

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-513328  
(P2004-513328A)

(43) 公表日 平成16年4月30日(2004.4.30)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

**G01N 33/50**  
**A01K 67/027**  
**A61K 35/76**  
**A61K 38/00**  
**A61K 45/00**

F 1

G01N 33/50  
A01K 67/027  
A61K 35/76  
A61K 45/00  
A61K 48/00

テーマコード(参考)

2 G045  
4 C084  
4 C087

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 85 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-602624 (P2000-602624)  
 (86) (22) 出願日 平成12年3月3日 (2000.3.3)  
 (85) 翻訳文提出日 平成13年9月3日 (2001.9.3)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2000/005465  
 (87) 國際公開番号 WO2000/052462  
 (87) 國際公開日 平成12年9月8日 (2000.9.8)  
 (31) 優先権主張番号 60/160,083  
 (32) 優先日 平成11年3月3日 (1999.3.3)  
 (33) 優先権主張國 米国(US)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, CN, JP, KR, NZ

(71) 出願人 500025570  
ルードヴィッヒ インスティテュート フ  
ォー キャンサー リサーチ  
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1015  
8、ニューヨーク、サード アベニュー  
605  
(74) 代理人 100107308  
弁理士 北村 修一郎  
(72) 発明者 アーセ, カリン  
スウェーデン エス-171 77 スト  
ックホルム ボックス 240 ルードヴ  
ィッヒ・インスティテュート・フォア・キ  
ャンサー・リサーチ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】血管内皮増殖因子(VEGF-B)欠損動物の心臓異常及びこれら心臓異常に関する方法

## (57) 【要約】

VEGF-B欠損動物は、房室(AV)伝導欠陥及び心筋層の虚血によって引き起こされるものと考えられる心臓異常を示す。VEGF-B欠損非ヒト動物を使用して房室伝導又は虚血調節活性に関して化合物をスクリーニングし、房室伝導欠陥又は虚血を治療又は軽減し、心臓疾患を診断するための方法が提供される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

房室伝導調節活性に関して化合物をスクリーニングする方法であって、前記方法は、前記化合物を VEGF - B 欠損非ヒト動物に導入する工程と、前記動物の房室伝導に対するその作用をアッセイする工程とを有する、房室伝導調節活性に関して化合物をスクリーニングする方法。

**【請求項 2】**

虚血調節活性に関して化合物をスクリーニングする方法であって、前記方法は、前記化合物を VEGF - B 欠損非ヒト動物に導入する工程と、前記動物の虚血に対するその作用をアッセイする工程とを有する、虚血調節活性に関して化合物をスクリーニングする方法。 10

**【請求項 3】**

哺乳動物における房室伝導欠陥の治療又は軽減の方法であって、有効房室伝導欠陥軽減量の、 VEGF - B 又は、 VEGF - B の生物活性を有するそのフラグメント又はアナログを投与する工程を有する、哺乳動物における房室伝導欠陥の治療又は軽減の方法。

**【請求項 4】**

哺乳動物における虚血の治療又は軽減の方法であって、有効虚血軽減量の、 VEGF - B 又は、 VEGF - B の生物活性を有するそのフラグメント又はアナログを投与する工程を有する、哺乳動物における虚血の治療又は軽減の方法。

**【請求項 5】**

房室伝導欠陥又は虚血の治療又は軽減の方法であって、有効量の、 VEGF - B 又は、 VEGF - B の生物活性を有するそのフラグメント又はアナログをコードする核酸配列を投与する工程を有し、前記核酸は、房室伝導欠陥又は虚血を治療又は軽減するべく、有効量の、 VEGF - B 又はそのフラグメント又はアナログをコードすることができる、房室伝導欠陥又は虚血の治療又は軽減の方法。 20

**【請求項 6】**

前記核酸配列はプロモーター配列に作動可能にリンクされている、請求項 5 の方法。

**【請求項 7】**

前記核酸配列はベクターにクローニングされ、プロモーター配列に作動可能にリンクされている、請求項 5 の方法。

**【請求項 8】**

前記ベクターは発現ベクターである、請求項 7 の方法。 30

**【請求項 9】**

前記発現ベクターは、アデノウイルス、ワクシニア又はレトロウイルスベースのベクターから成るグループから選択される、請求項 8 の方法。

**【請求項 10】**

被験体における VEGF - B 発現の喪失によって特徴付けられる心臓疾患を診断する方法であって、

前記被験体からの第 1 DNA 試料を準備する工程と、

VEGF - B DNA を含む第 2 DNA 試料を準備する工程と、

前記第 1 DNA 試料を、ポリメラーゼに作動可能に結合された VEGF - B DNA に対して特異的なプライマー対に接触させる工程と、 40

前記第 2 DNA 試料を、ポリメラーゼに作動可能に結合された VEGF - B DNA に対して特異的なプライマー対に接触させる工程と、

前記第 1 及び第 2 DNA 試料とポリメラーゼ連鎖反応を行う工程と、そして

前記第 1 DNA 試料中の VEGF - B DNA の增幅の欠如を検出するべく、前記第 1 及び第 2 DNA 試料のポリメラーゼ連鎖反応を比較する工程を有する、心臓疾患を診断する方法。

**【請求項 11】**

被験体における VEGF - B 発現の喪失によって特徴付けられる心臓疾患を診断する方法であって、

10

20

30

40

50

前記被験体からの生体試料を準備する工程と、  
前記試料を VEGF - B に対する特異的結合試薬と接触させる工程と、そして  
前記特異的結合試薬の結合の欠如を検出する工程を有する心臓疾患を診断する方法。

**【請求項 12】**

前記特異的結合試薬は、 VEGF - B に対する抗体である、請求項 11 の方法。

**【請求項 13】**

被験体の心臓における VEGF - B 欠損を診断する方法であって、  
前記被験体の心電図を探る工程と、そして

前記心電図を、正常な心電図との比較に於いて、PQ 間隔の延長又は ST 複合の低下に関して評価する工程を有する、被験体の心臓における VEGF - B 欠損を診断する方法。 10

**【請求項 14】**

被験体の心臓における VEGF - B 欠損を検出する方法であって、  
前記被験体の心電図を探る工程と、そして

前記心電図を、正常な心電図との比較に於いて、PQ 間隔の延長又は ST 複合の低下に関して評価する工程を有する、被験体の心臓における VEGF - B 欠損を検出する方法。

**【発明の詳細な説明】**

**【0001】**

本発明は、VEGF - B 欠損動物及びそれらの心臓異常に関する。 VEGF - B 欠損動物を使用して、心臓異常を阻止する物質をスクリーニングする方法、及び、心臓疾患、特に VEGF - B 発現の減失によって特徴付けられる疾患、を診断する方法が提供される。 20

**【0002】**

哺乳動物の血管系の二つの主要な構成要素は、内皮細胞と平滑筋細胞である。内皮細胞は、哺乳動物のすべての血管とリンパ管との内表面のライニングを形成する。新しい血管の形成は、二つの異なるプロセス、即ち、脈管形成 (vasculogenesis) 又は新脈管形成 (angiogenesis) によって起こりうる (リゾー, ダブリュ (Risau, W.), Nature 386 : 671 - 674 (1997) を参照)。脈管形成は、初期胚の一次血管網の形成に於いて起こるもののような、内皮細胞前駆体の、成熟内皮細胞への目的部位での (in situ) 分化と、これらの細胞の血管を形成するための融合作用、とによって特徴付けられる。これに対して、新脈管形成、即ち、既存の血管の増殖と分岐による血管の形成、は、後の胚形成に於いて重要であり、成体に於いて起こる血管の増殖の原因となる。新脈管形成は、内皮細胞の増殖、細胞外マトリクスの分解、血管の分岐、それに続く細胞接着事象、を含む生理学的に複雑なプロセスである。成体に於いて、新脈管形成は、タイトに制御され、正常な状況では女性の生殖系に限定される。しかしながら、新脈管形成は、組織損傷に応答してスイッチ・オンされることが可能である。重要な事実として、固形腫瘍は、周囲の組織に於いて新脈管形成を誘発させることができ、これによって、腫瘍の増殖を維持し転移の形成を容易にする (フォークマン, ジェイ (Folkman, J.) Nature Med. 1 : 27 - 31, (1995))。複雑な新脈管形成プロセスの背後に存在する分子機構についてはほとんど理解されていない。

**【0003】**

新脈管形成は、又、それが疾患の様々な余病に役割を果す、又は、それらに直接関わる、多数の病理状態にも関係している。いくつかの具体例として、種々の肝臓疾患に関連する新生血管形成 (neovascularization)、糖尿病の新生血管形成余病、高血圧症の新生血管形成余病、外傷後の新生血管形成、慢性肝感染 (たとえば、慢性肝炎) の新生血管形成、高温又は低温外傷による新生血管形成、ホルモンの過多に関連する機能障害、血管腫の形成、及び血管形成術後の再狭窄、が挙げられる。

**【0004】**

新脈管形成は、非常に多くの生理的又は病理的プロセスに於いて重要な役割を果すものである為、新脈管形成の制御に関連するファクターについて鋭意研究されてきた。新脈管形成の調節には、多数の増殖因子が関連していることが示されており、これらには、線維芽

10

20

30

40

50

細胞生長因子 ( FGF ) 、血小板由来増殖因子 ( PDGF ) 、トランスフォーミング増殖因子 ( TGF ) 、及び肝細胞増殖因子 ( HGF ) が含まれる。たとえば、フォークマン ( Folkman ) 等、 *J. Biol. Chem.*, 267: 10931 - 10934 ( 1992 ) を参照。

#### 【 0005 】

内皮細胞特異的増殖因子の特定のファミリー、即ち、血管内皮増殖因子 ( VEGF ) とそれらに対応するレセプター、とが、内皮細胞増殖及び分化の刺激と、分化細胞の或る種の機能とに主に寄与していることが示唆された。これらの因子は、 PDGF / VEGF 増殖因子のメンバーであり、内皮レセプターチロシンキナーゼ ( RTK ) を介して作用するものと考えられる。前記 PDGF / VEGF ファミリーの増殖因子は、システイン - ノット 10 スーパーファミリーの増殖因子に属し、それは、又、ニューロトロフィン ( neurotrophins ) とトランスフォーミング増殖因子 を含む。

#### 【 0006 】

PDGF / VEGF 増殖因子に於いて 8 種類のタンパク質が同定されている。即ち、二つの PDGF ( A 及び B ) と、 VEGF と、 VEGF に密接に関連する 5 つのメンバーである。 VEGF に密接に関連する 5 つのメンバーとは、 Ludwig Institute for Cancer Research とヘルシンキ大学の国際特許出願 PCT / US96, 02957 ( WO96/26736 ) 及び米国特許第 5, 840, 693 号及び 5, 607, 918 号に記載の VEGF - B 、ヨウコフ ( Joukova ) 他の EMBOD 20 J. 15: 290 - 298 ( 1996 ) 、リー ( Lee ) 他の Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1988 - 1992 ( 1996 ) 及び Human Genome Sciences 社の米国特許第 5, 932, 540 号及び第 5, 935, 540 号に記載の VEGF - C 又は VEGF 2 、国際特許出願 PCT / US97/14696 ( WO98/07832 ) 及びアチエン ( Achen ) 他の Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 548 - 553 ( 1998 ) に記載の VEGF - D 、マグリオーネ ( Maglione ) 他の Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9267 - 9271 ( 1991 ) に記載の胎盤増殖因子 ( PGF ) 、そして Human Genome Sciences 社の国際特許出願 PCT / US95/07283 ( WO96/39421 ) に記載の VEGF 3 である。各 VEGF ファミリーメンバーは、 VEGF に対して 30 % ないし 45 % のアミノ酸配列同一性を有する。これら VEGF ファミリーメンバーは、前記システイン - ノットモチーフを形成する 6 つのシステイン残基を含む VEGF ホモロジードメインを共有している。 VEGF ファミリーの機能的特徴としては、内皮細胞に対する様々なレベルのマイトジェン活性、血管透過性の誘発、及び新脈管形成及びリンパ形成特性がある。

#### 【 0007 】

血管内皮増殖因子 ( VEGF ) は、その名が暗示するように、内皮細胞特異性マイトジェンである。それは、強力な新生血管形成活性を有する。即ち、それは、新しい血管の増殖を促進する。重要な生理プロセスである新脈管形成には、血液と血管の細胞の多数のタンパク質が関連している。新脈管形成プロセス中、 VEGF のようなマイトジェン因子が重要な役割を果す。しかしながら、これらの因子の役割の生化学的詳細は、必ずしも入手可能ではない。

#### 【 0008 】

VEGF の同定と特徴付け以来、多くの重要な知見は、新脈管形成因子の活性と新しい因子の解明とに集中している。初期の知見は、新脈管形成が正常な発達と生理機能とに必要とされることを示した。胚形成、損傷治癒、黄体形成等のプロセスは、すべて新脈管形成及び新脈管形成因子に関連している。たとえば損傷治癒中に於いて、 VEGF mRNA のレベルが増加し、これは、 VEGF の発現と治癒プロセスとの間の直接的な相互関連を示唆している。又、 VEGF 調節の欠陥は、損傷治癒障害と関連しているかもしれない ( フランク , エス ( Frank , S. ) 他、 *J. Biol. Chem.* 2705: 12607 - 12613 ( 1995 ) ) 。

10

20

30

40

50

## 【0009】

新脈管形成因子に関するその他の重要な知見は、持続性で調節されない新脈管形成によって疾患が悪化および／又は発生するということを示している。たとえば、関節炎は、関節に侵入し軟骨組織を破壊する新しい毛細血管が関係している。糖尿病に於いて、網膜の新しい毛細血管が、硝子体液に侵入し、出血と盲目状態を引き起こす（フォークマン、ジェイ（Folkman, J.）及びシン、ワイ（Shing, Y.）J. Biol. Chem. 267: 10931 - 10934 (1992)）。これら及びその他の疾患における新脈管形成因子の役割は、まだはっきりとは確立されていない。

## 【0010】

別の重要な知見は、新脈管形成と腫瘍発達との間の関連に關係している。腫瘍の増殖と転移は、共に、新脈管形成依存プロセスである（フォークマン、ジェイ（Folkman, J.）及びシン、ワイ（Shing, Y.）J. Biol. Chem. 267: 10931 - 10934 (1992)）。たとえば、腫瘍細胞が動物に導入された時、VEGF mRNAの発現パターンは、壞死性の、腫瘍増殖領域の周囲の細胞に於いて最も高いレベルを示す。これらの領域内に於いて多数の血管が同定された。これらの領域におけるVEGFの発現は、低酸素血症、即ち、酸素（oxygenation）の不足状態、によって、壞死性腫瘍中のVEGFの発現と放出を引き起こす（trigger）ことを示唆している。後により詳細に記載する、別の血管内皮細胞マイトジエン、VEGF-B、の発現は、腫瘍の増殖、特にメラノーマ、と直接に相關している（米国特許第5,840,693号を参照）。

10

20

30

## 【0011】

VEGFは、血小板由来増殖因子（PDGF）に構造的に関連するタンパク質ファミリーのメンバーである。PDGFは、平滑筋細胞、グリア細胞、及びその他いくつかの細胞タイプに対する強力なマイトジエンである。一つの側面に於いて、PDGFファミリーのメンバーは、8つの保存システィン残基の存在によって特徴付けられる。その活性生理状態に於いて、これらタンパク質は、前記8つのシスティン残基に於いて、分子間結合と分子内結合との両方による、ジスルフィド結合によって形成されるダイマーである。別の側面に於いて、これらファミリーメンバーは、そのマイトジエン活性、特に、内皮及び他の関連細胞タイプに関連している。

## 【0012】

血管内皮増殖因子B（VEGF-B）、非グリコシル化、高塩基性増殖因子、は、PDGFファミリーのもう一つのメンバーである。VEGF、PDGF-A, PDGF-B及びPIGF（胎盤増殖因子）に対する密接な構造的類似性に依り、VEGF-Bは、成体及び胚組織、特に筋組織、における脈管形成に役割を果している。VEGF-Bは、又、新脈管形成マイトジエンでもある。ノーザンプロットは、心臓、脳、及び骨格筋を含む種々のマウス及びヒト組織におけるVEGF-B mRNAを示している。RT-PCRアッセイによって、メラノーマ、正常な皮膚、及び筋肉におけるVEGF-B mRNAの存在が示された。

40

## 【0013】

このように、VEGF-Bは、哺乳動物における多くの組織で、但し、心臓、骨格筋及び臍臍に於いて最も豊富に、発現される。VEGF-Bの発現パターンは、VEGFのそれと異なるが、これらは共に、多く組織に於いて発現される（オロフソン、ビー（Olofsson, B.）他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2576 - 2581 (1996)）。

## 【0014】

VEGF-Bのマウスとヒトの遺伝子は、ほとんど同一であって、これらは共に約4kbのDNAに及ぶ。これらの遺伝子は7つのエキソンから構成され、そのエキソン-インtron構成は、VEGF及びPIGF遺伝子のそれに類似している（グリモンド（Grimond）他、Genome Res. 6: 124 - 131 (1996); (オロフソン、ビー（Olofsson, B.）他、J. Biol. Chem. 271: 19310 -

50

19317(1996)；タウンソン(Townson)他、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 922-928(1996)。現在、mRNAの選択的スプライシングによって生成されるVEGF-Bの二つのアイソフォームが認識されている(グリモンド(Grimmond)他、*Genome Res.* 6: 124-131(1996)；(オロフソン, ビー(Olofsson, B.)他、*J. Biol. Chem.* 271: 19310-19317(1996)；タウンソン(Townson)他、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 922-928(1996))。これらのふたつの分泌型のVEGF-Bは、それぞれ、167(VEGF-B<sub>167</sub>)及び186(VEGF-B<sub>186</sub>)のアミノ酸残基を有している。これらアイソフォームは、シグナル配列を除き、115のアミノ酸残基の同じN末端ドメインを有し、これに対してC末端ドメインは異なっている。共通のN末端ドメインはエキソン1-5によってコード化されている。残りの3つのエキソンの使用の違いによって、前記二つのスプライシングアイソフォームが生じている。エキソン6の選択的スプライシング-アクセプター部位の使用により、101bpの挿入によってVEGF-B<sub>167</sub>C DNAのコード領域のフレームシフトと、停止とがもたらせる。このように、二つのVEGF-Bアイソフォームは異なるC末端ドメインを有する。10

#### 【0015】

前記VEGF-Bの二つのスプライシングアイソフォームの異なるC末端ドメインは、それらの生化学的及び細胞生物学的特性に影響する。VEGF-B<sub>167</sub>のC末端ドメインは、VEGFの対応する領域に構造的に関係し、複数の保存システイン残基と塩基性アミノ酸残基の伸展(stretch)とを有する。このように、このドメインは、親水性が高く、塩基性であり、従って、VEGF-B<sub>167</sub>は、生成する細胞がヘパリン又は高い塩濃度で処理されない限り、分泌に於いて細胞会合性(cell-associated)を維持する。VEGF-B<sub>167</sub>に結合する細胞会合分子は、恐らく、細胞表面又は細胞周囲ヘパリン硫酸プロテオグリカンである。このアイソフォームの細胞会合は、おそらく、その特異な塩基性C末端領域を介して起こる。20

#### 【0016】

VEGF-B<sub>186</sub>のC末端ドメインは、データベース中の公知のアミノ酸配列に対して有意な類似性を持たない。VEGF-B<sub>186</sub>のC末端ドメインの疎水性は、VEGF-B<sub>167</sub>の塩基性C末端ドメインの親水性と対照的である。このことは、VEGF-B<sub>186</sub>は、その分泌に於いて細胞会合性を維持しないという観察によって裏付けられている。最近の証拠は、このアイソフォームが、蛋白分解処理され、これによって、タンパク質の生物学的特性が調製されるということを示している(オロフソン, ビー(Olofsson, B.)他、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11709-11714(1998))。30

#### 【0017】

ヒト及びマウスのVEGF-Bと、各アイソフォームとに対する、ヌクレオチド及びアミノ酸配列を含む単離と特徴は、Ludwig Institute for Cancer Researchとヘルシンキ大学の米国特許第5,840,693号及び5,607,918号とオロフソン, ビー(Olofsson, B.)他、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2576-2581(1996)とに詳細に記載されている。国際特許出願PCT/US97/14696(WO98/07832)、米国特許第5,840,693号及び第5,607,918号の全開示をここに参考文献として合体させる。40

#### 【0018】

その関連するマイトジエンタンパク質と同様、VEGF-Bは、イン・ヴィヴォではジスルフィド結合ホモダイマーとして存在する。VEGF-Bの両アイソフォームは又、VEGFとヘテロダイマーを形成し、これは、PDGF様タンパク質の分子間及び分子内ジスルフィド結合に関連する前記8つのシステイン残基の保存と一致する。更に、多くの組織におけるVEGF-BとVEGFとの同時発現は、VEGF-B-VEGFヘテロダイマ50

ーが自然発生することを示唆している。VEGF-B<sub>167</sub>-VEGFヘテロダイマーは、細胞会合状態に維持される。これに対して、VEGF-B<sub>186</sub>とVEGFとのヘテロダイマーは、培養培地中に於いて細胞から遊離して分泌される。VEGFは、PIGFともヘテロダイマーを形成する(ジサルヴォ(DiSalvo)他、J. Biol. Chem. 270: 7717-7723(1995))。このファミリーの増殖因子のメンバー間のヘテロダイマー複合体の生成は、新脈管形成性又は調節分子の多様なアレイの為の基盤を提供しているのかもしれない。

## 【0019】

上述したように、前記PDGF/VEGFファミリーメンバーは、主として、レセプターチロシンキナーゼに結合することによって作用する。一般に、レセプターチロシンキナーゼは、糖タンパク質であって、これは、特定の増殖因子(单数又は複数)と結合できる細胞外ドメインと、通常そのタンパク質のアルファ-ヘリカル部分である膜貫通ドメイン、そのレセプターがたとえば、タンパク質燐酸化によって調節可能である膜近傍ドメイン、前記レセプターの酵素成分であるチロシンキナーゼドメイン、そして、多くのレセプターに於いては、チロシンキナーゼに対する基質の認識と結合とに関連しているカルボキシ末端尾、から成る。

## 【0020】

5つの内皮細胞特異性レセプターチロシンキナーゼが同定されている。即ち、VEGFR-1(Flt-1)、VEGFR-2(KDR/Flik-1)、VEGFR-3(Flt4)、Tie及びTek/Tie-2である。これらのレセプターは、その特異性とアフィニティーとに於いて異なっている。これらのすべてが、シグナル伝達に必要な固有のチロシンキナーゼ活性を有する。

## 【0021】

VEGFに結合することが知られているレセプターチロシンキナーゼは、VEGFR-1、VEGFR-2及びVEGFR-3だけである。VEGFR-1とVEGFR-2とは、高いアフィニティーでVEGFに結合し、VEGFR-1はPIGFにも結合する。VEGF-Bは、VEGFR-1に高いアフィニティで結合するが、VEGFR-2や-3には結合しない(オロフソン(Olofsson)他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 11709-11714(1998))。VEGFR-Cは、VEGFR-3に対するリガンドであることが示されており、これは、更に、VEGFR-2を活性化する(ヨウコフ(Joukoff)他、EMBO J. 15: 290-298(1996))。VEGFR-Dは、VEGFR-2とVEGFR-3との両方に結合する(アーチエン(Achen)他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 548-553(1998))。Tek/Tie-2のリガンドは、Regeneron Pharmaceuticals社の国際特許出願No. PCT/US95/12935(WO96/11269)に記載されている。Tieのリガンドはまだ同定されていない。

## 【0022】

最近、新規な130-135kDaのVEGFアイソフォーム特異性レセプターが精製されクローニングされた(ソーカー(Soker)他、Cell 92: 735-745(1998))。このVEGFレセプターは、ヘパリンに対して弱いアフィニティーを示す、エキソン7コード配列を介してVEGF<sub>165</sub>アイソフォームに特異的に結合することが判った(ソーカー(Soker)他、Cell 92: 735-745(1998))。驚くべきことに、このレセプターは、初期段階の神経形態形成(neuromorphogenesis)に関連するレセプターである、ヒトのニューロピリン(NP-1)と同一であることが示された。PIGF-2も、NP-1と作用するようである(ミグダール(Migdal)他、J. Biol. Chem. 273: 22272-22278(1998))。

## 【0023】

VEGFR-1、VEGFR-2及びVEGFR-3は、内皮細胞によって発現が異なる。一般に、VEGFR-1とVEGFR-2は、共に、血管内皮に発現される(エールリ

10

20

30

40

50

ッヒス (Oelrichs) 他、Oncogene 8 : 11 - 18 (1992) ; カイパイネン (Kaipainen) 他、J. Exp. Med. 178 : 2077 - 2088 (1993) ; デュモン (Dumont) 他、Dev. Dyn. 203 : 80 - 92 (1995) ; フォン (Fong) 他、Dev. Dyn. 207 : 1 - 10 (1996) )、そして VEGFR-3 は、ほとんど成体組織のリンパ内皮に発現される (カイパイネン (Kaipainen) 他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 9 : 3566 - 3570 (1995) )。VEGFR-3 は、又、腫瘍の周囲の血管網にも発現される。

## 【0024】

VEGFR-1 は、主として発達中に内皮細胞に発現されるが、これは、又、胚形成の初期段階に於いて造血前駆細胞中にも見つけることができる (フォン (Fong) 他、Nature 376 : 66 - 70 (1995) )。成体に於いては、単球とマクロファージもこのレセプターを発現する (バーレオン (Barleon) 他、Blood 87 : 3336 - 3343 (1995) )。胚に於いては、VEGFR-1 は、全部ではないが大半の血管によって発現される (ブライア (Breier) 他、Dev. Dyn. 204 : 228 - 239 (1995) ; フォン (Fong) 他、Dev. Dyn. 207 : 1 - 10 (1996) )。

## 【0025】

タンパク質の機能と生物活性を研究するためにトランスジェニック動物が有用なツールであり、そのような様々な動物がこの目的の為に作られている。トランスジェニック動物を作る一つの具体的な方法は、相同組換えに関するものである。相同組換えに於いて、ゲノム配列の全部又は一部が、ホモロガスな配列を含む別のDNAと置き換えられる。トランスジェニック操作と相同組換えによって、動物の細胞の遺伝子、又は遺伝子の一部を変化させることができる。遺伝子をもはや元のタンパク質として機能しないタンパク質をコードするように変化させることによって、ヌルミュータント又はヌルアレルが作り出される (たとえば、米国特許第5,557,032号を参照)。

## 【0026】

VEGF の機能と生理機能を研究するために、VEGF 遺伝子に対するヌルミュータントを含むトランスジェニック胚が報告されている (カーメリエット (Carmetliet) P 他、Nature, 380 : 435 - 439 (1996) )。それによっていくつかの重要な知見が得られた。前記 VEGF ヌルミュータントについてのヘテロの胚に於いて血管の形成は異常ではあったが無くならなかった。前記 VEGF ヌルミュータントについてのホモの胚は、新脈管形成に於いて更に大きな障害を示す。ホモ胚は、懐胎期間中に死亡した。生殖系列遺伝 (germ line transmission) によって作り出されたヘテロ子胚に於いても同様な表現型が観察された。しかしながら、(カーメリエット (Carmetliet) の研究が胚に制限されたことから、表現型又は動物の使用は報告されなかった。更に、VEGF トランスジェニック胚の生成によって、すべての VEGF 様タンパク質の新脈管形成特性又は腫瘍増殖調節特性に関する知見が得られたわけではない。

## 【0027】

このように、新脈管形成因子の機能と生理機能とを解明しようとする当該技術の努力にも拘わらず、これらの因子は、まだ、理解が不完全であり、VEGF-B 等の新脈管形成増殖因子の活性、又、上述した種々の病状におけるそれらの役割、を解明するために使用することが可能で、および / 又は、その他の新脈管形成ペプチドを開発および / 又は評価するために有用な、手段が今だ必要とされている。

## 【0028】

発明の要旨

その一態様に於いて、本発明は、変異 VEGF-B 遺伝子を含むトランスジェニック動物の利用法に関する。VEGF-B 遺伝子は、相同組換えプロセスによって変異される。これらのトランスジェニック動物は様々な利用法を有する。たとえば、これらの動物を研究

10

20

30

40

50

することによって、VEGF-B ポリペプチド、そのフラグメント、又は、小分子等のアナログ、の治療に関連した使用及び投与に関する重要な情報が提供される。特に、本発明の前記トランスジェニック動物は、透過性、炎症および/又は組織修復等の生理現象に対する VEGF-B および/又は他のサイトカインの影響を解明するのに有効である。これらの動物又はこれら動物由来の細胞は、新脈管形成および/又は腫瘍増殖調節化合物を同定するためのスクリーニングアッセイに有用である。これらの動物は、又、VEGF-B アゴニストのイン・ヴィヴォ分布、機能及び非毒性及び VEGF-B 含有分子をテストする方法に於いて有用である。

## 【0029】

別の態様に於いて、本発明は、少なくとも一つの非機能性変異 VEGF-B アレルを含有するトランスジェニック非ヒト動物を使用する方法を提供する。前記トランスジェニック動物は、非ヒト動物、好ましくはマウスの胚幹細胞にトランスジェニック DNA を導入することによって作られる。前記トランスジェニック DNA は、VEGF-B の配列とホモロガスな領域を有する。次に、前記トランスジェニック DNA が少なくとも一つの内因性のゲノム VEGF-B 配列の複製の部位に於いて、前記幹細胞のゲノム DNA に組み込まれた、細胞を選択する。この細胞を、増殖過程の動物の胚盤胞に導入し、トランスジェニック動物に増殖させる。

## 【0030】

本発明の前記方法において有用なトランスジェニック動物を作る方法に使用される前記トランスジェニック DNA は、公知の様々な方法で変化、変異又は修飾された VEGF-B 遺伝子からのスクレオチド配列を有する。これにより、前記トランスジェニック動物を作り出すのに使用される前記 DNA は、多種の DNA 配列を含むことができる。適当な配列の選択は、所望の効果に依存する。たとえば、システインに対する少なくとも一つのコドンを変化又は欠失させることができる。その結果得られる動物は、改変された、天然 VEGF-B 又は別の PDGF 様タンパク質とダイマーを形成する能力を有する VEGF-B を生成することができる。一好適実施例に於いて、VEGF-B の 8 つのシステイン残基の内の 7 つが欠失され、VEGF-B のヌルミュータントが得られた。

## 【0031】

更に別の態様に於いて、本発明は、化合物の、トランスジェニック動物に於いて、脈管形成を行う、又は、腫瘍増殖又は進行を調節する、又は、心臓の筋系を増加させる能力をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、前記化合物をトランスジェニック動物に導入する工程と、その動物の血管発達を検出する工程とを有する。或いは、前記方法は、トランスジェニック動物に腫瘍細胞を導入する工程と、この同じ動物に化合物を導入する工程と、その動物の腫瘍発達を検出する工程とを有する。

## 【0032】

上述した方法の様々な実施例が本発明の範囲に含まれる。たとえば、化合物の、VEGF-B 遺伝子産物の活性を回復又は検出可能に作用する能力をスクリーニングする方法であって、適当な細胞ラインに化合物を添加する、又は、その化合物をトランスジェニック動物に導入する工程を有する方法を考案することが可能である。本発明によって作られるトランスジェニック動物及び細胞ラインは、これらの方針に使用することができる。そのような動物又は細胞ライン系は、又、VEGF-B 遺伝子の活性および/又は新脈管形成を回復又は調節する能力を有する化合物を選択するために使用することも可能である。この化合物は、タンパク質（たとえば、組換え又はイン・ヴィトロで合成されたもの）、又は、VEGF-B をコードする DNA 又は VEGF-B のアナログとすることができる。これは、そのままの（naked）ゲノム DNA 又はプロモーターに作動可能にリンクされた cDNA とすることができる、これを更に、ウイルス又はバクテリアベクターにリンクさせることができある。前記 DNA は、ルイ（Lui）他、Nature Biotechnology, 15: 167-172 (1997) に例示されているように、リポソームコンストラクトに導入することができる。前記 DNA 又はタンパク質は、更に、8-16 の胚細胞段階で VEGF-B ノックアウトマウス胚に供給することができる。

10

20

30

40

50

**【 0 0 3 3 】**

前記ミュータント VEGF - B 遺伝子配列（野生型又はその変異フラグメント）によって得られたトランスジェニック動物を使用して、二重トランスジェニック動物を作り出すことができる。この目的の為に、前記ミュータント VEGF - B トランスジェニック動物を、同じ種の他のトランスジェニック動物又は、同じ種の自然発生ミュータント動物と交配することができる。その結果得られる二重トランスジェニック動物、又はそれから由来の細胞は、前記ミュータント親トランスジェニック動物と同じ用途に使用することが可能である。

**【 0 0 3 4 】**

核酸配列を変異又は修飾する公知の方法を使用して、本発明に於いて有用な、 VEGF - B ミュータント動物、細胞ライン又は配列を作り出すことができる。そのような方法は、非限定的に、点突然変異、部位特異的突然変異誘発、挿入突然変異、相同組換えによって得ることが可能な変異、及び、 DNA 又はその DNA を有する細胞の化学的又は放射線処理によって得られる変異、を含む。所望又は必要な場合には、 PCR 分析又は DNA シークエンシングを使用して、その產生した変異を検出することができる。次に、前記ミュータント動物、細胞ライン又は配列を、前述した、 DNA 配列、システム、アッセイ、方法又はプロセスに使用する。変異又は修飾された DNA は、その定義により、ゲノム DNA と異なる又は同じではないものとなる。ミュータント動物は、ここに記載の又は、本発明によって利用可能とされる前記配列を含む第 1 のトランスジェニック動物を第 2 の動物と交配させることによっても作り出される。前記第 2 動物は、前記第 1 動物に含まれる DNA とは異なる DNA を含むものとすることができます。このように、種々のミュータント動物を作り出すことができる。

**【 0 0 3 5 】**

更に、ここに記載の DNA 配列を変異させ、前述したように、これら DNA 配列を発現ベクターにリンクさせ、 VEGF - B タンパク質又はミュータントを発現するために組換え DNA 技術を利用することができる。これにより、前記 VEGF - B ミュータントの、生化学的又は作用活性を分析することができる。このように、効果的な VEGF - B の発現を妨げる変異 DNA 配列を作り出すことができる。

**【 0 0 3 6 】**

本発明の「修飾 VEGF - B DNA 」とは、イン・ヴィトロ又は組換え DNA 技術によって修飾された VEGF - B 遺伝子からのヌクレオチド配列をいう。この修飾 VEGF - B DNA は、トランスジェニック DNA が導入される前記胚幹細胞からの遺伝子と全く同じヌクレオチド配列は含まない。前記 VEGF - B DNA 配列へのヌクレオチドの欠失、置換、挿入を含む修飾が具体的に含まれる。一例として、一つの具体例の修飾 VEGF - B DNA は、マウス VEGF - B DNA の、エキソン 3 の一部とエキソン 4 の全部との欠失を含む。VEGF - B 座の制限地図（図 1 及び 3 ）を使用して、少なくとも一つの制限フラグメントを欠失させることにより、様々な修飾 VEGF - B DNA を設計することができる。

**【 0 0 3 7 】**

本発明の前記方法は、 VEGF - B 等の新脈管形成増殖因子を含む、種々の物質の新脈管形成及び腫瘍増殖調節活性を解明するための有用なモデルを提供するものである。改变された VEGF - B 遺伝子を有するトランスジェニック動物を使用したモデルシステムから、 VEGF - B のための治療、診断及び制御利用法を決定することができる。特に、前記トランスジェニック動物は、本発明により、 VEGF - B が透過性、炎症および / 又は組織修復等の生理現象に対して影響を与える能力に基づく、处置プロトコルの開発に使用することができる。更に、本発明の方法は、他のポリペプチド又は小分子の、新脈管形成活性や、 VEGF - B が、血液流から特定の組織への栄養素の摂取量等のその基本的特性に影響を与える内皮細胞遺伝子発現に基いて有する活性等の、 VEGF - B 様活性を評価するのに有用である。

**【 0 0 3 8 】**

10

20

30

40

50

前記トランスジェニック動物は、本発明に依り、野生型(+/+)ヘテロ(+/-)及びヌルアレル(-/-)動物に対する様々な生理的ストレスの影響をモニター又は比較することによって、VEGF-Bの発達的及びホメオスタシス機能を解明するために利用することができる。たとえば、VEGF-Bの凝血時間に対する影響を、損傷アッセイを使用してモニターすることができ、VEGF-Bの腫瘍増殖に対する影響を移植された腫瘍細胞の増殖をモニターすることによって測定することができ、VEGF-Bの身体的活性(physical activity)に対する影響を、比較身体的活性研究によって発見することができ、および/又は、VEGF-Bのストレス反応に対する影響を、圧縮空気の暴露等の過酷なストレスの適用によって測定することができる。更に、VEGF-Bの心拍数、心拍出量(たとえば、血圧)、および/又は血行力学的(haemodynamic)特性を、ゾウ(Zhou)他、Nature Medicine 4: 201-07(1998)によって記載されたものに類似の手順で、本発明のトランスジェニック動物を使用してアッセイすることができる。10

#### 【0039】

正常な心臓機能におけるVEGF-Bの役割を、VEGF-B欠損マウス(-/-)と、正常(+/+)な同腹仔とを比較することによって調査することができる。VEGF-B発現の喪失は、いくつかの有意な相違を示す。これらの相違は、欠損マウスが房室(AV)伝導欠損と、心筋層の虚血を示す兆候を有していることを示している。

#### 【0040】

本発明の更に別の態様は、房室伝導欠損と虚血調節活性とに関して化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、スクリーニングされる前記化合物をVEGF-B欠損非ヒト動物に導入する工程と、この動物における房室伝導欠損又は虚血に対するその影響をアッセイする工程とを有する。この方法は、たとえば、ファージ、ペプチド又はコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングする時に、房室伝導欠損と虚血調節活性とに関して一種類以上の化合物をスクリーニングするためには使用することができる。可溶性ペプチドライブラリーとその利用法の具体例は、ホーテン(Houghten), Gene, 137: 7-11(1993)である。ランダムペプチド-提示系ファージライブラリーの一例は、バリー(Barry)他、Nat. Med. 2: 299-305(1996)である。コンビナトリアルライブラリー一般及びそれらの利用法は、ケイ・エス・ラム(K. S. Lam)、Anticancer Drug Des. 12: 145-167(1997); ネフツィ(Nefzzi)他、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 8: 2273-2278(1998); コッffen(Coffen)他、Medicinal Chemistry Research, 8: 206-218(1998); リ(Li)他、Drug Discovery Today, 3: 105-112(1998)に記載されている。2030

#### 【0041】

更に別の関連する態様は、房室伝導欠損又は虚血を治療又は軽減する方法であって、房室伝導欠損又は虚血を軽減する量の、VEGF-B、又は、VEGF-Bの生物活性を有するそのフラグメント又はアナログ、を投与する工程を有する方法に関する。

#### 【0042】

前記「アナログ」又は「機能的アナログ」という用語は、少なくとも一つのアミノ酸置換が、そのアナログが、イン・ヴィヴォおよび/又はイン・ヴィトロで、その非修飾型全長又はそのフラグメントと実質的に同じ生物活性を保持するように行われた、VEGF-Bの非修飾型全長又はそのフラグメントをいう。40

#### 【0043】

「VEGF-Bの生物活性」という表現は、内皮細胞増殖、分化、遊走、生存又は新脈管形成又は血管透過性の内の単数又は複数を刺激する能力を意味するものと理解される。

#### 【0044】

房室伝導欠損又は虚血の治療又は軽減に使用される前記VEGF-Bポリペプチド及びVEGF-Bアナログは、又、その薬学的に許容可能な非毒性塩と、薬学的に許容可能な固50

体又は液体キャリア又はアジュバントと組み合わせて使用することも可能である。

【0045】

そのようなキャリア又はアジュバントの具体例としては、非限定的に、塩水、緩衝食塩水、リソゲル溶液、ミネラルオイル、タルク、コーンスターク、ゼラチン、ラクトース、スクロース、微結晶性セルロース、カオリン、マンニトール、リン酸カルシウム、塩化ナトリウム、アルギン酸、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、増粘剤、安定剤、懸濁剤、及びこれらの組み合わせが含まれる。そのような組成物は、溶液、懸濁液、タブレット、カプセル、クリーム、軟膏(salve)、エリキシル、シロップ、ウエハ、擦剤(ointment)、又はその他の従来形状とすることができます。その処方は、投与方法に適したものとされる。本発明のペプチドを含有する組成物は、前記活性化合物(単数又は複数種)を、重量比で、0.1%~90%、最も一般的には、約10%~30%含むものとされる。10

【0046】

筋肉内投与用の調合物としては、滅菌製剤、好ましくは、塩酸塩等の、適當な可溶性塩状態のVEGF-B、をバイロジエンを取り除いた水(希釈)、生理食塩水、又は5%グルコース溶液などの薬用希釈液中に溶解させて投与することができる。前記化合物の適當な不溶性のものは、水性基剤、又は、オレイン酸エチル等の長鎖脂肪酸エステル等の、薬用許容可能な油性基剤、中の懸濁物として調合し投与することができる。

【0047】

その投与量と投与経路とは、治療されるべき患者の特徴と状態とに依存し、担当の医師又は獣医の自由裁量とされる。適當な経路としては、経口、皮下、筋肉内、腹腔内、又は静脈内注射、非経口的、局所塗布、移植、等が含まれる。たとえば、有効量の本発明のペプチド又は抗体を、それを必要とする生体に対して、約0.1~100mg/kg体重、より好ましくは、1~10mg/kg体重、の投与量、投与される。治療の進行、患者の副作用、及び循環ポリペプチドレベルをモニターすることによって、最適投与養生法のための追加のガイダンスが提供される。VEGF-B又はそのフラグメント又はアナログの局所塗布は、VEGFに類似の方法で使用することができる。20

【0048】

房室伝導欠損又は虚血の治療又は軽減の別の方は、VEGF-B、又は、VEGF-Bの生物活性を有するそのフラグメント又はアナログをコードする核酸配列の有効量を、投与する工程を有し、ここで、前記核酸は、有効量の前記VEGF-B又はそのフラグメント又はアナログをコードして、房室伝導欠損又は虚血を治療又は軽減することが可能である。前記核酸配列は、好ましくは、プロモーター配列に作動可能にリンクされている。30

【0049】

前記核酸は、そのまで(naked)あってもよいし、或いは、ベクター又はリポソーム内にあるものであってもよい。本発明の好適なベクターは、本発明に依る核酸が単数又は複数の適當なプロモーターおよび/又はその他の制御配列に作動可能にリンクされ、適當な細胞が、前記ベクターにクローニングされた前記核酸によってトランスフォーム又はトランスフェクトされた時に、それが、本発明の前記ポリペプチドを発現することが可能であるような、発現ベクターである。最も好ましいベクターはアデノウイルス-、ワクシニア-、レトロウイルス-ベースのベクター、リポソームのような遺伝子療法のためのトランスフェクションに適したものである。そのようなベクターは様々なものが知られている。40

【0050】

本発明の更に別の態様は、被験体の心臓疾患を診断する方法であって、心電図を探る工程と、PQ間隔の延長および/又はST複合(又はU波)の低下を検索する工程とを有する方法を提供する。

【0051】

本発明の更に別の態様は、被験体におけるVEGF-B発現の喪失によって特徴付けられる心臓疾患を診断する方法を提供する。これらの方法は、ポリメラーゼ連鎖反応を使用し50

た V E G F - B D N A の増幅の欠如、又は、 V E G F - B に対する特異的結合試薬との結合の検出の欠如、のいずれかを検索することによって、 V E G F - B 発現の損失を検索する工程を含むことができる。前記特異的結合試薬は、好ましくは、 V E G F - B に対する抗体である。最も好適な抗体は、 V E G F - B に対するモノクローナル抗体である。

#### 【 0 0 5 2 】

本発明の前記抗体は、検出可能な標識によって標識することができる。この抗体は、画像化の為に、適當な、超磁性、常磁性、高電子密度、エコジェニック ( e c o g e n i c ) 、又は放射性又は非放射性物質 / 標識に結合させることができる。放射性物質 / 標識の具体例としては、<sup>1</sup><sup>2</sup><sup>5</sup> I や<sup>3</sup><sup>2</sup> P 等の放射性原子又は、原子団、がある。非放射性物質 / 標識の具体例としては、ホースラディシュペルキシダーゼ等の酵素標識又は、フルオレセイン - 5 - イソチオシアネート ( F I T C ) 等の蛍光標識がある。標識は、直接的又は間接的、共有結合的又は非共有結合的に行うことができる。

#### 【 0 0 5 3 】

##### 例示的実施例の詳細な説明

次に本発明を、添付の図面を参照しながらより詳細に説明する。下記の記載と例とは、本発明の実施例と範囲とを例示するものである。本発明は、この記載の範囲に限定されるものではない。当業者は、以下の例と実施例とが、公知の技術を使用して改変可能であるということを理解するであろう。たとえば、記載又は請求項されている核酸配列のバリエーションを、本発明者等が示した作用又は利点を変えることなく、公知の方法によって作り出すことが可能である。従って、そのようなバリエーションは、この記載と発明の範囲に含まれるものである。公知技術の多くのための詳細なプロトコルは、オースベル、エフ・エム ( Ausubel , F . M . ) 他、 Ed s . C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , Green Publishing Associates 及び Wiley - I n t e r s c i e n c e , John Wiley & Sons , ボストン、マサチューセッツ ( 1989 ) 、及び、以後 " Ausubel ( 1989 ) " と称する S u p p l e m e n t s , 1997 年 1 月、更に、サムブルック、ジェイ ( S a m b r o o k , J . ) 他、 M o l e c u l a r C l o n i n g . A L a b o r a t o r y M a n u a l , 第 2 版、 C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , ニューヨーク ( 1989 ) 、以後 「 S a m b r o o k ( 1989 ) 」 、そしてビー・ホーガン ( B . Hogan ) 、アール・ベディングトン ( R . Beddington ) 、エフ・コンスタンチーニ ( F . Constantini ) 及びイー・レイシー ( E . Lacy ) 編集の、 M a n i p u l a t i n g t h e M o u s e E m b r y o . A L a b o r a t o r y M a n u a l C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , ( 1994 ) 、以後、「 Hogan ( 1994 ) 」 に、記載されている。これらの文献を具体的にここに参考文献として合体させる。これらの文献を参照して当業者は、本発明の実施例を実施することが可能である。

#### 【 0 0 5 4 】

ここでの使用に於いて、「ヌルアレル」、「ヌル変異」及び「ヌルミュータント」とは、野生型タンパク質との比較に於いて、変質したタンパク質をコードする遺伝子配列をいう。一般に、「ヌルミュータント」は、その主要な機能 ( p r i m a r y f u n c t i o n ) が実質的に不能なタンパク質を作り出すように改変される。たとえば、 V E G F - B ヌルミュータントは、血管内皮細胞の増殖をもはや刺激しない、或いは、上述した V E G F - B のその他の作用のいずれも示さないタンパク質をコードする D N A 配列である。しかしながら、ヘパリン結合や二量化等の、 V E G F - B のその他の生化学的機能に関連する構造は、前記ヌルアレルによってコードされるタンパク質において存在するかもしれない。更に、前記「ヌルミュータント」という用語は、上述したように、変質されたタンパク質の遺伝子配列を有する動物又は細胞も指すことがある。

#### 【 0 0 5 5 】

トランスジェニック D N A とは、細胞に導入されて、この D N A がその細胞のゲノムに組

10

20

30

40

50

み込まれることが可能なDNAを指す。前記細胞は、前記トランスジェニックDNAを含む、トランスジェニック動物を作り出すことができる。一般に、前記トランスジェニックDNAは、特定の細胞への投与のために、ベクター、又はトランスジェニックベクターとして構築される。そのようなベクターは、環状等の、特定の構造形状である必要はない。

#### 【0056】

組換え遺伝子又は配列とは、単に、その遺伝子又は配列が、多数の公知の組換えDNA技術のいずれかによって操作されたということを意味する。

#### 【0057】

ここでの使用に於いて、「修飾VEGF-B DNA」という用語は、点突発変異、部位特異的突然変異誘発、欠失突然変異、挿入突然変異、相同組換えから得られる変異、および／又は、前記DNA又はDNAを有する細胞の化学的又は放射性処理から得られる変異のいずれか一つ又は複数によって修飾された、又は、天然状態に於いては野生型VEGF-B DNAと会合しない、マーカ配列等の別のDNA配列にリンクされた、動物由来のVEGF-B又クレオチド配列を指す。前記修飾VEGF-B DNAは、たとえば、Flt-1レセプター結合モチーフ等の、野生型VEGF-B DNAの活性の一部又は全部を保持しうる。

#### 【0058】

ここで言及されているVEGF-B遺伝子及びDNA配列は、マウス又はヒトからの遺伝子又は配列に限定されるものではない。すべての動物種を、VEGF-B遺伝子のソースとして使用することが可能である。トランスジェニックDNAに組み込まれた前記組換え配列に於いて、特定の胚細胞のVEGF-B遺伝子とホモロガスな配列は、その胚細胞と同じ種からのものである必要はない。

#### 【0059】

トランスジェニック動物を作り出す方法は、関連する種の如何に関わらず実質的に同じである。簡単に説明すると、トランスフェクト細胞を、それらがそのトランスフェクト細胞を組み込みできる段階、たとえば、胚盤胞期に於いて、胚に注入する。次に、前記胚を、代理母に再度移植し、これによって、前記トランスフェクトDNAを有するキメラ産仔が得られる。このように、必要なのは、動物からの適当な胚幹細胞のみである。

#### 【0060】

種々の動物からの胚幹(ES)細胞の生成は、当業者にとって周知である。胚幹細胞は、多数のソースから入手可能である。それらには、マウス、ラット、ウシ、ブタ、ヒツジ、及びその他の動物が含まれる。たとえば、ジョイナー、エイ・エル(Joynner, A. L.) (1993)、Gene Targeting, A practical approach, ウッド、アール(Wood, R.)及びハムス、ビー・ディ(Hamess, B. D.) The Practical Approach Series, 第126巻、Oxford IRL Press(具体的にここに参考文献として合体させる)は、ES細胞を作り出す方法を記載している。又、Manipulating the Mouse Embryo. A laboratory Manual, ビー・ホーガン(B. Hogan)、アール・ベディングтон(R. Beddington)、エフ・コンスタンチーニ(F. Constantini)及びイー・レーシー(E. Lacy)編、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1994)は、マウス胚の操作を記載している。更に、クーリー(Couly)ヒル・ドーリン(Le Douarin)、Development 108:543-555(1990)は、鶏とウズラの胚を単離し操作する方法を記載している。キンメル(Kimme1)とワルガ(Warga)、Nature 327:234-237(1987)は、ゼブラフィッシュの胚の単離と操作を記載している。そして、ウェア(Ware)他、“Development of Embryonic Stem Cell Lines from Farm Animals”, Society for the Study of Reproduction, 38:241(1988)は、マウス、畜牛(catle)、ブタ、ヒツジ等の多くの種用に適用可能な胚幹細胞培養条件を記載している。

10

20

30

40

50

従って、本発明は、具体的に例示したマウスに対してと同様、その他の動物にも適用することが可能である。

#### 【0061】

動物の細胞にDNAを挿入する様々な方法が知られている。たとえば、トランスジェニックDNAを、適当な細胞にマイクロインジェクションすることができる。ウイルスベクターを使用して、DNAを、適当な細胞及びそれら細胞のゲノムに導入することができる(たとえば、ツクイ(Tsukui)他、Nature Biotechnology 14: 982-985(1996)を参照)。細胞は、又、トランスフェクションや電気穿孔法によってイン・ヴィトロで操作することも可能である(オースベル(Ausubel)(1989)とホーガン(Hoganc)(1994)とを参照)。

10

#### 【0062】

一般に、トランスジェニックDNAは、ランダムインテグレーション又は相同組換えのいずれかによって細胞ゲノムに組み込まれる。相同組換えが発生した細胞を同定し単離するために、ES細胞及びその他の細胞に於いて、ランダムインテグレーションに対して相同組換えの相対頻度を増加させるためのストラテジーは当業者にとって周知である(たとえば、オースベル(Ausubel)(1989)、米国特許第5,557,023号、及びホーガン(Hoganc)(1994)を参照)。トランスジェニックDNAベクターの構築は、細胞配列の一部のトランスジェニックDNAへの組み込み、又は前記細胞配列とホモロガスな配列を含むものであってよい。その部分は、相同組換えが起こるために、前記トランスジェニックDNAと細胞DNAとがイン・ヴィヴォでハイブリダイズすることを許容する程度に前記細胞配列に対してホモロガスなものでなければならない。

20

#### 【0063】

胚幹細胞に挿入される前記トランスジェニックDNAは、好ましくは、ホモロジー5'及び3'領域を有する。これらのホモロジー領域は、胚幹細胞における相同組換えのプロセスを促進する作用を有する。当業者が拠り所とすることが可能な多数の刊行物が、相同組換での使用のために、いかにホモロジー領域を構築するかを記載している。たとえば、トーマス(Thoman)&カペッチ(Capuccchi)、Cell, 51: 503-512(1987)、マンスール(Mansour)他、Nature, 317: 348-352(1988)及びカペッチ(Capuccchi)の米国特許第5,487,992号は、それぞれ、相同組換え技術におけるホモロジー領域の構築のためのストラテジーを記載している。このように、相同組換えの為に配列を構成する方法は公知である。

30

#### 【0064】

しかしながら、トランスジェニックDNAが導入された各細胞については、相同組換えが起こらない。更に、多くの場合、一つ以上のアレルを有する遺伝子におけるように、相同組換えによって改変又は置換されることが望まれる細胞性のDNA配列の一つ以上のコピーが細胞内に存在する。従って、相同組換えによって、それらの細胞のいくつかは、一つの細胞性の配列に於いてのみトランスジェニックDNAが組み込まれ、他の細胞は、一以上の細胞性の配列、或いは、すべての細胞性の配列においてトランスジェニックDNAを組み込むかもしれない。従って、トランスジェニックDNAで相同組換えを受けたES細胞から、ホモとヘテロの両方の動物が作り出されるかもしれない。ホモ動物を、トランスジェニックDNAについてヘテロな別のトランスジェニック動物を作り出すために、野生型動物と交配させることができる。

40

#### 【0065】

##### (実施例)

正常及び疾患状態における、イン・ヴィヴォでの血管系の発達と維持におけるVEGF-Bの役割を分析するために、ミュータントVEGF-Bアレルを有するマウスを、作った。これらマウスの一つのVEGF-Bアレルを、相同組換えの技術によって機能的に不活性化させた。これにより、これらの細胞からつくられたマウスは、一つのミュータントと一つの野生型VEGF-Bアレルとを有していた。

#### 【0066】

50

図1は、4つの小部分、1A～1Dから構成され、これは、前記マウスVEGF-B遺伝子のヌル変異を作り出すために使用されたストラテジーの略図である。図1Aは、前記マウスVEGF-B遺伝子のエキソンイントロン編成の略図である。図1Bは、多数の制限酵素のための切断部位が示されているVEGF-B座の制限地図である。図面に於いて、前記制限酵素は、次のように示されている。N=Not I; S=Sph I; K=Kpn I; H=Hind III; そしてE=Eco RI。下記の例示トランスジェニックDNAコンストラクトにおいて除去された前記Sph I-Kpn Iフラグメントは、黒塗りのボックスによって示されている。図1(C)のトランスジェニックDNAコンストラクトを使用して、ミュータントVEGF-Bアレルを作った。このコンストラクトは、pPGK-ネオカセット(neocassette)(neo)を挟む、VEGF-B遺伝子の、5'ホモロガスなフラグメント(Not I/平滑Sph I)と3'ホモロガスなフラグメント(平滑Kpn I/Hind III)とを含んでいる。図1Dは、サザン・プロット分析に於いてVEGF-Bの野生型及びミュータントアレルを同定するために使用されたDNAプローブの位置を示している。

10

## 【0067】

図2に於いて、増幅された野生型バンド(wt)と、ネオマイシンカセット(neo)からの増幅バンドとの移動が右側に示されている。

## 【0068】

以下の項に於いて、VEGF-Bアレルを有する動物が作られた詳細な手順及び得られたマウス表現型の一次分析が記載される。

20

20

## 【0069】

実施例1：導入遺伝子として有用なVEGF-Bの選択

トランスジェニック動物を作るのに使用されるDNAは、様々なDNA配列を含むことができる。適当な配列の選択は、その望まれる作用に依存する。たとえば、もしもVEGF-Bのヌルミュータントを有する動物が望まれるのであれば、そのトランスジェニックDNAは、血管内皮細胞マイトジエンとしてのVEGF-Bの主要な機能を持たないタンパク質をコードする配列を含んだものとなる。変異タンパク質のマイトジエン活性を測定するたのアッセイを使用することも可能であるが、VEGF-B遺伝子の構造情報を使用して、特定の変異機構(scheme)の作用を正確に推定することも可能である。

30

## 【0070】

この実施例に於いては、VEGF-Bマウス遺伝子の一部を欠失させた。この欠失部分は、ジスルフィド結合のために重要な8つのシステイン残基の内の7つを含んでいる。上述したように、VEGF-Bは、PDGFファミリーの増殖因子のメンバーである。このファミリーのメンバーは構造的に関連しているので、VEGF-Bに対する影響を示すために他のPDGFファミリーメンバーに対する変異の作用を補外することができる。

30

従って、特定の作用を作り出すVEGFの変異によって、VEGF-Bにも同じ又は類似の作用が及ぼされる可能性が高い。同様に、PDGFファミリーの他のメンバーにおける変異を使用して、VEGF-B遺伝子の変異を作り出すことができる。これは、特に、すべてのファミリーメンバー、或いは、もう一つの別のファミリーメンバー、に関する構造情報が、特定の活性に関連する保存構造を示す場合である。これらの事項を考慮に入れて、8つのシステイン残基の内の7つが欠失されたヌルミュータントを作った。前記システイン残基は、PDGFファミリーに関するデータから、ジスルフィド結合及び二量化に関連していることが知られていたので、これら残基の内の7つの欠失によって、非機能性変異VEGF-Bタンパク質が得られることが予想される。本発明の為に使用されるトランスジェニックDNAの配列の選択に関する更なる詳細を以下に示す。

40

## 【0071】

本発明に於いて修飾されるDNA配列を選択するために、マウスVEGF-Bの遺伝子を、先ず、pcif-2をプローブとして使用してマウスFIXII-ライブラリー(Stratagene; La Jolla, CA)からクローニングした。この手順の詳細は、オロフソン、ビー(Olofsson, B.)他、J. Biol. Chem., 27

50

1 : 1 9 3 1 0 - 1 9 3 1 7 ( 1 9 9 6 ) ( ここに参考文献として合体させる ) に記載されている。それぞれ約 20 kb のマウスゲノム DNA を有する、 10 , 11 及び 12 として示す三つの - クローンが、単離され特徴付けられた。前記ゲノム DNA の詳細な制限地図を、前記 DNA を、様々な制限酵素によって消化し、その後、制限フラグメントをサザンプロッティングによって同定することによって作成した。前記マウス c DNA クローンの配列から得られた種々の  $^{32}\text{P}$  標識オリゴヌクレオチドプローブをサザンプロッティングに使用した。

#### 【 0 0 7 2 】

前記 VEGF - B 遺伝子に潜む ( harboring ) 前記 DNA の制限地図から得られた情報を使用して、遺伝子導入のための DNA を選択した。この選択された DNA は、 10  
トランスジェニック動物が有するべき性質、特性、遺伝子型、又は表現型に依存する。様々な性質、特性、遺伝子型又は表現型が望まれるかもしれない。たとえば、 VEGF - B

DNA が、 - ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、又は、ルシフェラーゼ、又は、その他公知の類似物、等のマーカ配列にリンクされた動物が、発現した VEGF - B タンパク質の局在性を測定するためのアッセイのために望ましいかもしれない。高誘導性プロモーター又は乳房組織に於いて発現を指示するプロモーターに作動可能にリンクされた VEGF - B DNA を有する動物が、その動物から VEGF - B タンパク質を得る目的のために望ましいかもしれない。使用可能な多くのプロモーター又は発現システムは、公知である。更に、ミュータント VEGF - B 配列は、一旦、トランスジェニック動物に作動挿入されると、新脈管形成又は腫瘍発達の分子的基盤 ( molecular basis ) を測定するための研究動物を提供することができる。 20

#### 【 0 0 7 3 】

一つのトランスジェニックプロトコルに於いて、 VEGF - B 遺伝子のヌルアレルが望まれる。前記ヌルアレルの遺伝子産物は、 VEGF - B の脈管形成特性に関して非機能性となるであろう。 VEGF - B のヌルアレルを有する動物は、たとえば、動物に於いて新脈管形成作用を有する化合物を同定するための様々なアッセイに有用なものとなる。

#### 【 0 0 7 4 】

ヌルアレルを作る一つの方法は、分子内又は分子間ジスルフィド結合、或いは、これらの両方の形成を妨げるべく DNA 配列を欠失させる又は修飾する工程を含む。具体的には、ジスルフィド結合に関連していることが知られている、又は、関連していると考えられるシステイン残基をコードする領域が欠失される。或いは、個々のシステイン残基を、その内の多くが公知である、点突然変異又は部位特異的突然変異誘発法によって変異する。しかしながら、ヌルアレルは、その他様々な方法でも作ることが可能である。たとえば、 VEGF - B の制限地図から、欠失ミュータントを作るために好適な制限部位を選択することができる。 30

#### 【 0 0 7 5 】

原則的に、非限定的に、 ( i ) 全遺伝子の欠失、 ( ii ) 重要なタンパク質コード配列の欠失、及び ( iii ) 転写調節配列の欠失を含む、ヌル変異を作る多くの方法がある。ヌル変異は、又、もしもその変異がスプライシング、 mRNA 安定性、等に影響する場合にも発生する可能性がある。更に、リーディングフレームを改変する、又は、早期停止コドンを導入する挿入又は置換によってもヌル変異が起こりうる。 40

#### 【 0 0 7 6 】

図 1 に示した制限地図から、 VEGF - B 遺伝子にヌル変異を導入するターゲットトランスジェニックコンストラクトを作る一つの方法は、制限フラグメントを欠失させることによる方法である。エキソン 1 の “ B ” 部位への PTKneo の挿入は、好ましく、ヌル変異を作り出すことができる。より詳細な制限地図、図 3 、から、その他のストラテジーも考案することができる。たとえば、エキソン 1 , 2 , 3 , 4 又は 5 の欠失、そして一つ以上のエキソンの組み合わせの欠失も考案することができる。

#### 【 0 0 7 7 】

ヌルミュータントを作る別のある方法は、レセプター結合に関連する領域を欠失させる方法で 50

ある。PDGFとVEGFとの両方に於いて、レセプター結合に関する構造情報が存在しており、それは公知である。その情報を使用して、VEGF-B遺伝子の関連部分を欠失させて、ヌルアレルを作ることが可能である。同様に、レセプター-F1t-1に結合するVEGF-Bとレセプター-F1t-1に結合するVEGF-Bアナログを同定する方法とが、ここに参考文献として合体させる同時係属米国出願08/994,540号に記載されている。この情報を使用して、VEGF-Bのヌルアレルを作ることも可能である。

#### 【0078】

上記記載から、当業者は、VEGF-Bのヌルアレルを構成するために公知の多くの技術を使用することが可能であることを理解するであろう。従って、本発明は、VEGF-Bのヌルアレルを有するトランスジェニック動物を作るここに具体的に例示した欠失に限定されるものではない。

#### 【0079】

実施例2： VEGF-B欠失ミュータントによるトランスジェニックベクターの作成  
本発明の一実施例に於いて、VEGF-Bのアミノ酸末端ドメインの8つのシステイン残基の内の7つが除去された。この欠失は、三つの分子内ジスルフィド結合、更に、成熟VEGF-B分子の共有結合性二量化に使用される二つの分子間ジスルフィド結合を分裂させる。これを行うために、330bp SpeI-KpnIフラグメントを欠失させた。このフラグメントは、VEGF-B遺伝子のエキソン3の一部とエキソン4の全部とを含む。具体的には、エキソン3の3'部分によってコードされる33のアミノ酸と、エキソン4の24のアミノ酸全部とが欠失された。前記ターゲットアレルからのその結果得られたVEGF-Bタンパク質は、これらの重要なアミノ酸を欠如しているが故に、非機能性であり、このアレルはヌルアレルである。

#### 【0080】

VEGF-Bの前記SpeI/KpnIフラグメントを欠如する組換えトランスジェニックベクターの作成のための出発物質は、プラスミドpBluecript(Sтратagen)にサブクローニングされた10kb NotI/HindIIIフラグメント(コンストラクトA)と、pBluecriptにクローニングされた1.7kb pPGK-ネオカセット(Sibiliia, M. Science 269: 234-238(1995))(コンストラクトB)とであった。

#### 【0081】

前記トランスジェニックベクターの3'領域を作るために使用された前記1.2kb KpnI/HindIIIフラグメントは、コンストラクトAからの前記10kb VEGF-Bフラグメントを、KpnIで消化し、T4ポリメラーゼによってKpnI粘着末端から平滑末端を作り、最後に、HindIIIで切断することによって単離された。このフラグメントと、それに続くすべてのフラグメントとは、1×TBE(トリスホウ酸EDTA)緩衝液中で作られた低ゲル化温度(LGT)アガロースゲル上で単離された。次に、単離された1.2kbフラグメントを、EcoRV及びHindIII消化pBluecriptベクターにライゲーションし、これによってコンストラクトCを得た。

#### 【0082】

トランスジェニックベクターの5'フラグメントはNotI/SpeIで切断することによって、コンストラクトAから単離された。単離されたフラグメントをNotI/SpeI消化コンストラクトCへライゲーションし、コンストラクトDを作り出した。

#### 【0083】

前記pPGKネオカセットは、コンストラクトBをNotI/HindIIIで消化し、クレノウフラグメントで平滑末端を作ることによって単離された。その結果得られたフラグメントを、ゲル精製し、次に、EcoRIで消化され、クレノウフラグメントで平滑化されたコンストラクトDにライゲーションし、コンストラクトEを得た。順方向に挿入された前記pPGK-ネオカセットを有するこの11.2kbのベクターを、遺伝子導入のためのターゲッティングベクターとして選択した。前記コンストラクトA-Eの概略を図4に示す。

10

20

30

40

50

## 【0084】

サザン・プロットアッセイを使用して、野生型対変異アレルのアイデンティティーを確認した。ゲノムDNAをEcoRIで消化し、プロッティング用に調製した。上述したスクリーニング手順に於いてプローブとして使用された450bpの放射性標識フラグメントは、主として、VEGF-BcDNAのエキソン7と3'非翻訳領域をコードする配列を含んでいた。このプローブは、クローン10からのDNAをテンプレートとして使用したPCRによって作られた。このPCRに使用されたプライマーは、5'-GTGAAAGCTCCAGCCGAGCA(センスストランド)(配列識別番号1)と、5'-TAGTGTCCTCCATCTCTTT(アンチセンスストランド)(配列識別番号2)であった。前記ミュータントアレルは、6.5kbのゲノムEcoRI制限フラグメントを作り出したのに対して、前記野生型アレルはこれらの条件に於いて>20kbのフラグメントを作り出した。10

## 【0085】

実施例3：トランスジェニックベクターの動物細胞への挿入

前記ミュータントVEGF-B(コンストラクトE)を含む前記ベクターを、電子穿孔法により、129/SWマウス(キューン(Kuhn)R.他、Science 254:707-710(1991))由来のE14.1細胞にトランスフェクトした。ネオマイシン耐性クローンを、標準手順によって単離し、特徴付けた。ビー・ホーガン(B.Hoganc)、アール・ベディングトン(R.Beddington)、エフ・コンスタンチニ(F.Constantini)及びイー・レイシー(E.Lacy)編集の、Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Pressは、胚を単離し操作するための手順を記載している(ここに参考文献として合体させる)。数百のクローンからのゲノムDNAを単離し、EcoRI消化し、サザン・プロッティングによって分析した。これらの手順を使用して、1a, 8f及び9hとして示される三つの陽性のクローンが、6.5kbのバンドと更に、野生型20kbバンドとを検出することによって同定された。サザンプロットを、放射線標識PKG-ネオカセットによって探索する(probing)ことによって、更に、クローン1a及び9hの予想された6.5kbのバンドが得られた。これらのデータは、ES細胞の二つのVEGF-Bアレルの内の一つのアレルが、前記コンストラクトによって正確にターゲッティングされたこと、そして、VEGF-Bのヌルアレルを含むES細胞が生成されたことを示している。20  
。

## 【0086】

実施例4：トランスジェニック動物の作成

細胞ライン9hからの細胞を、標準手続を使用してマウス胚盤胞に注入した。ビー・ホーガン(B.Hoganc)、アール・ベディングトン(R.Beddington)、エフ・コンスタンチニ(F.Constantini)及びイー・レイシー(E.Lacy)編集の、Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press、(1994)は、細胞を注入するための手順を記載している(ここに参考文献として合体させる)。前記胚盤胞を、偽妊娠(pseudopregnant)養母に移植した。その結果得られたキメラマウス、即ち、前記トランスジェニックDNAを有するマウスを、産仔の毛の色で同定した。40

## 【0087】

たとえば、ES細胞は、チンチラ(白黄)の毛皮とアグーチ(Agouti)座のキャリアとを有する129/SWマウス由来であり、宿主の胚盤胞は、黒色の皮を有しアグーチ座を有さないC57BL/6マウス由来であったので、キメラは、チンチラ(ES細胞のみが寄与する皮膚の斑点)と、黒色(宿主細胞のみが寄与する斑点)と、茶色又はアグーチ(129SW細胞とC57BL/6細胞との混合物が存在する斑点)との混合物となる。これらのキメラ動物は、129/SW細胞から分泌されたアグーチタンパク質は、C550

7B1 / 6 毛包細胞を、その毛が茶色になるようにメラニン（黒色色素）を処理するよう に刺激するので、茶色である。

【0088】

オスのキメラマウスを、C57B1 / 6 野生型メスと交配させた。これらのメスのマウスからの産仔における茶色のマウスの存在は、前記トランスジェニックDNAの生殖細胞遺伝を示した。

【0089】

これらF1マウスの尾から調製されたDNAを、上述したようにサザン・プロッティングによって分析した。概略を説明すると、0.5cmの尾組織を、外科除去し、これらを使用してDNA試料を作成した。茶色マウスの50%に6.5kb EcorI フラグメントが存在していたので、これは、VEGF-Bのターゲットヌルアレルに対する選択が無いことを示した。ターゲットVEGF-B座を有するF1マウスは、VEGF-Bの野生型アレルも有しているので、ヘテロ接合体である。VEGF-Bの一つの不活性化アレルを有する正常に発達したF1マウスの存在は、VEGF-Bにおいて遺伝子量(gene dosage)は、生存の為に必須ではないということを示している。

【0090】

ヘテロF1マウスを交配させ、その産仔からの尾DNAを、サザン・プロッティングとPCRとによって分析した。これら二つの技法を使用して得られた結果は同じであり、PCR遺伝子型分類(genotyping)手順の詳細を記載する。PCR增幅は、F2産仔からの尾DNAをテンプレートとして標準条件を使用して行われた。前記野生型アレルは、エキソン3及びエキソン4に位置する二つのプライマーを使用して316bpの増幅バンドとして同定された。これらのプライマーは、それぞれ、5' - G C C C A G C T G T G T G A C T G T (順方向) (配列識別番号3) と 5' - C C C A C C C A T G C T A C A C T (逆方向) (配列識別番号4) であった。ターゲットアレルは、ネオマイシン耐性遺伝子に位置する二つのプライマーを使用して140pbのバンドとして同定された。これらのプライマーは、それぞれ、5' - T G T T C T C C T C T T C C T C A T C T C C (順方向) (配列識別番号5) と 5' - A T T G T C T G T T G T G C C C A G T C (逆方向) (配列識別番号6) とであった。これらPCR增幅から得られた結果は図2にまとめられている。これらの分析は、VEGF-Bのターゲットアレルに関してホモなマウスが生育可能であることを示した。そして、F2世代の多数の動物は、1:2:1の、野生型、前記ヌルアレルを有するヘテロ、及びホモ、の比率を示した。このように、ヌルアレルは、古典的なメンデル法則に従って遺伝する。

【0091】

VEGF-Bの成体ノックアウトマウスの最初の外部観察からは、野生型マウスに対してなんら大きな構造的变化は示されなかった。しかしながら、一部のトランスジェニックVEGF-Bミュータントマウスの心臓は、奇形になっていることが観察された。これらの心臓は、一般に野生型よりもサイズが小さく、大きな血管はより拡張しているようであった。これらの表現型は、VEGF-Bノックアウトマウスが、心臓組織増殖又は発達に対する影響を与える化合物をスクリーニングするためのモデルとして使用可能であることを示している。

【0092】

実施例5：細胞又は組織標本中のVEGF-B核酸の検出

細胞又は組織標本は、公知の多くの簡便な方法によって得ることができる。一般に、遠心分離された細胞ペレット又は組織試料を即座に冷凍する。トータルRNAを、グアニジニアムイソチオシアネート法[チョムジンスキイ(Chomczynski)他、Anal.Biochem., 162: 156-159 (1987)]によって単離する。0.2μgのランダムヘキサデオキシヌクレオチドプライマー、5単位のマウス逆転写酵素、テンプレートとしての5μgのトータルRNA、そして一本鎖cDNA合成キット(Pharmacia)を使用してcDNAを合成する。37℃で1時間のインキュベーション後、その反応混合物を-70℃で保存する。逆転写酵素を添加しなかったことを除いて、同

10

20

30

40

50

様に、P C R 増幅の陰性対照試料を調製した。 - アクチンも、それは構成的に高いレベルに於いて発現され、その発現は異なる細胞に於いて大きな変化を示さないため、内部標準としてテストした。

#### 【 0 0 9 3 】

P C R 増幅のために、プライマー配列を、下記のように V E G F - B 及び - アクチン遺伝子から選択する。

V E G F - B センス : 5' - G C C A T G T G T C A C C T T C G C A G - 3' ( 配列識別番号 7 ) 、

V E G F - B アンチセンス : 5' - T G T C C C T G G A A G A A C A C A G C C - 3' ( 配列識別番号 8 )

- アクチン センス : 5' - C G G G A A A T C G T G C G T G A C A T - 3' ( 配列識別番号 9 )

- アクチン アンチセンス : 5' - G G A G T T G A A G G T A G T T C G T G - 3' ( 配列識別番号 10 ) [ - アクチン配列は、エング ( N g ) 他、 M o l . C e l l B i o l . , 5 : 2 7 2 0 - 7 3 2 ( 1 9 8 5 ) からのヌクレオチド 2 1 0 5 - 2 1 2 5 と 2 4 1 1 - 2 4 3 2 とから成る ] 。前記 c D N A 反応産物の 4  $\mu$  l のアリコットを、 9 4 まで 5 分間加熱し、これを、 2 0 p m o l のプライマー、 1 0  $\times$  P C R 緩衝液、 1  $\mu$  l の 2 0 m M d N T P 及び 2 . 5 U の T a q ポリメラーゼを使用した P C R 増幅のためのテンプレートとして使用する。最終ボリュームを、 D E P C 処理水によって 1 0 0  $\mu$  l に調節する。 9 5 で 1 分間の変性と、 6 2 で 4 5 秒間のアニーリングと、 7 2 で 5 0 秒間の重合を、 V E G F - B については全部で 3 5 サイクル、 - アクチンについては全部で 2 5 サイクル行う。 5 サイクル後毎に、 1 5  $\mu$  l のアリコットを分析のために採取する。

#### 【 0 0 9 4 】

5  $\mu$  l の前記 P C R 反応混合物の電気泳動を、エチジウムプロマイドを含有する 2 % アガロースゲル中で行った。サイズマーカ D N A フラグメントの長さの範囲は、 2 4 ~ 7 2 6 塩基対であった ( P r o m e g a , M a d i s o n , ウィスコンシン , U S A の X 1 7 4 D N A / H i n f I マーカ ) 。

#### 【 0 0 9 5 】

##### 実施例 6 : トランスジェニック動物からの細胞と組織の用途

上述したように、 V E G F - B ノックアウトマウスの心臓は、野生型よりも小さいよう見え、これは、とりわけ、心臓細胞増殖アッセイ、心拍数アッセイ、心臓拍出量アッセイ、及び、その他の血行力学的特性のアッセイにおける有用性を示唆している。当業者は、スクリーニングアッセイにおけるその他の用途も理解するであろう。

#### 【 0 0 9 6 】

そのようなスクリーニング法に於いてトランスジェニック動物の細胞及び組織を使用するために、トランスジェニック動物由来の少なくとも一つの細胞を含む、トランスジェニック動物からの細胞又は組織の培養株を使用することができる。それらの細胞は外植片として増殖されるか、又は、機械的分散によって分離され、一次培養物として増殖される。或いは、それらの細胞を、公知の形質転換法によって、或いは、最初に、そのトランスマウスを、たとえば、ジャット ( J a t ) 他、 P N A S U S A 8 8 : 5 0 9 6 - 5 1 0 0 ( 1 9 9 1 ) によって記載されている H - 2 K t s A 5 8 マウスと交配させたり、その他公知の関連する方法 ( たとえば、マクリーン , ジェイ・エス ( M c C l e a n , J . S . ) , T i b t e c h 1 1 : 2 3 2 ( 1 9 9 3 ) を参照 ) によって、細胞ラインにトランスマウスする。このように、ノックアウトミュータントと H - 2 K<sup>b</sup> t s A 5 8 トランスジェニックマウスとの交配は様々な細胞の不死化ラインを条件付で作り出す。具体的には、細胞は、 t s ( 温度感受性 ) A 5 8 T - 抗原の許容条件下ではじめに増殖するので、それらの細胞が多くの継代のための培養ができる。 T - A g は細胞を不死化する。細胞を T - A g の活性を不能にする非許容温度に変えると、細胞は分化し、それによって、様々な組織から多くの様々な細胞が潜在的に作り出される。

10

20

30

40

50

## 【0097】

実施例7： 新脈管形成性および／または腫瘍増殖調節活性のアッセイ

応答細胞も含まれているV E G F - B ノックアウトマウスからの心臓体外移植組織のような組織サンプルをV E G F アナログをテストするために使用することができる。技術分野で知られているように組織サンプル又は体外移植組織を溶液中に維持する。V E G F - B のアナログまたは小分子のような化合物を組織サンプル又は体外移植組織に添加し、組織サンプル又は体外移植組織における作用を分析した。このように、新脈血管形成性、腫瘍増殖の抑制又は促進、筋系の増加、又は、V E G F - B に関連するその他の作用をアッセイすることができる。当業者は、特定の実施例を考案するために、オースベル（A u s s u b e l ）（1998）やホーガン（H o g a n ）（1994）等の、公知の方法を拠り所とすることができる。10

## 【0098】

実施例8： V E G F - B 転写物の発現の研究

心臓及び骨格筋におけるV E G F - B 転写物の発現を、野生型（+ / +）、ヘテロマウス（+ / -）及びホモノックアウトマウス（- / -）におけるノザン・プロッティングによって調べた。V E G F - B 欠損及び野生型C 5 7 B 1 / 6 マウスを殺し、異なる組織をスナップ凍結（s n a p f r o z e n ）し、使用時まで - 8 0 で保存した。トータル細胞性R N A を、グアニジニウムイソチオシアネート／酸フェノール法〔チョムジンスキイ（C h o m c z y n s k i ）他、A n a l y t i c a l . B i o c h e m i s t r y , 1 6 2 : 1 5 6 - 1 5 9 ( 1 9 8 7 ) 〕によって作成した。各試料からの2 0 μ g のR N A を、1 % アガロースゲル中で各レーン毎に使用し、8 0 Vで約3時間ランさせた。次に、ゲルを、ナイロン膜（H y b o n d T M - N + , A m e r s h a m ）にトランスファーし、その後U Vクロスリンクを行った。プレハイブリダイゼーションを、製造業者のプロトコル（A m e r s h a m ）に依り、2時間、5 × S S C , 5 × デンハルト溶液、0 . 5 % S D S 及び1 0 0 μ g / m l の一本鎖D N A 中で行い、その後、6 5 で特定プローブによってハイブリダイゼーションを一晩行った。20

## 【0099】

使用された二つのプローブは、（a）全長マウスV E G F - B c D N A と（b）ヌルアレルに於いてV E G F - B 遺伝子の欠失部分をカバーするプローブとであった。1 . 8 k b のV E G F - B <sub>1</sub> <sub>6</sub> , c D N A フラグメントを使用して、推奨されているプロトコルに従って、ランダム標識キット（A m e r s h a m ）を使用して前記第1プローブを作成した。ノーザン分析に使用された前記第2プローブは、前記ヌル／ターゲッティングベクター中でN e o 遺伝子によって置換された、V E G F - B のエキソン3及び4中の1 4 8 b p のフラグメントを使用して作成し、これを、P C R 法によって標識した〔コナート（K o n a t ）他、P C R T e c h n o l o g y , p p 3 7 - 4 2 , G r i f f i n e d s . , C R C P r e s s , B o c a R a t o n ( 1 9 9 4 ) 〕。T a q D N A ポリメラーゼと<sup>3</sup> P - d C T P とを、9 4 で1分間、5 8 で2分間、そして7 2 で3分間の、3 0 サイクルの標識化P C R に使用した。30

## 【0100】

洗浄後、膜を、2 ~ 6 日間、X線フィルムに露出させた。膜を、煮沸0 . 5 S D S 中で剥離（s t r i p ）させ、完全な剥離を保証するべく、一晩、蛍光イメージヤ（p h o s p h o r i m a g e r ）に露出した。図5 a は、前記全長マウスV E G F - B c D N A プローブを使用したノーザン・プロットからの結果を示している。図5 b は、前記ヌルアレルの欠失部分をカバーするプローブからの結果を示している。40

## 【0101】

これらの結果は、両プローブが前記+ / + マウスから得られた豊富な1 . 4 k b V E G F - B m R N A にハイブリダイズすること、そして、より少量の二つの更なる転写物も検出されたことを示している。これら二つの小さな転写物は、それぞれ、その長さは3 . 0 k b と6 k b であった。+ / - マウスに於いてはハイブリダイゼーションシグナルのはっきりした減少が得られたのに対して、両プローブは、いずれも、- / - マウスから得られ50

たRNA試料中にはなんのVEGF-B転写物も検出しなかった。このことは、ターゲットVEGF-Bアレルがノックアウトされてヌルアレルが形成されたこと、そして、-/-マウスはVEGF-Bタンパク質の合成を有さないこと、を示すものである。ヘテロ接合体中のVEGF-B転写体のレベル低下は、又、残りの無傷のVEGF-Bアレルの転写はその代償としてアップレギュレーションされない、ということも示している。

#### 【0102】

##### 実施例9：腫瘍の移植と測定

腫瘍の増殖と転移は、腫瘍組織の新生血管形成に依存することが知られているので、移植された腫瘍の増殖を、同腹仔の、野生型(+/+)及びVEGF-B欠損(-/-)マウスに於いて調べた。このテストには、オスのVEGF-B欠損(-/-)マウスと、同腹仔のホモC57BL/6マウス(+/+)とを使用した。マウスT241線維肉腫細胞を、皮内注射した。6~8週齢のマウスを、腫瘍細胞の移植前に、メトキシフルランによって麻酔した。次に、対数期増殖中の $1 \times 10^6$ のT241マウス線維肉腫細胞を、100μlのPBS中に懸濁させ、各マウスの中背部に皮下移植した。これらの動物のそれぞれにおける腫瘍の増殖を測定した。腫瘍は、ノギスを使用して一日毎に観察、測定した。腫瘍の体積を、式：幅<sup>2</sup>×長さ×0.52を使用して計算した[ベーム(Boehm)他,Nature,390:404-407(1997)を参照]。

10

#### 【0103】

その結果を図6のグラフに示す。このグラフから、腫瘍の増殖は、+/+動物と比較して-/-動物に於いて大幅に遅いことが理解される。それは、ミュータント動物における方が長い(+/+動物の場合には約18-20日間)であるのに対して-/-動物の場合には30-32日間)、指数増殖期前の、初位相(initial phase)であるようと思える。このことは、VEGF-Bが、恐らくは腫瘍ストロマに影響を与えることによって、腫瘍の脈管形成に影響するということを示している。この結論は、その影響がミュータント動物に於いて観察される間に、腫瘍細胞が恐らく内因性のVEGF-Bを発現することから、引き出すことができる。

20

#### 【0104】

この結果は、内皮細胞増殖に対する直接的影響又は、遊走、細胞外マトリクスの分解等の間接的影響に起因するものであるかもしれない。いずれにせよ、これらの結果は、VEGF-Bが、腫瘍増殖を促進するのに役割を果すことを示しており、たとえば、モノクローナル抗体を使用して、VEGFR-1に対するVEGF-B結合の阻止、又は、VEGFR-1に対する小分子の結合、又は、アンチVEGF-B療法、或いは、これらの二つ以上の組み合わせによって、VEGF-Bの作用の抑制に基づいて、抗腫瘍ストラテジーを開発することが可能であること、を示している。

30

#### 【0105】

##### 実施例10：正常及びVEGF-B欠損マウスからの心臓組織の組織学的検査

正常マウスとVEGF-B欠損マウスからの心臓組織の組織学的検査は、大きな相違点を示さなかった。又、ミュータント動物の心筋層断面における毛細管密度は、正常であった。このことは、VEGF-Bが、心筋層の脈管形成を制御する新脈管形成プロセスに於いて重要な役割を演じていないかもしれないことを示唆している。

40

#### 【0106】

##### 実施例11：VEGF-B欠損マウスにおける新脈管形成因子の発現の分析

放射性標識cRNAプローブを使用したRNaseプロテクションアッセイ(RNase protection assay)による、正常及びVEGF-B欠損マウスの心臓における遺伝子発現の分析は、調べられた遺伝子の大半が、ミュータント動物に於いて正常に発現されることを示した。正常に発現された遺伝子は、VEGF、PDGF、PDGF-A、PDGFレセプターa及びb、VEGFレセプター1及び2、ニューロビリン1, Tie1レセプター、ウロキナーゼ プラズミノーゲンアクチベーター、プラズミノーゲンアクチベーターインヒビタ1及び血小板内皮細胞接着分子を含んでいた。その発現がミュータントマウスに於いて変化した唯一の遺伝子は、PDGF-B(約30%低下,p

50

> 0 . 0 5 ) であった。現時点に於いて、この P D G F - B の発現の変化が何を意味するのかは明らかではない。

#### 【 0 1 0 7 】

##### 実施例 1 2 : V E G F - B 欠損マウスにおける心臓異常

正常な心臓の機能における V E G F - B の役割を調べるために、テレメトリー・システム ( D A T A S c i e n c e , S t . P a u l , ミネソタ、 U S A ) を使用して心臓異常を探索するべく、 V E G F - B 欠損マウスと正常な同腹仔とを比較した。前記テレメトリー・システムは、植え込み型送信機 ( T A 1 0 E T A - F 2 0 ) と、テレメトリー受信機 ( R A 1 0 1 0 ) と、前記テレメトリー受信機から情報を中継する統合マトリクス ( c o n s o l i d a t i o n m a t r i x ) ( B C M 1 0 0 ) とから成る。心電図 ( E C G ) と 10 その他のパラメータとを記録するために、送信機を動物の腹に埋め込んだ。二つの電極を、心尖 ( h e a r t a p e x ) の近傍と、皮下的に右肩とにそれぞれ配置した。データ取得システムは、データ翻訳 ( D T 2 8 0 1 ) A D コンバータと、コンピュータプログラム P C - L A B v . 5 . 0 ( A x e n b o r g a n d H i r s c h , C o m p . M e t h . P r o g r . B i o m e d . 4 1 : 5 5 - 6 7 ( 1 9 9 3 ) ) とから成る。得られたデータを、 E x c e l マイクロプログラムを使用して更に分析し、そのデータを、毎分の発運動量カウント値、体温、及び毎分の心拍数として提示した。 E C G アレイを使用して、心調律を調べた。前記コンピュータプログラム P C - L A B v . 5 . 0 を使用して、平均的な E C G から、 P Q , Q R S 及び Q T 間隔をミリ秒単位で計算した。使用された手順は、ヨハンソン ( J o h a n s s o n ) 及びトーレン ( T o r e n ) 、 A c t a 20 P h y s i o l . S c a n d . 1 6 0 : 1 3 3 - 1 3 8 ( 1 9 9 7 ) に記載されており、これをここに参考文献として合体させる。

#### 【 0 1 0 8 】

正常マウス ( + / + ) と V E G F - B 欠損マウス ( - / - ) の平均 E C G の分析は、いくつかの大きな違いを示している。その結果を図 7 のグラフに示す。

#### 【 0 1 0 9 】

P Q 間隔は、 + / + 動物と比較して - / - 動物に於いて長くなっている ( 表 1 も参照 : 3 9 . 7 ミリ秒に対して 3 5 . 7 ミリ秒,  $p > 0 . 0 5$  ) 。これは、欠損動物が房室 ( A V ) 伝導欠陥を有することを示している。この理由は明らかではないが、ヒトの A V 伝導の低下は、 A V 束線維の虚血、瘢痕組織又は心臓の石灰化に依る A V 束の圧縮、 A V 接合部の A V 束又は、線維の炎症、或いは、迷走神経に依る心臓の過度の刺激によって引き起こされうる。

#### 【 0 1 1 0 】

Q R S 複合は正常のように見えるのに対して、マウスの U 波は、僅かな低下を有して異常であるように見える。U 波のこの僅かな低下は、虚血の徵候であるかもしれない。というのは、ヒトに於いて見られる対応する S T 複合の類似の低下は心筋虚血を示すことがあるからである。U 波の面積と振幅とを表 1 に示すとともに、図 7 A 及び 7 B に図示する。- / - マウスにおける U 波の低下は、図 7 B 中、斜線領域によって示されている。これは- / - 動物におけるその他の異常を示している。ヒトに於いては、 S T 群の低下は、心筋の虚血を示すものである。大半の場合、虚血は、不十分な冠状循環によって引き起こされる。心拍数と体温との両方は、- / - 動物に於いて正常であった。

#### 【 0 1 1 1 】

#### 【 表 1 】

正常 (+/+ , n=4) 及び VEGF-B 欠損 (-/- , n=4)

動物の ECG 測定のデータの一部

	遺伝子型		p 値
	+/+	-/-	
PQ 間隔	35.7 ms	39.7 ms	0.014
U 面積 (a.u. <sup>1</sup> )	4.31	9.62	-
U 振幅 (a.u. <sup>1</sup> )	-0.013	-0.034	-

10

20

### 【 0 1 1 2 】

以上の説明及び実施例は、単に、本発明を例示するために提供されたものであり、限定的なものではない。当業者は本発明の精神及び要旨を組み込んだ、ここに開示された実施例の改造を想到するであろう故、本発明は、添付の請求項の範囲内のすべて及びそれらの均等物を含むものと理解されるべきである。

### 【 図面の簡単な説明 】

#### 【 図 1 】

マウス VEGF - B 遺伝子のヌル変異を作り出すためのストラテジーの略図

#### 【 図 2 】

同腹仔の、ホモ VEGF - B (+/+) 、ヘテロ (+/-) 及び VEGF - B 座のホモノックアウトマウス (-/-) の F2 世代からの尾 DNA の PCR 増幅のアガロースゲル電気泳動を示している図

#### 【 図 3 】

マウス VEGF - B 座の詳細な制限地図を示す図であり、制限酵素と対応の記号は下にリストされている

#### 【 図 4 】

前記マウス VEGF - B 座をターゲットとしたトランスジェニックベクターを生成するのに使用された手順の略図であり、後述するコンストラクト A - E のそれぞれが、前記マウス VEGF - B 座をターゲットとしたトランスジェニックベクターを作る方法例に示されている

30

#### 【 図 5 a 】

野生型 (+/+) 、ヘテロ (+/-) 及びノックアウト (-/-) マウスの心臓及び骨格筋組織からの RNA のノーザンプロットを示す図

#### 【 図 5 b 】

野生型 (+/+) 、ヘテロ (+/-) 及びノックアウト (-/-) マウスの心臓及び骨格筋組織からの RNA のノーザンプロットを示す図

40

#### 【 図 6 】

同腹仔の、ホモ VEGF - B (+/+) 及び VEGF - B 欠損 (-/-) マウスにおける移植された腫瘍の増殖を比較するグラフ

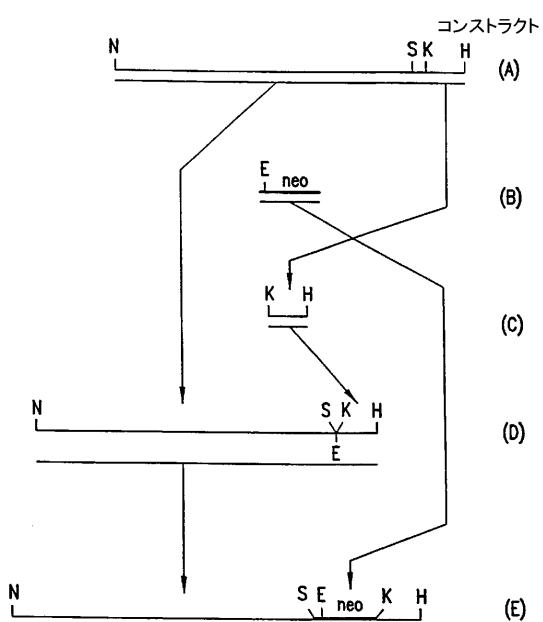
#### 【 図 7 A 】

同腹仔の、ホモ VEGF - B (+/+) 及び VEGF - B 欠損 (-/-) マウスの典型的な心電図

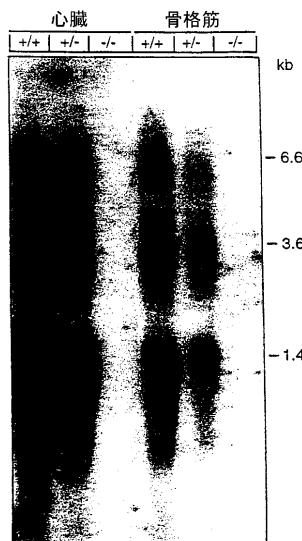
#### 【 図 7 B 】

同腹仔の、ホモ VEGF - B (+/+) 及び VEGF - B 欠損 (-/-) マウスの典型的な心電図

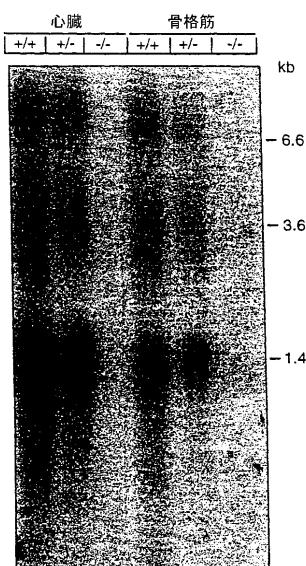
【図4】



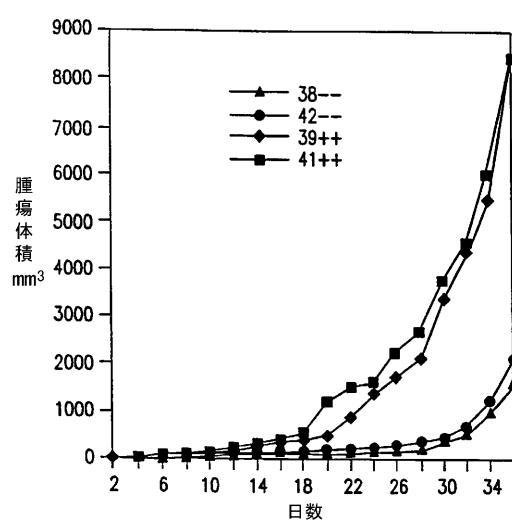
【図5 a】



【図5 b】



【図6】



## 【国際公開パンフレット】

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 7 : G01N 33/00, A01N 43/04, A61K 38/00, 39/395, 39/40, 39/42, 39/44, C07H 21/02, 21/04, C12N 15/00, 15/09, C12P 19/34	A1	(11) International Publication Number: WO 00/52462 (43) International Publication Date: 8 September 2000 (08.09.00)
(21) International Application Number: PCT/US00/05465		(81) Designated States: AU, CA, CN, JP, KR, NZ, European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) International Filing Date: 3 March 2000 (03.03.00)		
(30) Priority Data: 60/160,083 3 March 1999 (03.03.99) US		Published <i>With international search report.</i>
(71) Applicant: LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH [US/US]; 605 Third Avenue, New York, NY 10158 (US).		
(72) Inventors: AASE, Karin; Ludwig Institute for Cancer Research, Box 240, S-171 77 Stockholm (SE); THOREN, Peter; Karolinska Institute, Dept. of Physiology & Pharmacology, S-171 77 Stockholm (SE); ERIKSSON, Ulf; Ludwig Institute for Cancer Research, Box 240, S-171 77 Stockholm (SE).		
(74) Agent: EVANS, Joseph, D.; Evenson, Edwards & Lenahan, P.L.C., Suite 700, 1200 G Street, N.W., Washington, DC 20005 (US).		
(54) Title: HEART ABNORMALITIES IN VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR B (VEGF-B) DEFICIENT ANIMALS AND METHODS RELATING TO THESE HEART ABNORMALITIES		
(57) Abstract		
<p>VEGF-B deficient animals show heart abnormalities that appear to be caused by atrioventricular (AV) conduction defects and ischemia of the myocardium. Methods are provided for screening a compound for atrioventricular conduction or ischemia modulating activity using a VEGF-B deficient non-human animal, for the treatment or alleviation of atrioventricular conduction defects or ischemia and for diagnosing heart diseases.</p>		

***FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY***

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Fialand	LT	Lithuanian	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Galon	LV	Latvia	SZ	Switzerland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghara	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MT	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Moritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CO	Colombia	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

WO 00/52462

PCT/US00/05465

HEART ABNORMALITIES IN VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR B  
(VEGF-B) DEFICIENT ANIMALS AND METHODS RELATING TO THESE  
HEART ABNORMALITIES

---

This invention relates to VEGF-B deficient animals and their heart abnormalities. Methods are provided for using VEGF-B deficient animals to screen for substances to counteract heart abnormalities and for diagnosing heart diseases, particularly diseases characterized by a loss of VEGF-B expression.

The two major components of the mammalian vascular system are the endothelial and smooth muscle cells. The endothelial cells form the lining of the inner surface of all blood vessels and lymphatic vessels in the mammal. The formation of new blood vessels can occur by two different processes, vasculogenesis or angiogenesis (for review see Risau, W., Nature 386:671-674 (1997)). Vasculogenesis is characterized by the *in situ* differentiation of endothelial cell precursors to mature endothelial cells and association of these cells to form vessels, such as occurs in the formation of the primary vascular plexus in the early embryo. In contrast, angiogenesis, the formation of blood vessels by growth and branching of pre-existing vessels, is important in later embryogenesis and is responsible for the blood vessel growth which occurs in the adult. Angiogenesis is a physiologically complex process involving proliferation of endothelial cells, degradation of extracellular matrix, branching of vessels and subsequent cell adhesion events. In the adult, angiogenesis is tightly controlled and limited under normal circumstances to the female reproductive system. However angiogenesis can be switched on in response to tissue damage. Importantly solid tumors are able to induce angiogenesis in surrounding tissue, thus sustaining tumor growth and facilitating the formation of metastases (Folkman, J., Nature Med. 1:27-31, (1995)). The molecular mechanisms underlying the complex angiogenic processes are far from being understood.

Angiogenesis is also involved in a number of pathologic conditions, where it plays a role or is involved directly in

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/52462

PCT/US00/05465

different sequelae of the disease. Some examples include neovascularization associated with various liver diseases, neovascular sequelae of diabetes, neovascular sequelae to hypertension, neovascularization in post-trauma, neovascularization due to head trauma, neovascularization in chronic liver infection (e.g. chronic hepatitis), neovascularization due to heat or cold trauma, dysfunction related to excess of hormone, creation of hemangiomas and restenosis following angioplasty.

Because of the crucial role of angiogenesis in so many physiological and pathological processes, factors involved in the control of angiogenesis have been intensively investigated. A number of growth factors have been shown to be involved in the regulation of angiogenesis; these include fibroblast growth factors (FGFs), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor alpha (TGF $\alpha$ ), and hepatocyte growth factor (HGF). See for example Folkman et al, J. Biol. Chem., 267:10931-10934 (1992) for a review.

It has been suggested that a particular family of endothelial cell-specific growth factors, the vascular endothelial growth factors (VEGFs), and their corresponding receptors is primarily responsible for stimulation of endothelial cell growth and differentiation, and for certain functions of the differentiated cells. These factors are members of the PDGF/VEGF family, and appear to act primarily via endothelial receptor tyrosine kinases (RTKs). The PDGF/VEGF family of growth factors belongs to the cystine-knot superfamily of growth factors, which also includes the neurotrophins and transforming growth factor- $\beta$ .

Eight different proteins have been identified in the PDGF/VEGF family, namely two PDGFs (A and B), VEGF and five members that are closely related to VEGF. The five members closely related to VEGF are: VEGF-B, described in International Patent Application PCT/US96/02957 (WO 96/26736) and in U.S.

WO 00/52462

PCT/US00/05465

Patents 5,840,693 and 5,607,918 by Ludwig Institute for Cancer Research and The University of Helsinki; VEGF-C or VEGF2, described in Joukov et al, EMBO J. 15:290-298 (1996), Lee et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1988-1992 (1996), and U.S. Patents 5,932,540 and 5,935,540 by Human Genome Sciences, Inc; VEGF-D, described in International Patent Application No. PCT/US97/14696 (WO 98/07832), and Achen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:548-553 (1998); the placenta growth factor (PlGF), described in Maglione et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9267-9271 (1991); and VEGF3, described in International Patent Application No. PCT/US95/07283 (WO 96/39421) by Human Genome Sciences, Inc. Each VEGF family member has between 30% and 45% amino acid sequence identity with VEGF. The VEGF family members share a VEGF homology domain which contains the six cysteine residues which form the cystine-knot motif. Functional characteristics of the VEGF family include varying degrees of mitogenicity for endothelial cells, induction of vascular permeability and angiogenic and lymphangiogenic properties.

Vascular endothelial growth factor (VEGF), as its name implies, is an endothelial cell-specific mitogen. It has potent angiogenic activity, that is, it promotes the growth of new blood vessels. A vital physiological process, angiogenesis implicates a number of proteins of the blood and of the cells in the blood vessels. During the angiogenic process, mitogenic factors, such as VEGF, play an important role. However, the biochemical details of the role these factors play have not always been forthcoming.

Since the identification and characterization of VEGF, a number of important findings have focused attention on the activity of angiogenic factors and the elucidation of new factors. The early findings showed that angiogenesis is required for normal development and physiology. Processes such as embryogenesis, wound healing, and corpus luteum formation, all

WO 00/52462

PCT/US00/05465

involve angiogenesis and angiogenic factors. During wound healing, for example, VEGF mRNA levels increase suggesting a direct correlation between the expression of VEGF and the healing process. Also, a defect in VEGF regulation might be associated with wound healing disorders(Frank, S., et al, J. Biol. Chem. 270:12607-12613 (1995)).

Other important findings related to angiogenic factors indicate that persistent and unregulated angiogenesis exacerbates and/or causes diseases. For example, arthritis involves new capillaries invading the joint and destroying cartilage. In diabetes, new capillaries in the retina invade the vitreous humour, causing bleeding and blindness. (Folkman, J. and Shing, Y., J. Biol. Chem. 267:10931-10934 (1992).) The role of angiogenic factors in these and other diseases has not yet been clearly established.

Another important finding involves the connection between angiogenesis and tumor development. Both tumor growth and metastasis are angiogenesis-dependent processes. (Folkman, J. and Shing, Y., J. Biol. Chem. 267: 10931-10934 (1992).) For example, when tumor cells are introduced into an animal, the expression pattern of VEGF mRNA reveals expression at the highest level in cells at the periphery of necrotic, tumor growth areas. Numerous blood vessels were identified within these areas. The expression of VEGF in these areas suggests that hypoxemia, a state of deficient oxygenation, triggers expression and release of VEGF in the necrotic tumor. The expression of another vascular endothelial cell mitogen, VEGF-B, discussed more fully below, also has been directly correlated with tumor growth, especially in melanomas (see U.S. Patent No. 5,840,693).

VEGF is a member of a family of proteins structurally related to platelet-derived growth factor (PDGF). PDGF is a potent mitogen for smooth muscle cells, glial cells, and several other cell types. In one aspect, the members of the PDGF family

WO 00/52462

PCT/US00/05465

are characterized by the presence of eight conserved cysteine residues. In their active, physiological state, the proteins are dimers formed by disulfide bonding, by both inter- and intramolecular bonds, at the eight cysteine residues. In another aspect, the family members are related in their mitogenic actions, especially on endothelial and related cell types.

Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B), a non-glycosylated, highly basic growth factor, is another member of the PDGF family. With close structural similarities to VEGF, PDGF-A, PDGF-B, and PlGF (Placental Growth Factor), VEGF-B plays a role in vascularization of adult and embryonic tissues, and in muscle tissue in particular. VEGF-B acts also as an angiogenic mitogen. Northern blots show VEGF-B mRNA in a variety of mouse and human tissues, including heart, brain, and skeletal muscle. RT-PCR assays have demonstrated the presence of VEGF-B mRNA in melanoma, normal skin, and muscle.

Thus, VEGF-B is expressed throughout many tissues in mammals but most abundantly in heart, skeletal muscle, and pancreas. The expression pattern of VEGF-B is different from that of VEGF, although both are expressed in many tissues (Olofsson, B. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2576-2581 (1996)).

The mouse and human genes for VEGF-B are almost identical, and both span about 4 kb of DNA. The genes are composed of seven exons and their exon-intron organization resembles that of the VEGF and PlGF genes (Grimmond et al, Genome Res. 6:124-131 (1996); Olofsson et al, J. Biol. Chem. 271:19310-19317 (1996); Townson et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 220:922-928 (1996)). Presently, two isoforms of VEGF-B, generated by alternative splicing of mRNA, have been recognized (Grimmond et al, Genome Res. 6:124-131 (1996); Olofsson et al, J. Biol. Chem. 271:19310-19317 (1996); Townson et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 220:922-928 (1996)). These two secreted forms of VEGF-B have 167 (VEGF-B<sub>167</sub>) and 186 (VEGF-B<sub>186</sub>) amino acid residues,

WO 00/52462

PCT/US00/05465

respectively. The isoforms have an identical N-terminal domain of 115 amino acid residues, excluding the signal sequence, while the C-terminal domains differ. The common N-terminal domain is encoded by exons 1-5. Differential use of the remaining three exons gives rise to the two splice isoforms. By the use of an alternative splice-acceptor site in exon 6, an insertion of 101 bp introduces a frame-shift and a stop of the coding region of VEGF-B<sub>167</sub> cDNA. Thus, the two VEGF-B isoforms have differing C-terminal domains.

The different C-terminal domains of the two splice isoforms of VEGF-B affect their biochemical and cell biological properties. The C-terminal domain of VEGF-B<sub>167</sub> is structurally related to the corresponding region in VEGF, with several conserved cysteine residues and stretches of basic amino acid residues. Thus, this domain is highly hydrophilic and basic and, accordingly, VEGF-B<sub>167</sub> will remain cell-associated on secretion, unless the producing cells are treated with heparin or high salt concentrations. The cell-associated molecules binding VEGF-B<sub>167</sub> are likely to be cell surface or pericellular heparin sulfate proteoglycans. It is likely that the cell-association of this isoform occurs via its unique basic C-terminal region.

The C-terminal domain of VEGF-B<sub>186</sub> has no significant similarity with known amino acid sequences in the databases. The hydrophobic character of the C-terminal domain of VEGF-B<sub>186</sub> contrasts with the properties of the hydrophilic and basic C-terminal domain of VEGF-B<sub>167</sub>. This is supported by the observation that VEGF-B<sub>186</sub> does not remain cell-associated on its secretion. Recent evidence indicates that this isoform is proteolytically processed, which regulates the biological properties of the protein (Olofsson et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:11709-11714 (1998)).

WO 00/52462

PCT/US00/05465

The isolation and characteristics including nucleotide and amino acid sequences for the human and mouse VEGF-B and the respective isoforms are described in detail in PCT/US96/02957, in U.S. Patents 5,840,693 and 5,607,918 by Ludwig Institute for Cancer Research and The University of Helsinki and in Olofsson et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2576-2581 (1996). The entire disclosures of the International Patent Application PCT/US97/14696 (WO 98/07832), U.S. Patents 5,840,693 and 5,607,918 are incorporated herein by reference.

Like its related mitogenic proteins, VEGF-B exists as a disulfide-linked homodimers *in vivo*. Both isoforms of VEGF-B also form heterodimers with VEGF, consistent with the conservation of the eight cysteine residues involved in inter- and intramolecular disulfide bonding of PDGF-like proteins. Furthermore, co-expression of VEGF-B and VEGF in many tissues suggests that VEGF-B-VEGF heterodimers occur naturally. Heterodimers of VEGF-B<sub>167</sub>-VEGF remain cell-associated. In contrast, heterodimers of VEGF-B<sub>186</sub> and VEGF are freely secreted from cells in a culture medium. VEGF also forms heterodimers with PIGF (DiSalvo, et al, J. Biol. Chem. 270:7717-7723 (1995)). The production of heterodimeric complexes between the members of this family of growth factors could provide a basis for a diverse array of angiogenic or regulatory molecules.

As noted above, the PDGF/VEGF family members act primarily by binding to receptor tyrosine kinases. In general, receptor tyrosine kinases are glycoproteins, which consist of an extracellular domain capable of binding a specific growth factor(s), a transmembrane domain, which is usually an alpha-helical portion of the protein, a juxtamembrane domain, which is where the receptor may be regulated by, e.g., protein phosphorylation, a tyrosine kinase domain, which is the enzymatic component of the receptor and a carboxy-terminal tail, which in

WO 00/52462

PCT/US00/05465

many receptors is involved in recognition and binding of the substrates for the tyrosine kinase.

Five endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases have been identified, namely VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1), VEGFR-3 (Flt4), Tie and Tek/Tie-2. These receptors differ in their specificity and affinity. All of these have the intrinsic tyrosine kinase activity which is necessary for signal transduction.

The only receptor tyrosine kinases known to bind VEGFs are VEGFR-1, VEGFR-2 and VEGFR-3. VEGFR-1 and VEGFR-2 bind VEGF with high affinity, and VEGFR-1 also binds PlGF. VEGF-B binds to VEGFR-1 with high affinity, but not to VEGFR-2 or -3 (Olofsson et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:11709-11714 (1998)). VEGF-C has been shown to be the ligand for VEGFR-3, and it also activates VEGFR-2 (Joukov et al, The EMBO Journal 15:290-298 (1996)). VEGF-D binds to both VEGFR-2 and VEGFR-3 (Achen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:548-553 (1998)). A ligand for Tek/Tie-2 has been described in International Patent Application No. PCT/US95/12935 (WO 96/11269) by Regeneron Pharmaceuticals, Inc. The ligand for Tie has not yet been identified.

Recently, a novel 130-135 kDa VEGF isoform specific receptor has been purified and cloned (Soker et al, Cell 92:735-745 (1998)). The VEGF receptor was found to specifically bind the VEGF<sub>165</sub> isoform via the exon 7 encoded sequence, which shows weak affinity for heparin (Soker et al, Cell 92:735-745 (1998)). Surprisingly, the receptor was shown to be identical to human neuropilin-1 (NP-1), a receptor involved in early stage neuromorphogenesis. PlGF-2 also appears to interact with NP-1 (Migdal et al, J. Biol. Chem. 273:22272-22278 (1998)).

VEGFR-1, VEGFR-2 and VEGFR-3 are expressed differently by endothelial cells. Generally, both VEGFR-1 and VEGFR-2 are expressed in blood vessel endothelia (Oelrichs et al, Oncogene 8:11-18 (1992); Kaipainen et al, J. Exp. Med. 178:2077-2088

WO 00/52462

PCT/US00/05465

(1993); Dumont et al, Dev. Dyn. 203:80-92 (1995); Fong et al, Dev. Dyn. 207:1-10 (1996)) and VEGFR-3 is mostly expressed in the lymphatic endothelium of adult tissues (Kaipainen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 9:3566-3570 (1995)). VEGFR-3 is also expressed in the blood vasculature surrounding tumors.

Although VEGFR-1 is mainly expressed in endothelial cells during development, it can also be found in hematopoietic precursor cells during early stages of embryogenesis (Fong et al, Nature 376:66-70 (1995)). In adults, monocytes and macrophages also express this receptor (Barleon et al, Blood 87:3336-3343 (1995)). In embryos, VEGFR-1 is expressed by most, if not all, vessels (Breier et al, Dev. Dyn. 204:228-239 (1995); Fong et al, Dev. Dyn. 207:1-10 (1996)).

Transgenic animal models are useful tools to study the functions and physiological activities of proteins, and a variety of such animals have been produced for this purpose. One particular technique for producing transgenic animals involves the process of homologous recombination. In homologous recombination, all or part of a genomic sequence is replaced with another DNA containing homologous sequences. Through transgenic manipulation and homologous recombination, a gene or part of a gene in the cells of an animal can be changed. Changing the gene to encode a protein that no longer functions as the native protein does creates a null mutant or null allele. (See, for example, U.S. Patent No. 5,557,032.)

To study VEGF function and physiology, transgenic embryos containing a null mutant for the VEGF gene have been reported. (Carmetliet, P., et al., Nature, 380:435-439 (1996).) Some important findings resulted. The formation of blood vessels was abnormal, but not abolished, in embryos heterozygous for the VEGF null mutant. Embryos homozygous for the VEGF null mutant demonstrate an even greater impairment in angiogenesis. The homozygous embryos died in mid-gestation. Similar phenotypes

WO 00/52462

PCT/US00/05465

were observed in heterozygous offspring embryos generated by germ line transmission. However, since the Carmetliet et al. study was confined to embryos, no phenotype or use of animals was reported. Furthermore, the production of the VEGF transgenic embryos has not produced findings on the angiogenic properties or tumor growth modulating properties of all VEGF-like proteins.

Thus, despite the efforts of the art to elucidate the function and physiology of angiogenic factors, these factors are still incompletely understood, and there remains a need for means which can be used to evaluate the activities of angiogenic growth factors such as VEGF-B, as well as their roles in the various disease states discussed above, and/or which are useful to develop and/or evaluate other angiogenic peptides.

Summary of the Invention

In one of its aspects, the invention involves use of transgenic animals that contain a mutated VEGF-B gene. The VEGF-B gene was mutated through a homologous recombination process. There are a number of uses for these transgenic animals. For example, study of the animals may provide important information on the therapeutic use and administration of VEGF-B polypeptides, fragments thereof, or analogs such as small molecules. In particular, the transgenic animals of the invention may be useful in elucidating the effects of VEGF-B and/or other cytokines on physiological phenomena such as permeability, inflammation and/or tissue repair. The animals or cells derived from the animals are useful in screening assays to identify angiogenic and/or tumor growth modulating compounds. The animals can also be used in methods to test VEGF-B agonists for *in vivo* distribution and function and non-toxicity and VEGF-B containing molecules.

In another aspect, the invention provides a method for using a transgenic, non-human animal containing at least one non-functional mutated VEGF-B allele. The transgenic animal is

WO 00/52462

PCT/US00/05465

produced by introducing a transgenic DNA into embryonic stem cells of a non-human animal, preferably a mouse. The transgenic DNA has a region homologous with a sequence of VEGF-B. Then, a cell is selected where the transgenic DNA has integrated into the genomic DNA of the stem cell at the site of at least one copy of an endogenous, genomic VEGF-B sequence. This cell is introduced into a blastocyst of a developing animal and allowed to develop into a transgenic animal.

The transgenic DNA used to produce transgenic animals useful in the method of the invention comprises a sequence of nucleotides from the VEGF-B gene which has been changed, mutated, or modified in a number of ways known in the art. Thus, the DNA used to generate the transgenic animals can contain a number of different DNA sequences. The selection of an appropriate sequence depends on the desired effect. For example, at least one codon for cysteine can be changed or deleted. The resulting animal may produce a VEGF-B with an altered ability to form dimers with native VEGF-B or another PDGF-like protein. In a preferred embodiment, seven of the eight cysteine residues of VEGF-B have been deleted, resulting in a null mutant of VEGF-B.

In yet another aspect, the invention provides a method for screening compounds for the ability to effect angiogenesis or to modulate tumor growth or progression or to increase the musculature of the heart in a transgenic animal. The method comprises introducing the compound to a transgenic animal and detecting the vascular development in the animal. Alternatively, the method comprises introducing a tumor cell into a transgenic animal, introducing a compound into the same animal, and detecting the tumor development in the animal.

Numerous embodiments for the method described above are included within the scope of the invention. For example, a method for screening a compound for the ability to restore or detectably effect activity of the VEGF-B gene product comprising

WO 00/52462

PCT/US00/05465

adding a compound to an appropriate cell line or introducing the compound into a transgenic animal can be devised. Transgenic animals and cell lines generated according to this invention can be used in these methods. Such animal or cell line systems can also be used to select compounds, which could be able to restore or to modulate the activity of the VEGF-B gene and/or angiogenesis. The compound may be in the form of a protein (recombinant or synthesized *in vitro*, for example) or in the form of DNA encoding VEGF-B or an analog of VEGF-B. This can be naked genomic DNA or cDNA operatively linked to a promoter, which could be further linked to a viral or bacterial vector. The DNA could be incorporated into a liposome structure, as exemplified in Lui et al., *Nature Biotechnology*, 15:167-172 (1997). The DNA or protein could also be provided to VEGF-B knock out mice embryos at the 8-16 cell embryonic stage.

The transgenic animals obtained with the mutant VEGF-B gene sequence (wildtype or mutated fragments thereof) can be used to generate double transgenic animals. For this purpose the mutant VEGF-B transgenic animal can be mated with other transgenic animals of the same species or with naturally occurring mutant animals of the same species. The resulting double transgenic animal, or cells derived from it, can be used in the same applications as the mutant parent transgenic animal.

Known methods to mutate or modify nucleic acid sequences can be used to generate VEGF-B mutant animals, cell lines, or sequences useful in this invention. Such methods include, but are not limited to, point mutations, site-directed mutagenesis, deletion mutations, insertion mutations, mutations obtainable from homologous recombination, and mutations obtainable from chemical or radiation treatment of DNA or cells bearing the DNA. PCR analysis or DNA sequencing is used to determine the mutation generated if desired or necessary. The mutant animals, cell lines or sequences are then used in the DNA sequences, systems,

WO 00/52462

PCT/US00/05465

assays, methods or processes described. The mutated or modified DNA will, by definition, be different, or not identical to the genomic DNA. Mutant animals are also created by mating a first transgenic animal containing the sequences described here or made available by this invention, with a second animal. The second animal can contain DNA that differs from the DNA contained in the first animal. In such a way, various lines of mutant animals can be created.

Furthermore, recombinant DNA techniques are available to mutate the DNA sequences described here, as above, link these DNA sequences to expression vectors, and express the VEGF-B protein or mutant. The VEGF-B mutant can thus be analyzed for biochemical or behavioral activity. In such a way, mutated DNA sequences can be generated that prevent the expression of an efficient VEGF-B.

The "modified VEGF-B DNA" of this invention refers to a sequence of nucleotides from the VEGF-B gene that has been modified by an *in vitro* or recombinant DNA technique. The modified VEGF-B DNA does not contain the exact sequence of nucleotides as the gene from the embryonic stem cells into which the transgenic DNA is to be introduced. Modifications including deletions, substitutions, and insertions of nucleotides into the VEGF-B DNA sequence are specifically included. As an example, one particular modified VEGF-B DNA contains a deletion of part of exon three and all of exon 4 of the mouse VEGF-B DNA sequence. The restriction map of the VEGF-B locus (Figures 1 and 3) can be used to design numerous modified VEGF-B DNAs by deleting at least one restriction fragment.

The methods of the invention provide useful models for deciphering the angiogenic and tumor growth modulating activity of various substances, including angiogenic growth factors such as VEGF-B. Therapeutic, diagnostic, and regulatory uses for VEGF-B can be determined from model systems employing the

WO 00/52462

PCT/US00/05465

transgenic animals with altered VEGF-B genes. In particular, the transgenic animals may be used according to the invention in the development of treatment protocols based upon the ability of VEGF-B to influence physiological phenomena such as permeability, inflammation and/or tissue repair. In addition, the methods of the invention are useful to evaluate other polypeptides or small molecules for VEGF-B-like activity such as angiogenic activity or the activity that VEGF-B may have on endothelial cell gene expression which could affect their fundamental characteristics, e.g. the uptake of nutrients from the bloodstream to a particular tissue.

The transgenic animals may be used according to the invention to elucidate the developmental and homeostatic functions of VEGF-B by monitoring and comparing the effects of different physiological stresses applied to wildtype (+/+), heterozygote (+/-) and null allele (-/-) animals. For example, the effects of VEGF-B on blood clotting times could be monitored through the use of wounding assays; the effects of VEGF-B on tumor growth could be determined by monitoring the proliferation of implanted tumor cells; the effects of VEGF-B on physical activity could be discovered by comparative physical activity studies, and/or the effects of VEGF-B on stress reactions could be determined through application of severe stresses such as exposure to compressed air. In addition, effects of VEGF-B on heart rate, cardiac output (e.g. blood pressure) and/or hemodynamic properties could be assayed by using the transgenic animals of the invention in procedures analogous to those described by Zhou et al., *Nature Medicine* 4:201-07 (1998).

The role of VEGF-B in normal heart function can be investigated by comparing VEGF-B deficient mice (-/-) and normal (+/+) litter mates. Loss of VEGF-B expression reveals some significant differences. These differences indicate that the

WO 00/52462

PCT/US00/05465

deficient animals have atrioventricular (AV) conduction defects and signs that may indicate ischemia of the myocardium.

A further aspect of the invention provides a method for screening a compound for atrioventricular conduction or ischemia modulating activity. This method comprises introducing the compound being screened into a VEGF-B deficient non-human animal, and assaying the effect on atrioventricular conduction or ischemia in this animal. This method may also be used to screen more than one compound for atrioventricular conduction or ischemia modulating activity from example when screening a phage, peptide or combinatorial library. Representative of a soluble peptide library and its use is R. A. Houghten, Gene, 137:7-11 (1993). An example of a random peptide-presenting phage library is Barry et al, Nat. Med. 2:299-305 (1996). Combinatorial libraries in general and their uses are discussed in K. S. Lam, Anticancer Drug Des. 12:145-167 (1997); Nefzi et al, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 8:2273-2278 (1998); Coffen et al, Medicinal Chemistry Research, 8:206-218 (1998); and Li et al, Drug Discovery Today, 3:105-112 (1998).

Another related aspect is directed to a method of treatment or alleviation of atrioventricular conduction defects or ischemia comprising the step of administering an effective atrioventricular conduction defect or ischemia alleviating amount of VEGF-B, or a fragment or analog thereof having the biological activity of VEGF-B.

The term "analog" or "functional analog" refers to a modified form of the full-length or a fragment thereof of VEGF-B in which at least one amino acid substitution has been made such that said analog retains substantially the same biological activity as the unmodified form of the full-length or a fragment thereof of VEGF-B *in vivo* and/or *in vitro*.

The expression "biological activity of VEGF-B" is to be understood to mean the ability to stimulate one or more of

WO 00/52462

PCT/US00/05465

endothelial cell proliferation, differentiation, migration, survival or angiogenesis or vascular permeability.

The VEGF-B polypeptides and VEGF-B analogs used in the treatment or alleviation of atrioventricular conduction defects or ischemia also may be employed in combination with a pharmaceutically acceptable non-toxic salt thereof, and a pharmaceutically acceptable solid or liquid carrier or adjuvant.

Examples of such a carrier or adjuvant include, but are not limited to, saline, buffered saline, Ringer's solution, mineral oil, talc, corn starch, gelatin, lactose, sucrose, microcrystalline cellulose, kaolin, mannitol, dicalcium phosphate, sodium chloride, alginic acid, dextrose, water, glycerol, ethanol, thickeners, stabilizers, suspending agents and combinations thereof. Such compositions may be in the form of solutions, suspensions, tablets, capsules, creams, salves, elixirs, syrups, wafers, ointments or other conventional forms. The formulation to suit the mode of administration. Compositions comprising a peptide of the invention will contain from about 0.1% to 90% by weight of the active compound(s), and most generally from about 10% to 30%.

For intramuscular preparations, a sterile formulation, preferably a suitable soluble salt form of the VEGF-B, such as hydrochloride salt, can be dissolved and administered in a pharmaceutical diluent such as pyrogen-free water (distilled), physiological saline or 5% glucose solution. A suitable insoluble form of the compound may be prepared and administered as a suspension in an aqueous base or a pharmaceutically acceptable oil base, e.g. an ester of a long chain fatty acid such as ethyl oleate.

The dose(s) and route of administration will depend upon the nature of the patient and condition to be treated, and will be at the discretion of the attending physician or veterinarian. Suitable routes include oral, subcutaneous, intramuscular,

WO 00/52462

PCT/US00/05465

intraperitoneal or intravenous injection, parenteral, topical application, implants etc. For example, an effective amount of a peptide of the invention or antibody is administered to an organism in need thereof in a dose between about 0.1 and 100 mg/kg body weight, and more preferably 1 to 10 mg/kg body weight. Monitoring the progression of the therapy, patient side effects, and circulating polypeptide levels will provide additional guidance for an optimal dosing regimen. Topical application of VEGF-B, or a fragment or analog thereof may be used in a manner analogous to VEGF.

Another method of treatment or alleviation of atrioventricular conduction defects or ischemia comprises the step of administering an effective amount of a nucleic acid sequence encoding for VEGF-B, or a fragment or analog thereof having the biological activity of VEGF-B, where said nucleic acid is capable of encoding an effective amount of said VEGF-B, or a fragment or analog thereof to treat or alleviate the atrioventricular conduction defect or ischemia. The nucleic acid sequence preferably is operably linked with a promoter sequence.

The nucleic acid can be naked and/or in a vector or liposome. Preferred vectors of the invention are expression vectors in which a nucleic acid according to the invention is operatively connected to one or more appropriate promoters and/or other control sequences, such that when an appropriate cell is transformed or transfected with the nucleic acid cloned into the vector, it is capable of expressing the polypeptide of the invention. The most preferred vectors are those suitable for transfection for gene therapy, such as adenoviral-, vaccinia- or retroviral-based vectors or liposomes. A variety of such vectors is known in the art.

Another aspect of the invention provides a method for diagnosing heart disease in a test subject that involves taking

WO 00/52462

PCT/US00/05465

an electrocardiogram and looking for prolongation of the PQ interval and/or depression of the ST complex (or U-wave).

A still further aspect of the invention provides methods for diagnosing heart disease characterized by a loss of VEGF-B expression in a test subject. These methods can involve looking for the loss of VEGF-B expression either by looking for a lack of amplification of VEGF-B DNA using the polymerase chain reaction or a lack of detection of the binding of a specific binding reagent to VEGF-B. The specific binding reagent is preferably an antibody to VEGF-B. The most preferred antibody is a monoclonal antibody to VEGF-B.

The antibody according to the invention may be labeled with a detectable label. The antibody may be coupled to a suitable supermagnetic, paramagnetic, electron dense, ecogenic or radioactive or non-radioactive agent for imaging. Examples of radioactive agents/labels include a radioactive atom or group, such as  $^{125}\text{I}$  or  $^{32}\text{P}$ . Examples of non-radioactive agents/labels include enzymatic labels, such as horseradish peroxidase or fluorimetric labels, such as fluorescein-5-isothiocyanate (FITC). Labeling may be direct or indirect, covalent or non-covalent.

Brief Description of the Drawings

The invention will be described in further detail hereinafter with reference to the accompanying drawings in which:

Fig. 1 is a schematic representation of a strategy for producing a null mutation of the mouse VEGF-B gene;

Fig. 2 shows agarose gel electrophoresis of PCR amplifications of tail DNA from the F2 generation of litter-mate homozygote VEGF-B (+/+) , heterozygote (+/-) and homozygote knock out mice for the VEGF-B locus (-/-);

WO 00/52462

PCT/US00/05465

Fig. 3 shows a detailed restriction map of the mouse VEGF-B locus. Restriction enzymes and corresponding symbols are listed below;

Fig. 4 shows a schematic drawing of the procedures used to generate a transgenic vector targeted for the mouse VEGF-B locus. Each of constructs A-E, described below, are shown in an exemplified method to generate a transgenic vector targeted to the mouse VEGF-B locus;

Figs. 5a and 5b are Northern blots of RNA from heart and skeletal muscle tissues of wild type (+/+), heterozygote (+/-) and knock-out (-/-) mice,

Fig. 6 is a graph comparing the growth of a transplanted tumor in litter-mate homozygous VEGF-B (+/+) and VEGF-B deficient (-/-) mice, and

Fig. 7A and 7B are typical electrocardiograms from litter-mate homozygous VEGF-B (+/+) and VEGF-B deficient (-/-) mice.

#### Detailed Description of Illustrative Embodiments

The descriptions and examples below are exemplary of the embodiments and scope of this invention. The invention is not limited to the scope of this description. Persons skilled in the art will appreciate that the following examples and embodiments may be modified using techniques known in the art. For example, variations in the nucleic acid sequences described or claimed can be produced by known methods without altering the effects or advantages the inventors have shown. Such variations are therefore included within the scope of this description and invention. Detailed protocols for many of the techniques known in the art are described in Ausubel, F.M. et al. Eds. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Boston, MA (1989), and Supplements through Jan. 1997, hereinafter "Ausubel (1989)," as well as in Sambrook, J., et al., Molecular Cloning.

- 19 -

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/52462

PCT/US00/05465

A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), hereinafter "Sambrook (1989)," and Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual, edited by B. Hogan, R. Beddington, F. Constantini and E. Lacy, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1994), hereinafter "Hogan (1994)." These documents are specifically incorporated herein by reference. These documents may be relied on to enable one skilled in the art to practice the embodiments of the invention.

As used herein the phrases "null allele," "null mutation," and "null mutant" refer to gene sequences encoding an altered protein as compared to the wildtype protein. In general, the "null mutant" is altered in a manner resulting in a protein substantially incapable of its primary function. For example, a VEGF-B null mutant is a DNA sequence encoding a protein that no longer stimulates growth of vascular endothelial cells or which fails to exhibit any of the other effects of VEGF-B discussed above. However, structures related to other biochemical functions of VEGF-B, such as heparin binding and dimerization, may be present in the protein encoded by the null allele. In addition, the term "null mutant" can refer to the animal or cell bearing a gene sequence of an altered protein, as discussed above.

Transgenic DNA refers to DNA that is capable of being introduced into a cell so that the DNA is incorporated into the genome of the cell. The cell may be capable of giving rise to a transgenic animal, which contains the transgenic DNA. Generally, the transgenic DNA is constructed as a vector, a transgenic vector, for administration into a particular cell. Such a vector need not be in a particular structural form, such as a circular form.

A recombinant gene or sequence simply means the gene or sequence has been manipulated in any one of a number of recombinant DNA techniques known in the art.

WO 00/52462

PCT/US00/05465

As used herein the term "modified VEGF-B DNA" refers to a VEGF-B nucleotide sequence from an animal which has been modified by one or more point mutations, site-directed mutagenesis, deletion mutations, insertion mutations, mutations obtainable from homologous recombination, and/or mutations obtainable from chemical or radiation treatment of DNA or cells bearing the DNA, or which is linked to another DNA sequence, such as a marker sequence, which is not associated with wildtype VEGF-B DNA in nature. The modified VEGF-B DNA may retain some or all of the activities of wild-type VEGF-B DNA, e.g. Flt-1 receptor binding motif.

The VEGF-B gene and DNA sequences referred to herein are not limited to genes or sequences from mouse or human. Any animal species can be used as a source of the VEGF-B gene. In the recombinant sequences incorporated into a transgenic DNA, the sequences homologous to the VEGF-B gene in a particular embryonic cell need not be from the same species as the embryonic cell.

The process for generating transgenic animals is essentially the same regardless of the species involved. Briefly, transfected cells are injected into embryos at a stage at which they are capable of integrating the transfected cells, for example, at the blastocyst stage. The embryo is then replanted into a surrogate mother, resulting in chimeric offspring possessing the transgenic DNA. Thus, all that is required is the appropriate embryonic stem cell from an animal.

The production of embryonic stem (ES) cells from a variety of animals is well known to those of ordinary skill in the art. Embryonic stem cells are available from a number of sources. These include mice, rats, cows, pigs, sheep, and other animals. For example, Joyner A.L., (1993), Gene Targeting, A practical approach, edited by Wood, R. and Hames, B.D., The Practical Approach Series, vol. 126, Oxford IRL Press (specifically incorporated herein by reference), describes methods of producing

WO 00/52462

PCT/US00/05465

ES cells. Also, Manipulating the Mouse Embryo. A laboratory Manual, edited by B. Hogan, R. Beddington, F. Constantini and E. Lacy, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1994) describes manipulating the mouse embryo. In addition, Couly and Le Douarin, Development 108:543-555 (1990), describes methods for isolating and manipulating chicken and quail embryos. Kimmel and Warga, Nature 327:234-237 (1987), describe isolation and manipulation of zebrafish embryos. And Ware et al., "Development of Embryonic Stem Cell Lines from Farm Animals," Society for the Study of Reproduction, 38:241 (1988) discusses an embryonic stem cell culture condition amenable for many species like mouse, cattle, pig, and sheep. Accordingly, the invention is as applicable to other animals as it is to the specifically exemplified mice.

Various methods for inserting DNA into animal cells are known in the art. For example, transgenic DNA can be microinjected into appropriate cells. Viral vectors can be used to introduce the DNA into appropriate cells and the genome of those cells (See, for example, Tsukui et al., Nature Biotechnology 14:982-985 (1996)). Cells can also be manipulated *in vitro* through transfection and electroporation methods (See Ausubel (1989) and Hogan (1994)).

Generally, transgenic DNA incorporates into a cell genome through either random integration or homologous recombination. Persons skilled in the art are familiar with strategies for increasing the relative frequency of homologous recombination versus random integration, in ES cells and other cells, in order to identify and isolate cells wherein homologous recombination has occurred (see, Ausubel (1989), U.S. Patent No. 5,557,032, and Hogan (1994), for example). The design of transgenic DNA vectors may involve incorporating some portion of the cellular sequence into the transgenic DNA, or a sequence homologous to the cellular sequence. That portion must be sufficiently homologous to the

WO 00/52462

PCT/US00/05465

cellular sequence to allow the transgenic DNA and the cellular DNA to hybridize *in vivo*, for homologous recombination to occur.

The transgenic DNA to be inserted into an embryonic stem cell, preferably comprises 5' and 3' regions of homology. These regions of homology function to promote the process of homologous recombination in the embryonic stem cell. Numerous publications, on which persons of skill in the art may rely, discuss how to construct regions of homology for use in homologous recombination. For example, Thomas & Capecchi, *Cell*, 51:503-512 (1987), Mansour et al., *Nature*, 317:348-352 (1988), and Capecchi, U.S. Patent No. 5,487,992 each discuss strategies for designing regions of homology in a homologous recombination technique. Thus, methods for designing a sequence for homologous recombination are known in the art.

However, homologous recombination does not occur for each cell where the transgenic DNA has been introduced. In addition, it is often the case that more than one copy of the cellular DNA sequence desired to be changed or replaced through homologous recombination exists in the cell, such as in genes with more than one allele. Thus, through homologous recombination, some of the cells may incorporate the transgenic DNA at only one cellular sequence while other cells will incorporate the transgenic DNA into more than one cellular sequence, or even into every cellular sequence. Accordingly, both homozygous and heterozygous animals may be produced from the ES cells subjected to homologous recombination with the transgenic DNA. A homozygous animal may be mated with wildtype animals to produce further transgenic animals heterozygotic for the transgenic DNA.

#### Examples

To analyze the role of VEGF-B in development and maintenance of the vasculature *in vivo*, under both normal and diseased states, mice carrying mutant VEGF-B alleles were generated. One

- 23 -

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/52462

PCT/US00/05465

VEGF-B allele in the mice was functionally inactivated by the technique of homologous recombination. Mice generated from these cells, thus, carried one mutant and one wildtype VEGF-B allele.

Fig. 1 is composed of four subparts, 1A through 1D, and is a schematic representation of the strategy followed in producing a null mutation of the mouse VEGF-B gene. Fig. 1A is a schematic illustration of the exon-intron organization of the mouse VEGF-B gene. Fig. 1B is a restriction map of the VEGF-B locus in which the cleavage sites for a number of restriction enzymes are indicated. In the drawing the restriction enzymes are identified as follows: N = NotI; S = SpeI; K = KpnI; H = HindIII; and E = EcoRI. The SpeI-KpnI fragment, which is removed in an exemplified transgenic DNA construct described hereinafter, is indicated by the filled box. The transgenic DNA construct of Fig. 1 C) was used to generate a mutant VEGF-B allele. The construct contains a 5' homologous fragment (NotI/blunted SpeI) and a 3' homologous fragment (blunted KpnI/HindIII) of the VEGF-B gene, which flank the pPGK-neocassette (neo). Fig. 1D shows the locations of the DNA probes used to identify wildtype and mutant alleles of VEGF-B in Southern blot analysis.

In Figure 2, the migration of the amplified wildtype band (wt) and of the amplified band from the neomycin cassette (neo) are indicated to the right.

In the following sections, detailed procedures of how animals carrying mutant VEGF-B alleles were produced and the primary analysis of the resulting mouse phenotype are described.

Example 1: Selection of VEGF-B Sequences Useful as Transgene.

The DNA used to generate a transgenic animal can contain a number of different DNA sequences. The selection of an appropriate sequence depends on the desired effect. For example, if an animal possessing a null mutant of VEGF-B is desired, the transgenic DNA contains sequences encoding a protein that is

WO 00/52462

PCT/US00/05465

incapable of VEGF-B primary function as a vascular endothelial cell mitogen. While assays to determine the mitogenic activity of a mutated protein may be used, structural information on the VEGF-B gene can also be used to accurately deduce the effect of a particular mutation scheme.

In this example, a portion of the VEGF-B mouse gene was deleted. The deleted portion contains seven of the eight cysteine residues important for disulfide bonding. As noted above, VEGF-B is a member of the PDGF family of growth factors. As the members of the family are structurally related, the effects of mutations on other PDGF family members can be extrapolated to indicate the effect on VEGF-B. Accordingly, a mutation in VEGF producing a particular effect can likely result in the same or similar effect in VEGF-B. Likewise, mutations in the other members of the PDGF family can be used to create mutations in the VEGF-B gene. This is especially the case where the structural information on all of the family members, or even with one other family member, indicates a conserved structure related to specific activity. With these considerations in mind, a null mutant was created wherein seven of the eight cysteine residues were deleted. Since the cysteine residues were known, from data on the PDGF family, to be involved in disulfide bonding and dimerization, a deletion of seven of the cysteines would predictably result in a nonfunctional, mutant VEGF-B protein. Further details on the selection of sequences in the transgenic DNA used for this invention follow.

In order to select the DNA sequences to be modified in the invention, the gene for mouse VEGF-B first was cloned from a mouse λFIXII-library (Stratagene; La Jolla, CA) using pcif-2 as the probe. The details of this procedure are described in Olofsson et al., *J. Biol. Chem.*, 271:19310-19317 (1996) (specifically incorporated herein by reference). Three λ-clones denoted 10, 11 and 12, each carrying about 20 kb of mouse genomic

WO 00/52462

PCT/US00/05465

DNA, were isolated and characterized. A detailed restriction map of the genomic DNA was generated by digestion of the λDNA with different restriction enzymes followed by identification of the restriction fragments by Southern blotting. Various  $^{32}\text{P}$ -labeled oligonucleotide probes obtained from the sequence of the mouse cDNA clones were used in the Southern blotting.

The information obtained from the restriction map of the λDNA harboring the VEGF-B gene was used to select a DNA for transgenesis. The DNA selected depends on the properties, characteristics, genotype, or phenotype the transgenic animal is to possess. Various properties, characteristics, genotypes, or phenotypes may be desired. For example, an animal in which the VEGF-B DNA has been linked to a marker sequence, such as  $\beta$ -galactosidase, green fluorescent protein, or luciferase or the like known in the art, may be desired for assays to determine the localization of expressed VEGF-B protein. An animal with VEGF-B DNA operably linked to highly inducible promoter or promoter directing expression in mammary tissue may be desired for purposes of obtaining VEGF-B protein from the animal. Many promoters or expression systems that may be used are known in the art. In addition, mutant VEGF-B sequences, once operably inserted into a transgenic animal, may provide research animals for determining the molecular basis of angiogenesis or tumor development.

In one transgenic protocol, a null allele of the VEGF-B gene is desired. The gene product of the null allele would be non-functional with respect to the angiogenic properties of VEGF-B. Animals with a null allele of VEGF-B can be useful in a variety of assays to identify compounds that effect angiogenesis in an animal, for example.

One method for producing a null allele involves deleting or modifying the DNA sequence to prevent the formation of intramolecular or intermolecular disulfide bonds, or both.

WO 00/52462

PCT/US00/05465

Specifically, regions encoding cysteine residues known to or believed to be involved in disulfide bonding are deleted. Alternatively, individual cysteine residues are mutated by a point mutation or site-directed mutagenesis procedure, many of which are known in the art. However, null alleles can be produced in a number of other ways. From the restriction map of VEGF-B, for example, convenient restriction sites can be selected for creating deletion mutants.

In principle, there are many ways of creating a null mutation, including, but not limited to: (i) deleting the entire gene; (ii) deleting a critical protein-coding sequence; and (iii) deleting a transcription regulatory sequence. Null mutations may also occur if the mutation affects splicing, mRNA stability, etc. Also, insertions or substitutions that alter the reading frame or introduce premature stop codons may cause null mutations.

From the restriction map shown in Figure 1, one way of making a targeted, transgenic construct that would introduce a null mutation in the VEGF-B gene is by deleting a restriction fragment. Insertion of PTK neo into the "B" site in exon 1 likely creates a null mutation. From a more detailed restriction map, Figure 3, other strategies may be devised. For example, deletions of any of exons 1, 2, 3, 4, or 5, and deletions of combinations of more than one exon can also be devised.

Another method for producing a null mutant involves deleting those regions involved in receptor binding. For both PDGF and VEGF, structural information regarding receptor binding exists and is known in the art. That information can be used to delete related portions of the VEGF-B gene to create a null allele. Likewise, VEGF-B binding to receptor Flt-1 and methods for identifying VEGF-B analogs that bind to receptor Flt-1 are discussed in co-pending U.S. application Serial No. 08/994,540, specifically incorporated herein by reference. That information can be used to generate null alleles for VEGF-B as well.

WO 00/52462

PCT/US00/05465

From the discussion above, one skilled in the art will appreciate that a number of techniques known in the art can be used to design null alleles for VEGF-B. The invention, therefore, is not limited to the specifically exemplified deletion in generating a transgenic animal bearing a null allele of VEGF-B.

Example 2: Production of Transgenic Vector with VEGF-B Deletion Mutant.

In one embodiment of the invention, seven out of the eight cysteine residues in the amino terminal domain of VEGF-B were removed. This deletion disrupts three intramolecular disulfide bonds as well as two intermolecular disulfide bonds used for covalent dimerization of the mature VEGF-B molecule. To do this, a 330 bp SpeI-KpnI fragment was deleted. The fragment contains part of exon 3 and the whole of exon 4 of the VEGF-B gene. Specifically, 33 amino acids encoded by the 3' part of exon 3 and all 24 amino acids of exon 4 were deleted. The resulting VEGF-B protein generated from the targeted allele is nonfunctional as it lacks these critical amino acids and the allele is a null allele.

The starting materials for the generation of a recombinant transgenic vector lacking the SpeI\KpnI fragment of VEGF-B were a 10 kb NotI\HindIII fragment from λ-clone 10, subcloned into plasmid pBluescript™ (Stratagene) (construct A), and a 1.7 kb pPGK-neo cassette (Sibilia, M. Science 269:234-238 (1995)) cloned into pBluescript (construct B).

The 1.2 kb KpnI/Hind III fragment used to generate the 3' region of the transgenic vector was isolated by digesting the 10 kb VEGF-B fragment from construct A with KpnI, generating blunt ends from the KpnI sticky ends with T4 polymerase, and finally cleaving with HindIII. This and all subsequent fragments were isolated on low gelling temperature (LGT) agarose gels made in

WO 00/52462

PCT/US00/05465

1 x TBE (Tris Borate EDTA) buffer. The isolated 1.2 kb fragment was then ligated into EcoRV and HindIII digested pBluescript vector, resulting in construct C.

The 5' fragment of the transgenic vector was isolated from construct A by cleaving with NotI/SpeI. The isolated fragment was then ligated into NotI/SpeI digested construct C to generate construct D.

The pPGK-neo cassette was isolated by digesting construct B with NotI/HindIII and generating blunt ends with Klenow fragment. The resulting fragment was gel purified and then ligated into construct D digested with EcoRI and blunted with the Klenow fragment, resulting in construct E. This 11.2 kb vector with the pPGK-neo cassette inserted in the forward direction was chosen as the targeting vector for transgenesis. A schematic of constructs A-E is found in Figure 4.

A Southern blot assay was used to confirm the identity of wildtype versus mutated alleles. Genomic DNA was digested with EcoRI and prepared for blotting. The 450 bp radiolabeled fragment, used as the probe in the screening procedure above, mainly encompassed sequences encoding exon 7 and the 3' non-translated region of the VEGF-B cDNA. This probe was generated by PCR using DNA from clone 10 as the template. The primers used in the PCR application were 5'-GTGAAGCTCCAGCCGAGCA (sense-strand) (SEQ ID NO: 1) and 5'-TAGTGTCTTCATCTCTTT (antisense-strand) (SEQ ID NO: 2). The mutant allele generated a genomic EcoRI restriction fragment of 6.5 kb while the wild-type allele generated a >20 kb fragment under these conditions.

Example 3: Insertion of the Transgenic Vector Into Animal Cells.

The vector containing the mutant VEGF-B (construct E) was transfected into E14.1 cells derived from the 129/SW mouse (Kuhn, R. et al., Science 254: 707-710 (1991)) by electroporation. Neomycin resistant clones were isolated by standard procedures

WO 00/52462

PCT/US00/05465

and characterized. Manipulating the Mouse Embryo. A laboratory Manual edited by B. Hogan, R. Beddington, F. Constantini and E. Lacy, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1994) describes procedures for isolating and manipulating embryos (specifically incorporated herein by reference). Genomic DNA from several hundred clones were isolated, EcoRI digested, and analyzed by Southern blotting. Using these procedures, three positive clones denoted 1a, 8f, and 9h, were identified by detecting the 6.5 kb band and also the wild-type 20 kb band. Probing a Southern blot with radiolabeled PKG-neo cassette also gave the expected 6.5 kb band for clones 1a and 9h. These data show that one allele of the two VEGF-B alleles in the ES cells has been correctly targeted by the construct and that ES cells containing the null allele for VEGF-B were generated.

Example 4: Production of Transgenic Animals.

Cells from the cell line 9h were injected into mouse blastocysts using standard procedures. Manipulating the Mouse Embryo. A laboratory Manual, edited by B. Hogan, R. Beddington, F. Constantini and E. Lacy, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1994) describes procedures for injecting cells (specifically incorporated herein by reference). The blastocysts were implanted into pseudopregnant foster mothers. The resulting chimeric mice which were generated, i.e. those possessing the transgenic DNA, were identified by the coat color in the offspring.

For example, since the ES cells were derived from the 129/SW mouse with a chincilla (white-yellow) fur coat and carriers of the Agouti locus, whereas the host blastocysts were derived from the C57BL/6 mouse with a black coat and lacking the Agouti locus, the chimera will be a mixture of Chincilla (patches of skin to which only ES cells contributed), black (patches to which only host cells contributed) and brown or Agouti (patches of skin in

WO 00/52462

PCT/US00/05465

which there was a mixture of 129/SW and C57Bl/6 cells). The chimeric animals are brown because the Agouti protein secreted from 129/SW cells will stimulate C57Bl/6 hair follicle cells to process the melanin (black pigment) in such a way that the hair becomes brown.

Male chimeric mice were mated with C57Bl/6 wildtype females. The presence of brown mice in the offspring from these female mice indicated germline transmission of the transgenic DNA.

DNA prepared from the tails of these F1 mice were analyzed by Southern blotting as above. Generally, 0.5 cm of tail tissue was surgically removed and used to prepare DNA samples. The 6.5 kb EcoRI fragment was present in 50% of the brown mice indicating that there was no selection against the targeted null allele of VEGF-B. The F1 mice carrying the targeted VEGF-B locus are heterozygotes as they also carry a wildtype allele for VEGF-B. The presence of normally developed F1 mice carrying one inactivated allele of VEGF-B show that gene dosage for VEGF-B is not critical for survival.

Heterozygote F1 mice were crossed and tail DNA from the offspring was analyzed by Southern blotting and by PCR. The results obtained using the two techniques were identical and the details of the PCR genotyping procedure is given. The PCR amplifications were performed using standard conditions with tail DNA from the F2 offspring as the template. The wildtype allele was identified as a 316 bp amplified band using two primers located in exon 3 and exon 4. These primers were 5'-GCCAGCTGTGACTGT (forward) (SEQ ID NO: 3) and 5'-CCCACTCATGCTACACT (reverse) (SEQ ID NO: 4), respectively. The targeted allele was identified as a 140 bp band using two primers located in the neomycin resistance gene. These primers were 5'-TGTTCTCTCTTCATCTCC (forward) (SEQ ID NO: 5) and 5'-ATTGTCTGTGCCCCAGTC (reverse) (SEQ ID NO: 6), respectively. The results from the PCR amplifications are summarized in Fig. 2.

WO 00/52462

PCT/US00/05465

The analyses showed that mice homozygous for the targeted allele of VEGF-B are viable and analysis of a large number of animals of the F2 generation gave a 1:2:1 ratio of wildtype, heterozygotes, and homozygote animals carrying the null allele. Thus the null allele is inherited in a classical Mendelian fashion.

A first external inspection of adult knock out mice for VEGF-B did not reveal any gross morphological changes compared to wildtype mice. However, it was observed that the heart of some of the transgenic VEGF-B mutant mice appeared to be malformed. The hearts were generally smaller in size than wild-type and the larger vessels appeared more dilated. These phenotypes indicate that the VEGF-B knock out mice could be used as models to screen compounds for an effect on heart tissue growth or development.

Example 5: Detection of VEGF-B Nucleic Acids in Cell or Tissue Specimens.

Cell or tissue specimens can be obtained by many convenient methods known in the art. Generally, centrifuged cell pellets or tissue samples are immediately frozen. Total RNA is isolated by the guanidinium isothiocyanate procedure [Chomczynski et al., *Anal. Biochem.*, 162:156-159 (1987)]. cDNA is synthesized using 0.2 µg of random hexadeoxynucleotide primers, 5 units of murine reverse transcriptase, 5 µg of total RNA as a template and a first-strand cDNA synthesis kit (Pharmacia). After incubation at 37°C for 1 hour, the reaction mixture was stored at -70°C. Negative control samples for PCR amplification were prepared similarly except that reverse transcriptase was not added. β-actin also was tested as an internal standard because it is expressed at a constitutive high level, and its expression does not show much variation in different cells.

WO 00/52462

PCT/US00/05465

For PCR amplification, the primer sequences are selected from the VEGF-B and  $\beta$ -actin genes as follows:

VEGF-B sense: 5'-GCCATGTGTCACCTCGCAG-3' (SEQ ID NO: 7)  
VEGF-B antisense: 5'-TGTCCCTGGAAAGAACACAGCC-3' (SEQ ID NO: 8)  
 $\beta$ -actin sense: 5'-CGGGAAATCGTGCGTGACAT-3' (SEQ ID NO: 9)  
 $\beta$ -actin antisense: 5'-GGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3' (SEQ ID NO: 10) [ $\beta$ -actin sequences comprise nucleotides 2105-2125 and 2411-2432 from Ng et al., *Mol. Cell Biol.*, 5:2720-732 (1985)]. An aliquot of 4  $\mu$ l from the cDNA reaction product is heated to 94°C for 5 minutes and used as a template for PCR amplification with 20 pmole of primers, 10 x PCR buffer, 1 $\mu$ l of 20 mM dNTPs and 2.5 U of Taq polymerase. Final volume is adjusted to 100  $\mu$ l with DEPC treated water. Denaturation is at 95°C for 1 minute, annealing at 62°C for 45 seconds, and polymerization at 72°C for 50 seconds, for a total of 35 cycles for VEGF-B and 25 cycles for  $\beta$ -actin. After every 5 cycles, 15  $\mu$ l aliquots are taken for analysis.

Electrophoresis of 5  $\mu$ l of the PCR reaction mix was performed in a 2% agarose gel containing ethidium bromide. The size marker DNA fragments ranged in length from 24 to 726 base pairs ( $\phi$ X174 DNA/Hinf I marker from Promega, Madison, WI, USA).

Example 6: Use of Cells and Tissue from Transgenic Animals.

As noted above, the hearts of VEGF-B knock out mice appear smaller than wild-type, suggesting, *inter alia*, a usefulness in heart cell growth assays, heart rate assays, cardiac output assays or assays of other haemodynamic properties. Other uses in screening assays will be appreciated by one skilled in the art.

In order to use the cells and tissue of transgenic animals in such screening methods, cultures of the cells or tissue from transgenic animals can be used that contain at least one cell derived from the transgenic animal. The cells are grown as

WO 00/52462

PCT/US00/05465

explants or separated by mechanical dispersion and grown as primary cultures. Alternatively, the cells are transformed into cell lines by transformation methods known in the art or by initially crossing the transgenic mouse with, for example, the H-2K<sup>b</sup>tsA58 Mouse described by Jat et al. PNAS USA 88: 5096-5100 (1991), or other related methods known in the art (see, for example, McClean, J.S., Tibtech 11:232 (1993). In this way, the cross of the knock out mutant with the H-2K<sup>b</sup>tsA58 transgenic mouse would generate conditionally immortal lines of various cells. Specifically, cells are initially grown at the permissive temperature for the ts (temperature sensitive) A58 T-antigen so that the cells can be cultured for many passages. The T-Ag immortalizes the cells. When the cells are shifted to the non-permissive temperature to disable the activity of the T-Ag, the cells differentiate, thereby potentially generating many different cell lines from different tissues.

Example 7: Assays for Angiogenicity and/or Tumor Growth Modulating Activity.

A tissue sample, such as heart explants from the VEGF-B knock out mice, which would also contain the responding cells, can be used to test VEGF-B analogs. The tissue sample or an explant is maintained in a solution as known in the art. Compounds, such as VEGF-B analogs or small molecules, are added to the tissue sample or explant and the effect on the tissue sample or explant analyzed. In this way, physiological effects such as angiogenicity, inhibiting or facilitating tumor growth, increase in musculature, or other effects associated with VEGF-B can be assayed for. One skilled in the art can rely on methods known in the art, such as those in Ausubel (1989) and Hogan (1994) for example, to devise particular embodiments.

Example 8: Investigation of Expression of VEGF-B Transcripts.

WO 00/52462

PCT/US00/05465

The expression of VEGF-B transcripts in heart and skeletal muscle was investigated by Northern blotting in wild-type mice (+/+), heterozygote mice (+/-) and in the homozygous knockout mice (-/-). VEGF-B deficient and wild type C57Bl/6 mice were killed and different tissues were snap frozen and stored in -80°C until used. Total cellular RNA were prepared using the guanidinium thiocyanate/acid phenol method [see Chomczynski et al., *Analytical Biochemistry*, 162:156-159 (1987)]. 20 $\mu$ g of RNA from each sample was used per lane in a 1% agarose gel, running at 80 V for about 3 hours. The gel was subsequently transferred to a nylon membrane (Hybond™-N+, Amersham) followed by UV cross linking. Prehybridization was carried out for 2 hours in 5 x SSC, 5 x Denhardt solution, 0.5% SDS and 100  $\mu$ g/ml of single-stranded DNA, followed by hybridization overnight with specific probes at 65°C according to the manufacturer's protocol (Amersham).

The two probes used were (a) the full length mouse VEGF-B cDNA and (b) a probe covering the deleted portion of the VEGF-B gene in the null allele. A 1.8 kb VEGF-B<sub>16</sub> cDNA fragment was used to make the first probe using a random labelling kit (Amersham) following the recommended protocol. The second probe used in the Northern analysis was produced using a 148 bp fragment within the exons 3 and 4 of VEGF-B, which is replaced by the Neo gene in the null allele/targeting vector, and was labelled by a PCR method [see Konat et al., *PCR Technology*, pp. 37-42, Griffin eds., CRC Press, Boca Raton (1994)]. Tag DNA polymerase and <sup>32</sup>P-dCTP were used in the labelling PCR with 30 cycles of 1 min at 94°C, 2 min at 58°C and 3 min at 72°C.

After wash, the membranes were exposed to X-ray films for 2 to 6 days. Membranes were stripped in boiling 0.5% SDS and exposed to phosphor Imager overnight to insure the complete stripping. Figure 5a shows the results from the Northern blot using the full length mouse VEGF-B cDNA probe. Figure 5b shows

WO 00/52462

PCT/US00/05465

the results from a probe covering the deleted portion of the VEGF-B in the null allele.

The results show that both probes hybridize to the abundant 1.4 kb VEGF-B mRNA obtained from the +/+ mice and that two additional transcripts of lower abundance were also detected. The two minor transcripts were 3.0 and 6 kb in length, respectively. A clear reduction of the hybridization signal was obtained in the +/- mice, while both probes failed to detect any VEGF-B transcripts in the RNA samples obtained from the -/- mice. This shows that the targeted VEGF-B allele has been knocked out and resulted in a null allele, and that the -/- mice will have no synthesis of VEGF-B protein. The reduced levels of VEGF-B transcripts in the heterozygote also show that transcription of the remaining intact VEGF-B allele is not compensatorily upregulated.

Example 9: Transplantation and Measurement of Tumors.

As tumor growth and metastasis formation is known to depend on the neovascularization of the tumor tissue, the growth of a transplanted tumor was investigated in litter-mate wild-type (+/+) and VEGF-B deficient (-/-) mice. Male VEGF-B deficient (-/-) and litter-mate homozygous C57Bl/6 mice (+/+) were used in the test. Mouse T241 fibrosarcoma cells were injected intradermally. The 6 to 8 weeks old mice were anesthetized by methoxyflurane before implantation of the tumor cells. Then 1 x 10<sup>6</sup> T241 mouse fibrosarcoma cells growing in log phase were suspended in 100 µliter of PBS, and implanted subcutaneously in the midline dorsum of each mouse. The growth of the tumor was measured in each of the animals. Tumors were observed and measured every other day using a caliper. Tumor volume was calculated using the formula: width<sup>2</sup> x length x 0.52 [see Boehm et al, Nature, 390:404-407 (1997)].

WO 00/52462

PCT/US00/05465

The results are shown graphically in Figure 6. From the graph it can be seen that the growth of the tumor was significantly slower in the -/- animals compared to +/+ animals. It appears that it is the initial phase, before the exponential growth phase, which is longer in the mutant animals (around 18-20) days for the +/+ animals versus 30-32 days for the -/- animals). This result demonstrates that VEGF-B affects tumor vascularization, probably by affecting the tumor stroma. This conclusion can be drawn since the tumor cells probably express endogenous VEGF-B while the effect is observed in the mutant animals.

The result may be attributable to a direct effect on endothelial cell growth or to an indirect effect such as migration, degradation of extracellular matrix, etc. In either case, the results show that VEGF-B has a role in promoting tumor growth and indicate that anti-tumor strategies can be developed based on inhibition of the action of VEGF-B, for example by blocking the use of monoclonal antibodies to VEGF-B binding to VEGFR-1 or by small molecules binding to VEGFR-1, or by anti VEGF-B therapy, or by a combination of two or more of the foregoing.

Example 10: Histological Examination of Heart Tissue from Normal and VEGF-B Deficient Mice.

Histological examination of tissue sections of hearts from normal and VEGF-B deficient mice revealed no major differences. Also the capillary density in cross sectioned myocardium of the mutant animals was normal. This suggests that VEGF-B may not play a critical role in the angiogenic processes that control vascularization of the myocardium.

Example 11: Analysis of Expression of Angiogenic Factors in VEGF-B Deficient mice.

WO 00/52462

PCT/US00/05465

Analysis of gene expression in heart from normal and VEGF-B deficient mice, by RNase protection assays using radiolabelled cRNA probes, revealed that most genes investigated were normally expressed in the mutant animals. Normally expressed genes included the genes for VEGF, PIGF, PDGF A, PDGF receptors a and b, VEGF receptors 1 and 2, neuropilin 1, Tie 1 receptor, urokinase plaminogen activator, plasminogen activator inhibitor 1 and platelet endothelial cell adhesion molecule. The only gene whose expression was altered in the mutant mice was PDGF B (down about 30%, p > 0.05). At present it is unclear what the altered expression of PDGF B means.

Example 12: Heart abnormalities in VEGF-B deficient mice.

To investigate the role of VEGF-B in normal heart function, VEGF-B deficient mice and normal litter mates were compared to look for heart abnormalities using a telemetry system (DATA Science, St. Paul, MN, USA). The telemetry system consists of implantable transmitters (TA10ETA-F20), telemetry receivers (RA1010) and a consolidation matrix (BCM100) that relays information from the telemetry receivers. To record the electrocardiograms (ECGs) and other parameters, transmitters were implanted in the abdomen of the animals. The two electrodes were positioned close to the heart apex and subcutaneously on the right shoulder, respectively. The data acquisition system consists of a data translation (DT 2801) AD converter and the computer program PC-LAB v.5.0 (Axenborg and Hirsch, Comp. Meth. Progr. Biomed. 41:55-67, (1993)). The data obtained was further analyzed using an Excel macro program and the data was presented as locomotor activity counts per minute, body temperature and heart rate per minute. The ECG arrays were used to study heart rhythms. From the average ECGs, the PQ, QRS and QT intervals were calculated in milliseconds by the computer program PC-LAB v.5.0. The procedures used are described in Johansson and

WO 00/52462

PCT/US00/05465

Thorén, Acta Physiol. Scand. 160:133-138 (1997) and are specifically incorporated by reference.

Analysis of average ECGs from normal mice (+/+) and VEGF-B deficient mice (-/-) reveal some significant differences. The results are shown graphically in Figure 7.

The PQ interval is prolonged in the -/- animals as compared to +/+ animals (see also Table 1: 39.7 milliseconds versus 35.7 milliseconds, p>0.05). This indicates that the deficient animals have atrioventricular (AV) conduction defects. The reasons for this is unclear, but a decrease in the AV conduction in humans may be caused by ischemia of the AV bundle fibers, compression of the AV bundles by scar tissue or by calcification of the heart, inflammation of the AV bundle or fibers of the AV junction, or by extreme stimulation of the heart by nervus vagi.

While the QRS complex appears normal, the U wave in mice appears abnormal with a slight depression. This slight depression of the U wave might be an indication of ischemia since a similar depression of the corresponding ST complex seen in humans may indicate myocardial ischemia. The area and amplitude of the U wave are presented in Table 1 and illustrated in Figures 7A and 7B. The depression of the U-wave in -/- mice is shown by the shaded area in Figure 7B. This indicates another abnormality in the -/- animals. In humans, a depression in the ST complex is indicative of ischemia of the myocardium. In most cases the ischemia is caused by insufficient coronary circulation. Both the heart rates and body temperatures were normal in the -/- animals.

WO 00/52462

PCT/US00/05465

Table 1. Some data from ECG measurement of normal (+/+, n=4) and VEGF-B deficient (-/-, n=4) animals

	Genotype		p-value
	+/+	-/-	
PQ interval	35.7 ms	39.7 ms	0.014
U area (a.u. <sup>1</sup> )	4.31	9.62	-
U amplitude (a.u. <sup>1</sup> )	-0.013	-0.034	-

<sup>1</sup>a.u. - arbitrary units, ms - milliseconds. For the U areas and amplitudes, the average of the different groups are shown.

The foregoing description and examples have been set forth merely to illustrate the invention and are not intended to be limiting. Since modifications of the disclosed embodiments incorporating the spirit and substance of the invention may occur to persons skilled in the art, the invention should be construed to include everything within the scope of the appended claims and equivalents thereof.

WO 00/52462

PCT/US00/05465

What is claimed is:

1. A method for screening a compound for atrioventricular conduction modulating activity, said method comprising introducing said compound into a VEGF-B deficient non-human animal, and assaying the effect on atrioventricular conduction in said animal.
2. A method for screening a compound for ischemia modulating activity, said method comprising introducing said compound into a VEGF-B deficient non-human animal, and assaying the effect on ischemia in said animal.
3. A method of treatment or alleviation of atrioventricular conduction defects in a mammal, comprising the step of administering an effective atrioventricular conduction defect alleviating amount of VEGF-B, or a fragment or analog thereof having the biological activity of VEGF-B.
4. A method of treatment or alleviation of ischemia comprising the step of administering an effective ischemia alleviating amount of VEGF-B, or a fragment or analog thereof having the biological activity of VEGF-B.
5. A method of treatment or alleviation of atrioventricular conduction defects or ischemia comprising the step of administering an effective amount of a nucleic acid sequence encoding for VEGF-B, or a fragment or analog thereof having the biological activity of VEGF-B, where said nucleic acid is capable of encoding an effective amount of said VEGF-B, or a fragment or analog thereof to treat or alleviate the atrioventricular conduction defect or ischemia.

- 41 -

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/52462

PCT/US00/05465

6. The method of claim 5, wherein the nucleic acid sequence is operably linked with a promoter sequence.

7. The method of claim 5, wherein the nucleic acid sequence is cloned into a vector and is operably linked with a promoter sequence.

8. The method of claim 7, wherein the vector is an expression vector.

9. The method of claim 8, wherein the expression vector is selected from the group consisting of adenoviral-, vaccinia- or retroviral-based vectors.

10. A method for diagnosing heart disease characterized by a loss of VEGF-B expression in a test subject, comprising the steps of:

providing a first DNA sample from said test subject;  
providing a second DNA sample containing VEGF-B DNA;  
contacting said first DNA sample with a set of primers specific for VEGF-B DNA operatively coupled to a polymerase;  
contacting said second DNA sample with a set of primers specific for VEGF-B DNA operatively coupled to a polymerase;  
carrying out polymerase chain reactions with first and second DNA samples; and  
comparing polymerase chain reactions with first and second DNA samples to determine a lack of amplification of VEGF-B DNA in said first DNA sample.

WO 00/52462

PCT/US00/05465

11. A method for diagnosing heart disease characterized by a loss of VEGF-B expression in a test subject, comprising the steps of:  
providing a biological sample from said test subject;  
contacting said sample with a specific binding reagent for VEGF-B; and  
detecting a lack of binding of said specific binding reagent.

12. The method of claim 11, wherein the specific binding reagent comprises an antibody to VEGF-B.

13. A method for diagnosing a VEGF-B deficiency in the heart of a test subject, said method comprising the steps of:  
taking an electrocardiogram of said test subject, and  
evaluating the electrocardiogram for prolongation of the PQ interval or depression of the ST complex compared to a normal electrocardiogram.

14. A method for detecting a VEGF-B deficiency in the heart of a test subject, said method comprising the steps of:  
taking an electrocardiogram of said test subject, and  
evaluating the electrocardiogram for prolongation of the PQ interval and depression of the ST complex compared to a normal electrocardiogram.

WO 00/52462

PCT/US00/05465

1/8

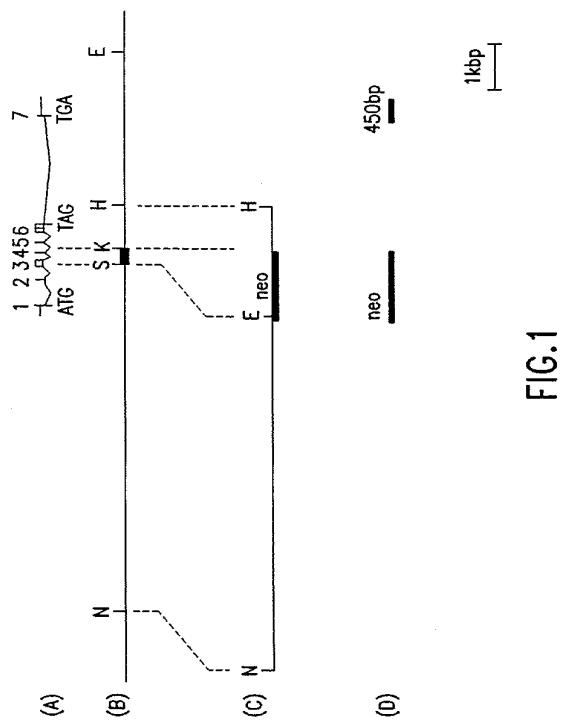


FIG.1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/52462

PCT/US00/05465

2/8

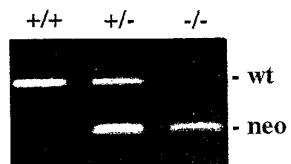


FIG. 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/52462

PCT/US00/05465

3 / 8

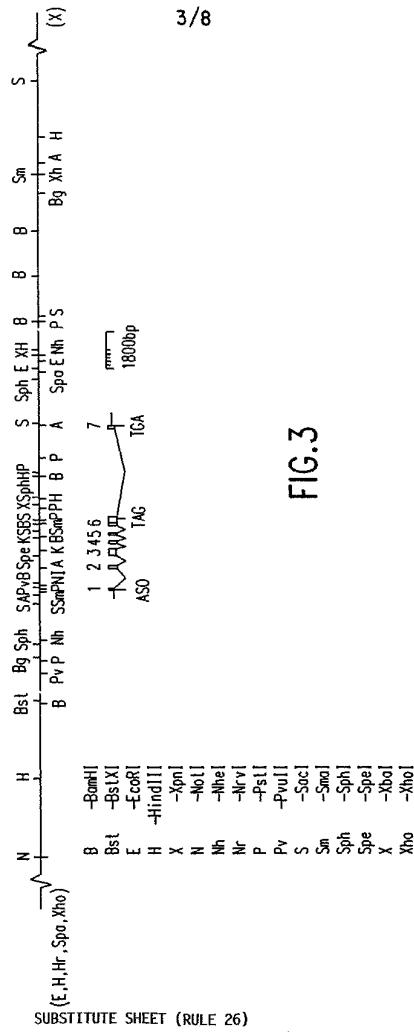


FIG. 3

WO 00/52462

PCT/US00/05465

4/8

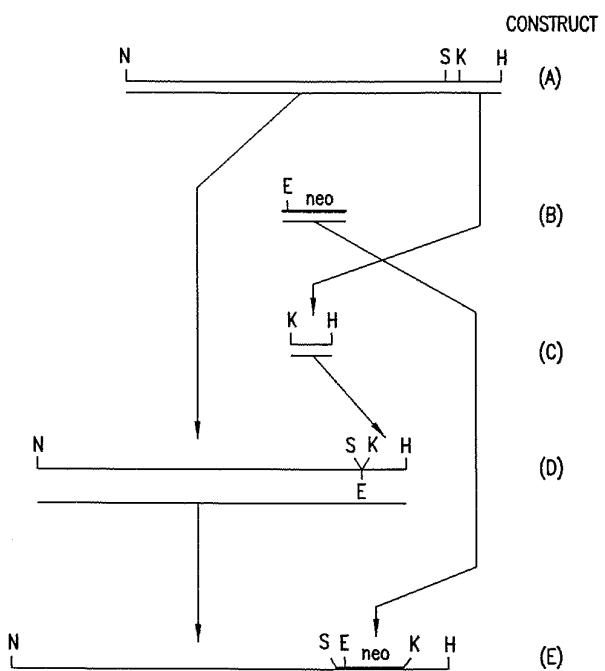


FIG.4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

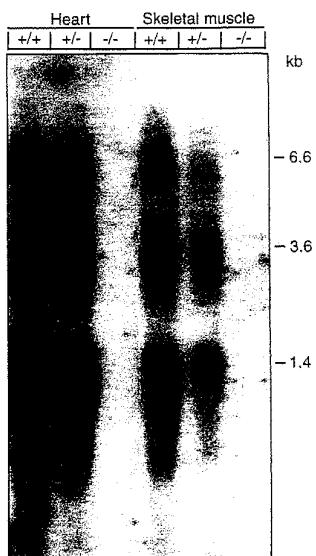


FIG. 5a

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/52462

PCT/US00/05465

6/8

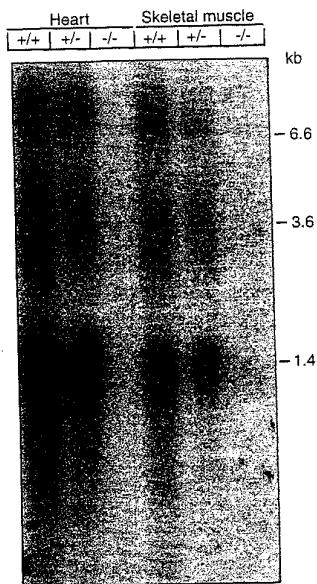


FIG. 5b

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/52462

PCT/US00/05465

7/8

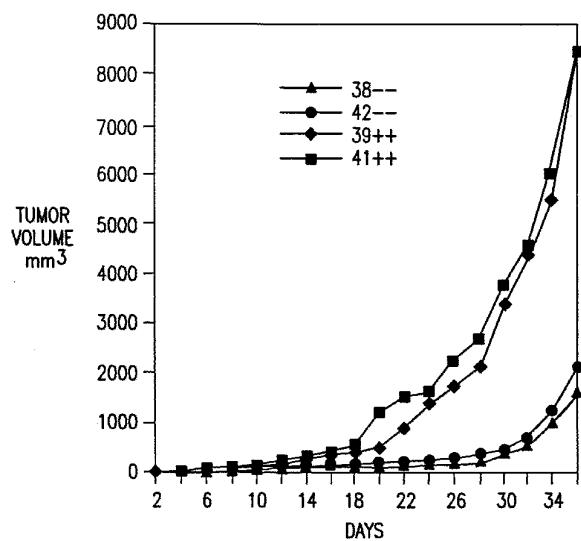


FIG.6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/52462

PCT/US00/05465

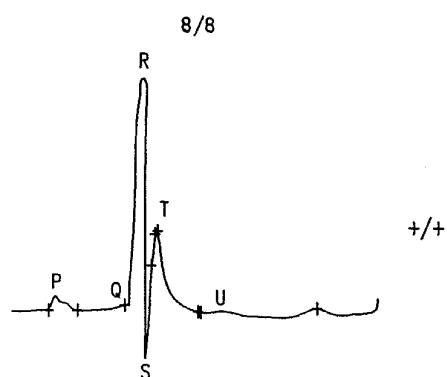


FIG. 7A

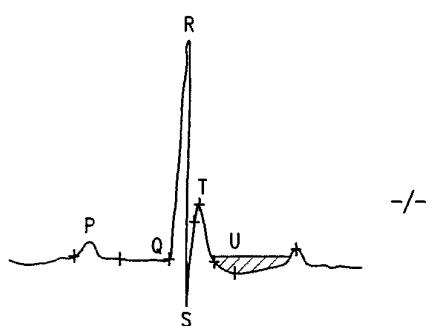


FIG. 7B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/52462

PCT/US00/05465

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH

<120> HEART ABNORMALITIES IN VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH  
FACTOR B (VEGF-B) DEFICIENT ANIMALS AND METHODS  
RELATING TO THESE HEART ABNORMALITIES

&lt;130&gt; Ludwig Inst for Cancer Research

<140>  
<141><150> 60/160,083  
<151> 1999-03-03

&lt;160&gt; 10

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

<210> 1  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Murinae gen. sp.<220>  
<223> PCR primer for mouse VEGF-B (sense strand)<400> 1  
ggagttgaag gtagtttcgt g

21

<210> 2  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Murinae gen. sp.<220>  
<223> PCR primer for mouse VEGF-B (anti-sense strand)<400> 2  
tagtgttcc catctcttt

19

<210> 3  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Murinae gen. sp.

&lt;220&gt;

1

**WO 00/52462****PCT/US00/05465**<223> PCR primer for mouse VEGF-B located in exon 3  
(forward)<400> 3  
tagtgttccatcttttt

19

<210> 4  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Murinae gen. sp.<220>  
<223> PCR primer for mouse VEGF-B in exon 4 (reverse)<400> 4  
gccccagctgtgtgactgt

18

<210> 5  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Murinae gen. sp.<220>  
<223> PCR primer for neomycin resistance gene (forward)<400> 5  
ccccaccccatgctacact

18

<210> 6  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Murinae gen. sp.<220>  
<223> PCR primer for the neomycin resistance gene  
(reverse)<400> 6  
tgtttcttc ttcctcatcc

22

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Murinae gen. sp.<220>  
<223> PCR primer for mouse VEGF-B (forward)

WO 00/52462

PCT/US00/05465

<400> 7  
attgtctgtt gtgcccgatc 20

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Murinae gen. sp.

<220>  
<223> PCR primer for mouse VEGF-B (reverse)

<400> 8  
gccccatgtgtc accttcgcag 20

<210> 9  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Murinae gen. sp.

<220>  
<223> PCR primer for mouse Beta-actin gene (sense)  
(nucleotides 2105-2125-Ng et al. Mol. Cell Biol.  
5:2720-2732, 1985)

<400> 9  
tgtccctggaa agaacacagc c 21

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Murinae gen. sp.

<220>  
<223> PCR primer for mouse Beta-actin gene (anti-sense)  
(nucleotides 2411-2432-Ng et al. Mol. Cell Biol.  
5:2720-2732, 1985)

<400> 10  
cgggaaatcg tgcgtgacat 20

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/05465
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) :Please See Extra Sheet. US CL :Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 800/3; 514/44, 21; 536/23.1, 24.1, 24.3; 435/320.1, 91.2; 424/178.1;		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, EMBASE, CAPLUS, CANCERLIT, BIOSIS, USPATFULL, WEST VEGF-B, VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR B, ATRIOVENTRICULAR CONDUCTION, ISCHEMIA, HEART DISEASE, ECG, VEGF-B KNOCKOUT MOUSE.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,840,693 A (ERIKSSON et al) 24 NOVEMBER 1998, col 4, lines 47-48; col 29, lines 63-65;	10 and 4
Y	US 5,840,693 A (ERIKSSON et al) 24 NOVEMBER, 1998. See entire document.	1-14
Y	WO 98/36052 A1 (VON EULER et al) 20 AUGUST, 1998. See entire document.	1-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier document published on or after the international filing date which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *D* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 15 MAY 2000	Date of mailing of the international search report 07 JUN 2000	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer <i>Yvette Connell</i> YVETTE CONNELL Telephone No. (703) 308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)\*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
International application No. PCT/US00/05465	
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER: IPC (7): G01N 33/00; A01N 43/04; A61K 38/00; 39/395, 39/40, 39/42, 39/44; C07H 21/02, 21/04; C12N 15/00, 15/09; C12P 19/34;</p> <p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER: US CL : 800/3; 514/44, 21; 536/23.1, 24.1, 24.3; 435/320.1, 91.2; 424/178.1;</p>	

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 1998)\*

## フロントページの続き

(51) Int.CI. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/00	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/531	G 0 1 N 33/531	A
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/577	B
	A 6 1 K 37/02	

(72)発明者 トーレン , ペーター

スウェーデン エス 171 77 ストックホルム (無番地) カロリンスカ・インスティテュート ディパートメント・オブ・フィジオロジー・アンド・ファーモコロジー

(72)発明者 エリクソン , ウルフ

スウェーデン エス 171 77 ストックホルム ボックス 240 ルードヴィッヒ・インスティテュート・フォア・キャンサー・リサーチ

Fターム(参考) 2G045 AA25 CB17 CB26 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03 FB08

JA20

4C084 AA02 AA13 BA44 NA14 ZA362

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZA36