

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4493854号
(P4493854)

(45) 発行日 平成22年6月30日(2010.6.30)

(24) 登録日 平成22年4月16日(2010.4.16)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 14/52 (2006.01)	C O 7 K 14/52
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
請求項の数 23 (全 40 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2000-589696 (P2000-589696)	(73) 特許権者	597160510
(86) (22) 出願日	平成11年12月23日(1999.12.23)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ
(65) 公表番号	特表2003-506008 (P2003-506008A)		・インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成15年2月18日(2003.2.18)		REGENERON PHARMACEU
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/030900		TICALS, INC.
(87) 国際公開番号	W02000/037642		アメリカ合衆国10591-6707ニュ
(87) 国際公開日	平成12年6月29日(2000.6.29)		ーヨーク州タリータウン、オールド・ソー
審査請求日	平成18年11月24日(2006.11.24)		・ミル・リバー・ロード777番
(31) 優先権主張番号	60/113,387	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成10年12月23日(1998.12.23)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ディビス, サミュエル
			アメリカ合衆国 ニューヨーク 1002
			4, ニューヨーク, ナンバービー2,
			ダブリュー. 88ティーエイチ スト
			リート 332
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リガンドの生物学的活性を増強する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

融合ポリペプチドをコードする核酸であって、該融合ポリペプチドは、アンギオポイエチン-1のフィブリノーゲンドメインの少なくとも1つのコピーを含む第1のサブユニットを含み、該第1のサブユニットは、多量体化成分のN末端に融合しており、該多量体化成分は、I g GのFcドメインあるいはI g Gの重鎖からなり、そのC末端で第2のサブユニットに融合しており、該第2のサブユニットは、第1のサブユニットと同様のアンギオポイエチン-1のフィブリノーゲンドメインの少なくとも1つのコピーを含む、核酸。

【請求項 2】

融合ポリペプチドをコードする核酸であって、該融合ポリペプチドは、アンギオポイエチン-2のフィブリノーゲンドメインの少なくとも1つのコピーを含む第1のサブユニットを含み、該第1のサブユニットは、多量体化成分のN末端に融合しており、該多量体化成分は、I g GのFcドメインあるいはI g Gの重鎖からなり、そのC末端で第2のサブユニットに融合しており、該第2のサブユニットは、第1のサブユニットと同様のアンギオポイエチン-2のフィブリノーゲンドメインの少なくとも1つのコピーを含む、核酸。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の核酸分子によりコードされる、融合ポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の融合ポリペプチドの多量体。

【請求項 5】

10

20

前記多量体が、二量体である、請求項4に記載の多量体。

【請求項6】

請求項1 または2に記載の核酸分子をふくむ、ベクター。

【請求項7】

請求項1 または2に記載の核酸分子を、発現制御配列に作動可能に連結して含む、発現ベクター。

【請求項8】

適切な宿主細胞中に、請求項7に記載の発現ベクターを含む、融合ポリペプチドの産生のための宿主ベクター系。

【請求項9】

前記適切な宿主細胞が、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞のいずれかである、請求項8に記載の宿主ベクター系。

【請求項10】

前記適切な宿主細胞が、E. coli, COS細胞またはCHO細胞のいずれかである、請求項9に記載の宿主ベクター系。

【請求項11】

融合ポリペプチドを産生するための方法であって、該方法は、融合ポリペプチドの産生を可能にする条件下で、請求項8～10のいずれかに記載の宿主ベクター系の細胞を増殖させる工程、およびそのように産生したポリペプチドを回収する工程、を包含する、方法。

【請求項12】

融合ポリペプチドをコードする核酸であって、該融合ポリペプチドは、アンギオポイエチン-1のフィブリノーゲンドメインの1つより多いコピーを一行に含み、そしてN末端フィブリノーゲンドメインまたはC末端フィブリノーゲンドメインのいずれかがまた、多量体化成分に融合されており、該多量体化成分が、IgGのFcドメインあるいはIgGの重鎖からなっている、核酸。

【請求項13】

融合ポリペプチドをコードする核酸であって、該融合ポリペプチドは、アンギオポイエチン-2のフィブリノーゲンドメインの1つより多いコピーを一行に含み、そしてN末端フィブリノーゲンドメインまたはC末端フィブリノーゲンドメインのいずれかがまた、多量体化成分に融合されており、該多量体化成分が、IgGのFcドメインあるいはIgGの重鎖からなっている、核酸。

【請求項14】

前記フィブリノーゲンドメインが、連続的に融合されている、請求項12 または13に記載の核酸。

【請求項15】

請求項12～14のいずれかに記載の核酸分子によりコードされる、融合ポリペプチド。

【請求項16】

請求項15に記載の融合ポリペプチドの多量体。

【請求項17】

前記多量体が二量体である、請求項16に記載の多量体。

【請求項18】

請求項12～14のいずれかに記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項19】

請求項12～14のいずれかに記載の核酸分子を、発現制御配列に作動可能に連結して含む、発現ベクター。

【請求項20】

適切な宿主細胞中に、請求項19に記載の発現ベクターを含む、融合ポリペプチドの産生のための宿主ベクター系。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

前記適切な宿主細胞が、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞のいずれかである、請求項 2 0 に記載の宿主ベクター系。

【請求項 2 2】

前記適切な宿主細胞が、E. coli, COS細胞またはCHO細胞のいずれかである、請求項 2 1 に記載の宿主ベクター系。

【請求項 2 3】

融合ポリペプチドを産生するための方法であって、該方法は、融合ポリペプチドの産生を可能にする条件下で、請求項 2 0 ～ 2 2 のいずれかに記載の宿主ベクター系の細胞を増殖させる工程、およびそのように産生したポリペプチドを回収する工程、を包含する、方法。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、1998年12月23日出願の米国特許番号60/113,387号の優先権を主張する。本出願を通じて、種々の刊行物が引用されている。それらの刊行物のそれぞれおよび全ての開示は、その全体が本出願中に参考として援用されている。

【0002】

(序論)

本発明は、ポリペプチドリガンドのネイティブ形態と比べた場合、生物学的活性が増強している新規な融合ポリペプチドリガンドを産生するための新規な方法を提供する。本発明はまた、生物学的に活性な融合ポリペプチドリガンドを産生するために有用な核酸、および融合ポリペプチドリガンド自体を提供する。

20

【0003】

(発明の背景)

ポリペプチドリガンドが細胞に結合して、それにより細胞増殖、細胞生存、または細胞分化のような表現型応答を誘発する能力は、しばしば、膜貫通チロシンキナーゼを通じて媒介される。各レセプターチロシンキナーゼ(RTK)の細胞外部分は、それがタンパク質にそのリガンド認識特徴を提供するということで、一般的に分子の最も特有の部分である。細胞外ドメインへのリガンドの結合は、細胞内チロシンキナーゼ触媒ドメイン(細胞内標的タンパク質に対して生物学的シグナルを伝達する)を介してシグナル伝達を生じる。この細胞質の触媒性ドメインの配列モチーフの特定のアレイは、潜在的なキナーゼ基質へのそのアクセスを決定する(Mohammadiら、1990、Mol. Cell. Biol., 11:5068~5078; Fantlら、1992、Cell、69:413~413)。

30

【0004】

RTKは、リガンド結合後に、二量体化またはいくつかの関連するコンフォメーション変化を受けるらしい(Schlessinger、J. 1988、Trend Biochem. Sci. 13:443~447; UllrichおよびSchlessinger、1990、Cell、61:203~212; SchlessingerおよびUllrich、1992、Neuron 9:383~391); 二量体化している細胞質ドメイン間の分子相互作用はキナーゼ機能の活性化を導く。いくつかの場合(例えば、増殖因子である血小板由来増殖因子(PDGF))は、リガンドは、2つのレセプター分子に結合する二量体である(Hartら、1988、Science、240:1529~1531; Heldin、1989、J. Biol. Chem. 264:8905~8912)が、例えば、EGFの場合は、リガンドは、単量体である(Weberら、1984、J. Biol. Chem. 259:14631~14636)。

40

【0005】

生物学産業の歴史を通して、多くの新規な遺伝子および関連するタンパク質が、公知の遺伝子とのそれらの配列相同性によって同定されてきた。多くのこのようなタンパク質がレセプターであると主張されているが、それらの同系のリガンドは同定されていないので

50

、それらは、オーファンレセプターと呼ばれている。これらの多くのオーファンレセプターのスクリーニングは、しばしば、レセプターに結合し得るリガンドの同定を導くが、この結合は、しばしば、どのような細胞内キナーゼの活性化または他の表現型変化にも関連しない。これは、Ephレセプターファミリーのメンバーの場合である。明確化のため、本出願人は、Eph Nomenclature Committee, 1997 (Cell, 第90巻: 403~403 (1997)) に発表) として引用された文書を本明細書において参考として組み込む。これは、EphレセプターおよびEphリガンドファミリーのための命名法を示している。

【0006】

1998年5月5日発行米国特許第5,747,033号に示されるような発見の前には、Ephファミリーレセプターに対するリガンドの結合に応答する生物学的活性は、存在するとしても、ほとんど観察されていなかった。その特許は、「クラスター化 (clustering)」の概念を記載する。これにより、リガンドの可溶性ドメインは、同系のレセプターを活性化し得る多量体を作製するために組み合わせられた。本出願者は、いまや、Ephファミリー以外のさらなるリガンド (例えば、アンギオポイエチンとして公知のTie-2レセプターリガンド) に対してクラスター化の概念を伸展させており、そしてまたクラスター化されたリガンドの同種形態の産生のためのこの方法が、ネイティブ形態のリガンドに比較して、リガンドの親和性を改善するためおよび/またはリガンドの活性を増大するために広範に適用され得ることを発見した。

【0007】

アンギオポイエチン-1 (Ang) は、Tie-2レセプターについての公知のリガンドの2つのうちの1つであり、そしてTie-2についてのアゴニストであることが示されている (Davisら、1996、Cell 87: 1161~1169) が、第二の公知のリガンドであるアンギオポイエチン-2は、Tie-2レセプターの天然に存在するアンタゴニストであることが示されている (Maisonpierreら、1997、Science 277: 55~60)。Ang1*は、アンギオポイエチン-1の変異型であり、これはコイル化したコイルドメインに融合したアンギオポイエチン-2のN末端ドメインおよびアンギオポイエチン-1のフィブリノーゲンドメインを含み、かつこれはアミノ酸245でCysからSerへの変異を有する。Ang1*は、Tie-2レセプターの強力なアゴニストであることが示されている。

【0008】

アンギオポイエチン-1およびアンギオポイエチン-2の変異体を用いる実験は、フィブリノーゲンドメイン (FD) がレセプター結合ドメインであること、およびその二量体化バージョン (例えば、Ang-1-FD-Fc (すなわち、Fcドメインに融合したAng-1のフィブリノーゲンドメイン)) が単量体型Ang-1-FDよりもかなり高い親和性でTie-2レセプターに結合し得る (二量体化は、隣接する分子のFc成分の間の相互作用に起因して生じる) ことを実証した。しかし、Ang-1-FD-Fcは、それがヤギ抗ヒトFc抗体 (Jackson ImmunoResearch) とさらにクラスター化されない限り、内皮細胞上のTie-2レセプターのリン酸化 (活性化) を誘導し得ない。この理由により、本質的により高度にクラスター化された、Ang-1-FDおよびAng-2-FDの変異体バージョン (すなわち、Ang-2のフィブリノーゲンドメイン) が設計された。

【0009】

(発明の要旨)

本発明は、細胞上のレセプターに結合する、新規な、生物学的に活性な、可溶性形態のポリペプチドリガンドを提供する。このようなポリペプチドリガンドは、レセプター保有細胞の示差的機能を促進する、および/または表現型 (例えば、成長および/または増殖) に影響するにおいて有用である。本発明はまた、このようなポリペプチドリガンドをコードする核酸、ならびにこのようなポリペプチドリガンドを産生するための原核生物発現系および真核生物発現系の両方を提供する。本明細書において記載される可溶性形態のポリ

10

20

30

40

50

ペプチドリガンドは、本発明に従って、レセプター発現細胞中の生物学的応答を促進するために用いられ得る。詳細には、融合ポリペプチドリガンド（次いで、クラスター化され得る）を産生する一般的方法が本明細書に記載されている。この方法は、そうでなければ不活性である可溶性ポリペプチドリガンドを生物学的に活性にするように機能するか、またはこのようなクラスター化のない、生物学的活性のレベルが低いポリペプチドリガンドの生物学的活性を増強する。この方法を用いて、ネイティブ形態のリガンドと比較して、クラスターした場合に改善された親和性および／または増加した活性（すなわち、シグナル伝達能力）を有する、任意のリガンド由来の複数（1つより多い）のレセプター結合ドメインを、クラスター化し得る。

（発明の詳細な説明）

10

以下により詳細に説明するように、出願人は、ポリペプチドリガンドを「クラスター化」するための方法を発見した。この方法は、そうでなければ、不活性の可溶性ポリペプチドリガンドを、生物学的に活性化するように機能するか、またはそのようなクラスター化がなければ、より低いレベルの生物学的活性を有するポリペプチドリガンドの生物学的活性を増強する。この方法を用いて、そのリガンドのネイティブ形態と比較して、クラスター化したときに改善された親和性および／または増加した活性（すなわち、シグナル伝達能力）を有する任意のリガンドから複数の（1つより多い）レセプター結合ドメインをクラスター化し得る。

【0010】

本発明は、融合ポリペプチドをコードする核酸を提供する。ここで、この融合ポリペプチドは、第一のサブユニットを包含する。この第一のサブユニットは、多量体化成分のN末端の末端に対して融合されており、この多量体化成分は、そのC末端で、あるリガンドのレセプター結合ドメインの少なくとも1つのコピーを含む第二のサブユニットに対して融合されている。

20

【0011】

本発明の1つの実施形態において、第一のサブユニットおよび第二のサブユニットのレセプター結合ドメインは、同じリガンドのレセプター結合ドメインのコピーである。この第一のサブユニットおよび第二のサブユニットは、各々が、そのリガンドのレセプター結合ドメインの1つまたは1を超えるコピーを有し得る。本発明の特定の実施形態において、そのレセプター結合ドメインは、アンギオポイエチン-1またはアンギオポイエチン-2のフィブリノーゲンドメインである。あるいは、そのレセプター結合ドメインは、リガンドのEPHファミリー（すなわち、エフリン（e p h r i n））からなる群より選択されるリガンド由来である。

30

【0012】

本発明の別の実施形態において、この第一のサブユニットのレセプター結合ドメインは、その第二のサブユニットのレセプター結合ドメイン由来の異なるリガンドのレセプター結合ドメインのコピーである。例えば、その第一のサブユニットは、アンギオポイエチンのレセプター結合ドメインを含み得、そしてその第二のサブユニットは、血管内皮増殖因子（VEGF）のレセプター結合ドメインを含み得る。あるいは、その第一のサブユニットは、VEGFのレセプター結合ドメインを含み得、そしてその第二のサブユニットは、レセプター結合ドメインおよび（a n）アンギオポイエチンを含み得る。さらになお、その第一のサブユニットおよびその第二のサブユニットは、各々、そのそれぞれのリガンドのレセプター結合ドメインの1つまたは1つを超えるそのレセプターのコピーを有し得る。

40

【0013】

「レセプター結合ドメイン」によって、そのレセプターに結合するために必要なリガンドの最小部分を意味する。

【0014】

本発明の好ましい実施形態において、その多量体化成分は、免疫グロブリン由来のドメインを含む。より詳細には、その免疫グロブリン由来のドメインは、IgGのFcドメイン、IgGの重鎖およびIgGの軽鎖からなる群より選択され得る。別の実施形態において

50

、その多量体化成分は、Fcドメインであり得、ここから、最初の5つのアミノ酸（システインを含む）が除去されて、Fc（ΔC1）と呼ばれる多量体化成分を生成する。

【0015】

本発明はまた、本発明の核酸分子によってコードされる融合ポリペプチドを提供する。好ましくは、この融合ポリペプチドは、多量体化成分の機能に起因して、多量体形態である。好ましい実施形態において、その多量体は二量体である。適切な多量体化成分は、Zymo Genetics, Inc. の欧州特許出願である出願番号EP 0 721 983 A1（1996年7月17日公開）に記載され、そして*S. cerevisiae* 抑制性酸ホスファターゼ（Mizunagaら、1988、*J. Biochem. (Tokyo)* 103:321-326）；*S. cerevisiae* 1型キラープレプロ毒素（Sturleyら、1986、*EMBO J.* 5:3381-3390）；*S. calshbergensis* αガラクトシダーゼメリビアーゼ（melibiase）（Sumner-Smithら、1985、*Gene* 36:333-340）；ならびに*Neurospora crassa* オリニチンデカルボキシラーゼ（Digangiら、1987、*J. Biol. Chem.* 262:7889-7893）を包含する。以下をコードする配列：免疫グロブリン重鎖ヒンジ領域（Takahashiら、1982、*Cell* 29:671-679）；*S. cerevisiae* SUC2遺伝子（Carlsonら、1983、*Mol. Cell. Biol.* 3:439-447）；免疫グロブリン遺伝子配列およびその一部。本発明の好ましい実施形態において、免疫グロブリン遺伝子配列（特に、Fcドメインをコードするもの）を使用して、多量体化成分をコードさせる。

10

20

【0016】

本発明はまた、本明細書に記載される本発明の核酸分子を含むベクターを意図する。

【0017】

また、本明細書に記載される本発明の核酸分子を含む発現ベクターが提供され、ここで、その核酸分子は、発現制御配列に作動可能に連結されている。その融合ポリペプチドの発現のために適切な、宿主細胞へ導入された本発明の発現ベクターを含む融合ポリペプチドの産生のための宿主ベクター系もまた、提供される。適切な宿主細胞は、*E. coli* のような細菌細胞、*Pichia pastoris* のような酵母細胞、*Spodoptera frugiperda* のような昆虫細胞、またはCOS細胞もしくはCHO細胞のような哺乳動物細胞であり得る。

30

【0018】

本発明はまた、本発明の融合ポリペプチドを産生する方法を提供する。この方法は、本明細書に記載される宿主ベクター系の細胞を、その融合ポリペプチドの産生を可能にする条件下で増殖させること、およびそのように産生された融合ポリペプチドを回収することによる。

【0019】

本発明を実施するために有用な融合ポリペプチドは、原核生物または真核生物の発現系中での発現によって調製され得る。

【0020】

多数の方法を利用して、組換え遺伝子は、発現され得、そしてそのポリペプチドが精製され得る。その遺伝子は、例えば、（これは、限定の目的ではない）pCP110のような細菌発現ベクター中にサブクローニングされ得る。

40

【0021】

その融合ポリペプチドは、安定な生物学的に活性なタンパク質の、続いての形成を可能にする任意の技術によって精製され得る。例えば（これは、限定の目的ではない）、その因子は、可溶性タンパク質としてまたは封入体としてのいずれかで細胞から回収され得、その封入体から、その因子は、8M塩酸グアニジニウムおよび透析によって定量的に抽出され得る。その因子をさらに精製するために、従来のイオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーまたはゲル濾過が使用され得る

50

。

【0022】

本発明はまた、その融合ポリペプチドが縦列に、リガンドのレセプター結合ドメインの1を超えるコピーを含む融合ポリペプチドをコードする核酸を提供する。ここで、そのN末端またはC末端のいずれかのレセプター結合ドメインはまた、多量体化成分に融合されている。本発明の1つの実施形態において、そのレセプター結合ドメインは、連続的に融合されている。本発明の別の実施形態において、そのレセプター結合ドメインは、リガンドのEPHファミリーのメンバーではないリガンド（すなわち、エフリンではない）由来である。本発明の特定の実施形態において、そのレセプター結合ドメインは、アンギオポイエチン-1またはアンギオポイエチン-2のフィブリノーゲンドメインドメインである。代替の実施形態において、そのレセプター結合ドメインは、血管内皮増殖因子（VEGF）由来である。別の実施形態において、そのレセプター結合ドメインは、エフリン由来である。

10

【0023】

「レセプター結合ドメイン」とは、そのレセプターに結合するために必要なリガンドの最小部分を意味する。

【0024】

本発明の好ましい実施形態において、多量体化成分は、免疫グロブリン由来のドメインを含む。より詳細には、その免疫グロブリン由来のドメインは、以下からなる群より選択され得る：IgGのFcドメイン、IgGの重鎖、およびIgGの軽鎖。別の実施形態において、その多量体化成分は、Fcドメインであり得、そこからは、最初の5つのアミノ酸（システインを含む）が除去されて、Fc(ΔC1)と呼ばれる多量体化成分が生成する。

20

【0025】

本発明はまた、本発明の核酸分子によってコードされる融合ポリペプチドを提供する。好ましくは、その融合ポリペプチドは、その多量体化成分の機能に起因して、多量体化形態で存在する。好ましい実施形態において、その多量体は、二量体である。適切な多量体化成分は、ZymoGenetics, Inc. の欧州特許出願である出願番号EP 0721 983 A1（1996年7月17日公開）に記載され、そしてS. cerevisiae抑制性酸ホスファターゼ（Mizunagaら、1988、J. Biochem. (Tokyo) 103:321-326）；S. cerevisiae1型キラープレプロ毒素（Sturleyら、1986、EMBO J. 5:3381-3390）；S. caltsbergensisαガラクトシダーゼメリビアーゼ（melibiase）（Sumner-Smithら、1985、Gene 36:333-340）；ならびにNeurospora crassaオリニチンデカルボキシラーゼ（Digangi, ら、1987、J. Biol. Chem. 262:7889-7893）を包含する。以下をコードする配列：免疫グロブリン重鎖ヒンジ領域（Takahashiら、1982、Cell 29:671-679）；S. cerevisiae SUC2遺伝子（Carlsonら、1983、Mol. Cell. Biol. 3:439-447）；免疫グロブリン遺伝子配列およびその一部。本発明の好ましい実施形態において、免疫グロブリン遺伝子配列（特に、Fcドメインをコードするもの）を使用して、多量体化成分をコードさせる。

30

40

【0026】

本発明はまた、本明細書に記載される本発明の核酸分子を含むベクターを意図する。

【0027】

また、本明細書に記載される本発明の核酸分子を含む発現ベクターが提供され、ここで、その核酸分子は、発現制御配列に作動可能に連結される。その融合ポリペプチドの発現のために適切な、宿主細胞へ導入された本発明の発現ベクターを含む融合ポリペプチドの産生のための宿主ベクター系もまた、提供される。適切な宿主細胞は、E. coliのような細菌細胞、Pichia pastorisのような酵母細胞、Spodoptera

50

f r u g i p e r d aのような昆虫細胞、またはC O S細胞もしくはC H O細胞のような哺乳動物細胞であり得る。

【0028】

本発明はまた、本発明の融合ポリペプチドを産生する方法を提供する。この方法は、本明細書に記載される宿主ベクター系の細胞を、その融合ポリペプチドの産生を可能にする条件下で増殖させること、およびそのように産生された融合ポリペプチドを回収することによる。

【0029】

本発明を実施するために有用な融合ポリペプチドは、原核生物または真核生物の発現系中での発現によって調製され得る。多数の方法を利用して、その組換え遺伝子は、発現され得、そしてそのポリペプチドが精製され得る。その遺伝子は、例えば、（これは、限定の目的ではない）p C P 1 1 0のような細菌発現ベクター中にサブクローニングされ得る。

【0030】

その融合ポリペプチドは、安定な生物学的に活性なタンパク質の、続いての形成を可能にする任意の技術によって精製され得る。例えば（これは、限定の目的ではない）、その因子は、可溶性タンパク質としてまたは封入体としてのいずれかで細胞から回収され得、その封入体から、その因子は、8 M塩酸グアニジニウムおよび透析によって定量的に抽出され得る。その因子をさらに精製するために、従来のイオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーまたはゲル濾過が使用され得る。

【0031】

実施例は、E p h（E p h膜貫通型チロシンキナーゼファミリーリガンド）のリガンドファミリーのメンバー、またはT i e - 2レセプターを結合し得るリガンドのアンギオエチンファミリーのメンバーのレセプター結合ドメインを含む新規ポリペプチドリガンドの調製を記載する。

【0032】

新規E p hファミリーリガンドの説明のために、それらを作製および使用方法ならびにE H K - 1 L、B 6 1およびE L K - Lの配列に加えて、それらをクラスター化することによるE P Hファミリーリガンドの生物学的活性を増強する方法の説明について、出願人は、以下を参照する米国特許第5, 7 4 7, 0 3 3号（1998年5月5日発行）（これは、その全体が本明細書において参考として援用される）。出願人は、さらにも参照する：国際出願P C T / U S 9 3 / 1 0 8 7 9（W O 9 4 / 1 1 0 2 0として1994年5月26日に公開）；および国際出願P C T / U S 9 6 / 1 7 2 0 1（W O 9 7 / 1 5 6 6 7として、発明の名称「B i o l o g i c a l l y A c t i v e E P H F a m i l y L i g a n d s」として公開）（これら各々は、その全体が、本明細書において参考として援用される）。

【0033】

以前に報告されたように、T I E - 2レセプターについてのリガンドのファミリーが発見され、そしてアンギオポイエチン（a n g i o p o i e t i n）と名づけられた。このファミリーは、T I E - 2リガンド1（A n g - 1）；T I E - 2リガンド2（A n g - 2）；T I Eリガンド3（A n g - 3）；およびT I Eリガンド4（A n g - 4）からなり、これらは、広汎に特徴付けられている。アンギオポイエチンのクローニング、配列決定および特徴づけの説明、ならびにそれらを作製および使用方法（その改変されたりガンドおよびキメラリガンドの産生および特徴付けを含む）については、以下の刊行物を本明細書において参照する（それら各々は、その全体が本明細書において参考として援用される）：米国特許第5, 5 2 1, 0 7 3号（1996年5月28日発行）；米国特許第5, 6 4 3, 7 5 5号（1997年7月1日発行）；米国特許第5, 6 5 0, 4 9 0号（1997年7月22日発行）；米国特許第5, 8 1 4, 4 6 4号（1998年9月29日発行）；米国特許第5, 8 7 9, 6 7 2号（1999年3月9日発行）；米国特許第5, 8 5 1, 7 9 7号（1998年12月22日発行）；P C T国際出願、発明の名称「T I E

「- 2 Ligands Methods of Making and Uses Thereof」(WO 96/11269として、1996年4月18日に発行、出願人は Regeneron Pharmaceuticals, Inc) ; PCT国際出願、発明の名称「TIE-2 Ligands Methods of Making and Uses Thereof」(WO 96/31598として1996年10月10日に発行、出願人は Regeneron Pharmaceuticals, Inc.) ; PCT国際出願、発明の名称「TIE-2 Receptor Ligands (TIE Ligand-3 ; TIE Ligand-4) And Their Uses」、(WO 97/48804として、1997年12月24日に発行、出願人は Regeneron Pharmaceuticals, Inc) ; ならびに PCT国際出願、発明の名称「Modified TIE-2 Receptor Ligands」、(WO 98/05779として、1998年2月12日に発行、出願人は、Regeneron Pharmaceuticals, Inc) 。

10

【0034】

本明細書において使用される場合、融合ポリペプチドは、アミノ酸残基がその配列内における残基について置換されており、サイレントまたは保存的な変化を生じる機能的に等価な分子を包含する。例えば、その配列内の1つ以上のアミノ酸残基は、機能的等価物として機能する類似の極性の別のアミノ酸に置き換えられ得、サイレントまたは保存的な変更を生じる。その配列内のアミノ酸の置換は、そのアミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択され得る。例えば、その非極性（疎水性）アミノ酸は、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンを含む。極性中性アミノ酸は、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンを含む。正に荷電した（塩基性）アミノ酸は、アルギニン、リジンおよびヒスチジンを含む。負に荷電した（酸性）アミノ酸は、アスパラギン酸、およびグルタミン酸を含む。本発明の範囲内に含まれるのはまた、同じまたは類似の生物学的な活性を示すタンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体、および例えばグリコシル化、タンパク質溶解分解、抗体分子または他の細胞リガンドへの連結など、翻訳の間または後に示差的に改変された誘導体である。

20

【0035】

本発明の融合ポリペプチドを発現する細胞は、遺伝子操作されて、例えば、トランスフェクション、形質誘導、エレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションによってそれらを産生する。

30

【0036】

本発明は、本発明の融合ポリペプチドをコードする核酸配列、および本発明の核酸配列に相補的な核酸配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする配列を包含する。ストリンジント条件は、例えば、以下に示されている：Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版第1巻、101-104頁、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)。さらに、本発明は、本発明の核酸配列とは異なるが、それにもかかわらず、遺伝コードの縮重に起因して本発明に融合ポリペプチドをコードする核酸配列を包含する。

40

【0037】

さらに、本発明は、タグ化された形態での、本明細書に記載される融合ポリペプチドの使用を意図する。

【0038】

DNAフラグメントのベクターへの挿入のための当業者に公知の方法のいずれかを用いて、適切な転写／翻訳制御シグナルおよびタンパク質コード配列を用いて、本発明の融合ポリペプチドをコードする発現ベクターを構築し得る。これらの方法は、インビトロの組換えDNAおよび合成技術、ならびにインビボの組換え（遺伝子組換え）を包含し得る。本発明の融合ポリペプチドをコードする核酸配列の発現は、第二の核酸配列によって調節さ

50

れ得、その結果、その融合ポリペプチドは、その組換えDNA分子で形質転換された宿主において発現される。例えば、本発明に記載される融合ポリペプチドの発現は、当該分野で公知の任意のプロモーター／エンハンサーエレメントによって制御され得る。その融合ポリペプチドの発現を制御するのに使用され得るプロモーターとしては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：Squintora、(1991、Cell 65:1-20)に記載されるような長末端反復；SV40初期プロモーター領域(BernoistおよびChambon、1981、Nature 290:304-310)、CMVプロモーター、ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復に含まれるM-MuLV 5'末端反復プロモーター(Yamamoto、ら、1980、Cell 22:787-797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagnerら、1981、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78:144-1445)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinsterら、1982、Nature 296:39-42)；原核生物発現ベクター(例えば、b-ラクタマーゼプロモーター(Villa-Kammaroff、ら、1978、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75:3727-3731)、またはtacプロモーター(DeBoer、ら、1983、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:21-25)、(以下もまた参照のこと：「Useful proteins from recombinant bacteria」、Scientific American、1980、242:74-94)；酵母または他の真菌由来のプロモーターエレメント(例えば、Gal 4プロモーター、ADH(アルコールデヒドロゲナーゼ)プロモーター、PGK(ホスホグリセロールキナーゼ)プロモーター、アルカリホスファターゼプロモーター、ならびに以下の動物転写制御領域(これは、組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている)：エラスターゼI遺伝子制御領域(これは、膵臓腺房細胞において活性である)(Swiftら、1984、Cell 38:639-646；Ornitzら、1986、Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409；MacDonald、1987、Hepatology 7:425-515)；インスリン遺伝子制御領域(これは、膵臓β細胞において活性である)(Hanahan、1985、Nature 315:115-122)、免疫グロブリン遺伝子制御領域(これは、リンパ細胞において活性である)(Grosschedlら、1984、Cell 38:647-658；Adamesら、1985、Nature 318:533-538；Alexanderら、1987、Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444)、マウス乳腺腫瘍ウイルス制御領域(これは、精巢、乳房、リンパ球およびマスト細胞において活性である)(Lederら、1986、Cell 45:485-495)、アルブミン遺伝子制御領域(これは、肝臓において活性である)(Pinkertら、1987、Genes and Devel. 1:268-276)、α-フェトプロテイン遺伝子制御領域(これは、肝臓で活性である)(Krumlaufら、1985、Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648；Hammerら、1987、Science 235:53-58)；α1-アンチトリプシン遺伝子制御領域(これは、肝臓において活性である)(Kelseyら、1987、Genes and Devel. 1:161-171)、βグロビン遺伝子制御領域(これは、骨髄細胞において活性である)(Mogramら、1985、Nature 315:338-340；Kolliasら、1986、Cell 46:89-94)；ミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域(これは、脳の稀突起神経膠細胞において活性である)(Readheadら、1987、Cell 48:703-712)；ミオシン軽鎖2遺伝子制御領域(これは、骨格筋において活性である)(Shani、1985、Nature 314:283-286)、ならびに性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域(これは、視床下部において活性である)(Masonら、1986、Science 234:1372-1378)。

【0039】

従って、本発明に従って、本明細書中に記載されるようなEph融合ペプチドをコードす

る核酸、またはアンギオポイエチン融合ペプチドをコードする核酸を含む、細菌宿主または真核生物宿主において複製し得る発現ベクターを用いて、宿主をトランスフェクトし、それにより、次いで生物学的に活性な形態において回収され得る融合タンパク質を産生する、このような核酸の発現を指向する。本明細書中に記載される場合、生物学的に活性な形態は、関連のレセプターに結合し得る形態、および分化機能を生じ得る形態および／またはレセプターを発現する細胞の表現型に影響を与え得る形態を含む。このような生物学的に活性な形態は、例えば、E h k - 1、E l k、またはT i e 2レセプターのチロシンキナーゼドメインのリン酸化、あるいは細胞性DNAの合成の刺激を含む。

【0040】

核酸挿入物を含む発現ベクターは、以下の3つの一般的アプローチによって同定され得る：(a) DNA-DNAハイブリダイゼーション、(b) 「マーカー」遺伝子機能の存在または非存在、および(c) 挿入された配列の発現。第一のアプローチにおいて、発現ベクターに挿入された外因性核酸の存在は、挿入核酸配列に相同な配列を含むプローブを用いる、DNA-DNAハイブリダイゼーションによって検出され得る。第二のアプローチにおいて、組換えベクター／宿主系は、ベクター内の外因性核酸配列の挿入によって生じる特定の「マーカー」遺伝子機能（例えば、チミジンキナーゼ活性、抗生物質に対する耐性、形質転換表現型、バキュロウイルスにおける封入体（occlusion body）形成など）の存在または非存在に基づいて同定および選択され得る。例えば、e f l 核酸配列がベクターのマーカー遺伝子内に挿入される場合、挿入物を含む組換え体は、マーカー遺伝子機能の非存在によって同定され得る。第三のアプローチにおいて、組換え体発現ベクターは、組換え体によって発現される外因性核酸産物をアッセイすることによって同定され得る。このようなアッセイは、例えば、検出可能な抗体もしくはその一部を用いて、タグ化され得るレセプターもしくはその一部に対するリガンドの結合、または目的のタンパク質もしくはその一部に対して産生された抗体への結合によるように、例えば、目的の核酸産物の物質的特性または機能的特性に基づき得る。

【0041】

本発明の細胞は、本明細書中に記載されるようなエフリンまたはアンギオポエチン融合ポリペプチドを、一過性に、または好ましくは、安定的かつ永久的に発現し得る。

【0042】

本発明のエフリン融合ポリペプチドは、神経学的疾患に罹患した患者の処置の方法に有用であり得る。この方法は、エフリン融合ポリペプチドの有効量を用いて、その患者を処置する工程を包含する。

【0043】

例えば、E l kレセプターは、主に脳に発現される。したがって、E l k結合エフリン融合ポリペプチドリガンドは、このレセプターを発現する神経細胞の増殖および／または生存のような、差示的な機能および／または表現型の影響の誘導を支持する。

【0044】

本発明はまた、適切な薬理的なキャリア中にエフリン融合ポリペプチドを含む薬学的組成物を提供する。この組成物は、全身性または局所的に投与され得る。当業者において公知の投与の任意の適切な様式が用いられ得、以下を含むが、これらに限定されない：静脈内、髄膜下、動脈内、鼻腔内、経口、皮下、腹腔内、または局所注射もしくは外科的移植。持続的放出处方物もまた提供される。

【0045】

神経変性疾患／神経外傷の本発明者の理解が明らかになるにつれて、内因性E f l - 6の効果が減少することが有益であることは、明白になり得る。従って、神経系の外傷の領域において、E l kレセプターとの相互作用について、細胞結合リガンドと競合し得るE f l - 6の融合ポリペプチド形態を含むが、これに限定されないE f l - 6アンタゴニストを提供することは所望され得る。全身性よりも傷害部位に局所的にこのようなアンタゴニストを提供することが所望され得る。移植を提供するE l f - 6アンタゴニストの使用が、所望され得る。

【0046】

あるいは、特定の条件が、E1f-6感応性における増加から恩恵を受け得る。従って、このような条件に罹患した患者におけるE1f-6結合親和性の数値が増加することが有益であり得る。

【0047】

本明細書中で、本発明はさらに、TIE-2レセプターを発現する細胞、組織または器官を含む障害に罹患した患者の処置のための治療剤として、融合ポリペプチドの開発を提供する。このような分子は、ヒトまたは動物の身体の処置の方法、あるいは、診断の方法に使用され得る。

【0048】

TIE-2レセプターが内皮細胞に関して同定され、最近示されたように、TIE-2リガンド1 (Ang-1) のようなレセプターのアゴニストのブロックは、血管新生を防ぐことが示されたので、本発明のTIE-2アゴニスト融合ポリペプチドが、このような血管新生が示される障害または疾患における血管新生の誘導に有用であり得ることを、出願人は予測する。このような疾患または障害は、創傷治癒、虚血、および糖尿病を含み得る。リガンドは、動物モデルにおいて試験され得、そして他の薬剤（例えば、血管内皮増殖因子 (VEGF)、血管由来の別の内皮細胞特異的因子）について記載されるように治療的に使用され得る。Ferraraら、1994年7月26日に発行された米国特許第5,332,671号。Ferraraの参考文献、ならびに他の研究は、虚血心筋への血流の増加、創傷治癒の増加、および新血管形成が所望される他の治療的条件における、血管由来因子の効果を示すために用いられ得るインビトロおよびインビボの研究を記載する。(Sudoら、1993年7月7日に公開された欧州特許出願第0550296A2; Banaiら、Circulation 89:2183-2189 (1994); Ungerら、Am. J. Physiol. 266:H1588-H1595 (1994); Lazarousら、Circulation 91:145-153 (1995)を参照すること)。本発明に従って、アゴニスト融合ポリペプチドは、単独、または1以上のさらなる薬学的に活性な化合物（例えば、VEGFまたは塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) のような）との組み合わせにおいて用いられ得る。

【0049】

逆に、TIE-2レセプターのアнтаゴニスト（例えば、1996年10月10日に公開された国際特許出願WO96/31598の実施例9に記載されるようなTIE-2レセプター体またはTIE-2リガンド2 (Ang-2)）はまた、血管新生を防止または減少することを示し、従って、例えば、腫瘍増殖の防止または減少に有用であることが期待される。次いで同様に、本発明のTIE-2アンタゴニスト融合ポリペプチドはまた、これらの目的に有用であり得る。これらのアンタゴニストは、単独または他の組成物（例えば、抗VEGF抗体）との組み合わせにおいて用い得、治療的意図が血管新生をブロックすることである状態の処置に有用であるべきである。

【0050】

例えば、出願人は、TIE-2リガンドが細胞において腫瘍内または腫瘍に近接して発現されることを決定した。例えば、TIE-2リガンド2 (Ang-2) は、腫瘍内皮細胞に非常に会合するようである。従って、本発明のTIE-2アンタゴニスト融合ポリペプチドはまた、例えば、腫瘍増殖の防止または減少に有用であり得る。

【0051】

他の実施形態において、本明細書中に記載される本発明のTIE-2アゴニスト融合ポリペプチドは、造血因子として用いられ得る。種々の造血因子およびそのレセプターは、血液に含まれる種々の細胞型の増殖および／または分化および／または移動に関与する。TIE-2レセプターは、初期造血細胞に発現されることから、TIE-2リガンドは発現され、これらの細胞の増殖または分化または移動において匹敵する役割を演じることが期待される。従って、例えば、TIE-2アゴニスト融合ポリペプチド組成物が、調製され得、アッセイされ得、インビトロおよびインビボでの生物学的系において試験され得、そ

10

20

30

40

50

して以下の任意において記載されるように治療的に使用され得る：Sousa、米国特許第4,810,643号、Leeら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4360-4364(1985)、Wongら、Science、228:810-814(1985)；Yokotaら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:1070(1984)；Bosselmanら、「Stem Cell Factor」という発明の名称の1991年3月2日に公開されたWO9105795；Kirknessら、「Haemopoietic Maturation Factor」という発明の名称の1995年7月27日に公開されたWO95/19985。従って、この融合ポリペプチドを使用して、正常血管新生が抑制される状態（貧血、血小板減少症、白血球減少症および顆粒球減少症を含むが、これらに限定されない）を診断または処置し得る。好ましい実施形態において、この融合ポリペプチドを使用して、患者が、正常血球レベルの減少を生じる後天性免疫不全症候群（AIDS）のような疾患を有するような状態において、骨髄移植と関連するような、造血集団の増加が所望されるような臨床の設定において、または、照射、化学処理または化学療法によって生じた形成不全または骨髄抑制の処置における血液細胞前駆体の分化を刺激し得る。

10

【0052】

本発明の融合ポリペプチドは、単独、または別の薬学的に活性な薬剤（例えば、サイトカイン、神経栄養因子、インターロイキンなど）との組み合わせにおいて用いられ得る。好ましい実施形態において、融合ペプチドは、幹細胞または他の造血前駆体増殖を誘導することが公知の変数の因子、または造血経路において造血前駆体細胞に作用因子（造血成熟因子、トロンボポイエチン、幹細胞因子、エリスロポイエチン、G-CSF、GM-CSFなどを含むが、これらに限定されない）とともに用いられ得る。

20

【0053】

代替の実施形態において、TIE-2レセプターアンタゴニスト融合ポリペプチドを用いて、（例えば、血小板血症、赤血球増加症および白血病のような骨髄増殖性障害または血液形成器官の他の増殖性障害の処置のために）所望の結果が造血経路の阻害であるような患者を診断または処置するために使用される。このような実施形態において、処置は、本明細書中に記載されるような治療的な有効量の融合ポリペプチドの使用を含み得る。

【0054】

これらまたは他の疾患または障害の処置に対して有用な有効量は、当業者に公知の方法を用いて決定され得る（例えば、Finglerら、The Pharmacological Basis of Therapeutics、GoodmanおよびGilman編、Macmillan Publishing Co., New York、1-46頁（1975）を参照のこと）。本発明に従って用いるための薬学的組成物は、キャリアまたは標的分子（例えば、抗体、ホルモン、増殖因子など）に連結され、および／またはインビボでの投与前にリポソーム、マイクロカプセル、および制御された放出調製物内に組み込まれた上記の融合ポリペプチドを、薬理学的に受容可能な液体、固体または半固体のキャリア中に含む。例えば、この薬学的組成物は、水溶液中（例えば、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液またはデキストロース溶液）に融合ポリペプチドを含み得る。あるいは、活性薬剤は、このような処置の必要な患者へ移植され得る固体（例えば、ろう）または半固体（例えば、ゼラチン性）処方物の投与物中に含まれ得る。投与経路は、当該分野において公知の任意の様式の投与であり得、以下を含むが、これらに限定されない：静脈内、髄膜下、皮下、関連組織内への注射によって、動脈内、鼻腔内、または移植装置を介して。

30

40

【0055】

投与は、身体全体かまたは局所領域において、本発明の活性薬剤の分配を生じ得る。例えば、神経系から離れた領域を含むいくつかの状態において、薬剤の静脈内投与または髄膜内投与が所望され得る。いくつかの状態において、活性薬剤を含む移植物は、障害の領域に、または障害の領域のそばに置かれ得る。適切な移植物は、ゲル発泡体、ろう、または微粒子ベース移植物を含むが、これらに限定されない。

50

【0056】

本発明はまた、薬理学的に受容可能なビヒクル中に、本明細書中に記載の融合ポリペプチドを含む薬学的組成物を提供する。組成物は、全身にまたは局所的に投与され得る。当該分野における投与の任意の適切な様式が用いられ、以下を含むが、これらに限定されない：静脈内、髄膜内、動脈内、美腔内、経口、皮下、腹腔内、または局所注射もしくは外科的移植による。持続的放出処方物もまた、提供され得る。

【0057】

本発明は、本発明の特定の実施形態によって範囲を限定されない。さらに、本明細書中に記載されるものに加えて、本発明の種々の改変は、前述の記載および添付の図から当業者に明らかとなる。このような改変は、添付する特許請求の範囲の範囲内であることが意図される。

10

【0058】

(実施例)

(アンギオポイエチンリガンド)

前述に記載されるように、Ang-1およびAng-2の変異体を用いる実験は、フィブリノーゲンドメイン(FD)がレセプター結合ドメインであること、および二量体化バージョン(二量体化は、隣接する分子のFc成分の間の相互作用に起因して生じる)(例えば、Ang-1-FD-Fc)が、単量体Ang-1-FDよりも高い親和性でTie-2レセプターと結合し得ることを実証した。しかし、Ang-FD-Fcは、ヤギ抗ヒトFc抗体(Jackson ImmunoResearch)を用いてさらにクラスター化しない場合、内皮細胞上のTie-2レセプターのリン酸化(活性化)を誘導し得ない。この理由のために、Ang-1-FDおよびAng-2-FDの変異体バージョンを、元来より高くクラスター化するように設計した。

20

【0059】

2つの一般的な型の核酸分子を構築した。Ang-1-FDの2つの直列のコピーからなる第一の型を、Fcタグに融合し、その結果、Fcタグに関して二量体であるが、Ang-1-FDに関して四量体である分泌ポリペプチド分子を導いた。同様に、Fcタグに融合されたAng-2-FDの2つの直列のコピーは、この型の構築物のアンギオポイエチン2を構成した。これらの分子は、それぞれAng-1-FD-FD-FcおよびAng-2-FD-FD-Fcであると称した。

30

【0060】

第二の型の構築された核酸分子において、2つのコピーのAng-1-FDを、これらの間を架橋するFcタグによって連結した。従って、Fcに関してまだ二量体であり、ならびにAng-1-FDに関して四量体である構造物Ang-1-FD-Fc-FDを作製した。アンギオポイエチン2もまた構築し、そしてこれらの2つの分子を、それぞれAng-1-FD-Fc-FDおよびAng-2-FD-Fc-FDと称した。

【0061】

いずれかの型の構築物について、類似の特性が観察された：内皮細胞においてTie-2を活性化しない二量体化Ang-1-FD-Fcに似ず、Ang-1-FD-FD-FcおよびAng-1-FD-Fc-FDの両方は、ネイティブなリガンドの能力に匹敵する能力を有して、内皮細胞において容易にTie-2を活性化し得る。また、ネイティブなアンギオポイエチン2に類似して、Ang-2-FD-Fc-FDは、ネイティブなアンギオポイエチン2に匹敵する能力を有し、そしてAng-2-FD-Fcダイマーのわずかなアンタゴニスト活性よりもはるかに高い能力を有して、アンギオポイエチン1活性をアンタゴナイズし得る。

40

【0062】

(変異体アンギオポイエチン核酸分子の構築)

以下の核酸分子の全てを、標準組換えDNA技術(例えば、Molecular Cloning、A Laboratory Manual (Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Har

50

bor, NY)、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY))により構築し、ABI 373A DNA配列決定機およびTaq Dideoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)を用いる標準技術により配列確認し、そしてタンパク質翻訳を促進する5'端にコザック配列(Kozak, M., 1987、Nucleic Acids Res. 15: 8125-8148)を有する哺乳動物発現ベクターpMT21 (Genetics Institute Inc.)にサブクローニングした。下に記載される、ブリッジする配列を導入し、都合のよい制限部位を提供し、そしてドメインの間の接合部に可撓性を与えたが、(これらのいくつかの構築物におけるリンカーの長さを変動させると、産生されるタンパク質の量におけるいくつかの変動を導いたが)これらのブリッジする配列に非常に重要な特徴があるという徴候はない。

10

【0063】

(実施例1: Ang-1-FD-FD-Fc、Ang-2-FD-FD-Fc、Ang-1-FD-Fc-FDおよびAng-2-FD-Fc-FD核酸分子の構築)

(Ang-1-FD-FD-Fc)

Ang-1-FD-FD-Fcは、そのアミノ末端において、分泌を許容するトリプシンシグナル配列(図1Aの塩基1~45)、引き続くアンギオポイエチン1フィブリノゲンドメイン(FD)(図1A~図1Bの塩基46~690)、アミノ酸Gly-Pro-Ala-Pro(図1Bの塩基691~702)からなる短いブリッジ配列、第二のアンギオポイエチン1 FD(図1B~図1Dの塩基703~1750)、アミノ酸Gly-Pro-Gly(図1Dの塩基1351~1359)からなる別のブリッジ配列、およびヒトIgG1のFc部分のコード配列(図1D~図1Eの塩基1360~2058)からなる。

20

【0064】

(Ang-2-FD-FD-Fc)

Ang-2-FD-FD-Fc核酸分子を、同様に構築した。これは、トリプシンシグナル配列(図2Aの塩基1~45)、アンギオポイエチン2 FD(図2A~図2Bの塩基46~690)、ブリッジアミノ酸配列Gly-Gly-Pro-Ala-Pro(図2Bの塩基691~705)、第二のアンギオポイエチン2 FD(図2B~図2Dの塩基706~1353)、別のブリッジアミノ酸配列Gly-Pro-Gly(図2Dの塩基1354~1362)、およびヒトIgG1のFc部分のコード配列(図2D~図2Eの塩基1363~2061)からなる。

30

【0065】

(Ang-1-FD-Fc-FD)

Ang-1-FD-Fc-FDは、トリプシンシグナル配列(図3Aの塩基1~45)、アンギオポイエチン1 FD(図3A~図3Bの塩基46~690)、ブリッジアミノ酸配列Gly-Pro-Gly(図3Bの塩基691~699)、ヒトIgG1のFc部分のコード配列(図3B~図3Dの塩基700~1395)、別のブリッジアミノ酸配列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly(図3Dの塩基1396~1419)、および第二のアンギオポイエチン1 FD(図3D~図3Eの塩基1420~2067)からなる。

40

【0066】

(Ang-2-FD-Fc-FD)

Ang-2-FD-Fc-FD核酸分子は、トリプシンシグナル配列(図4Aの塩基1~45)、アンギオポイエチン2 FD(図4A~図4Bの塩基46~690)、ブリッジアミノ酸配列Gly-Gly-Pro-Gly(図4Bの塩基691~702)、ヒトIgG1のFc部分のコード配列(図4B~図4Dの塩基703~1398)、ブリッジアミノ酸配列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly(図4D

50

の塩基1399～1422)、および第二のアンギオポイエチン2 FD (図4D～図4Eの塩基1423～2067)からなる。

【0067】

(実施例2: Ang-1 FD-Fc-FDタンパク質の特徴付け)

(分子量分析): Ang-1-FD-Fc-FDタンパク質について予測される分子量を、MacVector Program (Kodak, Scientific Imaging Systems, New Haven, CT)を使用して決定した。単量体形態 (Fcに関して)は、76,349の予測分子量を有する。さらに、約2500MW/部位の、3つの予測されるN連結型グリコシル化部位が存在し、これらは潜在的に、単量体タンパク質の分子量を83,849まで増加させ得る。隣接する分子のFc成分間の相互作用に起因して、このタンパク質は実際に、167,698の予測される分子量(可能なN連結型グリコシル化を含む)を有する二量体として存在する。以下に記載される、COS細胞由来のタンパク質の続いてのSDS PAGE分析によって、これらのおおよその分子量を確認した。バンドは、非還元条件下で約210kDに流れ、そしてバンドは、還元条件下で約85kDに流れた(図5)。光散乱分析を実施して、この分子量をさらに確認し、そしてより重要なことに、タンパク質が均一な種であるか否かを決定した。光散乱は、分子の質量および濃度の関数である。分子量を決定するために、タンパク質サンプルをゲル濾過カラムに注入し、そして溶出物をオンライン光散乱検出器ならびに屈折率および/またはUV検出器を用いてモニタリングした。光散乱検出器は、MiniDawnレーザ光散乱検出器であり、Wyatt Technology Corporation (Santa Barbara, CA)から入手した。この装置は、定常光(static light)を3つの異なる角度で測定する。オンラインの屈折率検出器またはUV検出器は、タンパク質濃度を測定するよう働く。Astra 4.7 Software (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA)を使用して、 dn/dc (dn =屈折率の変化; dc =濃度)またはタンパク質の消衰係数のいずれかに基づいて、タンパク質濃度を算出した。次いで、タンパク質の分子量を、光散乱の角度依存から算出した。図6は、COS細胞由来のタンパク質を使用するこの分析の結果を示す。この二量体タンパク質の分子量は、約200kDであるようであり、そして単一のピークの存在は、このタンパク質溶液が、実際に均一であることを示す。

【0068】

(COS細胞中での発現レベル): 組換えAng-1-FD-Fc-FDタンパク質を含むCOS細胞上清を、COS細胞を上記のAng1-FD-Fc-FD DNA構築物で過渡的にトランスフェクトすることによって、生成した。全てのトランスフェクションを、当該分野において公知の標準的な技術を使用して実施した。このCOS細胞上清を、Biacore技術(Pharmacia, Inc.)を使用して分析し、この上清に存在するAng-1-FD-Fc-FDタンパク質の量を定量した。この分析の結果は、765のRU値であり、これは、0.9mgの組換えタンパク質/COS細胞上清のリットルに等価である。これらの値は、非常に高いレベルの発現を表す。

【0069】

(COS上清の精製): Ang-1-FD-Fc-FDタンパク質はFcドメインを含むので、精製は、標準的なプロテインAカラムクロマトグラフィー(Pharmacia, Inc.)を使用し、続いて標準的なサイズ排除クロマトグラフィー(Pharmacia, Inc.)を使用して、比較的簡単であり、そして容易である。実際に、Ang-1-FD-Fc-FDタンパク質の精製が比較的容易であることにより、このタンパク質が由来する親タンパク質(アンギオポイエチン-1)、ならびにAng1*と呼ばれるアンギオポイエチン-2の変異型(これは、コイルドコイルドメインに融合されたアンギオポイエチン-2のN末端およびアンギオポイエチン-1のフィブリノーゲンドメインからなり、そしてアミノ酸245においてCys→Ser変異を有する)に対して顕著な利点を与えられる。(1998年2月12日に、出願人Regeneron Pharmace

uticals、Inc. の、WO98/05779として公開された、発明の名称「Modified TIE-2 Receptor Ligands」のPCT国際出願（特に、図27）を参照のこと。これを、本明細書中に参考として援用する）。

【0070】

アンギオポイエチン-1およびAng1*の両方は、広範で、高価であり労力の激しい精製スキームを要求し、その結果、組換えタンパク質の収率が比較的乏しくなる。臨床的な使用を意図される生物学物質のための費用効果的な、簡単な精製スキームに対する必要性は、過度に強調され得ない。

【0071】

COS細胞上清を上述のように精製し、そして約1mgの精製されたAng-1-FD-Fc-FDタンパク質を得、これを以下に記載する研究に使用して、このタンパク質をさらに特徴付けた。

【0072】

（COS細胞由来のAng-1-FD-Fc-FDタンパク質のN末端配列決定）：精製したAng-1-FD-Fc-FDタンパク質を、標準的なN末端配列決定分析に供して、このタンパク質のいずれかの短縮型種が生成されつつあるか否かを決定した。変異体分子（Ang1*）が10～20%のN末端短縮型種を含む履歴を有することから、このことを考慮した。この分析は、1つのN末端配列（Arg-Asp-X-Ala-Aspであり、ここでXはCysである）のみを明らかにした。この配列はまた、図3Aのアミノ酸16～20において見出され得、そして図3Aのアミノ酸1～15に対応するこのタンパク質のシグナル配列の直後に続く。

【0073】

（COS細胞由来のAng-1-FD-Fc-FDのレセプター結合分析）：以前の研究は、アンギオポイエチン分子のフィブリノーゲンドメイン（FD）がリガンド／レセプター相互作用に必須であることを決定した。さらに、Tie-2レセプターに対する高い親和性の結合が生じるために、ネイティブなアンギオポイエチン-1、アンギオポイエチン-2、および変異体Ang1*が、少なくとも四量体の多量体、可能であればより高次の多量体を形成しなければならない。COS細胞由来のAng-1-FD-Fc-FDタンパク質（これは、FDドメインに関して四量体である）がTie-2に対して高い親和性で結合し得るか否かを決定するために、標準的なBiacore分析を実施した。簡単に言えば、Tie-2-Fcレセプター体タンパク質（これは、ヒトIgG1のFcドメインに融合するTie-2の表面ドメインを含む、融合タンパク質である）を、Biacoreチップに固定した。Ang-1-FD-Fc-FDを含有する溶液に、このチップを通過させ、そしてTie-2表面ドメインとAng-1-FD-Fc-FDとの間の結合を生じさせた。この結合工程に続いて、0.5M NaCl高塩（high salt）洗浄を行った。この高塩洗浄は、Ang-1-FD-Fc-FDタンパク質とTie-2レセプター表面ドメインとの間の相互作用を破壊し得なかった。このことは、変異体リガンドとレセプターとの間に強力な相互作用が存在することを示す。この結果は、Ang-1-FD-Fc-FDの両方の親分子であるアンギオポイエチン-1および変異体Ang1*分子の両方が、Tie-2-Fcレセプターと強力に相互作用することを示した、初期のBiacoreの結果、ならびにこの相互作用が高塩によって破壊されないことと一致する。対照的に、親アンギオポイエチン-1分子から誘導されるいくつかの変異体分子は、高塩で処理される場合、Tie-2-Fcレセプターから容易に解離する。この変異体異分子（Ang-1/FD（FDに関する単量体）、Ang-1/FD-Fc（同様にFDに関しては単量体であるが、Fcドメインの存在により二量体を形成し得る）、およびAng-1/C/FD（FDに関しては単量体であるが、アンギオポイエチン-1のコイルドコイルドメインをもまた含む）と称する）は、Tie-2レセプターに高親和性で結合するに十分には、多量体形態に存在しない。

【0074】

（実施例3：COS細胞由来のAng-2-FD-Fc-FDタンパク質の特徴付け）

(分子量分析) : 上にAng-1-FD-Fc-FDに関して記載したように、Ang-2-FD-Fc-FDタンパク質について予測される分子量を、MacVector Program (Kodak、Scientific Imaging Systems、New Haven、CT) を使用して決定した。Ang-2-FD-Fc-FDの単量体形態は、76,052の予測分子量を有し、単量体タンパク質の分子量を83,552まで潜在的に増加させ得る3つの予測されるN連結型グリコシル化部位を有した。Ang-1-FD-Fc-FDと同様に、このタンパク質は、167,104の予測される分子量(可能なN連結型グリコシル化を含む)を有する二量体として存在する。COS細胞由来のタンパク質のSDS-PAGE分析は、非還元条件下で約200kDに流れるバンド、および還元条件下で約88kDに流れるバンドによって、これらのおおよその分子量を確認した(図7)。光散乱分析は、この分子量(171kD)を確認し、そしてAng-2-FD-Fc-FDタンパク質が、Ang-1-FD-Fc-FDと同様に、均一な種として存在することを明らかにした(図8)。

10

【0075】

(COS細胞中での発現レベル) : 組換えAng-2-FD-Fc-FDタンパク質を含むCOS細胞上清を、COS細胞を上記のAng-2-FD-Fc-FD DNA構築物で過渡的にトランスフェクトすることによって、生成した。このCOS細胞上清を、Biacoreによって分析し、この上清に存在するAng-2-FD-Fc-FDタンパク質の量を定量した。この分析の結果は、606のRU値であり、これは、0.7mgの組換えタンパク質/COS細胞上清のリットルに等価である。これらの値は、比較的高いレベルの発現を表す。

20

【0076】

(COS上清の精製) : Ang-1-FD-Fc-FDと同様に、Ang-2-FD-Fc-FDタンパク質はFcドメインを含むので、精製は比較的簡単であり、そして標準的なプロテインAカラムクロマトグラフィーを使用し、続いて標準的なサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、容易である。COS細胞上清を、Ang-1-FD-Fc-FDに関して上述のように精製し、そして約2mgの精製したAng-2-FD-Fc-FDタンパク質を得、これを以下に記載する研究に使用して、このタンパク質をさらに特徴付けた。

【0077】

30

(N末端配列決定) : 精製したCOS細胞由来のAng-2-FD-Fc-FDタンパク質を、標準的なN末端配列決定分析に供して、このタンパク質のいずれかの短縮型種が生成したか否かを決定した。この分析は、1つのN末端配列(Arg-Asp-X-Ala-Gluであり、ここでXはCysである)のみを明らかにした。この配列はまた、図4Aのアミノ酸16~20において見出され得、そして図4Aのアミノ酸1~15に対応するこのタンパク質のシグナル配列の直後に続く。

【0078】

(COS細胞由来のタンパク質のレセプター結合分析) : COS細胞由来のAng-2-FD-Fc-FDタンパク質がTie-2レセプターに対して高い親和性で結合し得るかを決定するために、Ang-1-FD-Fc-FDに関して上述した標準的なBiacore分析を実施した。Ang-1-FD-Fc-FDと同様に、高塩洗浄は、Ang-2-FD-Fc-FDタンパク質とTie-2-Fcレセプターとの間の相互作用を破壊し得なかった。このことは、再度、変異体リガンドとレセプターとの間に強力な相互作用が存在することを示す。

40

【0079】

(実施例4 : EAh y 926細胞におけるTie-2レセプターリン酸化に対する、COS細胞由来のAng-1-FD-Fc-FDおよびAng-2-FD-Fc-FDの効果)

Ang-1-FD-Fc-FDはアゴニストアンジオポイエチン-1由来の変異体分子であり、そしてAng-2-FD-Fc-FDはアゴニストアンジオポイエチン-2由来の

50

変異体分子であるので、本発明者らは、これら2つの変異体分子が、これらが由来する親分子に関連する活性を維持するか否かを決定することを欲した。

【0080】

(アッセイ系)：以下に記載する全ての実験は、細胞株E A h y 9 2 6 (E d g e l l, C. J. ら (1983) P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 80:3734~3737) および標準的なリン酸化アッセイ、ならびに当業者に馴染み深い試薬を使用した。

【0081】

((A) E A h y 9 2 6 細胞における、A n g 1 * 媒介T i e - 2 レセプターリン酸化対 A n g - 1 - F D - F c - F D 媒介T i e - 2 レセプターリン酸化)：E a h y 9 2 6 細胞を、0.1 μ g/ml、0.2 μ g/ml、または0.8 μ g/ml の、A n g 1 * またはA n g - 1 - F D - F c - F D タンパク質のいずれかで、刺激した。標準的なリン酸化アッセイは、A n g - 1 - F D - F c - F D が、E A h y 9 2 6 細胞においてT i e - 2 レセプターのリン酸化を刺激するその能力がA n g 1 * と等価であることを明らかにした(図9)。

10

【0082】

((B) A n g - 2 - F D - F c - F D がE A h y 9 2 6 細胞においてA n g 1 * 媒介T i e - 2 レセプターリン酸化をブロックする能力)：E A h y 9 2 6 細胞を、0.4 μ g/ml のT i e - 2 アゴニストA n g 1 * および1 μ g/ml、2 μ g/ml、4 μ g/ml、6 μ g/ml、または8 μ g/ml のA n g - 2 - F D - F c - F D で処理した。図10に示すように、A n g - 2 - F D - F c - F D は、A n g 1 * の少なくとも10~15倍のモル濃度過剰で存在する場合に、T i e - 2 レセプターのA n g 1 * 刺激をブロックし得る。

20

【0083】

((C) アンジオポイエチン-2 がE A h y 9 2 6 細胞においてA n g 1 * 媒介T i e - 2 レセプターリン酸化をブロックする能力)：天然に存在するアンタゴニストアンジオポイエチン-2 のブロッキング効果を、A n g - 2 - F D - F c - F D のブロッキング効果と比較するために、A n g - 2 - F D - F c - F D の代わりにアンジオポイエチン-2 を用いて、上記(B)に記載の同じ実験を実施した。この実験の結果を図11に示す。20倍モル濃度過剰において、アンジオポイエチン-2 は、リン酸化レベルを50%まで減少させなかった。この結果は、上記(B)において記載した結果と組み合わせて、A n g - 2 - F D - F c - F D がアンジオポイエチン-2 より強力なA n g 1 * 媒介T i e - 2 レセプターリン酸化のインヒビターであることを示す。

30

【0084】

((D) A n g - 2 - F D - F c - F D がE A h y 9 2 6 細胞においてアンジオポイエチン-1 媒介T i e - 2 レセプターリン酸化をブロックする能力)：E A h y 9 2 6 細胞を、0.2 μ g/ml の天然に存在するT i e - 2 アゴニストアンジオポイエチン-1 および1 μ g/ml、2 μ g/ml、4 μ g/ml、6 μ g/ml、または8 μ g/ml のA n g - 2 - F D - F c - F D で処理した。この実験の結果を図12に示す。この結果は、これらの細胞内においてT i e - 2 レセプターのアンジオポイエチン-1 媒介リン酸化をブロックする傾向がある一方で、A n g - 2 - F D - F c - F D は、図10に示し、上記(B)に記載したような、T i e - 2 のA n g 1 * 媒介リン酸化をブロックする際に、より効果的であるらしいことを示す。

40

【0085】

((E) アンジオポイエチン-2 がE A h y 9 2 6 細胞においてアンジオポイエチン-1 媒介T i e - 2 レセプターリン酸化をブロックする能力)：E A h y 9 2 6 細胞を、0.2 μ g/ml のアンジオポイエチン-1 および1 μ g/ml、2 μ g/ml、4 μ g/ml、6 μ g/ml、または8 μ g/ml のアンジオポイエチン-2 で処理した。この実験の結果を図13に示す。この結果は、これらの細胞におけるT i e - 2 レセプターのアンジオポイエチン-1 媒介リン酸化をブロックする傾向があるが、A n g - 2 - F D - F c

50

ーFDと同様に、アンギオポイエチン-2は、図11に示し、上記(C)に記載したような、Tie-2のAng1*媒介リン酸化をブロックする際に、より効果的であるらしいことを示す。

【0086】

(実施例5：Ang-1-FD-Fc-FD CHO細胞発現ベクターpRG763/Ang-1-FD-Fc-FDの構築)

pRG763/Ang-1-FD-Fc-FD CHO細胞発現ベクターを、プラスミドpCDNA3.1/Ang-1-FD-Fc-FD (Ang-1-FD-Fc-FDを含む2115塩基対EcoRI-NotIフラグメント) から単離し、このフラグメントをEcoRIおよびNotIで消化したpRG763ベクターへと連結することによって、構築した。pRG763/Ang-1-FD-Fc-FDプラスミドを有するE. coli DH10B細胞の大規模(2L)培養物を、TB+アンピシリン中で一晚増殖させ、そしてプラスミドDNAを、Promega Wizard Plus Maxiprepキットを使用して、製造業者のプロトコルに従って抽出した。精製したプラスミドDNAの濃度を、UV分光光度計および蛍光計で決定した。このプラスミドDNAを、NcoIおよびHincII制限酵素を含むアリコートで消化することによって、立証した。全ての制限酵素消化フラグメントは、1%アガロースゲルにおいて予測したサイズに対応した。

10

【0087】

(実施例6：CHO細胞におけるAng-1-FD-Fc-FDの発現)

40個の15cmペトリ皿に、CHO-K1/E1A細胞を、 4×10^6 細胞/プレートの密度で接種した。プレート培地は、Gibco HamのF-12w/10%HyClone Fetal Bovine Serum (FBS) + ペニシリン/ストレプトマイシンであり、グルタミンを補充した。翌日に、各プレートを6μgのpRG763/Ang-1-FD-Fc-FDで、Gibco OptimemおよびGibco Lipofectamineを使用して、12mlの体積で、製造業者のプロトコルに従ってトランスフェクトした。このトランスフェクション混合物を細胞に添加した4時間後に、12ml/プレートのOptimem w/10%FBSを添加した。プレートを、5%CO₂インキュベーター内で一晚、37℃でインキュベートした。翌日に、この培地を各プレートから除去し、そして25mlの発現培地(Gibco CHO-S-SFM I w/グルタミン+1mM酪酸ナトリウム)を添加した。これらのプレートを、37℃で3日間インキュベートした。インキュベーションの3日後に、この培地を各プレートから吸引し、そしてスインギングバケットローター内で400rpmで遠心分離して、細胞をペレット化した。この上清を滅菌したの1Lビンにデカンテーションし、そして以下に記載のように精製した。

20

30

【0088】

(実施例7：Ang-2-FD-Fc-FD CHO細胞発現ベクターpRG763/Ang-2-FD-Fc-FDの構築)

プラスミドpRG763/Ang-2-FD-Fc-FDを、プラスミドpCDNA3.1/Ang-2-FD-Fc-FD (Ang-2-FD-Fc-FDを含む2097塩基対EcoRI-NotIフラグメント) から単離し、このフラグメントをEcoRIおよびNotIで消化したpRG763ベクターへと連結することによって、構築した。pRG763/Ang-2-FD-Fc-FDプラスミドを有するE. coli DH10B細胞の大規模(1L)培養物を、TB+アンピシリン中で一晚増殖させ、そしてプラスミドDNAを、Promega Wizard Plus Maxiprepキットを使用して、製造業者のプロトコルに従って抽出した。精製したプラスミドDNAの濃度を、UV分光光度計および蛍光計で決定した。このプラスミドDNAをまた、NcoIおよびPpu10I制限酵素を含むアリコートでこのプラスミドDNAを消化することによって、立証した。全ての制限酵素消化フラグメントは、1%アガロースゲルにおいて予測したサイズに対応した。

40

50

【0089】

(実施例8：CHO細胞におけるAng-2-FD-Fc-FDの発現)

40個の15cmペトリ皿に、CHO-K1/E1A細胞を、 4×10^6 細胞/プレートの密度で接種した。プレート培地は、Gibco HamのF-12w/10%HyClone Fetal Bovine Serum (FBS) + ペニシリン/ストレプトマイシンであり、グルタミンを補充した。翌日に、各プレートを6 μ gのpRG763/Ang-2-FD-Fc-FDで、Gibco OptimemおよびGibco Lipofectamineを使用して、12mlの体積で、製造業者のプロトコルに従ってトランスフェクトした。このトランスフェクション混合物を細胞に添加した4時間後に、12ml/プレートのOptimem w/10%FBSを添加した。プレートを、5%CO₂インキュベーター内で一晚、37°Cでインキュベートした。翌日に、この培地を各プレートから除去し、そして25mlの発現培地(Gibco CHO-S-SFM I I、グルタミン+1mM酪酸ナトリウムを有する)を添加した。これらのプレートを、37°Cで3日間インキュベートした。インキュベーションの3日後に、この培地を各プレートから吸引し、そしてスインギングバケットローター内で400rpmで遠心分離して、細胞をペレット化した。この上清を滅菌した1Lビンにデカンテーションし、そして以下に記載のように精製した。

10

【0090】

(実施例9：安定なCHOクローン由来のAng-1-FD-Fc-FDタンパク質の特徴付け)

20

(分子量分析)：安定なCHOクローン由来のAng-1-FD-Fc-FDタンパク質について予測される分子量を、MacVector Program (Kodak、Scientific Imaging Systems、New Haven、CT)を使用して決定した。単量体形態(Fcに関して)は、76,349の予測分子量を有した。さらに、約2500MW/部位の、3つの予測されるN連結型グリコシル化部位が存在し、これらは潜在的に、この単量体タンパク質の分子量を83,849まで増加させ得る。隣接する分子のFc成分間の相互作用に起因して、このタンパク質は実際に、167,698の予測される分子量(可能なN連結型グリコシル化を含む)を有する二量体として存在する。続くSDS PAGE分析は、非還元条件下で約210kDに流れるバンド、および還元条件下で約85kDに流れるバンドによって、これらのおおよその分子量を確認した。光散乱分析を実施して、この分子量をさらに確認し、そしてより重要なことに、タンパク質が均一な種であるか否かを決定した。光散乱は、分子の質量および濃度の関数である。分子量を決定するために、タンパク質サンプルをゲル濾過カラムに注入し、そして溶出物をオンライン光散乱検出器ならびに屈折率および/またはUV検出器を用いてモニタリングした。光散乱検出器は、MiniDawnレーザ光散乱検出器であり、Wyatt Technology Corporation (Santa Barbara、CA)から入手した。この装置は、定常光を3つの異なる角度で測定する。オンラインの屈折率検出器またはUV検出器は、タンパク質濃度を測定するよう働く。Astra 4.7 Software (Wyatt Technology Corporation、Santa Barbara、CA)を使用して、dn/dc (dn=屈折率の変化；dc=濃度)またはタンパク質の消衰係数のいずれかに基づいて、タンパク質濃度を算出した。次いで、タンパク質の分子量を、光散乱の角度依存から算出した。この分析の結果は、この二量体タンパク質が約173.9kDであるらしく、そして単一のピークの存在は、このタンパク質溶液が、均一であることを示す。

30

40

【0091】

(安定なCHOクローンにおけるAng-1-FD-Fc-FDの発現レベル)：CHO細胞を上記のAng-1-FD-Fc-FD DNA構築物で安定にトランスフェクトすることによって、組換えAng-1-FD-Fc-FDタンパク質を含むCHO細胞上清を生成した。このCHO細胞上清を、捕捉抗体として抗ヒトIgG抗体、およびレポーター抗体としてアルカリホスファターゼに結合体化させた抗ヒトIgG抗体を使用する、標

50

準的ELISAによって分析し、その上清に存在するAng-1-FD-Fc-FDタンパク質の量を定量した。この分析によって、2～3 pg/細胞/日の発現レベルが示された。

【0092】

(安定なCHOクローン上清由来のAng-1-FD-Fc-FDタンパク質の精製)：Ang-1-FD-Fc-FDタンパク質はFcドメインを含むので、精製は、標準的なProtein Aカラムクロマトグラフィー(Pharmacia, Inc.)、その後の標準的なサイズ排除クロマトグラフィー(Pharmacia, Inc.)を使用して、比較的単純かつ簡易である。そのCHO細胞上清を上記のように精製し、そしてその精製されたAng-1-FD-Fc-FDタンパク質を下記の研究において使用して、このタンパク質をさらに特徴付けた。

10

【0093】

(安定なCHOクローン由来Ang-1-FD-Fc-FDタンパク質のN末端配列決定)：精製されたAng-1-FD-Fc-FDタンパク質を、N末端配列分析に供し、そのタンパク質の任意の短縮化種が生成されているか否かを決定した。この分析によって、ただ1つのN末端配列、Arg-Asp-X-Ala-Asp(ここで、XはCysである)が示された。この配列は、図3Aのアミノ酸16～20に見出され、そして図3Aのアミノ酸1～15に対応するこのタンパク質のシグナル配列の直後に続く。

【0094】

(実施例10：安定なCHOクローン由来のAng-2-FD-Fc-FDタンパク質の特徴付け)

20

(分子量分析)：上記の安定なCHOクローン由来Ang-1-FD-Fc-FDについて記載されたように、安定なCHOクローン由来Ang-2-FD-Fc-FDタンパク質の推定分子量を、MacVector Program(Kodak, Scientific Imaging Systems, New Haven, CT)を使用して決定した。Ang-2-FD-Fc-FD

の単量体形態は、76,052の推定分子量を有し、これは、3つの推定N結合型グリコシル化部位を有し、これらは、この単量体タンパク質の分子量を83,552に潜在的に増加し得た。Ang-1-FD-Fc-FDと同様に、このタンパク質は、167,104の推定分子量(可能なN結合型グリコシル化を含む)を有する二量体として存在する。SDS PAGE分析によって、非還元条件下で約200 kDaに泳動されるバンド、および還元条件下で約85 kDaに泳動されるバンドにより、これらのおよその分子量が確認された。光散乱分析によって、この分子量(176.6 kDa)が確認され、そして安定なCHOクローン由来のAng-2-FD-Fc-FDタンパク質が、安定なCHOクローン由来のAng-1-FD-Fc-FDと同様に、均質種として存在することが示された。

30

【0095】

(安定なCHOクローン由来のAng-2-FD-Fc-FDの発現レベル)：CHO細胞を上記のAng-2-FD-Fc-FD DNA構築物で安定にトランスフェクトすることによって、組換えAng-2-FD-Fc-FDタンパク質を含むCHO細胞上清を生成した。このCHO細胞上清を、捕捉抗体として抗ヒトIgG抗体、およびレポーター抗体としてアルカリホスファターゼに結合体化させた抗ヒトIgG抗体を使用する、標準的ELISAによって分析し、その上清に存在するAng-2-FD-Fc-FDタンパク質の量を定量した。この分析によって、約1～2 pg/細胞/日の発現レベルが示された。

40

【0096】

(細胞上清からの安定なCHOクローン由来のAng-2-FD-Fc-FDの精製)：Ang-1-FD-Fc-FDと同様に、Ang-2-FD-Fc-FDタンパク質はFcドメインを含むので、精製は、標準的なProtein Aカラムクロマトグラフィー、その後の標準的なサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、比較的単純かつ簡易であ

50

る。そのCHO細胞上清を、安定なCHOクローン由来のAng-1-FD-Fc-FD（前出）について上記されるように精製し、そして、それを下記の研究において使用して、このタンパク質をさらに特徴付けた。

【0097】

（安定なCHOクローン由来Ang-2-FD-Fc-FDタンパク質のN末端配列決定）：精製された安定なCHOクローン由来Ang-2-FD-Fc-FDタンパク質を、標準的なN末端配列分析に供し、そのタンパク質の任意の短縮化種が生成されているか否かを決定した。この分析によって、ただ1つのN末端配列、Asp-X-Ala-Glu-Val（ここで、XはCysである）が示された。この配列は、図4Aのアミノ酸17～21に見出され、そして図4Aのアミノ酸1～15に対応するこのタンパク質のシグナル配列の直後に続く。

10

【0098】

（実施例11：EAhy926細胞におけるTie-2レセプターリン酸化に対する、安定なCHOクローン由来のAng-1-FD-Fc-FDおよびAng-2-FD-Fc-FDの効果）

（アッセイ系）：下記の全ての実験は、細胞株EAhy926（Edgell, C. J. ら（1983）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3734-3737）、ならびに当業者に精通された標準的なリン酸化アッセイおよび試薬を使用した。

【0099】

（（A）EAhy926細胞における、Ang1*媒介Tie-2レセプターリン酸化対安定なCHOクローン由来Ang-1-FD-Fc-FD媒介Tie-2レセプターリン酸化）：EAhy926細胞を、0.4 μg/mlのAng1*、あるいは0.2 μg/mlまたは0.4 μg/mlの安定なCHOクローン由来Ang-1-FD-Fc-FDタンパク質で刺激した。標準的なリン酸化アッセイによって、安定なCHOクローン由来Ang-1-FD-Fc-FDが、EAhy926細胞におけるTie-2レセプターのリン酸化を刺激する能力において、Ang1*と等価であることが示された（図17）。

20

【0100】

（（B）安定なCHOクローン由来Ang-2-FD-Fc-FDが、EAhy926細胞における安定なCHOクローン由来Ang-1-FD-Fc-FD媒介Tie-2レセプターリン酸化をブロックする能力）：EAhy926細胞を、0.2 μg/mlのTie-2アゴニストAng-1-FD-Fc-FD、および2 μg/ml、4 μg/ml、8 μg/mlまたは16 μg/mlの安定なCHOクローン由来Ang-2-FD-Fc-FDで処理した。図18に示されるように、Ang-2-FD-Fc-FDは、それが、安定なCHOクローン由来Ang-1-FD-Fc-FDの少なくとも40倍のモル濃度過剰で存在する場合に、Tie-2レセプターの安定なCHOクローン由来Ang-1-FD-Fc-FD刺激をブロックし得る。

30

【0101】

（Ephrinリガンド）

以前の実験（Davisら、1994、Science, 266:816-819; Galeら、1996、Neuron 17:9-19、GaleおよびYancopoulos, 1997、Cell Tissue Research 290:227-241）において、可溶性の、クラスター化されていないEphrin-B1-FcおよびEphrin-B2-Fc（これらは、それらの各Fcドメインで二量体化し、従ってEphrin-B1外部ドメインまたはEphrin-B2外部ドメインのいずれかに関する二量体である）は、EphB2レセプターリン酸化を誘導しない。しかし、いずれかの分子を、抗Fc抗体で予めクラスター化することによって多量体化した場合、これらは、EphB2レセプターについての強力なアゴニストとなる（これは、COS細胞レポーターアッセイにおいてEphB2レセプターのチロシンリン酸化によって判断される場合である）。Ephrin-B1およびEphrin-B2の両方の多量体化は、レセプターリン

40

50

酸化の誘導に必要であるようなので、本発明者らは、Fcドメインに融合されたEphrin-B1またはEphrin-B2の外部ドメインのいずれかの直列反復に含まれる分子（これは、Fcドメインに関して二量体であるが、Ephrin外部ドメインに関して四量体である）は、十分にクラスター化されて、レセプターリン酸化を誘導し得ることを理論付けた。この仮説を試験するために、以下のDNA構築物を構築し、組換えタンパク質を産生し、そしてレポーターアッセイを行った。

【0102】

（直列Ephrin外部ドメイン／Fcドメイン核酸分子の構築）

以下の核酸分子の全てを、標準的な組換えDNA技術（例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)、Current Protocols in Molecular Biology (Ausbelら編、Green Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY)を参照のこと）によって構築し、ABI 373A DNAシーケンサーおよびTaq Dideoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)を使用する標準的技術によって配列を確認し、そして哺乳動物発現pJFE14 (Ephrin-B1-Ephrin-B1-Fc)または(pMT21 (Ephrin-B2-Ephrin-B2-Fc)（各々、5'末端にタンパク質翻訳を促進するためのKozak配列(Kozak, M., 1987, Nucleic Acids Res. 15:8125-8148)を有する)のいずれかにサブクローニングした。下記のブリッジ(bridging)配列を、簡便な制限酵素部位を提供するため、およびドメイン間の結合部に可撓性を与えるために導入した。しかし、これらのブリッジ配列に対する非常に重要な性質が存在するということは示されない（ただし、これらの構築物のいくつかにおけるリンカーの長さを変化することは、産生されるタンパク質の量にいくらかの変化を導く）。

【0103】

（実施例12：Ephrin-B1-Ephrin-B1-Fc核酸分子およびEphrin-B2-Ephrin-B2-Fc核酸分子の構築）

（(A) Ephrin-B1-Ephrin-B1-Fc）：Ephrin-B1-Ephrin-B1-Fc DNA分子は、Ephrin-B1 (Davisら、同書)の外部ドメインのコード配列（これは、図14A～図14Bのヌクレオチド1～711に対応する）、それに続くアミノ酸Gly-Pro-Glyからなるブリッジ配列のコード配列（図14Bのヌクレオチド712～720）、それに続くEphrin-B1の外部ドメインの第2のコピーのコード配列（これは、図14B～図14Dのヌクレオチド721～1344に対応する）からなり、ただし、このEphrin-B1外部ドメインのコピーにおいては、シグナル配列は除去されている。この第2のコピーに、第2のGly-Pro-Glyアミノ酸架橋（図14Dのヌクレオチド1345～1353）が続き、それにヒトIgG1のFc部分のコード配列（図14D～図14Eのヌクレオチド1354～2049）が続く。

【0104】

（(B) Ephrin-B2-Ephrin-B2-Fc）：Ephrin-B2-Ephrin-B2-Fc DNA分子は、Ephrin-B2 (Bergemannら、1995、Mol. Cell Biol. 15:4821-4929)の外部ドメインのコード配列（これは、図15A～図15Bのヌクレオチド1～675に対応する）、それに続くアミノ酸Gly-Pro-Glyからなるブリッジ配列のコード配列（図15Bのヌクレオチド676～684）、それに続くEphrin-B2の外部ドメインの第2のコピーのコード配列（これは、図15B～図15Dのヌクレオチド685～1270に対応する）からなり、ただし、このコピーにおいては、シグナル配列は除去されている。この第2のコピーに、第2のGly-Pro-Glyアミノ酸架橋（図15Dのヌクレオチド

1270～1278)が続き、それにヒトIgG1のFc部分のコード配列(図15D～図15Eのヌクレオチド1279～1977)が続く。

【0105】

上記アンギオポイエチン核酸分子と同様に、ブリッジ配列を、簡便な制限酵素部位を提供するため、およびドメイン間の結合部に可撓性を与えるために導入した。

【0106】

(実施例13: COS細胞における直列Ephrin組換えタンパク質の発現)

COS細胞を、当該分野で公知の標準的なトランスフェクション技術を使用して、上記のEphrin-B1-Ephrin-B1-Fc核酸分子またはEphrin-B2-Ephrin-B2-Fc核酸分子で一過的にトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後、増殖培地(100U/mlペニシリン、100μg/mlストレプトマイシン、2mMグルタミンおよび10%ウシ血清を補充したDMEM)を吸引し、無血清培地(100U/mlペニシリン、100μg/mlストレプトマイシン、2mMグルタミンを補充したDMEM)で置き換えた。細胞を、さらに3日間増殖し、次いで組換えタンパク質を含む無血清培地を収集した。組換えタンパク質濃度を、ドットプロットを行い、そして標準曲線から得られたシグナルを比較することにより決定した。一旦、およそのタンパク質濃度を決定し、Ephrin-B1-Ephrin-B1-FcおよびEphrin-B2-Ephrin-B2-Fc組換えタンパク質を、下記の細胞レポーターアッセイにおいて使用した。

【0107】

(実施例14: COS細胞由来直列Ephrin外部ドメイン/Fcドメイン組換えタンパク質の特徴付け)

(レポーターアッセイ): EphファミリーレセプターEphB2(Galeら、1996、Neuron 17: 9-19)を内因的に発現するCOS細胞を、Ephrin-B1-Ephrin-B1-FcおよびEphrin-B2-Ephrin-B2-Fcがレセプターリン酸化を誘導する能力を評価するために、レポーターアッセイにおいて使用した。このアッセイは、以前に記載(Davisら、同書; Galeら、同書)のように行った。手短かに言うと、COS細胞を、上記の標準的な増殖培地中で80～90%にコンフルエントにまで増殖させた。増殖後、培地を吸引し、そしてEphrin-B1-Ephrin-B1-FcまたはEphrin-B2-Ephrin-B2-Fc組換えタンパク質のいずれかでの処理の前に、1～2時間無血清培地(上記)で置き換えた。細胞を、アフィニティー精製したヒトIgG1 Fc特異的ヤギ抗ヒト抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)を最終濃度17μg/mlで含むかまたは含まない、500ng/mlのEphrin-B1-Ephrin-B1-FcまたはEphrin-B2-Ephrin-B2-Fcで37℃で30分間刺激した。この抗体は、Fcタグ化融合体をクラスター化し得る。処置後、COS細胞を回収し、そして細胞溶解物を、DavisらおよびGaleら(前出)に記載のように調製した。EphB2レセプタータンパク質を、抗EphB2抗血清(Henkemeyerら、1994、Oncogene 9: 1001-1014)を使用して細胞溶解物から免疫沈降させた。免疫沈降物を、標準的なSDS PAGEによって分離し、そしてウェスタンブロット分析のためにPVDF膜(Millipore)に転写させた。膜を、抗ホスホチロシン抗体4G10(Upstate Biotechnology Institute, Lake Placid, NY)または抗EphB2抗体(Henkemeyerら、同書)のいずれかでプローブし、上記実験条件における、EphB2リン酸化の程度およびEphB2の相対量を決定した。

【0108】

(結果): Ephrin-B1-Ephrin-B1-FcおよびEphrin-B2-Ephrin-B2-Fcは、COS細胞レポーターアッセイにおけるEphB2レセプターリン酸化を誘導するそれらの能力において、抗Fc抗体クラスター化Ephrin-B1-Fcとほぼ同様に活性であることが示された。さらに、これらのタンパク質のい

れかが、ヤギ抗Fcヒト抗体とさらにクラスター化された場合、これらは、EphB2レセプターリン酸化を誘導するそれらの能力は、なおさらに強力になった。図16は、このリン酸化アッセイの結果を示す。

【0109】

(実施例15：Ephrin-B2-Ephrin-B2-FcCHO発現ベクターの構築)

Ephrin-B2-Ephrin-B2-Fc DNA分子は、Ephrin-B2 (Bergemannら、1995、Mol. Cell Biol. 15:4821-4929)の外部ドメインのコード配列(これは、図15A~図15Bのヌクレオチド1~675に対応する)、それに続くアミノ酸Gly-Pro-Glyからなるブリッジ配列のコード配列(図15Bのヌクレオチド676~684)、それに続くEphrin-B2の外部ドメインの第2のコピーのコード配列(これは、図15B~図15Dのヌクレオチド685~1270に対応する)からなり、ただし、このコピーにおいては、シグナル配列は除去されている。この第2のコピーに、第2のGly-Pro-Glyアミノ酸ブリッジ(図15Dのヌクレオチド1270~1278)が続き、それにヒトIgG1のFc部分のコード配列(図15D~図15Eのヌクレオチド1279~1977)が続く。この分子を、発現ベクターpRG763のHindIIIおよびNotIポリリンカー部位にサブクロニングし、そしてpRG763-m(Ephrin-B2)-Fcを設計した。上記アングリオポイエチン核酸分子と同様に、ブリッジ配列を、簡便な制限酵素部位を提供するため、およびドメイン間の結合部に可撓性を与えるために導入した。

【0110】

(実施例16：CHO-K1(E1A)細胞におけるEphrin-B2-Ephrin-B2-Fcの発現)

40個の15cmペトリ皿に、 4×10^6 細胞/プレートの密度でCHO-K1/E1A細胞を播種した。プレート培地は、Gibco Ham's F-12w/10%HyClone Fetal Bovine Serum(FBS)+ペニシリン/ストレプトマイシンであり、そしてこれにグルタミンを補充した。翌日、各プレートを、12mlの容量のGibco Optimen およびGibco Lipofectamineを製造業者のプロトコルに従って使用して、6 μ gのpRG763-m(Ephrin-B2)-Fcでトランスフェクトした。細胞にトランスフェクション混合物を添加した4時間後、12ml/プレートのOptimen w/10% FBSを添加した。プレートを、5% CO₂インキュベーター中、37°Cで一晩インキュベートした。翌日、培地を各プレートから除去し、そして25mlの発現培地(Gibco CHO-S-SFM I I w/グルタミン+1mM 酪酸ナトリウム)を添加した。プレートを、37°Cで3日間インキュベートした。インキュベーションの3日後、培地を各プレートから吸引し、スイングバケットローター中で400rpmで遠心分離して、細胞をペレット化した。上清を滅菌1Lボトルにデカントし、そして上記のように精製した。

【図面の簡単な説明】

【図1A】 図1A：Ang-1-FD-FD-Fcの核酸配列および推定アミノ酸配列。

【図1B】 図1B：Ang-1-FD-FD-Fcの核酸配列および推定アミノ酸配列。

【図1C】 図1C：Ang-1-FD-FD-Fcの核酸配列および推定アミノ酸配列。

【図1D】 図1D：Ang-1-FD-FD-Fcの核酸配列および推定アミノ酸配列。

【図1E】 図1E：Ang-1-FD-FD-Fcの核酸配列および推定アミノ酸配列。

【図2A】 図2A：Ang-2-FD-FD-Fcの核酸配列および推定アミノ酸配列。

- 【図 2 B】 図 2 B : A n g - 2 - F D - F D - F c の核酸配列および推定アミノ酸配列。
【図 2 C】 図 2 C : A n g - 2 - F D - F D - F c の核酸配列および推定アミノ酸配列。
【図 2 D】 図 2 D : A n g - 2 - F D - F D - F c の核酸配列および推定アミノ酸配列。
【図 2 E】 図 2 E : A n g - 2 - F D - F D - F c の核酸配列および推定アミノ酸配列。
【図 3 A】 図 3 A : A n g - 1 - F D - F c - F D の核酸配列および推定アミノ酸配列。
【図 3 B】 図 3 B : A n g - 1 - F D - F c - F D の核酸配列および推定アミノ酸配列。
【図 3 C】 図 3 C : A n g - 1 - F D - F c - F D の核酸配列および推定アミノ酸配列。
【図 3 D】 図 3 D : A n g - 1 - F D - F c - F D の核酸配列および推定アミノ酸配列。
【図 3 E】 図 3 E : A n g - 1 - F D - F c - F D の核酸配列および推定アミノ酸配列。
【図 4 A】 図 4 A : A n g - 2 - F D - F c - F D の核酸配列および推定アミノ酸配列。
【図 4 B】 図 4 B : A n g - 2 - F D - F c - F D の核酸配列および推定アミノ酸配列。
【図 4 C】 図 4 C : A n g - 2 - F D - F c - F D の核酸配列および推定アミノ酸配列。
【図 4 D】 図 4 D : A n g - 2 - F D - F c - F D の核酸配列および推定アミノ酸配列。
【図 4 E】 図 4 E : A n g - 2 - F D - F c - F D の核酸配列および推定アミノ酸配列。
【図 5】 A n g - 1 - F D - F c - F D タンパク質の分子量分析。非還元的条件下での約 2 1 0 k D で泳動しているバンド（レーン 3）および還元条件下で約 8 5 k D で泳動しているバンド（レーン 7）を示す S D S P A G E 分析。
【図 6】 A n g - 1 - F D - F c - F D の分子量を確認するため、およびこのタンパク質が均質であるか否かを決定するための光散乱分析。光散乱は、高分子の質量および濃度の関数である。分子量を決定するため、このタンパク質サンプルをゲル濾過カラム上に注入し、そして溶出物をオンライン光散乱検出器および屈折率ならびに／または U V 検出器でモニターする。このオンライン屈折率検出器または U V 検出器を使用してタンパク質濃度を測定する。A s t r a 4 . 7 S o f t w a r e (W y a t t T e c h n o l o g y C o r p o r a t i o n , S a n t a B a r b a r a , C A) を用いてタンパク質濃度を算出する。次いで、光散乱の角依存性からタンパク質の分子量を算出する。二量体タンパク質の分子量は、約 2 0 0 k D であるとみられ、そして単一ピークの存在は、このタンパク質溶液が均質であることを意味する。
【図 7】 A n g - 2 - F D - F c - F D の分子量分析。非還元的条件下での約 2 0 0 k D で泳動しているバンド（レーン 7 および 8）および還元条件下で約 8 8 k D で泳動しているバンド（レーン 3 および 4）を示す S D S P A G E 分析
【図 8】 A n g - 2 - F D - F c - F D の分子量を確認するため、およびこのタンパク質が均質種であるか否かを決定するための光散乱分析。光散乱は、高分子の質量および濃度の関数である。分子量を決定するため、このタンパク質サンプルをゲル濾過カラム上に注入し、そして溶出物をオンライン光散乱検出器および屈折率ならびに／または U V 検出器でモニターする。このオンライン屈折率検出器または U V 検出器を使用してタンパク質濃度を測定する。A s t r a 4 . 7 S o f t w a r e (W y a t t T e c h n o l o g

10

20

30

40

50

y Corporation、Santa Barbara, CA) を用いてタンパク質濃度を算出する。次いで、光散乱の角依存性からタンパク質の分子量を算出する。二量体タンパク質の分子量は、約171kDであるらしく、そして単一ピークの存在は、このタンパク質溶液が均質であることを意味する。

【図9】 EAh y 926細胞中のAng 1^{*}媒介Tie-2レセプターリン酸化、対Ang-1-FD-Fc-FD媒介Tie-2レセプターリン酸化。標準的なリン酸化アッセイにより、Ang-1-FD-Fc-FDが、EAh y 926中のTie-2レセプターのリン酸化を刺激する能力において、Ang 1^{*}と、等価であることが示された。

【図10】 Ang-2-FD-Fc-FDが、EAh y 926細胞中のAng 1^{*}媒介Tie-2レセプターリン酸化をブロックする能力。標準的なリン酸化アッセイにおいて、Ang-2-FD-Fc-FDは、それがAng 1^{*}の少なくとも10~15倍モル過剰存在する場合、Tie-2レセプターのAng 1^{*}刺激をブロックし得る。

【図11】 アンギオポイエチン-2が、EAh y 926細胞中のAng 1^{*}媒介Tie-2レセプターリン酸化をブロックする能力。標準的なリン酸化アッセイにおいて、20倍モル過剰で、アンギオポイエチン-2は、Ang 1^{*}媒介リン酸化レベルを50%に低下させ得ない。この結果は、図10に記載の結果と組み合わせて、Ang-2-FD-Fc-FDが、Ang 1^{*}媒介Tie-2レセプターリン酸化の、アンギオポイエチン-2よりも強力なインヒビターであることを意味する。

【図12】 Ang-2-FD-Fc-FDが、EAh y 926細胞中のTie-2レセプターのアンギオポイエチン-1媒介リン酸化をブロックする能力。標準的なリン酸化アッセイにおいて、これらの細胞中にTie-2レセプターのアンギオポイエチン-1媒介リン酸化ブロックに向かう傾向が存在することが示されるが、Ang-2-FD-Fc-FDは、図10に示されるように、Tie-2のAng 1^{*}媒介リン酸化をブロックにおいてより効果的であるようである。

【図13】 アンギオポイエチン-2が、EAh y 926細胞中のTie-2レセプターのアンギオポイエチン-1媒介リン酸化をブロックする能力。標準的なリン酸化アッセイにおいて、これらの細胞中にTie-2レセプターのアンギオポイエチン-1媒介リン酸化ブロックに向かう傾向が存在することが示されるが、Ang-2-FD-Fc-FD同様、アンギオポイエチン-2は、図11に示されるように、Tie-2のAng 1^{*}媒介リン酸化をブロックにおいてより効果的であるようである。

【図14A】 Ephrin-B1-Ephrin-B1-Fcの核酸配列および推定アミノ酸配列。

【図14B】 Ephrin-B1-Ephrin-B1-Fcの核酸配列および推定アミノ酸配列。

【図14C】 Ephrin-B1-Ephrin-B1-Fcの核酸配列および推定アミノ酸配列。

【図14D】 Ephrin-B1-Ephrin-B1-Fcの核酸配列および推定アミノ酸配列。

【図14E】 Ephrin-B1-Ephrin-B1-Fcの核酸配列および推定アミノ酸配列。

【図15A】 Ephrin-B2-Ephrin-B2-Fcの核酸配列および推定アミノ酸配列。

【図15B】 Ephrin-B2-Ephrin-B2-Fcの核酸配列および推定アミノ酸配列。

【図15C】 Ephrin-B2-Ephrin-B2-Fcの核酸配列および推定アミノ酸配列。

【図15D】 Ephrin-B2-Ephrin-B2-Fcの核酸配列および推定アミノ酸配列。

【図15E】 Ephrin-B2-Ephrin-B2-Fcの核酸配列および推定アミノ酸配列。

【図16】 標準的EphB2リン酸化アッセイにおける、Ephrin-B1-Fc、Ephrin-B1-Ephrin-B1-Fc、Ephrin-B2-Fc、およびEphrin-B2-Ephrin-B2-Fcの比較。COS細胞を血清飢餓させ、次いで、未処理(UT)のまま残すか(レーン1)、または、非クラスター化Ephrin-B1-Fcおよびクラスター化Ephrin-B1-Fc(Efn-B1)で処理した(レーン2および3)。COS細胞をまた、非クラスター化Ephrin-B1-Ephrin-B1-Fcおよびクラスター化Ephrin-B1-Ephrin-B1-Fc(Efn-B1 DD)で処理した(レーン4および5)。さらに、細胞を、同様に非クラスター化Ephrin-B2-Fcおよびクラスター化Ephrin-B2-Fc(Efn-B2)で処理し(レーン6および7)、そして非クラスターEphrin-B2-Ephrin-B2-Fcおよびクラスター化Ephrin-B2-Ephrin-B2-Fc(Efn-B2 DD)で処理した(レーン8および9)。抗ホスホチロシンウエスタンブロッティングにより、EphB2リン酸化の程度を、アッセイし(上部パネル)、そして抗EphB2ウエスタンブロッティングにより、各レーンのEphB2の相対的な量を決定した(下部パネル)。

10

【図17】 EAh y 9 2 6細胞中のAng1*媒介Tie-2レセプターリン酸化、対安定なCHOクローン由来Ang-1-FD-Fc-FD媒介Tie-2レセプターリン酸化。EAhy926細胞を、0.4 μg/ml Ang1*または0.2 μg/mlもしくは0.4 μg/mlの安定なCHOクローン由来Ang-1-FD-Fc-FDタンパク質で刺激した。標準的なリン酸化アッセイにより、CHOクローン由来Ang-1-FD-Fc-FDが、EAhy926中のTie-2レセプターのリン酸化を刺激する能力において、Ang1*と、等価であることが示された。

20

【図18】 安定なCHOクローン由来Ang-2-FD-Fc-FDが、EAhy926細胞中の安定なCHOクローン由来Ang-1-FD-Fc-FD媒介Tie-2レセプターリン酸化をブロックする能力。EAhy926細胞を、0.2 μg/mlのTie-2アゴニストAng-1-FD-Fc-FDおよび2 μg/ml、4 μg/ml、8 μg/mlもしくは16 μg/mlの安定なCHOクローン由来Ang-2-FD-Fc-FDで刺激した。Ang-2-FD-Fc-FDが、安定なCHOクローン由来Ang-1-FD-Fc-FDの少なくとも40倍モル過剰で存在する場合、Ang-2-FD-Fc-FDは、Tie-2レセプターの安定なCHOクローン由来Ang-1-FD-Fc-FD刺激をブロックし得る。

30

【図 1 A】

Fig.1A.

10 20 30 40
ATG TCT GCA CTT CTG ATC CTA GCT CTT GTT GGA GCT GCA GTT GCT
Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala>
_b_b_b_ANG1 トリプシンシグナル配列 _b_b_b_b_>
50 60 70 80 90
AGA GAC TGT GCA GAT GTA TAT CAA GCT GGT TTT AAT AAA AGT GGA
Arg Asp Cys Ala Asp Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly>
_b_b_b_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _b_b_b_b_>
100 110 120 130
ATC TGC ACT ATT TAT ATT AAT AAT AGC CCA GAA CCC AAA AAG GTG
Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val>
_b_b_b_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _b_b_b_b_>
140 150 160 170 180
TTT TGC AAT ATG GAT GTC AAT GGG GGA GGT TGG ACT GTA ATA CAA
Phe Cys Asn Met Asp Val Asn Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln>
_b_b_b_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _b_b_b_b_>
190 200 210 220
CAT GGT GAA GAT GGA ACT CTA GAT TTC CAA AGA GGC TGG AAG GAA
His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu>
_b_b_b_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _b_b_b_b_>
230 240 250 260 270
TAT AAA ATG GGT TTT GGA AAT CCC TCC GGT GAA TAT TGG CTG GGG
Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu Tyr Trp Leu Gly>
_b_b_b_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _b_b_b_b_>
280 290 300 310
AAT GAG TTT ATT TTT GCC ATT ACC AGT CAG AAG CAG TAC ATG CTA
Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln Arg Gln Tyr Met Leu>
_b_b_b_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _b_b_b_b_>
320 330 340 350 360
AGA ATT GAG TTA ATG GAC TGG GAA GGG AAC CGA GCC TAT TCA CAG
Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg Ala Tyr Ser Gln>
_b_b_b_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _b_b_b_b_>
370 380 390 400
TAT GAC AGA TTC CAC ATA GSA AAT GAA AAG CAA AAC TAT AGG TTG
Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn Tyr Arg Leu>
_b_b_b_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _b_b_b_b_>
410 420 430 440 450
TAT TTA AAA GGT CAC ACT GGG ACA GCA GSA AAA CAG AGC AGC CTG
Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser Ser Leu>
_b_b_b_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _b_b_b_b_>

【図 1 B】

Fig.1B.

460 470 480 490
ATC TTA CAC GGT GCT GAT TTC AGC ACT AAA GAT GCT GAT AAT GAC
Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn Asp>
_b_b_b_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _b_b_b_b_>
500 510 520 530 540
AAC TGT ATG TGC AAA TGT GCC CTC ATG TTA ACA GGA GGA TGG TGG
Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp>
_b_b_b_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _b_b_b_b_>
550 560 570 580
TTT GAT GCT TGT GGC CCC TCC AAT CTA AAT GGA ATG TTC TAT ACT
Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr>
_b_b_b_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _b_b_b_b_>
590 600 610 620 630
GCG GGA CAA AAC CAT GGA AAA CTG AAT GGG ATA AAG TGG CAC TAC
Ala Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr>
_b_b_b_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _b_b_b_b_>
640 650 660 670
TTC AAA GGG CCC AGT TAC TCC TTA CGT TCC ACA ACT ATG ATG ATT
Phe Lys Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile>
_b_b_b_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _b_b_b_b_>
680 690 700 710 720
CGA CCT TTA GAT TTT GGC CCC GCG CCT TTT AGA GAC TGT GCA GAT
Arg Pro Leu Asp Phe>
_ANG1 FIBRINO>
Gly Pro Ala Pro>
_GPAP BR1>
Phe Arg Asp Cys Ala Asp>
_ANG1 FIBRINOGEN>
730 740 750 760
GTA TAT CAA GCT GGT TTT AAT AAA AGT GGA ATC TAC ACT ATT TAT
Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr>
_d_d_d_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _d_d_d_d_>
770 780 790 800 810
ATT AAT AAT ATG CCA GAA CCC AAA AAG GTG TTT TGC AAT ATG GAT
Ile Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp>
_d_d_d_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _d_d_d_d_>
820 830 840 850
GTC AAT GGG GGA GGT TGG ACT GTA ATA CAA CAT CGT GAA GAT GGA
Val Asn Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly>
_d_d_d_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _d_d_d_d_>

【図 1 C】

Fig.1C.

860 870 880 890 900
AGT CTA GAT TTC CAA AGA GGC TGG AAG GAA TAT AAA ATG GGT TTT
Ser Leu Asp Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe>
_d_d_d_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _d_d_d_d_>
910 920 930 940
GGA AAT CCC TCC GGT GAA TAT TGG CTG GGG AAT GAG TTT ATT TTT
Gly Asn Pro Ser Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe>
_d_d_d_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _d_d_d_d_>
950 960 970 980 990
GCC ATT ACC AGT CAG AAG CAG TAC ATG CTA AGA ATT GAG TTA ATG
Ala Ile Thr Ser Gln Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met>
_d_d_d_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _d_d_d_d_>
1000 1010 1020 1030
GAC TGG GAA GGG AAC CGA GCC TAT TCA CAG TAT GAC AGA TTC CAC
Asp Trp Glu Gly Asn Arg Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His>
_d_d_d_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _d_d_d_d_>
1040 1050 1060 1070 1080
ATA GGA AAT GAA AAG CAA AAC TAT AGG TTG TAT TTA AAA GGT CAC
Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His>
_d_d_d_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _d_d_d_d_>
1090 1100 1110 1120
ACT GGG ACA GCA GGA AAA CAG AGC AGC CTG ATC TTA CAC GGT GCT
Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser Ser Leu Ile Leu His Gly Ala>
_d_d_d_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _d_d_d_d_>
1130 1140 1150 1160 1170
GAT TTC AGC ACT AAA GAT GCT GAT AAT GAC AAC TGT ATG TGC AAA
Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn Asp Asn Cys Met Cys Lys>
_d_d_d_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _d_d_d_d_>
1180 1190 1200 1210
TGT GCC CTC ATG TTA ACA GGA GGA TGG TGG TTT GAT GCT TGT GGC
Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp Ala Cys Gly>
_d_d_d_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _d_d_d_d_>
1220 1230 1240 1250 1260
CCC TCC AAT CTA AAT GGA ATG TTC TAT ACT GCG GGA CAA AAC CAT
Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala Gly Gln Asn His>
_d_d_d_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _d_d_d_d_>

【図 1 D】

Fig.1D.

1270 1280 1290 1300
GGA AAA CTG AAT GGG ATA AAG TGG CAC TAC TTC AAA GGG CCC AGT
Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys Gly Pro Ser>
_d_d_d_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _d_d_d_d_>
1310 1320 1330 1340 1350
TAC TCC TTA CTT TCC ACA ACT ATG ATG ATT CGA CCT TTA GAT TTT
Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu Asp Phe>
_d_d_d_ANG1 フィブリノーゲン様ドメイン _d_d_d_d_>
1360 1370 1380 1390
GGA CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA
Gly Pro Gly>
_d_d_d_ANG1
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro>
_f_f_f_f_FC TAG [2799] _f_f_f_f_f_>
1400 1410 1420 1430 1440
CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCS TCA CTC CTC
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu>
_f_f_f_f_f_FC TAG [2799] _f_f_f_f_f_>
1450 1460 1470 1480
TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC TCC CGG ACC CTT
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro>
_f_f_f_f_f_FC TAG [2799] _f_f_f_f_f_>
1490 1500 1510 1520 1530
GAG GTC ACA TGC GTG GTG GAC GTG AGC CAC CAC GAA GAC CTT GAG
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu>
_f_f_f_f_f_FC TAG [2799] _f_f_f_f_f_>
1540 1550 1560 1570
GTC AAG TTC AAC TGG CAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala>
_f_f_f_f_f_FC TAG [2799] _f_f_f_f_f_>
1580 1590 1600 1610 1620
AAG ACA AAG CCG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val>
_f_f_f_f_f_FC TAG [2799] _f_f_f_f_f_>
1630 1640 1650 1660
GTC AGC GTC CTC ACC CTC GTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys>
_f_f_f_f_f_FC TAG [2799] _f_f_f_f_f_>

【図 2 A】

Fig.2A.

2A.

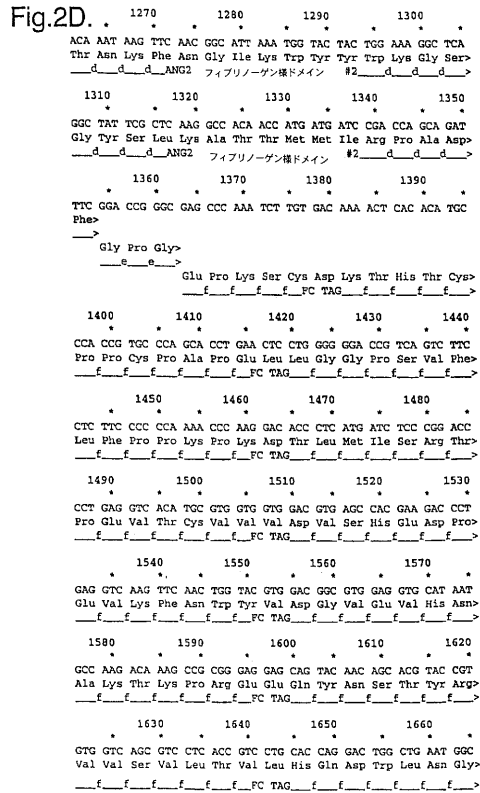
10						20						30						40						
ATG	TCT	GCA	CTT	CTG		ATC	CYA	GCT	CTT	CTT	GGA	GCT	GCA	GTT	CTG									
Met	Ser	Ala	Leu	Ser		Ile	Leu	Gly	Thr	Gly	Ala	Gly	Ala	Val	Ala									
トリプリーングラウド列																								
_ _ _ _ _					_ _ _ _ _					_ _ _ _ _					_ _ _ _ _									
50					60					70					80					90				
AGA	GAC	TCI	GCT	GAA		GTA	TCI	AAA	TCA	GGA	CAC	ACC	ACA	AAT	GGC									
Arg	Asp	Cys	Ala	Glu	Val	Phe	Lys	Phe	Lys	Ser	Gly	His	Thr	Thr	Asn	Gly-								
_ b _ _ _ ANG2										フィブリノーゲン様ドメイン #1					_ b _ _ _ b _									
100					110					120					130									
ATC	TAC	ACG	TAA	GAA		ATT	ACT	AAT	TCT	CAA	GAG	AAC	ATC	AAG	CGC									
Ile	Thr	Thr	Leu	Thr	Phe	Pro	Asn	Ser	Thr	Glu	Glu	Ile	Lys	Ala-										
_ b _ _ _ ANG2					フィブリノーゲン様ドメイン					#1					_ b _ _ _ b _									
140					150					160					170					180				
TAC	TCI	ACG	ATG	GAA		GTA	GGA	GGA	GGG	TGG	ACA	ATT	ATT	CTG										
Tyr	Cys	Asp	Met	Glu	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Trp	Thr	Thr	Ile	Lys	Gln-									
_ b _ _ _ ANG2					フィブリノーゲン様ドメイン					#1					_ b _ _ _ b _									
190					200					210					220									
GGA	CTG	GAT	GAT	GCT		AGC	CTT	GAT	TTC	GAC	AGG	ACT	TGC	AAA	GAA									
Arg	Arg	Gly	Asp	Gly	Ser	Val	Ala	Phe	Gln	Arg	Thr	Thr	Trp	Lys	Glu-									
_ b _ _ _ ANG2					フィブリノーゲン様ドメイン					#1					_ b _ _ _ b _									
230					240					250					260					270				
TAT	AAA	CTC	GGA	GAT		GGT	AAC	CTT	TCA	GAA	GAT	TAP	CTG	CTG	GAA									
Tyr	Lys	Val	Gly	Phe	Gly	Asn	Pro	Ser	Gly	Glu	Tyr	Tap	Lys	Gly-										
_ b _ _ _ ANG2					フィブリノーゲン様ドメイン					#1					_ b _ _ _ b _									
280					290					300					310									
AAT	GAG	TTT	GTT	TCG		CAA	CTC	ACT	AAT	GAC	CAA	GGC	TAT	GTC	CTT									
Asn	Glu	Phe	Val	Ser	Gln	Fibr	Thr	Asn	Gln	Gln	Gln	Arg	Tyr	Val	Leu-									
_ b _ _ _ ANG2					フィブリノーゲン様ドメイン					#1					_ b _ _ _ b _									
320					330					340					350					360				
AAA	TAT	CCG	CTT	GAA		CAC	TGC	GAA	CGC	GGC	ATA	AGC	GTC	TCA	TGG									
Lys	Ile	His	Leu	Lys	Asp	Asp	Trp	Glu	Gly	Asn	Ala	Tyr	Ser	Leu-										
_ b _ _ _ ANG2					フィブリノーゲン様ドメイン					#1					_ b _ _ _ b _									
370					380					390					400									
TAT	GAA	CTT	TTC	TAT		CTC	TCA	AGT	GAA	GAA	CTC	AAT	TAT	AGG	ATT									
Tyr	Glu	His	Phe	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Gly	Glu	Leu	Asn	Tyr	Arg	Ile-									
_ b _ _ _ ANG2					フィブリノーゲン様ドメイン					#1					_ b _ _ _ b _									
410					420					430					440					450				
CAC	CTT	AAA	GGA	CTT		ACA	GGG	ACA	CGC	GGC	AAA	ATC	AGC	AGC	ATC									
His	Leu	Lys	Gly	Leu	Thr	Gly	Thr	Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Ser	Ile-										
_ b _ _ _ ANG2					フィブリノーゲン様ドメイン					#1					_ b _ _ _ b _									

【図 2 C】

Fig.2C.

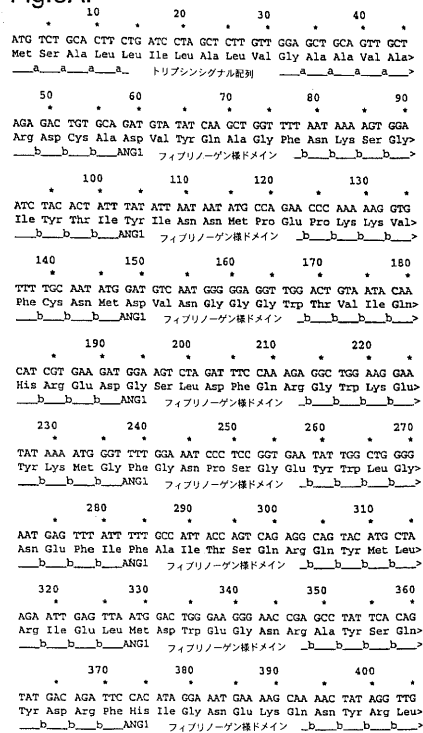
850				870				880				890				900			
GGC	AGC	GTC	GAT	TAT	GTC	AGG	ATC	TGC	AAA	GAA	TAT	AAA	GTC	GGA	GGA				
Gly	Ser	Val	Asp	Phe	Gln	Arg	Thr	Trp	Lys	Glu	Tyr	Lys	Glu	Val	Gly				
_d_d_d_ANG2				フィブリノーゲン様ドメイン				#2				_d_d_d_d_>							
910				920				930				940							
TTT	GGT	AGC	CTC	TCA	GGA	GAA	TAT	TGC	GTC	GGA	AAT	GAT	GTT	GTT					
Phe	Gly	Asn	Pro	Ser	Gly	Glu	Tyr	Trp	Lys	Glu	Asn	Glu	Phe	Val					
_d_d_d_d_ANG2				フィブリノーゲン様ドメイン				#2				_d_d_d_d_>							
950				960				970				980				990			
TCG	CAA	CTC	ACT	AAT	CAG	CAA	CGC	TAT	GTC	GTT	AAA	ATA	CAC	CTT					
Ser	Gln	Leu	Thr	Asn	Gln	Gln	Arg	Tyr	Val	Lys	Ile	His	Leu						
_d_d_d_d_ANG2				フィブリノーゲン様ドメイン				#2				_d_d_d_d_>							
1000				1010				1020				1030							
AAA	GAC	TGG	GAA	GCG	AAT	GAG	CTC	TAC	TCA	TTG	TAT	GAA	CAT	CTC					
Lys	Asp	Trp	Glu	Gly	Asn	Glu	Ala	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Glu	His	Phe					
_d_d_d_d_ANG2				フィブリノーゲン様ドメイン				#2				_d_d_d_d_>							
1040				1050				1060				1070				1080			
TAT	CTC	TCA	AGT	GAA	GAA	CTC	AAT	TAT	AGT	ATT	CAC	CAT	CTC	AAA	GGA				
Tyr	Leu	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Tyr	Arg	Ile	His	Leu	Lys	Gly					
_d_d_d_d_ANG2				フィブリノーゲン様ドメイン				#2				_d_d_d_d_>							
1090				1100				1110				1120							
CTT	ACA	GSG	GCA	GCG	GCC	AAA	ATC	AGC	AGC	ATC	AGC	CAA	CCA	GGA					
Leu	Thr	Gly	Thr	Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Ile	Ser	Gln	Pro	Gly						
_d_d_d_d_ANG2				フィブリノーゲン様ドメイン				#2				_d_d_d_d_>							
1130				1140				1150				1160				1170			
AAT	GAT	TTT	AGC	AGA	AAG	GAT	GCA	GAC	AAC	GAC	AAA	TGT	ATT	TGC					
Asn	Asp	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Gly	Asn	Asp	Lys	Cys	Ile	Cys						
_d_d_d_d_ANG2				フィブリノーゲン様ドメイン				#2				_d_d_d_d_>							
1180				1190				1200				1210				1220			
AAA	TGT	TCA	CAA	ATG	CTA	ACA	GCA	GGC	TGG	TGT	TGT	GAT	GCA	TGT					
Lys	Gly	Ser	Gln	Met	Leu	Thr	Gly	Gly	Gly	Trp	Phe	Asn	Ala	Cys					
_d_d_d_d_ANG2				フィブリノーゲン様ドメイン				#2				_d_d_d_d_>							
1220				1230				1240				1250				1260			
GGT	CTT	TGC	AAC	TCT	AAC	GCA	ATT	TAC	TAT	CCA	CAG	GAG	CAG	AAC					
Gly	Pro	Ser	Asn	Leu	Gly	Met	Tyr	Trp	Pro	Gln	Arg	Gln	Asn						
_d_d_d_d_ANG2				フィブリノーゲン様ドメイン				#2				_d_d_d_d_>							

【図 2 D】

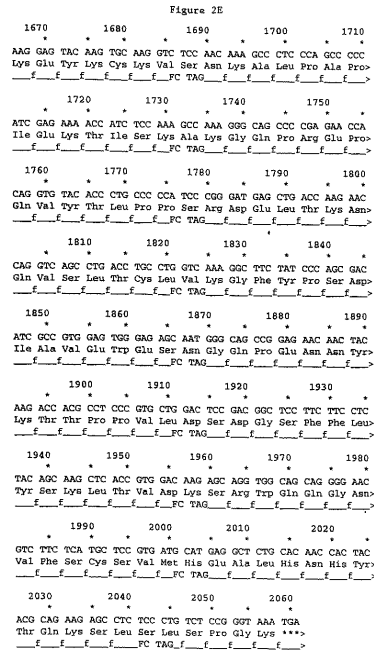


【図 3 A】

Fig.3A.

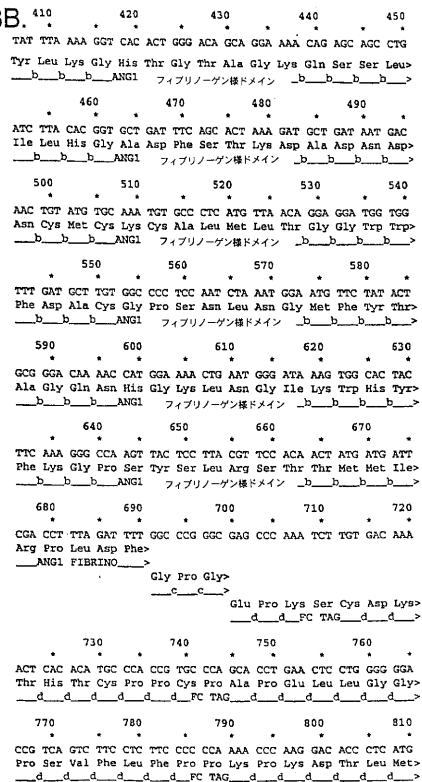


【図 2 E】



【図 3 B】

Fig.3B.



【図 3 D】

Figure 3C

	*820		*830		*840		*850						
ATC	TCC	GCG	ACC	CCT	GAG	CTG	ACA	TGC	GTG	GTG	GAC	GTG	AAC
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val Ser>
						d	c	f	c	t	a	g	
	*860		*870		*880		*890		*900				
CAC	GAA	GAC	CCT	GCG	GTG	TTC	ACC	TGG	TAC	GTG	GAC	GCG	GTG
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
						d	c	f	c	t	a	g	
	*910		*920		*930		*940						
GAG	GTG	CAT	AAT	GCG	ACA	AAG	COC	GCG	GAG	GAC	CAC	TAC	AAC
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr Asn>
						d	c	f	c	t	a	g	
	*950		*960		*970		*980		*990				
AGC	ATC	TAC	CCT	GTG	GTC	AGC	GTC	ACC	CTG	CTG	CAG	CAG	GAC
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp>
						d	c	f	c	t	a	g	
	*1060		*1010		*1020		*1030						
TGG	CTG	AAT	GCG	AAG	GAC	TAC	AGC	TGC	TCC	ACC	AAA	GCC	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys Ala>
						d	c	f	c	t	a	g	
	*1040		*1050		*1060		*1070		*1080				
CTC	ACA	GCC	CCT	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA	GCG CAG
Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	Glu	Ser	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp>
						d	c	f	c	t	a	g	
	*1090		*1100		*1110		*1120						
CCC	AGA	GAA	CAC	GCA	CGT	TAC	ACC	CTG	CCC	CCA	CTG	GAT	GAC
Pro	Glu	Arg	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu>
						d	c	f	c	t	a	g	
	*1130		*1140		*1150		*1160		*1170				
CTG	ACC	AAG	ACA	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	CTG	CTG	AAA	GGC	TTC
Leu	Thr	Lys	Asn	Glu	Thr	Thr	Cys	Leu	Val	Leu	Lys	Gly	Tyr>
						d	c	f	c	t	a	g	
	*1180		*1190		*1200		*1210						
TAT	CCC	AGC	GAC	ATC	GCG	GTG	GAG	TGG	GAC	AGC	AAT	GCG	CAG
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Ala	Gly	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly Gln Pro>
						d	c	f	c	t	a	g	
	*1220		*1230		*1240		*1250		*1260				
GAG	ACC	AAC	TAC	ARG	ACC	AGS	CTC	CCC	CTG	GAC	TCC	GAC	GGC
Gln	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Met	Thr	Pro	Fro	Val	Leu	Asn	Gly>
						d	c	f	c	t	a	g	

Fig.3D.

	1270	1280	1290	1300
TCC TTC TTC CTC CAC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAC AAG AGG TTG Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	d_d_d_d_d_d_FC TAG	d_d_d_d_d_d_d	d_d_d_d_d_d_d	d_d_d_d_d_d_d
1310	1320	1330	1340	1350
CAG CAG GGG AAC CTC TCA TCC TGC TCC CTG ATG CAT GAG GCT CTC Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	d_d_d_d_d_d_FC TAG	d_d_d_d_d_d_d	d_d_d_d_d_d_d	d_d_d_d_d_d_d
1360	1370	1380	1390	
CAC AAC CAC TAC AGC CAG AAG AGC CTC TCC TCG TCT CCG GGT AAA His Asn Lys Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	d_d_d_d_d_d_FC TAG	d_d_d_d_d_d_d	d_d_d_d_d_d_d	
1400	1410	1420	1430	1440
GGC GTT GCC GGT TCT GCC GCC CTT TTT AGA GAC TGT ACA GAT GTA Gly Gly Gly Ser Ser Gly Ala Pro				
G4S LINKER/ASC ブリッジ (N) Phe Arg Asp Cys Ala Asp Val- ANGI FIBRINGEN-LIKE				
1450	1460	1470	1480	
TAT CAA GCT GGT TTT AAT AAA AGT GGA ATC TAC ACT ATT TAT ATT Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Arg Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile-	f_f_f_f_ANGI			
フィブリノゲン様ドメイン				
1490	1500	1510	1520	1530
AAT AAT ATG CCA GAA CCC AAA AGG GTG TTT TGC AAT GAT GAT GTC Asn Asn Met Pro Cys Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val	f_f_f_f_ANGI		f_f_f_f_f_f	
フィブリノゲン様ドメイン				
1540	1550	1560	1570	
AAT GGG GGA GGT TGG ACT ATA ATA CAA CAT CGT GAA GAT GGA AGT Asn Gly Gly Gly Tyr Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser-	f_f_f_f_ANGI		f_f_f_f_f_f	
フィブリノゲン様ドメイン				
1580	1590	1600	1610	1620
CTA GAT TTC CAA GAA GGC TGG AAG GAA TAT AAT AGT GGT TTT GGA Leu Asp Phe Ala Arg Gly Tyr Lys Lys Gly Tyr Lys Met Gly Phe Gly-	f_f_f_f_ANGI		f_f_f_f_f_f	
フィブリノゲン様ドメイン				
1630	1640	1650	1660	
AAT CCC TCG GGT GAA TAT TGG CTG GGG AAT GAG TAT ATT TTT GCC Asn Pro Ser Gly Gly Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala-	f_f_f_f_ANGI			

【図 4 A】

Fig.3E.

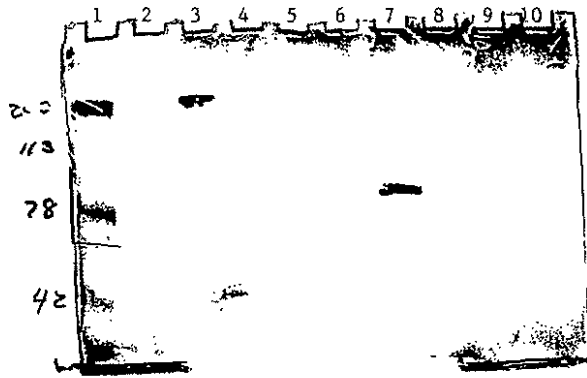
1670				1680				1690				1700				1710			
ATT	ACC	AGT	CAG	CAG	AGG	CAG	AGG	CAG	TAC	ATG	CTA	AGA	ATT	GAG	TTA	ATG	GCA		
Ile	Thr	Ser	Gln	Gln	Thr	Ser	Gln	Gln	Thr	Met	Leu	Ile	Glu	Leu	Met	Asp			
_f_e_f_e_ANG1				フィリノールゲン様ドメイン				_f_e_f_e_f_e_											
1720				1730				1740				1750							
TGG	GAA	GGG	AGC	GCA	GCC	ATT	TCA	CMA	TAT	GAC	AGA	TTC	CAC	ATA					
Trp	Glu	Gly	Asn	Arg	Ala	Tyr	Ser	Gln	Thr	Asp	Arg	Gly	His	Ile					
_f_e_f_e_ANG1				フィリノールゲン様ドメイン				_f_e_f_e_f_e_											
1760				1770				1780				1790				1800			
GGA	AAT	GAA	AGG	CAA	AAAT	ATC	AGG	TTG	TAT	TTA	AAA	GGT	CAC	ACT					
Gly	Asn	Glu	Lys	Gln	Asn	Tyr	Arg	Leu	Tyr	Leu	Lys	Gly	His	Thr					
_f_e_f_e_ANG1				フィリノールゲン様ドメイン				_f_e_f_e_f_e_											
1810				1820				1830				1840							
GGG	ACA	GCA	GCA	AAA	CAG	AGC	CTG	ATT	CTA	CAC	GGT	GCT	GAT						
Gly	Thr	Ala	Gly	Lys	Gln	Ser	Ser	Leu	Ile	Leu	His	Gly	Ala	Asp					
_f_e_f_e_ANG1				フィリノールゲン様ドメイン				_f_e_f_e_f_e_											
1850				1860				1870				1880				1890			
TTC	AGC	ACT	AAA	ATG	GCT	GAT	AAT	GAC	AAC	TGT	ATG	TGC	AAA	TGT					
Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Ala	Asn	Asn	Asp	Cys	Met	Cys	Lys	Cys						
_f_e_f_e_ANG1				フィリノールゲン様ドメイン				_f_e_f_e_f_e_											
1900				1910				1920				1930							
GCC	CTC	ATG	TTA	CTA	GGA	GGA	TGG	TGG	TTT	GAT	CCT	TGT	GGC	CCC					
Ala	Leu	Met	Leu	Thr	Gly	Gly	Gly	Trp	Trp	Phe	Ala	Cys	Gly	Pro					
_f_e_f_e_ANG1				フィリノールゲン様ドメイン				_f_e_f_e_f_e_											
1940				1950				1960				1970				1980			
TCC	AAT	CTA	AAT	GGA	ATG	TTG	TAT	ACT	GCG	GGA	CAA	CAC	CAT	GGA					
Ser	Asn	Leu	Asn	Gly	Met	Phe	Tyr	Thr	Ala	Gly	Gln	Asn	His	Gly					
_f_e_f_e_ANG1				フィリノールゲン様ドメイン				_f_e_f_e_f_e_											
1990				2000				2010				2020							
AAA	CTG	AAT	GGG	ATA	AAG	TGG	CAC	TAC	TCT	AAA	GGG	CCA	AGT	ATC					
Lys	Leu	Asn	Gly	Ile	Lys	Trp	His	Thr	Phe	Lys	Gly	Pro	Ser	Tyr					
_f_e_f_e_ANG1				フィリノールゲン様ドメイン				_f_e_f_e_f_e_											
2030				2040				2050				2060							
TCC	TTA	CGT	TCC	ACA	ACT	ATG	ATG	ATT	GCA	CCT	TTA	GAT	TTT						
Ser	Leu	Arg	Ser	Thr	Thr	Met	Met	Ile	Arg	Pro	Leu	Asp	Phe						
_f_e_f_e_ANG1				フィリノールゲン様ドメイン				_f_e_f_e_f_e_											

Fig.4A.

[illegible]

【図 5】

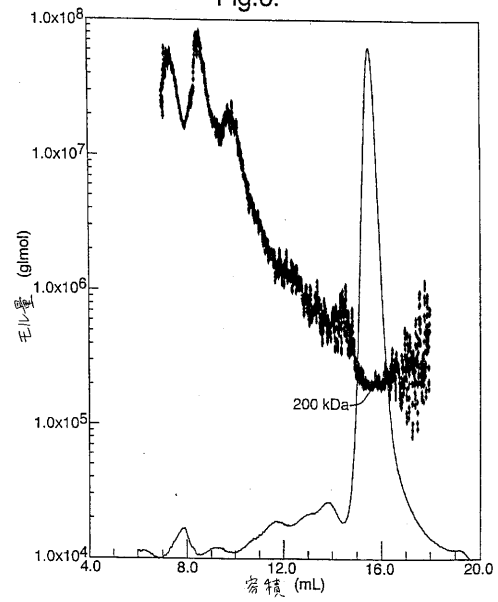
Figure 5



Ang1-FD-Fc-FD

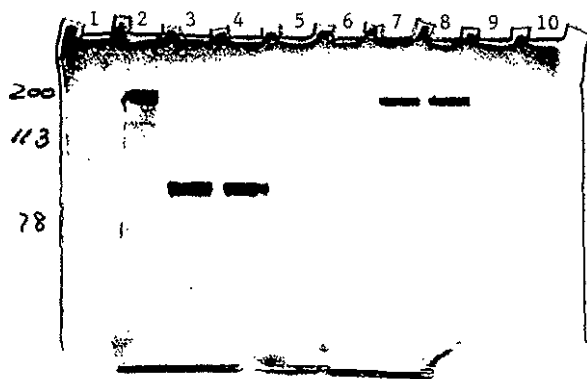
【図 6】

Fig.6.



【図 7】

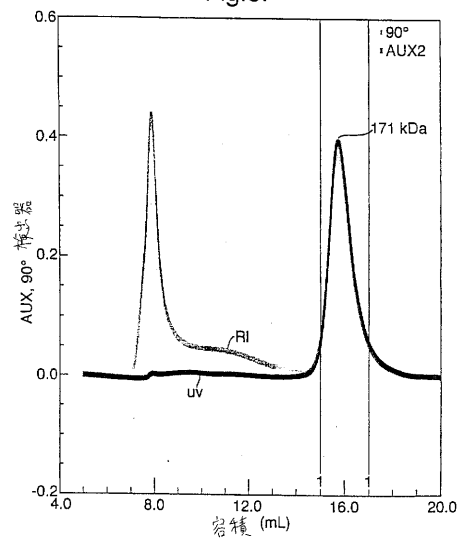
Figure 7



Ang2-FD-Fc-FD

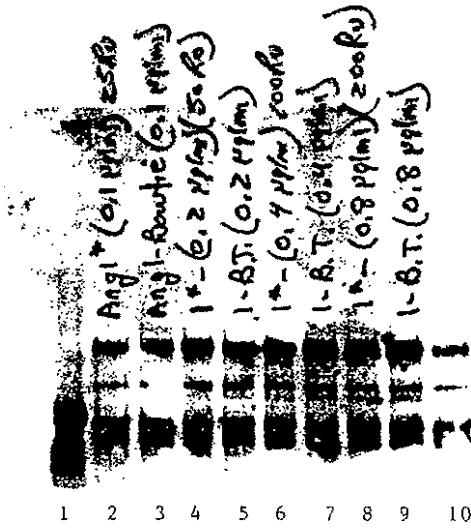
【図 8】

Fig.8.



【図 9】

Figure 9



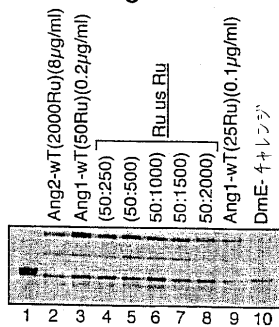
【図 12】

Fig.12.



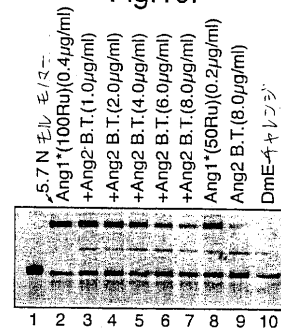
【図 13】

Fig.13.



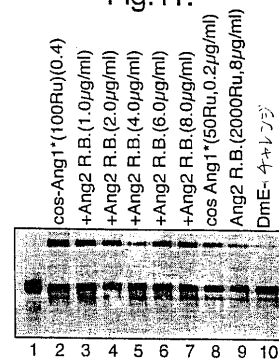
【図 10】

Fig.10.



【図 11】

Fig.11.



【図 14 A】

Fig.14A.

10	20	30	40	
ATG GCT CGG CCT GGG CAG CGT TGG CTC GGC AAG TGG CTT GTG GCG				
Met Ala Arg Pro Gly Gln Arg Trp Leu Gly Lys Trp Leu Val Ala>				
___a___a_ELK-L 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する)				___a___a___>
50	60	70	80	90
ATG GTC GTG TGG GCG CTG TGC CGG CTC GCC ACA CCG CTG GCC AAG				
Met Val Val Trp Ala Leu Cys Arg Leu Ala Thr Pro Leu Ala Lys>				
___a___a_ELK-L 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する)				___a___a___>
100	110	120	130	
AAC CTG GAG CCC GTA TCC TGG AGC TCC CTC AAC CCC AAG TTC CTG				
Asn Leu Glu Pro Val Ser Trp Ser Ser Leu Asn Pro Lys Phe Leu>				
___a___a_ELK-L 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する)				___a___a___>
140	150	160	170	180
AGT GGG AAG GGC TTG GTG ATC TAT CCG AAA ATT GGA GAC AAG CTG				
Ser Gly Lys Gly Leu Val Ile Tyr Pro Lys Ile Gly Asp Lys Leu>				
___a___a_ELK-L 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する)				___a___a___>
190	200	210	220	
GAC ATC ATC TGC CCC CGA GAA GCA GGG CGG CCC TAT GAG TAC				
Asp Ile Ile Cys Pro Arg Ala Glu Ala Gly Arg Pro Tyr Glu Tyr>				
___a___a_ELK-L 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する)				___a___a___>
230	240	250	260	270
TAC AAG CTG TAC CTG GTG CGG CCT GAG CAG GCA GCT GCC TGT AGC				
Tyr Lys Leu Tyr Leu Val Arg Pro Glu Gln Ala Ala Ala Cys Ser>				
___a___a_ELK-L 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する)				___a___a___>
280	290	300	310	
ACA GTT CTC GAC CCC AAC GTG TTG GTC ACC TGC AAT AGG CCA GAG				
Thr Val Leu Asp Pro Asn Val Leu Val Thr Cys Asn Arg Pro Glu>				
___a___a_ELK-L 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する)				___a___a___>
320	330	340	350	360
CAG GAA ATA CGC TTT ACC ATG AAC TTC CAG GAG TTC AGC CCC AAC				
Gln Glu Ile Arg Phe Thr Ile Lys Phe Gln Glu Phe Ser Pro Asp>				
___a___a_ELK-L 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する)				___a___a___>
370	380	390	400	
TAC ATG GGC CTG GAG TTC AAG AAG CAC CAT CAT TAC TAC ATT ACC				
Tyr Met Gly Leu Glu Phe Lys Lys His His Asp Tyr Tyr Ile Thr>				
___a___a_ELK-L 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する)				___a___a___>

【図 1 4 B】

Fig.14B.

410 420 430 440 450
TCA ACA TCC AAT GGA AGC CTG GAG GGG CTG GAA AAC CGG GAG GGC
Ser Thr Ser Asn Gly Ser Leu Glu Gly Leu Glu Asn Arg Glu Gly>
_a_a_ _ELK-L 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する) _a_a_a_>
460 470 480 490
GGT GTG TGC CGC ACA CGC ACC ATG AAG ATC ATC ATG AAG GTT GGG
Gly Val Cys Arg Thr Arg Thr Met Lys Ile Ile Met Lys Val Gly>
_a_a_ _ELK-L 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する) _a_a_a_>
500 510 520 530 540
CAA GAT CCC AAT GCT GTG AGC CCT GAG CAG CTG ACT ACC AGC AGS
Gln Asp Pro Asn Ala Val Thr Pro Glu Gln Leu Thr Thr Ser Arg>
_a_a_ _ELK-L 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する) _a_a_a_>
550 560 570 580
CCC AGC AAG GAG GCA GAC AAC ACT GTC AAG ATG GCC ACA CAG GCC
Pro Ser Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Lys Met Ala Thr Gln Ala>
_a_a_ _ELK-L 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する) _a_a_a_>
590 600 610 620 630
CCT GGT AGT CGG GGC TCC CTG GGT GAC TCT GAT GGC AAG CAT GAG
Pro Gly Ser Arg Gly Ser Leu Gly Asp Ser Asp Gly Lys His Glu>
_a_a_ _ELK-L 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する) _a_a_a_>
640 650 660 670
ACT GTG AAC CAG GAA GAG AAG AGT GGC CCA GGT ACA AGT GGG GGC
Thr Val Asn Gln Glu Glu Lys Ser Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gly>
_a_a_ _ELK-L 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する) _a_a_a_>
680 690 700 710 720
AGC AGC GGG GAC CCT GAT GGC TTC TAC AAC TCC AAC GGC CCG GGT
Ser Ser Gly Asp Pro Asp Gly Phe Phe Asn Ser Lys>
_ELK-L 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する) _b_b_b_>
Gly Pro Gly>
730 740 750 760
AAG AAC CTG GAG CCC GTA TCC TGG AGC TCC CTC AAC CCC AAG TTC
Lys Asn Leu Glu Pro Val Ser Trp Ser Ser Leu Asn Pro Lys Phe>
_c_c_c_ _ELK-L 外部ドメイン2 (シグナルなし) _c_c_c_c_>
770 780 790 800 810
CTG ACT GGG AAG GGC TTG GTG ATC TAT CCG AAA ATT GGA GAC AAG
Leu Ser Gly Lys Gly Leu Val Ile Tyr Pro Lys Ile Gly Asp Lys>
_c_c_c_c_ _ELK-L 外部ドメイン2 (シグナルなし) _c_c_c_c_>

【図 1 4 D】

Fig.14D.

1270 1280 1290 1300
GAG ACT GTG AAC CAG GAA GAG AAG AGT GGC CCA GGT GCA AGT GGG
Glu Thr Val Asn Gln Glu Glu Lys Ser Gly Pro Gly Ala Ser Gly>
_c_c_c_c_ _ELK-L 外部ドメイン2 (シグナルなし) _c_c_c_c_>
1310 1320 1330 1340 1350
GGC AGC AGC GGG GAC CCT GAT GGC TTC TAC AAC TCC AAA GGC CCG
Gly Ser Ser Gly Asp Pro Asp Gly Phe Phe Asn Ser Lys>
_c_c_c_ _ELK-L 外部ドメイン2 (シグナルなし) _c_c_c_>
Gly Pro>
_c_c_d_>
1360 1370 1380 1390
GGC GAG CCC AAA TCT TGT GAT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC
Gly>
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys>
_e_e_e_e_e_e_ ヒト IGGL FC TAG _e_e_e_e_e_e_>
1400 1410 1420 1430 1440
CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro>
_e_e_e_e_e_e_ ヒト IGGL FC TAG _e_e_e_e_e_e_>
1450 1460 1470 1480
CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CCG ACC CCT GAG GTC
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val>
_e_e_e_e_e_e_ ヒト IGGL FC TAG _e_e_e_e_e_e_>
1490 1500 1510 1520 1530
ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG
Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys>
_e_e_e_e_e_e_ ヒト IGGL FC TAG _e_e_e_e_e_e_>
1540 1550 1560 1570
TTC AAC TGC TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr>
_e_e_e_e_e_e_ ヒト IGGL FC TAG _e_e_e_e_e_e_>
1580 1590 1600 1610 1620
AAG CCG CCG GAG GAG CAG TAC AAC AGC AGC TAC CCT GTG GTC AGC
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser>
_e_e_e_e_e_e_ ヒト IGGL FC TAG _e_e_e_e_e_e_>
1630 1640 1650 1660
GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr>
_e_e_e_e_e_e_ ヒト IGGL FC TAG _e_e_e_e_e_e_>

【図 1 4 C】

Fig.14C.

820 830 840 850
CTG GAC ATC ATC TGC CCC CGA GCA GAA GCA GGG CGC CCC TAT GAG
Leu Asp Ile Ile Cys Pro Arg Ala Glu Ala Gly Arg Pro Tyr Glu>
_c_c_c_c_ _ELK-L 外部ドメイン2 (シグナルなし) _c_c_c_c_>
860 870 880 890 900
TAC TAC AAG CTG TAC CTG GTG CCG CCT GAG CAG GCA GCT GCC TGT
Tyr Tyr Lys Leu Tyr Leu Val Arg Pro Glu Gln Ala Ala Cys>
_c_c_c_c_ _ELK-L 外部ドメイン2 (シグナルなし) _c_c_c_c_>
910 920 930 940
AGC ACA GTT CTC GAC CCC AAC GTG TTG GTC ACC TGC AAT AGG CCA
Ser Thr Val Leu Asp Pro Asn Val Leu Val Thr Cys Asn Arg Pro>
_c_c_c_c_ _ELK-L 外部ドメイン2 (シグナルなし) _c_c_c_c_>
950 960 970 980 990
GAG CAG GAA ATA CCG TTT ACC ATC AAG TTC CAG GAG TTC AGC CCC
Glu Gln Glu Ile Arg Phe Thr Ile Lys Phe Gln Glu Phe Ser Pro>
_c_c_c_c_ _ELK-L 外部ドメイン2 (シグナルなし) _c_c_c_c_>
1000 1010 1020 1030
AAC TAC ATG GGC CTG GAG TTC AAG AAG CAC CAT GAT TAC ATT
Asn Tyr Met Gly Leu Glu Phe Lys Lys His Asp Tyr Tyr Ile>
_c_c_c_c_ _ELK-L 外部ドメイン2 (シグナルなし) _c_c_c_c_>
1040 1050 1060 1070 1080
ACC TCA ACA TCC AAT GGA AGC CTG GAG GGG CTG GAA AAC CCG GAG
Thr Ser Thr Ser Asn Gly Ser Leu Glu Gly Leu Glu Asn Arg Glu>
_c_c_c_c_ _ELK-L 外部ドメイン2 (シグナルなし) _c_c_c_c_>
1090 1100 1110 1120
GGC GGT GTG TGC CGC ACA CGC ACC ATG AAG ATC ATC ATG AAG GTT
Gly Gly Val Cys Arg Thr Arg Thr Met Lys Ile Ile Met Lys Val>
_c_c_c_c_ _ELK-L 外部ドメイン2 (シグナルなし) _c_c_c_c_>
1130 1140 1150 1160 1170
GGG CAA GAT CCC AAT GCT GTG ACG CCT GAG CAG CTG ACT ACC AGC
Gly Gln Asp Pro Asn Ala Val Thr Pro Glu Gln Leu Thr Thr Ser>
_c_c_c_c_ _ELK-L 外部ドメイン2 (シグナルなし) _c_c_c_c_>
1180 1190 1200 1210
AGG CCC AGC AAG GAG GCA GAC AAC ACT GTC AAG ATG GCC ACA CAG
Arg Pro Ser Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Lys Met Ala Thr Glu>
_c_c_c_c_ _ELK-L 外部ドメイン2 (シグナルなし) _c_c_c_c_>
1220 1230 1240 1250 1260
GCC CCT GGT AGT GGC GGC TCC CTG GGT GAC TCT GAT GGC AAG CAT
Ala Pro Gly Ser Arg Gly Ser Leu Gly Asp Ser Asp Gly Lys His>
_c_c_c_c_ _ELK-L 外部ドメイン2 (シグナルなし) _c_c_c_c_>

【図 1 4 E】

Fig.14E.

1670 1680 1690 1700 1710
AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATG GAC AAA
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys>
_e_e_e_e_e_e_ ヒト IGGL FC TAG _e_e_e_e_e_e_>
1720 1730 1740 1750
ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr>
_e_e_e_e_e_e_ ヒト IGGL FC TAG _e_e_e_e_e_e_>
1760 1770 1780 1790 1800
ACC CTG CCC CCA TCC CCG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser>
_e_e_e_e_e_e_ ヒト IGGL FC TAG _e_e_e_e_e_e_>
1810 1820 1830 1840
CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val>
_e_e_e_e_e_e_ ヒト IGGL FC TAG _e_e_e_e_e_e_>
1850 1860 1870 1880 1890
GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr>
_e_e_e_e_e_e_ ヒト IGGL FC TAG _e_e_e_e_e_e_>
1900 1910 1920 1930
CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC CTC TAC AGC AAG
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys>
_e_e_e_e_e_e_ ヒト IGGL FC TAG _e_e_e_e_e_e_>
1940 1950 1960 1970 1980
CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC CTC TTC TCA
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser>
_e_e_e_e_e_e_ ヒト IGGL FC TAG _e_e_e_e_e_e_>
1990 2000 2010 2020
TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACC CAG AAG
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys>
_e_e_e_e_e_e_ ヒト IGGL FC TAG _e_e_e_e_e_e_>
2030 2040 2050
AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>
_e_e_e_e_e_e_ ヒト IGGL FC TAG _e_e_e_e_e_e_>

【図 15 B】

Fig.15B.

410	420	430	440	450
TAC ATT ATA TCC TCA TCA AAG GGG TCT TTG GAG GGC GTG GAT AAC				
Thr Ile Ile Ser Thr Ser Asn Gly Ser Ser Leu Asp Gly Leu Asp Asn				
a EPHRIN-B2 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する)				
460	470	480	490	
CAG GAG GGA GGG GTG TGC CAG ACA GCC ATT GAG AAT ATC CTC ATG				
Gln Glu Gly Gly Val Cys Gln Thr Arg Ala Met Leu Ile Leu Met				
a EPHRIN-B2 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する)				
500	510	520	530	540
AAA GTT GCA CAA GAT GCA AGT TCT GCT GGA TCA CGC AGG AAT CAC				
Lys Val Gly Gln Asp Ala Ser Thr Ser Ala Gly Ser Ala Arg Asn His				
a EPHRIN-B2 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する)				
550	560	570	580	
GGT CCA ACA CAA GGT CCA GAG CTA GGA GCT GGT TCA AAT GGG AGA				
Gly Pro Thr Arg Arg Arg Pro Glu Leu Glu Ala Gly Thr Asn Gly Arg				
a EPHRIN-B2 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する)				
590	600	610	620	630
AGT TCA ACT AGT CCC TTG GAG ACA AAT CCA GAT CCA GCT TCT AGC				
Ser Ser Thr Thr Ser Thr Phe Val Lys Pro Asn Pro Gly Ser Ser				
a EPHRIN-B2 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する)				
640	650	660	670	
ACC GAT GCG AAC AGC GGG GGG CAT TCC GGG AAC ATT CTC CTC GGG				
Thr Asp Gly Asn Ser Ala Gly His Ser Gly Asn Asn Leu Leu Gly				
a EPHRIN-B2 外部ドメイン1 (シグナルペプチドを有する)				
680	690	700	710	720
GGC CCC GGA ATA GTT TTA GAG CCT ACT TAC TGG AAT TCC TCG AAC				
Gly Pro Gly				
b _b_				
Ile Val Leu Glu Pro Ile Tyr Trp Asn Ser Ser Asn				
a EPHRIN-B2 外部ドメイン2 (シグナルペプチドを有さない)				
730	740	750	760	
TCC AAA TTT TTA CCC GGA CAA GGC CTC GTA CTA TAC CCA CAG ATA				
Ser Lys Phe Leu Pro Gly Gln Gly Leu Val Lys Asp Ser Lys Thr				
a EPHRIN-B2 外部ドメイン2 (シグナルペプチドを有さない)				
770	780	790	800	810
GGA GCA AAA TTG GAT ATT ATT TCT CCC CCA AAA GTG CAG TCT AAA ACT				
Gly Asp Lys Leu Asp Asp Ile Ile Cys Pro Lys Val Asp Ser Lys Thr				
a EPHRIN-B2 外部ドメイン2 (シグナルペプチドを有さない)				

【図 15 D】

Fig 15D

5D. 1270 1280 1290 1300

CTC CTG GGG G GC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
_ _ _ _ _
_ _ _ _ _

Gly Pro Gly
_d_d_d_d_

Leu Leu Gly Xxx
_e_e_e_e_

1310 1320 1330 1340 1350

ACA TGC CCA CCG TCG CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CGG TCA
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
_ _ _ _ _
_ _ _ _ _

1360 1370 1380 1390

GTC TCT CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
_ _ _ _ _
_ _ _ _ _

1400 1410 1420 1430 1440

CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
_ _ _ _ _
_ _ _ _ _

1450 1460 1470 1480

GAC CCT GAG GAG GAG TTC AAC TGG TAT GTC GAC GGC GTG GAG GTG
Asp Cys Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
_ _ _ _ _
_ _ _ _ _

1490 1500 1510 1520 1530

CAT AAT GCC AAG ACA AAG AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
_ _ _ _ _
_ _ _ _ _

1540 1550 1560 1570

TAC CTG GTG GTG GGC GTC CTC ACC TGC CTC CAC GAC GAC TGG CTG
Tyr Arg Val Val Ser Val Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
_ _ _ _ _
_ _ _ _ _

1580 1590 1600 1610 1620

AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAA ACC AAA GCC CTC CCA
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
_ _ _ _ _
_ _ _ _ _

1630 1640 1650 1660

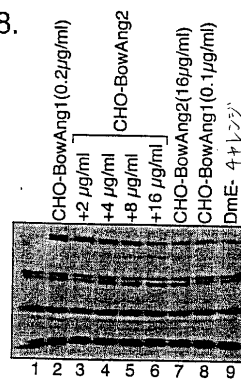
CCC CCC ATC GAC AAA ACC ATC TCC AAA CGC AAA GGG CAC CCC CGA
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Pro Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
_ _ _ _ _
_ _ _ _ _

【図 1 6】

Fig.15E.

【图 18】

Fig.18.



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 1/21 (2006.01) C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 1/19 (2006.01) C 1 2 N 1/19

(72)発明者 ゲイル, ニコラス ダブリュー.
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1, タリィタウン, ホワイト プレインズ ロード
1 7 7, アパートメント 4 6 ブィ

(72)発明者 ヤンコパウロス, ジョージ ディー.
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 8, ヨークタウン ハイツ, パプティスト チャー
チ ロード 1 5 1 9

(72)発明者 スタール, ニール
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 1 2, カーメル, ケント ショア ドライブ, アー
ルディ ナンバー 1 0

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 国際公開第 9 6 / 0 3 7 6 2 1 (WO, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
C12N 15/09