

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-1292

(P2010-1292A)

(43) 公開日 平成22年1月7日(2010.1.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	

審査請求 有 請求項の数 14 O L 外国語出願 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-160434 (P2009-160434)	(71) 出願人	596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・9408 0-4990・サウス・サン・フランシス コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(22) 出願日	平成21年7月7日(2009.7.7)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(62) 分割の表示	特願2000-536860 (P2000-536860) の分割	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
原出願日	平成11年3月10日(1999.3.10)	(72) 発明者	ナポレオン・フェラーラ アメリカ合衆国94109カリフォルニア 州サンフランシスコ, パシフィック・ア ベニュー・ナンバー706, 2090番
(31) 優先権主張番号	09/040, 220		
(32) 優先日	平成10年3月17日(1998.3.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	09/184, 216		
(32) 優先日	平成10年11月2日(1998.11.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 VEGFおよびBMP 1に相同なポリペプチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 癌細胞の増殖を阻害又は予防する方法を提供する。

【解決手段】 血管内皮性増殖因子(VEGF)と骨形態形成タンパク質1に関連する新規のポリペプチドである血管内皮性増殖因子-E(VEGF-E)のアンタゴニストを第二薬剤と組み合わせて投与する。第二薬剤は、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞障害剤、血管新生抑制剤、放射線療法に用いられる薬剤、抗VEGF抗体、FGFアンタゴニスト、PDGFアンタゴニスト、又はErbb2、EGFR、Erbb3、Erbb4又はVEGFレセプターに結合する抗体である。また、さらに第三の治療剤として、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞障害剤、血管新生抑制剤、放射線療法に用いられる薬剤、抗VEGF抗体、FGFアンタゴニスト、PDGFアンタゴニスト、又はErbb2、EGFR、Erbb3

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物の癌細胞の増殖を阻害又は予防する方法であって、有効量の V E G F - E アンタゴニストを、有効量の第二薬剤と組み合わせて哺乳動物に投与し、

このとき組み合わせた投与により癌細胞の増殖が阻害又は予防される、方法。

【請求項 2】

癌細胞の増殖が腫瘍増殖と関係している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

哺乳動物がヒトである、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

哺乳動物には、腫瘍についての治療が行われている腫瘍保持患者であり、該患者は該治療から更なる有益な効果を得ていない患者が含まれる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

第二薬剤が、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞障害剤、血管新生抑制剤、放射線療法に用いられる薬剤、抗 V E G F 抗体、F G F アンタゴニスト、P D G F アンタゴニスト、又は E r b B 2、E G F R、E r b B 3、E r b B 4 又は V E G F レセプターに結合する抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

第二薬剤が血管新生抑制剤である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 7】

血管新生抑制剤が抗 V E G F 抗体である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

V E G F - E アンタゴニストには抗 V E G F - E 抗体が含まれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

抗体がヒト化抗体である、請求項 7 又は 8 に記載の方法。

【請求項 10】

第三の治療剤を投与することがさらに含まれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

第三の治療剤が、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞障害剤、血管新生抑制剤、放射線療法に用いられる薬剤、抗 V E G F 抗体、F G F アンタゴニスト、P D G F アンタゴニスト、又は E r b B 2、E G F R、E r b B 3、E r b B 4 又は V E G F レセプターに結合する抗体である、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 12】

第三薬剤が血管新生抑制剤である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

血管新生抑制剤が抗 V E G F 抗体である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

抗体がヒト化抗体である、請求項 13 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血管内皮細胞増殖因子（以後、V E G F と称することもある）および骨形成タンパク質 1（以後、B M P 1 と称することもある）と関連するポリペプチド（本明細書中では V E G F - E ポリペプチドと称する）、これをコードする核酸、V E G F - E の製造方法および V E G F - E を利用する方法、組成物およびアッセイに関する。

【背景技術】

【0002】

種々の天然に存在するポリペプチドが内皮細胞の増殖を誘導することが報告されている

50

。このようなポリペプチドには、塩基性および酸性線維芽細胞増殖因子 (F G F) (Burge ss and Maciag, Annual Rev. Biochem., 58: 575 (1989))、血小板誘導性内皮細胞増殖因子 (P D - E C G F) (Ishikawa et al., Nature, 338: 557 (1989)) および血管内皮増殖因子 (V E G F) がある。Leung et al., Science, 246: 1306 (1989); Ferrara and Henzel, Biochem. Biophys. Res. Commun., 161: 851 (1989); Tischer et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 165: 1198 (1989); 1996年7月31日に許可された E P 471754B。

ヘパリン結合内皮細胞増殖因子である、V E G F は、数年前にウシ下垂体濾胞細胞又は濾胞星状 (folliculo-stellate) 細胞の培養培地から同定精製された。Ferrara et al., Biophys Res. Comm., 161: 851 (1989) を参照のこと。ヒト V E G F (h V E G F) c D N A でトランスフェクションされた細胞で馴化した培養培地は毛細管内皮細胞の増殖を促進したが、コントロール細胞の培養培地はこれを促進しなかった。Leung et al., Science, 246: 1306 (1989)。V E G F は、濾胞細胞または濾胞星状細胞 (F C) において生産され、形態学的によく特徴付けられている顆粒細胞の集団である、天然に存在する化合物である。F C は分泌細胞間に細胞質プロセスを伝える星状細胞である。

【 0 0 0 3 】

V E G F は、R N A の選択的スプライシングによって生じる、ひとまとめに h V E G F 関連タンパク質と称されもする複数のホモ二量体イソ型 (単量体あたり 1 2 1、1 6 5、1 8 9 および 2 0 6 アミノ酸) として種々の組織で発現される。1 2 1 アミノ酸のタンパク質は、h V E G F の残基 1 1 6 と 1 5 9 の間の 4 4 アミノ酸が欠失している点で h V E G F と異なっている。1 8 9 アミノ酸のタンパク質は、h V E G F の残基 1 1 6 の位置に 2 4 アミノ酸が挿入されている点で h V E G F と異なり、ヒト血管透過性因子 (human vascular permeability factor、h V P F) と明らかに同一である。2 0 6 アミノ酸のタンパク質は、h V E G F の残基 1 1 6 の位置に 4 1 アミノ酸が挿入されている点で h V E G F と異なっている。Houck et al., Mol. Endocrin., 5: 1806 (1991); Ferrara et al., J. Cell. Biochem., 47: 211 (1991); Ferrara et al., Endocrine Reviews, 13: 18 (1992); Keck et al., Science, 246: 1309 (1989); Connolly et al., J. Biol. Chem., 264: 20017 (1989); 1990年5月30日公開の E P 370989。V E G F 1 2 1 はヘパリンを結合しない可溶性分裂促進因子であり、これより長い形態の V G E F は長いものほどより強い親和力でヘパリンを結合する。ヘパリン結合型の V E G F のカルボキシ末端がプラスミンによって分解されると、拡散型の V E G F が放出され得る。プラスミン分解後に同定されるカルボキシ末端ペプチドのアミノ酸配列は A r g 1 1 0 - A l a 1 1 1 である。ホモ二量体として単離される、アミノ末端の「コア」タンパク質である V E G F (1 - 1 1 0) は、無傷の V E G F 1 6 5 ホモ二量体と同様の親和力で、中和モノクローナル抗体 (4 . 6 . 1 および 2 E 3) および可溶性 F M S 様チロシンキナーゼ (F L T - 1)、キナーゼドメイン領域 (K D R) および胎児肝臓キナーゼ (F L K) レセプターと結合する。

【 0 0 0 4 】

記載のように、V E G F は、それぞれ K D R および F L T - 1 レセプターと結合する 2 つのドメインを含む。これらのレセプターは内皮 (血管) 細胞にのみ存在する。外傷などのせいで、細胞の酸素が不足した場合、このような細胞では、V E G F 生産が増加した後、それぞれのレセプターに結合し、最終的な生物学的作用を生じさせるシグナルを送る。次いでこのシグナルは血管の透過性を増加させ、細胞は分裂し、増殖して、新しい血管経路を形成する - 血管形成および血管新生。

このように、V E G F は、過剰な組織成長の不存在下、血管上皮細胞に対する選択的な作用が重要であるような症状、例えば、糖尿病性の潰瘍および、皮下傷害のような外傷から生じる血管損傷の処置に有用である。V E G F は血管 (動脈および静脈) 内皮細胞増殖因子であり、損傷を受けた細胞を回復させ (血管形成と称される過程)、新しい血管の形成を刺激する (血管新生と称される過程)。

【 0 0 0 5 】

また V E G F に関しては、心筋梗塞後の脈管構造の回復における使用ならびにそれから導き出すことが可能な他の使用が見出せるであろう。これに関して、特に癌細胞における血管新生および血管形成のような過程を緩和するために、V E G F の阻害剤が望まれることもある。

【 0 0 0 6 】

現在、既存の内皮細胞からの新たな血管の形成を伴う血管新生が、種々の障害の病因に関連することがよく確立されている。これらには、充実性腫瘍および転移、アテローム性動脈硬化症、水晶体後部線維増殖症、血管腫、慢性炎症、眼球内血管新生症候群、例えば増殖性網膜症、例えば糖尿病性網膜症、加齢性黄斑変性 (A M D)、血管新生緑内障、移植された角膜組織および他の組織の免疫拒絶、慢性関節リウマチおよび乾癬が含まれる。Folkman et al., *J. Biol. Chem.*, 267: 10931-10934 (1992); Klagsbrun et al., *Annu. Rev. Physiol.*, 53: 217-239 (1991); および Garner A, "Vascular diseases", In: *Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach*, Garner A, Klintworth GK, Eds., 2nd Edition (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710.

腫瘍の増殖の場合、血管新生は過形成から新形成への移行と、増殖する充実性腫瘍への栄養の提供に関し、極めて重要であると思われる。Folkman et al., *Nature*, 339: 58 (1989)。血管新生は、腫瘍細胞に、正常細胞と比べて有利な増殖と増殖自律性を獲得させる。しかるべく、乳ガンおよび他のいくつかの腫瘍において、腫瘍セクションにおける微小血管の密度と患者の生存の相関が観察された。Weidner et al., *N Engl J Med*, 324: 1-6 (1991); Horak et al., *Lancet*, 340: 1120-1124 (1992); Macchiarini et al., *Lancet*, 340: 145-146 (1992)。

【 0 0 0 7 】

血管新生の正の調節因子についての調査では、a F G F、b F G F、T G F - 、T G F - 、H G F、T N F - 、アンジオゲニン、I L - 8 などを含む多くの候補が得られた。Folkman et al., *J.B.C.*, 上記、および Klagsbrun et al., 上記。これまでに同定された負の調節因子には、トロンボスポンジン (Good et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87: 6624-6628 (1990))、プロラクチンの 1 6 キロダルトン N 末端断片 (Clapp et al., *Endocrinology*, 133: 1292-1299 (1993))、アンジオスタチン (angiostatin) (O'Reilly et al. *Cell*, 79: 315-328 (1994)) およびエンドスタチン (endostatin) が含まれる。(O'Reilly et al. *Cell*, 88: 277-285 (1996))。最近数年間にわたって行われた実験では、血管上皮細胞増殖の刺激においてばかりでなく、血管透過性および血管新生の誘導においても、V E G F の重要な役割が確立された。Ferrara et al., *Endocr. Rev.*, 18: 4-25 (1997)。単一の V E G F 対立遺伝子が喪失しただけで、胎児が致死となることが発見されたことにより、この因子が血管系の発生および分化において埋め合わせのきかない役割を担っていることが示される。さらに、V E G F は、腫瘍および眼球内障害に伴う血管新生の鍵となる中間体であることが示された。Ferrara et al., *Endocr. Rev.*, 上記。試験されるヒト腫瘍の大多数において V E G F m R N A は過剰発現されている。Berkman et al., *J Clin Invest*, 91: 153-159 (1993); Brown et al., *Human Pathol.*, 26: 86-91 (1995); Brown et al., *Cancer Res.*, 53: 4727-4735 (1993); Mattern et al., *Brit. J. Cancer*, 73: 931-934 (1996); Dvorak et al., *Am J. Pathol.*, 146: 1029-1039 (1995)。

【 0 0 0 8 】

また、眼液 (eye fluids) 内の V E G F の濃度レベルは、糖尿病性および他の虚血関連の網膜症の患者において血管が活発に増殖していることと高度に相関する。Aiello et al., *N. Engl. J. Med.*, 331: 1480-1487 (1994)。さらに、最近の研究では、A M D 患者は脈絡膜の血管新生膜に V E G F が局在していることが示された。Lopez et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37: 855-868 (1996)。抗 V E G F 中和抗体は、ヌードマウスにおいて種々のヒト腫瘍セルラインの増殖を抑制し (Kim et al., *Nature*, 362: 841-844 (1993); Warren et al., *J. Clin. Invest.*, 95: 1789-1797 (1995); Borgstroem et al., *Cancer Res.*, 56: 4032-4039 (1996); Melnyk et al., *Cancer Res.*, 56: 921-924 (1996)

))、また虚血性網膜障害のモデルにおいて眼球内血管新生を阻害する。Adamis et al., Arch. Ophthalmol., 114: 66-71 (1996)。したがって、抗 - V E G F モノクローナル抗体または V E G F 作用の他の阻害剤は、充実性腫瘍および種々の眼球内血管新生障害を処置するための候補物質として見込みがある。このような抗体は例えば、1998年1月14日公開の EP 8 1 7 6 4 8 および 1998年4月3日提出の PCT / US 9 8 / 0 6 7 2 4 に記載されている。

【 0 0 0 9 】

骨形成タンパク質ファミリーに関しては、このファミリーのメンバーが軟骨の分化および血管形成および前形成されたヒドロキシアパタイトにおける骨誘導の促進に参与すると報告された。Zou, et al., Genes Dev. (U.S.), 11(17):2191 (1997); Levine, et al., Ann. Plast. Surg., 39(2):158 (1997)。骨形成タンパク質 (B M P) ファミリーの全メンバーである、多数の関連する骨形成タンパク質が同定された。骨形成天然および突然変異タンパク質、これらをコードする核酸、関連化合物 (レセプターを含む)、宿主細胞およびその使用は、少なくとも：米国特許第 5 6 7 0 3 3 8 号； 第 5 4 5 4 4 1 9 号； 第 5 6 6 1 0 0 7 号； 第 5 6 3 7 4 8 0 号； 第 5 6 3 1 1 4 2 号； 第 5 1 6 6 0 5 8 号； 第 5 6 2 0 8 6 7 号； 第 5 5 4 3 3 9 4 号； 第 4 8 7 7 8 6 4 号； 第 5 0 1 3 6 4 9 号； 第 5 1 0 6 7 4 8 号； および第 5 3 9 9 6 7 7 号にさらに説明されている。骨形成タンパク質 1 と同一性を有するタンパク質であって、基質沈着 (matrix deposition) の調節において重要な役割を担うプロコラーゲン C - プロテイナーゼには特に関心がある。多数の疾患および障害において血管内皮細胞増殖および血管新生の役割を考慮すると、これらの過程を引き起こす 1 つまたはそれ以上の生物学的作用を減少させるか、あるいは阻害する方法を得ることが望ましい。また、正常および疾患状態、特に癌における病原性ポリペプチドの存在に関してアッセイする方法を得ることが望ましい。さらに、ある特定の側面では、心臓肥大を処置するための一般的に適用可能な治療が存在しないため、心筋細胞肥大を妨げるか、あるいは減少させることが可能な因子を同定することは、異常生理学的心臓発育を阻害する新規治療戦略の開発において最も重要である。種々の心臓血管および腫瘍学的障害に関するいくつかの処置様相が存在するが、依然としてさらなる治療アプローチが必要とされている。

【 0 0 1 0 】

本発明は、V E G F および B M P ファミリーに関連する新規ポリペプチドおよび、特に細胞の生存、増殖および / または分化において役割を有するポリペプチドの同定を意図する研究に基づくものである。新規ポリペプチドが、それが同一性を有する既知のポリペプチドと同一の生物学的活性を有することを予想することはできないが、既知のポリペプチドの生物学的活性を用いれば、新規ポリペプチドにおける関連する生物学的活性を決定することができる。特に本明細書中に記載の新規ポリペプチドは、ポリペプチドが細胞の生存、増殖または分化を誘導する能力を決定するためのアッセイにおいて用いることができる。また、結果的にこれらのアッセイの結果を診断および治療目的に用いることができる。このような研究の結果は本発明の主題である。

【 発明の概要 】

【 0 0 1 1 】

したがって、本発明の 1 つの側面では、図 2 のアミノ酸残基 1 ~ 3 4 5 (配列番号 2) を含む血管内皮細胞増殖因子 - E (V E G F - E) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸を提供する。好ましい態様では、この核酸は図 1 のコード化ヌクレオチド配列 (すなわち、これは配列番号 1 の残基 2 5 9 ~ 1 2 9 3 を含む) またはその相補鎖を含む。他の側面では、本発明はこの核酸、好ましくは、ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識される制御配列に作動可能に連結されているものを含むベクター、ならびに該核酸を含む宿主細胞、好ましくは該ベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。好ましくは、この宿主細胞はチャイニーズハムスター卵巣細胞、昆虫細胞、大腸菌細胞または酵母細胞であり、最も好ましくはバキュロウイルス感染昆虫細胞である。

もう一つの態様では、本発明は、VEGF-Eポリペプチドの発現に適切な条件下で上記宿主細胞を培養し、この細胞培養物からVEGF-Eポリペプチドを回収することを含み、VEGF-Eポリペプチドの製造方法を提供する。さらに、この方法によって製造されるポリペプチドを提供する。

もう一つの態様では、本発明は配列番号2に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。

【0012】

さらなる態様では、本発明は、異種アミノ酸配列と融合されたVEGF-Eポリペプチドを含む、キメラポリペプチドを提供する。好ましい態様では、この異種アミノ酸配列はエピトプタグ配列または免疫グロブリンのFc領域である。

本発明のもう一つの側面では、VEGF-Eポリペプチドを担体と組み合わせて含む組成物を提供する。好ましい側面では、この組成物は治療有効量のポリペプチドを含み、ここに担体は製薬的に許容される担体である。また、この組成物がさらに、心臓血管、内皮または血管新生薬剤を含むのが好ましい。

さらなる態様では、本発明は心臓血管障害または内皮障害の処置用の組成物を製造する方法であって、治療有効量のVEGF-Eポリペプチドを担体と混合することを含む方法を提供する。

もう一つの態様では、本発明は以下のものを含む医薬品を提供する：

- (a) 上記組成物；
- (b) 該組成物を含む容器；
- (c) 心臓血管障害または内皮障害の処置における該VEGF-Eポリペプチドの使用に言及する、該容器に貼られたラベル、または該医薬品に含まれるパッケージ内の印刷物。

【0013】

さらなる態様では、本発明は、以下の過程を含む、VEGF-Eをコードする核酸配列の突然変異に関する、疾患または疾患に対する罹患しやすさの診断方法を提供する：

- (a) 宿主由来のサンプルからVEGF-Eをコードする核酸配列を単離し；ならびに、
- (b) VEGF-Eをコードする核酸配列中の突然変異を決定する。

さらなる態様では、本発明は、哺乳類の心臓血管障害および内皮障害の診断方法であって、

- (a) 哺乳類から得られた組織細胞の試験サンプル中、および、
- (b) 同細胞型の既知の正常組織細胞のコントロールサンプル中において、VEGF-Eポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含む方法を提供し、ここでは、試験サンプル中の発現レベルがコントロールより高いか、あるいはより低い場合には、該試験組織細胞のソースである哺乳類が心臓血管または内皮の機能不全を有していることが示される。

【0014】

さらなる態様では、本発明は、哺乳類の心臓血管障害または内皮障害の処置方法であって、該哺乳類に有効量のVEGF-Eポリペプチドを投与することを含む方法を提供する。好ましくは、該障害は心臓肥大、外傷または骨関連障害である。また、該哺乳類はヒトであるのが好ましい。もう一つの好ましい態様では、障害が心臓肥大であり、それが大量のPGF₂の存在を特徴とするか、あるいは、それが心筋梗塞によって誘導されたものである(ここでは、心筋梗塞後、48時間以内にVEGF-Eポリペプチドの投与が開始されるのが好ましい)。もう一つの好ましい態様では、心臓血管障害または内皮障害は心臓肥大であり、VEGF-Eポリペプチドを心臓血管薬剤または内皮薬剤とともに投与する。より好ましくは、該心臓血管、内皮または血管新生薬剤は、抗高血圧薬、ACE阻害剤、エンドセリンレセプターアンタゴニストおよび血栓溶解剤からなる群から選択される。

【0015】

もう一つの態様では、本発明はVEGF-Eポリペプチドに対するアゴニストの同定方法であって、

10

20

30

40

50

- (a) ポリペプチドが細胞の増殖を刺激する条件で、細胞と候補化合物を接触させ；
 (b) 細胞増殖が該化合物によって阻害される程度を測定することを含む方法を提供する。

さらに、上記方法によって同定された V E G F - E ポリペプチドに対するアゴニストを提供する。

また、V E G F - E ポリペプチドの発現または活性を阻害する化合物を同定する方法であって、

- (a) 化合物がポリペプチドと相互作用するのに十分な条件および時間で、候補化合物をポリペプチドと接触させ；ならびに、
 (b) 化合物がポリペプチドと相互作用する程度を測定することを含む方法を提供する。

10

【 0 0 1 6 】

もう1つ態様では、本発明は上記方法によって同定された化合物を提供する。

さらなる態様では、本発明は V E G F - E ポリペプチドの発現または活性を阻害する化合物を提供する。

もう1つの態様では、本発明は哺乳類の血管新生障害の処置方法であって、V E G F - E ポリペプチドに対する有効量のアンタゴニストを該哺乳類に投与することを含む方法を提供する。好ましい態様では、血管新生障害は癌または加齢性黄斑変性である。もう1つの好ましい態様では、該哺乳類はヒトである。さらなる好ましい側面では、有効量の血管新生薬剤を該アンタゴニストと組み合わせて投与する。

20

【 0 0 1 7 】

他の側面では、本発明は、V E G F - E ポリペプチドと結合する、単離された抗体を提供する。好ましくは、この抗体はモノクローナル抗体である。

さらなる側面では、本発明は、哺乳類（好ましくはヒトである）の、V E G F - E ポリペプチドによって誘導される血管新生の阻害方法であって、該哺乳類に治療有効量の抗体を投与することを含む方法を提供する。また該哺乳類は、好ましくは腫瘍または網膜障害を有する。別の好ましい側面では、該哺乳類は癌を有し、該抗体を化学療法薬、生長阻害剤または細胞毒性物質と組み合わせて投与する。

【 0 0 1 8 】

別の好ましい態様では、本発明は V E G F - E ポリペプチドの存在を測定する方法であって、V E G F - E ポリペプチドを含有すると推測される細胞を抗体に暴露し、細胞に対する抗体の結合を測定することを含む方法を提供する。

30

さらに別の好ましい側面では、本発明は、哺乳類の心臓血管障害、内皮障害または血管新生障害の診断方法であって、(a) 抗体を、該哺乳類から得られた組織細胞の試験サンプルと接触させ、(b) 抗 V E G F - E 抗体と、試験サンプル中の V E G F - E ポリペプチドの複合体形成を検出することを含む方法を提供する。

【 0 0 1 9 】

さらなる側面では、本発明は、適当なパッケージ中に該抗体および担体を含む癌診断キットを提供する。好ましくは、このキットはさらに、V E G F - E ポリペプチドを検出するための該抗体の使用に関する説明を含む。

40

さらなる態様では、本発明は以下のものを含む製品を提供する：

容器；

容器のラベル；および、

容器内に含有される抗 V E G F - E 抗体を含む組成物

(容器のラベルは、該組成物を治療的または診断的方法において用いることができることを示す) 。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 0 】

【 図 1 】 図 1 は V E G F - E の完全長 D N A 配列 (配列番号 1) を示し、そのうちコード化領域はヌクレオチド残基 2 5 9 ~ 1 2 9 3 までである。配列番号 1 は、the American T ype Culture Collection, Manassas, Virginia において D N A 2 9 1 0 1 - 1 2 7 6 1

50

998年3月5日として寄託されたDNA：29101を表す。本明細書中、UNQ：174と称されることもあるDNA：29101は、VEGF-Eをコードする領域を含む。開始コドンおよび終止コドンは丸で囲んであり、ATGで始まるコード領域および最後のコード化ヌクレオチドの直後にある終止コドンを示している。コード化領域は核酸1035個の長さであり、配列番号1の範囲内、第259位から第1293位である。配列番号1には、仮のリーダーシグナル配列またはプレタンパク質および推定の成熟タンパク質をコードする核酸が含まれる。

【図2】図2は、演繹されたVEGF-Eのアミノ酸配列を記載し、本明細書中では、PRO：200、配列番号2と称される。この配列はUNQ：174のオープンリーディングフレームによってコードされるタンパク質を表す。対応する分子量は39029Dである。pIは6.06である。NX(S/T)は3である。潜在的N-グリコシル化部位は第25位、第54位および第254位である。CUBドメインは第52～65位、第118～125位および第260～273位である。

【図3A】図3A～3HはHUV EC管形成に対する、生長因子なし(図3A)、1つまたはそれ以上の生長因子(VEGF、bFGFおよび/またはPMA)(図11B～11H)の効果を示す。図3BはVEGF、bFGFおよびPMAの組み合わせを示し、図3CはVEGFおよびbFGFの組み合わせを示し、図3DはVEGFとPMAの組み合わせを示す。

【図3B】図3A～3HはHUV EC管形成に対する、生長因子なし(図3A)、1つまたはそれ以上の生長因子(VEGF、bFGFおよび/またはPMA)(図11B～11H)の効果を示す。図3EはbFGFとPMAの組み合わせを示し、図3FはVEGFのみを示し、図3GはbFGFのみを示し、図3HはPMAのみを示す。

【図4】図4Aおよび4Bは、それぞれ、IgGと共役させたVEGF-E 1%希釈物およびバッファーコントロール(10mM HEPES/0.14M NaCl/4%マンニトール、pH6.8) 1%希釈物のHUV EC管形成に対する効果を示す。

【図5】図5Aおよび5Bは、それぞれ、ポリ-hisと共役させたVEGF-E 1%希釈物およびバッファーコントロール(図4Bと同じ) 1%希釈物のHUV EC管形成に対する効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

(発明の詳細な記述)

I. 定義

本明細書中で用いる「血管内皮細胞増殖因子-E」または「VEGF-E」とは、図2のヒトアミノ酸配列、VEGFおよび骨形成タンパク質1と相同性を有しかつVEGFの生物学的活性に必要とされることが示されたすべてのVEGFシステイン残基が完全に保存されている配列を含む、本明細書中に記載の哺乳類の増殖因子を表す。VEGF-Eの発現には、ヒト胎児骨、胸腺、胃腸管、ならびに胎児精巣、肺およびリンパ節、および以下の実施例に示される他の組織における発現が含まれる。天然のVEGF-Eの生物学的活性は、臍静脈内皮細胞の選択的増殖および/または生存を促進し、多能性線維芽細胞の増殖を誘導し、ヒト内皮セルラインにおいて即時型遺伝子c-fosを誘導し、心臓細胞の筋細胞肥大を引き起こし、副腎皮質毛細管内皮細胞のVEGF刺激性増殖を阻害するか、あるいは、対応する天然VEGF-Eの少なくとも1つのエピトープに対して作成された抗体と免疫学的に交差反応性である免疫エピトープを有する、その任意のアナログまたは変異体と共有される。本明細書中のヒトVEGF-Eはラットおよびマウス細胞に対して活性であり、このことから種間で保存されていることが示される。さらに本明細書中のVEGF-Eは成長板領域で発現され、胎児筋細胞を取り囲むことが示された。

【0022】

本明細書中で用いる「血管内皮細胞増殖因子」または「VEGF」とは、米国特許第5332671号に規定される哺乳類増殖因子を表す。天然VEGFの生物学的活性は、ウシ角膜内皮細胞、レンズ内皮細胞、副腎皮質細胞、BHK-21線維芽細胞またはケラチ

ン生成細胞以外の、血管内皮細胞の選択的増殖を促進するか、あるいは対応する天然 VEGF の少なくとも 1 つのエピトープに対して作成された抗体と免疫学的に交差反応性である免疫エピトープを有する、その任意のアナログまたは変異体と共有される。

本明細書中で用いる用語「VEGF-E ポリペプチド」および「VEGF-E」には、天然配列 VEGF-E ポリペプチドおよび VEGF-E ポリペプチド変異体（本明細書中でさらに定義されているもの）が含まれる。VEGF-E ポリペプチドは、ヒト組織型または他のソースのような種々のソースから単離することができ、また、組換え法あるいは合成法によって製造することができる。

【0023】

「天然配列 VEGF-E ポリペプチド」には、天然由来の VEGF-E ポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。このような天然配列 VEGF-E ポリペプチドは、天然ソースから単離するか、あるいは組換え法または合成法によって製造可能である。詳細には、用語「天然配列 VEGF-E ポリペプチド」には、天然に存在する、トランケートされた形態または分泌型の VEGF-E ポリペプチド、VEGF-E ポリペプチドの天然に存在する変異型（例えば異なってスプライシングされた形態）および天然に存在する対立性変異体 (allelic variants) が含まれる。本発明の 1 つの態様では、天然配列 VEGF-E ポリペプチドは、図 2 に記載のアミノ酸 1 ~ 345 を含む、成熟または完全長の天然配列 VEGF-E ポリペプチドである。

【0024】

「VEGF-E 変異体」とは、以下に定義される、完全長の天然配列 VEGF-E ポリペプチドに関して図 2 に示される演繹された（推定）アミノ酸配列を有する VEGF-E ポリペプチドと少なくとも約 80% のアミノ酸配列同一性を有する、活性な VEGF-E ポリペプチドを意味する。このような VEGF-E ポリペプチド変異体には、例えば、図 2 の配列の N 末端または C 末端、または配列内部で、1 つまたはそれ以上のアミノ酸残基が添加、欠失または置換されている VEGF-E ポリペプチドならびにその活性断片が含まれる。

通常、VEGF-E ポリペプチド変異体は、図 2 のアミノ酸配列と、少なくとも約 80% アミノ酸配列同一性を有し、より好ましくは少なくとも約 90% アミノ酸配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも約 95% アミノ酸配列同一性を有する。

【0025】

本明細書中で同定される VEGF-E アミノ酸配列に関する「%アミノ酸配列同一性」とは、VEGF-E ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である、候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義する（ここでは、配列をアラインメントし、必要であれば、最大の%配列同一性を達成するようにギャップを導入するが、いかなる保存的置換をも配列同一性の部分とは考えない）。当業者の技術水準の範囲内である種々の方法、例えば、ALIGN または Megalign (DNASTAR) ソフトウェアのような公に利用可能なコンピューターソフトウェアを用いて、%アミノ酸配列同一性を測定するためのアラインメントを行うことができる。当業者であれば、比較される配列の完全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適当なパラメータを決定できる。

【0026】

「%核酸配列同一性」とは、図 1 に示される配列（配列番号 1）と同一である、それぞれの候補配列内のヌクレオチドのパーセンテージとして定義する（ここでは配列をアラインメントし、必要であれば、最大の%配列同一性を達成するようにギャップを導入する）。当業者の技術水準の範囲内である種々の方法、例えば、ALIGN または Megalign (DNASTAR) ソフトウェアのような公に利用可能なコンピューターソフトウェアを用いて、%核酸配列同一性を測定するためのアラインメントを行うことができる。当業者であれば、比較される配列の完全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適当なパラメータを決定できる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 7 】

本明細書中で開示される種々のポリペプチドを記載するのに用いる「単離された」とは、その天然環境の成分から同定分離され、ならびに／あるいは回収されたポリペプチドを意味する。その天然環境の汚染成分は、一般にこのポリペプチドに関する診断的利用または治療的利用を妨害するであろう物質であり、これには、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性溶質または非タンパク質性溶質が含まれる。好ましい態様では、(1)スピニングカップ配列決定装置を用いて、少なくとも15残基のN末端または内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度に、あるいは(2)非還元または還元条件下、クーマシーブルーまたは、好ましくは銀染色剤を用いるSDS-PAGEにより均質にまで、ポリペプチドを精製する。組換え細胞内インシトウのポリペプチドは、VEGF-Eポリペプチド天然環境の成分が1つも存在しないので、単離されたポリペプチドに含まれる。しかし通常、「単離された」ポリペプチドは少なくとも1つの精製工程によって調製される。

10

【 0 0 2 8 】

「単離された」VEGF-Eポリペプチドをコードする核酸分子は、VEGF-Eポリペプチドをコードする核酸の天然ソースにおいて通常付随している少なくとも1つの汚染核酸分子から同定分離された核酸分子である。単離されたVEGF-Eポリペプチドをコードする核酸分子は、それが天然に見出されるような構成設定とは異なっている。したがって、単離されたVEGF-Eポリペプチドをコードする核酸分子は、天然細胞内に存在するVEGF-Eポリペプチドをコードする核酸分子とはっきり区別できる。しかし、単離されたVEGF-Eポリペプチドをコードする核酸分子には、VEGF-Eポリペプチドを通常発現している細胞であって、例えば該核酸分子が天然細胞内での位置と異なる染色体上の位置に存在する細胞内に含まれるVEGF-Eポリペプチドをコードする核酸分子が含まれる。

20

【 0 0 2 9 】

用語「心臓血管障害および内皮障害」および「心臓血管機能不全および内皮機能不全」とは、交換可能に用いられ、血管新生および／または心臓血管形成を刺激する、一般に全身性の障害を表す。これには、脈管に影響する疾患ならびに、動脈、毛細管、静脈および／またはリンパ管のような脈管自体の疾患が含まれる。このような障害には、例えば、アテローム性動脈硬化症、高血圧、炎症性脈管炎、レイノー(Reynaud's)病およびレイノー症状、動脈瘤、および動脈再狭窄症のような動脈疾患；血栓静脈炎、リンパ管炎およびリンパ水腫のような静脈およびリンパ管障害；および、末梢血管疾患、外傷、例えば傷害、やけどおよび他の損傷した組織、移植片凝固、瘢痕、虚血再灌流、損傷、慢性関節リウマチ、脳血管疾患、腎疾患、例えば急性腎不全および骨粗鬆症のような他の管障害が含まれる。これにはまた、アンギナ、心筋梗塞、例えば急性心筋梗塞、心臓肥大および心不全、例えば鬱血性心不全(CHF)が含まれるであろう。

30

【 0 0 3 0 】

用語「血管新生障害」とは、血管新生を阻害する薬剤、例えば血管静止化合物での処置を必要とする障害を表す。このような障害には、例えば、管腫、例えば血管腫(毛細管および海面性)、糸球体腫、毛細管拡張症、桿菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮細胞腫、カポジ肉腫、リンパ管腫およびリンパ管肉腫(lymphangiosarcoma)のようなタイプの癌および腫瘍血管新生が含まれる。

40

【 0 0 3 1 】

本明細書中で用いる「肥大」とは、腫瘍形成を含まない天然の生長とは無関係の、器官または構造の質量増加として定義する。器官または組織の肥大は個々の細胞の質量の増加に基づくものであるか(真の肥大)、あるいは組織を構成する細胞数の増加に基づくもの(過形成)であるか、あるいは両者に基づくものである。特定の器官、例えば心臓は生誕後短期間のうちに分裂能を失う。したがって、「心臓肥大」は心臓の質量の増加として定義され、成人では、これは、細胞分裂を伴わない心筋細胞のサイズおよび収縮性タンパク質含量の増加を特徴とする。肥大を刺激するストレスの特徴(例えば、心筋梗塞におけるような、前負荷の増加、後負荷の増加、心筋細胞の喪失、または収縮性の基本的機能低下

50

)は応答の性質を決定するのに重要な役割を果たすと思われる。初期段階の心臓肥大は通常、形態学的に、ミクロフィブリルおよびミトコンドリアのサイズの増加、ならびにミトコンドリアおよび核の拡大を特徴とする。この段階では、筋肉細胞は正常細胞より大きい、細胞内構成はほぼ保存されている。心臓肥大がより進んだ段階では、特定の細胞内小器官、例えばミトコンドリアのサイズまたは数が選択的に増加し、異常なことに、新たな収縮性成分が細胞の局在する領域に加えらる。長期にわたって肥大していた細胞は、非常に小さく分解された膜を有する、顕著に拡大した核を含めて、その細胞内構成がより明らかに崩壊し、ここでは、核に近接するミクロフィブリルが取り除かれ、正常なZ帯レジストレーションの崩壊が生じる。用語「心臓肥大」は、元となる心臓障害にかかわらず、種々の程度の、心筋の構造的損傷によって特徴付けられる、この症状のすべての進行段階を含むものとして用いられる。したがって、この用語はまた、心臓肥大の発達を助長する生理的状態、例えば高血圧、大動脈狭窄または心筋梗塞を含む。

10

【0032】

「心不全」とは、心臓が代謝組織の要求に必要な割合で血液を送り出さない心臓機能の異常を表す。心不全は、虚血性、先天性、リウマチ性、または特発性型を含む、多数の要因によって引き起こされ得る。

「鬱血性心不全」または「CHF」は、進行性の病理状態であり、ここでは心臓が徐々に、末梢組織に酸素化血をデリバリーするのに適当な心臓出力(心臓によって送り出される、時間あたり血液量)を供給できなくなる。CHFが進行するにつれて、構造的および血流力学的損傷が生じる。これらの損傷はさまざまに現れるが、1つの特徴的徴候は心室肥大である。CHFは多数の種々の心臓障害の一般的な最終結果である。

20

【0033】

一般に、「心筋梗塞」は、しばしば冠血栓症を併発する、冠動脈のアテローム性動脈硬化症から生じる。これは以下のような2つの主要なタイプに分類することができる: 経壁性梗塞(ここでは、心筋壊死に心室壁の完全肥厚が含まれる)および心内膜下心筋梗塞(subendocardial)(非経壁性)(ここでは、壊死に心内膜下(subendocardium)、壁内心筋または両者が関与し、心室壁を通るすべての経路は心外膜まで拡大しない)。心筋梗塞は、心臓の損傷領域または健康な領域において、血流力学的作用の変化および構造の変更の両方を引き起こすことが知られている。したがって心筋梗塞は、例えば最大心臓出力および心臓の拍動容量を減少させる。また心筋梗塞に付随して、隙間でDNA合成の刺激が生じ、ならびに、病気に冒されていない心臓領域のコラーゲン形成が増加する。

30

【0034】

例えばトータルの末梢抵抗の増加による長い高血圧状態において、心臓に対するストレスまたは緊張が増加した結果を受けて、長い間、心臓肥大は「高血圧」と関連付けられてきた。慢性の過負荷圧力のせいで肥大した心室の特徴は、心拡張運動障害である。Fouad et al., J. Am. Coll. Cardiol., 4: 1500-1506 (1984); Smith et al., J. Am. Coll. Cardiol., 5: 869-874 (1985)。初期本態性高血圧症においては、正常または正常以上の心収縮機能にもかかわらず、長い左心室の弛緩が検出された。Hartford et al., Hypertension, 6: 329-338 (1984)。しかし、血圧レベルと心臓肥大の間に密接な対応はない。ヒトにおいて、抗高血圧治療に応じて左心室機能の改善が報告された一方、利尿剤(ヒドロクロロチアジド)、 β -遮断剤(プロプラノロール)またはカルシウムチャンネル遮断剤(ジルチアゼム)でさまざまに処置された患者は左心室肥大の回復を示したが、心拡張機能の改善を示さなかった。Inouye et al., Am. J. Cardiol., 53: 1583-7 (1984)。

40

【0035】

心臓肥大に付随する別の複雑な心臓疾患は「肥大性心筋症」である。この症状は、形態学的、機能的および臨床的特徴に大きな多様性があることが特徴的であり(Maron et al., N. Engl. J. Med., 316: 780-789 (1987); Spirito et al., N. Engl. J. Med., 320: 749-755 (1989); Louie and Edwards, Prog. Cardiovasc. Dis., 36: 275-308 (1994); Wigle et al., Circulation, 92: 1680-1692 (1995))、その異質性は、すべての年代の患者を苦しめるという事実によって強調される。Spirito et al., N. Engl. J. Med., 33

50

6: 775-785 (1997)。肥大性心筋症の原因はまた、その多様性とほとんど理解されていないことでもある。一般に、筋節タンパク質をコードする遺伝子の突然変異は肥大性心筋症と関連する。最近のデータでは、 β -ミオシン重鎖突然変異が家族性の肥大性心筋症のうち約30～40%の原因であり得ることが示されている。Watkins et al., N. Engl. J. Med., 326: 1108-1114 (1992); Schwartz et al, Circulation, 91: 532-540 (1995); Marian and Roberts, Circulation, 92: 1336-1347 (1995); Thierfelder et al., Cell, 77: 701-712 (1994); Watkins et al., Nat. Gen., 11: 434-437 (1995)。 β -ミオシン重鎖に加えて、遺伝的突然変異の他の位置には、心臓トロポニンT、 α トロポミオシン(tropomyosin)、心臓ミオシン結合プロテインC、本態性(essential)ミオシン軽鎖および調節性(regulatory)ミオシン軽鎖が含まれる。Malik and Watkins, Curr. Opin. Cardiol., 12: 295-302 (1997)を参照のこと。

10

【0036】

心臓弁上膜(Supervalvular)「大動脈弁狭窄症」は、上行大動脈の狭窄を特徴とする遺伝的血管障害であり、肺動脈を含む他の動脈が影響を受けていることもある。大動脈弁狭窄症を未処置にしておくと、心臓内圧の増加を導き、心筋肥大および、ついには心臓機能不全および死を招き得る。この障害の病因は完全には理解されていないが、内側平滑筋の肥大および、可能性としては過形成もが、この障害の顕著な特徴である。エラスチン遺伝子の分子の変異体が大動脈弁狭窄症の発達および病因に関与することが報告された(1997年7月22日発行の米国特許第5650282号)。

【0037】

「弁閉鎖不全」は心臓疾患の結果として生じ、心臓弁の障害を引き起こす。リウマチ熱様の種々の疾患は、弁口を萎縮させ、あるいは引きちぎる原因になり得り、また他の疾患は心内膜炎、心内膜または房室口の内膜の炎症および心臓の手術を招くかもしれない。弁狭窄症の狭窄化または弁の閉鎖不全のような障害は、心臓腔に血液を蓄積させるか、あるいは弁を通る血液を逆流させる。治療しないと、長期の弁狭窄症または不全症は、心臓肥大および関連する心筋への損傷を生じさせ、ついには弁の交換を必要とするかもしれない。

20

これらすべてに対する処置および、心臓肥大を伴ってもよいし、伴わなくてもよい他の心臓血管障害および内皮障害に対する処置は本発明に包含される。

【0038】

用語「癌」「癌の」および「悪性の」とは、典型的には調節不能の細胞増殖を特徴とする哺乳類の生理的状态を意味し、あるいは説明する。癌の例には、腺癌、リンパ腫、芽細胞腫、黒色腫、肉腫および白血病を含む癌腫が含まれるが、これらに限定されない。このような癌のさらなる具体例には、扁平上皮癌、小細胞型肺癌、非小細胞型肺癌、胃腸管系癌、ホジキン型および非ホジキン型リンパ腫、膵臓癌、グリア芽細胞腫、頸癌、卵巣癌、肝臓癌、例えば肝癌および肝細胞腫、膀胱癌、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮体癌、唾液腺癌、腎臓癌、例えば腎細胞腫およびウィルムス腫瘍(Wilms' tumors)、基底細胞腫、黒色腫、前立腺癌、陰門癌、甲状腺癌、精巣癌、食道癌、および種々のタイプの頭部および頸部の癌が含まれる。本明細書中の処置に好ましい癌は乳癌、大腸癌、肺癌、黒色腫、卵巣癌および、上記の血管性腫瘍を含む他のものである。

30

40

【0039】

本明細書中で用いる用語「細胞毒性物質」とは、細胞の機能を阻害するか、あるいは防止し、ならびに/あるいは細胞の崩壊を引き起こす物質を表す。この用語には放射性同位体(例えば ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y および ^{186}Re)、化学療法薬および毒素、例えば、細菌、真菌、植物または動物起源の酵素的に活性な毒素またはその断片が含まれるものとする。

【0040】

「化学療法薬」は、癌の処置に有用な化学化合物である。化学療法薬の例には、アルキル化剤、葉酸剤アンタゴニスト、核酸代謝の抗-代謝産物、抗生物質、ピリミジンアナログ、5-フルオロウラシル、シスプラチン、プリンヌクレオシド、アミン、アミノ酸、ト

50

リアゾールヌクレオシドまたはコルチコステロイドが含まれる。具体例には、アドリアマイシン、ドキシソルピシン、5 - フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（「Ara - C」）、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、サイトキシン、タキソール、タキソテレ(Taxotere)、メトトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ピンブラスチン、プレオマイシン、エトポシド、イフォスファミド、マイトマイシンC、マイトキサントロン、ピンクレイスチン、ピノレルピン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラマイシン（米国特許第4675187号参照）、メルファラン、および他の関連ナイトロジェンマスタードが含まれる。また、この定義範囲内には、腫瘍に対するホルモン活性を調節し、あるいは阻害するように作用するホルモン性物質、例えばタモキシフェンおよびオナプリストン(onapristone)が含まれる。

10

【0041】

本明細書中で用いる「増殖阻害剤」とは、インビトロまたはインビボにおいて、Wnt過剰発現癌細胞のような細胞の増殖を阻害する化合物または組成物を表す。したがって、増殖阻害剤はS期にある悪性細胞のパーセンテージを有意に減少させるものである。増殖阻害剤の例には、セルサイクルの進行を（S期以外の時点で）遮断する物質、例えばG1停止またはM期停止を誘導する物質が含まれる。伝統的なM期遮断剤には、ニチニチソウ属(vincas、ピンクリスチンおよびピンブラスチン)、タキソールおよびトポII阻害剤(topo II inhibitors)、例えばドキシソルピシン、ダウノルピシン、エトポシドおよびプレオマイシンが含まれる。G1停止させる物質、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、デカルバジン(decarbazine)、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5 - フルオロウラシルおよびara - CのようなDNAアルキル化剤の場合でも、S期停止にずれ込むことがある。さらなる情報については、Murakami et al. The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" (WB Saunders: Philadelphia, 1995), 特にp. 13に見出すことができる。さらなる例には、腫瘍壊死因子(TNF)、酸性または塩基性のFGFまたは肝細胞増殖因子(HGF)の血管新生活性を阻害または中和することができる抗体、組織因子、プロテインCまたはプロテインSの凝固剤活性を阻害あるいは中和することができる抗体(1991年2月21日公開のWO 91/01753を参照)またはHER2レセプターに結合可能な抗体(WO 89/06692)、例えば4D5抗体(およびその機能的等価物)(例えばWO 92/22653)が含まれる。

20

30

【0042】

「処置」とは、心臓血管障害、内皮障害または血管新生障害の発達を防ぐか、あるいはその病状を変更することを意図して行われる介入である。処置の概念は最も広い意味に用いられ、具体的には、すべての状態の心臓血管障害、内皮障害または血管新生障害の予防、緩和、減少および治療が含まれる。したがって、「処置」とは、治療的処置および予防的または防止的測定の両方を意味し、その目的は心臓血管障害または内皮障害、例えば肥大、または血管新生障害、例えば癌を防止し、減退(減少)させることである。処置を必要とするのは、すでに該障害を伴う患者、ならびに該障害になりやすい患者または該障害を防止すべきである患者である。この障害は、特発性、心臓栄養性(cardiotrophic)または筋肉栄養性(myotrophic)の原因、または虚血または虚血性発作、例えば心筋梗塞を含む任意の原因から生じ得る。

40

【0043】

「慢性(長期)の」と投与とは、最初の効果、例えば抗肥大効果を長期間維持すべく、急性の方法とは反対の継続的方法によって薬剤を投与することを意味する。

処置を目的とする「哺乳類」とは、ヒト、およびイヌ、ウマ、ネコ、乳牛、ヒツジ、ブタなどのような家畜(domestic and farm animals)、および動物園の、競技用、もしくはペット動物を含む、哺乳類として分類されるあらゆる動物を表す。好ましくは哺乳類はヒトである。

1つまたはそれ以上のさらなる治療薬「と組み合わせた」投与には、同時に投与するこ

50

とおよび任意の順序で連続投与することが含まれる。

【0044】

用語「心臓血管薬剤または内皮薬剤」とは、包括的に、心臓血管障害および/または内皮障害の処置において作用する任意の薬物を表す。心臓血管薬剤の例には、すべて心臓血管疾患において役割を有する要因である、血圧、心臓速度、心臓収縮性および、内皮および平滑筋の生物学を調節することによって血管のホメオスタシスを達成するものである。これらの具体例には、アンジオテンシン - I レセプターアンタゴニスト；エンドセリンレセプターアンタゴニスト、例えばBOSENTAN（登録商標）およびMOXONODIN（登録商標）；インターフェロン - ガンマ（IFN - ）；デス - アルパルテート - アンジオテンシンI；血栓溶解剤、例えばストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、t - PA および、より長い半減期および非常に高いフィブリン特異性を有するように特別に設計されたt - PA変異体、TNK t - PA（T103N、N117Q、KHRR（296 - 299）AAAA t - PA変異体、Keyt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3670-3674（1994）；変力剤または高血圧剤、例えばジゴキシゲニンおよび - アドレナリン作動性レセプター遮断剤、例えばプロプラノロール、マレイン酸チモロール(timolol)、テルタロロール(tertalolol)、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール(betaxolol)、ペンブトロール、アセトブトロール、アテノロール、メトプロロールおよびカルベジロール；アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤、例えばキナプリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル(ramipril)、ベナゼプリル(benazepril)、フォシノプリル(fosinopril)およびリシノプリル；利尿剤、例えばクロロチアジド(chlorothiazide)、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメタジド(hydroflumethazide)、メチルクロロチアジド(methylchlorothiazide)、ベンズチアジド(benzthiazide)、ジクロルフェナミド(dichlorphenamide)、アセタゾルアミドおよびインダパミド；およびカルシウムチャンネル遮断剤、例えばジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル、ニカルジピンが含まれる。このタイプのうち好ましい範疇の1つは、心臓肥大または、心臓肥大の発達を助長する生理的条件、例えば高血圧、動脈狭窄または心筋梗塞を処置するために用いられる治療薬である。

10

20

30

40

50

【0045】

「血管新生薬剤」および「内皮薬剤」は、それぞれ血管新生(angiogenesis)および内皮細胞増殖、あるいは、適用可能であれば、血管形成(vasculogenesis)を促進する活性な薬剤である。これには、傷害治癒を促進する因子、例えば成長ホルモン、インシュリン様増殖因子 - I（IGF - I）、VEGF、VIGF、PDGF、上皮細胞増殖因子（EGF）、CTGFおよびそのファミリーのメンバー、FGFおよびTGF - およびTGF - が含まれるであろう。

【0046】

「血管静止剤」は、血管新生または血管形成を阻害し、また癌細胞の増殖を阻害あるいは防止する活性な薬剤である。具体例には、上に定義される血管新生剤に対する抗体または他のアンタゴニスト、例えばVEGFに対する抗体が含まれる。これにはさらに、細胞治療剤、例えば細胞毒性物質、化学療法薬、増殖阻害剤、アポトーシス剤および、癌を処置する他の薬剤、例えば抗HER - 2、抗CD20および他の生物活性物質および有機化学物質が含まれる。

【0047】

薬理学的意味において、本発明の明細書中、活性な薬剤（VEGF - Eポリペプチドまたはそのアンタゴニスト）の「治療有効量」とは、心臓血管障害、内皮障害および血管新生障害の処置に有効な量を表す。

【0048】

用語「アンタゴニスト」は最も広義に用いられ、これには、本明細書中に開示される、1つまたはそれ以上の天然VEGF - Eポリペプチドの生物学的活性、例えば、適用可能であれば、その有糸分裂促進活性または血管新生活性を部分的または完全に遮断、阻害あるいは中和する任意の分子が含まれる。VEGF - Eポリペプチドのアンタゴニストは、VEGF - Eポリペプチドが細胞のレセプターに結合するのを妨げるか、あるいはVEG

F - E ポリペプチドによって活性化された細胞を無能化するか、あるいは殺すか、あるいは V E G F - E ポリペプチドが細胞のレセプターに結合した後の血管内皮細胞の活性化を妨げることによって作用し得る。このような V E G F - E ポリペプチドアンタゴニストが介入するポイントは、本発明の目的に関して同等であると考えられる。このアンタゴニストは、V E G F - E ポリペプチドの有糸分裂促進活性、血管新生活性、または他の生物学的活性を阻害し、これゆえ、例として、腫瘍、および特に充実性腫瘍、慢性関節リウマチ、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性および他の網膜症、水晶体後部線維増殖症、加齢性黄斑変性、血管新生緑内障、血管腫、甲状腺性過形成 (thyroid hyperplasias、グレーブズ病を含む)、角膜および他の組織の移植および慢性炎症を含む、望ましくない過剰な新血管新生を特徴とする疾患または障害の処置に有用である。このアンタゴニストはまた、脳腫瘍関連浮腫、悪性腫瘍関連腹水症、メーグス症候群、肺炎、ネフローゼ症候群、心嚢貯留液 (例えば心膜炎に関連するもの) および胸水のような望ましくない過剰の血管透過性を特徴とする疾患または障害の処置にも有用である。

【 0 0 4 9 】

同様に、用語「アゴニスト」は最も広義に用いられ、これには、本明細書中に開示される、生物学的に活性な天然の V E G F - E ポリペプチドを模倣する任意の分子が含まれる。具体的に、適当なアゴニストまたはアンタゴニスト分子には、アゴニストまたはアンタゴニスト抗体または抗体断片、断片、または天然 V E G F - E ポリペプチドのアミノ酸配列変異体、ペプチド、有機小分子などが含まれる。

【 0 0 5 0 】

「小分子」とは、本明細書中では、約 5 0 0 ダルトン以下の分子量を有するものと定義する。

【 0 0 5 1 】

本明細書中で用いる用語「V E G F - E ポリペプチドレセプター」とは、V E G F - E ポリペプチドに対する細胞レセプター、通常、血管上皮細胞に見られる細胞表面レセプター、ならびにその変異体であって、V E G F - E ポリペプチド結合能を保持しているものを表す。

【 0 0 5 2 】

用語「抗体」は最も広義に用いられ、具体的には、単一の抗 V E G F - E ポリペプチドモノクローナル抗体 (アゴニスト、アンタゴニストおよび中和抗体を含む) およびポリエピトープ特異性を有する抗 V E G F - E 抗体組成物を含む。本明細書中で用いる用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に同質の抗体集団から得られる抗体を意味し、すなわち、この集団を構成する個々の抗体は、天然に少量存在し得る突然変異を除いて同一である。

【 0 0 5 3 】

本発明の目的に関する「活性化」または「活性」とは、天然の、あるいは天然に存在する V E G F - E ポリペプチドの生物学的に活性を有する V E G F - E 形態を表す。

【 0 0 5 4 】

ハイブリダイゼーションは「ストリンジェントな条件」下で行うのが好ましく、これは、(1) 洗浄に関し、低イオン強度および高温、例えば 0 . 0 1 5 塩化ナトリウム / 0 . 0 0 1 5 M クエン酸ナトリウム / 0 . 1 % ドデシル硫酸ナトリウムを 5 0 で用いるか、あるいは (2) ハイブリダイゼーション時に、変性剤、例えばホルムアミド、例えば、7 5 0 m M 塩化ナトリウム、7 5 m M クエン酸ナトリウムを含む 0 . 1 % ウシ血清アルブミン / 0 . 1 % F i c o l l / 0 . 1 % ポリビニルピロリドン / 5 0 n M リン酸ナトリウムバッファー (p H 6 . 5) を伴う 5 0 % (v o l / v o l) ホルムアミドを 4 2 で用いる。別の例では、5 0 % ホルムアミド、5 x S S C (0 . 7 5 M N a C l 、 0 . 0 7 5 M クエン酸ナトリウム)、5 0 m M リン酸ナトリウム (p H 6 / 8)、0 . 1 % ピロリン酸ナトリウム、5 x デンハート液、超音波破碎したサケ精子 D N A (5 0 μ g / m L)、0 . 1 % S D S および 1 0 % 硫酸デキストランを 4 2 で用い、0 . 2 x S S C および 0 . 1 % S D S 中 4 2 で洗浄する。さらに別の例では、1 0 % 硫酸

デキストラン、 $2 \times SSC$ (塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム) および 50% ホルムアミドのバッファーを 55 で用いてハイブリダイゼーションし、次いで EDTA を含む $0.1 \times SSC$ (55) で高ストリンジェンシー洗浄する。以前に記載されており、周知である他の条件を用いて、高度、低度または中程度のストリンジェンシーを達成することができる。核酸分子の核酸配列が提供されている場合、上に記載する条件下でそれにハイブリダイゼーションする他の核酸分子は本発明の範囲内であると考えられる。好ましくは、本明細書中に提供される核酸分子の核酸配列は、配列番号 1 の第 259 位 ~ 第 1293 位と 70% または 80% の核酸配列同一性を有する。最も好ましくは、この核酸配列は、配列番号 1 の第 259 位 ~ 第 1293 位と 90% または 95% の核酸同一性を有する。

【0055】

「トランスフェクション」とは、いずれかのコード配列が実際に発現されるか否かにかかわらず、宿主細胞によって発現ベクターが取り込まれることを表す。例えば、CaPO₄ およびエレクトロポレーションのようなたくさんのトランスフェクション方法が当業者に既知である。一般にトランスフェクションの成功は、このベクターの操作に関するいずれかの指標が宿主細胞内で生じることにより認識される。

【0056】

「形質転換 (形質導入)」とは、核酸を生物内に導入し、染色体外因子として、あるいは染色体に組み込ませることによって該核酸を複製可能にすることを意味する。用いられる宿主細胞に応じ、該細胞に適当な標準技術を用いて形質転換を行う。一般に、実質的な細胞壁障壁を有する原核生物および他の細胞に関しては、Cohen, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 69: 2110 (1972) および Mandel et al., J. Mol. Biol., 53: 154 (1970) に記載の、塩化カルシウムを用いるカルシウム処理を用いる。細胞壁を有さない哺乳類細胞に関しては、Graham and van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978) のリン酸カルシウム沈殿法が好ましい。哺乳類細胞宿主系形質転換の一般的側面は、1983年8月16日発行の米国特許第 4399216 号中、Axel によって記載されている。酵母への形質導入は、典型的に、Van Solingen et al., J. Bact., 130: 946 (1977) および Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979) の方法にしたがって行う。しかし、核注入またはプロトプラスト融合のような、細胞に核酸を導入する他の方法を用いることもできる。

【0057】

「部位特異的突然変異誘発」とは、当分野の技術標準であり、突然変異誘発されるべき一本鎖ファージ核酸と、所望の突然変異を示す一定のミスマッチを除いて相補的な合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて行う。簡単には、この合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、このファージに対する相補鎖を合成させ、得られた二本鎖核酸をファージ支持宿主バクテリア中に形質導入する。この形質転換されたバクテリアの培養物を上層寒天にプレーティングし、ファージを宿す単一の細胞からプラークを形成させる。理論的には、新規プラークの 50% が一本鎖として突然変異型を有するファージを含み；50% は元の配列を有するであろう。このプラークをキナーゼ処理された合成プライマーと、正確な対形成のハイブリダイゼーションを許容するが、元の鎖とのハイブリダイゼーションをミスマッチが妨げるのに十分な温度でハイブリダイゼーションさせる。次いで、該プローブとハイブリダイゼーションするプラークを選択し、培養して核酸を回収する。

【0058】

「作動可能に連結された」とは、成分の正常な機能が行われ得るような並置を表す。したがって、制御配列に「作動可能に連結された」コード化配列とは、コード化配列がこれらの配列の制御下で発現可能であり、連結されている DNA 配列が隣接し、さらに分泌リーダーの場合には、隣接し、リーディングフェイズ (reading phase) 内にあるような配置を表す。例えば、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合、プレ配列または分泌リーダーに対する核酸をポリペプチドに対する核酸に作動可能に連結し；配列の転写に影響を与える場合は、プロモーターまたはエンハンサーを作動可能に連結し；あるいは、翻訳を促進するように配置する場合には、コード化配列に対しリボソ-

10

20

30

40

50

ム結合部位を作動可能に連結する。連結は都合のよい制限部位でライゲーションすることによって行う。このような部位が存在しない場合は、慣用の実施にしたがって、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを利用する。

【0059】

「制御配列」は、特定の宿主生物内における、作動可能に連結されたコード化配列の発現に必要なDNA配列を表す。原核生物に適当な制御配列には、例えば、プロモーター、場合によりオペレーター配列、リボソーム結合部位および、可能性としては、他のまだ理解に乏しい配列が含まれる。真核生物細胞はプロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを利用することが知られている。

【0060】

「発現系」とは、作動可能な連結物内に所望のコード化配列（コーディング配列）および制御配列を含み、これらの配列で形質転換された宿主がコード化タンパク質を生産可能であるようなDNA配列を表す。形質転換を行うために、この発現系はベクター内に含まれ得るが、次いで、関連するDNAが宿主染色体に組み込まれることもある。

【0061】

本明細書中で用いる「細胞」、「細胞株」および「細胞培養物」は交換可能に用いられ、これらの名称はすべて、後代を含む。したがって、「形質転換体」または「形質転換細胞」には、何回世代交代したかにかかわらず、最初の対象細胞およびそこから誘導された培養物が含まれる。また、計画的または偶然の突然変異のせいで、すべての後代のDNA含量が正確に一致するわけではないかもしれないことが理解される。元の形質転換細胞においてスクリーニングされたものと同じ機能性を有する突然変異した後代も含まれる。はっきりと区別される名称が意図される箇所では、文脈からそれが明らかであろう。

【0062】

「プラスミド」は、大文字および/または数字が先立つ小文字pおよび/または後に続く小文字pによって表される。本明細書中の出発プラスミドは市販されているか、制限なく公に入手可能であるか、あるいは入手可能なプラスミドから公開されている手法にしたがって構築することができる。加えて、他の等価なプラスミドは当分野に既知であり、当業者には明らかであろう。

【0063】

DNAの「消化」とは、DNAの特定部位でのみ作用する酵素でDNAを触媒的に開裂させることを表す。このような酵素は制限酵素と称され、これに対してそれぞれ特異的な部位は制限部位と称される。本明細書中で用いられる種々の制限酵素は市販されており、その酵素の供給元によって確立された反応条件、補因子および他の必要物を用いる。制限酵素は一般に、各制限酵素が元々得られた微生物を表す、大文字およびそれに続く文字で構成される略語によって表され、次いで数字により特定の酵素が表される。一般に、約1mgのプラスミドまたはDNA断片を、バッファー溶液約20mL中の酵素約1~2ユニットとともに用いる。特定の制限酵素に対する適当なバッファーおよび基質量は製造元によって特定される。通常、37℃で約1時間のインキュベーションを行うが、これは供給元の指示にしたがって変わり得る。インキュベーション後、フェノールおよびクロロホルムで抽出してタンパク質を除去し、消化された核酸をエタノールで沈殿させて水性フラクションから回収する。制限酵素での消化後、まれに、末端5'リン酸塩をバクテリアのアルカリホスファターゼで加水分解し、DNA断片の2つの制限酵素開裂末端が「環化」するか、あるいは閉環ループを形成して、制限部位における別のDNA断片の挿入を妨害するのを妨げる。特に記載しない限り、プラスミドを消化した後、5'末端の脱ホスホリル化は行わない。脱ホスホリル化の手法および試薬は慣用のものである(Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982), pp. 133-134)。

【0064】

制限消化物からの規定のDNA断片の「回収」または「単離」とは、電気泳動して、ポリアクリルアミドゲルまたはアガロースゲル上で消化物を分離し、この移動度を既知の分

10

20

30

40

50

子量のマーカーDNA断片の移動度と比較して、関心ある断片を同定し、所望の断片を含むゲルセクションを切り出し、DNAからゲルを分離することを意味する。この手法は、一般に既知である。例えば、Lawn et al., *Nucleic Acids Res.*, 9: 6103-6114 (1981)、および Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.*, 8, 4057 (1980)を参照のこと。

【0065】

「サザン分析」とは、消化物またはDNA含有組成物中にDNA配列が存在することを既知のラベル化されたオリゴヌクレオチドまたはDNA断片とのハイブリダイゼーションによって確認する方法である。本発明の目的に関して、特に記載しないかぎり、サザン分析とは、1% アガロース上で消化物を分離し、変性させ、Southern, *J. Mol. Biol.*, 98: 503-517 (1975)の方法によってニトロセルロース膜に移し、Maniatis et al., *Cell*, 15: 687-701 (1978)に記載のようにハイブリダイゼーションさせることを意味する。

10

【0066】

「ライゲーション」とは、2つの二本鎖核酸断片間にホスホジエステル結合を形成させる過程を表す(Maniatis et al., 1982, 上記, p. 146)。特に記載しない限り、ライゲーションは、約等モル量の、ライゲーションされるDNA断片0.5mg当たり、T4DNAリガーゼ(「リガーゼ」)10ユニットを含む既知のバッファーおよび条件を用いて行い得る。

【0067】

形質転換体からのDNAの「調製」とは、微生物培養物からプラスミドDNAを単離することを意味する。特に記載しない限り、Maniatis et al., 1982, 上記, p. 90のアルカリ/SDS法を用いてもよい。

20

【0068】

「オリゴヌクレオチド」は、既知の方法(例えば、1988年5月4日公開のEP特許公報第266032号に記載のような固相技術を用いるか、あるいは Froehler et al., *Nucl. Acids Res.*, 14: 5399-5407 (1986)に記載のデオキシヌクレオシドH-ホスホナート中間体を介する、ホスホトリエステル、亜リン酸塩またはホスホルアミダイト化学)によって化学的に合成された、長さの短い、一本鎖または二本鎖のポリデオキシヌクレオチドである。次いでこれをポリアクリルアミドゲルで精製する。

【0069】

VEGF-Eの阻害剤には、アンチセンス分子を含む、VEGF-Eの活性または発現を減少させるか、あるいは阻害するものが含まれる。

30

【0070】

略語「KDR」とは、VEGF分子のキナーゼドメイン領域を表す。VEGF-EはこのドメインにおいてVEGFとの相同性を有さない。

【0071】

略語「FLT-1」とは、対応するFLT-1レセプターに結合することが知られている、FMS様チロシンキナーゼ結合ドメインを表す。VEGF-EはこのドメインにおいてVEGFとの相同性を有さない。

【0072】

II. 本発明の組成物および方法

40

A. 完全長VEGF-Eポリペプチド

本発明は、本明細書中、VEGF-Eと称されるポリペプチドをコードする、新規に同定単離されたヌクレオチド配列を提供する。具体的には、以下の実施例にさらに詳細に開示されているように、VEGF-EポリペプチドをコードするcDNAを同定単離した。BLAST配列アラインメントコンピュータープログラムを用い、VEGF-EポリペプチドがVEGFおよびBMP1と一定の配列同一性を有していることがわかった。

【0073】

B. VEGF-E変異体

本明細書中に記載の、完全長の天然配列VEGF-Eポリペプチドに加えて、VEGF-E変異体を調製することが可能であると考えられる。VEGF-E変異体は、VEGF

50

- EをコードするDNAに適当なヌクレオチド変更を導入するか、あるいは所望のVEGF-Eポリペプチドを合成することによって調製できる。当業者であれば、アミノ酸変更がVEGF-Eポリペプチドの翻訳後プロセッシング、例えばグリコシル化部位の数または位置もしくは膜アンカー性質を変化させ得ることを理解するであろう。

例えば、米国特許第5364934号に記載の保存的および非保存的突然変異に関するいずれかの技術およびガイドラインを用いて、天然の完全長配列VEGF-Eまたは、本明細書中に記載のVEGF-Eポリペプチドの種々のドメインに変異を施すことができる。変異は、VEGF-Eポリペプチドをコードする1つまたはそれ以上のコドンの置換、欠失、または挿入であって、天然配列のVEGF-Eと比べて、VEGF-Eポリペプチドのアミノ酸配列に変化を生じさせるものであり得る。場合により、この変異は、VEGF-Eポリペプチドの1つまたはそれ以上のドメインにおいて、少なくとも1つのアミノ酸が他のいずれかのアミノ酸で置換されていることによるものである。所望の活性に不都合な影響を与えることなく、いずれのアミノ酸残基を挿入、置換または欠失させることができるかの決定に関する指針は、VEGF-Eポリペプチドの配列を既知の相同タンパク質分子と比較し、高度に相同な領域内に施されるアミノ酸配列変化の数を最小にすることに見出すことができる。アミノ酸置換は、あるアミノ酸を、類似の構造および/または化学的性質を有する別のアミノ酸と取り替えること、例えばロイシンをセリンで置換すること、すなわち保存的アミノ酸置換の結果であり得る。挿入または欠失は、アミノ酸1~5個の範囲内であることもある。可能な変異は、該配列にアミノ酸の挿入、欠失または置換を計画的に施し、得られた変異体を、以下の実施例に記載のインビトロアッセイにおける活性に関して試験することによって決定することができる。

10

20

30

40

50

【0074】

このような変異は、当分野に既知の方法、例えばオリゴヌクレオチド媒介性(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキャンニング(alanine scanning)およびPCR突然変異誘発を用いて施すことができる。部位特異的突然変異誘発(Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987))、カセット突然変異誘発(Wells et al., Gene, 34:315 (1985))、制限選択的突然変異誘発(restriction selection mutagenesis, Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986))、または他の既知の技術をクローン化DNAに対して施し、VEGF-Eをコードする変異体DNAを生産する。

また、走査性アミノ酸(scanning amino acid)分析を用いて、1つまたはそれ以上のアミノ酸を、連続する配列に沿って同定することができる。好ましい走査性アミノ酸は比較的小さい中性アミノ酸である。このようなアミノ酸には、アラニン、グリシン、セリンおよびシステインが含まれる。アラニンは炭素を超える側鎖がなく、変異体の主鎖のコンフォメーションを変更する可能性が低いため、この群内の一般に好ましい走査性アミノ酸である。また、アラニンは最も一般的なアミノ酸であるため、一般に好ましい。さらに、アラニンはしばしば、埋め込まれた位置および暴露された位置の両方に見られる(Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976))。アラニン置換によって適量の変異が生じない場合には、イソテリックアミノ酸(isoteric amino acid)を用いることができる。

【0075】

C. VEGF-Eの修飾

VEGF-Eポリペプチドの共有結合による修飾は本発明の範囲内に含まれる。1つのタイプの共有結合による修飾には、VEGF-Eポリペプチドの標的アミノ酸残基を、VEGF-Eポリペプチドの選択的側鎖またはN末端またはC末端残基と反応可能な有機誘導体物質と反応させることが含まれる。二官能性物質での誘導体化は、例えば、抗VEGF-E抗体の精製方法での使用のために、VEGF-Eを水不溶性の支持基質または表面に架橋するのに有用であり、また逆も然りである。一般に用いられる架橋剤には、例えば1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸とのエステル、3,3'

- ジチオビス - (スクシンイミジルプロピオナート) のようなジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス - N - マレイミド - 1 , 8 - オクタンのような二官能性マレイミドおよび、メチル - 3 - ((p - アジドフェニル) - ジチオ) プロピオイミデートのような物質が含まれる。

他の修飾には、グルタミンルおよびアスパラギンル残基をそれぞれ対応するグルタミルおよびアルパルチル残基に脱アミド化し、プロリンおよびリシンをヒドロキシル化し、セリル残基またはスレオニル残基のヒドロキシル基をリン酸化し、リシン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖の - アミノ基をメチル化し(T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983))、N末端アミンをアセチル化し、ならびに任意のC末端カルボキシル基をアミド化することが含まれる。

10

【 0 0 7 6 】

本発明の範囲内に含まれる、VEGF - Eポリペプチドの、別のタイプの共有結合による修飾は、このポリペプチドの天然グリコシル化パターンを変更することを含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、本発明の目的のため、天然配列のVEGF - Eポリペプチド中に見られる1つまたはそれ以上の炭水化物部分を欠失させること、および/または、天然配列のVEGF - Eポリペプチドには存在しない1つまたはそれ以上のグリコシル化部位を加えることを意味するものとする。

VEGF - Eポリペプチドのアミノ酸配列を変更することによって、これにグリコシル化部位を加えることができる。この変更は、例えば(O結合グリコシル化に関しては)天然配列のVEGF - Eポリペプチドに1つまたはそれ以上のセリンまたはスレオニン残基を加えるか、あるいは天然配列のVEGF - Eポリペプチドを1つまたはそれ以上のセリンまたはスレオニン残基で置換することによって行ってもよい。場合により、DNAレベルでの変化、特にVEGF - EポリペプチドをコードするDNAをあらかじめ選択された塩基の位置で突然変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成させることによってVEGF - Eアミノ酸配列を変化させてもよい。

20

【 0 0 7 7 】

VEGF - Eポリペプチドの炭水化物部分の数を増加させる別の方法は、このポリペプチドに、化学的または酵素的にグリコシドをカップリングさせることによるものである。このような方法は、当分野、例えば1987年9月11日公開のWO 87 / 05330およびAplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981) に記載されている。

30

VEGF - Eポリペプチド上に存在する炭水化物部分は、化学的または酵素的に、あるいはグリコシル化の標的となるアミノ酸残基をコードするコドンの突然変異性置換によって除去することができる。化学的脱グリコシル化技術は当分野に既知であり、例えばHakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) およびEdge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981) に記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分は、Thokakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987) に記載のように、種々のエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼを用いて酵素的に開裂させることができる。

40

【 0 0 7 8 】

VEGF - Eの、別のタイプの共有結合による修飾には、米国特許第4640835号、第4496689号、第4301144号、第4670417号、第4791192号または第4179337号に記載の方法により、VEGF - Eポリペプチドを種々の非タンパク質性ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンのいずれかと結合させることが含まれる。

本発明のVEGF - Eポリペプチドをまた、別の異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列と融合させたVEGF - Eポリペプチドを含むキメラ分子を形成させるように修飾してもよい。1つの態様では、このようなキメラ分子は、VEGF - Eポリペプチドと、抗タグ抗体が選択的に結合可能なエピトープを提供するタグポリペプチドとの融合物を含む。このエピトープタグは一般に、VEGF - Eポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル

50

末端に配置される。このようなエピトープタグを付された形態の V E G F - E ポリペプチドの存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出可能である。また、エピトープタグを提供すると、抗タグ抗体または、このエピトープタグと結合する他のタイプのアフィニティー基質を用いるアフィニティー精製により、V E G F - E ポリペプチドを容易に精製することが可能になる。別の態様では、キメラ分子は、V E G F - E ポリペプチドと免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定領域との融合物を含み得る。二価形態のキメラ分子用には、該融合は I g G 分子の F c 領域に対するものであり得る。

【 0 0 7 9 】

種々のタグポリペプチドおよびそれぞれに対する抗体は当分野に周知である。具体例には、ポリヒスチジン (ポリ - h i s) またはポリヒスチジングリシン (ポリ - h i s - g l y) タグ ; f l u H A タグポリペプチドおよびその抗体 1 2 C A 5 (Field et al., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)) ; c - m y c タグおよびそれに対する 8 F 9、3 C 7、6 E 1 0、G 4、B 7 および 9 E 1 0 抗体 (Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)) ; および単純ヘルペスウイルスグリコプロテイン D (g D) タグおよびその抗体 (Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)) が含まれる。他のタグポリペプチドには、F l a g ペプチド (Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)) ; K T 3 エピトープペプチド (Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)) ; - チューブリンエピトープペプチド (Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)) ; および T 7 遺伝子 1 0 タンパク質ペプチドタグ (Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)) が含まれる。

【 0 0 8 0 】

D . V E G F - E の調製

以下の記載は主に、少なくとも、丸で囲まれた出発コドンで始まり、終止コドンの直前で終わる、図 1 に記載のコード化核酸を含むベクターで形質転換またはトランスフェクションされた細胞を培養することによって V E G F - E を生産することに関する。もちろん、当分野に周知の別の方法を用いて、V E G F - E ポリペプチドを調製してもよいと思われる。例えば、固相技術を用いる直接ペプチド合成によって V E G F - E 配列またはその一部を生産してもよい (Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969) ; Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963) を参照のこと)。インビトロタンパク質合成は、手動の技術を用いるか、あるいは自動操作により行うことができる。自動化合成は、例えば Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) を用い、製造元の使用説明にしたがって行うことができる。V E G F - E ポリペプチドの種々の部分を別々に化学合成し、化学的または酵素的方法を用いて結合させ、完全長 V E G F - E ポリペプチドを生産してもよい。

【 0 0 8 1 】

1 . V E G F - E をコードする D N A の単離

V E G F - E ポリペプチドをコードする D N A は、V E G F - E m R N A を有し、それを検出可能なレベルで発現していると信じられている組織から調製された c D N A ライブラリーから得ることができる。したがって、ヒト V E G F - E をコードする D N A は、実施例に記載のような、ヒト組織から調製された c D N A ライブラリーから簡単に得ることができる。また、V E G F - E をコードする遺伝子を、ゲノムライブラリーから得るか、あるいはオリゴヌクレオチド合成によって得てもよい。

ライブラリーは、関心ある遺伝子またはそれによってコードされるタンパク質を同定するように設計されたプローブ (例えば V E G F - E ポリペプチドに対する抗体または少なくとも約 1 7 ~ 8 0 塩基のオリゴヌクレオチド) を用いてスクリーニングできる。Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載のような標準的手法を用い、選択されたプローブで c D N A またはゲノムライブラリーのスクリーニングを行うことができる。V E G F - E をコードする遺伝子を単離する別の方法は、P C R 方法論を用いるものである (Sambrook et al., 上記 ; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor

10

20

30

40

50

Laboratory Press, 1995))。

【 0 0 8 2 】

以下の実施例は c D N A ライブラリーのスクリーニング技術を説明する。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、偽陽性を最小化するのに十分な長さでかつ十分明確なものであるべきである。オリゴヌクレオチドをラベルし、スクリーニングされるライブラリー中の D N A とのハイブリダイゼーション時に検出可能であるようにするのが好ましい。ラベル化法は当分野に周知であり、これには、³²P ラベル化 A T P のような放射性ラベル、ピオチニル化または酵素ラベル化の使用が含まれる。低ストリンジェンシー、中ストリンジェンシーおよび高ストリンジェンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、Sambrook et al., 1989 (上記) 中に提供される。

10

このようなライブラリースクリーニング法において同定された配列を、寄託され、G e n B a n k のような公的なデータベースまたは他の私的配列データベースにおいて入手可能な他の既知の配列と比較、アラインメントすることができる。分子の規定の領域内または完全長配列にわたる (アミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルでの) 配列同一性は、A L I G N、D N A s t a r および I N H E R I T のようなコンピューターソフトウェアプログラムを用いる配列アラインメントにより決定できる。

まず、本明細書中に開示される、演繹されたアミノ酸配列を用いて選択的 c D N A またはゲノムライブラリーをスクリーニングし、必要であれば、Sambrook et al., 1989 (上記) に記載の慣用のプライマー伸張手法を用いて、c D N A に逆転写されなかったかもしれない m R N A の前駆体およびプロセッシング中間体を検出することによって、タンパク質コード化配列を有する核酸を得ることができる。

20

【 0 0 8 3 】

2 . 宿主細胞の選択および形質転換

本明細書中に記載の、V E G F - E ポリペプチド生産用の発現ベクターまたはクローニングベクターで宿主細胞をトランスフェクションあるいは形質転換し、プロモーターの誘導、形質転換体の選択または所望の配列をコードする遺伝子の増幅用に適当なように修飾された慣用の栄養培地中で培養する。当業者であれば、過度に実験することなしに、培地、温度、p H などのような培養条件を選択することができる。一般に、細胞培養物の生産性を最大にするための原理、プロトコルおよび実施技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) および Sambrook et al., 1989 (上記) 中に見出すことができる。

30

トランスフェクション法、例えば C a P O₄ およびエレクトロポレーションは当業者に既知である。用いる宿主細胞に応じ、該細胞に適当な標準的技術を用いて形質転換を行う。Sambrook et al., 1989 (上記) に記載の塩化カルシウムを用いるカルシウム処理、またはエレクトロポレーションは一般に、実質的な細胞壁障壁を含む原核生物または他の細胞に対して用いられる。細胞壁のない哺乳類細胞に関しては、Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978) のリン酸カルシウム沈殿法を用いることができる。哺乳類細胞宿主系形質転換体の一般的側面は米国特許第 4 3 9 9 2 1 6 号に記載されている。酵母内への形質導入は一般に、Van Solingen et al., J. Bact., 130:946 (1977) および Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979) の方法にしたがって行う。しかし、D N A を細胞内へ導入する他の方法、例えばマイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞とのバクテリアプロトプラスト融合またはポリカチオン、例えばポリブレンまたはポリオルニチンによる方法を用いてもよい。哺乳類細胞を形質転換する種々の技術に関しては、Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) および Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988) を参照のこと。

40

【 0 0 8 4 】

本明細書中のベクター内の D N A をクローニングまたは発現するのに適当な宿主細胞には、原核生物、酵母または高等真核生物細胞が含まれる。適当な原核生物には、グラム陰性またはグラム陽性生物のような真正細菌、例えば大腸菌のような腸内細菌科が含まれるがこれらに限定されない。大腸菌 K 1 2 株 M M 2 9 4 (A T C C 3 1 , 4 4 6) ; 大腸

50

菌 X 1 7 7 6 (A T C C 3 1 , 5 3 7) ; 大腸菌株 W 3 1 1 0 (A T C C 2 7 , 3 2 5) および K 5 7 7 2 (A T C C 5 3 , 6 3 5) のような種々の大腸菌株が公に利用可能である。

原核生物に加えて、真核微生物、例えば繊維状真菌または酵母は、V E G F - E をコードするベクターの適当なクローニング宿主または発現宿主である。サッカロミセスセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) は一般に用いられる低級真核宿主微生物である。

【 0 0 8 5 】

グリコシル化 V E G F - E の発現に適当な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例には、ショウジョウバエ S 2、およびスポドプテラ (*Spodoptera*) S f 9 のような昆虫細胞ならびに植物細胞が含まれる。有用な哺乳類宿主セルラインの例には、
 10
 チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) および C O S 細胞が含まれる。より詳細な例には、S V 4 0 で形質転換されたサル腎臓 C V 1 ライン (C O S - 7、A T C C C R L 1 6 5 1) ; ヒト胎児腎臓ライン (2 9 3 または懸濁培養物中での生育に関してサブクローニングされた 2 9 3 細胞、Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)) ; チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - D H F R (C H O、Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 77:4216 (1980)) ; マウスセルトリ細胞 (T M 4、Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)) ; ヒト肺細胞 (W 1 3 8、A T C C C C L 7 5) ; ヒト肝臓細胞 (H e p G 2、H B 8 0 6 5) ; およびマウス乳房腫瘍 (M M T 0 6 0 5 6 2、A T C C C C L 5 1) が含まれる。適当な宿主細胞の選択は当業者の技術水準の範囲内であると考えられる。
 20

【 0 0 8 6 】

3. 複製可能なベクターの選択および使用

所望の V E G F - E ポリペプチドをコードする核酸 (例えば c D N A またはゲノム D N A) を、クローニング (D N A の増幅) 用または発現用の複製可能なベクターに挿入することができる。種々のベクターが公に利用可能である。ベクターは、例えばプラスミド、コスミド、ウイルス粒子またはファージの形態であり得る。種々の手法により、適当な核酸配列をベクターに挿入することができる。一般には、当分野に既知の技術を用い、D N A を適当な制限エンドヌクレアーゼ部位 (群) に挿入する。ベクター成分には一般に、1 つまたはそれ以上のシグナル配列、複製起点、1 つまたはそれ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー因子、プロモーターおよび転写終結配列が含まれるがこれらに限定されない。
 30
 1 つまたはそれ以上のこれらの成分を含む適当なベクターの構築には、当業者に既知の標準的ライゲーション技術を用いる。

所望の V E G F - E ポリペプチドを、直接組換え生産するだけでなく、成熟タンパク質またはポリペプチドの N 末端に特異的開裂部位を有するシグナル配列または他のポリペプチドであり得る、異種ポリペプチドとの融合ポリペプチドとして組換え生産してもよい。一般には、シグナル配列はベクターの成分であり得、あるいはベクターに挿入された V E G F - E をコードする D N A の一部であり得る。シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、l p p または熱安定性エンテロトキシン I E リーダーの群から選択される原核生物のシグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は例えば、酵母インペルターゼリーダー、(サッカロミセスおよびクルイペロミセス (*K luyveromyces*) 因子リーダー (後者は米国特許第 5 0 1 0 1 8 2 号に記載されている) を含む) 因子リーダーまたは酸ホスファターゼリーダー、C . アルビカンス (*C. albicans*) グルコアミラーゼリーダー (1 9 9 0 年 4 月 4 日公開の E P 3 6 2 1 7 9) または 1 9 9 0 年 1 1 月 1 5 日公開の W O 9 0 / 1 3 6 4 6 に記載のシグナルであってよい。哺乳類細胞の発現では、哺乳類のシグナル配列、例えば同種または関連種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列、ならびにウイルスの分泌リーダーを用いて、タンパク質を分泌させることができる。
 40

【 0 0 8 7 】

発現ベクターおよびクローニングベクターは両者とも、1 つまたはそれ以上の選択された宿主細胞内で該ベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。このような配列は種々の
 50

バクテリア、酵母およびウイルスに関して周知である。プラスミド p B R 3 2 2 由来の複製起点はほとんどのグラム陰性バクテリアに相当であり、2 μ プラスミド起点は酵母に相当であり、また種々ウイルス (S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V または B P V) の起点は、哺乳類細胞内のクローニングベクターに有用である。

発現ベクターおよびクローニングベクターは一般に、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質または他の毒素、たとえばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートまたはテトラサイクリンに対する耐性を与えるか、(b) 栄養要求性欠損を補完するか、あるいは (c) 複合培地からは利用可能でない重要な栄養素、例えば、パチルス (Bacilli) 用の D - アラニンラセマーゼをコードする遺伝子を供給するタンパク質をコードする。

【 0 0 8 8 】

哺乳類細胞に適切な選択可能マーカーの例は、V E G F - E をコードする核酸を取り込む能力を有する細胞の同定を可能にするもの、例えば D H F R またはチミジンキナーゼである。野生型 D H F R を用いる場合に適切な宿主細胞は、Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980) に記載のように調製培養された D H F R 活性を欠損している C H O セルラインである。酵母において使用するのに適切な選択遺伝子は、酵母プラスミド Y R p 7 上に存在する t r p 1 遺伝子である (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980))。t r p 1 遺伝子は、トリプトファン内での生育能を欠いている酵母突然変異株、例えば A T C C No. 4 4 0 7 6 または P E P 4 - 1 に関する選択マーカーを提供する (Jones, Genetics, 85:12 (1977))。

発現ベクターおよびクローニングベクターは通常、m R N A 合成のための、V E G F - E をコードしている核酸配列に作動可能に連結されているプロモーターを含む。種々の潜在的宿主細胞によって認識されるプロモーターは周知である。原核宿主とともに用いるのに適切なプロモーターには、 β -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系 (Chang et al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979))、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (t r p) プロモーター系 (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); E P 3 6 7 7 6) および t a c プロモーターのようなハイブリッドプロモーター (deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)) が含まれる。バクテリア系で使用するためのプロモーターはまた、V E G F - E ポリペプチドをコードする D N A と作動可能に連結されたシャイン - ダルガルノ (S . D .) 配列を含む。

【 0 0 8 9 】

酵母宿主とともに使用するのに適切なプロモーター配列の例には、3 - ホスホグリセラートキナーゼ (Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)) または他の糖分解酵素 (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978))、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド - 3 - ホスフェイトデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース - 6 - ホスフェイトイソメラーゼ、3 - ホスホグリセラートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースホスフェイトイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼおよびグルコキナーゼのプロモーターが含まれる。

生育条件によって制御される転写に関してさらなる利点を有する誘導可能なプロモーターである、他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロナーゼ 2、イソシトクローム C、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、金属結合性タンパク質、グリセルアルデヒド - 3 - ホスフェイトデヒドロゲナーゼおよびマルトースおよびガラクトース利用を行う酵素に関するプロモーター領域である。酵母内での発現において使用するのに適切なベクターおよびプロモーターは E P 7 3 6 5 7 にさらに記載されている。哺乳類宿主細胞におけるベクターからの V E G F - E の転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス (fowlpox virus、1 9 8 9 年 7 月 5 日公開の U K 2 2 1 1 5 0 4)、アデノウイルス (例えばアデノウイルス 2)、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイル

10

20

30

40

50

ス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、シミアンウイルス40 (SV40)のようなウイルスのゲノム由来のプロモーター、異種哺乳類プロモーター、例えばアクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーター由来、および熱ショックプロモーター由来のプロモーターによって制御される(ただし、このようなプロモーターは宿主細胞系と適合することを条件とする)。

【0090】

高等真核生物による、VEGF-EをコードするDNAの転写は、該ベクターにエンハンサー配列を挿入することによって増加させることができる。エンハンサーは、通常、約10~300bpのDNAのシス作用因子(cis-acting elements)で、プロモーターに作用し、その転写を増加させる。現在、哺乳類遺伝子(グロブリン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテインおよびインシュリン)由来の多くのエンハンサー配列が既知である。しかし、一般には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーを用いる。この例には、複製起点の後期側に位置するSV40エンハンサー(bp100~270)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側に位置する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含まれる。エンハンサーは、VEGF-Eコード化配列の5'側または3'側でベクターに挿入することができるが、プロモーターの5'側に位置させるのが好ましい。

真核宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒトまたは他の多細胞生物からの核形成細胞(nucleated cells))内で使用する発現ベクターはまた、転写終結に必要な配列およびmRNAの安定化に必要な配列を含む。このような配列は一般に、真核生物またはウイルスDNA群またはcDNA群の5'側および、時に3'側非翻訳領域から入手可能である。これらの領域は、VEGF-EをコードするmRNAの非翻訳部分に、ポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養物中でのVEGF-Eポリペプチドの合成に適用するのに適当な、さらに他の方法、ベクターおよび宿主細胞は、Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979); EP 117060; および EP 117058 に記載されている。

【0091】

4. 遺伝子増幅/発現の検出

遺伝子増幅および/または発現は、本明細書中で提供される配列に基づく、適当なラベル化プローブを用い、例えば慣用のサザンブロッティング、ノザンブロッティングによりmRNAの転写を定量して(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980))、あるいはドットブロッティング(DNA分析)またはインシトゥーハイブリダイゼーションによってサンプル中で直接測定することができる。別法では、二本鎖DNA、二本鎖RNAおよびDNA-RNAのハイブリッド二本鎖またはDNA-タンパク質の二本鎖(DNA-protein duplexes)を含む、特異的な二本鎖を認識できる抗体を用いてもよい。次いでこの抗体をラベルし、二本鎖を表面に結合させ、表面上の二本鎖形成時に、二本鎖に結合した抗体の存在が検出可能であるようなアッセイを行ってもよい。

別法では、免疫学的方法、例えば細胞または組織セクションの免疫組織化学的染色および細胞培養物または体液のアッセイを用い、直接、遺伝子産物の発現を定量することによって遺伝子発現を測定することができる。免疫組織化学的染色および/またはサンプル液のアッセイに有用な抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであってよく、任意の哺乳類内で調製することができる。簡単には、天然配列のVEGF-Eポリペプチド、または本明細書中に提供されるDNA配列に基づく合成ポリペプチド、またはVEGF-EをコードするDNAおよび特定の抗体エピトープをコードするDNAと融合された外因性配列に対する抗体を調製することができる。

【0092】

5. ポリペプチドの精製

各形態のVEGF-Eは培養培地または宿主細胞溶解物から回収することができる。VEGF-Eポリペプチドの発現に用いられる細胞は、凍結解凍サイクル、超音波破碎、機

械的破砕または細胞溶解剤のような種々の物理的または化学的手段によって粉砕することができる。VEGF-Eを、組換え細胞タンパク質またはポリペプチドから精製するのが望ましいこともある。以下の手法は適当な精製手法の例である：イオン交換カラムでのフラクション化；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカゲルクロマトグラフィーまたはカチオン交換樹脂、例えばDEAEクロマトグラフィー；等電点電気泳動(chromatofocusing)；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばSephadex G-75を用いるゲルろ過；汚染物、例えばIgGを除去するためのプロテインAセファロースカラム；およびエピトプタグを付された形態のVEGF-Eポリペプチドを結合させるための金属キレートカラム。当分野に既知であり、例えばDeutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990)；Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982)に記載されている種々のタンパク質精製方法を用いることができる。精製過程(群)は、例えば用いられる生成方法の性質および生成される特定のVEGF-Eポリペプチドに依存して選択される。

10

VEGF-Eは二量体に集合するため、ヘテロ二量体およびホモ二量体を提供することは本発明の範囲内である。1つまたはそれ以上のサブユニットが変異体である場合、アミノ酸配列の変化は各サブユニット鎖に関して同じこともあり、異なっていることもあり得る。ヘテロ二量体は、両サブユニットをコードするDNAで宿主細胞を同時形質転換し、必要であれば、所望のヘテロ二量体を精製することによるか、あるいはサブユニットを別々に合成し、(例えば、尿素、グアニジン塩酸などのカオトロピック物質で処理することによって)サブユニットを解離させ、解離したサブユニットを混合し、次いでカオトロピック物質を透析して除くことによってサブユニットを再び会合させることによって容易に生産される。

20

【0093】

E. VEGF-Eの使用および製剤化

1. 心臓血管、内皮および血管新生活性に関するアッセイ

種々のアッセイを用いて、本明細書中のポリペプチドを心臓血管、内皮および血管新生活性に関して試験することができる。このようなアッセイには、以下の実施例に提供されるものが含まれる。

米国特許第5773414号に開示される、エンドセリンアンタゴニスト活性に関して試験するアッセイには、レセプターアッセイにおけるヨウ素化エンドセリン-1結合を阻害する能力に関してポリペプチドを試験する、ラット心室結合アッセイ、ウサギ腎動脈血管平滑筋細胞を用い、無傷の細胞の放射性ラベル化エンドセリン-1結合に関して試験する、エンドセリンレセプター結合アッセイ、第二のメッセンジャーの細胞内レベルを測定することによってラット-1細胞における機能活性を測定する、リン酸イノシトール蓄積アッセイ、培養血管平滑筋内において、添加化合物がエンドセリン刺激性アラキドン酸放出を減少させる能力を測定する、アラキドン酸放出アッセイ、雄性ニュージーランドウサギ由来の内皮細胞を用いるインビトロ(単離血管)試験、ならびに雄性Sprague-Dawleyラットを用いるインビボ試験が含まれる。組織生成活性に関するアッセイには、WO 95/16035(骨、軟骨、腱)；WO 95/05846(神経、ニューロン)およびWO 91/07491(皮膚、内皮)に記載されるものが含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0094】

傷害治癒活性に関するアッセイには、例えば、Eaglstein and Mertz, *J. Invest. Dermatol.*, 71:382-384 (1978)の論文によって修飾された、Winter, *Epidermal Wound Healing*, Maibach, HI and Rovee, DT, eds. (Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago), pp. 71-112に記載されるアッセイが含まれる。

エンドセリンB₁(ETB₁)レセプターポリペプチドと結合し、シグナル変換活性を調節する、VEGF-Eポリペプチドに関連する試験分子に関してスクリーニングするアッセイは、例えば米国特許第5773223号に記載されるように、エンドセリンB₁レセプターポリペプチドをコードするDNAで形質転換された宿主細胞を提供し、この細胞

50

を試験候補物質に暴露し、エンドセリン B₁ レセプターシグナル変換活性を測定することを含む。

【0095】

いくつかの心臓肥大アッセイが存在する。インビトロアッセイには、成体ラット心筋細胞の拡大の誘導が含まれる。このアッセイでは、Piper et al., "Adult ventricular rat heart muscle cells" in Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research, H. M. Piper, ed. (Berlin: Springer-Verlag, 1990), pp. 36-60 に詳細に記載されている手法の修飾法に本質的にしたがって、単一の(雄性 Sprague-Dawley)ラットから心室筋細胞を単離する。この手法は、成体心室筋細胞の単離および桿状表現型のこれらの細胞の長期間培養を可能にする。フェニレフリンおよびプロスタグランジン F₂ (PGF₂) はこれらの成体細胞における拡大応答を誘導することが示された。次いで、PGF₂ または PGF₂ アナログ(例えばフルプロステノール(fluprostenol))およびフェニレフリンによって誘導される筋細胞拡大の、種々の潜在的な心臓肥大阻害剤による阻害を試験する。

10

【0096】

インビボアッセイの一例は、インビボでフルプロステノールによって誘導される心臓肥大の阻害に関する試験である。この薬理学的モデルは、フルプロステノール(PGF₂のアゴニストアナログ)の皮下注射により、ラット(例えば雄性 Wistar または Sprague-Dawley)において誘導された心臓肥大を阻害する、VEGF-Eポリペプチドの能力を試験する。心筋梗塞によって誘導された病理学上の心臓肥大を患うラットは、その心筋内において、抽出可能な PGF₂ 量が慢性的に増加していることが知られている。Lai et al., Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.), 271: H2197-H2208 (1996)。したがって、インビボの心筋細胞増殖に対するフルプロステノールの作用を阻害可能な因子は、心臓肥大の処置に関して潜在的に有用である。心臓肥大に対する VEGF-Eポリペプチドの効果は、VEGF-Eポリペプチドを投与しないフルプロステノール処置ラットと比較した、(体重によって標準化した)心臓、心室および左心室重量を測定することによって決定する。

20

インビボアッセイの別の例は、圧力過負荷心臓肥大アッセイである。インビボ試験に関しては、試験動物の腹部大動脈を締め付けることによって圧力過負荷心臓肥大を誘導するのが一般的である。典型的なプロトコルでは、ラット(例えば雄性 Wistar または Sprague-Dawley)を麻酔下で処置し、各ラットの腹部大動脈を横隔膜直下で締め付ける。Beznak M., Can. J. Biochem. Physiol., 33: 985-94 (1955)。外科的切開によってこの動脈を暴露させ、短い太針を管に隣接して設置する。針の周りを絹糸で縛ってこの動脈を締め付け、針をすぐに除去して、動脈の管腔を針の直径にまで小さくする。このアプローチは、例えば Rossi et al., Am. Heart J., 124: 700-709 (1992) および O'Rourke and Reibel, P.S.E.M.B., 200: 95-100 (1992) に記載されている。

30

【0097】

さらに別のインビボアッセイでは、実験的に誘導された心筋梗塞(MI)後の心臓肥大に対する作用を測定する。左冠動脈を縛ることによって急性MIを誘導し、心電計検査によって確認する。偽手術群の動物をコントロール動物として調製する。早期のデータでは、体重に対する心臓の重量比が18%増加したことによって示されるように、MIを患う動物の群には心臓肥大が伴うことが示された。Lai et al. (上記)。心臓肥大の候補遮断剤、例えば VEGF-Eポリペプチドでこれらの動物を処置すると、試験された候補物質の治療的潜在能力についての貴重な情報が得られる。心臓肥大の誘導に関する、さらなるこのようなアッセイ試験の1つは、Sprague-Dawleyラットを用いる、米国第5773415号に開示されているものである。

40

癌に関し、種々の周知の動物モデルを用いて、本明細書中で同定された遺伝子の、腫瘍の発達および病因に関する役割をさらに理解し、天然 VEGF-Eポリペプチドの抗体および他のアンタゴニスト、例えば小分子アンタゴニストを含む、候補治療薬の効力を試験することができる。このようなモデルのインビボ性質から、ヒト患者における応答を具体

50

的に予測することができる。腫瘍および癌（例えば乳癌、大腸癌、前立腺癌、肺癌など）の動物モデルには、組換えされていない動物および組換え（トランスジェニック）動物の両方が含まれる。組換えされていない動物モデルには、例えば齧歯動物、例えばマウスモデルが含まれる。このようなモデルは、標準的技術、例えば皮下注射、尾静脈注射、脾臓移植、腹膜内移植、腎被膜下移植またはオルトピン(orthopin)移植を利用し、腫瘍細胞を同系マウスに導入する（例えば大腸癌細胞を結腸組織内に移植する）ことによって調製することができる。例えば、1997年9月18日公開のPCT公報第WO 97/33551号を参照のこと。

【0098】

腫瘍学研究において最もよく用いられるであろう動物種は免疫機能不全マウス、特にヌードマウスである。胸腺減形成/無形成のヌードマウスは、ヒト腫瘍異種移植片の宿主として首尾よく働くことが観察され、このような目的に幅広く使用されることになった。常染色体劣性形質 *nu* 遺伝子が、例えば *ASW*、*A/He*、*AKR*、*BALB/c*、*B10.LP*、*C17*、*C3H*、*C57BL*、*C57*、*CBA*、*DBA*、*DDD*、*I/st*、*NC*、*NFR*、*NFS*、*NFS/N*、*NZB*、*NZC*、*NZW*、*P*、*RIII* および *SJL* を含む、非常に多数の明確な共通遺伝子系統ヌードマウスに導入された。さらに、ヌードマウス以外の遺伝的な免疫学的欠損を有する、他の広範な種々の動物を作成し、腫瘍異種移植片の受容体として用いた。さらに詳細には、例えば *The Nude Mouse in Oncology Research*, E. Boven and B. Winograd, eds. (CRC Press, Inc., 1991) を参照のこと。

該動物に導入される細胞は、上に列記される腫瘍セルラインおよび、例えば *B104-1-1* セルライン（*neu* 原腫瘍遺伝子でトランスフェクションされた安定 *NIH-3T3* セルライン）；*ras* トランスフェクション *NIH-3T3* 細胞；*Caco-2*（*ATCC HTB-37*）；または適度によく分化したグレード *II* ヒト結腸腺癌セルライン、*HT-29*（*ATCC HTB-38*）のような既知の腫瘍/癌セルラインまたは別の腫瘍および癌から誘導可能である。腫瘍または癌細胞のサンプルは、液体窒素中での凍結および保存を含む標準的条件を用い、手術を受けている患者から得ることができる。Karmali et al., *Br. J. Cancer*, 48: 689-696 (1983)。

【0099】

種々の手法により、腫瘍細胞を動物、例えばヌードマウスに導入することができる。マウスの皮下（*s.c.*）スペースは腫瘍の移植に非常に適している。腫瘍は、固形ブロックとして、トロカールの使用により針状バイオプシーとして、あるいは細胞懸濁物として皮下移植することができる。固形ブロックまたはトロカール移植用には、適当なサイズの腫瘍組織断片を皮下スペースに導入する。細胞懸濁物は、最初の腫瘍または安定な腫瘍セルラインから新たに調製し、皮下注射する。また、腫瘍細胞を皮下移植片として注射することもできる。この位置において、移植片は皮膚結合組織の下部と皮下組織の間に沈着する。

乳癌の動物モデルは、本質的には Drebin et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83: 9129-9133 (1986) に記載のように、例えばラット神経芽腫細胞（ここから *neu* 腫瘍遺伝子が最初に単離された）または *neu* トランスフェクション *NIH-3T3* 細胞をヌードマウスに移植することによって製造できる。

同様に、大腸癌の動物モデルは、動物、例えばヌードマウスに大腸癌細胞を継代し、これらの動物に腫瘍を出現させることによって製造できる。ヌードマウスにおけるヒト大腸癌の正所性移植モデルは、例えば Wang, et al., *Cancer Research*, 54: 4726-4728 (1994) および Too et al., *Cancer Research*, 55: 681-684 (1995) に記載されている。このモデルは、AntiCancer, Inc. (San Diego, California) から市販されている、いわゆる "METAMOUSE"（登録商標）に基づくものである。

【0100】

動物内に生じた腫瘍を取り出し、インビトロで培養することができる。次いで、インビトロ培養物由来の細胞を動物に継代 (passage) することができる。このような腫瘍は、さらなる試験または薬物スクリーニング用の標的として働き得る。別法として、継代により

得られた腫瘍を単離し、継代前の細胞および1回またはそれ以上の継代後に単離された細胞由来のRNAを関心ある遺伝子の差異発現に関して分析することができる。このような継代技術は、いずれかの既知の腫瘍または癌セルラインを用いて行うことができる。

例えばMeth A、CMS4、CMS5、CMS21およびWEHI-164は化学的に誘導された、BALB/c雌性マウスの繊維肉腫であり(DeLeo et al., J. Exp. Med., 146: 720 (1977))、これは、種々の物質の抗腫瘍活性を研究するための、高度に制御可能なモデル系を提供する。Palladino et al., J. Immunol., 138: 4023-4032 (1987)。簡単には、細胞培養物中、インビトロで腫瘍細胞を増殖させる。動物への注射前に、このセルラインを洗浄し、バッファ中に、約 $10 \times 10^6 \sim 10 \times 10^7$ 細胞/mLの細胞密度で懸濁する。次いでこの動物に、細胞懸濁液10~100 μ Lを皮下感染させ、1~3週間で腫瘍を出現させる。

10

【0101】

さらに、最もよく研究された実験的腫瘍の1つである、マウスのルイス肺(3LL)癌を、研究用の腫瘍モデルとして用いることができる。この腫瘍モデルにおける効力は、肺の小細胞型癌(SCCL)と診断されたヒト患者の処置における有益な効果と相関した。病気に冒されたマウス由来の腫瘍断片または培養物中に維持された細胞を注射することによって、この腫瘍を正常マウスに導入することができる。Zupi et al., Br. J. Cancer, 41: suppl. 4, 30 (1980)。腫瘍は単一の細胞の注射から出発したものでさえあり得、非常に高い割合の感染腫瘍細胞が生存していることを示す証拠がある。この腫瘍モデルについてのさらなる情報に関しては、Zacharski, Haemostasis, 16: 300-320 (1986)を参照のこと。

20

移植された腫瘍を有する動物モデルにおける、試験化合物の効力を評価する1つの方法は、処置前後の腫瘍のサイズを測定することである。伝統的に、移植された腫瘍のサイズはノギスを用いて二次元または三次元で測定されてきた。二次元に限定された測定では、腫瘍のサイズが正確に反映されない；したがって、通常は、数式を用いてこれに対応する容量に変換する。しかし、腫瘍サイズの測定は非常に不正確である。薬物候補の治療的効果は、処置誘導性の増殖遅延および特定の増殖遅延によってより首尾よく記載することができる。腫瘍増殖の記載における別の重要な変数は腫瘍容量倍増時間である。腫瘍増殖の計算および記載用のコンピュータープログラム、例えばRygaard and Spang-Thomsen, Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals, Wu and Sheng eds. (Basel, 1989), p.301によって報告されているプログラムもまた、利用可能である。しかし、処置後の壊死および炎症応答は、少なくとも最初は、実際に腫瘍サイズの増加を生じさせ得ることに注意したい。したがって、これらの変化については、形態計測法およびフローサイトメトリー分析を組み合わせて、慎重にモニターする必要がある。

30

【0102】

さらにまた、VEGF-Eポリペプチドまたはいずれかのその修飾形態をコードする核酸を用いて、治療的に有用な試薬の開発およびスクリーニングに有用なトランスジェニック動物または「ノックアウト」動物を作成することができる。トランスジェニック動物(例えばマウスまたはラット)とは、動物または出生前、例えば胎児期の原型動物に導入された導入遺伝子を含有する細胞を有する動物である。導入遺伝子は、そこからトランスジェニック動物が発育してなる細胞のゲノムに組み込まれたDNAである。したがって、トランスジェニック動物を作成するための標準的技術を用い、本明細書中で同定されるVEGF-Eをコードする遺伝子のコード化部分に関心ある動物のゲノムに導入することによって、組換え(トランスジェニック)動物モデルを工作できる。トランスジェニック操作の標的となり得る動物には、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタおよびヒト以外の霊長類、例えばヒヒ、チンパンジーおよびサルが含まれるが、これらに限定されない。一態様では、VEGF-EポリペプチドをコードするcDNAを用い、確立されている技術にしたがって、VEGF-EをコードするゲノムDNAをクローニングすることができ、このゲノム配列を用いて、VEGF-Eコード化DNAを発現する細胞を含有するトランスジェニック動物を作成できる。該動物に導入遺伝子を導入する、当分

40

50

野に既知の技術には、前核(pronucleic)マイクロインジェクション(米国特許第4873191号); 胚ラインへのレトロウイルス媒介性遺伝子転移(例えば Van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 6148-615 (1985)); 胎児幹細胞における遺伝子ターゲティング(Thompson et al., Cell, 56: 313-321 (1989)); 胎児のエレクトロポレーション(Lo, Mol. Cell. Biol., 3: 1803-1814 (1983)); および精子媒介性の遺伝子転移が含まれる。Lavitrano et al., Cell, 57: 717-73 (1989)。総括に関しては、例えば米国特許第4736866号を参照のこと。特にトランスジェニックマウスまたはラットのようなトランスジェニック動物の作成方法は当分野に一般的であり、例えば米国特許第4736866号および第4870009号に記載されている。典型的には、組織特異的エンハンサーを伴うVEGF-E導入遺伝子の包含に関して、特定の細胞を標的化する。胎児期に動物の胚ラインに導入された1コピーのVEGF-Eコード化導入遺伝子を含むトランスジェニック動物を用いて、VEGF-Eコード化DNAの発現増加作用を試験することができる。例えばその過剰発現に関連する病的症状からの保護を提供すると思われる試薬についてのテスター動物として、このような動物を用いることができる。本発明のこの側面では、動物を試薬で処置し、導入遺伝子を有する未処置の動物と比較して病的症状の発生率が減少したならば、これが該病的症状に対する有望な治療的介入であることが示されるであろう。

【0103】

本発明の目的に関し、トランスジェニック動物には、その細胞の一部にのみ導入遺伝子を保持しているもの(「モザイク動物」)が含まれる。導入遺伝子は、単一の導入遺伝子として組み込むか、あるいはコンカテマー(concatamers)内、例えばヘッドトゥヘッドまたはヘッドトゥテイル縦列(head-to-head or head-to-tail tandems)として組み込むことができる。また、例えば Lasko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 6232-636 (1992) の技術にしたがって、特定の細胞タイプに導入遺伝子を選択的に導入することも可能である。トランスジェニック動物における導入遺伝子の発現は標準的技術によってモニターできる。例えば、サザンブロット分析またはPCR増幅を用いて、導入遺伝子の組み込みを確認できる。次いで、インシトゥーハイブリダイゼーション、ノザンブロット分析、PCRまたは免疫細胞化学のような技術を用い、mRNA発現レベルを分析できる。腫瘍または癌の発達徴候に関して、この動物をさらに試験する。

【0104】

また、VEGF-Eポリペプチドをコードする内因性遺伝子と、動物の胎児細胞内に導入された、同ポリペプチドをコードする変更ゲノムDNA間で相同組換えを生じさせ、本明細書中で同定されるVEGF-Eポリペプチドをコードする、欠損または変更遺伝子を有する「ノックアウト」動物を構築できる。例えば特定のVEGF-EポリペプチドをコードするcDNAを用い、確立されている技術にしたがって、該ポリペプチドをコードするゲノムDNAをクローニングできる。特定のVEGF-EポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部を欠失させるか、あるいは他の遺伝子、たとえば選択可能マーカーをコードする遺伝子であって、これを用いて組み込みをモニターできるもので置換することができる。典型的には、(5'末端および3'末端の両方の)数キロ塩基の非翻訳フランキングDNAをベクターに含ませる。相同組換えベクターの説明に関しては、例えば Thoma s and Capecchi, Cell, 51: 503 (1987) を参照のこと。このベクターは(例えばエレクトロポレーションによって)胎児幹セルラインに導入され、導入DNAが内因性DNAと相同組換えされている細胞が選択される。例えば Li et al., Cell, 69: 915 (1992) を参照のこと。次いで、選択された細胞は動物(例えばマウスまたはラット)の胚盤胞に注射され、キメラ集団を形成する。例えば Bradley, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. (IRL: Oxford, 1987), pp. 113-152 を参照のこと。次いで、キメラ胎児は適当な偽妊娠雌性培養動物(foster animal)に移植され、この胎児を一定期間生育させて、「ノックアウトマウス」を創出できる。胚細胞内に相同組換えされたDNAを宿す後代を標準的技術によって同定し、これを用いて、全ての細胞が相同組換えされたDNAを含有する動物を作成できる。ノックアウト動物

10

20

30

40

50

は、例えば特定の病的症状に対する保護能力および V E G F - E ポリペプチドの不存在に基づく病的症状の発達によって特徴付けることができる。

【 0 1 0 5 】

また、本明細書中で同定される V E G F - E ポリペプチドを特異的に結合する抗体および他の薬物候補の効力は、自然発生した動物腫瘍の処置において試験することができる。このような研究に適切な標的はネコ口内扁平上皮細胞癌 (S C C) である。ネコ口内 S C C は高度に侵襲性の、最も一般的なネコ口内悪性疾患である悪性腫瘍であり、これはこの種において報告される、口内腫瘍のうち 6 0 % を超えるものの原因である。これはめったに遠隔部位に転移しないが、転移の発生率が低いのは単に、この腫瘍を患うネコの生存期間が短いことを反映しているにすぎないかもしれない。これらの腫瘍は、主としてネコ口腔の解剖であるため、通常は手術されない。現在、この腫瘍に対する有効な処置はない。この実験に入る前に、各ネコは完全臨床検査およびバイオプシーを受け、コンピューター断層撮影法 (C T) によってスキャンされる。舌下口内扁平上皮細胞腫瘍と診断されたネコは、この研究から排除する。この腫瘍のせいで舌が麻痺する可能性があり、処置によって腫瘍を殺生した場合でさえ、動物はひとりでえさを食べることができないこともある。長期間にわたって、各ネコを繰り返し処置する。処置期間中毎日、腫瘍の写真をとり、その後再検査する。処置後、それぞれのネコはもう一度 C T スキャンを受ける。C T スキャンおよび胸部 X 線写真は、その後 8 週間毎に評価される。コントロール群と比較した、生存、応答および毒性の差異に関してデータを評価する。陽性応答には、好ましくは生活の質の改善および / または寿命の増加を伴う腫瘍緩解の証拠が必要とされ得る。

10

20

【 0 1 0 6 】

さらに、他の自然発生的な動物腫瘍、例えばイヌ、ネコおよびヒヒの繊維肉腫、腺癌、リンパ腫、軟骨腫または平滑筋肉腫を試験することができる。これらのうち、イヌおよびネコの乳腺癌は、その発症および性質がヒトのものと非常に類似しているため、好ましいモデルである。しかし、このモデルの使用は、動物においてこのタイプの腫瘍がまれにしか存在しないことによって制限される。

当分野に既知の他のインビトロおよびインビボ心臓血管、内皮および血管新生試験もまた、本発明において適当である。

【 0 1 0 7 】

2 . 組織分布

本明細書中の心臓血管、内皮および血管新生アッセイの結果は、さらなる研究、例えば種々のヒト組織において m R N A 発現を測定することによって確認することができる。

上に記載のように、種々の組織における遺伝子増幅および / または遺伝子発現は、本明細書中に提供される配列に基づく適当なラベル化プローブを用い、慣用のサザンブロットイング、ノザンブロットイングにより m R N A の転写を定量し (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980))、あるいはドットブロットイング (D N A 分析) またはインシトゥーハイブリダイゼーションによって測定することができる。別法として、抗体を用いて、D N A 二重鎖、R N A 二重鎖および D N A - R N A ハイブリッド二重鎖または D N A - タンパク質二重鎖を含む特定の二重鎖を認識することができる。

30

40

また、種々の組織における遺伝子発現を免疫学的方法、例えば組織セクションの免疫組織化学的染色、および細胞培養物または体液のアッセイにより、遺伝子産物の発現を直接定量することによって測定してもよい。免疫組織化学的染色および / またはサンプル液のアッセイに有用な抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであってよく、任意の哺乳類において調製することができる。簡単には、天然配列 V E G F - E ポリペプチドまたは、本明細書中に提供される D N A 配列に基づく合成ペプチドまたは、V E G F - E をコードする D N A および特異的抗体エピトープをコードする D N A と融合された外因性配列に対して、抗体を調製することができる。抗体を作成する一般的技術および、インシトゥーハイブリダイゼーションに関する特別なプロトコルは、本明細書中、以下に提供する。

【 0 1 0 8 】

3 . 抗体結合実験

50

心臓血管、内皮および血管新生(angiogenic)研究の結果は、抗体結合実験によってさらに確認することができ、ここでは、抗 V E G F - E 抗体が、内皮細胞または、心臓血管、内皮および血管新生アッセイにおいて使用される他の細胞に対する V E G F - E ポリペプチドの作用を阻害する能力について試験される。抗体の例には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体およびヘテロ共役抗体(heteroconjugate antibodies)が含まれ、その製造方法は、本明細書中以下に記載される。

抗体結合実験は、任意の既知のアッセイ方法、例えば競合結合アッセイ、直接または間接サンドイッチアッセイおよび免疫沈澱アッセイにおいて行うことができる。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (CRC Press, Inc., 1987), pp.147-158。

【 0 1 0 9 】

競合結合アッセイは、限られた量の抗体との結合に関して、ラベル化標準物質が試験サンプル被検体と競合することができる能力に依存する。試験サンプル中の標的タンパク質の量は、該抗体と結合する標準物質の量と反比例する。結合する標準物質の測定を容易にするため、競合前または競合後に、抗体を不溶化し、抗体と結合している標準物質および被検体を、未結合の標準物質および被検体から簡単に分離することができるようにする。

サンドイッチアッセイには、それぞれが、検出されるタンパク質の異なる免疫原性部分またはエピトープと結合することができる、2つの抗体の使用が含まれる。サンドイッチアッセイでは、試験サンプル被検体を、固形支持体に固定化した第一の抗体に結合させ、その後、第二の抗体がこの被検体に結合し、これにより不溶性の三者複合体が形成される。例えば米国特許第 4 3 7 6 1 1 0 号を参照のこと。第二の抗体自体を検出可能な部分でラベルしておく(直接サンドイッチアッセイ)か、あるいは検出可能な部分でラベルされている抗免疫グロブリン抗体を用いて測定(間接サンドイッチアッセイ)してもよい。例えば、サンドイッチアッセイの1つのタイプは、E L I S A アッセイであり、ここでは検出可能部分が酵素である。

免疫組織化学では、組織サンプルは、例えば、新鮮なものか、あるいは凍結されたものか、あるいはパラフィン中に包埋され、保存剤、例えばホルマリンで固定されているものであってよい。

【 0 1 1 0 】

4 . 細胞に基づく腫瘍アッセイ

細胞に基づくアッセイおよび、心臓血管、内皮および血管新生障害、例えば腫瘍に関する動物モデルを用いて、本明細書中における、心臓血管、内皮および血管新生アッセイの発見を確認し、さらに本明細書中で同定された遺伝子と望ましくない心臓血管、内皮および血管新生細胞増殖の発達および病因との関係を理解することができる。望ましくない心臓血管、内皮および血管新生細胞増殖、例えば腫瘍細胞の発達および病理学に関する、本明細書中で同定された遺伝子産物の役割は、本明細書中で、V E G F - E ポリペプチドによって刺激されるか、あるいは阻害されるものとして同定された細胞またはセルラインを用いて試験することができる。このような細胞には、例えば、以下の実施例に記載のものが含まれる。

別のアプローチでは、特定の心臓血管、内皮および血管新生障害に関与することが知られている細胞型の細胞を、本明細書中に記載の c D N A でトランスフェクションし、これらの c D N A が過剰の増殖を誘導するか、あるいは増殖を阻害する能力を分析する。心臓血管、内皮および血管新生障害が癌である場合、適当な腫瘍細胞には、例えば、B 1 0 4 - 1 - 1 セルライン(n e u 原腫瘍遺伝子でトランスフェクションされた安定 N I H - 3 T 3 セルライン)および r a s トランスフェクション N I H - 3 T 3 細胞のような安定腫瘍セルラインが含まれ、これを所望の遺伝子でトランスフェクションし、腫瘍形成性増殖に関してモニターできる。次いで、このようなトランスフェクションされたセルラインを用い、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体または抗体組成物が、形質転換された細胞の増殖に対して細胞増殖抑制活性または細胞傷害性(細胞毒性)活性を行使するか、あるいは抗体依存性の細胞傷害性(A D C C)を媒介することによって、腫瘍形成性細胞

10

20

30

40

50

胞の増殖を阻害する能力を試験することができる。さらに、本明細書中で同定された遺伝子のコード化配列でトランスフェクションされた細胞を用いて、心臓血管、内皮および血管新生障害、例えば癌の処置用の薬物候補を同定することができる。

さらには、安定セルラインのほうが好ましいけれども、（上に記載されるような）トランスジェニック動物において腫瘍から誘導される最初の培養物を、本明細書中の細胞に基づくアッセイに用いることができる。トランスジェニック動物由来の継代セルラインを誘導する技術は当分野に周知である。例えば Small et al., Mol. Cell. Biol. 5: 642-648 (1985) を参照のこと。

【0111】

5. 遺伝子治療

本発明にしたがい、本明細書中の VEGF - E ポリペプチドおよびポリペプチド性アゴニストおよびアンタゴニストをインビボで発現させて用いることができ、このことはしばしば遺伝子治療と称される。

核酸（場合により、ベクターを含む）を患者の細胞に導入するためには、2つの主要なアプローチ：インビボおよびエキスピボがある。インビボデリバリー用には、核酸を、通常は患者の、VEGF - E ポリペプチドを必要としている部位、すなわち、既知であれば、VEGF - E ポリペプチドの合成部位および VEGF - E ポリペプチドの生物学的活性が必要とされる部位（例えば傷害部位）に直接注入する。エキスピボ処置用には、患者の細胞を取り出し、これらの単離された細胞に核酸を導入し、この修飾された細胞を直接患者に投与するか、あるいは、例えば多孔性膜内に包んで患者に移植する（例えば米国特許第 4892538 号および第 5283187 号を参照のこと）。

生存能力のある細胞に核酸を導入するための種々の利用可能な技術が存在する。この技術は、核酸を意図される宿主のインビトロ培養細胞に移すのか、あるいはインビボ細胞に移すのかに依存して変化する。核酸をインビトロ哺乳類細胞に移すのに適当な技術には、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAE - デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法の使用などが含まれる。形質導入には、複製欠損性組換えウイルス（好ましくはレトロウイルス）粒子を細胞レセプターと結合させ、次いで粒子内に含まれる核酸を細胞に導入することが含まれる。遺伝子のエキスピボデリバリー用に一般に用いられるベクターはレトロウイルスベクターである。

【0112】

現在の好ましいインビボ核酸輸送技術には、ウイルス性または非ウイルス性ベクター（例えばアデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペス I ウイルスまたはアデノ関連ウイルス（AAV））でのトランスフェクションおよび脂質に基づく系（遺伝子の脂質媒介性輸送に有用な脂質は例えば、DOTMA、DOPE および DC - Chol である；例えば Tonkinson et al., Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996) を参照のこと）が含まれる。遺伝子治療に用いるのに最も好ましいベクターはウイルスであり、最も好ましくはアデノウイルス、AAV、レンチウイルスまたはレトロウイルスである。ウイルス性ベクター、例えばレトロウイルスベクターには、少なくとも1つの転写プロモーター/エンハンサーまたは遺伝子座規定因子 (locus-defining element) (群)、または、メッセンジャーの選択的スプライシング、核 RNA 輸送または翻訳後修飾のような他の手段によって遺伝子発現を制御する他の因子が含まれる。さらに、ウイルス性ベクター、例えばレトロウイルスベクターには、VEGF - E ポリペプチドをコードする遺伝子の存在下で転写される場合、それに作動可能に連結されており、翻訳開始配列として作用する核酸分子が含まれる。このようなベクターコンストラクトにはまた、用いられるウイルスに適当な、パッケージングシグナル、長末端反復 (LTR 群) またはその一部、およびポジティブおよびネガティブ鎖プライマー結合部位が含まれる（これらが該ウイルス性ベクターに存在しない場合）。さらに、このようなベクターには、典型的に、ベクターを含む宿主細胞から VEGF - E ポリペプチドを分泌するためのシグナル配列が含まれる。本発明の目的のために好ましいシグナル配列は哺乳類のシグナル配列であり、最も好ましくは、VEGF - E ポリペプチドの天然シグナル配列である。場合により、このベクターコンストラクトに

10

20

30

40

50

は、ポリアデニル化用のシグナル、ならびに1つまたはそれ以上の制限部位および翻訳終結配列が含まれることもある。例示として、このようなベクターには典型的に、5'LTR, tRNA結合部位、パッケージングシグナル、第二鎖DNA合成の起点および3'LTRまたはその一部が含まれる。非ウイルス性の他のベクター、例えばカチオン性脂質、ポリリシンおよびデンドリマー(dendrimers)を用いることもできる。

【0113】

いくつかの状況では、標的細胞を標的とする物質、例えば細胞表面膜タンパク質または標的細胞に特異的な抗体、標的細胞のレセプターに対するリガンドなどを核酸ソースに提供することが望ましい。リポソームを用いる場合、エンドサイトーシスに関連する細胞表面膜タンパク質と結合するタンパク質、例えば特定の細胞タイプに向性があるキャプションタンパク質またはその断片、循環中に内面化(internalization)を受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的化し、細胞内半減期を高めるタンパク質を、標的化のために用い、ならびに/あるいはこれを用いて取り込みを促進してもよい。レセプター媒介性エンドサイトーシスの技術は、例えば Wu et al., J. Biol. Chem., 262: 4429-4432 (1987); および Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 3410-3414 (1990) に記載されている。現在既知の遺伝子マーキング(gene marking)および遺伝子治療プロトコルの総括に関しては、Anderson et al., Science, 256: 808-813 (1992) を参照のこと。また、WO 93/25673 およびその引用文献を参照のこと。

適当な遺伝子治療およびレトロウイルス粒子および構造タンパク質の作成方法は、例えば米国特許第5681746号に見出すことができる。

【0114】

6. 診断薬としての遺伝子の使用

本発明はまた、VEGF-Eポリペプチドをコードする遺伝子の、診断薬としての使用に関する。VEGF-Eポリペプチドにおける突然変異は腫瘍を生じさせることがあるため、突然変異型のVEGF-Eポリペプチドを検出することにより、心臓血管、内皮および血管新生疾患を診断するか、あるいは心臓血管、内皮および血管新生疾患、例えば腫瘍に対する罹患しやすさを診断することができる。

ヒトVEGF-Eポリペプチドをコードする遺伝子に突然変異を有する個体は、種々の技術によりDNAレベルで検出され得る。診断用の核酸は、患者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織バイオプシーおよび解剖物質から得ることができる。ゲノムDNAを直接、検出用に用いるか、あるいは、分析前に、PCR(Saiki et al., Nature, 324: 163-166 (1986))を用いてこれを酵素的に増幅してもよい。また、RNAまたはcDNAを同じ目的で用いてもよい。例として、VEGF-Eポリペプチドをコードする核酸と相補的なPCRプライマーを用いて、VEGF-Eポリペプチドの突然変異を同定し、分析することができる。例えば、欠失および挿入は、正常遺伝子型との比較において増幅産物のサイズ変化により検出可能である。点突然変異は、増幅されたDNAを、放射性ラベルされた、VEGF-EポリペプチドをコードするRNAまたは放射性ラベルされた、VEGF-EポリペプチドをコードするアンチセンスDNA配列とハイブリダイゼーションさせることによって同定可能である。完全に合致する配列は、RNAアーゼA消化または融解温度の差異によって mismatches とはっきり区別することができる。

【0115】

変性剤の存在または不存在下、ゲル中のDNA断片の、電気泳動による移動度の変化を検出することにより、DNA配列の差異に基づく遺伝子試験を行うことができる。小配列の欠失および挿入は、高分解能ゲル電気泳動によって明視化できる。異なる配列のDNA断片は、異なるDNA断片の移動度が、その特定の融解温度または部分的融解温度にしたがい、ゲル上の異なる位置で阻止される、変性ホルムアミジン濃度勾配ゲルにおいて区別することができる。例えば Myers et al., Science, 230: 1242 (1985) を参照のこと。

また特定の位置における配列の変化は、ヌクレアーゼ保護アッセイ、例えばRNAアーゼおよびS1保護または化学的開裂法、例えば Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 4397-4401 (1985) によっても示され得る。

10

20

30

40

50

したがって、ハイブリダイゼーション、RNAアーゼ保護、化学的開裂、直接DNA配列決定または制限酵素の使用、例えば制限断片長多型(RFLP)およびゲノムDNAのサザンブロッティングのような方法によって、DNA配列を詳細に検出することができる。

【0116】

7. VEGF-Eポリペプチドレベルを検出するための使用

より一般的なゲル電気泳動およびDNA配列決定に加え、インシトゥー分析によっても突然変異を検出できる。

VEGF-Eポリペプチド発現は、腫瘍形成に基づく血管疾患または新血管新生に関連し得る。VEGF-Eポリペプチドがシグナル配列を有し、mRNAが内皮細胞において高度に、また平滑筋細胞においてはより少ない程度に発現されていることは、VEGF-Eポリペプチドが血清中に存在していることを示す。したがって、VEGF-Eポリペプチドのレベル変化は腫瘍形成に伴う血管疾患または新血管新生の指標であり得るため、抗VEGF-Eポリペプチド抗体を用いて該疾患を診断することができる。

競合アッセイを用いてもよく、ここでは、VEGF-Eポリペプチドに特異的な抗体を固形支持体に結合させ、ラベルしたVEGF-Eポリペプチドと宿主由来のサンプルを固形支持体に通した結果、固形支持体に結合し、検出されたラベル量がサンプル中のVEGF-Eポリペプチド量と相関し得る。

【0117】

8. プローブおよび免疫アッセイ

天然VEGFに対して作成した抗体と免疫学的に交差反応性である、VEGF-Eアミノ酸変異体配列および誘導体は、VEGF-Eに関する免疫アッセイにおいて、標準物質としてか、あるいは、ラベル化されている場合は競合試薬として有用である。

完全長ヌクレオチド配列、配列番号1またはその一部をcDNAライブラリー用のハイブリダイゼーションプローブとして用い、完全長VEGF-E遺伝子を単離するか、あるいは、図1に開示されるVEGF-E配列(配列番号1)と望ましい配列同一性を有する、さらに他の遺伝子(例えば、天然に存在するVEGF-Eの変異体または他の種由来のVEGF-Eをコードするもの)を単離することができる。プローブの長さは約17~約50塩基であってよい。ハイブリダイゼーションプローブは、図1に示される配列番号1のヌクレオチド配列からか、あるいは、プロモーター、エンハンサー因子および天然配列VEGF-Eコード化DNAのイントロンを含むゲノム配列から誘導することができる。例示的に、スクリーニング方法には、既知のDNA配列を用いてVEGF-E遺伝子のコード領域を単離し、約40塩基の選択されたプローブを合成することが含まれる。ハイブリダイゼーションプローブは、放射性ヌクレオチド、例えば32Pまたは35S、または酵素的ラベル、例えばアビジン/ビオチンカップリング系によりプローブとカップリングしたアルカリホスファターゼを含む、種々のラベルでラベル化することができる。本発明のVEGF-E遺伝子と相補的な配列を有するラベル化プローブを用いて、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、該ライブラリーのどのメンバーに該プローブがハイブリダイゼーションするかを決定することができる。ハイブリダイゼーション技術については、以下の実施例にさらに詳細に記載する。

また、このプローブをPCR技術において用い、密接に関係するVEGF-E配列の同定に関して配列のプールを作成することができる。

【0118】

9. 染色体マッピング

また、VEGF-Eポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を用いて、VEGF-Eポリペプチドをコードする遺伝子のマッピング用および遺伝的障害を有する個体の遺伝的分析用のハイブリダイゼーションプローブを構築することができる。既知の技術、例えばインシトゥーハイブリダイゼーション、既知の染色体マーカーに対する連鎖分析およびライブラリーを用いるハイブリダイゼーションスクリーニングを用いて、本明細書中に提供されるヌクレオチド配列を染色体および染色体の特定領域にマッピングすることができ

10

20

30

40

50

る。

染色体同定では、配列は特異的に標的化され、個々のヒト染色体上の特定位置とハイブリダイゼーション可能である。さらに、染色体上の特定部位を同定する必要が存在している。染色体位置をマーキングするのに利用可能な、実際の配列データに基づく染色体マーキング物質（反復多型）は、現時点ではほとんどない。本発明にしたがってDNAを染色体にマッピングすることは、疾患と関連する遺伝子とその配列を相関させる重要な第一段階である。簡単には、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配列を染色体にマッピングできる。3'非翻訳領域に対するコンピューター分析を用い、増幅工程を面倒にするような、ゲノムDNA中の1つ以上のエキソンをまたぐことのない、プライマーを迅速に選択する。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スクリーニング用に用いる。このプライマーに対応するヒト遺伝子を含むハイブリッドだけが増幅断片を生産する。

10

【0119】

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定のDNAを特定の染色体に割り当てる迅速な手法である。本発明を同一オリゴヌクレオチドプライマー群とともに用い、特定の染色体群由来断片のパネルあるいは大きなゲノムクローンのプールを同様に用いてサブローカライゼーション(sublocalization)することができる。染色体にマッピングするために同様に用いることができる他のマッピング戦略には、インシトゥーハイブリダイゼーション、ラベル化されたフローソート染色体(flow-sorted chromosomes)でのプレスクリーニングおよびハイブリダイゼーションによる前選択によって染色体特異的cDNAライブラリーを構築することが含まれる。

20

有糸分裂中期の拡大した染色体に対するcDNAクローンの蛍光インシトゥーハイブリダイゼーション(FISH)を用いて、正確な染色体位置を一回の工程で提供することができる。この技術は500または600塩基程の短いcDNAとともに用いることができるが、2000bpより大きなクローンのほうが、簡単な検出のための十分なシグナル強度を伴って、唯一の染色体位置に結合する可能性がより高い。FISHは、VEGF-Eポリペプチドをコードする遺伝子の元となるクローンの使用を必要とし、クローンは長いほどよい。例えば2000bpで良好、4000bpでより良好であり、時間当たりの妥当なパーセンテージの良好な結果を得るために4000以上はおそらく必要ない。この技術の総括に関しては、Verma et al., Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques (Pergamon Press, New York, 1988)を参照のこと。

30

【0120】

配列を染色体位置に正確にマッピングすると、染色体上の配列の物理的位置は遺伝的地図データと相関し得る。このようなデータは、例えばV. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Library からオンラインで入手可能)に見出すことができる。次いで、連鎖分析(linkage analysis)（物理的に隣接する遺伝子の共同相続性）により同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患の関係を同定する。

次に、病気に冒された個体とそうでない個体間のcDNAまたはゲノム配列における差異を測定することが必要である。病気に冒された個体のいくつかあるいはすべてにおいては突然変異が観察されるが、いかなる正常個体においても観察されない場合、この突然変異は疾患の原因物質である可能性が高い。

40

物理的マッピングおよび遺伝的マッピング技術の現在の分解能では、疾患に関連する染色体領域を正確に起源とするcDNAは50～500の潜在的原因遺伝子のうちの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あたりに1遺伝子を仮定している）。

【0121】

10. 薬剤候補のスクリーニング分析

天然VEGF-E、または、VEGF-Eの受容体の生物学的活性を模倣するリード化合物を見つけるために、スクリーニング分析を設計することができる。このようなスクリ

50

ーニング分析には、ハイスループットスクリーニングで化学ライブラリーを分析でき、それにより小分子の薬剤候補を同定するのに特に適合された分析を含むであろう。意図された小分子には合成有機化合物、または、無機化合物が含まれる。分析は、蛋白質-蛋白質結合分析、生化学的スクリーニング分析、免疫分析、および、細胞を基礎とした分析を含む、当分野においてよく特性付られた種々の形式で行われ得る。

よって、本発明は、VEGF-Eポリペプチドを模倣する(アゴニスト)、または、VEGF-Eポリペプチドの効果を妨げる(アンタゴニスト)化合物を同定する、化合物のスクリーニング方法を含む。アンタゴニスト薬剤候補のスクリーニング分析は、本明細書中で同定される遺伝子によりコードされるVEGF-Eポリペプチドに結合、若しくは、それと複合体形成する化合物、または、そうでなければコードされるポリペプチドの他の細胞性蛋白質との相互作用を妨げる化合物を同定するように設計される。このようなスクリーニング分析には、ハイスループットスクリーニングにより化学ライブラリーを分析できる分析を含み、それは特に小分子の薬剤候補を同定するのに適当である。

10

【0122】

分析は、蛋白質-蛋白質結合分析、生化学的スクリーニング分析、免疫分析、および、細胞を基礎とした分析を含む、当分野においてよく特性付られた種々の形式で行われ得る。

アンタゴニストについての全ての分析は、薬剤候補と、本明細書中に同定される核酸によりコードされるVEGF-Eポリペプチドとを、これらの2成分の相互作用が可能な条件下、および時間、接触させること必要とする点で共通する。

20

結合分析では相互作用は結合であり、形成された複合体は反応混合物中で単離、または、検出され得る。特定の態様では、本明細書中で同定される遺伝子によりコードされたVEGF-Eポリペプチド、または、薬剤候補は、例えば、マイクロタイタープレート等の固相上に、共有、若しくは非共有結合により固定される。非共有結合は一般に、固体表面をVEGF-Eポリペプチドの溶液で被覆し、乾燥することによって達成される。代わりに、固定化されるべきVEGF-Eポリペプチドに特異的な、例えばモノクローナル抗体である固定化抗体を、それを固体表面に固定化するのに用い得る。検出可能な標識により標識化されていてもよい非固定化成分を、例えば、固定化された成分を含むコートされた表面である固定化された成分に添加することにより分析を行う。反応が終了したら、例えば洗浄により未反応の成分を除去し、固体表面に固定化された複合体を検出する。当初は固定化されていない成分が検出可能な標識を有する場合、表面に固定化された標識の検出は、複合体形成が起こったことを示す。当初は固定化されていない成分が標識を有さない場合には、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識化された抗体を用いて複合体形成は検出され得る。

30

【0123】

候補化合物が本明細書中で同定される遺伝子によりコードされる特定のVEGF-Eポリペプチドと相互作用はしても、結合はしない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、蛋白質-蛋白質相互作用を検出するための周知の方法により分析され得る。このような分析には、例えば、架橋法、共免疫沈降法、および、勾配またはクロマトグラフィーカラムによる共同精製等の伝統的な手法が含まれる。さらに、蛋白質-蛋白質相互作用は、Fieldsおよび共同研究者(Fields and Song, Nature(London), 340:245-246(1989); Chien et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 88:9578-9582(1991))により記載される、および、Chevray and Nathans(Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89:5789-5793(1991))により記述される酵母を用いた遺伝子系を用いてモニターされ得る。酵母のGAL4等の多くの転写活性化物質は、一方がDNA結合ドメインとして働き、もう一方が転写活性化ドメインとして機能する2つの物理的に別個のモジュールドメインから成る。前述の文献に記載の酵母発現系(一般に、「ツーハイブリッドシステム」と呼ばれる)は、この特性を利用し、1個は標的蛋白質がGAL4のDNA結合ドメインに融合された蛋白質、および、もう一方は候補活性化蛋白質が活性ドメインに融合された蛋白質である、2個のハイブリッド蛋白質を利用する。GAL4-活性化プロモーターの制御下のGAL1-lacZレポーター遺伝

40

50

子の発現は、蛋白質 - 蛋白質相互作用による G A L 4 活性の再構築に依存する。相互作用性のポリペプチドを含むコロニーは、 β -ガラクトシダーゼのための色原性の基質により検出される。ツーハイブリッド技術を用いた、2つの特異的な蛋白質間の蛋白質 - 蛋白質相互作用を同定するための完全なキット (M A T C H M A K E R (登録商標)) は、C l o n t e c h より市販されている。この系はまた、特異的な蛋白質相互作用に關与する蛋白質ドメインの位置付け、同じく、これらの相互作用に重要なアミノ酸残基の位置を正確に決定に拡張して用い得る。

【 0 1 2 4 】

本明細書中で同定される V E G F - E ポリペプチドをコードする遺伝子と、他の細胞内、または、細胞外成分との相互作用を妨げる化合物は、以下のように試験され得る：通常、遺伝子の産物、および、細胞内、または、細胞外成分を含む反応混合物が、2つの産物の相互作用、および結合を可能にする条件下、並びに、可能にする時間をかけて調製される。結合を阻害する候補化合物の能力を試験するために、反応を試験化合物の不在下、および、存在下で行う。さらに、陽性コントロールとして、第3の反応混合物にブラシーボを添加し得る。混合物中に存在する試験化合物、および、細胞内または細胞外成分の間の結合 (複合体形成) を、上述のようにモニターする。試験化合物を含む反応混合物中では形成されない、コントロール反応中の複合体の形成は、試験化合物とその反応相手との相互作用を試験化合物が妨げること示す。

V E G F - E ポリペプチドが、共マイトジェン C o n A の存在下で内皮細胞増殖を刺激する能力を有するのであれば、スクリーニング方法の1例は、この能力を利用する。特に、増殖分析では、ヒト臍帯血管の内皮細胞を得、96ウェル平底培養プレート (Costar, Cambridge, MA) 中で培養し、細胞増殖を促進するのに適当な反応混合物を補う。その混合物は、C o n - A (Calbiochem, La Jolla, CA) を含む。C o n - A、および、スクリーニングされる化合物を添加し、37°C で培養した後、培養物に $^3\text{-H}$ -チミジンを適用し、グラスファイバーフィルター (p h D ; Cambridge Technology, Watertown, MA) 上に採取する。3連の培養物の平均 $^3\text{-H}$ チミジン結合 (c p m) は、液体シンチレーションカウンター (Beckman Instruments, Irvine, CA) を用いて決定される。有意の $^3\text{-H}$ チミジン結合は、内皮細胞増殖の活性化を示す。

【 0 1 2 5 】

アンタゴニストを分析するため、上述の分析を行う：しかしながら、この分析では、V E G F - E ポリペプチドがスクリーニングされる化合物と一緒に添加され、V E G F - E ポリペプチド存在下で、 $^3\text{-H}$ チミジン結合を阻害する化合物の能力は、化合物が V E G F - E ポリペプチドのアンタゴニストであることを示唆する。代わりに、V E G F - E ポリペプチドとアンタゴニストとなり得るものを、膜結合 V E G F - E ポリペプチド受容体、または、組換え受容体と、競合阻害分析に適当な条件下で一緒にすることによっても、アンタゴニストは検出され得る。受容体に結合した V E G F - E ポリペプチド分子の数を、アンタゴニストとなり得るものの有効性を決定するのに用い得るよう、V E G F - E ポリペプチドを放射能等により標識化することができる。例えばリガンド選別、および、F A C S 分取等、当業者に公知の多数の方法により、受容体をコードする遺伝子を同定し得る (Coligan et al., Current Protocols in Immun., 1(2) : 第5章(1991))。ポリアデニル酸化 R N A が V E G F - E ポリペプチドに反応性の細胞から調製された場合には、好ましくは発現クローニングが採用され、この R N A から製造された c D N A ライブラリーはプールに分けられ、V E G F - E ポリペプチドに反応性でない C O S 細胞、または他の細胞をトランスフェクトするのに用いられる。スライドガラス上で生育されたトランスフェクトされた細胞を、標識された V E G F - E ポリペプチドに曝露する。V E G F - E ポリペプチドは、ヨード化、または、部位特異的蛋白質キナーゼのための認識部位を含めることを含む種々の手段により標識され得る。固定化、および培養に続き、スライドをオートラジオグラフィ分析に付す。陽性のプールを同定し、サブプールを調製し、相互作用サブ-プーリング、および再スクリーニング工程を用いて再トランスフェクトし、最終的に、推定される受容体をコードする単一のクローンが得られる。

【0126】

受容体同定の別の方法として、標識された V E G F - E ポリペプチドを、受容体分子を発現する細胞膜、または、抽出調製物と光親和性結合させ得る。架橋された材料を P A G E により分解し、X 線フィルムに曝露する。受容体を含む標識された複合体を、削り取り、ペプチド断片に分解し、蛋白質マイクロシーケンシングに付し得る。マイクロシーケンシングにより得られたアミノ酸配列は、推定される受容体をコードする遺伝子を同定用の、c D N A ライブラリーをスクリーニングするための縮重オリゴヌクレオチドプローブのセットを設計するのに用いられるであろう。

【0127】

アンタゴニストのための別の分析では、哺乳細胞、または、受容体を発現する膜調製物は、候補化合物の存在下で、標識された V E G F - E ポリペプチドとインキュベートされるであろう。その後、この相互作用を増幅、または、阻害する化合物の能力を測定し得る。心血管、内皮、および、血管新生系の疾患の処置に有用な組成物には、これらに限定されるわけではないが、抗体、小さい有機および無機分子、ペプチド、ホスホペプチド、アンチセンスおよびリボザイム分子、三重らせん分子等の標的遺伝子産物の発現、および/または、活性を阻害するものが含まれる。

アンタゴニストとなり得るものより具体的な例には、V E G F - E ポリペプチド、(ポリ)ペプチド-免疫グロブリン融合体、並びに、これらに限定されるわけではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、および、抗体断片、一本鎖抗体、抗イディオタイプ抗体、および、このような抗体若しくは断片のキメラまたはヒト化形体、ヒト抗体、および、抗体断片を含む、抗体が特に含まれる。或いは、アンタゴニストとなり得るものは、例えば、受容体を認識するが何の効果も与えず、それにより V E G F - E ポリペプチドの活性を競合的に阻害する V E G F - E ポリペプチドの変異形体である、密接に関連した蛋白質であり得る。

【0128】

別の V E G F - E ポリペプチドアンタゴニストとなり得るものは、アンチセンス技術により調製されたアンチセンス R N A または D N A 構築物であり、例えば、アンチセンス R N A または D N A 分子は、標的 m R N A にハイブリダイズし、蛋白質の翻訳を阻害することにより直接 m R N A の翻訳を妨げるように働く。三本鎖形成、または、アンチセンス D N A 若しくは R N A によって、アンチセンス技術は遺伝子発現を調製するのに用いることができ、どちらの方法もポリヌクレオチドの D N A または R N A への結合に基づく。例えば、ここでは成熟 V E G F - E ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の 5' コード部分は、長さが約 10 ~ 40 塩基対のアンチセンス R N A オリゴヌクレオチドを設計するのに用いられる。D N A オリゴヌクレオチドは、遺伝子の転写に関する領域に相補的に設計され (三本鎖 Lee et al., *Nucleic Acids Res.*, 6:3073(1979); Cooney et al., *Science*, 241:456(1988); Dervan et al., *Science*, 251:1360(1991) 参照)、それにより V E G F - E ポリペプチドの転写、および、産生を阻害する。アンチセンス R N A オリゴヌクレオチドはイン・ビボで m R N A にハイブリダイズし、m R N A 分子の V E G F - E ポリペプチドへの転写を妨げる (アンチセンス Okano, *Neurochem.*, 56:560(1991); 「Oligodeoxynucleotide as Antisense Inhibitors of Gene Expression」(CRC Press:Boca Raton, FL, 1988))。また、アンチセンス R N A または D N A がイン・ビボで V E G F - E ポリペプチドの産生を阻害するように発現されるように、上記オリゴヌクレオチドは細胞へ届けられ得る。アンチセンス D N A が用いられる場合、例えば、標的遺伝子ヌクレオチド配列の約 - 10 および + 10 位の間である翻訳開始部位由来のオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

【0129】

アンタゴニストとなり得るものには、活性部位、受容体結合部位、若しくは、成長因子に結合する小分子、または、V E G F - E ポリペプチドのその他の関連結合部位が含まれ、それにより V E G F - E ポリペプチドの通常の生物学的活性を阻害する。小分子の例には、これらに限定されるわけではないが、小型のペプチド、またはペプチド様分子、好ま

10

20

30

40

50

しくは可溶性ペプチド、および、合成非ペプチド有機、若しくは、無機化合物が含まれる。

リボザイムは、RNAの特異的開裂を触媒することができる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリダイゼーションに続く、内ヌクレオチド結合分解性開裂により機能する。標的RNAとなり得るもの内部の特異的リボザイム開裂部位は、公知の技術により同定され得る。詳細については、例えば、Rossi(Current Biology, 4:469-471(1994))、および、PCT公開第WO97/33551号(1997年9月18日公開)参照。

【0130】

転写を阻害するのに用いられる三本鎖ヘリックス形成における核酸分子は、一本鎖で、デオキシヌクレオチドにより構成されているべきである。これらのオリゴヌクレオチドの塩基組成は、一般的に二本鎖のうち的一本の上に相当な長さのプリン、または、ピリミジンを必要とするフーグスティーン型塩基対則をにより三本鎖ヘリックス形成を促進するように設計される。さらなる、詳細については、例えば前述のPCT公開第WO97/33551号参照。

これらの小分子は、上述のスクリーニング分析のいずれか1つ、若しくは、それ以上により、および/または、当業者に公知のその他のいずれかのスクリーニング技術により同定され得る。

【0131】

11. 処置されるべき心血管、内皮、および、血管新生系疾患の型

本明細書中に記載の心血管、血管新生、および、内皮分析において活性を有するか、および/または、その遺伝子産物が心血管系に局在することが見つけられているVEGF-Eポリペプチド、または、そのアゴニスト若しくはアンタゴニストは、真性糖尿病等の血管に作用する循環器系疾患を含む種々の心血管、内皮、および、血管新生系疾患において治療上の有用性を有する可能性がある。本発明のVEGF-E分子は細胞の生存、増殖、および/または、分化に関連した多数の治療上の有用性を有する。このような有用性には、VEGF-Eの立証されたヒト臍帯血管内皮細胞の生存増幅能力を考慮して、臍帯血管内皮細胞の処置が含まれる。血管が外傷を受けた場合、または、例えば、それが弱っているか、病気にかかっているか、人工的なマトリックスを基礎とするか、または、人工的な環境中にある場合等の臍帯血管の生存を増幅する人工的な手段が採用されるような状況で、処置が必要とされ得る。VEGF-Eの選択的マイトジェン特性により改善され得る、その他の物理的状態もまた本発明に含まれる。線維芽細胞の増殖、および、筋細胞中の肥大を誘導する、立証されたVEGF-Eの能力に基づき、線維芽細胞および筋細胞の処置も有用性に含まれる。特に、VEGF-Eは創傷治療、組織成長、並びに、筋肉産出、および再生に用い得る。

その治療上の有用性は、動脈、毛細血管、静脈、および/または、リンパ管の疾病を含み得る。以下の処置例には、筋肉衰弱疾病の処置、骨粗鬆症の処置、移殖の周囲の細胞の成長を刺激して、それにより意図された部位へのその付着を容易にする移殖定着における補助、可能であれば、組織または血清におけるIGF安定性の増加、および、IGF受容体への結合の増加(IGFは、イン・ヴィトロでヒト骨髄赤芽球および顆粒球始原細胞の成長を増幅することが示されているので)が含まれる。

【0132】

VEGF-Eポリペプチド、または、そのアゴニスト、若しくは、アンタゴニストはまた創傷治療、または、組織再生、並びに、結合組織、皮膚、骨、軟骨、筋肉、肺、または、腎臓等の組織の再成長に関係した治療、血管新生の刺激、血管新生の促進、内皮細胞の遊走の刺激若しくは阻害、血管平滑筋の遊走、並びに、内皮細胞の産生のための、赤血球生成若しくは顆粒球生成の刺激において用い得る。VEGF-Fポリペプチド、または、アンタゴニストにより仲介される血管新生の増加は、虚血組織、および、冠動脈狭瘻に続いて起こる心臓中の側枝冠動脈発生に有益である。例えば、VEGF-Eポリペプチドが創傷治療、または肺繊維症における過剰な結合組織の産生を促進する場合には、このよう

10

20

30

40

50

な産生を制限する等、アンタゴニストはこのポリペプチドの活性を阻害するのに用いられる。これには、急性心筋梗塞、および、心不全の処置が含まれる。

【0133】

さらに、本発明は、その原因によらず、治療的に有効な用量の V E G F - E ポリペプチド、または、そのアゴニスト若しくはアンタゴニストを投与する心肥大の処置に関する。目的がヒト患者の処置であれば、V E G F - E ポリペプチドは好ましくは、組換えヒト V E G F - E ポリペプチド (r h V E G F - E ポリペプチド) である。心肥大の処置は、心肥大、高血圧、肥大型心筋症、および、心臓弁膜逆流 (valvular regurgitation) を含む、多様な異なる病理学的状態に由来し得る、その種々のいずれかの段階で行われ得る。処置は、潜在的な心臓病に関らず、心筋の組織的損傷を伴うか、または、伴わない心肥大の進行における全ての段階に拡張される。

10

いずれかの特定の適応症に、その分子のアンタゴニストではなく分子自体、または、そのアゴニストを、使用すべきかの判断は主に、この分子が心血管新生、内皮細胞の生成、若しくは、血管新生を促進するか、または、これらの症状を阻害するかに依存する。例えば、分子が血管新生を促進するのであれば、そのアンタゴニストは、血管新生を制限または防止するのが望まれる疾患を処置するのに有用であろう。このような疾患の例には、血管腫 (haemangioma)、腫瘍血管新生、糖尿病性網膜症、早熟児網膜症、若しくは黄斑変性に伴う網膜、脈絡膜若しくは角膜における新血管新生、および、増殖性ガラス体網膜症、慢性関節リウマチ、クローン病、アテローム性動脈硬化、卵巣過剰刺激、乾癬、新血管新生を伴う子宮内膜症、気球血管新生による再狭窄 (restenosis)、例えば、手術後に形成されるケロイド、心筋梗塞後の繊維症、若しくは、肺繊維症に伴う繊維症病変に見られる瘢痕組織過剰生成が含まれる。

20

しかしながら、もし分子が血管新生を阻害するのであれば、それを直接、上記症状の処置に使用することが期待される。

【0134】

他方、分子が血管新生を刺激するのであれば、それ自身 (または、そのアゴニスト) が、末梢血管疾病、高血圧、炎症性脈管炎、レイノー病およびレイノー現象、動脈瘤、動脈再狭窄、血栓静脈炎、リンパ管炎、リンパ水腫、創傷治療および組織治療、虚血再灌流障害、アンギナ、急性心筋梗塞等の心筋梗塞、慢性心臓症状、鬱血性心不全等の心不全、および、骨粗鬆症等の血管新生が望まれる適応症に用いられる。

30

【0135】

以下、本発明の V E G F - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストが、血管関連薬剤ターゲティング、または、疾患の処置若しくは予防のための治療ターゲットとして有用な特定の型の疾病を記載する。アテローム性動脈硬化症は、脂質の蓄積、平滑筋細胞の増殖、および、動脈壁における繊維組織の形成に起因する、動脈での脈管内膜肥厚のプラークの蓄積により特性付けられる疾病である。疾病はいずれかの器官の大きい、中くらい、および、小さい動脈を襲い得る。内皮、および、血管平滑筋細胞機能における変化が、これらのプラークの蓄積、および、退縮を調節するのに重要な役割を果たすことが知られている。

40

【0136】

高血圧は、全身の動脈、肺動脈、または、門脈静脈系における血圧の上昇により特性付けられる。血圧の上昇は内皮機能障害、および/若しくは、血管疾病に起因するか、または、それらに帰着するかも知れない。

【0137】

炎症性脈管炎には、巨細胞動脈炎、高安動脈炎、結節性多発性動脈炎 (細血管障害性を含む)、川崎病、微細多脈管炎、ウェゲナー肉芽腫症、および、多様な感染関連血管疾患 (シェーンライン・ヘノッホ紫斑病を含む) が含まれる。これらの疾病において、変化した内皮細胞機能が重要であることが示されている。

【0138】

レイノー病、および、レイノー現象は、冷気への曝露による四肢の循環の間欠性の異常

50

障害により特性付られる。内皮細胞機能の変化が、この疾病において重要であることが示されている。

【0139】

動脈瘤は、内皮細胞、および/または、血管平滑筋細胞の変化に伴う、動脈性、または静脈性樹枝状分岐の嚢状、または、紡錘状拡張である。

【0140】

動脈再狭窄（動脈壁の再狭窄）は、内皮および血管平滑筋細胞の機能、および、増殖における変化の結果として、血管形成に続いて起こり得る。

【0141】

血栓静脈炎、および、リンパ管炎は各々、静脈およびリンパ管の炎症疾患であり、内皮細胞機能の変化に起因、および/または、それに帰着し得る。同様に、リンパ水腫は、内皮細胞機能に起因するリンパ管障害を含む症状である。

10

【0142】

良性、および、悪性血管腫瘍のファミリーは、血管系の細胞要素の異常な増殖、および、成長により特性付られる。例えば、リンパ管腫は、一般に新生児に見られるリンパ管系の良性腫瘍であり、先天性の、しばしば嚢胞性の、リンパ管の奇形である。嚢胞性腫瘍は、隣接する組織へと成長する傾向がある。通常、嚢胞性腫瘍は子宮頸、および、腋窩領域で起こる。四肢の柔組織中でも起こり得る。主な徴候は、結合組織により取り巻かれた、拡張した、場合により網状の組織リンパ管、および、リンパ球である。リンパ管腫は、不規則に結合された胎児リンパ系、または、その欠乏症により起こると推定されている。その結果は、局所リンパ排液障害(impaired local lymph drainage)である(Griener et al., Lymphology, 4:140-144(1971))。

20

【0143】

本発明のVEGF-Eポリペプチド、または、そのアンタゴニストの別の使用法は、腫瘍の成長、および/または、転移を可能にする腫瘍の血管新生を含む、腫瘍血管新生の防止での使用である。この過程は、新しい血管の成長に依存する。腫瘍血管新生を伴う腫瘍、および、関連する症状の例には、乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、結腸直腸癌、肝癌、卵巣癌、莢膜細胞種、セルトリ・間質細胞腫瘍、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮内膜増殖症、子宮内膜症、繊維肉腫、絨毛癌、頭部および頸部癌、微咽腔癌、喉頭癌、肝臓芽細胞腫、カポジ肉腫、黒色腫、皮膚癌、血管腫、海綿性血管腫、血管芽細胞腫、脾癌、網膜芽腫、星状細胞腫、膠芽腫、シュワン鞘細胞腫、乏突起細胞腫、髓芽腫、神経芽腫、横紋筋肉腫、骨肉腫、平滑筋腫、尿路癌、甲状腺癌、ウィルムス腫、腎細胞癌、前立腺癌、母斑症に伴う異常血管増殖、浮腫（脳腫瘍に伴うもの等）、および、メーグス症候群が含まれる。

30

【0144】

年齢と関連した黄斑変性(AMD)が、年配の集団における重篤な視覚消失の主要な原因である。AMDの滲出形体は、脈絡膜新血管新生、および、網膜色素内皮細胞剥離により特性付られる。脈絡膜新血管新生は予後における劇的な悪化と関連しているので、VEGF-Eポリペプチド、または、そのアンタゴニストはAMDの重篤さを減らすのに有用であると期待される。

【0145】

創傷治療、および、組織修復等の外傷の治療もまた、本発明のVEGF-Eポリペプチドまたはそのアンタゴニストの目的とされる使用である。新しい血管の形成および復帰は、組織治療および修復に必須である。この範疇には、骨、軟骨、腱、靭帯、および/若しくは、神経組織の成長、または、再生、同様に、創傷治療、組織修復、および、置換、並びに、火傷、切断および潰瘍の処置におけるものが含まれる。骨が正常に形成されない状況における軟骨、および/または、骨の成長を誘導するVEGF-Eポリペプチド、または、そのアンタゴニストは、ヒト、および、他の動物における骨折、および、軟骨損傷、または、欠損の治療に適用され得る。このようなVEGF-Eポリペプチド、または、そのアンタゴニストを用いた製剤は、閉鎖骨折、および複雑骨折整復、並びに、また人工的な関節の改善された固定において、予防的に使用し得る。骨形成剤により誘導された新た

40

50

な骨形成は、先天的な、外傷により誘導された、または、腫瘍学的な、切除により誘導された頭蓋および顔面の傷を修復するのに寄与し、また、美容形成外科でも有用である。

【0146】

V E G F - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストはまた、これらに限定されるわけではないが、圧迫性潰瘍(pressure ulcer)、血管不全、手術による傷、および外傷に伴う潰瘍等を含む、未回復創傷のより良い、または、より早い閉鎖を促進するのに有用であり得る。

V E G F - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストはまた、器官(例えば、膵臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚、若しくは、内皮を含む)、筋肉(平滑筋、骨格筋、若しくは、心筋)、並びに、血管(血管内皮を含む)組織等の他の組織の生成、若しくは、再生、または、このような組織を含む細胞の成長を促進する活性を示し得る。所望の効果の一部は、正常な組織の再生を可能にする繊維症癍痕の防止、または、モジュレーションであり得る。

10

【0147】

本発明のV E G F - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストはまた、消化管の保護、または、再生、並びに、肺若しくは肝臓繊維症、種々の組織における再灌流障害、および、全身性のサイトカイン損傷による症状の処置において有用であり得る。また、V E G F - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストは、先駆組織若しくは細胞からの上述の組織の分化を促進、若しくは、阻害する、または、上述の組織の成長の阻害において有用であり得る。

20

V E G F - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストは、歯周病の処置、および、その他の歯治療方法で用いられ得る。このような薬剤は、骨形成細胞を誘引する環境を提供するか、骨形成細胞の成長を刺激するか、または、骨形成の原細胞の分化を誘導し得る。血管は骨の再編成、および、成長に重要な役割を果たすので、本発明のV E G F - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストはまた、骨および/若しくは軟骨修復の刺激、または、炎症、若しくは、炎症過程により仲介される組織破壊の過程(コラゲナーゼ活性、破骨細胞活性等)の阻害等を介した、骨粗鬆症、または、骨関節症の処置において有用であり得る。

【0148】

本発明のV E G F - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストに帰し得る組織再生活性のその他の範疇は、腱/靭帯形成である。腱/靭帯様組織、または、他の組織の形成を、通常このような組織が形成されない条件下で誘導する蛋白質は、ヒトおよび他の動物において、腱または靭帯の炸裂、変形、並びに、他の腱または靭帯欠損の治療に適用できる。このような製剤は、腱または靭帯組織における損傷を予防する予防的な有用性、並びに、腱または靭帯の骨または他の組織への改善された固着化、および、腱または靭帯組織の欠損の修復における有用性を有し得る。本発明のV E G F - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストの組成物により誘導される新しい腱/靭帯様組織形成は、先天的な、外傷により誘導された、または、他の原因による腱若しくは靭帯の欠損の修復に寄与し、そしてまた、腱若しくは靭帯の固着または修復のための整形形成外科に有用である。本発明の組成物は、腱若しくは靭帯形成細胞を誘引し、腱若しくは靭帯形成細胞の成長を刺激し、腱若しくは靭帯形成原細胞の分化を誘導し、または、組織を修復するようイン・ビボに戻すための、エクス・ビボにおける腱/靭帯細胞若しくは始原細胞の成長を誘導する環境を提供し得る。本発明の組成物はまた、腱炎、手根管症候群、および、その他の腱、または靭帯の欠損を処置するのに有用であり得る。組成物はまた、当分野において周知のように、適当なマトリックス、および/または、分離剤(sequestering agent)を含み得る。

30

40

【0149】

V E G F - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストはまた、神経細胞の増殖、並びに、神経および脳組織の再生、即ち、中央および末梢神経系疾病、並びに、神経障害、同じく、神経細胞、若しくは神経組織の変性、死、または外傷に伴う機構性、および外傷性の疾患において有用であり得る。より具体的には、V E G F - E またはそのアンタゴニ

50

ストは、末梢神経傷害、末梢神経障害、および、局部神経障害等の末梢神経系の疾病、および、アルツハイマー、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、および、シャイ・ドレーガー症候群等の中央神経系の疾病の処置において使用され得る。本発明と関連して処置される得るその他の症状には、脊髄疾患、頭部外傷、および、卒中等の脳血管疾病等の機構性、および、外傷性疾患が含まれる。化学療法、または、他の医学的治療による末梢神経障害はまた、本発明の V E G F - E ポリペプチドまたはそのアンタゴニストを用いて処置し得る。

【 0 1 5 0 】

虚血再灌流障害は別の適応症である。内皮細胞機能不全は、虚血再灌流障害に続いて起こる後遺症の始まり、および、調節の両方において重要であり得る。

10

【 0 1 5 1 】

慢性関節リウマチは、さらなる適応症である。脈管構造を介した血管の成長、および、炎症細胞のターゲティングが、リウマチ、および、血清反応陰性の関節炎の病因において重要な要素である。

【 0 1 5 2 】

V E G F - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストは、症状の進行を抑制し、無症候性の患者の死を含む突然死を予防するため心肥大の患者に、予防的に投与され得る。このような予防的治療は、広範性左心室心肥大(massive left ventricular cardiac hypertrophy) (成人では、最大 3 5 mm 若しくはそれ以上の壁厚、または、子供ではそれに匹敵する値) と診断された患者の場合、または、心臓への血流負荷が特に強いような場合に特に確かなものである。

20

V E G F - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストはまた、肥大型心筋症と診断された患者における、実質的に発達する心房細動の治療において有用であり得る。

【 0 1 5 3 】

さらなる適応症にはアンギナ、急性心筋梗塞等の心筋梗塞、鬱血性心不全等の心不全が含まれる。その他の非腫瘍性の症状には乾癬、未熟児の網膜症を含む糖尿病性、若しくは、その他の増殖性網膜症、水晶体後繊維増殖、血管新生緑内障、甲状腺過形成(グレーブス病を含む)、角膜、若しくは、他の組織移殖、慢性炎症、肺炎、ネフロゼ症候群、子癩前症、腹水症、心膜滲出(心膜炎に伴うもの等)、および、胸膜滲出が含まれる。

上述の記載を考慮し、本明細書中に記載の内皮細胞の機能、増殖、および/若しくは形体を変化させるか、または、それらに影響する V E G F - E ポリペプチド、または、そのアゴニスト、若しくはアンタゴニストは、上述の多くの、若しくは全ての疾患の病因、または、病原で重要な役割を果たすかも知れず、このためこれらの過程を増大、若しくは阻害する治療ターゲットとして、または、これらの疾患における血管関連薬剤ターゲティングにおいて機能し得る。

30

【 0 1 5 4 】

1 2 . 投与プロトコル、スケジュール、用量、および、製剤

本発明の分子、並びに、そのアゴニスト、およびアンタゴニストは、上述のような種々の疾患および疾病に対する予防、および、治療薬剤として医薬的に有用である。

本発明の V E G F - E は、医薬的に有用な組成物の調製において公知の方法に従って製剤され得、本発明の V E G F - E は、医薬的に許容される担体ビヒクルと混合物として一緒にされる。適当な担体ビヒクル、および、例えば、ヒト血清アルブミン等の他のヒト蛋白質を含み得るその製剤は、例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第 1 6 版(1980年)(Mack Publishing Co., Osloら編)に記載される。本発明の V E G F - E は、心血管疾患、若しくは心血管病を患う患者に非経口で、または、その血流への有効な形体での運搬を保証する他の方法により投与され得る。

40

【 0 1 5 5 】

本発明の実施で用いられた本発明の V E G F - E の臨床投与に特に適した組成物には、例えば、滅菌水溶液、または、凍結乾燥された蛋白質等の滅菌された水和し得る粉末が含まれる。一般的に、製剤中にさらに医薬的に許容される塩を、一般には製剤を等張にする

50

のに有効な量である適当な量で含むことが望ましい。アルギニン塩基、およびリン酸等の pH 調節剤もまた、一般に 5.5 ~ 7.5 である適当な pH を維持するのに有効な量で、典型的には含まれる。さらに、水性製剤の貯蔵寿命、または、安定性を改善するため、グリセロール等の薬剤をさらに含むことが望ましい。このように、異なる VEGF-E 製剤が、非経口投与、および、特に静脈内投与に適当とされる。

【0156】

VEGF-E ポリペプチド、または、アゴニスト、または、アンタゴニストの治療用組成物が、適当な純度を有する所望の分子を、任意の医薬的に許容される担体、賦形剤、または、安定剤（「Remington's Pharmaceutical Sciences」第 16 版、Oslo 編（1980 年））と、凍結乾燥製剤、または、水溶液の形体で混合することにより貯蔵用に調製される。許容される担体、賦形剤、または、安定剤は、採用される用量および濃度で受容者にとって非毒性で、リン酸、クエン酸、および、他の有機酸等の緩衝剤；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；保存剤（オクタデシルジメチルベンジル アンモニウム クロライド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンズアルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、または、ベンジルアルコール；メチル、または、プロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；および、m-クレゾール等）；低分子量（約 10 残基より少ない）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、若しくは、免疫グロブリン等の蛋白質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、若しくは、リシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、若しくは、デキストリンを含む単糖、二糖、および、他の炭水化物；EDTA 等のキレート剤；ショ糖、マンニトール、トレハロース、若しくは、ソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属複合体（例えば、Zn-蛋白質複合体）；並びに/または、TWEEN（登録商標）、PLURONICS（登録商標）、若しくは、ポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。

10

20

30

40

【0157】

このような担体のさらなる例には、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レクチン、ヒト血清アルブミン等の血清蛋白質、リン酸、グリシン、ソルビン酸等の緩衝物質、飽和植物脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩、または、硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩等の電解質、コロイドシリカ、三珪酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースをベースとした物質、および、ポリエチレングリコールを含む。局所用、または、ゲルを基本とした形体のアンタゴニストのための担体には、カルボキシメチルセルロースナトリウム、または、メチルセルロース等の多糖、ポリビニルピロリドン、ポリアクリレート、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロックポリマー、ポリエチレングリコール、および、木蠟アルコールが含まれる。全ての投与について、慣用のデポー形体が好適に使用される。このような形体には、例えば、マイクロカプセル、ナノカプセル、リポソーム、硬膏、吸入形体、鼻スプレー、舌下錠剤、および、徐放性製剤が含まれる。VEGF-E ポリペプチド、または、アゴニスト、または、アンタゴニストは、このようなビヒクル中に、約 0.1 mg/ml ~ 100 mg/ml の濃度で典型的には製剤されるであろう。

40

【0158】

別の製剤は、VEGF-E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストを形作られた物品中に混合することを含む、このような物品は、内皮細胞成長、および、血管新生を調節するのに用い得る。さらに、これらの物品により腫瘍浸潤、および転移を調節し得る。

治療用に投与される VEGF-E は無菌でなければならない。滅菌は、滅菌濾過膜（例えば、0.2 ミクロン膜）で濾過することにより容易に行われる。通常、VEGF-E は、熱的および酸化的変性に対して非常に安定であれば、凍結乾燥形体、または、水溶液として貯蔵される。VEGF-E 製剤の pH は、場合によってはより高い、または、より低い pH 値が適当であるが、典型的には約 6 ~ 8 である。前述の或る種の賦形剤、担体、または、安定剤の使用により、VEGF-E の塩が形成されるであろうことが理解されるで

50

あろう。

【0159】

V E G F - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストの水性組成物の等張性を確保するために、等張剤が存在し得、そして、好ましくはグリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、および、マンニトール等の三価の、または、より高価の糖アルコールである多価糖アルコールが含まれる。これらの糖アルコールは、単独、または、組合わせて用い得る。代わりに、溶液を等張にするのに塩化ナトリウム、または、他の適当な無機塩を用い得る。

緩衝液は、例えば、所望の pH に応じて、酢酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、または、リン酸塩緩衝液であり得る。本発明の 1 つの型の液体製剤の pH は、約 4 ~ 8 の範囲に、好ましくは、およそ生理的な pH に緩衝化される。

保存剤のフェノール、ベンジルアルコール、および、ベンゼトニウムのハロゲン化物、例えば、塩化物が採用され得る公知の抗菌剤である。

【0160】

治療用 V E G F - E ポリペプチド組成物は、一般的に無菌の出入口を有する容器、例えば、皮下注射針が貫通し得る栓を有する静脈注射溶液のバック、または、ガラス瓶中に入れられる。製剤は好ましくは、静脈内 (i . v .)、皮下 (s . c .)、若しくは、筋肉内 (i . m .) 注射として繰り返し投与されるか、または、経鼻、若しくは、経肺運搬に適したエアロゾル製剤 (経肺運搬については、例えば、E P 2 5 7 9 5 6 号参照) として投与される。

V E G F - E ポリペプチドはまた、除放射性製剤の形体で投与され得る。除放射性製剤の適当な例には、蛋白質を含む固体の親水性ポリマーからなる半透性マトリックスを含む。マトリックスは、例えばフィルム、マイクロカプセル等の付形された物品の形体である。除放射性マトリックスの例には、ポリエステル、Langer et al., (J.Biomed.Mater.Res., 15:167-277(1981)) に記載されるようなヒドロゲル (例えば、ポリ (2 - ヒドロキシエチル - メタクリレート)、ポリアクトド (polyactide) (米国特許第 3 7 7 3 9 1 9 号、E P 5 8 4 8 1 号)、L - グルタミン酸、および、エチル - L - グルタミン酸の共重合体 (Sidman et al., Biopolymers, 22:547-556(1983))、非分解性エチレン - 酢酸ビニル (Langer et al., 前述)、Lupron Depot (登録商標) (乳酸 - グリコール酸共重合体、および、酢酸ロイプロリド (leuprolide) から成る注射可能なマイクロスフェア) 等の分解性乳酸 - グリコール酸共重合体、並びに、ポリ - D - (-) - 3 - ヒドロキシ酪酸 (E P 1 3 3 9 8 8 号) が含まれる。

【0161】

エチレン - 酢酸ビニル、および、乳酸 - グリコール酸等のポリマーは、分子を 1 0 0 日以上にわたって放出することを可能にするが、或る種のヒドロゲルは、より短い期間で蛋白質を放出する。カプセルに包まれた蛋白質が体内に長期間残ると、それらは、37 °C の湿気への曝露により変性、または、凝集し得、それにより生物学的活性を失い、免疫原性も変わることがあり得る。関連する仕組みに依存して、蛋白質の安定化のため合理的な方法を工夫することができる。例えば、もし凝圧機構が、チオ - ジスルフィド相互交換による分子間 S - S 結合形成であることが発見されたのならば、安定化は、メルカプト残基の改変、酸性溶液からの凍結乾燥、含湿量の調節、適当な添加剤の使用、および、特異的ポリマーマトリックス組成物の開発により達成され得る。除放射性 V E G F - E ポリペプチド組成物にはまた、リポソームによりトラップされた V E G F - E ポリペプチドが含まれる。V E G F - E ポリペプチドを含むリポソームは、本質的に公知の方法により調製される：D E 第 3 2 1 8 1 2 1 号；Epstein et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 82:3688-3692 (1985)；Hwang et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77:4030-4034(1980)；E P 第 5 2 3 2 2 号；E P 第 3 6 6 7 6 号；E P 第 8 8 0 4 6 号；E P 第 1 4 3 9 4 9 号；E P 第 1 4 2 6 4 1 号；日本特開昭第 5 8 - 1 1 8 0 0 8 号；米国特許第 4 4 8 5 0 4 5 号および第 4 5 4 4 5 4 5 号、並びに、E P 第 1 0 2 3 2 4 号。通常、リポソームは、小型 (約 2 0 0 ~ 8 0 0 オングストローム) の単層状型であり、脂質含量は約 3 0 モル % コレステロール

10

20

30

40

50

より大きく、選択された部分は、最適の治療のため調節される。

【0162】

VEGF-Eポリペプチド、または、そのアンタゴニストの治療上有効な量は当然、処置（予防を含む）される病理学条件、投与方法、処置に用いられる化合物の型、いずれかの一緒に行われる治療、患者の年齢、体重、一般的医療コンディション、病歴等の要因に依存して異なり、そしてその決定は、担当医の技術範囲内にある。よって、治療専門家は、最大の治療効果を得るのに必要とされる用量を滴定し、投与経路を加減することが必要である。もし、VEGF-Eポリペプチドが、狭いホスト範囲を有するのであれば、ヒト患者の処置にはヒトVEGF-Eポリペプチド、より好ましくは天然配列ヒトVEGF-Eポリペプチドを含む製剤が好まれる。臨床医は、問題の症状について所望の治療効果を達成する用量に達するまで、VEGF-Eポリペプチドを投与するであろう。例えば、目的がCHFの処置であれば、その量は、この症状に伴う進行性の心肥大を防止する量であろう。この治療の経過は、超音波心臓検査により容易にモニターされる。同様に、肥大型心筋症の患者においては、経験に基づいてVEGF-Eポリペプチドが投与され得る。

10

上述のガイドラインについて、一般的な有効量は約0.001~約1.0mg/kg、より好ましくは約0.01~1mg/kg、最も好ましくは約0.01~0.1mg/kgの範囲内である。

【0163】

成人高血圧を処置における非経口使用のためには、VEGF-Eポリペプチドを体重1kg当り約0.01~50mg、好ましくは約0.05~20mg、最も好ましくは1~20mgの注射の形体で日に1~3回、静脈注射により投与することが有利である。経口投与のためには、VEGF-Eポリペプチドをベースとした分子は、体重1kg当り約5mg~1g、好ましくは約10~100mgで、日に1~3回投与される。エンドキシンの混入が安全なレベルの最小限、例えば、0.5ng/mg蛋白質より少なく、抑えられることが望ましい。さらに、ヒトにおける投与のため、製剤はFDA局および生物学的基準で要求される無菌性、発熱性、全般的安全性、並びに、純度に適合する。

20

組織再生に用いられるVEGF-Eポリペプチドを含む医薬組成物の用量レジメは、担当医により、例えば、所望の形成される組織重量、損傷の部位、損傷された組織の状態、創傷の大きさ、損傷を受けた組織の型（例えば、骨）、患者の年齢、性別、および、食餌、いずれかの感染症の重篤度、投与の時間、並びに、その他の臨床的要因等のポリペプチドの活性を変える種々の要因を考慮して決定される。再構成に用いられるマトリックスの型、および、医薬組成物内のその他の蛋白質の含有により用量は異なる。例えば、IGF-I等のその他の公知の成長因子の最終組成物への添加もまた、用量に影響するであろう。経過は、組織/骨成長、および/または修復の周期的な評価、例えば、X線、組織形態学的測定、および、テトラサイクリン標識によりモニターされ得る。

30

【0164】

VEGF-Eポリペプチド、または、アンタゴニスト、または、アゴニスト投与の経路は以下のように、例えば、静脈内、筋肉内、脳内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、眼内、関節内、滑液内、包膜内、経口、局所、若しくは吸入経路の注射、若しくは、点滴、または、除放性系等の公知の方法に適合する。VEGF-Eポリペプチド、または、そのアンタゴニストは、腫瘍内、腫瘍周囲、損傷内、または、損傷周辺経路によっても適切に投与され、局所的、および、全身性の治療効果を発揮する。腹膜内経路は、例えば、卵巣腫瘍の処置において、特に有用であると期待される。

40

ペプチド、または、小型の分子がアンタゴニスト、または、アゴニストとして用いられた場合、それは好ましくは経口、または非経口で、液体、または固体形体で、哺乳動物に投与される。

塩を形成し、ここで有用な分子の薬理的に許容される塩の例には、アルカリ金属塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩）、アルカリ土類金属塩（例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩）、アンモニウム塩、有機塩基塩（例えば、ピリジン塩、トリエチルアミン塩）、無機酸塩（例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩）、および、有機酸の塩（例えば、酢

50

酸塩、シュウ酸塩、p - トルエンスルホン酸塩)が含まれる。

【0165】

骨、軟骨、腱、または、靭帯の生成に有用な、本発明の組成物については、治療方法において組成物を局所的、全身的、または、インプラント、若しくは、装置により局部的に投与することを含む。投与される場合、使用される治療的組成物は、発熱原を含まず、生理的に許容される形体である。さらに、組成物は望ましくはカプセルに含まれるか、または、骨、軟骨、または組織の損傷部位に運搬される粘性形体で注射され得る。局所的投与は、創傷治療、および組織修復に適当であり得る。好ましくは、骨、および/または軟骨形成のため、組成物は蛋白質含有組成物を骨、および/または軟骨の損傷部位へ運搬できるマトリックスを含み、骨および軟骨を作る構造を提供し、好ましくは体に再吸収され得る。このようなマトリックスは、他の移植用の医療適用で現在用いられる材料より形成され得る。

10

マトリックス材料の選択は生体適合性、生分解性、物理的特性、整形的様相、および界面特性に基づく。組成物の特定の適用は、それに適当な製剤を明確にするであろう。組成物のマトリックスとなり得るものは生分解性で、化学的に明らかな、硫酸カルシウム、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、ポリ乳酸、および、ポリ無水物であり得る。その他の材料となり得るものは、骨、または、皮膚コラーゲン等の生分解性で、生物学的に明確なものである。さらなるマトリックスは、純粋な蛋白質、または、細胞外マトリックス成分から成る。他のマトリックスとなり得るものは、焼結ヒドロキシアパタイト、生体ガラス、アルミン酸塩、または、他のセラミックス等の非生物分解性で化学的に明確なものである。マトリックスは、ポリ乳酸とヒドロキシアパタイト、または、コラーゲンとリン酸三カルシウム等、上述の型の材料のいずれかの組み合わせから成ってもよい。生体セラミックは、カルシウム - アルミン酸塩 - リン酸塩中のように組成が変えられていてもよく、孔の大きさ、粒子径、粒子形、および、生分解性を変えるために加工されているもよい。

20

【0166】

一つの特定の態様は、150 ~ 800ミクロンにわたる直径を有する多孔性粒子の形体の乳酸、および、グリコール酸の50 : 50 (モル重量)の共重合体である。幾つかの応用法では、カルボキシメチルセルロース、または、自己由来血餅等の分離剤をポリペプチド組成物がマトリックスから分離するのを防ぐために使用することが有益である。

30

分離剤の1つの好ましいファミリーは、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、および、カルボキシメチルセルロースを含むアルカリセルロース(ヒドロキシアルカリセルロースを含む)であり、好ましいのは、カルボキシメチルセルロース(CMC)のカチオン塩である。その他の好ましい分離剤には、ヒアルロン酸、アルギン酸ナトリウム、ポリ(エチレン グリコール)、ポリオキシエチレンオキシド、カルボキシビニルポリマー、および、ポリ(ビニルアルコール)が含まれる。ここで有用な分離剤の量は総製剤重量に基づいて、0.5 ~ 20重量%、好ましくは1 ~ 10重量%であり、これはポリマーマトリックスからのポリペプチド(または、そのアンタゴニスト)の脱着を防止し、そして、組成物の適当な使い易さを提供するのに必要な量であり、マトリックスに原細胞が浸潤するのを妨げるほど多くはなく、それにより原細胞の骨形成活性をポリペプチド(または、そのアンタゴニスト)が補助する機会を提供する量である。

40

一般に、疾患が許せば、VEGF - Eを部位特異的運搬用に製剤し、投与すべきである。これは、創傷および潰瘍の場合に重宝である。

【0167】

局所的に適用する場合、VEGF - Eは、担体、および/または、アジュバンド等の他の成分と適当に組合される。このような他の成分の性質について、それらが医薬的に許容され得るものであり、目的とされる投与について効能を有し、組成物中の活性成分の活性を弱めるものでないという以外は、限定はない。適当なビヒクルの例には、精製されたコラーゲンを含むか、または、含まない軟膏、クリーム、ゲル、または、懸濁剤が含まれる

50

。組成物はまた、好ましくは液体、または、半液体形体で経皮パッチ、バンソウコウ、および、包帯にしみ込ませてもよい。ゲル製剤を得るために、液体組成物中に製剤された V E G F - E は、有効量の水溶性多糖類、または、ポリエチレングリコール等の合成ポリマーと、局所的に適用するのに適切な粘性のゲルを形成するために混合され得る。使用し得る多糖類には、例として、例えばメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、および、ヒドロキシプロピルセルロース等のアルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、並びに、アルキルヒドロキシアルキルセルロースを含むエーテル化されたセルロース誘導体等のセルロース誘導体；澱粉、および、分別された澱粉；寒天；アルギン酸、および、アルギン酸塩；アラビアゴム；プルラン；アガロース；カラゲニン；デキストラン；デキストリン；フルクタン；イヌリン；マンナン；キシラン；アラビナン；キトサン；グリコーゲン；グルカン；および、合成生物ポリマー；そしてまた、キサンタンゴム、グアールゴム、イナゴマメゴム、アラビアゴム、トラガカントゴム、および、梧桐ゴム等のゴム；並びに、それらの誘導体および混合物が含まれる。

好ましくは、多糖類はエーテル化されたセルロース誘導体、より好ましくは、例えば、メチルセルロース、および、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、および、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等のヒドロキシアルキルセルロース誘導体等の明確で、精製され、そして U S P に載ったものである。ここで、最も好ましいのはメチルセルロースである。

【 0 1 6 8 】

ゲル化するのに有用なポリエチレングリコールは、典型的には、適切な粘性を達成する低分子量、および、高分子量のポリエチレングリコールの混合物である。例えば、分子量 4 0 0 ~ 6 0 0 のポリエチレングリコールと、分子量 1 5 0 0 のものとの混合物が、ペーストを得るのに適当な割合で混合されれば、この目的に有効であろう。

多糖類、および、ポリエチレングリコールに関しての「水溶性」という用語は、コロイド溶液および分散液を含むことを意味する。一般に、セルロース誘導体の溶解性は、エーテル基の置換の度合いにより決定され、本発明で有用な安定化誘導体は、セルロース鎖中の各無水グルコース単位当りこのようなエーテル基を十分量有するべきである。一般に、各無水グルコース単位当り少なくとも 0 . 3 5 個のエーテル基によるエーテル置換の程度が十分である。さらに、セルロース誘導体は、例えば、L i、N a、K または C s 塩等のアルカリ金属塩の形体であり得る。

ゲル中でメチルセルロースが用いられる場合、それは、ゲルの好ましくは約 2 ~ 5 %、より好ましくは約 3 % を構成し、V E G F - E は、ゲル 1 m l 当り約 3 0 0 ~ 1 0 0 0 m g の量で存在する。

【 0 1 6 9 】

1 3 . 組合せ治療

V E G F - E ポリペプチド、または、そのアゴニスト若しくはアンタゴニストの、問題となる疾患を予防、若しくは処置する効力は、その活性な薬剤を、連続して、または、その目的に有効な他の剤と組合わせた一つの組成物として、若しくは、別々の組成物として投与することにより改善され得る。よって、V E G F - E 治療を V E G F - E を含むいずれかの成長因子の細胞増殖、生存、分化および修復を増進する活性を増幅するため、他の新規、若しくは慣用の治療（例えば、V E G F、a F G F、b F G F、P D G F、I G F、N G F、蛋白同化ステロイド、E G F、または、T G F - ）と組合わせることは本発明の範囲内に含まれる。このような共同治療の薬剤自体が組成物中に含まれることは、本発明において必要ではないが、このような薬剤が蛋白質性である場合には都合がよい。このような混合物は、V E G F - E を単独で用いる場合と同様の方法で、同様の目的のために適切には投与される。

【 0 1 7 0 】

心肥大の処置のため、V E G F - E ポリペプチド治療は、例えば、フェニレフリン等の - アドレナリン作用性アゴニストの阻害剤；B O S E N T A N（登録商標）、および、

10

20

30

40

50

MOXONODIN (登録商標)等のエンドセリン - 1 阻害剤 ; CT - 1 に対する阻害剤 (米国特許第 5 6 7 9 5 4 5 号) ; LIF に対する阻害剤 ; ACE 阻害剤 ; デス - アスパラギン酸 - アンギオテンシン I 阻害剤 (米国特許第 5 7 7 3 4 1 5 号) 、および、アンギオテンシン II 阻害剤等の公知の心筋細胞肥大因子の阻害剤の投与と組合わせ得る。

【 0 1 7 1 】

高血圧に伴う心肥大の処置では、VEGF - E ポリペプチドは、例えば、プロパノール、チモロール、テルタロロール(tertalolol)、カルテオロール(carteolol)、ナドロール(nadolol)、ベタキソロール(betaxolol)、ペンブトロール(penbutolol)、アセトブトロール(acetobutolol)、アテノロール、メトプロロール、若しくは、カルベジロール(carvedilol)等の β - アドレナリン作用性受容体のブロック剤 ; 例えば、キナプリル(quinapril) 、カプトプリル、エナラプリル(enalapril)、ラミプリル(ramipril)、ベンアゼプリル(benazepril)、フォシノプリル(fosinopril)、若しくは、リシノプリル(lisinopril)等の ACE 阻害剤 ; 例えば、クロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメタジド(hydroflumethazide)、メチルクロチアジド(methylchlorothiazide)、ベンズチアジド(benzthiazide)、ジクロフェンアミド(dichlorphenamide)、アセタゾルアミド、若しくは、インダパミド(indapamide)である利尿剤 ; 並びに / または、例えば、ジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル、若しくは、ニカルジピン(nicardipine)であるカルシウムチャネル遮断剤と組合わせて投与され得る。本明細書において、一般名 VEGF - E と同定された治療剤を含む医薬組成物は、市販されており、用量、投与、有害作用、禁忌等については製造者の指示にしたがって投与されるべきである (例えば、「Physicians' Desk Reference」 (Medical Economics Data Production Co.:Montvale, N.J., 1997) 第 5 1 版参照)。

10

20

【 0 1 7 2 】

肥大型心筋症の処置における組合わせ治療のための好ましい候補は、 β - アドレナリン作用性阻害剤 (例えば、プロプラノロール、チモロール、テルタロロール、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール、アテノロール、メトプロロール、または、カルベジロール) 、ベラパミル、ジフェジピン(difedipine)、または、ジルチアゼムである。高血圧に伴う肥大の処置には、例えば、ジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル、若しくは、ニカルジピン等のカルシウムチャネル遮断剤 ; β - アドレナリン作用性阻害剤 ; 例えば、クロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメタジド、メチルクロチアジド、ベンズチアジド、ジクロフェンアミド、アセタゾルアミド、または、インダパミド等の利尿剤 ; 並びに / または、例えば、キナプリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベンアゼプリル、フォシノプリル、若しくは、リシノプリル等の ACE - 阻害剤を用いた、抗高血圧薬物治療を必要とし得る。

30

他の適応症について、VEGF - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストは、問題となる骨、および / または、軟骨の欠陥、創傷、若しくは、組織の処置に有用な他の薬剤と組み合わせ得る。これらの薬剤には、EGF、PDGF、TGF - β 、若しくは、TGF - α 、IGF、FGF、および、CTGF等の種々の成長因子が含まれる。

【 0 1 7 3 】

さらに、癌を処置するのに使用される VEGF - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストは、上述のように細胞毒性薬、化学療法薬、または、成長阻害薬と組合わせ得る。また、癌処置のため、VEGF - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストは、放射性物質の照射、若しくは、投与のどちらかを含む放射線治療と連続して、または、組合わせて適切に投与される。

40

VEGF - E ポリペプチド、または、そのアンタゴニストと組合わせて投与される治療薬の有効量は医師、または、獣医の裁量に任される。投薬投与、および、調整は、処置されるべき症状の最大の処置を達成するように行われる。例えば、高血圧を処置するためのこれらの量では、理想的には利尿剤、または、ジギタリスの使用、および、高血圧、若しくは低血圧、腎傷害等の症状が考慮される。用量はさらに、使用される治療薬の型、処置される特定の患者等の要因に依存する。典型的には、VEGF - E ポリペプチドなしで投与される治療薬において使用されるのと同じ用量が採用される。VEGF - E の二次成長

50

因子に対する有用なモル比は典型的には、1 : 0 . 1 ~ 1 0 であり、等モル量が好ましい。

【 0 1 7 4 】

1 4 . 製品

上述の疾患の診断または処置に有用な V E G F - E ポリペプチド、若しくは、そのアンタゴニストを含むキット等の製品は、少なくとも1つの容器、および、1枚のラベルを含む。適当な容器には、例えば、瓶、ガラス瓶、シリンジ、および、試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチック等の多様な材料より形成され得る。容器には、症状を診断または処置するのに有効な組成物が保持され、無菌の出入口（例えば、容器は、皮下注射針が貫通し得る栓を有する、静脈注射用の溶液バックまたはガラス瓶であり得る）を有し得る。組成物中の活性剤は V E G F - E ポリペプチド、または、そのアゴニスト、若しくは、アンタゴニストである。容器上のラベル、または、それに関連するラベルは、組成物が選ばれた症状を診断、または、処置するのに用いられることを示す。製品はさらに、リン酸緩衝化塩水、リンガー溶液、および、デキトロース溶液等の医薬的に許容される緩衝液を含む第2の容器を含んでもよい。さらに、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および、使用のための指示が記されたパッケージ内の印刷物を含む、商業および使用者の観点から望ましい他の材料を含んでもよい。製品はまた、上述のように別の活性剤を含む第2または第3の容器を含んでもよい。

10

【 0 1 7 5 】

F . 抗 - V E G F - E 抗体

本発明によりさらに、抗 - V E G F - E ポリペプチド抗体が提供される。抗体の例には、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性、および、異結合抗体を含む。

20

【 0 1 7 6 】

1 . ポリクローナル抗体

本発明の抗 - V E G F - E 抗体は、ポリクローナル抗体を含み得る。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者には周知である。ポリクローナル抗体は、例えば、免疫化剤、および、望ましければアジュバンドの1若しくは複数回の注射により、哺乳動物中で生じさせ得る。典型的には、免疫化剤、および/または、アジュバンドは、哺乳動物に複数の皮下、または、腹腔内注射により注入される。免疫化剤には、V E G F - E ポリペプチド、または、その融合蛋白質が含まれ得る。免疫化剤を、免疫化される哺乳動物において免疫原性であることが知られている蛋白質に結合することは有用であり得る。このような免疫原性の蛋白質の例には、これらに限定されるわけではないが、スカシガイのヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、および、ダイズトリブシン阻害剤が含まれる。採用され得るアジュバンドの例には、フロイントの完全アジュバンド、および、M P L - T D M アジュバンド（モノホスホリルリピド A、合成トレハロースジコリノミコレート）が含まれる。免疫化方法は、過度の実験をすることなく当業者により選択され得る。

30

【 0 1 7 7 】

2 . モノクローナル抗体

代わりに、抗 - V E G F - E 抗体は、モノクローナル抗体であり得る。モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein(Nature,256:495(1975))に記載される方法等のハイブリドーマ法により調製され得る。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター、または、他の適当な宿主動物が、免疫化剤に特異的に結合するであろう抗体を産生できる、または、産生する能力を有するリンパ球を誘導する免疫化剤で典型的には免疫化される。或いは、リンパ球はイン・ヴィトロで免疫化され得る。

40

免疫化剤には、典型的には V E G F - E ポリペプチド、または、その融合蛋白質が含まれる。一般的に、ヒト起源のものが望ましければ末梢血リンパ球（P B L(peripheral blood lymphocytes)）、または、非ヒト哺乳動物起源のものが望ましければ脾臓細胞、若しくは、リンパ節細胞のどちらかが用いられる。その後リンパ球は、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いて、不死化セルラインと、ハイブリドーマ細胞を形成するよう融合される（Goding, 「Monoclonal Antibodies: Principles and Practice」(Academic P

50

ress,(1986))第59-103頁)。不活化セルラインは通常、形質転換された哺乳動物細胞、特に、げっ歯類、ウシ、および、ヒト起源のミエローマ細胞である。通常、ラット、または、マウスミエローマセルラインが採用される。ハイブリドーマ細胞は、融合されていない不活化細胞の成長、または、生存を阻害する、1若しくはそれ以上の物質を好ましくは含む適当な培養培地中で培養され得る。例えば、親細胞が、酵素ヒポキサチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPRRT)を欠く場合、ハイブリドーマのための培養培地は典型的には、HGPRT-欠損細胞の成長を妨げる物質であるヒポキサチン、アミノプテリン、および、チミジンを含む(HAT培地)。

【0178】

好ましい不活化セルラインは、効率良く融合し、選択された抗体産生細胞における抗体の安定で、高レベルの発現を維持し、そして、HAT培地等の培地に感受性のものである。より好ましい不活化セルラインは、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center(San Diego,California)、および、American Type Culture Collection(Manassas, Virginia)から入手可能なマウスミエローマラインである。ヒトモノクローナル抗体産生のための、ヒトミエローマおよびマウス-ヒトヘテロミエローマセルラインについても記載されている(Kozbor,J.Immunol.,133:3001(1984);Brodeur et al.,「Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications」Marcel Dekker, Inc., New York(1987)第51-63頁)。

その後、ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、VEGF-Eポリペプチドに対するモノクローナル抗体の存在について評価し得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、放射免疫分析(RIA)、または、酵素結合免疫吸着分析(ELISA)等の免疫沈降、または、イン・ヴィトロ結合分析により決定される。このような技術、および、分析は公知である。例えば、モノクローナル抗体の結合親和性は、Munson et al., Pollardのスカッチャード分析により決定され得る(Anal.Biochem.,107:220(1980))。

【0179】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により成長させ得る(Goding、前述)。この目的に適した培養培地には、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地、および、RPMI-1640培地が含まれる。代わりに、ハイブリドーマ細胞をイン・ビボで、哺乳動物中の腹水として生じさせ得る。

サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、または、アフィニティークロマトグラフィー等の慣用の免疫グロブリン精製方法により培養培地、または、腹水液から精製され得る。

【0180】

モノクローナル抗体はまた、米国特許第4816567号等に記載の組換えDNA技術によっても作られ得る。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは慣用の手法(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いること)により容易に単離、および配列決定され得る。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい源となる。一度単離したら、DNAを発現ベクターに入れ、その後、そうしない場合には免疫グロブリン蛋白質を産生しないサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または、ミエローマ細胞等の宿主細胞にトランスフェクトし、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体が合成されるようにする。DNAはまた、例えば、相当するマウス配列をヒトの重鎖、および、軽鎖定常部位のコード配列で置換すること(米国特許第4816567号)、または、免疫グロブリンコード配列の全て、若しくは、一部を非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列と共有結合することにより改変し得る。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインを置換、または、本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインを置換して、キメラ二価抗体を形成し得る。

抗体は一価抗体であり得る。一価抗体を調製する方法は当分野において周知である。例えば、一つの方法には免疫グロブリンの軽鎖、および改変された重鎖の組換え発現が含まれる。重鎖の架橋を妨げるように、一般に、重鎖はFc領域のいずれかの部分が切断されている。代わりとしては、架橋を妨げるように関連するシステイン残基は別のアミノ酸残基で置換されるか、または、欠失されている。

イン・ヴィトロの方法もまた一価抗体を調製するのに適当である。その断片、特にFab断片を製造するための抗体の消化は、当分野においての公知のルーチンな技術により行われ得る。

【0181】

3. ヒト化抗体

本発明の抗-VEGF-E抗体は、さらにヒト化抗体、または、ヒト抗体を含み得る。非ヒト(例えば、マウス)抗体のヒト化形体は、最小限の非ヒト免疫グロブリン由来の配列を含む、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、または、その断片(Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、または、その他の抗体の抗原結合配列等)である。ヒト化抗体には、受容体の相補性決定領域(CDR)が、所望の特異性、親和性、および、能力を有するマウス、ラット、若しくはウサギ等の非ヒト種のCDRからの残基(供与抗体)により置換されたヒト免疫グロブリン(受容抗体)が含まれる。場合により、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は対応する非ヒト残基により置換される。ヒト化抗体はまた、受容抗体、または導入されたCDR、若しくは、フレームワーク配列中のどちらにも見られない残基を含み得る。一般に、ヒト化抗体は、CDR領域の全部、若しくは、実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンに対応し、FR領域の全部、若しくは、実質的に全部がヒト免疫グロブリン定常配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、最適には、典型的にはヒト免疫グロブリンである免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも1部を含むであろう(Jones et al., Nature, 321: 522-525(1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329(1988); および、Presta et al., Curr.Op.Struct.Biol., 2:593-596(1992))。

【0182】

非ヒト抗体をヒト化する方法は周知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト源から導入された1またはそれ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「導入(import)」残基と呼ばれ、典型的には「導入」可変ドメイン由来である。ヒト化は実際に、Winterおよび共同研究者らの方法(Jones et al., Nature, 321:522-525(1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329(1988); および、Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536(1988))に従って、げっ歯類CDR、または、CDR配列をヒト抗体の対応する配列により置換することにより行われ得る。よって、このような「ヒト化」抗体はキメラ抗体であり(米国特許第4816567号)、実質的に完全なヒト可変ドメインより少ない部分が、非ヒト種の対応配列により置換されたものである。実務では、ヒト化抗体は、典型的には、CDR残基、および、場合によりいくつかのFR残基がげっ歯類抗体の相似部位からの残基により置換されたヒト抗体である。

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリー(Hoogenboom and Winter, J.Mol. Biol., 227:381(1991); Marks et al., J.Mol.Biol., 222:581(1991))を含む、種々の公知の技術を用いて製造され得る。Cole et al.および、Boerner et al.の技術もまたヒトモノクローナル抗体の調製に使用し得る(Cole et al., 「Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy」, Alan R. Liss, 第77頁(1985)、および、Boerner et al., J.Immunol., 147(1):86-95(1991))。

【0183】

4. 両特異性(bispecific)抗体

両(二)特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体であり、好ましくはヒト又は擬人化モノクローナル抗体である。本発明の場合には、結合特異性のうち一つは、VEGF-Eポリペプチドに対するものであり、他は任意の他の抗原に対するものであるが、好ましくは細胞表面タンパク又は受容体又は受

10

20

30

40

50

容体サブユニットに対するものである。

両特異性抗体の作成法は当該技術分野で既知である。伝統的には、両特異性抗体の組換え生産は2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖ペアの共発現(co-expression)に基いている。ここで、2個の重鎖は異なる特異性を有する(Milstein and Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983))。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の種類がランダムなので、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子のタンパク混合物を生産する可能性があり、そのうち、唯一つが正しい両特異性構造を有する。正しい分子の精製は通常、アフィニティークロマトグラフィー工程で達成される。同様の方法はWO 93/08829(1993年5月13日公開)およびTrauneker et al., (EMBO J. 10: 3655-3659 (1991))に開示されている。

10

【0184】

所望の結合特異性を有する抗体の可変部(可変ドメイン)(抗体-抗原結合部位)は、免疫グロブリン定常部(定常ドメイン)の配列と融合させることができる。少なくともヒンジ、CH2およびCH3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常部との融合が好ましい。軽鎖の結合に必要な部位を含有する第1の重鎖定常領域(CH1)を融合の少なくとも1つに存在させておくことが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物、および、所望により免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質導入(コトランスフェクション)する。両特異性抗体の生成の詳細については、例えば、Suresh et al.のMethods in Enzymology, 121: 210 (1986)を参照。

20

【0185】

5. 異種複合(ヘテロコンジュゲート)抗体

異種複合抗体も本発明の範囲内である。異種複合抗体は2つの共有結合で結合した抗体で構成される。そのような抗体は、例えば、望ましくない細胞に免疫系細胞を標的化するため(USP 4676980)、HIV感染の治療(WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03039)のために、提案されている。抗体は合成タンパクの化学、例えば架橋剤を含めて、において既知の方法を用い、インビトロで調製できると考えられる。例えば、抗毒素は、ジスルフィド-交換反応を用いるかチオエーテル結合を形成することにより構築することができる。この目的に適当な試薬にはイミノチオラートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミダート、並びに米国特許4676980号に記載の試薬が含まれる。

30

【0186】

6. エフェクター機能工学

本発明の抗体をエフェクター機能、例えば癌の治療における抗体の有効性、に関して改良することが望ましいであろう。例えば、システイン残基(単数又は複数)をFc領域に挿入することによりこの領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させうる。このようにして生成されたホモ二量体抗体では内部移行(インターナリゼーション)能力が改良されおよび/又は補体を介する細胞死滅化および抗体依存性の細胞性細胞毒性(ADCC)が増大されうる。Caron et al., J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992) およびShopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992) 参照。高められた抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体は、Wolff et al., (Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993))が記載したように、異種両機能性クロスリンカーを用いても調製することができる。別法として、二重Fc領域を有し、それにより高められた補体溶解性とADCC能を有しうる抗体を設計(工作)することができる。Stevenson et al., (Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989))参照。

40

【0187】

7. 免疫複合体(イムノコンジュゲート)

本発明はまた以下の物質と結合(共役)した抗体からなる免疫複合体に関する; 化学療法剤、毒素(例、酵素的に活性な、細菌、真菌、植物、動物起源の毒素若しくはそのフラグメント)、又は放射性同位体(即ち、放射性複合体)。そのような免疫複合体の製造に有用な化学療法剤は上記したとおりである。使用し得る酵素的に活性な毒素およびそのフラグメントにはジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性フラグメント、外毒素A

50

鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*)由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォルディ(*Aleurites fordii*)タンパク、ディアンシン(*dianthin*)タンパク、フィトラーカ・アメリカーナ(*Phytolaca americana*)タンパク(P A P I、P A P I IおよびP A P - S)、ノモルディカ・カランティア(*nomordica charantia*)インヒビター、クルシン(*crucifin*)、クロチン(*crotin*)、サパオナリア・オフィシナリス(*sapaonaria officinalis*)インヒビター、ゲロニン(*gelonin*)、ミトゲリン(*mitogellin*)、レストリクトシン(*restrictocin*)、フェノマイシン、エノマイシンおよびトリコテセン類(*tricothecene*)が含まれる。放射性複合抗体を得るために、様々な放射性核種を使用することができる。例として ^{212}Bi 、 ^{131}In 、 ^{90}Y および ^{186}Re が挙げられる。

10

【0188】

抗体と細胞毒性物質との複合体(抱合体)は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(S P D P)、イミノチオラン(I T)、イミドエステルの二価性誘導体(例、ジメチルアジピミダートH C l(*dimethyl adipimidate HCl*))、活性エステル類(例、ジスクシンイミジルスベラート)、アルデヒド類(例、グルタレルデヒド(*glutareldehyde*))、ビス-アジド化合物(例、ビス-(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム化合物(例、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアナート類(例、トリエン2,6-ジイソシアナート)および二価活性フッ素化合物(例、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)等の様々な二価性(bifunctional)タンパク-カップリング剤を用いて作成される。例えば、リシン抗毒素(イムノトキシン)は記載の方法(Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1997))に従って調製することができる。14C-標識1-イソチオシアナートベンジル-3-メチルジエチレン トリアミノペンタ酢酸(M X - D T P A)は、放射性ヌクレオチドを抗体に結合(*conjugate*)させるためのキレート化剤の一例である。W O 9 4 / 1 1 0 2 6 参照。

20

他の実施態様では、腫瘍の予備的なターゲティングに用いるために、抗体を「受容体」(例、ストレプトアビジン)と結合させる。この場合、抗体-受容体複合体を患者に投与したのち、清掃剤(*clearing agent*)を用いて循環中から非結合複合体を除去し、次いで細胞毒性物質(例、放射性ヌクレオチド)と結合した「リガンド(例、アビジン)」を投与する。

30

【0189】

8. 免疫リポソーム

本明細書に開示した抗体は免疫リポソームとしても製剤化することができる。抗体含有リポソームは当該技術分野で既知の方法により調製することができる(Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); 米国特許4485045号および4544545号)。循環時間を増加したリポソームは米国特許5013556号に記載されている。

特に有用なリポソームはホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG-誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含有する脂質組成物を用い、逆相蒸発法で生成させることができる。リポソームは、規定の孔径のフィルターを通して押し出し成形し、所望の直径のリポソームを得る。Martin et al.が記載した方法(Martin et al., *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982))で、互換反応により本発明の抗体のFab'フラグメントをリポソームに結合させることができる。場合により化学療法剤(ドキソルピシンなど)をリポソームに含有させる。Gabizon et al.の*J. National Cancer Inst.*, 81: 1484 (1989)参照。

40

【0190】

G. 抗VEGF-E抗体の用途

本発明の抗VEGF-E抗体は様々な用途を有する。例えば、抗VEGF-E抗体は、VEGF-Eポリペプチドの診断アッセイ、例えば、特異的な細胞、組織又は血清中での発現の検出に用いることができる。当該技術分野で既知の様々な診断検定法が使用可能で

50

あり、例えば、異種又は同種相で実施される競合的結合アッセイ、直接又は間接的なサンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイなどがある(Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158)。診断アッセイで用いる抗体を検出可能な部分で標識することができる。検出可能な部分は直接又は間接的に、検出可能なシグナルを生産しうるはずである。例えば、検出可能な部分は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 又は ^{125}I 等の放射性同位元素、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン又はルシフェリン等の蛍光性又は化学発光性化合物、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、又は西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素であってよい。例えば、文献(Hunter et al., Nature 144: 945 (1962); David et al., Biochemistry, 13: 1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40: 219 (1981); およびNygren, J. Histochem. And Cytochem., 30: 407 (1982)等)に記載された方法を含む、当該技術分野で既知の、抗体を検出可能な部分に結合させるための方法を適宜用いることができる。

抗VEGF-E抗体はまた、組換え細胞培養又は天然起源からのVEGF-Eポリペプチドのアフィニティー精製にも有用である。この方法では、当該技術分野で周知の方法により、VEGF-Eに対する抗体を、SephadexTMレジンやろ紙などの適当な支持体に固定化する。次いで、固定化抗体を精製すべきVEGF-Eポリペプチドを含有する試料と接触させたのち、支持体に結合した、試料中のVEGF-Eポリペプチドを除く全物質を除去する適当な溶媒で支持体を洗浄する。最後に、支持体を抗体からVEGF-Eポリペプチドを放出させる他の適当な溶媒で洗浄する。

【0191】

1. 抗体の医薬組成物

本発明で同定したVEGF-Eポリペプチドと結合する抗体、並びに後述のスクリーニングアッセイによって同定された他の分子は、様々な上記および下記の疾患(障害)の治療に医薬組成物の形で投与することができる。

VEGF-Eポリペプチドが細胞内にあって、全抗体をインヒビターとして用いる場合、内部移行性抗体が好ましい。しかしながら、抗体又は抗体フラグメントを細胞内に到達させるために、リポフェクチンやリポソームも使用できる。抗体フラグメントを用いる場合、標的タンパクの結合ドメインに特異的に結合する最小の阻害性フラグメントが好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基いて、標的タンパクとの結合能力を維持しているペプチド分子をデザインすることができる。そのようなペプチドは化学的に合成するか、および/又は組換えDNA技術で製造することができる。例えば、Marasco et al.のProc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993) 参照。本発明の処方または、治療すべき特定の兆候(適応)に対して必要ならば1以上の、好ましくは相互に不利な影響を及ぼさない相補的な活性を有する活性物質を含有していても良い。別法として、あるいは、付加的に、組成物は、その機能を高める物質、例えば、細胞毒性物質、サイトカイン、化学療法剤、又は成長阻害物質など、を含有していてもよい。意図する目的に有効な量のそのような分子と一緒に適切に含有させる。

【0192】

活性成分はまた、コロイド性薬物デリバリーシステム(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロカプセル、マイクロエマルジョン、ナノ-粒子、およびナノカプセルなど)又はマクロエマルジョン中、例えば、それぞれ、コアセルベーション法又は界面重合法によって製造された、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタシラート)(poly-(methylmethacrylate) マイクロカプセル)に取込むことができる。そのような技術は文献(Remington's Pharmaceutical Science、前掲)に記載されている。

インビボ投与のために用いられる製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌ろ過膜を通してろ過することにより、容易に達成される。

【0193】

徐放性製剤も調製できる。適切な例の徐放性製剤は、抗体を含有する固形疎水性ポリマ

ーの半透過性マトリックス、このマトリックスはフィルムやマイクロカプセル等の成形品の形である、を含む。徐放性マトリックスの例として、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）又はポリ（ビニルアルコール））、ポリアクチド（米国特許第3773919号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタマートの共重合体、非-分解性エチレン-ビニルアセテート、LUPRON DEPOSITTM（乳酸-グリコール酸共重合体および酢酸ロイプロリド(leuprolide acetate)から構成される注射用ミクロスフェア）のような分解性乳酸-グリコール酸共重合体、およびポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-ビニルアセテートおよび乳酸-グルコール酸のようなポリマーは分子を100日間にわたって放出することができるが、ある種のヒドロゲルはタンパクをより短時間の間放出する。被包された抗体が体内に長時間維持された場合、37で水分に暴露されて変性するか凝集し、結果として生物学的活性を失い免疫原性が変化するかもしれない。関与する機構に応じて安定化のための合理的な戦略を考案することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を介する分子間S-S結合の形成であることが分かれば、安定化は、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含量のコントロール、適当な添加物の使用、および特異的なポリマーマトリックス組成物の使用によって達成することができる。

10

【0194】

2. 抗体を用いる治療方法

VEGF-Eポリペプチドに対する抗体は前記のごとく、様々な心血管、内皮、および血管形成障害の治療に用いることができる。

20

抗体は、ポラス静脈内投与、又はある期間の連続注入、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液内、包膜内、経口、局所などの投与経路又は吸入経路などの既知の方法で哺乳類、好ましくはヒトに投与される。抗体は静脈内投与が好ましい。

他の治療レジメも上記の本発明の抗体と一緒に投与することができる。例えば、抗体が癌の治療のためのものであれば、そのような抗体で治療される患者は放射線治療をも受けるであろう。別法として、あるいは付加的に患者に化学療法剤を投与することができる。そのような化学療法剤の調製および投与スケジュールは、業者の指示に従うか、熟練した医師によって経験的に決定される。そのような化学療法剤の調製および投与スケジュールは専門書(Chemotherapy Service, M.C.Perry編(Williams & Wilkins: Baltimore, M.D., 1992))にも記載されている。化学療法剤は、抗体の投与に先立って、或いは後に、又は同時に投与することができる。抗体は、タモキシフェン又はEVIESTATMのような抗-エストロゲン物質、又はオナプリストン(EP 616812参照)のような抗プロゲステロン物質と、それらの分子に関して既知の用量で併用することができる。

30

【0195】

抗体を癌の治療に用いる場合、Erbb2、EGFR、Erbb3、Erbb4又はVEGF受容体(群)の1又はそれ以上と結合する抗体のような、他の腫瘍-関連抗原に対する抗体をも投与することが望ましいかもしれない。これらは上記の物質(剤)をも含有する。また、抗体は、放射線照射又は放射活性物質の投与のいずれかの放射線医学療法と連続的に又は組合わせて投与するのにも適する。別法として、あるいは付加的に、本明細書に開示した、同一の、又は2又はそれ以上の異なる抗原と結合する2又はそれ以上の抗体を患者に共-投与してもよい。患者に1又はそれ以上のサイトカインを投与することが有利な場合もある。好ましい態様では、本明細書に開示した抗体は成長-阻害物質と一緒に共-投与する。例えば、まず成長阻害剤を投与し、次いで本発明の抗体を投与する。しかしながら、抗体を同時、又は先に投与することも想定されている。成長阻害剤の適当な用量は現在使用されている用量であり、成長阻害剤と本発明の抗体の協同作用(相乗的)によって減量することができる。

40

一つの態様では、併用治療で腫瘍の血管形成を攻撃する。例えば、腫瘍患者に、腫瘍又はその転移巣(あれば)の壊死を観察することにより、決定された治療有効量の抗VEGF-Eポリペプチドと他の抗体(例、抗-VEGF)を投与する。この治療法はさらに有利な効果が観察されなくなるまで、又は臨床検査で腫瘍又はあらゆる転移病巣の痕跡が示

50

されなくなるまで継続する。次いで、TNFを単独又は補助剤、又は熱又は照射と一緒に与える。補助剤には、 α -、 β -若しくは γ -インターフェロン、抗HER2抗体、ヘレグリン、抗ヘレグリン抗体、D因子、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、顆粒球-マクrophageコロニー刺激因子(GM-CSF)又は腫瘍内での微小血管凝集を促進する他の物質、例えば抗プロテインC抗体、抗プロテインS抗体又はC4b結合タンパク(WO91/01753(1991年2月21日公開)参照)が含まれる。

【0196】

補助剤の効果は様々なので、常法に従い、腫瘍マトリックススクリーニングによってこれらの腫瘍に対する影響力を比較することが望ましい。抗VEGF-Eポリペプチド抗体とTNFの投与は、所望の臨床効果が達成されるまで繰り返される。別法として、抗VEGF-Eポリペプチド抗体をTNF、および場合により、補助剤(類)と一緒に投与する。固形腫瘍が四肢、又は他の全身循環系から隔離されうる部位に存在する場合、本明細書に記載した治療剤を隔離された腫瘍又は器官に投与する。他の態様では、抗FGF抗体又は抗PDGF中和抗体のようなFGF又はPDGFアンタゴニストを抗VEGF-Eポリペプチド抗体と連結して投与する。抗VEGF-Eポリペプチド抗体による治療は、傷治癒又は所望の新血管新生の間維持することが好ましい。

心血管、内皮、および脈管形成障害の予防又は治療のための本発明抗体の適当な用量は上で明らかにしたように、治療すべき障害(疾患)のタイプ、疾患の重篤度、および経過、抗体を予防又は治療のいずれの目的で投与するか、治療歴、患者の病歴および抗体に対する反応、および担当医師の判断に依存する。抗体は一回で、又は一連の治療を通して患者に適宜投与される。

【0197】

例えば、疾患の型および重篤度に応じ、患者への初期投与量として約 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 50\text{mg}/\text{kg}$ (例、 $0.1 \sim 20\text{mg}/\text{kg}$)の抗体を一回又はそれ以上の回数に分けて、又は連続注入によって投与することが挙げられる。典型的な1日又は1週間の用量は、上記の因子に応じて約 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 100\mu\text{g}/\text{kg}$ 又はそれ以上である。数日又はそれ以上の間の反復投与のためには、症状に応じて、疾患症状の所望の抑制が起るまで、治療を繰り返すか、維持する。しかしながら、他の投与レジメも有用である。この治療法の進行は、例えば、X線による腫瘍イメージング(radiographic tumor imaging)などの通常の方法およびアッセイで容易にモニターすることができる。

【0198】

3. 抗体を伴う製品

抗体と標識を備えた容器を含む製造品も提供される。活性物質として抗VEGF-E抗体を含有するそのような製品は上に記載されている。

【0199】

4. 抗体を用いる腫瘍の診断および予防

抗体を使用すべき指示が癌である場合、細胞表面タンパク、例えば、ある種の腫瘍内で過剰発現している成長レセプター、は薬物候補又は腫瘍(例、癌)治療の優れた標的であるが、同タンパクはまたVEGF-Eポリペプチドと一緒に腫瘍の診断および予防にも付加的な用途を有する。例えば、VEGF-Eポリペプチドに対する抗体は腫瘍診断薬又は予防薬として使用できる。

例えば、抗体断片を含む抗体を、VEGF-Eポリペプチドをコードする遺伝子を含む遺伝子の発現を定量的又は定性的に検出するために用いることができる。抗体は検出可能な標識を有し(例、蛍光性ラベル)、結合を光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光分析法、又は当該技術分野で既知の他の方法で観察し得ることが好ましい。そのような結合アッセイは基本的に上記のようにして実施される。

マーカー遺伝子産物に結合する抗体のインシトゥー検出は、例えば、免疫蛍光又は免疫電子顕微鏡検査で行うことができる。この目的には、患者から組織学的標本を取り、標識した抗体を、好ましくは抗体を生物学的標本に重層することにより、適用する。この方法

10

20

30

40

50

によって、検査した組織内でのマーカー遺伝子産物の分布を決定することもできる。当業者には明らかであるが、インシトゥー検出には広範な組織学的方法を容易に用いることができる。

【0200】

以下の実施例は単に例示のためのものであって、いかなる意味でも本発明を限定するものではない。

本明細書中で参照した全ての特許および文献は、その全体を本明細書に引用して組み込まれる。

【実施例】

【0201】

実施例中で言及されている市販の試薬は、特に記載しない限り、製造元の使用説明にしたがって用いた。以下の実施例、および本明細書を通して、ATCC受入れ番号により同定される細胞の供給元は、the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia である。

【0202】

実施例 I : VEGF 関連タンパク質 (VEGF - E) をコードするクローンの同定

VEGF との相同性により、the Incyte Pharmaceuticals データベースから同定された、発現配列タグ (expressed sequence tag、EST) に基づくプローブを用いて、ヒト神経膠腫セルライン G61 由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングした。具体的には、Incyte Clone "INC1302516" を用いて以下の4つのプローブを製造した：

(配列番号3) 5' - ACTTCTCAGTGTCCATAAGGG ;

(配列番号4) 5' - GAACATAAGAGAAACCGATACCAATTTTCTGGCCAGGTTGTCT ;

(配列番号5) 5' - CACCACAGCGTTTAACCAAGG ; および

(配列番号6) 5' - ACAACAGGCACAGTTCCAC .

9個のポジティブを同定し、特徴付けした。3個のクローンは完全コード化領域を含み、配列が同一であった。また、胎児肺ライブラリーから部分的クローンを同定した。これは、コード化されるアミノ酸を変化させない1個のヌクレオチド変化を除いて、神経膠腫由来配列と同一であった。

【0203】

実施例 2 : 発現コンストラクト

哺乳類タンパク質の発現のため、完全なオープンリーディングフレーム (ORF) を CMV に基づく発現ベクターにクローン化した。エピトープタグ (FLAG (登録商標)、Kodak) およびヒスチジンタグ (His8) をこの ORF と終止コドンの間に挿入した。VEGF - E - His8 および VEGF - E - FLAG を、Superfect (登録商標) (Qiagen) によってヒト胎児腎臓 293 細胞にトランスフェクションし、(3⁵S) メチオニンおよび (3⁵C) システインで3時間パルスラベルした。15倍濃縮された、血清を含まない条件培地 20 μL を、ドデシル硫酸ナトリウムサンプルバッファー中、ポリアクリルアミドゲル (Novex) 上で電気泳動 (SDS - PAGE) すると、両方のエピトープタグを付されたタンパク質はいっしょに移動した。VEGF - E - IgG 発現プラスミドは、この ORF をヒト Fc (IgG) 配列の前にクローニングすることによって構築した。

この VEGF - E - IgG プラスミドを、Baculogold Baculovirus (登録商標) DNA (Pharming) とともに、Lipofectin (登録商標) (GibcoBRL) を用いて、10% ウシ胎児血清を補った Hink's (登録商標) TNM - FH 培地 (JRH Biosciences) 中で培養された 105 Sf9 細胞中に同時トランスフェクションした。細胞を 28 で5日間インキュベーションした。上清を回収した後、これを感染多重度 (MOI) 約 10 で Sf9 細胞に感染させることによって最初のウイルス増幅用に用いた。細胞を3日間インキュベーションした後、上清を回収し、上清 1 mL を Prot

10

20

30

40

50

e i n - A S e p h a r o s e (登 録 商 標) C L - 4 B ビ ー ズ (P h a r m a c i a) 3 0 μ L に 結 合 せ せ た 後 、 S D S - P A G E 分 析 し て 組 換 え プ ラ ス ミ ド の 発 現 を 測 定 し た 。 最 初 の 増 幅 上 清 を 用 い 、 E S F - 9 2 1 培 地 (E x p r e s s i o n S y s t e m s L L C) 中 で 培 養 さ れ た S f 9 細 胞 の 攪 拌 培 養 物 5 0 0 m L を 感 染 多 重 度 約 0 . 1 で 感 染 さ せ た 。 回 収 さ れ た 上 清 を 滅 菌 ろ 過 し た こ と を 除 い て 、 上 記 の よ う に 細 胞 を 処 理 し た 。 特 異 的 タ ン パ ク 質 を P r o t e i n - A S e p h a r o s e 4 F a s t F l o w (登 録 商 標) (P h a r m a c i a) カ ラ ム と 結 合 さ せ て 精 製 し た 。

【 0 2 0 4 】

実施例 3 : ノザンプロット分析

複数の成人および胎児組織および腫瘍セルラインからのヒトポリ (A) + R N A の プ ロ ッ ト は 、 C l o n t e c h (P a l o A l t o , C A) か ら 得 ら れ た も の で あ る 。 完 全 コ ー ド 化 領 域 を 含 む ³ ² P - ラ ベ ル 化 プ ロ ー プ を 用 い て ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン を 行 い 、 0 . 1 \times S S C 、 0 . 1 % S D S 中 、 6 3 で 洗 浄 し た 。

V E G F - E m R N A は 、 胎 児 肺 、 腎 臓 、 脳 お よ び 肝 臓 、 な ら び に 成 人 心 臓 、 胎 盤 、 肝 臓 、 骨 格 筋 、 腎 臓 お よ び 膵 臓 に お い て 検 出 可 能 で あ っ た 。 ま た V E G F - E m R N A は 、 A 5 4 9 肺 腺 癌 (l u n g a d e n o c a r c i n o m a) お よ び H e L a 頸 部 腺 癌 (c e r v i c a l a d e n o c a r c i n o m a) セ ル ラ イ ン に お い て も 見 ら れ た 。

【 0 2 0 5 】

実施例 4 : インシトゥーハイブリダイゼーション

インシトゥーハイブリダイゼーションは、細胞または組織調製物内の核酸配列の検出および局在部位決定 (localization) に 関 する 強 力 で 用 途 の 広 い 技 術 で あ る 。 こ れ は 、 例 え ば 遺 伝 子 発 現 部 位 を 同 定 し 、 転 写 の 組 織 分 布 を 分 析 し 、 ウ イ ル ス 感 染 を 同 定 し 、 そ の 局 在 部 位 を 決 定 し 、 特 定 の m R N A 合 成 の 変 化 を 追 跡 し 、 染 色 体 マ ッ ピ ン グ を 援 助 す る の に 有 用 で あ り 得 る 。

Lu and Gillett, Cell Vision 1: 169-176 (1994) のプロトコルの最適化バージョンにしたがい、P C R 作 成 ³ ³ P ラ ベ ル 化 リ ボ プ ロ ー プ を 用 い て インシトゥーハイブリダイゼーションを行った。簡単には、ホルマリン固定され、パラフィンに包埋されたヒト組織をセクション化し、パラフィン除去し、プロテイナーゼ K (2 0 g / m L) 中 、 3 7 で 1 5 分 間 タ ン パ ク 質 除 去 し 、 さ ら に 、 L u a n d G i l l e t t , (上 記) に 記 載 の よ う に 、 インシトゥーハイブリダイゼーション用にプロセッシングする。(以下に記載のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて) 9 8 0 b p の P C R 産 物 か ら (³ ³ - P) U T P ラ ベ ル 化 アンチセンスリボプローブを製造し、5 5 で一晩ハイブリダイゼーションさせた。このスライドグラスを K O D A K N T B 2 (登 録 商 標) 核 追 跡 エ マ ル ジ ョ ン (n u c l e a r t r a c k e m u l s i o n) 中 に 浸 し 、 4 週 間 暴 露 し た 。

【 0 2 0 6 】

³ ³ P リボプローブ合成

³ ³ P - U T P (A m e r s h a m B F 1 0 0 2 , S A < 2 0 0 0 C i / m m o l) 6 . 0 μ L (1 2 5 m C i) を 急 速 減 圧 乾 燥 し た 。 乾 燥 ³ ³ P - U T P を 含 む そ れ ぞ れ の 試 験 管 に 以 下 の 成 分 を 加 え た :

5 \times 転写バッファー 2 . 0 μ L

D T T (1 0 0 m M) 1 . 0 μ L

N T P m i x (2 . 5 m M : 1 0 m M G T P , C T P お よ び A T P 各 1 0 μ L + H ₂ O 1 0 μ L) 2 . 0 μ L

U T P (5 0 μ M) 1 . 0 μ L

R N A s i n 1 . 0 μ L

D N A 鋳 型 1 . 0 μ L (1 μ g)

H ₂ O 1 . 0 μ L

R N A ポ リ メ ラ ー ゼ (通 常 、 P C R 産 物 に 関 し て T 3 = A S 、 T 7 = S) 1 . 0 μ L 。

【 0 2 0 7 】

こ の 試 験 管 を 3 7 で 1 時 間 インキュベーションした。トータルで 1 . 0 μ L の R Q 1

10

20

30

40

50

D Nアーゼを加えた後、37 で15分間インキュベーションした。トータルで90 μ LのTE (10 mM トリス pH 7.6 / 1 mM EDTA pH 8.0)を加え、混合物をDE 81ペーパー上にピペティングした。残りの溶液をMICROCON-50 (登録商標)限外ろ過ユニットに載せ、プログラム10を用いて回転させた(6分間)。ろ過ユニットを逆さにして第二の試験管に注ぎ、プログラム2を用いて回転させた(3分間)。最後に回転(spin)させて回収した後、トータル100 μ LのTEを加えた。次いで最終産物1 μ LをDE 81ペーパー上にピペティングし、BIOFLUOR II (登録商標)6 mL中でカウントした。

このプローブをTBE/尿素ゲル上で電気泳動した。トータル1~3 μ Lのプローブまたは5 μ LのRNA Mark IIIをローディングバッファー (loading buffer) 3 μ Lに加えた。95 の熱ブロック(heat block)上で3分間加熱した後すぐに、このゲルを氷上に置いた。ゲルのウェルを洗い流し、サンプルを載せ、180~250ボルトで45分間、電気泳動した。このゲルをプラスチックラップ (SARAN (登録商標)ブランド)で覆い、XARフィルムに暴露し、-70 フリーザー内で1時間~一晩補力スクリーニング (intensifying screen)した。

【0208】

³³Pハイブリダイゼーション

A. 凍結セクションの前処理

スライドガラスをフリーザーから取り出し、アルミニウムトレイに載せ、室温で5分間解凍した。このトレイを55 のインキュベーター内に5分間置き、曇り (condensation) を減少させた。このスライドガラスを、換気フード内、氷上の4%パラホルムアルデヒド中で10分間固定し、室温下の0.5 x SSC (20 x SSC 25 mL + s.c.H₂O 975 mL)中で5分間洗浄した。0.5 μ g/mL プロテイナーゼK (前もってあたためておいたRNAseを含まないRNAseバッファー250 mL中の10 mg/mL ストック 12.5 μ L)中、37 で10分間、タンパク質除去を行った後、セクションを0.5 x SSC中、室温で10分間洗浄した。このセクションを、70%、95%および100%エタノール中で、それぞれ2分間脱水した。

【0209】

B. パラフィン包埋セクションの前処理

このスライドガラスをパラフィン除去し、s.c.H₂O中に置き、室温で各5分間、2 x SSCで2回すすいだ。セクションを、ヒト胎児組織用には、20 μ g/mL プロテイナーゼK中 (RNAseを含まないRNAseバッファー250 mL中の10 mg/mL 500 μ L; 37、15分間)、あるいはホルマリン組織用には、8 x プロテイナーゼK (RNAseバッファー250 mL中の100 μ L、37、30分間)中でタンパク質除去した。次いで、上記のように0.5 x SSC中ですすぎ、脱水した。

【0210】

C. プレハイブリダイゼーション

このスライドガラスを、Boxバッファー (4 x SSC、50%ホルムアミド)で満たされたプラスチックボックスに移した。ろ紙を浸した。この組織を、ハイブリダイゼーションバッファー (硫酸デキストラン3.75 g + s.c.H₂O 6 mL) 50 μ Lで覆い、ボルテックスし、キャップを緩めて電子レンジで2分間加熱した。氷上で冷却した後、ホルムアミド 18.75 mL、20 x SSC 3.75 mLおよびs.c.H₂O 9 mLを加え、この組織を十分にボルテックスし、42 で1~4時間インキュベートした。

【0211】

D. ハイブリダイゼーション

スライドガラス当たり1.0 x 10⁶ cpmプローブおよびtRNA (50 mg/mL ストック) 1.0 μ Lを95 で3分間加熱した。このスライドガラスを氷上で冷却し、スライドガラス当たりハイブリダイゼーションバッファー48 μ Lを加えた。ボルテックスした後、スライドガラス上のプレハイブリダイゼーション物50 μ Lに³³P mi

10

20

30

40

50

× 50 μL を加えた。このスライドガラスを 55 °C で一晩インキュベートした。

【0212】

E. 洗浄

室温で 2 × 10 分間、2 × SSC、EDTA で洗浄し (20 × SSC 400 mL + 0.25 M EDTA 16 mL、 $V_f = 4 L$)、次いで 37 °C で 30 分間 RNase A 処理した (RNase バッファー 250 mL 中の 10 mg/mL 500 μL = 20 μg/mL)。このスライドガラスを、室温で 2 × 10 分間、2 × SSC、EDTA で洗浄した。ストリンジェンシーな洗浄条件は以下のものであった: 55 °C で 2 時間、0.1 × SSC、EDTA (20 × SSC 20 mL + EDTA 16 mL、 $V_f = 4 L$)。

【0213】

F. オリゴヌクレオチドプライマー

本明細書中に開示される、DNA 29101 配列に対してインシトゥー分析を行った。これらの分析用のリボプローブを製造するために用いられるオリゴヌクレオチドプライマーは以下のものであった。

P1: 5' - GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GGC GGA ATC CAA CCT GAG TAG (配列番号7)

P2: 5' - CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GCG GCT ATC CTC CTG TGC TC (配列番号8)。

【0214】

G. 結果

インシトゥー分析から得られた結果は次のようであった。

ヒト胎児下肢では、軟骨原基の縁(edge) (すなわち外縁の周り) にある発達中の下肢骨、発達中の腱、血管の平滑筋および、発達中の骨格筋の筋細胞および筋管を含む細胞内で VEGF-E の発現が見られた。発現は、骨端成長板でも観察された。ヒト胎児リンパ節では、発達中のリンパ節の辺縁洞(marginal sinus) に VEGF-E の発現が見られた。ヒト胎児胸腺では、胸腺皮質の莢膜下領域(subcapsular region)、可能性としては、この領域に見られる莢膜上皮細胞、または増殖中のダブルネガティブな胸腺細胞で発現が見られた。ヒト胎児脾臓は発現に関してネガティブであった。

気管では、ヒト胎児組織の平滑筋で VEGF-E の発現が観察された。ヒト胎児脳 (大脳皮質) では、皮質性ニューロン(cortical neurons) に集中して VEGF-E の発現が見られた。ヒト胎児脊髄はネガティブであった。ヒト胎児小腸では、平滑筋で VEGF-E の発現が見られた。さらに、ヒト胎児甲状腺では、甲状腺上皮全般にわたって VEGF-E の発現が見られた。ヒト胎児副腎(adrenal gland) はネガティブであった。肝臓では、ヒト胎児管板細胞(ductal plate cells) で VEGF-E の発現が観察され、ならびに、ヒト胎児胃では壁平滑筋で、ヒト胎児皮膚では扁平上皮の基底層で発現が見られた。さらに、ヒト胎児胎盤では栄養膜絨毛内の間質細胞で VEGF-E の発現が見られ、ヒト胎児索状組織(cord) では、動脈壁および静脈壁で発現が見られた。

【0215】

過排卵させたラット卵巣において試験した場合、すべてのセクション、コントロールおよび過排卵させた卵巣は、アンチセンスおよびセンスプローブの両者に対してネガティブであった。このモデルでは、メッセンジャーが発現されなかったか、あるいはこのヒトプローブはラットと交差反応性でないかである。

さらに以下の部位では、VEGF-E の高度な発現が観察された:

チンパンジー(chimp) 卵巣 - 成熟した濾胞の顆粒膜細胞、包膜細胞(thecal cells) での低い強度のシグナルが観察された。

チンパンジー副甲状腺(parathyroid) - 主細胞での高度な発現。

ヒト胎児精巣 - 発達中の尿細管を取り囲む間質細胞での中程度の発現。

ヒト胎児肺 - 発達中の気管支の軟骨細胞での高度な発現および、分岐する気管上皮での低レベルの発現。

腎細胞癌、胃癌および大腸癌に対しては特異的な発現が観察されなかった。

10

20

30

40

50

【0216】

上記実験で試験された胎児組織 (E12 - E16週) には以下のものが含まれる：
胎盤、臍帯(umbilical cord)、肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、肺、心臓、大血管、食道、胃、小腸、脾臓、胸腺、膵臓、脳、眼、脊髄、体壁(body wall)、骨盤および下肢。

上記実験で試験された成人組織には以下のものが含まれる：

肝臓、腎臓、副腎、心筋、大動脈、脾臓、リンパ節、膵臓、肺、皮膚、大脳皮質 (rm)、海馬 (rm)、小脳 (rm)、陰茎、眼、膀胱、胃、胃癌、大腸、大腸癌および軟骨肉腫ならびに、アセトミノフェン(acetaminophen)誘導性の肝臓傷害および肝硬変を有する組織。

まとめると、この発現パターンによって、VEGF-Eが細胞の分化および/または増殖に参与し得ることが示される。発達中の骨格筋での発現パターンにより、このタンパク質が筋芽細胞の分化および/または増殖に参与し得ることが示される。

10

【0217】

実施例5：筋細胞肥大アッセイ

新生児 Harlan Sprague Dawley ラット心室 (妊娠23日) 由来の筋細胞を、96ウェルプレートに75000細胞/mLで2回(in duplicate)配置した。細胞を、2000、200、20または2ng/mL VEGF-E-IgGで48h処理した。筋細胞をクリスタルバイオレットで染色して形態を明視化し、3~7の尺度で評価した (3は未刺激のものであり、7は完全膨張 (full-blown) 肥大のものである)。

20

2000ng/mLおよび200ng/mLのVEGF-Eは評価5の肥大を生じさせた。

【0218】

実施例6：細胞増殖アッセイ

マウス胎児線維芽細胞C3H10T1/2細胞(ATCC)を、50:50 Ham's F-12:10%ウシ(calf)胎児血清(FCS)を含む低グルコースDMEM培地中で培養した。細胞を24ウェルプレートに1000、2000および4000細胞/ウェルで2回(in duplicate)配置した。48時間後、2%FCSを含む培地に細胞を移し、200、800または2000ng/mL VEGF-Eと、あるいは増殖因子を加えずに、72時間インキュベーションした。

30

200ng/mL VEGF-Eの存在下では、3つの細胞濃度すべてで、その不存在下と比べて約1.5倍多い数の細胞が測定された。

【0219】

実施例7：内皮細胞生存アッセイ

ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC、Cell Systems)をComplete Media(Cell Systems)中で維持し、48ウェルプレート中、20000細胞/ウェルで血清を含まない培地(0.1%BSAを含むBasic Media、Cell Systems)に3回(in triplicate)配置した。細胞を、200または400ng/mL VEGF-E-IgG、100ng/mL VEGF-E、20ng/mL 塩基性FGFと、あるいは何も添加せずに5日間インキュベーションした。

40

VEGF-Eを加えると、増殖因子を添加しなかった場合と比べて生存率が2~3倍高くなった。VEGFおよび塩基性FGFはポジティブコントロールとして加えられたものである。

【0220】

実施例8：内皮管(endothelial tube)形成の刺激

このアッセイは Davis and Camarillo, Experimental Cell Research, 224:39-51 (1996) に記載のアッセイにしたがうか、あるいはそれを以下のように修飾して用いた：

プロトコル：HUVEC細胞(最初からの継代数8以下)を、 6×10^5 細胞/mLの密度で最終濃度2.6mg/mLのタイプIラット尾コラーゲンと混合し、96ウェルプレートにウェルあたり50 μ Lを配置する。このゲルを37℃で1hr固化させ、次いで1

50

% F B S および V E G F - E サンプルを (それぞれ 1 %、0.1 % および 0.01 % 希釈で) 補ったウェルあたり 50 μ L の M 1 9 9 培養培地を 1 μ M 6 - F A M - F I T C 色素とともに加え、空胞 (vacuoles) をその形成時に染色する。細胞を 37 / 5 % C O 2 で 4 8 h r インキュベーションし、室温で 10 分間、3.7 % ホルマリンで固定し、P B S で 5 回洗浄し、次いで 4 で一晩、R h - P h a l l o i d i n で染色した後、4 μ M D A P I で核を染色する。

【0221】

1. アポトーシスアッセイ

このアッセイでは、外因性増殖因子 (P M A を含まない V E G F、b F G F) の存在下において、三次元基質 (3-dimensional matrix) 中で細胞の生存を促進する因子を同定する。

10

ポジティブな結果は 1 であるか、あるいは 1 以下である。0 = アポトーシスなし、1 = 20 % 以下の細胞がアポトーシス、2 = 50 % 以下の細胞がアポトーシス、3 = 50 % 以上の細胞がアポトーシス。この系におけるアポトーシスの刺激剤はアポトーシス因子であると予想され、阻害剤はアポトーシスを防止または減少させることが予想される。

【0222】

2. 空胞アッセイ

このアッセイでは、b F G F および V E G F (40 ng / mL) の存在下における内皮空胞形成および管腔 (lumen) 形成を刺激する因子を同定する。

ポジティブな結果は 2 であるか、あるいは 2 以上である。1 = 20 % 以下の細胞内に空胞が存在、2 = 20 ~ 50 % の細胞内に空胞が存在、3 = 50 % 以上の細胞内に空胞が存在。このアッセイは、ピノサイトーシス、イオンポンプ作用、透過性および接合部 (junction) 形成の刺激に關与する因子を同定するように設計されている。

20

【0223】

3. 管形成アッセイ

このアッセイは、三次元基質内における内皮管形成を刺激する因子を同定するためのものである。このアッセイは、外因性増殖因子 (V E G F、b F G F) の存在下、内皮細胞を刺激して、三次元基質内で管様構造に分化させる因子を同定する。

ポジティブな結果は 2 であるか、あるいは 2 以上である。1 = 細胞はすべて丸型、2 = 細胞は伸長、3 = 細胞はいくつか連結して管を形成中、4 = 細胞は複雑な管状ネットワークを形成中。このアッセイは、トラッキング、走化性または内皮細胞形変化の刺激に關与し得る因子を同定するであろう。

30

【0224】

この結果を図 3 から図 5 に示す。図 3 A は増殖因子不存在下での H U V E C 管形成を示す。図 3 B は V E G F / b F G F および P M A 存在下、図 3 C は V E G F および b F G F 存在下、図 3 D は V E G F および P M A 存在下、図 3 E は b F G F および P M A 存在下、図 3 F は V E G F 存在下、図 3 G は b F G F 存在下、ならびに図 3 H は P M A 存在下での H U V E C 管形成を示す。

図 4 A および 4 B はそれぞれ、H U V E C 管形成に対する V E G F - E - I g G 1 % 希釈物の作用およびバッファークントロール (10 mM H E P E S / 0.14 M N a C l / 4 % マンニトール、p H 6.8) 1 % 希釈物の作用を示す。図 5 A および 5 B はそれぞれ、H U V E C 管形成に対する V E G F - E - ポリ - h i s 1 % 希釈物の作用および V E G F - E - I g G 用バッファークントロール 1 % 希釈物の作用を示す。

40

この結果により、V E G F - E - I g G および V E G F - E - ポリ - h i s サンプルを用いると、バッファークントロールの場合より複雑な管形成が生じることをはっきりと示される。

【0225】

実施例 9 : トランスジェニックマウス

皮膚での発現を生じさせるケラチンプロモーター (Xie et al., Nature, 391: 90-92 (1998)) の制御下に V E G F - E をコードする c D N A を含むマイクロインジェクションに

50

適当なベクターを用い、C57BL/6/SJL F2マウス胚(DNA X)をマイクロインジェクションして、トランスジェニックマウスを作成した。

トランスジェニックイヌは生誕時にはしわがあつて、光沢を示し(shiny)、毛が生えるのが遅かった。マウスは齢2週間までにその表現型を喪失した。ヒストパシックな(histopathic)変化は検出できなかった。

【0226】

実施例10：抗体の生産

雌性ニュージーランド白色ウサギ内で、ヒトVEGF-Eに対するポリクローナル抗血清を作成した。このタンパク質を最初のインジェクション用に Freund's 完全アジュバントと、以後すべての追加免疫(boost)用には、 Freund's 不完全アジュバントとホモジナイゼーションした。最初の免疫化および最初の追加免疫に関しては、 Bennett et al., J. Biol. Chem., 266: 23060-23067 (1991); および Sigel, Sinha and VanderLaan, "Production of Antibodies by Inoculation into Lymph Nodes" in Methods in Enzymology, vol. 93 (New York: Academic Press, 1983) にしたがって、体重1kgあたり3.3μgを膝窩リンパ節に直接インジェクションした。以後すべての追加免疫に関しては、体重1kgあたり3.3μgを皮下および筋肉内部位にインジェクションした。インジェクションは3週間毎に行い、各インジェクション後、2週間を経過した時点で採血した。このように得られたポリクローナル抗血清は、免疫沈澱実験によって示されるようにVEGF-Eと結合する抗体を含んでいた。

【0227】

実施例11：VEGF刺激性内皮細胞(ACE細胞)増殖の阻害

(最初の培養物由来、最大12~14継代)ウシ副腎皮質毛細管内皮細胞(ACE細胞)を96ウェルプレートに100μLあたり500細胞/ウェルで配置した。アッセイ培地には、低グルコースDMEM、10%ウシ(calf)血清、2mM グルタミンおよび1xペニシリン/ストレプトマイシン/ファンギゾン(fungizone)が含まれていた。コントロールウェルには以下のものが含まれていた：(1)ACE細胞を添加せず；(2)ACE細胞のみ；(3)ACE細胞+5ng/mL FGF；(4)ACE細胞+3ng/mL VEGF；(5)ACE細胞+3ng/mL VEGF+1ng/mL TGF-β；および(6)ACE細胞+3ng/mL VEGF+5ng/mL LIF。次いで試験サンプル、ポリ-hisタグを付されたVEGF-Eポリペプチド(上記実施例に記載されているもの；100μL容量)を(それぞれ1%、0.1%および0.01%希釈で)ウェルに加えた。この細胞培養物を37°C/5%CO₂で6~7日間インキュベーションした。インキュベーション後、ウェル中の培地を吸引し、細胞をPBSで1x洗浄した。次いで酸ホスファターゼ反応混合物(100μL；0.1M 酢酸ナトリウム、pH5.5、0.1%トリトンX-100、10mM p-ニトロフェニルホスフェイト)を各ウェル加えた。37°Cで2時間インキュベーションした後、1N NaOH 10μLを加えて、この反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて、405nmでの光学密度(OD)を測定した。

VEGF-Eの活性を、(OD405nmでの酸ホスファターゼ活性によって測定される、)刺激しない細胞と比較した、VEGF(3ng/mL)刺激性増殖の阻害パーセントとして計算した。TGF-βは、活性リファレンスとして用いた。TGF-βは1ng/mLでVEGF刺激性ACE細胞増殖の70~90%を遮断する。観察された阻害が>30%であった場合、このアッセイの結果は「ポジティブ」と判断される。

最初のアッセイ実行では、VEGF-Eは、1%、0.1%および0.01%希釈物で、それぞれ52%、90%および96%阻害を示した。2回目のアッセイ実行では、VEGF-Eは、1%、0.1%および0.01%希釈物で、それぞれ57%、93%および91%阻害を示した。

【0228】

物質の寄託

以下の物質は the American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia USA (ATCC) に寄託された :

材料	A T C C 寄託番号	寄託日
D N A 2 9 1 0 1 - 1 2 7 2	2 0 9 6 5 3	1 9 9 8 年 3 月 5 日

この寄託は、the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (ブダペスト条約) の規定下で行われたものである。これは寄託物の生存培養物を、その寄託の日から30年間維持することを保証する。この寄託物は、ブダペスト条約の条件下、A T C C によって利用可能にされ、Genentech, Inc. と A T C C 間の同意に付され、これにより、いずれが先になっても、当米国特許の発行時か、あるいはいずれかの米国または外国特許出願の公開時に、公に対する、寄託物の後代培養物の、恒久的で非制限的な利用可能性が保証され、the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks (米国特許および商標庁の長官) によって決定された、35 U.S.C. § 122 およびそれにしたがう長官の規則 (the Commissioner's rules) (37 C.F.R. § 1.14、特に 886 O.G. 638 を含む) により権利を有する者に対する後代の利用可能性が保証される。

10

本出願の代理人は、この寄託時の物質の培養物が、適当な条件下で培養された場合に、死ぬか、あるいは失われるか、あるいは破壊されたならば、この物質を、通知時において迅速に、別の同物質で置き換えることに同意した。この寄託物質の利用可能性は、いずれかの政府の、その特許法にしたがう権限下に認められた権利に違反して、本発明を実施するためのライセンスとして考えられるべきではない。

20

【0229】

上に記載の明細書は、当業者による本発明の実施を可能にするのに十分であると考えられる。寄託された態様は、本発明のある側面の1つの例示として意図されるものであるため、本発明は、寄託された構築物によってその範囲が限定されるべきではなく、機能的に等価なすべての構築物が本発明の範囲内である。本明細書中の物質の寄託は、本明細書中に含まれる記載が、その最良の様式を含む本発明の任意の側面の実施を可能にするのに不十分であることを認めるためのものではなく、また、請求の範囲を、それが代表するような特定の例示に限定するものとして考えられるべきでもない。実際、本明細書中に示され、記載されるものに加えて、当業者には、本発明の種々の修飾が上の記載から明らかであり、このような修飾は添付の請求の範囲に含まれるものである。

30

【0230】

1. 図2のアミノ酸残基1~345(配列番号2)を含む血管内皮細胞増殖因子-E (VEGF-E)ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。
2. 図1のヌクレオチド259~1293の配列(配列番号1)またはその相補鎖を含む、請求項1に記載の核酸。
3. ストリンジェンシーな条件下で、請求項1に記載のヌクレオチド配列とハイブリダイゼーションするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。
4. 請求項1に記載の核酸を含むベクター。
5. 請求項1に記載の核酸を含む宿主細胞。
6. チャイニーズハムスター卵巣細胞、昆虫細胞、大腸菌細胞または酵母細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。
7. パキユロウイルス感染昆虫細胞である、請求項6に記載の宿主細胞。
8. 請求項5に記載の宿主細胞をVEGF-Eポリペプチドの発現に適当な条件下で培養し、細胞培養物からVEGF-Eポリペプチドを回収することを含む、血管内皮細胞増殖因子-E (VEGF-E)ポリペプチドの製造方法。
9. 請求項8に記載の方法によって製造されたポリペプチド。
10. 図2のアミノ酸残基1~345(配列番号2)を含むVEGF-Eポリペプチド。
11. (a) 図2のアミノ酸残基1~345(配列番号2)を含むポリペプチドおよび(b) 生物学的に活性な(a)のポリペプチド断片からなる群から選択されるVEGF-Eポリペプチド。

40

50

12. ATCC 寄託番号第 209653 号のヌクレオチド配列挿入物によってコードされる VEGF-E ポリペプチド。
13. 異種アミノ酸配列と融合された請求項 10 に記載のポリペプチドを含むキメラポリペプチド。
14. 異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列または免疫グロブリンの Fc 領域である、請求項 13 に記載のキメラポリペプチド。
15. 担体とともに請求項 10 に記載のポリペプチドを含む組成物。
16. 担体が製薬的に許容される担体であり、治療有効量の該ポリペプチドを含む、請求項 15 に記載の組成物。
17. (a) 請求項 15 に記載の組成物；
(b) 該組成物を含む容器；および、
(c) 心臓血管障害または内皮障害の処置における VEGF-E ポリペプチドの使用に言及する、該容器に貼られたラベルまたは医薬品に含まれるパッケージ内の印刷物を含む医薬品。
18. 哺乳類の心臓血管障害または内皮障害の処置方法であって、請求項 15 に記載の組成物の有効量を該哺乳類に投与することを含む方法。
19. 障害が心臓肥大、外傷または骨関連障害である、請求項 18 に記載の方法。
20. 心臓肥大が高レベルの PGF₂ の存在を特徴とする、請求項 19 に記載の方法。
21. 心臓肥大が心筋梗塞によって誘導されたものである、請求項 19 に記載の方法。
22. 心筋梗塞後、48 時間以内に VEGF-E ポリペプチドの投与を開始する、請求項 21 に記載の方法。
23. (a) 宿主由来のサンプルから VEGF-E をコードする核酸配列を単離し；
(b) VEGF-E をコードする核酸配列中の突然変異を測定することを含む、血管内皮細胞増殖因子-E (VEGF-E) をコードする核酸配列の突然変異に関係する疾患または疾患に対する罹患しやすさの診断方法。
24. (a) 哺乳類から得られた組織細胞の試験サンプル中、および (b) 同細胞タイプの既知の正常組織細胞のコントロールサンプル中の、血管内皮細胞増殖因子-E (VEGF-E) ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出し、試験サンプル中の発現レベルがコントロールより高いか、あるいは低ければ、該試験組織細胞の供給元の哺乳類が心臓血管機能不全または内皮機能不全を有していることが示されることを含む、哺乳類の心臓血管障害および内皮障害の診断方法。
25. 血管内皮細胞増殖因子-E (VEGF-E) ポリペプチドに対するアゴニストの同定方法であって、
(a) 該ポリペプチドが細胞の増殖を刺激可能な条件下で細胞と候補化合物を接触させ；
(b) この化合物によって細胞の増殖が阻害された程度を測定することを含む方法。
26. 請求項 25 の方法によって同定された VEGF-E ポリペプチドに対するアゴニスト。
27. 血管内皮細胞増殖因子-E (VEGF-E) ポリペプチドの発現または活性を阻害する化合物の同定方法であって、
(a) 化合物が該ポリペプチドと相互作用するのに十分な条件および時間で、候補化合物を該ポリペプチドと接触させ；
(b) この化合物が該ポリペプチドと相互作用する程度を測定することを含む方法。
28. 請求項 27 に記載の方法によって同定された化合物。
29. 血管内皮細胞増殖因子-E (VEGF-E) ポリペプチドと結合する、単離された抗体。
30. モノクローナル抗体である、請求項 29 に記載の抗体。
31. VEGF-E ポリペプチドを含有する可能性がある細胞を、請求項 29 に記載の抗体に暴露し、この細胞と抗体の結合を測定することを含む、血管内皮細胞増殖因子-E (VEGF-E) ポリペプチドの存在を測定する方法。
32. (a) 請求項 29 に記載の抗体を哺乳類から得られた組織細胞の試験サンプルと接

触させ、(b)試験サンプル中の抗VEGF-E抗体とVEGF-Eポリペプチド間の複合体形成を検出することを含む、哺乳類の心臓血管障害、内皮障害または血管新生障害の診断方法。

33. 容器；

容器のラベル；および、

容器内に含まれる、請求項29に記載の抗体を含む組成物を含む製品（容器のラベルは、治療的または診断的方法における該抗体の使用に関する説明を示す）。

【図1】

GAGCGGTGGGCGGACCGCTGGGCTGCTCAGTCCAGGTTTGGCTTTGATCCCTTTTCAAA
AACTGGAGACACAGAAAGGGCTCTAG3AAAAGTTTGGATGGGATTTAGTGGAACTA
CCCTGCGATTCTCTGCTGCCAGAGCAGGCTCGGGCTTCCACCCAGTGCAGCTTCCCC
TGGCGTGTGAAAGAGACTCGGGAGTCGCTGCTCCAAAGTCCCGCGCTGAGTGAGCT
CTCACCCAGTCAGCCAA

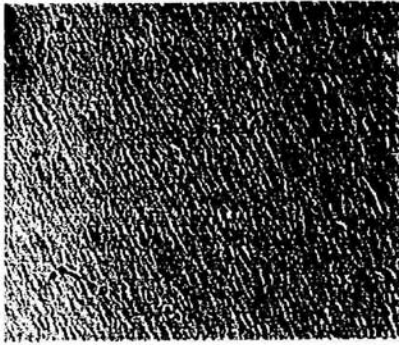
(ATGAGCCCTTCGGGCTTCTCCTGCTGACATCTGCCCTGGGCGCCAGAGACAGGGGACT
CAGGCGGAATCCAACTGAGTAGTAATCCAGTTTCCAGCAACAAGGAACAGAAOOGA
GTACAGATCCTCAGCATGAGAGAAATTAATCTGTTCTACTAATGGAAGTATTCAACAGC
CCAAAGGTTTCTCTACTATTATCCAAAGAAATACGGTCTTGGTATGGAGATTAGTAGCAGTA
CAGGAAATGATGAGTACAACTTACGTTTGAATGAAAGATTGGGCTTGAAGACCCAGAA
GATGACATTTGCAAGTATGATTTTGTAGAAAGTTGAGGAACCCAGTATGGAACATATTA
GGGCGTGGTGGTCTGTTACTTACAGGAAACAGATTTCTAAAGAAATCAAAAT
AAGATTAAGATTGTTATCTGATGAAATTTTTCCTGTAACAGGGTTCGCACTCCACTAC
AACATTTGCAATGCCAATTTACAGAGAGCTGTTGCTCTTATGATCCTTGGAAAGCTTATTT
TGCCACTGGACCTGCTTAATTAATGCTTAACTGCTTGAAGATCTATATAGGCCAATCTGG
CGATATCTTGAACCCAGAGAGATGGCAGTTGGACTTGAAGATCTATATAGGCCAATCTGG
CAACTCTTGGACAGGCTTTTGTGTTTTGGAAGAAATCCAGAGTGGTGGATCTGAACCTT
CTAACAGAGGAGTAAAGATTATACAGCTGCAACCTCGTAACCTTCTCAGTGTCCATAAGG
GAAGAACTAAAGAGAACCGATACCAATTTCTGGCCAGGTTGCTCTCTGTTAAAGCGTGT
GGTGGAACTGTGCTGTTGTTGCTTCCCAATTTGCAATGAAATGTTCAATGTTGCCAAGCAA
GTTACTAAAAAATCAACAGGTTCTCAGTTGAGAACCAAGACCGGTTGTCAGGGGATTTG
CAGAAATCACTACCGAGTGGCCCTGGAGCACCATGAGGAGTGTGACTGTGTTGTCAGA
GGAGGACAGGAGGTTAGCCGATCAACACCCAGCAGCTCTGGCCAGAGCTGTGCAATGTC
AGTGGCTGATCTATTTAGGAACGTATGCGTATCTCCATCCTTAATCTCAGTTGTTTGC
TTCCAGGACCTTTCATCTTCCAGGATTTACAGTGCATTTCTGAAAGAGGAGACATCAAAAG
AATTAGGAGTTTGGCAACAGCTCTTTGAGAGGAGGCTTAAAGGACAGGAGAAAGGCT
TCAATGTTGGAAAGAAAATTAATGTTGATTAATAGATCACCGCTAGTTTTCAGGTT
ACCATGTACGTATTTCCACTAGCTGGGTTCTGTTATTTTCAGTTCTTTCGATACGGCTTAGG
TAATGTACGTACAGGAAAGAAACTGTGCAAGTGAACCACTGATTTCCGTTGCTTCTTAA
CTCTAAAGCTCCATGCTTGGCCCTAAAAATCGTATAAAATCTGGATTTTTTTTTTTTT
TTGCTCATATTTACATATGTAACCAAGAACTTCTATGTACTACAAACCTGGTTTTTAAA
AAGGAACTATGTTGCTATGAATTAACCTTGTGCTATGATGAGACAGACTGGATTTTTT
CATATTTCTTATTAATAATTTCTGCCATTTAGAGAAAGAGAACTACATTTCAATGTTTGGAA
GAGATAACCTGAAAGAAAGAGTGGCCCTTCTTCTCACTTTATCGATAAGTCAAGTTTATTT
GTTTCATTTGTTACATTTTATATCTCTCTTTTGGACATTTATAACCTGTTGGCTTTTCTAAT
CTTTGTTAATATATCTTTTAAACCAAGGATTTAATATTTCTTTTATGACAACTTAG
ATCAACTATTTTGTCTGTTGTTAATTTTCTAACAACAATTTGTTATAGCCAGAGGACAA
AGATGATATAAAATATTTGTTGCTCTGACAAAATACATGTTTCTTCTCTGATGTTGTC
TAGAGTTAGATTAATCTGCATTTAAAAAATGAAATGGAAATGAAATTTGAGATGAAAT
AAGACTTTTGAATAATTAATTAATATCATATCTTCCATTCCTGTTATTGGAGATGAAAT
AAAAAGCACTTATGAAAGTACATCTCAGTCCAGCCATTAATACTTCTCTTTT
GGGAAATCTGAGCCTAGCTCAGAAAACATAAAGCACTTGAAGAAAGACTTGGCAGCTT
CCTGATAAAGCGTCTGTGCTGTGCAATGAGAACACATCTCTTATTTATGATGTTGTTGG
TTTTATATCTTAAACTCTGTTCCATACACTTTGATAAAACATGATTTTATGATC
AGAGATATGTTCTTAAACAGTCTACTTATTTGACTCTTGGCAATTTAAAAGAAATCAGT
AAAAATTTTGTCTGTAAAATGCTTAAATNGTCCCTAGGTTATGTTGGTACTATTTGAA
TCAAAATGATTTGATCAATAAAGAAATTTGGCTATTTTGGGAGAAAATTAATA
AAAAAATTAATAAAGGTTTGGGATTAACAGGTTAATGCGGCGC 配列番号:1

【図2】

MSLFGLLLLSALAGQRQGTQAESNLSSKQFQFSSNKEQNGVQDPQHERIITVSTNGSIHS
PRFPHTYPRNTVLVWRLVAVENWVQLTDFDERFGLDEPDDICKYDFVEVEEPSDGTLL
GRWCGSGTVPKQISKGNQIRIRFVSDYFPSEPGFCIHYNIIVMPQFTEAVSPLPPSA
LPLDLLNNAITAFSTLEDLIRYLEPERWQLDLEDLYRPTWQLLKGAFVFRKSRVLDNL
LITEEVRLYSCTPRNFVSVIRELKRDTTIFWPQCLLVKRCGGNACCLHNCNECCQCVPSK
VTKKYHEVLQLRPKTVRGLHKSLLDVALEHHEEDCCVCRGSTGG 配列番号:2

【 図 3 A 】

増殖因子なし



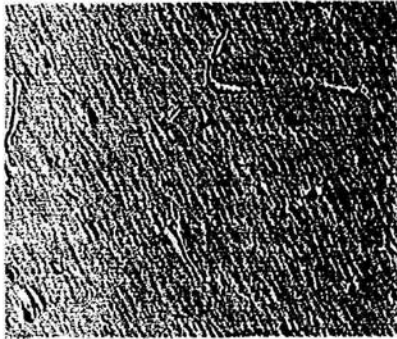
A

vegf/bfgf/pma



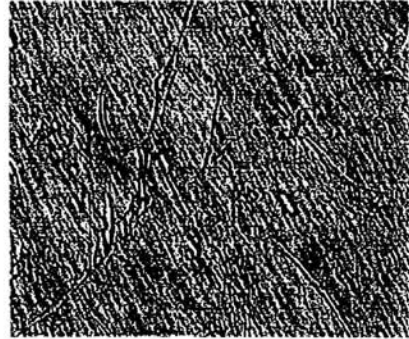
B

vegf/bfgf



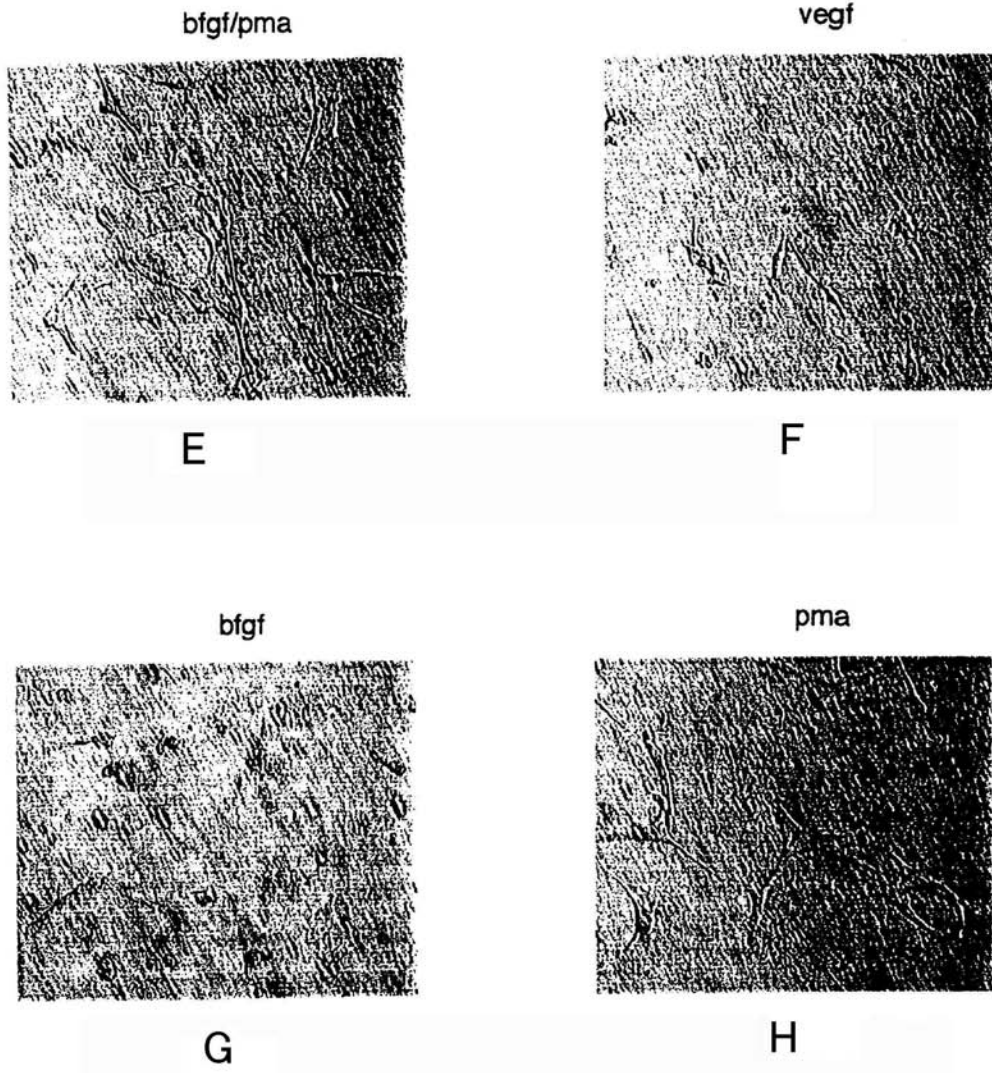
C

vegf/pma

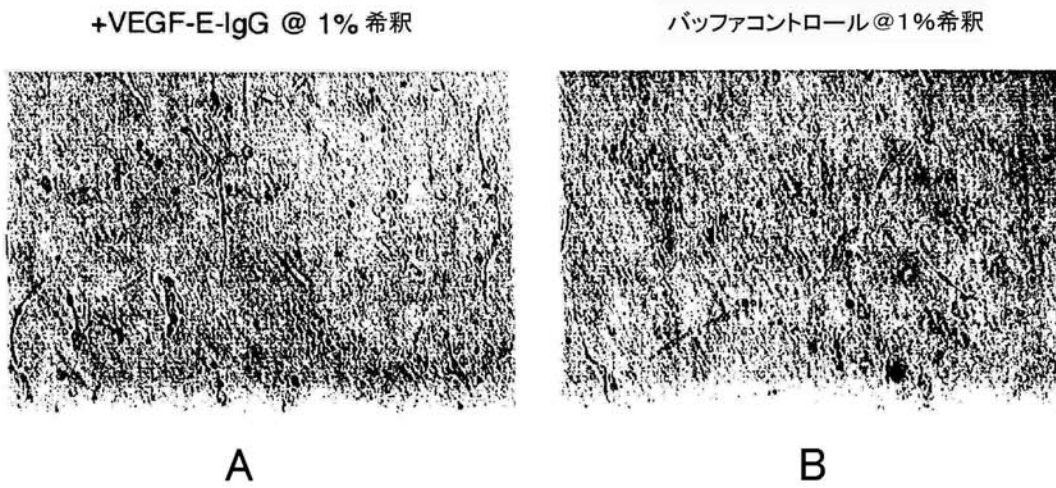


D

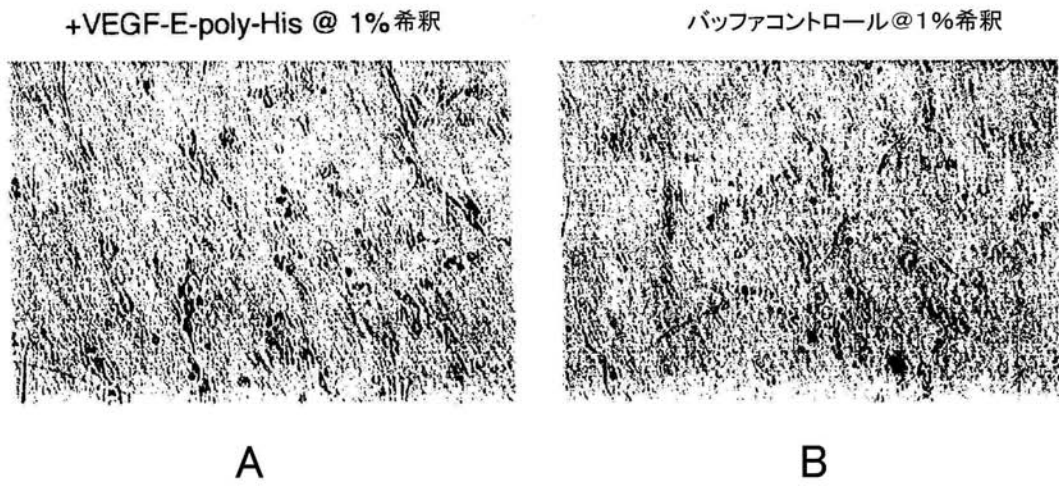
【 図 3 B 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

2010001292000001 .app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 ソフィア・エス・クオ
アメリカ合衆国 9 4 1 3 1 カリフォルニア州サンフランシスコ, サリー・ストリート 5 9 番, ア
パートメント 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA43 CA03 CA04 CA09 DA02 EA04 GA11 HA12
4C084 AA20 AA24 MA02 NA14 ZB262 ZC752
4C085 AA13 AA14 BB07 CC03

【外国語明細書】

2010001292000001.pdf

2010001292000002.pdf

2010001292000003.pdf

2010001292000004.pdf