



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102225194 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 16

(21) 申请号 201110162095. 3

A61P 25/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2004. 03. 12

A61P 27/02 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 29/00 (2006. 01)

60/454, 462 2003. 03. 12 US

A61P 35/02 (2006. 01)

60/511, 390 2003. 10. 14 US

A61P 37/02 (2006. 01)

A61P 37/06 (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

A61P 43/00 (2006. 01)

200480013161. 9 2004. 03. 12

(73) 专利权人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(56) 对比文件

WO 0200711 A2, 2002. 01. 03, 权利要求 6.

(72) 发明人 纳波利昂·费拉拉 珍妮弗·莱库特

JENNIFER LECOUTER 等. Endocrine gland - derived VEGF and the emerging hypothesis of organ-specific regulation of angiogenesis. 《NATURE MEDICINE》. 2002, 第 8 卷 (第 9 期), 第 913-917 页.

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张红春

Christian Wechselberger 等. The mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes. 《FEBS Letters》. 1999, 第 462 卷第 177-181 页.

(51) Int. Cl.

A61K 38/17 (2006. 01)

A61K 38/18 (2006. 01)

A61K 31/7105 (2006. 01)

A61P 1/00 (2006. 01)

A61P 1/16 (2006. 01)

A61P 3/10 (2006. 01)

A61P 7/00 (2006. 01)

A61P 7/06 (2006. 01)

A61P 17/06 (2006. 01)

A61P 21/04 (2006. 01)

A61P 31/00 (2006. 01)

A61P 31/18 (2006. 01)

A61P 19/02 (2006. 01)

Jennifer LeCouter 等. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. 《NATURE》. 2001, 第 412 卷第 877-884 页.

审查员 代月函

权利要求书2页 说明书62页

序列表14页 附图26页

(54) 发明名称

Bv8 和 / 或 EG-VEGF 促进造血的用途

(57) 摘要

本发明提供了利用 Bv8 和 EG-VEGF 多肽及核酸促进造血的方法。还提供了筛选 Bv8 和 EG-VEGF 活性的调解物的方法。此外, 提供了利用 Bv8 和 EG-VEGF 多肽或 Bv8 和 EG-VEGF 拮抗剂的治疗方法。

1. (i)Bv8 多肽, (ii) 编码 Bv8 多肽的多核苷酸, (iii)Bv8 多肽和 EG-VEGF 多肽, 或 (iv) 编码 Bv8 多肽的多核苷酸和编码 EG-VEGF 多肽的多核苷酸, 在制备用于在受试者中诱导淋巴系祖细胞 (lymphoid lineage progenitor cell) 及其子代的增殖的药物中的用途, 其中所述子代是淋巴样前体细胞或淋巴细胞。

2. 权利要求 1 的用途, 其中所述子代是 B 细胞或 T 细胞。

3. 权利要求 2 的用途, 其中所述 T 细胞是 CD4+T 细胞。

4. 权利要求 1 的用途, 其中所述受试者具有淋巴细胞减少症。

5. 权利要求 1 的用途, 其中所述受试者具有嗜中性粒细胞减少症。

6. 权利要求 1 的用途, 其中所述受试者具有单核细胞减少症。

7. 权利要求 1 的用途, 其中所述受试者具有粒细胞减少症。

8. (i)Bv8 多肽, (ii) 编码 Bv8 多肽的多核苷酸, (iii)Bv8 多肽和 EG-VEGF 多肽, 或 (iv) 编码 Bv8 多肽的多核苷酸和编码 EG-VEGF 多肽的多核苷酸, 在制备用于治疗受试者中嗜中性粒细胞减少症的药物中的用途。

9. (i)Bv8 多肽, (ii) 编码 Bv8 多肽的多核苷酸, (iii)Bv8 多肽和 EG-VEGF 多肽, 或 (iv) 编码 Bv8 多肽的多核苷酸和编码 EG-VEGF 多肽的多核苷酸, 在制备用于治疗受试者中淋巴细胞减少症的药物中的用途。

10. (i)Bv8 多肽, (ii) 编码 Bv8 多肽的多核苷酸, (iii)Bv8 多肽和 EG-VEGF 多肽, 或 (iv) 编码 Bv8 多肽的多核苷酸和编码 EG-VEGF 多肽的多核苷酸, 在制备用于治疗受试者中的药物中单核细胞减少症的用途。

11. (i)Bv8 多肽, (ii) 编码 Bv8 多肽的多核苷酸, (iii)Bv8 多肽和 EG-VEGF 多肽, 或 (iv) 编码 Bv8 多肽的多核苷酸和编码 EG-VEGF 多肽的多核苷酸, 在制备用于治疗受试者中粒细胞减少症的药物中的用途。

12. (i)Bv8 多肽, (ii) 编码 Bv8 多肽的多核苷酸, (iii)Bv8 多肽和 EG-VEGF 多肽, 或 (iv) 编码 Bv8 多肽的多核苷酸和编码 EG-VEGF 多肽的多核苷酸, 在制备用于在用免疫抑制剂或化疗治疗后在受试者中增加白细胞群体的药物中的用途。

13. 权利要求 12 的用途, 其中所述白细胞包括 B 细胞、T 细胞或嗜中性粒细胞。

14. 权利要求 12 的用途, 其中所述的化疗包括利用 5- 氟尿嘧啶, 长春新碱, 顺铂, oxoplatin, 甲氨喋呤, 3'- 叠氮基 -3'- 脱氧胸苷, 紫杉醇, 紫杉萜, 蒽环类抗生素, 或其混合物进行的治疗。

15. (i)Bv8 多肽, (ii) 编码 Bv8 多肽的多核苷酸, (iii)Bv8 多肽和 EG-VEGF 多肽, 或 (iv) 编码 Bv8 多肽的多核苷酸和编码 EG-VEGF 多肽的多核苷酸, 在制备用于调节 B 细胞或 T 细胞增殖或活化或 CD4+ 细胞中细胞因子产生的药物中的用途。

16. 权利要求 15 的用途, 其中所述 T 细胞是 CD4+T 细胞或 CD8+T 细胞。

17. 权利要求 1 - 16 之一的用途, 其中所述 Bv8 多肽由 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列组成。

18. 权利要求 1-16 之一的用途, 其中所述 Bv8 多肽是天然 Bv8 多肽。

19. 权利要求 18 的用途, 其中所述 Bv8 多肽是天然人 Bv8 多肽。

20. 权利要求 1-16 之一的用途, 其中所述 Bv8 多肽结合肝素。

21. 权利要求 1-16 之一的用途, 其中所述 Bv8 多肽包含融合多肽, 嵌合多肽或免疫粘附

素。

22. 权利要求 1 — 16 之一的用途,其中编码 Bv8 多肽的多核苷酸由以下核酸序列组成: SEQ ID NO:1 的核酸位置 11 到核酸位置 400,SEQ ID NO:3 的核酸位置 11 到核酸位置 396,或 SEQ ID NO:5 的核酸位置 46 到核酸位置 384。

23. 权利要求 1-16 之一的用途,其中所述 EG-VEGF 多肽是天然 EG-VEGF 多肽。

24. 权利要求 23 的用途,其中所述 EG-VEGF 多肽是天然人 EG-VEGF 多肽。

25. 权利要求 1 — 16 之一的用途,其中所述 EG-VEGF 多肽由 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列或 SEQ ID NO:8 的氨基酸残基 20 — 105 组成。

26. 权利要求 1-16 之一的用途,其中所述 EG-VEGF 多肽包含融合多肽,嵌合多肽或免疫粘附素。

27. 权利要求 1 — 16 之一的用途,其中编码 EG-VEGF 多肽的多核苷酸由 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:9 的核酸序列组成。

28. 权利要求 1 和 8-12 之一的用途,其中所述受试者是人。

29. 一种制品,其包括:

容器;

(i)Bv8 多肽和 EG-VEGF 多肽,或(ii)编码 Bv8 多肽的多核苷酸和编码 EG-VEGF 多肽的多核苷酸;以及

使用 Bv8 多肽,编码 Bv8 多肽的多核苷酸,EG-VEGF 多肽,编码 EG-VEGF 多肽的多核苷酸,或其组合治疗免疫缺陷疾病的说明。

Bv8 和 / 或 EG-VEGF 促进造血的用途

[0001] 本申请是申请号为 200480013161.9, 申请日为 2004 年 3 月 12 日, 发明名称为“Bv8 和 / 或 EG-VEGF 促进造血的用途”的专利申请的分案申请。

[0002] GENENTECH, INC 等, 美国国民或居民, 提交该 PCT 申请, 要求 2003 年 3 月 12 日提交的美国临时申请 60/454,462 和 2003 年 10 月 14 日提交的美国临时申请 60/511,390 的优先权。

背景技术

[0003] Bv8 是一种小分子蛋白, 它最初是从青蛙 *Bombina variegata* 的皮肤分泌物中分离得到的 (Mollay 等 *Eur. J. Pharmacol.* 374:189-196(1999))。 (Mollay et al., *Eur. J. P/ MMco.*, 374:189-196(1999))。 Bv8 属于包括内分泌腺来源的血管内皮生长因子 (EG-VEGF) 在内的结构关联肽种类 (LeCouter et al., *nature*, 412:877-884(2001))。 这些分子的明显不同的结构基序是辅脂肪酶-折叠, 其中 10 个半胱氨酸残基在保守区 (conserved span) 内形成 5 个二硫桥。

[0004] Bv8 和 EG-VEGF 是血管内皮生长因子 (VEGF) 同系物, VEGF 是已知在肿瘤生长和存活中有重要作用的血管生成因子。 Bv8 和 EG-VEGF 都被鉴定为对特定组织的内皮细胞具有选择性活性的血管生成因子。 EG-VEGF 促进培养的肾上腺毛细血管内皮细胞的增殖, 迁移, 存活以及排列 (fenestration) 并诱导卵巢和睾丸中的血管生成。 LeCouter et al., 2001, *Nature*, 412:877-884; LeCouter et al., 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:2685-2690。

[0005] 和 EG-VEGF 一样, Bv8 促进肾上腺皮质毛细血管内皮细胞的增殖, 存活和迁移, 并诱导睾丸中的血管生成。 LeCouter et al., 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:2685-2690。 睾丸显示相对较高的内皮细胞更新率。 因此, Bv8 和 EG-VEGF 以及其它因子诸如 VEGF 被认为在睾丸血管的完整性保持及其增殖调节中有重要作用。

[0006] VEGF 是已知在肿瘤生长和存活中具有重要作用的血管生成因子。 由于 Bv8 和 EG-VEGF 是对特定组织具有选择性活性的血管生成因子, 还需要对所述分子进行进一步的表征。

发明内容

[0007] 本发明基于对 Bv8 和 EG-VEGF 在造血干细胞 (HSC), 系定向型血液祖细胞 (lineage-committed blood progenitor cell) 以及淋巴细胞中的新的表达和活性的鉴定。 具体如本文所述, Bv8, EG-VEGF, 及其受体表达于骨髓 HSC, 外周血白细胞 (PBL), 以及许多血液恶性细胞系中。 体外和体内试验显示 Bv8 和 EG-VEGF 能够促进骨髓单个核细胞以及脾来源的祖细胞的集落形成, 增加血白细胞的群体, 并促进 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的活化。 因此, Bv8 核酸和多肽, EG-VEGF 核酸和多肽, 或其组合可用于多种分析以及造血相关疾病、嗜中性粒细胞减少症 (neutropenia)、免疫缺陷疾病以及自身免疫病的诊断和治疗中。

[0008] Bv8 和 EG-VEGF 的受体见于骨髓造血干细胞 (CD34+) 和系定向型祖细胞 (CD34+)。 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 诱导 CD34+ 髓样 (myeloid) 及淋巴样 (lymphoid) 祖细胞的增殖。 该增殖

导致白细胞数目增加,所述白细胞包括B细胞,T细胞,具体是嗜中性粒细胞。BV8,EG-VEGF,及其激动剂可用于治疗,例如用于免疫缺陷疾病的治疗中,所述免疫缺陷疾病诸如淋巴细胞减少症,嗜中性粒细胞减少症等。这些分子也可用于促进骨髓抑制,例如化疗诱导的骨髓抑制之后的造血恢复。

[0009] 现在发现各种白血病细胞,诸如 ALL, AML, MPD, CML 以及 MDS 细胞表达 BV8 和 EG-VEGF 的受体。生长因子 BV8 和 / 或 EG-VEGF 的拮抗剂对抑制这些白血病细胞的增殖有用。

[0010] 令人吃惊的发现是, BV8 和 / 或 EG-VEGF 也诱导 B 和 T 细胞活化。这些分子的激动剂和拮抗剂可治疗性地用于调节免疫反应。Bv8, EG-VEGF, 及其激动剂可用于并诱导免疫受损的个体例如 HIV 患者中的 T 细胞增殖及活化。这些分子的拮抗剂可治疗性地用于抑制免疫反应,例如与自身免疫病相关的免疫反应。

[0011] 骨髓细胞的增殖

[0012] 一方面,本发明提供诱导骨髓细胞增殖的方法。一个实施方案中,所述方法包括使 BM 细胞与细胞增殖诱导有效量的 Bv8, EG-VEGF, 或其组合接触。另一实施方案中,所述方法包括将编码 Bv8, EG-VEGF, 或其组合的多核苷酸序列导入 BM 细胞,所述多核苷酸序列的量可有效诱导 BM 细胞增殖。

[0013] 在一个实施方案中, Bv8 和 / 或 EG-VEGF 是天然序列 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 多肽。优选天然序列 Bv8 多肽是天然人 Bv8 多肽。天然人 Bv8 多肽可包含氨基酸序列 SEQ ID NO :2 或氨基酸序列 SEQ ID NO :4。在另一实施方案中,天然序列 Bv8 包含氨基酸序列 SEQ ID NO :6。在另一实施方案中, Bv8 能与肝素结合。优选,天然序列 EG-VEGF 多肽是天然人 EG-VEGF 多肽。天然人 EG-VEGF 多肽可包含氨基酸序列 SEQ ID NO :8。在另一实施方案中,天然序列 EG-VEGF 包含氨基酸序列 SEQ ID NO :10。在另一实施方案中, Bv8 和 / 或 EG-VEGF 是免疫粘附素。在另一实施方案中, Bv8 和 / 或 EG-VEGF 是嵌合的。

[0014] 在一个实施方案中, Bv8/EG-VEGF 促进 BM 造血干细胞和 / 或系定向型祖细胞的增殖。所述系定向型祖细胞通常是髓系和 / 或淋巴系。

[0015] 在另一方面,本发明提供了在需要具体血细胞群的患者中维持所述细胞群的方法。在一个实施方案中,所述方法包括使所述细胞与能够有效促进所述细胞增殖的量的 Bv8, EG-VEGF, 或其组合接触,从而维持其群体。在另一个实施方案中,所述方法包括将编码 Bv8, EG-VEGF, 或其组合的多核苷酸序列引入所述细胞,所述多核苷酸的量能有效促进细胞存活。所述方法还包括将编码 VEGF 的核酸引入所述细胞中。一方面,所需具体细胞类型是白细胞,优选嗜中性粒细胞, B 淋巴细胞, CD4+T 淋巴细胞, 和 / 或 CD8+T 淋巴细胞。另一方面,所述患者患有嗜中性粒细胞减少症,淋巴细胞减少症 (lymphopenia), 或免疫缺陷疾病,并因此需要嗜中性粒细胞, B 淋巴细胞, CD4+T 淋巴细胞, 和 / 或 CD8+T 淋巴细胞。

[0016] 异常造血的治疗

[0017] 另一方面,本发明提供治疗哺乳动物中与异常造血相关的疾病的方法。一个实施方案中,所述方法优选包括将包含 Bv8, EG-VEGF, 或其组合,或其激动剂或拮抗剂的组合物给药哺乳动物,所述组合物的量足以治疗所述疾病。所述哺乳动物优选人。

[0018] 一方面,本发明任意方法中所用包含 Bv8, EG-VEGF, 或其组合的组合物包含天然序列 Bv8 多肽和 / 或天然序列 EG-VEGF 多肽。优选,所述天然序列 Bv8 多肽是天然人 Bv8 多

肽。天然人 Bv8 多肽可包含氨基酸序列 SEQ ID NO :2 或氨基酸序列 SEQ ID NO :4。另一个实施方案中,天然序列 Bv8 包含氨基酸序列 SEQ ID NO :6。另一个实施方案中,Bv8 多肽与肝素结合。优选,天然序列 EG-VEGF 多肽是天然人 EG-VEGF 多肽。天然人 EG-VEGF 多肽可包含氨基酸序列 SEQ ID NO :8。另一个实施方案中,天然序列 EG-VEGF 包含氨基酸序列 SEQ ID NO :10。

[0019] 血液疾病的治疗

[0020] 另一方面,本发明提供治疗哺乳动物优选人中的血液疾病的方法。一个实施方案中,所述方法包括将细胞增殖抑制有效量的 Bv8 拮抗剂,EG-VEGF 拮抗剂,或其组合给药哺乳动物。一个实施方案中,可用本发明方法治疗的血液疾病包括各种白血病,骨髓增生性疾病,骨髓发育不良性疾病,淋巴组织增生性疾病,和淋巴组织发育不良性疾病。优选,所述血液疾病选自急性髓性白血病 (acute myeloid leukemia) (AML),慢性髓性白血病 (chronic myelogenous leukemia) (CML),急性淋巴母细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia) (ALL),多发性骨髓瘤 (multiple myeloma),T-细胞淋巴瘤 (T-cell lymphoma),真性红血球增多症 (polycythaemia vera) (PV),原发性血小板增多症 (essential thrombocythaemia) (ET),和骨髓外化生 (myeloid metaplasia) (骨髓纤维化 (myelofibrosis)) 等。

[0021] 免疫疾病的治疗

[0022] 本发明另一方面提供通过给药 Bv8, EG-VEGF,或其组合治疗哺乳动物优选人中的免疫缺陷疾病的方法。患有免疫缺陷疾病的患者缺乏 B 和 T 淋巴细胞,并需要增加的 B 淋巴细胞和 / 或 T 淋巴细胞群体。可提供 Bv8, EG-VEGF,或其组合以增加 B 和 T 细胞群体。所述免疫缺陷疾病可以是原发或继发的。一个实施方案中,继发性免疫缺陷疾病是与感染性疾病 (包括人免疫缺陷病毒 (HIV) 或肝炎) 相关的疾病。另一个实施方案中,所述免疫缺陷疾病是与给药免疫抑制剂相关的疾病,诸如具有继发性免疫抑制效应的治疗剂,所述治疗剂包括但不限于,5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil),长春新碱 (vincristine),顺铂 (cisplatin),oxoplatin,甲氨喋呤 (methotrexate),3' - 叠氮基 (azido)-3' - 脱氧胸苷 (deoxythymidine),紫杉醇 (paclitaxel),紫杉萜 (doxetaxel),蒽环类抗生素 (anthracycline antibiotic),或其混合物。

[0023] 本发明另一方面提供治疗哺乳动物优选人中的免疫缺陷疾病的方法。Bv8 拮抗剂,EG-VEGF 拮抗剂,或其组合,可用于治疗自身免疫病,其中活化的 B 细胞,CD4+T 细胞,和 / 或 CD8+T 细胞的数目减少是所需的。具体实施方案包括利用本发明提供的药剂和组合物治疗自身免疫病相关的 II,III,和 IV 型超敏反应。一个实施方案中,所述方法包含将自身免疫疾病抑制有效量的 Bv8 拮抗剂,EG-VEGF 拮抗剂,或其组合给药哺乳动物。另一个实施方案中,所述方法包括将 Bv8 拮抗剂,EG-VEGF 拮抗剂,或其组合给药患者,所述药剂的量可有效抑制 CD4+ 淋巴细胞和 / 或 CD8+T 淋巴细胞的增殖。

[0024] 免疫反应的调节

[0025] 本发明另一方面提供调节免疫反应的方法。可给药 Bv8,EG-VEGF,或其组合,或其激动剂来活化 B 淋巴细胞,CD4+T 淋巴细胞,和 / 或 CD8+T 淋巴细胞。一个实施方案中,可给药 Bv8, EG-VEGF,或其组合,或其激动剂来选择性促进或抑制 CD4+T 淋巴细胞和 / 或 CD8+T 淋巴细胞的增殖。

[0026] Bv8 和 EG-VEGF 诱导 CD4+T 淋巴细胞和 CD8+T 淋巴细胞中的细胞因子产生。一个

实施方案中,诱导 CD4+T 淋巴细胞中的 IL-2 合成的 Bv8,EG-VEGF,其激动剂,或其组合可用于诱导 CD4+ 淋巴细胞的增殖。另一个实施方案中,可给药诱导 CD4+T 淋巴细胞中的 IFN- γ 的 Bv8,EG-VEGF,其激动剂,或其组合来抑制 CD4+T 淋巴细胞的增殖。

[0027] 拮抗剂

[0028] 本发明所用 Bv8 拮抗剂和 EG-VEGF 拮抗剂可以是任何可以阻断,干扰,或最小化 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 活性的组合物。这些拮抗剂包括抗 -Bv8 和 / 或抗 -EG-VEGF 抗体或其片段,能够与 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 受体结合而不激发信号转导活性的经截短的肽,能够螯合 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 肽的可溶性 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 受体,能够干扰 Bv8 或 EG-VEGF 受体活性的抗 -Bv8 和 / 或抗 -EG-VEGF 受体抗体或小分子。一个实施方案中,Bv8 或 EG-VEGF 受体是 Bv8/EG-VEGF 受体 -1 和 / 或 Bv8/EG-VEGF 受体 -2。Bv8 和 EG-VEGF 结合受体 1 和受体 2,这将在发明详述部分更详细描述。

[0029] 制品

[0030] 另一方面,本发明提供一种制品,其包括容器,Bv8 和 / 或 EG-VEGF,以及使用 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的说明。一个实施方案中,所述说明是使用 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 治疗与异常造血相关的疾病的说明。另一个实施方案中,所述说明是使用 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 治疗免疫缺陷疾病相关疾病的说明。另一方面,本发明提供一种制品,其包括容器,Bv8 拮抗剂和 / 或 EG-VEGF 拮抗剂,以及使用 Bv8 拮抗剂和 / 或 EG-VEGF 拮抗剂的说明。一个实施方案中,所述说明是使用 Bv8 拮抗剂和 / 或 EG-VEGF 拮抗剂治疗血液疾病的说明。另一个实施方案中,所述说明是使用 Bv8 拮抗剂和 / 或 EG-VEGF 拮抗剂治疗免疫缺陷疾病的说明。另一个实施方案中,所述说明是使用 Bv8 拮抗剂和 / 或 EG-VEGF 拮抗剂治疗自身免疫病的说明。

[0031] 鉴定拮抗剂的方法

[0032] 本发明另一方面提供了鉴定 Bv8 拮抗剂的方法,所述方法是使候选化合物与 Bv8 接触,测定该化合物对 Bv8 生物学活性的影响,并鉴定抑制 Bv8 生物学活性的拮抗剂。在一个实施方案中,Bv8 拮抗剂通过其抑制 Bv8 刺激内皮细胞增殖的能力来鉴定。在另一实施方案中,Bv8 或 EG-VEGF 拮抗剂通过其抑制 Bv8 或 EG-VEGF 促进内皮细胞存活的能力来鉴定。

附图说明

[0033] 图 1 显示编码人 Bv8 同系物的 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :1)。分别用粗体和下划线表示起始密码子 (从核酸位置 11 开始的“atg”)和终止密码子 (从核酸位置 398 开始的“taa”)的位置。

[0034] 图 2 显示人 Bv8 同系物多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2),其由编码序列 SEQ ID NO :1 衍生。公认的信号序列包含氨基酸 1-21。

[0035] 图 3 显示编码人 Bv8 同系物旁路剪接形式的 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :3)。分别用粗体和下划线表示起始密码子 (从核酸位置 11 开始的“atg”)和终止密码子 (从核酸位置 398 开始的“taa”)的位置。

[0036] 图 4 显示人 Bv8 同系物多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO :4),其由编码序列 SEQ ID NO :3 衍生。

[0037] 图 5 显示编码小鼠 Bv8 同系物的 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :5)。分别用粗体和下划线表示起始密码子 (从核酸位置 11 开始的“atg”)和终止密码子 (从核酸位置 398

开始的“taa”)的位置。

[0038] 图 6 显示小鼠 Bv8 同系物多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO :6), 由编码序列 SEQ ID NO :5 衍生。

[0039] 图 7 显示小鼠 Bv8 同系物与人 Bv8 同系物的序列比对。潜在的肝素-结合区用盒子表示。该区不出现在旁路剪接转录物中。小鼠 Bv8 同系物与人 Bv8 同系物有近 96% 相同。

[0040] 图 8 显示编码人天然序列 EG-VEGF 的 cDNA 的多核苷酸序列 (SEQ ID NO :7)。

[0041] 图 9 显示人天然序列 EG-VEGF 多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO :8), 其来自 SEQ ID NO :7 的编码序列。

[0042] 图 10 显示编码天然小鼠 EG-VEGF 多肽 (SEQ ID NO :10) 的 cDNA 的多核苷酸序列 (SEQ ID NO :9)。

[0043] 图 11 显示人天然 EG-VEGF 多肽 (SEQ ID NO :8) 与天然小鼠 EG-VEGF 多肽 (SEQ ID NO :8) 的比对。

[0044] 图 12 显示人 Bv8 同系物 (SEQ ID NO :4 的氨基酸 28-108) 的氨基酸序列与人 EG-VEGF (SEQ ID NO :10 的氨基酸 20-105) 的氨基酸序列的比对。没有显示任一分子的信号序列。人 Bv8 与人 EG-VEGF 大约 60% 相同。

[0045] 图 13 显示 RNA 斑点杂交试验的结果, 所述结果揭示骨髓, PBL 以及睾丸中的 hBv8 信号。

[0046] 图 14A-D 是照片, 显示原位杂交研究的结果, 其揭示了嗜中性粒细胞和相关浸润细胞中 Bv8 的受限制的表达。图 14A 和 B 显示扁桃体炎中的 Bv8 表达, 图 14A 显示组织的苏木精-伊红染色, 图 14B 显示利用 ³³P- 标记的探针显示的、Bv8 在相同组织中的表达。图 14C 和 D 显示阑尾炎中的 Bv8 表达, 图 14C 显示组织的苏木精-伊红染色, 图 14D 显示利用 ³³P- 标记的探针显示的、Bv8 在相同组织中的表达。

[0047] 图 15A-D 图示了各种组织和细胞中 Bv8 及其受体的实时定量 PCR 表达分析的结果。图 15A 显示 Bv8 在骨髓以及睾丸中强烈表达; 图 15B 显示 Bv8 在多种类型造血细胞中的差异表达; 图 15C 和 D 显示造血细胞的 Bv8/EG-VEGF 受体 -1 表达 (图 15C) 以及 Bv8/EG-VEGF 受体 -2 表达 (图 15D)。

[0048] 图 16 是柱图, 显示 Bv8 与 Bv8/EG-VEGF 受体 -1 和 Bv8/EG-VEGF 受体 -2 在以下各种白血病细胞系中的实时定量 PCR 表达分析的结果: (A) HL60CML; (B) K562CML; (C) He1-92 红白血病; (D) TF-1 全血细胞减少症; (E) KG-1AML。

[0049] 图 17A-B 图示了在各种生长因子存在的条件下, 体外骨髓单个核培养物中的集落形成。图 17A 显示 Bv8 (5nM 和 50mM) 增加小鼠骨髓单个核细胞中的集落形成。图 17B 显示, Bv8 与 EG-VEGF 相似, 可增加人骨髓单个核细胞培养物中具体类型的髓样祖细胞的集落形成。Ct 指实施例 2 中所述的完全培养基。基础指实施例 2 中所述的基础培养基。

[0050] 图 18 图示了 Bv8 与 EG-VEGF 相似, 增加体内白细胞计数。细胞计数在将表达 Bv8 的腺病毒载体导入体内后 3 天 (浅灰), 6 天 (深灰), 或 12 天 (空心柱) 测定。

[0051] 图 19A-D 图示了, 人和小鼠来源的 B 淋巴细胞, CD4+T 淋巴细胞, CD8+T 淋巴细胞, 和自然杀伤细胞中, Bv8/EG-VEGF 受体 -1 和 Bv8/EG-VEGF 受体 -2 的实时定量 PCR 表达分析。图 19A 和 B 显示人 (图 19A) 和小鼠 (图 19B) 来源的 B 淋巴细胞, CD4+T 淋巴细胞, CD8+T

淋巴细胞,和自然杀伤细胞中,Bv8/EG-VEGF 受体-1 的相对转录水平。图 19C 和 D 显示人(图 19C)和小鼠(图 19D)来源的 B 淋巴细胞,CD4+T 淋巴细胞,CD8+T 淋巴细胞,和自然杀伤细胞中,Bv8/EG-VEGF 受体-2 的相对转录水平。

[0052] 图 20 图示了 Bv8 和 EG-VEGF 增加离体小鼠 B 淋巴细胞的 ^3H -胸苷掺入。

[0053] 图 21 图示了 Bv8 和 EG-VEGF 增加离体小鼠 CD4+T 淋巴细胞中的 ^3H -胸苷掺入。插图显示在浓度渐增的 EG-VEGF 或 Bv8 存在的条件下,CD4+T 细胞中的 ^3H -胸苷掺入。

[0054] 图 22A-D 图示了 EG-VEGF 诱导 CD4+T 细胞中的细胞因子生成。EG-VEGF 诱导 CD4+T 细胞中的 IL-2 和 IFN- γ 生成。

[0055] 图 23A-E 图示了 Bv8 促进 5-FU 骨髓抑制后体内造血的恢复。体内引入表达 Bv8 的腺病毒载体后第 5、11 和 14 天测定细胞计数。Flt^{se1} 指 VEGF 突变体,其选择性结合 FLT1 受体。KDR^{se1} 指 VEGF 突变体,其选择性结合 KDR 受体。Bv8 增加 5-FU 骨髓抑制后的白细胞计数,粒细胞计数,单核细胞计数以及血小板计数。

[0056] 图 24 图示了 5-FU 骨髓抑制后,存在多种生长因子的条件下,脾来源的定向单个核细胞在体外的集落形成。与用非病毒或 LacZ 治疗的对照小鼠相比,分离自经 Bv8 治疗的动物的脾细胞含有明显更多的髓样祖细胞(CFU-GM)。

[0057] 优选实施方案详述

[0058] I. 定义

[0059] 除非特别声明,本文中采用的技术和科学术语与本发明所述技术领域的普通技术人员所通常理解的术语具有相同的含义。参见,例如 Singleton 等,Dictionary of Microbiology 和 Molecular Biology 第 2 版, J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrook 等, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989)。为了本发明的目的,对以下术语作出如下限定。

[0060] 本文中术语“Bv8”和“Bv8 多肽”可互换使用,它们指天然序列 Bv8, Bv8 变体,和嵌合 Bv8,它们每一个都在本文中限定。可选地, Bv8 不与天然糖基化相关。“天然糖基化”是指,当 Bv8 在哺乳动物细胞(具体是在天然产生 Bv8 的细胞)中产生时,与其共价结合的糖组分。因此,非人细胞中产生的人 Bv8 是一例“不与天然糖基化相关”的 Bv8。Bv8 可根本不发生糖基化,正如它在原核细胞,例如大肠杆菌中产生时那样。

[0061] Bv8 核酸是编码上文定义的 Bv8 多肽的 RNA 或 DNA,或者是与所述 DNA 或 RNA 杂交并在严格杂交条件下与其稳定结合的、长度超过约 10 个核苷酸的 RNA 或 DNA。严格杂交条件是指,(1) 利用低离子强度和高温洗涤,例如,0.15M NaCl/0.015M 柠檬酸钠/0.1% NaDodSO₄, 50°C, 或 (2) 在杂交期间使用变性剂,如甲酰胺,例如 50% (vol/vol) 甲酰胺以及 0.1% 牛血清白蛋白/0.1% Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯烷酮/50mM 磷酸钠缓冲液, pH 6.5, 750mM NaCl, 75mM 柠檬酸钠, 42°C。

[0062] 当多核苷酸处于与另一个核酸序列有功能关系的位置上时,该多核苷酸是可操作相连的。Bv8 核酸可以与另一核酸序列在载体中可操作相连,使其能在具体宿主生物中表达。这可以通过本领域已知方法进行。例如,前序列或分泌前导序列被表达为参与多肽分泌的前蛋白时,编码前序列或分泌前导序列的 DNA 与编码该多肽的 DNA 是可操作相连的;启动子或增强子影响编码序列的转录时,其与该编码序列是可操作相连的;或核糖体结合位点处在促进翻译的位置上时,它与编码序列是可操作相连的。通常,“可操作相连”是指相连

的 DNA 是邻接的,而且,在分泌前导序列的情况中,是邻接并处在阅读相。但增强子不是必需邻接的。连接可通过在便利的限制性位点连接来完成的。如果不存在这类位点,可根据常规实践使用合成的寡核苷酸接头或连接区。

[0063] “天然序列 Bv8”包括具有与自然界衍生的 Bv8 相同的氨基酸序列的多肽,无论其通过什么方法制备。因此,天然序列 Bv8 可以具有天然人 Bv8、鼠 Bv8、或任何其它哺乳动物物种来源的 Bv8 的氨基酸序列。例如,全长天然序列人 Bv8 的氨基酸序列见图 2(SEQ ID NO:2)。另一种全长天然序列人 Bv8 见图 4(SEQ ID NO:4)。这两个序列是对编码标准(canonical)肝素结合区的外显子进行两种不同剪接的结果。因此,氨基酸序列如图 2(SEQ ID NO:2)所示的那种天然序列人 Bv8 包含肝素结合区,而图 4(SEQ ID NO:4)所示天然序列 Bv8 不含该区。天然序列小鼠 Bv8 氨基酸序列见图 6(SEQ ID NO:6)。人和鼠 Bv8 的序列也已经公开,参见 Wechselberger 等 (FEBS Lett. 462:177-181(1999)) 和 Li 等 (Mol. Pharm. 59:692-698(2001))。这样的天然序列 Bv8 可以从自然界分离,也可以通过重组和/或合成手段制备。术语“天然序列 Bv8”具体包含 Bv8 的天然前原(prepro)形式,原(pro)形式,成熟形式和截短形式,天然变体形式(例如旁路剪接形式,诸如图 4(SEQ ID NO:4)所示的形式),以及天然等位变体。优选的天然序列 Bv8 是图 2(SEQ ID NO:2)所示的全长天然序列人 Bv8。

[0064] “Bv8 变体”是指,具有不同于天然序列 Bv8 多肽的氨基酸序列的生物活性 Bv8 多肽,如图 2,4 和 6(SEQ ID NO:2,4 和 6)所示的人和鼠 Bv8,可通过在天然序列中插入、缺失、修饰和/或取代一或多个氨基酸残基而获得。Bv8 变体通常与天然序列 Bv8 有不到 100% 序列同一性,如图 2(SEQ ID NO:2)所示的人 Bv8。但一般情况下,生物活性 Bv8 变体具有与天然 Bv8(如图 2(SEQ ID NO:2)所示的人 Bv8)至少约 70% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列,优选至少约 75%,更优选至少约 80%,还更优选至少约 85%,还更优选至少约 90%,优选以 1% 的增量从至少约 95% 递增到至少约 99% 的氨基酸序列同一性。Bv8 变体包括具有至少 5 个氨基酸且保留了相应天然序列 Bv8 多肽的生物活性的肽片段。Bv8 变体还包括在天然 Bv8 序列的 N- 或 C- 末端,或者内部添加了一或多个氨基酸残基的 Bv8 多肽。Bv8 变体还包括缺失了多个氨基酸残基并且任选地被一或多个氨基酸残基取代的 Bv8 多肽。Bv8 变体还可以进行共价修饰,例如用不同于天然氨基酸的组分进行取代,或者修饰氨基酸残基从而产生非天然氨基酸。Bv8 变体可以包含肝素结合区。

[0065] 本文中术语“EG-VEGF”和“EG-VEGF 多肽”可互换使用,它们指天然序列 EG-VEGF, EG-VEGF 变体,和嵌合 EG-VEGF,它们每一个都在本文中限定。可选地,EG-VEGF 不与天然糖基化相关。“天然糖基化”是指,当 EG-VEGF 在哺乳动物细胞(尤其天然产生 EG-VEGF 的细胞)中产生时,与其共价结合的糖组分。因此,非人细胞中产生的人 EG-VEGF 是一例“不与天然糖基化相关”的 EG-VEGF。有时,EG-VEGF 根本不发生糖基化,正如它在原核细胞,例如大肠杆菌中产生时那样。

[0066] EG-VEGF 核酸是编码上文定义的 EG-VEGF 多肽的 RNA 或 DNA,或者是与所述 DNA 或 RNA 杂交并在严格杂交条件下与其稳定结合的、长度超过约 10 个核苷酸的 RNA 或 DNA。严格杂交条件是指,(1) 利用低离子强度和高温洗涤,例如,0.15M NaCl/0.015M 柠檬酸钠/0.1% NaDodSO₄,50℃,或(2) 在杂交期间使用变性剂,如甲酰胺,例如 50% (vol/vol) 甲酰胺以及 0.1% 牛血清白蛋白/0.1% Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯烷酮/50mM 磷酸钠缓冲液,

pH 6.5, 750mMNaCl, 75mM 柠檬酸钠, 42°C。

[0067] 当多核苷酸处于与另一个核酸序列有功能关系的位置上时, 该多核苷酸是可操作相连的。EG-VEGF 核酸可以与另一核酸序列在载体中可操作相连, 使其能在具体宿主生物中表达。这可以通过本领域已知方法进行。例如, 前序列或分泌前导序列被表达为参与多肽分泌的前蛋白时, 编码前序列或分泌前导序列的 DNA 与编码该多肽的 DNA 是可操作相连的; 启动子或增强子影响编码序列的转录时, 其与该编码序列是可操作相连的; 或核糖体结合位点处在促进翻译的位置上时, 它与编码序列是可操作相连的。通常, “可操作相连”是指相连的 DNA 是邻接的, 而且, 在分泌前导序列的情况中, 是邻接并处在阅读相。但增强子不是必需邻接的。连接可通过在便利的限制性位点连接来完成的。如果不存在这类位点, 可根据常规实践使用合成的寡核苷酸接头或连接区。

[0068] “天然序列 EG-VEGF”包括具有与自然界衍生的 EG-VEGF 相同的氨基酸序列的多肽, 无论其通过什么方法制备。因此, 天然序列 EG-VEGF 可以具有天然人 EG-VEGF、鼠 EG-VEGF、或任何其它哺乳动物物种来源的 EG-VEGF 的氨基酸序列。一个实施方案中, 全长天然序列人 EG-VEGF 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:8。一个实施方案中, 全长天然序列小鼠 EG-VEGF 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:10。人和鼠 EG-VEGF 的序列也已经公开, 参见 LeCouter 等, 2001, Nature, 412:877-844。

[0069] 这样的天然序列 EG-VEGF 可以从自然界分离, 也可以通过重组和 / 或合成手段制备。术语“天然序列 EG-VEGF”具体包含 EG-VEGF 的天然前原 (prepro) 形式, 原 (pro) 形式, 成熟形式和截短形式, 天然变体形式 (例如旁路剪接形式), 以及天然等位变体。优选的天然序列 EG-VEGF 是包含氨基酸序列 SEQ ID NO:8 的全长天然序列人 EG-VEGF。

[0070] “EG-VEGF 变体”是指, 具有不同于天然序列 EG-VEGF 多肽的氨基酸序列的生物活性 EG-VEGF 多肽, 如人和鼠 EG-VEGF, 可通过在天然序列中插入、缺失、修饰和 / 或取代一或多个氨基酸残基而获得。EG-VEGF 变体通常与天然序列 EG-VEGF 有不到 100% 序列同一性。但一般情况下, 生物活性 EG-VEGF 变体具有与天然 EG-VEGF 至少约 70% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 优选至少约 75%, 更优选至少约 80%, 还更优选至少约 85%, 还更优选至少约 90%, 优选以 1% 的增量从至少约 95% 递增到至少约 99% 的氨基酸序列同一性。EG-VEGF 变体包括具有至少 5 个氨基酸且保留了编码天然序列 EG-VEGF 多肽的生物活性的肽片段。EG-VEGF 变体还包括在天然 EG-VEGF 序列的 N- 或 C- 末端, 或者内部添加了一或多个氨基酸残基的 EG-VEGF 多肽。EG-VEGF 变体还包括缺失了多个氨基酸残基并且任选地被一或多个氨基酸残基取代的 EG-VEGF 多肽。EG-VEGF 变体还可以进行共价修饰, 例如用不同于天然氨基酸的组分进行取代, 或者修饰氨基酸残基从而产生非天然氨基酸。EG-VEGF 变体可以包含肝素结合区。

[0071] Bv8 或 EG-VEGF 的“氨基酸序列同一性百分比”在本文中定义为, 经过序列对比, 并在必要时导入空隙以获取最大序列同一性百分比, 而不将任何保守取代视为序列同一性的一部分时, 候选序列中与 Bv8 序列中的残基相同的氨基酸残基的百分比。在候选的 Bv8 或 EG-VEGF 序列中, 在 N- 末端、C- 末端或内部的延伸, 缺失或插入, 都不视为影响序列同一性或同源性。序列比对的方法和计算机程序是已知的。一个这样的计算机程序是 Genentech, Inc. 公司拥有的“ALIGN-2”, 该程序及其用户文件 (user documentation) 已提交美国版权局 (United States Copyright Office), Washington, D. C. 20559, 其美国版权注册号为

TXU510087。

[0072] “嵌合 EG-VEGF”分子是包含与异源多肽融合或键合的全长 EG-VEGF 或其一个或多个结构域的多肽。嵌合 EG-VEGF 分子通常与天然 EG-VEGF 共享至少一种生物学特性。嵌合 EG-VEGF 分子的一个实例是带有可用于纯化的表位标签的分子。另一种嵌合 EG-VEGF 分子是 EG-VEGF 免疫粘附素。

[0073] 本文中“带有表位标签”是指，包含与“标签多肽”融合的 Bv8 或 EG-VEGF 的嵌合多肽。标签多肽具有足以提供制备抗体所需的表位的残基，但同时它又很短，不会干扰 Bv8 的生物活性。标签多肽优选非常独特，使其抗体基本上不与其它表位发生交叉反应。合适的标签多肽通常具有至少 6 个氨基酸残基，通常约 8-50 个氨基酸残基（优选约 9-30 个残基）。优选聚-组氨酸序列，它可以与镍结合，从而能通过 Ni-NTA 层析分离带有该标签的蛋白（参见，例如 Lindsay 等 1996 *Neuron* 17 :571-574）。

[0074] “分离的”是指，从 Bv8 或 EG-VEGF 来源纯化得到的，或者是通过重组或合成方法制备并纯化的 Bv8 或 EG-VEGF。纯化的 Bv8 基本上不含其它多肽或肽。“基本上不含”是指，其它来源的蛋白的污染少于约 5%，优选少于约 2%，更优选少于约 1%，还更优选少于约 0.5%，最优选少于约 0.1%。

[0075] “基本纯”的蛋白是指一种组合物，其总重量中所述蛋白的重量占至少约 90%，优选占至少约 95%，更优选占至少约 90%，还更优选占至少约 95%。“基本均一”的蛋白是指一种组合物，其总重量中有至少约 99% 重量是所述蛋白。

[0076] “激动剂”是具有天然序列 Bv8 或 EG-VEGF 的一或多种生物学特性的分子或化合物。包括但不限于，有机小分子，肽，和激动剂抗-Bv8 或抗 EG-VEGF 抗体。

[0077] 术语“拮抗剂”使用其最广泛含义，包括任何能部分地或完全地阻断、抑制、或中和天然 Bv8 或 EG-VEGF 多肽的生物活性的分子。合适的拮抗剂分子具体包括拮抗剂抗体或抗体片段，天然 Bv8 或 EG-VEGF 多肽的片段或氨基酸序列变体，可溶性 Bv8 或 EG-VEGF 受体或其片段，肽，有机小分子等。鉴定 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 多肽的激动剂或拮抗剂的方法包括使 Bv8 或 EG-VEGF 多肽与候选的激动剂或拮抗剂分子接触，并测定通常与 Bv8 或 EG-VEGF 多肽有关的一或多种生物活性的改变。

[0078] 本文中“有活性”或“活性”是指保留了天然或天然存在的 Bv8 或 EG-VEGF 的生物活性或免疫活性的 Bv8 或 EG-VEGF 形式，其中“生物”活性是指由天然或天然存在的 Bv8 或 EG-VEGF 导致的生物功能（抑制性或刺激性），而不是指天然或天然存在的 Bv8 或 EG-VEGF 所具有的诱导产生抗抗原性表位抗体的能力，“免疫”活性是指天然或天然存在的 Bv8 或 EG-VEGF 所具有的诱导产生抗抗原性表位抗体的能力。

[0079] 因此，当“生物活性”与“Bv8”、“分离的 Bv8”、Bv8 激动剂、“EG-VEGF”、“分离的 EG-VEGF”或 EG-VEGF 激动剂联合使用时，是指显示或共有天然序列 Bv8 或 EG-VEGF 的效应功能的 Bv8 或 EG-VEGF 多肽。Bv8 或 EG-VEGF 的一种基本效应功能是其刺激内皮细胞增殖的能力。更优选，所述生物活性是调节造血的能力。

[0080] “生物学特性”当与“EG-VEGF”、“分离的 EG-VEGF”或 EG-VEGF 激动剂联合使用时，是指具有由天然序列 EG-VEGF（不管是其天然构型还是变性的构型）直接或间接导致或实施的效应功能或效应活性或者抗原功能或抗原活性。效应功能包括增强内皮细胞的增殖，诱导血管生成和 / 或调节造血。

[0081] “生物学特性”当与“Bv8”、“分离的 Bv8”、Bv8 激动剂联合使用时,是指具有由天然序列 Bv8(不管是其天然构型还是变性的构型)直接或间接导致或实施的效应功能或效应活性或者抗原功能或抗原活性。效应功能包括增强内皮细胞的增殖,诱导血管生成和/或调节造血。

[0082] “Bv8 受体”是与 Bv8 结合并介导 Bv8 的生物学特性的分子。Bv8 受体也可结合并介导 EG-VEGF 的生物学性质。因此,术语“Bv8 受体”的含义包括 Bv8/EG-VEGF 受体-1 和 Bv8/EG-VEGF 受体-2(LeCouter et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 :2685-2690 ;Lin et al., 2002, J. Biol. Chem., 277 :19276-19280 ;Masuda et al., 2002, Biochem. Biophys. Res. Commun., 293 :396-402)。

[0083] “EG-VEGF 受体”是与 EG-VEGF 结合并介导 EG-VEGF 的生物学性质的分子。EG-VEGF 受体也结合并介导 Bv8 的生物学性质。因此,术语“EG-VEGF 受体”的含义包括 Bv8/EG-VEGF 受体-1 和 Bv8/EG-VEGF 受体-2(LeCouter et al., 2003 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 :2685-2690 ;Lin et al., 2002, J. Biol. Chem., 277 :19276-19280 ;Masuda et al., 2002, Biochem. Biophys. Res. Commun., 293 :396-402)。

[0084] 术语“抗体”是指最广义上的抗体,具体包括人、非-人(例如鼠)和人源化的单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们显示所需的生物学活性。

[0085] “抗体”(Ab)和“免疫球蛋白”(Ig)是具有相同结构特征的糖蛋白。抗体表现出对特异抗原的结合特异性,而免疫球蛋白包括抗体和其它缺少抗原特异性的抗体-样分子。后一类多肽例如是,在淋巴系统中低水平产生而在骨髓瘤中高水平产生的那些。

[0086] “天然抗体”和“天然免疫球蛋白”通常是约 150,000 道尔顿的异四聚糖蛋白,其由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而不同免疫球蛋白同种型的重链具有不同的二硫键数目。每条重链和轻链还有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(V_H),其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(V_L),另一端有恒定区;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区对齐,轻链的可变区与重链的可变区对齐。人们相信有一些氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

[0087] 术语“可变”是指可变区的某些部分的序列在不同抗体之间有很大差异,它们可在各个具体抗体针对其具体抗原的结合和特异性方面发挥作用。然而,该变异性并非均匀分布于抗体的整个可变区。它集中于轻链和重链可变区中三个称为超变区的节段中。可变区中高度保守的区域称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变区各包括 4 个 FR(分别为 FR1, FR2, FR3 和 FR4),主要采取 β 折叠构型,由三个超变区相连,形成环状连接,在某些情况下可形成所述 β 折叠结构的部分。每条链的超变区通过 FR 紧密相连,彼此十分靠近,并且与其它链的超变区一起形成抗体的抗原结合位点(见 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), 第 647-669 页)。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是表现出各种效应功能,例如参与抗体的抗体依赖性细胞毒性作用。

[0088] 本文中术语“超变区”是指抗体上负责与抗原结合的氨基酸残基。超变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(即,轻链可变区中的残基 24-34(L1), 50-56(L2) 和 89-97(L3), 重链可变区中的 31-35(H1), 50-65(H2) 和 95-102(H3);Kabat 等, Sequence

of proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)), 和 / 或来自“超变环”的那些残基 (即, 轻链可变区中的残基 26-32(L1), 50-52(L2) 和 91-96(L3), 重链可变区中的 26-32(H1), 53-55(H2) 和 96-101(H3); Chothia 和 Lesk J. Mol. Biol. 196 :901-917(1987))。“框架区”或“FR”残基是那些可变区的残基而不是本文定义的超变区残基。

[0089] 用木瓜蛋白酶消化抗体可产生两个相同的各带有单个抗原结合位点的抗原结合片段 (称为“Fab”片段) 和残余的“Fc”片段, Fc 片段的名称反应了其易于结晶的能力。经胃蛋白酶处理可产生具有两个抗原结合位点并仍然能与抗原交联的 $F(ab')_2$ 片段。

[0090] “Fv”是含有完整的抗原-识别和-结合位点的最小抗体片段。此区由一个重链可变区与一个轻链可变区紧密地非共价连接形成的二聚体组成。在这个构型中, 每个可变区的三个 CDR 相互作用, 在 V_H - V_L 二聚体表面限定抗原结合位点。这六个 CDR 共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而, 即使是单个可变区 (或 F_v 上仅含有三个抗原特异性超变区的一半) 也具有识别和结合抗原的能力, 尽管与完整的结合位点相比其亲和力较低。

[0091] Fab 段还包括轻链恒定区和重链的第一个恒定区 (CH1)。Fab' 片段区别于 Fab 片段之处在于, Fab' 在重链 CH1 区的羧基末端多出几个残基, 包括抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH 在本文中是指恒定区半胱氨酸残基带有游离巯基的那些 Fab'。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初产生为 Fab' 片段对的形式, 在它们之间具有铰链区半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联是众所周知的。

[0092] 脊椎动物任何物种的抗体 (免疫球蛋白) 的“轻链”, 可依据其恒定区氨基酸序列而归为两种完全不同类型 (称为 κ 和 λ) 中的一类。

[0093] 免疫球蛋白根据其重链恒定区的氨基酸序列可分为不同的类。主要有 5 类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 其中一些还可进一步分成“亚类” (同种型), 例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。对应于不同类抗体的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是众所周知的。

[0094] “抗体片段”包括完整抗体的一部分, 通常是其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 和 Fv 片段; 二价抗体; 线性抗体; 单链抗体分子; 和由多个抗体片段形成的多特异性抗体。

[0095] 本文中术语“单克隆抗体”是指来自基本均一的抗体群的抗体, 即, 除了可能少量存在的天然突变以外, 该抗体群中的各个抗体均相同。单克隆抗体具有高度特异性, 针对单个抗原位点。而且, 与通常包括针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体的常规 (多克隆) 抗体制剂相反, 每种单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。修饰词“单克隆”表明该抗体的特点, 即, 它来自基本均一的抗体群, 不解释为需通过任何特殊方法产生该抗体。例如, 根据本发明应用的单克隆抗体可通过由 Kohler 等, Nature, 256 :495(1975) 首先描述的杂交瘤法进行制备, 或者可通过重组 DNA 法进行制备 (例如见美国专利 4,816,567)。“单克隆抗体”还可利用例如 Clackson 等, Nature, 352 :624-628(1991) 和 Marks 等, J. Mol. Biol., 222 :581-597(1991)) 所述技术从噬菌体抗体库中分离。

[0096] 本文中单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体 (免疫球蛋白), 其重链和 / 或轻链的一部分与源自具体物种或属于具体抗体种类或亚类的抗体的相应序列相同或同源, 但所述链的剩余部分的序列与源自另一个物种或属于另一个抗体种类或亚类的抗体 (以及此抗体

的片段,只要它们显示所需的生物学活性)的相应序列相同或同源(美国专利 4,816,567;Morrison 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984))。

[0097] “人源化”非人(例如鼠)抗体是包含非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。大多数场合,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),但其中受体的超变区残基被具有所需特异性、亲和力和能力的小鼠、大鼠、家兔或非人灵长类等非人源物种抗体(供体抗体)的超变区残基所取代。在一些实例中,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基由相应的非人类残基所取代。而且,人源化抗体可包括在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。这些修饰旨在进一步改善(refine)抗体的性能。通常,人源化抗体基本上包括至少一个(通常包括两个)可变区的全部,其中超变区的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白的相应部分,而 FR 的全部或基本上全部是人免疫球蛋白的序列。FR 可选为共有序列或经修饰的共有序列的那些,例如 Carter 等,美国专利 6,054,297 中所述。人源化抗体还任选包括免疫球蛋白恒定区(Fc),通常为人的免疫球蛋白恒定区。详见 Jones 等,Nature 321:522-525(1986);Riechmann 等,Nature 332:323-329(1988);和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)。

[0098] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域,这些结构域存在于单个多肽链上。Fv 多肽在 V_H 和 V_L 结构域之间通常还包含一个多肽接头,它使 scFv 能形成抗原结合所需的结构。关于 scFv 的综述见 Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 卷 113, Rosenberg 和 Moore 编 Springer-Verlag, New York, pp. 269-315(1994)。

[0099] 术语“二价抗体”是指具有两个抗原结合位点的小分子抗体片段,这些片段在一条多肽链(V_H - V_L)上含有相连的一个重链可变区(V_H)和一个轻链可变区(V_L)。利用一种太短以至于同一条链上的两个结构域无法配对的接头,可以允许这些结构域与另一条链上的互补结构域配对,并形成两个抗原结合位点。二价抗体的详细说明参见,如 EP 404,097;WO 93/11161;以及 Hollinger 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)。

[0100] 本申请全文中用到的“线性抗体”,是指在 Zapata 等,Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)中描述的抗体。简言之,这些抗体包含一对串联的 Fd 片段(V_H - C_H1 - V_H - C_H1),其形成一对抗原结合区。线性抗体可以具有双特异性或单特异性。

[0101] 术语“表位”是指蛋白抗原上与(单克隆或多克隆)抗体结合的位点。

[0102] “激动剂抗体”是指可以作为 Bv8 或 EG-VEGF 激动剂并因此具有天然序列 Bv8 或 EG-VEGF 的一或多种生物学特性的抗体。

[0103] 术语“Bv8 免疫粘附素”和“EG-VEGF 免疫粘附素”可分别与术语“Bv8-免疫嵌合体”和“EG-VEGF-免疫嵌合体”互换使用,它们都是指将 Bv8 或 EG-VEGF 分子(天然或变体)的至少一部分与免疫球蛋白序列组合形成的嵌合分子。免疫球蛋白序列优选,但并非必需是,免疫球蛋白恒定区。免疫粘附素可以具有人抗体的多种有价值的化学或生物学特性。由于可以将具有所需特异性的人蛋白序列与适当的人免疫球蛋白铰链区和恒定区(Fc)序列相连来构建免疫粘附素,因此可以用完整的人组分获得所需的结合特异性。这样的免疫粘附素对患者的免疫原性最小,长期或反复使用的安全性较好。

[0104] 已报道可用于治疗的同型多体免疫粘附素包括 CD4-IgG 免疫粘附素,它可以使 HIV 与细胞表面的 CD4 结合。在 I 期临床试验中,将 CD4-IgG 施用于即将临产的孕妇,所得

的数据提示,这种免疫粘附素可以有效防止 HIV 的母婴传播 (Ashkenazi 等, Intern. Rev. Immunol. 10 :219-227(1993))。还有人开发了与肿瘤坏死因子 (TNF) 结合的免疫粘附素。TNF 是一种促炎 (proinflammatory) 细胞因子,有证据表明它是败血性休克的主要介质。基于小鼠败血性休克模型的试验表明, TNF 受体免疫粘附素有望作为临床治疗败血性休克的药物 (Ashkenazi, A. 等 (1991)PNAS USASE :10535-10539)。ENBREL[®] (etanercept) 也是一种免疫粘附素,它包含与 IgG Fc 区融合的 TNF 受体,美国食品和药品管理局 (FDA) 于 1998 年 11 月 2 日批准将它用于治疗类风湿性关节炎。2000 年 6 月 6 日,经 FDA 批准,ENBREL[®]在治疗类风湿性关节炎方面的应用进一步扩展。有关 TNF 阻断药 (包括 ENBREL[®]) 的最新信息,可参见 Lovell 等, N. Engl. J. Med. 342 :763-169(2000),以及第 810-811 页的相关评论;Weinblatt 等, N. Engl. J. Med. 340 :253-259(1999);综述见 Maini 和 Taylor, Annu. Rev. Med. 51 :207-229(2000)。

[0105] 当免疫粘附素结构的双臂具有不同特异性时,通过与双特异性抗体类比,将这种免疫粘附素称为“双特异性免疫粘附素”。Dietsch 等, J. Immunol. Methods 162 :123(1993) 描述了一种这样的双特异性免疫粘附素,它组合了粘附分子 E-选择素和 P-选择素的胞外区,这两种选择素在自然状态下是在不同类型的细胞中表达。结合研究表明,如此形成的双特异性免疫球蛋白融合蛋白与衍生出它的单特异性免疫粘附素相比,与骨髓细胞系的结合能力增强了。

[0106] 术语“异型粘附素”与“嵌合异型多体粘附素”可以互换使用,是指嵌合分子 (氨基酸序列) 的复合物,其中每一嵌合分子将每一异型多体受体单体的生物活性部分 (如胞外区) 与一种多聚体化结构域组合在一起。“多聚体化结构域 (multimerization domain)”促进了该异型多体复合物内部的嵌合分子之间稳定的相互作用。多聚体化结构域可以借助以下结构发生相互作用:免疫球蛋白序列,亮氨酸拉链,疏水区,亲水区,或者形成嵌合异型多体的嵌合分子之间的分子间二硫键的游离巯基。多聚体化结构域可包含免疫球蛋白恒定区。经过改造,多聚体化结构域还可以使其空间相互作用不仅有利于稳定的相互作用,而且有利于在由单体混合物形成的同型二聚体上形成异型二聚体。“突起 (Protuberances)”是将第一种多肽的界面上的氨基酸小侧链替换为较大侧链 (如酪氨酸或色氨酸) 而形成的。备选地,可以在第二种多肽上,通过用较小的氨基酸侧链 (如丙氨酸或苏氨酸) 取代较大侧链,而形成与所述突起具有相同或相似大小的互补型“空穴”。所述免疫球蛋白序列优选,但并非必需是,免疫球蛋白恒定区。本发明嵌合体中的免疫球蛋白组分优选来自 IgG,, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚类, IgA, IgE, IgD 或 IgM,但优选 IgG,或 IgG3。

[0107] 本文中“治疗”是指获得有益的或所需的临床后果的方法。为了本发明的目的,有益的或所需的临床后果包括,但不限于,症状缓解,疾病的程度减轻,疾病状态稳定 (即,不恶化),疾病进展延迟或减慢,疾病状态改善或减轻,以及消退 (部分或全部),无论是可以检测到的还是不能检测到的。“治疗”还可以指与不接受治疗所预期的存活相比,存活延长。“治疗”是为了阻止疾病进展或改变疾病的病理学而实施的介入。因此,“治疗”既指治疗性措施也指预防性措施。需要治疗的个体包括那些已经患有疾病或者希望预防患病的个体。具体地,治疗可直接阻止,减缓或降低细胞变性或损伤的病理学,如癌症治疗中肿瘤细胞的病理学,或者可以使细胞对其它治疗剂的治疗更敏感。

[0108] “长期 (Chronic)”给药是指将试剂以连续方式而非短期 (acute) 方式给药,使得

能将最初的治疗效应（活性）维持更长的时间。“间断（Intermittent）”给药是指一种治疗，它不是没有中断地连续进行，本质上是一种循环。

[0109] 需要治疗的“哺乳动物”是指哺乳类任何动物，包括人、其它高等灵长类，家养动物、农用动物，和动物园、运动项目用的动物或宠物，如犬、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、兔等。优选哺乳动物是人。

[0110] 本文中“肿瘤”是指所有瘤细胞 (neoplastic cell) 生长和增殖（无论恶性或良性），和所有前癌性 (pre-cancerous) 和癌性 (cancerous) 细胞和组织。

[0111] 术语“癌”和“癌性的”是指或描述哺乳动物中通常以细胞生长失控为特点的病理状态。癌的实例包括但不限于癌，淋巴瘤，母细胞瘤，肉瘤和白血病。所述癌症的更具体实例包括：鳞状细胞癌，小细胞肺癌，非小细胞肺癌，肺腺癌，肺鳞状细胞癌，腹膜的癌，肝细胞癌，胃肠癌，胰腺癌，神经母细胞瘤，宫颈癌，卵巢癌，肝癌，膀胱癌，肝细胞瘤，乳腺癌，大肠癌，结肠直肠癌，子宫内膜癌或子宫癌，唾液腺癌，肾癌，肝癌，前列腺癌，外阴癌，甲状腺癌和各种类型的头和颈癌。

[0112] “血液疾病”指特征在于血细胞异常增生和 / 或分化的疾病，其可导致血细胞发育不良性改变以及血液学恶性疾病。许多血液疾病可分类为白血病，骨髓增生性疾病 (MPD)，骨髓发育不良性疾病，淋巴组织增生性疾病，和淋巴组织发育不良性疾病。这些疾病中许多可出现在成人以及儿童中。血液疾病的实例包括但不限于，急性髓性白血病 (AML)，慢性髓性白血病 (CML)，急性淋巴母细胞白血病 (ALL)，多发性骨髓瘤，T- 细胞淋巴瘤，淋巴组织发育不良性白血病，真性红血球增多症 (PV)，原发性血小板增多症 (ET)，和骨髓外化生（骨髓纤维化）。

[0113] 术语“嗜中性粒细胞减少症”指特征在于循环嗜中性粒细胞数目异常低下或减少的疾病或病症。嗜中性粒细胞减少症可以是疾病，遗传疾病，药物，毒素，放射和许多治病性治疗诸如高剂量化疗和常规肿瘤治疗的结果。与嗜中性粒细胞减少症相关的疾病或病症包括但不限于，血液疾病，感染性疾病包括结核，伤寒，肝炎，败血症，急性细菌性疾病，重症分支杆菌或真菌疾病，以及单核细胞增多症，给药骨髓毒性和免疫抑制剂包括放射，免疫抑制性药物和皮质类固醇，细胞毒化疗或放疗，浸润性血液疾病 (infiltrative and hematological disorder) 包括白血病，骨髓瘤，何杰金氏病及淋巴瘤，粒细胞缺乏症与再生障碍性贫血，组织细胞增多症和结节病，手术和外伤包括烧伤，脾切除和麻醉，酒精性肝硬化，衰老，抗惊厥药物，尿血，糖尿病，维生素和矿物质缺乏，以及营养不良。患有嗜中性粒细胞减少症的患者很可能患感染和疾病，这是由于血液中的循环嗜中性粒细胞数目减少损害了患者抗击入侵微生物的能力。

[0114] 术语“免疫缺陷疾病”指特征在于免疫反应降低或缺失的疾病或病症。B 细胞，T 细胞，吞噬细胞，或补体可以有缺陷。所述免疫缺陷疾病可为原发或继发的。白细胞减少症，包括淋巴细胞减少症，嗜中性粒细胞减少症，单核细胞减少症，以及粒细胞减少症，可以与原发或继发性免疫缺陷疾病相关。原发性免疫缺陷疾病的实例包括但不限于，B- 细胞缺陷，包括无 γ 球蛋白血症和伴随高 α -IgM 的免疫球蛋白缺陷 (Ig)，T 细胞缺陷包括 DiGeorge 异常，慢性粘膜皮肤念珠菌病，缺陷伴有 Ig，核苷磷酸化酶 (phosphorlyase)，和特发性 CD4 淋巴细胞减少症的联合免疫，和联合的 T 和 B 细胞缺陷，包括重症联合免疫缺陷，Wiskott-Aldrich 综合症，和 X- 连锁的淋巴细胞增生性综合症。继发性免疫缺陷疾病的实

例包括,但不限于与感染性疾病相关的疾病,包括人获得性免疫缺陷病毒(HIV),肝炎,流感,结核,伤寒,败血症,巨细胞病毒,急性细菌性疾病,重症分支杆菌或真菌疾病,先天性风疹,感染性单核细胞增多症和病毒性皮疹(viral exanthm),给药骨髓毒性和免疫抑制剂包括放射,免疫抑制性药物和皮质类固醇,细胞毒化疗或放疗,浸润性血液疾病包括白血病,骨髓瘤,何杰金氏病及淋巴瘤,粒细胞缺乏症与再生障碍性贫血,组织细胞增多症和结节病,手术和外伤包括烧伤,脾切除和麻醉,酒精性肝硬化,衰老,抗惊厥药物,移植物抗宿主疾病,尿血,糖尿病,维生素和矿物质缺乏,以及营养不良。

[0115] 术语“自身免疫性疾病”指由对特异性自身抗原的持续获得性免疫反应介导的疾病。自身免疫病可根据与所述疾病相关的超敏反应的类型而分类。类型 I 反应由 IgE 介导,其诱导肥大细胞的活化。类型 II 和 III 由 IgG 介导,其可活化补体介导的或吞噬效应物机制。类型 II 反应针对细胞表面或基质相关抗原,其导致组织破坏。类型 III 反应针对可溶性抗原,并且组织破坏是由免疫复合物激发的下游反应造成的。类型 IV 反应是 T 淋巴细胞介导的,并可分为两种亚类型。第一个亚类中,组织破坏由炎性 T 细胞(TH1 细胞)导致,主要由巨噬细胞介导。第二个亚类中,组织损伤直接由细胞毒 T 细胞导致。自身免疫病的实例包括,但不限于,移植物抗宿主疾病,炎性肠病包括克隆氏病和结肠炎,格林巴利综合征(Guillain-Barre' syndrome),狼疮,多发性硬化,重症肌无力,视神经炎,银屑病,类风湿性关节炎,Graves 病,自身免疫性肝炎,I 型糖尿病,再生障碍性贫血,间质性膀胱炎,硬皮病,vulvodynia,神经性肌紧张(neuromyotonia)和白癜风(vitiligo)。

[0116] 疾病的“病理学”包括损害患者健康状况(well-being)的所有现象。对于癌症而言,包括但不限于,异常或失控的细胞生长,转移,干扰邻近细胞的正常功能,释放异常水平的细胞因子或其它分泌产物,抑制或加重炎症或免疫应答,等等。

[0117] 与一或多种其它治疗剂“联合”给药包括同时给药和以任何顺序连贯给药。

[0118] 本文所用“载体”包括在所用剂量和浓度下对所暴露的细胞或哺乳动物没有毒性的可药用载体、赋形剂、或稳定剂。生理可接受载体常常是含水的 pH 缓冲的溶液。生理可接受载体的实例包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐、和其它有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸;低分子量(小于 10 个残基)多肽;蛋白,如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白;亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖,和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖、或糊精;螯合剂如 EDTA;糖醇如甘露醇或山梨醇;成盐反离子如钠;和/或非离子表面活性剂如 TWEEN™、聚乙二醇(PEG)和 PLURONICS™。

[0119] “脂质体”是由能向哺乳动物有效运送药物(如 Bv8 多肽或其抗体)的各类脂质、磷脂和/或表面活性剂组成的小分子囊泡。脂质体的组分通常排列为双层形式,与生物膜的脂质排列相似。

[0120] 本文中“小分子”是指分子量小于约 500 道尔顿。

[0121] 本文中术语“血管内皮生长因子”,“VEGF”,“VEGF 多肽”和“VEGF 蛋白”包括天然序列 VEGF 和 VEGF 变体(见下文详述)。VEGF 多肽可以从各种来源分离,如从人组织类型或从其它来源分离,或通过重组和/或合成方法制备。

[0122] “天然序列 VEGF”包括具有与自然界衍生的 VEGF 相同的氨基酸序列的多肽。所述天然序列 VEGF 可以从自然界分离或者通过重组和/或合成手段制备。术语“天然序列 VEGF”具体包括 VEGF 的天然截短形式或分泌形式(如,胞外区序列),天然变体形式(如,

旁路剪接形式)以及天然衍生的等位变体。在本发明一个实施方案中,天然序列 VEGF 是分别由 121,145,165,189 和 206 个氨基酸残基组成的五种已知同种型之一,对这五种同种型的描述见美国专利 5,332,671 和 5,240,848 ;W098/10071 ;Leung 等,1989,Science 246 :1306-1309 ;Keck 等,1989,Science 246 :1309-1312。

[0123] “VEGF 变体多肽”是指如下定义的活性 VEGF 多肽,其与天然序列 VEGF 的氨基酸序列有至少约 80%,优选至少约 85%,更优选至少约 90%,还更优选至少约 95%,最优选至少约 98%的氨基酸序列同一性。这样的 VEGF 变体多肽包括,例如,在天然序列的 N- 和 / 或 C- 末端、以及一或多个内部结构域中添加或删除一或多个氨基酸残基所形成的 VEGF 多肽。本发明的一个实施方案中,VEGF 是天然 VEGF 的受体特异性变体,如例如 PCT 公开 WO 97/08313 和 WO 00/63380 以及美国专利 6,020,473 中所述。

[0124] VEGF 的序列同一性(无论氨基酸或核酸)采用与 Bv8 或 EG-VEGF 相同的方法来确定。类似地,对 Bv8 或 EG-VEGF 的激动剂和拮抗剂(包括但不限于抗体)的定义也适用于 VEGF 激动剂和拮抗剂。

[0125] 实施本发明的方法

[0126] 本发明基于造血干细胞,系定向的血液祖细胞,和淋巴细胞中 Bv8 和 EG-VEGF 的新表达与活性。具体地,如本文所详述的,Bv8,EG-VEGF 及其受体在骨髓 HSC,外周血白细胞(PBL)以及许多血液恶性细胞系中表达。体外和体内实验都显示,BvS 和 EG-VEGF 能够促进骨髓单个核细胞以及脾来源的定向型单个核祖细胞的集落形成,增加白细胞群体,以及促进 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的活化。因此,Bv8 核酸和多肽,EG-VEGF 核酸和多肽,或其组合可用于多种实验以及造血相关疾病,嗜中性粒细胞减少症,免疫缺陷疾病和自身免疫病的诊断和治疗。

[0127] A. 造血

[0128] 造血指增殖和分化过程,其中不同类型的血细胞自具有增殖和分化能力的多能干细胞发育而来。血液中大多数血细胞寿命较短,由此在一生中可被经常替换。循环成熟血细胞的水平可应答于不同环境应激而迅速改变,所述环境应激的范围包括失血,感染等。胎儿约 20 周后,体内的主要造血位点是骨髓(BM),其为由异源细胞群体组成的组织,包括造血干细胞(HSC),内皮细胞(EC),和其它基质细胞以及参与骨的动态平衡的细胞包括破软骨细胞和破骨细胞。Gerber 和 Ferrara,2003,J. Mol. Med.,81 :20-31。

[0129] 正常造血基于多能干细胞的双重功能。大量自我更新保持了未分化干细胞的群体,而分化导致各种类型成熟血细胞的形成,其可分类为三种主要的血细胞系之一:淋巴细胞,骨髓细胞和红细胞系。淋巴细胞系包括 B 细胞和 T 细胞,其在抗体生成和抗原检测中作为整体起作用,由此作为细胞和体液免疫系统而发挥功能。骨髓细胞系包括单核细胞(巨噬细胞),粒细胞(包括嗜中性粒细胞)和巨核细胞,并监测血流中的抗原,从血流中清除抗原,抗击感染剂,以及产生参与血液凝结的血小板。红细胞系包含血红细胞,其在整个机体内携氧。

[0130] 造血干细胞以及注定要成为嗜中性粒细胞,红细胞,血小板等的定向型祖细胞,可通过具体祖细胞“标记”抗原的存在而与大多数其它细胞区分,所述祖细胞“标记”抗原存在于这些干 / 祖细胞的表面。能够识别这种具体标记抗原的一组抗体被称为“分化簇 34”或“CD34”。术语“CD34+”用于描述具有可被 CD34 抗体组识别的具体细胞表面抗原的细胞。

干细胞是 CD34⁺。然而大部分 CD34⁺ 骨髓细胞是 B 淋巴祖细胞和髓样祖细胞。

[0131] 1. 造血因子

[0132] 早期和分化的造血细胞的发育由 BM 微环境中的周围细胞以及各种非造血器官（例如肝，肾）和正常 T 淋巴细胞分泌的多种造血生长因子，细胞因子，以及化学因子调节。所有这些因子共同调节 BM 中存在的造血细胞的生物功能以及命运。Janowska-Wieczorek 等，2001, Stem Cells, 19 :99-07。

[0133] 已知至少四种集落刺激因子 (CSF) 在嗜中性粒细胞的生成的调控中协同地起作用。这四种因子，称为 GM-CSF (粒细胞和巨噬细胞)，IL-3 (白介素 -3)，G-CSF (粒细胞)，以及 M-CSF (巨噬细胞)，已知为 CSF-1，由巨噬细胞，T 细胞，内皮细胞以及其它类型的细胞合成。祖细胞应答 CSF 的能力部分通过细胞表面上具体 CSF 受体的存在而确定，部分通过所述具体 CSF 的浓度确定。还存在间接刺激的一些指示，其可经由辅助细胞或通过与其它专性生长因子诸如 c-kit 配体，IL-6 (白介素 -6) 7 IL-11 (白介素 -11)，IL-4 (白介素 -4) dIL-1 (白介素 -1) 的协同作用。

[0134] 2. 嗜中性粒细胞

[0135] 人免疫系统的主要感染和疾病抗击细胞是血白细胞 (白细胞)，其来自骨髓细胞系，并在血液系统中循环。在许多类型的白细胞中，中性粒细胞 (含有形状奇特的细胞核以及高度颗粒化的细胞浆的粒细胞亚型)，是最常见的细胞类型并占整个人体内血白细胞的约三分之二。嗜中性粒细胞是可运动的，负责感染产生的趋化刺激，并能够移动到被感染的组织中杀死入侵的微生物。所述杀死行为有赖于嗜中性粒细胞吞噬微生物以及释放氧自由基和杀微生物酶的能力。Baggiolini, 1984, Experientia, 40 :906-909。

[0136] 嗜中性粒细胞从干细胞分化，其中经过一系列中间前体细胞，其可通过它们的显微形态外观来区分，包括诸如细胞核大小，细胞核形状，细胞大小，细胞核 / 胞浆比，颗粒的存在 / 缺失，以及染色性质等。最初，不能在体外直接测定的多能干细胞产生骨髓“祖细胞”，所述祖细胞产生所有骨髓细胞系的前体。第一个髓样祖细胞称为 CFU-GEMM，即“集落形成单位 - 粒细胞，红细胞，巨噬细胞和巨核细胞”。CFU-GEMM 祖细胞反过来会产生 CFU-GM 祖细胞，其也已知为“集落形成单位 - 粒细胞和巨噬细胞”。在所有这些描述性术语中，“集落”指能够在克隆生长体外实验中，在 14 天中产生 50 个细胞以上的细胞，所述实验的条件是本发明实施例 5 所述的条件。这些细胞将分裂至少 6 次。

[0137] CFU-GM 是定向型祖细胞；其仅仅定向分化为粒细胞以及巨噬细胞。它不能分化为其它类型的细胞也不能分化为早期祖细胞。CFU-GM 祖细胞可分化成原粒细胞。从 CFU-GEMM 分化成原粒细胞所需的时间据信为约 1-4 天。原粒细胞是可被称为嗜中性粒细胞“前体”的一系列细胞中的第一种，这是由于所述细胞一旦被允许充分发育 (分化) 可仅仅形成嗜中性粒细胞。嗜中性粒细胞仅仅能够经历少于 6 次细胞分裂，并因此不如前所述在体外集落实验中形成集落。

[0138] 一旦分化进展到原粒细胞阶段，原粒细胞最终分化成早幼粒细胞，其经历约 4-6 天的时程分化成中幼粒细胞。在另外的 5 天左右之内，中幼粒细胞分化成晚幼粒细胞，后者分化为条带型嗜中性粒细胞。这些条带型嗜中性粒细胞最终分化成成熟阶段型嗜中性粒细胞，其半寿期大约 0.3-2 天。术语“祖细胞”指干细胞，以及可形成集落的细胞。“前体”指原粒细胞，早幼粒细胞和中幼粒细胞，以及在一些情况下，指晚幼粒细胞和条带型嗜中性粒

细胞。

[0139] 在该渐进性形态分化过程中,前体细胞表面抗原中的改变可被观察到。例如,干细胞, CFU-GEMM 和 CFU-GM 为 CD34+。在 CFU-GM 阶段以外分化的造血细胞不再是 CD34+。对于细胞表面抗原 CD33 和 CD45RA 也观察到类似的表达进展。所有在早幼粒细胞前体细胞之后的嗜中性前体细胞的特征在于 CD34-, CD33+, CD38+, CD13+, CD45RA-, 和 CD15+。更多成熟细胞的特征在于 CD11+ 和 CD16+ (Terstappen et al., 1990, Leukemia, 4:657)。但是应理解,细胞表面抗原表达中的所述转变是逐渐的,而不是突然的,其中具体前体细胞类型的一些细胞可以是阳性的,相同类型的其它细胞的具体细胞表面抗原可为阴性的。此外,具体细胞类型的具体细胞表面抗原是阳性或阴性的测定部分有赖于用于进行该测定的具体方法。通过细胞表面抗原表达来表征细胞分化可通过表征细胞表达的其它方法诸如细胞形态学来证实。

[0140] “嗜中性粒细胞减少症”是特征在于异常低数目的循环嗜中性粒细胞的疾病。患有嗜中性粒细胞减少症的患者很可能患感染和疾病,这是由于在血液中循环的嗜中性粒细胞的数目减少从实质上损害了所述患者抗击任何入侵生物体的能力。嗜中性粒细胞减少症本身是疾病、遗传疾病、药物、毒素和放射以及许多致病性治疗的结果,所述致病性治疗诸如高剂量化疗 (HDC) 和常规肿瘤治疗。例如,尽管许多癌症被发现对于非常高剂量的放疗或抗肿瘤 (抗癌) 药物敏感,如此大量的 HDC 没有被广泛使用,因为它不仅杀死癌性细胞还经常破坏造血系统细胞,其负责产生保持有效免疫系统所需的多种 (army of) 中性粒细胞。完全破坏嗜中性粒细胞祖细胞与前体细胞消除了所述患者产生成熟中性粒细胞的短期能力,由此严重破坏了所述患者对抗感染的能力。所述患者变成“免疫受损的”,并易患机会性感染。所述疾病最终导致发病和死亡。其它情况也会在存在对造血系统的严重侵害时出现,导致中性粒细胞及其前体实质上减少。

[0141] 3. 血液疾病

[0142] 血液疾病的特征在于血细胞的异常增殖和分化,其可导致血细胞的发育不良性改变以及血液恶性疾病。许多血液疾病的进展都是克隆过程,其中一种细胞类型占主要。一些情况下,其它细胞类型也可异常发育。此外,具体疾病的异常细胞代表未分化的血液祖细胞,无论多能干细胞还是系定向型前体细胞的克隆衍生物。Gerber 和 Ferrara, 2003, J; Mol. Med., 81:20-31; Raskind et al., 1995, Leukemia, 12:108-116。许多血液疾病可分类为白血病,骨髓增生性疾病 (myeloproliferative disorder) (MPD) 和骨髓发育不良性疾病 (myelodysplastic disorder)。这些疾病中许多可出现在成人以及儿童中。

[0143] 急性髓性白血病 (AML) 是最为常见的成人急性白血病类型。多种获得性遗传疾病以及免疫缺陷状态与 AML 的危险性增加相关。这些包括可导致随机染色体断裂的 DNA 稳定性有缺陷的疾病,诸如 Bloom's 综合征,范可尼贫血 (Fanconi's anemia), Li-Fraumeni 家族 (kindred), 共济失调-毛细血管扩张 (ataxia-telangiectasia), 和 X-连锁的无 γ 免疫球蛋白血症。阿糖胞苷 (Ara-C) 已经被单独使用或与蒽环类抗生素或柔红霉素联用以治疗 AML。

[0144] 急性淋巴母细胞白血病 (ALL) 是具有不同亚类显示的独特临床特征的异源疾病。复发性细胞基因异常已经在 ALL 中证实。最常见的细胞基因异常涉及染色 9 和 22 的转位。产生的 Philadelphia 染色体表示患者预后较差。长春新碱,蒽环类抗生素,和泼尼松可用

于治疗 ALL。

[0145] 骨髓增生性疾病 (MPD) 的特征在于造血细胞的异常增生。在每种具体的 MPD 中, 一种具体细胞类型为主, 但有证据表明一些和所有其它 BM 细胞类型也在较小程度上异常增生。例如, 慢性髓性白血病 (CML) 是多能干细胞的克隆性 MPD。CML 的特征在于存在大量在血液中循环的异常成熟粒细胞, 这是由于涉及染色体 9 和 22 转位的特异性染色体异常产生了 Philadelphia 染色体而造成的。电离辐射与 CML 的进展相关。羟基脲, 干扰素 (INF) 和 Ara-C 已经用于治疗 CML 患者。其它常见 MPD 包括, 但不限于, 真性红细胞增多症 (PV; 红细胞过度增生), 原发性血小板减少症 (ET; 血小板过度增生) 和骨髓外化生 (也称为骨髓纤维化)。

[0146] 骨髓发育不良综合征 (MDS) 是一组异源克隆性造血干细胞疾病, 由于在一或多种造血细胞系中存在发育不良性改变, 包括骨髓细胞, 红细胞和巨核细胞系中的发育不良改变。这些改变导致三种细胞系中一或多个细胞系的细胞减少。患有 MDS 的患者通常出现与贫血, 嗜中性粒细胞减少症 (感染), 或血小板减少症 (出血) 相关的并发症。通常约 10% - 约 70% 的 MDS 患者出现急性白血病。

[0147] B. Bv8 和 EG-VEGF

[0148] Bv8 是小分子蛋白, 最初分离自青蛙 *Bombina variegata* 的皮肤分泌物 (Mollay et al., 1999, Eur. J. Pharmacol., 374:189-196)。Bv8 属于以下肽的结构关联种类: 消化性酶辅脂肪酶, *Xenopus* 组织者 (head-organizer), Dickkopf (Glinka et al., 1998, Nature, 391:357-362), 蛇毒蛋白 A (VPRA) (Joubert and Strydom, 1980, Hopper-Seyler's Z. Physiol. Chem., 361:1787-1794) 或 HIT-1 (Schweitz et al. 1999, FERS' L., 461:183-188), *Dendroaspis polylepis polylepis* 蛇毒的非毒性组分, 和新近鉴定的内分泌腺来源的血管内皮生长因子 (EG-VEGF) (LeCouter et al., Nature, 412:877-884 (2001))。独特的结构基序是辅脂肪酶 - 折叠, 其中 10 个半胱氨酸残基形成保守区域内的 5 个二硫桥。EG-VEGF (与 VPRA 有 80% 相同) 及 VPRA 与 Bv8 肽的关系最紧密, 分别具有 83% 和 79% 同一性。最近鉴定了 Bv8 的小鼠和人直向同源物 (也已知为激动素原蛋白 (prokineticin)-2 (PK2)) (Li et al., 2001, Mol. Pharm., 59:692-698), 并报道了这些蛋白的多种活性, 包括对神经元存活, 胃肠平滑肌收缩以及生理周期运动节律的影响。Li et al., 2001; Melchiorri et al., 2001, Eur. J. Neurosci. 13:1694-1702; Cheng et al., 2002, Nature 417:405-410。

[0149] EG-VEGF 和 Bv8 都被鉴定为对特定组织的内皮细胞具有选择活性的血管生成因子。内皮细胞的各种结构和功能性质, 以及来自多种体内和离体系统的证据, 提示局部的组织特异性调节物的存在, 其调节内皮细胞基因型以及生长。人 (h)EG-VEGF mRNA 的表达主要限制于类固醇生成腺体: 卵巢, 睾丸, 肾上腺, 和胎盘。EG-VEGF 促进培养的肾上腺毛细血管内皮细胞的增殖, 迁移, 存活和排列。其在递送到卵巢的情况下诱导大量血管生成, 而对其它组织没有所述影响。LeCouter et al., 2001, Nature, 412:877-884。

[0150] 已经发现 Bv8 主要在睾丸中表达, 并主要限于初级精母细胞 (LeCouter et al., 2003, PNAS 5:2685-2690.)。和 EG-VEGF 一样, Bv8 能够诱导肾上腺毛细血管内皮细胞的增殖, 存活, 和迁移。Bv8 基因表达由低氧应激诱导。将 Bv8 或 EG-VEGF 经由腺病毒载体递送到小鼠睾丸导致有效的血管生成反应。此外, Bv8/EG-VEGF 的两种 G 蛋白偶联的受体

Bv8/EG-VEGF 受体 -1 和 Bv8/EG-VEGF 受体 -2 的表达局限于血管内皮细胞 (LeCouter et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 :2685-2690 ;Lin et al., 2002, J. Biol. Chem. 277 : 19276-19280 ;Masuda et al., 2002, Biochem. Biophys. Res. Commun. 293 :396-402)。睾丸显示相对高的内皮细胞更新率。因此, Bv8 和 EG-VEGF 以及其它因子诸如 VEGF 被认为在保持睾丸血管完整性和调节睾丸血管增生中是重要的。

[0151] C. Bv8 和 EG-VEGF 变体的鉴定

[0152] 除了本文所述全长天然序列 Bv8 和 EG-VEGF 多肽, 还涉及可在本发明中鉴定, 制备和应用的 Bv8 和 EG-VEGF 变体。Bv8 和 EG-VEGF 变体可通过将适合的核苷酸变化引入 Bv8 或 EG-VEGF DNA, 和 / 或通过合成所需 Bv8 或 EG-VEGF 多肽来制备。本领域技术人员可以理解, 氨基酸的变化可以改变 Bv8 或 EG-VEGF 的翻译后加工, 例如改变糖基化位点的数目或位置。制备 Bv8 和 EG-VEGF 变体的方法优选与下文将详细描述的准备天然序列 Bv8 和 EG-VEGF 的方法相同, 但是用编码所述变体的核酸取代编码天然序列的核酸。

[0153] 编码 Bv8 或 EG-VEGF 的核酸分子用于本发明的方法中。编码人 Bv8 的两种全长变体的 cDNA 示于图 1 和 2 (SEQ ID NO :1 和 2), 相应的推导氨基酸序列示于图 2 和 4 (SEQ ID NO :2 和 4)。编码小鼠 Bv8 的 cDNA 示于图 5 (SEQ ID NO :5), 其相应的推导氨基酸序列示于图 6 (SEQ ID NO :6)。编码两种全长天然 EG-VEGF (SEQ ID NO :7 和 9) 的 cDNA 以及相应的推导氨基酸序列 (SEQ ID NO :6) 可用于本发明的方法。本发明中使用多核苷酸可以用本领域技术人员熟知的标准技术, 如杂交筛选和 PCR 方法来获得。

[0154] 编码 Bv8 或 EG-VEGF 的氨基酸序列的任何核苷酸序列都可以用于制备能分别指导 Bv8 或 EG-VEGF 表达的重组分子。本发明的方法还可以利用由 Bv8 编码序列与编码异源蛋白的第二种序列形成的融合多核苷酸。

[0155] 为了从编码完整 Bv8 或 EG-VEGF cDNA 的任何物种 (species) 克隆出全长同源 cDNA 序列, 或者克隆出家族成员或变体形式 (如等位变体), 可以将对应于本文所述 cDNA 序列任何部分的片段制备的标记的 DNA 探针, 用于筛选从据信能表达 Bv8 或 EG-VEGF 的细胞或组织类型衍生的 cDNA 文库。更具体地, 可以用对应于编码序列的 5' 或 3' 末端的寡核苷酸获得更长的核苷酸序列。

[0156] 有可能必需筛选来自不同组织的多重 cDNA 文库, 以便获得全长 cDNA。进行 cDNA 克隆时, 常常难于鉴定编码完整 5' 端编码区的 cDNA 克隆, 在这样的事件中, 可以使用 RACE (cDNA 末端快速扩增) 技术。RACE 是业已证实的一种以 PCR 为基础、扩增不完整 cDNA 的 5' 端的策略。从人的胎盘合成的、含有唯一锚着序列的 5' -RACE-Ready RNA 已有商品 (Clontech)。为了获得 cDNA 的 5' 端, 用所提供的锚着引物和 3' 引物对 5' -RACE-Ready cDNA 进行 PCR。然后用被锚着的引物和一种巢式 3' 引物按照厂家建议进行第二轮 PCR。一旦获得了全长 cDNA 序列, 就可以将其翻译成氨基酸序列, 并检查特定的标记 (landmark), 如, 以翻译起始和终止位点为两侧的连续的开放阅读框, 潜在的信号序列, 以及与本文所述 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 序列的整体结构同一性。

[0157] 备选地, 可以使用下文所述的相应严格条件, 用标记的探针筛选从目的生物衍生的基因组文库。

[0158] 可以根据本文所述的 Bv8 或 EG-VEGF 编码序列, 设计两个简并寡核苷酸引物库, 通过聚合酶链反应 (PCR) 分离出 Bv8 或 EG-VEGF 编码序列或同源序列。该反应的模板可以从,

例如,人或非人细胞系,或者已知或怀疑表达 Bv8 等位基因或 EG-VEGF 等位基因的组织制备的 mRNA 进行反转录 (RT) 而获得。

[0159] 可以将 PCR 产物亚克隆并测序,以确保所扩增的序列代表 Bv8 或 EG-VEGF 的编码序列。然后,用 PCR 片段经各种方法分离全长 cDNA 克隆。例如,可以将所扩增的片段进行标记,并用于筛选噬菌体 cDNA 文库。另一种方法是,用带有标记的片段通过筛选基因组文库来分离基因组克隆。

[0160] PCR 技术也可以用于分离全长 cDNA 序列。例如,可以按照标准方法从适当的细胞来源或组织来源分离 RNA。可以用特异于扩增片段 5' 最末端的寡核苷酸引物对所述 RNA 进行 RT 反应,从而引发第一链合成。然后,使所得 RNA/DNA 杂合体的尾部通过标准的末端转移酶反应而带上 (tailed with) 鸟嘌呤,用 RNAase H 消化该杂合体,然后用 poly-C 引物引发第二链合成。如此一来,可以轻易分离出扩增片段上游的 cDNA 序列。

[0161] 也可以利用,例如 PCR,分离出 Bv8 或 EG-VEGF 基因的突变体或等位基因变体的 cDNA 克隆。在这种情况下,通过使 oligo-dT 寡核苷酸与从推定携带突变 Bv8 等位基因,突变 EG-VEGF 等位基因或其组合的个体中已知或怀疑表达 Bv8, EG-VEGF 或其组合的组织分离得到的 mRNA 杂交来合成第一条 cDNA 链,并用逆转录酶延伸这条新链。然后用与正常基因的 5' 末端特异性杂交的寡核苷酸合成第二条 cDNA 链。再用这两种引物将产物通过 PCR 进行扩增,克隆到合适的载体中,用本领域已知的方法进行 DNA 序列分析。将突变 Bv8 或 EG-VEGF 等位基因的 DNA 序列与正常的 Bv8 等位基因的 DNA 序列进行比较,确定使突变的 Bv8 或 EG-VEGF 基因产物的功能发生损失或改变的突变。

[0162] 另一种方法是,从怀疑或已知携带突变的 Bv8 等位基因或突变的 EG-VEGF 等位基因的个体获得 DNA,用该 DNA 构建基因组文库;或者,从已知或怀疑表达突变的 Bv8 等位基因或突变的 EG-VEGF 等位基因的组织获得 RNA,用该 RNA 构建 cDNA 文库。再将未受损的 (unimpaired) Bv8 基因或其任何合适的片段带上标记,并用作探针,来鉴定所述文库中相应的突变的 Bv8 等位基因。然后将包含所述不同的 Bv8 基因序列的克隆纯化,按照本领域已知方法进行序列分析。

[0163] 另外,可以从怀疑或已知携带突变的 Bv8 等位基因或突变的 EG-VEGF 等位基因的个体中已知或怀疑表达该突变的等位基因的组织分离出 RNA,从该 RNA 合成 cDNA,再用该 cDNA 构建表达文库。在这种方法中,由推定的突变组织制备的基因产物得以表达,并可以按照标准的抗体筛选技术,用抗正常 Bv8 或 EG-VEGF 基因产物的抗体进行筛选,如下所述。

[0164] 本文中,术语核酸,多核苷酸和核苷酸可以互换使用,它们指任何核酸,无论是脱氧核糖还是核糖核酸,也是无论是由磷酸二酯键构成还是由下述经过修饰的键构成,所述经过修饰的键如磷酸三酯,氨基磷酸酯,硅氧烷,碳酸酯,羧甲基酯,氨基乙酸酯 (acetamidate),氨基甲酸酯,硫醚,桥联 (bridged) 氨基磷酸酯,桥联亚甲基膦酸酯,桥联氨基磷酸酯,桥联氨基磷酸酯,桥联亚甲基膦酸酯,硫代磷酸酯,甲基膦酸酯,二硫代磷酸酯,桥联硫代磷酸酯或磺内酯 (sultone) 键,或这些键的组合。

[0165] 术语核酸,多核苷酸和核苷酸具体包括由除了 5 种生物学天然碱基 (腺嘌呤,鸟嘌呤,胸苷,胞嘧啶,和尿嘧啶) 以外的其它碱基组成的核酸。例如,本发明的多核苷酸可以包含至少一个选自下组的经修饰的碱基:5- 氟尿嘧啶,5- 溴尿嘧啶,5- 氯尿嘧啶,5- 碘尿嘧啶,次黄嘌呤, xantine,4- 乙酰基胞嘧啶,5-(羧基羟基甲基) 尿嘧啶,5- 羧基甲基氨基甲

基-2-硫代尿苷,5-羧基甲基氨基甲基-尿嘧啶,二氢尿嘧啶,beta-D-半乳糖基 queosine,次黄嘌呤核苷 N6-异戊烯基腺嘌呤,1-甲基鸟嘌呤,1-甲基次黄嘌呤核苷 2,2-二甲基鸟嘌呤,2-甲基腺嘌呤,2-甲基鸟嘌呤,3-甲基胞嘧啶,5-甲基胞嘧啶,N6-腺嘌呤,7-甲基鸟嘌呤,5-甲基氨基甲基尿嘧啶,5-甲氧基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶,beta-D-甘露糖基 queosine,5N-甲氧基羧基甲基尿嘧啶,5-甲氧基尿嘧啶,2-甲基硫代-N6-异戊烯基腺嘌呤,尿嘧啶-5-氧乙酸(v),wybutoxosine,假尿嘧啶,queosine,2-硫代胞嘧啶,5-甲基-2-硫代尿嘧啶,2-硫代尿嘧啶,4-硫代尿嘧啶,5-甲基尿嘧啶,尿嘧啶-5-氧乙酸甲基酯,尿嘧啶-5-氧乙酸(v),5-甲基-2-硫代尿嘧啶,3-(3-氨基-3-N-2-羧基丙基)尿嘧啶,(acp3)_w,和 2,6-二氨基嘌呤。

[0166] 本发明所用的多核苷酸还可以包含至少一个修饰的糖组分,该糖组分选自阿拉伯糖,2-氟阿拉伯糖,木酮糖,和己糖。

[0167] 本发明的方法并不受多核苷酸来源的限定。所述多核苷酸可以来自人或非人哺乳动物,衍生自任何重组来源,通过体外合成或化学合成。所述核苷酸可以是 DNA 或 RNA,可以是双链,单链或部分双链形式。

[0168] 本发明有用的核酸包括,例如但不限于,寡核苷酸如反义 DNA 和 / 或 RNA ;核酶 ;用于基因治疗的 DNA ;DNA 和 / 或 RNA 嵌合体 ;DNA 的各种结构形式,包括单链 DNA,双链 DNA,超螺旋 DNA 和 / 或三螺旋 DNA ;Z-DNA ;等等。核酸可以通过常用于大量制备核酸的任何常规手段来制备。例如,DNA 和 RNA 可以用市售试剂和合成仪按照本领域已知的方法进行化学合成(参见,例如,Gait,1985,Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach,IRL Press,牛津,英国)。RNA 可以例如诸如 SP65(Promega Corporation, Madison, WI) 等质粒通过体外转录而大量制备。

[0169] 由 Bv8 或 EG-VEGF 核酸序列编码的任何 mRNA 转录物都可以用于本发明的方法中,包括对 mRNA 前体进行旁路剪接或加工所得的 mRNA 转录物。

[0170] 在有些情况下,诸如当希望增加核酸酶的稳定性时,优选具有修饰的核苷酸之间连接键的核酸。具有修饰的核苷酸间键合的核酸也可以用本领域已知的试剂和方法合成。例如,合成含有以下核苷酸之间连接键的核酸的方法是本领域已知的,所述连接键是指磷酸硫代磷酸酯,二硫代磷酸酯,氨基磷酸甲氧基乙基氨基磷酸酯,甲乙缩醛(formacetal),硫代甲乙缩醛(thioformacetal),二异丙基甲硅烷基(diisopropylsilyl),氨基乙酸酯,氨基甲酸酯,二亚甲基-硫醚(sulfide)(-CH₂-S-CH₂),二亚甲基-亚砷(-CH₂-SO-CH₂),二亚甲基-砷(-CH₂-SO₂-CH₂),2'-O-烷基,和 2'-脱氧-2'-氟硫代磷酸酯(参见,Uhlmann 等,1990,Chem. Rev. 90 :543-584 ;Schneider 等,1990,Tetrahedron Lett. 31 :335 以及其中引用的参考文献)。

[0171] 在本发明一些实施方案中,所用的核苷酸是 α -端基异构(anomeric)核苷酸。 α -端基异构核苷酸与互补 RNA 形成特异性双链杂合体,其中的链彼此平行,而不是形成通常的 β -单位(Gautier 等,1987,Nucl. Acids Res. 15 :6131-6641)。所述核苷酸是 2'-O-甲基核糖核苷酸(Inoue 等,1987, Nucl. Acids Res. 15 :6131-6148),或嵌合 RNA-DNA 类似物(Inoue 等,1987, FEBS Lett. 215 :327-330)。

[0172] 所述核酸可以用本领域已知的任何适当方法进行纯化。例如,可以通过反相或离子交换 HPLC,大小排阻层析或凝胶电泳来纯化核酸。当然,本领域技术人员应能认识到,纯

化方法部分地取决于需要纯化的 DNA 的大小。

[0173] Bv8 编码序列, EG-VEGF 编码序列以及其组合的经过分离或纯化并具有至少 10 个核苷酸 (即可杂交部分) 的多核苷酸或其互补物, 也可以用于本发明的方法中。在其它实施方案中, 所述多核苷酸包含 Bv8 编码序列, EG-VEGF 编码序列以及其组合的至少 25 个 (连续) 核苷酸, 50 个核苷酸, 100 个核苷酸, 150 个核苷酸, 或 200 个核苷酸, 或包含 Bv8 编码序列, EG-VEGF 编码序列以及其组合的全长。核酸可以是单链或双链。此外, 本发明涉及与上述编码序列选择性杂交的多核苷酸。在优选的实施方案中, 所述多核苷酸包含 Bv8 编码序列, EG-VEGF 编码序列以及其组合的至少 10, 25, 50, 100, 150 或 200 个核苷酸或其全长。

[0174] 编码 Bv8 或 EG-VEGF 突变体, Bv8 或 EG-VEGF 肽片段, Bv8 或 EG-VEGF 截短形式, 和 Bv8 或 EG-VEGF 融合蛋白的核苷酸序列也可以用于本发明的方法中。编码融合蛋白的核苷酸包括, 但不限于, 全长 Bv8 或 EG-VEGF 序列, Bv8 或 EG-VEGF 的截短形式, 或者与不相关蛋白或肽融合的编码 Bv8 或 EG-VEGF 肽片段的核苷酸, 例如, 与 Ig Fc 区融合而增强所得融合蛋白 (如 Bv8-Ig 或 EG-VEGF-Ig) 在血流中的稳定性和半寿期; 或者酶, 例如可以用作标志物的荧光蛋白或发光蛋白。

[0175] 此外, 本发明方法中可以使用至少部分地通过一些形式的变革, 如美国专利 5, 605, 793 和 5, 837, 458 中所述的基因改组和 / 或回归 (recursive) 序列重组而产生的 Bv8 或 EG-VEGF 多核苷酸变体。例如, 可以利用这样的技术, 以一或多个 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 编码序列作为起始点, 来产生编码具有改变的功能和 / 或结构特性的功能性和 / 或结构性类似蛋白的新序列。

[0176] 与上述编码 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的多核苷酸序列高度相关的基因同系物也可以用于本发明。高度相关的基因同系物是编码蛋白的多核苷酸, 它们与天然 Bv8 或 EG-VEGF 的氨基酸序列, 例如图 2 或图 4 (SEQ ID NO :2 和 4) 所示的人成熟 Bv8 的氨基酸序列, 以及成熟人 EG-VEGF (SEQ ID NO :28) 具有至少约 60% 的氨基酸序列同一性, 优选至少约 65%, 70%, 75%, 80%, 优选以 1% 的增量从至少约 85% 递增到至少约 99% 的氨基酸序列同一性。高度相关的同系物可以编码与 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 具有相同功能活性的蛋白。

[0177] 本发明方法的有利之处还在于可以利用以下物质: (a) DNA 载体, 包含上述任一种 Bv8 或 EG-VEGF 编码序列和 / 或其互补体 (即反义序列); (b) DNA 表达载体, 包含上述任一种 Bv8 或 EG-VEGF 编码序列、且该序列与指导其表达的调节元件可操作相连; (c) 遗传工程化宿主细胞, 包含上述任一种 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 编码序列或其组合, 所述序列与指导其在宿主细胞中表达的调节元件可操作相连; 和 (d) 遗传工程化宿主细胞, 其在外源引入的调节元件控制之下表达内源 Bv8 或 EG-VEGF 基因 (即基因活化)。

[0178] 天然序列 Bv8 或 EG-VEGF 中或者本文所述 Bv8 或 EG-VEGF 的结构域中的变异, 可以通过, 例如, 进行保守和非保守突变的任何技术和指南来产生, 例如, 参见美国专利 5, 364, 934。变异可以是取代、缺失或插入一或多个编码 Bv8 或 EG-VEGF 的密码子, 使该 Bv8 或 EG-VEGF 的氨基酸序列与天然序列 Bv8 或 EG-VEGF 相比发生改变。可选地, 所述变异是将 Bv8 或 EG-VEGF 的一或多个结构域中的至少一个氨基酸用另一氨基酸取代。确定哪一个氨基酸残基可以进行插入、取代或缺失而不影响所需活性的方法可以是, 将 Bv8 或 EG-VEGF 的序列与已知的同源蛋白分子的序列进行比较, 并使高度同源区域中氨基酸序列变化的数量最小。氨基酸取代可以是将一个氨基酸替换为具有相似结构和 / 或化学特性的另一氨基

酸,如将亮氨酸替换为丝氨酸,即保守氨基酸替换。插入或缺失可以任选在约 1-5 个氨基酸的范围内。所能允许的变异可以如下确定:在所述序列中进行总体(systematically)的氨基酸插入、缺失或取代,并检验所得变体是否具有全长或成熟天然序列的活性。

[0179] Bv8 多肽片段或 EG-VEGF 多肽片段也可以用于本发明方法中。这样的片段可以是,与全长天然蛋白相比,在 N-末端或 C-末端截短,或缺少内部残基。一些片段缺少 Bv8 多肽或 EG-VEGF 多肽的目标生物活性所不必需的氨基酸残基。

[0180] Bv8 片段或 EG-VEGF 片段可以用多种常规技术中的任一种来制备。所需肽片段可以化学合成。另外的方法涉及对 Bv8 或 EG-VEGF 片段进行酶消化,例如用已知在特定氨基酸所占据的位点进行切割的酶处理所述蛋白,或用合适的限制酶消化 DNA 并分离所需片段。另一种合适的技术涉及分离并通过聚合酶链反应(PCR)扩增编码所需多肽片段的 DNA 片段。在 PCR 中,可以利用该 DNA 片段所需末端的寡核苷酸作为 5' 和 3'。优选 Bv8 或 EG-VEGF 多肽片段与天然 Bv8 多肽和 / 或天然 EG-VEGF 多肽具有至少一种相同的生物学和 / 或免疫学活性。

[0181] 在具体实施方案中,感兴趣的保守取代见表 1 的“优选取代”栏。如果这些取代引起生物学活性的改变,则可引入表 1 中“取代举例”栏的更实质性改变,或进一步在下文的氨基酸分类中所述的更实质性改变,并筛选产物。

[0182] 表 1

[0183]

原始残基	取代举例	优选取代
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸	leu
Leu (L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	ile

[0184]

Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr; cys	cys
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 正亮氨酸	leu

[0185] Bv8 或 EG-VEGF 多肽的功能或免疫学特性的实质改变可通过选择性取代来完成,所选的取代应在维持 (a) 取代区多肽骨架的结构,例如片层结构或螺旋构象, (b) 该分子的靶位点的电荷或疏水性, (c) 侧链的大小,这几方面有显著不同的效应。天然残基根据共有的侧链特性可分为:

[0186] (1) 疏水性:正亮氨酸,甲硫氨酸,丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸异亮氨酸

[0187] (2) 中性亲水:半胱氨酸,丝氨酸,苏氨酸

[0188] (3) 酸性:天冬氨酸,谷氨酸

[0189] (4) 碱性:天冬酰胺,谷氨酰胺,组氨酸,赖氨酸,精氨酸

[0190] (5) 影响侧链定向的残基:甘氨酸,脯氨酸

[0191] (6) 芳香族:色氨酸,酪氨酸,苯丙氨酸。

[0192] 非保守取代将限定上述某一类的成员被另一类取代。也可以将这类取代残基引入保守取代位点,更优选引入剩余(非保守)位点。

[0193] 可以使用本领域已知方法如寡核苷酸-介导的(定点)诱变、丙氨酸扫描,和 PCR 诱变技术来产生变异。可以对克隆的 DNA 实施定点诱变(Carter 等, Nucl. Acids Res., 13:4331(1986); Zoller 等, Nucl. Acids Res., 10:6487(1987))、盒式诱变(Wells 等, Gene, 34:315(1985))、限制选择诱变(Wells 等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415(1986))或其它已知技术以产生 Bv8 变体 DNA 和/或 EG-VEGF 变体 DNA。

[0194] 扫描氨基酸分析也可用于沿邻接序列鉴定一个或多个氨基酸。优选的扫描氨基酸是相对较小的中性氨基酸。此类氨基酸包括丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸和半胱氨酸。丙氨酸通常是此组中优选的扫描氨基酸,因为它不存在 β -碳上的侧链并且极少改变变体的主链构象(Cunningham 和 Wells, Science, 244:1081-1085(1989))。优选丙氨酸的另一原因是因为它是最常用氨基酸。而且,它常常既出现在埋藏位置也出现在暴露位置(Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1(1976))。如果丙氨酸取代不能产生足够量的变体,则可使用同构(isoteric)氨基酸。

[0195] D. 制备 Bv8, EG-VEGF, 及其变体

[0196] 适合于制备 Bv8, EG-VEGF, 及其变体的技术是本领域已知的。鉴于优选的技术对于 Bv8, EG-VEGF, 及其变体而言是一样的,因而下述技术既可以分别应用于 Bv8 和 EG-VEGF 变体也可以分别应用于天然序列 Bv8 和 EG-VEGF。

[0197] 优选的制备方法包括从 Bv8 或 EG-VEGF 的内源性来源分离该多肽,肽合成(用肽合成仪)和重组技术(或这些技术的任意组合)。

[0198] 以下论述主要涉及,通过培养已被含有 Bv8 核酸,EG-VEGF 核酸,或其组合的载体所转化的细胞并从培养物中回收该多肽来重组制备 Bv8 或 EG-VEGF。但本领域技术人员将认识到,还有其它很多种制备 Bv8 和或 EG-VEGF 的方法。

[0199] 简言之,该方法涉及用构建体(即载体)转化含有 Bv8 或 EG-VEGF 编码基因的原代人细胞,所述构建体包含可以扩增的基因(如二氢叶酸还原酶(DHFR)或下述其它基因)和至少一个侧翼区,该侧翼区有至少约 150bp 且与 Bv8 或 EG-VEGF 基因编码区基因座上的 DNA 序列同源,因而扩增 Bv8 或 EG-VEGF 基因。所述可以扩增的基因必须位于不影响 Bv8 或 EG-VEGF 基因表达的位置。转化应使得所述构建体同源整合到该原代细胞的基因组中,以便限定可以扩增的区域。

[0200] 含有该构建体的原代细胞然后可以借助所述可以扩增的基因或该构建体中存在的其它标记物来进行选择。标记基因的存在可以确认该构建体在宿主基因组中的存在和整合。不需要再对原代细胞进行其它选择,因为可以在第二宿主中进行选择。需要时,同源重组事件的发生可以在进行 PCR 之后如下确定:对所扩增的 DNA 序列测序,或者当存在来自正确的同源整合体的 DNA 时确定 PCR 片段的合适长度并且仅仅扩增含有这类片段的细胞。另外,如果需要,可以在这时,通过将适当的扩增试剂(当可以扩增的基因是 DHFR 时,扩增试剂是氨甲蝶呤)作用于(stress)所选出的细胞,使这些细胞扩增,从而获得靶基因的多个拷贝。但优选直到下述第二轮转化之后再行扩增步骤。

[0201] 上述扩增步骤之后,从所选的原代细胞中分离出具有足以包括完整可扩增区的大小的基因组 DNA 部分。然后用这些基因组 DNA 部分转化第二种哺乳动物表达宿主细胞,对细胞进行克隆,选出包含可扩增区的克隆。然后,在可扩增区尚未在原代细胞中扩增的情况下,用扩增试剂使可扩增区扩增。最后,对那些已包含多拷贝可扩增区(含有 Bv8 或 EG-VEGF)的第二种表达宿主细胞进行培养,从而表达所述基因并产生所述蛋白。

[0202] 编码 Bv8 或 EG-VEGF 的 DNA 可以从 cDNA 文库获得,所述 cDNA 文库是从据信具有 Bv8mRNA 或 EG-VEGF mRNA 并且以可测得的水平表达 Bv8 或 EG-VEGF 的组织制备的。因此,可以从人多重组织制备的 cDNA 文库中很方便地得到 Bv8 或 EG-VEGF DNA。也可以从基因组文库或通过寡核苷酸合成来获得编码 Bv8 或 EG-VEGF 的基因。

[0203] 文库可以使用为鉴别目的基因或其编码的蛋白而设计的探针(如抗 Bv8 或抗 EG-VEGF 抗体或至少约 20-80 个碱基的寡核苷酸)来筛选。用所选探针筛选 cDNA 或基因组文库可以按照标准操作进行,如 Sambrook 等在 Molecular Cloning:A Laboratory Manual(New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) 中第 10-12 章所述方法。另一种分离编码 Bv8 或 EG-VEGF 的基因的方法,是使用 Sambrook 等(出处同上)第 14 章所述的 PCR 方法。

[0204] 分离 Bv8cDNA 和/或 EG-VEGF cDNA 的优选方法是,使用精心选出的寡核苷酸序列筛选来自各种人组织的 cDNA 文库。选作探针的寡核苷酸序列应当具有足够的长度并且足够明确(unambiguous),以便使假阳性出现机率最小。优选的序列是从本文所述天然 Bv8 或 EG-VEGF 获得的。

[0205] 寡核苷酸必须带有标记,使其能通过正在筛选的文库中的 DNA 杂交而被检测。

优选的标记方法是如本领域所公知的那样,用 ^{32}P - 标记的 ATP 和多核苷酸激酶使寡核苷酸带上放射性标记。也可以使用其它方法标记寡核苷酸,包括但不限于,生物素标记或酶标记。

[0206] 可以将编码 Bv8 或 EG-VEGF 的核酸(如 cDNA 或基因组 DNA)插入复制载体以便进一步克隆(扩增该 DNA)或进行表达。可以使用的载体有很多。载体组分通常包括,但不限于,以下一或多项:信号序列,复制起点,一或多个标记基因,增强子元件,启动子,以及转录终止序列。

[0207] 本发明的 Bv8 或 EG-VEGF 不仅可以直接重组制备,还可以制备成与异源多肽融合的多肽,所述异源多肽优选信号序列或在成熟蛋白或多肽的 N- 末端具有特异性切割位点的其它多肽。通常,信号序列可以是载体的组分,或者是插入该载体的 Bv8 或 EG-VEGF DNA 的一部分。所选的异源信号序列优选是能被宿主细胞识别并加工(即被信号肽酶切割)的信号序列。对于不能识别并加工天然 Bv8 或 EG-VEGF 信号序列的原核宿主细胞来说,可以将信号序列替换为选自下组的原核信号序列:碱性磷酸酶,青霉素酶, lpp, 或热稳定肠毒素 II 前导序列。为了进行酵母分泌,可以将天然信号序列替换为,例如,酵母转化酶前导序列, α 因子前导序列(包括糖酵母 α 因子前导序列和 1991 年 4 月 23 日授权的美国专利 5,010,182 所述的克鲁维酵母 α 因子前导序列),或酸性磷酸酶前导序列,白色念珠菌葡萄糖淀粉酶前导序列(EP 362,179,公开于 1990 年 4 月 4 日),或于 1990 年 11 月 15 日公开的 W090/13646 描述的信号。在哺乳动物细胞表达中,天然信号序列(如通常在体内指导 Bv8 或 EG-VEGF 从人的细胞中分泌的 Bv8 或 EG-VEGF 前序列)可以满足要求,但其它哺乳动物信号序列也是适合的,如来自其它动物 Bv8 多肽的信号序列,来自相同或相关物种的分泌多肽的信号序列,以及病毒的分泌前导序列,如单纯疱疹病毒 gD 信号。

[0208] 可以将所述前体区域的 DNA 与编码成熟 Bv8 或 EG-VEGF 或其可溶性变体的 DNA 连接在同一个阅读框内。

[0209] 表达载体和克隆载体都包含能使该载体在一或多种选定的宿主细胞中复制的核酸序列。一般情况下,在克隆载体中,这种序列是能使该载体独立于宿主染色体 DNA 而复制的序列,包括复制起点或自我复制序列。这样的序列在各种细菌、酵母和病毒中都是众所周知的。质粒 pBR322 的复制起点适合大多数革兰氏阴性细菌,2 μ 质粒起点适合酵母菌,多种病毒起点(SV40,多瘤病毒(Polyoma),腺病毒, VSV 或 BPV) 可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。复制起点组分一般不是哺乳动物表达载体所必需的(SV40 起点的使用通常仅仅是由于其包含早期启动子)。

[0210] 大多数表达载体都是“穿梭”载体,即它们能在至少一类生物中复制但可以转移到另一生物中进行表达。例如,可以在大肠杆菌中克隆出载体,然后将该载体转移到酵母或哺乳动物细胞中进行表达,即使它不能独立于宿主细胞染色体而复制也无所谓。

[0211] DNA 也可以通过插入宿主基因组而扩增。这可以利用芽孢杆菌作为宿主,通过,例如在该载体中包含与芽孢杆菌基因组 DNA 中找到的序列互补的 DNA 序列而很容易地实现。用该载体转化芽孢杆菌导致基因组与 Bv8DNA 和 / 或 EG-VEGF DNA 插入片段之间发生同源重组。但编码 Bv8 或 EG-VEGF 的基因组 DNA 的回收比外源复制载体的回收更复杂,因为必需用限制酶消化 Bv8 和 / 或 EG-VEGF DNA。

[0212] 表达载体和克隆载体应该包含选择基因,也称选择标记。该基因编码使经过转化

的宿主细胞在选择性培养基中存活或生长所必需的蛋白。没有被包含该选择基因的载体转化的宿主细胞在所述选择性培养基中不能存活。典型的选择基因编码具有以下性质的蛋白：(a) 赋予对抗生素或其它毒素（如氨基青霉素，新霉素，氨基蝶呤或四环素）的抗性，(b) 弥补营养缺陷，或 (c) 提供复合培养基不能供给的关键营养物，例如编码芽孢杆菌 D- 丙氨酸消旋酶的基因。

[0213] 选择方案的一个实例是利用药物限制 (arrest) 宿主细胞的生长。那些被异源基因成功转化的细胞产生一种赋予药物抗性的蛋白，从而在该选择环境中存活。这种显性选择可以采用的药物有新霉素，霉酚酸和潮霉素。

[0214] 适合于哺乳动物细胞的另一例选择标记是允许鉴定能摄取 Bv8 核酸的细胞的那些，如 DHFR 或胸苷激酶。可以将哺乳动物细胞转化体置于仅有转化体通过摄取该标记物而存活的选择压力下。选择压力通过将转化体培养在具有连续变化的选择试剂浓度的培养基中来实施，所述连续变化的浓度导致选择基因和编码 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的 DNA 都被扩增。扩增是指，对生长十分关键的那些蛋白的生产所重点需要的基因在连续数代重组细胞的染色体中被不断复制 (reiterated in tandem) 的过程。扩增的 DNA 不断地合成 Bv8 和 / 或 EG-VEGF。扩增基因的其它实例包括金属硫蛋白 -I 和 -II，优选灵长类金属硫蛋白基因，腺苷脱氨酶，鸟氨酸脱羧酶等。一种优选的载体系统可参见美国专利 5, 561, 053。

[0215] 例如，用 DHFR 选择基因转化的细胞首先通过将所有转化体培养在包含氨基蝶呤 (Mtx, 为 DHFR 的一种竞争型拮抗剂) 的培养基中进行鉴定。当采用野生型 DHFR 时，合适的宿主细胞包括 DHFR 活性有缺陷的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系，其制备和增殖参见 Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 :4216 (1980)。然后将经过转化的细胞暴露于浓度渐增的氨基蝶呤。这导致合成多拷贝的 DHFR 基因，同时还合成多拷贝的包含在所述表达载体中的其它 DNA，如编码 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的 DNA。当采用 Mtx 高抗性 DHFR 突变基因时，这种扩增技术可以使用其它合适的宿主细胞，如 ATCC CCL61CHO-K1，尽管它存在内源 DHFR (EP 117, 060)。

[0216] 或者，宿主细胞（尤其包含内源 DHFR 的野生型宿主）被编码 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 野生型 DHFR 蛋白以及另一种选择标记如氨基糖苷 3' - 磷酸转移酶 (APH) 的 DNA 序列转化或共转化以后，可以通过在含有针对该选择标记的选择试剂如氨基糖苷类抗生素（如卡那霉素，新霉素或 G418）的培养基中培养细胞来进行选择。参见美国专利 4, 965, 199。

[0217] 适用于酵母的合适选择基因是存在于酵母质粒 YRp7 中的 trp1 基因 (Stinchcomb 等, Nature, 282 :39 (1979))。Trp1 基因为不能在色氨酸中生长的酵母突变株（例如 ATCC 44076 或 PEP4-1）提供了选择标记 (Jones, Genetics, 85 :12 (1977))。此后，酵母宿主细胞基因组中 trp1 损伤的存在提供了通过在缺乏色氨酸的条件中生长而检测转化的有效环境。类似地，Leu2- 缺陷型酵母菌株 (ATCC 20, 622 或 38, 626) 可以由携带 Leu2 基因的已知质粒来互补。

[0218] 此外，源自 1.6 μ m 环状质粒 pKD1 的载体可以用于转化克鲁维酵母 (Kluyveromyces)。Bianchi 等, Curr. Genet., 12 :185 (1987)。最近，Van den Berg, Bio/Technology, 8 :135 (1990) 报道了一种用于在乳克鲁维酵母 (K. lactis) 中大规模制备重组小牛凝乳酶的表达系统。还有人公开了用于通过克鲁维酵母工业菌株分泌成熟重组人血清白蛋白的稳定、多拷贝表达载体。Fleer 等, 1991 Bio/Technology, 9 :968-975。

[0219] 表达载体和克隆载体通常包含能被宿主生物识别的启动子,它与 Bv8 核酸可操作相连。启动子是位于结构基因的起始密码子上游(5',一般相距不超过大约 100-1000bp)的非翻译序列,它控制着与之可操作相连的具体核酸序列,如 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 核酸序列的转录和翻译。这种启动子通常分为诱导型和组成型这两类。诱导型启动子,当培养条件发生一些改变,例如存在或缺乏某种营养,或者温度改变时,应答这样的改变而使受其控制的 DNA 的转录水平升高的那些启动子。迄今为止,由不同的宿主细胞识别的非常多种启动子已为本领域熟知。通过限制酶消化而从来源 DNA 取出启动子,并将分离的启动子序列插入载体,从而将这些启动子与编码 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的 DNA 可操作相连。天然 Bv8 或 EG-VEGF 启动子序列和多种异源启动子都可以用于指导 Bv8 或 EG-VEGF DNA 的扩增和 / 或表达。但优选异源启动子,因为它们与天然启动子相比,通过能引起 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的更强转录并获得更高的产量。

[0220] 适用于原核宿主的启动子,包括 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统(Chang 等, Nature, 275 :615(1978);Goeddel 等, Nature, 281 :544(1979)),碱性磷酸酶,色氨酸(trp)启动子系统(Goeddel, 核酸 Res., 8 :4057(1980);EP 36776),和杂化启动子如 tac 启动子。deBoer 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 :21-25(1983)。也可以使用其它已知的细菌启动子。它们的核苷酸序列已经公开,因此本领域技术人员可以利用接头或衔接子来提供任何所需的限制性位点,将已知启动子与编码 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的 DNA 可操作相连(Siebenlist 等, Cell, 20 :269(1980))。适用于细菌系统的启动子还可以包含与编码 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的 DNA 可操作相连的 Shine-Dalgarno(S. D.) 序列。

[0221] 真核生物的启动子序列也是已知的。几乎所有的真核基因在转录起始点上游约 25-30 个碱基处具有 AT- 富集区。很多基因在其转录起始点上游 70-80 个碱基处有另一种序列: CXCAAT, 其中 X 可以是任何核苷酸。大多数真核基因的 3' 端是 AATAAA 序列,它可以作为一种信号用于将 poly-A 尾添加到编码序列 3' 端。所有这些序列都适合于插入真核表达载体中。

[0222] 适用于酵母宿主的启动子实例包括: 3-磷酸甘油酸激酶(Hitzeman 等, J. Biol. Chem., 255 :2073(1980))或其它糖酵解酶(Hess 等, J. Adv. Enzyme Reg., 7 :149(1968);Holland, Biochemistry, 17 :4900(1978))的启动子,所述其它糖酵解酶如烯醇化酶,甘油醛-3-磷酸脱氢酶,己糖激酶,丙酮酸脱羧酶,磷酸果糖激酶,葡萄糖-6-磷酸异构酶,3-磷酸甘油变位酶,丙酮酸激酶,磷酸丙糖异构酶,磷酸葡萄糖异构酶和葡萄糖激酶。

[0223] 其它的酵母启动子,即那些还具有由生长条件控制转录的优点的诱导型启动子,是下述基因的启动子区: 醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶。在 EP 73,657 中进一步描述了适用于酵母表达系统的载体和启动子。酵母增强子与酵母启动子联合使用也是有利的。

[0224] 在哺乳动物宿主细胞中,从载体转录 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 可以受启动子调控,所述启动子例如来自病毒基因组,如多形瘤病毒、鸡痘病毒(1989 年 7 月 5 日公布的 UK 2211504)、腺病毒(如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猴病毒 40(SV40)的启动子,或者来自异源哺乳动物的启动子,如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子等,来自热休克启动子,以及来自通常与 Bv8 或 EG-VEGF 序列相连

的启动子,前提是这些启动子与宿主细胞系统相容。

[0225] SV40 病毒的早期和晚期启动子可以作为还包含 SV40 病毒复制起点的 SV40 限制性片段而方便地获得。Fiers 等, *Nature*, 273 :113(1978) ;Mulligan 等, *Science*, 209 :1422-1427(1980) ;Pavlaicis 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 :7398-7402(1981)。人巨细胞病毒的即早期启动子可以作为 Hind III E 限制性片段方便地获得。Greenaway 等, *Gene*, 18 :355-360(1982)。美国专利 4,419,446 中公开了在哺乳动物宿主中用牛乳头瘤病毒作为载体来表达 DNA 的系统。美国专利 4,601,978 中叙述了对这个系统改进。另见 Gray 等, *Nature*, 295 :503-508(1982) 中关于在猴细胞中表达编码免疫干扰素的 cDNA ;Reyes 等, *Nature*, 297 :598-601(1982) 中关于在单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子控制下在小鼠细胞中表达人 β 干扰素 cDNA ;Canaani 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 :5166-5170(1982) 中关于在培养的小鼠和兔细胞中表达人干扰素 β 1 基因 ;以及 Gorman 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 :6777-6781(1982) 关于在 CV-1 猴肾细胞、鸡胚成纤维细胞、中国仓鼠卵巢细胞、HeLa 细胞和小鼠 NIH-3T3 细胞中,用劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子来表达细菌 CAT 序列。

[0226] 编码 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的 DNA 在高等真核生物中的转录常常通过将增强子序列插入载体中来增加。增强子是作用于启动子以增加其转录的 DNA 顺式作用元件,一般约 10 ~ 300bp。增强子相对不太依赖于方向和位置,见于转录单元的 5' 端 (Laimins 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 :993(1981)) 和 3' 端 (Lusley 等, *Mol. Cell Bio.*, 3 :1108(1983)), 内含子内部 (Banerji 等, *Cell*, 33 :729(1983)), 以及编码序列的内部。Osborne 等, *Mol. Cell Bio.*, 4 :1293(1984)。目前已知很多哺乳动物基因 (球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素) 的增强子序列。但通常使用真核细胞病毒的增强子。实例包括在其复制起始点晚期侧的 SV40 增强子 (bp 100-270), 巨细胞病毒早期启动子增强子, 在其复制起始点晚期侧的多形瘤增强子, 和腺病毒增强子。也可参见 Yaniv, *Nature*, 297 :17-18(1982) 所述用于活化真核启动子的增强元件。所述增强子可以剪接插入载体中 Bv8 或 EG-VEGF 编码序列的 5' 或 3' 侧, 但优选位于启动子的 5' 侧。

[0227] 用于真核宿主细胞 (酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其它多细胞生物的有核细胞) 的表达载体, 还包括对转录终止和稳定 mRNA 所必需的序列。这些序列通常来自真核或病毒 DNA 或 cDNA 的 5' (偶尔为 3') 非翻译区。这些区域包含转录为编码 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的 mRNA 的非翻译区中聚腺苷酸化片段的核苷酸片段。

[0228] 包含上述一或多个组分的合适载体的构建可以利用标准连接技术。分离的质粒或 DNA 片段经过切割, 修剪 (tailored), 并重新连接为所需形式, 以便产生所需质粒。

[0229] 为了通过分析来证实所构建的质粒中的正确序列, 可用连接混合物转化大肠杆菌 K12 菌株 294 (ATCC 31,446), 并用相应的氨苄青霉素或四环素抗性选择成功的转化子。从转化子制备质粒, 通过限制性内切核酸酶消化来分析, 和 / 或用 Messing 等, *Nucleic Acids Res.*, 9 :309(1981) 所述方法或 Maxam 等, *Methods in Enzymology*, 65 :499(1980) 所述方法测序。

[0230] 在 Bv8, EG-VEGF 及其变体的制备中特别有用的是, 能在哺乳动物细胞中瞬时表达编码 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的 DNA 的表达载体。通常, 瞬时表达涉及应用能在宿主细胞中有效复制的表达载体, 从而该宿主细胞积累所述表达载体的多个拷贝, 并合成高水平的由该

表达载体所编码的所需多肽。Sambrook 等, 出处同上 pp. 16. 17-16. 22。包含适宜表达载体及宿主细胞的瞬时表达系统, 允许对克隆化 DNA 所编码的多肽进行方便地阳性鉴定, 还允许快速筛选这些多肽的所需生物特性或生理特性。因此, 瞬时表达系统特别可用于本发明鉴定具有 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 生物活性的 Bv8 类似物和变体的目的。

[0231] 适应于在重组脊椎动物细胞培养物中合成 Bv8 的其它方法, 载体, 和宿主细胞在 Gething 等, *Nature*, 293 :620-625 (1981) ;Mantei 等, *Nature*, 281 :40-46 (1979) ;EP 117, 060 ;和 EP 117, 058 中描述。特别可用于 Bv8 的哺乳动物细胞培养表达的质粒是 pRK5 (EP 307, 247) 或 pSVI6B。WO 91/08291, 1991 年 6 月 13 日公开。

[0232] 克隆或表达本文所述载体中 DNA 的适宜宿主细胞, 包括原核生物、酵母或高等真核细胞。适于此目的的原核生物包括真细菌, 如革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌, 例如肠杆菌科 (Enterobacteriaceae), 如埃希氏菌属 (*Escherichia*), 例如, 大肠杆菌 (*E. coli*), 肠杆菌属 (*Enterobacter*), 欧文菌属 (*Erwinia*), 克雷白菌属 (*Klebsiella*), 变形菌杆属 (*Proteus*), 沙门菌属 (*Salmonella*) (如鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*)), 沙雷菌属 (*Serratia*) (如粘质沙雷菌 (*Serratia marcescans*)) 和志贺菌属 (*Shigella*) 等, 以及芽孢杆菌属 (*Bacilli*) 如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) (例如 1989 年 4 月 12 日出版的 DD 266, 710 中所述地衣芽孢杆菌 41P) 等, 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 如铜绿菌假单胞菌 (*P. aeruginosa*), 及链霉菌 (*Streptomyces*)。优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294 (ATCC 31, 446), 但其它菌株, 如大肠杆菌 B, 大肠杆菌 X1776 (ATCC 31, 537) 和大肠杆菌 W3110 (ATCC 27, 325) 也是合适的。这些实例是用于说明, 并非限制。W3110 株是一个特别优选的宿主或亲本宿主, 因为它是重组 DNA 产物发酵常用的宿主菌株。优选地, 宿主细胞分泌少量蛋白水解酶。例如, 可以修饰 W3110 株以使编码蛋白的基因中发生遗传突变, 此类宿主的实例包括大肠杆菌 W3110 株 27C7。27C7 的完整基因型是 *tonA* Δ *ptr3* *phoA* Δ *E15* Δ (*argF-lac*) *169ompT* Δ *degP41kan^r*。菌株 27C7 已于 1991 年 10 月 31 日保藏在美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection), 保藏号为 ATCC 55, 244。或者, 可以采用 1990 年 8 月 7 日授权的美国专利 4, 946, 783 中公开的具有突变型周质蛋白酶的大肠杆菌株。

[0233] 除了原核生物, 真核微生物如丝状真菌或酵母也是适合于 Bv8 编码载体的克隆或表达宿主。酿酒酵母或常见的面包酵母是最常用的低等真核宿主微生物。还有多个其它属、种和株已有商品供应, 并且可以用于本发明, 例如粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach 等, *Nature*, 290 :140 (1981) ;1985 年 5 月 2 日公布的 EP 139, 383) ;克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 宿主 (美国专利 4, 943, 529 ;Fleer 等, 出处同上), 例如乳克鲁维酵母 (*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574 ;Louvencourt 等, *J. Bacteriol.*, 737 (1983))、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12, 424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16, 045)、威克曼氏克鲁维酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC24, 178)、*K. waltii* (ATCC 56, 500)、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilarum*) (ATCC36, 906 ;Van den Berg 等, 出处同上)、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*) 和马克斯克鲁维氏酵母 (*K. marxianus*) 等 ;*yarrowia* (EP 402, 226) ;巴斯德毕赤酵母 (*pichia pastoris*) (EP 183, 070 ;Sreekrishna 等, *J. Basic Microbiol.*, 28 :265-278 (1988)) ;念珠菌属 ;*Trichoderma reesia* (EP 244, 234) ;粗糙链孢霉 (Case 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 :5259-5263 (1979)) ;许旺氏酵母属

(schwanniomyces) 如西方许旺氏酵母 (schwanniomyces occidentalis) (1990 年 10 月 31 日公布的 EP 394, 538) 等; 和丝状真菌, 例如链孢霉属、青霉属、*Tolypocladium* (1991 年 1 月 10 日公布的 WO 91/00357) 以及曲霉属宿主如构巢曲霉 (Ballance 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 (1983); Tilburn 等, *Gene*, 26:205-221 (1983); Yelton 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1470-1474 (1984)) 和黑曲霉等 (Kelly 等, *EMBO J.*, 4:475-479 (1985))。

[0234] 适合于表达糖基化 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的宿主细胞来自多细胞生物。这样的宿主细胞能将加工活性和糖基化活性组合在一起。原则上, 任何高等真核细胞培养物都是可以的, 无论它来自脊椎动物培养物还是无脊椎动物培养物。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。目前已经从下述宿主中鉴定了大量的杆状病毒株和变体以及相应的容许型昆虫宿主细胞: 草地夜蛾 (*Spodoptera Frugiperda*, 毛虫)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*, 蚊子)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*, 蚊子)、*Drosophila melanogaster* (果蝇) 和家蚕蛾 (*Bombyx mori*) 等。参见, 例如 Luckow 等, *Bio/Technology*, 6:47-55 (1988); Miller 等, 在 *Genetic Engineering* 中, Setlow 等编, Vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), pp. 277-279; Maeda 等, *Nature*, 315:592-594 (1985)。用于转染的各种病毒株可以公开地获得, 例如加利福尼亚 Y 级夜蛾 (*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变体和家蚕蛾 NPV 的 Bm-5 株, 并且这些病毒可以在此用作本发明的病毒, 尤其是用于转染草地夜蛾细胞。

[0235] 棉花、玉米、土豆、大豆、矮牵牛、西红柿和烟草的植物细胞培养物也可以用作宿主。通常, 植物细胞通过与事先经过操作而含有编码 Bv8 或 EG-VEGF 的 DNA 或其组合的根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株一起保温来进行转染。在植物细胞培养物与根癌土壤杆菌一起保温期间, 编码 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的 DNA 被转移到该植物细胞宿主中, 使它被转染, 然后在适当的条件下表达编码 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的 DNA。此外, 与植物细胞相容的调节序列和信号序列也是可以获得的, 如胭脂氨酸合成酶启动子和聚腺苷酸化信号序列。Depicler 等, *J. Mol. Appl. Gen.*, 1:561 (1982)。此外, 从 T-DNA 780 基因上游区分离的 DNA 片段能活化或增加含有重组 DNA 的植物组织中植物可表达型基因的转录水平。EP 321, 196, 1989 年 6 月 21 日公开。

[0236] 然而, 关注最多的是脊椎动物细胞, 而且在培养 (组织培养) 中繁殖脊椎动物细胞已经成为常规方法。参见, 例如 *Tissue Culture*, Academic Press, Kruse 和 Patterson, 编 (1973)。有效哺乳动物宿主细胞系的实例是用 SV40 转化的猴肾 CV1 细胞系 (COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚肾细胞系 (293 细胞或经过再克隆以便能在悬浮培养物中生长的 293 细胞, Graham 等, *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)); 幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10); 中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO, Urlaub 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77:4216 (1980)); 小鼠足细胞 (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); 猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2); 犬肾细胞 (MDCK ATCC CCL 34); 布法罗 (buffalo) 大鼠肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞 (Hep G2, HB 8065); 小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI 细胞 (Mather 等, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); MRC 5 细胞; FS4 细胞; 和人肝细胞癌细胞系 (Hep G2)。

[0237] 宿主细胞用上述用于制备 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的表达或克隆载体转染 (优选转

化),并在改进型传统营养培养基上培养,所述培养基经改进已适于诱导启动子、筛选转化体或扩增编码所需序列的基因。

[0238] 转染是指由宿主细胞摄取表达载体,而不论事实上是否表达了任何编码序列。多种转染方法是本领域普通技术人员已知的,例如, CaPO_4 沉淀和电穿孔。成功的转染一般在宿主细胞中出现关于该载体操作的任何征兆时可以予以识别。

[0239] 转化是指,将 DNA 引入生物体,使 DNA 能够作为染色体外元件或以染色体整合体的形式复制。根据所用的宿主细胞,用适合于所述细胞的标准技术进行转化。利用氯化钙进行钙处理的方法(见 Sambrook 等,出处同上的 1.82 章节)或电穿孔常用于包含坚固的细胞壁屏障的原核细胞或其它细胞。用根瘤土壤杆菌进行的感染可以用于转化一些植物细胞,参见 Shaw 等, *Gene*, 23:315(1983) 以及 1989 年 6 月 29 日公开的 WO 89/05859。此外,植物可以用 1991 年 1 月 10 日公开的 WO 91/00358 中所述的超声处理方法进行转染。

[0240] 对于没有所述细胞壁的哺乳动物细胞,优选 Graham 等, *Virology*, 52:456-457(1978) 所述的磷酸钙沉淀法。哺乳动物细胞宿主系统转化的综述见 1983 年 8 月 16 日公布的美国专利 4,399,216。酵母转化通常根据 Van Solingen 等, *J. Bact.*, 130:946(1977) 和 Hsiao 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3829(1979) 所述方法进行。但也可使用将 DNA 引入细胞中的其它方法,如核显微注射、电穿孔、使细菌原生质体与完整无损的(intact)细胞融合,或聚阳离子如 polybrene,聚鸟氨酸等。哺乳动物细胞转化的各种技术可参见 Keown 等, *Methods in Enzymology*, 185:527-537(1990) 和 Mansour 等, 1988, *Nature*, 336:348-352。

[0241] 用于产生 Bv8 多肽,EG-VEGF 多肽或其组合的原核细胞在 Sambrook 等,出处同上所一般性描述的合适培养基中进行培养。

[0242] 用于产生本发明 Bv8, EG-VEGF 多肽或其组合的真核宿主细胞可以在各种培养基中培养。市售培养基如 Ham's F10(Sigma),基本必需培养基((MEM)Sigma),RPMI-1640(Sigma),和 Dulbecco 改良 Eagle 培养基((DMEM),Sigma)都适于培养所述宿主细胞。此外,Ham 和 Wallace, *Meth. Enz.*, 58:44(1979),Barnes 等, *Anal. Biochem.*, 102:255(1980),U. S. 4,767,704;4,657,866;4,927,762;4,560,655;或 5,122,469;WO 90/03430;WO 87/00195;U. S. Pat. Re. 30,985 所述的任一种培养基也可以用作宿主细胞培养基。任何上述培养基可以根据需要添加激素和/或其它生长因子(如胰岛素,运铁蛋白,或表皮生长因子),盐(如氯化钠,钙,镁,和磷酸盐),缓冲液(如 HEPES),核苷(如腺苷和胸苷),抗生素(如 Gentamycin™),痕量元素(定义为通常以微摩尔水平的终浓度出现的无机化合物),和葡萄糖或等效能源。还可以包括本领域技术人员已知的适当浓度的任何其它必需添加物。培养条件,如温度,pH 等,都是前面在选定的表达宿主上用到的那些,并且对本领域技术人员而言也是显而易见的。

[0243] 通常,使哺乳动物细胞培养物的生产力最大化的原则、方案、以及具体技术可以参见哺乳动物 Cell Biotechnology:a Practical Approach,M. Butler,编(IRL Press,1991)。

[0244] 该文献中提到的宿主细胞包括培养的细胞以及宿主动物体内的细胞。

[0245] 基因扩增和/或表达,可以基于本文提供的序列选择适当标记的探针,利用诸如常规 Southern 印迹、测定 mRNA 转录量的 Northern 印迹(Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA, 77 :5201-5205 (1980))、斑点 (DNA 分析) 或原位杂交, 直接在样品中测定。可以采用各种标记, 最常见放射性同位素, 尤其是 ^{32}P 。也可以采用其它技术, 如用生物素修饰的核苷酸来引入多核苷酸。该生物素然后可以作为亲和素或抗体的结合位点, 后者可以带有各种标记, 如放射性核素, 荧光, 酶等等。或者, 可以使用能够识别特异双链体的抗体, 所述双链体包括 DNA 双链体、RNA 双链体和 DNA-RNA 杂合双链体或者 DNA-蛋白双链体。抗体也可以带有标记, 试验在双链体与表面结合之处进行, 因此通过在表面形成双链体可以检测与双链体结合的抗体的存在。

[0246] 或者, 基因表达可以通过免疫学方法, 如组织切片的免疫组化染色和细胞培养物或体液的来分析来测定, 以便直接确定基因产物的表达量。有了免疫组化染色技术, 就可以制备细胞样品 (通常通过脱水和固定来制备), 然后将其与特异于所结合的基因产物的标记抗体反应, 所述标记一般是可以目测观察到的, 如酶标记, 荧光标记, 发光标记等。适用于本发明的一种具体的敏感染色技术可参见 Hsu 等, 1980, *Am. J. Clin. Path.*, 75 :734-738。

[0247] 适用于免疫组化染色和 / 或样品液分析的抗体, 可以是单克隆抗体或多克隆抗体, 并且可以如本文所述进行制备。

[0248] Bv8 和 / 或 EG-VEGF 优选从培养基中回收, 为分泌多肽的形式, 也可以从宿主细胞裂解物回收。如果 Bv8 或 EG-VEGF 为膜结合型, 可以用合适的去污剂溶液 (例如 Triton-X 100) 从膜上释放。

[0249] 当 Bv8, EG-VEGF 多肽或其组合是在重组细胞中产生而不是从人源产生时, 该 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 完全不含人源蛋白或多肽。但必需从重组细胞蛋白或多肽纯化 Bv8 和 / 或 EG-VEGF, 以获得本质上均一的 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 制剂。第一步, 可以使培养基或裂解物离心以除去微粒状细胞残渣。然后用以下举例说明的适宜纯化方法, 从污染的可溶性蛋白和多肽中纯化出 Bv8 和 / 或 EG-VEGF: 在离子-交换柱上分级分离; 乙醇沉淀; 反相 HPLC; 硅胶层析; 层析聚焦; 免疫亲和; 表位-标签结合树脂; SDS-PAGE; 硫酸铵沉淀; 使用例如 Sephadex G-75 进行凝胶过滤; 和蛋白 A Sepharose 柱以除去污染物如 IgG。

[0250] E. 修饰 Bv8 和 EG-VEGF

[0251] 本发明包括 Bv8, EG-VEGF 或其变体的共价修饰。一种共价修饰形式包括使 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 多肽的靶氨基酸残基与能与该 Bv8 或 EG-VEGF 的选定侧链或 N- 或 C- 末端残基发生反应的有机衍化剂进行反应。用双功能剂进行的衍化可以用于, 例如, 使 Bv8 或 EG-VEGF 与水溶性支持物基质或表面发生交联, 以便在纯化抗-Bv8 或抗-EG-VEGF 抗体的方法中使用, 反之亦然。常用的交联剂包括, 例如, 1,1- 双 (二偶氮乙酰基)-2- 苯乙烷, 戊二醛, N- 羟琥珀酰亚胺酯, 如与 4- 叠氮基水杨酸的酯, 同型双功能酰亚胺酯, 包括二琥珀酰亚胺酯如 3,3'- 二硫代双 (琥珀酰亚胺基丙酸酯)、双功能马来酰亚胺如双-N- 马来酰亚胺-1,8- 辛烷和试剂如甲基-3-[(对-叠氮苯基)二硫]丙炔亚胺酯。

[0252] 其它修饰包括, 谷氨酰胺基和天冬酰胺基分别脱酰胺成为相应的谷氨酰基和天冬氨酰基, 脯氨酸和赖氨酸羟基化, 丝氨酸或苏氨酸残基的羟基磷酸化, 赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α - 氨基甲基化 (T. E. Creighton, 1983, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86), N- 末端胺的乙酰化, 以及任何 C- 末端羧基的酰胺化。

[0253] 本发明还包括 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 多肽的另一类共价修饰, 所述共价修饰包括改

变多肽的天然糖基化模式。“改变天然糖基化模式”为本文目的是指,删除天然序列 Bv8 中一个或多个糖组分(方法是除去潜在的糖基化位点或利用化学和/或酶手段消除糖基化),和/或添加一或多个在天然序列 Bv8 或 EG-VEGF 中本不存在的糖基化位点。此外,该短语包括天然蛋白糖基化中的性质变化,它涉及不同糖组分在性质和比例上的变化。

[0254] 在 Bv8 或 EG-VEGF 多肽中添加糖基化位点还可以通过改变氨基酸序列来现。所述改变可以是,例如,向天然序列 Bv8 或 EG-VEGF 中添加、或取代一或多个丝氨酸或苏氨酸残基(对 O-连接糖基化位点而言)。任选地,可以通过 DNA 水平的变化,特别是通过使编码 Bv8 多肽的 DNA 中的预定碱基发生突变从而产生出翻译所需氨基酸的密码子,来改变 Bv8 的氨基酸序列。

[0255] 另一种增加 Bv8 或 EG-VEGF 多肽上糖组分数目的方法是,将配糖体(glycoside)通过化学处理或酶处理而与所述多肽偶联。这类方法可参见,例如 1987 年 9 月 11 日公布的 WO 87/05330,以及 Aplin 和 Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 第 259-306 页(1981)。

[0256] Bv8 或 EG-VEGF 多肽中糖组分的去除可以通过化学处理或酶处理来实现,或者通过使编码糖基化靶点的氨基酸残基的密码子发生突变性取代来实现。化学脱糖基化技术为本领域所公知,例如参见 Hakimuddin 等, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52(1987) 和 Edge 等, *Anal. Biochem.*, 118:131(1981)。多肽上糖组分的酶切除可以利用 Thotakura 等, *Meth. Enzymol.*, 138:350(1987) 所述的各种内-和外-糖苷酶来实现。

[0257] Bv8 或 EG-VEGF 的另一类共价修饰包括,按照美国专利 4,640,835、4,496,689; 4,301,144、4,670,417; 4,791,192 或 4,179,337 所述方式,将 Bv8 或 EG-VEGF 多肽连接与诸如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯等各种非蛋白聚合物之一连接。

[0258] 本发明 Bv8 和 EG-VEGF 也可被修饰成嵌合分子,其中包含与另一异源多肽或氨基酸序列融合的 Bv8 或 EG-VEGF。

[0259] 在一个实施方案中,所述嵌合分子包含 Bv8 或 EG-VEGF 与标签多肽所形成的融合体,该标签多肽提供抗-标签抗体可以选择性结合的表位。表位标签一般位于 Bv8 或 EG-VEGF 的氨基-或羧基-末端。Bv8 和/或 EG-VEGF 的这类表位-标记形式的存在可以使用抗标签多肽的抗体来检测。另外,提供表位标签,使 Bv8 和/或 EG-VEGF 能利用抗-标签抗体或另一类与该表位标签结合的亲和基质容易地进行亲和纯化。各种标签多肽及其各自的抗体是本领域众所周知的。实例包括聚-组氨酸(poly-his)或聚-组氨酸-甘氨酸(poly-his-gly)标签;flue HA 标签多肽及其抗体 12CA5(Field 等, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165(1988));c-myc 标签以及针对它的 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和 9E10 抗体(Evan 等, *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616(1985));单纯疱疹病毒糖蛋白 D(gD)标签及其抗体(Paborsky 等, *Protein Engineering*, 3(6):547-553(1990))。其它标签多肽包括 Flag-肽(Hopp 等, *BioTechnology*, 6:1204-1210(1988));KT3 表位肽(Martin 等, *Science*, 255:192-194(1992)); α -微管蛋白表位肽(Skinner 等, *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166(1991));和 T7 基因 10 蛋白肽标签(Lutz-Freyermuth 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397(1990))。

[0260] 在另一实施方案中,嵌合分子可包括 Bv8 和/或 EG-VEGF 与免疫球蛋白或免疫球蛋白特定区域的融合。对于二价形式的嵌合分子(也称“免疫粘附素”)而言,所述融合可以是与 IgG 分子的 Fc 区融合。

[0261] 最简单和最直接的免疫粘附素设计是将“粘附素”蛋白的结合区与免疫球蛋白重链的铰链区和 Fc 区结合。通常,制备本发明所用的 Bv8-免疫球蛋白嵌合体或 EG-VEGF-免疫球蛋白嵌合体时,将编码 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的核酸在 C 末端与编码免疫球蛋白恒定区序列的 N 末端融合,也可以进行 N 末端融合。

[0262] 通常在此融合中,编码的嵌合多肽至少保留免疫球蛋白重链恒定区的功能活性铰链区、CH2 和 CH3 区。还可以与恒定区的 Fc 区的 C 末端或者紧邻重链 CH1 的 N-末端处或轻链的相应区域进行融合。

[0263] 进行所述融合的确切位点并不重要;具体位点是众所周知的,并且为了使 Bv8-免疫球蛋白嵌合体的生物活性最佳,可以对这些位点进行选择。

[0264] 在一些实施方案中,Bv8-免疫球蛋白嵌合体和 / 或 EG-VEGF-免疫球蛋白嵌合体被组装成单体,或者异型或同型多聚体,尤其二聚体或四聚体,基本上如 WO 91/08298 所述。

[0265] 在优选实施方案中,Bv8 和 / 或 EG-VEGF 序列与抗体 C 末端区(尤其 Fc 区)的 N 末端融合,所述 C 末端区具有免疫球蛋白,例如免疫球蛋白 G1(IgG1)的效应功能。可以将整个重链恒定区与 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 序列融合。然而,更优选在融合中应用起始于铰链区中正好在木瓜蛋白酶切割位点(它从化学上限定 IgG Fc;以重链恒定区的第一个残基为 114 时的残基 216,或其它免疫球蛋白的类似位点)上游的序列。在具体优选实施方案中,Bv8 氨基酸序列与 IgG1, IgG2, 或 IgG3 重链的铰链区和 CH2 和 CH3,或与 CH1、铰链、CH2 和 CH3 区融合。融合的确切位点并非关键,最佳位点可以通过常规实验来确定。

[0266] 在一些实施方案中,所述 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 免疫球蛋白嵌合体被组装为多聚体,尤其是同型-二聚体或-四聚体。通常,这些组装好的免疫球蛋白具有已知的单元结构。可以形成一种基本的四链结构单元,其中有 IgG、IgD 和 IgE。四-单元在较高分子量免疫球蛋白中重复;IgM 一般以通过二硫键维持的基本四-单元的五聚体形式存在。IgA 球蛋白,偶尔也包括 IgG 球蛋白,在血清中也以多聚体的形式存在。在多聚体的情况中,每个四-单元可以相同或不同。

[0267] 或者,可将 Bv8 或 EG-VEGF 序列插入免疫球蛋白重链和轻链序列之间,以得到含有嵌合重链的免疫球蛋白。在这个实施方案中,将 Bv8 或 EG-VEGF 序列与免疫球蛋白每个臂中的重链 3' 末端融合,可以是在铰链和 CH2 区之间或在 CH2 和 CH3 区之间。类似的构建体可参见 Hoogenboom 等, Mol. Immunol., 28:1027-1037(1991) 的报道。

[0268] 尽管本发明的免疫粘附素不需要免疫球蛋白轻链的存在,但也可使免疫球蛋白轻链与 Bv8 或 EG-VEGF 免疫球蛋白重链融合多肽共价结合,或直接与 Bv8 或 EG-VEGF 融合。在前一种情况中,编码免疫球蛋白轻链的 DNA 通常与编码 Bv8 或 EG-VEGF 免疫球蛋白重链融合蛋白的 DNA 共表达。通过分泌,杂合重链和轻链共价结合,从而提供一种免疫球蛋白-样结构,它含有两个二硫键连接的免疫球蛋白重链-轻链对。适合制备此类结构的方法可以参见,例如美国专利 4,816,567(1989 年 3 月 28 日授权)。

[0269] 在一优选实施方案中,用于构建本发明免疫粘附素的免疫球蛋白序列来自 IgG 免疫球蛋白重链恒定区。对人免疫粘附素而言,优选使用人 IgG1 和 IgG3 免疫球蛋白序列。使用 IgG1 的主要好处是, IgG1 免疫粘附素可以在固相蛋白 A 上有效纯化。IgG3 的纯化需要蛋白 G,这是一种远不及蛋白 A 常用的介质。然而,当选择具体免疫粘附素构建体的 Ig 融合配对物时,应该考虑免疫球蛋白的其它结构和功能特性。例如, IgG3 铰链较长且较易弯曲

(flexible),因此它与可以适应较大的粘附素结构域,这样的结构域在与 IgG1 融合时可能不能正确折叠或发挥功能。另一考虑是化合价;IgG 免疫粘附素都是二价同型二聚体,而 Ig 亚型象 IgA 和 IgM 分别可产生基本 Ig 同型二具体单元的二聚体或五聚体结构。对那些为体内应用而设计的 Bv8 免疫粘附素而言,由 Fc 区决定的药代动力学特性和效应功能也是重要的。尽管 IgG1, IgG2 和 IgG4 都具有 21 天的体内半衰期,但它们激活补体系统的潜力是不同的。IgG4 不激活补体,IgG2 的补体激活能力显著弱于 IgG1。而且,与 IgG1 不同,IgG2 不结合单核细胞或中性粒细胞表面的 Fc 受体。IgG3 对于补体激活而言是最佳的,但其体内半寿期仅为其它 IgG 同种型的约三分之一。对设计用于人治疗的免疫粘附素而言,另一个重点考虑是具体同种型的同种异型 (allotypic) 变体的数量。一般优选具有较少的血清学限定性同种异型的 IgG 同种型。例如, IgG1 仅具有四个血清学限定性同种异型位点,其中两个 (G1m 和 2) 位于 Fc 区中;其中的 G1m1 不具有免疫原性。而 IgG3 中有 12 个血清学限定性同种异型,它们都位于 Fc 区中;其中仅 3 个位点 (G3m5, 11 和 21) 具有一种非免疫原性同种异型。因此, γ 3 免疫粘附素的潜在免疫原性大于 γ 1 免疫粘附素的。

[0270] 对亲本免疫球蛋白而言,一个有效连接点是紧靠铰链区胱氨酸上游之处,它形成两条重链之间的二硫键。在常用的设计中,将该分子 Bv8 部分的 C- 末端残基的密码子置于紧靠 IgG1 铰链区序列 DKTHCPPCP 的密码子上游之处。

[0271] 适于构建和表达免疫粘附素的一般方法与上文中涉及 Bv8 和 EG-VEGF 的方法相同。Bv8 和 EG-VEGF 免疫粘附素最方便的构建方法是,将编码 Bv8 或 EG-VEGF 部分的 cDNA 序列与 Ig cDNA 序列融合在同一阅读框内。也可以与基因组 Ig 片段融合(参见,例如 Gascoigne 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 :2936-2940(1987); Aruffo 等, Cell, 61 :1303-1313(1990); Stamenkovic 等, Cell, 66 :1133-1144(1991))。后一种融合形式需要表达调节序列的存在。编码 IgG 重链恒定区的 cDNA,可以根据已公开的序列,从衍生自脾或外周血淋巴细胞的 cDNA 文库中,通过杂交或通过聚合酶链反应 (PCR) 技术分离。将编码 Bv8 或 EG-VEGF 的 cDNA 以及免疫粘附素的 Ig 部分串联插入能在所选宿主细胞中指导有效表达的质粒载体中。为了在哺乳动物细胞中表达,可以采用基于 pRK5 的载体 (Schall 等, Cell, 61 :361-370(1990)) 和基于 CDM8 的载体 (Seed, Nature, 329 :840(1989))。可以利用寡核苷酸定向缺失诱变,除去所设计的连接密码子之间的额外序列,来创建真正的连接 (Zoller 等, 核酸 Res., 10 :6487(1982); Capon 等, Nature, 337 :525-531(1989))。可以使用合成寡核苷酸,其中每一半与所需连接的任一侧的序列互补;理想条件下,它们是 36 体-48 体。或者,可以通过 PCR 用合适的载体将该分子的两部分连接在同一阅读框中。

[0272] 对表达 Bv8 或 EG-VEGF 免疫粘附素的宿主细胞系的选择主要取决于表达载体。另一个考虑是需要的蛋白量。毫克量常常可以通过瞬时转染来产生。例如,经腺病毒 EIA- 转化的 293 人胚肾细胞系可以用基于 pRK5 的载体通过改良的磷酸钙方法进行瞬时转染,从而有效表达免疫粘附素。基于 CDM8 的载体可以用于通过 DEAE- 葡聚糖法转染 COS 细胞 (Aruffo 等, Cell, 61 :1303-1313(1990); Zettmeissl 等, DNA Cell Biol. US, 9 :347-353(1990))。当希望获得大量蛋白时,可以在稳定转染宿主细胞系之后表达免疫粘附素。例如,可以将基于 pRIC5 的载体在存在编码二氢叶酸还原酶 (DHFR) 并赋予 G418 抗性的附加质粒的情况下引入中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。在培养中选出 G418 抗性克隆;在有水平不断增加的 DHFR 抑制剂氨基蝶呤存在的情况下培养这些克隆;选出编码 DHFR 的基因拷

贝和免疫粘附素序列的数量一起被扩增的那些克隆。当免疫粘附素在其 N- 端包含疏水前导序列时,它倾向于被转染细胞加工并分泌。具有更复杂结构的免疫粘附素的表达可能需要唯一匹配的宿主细胞;例如,象轻链或 J 链等组分可以由特定的骨髓瘤或杂交瘤细胞宿主来提供 (Gascoigne 等,1987,出处同上,Martin 等,1993,J. Virol.,67:3561-3568)。

[0273] 免疫粘附素可以通过亲和层析方便地进行纯化。蛋白 A 作为亲和配体的合适性取决于嵌合体中所用的免疫球蛋白 Fc 区的类别和同种型。蛋白 A 可以用于纯化那些基于人 $\gamma 1$, $\gamma 2$, 或 $\gamma 4$ 重链的免疫粘附素 (Lindmark 等,J. Immunol. Meth.,62:1-13(1983))。蛋白 G 被推荐用于小鼠的所有同种型和人的 $\gamma 3$ (Guss 等,EMBO J.,5:1567-1575(1986))。亲和配体所附着的基质最常见琼脂糖,也可以用其它基质。机械稳定型基质如控制孔径的玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯与琼脂糖相比能允许较快的流速和较短的处理时间。使免疫粘附素与蛋白 A 或蛋白 G 亲和柱结合所需的条件完全取决于 Fc 区的特性;即,其类别和同种型。一般而言,当选择了正确的配体时,在未经培养的培养液中可以直接产生有效结合。免疫粘附素的区分特征之一是,对于人 $\gamma 1$ 分子而言,与蛋白 A 结合的能力相对于具有相同 Fc 型别的抗体而言在一定程度上减弱。结合的免疫粘附素可以在酸性 pH(3.0 或更高)或在含有离液序列适中的盐的 pH 缓冲液中有效洗脱。这种亲和层析步骤可以获得 > 95% 纯的免疫粘附素制剂。

[0274] 可以用本领域已知的其它方法替代,或补充在蛋白 A 或 G 上进行的亲和层析,来纯化免疫粘附素。免疫粘附素的行为在嗜疏凝胶层析 (Hutchens 等,Anal. Biochem.,159:217-226(1986)) 和固相金属螯合层析 (Al-Mashikhi 等,J. Dairy Sci.,71:1756-1763(1988)) 中与抗体类似。但与抗体相反,它们在离子交换柱上的行为不仅取决于它们的等电点,还取决于它们的嵌合特性所导致的分子中的偶极电荷 (charge dipole)。

[0275] 需要时,可以制备双特异性免疫粘附素。因此,本发明的免疫粘附素可以将 Bv8 或 EG-VEGF 区与另一区,如来自另一种生长因子的区包括但不限于 VEGF, Bv8 以及 EG-VEGF 组合。对于双特异性分子而言,由一条臂上的嵌合抗体重链和另一条臂上的嵌合抗体轻链 - 轻链对组成的具有它们的抗体 - 样结构的三聚体分子是有利的,因为它们易于纯化。常规用于生产双特异性免疫粘附素的抗体 - 生成 quadroma 可以产生十种四聚体的混合物,与它相反,用编码三聚体免疫粘附素的三条链的核酸转染的细胞仅仅产生三种分子的混合物,从该混合物中纯化所需产物要相对较容易。

[0276] F. 制备并鉴定 Bv8 和 EG-VEGF 活性的调节物

[0277] 本发明还涉及筛选化合物以便鉴定那些能模拟或增强 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的一种或多种生物活性 (激动剂) 或阻止 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的效应 (拮抗剂) 的方法。Bv8 和 EG-VEGF 激动剂和拮抗剂也称 Bv8 和 EG-VEGF 调节物。针对拮抗剂药物候选物的筛选试验经过设计,可以鉴定出与 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 多肽结合或与之形成复合物,或者干扰 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 与其它细胞蛋白相互作用的化合物。

[0278] 1. 小分子筛选

[0279] 小分子可以具有作为 Bv8 激动剂或拮抗剂和 / 或 EG-VEGF 激动剂或拮抗剂的能力并因此具有治疗价值。这样的小分子可以包括天然小分子,合成的有机或无机化合物和肽。但本发明的小分子不限于这些形式。市场上已有广泛多种小分子文库,本领域也已知广泛多种筛选具有所需活性的小分子的试验。

[0280] 候选的 Bv8 激动剂或拮抗剂和 / 或 EG-VEGF 激动剂或拮抗剂小分子优选首先在允许快速鉴定 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 活性的潜在调节物的试验中予以鉴定。这类试验的一个实例是蛋白 - 蛋白结合试验, 其中检测候选分子与 Bv8 或 EG-VEGF 受体结合的能力。在另一实例中, 检测候选分子干扰 Bv8 与 Bv8 受体结合或者 EG-VEGF 与 EG-VEGF 受体结合的能力。一个实施方案中, Bv8 受体或 EG-VEGF 受体分别为 Bv8 或 EG-VEGF 受体 -1 和 Bv8 或 EG-VEGF 受体 -2。

[0281] 在优选实施方案中, 小分子 Bv8 或 EG-VEGF 激动剂通过它们模拟 Bv8 或 EG-VEGF 的一或多种生物活性的能力来鉴定。例如, 筛选小分子的以下能力: 诱导内皮细胞增殖, 促进内皮细胞存活, 如下文所述, 或诱导血管生成, 如下文所述。诱导 Bv8 或 EG-VEGF 的一或多种所述生物活性的候选化合物被鉴定为激动剂。

[0282] 在另一实施方案中, 小分子 Bv8 或 EG-VEGF 拮抗剂通过它们抑制 Bv8 或 EG-VEGF 的一或多种生物活性的能力来鉴定。例如, 筛选小分子的以下能力: 抑制内皮细胞增殖, 内皮细胞存活, 或血管生成, 如下文所述。抑制 Bv8 或 EG-VEGF 的一或多种所述生物活性的候选化合物被鉴定为拮抗剂。

[0283] 候选化合物诱导或抑制血管生成的能力在例如 WO 02/00711 和 W003/020892 中的小鼠实验中测定。

[0284] 内皮细胞增殖

[0285] 内皮细胞存活

[0286] 鉴定为 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 激动剂或拮抗剂的化合物可以应用在本发明的方法中。例如, Bv8 和 / 或 EG-VEGF 拮抗剂可以用于治疗癌症。

[0287] 2. 制备和鉴定抗体

[0288] 能模拟 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 生物学特性的激动剂型的人和非 - 人多克隆和单克隆抗体 (包括非 - 人单克隆抗体的人源化形式), 以及能抑制 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 生物学特性的拮抗剂型的人和非 - 人多克隆和单克隆抗体 (包括非 - 人单克隆抗体的人源化形式), 也包括在本发明中。这些包括抗体的氨基酸序列变体, 糖基化变体和片段。制备这类抗体并筛选激动剂抗体的一般技术是本领域已知的, 简述如下。

[0289] (i) 多克隆抗体

[0290] 制备多克隆抗体的方法为本领域已知。多克隆抗体可在哺乳动物中产生, 例如, 通过一次或多次注射致免疫剂, 如果需要, 可加入佐剂。通常, 对哺乳动物皮下或腹膜内多次注射致免疫剂和 / 或佐剂。将致免疫剂与在所免疫的哺乳动物中具有免疫原性的蛋白 (如血清白蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂) 进行偶联是有效的。可以使用的佐剂的实例包括弗氏完全佐剂和 MPL-TDM。

[0291] (ii) 单克隆抗体

[0292] 单克隆抗体可以使用由 Kohler 和 Milstein, Nature, 256 :495 (1975) 首次描述的杂交瘤方法来制备, 或者可以通过重组 DNA 方法来制备 (美国专利 4, 816, 567)。

[0293] 在杂交瘤方法中, 对小鼠或其它适宜宿主动物如仓鼠或猕猴 (macaque monkey) 按照上文所述进行免疫, 以刺激那些产生或能够产生与免疫所用蛋白特异性结合的抗体的淋巴细胞。或者, 淋巴细胞可以在体外致敏。然后, 将淋巴细胞与骨髓瘤细胞用合适的融合剂, 如聚乙二醇融合, 以便形成杂交瘤细胞 (Goding, Monoclonal Antibodies :Principles

和 Practice, pp. 59-103, (Academic Press, 1986))。

[0294] 如此制备的杂交瘤细胞可以接种在适宜培养基中培养,所述培养基优选含有一或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如,亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT) 时,杂交瘤的培养基通常包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷 (HAT 培养基),这些物质阻止 HGPRT- 缺陷型细胞的生长。

[0295] 优选骨髓瘤细胞是那些能有效融合、支持所选抗体生成细胞以稳定的高水平产生抗体,并对诸如 HAT 培养基等类似培养基敏感的细胞。其中,优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤系,如由 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA 提供的 MOPC-21 和 M. C. -11 小鼠肿瘤,和由美国典型培养物保藏中心, Rockville, Maryland USA 提供的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞。也有报道称人骨髓瘤以及小鼠-人异质性骨髓瘤细胞系可用于产生人单克隆抗体 (Kozbor, J. Immunol., 133 :3001 (1984) ; Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0296] 可在含有生长的杂交瘤细胞的培养基中分析抗所述抗原的单克隆抗体的产生。优选地,杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合试验,如放射免疫分析 (RIA) 或酶联免疫吸附试验 (ELISA) 来分析。

[0297] 单克隆抗体的结合亲和力可通过,例如 Muson 等, Anal. Biochem., 107 :220 (1980) 所述 Scatchard 分析来测定。

[0298] 鉴定出能产生具有所需特异性、亲和力、和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞后,将这些细胞通过有限稀释法进一步克隆并用标准方法进行培养 (Goding, Monoclonal Antibodies :Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。适于此目的的培养基包括,例如, D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外,杂交瘤细胞可以进行体内生长,为动物中的腹水肿瘤形式。

[0299] 由这些亚克隆分泌的单克隆抗体可以适当地用常规免疫球蛋白纯化方法从培养基、腹水或血清中分离,所述方法例如蛋白 A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析。

[0300] 编码单克隆抗体的 DNA 可用常规方法很容易的分离和测序 (如利用能与编码该单克隆抗体重链和轻链的基因特异结合的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞是这类 DNA 的优选来源。DNA 分离后,可将其插入表达载体中,然后用此表达载体转染宿主细胞,如大肠杆菌细胞、猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞,以便在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。DNA 也可以通过,例如,用编码人类重链和轻链恒定区的序列取代小鼠同源序列来修饰, Morrison 等, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 81 :6851 (1984)), 或通过将非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列与免疫球蛋白编码序列共价结合来修饰。在这种方式中,可以制备出具有本文所述 Bv8 或 EG-VEGF 激动剂单克隆抗体或者 Bv8 或 EG-VEGF 拮抗剂单克隆抗体的结合特异性的“嵌合”或“杂合”抗体。

[0301] 嵌合或杂合抗体也可以用合成蛋白质化学中的已知方法在体外制备,包括那些涉及交联剂的方法。例如,可以用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。适于此目的的合适试剂包括亚氨基硫醇酯 (iminothiolate) 和甲基 -4- 巯基丁基亚胺酸酯 (mercaptobutyrimide)。

[0302] 抗体的重组制备将在下文中详述。

[0303] (iii) 人源化抗体

[0304] 一般情况下,人源化抗体中已导入一或多个源自非人来源的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常称为“引进的”残基,它们通常来自“引进的”可变区。人源化过程基本是按照 Winter 及其同事 (Jones 等, Nature, 321 :522-525 (1986) ;Riechmann 等, Nature, 332 :323-327 (1988) ;Verhoeyen 等, Science, 239 :1534-1536 (1988)) 所述,用啮齿类 CDR 或 CDR 序列取代人类抗体的相应序列来进行。

[0305] 因此,这样的“人源化”抗体是嵌合抗体 (Cabilly, 出处同上),其中完整人类可变区的很少一部分被非人物种的相应序列取代。实践中,人源化抗体通常是人的抗体,其中 CDR 残基且可能有部分 FR 残基被啮齿类抗体中类似位点的残基取代。

[0306] 重要的是,将抗体人源化后保留了对抗原的高亲和力和其它有利的生物特性。为达到此目的,在一种优选方法中,通过用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物来制备人源化抗体。免疫球蛋白三维模型已有商品,是本领域技术人员所熟悉的。还有用于描述和展示所选免疫球蛋白序列可能的三维构象结构的计算机程序。通过观察这些展示结果可分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中可能发挥的作用,即分析能影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。通过这种方法,可从共有序列和引进序列中选出 FR 残基并组合,从而得到所需抗体性质,如对靶抗原的亲合力增加。总之,CDR 残基直接并且最主要涉及对抗原结合的影响。详见美国专利 5,821,337 和 6,054,297。

[0307] (iv) 人的抗体

[0308] 人单克隆抗体可以通过杂交瘤方法制备。人骨髓瘤和小鼠-人异质性骨髓瘤细胞系用于产生人单克隆抗体的相关报道可参见,例如, Kozbor, J. Immunol., 133 :3001 (1984) ; Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。

[0309] 现在可以制备转基因动物 (如小鼠),它经过免疫能在缺乏内源性免疫球蛋白生成的情况下产生全套人抗体。例如,已指出在嵌合和胚系 (germ-line) 突变小鼠中,抗体重链连接区 (JH) 基因的纯合缺失导致内源性抗体生成的完全抑制。将人胚系免疫球蛋白基因阵列转移到此胚系突变小鼠中,将导致在抗原攻击的情况下产生人抗体。例如,见 Jakobovits 等, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :2551 (1993) ;Jakobovits 等, Nature, 362 :255-258。

[0310] Mondez 等 (Nature Genetics 15 :146-156 (1997)) 进一步改进了该技术并产生出命名为“Xeno 小鼠 II”的转基因小鼠品系,当其受到抗原攻击时,可产生高亲和性完全人抗体。这是通过将兆碱基人重链和轻链基因座经胚系整合到上述具有内源 J_H 节段缺失的小鼠中实现的。Xeno 小鼠 II 具有含约 66V_H 基因,完全 D_H 和 J_H 区以及三种不同恒定区 (μ , δ 和 κ) 的 1020Kb 人重链基因座,并具有包含 32V_K 基因, J_K 节段和 C_K 基因的 800Kb 人 κ 基因座。这些小鼠中产生的抗体与人类中所见的抗体在各方面均十分相似,包括基因重排、组装和所有组成成分。由于内源 J_H 节段中的缺失阻止鼠基因座中的基因重排,人抗体优先于内源抗体表达。

[0311] 或者,可用噬菌体展示技术 (McCafferty 等, 自然 348 :552-553 (1990)) 从未免疫

供体的免疫球蛋白可变 (V) 区基因的所有组成而体外产生人类抗体和抗体片段。依据此技术,将抗体 V 区基因与丝状噬菌体 (如 M13 或 fd) 主要或次要衣壳蛋白基因克隆在相同的阅读框内,并在噬菌体颗粒的表面展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,根据抗体的功能特点进行的选择也导致对显示这些性质的抗体的编码基因进行选择。因此,噬菌体模仿了 B 细胞的部分特点。噬菌体展示可以以多种形式进行;这些综述见 Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571(1993)。可使用 V 基因节段的多个来源进行噬菌体展示。Clackson 等, *Nature*, 352:624-628(1991) 从免疫小鼠脾脏来源的 V 基因随机组合小文库中分离出一批多样的抗-噁唑酮抗体。可基本如 Marks 等, *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1991), 或 Griffith 等, *EMBO J.* 12:725-734(1993) 所述,构建未免疫的人类供体的 V 基因库,并分离针对多种多样抗原 (包括自身抗原) 的抗体。在天然免疫应答中,抗体基因以较高速率积累突变 (体细胞超变)。其中一些变化赋予较高亲和力,而展示高亲和力表面免疫球蛋白的 B 细胞在随后的抗原攻击阶段优先复制并分化。这种天然过程可以用已知为“链改组”的技术 (Marks 等, *Bio/Technol.* 10,779-783[1992]) 来模仿。在该方法中,通过噬菌体展示而获得的“原代”人抗体的亲和力可以得到改进,方法是用未免疫供体的 V 区基因的天然变体所有组成相继取代重链和轻链 V 区基因。该技术允许产生具有 nM 水平的亲和力的抗体和抗体片段。制备非常大的噬菌体抗体库 (也称“所有库的母库”(the mother-of-all library)) 的策略在 Waterhouse 等, *Nucl. Acids Res.* 21,2265-2266(1993) 中描述,直接从这样的噬菌体大文库中分离出高亲和力人抗体的技术可参见 Griffith 等, *EMBO J.* (1994), 待出版。基因改组也可以用于从啮齿动物的抗体衍生出人抗体,其中的人抗体具有与起始的啮齿动物抗体相似的亲和性和特异性。根据该方法 (也称“表位印痕 (epitope imprinting)”),通过噬菌体展示技术获得的啮齿动物抗体重链或轻链 V 区基因被人 V 区基因所有组成取代,产生啮齿动物-人嵌合体。对抗原的选择导致分离出能重建原功能性抗原结合位点的人类可变区,即表位控制 (govern) (决定 (imprint)) 对配对物的选择。当重复该方法以取代余下的啮齿动物 V 区时,获得人抗体 (见 PCT 专利申请 WO 93/06213, 公开于 1993 年 4 月 1 日)。与啮齿动物的抗体通过 CDR 移植进行的传统人源化不同,该技术提供彻底的人抗体,其不具有啮齿动物来源的框架或 CDR 残基。

[0312] (v) 双特异性抗体

[0313] 双特异性抗体是具有针对至少两种不同表位的结合特异性的单克隆抗体 (优选人抗体或人源化抗体)。制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。传统上,双特异性抗体的重组制备是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中这两条链具有不同特异性 (Millstein 和 Cuello, *Nature*, 305:537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链轻链随机分配,这些 quadroma 产生 10 种不同抗体分子的混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。对所述正确分子的纯化 (通常通过亲和层析步骤来进行) 非常复杂,且产量很低。类似的方法见 W093/08829 (1993 年 5 月 13 日公开) 和 Traunecker 等, *EMBO J.* 10:3655-3659(1991)。

[0314] 依据另一种并且是更优选的方法,可将具有所需结合特异性 (抗体-抗原结合位点) 的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。该融合优选与包含铰链区、CH2 及 CH3 区的至少一部分的免疫球蛋白重链恒定区融合。优选使含有轻链结合所需位点的第一重链恒定区 (CH1) 出现在至少在一种融合中。可将编码免疫球蛋白重链融合体,以及必要时,编码

免疫球蛋白轻链的 DNA 插入不同表达载体,共转染至适当宿主生物。这使得在使用非等比的三种多肽链进行构建的实施方案中,能够较灵活地调整三种多肽片段的相互比例,以获得最佳产量。但也可在至少两种多肽链以等比例表达而获得高产时或所述比例无特别意义时,将两种或所有三种多肽链的编码序列插入同一表达载体。在该方法的一个优选实施方案中,所述双特异性抗体由一条臂上的具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一条臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。已发现这种不对称结构有利于从非必要免疫球蛋白链的混合中分离出所需双特异性化合物,因为只有该双特异性分子的一半存在免疫球蛋白轻链,这使得分离更加容易。此方法公开于 1994 年 3 月 3 日公开的 W094/04690 中。

[0315] 制备双特异性抗体的进一步细节可以参见,例如 Suresh 等,Methods in Enzymology,121:210(1986)。

[0316] (vi) 异源偶联抗体

[0317] 异源偶联抗体由两个共价连接的抗体组成。此种抗体据称例如可以使免疫系统细胞靶向不需要的细胞(美国专利 4,676,80)和用于治疗 HIV 感染(W091/00360 和 W092/200373;EP 03089)。异源偶联抗体可以用任何方便的交联方法来制备。适宜的交联剂为本领域已知,并在美国专利 4,676,980 中与一些交联技术一起公开。

[0318] (vii) 抗体片段

[0319] 在一些实施方案中,所述激动剂和/或拮抗剂抗体(包括鼠,人和人源化抗体,以及抗体变体)是抗体片段。已开发了多种技术用于生产抗体片段。传统上,这些片段通过对完整抗体进行蛋白水解消化来衍生(见例如, Morimoto 等, J. Biochem. Biojphys. Methods 24:107-117(1992) 和 Brennan 等, Science 229:81(1985))。然而,这些片段现在可通过重组宿主细胞直接产生。例如, Fab'-SH 片段可从大肠杆菌直接回收并利用化学方法偶联形成 F(ab')₂ 片段(Carter 等, Bio/Technology 10:163-167(1992))。在另一实施方案中,利用亮氨酸拉链 GCN4 形成 F(ab')₂ 以便促进 F(ab')₂ 分子的组装。根据另一方法, Fv, Fab 或 F(ab')₂ 片段可以直接从重组宿主细胞培养物中分离。制备抗体片段的其它技术对于熟练技术人员而言是显而易见的。

[0320] (viii) 鉴定激动剂抗体

[0321] Bv8 或 EG-VEGF 激动剂抗体根据它们诱导 Bv8 或 EG-VEGF 的生物活性,包括但不限于内皮细胞增殖,内皮细胞存活以及血管生成的能力来鉴定。测定内皮细胞增殖,内皮细胞存活以及血管生成的实验是本领域已知的。内皮细胞增殖的诱导可如上述“小分子”标题下所述内容进行。Bv8 和 EG-VEGF 激动剂抗体可通过其诱导血管生成的能力鉴定,例如在 W002/00711 和 W003/020892 中所述的小鼠实验中进行。

[0322] (viii) 鉴定拮抗剂抗体

[0323] Bv8 或 EG-VEGF 拮抗剂抗体根据它们抑制 Bv8 或 EG-VEGF 的生物活性,包括但不限于内皮细胞增殖,内皮细胞存活以及血管生成的能力来鉴定,例如利用上述实验之一

[0324] G. 筛选与 Bv8 和/或 EG-VEGF 相互作用的蛋白的试验

[0325] 适于检测蛋白-蛋白相互作用的任何方法都可以用于鉴定与 Bv8 和/或 EG-VEGF 相互作用的蛋白或其它分子,包括但不限于跨膜蛋白或细胞内蛋白。在众多可以应用的传统方法中,有免疫沉淀,利用梯度或层析柱进行交联和共-纯化,来鉴定与 Bv8 和/或

EG-VEGF 相互作用的蛋白。在这样的试验中, Bv8 或 EG-VEGF 组分可以是全长蛋白, 其可溶性衍生物, 对应于目的结构域的肽, 或含有 Bv8 或 EG-VEGF 某一区域的融合蛋白。

[0326] 可以采用能同时鉴定编码与 Bv8 或 EG-VEGF 相互作用的蛋白的基因的方法。这些方法包括, 例如, 用标记的 Bv8 或 EG-VEGF 或其变体, 按照类似于已知对 λ gt11 文库的抗体探测技术的方式来探测表达库。

[0327] 一种体内检测蛋白质相互作用的方法, 双杂合体系 (two-hybrid system) 在这里详细描述作为举例, 而非限制。该体系的一种版本已有文献描述 (Chien 等, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 :9578-9582), 并且可以从 Clontech (Palo Alto, CA) 购买。

[0328] 简言之, 可以利用这样的体系构建编码两种杂合蛋白的质粒: 其中一种质粒由编码转录激活蛋白的 DNA- 结合区的核苷酸与编码 Bv8 或 EG-VEGF、或其多肽、肽、或融合蛋白的核苷酸序列融合而组成, 另一种质粒作为 cDNA 文库的一部分、由编码转录激活蛋白的激活区的核苷酸与编码已重组在该质粒中的未知蛋白的 cDNA 融合而组成。将 DNA- 结合区融合质粒和 cDNA 文库转化到含有报告基因的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中, 所述报告基因 (如 HBS 或 lacZ) 的调节区包含所述转录激活剂的结合位点。任何一种杂合蛋白单独都不能激活该报告基因的转录: 所述 DNA- 结合区杂合体不能激活是因为它不能提供激活功能, 所述激活区杂合体不能激活是因为它不能定位到激活剂结合位点。这两种杂合蛋白的相互作用可以重新组建功能性激活蛋白, 并导致报告基因的表达, 该表达可以通过测定该报告基因产物的试验来检测。

[0329] 所述双杂合体系或相关方法学可以用于筛选与“诱饵 (bait)”基因产物相互作用的蛋白的激活区文库。例如, 但并非限制地, 可以用 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 作为诱饵基因产物。将总基因组或 cDNA 序列与编码激活区的 DNA 融合。用该文库和编码诱饵 Bv8 基因产物或诱饵 EG-VEGF 基因产物与 DNA 结合区融合所得的杂合体的质粒共转化到酵母报告菌株中, 并筛选出表达该报告基因的转化体。例如, 但并非限制地, 可以将诱饵 Bv8 基因序列或诱饵 EG-VEGF 基因序列, 例如所述基因的开放读框, 克隆到载体中, 使其与编码 GAL4 蛋白的 DNA- 结合区的 DNA 融合在一起被翻译。纯化这些菌落, 并分离出负责报告基因表达的文库质粒。然后用 DNA 测序来鉴定所述文库质粒编码的蛋白。

[0330] 当从一种细胞系中检测出与诱饵 Bv8 基因产物或诱饵 EG-VEGF 基因产物相互作用的蛋白时, 可以用本领域常规实践的方法制备该细胞系的 cDNA 文库。根据本文所述的具体体系, 例如, 可以将 cDNA 片段插入载体中, 使它们与 GAL4 的转录激活区融合在一起被翻译。该文库可以与诱饵 Bv8 基因 -GAL4 融合质粒或诱饵 EG-VEGF 基因 -GAL4 融合质粒共转化到含有 lacZ 基因的酵母菌株中, 所述 lacZ 基因受到含有 GAL4 激活序列的启动子驱动。由 cDNA 编码、与 GAL4 转录激活区融合、并与诱饵 Bv8 基因产物或诱饵 EG-VEGF 基因产物相互作用的蛋白可以重新组建活性 GAL4 蛋白并因此驱动表达。可以用本领域常规方法检测出驱动表达的菌落。然后从这些菌株纯化出 cDNA, 将其用于通过本领域常规实践的技术来制备并分离诱饵 Bv8 基因 - 相互作用蛋白或诱饵 EG-VEGF 基因 - 相互作用蛋白。

[0331] 1. 调节 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 表达或活性的化合物

[0332] 设计以下试验来鉴定: 与 Bv8 或 EG-VEGF 相互作用 (即发生结合) 的化合物, 干扰 Bv8 或 EG-VEGF 与其结合配对物、关连物 (cognate) 或受体的相互作用的化合物, 以及调节 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 基因表达活性 (即调节 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 基因表达水平) 或调节机

体中 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 水平的化合物。还可以利用该试验鉴定出与 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 基因调节序列 (如启动子序列) 结合、并因此可调节 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 基因表达的化合物。参见, 例如 Platt, K. A., 1994, J. Biol. Chem. 269 :28558-28562。

[0333] 可以根据本发明进行筛选的化合物包括, 但不限于, 肽, 抗体及其片段, 以及其它有机化合物 (例如肽模拟物), 它们可以与 Bv8 或 EG-VEGF, 或 Bv8/EG-VEGF 受体结合, 并模拟由天然配体激发的活性 (即激动剂) 或抑制由天然配体激发的活性 (即拮抗剂)。

[0334] 这类化合物包括但不限于肽, 如可溶性肽, 包括但不限于随机肽文库的成员 ; (参见, 例如, Lam, K. S. 等, 1991, Nature 354 :82-84 ; Houghten, R. 等, 1991, Nature 354 :84-86), 以及由 D- 和 / 或 L- 构型的氨基酸组成的组合型化学衍生分子库的成员, 磷肽 (phosphopeptides) (包括但不限于随机或部分变性的直接磷肽库的成员 (members of random 或 partially degenerate, directed phosphopeptide libraries) ; 参见, 例如, Songyang, Z. 等, 1993, Cell 72 :767-778), 抗体 (包括但不限于多克隆抗体, 人源化抗体, 抗 - 独特型抗体, 嵌合抗体或单链抗体, 以及 FAb, F(abN)₂ 和 FAb 表达库片段, 及其表位 - 结合片段), 还有有机或无机分子。

[0335] 可以根据本发明进行筛选的其它化合物包括, 但不限于, 能进入相应细胞 (如内皮细胞) 并影响 Bv8 或 EG-VEGF 基因表达或影响与 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 介导的途径 (例如, 通过与涉及基因表达的调节区或转录因子发生相互作用) 有关的一些基因表达的有机小分子 ; 或者, 影响或替代 Bv8 或 EG-VEGF 活性或影响或替代与 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 信号传递、分解代谢, 或代谢途径有关的一些其它细胞内因子的活性的化合物。

[0336] 计算机建模和搜索技术允许鉴定能调节 Bv8 或 EG-VEGF 表达或活性的化合物或已知化合物的改进。在鉴定出这样的化合物或组合物后, 可以鉴定出活性位点或区域。这样的活性位点通常是配体结合位点。活性位点可以用本领域已知方法来鉴定, 例如从肽的氨基酸序列, 从核酸的核苷酸序列, 或从相关化合物或组合物与其天然配体形成的复合物的研究来鉴定。在后一种情况中, 可以用化学方法或 X- 线晶体成像方法, 通过找出该因子 (factor) 上发现复合配体之处来找出活性位点。

[0337] 接着, 测定活性位点的二维几何结构。这可以通过已知方法 (包括测定完整分子结构的 X- 线晶体成像) 来完成。另一方面, 可以用固相或液相 NMR 来确定一些分子内间距。任何其它测定结构的实验方法都可以用于获得部分或完整的几何结构。几何结构可以用天然或人工的复合配体来测量, 它可以提高所测定的活性位点结构的精确度。

[0338] 如果测定出不完整或不够精确的结构, 可以用基于计算机的数字化建模方法来完善该结构或提高其精确度。任何可以识别的建模方法都可以使用, 包括特异于具体生物大分子 (如蛋白或核酸) 的参数化模型, 基于计算机化分子运动的分子动力学模型, 基于热系综 (thermal ensemble) 的统计学机械模型, 或组合模型。对大多数类型的模型而言, 标准分子力场 (代表原子和基团之间的力) 是必需的, 且可以选自物理化学中已知的力场。上述不完整或不够精确的实验结构可以作为用这些建模方法通过计算机获得更精确的完整结构时的一种限制。

[0339] 最后, 通过实验, 通过建模, 或者通过组合而测定了活性位点 (或结合位点) 的结构以后, 可以通过搜索含有化合物以及它们分子结构的信息的数据库来鉴定候选的调节性化合物。这样的搜索可找出具有与测定的活性位点结构相匹配的结构并与限定该活性位点

的基团相互作用的化合物。这样的搜索可以是手动的,但优选有计算机辅助。根据该搜索找出的这些化合物都是 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 活性的潜在调节物。

[0340] 另一方面,可以用这些方法从已知的调节化合物或配体鉴定改进的调节化合物。可以对已知化合物的组合物进行修饰,修饰的结构效应可以用上述应用于新组合物的实验方法和计算机建模方法来确定。然后将改变的结构与该化合物的活性位点结构相比较,从而确定是否匹配得更好或相互作用更好。通过这种方式,可以对组合物中的系统变化,诸如改变侧链基团所导致的变化进行快速评估,以便获得改进了特异性或活性的修饰型调节化合物或配体。

[0341] 其它可以根据对 Bv8 或 EG-VEGF 活性位点(或结合位点),以及相关转导和转录因子的鉴定,来鉴定调节化合物的实验方法和计算机建模方法,都是本领域已知的。

[0342] 分子建模系统实例如 CHARMM 和 QUANTA 程序(Polygen Corporation, Waltham, MA)。CHARMM 执行能量最小化和分子动力学功能。QUANTA 执行分子结构的构建,建立模型图和分析。QUANTA 允许交互构建、修饰、观察、以及分析分子相互之间的行为。

[0343] 关于与具体蛋白相互作用的药物的计算机建模综述可以参见多篇文献,如 Rotivinen,等,1988, Acta Pharmaceutical Fennica 97:159-166;Ripka, New Scientist 54-57(June 16,1988);McKinalyand Rossmann,1989, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29:111-122;Perry 和 Davies, OSAR:Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design pp.189-193(Alan R.Liss, Inc.1989);Lewis 和 Dean,1989 Proc. R. Soc. Lond. 236:125-140 和 141-162;关于核酸组分的模型受体,参见 Askew 等,1989, J. Am. Chem. Soc. 111:1082-1090。其它用图像和画面描述化学物品的计算机程序可以从诸如 BioDesign, Inc. (Pasadena, CA.), Allelix, Inc. (Mississauga, Ontario, Canada), 以及 Hypercube, Inc. (Cambridge, Ontario) 公司获得。尽管这些程序主要是为具体蛋白的特异性药物应用所设计的,它们也适于设计 DNA 或 RNA 区域特异性药物,只要该区域是确定的。

[0344] 上文针对能够改变结合的化合物的设计和制备进行了描述,但也可以在已知化合物(包括天然产物或合成的化学物质),以及生物活性物质(包括蛋白)的文库中筛选可以作为抑制剂或激活剂的化合物。

[0345] 通过本文上述试验鉴定出的化合物可以用于,例如,阐述 Bv8 基因产物和 / 或 EG-VEGF 基因产物的生物功能。可以将这样的化合物以治疗有效剂量给予患者,以便治疗任一种生理学疾病。治疗有效剂量是指化合物足以导致任何生物学症状的改善,阻碍(impediment),预防或改变的量。

[0346] b. 分析与 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 结合的化合物

[0347] 可以设计一些系统,用于鉴定能与 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 相互作用(如结合)或能模拟 Bv8 和 / 或 EG-VEGF,或能干扰 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 与关连受体、结合配对物或底物的相互作用的化合物。所鉴定的化合物可以用于,例如,调节野生型和 / 或突变的 Bv8 基因产物或 EG-VEGF 基因产物的活性;阐述 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的生物功能;在筛选中鉴定那些能破坏 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的正常相互作用的化合物;或它们自身可以破坏或激活这类相互作用。

[0348] 用于鉴定与 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 结合,或与 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 关连受体或底物结合的化合物的试验,在原则上涉及制备 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 与待测化合物的反应混合物,该

过程所用的时间和条件足以允许这两种组分相互作用并结合而形成复合物,该复合物可以从反应混合物中取出和 / 或检测出。所用的 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的类型可以根据筛选试验的目的不同而不同。例如,希望筛选出天然受体的激动剂时,可以利用全长 Bv8 或 EG-VEGF,或可溶性截短型 Bv8 或 EG-VEGF,肽,或包含一或多个 Bv8 或 EG-VEGF 结构域与在试验系统中提供便利(如,标记,分离所得复合物,等等)的蛋白或多肽的融合蛋白。当希望筛选出与 Bv8 直接相互作用的化合物时,可以使用对应于 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的多肽以及含有 Bv8 或 EG-VEGF 的融合蛋白。

[0349] 筛选试验可以通过多种方式进行。例如,一种方法涉及将 Bv8 或 EG-VEGF,其多肽,肽,或融合蛋白锚着在固相上,并在反应结束时检测锚着在固相上的 Bv8/ 待测化合物复合物或 EG-VEGF/ 待测化合物复合物。在这类方法的一个实施方案中,Bv8 或 EG-VEGF 反应试剂可以锚着在固体表面,未锚着的待测化合物可以被直接或间接标记。

[0350] 在实践中,可以方便地用微滴板作为固相。将锚着组分通过非共价或共价结合作用而固定。非共价结合可以通过将固体表面简单地包被蛋白溶液并干燥而实现。或者,可以用特异于待固定蛋白的固相抗体(优选单克隆抗体)将该蛋白锚着到固体表面。所述表面可以事先制备并贮藏。

[0351] 为了进行试验,将未固定的组分添加到含有锚着组分的包被表面。反应完成后,在能使所形成的任何复合物仍然固定在固体表面的条件下除去(例如,通过洗涤)未反应的组分。对锚着在固体表面的复合物的检测可以通过多种方式实现。当上述未固定组分事先已有标记时,检测出固定在所述表面的标记就表明形成了复合物。当上述未固定组分事先未被标记时,可以用间接标记物检测锚着在所述表面的复合物;例如,用带有标记的特异于上述未固定组分的抗体(该抗体本身可以直接标记或用标记的抗-Ig 抗体间接标记)。

[0352] 或者,可以在液相中进行反应,使反应产物与未反应的组分分离,并检测复合物;例如用特异于 Bv8 或 EG-VEGF 蛋白,多肽,肽,或融合蛋白或待测化合物的固相抗体来锚着溶液中形成的任何复合物,以及用对抗可能的复合物中另一组分的特异性标记抗体来检测锚着的复合物。

[0353] c. 干扰 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的相互作用的化合物

[0354] 与 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 相互作用的大分子在本节中称为“结合配对物”。这些结合配对物都很可能参与 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 介导的生物途径。因此,希望鉴定干扰或破坏所述结合配对物的相互作用的化合物,它们可用于调节或增强机体中的 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 活性和 / 或控制与该活性相关的疾病(或该活性的缺陷)。

[0355] 用于鉴定能干扰 Bv8 或 EG-VEGF 与结合配对物或配对物相互作用的化合物的试验系统,其基本原则涉及制备含有 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 或其一些变体以及结合配对物的反应混合物,该过程所用的时间和条件足以允许这两种组分相互作用并结合而形成复合物。为了检验化合物的抑制活性,所述反应混合物在有和没有该待测化合物的条件下制备。待测化合物可以是最初就包括在反应混合物中,或者可以是在添加了 Bv8 或 EG-VEGF 和它的结合配对物之后间隔一段时间而加入混合物中。对照反应混合物在不含待测化合物或含有安慰剂的条件下保温。然后检测 Bv8 或 EG-VEGF 与结合配对物是否形成任何复合物。在对照反应中形成复合物,但在含有待测化合物的反应混合物中不形成复合物,则表明所述化合物干扰 Bv8 或 EG-VEGF 与结合配对物的相互作用。另外,也可以将在含有待测化合物和正

常 Bv8 或 EG-VEGF 蛋白的反应混合物中复合物的形成与在含有待测化合物和突变 Bv8 或 EG-VEGF 蛋白的反应混合物中复合物的形成进行比较。当在这些情况中希望鉴定出那些特异性破坏突变体或突变的 Bv8 或 EG-VEGF 而不是正常蛋白的相互作用的化合物时,这种比较是很重要的。

[0356] 干扰 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 与结合配对物相互作用的化合物的分析可以采用异质 (heterogeneous) 形式或同质 (homogeneous) 形式。异质试验涉及将 Bv8, 或 EG-VEGF, 或者其结合配对物锚着在固相上, 并在反应结束时检测锚着在固相上的复合物。在同质试验中, 整个反应在液相中进行。在每一种方法中, 可以改变反应试剂的添加顺序, 以便获得关于待测化合物的不同信息。例如, 通过竞争来干扰相互作用的待测化合物, 可以通过在有该待测物质存在的情况下进行反应来鉴定; 即, 将待测物质先加入反应混合物中, 然后再加入 Bv8 或 EG-VEGF 和相互作用结合配对物; 或者将它们同时加入。另外, 对已形成的复合物造成破坏的待测化合物, 例如具有较高结合常数因而能替换掉复合物上的一种组分的化合物, 可以通过在形成复合物之后将该待测化合物加入反应混合物中而进行检验。各种形式简述如下。

[0357] 在异质试验系统中, 将多肽 (Bv8 或 EG-VEGF) 或者相互作用结合配对物锚着在固体表面, 未锚着的物质被直接或间接标记。在实践中, 常常利用微滴板。锚着物质可以通过非共价或共价结合作用而固定。非共价结合可以简单地通过将固体表面包被 Bv8 或结合配对物溶液并干燥而实现。或者, 可以用特异于待锚着物质的固相抗体将所述物质锚着到固体表面。所述表面可以事先制备并贮藏。

[0358] 为了进行该试验, 在有或无待测化合物的条件下将所固定物质的配对物暴露于包被表面。反应完成后, 除去 (例如, 通过洗涤) 未反应的组分, 所形成的任何复合物仍然固定在固体表面。对锚着在固体表面的复合物的检测可以通过多种方式实现。当未被固定的物质事先已有标记时, 检测出固定在所述表面的标记就表明形成了复合物。当未被固定的物质事先未被标记时, 可以用间接标记物检测锚着在所述表面的复合物; 例如, 用带有标记的特异于最初未被固定的物质的抗体 (该抗体本身可以直接标记或用标记的抗-Ig 抗体间接标记)。根据反应组分的添加顺序, 可以检测出抑制复合物形成或者破坏已形成的复合物的待测化合物。

[0359] 或者, 可以在待测化合物存在或缺乏的条件下在液相中进行反应, 使反应产物与未反应的组分分离, 并检测复合物; 例如用特异于其中一种结合组分的固相抗体来锚着溶液中形成的任何复合物, 以及用特异于另一种配对物的标记抗体来检测锚着的复合物。同样, 根据液相中反应组分的添加顺序, 可以鉴定出抑制复合物形成或者破坏已形成的复合物的待测化合物。

[0360] 在本发明的另一实施方案中, 可以采用同质试验。在该方法中, 制备预形成的多肽 (Bv8 或 EG-VEGF) 与结合配对物的复合物, 使其中的 Bv8 或其结合配对物被标记, 但该标记所产生的信号由于形成复合物而消失 (参见, 例如 Rubenstein 的美国专利 4, 109, 496, 它利用此方法进行免疫分析)。加入能竞争并替换掉预形成复合物上的一种物质的待测物质, 将产生高于背景的信号。这样就可以鉴定出破坏所述相互作用的待测物质。

[0361] 在一个具体实施方案中, 可以制备 Bv8 (或 EG-VEGF) 融合体用于进行固定。例如, 可以用融合载体 (如 pGEX-5X-1) 将多肽 (Bv8 或 EG-VEGF) 或其肽片段与谷胱甘肽-S-转

移酶 (GST) 基因融合,所用的融合方式使得在最终的融合蛋白中保留了所述多肽的结合活性。可以将结合配对物纯化,并用于产生单克隆抗体,其利用实践中常规的以及本发明上文中描述的方法。该抗体可以通过本领域常规实践的方法用放射性同位素 ^{125}I 进行标记。在异质试验中,可以将融合蛋白锚着在谷胱甘肽-琼脂糖珠上。然后在有或没有待测化合物的情况下,按照允许发生相互作用并结合的方式,添加相互作用结合配对物。在反应结束时,将未结合的物质洗去,向该系统中添加标记的单克隆抗体,使之与复合的组分结合。多肽 (Bv8 或 EG-VEGF) 与相互作用结合配对物之间的相互作用,可以通过测量仍然保持与谷胱甘肽-琼脂糖珠结合的放射活性的量来检测。待测化合物对相互作用的成功抑制可以导致所测量的放射活性降低。

[0362] 或者,在缺乏固体的谷胱甘肽-琼脂糖珠的情况下,可以将 GST 融合蛋白与相互作用结合配对物混合在液体中。待测化合物可以在上述物质发生相互作用期间或之后加入。然后将该混合物添加到谷胱甘肽-琼脂糖珠上,洗去未结合的物质。Bv8 或 EG-VEGF 与结合配对物之间相互作用受到抑制的程度,可以通过添加标记抗体并测量与珠结合的放射活性来进行检测。

[0363] 在本发明另一实施方案中,可以用对应于多肽 (Bv8 或 EG-VEGF) 和 / 或相互作用配对物或结合配对物 (在结合配对物是蛋白的情况中) 的结合区的肽片段,代替两种全长蛋白之一或两者,实施上述相同的技术。可以用本领域常规实践的任意多种方法来鉴定并分离结合位点。这些方法包括,但不限于,对编码其中一种蛋白的基因进行诱变并在共-免疫沉淀试验中筛选对结合的破坏。然后可以选出编码复合物中第二种物质的基因中的补偿突变。对编码每种蛋白的基因进行序列分析,可以揭示对应于蛋白上参与相互结合的区域 of 的突变。或者,可以用上述方法将一种蛋白锚着在固体表面,使之与其带有标记的结合配对物发生相互作用并结合,所述配对物已经经过蛋白水解酶 (如胰蛋白酶) 处理。洗涤后,相对较短的、含有结合区的标记肽可以保持与固体物质结合,可以将其分离并通过氨基酸测序而鉴定。一旦获得了编码细胞内结合配对物的基因,可以对短基因片段进行工程化,以便表达所述蛋白的肽片段,然后检验其结合活性,并进行纯化或合成。

[0364] 可以如上所述将 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 锚着在固体物质上,方法是例如,但并非限制地,制备 GST 融合蛋白并使之与谷胱甘肽-琼脂糖珠结合。相互作用结合配对物可以被放射性同位素如 ^{35}S 标记,并用诸如胰蛋白酶等蛋白水解酶切割。再将切割产物添加到锚着的融合蛋白上,使之结合。洗去未结合的肽之后,可以用已知方法将标记的结合物质 (代表细胞内结合配对物结合区) 洗脱,纯化,并分析其氨基酸序列。如此鉴定出的肽可以通过合成来制备,或者利用重组 DNA 技术与适当的有利蛋白融合。

[0365] H. 药物组合物

[0366] 本文所述 Bv8 多肽, EG-VEGF 多肽及其调节物,包括 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的激动剂或拮抗剂可以以治疗剂的形式应用。本发明所述多肽及其调节物可以按照已知方法配制,以便制备药物学有效的组合物,其中将这里的 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 产物与可药用载体赋形剂混合。Bv8, EG-VEGF 或其组合的治疗性配制剂可以如下制备:将具有所需纯度 (优选基本纯) 的 Bv8 和 / 或 EG-VEGF,与任选的药用载体、赋形剂或稳定剂 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 见上文) 混合成冻干剂或水溶液的形式。可接受的载体、赋形剂或稳定剂对暴露在所用剂量和浓度下的细胞或哺乳动物无毒性。实例包括缓冲剂例如磷

酸盐,柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸;小分子多肽(少于约10个残基);蛋白,如血清白蛋白,明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮,氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖、或糊精;螯合剂如EDTA;糖醇如甘露糖醇或山梨糖醇;成盐反离子如钠;和/或非离子表面活性剂,如Tween, Pluronic 或PEG。

[0367] 用于体内给药的Bv8和/或EG-VEGF必需是无菌的。这可以通过本领域已知的任何方法,如在冷冻干燥和重新配制之前或之后通过除菌滤膜过滤而轻易实现。Bv8可以以冻干形式保存。治疗性组合物Bv8, EG-VEGF或其组合通常置于具有无菌存取口的容器中,例如静脉注射袋或带有能通过皮下注射针刺穿的塞子的小瓶。

[0368] Bv8可以选择与其它生长因子组合或联合给药。例如,它可以与EG-ECGF或VEGF组合。EG-ECGF可以选择与其它生长因子组合或联合给药。例如,它可以与Bv8或VEGF组合。

[0369] Bv8, EG-ECGF或其调节物可以与治疗以下疾病的其它常规疗法一起使用:癌症,其它血液疾病,嗜中性粒细胞减少症,免疫缺陷疾病,自身免疫疾病等。

[0370] 给药途径与已知方法一致,例如经静脉,经腹腔内,经大脑内,经肌肉内,经眼内,经动脉内或经损伤内等途径进行注射或输注,局部给药,或通过持续释放系统给药。

[0371] 本发明药物组合物的剂量和所需药物浓度将依预想的特定用途而异。决定适宜剂量或给药途径是普通内科医师完全能够很好胜任的事情。动物实验可以为确定人类治疗的有效剂量提供可靠的指导。可以按照Mordenti, J. 和Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi 等编, Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96中所述原则,来换算种属间有效剂量的比例(Interspecies scaling)。

[0372] 当希望将Bv8和/或EG-VEGF多肽以配制剂形式持续释放地给药且该配制剂具有适于治疗任何需要给药Bv8和/或EG-VEGF多肽的疾病的释放特性时,考虑将Bv8和/或EG-VEGF多肽或其调节物包封在微胶囊中。例如,将纯化的Bv8, EG-VEGF或其组合包封在按照例如凝聚技术或界面聚合技术制备的微胶囊(分别例如羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中,在胶体药物释放系统(例如脂质体,白蛋白微球体,微乳剂,纳米颗粒和纳米胶囊)中或在大乳剂(macroemulsion)中。这类技术公开在Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)中。

[0373] 可以将Bv8, EG-VEGF或其组合掺入持续释放制剂中用于治疗用途。持续释放制剂的适当实例包括具有一定形状的半通透聚合物基质,如薄膜或微胶囊。缓释基质实例包括聚酯、水凝胶(如聚(2-羟基乙基-异丁烯酸酯)(Langer等, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277(1981); Langer, Chem. Tech., 12:98-105(1982))或聚(乙烯醇),聚交酯(美国专利3773919, EP 58,481), L-谷氨酸与γ-乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman,等, Biopolymers 22:547(1983)),不可降解的乙烯乙酸乙酯(Langer,等,出处同上),或可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物如Lupron DepotTM(由乳酸-羟基乙酸共聚物和亮氨酸脯氨酸(leuprolide)乙酸酯组成的可注射的微球体),以及聚D-(-)-3-羟基丁酸(EP 133,988)。

[0374] 聚合物如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-羟基乙酸能持续释放分子100天以上,而一些水凝胶释放蛋白的时间却较短。当胶囊化蛋白长时间停留在体内时,它们可能由于暴露

在 37℃ 潮湿环境中而变性或凝聚, 导致损失生物活性, 且免疫原性可能会改变。可以根据相关机理来设计使蛋白稳定的合理策略。例如, 如果发现凝聚的机理是通过硫代二硫键互换而形成分子间 S-S 键, 则可通过修饰巯基残基、从酸性溶液中冻干、控制湿度、采用合适的添加剂、和开发特异性聚合物基质组合物来实现稳定。

[0375] 持续释放型 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 组合物也可以包括用脂质体包裹的 Bv8 和 / 或 EG-VEGF。含有 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的脂质体通过本领域已知方法来制备 (Epstein 等, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 82 :3688 ;Hwang 等, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4030 ; DE 3. 218, 121 A ;EP 52322A ;EP 36676A ;EP 88046A ;EP 143949A ;EP 142641A ;日本专利申请 83-118008 ;美国专利 4, 485, 045 和 4, 544, 545 ;EP 102, 324A)。脂质体通常为小单层 (unilamellar) (约 200-800Å), 其中的脂质含量超过约 30mol. % 胆固醇, 调整所选比例以便使 Bv8 治疗效果最佳。

[0376] 当局部用药时, Bv8, EG-VEGF 或其组合适合于与诸如载体和 / 或佐剂等其它成分组合。对所述其它成分的特性没有限制, 但它们必须是生理上可接受的, 对于其目的用药是有效的, 并且不会降低组合物中活性成分的活性。合适的赋形剂的例子包括软膏剂, 乳膏, 凝胶剂, 或悬液, 含有或不含纯化的胶原蛋白。组合物也可浸渗到经皮贴剂 (pach), 硬膏剂 (plaster) 和绷带中, 优选以液体或半液体的形式浸渗。

[0377] 为了获得凝胶配制剂, 可以将配制在液体组合物中的 Bv8, EG-VEGF 或其组合与有效量的水溶性多肽或合成聚合物如 PEG 混合, 以便形成具有适合于局部应用的粘度的凝胶。可以使用的多糖包括, 例如, 纤维素衍生物, 如醚化的纤维素衍生物, 包括烷基纤维素, 羟烷基纤维素, 和烷基羟烷基纤维素, 例如, 甲基纤维素, 羟乙基纤维素, 羧甲基纤维素, 羟丙基甲基纤维素, 和羟丙基纤维素; 淀粉和分级淀粉; 琼脂; 藻酸和藻酸盐; 阿拉伯胶; 支链淀粉; 琼脂糖; 角叉藻聚糖; 葡聚糖 (dextran); 糊精; 果聚糖; 菊粉; 甘露聚糖; 木聚糖; 阿拉伯聚糖; 脱乙酰壳多糖; 糖原; 葡聚糖 (glucan); 和合成性生物聚合物; 以及胶, 例如黄原胶; 瓜尔豆胶; 槐豆荚胶; 阿拉伯胶; 西黄蓍胶; 和刺梧桐树胶; 及其衍生物和混合物。本文优选的胶化剂是对生物学系统为惰性的, 无毒的, 制备简单的, 且不太流动或粘滞的胶化剂, 它不会使承载在其内部的 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 失去稳定性。

[0378] 优选的多糖是醚化的纤维素衍生物, 更优选充分鉴定、纯化并在 USP 中列出的多糖, 例如, 甲基纤维素和羟烷基纤维素衍生物, 如羟丙基纤维素, 羟乙基纤维素和羟丙基甲基纤维素。本文最优选甲基纤维素。

[0379] 用于凝胶配制的聚乙二醇一般是低分子量和高分子量 PEG 的混合物, 这样能获得适当的粘度。例如, 分子量 400-600 的 PEG 与分子量 1500 的 PEG 的混合物当以适当比率混合而获得糊剂 (paste) 时对该目的是有效的。

[0380] 用于多糖和 PEG 的术语“水溶性”意在包括胶体溶液和分散液。一般来说, 纤维素衍生物的溶解度可以通过醚基团的取代程度来确定, 本文有用的稳定衍生物在纤维素链中每个脱水葡萄糖单元应具有足够量的这类醚基团以使所述衍生物具有水溶性。醚取代程度为每个脱水葡萄糖单元上至少 0.35 个醚基团一般是足够的。另外, 纤维素衍生物可以是碱金属盐, 例如, Li, Na, K, 或 Cs 盐的形式。

[0381] 当凝胶中使用甲基纤维素时, 优选它占该凝胶的约 2-5%, 更优选约 3%, 而 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的量为每毫升凝胶约 300-1000mg。

[0382] 半通透的可植入膜装置可以作为在一些情况下运送药物的有效工具。例如,可以将分泌 Bv8 和 / 或 EG-VEGF, Bv8 和 / 或 EG-VEGF 变体, Bv8 和 / 或 EG-VEGF 嵌合体或 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 激动剂或拮抗剂的细胞被囊化,并将这类装置植入到患者体内。相应地,本发明还包括预防或治疗癌症、其它血液疾病、嗜中性粒细胞减少症、免疫疾病、自身免疫病等的方法,包括将分泌 Bv8 和 / 或 EG-VEGF、或根据具体情况需要分泌其激动剂或拮抗剂的细胞植入到有需要的患者体内。最后,本发明包括通过在患者体内植入植入体来预防或治疗癌症、其它血液疾病、嗜中性粒细胞减少症、免疫疾病、自身免疫病等的装置,所述植入体包含半透膜,和分泌 Bv8 和 / 或 EG-VEGF (或根据具体情况的需要分泌其激动剂或拮抗剂) 的细胞,所述细胞包裹在所述膜中,且所述膜可以透过 Bv8 和 / 或 EG-VEGF (或其激动剂或拮抗剂) 但不能透过来自患者的对细胞有害的因子。可以将患者自身的经过转化能离体 (exvivo) 产生 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的细胞直接植入该患者,任选不经过上述被囊化。将活细胞用膜进行被囊化的方法是本领域普通技术人员很熟悉的,且被囊化细胞的制备以及将它们植入患者都无需过多的实验就可以实现。

[0383] 含有 Bv8, EG-VEGF 或其组合,或其激动剂或拮抗剂的药物组合物优选装在合适的容器内。所述容器优选带有详细说明该药物组合物的相应用途和剂量的说明。本领域技术人员将认识到,依据治疗方法的不同,这些说明会有不同。

[0384] I. 治疗方法

[0385] 本文提供的 Bv8, EG-VEGF 及其激动剂或拮抗剂可以在多种诊断实验和治疗中使用。Bv8 和 / 或 EG-VEGF 诱导骨髓细胞及其子代的增殖,包括但不限于,造血干细胞,CD34+ 髓样祖细胞, CD34+ 淋巴样祖细胞,髓样前体细胞,淋巴样前体细胞,单核细胞,以及淋巴细胞。所述增殖导致白细胞包括 B 细胞, T 细胞,巨噬细胞,特别是嗜中性粒细胞的数量增加。

[0386] Bv8, EG-VEGF 及其激动剂可用于治疗例如需要增加骨髓细胞及其子代增殖的疾病或病症,所述骨髓细胞包括但不限于,髓样祖细胞,髓样前体细胞,嗜中性粒细胞,淋巴样祖细胞,淋巴样前体细胞以及淋巴细胞,或用于治疗需要促进特定类型血细胞的存活,所述血细胞诸如嗜中性粒细胞, B 细胞,或 T 细胞。一个实施方案中,将有效治疗所述疾病的量的 Bv8, EG-VEGF,或其激动剂给药哺乳动物。优选,所述哺乳动物是人。Bv8, EG-VEGF,或其组合可以以多肽或核酸的形式给药。

[0387] 例如, Bv8, EG-VEGF 及其激动剂可用于治疗与嗜中性粒细胞减少症,淋巴细胞减少症,或免疫缺陷疾病 (可为原发或继发免疫缺陷疾病) 相关的疾病或病症。所述疾病或病症可与例如以下疾病相关:遗传疾病, B 细胞缺陷, T 细胞缺陷,感染疾病包括细菌和病毒感染,浸润性和血液疾病,手术和外伤,以及给药具有继发免疫抑制效果的治疗剂。

[0388] 一些情况下,激发免疫抑制效应导致免疫缺陷疾病。Bv8, EG-VEGF 或其组合可用于促进骨髓抑制的恢复,例如在正在接受治病性治疗的癌症患者中,其中所述治疗剂严重降低循环白细胞的水平并损害所述患者的免疫系统。Bv8, EG-VEGF 或其组合可在放射,高剂量化疗,或其它抗癌药物之前,联合,或之后给药,以促进造血恢复和 / 或增加循环嗜中性粒细胞, B 细胞, T 细胞的数目。

[0389] Bv8, EG-VEGF 或其组合可与另一种化合物或组合物联合给药。Bv8 和 / 或 EG-VEGF 可在所述化合物或组合物的治疗之前,过程中,或之后给药,使得 Bv8, EG-VEGF 和 / 或所述化合物或组合物的治疗效力增加。如上所述,所述化合物或组合物可为化疗剂。优选

的化疗剂包括但不限于,长春新碱(长春新碱),顺铂(顺铂),氮甲蝶呤,3'-叠氮(叠氮基)-3'-脱氧胸苷,紫杉醇(taxane)(TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)和紫杉萜(TAXOTERE[®], Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France)和/或蒽环类(蒽环类抗生素)抗生素。这类化疗剂的制备和剂量方案可以按照厂家的说明书所述来确定,或者可以由有经验的医师根据其经验来确定。这类化疗剂的制备和剂量方案还可以参见 Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)。

[0390] 另一实施方案中, Bv8, EG-VEGF 或其组合与 VEGF 或其激动剂一起给药。VEGF 可以是 VEGF 的受体选择性突变体。一个是实施方案中, 所述化合物是 VEGF 的 FLT1 受体选择性突变体或其激动剂。另一实施方案中, 所述化合物是 VEGF 的 DDR 受体选择性突变体或其激动剂。

[0391] Bv8 和 EG-VEGF 的拮抗剂及其组合可用于治疗与血细胞异常增殖或分化相关的血液疾病。所述异常增殖或分化可导致血细胞发育不良性变化以及血液恶性疾病。具体实施方案包括治疗患者中的白血病, 骨髓增生性疾病, 骨髓发育不良性疾病, 淋巴组织增生性疾病, 或淋巴组织发育不良性疾病。各种白血病性疾病中的细胞诸如 ALL, AML, MPD, CML 和 MDS 细胞, 已经被发现表达 Bv8 和 EG-VEGF 受体。Bv8 和 EG-VEGF 受体的拮抗剂可用于抑制这些白血病细胞的增生。

[0392] Bv8 和 EG-VEGF 诱导 B 和 T 细胞活化。这些分子的激动剂和拮抗剂可治病性地用于调节免疫反应。可给药 Bv8, EG-VEGF 或其组合或其激动剂以诱导 B 淋巴细胞, CD4+T 淋巴细胞, 和/或 CD8+T 淋巴细胞的增殖和/或活化。Bv8 和 EG-VEGF 的拮抗剂可被给药以抑制 B 淋巴, CD4+T 淋巴细胞, 和/或 CD8+T 淋巴细胞的增殖和/或活化。

[0393] Bv8 和/或 EG-VEGF 可促进或抑制 CD4+T 淋巴细胞的增殖和活化。Bv8 和 EG-VEGF 诱导 CD4+T 淋巴细胞中的细胞因子生成。一个实施方案中, 所述细胞因子是 IL-2 和/或 IFN- γ 。选择性诱导 CD4+T 淋巴细胞中的 IL-2 合成的 Bv8 或 EG-VEGF 激动剂可用于诱导 CD4+T 淋巴细胞的增殖。选择性诱导 CD4+T 淋巴细胞中的 IFN- γ 合成的 Bv8 或 EG-VEGF 激动剂可用于抑制 CD4+T 淋巴细胞的增殖。

[0394] Bv8 拮抗剂, EG-VEGF 拮抗剂以及其组合可用于治疗自身免疫病, 对于所述自身免疫病而言, 活化的 B 细胞, CD4+T 细胞, 和/或 CD8+T 细胞的数目减少是所需的。具体实施方案包括利用本文提供的药剂和组合物来治疗与自身免疫病相关的 II, III 和 IV 型超敏反应。在优选实施方案中, 所述自身免疫病是炎性肠病, 克隆氏病, 结肠炎, 或移植物抗宿主疾病。

[0395] 诸如通过以上部分 4 和 5 中所述的筛选实验鉴定的那些物质的化合物, 可用于调节 Bv8 和/或 EG-VEGF 活性或表达的水平。具体地, 鉴定为 Bv8 和/或 EG-VEGF 激动剂或可刺激 Bv8 和/或 EG-VEGF 与其受体的结合的化合物可用于这样的治疗, 其中升高的 Bv8 和/或 EG-VEGF 活性水平是所需的。类似地, 被鉴定为可促进 Bv8 和/或 EG-VEGF 表达的化合物可用于这种类型的治疗。Bv8 和/或 EG-VEGF 激动剂以及增加 Bv8 和/或 EG-VEGF 基因表达的化合物可用于治疗嗜中性粒细胞减少症, 淋巴细胞减少症, 以及免疫缺陷疾病, 其中嗜中性粒细胞, B 淋巴细胞和/或 T 淋巴细胞数目的增加是所需的。

[0396] 化合物诸如通过以上部分 4 和 5 中的筛选实验鉴定的 Bv8 和/或 EG-VEGF 拮抗剂,

可分别用于调节 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 活性或表达的水平,如本文所述。化合物诸如通过以上部分 4 和 5 中的筛选实验鉴定的 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 激动剂,可分别用于调节本文所述的免疫反应。

[0397] 应理解增加骨髓细胞增殖和抑制骨髓细胞增殖的方法可在体内或体外进行。一些情况下,需要将 Bv8, EG-VEGF 或其组合添加到体外细胞样品中,以刺激具体细胞类型的增殖。用 Bv8, EG-VEGF 或其组合处理的样品可用于筛选试验,或者移植到需要治疗的个体或动物模型中。

[0398] 有效量的 Bv8 或 Bv8 激动剂或拮抗剂, EG-VEGF 或 EG-VEGF 激动剂或拮抗剂可以根据,例如治疗目的,给药途径,和病人的情况而用于治疗。因此,临床医师必需根据获得最佳治疗效果的需要来滴定剂量并调整给药途径。通常,临床医师会持续给药 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 直到获得所需效果。全身治疗的通常日剂量为约 10ng/kg- 最多 100mg/kg 哺乳动物体重 / 天或更高剂量不等。优选约 1 μ g/kg/ 天-10mg/kg/ 天,这取决于给药途径。应能预计到,不同配制剂可以针对不同的治疗化合物和不同的疾病有效,针对一种器官或组织进行给药时所必需的方式可以不同于其它器官或组织。

[0399] 另一种建议是,将 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 以能在靶组织中建立有效但无不当毒性的 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 水平的剂量来配制并运送到靶位点或组织。该组织内浓度应通过连续输注、缓释、局部应用、植入表达 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的细胞、或按照经验确定的频率进行注射等方式尽可能地维持。该治疗的进展可以通过常规试验很容易地监控。

[0400] 用药方案必需根据个体的情况来确定。但在优选实施方案中,Bv8 和 / 或 EG-VEGF, 及其激动剂或拮抗剂是每天给药,更优选每隔天给药,还更优选一周至少两次给药。治疗优选持续 6 个月,更优选持续 1 个月,还更优选持续至少两周。本领域技术人员将认同,真实的用药方案必需由临床医师根据个体的情况来确定。

[0401] 编码 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 多肽的多核苷酸可以用于基因治疗。在基因治疗的应用中,将基因引入细胞以便实现在体内合成对治疗有效的基因产物,例如用于替换缺陷基因基因产物。“基因治疗”既包括经单次治疗就可获得永久效果的常规基因治疗,也包括基因治疗剂的给药,后者涉及一次或重复多次施用治疗有效量的 DNA 或 mRNA。反义 RNA 和 DNA 可用作体内阻断特定基因表达的治疗剂。业已证明,可以将短链反义寡核苷酸运输到细胞中,它们在那里起抑制剂的作用,该作用不受细胞膜限制其摄取所导致的其较低细胞内浓度。(Zamecnik 等,1986,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 :4143-4146)。可以修饰寡核苷酸以增强其摄取,例如用不带电荷的基团取代带负电荷的磷酸二酯基团。

[0402] 有多种技术可以用于将核酸引入到活细胞中。所述技术根据是将核酸转移到体外培养的细胞中,还是转移到目标宿主体内的细胞中而异。适于将核酸转移到哺乳动物体外细胞中的技术,包括脂质体的使用、电穿孔、显微注射、细胞融合、DEAE- 葡聚糖、磷酸钙沉淀法等。目前优选的体内基因转移技术包括,用病毒(通常为逆转录病毒)载体进行转染和用病毒衣壳蛋白- 脂质体介导的转染(Dzau 等, Trends in Biotechnology 11, 205-210(1993))。有些情况下,希望提供带有靶向靶细胞的试剂的核酸源,所述物质如对细胞表面膜蛋白或靶细胞具有特异性的抗体,靶细胞表面受体的配体等。使用脂质体时,将与参与胞吞的细胞表面膜蛋白结合的蛋白用于靶向和 / 或促进摄取,例如对特定类型细胞具有向性的衣壳蛋白或其片段、在循环中发生内化的蛋白的抗体、靶向细胞内位置并延

长细胞内半寿期的蛋白。有关受体-介导的胞吞的技术在例如 Wu 等, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432(1987); 和 Wagner 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414(1990) 中有描述。关于基因示踪 (marking) 和基因治疗方案的综述, 请参见 Anderson 等, Science 256, 808-813(1992)。

[0403] 编码 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的肽或核酸序列也可以用于诊断方法中。Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的异常表达可以指示造血异常, 血液疾病的开始, 嗜中性粒细胞减少的开始, 免疫缺陷疾病的开始, 或自身免疫病的开始。而且, 可以分析患者样品中突变的或失去功能的 Bv8 和 / 或 EG-VEGF。这类方法一般包括比较患者样品和对照样品中 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的表达。

[0404] J. 制品

[0405] 本发明另一实施方案涉及一种制品, 其包含可用于治疗或预防疾病的材料。所述制品优选包括一个容器和位于该容器表面的或与该容器相连的标签或包装插页。适当的容器有瓶子, 小瓶, 注射器等。容器可由各种材料如玻璃或塑料制成。该容器内装载含有 Bv8 和 / 或 EG-VEGF、或其激动剂或拮抗剂的组合物, 标签或包装插页优选提供 Bv8 和 / 或 EG-VEGF、或其激动剂或拮抗剂的使用说明。在一个实施方案中, 所述制品包含 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 的拮抗剂和用所述拮抗剂治疗血液疾病诸如白血病、骨髓增生性疾病, 骨髓发育不良性疾病等的使用说明。在另一实施方案中, 所述制品包含 Bv8 和 / 或 EG-VEGF, 以及用所述多肽治疗或预防与异常造血相关的疾病的使用说明。在另一实施方案中, 所述制品包含 Bv8 和 / 或 EG-VEGF, 以及使用所述多肽治疗免疫缺陷疾病的使用说明。包装插页还说明了适当的剂量方案。在一个实施方案中, 该插页指示, 可以按照约 0.01 μ g/kg-50mg/kg 的量给药所述组合物。

实施例

[0406] 以下实施例中用到的可购得试剂, 除非特别说明, 都按照厂家建议使用。以下实施例以及说明书全文中用 ATCC 保藏号定义的细胞都来自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection), Manassas, VA。

[0407] 本文引用的所有参考文献均包含在此作为参考。

[0408] 实施例 1Bv8 及其受体的表达分析

[0409] 为说明 Bv8 的表达模式, 对代表多种组织和细胞系 RNA 阵列进行斑点分析 (Dot blot analysis), 所述组织和细胞系来自多种人, 小鼠和大鼠组织。组织 / 细胞 RNA 阵列和印迹 (blot) 均购自 CLONTECH。cDNA 探针利用 50ng 人或小鼠 Bv8 编码序列利用前述方法 (LeCouter et al., 2001, Nature) 制备。如图 13 所示, Bv8 表达似乎限制在外周血白细胞, 骨髓组织和以前表征的睾丸 (LeCouter et al., 2003, PNAS)。

[0410] 为鉴定表达 hBv8 的细胞类型, 利用一系列炎性组织样品进行原位杂交 (ISH) 试验, 其中存在升高的白细胞水平。加工组织以便进行 ISH, 并利用标准方法和物质生成 [33 P] UTP- 标记的 RNA 探针。hBv8 的有义和反义探针从对应核苷酸 533-1132 的 cDNA 片段合成; mBv8, 从对应核苷酸 886-1611D 的 cDNA 片段合成; 和 mR-1, 从对应核苷酸 220-946 的 cDNA 片段合成。该探针与 mR-2 有 81.2% 相同。在炎性扁桃体和炎性阑尾炎中, Bv8 的强杂交信号主要在嗜中性粒细胞和相关浸润细胞中检测到 (图 14)。

[0411] 为证实 Bv8 及其受体的细胞表达模式,在造血细胞和白血病细胞系中进行实时定量 PCR 分析 (Heid et al., 1996, Genome Res., 6 :986-994)。从人和小鼠造血干细胞,系定向型祖细胞或白血病细胞系、利用 Rneasy 试剂盒、根据生产商的说明制备总 RNA。人细胞制备物购自 AllCells Inc. (Berkeley, CA),系定向型小鼠细胞和干细胞 (Sca+c-Kit+) 自 28 大腿的总收集物制备并如上述进行分类 (Gerber, 2002, Nature)。人细胞系 (HL-60, K562, He1-92, TF-1 和 KG-1) 获自 ATCC。对于实时 RT-PCR 分析,利用 100ng 总 RNA。对于小鼠和人样品,利用睾丸 RNA 产生标准曲线。所述分析中所用引物和探针如下:

人 (h) GADPH	正向 反向 探针	5' TGGGCTACACTGAGCACCAG 3' 5' CAGCGTCAAAGGTGGAGGAG 3' 5' FAM- TGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACAC- TAMRA 3'	SEQ ID NO:11 SEQ ID NO:12 SEQ ID NO:13
人 (h) Bv8	正向 反向 探针	5' CCATTTTTTGGGCGGAGG 3' 5' CCGTAAACAGGCCAAGCCT 3' 5' FAM-TGCATCACACTTGCCCATGTCTG C- TAMRA 3'	SEQ ID NO:14 SEQ ID NO:15 SEQ ID NO:16
hEG- VEGF	正向 反向 探针	5' CCGGCAGCCACAAGGTC 3' 5' TGGGCAAGCAAGGACAGG 3' 5' FAM- CCTTCITCAGGAAACGCAAGCACCAC- TAMRA 3'	SEQ ID NO:17 SEQ ID NO:18 SEQ ID NO:19
hBv8/EG- VEGF 受体-1	正向 反向 探针	5' GGCGCCCTTCTACGGCT 3' 5' TCTCCTTCACGAACACGGTG 3' 5' FAM-CACCATCGTGC GCGACTTCTTCC- TAMRA 3'	SEQ ID NO:20 SEQ ID NO:21 SEQ ID NO:22
hBv8/EG- VEGF 受体-2	正向 反向 探针	5' GGAAATGACATCTGTGTTTCATGC 3' 5' TCATTGTATGTACGACTTTGCAGC 3' 5' FAM-CCCGTGCCCTCAAGAAGCCGA- TAMRA 3'	SEQ ID NO:23 SEQ ID NO:24 SEQ ID NO:25
鼠 (m) GADPH	正向 反向 探针	5' ATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG 3' 5' GAAGACACCACTAGACTCCACGACA 3' 5' FAM- AAGCCCATCACCATCTTCCAGGAGCGAGA- TAMRA 3'	SEQ ID NO:26 SEQ ID NO:27 SEQ ID NO:28
鼠 (m) Bv8	正向 反向 探针	5' CGGAGGATGCACCACACC 3' 5' CCGGTTGAAAGAAGTCCTTAAACA 3' 5' FAM-CCCCTGCCTGCCAGGCTTGG-TAMRA 3'	SEQ ID NO:29 SEQ ID NO:30 SEQ ID NO:31
mEG- VEGF	正向 反向 探针	5' TGAGGAAACGCCAACACCAT 3' 5' CCGGGAACCTGGAGCAC 3' 5' FAM-CCTGTCCCTGCTCAGCCAGCCTG- TAMRA 3'	SEQ ID NO:32 SEQ ID NO:33 SEQ ID NO:34
mBv8/EG- VEGF 受体-1	正向 反向 探针	5' CAGCGCACATGAAGACTTG 3' 5' GTCATCTTCGGTTTCTGAGT 3' 5' FAM-TCCAGGCAGCAGCCCTGATG-TAMRA 3'	SEQ ID NO:35 SEQ ID NO:36 SEQ ID NO:37
mBv8/EG- VEGF 受体-2	正向 反向 探针	5' GAACTCCACGTGAGCGCA 3' 5' GGGTCCCATGTTGATGATGCT 3' 5' FAM- CTCCCTGATACACACCAGCCACCTG- TAMRA 3'	SEQ ID NO:38 SEQ ID NO:39 SEQ ID NO:40

[0412]

[0413] 如图 15A-D 所示, hBv mRNA 最主要在骨髓和睾丸中表达, 而胎盘中的表达水平为睾丸中的约 10% (图 15A)。在不同造血细胞类型中, hBv8mRNA 主要在嗜中性粒细胞中表

达,在单核细胞和骨髓单个核细胞中也有中度表达(图 15B)。相比而言,Bv8/EG-VEGF 受体 1 和受体 2 都在 CD34⁺ 细胞,AC133 和 BM-MNC 中而不在嗜中性粒细胞或单核细胞中高水平表达(图 15C, D)。

[0414] hBv8 和 hBv8/EG-VEGF 受体的表达也在各种白血病细胞系中利用实时定量 PCR 分析研究。如图 16 所示,一些白血病细胞系(诸如 HL60CML, K562CML 和 KG-1AML)表达显著水平的 Bv8 及其受体。

[0415] 实施例 2 集落形成实验

[0416] Bv8 在小鼠和人造血细胞中的生物功能利用甲基纤维素集落形成实验研究。小鼠骨髓单个核细胞通过用含有 20% FCS 的 3ml 冷(4℃)Iscove' s MDM 冲洗小鼠股骨来收集。血液红细胞利用 10mM NH₄Cl 在 10mM Tris pH7.2 中、冰上裂解 10 分钟。剩余的单个核细胞在培养基中洗涤并通过离心沉淀。对于甲基纤维素培养物,根据生产商的说明将 70000 细胞铺于各自为 35mm 的糙面(grided)板上的培养基制备物(MethoCult M3434,其为完全培养基含有 SCF、IL-3、IL-6 和 Epo,以及 M3334,其为基本培养基,含有单独的 Epo)中,所述培养基均购自 StemCell Technologies Inc. 小鼠 IL-3, IL-6 和 SCF 购自 StemCell Technologies Inc., VEGF, EG-VEGF 和 Bv8 如前所述由 Genentech 制备(LeCouter et al., 2001, Nature, 412 :877-884 ;LeCouter et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 : 2685-2690)。外源因子的终浓度如下:10ng/ml 小鼠 IL-3, 10ng/ml mouse IL-6, 50ng/ml 小鼠 SCF, 10ng/ml VEGF, 5 或 50nM EG-VEGF 或 50nM 小鼠 Bv8。37℃和 5% CO₂ 中培养 12 天后,利用光学显微镜计数一式三份样品中的造血集落。

[0417] 如图 17A 所示,加入 5nM 或 50nM 的 Bv8 显著增加小鼠 BM-MNC 中形成的集落的数目。

[0418] 对于人培养物,70000 骨髓来源的单个核细胞(AllCells Inc)铺于 MethoCult 4434 完全培养基,4330 基本培养基,或补充了 10ng/ml IL-3, 10ng/ml IL-6, 5ng/ml G-CSF, 5ng/ml GM-CSF, 50nM EG-VEGF, 50nM Bv8 的基本培养基,如所述(均来自 StemCell Technologies Inc.)。培养 14-16 天后,细胞集落通过显微镜观察鉴定并计数。

[0419] 如图 17B 所示, Bv8 或 EG-VEGF 促进至少一些类型的系定向型髓样祖细胞的集落形成。例如,当将 Bv8 或 EG-VEGF 加入补充了 IL-3 和 IL-6 的基础培养基时, CFU-GM 细胞的集落数目分别增加约 1.7- 倍和约 2.2- 倍; CFU-G 细胞的集落数目分别增加约 1.7- 倍和约 2.5- 倍; CFU-GEMM 细胞的集落数目分别增加约 4- 倍和约 7- 倍。值得注意的是,就集落数目而言,这些增加类似用 G-CSF 处理的组,所述 G-CSF 为已知的粒细胞集落刺激因子。

[0420] 实施例 3 细胞动员实验

[0421] 经由尾静脉向免疫缺陷(裸)小鼠注入编码 LacZ(5x10⁸pfa), VEGF(10⁷pfu), EG-VEGF(5x10⁸pfu) 或 Bv8(5x10⁸pfu) 的腺病毒。所述给药途径用于实现所分泌因子的系统生成。为评估 HSC 动员,在 3,6 和 12 天从眶后窦(retro-orbital sinus)收集血样,利用 Coulter 计数器确定差异血细胞计数。在验尸期间的第 6 和 12 天,测定体重和器官重量。Bv8 促进 BBC 上皮细胞的存活。具体地,存在任何浓度的 Bv8 的情况与存在 2% FCS 或 25nM EG-VEGF 的情况相比,前者的培养物中的凋亡细胞更少。Bv8 和 VEGF 显示协同效果,联用两种化合物使得与单独的生长因子或 10% FCS 相比,细胞存活大大增加。

[0422] 如图 18 所示,腺病毒-Bv8 注入导致白细胞计数增加约 2- 约 2.5 倍。同时,红细

胞或血小板计数不具有任何明显改变。类似的效应可在通过腺病毒注射而导入 EG-VEGF 表达的情况下观察到。

[0423] 实施例 4 淋巴细胞中的 Bv8/EG-VEGF 受体表达

[0424] 人和鼠淋巴细胞对 Bv8/EG-VEGF 及其各自受体的表达利用实时定量 PCR 分析来研究。分析自可购得的制备物 (AllCellsInc., Berkley, CA) 严格 (acutely) 分离的人和小鼠纯化细胞和人细胞的受体表达。B 细胞, CD4+T 细胞, CD8+T 细胞, 和自然杀伤细胞利用适当抗体 (分别为抗 -CD 19, 抗 -CD4, 抗 -CD8 和抗 -CD56 抗体) 进行阳性选择 (positively select), 所述抗体偶联于顺磁性珠 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)。简而言之, 90 μ l MACS 缓冲液 (PBS 含有 0.5% 牛血清白蛋白和 2mM EDTA) 中的 10^7 总细胞与 10 μ l 抗体 - 偶联的顺磁性珠在 4°C 保温 15 分钟。所述珠随后在过量 MACS 缓冲液中洗涤, 300xg 离心 10 分钟, 将沉淀重悬于 2ml MACS 缓冲液。将细胞悬液加于 LS+/VS+ 选择柱 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), 其被置于 MACS 分离器的磁场 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)。所述柱用 3ml MACS 缓冲液润洗两次, 从所述分离器移出, 利用与柱一起提供的动铁芯 (plunger) 用 MACS 缓冲液将阳性细胞级分从所述柱冲洗下来。

[0425] 总 RNA 用 Rneasy 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 根据生产商的说明从阳性选择的细胞制备。在这些研究中, 至少两种独立纯化的人和小鼠 RNA 分离物具有相似结果。对于实时定量 PCR 分析, 将 50ng 总 RNA 作为反应模板, 评估 EG-VEGF, Bv8 及其同类受体 Bv8/EG-VEGF 受体 -1 和 Bv8/EG-VEGF 受体 -2 的表达 (LeCouter et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 100 :2685-2690)。对于小鼠和人样品, 利用睾丸 RNA 生成标准曲线。分析中所用引物和探针如下:

[0426]

人 (h) Bv8	正向	5' CCATTTTTTGGGCGGAGG 3'	SEQ ID NO:14
	反向	5' CCGTAAACAGGCCAAGCCT 3'	SEQ ID NO:15
	探针	5' FAM-TGCATCACACTTGCCCATGTCTG C-TAMRA 3'	SEQ ID NO:16
hEG-VEGF	正向	5' CCGGCAGCCACAAGGTC	SEQ ID NO:17
	反向	5' TGGGCAAGCAAGGACAGG	SEQ ID NO:18
	探针	5'FAM-CCTTCTTCAGGAAACGCAAGCACCCAC-TAMRA 3'	SEQ ID NO:19
hBv8/EG-VEGF 受体-1	正向	5' GCGGCCCTTCTACGGCT 3'	SEQ ID NO:20
	反向	5' TCTCCTTCACGAACACGGTG 3'	SEQ ID NO:21
	探针	5'FAM-CACCATCGTGCGCGACTTCTTCC-TAMRA 3'	SEQ ID NO:22
hBv8/EG-VEGF 受体-2	正向	5' GGAAATGACATCTGTGTTTCATGC 3'	SEQ ID NO:23
	反向	5' TCATTGTATGTTACGACTTTGCAGC 3'	SEQ ID NO:24
	探针	5'FAM-CCCGTGCCCTCAAGAAGCCGA-TAMRA 3'	SEQ ID NO:25
鼠 (m) Bv8	正向	5' CGGAGGATGCACCACACC 3'	SEQ ID NO:29
	反向	5' CCGGTTGAAAGAAGTCCTTAAACA 3'	SEQ ID NO:30
	探针	5'FAM-CCCCTGCCTGCCAGGCTTGG-TAMRA 3'	SEQ ID NO:31
mEG-VEGF	正向	5'TGAGGAAACGCCAACACCAT 3'	SEQ ID NO:32
	反向	5' CCGGGAACCTGGAGCAC 3'	SEQ ID NO:33
	探针	5'FAM-CCTGTCCCTGCTCACCAGCCTG-TAMRA 3'	SEQ ID NO:34
mBv8/EG-VEGF 受体-1	正向	5' CAGCGCACATGAAGACTTG 3'	SEQ ID NO:35
	反向	5' GTCATCTTCGGTTTCCTGAGT 3'	SEQ ID NO:36
	探针	5' FAM-TCCAGGCAGCACCCCTGATG-TAMRA 3'	SEQ ID NO:37
mBv8/EG-VEGF 受体-2	正向	5' GAACTCCACGTGAGCGCA 3'	SEQ ID NO:38
	反向	5' GGGTCCCATGTTGATGATGCT 3'	SEQ ID NO:39
	探针	5'FAM-CTCCCTGATACACACCA GCCCACCTG-TAMRA 3'	SEQ ID NO:40

[0427] 如图 19A-D 所示,人和小鼠 B 细胞, CD4+T 细胞, CD8+T 细胞和自然杀伤细胞表达 Bv8/EG-VEGF 受体 -1 和 Bv8/EG-VEGF 受体 -2。这些结果表明,这些淋巴细胞在体内对 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 配体有反应,所述配体主要由嗜中性粒细胞表达。

[0428] 实施例 5Bv8/EG-VEGF 促进的 B 细胞增殖

[0429] 研究了 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 促进 B 细胞研究的能力。B 细胞分离自 Balb/C 或 C57B1/6J 小鼠的脾。脾从所述小鼠收集并在两个玻璃载片之间机械解离。将细胞制备物悬浮于 MACS 缓冲液 (PBS, 含有 0.5% 牛血清白蛋白和 2mM EDTA) 中,随后通过 40 μ m 尼龙细胞滤网。所得单个细胞悬液加于 Ficoll 梯度 (Lymphocyte M, Cedarlane Laboratories Ltd., Ontario, Canada), 并在 2500rpm 离心 15 分钟。收集位于界面的细胞并在 MACS 缓冲液中洗涤三次。随后从纯化的细胞群体利用 CD 19 微珠 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) 如实施例 1 所述从纯化的细胞群体中阳性选出 B 细胞。

[0430] 对于增殖实验,以 5×10^5 细胞每孔铺于平底 96-孔板中的 RPMI 实验介质 (RPMI 1640, 其中补充了 10% 胎牛血清和青霉素 / 链霉素溶液 (Life Technologies, Inc., Rockville, MD) 中。以浓度范围 2-200nM 将重组 Bv8 或 EG-VEGF 加入每个孔。一些孔中,将 20 或 30 μ g/ml 抗-小鼠 IgM Fab 片段 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 加入来诱导 B 细胞的基本活化 (basal activation)。在阳性对照中,将 1 μ g/ml LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 或 10 μ g/ml Bly (Genentech, Inc., South San Francisco, CA) 加入每孔来代替重组 Bv8 和 EG-VEGF。所述细胞在 37°C 保温 72 小时,随后用 1 μ 居里 3H- 胸苷 每 ml (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 脉冲 (pulse)。利用 Filtermate 196 Harvester (Packard, Boston, MA) 收集样品并利用 Microplate Scintillation Counter (Packard, Boston, MA) 分析。

[0431] 小鼠 B 细胞的增殖通过评估 3 H- 胸苷掺入来分析。如图 20 所示, Bv8 和 EG-VEGF 各自可重复地诱导 B 细胞中的 3 H- 胸苷掺入增加 4-6 倍。该数据表明, Bv8 和 EG-VEGF 作为 B 淋巴细胞的有丝分裂原以及存活因子起作用。

[0432] 实施例 6 BvS/EG-VEGF 促进的 T 细胞增殖

[0433] 研究 Bv8 和 / 或 EG-VEGF 促进 CD4+T 细胞增殖的能力。CD4+T 细胞分离自 Balb/C 或 C57B1/6J 小鼠的脾。收集脾并如实施例 5 所述进行机械解离。细胞制备物随后悬于 MACS 缓冲液并如实施例 5 所述进行纯化。利用 CD4+T 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), 从纯化的细胞群体阴性选择 (negatively select) T 细胞。

[0434] 简而言之, 90 μ l MACS 缓冲液 (含有 0.5% 牛血清白蛋白和 2mM EDTA 的 PBS) 中的 10^7 总细胞与 10 μ l MACS 抗半-抗原 (Anti-Hapten) 在 4°C 保温 15 分钟。所述珠随后在过量 MACS 缓冲液中洗涤, 300xg 离心 10 分钟, 将沉淀重悬于 2ml MACS 缓冲液。将细胞悬液加于 LS+/VS+ 选择柱 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), 所述柱被置于 MACS 分离器的磁场 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)。收集代表富集的 CD4+T 细胞级分的柱洗出物。所述柱用 3ml MACS 缓冲液润洗三次, 收集代表富集的 CD4+T 细胞级分的洗出物。富集的 CD4+T 细胞级分在 MACS 缓冲液中洗涤, 随后重悬于 RPMI 实验介质。

[0435] 利用阴性选出的 CD4+T 细胞的增殖实验如上实施例 5 所述进行。将 2-200nM 的重组 Bv8 或 EG-VEGF 加入每孔。一些孔与 0.5 μ g/ml 抗-小鼠 CD3 抗体 (PharMingen, LaJolla, CA) 和 / 或 1 μ g/ml 抗-小鼠 CD28 抗体 (PharMingen, LaJolla, CA), 在碳酸盐缓冲液, pH 9.0 中, 37°C 预保温 2 小时。所述抗体与其各自的受体在 T 细胞表面交联, 诱导基础活化。加入抗-CD3 抗体以及抗-CD28 抗体诱导最佳活化。

[0436] 如图 21A 和 B 所述, Bv8 和 EG-VEGF 各自诱导 3H- 胸苷掺入 T 细胞增加 5-8 倍。该数据表明, Bv8 和 EG-VEGF 作为 CD4+T 细胞的有丝分裂原和有效存活因子起作用。

[0437] 实施例 7 CD4+T 细胞中细胞因子 EG-VEGF 产生的诱导

[0438] 研究了 EG-VEGF 诱导 CD4+T 细胞中的细胞因子生成的能力。如实施例 6 所述分离并纯化 CD4+T 细胞。T 细胞增殖实验如实施例 6 所述进行。将 2-200nM 的重组 Bv8 或 EG-VEGF 加入每孔。所述孔与 0.5 μ g/ml 抗-小鼠 CD3 抗体 (PharMingen, LaJolla, CA) 和 / 或 1 μ g/ml 抗-小鼠 CD28 抗体 (PharMingen, LaJolla, CA), 在碳酸盐缓冲液, pH 9.0 中, 37°C 预保温 2 小时。所述抗体与其各自的受体在 T 细胞表面交联, 诱导基础活化。加入抗-CD3 抗体以及抗-CD28 抗体诱导最佳活化。保温步骤以前, 收集 30 μ l 等分试样的 RPMI

实验培养基并用等体积的新鲜实验培养基置换。72 小时的保温步骤过程中,在 24 小时收集 30 μ l 等分试样的 RPMI 实验培养基以分析细胞因子生成,并用等体积新鲜 RPMI 实验培养基置换。在加入 ^3H - 胸苷以前,立刻收集第二份等分试样。利用 Luminex Multiplex Assay 系统 (Luminex Corp., Austin, TX) 分析所收集样品的 IL-2 和 IFN- γ 。

[0439] 来自 CD4+T 细胞的细胞因子在用 EG-VEGF 刺激后收集。加入配体后 24 小时, EG-VEGF 诱导 T 细胞的 IL-2 生成 (图 22A 和 B) 和 IFN 生成 (图 22C 和 D)。与 EG-VEGF 保温 72 小时后, T 细胞产生的 IFN- γ 浓度超过了实验的检测限。这些结果表明 Bv8 和 EG-VEGF 能够调节 CD4+T 细胞反应的发展。

[0440] 实施例 8Bv8 促进 5-FU 骨髓抑制后的恢复

[0441] 研究了 Bv8 促进 5-FU 骨髓抑制后的造血恢复的能力。利用 AdEasy 载体系统 (Stratagene, LaJolla, CA) 制备重组腺病毒。编码 81 氨基酸的小鼠 Bv8 同种型 (SEQID NO:6) 或全长 humEG-VEGF (SEQID NO:8) 的 cDNA 编码被克隆入 pCT015 穿梭载体的多克隆位点。重组和随后在 293 细胞中的扩增如生产商的推荐进行。利用 AAV 纯化试剂盒 (Virapur, San Diego, CA) 自上清液和细胞沉淀纯化所述病毒。病毒滴度通过标准空斑实验利用 CMV-LacZ 病毒作为对照来确定。其它对照包括 VEGF 的受体选择性突变体。

[0442] 经由尾静脉向对照裸小鼠中注入重组腺病毒。每只动物的病毒剂量为 100 微升磷酸盐缓冲的溶液中 108pfu。给予病毒后 12 天监测血细胞计数。血样获自小鼠的眶窦 (orbital sinus) 放血,并利用 Cell Dyn 自动血液分析仪 (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA) 分析。差异计数通过人工方法和利用光学显微镜的自动分析一起进行。

[0443] 将重组腺病毒注入受试动物,在骨髓抑制诱导前三天给药小鼠。每只动物的剂量为 100 微升磷酸盐缓冲的盐水中 10^8 pfu。为诱导小鼠中的骨髓抑制,将单剂量的 125mg/kg 5- 氟尿嘧啶 (Acrucil, NDC 0013-1046-94) 注入腹腔。在给药 5-FU 的 5, 10, 14 天后测定血细胞计数和差异计数。血样获自小鼠眶窦放血,并利用 Cell Dyn 自动血液分析仪 (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA) 分析。差异计数通过人工方法和利用光学显微镜的自动分析一起进行。给药 5-FU 后 14 天,处死动物并切除脾。称重脾并如实施例 5 所述进行机械解离。脾细胞性 (spleen cellularity) 通过利用 Coulter 计数器 (Beckman Coulter, Miami, FL) 计数单个细胞悬液中的细胞来测定。来自每只脾的 2×10^4 细胞以一式三份铺于小鼠完全 Methocult (StemCell Technologies, Inc.) 培养基,培养 10-14 天后对造血细胞集落类型进行评分。

[0444] 如图 23A 所示,在所述研究过程中, Bv8 处理组中的血白细胞计数明显高于其它组。与该数据一致,粒细胞和单核细胞数目较高 (图 23B 和 C)。脾细胞性在 Bv8 处理的小鼠中与对照组 (图 24) 相比明显更高 (至少 2.5- 倍)。此外,与非病毒或 LacZ 处理的小鼠相比, Bv8 脾含有明显更高数目的祖细胞 (图 24)。

[0445] 以上说明书足以使本领域技术人员实施本发明。但除了本文显示和描述的以外,对本发明的各种修改都是本领域技术人员根据上述说明显而易见的,并且都落在所附的权利要求范围内。

[0001]

序 列 表

<110> 健泰科生物技术公司(GENENTECH, INC.)

<120> Bv8 和/或 EG-VEGF 促进造血的用途

<130> 11669.162WOU1

<140> PCT/US2004/007622

<141> 2004-03-12

<150> US 60/454,462

<151> 2003 03 12

<150> US 60/511,390

<151> 2003-10-14

<160> 40

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 427

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码人 Bv8 同系物的 cDNA

```

<400> 1
tgagggcgcc atgaggagcc tgtgtgcgc cccactctg ctctctttgc tgtgcgcgc 60
gtgtgtgtgc acgccccgcg ctggggacgc cgccgtgac accggggctt gtgacaagga 120
ctcccaatgt ggtggaggca tgtgtgtgtc tgtcagtatc tgggtcaaga gcataaggat 180
ttgeacacct atgggcaaac tgggagacag ctgccatcca ctgactcgta aaaacaattt 240
tggaatgga aggcaggaaa gaagaaagag gaagagaagc aaaaggaaaa aggaggttcc 300
atTTTTTggg cggaggatgc atcacacttg cccatgtctg ccaggcttgg cctgtttacg 360
gacttcattt aaccgattta tttgtttagc ccaaaagtaa tcgctctgga gtagaaacca 420
aatgtga 427

```

<210> 2

<211> 129

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 2

[0002]

Met Arg Ser Leu Cys Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro
 1 5 10 15
 Pro Leu Leu Leu Thr Pro Arg Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly
 20 25 30
 Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val
 35 40 45
 Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Lys Leu
 50 55 60
 Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Asn Asn Phe Gly Asn Gly
 65 70 75 80
 Arg Gln Glu Arg Arg Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Glu Val
 85 90 95
 Pro Phe Phe Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly
 100 105 110
 Leu Ala Cys Leu Arg Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Gln
 115 120 125
 Lys

<210> 3
 <211> 423

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码人 Bv8 同系物的 cDNA

<400> 3
 tgagggcgcc atgaggagcc tgtgtgcgc cccactctg ctctctttgc tgtgcgcgc 60
 gagggcgcca tgaggagcct gtgtgcgc ccactctgc tctctttgct gctgcgcgcg 120
 ctgtgtctca cgcgccgcgc tggggacgcc gccgtgatca ccggggcttg tgacaaggac 180
 tcccaatgtg gtggaggcat gtgtgtgtgt gtcagtatct gggtaagag cataaggatt 240
 tgcacaccta tgggcaaaact gggagacagc tgccatccac tgaactgtaa agttccattt 300
 tttgggcgga ggatgcatca cacttgccca tgtctgccag gcttggcctg tttacggact 360
 tcatttaacc gatttatttg tttagcccaa aagtaatcgc tctggagtag aaaccaaag 420
 tga 423

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

[0003]

<400> 4

Met Arg Ser Leu Cys Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro
 1 5 10 15

Pro Leu Leu Leu Thr Pro Arg Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly
 20 25 30

Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val
 35 40 45

Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Lys Leu
 50 55 60

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

Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly Leu Ala Cys Leu Arg
 85 90 95

Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Gln Lys
 100 105

<210> 5

<211> 1338

<212> DNA

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 5

cggacgcgtg ggcgtccctt aaccgccacc gcgtccccgg gacgccatgg gggaccegcg 60
 ctgtgccccg ctactgttac ttctgtctgt accgtgtgtg ttacaccgc cgcgcgggga 120
 tgccgcggtc atcaccgggg cttgcgacaa ggactctcag tgcggaggag gcatgtgtctg 180
 tgctgtcagt atctgggtta agagcataag gatctgcaca cctatgggcc aagtgggcga 240
 cagctgccac cccctgactc ggaaagtacc attttggggg cggaggatgc accacacctg 300
 cccctgcctg ccaggtttgg cgtgtttaag gacttcttcc aaccggttta ttgtcttggc 360
 ccggaaatga tcaacttgaa gtaggaactt gaaatgcgac cctccgtgc acaatgtccg 420
 tcgagtctca cttgtaattg tggcaaacaa agaatactcc agaaagaaat gttctccccc 480
 ttcccttgact ttccaagtaa cgtttctatc ttgtattttt gaagtggcctt tttttttttt 540
 ttttttttcc ttcccttgaa ggaaagtttt gatttttgga gagatttata gaggacttcc 600
 tgacatgget tctcatttcc ctgtttatgt ttgccttga catttttgaa tgccaataac 660
 aactgttttc acaaatagga gaataagagg gaacaatctg ttgcagaaac ttccctttgc 720
 cctttgcccc actcgccccg ccccgccccg ccccgccctg cccatgcgca gacagacaca 780
 cccttactct tcaaagaactc tgatgatcct cacccttactg tagcattgtg ggtttctaca 840
 ctccccgcc ttgttggtgg acccaactgag gaggtcaga gagctagcac tgtacaggtt 900
 tgaaccagat cccccaagca gctcatttgg ggcagacgtt gggagcgtc caggaaacttt 960
 cctgcacca tctgccccac tggttttcag ttctgtctgt taactggttg gaggacaaaa 1020

[0004]

```

ttaacgggac cctgaaggaa cctggcccgt ttatctagat ttgtttaagt aaaagacatt 1080
ttctccttgt tgtggaatat tacatgtctt tttctttttt atctgaaget tttttttttt 1140
ttctttaagl ctctctgttg gagacatttt aaagaacgcc acctgaggaa gcatlgattt 1200
tcatytgga tgacaggagt catcatttta aaaaatcggt gttaagttat aatttaaact 1260
ttatttgtaa cccaaaggty taatgtaaat ggatttcctg atatcctgcc atttgtactg 1320
gtatcaatat ttytatgt 1338

```

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 6

```

Met Gly Asp Pro Arg Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro
1          5          10          15

```

```

Leu Leu Phe Thr Pro Pro Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly Ala
          20          25          30

```

```

Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val Ser
          35          40          45

```

```

Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Gln Val Gly
50          55          60

```

```

Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val Pro Phe Trp Gly Arg Arg
65          70          75          80

```

```

Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly Leu Ala Cys Leu Arg Thr
          85          90          95

```

```

Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Arg Lys
          100          105

```

<210> 7

<211> 1415

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码人天然 EG-VEGF 的 cDNA

<400> 7

```

tggcctcccc agcttgccag gcacaaggct gagcgggagg aagcgagagg catctaagca 60
ggcagtgttt tgccttcacc ccaagtgacc atgagagggt ccacgcgagt ctcaatcatg 120
ctcctcctag taactgtgtc tgactgtgct gtgatcacag gggcctgtga gcgggatgtc 180
cagtgtgggg caggcacctg ctgtgccate agcctgtggt ttcgagggtc gcggatgtgc 240
accccgctgg ggcggaagg cgaggagtgc caccgcggca gccacaaggc ccccttcttc 300

```

[0005]

```

aggaaacgca agcaccacac ctgtccttgc ttgcccaacc tgetgtgctc caggttcecg 360
gaaggcaggt accgetgctc catggacttg aagaacatca atttttagge gcttgectgg 420
tctcaggata cccaccatcc ttttcctgag cacagcctgg atttttatll ctgccatgaa 480
accagctcc catgactctc ccagtccta cactgactac cctgatctct cttgtctagt 540
acgcacatat gcacacagge agacatacct cccatcatga catggteccc aggctggcct 600
gaggatgtca cagcttgagg ctgtggtgtg aaagggtgcc agcctgggtc tcttccctgc 660
tcaggetgcc agagaggtgg taaatggcag aaaggacatt cccctccccc tccccagggtg 720
acctgtctct tttcctgggc cctgcccctc tccccacatg tatecctcgg tctgaattag 780
acattcctgg gcacaggctc ttgggtgcat tgetcagagt cccaggteet ggctgaccc 840
tcaggccctt cactgaggt ctgtgaggac caatttgtgg gtagttcctc ttcctcgat 900
tggttaactc cttagtttca gaccacagac tcaagattgg ctcttcccag agggcagcag 960
acagtcaccc caaggcaggt gtagggagcc caggagggcc aatcagcccc ctgaagactc 1020
tggtcccagt cagcctgtgg cttgtggcct gtgacctgtg accttctgcc agaattgtca 1080
tgcctctgag gccccctctt accacacttt accagttaac cactgaagcc cccaattccc 1140
acagcttttc cattaaaatg caaatggtgg tggttcaatc taatctgata ttgacatatt 1200
agaaggcaat taggggtgtt ccttaaacaa ctctttcca aggatcagcc ctgagagcag 1260
gttggtgact ttgaggaggg cagtcctctg tccagattgg ggtgggagca agggacaggg 1320
agcagggcag gggetgaaag gggcactgat tcagaccagg gaggcaacta cacaccaaca 1380
tgettgcttt agaataaaag caccaactga aaaaa 1415

```

<210> 8

<211> 105

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 8

```

Met Arg Gly Ala Thr Arg Val Ser Ile Met Leu Leu Leu Val Thr Val
1          5          10          15

```

```

Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys
20          25          30

```

```

Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg
35          40          45

```

```

Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser
50          55          60

```

```

His Lys Val Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys
65          70          75          80

```

```

Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys
85          90          95

```

```

Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe

```

[0006]

100

105

<210> 9

<211> 757

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码天然小鼠 EG-VEGF 的 cDNA

<400> 9

```

gaagtgaggg gtaccaaagt agactgtgtt tgctgtcacc tcaagtgate atgagaggcg      60
ctgtgcatat cttcatcatg ctccctctag caacggcgtc cgactgtgcg gtcacacag      120
gggcctgtga acgagatata cagtgtgggg ccggcacctg ctgcgctata agtctgtggc      180
tgcggggcct gcggttgtgt accccactgg ggcgtgaagg agaggagtgc cacccaggaa      240
gccacaagat ccccttcttg aggaaacgcc aacaccatac ctgtccctgc tcaccagcc      300
tgctgtgctc caggttcccg gacggcaggt accgctgctt ccgggacttg aagaataact      360
tttagtttgt ctggactctg tctggagcct gactgggtga cctcttgctt tacacctgtg      420
tgatttagct ccttgcacct tcgccattcc ccatcttgtc cgtgtatgtg cagacaggea      480
gaccttcgcg tatggaatag ttcaccaggg tgcagagagg agttcgtggc cttgagaagt      540
tggccagccc gaccttcctg gctcagactg cctgaagttg tgacagtgtg ggccttctca      600
gttgctgcc ccttctgca tgtgcgcttc ttcctaaacc acacctttct gggcactggc      660
ccatggatgc accactaaat caacaggtct gtgggggtga tgatcaactt tctctccatt      720
tttcttttat tgactggctt cctaatttaa ggactgt      757

```

<210> 10

<211> 105

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 10

```

Met Arg Gly Ala Val His Ile Phe Ile Met Leu Leu Leu Ala Thr Ala
1           5           10           15

```

```

Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Ile Gln Cys
20           25           30

```

```

Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg
35           40           45

```

```

Leu Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser
50           55           60

```

```

His Lys Ile Pro Phe Leu Arg Lys Arg Gln His His Thr Cys Pro Cys
65           70           75           80

```

[0007]

Ser Pro Ser Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys
85 90 95

Phe Arg Asp Leu Lys Asn Ala Asn Phe
100 105

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 11

tgggctacac tgagcaccag

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 12

cagcgtcaaa ggtggaggag

20

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 探针

<400> 13

tggtctctctc tgacttcaac agcgacac

28

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

[0008]

<400> 14 ccatTTTTTg ggcggagg	18
<210> 15	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 15 cggtaaacag gccaaacct	19
<210> 16	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 探针	
<400> 16 tgcatacacac ttgccatgt ctgc	24
<210> 17	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 17 cggcagcca caaggtc	17
<210> 18	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 18 tgggcaagca aggacagg	18
<210> 19	

[0009]

<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	探针	
<400>	19	
	ccttcttcag gaaacgcaag caccac	26
<210>	20	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	20	
	ggcgcccttc tacggct	17
<210>	21	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	21	
	tctccttcac gaacacgggtg	20
<210>	22	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	探针	
<400>	22	
	caccatcgtg cgcgacttct tcc	23
<210>	23	
<211>	23	
<212>	DNA	

[0010]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 23 ggaaatgaca tctgtgttca tgc	23
<210> 24	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 24 tcattgtatg ttacgacttt gcagc	25
<210> 25	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 探针	
<400> 25 cccgtgccct caagaagccg a	21
<210> 26	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 26 atgttccagt atgactccac tcacg	25
<210> 27	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

[0011]

<223> PCR 引物	
<400> 27 gaagacacca gtagactcca cgaca	25
<210> 28	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 探针	
<400> 28 aagcccatca ccattcttcca ggagcgaga	29
<210> 29	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 29 cggaggatgc accacacc	18
<210> 30	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 30 ccggttgaaa gaagtcctta aaca	24
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 探针	
<400> 31 cccctgcctg ccagccttgg	20

[0012]

<210>	32	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	32	
	tgaggaaacg ccaacaccat	20
<210>	33	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	33	
	ccgggaacct ggagcac	17
<210>	34	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	探针	
<400>	34	
	cctgtccctg ctcaccacgc ctg	23
<210>	35	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	35	
	cagcgacat gaagacttg	19
<210>	36	
<211>	21	

[0013]

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	36	
	gtcatcttctg gtttctctgag t	21
<210>	37	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	探针	
<400>	37	
	tccaggcagc acccctgatg	20
<210>	38	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	38	
	gaactccacg tgagcgca	18
<210>	39	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	39	
	gggtcccatg ttgatgatgc t	21
<210>	40	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0014]

<220>

<223> 探针

<400> 40

ctccctgata cacaccagcc cacctg

26

1 tgagggcgcc **atg**aggagcc tgtgctgcg cccactcctg ctccctcttg ctctgcccgc
61 gctgctgctc acgccccgcg ctggggacgc cgccgtgac accggggctt gtgacaagga
121 ctcccaatgt ggtggaggca tgtgctgtgc tgtcagtatc tgggtcaaga gcataaggat
181 ttgcacacct atgggcaaac tgggagacag ctgccatcca ctgactcgta aaaaacaattt
241 tggaaaatgga aggcaggaaa gaagaaagag gaagagaagc aaaaggaaaa aggaggttcc
301 attttttggg cggaggatgc atcacacttg cccatgtctg ccaggcttgg cctgtttacg
361 gacttcattt aaccgattta tttgttttag ccaaaag**taa** tcgctctgga gtagaaacca
421 aatgtga

图 1

MRSLCCAPLLLLLLPPLLLTPRAGDAAVITGACDKDSQCGGMCACAVSIWKSIRICT
PMGKLGDSCHPLTRKNNFNGRQERRKRKRKRKRKEVFFGRRMHHTCPCLPGLACLRT
SFNRFICLAQK

图 2

1 tgagggcgcc **atg**aggagcc tgtgctgcg cccactcctg ctccctcttg ctctgcccgc
61 gagggcgcca tgaggagcct gtgctgcgcc cccactcctg ctctcttgct gctgcccgcg
121 ctgctgctca cggcccgcg tggggacgcc gccgtgatca ccggggcttg tgacaaggac
181 tcccaatgtg gtggaggcat gtgctgtgct gtcagtatct ggggtcaagag cataaggatt
241 tgcacaccta tgggcaaaact gggagacagc tgccatccac tgactcgtaa agttccattt
301 tttgggcgga ggatgcatca cacttgccca tgtctgccag gcttggcctg ttacggact
361 tcatttaacc gatttatttg tttagcccaa aag**taa**tcgc tctggagtag aaacccaatg
421 tga

图 3

MRSLCCAPLLLLLLPPLLLTPRAGDAAVITGACDKDSQCGGMCACAVSIWKSIRICT
PMGKLGDSCHPLTRKVFFGRRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLAQK

图 4

1 cggaaggctg ggcgtccctt aaccgccacc gcgtccccgg gacgccaagg gggacccgcg
61 ctgtgccccg ctactgctac ttctgctget accgctgctg ttcacaccgc cgcgcgggga
121 tgccggggtc atcacccggg cttagcaciaa ggactctcag tgcggaggag gcatgtgctg
181 tgctgtcagt atctggggtta agagcataag gatctgcaca cctatgggcc aagtgggcga
241 cagctgccac ccctgactc ggaaagtcc atttggggg cggaggatgc accacacctg
301 cccctgcctg ccaggcttgg cgtgtttaag gacttctttc aaccggttta ttgcttggc
361 ccgaaaatga tcaactctgaa tagggaactt gaaatgcgac cctccgctgc acaatgtccg
421 tcgagttca cttgtaattg tggcaacaa agaatactcc agaaagaaat gttctcccc
481 ttcccttgact ttccaagtaa cgtttctatc tttagattttt gaagtggctt tttttttttt
541 ttttttttcc ttcccttgaa ggaaagtttt gatttttggg gagatttata gaggactttc
601 tgacatggct tctcatttcc ctgttttatgt ttgaccttga catttttgaa tgccaataac
661 aactgttttc acaaatagga gaataagagg gaacaatctg ttgcagaaac ttccttttgc
721 cctttgcccc actcgccccg ccccgccccg ccccgccccg cccatgcgca gacagacaca
781 cccttactct tcaaagactc tgatgatcct caccttactg tagcattgtg ggtttctaca
841 ctcccccgc ttgctggtgg accactgag gaggtcaga gagctagcac tgtacaggtt
901 tgaaccagat ccccaagca gctcatttgg ggcagacgtt gggagcgctc caggaaacttt
961 cctgcaccca tctggcccac tggctttcag ttctgctgtt taactgggtg gaggacaaaa
1021 ttaacgggac cctgaaggaa cctggccccg ttatcttagat ttgtttaagt aaaagacattt
1081 ttctcccttg ttgtggaatat tacatgtctt ttcttttttt atctgaagct tttttttttt
1141 ttctttaagt cttcttgttg gagacatttt aaagaacgcc actcgaggaa gcattgattt
1201 tcatytgga tgacaggagt catcatttta aaaaatcggg gttaaagtta aatttaact
1261 ttatttgtaa ccaaaaggy taatgtaaat ggatttcctg atatcctgcc atttgtactg
1321 gtatcaatat ttytatgt

图 5

MGDPRCAPLLLLLLPLFTPPAGDAAVITGACDKDSQCGGMCCAVSIWKSIRICTP
MGQVGDSCHPLTRKVPFWGRRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLARK

图 6

	10	20	30	40	50
人 BV8	MRSLCCAPLLLLLLLLPPLLLTPRAGDAAVITGACDKDSQCGGGMCCAVSI				
小鼠 BV8	<u>MGDPRCAPLLLLLLLLPPLLLFTPRAGDAAVITGACDKDSQCGGGMCCAVSI</u>				
	60	70	80	90	100
人 BV8	WVKSIRICTPMGKLGDSCHPLTRKNNFNGRQERRRKRKRKKEVPFF-G				
小鼠 BV8	WVKSIRICTPMGQVGDSCHPLTRKSHVANGRQERRRAKRRKRKKEVVPFWG				
	110	120	129		
人 BV8	RRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLAQK				
小鼠 BV8	RRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLARK				

图 7

```

1      tggcctcccc agcttgccag gcacaaggct gagcggggagg aagcgagagg catctaagca ggcagtgtttt
71     tgccctcacc ccaagtgacc atgagaggtg ccacgcgagt ctcaatcatg ctccctcctag taactgtgtc
141    tgactgtgct gtgatcacag gggcctgtga ggggatgtc cagtgtggg caggcacctg ctgtgccatc
211    agcctgtggc ttcgagggct gcgagtgtgc accccgctgg ggcgggaagg cgaggagtgc caccgccgca
281    gccacaaggc ccccttcttc aggaacgca agcaccacac ctgtccttgc ttgcccacc tgctgtgtctc
351    caggttcccg gacggcaggt accgctgtc catggacttg aagaacatca atttttaggc gcttgcctgg
421    tctcaggata ccaccatcc ttttctctgag cacagcctgg atttttattt ctgccatgaa acccagctcc
491    catgactctc ccagtcctca cactgactac cctgactctc ctgtcttagt acgcacatat gcacacaggc
561    agacatacct cccatcatga catggtcccc aggtggcct gaggatgtca cagcttgagg ctgtgggtgtg
631    aaaggtggcc agcctggttc tcttccctgc tcaggctgcc agagaggtgg taaatggcag aaaggacatt
701    cccctcccc tcccagggtg acctgctctc tttcctgggc cctgccccctc tcccacatg tatccctcgg
771    tctgaattag acattcctgg gcacaggctc ttgggtgcat tgctcagagt ccagggtcct ggcctgaccc
841    tcaggccctt cactgaggt ctgtgaggac caatttgtgg gtagttcatc ttccctcgat tggttaactc
911    cttagtttca gaccacagac tcaagattgg ctcttcccag agggcagcag acagtcaccc caaggcaggt
981    gtaggagacc cagggaggcc aatcagcccc ctgaagactc tgggtcccagt caggctgtgg ctltgtggcct
1051   gtgacctgtg accttctgcc agaattgtca tgcctctgag gccccctctt accacacttt accagttaac
1121   cactgaagcc cccaattccc acagcttttc cattaaaaatg caaatgggtgg tggttcaatc taatctgata
1191   ttgacatat attagaaggcaat taggtgtttt ccttaaacaa ctccctttcca aggatcagcc ctgagagcag
1261   gttggtgact ttgaggaggg cagtccctctg tccagattgg ggtgggagca agggacaggg agcaggggcag
1331   gggctgaaa gggcactgat tcagaccagg gaggcaacta cacaccaaca tgctggcctt agaataaaa
1401   caccaactga aaaa

```

图 8

Met Arg Gly Ala Thr Arg Val Ser Ile Met Leu Leu Val Thr Val Ser
 20 Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala
 40 Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Met Cys Thr
 60 Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser His Lys Val Pro
 70 Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Asn Leu Leu
 90 Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Met Asp Leu Lys Asn
 105 Ile Asn Phe

图 9

```

1   GAA GTG AGG GGT ACC AAA GTA GAC TGT GTT TGT CGT CAC CTC AAG TGA TC

51  ATG AGA GGC GCT GTG CAT ATC TTC ATC ATG CTC CTT CTA GCA ACG GCG TCC
    M R G A V H I F I M L L A T A S

102 GAC TGT GCG GTC ATC ACA GGG GCC TGT GAA CGA GAT ATC CAG TGT GGG GCC
    D C A V I T G A C E R D I Q C G A

153 GGC ACC TGC TGC GCT ATC AGT CTG TGG CTG CGG GGC CTG CGG TTG TGT ACC
    G T C C A I S L W L R G L R L C T

204 CCA CTG GGG CGT GAA GGA GAG TGC CAC CCA GGA AGC CAC AAG ATC CCC
    P L G R E G E C H P G S H K I P

255 TTC TTG AGG AAA CGC CAA CAC CAT ACC TGT CCC TGC TCA CCC AGC CTG CTG
    F L R K R Q H H T C P C S P S L L

306 TGC TCC AGG TTC CCG GAC GGC AGG TAC CGC TGC TTC CGG GAC TTG AAG AAT
    C S R F P D G R Y R C F R D L K N

357 GCC AAC TTT TAGTTGTCTGGACTCTGTCTGGAGCCTGACTGGGTGACCTCTTGCTTTACACCT
    A N F *

GTGTGATTTAGCTCCCTGCAACTTCGCCATTCCCATCTTGTCCGTGTATGTGCAGACAGCAGACC
TTCCGCTATGGAATAGTTCAACAGGGTGACAGAGAGTTCGTGGCCCTTGAGAAAGTTGGCCAGCCCG
ACCTTCCTGGCTCAGACTGCCCTGAAGTTGTGACAGTGTGGCCCTTCTCAGTTGCCCTTCCCTCTG
CATGTGCGCTTCTTCTTAACCAACACCTTCTGGGCACTGGCCCATGGATGCACCAATAAACAACA
GGTCTGTGGGTGGATGATCAACTTCTCTCCATTTTCTTTATTGACTGGCTTCCTAATTTAAGG
ACTGT

```

图 10

人	EG-VEGF	MRGATRVSIM	LLLVTVSDCA	VITGACERDV	QCGAGTCCAI	SLWLRGLRMC	50
鼠	EG-VEGF	MRGAVHIIFIM	LLLATASDCA	VITGACERDI	QCGAGTCCAI	SLWLRGLRLC	
人	EG-VEGF	TPLGREGEEC	HPGSHKVPFF	RKRKHHTCPC	LPNLLCSRFP	DGRYRCSMDL	KNINF
鼠	EG-VEGF	TPLGREGEEC	HPGSHKIPFL	RKRQHHTCPC	SPSLLCSRFP	DGRYRCFRDL	KNANF

图 11

	28		
人 BV8	AVITGACDKDSQCGGGMCCAVSIWVKSIRICTPMGKLGDSCHPLTRKVPF		
	20		
人 EG-VEGF	AVITGACERDVQCGAGTCCAISLWLRGLRMCTPLGREGEETCHPGSHKVPF		
	78	108	
人 Bv8	FGRRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLAQK		
	70	105	
人 EG-VEGF	FRKRKHHTCPCLPNLLCSRFPDGRYRCMDLKNINF		

图 12

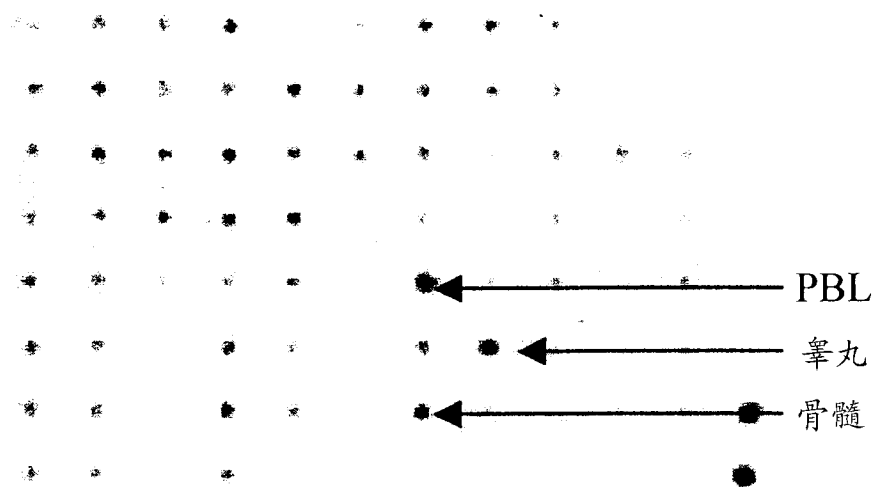


图 13

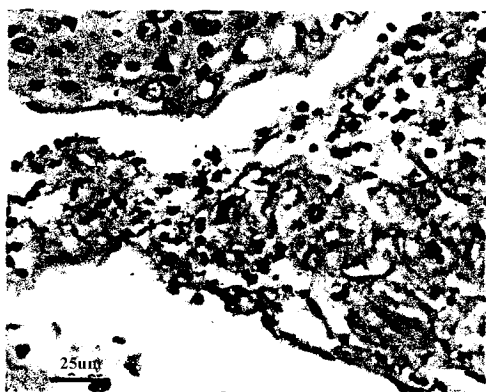


图 14A

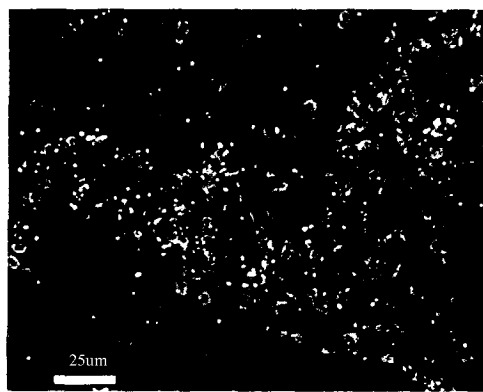


图 14B

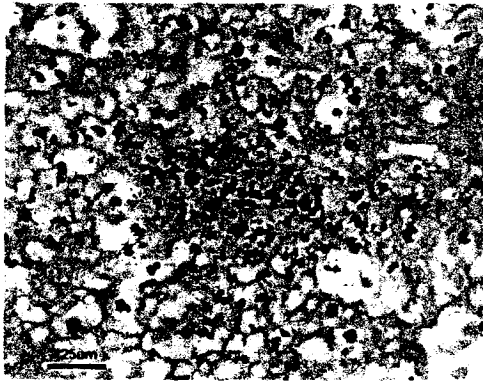


图 14C

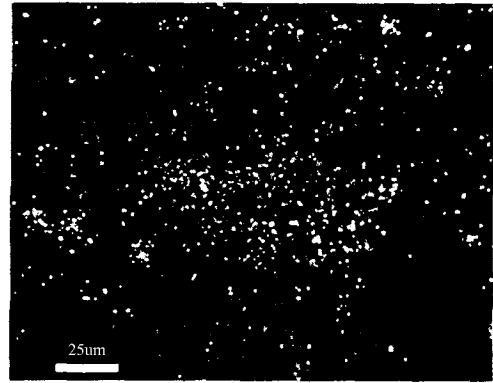


图 14D

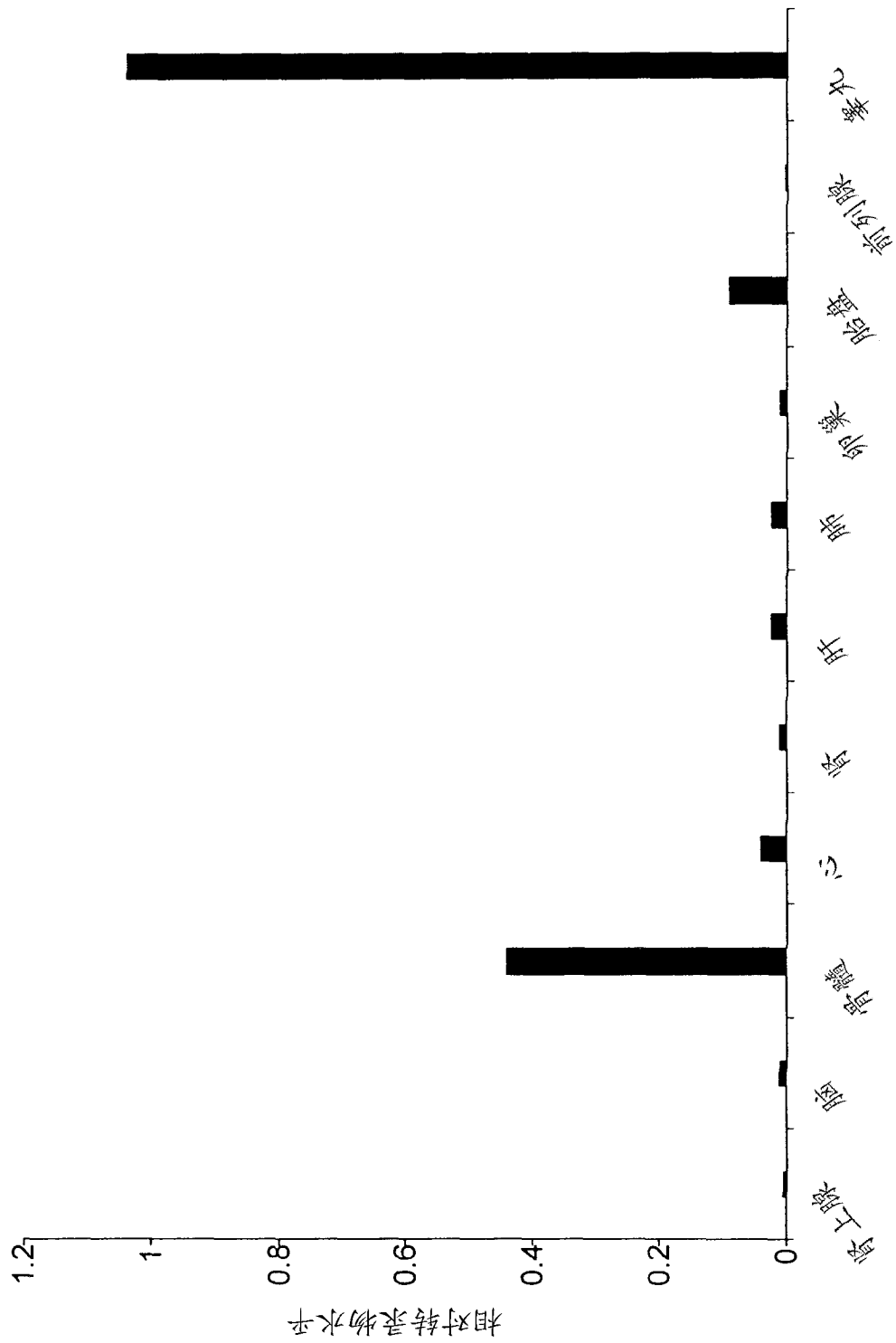


图 15A

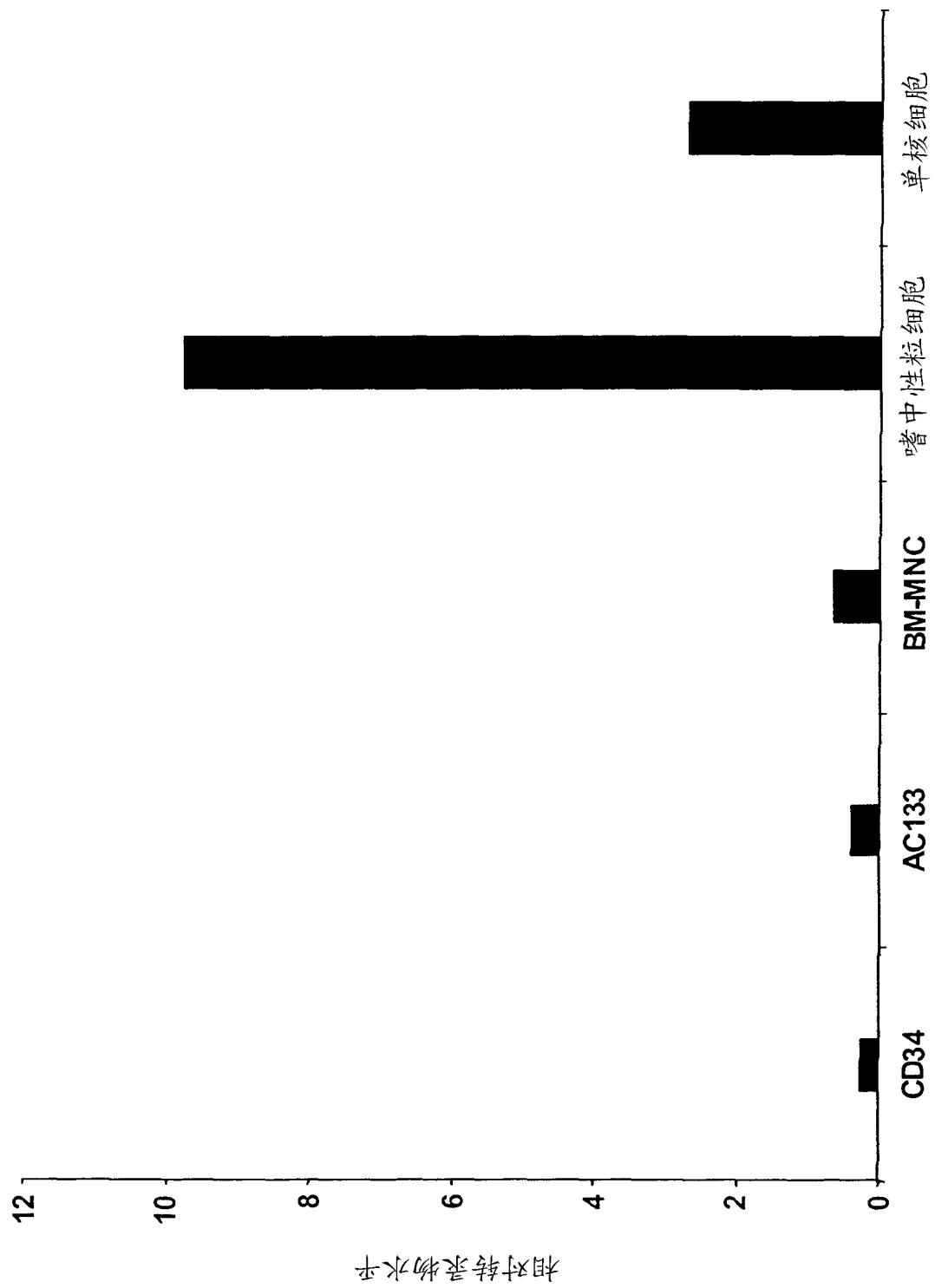


图 15B

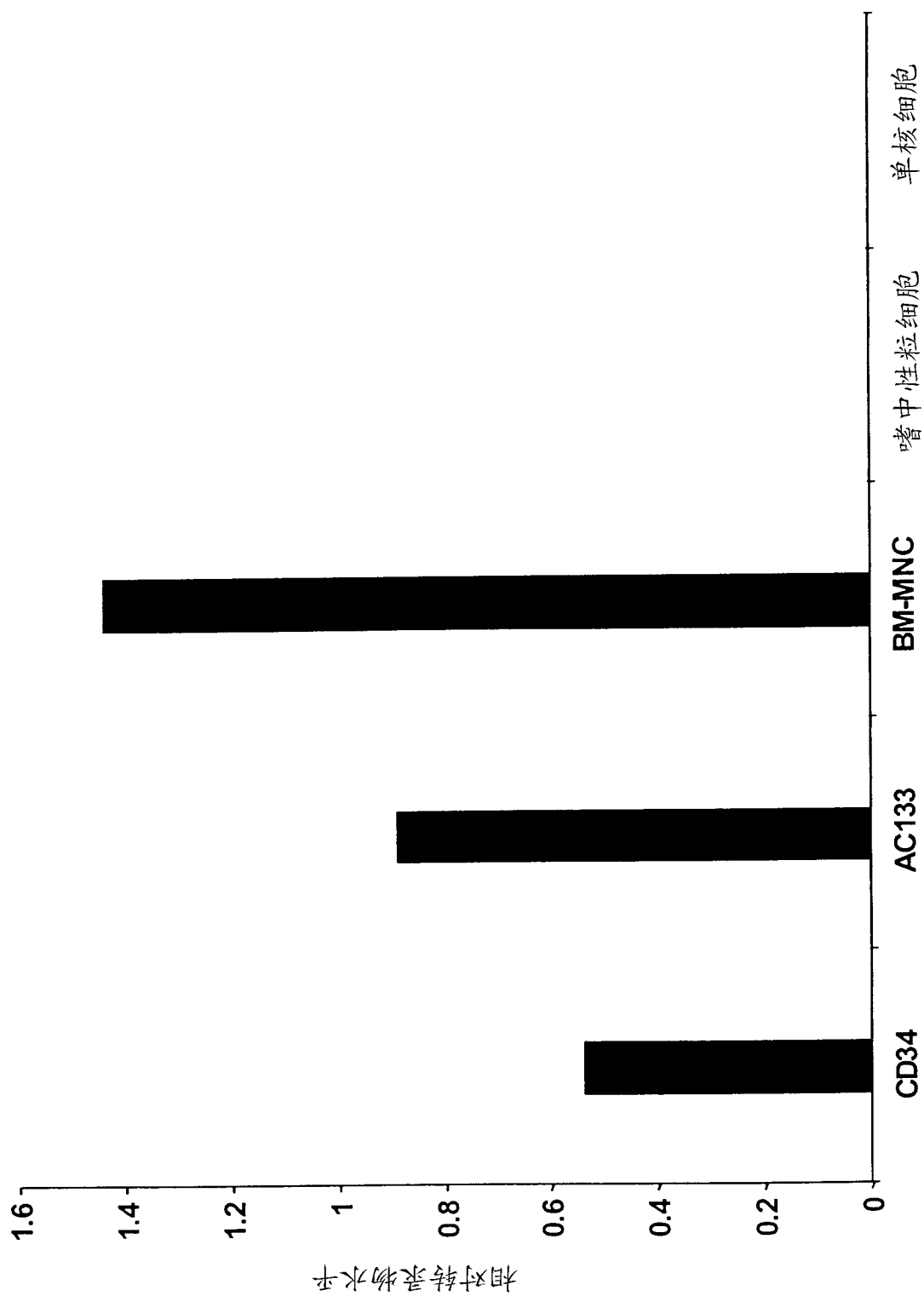


图 15C

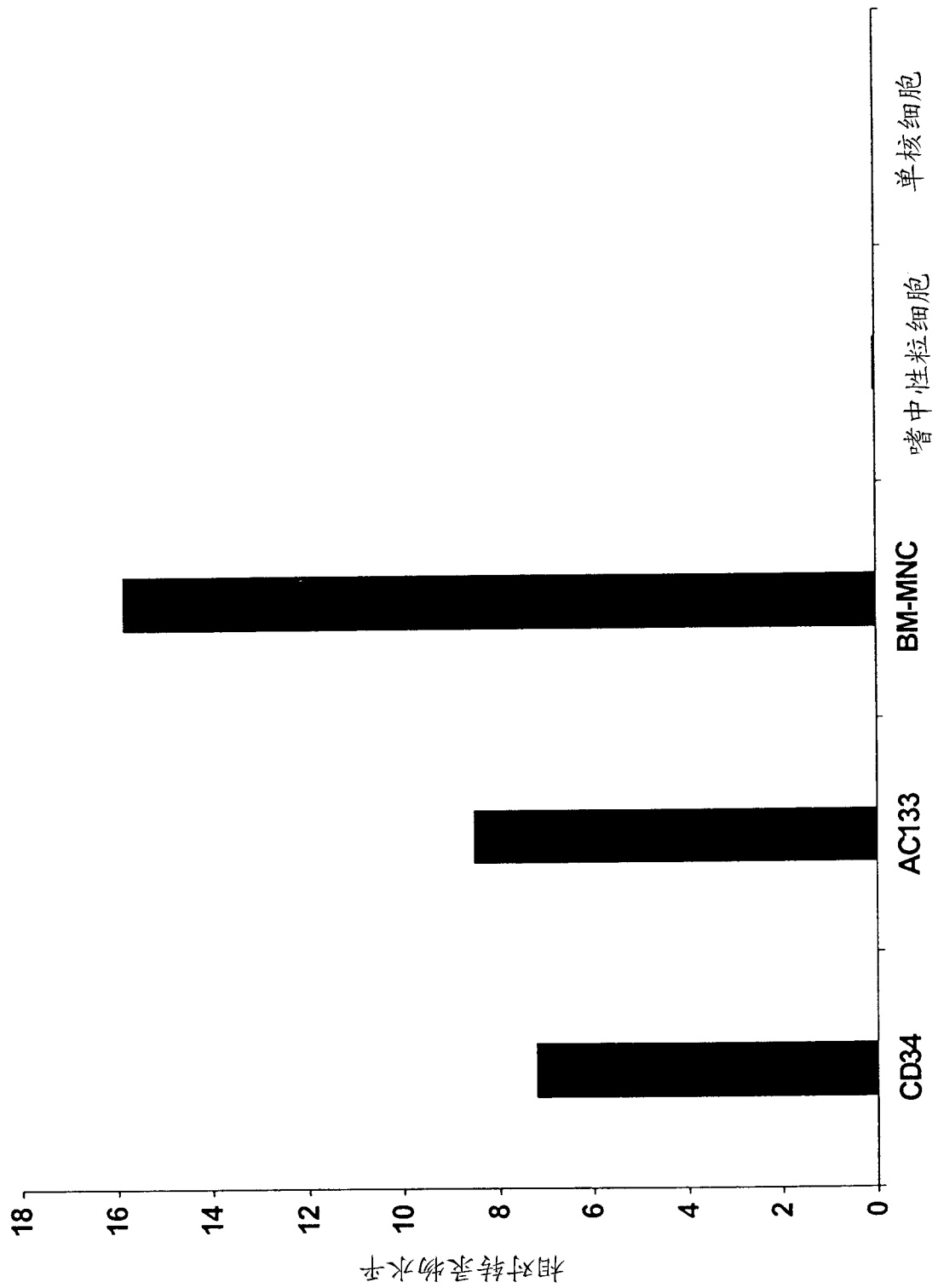


图 15D

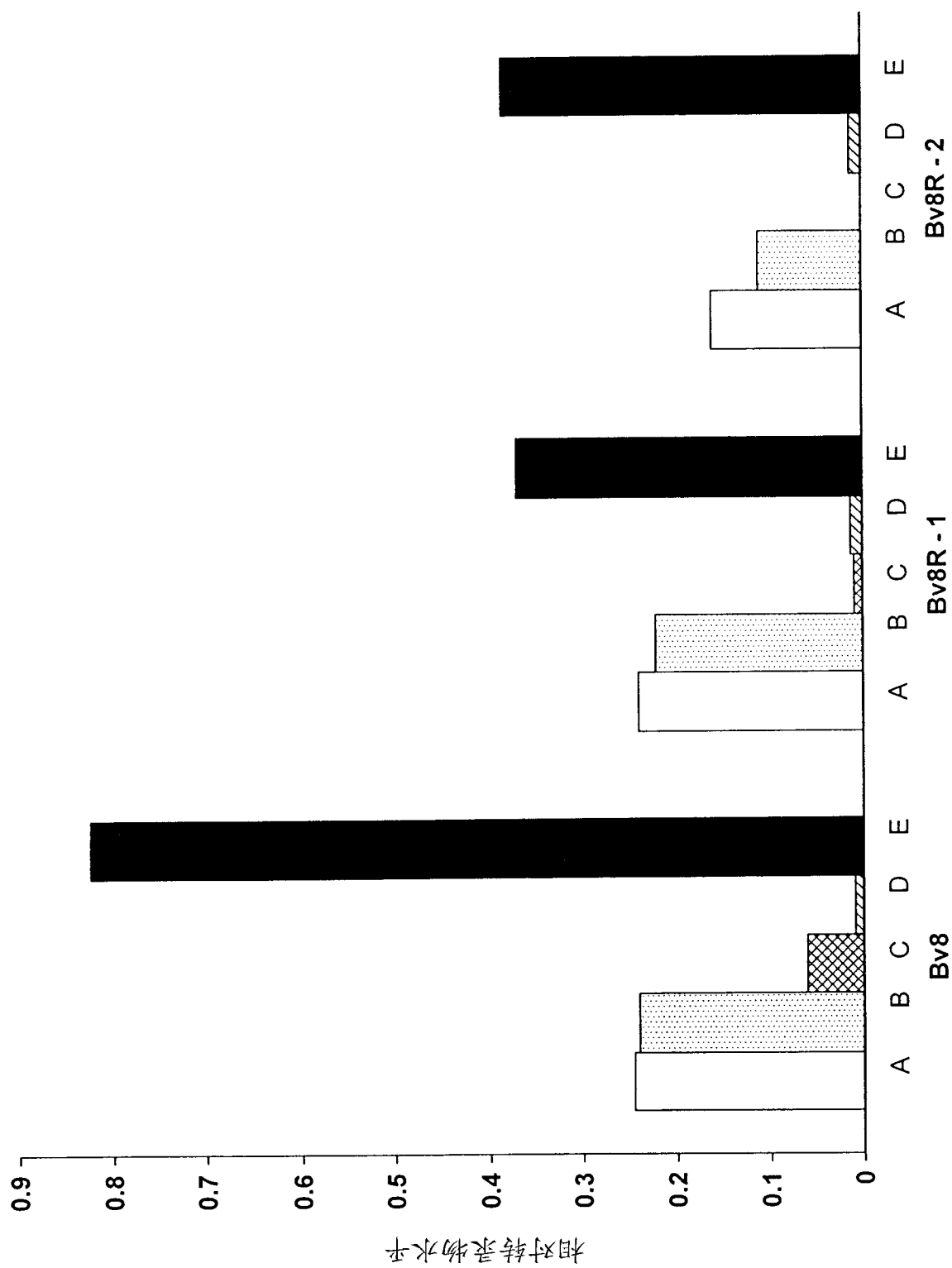


图 16

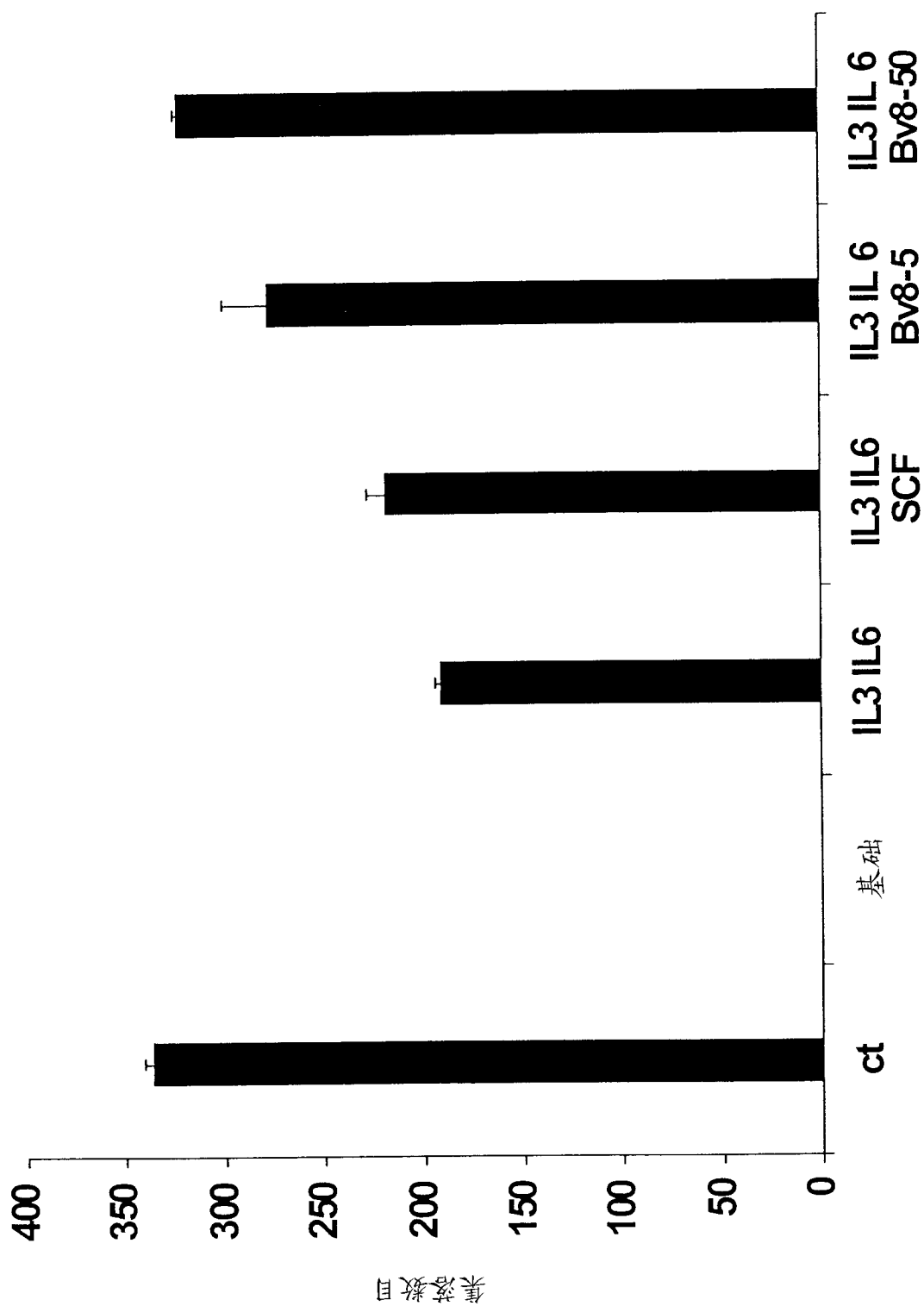


图 17A

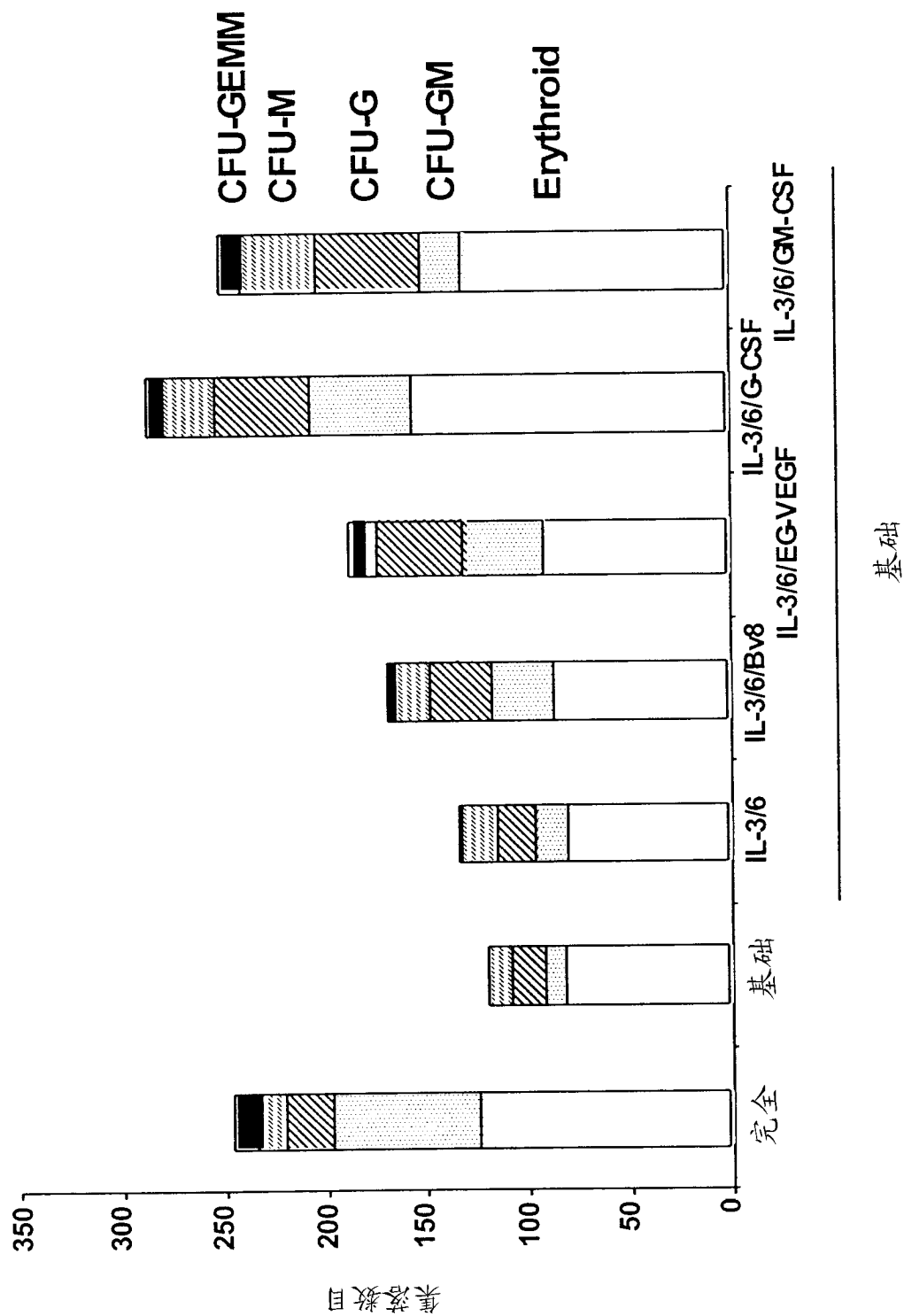


图 17B

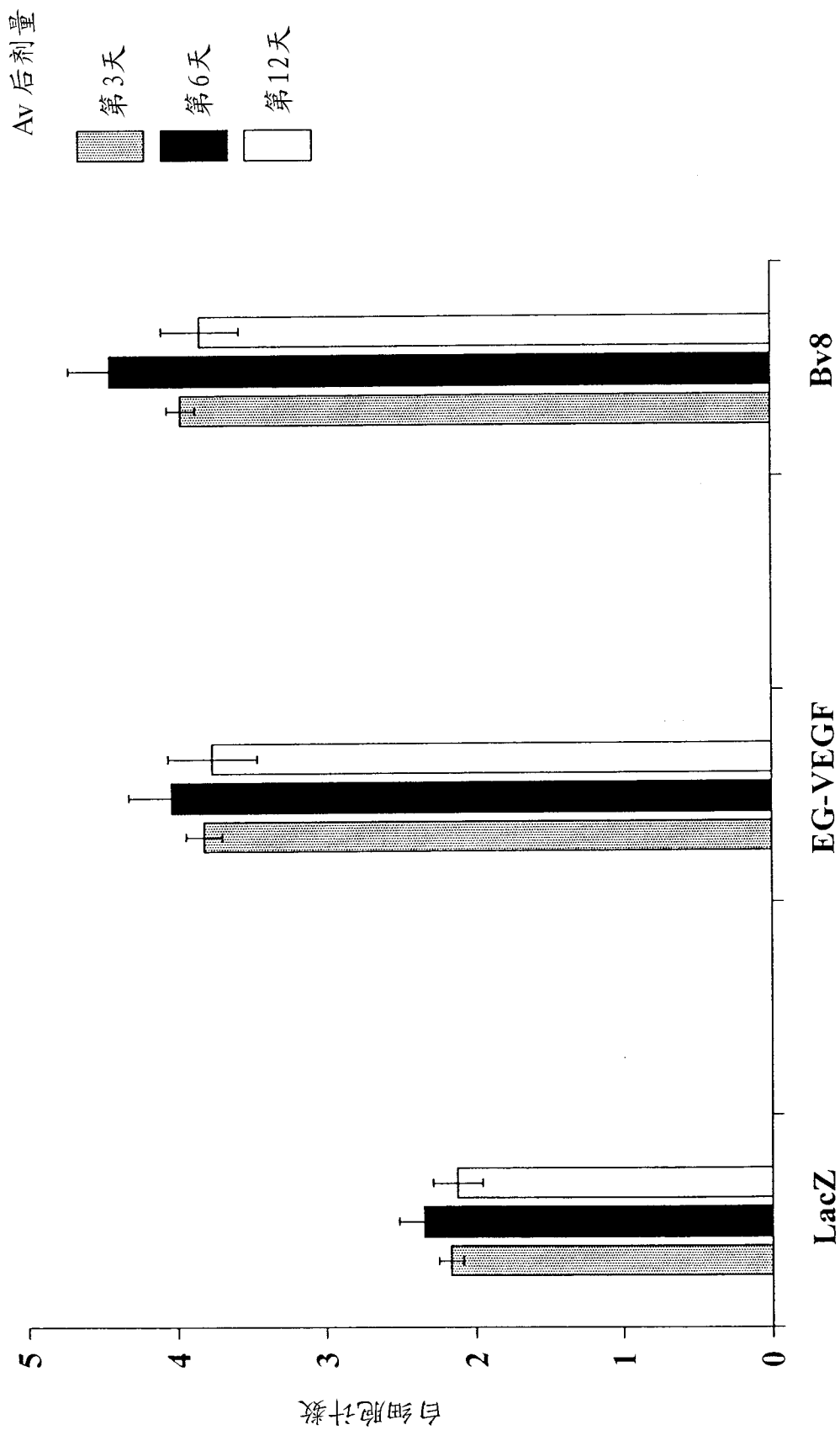


图 18

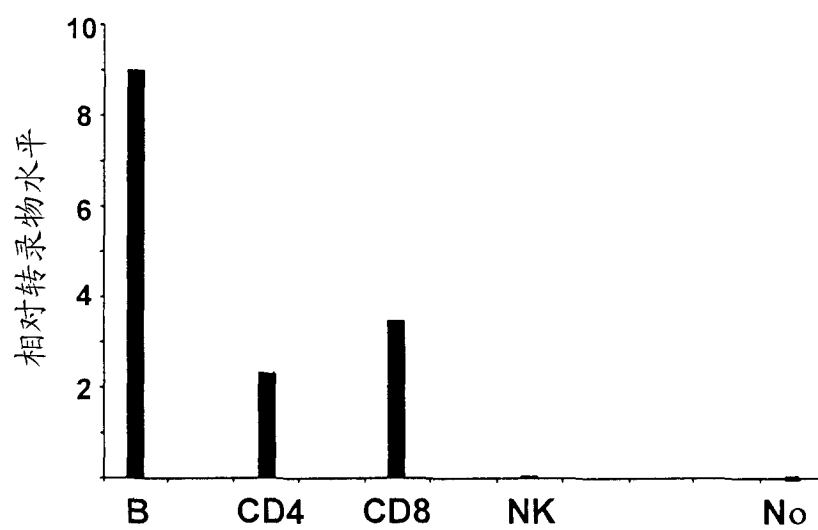


图 19A

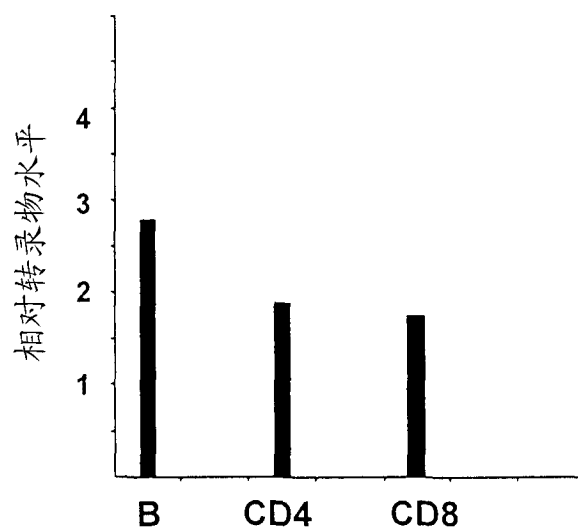


图 19B

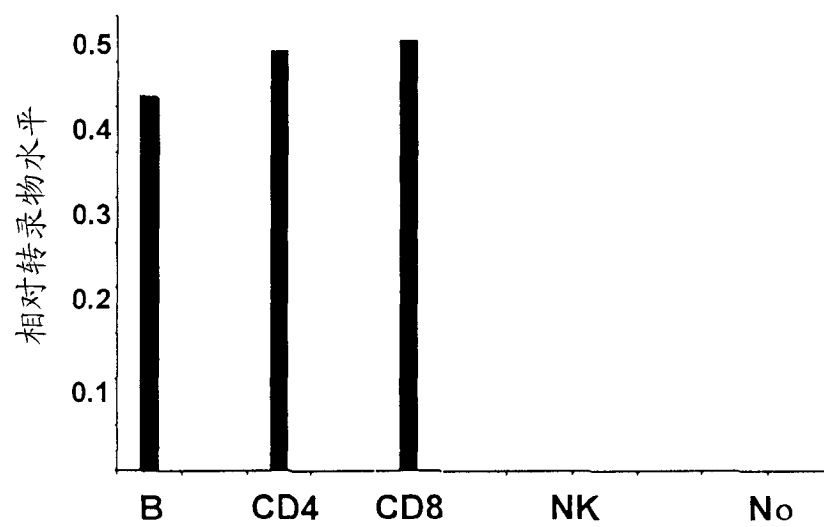


图 19C

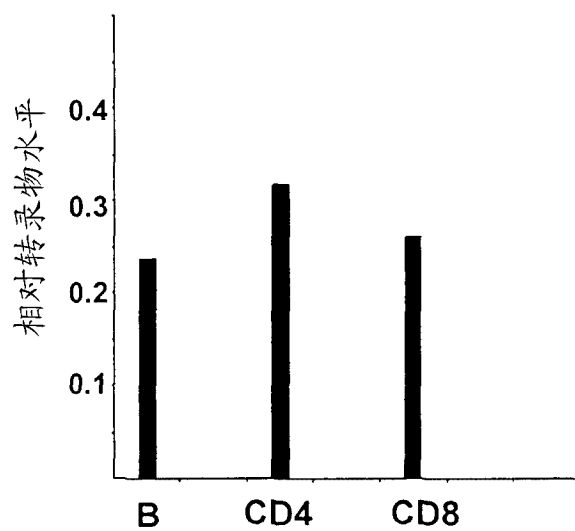


图 19D

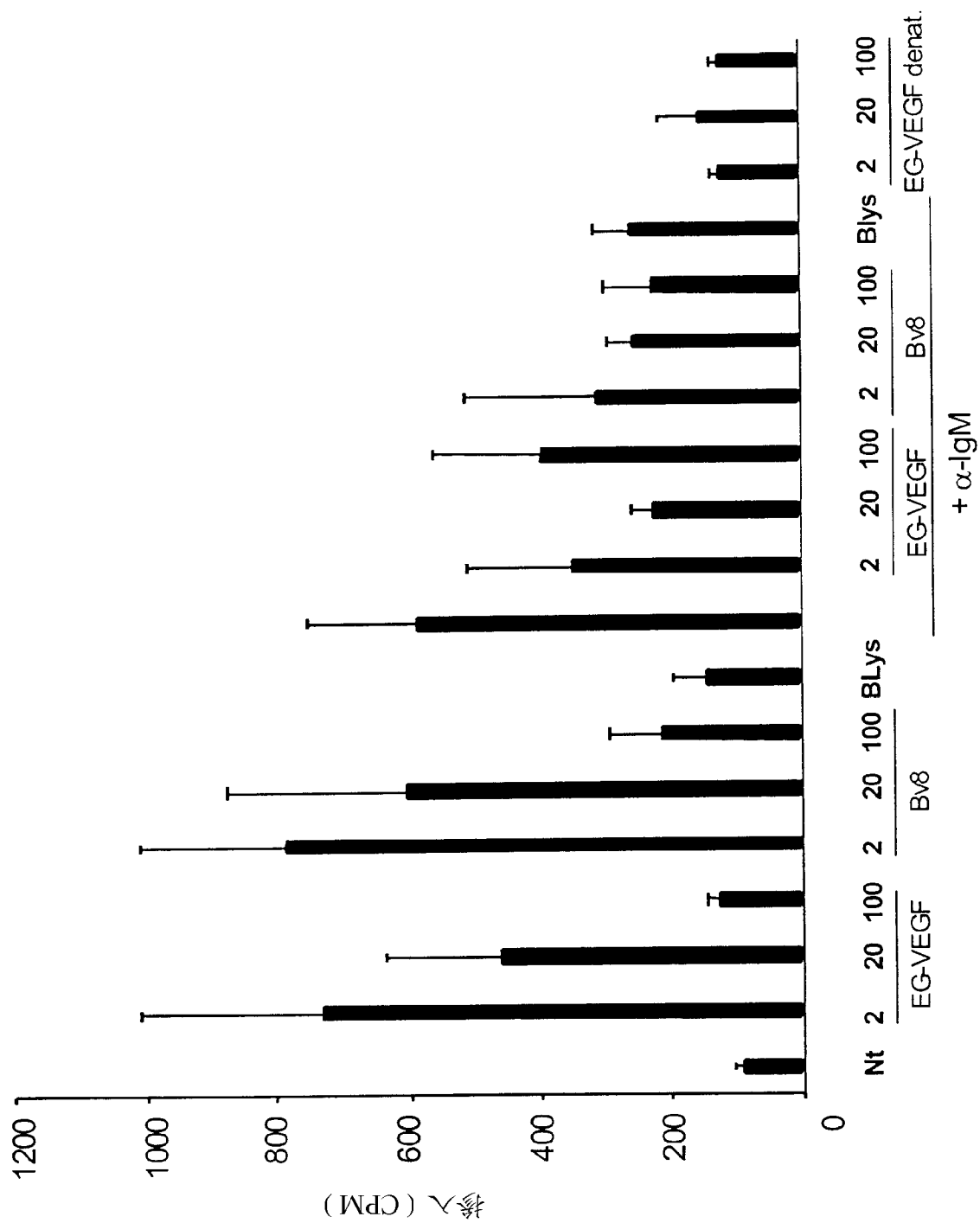


图 20

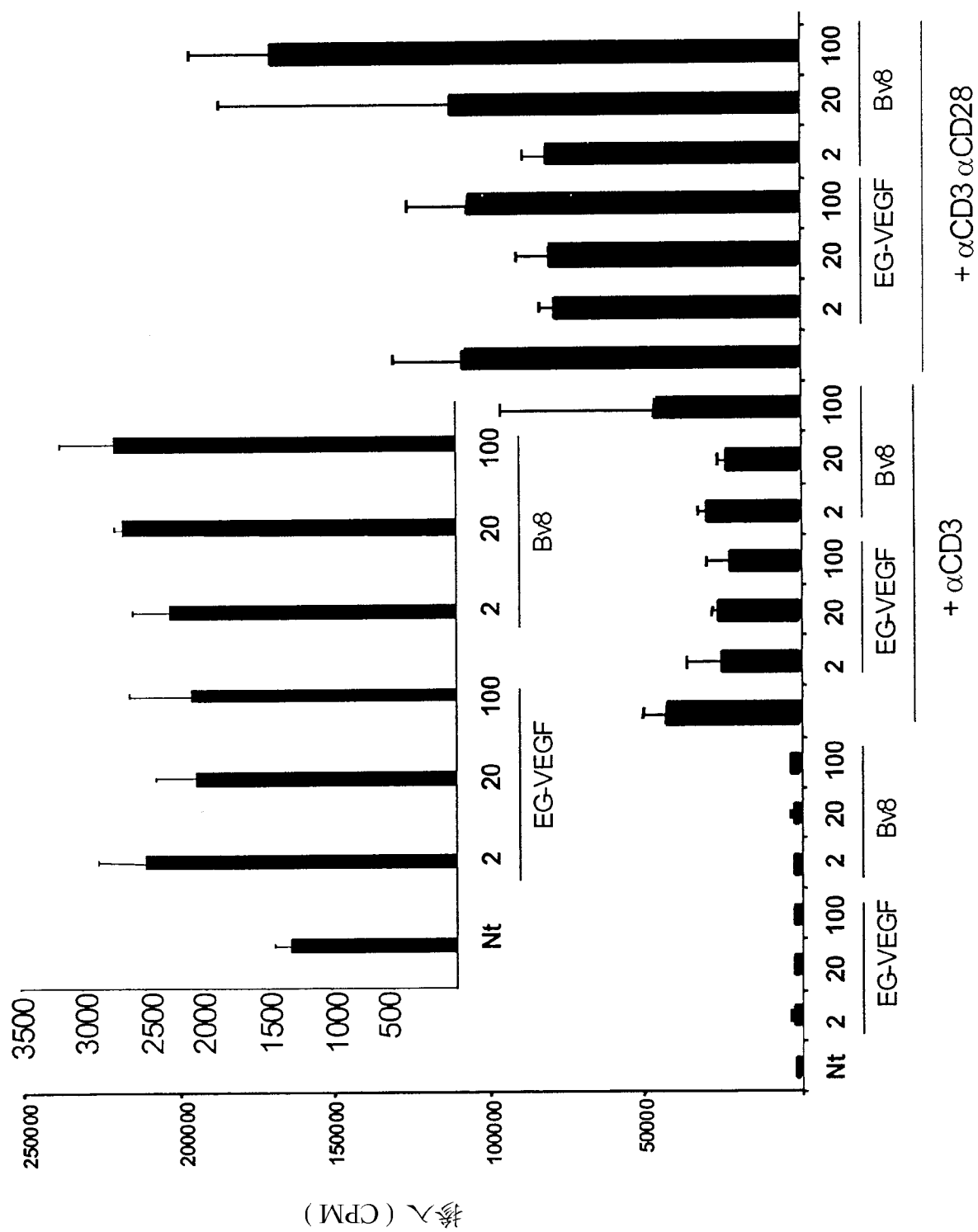


图 21

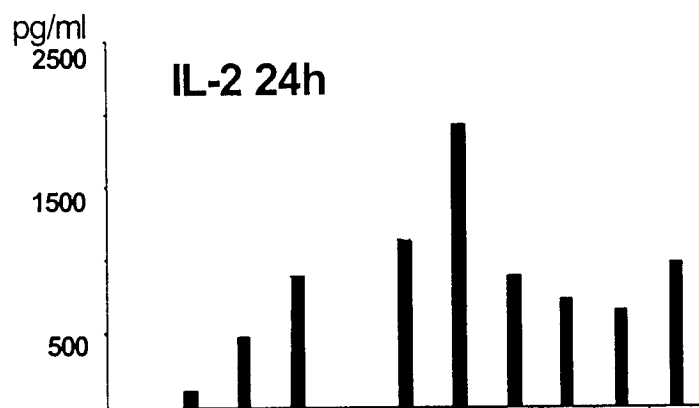


图 22A

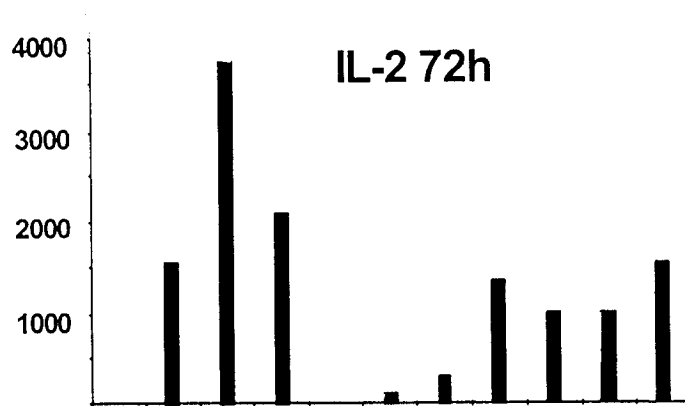


图 22B

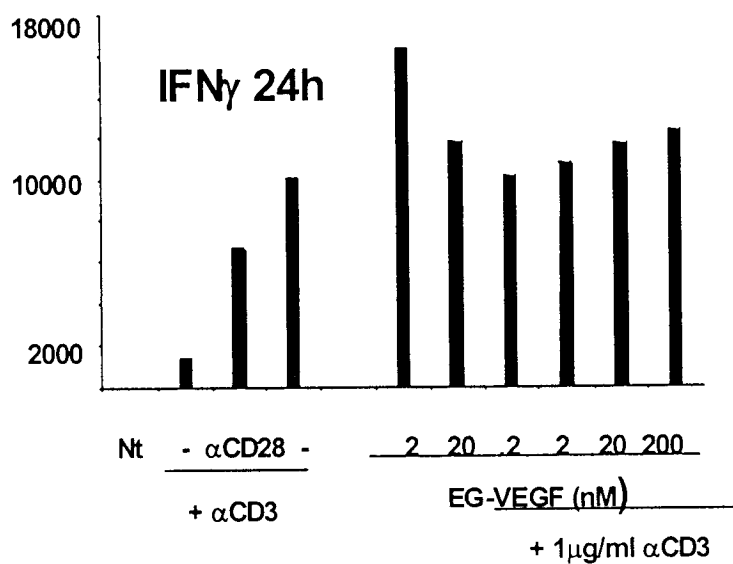


图 22C

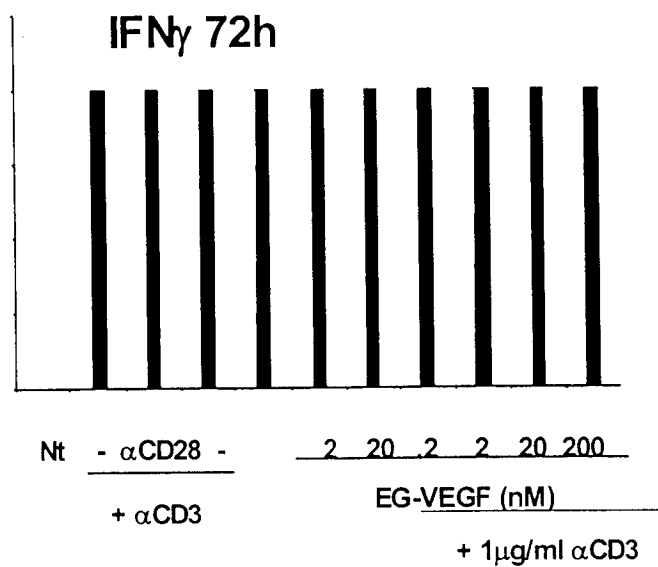


图 22D

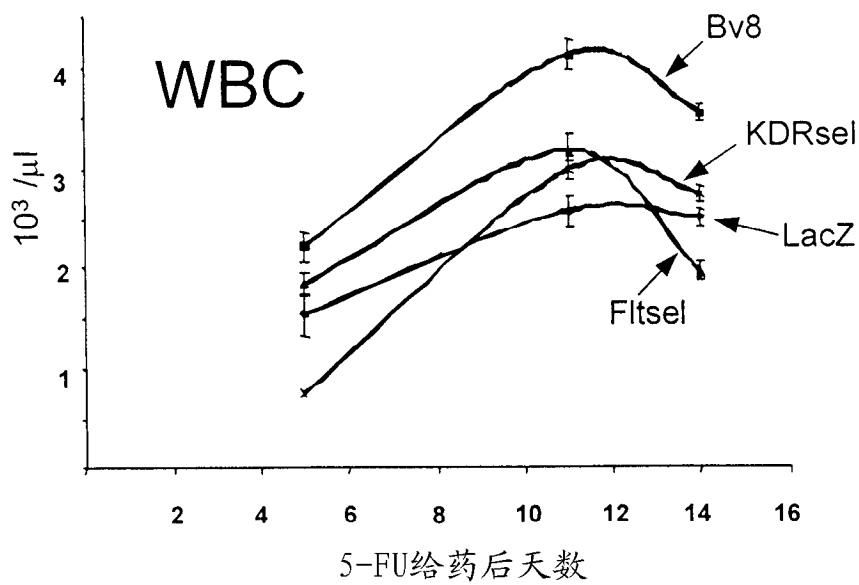


图 23A

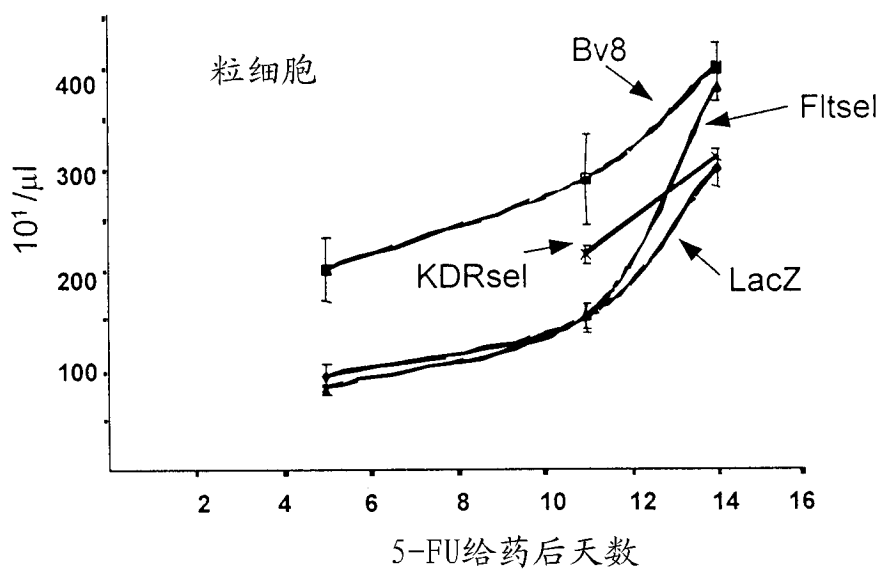


图 23B

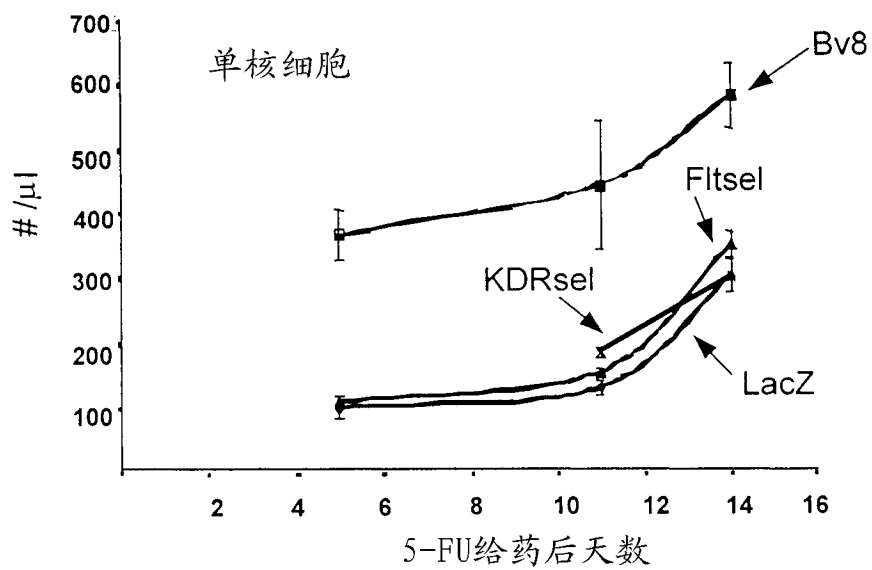


图 23C

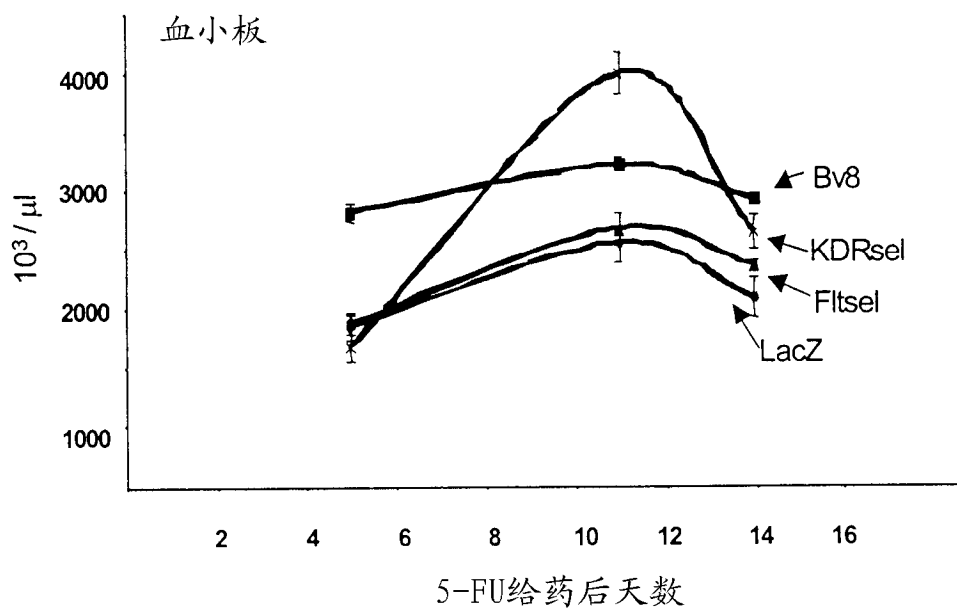


图 23D

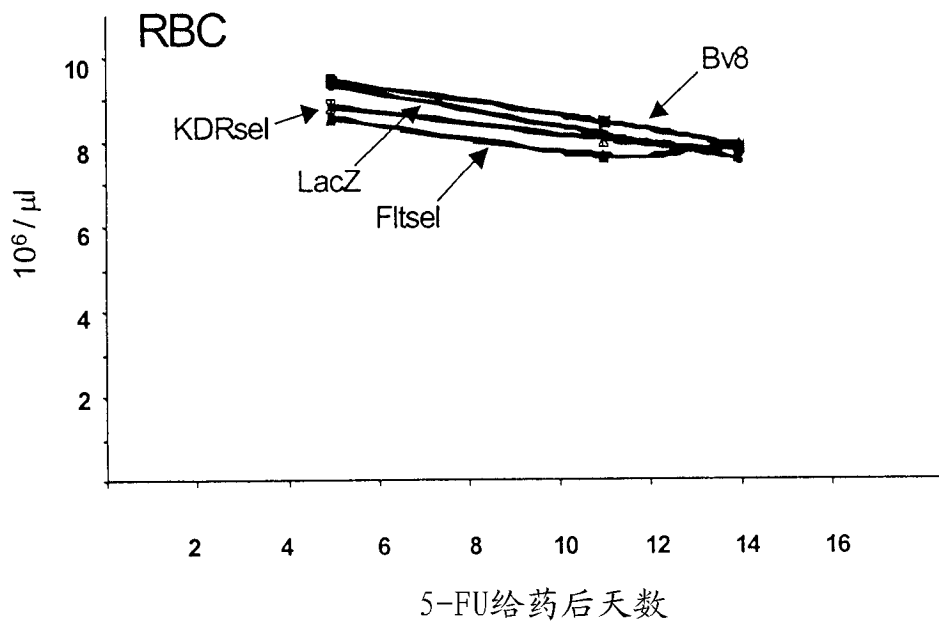


图 23E

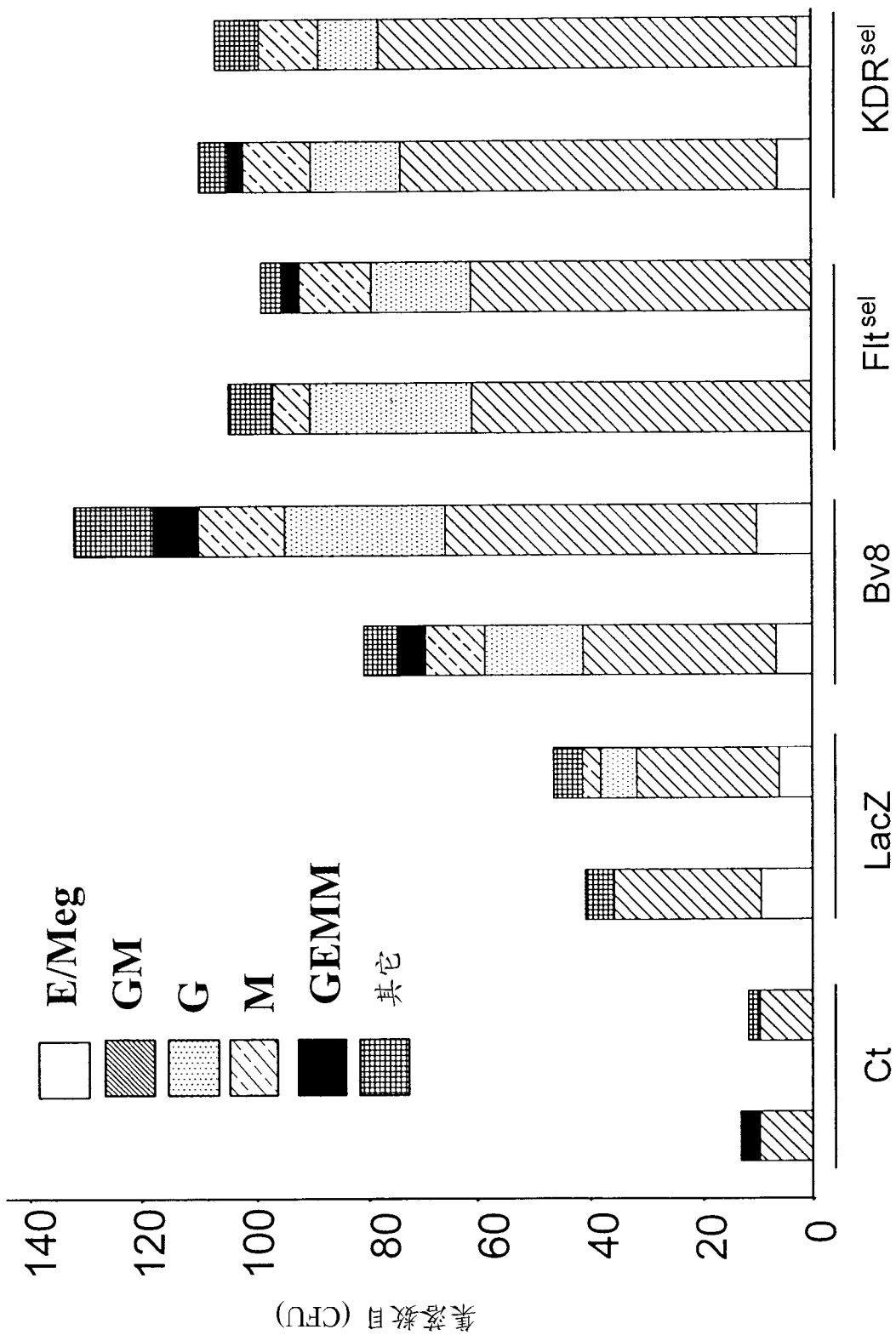


图 24