェクション、沈降剤など（先により詳細に記載された）のようなトランスフェクション促進剤と組み合わせてかのいずれかで、細胞に送達する。Pプロモーター-標的化配列を、直接的な針注射、静脈内注射、局部投与、カテーテル注入、粒子加速器などを含む任意の方法によって送達し得る。この方法を、以下により詳細に記載する。

30

【0325】

プロモーター-標的化配列構築物は、細胞によって取り込まれる。構築物と内因性配列との間の相同組換えが起こり、その結果、内因性VEGF-2配列がプロモーターの制御下におかれる。次いで、このプロモーターは、内因性VEGF-2配列の発現を駆動する。

【0326】

VEGF-2をコードするポリヌクレオチドは、他の脈管形成(angionogenic)タンパク質をコードする他のポリヌクレオチドと共に投与され得る。血管由来タンパク質には、以下が挙げられるが、それらに限定されない：酸性線維芽細胞増殖因子および塩基性線維芽細胞増殖因子、VEGF-1、上皮増殖因子 および、血小板由来内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、腫瘍壊死因子、肝細胞増殖因子、インスリン様増殖因子、コロニー刺激性因子、マクロファージコロニー刺激性因子、顆粒球/マクロファージコロニー刺激性因子、および酸化窒素シンターゼ。

40

【0327】

好ましくは、VEGF-2をコードするポリヌクレオチドは、タンパク質の分泌を促進する分泌シグナル配列を含む。代表的には、このシグナル配列は、コード領域の5'末端の方向またはその5'末端にて発現されるポリヌクレオチドのコード領域に配置される。

50

このシグナル配列は、目的のポリヌクレオチドに対して同種または異種であり得、そしてトランスフェクトされる細胞に対して同種または異種であり得る。さらに、このシグナル配列は、当該分野において公知の方法を用いて化学合成され得る。

【0328】

上記ポリヌクレオチド構築物のいずれかの任意の投与様式が、その様式が治療効果を提供するために十分な量で1つ以上の分子の発現を生じる限り、使用され得る。これは、直接針注射、全身性注射、カテーテル注入、微粒子銃インジェクター、粒子加速器（すなわち、「遺伝子銃」）、ゲルフォームスポンジ貯留物（depot）、他の市販されている貯留物材料、浸透圧ポンプ（例えば、Alzaミニポンプ）、経口もしくは座剤固体（錠剤もしくは丸剤）薬学的処方物、および手術の間のデカントもしくは局所適用を包含する。例えば、ラット肝およびラット脾への裸のリン酸カルシウム沈殿プラスミドの直接注入、またはタンパク質被覆プラスミドのブタ静脈への直接注入が、ラット肝における外来遺伝子の遺伝子発現を生じた（Kanedaら、Science 243:375（1989））。

10

【0329】

局所投与の好ましい方法は、直接注射によることである。好ましくは、送達ビヒクルと複合体化された本発明の組換え分子は、動脈の領域への直接注射により投与されるか、またはその中に局所的に投与される。組成物を動脈の領域内へ局所的に投与するとは、動脈内に組成物を数センチメートル、および好ましくは数ミリメートル注射することをいう。

【0330】

局所投与の別の方法は、本発明のポリヌクレオチド構築物を外科的創傷中にまたはその周囲に接触させることである。例えば、患者は、手術を受け得て、そしてポリヌクレオチド構築物は創傷の内側の組織の表面上に被覆され得るか、またはこの構築物は、創傷の内部の組織の領域に注入され得る。

20

【0331】

全身投与に有用な治療組成物は、本発明の標的化された送達ビヒクルに複合体化された本発明の組換え分子を含む。全身投与で使用するための適切な送達ビヒクルは、特定の部位に対してビヒクルを標的化するためのリガンドを含むリポソームを含む。

【0332】

全身投与の好ましい方法は、静脈注射、エアロゾル、経口および経皮（局所）送達を包含する。静脈注射は、当該分野で標準的な方法を使用して実施され得る。エアロゾル送達もまた、当該分野で標準的な方法を使用して実施され得る（例えば、Striblingら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189:11277-11281、1992（これは、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。経口送達は、本発明のポリヌクレオチド構築物を、動物の腸における消化酵素による分解を耐え得るキャリアに対して複合体化することにより実施され得る。このようなキャリアの例には、当該分野で公知のもののような、プラスチックカプセルまたは錠剤が含まれる。局所送達は、本発明のポリヌクレオチド構築物を、皮膚に通過し得る親油性試薬（例えば、DMSO）と混合することにより実施され得る。

30

【0333】

送達されるべき有効量の物質を決定することは、多数の要因に依存し得る。このような要因には、例えば、物質の化学構造および生物学的活性、動物の年齢および体重、処置を必要とする正確な状態およびその重度、ならびに投与経路が含まれる。処置の頻度は、多数の要因に依存する。このような要因としては、例えば、1投与当たりの投与されるポリヌクレオチド構築物の量、ならびに被験体の健康および医歴が挙げられる。正確な量、投与回数、および投与時期は、かかりつけの医師または獣医によって決定される。

40

【0334】

本発明の治療組成物は、任意の動物に、好ましくは、哺乳動物および鳥類に投与され得る。好ましい哺乳動物には、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、およびブタが含まれる。ヒトが特に好ましい。

50

## 【 0 3 3 5 】

( 核 酸 有 用 性 )

VEGF - 2 核酸配列および VEGF - 2 ポリペプチドはまた、科学的研究、DNA の合成、および DNA ベクターの製造に関連するインビトロの目的のため、およびヒトの疾患を処置するための診断薬および治療薬の生産のために使用され得る。例えば、VEGF - 2 は、血管内皮細胞のインビトロでの培養のために使用され得、ここで、VEGF - 2 は 10 pg/ml ~ 10 ng/ml の濃度で馴化培地に添加される。

## 【 0 3 3 6 】

全長 VEGF - 2 遺伝子のフラグメントは、cDNA ライブラリーのためのハイブリダイゼーションプローブとして使用されて、この遺伝子に対する高い配列類似性または同様の生物学的活性を有する他の遺伝子を単離し得る。このタイプのプローブは、一般に、少なくとも 50 塩基対を有するが、それらはさらに多数の塩基を有し得る。このプローブはまた、全長転写物に対応する cDNA クローン、ならびに調節領域およびプロモーター領域、エキソン、およびイントロンを含む完全な VEGF - 2 遺伝子を含むゲノムクローン (単数または複数) を同定するために使用され得る。スクリーニングの例として、オリゴヌクレオチドプローブを合成するために公知の DNA 配列を使用することによる VEGF - 2 遺伝子のコード領域を単離することが挙げられる。本発明の遺伝子の配列に相補的な配列を有する標識したオリゴヌクレオチドが、ヒト cDNA、ゲノム DNA、または mRNA のライブラリーをスクリーニングし、このライブラリーのどのメンバーにこのプローブがハイブリダイズするかを決定するために使用される。

## 【 0 3 3 7 】

本発明は、VEGF - 2 レセプターの同定のための方法を提供する。このレセプターをコードする遺伝子は、当業者に公知の多くの方法 (例えば、リガンドパンニングおよび FACS ソーティング (Coligan ら、Current Protocols in Immun., 1 (2), 第 5 章、(1991))) によって同定され得る。好ましくは、発現クローニングを使用し、ここで、ポリアデニル化された RNA を VEGF - 2 に応答する細胞から調製し、そしてこの RNA から作製した cDNA ライブラリーを複数のプールに分割し、そして VEGF - 2 に応答しない COS 細胞または他の細胞をトランスフェクトするために使用する。ガラススライド上で増殖するトランスフェクトされた細胞を、標識した VEGF - 2 に曝す。VEGF - 2 を、部位特異的プロテインキナーゼについての認識部位のヨウ素化または包含を含む、種々の手段によって標識し得る。固定およびインキュベーションに続いて、スライドをオートラジオグラフィ分析に供する。陽性のプールを同定し、そしてサブプールを調製し、そして反復サブプール化プロセス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、最終的に推定のレセプターをコードする単一のクローンを生じる。

## 【 0 3 3 8 】

レセプター同定のための代替のアプローチとして、標識した VEGF - 2 は、レセプター分子を発現する細胞膜または抽出調製物と光親和性連結され得る。架橋した材料を PAGE によって分離し、そして X 線フィルムに曝す。次いで、VEGF - 2 を含有する標識した複合体を切り出し、ペプチドフラグメントに分解し、そしてタンパク質微量配列決定に供する。微量配列決定から得られたアミノ酸配列は、縮重オリゴヌクレオチドプローブのセットを設計して、cDNA ライブラリーをスクリーニングして推定のレセプターをコードする遺伝子を同定するために使用される。

## 【 0 3 3 9 】

( VEGF - 2 アゴニストおよび VEGF - 2 アンタゴニスト )

本発明はまた、VEGF - 2 アゴニストまたは VEGF - 2 アンタゴニストである化合物を同定するための化合物のスクリーニング方法に関する。そのような方法の一例は、コマイトジェン (comitogen) Con A の存在下でヒト内皮細胞の増殖を有意に刺激する VEGF - 2 の能力を利用する。内皮細胞を得、そして Con - A (Calbiochem, La Jolla, CA) を補充した反応混合物中で 96 ウェル平底培養ブ



レート (Costar, Cambridge, MA) で培養する。Con-A、本発明のポリペプチド、およびスクリーニングされるべき化合物を添加する。37 °Cでのインキュベーションの後、<sup>3</sup>[H]を取り込むに十分な時間、1 F Ciの<sup>3</sup>[H]チミジン(5 Ci/mmol; 1 Ci = 37 Bq; NEN)を培養物に断続的に添加し、そしてガラスファイバーフィルター (Cambridge Technology, Watertown, MA) 上に回収する。3連の培養物の平均の<sup>3</sup>[H]チミジン取り込み (cpm) を、液体シンチレーションカウンター (Beckman Instruments, Irvine, CA) を使用して決定する。化合物を除いたコントロールアッセイと比較して有意な<sup>3</sup>[H]チミジン取り込みは、内皮細胞増殖の刺激を示す。

#### 【0340】

アンタゴニストについてアッセイするために、上記のアッセイを行ない、そして化合物がVEGF-2の存在下で<sup>3</sup>[H]チミジン取り込みを阻害する能力は、この化合物がVEGF-2に対するアンタゴニストであることを示す。あるいは、VEGF-2アンタゴニストは、競合阻害アッセイに適切な条件下で、VEGF-2および潜在的なアンタゴニストと、膜に結合したVEGF-2レセプターまたは組換えレセプターとを組み合わせることによって検出され得る。VEGF-2は、例えば、放射能によって標識され得、その結果、レセプターに結合したVEGF-2分子の数が、潜在的なアンタゴニストの有効性を決定し得る。

#### 【0341】

あるいは、VEGF-2とレセプターとの相互作用の後の公知のセカンドメッセンジャーシステムの応答を、この化合物の存在下または非存在下で測定し、そして比較する。そのようなセカンドメッセンジャーシステムは、cAMPグアニル酸シクラーゼ、イオンチャンネル、またはホスホイノシチド加水分解を包含するが、これらに限定されない。別の方法では、VEGF-2レセプターを発現する哺乳動物細胞または膜調製物が、この化合物の存在下で、標識したVEGF-2と共にインキュベートされる。次いで、この相互作用を増強またはブロックする、この化合物の能力が測定され得る。

#### 【0342】

潜在的なVEGF-2のアンタゴニストは、抗体、またはいくつかの場合にはオリゴヌクレオチドを含み、これはこのポリペプチドに結合し、そしてVEGF-2の機能を有効に消去させる。あるいは、潜在的なアンタゴニストは、VEGF-2レセプターに結合する、密接に関連するタンパク質であり得るが、それらはこのポリペプチドの不活性な形態であり、それによりVEGF-2の作用を妨げる。これらのアンタゴニストの例は、VEGF-2ポリペプチドのドミナントネガティブ変異体を包含し、例えば、VEGF-2のヘテロ二量体形態の一方の鎖は優性であり得、そして生物学的活性が保持されないように変異され得る。ドミナントネガティブ変異体の例は、二量体VEGF-2の短縮バージョンを包含する。この短縮バージョンは別の二量体と相互作用して、野生型VEGF-2を形成し得るが、得られるホモ二量体は不活性であり、特徴的なVEGF活性を示すことができない。

#### 【0343】

別の潜在的なVEGF-2アンタゴニストは、アンチセンス技術を使用して調製されるアンチセンス構築物である。アンチセンス技術は、3重らせん形成またはアンチセンスDNAもしくはRNAを介して遺伝子発現を制御するために使用され得る。これらの方法は両方ともDNAまたはRNAへのポリヌクレオチドの結合に基づく。例えば、このポリヌクレオチド配列の5'コード部分は、本発明の成熟ポリペプチドをコードし、約10~40塩基対の長さのアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計するために使用される。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に参与する遺伝子の領域に相補的であるように設計され(三重らせん - Leeら、Nucl. Acids Res. 6: 3073 (1979); Cooneyら、Science, 241: 456 (1988); およびDervanら、Science, 251: 1360 (1991)を参照のこと)、それにより、VEGF-2の転写および産生を妨げる。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、インビ

10

20

30

40

50

ボでmRNAにハイブリダイズし、そしてmRNA分子のVEGF-2ポリペプチドへの翻訳をブロックする(アンチセンス - Okano, J. Neurochem., 56: 560 (1991); 遺伝子発現のアンチセンスインヒビターとしてのオリゴデオキシヌクレオチド、CRC Press, Boca Raton, FL (1988))。上記のオリゴヌクレオチドはまた、細胞に送達され得、その結果、アンチセンスRNAまたはDNAがインビボで発現してVEGF-2の産生を阻害し得る。

【0344】

潜在的なVEGF-2アンタゴニストはまた、ポリペプチドの活性部位に結合し、そしてこの部位を占め、それにより触媒部位が基質に接近できないようにし、その結果、正常な生物学的活性が妨げられる、低分子を含む。低分子の例としては、低分子ペプチドまたはペプチド様分子が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0345】

アンタゴニスト(例えば、VEGF-2抗体)は、固形腫瘍転移に必要な新脈管形成を制限するために使用され得る。VEGF-2の同定は、血管内皮成長因子の特定のインヒビターの生成のために使用され得る。新脈管形成および新生血管形成は固形腫瘍増殖における必須工程であるので、血管内皮成長因子の新脈管形成活性の阻害は、固形腫瘍のさらなる増殖、退行、または抑制さえをも妨害するために非常に有用である。VEGF-2の発現レベルは、胸部を含む正常組織において極度に低いが、悪性腫瘍に由来する少なくとも2つの乳癌細胞株においては中程度で発現されることが見出され得る。従って、VEGF-2が腫瘍脈管形成および増殖に関与することが可能である。

20

【0346】

神経膠腫はまた、本発明のアンタゴニストで処置され得る新生物の1つのタイプである。

【0347】

アンタゴニスト(例えば、VEGF-2抗体)はまた、血管透過性の増大により引き起こされる慢性炎症を処置するために使用され得る。これらの障害に加えて、アンタゴニストはまた、糖尿病に関連する網膜症、慢性関節リウマチ、および乾癬を処置するために使用され得る。

【0348】

アンタゴニスト(例えば、VEGF-2抗体)は、薬学的に受容可能なキャリア(例えば、本明細書中以下に記載するような)を有する組成物中で使用され得る。

30

【0349】

(薬学的組成物)

VEGF-2抗体は、適切な薬学的キャリアと組み合わせ使用され得る。そのような組成物は、治療的有效量のポリペプチドまたはアゴニストもしくはアンタゴニスト、および薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤を含む。そのようなキャリアとしては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。処方物は、投与の形態に合わせるべきである。

【0350】

40

本発明はまた、1つ以上の本発明の薬学的組成物の成分で充填した1つ以上の容器を備えた薬学的パックまたはキットを提供する。そのような容器には、薬剤または生物学的製品の製造、使用、または販売を統制する政府機関によって指定される形式の通知を伴い得、この通知は、ヒトへの投与のための製造、使用、または販売の機関による認可を表す。さらに、薬学的組成物は、他の治療用化合物と組み合わせ使用され得る。

【0351】

薬学的組成物は、局所、静脈内、腹腔内、筋肉内、腫瘍内、皮下、鼻腔内、または皮内の経路によるような好都合な様式で投与され得る。薬学的組成物は、特定の適応症を処置および/または予防するのに有効な量で投与される。一般に、薬学的組成物は、少なくとも約10mg/kg体重の量で投与され、そしてほとんどの場合はこれらは一日あたり約

50

8 mg / kg 体重を超えない量で投与される。ほとんどの場合、投薬は、投与経路、症状などを考慮して、1日あたり約10 mg / kg 体重 ~ 約1 mg / kg 体重である。

【0352】

ポリペプチドであるVEGF-2抗体はまた、上記の、インビボでのそのようなポリペプチドの発現により本発明に従って用いられ得、これはしばしば、「遺伝子治療」といわれる。

【0353】

従って、例えば、骨髄細胞のような細胞は、ポリペプチドまたはVEGF-2抗体をコードするポリヌクレオチド(DNAまたはRNA)を用いてエクソビボで操作され得、次いで、操作された細胞はこのポリペプチドで処置されるべき患者に提供される。そのような方法は当該分野で周知である。例えば、細胞は、本発明のポリペプチドをコードするRNAを含有するレトロウイルス粒子の使用により、当該分野で公知の手順によって操作され得る。

【0354】

同様に、細胞は、インビボでのポリペプチドまたはVEGF-2抗体の発現のために、例えば、当該分野で公知の手順によりインビボで操作され得る。当該分野で公知のように、本発明のVEGF-2抗体をコードするRNAを含有するレトロウイルス粒子を産生するためのプロデューサー細胞は、インビボで細胞を操作するため、およびインビボでのまたはVEGF-2抗体の発現のために患者に投与され得る。そのような方法により本発明のまたはVEGF-2抗体を投与するためのこれらの方法および他の方法は、本発明の教示により当業者には明らかであるはずである。例えば、細胞を操作するための発現ビヒクルは、レトロウイルス粒子以外のもの(例えば、アデノウイルス)であり得る。これは、適切な送達ビヒクルと組み合わせた後、インビボで細胞を操作するために使用され得る。

【0355】

本明細書中上記で述べたレトロウイルスプラスミドベクターが由来し得るレトロウイルスとしては、モロニー Maus 白血病ウイルス、脾壊死ウイルス、レトロウイルス(例えば、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、鳥類白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全症ウイルス)、アデノウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳腺癌ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。1つの実施形態において、レトロウイルスプラスミドベクターは、モロニー Maus 白血病ウイルスに由来する。

【0356】

ベクターは1つ以上のプロモーターを含む。使用され得る適切なプロモーターとしては、レトロウイルスLTR; SV40プロモーター; およびヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(Millerら、Biotechniques, 7: 980-990(1989)に記載される)、または他の任意のプロモーター(例えば、真核生物細胞性プロモーターのような細胞プロモーター(ヒストン、pol III、および -アクチンのプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない))が挙げられるが、これらに限定されない。使用され得る他のウイルスプロモーターとしては、アデノウイルスプロモーター、チミジンキナーゼ(TK)プロモーター、およびB19パルボウイルスプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。適切なプロモーターの選択は、本明細書中に含まれる教示から、当業者に明らかである。

【0357】

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列は、適切なプロモーターの制御下にある。使用され得る適切なプロモーターとしては、アデノウイルス主要後期プロモーターのようなアデノウイルスプロモーター; またはサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターのような異種プロモーター; RSウイルス(RSV)プロモーター; MMTプロモーター、メタロチオネインプロモーターのような誘導性プロモーター; 熱ショックプロモーター; アルブミンプロモーター; ApoA Iプロモーター; ヒトグロビンプロモーター; 単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーターのようなウイルスチミジンキナーゼプロモーター; レトロウイルスLTR(本明細書上記の改変したレトロウイルスLTRを含む); b - A

10

20

30

40

50

クチンプロモーター；およびヒト成長ホルモンプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。プロモーターはまた、ポリペプチドをコードする遺伝子を制御するネイティブプロモーターであり得る。

【0358】

レトロウイルスプラスミドベクターは、パッケージング細胞株を形質導入してプロデューサー細胞株を形成するために使用される。トランスフェクトされ得るパッケージング細胞の例としては、PE501、PA317、y-2、y-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、yCRE、yCRIP、GP+E-86、GP+envAm12、およびDAN細胞株（その全体が本明細書中で参考として援用される、Miller, Human Gene Therapy 1:5-14頁(1990)に記載される）が挙げられるが、これらに限定されない。ベクターは、当該分野で公知の任意の手段を介してパッケージング細胞を形質導入し得る。そのような手段としては、エレクトロポレーション、リポソームの使用、およびCaPO<sub>4</sub>沈澱が挙げられるが、これらに限定されない。代替としては、レトロウイルスプラスミドベクターは、リポソーム中にカプセル化され得るか、または脂質に結合され得、次いで宿主に投与され得る。

10

【0359】

プロデューサー細胞株は、ポリペプチドをコードする核酸配列を含む感染性レトロウイルスベクター粒子を生成する。次いで、そのようなレトロウイルスベクター粒子が、インビトロまたはインビボのいずれかで、真核生物細胞を形質導入するために使用され得る。形質導入された真核生物細胞としては、ポリペプチドをコードする核酸配列を発現する。形質導入され得る真核生物細胞は、胚性幹細胞、胚性癌細胞、ならびに造血幹細胞、肝細胞、線維芽細胞、筋芽細胞、ケラチノサイト、内皮細胞、および気管支上皮細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0360】

(診断アッセイ)

本発明はまた、VEGF-2核酸配列における変異の存在に関する疾患または疾患に対する感受性を検出するための診断アッセイの一部としての、VEGF-2遺伝子の使用に関する。

【0361】

VEGF-2遺伝子における変異を有する個体は、種々の技術によってDNAレベルで検出され得る。診断のための核酸は、患者の細胞（例えば、血液）、尿、唾液、組織生検、および剖検材料から得られ得る。ゲノムDNAは、検出のための直接使用され得るか、または分析の前にPCR(Saikira, Nature 324:163-166(1986))を使用して酵素的に増幅され得る。RNAまたはcDNAもまた、同じ目的のために使用され得る。例として、VEGF-2をコードする核酸に対して相補的であるPCRプライマーは、VEGF-2変異を同定および分析するために使用され得る。例えば、欠失および挿入は、正常な遺伝子型に対して比較した増幅産物のサイズの変化によって検出され得る。点変異は、増幅したDNAを、放射性標識したVEGF-2 RNA、または代替的に、放射性標識したVEGF-2アンチセンスDNA配列とハイブリダイズさせることによって、同定され得る。完全に一致した配列は、RNase A消化または融解温度の違いによって、一致していない二重鎖から区別され得る。

30

40

【0362】

DNA配列の違いに基づく遺伝子試験は、変性剤の存在下または非存在下で、ゲル中のDNAフラグメントの電気泳動的な移動度の変化の検出によって達成され得る。小さな配列の欠失および挿入は、高解像度のゲル電気泳動によって可視化され得る。異なる配列のDNAフラグメントは、変性ホルムアミド勾配ゲル上で区別され得る。ここで、異なるDNAフラグメントの移動度は、ゲル中で、それらの特異的な融解温度または部分的な融解温度に従って異なる位置において遅れる（例えば、Myersら, Science 230:1242(1985)を参照のこと）。

【0363】

50

特定の位置での配列の変化もまた、ヌクレアーゼ保護アッセイ（例えば、RNaseおよびS1保護）または化学的切断法によって示され得る（例えば、Cottonら、PNAS, USA 85:4397-4401(1985)）。

【0364】

従って、特定のDNA配列の検出は、ハイブリダイゼーション、RNase保護、化学的切断、直接的DNA配列決定または制限酵素の使用（例えば、制限酵素DNA断片長の多型(RFLP)）、およびゲノムDNAのサザンブロットティングのような方法によって達成され得る。

【0365】

より慣用的なゲル電気泳動法およびDNA配列決定に加えて、変異誘発もまた、インサイチュ分析によって検出され得る。

【0366】

本発明はまた、種々の組織におけるVEGF-2タンパク質の変化レベルを検出するための診断アッセイに関する。なぜなら、通常のコントロール組織サンプルと比較したタンパク質の過剰発現は、疾患（例えば、異常な細胞増殖）の存在またはその疾患に対する感受性を検出し得るからである。宿主由来のサンプル中のVEGF-2タンパク質のレベルを検出するために使用されるアッセイは、当業者に周知であり、そしてこれには、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウェスタンブロット分析、ELISAアッセイ、および「サンドイッチ」アッセイが含まれる。ELISAアッセイ(Coliganら、Current Protocols in Immunology 1(2)、第6章、(1991))は、最初に、VEGF-2抗原に特異的な抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）を調製する工程を包含する。さらに、レポーター抗体がモノクローナル抗体に対して調製される。レポーター抗体に対して、検出可能な試薬（例えば、放射能、蛍光、またはこの例においては、西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素）が結合される。サンプルは宿主から取り出され、そしてサンプル中のタンパク質を結合する固体支持体（例えば、ポリスチレンディッシュ）上でインキュベートされる。次いで、ディッシュ上のいかなる遊離のタンパク質結合部位も、非特異的タンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン(albumen)）とインキュベートすることによって覆われる。次に、モノクローナル抗体は、このモノクローナル抗体がポリスチレンディッシュに結合したいいかなるVEGF-2タンパク質とも結合する時間の間、ディッシュ中でインキュベートされる。すべての非結合モノクローナル抗体は、緩衝液で洗い流される。西洋ワサビペルオキシダーゼに結合されたレポーター抗体は、ディッシュ中に置かれ、これは、レポーター抗体の、VEGF-2に結合したモノクローナル抗体への結合を生じる。次いで、未結合のレポーター抗体は洗い流される。次いで、ペルオキシダーゼ基質がディッシュに添加され、そして所定の時間の期間で発色した色の量は、標準曲線に対して比較した場合に、患者サンプルの所定の容量中に存在するVEGF-2タンパク質の量の尺度である。

【0367】

競合アッセイが利用され得、ここではVEGF-2に特異的な抗体が固体支持体に結合される。次いで、本発明のポリペプチドは、例えば、放射能によって標識され、そして宿主由来のサンプルが固体支持体上を通過し、そして検出された標識の量（例えば、液体シンチレーションクロマトグラフィーによって検出される）は、サンプル中のVEGF-2の量と相関し得る。

【0368】

「サンドイッチ」アッセイは、ELISAアッセイと類似している。「サンドイッチ」アッセイにおいて、VEGF-2は、固体支持体上を通過し、そして固体支持体に結合している抗体に結合する。次いで、第2の抗体がVEGF-2に結合される。次いで、標識されかつ第2の抗体に特異的な第3の抗体は、固体支持体上を通過し、そして第2の抗体に結合し、次いで量が定量され得る。

【0369】

(染色体の同定)

10

20

30

40

50

本発明の配列はまた、染色体同定に価値がある。その配列は、個々のヒト染色体上の特定の位置に特異的に標的化され、そしてそれとハイブリダイズし得る。さらに、染色体上の特定の部位を同定する必要性が現在存在する。実際の配列データ（反復多型のデータ）に基づく染色体マーキング試薬は、染色体位置のマーキングのために現在ほとんど利用可能ではない。本発明による、DNAの染色体へのマッピングは、疾患と関連する遺伝子とそれらの配列とを相関付ける際の重要な第1の工程である。

【0370】

手短には、配列は、cDNA由来のPCRプライマー（好ましくは、15～25bp）を調製することによって、染色体にマッピングされ得る。cDNAのコンピュータ分析を使用して、ゲノムDNAにおける1より多くのエキソンにまたがらないプライマーを迅速に選択し、それによって増幅プロセスは複雑にされる。次いで、これらのプライマーを、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングのために使用する。プライマーに対応するヒト遺伝子を含むハイブリッドのみが、増幅フラグメントを産生する。

10

【0371】

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定の染色体に特定のDNAを割り当てるための迅速な手順である。同じオリゴヌクレオチドプライマーを用いる本発明を使用して、特定の染色体または大きなゲノムクローンのプールからのフラグメントの群を用いて、サブローカリゼーションが、類似の様式で達成され得る。その染色体にマッピングするために同様に使用され得る他のマッピングストラテジーとしては、インサイチュハイブリダイゼーション、標識されたフロー選別された（flow-sorted）染色体を用いるプレスクリーニング、および染色体特異的cDNAライブラリーを構築するためのハイブリダイゼーションによるプレ選択が挙げられる。

20

【0372】

中期染色体スプレッドへのcDNAクローンの蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（「FISH」）を使用して、1つの工程で、正確な染色体位置を提供し得る。この技術は、50または60bpほどの短いcDNA由来のプロープとともに使用され得る。この技術の概説について、Vermaら、Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques、Pergamon Press、New York（1988）を参照のこと。

30

【0373】

一旦、配列が正確な染色体位置にマッピングされると、染色体上のその配列の物理的位置を、遺伝子マップデータに相関付けし得る。そのようなデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University, Welch Medical Library からオンラインで利用可能) において見い出される。次いで、同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患との間の関係を、連鎖解析（物理的に隣接する遺伝子の同時遺伝）を介して同定する。

【0374】

次いで、罹患している個体と罹患していない個体との間の、cDNA配列またはゲノム配列における差を決定することが必要である。変異が、罹患している個体のいくらか、またはすべてにおいて観察されるが、正常な個体においては観察されない場合、変異は、その疾患の原因因子である可能性がある。

40

【0375】

物理的マッピング技術および遺伝子マッピング技術の現状の分解能を用いて、疾患に関連する染色体領域に正確に位置付けられたcDNAは、50個と500個の間の潜在的な原因遺伝子の1つであり得る。（これは、1メガ塩基のマッピング分解能および20kbあたり1つの遺伝子を仮定している。）

罹患した個体および罹患していない個体の比較は、一般的に、染色体における構造的変化（例えば、欠失または転座）を探索することを第1に含み、この変化は、染色体のスプ

50

レッドから可視的であるか、またはその cDNA 配列に基づく PCR を用いて検出可能である。最終的に、何人かの個体からの遺伝子の完全な配列決定は、変異の存在を確認しかつ多型性からの変異を区別するために必要とされる。

【0376】

(アンチセンス)

本発明はさらに、アンチセンス技術の使用によって、インビボで VEGF - 2 を阻害することに関する。アンチセンス技術を用いて、3重らせんの形成またはアンチセンス DNA もしくはアンチセンス RNA を通して遺伝子発現を制御し得る。これらの方法は両方とも、DNA または RNA へのポリヌクレオチドの結合に基づく。例えば、成熟ポリヌクレオチド配列の 5' コード部分は、本発明の成熟ポリペプチドをコードし、10 ~ 40 塩基対の長さのアンチセンス RNA オリゴヌクレオチドを設計するために使用される。DNA オリゴヌクレオチドは、転写に關与する遺伝子の領域に相補的であるように設計され (三重らせん - Lee ら、Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney ら、Science, 241:456 (1988); および Dervan ら、Science, 251:1360 (1991) を参照のこと)、それにより、VEGF - 2 の転写および産生を妨げる。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、そして mRNA 分子の VEGF - 2 への翻訳をブロックする (アンチセンス - Okano, J. Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988))。 10 20

【0377】

あるいは、上記のオリゴヌクレオチドは、当該分野の手順によって細胞に送達され得、その結果、アンチセンス RNA またはアンチセンス DNA がインビボで発現して、上記の様式において VEGF - 2 の産生を阻害し得る。

【0378】

従って、VEGF - 2 に対するアンチセンス構築物は、VEGF - 2 の脈管形成活性を阻害し得、そして固形腫瘍のさらなる増殖を妨げるかまたは消失さえさせ得る。なぜならば、新脈管形成および新生血管形成は、固形腫瘍の増殖における必須の段階であるからである。これらのアンチセンス構築物をまた使用して、異常な新脈管形成によって全て特徴付けられる慢性関節リウマチ、乾癬、糖尿病網膜症およびカポジ肉腫を処置し得る。 30

【0379】

(エピトープ保有部分)

本発明は、配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 18 のアミノ酸配列を有するポリペプチド (またはそのフラグメントもしくは改変体) のエピトープ、あるいは、ATCC 受託番号 97149 もしくは 75698 に含まれるポリヌクレオチド配列によってコードされるかまたは配列番号 1 もしくは配列番号 3 の配列の相補物または ATCC 受託番号 97149 もしくは 75698 に含まれる配列の相補物、上記で規定されたようなストリンジентなハイブリダイゼーション条件下もしくはより低いストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列によってコードされる全長ポリペプチドのエピトープ (またはそのフラグメントもしくは改変体) を、含むかあるいはそれらからなる、ポリペプチドを含む。本発明はさらに、本発明のポリペプチド配列 (例えば、配列番号 2、配列番号 4 および配列番号 18 で開示された配列) のエピトープをコードするポリヌクレオチド配列、本発明のエピトープをコードするポリヌクレオチド配列の相補鎖のポリヌクレオチド配列、および上記で定義されたストリンジентなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件下で相補鎖にハイブリダイズするポリヌクレオチド配列を含む。 40

【0380】

別の局面において、本発明は、本発明のポリペプチドのエピトープ保有部分を含むペプチドおよびポリペプチド、ならびにこれらのエピトープ保有部分をコードするポリヌクレ 50

オチドを提供する。これらのエピトープは、本発明のポリペプチドの免疫原性エピトープまたは抗原性エピトープである。「免疫原性エピトープ」は、本発明のポリペプチド全体、またはそのフラグメントが免疫原である場合、インビボで抗体応答を誘発するタンパク質の一部として規定される。一方、抗体が結合し得るポリペプチド領域が、「抗原決定基」または「抗原性エピトープ」として規定される。タンパク質のインビボでの免疫原性エピトープの数は、一般に抗原性エピトープの数よりも少ない。例えば、Geysenら、(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3998-4002を参照のこと。しかし、抗体は、それが免疫原性エピトープであるか否かに関わらず、ファージディスプレイのような方法を用いることによって、任意の抗原性エピトープに対して作製され得る。例えば、Petersen G.ら(1995) Mol. Gen. Genet. 249: 425-431を参照のこと。従って、本発明には、免疫原性エピトープおよび抗原性エピトープの両方が含まれる。

10

**【0381】**

免疫原性エピトープが、Jameson-Wolf分析によって決定される、予測される重要なアミノ酸残基を含むことが、特に指摘される。従って、N末端、C末端、またはN末端およびC末端の両方、のいずれかにおけるさらなる隣接残基を、これらの配列に付加して、本発明のエピトープ保有ポリペプチドを生成し得る。従って、免疫原性エピトープは、さらなるN末端アミノ酸残基またはC末端アミノ酸残基を含み得る。このさらなる隣接アミノ酸残基は、本発明のポリペプチド由来の連続した隣接N末端配列および/またはC末端配列、または異種ポリペプチド配列であり得るか、あるいは、本発明のポリペプチド由来の連続した隣接配列および異種ポリペプチド配列の両方を含み得る

20

抗体は、好ましくは、これらの領域から、またはこれらの領域の別個のフラグメントから、調製される。しかし、抗体は、本明細書中に記載されるように、ペプチドの任意の領域から調製され得る。好ましいフラグメントは、VEGF-2のそのレセプター(例えば、flk-1、またはflt-4)への結合を減少するかまたは完全に妨げる抗体を産生する。抗体は、全長VEGF-2またはそのレセプターの部分(例えば、VEGF-2ポリペプチドの分泌形態またはこれらの領域の任意の部分)に対して開発され得る。抗体はまた、特定の機能的部位(例えば、レセプター結合部位、あるいは、グリコシル化されるか、リン酸化されるか、ミリスチル化されるか、またはアミド化される部位)に対して開発され得る。

30

**【0382】**

エピトープとして機能するフラグメントは、任意の従来の方法によって産生され得る。(例えば、Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5131-5135(1985)を参照のこと。これはさらに、米国特許第4,631,211号に記載される)。

**【0383】**

免疫原性エピトープまたは抗原性エピトープを含む本発明のポリペプチドは、少なくとも7アミノ酸残基の長さである。「少なくとも」とは、免疫原性エピトープまたは抗原性エピトープを含む本発明のポリペプチドが、7アミノ酸残基の長さであり得るか、または7アミノ酸と本発明の全長ポリペプチドのアミノ酸残基数との間の任意の整数であり得ることを意味する。免疫原性エピトープまたは抗原性エピトープを含む好ましいポリペプチドは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100のアミノ酸残基の長さである。しかし、7と全長ポリペプチドのアミノ酸残基数との間の各整数およびどの整数も本発明に含まれることが指摘される。

40

**【0384】**

免疫原性および抗原性エピトープ保有フラグメントは、上記のような連続するアミノ酸残基の数のいずれかによって特定され得るか、または配列番号2のアミノ酸配列におけるこれらのフラグメントのN末端位置およびC末端位置によってさらに特定され得る。例えば、少なくとも7または少なくとも15の連続したアミノ酸残基の長さのフラグメントが

50



、配列番号2、配列番号4、または配列番号18のアミノ酸配列上に占有し得る、N末端位置およびC末端位置のどの組み合わせも本発明に含まれる。再び、「少なくとも7つの連続するアミノ酸残基の長さ」とは、7アミノ酸残基の長さ、または7アミノ酸と本発明の全長ポリペプチドのアミノ酸残基の数との間の任意の整数を意味する。詳細には、7と全長のポリペプチドのアミノ酸残基の数との間の各整数およびどの整数も、本発明に含まれる。

【0385】

本発明の免疫原性エピトープ保有ポリペプチドおよび抗原性エピトープ保有ポリペプチドは、例えば、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体を作製するのに有用であり、そして本発明のポリペプチドを検出するイムノアッセイにおいて有用である。この抗体は、例えば、本発明のポリペプチドのアフィニティー精製において有用である。この抗体はまた、種々の定性的および定量的イムノアッセイ、特に当該分野において公知の方法を用いる本発明のポリペプチドについて慣用的に使用され得る。例えば、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual、(Cold Spring Harbor Laboratory Press; 第2版、1988)を参照のこと。

10

【0386】

好ましい抗原性エピトープは、本明細書中で開示される抗原性エピトープ、ならびに2、3、4、5以上のこれらの抗原性エピトープの任意の組み合わせを含む。抗原性エピトープは、イムノアッセイにおいて、標的分子として使用され得る。(例えば、Wilsonら、Cell 37: 767-778 (1984); Sutcliffeら、Science 219: 660-666 (1983)を参照のこと)。

20

【0387】

好ましい免疫原性エピトープは、本明細書中で開示される免疫原性エピトープ、ならびにこれらの免疫原性エピトープの2、3、4、5またはそれ以上の任意の組み合わせを含む。1つ以上の免疫原性エピトープを含むポリペプチドは、キャリアタンパク質(例えば、アルブミン)とともに動物系(例えば、ウサギまたはマウス)に、抗体応答を誘発するために提供され得るか、またはこのポリペプチドが十分に長い場合(少なくとも約25アミノ酸)、このポリペプチドは、キャリアなしで提供され得る。しかし、8~10程度の少なさのアミノ酸を含む免疫原性エピトープは、少なくとも変性ポリペプチド中の直鎖状エピトープに結合し得る抗体を惹起するには十分であることが示されている(例えば、ウエスタンブロットティングにおいて)。

30

【0388】

本発明のエピトープ保有ポリペプチドは、当該分野において公知の合成方法および組換え方法を含む、ポリペプチドを作製するための任意の従来の方法によって、生成され得る。例えば、エピトープ保有ペプチドは、化学合成の公知の方法を用いて合成され得る。例えば、Houghtenは、大きな数のペプチド(例えば、248の個体の10~20mg)およびHA1ポリペプチドの単一のアミノ酸改変体のセグメントを提示する異なる13残基のペプチドの合成についての簡単な方法を記載しており、それらの全ては、4週間未満で調製されそして特徴付けられた(ELISA型結合研究によって)(Houghten、R. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5131-5135 (1985))。この「同時複数ペプチド合成(SMPS)」プロセスは、Houghtenおよび共同研究者らに対する米国特許第4,631,211号(1986)においてさらに記載される。この手順において、種々のペプチドの固相合成についての個々の樹脂は、分離した溶媒浸透パッケージ中に含まれ、これは、固相方法に關与する多くの同一の反復工程の最適使用を可能にする。完全なマニュアル手順は、500~1000以上の合成を同時に行い得る(Houghtenら(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 5131-5135の5134)。

40

【0389】

本発明のエピトープ保有ペプチドはまた、Proc. Natl. Acad. Sci. U

50

. S . A . 8 5 : 5 4 0 9 (この全体が本明細書中に参照として援用される)に J . P . Tamによって最初に記載された、複数抗原ペプチド (multiple antigen peptide) (MAP)として合成され得る。MAPは、非免疫抗原性リジン核に結合する特定のペプチドの複数のコピーからなる。Mapペプチドは、通常、MAP-4ペプチドまたはMAP-8ペプチドとしてしばしば称される4または8コピーのペプチドを含む。非限定的な例として、MAPは、ポリエチレングリコール-ポリスチレン (PEG-PS) 支持体に結合するリジン核マトリックスにおいて合成され得る。目的のペプチドは、9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 化学を使用してリジン残基において合成される。例えば、Applied Biosystems (Forster City, CA)は、MAP樹脂 (例えば、MAPを合成するために使用され得るFmoc樹脂4分枝 (Fmoc Resin 4 Branch)およびFmoc樹脂8分枝 (Fmoc Resin 8 Branch)など)を提供する。樹脂からのMAPの切断は、当該分野で公知の標準トリフルオロ酢酸 (TFA) ベースのカクテルを使用して実施される。MAPの精製 (脱塩を除く)は、必要ではない。MAPペプチドは、MAPとこのペプチドを由来とするネイティブのタンパク質の両方を認識する抗体を惹起する免疫ワクチンとして使用され得る。

#### 【0390】

本発明のエピトープ保有ポリペプチドは、例えば、ペプチドのアミノ末端および/またはカルボキシ末端にアミノ酸の添加によって改変され得る。このような改変は、例えば、エピトープ保有ポリペプチドの立体配座を変更するために実施され得、その結果、エピトープは、ネイティブのタンパク質におけるエピトープの構造により密接に関連する立体配座を有する。本発明の改変されたエピトープを保有するポリペプチドの例は、1つ以上のシステイン残基が、2つのシステイン間にジスルフィド結合の形成を可能にするためにポリペプチドに加えられたポリペプチドであり、非還元条件下でエピトープ保有ポリペプチドの安定なループ構造を生じる。ジスルフィド結合は、ポリペプチドに加えられたシステイン残基と、天然に存在するエピトープのシステイン残基との間に形成され得るか、または両方の天然に存在するエピトープ保有ポリペプチドに加えられた2つのシステイン間に形成され得る。さらに、ジスルフィド結合されたループ構造の形成を促進するためにシステインでこれらを置換することによって、天然に存在するエピトープ保有ポリペプチドの1つ以上のアミノ酸残基を改変することが可能である。合成ペプチドの環状チオエーテル分子は、当該分野で公知であり、そしてPCT公開WO97/46251 (その全体が本明細書中に参照として援用される)に記載される技術を使用して慣用的に産生され得る。本発明によって企図されるエピトープ保有ポリペプチドの他の改変としては、ビオチン化が挙げられる。

#### 【0391】

本発明のエピトープ保有ポリペプチドは、当該分野で周知の方法に従って抗体を誘導するために使用される。これらの方法としては、インビボ免疫、インビトロ免疫、およびファージディスプレイ法が挙げられるが、それらに限定されない。例えば、Sutcliffeら, 前出; Wilsonら, 前出; およびBittleら, (1985) J. Gen. Virol. 66: 2347-2354を参照のこと。インビボ免疫を使用する場合、動物を遊離ペプチドを用いて免疫し得るが; 抗ペプチド抗体力価は、高分子キャリア (例えば、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) または破傷風トキソイド) にペプチドを結合させることによりブーストされ得る。例えば、システイン残基を含むペプチドは、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) のようなリンカーを用いてキャリアに結合され得る。その一方、他のペプチドは、より一般的な結合剤 (例えば、グルタルアルデヒド) を用いてキャリアに結合され得る。ウサギ、ラット、およびマウスのような動物は、遊離のペプチドもしくはキャリア結合ペプチドまたはMAPペプチドのいずれかを用いて、例えば、エマルジョン (約100 μgのペプチドまたはキャリアタンパク質およびフロイントアジュバントを含む) の腹腔内注射および/または皮内注射により免疫される。いくつかのブースター注射が、抗ペプチド抗体の有用な力価

10

20

30

40

50

を提供するために、例えば、約2週間の間隔で、必要とされ得る。この力価は、例えば、固体表面に吸着した遊離のペプチドを用いるELISAアッセイにより検出され得る。免疫した動物由来の血清中の抗ペプチド抗体の力価は、抗ペプチド抗体の選択（例えば、当該分野で周知の方法に従う固体支持体上のペプチドの吸着および選択された抗体の溶出による）により上昇し得る。

#### 【0392】

当業者に理解されるように、そして上記で考察されるように、（例えば、免疫原性エプトープまたは抗原性エプトープを含む）本発明のポリペプチドは、異種ポリペプチド配列に融合され得る。例えば、本発明のポリペプチド（そのフラグメントまたは改変体を含む）は、免疫グロブリン（IgA、IgE、IgG、IgM）の定常ドメイン、またはそれらの部分（CH1、CH2、CH3、もしくはそれらの任意の組み合わせおよびそれらの部分）と融合し得、これがキメラポリペプチドを生じる。別の非制限的例により、本発明のポリペプチドおよび/または抗体（そのフラグメントまたは改変体を含む）は、アルブミン（組換えヒト血清アルブミンまたはそのフラグメントもしくは改変体を含むが、これらに限定されない）と融合され得る（例えば、1999年3月2日に発行された米国特許第5,876,969号、欧州特許第0413622号、および1998年6月16日に発行された米国特許第5,766,883号を参照のこと（これらは、その全体が本明細書中で参考として援用される））。好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/または抗体（そのフラグメントまたは改変体を含む）は、ヒト血清アルブミンの成熟形態（すなわち、欧州特許第0322094号の図1および2において示されるようにヒト血清アルブミンのアミノ酸1~585）（これは、本明細書中にその全体が参考として援用される）と融合される。別の実施形態では、好ましい実施形態では、本発明のポリペプチドおよび/または抗体（そのフラグメントまたは改変体を含む）は、ヒト血清アルブミンのアミノ酸残基1~xを含むか、あるいは、これらからなるポリペプチドフラグメントと融合され、ここで、xは、1~585の整数であり、そしてアルブミンフラグメントは、ヒト血清アルブミン活性を有する。別の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/または抗体（そのフラグメントまたは改変体を含む）は、米国特許第5,766,883号（本明細書中にその全体が参考として援用される）に記載されるように、ヒト血清アルブミンのアミノ酸残基1~zを含むか、あるいは、これらからなるポリペプチドフラグメントと融合され、ここで、zは、369~419の整数である。本発明のポリペプチドおよび/または抗体（そのフラグメントまたは改変体を含む）は、異種タンパク質（例えば、免疫グロブリンFcポリペプチドまたはヒト血清アルブミンポリペプチド）のN末端またはC末端のいずれかに融合され得る。本発明の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、本発明によって含まれる。

#### 【0393】

このような融合タンパク質は、上記のように、精製を容易にし得、そしてインビボでの半減期を増大させ得る。これは、ヒトCD4-ポリペプチドの最初の2つのドメインおよび哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質について示されている。例えば、EP394,827; Traunckerら、Nature, 331:84~86(1988)を参照のこと。上皮の障壁を横切る抗原の免疫系への増強された送達は、IgGまたはFcフラグメントのようなFcRn結合パートナーへ結合体化された抗原（例えば、インスリン）について実証された（例えば、PCT公開WO96/22024および同WO99/04813を参照のこと）。IgG部分のジスルフィド結合に起因するジスルフィド連結二量体構造を有するIgG融合タンパク質はまた、単量体ポリペプチドまたはそれらのフラグメント単独よりも、他の分子の結合および中和においてより効果的であることが見出された。例えば、Fountoulakisら、J. Biochem., 270:3958-3964(1995)を参照のこと。上記のエプトープをコードする核酸はまた、エプトープタグ（例えば、赤血球凝集素（「HA」）タグまたはフラッグ（flag）タグ）として目的の遺伝子と組換えられ、発現されたポリペプチドの検出および精製を補助し得る。例えば、Jankne

10

20

30

40

50

c h tらによって記載される系は、ヒト細胞株中で発現される非変性融合タンパク質の容易な精製を可能にする (Janknechtら、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972-897)。この系において、目的の遺伝子は、ワクシニア組換えプラスミドへサブクローン化され、その結果、この遺伝子のオープンリーディングフレームが、6つのヒスチジン残基からなるアミノ末端タグへ翻訳時に融合される。このタグは、融合タンパク質についてのマトリクス結合ドメインとしての機能を果たす。組換えワクシニアウイルスを用いて感染された細胞からの抽出物は、Ni<sup>2+</sup>ニトリロ酢酸-アガロースカラム上へロードされ、そしてヒスチジンタグ化タンパク質は、イミダゾール含有緩衝液を用いて選択的に溶出され得る。

#### 【0394】

本発明のさらなる融合タンパク質は、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エキソンシャッフリング、および/またはコドンシャッフリング (総称して「DNAシャッフリング」といわれる) の技術を通じて生成され得る。DNAシャッフリングを利用して、本発明のポリペプチドの活性を調節し得、この方法を使用することにより、改変された活性を有するポリペプチド、ならびにこれらのポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを生成し得る。一般には、米国特許第5,605,793号;同第5,811,238号;同第5,830,721号;同第5,834,252号;および同第5,837,458号、ならびにPattenら、Curr. Opin. Biotechnol. 8: 724-33 (1997); Harayama, Trends Biotechnol. 16(2): 76-82 (1998); Hanssonら、J. Mol. Biol. 287: 265-76 (1999); ならびにLorenzoおよびBlasco, Biotechniques 24(2): 308-13 (1998) (これらの特許および刊行物の各々が本明細書によってその全体において参考として援用される) を参照のこと。1つの実施形態において、配列番号1または配列番号3に対応するポリヌクレオチドおよびこれらのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの改変は、DNAシャッフリングにより達成され得る。DNAシャッフリングは、相同組換えまたは部位特異的組換えにより、ポリヌクレオチド配列において変化を生じるように2つ以上のDNAセグメントをアSEMBLすることを含む。別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドまたはそのコードするポリペプチドは、組換え前に、誤りがちの (error-prone) PCR、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法による、ランダム変異誘発に供されることによって改変され得る。別の実施形態において、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの1つ以上の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、フラグメントなどは、1つ以上の異種分子の、1つ以上の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、フラグメントなどと組換えられ得る。

#### 【0395】

(抗体)

本発明は、さらに、抗体およびT細胞抗原レセプター (TCR) に関する。この抗体およびT細胞抗原レセプター (TCR) は、(特定の抗体-抗原結合のアッセイについて当該分野で周知の免疫アッセイにより決定される場合)、本発明のポリペプチド、本発明の、ポリペプチド、ポリペプチドフラグメント、あるいは配列番号2、配列番号4、もしくは配列番号18の改変体、あるいは全長ポリペプチド (またはそのフラグメントもしくは改変体)、プロタンパク質ポリペプチド配列、あるいはATCC受託番号97149もしくは75698に含まれるポリヌクレオチド配列によりコードされる分泌ポリペプチド、および/あるいはエピトープを特異的に結合する。

#### 【0396】

本発明の抗体により結合されるVEGF-2ポリペプチドは、単量体または多量体 (すなわち、二量体、三量体、四量体、およびより高次の多量体) 中にあり得る。従って、本発明は、本発明のVEGF-2ポリペプチドの単量体および多量体、これらの調製物、およびこれらを含む組成物 (好ましくは、薬学的組成物) を結合する抗体に関する。特定の実施形態において、本発明の抗体により結合されるVEGF-2ポリペプチドは、単量体

10

20

30

40

50

、二量体、三量体、または四量体である。さらなる実施形態において、本発明の抗体により結合されるポリペプチドは、少なくとも二量体、少なくとも三量体、または少なくとも四量体である。

【0397】

本発明の抗体によって結合される多量体 VEGF - 2 は、ホモマーまたはヘテロマーであり得る。VEGF - 2 ホモマーは、VEGF - 2 ポリペプチド（本明細書中に記載される、VEGF - 2 フラグメント、改変体、および融合タンパク質を含む）のみを含む多量体をいう。これらのホモマーは、同一のアミノ酸配列または異なるアミノ酸配列を有する VEGF - 2 ポリペプチドを含み得る。特定の実施形態において、本発明の抗体により結合される VEGF - 2 多量体は、ホモ二量体（例えば、同一または異なるアミノ酸配列を有する 2 つの VEGF - 2 ポリペプチドを含む）、またはホモ三量体（例えば、同一または異なるアミノ酸配列を有する 3 つの VEGF - 2 ポリペプチドを含む）である。好ましい実施形態において、本発明の抗体は、VEGF - 2 のホモ三量体を結合する。さらなる実施形態において、本発明の抗体により結合されるホモマーの VEGF - 2 多量体は、少なくともホモ二量体、少なくともホモ三量体、または少なくともホモ四量体である。

10

【0398】

ヘテロマー VEGF - 2 は、本発明の VEGF - 2 ポリペプチドに加えて、異種ポリペプチド（すなわち、異なるタンパク質のポリペプチド）を含む多量体をいう。特定の実施形態において、本発明の抗体により結合される VEGF - 2 多量体は、ヘテロ二量体、ヘテロ三量体、またはヘテロ四量体である。さらなる実施形態において、本発明の抗体により結合されるヘテロマー VEGF - 2 多量体は、少なくともヘテロ二量体、少なくともヘテロ三量体、または少なくともヘテロ四量体である。

20

【0399】

本発明の抗体により結合される VEGF - 2 多量体は、疎水性、親水性、イオン性、および/もしくは共有結合性の会合の結果であり得、そして/または、例えば、リポソーム形成によって間接的に連結され得る。従って、1 つの実施形態において、例えばホモ二量体またはホモ三量体のような VEGF - 2 多量体は、本発明のポリペプチドが溶液中で互いに接触する場合に形成される。別の実施形態において、例えば、VEGF - 2 ヘテロ三量体または VEGF - 2 ヘテロ四量体のような本発明の VEGF - 2 ヘテロ多量体は、本発明のポリペプチドが、溶液中で本発明のポリペプチドに対する抗体（本発明の融合タンパク質における異種ポリペプチド配列に対する抗体を含む）と接触する場合に形成される。別の実施形態において、VEGF - 2 多量体は、本発明の VEGF - 2 ポリペプチドとの共有結合的会合、および/または VEGF - 2 ポリペプチド間の共有結合的会合によって形成される。このような共有結合的会合は、（例えば、配列番号 2、配列番号 14 または配列番号 18 に示される）ポリペプチド配列に含まれる 1 つ以上のアミノ酸残基を含み得る。1 つの例において、この共有結合的な会合は、ネイティブ（すなわち、天然に存在する）ポリペプチド中で相互作用するポリペプチド配列内に位置するシステイン残基間の架橋である。別の例において、この共有結合的な会合は、化学的、または組換え的操作の結果である。あるいは、このような共有結合的な会合は、VEGF - 2 融合タンパク質中の異種ポリペプチド配列に含まれる 1 つ以上のアミノ酸残基を含み得る。1 つの例において、共有結合的な会合は、融合タンパク質に含まれる異種配列間にある（例えば、米国特許第 5, 478, 925 号を参照のこと）。特定の例において、この共有結合的な会合は、VEGF - 2 - Fc 融合タンパク質に含まれる異種配列間にある。別の特定の例において、本発明の融合タンパク質の共有結合的な会合は、共有結合的に会合する多量体を形成し得る別の PDGF / VEGF ファミリーリガンド / レセプターメンバーに由来する異種ペプチド配列である。例としては、米国特許第 5, 073, 627 号（本明細書中に参考として援用される）に開示されるペプチドリンカーが挙げられる。ペプチドリンカーにより分離される多量体 VEGF - 2 ポリペプチドを含むタンパク質は、従来の組換え DNA 技術を用いて生成され得る。

30

40

【0400】

50

基本的な抗体の構造単位は、四量体を構成することが公知である。各四量体は、ポリペプチド鎖の2つの同一の対からなり、各対は、1つの「軽」鎖（約25kDa）および1つの「重」鎖（約50～70kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部は、主に抗原の認識を担う約100～110以上のアミノ酸の可変領域を含む。この鎖のカルボキシ末端部は、主にエフェクター機能を担う定常領域を規定する。ヒト軽鎖は、軽鎖および軽鎖として分類される。重鎖は、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$  または  $\alpha$  として分類され、それぞれIgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEとして抗体のイソタイプを規定する。一般的に、Fundamental Immunology 第7章（Paul, W. 編、第二版、Raven Press, N.Y. (1989)）（その全体が全ての目的のために参考として援用される）を参照のこと。各軽鎖/重鎖の対の可変領域は、抗体の結合部位を形成する。

10

## 【0401】

従って、インタクトなIgG抗体は、2つの結合部位を有する。二重機能性または二重特異性の抗体を除いて、これら2つの結合部位は、同じである。

## 【0402】

これらの鎖は全て、相補性決定領域またはCDRとまた称される3つの高可変領域によって連結された、比較的保存されたフレームワーク領域（FR）の、同じ一般的構造を示す。各対の重鎖および軽鎖由来のCDRは、特定のエピトープに結合し得るフレームワーク領域によって並べられる。N末端からC末端へ、軽鎖および重鎖の両方が、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4を含む。各ドメインに対するアミノ酸の指定は、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987および1991))、またはChothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothiaら、Nature 342:878-883 (1989)の定義に従う。

20

## 【0403】

二重特異性または二重機能性の抗体は、2つの異なる重鎖/軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する人工的なハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'フラグメントの連結を含む種々の方法によって産生され得る。例えば、Songsivilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990)、Kostelnyら、J Immunol. 148:1547-1553 (1992)を参照のこと。さらに、二重特異性抗体は、「ダイアボディ (diabody)」として形成され得る (Holligerら、「Diabodies': small bivalent and bispecific antibody fragments」PNAS USA 90:6444-6448 (1993)) または「ヤヌシン (Janusin)」 (Traunekerら、「Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells」EMBO J 10:3655-3659 (1991) および Traunekerら、「Janusin: new molecular design for bispecific reagents」Int J Cancer 補遺 7:51-52 (1992))。

30

40

## 【0404】

本発明の抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体、単鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、Fab発現ライブラリーによって産生されたフラグメント、抗イデオタイプ（抗Id）抗体（例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体が挙げられる）、細胞内で生成される抗体（すなわち、イントラボディ (intrabody)）、および任意の上記の抗体のエピトープ結合フラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。本

50

明細書中で使用される場合、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、抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子）をいう。本発明の抗体としては、I g G（I g G 1、I g G 2、I g G 3、およびI g G 4を含む）、I g A（I g A 1およびI g A 2を含む）、I g D、I g E、またはI g MおよびI g Yが挙げられる。好ましい実施形態において、免疫グロブリンはI g G 1イソタイプである。別の好ましい実施形態において、この免疫グロブリンはI g G 2イソタイプである。別の好ましい実施形態において、この免疫グロブリンはI g G 4イソタイプである。免疫グロブリンは、重鎖および軽鎖の両方を有し得る。I g G、I g E、I g M、I g D、I g A、およびI g Y重鎖は、または形態の軽鎖と対になり得る。

10

## 【0405】

最も好ましくは、この抗体は、本発明のヒト抗原結合抗体フラグメントであり、これには、F a b、F a b'およびF ( a b' ) 2、F d、単鎖F v s ( s c F v )、単鎖抗体、ジスルフィド連結F v ( s d F v )およびV<sub>L</sub>またはV<sub>H</sub>ドメインのいずれかを含むフラグメントが挙げられるがこれらに限定されない。抗体は、任意の動物起源（鳥類および哺乳動物を含む）に由来し得る。好ましくは、抗体は、ヒト、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマまたはニワトリである。単鎖抗体を含む抗原結合抗体フラグメントは、可変領域を単独で、または以下の全体もしくは部分と組み合わせて含み得る：ヒンジ領域、C H 1ドメイン、C H 2ドメインおよびC H 3ドメイン。また、可変領域と、ヒンジ領域、C H 1ドメイン、C H 2ドメインおよびC H 3ドメインとの任意の組み合わせもまた含む抗原結合フラグメントが、本発明に含まれる。

20

## 【0406】

抗原結合抗体フラグメント（単鎖抗体を含む）は、可変領域のみを含み得るか、または以下の全体もしくは一部分と組み合わせて含み得る：ヒンジ領域、C H 1ドメイン、C H 2ドメインおよびC H 3ドメイン。また、本発明は、可変領域ならびにヒンジ領域、C H 1ドメイン、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメインの任意の組み合わせを含む。本発明はさらに、本発明のポリペプチドを特異的に結合するキメラ抗体、ヒト化抗体、ならびにヒトモノクローナル抗体およびヒトポリクローナル抗体を含む。本発明はさらに、本発明の抗体に対して抗イディオタイプである抗体を含む。

30

## 【0407】

本発明の抗体は、単一特異的、二価特異的、三価特異的またはより多価特異的であり得る。多価特異的抗体は、本発明のポリペプチドの異なるエピトープに特異的であり得るか、または本発明のポリペプチドならびに異種の組成物（例えば、異種のポリペプチドまたは固体支持材料）の両方に特異的であり得る。例えば、W O 9 3 / 1 7 7 1 5 ; W O 9 2 / 0 8 8 0 2 ; W O 9 1 / 0 0 3 6 0 ; W O 9 2 / 0 5 7 9 3 ; T u t t , A . ら ( 1 9 9 1 ) J . I m m u n o l . 1 4 7 : 6 0 ~ 6 9 ; 米国特許第 5 , 5 7 3 , 9 2 0 号、同第 4 , 4 7 4 , 8 9 3 号、5 , 6 0 1 , 8 1 9 号、4 , 7 1 4 , 6 8 1 号、4 , 9 2 5 , 6 4 8 号 ; K o s t e l n y , S . A . ら ( 1 9 9 2 ) J . I m m u n o l . 1 4 8 : 1 5 4 7 ~ 1 5 5 3 を参照のこと。

40

## 【0408】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドのエピトープもしくは部分（抗体により認識されるかまたは特異的に結合される）に関して記載または特定化され得る。このエピトープまたはポリペプチド部分は、本明細書において記載のように（例えば、N末端位置およびC末端位置により、隣接するアミノ酸残基のサイズにより）、または表および図に列挙されるように、特定化され得る。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、A T C C 寄託番号 9 7 1 4 9 または 7 5 6 9 8 に含まれるポリヌクレオチド配列によりコードされる全長 V E G F - 2 タンパク質を結合する。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、A T C C 寄託番号 9 7 1 4 9 または 7 5 6 9 8 に含まれるポリヌクレオチド配列によりコードされる V E G F - 2 タンパク質のプロタンパク質形態を結合する。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、A T C C 寄託番号 9 7 1 4 9 または 7 5 6 9 8 に含まれるポリヌクレオチ

50

ド配列によりコードされる分泌 V E G F - 2 タンパク質を結合する。他の好ましい実施形態では、本発明の抗体は、分泌 V E G F - 2 タンパク質を結合するが、A T C C 寄託番号 9 7 1 4 9 または 7 5 6 9 8 に含まれるポリヌクレオチド配列によりコードされる全長 V E G F - 2 タンパク質ではない。他の好ましい実施形態では、本発明の抗体は、V E G F - 2 タンパク質の分泌形態および A T C C 寄託番号 9 7 1 4 9 または 7 5 6 9 8 に含まれるポリヌクレオチド配列によりコードされる全長 V E G F - 2 タンパク質の両方を結合する。

#### 【 0 4 0 9 】

他の好ましい実施形態では、本発明の抗体は、配列番号 1 8 のアミノ酸 1 0 3 ~ 2 2 7 を結合する。他の実施形態では、本発明の抗体は、各々配列番号 1 8 のアミノ酸 1 0 3 ~ 2 2 7 からなる 2 つのポリペプチドからなる二量体 V E G F - 2 ポリペプチドを結合する。さらに他の好ましい実施形態では、本発明の抗体は、配列番号 1 8 のアミノ酸 1 1 2 ~ 2 2 7 を結合する。さらに他の実施形態では、本発明の抗体は、各々配列番号 1 8 のアミノ酸 1 1 2 ~ 2 2 7 からなる 2 つのポリペプチドからなる二量体 V E G F - 2 ポリペプチドを結合する。

#### 【 0 4 1 0 】

本発明の任意のエピトープまたはポリペプチドを特異的に結合する抗体もまた除外される。従って、本発明は、本発明のポリペプチドを特異的に結合し、そしてこのポリペプチドの除外を可能にする抗体を含む。

#### 【 0 4 1 1 】

本発明の抗体はまた、その交差反応性によって記載され得るか、または特定化され得る。本発明のポリペプチドの任意の他のアナログ、オルソログ ( o r t h o l o g ) またはホモログを結合しない抗体が含まれる。本発明のポリペプチドに対して、9 5 % 未満、9 0 % 未満、8 5 % 未満、8 0 % 未満、7 5 % 未満、7 0 % 未満、6 5 % 未満、6 0 % 未満、5 5 % 未満および 5 0 % 未満の同一性 ( 当該分野で公知の方法および本明細書において記載された方法を用いて計算される場合 ) を有するポリペプチドを結合しない抗体もまた、本発明に含まれる。特定の実施形態において、本発明の抗体は、ヒトタンパク質のマウスホモログ、サルホモログ、ラットホモログおよび / またはウサギホモログ、ならびにその対応するエピトープと交差反応する。本発明のポリペプチドに対して 9 5 % 未満の、9 0 % 未満の、8 5 % 未満の、8 0 % 未満の、7 5 % 未満の、7 0 % 未満の、6 5 % 未満の、6 0 % 未満の、5 5 % 未満のおよび 5 0 % 未満の同一性 ( 当該分野で公知の方法および本明細書において記載された方法を用いて計算される場合 ) を有するポリペプチドを結合しない抗体もまた、本発明に含まれる。特定の実施形態において、上記の交差反応性は、任意の単一の特異的抗原性ポリペプチドまたは免疫原性ポリペプチド、あるいは本明細書に開示される、2、3、4、5 以上の特定の抗原性ポリペプチドおよび / または免疫原性ポリペプチドの組み合わせに関する。さらに本発明には、( 本明細書中に記載されるような ) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのみを結合する抗体が含まれる。

#### 【 0 4 1 2 】

本発明の抗体 ( その抗体フラグメントもしくは改変体を含むか、またはこれらからなる、分子を含む ) は、ヒト V E G F - 2 ( 配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 1 8 ) および / あるいはサル V E G F - 2 のポリペプチドまたはポリペプチドフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する。好ましくは、本発明の抗体は、ヒト V E G F - 2 に免疫特異的に結合する。好ましくは、本発明の抗体は、ヒト V E G F - 2 およびサル V E G F - 2 に免疫特異的に結合する。また好ましくは、本発明の抗体は、ヒト V E G F - 2 およびマウス V E G F - 2 に免疫特異的に結合する。さらに好ましくは、本発明の抗体は、マウス V E G F - 2 よりもヒト V E G F - 2 に、免疫特異的かつより高い親和性で結合する。

#### 【 0 4 1 3 】



好ましい実施形態では、本発明の抗体（その抗体フラグメントもしくは改変体を含むか、またはこれらからなる、分子を含む）は、VEGF-2に免疫特異的に結合し、そして他の抗原と交差反応しない。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、VEGF-2に免疫特異的に結合し、そして、例えば、VEGF、VEGF-1、VEGF-3（VEGF-B）、VEGF-4（VEGF-D）、PDGFaまたはPDGFbのような、VEGF/PDGFファミリーの他のメンバーと交差反応しない。

【0414】

他の好ましい実施形態では、本発明の抗体は、VEGF-2に免疫特異的に結合し、そして、例えば、例えば、VEGF、VEGF-1、VEGF-3（VEGF-B）、VEGF-4（VEGF-D）、PDGFaまたはPDGFbのような、VEGF/PDGFファミリーの他のメンバーと交差反応する。

10

【0415】

好ましい実施形態では、本発明の抗体は、VEGF-2（配列番号2、配列番号4または配列番号18）、またはそのフラグメントおよび改変体に対して、他の抗原（例えば、他のケモカインレセプターなど）を結合する能力と比べて、優先的に結合する。

【0416】

非限定的な実施例について、抗体が、第二の抗原についての抗体の $K_D$ 未満の解離定数（ $K_D$ ）で第一の抗原に結合する場合に、この抗体は第一の抗原に優先的に結合したとみなされ得る。別の非限定的な実施形態において、抗体が第二の抗原についての抗体の $K_D$ よりも、少なくとも一オーダー程度より低い親和性で第一の抗原に結合する場合に、この抗体は、第一の抗原に優先的に結合したとみなされ得る。別の非限定的な実施例において、抗体が第二の抗原についての抗体の $K_D$ よりも、少なくとも二オーダー程度より低い親和性で第一の抗原に結合する場合に、この抗体は、第一の抗原に優先的に結合したとみなされ得る。

20

【0417】

別の非限定的な実施例において、抗体が第二の抗原についての抗体の $k_{off}$ 未満の解離速度（off rate）（ $k_{off}$ ）で第一の抗原に結合する場合に、この抗体は第一の抗原に優先的に結合したとみなされ得る。別の非限定的な実施形態において、抗体が第二の抗原についての抗体の $k_{off}$ よりも、少なくとも一オーダー程度より低い親和性で第一の抗原に結合する場合に、この抗体は、第一の抗原に優先的に結合したとみなされ得る。別の非限定的な実施例において、抗体が第二の抗原についての抗体の $k_{off}$ よりも少なくとも二オーダー程度より低い親和性で第一の抗原に結合する場合に、この抗体は、第一の抗原に優先的に結合したとみなされ得る。

30

【0418】

本発明の抗体はまた、本発明のポリペプチドに対する結合親和性に関して記載されるかまたは特定化され得る。好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-2} M$ 、 $10^{-2} M$ 、 $5 \times 10^{-3} M$ 、 $10^{-3} M$ 、 $5 \times 10^{-4} M$ 、または $10^{-4} M$ 未満の解離定数または $K_D$ を有する結合親和性が挙げられる。より好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-5} M$ 、 $10^{-5} M$ 、 $5 \times 10^{-6} M$ 、 $10^{-6} M$ 、 $5 \times 10^{-7} M$ 、 $10^{-7} M$ 、 $5 \times 10^{-8} M$ 、または $10^{-8} M$ 未満の解離定数または $K_D$ を有する結合親和性が挙げられる。さらにより好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-9} M$ 、 $10^{-9} M$ 、 $5 \times 10^{-10} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $5 \times 10^{-11} M$ 、 $10^{-11} M$ 、 $5 \times 10^{-12} M$ 、 $10^{-12} M$ 、 $5 \times 10^{-13} M$ 、 $10^{-13} M$ 、 $5 \times 10^{-14} M$ 、 $10^{-14} M$ 、 $5 \times 10^{-15} M$ 、または $10^{-15} M$ 未満の解離定数または $K_D$ を有する結合親和性が挙げられる。

40

【0419】

本発明はまた、競合的な結合を決定するための当該分野で公知の任意の方法（例えば、本明細書中に記載されるイムノアッセイ）によって決定されるような、本発明のエピトープに対する抗体の結合を競合的に阻害する抗体を提供する。好ましい実施形態において、抗体は、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%まで

50

、エピトープに対する結合を競合的に阻害する。

【0420】

本発明は、さらに、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストとして作用する抗体に関する。例えば、本発明は、本発明のポリペプチドとのレセプター/リガンド相互作用を部分的または完全にのいずれかで破壊する抗体を含む。レセプター特異的抗体およびリガンド特異的抗体の両方が含まれる。リガンド結合を妨げないがレセプターの活性化を妨げるレセプター特異的抗体が含まれる。レセプターの活性化（すなわち、シグナル伝達）は、本明細書中に記載される技術、またはさもなくば当該分野で公知の技術によって決定され得る。例えば、レセプターの活性化は、（例えば、上記されたような）免疫沈降、続いてウエスタンブロット分析によって、レセプターのリン酸化（例えば、チロシンまたはセリン/スレオニン）あるいはその基質を検出することによって決定され得る。特定の実施形態において、抗体の非存在下の活性の、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%まで、リガンド活性またはレセプター活性を阻害する抗体を提供する。

10

【0421】

本発明はまた、リガンド結合およびレセプター活性化の両方を妨げるレセプター特異的抗体、ならびにレセプター-リガンド複合体を認識し、そして、好ましくは、結合していないレセプターまたは結合していないリガンドを特異的に認識しない抗体を特徴とする。同様に、リガンドに結合し、そしてリガンドのレセプターへの結合を妨げる中和抗体、ならびにリガンドに結合し、それによってレセプター活性化を妨げるが、リガンドがレセプターに結合することは妨げない抗体が含まれる。さらに含まれるものは、レセプターを活性化する抗体である。これらの抗体は、リガンド媒介レセプター活性化により影響される全てかまたは全てに満たないかのいずれかの生物学的活性に対するアゴニストとして作用し得る。この抗体は、本明細書中に開示される特定の活性を含む生物学的活性に対するアゴニストまたはアンタゴニストとして特定化され得る。上記の抗体アゴニストは、当該分野で公知の方法を用いて作製され得る。例えば、WO96/40281；米国特許第5,811,097号；Deng, B.ら、(1998) Blood 92(6):1981-1988；Chen, Z.ら、(1998) Cancer Res. 58(16):3668-3678；Harrop, J. A.ら、(1998) J. Immunol. 161(4):1786-1794；Zhu, Z.ら、(1998) Cancer Res.:58(15):3209-3214；Yoon, D. Y.ら、(1998) J. Immunol. 160(7):3170-3179；Prat M.ら、(1998) J. Cell. Sci. 111(Pt2):237-247；Pitard, V.ら、(1997) J. Immunol. Methods 205(2):177-190；Liautard, J.ら、(1997) Cytokine 9(4):233-241；Carlson, N. G.ら、(1997) J. Biol. Chem. 272(17):11295-11301；Taryman, R. E.ら、(1995) Neuron 14(4):755-762；Muller, Y. A.ら、(1998) Structure 6(9):1153-1167；Bartunek, P.ら、(1996) Cytokine 8(1):14-20（上記の参考文献はすべて、その全体が参考として援用される）を参照のこと。

20

30

40

【0422】

本発明はまた、本明細書中に記載された1つ以上の抗体と同じ1つ以上の生物学的特徴を有する抗体（抗体フラグメントまたはその改変体を含む分子、あるいは抗体フラグメントまたはその改変体からなる分子、を含む）を包含する。「生物学的特徴」とは、例えば、以下のような、抗体のインビトロまたはインビボでの活性または特性を意味する：VEGF-2のそのレセプター（例えば、flk-1および/またはflt-4）への結合を阻害する能力（例えば、実施例33を参照のこと）、VEGF-2により誘導されるElk-1のリン酸化を阻害する能力（例えば、実施例35を参照のこと）、VEGF-2に

50

より誘導される血管および/またはリンパ性内皮細胞の増殖を阻害する能力（例えば、実施例 3 4 を参照のこと）、新脈管形成を阻害する能力（例えば、実施例 1 6 および 2 3 を参照のこと）、ならびに/あるいは、腫瘍増殖および/または腫瘍転移を阻害する能力（例えば、実施例 3 7 および 3 8 を参照のこと）。必要に応じて、本発明の抗体は、本明細書中で具体的に言及された少なくとも 1 つの抗体と同じエピトープに結合する。このようなエピトープへの結合は、当該分野で公知のアッセイを使用して、慣用的に決定され得る。

#### 【 0 4 2 3 】

本発明はまた、V E G F - 2 を中和する抗体（抗体フラグメントまたはその改変体を含む分子、あるいは抗体フラグメントまたはその改変体からなる分子、を含む）を提供し、この抗体は、表 2 において言及された s c F v の V H ドメインまたは V L ドメインの一部（例えば、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2、および/または V L C D R 3）を含むか、あるいはそれらからなる。「V E G F - 2 またはそのフラグメントもしくは改変体を中和する」抗体は、例えば、V E G F - 2 のそのレセプター（例えば、f l k - 1 および/または f l t - 4）への結合を阻害する抗体（例えば、実施例 3 3 を参照のこと）、V E G F - 2 により誘導される E l k - 1 のリン酸化を阻害する抗体（例えば、実施例 3 5 を参照のこと）、V E G F - 2 により誘導される血管および/またはリンパ性内皮細胞の増殖を阻害する抗体（例えば、実施例 3 4 を参照のこと）、新脈管形成を阻害する抗体（例えば、実施例 1 6 および 2 3 を参照のこと）、ならびに/あるいは、腫瘍増殖および/または腫瘍転移を阻害する抗体（例えば、実施例 3 7 および 3 8 を参照のこと）である。1 つの実施形態では、V E G F - 2 を中和する抗体は、表 2 において言及された s c F v の V H ドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはそのポリペプチドからなり、そして表 2 において言及された s c F v の V L ドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、V E G F - 2 を中和する抗体は、本発明の単鎖抗体（または、s c F v フラグメントもしくは F a b フラグメント）由来の V H ドメインおよび V L ドメイン、またはそれらのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。1 つの実施形態では、V E G F - 2 を中和する抗体は、表 2 において言及された s c F v の V H ドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、V E G F - 2 を中和する抗体は、表 2 において言及された s c F v の V L ドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、V E G F - 2 を中和する抗体は、表 2 において言及された s c F v の V H C D R ドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。好ましい実施形態では、V E G F - 2 またはそのフラグメントもしくは改変体を中和する抗体は、表 2 において言及された s c F v の V H C D R 3、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、V E G F - 2 またはそのフラグメントもしくは改変体を中和する抗体は、表 2 において言及された s c F v の V L C D R、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の好ましい実施形態では、V E G F - 2 またはそのフラグメントもしくは改変体を中和する抗体は、表 2 において言及された s c F v の V L C D R 3、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。これらの抗体をコードする核酸分子もまた、本発明によって包含される。

#### 【 0 4 2 4 】

本発明はまた、V E G F - 2 のそのレセプター（例えば、f l k - 1 および/または f l t - 4）への結合を阻害する抗体（抗体フラグメントまたはその改変体を含む分子、あ

10

20

30

40

50

るいは抗体フラグメントまたはその改変体からなる分子、を含む)を提供する(例えば、実施例33を参照のこと)。このような抗体は、表2において言及されたs c F vのアミノ酸配列を有するV HドメインまたはV Lドメインの一部(例えば、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2、またはV L C D R 3)、またはそのフラグメントもしくは改変体を含み得るか、あるいはそれらからなり得る。1つの実施形態では、V E G F - 2のそのレセプター(例えば、f l k - 1および/またはf l t - 4)への結合を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV Hドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなり、そして表2において言及されたs c F vのV Lドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、V E G F - 2のそのレセプター(例えば、f l k - 1および/またはf l t - 4)への結合を阻害する抗体は、本発明の単鎖抗体(または、s c F vフラグメントもしくはF a bフラグメント)由来のV HドメインおよびV Lドメイン、またはそれらのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。1つの実施形態では、V E G F - 2のそのレセプター(例えば、f l k - 1および/またはf l t - 4)への結合を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV Hドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、V E G F - 2のそのレセプター(例えば、f l k - 1および/またはf l t - 4)への結合を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV Lドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。好ましい実施形態では、V E G F - 2のそのレセプター(例えば、f l k - 1および/またはf l t - 4)への結合を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV H C D R 3、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の好ましい実施形態では、V E G F - 2のそのレセプター(例えば、f l k - 1および/またはf l t - 4)への結合を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV L C D R 3、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。これらの抗体をコードする核酸分子もまた、本発明によって包含される。

#### 【0425】

本発明はまた、例えば、実施例35に記載されるアッセイのような当該分野で公知の任意の方法によって決定されるような、V E G F - 2により誘導されるE l k - 1のリン酸化を阻害する抗体(抗体フラグメントまたはその改変体を含む分子、あるいは抗体フラグメントまたはその改変体からなる分子、を含む)を提供する。このような抗体は、表2において言及されたs c F vのアミノ酸配列を有するV HドメインまたはV Lドメインの一部(例えば、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2、またはV L C D R 3)、またはそのフラグメントもしくは改変体を含み得るか、あるいはそれらからなり得る。1つの実施形態では、V E G F - 2により誘導されるE l k - 1のリン酸化を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV Hドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなり、そして表2において言及されたs c F vのV Lドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、V E G F - 2により誘導されるE l k - 1のリン酸化を阻害する抗体は、本発明の単鎖抗体(または、s c F vフラグメントもしくはF a bフラグメント)由来のV HドメインおよびV Lドメイン、またはそれらのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。1つの実施形態では、V E G F - 2により誘導されるE l k - 1のリン酸化を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV Hドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか

10

20

30

40

50

、またはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、VEGF-2により誘導されるE1k-1のリン酸化を阻害する抗体は、表2において言及されたscFvのVLドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。好ましい実施形態では、VEGF-2により誘導されるE1k-1のリン酸化を阻害する抗体は、表2において言及されたscFvのVH CDR3、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の好ましい実施形態では、VEGF-2により誘導されるE1k-1のリン酸化を阻害する抗体は、表2において言及されたscFvのVL CDR3、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。これらの抗体をコードする核酸分子もまた、本発明によって包含される。

10

## 【0426】

本発明はまた、VEGF-2により誘導される血管および/またはリンパ性内皮細胞の増殖を阻害する抗体(抗体フラグメントまたはその改変体を含む分子、あるいは抗体フラグメントまたはその改変体からなる分子、を含む)を提供する(例えば、実施例34を参照のこと)。このような抗体は、表2において言及されたscFvのアミノ酸配列を有するVHドメインまたはVLドメインの一部(例えば、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、またはVL CDR3)、またはそのフラグメントもしくは改変体を含み得るか、あるいはそれらからなり得る。1つの実施形態では、VEGF-2により誘導される血管および/またはリンパ性内皮細胞の増殖を阻害する抗体は、表2において言及されたscFvのVHドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなり、そして表2において言及されたscFvのVLドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、VEGF-2により誘導される血管および/またはリンパ性内皮細胞の増殖を阻害する抗体は、本発明の単鎖抗体(または、scFvフラグメントもしくはFabフラグメント)由来のVHドメインおよびVLドメイン、またはそれらのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。1つの実施形態では、VEGF-2により誘導される血管および/またはリンパ性内皮細胞の増殖を阻害する抗体は、表2において言及されたscFvのVHドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、VEGF-2により誘導される血管および/またはリンパ性内皮細胞の増殖を阻害する抗体は、表2において言及されたscFvのVLドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。好ましい実施形態では、VEGF-2により誘導される血管および/またはリンパ性内皮細胞の増殖を阻害する抗体は、表2において言及されたscFvのVH CDR3、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の好ましい実施形態では、VEGF-2により誘導される血管および/またはリンパ性内皮細胞の増殖を阻害する抗体は、表2において言及されたscFvのVL CDR3、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。これらの抗体をコードする核酸分子もまた、本発明によって包含される。

20

30

40

## 【0427】

非常に好ましい実施形態では、本発明はまた、新脈管形成を阻害する抗体(抗体フラグメントまたはその改変体を含む分子、あるいは抗体フラグメントまたはその改変体からなる分子、を含む)を提供する(例えば、実施例16および24を参照のこと)。このような抗体は、表2において言及されたscFvのアミノ酸配列を有するVHドメインまたはVLドメインの一部(例えば、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、またはVL CDR3)、またはそのフラグメントもしくは

50

は改変体を含み得るか、あるいはそれらからなり得る。1つの実施形態では、新脈管形成を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV Hドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなり、そして表2において言及されたs c F vのV Lドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、新脈管形成を阻害する抗体は、本発明の単鎖抗体（または、s c F vフラグメントもしくはF a bフラグメント）由来のV HドメインおよびV Lドメイン、またはそれらのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。1つの実施形態では、新脈管形成を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV Hドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、新脈管形成を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV Lドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。好ましい実施形態では、新脈管形成を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV H C D R 3、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の好ましい実施形態では、新脈管形成を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV L C D R 3、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。これらの抗体をコードする核酸分子もまた、本発明によって包含される。

【0428】

他の非常に好ましい実施形態では、本発明はまた、腫瘍増殖および/または腫瘍転移を阻害する抗体（抗体フラグメントまたはその改変体を含む分子、あるいは抗体フラグメントまたはその改変体からなる分子、を含む）を提供する（例えば、実施例37および38を参照のこと）。このような抗体は、表2において言及されたs c F vのアミノ酸配列を有するV HドメインまたはV Lドメインの一部（例えば、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2、またはV L C D R 3）、またはそのフラグメントもしくは改変体を含み得るか、あるいはそれらからなり得る。1つの実施形態では、腫瘍増殖および/または腫瘍転移を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV Hドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなり、そして表2において言及されたs c F vのV Lドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、腫瘍増殖および/または腫瘍転移を阻害する抗体は、本発明の単鎖抗体（または、s c F vフラグメントもしくはF a bフラグメント）由来のV HドメインおよびV Lドメイン、またはそれらのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。1つの実施形態では、腫瘍増殖および/または腫瘍転移を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV Hドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、腫瘍増殖および/または腫瘍転移を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV Lドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。好ましい実施形態では、腫瘍増殖および/または腫瘍転移を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV H C D R 3、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の好ましい実施形態では、腫瘍増殖および/または腫瘍転移を阻害する抗体は、表2において言及されたs c F vのV L C D R 3、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。これらの抗体をコードする核酸分子もまた、本発明によって包含される。

【0429】

10

20

30

40

50

本発明はまた、VEGF-2の活性を増強させる抗体（抗体フラグメントまたはその改変体を含む分子、あるいは抗体フラグメントまたはその改変体からなる分子、を含む）を提供し、この抗体は、表2において言及されたscFvのVHドメインまたはVLドメインの一部（例えば、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、またはVL CDR3）を含むか、あるいはそれらからなる。限定することのない例として、「VEGF-2またはそのフラグメントもしくは改変体の活性を増強させる」抗体は、VEGF-2がそのレセプター（例えば、flk-1またはflt-4）に結合する能力、VEGF-2がVEGF-2シグナル伝達カスケードを刺激する（例えば、VEGF-2により誘導されるEtk-1のリン酸化を増加させる（実施例35を参照のこと））能力、VEGF-2が血管および/またはリンパ性内皮細胞の増殖を誘導する能力（例えば、実施例34を参照のこと）、ならびに/あるいはVEGF-2が新脈管形成を促進する能力を増加させる抗体である。1つの実施形態では、VEGF-2の活性を増強させる抗体は、表2において言及されたscFvのVHドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはそのポリペプチドからなり、そして表2において言及されたscFvのVLドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、VEGF-2の活性を増強させる抗体は、本発明の単鎖抗体（または、scFvフラグメントもしくはFabフラグメント）由来のVHドメインおよびVLドメイン、またはそれらのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。1つの実施形態では、VEGF-2またはそのフラグメントもしくは改変体の活性を増強させる抗体は、表2において言及されたscFvのVHドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、VEGF-2またはそのフラグメントもしくは改変体の活性を増強させる抗体は、表2において言及されたscFvのVLドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、VEGF-2またはそのフラグメントもしくは改変体の活性を増強させる抗体は、表2において言及されたscFvのVH CDRドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。好ましい実施形態では、VEGF-2またはそのフラグメントもしくは改変体の活性を増強させる抗体は、表2において言及されたscFvのVH CDR3、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の実施形態では、VEGF-2またはそのフラグメントもしくは改変体を増強させる抗体は、表2において言及されたscFvのVL CDR、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。別の好ましい実施形態では、VEGF-2またはそのフラグメントもしくは改変体の活性を増強させる抗体は、表2において言及されたscFvのVL CDR3、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またはそのポリペプチドからなる。これらの抗体をコードする核酸分子もまた、本発明によって包含される。

【0430】

本発明はまた、VEGF-2に免疫特異的に結合する抗体（抗体フラグメントまたはその改変体を含む分子、あるいは抗体フラグメントまたはその改変体からなる分子、を含む）と異種ポリペプチドとを含む融合タンパク質、あるいはそれらからなる融合タンパク質を提供する。好ましくは、上記抗体を融合する異種ポリペプチドは、機能のために有用であるか、または特定の細胞（腫瘍細胞、特に、前立腺癌細胞、乳癌細胞、脳の癌細胞、または結腸癌細胞）にVEGF-2抗体を標的化させるために有用である。1つの実施形態では、本発明の融合タンパク質は、表2において言及されたscFvの任意の1つ以上のVHドメインのアミノ酸配列、もしくは表2において言及されたscFvの任意の1つ以上のVLドメインのアミノ酸配列、またはそれらのフラグメントもしくは改変体を有する

10

20

30

40

50

ポリペプチドと、異種ポリペプチド配列とを含むか、またはそれらからなる。別の実施形態では、本発明の融合タンパク質は、表2において言及されたs c F vの任意の1つ、2つ、3つ、もしくはそれより多いV H C D Rのアミノ酸配列、または表2において言及されたs c F vの任意の1つ、2つ、3つ、もしくはそれより多いV L C D Rのアミノ酸配列、またはそれらのフラグメントもしくは改変体を有するポリペプチドと、異種ポリペプチド配列とを含むか、またはそれらからなる。好ましい実施形態では、この融合タンパク質は、表2において言及されたs c F vのV H C D R 3のアミノ酸配列、またはそのフラグメントもしくは改変体を有するポリペプチドと、異種ポリペプチド配列とを含むか、またはそれらからなり、この融合タンパク質は、V E G F - 2に免疫特異的に結合する。別の実施形態では、融合タンパク質は、表2において言及されたs c F vの少なくとも1つのV Hドメインのアミノ酸配列、および表2において言及されたs c F vの少なくとも1つのV Lドメインのアミノ酸配列、またはそれらのフラグメントもしくは改変体を有するポリペプチドと、異種ポリペプチド配列とを含むか、またはそれらからなる。好ましくは、融合タンパク質のV HドメインおよびV Lドメインは、本発明の単鎖抗体（または、s c F vフラグメントもしくはF a bフラグメント）に対応する。さらに別の実施形態では、本発明の融合タンパク質は、表2において言及されたs c F vの任意の1つ、2つ、3つ、もしくはそれより多いV H C D Rのアミノ酸配列、および表2において言及されたs c F vの任意の1つ、2つ、3つ、もしくはそれより多いV L C D Rのアミノ酸配列、またはそれらのフラグメントもしくは改変体を有するポリペプチドと、異種ポリペプチド配列とを含むか、またはそれらからなる。好ましくは、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれより多いV H C D RまたはV L C D Rが、本発明の単鎖抗体（または、s c F vフラグメントもしくはF a bフラグメント）に対応する。これらの融合タンパク質をコードする核酸分子もまた、本発明によって包含される。

#### 【0431】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドを精製、検出および標的化するための当該分野で公知の方法を含むがこれに限定されない用途を有する（インビトロおよびインビボの両方における診断方法および治療方法を含む）。例えば、この抗体は、生物学的サンプル中の本発明のポリペプチドのレベルを定性的および定量的に測定するためのイムノアッセイにおける使用を有する。例えば、この抗体は、生物学的サンプル中の本発明のポリペプチドのレベルを定性的および定量的に測定するためのイムノアッセイにおける用途を有する。例えば、Harlowら、ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL、(Cold Spring Harbor Laboratory Press、第2版、1988)(その全体が本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。

#### 【0432】

限定することのない別の例として、本発明の抗体は、受動免疫の形態として個体に投与され得る。あるいは、本発明の抗体をエピトープマッピングのために使用して、抗体により結合されるエピトープを同定し得る。このようにして同定されたエピトープは、次に、例えば、ワクチン候補物（すなわち、個体を免疫化し、天然に存在する形態のV E G F - 2に対する抗体を惹起するため）に使用され得る。

#### 【0433】

本発明の抗体は、単独または他の組成物との組み合わせのいずれかで用いられ得る。この抗体は、さらに、N末端もしくはC末端で異種ポリペプチドに組換え的に融合され得るか、またはポリペプチドもしくは他の組成物に化学的に結合（共有結合および非共有結合を含む）され得る。例えば、本発明の抗体は、検出アッセイにおける標識として有用な分子およびエフェクター分子（例えば、異種ポリペプチド、薬物または毒素）に、組換え的に融合され得るかまたは結合され得る。例えば、P C T公開W O 9 2 / 0 8 4 9 5 ; W O 9 1 / 1 4 4 3 8 ; W O 8 9 / 1 2 6 2 4 ; 米国特許第5, 3 1 4, 9 9 5号; およびE P 0 3 9 6 3 8 7号を参照のこと。

#### 【0434】

本発明の抗体は、改変された（すなわち、抗体に対する任意の分子型の共有結合による

10

20

30

40

50



誘導体を含む。例えば、限定を目的としてではなく、この抗体誘導体としては、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化 (pegylation)、リン酸化、アミド化、既知の保護基/ブロック基 (blocking group) による誘導体化、タンパク質分解性切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への連結などによって改変された抗体が挙げられる。多数の任意の化学的改変が、特異的の化学切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝的合成などを含むが、これらに制限されない公知の技術によって実施され得る。さらに、誘導体は、1つ以上の非古典的アミノ酸を含み得る。

【0435】

本発明の抗体は、当該分野で公知の任意の適切な方法によって調製され得る。例えば、本発明のポリペプチドまたはその抗原性フラグメントは、この抗原に特異的なポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導するために、動物に投与され得る。種々のアジュバントが、宿主種に依存して、免疫学的応答を増加させるために使用され得、そしてフロイント (完全および不完全)、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル (mineral gel)、リゾレシチンのような界面活性物質、プルロニック (pluronic) ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびにBCG (カルメット-ゲラン杆菌) および *Corynebacterium parvum* のような潜在的に有用なヒトアジュバントを含むが、これらに限定されない。このようなアジュバントはまた、当該分野で周知である。

【0436】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマおよび組換え技術の使用を含む、当該分野で公知の広範な技術を用いて調製され得る。例えば、Harlowら、ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版、1988); Hammerlingら、MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS 563-681 (Elsevier, N.Y. 1981) (上記の参考文献は、その全体が参考として援用される) を参照のこと。本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」とは、ハイブリドーマ技術を介して生成された抗体に限定されない。用語「モノクローナル抗体」とは、任意の真核生物クローン、原核生物クローン、またはファージクローンを含む単一のクローンに由来する抗体をいい、そしてそれを産生する方法に由来する抗体ではない。

【0437】

ハイブリドーマ技術を用いて特異的抗体を産生およびスクリーニングする方法は、当該分野で慣用的でありそして周知である。限定することのない例において、マウスは、本発明のポリペプチドまたはそのようなペプチドを発現する細胞を用いて免疫され得る。一旦免疫応用が検出される (例えば、抗原に特異的な抗体が、マウスの血清中に検出される) と、そのマウスの脾臓を収集しそして脾細胞を単離する。次いで、その脾細胞を周知技術によって任意の適切な骨髄腫細胞 (例えば、ATCCから入手可能な細胞株SP2/0由来の細胞) に融合させる。ハイブリドーマを、限界希釈によって選択およびクローン化する。次に、ハイブリドーマクローンを、本発明のポリペプチドに結合し得る抗体を分泌する細胞について、当該分野で公知の方法によってアッセイする。一般的に高いレベルの抗体を含む腹水が、陽性ハイブリドーマクローンを介してマウスに免疫することによって産生され得る。

【0438】

従って、本発明は、モノクローナル抗体を産生する方法および本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養する工程を包含する方法によって産生される抗体を提供し、ここで、好ましくは、このハイブリドーマは、本発明の抗原で免疫したマウスから単離された脾細胞と骨髄腫細胞とを融合させ、次いで本発明のポリペプチドに結合し得る抗体を分泌するハイブリドーマクローンについて、その融合から生じるハイブリドーマをスクリーニングすることによって産生される。

【0439】

10

20

30

40

50

ポリクローナル性およびモノクローナル性のヒトB細胞株の両方を生産する別の周知の方法は、エプスタインバーウイルス（EBV）を使用する形質転換である。EBV形質転換B細胞株を産生するためのプロトコル（例えば、Current Protocols in Immunology、Coligenら編、1994、John Wiley & Sons、NY（これは、その全体が本明細書中で参考として援用される）の第7.22章に概略されるプロトコル）が、当該分野で一般的に知られている。形質転換のためのB細胞の供給源は、一般的にヒト末梢血であるが、形質転換のためのB細胞はまた、以下に挙げられる他の供給源に由来し得るが、これらに限定されない：リンパ節、扁桃腺、脾臓、腫瘍組織、および感染した組織。一般的に組織は、EBV形質転換の前に単細胞懸濁液になされる。さらに、B細胞を含むサンプル中のT細胞を物理的に取り除くか、またはT細胞を不活化（例えば、シクロスポリンAを用いる処理によって）する工程がとられ得る。なぜなら、抗EBV抗体について血清陽性の個体由来のT細胞は、EBVによるB細胞の不死化を抑制し得るからである。一般的に、ヒトB細胞を含むサンプルにEBVを接種し、そして3～4週間培養する。EBVの代表的な供給源は、B95-8細胞株（ATCC#VR-1492）の培養上清である。EBV形質転換の物理学的徴候は、一般的に、3～4週間の培養期間の最後に観察され得る。位相差顕微鏡によって、形質転換された細胞は、大きく、明瞭で、毛様（hairy）に見え、そして細胞の密集したクラスター状に凝集する傾向にあり得る。一般的に、最初EBV株はポリクローナルである。しかし、過剰に長期にわたった細胞培養物のEBV株は特定のB細胞クローンの選択的な増殖の結果としてモノクローナルまたはポリクローナルになり得る。あるいは、ポリクローナル性のEBV形質転換株は、適切な融合パートナーでサブクローニング（例えば、限界希釈培養によって）され得るか、または融合され得、そして限界希釈でプレートされ、モノクローナルB細胞株を入手し得る。EBV形質転換細胞株のための適切な融合パートナーとして、マウス骨髄腫細胞株（例えば、SP2/0、X63-Ag8.653）、ヘテロ骨髄腫細胞株（ヒト×マウス；例えば、SPAM-8、SBC-H20、およびCB-F7）、およびヒト細胞株（例えば、GM1500、SKO-007、RPMI 8226、およびKR-4）が挙げられる。従って、本発明はまた、本発明のポリペプチドまたはこれらのフラグメントに対するポリクローナル性またはモノクローナル性のヒト抗体を作製する方法を提供し、この方法は、ヒトB細胞のEBV形質転換を包含する。

#### 【0440】

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の技術によって作製され得る。例えば、本発明のFabフラグメントおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、例えば、パパイン（Fabフラグメントを産生するため）またはペプシン（F(ab')<sub>2</sub>フラグメントを産生するため）のような酵素を用いて免疫グロブリン分子のタンパク質分解性切断によって産生され得る。F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、可変領域、軽鎖含有領域、および重鎖のCH1ドメインを含む。

#### 【0441】

あるいは、本発明の抗体は、当該分野で公知の方法を使用して、組換えDNA技術の適用を通してかまたは合成化学を通して産生され得る。例えば、本発明の抗体は、当該分野で公知の種々のファージディスプレイ法を使用して調製され得る。ファージディスプレイ法において、機能的抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面に提示される。所望される結合特性を有するファージは、抗原（代表的には、固体表面またはビーズに結合または捕捉された抗原）を用いて直接的に選択することによって、レポトリまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒトまたはマウス）から選択される。これらの方法において用いられるファージは、代表的には、ファージ遺伝子IIIタンパク質またはファージ遺伝子VIIタンパク質のいずれかに組換え的に融合されたFab、Fvまたはジスルフィドで安定化されたFvの抗体ドメインを有する系状ファージ（fdおよびM13を含む）である。本発明の抗体を作製するために用いられ得るファージディスプレイ方法の例としては、以下に開示される方法が挙げられる：Brinkman U.ら（1995）、J. Immunol. Metho

10

20

30

40

50

ds 182:41-50; Ames, R. S. ら (1995)、J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough, C. A. ら (1994)、Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic, L. ら (1997)、Gene 187:9-18; Burton, D. R. ら (1994)、Advances in Immunology 57:191-280; PCT/GB91/01134; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; ならびに米国特許第5,698,426号; 同第5,223,409号; 同第5,403,484号; 同第5,580,717号; 同第5,427,908号; 同第5,750,753号; 同第5,821,047号; 同第5,571,698号; 同第5,427,908号; 同第5,516,637号; 同第5,780,225号; 同第5,658,727号; および同第5,733,743号(これらの参考文献は、本明細書中でその全体が参考として援用される)。

10

## 【0442】

上記参考文献に記載されるように、ファージ選択後、ファージ由来の抗体コード領域は、ヒト抗体を含む抗体の全体または任意の他の所望の抗原結合フラグメントを生成するために単離および使用され得、そして、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌を含む任意の所望の宿主において発現され得る。例えば、Fabフラグメント、Fab'フラグメントおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを組換え的に産生するための技術はまた、当該分野で公知の方法を用いて使用され得、このような方法は、例えば、以下に開示される: WO 92/22324; Mullinax, R. L. ら (1992)、Bio Techniques 12(6):864-869; および Sawai, H. ら (1995)、AJRI 34:26-34; および Better, M. ら (1988)、Science 240:1041-1043(これらの参考文献は、その全体が参考として援用される)。

20

## 【0443】

単鎖のFvおよび抗体を産生するために用いられ得る技術の例としては、米国特許第4,946,778号および同第5,258,498号; Houston ら (1991)、Methods in Enzymology 203:46-88; Shu, L. ら (1993)、PNAS 90:7995-7999; および Skerra, A. ら (1988)、Science 240:1038-1040に記載される技術が挙げられる。ヒトにおける抗体のインビボでの使用およびインビトロ検出アッセイを含むいくつかの用途のために、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体の使用が好適であり得る。キメラ抗体を産生するための方法は、当該分野において公知である。例えば、Morrisson, Science 229:1202(1985); Oi ら、Bio Techniques 4:214(1986); Gillies, S. D. ら、(1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; ならびに米国特許第5,807,715号; 同第4,816,567号; および同第4,816,397号を参照のこと(これらはそれらの全体が、参考として本明細書中に援用される)。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の1つ以上の相補性決定領域(CDR)およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する所望された抗原に結合する非ヒト種抗体由来の抗体分子である。しばしば、ヒトフレームワーク領域内のフレームワーク残基(framework residue)は、抗原結合を変化させるため(好ましくは改善させるために)CDRドナー抗体由来の対応残基で置換される。これらフレームワークの置換は、当該分野で周知の方法(例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリング、ならびに特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較によって(例えば、Queen ら、米国特許第5,585,089号; Riechmann ら、Nature 332:323(1988)を参照のこと(これらはそれらの全体が参考として本明細書中に援用される))、同定される。

30

40

## 【0444】

50

抗体は、以下を含む種々の技術を用いてヒト化され得る：CDR - グラフティング (grafting) (EP 0 239 400号; WO 91/09967; 米国特許第5,530,101号および同第5,585,089号)、ベニヤリング (veneer ing) またはリサーフェイシング (resurfacing) (EP 0 592 106号; EP 0 519 596号; Padlan, E. A. (1991)、Molecular Immunology 28(4/5): 489-498; Studnicka, G. M. ら (1994)、Protein Engineering 7(6): 805-814; Roguska M. A. ら (1994)、PNAS 91: 969-973)、およびチェーンシャッフリング (chain shuffling) (米国特許第5,565,332号)。ヒト抗体は、上記のファージディスプレイ法を含む、当該分野で公知の種々の方法によって作製され得る。また、米国特許第4,444,887号、同第4,716,111号、同第5,545,806号、および同第5,814,318号; ならびにWO 98/46645を参照のこと(これらの参考文献は、その全体において参考として援用される)。

#### 【0445】

完全なヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置のために特に所望される。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いた上記のファージディスプレイ法を含む当該分野で公知の種々の方法により作製され得る。米国特許第4,444,887号、同第4,716,111号; およびPCT公開WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735、およびWO 91/10741; (これらの各々はその全体が参考として本明細書中に援用される) もまた参照のこと。

#### 【0446】

ヒト抗体はまた、機能的内因性免疫グロブリンを発現し得ないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現し得るトランスジェニックマウスを用いて産生され得る。例えば、ヒト重鎖免疫グロブリン遺伝子およびヒト軽鎖免疫グロブリン遺伝子の複合体は、無作為にまたは相同組換えによってマウス胚性幹細胞に導入され得る。あるいは、ヒト可変領域、定常領域および多様性領域 (diversity region) が、ヒト重鎖遺伝子およびヒト軽鎖遺伝子に加えて、マウスの胚性幹細胞に導入され得る。マウス重鎖免疫グロブリン遺伝子およびマウス軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入と別々にまたはそれと同時に非機能的になされ得る。特に、JH領域のホモ接合性の欠失は、内因性抗体の産生を妨げる。改変された胚性幹細胞を拡大させ、そしてキメラマウスを産生するために胚盤胞中に微量注入する。次に、キメラマウスを、ヒト抗体を発現するホモ接合性の子孫を産生するために交配させる。トランスジェニックマウスを、選択された抗原(例えば、本発明のポリペプチドの全体または部分)を用いて通常の様式で免疫する。抗原に対するモノクローナル抗体は、従来ハイブリドーマ技術を用いて、免疫したトランスジェニックマウスから得られ得る。トランスジェニックマウスに保有されたヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の間に再編成し、そしてその後、クラススイッチおよび体細胞変異を受ける。従って、そのような技術を使用して、治療的に有用なIgG抗体、IgA抗体、IgM抗体およびIgE抗体を産生することが可能である。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概要については、LonbergおよびHuszar、Int. Rev. Immunol. 13: 65-93(1995)を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技術のならびにそのような抗体を産生するためのプロトコールの詳細な考察については、例えば、PCT公開WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; 欧州特許第0 598 877; 米国特許第5,413,923号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 同第5,569,825号; 同第5,661,016号; 同第5,545,806号; 同第5,814,318号; 同第5,885,793号; 同第5,916,771号; 同第5,939,598号; 同第6,075,181号; および同第6,114,598号(これらはその全体が本明細書中に参考とし

10

20

30

40

50

て援用される)を参照のこと。さらに、Abgenix, Inc. (Fremont, CA)およびGenpharm (San Jose, CA)のような企業は、上記の技術に類似した技術を用いて、選択された抗原に対して指向するヒト抗体を提供することに従事し得る。

【0447】

選択されたエピトープを認識する完全なヒト抗体を、「ガイド選択(guided selection)」といわれる技術を用いて産生し得る。このアプローチにおいて、選択された非ヒトモノクローナル抗体(例えば、マウス抗体)は、同じエピトープを認識する完全なヒト抗体の選択を導くために使用される。(Jespersら、Bio/technology 12:899-903(1988))。

10

【0448】

さらに、本発明のポリペプチドに対する抗体は、次いで、当業者に周知の技術を用いて本発明のポリペプチドを「模倣する」抗イデオタイプ抗体を産生するために利用され得る。(例えば、Greenspan&Bona、FASEB J. 7(5):437-444;(1989)およびNissinoff, J. Immunol. 147(8):2429-2438(1991)を参照のこと)。例えば、リガンドに結合し、かつポリペプチドの多量体化および/またはリガンドに対する本発明のポリペプチドの結合を競合的に阻害する抗体が、ポリペプチドの多量体化ドメインおよび/または結合ドメインを「模倣」し、そして結果として、ポリペプチドおよび/またはそのリガンドに結合し、そして中和する抗イデオタイプを産生するために使用され得る。このような抗イデオタイプまたはそのような抗イデオタイプのFabフラグメントの中和は、ポリペプチドリガンドを中和するための治療的レジメンに使用され得る。例えば、そのような抗イデオタイプ抗体は、本発明のポリペプチドに結合するため、および/またはそのリガンド/レセプターに結合するために使用され得、そしてそれによってその生物学的活性が活性化されるか、またはブロックされる。

20

【0449】

イントラボディー(intrabody)は、組換え核酸分子から発現される抗体(しばしば、scFv)であり、そして細胞内に保持される(例えば、細胞質、小胞体、またはペリプラズムに保持される)ように操作される。イントラボディーを使用して、例えば、イントラボディーが結合するタンパク質の機能を排除し得る。イントラボディーの発現はまた、イントラボディーを含む核酸発現ベクター中の誘導可能なプロモーターの使用を介して調節され得る。本発明のイントラボディーは、以下に開示および概説されるように、当該分野で公知の方法を使用して産生され得る:Chenら、Hum. Gene Ther. 5:595~601(1994);Marasco, W. A., Gene Ther. 4:11~15(1997);RondonおよびMarasco, Annu. Rev. Microbiol. 51:257~283(1997);Probaら、J. Mol. Biol. 275:245~253(1998);Cohenら、Oncogene 17:2445~2456(1998);OhageおよびSteipe, J. Mol. Biol. 291:1119~1128(1999);Ohageら、J. Mol. Biol. 291:1129~1134(1999);WirtzおよびSteipe, Protein Sci. 8:2245~2250(1999);Zhuら、J. Immunol. Methods 231:207~222(1999);およびこれらにおいて引用されている参考文献。特に、CCR5イントラボディーが、Steinbergerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:805~810(2000)によって産生されている。

30

40

【0450】

(XenoMouse技術)

本発明による抗体は、挿入されたヒト抗体産生ゲノムの実質的な部分を有するが、外因性マウス抗体の産生を欠損させるトランスジェニックマウスの使用により調製され得る(例えば、XenoMouse系統はAbgenix Inc., Fremont, CAか

50

ら入手可能)。次いで、このようなマウスは、ヒト免疫グロブリン分子および抗体を産生し得、そしてマウス免疫グロブリン分子および抗体の産生を欠損する。同じことを達成するために使用される技術が、特許、出願および本明細書中に開示される参考文献に開示される。

【0451】

YACのメガベースの大きさのヒト遺伝子座をクローン化し、そして再構築する能力、およびそれらをマウスの生殖系列に導入する能力は、非常に大きなまたは大雑把にマッピングされた遺伝子座の機能的な成分の解明ならびにヒト疾患の有用なモデル作成に対する強力なアプローチを提供する。さらに、マウス遺伝子座のそれらのヒト等価物との置換のためのこのような技術の使用は、発生期のヒト遺伝子産物の発現および調節、それらの他の系との係わり合い、ならびに疾患の誘導および進行とそれらの関連に独特な知見を提供し得る。

10

【0452】

このようなストラテジーの重要な実用的適用は、マウス体液性免疫系の「ヒト化」である。ヒト免疫グロブリン(Ig)遺伝子座のマウスへの導入において、外因性Ig遺伝子は不活化され、プログラムされた発現の基礎となるメカニズムを研究する機会を与え、そして抗体およびB細胞発生におけるこれらの役割を構築する。さらに、このようなストラテジーは、完全ヒトモノクローナル抗体(MAb)の産生のための理想的な供給源を提供し得、ヒト疾患における抗体治療の期待を実現することへの重要な布石である。

【0453】

完全ヒト抗体は、マウスまたはマウス誘導モノクローナル抗体に対する内因性の免疫原性およびアレルギー性の応答を最小にし、従って、投与される抗体の効力および安全性を高めることが期待される。完全ヒト抗体の使用は、繰り返し抗体の投与が必要な慢性的および再発性のヒト疾患(例えば、癌)の処置において実質的な利益を提供することが期待され得る。

20

【0454】

この目的に対する1つのアプローチは、マウス抗体産生を欠損するマウス系統を、このようなマウスが、マウス抗体の非存在下でヒト抗体の巨大レパートリーを産生することを予測して、ヒトIg遺伝子座の巨大フラグメントを用いて操作することである。巨大ヒトIgフラグメントは、巨大可変遺伝子多様性ならびに抗体産生および発現の適切な調節を保持する。抗体多様化および選択についてのマウスの機構ならびにヒトタンパク質に対する免疫学的耐性の欠如を開発することによって、これらのマウス系統における再生されたヒト抗体レパートリーは、ヒト抗原を含む目的の任意の抗原に対する高い親和性の抗体を生じるはずである。ハイブリドーマ技術を使用して、所望の特異性を有する抗原特異的ヒトモノクローナル抗体は、容易に産生および選択され得る。

30

【0455】

この一般的なストラテジーは、1994年に発行された最初のXenomouse<sup>TM</sup>系統の作製に関連して示された。Greenら、Nature Genetics 7: 13~21(1994)を参照のこと。Xenomouse<sup>TM</sup>系統を245kbおよび10190kbの大きさの生殖系列配置のフラグメント(それぞれ、ヒト重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座(これらは核可変領域配列および定常領域配列に含まれる))を含む酵母人工染色体(YACS)で操作した。同上。YACを含むヒトIgは、再配列および抗体の発現の両方のためにマウス系と適合するように検証され、そして不活化されたマウスIg遺伝子を置換し得た。このことは、B細胞発生を誘発し、完全ヒト抗体の成人様ヒトレパートリーを産生し、そして抗原特異的ヒトモノクローナル抗体を生成するこれらの能力によって実証された。これらの結果はまた、より多数のV遺伝子、さらなる調節エレメント、およびヒトIg定常領域を含むヒトIg遺伝子座のより大きな部分の導入が、感染および免疫化に対するヒト体液性応答の特徴である完全レパートリーを実質的に再利用することを示唆した。最近、Greenらの研究を、Xenomouse<sup>TM</sup>マウスを作製するために、ヒト重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座それぞれのメガベースの大きさの

40

50

生殖系列配置のYACフラグメントの導入を介して約80%より大きいヒト抗体レパートリーの導入にまで発展させた。Mendezら、Nature Genetics 15:146~156(1997)、GreenおよびJakobovits J Exp. Med. 188:483~495(1998)、Green、Journal of Immunological Methods 231:11~23(1999)および米国特許出願番号08/759,620(1996年12月3日出願)(これらの開示は、本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。

【0456】

このようなアプローチは、さらに以下において議論され、そして描写される：米国特許出願番号07/466,008(1990年1月12日出願)、同07/710,515(1990年11月8日出願)、同07/919,297(1992年7月24日出願)、同07/922,649(1992年7月30日出願)、同08/031,801(1993年3月15日出願)、同08/112,848(1993年8月27日出願)、同08/234,145(1994年4月28日出願)、同08/376,279(1995年1月20日出願)、同08/430,938(1995年4月27日出願)、同08/464,584(1995年6月5日出願)、同08/464,582(1995年6月5日出願)、同08/471,191(1995年6月5日出願)、同08/462,837(1995年6月5日出願)、同08/486,853(1995年6月5日出願)、同08/486,857(1995年6月5日出願)、同08/486,859(1995年6月5日出願)、同08/462,513(1995年6月5日出願)、同08/724,752(1996年10月2日出願)、および08/759,620(1996年12月3日出願)。Mendezら、Nature Genetics 15:146~156(1997)ならびにGreenおよびJakobovits J Exp. Med. 188:483~495(1998)もまた参照のこと。欧州特許番号EP 0471 151 B1(1996年6月12日許可公開)、国際特許出願番号WO 94/02602(1994年2月3日公開)、国際特許出願番号WO 96/34096(1996年10月31日公開)および同WO 98/24893(1998年6月11日公開)もまた参照のこと。上記列挙した特許、出願、および参考文献のそれぞれの開示は、その全体が参考として本明細書中に援用される。

【0457】

ヒト抗マウス抗体(HAMA)応答は、キメラまたは他のヒト化抗体を調製する産業をもたらした。キメラ抗体は、ヒト定常領域およびマウス可変領域を含むが、特定のヒト抗キメラ抗体(HACA)応答が、特に慢性の抗体の利用または抗体の多回用量利用において観察されることが予想される。従って、VEGF-2ポリペプチドに対する完全ヒト抗体が提供されることが、HAMA応答またはHACA応答の関連および/または影響を無くすために望まれる。

【0458】

ファージディスプレイ技術を使用して、本発明者らは、VEGF-2に免疫特異的に結合する単鎖抗体分子(「scFv」)を同定した。VEGF-2(もしくはフラグメントまたはこれらの改変体であって、VEGF-2のプロタンパク質形態およびVEGF-2の分泌形態を含む)に免疫特異的に結合する、これらのscFvのフラグメントまたは改変体(例えば、表2において参照されるいずれか1つのアミノ酸配列を有する、VHドメイン、VH CDR、VLドメイン、またはVL CDRが挙げられる)を含むか、またはこれらから構成される分子はまた、これらのscFvおよび/または分子をコードする核酸分子であるように、本発明によって包含される。

【0459】

特に、本発明は、以下の表2において参照されるように、配列番号72~78、好ましくは、配列番号72および73からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むscFvか、あるいは、これらの配列からなるscFvに関する。VEGF-2に免疫特異的に結合する、これらのscFvのフラグメントまたは改変体(例えば、表2に参照されるいずれ

10

20

30

40

50

か1つのアミノ酸配列を有する、VHドメイン、VH CDR、VLドメイン、またはVL CDRが挙げられる)を含むか、あるいはこれらから構成される分子はまた、これらのscFvおよび/または分子をコードする核酸分子であるように、本発明によって包含される。

【0460】

本発明は、VEGF-2のポリペプチドまたはポリペプチドフラグメントに免疫特異的に結合する、抗体(これらの抗体フラグメントまたは改変体を含むか、あるいはこれらから構成される分子を含む)を提供する。特に、本発明は、表2に参照されるscFvに対応する抗体を提供し、このようなscFvは、慣用的に、以下の実施例32においてより詳細に記載されるように、例えば、scFvのVHドメインおよび/またはVLドメインをコードするヌクレオチド配列を、定常ドメイン配列を含む発現ベクターに挿入することによって、免疫グロブリン分子に「変換」され得、そして免疫グロブリン分子の発現を指示するように操作され得る。

10

【0461】

(表2: VEGF-2に免疫特異的に結合するscFv)

【0462】



【 表 2 】

scFv	scFv 配列番号	VH ドメイン の AA	VH CDR1 の AA	VH CDR2 の AA	VH CDR3 の AA	VL ドメイン の AA	VL CDR1 の AA	VL CDR2 の AA	VL CDR3 の AA	抗体を 発現する 細胞株	ATCC 寄託番号	寄託年月日
69D09	79	1-118	26-35	50-66	108-117	136-247	158-170	186-192	225-236	NSO-マウス 骨髄腫	PTA-4095	2002年2月21日
72D09	80	1-118	26-35	50-66	99-107	135-246	157-169	185-191	224-235			
25A07	81	1-118	26-35	50-66	99-107	119-230	141-153	169-175	208-219	NSO-マウス 骨髄腫	PTA-4179	2002年3月25日
32G10X	82	1-128	26-35	50-66	99-117	129-235	151-161	177-183	216-224	NSO-マウス 骨髄腫	PTA-4096	2002年2月21日
30E06X	83	1-128	26-35	50-66	99-117	129-235	151-161	177-183	216-224	NSO-マウス 骨髄腫	PTA-4180	2002年3月25日
17D06	72	1-122	26-35	50-66	99-110	139-250	161-173	189-195	228-239			
16C10	73	1-129	26-35	50-66	99-117	146-252	168-178	194-200	233-241			
16B06	74	1-122	26-35	50-66	99-110	138-247	160-173	189-196	228-238			
19B09	75	1-124	26-37	52-67	100-112	140-251	162-175	191-197	230-240			
20D05	76	1-127	26-35	50-66	99-115	143-253	165-177	193-199	232-242			
20G02	77	1-118	26-35	50-66	99-106	134-244	156-169	185-191	224-233			
20G11	78	1-121	26-35	50-66	99-109	138-248	160-172	188-194	229-237			

1つの実施形態において、本発明は、配列番号72のscFv（もしくはフラグメントまたはこれらの改変体）を提供する。別の実施形態において、本発明は、配列番号72の

10

20

30

40

50

s c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) をコードする核酸分子を提供する。

【0463】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号73のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) を提供する。別の実施形態において、本発明は、配列番号73のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) をコードする核酸分子を提供する。

【0464】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号74のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) を提供する。別の実施形態において、本発明は、配列番号74のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) をコードする核酸分子を提供する。

10

【0465】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号75のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) を提供する。別の実施形態において、本発明は、配列番号75のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) をコードする核酸分子を提供する。

【0466】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号76のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) を提供する。別の実施形態において、本発明は、配列番号76のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) をコードする核酸分子を提供する。

20

【0467】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号77のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) を提供する。別の実施形態において、本発明は、配列番号77のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) をコードする核酸分子を提供する。

【0468】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号78のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) を提供する。別の実施形態において、本発明は、配列番号78のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) をコードする核酸分子を提供する。

30

【0469】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号79のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) を提供する。別の実施形態において、本発明は、例えば、配列番号84において見出されるように、配列番号79のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) をコードする核酸分子を提供する。

【0470】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号80のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) を提供する。別の実施形態において、本発明は、例えば、配列番号85において見出されるように、配列番号80のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) をコードする核酸分子を提供する。

40

【0471】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号81のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) を提供する。別の実施形態において、本発明は、配列番号81のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) をコードする核酸分子を提供する。

【0472】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号82のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) を提供する。別の実施形態において、本発明は、配列番号82の

50

s c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) をコードする核酸分子を提供する。

【0473】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号83のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) を提供する。別の実施形態において、本発明は、配列番号83のs c F v (もしくはフラグメントまたはこれらの改変体) をコードする核酸分子を提供する。

【0474】

本発明は、VEGF-2ポリペプチド、またはこれらのフラグメント、改変体、もしくは融合タンパク質に免疫特異的に結合する抗体(抗体フラグメントまたはそれらの改変体を含むか、あるいはこれらから構成される分子を含む)を包括する。VEGF-2ポリペプチドとしては、配列番号2、配列番号4もしくは配列番号18のVEGF-2ポリペプチド、またはそれぞれ1995年5月12日および1995年5月4日に寄託されたATCC受託番号97149もしくは75698に含まれるcDNAによってコードされるポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体によって結合されるVEGF-2ポリペプチドは、VEGF-2の全長タンパク質、プロタンパク質、または分泌形態であり得る。VEGF-2は、配列番号2、配列番号4または配列番号18のポリペプチドをコードする核酸(例えば、ATCC受託番号97149または75698のcDNA)の組換え発現を介して産生され得る。

【0475】

本発明の1つの実施形態において、VEGF-2またはこれらのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する抗体は、表2で参照されるs c F vのVHドメインのいずれか1つ、および/または表2で参照されるs c F vのVLドメインのいずれか1つのアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。好ましい実施形態において、本発明の抗体は、表2で参照されるs c F vからなる群より選択される同一のs c F v由来のVHドメインおよびVLドメインのアミノ酸配列を含む。代替的な実施形態において、本発明の抗体は、表2で参照されるs c F vと異なるVHドメインおよびVLドメインのアミノ酸配列を含む。VEGF-2に免疫特異的に結合する表2で参照されるs c F vのVHドメインおよび/もしくはVLドメインの抗体フラグメントまたは改変体を含むか、あるいはこれらから構成される分子はまた、これらのVHドメインおよびVLドメイン、分子、フラグメントならびに/または改変体のように、本発明により包含される。

【0476】

本発明はまた、VEGF-2のポリペプチド、もしくはポリペプチドフラグメントまたは改変体に免疫特異的に結合する抗体を提供し、ここで、この抗体は、表2に参照される1つ以上のs c F vのVHドメインに含まれるVH CDRのいずれかの1つ、2つ、または3つ以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。特に、本発明は、VEGF-2に免疫特異的に結合する抗体を提供し、この抗体は、表2で参照される1つ以上のs c F vのVHドメインに含まれるVH CDR1のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。別の実施形態において、VEGF-2に免疫特異的に結合する抗体は、表2で参照される1つ以上のs c F vのVHドメインに含まれるVH CDR2のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。好ましい実施形態において、VEGF-2に免疫特異的に結合する抗体は、表2に参照される1つ以上のs c F vのVHドメインに含まれるVH CDR3のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。VEGF-2もしくはVEGF-2フラグメントまたはこれらの改変体に免疫特異的に結合するこれらの抗体もしくは抗体フラグメントまたはこれらの改変体を含むか、あるいはこれらから構成される分子は、これらの抗体、分子、フラグメントおよび/または改変体をコードする核酸分子のように、本発明によって包括される。

【0477】

本発明はまた、VEGF-2のポリペプチドもしくはポリペプチドフラグメントまたは

10

20

30

40

50

改変体に免疫特異的に結合する抗体を提供し、ここで、この抗体は、表2で参照される1つ以上のs c F vのV Lドメインに含まれるいずれかの1つ、2つ、または3つ以上のV L C D Rのアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。特に、本発明は、V E G F - 2に免疫特異的に結合する抗体を提供し、この抗体は、表2で参照される1つ以上のs c F vのV Lドメインに含まれるV L C D R 1のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。別の実施形態において、V E G F - 2に免疫特異的に結合する抗体は、表2で参照される1つ以上のs c F vのV Lドメインに含まれるV L C D R 2のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。好ましい実施形態において、V E G F - 2に免疫特異的に結合する抗体は、表2で参照される1つ以上のs c F vのV Lドメインに含まれるV L C D R 3のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。V E G F - 2もしくはV E G F - 2フラグメントまたはこれらの改変体に免疫特異的に結合する抗体もしくは抗体フラグメントまたはこれらの改変体を含むか、あるいはこれらから構成される分子はまた、これらの抗体、分子、フラグメントおよび/または改変体をコードする核酸分子のように本発明によって包括される。

10

## 【0478】

本発明はまた、V E G F - 2ポリペプチド、またはV E G F - 2のポリペプチドフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する抗体（抗体フラグメントまたは改変体を含むか、あるいはこれらから構成される分子を含む）を提供し、ここで、この抗体は、表2で参照される1つ以上のs c F vのV HドメインまたはV Lドメインに含まれるような、1つ、2つ、または3つ以上のV H C D Rおよび1つ、2つ、または3つ以上のV L C D Rを含むか、あるいはこれらから構成される。特に、本発明は、V E G F - 2のポリペプチドもしくはポリペプチドフラグメントまたは改変体に免疫特異的に結合する抗体を提供し、ここで、この抗体は、表2で参照される1つ以上のs c F vのV HドメインまたはV Lドメインに含まれる、V H C D RおよびV L C D Rの、V H C D R 1およびV L C D R 1、V H C D R 1およびV L C D R 2、V H C D R 1およびV L C D R 3、V H C D R 2およびV L C D R 1、V H C D R 2およびV L C D R 2、V H C D R 2およびV L C D R 3、V H C D R 3およびV L C D R 1、V H C D R 3およびV L C D R 2、V H C D R 3およびV L C D R 3、またはこれらの任意の組み合わせを含むか、あるいはこれらから構成される。好ましい実施形態において、1つ以上のこれらの組み合わせは、表2に開示されるように同一のs c F v由来である。V E G F - 2に免疫特異的に結合する、これらの抗体のフラグメントまたは改変体を含むか、あるいはこれらから構成される分子はまた、これらの抗体、分子、フラグメントまたは改変体をコードする核酸分子のように本発明に包括される。

20

30

## 【0479】

（s c F vに対応するV E G F - 2抗体をコードする核酸分子）

本発明はまた、一般に、単離された、本発明の抗体（抗体フラグメントまたはその改変体を含むか、あるいはこれらから構成される分子を含む）をコードする核酸分子を提供する。特定の実施形態において、本発明の核酸分子は、表2において参照されるs c F vのいずれか1つのV Hドメインのアミノ酸配列を有するV Hドメイン、および表2において参照されるs c F vのいずれか1つのV Lドメインのアミノ酸配列を有するV Lドメインを含むか、あるいはこれらからなる抗体（抗体フラグメントまたはこれらの改変体を含むか、あるいはこれらから構成される分子を含む）をコードする。別の実施形態において、本発明の核酸分子は、表2において参照されるs c F vのいずれか1つのV Hドメインのアミノ酸配列を有するV Hドメイン、または表2において参照されるs c F vのいずれか1つのV Lドメインのアミノ酸配列を有するV Lドメインを含むか、あるいはこれらから構成される抗体（抗体フラグメントまたはこれらの改変体を含むか、あるいはそれらから構成される分子を含む）をコードする。

40

## 【0480】

本発明はまた、本明細書中に記載される抗体分子（例えば、V Hドメインおよび/また

50

はVLDメイン)の改変体(誘導体を含む)を含むか、あるいはこれらから構成される抗体を提供し、VEGF-2またはそのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する。当業者に公知の標準的技術を使用して、本発明の分子をコードするヌクレオチド配列に変異を導入し得、この変異としては、例えば、アミノ酸置換を生じる部位指向変異誘発およびPCR媒介性変異誘発が挙げられる。好ましくは、改変体(誘導体を含む)は、参照のVHドメイン、VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLDメイン、VLCDR1、VLCDR2、またはVLCDR3と比較して、50個未満のアミノ酸置換、40個未満のアミノ酸置換、30個未満のアミノ酸置換、25個未満のアミノ酸置換、20個未満のアミノ酸置換、15個未満のアミノ酸置換、10個未満のアミノ酸置換、5個未満のアミノ酸置換、4個未満のアミノ酸置換、3個未満のアミノ酸置換、または2個未満のアミノ酸置換をコードする。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が同様の電荷を有する側鎖を有するアミノ酸残基で置換される置換である。同様の電荷を有する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、分枝側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸が挙げられる。あるいは、変異は、コード配列の全てまたは一部と共に、例えば、飽和変異誘発によって、ランダムに導入され得、そして、得られた変異体は、生物学的活性についてスクリーニングされて、活性(例えば、VEGF-2に結合する能力)を保持する変異体を同定し得る。

#### 【0481】

例えば、フレームワーク領域のみかまたは抗体分子のCDR領域のみに変異を導入することが可能である。導入された変異は、サイレントな変異または中性ミスセンス変異(すなわち、抗原に結合する抗体の能力に対する影響が全くないかまたはほとんどない)であり得る。これらの型の変異は、コドン使用を最適化するか、またはハイブリドーマの抗体産生を改善するために有用であり得る。あるいは、非中性ミスセンス変異は、抗原に結合する抗体の能力を変化し得る。大部分のサイレントな変異および中性ミスセンス変異の位置は、フレームワーク領域に存在するようであるが、これは絶対的な必要条件ではないけれども、多くの非中性のミスセンス変異は、CDR中に存在するようである。当業者は、抗原結合活性における無変化または結合活性の変化(例えば、抗原結合活性における改善または抗体特異性における変化)のような所望の特性を有する変異分子を設計および試験し得る。変異誘発後、コードされたタンパク質は、慣例的に発現され得、そして、コードされたタンパク質の機能的および/または生物学的活性(例えば、VEGF-2に免疫特異的に結合する能力)は、本明細書中に記載される技術を使用してかまたは当該分野で公知の技術を慣例的に改変することによって決定され得る。

#### 【0482】

特定の実施形態において、VEGF-2ポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する、本発明の抗体(抗体フラグメントまたはその改変体を含むか、あるいはこれらから構成される分子を含む)は、ストリンジェントな条件下で(例えば、約45で6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中でフィルターに結合したDNAへのハイブリダイゼーションの後)、約50~65での0.2×SSC/0.1% SDS中での1回以上の洗浄、高度にストリンジェントな条件下で(例えば、約45で6×SSC中でフィルターに結合した核酸へのハイブリダイゼーションの後)、約68での0.1×SSC/0.2% SDS中での1回以上の洗浄、または当業者に公知の他のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、表2において参照される1つのscfvのVHドメインまたはVLDメインの1つをコードするヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によって

10

20

30

40

50

コードされるアミノ酸配列を含むか、あるいはこれらから構成される（例えば、Ausubel, F. M. 編、1989、Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. および John Wiley & Sons, Inc., New York、6.3.1~6.3.6頁および2.10.3頁を参照のこと）。これらの抗体をコードする核酸分子はまた、本発明によって包含される。

【0483】

同様のアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、しばしば、同様の構造および多数の同じ生物学的活性を有することが当該分野で周知である。従って、1つの実施形態において、VEGF-2ポリペプチドまたはVEGF-2ポリペプチドのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する抗体（抗体フラグメントまたはその改変体を含むか、あるいはこれらから構成される分子を含む）は、表2に参照されるscFvのVHドメインのアミノ酸配列に、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するVHドメインを含むか、あるいはこれらから構成される。

【0484】

別の実施形態において、VEGF-2ポリペプチドまたはVEGF-2ポリペプチドのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する抗体（抗体フラグメントまたはその改変体を含むか、あるいはこれらから構成される分子を含む）は、表2に参照されるscFvのVLドメインのアミノ酸配列に、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するVLドメインを含むか、あるいはこれらから構成される。

【0485】

（抗体をコードするポリヌクレオチド）

本発明の抗体（抗体フラグメントまたは改変体を含む）は、当該分野で公知の任意の方法によって産生され得る。例えば、本発明に従って、抗体は、ハイブリドーマ細胞株以外の細胞株において発現されることが理解される。特定の抗体についてのcDNAまたはゲノムクローンをコードする配列は、例えば、適切な哺乳動物宿主細胞もしくは非哺乳動物宿主細胞の形質転換のため、またはファージディスプレイライブラリーを作成するために使用され得る。さらに、本発明のポリペプチド抗体は、化学的に合成され得るか、または組換え発現系の使用を介して産生され得る。

【0486】

本発明の抗体を産生するための1つの方法は、表2に参照されるscFvのVHドメインおよび/またはVLドメインをクローン化することである。ハイブリドーマ細胞株からVHドメインおよびVLドメインを単離するために、VHヌクレオチド配列またはVLヌクレオチド配列を含むPCRプライマー（実施例32を参照のこと）を使用して、ファージによって発現されたVH配列および発現されたVL配列を増幅し得る。次いで、PCR産物は、例えば、5'および3'の単一のTヌクレオチド突出（これは、PCR反応について使用される多数のDNAポリメラーゼによって、PCR産物の5'および3'末端に付加された突出する単一のアデニンヌクレオチドに相補的である）からなるPCR産物クローニング部位を有するベクターを使用してクローン化され得る。次いで、VHドメインおよびVLドメインは、当該分野で公知の従来の方法を使用して配列決定され得る。

【0487】

クローン化されたVH遺伝子およびVL遺伝子は、1つ以上の適切な発現ベクター中に配置され得る。非制限的な例として、VHまたはVLヌクレオチド配列、制限部位、および制限部位を保護するための隣接配列を含むPCRプライマーを使用して、VH配列また

10

20

30

40

50

はV L 配列を増幅し得る。当業者に公知のクローニング技術を利用して、P C R 増幅されたV Hドメインは、適切な免疫グロブリン定常領域（例えば、それぞれ、V HドメインについてのヒトI g G 1 定常領域またはI g G 4 定常領域、ならびに V LドメインおよびV Lドメインについてのヒト 定常領域または 定常領域）を発現するベクターにクローン化され得る。好ましくは、V HドメインまたはV Lドメインを発現するベクターは、選択された発現系における重鎖および軽鎖の発現を指向するのに適したプロモーター、分泌シグナル、免疫グロブリン可変領域についてのクローニング部位、免疫グロブリン定常領域、およびネオマイシンのような選択マーカを含む。V HドメインおよびV Lドメインはまた、必要な定常領域を発現する単一のベクターにクローン化され得る。次いで、重鎖転換ベクターおよび軽鎖転換ベクターを、当業者に公知の技術を使用して、細胞株に同時トランスフェクトし、安定してかまたは一過的に全長抗体（例えば、I g G）を発現する細胞株を作製する（例えば、Guoら、J . C l i n . E n d o c r i n o l . M e t a b . 8 2 : 9 2 5 ~ 3 1 ( 1 9 9 7 ) およびAmesら、J . I m m u n o l . M e t h o d s 1 8 4 : 1 7 7 - 8 6 ( 1 9 9 5 )（これらは、本明細書中にその全体が参考として援用される）を参照のこと）。

10

**【0488】**

本発明はさらに、本発明の抗体およびそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件、またはより低いストリジェンシーのハイブリダイゼーション条件下で（例えば、上記に定義されるような）、抗体（好ましくは、本発明のポリペプチドと特異的に結合し、好ましくは、配列番号2、配列番号4または配列番号18のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合する抗体）をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。

20

**【0489】**

ポリヌクレオチドは、当該分野で公知の任意の方法によって得られ得、そしてそのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が決定される。例えば、抗体のヌクレオチド配列が既知である場合、この抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドからアセンブルされ得（例えば、Kutmeierら、BioTechniques 17:242(1994)に記載されるような）、これは、簡単にいうと、以下を包含する：この抗体をコードする配列の部分を含むオーバーラップするオリゴヌクレオチドの合成、これらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよび連結、次いでP C Rによる連結されたオリゴヌクレオチドの増幅。

30

**【0490】**

あるいは、抗体をコードするポリヌクレオチドは、適切な供給源由来の核酸から生成され得る。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンは入手不可能だが、その抗体分子の配列が既知である場合、免疫グロブリンをコードする核酸は、化学的に合成され得るか、または適切な供給源（例えば、抗体c D N Aライブラリー、または抗体を発現する任意の組織もしくは細胞（例えば、本発明の抗体の発現のために選択されたハイブリドーマ細胞）から生成されたc D N Aライブラリー、またはこれらから単離された核酸（好ましくはポリA + R N A））から、例えば、その抗体をコードするc D N Aライブラリーからのc D N Aクローンを同定するために、配列の3'末端および5'末端（実施例32を参照のこと）にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するP C R増幅によって、または特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって得られ得る。次いで、P C Rによって生成された増幅された核酸は、当該分野で周知の任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクターにクローン化され得る。

40

**【0491】**

一旦、抗体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、抗体のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の操作について当該分野で周知の方法（例えば、組換えD N A技術、部位特異的変異誘発、P C Rなど（例えば、Sambrookら、1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual

50

、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYおよびAusubelら編、1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY(これらは両方がその全体において本明細書に参考として援用される)を参照のこと)を用いて操作されて、例えば、アミノ酸の置換、欠失、および/または挿入を作製するような、異なるアミノ酸配列を有する抗体を生成し得る。

【0492】

特定の実施形態において、重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、相補性決定領域(CDR)の配列の同定のために、当該分野において周知の方法によって(例えば、配列超可変性の領域を決定するために、他の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の既知のアミノ酸配列と比較することによって)調べられ得る。慣用的な組換えDNA技術を用いて、1つ以上のCDRが、前述のようにフレームワーク領域内に(例えば、非ヒト抗体をヒト化するために、ヒトフレームワーク領域中に)挿入され得る。このフレームワーク領域は天然に存在し得るか、またはコンセンサスフレームワーク領域であり得、そして好ましくはヒトフレームワーク領域であり得る(例えば、列挙したヒトフレームワーク領域については、Chothiaら、J. Mol. Biol. 278: 457-479(1998)を参照のこと)。好ましくは、フレームワーク領域およびCDRの組み合わせによって生成されたポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上記に議論されるように、1つ以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域内で作製され得、そして好ましくは、そのアミノ酸置換は、抗体のその抗原への結合を改善する。さらに、このような方法は、1つ以上の鎖内ジスルフィド結合が欠如した抗体分子を生成するように、鎖内ジスルフィド結合に関与する1つ以上の可変領域のシステイン残基のアミノ酸置換または欠失を作製するために使用され得る。ポリヌクレオチドへの他の変更は、本発明によって、および当該分野の技術において包含される。

【0493】

いくつかの用途のために、例えば、本発明の抗体のインビトロ親和性成熟について、ファージディスプレイライブラリーにおける単鎖抗体またはFabフラグメントのように本発明の1つ以上の抗体のVHドメインおよびVLドメインを発現することが有用であり得る。例えば、本発明の1つ以上の抗体のVHドメインおよびVLドメインをコードするcDNAは、ファージディスプレイライブラリーを使用して、全てのあり得る組み合わせにおいて発現され得、改善した親和性または改善したオフレートのような好ましい結合特徴を有するVEGF-2ポリペプチドと結合するVH/VL組み合わせの選択を可能にする。さらに、VHおよびVLセグメント(特に、本発明の1つ以上の抗体のVHドメインおよびVLドメインのCDR領域)は、インビトロで変異され得る。ファージディスプレイライブラリーにおける「変異」CDRを有するVHドメインおよびVLドメインの発現は、改善した親和性または改善したオフレートのような好ましい結合特徴を有するVEGF-2レセプターポリペプチドと結合するVH/VL組み合わせの選択を可能にする。

【0494】

ファージディスプレイ方法において、機能的抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面に提示される。特に、VHドメインおよびVLドメインをコードするDNA配列は、動物のcDNAライブラリー(例えば、ヒトまたはマウスのリンパ系組織のcDNAライブラリー)または合成cDNAライブラリーから増幅される。VHドメインおよびVLドメインをコードするDNAは、PCRによりcsFvリンカーによって共に結合され、そして、ファージミドベクター(例えば、pCANTAB6またはpComb3HSS)にクローニングされる。このベクターは、E.coliにエレクトロポレ-ションされ、そして、E.coliは、ヘルパーファージに感染される。これらの方法において用いられるファージは、代表的には、fdおよびM13を含む糸状ファージであり、VHドメインおよびVLドメインは、通常、ファージ遺伝子IIIまたはファージ遺伝子VIIのいずれかに組換え的に融合される。目的の

10

20

30

40

50



抗原（すなわち、VEGF-2ポリペプチドまたはそのフラグメント）に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて選択され得るかまたは同定され得る（例えば、標識された抗原または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕獲された抗原を使用して）。本発明の抗体を作製するために用いられ得るファージディスプレイ方法の例としては、以下に開示される方法が挙げられるが、これらに限定されない：Brinkmanら、*J. Immunol. Methods* 182:41~50(1995)；Amešら、*J. Immunol. Methods* 184:177~186(1995)；Kettleboroughら、*Eur. J. Immunol.* 24:952~958(1994)；Persicら、*Gene* 187:9~18(1997)；Burtonら、*Advances in Immunology* 57:191~280(1994)；PCT出願番号PCT/GB91/01134；PCT公開WO 90/02809；WO 91/10737；WO 92/01047；WO 92/18719；WO 93/11236；WO 95/15982；WO 95/20401；WO 97/13844；および米国特許第5,698,426号、同第5,223,409号、同第5,403,484号、同第5,580,717号、同第5,427,908号、同第5,750,753号、同第5,821,047号、同第5,571,698号、同第5,427,908号、同第5,516,717号、同第5,780,225号、同第5,658,727号、同第5,735,743号、および同第5,969,108号（これらの各々は、本明細書中にその全体が参考として援用される）。

10

#### 【0495】

20

さらに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングさせることによって、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術（Morrissonら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855(1984)；Neubergerら、*Nature* 312:604-608(1984)；Takedaら、*Nature* 314:452-454(1985)）が使用され得る。上記のように、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、このような分子は、マウスmAbおよびヒト免疫グロブリンの定常領域由来の可変領域を有する（例えば、ヒト化抗体）。

#### 【0496】

あるいは、単鎖抗体の産生に関する記載された技術（米国特許第4,946,778号；Bird、*Science* 242:423-42(1988)；Hustonら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883(1988)；およびWardら、*Nature* 334:544-54(1989)）が、単鎖抗体の産生に適応され得る。単鎖抗体は、Fv領域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントがアミノ酸架橋を介して連結されることによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じる。E.coliにおける機能性Fvフラグメントのアセンブリのための技術もまた、使用され得る（Skerraら、*Science* 242:1038-1041(1988)）。

30

#### 【0497】

（抗体を産生する方法）

40

本発明の抗体は、抗体を合成するための当該分野で公知の任意の方法によって、特に、化学合成によって、細胞内免疫（すなわち、内部抗体技術）、または、好ましくは、組換え発現技術によって産生され得る。抗体を産生する方法としては、ハイブリドーマ技術、EBV形質転換、および本明細書中に考察される他の方法ならびに以下に議論されるような組換えDNA技術の使用を含むが、これらに限定されない。

#### 【0498】

本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導體、改変体もしくはアナログ（例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖または本発明の単鎖抗体）の組換え発現は、その抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。一旦、本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、あるいはそれらの部分（好ましくは、重鎖ま

50

たは軽鎖の可変ドメインを含有する)をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の産生のためのベクターは、当該分野で周知の技術を用いる組換えDNA技術によって生成され得る。従って、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドの発現によってタンパク質を調製するための方法は、本明細書に記載される。当業者に周知の方法は、抗体をコードする配列ならびに適切な転写制御シグナルおよび翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターの構築のために使用され得る。これらの方法としては、例えば、インビトロの組換えDNA技術、合成技術、およびインビボの遺伝子組換えが挙げられる。従って、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体分子、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖の可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む、複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、抗体分子の定常領域(例えば、PCT公開WO86/05807; PCT公開WO89/01036; および米国特許第5,122,464号を参照のこと)をコードするヌクレオチド配列を含み得、そしてこの抗体の可変ドメインは、重鎖または軽鎖の全体の発現のためにこのようなベクターにクローニングされ得る。

#### 【0499】

この発現ベクターは、従来技術によって宿主細胞へと移入され、次いで、このトランスフェクトされた細胞は、本発明の抗体を産生するために、従来技術によって培養される。従って、本発明は、異種プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または本発明の単鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。二重鎖抗体の発現についての好ましい実施形態において、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、以下に詳述されるように、免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞中に同時発現され得る。

#### 【0500】

種々の宿主発現ベクター系は、本発明の抗体分子を発現させるために利用され得る。このような宿主発現系は、目的のコード配列が産生され、かつ続いて精製され得るビヒクルを表わすが、また、適切なヌクレオチドをコードする配列で形質転換またはトランスフェクトされる場合に、インサイチュで本発明の抗体分子を発現し得る細胞を表わす。これらには、以下が挙げられるが、これらに限定されない:抗体をコードする配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換された細菌(例えば、E. coli、B. subtilis)のような微生物;抗体をコードする配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えば、Saccharomyces、Pichia);抗体をコードする配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系;組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV;タバコモザイクウイルス、TMV)に感染した植物細胞系または抗体をコードする配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系;あるいは哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター(例えば、メタロチオネインプロモーター)または哺乳動物のウイルスに由来するプロモーター(例えば、アデノウイルス後期プロモーター;ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)を含む組換え発現構築物を保有する哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3、NSO細胞)。好ましくは、Escherichia coliのような細菌細胞、そしてより好ましくは、特に、組換え抗体分子全体の発現のために真核生物細胞が、組換え抗体分子の発現のために使用される。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子プロモーターエレメントのようなベクターと組み合わせられた、チャイニーズハムスターの卵巣細胞(CHO)のような哺乳動物細胞が、抗体のための効果的な発現系である(Foeckingら、Gene 45:101(1986);Cockettら、Bio/Technology 8:2(1990))。

#### 【0501】

細菌系において、多くの発現ベクターが、抗体分子の発現を意図する使用に依存して有利に選択され得る。例えば、多量のこのようなタンパク質が産生されるべき場合、抗体分

10

20

30

40

50

子の薬学的組成物の生成のために、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を指向するベクターが所望され得る。このようなベクターには、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体をコードする配列が *lacZ* をコードする領域と共にベクターにインフレーム (*in frame*) で個別に連結され得、その結果、融合タンパク質が産生される *E. coli* 発現ベクター *pUR278* (Rutherford, *EMBO J.* 2:1791 (1983)); *pIN* ベクター (Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109 (1985)); Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509 (1989) など。 *pGEX* ベクターもまた、グルタチオン *S*-トランスフェラーゼ (*GST*) との融合タンパク質として、外来性ポリペプチドを発現させるために使用され得る。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、そして溶解した細胞から、マトリックスグルタチオン-アガロースビーズへの吸着および結合、それに続く遊離グルタチオン存在化での溶出によって容易に精製され得る。この *pGEX* ベクターは、トロニンまたは *Xa* 因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計され、その結果、このクローニングされた標的遺伝子産物は、*GST* 部分から放出され得る。

#### 【0502】

昆虫系においては、*Autographa californica* 核多角体病ウイルス (*AcNPV*) は、異種遺伝子を発現するためのベクターとして使用される。このウイルスは、*Spodoptera frugiperda* 細胞において増殖する。抗体をコードする配列は、このウイルスの非必須の領域 (例えばポリヘドリン遺伝子) に個々にクローニングされ得、そして *AcNPV* プロモーター (例えばポリヘドリンプロモーター) の制御下に配置され得る。

#### 【0503】

哺乳動物宿主細胞においては、多数のウイルスに基づく発現系が利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合においては、目的の抗体をコードする配列は、アデノウイルスの転写/翻訳制御複合体、例えば後期プロモーターおよび3つの部分に分かれるリーダー配列、に連結され得る。次いで、このキメラ遺伝子は、インビトロまたはインビボでの組換えによって、アデノウイルスゲノムに挿入され得る。ウイルスのゲノムの非必須領域 (例えば、*E1* または *E3* 領域) における挿入は、生存可能で、感染した宿主において抗体分子を発現する能力のある組換えウイルスを生じる (例えば、Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359 (1984) を参照のこと)。特異的開始シグナルはまた、挿入された抗体をコードする配列の効率的な翻訳のために必要とされ得る。これらのシグナルは、*ATG* 開始コドンおよび隣接する配列を含む。さらに、この開始コドンは、挿入部分全体の翻訳を確実にするために、所望されるコード配列のリーディングフレーム (*reading frame*) と同調していなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、種々の起源、天然および合成の両方であり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサー要素、転写ターミネーター、などの含有によって高められ得る (Bittner, *Methods in Enzymol.* 153:51-544 (1987) を参照のこと)。

#### 【0504】

さらに、宿主細胞株は、選択され得、これは挿入配列の発現を調節し、また所望される特異的な様式で遺伝子産物を改変し、そしてプロセシングする。タンパク質産物のこのような改変 (例えばグリコシル化) およびプロセシング (例えば切断) は、タンパク質の機能のために重要であり得る。異なる宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の、翻訳後プロセシングおよび改変のための、特徴的で特異的な機構を有する。適切な細胞株または宿主系は、発現された異種タンパク質の正確な改変およびプロセシングを確実にするために選択され得る。この目的のために、遺伝子産物の、第一の転写、グリコシル化、およびリン酸化の正確なプロセシングのための細胞機構を有する、真核生物宿主細胞が、使用され得る。このような哺乳動物宿主細胞としては、*CHO*、*VERY*、*BHK*、*HeLa*、

10

20

30

40

50

COS、MDCK、293、3T3、WI38、そして特に、例えば、BT483、Hs578T、HTB2、BT20およびT47Dのような乳癌細胞株、ならびに、例えば、CRL7030およびHs578Bstのような正常な乳腺細胞株、が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0505】

組換えタンパク質の長期間の高収率産生、安定発現が好ましい。例えば、安定に抗体分子を発現する細胞株が操作され得る。ウィルスの複製起点を含む発現ベクターを使用するよりも、宿主細胞は、適切な発現制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位、など）、および選択マーカーによって制御されるDNAで形質転換され得る。異種DNAの導入に続いて、操作された細胞は、1~2日間富化培地で増殖させられ得、次いで、選択培地に切り替えられる。組換えプラスミドにおける選択マーカーは、選択したものに耐性を与え、そして細胞が、プラスミドをその染色体内に安定に組み込み、そして増殖して、細胞増殖巣を形成し、これを今度はクローニングし得、細胞株に拡張され得ることを可能にする。この方法は、抗体分子を発現する細胞株を操作するために、有利に使用され得る。このような操作された細胞株は、直接的または間接的に抗体分子と相互作用する化合物のスクリーニングおよび評価において、特に有用であり得る。

#### 【0506】

多数の選択系が使用され得、この選択系は、単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ (Wiglerら、Cell 11:223 (1977))、ヒポキサンチン-グアニン ホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992))、およびアデニン ホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowyら、Cell 22:817 (1980)) の遺伝子を含むが限定されず、これらの遺伝子は、tk-、hgprt-またはaprt-細胞においてそれぞれ使用され得る。また、代謝拮抗物質耐性は、以下の遺伝子の選択の根拠として使用され得る：dhfr、これはメトトレキサートに対する耐性を与える (Wiglerら、Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980))；O'Hareら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981))；gpt、これはミコフェノール酸に対する耐性を与える (Mulligan & Berg、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981))；neo、これはアミノグリコシドG-418に対する耐性を与える (Clinical Pharmacy 12:488-505；Wu and Wu、Biotherapy 3:87-95 (1991)；Tolstoshev、Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993)；Mulligan、Science 260:926-932 (1993)；およびMorgan and Anderson、Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993)；1993年5月、TIB TECH 11(5):155-215)；ならびにhygro、これはハイグロマイシンにに対する耐性を与える (Santerreら、Gene 30:147 (1984))。組換えDNA技術の分野で周知の方法は、所望の組換えクローンを選択するために、慣用的に適用され得、そしてこのような方法は、以下に記載されている：例えば、Ausubelら (編)、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、NY (1993)；Kriegler、Gene Transfer and Expression、A Laboratory Manual、Stockton Press、NY (1990)；ならびに12章および13章、Dracopolisら (編)、Current Protocols in Human Genetics、John Wiley & Sons、NY (1994)；Colberre-Garapinら、J. Mol. Biol. 150:1 (1981) (これらはその全体が本明細書中に参考として援用される)。

#### 【0507】

10

20

30

40

50

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増大され得る（総説として、BebbingtonおよびHentschel、The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning、Vol. 3 (Academic Press、New York、1987)を参照のこと）。抗体を発現するベクター系におけるマーカーが、増幅可能である場合、宿主細胞の培養物に存在するインヒビターのレベルにおける増加は、マーカー遺伝子のコピーの数を増加する。増幅領域は抗体遺伝子と結合しているため、抗体の産生もまた増加する（Crouseら、Mol. Cell. Biol. 3: 257 (1983)）。

10

## 【0508】

グルタミンシンターゼ（GS）またはDHFRを選択マーカーとして使用するベクターは、それぞれメチオニンスルホキシミン薬物またはメトトレキサート薬物の存在において増幅され得る。グルタミンシンターゼベースのベクターの利点は、グルタミンシンターゼ陰性である細胞株（例えば、マウス骨髄腫細胞株、NS0）の有効性である。グルタミンシンターゼ発現系はまた、グルタミンシンターゼ発現細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）において機能して、さらなるインヒビターを提供することで内因性遺伝子の機能化を阻害し得る。グルタミンシンターゼを選択マーカーとして使用するベクターとしては、StephensおよびCockett、Nucl. Acids. Res. 17: 7110 (1989)に記載されるpEE6発現ベクターが挙げられるがこれに限定されない。グルタミンシンターゼ発現系およびそれらの成分は、PCT公報：WO87/04462；WO86/05807；WO89/01036；WP89/10404；およびWO91/06657（本明細書中に参考としてその全体が援用される）に詳述される。さらに、本発明に従って使用され得るグルタミンシンターゼ発現ベクターは、供給業者（例えば、Lonza Biologics、Inc. (Portsmouth, NH)が挙げられる）から市販される。マウス骨髄腫細胞におけるGS発現系を使用するモノクローナル抗体の発現および産生は、Bebbingtonら、Bio/technology 10: 169 (1992)ならびにBibliaおよびRobinson Biotechnol. Prog. 11: 1 (1995)（本明細書中に参考としてその全体が援用される）に記載される。

20

30

## 【0509】

宿主細胞は、本発明の二つの発現ベクター（重鎖由来のポリペプチドをコードする第一のベクターおよび軽鎖由来のポリペプチドをコードする第二のベクター）で、同時トランスフェクトされ得る。この二つのベクターは、重鎖および軽鎖のポリペプチドの等しい発現を可能にする、同一の選択マーカーを含み得る。あるいは、単一のベクターが使用され得、これは重鎖および軽鎖両方のポリペプチドをコードし、そして発現可能である。このような状況において、過剰の毒性の遊離重鎖を避けるために、重鎖の前に軽鎖が配置されるべきである（Proudfoot、Nature 322: 52 (1986)；Kohler、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197 (1980)）。重鎖および軽鎖のためのコード配列はcDNAまたはゲノムDNAを含み得る。

40

## 【0510】

一旦本発明の抗体分子が、動物によって産生されるか、化学的に合成されるか、または組換えにより発現されると、免疫グロブリン分子の精製のための、当該分野で公知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティー（特に、プロテインAの後の特異的抗原に対するアフィニティーによる）、およびサイズカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質精製のための任意の他の標準的な技術によって、精製され得る。さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントは、本明細書中に記載されるかまたはそうでなければ当該分野において公知の、異種ポリペプチド配列に融合され得、精製を容易にする。

## 【0511】

50

## (抗体結合体)

本発明のポリペプチドに組換えにより融合され、または化学的に結合（共有結合および非共有結合の両方を含む）された抗体は、本発明にさらに含まれる。この抗体は、本発明のポリペプチド以外の抗原に特異的であり得る。例えば、インビトロまたはインビボのいずれにおいても、本発明のポリペプチドを特定の細胞表面のレセプターに特異的な抗体に融合または結合させることによって、特定の細胞のタイプに対して、本発明のポリペプチドを標的にするために、抗体が使用され得る。本発明のポリペプチドに融合または結合される抗体はまた、インビトロ免疫アッセイおよび当該分野で公知の方法を使用する精製方法において使用され得る。例えば、Harborら、上記、および第WO93/21232号；EP0,439,095；Naramura, M.ら（1994）、Immuno 10  
 1.Lett.39:91-99；米国特許第5,474,981号；Gillies, S.O.ら（1992）、PNAS 89:1428-1432；Fell, H.P.ら（1991）、J.Immunol.146:2446-2452を参照のこと。上記参考文献は、その全体が参考として援用される。

## 【0512】

本発明はさらに、抗体の可変領域以外のドメインに融合または結合された、本発明のポリペプチドを含む組成物を含む。例えば、本発明のポリペプチドは、抗体のFc領域、またはその部分に融合または結合され得る。この抗体の本発明のポリペプチドに融合された部分は、ヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン、またはそのドメイン全体もしくは部分の任意の組合せを含み得る。本発明のポリペプチドは、上記の抗体の部分に融合または結合され得、ポリペプチドのインビボでの半減期または当該分野で公知の方法を使用した免疫アッセイにおける使用の間増加する。これらのポリペプチドはまた、上記の抗体の部分に融合または結合され得、多重体を形成する。例えば、本発明のポリペプチドに融合されたFc部分は、このFc部分の間のジスルフィド結合を通して二量体を形成し得る。より高度の多重体形態は、ポリペプチドをIgAおよびIgMの部分に融合させることによって作製され得る。本発明のポリペプチドを抗体部分に融合または結合させるための方法は、当該分野において公知である。例えば、米国特許第5,336,603号；同第5,622,929号；同第5,359,046号；同第5,349,053号；同第5,447,851号；同第5,112,946号；EP0,307,434；EP0,367,166；WO96/04388号；WO91/06570号；Ashkenazi, A.ら（1991）、PNAS 88:10535-10539；Zheng, X.X.ら（1995）、J.Immunol.154:5590-5600；およびVil, H.ら（1992）、PNAS 89:11337-11341（上記の参考文献はその全体が参考として援用される）を参照のこと。 20  
 30

## 【0513】

本発明は、組換えにより融合されるかまたは化学的に、本発明のポリペプチド（またはその部分、好ましくはこのポリペプチドの少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100個のアミノ酸）に結合（共有結合および非共有結合の両方を含む）されて、融合タンパク質を生成する抗体を含む。この融合は、直接的である必要はないが、リンカー配列を介して起こり得る。この抗体は、本発明のポリペプチド（またはその部分、好ましくはこのポリペプチドの少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100個のアミノ酸）以外の抗原に特異的であり得る。例えば、インビトロまたはインビボのいずれにおいても、本発明のポリペプチドを特定の細胞表面のレセプターに特異的な抗体に融合または結合させることによって、特定の細胞のタイプに対して、本発明のポリペプチドを標的にするために、抗体が使用され得る。本発明のポリペプチドおよび/または抗体（そのフラグメントまたは改変体を含む）は、異種タンパク質（例えば、免疫グロブリンFcポリペプチドまたはヒト血清アルブミンポリペプチド）のN末端またはC末端のいずれかに融合され得る。本発明の抗体はまた、アルブミン（組換えヒト血清アルブミン（例えば、米国特許第5,876,969号（1999年3月2日公開）、欧州特許第0413622号および米国特許第5, 40  
 50

766, 883号(1998年6月16日公開)(本明細書中にその全体が参考として援用される)を含むがこれらに限定されない)に融合され得、キメラポリペプチドを生じる。好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/または抗体(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、ヒト血清アルブミンの成熟形態(すなわち、欧州特許第0322094号の図1および2において示されるようにヒト血清アルブミンのアミノ酸1~585)(これは、本明細書中にその全体が参考として援用される)と融合される。別の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/または抗体(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、ヒト血清アルブミンのアミノ酸残基1~xを含むか、またはそれからなるポリペプチドフラグメントと融合され、ここで、xは、1~585の整数であり、そしてアルブミンフラグメントは、ヒト血清アルブミン活性を有する。別の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/または抗体(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、米国特許第5,766,883号(本明細書中にその全体が参考として援用される)に記載されるように、ヒト血清アルブミンのアミノ酸残基1~zを含むか、またはそれからなるポリペプチドフラグメントと融合され、ここで、zは、369~419の整数である。本発明の融合タンパク質をコードするポリペプチドもまた、本発明によって包含される。このような融合タンパク質は、例えば、精製を容易にし、そして、インビボ半減期を増加し得る。本発明のポリペプチドに融合または結合される抗体はまた、インビトロ免疫アッセイおよび当該分野で公知の方法を使用する精製方法において使用され得る。例えば、Harborら、上記、およびPCT公開WO93/21232号;EP439,095;Naramuraら、Immunol.Lett.39:91-99(1994);米国特許第5,474,981号;Gilliesら、PNAS89:1428-1432(1992);Fellら、J.Immunol.146:2446-2452(1991)を参照のこと。これらは、その全体が参考として援用される。

#### 【0514】

本発明はさらに、可変領域以外の抗体のドメインに融合または結合された、本発明のポリペプチドを含む組成物を含む。例えば、本発明のポリペプチドは、抗体のFc領域、またはその部分に融合または結合され得る。本発明のポリペプチドに融合された抗体部分は、定常領域、ヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン、またはそのドメイン全体もしくは部分任意の組合せを含み得る。これらのポリペプチドはまた、上記の抗体の部分に融合または結合され得、多重体を形成する。例えば、本発明のポリペプチドに融合されたFc部分は、このFc部分の間のジスルフィド結合を通して二量体を形成し得る。より高度の多重体形態は、ポリペプチドをIgAおよびIgMの部分に融合させることによって作製され得る。本発明のポリペプチドを抗体部分に融合または結合させるための方法は、当該分野において公知である。例えば、米国特許第5,336,603号;同第5,622,929号;同第5,359,046号;同第5,349,053号;同第5,447,851号;同第5,112,946号;EP307,434;EP367,166;PCT公開第WO96/04388号;WO91/06570号;Ashkenaziら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA88:10535-10539(1991);Zhengら、J.Immunol.154:5590-5600(1995);およびVilら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:11337-11341(1992)(前記の参考文献はその全体が参考として援用される)を参照のこと。

#### 【0515】

上で考察されたように、ポリペプチド、ポリペプチドフラグメント、または配列番号2、配列番号4もしくは配列番号18の変異体、に対応するポリペプチドは、このポリペプチドのインビボ半減期を増大させるため、または当該分野で公知の方法を使用する免疫学的アッセイにおいて使用するために、上記の抗体部分に融合または結合され得る。さらに、配列番号2、配列番号4または配列番号18に対応するポリペプチドを、上記の抗体部分に融合または結合して、精製を容易にし得る。1つの報告された例は、ヒトCD4ポリ

10

20

30

40

50

ペプチドの最初の2つのドメイン、および哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質を記載している (EP 394, 827; Traunckerら、Nature 331: 84-86 (1988))。ジスルフィド連結二量体構造 (IgGに起因する) を有する抗体に融合または結合される、本発明のポリペプチドもまた、単量体分泌タンパク質またはタンパク質フラグメント単独よりも、他の分子に結合しそして中和するのにさらに効率的であり得る (Fountoulakisら、J. Biochem. 270: 3958-3964 (1995))。多くの場合、融合タンパク質のFc部分は、治療および診断において有益であり、従って、例えば、改良された薬物動態学的な特性を生じ得る (EPA 232, 262)。あるいは、融合タンパク質が発現され、検出され、そして精製された後に、Fc部分を欠失させることが望ましい。例えば、融合タンパク質が免疫化のための抗原として使用される場合、Fc部分は、治療および診断を妨害し得る。例えば、薬物の発見において、hIL-5のようなヒトタンパク質は、hIL-5のアンタゴニストを同定するためのハイスループットスクリーニングアッセイの目的のためにFc部分と融合されてきた (Bennettら、J. Molecular Recognition 8: 52-58 (1995); Johansonら、J. Biol. Chem. 270: 9459-9471 (1995)) を参照のこと)。

#### 【0516】

さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントは、精製を容易にするペプチドのような、マーカー配列に融合され得る。好ましい実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、とりわけヘキサ-ヒスチジンペプチド (例えば、pQEベクター (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311) において提供されるタグ) であり、これらの多くのマーカーアミノ酸配列が市販されている。例えば、Gentzら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824 (1989) に記載されるように、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の都合の良い精製を提供する。精製のために有用な別のペプチドタグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する「HA」タグ (Wilsonら、Cell 37: 767 (1984))、および「flag」タグを含むが、これに限定されない。

#### 【0517】

本発明は、診断剤または治療剤に結合される、抗体またはそのフラグメントをさらに含む。抗体は、例えば、臨床上の試験手順 (例えば、所定の処置レジメンの効力を決定するため) の一部として、腫瘍の発生または進行をモニターするために、診断的に使用され得る。検出は、抗体を検出可能な物質と連結させることによって容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、種々の陽電子放射断層撮影を使用する陽電子放射金属、および非放射性常磁性金属イオン、が挙げられる。この検出可能な物質は、抗体 (またはそのフラグメント) に対して、直接的または間接的のいずれかで、当該分野で公知の技術を使用する媒介物 (例えば、当該分野で公知のリンカーのような) を介して、連結または結合され得る。例えば、本発明に従う診断薬としての使用のための抗体に結合され得る金属イオンに関しては、米国特許第4,741,900号を参照のこと。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ; 適切な補欠分子団複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ; 適切な蛍光物質の例としては、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ネート、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、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ; 発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ; 生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ; ならびに、適切な放射性物質の例としては、ヨウ素 ( $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ )、炭素 ( $^{14}\text{C}$ )、硫黄 ( $^{35}\text{S}$ )、トリチウム ( $^3\text{H}$ )、インジウム ( $^{111}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ )



n、 $^{115m}\text{In}$ ）、テクネチウム ( $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{99m}\text{Tc}$ )、タリウム ( $^{201}\text{Tl}$ )、ガリウム ( $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ )、パラジウム ( $^{103}\text{Pd}$ )、モリブデン ( $^{99}\text{Mo}$ )、キセノン ( $^{133}\text{Xe}$ )、フッ素 ( $^{18}\text{F}$ )、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、および $^{97}\text{Ru}$ が挙げられる。

#### 【0518】

特定の実施形態において、本発明のVEGF-2ポリペプチドは、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、および $^{153}\text{Sm}$ を含むがこれらに限定されない放射性金属イオンをポリペプチドに結合体化するために有用な大環状のキレート剤に結合される。好ましい実施形態において、本発明のVEGF-2ポリペプチドに結合した大環状キレート剤と結合する放射性金属イオンは、 $^{111}\text{In}$ である。別の好ましい実施形態において、本発明のVEGF-2ポリペプチドに結合された大環状キレート剤と結合する放射性金属イオンは、 $^{90}\text{Y}$ である。特定の実施形態において、大環状キレート剤は、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-N, N', N'', N'''-テトラ酢酸(DOTA)である。別の特定の実施形態において、DOTAは、リンカー分子を介して、本発明のVEGF-2ポリペプチドに結合される。ポリペプチドへDOTAを結合体化するために有用なリンカー分子の例は、当該分野で周知であり、例えば、DeNardoら、*Clin Cancer Res.* 4(10): 2483-90, 1998; Petersonら、*Bioconjug. Chem.* 10(4): 553-7, 1999; および Zimmermanら、*Nucl. Med. Biol.* 26(8): 943-50, 1999 (これらは、本明細書中にその全体が参考として援用される)を参照のこと。さらに、抗体に結合体化され得るキレート剤およびそれを作製および使用するための方法を開示する、米国特許第5,652,361号および同第5,756,065号は、本明細書中にその全体が参考として援用される。米国特許第5,652,361号および同第5,756,065号は、抗体にキレート剤を結合体化することに焦点をあてるが、当業者は、キレート剤を他のポリペプチドに結合体化するために、そこに開示された方法を容易に調整し得る。

#### 【0519】

細胞毒または細胞毒性薬剤は、細胞に対して有害な任意の薬剤を含む。例としては、パクリタキセル(paclitaxol)、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド(tenoposide)、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン(dihydroxy anthracin dione)、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにこれらのアナログまたはホモログ、が挙げられる。治療剤は、代謝拮抗物質(例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(例えば、クロルメチン(mechlorethamine)、チオエパ(thioepa)クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびにcis-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(例えば、ダウノルピシン(以前はダウノマイシン)およびドキシソルピシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前はアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン(anthramycin)(AMC))、ならびに抗有糸分裂剤(例えばピンクリスチンおよびピンブラスチン)、を含む。

#### 【0520】

本発明の抗体結合体は、所定の生物学的応答を改変するために使用され得、治療剤または薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定されると解釈されない。例えば、薬物部分は

10

20

30

40

50

、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質としては、例えば、毒素（例えばアブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、またはジフテリア毒素）；タンパク質（例えば、腫瘍壊死因子、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\beta$ -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベーター、アポトーシス剤（例えば、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、AIM-1（国際公開第WO97/33899号を参照のこと）、AIM-2（国際公開第WO97/34911号を参照のこと）、Fasリガンド（Takahashiら、Int. Immunol. 6:1567-1574（1994））、VEGF（国際公開第WO99/23105号を参照のこと））、血栓症薬もしくは抗脈管形成薬（例えば、アンジオスタチンもしくはエンドスタチン）；または生物学的応答改変剤（例えばリンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、または他の増殖因子など）、が挙げられ得る。

10

#### 【0521】

抗体はまた、固体支持体に付着させられ得、この固体支持体は、標的抗原の免疫アッセイまたは精製に特に有用である。このような固体支持体としては、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレン、が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0522】

このような治療部分を抗体に結合する技術は、周知であり、例えば、Arnonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら（編）、243-56頁（Alan R. Liss, Inc. 1985）；Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」、Controlled Drug Delivery（第二版）、Robinsonら（編）、623-53頁（Marcel Dekker, Inc. 1987）；Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications、Pincheraら（編）、475-506頁（1985）；「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy、Baldwinら（編）、303-16頁（Academic Press 1985）、およびThorpeら、「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」、Immunol. Rev. 62:119-58（1982）を参照のこと。

20

30

40

#### 【0523】

あるいは、抗体は、Segalにより米国特許第4,676,980号（その全体が参考として本明細書中で援用される）に記載されるように、二次抗体に結合され、抗体ヘテロ結合体を形成し得る。

#### 【0524】

単独または細胞毒因子および/もしくはサイトカインと組合せて投与される抗体（その抗体に結合する治療部分を有するまたは有さない）は、治療剤として使用され得る。

#### 【0525】

（免疫表現型分類（immunophenotyping））

本発明の抗体は、細胞株および生物学的サンプルの免疫表現型分類のために利用され得

50

る。本発明の遺伝子の翻訳生成物は、細胞特異的マーカーとして、あるいはより詳細には、特定の細胞型の分化および/または成熟の種々の段階で示差的に発現される細胞マーカーとして有用であり得る。特異的エピトープ、またはエピトープの組み合わせに対して指向されるモノクローナル抗体は、マーカーを発現する細胞集団のスクリーニングを可能とする。種々の技術が、マーカーを発現する細胞集団をスクリーニングするために、モノクローナル抗体を用いて利用され得、そしてその技術には、抗体でコーティングされた磁気ビーズを用いる磁気分離、固体マトリクス（すなわち、プレート）に付着した抗体を用いる「パンニング」、ならびにフローサイトメトリー（例えば、米国特許第5,985,660号；およびMorrissonら、Cell, 96:737-49(1999)を参照のこと）が挙げられる。

10

## 【0526】

これらの技術は、血液学的悪性腫瘍（すなわち、急性白血病患者における微小残存病変（minimal residual disease）（MRD））および移植片対宿主病（GVHD）を予防するための移植術における「非自己」細胞と共に見出され得るような、細胞の特定集団のスクリーニングを可能にする。あるいは、これらの技術は、ヒト臍帯血において見出され得るような増殖および/または分化を受け得る、造血幹細胞および前駆細胞のスクリーニングを可能にする。

## 【0527】

（抗体結合アッセイ）

本発明の抗体は、免疫特異的結合について、当該分野で公知の任意の方法によってアッセイされ得る。使用され得る免疫アッセイは、競合的および非競合的アッセイ系を含むがこれに限定されない。このアッセイ系は以下のような技術を使用する、少し例を挙げると、BIAcore分析（例えば、実施例33を参照）、FACS（蛍光活性化細胞分離装置）分析、免疫蛍光検査、免疫細胞化学、ウエスタンブロット、放射性免疫アッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射分析アッセイ、蛍光免疫アッセイ、プロテインA免疫アッセイ。このようなアッセイは、当該分野で、慣習的および周知である（例えば、Ausubelら（編）、1994、Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、John Wiley & Sons Inc., New Yorkを参照のこと。これはその全体が本明細書中で参考として援用される）。典型的な免疫アッセイは、以下に簡単に記載される（しかし限定として意図されない）。

20

30

## 【0528】

免疫沈降プロトコルは、一般に、RIPA緩衝液（1%NP-40またはTriton X-100、1%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%SDS、0.15M NaCl、0.01Mリン酸ナトリウム（pH7.2）、1%Trasyol）のような、タンパク質ホスファターゼおよび/またはプロテアーゼインヒビター（例えば、EDTA、PMSF、アプロチニン、パナジウム酸ナトリウム）を補充した溶解緩衝液中で、細胞の集団を溶解する工程、目的の抗体を細胞溶解物に添加する工程、4 である時間（例えば、1~4時間）インキュベートする工程、プロテインAおよび/またはプロテインGのセファロースビーズを細胞溶解物に添加する工程、約1時間以上、4 でインキュベートする工程、ビーズを溶解緩衝液で洗浄する工程およびビーズをSDS/サンプル緩衝液中に再懸濁する工程、を包含する。目的の抗体が特定の抗原を免疫沈降する能力は、例えば、ウエスタンブロット分析によって評価され得る。当業者は、抗原に対する抗体の結合を増加し、そしてバックグラウンドを減少する（例えば、セファロースビーズとともに細胞溶解物を予め洗浄する）ように改変され得るパラメータに関して、よく知っている。免疫沈降プロトコルに関するさらなる考察については、例えば、Ausubelら（編）、1994、Current Protocols in Molecular Biology、Vol. 1、John Wiley & Sons, Inc., New York (10.16.1)を参照のこと。

40

50

## 【0529】

ウェスタンブロット分析は一般的に、タンパク質サンプルを調製する工程、タンパク質サンプルのポリアクリルアミドゲルでの電気泳動（例えば抗原の分子量によって8%～20%のSDS-PAGE）、タンパク質サンプルをポリアクリルアミドゲルからメンブレン（例えばニトロセルロース、PVDFまたはナイロン）へ移す工程、ブロッキング溶液（例えば、3%のBSAまたは無脂肪ミルクを含むPBS）中でメンブレンをブロッキングする工程、メンブレンを洗浄緩衝液（例えば、PBS-Tween20）中で洗浄する工程、ブロッキング緩衝液で希釈された一次抗体（目的の抗体）を用いてメンブレンをブロッキングする工程、洗浄緩衝液中でメンブレンを洗浄する工程、ブロッキング緩衝液で希釈された、酵素基質（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼ）または放射性分子（例えば $^{32}\text{P}$ または $^{125}\text{I}$ ）に結合した二次抗体（これは一次抗体（例えば抗ヒト抗体）を認識する）でメンブレンをブロッキングする工程、洗浄緩衝液中でメンブレンを洗浄する工程、および抗原の存在を検出する工程、を包含する。当業者は、検出されるシグナルを増加し、そしてバックグラウンドノイズを減少するように改変され得るパラメータをよく知っている。ウェスタンブロットプロトコルに関するさらなる考察については、例えば、Ausubelら（編）、1994、*Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York (10.8.1)を参照のこと。

10

## 【0530】

ELISAは、抗原を調製する工程、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルをその抗原でコーティングする工程、酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）のような検出可能な化合物に結合した目的の抗体をそのウェルに添加し、そして一定時間インキュベートする工程、および抗原の存在を検出する工程を包含する。ELISAにおいて、目的の抗体は、検出可能な化合物に結合している必要はない；その代わりに、検出可能な化合物に結合した第二の抗体（目的の抗体を認識する）がウェルに添加され得る。さらに、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、抗体がウェルにコーティングされ得る。この場合、検出可能な化合物に結合した第二の抗体が、コーティングされたウェルへの目的の抗原の添加に続いて、添加され得る。当業者は、検出されるシグナルを増加させるように改変され得るパラメータ、および当該分野において公知のELISAの他のバリエーションを熟知している。ELISAに関するさらなる考察

20

30

## 【0531】

抗体の抗原に対する結合親和性および抗体-抗原相互作用のオフレート（off-rate）が、競合結合アッセイにより決定され得る。競合結合アッセイの一つの例は、ラジオイムノアッセイであり、ラジオイムノアッセイは、標識した抗原（例えば、 $^3\text{H}$ または $^{125}\text{I}$ ）またはそのフラグメントもしくは改変体と、漸増量の非標識抗原の存在下での目的の抗体とのインキュベーション、および標識した抗原に結合した抗体の検出を含む。目的の抗体の、特定の抗原に対する親和性、および結合オフレートは、スキッチャードプロット分析によるデータから決定され得る。第二の抗体との競合はまた、ラジオイムノアッセイを用いて決定され得る。この場合、抗原は、漸増量の非標識第二抗体の存在下で、標識した化合物（例えば、 $^3\text{H}$ または $^{125}\text{I}$ で標識した化合物）に結合した目的の抗体とともにインキュベートされる。2つの抗体間のこの種の競合アッセイはまた、2つの抗体が同じエピトープに結合するのか、または異なるエピトープに結合するのかを決定するために使用され得る。

40

## 【0532】

好ましい実施形態において、BIACore動態学的分析が、VEGF-2またはVEGF-2のフラグメントに対する、抗体（抗体フラグメントまたはその改変体を含む）の結合のオンレート（on rate）およびオフレートを決定するために使用される。B

50

I A c o r e 動態学的分析は、実施例 3 3 に詳細に記載されるように、チップ表面上に固定化された V E G F - 2 を有するチップへの抗体の結合およびこのチップからの解離を分析する工程を包含する。

【 0 5 3 3 】

( 治療用途 )

本発明はさらに、抗体を基礎とした治療に関し、この治療は、本発明の抗体を、1つ以上の開示された疾患、障害、または状態を処置するために、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトの患者に投与する工程を含む。本発明の治療化合物としては、本発明の抗体（本明細書中に記載するような、それらのフラグメント、アナログおよび誘導体を含む）ならびに本発明の抗体をコードする核酸（本明細書中に記載するような、それらのフラグメント、アナログおよび誘導体ならびに抗イディオタイプ抗体を含む）が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の抗体は、本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性に関連した疾患、障害または状態（本明細書中に記載する任意の1つ以上の疾患、障害、または状態を含むがこれらに限定されない）を処置、阻害または予防するために使用され得る。本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性に関連した疾患、障害または状態の処置および/または予防は、それらの疾患、障害または状態に関連した症状を緩和する工程を含むがこれに限定されない。本発明の抗体は、当該分野で公知であるか、または本明細書中に記載されるように、薬学的に受容可能な組成物中に提供され得る。

10

【 0 5 3 4 】

本発明の抗体が治療的に使用され得る方法の1つの要約は、身体内で局所的にまたは全身的に、あるいは（例えば、補体（C D C）により、またはエフェクター細胞（A D C C）により媒介されるような）抗体の直接的細胞傷害性により、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを結合させることを含む。これらのアプローチのいくつかは、より詳細に以下に記載される。本明細書中で提供される教示を与えられれば、当業者は、過度の実験なしに、診断上の目的、モニタリングの目的あるいは治療上の目的のために、本発明の抗体を使用する方法がわかる。

20

【 0 5 3 5 】

本発明の抗体は、例えば、抗体と相互作用するエフェクター細胞の数または活性を増加させるために役立つ、他のモノクローナル抗体またはキメラ抗体、あるいはリンホカインまたは造血増殖因子（例えば、I L - 2、I L - 3 および I L - 7 など）と組み合わせて有利に利用され得る。

30

【 0 5 3 6 】

本発明の抗体は、単独で、または他の型の処置（例えば、放射線療法、化学療法、ホルモン治療、免疫治療、抗腫瘍剤、および抗レトロウイルス剤）との組み合わせで投与され得る。非常に好ましい実施形態において、本発明の抗体は、単独で投与されてもよいし、または抗血管形成剤と組み合わせて使用されてもよい。一般的に、（抗体の場合には）患者の種と同じ種である種起源または種反応性の生成物の投与が好ましい。従って、好ましい実施形態においては、ヒト抗体、フラグメント誘導体、アナログ、または核酸が、治療または予防のために、ヒト患者に投与される。

40

【 0 5 3 7 】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（それらのフラグメントを含む）に関するイムノアッセイ、およびそれらに関連した障害の治療の両方のために、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する、高親和性および/または強力な、インビボでの阻害抗体および/または中和抗体、それらのフラグメント、またはその領域を使用することが好ましい。このような抗体、フラグメント、または領域は、好ましくは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（それらのフラグメントを含む）に対して親和性を有する。好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ 、 $10^{-2} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 、 $10^{-3} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 、 $10^{-4} \text{ M}$  より小さい解離定数すなわち  $K_d$  を有する結合親和性が挙げられる。さらに好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、 $10^{-5} \text{ M}$ 、

50

$5 \times 10^{-6}$  M、 $10^{-6}$  M、 $5 \times 10^{-7}$  M、 $10^{-7}$  M、 $5 \times 10^{-8}$  Mまたは $10^{-8}$  Mより小さい解離定数すなわちKdを有する結合親和性が挙げられる。なおさらに好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-9}$  M、 $10^{-9}$  M、 $5 \times 10^{-10}$  M、 $10^{-10}$  M、 $5 \times 10^{-11}$  M、 $10^{-11}$  M、 $5 \times 10^{-12}$  M、 $10^{-12}$  M、 $5 \times 10^{-13}$  M、 $10^{-13}$  M、 $5 \times 10^{-14}$  M、 $10^{-14}$  M、 $5 \times 10^{-15}$  M、または $10^{-15}$  Mより小さい解離定数すなわちKdを有する結合親和性が挙げられる。

#### 【0538】

(遺伝子治療)

特定の実施形態において、抗体またはその機能的誘導体をコードする配列を含む核酸は、本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性に関連した疾患または障害を処置、阻害または予防するために、遺伝子治療の目的で投与される。遺伝子治療とは、発現したか、または発現可能な核酸の、被験体への投与により行われる治療をいう。本発明のこの実施形態において、核酸は、それらのコードされたタンパク質を産生し、そのタンパク質は治療効果を媒介する。

10

#### 【0539】

当該分野で利用可能な遺伝子治療のための任意の方法は、本発明に従って使用され得る。例示的な方法が以下に記載される。

#### 【0540】

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspielら、*Clinical Pharmacy* 12:488-505(1993); WuおよびWu、*Biotherapy* 3:87-95(1991); Tolstoshev、*Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596(1993); Mulligan、*Science* 260:926-932(1993); ならびにMorganおよびAnderson、*Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217(1993); May、*TIBTECH* 11(5):155-215(1993)を参照のこと。使用され得る、組換えDNA技術分野において一般的に公知である方法は、Ausubelら(編)、*Current Protocols in Molecular Biology*、John Wiley & Sons、NY(1993); およびKriegler、*Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*、Stockton Press、NY(1990)に記載される。

20

30

#### 【0541】

好ましい局面において、化合物は抗体をコードする核酸配列を含有し、上記核酸配列は、適切な宿主において、抗体、またはそのフラグメントもしくはキメラタンパク質、あるいはその重鎖もしくは軽鎖を発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸配列は、抗体コード領域に作動可能に連結したプロモーターを有し、上記プロモーターは誘導性であるかまたは構成性であり、そして必要に応じて組織特異的である。別の特定の実施形態においては、抗体をコードする配列および任意の他の所望の配列がゲノム中の所望の部位での相同組換えを促進する領域に隣接した核酸分子が使用され、それにより抗体をコードする核酸の染色体内の発現を提供する(KollerおよびSmithies、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935(1989); Zijlstraら、*Nature* 342:435-438(1989))。特定の実施形態において、発現した抗体分子は単鎖抗体であるか; あるいはこの核酸配列は、この抗体の重鎖および軽鎖の両方をコードする配列またはそのフラグメントを含む。

40

#### 【0542】

核酸の患者への送達は、直接的(この場合、患者は核酸または核酸保有ベクターに直接的に曝される)か、または間接的(この場合、細胞は最初にインビトロで核酸で形質転換され、次いで患者に移植される)のいずれかであり得る。これらの2つのアプローチは、それぞれ、インビボ遺伝子治療として、またはエキソビボ遺伝子治療として公知である。

#### 【0543】

50

特定の実施形態において、核酸配列はインビボで直接的に投与され、そこで核酸配列は発現されて、コードされた産物を産生する。これは、当該分野で公知の多数の方法のいずれかにより（例えば、それらを適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、そしてそれを細胞内になるように投与することにより（例えば、欠損性または弱毒化したレトロウイルスまたは他のウイルスベクター（米国特許第4,980,286号を参照のこと）を用いた感染により）、あるいは、裸のDNAの直接注射により、あるいは、微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃；Biolistic, Dupont）の使用により、あるいは脂質もしくは細胞表面のレセプターでコーティングするか、または薬剤をトランスフェクトすることにより、リポソーム、微粒子、もしくはマイクロカプセル中へのカプセル化により、あるいは、それらを核に進入することが公知であるペプチドと結合させて投与することにより、レセプター媒介のエンドサイトーシスを受けるリガンドとそれを結合させて投与することにより（例えば、WuおよびWu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)を参照のこと）（レセプターを特異的に発現する細胞型を標的にするために用いられ得る）達成され得る。別の実施形態において、核酸-リガンド複合体が形成され得、ここで、このリガンドはエンドソームを破壊するフソジェニック（fusogenic）ウイルス性ペプチドを含み、核酸がリソソーム分解を回避するようにする。さらに別の実施形態において、核酸は、特異的なレセプターを標的とすることにより、細胞特異的な取り込みおよび発現についてインビボで標的とされ得る（例えば、PCT公開第WO92/06180号；同第WO92/22635号；同第WO92/20316号；同第WO93/14188号、同第WO93/20221号を参照のこと）。

あるいは、核酸は、細胞内に導入され得、そして相同組換えにより、発現のために宿主細胞DNA中に組み込まれ得る（KollerおよびSmithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935 (1989)；Zijlstraら, Nature 342: 435-438 (1989)）。

#### 【0544】

特定の実施形態において、本発明の抗体をコードする核酸配列を含むウイルスベクターが使用される。例えば、レトロウイルスベクターが用いられ得る（Millerら, Meth. Enzymol. 217: 581-599 (1993)を参照のこと）。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルス性ゲノムの正確なパッケージングおよび宿主細胞DNAへの正確な組み込みのために必要な構成要素を含む。遺伝子治療において使用される抗体をコードする核酸配列は、一つ以上のベクター中にクローン化され、これは、患者内への遺伝子の送達を容易にする。レトロウイルスベクターに関するさらなる詳細は、Boesenら, Biotherapy 6: 291-302 (1994)（これは、造血性幹細胞を化学療法に対してより耐性にするために、mdr1遺伝子をこの造血性幹細胞に送達するための、レトロウイルスベクターの使用を記載する）に見出され得る。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を説明する他の参考文献は、以下である。：Clowesら, J. Clin. Invest. 93: 644-651 (1994)；Kiemら, Blood 83: 1467-1473 (1994)；SalmonsおよびGünzberg, Human Gene Therapy 4: 129-141 (1993)；ならびにGrossmanおよびWilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3: 110-114 (1993)。

#### 【0545】

アデノウイルスは、遺伝子治療において使用され得る他のウイルスベクターである。アデノウイルスは、特に、気道上皮へ遺伝子を送達するための魅力的なビヒクルである。アデノウイルスは、自然に気道上皮に感染し、そこで軽い疾患を起こす。アデノウイルスに基づく送達系の他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染し得るという利点を有する。KozarskyおよびWilson, Current Opinion in Genetics and Development 3: 499-503 (1993)は、アデノウイルスに基づく遺伝子治療の概説を示す。Boutら, Human Gene Therapy 5: 3-10 (

10

20

30

40

50

1994)は、アカゲザルの気道上皮に遺伝子を移入するためのアデノウイルスベクターの使用を実証した。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用の他の例は、Rosenfeldら, *Science* 252:431-434(1991); Rosenfeldら, *Cell* 68:143-155(1992); Mastrangeliら, *J. Clin. Invest.* 91:225-234(1993); PCT公開第WO94/12649号; およびWangら, *Gene Therapy* 2:775-783(1995)に見出され得る。好ましい実施形態において、アデノウイルスベクターが使用される。

【0546】

アデノ随伴ウイルス(AAV)はまた、遺伝子治療における使用について提案されてきた(Walshら, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300(1993); 米国特許第5,436,146号)。

10

【0547】

遺伝子治療への別のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、またはウイルス感染のような方法により、組織培養物中の細胞へ遺伝子を移入する工程を含む。通常、移入の方法は、選択マーカーの細胞への移入を含む。次いで、細胞は、移入された遺伝子を取り込みそして発現している細胞を単離するために選別下に置かれる。それらの細胞は次いで、患者に送達される。

【0548】

この実施形態においては、得られた組換え細胞のインビボ投与の前に、核酸が細胞に導入される。このような導入は、当該分野において公知の任意の方法により実施され得、それらの方法としては以下が挙げられるがこれらに限定されない: トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含むウイルスベクターまたはバクテリオファージベクターでの感染、細胞融合、染色体媒介の遺伝子移入、マイクロセル(microcell)媒介の遺伝子移入、スフェロプラスト融合など。外来遺伝子の細胞への導入については、当該分野において多数の技術が公知であり(例えば、LoefflerおよびBehr, *Meth. Enzymol.* 217:599-618(1993); Cohenら, *Meth. Enzymol.* 217:618-644(1993); Cline, *Pharmac. Ther.* 29:69-92m(1985)を参照のこと)、そしてレシピエント細胞の必要な発生的および生理学的機能が破壊されない場合、本発明に従って使用され得る。この技術は、核酸の細胞への安定した移入を提供するはずであり、その結果、核酸は、細胞により発現可能であり、そして好ましくは、遺伝性であり、そしてその細胞の子孫により発現可能である。

20

30

【0549】

得られた組換え細胞は、当該分野において公知の様々な方法により、患者へ送達される。組換え血球(例えば、造血幹細胞または造血前駆細胞)は、好ましくは、静脈内に投与される。使用が考えられる細胞の量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、そして当業者により決定され得る。

【0550】

遺伝子治療の目的のために核酸が導入され得る細胞は、任意の所望の入手可能な細胞型を包含し、そして以下を含むがこれらに限定されない: 上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞; Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球のような血球; 種々の幹細胞または前駆細胞、特に、造血幹細胞または造血前駆細胞(例えば、骨髄、臍帯血、末梢血、胎児の肝臓などから得られるような細胞)。

40

【0551】

好ましい実施形態において、遺伝子治療に使用される細胞は、患者に対して自己である。

【0552】

遺伝子治療において組換え細胞が使用される実施形態において、抗体をコードする核酸

50



配列は、細胞またはそれらの子孫により核酸配列が発現可能であるように細胞に導入され、次いで組換え細胞は、治療的効果のためにインビボで投与される。特定の実施形態において、幹細胞または前駆細胞が用いられる。インビトロで単離され得、そしてインビトロで保存され得る任意の幹細胞および/または前駆細胞は、本発明のこの実施形態に従って潜在的に使用され得る（例えば、PCT公開第WO94/08598号：StempleおよびAnderson, Cell 71:973-985(1992); Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A:229(1980); ならびにPitelkowitzおよびScott, Mayo Clinic Proc. 61:771(1986)を参照のこと）。

#### 【0553】

特定の実施形態において、遺伝子治療の目的で導入される核酸は、コード領域に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含有し、その結果、核酸の発現は、適切な転写誘導因子の存在または非存在を制御することにより制御可能である。

#### 【0554】

（治療活性または予防活性の実証）

本発明の化合物または薬学的組成物は、好ましくは、ヒトでの使用の前にインビトロで、次いでインビボで、所望の治療活性または予防活性について試験される。例えば、化合物または薬学的組成物の治療有用性または予防有用性を実証するためのインビトロアッセイとしては、細胞株または患者組織サンプルに対する化合物の効果が挙げられる。細胞株および/または組織サンプルに対する化合物または組成物の効果は、当業者に公知である技術（ロゼット形成アッセイおよび細胞溶解アッセイが挙げられるがこれらに限定されない）を利用して決定され得る。本発明に従って、特定の化合物の投与が示されるかどうかを決定するために用いられ得るインビトロアッセイとしては、インビトロ細胞培養アッセイが挙げられ、このアッセイでは、患者組織サンプルが培養中において増殖され、そして化合物に曝されるか、そうでなければ化合物が投与され、そして、組織サンプルに対するそのような化合物の効果が観察される。

#### 【0555】

（治療的/予防的な投与および組成物）

本発明は、被験体への有効量の本発明の化合物または薬学的組成物、好ましくは本発明の抗体の投与による処置、阻害および予防の方法を提供する。好ましい局面において、化合物は実質的に精製される（例えば、その効果を制限するかまたは望ましくない副作用を生じる物質は実質的にない）。被験体は好ましくは、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物が挙げられるがこれらに限定されない動物であり、そして好ましくは哺乳動物であり、そして最も好ましくはヒトである。

#### 【0556】

化合物が核酸または免疫グロブリンを含む場合に使用され得る処方物および投与方法は、上記に記載され；さらなる適切な処方物および投与経路は、本明細書中で以下に記載されたものの中から選択され得る。

#### 【0557】

種々の送達系が公知であり、そして本発明の化合物を投与するために用いられ得る（例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル中でのカプセル化、この化合物の発現が可能な組み換え細胞、レセプター媒介エンドサイトーシス（例えば、WuおよびWu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432(1987)を参照のこと）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築など）。導入方法としては、皮内、筋内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口経路が挙げられるがこれらに限定されない。化合物または組成物は、任意の好都合な経路により（例えば、注入またはポラス注射により、上皮または粘膜皮膚内層（例えば、口腔粘膜、直腸粘膜および腸粘膜など）を通しての吸収により）投与され得、そして他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与され得る。投与は、全身的または局所的であり得る。さらに、本発明の薬学的化合物または組成物を、任意の適切な経路（脳室内注射および鞘内注射を包含する；脳室内注

10

20

30

40

50

射は、例えば、Ommaya リザーバのようなリザーバに取り付けられた脳室内カテーテルにより容易にされ得る)により中枢神経系に導入することが望まれ得る。例えば、吸入器または噴霧器の使用、およびエアゾール化剤を用いた処方により、肺投与もまた使用され得る。

【0558】

特定の実施形態において、本発明の薬学的化合物または組成物を、処置の必要な領域に局所的に投与することが望まれ得る；これは、制限する目的ではないが、例えば、手術中の局部注入、局所適用（例えば、手術後の創傷包帯との組み合わせ）により、注射により、カテーテルにより、坐剤により、またはインプラント（このインプラントは、シアラストイック (silastic) 膜のような膜または繊維を含む、多孔性、非多孔性、またはゼラチン様材料である）により達成され得る。好ましくは、抗体を含む本発明のタンパク質を投与する場合、タンパク質が吸収されない材料を使用することに注意が払われなければならない。

10

【0559】

別の実施形態において、化合物または組成物は、小胞、特に、リポソームの形態で送達され得る (Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treatら, Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein および Fidler (編), Liss, New York, 353~365頁 (1989); Lopez-Berestein, 同書 317~327頁を参照のこと；広く同書を参照のこと)。

20

【0560】

さらに別の実施形態において、化合物または組成物は制御された放出系で送達され得る。1つの実施形態において、ポンプが用いられ得る (Langer, (前出); Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 (1987); Buchwaldら, Surgery 88: 507 (1980); Saudekら, N. Engl. J. Med. 321: 574 (1989)を参照のこと)。別の実施形態において、高分子材料が用いられ得る (Medical Applications of Controlled Release, Langer および Wise (編), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen および Ball (編), Wiley, New York (1984); Ranger および Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61 (1983)を参照のこと；Levyら, Science 228: 190 (1985); Duringら, Ann. Neurol. 25: 351 (1989); Howardら, J. Neurosurg. 71: 105 (1989)もまた参照のこと)。さらに別の実施形態において、制御された放出系は、治療標的、即ち、脳の近くに置かれ得、従って、僅かな全身用量しか必要としない (例えば、Goodson, Medical Applications of Controlled Release, (前出), 第2巻, 115~138頁 (1984)を参照のこと)。

30

40

【0561】

他の制御された放出系は、Langerにより総説において議論される (Science 249: 1527-1533 (1990))。

【0562】

本発明の化合物がタンパク質をコードする核酸である、具体的な実施形態において、その核酸は、それを適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、そしてそれが細胞内になるように投与することにより (例えば、レトロウイルスベクターの使用により (米国特許第4,980,286号を参照のこと)、または直接注射により、または微粒子ボンバードメント (例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont) の使用により、また

50

は脂質もしくは細胞表面レセプターもしくはトランスフェクト剤でコーティングすることにより、または核に入ることが公知であるホメオボックス様ペプチドと結合させて投与すること（例えば、Joliotら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868(1991)を参照のこと）などにより、そのコードされたタンパク質の発現を促進するようにインピボで投与され得る。あるいは、核酸は、細胞内に導入され得、そして、発現のために相同組換えにより宿主細胞DNA内に組み込まれ得る。

【0563】

本発明はまた、薬学的組成物を提供する。このような組成物は、治療有効量の化合物、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。具体的な実施形態において、用語「薬学的に受容可能な」とは、動物における、そしてさらに特にヒトにおける使用のために、連邦規制当局もしくは米国政府により認められたか、または米国薬局方もしくは他の一般に認められた薬局方に列挙されたことを意味する。用語「キャリア」とは、治療剤とともに投与される、希釈剤、アジュバンド、賦形剤、またはビヒクルをいう。このような薬学的なキャリアは、水および油（石油起源、動物起源、植物起源、または合成起源の油（例えば、ピーナツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油など）を含む）のような滅菌した液体であり得る。水は、薬学的組成物が静脈内に投与される場合に、好ましいキャリアである。生理食塩水溶液、ならびにデキストロースおよびグリセロールの水溶液はまた、特に注射可能な溶液のために、液体キャリアとして使用され得る。適切な薬学的賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦、チヨーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物はまた、所望されるならば、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含み得る。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、持続放出処方物などの形態を取り得る。この組成物は、従来の結合剤およびトリグリセリドのようなキャリアとともに、坐剤として処方され得る。経口処方物は、薬学的等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような標準キャリアを含み得る。適切な薬学的キャリアの例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載される。このような組成物は、治療有効量の化合物を、好ましくは精製された形態で、適切な量のキャリアとともに含んで、患者への適切な投与のための形態を提供する。処方物は、投与形態に適すべきである。

【0564】

好ましい実施形態において、組成物は、慣用手順に従って、ヒトへの静脈内投与のために採用された薬学的組成物として、処方される。代表的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液の溶液である。必要な場合、組成物はまた、可溶化剤および注射の部位での痛みを緩和するリグノカインのような局部麻酔を含み得る。一般的には、成分は、別々にかまたは単回投薬形態で一緒に混合してのどちらかで、例えば、一定量の活性薬剤を示すアンプルまたは小袋(sachette)のような密封された容器中の凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として供給される。組成物が注入により投与されるべき場合には、組成物は、滅菌した薬学的等級の水または生理食塩水を含む注入ボトルに分配され得る。組成物が注射により投与される場合、成分が投与の前に混合され得るように、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供され得る。

【0565】

本発明の化合物は、中性の形態または塩の形態として処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するもののようなアニオンとともに形成される塩、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第2鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するもののようなカチオンとともに形成される塩が挙げられる。

【0566】

10

20

30

40

50

この処置（本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性と関連する疾患または障害の抑制および予防）において効果的である本発明の化合物の量は、標準的な臨床技術により決定され得る。さらに、インビトロアッセイを、必要に応じて、使用して最適な投薬量の範囲を同定するのを助け得る。処方において使用されるべき正確な用量はまた、投与の経路、および疾患または障害の重篤さに依存し、そして開業医の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。有効用量は、インビトロまたは動物モデル試験系から得られた用量反応曲線から外挿され得る。

【0567】

抗体に関して、患者に投与される投薬量は、代表的に、患者の体重1kgあたり0.1mg~100mgである。好ましくは、患者に投与される投薬量は、患者の体重1kgあたり0.1mgと20mgとの間であり、より好ましくは、患者の体重1kgあたり1mg~10mgである。一般に、ヒト抗体は、外来ポリペプチドへの免疫応答に起因して、他種由来の抗体よりもヒト体内で長い半減期を有する。従って、ヒト抗体の低い投薬量および頻度の低い投与は、しばしば可能である。さらに、本発明の抗体の投与の投薬量および頻度は、改変（例えば、脂溶化（lipidation）のような）による抗体の取り込みおよび組織浸透（例えば、脳への）を増強することにより減少され得る。

10

【0568】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の一つ以上の成分で満たされている一つ以上の容器を備える薬学的パックまたはキットを提供する。薬学的製品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制している政府機関により規定される形式における通告は、このよう

20

【0569】

（診断および画像化）

目的のポリペプチドに特異的に結合する標識化抗体、ならびにその誘導体およびそのアナログを、診断目的のために使用して、本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性に関連する疾患、障害および/または状態を検出、診断またはモニターし得る。本発明は、目的のポリペプチドの異常な発現の検出を提供し、これは、（a）目的のポリペプチドに特異的な1つ以上の抗体を使用して、個体の細胞または体液中の目的のポリペプチドの発現をアッセイする工程、および（b）この遺伝子発現レベルと標準的な遺伝子発現のレベルを比較する工程、を包含し、これによって、その標準的な発現レベルと比較されるアッセイされたポリペプチド遺伝子発現レベルの増加または減少が、異常な発現を示す。

30

【0570】

本発明は、障害を診断するための診断アッセイを提供し、このアッセイは、（a）目的のポリペプチドに特異的な1つ以上の抗体を使用して、個体の細胞または体液中の目的のポリペプチドの発現をアッセイする工程、および（b）この遺伝子発現レベルと標準的な遺伝子発現のレベルを比較する工程、を包含し、これによって、その標準的な発現レベルと比較されるアッセイされたポリペプチド遺伝子発現レベルの増加または減少が、特定の障害を示す。癌に関して、個体由来の生検組織における比較的高い量の転写物の存在は、疾患の発生についての素因を示し得るか、または実際の臨床症状の出現前に疾患を検出するための手段を提供し得る。この型のより決定的な診断は、保健専門家に予防手段を使用させること、またはより早期の積極的な処置を可能にし得、これにより、癌の発生またはさらなる進行を予防する。

40

【0571】

本発明の抗体を使用して、当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を使用して生物学的サンプル中のタンパク質レベルをアッセイし得る（例えば、Jalkanenら、J. Cell. Biol. 101:976-985(1985); Jalkanenら、J. Cell. Biol. 105:3087-3096(1987)を参照のこと）。タンパク質遺伝子発現を検出するために有用な、抗体に基づく他の方法としては、イムノアッセ

50

イ（例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）および放射免疫アッセイ（R I A））が挙げられる。適切な抗体アッセイ標識は、当該分野において公知であり、そして酵素標識（例えば、グルコースオキシダーゼ）；放射性同位体（例えば、ヨウ素（ $^{125}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ ）、炭素（ $^{14}\text{C}$ ）、硫黄（ $^{35}\text{S}$ ）、トリチウム（ $^3\text{H}$ ）、インジウム（ $^{112}\text{In}$ ）、およびテクネチウム（ $^{99}\text{Tc}$ ））；発光標識（例えば、ルミノール）；ならびに蛍光標識（例えば、フルオレセインおよびローダミン）、ならびにビオチンが挙げられる。

【0572】

本発明の1つの局面は、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトにおける、目的のポリペプチドの異常な発現と関連する疾患または障害の検出および診断である。1つの実施形態において、診断は、a) 目的のポリペプチドに特異的に結合する有効量の標識化分子を被験体に（例えば、非経口的に、皮下に、または腹腔内に）投与する工程；b) このポリペプチドが発現する被験体内の部位でこの標識化分子が優先的に濃縮することを可能にするために（および結合していない標識化分子がバックグラウンドレベルまで除去されるために）投与後、時間間隔を待つ工程；c) バックグラウンドレベルを決定する工程；およびd) この被験体中の標識化分子を検出する工程、を包含し、その結果、このバックグラウンドレベルを越える標識化分子の検出は、この被験体が目的のポリペプチドの異常な発現と関連する特定の疾患または障害を有することを示す。バックグラウンドレベルは、特定の系について以前に決定された標準的な値と、検出された標識化分子の量を比較する工程を包含する種々の方法により決定され得る。

【0573】

被験体のサイズおよび用いられる画像化システムは、診断画像を生成するために必要な画像化部分の量を決定することが当該分野で理解される。放射性同位体部分の場合には、ヒト被験体について、注射される放射能の量は、通常、約5～20ミリキュリーの $^{99\text{m}}\text{Tc}$ の範囲である。次いで、標識された抗体または抗体フラグメントは、特定のタンパク質を含む細胞の位置に優先的に蓄積される。インビボ腫瘍画像化は、S. W. Burchielら、「Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments」(Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancerの第13章、S. W. BurchielおよびB. A. Rhodes編、Masson Publishing Inc. (1982)に記載される。

【0574】

用いられる標識の型および投与の様式を含む、いくつかの可変要素に依存して、標識された分子が被験体の部位に優先的に濃縮し、そして結合されていない標識された分子がバックグラウンドレベルまで一掃されることを可能にする、投与後の時間間隔は、6～48時間または6～24時間または6～12時間である。別の実施形態においては、投与後の時間間隔は、5～20日間または5～10日間である。

【0575】

1つの実施形態においては、疾患または障害のモニタリングは、その疾患または障害を診断するための方法を繰り返すこと（例えば、最初の診断後1ヶ月、最初の診断後6ヶ月、最初の診断後1年など）により行われる。

【0576】

標識された分子の存在は、インビボ走査について当該分野において公知の方法を用いて、患者から検出され得る。これらの方法は、用いられる標識の型に依存する。当業者は、特定の標識を検出するための適切な方法を決定し得る。本発明の診断方法において用いられ得る方法およびデバイスとしては、限定はされないが、コンピューター断層撮影（CT）、陽子（positron）射出断層撮影法（PET）のような全身走査、磁気共鳴像（MRI）、および超音波診断法が挙げられる。

【0577】

特定の実施形態においては、この分子は放射性同位体で標識され、そして放射線応答性

10

20

30

40

50

の外科用機器を用いて患者から検出される (Thurstonら、米国特許第5,441,050号)。別の実施形態においては、この分子は蛍光化合物で標識され、そして蛍光応答性の走査機器を用いて患者から検出される。別の実施形態においては、この分子は陽電子放出金属で標識され、そして陽子射出断層撮影法を用いて患者 (patient) から検出される。さらに別の実施形態においては、この分子は常磁性標識で標識され、そして磁気共鳴映像 (MRI) を用いて患者から検出される。

**【0578】**

(キット)

本発明は、上記の方法において用いられ得るキットを提供する。1つの実施形態においては、キットは、1以上の容器中に、本発明の抗体 (好ましくは精製された抗体) を備える。特定の実施形態においては、本発明のキットは、このキットに含まれる抗体と特異的に免疫反応性であるエピトープを含む、実質的に単離されたポリペプチドを備える。好ましくは、本発明のキットは、目的のポリペプチドと反応しないコントロール抗体を、さらに備える。別の特定の実施形態においては、本発明のキットは、目的のポリペプチドとの抗体の結合を検出するための手段を備える (例えば、この抗体は、検出可能な基質 (例えば、蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物または発光化合物) と結合体化され得るか、あるいは第一の抗体を認識する第二の抗体が、検出可能な基質と結合体化され得る)。

10

**【0579】**

本発明の別の特定の実施形態においては、このキットは、増殖性および/または癌性のポリヌクレオチドおよびポリペプチドに対して特異的な抗体を含む血清をスクリーニングする際に用いる診断用キットである。このようなキットは、目的のポリペプチドと反応しないコントロール抗体を備え得る。このようなキットは、少なくとも1つの抗ポリペプチド抗原抗体と特異的に免疫反応性であるエピトープを含む、実質的に単離されたポリペプチド抗原を備え得る。さらに、このようなキットは、この抗体の抗原への結合を検出するための手段を備える (例えば、この抗体は、フローサイトメトリーにより検出され得る、フルオレセインまたはローダミンのような蛍光化合物と結合体化され得る)。特定の実施形態においては、このキットは、組換え的に産生されたポリペプチド抗原または化学的に合成されたポリペプチド抗原を備え得る。このキットのポリペプチド抗原はまた、固体支持体に付着され得る。

20

**【0580】**

より特定の実施形態においては、上記のキットの検出手段は、このポリペプチド抗原が付着される固体支持体を含む。このようなキットはまた、非付着レポーター標識抗ヒト抗体を備え得る。この実施形態においては、抗体のポリペプチド抗原との結合はこのレポーター標識抗体の結合により検出され得る。

30

**【0581】**

さらなる実施形態においては、本発明は、本発明のポリペプチドの抗原を含む血清をスクリーニングする際に用いる診断用キットを含む。この診断用キットは、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド抗原と特異的に免疫反応性である、実質的に単離された抗体、およびこのポリヌクレオチドまたはポリペプチド抗原の抗体との結合を検出する手段を備える。1つの実施形態においては、この抗体は、固体支持体に付着される。特定の実施形態においては、この抗体は、モノクローナル抗体であり得る。このキットの検出手段は、第二の標識されたモノクローナル抗体を含み得る。あるいは、またはさらに、この検出手段は、標識された、競合抗原を含み得る。

40

**【0582】**

1つの診断の構成においては、試験血清は、本発明の方法により得られる表面結合抗原を有する固相試薬と反応する。特異的な抗原抗体をこの試薬と結合させ、そして結合されない血清成分を洗浄により除去した後、固体支持体上に結合する抗抗原抗体の量に応じて、レポーターをこの試薬と結合させるために、この試薬をレポーター標識抗ヒト抗体と反応させる。この試薬は、結合されない標識抗体を除去するため、再び洗浄され、そしてこの試薬と会合したレポーターの量が決定される。代表的には、レポーターは、適切な蛍光

50

測定基質、発光基質または比色基質 (Sigma, St. Louis, MO) の存在下で、この固相をインキュベートすることにより検出される酵素である。

【0583】

上記のアッセイにおける固体表面試薬は、タンパク質材料を固体支持体材料 (例えば、高分子ビーズ、計深棒、96ウェルプレートまたは濾過材料) に付着させるための公知の技術により調製される。これらの付着方法としては、一般的に、支持体へのタンパク質の非特異的な吸着または固体支持体上の化学的に活性な基 (例えば、活性化カルボキシル基、ヒドロキシル基、またはアルデヒド基) とのタンパク質の共有結合 (covalent attachment) (代表的には、遊離アミン基を介する) が挙げられる。あるいは、ストレプトアビジンでコートされたプレートが、ビオチン化された抗原と共に使用され得る。

10

【0584】

従って、本発明は、この診断方法を行うためのアッセイ系またはキットを提供する。このキットは、一般的に、表面結合された組換え抗原を有する支持体、および表面結合された抗抗原抗体を検出するための、レポーター標識された抗ヒト抗体を備える。

【0585】

抗体は、さらに、特定の個体において腫瘍の存在を検出するためのイムノアッセイにおいて用いられ得る。酵素イムノアッセイは、個体の血液サンプルから実行され得る。VEGF-2のレベルの上昇は、癌の診断とみなされ得る。

【0586】

内皮細胞の成長を活性化しないダイマーを形成するように野生型のVEGF-2と相互作用し得、従ってこれは内因性のVEGF-2を不活性化するVEGF-2の短縮バージョンがまた産生され得る。または、VEGF-2の変異形態は、それら自身でダイマーを形成し、そして標的細胞表面上の適切なチロシンキナーゼレセプターのリガンド結合ドメインを占有するが、細胞の成長は活性化しない。

20

【0587】

あるいは、本発明のポリペプチドが通常結合するレセプターに対して結合する、本発明のポリペプチドに対するアンタゴニストが使用され得る。このアンタゴニストは、密接に関連するタンパク質であり得、その結果、これらは天然のタンパク質のレセプター部位を認識し、そして結合するが、それらは、天然のタンパク質の不活性な形態であり、これによりレセプター部位が占有されるのでVEGF-2の作用を妨げる。これらの方法において、VEGF-2の作用は、妨げられ、そしてアンタゴニスト/インヒビターは、VEGF-2により認識される腫瘍のレセプター部位を占有することにより、またはVEGF-2自身を不活性化することにより抗腫瘍薬物として治療的に用いられ得る。このアンタゴニスト/インヒビターはまた、VEGF-2の血管透過性作用の上昇に起因する炎症を妨げるために用いられ得る。このアンタゴニスト/インヒビターはまた、固形腫瘍増殖、糖尿病性網膜症、乾癬および慢性関節リウマチの処置のために用いられ得る。

30

【0588】

このアンタゴニスト/インヒビターは、例えば、本明細書において上記されたような薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせて使用され得る。

40

【0589】

本発明を以下の実施例を参照にしてさらに記載する；しかし、本発明はそのような実施例に限定されないことを理解されたい。全ての部または量は、他に明記しない限り重量基準である。

【0590】

以下の実施例の理解を容易にするために、特定の頻繁に現れる方法および/または用語を記載する。

【0591】

「プラスミド」は、大文字および/または数字の前および/または後の小文字のpにより示される。本明細書中の出発プラスミドは、市販されるか、制限無く公的に入手可能で

50

あるか、または公開された手順に従って入手可能なプラスミドから構築され得るかのいずれかである。さらに、記載されるプラスミドと等価のプラスミドが当該分野で公知であり、そして当業者には明らかである。

【0592】

DNAの「消化」は、DNA中の特定の配列でのみ作用する制限酵素でDNAを触媒反応的に切断することをいう。本明細書中で使用される種々の制限酵素は市販されており、そしてそれらの反応条件、補因子、および他の必要条件は当業者に公知のものが使用された。分析目的には、代表的には1mgのプラスミドまたはDNAフラグメントが約2単位の酵素とともに約20F1の緩衝溶液中で使用される。プラスミド構築のためのDNAフラグメントを単離する目的には、代表的には5~50mgのDNAが20~250単位の酵素で、より多量の容量中で消化される。特定の制限酵素のための適切な緩衝液および基質量は、製造者により特定される。37ECにての約1時間のインキュベーション時間が通常使用されるが、しかしこれは供給者の説明書に従って変動させ得る。消化後、反応物をポリアクリルアミドゲルで直接電気泳動して所望のフラグメントを単離する。

10

【0593】

切断されたフラグメントのサイズ分離は、Goeddel, D.ら, *Nucleic Acids Res.* 8:4057(1980)により記載された8%ポリアクリルアミドゲルを使用して行われる。

【0594】

「オリゴヌクレオチド」は、1本鎖ポリデオキシヌクレオチドまたは2つの相補的なポリデオキシヌクレオチド鎖のいずれかをいい、これらは化学的に合成され得る。そのような合成オリゴヌクレオチドは、5'リン酸を有さず、従ってキナーゼの存在下でATPを用いてリン酸を付加しなければ別のオリゴヌクレオチドに連結しない。合成オリゴヌクレオチドは、脱リン酸化されていないフラグメントに連結する。

20

【0595】

「連結」は、2つの2本鎖核酸フラグメントの間でホスホジエステル結合を形成するプロセスをいう(Sambrookら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)、146頁)。他に提供されていなければ、連結は公知の緩衝液および条件で、ほぼ等モル量の連結されるべきDNAフラグメント0.5μgあたり10単位のT4 DNAリガーゼ(「リガーゼ」)を用いて達成され得る。

30

【0596】

他に明言しない限り、形質転換はGraham, F.およびVan der Eb, A., *Virology*, 52:456-457(1973)の方法に記載のように実施した。

【実施例】

【0597】

(実施例)

(実施例1)

(ヒト組織および乳癌細胞株におけるVEGF-2の発現パターン)

ノーザンブロット分析を行い、ヒト組織およびヒト組織中の乳癌細胞株におけるVEGF-2の発現のレベルを試験した。全細胞RNAサンプルを、RNAzol<sup>TM</sup>Bシステム(Biotecx Laboratories, Inc.)を用いて単離した。各々の乳癌組織および特定化された細胞株から単離された約10mgの全RNAを、1%アガロースゲル上で分離し、そしてナイロンフィルター上にブロットした(Sambrookら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))。標識反応は、50ngのDNAフラグメントを用いてStratagene Prime-Itキッ

40

50



トに従って行った。標識したDNAを、5 Prime ÷ 3 Prime, Inc (Boulder, CO)のSelect-G-50カラムを用いて精製した。次いで、フィルターを、0.5 M NaPO<sub>4</sub>および7% SDS中1,000,000 cpm/mlの放射性標識した全長VEGF-2遺伝子で、65 にて一晚ハイブリダイズした。0.5 x SSC、0.1% SDSによる室温での2回の洗浄および60 での2回の洗浄後、次いで、フィルターを、増感スクリーンを用いて-70 で、一晚露光した。1.6 Kdのメッセージが、2つの乳癌細胞株において観察された。図5、レーン4は、極めて腫瘍形成性の細胞株を示し、これは、増殖についてエストロゲン非依存である。

#### 【0598】

また、10のヒト成体組織由来の10 mgの全RNAを、アガロースゲル上で分離し、そしてナイロンフィルター上にプロットした。次いで、そのフィルターを、7% SDS、0.5 M NaPO<sub>4</sub>、pH 7.2; 1% BSA中の放射性標識したVEGF-2プローブで、65 にて一晚ハイブリダイズした。0.2 x SSC中、65 での洗浄後、このフィルターを、増感スクリーンを用いて-70 で、24日間フィルムに露光した。図6を参照のこと。

#### 【0599】

(実施例2)

(インビトロ転写および翻訳による短縮形態のVEGF-2(配列番号4)の発現)

VEGF-2 cDNAをインビトロで転写して、そして翻訳し、短縮形態のVEGF-2および部分VEGF-2 cDNAによりコードされる翻訳可能なポリペプチドの大きさを決定した。pBluescript SKベクター中のVEGF-2の2つの挿入物を、以下の3対のプライマーを用いてPCRにより増幅した; 1) M13逆方向および順方向プライマー; 2) M13逆方向プライマーおよびVEGFプライマーF4; ならびに3) M13逆方向プライマーおよびVEGFプライマーF5。これらのプライマーの配列は、以下のとおりである。

#### 【0600】

M13-2逆方向プライマー: 5' - ATGCTTCCGGCTCGTATG - 3' (配列番号9)。この配列は、pBluescriptベクター中のVEGF-2 cDNA挿入物の5'末端の上流に位置し、そしてそのcDNAとアンチセンスの方向にある。T3プロモーター配列は、このプライマーとVEGF-2 cDNAとの間に位置する。

#### 【0601】

M13-2順方向プライマー: 5' GGGTTTTTCCCAGTCACGAC - 3' (配列番号10)。この配列は、pBluescriptベクター中のVEGF-2 cDNA挿入物の3'末端の下流に位置し、そしてそのcDNA挿入物とアンチセンスの方向にある。

#### 【0602】

VEGFプライマーF4: 5' - CCACATGGTTTCAGGAAGACA - 3' (配列番号11)。この配列は、VEGF-2 cDNA内にアンチセンス方向で、bp 1259-1239に位置し、これは、このcDNAの終止コドンの3'末端から約169 bp離れており、そしてこのcDNAの最後のヌクレオチドの約266 bp前にある。

#### 【0603】

3対全てのプライマーを用いるPCR反応は、cDNA挿入物の前にT3プロモーター配列を含む増幅産物を生成する。第1対および第3対のプライマーは、配列番号4に示されるVEGF-2のポリペプチドをコードするPCR産物を生成する。第2対のプライマーは、VEGF-2ポリペプチドのC末端で36アミノ酸コード配列を欠く、PCR産物を生成する。

#### 【0604】

第1対のプライマーからの約0.5 mg、第2対のプライマーからの約1 mg、第3対のプライマーからの約1 mgのPCR産物を、インビトロ転写/翻訳のために使用した。インビトロ転写/翻訳反応は、25 Flの容量で、T<sub>N</sub>TJ Coupled Reti

10

20

30

40

50

culocyte Lysate Systems (Promega, CAT#L4950) を使用して行った。詳細には、その反応は、12.5 Fl の T<sub>N</sub>T ウサギ網状赤血球溶解物、2 Fl の T<sub>N</sub>T 反応緩衝液、1 Fl の T3 ポリメラーゼ、1 Fl の 1 mM のアミノ酸混合物 (メチオニン非含有)、4 Fl の <sup>35</sup>S - メチオニン (>1000 Ci/mmole、10 mCi/ml)、1 Fl の 40 U/μl ; RNasin リボヌクレアーゼインヒビター、0.5 または 1 mg の PCR 産物を含む。ヌクレアーゼを含まない H<sub>2</sub>O を添加して、容量を 25 Fl に合わせた。反応を、30 で 2 時間インキュベートした。5 μl の反応産物を、4 ~ 20 % の勾配 SDS - PAGE ゲル上で分析した。25 % イソプロパノールおよび 10 % 酢酸で固定した後、ゲルを乾燥し、そして 70 で一晩、X 線フィルムに露光した。

10

## 【0605】

図 7 に示されるように、短縮型 VEGF - 2 cDNA (すなわち、配列番号 3 に示されるような) を含む PCR 産物、および 3' 非翻訳領域 (3' - UTR) 中の 266 bp を欠く cDNA が、同じ長さの翻訳産物を生成し、それらの分子量は、38 ~ 40 kd であると推定される (レーン 1 および 3)。全ての 3' UTR を欠き、かつ C 末端の 36 アミノ酸をコードする配列を欠く cDNA は、推定分子量 36 ~ 38 kd のポリペプチドに翻訳された (レーン 2)。

## 【0606】

(実施例 3)

(バキュロウイルス発現系を使用する VEGF - 2 のクローニングおよび発現)

N 末端の 46 アミノ酸を含まない VEGF - 2 タンパク質をコードする DNA 配列 (ATCC 番号 97149 を参照のこと) を、その遺伝子の 5' および 3' 配列に対応する PCR オリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅した。

20

## 【0607】

5' プライマーは、配列 TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAT CCC GCC ATG GAG GCC ACG GCT TAT GC (配列番号 12) を有し、そして BamH1 制限酵素部位 (下線部) および VEGF - 2 の 5' 配列 (ヌクレオチド 150 - 166) に相補的な 17 ヌクレオチド配列を含む。

## 【0608】

3' プライマーは、配列 GATC TCT AGA TTA GCT CAT TTG TGG TCT (配列番号 13) を有し、そして制限酵素 XbaI に対する切断部位および VEGF - 2 の 3' 配列 (終止コドンおよび終止コドン前の 15 ヌクレオチド配列を含む) に相補的な 18 ヌクレオチドを含む。

30

## 【0609】

増幅された配列を、市販のキット (「GeneClean」BIO 101 Inc., La Jolla, CA) を用いて、1% アガロースゲルから単離した。次いで、このフラグメントを、エンドヌクレアーゼ BamH1 および XbaI で消化し、次いで、再度 1% アガロースゲル上で精製した。このフラグメントを、pAcGP67A バキュロウイルス転移ベクター (Pharming) に BamH1 および XbaI 部位で連結した。この連結によって VEGF - 2 cDNA をバキュロウイルス gp67 遺伝子のシグナル配列とインフレームでクローン化し、そしてベクターのシグナル配列の 3' 末端に位置した。これを、pAcGP67A - VEGF - 2 と称する。

40

## 【0610】

gp67 遺伝子のシグナル配列を有する VEGF - 2 を発現のための pRG1 ベクターにクローン化するために、シグナル配列およびいくらかの上流配列を有する VEGF - 2 を、VEGF - 2 cDNA の上流に位置する XhoI 制限エンドヌクレアーゼ部位および XbaI 制限エンドヌクレアーゼ部位で、XhoI および XbaI 制限酵素によって、pAcGP67A - VEGF - 2 プラスミドから切り出した。このフラグメントを、1% アガロースゲル上でベクターの残部から分離し、そして「GeneClean」キットを使用して精製した。これを F2 と称した。

50

## 【0611】

PRG1ベクター(pVL941ベクターの改変)を、バキュロウイルス発現系(総説については; Summers, M. D. および Smith, G. E., 「A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures」 Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555 (1987)を参照のこと)を使用するVEGF-2タンパク質の発現のために使用する。この発現ベクターは、Autographa californica核多角体病ウイルス(ACMNPV)の強力なポリヘドリンプロモーターを含み、続いて制限エンドヌクレアーゼBamHI、SmaI、XbaI、BglIIおよびAsp718についての認識部位を含む。制限エンドヌクレアーゼXhoIについての部位は、BamHI部位の上流に位置する。XhoIとBamHIとの間の配列は、Pacgp67A(テープ上で静的な)ベクターにおける配列と同じである。シミアンウイルス(SV)40のポリアデニル化部位を、効率的なポリアデニル化のために使用する。組換えウイルスの容易な選択のために、E. coli由来のガラクトシダーゼ遺伝子が、ポリヘドリンプロモーターと同じ方向で挿入され、ポリヘドリン遺伝子のポリアデニル化シグナルがこれに続く。ポリヘドリン配列には、同時トランスフェクトされた野生型ウイルスDNAの細胞媒介性相同組換えのためにウイルス配列が両側で隣接される。多くの他のバキュロウイルスベクターが、pRG1に代わって使用され得る(例えば、pAc373、pVL941およびpAcIM1(Luckow, V. A. および Summers, M. D., Virology 170:31-39(1989))。 10

## 【0612】

プラスミドを、制限酵素XboIおよびXbaIで消化し、次いでウシ腸ホスファターゼを使用して、当該分野で公知の手順により脱リン酸化した。そのDNAを次いで、市販のキット(「GeneClean」BIO 101 Inc., La Jolla, Ca)を用いて1%アガロースゲルから単離した。このベクターDNAを、V2と称する。 20

## 【0613】

フラグメントF2および脱リン酸化プラスミドV2を、T4 DNAリガーゼで連結した。次いで、E. coli HB101細胞を形質転換し、そしてVEGF-2遺伝子を有するプラスミド(pBacgp67-VEGF-2)を含む細菌を、酵素BamHIおよびXbaIを使用して同定した。クローン化フラグメントの配列を、DNA配列決定によって確認した。 30

## 【0614】

5mgのプラスミドpBacgp67-VEGF-2を、リポフェクチン法(Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417(1987))を使用して、1.0mgの市販の線状化バキュロウイルス(「BaculoGold」baculovirus DNA, Pharmingen, San Diego, CA.)とともに同時トランスフェクトした。 40

## 【0615】

1mgのBaculoGoldJウイルスDNAおよび5mgのプラスミドpBacgp67-VEGF-2を、50mlの無血清グレース培地(Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD)を含むマイクロタイタープレートの滅菌ウェル中で混合した。その後、10mlのリポフェクチンおよび90mlのグレース培地を添加し、混合し、そして室温にて15分間インキュベートした。次いで、このトランスフェクション混合物を、無血清グレース培地1mlを有する35mm組織培養プレート内に播種されたSf9昆虫細胞(ATCC CRL 1711)に滴下した。プレートを前後に傾けて、その新しく添加した溶液を混合した。次いで、プレートを、27度で5時間インキュベートした。5時間後、トランスフェクション溶液をプレートから除去し、そして10%ウシ胎児血清を補充した1mlのグレース昆虫培地を添加した。プレ 50

ートをインキュベーター内に置き戻し、そして培養を、27℃で4日間継続した。

【0616】

4日後、上清を回収し、そしてSummersおよびSmith、前出に記載されるのと同様にブランクアッセイを行った。改変として、「Blue Gal」(Life Technologies Inc., Gaithersburg)を含むアガロースゲルを用いて、青色染色されたブランクの容易な単離を可能にした。(「ブランクアッセイ」の詳細な説明はまた、Life Technologies Inc., Gaithersburg、で配布される昆虫細胞培養およびバキュロウイルス学のための使用者ガイド(9~10頁)においても見い出され得る)。

【0617】

段階希釈の4日後、ウイルスを細胞に添加し、青色染色されたブランクをEppendorfピペットのチップで拾った。次いで、組換えウイルスを含む寒天を、200mlのグレース培地を含むEppendorfチューブに再懸濁した。寒天を手短な遠心分離により除去し、そして組換えバキュロウイルスを含む上清を使用して、35mmディッシュに播種されたSf9細胞を感染させた。4日後、これらの培養ディッシュの上清を収集し、次いでそれらを4℃で保存した。

【0618】

Sf9細胞を、10%熱非働化FBSを補充したグレース培地中で増殖させた。細胞に、1の感染多重度(「MOI」)で組換えバキュロウイルスV-gp67-VEGF-2を感染させた。6時間後、培地を除去し、そしてメチオニンおよびシステインを除いたSF900 II培地(Life Technologies Inc., Gaithersburg)で置換した。42時間後、5mCiの<sup>35</sup>S-メチオニンおよび5mCiの<sup>35</sup>S-システイン(Amersham)を添加した。細胞をさらに16時間インキュベートし、次いで細胞を遠心分離により収集し、そして標識タンパク質を、SDS-PAGEおよびオートラジオグラフィーにより可視化した。

【0619】

培地およびSf9細胞の細胞質由来のタンパク質を、非還元条件下および還元条件下でのSDS-PAGEにより分析した。それぞれ、図8Aおよび図8Bを参照のこと。培地を、50mM MES、pH5.8に対して透析した。透析後、沈殿物を得て、そして100mM クエン酸Na、pH5.0中に再懸濁した。再懸濁した沈殿物を、SDS-PAGEにより再度分析し、そしてクーマシーブリリアントブルーで染色した。図9を参照のこと。

【0620】

培地上清をまた、50mM MES、pH5.8中に1:10で希釈し、そしてSP-650Mカラム(1.0x6.6cm、Toyopearl)に流速1ml/分で適用した。タンパク質を、200、300および500mM NaClでの段階勾配で溶出した。VEGF-2は、500mMでの溶出を用いて得られた。溶出物を、還元剤b-メルカプトエタノールの存在下または非存在下でのSDS-PAGEにより分析し、クーマシーブリリアントブルーにより染色した。図10を参照のこと。

【0621】

(実施例4)

(COS細胞における組換えVEGF-2の発現)

プラスミドVEGF-2-HAの発現は、ベクターpCDNA1/Amp(Invitrogen)に由来し、このベクターpCDNA1/Ampは以下を含む:(1)SV40複製起点、(2)アンピシリン耐性遺伝子、(3)E.coli複製起点、(4)CMVプロモーター、それに続くポリリンカー領域、SV40イントロンおよびポリアデニル化部位。VEGF-2前駆体全体およびその3'末端にインフレームで融合されたHAタグをコードするDNAフラグメントを、このベクターのポリリンカー領域内にクローン化した。従って、組換えタンパク質の発現は、CMVプロモーター下で指向される。HAタグは、(Wilsonら、Cell 37:767(1984))に以前に記載されたイ

10

20

30

40

50

ンフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに対応する。標的タンパク質へのHAタグの融合は、HAエピトープを認識する抗体を用いた、組換えタンパク質の容易な検出を可能にする。プラスミド構築戦略は、以下に記載の通りである。

【0622】

VEGF-2をコードするDNA配列(ATCC番号97149)を、以下の2つのプライマーを使用するPCRにより構築した：5'プライマー(CGC GGA TCC ATG ACT GTA CTC TAC CCA)(配列番号14)は、BamHI部位を含み、続いて、開始コドンから始まるVEGF-2のコード配列の18ヌクレオチドを含む；

3'配列(CGC TCT AGA TCA AGC GTA GTC TGG GAC GTC GTA TGG GTA CTC GAG GCT CAT TTG TGG TCT 3')(配列番号15)は、XbaI部位、HAタグ、XhoI部位、およびVEGF-2コード配列の最後の15のヌクレオチド(終止コドンは含んでいない)に対する相補配列を含む。

【0623】

従って、PCR産物は、BamHI部位、コード配列、これに続くXhoI制限エンドヌクレアーゼ部位およびインフレームで融合されたHAタグ、HAタグに続く翻訳終止コドン、ならびにXbaI部位を含む。PCR増幅DNAフラグメントおよびベクターpcDNA1/Ampを、BamHIおよびXbaI制限酵素で消化し、そして連結した。連結混合物を、E. coli株SURE(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037)内に形質転換し、形質転換培養物を、アンピシリン培地プレートへプレーティングし、そして耐性コロニーを選択した。プラスミドDNAを形質転換体から単離し、そして正しいフラグメントの存在について制限分析によって試験した。組換えVEGF-2発現のために、COS細胞を、DEAE-DEXTRAN法(J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press(1989))により発現ベクターでトランスフェクトした。VEGF-2-HAタンパク質の発現を、放射標識化および免疫沈降法(E. HarlowおよびD. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988))によって検出した。細胞を、トランスフェクションの2日後に<sup>35</sup>S-システインで8時間標識した。次いで、培養培地を収集し、そして細胞を界面活性剤(RIPA緩衝液(150mM NaCl、1% NP-40、0.1% SDS、1% NP-40、0.5% DOC、50mM Tris、pH 7.5)(Wilsonら、Cell 37:767(1984))で溶解した。細胞溶解物および培養培地の両方を、HA特異的モノクローナル抗体を用いて沈降した。沈降されたタンパク質を、15% SDS-PAGEゲル上で分析した。

【0624】

(実施例5)

(血管内皮細胞の増殖に対する部分精製したVEGF-2タンパク質の効果)

1日目に、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)を、4%ウシ胎児血清(FBS)、16ユニット/mlのヘパリン、および50ユニット/mlの内皮細胞増殖補完物(EGS、Biotec, Inc.)を含むM199培地中、2~5×10<sup>4</sup>細胞/35mmディッシュの密度で播種した。2日目に、培地を、10%FBS、8ユニット/mlのヘパリンを含む、M199で置換した。最初の45アミノ酸残基を欠く配列番号2のVEGF-2タンパク質、(VEGF)および塩基性FGF(bFGF)を、示した濃度で添加した。4日目および6日目に、培地を置換した。8日目に、細胞数を、Coulter Counterで決定した(図12を参照のこと)。

【0625】

さらに、当業者は、上記のプロトコルを容易に改変し、VEGF-2で誘発されるHU

VEG細胞の増殖に対するVEGF-2のアゴニストおよび/またはアンタゴニスト(例えば、VEGF-2抗体)の効果を試験し得る。

【0626】

(実施例6 血管内皮細胞の増殖への精製VEGF-2タンパク質の影響)

1日目に、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)を、4%ウシ胎児血清(FBS)、16単位/mlのヘパリン、50単位/mlの内皮細胞増殖補充物(EGS, Biotechnology, Inc.)を含むM199培地に $2 \sim 5 \times 10^4$ 細胞/35mmディッシュの密度で播種した。2日目に、培地を、10%FBS、8単位/mlのヘパリンを含むM199と置き換えた。最初の45アミノ酸残基を除いた配列番号2の精製VEGF-2タンパク質をこの時点で培地に添加した。4日目および6日目に、培地を新鮮な培地および補充物と置き換えた。8日目に、Coulter Counterで細胞数を決定した(図13を参照のこと)。

10

【0627】

さらに、当業者は、上記のプロトコルを容易に改変し、VEGF-2で誘発されるHUVEC細胞の増殖に対するVEGF-2のアゴニストおよび/またはアンタゴニスト(例えば、VEGF-2抗体)の効果を試験し得る。

【0628】

(実施例7 遺伝子治療を介する発現)

線維芽細胞を、被験体から皮膚生検によって得る。得られた組織を組織培養培地中に置き、そして小片に分ける。組織の小塊を、組織培養フラスコの湿った表面上に置き、各フラスコ中におよそ10片を置く。フラスコの上下を逆さにし、密閉し、そして室温に一晩放置する。室温で24時間後、フラスコを反転させ、そして組織塊をフラスコの底に付着したままにし、そして新鮮な培地(例えば、10%FBS、ペニシリン、およびストレプトマイシンを有するHamのF12培地)を添加する。次いで、これを37°Cでおよそ1週間インキュベートする。この時点で新鮮な培地を添加し、その後数日ごとに取り替える。さらに2週間の培養後、線維芽細胞の単層が出現する。単層をトリプシン処理し、そしてより大きなフラスコにスケールアップ(scale)する。

20

【0629】

モロニーマウス肉腫ウイルスの長い末端反復に隣接するpMV-7(Kirschmeier, P.T.ら、DNA 7:219-225(1988))をEcoRIおよびHindIIIを用いて消化し、続いて仔ウシ腸ホスファターゼで処理する。直鎖状ベクターをアガロースゲル上で分画し、そしてガラスビーズを用いて精製する。

30

【0630】

本発明のポリペプチドをコードするcDNAを、それぞれ5'末端配列および3'末端配列に対応するPCRプライマーを用いて増幅する。5'プライマーはEcoRI部位を含み、そして3'プライマーはHindIII部位をさらに含む。等量のモロニーマウス肉腫ウイルス直鎖状骨格、ならびに増幅されたEcoRIおよびHindIIIフラグメントを、T4 DNAリガーゼの存在下で一緒に加える。得られた混合物を、2つのフラグメントの連結に適切な条件下で維持する。連結混合物を使用して、細菌HB101を形質転換し、次いで、これを、適切に挿入された目的の遺伝子をベクターが有することを確認する目的のために、カナマイシン含有寒天にプレーティングする。

40

【0631】

アンホトロピックpA317またはGP+am12パッケージング細胞を、10%仔ウシ血清(CS)、ペニシリン、およびストレプトマイシンを有するDulbecco改良Eagle培地(DMEM)中の組織培養物中で、コンフルエントな密度になるまで増殖させる。次いで、遺伝子を含むMSVベクターを培地に添加し、そしてパッケージング細胞をベクターで形質導入する。この時点でパッケージング細胞は、遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生する(この時点でパッケージング細胞は、プロデューサー細胞と呼ばれる)。

【0632】

50

新鮮な培地を、形質導入したプロデューサー細胞に添加し、その後、コンフルエントなプロデューサー細胞の10cmプレートから培地を回収する。感染性ウイルス粒子を含む使用済みの培地を、ミリポア(millipore)フィルターを通して濾過して、剥離したプロデューサー細胞を除去し、次いでこの培地を用いて線維芽細胞を感染させる。培地を、線維芽細胞のサブコンフルエントなプレートから除去し、そして直ちにプロデューサー細胞からの培地に置き換える。この培地を除去し、そして新鮮な培地と置き換える。ウイルスの力価が高い場合、事実上全ての線維芽細胞が感染され、そして選択は必要ではない。力価が非常に低い場合、選択マーカー(例えば、neo、またはhis)を有するレトロウイルスベクターを使用することが必要である。

【0633】

10

次いで、操作された線維芽細胞は、単独で、またはcytodex 3マイクロキャリアーズ上でコンフルエントになるまで増殖させた後のいずれかで、宿主に注入する。この時点で、線維芽細胞は、タンパク質産物を産生する。

【0634】

(実施例8 ヒト胎児組織および成体組織におけるVEGF-2 mRNAの発現)  
(実験設計)

ノーザンブロット分析を、ヒト胎児組織および成体組織におけるVEGF-2 mRNAの発現のレベルを試験するために実行した。VEGF-2タンパク質の完全ヌクレオチド配列を含むcDNAプローブを、製造者の指示書に従って、rediprime<sup>o</sup> DNA標識システム(Amersham Life Science)を用いて<sup>32</sup>Pで標識した。標識後、このプローブを、製造者のプロトコール番号PT1200-1に従って、CHROMA SPIN-100\*カラム(Clontech Laboratories, Inc.)を使用して精製した。次いで、精製した標識化プローブを、VEGF-2 mRNAについて種々のヒト組織を試験するために使用した。

20

【0635】

種々のヒト組織(胎児腎臓、胎児肺、胎児肝臓、脳、腎臓、肺、肝臓、脾臓、胸線、骨髄、睾丸、胎盤、および骨格筋)を含む、複数の組織のノーザン(MTN)ブロットを、Clontechより入手した。MTNブロットを、製造者のプロトコール番号PT1190-1に従って、ExpressHyb\*ハイブリダイゼーション溶液(Clontech)を使用して、標識化プローブを用いて試験した。ハイブリダイゼーションおよび洗浄後、このブロットを、増感スクリーンとともに-70℃で一晩フィルムに曝露し、そして標準的な手順に従って現像した。

30

【0636】

(結果)

VEGF-2 mRNAの発現は、血管平滑筋およびいくつかの高度に血管化された組織において豊富である。VEGF-2は、造血活性または血管形成活性と関連する組織、すなわち胎児腎臓、胎児肺、骨髄、胎盤、脾臓および肺組織において有意により高いレベルで発現される。VEGF-2の発現レベルは、成体腎臓、胎児肝臓、成体肝臓、睾丸において低く；そして胎児脳および成体脳においてはほとんど検出不可能である(図14A~Bを参照のこと)。

40

【0637】

初代培養細胞において、VEGF-2 mRNAの発現は、血管平滑筋細胞および皮膚の線維芽細胞において豊富であるが、ヒト臍静脈内皮細胞においてはるかに低い(図15を参照のこと)。このmRNA分布パターンは、VEGFのそれと非常に類似する。

【0638】

(実施例9 アミノ末端欠失変異体およびカルボキシ末端欠失変異体の構築)

生物学的に活性なVEGF-2ポリペプチドを同定および分析するために、VEGF-2の欠失変異体のパネルを、発現ベクターpHE4aを使用して構築した。

【0639】

(1.pHE4中のVEGF-2 T103-L215の構築)

50

E . c o l i タンパク質発現ベクター p H E 4 への V E G F - 2 T 1 0 3 - L 2 1 5 ( 図 1 または配列番号 1 8 のアミノ酸 1 0 3 ~ 2 1 5 ) の、ポリメラーゼ連鎖反応を指向する増幅およびサブクローニングを可能にするために、V E G F - 2 の所望の領域に相補的な 2 つのオリゴヌクレオチドプライマーを、以下の塩基配列を用いて合成した：

5 ' プライマー ( N d e I / S T A R T およびコード配列の 1 8 ヌクレオチド ) :

5 ' - G C A G C A C A T A T G A C A G A A G A G A C T A T A A A A - 3 ' ( 配列番号 1 9 )

3 ' - プライマー ( A s p 7 1 8 、 S T O P 、 およびコード配列の 1 5 ヌクレオチド )

5 ' - G C A G C A G G T A C C T C A C A G T T T A G A C A T G C A - 3 ' ( 配列番号 2 0 ) 10

上記の 5 ' プライマー ( 配列番号 1 9 ) は、N d e I 制限部位を組み込み、そして上記の 3 ' プライマー ( 配列番号 2 0 ) は、A s p 7 1 8 制限部位を組み込む。この 5 ' プライマー ( 配列番号 1 9 ) はまた、V E G F - 2 コード領域に隣接し、そして V E G F - 2 コード領域とインフレームである A T G 配列を含み、E . c o l i におけるクローン化されたフラグメントの翻訳を可能にし、一方 3 ' プライマー ( 配列番号 2 0 ) は、V E G F - 2 コード領域に隣接し、そして V E G F - 2 コード領域とインフレームである 1 つの終止コドン ( 好ましくは、E . c o l i で利用されるコドン ) を含み、これは E . c o l i における正確な翻訳の終結を確かにする。

【 0 6 4 0 】

20

ポリメラーゼ連鎖反応を、当業者に周知の標準的な条件、および、鋳型として、例えば実施例 3 において構築されるような、成熟 V E G F - 2 についてのヌクレオチド配列 ( 配列番号 1 8 のアミノ酸 2 4 ~ 4 1 9 ) を使用して行った。生じたアンプリコンを、N d e I および A s p 7 1 8 で制限消化し、そして N d e I / A s p 7 1 8 消化した p H E 4 a 発現ベクターにサブクローニングした。

【 0 6 4 1 】

( 2 . p H E 4 中の V E G F - 2 T 1 0 3 - R 2 2 7 の構築 )

E . c o l i タンパク質発現ベクター p H E 4 への V E G F - 2 T 1 0 3 - R 2 2 7 ( 図 1 または配列番号 1 8 のアミノ酸 1 0 3 ~ 2 2 7 ) の、ポリメラーゼ連鎖反応を指向する増幅およびサブクローニングを可能にするために、V E G F - 2 の所望の領域に相補的な 2 つのオリゴヌクレオチドプライマーを、以下の塩基配列を用いて合成した：

5 ' プライマー ( N d e I / S T A R T およびコード配列の 1 8 ヌクレオチド ) :

5 ' - G C A G C A C A T A T G A C A G A A G A G A C T A T A A A A - 3 ' ( 配列番号 1 9 )

3 ' - プライマー ( A s p 7 1 8 、 S T O P 、 およびコード配列の 1 5 ヌクレオチド )

5 ' - G C A G C A G G T A C C T C A A C G T C T A A T A A T G G A - 3 ' ( 配列番号 2 1 ) 30

上記のプライマーの場合、N d e I または A s p 7 1 8 制限部位は、5 ' プライマーおよび 3 ' プライマーにそれぞれ組み込まれていた。この 5 ' プライマー ( 配列番号 1 9 ) はまた、V E G F - 2 コード領域に隣接し、そして V E G F - 2 コード領域とインフレームである A T G 配列を含み、E . c o l i におけるクローン化されたフラグメントの翻訳を可能にし、一方 3 ' プライマー ( 配列番号 2 1 ) は、V E G F - 2 コード領域に隣接し、そして V E G F - 2 コード領域とインフレームである 1 つの終止コドン ( 好ましくは、E . c o l i で利用されるコドン ) を含み、これは E . c o l i における正確な翻訳の終止を確かにする。

【 0 6 4 2 】

40

ポリメラーゼ連鎖反応を、当業者に周知の標準的な条件、および、鋳型として、例えば実施例 3 において構築されるような、成熟 V E G F - 2 についてのヌクレオチド配列 ( 配列番号 1 8 のアミノ酸 2 4 ~ 4 1 9 ) を使用して行った。生じたアンプリコンを、N d e 50



IおよびA s p 7 1 8で制限消化し、そしてN d e I / A s p 7 1 8消化したp H E 4 aタンパク質発現ベクターにサブクローニングした。

【0643】

(3 . p A 2 G P中のV E G F - 2 T 1 0 3 - L 2 1 5の構築)

この例示的な実施例において、プラスミドシャトルベクターp A 2 G Pを、バキュロウイルスリーダーおよびSummersら、A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin 番号1555 (1987)に記載されるような標準的な方法を用いて、N - 末端およびC - 末端欠失させたV E G F - 2タンパク質(図1または配列番号18のアミノ酸103~215)をコードするクローン化されたDNAをバキュロウイルス中に挿入するために使用して、N - 末端およびC - 末端欠失させたV E G F - 2タンパク質を発現させる。この発現ベクターは、Autographa californica核多角体病ウイルス(AcMNPV)の強力なポリヘドリンプロモーター、続いてバキュロウイルスgp67タンパク質の分泌シグナルペプチド(リーダー)ならびにBamHI、XbaI、およびA s p 7 1 8のような便利な制限部位を含む。シミアンウイルス40(「SV40」)のポリアデニル化部位を、効率的なポリアデニル化のために使用する。組換えウイルスの容易な選択のために、このプラスミドは、同じ方向の弱いDrosophilaプロモーターの制御下にある、E. coli由来の-lacラクトシダーゼ遺伝子、続いてポリヘドリン遺伝子のポリアデニル化シグナルを含む。挿入された遺伝子は、野生型ウイルスDNAとの細胞媒介の相同組換えのために両側がウイルス配列で隣接され、クローン化されたポリヌクレオチドを発現する生存可能なウイルスを生成する。

【0644】

多くの他のバキュロウイルスベクター(例えば、pAc373、pVL941、およびpAcIM1)を、当業者が容易に理解するように、構築物が転写、翻訳、分泌などのための適切に配置されたシグナル(必要とされるようなシグナルペプチドおよびインフレームのAUGを含む)を提供する限りは、上記のベクターの代わりに使用し得る。このようなベクターは、例えば、Luckowら、Virology 170:31~39(1989)に記載される。

【0645】

図1における、N - 末端の102アミノ酸を有さず、かつC - 末端の204アミノ酸を有さないV E G F - 2タンパク質をコードするcDNA配列を、この遺伝子の5'配列および3'配列に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅した。

【0646】

5'プライマーは、BamHI制限酵素部位(太字)、続いてベクターによって供給されるシグナルペプチドとともにインフレームにとどまるための1スペーサーヌクレオチド、およびV E G F - 2タンパク質のコード配列塩基の17ヌクレオチドを含む配列

【0647】

【化11】

5'-GCA GCA **GGA TCC** CAC AGA AGA

GAC TAT AAA-3'(SEQ ID NO:22)

を有する。3'プライマーは、XbaI制限部位(太字)、続いて終止コドンおよびV E G F - 2の3'コード配列に相補的な17ヌクレオチドを含む配列

【0648】

【化12】

5N-GCA GCA **TCT AGA** TCA CAG TTT AGA CAT GCA-3'(SEQ ID NO:23)

を有する。

10

20

30

40

50

## 【0649】

増幅した配列を、市販のキット(「GeneClean」BIO 101, Inc., La Jolla, CA)を使用して、1%アガロースゲルから単離した。次いで、そのフラグメントを、エンドヌクレアーゼBamHIおよびXbaIを用いて消化し、次いで1%アガロースゲル上で再度精製した。このフラグメントを、BamHI部位およびXbaI部位において、pA2 GPバキュロウイルス移入ベクター(Supplier)と連結した。この連結を通して、N-末端およびC-末端欠失VEGF-2タンパク質(図1または配列番号18のアミノ酸103~215)を表すVEGF-2 cDNAを、バキュロウイルスGP遺伝子のシグナル配列とともにインフレームでクローン化し、そしてベクターのシグナル配列の3'末端に配置した。これを、pA2GPVEGF-2.T103-L215と命名した。

10

## 【0650】

(4.pA2GP中のVEGF-2.T103-R227の構築)

図1における、N-末端の102アミノ酸を有さず、かつC-末端の192アミノ酸を有さないVEGF-2タンパク質(すなわち、配列番号18のアミノ酸103~227)をコードするcDNA配列を、この遺伝子の5'配列および3'配列に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅した。

## 【0651】

【化13】

5'-GCA GCA GGA TCC CAC AGA AGA GAC TAT AAA ATT TGC TGC-3'

20

プライマーは、BamHI制限酵素部位(太字)を含み、続いてベクターによって供給されるシグナルペプチドとともにインフレームにとどまるための1スペーサーヌクレオチド、およびVEGF-2タンパク質のコード配列塩基の26ヌクレオチドを含む配列(配列番号24)を有する。3'プライマーは、XbaI制限部位(太字)続いて終止コドンおよびVEGF-2の3'コード配列に相補的な21ヌクレオチドを含む配列

## 【0652】

【化14】

5N-GCA GCA TCT AGA TCA ACG TCT AAT AAT  
GGA ATG AAC-3' (SEQ ID NO:25)

30

を有する。

## 【0653】

増幅した配列を、市販のキット(「GeneClean」BIO 101, Inc., La Jolla, CA)を使用して、1%アガロースゲルから単離した。次いで、そのフラグメントを、エンドヌクレアーゼBamHIおよびXbaIを用いて消化し、次いで1%アガロースゲル上で再度精製した。このフラグメントを、BamHI部位およびXbaI部位において、pA2 GPバキュロウイルス移入ベクター(Supplier)と連結した。この連結を通して、N-末端およびC-末端欠失VEGF-2タンパク質(図1または配列番号18のアミノ酸103~227)を表すVEGF-2 cDNAを、バキュロウイルスGP遺伝子のシグナル配列とともにインフレームでクローン化し、そしてベクターのシグナル配列の3'末端に配置した。この構築物を、pA2GPVEGF-2.T103-R227と命名した。

40

## 【0654】

(5.pC1におけるVEGF-2の構築)

発現ベクターpC1およびpC4は、ラウス肉腫ウイルスの強力なプロモーター(LTR)(Cullenら、Molecular and Cellular Biology, 438~447(1985年3月))およびCMVエンハンサー(Boshartら、Cell 41:521~530(1985))のフラグメントを含む。マルチプルクローニングサイト(例えば、制限酵素切断部位BamHI、XbaI、およびAsp71

50

8を有する)は、目的の遺伝子のクローニングを容易にする。このベクターはさらに、ラットプレプロインシュリン遺伝子の3Nイントロン、ポリアデニル化シグナルおよび終結シグナルを含む。

【0655】

ベクターpC1を、VFGF-2タンパク質の発現のために使用する。プラスミドpC1は、プラスミドpSV2-dhfr[ATCC受託番号37146]の誘導體である。両方のプラスミドは、SV40初期プロモーターの制御下にあるマウスDHFR遺伝子を含む。これらのプラスミドを用いてトランスフェクトされた、ジヒドロ葉酸活性を欠くチャイニーズハムスター卵巣細胞または他の細胞を、化学治療剤メトトレキサートを補充した選択培地(アルファマイナスMEM、Life Technologies)において細胞を増殖させることによって選択し得る。メトトレキサート(MTX)に耐性である細胞におけるDHFR遺伝子の増幅は、十分に引証されている(例えば、Alt, F.W., Kellems, R.M., Bertino, J.R., およびSchimke, R.T., 1978, J. Biol. Chem. 253: 1357~1370, Hamlin, J.L. およびMa, C. 1990, Biochem. et Biophys. Acta, 1097: 107~143, Page, M.J. およびSydenham, M.A. 1991, Biotechnology 9: 64~68を参照のこと)。MTXの濃度が増加した際に増殖する細胞は、DHFR遺伝子の増幅の結果として、標的酵素DHFRを過剰増殖させることによって、薬物に対する耐性を発達させる。DHFR遺伝子に第2の遺伝子が連結されている場合、それは通常同時増幅され、そして過剰発現される。1,000コピーより多い遺伝子を有する細胞株を発達させることは、技術水準である。引き続き、メトトレキサートが取り除かれた場合には、細胞株は染色体に組込まれた増幅した遺伝子を含む。

【0656】

プラスミドpC1は、目的の遺伝子の発現のために、ラウス肉腫ウイルスの長末端反復(LTR)の強力なプロモーター(Cullenら、Molecular and Cellular Biology, 1985年3月: 438~4470)およびヒトサイトメガロウイルス(CMV)の前初期遺伝子のエンハンサー(Boshartら、Cell 41: 521~530(1985))から単離されたフラグメントを含む。プロモーターの下流は、遺伝子の組み込みを可能にする以下の単一の制限酵素切断部位である: BamHI、PvuII、およびNruI。これらのクローニング部位の後では、プラスミドは、3つすべてのリーディングフレームにおける翻訳終止コドン、続いて3Nイントロンおよびラットプレプロインシュリン遺伝子のポリアデニル化部位を含む。他の高度に効率的なプロモーター(例えば、ヒトb-アクチンプロモーター、SV40初期もしくは後期プロモーター、または他のレトロウイルス(例えば、HIVおよびHTLV I)由来の長末端反復)もまた、発現のために使用され得る。mRNAのポリアデニル化のために、例えば、ヒト成長ホルモン遺伝子またはグロビン遺伝子由来の他のシグナルが、同様に使用され得る。

【0657】

染色体に組み込まれた目的の遺伝子を有する安定な細胞株はまた、gpt、G418、またはハイグロマイシンのような選択マーカーを用いる同時トランスフェクションに際して選択され得る。最初に1つより多くの選択マーカー(例えば、G418およびメトトレキサート)を使用することが有利である。

【0658】

プラスミドpC1を、当該分野において公知の手順によって、制限酵素BamHIで消化し、次いで仔ウシ腸ホスファターゼ(phosphatase)を使用して脱リン酸化する。次いで、そのベクターを、1%アガロースゲルから単離する。

【0659】

VEGF-2(ATCC受託番号97149)をコードするDNA配列を、VEGF-2遺伝子の5'末端および3'末端に対応する2つのプライマーを使用するPCRによ

10

20

30

40

50

て構築した：5'プライマー（5'-GAT CGA TCC ATC ATG CAC TCG CTG GGC TTC TTC TCT GTG GCG TGT TCT CTG CTC G-3'（配列番号26））は、Klenowで平滑化されたBamHI部位および開始コドンから開始するVEGF-2コード配列の40ヌクレオチドを含む；3'プライマー（5'-GCA GGG TAC GGA TCC TAG ATT AGC TCA TTT GTG GTC TTT-3'（配列番号27））は、BamHI部位および終止コドンを含まないVEGF-2コード配列の16ヌクレオチドを含む。

#### 【0660】

PCR増幅DNAフラグメントを、上記のように1%アガロースゲルから単離し、次いでエンドヌクレアーゼBamHIで消化し、次いで1%アガロースゲル上で再度精製する。次いで、単離したフラグメントおよび脱リン酸化したベクターを、T4 DNAリガーゼを用いて連結する。次いで、E. coli HB101細胞を形質転換し、そしてプラスミドpC1を含む細菌を同定する。挿入された遺伝子の配列および方向を、DNA配列決定によって確認する。この構築物を、pC1VEGF-2と呼ぶ。

10

#### 【0661】

（6.pC4SigVEGF-2 T103-L215の構築）

プラスミドpC4Sigは、ヒトIgGFc部分の配列およびタンパク質シグナル配列を含むプラスミドpC4（受託番号209646）である。

#### 【0662】

VEGF-2 T103-L215（図1または配列番号18におけるアミノ酸103~215）のポリメラーゼ連鎖反応を指向する増幅およびpC4Sigへのサブクロニングを可能にするために、VEGF-2の所望される領域に相補的な2つのオリゴヌクレオチドプライマー（以下の塩基配列を有する）を合成した：

5'プライマー（BamHIおよび26ntのコード配列）：

5'-GCA GCA GGA TCC ACA GAA GAG ACT ATA AA TTT GCT GC-3'（配列番号34）：

3'プライマー（XbaI、停止、および15ntのコード配列）：

5'-CGT CGT TCT AGA TCA CAG TTT AGA CAT G CA TCG GCA G-3'（配列番号35）。

20

30

#### 【0663】

ポリメラーゼ連鎖反応を、当業者に周知の標準的条件、および例えば、実施例3で構築された成熟VEGF-2（アミノ酸24~419）に関するヌクレオチド配列を鋳型として用いて行った。生じたアンプリコンをBamHIおよびXbaIで制限消化し、そしてBamHI/XbaIで消化したpC4Sigベクターへサブクロニングした。

#### 【0664】

（7.pC4SigVEGF-2 T103-R227の構築）

VEGF-2 T103-L215（図1または配列番号18におけるアミノ酸103~227）のポリメラーゼ連鎖反応を指向する増幅およびpC4Sigへのサブクロニングを可能にするために、VEGF-2の所望される領域に相補的な2つのオリゴヌクレオチドプライマー（以下の塩基配列を有する）を合成した：

5'プライマー（BamHIおよび26ntのコード配列）：

5'-GCA GCA GGA TCC ACA GAA GAG ACT ATA AA TTT GCT GC-3'（配列番号34）：

3'プライマー（XbaI、停止、および21ntのコード配列）：

5'-GCA GCA TCT AGA TCA ACG TCT AAT AAT G GA ATG AAC-3'（配列番号25）。

40

#### 【0665】

ポリメラーゼ連鎖反応を、当業者に周知の標準的条件、および例えば、実施例3で構築された、成熟VEGF-2（アミノ酸24~419）のヌクレオチド配列を、鋳型として

50

用いて行った。生じたアンプリコンをBamHIおよびXbaIで制限消化し、そしてBamHI/XbaIで消化したpC4Sigベクターへサブクローニングした。

【0666】

(8.pC4VEGF-2 M1-M263の構築)

発現ベクターpC4は、ラウス肉腫ウイルスの強力なプロモーター(LTR)(Cullenら、Molecular and Cellular Biology, 438-447(1985年3月))およびCMVエンハンサーのフラグメント(Boshartら、Cell 41:521-530(1985))を含む。マルチクローニング部位(例えば、制限酵素切断部位BamHI、XbaIおよびAsp718を有する)は、目的の遺伝子のクローニングを容易にする。このベクターは、さらにラットプレプロインシュリン遺伝子の3Nイントロン、ポリアデニル化シグナルおよび終結シグナルを含む。

10

【0667】

この例示的な実施例では、C末端欠失VEGF-2 M1-M263タンパク質(図1または配列番号18におけるアミノ酸1~263)をコードするクローン化DNAを、このC末端欠失VEGF-2タンパク質を発現させるためにプラスミドベクターpC4へ挿入する。

【0668】

VEGF-2 M1-M263のポリメラーゼ連鎖反応を指向する増幅および発現ベクターpC4へのサブクローニングを可能にするために、VEGF-2の所望される領域に相補的な2つのオリゴヌクレオチドプライマー(以下の塩基配列を有する)を合成した:

20

5'プライマー 5'-GAC TGG ATC CGC CAC CAT GCA CTC GCT GGG CTT CTT CTC-3'(配列番号28);  
3'プライマー 5'-GAC TGG TAC CTT ATC ACA TAA AAT CTT CCT GAG CC-3'(配列番号29)。

【0669】

上記の5'プライマーに関してはBamHI制限部位を組み込み、一方、3'プライマーに関してはAsp718制限部位を組み込んだ。この5'プライマーはまた、VEGF-2コード配列の6nt、20nt、およびE.coliにおけるこのクローン化フラグメントの翻訳を可能にするための、このVEGF-2コード領域に隣接しそしてこの領域とインフレームにある、ATG配列を含み、一方、3'プライマーは、VEGF-2コード配列の2nt、20nt、およびE.coliにおいて正確な翻訳終結を保證する、VEGF-2コード領域に隣接しそしてこの領域とインフレームにある、1つの終止コドン(E.coliにおいて優先的に利用される)を含む。

30

【0670】

ポリメラーゼ連鎖反応を、当業者に周知の標準的条件、および、例えば、実施例3で構築された、成熟VEGF-2(アミノ酸24~419)のヌクレオチド配列を鋳型として用いて行った。生じたアンプリコンをBamHIおよびAsp718で制限消化し、そしてBamHI/Asp718で消化したpC4タンパク質発現ベクターへサブクローニングした。この構築物をpC4VEGF-2 M1-M263と命名する。

【0671】

(9.pC4VEGF-2 M1-D311の構築)

この例示的な実施例では、C末端欠失VEGF-2 M1-D311タンパク質(図1または配列番号18におけるアミノ酸1~311)をコードするクローン化DNAを、このC末端欠失VEGF-2タンパク質を発現させるためにプラスミドベクターpC4へ挿入する。

40

【0672】

VEGF-2 M1-D311のポリメラーゼ連鎖反応を指向する増幅および発現ベクターpC4へのサブクローニングを可能にするために、VEGF-2の所望される領域に相補的な2つのオリゴヌクレオチドプライマー(以下の塩基配列を有する)を合成した:

50

5'プライマー 5'-GAC TGG ATC CGC CAC CAT GCA C

T C G C T G G G C T T C T T C T C - 3 ' ( 配列番号 3 0 ) ;  
 3 ' プライマー 5 ' - G A C T G G T A C C T T A T C A G T C T A G  
 T T C T T T G T G G G G - 3 ' ( 配列番号 3 1 ) 。

## 【 0 6 7 3 】

上記の 5 ' プライマーに関しては B a m H I 制限部位を組み込み、一方、3 ' プライマーに関しては A s p 7 1 8 制限部位を組み込んだ。この 5 ' プライマーはまた、V E G F - 2 コード配列の 6 n t、2 0 n t、および E . c o l i におけるクローン化フラグメントの翻訳を可能にするための、V E G F - 2 コード領域に隣接しそしてその領域とインフレーションにある、A T G 配列を含み、一方、3 ' プライマーは、V E G F - 2 コード配列の 2 n t、2 0 n t、および E . c o l i において正確な翻訳終結を保證する、V E G F - 2 コード領域に隣接しそしてその領域とインフレーションにある、1 つの終止コドン ( E . c o l i において優先的に利用される ) を含む。

10

## 【 0 6 7 4 】

ポリメラーゼ連鎖反応を、当業者に周知の標準的条件、および、例えば、実施例 3 で構築された、成熟 V E G F - 2 ( アミノ酸 2 4 ~ 4 1 9 ) に関するヌクレオチド配列を鋳型として用いて行った。生じたアンプリコンを B a m H I および A s p 7 1 8 で制限消化し、そして B a m H I / A s p 7 1 8 で消化した p C 4 タンパク質発現ベクターへサブクローニングした。

## 【 0 6 7 5 】

( 1 0 . p C 4 V E G F - 2 M 1 - Q 3 6 7 の構築 )

20

この例示的实施例では、C 末端欠失 V E G F - 2 M 1 - Q 3 6 7 タンパク質 ( 配列番号 1 8 におけるアミノ酸 1 ~ 3 6 7 ) をコードするクローン化 D N A を、この C 末端欠失 V E G F - 2 タンパク質を発現させるためにプラスミドベクター p C 4 へ挿入する。

## 【 0 6 7 6 】

V E G F - 2 M 1 - D 3 6 7 のポリメラーゼ連鎖反応を指向する増幅および発現ベクター p C 4 へのサブクローニングを可能にするために、V E G F - 2 の所望される領域に相補的な 2 つのオリゴヌクレオチドプライマー ( 以下の塩基配列を有する ) を合成した :

5 ' プライマー 5 ' - G A C T G G A T C C G C C A C C A T G C A C  
 T C G C T G G G C T T C T T C T C - 3 ' ( 配列番号 3 2 ) ;

3 ' プライマー 5 ' - G A C T G G T A C C T C A T T A C T G T G G  
 A C T T T C T G T A C A T T C - 3 ' ( 配列番号 3 3 ) 。

30

## 【 0 6 7 7 】

上記の 5 ' プライマーに関しては B a m H I 制限部位を組み込み、一方、3 ' プライマーに関しては A s p 7 1 8 制限部位を組み込んだ。この 5 ' プライマーはまた、V E G F - 2 コード配列の 6 n t、2 0 n t、および E . c o l i におけるこのクローン化フラグメントの翻訳を可能にするための、V E G F - 2 コード領域に隣接しそしてこの領域とインフレーションにある、A T G 配列を含み、一方、3 ' プライマーは、V E G F - 2 コード配列の 2 n t、2 0 n t、および E . c o l i において正確な翻訳終結を保證する、V E G F - 2 コード領域に隣接しそしてこの領域とインフレーションにある、1 つの停止コドン ( E . c o l i において優先的に利用される ) を含む。

40

## 【 0 6 7 8 】

ポリメラーゼ連鎖反応を、当業者に周知の標準的条件、および、例えば、実施例 3 で構築された、成熟 V E G F - 2 ( アミノ酸 2 4 ~ 4 1 9 ) に関するヌクレオチド配列を鋳型として用いて行った。生じたアンプリコンを B a m H I および A s p 7 1 8 で制限消化し、そして B a m H I / A s p 7 1 8 で消化した p C 4 タンパク質発現ベクターへサブクローニングした。この構築物を p C 4 V E G F - 2 M 1 - Q 3 6 7 と命名する。

## 【 0 6 7 9 】

( 実施例 1 0 C O S - 7 細胞における V E G F - 2 タンパク質の一過性発現 )

( 実験設計 )

例えば、実施例 4 において作製された構築物からの V E G F - 2 - H A 融合タンパク質

50

の発現を、例えば、Harlowおよび共同研究者ら (Antibodies: A Laboratory Manual、第2版; Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor, New York (1988)) に記載される方法を用いて、放射性標識化および免疫沈降によって検出した。この目的を達するために、トランスフェクションの2日後に、細胞を35Sシステインを含む培地中で8時間インキュベーションすることにより標識した。Wilsonおよび共同研究者ら (前出) によって記載されるように、細胞および培地を回収し、そして細胞を洗浄し、次いで界面活性剤含有RIPA緩衝液 (150 mM NaCl、1% NP-40、0.1% SDS、1% NP-40、0.5% DOC、50 mM Tris (pH 7.5)) で溶解した。タンパク質を、HA特異的モノクローナル抗体を用いて細胞溶解物および培養培地から沈殿させた。次いで、沈殿させたタンパク質をSDS-PAGEおよびオートラジオグラフィーによって分析した。

10

## 【0680】

(結果)

図16A~Bに示すように、pcDNA1-VEGF-2HAでトランスフェクトした細胞は、56kdおよび30kdタンパク質を分泌した。この56kdタンパク質(30kdタンパク質ではなく)はまた、細胞溶解物において検出され得るが、コントロールでは検出されない。このことは、30kdタンパク質が56kdタンパク質の切断から生じようであることを示唆する。HAタグは、VEGF-2のC末端にあるので、この30kdタンパク質は切断されたタンパク質のC末端部分に相当しなければならないが、切断されたタンパク質のN末端部分は、免疫沈降によって検出されない。これらのデータは、哺乳動物細胞において発現されるVEGF-2タンパク質は、分泌されそしてプロセッシングされることを示す。

20

## 【0681】

(実施例11 血管内皮細胞の増殖に対するVEGF-2の刺激効果)

(実験設計)

VEGF-2の発現は、高度に血管化された組織において豊富である。従って、内皮細胞のいくつかの型の増殖の調節におけるVEGF-2の役割を試験した。

## 【0682】

(内皮細胞増殖アッセイ)

増殖因子の有糸分裂活性の評価のために、電子カップリング試薬PMS(フェナジンメトサルフェート)と共に比色定量MTS(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)2H-テトラゾリウム)アッセイを行った(Cell Titer 96 AQ, Promega)。細胞を、96ウェルプレート(5,000細胞/ウェル)にて0.1mLの血清を補充した培地に播種し、そして一晩付着させた。0.5%FBS中で12時間の血清飢餓後、ヘパリン(8U/mL)を有するかまたは有さずに、条件(0.5%FBS中、bFGF、VEGF<sub>165</sub>またはVEGF-2)をウェルに48時間添加した。20mgのMTS/PMS混合物(1:0.05)を、1ウェルあたり加え、37°Cで1時間インキュベートさせて、その後、ELISAプレートリーダーにおいて490nmでの吸光度を測定した。コントロールウェル(いくつかの培地、無細胞)からのバックグラウンド吸光度を差し引いて、そして7つのウェルについて各条件を並行して行った。Leakら、In Vitro Cell Dev Biol 30A:512-518(1994)を参照のこと。

30

40

## 【0683】

(結果)

VEGF-2は、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)および皮膚微小血管内皮細胞の増殖をわずかに刺激した(図17および18)。VEGF-2の刺激効果は、子宮内膜内皮細胞および微小血管内皮細胞の増殖においてより明白である(図19)。子宮内膜内皮細胞(HEEC)は、VEGF-2に対する最高の応答(微小血管内皮細胞に対するVEG

50

Fの効果の96%)を示した。VEGF-2に対する微小血管内皮細胞(HMEC)の応答は、VEGFと比べると73%であった。VEGF-2に対するHUVECおよびBAEC(ウシ大動脈内皮細胞)の応答は、それぞれかなり低く10%および7%であった。VEGF-2タンパク質の活性は、異なる精製の実行の間で変化し、HUVEC増殖に対する特定のバッチの刺激効果は、他のバッチの刺激効果よりも顕著により高かった。

【0684】

さらに当業者は、上記プロトコールを容易に改変し、VEGF-2で誘導した内皮細胞の増殖に対する、VEGF-2アゴニストおよび/またはVEGF-2アンタゴニスト(例えば、VEGF-2抗体)の効果を試験し得る。

【0685】

(実施例12 PDGF誘導した血管平滑筋細胞増殖の阻害)

VEGF-2発現は、血管平滑筋細胞において高い。平滑筋は、再狭窄のような血管疾患についての重要な治療標的である。平滑筋細胞に対するVEGF-2の潜在的効果を評価するために、ヒト大動脈平滑筋細胞(HAOSMC)増殖に対するVEGF-2の効果を試験した。

【0686】

(実験設計)

HAOSMC増殖を、例えばBrdUrdの取り込みによって測定し得る。簡単に言えば、4-チャンバスライド上で増殖させたサブコンフルエントな休止細胞を、CRPまたはFITC標識化AT2-3LPでトランスフェクトする。次いで、細胞を10%仔ウシ血清および6mg/ml BrdUrdでパルスする。24時間後、免疫細胞化学を、BrdUrd Staining Kit(Zymed Laboratories)を用いることによって行う。簡単には、細胞を、変性溶液への曝露後、ビオチン化マウス抗BrdUrd抗体と共に4で2時間インキュベートし、次いでストレプトアビジン-ペルオキシダーゼおよびジアミノベンジジンと共にインキュベートする。ヘマトキシリンでの対比染色後、細胞を、顕微鏡試験のためにマウントし、そしてBrdUrd陽性細胞を計数する。BrdUrd指数を、総細胞数に対するBrdUrd陽性細胞の割合として計算する。さらに、BrdUrd染色(核)およびFITC取り込み(細胞質)の同時検出を、明視野照明および暗視野UV蛍光照明の同時使用によって個々の細胞について行う。Hayashidaら、J. Biol. Chem. 6; 271(36): 21985-21992(1996)を参照のこと。

【0687】

(結果)

VEGF-2は、PDGFによって誘導された血管平滑筋細胞の増殖に対して阻害効果を有するが、ウシ胎仔血清(FBS)によって誘導された血管平滑筋細胞の増殖に対して阻害効果を有さない(図20)。

【0688】

さらに当業者は、上記プロトコールを容易に改変し、血管平滑筋細胞の増殖によるVEGF-2阻害に対する、VEGF-2アゴニストおよび/またはVEGF-2アンタゴニスト(例えば、VEGF-2抗体)の効果を試験し得る。

【0689】

(実施例13 内皮細胞移動の刺激)

内皮細胞移動は、新脈管形成に關与する重要な工程である。

【0690】

(実験設計)

本実施例を用いて、VEGF-2がリンパ内皮細胞移動(lymphatic endothelial cell migration)を刺激し得るという可能性を探求する。現在のところ、このようなモデルの刊行された報告は存在しない。しかし、本発明者らは、血管内皮細胞移動のモデルを、本質的に以下のように、リンパ内皮細胞での使用に適應させる：

10

20

30

40

50



内皮細胞移動アッセイを48ウェル微量走化性(microchemotaxis)チャンバを用いて行う(Neuroprobe Inc., Cabin John, MD; Falk, W., Goodwin, R. H. J., およびLeonard, E. J. 「A 48 well microchemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration.」J. Immunological Methods 1980; 33: 239-247)。8µmの孔径を有するポリビニルピロリドン非含有ポリカーボネートフィルター(Nucleopore Corp. Cambridge, MA)を、0.1%ゼラチンで、少なくとも6時間室温でコートし、そして滅菌空気下で乾燥する。試験物質を、0.25%ウシ血清アルブミン(BSA)を補充したM199中で適切な濃度まで希釈し、そして25µlの最終希釈液を、改変したポイデン装置の下部チャンバに置く。サブコンフルエントな初期の継代(2~6)のHUV ECおよびBMEC培養物を、洗浄し、そして細胞脱離を達成するのに必要とされる最小の時間でトリプシン処理する。下部チャンバと上部チャンバの間にフィルターを置いた後、1%FBSを含む50µlのM199に懸濁した $2.5 \times 10^5$ の細胞を、この上部コンパートメントに播種する。次いでこの装置を、細胞移動を可能にするために5%CO<sub>2</sub>を含む加湿したチャンバ中で37℃で5時間インキュベートする。インキュベーション期間後、このフィルターを取り出し、そして非移動細胞を有するフィルターの上側を、ラバーポリスマンでスクラップする。このフィルターをメタノールで固定し、そしてGiemsa溶液(Diff-Quick, Baxter, McGraw Park, IL)で染色する。移動を、各ウェル中の3つの無作為の高倍率視野(40x)の細胞を計数することによって定量し、そして全てのグループを4連で行う。

【0691】

(結果)

43ウェル微量走化性チャンバを用いてHUV EC移動を試験するアッセイにおいて、VEGF-2は、HUV ECの移動を刺激し得た(図21A~B)。

【0692】

さらに、当業者は、容易に上記のプロトコルを変更して、VEGF-2により誘導される内皮細胞の移動に対するVEGF-2のアゴニストおよび/またはアンタゴニスト(例えば、VEGF-2抗体)の影響を試験し得る。

【0693】

(実施例14 内皮細胞による一酸化窒素生成の刺激)

血管内皮により放出される一酸化窒素は、血管内皮弛緩のメディエータ-であると考えられている。VEGF-1は、VEGF-1に応答した内皮細胞による一酸化窒素の生成を誘導することが実証されている。結果として、VEGF-2活性を、VEGF-2に応答した内皮細胞による一酸化窒素の生成を決定することによってアッセイし得る。

【0694】

(実験の設計)

一酸化窒素を、24時間の飢餓および引き続く4時間の様々なレベルのVEGF-1およびVEGF-2への曝露の後のコンフルエントな微小血管内皮細胞の96ウェルプレートにおいて測定する。培地における一酸化窒素を、Griess試薬の使用によって決定し、硝酸レダクターゼによる一酸化窒素由来硝酸の還元後の総亜硝酸塩量を測定する。一酸化窒素放出に対するVEGF-2の効果を、HUV ECにおいて試験した。

【0695】

簡単に言えば、培養されたHUV EC単層からのNO放出を、NOメーターに接続したNO特異的ポーラログラフィー電極(Iso-NO, World Precision Instruments Inc.) (1049)で測定した。NO成分の較正を、以下の式に従って行った： $2KNO_2 + 2KI + 2H_2SO_4 \rightarrow 2NO + I_2 + 2H_2O + 2K_2SO_4$ 。

【0696】

10

20

30

40

50

標準検量線を、段階的濃度の $\text{KNO}_2$  (0、5、10、25、50、100、250、および500 nmol/L)をKIおよび $\text{H}_2\text{SO}_4$ を含む検量液に添加することによって得た。NOに対するIso-NO電極の特異性は、真の(authentic)NOガス(1050)からのNOの測定によってあらかじめ決定した。培養培地を除去し、そしてHUVECをダルベッコリン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄した。次いで、細胞を、6ウェルプレート中の5mlの濾過したクレブス-ヘンゼライト溶液に添加し、そして細胞プレートを、温度を37で維持するためにスライドウォーマー(Lab Line Instruments Inc.)上で保持した。NOセンサープローブを、異なる条件を加える前にウェル中へ垂直に挿入した(溶液の表面の2mm下で電極のチップを保持する)。S-ニトロソアセチルペニシラミン(SNAP)を陽性コントロールとして用いた。放出したNOの量を、 $1 \times 10^6$ 個の内皮細胞あたりのピコモル濃度として表わした。報告された全ての値は、各グループにおける4~6回の測定(細胞培養ウェルの数)の平均であった。Leakら、Biochem. and Biophys. Res. Comm. 217:96-105(1995)を参照のこと。

【0697】

(結果)

VEGF-2は、VEGFより高いレベルにまで、HUVEC(図22)での一酸化窒素放出を刺激することが可能であった。このことは、VEGF-2が血管透過性および血管拡張を改変し得ることを示唆した。

【0698】

さらに、当業者は、容易に上記のプロトコルを変更して、内皮細胞からのVEGF-2により誘導される一酸化窒素の放出におけるVEGF-2のアゴニストおよび/またはアンタゴニスト(例えば、VEGF-2抗体)の影響を試験し得る。

【0699】

(実施例15:新脈管形成における索形成に対するVEGF-2の効果)

新脈管形成における別の工程は、内皮細胞の分化に顕著な索形成である。このバイオアッセイは、微小血管内皮細胞がインビトロで培養した場合に毛細管様構造(中空構造)を形成する能力を測定する。

【0700】

(実験計画)

CADMEC(微小血管内皮細胞)をCell Applications Inc.から増殖(継代2)細胞として購入し、そしてCell Applications' CADMEC増殖培地中で培養し、そして継代5で使用する。インビトロ新脈管形成アッセイのために、48ウェル細胞培養プレートのウェルをCell Applications' 付着因子培地(200ml/ウェル)を30分間、37でコーティングする。CADMECをコーティングしたウェルに7,500細胞/ウェルで播種し、増殖培地中で一晚培養する。次いで、増殖培地を、コントロール緩衝液または本発明のタンパク質(0.1~100ng/ml)を含有する300mgのCell Applications' 索形成培地で置き換え、そして細胞をさらに48時間培養する。毛細管様索の数および長さをBoeckeler VIA-170ビデオ画像分析機の使用によって定量する。全てのアッセイを3連で行う。

【0701】

市販の(R&D)VEGF(50ng/ml)を陽性コントロールとして使用する。b-エストラジオール(1ng/ml)を陰性コントロールとして使用する。適切な緩衝液(タンパク質なし)もまた、コントロールとして使用する。

【0702】

(結果)

VEGF-2は、内皮細胞増殖もまた刺激するIFN $\alpha$ に類似の索形成を阻害することが観察された(図23)。この阻害効果は、索形成プロセスと相互に両立しない内皮細胞増殖の二次的効果であり得る。

10

20

30

40

50

## 【0703】

さらに、当業者は、容易に上記のプロトコルを変更して、索形成のVEGF-2阻害に対するVEGF-2のアゴニストおよび/またはアンタゴニスト(例えば、VEGF-2抗体)の影響を試験し得る。

## 【0704】

(実施例16:ニワトリ漿尿膜に対する脈管形成効果)

ニワトリ漿尿膜(CAM)は、新脈管形成を試験するために十分確立された系である。CAMにおける血管形成は、容易に視覚で確認でき、かつ定量化し得る。VEGF-2がCAMにおいて新脈管形成を刺激し得る能力を試験した。

## 【0705】

(実験計画)

(胚)

白色レグホーンニワトリ(*Gallus gallus*)の受精卵および日本ウズラ(*Coturnix coturnix*)の受精卵を、37.8 °Cおよび湿度80%でインキュベートした。16日齢ニワトリの分化したCAMおよび13日齢のウズラ胚を、以下の方法を用いて研究した。

## 【0706】

(CAMアッセイ)

発生4日目に、鶏卵の卵殻に窓を作製した。胚を正常な発生についてチェックし、そして卵をセロテープ(登録商標)で塞いだ。それらを、13日目までさらにインキュベートした。Thermanoxカバースリップ(Nunc, Naperville, IL)を約5mm直径のディスクに切った。滅菌かつ無塩の増殖因子を蒸留水に溶解し、そして約3.3mg/5mlをディスク上にピペットで移した。風乾後、逆にしたディスクをCAMにアプライした。3日後、標本を3%グルタルアルデヒドおよび2%ホルムアミドで固定し、そして0.12M カコジル酸ナトリウム緩衝液でリンスした。それらを実体顕微鏡[Wild

M8]で撮影し、そして上記のように準超薄切片化および超薄切片化するために包埋した。コントロールをキャリアディスク単独で行った。

## 【0707】

(結果)

このデータは、VEGF-2が未処理コントロールと比較して、CAMアッセイにおいて9倍新脈管形成を刺激し得ることを実証する。しかし、この刺激は、VEGF刺激のレベルのわずか45%である(図24)。

## 【0708】

さらに、当業者は、容易に上記のプロトコルを変更して、CAMアッセイにおける新脈管形成のVEGF-2刺激に対するVEGF-2のアゴニストおよび/またはアンタゴニスト(例えば、VEGF-2抗体)の影響を試験し得る。

## 【0709】

(実施例17:マウスにおけるマトリゲルインプラントを使用する新脈管形成アッセイ)

(実験計画)

タンパク質活性を試験するため、新脈管形成のためのインビボモデルを確立するために、マウスおよびラットに、20mgのBSA(陰性コントロール)および1mgのbFGFおよび0.5mgのVEGF-1(陽性コントロール)のいずれかを含むメチルセルロースディスクを皮下移植した。

## 【0710】

陽性コントロールディスクが脈管形成の兆候を示したのに対して、BSAディスクは血管新生をほとんど含まないようであった。9日目に、1匹のマウスは、bFGFに対する明らかな応答を示した。

## 【0711】

10

20

30

40

50

## (結果)

両方のVEGFタンパク質は、肉眼評価によって約2という因子によってマトリゲル細胞性を増強するようであった。

## 【0712】

さらなる30匹のマウスにBSA、bFGF、および可変量のVEGF-1、VEGF-2-B8、およびVEGF-2-C4を含むディスクを移植した。各マウスは、1つのコントロールおよび1つの実験ディスクではなく、2つの同じディスクを受けた。

## 【0713】

回収した全てのディスクのサンプルを、ディスクにおける内皮細胞の存在を検出するためのフォン・ビルブランド因子、ならびに血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞とを区別するためのflk-1およびflt-4で免疫染色した。しかし、新血管形成およびリンパ管形成の最終的な組織化学分析によって決定できなかった。

10

## 【0714】

さらに、当業者は、容易に上記のプロトコルを変更して、VEGF-2により調節された新脈管形成に対するVEGF-2のアゴニストおよび/またはアンタゴニスト(例えば、VEGF-2抗体)の影響を試験し得る。

## 【0715】

(実施例18:ウサギ下肢モデルにおける虚血のレスキュー)

(実験計画)

VEGF-2の虚血に対するインビゴ効果を研究するために、ウサギ後肢虚血モデルを、以前に記載された(Takeshita, S.ら、Am. J. Pathol 147: 1649-1660(1995))ように1つの大腿動脈の外科的切除によって作製した。大腿動脈の切除は、外腸骨動脈の血栓および閉塞の逆行性増殖を生じる。結論として、虚血四肢に対する血流は、内腸骨動脈に由来する側副血管に依存する(Takeshita, S.ら、Am. J. Pathol 147: 1649-1660(1995))。10日の間隔によって、ウサギの術後回復および内因性側副血管の発生を可能にした。手術(0日目)して後10日に、基底血管造影を行った後、虚血四肢の内腸骨動脈を、記載(Riessen, R.ら、Hum. Gene Ther. 4: 749-758(1993); Leclerc, G.ら、J. Clin. Invest. 90: 936-944(1992))のように、ヒドロゲルコーティングしたバルーンカテーテルを使用して、動脈遺伝子移入技術により500mgの裸のVEGF-2発現プラスミドでトランスフェクトした。VEGF-2を処置において使用した場合、500mgのVEGF-2タンパク質またはコントロールの単回ボラスを、1分間にわたって、注入カテーテルを用いて虚血四肢の内腸骨動脈に送達した。30日目に、種々のパラメーターを、これらのウサギにおいて測定した。

20

30

## 【0716】

(結果)

VEGF-2タンパク質(図25A)および裸の発現プラスミド(図25B)の両方は、虚血四肢において以下のパラメーターを回復し得た。血流の回復(血管造影スコア)は、500mgのタンパク質によるものと比較した場合、500mgのプラスミドの投与によってわずかに大きかったようである(図25C)。回復の程度は、別個の試験のVEGFによる程度に匹敵する(データは示さず)。血管拡張薬は、同じ効果を達成できなかった。このことは、血流の回復が、単に血管拡張効果に起因するのではないことを示唆する。

40

## 【0717】

1. BP比(図25A~C)

虚血四肢の収縮圧: 正常四肢の収縮圧の血压比。

## 【0718】

2. 血流および血流予備能(図25D~I)

静止FL: 非拡張状態の間の血流

50

最大 F L :十分に拡張した状態の間の血流(また、血管量の間接測定)

血流予備能は、最大 F L :静止 F L の比を反映する。

【0719】

3.血管造影スコア(図25J~L)

これは、側副血管の血管造影によって測定される。スコアは、交差する不透過性動脈をウサギ大腿の総数mで除算した、重複グリッドの円の割合によって決定される。

【0720】

4.毛細管密度(図25M~O)

側副毛細管の数は、後肢から採取した切片を光学顕微鏡で検鏡して決定した。

【0721】

議論されるように、VEGF-2は、同時精製されるN末端フラグメントおよびC末端フラグメントにプロセッシングされる。N末端フラグメントは、インタクトな推定機能的ドメインを含み、そして生物学的活性を担っている可能性がある。

【0722】

(実施例19:血管拡張に対するVEGF-2の効果)

上記のように、VEGF-2は、血管内皮細胞拡張のメディエータであるNO放出を刺激し得る。血管内皮細胞の拡張は、血圧を低下する際に重要であるため、VEGF-2が自然発症高血圧ラット(SHR)における血圧に影響を及ぼす能力を試験した。VEGF-2は、拡張期血圧の用量依存性低下を引き起こした(図26aおよびb)。300mg/kgの用量を投与した場合、VEGF-2の用量の増加に伴い、拡張期血圧が確実に低下し、これは統計学的有意に達した。この用量において観察した変化は、アセチルコリンでみられた変化と異ならなかった(0.5mg/kg)。平均動脈圧(MAP)の減少もまた観察した(図26cおよびd)。VEGF-2(300mg/kg)およびアセチルコリンは、正常レベルに対してこれらのSHR動物のMAPを低下させた。

【0723】

さらに、漸増用量(0、10、30、100、300、および900mg/kg)のB8、C5、およびC4プレップのVEGF-2を、13~14週齢の自然発症高血圧マウス(SHR)に投与した。データを平均+/-SEMとして表す。統計学的分析を対応のあるT検定(paired t-test)で行い、そして統計学的有意性を、 $p < 0.05$ (緩衝液単独に対する応答に対して)と定義した。

【0724】

VEGF-2(C5プレップ)を用いた研究は、VEGF-2(C5プレップ)が血圧を有意に低下させたが、その応答の大きさが、900mg/kgの用量で用いられた場合ですら、VEGF-2(B8プレップ)で認められたほど大きくはないことを示した。

【0725】

VEGF-2(C4調製物)を用いた研究は、このCHO発現タンパク質調製物は、C5で認められた結果と同様の結果が得られたことを明らかにした(すなわち、統計学的有意ではあるが、B8調製物で認められた大きさよりはるかに小さい)(図26A~Dを参照のこと)。

【0726】

コントロールとして、ならびにVEGF-2のC4およびC5バッチは、わずかではあるが、統計的には有意な血圧の変化を得たために、実験を別のCHO発現タンパク質(M-CIF)を用いる実験で行った。10~900mg/kgの範囲の用量でのM-CIFの投与は、拡張期血圧の有意な変化を生じなかった。平均動脈圧のわずかな統計学的有意な低下が100および900mg/kgの用量で観察されたが、用量応答は顕著ではなかった。これらの結果は、VEGF-2のC4およびC5バッチで観察された血圧の低下が特異的であった(すなわち、VEGF-2関連であった)ことを示唆する。

【0727】

(実施例20:ラット虚血皮膚弁モデル)

(実験計画)

10

20

30

40

50

評価パラメーターは、皮膚血流、皮膚温度、および第VII因子、免疫組織化学的または内皮のアルカリホスファターゼ反応を含む。皮膚虚血の間のVEGF-2発現は、インサイチュハイブリダイゼーションを用いて研究する。

【0728】

このモデルにおける研究は、以下のとおり3部に分けられる：

- a) 虚血皮膚
- b) 虚血皮膚創傷
- c) 通常創傷

実験プロトコルは、以下を包含する：

- a) 3 × 4 cm (単一の有茎完全厚ランダム皮膚弁) を作製 (動物の下部背上の筋皮弁)
- b) 虚血皮膚における切除による創傷 (直径4 ~ 6 mm) (皮膚弁)
- c) 以下の種々の投薬範囲での切除による創傷のVEGF-2での局所的処置 (創傷後0、1、2、3、4日目) : 1 mg ~ 100 mg
- d) 組織学的研究、免疫組織化学的研究およびインサイチュ研究のための創傷後3、5、7、10、14および21日目での創傷組織採取。

10

【0729】

(実施例21：末梢性動脈疾患モデル)

VEGF-2を用いた脈管形成治療を、新規な治療ストラテジーとして開発して、末梢性動脈疾患において虚血周辺の血流の回復を得た。

20

【0730】

(実験計画)

実験プロトコルは、以下を包含する：

- a) 大腿動脈の片側を結紮して、後肢の虚血筋肉を作製し、後肢の他方の片側は、コントロールとして用いる。

【0731】

- b) 20 mg ~ 500 mg の範囲の投薬量でVEGF-2タンパク質を、2 ~ 3週間の間1週あたり静脈内および/または筋肉内で3回 (おそらくそれより多く) 送達する

- c) 虚血筋肉組織を、大腿動脈の結紮後、VEGF-2発現および組織学の分析のために1週、2週および3週で採取する。生検もまた、対側性の後肢の正常筋肉の他方の片側で行う。

30

【0732】

(実施例22：虚血性心筋疾患モデル)

VEGF-2を、側副血管の発生を刺激し得、かつ冠状動脈閉塞後に新たな血管を再構成し得る強力なマイトジェンとして評価する。VEGF-2発現の改変をインサイチュで調査する。

【0733】

(実験計画)

実験プロトコルは、以下を包含する：

- a) 心臓を、ラットの左側を開胸して露出させる。直ちに、左冠状動脈を細い (6 ~ 0) 縫合糸で閉塞し、そして胸郭を閉じる
- b) 20 mg ~ 500 mg の範囲の投薬量でVEGF-2タンパク質を、2 ~ 4週間の間1週あたり静脈内および/または筋肉内で3回 (おそらくそれより多く) 送達する
- c) 外科手術30日後に、心臓を取り出し、そして形態分析およびインサイチュ分析のために薄片化する。

40

【0734】

(実施例23：ラット角膜創傷治癒モデル)

この動物モデルは、VEGF-2の新血管形成に対する効果を示す。

【0735】

(実験計画)

50

実験プロトコルは、以下を包含する：

- a) 角膜の中央から間質層へ、1～1.5 mm長の切開を作製する
- b) 眼の外側角膜に向き合う切開の縁の下にスパチュラを挿入する
- c) ポケットを作製する(その基底は、眼の縁から1～1.5 mm)
- d) 50 mg～500 mgのVEGF-2を含むペレットを、ポケット内に配置する
- e) VEGF-2処置を20～500 mgの範囲の投薬量で角膜創傷に局所的に適用し得る(毎日処置(daily treatment)を5日間)。

【0736】

(代替プロトコル)

このプロトコルにおいて、VEGF-2ポリペプチドおよび/またはVEGF-2抗体を、以下に記載されるような角膜に挿入されるフィルターディスクを用いて、ラットの角膜に送達する。

【0737】

(フィルターディスク調製)

無菌角膜フィルターディスクを、標準傾斜カットオフおよび平板化チップの周りの機械傾斜グラウンドを有する滅菌した20 Gの注射針を用いて、生物学的に安全なフード下で、0.45 μmの細孔サイズのMillipore HAWP01300フィルターからスタンピングする。スタンピングディスクを、24 Gスタイレットによって20 G注射針から除去する。VEGF-2ポリペプチドおよび/またはVEGF-2抗体溶液を、以下のように滅菌濾過した1×TBS(50 mM Tris-HCl pH7.4 / 150 mM NaCl)中で調製する。このコントロール群は、1×TBSまたはフラッグペプチドのみを受ける。

【0738】

(角膜手術およびフィルターディスクの挿入)

一般的に、体重175～200 gである20匹のSprague Dawleyラットを、これらの実施例のために使用する。手術の日に、それぞれの動物を、ケタミン(50 mg/kg im; Phoenix番号NDC 57319-291-02)、キシラジン(10 mg/kg im; Phoenix番号NDC 57319-326-26)およびアセプロマジン(1.0 mg/kg im; Fermenta番号117-531)で麻酔する。ラットを麻酔した後、感覚毛を切り取り、そしてラットに0.5 mg/kgの硫酸アトロピン(RBI番号A-105; Lot番号69H0545)を注射する。このラットを、滅菌した包帯で巻く。滅菌したグローブを外科的手順のために使用する。外科的領域(眼および周囲の毛)を、生理食塩水、次いで5%のポビドンヨード(Perdue Frederick番号H8151-K97; Lot番号6H31)で洗浄する。次いで、この眼を、滅菌した生理食塩水で洗浄し、そして2滴の2%リドカインHCl(Phoenix番号NDC-57319-093-05; Lot番号0080991)を眼に滴下する。眼を、生理食塩水で灌漑し、手順の間に乾燥するのを防ぐ。角膜輪部から滅菌した番号15のメスの2 mmの刃を用いて切開する。角膜の厚さの約半分を切開する。切開した後、滅菌した顕微手術のハサミを使用して、縁から約0.75 mmの切開の点から伸長するポケットを作製する。予浸した(氷上の滅菌したペトリ皿で20 μLのそれぞれの試験溶液中で一晩浸す)ディスクを、ディスクの主要な縁が、角膜輪部から1 mmとなるようこのポケットに挿入する。

【0739】

手術が完了する後、眼瞼を閉じ、そして微細動脈瘤クランプと一緒に徐々に固定する。次いで、このラットを反転し、そして工程番号6で開始する手順を繰り返す。両目を終了する後、ラットを起きるまで隔離ゲージに置く。ラットが意識を回復し始めたらずぐに、微細動脈瘤クランプを除去する。

【0740】

(画像化)

手術の5日後、このラットに、0.5 mg/kgのアトロピンを服用させる。散瞳を観

10

20

30

40

50

察する際、動物を安楽死させる。それぞれのラットの眼を、Image Pro Plus を用いて4.0倍でデジタル画像化する。表面積(画素)および密度(目的の領域のパーセント)を、フィルターディスクの直下およびどちらかの側の領域で定量化する。9つの表面積測定を、1つの眼あたりで獲得する。平均の脈管形成の表面積をそれぞれの眼に対して獲得する。

【0741】

当業者は、上記のプロトコルを容易に変更し得、VEGF-2により調節される新血管形成に対するVEGF-2のアゴニストおよび/またはアンタゴニスト(例えば、VEGF-2抗体)の効果を試験する。1つの変更において、フィルターディスクは、VEGF-2およびVEGF-2抗体の等モル量で浸し得る。あるいは、VEGF-2ポリペプチドでのみ直接角膜を処置し得、そしてVEGF-2抗体を全身、腹腔内注射、静脈内注射または皮下注射を介して投与する。全身注射が使用される場合、例えば、ラットは0.1~10mg/kgの間の1回以上の用量を与えられ得る。

10

【0742】

(実施例24:糖尿病マウスおよびグルココルチコイド欠陥創傷治癒モデル)

(実験計画)

実験プロトコルは、以下を包含する:

1.糖尿病db+/db+マウスモデル

VEGF-2が治癒プロセスを促進することを決定するために、創傷治癒の遺伝的糖尿病マウスモデルを使用する。db+/db+マウスにおける完全厚創傷治癒モデルは、十分に特徴づけられており、臨床的に明らかであり、そして創傷治癒の欠陥の再現可能なモデルである。糖尿病性創傷の治癒は、収縮よりむしろ、顆粒形成組織の形成および再上皮形成(re-epithelialization)に依存する(Gartner, M. H.ら、J. Surg. Res. 52:389(1992); Greehalgh, D. G.ら、Am. J. Pathol. 136:1235(1990))。

20

【0743】

糖尿病動物は、II型糖尿病において観察される、多くの特有の特徴を有する。ホモ接合性(db+/db+)マウスは、それらの正常なヘテロ接合性(db+/+m)同腹仔と比較して肥満である。変異型糖尿病(db+/db+)マウスは、単一の常染色体劣性変異を、第4染色体上に有する(db+)(Colemanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:283-293(1982))。動物は、多食症、多渴症および多尿症を示す。変異型糖尿病マウス(db+/db+)は、血液グルコースの上昇、増加したインスリンレベルまたは正常インスリンレベル、および細胞性免疫の抑制を有する(Mandelら、J. Immunol. 120:1375(1978); Debray-Sachs, M;ら、Clin. Exp. Immunol. 51(1):1-7(1983); Leiterら、Am. J. of Pathol. 114:46-55(1985))。末梢神経障害(peripheral neuropathy)、心筋合併症、ならびに微小血管病変、基底膜肥厚および糸球体濾過異常がこれらの動物において記載されている(Norido, F.ら、Exp. Neurol. 83(2):221-232(1984); Robertsonら、Diabetes 29(1):60-67(1980); Giacomelliら、Lab Invest. 40(4):460-473(1979); Coleman, D. L., Diabetes 31(増補):1-6(1982))。これらのホモ接合性糖尿病マウスは、ヒトII型糖尿病に類似する、インスリン耐性の高血糖症を発症する(Mandelら、J. Immunol. 120:1375-1377(1978))。

30

40

【0744】

これらの動物において観察される特徴は、このモデルにおける治癒がヒト糖尿病において観察される治癒と類似し得ることを示唆する(Greehalghら、Am. J. of Pathol. 136:1235-1246(1990))。

【0745】

50



## (動物)

遺伝性糖尿病の雌性 C57BL/KsJ (db+/db+) マウスおよびそれらの非糖尿病の (db+/m) ヘテロ接合性同腹仔を本研究に使用した (Jackson Laboratories)。6週齢の動物を購入し、そして研究を開始した時は8週齢であった。動物は、個々に飼育し、そして食物および水を無制限に与えた。全ての操作は、無菌技術を使用して行なった。実験は、Human Genome Sciences, Inc. の Institutional Animal Care and Use Committee and the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals の規則およびガイドラインに従って行なった。

10

## 【0746】

## (外科的創傷)

創傷プロトコルは、以前に報告された方法 (Tsuboi, R. および Rifkin, D. B., J. Exp. Med. 172: 245-251 (1990)) に従って行なう。手短かに言えば、創傷当日に、動物を脱イオン水中に溶解した Avertin (0.01 mg/mL)、2, 2, 2-トリプロモエタノールおよび2-メチル-2-ブタノールの腹腔内注射により麻酔する。動物の背側領域を剃毛し、そして皮膚を、70%エタノール溶液およびヨードで洗浄する。外科手術領域を、創傷の前に滅菌ガーゼを用いて乾燥させる。次いで、全厚8mmの創傷を、Keyらの組織パンチを用いて作製する。創傷後すぐに、周囲の皮膚を創傷の拡大を排除するために、やさしく伸ばす。創傷は、実験の期間中開いたままにする。処置の適用は、創傷の日から、5日間連続で局所的に行なう。処置の前に、創傷を滅菌生理食塩水およびスポンジのガーゼでやさしく洗浄する。

20

## 【0747】

創傷を、手術の日およびそれから2日毎に、視覚的に試験し、そして一定間隔で写真に取る。創傷の閉鎖は、1~5日目および8日目に毎日測定することにより決定する。創傷を、目盛りのついた Jameson caliper を使用して水平方向および垂直方向に測定する。肉芽組織が、もはや目に見えなくなり、そして創傷が、連続した上皮で覆われた場合に、創傷が、治癒したと考える。

## 【0748】

VEGF-2を、8日間、ビヒクル中4mg~500mg/創傷/日のVEGF-2の異なる用量範囲を使用して投与する。ビヒクルコントロール群は、50mLのビヒクル溶液を受容する。

30

## 【0749】

動物は、ペントバルビタールナトリウム (300mg/kg) の腹腔内注入で8日目に安楽死させる。次いで、創傷および周囲の皮膚を組織学および免疫組織化学のために採取する。組織試料を、さらなるプロセスのために、組織診スポンジ間の組織カセット中で、10%中性緩衝化ホルマリン中に置く。

## 【0750】

## (実験計画)

10動物ずつの3つのグループ (5匹が糖尿病性コントロールであり、そして5匹が非糖尿病性コントロールである) を、1) ビヒクルプラセボコントロール、2) VEGF-2について評価した。

40

## 【0751】

## (創傷面積および閉鎖の測定)

創傷閉鎖を、垂直軸および水平軸における面積の測定、および創傷の総平方面積を得ることにより分析する。次いで、収縮を、最初の創傷面積 (0日目) と処置後の創傷面積 (8日目) との間の違いを確立することにより、見積もる。1日目の創傷面積は、64mm<sup>2</sup>であった (皮膚パンチの大きさに対応する)。計算は、以下の式を使用して行なった: [8日目の開口面積] - [1日目の開口面積] / [1日目の開口面積]。

## 【0752】

50

## (組織像)

試料を10%緩衝化ホルマリン中で固定し、そしてパラフィン包埋ブロックを、創傷表面に垂直に切り出し(5mm)、そしてReichert-Jungマイクロトームを使用して切断する。通常のヘマトキシリン-エオシン(H&E)染色を、二等分した創傷の断面で行なう。創傷の組織学試験を使用して、治癒過程および修復された皮膚の形態的外観が、VEGF-2での処置により変化するかどうかを評価する。この評価は、細胞蓄積、炎症細胞、毛細管、線維芽細胞、再上皮化および上皮の成熟度の存在の検査を含んだ(Greenhalgh, D.G.ら、Am. J. Pathol. 136:1235(1990))。実験条件の伏せられた観測者が、目盛りつきレンズマイクロメーターを使用する。

10

## 【0753】

## (免疫組織化学)

## (再上皮化)

組織切片は、ABC Elite検出システムを使用して、ポリクローナルウサギ抗ヒトケラチン抗体を用いて免疫組織化学的に染色する。ヒトの皮膚を、陽性組織コントロールとして使用し、一方非免疫IgGを、陰性コントロールとして使用する。ケラチノサイト増殖を、目盛りつきレンズマイクロメーターを使用して、創傷の再上皮化の程度を評価することにより決定する。

## 【0754】

## (細胞増殖マーカー)

皮膚試料における増殖細胞核抗原/サイクリン(PCNA)を、ABC Elite検出システムを用いて抗PCNA抗体(1:50)の使用により実証する。ヒト結腸癌を、陽性組織コントロールとして使用し、そしてヒト脳組織を、陰性組織コントロールとして使用する。各試料は、一次抗体の脱落、および非免疫マウスIgGとの置換を有する切片を含んだ。これらの切片の順位は、わずかな増殖を反映するスケールの低い側から、強い増殖を反映する高い側への0~8のスケールでの、増殖の程度に基づく。

20

## 【0755】

## (統計的分析)

例示的なデータを、片側t検定を使用して分析する。0.05より大きいp値を、有意とみなす。

30

## 【0756】

## (2.ステロイド障害性ラットモデル)

ステロイドによる創傷治癒の障害は、種々のインビトロおよびインビボ系において十分に実証されている(Wahl, S.M. Glucocorticoids and Wound healing. Anti-Inflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects. 280-302(1989); Wahl, S.M.ら、J. Immunol. 115:476-481(1975); Werb, Z.ら、J. Exp. Med. 147:1684-1694(1978))。糖質コルチコイドは、新脈管形成の障害、血管透過性(Ebert, R.H.ら、An. Intern. Med. 37:701-705(1952))、線維芽細胞の増殖、およびコラーゲン合成(Beck, L.S.ら、Growth Factors. 5:295-304(1991); Haynes, B.F.ら、J. Clin. Invest. 61:703-797(1978))の減少および循環する単球の一過性減少の生成(Haynes, B.F.ら、J. Clin. Invest. 61:703-797(1978); Wahl, S.M. 「Glucocorticoids and Wound healing」Anti-inflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects, Academic Press, New York, 280~302頁(1989))により創傷治癒を遅らせる。創傷治癒の減弱に対するステロイドの全身投与は、ラットにおいて十分に確立された現象である(Beck, L.S.ら、Growth Factors. 5:295-30

40

50

4 (1991); Haynes, B. F. & J. Clin. Invest. 61: 703-797 (1978); Wahl, S. M. 「Glucocorticoids and wound healing」 Antinflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects, Academic Press, New York, 280~302頁 (1989); Pierce, G. F. & Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2229-2233 (1989)。

【0757】

VEGF-2が、治癒過程を加速し得ることを実証するために、メチルプレドニゾロンの全身投与により、治癒が損なわれているラットの皮膚の全厚切除創傷に対するVEGF-2の複数の局所適用の効果を評価する。

10

【0758】

(動物)

重量が、250~300gの若い成体雄性Sprague Dawleyラット(Charles River Laboratories)を本実施例に使用する。動物を、8週齢で購入し、そして9週齢で研究を開始した。ラットの治癒応答を、創傷時にメチルプレドニゾロンの全身投与(17mg/kg/ラット筋肉内)により損なわせる。動物を個々に飼育し、そして食物および水を無制限に与える。全ての操作は、無菌技術を使用して行なう。本研究は、Human Genome Sciences, Inc.のInstitutional Animal Care and Use Committee and the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animalsの規則およびガイダンスに従って行なう。

20

【0759】

(外科的創傷)

創傷プロトコルは、上述のA節に従って行なう。創傷の日に、動物を、ケタミン(50mg/kg)およびキシラジン(5mg/kg)の筋肉内注射で麻酔する。動物の背側領域を剃毛し、そして皮膚を、70%エタノール溶液およびヨード溶液で洗浄する。外科手術領域を、創傷の前に滅菌ガーゼを用いて乾燥させる。全厚8mmの創傷を、Keyの組織パンチを用いて作製する。創傷は、実験の期間中開いたままにする。試験材料の適用は、創傷の日から7日間連続で、およびメチルプレドニゾロンの投与に引き続いて、一日1回、局所的に行なう。処置の前に、創傷を滅菌生理食塩水およびスポンジのガーゼでやさしく洗浄する。

30

【0760】

創傷を、創傷の日および処置の最後に、視覚的に試験し、そして固定した距離で写真に取る。創傷の閉鎖は、図のために1~5日目および8日目まで毎日測定することにより決定する。創傷を、目盛りのついたJameson caliperを使用して水平方向および垂直方向に測定する。肉芽組織が、もはや目に見えなくなり、そして創傷が、連続した上皮で覆われた場合に、創傷が治癒したと考える。

40

【0761】

VEGF-2を、8日間、ビヒクル中4mg~500mg/創傷/日のVEGF-2の異なる用量範囲を使用して投与する。ビヒクルコントロール群は、50mLのビヒクル溶液を受容する。

【0762】

動物は、ペントバルビタールナトリウム(300mg/kg)の腹腔内注入で8日目に安楽死させる。次いで、創傷および周囲の皮膚を組織学のために採取する。組織標本を、さらなる加工のために、組織診スポンジ間の組織カセット中で、10%中性緩衝化ホルマリン中に置く。

【0763】

(実験計画)

50

10 動物ずつの4つのグループ(5匹がメチルプレドニゾロンで処置、そして5匹は、糖質コルチコイドを有さない)を、1)未処置グループ、2)ビヒクルプラセボコントロール、3)VEGF-2処置グループについて評価する。

#### 【0764】

(創傷面積および閉鎖の測定)

創傷閉鎖は、垂直軸および水平軸の面積を測定すること、および創傷の総面積を得ることにより分析する。次いで、閉鎖を、開始時の創傷面積(0日目)と処置後の創傷面積(8日目)との間の差異を確立することにより、見積もる。1日目の創傷面積は、 $64\text{ mm}^2$ であった(皮膚パンチの大きさに対応する)。計算は、以下の式を使用して行なった：  
[8日目の開口面積] - [1日目の開口面積] / [1日目の開口面積]。

10

#### 【0765】

(組織学)

標本を10%緩衝化ホルマリン中で固定し、そしてパラフィン包埋ブロックを、創傷表面に垂直に切り出し(5mm)、そしてOlympusマイクロトームを使用して薄切する。通常のヘマトキシリン-エオシン(H&E)染色を、二等分した創傷の断面で行なった。創傷の組織学試験は、治癒過程および修復された皮膚の形態的外観が、VEGF-2での処置により改善されたかどうかの評価を可能にする。目盛りつきレンズマイクロメータを機械的な観察者が使用して、創傷間隙の距離を決定した。

#### 【0766】

(統計的分析)

実験データを、片側t検定を使用して分析する。0.05未満のp値を、有意であるとみなす。

20

#### 【0767】

(実施例25:VEGF-2モノクローナル抗体産生のための特定のペプチドフラグメント)

4つの特定のペプチド(SP-40、SP-41、SP-42およびSP-43と命名された)を、産生した。これらを用いて、VEGF-2プロセッシングを分析するためのモノクローナル抗体を産生する。このペプチドを以下に示す：

1. 「SP-40」：MTVLYPEYWKMY(配列番号18のアミノ酸70~81)
2. 「SP-41」：KSIDNEWKRTQSMPREV(配列番号18のアミノ酸120~136(131位でC->S変異に注意のこと))
3. 「SP-42」：MSKLDVYRQVHSIIRR(配列番号18のアミノ酸212~227)
4. 「SP-43」：MFS SDAGDDSTDGFHDI(配列番号18のアミノ酸263~279)

30

(実施例26:リンパ水腫(lymphadema)動物モデル)

この実験的アプローチの目的は、ラット後肢でのリンパ性循環系のリンパ管形成および再形成におけるVEGF-2の治療的効果を試験するために、適切かつ一致するリンパ水腫モデルを生成することである。有効性を、発症した後肢の体積の膨張、リンパ管の定量、総血液血漿タンパク質、および組織変化により測定する。急性リンパ水腫を、7~10日間観察する。おそらくより重要なことに、水腫の慢性的な進行は、3~4週間まで続く。

40

#### 【0768】

(実験の手順)

手術の開始に先立って、血液サンプルを、タンパク質濃度分析のために採取した。約350gの雄性ラットに、Pentobarbitalを投与する。引き続いて、右足を、膝から股関節部にかけて剃毛した。剃毛した領域を、70%エタノールに浸漬したガーゼで拭き取る。血液を血清総タンパク質試験のために採取する。外周および体積測定を、足への色素の注入の前に、2つの測定レベルのマーキング(背側の足のptの中間で、踵より0.5cm上)後に行なった。右足および左足の両方の背側の皮内に、0.05mlの

50

1% Evan's Blueを注入する。次いで、外周および体積測定を、足への色素の注入に続いて行なう。

【0769】

膝関節を目印として使用して、脚中部の鼠径部の切開を、大腿部の血管の周囲に位置し得るように行なう。鉗子および止血剤を使用して、皮弁を解体および分離する。大腿部の血管をつきとめた後、血管の側および下部に沿って走るリンパ管をつきとめる。次いで、この領域の主要なリンパ管を、電氣的に凝固するか、または縫合結紮する。

【0770】

顕微鏡を使用して、脚の裏の筋肉（半腱様筋（*semitendinosus*）および内転筋の近く）を、平滑に切開する。次いで、膝窩リンパ節をつきとめる。

10

【0771】

次いで、膝窩の節の2つの近位のリンパ管および2つの遠位のリンパ管ならびに遠位の血液供給を、縫合することにより結紮する。次いで、膝窩リンパ節および任意の付随する脂肪組織を、結合組織をカットすることにより取り除く。

【0772】

この手順により生じる任意の穏やかな出血の制御するように注意を払った。リンパ管を閉塞した後、皮弁を、流動性の（*liquid*）皮膚（*Vetbond*）（*AJ Buck*）を使用することにより密封する。分離した皮膚の縁を、下にある筋組織にシールするが、脚の周囲の約0.5cmの間隙は、そのままにする。皮膚をまた、必要であれば、下にある筋肉に縫合することにより固着し得る。

20

【0773】

感染を避けるために、動物をメッシュを用いて個々に飼育する（ベッドなしで）。回復する動物を、代表的には5～7日までに生じる最適な水腫のピークによって、毎日チェックした。次いで、プラトーな水腫ピークを観察した。リンパ水腫の強度を評価するために、本発明者らは、手術前、および7日間毎日、各足の2つの指定された場所の外周および体積を測定した。血漿タンパク質がリンパ水腫に対して有する影響およびタンパク質分析が、有用な試験ペリメータであるかどうかの決定もまた、研究する。コントロールの肢と水腫肢の両方の重量を、2つの場所で評価する。分析を盲目様式により行なう。

【0774】

（外周測定）

肢の動きを防ぐために短いガス麻酔下で、布のテープを使用して、肢の外周を測定する。測定は、距骨および背側の足で、2人の異なる人により行ない、次いで、その2つの記録の平均を取る。記録は、コントロールの肢および水腫の肢の両方から取る。

30

【0775】

（体積測定）

外科手術の日、動物を *Pentobarbital* を用いて麻酔し、そして手術の前に試験する。毎日の体積測定のために、動物を簡単なハロタン麻酔し（急激に固定化し、そしてすぐに回収する）、両方の脚を剃毛し、そして脚に防水性マーカ―を用いて同様に印付けする。最初に、脚を水につけ、次いで、個々の印のレベルを機器につけ、次いで *Buxco edema* ソフトウェア（*Chen/Victor*）により測定する。データを1人の人が記録し、一方他の人は、印の領域に対して肢をつける。

40

【0776】

（血液血漿タンパク質測定）

総タンパク質および  $Ca^{2+}$  比較のために、外科手術の前、次いで終了時に、血液を採取し、遠心分離（*spin*）し、そして血清を分離する。

【0777】

（脚の重量比較）

血液を採取した後、動物を組織収集のために調製する。肢を、*quillitine* を用いて切断し、次いで、実験用の脚およびコントロールの脚の両方を、結紮法で切断し、そして秤量した。第二の秤量を、脛骨-踵骨関節（*tibiocalcaneal joint*）

50

int)を解体したときに行ない、そして足を秤量した。

【0778】

(組織学的調製)

膝の後ろ(膝窩)の領域に位置する横筋を解体し、そして金属の骨組みを配置し、凍結ゲルで満たし、冷却メチルブタン中に漬け、標識したサンプルバッグ中に入れ、切り出すまで-80°Cで置いた。切り出す際に、筋肉をリンパ節について蛍光顕微鏡で観察した。他の免疫/組織学的方法が、現在評価されている。

【0779】

(実施例27: VEGF-2ポリペプチドの産生のための遺伝子治療を使用する処置方法-インビボ)

本発明の別の局面は、障害、疾患および状態を処置するためにインビボでの遺伝子治療方法を使用することである。この遺伝子治療方法は、VEGF-2の発現を増加させるために、動物中への、プロモーターに作動可能連結されたVEGF-2を含む裸の核酸(DNA、RNA、およびアンチセンスDNAまたはRNA)の導入に関する。このような遺伝子治療および送達技術および方法は、当該分野で公知であり、例えば、WO90/11092、WO98/11779; 米国特許第5693622号、同第5705151号、同第5580859号; Tabata, H.ら(1997) Cardiovasc. Res. 35(3): 470-479、Chao, J.ら(1997) Pharmacol. Res. 35(6): 517-522、Wolff, J. A. (1997) Neuromuscul. Disord. 7(5): 314-318、Schwartz, B.ら(1996) Gene Ther. 3(5): 405-411、Tsurumi, Y.ら、(1996) Circulation 94(12): 3281-3290(本明細書に参照として引用される)を参照のこと。

【0780】

VEGF-2ポリヌクレオチド構築物を、動物細胞に注入可能物質を送達する任意の方法(組織(心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓、腸など)の間質隙に注入するような)によって送達し得る。VEGF-2ポリヌクレオチド構築物をまた、直接動脈内に送達し得る。VEGF-2ポリヌクレオチド構築物を、薬学的に受容可能な液体または水溶性キャリア中に送達し得る。

【0781】

用語「裸の」ポリヌクレオチド、DNAまたはRNAは、ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方物、リポフェクチン、または沈降剤などを含む細胞への侵入の補助、促進、または亢進のために作用する、任意の送達ビヒクルを含まない配列をいう。しかし、VEGF-2ポリヌクレオチドをまた、当業者に周知の方法により調製され得るリポソーム処方物(例えば、Felgner P. L.ら(1995) Ann. NY Acad. Sci. 772: 126-139およびAbdallah B.ら(1995) Biol. Cell 85(1): 1-7に教示されるような)に送達し得る。

【0782】

遺伝子治療方法において使用するVEGF-2ベクター構築物は、好ましくは、宿主ゲノム中に組みこまれないだけでなく、複製を可能にする配列をも含まない構築物である。他の遺伝子治療技術とは違って、標的細胞への裸の核酸配列の導入の1つの主要な利点は、細胞におけるポリヌクレオチド合成の一時的な性質である。研究は、非複製DNA配列を、細胞内に導入し、6ヶ月までの期間、所望のポリペプチドの産生を提供し得ることを示した。

【0783】

VEGF-2構築物は動物内の組織の間隙質に送達され得、この間隙質としては、筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺および結合組織が挙げられる。これらの組織の間隙質は、細胞間液、器官組織の細網線維間、血管または室の壁における弾性線維間、線維性組織のコラーゲン線維間のムコポリ多糖マトリックス、あるいは結

10

20

30

40

50

合組織鞘筋肉細胞内、または骨の裂孔におけるその同じマトリックスを含む。それは、同様に、循環の血漿およびリンパチャネルのリンパ液によって占められる空間である。これらは、これらの細胞を含む組織中への注射によって、都合良く送達され得る。これらは、好ましくは、持続性の、分化した非分裂細胞に送達され、そしてこの非分割細胞において発現されるが、送達および発現を、未分化細胞または完全には分化していない細胞（例えば、血液幹細胞または皮膚線維芽細胞のような）において達成し得る。好ましくは、これらを動脈中への直接注射によって送達する。

【0784】

裸のポリヌクレオチド注射に関して、有効投薬量のDNAまたはRNAは、約0.05 g/kg体重～約50 mg/kg体重の範囲である。好ましくは、この投薬量は、約0.005 mg/kg～約20 mg/kgであり、そしてより好ましくは、約0.05 mg/kg～約5 mg/kgである。もちろん、当業者が理解するように、この投薬量は、注射の組織部位に従って異なる。適切かつ有効な投薬量の核酸配列を当業者は容易に決定し得、そしてこの投薬量は処置される状態および投与経路に依存し得る。投与の好ましい経路は、組織の間隙質内への、または直接的な動脈内への注射の非経口経路による。しかし、他の非経口経路（例えば、特に、肺または気管支組織、喉または鼻の粘膜への送達のためのエアロゾル処方物の吸入）もまた、使用し得る。さらに、裸のVEGF-2構築物をこの手順において使用するカテーテルによって血管形成中に動脈に送達し得る。

10

【0785】

注射されたVEGF-2ポリヌクレオチド構築物の、動脈中のインビボでの用量応答効果を以下のように決定する。VEGF-2をコードするmRNA産生のための適切なテンプレートDNAを標準の組換えDNA方法論に従って調製する。テンプレートDNA（これは、環状または直鎖状であり得る）を裸のDNAとして使用するか、またはリポソームと複合体化するかのいずれかである。次いで、ウサギの動脈に種々の量のテンプレートDNAを注射する。

20

【0786】

ウサギの後肢虚血を実施例18に記載するように外科的に誘導する。この後すぐに、5つの異なる部位（内転筋（2部位）の、内側ラージ（large）（2部位）、および半膜様筋肉（1部位）における）を小さい皮膚切開を通して、改良型3mlシリンジおよび2ゲージ針を使用して、VEGF-2をコードするプラスミドDNAを直接注射する。次いで、皮膚を4.0ナイロンを使用して閉じる。

30

【0787】

後肢虚血をレスキューする能力を、非処置ウサギからの虚血性後肢、子ウシ血圧の測定および流速の動脈内ドップラーガイドワイヤー（Doppler guidewire）測定と比較して、処置した後肢から採取した、光学顕微鏡切片中のキャピラリーの数を測定することによって決定する（Takeishitara、J. Clin. Invest. 93:662-670（1994））。ウサギにおける上記実験の結果を、VEGF-2ポリヌクレオチドの裸のDNAを使用する、ヒトおよび他の動物における適切な投薬量および他の処置パラメーターを推測するために使用し得る。

40

【0788】

（実施例28、遺伝子治療を使用した処置方法 - エキソビボ）

遺伝子治療の1つの方法は、線維芽細胞（これは、VEGF-2ポリペプチドを発現し得る）を患者に移植することである。一般的に、線維芽細胞は皮膚生検によって被験体から得られる。得られた組織を組織培養培地に置き、そして小片に分離する。組織の小塊を組織培養フラスコの湿潤表面上に置き、約10片を各フラスコに置く。このフラスコを逆さまにし、密栓し、そして室温で一晩放置する。室温で24時間後、フラスコを反転させ、そして組織塊をフラスコの底に固定したままにし、そして新鮮な培地（例えば、10% FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを有するHam's F12培地）を添加する。次いで、フラスコを37℃で約1週間インキュベートする。

【0789】

50

この時、新鮮な培地を添加し、そして引き続いて数日毎に交換する。さらなる2週間の培養後、線維芽細胞の単層が出現する。この単層をトリプシン処理し、そしてより大きなフラスコにスケールアップする。

【0790】

pMV-7 (Kirschmeier, P. Tら、DNA、7:219-25 (1988)) (モロニーマウス肉腫ウイルスの長末端反復に隣接する) をEcoRIおよびHindIIIで消化し、そして引き続いて仔ウシ腸ホスファターゼで処理する。直鎖状ベクターをアガロースゲル上で分画し、そしてガラスビーズを使用して精製する。

【0791】

実施例1に示すように、VEGF-2をコードするcDNAを、5'および3'末端配列にそれぞれ対応するPCRプライマーを使用して増幅し得る。好ましくは、5'プライマーは、EcoRI部位を含み、3'プライマーは、HindIII部位を含む。等しい量のモロニーマウス肉腫ウイルス直鎖状骨格および増幅されたEcoRIおよびHindIIIフラグメントを、T4 DNAリガーゼの存在下で共に加える。得られた混合物をこの2つのフラグメントの連結のために適切な条件下で維持する。次いで、この連結混合物を使用して細菌HB101を形質転換し、次いでこの細菌HB101を、ベクターが適切に挿入されたVEGF-2を含むことを確認する目的のため、カナマイシンを含む寒天上にプレートする。

【0792】

アンホトロピックなpA317パッケージング細胞またはGP+am12パッケージング細胞を組織培養物中でコンフルエントな密度まで、10%の仔ウシ血清(CS)、ペニシリンおよびストレプトマイシンを有するダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で増殖させる。次いで、VEGF-2遺伝子を含むMSVベクターを培地に添加し、そしてパッケージング細胞をベクターで形質導入する。ここで、パッケージング細胞は、VEGF-2遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生する(ここで、パッケージング細胞は、プロデューサー細胞と言われる)。

【0793】

新鮮な培地を形質導入されたプロデューサー細胞に添加し、引き続いて、この培地を10cmプレートのコンフルエントなプロデューサー細胞から収集する。感染性のウイルス粒子を含む使用済みの培地をミリポアフィルターを通して過し、剥離したプロデューサー細胞を除去し、次いで、この培地を使用して、線維芽細胞を感染させる。培地を線維芽細胞のサブコンフルエントなプレートから除去し、そしてプロデューサー細胞からの培地に迅速に置換する。この培地を除去し、そして新鮮な培地に置換する。ウイルスの力価が高い場合、次いで実質的に全ての線維芽細胞が感染され、そして選択は、必要とされない。この力価が非常に低い場合、次いで、選択マーカー(例えば、neoまたはhis)を有するレトロウイルスベクターを使用する必要がある。一旦、線維芽細胞が効率的に感染されると、線維芽細胞を分析して、VEGF-2タンパク質が産生されているかどうか決定する。

【0794】

次いで、単独か、またはサイトデクス(cytodex)3マイクロキャリアビーズ上でコンフルエントまで増殖させた後のいずれかで、操作された線維芽細胞を宿主内へ移植する。

【0795】

(実施例29、遺伝子治療(相同的組換え)を使用した処置の方法、)

本発明に従った遺伝子治療の別の方法は、例えば、以下に記載されるような相同的組換えを介した、内因性VEGF-2配列をプロモーターと作動可能に結合させる工程を包含する: 1997年6月24日に発行された米国特許第5,641,670号; 1996年9月26日に公開された国際公開第WO 96/29411号; 1994年8月4日に公開された国際公開第WO 94/12650号; Kollerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); および Zijl

10

20

30

40

50



straら、Nature 342:435-438(1989)。この方法は、標的細胞中に存在するが、その細胞中で発現しないか、または所望より低いレベルで発現する遺伝子の活性化を包含する。

【0796】

プロモーターおよび標的配列を含む、ポリヌクレオチド構築物が作製され、これらの標的配列は、このプロモーターに隣接する、内因性VEGF-2の5'非コード配列に対して相同性である。このプロモーターが、相同的な組換えに際して内因性配列と作動可能に連結されるように、この標的配列は、VEGF-2の5'末端に十分近接している。このプロモーターおよび標的配列をPCRを使用して増幅し得る。好ましくは、増幅されたプロモーターは、5'および3'末端に異なる制限酵素部位を含む。好ましくは、第1の標的配列の3'末端は、増幅されたプロモーターの5'末端と同じ制限酵素部位を含み、そして第2の標的配列の5'末端は、増幅されたプロモーターの3'末端と同じ制限部位を含む。

10

【0797】

この増幅されたプロモーターおよび増幅された標的配列を適切な制限酵素で消化し、そして引き続いて仔ウシ腸ホスファターゼで処理する。消化したプロモーターおよび消化した標的配列をT4 DNAリガーゼの存在下で共に加える。得られた混合物をこの2つのフラグメントの連結のために適切な条件下で維持する。この構築物をアガロースゲル上でサイズ分画し、次いでフェノール抽出およびエタノール沈殿によって精製する。

【0798】

この実施例において、ポリヌクレオチド構築物をエレクトロポレーションを介して裸のポリヌクレオチドとして投与する。しかし、このポリヌクレオチド構築物はまた、トランスフェクション促進剤(例えば、リポソーム、ウイルス性配列、ウイルス性粒子、沈殿剤など)と共に投与され得る。このような送達の方法は、当該分野で公知である。

20

【0799】

一旦、細胞がトランスフェクトされると、相同的な組換えが生じ、これは、内因性のVEGF-2配列と作動可能に連結されているプロモーターを生じる。これは、細胞中でVEGF-2の発現を生じる。発現を、免疫学的な染色または当該分野で公知の任意の他の方法によって検出し得る。線維芽細胞を皮膚生検によって被験体から得る。得られた組織をDMEMおよび10%胎仔ウシ血清中に置く。指数関数的な増殖期または初期の定常期の線維芽細胞をトリプシン処理し、そしてプラスチックの表面から栄養培地でリンスする。細胞懸濁液のアリコートを計数のために取り出し、そして残りの細胞を遠心分離に供する。上清を吸引し、そしてペレットを5mlのエレクトロポレーション緩衝液(20mM HEPES(pH7.3)、137mM NaCl、5mM KCl、0.7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、6mM デキストロース)中で再懸濁する。この細胞を再度遠心分離し、上清を吸引し、そして細胞を1mg/ml アセチル化ウシ血清アルブミンを含む、エレクトロポレーション緩衝液に再懸濁する。最終的な細胞懸濁物は、約3×10<sup>6</sup>細胞/mlを含む。エレクトロポレーションは、再懸濁後すぐに行うべきである。

30

【0800】

プラスミドDNAを標準の技術に従って調製する。VEGF-2遺伝子座に標的化するためのプラスミドを構築するために、プラスミドpUC18(MBI Fermentas, Amherst, NY)をHindIIIで消化する。CMVプロモーターを5'末端にXbaI部位および3'末端にBamHI部位を付加するPCRで増幅する。2つのVEGF-2非コード配列をPCRを介して増幅する:一方のVEGF-2非コード配列(VEGF-2フラグメント1)を5'末端のHindIII部位および3'末端のXbaI部位を付加して増幅する;他方のVEGF-2非コード配列(VEGF-2フラグメント2)を5'末端のBamHI部位および3'末端のHindIII部位を付加して増幅する。CMVプロモーターおよびVEGF-2フラグメントを適切な酵素(CMVプロモーター-XbaIおよびBamHI;VEGF-2フラグメント1-XbaI;VEGF-2フラグメント2-BamHI)で消化し、共に連結する。得られた連結産物をHin

40

50

d I I I で消化し、そしてH i n d I I I 消化したp U C 1 8 プラスミドで連結する。

【 0 8 0 1 】

プラスミドDNAを0.4cmの電極ギャップを有する滅菌キュベット(Bio-rad)に添加する。最終のDNA濃度は、一般に少なくとも120 $\mu$ g/mlである。次いで、0.5mlの細胞懸濁物(約 $1.5 \times 10^6$ 細胞を含有)をキュベットに添加し、そして細胞懸濁物およびDNA溶液を緩やかに混合する。エレクトロポレーションをGene-Pulsar装置(Bio-rad)を用いて行う。電気容量および電圧を960 $\mu$ Fおよび250~300Vにそれぞれ設定する。電圧が上がるにつれて、細胞の生存は減少するが、細胞のゲノム内に導入されたDNAを安定に組み込む生存細胞のパーセンテージは劇的に増加する。これらのパラメーターを与えると、約14~20mSecのパルス時間が観察されるはずである。

10

【 0 8 0 2 】

エレクトロポレーションした細胞を室温で約5分間維持し、次いでキュベットの内容物を滅菌したトランスファーピペットを使用して、穏やかに取り出す。この細胞を直接、10cmディッシュ中で10mlの予め温めた栄養培地(15%仔ウシ血清を有するDMEM)に加え、そして37 $^{\circ}$ C(EC)でインキュベートする。次の日、培地を吸引し、そして10mlの新鮮な培地で置換し、そしてさらに16~24時間インキュベートする。

【 0 8 0 3 】

次いで、操作された線維芽細胞を単独でか、またはサイトデックス3マイクロキャリアビーズ上でコンフルエントまで増殖させた後のいずれかで、宿主に注射する。ここで、線維芽細胞は、タンパク質産物を産生する。

20

【 0 8 0 4 】

(実施例30、VEGF-2トランスジェニック動物)

VEGF-2ポリペプチドをまた、トランスジェニック動物で発現し得る。任意の種の動物(マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、ブタ、ブタ、マイクロピッグ(micro-pig)、ヤギ、ヒツジ、ウシ(cow)および非ヒト霊長類(例えば、ヒヒ、サル、およびチンパンジー)を含むが、これらに限定されない)は、トランスジェニック動物を作製するために使用され得る。特定の実施形態において、本明細書中に記載された技術またはそうでなければ当該分野において公知の技術を使用して遺伝子治療プロトコルの一部として、ヒトにおいて本発明のポリペプチドを発現させる。

30

【 0 8 0 5 】

当該分野で公知の任意の技術を使用して、トランスジェニック動物の創始系統を作製するために、動物内に導入遺伝子(すなわち、本発明のポリヌクレオチド)を導入し得る。このような技術としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:前核のマイクロインジェクション(Patersonら、Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:691-698(1994); Carverら、Biotechnology (NY) 11:1263-1270(1993); Wrightら、Biotechnology (NY) 9:830-834(1991); およびHoppeら、米国特許第4,873,191号(1989)); 生殖細胞系(胚盤胞または胚)へのレトロウイルス媒介遺伝子移入(Vander Puttenら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:6148-6152(1985)); 胚性幹細胞における遺伝子標的化(Thompsonら、Cell 56:313-321(1989)); 細胞または胚のエレクトロポレーション(Lo, 1983, Mol Cell Biol. 3:1803-1814(1983)); 遺伝子銃を使用する本発明のポリヌクレオチドの導入(例えば、Ulmerら、Science 259:1745(1993)を参照のこと); 胚性多能性(pleuripotent)幹細胞中に核酸構築物を導入する工程および胚盤胞中に幹細胞を戻す工程; ならびに精子媒介遺伝子導入(Lavitra noら、Cell 57:717-723(1989)); など。このような技術の概要については、Gordon, 「Transgenic Animals」Intl. Rev. Cytol. 115:171-229(1989)(その全体が本明細書中に参考とし

40

50

て援用される)を参照のこと。

【0806】

当該分野で公知の任意の技術を使用して、本発明のポリヌクレオチドを含むトランスジェニッククローンを作製し得る(例えば、静止状態に誘導した、培養された胚性細胞、胎児細胞または成体細胞由来の核の、除核した卵母細胞への核移入)(Campbellら、Nature 380:64-66(1996);Wilmutら、Nature 385:810-813(1997))。

【0807】

本発明は、全てのこれらの細胞において導入遺伝子を保持するトランスジェニック動物、ならびにいくつかの細胞において導入遺伝子を保持するが、全てのこれらの細胞において保持するのではない、トランスジェニック動物(すなわち、モザイク動物またはキメラ)を提供する。この導入遺伝子を単一の導入遺伝子として、または多数のコピーとして(例えば、コンカテマー(例えば、頭-頭タンデムもしくは頭-尾タンデム)における)組み込み得る。この導入遺伝子をまた、例えば、Laskoら(Laskoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236(1992))の教示に従って、特定の細胞型に選択的に導入し得、そして特定の細胞型で活性化し得る。このような細胞型特異的活性化に必要とされる調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、そして当業者にとって明らかである。このポリヌクレオチド導入遺伝子が内因性遺伝子の染色体部位に組み込まれることが所望される場合、遺伝子標的化が好ましい。

【0808】

簡潔には、このような技術が利用されるべき場合、内因性遺伝子と相同性のいくつかのヌクレオチド配列を含むベクターを、染色体配列との相同組換えを介して、内因性遺伝子のヌクレオチド配列の機能の中に組み込む目的のため、およびこの機能を破壊する目的のために設計する。この導入遺伝子を特定の細胞型に選択的に導入し得、従って、この遺伝子は、例えば、Guら(Guら、Science 265:103-106(1994))の教示に従って、その細胞型のみにおいて内因性遺伝子を不活性化する。このような細胞型特異的不活性化に必要とされる調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、そして当業者に明らかである。

【0809】

一旦、トランスジェニック動物が作製されると、組換え遺伝子の発現を標準技術を利用してアッセイし得る。導入遺伝子の組み込みが生じたことを確認するために、最初のスクリーニングを、サザンブロット分析またはPCR技術によって、動物組織を分析するために達成し得る。トランスジェニック動物の組織における導入遺伝子のmRNAの発現レベルをまた、その動物から得られた組織サンプルのノーザンブロット分析、インサイチュハイブリダイゼーション分析および逆転写酵素PCR(rt-PCR)を含むが、これらに限定されない技術を使用して評価し得る。トランスジェニック遺伝子発現組織のサンプルもまた、導入遺伝子産物に特異的な抗体を使用して、免疫細胞化学的にまたは免疫組織化学的に評価し得る。

【0810】

一旦、創始動物が作製されると、これらを繁殖させるか、近系交配させるか、異系交配させるか、または異種交配し、特定の動物のコロニーを作製し得る。このような繁殖戦略の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:分離系統を確立するための1つより多い組み込み部位を有する創始動物の異系交配;各導入遺伝子のさらなる発現の効果に起因して、より高いレベルで導入遺伝子を発現する複合トランスジェニックを作製するための分離系統の近系交配;発現を増強させ、そしてDNA分析による動物のスクリーニングの必要性を排除するため両方のために、所定の組み込み部位に対してホモ接合性の動物を作製するためのヘテロ接合性のトランスジェニック動物の交配;複合ヘテロ接合体系統または複合ホモ接合体系統を作製するための分離ホモ接合体系統の交配;および目的の実験モデルに適切な異なるバックグラウンド上に導入遺伝子を配置するための交配。

【0811】

異常な V E G F - 2 発現に関連する状態および/または障害を研究し、V E G F - 2 ポリペプチドの生物学的な機能を詳しく述べる際に、ならびにこのような状態または障害を緩和する際に有効な化合物のスクリーニングの際に有用な動物モデル系が挙げられるが、これらに限定されない本発明のトランスジェニック動物を使用する。

#### 【 0 8 1 2 】

(実施例 3 1、V E G F - 2 ノックアウト動物)

内因性 V E G F - 2 遺伝子発現はまた、標的化相同性組換えを使用して V E G F - 2 遺伝子および/またはそのプロモーターを不活性化または「ノックアウト」することによって減少され得る(例えば、S m i t h i e s ら、N a t u r e 3 1 7 : 2 3 0 - 2 3 4 ( 1 9 8 5 ) ; T h o m a s および C a p e c c h i、C e l l 5 1 : 5 0 3 - 5 1 2 ( 1 9 8 7 ) ; T h o m p s o n ら、C e l l 5 : 3 1 3 - 3 2 1 ( 1 9 8 9 ) を参照のこと; これらの各々は、本明細書中でその全体が参考として援用される)。例えば、内因性のポリヌクレオチド配列(この遺伝子のコード領域か、または調節領域のいずれか)に相同性の D N A によって隣接する、本発明の変異型、非機能的ポリヌクレオチド(または完全に関連のない D N A 配列)を選択マーカーおよび/または陰性を選択マーカーを有するか、または有さずに、インピボで本発明のポリペプチドを発現する細胞をトランスフェクトするために使用し得る。別の実施形態において、当該分野で公知の技術を使用して、目的の遺伝子を含むが発現しない細胞中でノックアウトを生成する。標的化相同的組換えを介した、この D N A 構築物の挿入は、標的化された遺伝子の不活性化を生じる。このようなアプローチは、胚性幹細胞に対する改変が不活性の標的化遺伝子を有する動物の子孫を作製するために使用され得る研究分野および農業分野において特に適している(例えば、T h o m a s および C a p e c c h i 1 9 8 7 および T h o m p s o n 1 9 8 9、前出)。しかし、このアプローチは、組換え D N A 構築物が当業者に明らかな適切なウイルスベクターを使用してインピボで直接投与されるか、または必要とされる部位に標的化される場合、ヒトにおいての使用に慣用的に適合し得る。

#### 【 0 8 1 3 】

本発明のさらなる実施形態において、本発明のポリペプチドを発現するように遺伝子操作される細胞、あるいは本発明のポリペプチドを発現しないように遺伝子操作される細胞(例えば、ノックアウト)をインピボで患者に投与する。このような細胞を患者(すなわち、ヒトを含む動物)または M H C 適合性ドナーから入手し得、そしてこれらの細胞は、線維芽細胞、骨髄細胞、血球(例えば、リンパ球)、脂肪細胞、筋肉細胞、内皮細胞等を含み得るが、これらに限定されない。この細胞を、例えば、形質導入(ウイルス性ベクター、および好ましくは細胞のゲノムに導入遺伝子を組みこむベクターを使用して)またはトランスフェクション手順(プラスミド、コスミド、Y A C、裸の D N A、エレクトロポレーション、リポソームなどの使用を含むがこれらに限定されない)によって、細胞内に本発明のポリペプチドのコード配列を導入するために、あるいは、本発明のポリペプチドに関連するコード配列および/または内因性調節配列を破壊するために、組換え D N A 技術を使用してインピトロで遺伝子操作される。本発明のポリペプチドのコード配列を、V E G F - 2 ポリペプチドの発現および好ましくは分泌を達成するために、強力な構成的プロモーターまたは強力な誘導性プロモーターあるいはプロモーター/エンハンサーの制御下に配置し得る。本発明のポリペプチドを発現および好ましくは分泌する操作された細胞を患者に全身的に(例えば、循環中において、または腹腔内に)導入し得る。

#### 【 0 8 1 4 】

あるいは、この細胞をマトリックス中に組み込み得、そして身体中に移植し得、例えば、遺伝子に操作された線維芽細胞を、皮膚移植片の一部として移植し得る; 遺伝子操作された内皮細胞をリンパの移植片または血管移植片の一部として移植し得る(例えば、A n d e r s o n ら、米国特許第 5, 3 9 9, 3 4 9 号; ならびに M u l l i g a n および W i l s o n、米国特許第 5, 4 6 0, 9 5 9 号を参照のこと。これらの各々は、本明細書中でその全体が参考として援用される)。

#### 【 0 8 1 5 】

10

20

30

40

50

投与されるべき細胞が非自己の適合性細胞または非MHC適合性細胞である場合、これらの細胞を、周知の技術を使用して投与し得、この技術は、導入細胞に対して宿主免疫応答の発生を妨げる。例えば、それらの細胞をカプセル化形態で導入し得、これは、初期の細胞外環境との成分の交換を可能にするが、導入細胞は、宿主免疫系によって認識されることを可能にしない。

【0816】

異常なVEGF-2発現に関連する状態および/または障害を研究して、VEGF-2ポリペプチドの生物学的な機能を上昇する際、およびこのような状態および/または障害の回復に有効な化合物をスクリーニングする際に、有用な動物モデル系を含むが、これらに限定されない本発明のノックアウト動物を使用している。

10

【0817】

(実施例32)

(VHドメインおよびVLドメインの同定およびクローニング)

特定の抗体を発現する細胞株由来のVHドメインおよびVLドメインを同定しそしてクローニングするための1つの方法は、VHおよびVL特異的プライマーを用いて抗体発現細胞株から作成されたcDNAに対してPCRを実施することである。手短かに言うと、RNAを細胞株から単離し、そしてEBV細胞株によって発現された抗体のVHドメインおよびVLドメインを増幅するために設計したRT-PCRのためのテンプレートとして使用した。細胞をTRIzol(登録商標)試薬(Life Technologies, Rockville, MD)中で溶解し、そして5分の1容量のクロロホルムを加えて抽出し得る。クロロホルム添加後、この溶液を室温で10分間インキュベートし、そして卓上遠心機中で、14,000rpmで15分間4で遠心分離した。その上清を回収し、そして等量のイソプロパノールを用いて、RNAを沈殿させた。沈殿したRNAを、卓上遠心機中で、14,000rpmで15分間4での遠心分離によってペレット化した。遠心分離後、その上清を捨て、そして75%のエタノールで洗浄した。洗浄後、そのRNAを再び800rpmで5分間4で遠心した。その上清を捨て、そしてそのペレットを風乾した。RNAをDEPC水に溶解し、そして60で10分間加熱した。光学濃度測定を用いて、RNAを定量し得る。

20

【0818】

当該分野に公知の方法に従って、逆転写酵素およびランダムヘキサマープライマー(random hexamer primer)を用いて、1.5~2.5マイクログラムのRNAからcDNAを合成し得る。次いで、cDNAをVHドメインおよびVLドメインのPCR増幅のためのテンプレートとして使用した。VH遺伝子およびVL遺伝子を増幅するために使用したプライマーを、表5に示す。代表的に、PCR反応は、単一の5'プライマーおよび単一の3'プライマーを使用する。時々、利用可能なRNAテンプレートの量が制限される場合、またはより大きな有効性のために、5プライマーおよび/または3'プライマーのグループを使用し得る。例えば、時々、5つのVH-5'プライマー全ておよびJH3'プライマーの全てを単一のPCR反応に使用する。このPCR反応を、1xPCR緩衝液、2mMの各dNTP、0.7単位のHigh Fidelity Taqポリメラーゼ、5'プライマー混合物、3'プライマー混合物および7.5マイクロリットルのcDNAを含む50マイクロリットル容量において実施する。VHおよびVLの両方の5'プライマーおよび3'プライマーの混合物を、それぞれ、22pモルおよび28pモルの別個のプライマー各々と一緒にプールのすることによって作成し得る。PCR条件は、以下の通りである：96 5分間；続いて、94 1分間、50 1分間、そして72 1分間を25サイクル；続いて72 10分間の伸長サイクル。反応を完了した後、サンプルチューブを4で保存する。

30

40

【0819】

(表3：VHドメインおよびVLドメインを増幅するために使用したプライマー配列)

【0820】

## 【表3】

プライマー名	配列番号	プライマー配列 (5'-3')
<u>VHプライマー</u>		
Hu VH1-5'	36	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
Hu VH2-5'	37	CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGG
Hu VH3-5'	38	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
Hu VH4-5'	39	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG
Hu VH5-5'	40	GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC
Hu VH6-5'	41	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG

10

【0821】

【表 4】

Hu JH1,2-5'	42	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC
Hu JH3-5'	43	TGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC
Hu JH4,5-5'	44	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC
Hu JH6-5'	45	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC

プライマー名	配列番号	プライマー配列 (5'-3')	
<u>VLプライマー</u>			10
Hu V $\kappa$ 1-5'	46	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC	
Hu V $\kappa$ 2a-5'	47	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCC	
Hu V $\kappa$ 2b-5'	48	GATATTGTGATGACTCAGTCTCC	
Hu V $\kappa$ 3-5'	49	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC	
Hu V $\kappa$ 4-5'	50	GACATCGTGATGACCCAGTCTCC	
Hu V $\kappa$ 5-5'	51	GAAACGACACTCACGCAGTCTCC	
Hu V $\kappa$ 6-5'	52	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC	
Hu V $\lambda$ 1-5'	53	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC	20
Hu V $\lambda$ 2-5'	54	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC	
Hu V $\lambda$ 3-5'	55	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC	
Hu V $\lambda$ 3b-5'	56	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC	
Hu V $\lambda$ 4-5'	57	CACGTTATACTGACTCAACCGCC	
Hu V $\lambda$ 5-5'	58	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC	
Hu V $\lambda$ 6-5'	59	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA	
Hu J $\kappa$ 1-3'	60	ACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCC	
Hu J $\kappa$ 2-3'	61	ACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC	30
Hu J $\kappa$ 3-3'	62	ACGTTTGATATCCACTTTGGTCCC	
Hu J $\kappa$ 4-3'	63	ACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC	
Hu J $\kappa$ 5-3'	64	ACGTTTAACTCTCCAGTCGTGTCCC	
Hu J $\lambda$ 1-3'	65	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC	
Hu J $\lambda$ 2-3'	66	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC	
Hu J $\lambda$ 3-3'	67	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC	
Hu J $\lambda$ 3b-3'	68	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC	
Hu J $\lambda$ 4-3'	69	CACGTTATACTGACTCAACCGCC	40
Hu J $\lambda$ 5-3'	70	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC	
Hu J $\lambda$ 6-3'	71	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA	

次いで、PCRサンプルを1.3%のアガロースゲルで電気泳動した。期待したサイズのDNAバンド(VHドメインについて約506塩基対およびVLドメインについて344塩基対)をゲルを切り出し、そして当該分野で周知の技術を用いて精製し得る。精製したPCR産物をPCRクローニングベクター(Invitrogen Inc., Carlsbad, CAからのTAベクター)に結合し得る。別個にクローニングしたPCR産物を、E. coliのトランスフェクションおよび青/白の色選択後に同定し得る。次いで、当該分野で共通に公知の方法を用いて、クローニングしたPCR産物を配列決定し得

る。

【0822】

VHドメインおよびVLドメインを含むPCRバンドを用いて、全長のIg発現ベクターを作成し得る。VHドメインおよびVLドメインを、重鎖（例えば、ヒトIgG1もしくはヒトIgG4）または軽鎖（ヒトもしくはヒト）の定常領域のヌクレオチド配列を含むベクター内にクローニングし得、その結果、適切な宿主細胞内にトランスフェクトした場合、これらのベクターから完全な重鎖分子または軽鎖分子を発現し得た。さらに、クローニングした重鎖および軽鎖の両方を1つの細胞において（1つまたは2つのベクターのいずれかから）発現する場合、それらを、細胞培地中に分泌される完全な機能性抗体分子内に構築し得る。完全な抗体分子をコードする発現ベクターを作成するために、VH抗体ドメインおよびVL抗体ドメインをコードするポリヌクレオチドを用いる方法は、当該分野で周知である。

10

【0823】

（実施例33）

（VEGF-2結合ポリペプチドの親和性のBIAcore分析）

VEGF-2抗体のVEGF-2への結合は、例えば、BIAcore分析によって分析し得る。VEGF-2（もしくは他の抗原に対するVEGF-2抗体の親和性を知りたい物質に対する他の抗原）またはVEGF-2抗体のいずれかを、N-エチル-N'（ジメチルアミノプロピル）カルボイイミド（carboiimide）/N-ヒドロキシスクシニミド化学を用いて、アミン基を介してBIAcoreセンサーチップ（CM5チップ）に共有結合的に固定化し得る。VEGF-2抗体またはVEGF-2（もしくはVEGF-2抗体の親和性を知りたい物質に対する他の抗原）、それぞれの種々の希釈物は、50マイクロリットルの容量全てについて25マイクロリットル/分で、フローセル中の誘導体化したCM5チップ上を流れる。結合したタンパク質の量は、HBS緩衝液（10mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、3.4mM EDTA、0.005% 界面活性剤p20）でのフローセルの洗浄中に定量し得る。目的のタンパク質についての結合特異性は、目的のタンパク質の存在下で、可溶性競合物との競合によって決定される。

20

【0824】

このフローセル表面は、20マイクロリットルの10mM グリシン-HCl、pH2.3で洗浄することにより結合タンパク質を置換することによって再生し得る。動態分析に関して、このフローセルを、CM5チップ上の異なる流速および異なるポリペプチド密度について試験する。オンの速度（on-rate）およびオフの速度（off-rate）は、BIAevaluation 3ソフトウェアにおける動態評価プログラムを用いて決定し得る。

30

【0825】

BIAcore技術はまた、例えば、VEGF-2のそのレセプターに結合する能力を阻害する、抗VEGF-2抗体の能力を定量的に決定するために使用し得る。

【0826】

（実施例34：内皮細胞増殖アッセイ）

VEGF-2処置は、血管内皮細胞およびリンパ管内皮細胞が増殖するのを誘導する。VEGF-2処置細胞においてこの活性を可能にするために、以下のアッセイを使用する。さらに、VEGF-2抗体が、内皮細胞の増殖を誘導するVEGF-2タンパク質の能力を阻害し得るかどうかを決定するためにもまた、このアッセイを使用し得る。下記のプロトコルは、VEGF-2抗体の阻害活性を試験するためのアッセイを明示するが、当業者は、このアッセイを容易に改変して、内皮細胞増殖を誘導するVEGF-2タンパク質の能力を試験するために、VEGF-2抗体を取り除き得る。

40

【0827】

（ウシリンパ管内皮細胞（bLEC）の継続的な継代培養）

ウシのリンパ管内皮細胞（bLEC）細胞（ATCC番号、PTA-1149）を、7

50



5 cm<sup>2</sup> フラスコ内の完全培地 (DMEM、10%の、熱で不活化したFBS (Biowhitakerのカatalog番号; 14-502F)、100 U/mlのペニシリン、100 µg/mlのストレプトマイシン、2 mMのグルタミン、5 ml / 500 mlの非必須アミノ酸溶液 (NEAA)の培地、150 µg/ml ウシの脳抽出物 (ウシの脳抽出物は、Maciagra、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5674-5678 (1979)に記載されるように調製する)、100 µg/mlのヘパリン) 中で増殖させる。コンフルエンスに達したら、75 cm<sup>2</sup> フラスコから培地を除き、そして細胞を20 mlのPBS (カルシウムもマグネシウムも含まない) で1回洗浄し、次いで、4 mlのトリプシン-EDTAで覆い (cover)、そして3~5分間インキュベーターに戻した。次いで、静かに揺り動かして (gentle agitation) プラスティックからその細胞を剥がし、トリプシンを不活化するために4 mlの完全培地を加える。次に、この細胞懸濁物を、15 mlの遠心チューブに打つし、そして1000 rpmで5分間遠心して細胞をペレット化する。その上清は除去し、そしてその細胞ペレットを完全培地に再懸濁する。この細胞を1:3に分けて、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で37 °Cで維持する。培地は、細胞を分ける必要性にかかわらず、週に2回交換する。

10

## 【0828】

(VEGF-2 増殖アッセイプロトコル)

1日目: 外側の列を除いて、96ウェルプレート中で1ウェルにつき3500個の細胞でbLECをプレーとし、そして完全培地中で一晚培養する。後日、

2日目: 完全培地を除去し、そして100マイクロリットルの飢餓培地 (飢餓培地) (EBM (Cloneticsのカatalog番号; CC-3121)、0.5% FBS) を加える。

20

## 【0829】

3日目: VEGF-2 タンパク質を飢餓培地で希釈し、3×濃縮物を生じる。12ウェルプレートにおいて、全部で14の希釈のために、各抗体 (飢餓培地中のVEGF-2の3×濃縮物を希釈剤として用いる) の連続希釈を作成する。実験プレートに抗体を加えた後の最終濃度は、三連で、4000 ng/ml ~ 0.0006 ng/ml (3倍希釈) の範囲にすべきである。最小の抗体量から始まる各希釈物50マイクロリットルを96ウェルプレートに移す。37 °Cで、5% CO<sub>2</sub> で3日間プレートをインキュベートする。

## 【0830】

6日目: 1ウェルにつき3H-チミジン 0.5 mCi (6.7 Ci/mM) を含む50マイクロリットルの飢餓培地を各ウェルに補充し、そして細胞を、さらに18~20時間インキュベートする。

30

## 【0831】

7日目: プレートを-80 °Cで冷凍する。2~3時間後、プレートを解凍する。細胞を回収し、そして3H-チミジン取り込みを測定する。

## 【0832】

(実施例35: Elk-1リン酸化アッセイ)

VEGF-2は、Elk-1タンパク質をリン酸化するキナーゼを活性化するVEGF-2応答細胞におけるシグナル伝達カスケードを誘導する。VEGF-2処置細胞においてこの活性を可能にするために、以下のアッセイを使用する。さらに、VEGF-2抗体が、Elk-1のリン酸化を誘導するVEGF-2タンパク質の能力を阻害し得るかどうかを決定するためにもまた、このアッセイを使用し得る。下記のプロトコルは、VEGF-2抗体の阻害活性を試験するためのアッセイを明示するが、当業者は、このアッセイを容易に改変して、Elk-1リン酸化を誘導するVEGF-2タンパク質の能力を試験するために、VEGF-2抗体を取り除き得る。

40

## 【0833】

手短に言うと、96ウェルの平底培養プレートにウシのリンパ管内皮細胞 (bLEC) を1ウェルにつき100マイクロリットル容量の完全増殖培地 (Clonetics Corporation, Cat. No. CC4143からのEGM-MV) 中に25, 0

50

00細胞で播き、そして37℃で5% CO<sub>2</sub>で一晩インキュベートする。PBS + 0.05% BSA (低い内毒素)中に0.2マイクログラム/ミリリットルでのVEGF-2 (例えば、全長のタンパク質またはVEGF-2の分泌形態)の常用ストック溶液を調製する。

#### 【0834】

別個のアッセイプレートにおいて、6 ngの全長VEGF-2タンパク質または2 ngの分泌形態のVEGF-2タンパク質のいずれかを、1,500 ng (100×モル濃度の過剰量の抗体を示す)のVEGF-2抗体と混合し、そして、ヒト内皮-無血清培地 (Life Technologies, Cat. No. 11111-044) (SFM) を用いて、総容量を100マイクロリットルに調製する。全長のVEGF-2、分泌されるVEGF-2および抗体の最終濃度は、それぞれ、60 ng/mL、20 ng/mLおよび15 μg/mLである。抗体サンプルが調製済み培地である場合、アッセイに必要なとする抗体量を計算するために、総IgG濃度を用いる。VEGF-2-抗体複合体は、形成は、室温で1時間で形成され得る。

10

#### 【0835】

抗体-抗原複合体を形成する間、細胞から完全増殖培地を除去してそれをSFM飢餓培地と置換し、そして細胞を(5つのインキュベートについて(for 5 Incubate))37℃で5% CO<sub>2</sub>で1時間インキュベートする。細胞の1時間のインキュベートが終わった後、細胞から飢餓培地をデカントし、そして50マイクロリットルの各VEGF-2/VEGF-2抗体サンプルをアッセイプレートから細胞プレートに移す。次いで、細胞プレートを15分間37℃でインキュベートする。インキュベーション後、VEGF-2-抗VEGF-2複合体を含む液体を細胞からデカントし、そして1ウェルにつき50マイクロリットルの氷冷溶解緩衝液(20 mM Tris-Cl (pH 7.5)、250 mM NaCl、0.5% NP-40、10% グリセロール、3 mM EDTA、3 mM EGTA、0.1 mM オルトバナジウム酸ナトリウム、1 mM NaF、0.5 mM DTT [フレッシュなものを加える]、1×Roche Completeプロテアーゼインヒビター [フレッシュなものを加える])を加え、そして1~3分間静置する。この溶解物は、キナーゼアッセイにおいて直ちに使用するか、または-70℃で保存するべきである。

20

#### 【0836】

(キナーゼアッセイ:)

GST-Elk1融合タンパク質(Cell Signaling Technologies 番号; 9184、またはBoston Biologicals番号; 1010)をPBSで10 μg/mLまで希釈し、そして96-ウェルのDynex Microplate 2プレート(Catalogue番号; 7417)に1ウェルにつき50マイクロリットル加える。プレートを静かに叩いて、液体が底部を完全に覆うようにする。室温で一晩または37℃で1時間、インキュベートする。プレートを、1ウェルにつき250マイクロリットルの洗浄緩衝液(0.05% Tween 20、PBS + PBST)で1回洗浄する。次に、1ウェルにつきブロッキング緩衝液(1.0% Nonfat Dry Milk、PBST)150マイクロリットルを用いて、ウェル中の使用されていない結合部位をブロックし、そして1時間室温でインキュベートする。次いで、1ウェルにつき250マイクロリットルの洗浄緩衝液でプレートを3回洗浄する。アッセイプレートの各ウェルに、15マイクロリットルのサンプル(2連で)および10マイクロリットルの水を加える。1ウェルにつき25マイクロリットルの2×キナーゼ緩衝液(2×キナーゼ反応緩衝液(100 mM HEPES (pH 7.5)、20 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM NaF、0.2 mM オルトバナジウム酸ナトリウム、1 mM DTT [フレッシュなものを加える]、1 mM ATP [フレッシュなものを加える])を各ウェルに加えて、キナーゼ反応を開始する。精製し、活性化し、そして不活化したERK1/2キナーゼ(それぞれ、Stratagene、番号206110および番号206120)をコントロールとして含む。室温で1時間インキュベートする(1~3時間の間、反応は直線

30

40

50

である)。

【0837】

GST-Elk-1融合タンパク質を含む溶解物またはキナーゼコントロールのインキュベーションの後、プレートに1ウェルにつき250マイクロリットルの洗浄緩衝液で3回洗浄する。次いで、抗体希釈剤(0.1% BSA、PBST)で抗-リン酸-Elk1抗体(Cell Signaling Technologies, 番号9181)を1:1000に希釈し、そして各ウェルに50マイクロリットルを加える。室温で1時間インキュベートする。

【0838】

次いで、プレートに1ウェルにつき250マイクロリットルの洗浄緩衝液で3回洗浄する。Zymaxのヤギの抗-ウサギIgG-アルカリホスファターゼ(Zymed Laboratories Inc., 番号; 81-6122)を抗体希釈剤で1:4000に希釈する。1ウェルにつき50マイクロリットルの希釈した抗体を各ウェルに加え、そして1時間室温でインキュベートする。1ウェルにつき250マイクロリットルの洗浄緩衝液で3回洗浄する。次いで、1ウェルにつき50マイクロリットルのBM化学発光ELISA AP基質(Roche Molecular Biochemicals, 番号; 1759779)(パッケージ中の「ELISA 使用説明書」に従って調製される)を加える。ルミノメーターでリードする前に、室温で12分間インキュベートする。

【0839】

(実施例36)

(腫瘍血管新生のVEGF-2抗体の効果を研究するための容量チャンパーモデル)

マウスにおける透明ウィンドウシステムでの微小血管生理学の複数の局面の特性は、血管新生、炎症、微小血管輸送、組織の拒絶反応、および腫瘍生理学に関する貴重なデータを提供している(Melder, R. J.ら、Biophys. J. 69: 2131-2138, (1995); Fukumura, D.ら、Cancer Res. 55: 4824-4829, (1995); Yamada, S.ら、Blood, 86: 3487-3492, (1995); Yamada, S., ら、Blood, 86: 4707-4708, (1995); Melder, R. J., ら、Microvas. Res. 50, 35-44, (1995); Melder, R. J.ら、Nature Medicine 2: 992-997, (1996); Dellian, M., ら、Am. J. Path. 149: 59-71, (1996); ならびにLeunig M., ら、Cancer Res 52: 6553-60 (1992))。このアッセイを使用して、皮膚または軟膜表面の間質性コンパートメント(interstitial compartment)に直接投与されるVEGF-2ポリペプチドが、微小血管系の構造および機能における変化を誘導するという仮説を試験し得る。これらの研究は、特に、観測ウィンドウ内に存在する脈管構造および移植ゲル中のこれらのタンパク質に応答して発達する新生脈管構造に対する活性を特徴付ける。以下の観察がなされる:

- a) VEGF-2ポリペプチドでの処置に応答して皮膚または軟膜表面に生じる血管網状組織(血管網状組織)の長さ、直径および密度;
- b) 処置した血管床での血流速度および白血球の流量;
- c) 処置した血管床での回転白血球および接着性白血球の頻度;
- d) VEGF-2ポリペプチドでの処置に対する応答における、皮膚または軟膜表面での血管網状組織の存在の浸透性;
- e) ウィンドウ調製物内に移植したコラーゲンディスクにおける、VEGF-2ポリペプチドに対する脈管形成応答;
- f) ウィンドウ調製物内に移植したコラーゲンディスクにおける、血流速度 白血球の流量ならびに回転白血球および接着性白血球の数;
- g) 皮膚または頭部のウィンドウ調製物内に移植したコラーゲンディスクにおける、VEGF-2ポリペプチドに対する応答における血管由来の血管網状組織の浸透性。

【0840】

このアッセイに関して、Swiss nu/nuマウスを使用する。Swiss nu/nuマウスを使用する利点は、以下を含め、数倍である (several-fold) : a) 研究期間の間、免疫応答の可能性を減少させる、b) 皮膚における色素沈着および毛の欠如に起因する光学を改善する、c) 同様の種々の研究を用いて、経過の一貫性を維持する。

#### 【0841】

各実験グループおよびコントロールグループは、7匹のマウスを有する。雄マウスを用意する。なぜなら、雄マウスの方がより大きく、そして外科的ウィンドウ移植のためのより多くの皮膚を有する。試験するためのサンプルは、VEGF-2ポリペプチドおよび組み換えタンパク質コントロールを含む。存在する血管床上でのタンパク質活性を検査する各研究は、以下の5つの実験グループからなる：

グループ 1：緩衝液中の試験サンプル（用量1）

グループ 2：緩衝液中の試験サンプル（用量2）

グループ 3：緩衝液中の試験サンプル（用量3）

グループ 4：緩衝液およびBSAコントロール

グループ 5：ポジティブコントロール（bFGF、10 ng）

滅菌したタンパク質溶液を10 μl容量として、背部の皮膚ウィンドウを有するマウスのウィンドウ調製物内に直接投与する。あるいは、上記に列挙されるようなタンパク質濃縮物を含む滅菌したコラーゲン/スクラルフェートディスクを、脈管形成能の評価のためにウィンドウ調製物に配置する。滅菌した抗体溶液を静脈内に投与する。

#### 【0842】

これらの実験は、皮膚の血管外コンパートメントに投与されるVEGF-2ポリペプチドが、毛細管および後毛細管集合に存在する構造および機能における変化を誘導するという仮説を試験するために計画する。コラーゲンディスク中のポリペプチドの投与は、新脈管形成を調節する可能性を調べる。

#### 【0843】

（方法）

（動物調製）

外科的手順を、Swissヌードマウスにおいて実施する。外科的手順について、動物（20～30 g）を体重1 kgにつき90 mgのケタミンおよび9 mgのキシラジンのカクテルを皮下注射して麻酔する。外科的手順全てが、蒸気滅菌、気体滅菌または化学的に滅菌されている設備を備える水平な層状の流動性フードにおいて、特定の条件下で実施される。このベンチの無菌性は、使用しない場合、U.V.光によって維持される。手術中は、加熱作業面の手段によって、動物の体温を一定に維持する。マウス全てを別々に微小隔離飼育機（microisolator）ケージに収容し、そして処置全てを層状の流動性フード中で行う。手術後、任意の不快/苦痛について動物を観察する。不快の基準としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：体重減少（20%）、移動不能、自傷の証拠、または食べることもしくは飲むことが出来ないこと。移植後3日間、ブプレノルフィン（0.1 mg/kg q 12時間）を鎮痛薬として使用する。手術後3日間、不快のサインを示す任意の動物は、CO<sub>2</sub>吸入を用いて安楽死させる。

#### 【0844】

（背部皮膚チャンバー移植：）

チャンバーを、Leunigら、Cancer Res 52:6553-6560 (1992)に記載されるように移植する。手短に言うと、このチャンバーを、チャンバーが背部表面上に広がる2層の皮膚（すなわち、「皮膚を挟む（pinch of skin）」）上に配置されるように、位置付ける。背部皮膚組織弁の一面の全厚さを、直径約15 mmの円形領域で除去する。組織弁（表皮、筋膜、および横紋筋からなる）の第2の部位は、チャンバーのフレームおよび開口部（「ウィンドウ」）上に配置され、滅菌した、ガラスのカバースリップでカバーする。このチャンバーを、縫合糸（絹、4-0）を用いて適所に配置し、この縫合糸は、チャンバーの上部に沿って広がった皮膚および穴を介

10

20

30

40

50

して通される。マウスは、72時間で回復できる。

【0845】

この回復後、処置のために、各マウスを透明な、ポリカーボネートチューブ（直径25mm）に配置する。カバースリップを注意深く除去し、続いて処置因子を加える。処置因子添加後、次いで、観察面上に、新しい、滅菌したカバースリップを配置する。測定は、CCDカメラおよびSITカメラ、S-VHSビデオカセットレコーダーならびに直接デジタル画像取得を用いる形態計測分析によって行う。移植チャンバーを有するマウスを、フローチャートに示すように、28日間観察する。

【0846】

（測定）

マウスを、体重1kgにつき90mgのケタミンおよび9mgのキシラジンのカクテルのs.c.注射により麻酔し、次いで、滅菌したプラスチックステージアセンブリ上に配置する。次いで、透過照明（背部表面ウィンドウ）または後の100μlのBSA-FITC注射（1mg/ml、i.v.）および落射証明（頭部ウィンドウ）を用いて、ウィンドウの血管地図を作成する。血管床のビデオ録画を、オフライン分析のための倍率範囲（1x~40x）およびデジタルフレームで行う。血管密度、血流速度、および血管の寸法（剪断速度分析）について、画像を定量化する。さらに、毛細管細静脈および後毛細管細静脈のビデオ顕微鏡法後に、10μlのローダミン6-G注射によって循環する白血球相互作用を評価する。透過性測定を、5分、10分、15分および20分でのBSA輸送の画像オフライン分析から行う。正常血管床および脈管形成血管床の毛細管密度の定量を、5セットの実験マウスおよびコントロールマウスの観察を7日間隔（計28日間）でビデオテープのオフライン分析から行う。

【0847】

（実施例37）

（結腸癌LS174T背部チャンバーモデル）

結腸癌（LS174T）は、VEGF-2ポリペプチドを産生/分泌する。従って、VEGF-2抗体による処置が、LS174T腫瘍増殖を遅らせるかまたは阻止するか、あるいはさらにLS174T腫瘍後退に作用するかを試験することは特に興味深い。この仮説を試験するために、上記の背部チャンバーモデルが、背部チャンバー内の腫瘍増殖および血管新生を研究するために適し得る。

【0848】

背部チャンバーの移植3日後、2マイクロリットルのペレット化したLS174T腫瘍細胞懸濁物（約 $2 \times 10^5$ 細胞を含む）をチャンバー内の皮下組織の横紋筋層上に接種（innoculate）する。次いで、接種した腫瘍は、「取る」ことが出来るまで一時期放置し、そしてVEGF-2処置を開始する前に、特定のサイズ（例えば、直径4~6mm）まで成長させる。

【0849】

マウスに最初に0.4ミリグラムのVEGF-2抗体を注射し、続いて0.2ミリグラムのVEGF-2抗体を5日おきに30日間注射する。注射は、腹腔内（i.p.）または静脈内（i.v.）投与し得る。

【0850】

腫瘍増殖に対するVEGF-2処置の効果を評価するために測定されるパラメータとしては、腫瘍サイズおよび（内皮およびリンパの）血管密度が挙げられる。

【0851】

さらに、このアッセイは、内因性VEGF-2ポリペプチドの産生に関係なく、他の腫瘍に対するVEGF-2処置の効果を試験するために改変し得る。

【0852】

（実施例38）

（MDA-MB-231腫瘍におけるVEGF-2抗体処置の効果）

このMDA-MB-231細胞株（ATCC番号；HTB-26）は、乳癌細胞株であ

10

20

30

40

50

る。以下のアッセイを用いて、VEGF-2抗体での処置がMDA-MB-231腫瘍増殖を遅らせるかまたは阻止するかどうか、あるいはMDA-MB-231腫瘍退行に作用するかどうかをを試験する。以下の実施例は、MDA-MB-231細胞を必要とする実験プロトコルの概要を述べるが、当業者は、他の腫瘍型に対するVEGF-2抗体の処置の効果を試験するためにこのプロトコルを容易に改変し得る。

【0853】

第0日目に、マウスに100万個のMDA-MB-231細胞を有する乳房の詰め物を注入する。この移植した腫瘍は、2mm×2mm（通常、約5日間かかる）まで成長する。この腫瘍が2×2mm<sup>2</sup>の大きさまで達したら、動物に、初期用量の0.4ミリグラムのVEGF-2抗体を投与する。従って、0.2ミリグラムのVEGF-2抗体を、初期注入から5日後および10日後に投与する。さらに、特定の例示的グループにおける動物にもまた、5mg/kgのタキソール（またはたの適切な用量の別の化学療法剤）を毎日投与する。

10

【0854】

本発明の多数の改変および変更が上記の教示の観点から可能であり、従って、添付の請求項の範囲内で、本発明は、特に記載される以外の別の方法で実施され得る。

【0855】

本明細書中で引用される全ての刊行物（特許、特許出願、学术论文、実験室マニュアル、書籍または他の文書を含む）の完全な開示は、本明細書により参考として援用される。

【0856】

20

【表5】

寄託された微生物に関する表示  
(PCT規則13規則の2)

A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

11 頁、 段落 66、

B. 寄託物の表示  その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。

寄託機関の名称

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

10

寄託機関の住所 (郵便番号および国を含む)

アメリカ合衆国

バージニア 20110-2209、マナサス

ユニバーシティ ブールバード 10801

寄託日

1995年5月12日

受託番号

97149

C. 追加の表示 (なければ空白のまま)  この情報は追付の用紙に続く

20

D. 表示がなされた指定締結国 (全ての指定締結国に対する表示ではない場合)

ヨーロッパ

欧州特許が求められる指定機関に関して、寄託された微生物の試料は、欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる日までは、試料の請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能となされる。(EPC規則28(4))

追付の用紙に続く

30

E. 別に添付する表示物 (なければ空白のまま)

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する(表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定)

受理官庁記入欄

国際事務局記入欄

この用紙は国際出願とともに受理された

この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された

認定官

認定官

40

PCT/R0/134様式 (2001年1月)

A T C C 寄託番号 9 7 1 4 9

(カナダ)

出願人は、出願に基づきカナダ国特許が発行されるか、あるいは同出願が拒絶または放棄されて回復され得なくなるかもしくは取り下げられるまでは、特許庁長官 (Commissioner of Patents) が、長官により指名された独立の専門家に対し

50

てのみ出願中で言及された寄託済みの生物学的材料のサンプルの供与を許可する旨を請求し、出願人は、国際出願の公表のための規則上の準備が完了する前に、書面によりその旨を国際事務局に告知しなければならない。

## 【 0 8 5 7 】

( ノルウェー )

出願人はここにおいて、出願が(ノルウェー特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにノルウェー特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、ノルウェー特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりノルウェー特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、ノルウェー特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

10

## 【 0 8 5 8 】

( オーストラリア )

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は、特許の付与前において、あるいは出願の放棄(lapsing)、拒絶あるいは取り下げ前において、発明に対し利害関係を有さない当業者である対象者(skilled addressee)に対してのみ行われる旨を、告知するものである(オーストラリア国特許法第3.25(3)号規定)。

20

## 【 0 8 5 9 】

( フィンランド )

出願人はここにおいて、出願が(特許および統制委員会(National Board of Patents and Regulations)により)公開に付されるかあるいは公開を経ずに国立特許および法規委員会による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。

A T C C 寄託番号 9 7 1 4 9

( 英国 )

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は専門家に対してのみ利用可能にされる旨を、請求する。この旨の請求は、出願の国際公表のための規則上の準備が完了する前に、出願人により国際事務局に対してなされなければならない。

30

## 【 0 8 6 0 】

( デンマーク )

出願人はここにおいて、出願が(デンマーク特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにデンマーク特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、デンマーク特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりデンマーク特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、デンマーク特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

40

## 【 0 8 6 1 】

( スウェーデン )

出願人はここにおいて、出願が(スウェーデン特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにスウェーデン特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、優先日から16ヶ月が経過するよりも前に、出願人により国際事務局に対してなされるものとする(好ましくはPCT Applicant's GuideのVolume Iのannex Zに記載された書式PCT/RO/134による)。そのような請求が出願人によりなされた

50



場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、スウェーデン特許庁により作成された公認専門家のリスト (list of recognized experts) に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【 0 8 6 2 】

(オランダ)

出願人はここにおいて、オランダ特許の発行日まで、あるいは出願が拒絶、取り下げあるいは放棄 (lapsed) される日までは、特許法 3 1 F ( 1 ) の規定に基づき、微生物は専門家へのサンプル供与の形でのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、オランダ王国特許法の第 2 2 C 条または第 2 5 条に基づき出願が公に利用可能にされる日のうちいずれか早い方の日付よりも前に、出願人によりオランダ工業所有権局に対して提出されるものとする。

【 0 8 6 3 】

【表6】

寄託された微生物に関する表示  
(PCT規則13規則の2)

A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

12 頁、 段落 67、

B. 寄託物の表示

その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。



寄託機関の名称

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

10

寄託機関の住所 (郵便番号および国を含む)

アメリカ合衆国

バージニア 20110-2209、マナサス

ユニバーシティ ブールバード 10801

寄託日

1994年3月4日

受託番号

75698

C. 追加の表示 (なければ空白のまま)

この情報は追付の用紙に続く



20

D. 表示がなされた指定締結国 (全ての指定締結国に対する表示ではない場合)

ヨーロッパ

欧州特許が求められる指定機関に関して、寄託された微生物の試料は、欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる日までは、試料の請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能となされる。(EPC規則28(4))

追付の用紙に続く

30

E. 別に添付する表示物 (なければ空白のまま)

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する(表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定)

受理官庁記入欄

国際事務局記入欄

この用紙は国際出願とともに受理された

この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された

認定官

認定官

40

PCT/R0/134様式 (2001年1月)

A T C C 寄託番号 7 5 6 9 8

(カナダ)

出願人は、出願に基づきカナダ国特許が発行されるか、あるいは同出願が拒絶または放棄されて回復され得なくなるかもしくは取り下げられるまでは、特許庁長官 (Commissioner of Patents) が、長官により指名された独立の専門家に対し

50

てのみ出願中で言及された寄託済みの生物学的材料のサンプルの供与を許可する旨を請求し、出願人は、国際出願の公表のための規則上の準備が完了する前に、書面によりその旨を国際事務局に告知しなければならない。

【0864】

(ノルウェー)

出願人はここにおいて、出願が(ノルウェー特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにノルウェー特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、ノルウェー特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりノルウェー特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、ノルウェー特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

10

【0865】

(オーストラリア)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は、特許の付与前において、あるいは出願の放棄(lapsing)、拒絶あるいは取り下げ前において、発明に対し利害関係を有さない当業者である対象者(skilled addressee)に対してのみ行われる旨を、告知するものである(オーストラリア国特許法第3.25(3)号規定)。

20

【0866】

(フィンランド)

出願人はここにおいて、出願が(特許および統制委員会(National Board of Patents and Regulations)により)公開に付されるかあるいは公開を経ずに国立特許および法規委員会による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。

A T C C 寄託番号 7 5 6 9 8

(英国)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は専門家に対してのみ利用可能にされる旨を、請求する。この旨の請求は、出願の国際公表のための規則上の準備が完了する前に、出願人により国際事務局に対してなされなければならない。

30

【0867】

(デンマーク)

出願人はここにおいて、出願が(デンマーク特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにデンマーク特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、デンマーク特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりデンマーク特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、デンマーク特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

40

【0868】

(スウェーデン)

出願人はここにおいて、出願が(スウェーデン特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにスウェーデン特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、優先日から16ヶ月が経過するよりも前に、出願人により国際事務局に対してなされるものとする(好ましくはPCT Applicant's GuideのVolume Iのannex Zに記載された書式PCT/RO/134による)。そのような請求が出願人によりなされた

50

場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、スウェーデン特許庁により作成された公認専門家のリスト (list of recognized experts) に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【0869】

(オランダ)

出願人はここにおいて、オランダ特許の発行日まで、あるいは出願が拒絶、取り下げあるいは放棄 (lapsed) される日までは、特許法 31 F (1) の規定に基づき、微生物は専門家へのサンプル供与の形でのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、オランダ王国特許法の第 22 C 条または第 25 条に基づき出願が公に利用可能にされる日のうちいずれか早い方の日付よりも前に、出願人によりオランダ工業所有権局に対して提出されるものとする。

【0870】

【表7】

寄託された微生物に関する表示  
(PCT規則13規則の2)

A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

143 頁、 表2、

B. 寄託物の表示  その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。

寄託機関の名称

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

10

寄託機関の住所 (郵便番号および国を含む)

アメリカ合衆国

バージニア 20110-2209、マナサス

ユニバーシティ ブールバード 10801

寄託日

2002年2月21日

受託番号

PTA-4095

C. 追加の表示 (なければ空白のまま)  この情報は追付の用紙に続く

20

D. 表示がなされた指定締結国 (全ての指定締結国に対する表示ではない場合)

ヨーロッパ

欧州特許が求められる指定機関に関して、寄託された微生物の試料は、欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる日までは、試料の請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能となされる。(EPC規則28(4))

追付の用紙に続く

30

E. 別に添付する表示物 (なければ空白のまま)

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する(表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定)

受理官庁記入欄

国際事務局記入欄

この用紙は国際出願とともに受理された

この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された

認定官

認定官

40

PCT/RO/134様式 (2001年1月)

A T C C 寄託番号 P T A - 4 0 9 5

(カナダ)

出願人は、出願に基づきカナダ国特許が発行されるか、あるいは同出願が拒絶または放棄されて回復され得なくなるかもしくは取り下げられるまでは、特許庁長官 (Commissioner of Patents) が、長官により指名された独立の専門家に対し

50

てのみ出願中で言及された寄託済みの生物学的材料のサンプルの供与を許可する旨を請求し、出願人は、国際出願の公表のための規則上の準備が完了する前に、書面によりその旨を国際事務局に告知しなければならない。

【0871】

(ノルウェー)

出願人はここにおいて、出願が(ノルウェー特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにノルウェー特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、ノルウェー特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりノルウェー特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、ノルウェー特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

10

【0872】

(オーストラリア)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は、特許の付与前において、あるいは出願の放棄(lapsing)、拒絶あるいは取り下げ前において、発明に対し利害関係を有さない当業者である対象者(skilled addressee)に対してのみ行われる旨を、告知するものである(オーストラリア国特許法第3.25(3)号規定)。

20

【0873】

(フィンランド)

出願人はここにおいて、出願が(特許および統制委員会(National Board of Patents and Regulations)により)公開に付されるかあるいは公開を経ずに国立特許および法規委員会による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。

A T C C 寄託番号 P T A - 4 0 9 5

(英国)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は専門家に対してのみ利用可能にされる旨を、請求する。この旨の請求は、出願の国際公表のための規則上の準備が完了する前に、出願人により国際事務局に対してなされなければならない。

30

【0874】

(デンマーク)

出願人はここにおいて、出願が(デンマーク特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにデンマーク特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、デンマーク特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりデンマーク特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、デンマーク特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

40

【0875】

(スウェーデン)

出願人はここにおいて、出願が(スウェーデン特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにスウェーデン特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、優先日から16ヶ月が経過するよりも前に、出願人により国際事務局に対してなされるものとする(好ましくはPCT Applicant's GuideのVolume Iのannex Zに記載された書式PCT/RO/134による)。そのような請求が出願人によりなされた

50

場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、スウェーデン特許庁により作成された公認専門家のリスト (list of recognized experts) に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【 0 8 7 6 】

(オランダ)

出願人はここにおいて、オランダ特許の発行日まで、あるいは出願が拒絶、取り下げあるいは放棄 (lapsed) される日までは、特許法 3 1 F ( 1 ) の規定に基づき、微生物は専門家へのサンプル供与の形でのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、オランダ王国特許法の第 2 2 C 条または第 2 5 条に基づき出願が公に利用可能にされる日のうちいずれか早い方の日付よりも前に、出願人によりオランダ工業所有権局に対して提出されるものとする。

【 0 8 7 7 】

【表 8】

寄託された微生物に関する表示  
(PCT規則13規則の2)

A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

143 頁、 表 2

B. 寄託物の表示  その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。

寄託機関の名称

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

10

寄託機関の住所 (郵便番号および国を含む)

アメリカ合衆国

バージニア 20110-2209、マナサス

ユニバーシティ ブールバード 10801

寄託日

2002年3月25日

受託番号

PTA-4179

C. 追加の表示 (なければ空白のまま)  この情報は追付の用紙に続く

20

D. 表示がなされた指定締結国 (全ての指定締結国に対する表示ではない場合)

ヨーロッパ

欧州特許が求められる指定機関に関して、寄託された微生物の試料は、欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる日までは、試料の請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能となされる。(EPC規則28(4))

追付の用紙に続く

30

E. 別に添付する表示物 (なければ空白のまま)

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する(表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定)

受理官庁記入欄

国際事務局記入欄

この用紙は国際出願とともに受理された

この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された

認定官

認定官

40

PCT/R0/134様式 (2001年1月)

A T C C 寄託番号 P T A - 4 1 7 9

(カナダ)

出願人は、出願に基づきカナダ国特許が発行されるか、あるいは同出願が拒絶または放棄されて回復され得なくなるかもしくは取り下げられるまでは、特許庁長官 (Commissioner of Patents) が、長官により指名された独立の専門家に対し

50



てのみ出願中で言及された寄託済みの生物学的材料のサンプルの供与を許可する旨を請求し、出願人は、国際出願の公表のための規則上の準備が完了する前に、書面によりその旨を国際事務局に告知しなければならない。

【0878】

(ノルウェー)

出願人はここにおいて、出願が(ノルウェー特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにノルウェー特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、ノルウェー特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりノルウェー特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、ノルウェー特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

10

【0879】

(オーストラリア)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は、特許の付与前において、あるいは出願の放棄(lapsing)、拒絶あるいは取り下げ前において、発明に対し利害関係を有さない当業者である対象者(skilled addressee)に対してのみ行われる旨を、告知するものである(オーストラリア国特許法第3.25(3)号規定)。

20

【0880】

(フィンランド)

出願人はここにおいて、出願が(特許および統制委員会(National Board of Patents and Regulations)により)公開に付されるかあるいは公開を経ずに国立特許および法規委員会による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。

A T C C 寄託番号 P T A - 4 1 7 9

(英国)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は専門家に対してのみ利用可能にされる旨を、請求する。この旨の請求は、出願の国際公表のための規則上の準備が完了する前に、出願人により国際事務局に対してなされなければならない。

30

【0881】

(デンマーク)

出願人はここにおいて、出願が(デンマーク特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにデンマーク特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、デンマーク特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりデンマーク特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、デンマーク特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

40

【0882】

(スウェーデン)

出願人はここにおいて、出願が(スウェーデン特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにスウェーデン特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、優先日から16ヶ月が経過するよりも前に、出願人により国際事務局に対してなされるものとする(好ましくはPCT Applicant's GuideのVolume Iのannex Zに記載された書式PCT/RO/134による)。そのような請求が出願人によりなされた

50

場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、スウェーデン特許庁により作成された公認専門家のリスト (list of recognized experts) に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【 0 8 8 3 】

(オランダ)

出願人はここにおいて、オランダ特許の発行日まで、あるいは出願が拒絶、取り下げあるいは放棄 (lapsed) される日までは、特許法 3 1 F ( 1 ) の規定に基づき、微生物は専門家へのサンプル供与の形でのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、オランダ王国特許法の第 2 2 C 条または第 2 5 条に基づき出願が公に利用可能にされる日のうちいずれか早い方の日付よりも前に、出願人によりオランダ工業所有権局に対して提出されるものとする。

【 0 8 8 4 】

【表 9】

寄託された微生物に関する表示  
(PCT規則13規則の2)

A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

143 頁、 表 2

B. 寄託物の表示  その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。

寄託機関の名称

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

10

寄託機関の住所 (郵便番号および国を含む)

アメリカ合衆国

バージニア 20110-2209、マナサス

ユニバーシティ ブールバード 10801

寄託日

2002年2月21日

受託番号

PTA-4096

C. 追加の表示 (なければ空白のまま)  この情報は追付の用紙に続く

20

D. 表示がなされた指定締結国 (全ての指定締結国に対する表示ではない場合)

ヨーロッパ

欧州特許が求められる指定機関に関して、寄託された微生物の試料は、欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる日までは、試料の請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能となされる。(EPC規則28(4))

追付の用紙に続く

30

E. 別に添付する表示物 (なければ空白のまま)

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する(表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定)

受理官庁記入欄

国際事務局記入欄

この用紙は国際出願とともに受理された

この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された

認定官

認定官

40

PCT/R0/134様式 (2001年1月)

A T C C 寄託番号 P T A - 4 0 9 6

(カナダ)

出願人は、出願に基づきカナダ国特許が発行されるか、あるいは同出願が拒絶または放棄されて回復され得なくなるかもしくは取り下げられるまでは、特許庁長官 (Commissioner of Patents) が、長官により指名された独立の専門家に対し

50

てのみ出願中で言及された寄託済みの生物学的材料のサンプルの供与を許可する旨を請求し、出願人は、国際出願の公表のための規則上の準備が完了する前に、書面によりその旨を国際事務局に告知しなければならない。

【0885】

(ノルウェー)

出願人はここにおいて、出願が(ノルウェー特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにノルウェー特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、ノルウェー特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりノルウェー特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、ノルウェー特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

10

【0886】

(オーストラリア)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は、特許の付与前において、あるいは出願の放棄(lapsing)、拒絶あるいは取り下げ前において、発明に対し利害関係を有さない当業者である対象者(skilled addressee)に対してのみ行われる旨を、告知するものである(オーストラリア国特許法第3.25(3)号規定)。

20

【0887】

(フィンランド)

出願人はここにおいて、出願が(特許および統制委員会(National Board of Patents and Regulations)により)公開に付されるかあるいは公開を経ずに国立特許および法規委員会による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。

A T C C 寄託番号 P T A - 4 0 9 6

(英国)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は専門家に対してのみ利用可能にされる旨を、請求する。この旨の請求は、出願の国際公表のための規則上の準備が完了する前に、出願人により国際事務局に対してなされなければならない。

30

【0888】

(デンマーク)

出願人はここにおいて、出願が(デンマーク特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにデンマーク特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、デンマーク特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりデンマーク特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、デンマーク特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

40

【0889】

(スウェーデン)

出願人はここにおいて、出願が(スウェーデン特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにスウェーデン特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、優先日から16ヶ月が経過するよりも前に、出願人により国際事務局に対してなされるものとする(好ましくはPCT Applicant's GuideのVolume Iのannex Zに記載された書式PCT/RO/134による)。そのような請求が出願人によりなされた

50

場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、スウェーデン特許庁により作成された公認専門家のリスト (list of recognized experts) に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【0890】

(オランダ)

出願人はここにおいて、オランダ特許の発行日まで、あるいは出願が拒絶、取り下げあるいは放棄 (lapsed) される日までは、特許法 31 F (1) の規定に基づき、微生物は専門家へのサンプル供与の形でのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、オランダ王国特許法の第 22 C 条または第 25 条に基づき出願が公に利用可能にされる日のうちいずれか早い方の日付よりも前に、出願人によりオランダ工業所有権局に対して提出されるものとする。

【0891】

【表 1 0】

寄託された微生物に関する表示  
(PCT規則13規則の2)

A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

143 頁、 表 2

B. 寄託物の表示  その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。

寄託機関の名称

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

10

寄託機関の住所 (郵便番号および国を含む)

アメリカ合衆国

バージニア 20110-2209、マナサス

ユニバーシティ ブールバード 10801

寄託日

2002年3月25日

受託番号

PTA-4180

C. 追加の表示 (なければ空白のまま)  この情報は追付の用紙に続く

20

D. 表示がなされた指定締結国 (全ての指定締結国に対する表示ではない場合)

ヨーロッパ

欧州特許が求められる指定機関に関して、寄託された微生物の試料は、欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる日までは、試料の請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能となされる。(EPC規則28(4))

追付の用紙に続く

30

E. 別に添付する表示物 (なければ空白のまま)

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する(表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定)

受理官庁記入欄

国際事務局記入欄

この用紙は国際出願とともに受理された

この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された

認定官

認定官

40

PCT/RO/134様式 (2001年 1月)

A T C C 寄託番号 P T A - 4 1 8 0

(カナダ)

出願人は、出願に基づきカナダ国特許が発行されるか、あるいは同出願が拒絶または放棄されて回復され得なくなるかもしくは取り下げられるまでは、特許庁長官 (Commissioner of Patents) が、長官により指名された独立の専門家に対し

50

てのみ出願中で言及された寄託済みの生物学的材料のサンプルの供与を許可する旨を請求し、出願人は、国際出願の公表のための規則上の準備が完了する前に、書面によりその旨を国際事務局に告知しなければならない。

【0892】

(ノルウェー)

出願人はここにおいて、出願が(ノルウェー特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにノルウェー特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、ノルウェー特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりノルウェー特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、ノルウェー特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

10

【0893】

(オーストラリア)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は、特許の付与前において、あるいは出願の放棄(lapsing)、拒絶あるいは取り下げ前において、発明に対し利害関係を有さない当業者である対象者(skilled addressee)に対してのみ行われる旨を、告知するものである(オーストラリア国特許法第3.25(3)号規定)。

20

【0894】

(フィンランド)

出願人はここにおいて、出願が(特許および統制委員会(National Board of Patents and Regulations)により)公開に付されるかあるいは公開を経ずに国立特許および法規委員会による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。

A T C C 寄託番号 P T A - 4 1 8 0

(英国)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は専門家に対してのみ利用可能にされる旨を、請求する。この旨の請求は、出願の国際公表のための規則上の準備が完了する前に、出願人により国際事務局に対してなされなければならない。

30

【0895】

(デンマーク)

出願人はここにおいて、出願が(デンマーク特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにデンマーク特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、デンマーク特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりデンマーク特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、デンマーク特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

40

【0896】

(スウェーデン)

出願人はここにおいて、出願が(スウェーデン特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにスウェーデン特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、優先日から16ヶ月が経過するよりも前に、出願人により国際事務局に対してなされるものとする(好ましくはPCT Applicant's GuideのVolume Iのannex Zに記載された書式PCT/RO/134による)。そのような請求が出願人によりなされた

50





【 図 1 C 】

FIG. 1Bに対応する

661 TTTACAGACAAGTTCATCCATATTAAGAGTTCCTCCAGCAGCAACACATCCAGATGTC  
 AAATGCTGTTCAGTAAGTAATATCTGCAGGGACAGGTGGTGGATGGTGTACAG  
 Y R Q V H S I R S L P A T L P Q C Q  
 720  
 721 AGGCAGCAACAAGACCTGCCCCCAATTAATGTGGATTAATCAATTCAGATGCC  
 TCCGTCGTTCAGTGGAGGGGTAAATGTACACCTTAATAGTGTAGAGCTACGG  
 A A N K T C P T N Y M W N N H I C R C L  
 780  
 781 TGCCATGAGAAATTTTATGTTTTCTCCGGATGCTGGAGATGACTCAACAGATGATTC  
 ACCGATGCTTTCTAAAATACAAAGGACCTACGACCTTCTACTGAGTTGTTACTAAGG  
 A Q E D F M F S S D A G D D S T D G F H  
 841 ATGACATCTGGACCACACAGGACCTGGATGAGAGACCTGTCAGTGTGTCAGAG  
 TACTGTAGACACCTGCTGTTCCTCGACCTACTCTCTGGACACTGACACACAGAGTCTC  
 D I C G P N K E L D E T C Q C V C R A  
 901 CGGGCTTCGGCCTGCCCAGCTGTGGACCCCAAAAGAACTAGACAGAAACTCATGCCAGT  
 GCCCAGAGCCGACCGTGCACACCTGGGGTGGTTTTGTGATCGTCTTGGAGTACGGTCA  
 G L R P A S C G P H K E L D R N S C Q C  
 960

FIG. 1C

FIG. 1Dに対応する

【 図 1 D 】

FIG. 1Cに対応する

961 GTGCTGTAAAACAAAACCTCTCCAGCAATGTGGGCCAACCAGAAATTTGATGAA  
 CACAGACATTTTGTGAGAAAGGCGGTACACCCCGGTCCTTAAAACATCTTT  
 V C K N K L F P S Q C G A N R E F D E N  
 1021 ACACATGCCAGTGTGTATAAAGAACCCTGCCCAGAAATCAACCCCTAAAATCCTGGAA  
 TGTGTACGGTCCACACATACATTTCTGGACGGGTCTTTTGTGGGATTTAGACCTT  
 T C Q C V C K R T C F R N Q P L N P G K  
 1081 AATGTGCTGTGAATGTACAGAAAATCCACAGAAATGCTTTGTTAAAAGGAAAGATTC  
 TTTACAGGACACTTACATGCTTTTCAGGTGCTTTTACGAACAATTTCTTTTCAAGG  
 C A C E C T E S P Q K C L L K G K K F H  
 1141 ACCACAACATGCAGTGTTCAGAGGCAATGTACGAACCCAGCCAGGCTTTGAGC  
 TGGTGGTTTGTACGACAAATGCTGCCGGTACATGCTGGGGTCTTCCGAACCTCG  
 H Q T C S C Y R R P C T N R Q K A C E P  
 1201 CAGGATTTTCAATAGTGAAGAAGTGTGTTGTTCCCTTCATATTTGGCAAGACAC  
 GTCCTAAAAGTATATCACTTCACACACACACAGGAGTATACCTTTTCTGGTGTG  
 G F S Y S E E V C R C V P S Y W O R F Q

FIG. 1D

FIG. 1Eに対応する

【 図 1 E 】

FIG. 1Dに対応する

1320 AAAATGACTAAGATGTACTGTTTCCAGTTCATCGATTTTCTATTTATGGAAAACGTGTG  
 TTTACTCGATTTCAATGACAAAGGTTCAAGTAGTAAAGATAATACCTTTTGACACA  
 M S \*  
 1380 TGCCACATGAGACTGTCTGTAACAGAGACCCCTTGCGGTCCATGCTAAACAAGACA  
 ACGGTGTCACTTTGACAGACACTTGTCTCTGGGAACCCAGGTACGATTTGTTCTGT  
 1440 AAAGTGTCTTCTGAAACCATGTGGATACTTTTACAGAAATGGACTGGAGCTCATCTG  
 TTTTCAGACGAAAGGACTTGGTACACCTATTGAAAATGCTTTACCTGACCCTCGAGTACAG  
 1500 CMAAAGCCTCTTTGTAAGACTGTTTTCTCCCAATGACCAACACCCAGATTTTCTCTC  
 GTTTCCGGAGACATTTCTGACCAAAAGACGGTACTGGTGTCTCGTCTTAAAAGAG  
 1560 TTGTGATTTCTTAAAAGAAATGACTATATAATTTATTTCCACTMAAAAATATTTTCTG  
 RACACTAAGAAATTTTCTTACTGATATATAATAAAGGTGATTTTATAACAAGAGC  
 1620 APTCAATTTTATGACCAACAAATGGTAAACTACTGTAACAATATTTTATATCAT  
 TAAAGTAAAATATCGTTTGTAAACCATTTTGGAGTGACACTAGTTATATAAAAATATATGTA  
 1674 GCAAAATATGTTTAAAATAAAATGAAAATTTGTAATTAATAAAAATAAAATAAAAA  
 CGTTTATACAAAATTTTATTTTACTTTTAAACATATAATTTTATTTTATTTTATTTT

FIG. 1E

【 図 2 A 】

FIG. 2Bに対応する

1 CGAGGCCAGGCTTATGCACCAAGTCTGGAGGACAGTTAGGTCGTGTCCAGTGT  
 61 AGATGAACCTACTACTACCCAGAAATTTGGAAAATGTACAAGTGTGACTAAG  
 M T V L Y P E Y W K M Y K C Q L R  
 121 GAAGGAGGCTGGCAACATPACAGAGAACAGGCCAACCTCACTCAAGGAGAGAGAC  
 K G G W Q H N R E Q A N L N S R T E E T  
 181 TATAAAAATTTCTGCAGCACATTAATPACAGAGACTTTGAAAAGTATTGATATGAGTG  
 I K F A A A H Y N T E I L K S I D N E W  
 241 GAGAAAGACTCAATGATGTCAGGAGGCTGTATAGATGTTGGGAAGGATTTGGAGT  
 R K T Q C M P R E V C I D V G K E F G V  
 301 CGCGACAACACCTTTTAAACCTCCATGTTGTCGGTCTACAGATGTTGGGGTTGCTG  
 A T N T F F K P P C V S V Y R C G G C C

FIG. 2A

FIG. 2Bに対応する

【 2 B 】

FIG.2Aに対応する

421 TGAATPACAGTCCCTCTCTCAAGGCCCAACCCAGTACATCAATCAAGTTTGGCAATCA  
 E I T V P L S Q G P K P V T I S F A N H

481 CACTTCCGGCATGCAIGCTAAACTGGAGTGTTCAGAGACAAGTTCATTCGATTTATTAG  
 T S C R C M S K L D V Y R Q V H S I I R

541 ACCTTCCCTGCCAGCAACATCCACAGTCTCAGGCAGCAAGAAAGACTGGCCCCACCAA  
 R S L P A T L P Q C Q A A N K T C P T N

601 TTACATGGAAATACATCTGCAGATGCCGCTCAGGAAGATTTATGTTTTCTC  
 Y M W N N H I C R C L A Q E D F M F S S

661 GGATGCTGGAGTACTCAACAGATGGATTCCATGACATCTGTGACCAACACAGGAGCT  
 D A G D D S T D G F H D I C G P N K E L

721 GGATGAGAGACCTGTCACTGCTGTGTGAGAGGGGGCTTCGGCTCCAGAGCTGTGGACC  
 D E E T C Q C V C R A G L R P A S C G P

FIG.2Cに対応する

FIG. 2B

【 2 C 】

FIG.2Bに対応する

781 CCACAAAGAACTAGACAGAAACTGCGCAGTGTGTCTGTAATAAACAACCTTCCCCAG  
 H K E L D R N S C Q C V C K N K L F P S

841 CCAATGGGCCCAACCCGAAATTTGATGAAAACACATGCCAGTGTGTGTAAGAAGAAC  
 Q C G A N R E F D E N T C Q C V C K R T

901 CTGCCCCAGAAATCAACCCCTAAATCCCTGGAAAATGTCCTGTGATGTACAGAAAGTCC  
 C P R N Q P L N P G K C A C E C T E S P

961 ACAGAAAATGCTTTTAAAGGAAAGAAAGTTCACCAACCAACATGCAGCTGTTACAGACG  
 Q K C L L K G K K F H Q T C S C Y R R

1021 GCCAATGACAAACCCGCAAGAGCTGTGAGCCAGGATTTTCATATAGTGAAGAAGTGTG  
 P C T N R Q K A C E P G F S Y S E E V C

1081 TCGTTGTGTCCTTCATATTGGCAAGAACCCACAAAATGAGACTAGAGATTTGCTGTTTTCCA  
 R C V P S Y W Q R P Q M S \*

FIG.2Dに対応する

FIG. 2C

【 2 D 】

FIG.2Cに対応する

1141 GTTCATCGATTTTCATATTGGAAGAACTGTGTGCCACAGTACAGTCTGTGAAACAGA  
 -----

1201 GAGACCCCTGTGGTCCCAAGCTAACAAGAACAAAAGTCTGTTCCTGAAACATGTGGAA  
 -----

1261 TAACTTTACAGAAATGGACTGGAGCTCACTCTGCAAAAAGGCCCTTTGTAAGAAGCTGGTTTT  
 -----

1321 CTGCCAATGACCAACACAGCAAGATTTCCCTCTGTGTGATTTCTTTAAAGAATGACTATA  
 -----

1381 TAAATTTATTCACTAABAATATTGTTTCGGCAATTCATTTTTATAGCAACAACAATTTGGT  
 -----

1441 AAAACTCACCTGTGATCAATATTTTTATATCATGCAAAAATATGTTTAAATAAATAATGAAAA  
 -----

1501 TTGATATTATPAAAAAATAAAAAAAAAA  
 -----

FIG. 2D

【 3 A 】

1 Pdg1a MRTLACLIL LGCCYLAWL AEEAEIPREV IERLARSOIH SIRDORLLE  
 Pdg1b MNRCWA LFL SLCCYLRLVS AEGDP IPEEL YEMLSDSHSIR SFDDLORLH  
 Veg1 .....MNFLL SWHMSLALL LY.....  
 Veg1? .....MTV LYPEYKMYK CQ.....  
 50

51 Pdg1a IDSVGSEDSL DTSLRAHGVH ATKVPEKRP LPIRRKRSI.....EEAVP  
 Pdg1b GDP.GEEDGA ELDLNMTRSH SGGELES...LARGRRSLG SLTIAEPAMI  
 Veg1 APMAE.....GCGO NHHEVVKFMD .VYOR.....  
 Veg1? REQANLNSRT EETIKFAAAH YNTEILKSID NEWRK.....  
 100

101 Pdg1a AMKTRTVIY EIPRSVDPT SANFLWPPC VEKRTGCC NTSWKKDPS  
 Pdg1b AECKTRIEVF EISRRL IDRT NANFLWPPC VEVORSGCC NNRNVDPT  
 Veg1 SYCHPIETLV DIFOEYDIEI ..EYIFKPSG VPLMRGGCC NDEGLDPT  
 Veg1? TQMPREVCV DWKKEFGVAT ..NITFFKPPC VSYVRCGGCC NSEGLDQNT  
 150

151 Pdg1a RVHRSKVKVA KVEYVRKPK LKEVQVRLEE HLEDM .....AT.....  
 Pdg1b QVOLRQVQRV KIEIVRKKPI FRKATVILEL HLAQI .....ETVAARPVT  
 Veg1 EESNITMQIM RIK PH..OG OHIGEMSFLO HMKCEQPKK DRAREKKS  
 Veg1? STSYLSKTLF EIT.VPLSQG PKPVITISFAN HTSQQASKL DRYRQVHSHI  
 200

FIG. 3A

【 図 3 B 】

```

250
Pdgfra .....TSLMPD YREEDDMR.....RTVRRRPPK GKHRFKHTH DKTALKEITLG
Pdgfb .....RSPGSGEOR AKTPTQRTVI.....KSRYSKWSVY VGARCLMPW SLPGPHP
Vegf  RCK .....GKGRKRK.....KSRYSKWSVY VGARCLMPW SLPGPHP
Vegf2  RRSLPATLPQ COMANKTCTP NMMNNHICR CLAQEDFMFS SDAGDSDTDG
251
Pdgfra .....
Pdgfb  A.....CSE RRHLFYDDP QTCKCSCKNT
Vegf   CGP.....
Vegf2  FHDICPNKE LDIETCCVC RAGLRPASCG PHKEL...DR NSCCCVGRNK
301
Pdgfra .....
Pdgfb  .....DSRCKARO LELNERICRC DKPRR.....
Vegf   LFPSCGANR .EFDENTCOC VGRKTCPRND PLNPGKCAE CTESPOKCLL
Vegf2  .....
351
Pdgfra .....
Pdgfb  .....
Vegf   .....SCYRRPCTNR QKACEPGFST SEEVCRVPS YWRRPQMS
Vegf2  .....
398

```

FIG. 3B

【 図 4 】

各対の遺伝子間のアミノ酸同一性パーセント(%)が以下の表に表される

	PDGF $\alpha$	PDGF $\beta$	VEGF	VEGF-2
PDGF $\alpha$				
PDGF $\beta$	48.0			
VEGF	20.7	22.7		
VEGF-2	28.5	22.4	30.0	

FIG. 4

【 図 5 】

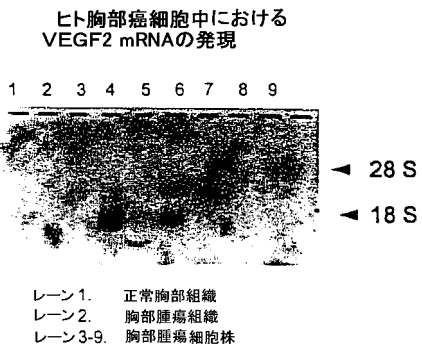


FIG. 5

【 図 6 】

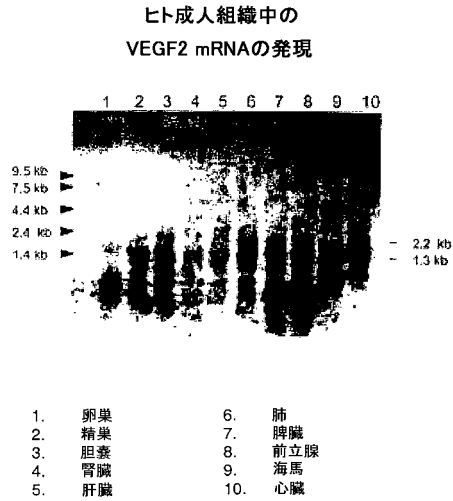


FIG. 6

【 図 7 】

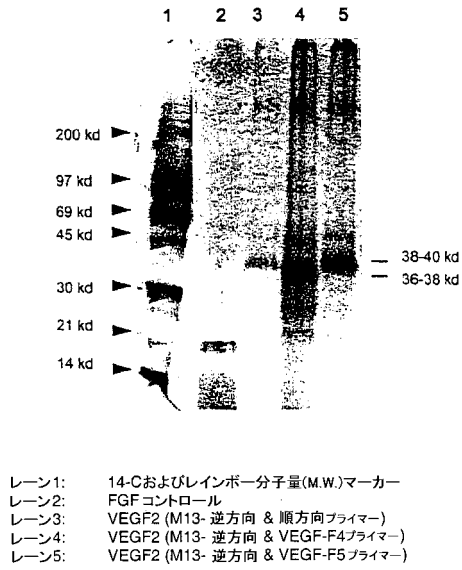


FIG. 7

【 図 8 A 】

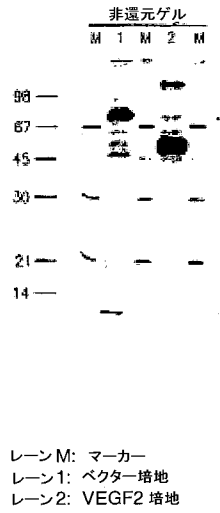


FIG. 8A

【 図 8 B 】

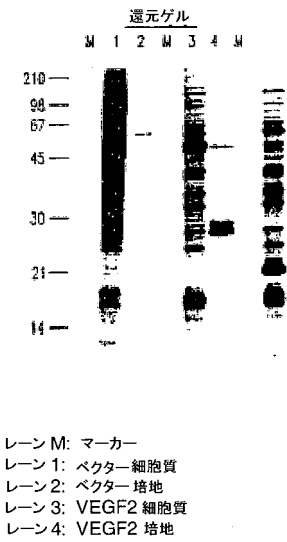


FIG. 8B

【 図 9 】

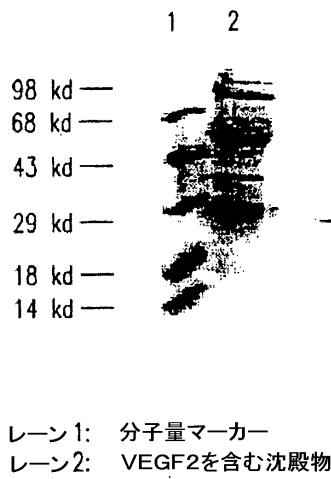


FIG. 9

【 図 1 0 】

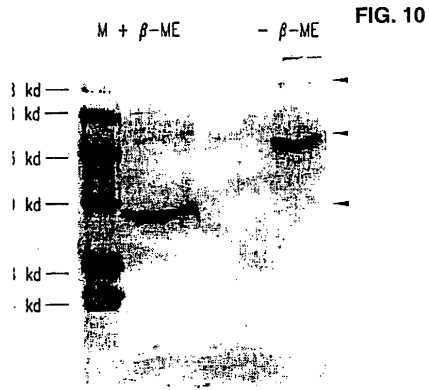


FIG. 10

【 図 1 1 】

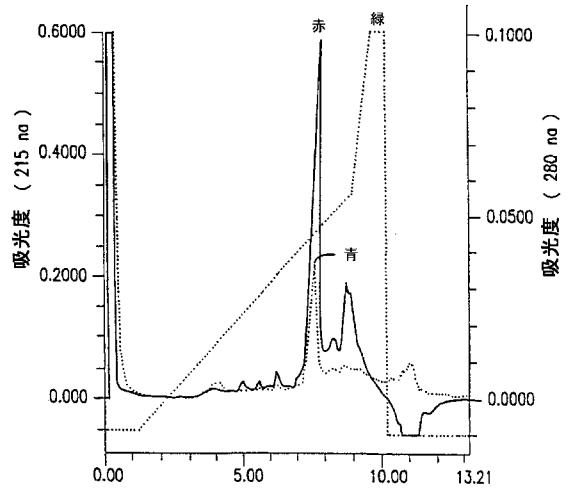


FIG. 11

【 図 1 2 】

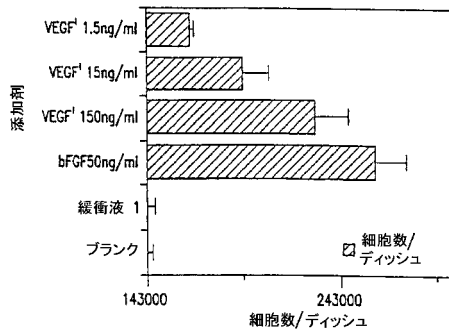


FIG. 12

【 図 1 4 A 】

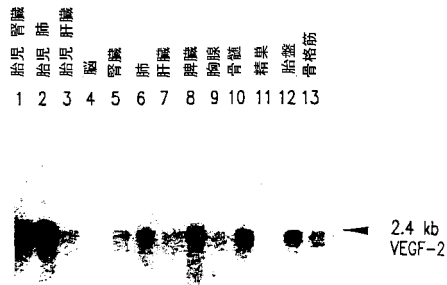


FIG. 14A

【 図 1 3 】

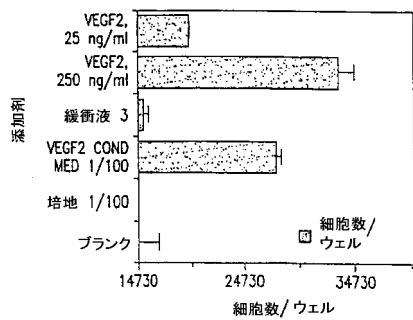


FIG. 13

【 図 1 4 B 】

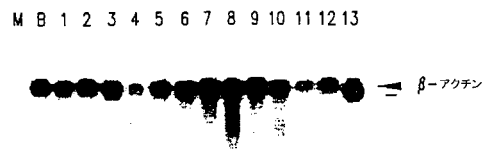
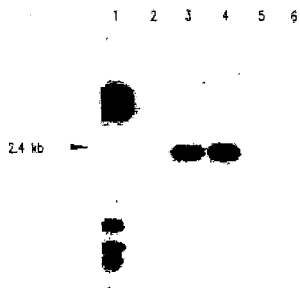


FIG. 14B

【 図 15 】



- 1. 分子量マーカー
- 2. 臍静脈(Umbelical vein)内皮細胞
- 3. 大動脈平滑細胞
- 4. 真皮線維芽細胞

FIG. 15

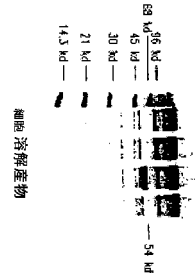
【 図 16 A 】



- 1. 分子量マーカー
- 2. ブランク
- 3. コントロールタンパク質-HA
- 4. VEGF2-HA
- 5. ベクターコントロール

FIG. 16A

【 図 16 B 】



- 1. 分子量マーカー
- 2. ブランク
- 3. コントロールタンパク質-HA
- 4. VEGF2-HA
- 5. ベクターコントロール

FIG. 16B

【 図 17 】

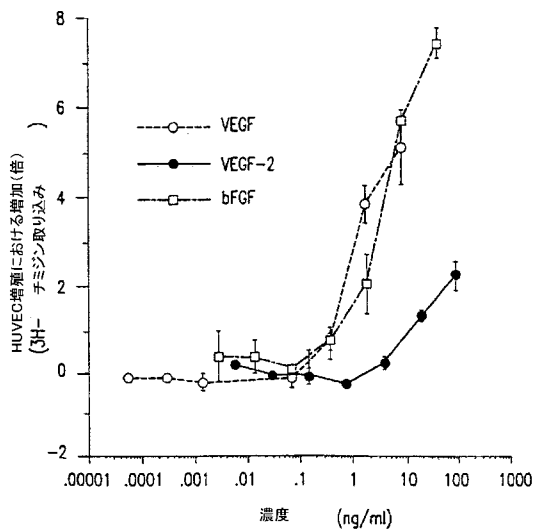


FIG. 17

【 図 18 】

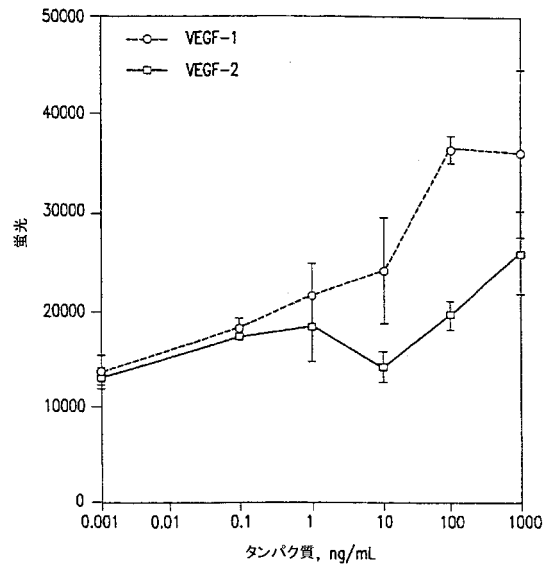


FIG. 18

【 図 19 】

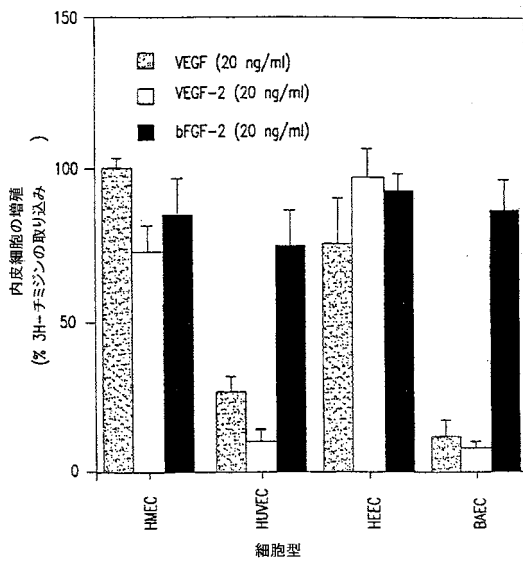


FIG. 19

【 図 20 A 】

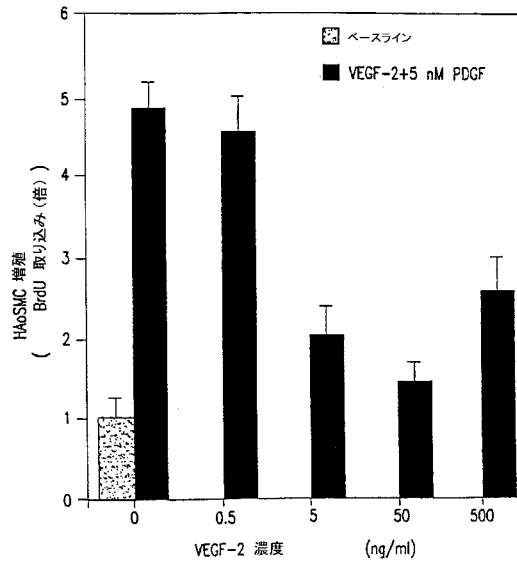


FIG. 20A

【 図 20 B 】

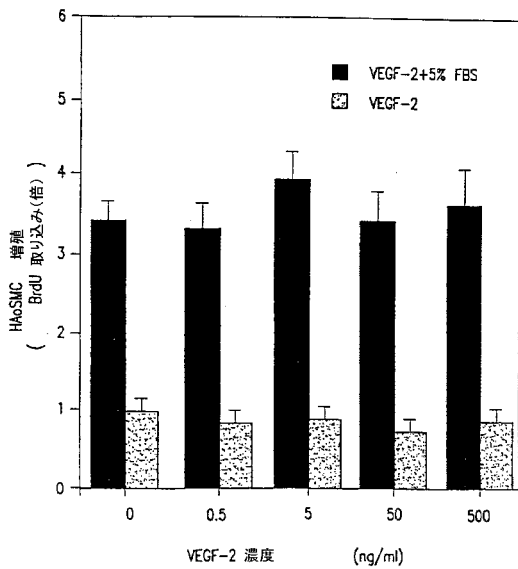


FIG. 20B

【 図 21 A 】

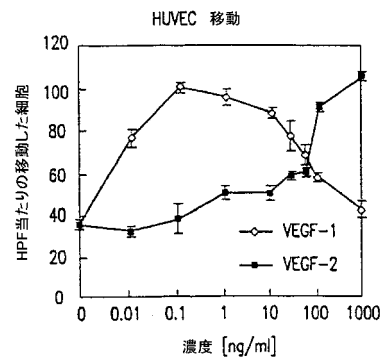


FIG. 21A

【 図 21 B 】

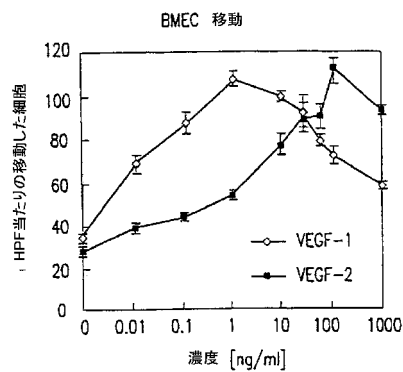


FIG. 21B

【 図 2 2 】

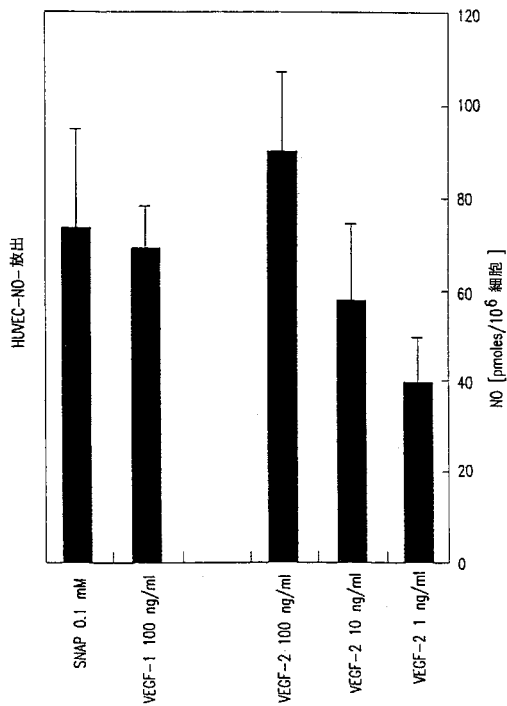


FIG. 22

【 図 2 3 】

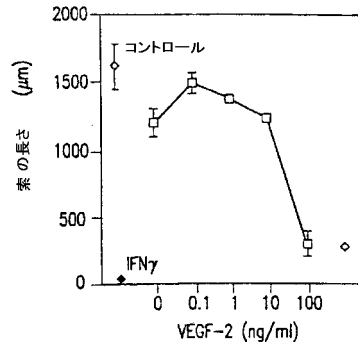


FIG. 23

【 図 2 4 】

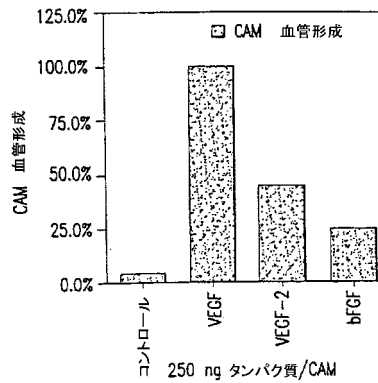


FIG. 24

【 図 2 5 A 】

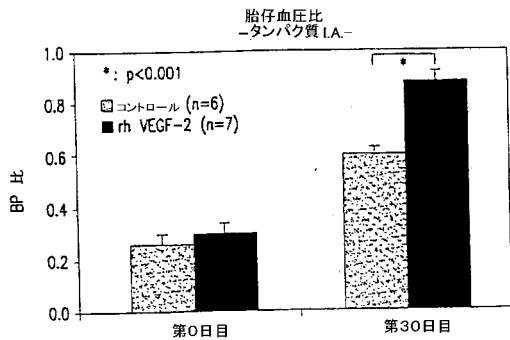


FIG. 25A

【 図 2 5 C 】

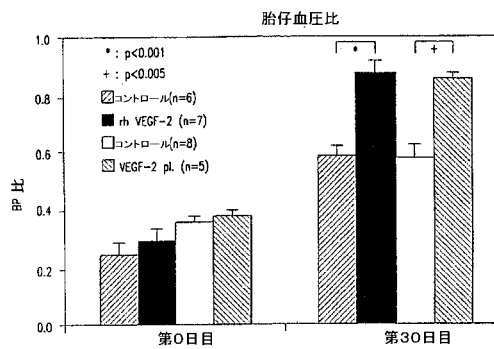


FIG. 25C

【 図 2 5 B 】

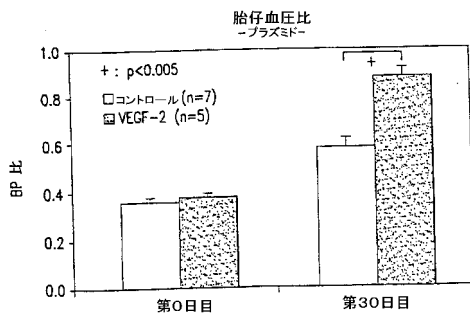


FIG. 25B

【 図 2 5 D 】

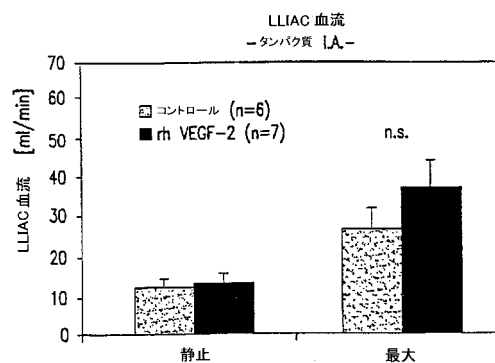
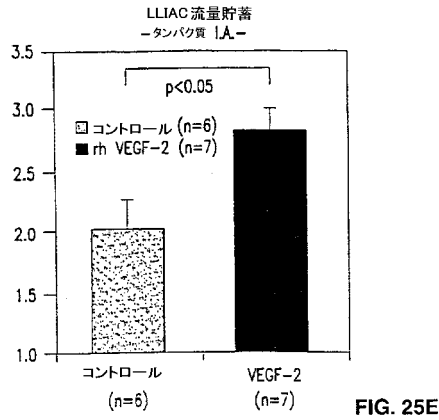


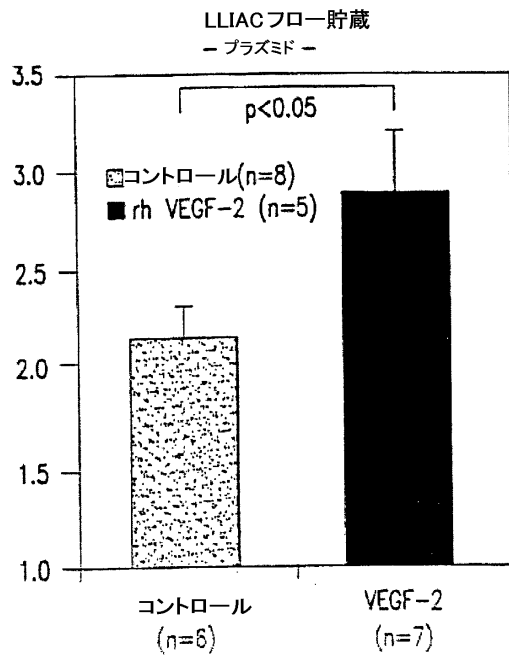
FIG. 25D



【 図 2 5 E 】



【 図 2 5 G 】



【 図 2 5 F 】

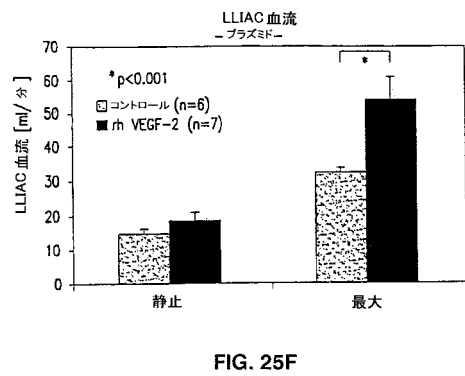
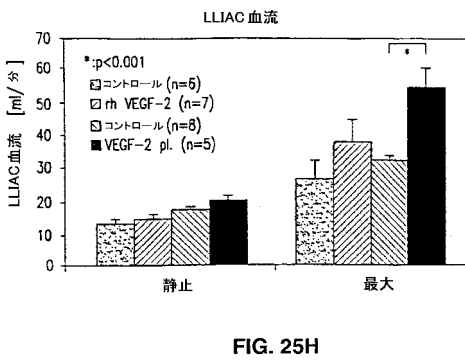
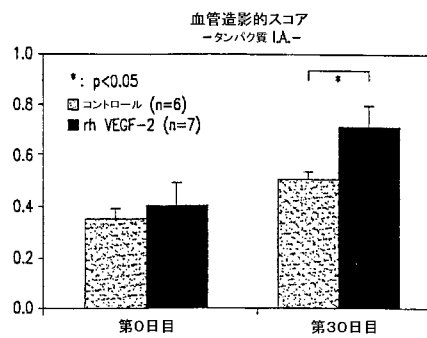


FIG. 25G

【 図 2 5 H 】



【 図 2 5 J 】



【 図 2 5 I 】

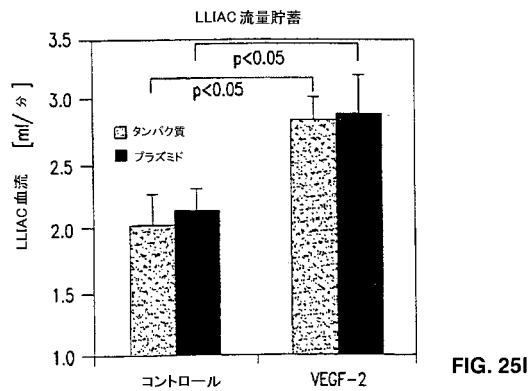
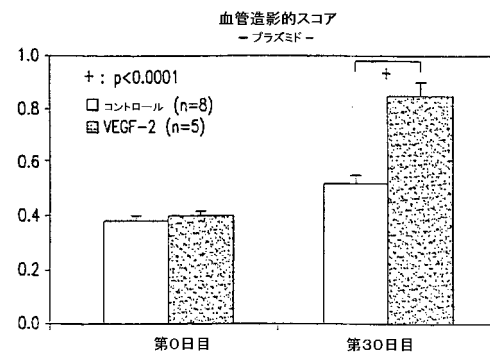


FIG. 25J

【 図 2 5 K 】



【 図 2 5 L 】

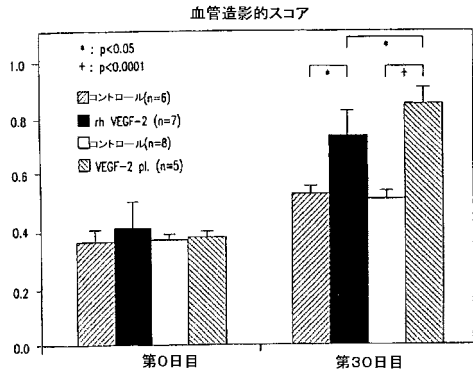


FIG. 25L

【 図 2 5 M 】

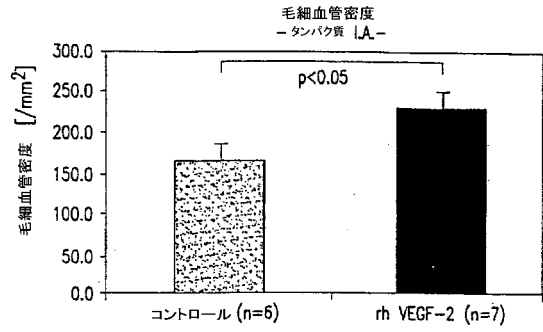


FIG. 25M

【 図 2 5 N 】

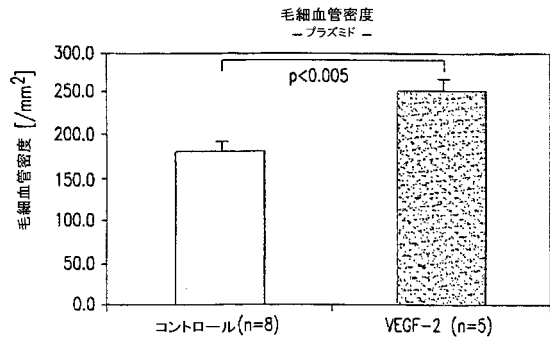


FIG. 25N

【 図 2 5 O 】

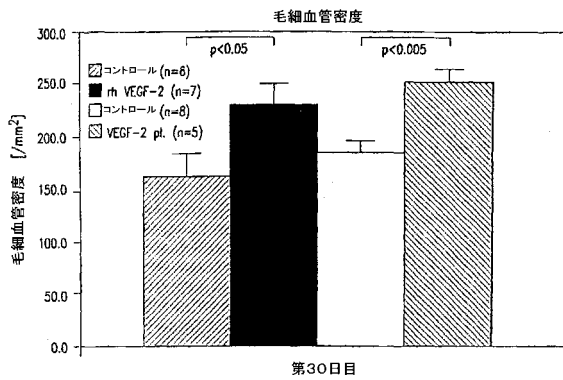


FIG. 25O

【 図 2 6 A 】

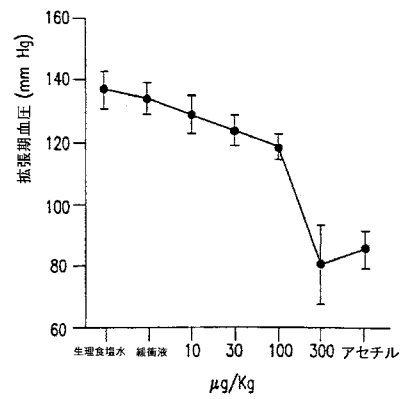


FIG. 26A

【 図 2 6 B 】

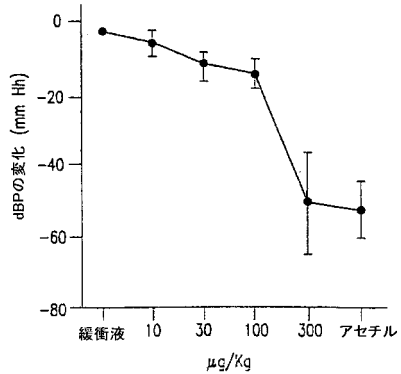


FIG. 26B

【 図 2 6 C 】

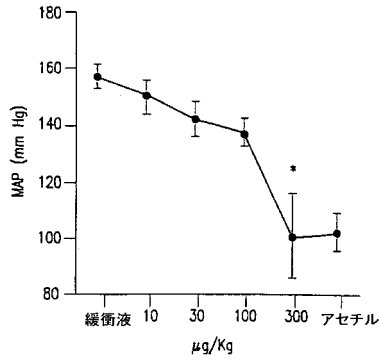


FIG. 26C

【 図 2 6 E 】

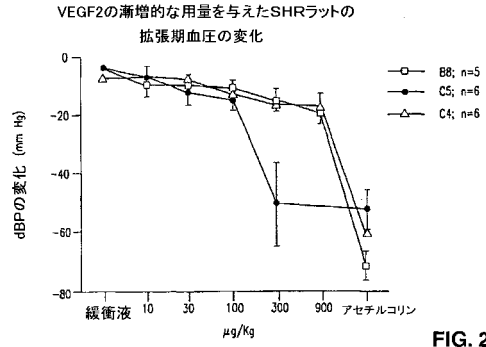


FIG. 26E

【 図 2 6 D 】

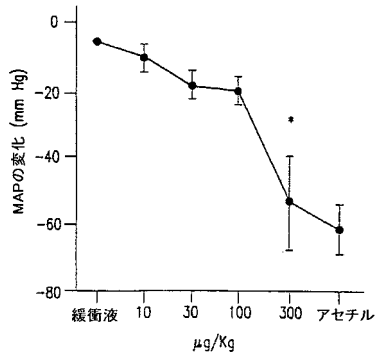


FIG. 26D

【 図 2 6 F 】

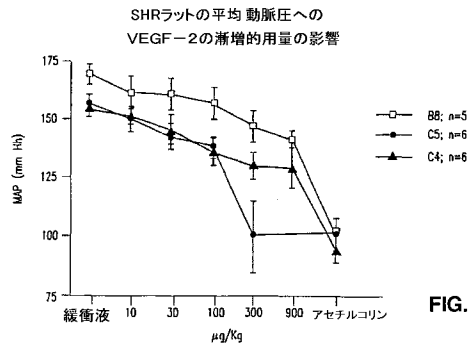


FIG. 26F

【 図 2 6 G 】

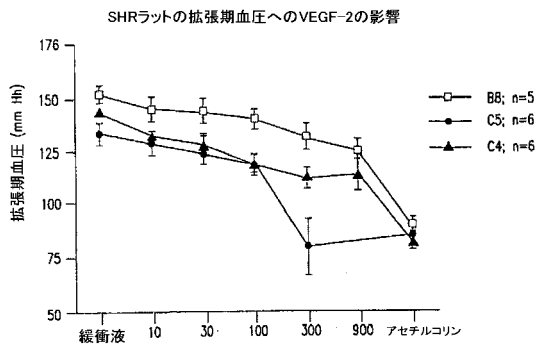


FIG. 26G

【 図 2 7 】

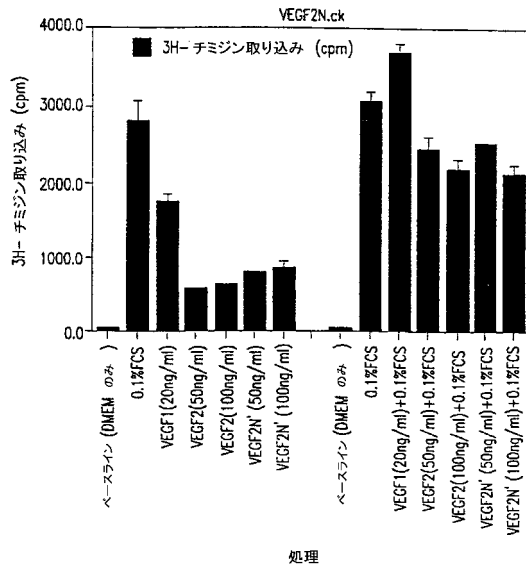


FIG. 27

【 図 28 】

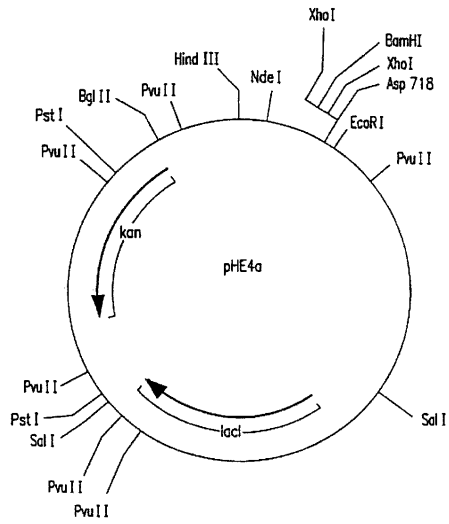


FIG. 28

【 図 29 】

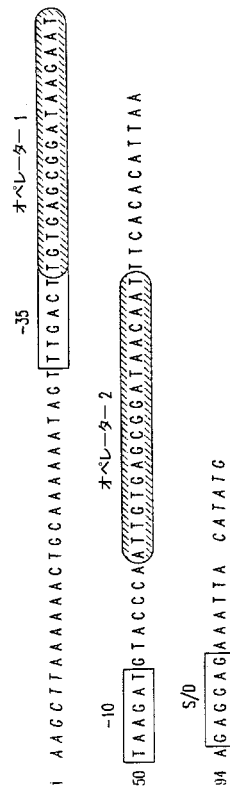


FIG. 29

【 図 30 A 】

Nuceマウスにおける  
MDA-MB-231ヒト胸部癌細胞増殖への  
α VEGF-2の影響

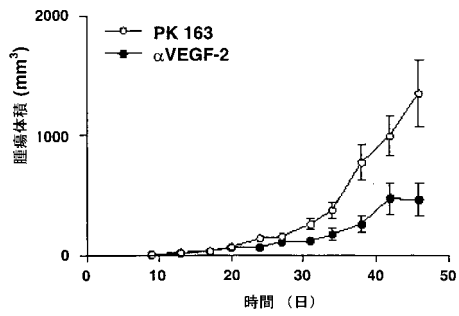


FIG. 30A

【 図 30 B 】

第42日 PC-3 腫瘍体積

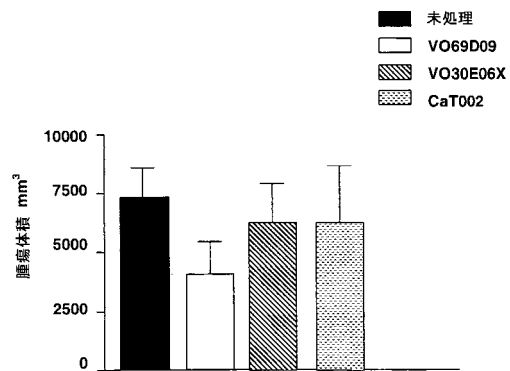


FIG. 30B

【 図 3 0 C 】

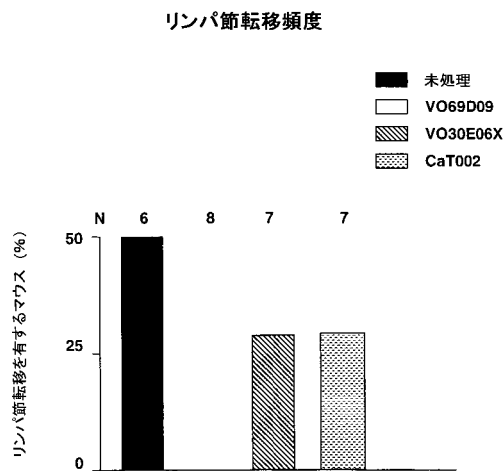


FIG. 30C

【 図 3 0 D 】

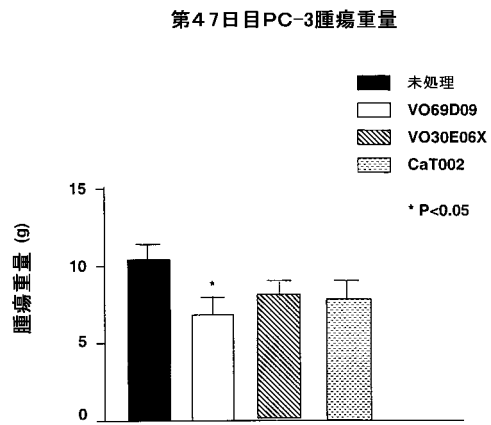


FIG. 30D

【 図 3 0 E 】

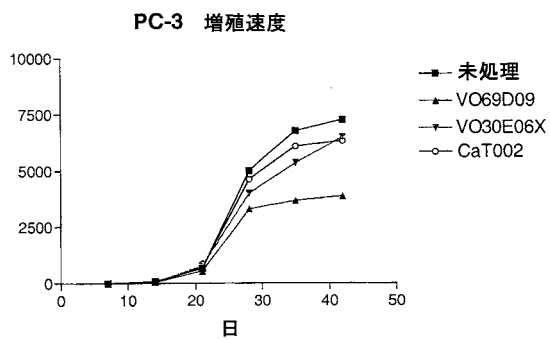


FIG. 30E

【 図 3 0 F 】

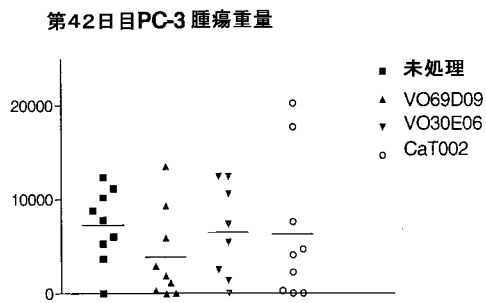


FIG. 30F

**【配列表】**

0005132008000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K	16/24 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/24
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/06
A 6 1 P	31/00 (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	31/00
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	A 6 1 P	35/04
		A 6 1 P	37/02
		G 0 1 N	33/574 A

微生物の受託番号 ATCC 75698  
 微生物の受託番号 ATCC PTA-4095  
 微生物の受託番号 ATCC PTA-4096  
 微生物の受託番号 ATCC PTA-4179  
 微生物の受託番号 ATCC PTA-4180

## 早期審査対象出願

- (72)発明者 クレイグ エイ． ローゼン  
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 8 2 , レイトンズビル, ローリング ヒル レイン  
 2 2 4 0 0
- (72)発明者 ビビアン アール． アルベルト  
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 5 0 , ロックビル, ミルズ ファーム ロード 1 3  
 7 1 0
- (72)発明者 スチープン エム． ルーベン  
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 3 3 , ブルックビル, パイライト レイン 1 9 4 2  
 0
- (72)発明者 ルース イー． ウェガー  
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 5 5 , ロックビル, ゴールド リング テラス 7 3  
 0 9

審査官 三原 健治

- (56)参考文献 特表2004-536579(JP,A)  
 国際公開第99/046364(WO,A1)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 6 / 4 6  
 C 1 2 N 1 5 / 0 9  
 GenBank/EMBL/DDBJ/UniProt/GeneSeq  
 PubMed

专利名称(译)	血管内皮生长因子2		
公开(公告)号	<a href="#">JP5132008B2</a>	公开(公告)日	2013-01-30
申请号	JP2012058538	申请日	2012-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	人类基因科学公司		
申请(专利权)人(译)	人类Jinomu科学公司		
当前申请(专利权)人(译)	人类Jinomu科学公司		
[标]发明人	クレイグエイローゼン ビビアンアールアルベルト スチーブンエムルーベン ルースイーウェガー		
发明人	クレイグ エイ. ローゼン ビビアン アール. アルベルト スチーブン エム. ルーベン ルース イー. ウェガー		
IPC分类号	A61K39/395 A61P27/02 A61P43/00 C12N15/09 C12P21/08 C07K16/24 C07K16/46 A61P17/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 G01N33/574 G01N33/53 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P3/10 A61P9/00 A61P13/08 A61P15/00 A61P19/00 A61P31/18 A61P37/04 C07K14/52 C07K16/18 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10		
CPC分类号	A01K2217/05 A01K2217/075 A61K38/00 A61K48/00 A61K2039/505 A61P1/00 A61P3/02 A61P13/08 A61P15/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P27/02 A61P27/06 A61P29/00 A61P31/00 C07K14/52 C07K16/24 C07K2317/21 C07K2317/622 C12N2799/026 G01N33/574 G01N33/74 Y02A50/41 Y02A50/422 Y10S435/81 C07K16/22		
FI分类号	A61K39/395.N A61K39/395.D A61P27/02 A61P43/00.105 C12N15/00.ZNA.A C12P21/08 C07K16/24 C07K16/46 A61P17/06 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 G01N33/574.A C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/06.100 C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/BA56 4B024/CA02 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC22 4C085/CC23 4H045/AA11 4H045/BA09 4H045/CA42 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA23 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
审查员(译)	三原贤治		
优先权	60/283385 2001-04-13 US 60/350366 2002-01-24 US		
其他公开文献	JP2012165745A JP2012165745A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			



要解决的问题：提供新的血管内皮生长因子。溶解：公开了人VEGF-2抗体，人VEGF-2抗体片段或其变体。还提供了产生这种抗体的方法。还提供了用于预防，治疗或改善疾病或病症的方法和组合物，并且该方法包括给动物（优选人）施用有效量的一种或多种VEGF-2抗体或VEGF-2抗体片段的步骤。或其变体。在一个实施方案中，第一抗体是单克隆抗体。

芳香族	フェニルアラニン トリプトファン チロシン
疎水性	ロイシン イソロイシン バリン
極性	グルタミン アスパラギン
塩基性	アルギニン リジン ヒスチジン
酸性	アスパラギン酸 グルタミン酸
小型	アラニン セリン スレオニン メチオニン グリシン