

(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2004-507208

(P2004-507208A)

(43) 公表日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 9/10	4 B O 2 4
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 17/06	4 B O 6 5
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 19/02	4 C O 8 4
		4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 567 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-561752 (P2001-561752)	(71) 出願人	500025570
(86) (22) 出願日	平成13年2月26日 (2001.2.26)		ルードヴィッヒ インスティテュート フ
(85) 翻訳文提出日	平成14年8月26日 (2002.8.26)		ォー キャンサー リサーチ
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/006113		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 1 5
(87) 国際公開番号	W02001/062942		8、ニューヨーク、サード アベニュー
(87) 国際公開日	平成13年8月30日 (2001.8.30)		6 0 5
(31) 優先権主張番号	60/185, 205	(71) 出願人	502308893
(32) 優先日	平成12年2月25日 (2000.2.25)		ライセンティア オーワイ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		フィンランド ヘルシンキ エフアイエヌ
(31) 優先権主張番号	60/205, 331		- 0 0 1 3 0 エロッタヤンカトゥ 1 9
(32) 優先日	平成12年5月18日 (2000.5.18)		ビー 5
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100065868
			弁理士 角田 嘉宏
		(74) 代理人	100088960
			弁理士 高石 ▲さとる▼
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハイブリッド血管内皮成長因子DNA s およびタンパク質に関する物質および方法

(57) 【要約】

本発明は、脈管内皮成長因子ペプチド細胞レセプターを結合するポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドを含む組成物、ならびに前記物質が関係する方法および用途を提供する。本発明に記載する一部のポリペプチドは、天然に存在する既知の脈管内皮成長因子と比較して、独特の受容体結合特性を示す。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

種々の血管内皮増殖因子受容体結合プロフィールを有する 2 つまたはそれ以上の自然発生脊椎動物血管内皮増殖因子ポリペプチドに由来する複数のペプチドサブユニットを含むキメラポリペプチドであって、

該キメラポリペプチドは、1 つの自然発生血管内皮増殖因子ポリペプチドの少なくとも 1 つの受容体において結合し、および

該キメラポリペプチドは、自然発生増殖因子ポリペプチドと異なる受容体結合プロフィールを有する、キメラポリペプチド。

【請求項 2】

10

自然発生増殖因子ポリペプチドが、血管内皮増殖因子 A、血管内皮増殖因子 B、血管内皮増殖因子 C、血管内皮増殖因子 D、血管内皮増殖因子 E、血小板由来増殖因子 A、血小板由来増殖因子 B および胎盤増殖因子からなるグループから選択される請求項 1 に記載のキメラポリペプチド。

【請求項 3】

医薬的に許容される担体中に、請求項 1 に記載のポリペプチドを含む組成物。

【請求項 4】

ポリペプチドが、ヒト VEGFR-1 およびヒト VEGFR-3 に結合し、ヒト VEGFR-2 に結合しない請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

20

ポリペプチドが、ヒト VEGFR-1、ヒト VEGFR-2 およびヒト VEGFR-3 に結合する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 7】

発現調節配列に操作可能に結合された請求項 6 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 8】

それによってコード化されるキメラポリペプチドを発現する請求項 6 に記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

30

【請求項 9】

式：



〔式中、 X_1 は、配列番号：128 のアミノ酸 3～11 および配列番号：137 のアミノ酸 3～11 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

X_2 は、配列番号：129 および 138 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

X_3 は、配列番号：130 および 139 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

40

X_4 は、配列番号：131 および 140 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

X_5 は、配列番号：132 および 141 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

X_6 は、配列番号：133 および 142 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

X_7 は、配列番号：134 および 143 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

X_8 は、配列番号：135 および 144 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

50

X₉ は、配列番号：1 3 6 および 1 4 5 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

NH₂ - X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - COOH は、配列番号：2 のアミノ酸 3 4 ~ 1 3 5 または配列番号：2 2 のアミノ酸 1 1 2 ~ 2 1 6 と同じでない]

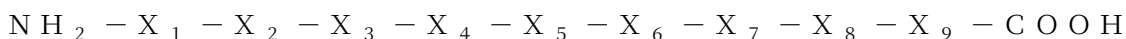
で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、該ポリペプチドが、ヒト VEGFR-1、ヒト VEGFR-2 およびヒト VEGFR-3 からなるグループから選択される少なくとも 1 つの受容体に結合するポリペプチド。

【請求項 10】

ポリペプチドが、ヒト VEGFR-1、ヒト VEGFR-2 およびヒト VEGFR-3 からなるグループから選択される 1 つの受容体に正確に結合する請求項 9 に記載のポリペプチド。 10

【請求項 11】

ポリペプチドが、式



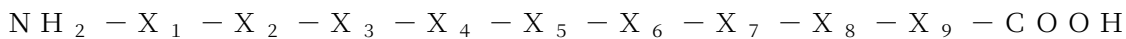
のアミノ酸配列に結合したシグナルペプチドアミノ酸配列をさらに含む請求項 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

ポリペプチドが、アミノ末端メチオニン残基をさらに含む請求項 9 に記載のポリペプチド。 20

【請求項 13】

ポリペプチドが、式



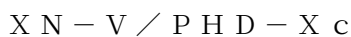
のアミノ酸配列に結合したタグアミノ酸配列をさらに含む請求項 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 14】

ポリペプチドが、プレプロ-VEGF-C シグナルペプチド、プレプロ-VEGF-C アミノ末端ペプチド、およびプレプロ-VEGF-C カルボキシ末端プロペプチドからなるグループから選択される 1 つまたはそれ以上のアミノ酸配列をさらに含む請求項 9 に記載のポリペプチド。 30

【請求項 15】

式：



[式中、XN は、配列番号：2 のアミノ酸 1 ~ 3 4、配列番号：2 2 のアミノ酸 1 ~ 1 1、配列番号：4 7 のアミノ酸 1 ~ 3 4、またはそれらの断片からなるグループから選択され；

V / PHD は、請求項 9 に記載のポリペプチドであり；

Xc は、配列番号：2 のアミノ酸 1 3 6 ~ 1 9 1、配列番号：2 2 のアミノ酸 2 1 7 ~ 4 1 9、アミノ酸 1 3 6 ~ 2 3 2、またはそれらの断片からなるグループから選択され；

XN および Xc は、自然発生ヒト VEGF-A または VEGF-C 先駆タンパク質、または自然発生ヒト VEGF-A または VEGF-C イソホームにおけるアミノ酸配列と同じである] で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。 40

【請求項 16】

医薬的に許容される担体中に、請求項 9 に記載のポリペプチドを含む組成物。

【請求項 17】

請求項 9 に記載のポリペプチドをコード化するヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。

【請求項 18】

式：



[式中、N₁ は、A 1 - F または C 1 - F (配列番号：3 または 2 3) の VEGF ヌクレ 50

オチド配列を含み；

N₂ は、A 2－F または C 2－F（配列番号：4 または 24）の V E G Fヌクレオチド配列を含み；

N₃ は、A 3－F または C 3－F（配列番号：5 または 25）の V E G Fヌクレオチド配列を含み；

N₄ は、A 4－F または C 4－F（配列番号：6 または 26）の V E G Fヌクレオチド配列を含み；

N₅ は、A 5－F または C 5－F（配列番号：7 または 27）の V E G Fヌクレオチド配列を含み；

N₆ は、A 6－F または C 6－F（配列番号：8 または 28）の V E G Fヌクレオチド配列を含み； 10

N₇ は、A 7－F または C 7－F（配列番号：9 または 29）の V E G Fヌクレオチド配列を含み；

N₈ は、A 8－F または C 8－F（配列番号：10 または 30）の V E G Fヌクレオチド配列を含み；

N₉ は、A 9－F または C 9－F（配列番号：11 または 31）の V E G Fヌクレオチド配列を含む]

で示されるヌクレオチド配列を含む請求項 17 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 19】

請求項 17 に記載のヌクレオチド配列を含む発現ベクター。 20

【請求項 20】

請求項 17 に記載のポリヌクレオチドによって、形質転換されるかまたは発現される宿主細胞。

【請求項 21】

該ポリヌクレオチドによってコード化されたポリペプチドを発現する請求項 20 に記載の宿主細胞。

【請求項 22】

哺乳動物内皮細胞または哺乳動物内皮先駆細胞の増殖を調節する方法であって、哺乳動物内皮細胞の増殖を調節するのに有効な量の請求項 1 に記載のポリペプチドに該細胞を接触させる段階を含む方法。 30

【請求項 23】

哺乳動物造血前駆細胞の増殖を調節する方法であって、哺乳動物内皮細胞の増殖を調節するのに有効な量の請求項 1 に記載のポリペプチドに該細胞を接触させる段階を含む方法。

【請求項 24】

哺乳動物対象における内皮細胞の増殖を調節するために、哺乳動物対象を治療する方法であって、請求項 1 に記載のポリペプチドを哺乳動物対象に投与する段階を含む方法。

【請求項 25】

哺乳動物対象がヒトである請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

非自然発生血管内皮増殖因子アミノ酸配列を含むポリペプチドであって、該非自然発生血管内皮増殖因子アミノ酸配列が、式： 40

$\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{X}_2 - \text{X}_3 - \text{X}_4 - \text{X}_5 - \text{X}_6 - \text{X}_7 - \text{X}_8 - \text{X}_9 - \text{COOH}$

[式中、X₁ は、配列番号：128 のアミノ酸 3～11 および配列番号：137 のアミノ酸 3～11 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

X₂ は、配列番号：129 および 138 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

X₃ は、配列番号：130 および 139 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

X₄ は、配列番号：131 および 140 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

X₅ は、配列番号：1 3 2 および 1 4 1 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

X₆ は、配列番号：1 3 3 および 1 4 2 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

X₇ は、配列番号：1 3 4 および 1 4 3 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

X₈ は、配列番号：1 3 5 および 1 4 4 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；

X₉ は、配列番号：1 3 6 および 1 4 5 からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み]

10

で示されるアミノ酸配列に少なくとも 95% 同じアミノ酸配列からなり、該ポリペプチドは、ヒト VEGFR-1、ヒト VEGFR-2 およびヒト VEGFR-3 からなるグループから選択される少なくとも 1 つの受容体に結合するポリペプチド。

【請求項 27】

哺乳動物内皮細胞の増殖を調節するポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを製造する方法であって、該方法が、

少なくとも 2 つの脊椎動物血管内皮増殖因子ポリペプチドのアミノ酸断片をコード化するポリヌクレオチドを用意する工程；

ポリヌクレオチドを組み換えてハイブリッドポリヌクレオチドを形成する条件下に、ポリヌクレオチドを混合する工程；

20

ハイブリッドポリヌクレオチドを発現させて、ハイブリッドポリヌクレオチドによってコード化されたハイブリッドポリペプチドを製造する工程；

ハイブリッドポリペプチドをスクリーニングして、脊椎動物血管内皮増殖因子の受容体に結合するハイブリッドポリペプチドを同定する工程；および

スクリーニング工程において受容体に結合するハイブリッドポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを選択する工程、を含む方法。

【請求項 28】

該スクリーニング工程が、受容体を発現する細胞にハイブリッドポリペプチドを接触させることを含み、ハイブリッドポリペプチドによって誘発された細胞増殖または細胞生存の変化が、ハイブリッドポリペプチドと受容体との結合を示す請求項 27 に記載の方法。

30

【請求項 29】

該スクリーニング工程が、ヒト VEGFR-1 およびヒト VEGFR-3 に結合するハイブリッドポリペプチドを同定するためにスクリーニングすることを含み、該選択工程が、ヒト VEGFR-1 およびヒト VEGFR-3 に結合するハイブリッドポリペプチドを選択することを含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

該スクリーニング工程が、ヒト VEGFR-1、VEGFR-2 およびヒト VEGFR-3 に結合するハイブリッドポリペプチドを同定するためにスクリーニングすることを含み、該選択工程が、ヒト VEGFR-1、VEGFR-2 およびヒト VEGFR-3 に結合するハイブリッドポリペプチドを選択することを含む、請求項 27 に記載の方法。

40

【請求項 31】

哺乳動物内皮細胞の増殖を調節するポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを製造する方法であって、該方法が、

ポリヌクレオチド断片の組であって、

該組は、コード化ポリヌクレオチド断片の第一サブセットを含み、第一サブセットの各コード化ポリヌクレオチド断片は、第一哺乳動物血管内皮増殖因子のアミノ酸配列の少なくとも 4 つのアミノ酸をコード化し、

該組は、コード化ポリヌクレオチド断片の第二サブセットを含み、第二サブセットの各コード化ポリヌクレオチド断片は、第二哺乳動物血管内皮増殖因子のアミノ酸配列の少なくとも 4 つのアミノ酸をコード化する、特性を有するポリヌクレオチド断片の組を用意する

50

工程；

第一および第二サブセットからのコード化ポリヌクレオチド断片を組み換えてハイブリッドポリヌクレオチドを形成する条件下に、該組を含むポリヌクレオチド断片を混合する工程；

ハイブリッドポリヌクレオチドを発現させて、ハイブリッドポリヌクレオチドによってコード化されたハイブリッドポリペプチドを製造する工程；

ハイブリッドポリペプチドをスクリーニングして、哺乳動物内皮細胞の増殖を調節するハイブリッドポリペプチドを同定する工程；

スクリーニング工程において哺乳動物内皮細胞の増殖を調節するハイブリッドポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを選択する工程、を含む方法。

10

【請求項 3 2】

哺乳動物血管内皮増殖因子が、ヒト血管内皮増殖因子 A (VEGF-A)、ヒト血管内皮増殖因子 B (VEGF-B)、ヒト血管内皮増殖因子 C (VEGF-C)、およびヒト血管内皮増殖因子 D (VEGF-D) に保存されている 8 つのシステインを特徴とする受容体結合ドメインを含む請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

第一および第二哺乳動物血管内皮増殖因子が、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、PDGF、PDGF- α および PDGF- β ポリペプチドからなるグループから選択される請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

20

第一および第二哺乳動物血管内皮増殖因子がヒトである請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 5】

配列番号：5 1 に記載のアミノ酸 1 ～ 1 0 2 を含むポリペプチド。

【請求項 3 6】

配列番号：5 9 に記載のアミノ酸 1 ～ 1 0 2 を含むポリペプチド。

【請求項 3 7】

配列番号：6 3 に記載のアミノ酸 1 ～ 1 0 2 を含むポリペプチド。

【請求項 3 8】

配列番号：6 7 に記載のアミノ酸 1 ～ 1 0 4 を含むポリペプチド。

【請求項 3 9】

30

配列番号：7 1 に記載のアミノ酸 1 ～ 1 0 4 を含むポリペプチド。

【請求項 4 0】

配列番号：7 5 に記載のアミノ酸 1 ～ 1 0 4 を含むポリペプチド。

【請求項 4 1】

配列番号：7 7 に記載のアミノ酸 1 ～ 1 0 4 を含むポリペプチド。

【請求項 4 2】

配列番号：1 5 3 に記載のアミノ酸 1 ～ 1 0 4 を含むポリペプチド。

【請求項 4 3】

配列番号：1 5 5 に記載のアミノ酸 1 ～ 1 0 5 を含むポリペプチド。

【請求項 4 4】

40

配列番号：1 5 7 に記載のアミノ酸 1 ～ 1 0 5 を含むポリペプチド。

【請求項 4 5】

配列番号：1 5 9 に記載のアミノ酸 1 ～ 1 0 5 を含むポリペプチド。

【請求項 4 6】

配列番号：1 6 1 に記載のアミノ酸 1 ～ 1 0 3 を含むポリペプチド。

【請求項 4 7】

配列番号：1 6 3 に記載のアミノ酸 1 ～ 1 0 2 を含むポリペプチド。

【請求項 4 8】

配列番号：1 6 5 に記載のアミノ酸 1 ～ 1 0 4 を含むポリペプチド。

【請求項 4 9】

50

配列番号：167に記載のアミノ酸1～104を含むポリペプチド。

【請求項50】

配列番号：169に記載のアミノ酸1～104を含むポリペプチド。

【請求項51】

配列番号：171に記載のアミノ酸1～104を含むポリペプチド。

【請求項52】

配列番号：173に記載のアミノ酸1～104を含むポリペプチド。

【請求項53】

配列番号：175に記載のアミノ酸1～104を含むポリペプチド。

【請求項54】

請求項35乃至53のいずれか1つに記載のポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項55】

請求項35乃至53のいずれか1つに記載のポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項56】

請求項35乃至53のいずれか1つに記載のポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項57】

X₄が配列番号：140を含み、ポリペプチドがVEGFR-3に結合する、請求項9または26に記載のポリペプチド。

【請求項58】

X₅が配列番号：141を含む請求項57に記載のポリペプチド。

【請求項59】

X₈が配列番号：144を含む請求項57または58に記載のポリペプチド。

【請求項60】

ペプチド配列TNTFX_nP〔X_nは1～7つのアミノ酸を含む〕を含む分子であって、VEGFR-3のVEGF-C媒介活性化を阻害する分子。

【請求項61】

X_nが3つのアミノ酸を含む請求項60に記載の分子。

【請求項62】

ヒトVEGF-Cペプチド配列EFGVATNTFFKPPCVSVYRCG、またはその断片または変異形を含む分子であって、VEGFR-3のVEGF-C媒介活性化を阻害する分子。

【請求項63】

該分子が、アミノ酸配列EFGVATNTFFKPPCVSVYRCGを含む請求項62に記載の分子。

【請求項64】

該分子が、アミノ酸配列TNTFFKPPを含む請求項63に記載の分子。

【請求項65】

該断片または変異形が、アミノ酸配列TNTFFKPPCVXXXRを含む請求項62に記載の分子。

【請求項66】

該断片または変異形が、アミノ酸配列TNTFFKPPCVXXXRCGGCCを含む請求項62に記載の分子。

【請求項67】

X₂が配列番号：129を含み、ポリペプチドがVEGFR-1に結合する、請求項9または26に記載のポリペプチド。

【請求項68】

X₇が配列番号：134を含む請求項67に記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 69】

X₄ が配列番号：140を含み、ポリペプチドがVEGFR-3に結合する、請求項67または68に記載のポリペプチド。

【請求項 70】

X₅ が配列番号：141を含む請求項69に記載のポリペプチド。

【請求項 71】

X₈ が配列番号：144を含む請求項70に記載のポリペプチド。

【請求項 72】

VEGFR-1のVEGF-Aへの結合のモジュレーターを同定する方法であって、該方法が、(i) VEGFR-1のVEGF-Aへの結合を可能にする条件下に、被験化合物の存在および不存在において、VEGFR-1とVEGF-Aとの結合を測定する工程、および(ii) VEGFR-1のVEGF-Aへの結合を変化させ、配列番号：2のPhe⁴³、Met⁴⁴、Tyr⁴⁷、Gln⁴⁸、Tyr⁵¹、Gln¹⁰⁵およびMet¹⁰⁷によって規定される部位においてVEGF-Aと結合するか、または配列番号：2の該残基とインターフェースするVEGFR-1残基においてVEGFR-1と結合する被験化合物をモジュレーターとして同定する工程、を含む方法。

【請求項 73】

VEGFR-1のVEGF-Aへの結合のモジュレーターを同定する方法であって、該方法が、(i) VEGFR-1のVEGF-Aへの結合を可能にする条件下に、被験化合物の存在および不存在において、VEGFR-1とVEGF-Aとの結合を測定する工程、および(ii) VEGFR-1のVEGF-Aへの結合を変化させ、配列番号：2のLys⁴²、Phe⁴³、Met⁴⁴、Tyr⁴⁷、Gln⁴⁸、Tyr⁵¹、Ile⁷²、Lys⁷⁴、Asp⁸⁹、Gly⁹¹、Leu⁹²、Gln¹⁰⁵、Met¹⁰⁷、Ile¹⁰⁹、Phe¹¹¹、His¹¹²、Gln¹¹⁵、Ile¹¹⁷、Glu¹²⁹、Arg¹³¹およびPro¹³²によって規定される部位においてVEGF-Aと結合するか、または配列番号：2の該残基とインターフェースするVEGFR-1残基においてVEGFR-1と結合する被験化合物をモジュレーターとして同定する工程、を含む方法。

【請求項 74】

VEGFR-3のVEGF-Cへの結合のモジュレーターを同定する方法であって、該方法が、(i) VEGFR-3のVEGF-Cへの結合を可能にする条件下に、被験化合物の存在および不存在において、VEGFR-3とVEGF-Cとの結合を測定する工程、および(ii) VEGFR-3のVEGF-Cへの結合を変化させ、配列番号：22のLys¹²⁰、Ser¹²¹、Ile¹²²、Trp¹²⁶、Arg¹²⁷、Gln¹³⁰、Phe¹⁵¹、Lys¹⁵³、Ser¹⁶⁸、Gly¹⁷⁰、Leu¹⁷¹、Tyr¹⁸⁴、Phe¹⁸⁶、Ile¹⁹⁰、Pro¹⁹¹、Pro¹⁹⁶、Pro¹⁹⁸、Arg²¹⁰、Met²¹²およびSer²¹³によって規定される部位においてVEGF-Cと結合するか、または配列番号：22の該残基とインターフェースするVEGFR-3残基においてVEGFR-3と結合する被験化合物をモジュレーターとして同定する工程、を含む方法。

【請求項 75】

VEGFR-3のVEGF-Cへの結合のモジュレーターを同定する方法であって、該方法が、(i) VEGFR-3のVEGF-Cへの結合を可能にする条件下に、被験化合物の存在および不存在において、VEGFR-3とVEGF-Cとの結合を測定する工程、および(ii) VEGFR-3のVEGF-Cへの結合を変化させ、配列番号：22のThr¹⁴⁸、Asn¹⁴⁹、Thr¹⁵⁰、Phe¹⁵¹およびPro¹⁵⁵によって規定される部位においてVEGF-Cと結合するか、または配列番号：22の該残基とインターフェースするVEGFR-3残基においてVEGFR-3と結合する被験化合物をモジュレーターとして同定する工程、を含む方法。

【請求項 76】

請求項 7 2 または 7 3 に記載の方法によって同定されたモジュレーターを含む医薬組成物。

【請求項 7 7】

請求項 7 4 または 7 5 に記載の方法によって同定されたモジュレーターを含む医薬組成物。

【請求項 7 8】

VEGFR-1 に結合する自然リガンドへの VEGFR-1 の結合によって生じる病状を改善する薬剤の製造における、請求項 7 2 または 7 3 に記載の方法によって同定されたモジュレーターの使用。

【請求項 7 9】

VEGFR-3 に結合する自然リガンドへの VEGFR-3 の結合によって生じる病状を改善する薬剤の製造における、請求項 7 4 または 7 5 に記載の方法によって同定されたモジュレーターの使用。

【請求項 8 0】

VEGFR-1 に結合する自然リガンドへの VEGFR-1 の結合を阻害する方法であって、VEGFR-1 を発現する細胞を、請求項 7 6 に記載の医薬組成物に接触させる工程を含む方法。

【請求項 8 1】

VEGFR-3 に結合する自然リガンドへの VEGFR-3 の結合を阻害する方法であって、該方法が、VEGFR-3 を発現する細胞を、請求項 7 7 に記載の医薬組成物に接触させる工程を含む方法。

【請求項 8 2】

VEGFR-1 に結合する自然リガンドへの VEGFR-1 の結合によって生じる病状を改善する方法であって、該方法が、該リガンドへの VEGFR-1 の結合を阻害するのに有効な量の、該リガンドへの VEGFR-1 の結合の負のレギュレーターを、それを必要とする対象に投与する工程を含み、該負のレギュレーターが、配列番号：2 の Phe^{4 3}、Met^{4 4}、Tyr^{4 7}、Gln^{4 8}、Tyr^{5 1}、Gln^{1 0 5} および Met^{1 0 7} によって規定される部位、および配列番号：2 の Lys^{4 2}、Phe^{4 3}、Met^{4 4}、Tyr^{4 7}、Gln^{4 8}、Tyr^{5 1}、Ile^{7 2}、Lys^{7 4}、Asp^{8 9}、Gly^{9 1}、Leu^{9 2}、Gln^{1 0 5}、Met^{1 0 7}、Ile^{1 0 9}、Phe^{1 1 1}、His^{1 1 2}、Gln^{1 1 5}、Ile^{1 1 7}、Glu^{1 2 9}、Arg^{1 3 1} および Pro^{1 3 2} によって規定される部位からなるグループから選択される VEGFR-1 調節部位に結合する方法。

【請求項 8 3】

VEGFR-3 に結合する自然リガンドへの VEGFR-3 の結合によって生じる病状を改善する方法であって、該方法が、該リガンドへの VEGFR-3 の結合を阻害するのに有効な量の、該リガンドへの VEGFR-3 の結合の負のレギュレーターを、それを必要とする対象に投与する工程を含み、該負のレギュレーターが、配列番号：22 の Lys^{1 2 0}、Ser^{1 2 1}、Ile^{1 2 2}、Trp^{1 2 6}、Arg^{1 2 7}、Gln^{1 3 0}、Phe^{1 5 1}、Lys^{1 5 3}、Ser^{1 6 8}、Gly^{1 7 0}、Leu^{1 7 1}、Tyr^{1 8 4}、Phe^{1 8 6}、Ile^{1 9 0}、Pro^{1 9 1}、Pro^{1 9 6}、Pro^{1 9 8}、Arg^{2 1 0}、Met^{2 1 2} および Ser^{2 1 3} によって規定される部位、および配列番号：22 の Thr^{1 4 8}、Asn^{1 4 9}、Thr^{1 5 0}、Phe^{1 5 1} および Pro^{1 5 5} によって規定される部位からなるグループから選択される VEGFR-3 調節部位に結合する方法。

【請求項 8 4】

請求項 1、2、4～6、9～15、26、35～53、57～59、および 67～71 のいずれか 1 つに記載のポリペプチドを含む医薬組成物。

【請求項 8 5】

請求項 60～66 のいずれか 1 つに記載の分子を含む医薬組成物。

【請求項 8 6】

10

20

30

40

50

請求項 84 に記載の医薬組成物を、VEGFR-1 を選択的に刺激するのに有効な投与量において投与することによって哺乳動物対象を治療する方法。

【請求項 87】

請求項 84 に記載の医薬組成物を、VEGFR-3 を選択的に刺激するのに有効な投与量において投与することによって哺乳動物対象を治療する方法。

【請求項 88】

請求項 85 に記載の医薬組成物を、VEGFR-1 を選択的に刺激するのに有効な投与量において投与することによって哺乳動物対象を治療する方法。

【請求項 89】

請求項 85 に記載の医薬組成物を、VEGFR-3 を選択的に刺激するのに有効な投与量において投与することによって哺乳動物対象を治療する方法。 10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本願は、2000年5月18日に出願された米国仮特許出願第60/205,331号、および2000年2月25日に出願された米国仮特許出願第60/185,205号の優先権を主張する。

各優先権出願の全文および図面は、何らの予断や放棄を伴わずして、参考までに本明細書に組み込まれる。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】

PDGF（血小板由来成長因子）タンパク質類およびそれらの受容体類（PDGFRs）は、数種の細胞タイプの細胞増殖、生存および移動の調節に関係している。

VEGF（血管内皮成長因子）タンパク質類およびそれらの受容体類（VEGFRs）は、早期分化内皮細胞からの胎児脈管構造の発達である脈管形成、および先在血管から新規血管を形成するプロセスである血管新生の両方において重要な役割を果たす [Risau et al., Dev Biol 125:441-450 (1988); Zachary, Intl J Biochem Cell Bio 30:1169-1174 (1998); Neufeld et al., FASEB J 13:9-22 (1999); Ferrara, J Mol Med 77:527-543 (1999)]。 30

どちらのプロセスも厳密に制御された内皮細胞の増殖、移動、分化および生存に左右される。

内皮細胞調節システムの機能不全は、癌および例えば増殖性網膜症、加齢性筋変性症、慢性関節リウマチおよび乾癬のような血管形成異常に関連する数種の疾患の重要な特徴である。

内皮細胞の調節に関係する中心的存在が果たす特定の生物学的機能を理解できれば、結果としてそのような疾患を治療するためのより効果的な治療適用につながるであろう [Zachary, Intl J Biochem Cell Bio 30:1169-1174 (1998); Neufeld et al., FASEB J 13:9-22 (1999); Ferrara, J Mol Med 77:527-543 (1999)]。 40

【0003】

PDGF/VEGFファミリー

成長因子のPDGF/VEGFファミリーのメンバーには、少なくとも次のものが含まれる：PDGF-A（例えば、GenBank登録番号X06374を参照）、PDGF-B（例えば、GenBank登録番号M12783を参照）、VEGF（例えば、GenBank登録番号Q16889を参照；ここでは明瞭にするためにVEGF-Aまたは特定アイソフォームと称する）、PlGF（例えば、GenBank登録番号X54936を参照；胎盤由来成長因子）、VEGF-B（例えば、GenBank登録番号U48801を参照；VEGF関連因子（VRF）としても知られている）、VEGF-C（例えば、GenBank登録番号X94216を参照；VEGF関連タンパク質（VRP）と 50

しても知られている)、VEGF-D (c-fos誘発性成長因子(FIGF)としても知られている;例えば、GenBank登録番号AJ000185を参照)、VEGF-E (NZ7 VEGFまたはOV NZ7としても知られている;例えば、GenBank登録番号S67522を参照)、NZ2 VEGF (CV NZ72としても知られている;例えば、GenBank登録番号S67520を参照)、D1701 VEGF様タンパク質(例えば、GenBank登録番号AF106020を参照;Mayer et al., EMBO J 18:363-374)、およびNZ10 VEGF様タンパク質(国際出願第PCT/US92/25869号に記載されている)[Stacker and Achen, Growth Factors 17:1-11(1999);Neufeld et al., FASEB J 13:9-22(1999);Ferrara, J Mol Med 77:527-543(1999)]。 10

【0004】

PDGF/VEGFファミリーのメンバーは、下記の配列によって定義される保存されたPDGFモチーフを含む多数の構造モチーフを特徴とする:P-[PS]-C-V-X(3)-R-C-[GSTA]-G-C-C。

角括弧は、ポリペプチド内のこの位置が角括弧内に含まれるアミノ酸のいずれか1つであってよいことを示している。

丸括弧内に含まれている数は“V”および“R”残基を分離するアミノ酸の数を示している。

この保存されたモチーフは、一部は分子間および分子内ジスルフィド結合を形成する8個の高度に保存されたシステイン残基によって定義される70~150アミノ酸の大きなドメイン内に含まれている。 20

このドメインは、例えばトランスフォーミング成長因子 β (TGF- β)のような他のシステインノット成長因子において所見されるものに類似する、2つの隣接 β ストランド間で共有結合したリング構造を形成する2個のジスルフィド結合と、そのリングに貫通する第3のジスルフィド結合とからなるシステインノットモチーフを形成している[例えば、Muller et al., Structure 5:1325-1338(1997)]に記載の図1を参照]。

VEGF-E以外は全部がよく知られているPDGF/VEGFタンパク質のアミノ酸配列はPDGFドメインを含有している。 30

PDGF/VEGFファミリータンパク質類は、主としてそれらのサブユニットがアンチパラレル法で配列されているジスルフィド結合もしくは非共有結合ホモダイマーもしくはヘテロダイマーのどちらかを形成する分泌糖タンパク質である[Stacker and Achen, Growth Factors 17:1-11(1999);Muller et al., Structure 5:1325-1338(1997)]。

【0005】

PDGFサブファミリー

PDGFsは、in vitroで数多くの細胞タイプの細胞増殖、細胞生存および化学走化性を調節する[Heldin et al., Biochimica et Biophysica Acta 1378:F79-113(1998)]。 40

PDGF、PDGF-AおよびPDGF-Bを作り上げる2つの鎖は、PDGF-AA、PDGF-ABまたはPDGF-BBの3種のアイソフォームを産生しながらホモダイマー化またはヘテロダイマー化することができる。

PDGF-AはPDGF α 受容体(PDGF α R)にしか結合できないが、他方PDGF-BはPDGF α と第2PDGF受容体(PDGF β)の両方に結合することができる。

In vivoにおいて、PDGFタンパク質類はパラクリン(傍分泌)法でそれらの機能を発揮するが、それはPDGFタンパク質類がしばしばPDGF受容体発現間充織に密接に付着している上皮(PDGF-A)または内皮(PDGF-B)細胞中で発現するからである[Ataliotis et al., Int Rev Cytology 17 50

2 : 9 5 - 1 2 7 (1 9 9 7) において検討されている]。

P D G F s の過剰発現は、悪性腫瘍、アテローム硬化症および線維増殖性疾患を含む数種の病的状態において観察されている。

I n v i t r o で増殖した腫瘍細胞および細胞株では、P D G F s および P D G F 受容体の共発現は、細胞形質転換のために重要である自己分泌ループを発生させる [B e t s h o l t z e t a l . , C e l l 3 9 : 4 4 7 - 5 7 (1 9 8 4) ; K e a t i n g e t a l . , S c i e n c e 2 3 9 : 9 1 4 - 6 (1 9 8 8)] 。

【0006】

細胞増殖および細胞生存の調節物質としての P D G F s の重要性は、マウスにおいて最近実施された遺伝子標的試験によって明確に証明されている。

P D G F - A または P D G F - B のどちらかに対するホモ接合性ヌル突然変異はマウスにおいて致死性である。

約 5 0 % のホモ接合性 P D G F - A 欠損マウスは早期致死性表現型を有しており、生き残った動物は不適切な肺胞中隔形成を原因とする肺気腫を伴う複雑な後天性表現型、そして、薄い真皮、奇形毛嚢および薄い毛髪を特徴とする皮膚表現型を有している。

P D G F - A はさらにまた、希突起膠細胞の正常な発達および引続いての中樞神経系の髄鞘形成のためにも必要とされる。

P D G F - B 欠損マウスは、腎臓、血液および心血管の異常を発生する；腎臓および心血管欠損は、少なくとも一部には、壁細胞（血管平滑筋細胞、周囲細胞もしくはメサンギウム細胞）から血管への適正な補充現象の欠如を原因とする。

【0007】

V E G F サブファミリー

V E G F サブファミリーは、次の配列を特徴とする V E G F ホモロジドメイン (V H D) を共有する P D G F / V E G F メンバーからなる：C - X (2 2 - 2 4) - P - [P S R] - C - V - X (3) - R - C - [G S T A] - G - C - C - X (6) - C - X (3 2 - 4 1) - C 。

V E G F サブファミリーメンバーの解析から決定された V H D ドメインは、P D G F モチーフを含んでいるが、より特異的である。

【0008】

V D G F - A は、最初は内皮細胞に向かう有糸分裂促進活性に基づいて、およびそのために血管透過性亢進因子 (V P F) とも呼ばれている微小血管透過性を誘発する能力によって数種の起源から精製された。

V E G F - A はその後、細胞内カルシウムの可動化、プラスミノゲンアクチベーターおよびプラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 合成の誘導、i n v i t r o での単球移動の促進、内皮細胞における窓形成の誘導、内皮細胞における細胞付着分子発現の促進および酸化窒素媒介性血管拡張および降圧の誘導を含む多数の生物学的プロセスを誘導することが証明されている [F e r r a r a , J M o l M e d 7 7 : 5 2 7 - 5 4 3 (1 9 9 9) ; N e u f e l d e t a l . , F A S E B J 1 3 : 9 - 2 2 (1 9 9 9) ; Z a c c h a r y , I n t l J B i o c h e m C e l l B i o 3 0 : 1 1 6 9 - 1 1 7 4 (1 9 9 8)] 。

【0009】

V E G F - A は 2 3 k D サブユニットからなる分泌ジスルフィド結合ホモダイマー糖タンパク質である。

別個の m R N A スプライス変種によってコードされた長さが 1 2 1、1 4 5、1 6 5、1 8 9 もしくは 2 0 6 アミノ酸の 5 種のヒト V E G F - A アイソフォーム (V E G F 1 2 1 - 2 0 6) が報告されており、それらはいずれも内皮細胞中で有糸分裂生起を刺激することができる。

しかし、各アイソフォームは、生物学的活性、受容体特性、および V E G F - A に対する低親和性受容体として挙動する細胞表面マトリックスおよび細胞外マトリックス関連性へパラン硫酸プロテオグリカン類に対する親和性に関しては相違している。

VEGF₁₂₁ はヘパリンにもヘパラン硫酸にも結合しない；VEGF₁₄₅ および VEGF₁₆₅ (GenBank 登録番号 M32977) はどちらもヘパリンに結合することができる；VEGF₁₈₉ および VEGF₂₀₆ はヘパリンおよびヘパラン硫酸に対して最強の親和性を示す。

VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₅ および VEGF₁₆₅ は可溶形で分泌されるが、ほとんどの VEGF₁₆₅ は細胞表面および細胞外マトリックスプロテオグリカンに限定され、他方、VEGF₁₈₉ および VEGF₂₀₆ は細胞外マトリックスに結び付いたままとなる。

VEGF₁₈₉ および VEGF₂₀₆ はどちらもヘパリンまたはヘパリナーゼを用いた処理によって遊離させることができるが、これはこれらのアイソフォームがプロテオグリカン類によって細胞外マトリックスに結合されていることを示している。 10

細胞定着 VEGF₁₈₉ はさらにまたプラスミンのようなプロテアーゼ類によって分解させることもでき、活性可溶性 VEGF₁₁₀ の遊離を生じさせる。

【0010】

VEGF を発現するほとんどの組織は同時に数種の VEGF アイソフォームを発現することが観察されているが、VEGF₁₂₁ および VEGF₁₆₅ が優勢なアイソフォームであり、他方、VEGF₂₀₆ はめったに検出されない [Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999)]。

VEGF₁₄₅ は、主として生殖器に由来する細胞中で発現する点で相違している [Neufeld et al., FASEB J 13: 9-22 (1999)]。 20

【0011】

VEGF-A 発現のパターンは、VEGF-A が正常血管系の発達および維持、ならびに腫瘍増殖および、例えば、慢性関節リウマチのような他の病的状態に関連する血管形成に関係していることを示唆している。

VEGF-A は発達中の血管系に関連する胎児組織内で発現するが、極めて多数の腫瘍細胞株によっても分泌される。

【0012】

標的遺伝子破壊によって VEGF-A がノックアウトされたマウスの解析は、VEGF-A が生存のために極めて重要であること、および心血管系の発達が VEGF-A 濃度勾配に高度に感受性であることを指摘している。 30

VEGF-A の単一コピーが欠如するマウスは妊娠第 11～12 日目に死亡した。

これらのマウス胎児は成長障害および発達中の心血管構造における欠損を含む数種の発達異常を示している。

VEGF-A はさらにまた、出生後にも成長、器官発達、成長板形態形成の調節および軟骨内骨形成のために必要とされる。

VEGF-A に対する必要は、加齢とともに、特に生後第 4 週後には減少する。

成体動物では、VEGF-A は、主として、例えば、創傷治癒および黄体の発達のようなプロセスにおける活性血管形成のために必要とされる [Neufeld et al., FASEB J 13: 9-22 (1999); Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999)]。 40

VEGF-A 発現は、主として低酸素状態および多数のホルモン類や上皮成長因子 (EGF)、TGF-β を含むサイトカイン類、さらに種々のインターロイキン類による影響を受ける。

調節は転写によって、および、さらに、例えば、mRNA 安定性の増加によってのように転写後に発生する [Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999)]。

【0013】

VEGF サブファミリーの第 2 メンバーである PlGF は、VEGF-A に比較して血管形成および内皮細胞増殖の不良な刺激因子であり、PlGF の *in vivo* での役割は明確には判明していない。

選択的mRNAスプライシングによって産生するPlGFの3種のアイソフォームが報告されている [Hauser et al., Growth Factors 9:259-268 (1993); Maglione et al., Oncogene 8:925-931 (1993)]。

PlGFは、VEGF-Aとのジスルフィド結合ホモダイマーおよびヘテロダイマーの両方を形成する。

PlGF-VEGF-Aヘテロダイマーは内皮細胞増殖および血管形成を誘導することに関しては、PlGFホモダイマーより有効である。

PlGFは主として胎盤中で発現し、さらにまた傍卵黄囊の絨毛性巨細胞における早期胎児形成中にはVEGF-Aと共発現する [Stacker and Achen, Growth Factors 17:1-11 (1999)]。 10

【0014】

国際公開公報第WO96/26736号および米国特許第5,840,693号および第5,607,918号に詳細に記載されているVEGF-BはVEGF-Aと約44%のアミノ酸同一性を共有している。

VEGF-Bのin vivoでの生物学的機能はまだ完全には判明していないが、血管形成特性を有することは証明されており、さらに細胞付着および移動、および細胞外マトリックスの変性を調節することに関係している可能性がある。

VEGF-Bは選択的スプライシングによって産生する167および186アミノ酸配列を有する2種のアイソフォームとして発現する。 20

VEGF-B167は、ヘパリン結合ドメインを介して細胞表面もしくは細胞外マトリックスと結び付いているが、他方VEGF-B186は分泌される。

VEGF-B167およびVEGF-B186は、どちらもVEGF-Aとともにジスルフィド結合ホモダイマーまたはヘテロダイマーを形成することができる。

VEGF165-VEGF-B167ヘテロダイマーの細胞表面とのつながりは、VEGF-Bコンポーネントによって決定されると思われ、これはVEGF-Aを隔離するためにヘテロダイマー化が重要である可能性を示唆している。

VEGF-Bは、主として胎児および成体心臓および骨格筋組織中で発現する [Joukov et al., J Cell Physiol 173:211-215 (1997); Stacker and Achen, Growth Factors 17:1-11 (1999)]。VEGF-Bが欠如するマウスは生き残るが、小さな心臓、機能不全の冠血管構造を有しており、さらに心虚血の結果として生じる回復障害を示す [Bellomo et al., Circ Res 2000; E29-E35]。 30

【0015】

VEGFサブファミリーの第4のメンバーであるVEGF-Cは、VEGF-Aとアミノ酸レベルで約30%同一性であるVHDを備えている。

VEGF-Cは、バルビアニリング3タンパク質に典型的なモチーフ内に縦列反復システイン残基を含有するC末端ペプチドとともに、VHDに隣接する広範囲のアミノ末端およびカルボキシ末端ペプチド配列を有する大きな前駆タンパク質であるプレプロ-VEGF-Cとして発現する。 40

プレプロ-VEGF-Cは、シグナルペプチド、C末端プロペプチドおよびN末端プロペプチドの連続開裂を含む広範囲のタンパク質分解性成熟を受ける。

分泌VEGF-Cタンパク質は、その中で各モノマーがVHDを含有している1種の非共有結合ホモダイマーからなる。

部分タンパク質溶解性プロセッシングによって産生するVEGF-Cの中間体は、VEGFR-3受容体に対する親和性増加を示し、さらに成熟タンパク質もまたVEGFR-2受容体に結合することができる [Joukov et al., EMBO J., 16:(13):3898-3911 (1997)]。

その中で第156位にある単一システインが別のアミノ酸によって置換されているか欠失している突然変異VEGF-CはVEGFR-2に結合する能力を消失しているが、依然 50

として VEGFR-3 に結合して活性化することはできることも証明されている [国際公開公報第 WO 98/33917 号]。

【0016】

マウス胎児では、VEGF-C mRNA は主として尿膜、頸部領域および後腎において発現する [Joukov et al., J Cell Physiol 173:211-215 (1997)]。

VEGF-C は、リンパ管形成の調節に関係している：VEGF-C がトランスジェニックマウスに皮膚中で過剰発現すると、過形成リンパ管網が観察されるが、これは VEGF-C がリンパ成長を誘導することを示唆している [Jeltsch et al., Science, 276:1423-1425 (1997)]。

成体における VEGF-C の持続的発現は、さらに分化リンパ内皮の維持において重要な役割を果たすことを示している [Ferrara, J Mol Med 77:527-543 (1999)]。

VEGF-C は、さらにまた血管形成特性も示している：VEGF-C は、コラーゲン中のウシ毛細管内皮 (BCE) 細胞の移動を刺激したり、ヒト内皮細胞の成長を促進したりすることができる [例えば、参照してここに組み込まれる国際公開公報第 WO 98/33917 号を参照]。

【0017】

VEGF-D は、VEGF-C に構造的および機能的に極めて密接に関連している [例えば、参照してここに組み込まれる国際公開公報第 WO 98/07832 号を参照]。VEGF-C と同様に、VEGF-D は、最初はプレプロペプチドとして発現し、N-末端および C-末端タンパク質溶解性プロセッシングを受け、非共有結合ダイマーを形成する。

VEGF-D は、in vitro で内皮細胞における有糸分裂誘起反応を刺激する。胎児形成中に、VEGF-D は複雑な時間的および空間的パターンで発現し、その発現は成体における心臓、肺および骨格筋において存続する。VEGF-D ΔNΔC と指定されている VEGF-D の生物学的に活性な断片の単離については、参照してここに組み込まれる国際公開公報第 WO 98/07832 号に記載されている。

VEGF-D ΔNΔC は、親和性タグペプチド FLAG (登録商標) へ連結された VEGF-D の 93~201 アミノ酸残基からなる。

【0018】

VEGF サブファミリーのさらに 4 種のメンバーは、ヒト、ヒツジおよびヤギに感染するポックスウイルスにおいて同定されている。

オルフウイルスをコードする VEGF-E および NZ2 VEGF は、強力な有糸分裂促進剤であり、透過性強化因子である。

どちらも哺乳類 VEGF-A との約 25% のアミノ酸同一性を示し、ジスルフィド結合ホモダイマーとして発現する。

これらのウイルスによる感染症は、これらのウイルス VEGF タンパク質によって誘発される内皮細胞増殖および血管透過性を含む可能性がある嚢胞性皮膚炎を特徴とする [Ferrara, J Mol Med 77:527-543 (1999)]。

VEGF 様タンパク質は、さらにまたオルフウイルスのさらに 2 つの菌株である D1701 [GenBank 登録番号 AF106020; Meyer et al., EMBO J 18:363-374 (1999) に記載されている] および NZ10 [参照までに本明細書に組み込んだ国際出願第 PCT/US99/25869 号に記載されている] からも同定されている。

【0019】

これらのウイルス VEGF 様タンパク質は、宿主内皮上に存在する VEGFR-2 に結合することが証明されており、この結合は感染症の発生および血管形成のウイルス誘導にとって重要である [Meyer et al., EMBO J 18:363-374 (1999); 国際出願第 PCT/US99/25869 号を参照]。

【0020】

PDGF/VEGF受容体

PDGF/VEGFファミリーメンバーと相互作用する7種の細胞表面受容体が同定されている。

これらには、PDGFR- α （例えば、GenBank登録番号NM002606を参照）、PDGFR- β （例えば、GenBank登録番号NM002609を参照）、VEGFR-1/Flt-1（fms様チロシンキナーゼ-1；GenBank登録番号X51602；De Vries et al., Science 255:989-991 (1992)）、VEGFR-2/KDR/Flk-1（受容体/胎児肝キナーゼ-1を含有するキナーゼ挿入ドメイン；GenBank登録番号X59397（Flk-1）およびL04947（KDR）；Terman et al., Biochem Biophys Res Comm 187:1579-1586 (1992)；Matthews et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:9026-9030 (1991)を参照）、VEGFR-3/Ft4（fms様チロシンキナーゼ-4；米国特許第5,776,755号およびGenBank登録番号X68203およびS66407；Pajusola et al., Oncogene 9:3545-3555 (1994)を参照）、ニューロピリン-1（GenBank登録番号NM003873）を参照、およびニューロピリン-2（GenBank登録番号NM003872を参照）が含まれる。

2種のPDGF受容体は上記のようにPDGFsのシグナリングを媒介する。

VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅、VEGF-B、PlGF-1およびPlGF-2はVEGFR-1に結合する；VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₅、VEGF₁₆₅、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-EおよびNZ2 VEGFは、VEGFR-2に結合する；VEGF-CおよびVEGF-DはVEGFR-3に結合する；VEGF₁₆₅、PlGF-2およびNZ2 VEGFは、ニューロピリン-1に結合する；そしてVEGF₁₆₅はニューロピリン-2に結合する[Neufeld et al., FASEB J 13:9-22 (1999)；Stacker and Achen, Growth Factors 17:1-11 (1999)；Ortrega et al., Front Biosci 4:141-152 (1999)；Zachary, Intl J Biochem Cell Bio 30:1169-1174 (1998)；Petrova et al., Exp Cell Res 253:117-130 (1999)]。

【0021】

PDGF受容体はそれらの細胞外ドメインに5個の免疫グロブリン様ループを含有するタンパク質チロシンキナーゼ受容体（PTKs）である。

VEGFR-1、VEGFR-2およびVEGFR-3は、それらの細胞外ドメインに7個のIgドメインおよび細胞質領域内には1個の分断キナーゼドメインが存在することによって特徴付けられるPTKsのPDGFサブファミリーのサブグループを備えている。ニューロピリン-1およびニューロピリン-2はどちらも非PTK-VEGF受容体である。

NP-1は、MAMドメイン；凝固因子VおよびVII、MFGPsおよびDDRチロシンキナーゼに相同性の領域；および2個のCUB様ドメインを含む細胞外部分を有している。

【0022】

VEGF受容体類のいくつかは2種以上のアイソフォームとして発現する。

第7Ig様ループ、膜貫通ドメインおよび細胞質領域が欠けているVEGFR-1の可溶性アイソフォームは、ヒト臍静脈内皮細胞中で発現する。

このVEGFR-1アイソフォームは、高度の親和性でVEGF-Aに結合し、VEGF-A誘発性有糸分裂誘起反応を防止することができる[Ferrara, J Mol Med 77:527-543 (1999)；Zachary, Intl J Biochem Cell Bio 30:1169-1174 (1998)]。

VEGFR-2 から切断された C 末端もまた報告されている [Zachary, Intl J Biochem Cell Bio 30:1169-1174 (1998)]。ヒトでは、それらの C 末端の長さが相違する VEGFR-3 タンパク質の 3 種のアイソフォームがある。

これまでに実施された試験は、長い方のアイソフォームが VEGFR-3 の生物学的特性のほとんどの原因となっていることを示唆している。

【0023】

PDGF に対する受容体である PDGF α -受容体 (PDGFR- α) および β 受容体 (PDGFR- β) は、多数の *in vitro* で増殖させた細胞株によって発現するが、それらは *in vivo* では主として間葉細胞によって発現する ([Raines et al., Peptide growth factors and their receptors (ペプチド成長因子およびそれらの受容体), Heidelberg, Springer-Verlag (1990) の中で検討されている]。10
上記のように、PDGF-B は両方の PDGFRs に結合するが、PDGF-A は PDGFR- α へ選択的に結合する。

【0024】

マウスにおける遺伝子標的試験は、PDGFRs のリガンド特異性が重複しているにもかかわらず、PDGF 受容体に対して別個の生理学的役割を有することを解明した [Rosenkranz et al., Growth Factors 16:201-16 (1999)]。20

2 種の PDGF 受容体のいずれについてのホモ接合性突然変異は、致死性である。

PDGFR- α 欠損マウスは、胎児形成中に妊娠第 10 日目で死亡し、不完全な頭部閉鎖、神経堤発達障害、心血管欠損、骨格欠損および水腫を示す。

PDGFR- β 欠損マウスは、腎臓、血液および心血管異常を特徴とする PDGF-B が欠損している動物に類似する表現型を発生する；腎臓および心血管欠損は、少なくとも一部には、壁細胞（血管平滑筋細胞、周囲細胞もしくはメサングウム細胞）から血管への適正な補充現象の欠如が原因である。

【0025】

VEGFR-1 の発現は、主として血管内皮細胞において発生するが、一部は単球、栄養膜細胞および腎メサングウム細胞に存在する可能性がある [Neufeld et al., FASEB J 13:9-22 (1999)]。30

高レベルの VEGFR-1 mRNA はさらに成体器官中でも検出されており、これは VEGFR-1 が細胞増殖に関連しない成熟血管の静止内皮における機能を有することを示唆している。

VEGFR-1-/- マウスは、子宮内で第 8.5~9.5 日の間に死亡する。

これらの動物において、内皮細胞は発達していたが、機能的血管の形成は重度に損傷されており、これは VEGFR-1 がおそらく細胞移動に関連する細胞-細胞もしくは細胞-マトリックス相互作用に関係していることを示唆している。

最近、チロシンキナーゼドメインだけが消失している突然変異 VEGFR-1 を発現するマウスが正常な血管形成および生存を示すことが証明されたが、これは VEGFR-1 のシグナリング能力が必須ではないことを示唆している [Neufeld et al., FASEB J 13:9-22 (1999); Ferrara, J Mol Med 77:527-543 (1999)]。40

【0026】

VEGFR-2 発現は、血管内皮において広汎に発現する VEGFR-1 の発現に類似しているが、VEGFR-2 発現は、造血幹細胞、巨核球、および腎前駆細胞においても存在する [Neufeld et al., FASEB J 13:9-22 (1999)]

。 VEGFR-1 および VEGFR-2 の発現パターンは広範囲に重複するが、これまでに得られた証拠は、大多数の細胞タイプにおいて、VEGFs の大多数がそれらの生物学的 50

活性を発揮することを通して VEGFR-2 が主要受容体であることを示唆している。VEGFR-2 が欠けているマウス胎児の試験は、さらにこの受容体が内皮細胞分化および造血幹細胞の発達の両方のために必要とされることを指摘している [Joukov et al., J Cell Physiol 173: 211-215 (1997)]。

【0027】

VEGFR-3 は、早期胎児形成中に内皮細胞中で広汎に発現する。

発達の後期中、VEGFR-3 の発現はリンパ管を発達させることに制限されるようになる [Kaipainen A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 3566-3570 (1995)]。

成体では、リンパ管内皮および一部の高内皮小葉脈が VEGFR-3 を発現し、転移性リンパ節におけるリンパ洞およびリンパ管腫において発現増加が発生する。 10

VEGFR-3 はさらにまた、過剰発現試験によって証明された VEGF-C の骨髓造血活性を媒介することができる CD34⁺ 造血幹細胞のサブセットにおいても発現する [国際公開公報第 WO98/33917 号]。

マウス胎児中での VEGFR-3 遺伝子の標的破壊は、主要血管網のリモデリングの不成功、および第 9.5 日後の胎児死亡を引き起こす [Dumont et al., Science, 282: 946-949 (1998)]。

これらの試験は、胎児血管構造の発達およびさらにリンパ管形成中における VEGFR-3 が本質的役割を果たすことを示唆している。

【0028】

VEGF 受容体類の構造解析は、VEGFR-1 および VEGFR-2 上の VEGF-A 結合部位が第 2 および第 3 Ig 様ループに位置することを示している。 20

同様に、VEGFR-2 および VEGFR-3 上の VEGF-C および VEGF-D 結合部位もまた第 2 Ig ループ内に含まれている [Taipale et al., Curr Top Microbiol Immunol 237: 85-96 (1999)]。

第 2 Ig 様ループは、さらにドメインスワッピング実験によって証明されたようにリガンド特異性を付与する [Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999)]。

【0029】

受容体-リガンド試験は、VEGF ファミリータンパク質によって形成されたダイマー類が 2 個の VEGF 受容体分子に結合することができ、それによって VEGF 受容体類をダイマー化できることを示している。 30

VEGFR-1 上、およびおそらくはさらに VEGFR-2 上の第 4 Ig 様ループはリガンドダイマーに受容体類が結合すると 2 個の受容体分子を結合させる受容体ダイマー化ドメインとして機能する [Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999)]。

VEGFR-1 および VEGFR-2 に結合する VEGF-A の領域は相当に大きく重複しているが、これまでに実施された試験は VEGFR-1 または VEGFR-2 のどちらかと相互作用する VEGF-A 内の 2 つの別個のドメイン、ならびにリガンド-受容体相互作用のために決定的に重要であるこれらのドメイン内の特定アミノ酸残基を解明した。 40

1 個の特定 VEGF 受容体への結合を特異的に防止するどちらかの VEGF 受容体特異的ドメイン内の突然変異もまた復元されている [Neufeld et al., FASEB J 13: 9-22 (1999)]。

【0030】

VEGFR-1 および VEGFR-2 は構造的に類似であり、共通リガンド (VEGF₁₂₁ および VEGF₁₆₅) を共有しており、さらに発達中に類似の発現パターンを示す。

しかし、同一リガンドによって VEGFR-1 および VEGFR-2 を通して媒介されるシグナルはわずかに相違しているように思われる。

VEGFR-2 は、VEGF-A に反応して自己リン酸化を受けることが証明されている 50

が、同一条件下での VEGFR-1 のリン酸化はほとんど検出されなかった。

VEGFR-2 媒介性シグナルは、この受容体を組換え的に過剰発現するブタ大動脈内皮細胞の形態、アクチン再構成、およびラフリングにおける著しい変化を惹起する。

これらの細胞では、VEGFR-2 はさらにまたリガンド誘発性化学走化性および有糸分裂誘起性を媒介したが、他方 VEGFR-1 トランスフェクト細胞は、VEGF-A に対する有糸分裂誘起反応が欠如していた。

VEGFR-2 への結合を破壊する VEGF-A における突然変異は内皮細胞の増殖を誘導することに成功しないが、他方 VEGFR-1 への結合能力が欠損している VEGF-A 突然変異体はまだ内皮増殖を促進することができる。

同様に、VEGFR-2 だけを発現する細胞の VEGF 刺激は有糸分裂誘起反応を引き起こすが、他方 VEGFR-1 だけを発現する細胞の匹敵する刺激は細胞移動を生じさせるが細胞増殖は誘導しない。

さらに、VEGFR-1 および VEGFR-2 と共沈するリンタンパク質類は別個であるので、これは相違するシグナリング分子が受容体特異的細胞内配列と相互作用することを示唆している。

【0031】

ここで浮上する仮説は、血管形成における VEGFR-1 の主要機能は、VEGF-A に結合し、従ってそれと VEGFR-2 との相互作用を防止することによって VEGF-A の活性をマイナス調節することであり、他方 VEGFR-2 は内皮細胞における VEGF-A シグナルの主要トランスデューサーであると考えられるというものである。

この仮説を支持して、VEGFR-1 が欠けているマウスは胎児として死亡するが、他方 VEGF-A には結合できるがチロシンキナーゼドメインが欠けている VEGFR-1 受容体を発現するマウスは生き残り、異常な胎児発達または血管形成を示さない。

さらに、VEGFR-2 にだけ結合する VEGF-A 突然変異体の解析は、それらが内皮細胞内における有糸分裂誘起反応を誘導する能力を保持していることを証明している。

しかし、単球の VEGF 媒介性移動は VEGFR-1 に左右されるので、これはこの受容体を通してのシグナリングが少なくとも 1 つの生物学的機能のために重要であることを示している。

さらに、樹状細胞の成熟を防止する VEGF-A の能力もまた VEGFR-1 シグナリングに関連しており、これは VEGFR-1 が内皮細胞以外の細胞タイプにおいて機能する可能性があることを示唆している [Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999); Zachary, Intl J Biochem Cell Bio 30: 1169-1174 (1998)]。

【0032】

ニューロピリン-1 は、最初は軸索誘導に関係するタンパク質のコラプシン/セマホリンファミリーに対する受容体としてクローニングされた [Stacker and Achen, Growth Factors 17: 1-11 (1999)]。

ニューロピリン-1 は、胎児形成中に内皮および特定サブセットのニューロンの両方で発現するので、神経系および血管系の発達を調整することに関係していると思われる。

ニューロピリン-1 の活性化は、VEGF ファミリーチロシンキナーゼ受容体類の不在下で生物学的反応を引き出すとは思われないが、細胞上でのそれらの存在はより効率的な VEGF₁₆₅ の結合および VEGFR-2 媒介性反応をもたらす [Neufeld et al., FASEB J 13: 9-22 (1999)]。

ニューロピリン-1 が欠如するマウスは胎児心血管系の発達において異常を示す [Neufeld et al., FASEB J 13: 9-22 (1999)]。

【0033】

ニューロピリン-2 は発現クローニングによって同定されており、ニューロピリン-1 に密接に関連するコラプシン/セマホリン受容体である。

ニューロピリン-2 は、VEGF₁₆₅ だけに結合するアイソフォーム特異的 VEGF 受容体である。

ニューロピリン-1と同様に、ニューロピリン-2は、内皮および特定ニューロンの両方で発現するが、相当に短い細胞内ドメインのために独立して機能するとは予測されていない。

血管発達におけるニューロピリン-2の機能は不明である [Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999) ; 国際公開公報第WO99/30157号]

。

【0034】

VEGFポリペプチドおよびアンタゴニストに対する治療適用

VEGF-Aが、血管発達の重要な調節物質であるとの発見は、心血管医学においてVEGFをベースとする治療的血管形成を使用する積極的な研究ならびにVEGFアンタゴニストを用いた病的血管形成を特徴とする疾患の治療を鼓舞してきた。 10

引続いて追加のVEGFファミリータンパク質の同定およびそれらが血管信性において果たす役割の解明もまた、これらの成長因子に基づく治療法の発達をもたらしてきた [Ferrara and Alitalo, Nature Med 5: 1359-1364 (1999)] 。

裸DNAまたはアデノウイルスベクターを使用した組換えタンパク質もしくは遺伝子導入の適用によって送達されるVEGF-AまたはVEGF-Cを使用した後肢虚血および心筋虚血の動物試験の結果は、これらの分子が血管新生を促進し、冠動脈血流量を増加させることを意味している。

これらの前途有望な試験結果は、裸DNAをコードするVEGF₁₆₅の動脈内または筋内遺伝子導入によって四肢虚血を有する患者が治療される臨床試験を導いた。 20

心筋虚血またはビュルガー病（閉塞性血栓性血管炎）を有する患者にもVEGF₁₆₅プラスミドDNAが局所注射された。

これらの臨床試験はプラセボ対照試験ではなかったが、患者は臨床的改善および虚血性組織における血管形成の証拠を示した。

心筋虚血を有する患者を治療するために、VEGF-C裸DNAの遺伝子導入またはアデノウイルスベクターを用いたVEGF₁₂₁による遺伝子療法を使用した臨床試験は、現在フェーズIが進行中である [Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999) ; Neufeld et al., FASEB J 13: 9-22 (1999) ; 30

Ferrara and Alitalo, Nature Med 5: 1359-1364 (1999)] 。

組換えVEGF-Aタンパク質を投与する治療効果についてもまた現在進行中の臨床試験で調査中である。

組換えVEGF₁₆₅の冠動脈内注射によって治療された冠虚血症を有する患者のフェーズI試験からの結果は、灌流改善および側副血管形成の証拠を示している。

しかし、引続いてのフェーズII試験では、患者はプラセボ対照群に比較して統計的に有意な改善を示さなかった。

VEGF成長因子についての他の潜在的治療使用には、乳癌手術中に腋窩リンパ節が切除された患者におけるリンパ管形成を促進するためのVEGF-Cの使用が含まれる。 40

組織中の血管形成を促進するために成長因子の組み合わせを使用する治療法もまた、一定の疾患を治療することに関して望ましいことが証明される可能性がある [Ferrara and Alitalo, Nature Med 5: 1359-1364 (1999)] 。

【0035】

VEGF成長因子の活性を阻害することに基づく治療法は現在、病的血管形成を特徴とする疾患状態を治療するために試験中である。

VEGF発現は、原発性乳癌および胃癌を含むヒトの大多数の腫瘍においてアップレギュレーションされる。

マウスにおける試験は、VEGF-Aに対するモノクローナル抗体を用いて動物を治療す 50

ることによって腫瘍関連性血管形成および腫瘍細胞増殖を阻害できることを示している。また別の動物試験は、VEGFR-2受容体を通してのシグナリングを防止する優勢陰性VEGFR-2突然変異体の発現、またはVEGFR-1およびVEGFR-2受容体の細胞外部分だけを含有する組換えVEGFR-1またはVEGFR-2突然変異体の投与が数種の腫瘍細胞株の増殖を抑制することを証明した。

これらの有望な試験結果は、VEGF-AインヒビターとしてVEGF-Aに対するヒト化高親和性モノクローナル抗体類(rhMAb VEGF)を使用する臨床試験を導いた。

非小細胞肺癌、結腸直腸癌、乳癌および腎細胞癌を治療するためのrhMAb VEGFを使用したフェーズII試験もまた現在進行中である。

10

VEGF-C活性の阻害を目標とする化合物もまた癌患者における治療使用について現在試験中である：VEGF-Cの小分子インヒビター類はフェーズII臨床試験中であり、VEGF-Cに対するモノクローナル抗体類は臨床試験に入りつつある。

【0036】

糖尿病性網膜症、網膜中心静脈閉塞または未熟児はVEGF-Aのレベル上昇と関連付けられてきた。

VEGF-Aに対するモノクローナル抗体類または免疫グロブリンγFドメインへ融合した細胞外ドメインだけを含有する可溶性VEGFR-1もしくはVEGFR-2突然変異体を使用した動物試験は、網膜血管形成の抑制を証明している。

VEGF-Aはさらにまた加齢性黄斑変性症(AMD)においても検出されており、その発現はこの疾患における新血管形成の原因であると考えられる。

20

AMDを治療するための組換えヒト化抗VEGF-A Fab抗体断片の硝子体内送達または2'-フルオロピリミジンRNAオリゴヌクレオチドリガンド(アプタマー)の注射については現在、臨床試験進行中である。

VEGF成長因子の活性を阻害する化合物もまた異常血管形成に関係するその他の疾患状態を治療するために使用できる可能性がある。

これらには、虚血性再灌流関連性脳水腫および脳損傷、例えば多嚢胞性卵巣症候群、子宮内膜症および卵巣過激刺激症候群のような卵巣の過形成および過剰血管分布に関連する状態が含まれる[Ferrara and Allitalo, Nature Med 5:1359-1364 (1999)]。

30

【0037】

上述の考察から、VEGFファミリーの成長因子類、およびそれらのインヒビター類が治療薬として極めて大きな可能性を有していることは明白であろう。

例えば、そのような成長因子類およびインヒビター類は、虚血性障害の治療、創傷治癒の促進、または血管形成依存性である新生腫瘍障害の阻害または排除におけるように、必要な場合に血管形成を促進または阻害するために有用である。

しかし、この成長因子ファミリーの様々な天然型メンバーはしばしば多数の受容体に結合し、さらに種々のよく知られている受容体は複数の細胞タイプ上で発現して発達工程および病的状態の存在もしくは不在に依存して変化する可能性がある発現パターンを有している。

40

あらゆる特定成長因子の生物学的作用は受容体依存性、アイソフォーム依存性、および細胞タイプ依存性である可能性がある。

1つの受容体を通して媒介される望ましい治療作用には別の受容体を通して媒介される望ましくない副作用が付随することがある。

あるいはまた、望ましい治療作用は複数の受容体類の刺激を通して強化できる可能性があるが、これは天然型のよく知られているいずれかの単一の成長因子を用いて刺激することはできない。

このため、固有の受容体結合のユニークなプロファイルおよび受容体刺激活性または受容体阻害活性を備える新規のペプチド成長因子に対する必要が存在する。

【0038】

50

【課題を解決するための手段】

本発明は、自然発生血管内皮増殖因子受容体のための新規ポリペプチド結合分子、および該新規ポリペプチドをコード化し、該ポリペプチドの組換え発現に有用なポリヌクレオチドを提供することによって、前記の要求を満たす。

本発明を説明するために、「血管内皮増殖因子」という用語およびその略語「VEGF」（修飾因子なし）は本明細書において総称的に使用され、血管内皮増殖因子-A（VEGF-A）、血管内皮増殖因子-B（VEGF-B）、血管内皮増殖因子-C（VEGF-C）、血管内皮増殖因子-D（VEGF-D）、血小板由来増殖因子-A（PDGF-A）、血小板由来増殖因子-B（PDGF-B）、胎盤増殖因子（PlGF）およびウイルスコード化VEGF様分子を包含するがそれらに限定されない増殖因子ポリペプチドのファミリーのいずれかを意味する。 10

【0039】

例えば、1つの局面において、本発明は、種々の血管内皮増殖因子受容体結合プロフィールを有する2つまたはそれ以上の自然発生脊椎動物血管内皮増殖因子ポリペプチドに由来する複数のペプチドサブユニットを含むキメラポリペプチドを提供し、該キメラポリペプチドは、1つの自然発生血管内皮増殖因子ポリペプチドの少なくとも1つの受容体において結合し、および、該キメラポリペプチドは、自然発生増殖因子ポリペプチドと異なる受容体結合プロフィールを有する。

【0040】

これに関連して、「自然発生脊椎動物血管内皮増殖因子ポリペプチド」という用語は、下記の特性を有するポリペプチドを意味する： 20

(1) ポリペプチドは、脊椎動物（例えば、爬虫類、両生類、鳥類または哺乳類、好ましくは鳥類または哺乳類、最も好ましくは哺乳類、特に、有尾猿、無尾猿またはヒトのような霊長類哺乳動物）のゲノムDNAによってコード化されるか、または哺乳動物ポックスウイルスのような脊椎動物病原体のゲノムによってコード化される；

(2) ポリペプチドは、脊椎動物によって発現される（すなわち、脊椎動物のゲノムDNAの転写／翻訳からか、またはウイルス核酸によってコード化されるポリペプチドの場合には、ウイルス誘発転写／翻訳から）アミノ酸配列の全てまたは一部を含む；

(3) ポリペプチドまたは部分は、自然発生受容体に結合し、アミノ酸モチーフ：C-X(18-28)-P-X-C-X(4)-R-C-X-G-C(1-2)-X(6-12)-C-X(30-46)-C [式中、Xはアミノ酸を表し、括弧内の数字はアミノ酸の許容範囲を表し（例えば、X(18-28)は18-28アミノ酸のストレッチを表す）；C(1-2)は1つまたは2つのシステイン残基を表す] によって部分的に特徴づけられる約70~150アミノ酸のVEGF/PDGF相同ドメイン（V/PHD）を含む。V/PHDは、ヒト血管内皮増殖因子A、B、CおよびD（VEGF-A、-B、-Cおよび-D）、およびヒト血小板由来増殖因子（PDGF）に見られるのと同様のシステインノットモチーフを形成する8つの保存システインを一般に有する。 30

好ましいポリペプチドまたは部分は、より特徴的なアミノ酸モチーフ：C-X(22-24)-P-[PSR]-C-V-X(3)-R-C-X-G-C-C-X(6)-C-X(32-41)-C [式中、括弧内のアミノ酸（例えば[PSR]）は、アミノ酸配列における1つの位置における代替物を表す] を特徴とするV/PHDを含む；および 40

(4) ポリペプチドは、脊椎動物の血管またはリンパ管の内表面を形成する内皮細胞、または血管の内表面を形成し、血管を支える周皮／平滑筋細胞において発現される少なくとも1つの細胞表面受容体に結合する。

好ましいポリペプチドは、内皮細胞において発現される少なくとも1つの細胞表面受容体に結合する。

【0041】

従って、「自然発生脊椎動物VEGFポリペプチド」という用語は、ある特定の構造特性および機能特性を有するポリペプチドを意味する。

これに関連して、該用語は起源を意味するものではない。 50

従って、前記の基準を満たす組換え産生ポリペプチドは、自然に存在する V E G F ポリペプチドのアミノ酸配列および受容体結合特性を有する故に、「自然発生」であると考えられる。

ヒト血管内皮増殖因子-A (V E G F-A)、血管内皮増殖因子-B (V E G F-B)、血管内皮増殖因子-C (V E G F-C)、血管内皮増殖因子-D (V E G F-D)、血小板由来増殖因子-A (P D G F-A)、血小板由来増殖因子-B (P D G F-B)、胎盤増殖因子 (P l G F) ; それらの哺乳類および鳥類オルトログ (「オルトログ」という用語は種相同体を意味する) ; および血管内皮増殖因子-E (V E G F-E)、N Z 2 V E G F、およびボックスウイルスにおいて同定された菌株 D 1 7 0 1 および Z N 1 0 において同定された2つの V E G F 様タンパク質を包含するがそれらに限定されない多くの例示的自然発生血管内皮増殖因子ポリペプチドが当分野において既に知られている。

10

自然発生ヒト V E G F の使用は、ヒト治療法として有効なキメラ分子を発現させて、ヒトにおいて免疫反応を生じるキメラの発現の可能性を最小限にするのに好ましい。

しかし、多くの場合、特に受容体結合ドメインにおいて、V E G F 種オルトログの間に極めて高い相同が存在し、非ヒト自然発生 V E G F を使用して、ヒト治療に使用されるキメラ分子を発現させることもできると考えられる。

本明細書において部分的に特に V E G F-A / V E G F-C キメラポリペプチドに関して本発明を説明するが、本明細書に記載する2つ、または3つ、または4つ、またはそれ以上の V E G F、またはそれらの種オルトログに由来するキメラポリペプチドが特に考えられる。

20

【0042】

本発明のこの局面を説明するために使用される「キメラ」という用語は、キメラ分子のアミノ酸配列が、それが由来する各自然発生 V E G F からの1つまたはそれ以上のアミノ酸の少なくとも1つのストレッチ (好ましくは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 またはそれ以上のアミノ酸のストレッチ) を有することを必要とする。

従って、キメラポリペプチドは、2つまたはそれ以上のポリペプチドの「ハイブリッド」または「モザイク」である。

「キメラ」という用語は、本発明のポリペプチドが、あらゆる自然発生 V E G F 配列 (または自然 V E G F 配列の断片) と同じでないことを意味する。

30

【0043】

本発明のこの局面を説明するために使用される「由来する」 (例えば、「2つまたはそれ以上の自然発生 V E G F ポリペプチドに由来する」) という用語は、キメラポリペプチドおよび2つまたはそれ以上の自然発生 V E G F のアミノ酸配列を標準アルゴリズムを使用して整列した場合に、キメラポリペプチドにおける実質的に全てのアミノ酸が、該キメラが由来する1つまたはそれ以上の自然発生 V E G F における同じ残基と整列することを意味する。

標準タンパク質配列アルゴリズム、例えばクラストラル法 (N u c l A c i d s R e s 2 2 ; 4 6 7 3 - 8 0 (1 9 9 4))、J o t u n - H e i n 法 (M e t h o d s E n z y m o l 1 8 3 ; 6 2 6 - 6 4 5 (1 9 9 0))、または F e n g - D o o l i t t l e 法 (J M o l E v o l 2 5 ; 3 5 1 - 3 6 0 (1 9 8 7)) を使用して、自然発生脊椎動物血管内皮増殖因子ポリペプチドを整列することができ、そのような整列は、V / P H D に分布した8つの高保存システインの存在によって円滑に促進される。

40

従って、一般に認められているタンパク質配列アルゴリズムを使用して整列を行うことによって、キメラポリペプチドが2つまたはそれ以上の自然発生 V E G F に「由来する」ことを容易に確認することができる。

標準アルゴリズムを使用して、キメラポリペプチドおよび2つまたはそれ以上の自然発生 V E G F のアミノ酸配列を整列した後に、キメラポリペプチドにおける実質的に全てのアミノ酸が、1つまたはそれ以上の天然 V E G F における同じ残基と整列する場合、キメラポリペプチドは自然発生 V E G F に由来している。

50

1つの実施形態において、キメラ分子の全てのアミノ酸がこのように整列する。

しかし、「実質的に全ての」という用語の使用は、キメラポリペプチドを製造する本明細書に記載されている方法は、挿入、欠失または置換のような変異を導入し、親配列への100%の相関を妨げる場合があることを示している。

【0044】

そのような場合、キメラポリペプチドの残基の少なくとも約90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%または99%が、少なくとも1つの天然VEGFからの同じ残基と整列する。

【0045】

キメラポリペプチドが由来した天然VEGFポリペプチドと完全にあるいは実質的に整列している本発明のキメラポリペプチドを提示する場合、突然変異（特に保存的変異）をそのキメラポリペプチドに意図的に導入して、また、その受容体結合プロフィールに関してこうした修飾キメラポリペプチドを試験することは、熟練した技術を有する当業者の技術の範囲内にある。

受容体結合プロフィールにおいて実質的な変化を導入することがないキメラポリペプチドの修飾（特に保存的アミノ酸置換）は、本発明の範囲内の等価物と考えられる。

【0046】

こうしたキメラポリペプチドの文脈では、「複数のペプチドサブユニット」という用語は、2つあるいはそれ以上のペプチドサブユニットを意味する。

本明細書で例示されているのは、それぞれ約8～16コドンの9サブユニットの中に2つの自然発生VEGF cDNAのもの（ヒトVEGF-AおよびヒトVEGF-C）の中にキメラポリペプチドを断片化して入れ、また、これら断片をその9つのサブユニットの全512の配列（サブユニットの順序を維持して）内に組み込み、また、その結果生じたキメラcDNAを発現させることにより得られるキメラポリペプチドである。

断片の数とサイズは、1つの非常に重要な特徴であるとは考えられていない。

好適な実施形態では、複数のものは、2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24あるいは25あるいはそれ以上のサブユニットからなる。

本明細書に例示されているように、「サブユニット」は、ポリペプチド鎖を形成するペプチド結合により結合される。

【0047】

本発明のキメラポリペプチドあるいは自然発生VEGFポリペプチドの文脈では、「血管内皮成長因子受容体結合プロフィール」の測定は、ポリペプチドが結合するであろう受容体、およびそれが結合しないであろう受容体の測定を意味する。VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3を含む公知のVEGF受容体は、本明細書中の他の箇所にさらに詳細に説明されている。

公知のPDGF受容体はまた、本明細書中の他の箇所でさらに詳細に説明されている。

キメラポリペプチドが自然発生するPDGF配列から一部分得られた場合は、PDGF受容体に結合するためのキメラポリペプチドをスクリーニングすることが、その受容体結合プロフィール測定の一部として考えられている。

例として、キメラポリペプチドが、VEGFR-2とVEGFR-3に結合するVEGF-Aから、また、VEGFR-2とVEGFR-3に結合するVEGF-Cから獲得された場合には、そのキメラポリペプチドはそれがその3つの受容体のうちの1つのみに結合する場合、あるいはそれが全3つの受容体に結合する場合、あるいはそれがVEGFR-1とVEGFR-3には結合するが、VEGFR-2には結合しない場合には、その親分子のいずれとも異なる受容体結合プロフィールを有する。

1つの好適な実施形態では、本発明は、そのキメラポリペプチドは、自然発生するその2つあるいはそれ以上の脊椎動物VEGFポリペプチドのそれぞれによって結合される少なくとも2つのVEGF受容体にキメラポリペプチドが結合し、また、そのキメラポリペプチドが得られたその自然発生VEGFポリペプチドが、その少なくとも2つのVEGFポ

リペプチドの1つあるいはそれ以上に結合することには失敗するキメラポリペプチドを提供する。

【0048】

NP-1とNP-2の結合を司っているVEGF（またその他のファミリーメンバー）のその部分はV／PHDコア領域の外側の部分であるため、そのニューロピリン {neuropilin = ニューロピル = 神経絨} NP-1に対して結合するために本発明のポリペプチドをスクリーニングすることは、受容体結合プロフィール測定の一部としては考えられていない。

NP-1結合はVEGF-Aに関しては、配列番号：2のアミノ酸残基142～185により仲介され、また、VEGF-Bに関しては、アミノ酸残基138～182により仲介される [Soker et al., J. Biol. Chem. 271: 5761-7 (1996); Makinen et al., J. Biol. Chem. 274: 21217-22 (1999)]。

下記に説明されているように、本発明のキメラポリペプチドに対して上流あるいは下流を付加することが企図され、また、いくつかの付加配列が、NP-1およびNP-2結合を結果的に生じるよう、企図される。

【0049】

本発明は、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3の全てに結合することができると考えられる。

この受容体結合プロフィールを有する全てのポリペプチドは、本発明の範囲内にあるものと考えられる。

【0050】

自然発生VEGFポリペプチドは一般的には高い親和性をもって、すなわち、これはサブナノモル解離定数をもってそれぞれの受容体を結合させることを意味していることがこの文脈では理解される。

例えば、VEGF-Aは、それぞれおよそ16 pMおよび760 pMのKdをもって、VEGF-1とVEGFR-2を結合させ、また、VEGF-Cは、それぞれおよそ410 pMおよび135 pMのKdをもって、VEGFR-2とVEGFR-3を結合させる。正常血清濃度を越える濃度を達成するために、治療用の成長因子を投与すること、また、生物学的半減期を増大させるためにこうしたポリペプチドを製剤化することが可能であるため、より小さな受容体親和性（すなわち、より高い解離定数）を有するキメラポリペプチドは、それでもなお、受容体アゴニストおよびアンタゴニストとして有用となる。

キメラポリペプチドの受容体結合を評点する目的で、50ナノモルの解離定数の切り捨てが選択される。参考文献として本明細書に組み込まれている、Colingane et al., 『タンパク質の科学における現行プロトコル』、第2巻, New York, John Wiley & Sons社刊、A. 5A. 1～A. 5A. 40ページ (1998) に記載されているそうしたものの何らかの通常および認められている方法により、測定された50ナノモルよりも小さなものの解離定数により受容体を結合させるキメラポリペプチドは、受容体に結合するものとして評点され、また、より低い親和性を有するポリペプチドは、非結合のものとして評点される。

【0051】

自然発生VEGFのものは、タンパク質分解プロセスを受けるスプライス変異体および／またはプレタンパク質分子および／またはプレプロタンパク質分子として発現される。

本発明のキメラポリペプチドには、前出の段落で説明されているように、キメラ（ハイブリッド）受容体結合ドメインが含まれ、また、任意には、自然発生循環VEGFのものの成熟イソ型に存在している上流および下流配列および／または正常細胞内あるいは細胞外プロセス時に取り除かれる上流あるいは下流プロペプチド配列を含む自然発生VEGFのものから得られる付加的な上流あるいは下流配列が含まれることがある。

説明図により、実施例1に説明されているキメラポリペプチドは、VEGF-Aの残基34～135（配列番号：2）を使用して、また、ヒトプレプロ-VEGF-C（配列番号

10

20

30

40

50

：22)の{残基}112～216を使用して調製された。

本発明のキメラポリペプチドには、実際に例示されたペプチドが含まれ、また、配列番号：2あるいは22から得られた上流あるいは下流VEGF-AあるいはVEGF-C配列により修飾されたこうしたペプチドもまた含まれる。

本明細書に例示されているように、VEGF-A/VEGF-Cキメラポリペプチドに関しては、天然VEGF-AあるいはVEGF-Cイソ型の特徴を有するアミノ-および/またはカルボキシル-末端配列と一致する上流および下流配列の付加が特に企図されている。

【0052】

イニシエーターであるメチオニンにより、異種シグナルペプチドにより、その他のポリペプチドとの融合など、精製を容易にする1つあるいはそれ以上のタグ配列により、あるいはその他により、タンパク質を組換え的に発現させることもまた、この文脈では周知のことである。

また、糖鎖形成、ポリエチレングリコール化、あるいはその他の修飾によりポリペプチドを修飾することが周知のものであり、安定性、循環半減期を改善するそのうちのあるものは、あるいは(糖鎖形成の場合は)内因性血管内皮成長因子にさらに類似しているポリペプチドを作ることもある。

本発明によるキメラポリペプチドは、2つあるいはそれ以上の自然発生脊椎動物血管内皮成長因子ポリペプチドから得られたアミノ酸配列に対するいずれかのこうした修飾および付加からなることがある。

【0053】

異なる受領体結合プロフィールを有するキメラ分子に加えて、本発明の付加的な実施態様には、増加する受容体結合親和性を有するキメラ分子が含まれる。

例えば、本発明は、2つあるいはそれ以上の自然発生脊椎動物血管内皮成長因子ポリペプチドから得られた複数のペプチドサブユニットからなるキメラポリペプチドを提供し、そのキメラポリペプチドは、その受容体に対する2つあるいはそれ以上の自然発生血管内皮成長因子の結合親和性に比較して増大した結合親和性をもって少なくとも1つの自然発生血管内皮成長因子受容体を結合させる。

自然発生VEGFのものよりも大きな親和性により受容体を結合させるキメラ分子は、たとえキメラ分子に関する受容体結合プロフィールが自然発生VEGFのそれと同じものであっても、本発明の好適なキメラ分子の間にある。増加した受容体結合親和性は、受容体活性化剤あるいは阻害剤としての大きな力価と相関していることが考えられる。

一般的には、いずれかの受け入れられている手順により測定された解離定数(K_d)は、大きな結合親和性を示す低いK_dにより受容体親和性を示す。特に企図されているのは、そのキメラが得られた自然発生分子に比べて、並列試験においては、 $p < 0.05$ のレベルで統計的に有意なものであるK_dで何らかの減少を示すキメラ分子である[例えば、Collingane et al., 『タンパク質の科学における現行プロトコル』、第2巻、New York, John Wiley & Sons社刊、A. 5A. 1～A. 5A. 40ページ(1998)を参照]。VEGF受容体に関してはK_dで20パーセント減少を示すキメラが好ましい。

35%あるいは50%の減少は非常に好ましい。

解離定数の3分の1に減少(例えば、自然発生VEGFの100 pM K_dと比べて、キメラポリペプチドの33.3 pMというK_d値)、5分の1に減少、10分の1に減少、あるいは20分の1に減少することが非常に好ましい。

【0054】

キメラ分子に関するもう1つの関連好適クラスとは、そのキメラが由来した自然発生分子に比較して、並列試験で $p < 0.05$ のレベルで統計的に有意なものとなっているEC₅₀濃度において何らかの減少を示す、そういった分子である。

1つのVEGF受容体に対してEC₅₀において20パーセントの減少を示す(すなわち、結合親和性が増加)キメラが好ましい。

10

20

30

40

50

33%あるいは50%といった減少は非常に好ましい。

EC₅₀ すなわち、50%有効濃度とは、最大効果の50%を産み出す濃度である。

特定受容体に対する推定リガンドのEC₅₀を測定するための1つの例示的なアッセイについては実施例6で以下に詳細に述べる。

【0055】

以下に述べる実施例は、本発明の非常に数多くの特定ハイブリッドポリペプチドの合成および検査の説明を提供し、その1つ1つがそれ自体、本発明の1つの実施態様と考えられる。

例示されているポリペプチドの中にある、ハイブリッドポリペプチドの1つの好ましいグループは、この式のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

すなわち、



ここで、X₁は、配列番号：128のアミノ酸3～11および配列番号：137のアミノ酸3～11からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み；X₂は、配列番号：129および138からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、X₃は、配列番号：130および139からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、X₄は、配列番号：131および140からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、X₅は、配列番号：132および141からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、X₆は、配列番号：133および142からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、X₇は、配列番号：134および143からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、X₈は、配列番号：135および144からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、X₉は、配列番号：136および145からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、NH₂ - X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - COOHは、配列番号：2のアミノ酸34～135または配列番号：22のアミノ酸112～216と同じではなく、また、ここでは、そのポリペプチドはヒトVEGFR-1、ヒトVEGFR-2、ヒトVEGFR-3からなるグループから選択される少なくとも1つの受容体に結合する。

以下に、さらに詳細に説明されているように、特定アミノ酸配列対のそれぞれ（例えば、配列番号：128と137）が標準的な整列化アルゴリズムを使用して、配列相同性を最大にするためにVEGF-AとVEGF-Cの受容体結合ドメインが整列化されるときに、それぞれが互いに整列するVEGF-A cDNA断片あるいはVEGF-C cDNA断片によりコード化される。

【0056】

ポリペプチドのハイブリッドの前者の属に関しては、1つの好ましい亜属は、ヒトVEGFR-1、ヒトVEGFR-2、ヒトVEGFR-3からなるグループから選択される正確に1つの受容体に結合するそうしたポリペプチドからなる。

初期スクリーニングでは、以下の特定構築物（以下に詳細に記載されている）は、この基準を満たしていることが示唆される。

すなわち、82～14、82～16、22～3、72～6、12～14、12～16、32～9、32～11、32～14、32～15、32～16、52～9、52～11、52～14、52～15、14～7、23～10、23～12、23～14、33～1、33～3、33～6、33～9、53～1、53～3、53～7、62～8、62～10、62～13、63～3、63～6、73～7、73～15、～8、74～10、74～12、11～9、11～13、12～1、12～5、81～9、81～13、13～9、13～11、13～13、13～15、14～1、14～5、41～1、43～1、83～9、83～13、83～15、61～1、61～3、62～1、82～5、84～1、84～5である。

【0057】

もう1つの好ましい亜属は、VEGFR-1とVEGFR-3には結合するが、VEGFR-2には結合しないそうしたハイブリッドポリペプチドからなる。

初期スクリーニングでは、以下の特定構築物（以下に詳細に記載されている）はこの基準を満たしていることが示唆される。

すなわち、12～9、12～13、14～9、82～9、82～13、84～9である。

【0058】

1つの非常に好ましい垂属は、VEGFR-1とVEGFR-2と、VEGFR-3とを結合させる本発明のハイブリッドポリペプチドからなる。

初期スクリーニングでは、以下の特定構築物（以下に詳細に記載されている）はこの基準を満たしていることが示唆される。

すなわち、12～7、12～11、82～11、84～11である。

【0059】

他の垂属には、VEGFR-1と、VEGFR-2と（その両方ともVEGF-Aにより結合される）は結合させるが、VEGFR-3に結合させない、そうしたハイブリッドポリペプチドと、VEGFR-2とVEGFR-3（その両方とも完全に処理されたVEGF-Cにより結合される）は結合させるが、VEGFR-1は結合させない、そうしたハイブリッドポリペプチドと、が含まれる。

【0060】

以下にさらに詳細に教示されているように、第4断片（X4）には、VEGFR-3結合親和性を与えるために重要なものである残基が含まれているように見える。このため、そのハイブリッドポリペプチドのもう1つの好適な属は、X4が配列番号：140からなるそうしたものであり、また、そのポリペプチドが、VEGFR-3に結合するそうしたものである。

VEGF-Cの断片5と8もまた、VEGFR-3結合に貢献しているように見える。

このように、非常に好適なものであるのは、配列番号：141からなるX5、および／または配列番号：144からなるX8によりさらに特徴付けられるポリペプチドである。

【0061】

同様に、以下のデータでは、VEGF-Aの断片2と7は、VEGF-R1結合に貢献していることが示唆されている。

したがって、もう1つの好適なハイブリッドポリペプチドの遺伝子は、X2が配列番号：129からなり、また、そのポリペプチドがVEGFR-1に結合する、そうした遺伝子である。

1つの非常に好適な実施形態では、X7は配列番号：134からなる。VEGFR-3にも結合するこのポリペプチドには非常に望ましいものである1つの実施形態では、1つの好適な構築物はX4が配列番号：140からなるものである。VEGFR-3結合を付与するためには、X5にとっては、配列番号：141から構成されることがさらに好適であり、および／またはX8にとっては、配列番号：144から構成されることがさらに好適である。

【0062】

ハイブリッド分子を生成するために以下に説明されている組換え実験は、VEGF-AとVEGF-Cあるいはプレタンパク質あるいはプレプロタンパク質配列の自然分泌形態に相当する配列によるのではなく、ヒトVEGF-AとVEGF-Cの受容体結合ドメインによってのみ実施された。

しかし、Ausubel et al., (編)、『分子生物学におけるプロトコル』, John Wiley & Sons社刊(1994～1999)あるいはSambrook et al., (編)、『分子クローニング研究室マニュアル』, Cold Spring Harbour Laboratory Press社刊、ニューヨーク州 Cold Spring Harbour (1989)に説明されているそうした技術などの日常的な組換えDNA技術は、自然に発生するタンパク質中の受容体結合ドメインの上流あるいは下流で見つかるVEGF-AあるいはVEGF-C配列、特に、VEGF-AあるいはVEGF-Cの自然に発生する分泌および循環形態で見つかる配列をコードするポリヌクレオチドと、そのハイブリッドタンパク質をコードするポリヌクレオチドを結合する

10

20

30

40

50

のに使用することができる。

【0063】

したがって、本発明は、式 $XN-V/PHD-XC$ のアミノ酸配列からなるポリペプチドを提供し、ここでは、 XN は配列番号：2のアミノ酸1～34、配列番号：22のアミノ酸1～111、配列番号：147のアミノ酸1～34、あるいはそれらの断片からなるグループから選択される。

【0064】

ここでは、 V/PHD は本明細書の他の箇所で説明されているキメラポリポリペプチドであり、

ここでは、 XC は、配列番号：2のアミノ酸136～191、配列番号：22のアミノ酸217～419、配列番号：147のアミノ酸136～232、あるいはそれらの断片からなるグループから選択され、また、

ここでは、 XN と XC はそれぞれ自然発生ヒトVEGF-AあるいはVEGF-C前駆体タンパク質あるいは自然発生ヒトVEGF-AあるいはVEGF-Cイソ型中のアミノ酸配列に同一である。

【0065】

1つの特定な変化では、本発明は、上述されているように、ハイブリッドポリペプチドを提供し、ここでは、そのポリペプチドにはさらに、プレプロ-VEGF-Cシグナルペプチドと、プレプロ-VEGF-Cアミノ末端プロペプチドと、プレプロ-VEGF-Cカルボキシ末端プロペプチドとからなるグループから選択される1つあるいはそれ以上のアミノ酸配列が含まれる。

【0066】

しかし、本発明のハイブリッドポリペプチドの発現は、自然発生フランキングVEGF-AあるいはVEGF-C配列によってのみの発現に限定されているわけではない。

細菌における本発明のポリペプチドの発現は、ハイブリッドVEGF配列の上流にあるイニシエーターであるメチオニンあるいはメチオニン-リジンを含むことにより達成されることもあり、ここでは、哺乳動物細胞における発現と分泌は、少なくともシグナルペプチドを含むことによりもっとも好都合に達成される。

したがって、1つの実施形態では、本発明は、上述のように、ポリペプチドを提供し、ここでは、そのポリペプチドにはさらに、アミノ末端メチオニン残基あるいはアミノ末端Met-Lys配列が含まれる。もう1つの実施形態では、そのポリペプチドにはさらに、式 $NH_2-X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-COOH$ のアミノ酸配列に接続されているシグナルペプチドアミノ酸配列が含まれる。

【0067】

精製を容易にするタグ配列あるいは、より大きな融合ペプチドの一部としての発現などのその他の異種配列との融合としての本発明ポリペプチドの発現もまた、企図されている。

このタイプの1つの例示的なタグは、ニッケルキレート化を用いてそのように標識化された化合物の分離を可能にする一般的にはだいたい6つのヒスチジン残基であるポリヒスチジン配列である。

当業者には周知のものであり、また日常的に使用されているFLAG（登録商標）タグ（Eastman Kodak社製、ニューヨーク州ロチェスター市）などの他の標識とタグは、本発明により受け入れられる。

例示的な融合には、グルタチオン-S-転移酵素（GST）融合産物的一部分として、所望されるポリペプチドを発現させる市販されていて入手可能なベクターの使用が含まれる。

所望されるポリペプチドからそのGST成分を切断した後、位置-1で付加的グリシン残基が残ることがある。

他のベクターシステムにおける発現から得られる変異体もまた、企図されている。

【0068】

10

20

30

40

50

本明細書に説明されている受容体結合と活性アッセイのため、本適用もまた、本発明のハイブリッドポリペプチドの変異体（類似体）を提供し、ここでは、ハイブリッドペプチドアミノ酸配列の1つあるいはそれ以上のアミノ酸が付加され、欠失され、あるいは別のアミノ酸により置換され、また、ここでは、ハイブリッドは、そのハイブリッドポリペプチドのその受容体結合および／または生物学的活性特性を保持する。

【0069】

単なる保存的な置換が導入された置換変異体（例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの修飾により）は、本発明のハイブリッドポリペプチドの等価物と考えられる。

アミノ酸は物理的特性と、2次と3次タンパク質構造により分類することができる。

10

保存的置換は、当業者には、同様な特性を有する別のアミノ酸に対する1つのアミノ酸の置換として認識される。

アミノ酸側鎖特性に基づいた例示的な保存的置換は、標準的な1文字略語を使用してすぐ下にある表の中に掲載されている。

【0070】

【表1】

側鎖特性	アミノ酸
脂肪族	
非極性	GAPILV
極性－非電荷	CSTMNQ
極性－電荷	DEKR
芳香族	FWY
その他	NQDE

20

【0071】

代替的には直ぐ下の表に掲載したとおりに、保存的アミノ酸がLehninger、『生化学』，第2版；Worth Publishers刊、ニューヨーク州ニューヨーク市（1975），71～77ページ］の中に記載されているようにグループ化することができる。

30

【0072】

【表2】

非極性（疎水性）側鎖

脂肪族：	AL I V P
芳香族：	FW
含 硫：	M
境 界：	G

非荷電極性側鎖

ヒドロキシル：	STY
アミド類：	NQ
スルフヒドリル：	C
境 界：	G
プラス荷電（塩基性）：	KRH
マイナス荷電（酸性）：	DE

10

20

【0073】

以下の表は、さらにもう1つの代替的な、保存的アミノ酸置換体の例示的セットを提供する。

1文字と3文字略語の両方をともに示す。

すなわち、

【0074】

【表3】

原残基	保存的置換体
アラニン : Ala (A)	Val, Leu, Ile
アルギニン : Arg (R)	Lys, Gln, Asn
アスパラギン : Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
アスパラギン酸 : Asp (D)	Glu
システイン : Cys (C)	Ser
グルタミン酸 : Gln (Q)	Asn
グルタミン : Glu (E)	Asp
ヒスチジン : His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
イソロイシン : Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe
ロイシン : Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
リジン : Lys (K)	Arg, Gln, Asn
メチオニン : Met (M)	Leu, Phe, Ile
フェニルアラニン : Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
プロリン : Pro (P)	Gly
セリン : Ser (S)	Thr
スレオニン : Thr (T)	Ser
トリプトファン : Trp (W)	Tyr
チロシン : Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
バリン : Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

10

20

30

【0075】

多くのタンパク質について言えることであるが、アミノ酸変化に関するいずれかの個々の基あるいは小さな基の効果は、特にその変化が保存的置換である場合は、その変化が非常に重要な残基では導入されないという条件であれば、有意に生物学的特性を改変するような可能性はない。

本発明のハイブリッドポリペプチドの好適な変異体は、自然発生 VEGF のものから得られたアミノ酸配列から全部構成されるハイブリッドと、少なくとも約 70%、80%、90%、95%、96%、97%、98% あるいは 99% アミノ酸同一性を共有する。

40

【0076】

関連核酸分子とポリペプチドの同一性と類似性は、公知の諸方法により容易に計算することができる。こうした諸方法には、Lesk, A. M. 編『計算分子生物学』, Oxford University Press 社刊、ニューヨーク、1988; Smith, D. W. 編『バイオコンピューティング—インフォーマティクスとゲノム計画』, Academic Press 社刊、ニューヨーク、1993; Griffin, A. M., Griffin, H. G. 編『シーケンスデータのコンピュータ分析』, 第1部、Human Press 社刊、ニュージャージー州、1994; von Heijne, G

50

., 『分子生物学におけるシーケンス分析』, Academic Press, 1987; Gribskov, M., Devereux, J. 編『シーケンス分析プライマー』, Stockton Press社刊、ニューヨーク州、1991; Carillo et al., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988) に記載されているそうしたものが含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0077】

同一性および／または類似性を測定するための好適な諸方法は、試験された配列間で最大適合を与えるように設計される。

同一性と類似性を測定するための諸方法は、公的に入手可能なコンピュータプログラムに記載されている。

2つの配列間の同一性と類似性を測定するための好適なコンピュータプログラムの諸方法には、GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res., 12:387 (1984); ウィスコンシン大学のGenetics Computer Group, ウィスコンシン州マディソン市) を含むGCGプログラムパッケージ、BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)) が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

そのBLASTPプログラムは、全米バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) とその他の情報源 (BLAST マニュアル、Altschul et al., NCB/NLM/NIH、メリーランド州 20894 Bethesda市; Altschul et al., 同上掲書) から公的に入手可能である。

周知であるSmith Watermanアルゴリズムはまた、同一性を測定するのにも使用されうる。

【0078】

ポリペプチド配列比較のための好適なパラメーターには、以下のものが含まれる。

すなわち、

アルゴリズム: Needleman et al., J. Mol. Biol., 48, 443~453 (1970);

比較マトリックス: Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919 (1992) からBLOSUM62

ギャップペナルティ: 12

ギャップ長さペナルティ: 4

類似性の閾値: 0

核酸分子配列比較のために好適なパラメーターには、以下のものが含まれる。すなわち、アルゴリズム: Needleman et al., J. Mol. Biol., 48, 443~453 (1970);

比較マトリックス: 適合=+10, 不適合=0

ギャップペナルティ: 50

ギャップ長さペナルティ: 3

このように、さらにもう1つの実施形態では、本発明は非自然発生血管内皮成長因子アミノ酸配列からなるポリペプチドを提供し、前記非自然発生血管内皮成長因子アミノ酸配列は、以下の式のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列からなる。

すなわち、

$\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{X}_2 - \text{X}_3 - \text{X}_4 - \text{X}_5 - \text{X}_6 - \text{X}_7 - \text{X}_8 - \text{X}_9 - \text{COOH}$

ここでは、 X_1 は、配列番号: 128のアミノ酸3~11および配列番号: 137のアミノ酸3~11からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、 X_2 は、配列番号: 129および138からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、 X_3 は、配列

10

20

30

40

50

番号：130および139からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、 X_4 は、配列番号：131および140からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、 X_5 は、配列番号：132および141からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、 X_6 は、配列番号：133および142からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、 X_7 は、配列番号：134および143からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、 X_8 は、配列番号：135および144からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、 X_9 は、配列番号：136および145からなるグループから選択されるアミノ酸配列を含み、また、ここでは、そのポリペプチドはヒトVEGFR-1、ヒトVEGFR-2、ヒトVEGFR-3からなるグループから選択される少なくとも1つの受容体に結合する。

10

1つの好適な実施形態では、 $NH_2 - X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - COOH$ は、配列番号：2のアミノ酸34～135または配列番号：22のアミノ酸112～216と同じでない。

【0079】

「非自然発生血管内皮成長因子アミノ酸配列」により、いずれかの公知のものである自然発生アミノ酸配列、この場合は、公知のものであるVEGF-AあるいはVEGF-C配列から得られる受容体結合ドメインなどの自然発生アミノ酸配列に対しては同一ではない配列を意味する。

【0080】

さらに一般的に言うと、本発明は、本発明のいずれかの特定のアミノ酸配列に対して少なくとも約70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、あるいは99%同一であるアミノ酸配列からなり、また、その自然発生血管内皮成長因子の少なくとも1つを結合させ、また、異なる受容体結合プロフィールあるいは自然発生成長因子ポリペプチドよりも改善されている受容体結合親和性を有するポリペプチドを提供する。パーセント同一性評価基準を満たし、また、指示対象ポリペプチドと同じ受容体結合プロフィールを表示するポリペプチドが特に企図されている。

20

例えば、本発明は、構築物12-7（配列番号：63）、12-11（配列番号：71）、82-11あるいは84-11によりコードされたアミノ酸配列と少なくとも約70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、あるいは99%同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドを提供し、そのポリペプチドのうちの少なくとも1つが、本発明によるポリペプチドであり、そのポリペプチドはVEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3を結合させる。

30

【0081】

さらにもう1つの実施態様では、本発明は、第2ポリペプチドと会合されている第1ポリペプチドからなる二量体タンパク質分子を提供し、ここではそのポリペプチドの少なくとも1つが本発明によるポリペプチドである。そのポリペプチドの間の会合は共有結合によるものでありうる（例えば、ジスルフィド結合）、あるいはポリペプチド鎖の非共有結合（例えば、水素結合、安定あるいは誘起双極子-双極子相互作用による結合、疎水性あるいは親水性相互作用による結合、これら結合メカニズムの組み合わせ、など）。

【0082】

もう1つの実施形態では、本発明は、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド（例えば、cDNA、真核系における発現を容易にするために導入されたイントロンを備えたcDNA、合成DNA、RNAあるいはそれらを組み合わせたもの、一本鎖あるいは二本鎖のもの）を提供する。

40

精製および分離ポリヌクレオチドが好ましい。

遺伝子コードの周知の縮重により、本発明の各ポリペプチドアミノ酸配列をコードするいくつかのポリヌクレオチド配列が存在する。

こうしたポリヌクレオチドは、本発明の本ポリペプチドを組換え的に発現させるのに有用である。

【0083】

50

本発明はまた、V E G F 受容体結合ポリペプチドをコードするポリペプチド、また、V E G F 受容体結合ポリペプチドをコードする、本明細書に詳細に説明されているそのポリヌクレオチドの完全な非コード鎖あるいは補体に、適度な緊縮性あるいは高い緊縮性条件下でハイブリダイズされるポリヌクレオチドを受け入れる。

ポリヌクレオチドのこの属は、本明細書に詳細に教示されているアミノ酸配列に比して、1つあるいはいくつかのアミノ酸差異（付加、挿入あるいは欠失）を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを受け入れる。

こうした変化は、部位定方向突然変異誘発を行うことにより、あるいは例えば、本発明のハイブリッドポリペプチドを構築するのに使用されるヒトV E G F - AあるいはV E G F - C ポリペプチドの断片に、非ヒト相同分子種V E G F - AあるいはV E G F - C ポリペプチドから得た断片を置換することにより、容易に導入される。 10

【0084】

例示的な高い緊縮性ハイブリダイゼーション条件とは以下のようなものである。すなわち、

5 × S S P E, 5 × デンハード溶液、0. 5 % S D S、1 0 0 m l ハイブリダイゼーション溶液当たり 2 m g 音波非相同性 D N A からなるハイブリダイゼーション溶液の中に 6 5 °C にて少なくとも 1 2 時間ハイブリダイゼーションを行う；2 × S S P E と 0. 1 % S D S からなる洗浄溶液の中に室温にて 1 0 分間 2 回洗浄する；引き続いて、2 × S S P E と 0. 1 % S D S で 6 5 °C にて 1 5 分間 1 回洗浄する；引き続いて、0. 1 × S S P E と 0. 1 % S D S で 6 5 °C にて 1 0 分間最終洗浄する。 20

適度なストリンジェント洗浄は、6 5 °C にて 1 0 分間で行う最終洗浄の 0. 1 × S S P E の代わりに、0. 5 × S S P E で洗浄することにより達成することができる。

低度のストリンジェント洗浄は 6 5 °C にて 1 5 分間洗浄 1 × S S P E を使用して、また、最終 1 0 分間の洗浄は省略することにより、達成することができる。

等価緊縮性の条件は、A u s u b e l e t a l. , (編) 『分子生物学におけるプロトコル』, J o h n W i l e y & S o n s (1994), 6. 03 ~ 6. 4. 10 ページに記載されているように、温度と緩衝液、あるいは塩濃度に変化をつけることにより達成することができる。

ハイブリダイゼーション条件における修飾は、経験的に測定するか、あるいはそのプローブのグアノシン/シトシン (G C) 塩基対の長さとパーセンテージに基づいて正確に計算 30

そのハイブリダイゼーション条件は、S a m b r o o k e t a l. , (編)、『分子クローニング研究室マニュアル』, 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 刊：ニューヨーク州 C o l d S p r i n g H a r b o r 市 (1998)、9. 47 ~ 9. 51 ページに説明されているように計算することができる。

【0085】

例えば、本発明は、本発明のいずれかの特定のヌクレオチド配列に、適度のストリンジェントあるいは高いストリンジェントハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズされるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、少なくとも 1 つの自然発生血管内皮成長因子あるいは血小板由来成長因子を結合するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド 40

、また、異なる受容体結合プロフィールを有し、あるいは自然発生成長因子ポリペプチドよりも改善された受容体結合親和性を有するポリヌクレオチドを提供する。

そのハイブリダイゼーション評価基準を満たし、また、指示対象であるポリヌクレオチドと同じ受容体結合プロフィールを表示するポリヌクレオチドが特に企図される。

例えば、本発明は、構築物 1 2 - 7 (配列番号：6 2), 1 2 - 1 1 (配列番号：7 0), 8 2 - 1 1, あるいは 8 4 - 1 1 に関して本明細書に教示されているヌクレオチド配列に、適度なストリンジェントあるいは高いストリンジェントハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズされるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを提供し、ここでは、そのポリヌクレオチドは、V E G F R - 1 と、V E G F R - 2 と、V E G F R - 3 と、を結合させるポリペプチドをコードする。 50

【0086】

1つの関連実施形態では、本発明は、本発明のいずれかの特定のヌクレオチド配列に少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、あるいは99%同一であるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、少なくとも1つの自然発生血管内皮成長因子あるいは血小板由来成長因子を結合するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、また、異なる受容体結合プロフィールを有し、あるいは自然発生成長因子ポリペプチドよりも改善された受容体結合親和性を有するポリヌクレオチドを提供する。

そのハイブリダイゼーション評価基準を満たし、また、指示対象であるポリヌクレオチドと同じ受容体結合プロフィールを表示するポリヌクレオチドが特に企図される。

例えば、本発明は、構築物12-7（配列番号：62）、12-11（配列番号：70）、82-11、あるいは84-11に関して本明細書に教示されているヌクレオチド配列に、適度なストリンジェントあるいは高いストリンジェントハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズされるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを提供し、ここでは、そのポリヌクレオチドは、VEGFR-1と、VEGFR-2と、VEGFR-3と、を結合させるポリペプチドをコードする。 10

【0087】

1つの関連実施形態では、本発明は、本発明のポリヌクレオチドからなるベクターを提供する。

こうしたベクターは、例えば、有用なそれらの品質を作り出すために宿主細胞の中でポリヌクレオチドを増殖するのに有用である。 20

好適な実施形態では、そのベクターは、本発明のそのポリペプチド発現制御配列からなるポリヌクレオチドに操作可能にリンクされる、発現ベクターである。

本発明のポリヌクレオチドを組み込むプラスミドとウイルスDNAベクターなどの自律的に複製する組換え発現構築物は特に企図される。

発現制御DNA配列には、プロモーターと、エンハンサーと、オペレーターが含まれ、また、一般的には、その発現構築物が利用されるべき発現システムに基づいて選択される。

好適なプロモーターとエンハンサー配列は一般的には、遺伝子発現を増加させる能力で選択され、一方、オペレーター配列は一般的には、遺伝子発現を調節する能力で選択される。

本発明の発現構築物にはまた、その構築物を有する宿主細胞の同定を可能にする1つあるいはそれ以上の選択可能なマーカーをコードする配列が含まれる。 30

発現構築物にはまた、宿主細胞中で、相同性組換えを容易にし、また好適には促進する配列が含まれる。

本発明の好適な構築物にはまた、宿主細胞中での複製に必要な配列が含まれる。

【0088】

ベクターはまた、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、その対象中の細胞に*in vivo*にて本発明の本ポリペプチドを発現させる形態で、血管内皮成長因子受容体の調節（刺激あるいは阻害）を含む治療が必要である対象の中に導入される、「遺伝子治療」治療処方計画には有用である。

【0089】

もう1つの関連実施形態では、本発明は、本発明のポリヌクレオチドあるいは本発明のベクターにより形質転換される、あるいはトランスフェクションされる（安定的にあるいは一過性に）原核細胞および真核細胞を含む宿主細胞を提供する。 40

本発明のポリヌクレオチドは、円形プラスミドの一部として、あるいは分離タンパク質コード領域あるいはウイルスベクターからなる線形DNAとして、宿主細胞の中に導入される。

当業者には周知の、また、日常的に実施されているDNAを宿主細胞の中に導入するための諸方法には、形質転換、トランスフェクション、電気穿孔、核注入、あるいはリポソーム、ミセル、ゴースト菌体、プロトプラストなどのキャリアーによる融合が含まれる。

上述されているように、こうした宿主細胞はそのポリヌクレオチドを増幅するのに有用で 50

あり、また、そのポリヌクレオチドによりコードされる本発明の本ポリペプチドを発現させるのにも有用である。

こうした宿主細胞は、本明細書に記載されているように、アッセイにおいて有用である。本発明のポリペプチドの発現に関しては、細菌、酵母、植物、無脊椎動物（例えば、昆虫）、脊椎動物、哺乳動物の宿主細胞を含む、いずれの宿主細胞も受け入れ可能であるが、それらに限定されるわけではない。

治療用調製剤を開発することに関しては、哺乳動物細胞系統、特にヒト細胞系統における発現が好ましい。

本発明の組換え発現産物についての最適生物学的活性を与えるのに望ましいものとなるように、哺乳動物宿主細胞の使用では、こうした翻訳後修飾（例えば、糖鎖形成、切断、脂質化、リン酸化）を用意することが考えられる。 10

ポリペプチドの糖鎖形成および非糖鎖形成形態は本発明により受け入れられる。

同様に、本発明はさらに、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレングリコール、あるいはポリプロピレングリコールなどの1つあるいはそれ以上の水溶性ポリマー添加物を含むように共有結合的に修飾された上述されているポリペプチドを受け入れる。

【0090】

本発明のポリペプチドはまた、化学的に合成されうる。

【0091】

さらにもう1つの関連実施形態では、本発明は、栄養培地中の本発明の宿主細胞を増殖させ、また、その細胞あるいはその培地からそのポリペプチドあるいはその変異体を分離させるステップからなる血管内皮成長因子受容体結合タンパク質を産生するための方法を提供する。 20

その細胞が増殖されているその細胞からあるいはその培地からそのポリペプチドを分離することは、当業者には公知の精製の諸方法、例えば、免疫親和性クロマトグラフィー、受容体親和性クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、レクチン親和性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、カチオンあるいはアニオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、逆相HPLCなど通常のクロマトグラフィーの諸方法により達成される。

精製のさらに他の諸方法には、特異的結合パートナーあるいは薬剤により認識される特定タグ、標識あるいはキレート化部分を有する融合タンパク質として、その所望されるタンパク質が発現されまた精製される、そうした方法が含まれる。 30

その精製タンパク質は、その所望されるタンパク質を産生する、あるいは完全な融合タンパク質として残されるように、切断することができる。

その融合成分の切断により、その切断プロセスの結果として、付加的なアミノ酸残基を有するその所望されるタンパク質の1つの形態を作り出すことが可能である。

【0092】

本発明のポリペプチドあるいはポリヌクレオチドからなる組成もまた本発明の範囲内にある。

1つの好適な実施形態では、こうした組成物は、製薬的に受け入れられうる（例えば、滅菌および非毒性）希釈液あるいはキャリアーにより製剤化された本発明の1つあるいはそれ以上のポリヌクレオチドあるいはポリペプチドからなる。 40

製薬的な賦形剤、補形薬あるいは培地として役に立つ液体、半固体、あるいは固体希釈剤が好ましい。

当業者には公知のいずれの希釈剤も使用されうる。

例示的な希釈剤には、水、食塩水溶液、一ラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ステアリン酸マグネシウム、メチルーおよびプロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、アルギン酸塩、デンプン、ラクトース、スクロース、デキストロース、ソルビトール、マンニトール、グリセロール、リン酸カルシウム、鉱油、ココアバターが含まれるが、それらに限定されるわけではない。

こうした製剤は、例えば、治療計画における哺乳動物（ヒトを含む）対象に対して本発明 50

のポリペプチドあるいはポリヌクレオチドの投与のためには、有用である。

【0093】

同様に、本発明は、血管新生形成が望ましい、望ましくない内皮細胞増殖および／または虚血により特徴付けられる障害および／または血管閉塞により特徴付けられる障害を含む、本明細書に記載されている障害の治療に関する医薬品の製造に向けて、本発明のポリペプチドあるいはポリヌクレオチドの使用法を用意しているが、それらに限定されるわけではない。

【0094】

1つの関連実施形態では、本発明は、バイアルあるいは瓶などの容器の中にパッケージされた本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、あるいは組成物からなり、その容器に貼付させた、あるいはその容器と一緒にパッケージされた標識からさらになるキットを提供するが、その標識は本明細書に記載されているように1つあるいはそれ以上の疾患の諸容態を治療するために、その容器の内容物を記載し、また、その容器の内容物の使用法に関する表記および／または指示書を提供する。

10

【0095】

その上さらにもう1つの実施態様では、本発明は、新規なVEGF受容体結合および刺激特性を有するポリペプチドを産生する諸方法と、こうしたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを産生するための諸方法を提供する。例えば、本発明は、哺乳動物内皮細胞あるいは哺乳動物の周皮細胞／平滑筋細胞の増殖を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを作り出すための方法を提供し、本発明は、少なくとも2つの脊椎動物血管内皮成長因子ポリペプチドのアミノ酸断片をコードするポリヌクレオチドを調製する工程と、ポリヌクレオチドがハイブリッドポリヌクレオチドを形成するように組み換える条件下でそのポリヌクレオチドを混合する工程、そのハイブリッドポリヌクレオチドによりコードされるハイブリッドポリペプチドを作り出すためにそのハイブリッドポリヌクレオチドを発現させる工程、脊椎動物血管内皮成長因子に対する受容体に結合するハイブリッドポリペプチドを同定するためにそのハイブリッドポリペプチドをスクリーニングする工程、そのスクリーニングステップでその受容体に結合するそのハイブリッドポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを選択する工程からなる。

20

その選択されたポリヌクレオチドの発現（所望されるポリペプチドを産生するために）もまた企図される。

30

【0096】

この文脈では、「哺乳動物内皮細胞の増殖を調節する」という語句は、血管内皮細胞上で発現した結合細胞表面受容体により、分裂促進シグナルを誘導することによりこうした増殖を刺激すること、あるいは、こうした増殖を阻害することを意味する。

本明細書の他の箇所で説明されているように、阻害は、血管内皮成長因子受容体の妨害、あるいはその内皮成長因子による内在性受容体の刺激を防ぐ内在性成長因子によるヘテロ二量体の形成によることがある。

阻害はまた、VEGF受容体を結合させる本発明のポリペプチドに、細胞毒性薬剤を共役させることにより達成されうる。

例示的な毒素は、当業者には公知のものであり、また、本明細書の他の箇所に記載されている。

40

細胞増殖を調節する細胞毒性薬剤あるいはその他の薬剤に共役された本発明のポリペプチドは、本発明のもう1つの実施態様として企図される。

【0097】

この文脈では、「脊椎動物血管内皮成長因子ポリペプチド」はまた、以下の特徴を有するポリペプチドを意味する。

すなわち、

(1) そのポリペプチドは、脊椎動物（例えば、爬虫類、両生類、鳥、あるいは哺乳動物、好適には、鳥あるいは哺乳動物、もっとも好適には、哺乳動物である；特に、サル、類人猿、あるいはヒト霊長類哺乳動物）あるいは、哺乳動物ポックスウイルスなどの脊椎

50

動物病原体のゲノムDNAによりコードされ、

(2) そのポリペプチドは、脊椎動物により発現されるコード配列の全てあるいは一部分からなり(すなわち、脊椎動物のゲノムDNAの転写／翻訳から、あるいは、ウイルス核酸によりコードされるポリペプチドの場合は、ウイルスにより誘導される転写／翻訳から)、

(3) そのポリペプチドあるいは部分は、自然発生受容体に結合する約70～150アミノ酸のVEGF相同ドメイン(V/PHD)からなり、そのアミノ酸モチーフ：C-X(18-28)-P-X-C-X(4)-R-CXG-C(1-2)-X(6-12)-C-X-(30-46)-Cにより部分的に特徴付けられ、ここでは、Xは、アミノ酸の許容範囲を表わす括弧内のいずれかのアミノ酸および番号を表わしている(例えば、X(18-28)は、いずれかの18-28アミノ酸の伸長を表わす；C(1-2)は、1つあるいは2つのシステイン残基を表わす)。

V/PHDには、ヒト血管内皮成長因子A, B, C, D(VEGF-A, -B, -C, -Dとヒト血小板由来成長因子(PDGF))で見つかったものに類似のシステインノットモチーフを形成する8つの保存的システインが含まれる。

好適なポリペプチドあるいは部分は、さらに詳細なアミノ酸モチーフ：C-X(22-24)-P-[PSR]-C-V-X(3)-R-C-X-G-C-C-X(6)-C-X(32-41)-Cにより特徴付けられるVPHDからなり、ここでは、括弧内(例えば、[PSR])のアミノ酸は、アミノ酸配列における単一位置に対する代替物を表わし、

(4) そのポリペプチドは、脊椎動物の血管あるいはリンパ管を一行に並べる内皮細胞上あるいは血管を一行に並べかつ支持している周皮細胞／平滑筋細胞上で発現させる少なくとも1つの細胞表面受容体に結合する。

好適なポリペプチドは、内皮細胞上で発現させる少なくとも1つの細胞表面受容体に結合する。

【0098】

調製工程を実施するための方法がいくつか存在する。

1つの変形例では、哺乳動物VEGFポリペプチド配列と国際遺伝子コードの知識に基づき、かつ通常の化学合成技術を使用して、調製される。

下記の実施例1はこうした技術を示しており、ここでは、ヒトVEGF-AとヒトVEGF-Cの断片をコードした、一本鎖コヒーシブエンドを有する二本鎖ポリヌクレオチドを調製するために、合成オリゴヌクレオチド対が調製され、また、アニーリングされる。

もう1つの変形例では、天然VEGFのものをコードするcDNAあるいはゲノムDNA(好適にはcDNA)が、1つあるいはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼを使用して、DNアーゼIあるいは、エキソヌクレアーゼIIIを使用して断片化される[例えば、Chang et al., Nature Biotechnology, 17:793-797(1999)(DNアーゼI手順)；Kikuchi et al., Gene, 236:159-167(1999)(制限エンドヌクレアーゼ手順)；Harayama et al., TIBTECH, 16:76-82(1998)(総説)；Patten et al., Curr. Opin. Biotechnology, 8:724-733(1997)(総説、DNアーゼI)；Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4504-09(1997)(DNアーゼI手順)；Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:10747-1074(1997)(DNアーゼI手順)；Stemmer, Nature, 370:389-391(1994)(DNアーゼI手順)；Ostermeier et al., Nature Biotechnology, 17:1205-1209(1999)(ExoIII手順)、全て参考文献として本明細書に全体として組み込まれている、を参照]。

さらにもう1つの変形例では、cDNA(コードあるいは非コード鎖)が、DNAポリメラーゼと鎖終止試薬を使用して、相補的断片を合成するためにテンプレートとして使用される[例えば、Lehtovaara et al., Protein Engineering 50

ng, 2:63-68 (1988), 参考文献として組み込まれている、を参照]。

【0099】

混合工程を実施するための諸方法もまたいくつか存在する。

1つの変形例では、ポリヌレオチドは、ポリヌクレオチドの通常のアニーリングおよびライゲーション条件下で所望の順序で断片のアニーリングを容易にするために、相補的なコヒーシブ一本鎖末端により調製される。

下記の実施例1は、510ヒトVEGF-A/VEGF-Cハイブリッドを生成するために、この技術の呈示を提供する。

こうした技術はまた、制限エンドヌクレアーゼにより加水分解された2つあるいはそれ以上のVEGF cDNAの断片混合物をアニーリングするのに適当でありうる。

代替的には、その混合工程は、そのポリヌクレオチドを混合し、また、それらを、変性、アニーリング、伸長の連続工程を含む自己プライミングPCR反応を受けさせることにより達成される[例えば、Chang et al., (1999); Kikuchi et al., (1999); Patten et al., (1997); Zhang et al., (1997); Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:10747-1074 (1994); Stemmer, Nature, 370:389-391 (1994)を参照]。

任意には、PCRは、PCR産物に誤り(変異)を導入する条件下で実施される。

こうした変異は付加的な分子変異を導入し、また、生物学的に活性な分子の全体的なパーセンテージを減少させることが予想されるが、また、予想されない、優れた活性を備えた分子を産生することもありうる。

【0100】

そのハイブリッドDNAを合成した後、その分子は当業者には公知のいずれかの手段により発現させる。

1つの変形例では、その分子はクローン化して発現ベクターの中に入れ、それを今度はそのポリペプチドを発現させるために、細胞を形質転換あるいはトランスフェクションするのに使用される。

もう1つの変形例では、そのポリヌクレオチドは、スクリーニングのためにクローン化してファージ表示ベクターシステムの中に入れる[例えば、Chang et al., (1999)を参照]。

そのスクリーニングアッセイは、実施例3において以下に説明されるように、直接受容体結合アッセイを伴うことがある。

代替的には、受容体結合は、受容体結合により誘導される生物学的活性に関して測定することにより間接的に測定されうる。

このように、1つの変形例では、スクリーニング工程は、その受容体を発現する細胞にハイブリッドポリペプチドを接触させることからなり、ここでは、そのハイブリッドポリペプチドにより誘導される細胞増殖あるいは細胞生存の変化により、そのハイブリッドポリペプチドと受容体の間の結合が示される。

【0101】

本方法の1つの好適な変形例では、スクリーニング工程と選択工程は、そのポリペプチドが由来した自然発生VEGFのものにより所有されてはいない新規な受容体結合プロフィールを有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを選択するように設計されている。

例えば、その方法が実施され、ここでは、スクリーニング工程は、ヒトVEGFR-1とヒトVEGFR-3を結合するハイブリッドポリペプチドを同定するスクリーニングからなり、また、選択工程は、ヒトVEGFR-1と、ヒトVEGFR-2と、ヒトVEGFR-3を結合するハイブリッドポリペプチドを選択することからなる。

【0102】

1つの関連実施形態では、本発明は哺乳動物内皮細胞の増殖を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを作り出すための方法を提供し、本発明は、(a) 以下の特

10

20

30

40

50

徴を有するポリヌクレオチド断片のセットを調製し、(i) そのセットには、コードポリヌクレオチド断片の第1サブセットが含まれ、ここでは、第1サブセットの各コードポリヌクレオチド断片が第1哺乳動物血管内皮成長因子のアミノ酸配列の少なくとも4つのアミノ酸をコードし、(ii) そのセットには、コードポリヌクレオチド断片の第2セットが含まれ、ここでは、第1サブセットの各コードポリヌクレオチド断片が第2哺乳動物血管内皮成長因子のアミノ酸配列の少なくとも4つのアミノ酸をコードする工程と、(b) 第1と第2サブセットから得られたコードポリヌクレオチド断片が、ハイブリッドポリヌクレオチドを形成するために組み換える工程と、(c) ハイブリッドポリヌクレオチドによりコードされるハイブリッドポリペプチドを作り出すために、そのハイブリッドポリヌクレオチドを発現させる工程と、(d) 哺乳動物内皮細胞の増殖を調節するハイブリッドポリペプチドを同定するためにハイブリッドポリペプチドをスクリーニングする工程と、(e) 前記スクリーニング工程で哺乳動物内皮細胞の増殖を調節するハイブリッドポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを選択する工程と、からなる。

10

【0103】

ヒト血管内皮成長因子A (VEGF-A)、ヒト血管内皮成長因子B (VEGF-B)、ヒト血管内皮成長因子C (VEGF-C)、ヒト血管内皮成長因子D (VEGF-D) の中に保存されている8つのシステインにより特徴付けられる受容体結合ドメインからなる哺乳動物血管内皮成長因子を使用して、ハイブリッドポリヌクレオチドを生成するこれらの諸方法の実施が好ましい。

例示的な開始分子には、ヒトとその他の哺乳動物のVEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PDGF, PDGF-A, PDGF-Bポリペプチドが含まれる。また、成長因子のPDGF/VEGFファミリーの構造的な特徴を有するEMBLデータベース(受託番号AF091434)(配列番号: 149)に開示され、最近記載されたタンパク質には、ファロティンが含まれる。

20

このように、その他の哺乳動物VEGFと一緒にハイブリッドタンパク質を生成する際に、ファロティンを使用することもまた企図されている。

【0104】

前者の諸方法のポリヌクレオチドとコードされたポリペプチド産物は、それら自体、本発明の付加的な実施態様であると考えられる。

【0105】

本発明のポリペプチドに対して生成されうる抗体、いずれかの自然発生VEGFに対してよりも大きな親和性を備えた本発明のポリペプチドを結合させる抗体もまた、本発明の実施態様として企図される。

30

こうした抗体の抗原結合断片からなるポリペプチドもまた、本発明の1つの実施態様として企図される。

本発明の本ポリペプチドに結合するが、脊椎動物のVEGFのものには結合しない抗体が企図される。

【0106】

その上さらにもう1つの実施形態では、本発明は、本発明のポリペプチドとポリヌクレオチドを使用する非常に数多くの*in vitro*と*in vivo*の諸方法を提供する。

40

こうした諸方法は、詳細な説明において以下により詳細に説明される。一般的に言うと、本発明のポリペプチドは、PDGFR- α と、PDGFR- β と、VEGF-1と、VEGF-2と、および/またはVEGF-3などの受容体のPDGF/VEGFファミリーのいずれかにより仲介される細胞プロセスを調節する(刺激するあるいは阻害する)のに有用である。これら受容体はある種のプロセスの中に、また、組み合わせの中に、他のプロセスの中にさまざまな程度で単独に含まれる。

本発明のポリペプチドは多くの異なる受容体結合プロフィールを所有しており、また、本発明の長所の1つは、調節されるように生物学的プロセスの受容体発現プロフィールを適合させる受容体結合プロフィールによりポリペプチドを選択する能力である。

【0107】

50

このように、1つの変形例では、本発明は、細胞の中にあるPDGFR- α 、PDGFR- β 、VEGF-1、VEGF-2、および／またはVEGF-3の1つあるいはそれ以上のシグナリングを調節する方法を提供し、本発明は、PDGFR- α 、PDGFR- β 、VEGF-1、VEGF-2、および／またはVEGF-3の1つあるいはそれ以上を発現させる細胞を本発明のポリペプチドからなる組成物と接触させる工程からなる。

1つの変形例では、シグナリングを活性化させるための調節が企図され、また、その細胞を1つあるいはそれ以上の受容体に結合し、また受容体シグナリングを誘導するのに十分な量で受容体シグナリングを刺激する原発明のポリペプチドと接触させる。

【0108】

もう1つの変形例では、シグナリングを阻害するための調節が企図される。

10

その細胞を、その細胞の環境において内在性に存在する受容体リガンド成長因子ポリペプチドにより誘発されるシグナリングを阻害するのに十分な量でリガンド誘導受容体活性化（あるいは細胞毒素に共役されるポリペプチド）を阻害するポリペプチドと接触させる。用量反応研究では、用いるポリペプチドの適当な量を正確に測定することが可能である。有効量は、標的受容体に対するポリペプチドの結合親和性、標的細胞上に存在する受容体の量、予想循環血液量（例えば、*in vivo*実施形態に関する患者体重と血液量）、ポリペプチドクリアランス速度の測定から推測することができる。

【0109】

もう1つの変形例では、本発明は、1つあるいはそれ以上のPDGFR- α 、PDGFR- β 、VEGF-1、VEGF-2および／またはVEGF-3のシグナリングを調節する方法を提供し、その患者の細胞が、そのポリヌクレオチドにより形質転換あるいはトランスフェクションされ、また、それによってコードされた本発明のポリペプチドを発現させ、ここでは、その発現させたポリペプチドが1つあるいはそれ以上の受容体のシグナリングを調節するという条件下で、1つあるいはそれ以上のこれら受容体のシグナリング調節を必要としている患者に、本発明のポリヌクレオチドからなる組成物を投与する工程からなる。

20

【0110】

以下に論じられているように、そのキメラ受容体結合特性と、VEGF-Aの配列に関するVEGFR-3リガンドの配列の分析からは、VEGF-C分子から得た断片4と5は、また、特に、断片4と5内で見つかった残基TNTFxxxPの配列は、VEGFR-3結合親和性を与えるためには重要である。

30

したがって、もう1つの変形例では、本発明は、VEGFR-3生物学的活性を調節するために、これらコア残基と他の置換基とを使用して設計した分子を提供する。

例えば、1つの実施形態では、本発明は、そのペプチド配列TNTFX_nP7からなる分子を提供し、ここではX_nは1つ～7つのアミノ酸からなり、またここでは、その分子はVEGFR-3のVEGF-C仲介活性化を阻害する。

その分子には、付加的な残基あるいは有機的部分が含まれうる。

1つの変形例では、こりのエピトープは、非VEGF-Cアミノ酸配列により、受容体結合に含まれるほかのエピトープにリンクされるようになり、それによってリガンド結合に含まれる受容体座位と相互作用することができる分子を作り出す。

40

1つの好適な実施形態では、X_nは3つのアミノ酸からなり、それは在来VEGF-Cと同じアミノ酸スペーシングを表わしている。

【0111】

1つの関連実施形態では、本発明は、ヒトVEGF-Cペプチド配列EFGVATNTFFKPPCVSVVRCOあるいは1つの断片あるいはその変異体からなる分子を提供し、ここではその分子は、VEGFR-3のVEGF-C仲介活性化を阻害する。

1つの変形例では、その断片は、アミノ酸配列EFGVATNTFFKPPCVSVVRCOからなるようなそうしたものである。

もう1つの変形例では、その断片は、その分子が、アミノ酸配列TNTFFKPPからなるようなそうしたものである。

50

さらにもう1つの変形例では、その断片あるいは変異体は、アミノ酸配列 T N T F F K P P C V x x x R あるいはアミノ酸配列 T N T F F K P P C V x x x R C G G C C からなる。

【0112】

本発明の結合特性とキメラ分子の配列に関するデータからはまた、受容体／リガンド相互作用のモジュレーターを合成設計するための重要なアミノ酸標的についての洞察が提供される。

例えば、1つの実施形態では、本発明は、VEGF-Aに結合するVEGFR-1のモジュレーターを同定するための方法を提供し、本発明は、(i) VEGFR-1のVEGF-Aへの結合を可能にする条件下で、試験化合物の存在下でおよび存在しない場合で、VEGFR-1とVEGF-Aの間の結合を測定する工程と、(ii) VEGF-AへのVEGFR-1の結合を改変し、また、配列番号：2のPhe⁴³, Met⁴⁴, Tyr⁴⁷, Gln⁴⁸, Tyr⁵¹, Gln¹⁰⁵, Met¹⁰⁷により定義される部位でVEGF-Aを結合させる、あるいは配列番号：2の前記残基と界面上で接続されるVEGFR-1残基の箇所でVEGFR-1を結合させる試験化合物をモジュレーターとして同定する工程と、からなる。

阻害座位として作用し、また、望ましくないあるいは過剰なりガンド仲介受容体活性化により特徴付けられる条件を改善するのには有用であるモジュレーターは、モジュレーターの1つの好適なクラスである。

【0113】

1つの関連実施形態では、本発明は、VEGF-Aに結合するVEGFR-1のモジュレーターを同定するための方法を提供し、本発明は(i) VEGFR-1のVEGF-Aへの結合を可能にする条件下で、試験化合物の存在下でおよび存在しない場合で、VEGFR-1とVEGF-Aの間の結合を測定する工程と、(ii) VEGF-AへのVEGFR-1の結合を改変し、また、配列番号：2のLys⁴², Phe⁴³, Met⁴⁴, Tyr⁴⁷, Gln⁴⁸, Tyr⁵¹, Ile⁷², Lys⁷⁴, Asp⁸⁹, Gly⁹¹, Leu⁹², Gln¹⁰⁵, Met¹⁰⁷, Ile¹⁰⁹, Phe¹¹¹, His¹¹², Gln¹¹⁵, Ile¹¹⁷, Glu¹²⁹, Arg¹³¹, Pro¹³²により定義される部位でVEGF-Aを結合させる、あるいは配列番号：2の前記残基と界面上で接続されるVEGFR-1残基の箇所でVEGFR-1を結合させる試験化合物をモジュレーターとして同定する工程と、からなる。

【0114】

同様に、本発明は、VEGF-Cに結合するVEGFR-3のモジュレーターを同定するための方法を提供し、本発明は(i) VEGFR-3のVEGF-Cへの結合を可能にする条件下で、試験化合物の存在下でおよび存在しない場合で、VEGFR-3とVEGF-Cの間の結合を測定する工程と、(ii) VEGF-CへのVEGFR-3の結合を改変し、また、配列番号：22のLys¹²⁰, Ser¹²¹, Ile¹²², Trp¹²⁶, Arg¹²⁷, Gln¹³⁰, Phe¹⁵¹, Lys¹⁵³, Ser¹⁶³, Gly¹⁷⁰, Leu¹⁷¹, Tyr¹⁸⁴, Phe¹⁸⁶, Ile¹⁹⁰, Pro¹⁹⁶, Pro¹⁹⁸, Arg²¹⁰, Met²¹², Ser²¹³,により定義される部位でVEGF-Cを結合させる、あるいは配列番号：22の前記残基と界面上で接続されるVEGFR-3残基の箇所でVEGFR-3を結合させる試験化合物をモジュレーターとして同定する工程と、からなる。

本発明はまた、VEGF-Cに結合するVEGFR-3のモジュレーターを同定するための方法を提供し、本発明は(i) VEGFR-3のVEGF-Cへの結合を可能にする条件下で、試験化合物の存在下でおよび存在しない場合で、VEGFR-3とVEGF-Cの間の結合を測定する工程と、(ii) VEGF-CへのVEGFR-3の結合を改変し、また、配列番号：22のThr¹⁴⁸, Asn¹⁴⁹, Thr¹⁵⁰, Phe¹⁵¹, Pro¹⁵⁵により定義される部位でVEGF-Cを結合させる、あるいは配列番号：22の前記残基と界面上で接続されるVEGFR-3残基の箇所でVEGFR-3を結

合させる試験化合物をモジュレーターとして同定する工程と、からなる。

【0115】

本発明の実施態様として企図されているのはまた、前記諸方法により同定されるモジュレーターからなる組成物、特に、製薬的に受け入れ可能なキャリアー中の実質的に精製されたモジュレーターからなる組成物である。

同様に、異常血管内皮成長因子受容体活性により特徴付けられる疾患状態の治療のための医薬品の製造におけるこうしたモジュレーターの使用法が企図される。

【0116】

その上さらにもう1つの変形例では、前記諸方法のいずれかには、任意に、受容体活性の望ましくない値により特徴付けられる疾患状態に対する治療を必要としている患者に、その同定されたモジュレーターを投与するという付加的な工程、あるいはその細胞中の受容体活性値を調節するために、その受容体を発現させる細胞を接触させる工程が含まれる。 10

【0117】

本発明の付加的な実施形態、特長および変形例は、図面と詳細な説明を含む本出願の全体から熟練した技術を有する当業者には自明のものとなり、また、すべてのこうした特長は本発明の実施態様と考えられる。

【0118】

同様に、本明細書に記載されている特長は、特長を組み合わせたものが本発明の1つの実施態様あるいは実施形態として詳細に上述されているかどうかには無関係に、また本発明の実施態様として考えられる付加的な実施形態の中で再び組み合わせることができる。 20

また、本発明にとって非常に重要なものとして本明細書に記載されているこうした限定のみ、このように考えるべきである。

すなわち、非常に重要なものとして本明細書に記載されなかった限定を欠いている本発明の変形例は、本発明の実施態様として考える。

【0119】

集合あるいは属として記載された本発明の実施態様に関しては、その集合あるいは属のすべての個々の要素は、個々が、本発明の1つの実施態様として考えられる。

【0120】

加えて、本発明には、1つの付加的な実施態様として、詳細に上述されている変形例よりも、いかなる点でも範囲においてより狭い本発明の全ての実施態様が含まれる。 30

本出願人（ら）は、本明細書に添付されている請求項の完全な範囲を発明したが、これに添付されている請求項は他の先行技術の仕事をその範囲内に包含することは意図されていない。

したがって、請求項の範囲内にある制定法上の先行技術が特許庁あるいはその他の実体あるいは個人により、本出願人の注意に及ぶところとなる場合には、本出願人（ら）は、こうした特許請求の範囲から、こうした制定法上の先行技術あるいは制定法上の自明の変形例を詳細に除外するように、こうした請求項の主題を再び定義するために、適用可能な特許法下で補正の権利を行使する権利を留保する。

このような補正により定義された本発明の変形例はまた、本発明の実施態様と考えられる。 40

【0121】

【発明の実施の形態】

本発明は、血管内皮成長因子ポリペプチドのための細胞受容体を結合する新規なポリペプチド、このようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドからなる組成物、ならびに前記に関する方法および使用を提供する。

これらの材料および方法は、前記発明の要約の部分に詳細に説明するが、これによりそれをその全体において詳細な説明に取り込む。

本発明のいくつかのポリペプチドは、既知の天然に生じる血管内皮成長因子に比べて独特の受容体結合特徴を表す。

【0122】

ペプチドの調製方法

本発明のペプチドは、発明の要約および実施例に記載するものを含む、種々の方法を用いて合成するとよい。

本発明のペプチドは、慣用の技術に従って溶液内で、または固体支持体上で合成することができる。

種々の自動合成装置が市販で入手可能であり、既知のプロトコルに従って用いることができる。

例えば、参考文献として本明細書中に取り込まれている Stewar and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2d. ed., Pierce Chemical Co., (1984); Tarn et al., J. Am. Chem. Soc., 105:6442 (1983); Merrifield, Science, 232:341-347 (1986); および Berany and Merrifield, The Peptide, Gross and Meienhofer, eds, Academic Press, New York, 1-284; Barany et al., Int. J. Peptide Protein Res., 30, 705-739 (1987); ならびに米国特許第5,424,398号を参照するとよい。

【0123】

固相ペプチド合成方法は、0.1~1.0mMolアミン/gポリマーを含有するコポリ(スチレンージビニルベンゼン)を用いる。

ペプチド合成のためのこれらの方法は、アルファアミノ基のブチロキシカルボニル(t-BOC)または9-フルオレニルメチロキシカルボニル(FMOC)保護を用いる。両方法とも、一つのアミノ酸をペプチドのC末端から始まる各工程で加える工程的合成を含む(Coligan et al., Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1991, Unit 9)。

化学的合成を完成するに際しては、ペプチドを脱保護してt-BOCまたはFMOCアミノ酸ブロッキング基を除去し、温度を下げて酸処理することによりポリマーから開裂するとよい(例えば、0℃で約0.25~約1時間、液体HF-10%アニソール)。

試薬を蒸発後、1%酢酸溶液を用いてポリマーからペプチドを抽出し、次に粗材料を得るために凍結乾燥する。

通常はこれを溶媒として5%酢酸を用いたSephadex G-15でのゲル濾過といった技術により精製するとよい。

カラムの適切な画分の凍結乾燥により、均一なペプチドまたはペプチド誘導体を産生し、次にアミノ酸分析、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、紫外線吸光度法、モル旋光度、溶解性および固相Edman分解による定量といった標準的な技術により特徴づけることができる。

【0124】

ファージディスプレイライブラリーからペプチドを選択する他の方法を、本明細書中に特に記載するペプチドを改良するために得ることができる。

ライブラリーは、本明細書中に記載するアミノ酸セットから調製するとよい。

ファージディスプレイは、本発明により有用な結合ペプチド特定において特に有効であろう。

要約すると、4~約80アミノ酸残基の挿入を表すファージライブラリー(例えば、ml13, fdまたはラムダファージを用いる)を調製する。

挿入は、例えば完全な縮重アレイまたは偏向アレイを示すであろう。

次に、標的VEGF受容体に結合する挿入を担持するファージを選択する。

この過程を標的受容体に結合するファージ再選択のいくつかのサイクルを通じて繰り返すとよい。

繰り返しにより特別な配列を担持する豊富なファージに至る。

DNA配列分析を行い、発現したポリペプチドの配列を特定してもよい。

標的受容体に結合する配列の最小直線部を決定してもよい。

最小直線部の部分または全体プラスその上流または下流の1つ以上のさらなる縮重残基を含む偏向ライブラリーを用いた操作を繰り返してもよい。

これらの技術により本明細書中にすでに特定したペプチドよりもより大きい受容体結合アフィニティーを有する本発明のペプチドを特定することもありうる。

多重受容体に対する耐性ペプチドをスクリーニングでは、多重受容体結合アフィニティーを有するペプチドを特定するであろう。

Yキャスト2ハイブリッドスクリーニング方法を用いて、標的受容体に結合するポリペプチドを特定してもよい。

10

【0125】

代替的には、種々の発現ベクター／宿主系を用いて本発明のキメラペプチドを含ませ、発現させてもよい。

これらには組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌、酵母発現ベクターで形質転換した酵母、ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系、ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルスCaMV、タバコモザイクウイルスTMV）で感染させた、または細菌発現ベクター（例えば、TiまたはpBR322プラスミド）で形質転換した植物細胞系といった微生物、または動物細胞系が挙げられるが、これらに限定されない。

組換えタンパク質生産において有用なほ乳類細胞には、VERO細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞系、COS細胞（COS-7など）、W138、BHK、HepG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562および293細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

20

タンパク質組換え発現についての例示的プロトコルを、本明細書中以下に記載する。

【0126】

例えば、市販で入手できる発現系、例えばPichia発現系（Invitrogen, San Diego, CA）を用いて製造者の指示に従って酵母でキメラペプチドを組み換えて発現するとよい。

この系は直接分泌するためのプレプロアルファ配列にもあるが、挿入の転写はメタノールによる誘発の際アルコールオキシダーゼ（AOX1）プロモーターにより支配される。

30

【0127】

分泌ペプチドを酵母成長培地から、例えば、細菌および、哺乳類細胞上清からキメラペプチドを精製するために用いられる方法により精製する。

【0128】

代替的には、ペプチドをコードするcDNAをバキュロウイルス発現ベクターpVL1393（PharMingen, San Diego, CA）にクローニングするとよい。

次に、このベクター（PharMingen）を製造者の指示に従って用い、sF9タンパク質非含有培地中のSpodoptera frugiperdaを感染させ、組換えタンパク質を製造する。

40

タンパク質を精製し、ヘパリンーセファロースカラム（Pharmacia, Piscataway, NJ）、連続分子サイズカラム（Amicon, Berly, MA）を用いて培地から濃縮し、そしてPBSに再懸濁する。

SDS-PAGE分析では単一バンドを示し、タンパク質のサイズを確認し、Porton 2090ペプチドシーケンサーでのEdman配列決定ではそのN末端配列を確認する。

【0129】

代替的には、ペプチドを昆虫系で発現してもよい。

タンパク質発現のための昆虫系は当該技術分野における通常の知識を有する者によく知られている。

50

このような系の一つでは、Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) をベクターとして用いて Spodoptera frugiperda 細胞または Trichoplusia larvae 内で外来遺伝子を発現する。

配列をコードするペプチドをポリヘドリン遺伝子などのウイルスの非本質的領域にクローニングし、ポリヘドリンプロモーターのコントロール下におく。

ペプチドの挿入が成功すると、ポリヘドリン遺伝子が不活化し、被覆タンパク質被覆を欠いた組換えウイルスが製造される。

【0130】

次に、組換えウイルスを用いてペプチドが発現する *S. frugiperda* 細胞または *Trichoplusia larvae* を感染する (Smith et al., J Virol 46:584, 1983; Engelhard EK et al., Proc Natl Acad Sci 91:3224-7, 1994)。

【0131】

別の実施例では、ペプチドをコードする DNA 配列を PCR により増幅し、例えば pGEX-3X (Pharmacia, Piscataway, NJ) といった適切なベクターにクローニングする。

pGEX ベクターを設計してベクターによりコードされるグルタチオン S トラंसフェラーゼ (GST) およびベクターのクローニング部位に挿入される DNA 断片によりコードされるタンパク質からなる融合タンパク質を製造する。

PCR のためのプライマーを産生して、例えば適切な開裂部位を含ませてもよい。

【0132】

融合パートナーを単独で用いて発現を容易にするか、さもなくば目的のペプチドへのアタッチメントとして望ましくない場合は、次に組換え融合タンパク質を融合タンパク質の GST 部分から開裂するとよい。

pGEX-3X/キメラペプチド構築物を *E. coli* XL-1 ブルー細胞 (Stratagene, La Jolla, CA) に形質転換し、各形質転換体を単離して成長させた。

各形質転換体からのプラスミド DNA を精製し、自動シーケンサーを用いて部分的に配列決定し、正しい配向での核酸挿入をコードする目的キメラペプチドの存在を確認する。

【0133】

本発明の特に好ましいペプチド組成物は、腫瘍壊死因子 (TNF) といった抗腫瘍ペプチドに接合するものである。

特に好ましい方法では、TNF (Novagen) コード配列とフレームがあうように融合したペプチドコード配列を有する組換え融合体として TNF ペプチドキメラを産生する。

ペプチド TNF cDNA を pET-11b ベクター (Novagen) にクローニングし、BL21 *E. coli* 内の TNF ペプチド発現を pET11b の製造者の指示に従って誘導する。

可溶性 TNF ペプチドを硫酸アンモニウム調製、フェニルセファロース 6 ファーストフローでの疎水性相互作用クロマトグラフィー、DEAE セファロースファーストフローでの陰イオン交換クロマトグラフィーおよびセファクリル S300 HR でのゲル濾過クロマトグラフィーにより細菌溶解物から精製する。

【0134】

組換えタンパク質製造を用いてキメラペプチド組成物を製造することも検討する。

例えば、GST/キメラペプチドの誘導を 37℃ で LB 培地中 (カルベニシリンを添加している) 光学密度を波長 600 nm で 0.4 まで形質転換した XL-1 ブルー培養を成長させ、その後さらに 0.5 mM イソプロピル β-D-チオガラクトピラノシド (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) の存在下 4 時間インキュベーションすることにより達成する。

10

20

30

40

50

【0135】

細菌内で不溶性封入体として製造されることが期待される融合タンパク質を以下のように精製するとよい。

細胞を遠心分離により播き、0.15M NaCl、10mM Tris、pH8、1mM EDTAで洗浄し、室温で15分間0.1mg/mlリゾチーム（Sigma Chemical Co.）で処理する。

ライゼートを音波処理によりきれいにし、細胞残骸を10分間12,000×gで遠心分離することによりペレットとする。

ペレットを含む融合タンパク質を50mM Tris pH8および10mM EDTAに再懸濁し、50%グリセロール上に重層し、30分間、6000×gで遠心分離する。ペレットをMg⁺⁺およびCa⁺⁺を含まない標準的なリン酸緩衝溶液（PBS）に再懸濁する。 10

さらに融合タンパク質を変性したSDSポリアクリルアミドゲル（Sambrook et al.，前記）に再懸濁下ペレットを分画することにより精製する。

ゲルを0.4M KClに浸してタンパク質を可視化し、これを切り出してSDSを欠いたゲル泳動緩衝液で電気溶出する。

GST/キメラペプチド融合タンパク質を可溶性タンパク質として細菌内に製造する場合は、GST精製モジュール（Pharmacia Biotech）を用いて精製してもよい。

【0136】

融合タンパク質を消化して本発明のキメラペプチドからGSTを開裂してもよい。

消化反応（20～40μg融合タンパク質、20～30ユニットのヒトトロンビン（0.5ml PBSに4000U/mg（Sigma）））は16～48時間室温でインキュベートし、編成SDS-PAGEにのせて反応産物を分画する。

ゲルを0.4M KClに浸してタンパク質バンドを可視化する。

キメラペプチドの予想分子量に相当するタンパク質バンドの特定は、自動シーケンサー（Applied Biosystems Model 473A, Foster City, CA）を用いてアミノ酸配列分析により確認するとよい。

代替的には、タンパク質のHPLCおよび／または質量分析を実施することにより確認してもよい。 30

【0137】

代替的には、キメラペプチドをコードするDNA配列を所望とするプロモーター、および任意にリーダー配列（例えば、Better et al.，Science，240：1041-43，1988を参照のこと）を含むプラスミドにクローニングしてもよい。この構築物の配列を自動配列決定により確認するとよい。

次に、プラスミドを細菌のCaCl₂インキュベーションおよび熱ショック処理（Sambrook et al.，前記）を採用する標準的操作を用いてE. coli株MC1061に形質転換する。

形質転換した細菌をカルベニシリンを添加したLB培地で成長させ、発現したタンパク質の製造を適切な培地で成長させることにより誘導する。 40

もし存在しておれば、リーダー配列はキメラペプチドの分泌に有効となり、分泌中に開裂するであろう。

【0138】

分泌した組換えタンパク質を本発明中以下に記載する方法により細菌培養物から精製する。

【0139】

組換えタンパク質の発現のためのほ乳類宿主系も当該技術分野の通常の知識を有する者にはよく知られる。

宿主細胞株を発現したタンパク質を進行させまたはタンパク質活性を与えるのに有用となる翻訳後修飾をうむ特別な能力により選択するとよい。 50

ポリペプチドのこのような修飾としては、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化が挙げられるが、これらに限定されない。

CHO、HeLa、MDCK、293、WI38などといった異なる宿主細胞は特異的細胞機構およびこのような修飾後活性について特徴的なメカニズムを有し、誘導される外来タンパク質の正しい修飾および進行を確実にするために選択するとよい。

【0140】

形質転換した細胞を長期間、多量のタンパク質製造に用いることが好ましく、このような安定した発現が望ましい。

一旦このような細胞を所望とする発現カセットと共に選択可能なマーカーを含むベクターで形質転換すると、細胞を選択培地に交換する前に豊富な培地で1～2日間成長させるとよい。

選択可能なマーカーを設計して選択に対する耐性を与え、その存在により誘導した配列の発現に成功した細胞の成長および回収を可能とする。

適切に形質転換した細胞の耐性塊を、細胞に適した組織培養技術を用いて増殖させるとよい。

【0141】

多数の選択系を用いて組換えタンパク質製造のために形質転換した細胞を回収することができる。

このような選択系には、それぞれtk⁻、hgp⁺rt⁻またはap⁺rt⁻細胞におけるHSVチミジンキナーゼ、ヒポキサチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼおよびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。

また、抗代謝産物耐性を、メトトレキセートに対する耐性を与えるdhfr、ミコフェノリックアシッドに対する耐性を与えるgpt、アミノグリコシドG418に対する耐性を与え、またクロルスルフロニに対する耐性を与えるneo、およびヒグロマイシンに対する耐性を与えるhygroのための選択の基本として用いることもできる。

細胞がトリプトファンの場所にインドールを用いることを可能とするtrp^B、または細胞がヒスチジンの場所にヒスチノールを用いることを可能とするhis^Dといった他の適切な遺伝子も有用であろう。

形質転換体の特定を可視的に指示するマーカーとしては、アントシアン、ベクターグルクロニダーゼおよびその基質、GUS、ならびにルシフェラーゼおよびその基質、ルシフェリンが挙げられる。

【0142】

特定の適用には、タンパク質分解による消化に対して耐性のある本発明のペプチドまたはポリペプチドを製造することが望ましいであろう。

このようなペプチドとしては、加水分解不能ペプチド結合、およびC末端でアミド（例えば、CONH₂）またはN末端でアセチル基といった末端修飾を有するペプチドが挙げられるであろう。

本発明のペプチドを、そのin vivo半減期が増大し、その物質安定性が増大し、in vivo放出速度およびin vivoクリアランスも影響されるように修飾することを検討する。

【0143】

加水分解不能なペプチドを調製するために、ライブラリー加水分解不能ペプチドからペプチドを選択してもよく、または修飾を誘導して1つ以上のDアミノ酸または1つ以上の加水分解不能なペプチド結合連結アミノ酸といったペプチドを選択してもよい。

例えば、望ましい受容体結合特徴を有するペプチドを選択し、次にプロテアーゼによる加水分解のためのポテンシャルを減ずる必要に応じてこのようなペプチドを修飾することができる。

例えば、タンパク質分解による開裂に対する感受性を決定するには、ペプチドを標識し、細胞抽出物または精製プロテアーゼと共にインキュベートして、次に単離してどのペプチ

ド結合がタンパク質分解に対し感受性があるかを、例えば、ペプチドおよびタンパク質断片配列決定により決定するとよい。

代替的には、潜在的に感受性のあるペプチド結合は、本発明のペプチドのアミノ酸配列をプロテアーゼパネルの既知の開裂部位特異性と比較することにより特定されるであろう。このようなアッセイの結果に基づいて、タンパク質分解に対して感受性のある各ペプチド結合をペプチドの *in vitro* 合成による加水分解不能なペプチドと置き換えることができる。

【0144】

多くの加水分解不能なペプチドが、このような結合を含むペプチド合成のための操作と共に当該技術分野で知られる。

加水分解不能な結合としては、 $-\text{[CH}_2\text{NH]}-$ 還元アミドペプチド結合、 $-\text{[COCH}_2\text{]}-$ ケトメチレンペプチド結合、 $-\text{[CH(CN)NH]}-$ (シアノメチレン)アミノペプチド結合、 $-\text{[CH}_2\text{CH(OH)]}-$ ヒドロキシエチレンペプチド結合、 $-\text{[CH}_2\text{O]}-$ ペプチド結合、および $-\text{[CH}_2\text{S]}-$ チオメチレンペプチド結合(例えば、米国特許第6,172,043号を参照のこと)が挙げられる。

【0145】

本発明において有用なペプチドは直線であればよく、環状または天然または合成方法により環状化していてもよい。

例えば、システイン残基間のジスルフィド結合がペプチド配列を環状化してもよい。

二作用の試薬を用いてペプチドの2以上のアミノ酸間の連結を提供することができる。

Answer et al., (Int. J. Pep. Protein Res. 36:392-399, 1990) および River-Baeza et al., (Neuropeptides 30:327-333, 1996) といったペプチドの環状化についての他の方法も、当該技術分野では知られている。

【0146】

さらに、安定な構造または低減した生分解を提供するペプチドの非ペプチド類似体も検討する。

ペプチド擬似類似体は、非ペプチド部分で1つ以上の残基を置換することにより選択されたペプチドに基づいて調製することができる。

好ましくは、非ペプチド部分はペプチドがその天然のコンホメーションを保持し、または好ましい、例えば生活性なコンホメーションを安定にする。

ペプチドから非ペプチド擬似類似体を調製する方法の一例が、Nachman et al., Regul. Pept. 57:359-370 (1995) に記載されている。

本明細書中に用いるペプチドには、前記全てが包含される。

【0147】

本発明のポリペプチドは、例えばグリコシル化、アミド化、カルボキシル化またはリン酸化により、または、酸添加塩、アミド、エステル、特にC末端エステルおよびN末端アシル誘導体の作成により修飾する。

【0148】

また前記のように、本発明は他の部分との共有または非共有複合体を形成することにより修飾されたポリペプチドを包含する。

共有結合した複合体は、化学的部分をペプチドからなるアミノ酸の側鎖上で、またはNまたはC末端で官能基に連結することにより調製することができる。

【0149】

特に、前記ペプチドを蛍光標識、酵素(例えば、クロロメトリックまたはフルオロメトリック反応を触媒するもの)、基質、固体マトリックスまたは担体(例えば、ビオチンまたはアビジン)といった、しかしこれらに限定されない受容体基に接合することができることを見込む。

従って、本発明は2以上の血管内皮成長因子ポリペプチド由来の複数のペプチド基質を含むキメラポリペプチドを含む分子であって、キメラポリペプチドは好ましくはさらに放射

10

20

30

40

50

標識、蛍光標識、酵素、基質、固体マトリックスおよび担体からなる群より選択されるレポーター基を含む分子を提供する。

このような標識の使用はよく知られ、例えば、米国特許第3,817,837号、米国特許第3,850,752号、米国特許第3,996,345号および米国特許第4,277,437号に記載されている。

放射活性標識、蛍光標識および化学的発光標識といった他の標識も有用であろうが、これらに限定されない。このような標識の使用に関する米国特許としては、例えば米国特許第3,817,837号、米国特許第3,850,752号、米国特許第3,939,350号および米国特許第3,996,345号が挙げられる。

本発明のペプチドはいずれも1、2またはそれ以上のこれらの標識のいずれかを含むとよい。 10

【0150】

本発明のポリペプチドを用いる方法

P D G F / V E G F 受容体ファミリー（血管内皮細胞および血管の成長および移動に影響し、リンパ内皮細胞およびリンパ管の成長を促進し、血管浸透性を増大し、かつ骨髄造血に影響することを含むが、これらに限定されない）により媒介される多くの生物活性は、これらの生物活性をモジュレート（刺激または阻害）するためのV E G F 受容体ファミリーの1つ以上のメンバーを結合することができる本発明のポリペプチドのための多数の診断ならびに *in vitro* および *in vivo* 臨床使用を支持する。

【0151】

本発明のどのポリペプチドが成長因子として（すなわち、アニストまたは受容体刺激剤）働くかについては、多重メカニズムが存在する。

例えば、V E G F 受容体ファミリーの1つ以上のメンバーを結合および活性化するホモ二量体を形成する本発明のポリペプチドは、血管内皮成長因子として有用であろう。

代替的には、内皮成長因子ポリペプチド（V E G F - A または V E G F - C または他のファミリーメンバー）とヘテロ二量体を形成する本発明のポリペプチドもアゴニストに影響し、こうして形成されたヘテロ二量体が受容体を結合し、活性化してシグナル形質導入を誘導することができるようにする。

【0152】

本発明のどのポリペプチドがV E G F ファミリーの成長因子の阻害剤（アンタゴニスト）として機能するかについては、多重なメカニズムが存在する。 30

1つ以上の受容体に結合するが、刺激しない本発明のポリペプチドは内皮成長因子により受容体の刺激を阻害し、それにより内皮成長因子の阻害剤として働くであろう。

【0153】

このように刺激を損ねるのは、全体としてまたは部分的に受容体を二量化できないこと、恐らく本発明のハイブリッドポリペプチドが成長因子ホモ二量体を形成することができないによるであろう。

ヘテロ二量体が受容体を結合し損ねたり、ヘテロ二量体が各受容体のみまたは受容体活性およびシグナル形質導入を妨げるようにヘテロの受容体対に結合した場合には、内皮成長因子ポリペプチドとヘテロ二量体を形成する本発明のポリペプチドはV E G F ファミリー受容体の刺激を阻害するであろう。 40

いずれのメカニズムにしても、内皮V E G F ポリペプチド（および活性ホモ二量体を形成しないもの）と活性破壊ヘテロ二量体を形成する本発明のポリペプチドは、天然の内皮V E G F 活性のアンタゴニストとして有用である。

【0154】

また受容体を結合するポリペプチドはいずれも、細胞毒性または細胞増殖抑制剤に接合して、このような標的細胞に対する薬剤を送達することができる。

このような薬剤の付着が、V E G F ポリペプチドが分裂応答を表す細胞の成長を阻害するための別の方法である。

毒素の例としては、化学治療、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素などが 50

挙げられる。

【0155】

本発明の2以上のハイブリッドポリペプチドは混ぜることができ、こうして形成されたヘテロ二量体はその受容体結合および刺激特性に依存するモジュレーターとして有用であることは明らかであろう。

本発明のポリペプチドは異なる受容体結合特性を有するであろう天然に生じる血管内皮成長因子由来のハイブリッドであるから、ハイブリッドのいくつかは1つ以上の受容体の活性剤として機能するであろうし、いくつかは1つ以上の受容体の阻害剤として働くであろうことが検討される。

本明細書中に記載する操作および当該技術分野で知られる他の操作を用いて、本発明のポリペプチドの受容体結合、受容体活性化および受容体阻害特性を決定することができる。 10

【0156】

1つ以上のVEGF受容体を結合し、活性化する本発明のポリペプチドは、血管形成および／またはリンパ管形成を促進するのに有用であり、例えば、損傷治癒を促進し、組織移植を容易にし、動脈口狭窄まわりの側副血管の形成を促進し、梗塞形成後の傷ついた組織には虚血を治療する。

他方、内皮VEGFタンパク質のアンタゴニストとして機能する本発明のポリペプチドは、血管形成の抑制が望ましい腫瘍形成、網膜症、リウマチ様関節炎および乾癬を治療するための治療学的適用に用いることもできる。

【0157】

本発明のポリペプチドは、それらのいくつかがVEGF受容体の一つを選択的に結合し、こうして一つの特別なVEGF受容体を通して特異的にシグナリングを誘導するために用いることができる点で、天然のVEGF受容体リガンドとは異なる。 20

例えば、単にVEGFR-3シグナリングを誘導するポリペプチドを治療学的に用いて、リンパ疾患を患った患者のリンパ内皮を標的とし、このような患者のリンパ管の構造および機能を改善することができる。

またこのようなポリペプチドを用いて、その表面上のVEGFR-3を発現する細胞により特徴付けられる腫瘍形成を標的とすることができる。

VEGFによる単球／マクロファージの化学走性 [Barleon et al., Blood 87:3336-3343 (1996)] は、VEGFR-1により媒介される 30

。このように、特異的にVEGFR-1受容体を標的とする分子を用いて、この特別なVEGF受容体上に治療学的影響を及ぼす。

例えば、VEGFR-1の阻害剤を用いてウイルス性誘発腫瘍形成を予防したり、特異的にVEGFR-1を活性化する分子を用いて単球／マクロファージ移動を高めたりすることができる。

VEGFR-2は腫瘍形成に必須であり、ウイルス性誘発腫瘍形成にとって充分である。このように、ウイルス性VEGFにより誘導されるような腫瘍形成を阻害するために、VEGFR-2の阻害剤を用いればよく、VEGFR-2を刺激する分子は腫瘍形成を促進するために用いることができる。 40

【0158】

本発明のポリペプチドのサブセットは、既知の天然のVEGFリガンドについては実証されないVEGF受容体の組み合わせを結合することができ、全ての3つの既知のVEGF受容体VEGFR-1、R-2およびR-3を結合することができる。

これらのポリペプチドは、VEGF受容体の異なる組み合わせの活性化または阻害を望む治療にとって有用である。

【0159】

VEGFR-3を活性化することができる本発明のポリペプチドを用いて、リンパ管およびリンパ管の損傷、リンパ管の閉塞、リンパ管腫および主要な特発性リンパ水腫、ミルロイ病および早発性リンパ水腫などだけでなく、リンパ節および管の除去、癌、損傷および 50

乾癬の治療における放射治療および手術から生じる二次的リンパ水腫を治療するための組織の内皮機能を促進することができる。

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを、リンパ水腫進行のリスクがある患者にリンパ水腫を防ぐための予防的治療として、またはリンパ水腫を患った患者に治療学的処置として、例えばその症状（例えば、リンパの蓄積による腫れ）を改善する目的で、単純に投与することができるであろう。

【0160】

VEGF-R3を活性化する本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを用いて、腋窩のリンパ管が癌治療（例えば、乳ガン）における手術介入の際に除去された患者のリンパ管の再成長または浸透性を促進することができる。

10

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを用いれば、例えば、臓器移植患者における血管新生を治療することができる。

本発明のポリペプチドを含む組成物を、*in vivo*で移植する前に単離した管のセグメントに直接適用して、移植した材料の拒絶を最小とし、移植材料の血管新生を刺激してもよい。

【0161】

VEGF受容体活性を活性化する本発明のポリペプチドを用いて、創傷、手術による切開、傷、および新血管形成の過程が誘導および／または促進されうる場合には治癒が適当に促進されることが期待される他の症状を治療するとよい。

【0162】

20

前記により詳細に説明し、文献に報告されるように、血管内皮成長因子についての受容体の発現は、造血前駆細胞などの特定の前駆細胞において観察され、VEGF-Cは骨髓造血活性を有することが観察されている。

これらの観察は、本発明に従ったポリヌクレオチドまたはポリペプチドを用いて、免疫細胞または造血細胞の増殖、分化および成熟または移動をモジュレートすることにより炎症、感染または免疫疾患を治療または予防してもよいという予見を与える。

また本発明に従ったポリヌクレオチドまたはポリペプチドを用いて、組織およびリンパ管の間の白血球の通行、ならびに胸腺内外の移動を促進または阻害してもよい。

【0163】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを、骨髓造血（特に、好中球の成長）を刺激するためまたはそれを阻害するために用いることができる。

30

このように、本発明はほ乳類患者に骨髓造血のモジュレーションの必要に応じて骨髓造血をモジュレートするのに有効な本発明のポリペプチド量を投与することを含むほ乳類患者における骨髓造血モジュレート方法を含む。

1実施形態では、顆粒球減少を患ったほ乳類患者を選択し、方法は骨髓造血を刺激するのに有効なポリペプチド量を患者に投与することを含む。

特に、本発明のポリペプチドを患者の血液中の好中球カウントを増大するのに有効な量で投与する。

【0164】

関連する実施形態では、本発明は患者の細胞内で血液好中球の数を増大する必要に応じて、VEGF受容体によりシグナリングを活性化することができる本発明のポリヌクレオチドをコードするDNAを発現する工程であって、DNAは動作可能なように細胞内のDNAの発現を促進する他のコントロールまたはプロモーター配列に連結している工程を含むほ乳類患者の血液における好中球の数を増大する方法を含む。

40

同様に、本発明はほ乳類幹細胞を本発明のポリペプチドとほ乳類内皮細胞の成長をモジュレートするのに有効な量で接触させる工程を含む*in vitro*または*in vivo*での好中球顆粒球の成長をモジュレートする方法を含む。

【0165】

また本発明は、ほ乳類CD34⁺前駆細胞を本発明のポリペプチドとほ乳類内皮細胞の成長をモジュレートするのに有効な量で接触させる工程を含む*in vitro*または*in*

50

*in vivo*でのCD34⁺前駆細胞（特に、造血前駆細胞および内皮前駆細胞）の成長をモジュレートする方法を含む。

*in vitro*方法では、臍帯血または骨髓から単離したCD34⁺前駆細胞を特異的に検討する。

CD34⁺前駆細胞の成長を刺激するための本発明の*in vitro*および*in vivo*方法はまた、本発明のポリペプチドを造血／骨髓造血または内皮細胞増殖をモジュレートする目的で他のポリペプチドと共に（同時にまたは連続して）採用する方法を含む。

このような他の因子としては、コロニー刺激因子（「CSF」、例えば顆粒球-CSF（G-CSF）、マクロファージ-CSF（M-CSF）および顆粒球-マクロファージ-CSF（GM-CSF））、インターロイキン-3（IL-3、マルチコロニー刺激因子ともいわれる）、他のインターロイキン、幹細胞因子（SCF）、他のポリペプチド因子、ならびに当該技術分野で記載され、知られるその類似体が挙げられる。

一般的には、The Cytokine Handbook, Second Ed., Angus Thomson (editor), Academic Press (1996); Callard and Gearing, The Cytokine Fact Book, Academic Press Inc. (1994); および Cowling and Dexter, TIBTECH. 10(10): 349-357 (1992) を参照のこと。

前駆細胞または骨髓造血細胞成長因子または1つ以上の前記因子を有する共因子としての本発明のポリペプチドの使用は、前記因子に欠いた使用が本発明のポリペプチドがなく必要となる一方で、予め最適化しうる骨髓造血効果を高め、および予め影響しうる骨髓造血効果を高めるであろう。

【0166】

また、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを肺疾患の治療に用いて、体液蓄積を弱めるように血管浸透性に影響を及ぼすことにより、肺および血流管の肺における血液循環および／またはガス交換を改善し、心不全の場合には心臓への血液循環および酸素ガス浸透性を改善し、慢性閉塞性気道疾患における血流およびガス交換を改善し、および例えば血管浸透性における増大から生じる肺での体液の蓄積に關与する鬱血性心不全といった症状を治療してもよい。

【0167】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを用いて、その血液循環増大および血管浸透性増大活性の結果として腸管での吸収不良性症候群を治療することもできるであろう。

【0168】

1つ以上のVEGF受容体により結合するが、シグナリングを刺激しない本発明のポリペプチドを用いて、血管浸透性増大、糖尿病に関連する網膜症、リウマチ様関節炎および乾癬により引き起こされる慢性的炎症を治療してもよい。

【0169】

1つ以上のVEGF受容体の機能を阻害することができる本発明に従ったポリヌクレオチドまたはポリペプチドを用いて、水腫、末梢動脈疾患、カポジ肉腫または成熟前の新生骨における異常な網膜発達を治療することもできる。

【0170】

別の実施形態では、本発明はほ乳類内皮細胞の成長をモジュレートするのに有効な量の本発明に従ったポリペプチドにはほ乳類内皮細胞をさらす工程を含むほ乳類患者の内皮細胞の成長をモジュレートする方法を提供する。

1実施形態では、成長のモジュレーションはVEGF受容体を発現する宿主細胞内でVEGF受容体のチロシンリン酸化を刺激できるポリペプチドを用いることにより影響される。

内皮細胞の成長をモジュレートすることにおいて、本発明は内皮細胞関連疾患のモジュレーションを検討する。

好ましい実施形態では、患者および内皮細胞はヒトである。

10

20

30

40

50

内皮細胞は *in vitro* および *in vivo* で提供すればよく、これらが組織移植片に含まれていてもよい。

ポリペプチドの有効量は、(細胞増殖時間の顕微的または巨視的可視化および見積または核酸合成アッセイにより決定されるような)細胞成長速度において再生可能な変化を達成するために必要な量である。

【0171】

血管新生および新血管新生は腫瘍成長について本質的であるので、血管新生活性の障害はさらに成長を妨げ、固体腫瘍の後退にすら至ることができる。

さもなくば、リンパ管新生の障害は転移を予防するのに役立つであろう。

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、腫瘍血管新生を阻害することにより肉腫、黒色腫、癌腫およびグルムス血管腫といった腫瘍形成を治療するのに有用であろう。 10

【0172】

このように、脳(グリア芽腫、星状細胞腫、乏突起膠腫上衣細胞腫)、肺、肝臓、脾臓、腎臓、リンパ節、膵臓、小腸、血液細胞、大腸、胃、胸、子宮内膜、前立腺、精巣、卵巣、皮膚、心臓および首、食道、骨髄、血液または他の組織の癌といった広い範囲の癌を、本発明のペプチドを用いて治療するとよい。

【0173】

多くの場合、腫瘍細胞を殺傷、または通常の細胞死または「アポトーシス」に被らせるよう誘導することができることは必要ではない。

むしろ、意味のある治療とするために必要な全てとは腫瘍の成長がある程度まで示されまたは特異的に領域に位置し、かつ疾患部位まで広がるのを阻害することである。 20

しかしながら、腫瘍成長は完全に遮断されるか、いくつかの腫瘍退化が達成されるであろう。

「沈静化」および「腫瘍の減少」義務といった臨床的用語も、その通常の用法を与えると考える。

本発明の背景から、治療学的効果は血管新生の阻害および／またはリンパ管新生の阻害から生じるであろう。

【0174】

このように、本発明は細胞内の1つ以上のVEGF受容体の発現により特徴付けられる新生疾患を患ったほ乳類生物を治療する方法であって、該方法はVEGF受容体の発現により特徴付けられる新生疾患を患ったほ乳類生物を特定する工程、およびこのような治療を必要とするほ乳類生物に組成物を投与する工程を含む、該組成物は細胞のVEGF受容体媒介増殖を阻害するのに有効な本発明の1つ以上のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含む方法を含む。 30

このような治療方法論は、特に沈静期管と結ばれる内皮細胞と相応して、1つ以上のVEGF受容体のレベル増大を表す内皮細胞と結ばれる管に関与する新血管新生により特徴付けられる新生疾患状態およびVEGF受容体を発現する癌細胞により特徴付けられる疾患状態について示される。

腫瘍想定においてVEGFR-3を標的とすることおよび抗腫瘍治療は、参考文献により本明細書中に取り込まれているPCT/US99/235255(WO 00/2156 40 0)、2000年4月20日発行に記載されている。

他のVEGF受容体(例えば、VEGFR-1)も、腫瘍血管新生または転移に関係するとみなされている。

【0175】

少なくとも成長因子のVEGFファミリーのVEGF-CおよびVEGF-Dが血管の狭窄または再狭窄を予防するのに有用である証拠がある。

参考文献により本明細書中にその全体において取り込まれている国際特許出願第PCT/US99/24054号(WO 00/24412)、「再狭窄を予防するためのVEGF-CまたはVEGF-D遺伝子またはタンパク質の使用」、1999年10月26日出願を参照のこと。 50

また本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、これらの指示についても有用であろう。

このように別の観点では、本発明は血管の狭窄または再狭窄を予防するためには乳類患者を治療する方法であって、血管の狭窄または再狭窄を予防する処置を必要とする乳類患者に本発明の1つ以上のポリペプチドを血管の狭窄または再狭窄を予防するのに有効量投与する工程を含む方法を提供する。

好ましい実施形態では、投与は哺乳類患者において血管内ステントを移植することを含む、ステントが組成物で被覆または植え付けられている。

薬剤被覆または薬剤植え付けステントを構築するための材料の例は前記文献に記載され、*Lincoff et al., Circulation, 90:2070-2084 (1994)* に総説されている。 10

別の好ましい実施形態では、組成物はその粒子が本発明のポリペプチドを封入するかポリペプチドにより植え付けられているPGA、非崩壊性ポリマーまたは生物ポリマー（例えば、デンプン）などの生物崩壊しうるポリマーからなる微粒子を含む。

このような粒子は、例えば、導入血管形成カテーテルを用いて血管内壁に送達される。

局所的な持続性薬物送達を達成するための他の方法は、参考文献により本明細書中に取り込まれている *Wilensky et al., Trends Cardiovasc. Med., 3:163-170 (1993)* に総説されている。

【0176】

血管形成またはバイパス生産に続く1つ以上の血管内導入を介した投与も検討する。 20

操作部位に本発明のポリペプチドをおくことは、増殖する内皮細胞上のVEGF受容体発現により起こる。

さらに局所化は、融合ポリペプチドとして本発明のポリペプチドを組換え発現することにより（例えば、*Shin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1436-1440 (1990)* に記載されているアポリポタンパク質B-100オリゴペプチドに融合している）容易となる。

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを共投与することも検討する。

【0177】

同様に、本発明は血管内または血管腔ステント、バルーンカテーテル、注入灌流カテーテル、血管外カラー、エラストマー膜などといった循環系疾患を治療するために用いられる手術器具であって、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含でなる装置で被覆、植え付け、付着または封入することにより改善されている器具をも提供する。 30

【0178】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、狭窄を予防するための予防的治療として、または患者の管の再狭窄を予防する目的で、経皮血管冠動脈形成操作のわずか前におよび／または同時におよび／またはわずか後に単に投与することができる。

別の好ましい実施形態では、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドをバイパス操作（例えば、冠動脈バイパス操作）の前、間および／またはわずか後に投与して、移植した管内または付近の狭窄または再狭窄、特には移植片自身の位置での狭窄を予防する。

なおも別の実施形態では、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを、周辺虚血または間欠性跛行を治療するために実施された血管周囲内の血管移植前、間または後に投与する。 40

狭窄または再狭窄の予防により、このような手術操作でしばしば起こる狭窄または再狭窄の量／重篤性を減少し、および／または実質的に見積る予防的治療となる。

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、哺乳類患者の血管内VEGF受容体の刺激を促進するのに有効量で組成物に含まれ、これにより血管の狭窄または再狭窄が予防される。

【0179】

好ましい実施形態では、哺乳類患者はヒト患者である。

例えば、患者は治療的バルーン血管形成（血管内ステントの挿入をしてまたはせずに）操作から、または冠動脈バイパス操作から有益となるであろう候補者として心臓内科医により特定される冠動脈疾患を患ったヒトである。 50

他の哺乳類患者、特にはヒトにおいて治療学的効果を実証するためのモデルとして共通して用いられる哺乳類（例えば、霊長類、ブタ、イヌまたはウサギ動物）における本発明の方法の使用も検討する。

【0180】

本発明に従ったポリペプチドは、適切な薬学的に許容しうる担体、例えば、薬学的に許容しうる希釈剤、補助薬、賦形剤または担体を用いたいずれの適切な方法においても投与されるであろう。

本発明の方法に従って投与される組成物は、好ましくは水、食塩水、リン酸緩衝液、グルコースまたは血管内治療を送達するために慣用で用いられる他の担体といった薬学的に許容しうる担体溶液を（ポリヌクレオチドまたはベクターに加えて）含む。

10

また組成物が任意に本発明のポリヌクレオチド／ベクターおよび再狭窄を予防するために選択される別のポリヌクレオチド／ベクターの両者を含む場合には、多重遺伝子治療も検討する。

本発明のポリペプチドをコードするトランス遺伝子を用いて共トランスフェクションするための候補遺伝子／ベクターの例としては、前記文献に記載され、細胞毒因子、内皮成長因子および平滑筋細胞成長／移動阻害剤をコードする遺伝子が挙げられる。

【0181】

本方法に従って実施される「投与」は、注射（例えば、静脈内、筋肉内、腹膜内またはカテーテル）、経口摂取、鼻腔内または局所投与などの、しかしこれらに限定されない哺乳類患者の血管への治療的に直接または間接的導入のための医薬的に許容される方法を用いて実施されるであろう。

20

好ましい実施形態では、本発明のポリヌクレオチドを含む組成物の投与は、静脈、動脈または冠動脈注射といった血管内に行われる。

治療的組成物を多重部位で患者に送達してもよい。

多重投与は、同時にしてもよく、または数時間にわたって投与してもよい。

【0182】

特定の場合には、治療的組成物の連続フローを提供することが有益であろう。さらなる治療は、例えば日、週または月ごとの期間で投与するとよい。

【0183】

一般的に、ペプチドの治療的送達のための経口投与剤は効き目のためのこのような製剤のために効果がなく、ペプチドを胃腸管の酵素環境から保護しなければならない。

30

さらに、ペプチドを治療結果に影響する充分な条件で内皮細胞バリアにより容易に吸収されるように製剤化しなければならない。

本発明のペプチドはその効果を増大するように取り込みまたは吸収エンハンサーを有するよう製剤化するとよい。

このようなエンハンサーとしては、例えば、サリチル酸塩、グリココール酸塩／リノール酸塩、グリコール酸塩、アプロチニン、バシトラシン、カプリン酸 S D S などが挙げられる。

治療的送達のためのペプチドの経口製剤のさらなる記載は、当該技術分野において通常の知識を有する者には F i s (J . P h a r m . S c i . , 85 (12) 1282-1285, 1996) ならびに O l i y a i a n d S t e l l a (A n n . R e v . P h a r m a c o l . T o x i c o l . , 32 : 521-544, 1993) に参照される。

40

【0184】

与える投与量におけるペプチド量は、治療する疾患の特徴に加えて、治療を投与する個体のサイズにより変わるであろう。

治療の例としては、約 50 mg / 日、75 mg / 日、100 mg / 日、150 mg / 日、200 mg / 日、250 mg / 日を投与することが必要であろう。

これらの濃度は、単一投与剤または多重投与として投与するとよい。

【0185】

50

またポリペプチドをこのようなポリペプチドの *in vivo* 発現により本発明に従って採用してもよく、これはしばしば遺伝子治療を参考とする。

本発明は、微生物または真核生物細胞に挿入することができ、コードするタンパク質を発現することができる本発明のポリペプチドをコードする異種セグメントを含む組換え DNA ベクターを提供する。

【0186】

非常に好ましい実施形態では、組成物を局所的に投与する。

このように、再狭窄または狭窄を治療する場合、血管形成またはバイパスの部位へ直接投与することが好ましい。

例えば、投与は哺乳類患者の血管への、特に哺乳類患者の冠動脈へのトランス遺伝子含有組成物のカテーテル媒介トランスファーを含む。 10

局所送達のための材料および方法の例としては、両者共に参考文献により本明細書中に取り込まれている *Lincoff et al., Circulation, 90:2070-2084 (1994)* ; および *Wilensky et al., Trends Cardiovasc. med., 3:163-170 (1993)* に総説されている。

例えば、組成物は冠動脈内薬剤注入についての文献に記載されているように注入灌流バルーンカテーテル（好ましくは微小孔バルーンカテーテル）を用いて投与する。

例えば、米国特許第 5, 713, 860 号（注入アレイを有する血管内カテーテル）、米国特許第 5, 087, 244 号、米国特許第 5, 653, 689 号および *Wolinsky et al., J. Am. Coll. Cardiol., 15:475-481 (1990)* (*Wolinsky* 注入カテーテル)、および *Lambett et al., Coron. Artery Dis., 4:469-475 (1993)* であって、その全てが参考文献によりその全体において本明細書中に取り込まれているものを参照のこと。 20

部位直接体細胞遺伝子治療のためのこのようなカテーテルの使用は、例えば参考文献により本明細書中に取り込まれている *Mazur et al., Texas Heart Institute Journal, 21:104-111 (1994)* に記載されている。

本発明のポリペプチドをコードするトランス遺伝子をアデノウイルスベクターにおいて投与する実施形態では、好ましくはベクターを $10^7 - 10^{13}$ ウイルス粒子の力価で、およびより好ましくは $10^9 - 10^{11}$ ウイルス粒子の力価で薬学的に許容しうる担体において投与する。 30

好ましくは、アデノウイルスベクター組成物を 15 秒～30 分間、より好ましくは 1～10 分間の期間にわたって注入する。

【0187】

例えば、冠動脈における単一または多重損傷による狭心症を有し、PTCA が主要な冠動脈血管造影図による知見に基づいて予見されている患者では、プロトコルの例として大腿骨アプローチを用いて標準的臨床実施に従って 7 F ガイドカテーテルにより PTCA を実施することが挙げられる。

最適な結果が PTCA 単独で得られない場合には、次に血管外ステントも移植する。 40
(通常の結果は、視覚的見積りおよび B または C 型切開によれば管腔の 30% より大きい過剰狭窄として定義される。)

バルーン拡張部位での動脈遺伝子トランスファーは、血管形成後すぐではあるがステント移植前に、注入灌流バルーンカテーテルを用いて、本発明のポリペプチドを発現する複製不完全アデノウイルスベクターを用いて実施する。

【0188】

カテーテルのサイズは、血管造影図から測定される動脈径にマッチするように選択され、例えば、3.0～3.5 F 径で変わる。

バルーンを最適圧力に膨張させ、遺伝子トランスファーを 1.15×10^{13} ウイルスタイターで 0.5 ml / 分の速度で 10 分間注入して実施する。 50

【0189】

別の実施形態では、他のトランス遺伝子を導入するための文献に記載されるように、ゲル被覆カテーテルを用いた血管内投与を検討する。

例えば、全てが参考文献により本明細書中に取り込まれている米国特許第5,674,192号（頑強に接着した膨張ヒドロゲルポリマー）；Riessen et al., Human Gene Therapy, 4:749-758 (1993)；およびSteg et al., Circulation, 96:408-411 (1997) および90:1648-1656 (1994)を参照のこと。

要約すると、DNA溶液（例えば、本発明のポリヌクレオチド）をヒドロゲルポリマー（例えば、ハイドロプラスを有するSlider, Mansfield Boaston Science Corp., Watertown, MA）で被覆した炎症血管形成カテーテルバルーンの表面へex vivoで一回以上適用する。

ハイドロプラス被覆は、バルーンに強く接着した高分子量ヒドロゲルを形成するようにバルーンに架橋する親水性ポリアクリル酸ポリマーである。

DNA被覆したヒドロゲルを、バルーンの収縮前に乾燥させる。

血管形成過程におけるバルーンの血管内再膨張は、管壁へのDNAのトランスファーを引き起こす。

【0190】

なおも別の実施形態では、バルーン血管形成カテーテルまたはステントを有する総体またはマウントする拡張伸縮膜または類似の構造を採用して、本発明のポリペプチドをコードするトランス遺伝子を送達する。

例えば、全て本明細書中に参考文献により取り込まれている米国特許第5,707,385号、第5,697,967号、第5,700,286号、第5,800,507号および第5,776,184号を参照のこと。

【0191】

別の変型では、本発明のポリペプチドをコードするトランス遺伝子を含有する組成物を血管外に、例えば管部分の取り囲みまたは囲みをするための装置を用いて投与する。

例えば、参考文献により本明細書中に取り込まれている国際公開公報WO98/20027で、プラスミドまたはリポソームベクターを介して動脈壁にトランス遺伝子を送達するために動脈外周囲にカラーをおくこと（例えば、バイパス操作中に）が記載されている。

【0192】

なおも別の変型では、内皮細胞または内皮前記細胞を本発明のポリペプチドをコードするトランス遺伝子、および哺乳類患者に投与するようなトランスフェクション細胞を用いてex vivoでトランスフェクションする。

一般的に修飾した内皮細胞を用いて血管移植する操作の例は、参考文献により本明細書中に取り込まれている米国特許第5,785,965号に記載されている。

【0193】

好ましい実施形態では、本発明のポリヌクレオチドはさらに遺伝子治療を容易にする追加の配列を含む。

1実施形態では、本発明のポリペプチドをコードする「裸の」トランス遺伝子（すなわち、ウイルス、リポソームまたは他のトランスフェクションを容易にするベクターを有しない）を遺伝子治療に採用する。

この実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは好ましくは適切なプロモーターおよび／またはエンハンサー配列（例えば、サイトメガウイルスプロモーター／エンハンサー [Lehner et al., J. Clin. Microbiol., 29:2494-2502 (1991)；Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985)]、ラウス肉腫ウイルスプロモーター [Davis et al., Hum. Gene Ther., 4:151 (1993)]、Tieプロモーター [Korhonen et al., Blood, 86(5):1828-1835 (1995)]、またはサルウイルス40プロモーター）を標的哺乳類細胞で発現するために含む、プロ

10

20

30

40

50

モーターはポリペプチドコード配列の上流（すなわち、5'）に操作可能に連結されている。

また本発明のポリペプチドは、好ましくはさらにポリペプチドコード配列の下流（すなわち、3'）に操作可能に連結した適切なポリアデニル化配列（例えば、SV40またはヒト成長ホルモン遺伝子ポリアデニル化配列）を含む。

また本発明のポリヌクレオチドは、好ましくはポリペプチド配列とフレームがあうように融合した分泌シグナルペプチドをコードするヌクレオチドを含む。

分泌シグナルペプチドは、ポリペプチドを発現する細胞による本発明のポリペプチドの分泌を目的とし、分泌したポリペプチドから細胞により開裂される。

シグナルペプチド配列を他の分泌タンパク質のものとすることもでき、または哺乳類患者の細胞内での分泌を目的とするのに有効な完全合成シグナル配列とすることもできる。 10

【0194】

ポリヌクレオチドは、さらに例えば複製の細菌オリジンおよび選択可能なマーカーをコードする配列といった、細菌内で、唯一目的とする機能がベクターの大量生産を容易とする配列を任意に含んでもよい。

しかしながら、好ましい実施形態では、このような外来配列は少なくとも本発明の方法に従ったヒトへの投与前に開裂される。

このようなポリヌクレオチドを製造し、投与して、他のトランス遺伝子についての文献に記載されている操作を用いて遺伝子治療の成功に至る。

例えば、参考文献によりその全体において本明細書中に取り込まれている Insner et al., Circulation, 91:2687-2692 (1995); および Insner et al., Human Gene Therapy, 7:989-1011 (1996) を参照のこと。 20

【0195】

いずれかの適切なベクターを用いて宿主への本発明のポリペプチドの一つをコードするトランス遺伝子を導入してもよい。

文献に記載されているベクターの例としては、複製不完全レトロウイルスベクターが挙げられ、レンチウイルスベクター [Kim et al., J. Virol., 72(1):811-816 (1998); Kingsman & Johnson, Scrip Magazine, 1998年10月, pp. 43-46]; アデノ関連ウイルスベクター [米国特許第5,474,935号、米国特許第5,139,941号、米国特許第5,622,856号、米国特許第5,658,776号、米国特許第5,773,289号、米国特許第5,789,390号、米国特許第5,834,441号、米国特許第5,863,541号、米国特許第5,851,521号、米国特許第5,252,479号; Gnatenko et al., J. Invest. Med., 45:87-98 (1997)]; アデノウイルスベクター [例えば、米国特許第5,792,453号、米国特許第5,824,544号、米国特許第5,707,618号、米国特許第5,693,509号、米国特許第5,670,488号、米国特許第5,585,362号; Quantin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US A. 89:2581-2584 (1992); Stratford-Perri et al., J. Clin. Invest., 90:626-630 (1992)]; および Rosenfeld et al., Cell, 68:143-155 (1992)]; アデノウイルス-アデノ関連ウイルスハイブリッド（例えば、米国特許第5,856,152号を参照のこと）またはワクシニアウイルスまたはヘルペスウイルス（例えば、米国特許第5,879,934号、米国特許第5,849,571号、米国特許第5,830,727号、米国特許第5,661,033号、米国特許第5,328,688号を参照のこと）; リポフェクチン媒介遺伝子トランスファー (BRL); リポソームベクター [例えば、米国特許第5,631,237号（センダイウイルスタンパク質を含むリポソーム）を参照のこと]; およびそれらの組み合わせがある。 30 40

前記文献は全てその全体において参考文献により本明細書中に取り込まれている。 50

複製不完全アデノウイルスベクターは好ましい実施形態を構成する。

【0196】

検討した他の非ウイルス送達メカニズムとしては、リン酸カルシウム沈殿 (Graham および Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1993; Chen および Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987; Rippe et al., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990)、DEAEデキストラン (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985)、エレクトロポレーション (Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986; Pottter et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984)、直接のマイクロ注入 (Harland および Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985)、DNA 取り込みリポソーム (Nicolau および Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982; Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979; Felgner, *Sci Am.* 276(6):102-6, 1997; felgner, *Hum Gene Ther*, 7(15):1791-3, 1996)、細胞音波処理 (Fechheimer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987)、高速マイクロ噴射を用いた遺伝子衝撃 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:9568-9572, 1990)、および受容体媒介トランスフェクション (Wu および Wu, *J Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987; Wu および Wu, *Biochemistry*, 27:887-892, 1988; Wu および Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993) が挙げられる。

【0197】

本発明の特別な実施形態では、発現構築物 (または前記実際のペプチド) をリポソームに取り込んでもよい。

リポソームは、リン脂質二層膜および内部水性液により特徴付けられる小胞構造である。多重ラメラリポソームは水性液により分離される多重脂質層を有する。

それらは、リン脂質が過剰な水溶液に懸濁されると、自然に形成する。

リン成分は閉鎖構造の形成前に自己再配置をうけ、そして脂質二層間に水および溶解した溶液を取り込む (Ghosh および Bachhawat, 「肝臓病、標的診断および特異的受容体およびリガンドを用いた治療」, Wu G, Wu C 編集, New York: Mercel Dekker, pp. 87-104, 1991)。

陽イオン性リポソームへの DNA の添加は、リポソームから光学的に複屈折な液体結晶濃縮小球への位相的移行を引き起こす (Radler et al., *Science*, 275(5301):810-4, 1997)。

これらの DNA 液体複合体は、遺伝子治療および送達における用途のための有効な非ウイルスベクターである。

【0198】

In vitro での外来 DNA のリポソーム媒介核酸送達および発現は、非常に成功している。

また本発明では、「リポフェクション」技術といった種々の市販によるアプローチも検討している。

本発明の特定の実施形態では、リポソームを赤血球凝集ウイルス (HVJ) と複合してもよい。

これは細胞膜との融合を容易にし、リポソーム取り囲み DNA の細胞侵入を促進することが示されている (Kaneda et al., *Science*, 243:375-378, 1989)。

10

20

30

40

50

他の実施形態では、リポソームを核非ヒストン染色体タンパク質 (HMG-1) との接合で複合または採用するとよい (Kato et al., J. Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991)。

なおもさらなる実施形態では、リポソームをHVJおよびHNG-1の両者との接合で複合または採用してもよい。

このような発現では、構築物を *in vitro* および *in vivo* での核酸のトランスファーおよび発現に採用するのに成功し、次にそれらを本発明のために適用することができる。

【0199】

細胞への治療的遺伝子をコードする核酸を送達するために採用することができる他のベクター送達システムとしては、受容体媒介送達ビークルが挙げられる。 10

【0200】

これらは、ほとんど全ての真核生物細胞での受容体媒介エンドサイトーシスによりマクロ分子の選択的取り込みを有利にする。

種々の受容体の細胞型特異的分布により、送達は非常に特異的にされうる (Wu および Wu, 1993, 前記)。

【0201】

媒介物を標的とする受容体媒介遺伝子は、一般的に2つの成分、すなわち細胞受容体特異的リガンドおよびDNA結合剤を構成する。

いくつかのリガンドが受容体媒介遺伝子トランスファーに用いられている。 20

最も広く特徴付けられているリガンドは、アシアロオロソムコイド (ASOR) (Wu および Wu, 1987, 前記) およびトランスフェリン (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(9):3410-3414, 1990) である。

最近、ASORと同じ受容体を認識する合成新糖タンパク質が、遺伝子送達媒体として用いられており (Ferkol et al., FASEB J., 7:1081-1091, 1993; Perales et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91:4086-4090, 1994)、上皮成長因子 (EGF) も扁平上皮腫瘍細胞へ遺伝子を送達するために用いられた (Myers, EPO 0273085)。 30

【0202】

他の実施形態では、送達媒体はリガンドおよびリポソームを含むとよい。

例えば、Nicolaouら (Methods Enzymol., 149:157-176, 1987) はラクトシルセラミド、ガラクトース末端アシアルガングリオシドをリポソームへ取り込み、肝細胞によりインシュリン遺伝子の取り込みにおける増大を観察した。

このように、治療的遺伝子をコードする核酸をリポソームを用いてまたは用いずにいくつかの受容体リガンドシステムにより特別な細胞型へ特異的に送達してもよい。

【0203】

本発明の別の実施形態では、発現構築物は単に裸の組換えDNAまたはプラスミドから構成される。 40

構築物のトランスファーは、物理的にまたは化学的に細胞膜を浸透させる前記方法のいずれかにより実施するとよい。

これは *in vitro* でのトランスファーについて特に適用しうるが、*in vivo* 使用についても同様に適用するとよい。

Dubenskyら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:7529-7533, 1984) は、CaPO₄ 沈殿の形態のポリオマウイルスDNAを急性ウイルス複製および急性感染を実証した大人および生まれたてのマウスの肝臓および脾臓に注入した。

Benvenisty および Neshif (Proc. Natl. Acad. Sci. US 50

A, 83:9551-9555, 1986) も、 CaPO_4 沈殿プラスミドの直接複腔内注入がトランスフェクションした遺伝子の発現に至ることを実証した。

【0204】

細胞に裸のDNA発現構築物をトランスファーするための本発明の別の実施形態では、粒子衝撃に関するであろう。

この方法は、DNA被覆マイクロ噴射が細胞膜を貫通し、それらを殺すことなく細胞侵入させるほどの高速加速能力に依存する (Klein et al., Nature, 327:70-73, 1987)。

小さい粒子を加速するためのいくつかの装置が開発されている。

このような装置の一つは、高電圧放電して電流をだし、次に誘因力を提供する (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:9568-9572, 1990)。

用いたマイクロ噴射は、タングステンまたは金粒子といった生物的内部物質から構成されている。

【0205】

ウイルスベクターを採用する実施形態では、好ましいポリヌクレオチドはさらに前記適切なプロモーターおよびポリアデニル化配列を含む。

さらにこれらの実施形態では、ポリヌクレオチドはさらに本発明のポリペプチドをコードする配列に動作可能に接続されたベクターポリヌクレオチド配列 (例えば、アデノウイルスポリヌクレオチド配列) を含むことが容易にわかるであろう。

【0206】

このように1実施形態では、投与する組成物はベクターを含む、該ベクターは本発明のポリヌクレオチドを含む。

好ましい実施形態では、ベクターはアデノウイルスベクターである。

非常に好ましい実施形態では、アデノウイルスベクターは複製不完全であり、すなわちアデノウイルスゲノムからの実質的なウイルス複製配列の欠失により哺乳類患者内では複製されえない。

例えば、本発明はベクターが複製不完全アデノウイルスを含む、アデノウイルスがプロモーターに動作可能に接続され、アデノウイルスポリヌクレオチド配列によりいずれかの末端にフランクされた本発明のポリヌクレオチドを含む方法を検討する。

【0207】

同様に、本発明はその使用が本発明の方法を実施するのを容易にするようにパッケージとされた本発明の成分または組成物を含むキットを含む。

もっとも単純な実施形態では、このようなキットは本発明の実施に用いられるような本明細書中に記載される成分または組成物を含む (例えば、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド)、密封したボトルまたは容器といった入れ物に、パッケージに張り付けたまたは入れた本発明の方法を実施するための成分または組成物の使用を記載するラベルとともにある。

好ましくは、成分または組成物は投与型単位でパッケージとされる。

別の好ましい実施形態では、本発明のキットはステント、カテーテル、血管該カラー、ポリマーフィルムなどといった本発明の方法を実施するのに有用な物的器具と共にパッケージとされたポリヌクレオチドまたはポリペプチドの両者の組成物を含む。

別の実施形態では、本発明のキットはヒドロゲルポリマーまたは微粒子ポリマーまたは患者にポリヌクレオチドまたはポリペプチドを送達するのに有用な本明細書中に記載する他の担体と共にパッケージとされた本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの両者の組成物を含む。

【0208】

本発明のポリペプチドは、VEGF受容体タンパク質発現を検出するための診断または予知アッセイにおいて有用である。

1つ以上のVEGF受容体に結合する本発明のポリペプチドを用いて、例えば医学的イメ

ージ、検出、スクリーニングまたは標的治療といった目的に試料内の特異的受容体タンパク質の存在を検出および測定するとよい。

酵素標識またはビオチン／アビジン系の標識を含む、放射活性または非放射活性標識といった検出可能な標識を用いて、本発明のポリペプチドにタグするとよい。

またポリペプチドをイメージのための適切なスーパー磁気性、パラ磁気性、電気密度、環境遺伝的または放射活性の剤に共有してまたは共有せずに結合させてもよい。

【0209】

また、本発明は、正常なコントロール組織試料に比べてタンパク質の過剰発現が、例えば、異常な細胞成長または分化といった疾患または疾患に対する疑いの存在を検出するので、種々の組織内のVEGF受容体タンパク質のレベル変化を検出するための診断アッセイにも関する。 10

本発明のポリペプチドは、結合アッセイにおける活性受容体またはリガンドの存在について生検材料をアッセイすることまたは本発明の検出可能な標識ポリペプチドを用いたキットにより、将来の転移リスクを定量するために用いることができる。

【0210】

本発明に関連する観点は、例えば内皮細胞といった特異的細胞を検出する方法である。これらの細胞は*in vivo*でまたは*ex vivo*で生物組織試料に見い出されるであろう。

検出方法は、例えば内皮細胞を含む生物組織を、ハイブリッドポリペプチドが細胞に結合する条件下、VEGFRに結合することができる本発明によるハイブリッドポリペプチドと接触させる工程、任意に生物組織を洗浄する工程、および生物組織内で細胞に結合したハイブリッドポリペプチドを検出する工程、これにより細胞を検出する工程を含む。 20

本発明の特定のポリペプチドが1つ以上のVEGFRを発現する細胞を検出および／またはイメージするのに有用となり、他のポリペプチドは特別なVEGFRを特異的に発現する細胞をイメージするのに有用となることは明らかであろう。

【0211】

また本発明は、特異的VEGFRを発現する細胞を含む疑いのある脊椎動物組織をイメージする方法であって、(a) 脊椎動物組織を特別なVEGFRに特異的に結合する本発明のポリペプチドを含む組成物と接触させる工程、および(b) 組織に結合したVEGFR結合ポリペプチドを検出することにより組織をイメージする工程を含む方法を目的とする。 30

好ましくは、組織はヒト組織であり、かつ方法はさらに接触工程後でイメージ工程前に、組織から組織内でVEGFRに結合していないポリペプチドを除去する条件下、組織を洗浄する工程を含む。

【0212】

関連する変型では、本発明は脊椎動物体から組織の腫瘍をイメージする方法であって、該方法は(a) 腫瘍を含む疑いのある脊椎動物組織をVEGFR結合化合物を含む組成物と接触させる工程、および(b) 該組織内の細胞に結合したVEGFR結合化合物を検出する工程、および(c) VEGFR結合化合物により結合した血管内皮細胞を特定することにより固体腫瘍をイメージする工程を含む、該VEGFRを発現している血管が組織内の腫瘍の存在および位置と関連する方法を提供する。 40

【0213】

また本発明は、特別な組織および細胞型についての特異的なマーカーとしてVEGFR受容体に結合する本発明のハイブリッドポリペプチドの使用を目的とする。

【0214】

例えば、VEGFR-3を特異的に結合する本発明のこれらのポリペプチドは、リンパ内皮細胞のためのマーカーとして働くことができる。

【0215】

同様に、本発明のポリペプチドは単離した細胞または細胞系の成長をモジュレートする能力についてスクリーニングしてもよい。

例えば、特定の新生疾患状態は細胞表面上の V E G F R 受容体の出現により特徴付けられる [Valtola et al., Am J Path 154: 1381-90 (1999)]。

本発明のポリペプチドを、新生細胞の成長をモジュレートするポリペプチドの能力を決定するためにスクリーニングしてもよい。

他の疾患状態が、V E G F 受容体における突然変異により特徴付けられることもありうる [Ferrell et al., Hum Mol Genetics 7: 2073-78 (1998)]。

天然に生じる動脈内皮成長因子とは異なるように V E G F 受容体の変異型の活性をモジュレートする本発明のポリペプチドは、このような疾患状態の症状および重篤性をモジュレートするにも有用であろう。 10

【0216】

In vivo イメージまたは組織生検は、特定の新生細胞が受容体の特別な組み合わせを発現することを表し、これにより発現した受容体セットを結合し、リガンド媒介成長を阻害する本発明のポリペプチドについての指示を提供する。

【0217】

このような診断的イメージの使用は、特に例えば腫瘍塊または腫瘍塊付近の新血管形成の像を得ることにおいて特に適切である。

本発明のペプチドを、参考文献により本明細書中に取り込まれる米国特許第 6, 107, 046 号に開示される抗体に基づく方法に類似の方法でのイメージに採用してもよいことが検討される。 20

【0218】

多くの適切なイメージ剤が当該技術分野で知られ、本発明のペプチドに標識剤を付着する方法と同様である（例えば、参考文献により本明細書中に取り込まれている米国特許第 4, 965, 392 号、米国特許第 4, 472, 509 号、米国特許第 5, 021, 236 号および米国特許第 5, 037, 630 号を参照のこと）。

標識したペプチドを薬学的に許容しうる担体において患者に投与し、V E G F R-3 受容体を有する標的部位で蓄積させる。

次に、このペプチドイメージ剤は、標的部位の X 線、磁気共鳴、超音波またはシンチグラフィイメージのためのコントラスト剤として働く。 30

本発明のペプチドは、癌および他の V E G F R-3 関連疾患の臨床的調査のための入手可能な医学的イメージツールの保有に加えて、便利かつ重要である。

【0219】

本発明のイメージ剤において有用なパラ磁氣的イオンとしては、例えば、クロム (I I I)、マンガン (I I)、鉄 (I I I)、鉄 (I I)、コバルト (I I)、ニッケル (I I)、銅 (I I)、ネオジウム (I I I)、サマリウム (I I I)、イットルビウム (I I I)、ガドリニウム (I I I)、バナジウム (I I)、テルビウム (I I I)、ジスプロシウム (I I I)、ホルミウム (I I I) およびエルビウム (I I I) が挙げられる。

X 線イメージについて有用なイオンとしては、ランタニウム (I I I)、金 (I I I)、鉛 (I I) および特別なビスマス (I I I) が挙げられるが、これらに限定されない。 40

臨床適用のための放射性アイソトープとしては、例えば、²¹¹ アスタチン、¹⁴ 炭素、⁵¹ クロム、³⁶ 塩素、⁵⁷ コバルト、⁶⁷ 銅、¹⁵² E u、⁶⁷ ガリウム、³ 水素、¹²³ ヨウ素、¹¹¹ インジウム、⁵⁹ 鉄、³² リン、¹³ レニウム、⁷⁵ セレニウム、⁵ 硫黄、^{99m} テクニシウムおよび ⁹⁰ イットリウムが挙げられる。

【0220】

本発明のペプチドを、当該技術分野の通常の知識を有する者によく知られる技術に従って標識してもよい。

例えば、ペプチドをヨウ化ナトリウムまたはカリウムおよび塩酸ナトリウムといった化学的酸化剤またはラクトペルオキシダーゼといった酵素性酸化剤と接触させることによりヨウ化することができる。 50

ペプチドを、例えばスズ溶液を用いて過テクネチウム酸塩を還元し、Sephadexカラム上に還元したテクネチウムをキレートし、かつカラムにペプチドをのせることにより、リガンド交換によるテクネチウム-99mで標識してもよい。
タンパク質およびペプチドを標識するこれらのおよび他の技術は、当該技術分野の通常の知識を有する者にはよく知られる。

【0221】

新形成障害のための組合せ治療における本発明のポリペプチドの使用

DNA損傷剤に対する腫瘍細胞抵抗性は、臨床的腫瘍学における主要な問題を表す。
現在の癌研究の1つの目標は、化学的および放射線治療の効率を改良する道を見出すことにある。

前記したごとく、本発明のペプチドは、化学的—または放射線治療的介入、免疫治療と組み合わせ、または他の抗—血管形成／抗—リンパ管形成治療と組合せて投与することができる。

【0222】

本発明の方法および組成物を用い、細胞を殺し、細胞増殖を阻害し、転移を阻害し、血管形成を阻害し、または組合せ治療を介して腫瘍細胞の悪性表現型を逆行または低下させるには、一般に、「標的」細胞または組織（例えば、腫瘍および／またはその血管系）と（ペプチド組成物として、または該ペプチドを発現する発現構築体としての）本発明の治療ペプチドおよび少なくとも1つの他の剤とを接触させ、該他の剤は所望により、本発明のペプチドとコンジュゲートさせる。

これらの組成物は、癌細胞および／または癌細胞を供給しそれを働かさせる血管およびリンパ系管の内皮細胞の増殖を殺傷および／または阻害することによって、癌を殺しまたはその増殖を阻害するのに有効な組合せ量で供されるであろう。

このプロセスは、細胞を、同時にペプチドまたは発現構築体および剤または因子と接触させることを含むことができる。

これは、細胞を、双方の剤を含む単一組成物または薬理的処方と接触させるか、あるいは、同時に、細胞を2つの区別される組成物または処方と接触させることによって達成することができ、ここに、1つの組成物は、ペプチドまたは発現構築体および第2の剤を含む他のものを含む。

【0223】

別法として、本発明のペプチドを使用する治療的処置は、数分乃至数週間の範囲の間隔だけ他の剤の治療より先行するかそれに続くことができる。

他の剤および発現構築体を別々に投与する具体例において、一般に、有意な期間が各送達の時点の間に消滅しないことを保証し、従って、剤およびペプチドベースの治療在は、依然として、有利には組合せ効果を発揮させることができるであろう。

【0224】

そのような例において、相互から約12～24時間内に、より好ましくは相互から約6～12時間内に双方の様式を投与することが考えられ、ただ12時間の遅延時間が最も好ましい。

いくつかの状況では、治療用の期間をかなり延長するのが望ましいが、数日（2、3、4、5、6または7）乃至数週間（1、2、3、4、5、6、7または8）が各投与の間に経過する。

一方のまたは双方の剤での反復された治療が具体的には考えられる。

特別の具体例においては、抗癌治療を送達することができ、これは、癌細胞を殺し、阻害しまたは壊死させるように癌細胞に直接的に攻撃し、加えて、本発明のペプチドに基づく治療組成物を、抗血管形成および／または抗—リンパ管形成効果を有するのに有効な量にて個体に投与される。

他の抗癌剤の前に、あるいは事実、所望により他の剤とコンジュゲートさせた、他の抗癌剤と同時に、ペプチド組成物は、他の抗癌剤に続いて投与することができる。

【0225】

組合せ治療で用いるのに適した剤または因子は、細胞に適用された場合にDNA損傷を誘導するいずれの化学化合物または治療方法でもある。

そのような剤および因子は、 γ -照射、X線、UV照射、マイクロ波、電子エミッションなどを誘導する放射線および波を含む。

「化学療法剤」とも記載される種々の化学化合物はDNA損傷を誘導するように機能し、その全ては、本明細書中に開示する組合せ治療方法で用いられることを意図している。

用いることが考えられる化学療法剤は、例えば、アドリアマイシン、5-フルオロウラシル(5FU)、エトポシド(EP-16)、カンプトテシン、アクチノマイシン-D、マイトマイシンC、シスプラチン(CDDP)および過酸化水素さえ含む。

また、本発明は、放射線ベースのまたは現実の化合物であるかを問わず、シスプラチンとX線の使用、またはシスプラチンとエトポシドの使用のとき、1つ以上のDNA損傷剤の組合せの使用を含む。 10

【0226】

本発明による癌の治療においては、腫瘍細胞および／または腫瘍欠陥の内皮細胞を、本発明の1つ以上のペプチドを含む治療剤に加えて、剤と接触させる。

これは、局所的腫瘍部位を、X線、UV光、ガンマ線またはマイクロ波のとき放射線を照射することによって達成することができる。

別法として、対象に、アドリアマイシン、5-フルオロウラシル、エトポシド、カンプトテシン、アクチノマイシン-D、マイトマイシンCまたはシスプラチンのとき化合物を含む医薬組成物の治療的に有効な量を投与することによって、腫瘍細胞を剤と接触させることができる。 20

キナーゼ阻害剤もまた、本発明のペプチドとの組合せ治療で有用であると考えられる。

剤は、それを前記したとき本発明のキメラペプチドと組み合わせることによって、組合せ治療組成物またはキットとして調製し、使用することができる。

【0227】

核酸、特別にはDNAを直接架橋させる剤は、DNA損傷を促進すると考えられ、キメラペプチドベースの治療との相乗的な抗新形成組合せに導く。

シスプラチンおよび他のDNAアルキル化剤のとき剤を用いることができる。

シスプラチンは、3コースの全体の間、3週間毎に5日間、 20 mg/m^2 の臨床的適用で用いる効果的な用量にて、癌を治療するのに広く用いられてきた。 30

シスプラチンは経口では吸収されず、従って、静脈内、皮下、筋肉内または腹腔内注射を介して送達されなければならない。

【0228】

また、DNAを損傷する剤は、DNA複製、有糸分裂および染色体分離と干渉する化合物も含む。

そのような化学療法化合物はドキソルビシンとしても知られているアドリアマイシン、エトポシド、ベラパミル、ポドフィロトキシン等を含む。

【0229】

新形成の治療のための臨床的設定で広く使用され、これらの化合物は、アドリアマイシンでは21日間隔で $25\sim 75\text{ mg/m}^2$ の範囲の用量にての静脈内ボラス注射を介して、エトポシドでは $35\sim 50\text{ mg/m}^2$ の範囲の用量にて静脈内または静脈内用量の2倍にて経口的に投与される。 40

【0230】

また、核酸前駆体およびサブユニットの合成および忠実度を破壊する剤はDNA損傷に導く。

多数の核酸前駆体それ自体が開発されてきた。

特に有用なのは、広いテストを受けた剤であり、容易に入手できる。

それ自体、5-フルオロウラシル(5FU)のとき剤は、新形成組織によって優先的に使用され、この剤を、新形成細胞に対して標的化するのに特に有用にする。

かなり毒性ではあるが、5FUは、局所を含めて、広い範囲の担体中にて適用可能であ 50

るが、3乃至15mg/kg/日の範囲の用量での静脈内投与が通常は使用される。

【0231】

以下の例は、化学療法剤およびかかる剤の投与によって管理されることが示されてきた癌のリストである。

これらの化学療法剤と本発明のペプチドの組合せは、種々の新形成障害の緩和で有用であることが証明できる。

これらの化合物の例は（ドキソルビシンとしても知られている）アドリアマイシン、（エトポシドとしても知られている）VP-16等、（DNAにインターカレートし、DNA指向性RNAポリメラーゼをブロックし、DNA合成を疎外する）ダウノルビシンを含み；（ムタマイシンおよび／またはマイトマイシン-Cとしても知られている）マイトマイシンは、抗腫瘍活性を有することが知られている *Streptomyces caespitosus* のブロスから単離された抗生物質であり；アクチノマイシンDもまた、本発明のペプチドと組み合わせて使用される有用な薬物であろう。

なぜならば、全身治療に応答しない腫瘍は、時々、放射性治療を増強することが知られているダクチノマイシンでの局所的灌流に反応するからである。

また、それは、一次的外科処置、放射線治療、および他の薬物、特にビンクリスチンおよびシクロホスファミドと組み合わせて用いられ、エーウィン腫瘍、カポシ肉腫、および軟組織肉腫、絨毛癌、転移性精巣癌腫、保持筋病および非-保持筋リンパ腫に対して効果的であることが判明している。

【0232】

ブレオマイシンは、*Streptomyces verticillius* の株から単離された細胞毒性糖ペプチド抗生物質の混合物であり、単一剤として、または当部および首（口、舌、扁桃、鼻咽頭、洞、口蓋、唇、頬粘膜、歯肉、喉頭蓋、口蓋を含む）、皮膚、ペニス、頸部、および外陰部のごとき鱗状細胞癌腫における他の認可された化学療法剤との証明された組合せにおいて、前記新形成の管理で効果的である。

また、それはリンパ腫および精巣癌腫の治療でも用いられてきた。

【0233】

シスプラチンは、転移性精巣または卵巣癌腫、進行した膀胱癌、頭部または首癌、頸癌、肺癌または他の腫瘍のごとき癌を治療するのに広く用いられており、本発明のペプチドとの有用な組合せであろうVP16（エトポシド）は、ブレオマイシンおよびシスプラチンとの組合せにて、および肺の小細胞癌腫のためにシスプラチンとの組合せにて、精巣腫瘍の治療で主として用いられる。

また、それは、非-保持筋リンパ腫、急性非リンパ系白血病、乳房の癌腫、および後天性免疫不全症候群（AIDS）と関連したカポシ肉腫に対しても活性である。

いくつかの種類の癌細胞を殺し、サイトカインの生産を活性化し、マクロファージおよび肺非細胞を活性化し、コラーゲンおよびコラゲナーゼの生産を促進する腫瘍壊死因子〔TNF；カシクチン〕糖タンパク質は炎症メディエーターであり、また、敗血症ショックのメディエーターであり、かつ異化、発熱および睡眠を促進する。

【0234】

TNFは効果的な用量にて単独で用いた場合かなり毒性であり得、従って最適な療法は、おそらくは、それを他の薬物と組み合わせて低用量で用いる。

その免疫抑制作用はγ-インターフェロンによって増強され、従って、組合せは潜在的には危険である。

TNFおよびインターフェロンαのハイブリッドは、抗癌活性を保有することが判明している。

【0235】

タキソール、アッシュツリー、*Taxus brevifolia* の皮から元来単離された抗有糸分裂剤、およびその誘導体のパクリタキソールは乳癌に対して有用であることが判明しており、本発明の組合せ療法で用いることができる。

【0236】

ビンクリスチンに対する有利な応答は、種々の他の新形成、特にウィルムズ腫瘍、神経芽腫、脳腫瘍、横紋筋肉腫、および乳房、膀胱および男性および女性生殖系の癌腫を持つ患者で報告されている。

ビンブラスチンもまたビンクリスチンと同一の癌で有用な治療剤として示されている。

ビンブラスチンの最も頻繁な臨床的腫瘍は、転移性精巣腫瘍の治療的処置においてブレオマイシンおよびシスプラチンと共に用いるものである。

それは、カボシ肉腫、神経芽細胞腫および Letterer-Siwe 病（組織球増殖症 X）、ならびに乳房の癌腫および婦人における絨毛腫において活性である。

【0237】

アルケラン、L-フェニルアラニンマスタード、フェニルアラニンマスタード、L-PAM または L-サルコリシンとしても知られているメルファランは窒素マスタードのフェニルアラニン誘導体である。 10

メルファランは、選択的ヒト新形成病に対して活性な二官能性アルキル化剤である。メルファランは、ある種の動物腫瘍に対して活性が低く、染色体に対する効果を生じるのに必要な用量は L-異性体で必要なものよりも大きい、メドファランとしても知られている D-異性体の活性な L-異性体である。

メドファランは経口投与に適した形態で入手でき、多発性骨髄腫を治療するのに用いられてきた。

入手できる証拠は、多発性骨髄腫を持つ患者のほぼ 1/3 乃至 1/2 が薬物の経口投与に対して好都合な応答を示すことを示唆する。 20

メドファランは、上皮卵巢癌腫の治療で用いられてきた。

【0238】

シクロホスファミドは胃腸間で安定であり、よく許容されており、経口および非経口経路によって効果的であり、局所的な小胞形成、壊死、静脈炎または苦痛でさえ引き起こさない。

クロラムブシルは、選択されたヒト新形成病に対して活性であることが判明している窒素マスタードタイプの二官能性アルキル化剤である。

クロラムブシルは、慢性リンパ系（リンパ球）白血病、リンパ肉腫を含めた悪性リンパ腫、巨大濾胞性リンパ腫および保持菌病の治療において示されている。

それは、これらの障害のいずれにおいても治療できではないが、臨床的に有用な緩和を生じ得る。 30

【0239】

DNA 損傷を引き起こし、広く用いられてきた他の因子は、ガンマ線、X 線および/または腫瘍細胞に対する放射性同位体の指向された送達として通常知られているものを含む。

マイクロ波および UV 照射のごとき、DNA 損傷因子の他の形態も考えられる。

これらの因子の全ては、DNA の前駆体、DNA の複製および修復および染色体の組み立ておよび維持に対して広い範囲の損傷 DNA を行うようである。

X-線についての用量範囲は、延長された期間（3 乃至 4 週間）についての 50 乃至 200 レントゲンの日用量乃至 2000 乃至 6000 レントゲンの単一用量の範囲である。

放射性同位体についての用量範囲は広く変化し、同位体の半減期、照射された放射線の強度およびタイプ、新形成細胞による摂取に依存する（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第 15 版、第 33 章、特に 624 ~ 652 頁参照）。 40

用量におけるいくつかの変形は、治療すべき対象の状態に依存して必然的に起こるであろう。

投与を担うヒトは、いずれにせよ、ここの対象についての適切な用量を決定するであろう。

さらに、人投与では、製剤は、FDA の Official of Biologics 標準によって要求される滅菌性、発熱原性、一般的安全性および純度の標準に適合すべきである。

【0240】

キメラペプチドベースの療法と化学ーおよび放射線療法との組合せに加えて、遺伝子治療との組み合わせが有利であることも考えられる。

例えば、キメラペプチドベースの療法および p 5 3 または p 1 6 突然変異の同時の標的化は改良された抗癌治療を生じるであろう。

p 2 1、Rb、APC、DCC、NF-1、NF-2、BCRA2、p 1 6、FHIT、WT-1、MEN-1、MEN-11、BRCA1、VHL、FCC、MCC、ras、mic、neu、raf、erb、src、fins、jun、trk、ret、gsp、hst、bcl および abl のとき、いずれの他の腫瘍ー関連遺伝子も、概念的には、このように標的化できる。

10

【0241】

前記した抗癌治療剤に加えて、本発明のペプチドは他の欠陥形成疎外剤と組み合わせることができると考えられる。

本発明のペプチドは、抗ーリンパ管形成および抗ー血管形成特性を共に有すると予測される。

多くの抗ー血管形成薬物は抗ーリンパ管形成特性も有するであろう。

http://cancertrials.nci.nih.gov/news/angi_o は、抗ー血管形成剤で現在行われている試験についての現在の情報を提供する National Institutes of Health によって維持されているウェブサイトである。

20

これらの剤は、例えば、マリマスタット (British Biotech, Annapolis MD; 非ー小細胞肺、小細胞肺および乳癌で示されている); AG3340 (Agouron, La Jolla, CA; 神経膠芽細胞腫多形について); COL-3 (Collagenix, Newtown PA; 脳腫瘍について)、ネオバスタット (Neovastat) (Aetema, Quebec, Canada; 腎臓および非ー小細胞肺癌); BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb, Wallingford CT; 転移性非ー小細胞肺癌); タリドマイド (Thalidomide) (Celgen; メラノーマ、頭部および首癌、卵巣、転移性前立腺、およびカポシ肉腫; 再発性または転移性結直腸癌 (アジュバントと共に); 婦人科学肉腫、肝臓癌、多発性骨髄腫; CLL、再発性または進行性脳癌、多発性骨髄腫、非ー小細胞肺、非転移性前立腺、難治性多発性骨髄腫、および腎臓癌について); スクアラミン (Squalamine) (Magaimin Pharmaceuticals Plymouth Meeting, PA; 非ー小細胞癌および卵巣癌について); エンドスタチン (Endostatin) (EnterMed, Rockville, MD; 固体腫瘍について); SU5416 (Sugen, San Francisco, CA; 再発性頭部および首、進行した固体腫瘍、IIIb または IV 期の乳癌; 再発性または進行性脳 (小児科); 卵巣、AML; 神経膠腫、進行した悪性腫瘍、進行した結直腸、von-Hippel Lindau 病、進行した軟組織; 前立腺癌、結直腸癌、転移性メラノーマ、多発性骨髄腫、悪性中皮腫; 転移性腎臓、進行したまたは再発性頭部および首、転移性結直腸癌について); SU6668 (Sugen San Francisco, CA; 進行した腫瘍について); インターフェロン-α; 抗-VEGF 抗体 (National Cancer Institute, Bethesda MD; Genentech San Francisco, CA; 難治性個体腫瘍; 転移性腎臓細胞癌、未処理の進行した結直腸について) (EMD121974 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; HIV 関連カポシ肉腫、進行性または再発性退生神経膠腫について); インターロイキン12 (Genetics Institute, Cambridge, MA; カポシ肉腫について) および IM862 (Gytran, Kirkland, WA; 卵巣癌、結腸および直腸起源の未処理転移性癌およびカポシ肉腫について) を含む。

30

40

該剤の後のかっこにいたれた情報は、該剤がこれらの試験で持ちいられつつある癌を示す。

50

これらの障害のいずれも本発明のペプチド単独で、またはリストした剤と組み合わせて治療することができると考えられる。

【0242】

【実施例】

本発明のさらなる特徴は以下の実施例から明らかであろう。

【0243】

実施例 1

VEGF-A / VEGF-C ハイブリッド分子の構築

VEGFファミリーメンバーの受容体結合ドメインのアミノ酸残基は共有された保存モチーフであるが、これらのタンパク質は異なる受容体特異性を呈する。

10

以下の実験では、VEGF-AまたはVEGF-Cいずれかの受容体結合ドメインの異なる部分を含有するポリペプチドをコードするDNA分子を、ユニークな構造および機能的特徴を持つ新規なハイブリッド分子を創製するためのコンビナトリアルアプローチを用いて構築した。

【0244】

新規な分子を創製するために、VEGF-Aおよび成熟VEGF-Cのヌクレオチド配列を分析して、合成でき、容易に組換えることができる短いDNA断片を設計するのに適するであろうヌクレオチド同一性の局所化領域を決定した。

同一性の8つの対応する領域を、(9つの断片への)断片化およびキメラ(ハイブリッド)分子への組換えのための部位として各々の分子において選択した。

20

これらの断片化部位はヌクレオチド配列に基づいて選択し、これは、得られた断片はVEGF-Aの結晶構造に基づく構造エレメント(例えば、アルファラセン、ループ等)に対応するからである(図1参照)。

【0245】

VEGF-Aの断片化

(配列番号: 1のヌクレオチド156乃至461に対応し、配列番号: 2のアミノ酸残基34乃至135をコードする)VEGF-Aの受容体結合ドメインコーディング領域を含む9つのDNA断片を形成する目的で、VEGF₁₂₁についてのコーディング配列に基づき、合成ヌクレオチドの9つの対を設計した。

各オリゴヌクレオチド対は、コーディング配列を含む順方向プライマーおよび該順方向プライマーの1部に相補的なヌクレオチド配列を持つ逆方向プライマーよりなって、プライマーを相互に対してアニーリングして二本鎖DNA断片とするのを可能とする。

30

各対の順方向または逆方向プライマーのいずれも、その対となったプライマーのいずれかの配列に相補的でない短い5'および3'ヌクレオチド配列も含む。

これらの短いさらなる配列は、前記したヌクレオチド同一性の局所化領域に対応する。

プライマー対のアニーリングに続き、このさらなる配列は、後記にて非常に詳細に記載するごとく、他の二本鎖のアニールしたプライマー対とのアニーリングと適合する一本鎖突出を形成した。

VEGF-A順方向および逆方向プライマーからのヌクレオチド配列は、各々、表1Aおよび1Bに記載されている。

40

【0246】

【表4A】

表1 A-VEGF-Aについての順方向(コーディング)プライマー

A1-F	gat cct GGG CAG AAT CAT CAC GAA GTG Gtg aaa t D P G Q N H H E V V K
A2-F	TC ATG GAT GTC TAT CAG CGC AGC TAC TGC CAT F M D V Y Q R S Y C H
A3-F	cCG aTC GAG ACA CTG GTG GAC ATC TTC CAG <u>GAATAGAAGAGC</u> P I E T L V D I F Q
A4-F	<u>CGCTCTTCGAA</u> TAC CCT GAT GAG ATC GAG TAC A E Y P D E I E Y
A5-F	tc ttc aag cca TCC TGC GTG CCC CTG ATG AGA TGT GGC I F K P S C V P L M R C G
A6-F	<u>CCG</u> GGT TGC TGC AAT GAC GAA GGG CTC G G C C N D E G L
A7-F	ag tgc GTT CCC ACC GAG GAG TCC AAC ATC ACC ATG CAG ATT ATG AG E C V P T E E S N I T M Q I M R
A8-F	a att AAA CCT CAC CAA GGG CAG CAC ATC GGA GAG ATG agc ttt I K P H Q G Q H I G E M S F
A9-F	CTC CAG CAT AAC AAA TGT GAA TGT AGA CCA AAG AAA <u>GATTGAGTCTTCGC</u> L Q H N K C E C R P K K D

10

【0247】

20

順方向プライマーA1-D乃至A9-Fのヌクレオチド配列は、各々、配列番号：3～11に記載されている。

リストしたプライマーの各々について、頂部ストランドは、DNA配列を示し、底部ストランドは特定のプライマーによってコードされたアミノ酸を示す。

いくつかの例において、与えられたコドンの2つのヌクレオチドのみが1つのプライマーに含まれ、コドンの残りのヌクレオチドは先行または後行プライマーに含まれる。

これらの例において、アミノ酸は、その特定のコドンの3つのうち2つを含むプライマー下にリストされる。

太文字部分は、タンパク質リンカー領域を構成し、親VEGF-AまたはVEGF-C分子の1部ではないアミノ酸をコードするヌクレオチドを示し；下線を施したヌクレオチドは、断片のハイブリッド構築体への組み立ての間に除去されるものであり；ローケースの文字は、オリゴヌクレオチド対が相互にアニールされて9つの断片を生じる場合に突出を生じるヌクレオチドである。

【0248】

【表4B】

表1 B-VEGF-Aについての逆方向(非コーディング)プライマー

A1-R	CCACTTCGTGATGATTCTGCCAG
A2-R	tcggATGGCAGTAGCTGCGCTGATAGACATCCATGAatttca
A3-R	<u>tcgaGCTCTTCTATTCCTGGAAGATCTCCACCACTGTCTCGA</u>
A4-R	tggcttgaagatGTACTCGATCTCATCAGGGTATT <u>CGAAGAGCG</u> gtac
A5-R	<u>catgGCCACATCTCATCAGGGGCACGCAGGA</u>
A6-R	gcactCCAGCCCTTCGTCAATGCAACCC <u>GGGTAC</u>
A7-R	aatttCTCATAATCTGCATGGTGATGTTGGACTCCTCGGTGGGAAC
A8-R	CATCTCTCCGATGTGCTGCCCTTGGTGAGGTTT
A9-R	<u>GGCCGCGAAGACTCAATCTTCTTTTGGTCTACATTACATTTGTTATGCTGGAGaaagct</u>

40

【0249】

逆方向プライマーA1-R乃至A9-Rのヌクレオチド配列は、各々、配列番号：12～20に記載される。

太文字、下線を施した小文字は表1Aに記載されたごとく用いる。

50

【0250】

9つのVEGF-Aポリヌクレオチド断片は、合成オリゴヌクレオチドプライマーのマッチした対をアニールすることによって組み立てた。

例えば、断片A1は、プライマーA1-FをプライマーA1-Rとアニールすることによって創製し、断片A2は、A2-FとA2-Rとをアニールすることによって創製し、等等。

【0251】

アニーリングは、2ピコモル/μlの各適当なプライマー、20mM トリス-HCl、2mM MgCl₂ および50mM NaCl、pH 7.4を95℃にて5分間インキュベートし、続いて溶液を1℃/分の速度で37℃まで冷却することによって達成した。

表1Aに示すごとく、断片A1は配列番号：2のアミノ酸残基34乃至42、およびアミノ酸43の部分をコードし；断片A2は配列番号：2のアミノ酸43の部分、およびアミノ酸44～53をコードし；断片A3は配列番号：2のアミノ酸54乃至63、およびアミノ酸64をコードし；断片A4は配列番号：2のアミノ酸64の部分、アミノ酸65乃至71、およびアミノ酸72の部分をコードし；断片A5は配列番号：2のアミノ酸72の部分、アミノ酸73乃至83、および84の部分をコードし；断片A6は配列番号：2のアミノ酸84の部分、アミノ酸85乃至92、およびアミノ酸93の部分をコードし；断片A7は配列番号：2のアミノ酸93の部分、アミノ酸94乃至107、およびアミノ酸108の部分をコードし；断片A8は配列番号：2のアミノ酸108、およびアミノ酸109乃至122をコードし；および断片A9は配列番号：2のアミノ酸123乃至135をコードする。

【0252】

VEGF-Cの断片化

同様にして、（配列番号：22のアミノ酸残基112乃至216をコードする配列番号：21のヌクレオチド658乃至999に対応する）VEGF-Cの受容体結合ドメインのアミノ酸配列の基づき、オリゴヌクレオチドの9つの対を設計し、合成した。

9つの順方向プライマーおよび9つの逆方向プライマーのヌクレオチド配列を、各々、表2A（配列番号：23～31）および表2B（配列番号：32～40）に記載される。

【0253】

【表5A】

表2A-VEGF-Cについての順方向（コーディング）プライマー

C1-F	gat cct GCA CAT TAT AAT ACC GAG ATC Ctg aaa t
	D P A H Y N T E I L K
C2-F	CT ATT GAT AAT GAG TGG AGA AAG ACT CAG TGC ATG
	S I D N E W R K T Q C M
C3-F	cag aGA GAG GTG TGT ATC GAC GTG GGG AAG GAATACAAGACC
	P R E V C I D V G K
C4-F	CGCTCTTCGAA TTT GGA GTC GCG ACA AAC ACC T
	E F G V A T N T
C5-F	tc ttc aag cca CCA TGT GTG TCC GTG TAC AGA TGT GGC
	F F K P P C V S V Y R C G
C6-F	CCG GGT TGC TGC AAT AGT GAG GGG CTG C
	G C C N S E G L
C7-F	ag tgc ATG AAC ACG TCC ACG AGC TAC CTC AGC AAG ACG CTG TTT GA
	Q C M N T S T S Y L S K T L F E
C8-F	a att ACA GTG CCT CTC TCT CAA GGG CCC AAA CCA GTG ACA ATC agcttt
	I T V P L S Q G P K P V T I S F
C9-F	GCC AAT CAC ACT TCC TGC CGA TGC ATG TCT AAG CTG GATTCAGTCTTCGC
	A N H T S C R C M S K L D

【0254】

【表5B】

10

20

30

40

50

表 2 B-VEGF-C についての順方向 (コーディング) プライマー

C1-R GGATCTCGGTATTATAATGTGCAG
 C2-R tgggCATGCACTGAGTCTTTCTCCACTCATTATCAATAGatttga
 C3-R tgggGCTCTTCTATTTCCTTCCCCAGGTCGATACACACCTCTC
 C4-R tggcttgaagaAGGTGTTTGTGCGGACTCCAAATTGGAAGAGCGgtac
 C5-R gatggCCACATCTGTACACGGACACACATGG
 C6-R gcactGCAGCCCCCTCACTATTGCAGCAACCCGGgtac
 C7-R aatttCAAACAGCGTCTTGCTGAGGTAGCTCGTGGACGTGTTTCAT
 C8-R GATTGTCACTGGTTTGGCCCCCTTCAGAGAGAGGCACCTGT
 C9-R gggccGCGAAGACTCAATCCAGCTTAGACATGCATCGGCAGGAAGTGTGATTGGCaagct

10

【0255】

太文字、下線を施したおよび小文字は表 1 A に記載したごとく表 2 A および 2 B で用いる。

【0256】

VEGF-A について前記したごとく、プライマー対をアニールして、一緒に VEGF-C の受容体結合ドメインをコードし、かつ他の断片へのアニーリングのための適当な一本鎖突出を保有する 9 つの二本鎖 DNA 断片を形成した。

【0257】

断片 C 1 は配列番号：22 のアミノ酸残基 112 乃至 120、およびアミノ酸 121 の部分をコードし；断片 C 2 は配列番号：22 のアミノ酸 121 の部分およびアミノ酸 122 乃至 132 をコードし；断片 C 3 は配列番号：22 のアミノ酸 133 乃至 142、およびアミノ酸 143 の部分をコードし；断片 C 4 は配列番号：22 のアミノ酸 143 の部分、アミノ酸 144 乃至 150、およびアミノ酸 151 の部分をコードし；断片 C 5 は配列番号：22 のアミノ酸 151 の部分、アミノ酸 152 乃至 162、およびアミノ酸 163 の部分をコードし；断片 C 6 は配列番号：22 のアミノ酸 163 の部分、アミノ酸 164 乃至 171、およびアミノ酸 172 の部分をコードし；断片 C 7 は配列番号：22 のアミノ酸 172 の部分、アミノ酸 173 乃至 186、およびアミノ酸 187 の部分をコードし；断片 C 8 は配列番号：22 のアミノ酸 187 の部分、アミノ酸 188 乃至 203 をコードし；および断片 C 9 は配列番号：22 のアミノ酸 204 乃至 216 をコードする。

20

30

【0258】

VEGF-A および VEGF-C の断片の合成に対する考察

かくして、VEGF-A のアミノ酸配列から設計したプライマーの 9 つの対および VEGF-C のアミノ酸配列から設計したプライマーの 9 つの対を合成し、それをアニールすることによって、18 の DNA 断片を創製した。

図 2 は、9 つの VEGF-A および 9 つの VEGF-C の DNA 断片の構築を示す模式的ダイアグラムである。

オリゴヌクレオチドを設計して、アニーリングに際してユニークな粘着末端を含む二本鎖 DNA 断片を生じさせた。

40

9 つの VEGF-A の DNA 断片を連結すると、VEGF-A のアミノ酸 34-135 をコードする単一の線状二本鎖 DNA を生じ (配列番号：2)、および 9 つの VEGF-C の DNA 断片を連結する結果、VEGF-C のアミノ酸 112-216 をコードする単一の DNA が得られる (配列番号：22)。

【0259】

粘着末端の挿入は、所望の順序および向きでの断片の連結を大いに促進したが、断片の連結は粘着末端なしでも達成できることが認識されよう。

平滑末端断片を合成し、それをアニールして、前記した方法を用いてハイブリッドタンパク質を創製することもできる。

平滑末端戦略では、親分子のヌクレオチド配列は、粘着末端の創製を可能とするヌクレオ

50

チド同一性の存在につき調べる必要はない。

しかしながら、さらなる連結後スクリーニングが、所望の順序および向きで断片を含むハイブリッドを同定するのに必要であろう。

【0260】

合成プライマーおよび二本鎖DNA断片についてのいくつかのさらなる詳細は強調するのに値する。

まず、VEGF-A断片A-1およびVEGF-C断片C1では、最初の2つのコードされたアミノ酸AspおよびProは（作成されたBamHI認識部位によってコードされた）タンパク質リンカーを構成し、VEGF-AまたはVEGF-C配列いずれかに応答しないことは言及に値する。

10

【0261】

第2に、図1および2を参照し、VEGFファミリータンパク質の受容体結合ドメイン内の区別される構造エレメントに対応するように断片の多くを設計したことは言及するの値する。

断片2はN-末端ラセンに対応し；断片4はβ2に対応し；断片6はβ3-β4ループに対応し、断片7はβ5に対応し；断片8はβ5-β6ループに対応し；および断片9はβ7に対応する。

【0262】

第3に、オリゴヌクレオチドはヒトVEGF-AおよびVEGF-Cポリペプチドのコードされたアミノ酸配列を保持するように設計されたという事実にとらわれず、設計された36のオリゴヌクレオチドは、天然ヒトVEGF-AまたはVEGF-C cDNA配列（すなわち、天然に生じるヒトmRNA配列のDNAカウンターパート）に正確には対応しない。

20

例えば、オリゴヌクレオチドは、VEGF-AおよびVEGF-C双方についての受容体結合ドメインをコードする天然（内因性）ヒトヌクレオチド配列が新しい制限部位を生じるように、重複が「A」および「C」断片の間で望まれる場合にヌクレオチド同一性のより長いストレッチを供するように、またはヒト細胞培養における発現用のコドン用法を改良するように修飾される用に設計された。

（天然配列に重要な）全てのヌクレオチド突然変異はサイレントであった。

かくして、（アニーリング断片A1-A9に由来する）VEGF-Aおよび（アニーリング断片C1-C9からの）VEGF-Cの受容体結合ドメインのアミノ酸配列は、各親分子のそれと同一である。

30

【0263】

第4に、図2を参照し、9つのVEGF-A断片の各々は対応するVEGF-C断片と整理し、かつ他の分子からの隣接断片にアニールする適合粘着末端を有することは言及に値する。

例えば、断片A1およびC1は、各々、VEGF-AおよびVEGF-Cの同一相対的部分に対応し、同一の頂部ストランド粘着末端を有する。

これらの粘着末端は、A1がA2またはC2いずれかにアニールでき、C1がやはりA2またはC2にアニールできるように、双方の断片A2およびC2の底部ストランド粘着末端に正確に相補的である。

40

断片A2およびC2はVEGF-AおよびVEGF-Cの同一の相対的部分に対応し、各々は、断片A3およびC3の頂部ストランド粘着末端に正確に相補的であるもう1つの底部ストランド粘着末端を保有する、等等。

かくして、9つの断片の各組は、その親VEGF-A/VEGF-C分子の隣接末端にアニールするのみならず、他の分子の隣接断片にアニールするように設計された。

【0264】

キメラ（ハイブリッド）VEGF分子の組み立て

9つのVEGF-Aおよび9つのVEGF-CのDNA断片の、VEGF-AおよびVEGF-C双方からの領域を含むハイブリッドDNAへの組み立ては、VEGF-Aおよび

50

VEGF-CのDNA断片の異なる組合せを連結することによって達成された。

全てのDNA断片は、適当な制限酵素での消化およびQiaex IIビーズ (Qia gen) を用いるゲル電気泳動の後に単離した。

もし断片の適当な順序 (1-2-3-4-5-6-7-8-9) が保存されていれば、9つのVEGF-A断片および9つのVEGF-C断片は組み替えることができ、520の区別されるハイブリッドにアニールにすることができ、その2つは天然に生じる配列 (A1-A2-A3-A4-A5-A6-A7-A8-A9およびC1-C2-C3-C4-C5-C6-C7-C8-C9) を表し、その51は新規なハイブリッドを表すことは明らかであろう。

すべての512の配列は、以下の3工程プロセスを用いて再構築した。

10

【0265】

まず、図2に示すごとく、VEGF-AおよびVEGF-Cの受容体結合ドメインを、N123、N45、C67およびC89と命名された4つのサブドメインに分割した。

N123はVEGF-AおよびVEGF-C双方の受容体結合ドメインをコードする最初の3つのDNA断片よりなる。

N45、C67およびC89は、各々、2つのDNA断片よりなり、ここに、N45は断片4および5を含み、C67は断片6および7よりなり、およびC89は断片8および9を含む。

【0266】

N123領域に対応する連続DNAは、VEGF-AまたはVEGF-Cいずれかからの断片1、2および3を連結し、かくして、図3に模式的に示された8つの可能な異なるN123のDNAセグメントの全てを生じさせることによって構築した。

20

同様に、N45、C67およびC89領域に対応する連続DNAは、VEGF-AまたはVEGF-Cからの2つの適当なDNA断片を連結することによって構築された。

これらの場合において、全ての4つの可能な異なる分子が領域の各々について生じた。

【0267】

図4は全ての4つな可能なN45のDNAセグメントを示す模式的ダイアグラムであり、図5は全ての4つの可能なC67のDNAセグメントを示し、および図6は全ての4つの可能なC89のDNAセグメントを示す。

これらの分子の全てを、連結反応の1部としてpKO-Scrambler-V912-BXベクター (Lexicon Genetics Inc.) の多重クローニング部位にクローン化した。

30

全ての連結は、インサートのベクターへのクローニングを可能とする適当な制限酵素で切断され、かつ脱リン酸化された8ナノモル/ μ lのベクター；ベクターに挿入されるべき各々80ナノモル/ μ lのDNA断片；および50mMトリス/HCl、10mM MgCl₂、10mM DTT、1mM ATP、25 μ g/ml BSA、および5%PEG-4000、pH 7.5中の5 Weiss単位のT4 DNAリガーゼを合わせ、続いて16℃にて12時間インキュベートすることによって行った。

図7A-7Dは、断片A1-A9の各々によってコードされたアミノ酸配列を示し；および8つのN123構築体 (図7A)、4つのN45構築体 (図7B)、4つのC67構築体 (図7C)、および4つのC89構築体 (図7D) を形成する組換えに由来するコードされたペプチドの全ての順列を模式的に示す。

40

【0268】

第2の工程において、N123断片をN45断片と連結し、およびC67断片をC89断片と連結した。

N123乃至N45の連結を可能とし、かつ断片3および4の非タンパク質コーディング領域の除去も達成した制限酵素の消化によって、N123およびN45断片をそれらのpKO-Scrambler-V912宿主ベクターから除去した (表1A、1B、2Aおよび2B)。

8つの異なるN123領域の各々を全ての4つの可能なN45領域に連結することによ

50

て、受容体結合ドメインの32の区別されるN-末端部分を得た。

これらのクローンをさらにpSecTagIベクターに挿入した（配列番号：41）。

pSecTagIベクターは、pSecTagAベクター（Invitrogen）を修飾することによって構築された組合せE. coli／哺乳動物発現ベクターである。

pSecTagAを修飾して、部位特異的突然変異誘発および合成リンカーを用いて特異的制限部位を排除し、pICZα-A（Invitrogen）およびpTRACER-CMVからのEM7プロモーターを、pSecTagAのCMVプロモーターの下流に付加した。

pSecTagIおよびその親ベクターpSecTagAは共に、適当な細胞系、例えば293T細胞を用いる哺乳動物細胞培養における高レベルの発現、安定にトランスフェクトされた哺乳動物細胞のゼオシン（zeocin）選択を可能とし、発現されたタンパク質の分泌用の哺乳動物シグナルペプチドを含み、かつ発現されたタンパク質の検出、定量および精製のためのC-末端mycエピトープおよびポリヒスチジンタグを含む。

pSecTagIベクターは、E. coliにおける発現が構成的であり、制限部位の修飾がハイブリッド構築体のクローニングを促進した点でpSecTagAベクターとは異なる。

10

【0269】

V67およびC89断片は、やはり断片6および9の非-タンパク質コーディング領域の除去を達成した、適当は制限酵素での消化によってそれらのpKO-Scrambler-V912宿主ベクターから除去した（表1A、1B、2Aおよび2B参照）。

20

4つの異なるC67分子の4つの異なるC89分子への連結により、受容体結合ドメインの16の区別されるC-末端半体を生じた。

これらの連結の間にC67-C89断片はpKO-Scramblerベクターにクローン化された。

最後に、32の異なるN-末端部分および16の区別されるC-末端領域を合わせる512最終連結の結果、その510がVEGF-AおよびVEGF-C双方のアミノ酸残基よりなるハイブリッドである合計512の区別される分子が得られた。

この工程の間に、32の異なるN-末端部分を含むpSecTagIベクターに512の構築体がクローン化された。

残りの2つの分子は、受容体結合ドメインをコードする元々のVEGF-AおよびVEGF-C配列に対応する。

30

【0270】

また、ハイブリッド分子の組み立ては、前記で概説したものよりも少ない連結工程にて達成することもできる。

例えば、N123、N45、C67およびC89の連結は単一の連結反応で完了することができる。

隣接断片の粘着末端のみを持つ完全な相補体である粘着末端を持つ断片を設計することによって、単一連結反応にて正しい順番で複数断片を連結することが可能である。

【0271】

実施例2

40

ハイブリッド分子の発現

512の構築体の各々を293T細胞に別々に一過的にトランスフェクトして、異なるハイブリッド構築体を発現させた。

ダルベッコの修飾イーグル培地（DMEM）および10%胎児ウシ血清（FBS）よりなる培地中での標準的なプロトコルに従い、293T細胞を増殖させた。

トランスフェクションに24時間先立ち、密集皿を新鮮な培地で6つのウェルに1：10に希釈した。

トランスフェクションに4時間先立ち、培地を交換した。

各構築体につき、リン酸カルシウム-媒介トランスフェクションについての標準的なプロトコルを用い、3μgのDNAをトランスフェクトした「Sambrook et al.

50

, Molecular Cloning. A Laboratory Manual pp. 16.33-16.36 (1989)」。

トランスフェクションの24時間後に、細胞を暖かいTBSで2回洗浄し、2mlの培地を各ウェルに添加した。

【0272】

最初の実験を行って、トランスフェクトされた細胞が、ハイブリッドDNA分子によってコードされたハイブリッドVEGFポリペプチドを発現しているかを判断した。

かくして、トランスフェクションから48時間後に、システインおよびメチオニンを欠くMEM、0.1%bsa、24μCi³⁵S-メチオニン-システイン/ml (Redivue PRO-MIX, Amersham) よりなる1.3ml/ウェルの標識培地を用い、³⁵S-メチオニンおよび³⁵S-システインでの代謝標識を開始した。 10

細胞上清をトランスフェクションから72~78時間後に収穫し、遠心によって透明化し、4℃で保存した。

【0273】

攪拌しつつ、175μlの試料上清を100μl IPミックス (1.5%BSA、0.05%Tween20および12μl/ml抗-ペンタヒスチジン抗体を含むPBS) と4℃にて一晩混合することによって、上清を抗-ペンタヒスチジン抗体 (Qiagen) で免疫沈殿させた (pSecTagI発現ベクターを作成して、ポリヒスチジンタグを持つハイブリッドVEGFタンパク質の各々を発現させた)。

免疫沈殿したタンパク質を収集するために、PBS中の50μlの30%プロテインAセファロース (PAS, Pharmacia) スラリーを添加し、少なくとも1.5時間4℃にて攪拌下でインキュベートした。 20

標準緩衝液免疫沈殿試料に添加し、95℃にて5分間沸騰させ、その間に免疫沈殿したタンパク質はプロテインAセファロースから解離する。

遠心後、10μlの各試料を、還元条件下で15%SDS-PAGEで分析した。

ゲルを乾燥し、ホスホルイメージャープレート上で12時間、またはX線フィルム上で4週間露出した。

これらの実験の結果を、発現につき「EXP」の印をつけた欄にて、以下の表3に示す。

「Yes」を伴う表に示すごとく、ハイブリッド構築体のほとんど大部分を発現させようとする最初の試みは成功した。 30

弱い発現 (「weak」) および発現なし (「none」) が予備実験で観察された構築体を示す。

最初の実験において発現を達成できないのは完全性のために報告し、非一生存率または他の確認された問題の結論を反映する意図のものではない。

しかしながら、非一発現構築体の内、ほとんど全てが、断片-3がVEGF-Aに由来し、断片7がVEGF-Cに由来するキメラ分子であったことは注目に値する。

これらの2つの断片の間の物理的関係の分析は、これらの2つの断片からの残基が、VEGF-A結晶構造から判断して原子レベルで相互にまれにしか接触しないことを示す。

VEGF-Aからの断片-3およびVEGF-Cからの断片7の不適合性は分子の正しくない折り畳みから起こり、おそらくは、分子が小胞体に出現する場合にVEGF-C由来断片7の迅速なグリコシル化によって部分的には引き起こされた。 40

VEGF-A内のグリコシル化部位は受容体結合ドメインから一定の距離のところに位置し、他方、VEGF-C内のグリコシル化部位は、受容体の第3のドメインと接触を形成することが予測される断片3によって形成された分子の領域により近く位置する。

また、炭水化物残基はリガンドおよび受容体の間の相互作用に関与するであろう。

【0274】

実施例3

可溶性VEGF受容体-Fc融合タンパク質に関するハイブリッド分子の結合アッセイ

293T細胞で発現されたハイブリッドタンパク質 (実施例2および表1参照) を、可溶性VEGF受容体-Fc融合タンパク質に結合する能力につきテストした。 50

全ての3つのVEGF受容体、VEGFR-1、VEGFR-2およびVEGFR-3に対するハイブリッドタンパク質の結合を同様に分析した。

例示的な結合アッセイは、引用によりその全体を一体化させるArchene et al., Proc Natl Acad Sci USA 95:548-33 (1998)に記載されている。

【0275】

結合アッセイは、限定されるものではないが、天然で受容体を発現する、または受容体を発現するように組換え修飾されている全細胞；受容体の切形された可溶化細胞外リガンド結合ドメイン；アルカリ性ホスファターゼ（例えば、Cao et al., J. Biol. Chem. 271:3154-62 (1996)に記載されたVEGFR-2-AP）または免疫グロブリン配列のごとき他のタンパク質に融合した受容体細胞外ドメインを含む融合；および抗体でまたは個体支持体でタンパク質を捕獲するのに有用なタグ配列（例えば、ポリヒスチジンタグ）に融合した受容体細胞外ドメインを含む融合；およびCNBr-活性化セファロースビーズのごとき固体支持体に化学的に結合した受容体細胞外ドメインを含めた、それらの各リガンドに結合する能力を保持する天然に生じるVEGF受容体のいずれかの形態で行うことができるのは認識されよう。

【0276】

本実験では、受容体結合は、免疫グロブリン定常領域鎖に融合したVEGFR-1、VEGFR-2またはVEGFR-3の細胞外ドメインを含む構築体を用いてアッセイした。

【0277】

VEGFR-1の最初の3つのIgドメインを、シグナル-pIgPlusベクター（Ingenuity/Novagen/R&D Systems）からのFc断片に融合させた。

【0278】

この構築体（VEGFR-1-Fc）はDrosophila Schneider 2 (S2)細胞で安定に発現され、プロテインAセファロースを用いて精製された。

純度はPAGEゲルの銀染色によって分析し、融合タンパク質の機能性は、³⁵S-標識VEGFタンパク質に結合するその能力によってテストした。

VEGFR-2-Fc受容体は、pIgベクター中のFc断片に融合した（Genbank Ac. No. X61656のヌクレオチド64-972によってコードされた）VEGFR-2の最初の3つのIgドメインを含む。

VEGFR-3-Fc受容体は、pIgベクターのFc断片に融合した（Genbank Ac. No. X68203のヌクレオチド20-1005によってコードされた）VEGFR-3の最初の3つのIgドメインより同様になる。

VEGFR-2-FcおよびVEGFR-3-Fcタンパク質を293T細胞で発現させ、VEGFR-1-Fcについて記載したごとく精製した。

【0279】

結合アッセイの手法は、免疫沈殿（IP）ミックスの組成とは別に、実施例2に記載されたペンタヒスチジン抗体を用いる免疫沈殿と同一であった。

受容体結合分析で用いたIPミックスは以下の通りであった：VEGFR-1結合アッセイでは、IPミックスは、1.5% BSA、0.06% Tween 20、3 μg/mlヘパリンおよび400 ng/ml VEGFR-1-Fc融合タンパク質を含有するリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）であり（このIPミックスの100 μlを200 μlの試料上清に添加した）；VEGFR-2結合アッセイでは、IPミックスは、5% BSA、0.2% Tween 20および10 μg/mlヘパリンを含む18% PBS溶液を含む混合物中で、VEGFR-2-Fc融合タンパク質を一過的に発現する293T細胞からの82%条件細胞上清であった（250 μlのIPミックスを200 μlの試料上清に添加した）；およびVEGFR-3結合アッセイでは、IPミックスは、5% BSA、0.2% Tween 20および10 μg/mlヘパリンを含む18% PBS中でVEGFR-3-Fc融合タンパク質を一過的に発現する293T細胞からの82%条件細胞上清であ

った（250 μl の I P ミックスを 200 μl の試料上清に添加した）。

少数の選択した構築体（クローン 12-1、12-5、12-7、12-9、12-11、12-13、12-14、14-9、23-1、32-14、52-15、53-3、82-7、82-9、82-11、82-13、83-15、84-9 および 84-11）を一回を越えて調べた。

【0280】

³⁵S 標識ハイブリッドタンパク質を用いる結合アッセイからの結果を以下の表 3 にまとめる。

検出されたタンパク質の見掛けの分子量は 18 および 27 kD の間であった。

通常、2 つのバンドが異なるバンド強度にて目に見えた。

10

時々、第 2 のバンドのみが長い露出後に検出できた。

2 つのバンドの存在は、調べたハイブリッドタンパク質の断片 7 および 9 の起源と関連する。

断片 7 は、それが VEGF-A または VEGF-C に由来するか否かとは無関係に潜在的な N-グリコシル化部位を含み、他方、断片 9 のみがそれが FGF-C に由来すれば N-グリコシル化部位を含む。

かくして、複数のバンドは、分析すべきハイブリッドタンパク質の異なるグリコシル化によるものらしい。

以下のものはグリコシル化部位の異なる組合せについての予測されるバンドである：

（1） VEGF-A に由来する断片 7 および VEGF-A からの断片 9 は～18 および～22 kD の 2 つのバンドを生じる。

20

【0281】

（2） VEGFR-A に由来する断片 7 および VEGF-C からの断片 9 は～26 kD バンドを生じる（～22 kD の第 2 のバンドは時々失われ、～18 kD の第 3 のごく弱いバンドは時々目に見える）。

【0282】

（3） VEGF-C に由来する断片 7 および VEGF-A からの断片 9 は～22 kD バンドを生じる（～18 kD の第 2 のバンドは時々失われる）。

【0283】

（4） VEGF-C に由来する断片 7 および VEGF-C からの断片 9 は～23 kD の 1 つのバンドを生じる。

30

【0284】

結合アッセイの結果は、もし当方のグリコシル化部位が VEGF-C に由来するならば。異種グリコシル化が観察されるのは少ないことを示す。

VEGF-A からの断片 7 および VEGF-C からの断片 7 双方を含む分子は人工的な高グリコシル化を促進するようである。

断片 7 に含まれた VEGF-A グリコシル化部位もまた不完全なグリコシル化の傾向がある。

【0285】

結合アッセイデータは、ハイブリッド分子のいくつかが新規な結合特性を呈することを示す。

40

分析は定量的ではなかったが、ハイブリッド分子のいくつかは異なる相対的シグナル強度を示す。

例えば、クローン 72-10 は、VEGFR-2 に対するその親和性の保持しつつ、VEGFR-3 に対するその親和性の多くを喪失してしまったように見える。

これらの結果は、親タンパク質（VEGF-A または VEGF-C）いずれかの受容体特異性を保持するハイブリッドタンパク質の中で、いくつかは、対応する受容体に対するこれらの結合親和性の異なる変化を受けることができることを示唆する。

【0286】

以下の表 3 において、欄 1 は調べた構築体をリストする。

50

欄 2 は続いて各構築体の 9 つの断片をリストし、ここに、 $A = VEGF - A$ からの断片、および $C = VEGF - C$ からの断片である。

「EXP」と記した欄 3 は、実施例 2 に記載したごく 293T 細胞において構築体を発現させた実験からの結果をリストする。

この欄において、「none」は、検出可能なタンパク質が発現されなかったことを示し；「weak」は弱い発現が検出可能であることを示し；および「yes」は発現されたタンパク質が容易に検出可能であることを示す。

最後の 3 つの欄は実施例 3 に記載した受容体結合アッセイからの結果をリストし、ここに、 $VEGFR - 1 - Fc$ 、 $VEGFR - 2 - Fc$ および $VEGFR - 3 - Fc$ への結合を調べた。

これらの最後の 3 つの欄では、「あり」は結合を示し、「なし」は受容体への結合はないことを示し、および「0」は、この構築体が 293T 細胞で発現されず、かくして、結合アッセイで使用できなかったことを示す。

【0287】

【表 6A】

表3 ハイブリッド分子発現および受容体結合アッセイの結果

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	
31-1	ACAAAAAAA あり	なし	なし	なし	
31-5	ACAAAACAA なし	0	0	0	
31-13	ACAAACCAA なし	0	0	0	10
31-9	ACAAACAAA あり	なし	なし	なし	
31-2	ACAAAAAAC あり	なし	なし	なし	
31-10	ACAAACAAC あり	なし	なし	なし	
31-6	ACAAAACAC あり	なし	なし	なし	
31-14	ACAAACCCAC なし	0	0	0	
31-12	ACAAACACA あり	なし	なし	なし	
31-11	ACAAACACA あり	なし	なし	なし	20
31-7	ACAAAACCA なし	0	0	0	
31-4	ACAAAAACC あり	なし	なし	なし	
31-8	ACAAAACCC あり	0	0	0	
31-3	ACAAAAACA あり	なし	なし	なし	
31-15	ACAAACCCA なし	0	0	0	
31-16	ACAAACCCC なし	0	0	0	
21-1	CCCAAAAAA あり	なし	なし	なし	30
21-2	CCCAAACAA あり	なし	なし	なし	
21-3	CCCAACAAA あり	なし	なし	なし	
21-4	CCCAACCAA あり	なし	なし	なし	
21-5	CCCAAAAAC あり	なし	なし	なし	
21-6	CCCAAACAC あり	なし	なし	なし	

【0288】

【表6B】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	
21-7	CCCAACAAC あり	なし	なし	なし	
21-8	CCCAACCAC あり	なし	なし	なし	
21-9	CCCAAAACA あり	なし	なし	なし	
21-10	CCCAAACCA あり	なし	なし	なし	
21-11	CCCAACACA あり	なし	なし	なし	10
21-12	CCCAACCCA あり	なし	なし	なし	
21-13	CCCAAAACC あり	なし	なし	なし	
21-14	CCCAAACCC あり	なし	なし	なし	
21-15	CCCAACACC あり	なし	なし	なし	
21-16	CCCAACCCC あり	なし	なし	なし	
22-1	CCCCCAAAA あり	なし	なし	なし	
22-2	CCCCCACAA あり	なし	あり	あり	20
22-3	CCCCC AAA あり	なし	なし	あり	
22-4	CCCCCCCCAA あり	なし	あり	あり	
22-5	CCCCCAAAC あり	なし	なし	なし	
22-6	CCCCCACAC あり	なし	あり	あり	
22-7	CCCCCCAAC あり	なし	なし	なし	
22-8	CCCCCCCAC あり	なし	あり	あり	
22-9	CCCCCAACA あり	なし	なし	なし	30
22-10	CCCCCACCA あり	なし	あり	あり	
22-11	CCCCCCACA あり	なし	なし	なし	
22-12	CCCCCCCCCA あり	なし	あり	あり	
22-13	CCCCCAACC あり	なし	なし	なし	

【0289】

【表6C】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	
22-14	CCCCCACCC あり	なし	あり	あり	
22-15	CCCCCCACC あり	なし	なし	なし	
22-16	CCCCCCCCC あり	なし	あり	あり	
72-1	ACCCCAAAA あり	なし	なし	なし	
72-2	ACCCACAAA あり	なし	あり	あり	10
72-3	ACCCCAAAA あり	なし	なし	なし	
72-4	ACCCCCCAA あり	なし	あり	あり	
72-5	ACCCCAAAC あり	なし	なし	なし	
72-6	ACCCACAC あり	なし	なし	あり	
72-7	ACCCCAAC あり	なし	なし	なし	
72-8	ACCCCCCAC あり	なし	あり	あり	
72-9	ACCCAACA あり	なし	なし	なし	20
72-10	ACCCACCA あり	なし	あり	あり	
72-11	ACCCACACA あり	なし	なし	なし	
72-12	ACCCCCCCA あり	なし	あり	あり	
72-13	ACCCAACC あり	なし	なし	なし	
72-14	ACCCACCC あり	なし	あり	あり	
72-15	ACCCCCACC あり	なし	なし	なし	
72-16	ACCCCCCCC あり	なし	あり	あり	30
11-1	AAAAAAAAA あり	あり	あり	なし	
11-2	AAAAAACAA なし	0	0	0	
11-3	AAAAACAAA あり	あり	あり	なし	
11-4	AAAAACCAA なし	0	0	0	

【0290】

【表6D】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	
11-5	AAAAAAAAAC あり	あり	あり	なし	
11-6	AAAAAACAC なし	0	0	0	
11-7	AAAAACAAC あり	あり	あり	なし	
11-8	AAAAACCAC なし	0	0	0	
11-9	AAAAAAACA あり	あり	なし	なし	
11-10	AAAAAACCA なし	0	0	0	10
11-11	AAAAACACA あり	あり	あり	なし	
11-12	AAAAACCCA なし	0	0	0	
11-13	AAAAAAACC あり	あり	なし	なし	
11-14	AAAAAACCC なし	0	0	0	
11-15	AAAAACACC あり	あり	あり	なし	
11-16	AAAAACCCC なし	0	0	0	
12-1	AAACC AAAA あり	あり	あり	あり	20
12-2	AAACCACAA なし	0	0	0	
12-3	AAACCCAAA あり	あり	あり	なし	
12-4	AAACCCCAA なし	0	0	0	
12-5	AAACC AAAC あり	あり	なし	なし	
12-6	AAACCACAC なし	0	0	0	
12-7	AAACCCAAC あり	あり	あり	あり	
12-8	AAACCCCAC なし	0	0	0	30
12-9	AAACCAACA あり	あり	なし	あり	
12-10	AAACCACCA なし	0	0	0	
12-11	AAACCCACA あり	あり	あり	あり	

【0291】

【表6E】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	
12-12	AAACCCCCA なし	0	0	0	
12-13	AAACCAACC あり	あり	なし	あり	
12-14	AAACCACCC あり	なし	なし	あり	
12-15	AAACCCACC あり	なし	あり	あり	
12-16	AAACCCCCC あり	なし	なし	あり	10
81-1	CAAAAAAAAA あり	あり	あり	なし	
81-2	CAAAAACAA なし	0	0	0	
81-3	CAAAACAAA あり	あり	あり	なし	
81-4	CAAAACCAA なし	0	0	0	
81-5	CAAAAAAAC あり	あり	あり	なし	
81-6	CAAAAACAC なし	0	0	0	
81-7	CAAAACAAC あり	あり	あり	なし	20
81-8	CAAAACCCAC なし	0	0	0	
81-9	CAAAAAACA あり	あり	なし	なし	
81-10	CAAAAACCA なし	0	0	0	
81-11	CAAAACACA あり	あり	あり	なし	
81-12	CAAAACCCA なし	0	0	0	
81-13	CAAAAAACC あり	あり	なし	なし	
81-14	CAAAAACCC なし	0	0	0	30
81-15	CAAAACACC あり	あり	あり	なし	
81-16	CAAAACCCC なし	0	0	0	
13-1	AAAACAAAA あり	あり	あり	なし	
13-2	AAAACACAA なし	0	0	0	

【0292】

【表6F】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3
13-3	AAAACCAA なし	0	0	0
13-4	AAAACCCAA あり	なし	なし	なし
13-5	AAAACAAAC あり	あり	あり	なし
13-6	AAAACACAC あり	なし	なし	なし
13-7	AAAACCAAC あり	あり	あり	なし
13-8	AAAACCCAC あり	なし	なし	なし
13-9	AAAACAACA あり	あり	なし	なし
13-10	AAAACACCA なし	0	0	0
13-11	AAAACCACA あり	あり	なし	なし
13-12	AAAACCCCA なし	0	0	0
13-13	AAAACAACC あり	あり	なし	なし
13-14	AAAACACCC あり	なし	なし	なし
13-15	AAAACCACC あり	あり	なし	なし
13-16	AAAACCCCC なし	0	0	0
14-1	AAACAAAAA あり	あり	なし	なし
14-2	AAACAACAA なし	0	0	0
14-3	AAACACAAA あり	あり	あり	なし
14-4	AAACACCAA なし	0	0	0
14-5	AAACAAAAC あり	あり	なし	なし
14-6	AAACAACAC なし	0	0	0
14-7	AAACACAAC あり	なし	あり	なし
14-8	AAACACCAC なし	0	0	0
14-9	AAACAAACA あり	あり	あり	あり

10

20

30

【0293】

【表6G】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3
14-10	AAACAACCA なし	0	0	0
14-11	AAACACACA なし	0	0	0
14-12	AAACACCCA なし	0	0	0
14-13	AAACAAACC あり	なし	なし	なし
14-14	AAACAACCC なし	0	0	0
14-15	AAACACACC あり	なし	なし	なし
14-16	AAACACCCC なし	0	0	0
23-1	CCCACAAAA あり	なし	なし	なし
23-2	CCCACACAA あり	なし	なし	なし
23-3	CCCACCAAA あり	なし	なし	なし
23-4	CCCACCCAA あり	なし	なし	なし
23-5	CCCACAAAC あり	なし	なし	なし
23-6	CCCACACAC あり	なし	なし	なし
23-7	CCCACCAAC あり	なし	なし	なし
23-8	CCCACCCAC あり	なし	なし	なし
23-9	CCCACAACA あり	なし	なし	なし
23-10	CCCACACCA あり	なし	あり	なし
23-11	CCCACCACA あり	なし	なし	なし
23-12	CCCACCCCA あり	なし	あり	なし
23-13	CCCACAACC あり	なし	なし	なし
23-14	CCCACACCC あり	なし	あり	なし
23-15	CCCACCACC あり	なし	なし	なし

10

20

30

【0294】

【表6H】

		EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3
23-16	CCCACCCCC	あり	なし	なし	なし
33-1	ACAACAAAA	あり	なし	あり	なし
33-2	ACAACACAA	あり	なし	なし	なし
33-3	ACAACCAAA	あり	なし	あり	なし
33-4	ACAACCCAA	あり	なし	なし	なし
33-5	ACAACAAAC	あり	なし	なし	なし
33-6	ACAACACAC	あり	なし	なし	なし
33-7	ACAACCAAC	あり	なし	なし	なし
33-8	ACAACCCAC	あり	なし	なし	なし
33-9	ACAACAACA	あり	なし	あり	なし
33-10	ACAACACCA	なし	0	0	0
33-11	ACAACCACA	あり	なし	なし	なし
33-12	ACAACCCCA	なし	0	0	0
33-13	ACAACAACC	あり	なし	なし	なし
33-14	ACAACACCC	あり	なし	なし	なし
33-15	ACAACCACC	あり	なし	なし	なし
33-16	ACAACCCCC	あり	なし	なし	なし
34-1	ACACAAAAA	あり	なし	なし	なし
34-2	ACACAACAA	なし	0	0	0
34-3	ACACACAAA	あり	なし	なし	なし
34-4	ACACACCAA	なし	0	0	0
34-5	ACACAAAAC	あり	なし	なし	なし
34-6	ACACAACAC	なし	0	0	0

10

20

30

【0295】

【表61】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	
34-7	ACACACAAC あり	なし	なし	なし	
34-8	ACACACCAC なし	0	0	0	
34-9	ACACAAACA あり	なし	なし	なし	
34-10	ACACAACCA なし	0	0	0	
34-11	ACACACACA あり	なし	なし	なし	
34-12	ACACACCCA なし	0	0	0	10
34-13	ACACAAACC あり	なし	なし	なし	
34-14	ACACAACCC あり	なし	なし	なし	
34-15	ACACACACC あり	なし	なし	なし	
34-16	ACACACCCC なし	0	0	0	
41-1	CACAAAAAA あり	あり	なし	なし	
41-2	CACAAACAA なし	0	0	0	
41-3	CACAACAAA あり	なし	なし	なし	20
41-4	CACAACCAA なし	0	0	0	
41-5	CACAAAAAC あり	なし	なし	なし	
41-6	CACAAACAC あり	なし	なし	なし	
41-7	CACAACAAC あり	なし	なし	なし	
41-8	CACAACCAC なし	0	0	0	
41-9	CACAAAACA あり	なし	なし	なし	
41-10	CACAAACCA なし	0	0	0	30
41-11	CACAACACA あり	なし	なし	なし	
41-12	CACAACCCA なし	0	0	0	
41-13	CACAAAACC あり	なし	なし	なし	

【0296】

【表6J】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3
41-14	CACAAACCC あり	なし	なし	なし
41-15	CACAACACC あり	なし	なし	なし
41-16	CACAACCCC あり	なし	なし	なし
42-1	CACCCAAAA あり	なし	なし	なし
42-2	CACCCACAA なし	0	0	0
42-3	CACCCCAAA あり	なし	なし	なし
42-4	CACCCCCAA なし	0	0	0
42-5	CACCCAAAC なし	0	0	0
42-6	CACCCACAC あり	なし	なし	なし
42-7	CACCCCAAC あり	なし	なし	なし
42-8	CACCCCCAC あり	なし	なし	なし
42-9	CACCCAACA あり	なし	なし	なし
42-10	CACCCACCA あり	なし	なし	なし
42-11	CACCCCACA あり	なし	なし	なし
42-12	CACCCCCCA あり	なし	なし	なし
42-13	CACCCAACC あり	なし	なし	なし
42-14	CACCCACCC あり	なし	なし	なし
42-15	CACCCACCC あり	なし	なし	なし
42-16	CACCCCCCC あり	なし	なし	なし
43-1	CACACAAAA あり	あり	なし	なし
43-2	CACACACAA なし	0	0	0
43-3	CACACCAAA あり	なし	なし	なし
43-4	CACACCCAA なし	0	0	0

10

20

30

【0297】

【表6K】

40

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	
43-5	CACACAAAC あり	なし	なし	なし	
43-6	CACACACAC あり	なし	なし	なし	
43-7	CACACCAAC あり	なし	なし	なし	
43-8	CACACCCAC あり	なし	なし	なし	
43-9	CACACAACA あり	なし	なし	なし	
43-10	CACACACCA なし	0	0	0	10
43-11	CACACCACA あり	なし	なし	なし	
43-12	CACACCCCA なし	0	0	0	
43-13	CACACAACC あり	なし	なし	なし	
43-14	CACACACCC あり	なし	なし	なし	
43-15	CACACCACC あり	なし	なし	なし	
43-16	CACACCCCC あり	なし	なし	なし	20
44-1	CACCAAAAA あり	なし	なし	なし	
44-2	CACCAACAA あり	なし	なし	なし	
44-3	CACCACAAA あり	なし	なし	なし	
44-4	CACCACCAA あり	なし	なし	なし	
44-5	CACCAAAAC あり	なし	なし	なし	
44-6	CACCAACAC なし	0	0	0	
44-7	CACCACAAC あり	なし	なし	なし	30
44-8	CACCACCAC あり	なし	なし	なし	
44-9	CACCAAACA あり	なし	なし	なし	
44-10	CACCAACCA あり	なし	なし	なし	
44-11	CACCACACA あり	なし	なし	なし	

【0298】

【表6L】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	
44-12	CACCACCCA あり	なし	なし	なし	
44-13	CACCAAACC あり	なし	なし	なし	
44-14	CACCAACCC あり	なし	なし	なし	
44-15	CACCACACC あり	なし	なし	なし	
44-16	CACCACCCC あり	なし	なし	なし	
54-1	CCACAAAAA あり	なし	なし	なし	10
54-2	CCACAACAA なし	0	0	0	
54-3	CCACACAAA あり	なし	なし	なし	
54-4	CCACACCAA なし	0	0	0	
54-5	CCACAAAAC あり	なし	なし	なし	
54-6	CCACAACAC なし	0	0	0	
54-7	CCACACAAC あり	なし	なし	なし	
54-8	CCACACCAC なし	0	0	0	20
54-9	CCACAAACA あり	なし	なし	なし	
54-10	CCACAACCA あり	なし	なし	なし	
54-11	CCACACACA あり	なし	なし	なし	
54-12	CCACACCCA あり	0	0	0	
54-13	CCACAAACC あり	なし	なし	なし	
54-14	CCACAACCC なし	0	0	0	
54-15	CCACACACC あり	なし	なし	なし	30
54-16	CCACACCCC なし	0	0	0	
64-1	AACCAAAAA あり	なし	なし	なし	
64-2	AACCAACAA あり	なし	なし	なし	

【0299】

【表6M】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3
64-3	AACCACAAA あり	なし	なし	なし
64-4	AACCACCAA あり	なし	なし	なし
64-5	AACCAAAAC あり	なし	なし	なし
64-6	AACCAACAC あり	なし	なし	なし
64-7	AACCACAAC あり	なし	なし	なし
64-8	AACCACCAC あり	なし	なし	なし
64-9	AACCAAACA あり	なし	なし	なし
64-10	AACCAACCA あり	なし	なし	なし
64-11	AACCACACA あり	なし	なし	なし
64-12	AACCACCCA あり	なし	なし	なし
64-13	AACCAAACC あり	なし	なし	なし
64-14	AACCAACCC あり	なし	なし	なし
64-15	AACCACACC あり	なし	なし	なし
64-16	AACCACCCC あり	なし	なし	なし
83-1	CAAACAAAA あり	あり	あり	なし
83-2	CAAACACAA なし	0	0	0
83-3	CAAACCAAA あり	あり	あり	なし
83-4	CAAACCCAA なし	0	0	0
83-5	CAAACAAAC あり	あり	あり	なし
83-6	CAAACACAC あり	なし	なし	なし
83-7	CAAACCAAC あり	あり	あり	なし
83-8	CAAACCCAC なし	0	0	0
83-9	CAAACAACA あり	あり	なし	なし

10

20

30

【0300】

【表6N】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	
83-10	CAAACACCA なし	0	0	0	
83-11	CAAACCACA あり	あり	あり	なし	
83-12	CAAACCCCA なし	0	0	0	
83-13	CAAACAACC あり	あり	なし	なし	
83-14	CAAACACCC なし	0	0	0	
83-15	CAAACCACC あり	あり	あり	なし	10
83-16	CAAACCCCC なし	0	0	0	
24-1	CCCCAAAAA あり	なし	なし	なし	
24-2	CCCCAACAA あり	なし	なし	なし	
24-3	CCCCACAAA あり	なし	なし	なし	
24-4	CCCCACCAA あり	なし	なし	なし	
24-5	CCCCAAAAC あり	なし	なし	なし	
24-6	CCCCAACAC あり	なし	なし	なし	20
24-7	CCCCACAAC あり	なし	なし	なし	
24-8	CCCCACCAC あり	なし	なし	なし	
24-9	CCCCAAACA あり	なし	なし	なし	
24-10	CCCCAACCA あり	なし	なし	なし	
24-11	CCCCACACA あり	なし	なし	なし	
24-12	CCCCACCCA あり	なし	なし	なし	
24-13	CCCCAAACC あり	なし	なし	なし	30
24-14	CCCCAACCC あり	なし	なし	なし	
24-15	CCCCACACC あり	なし	なし	なし	

【0301】

【表60】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3
24-16	CCCCACCCC あり	なし	なし	なし
32-1	ACACCAAAA あり	なし	なし	なし
32-2	ACACCACAA なし	0	0	0
32-3	ACACCCAAA あり	なし	なし	なし
32-4	ACACCCCAA なし	0	0	0
32-5	ACACCAAAC あり	なし	なし	なし
32-6	ACACCACAC あり	なし	なし	なし
32-7	ACACCCAAC あり	なし	なし	なし
32-8	ACACCCCAC あり	なし	なし	なし
32-9	ACACCAACA あり	なし	なし	あり
32-10	ACACCACCA なし	0	0	0
32-11	ACACCCACA あり	なし	なし	あり
32-12	ACACCCCCA なし	0	0	0
32-13	ACACCAACC あり	なし	なし	なし
32-14	ACACCACCC あり	なし	なし	あり
32-15	ACACCCACC あり	なし	なし	あり
32-16	ACACCCCCC あり	なし	なし	あり
51-1	CCAAAAAAA あり	なし	なし	なし
51-2	CCAAAACAA あり	なし	なし	なし
51-3	CCAAACAAA あり	なし	なし	なし
51-4	CCAAACCAA あり	なし	なし	なし
51-5	CCAAAAAAC あり	なし	なし	なし
51-6	CCAAAACAC あり	なし	なし	なし

10

20

30

【0302】

【表6P】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	
51-7	CCAAACAAC あり	なし	なし	なし	
51-8	CCAAACCAC あり	なし	なし	なし	
51-9	CCAAAAACA あり	なし	なし	なし	
51-10	CCAAAACCA なし	0	0	0	
51-11	CCAAACACA あり	なし	なし	なし	10
51-12	CCAAACCCA なし	0	0	0	
51-13	CCAAAAACC あり	なし	なし	なし	
51-14	CCAAAACCC あり	なし	なし	なし	
51-15	CCAAACACC あり	なし	なし	なし	
51-16	CCAAACCCC なし	0	0	0	
52-1	CCACC AAAA あり	なし	なし	なし	
52-2	CCACCACCA なし	0	0	0	20
52-3	CCACCCAAA あり	なし	なし	なし	
52-4	CCACCCCAA なし	0	0	0	
52-5	CCACC AAAC あり	なし	なし	なし	
52-6	CCACCACAC あり	なし	なし	なし	
52-7	CCACCCAAC あり	なし	なし	なし	
52-8	CCACCCAC あり	なし	なし	なし	
52-9	CCACCAACA あり	なし	なし	あり	30
52-10	CCACCACCA なし	0	0	0	
52-11	CCACCCACA あり	なし	なし	あり	
52-12	CCACCCCCA なし	0	0	0	
52-13	CCACCAACC なし	0	0	0	

【0303】

【表6Q】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	
52-14	CCACCACCC あり	なし	なし	あり	
52-15	CCACCCACC あり	なし	なし	あり	
52-16	CCACCCCCC あり	なし	あり	あり	
53-1	CCAACAAAA あり	なし	あり	なし	
53-2	CCAACACAA なし	0	0	0	
53-3	CCAACCAAA あり	あり	あり	あり	10
53-4	CCAACCCAA なし	0	0	0	
53-5	CCAACAAAC あり	なし	なし	なし	
53-6	CCAACACAC あり	なし	なし	なし	
53-7	CCAACCAAC あり	なし	あり	なし	
53-8	CCAACCCAC あり	なし	なし	なし	
53-9	CCAACAACA あり	なし	なし	なし	
53-10	CCAACACCA なし	0	0	0	20
53-11	CCAACCACA あり	なし	なし	なし	
53-12	CCAACCCCA なし	0	0	0	
53-13	CCAACAACC あり	なし	なし	なし	
53-14	CCAACACCC あり	なし	なし	なし	
53-15	CCAACCACC あり	なし	なし	なし	
53-16	CCAACCCCC あり	なし	なし	なし	
61-1	AACAAAAAA あり	あり	なし	なし	30
61-2	AACAAACAA あり	なし	なし	なし	
61-3	AACAACAAA あり	あり	なし	なし	
61-4	AACAACCAA あり	なし	なし	なし	

【0304】

【表6R】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3
61-5	AACAAAAAC あり	なし	なし	なし
61-6	AACAAACAC あり	なし	なし	なし
61-7	AACAACAAC あり	なし	なし	なし
61-8	AACAACCAC あり	なし	なし	なし
61-9	AACAAAACA あり	なし	なし	なし
61-10	AACAAACCA あり	なし	なし	なし
61-11	AACAACACA あり	なし	なし	なし
61-12	AACAACCCA あり	なし	なし	なし
61-13	AACAAAACC あり	なし	なし	なし
61-14	AACAAACCC あり	なし	なし	なし
61-15	AACAACACC あり	なし	なし	なし
61-16	AACAACCCC あり	なし	なし	なし
62-1	AACCCAAAA あり	あり	なし	なし
62-2	AACCCACAA あり	0	0	0
62-3	AACCCCAAA あり	なし	なし	なし
62-4	AACCCCCAA あり	なし	なし	なし
62-5	AACCCAAAC あり	なし	なし	なし
62-6	AACCCACAC あり	なし	なし	なし
62-7	AACCCCAAC あり	なし	なし	なし
62-8	AACCCCCAC あり	なし	あり	なし
62-9	AACCCAACA あり	なし	なし	なし
62-10	AACCCACCA あり	なし	あり	なし
62-11	AACCCCACA あり	なし	あり	あり

10

20

30

【0305】

【表6S】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3
62-12	AACCCCCCA あり	なし	なし	なし
62-13	AACCCAACC あり	なし	あり	なし
62-14	AACCCACCC あり	なし	なし	なし
62-15	AACCCCACC あり	なし	なし	なし
62-16	AACCCCCCC あり	なし	なし	なし
63-1	AACACAAAA あり	あり	あり	なし
63-2	AACACACAA なし	0	0	0
63-3	AACACCAAA あり	なし	あり	なし
63-4	AACACCCAA なし	0	0	0
63-5	AACACAAAC あり	なし	なし	なし
63-6	AACACACAC あり	なし	あり	なし
63-7	AACACCAAC あり	なし	あり	あり
63-8	AACACCCAC あり	なし	なし	なし
63-9	AACACAACA あり	なし	なし	なし
63-10	AACACACCA あり	なし	なし	なし
63-11	AACACCACA あり	なし	なし	なし
63-12	AACACCCCA あり	0	0	0
63-13	AACACAACC あり	なし	なし	なし
63-14	AACACACCC あり	なし	なし	なし
63-15	AACACCACC あり	なし	なし	なし
63-16	AACACCCCC あり	なし	なし	なし
71-1	ACCAAAAAA あり	なし	なし	なし
71-2	ACCAAACAA あり	なし	なし	なし

10

20

30

【0306】

【表6T】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3
71-3	ACCAACAAA あり	なし	なし	なし
71-4	ACCAACCAA あり	なし	なし	なし
71-5	ACCAAAAAC あり	なし	なし	なし
71-6	ACCAAACAC あり	なし	なし	なし
71-7	ACCAACAAC あり	なし	なし	なし
71-8	ACCAACCAC あり	なし	なし	なし
71-9	ACCAAAACA あり	なし	なし	なし
71-10	ACCAAACCA あり	なし	なし	なし
71-11	ACCAACACA あり	なし	なし	なし
71-12	ACCAACCCA あり	なし	なし	なし
71-13	ACCAAAACC あり	なし	なし	なし
71-14	ACCAAACCC あり	なし	なし	なし
71-15	ACCAACACC あり	なし	なし	なし
71-16	ACCAACCCC あり	なし	なし	なし
73-1	ACCACAAAA あり	なし	なし	なし
73-2	ACCACACAA あり	なし	なし	なし
73-3	ACCACCAAA あり	なし	なし	なし
73-4	ACCACCCAA あり	0	0	0
73-5	ACCACAAAC あり	なし	なし	なし
73-6	ACCACACAC あり	なし	なし	なし
73-7	ACCACCAAC あり	なし	あり	なし
73-8	ACCACCCAC あり	なし	なし	なし
73-9	ACCACAACA あり	なし	なし	なし

10

20

30

【0307】

【表6U】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	
73-10	ACCACACCA あり	なし	なし	なし	
73-11	ACCACCACA あり	なし	なし	なし	
73-12	ACCACCCCA あり	なし	なし	なし	
73-13	ACCACAACC あり	なし	なし	なし	
73-14	ACCACACCC あり	なし	なし	なし	
73-15	ACCACCACC あり	なし	あり	なし	10
73-16	ACCACCCCC あり	なし	なし	なし	
74-1	ACCCAAAAA あり	なし	なし	なし	
74-2	ACCCAACAA あり	なし	なし	なし	
74-3	ACCCACAAA あり	なし	なし	なし	
74-4	ACCCACCAA あり	なし	なし	なし	
74-5	ACCCAAAAC あり	なし	なし	なし	20
74-6	ACCCAACAC あり	なし	なし	なし	
74-7	ACCCACAAC あり	なし	なし	なし	
74-8	ACCCACCAC あり	なし	あり	なし	
74-9	ACCCAAACA あり	なし	なし	なし	
74-10	ACCCAACCA あり	なし	あり	なし	
74-11	ACCCACACA あり	なし	なし	なし	
74-12	ACCCACCCA あり	なし	あり	なし	30
74-13	ACCCAAACC あり	なし	なし	なし	
74-14	ACCCAACCC あり	なし	なし	なし	
74-15	ACCCACACC あり	なし	なし	なし	

【0308】

【表6V】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	
74-16	ACCCACCCC あり	なし	なし	なし	
82-1	CAACCAGAAA あり	なし	なし	なし	
82-2	CAACCACAA なし	なし	なし	なし	
82-3	CAACCCAAA あり	なし	なし	なし	
82-4	CAACCCCAA なし	なし	なし	なし	
82-5	CAACCAGAAC あり	あり	なし	なし	10
82-6	CAACCACAC なし	0	0	0	
82-7	CAACCCAAC あり	あり	あり	あり	
82-8	CAACCCCAC なし	0	0	0	
82-9	CAACCAACA あり	あり	あり	あり	
82-10	CAACCACCA なし	0	0	0	
82-11	CAACCCACA あり	あり	あり	あり	20
82-12	CAACCCCCA なし	0	0	0	
82-13	CAACCAACC あり	あり	なし	あり	
82-14	CAACCACCC あり	なし	なし	あり	
82-15	CAACCCACC あり	なし	あり	あり	
82-16	CAACCCCCC あり	なし	なし	あり	
84-1	CAACAGAAA あり	あり	なし	なし	
84-2	CAACAACAA なし	0	0	0	30
84-3	CAACACAAA あり	あり	あり	なし	
84-4	CAACACCAA なし	0	0	0	
84-5	CAACAGAAC あり	あり	なし	なし	
84-6	CAACAACAC なし	0	0	0	

【0309】

【表6W】

	EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3
84-7	CAACACAAC あり	なし	なし	なし
84-8	CAACACCAC なし	0	0	0
84-9	CAACAAACA あり	あり	あり	あり
84-10	CAACAACCA なし	0	0	0
84-11	CAACACACA あり	あり	あり	あり
84-12	CAACACCCA なし	0	0	0
84-13	CAACAAACC なし	0	0	0
84-14	CAACAACCC なし	0	0	0
84-15	CAACACACC なし	0	0	0
84-16	CAACACCCC なし	0	0	0

10

【0310】

20

受容体結合特性は、発現された構築体についてのみ分析した。

もしクローンが弱く発現されれば、その受容体結合特性は、そのサイズが内因性 VEGF-A 発現からの区別を可能とする場合、あるいはもしそのアミノ酸組成が、受容体結合のアッセイに先だってモノクローナル抗-VEGF-A 抗体を用いる内因性 VEGF-A の除去を可能とする場合のみ分析した。

この抗-VEGF-A 抗体によって認識されたエピトープは特徴付けされていないが、我々の予備的結果によれば、該エピトープは VEGF-A の断片 2、3、4、7 または 9 のうちの 1 つ以上内に位置することが示されている。

かくして、内因性 VEGF-A の抗体沈殿を、断片 2、3、4、7 および 9 が VEGF-C に由来する全ての構築体について行った。

30

この抗体のエピトープのさらなるマッピングは、さらなる構築体の同様な実験を可能とするであろう。

例えば、もし引き続いての分析が、エピトープが断片 2 に存在しないことを示せば、断片 2 が VEGF-A に由来する構築体もこの方法によって分析することができる。

VEGFR-1 または VEGFR-2 への結合に対してこの手法を行って、どのようにして、多くの低い親和性結合ハイブリッド分子が、内因性 VEGF との干渉により検出されないかを評価した。

受容体結合アッセイにおいて、シグナルを検出できないか、または弱いシグナルの検出は、受容体結合親和性の欠如、または低い受容体結合親和性を結論的に示すものではない。実験の固有の設定は、弱く発現される VEGFR-1 および VEGFR-2 の低い親和性

40

バインダーの検出が可能としない。
かくして、結合アッセイは、弱く発現されたハイブリッドタンパク質のいくつかについて VEGFR-1 および VEGFR-2 の低い親和性バインダーを検出しなかったであろう。

【0311】

このアッセイにおいて、低レベルで発現されたハイブリッド分子のみかけの低い受容体結合親和性は、内因性 VEGF とのヘテロ二量体化によるものであろう。

例えば、もしハイブリッドタンパク質が受容体-親和性それ自体を有しないが、内因性 VEGF-A とで二量体化できれば、そのようなヘテロダイマーは、低い親和性をもって、より多くの受容体のうちの 1 つに結合できるであろう。

50

(例えば、m y cまたはH Aタグ配列いずれかを認識する抗体での免疫アフィニティークロマトグラフィーを用い) および受容体結合アッセイにおいて精製されたポリペプチドを用いる本発明のキメラポリペプチドの精製は、条件培地中で内因性V E G F - Aによって引き起こされたいずれの曖昧さも解決するであろう。

あるいは、ハイブリッドタンパク質が昆虫細胞、例えば、S 9の細胞で発現されて、内因性V E G F - Aでの汚染を回避するであろう。

【0312】

特定の構築体の発現の欠如または低いレベルの発現は、ハイブリッドタンパク質それ自体の特性、D N A質の変化によるものであろう、あるいはハイブリッドクロンの構築の間に獲得されたD N Aの突然変異を反映するものであろう。

10

この場合において、最初の連結工程の後に全ての構築体を配列決定し、第2の連結工程の後に、選択されたクロンを配列決定した。

これらの配列の分析は、第1の工程の間に突然変異は起こらず、および構築体の第2の工程後に調べて配列で突然変異を含むものはなかったことを示した。

かくして、最終クロンに存在するいずれの突然変異も、最も有り得るのは、最終連結工程の間に起こった。

【0313】

5 1 2のクロンの内、3 6を配列決定して、アミノ酸レベルで変化をもたらしたクロンの構築の間に構築体が突然変異を獲得した頻度を決定した。

配列決定された構築体はクロン1 1～1 (配列番号：4 2～4 3)、1 1～1 6 (配列番号：4 4～4 5)、2 2～1 (配列番号：4 6～4 7)、2 2～1 6 (配列番号：4 8～4 9)、1 2～1乃至1 2～1 6 (配列番号：5 0～8 1)、および3 1～1乃至3 1～1 6 (配列番号：8 2～1 1 3)であった。

20

3 6のクロンの内、2つのみ(1 2～1 3および1 2～1 6)が、予測された配列から偏りを示した。

クロン1 2～1 6はN 4 5およびC 6 7の間の連結接合において2つの塩基対の喪失を受け、その結果、断片C 5のR C Gトリプレットおよびそれからただ数個のコドン後の停止コドンの後にフレームシフト突然変異が得られた。

クロン1 2～1 3は、このハイブリッドタンパク質の最後のC-末端アミノ酸におけるA s pのA s nによる置換をもたらす点突然変異を獲得した。

30

【0314】

調べた5 1 2のハイブリッド構築体から、配列決定して、ハイブリッドタンパク質の構築および最初の結果を確認するための結合アッセイの反復の間にいずれかの突然変異が起こったかを決定することを含めたさらなる分析のため4つを選択した。

これらの4つの特定のハイブリッドタンパク質：構築体1 2-1 3、1 2-1 1、1 2-9および1 2-7の結合アッセイからの結果は、それらが、公知のV E G F受容体リガンドによって呈されない新規な結合パターンを示すことを示す。

1 2-9および1 2-1 3はV E G F R-1およびV E G F R-3に対する結合を示すが、V E G F R-2に対する結合は示さず、他方、1 2-7および1 2-1 1は全ての3つのV E G F受容体に対する結合を呈する。

40

【0315】

これらの結果は、それが、修飾された特性を有するV E G F-関連成長因子を供するコンビナトリアルアプローチによって可能であることを示す。

いくつかの場合に構築された新規分子は、それらの野生型先祖と比較して修飾された生物学的効果を有することが示されており、かくして、生物学的効果の特異性および微妙なチューニングが必要である適用で用いることができる。

特に、これらの実験は、全ての3つの公知のV E G F Rに結合し、従って、血管増殖の誘導においてユニークに優れているはずであるクロン1 2～7および1 2～1 1のごとき「スーパー-V E G F」を構築することができることを示す。

【0316】

50

実施例 4

VEGF-AおよびVEGF-C受容体結合エピトープの調査

VEGF-A／VEGF-Cハイブリッドタンパク質を用いて、VEGF-AまたはVEGF-Cとそれらの受容体との間の相互作用を調べることができる。

表3および実施例3に記載したもののごとき受容体結合アッセイからの結果の分析は、これらの2つのVEGF成長因子の受容体－結合エピトープの注意深い調査を可能とする。

VEGF受容体の内の1つに結合する特定のハイブリッドタンパク質の能力は、親分子の1つに由来する1つ以上の特定の断片の存在に相関するであろう。

そのようなデータは、特異的VEGF受容体への結合に重要なアミノ酸残基を規定するのを助けることができる。

特定のVEGFタンパク質の正確な受容体結合エピトープの知識は、治療目的で有用な阻害性分子の設計を促進することができる。

10

【0317】

VEGFR-1と相互作用することで重要な21のVEGF残基を大きな太文字で示す：

GQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDFQEYPDEIEYIF
KPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTTEESNITMQIMRIKPHQ
GQHIGEMSFLQHNKCECRPKKD

キメラ実験からのデータは、N-末端螺旋に対応する断片2からの残基およびストランドβ5に対応する断片7からの残基が、VEGFR-1特異性を付与するのに特に重要に見えることを示す。

20

図8は、VEGF-Aダイマーと2つのVEGFR-1分子との相互作用の三次元モデルである。

2つのVEGF-Aモノマーは、各々、緑色および青色の色を付す。

2つのVEGFR-1受容体のドメイン2は灰色で示す。

【0318】

赤色は、VEGFR-1インターフェーシングで重要なVEGF-Aモノマー内の残基の位置を表す。

これらの残基はVEGFダイマーも2つの端部でクラスターとなっており、N-末端ラセンおよびβ5鎖の一部を含む。

【0319】

同様にVEGFR-3への調和に関与するVEGF-C中の対応する21の残基を大きな太文字で以下に示す：

AHYNTEILKSIDNEWRKTCMPREVCIDVGKEFGVATNTFF
FKPPCVSVYRCGGCCNSEGLQCMNTSTSYLSKTLFEITVPL
LSQGP KPVTISFANH TSCRCMSKLD

興味深いことに、キメラ実験からの受容体パターンの分析は、VEGF-C由来の断片4（分子のβ2ストランドを含有）は、VEGFR-3結合特異性に絶対的に必要であることを示す（β3ストランドを含む）断片5は、VEGFR-3結合のための2つの他の重要なVEGF-C断片を表すようである。

VEGF-C断片4および5のアミノ酸配列は、EFGVATNTFFFKPPCVSVYRCGである。

40

残基のTNTFFxxxPKインテッドは特に注目に値する。

なぜならば、これらの残基はヒト、ウズラおよびウシVEGF-CおよびヒトVEGFR-D（このすべてがVEGFR-3に結合する）で保存されているからである。

VEGFR-3に結合しないヒトVEGF-A中の類似の残基は異なる：IEYIxxxS。

図10は、VEGF-A／VEGFR-1モデルから外挿された、VEGF-Cダイマーの部分および単一VEGFR-3分子の間の相互作用の三次元モデルである。

青色および緑色は2つのVEGF-Cモノマーを表し、灰色はVEGFR-3を表す。

緑色VEGF-Cモノマーの断片5はオレンジ色で示し、同一モノマーの断片4は白色で

50

示す。

赤色の残基は、受容体に恐らくは接触している断片4または5内に位置したものである。

【0320】

図9は、VEGFR-3特異性に重要であるらしい断片によって形成された溝を示す三次元モデルである。

この溝は、VEGFR-3受容体のドメイン2および3の間のリンカー領域を収容すると推定される。

この溝の入り口および側面は、VEGFR-3特異性を付与するのに重要であるらしい断片によって形成される。

緑色および青色は2つのVEGF-Cモノマーを示し、灰色はVEGFR-3受容体分子を示す。 10

VEGFR-3への結合に参画すると考えられVEGF-C残基を黄色で示す。

【0321】

断片6および9はVEGF受容体との相互作用に関与するが、これらの断片は受容体特異性の決定に関与するようには見えない。

【0322】

実施例5

ハイブリッドVEGFタンパク質による受容体活性化および阻害の分析

VEGF-A/VEGF-Cハイブリッドタンパク質は、1つ以上のVEGF受容体の阻害のいずれかの活性化が望まれる治療適用で用いることができる。 20

例えば、その活性化が細胞生存に必要な特定のVEGF受容体を発現する安定な細胞系に候補ハイブリッドを添加することができる。

細胞系の生存は、候補ハイブリッドタンパク質がその特定のVEGF受容体に結合し、それを活性化できることを示す。

他方、細胞系の死滅は、候補ハイブリッドタンパク質が受容体を活性化できないことを示す。

そのような細胞-生存アッセイの例示的な例は、ここに引用して一体化させる国際公開公報第WO98/07832およびAchen et al., Proc Natl Acad Sci USA 95: 584-553 (1998)に記載されている。

このアッセイは、VEGFR-2の細胞外ドメインおよびエリスロポエチン受容体 (EpoR) の細胞質ドメインよりなるキメラ受容体をコードするプラスミドでトランスフェクトされているBa/F3プレ-B細胞であるBa/F3-NYK-EpoR細胞を使用する。 30

これらの細胞はインターロイキン-3 (IL-3) 中でルーティン的に継代され、IL-3の不存在下では死滅するであろう。

しかしながら、もしシグナリングがキメラ受容体の細胞質ドメインから誘導されれば、これらの細胞はIL-3の不存在下で生存し、増殖する。

そのようなシグナリングは、キメラ受容体のVEGFR-2細胞外ドメインに結合するリガンドによって誘導される。

例えば、VEGF-AまたはVEGF-DのVEGFR-2細胞外ドメインへの結合は、細胞がIL-3の不存在下で生存し、増殖するようにする。 40

キメラ受容体を欠く親Ba/F3細胞はVEGF-AまたはVEGF-Dいずれかによって誘導されて、IL-3の不存在下で増殖するということではなく、これは、これらのリガンドに対するBa/F3-NYK-EpoR細胞の応答が全体としてキメラ受容体に依存することを示す。

【0323】

IL-3の不存在下での細胞生存をアッセイすることによって、VEGFR-2細胞外ドメインへの結合、引き続いてのキメラ受容体の活性につき候補ハイブリッドタンパク質を試験することができる。

他方、細胞外ドメインに対する、VEGF-AまたはVEGF-DのごときVEGFR- 50

2 リガンドの結合に、または細胞質ドメインの活性化に干渉するハイブリッドタンパク質は、IL-3の不存在下で細胞死滅を引き起こすであろう。

【0324】

細胞を必要となるまでIL-3の存在下で培養し、次いで、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中で3回洗浄し、無IL-3細胞培養基(胎児ウシ血清(10%)、L-グルタミン(1%)、ゲネチシン(1mg/ml)、ストレプトマイシン(100μg/ml)およびペニシリン(60μg/ml)を補足したダルベッコの修飾イーグル培地(DMEM))に再懸濁し、ほぼ100細胞/ウェルの密度にて72-ウェル培養プレート(Nunc, デンマーク国)中で再度平板培養した。

受容体活性についてアッセイするために、候補ハイブリッドタンパク質を培養ウェルに 10^{-10} 乃至 10^{-5} Mの最終濃度にて添加し、10%CO₂中で37℃にて1時間インキュベートした。

VEGFR-2/EpoR受容体の活性化を疎外する候補ハイブリッドタンパク質の能力をアッセイするためには、組換えVEGF-AまたはVEGF-Dをハイブリッドタンパク質含有ウェルに、Ba/F3-NYK-EpoR細胞の最大近くの生存を生じる濃度(典型的には500ng/ml)にて添加する。

陽性対照培養はVEGF-AまたはVEGF-D上清単独いずれかを、陽性対照培養はハイブリッドタンパク質も成長因子も含まない。

【0325】

次いで、細胞を48時間培養にて増殖させ、その時点の後、3-(3, 4-ジメチルチアゾール-2-イル)-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイドの溶液(MTT; 500μg/ml)を培養に添加し、さらに30分間インキュベートする。

ミトコンドリアによってMDTを青色ホルマザン生成物に変換し、かくして、生細胞を青色に染色する。

活性化(ハイブリッドタンパク質単独)または疎外(ハイブリッドタンパク質+VEGF-AまたはVEGF-D)いずれかをアッセイした実験において生存する青色細胞を、倒立顕微鏡下(1000×倍率)で計測し、陽性対照(VEGF-AまたはVEGF-Dのみ)ウェルにおける細胞生存と比較する。

陰性対照における生存が0に設定され(典型的には、陰性対照では生きた細胞は見られない)、他方、陽性対照での生存が100%に設定される(典型的には300~400細胞/ウェル)用に、細胞生存を正規化する。

【0326】

ハイブリッドタンパク質単独(受容体の結合および活性化をアッセイするため)、またはVEGF-AまたはVEGF-D単独(陽性対照)と共にハイブリッドタンパク質+VEGF-AまたはVEGF-D(受容体活性化の阻害をアッセイするため)の個々の培養の間の差につきテストするためにその後に行ったBonferroni多重比較にて、片側偏差分析(ANOVA)によってデータを分析する。

【0327】

異なるキメラ受容体(例えば、VEGFR-3/EpoR)でトランスフェクトした細胞を用いる同一アッセイの反復は、異なるVEGFRの活性化についてのスクリーニングを可能とする。

【0328】

VEGFR-2(KDR)およびVEGFR-3(Flt4)自己リン酸化アッセイ

活性の別のインジケートとして、特定のVEGF受容体の自己リン酸化を刺激するハイブリッドタンパク質の能力を調べることもできる。

特定のVEGF受容体を発現する細胞に候補ハイブリッドタンパク質を添加する。

次いで、細胞を溶解させ、抗-VEGF受容体抗血清で免疫沈殿させ、抗-ホスホチロシン抗体を用いるウェスタンブロッティングによって分析して、VEGF受容体のハイブリッドタンパク質-誘導リン酸化を測定する。

【0329】

本発明のハイブリッドVEGF分子をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、リン酸カルシウムトランスフェクション方法を用いて、適当な宿主細胞（例えば、293-EbNA細胞）にトランスフェクトする。

トランスフェクションの約48時間後に、トランスフェクトされた細胞の増殖培地を（例えば、胎児ウシ血清を欠くDMEM培地）に変更し、細胞を（例えば、さらに36時間）インキュベートして条件培地を供する。

条件培地を収集し、5000×gにて20分間遠心し、上清を濃縮する。

【0330】

濃縮された条件培地を用いて、VEGF受容体を発現する細胞を刺激する。

例えば、PAE-KDR細胞（Pajusola et al., *Oncogene*, 9: 3545-55 (1994); Waltonberger et al., *J. Biol. Chem.*, 269: 26988-26995 (1994))をハムのF12培地-10%胎児ウシ血清（FCS）中で増殖させ、あるいはVEGFR-3を発現する密集NIH 3T3細胞をDMEM培地中で増殖させる。

DMEM培地または0.2%ウシ血清アルブミン（BSA）を補足したハムのF12中で細胞を一晩飢餓状態とし、次いで、濃縮されていない、2倍、5倍および／または10倍濃縮した条件培地と共に5分間インキュベートする。

組換えヒトVEGF-AまたはVEGF-Cおよびモックトランスフェクト細胞からの条件培地は例示的対照である。

条件培地に加えて、精製されたハイブリッドポリペプチドを、このアッセイまたは本明細書中に記載した他のアッセイで使用するすることができる。

【0331】

条件培地での刺激の後、100mMオルトパナジン酸ナトリウムを含有する氷冷トリス-緩衝化生理食塩水（TBS）で細胞を2回洗浄し、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル（PMFS）、0.1U/mlアプロチニンおよび1mMオルトパナジン酸ナトリウムを含有するRIPA緩衝液中で溶解させた。

溶解物を音波処理し、16,000×gにて20分間遠心することによって透明化し、VEGFR-3またはVEGFR-2に特異的な3~5μlの抗血清と共に氷上で3~6時間インキュベートする。

免疫沈殿をプロテインA-セファロースに結合させ、1mM PMSF、1mMオルトパナジン酸ナトリウムを含有するRIPA緩衝液で3回洗浄し、10mMトリス-HCl（pH 7.4）で2回洗浄し、7%ゲルを用いるSDS-PAGEに付す。

ウェスタンブロッティングによってポリペプチドをニトロセルロースに移し、PY20ホスホチロシン-特異的モノクローナル抗体（Transduction Laboratories）または受容体-特異的抗血清およびECL検出方法（Amersham Corp.）を用いて分析する。

【0332】

（抗-ホスホチロシン抗体を用いて検出された）自己リン酸化を刺激するハイブリッドポリペプチドの能力を、受容体の刺激としてスコア取りする。

VEGF-AまたはVEGF-Cの既知濃度に対するハイブリッドポリペプチドの種々の濃度について観察された刺激のレベルは、受容体刺激の能力の尺度を提供する。

受容体に結合することが示されているが、受容体リン酸化を刺激することができないポリペプチドは阻害剤として認定される。

組換えVEGF-AまたはVEGF-Cのような公知の受容体アゴニストと培地単独、または濃縮された調製培地と混合することによって、阻害活性をさらにアッセイして、濃縮された調製培地がVEGF-A-媒介またはVEGF-C-媒介受容体リン酸化を阻害するかを決定することができる。

【0333】

VEGFR-2またはVEGFR-3に結合する選択されたハイブリッド分子によって媒介されたVEGFR-2およびVEGFR-3のチロシンリン酸化を調べる最初の実験に

において、テストしたすべてのハイブリッドタンパク質は受容体のリン酸化を誘導することができるが、V E G F - A または V E G F - C によって媒介されたものよりは程度が低いことが観察された。

タンパク質を生じさせるのに用いたバキュロウイルス系におけるハイブリッドタンパク質の発現レベルのさらなる調査は、タンパク質が全ては匹敵する量では発現されないことを示す。

ハイブリッドタンパク質の異なる発現レベルは、V E G F R - 2 および V E G F R - 3 のチロシンリン酸化を刺激するそれらの能力のアッセイにおいてこれらのタンパク質によって呈されたより低い活性のいくつかを説明することができる。

加えて、この特別のアッセイを用いて測定されたこれらのハイブリッド分子によって誘導されたリン酸化の程度は、i n v i v o での生物学的活性とは相関しないであろう。 10

【0334】

実施例 6

ハイブリッドタンパク質の受容体結合親和性の分析

512 のハイブリッドタンパク質の予備的分析は、それらの多数が1つ以上の V E G F R に結合できることを示す。

加えて、これらの実験からの結果は、いくつかは、1つ以上の V E G F R に対する異なる結合親和性を示すことを示唆する。

これらの実験では、ハイブリッドタンパク質が昆虫細胞系、例えば、S 9 細胞で発現されて、哺乳動物細胞で見出された内因性 V E G F - A での汚染を排除する。 20

選択されたハイブリッドタンパク質の相対的結合親和性を測定するために、E L I S A - タイプの方法を用いる。

例えば、V E G F R - 1 に対する結合親和性を調べるために、競合する V E G F R - 1 - I g G 融合タンパク質および M Y C エピトープでタグを付した飽和下濃度の候補ハイブリッドタンパク質の系列希釈を、V E G F R - 1 を被覆したマイクロタイタープレートに添加し、平衡が確立されるまでインキュベートする。

次いで、プレートを洗浄して未結合タンパク質を除去する。

V E G F R - 1 被覆プレートに結合したままであるハイブリッド分子を、容易に検出可能な標識、例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲートした抗-m y c 抗体を用いて検出する。 30

結合親和性 (E C₅₀) は、最大の半分の結合をもたらす競合 V E G F R - I g G 融合タンパク質の濃度として計算することができる。

これらの値を、V E G F - A または V E G F - C の分析から得られたものと比較して、1つ以上の V E G F R の結合親和性の変化を決定することができる。

同様に、V E G F R - 2 に対する結合は V E G F R - 2 - I g G 融合タンパク質を用いて達成され、V E G F R - 3 に対する結合は V E G F R - 3 - I g G 融合タンパク質を用いて測定される。

【0335】

実施例 7

V E G F - A / V E G F - C ハイブリッドタンパク質によって

媒介されたコラーゲングル中の内皮細胞移動

V E G F - A および V E G F - C は共にコラーゲングル中の内皮細胞移動を刺激する。 40

【0336】

本発明のハイブリッドタンパク質を調べて、それらがコラーゲングル中の内皮細胞移動を刺激でき、かくして、生物学的活性のもう1つの指標を供することができるかを決定する。

そのような細胞移動の例は、参考までに本明細書に引用した国際公開公報第 W O 9 8 / 3 3 9 1 7 号に記載されている。

簡単に述べれば、ウシ毛細血管内皮細胞 (B C E) を、組織培養プレート中のコラーゲン層の頂部に蒔く。

【0337】

候補ハイブリッドタンパク質を生産する発現ベクターでトランスフェクトされた細胞からの条件培地を、付着したBCE細胞の位置からほぼ4mm離れたコラーゲングル中で作成されたウェルに入れる。

次いで、ハイブリッドタンパク質を含有するウェルに向けて、コラーゲン中の付着の元来の領域から移動したBCE細胞の数をカウントして、細胞移動を誘導するハイブリッドタンパク質の能力を評価する。

【0338】

BCE細胞 (Folkman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 5217-5221 (1979)) は、Pertovaara et al., J. Biol. Chem., 269: 6271-74 (1994) に記載されている。 10

コラーゲングルは、I型コラーゲンストック溶液 (1mM HCl中5mg/ml) を、等容量の2×MEMおよび2容量の10%新生児ウシ血清を含有するMEMと混合することによって調製する。

組織培養プレート (5cm直径) を溶液の約1mm厚みの層で被覆し、これは37℃での重合を可能とする。

【0339】

BCE細胞をこの層の頂上に蒔く。

【0340】

移動アッセイでは、最初のコラーゲン層の頂部に置かれたプラスチックリング (1cm直径) の内部に細胞を付着させる。 20

30分後、リングを取り出し、未付着細胞をすすいで除去する。

0.75%低融点寒天 (FMC BioProducts, Rockland, ME) によって固化したコラーゲンの第2の層および増殖培地 (5%新生児ウシ血清 (NCSS)) の層を添加する。

4mmの距離に置いて細胞スポットの両側の全ての層を通してウェル (3mm直径) をパンチし、ハイブリッドVEGFポリペプチドを含有する培地 (または対照として供するための培地単独またはVEGF-AもしくはVEGF-Cを含有する培地) をピペットで毎日ウェルに入れる。 30

スポットのエッジから外に移動する細胞の顕微鏡写真を、例えば、6日後に、相コントラストオプティックスを備えたオリンパスCK2倒立顕微鏡を通して撮る。

蛍光色素ビスベンズイミド (1mg/ml, Hoechst 33258, Sigma) での核染色の後に移動する細胞をカウントする。

【0341】

非トランスフェクトされた (対照) またはトランスフェクトされた (モック; ハイブリッド; VEGF-C: またはVEGF-A) 細胞によって条件付けされた培地を含有する細胞に向けて、付着の元来の領域から異なる距離において移動する細胞の数を、培地の添加から6日後に測定する。

付着の元のリングから外に移動する細胞の数を、蛍光顕微鏡にて、顕微鏡接眼レンズグリッドおよび10×倍率を用い、5つの隣接する0.5mm×0.5mm角でカウントする。 40

0.5mmよりさらに移動する細胞を、0.5mm工程でグリッドを取り出すことによって同様にカウントする。

【0342】

BCE細胞の移動を誘導するハイブリッドポリペプチドの能力は、受容体アゴニストの活性の指標である。

ハイブリッドタンパク質-対-同様な濃度のVEGF-AまたはVEGF-Cの存在下における移動細胞の数は、アゴニスト活性の能力の指標を提供する。

BCE細胞で発現された受容体に結合することが示されているが、移動を刺激することが 50

できないポリペプチドを潜在的疎外剤として認定する。

組換えVEGF-AまたはVEGF-Cのような公知の受容体アゴニストと、培地単独と、または濃縮された調製培地と混合することによって、阻害活性をさらにアッセイして、濃縮された調製培地がVEGF-A-媒介またはVEGF-C-媒介（BCE移動を阻害するかを決定することができる）。

【0343】

実施例8

ハイブリッドタンパク質の脈管透過性誘発能力の分析

VEGF-AおよびVEGF-Cは、共に脈管の透過性を高める能力を有する。

本発明のハイブリッドタンパク質を試験にかけ、両タンパク質のいずれが、この生物活性を有し、いずれが、それを阻害するかを決定する。 10

たとえば、脈管透過性の検定には、MilesおよびMilesの方法（J. Physiol. 118: 228~257 (1952)；全体を参照してここに組み込む）が使用される。

【0344】

その概要を説明すると、まず、実験動物、たとえばモルモットにポンタミン・スカイ・ブルーのような生体色素を静脈注射し、その後で試験候補であるハイブリッドタンパク質を含む組成物を皮内注射する。

比較対照として、培養液単独か、VEGF-AまたはVEGF-Cを含む培養液を同様に注射する。 20

ある時間が経過したのち、皮膚の注射部位に蓄積した色素量を測定する。

透過性を高めるこれらのハイブリッドタンパク質は、脈管透過性を誘発しないハイブリッドタンパク質と比べて、注射部位に蓄積する色素量を増加させる。

【0345】

この試験法の変法によれば、まず、VEGF-AまたはVEGF-Cのインヒビターではないかと疑われるハイブリッドタンパク質に、VEGF-AまたはVEGF-Cを比率を変えて混合し（たとえば、50:1、10:1、5:1、2:1、1:1、1:2、1:5、1:10）、それら混合物を実験動物の皮内に注射する。

このようにして、ハイブリッドタンパク質が、VEGF-AまたはVEGF-Cがそれぞれ仲介する脈管透過性を阻害する能力を検定する。 30

【0346】

実施例9

内皮細胞増殖試験

ハイブリッドタンパク質の分裂促進活性は、たとえばBreierら（Dev. 114: 521~532 (1992)；）が記載している内皮細胞増殖試験を使って検査することができる。

ハイブリッドタンパク質は、哺乳動物細胞系、たとえばCOS細胞に発現される。

培養物上清を集め、それをウシ大動脈内皮（BAE）細胞に添加して、BAE細胞に対する分裂活性を検定する。

3日後、トリプシンで細胞を切り離し、細胞数計数計を使って、BAE細胞の増殖に対するハイブリッドタンパク質の効果の有無を決定する。 40

ネガティブな対照としては、10% FCSを添加したDMEMおよびベクターを移入していないCOS細胞またはベクターを移入したCOS細胞からの条件調整した培養液を単独で使うことができる。

【0347】

また、ポジティブな対照としては、BAE細胞の増殖を誘発することが証明されているタンパク質（たとえばVEGF-A）を発現する構築体を移入した細胞上清を使用することができる。

【0348】

実施例10

ヒト K 1 4 ケラチン・プロモーターを通して発現されるハイブリッドタンパク質

が、トランスジェニック・マウスの皮膚にリンパ管の成長を誘発する能力試験

組織内にハイブリッドタンパク質を過度に発現する特異的効果を分析するための試験を、トランスジェニック・マウスを使って行う。

生体内での生理的効果は、受容体の活性化／阻害プロファイルの指標となるばかりでなく、ハイブリッドタンパク質が有する治療作用の可能性を示す指標ともなる。

一例を挙げれば、重層扁平上皮の基底細胞中で活性を示すヒト K 1 4 ケラチン・プロモーター（Vassarら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 1563～1567 (1989)）を、組換えハイブリッドタンパク質導入遺伝子の発現制御要素として使用することができる。

K 1 4 ケラチン・プロモーターを含むベクターは、Vassarら、Genes Dev., 5: 714～727 (1991) および Nelsonら、J. Cell Biol., 97: 244～251 (1983) に記載されている。

【0349】

K 1 4 プロモーター、ハイブリッドタンパク質 cDNA および K 1 4 ポリアデニル化シグナルを含む DNA 断片を合成し、分離後、FVB-NIH マウス系の受精卵母細胞に注入する。

注入した接合子を疑似妊娠した C 5 7 B L / 6 × D B A / 2 J ハイブリッド・マウスの卵管に移植する。

このようにして作製したファウンダー・マウスの導入遺伝子を、該当するプライマーを使ったテイル DNA のポリメラーゼ連鎖反応か、サザン分析法によって分析する。

【0350】

つぎに、これらのトランスジェニック・マウスに対して、脈管形成またはリンパ管形成、たとえば VEGF-C を過度に発現するリンパ管形成（国際公開公報第 WO 98 / 33917 号を参照）を示す証拠がないか検査する。

K 1 4 - VEGF-C トランスジェニック・マウスの組織を調べた結果、野生型同腹子の皮膚と比較して、背部の真皮は萎縮し、そして結合組織は、赤色細胞を持たない大裂孔で置き換えられ、薄い内皮層で覆われていることがわかった。

これらの拡張した脈管類似の構造は、ヒトのリンパ管腫に見られる構造と似ていた。

皮膚付属器と毛嚢の数は減少した。

口吻部では脈管数が増えていることもわかった。

【0351】

血管またはリンパ管に特定のタンパク質を認識する抗体を使ってトランスジェニック・マウスの皮膚の脈管を調べたところ、これらの脈管が同一であることも確認された。

タイプ I V および X V I I I コラーゲン（Muragakiら、Natl. Acad. Sci. USA, 92: 8763～8766 (1995)）およびラミニンは脈管内皮細胞に発現されるのに対して、デスモプラキン I および I I （プロゲン）はリンパ管内皮細胞に発現される。

Schmerzら、Differentiation, 57: 97～117 (1994) を参照。

【0352】

実施例 1 1

骨髓造血の促進または抑制におけるハイブリッドタンパク質の分析

K 1 4 - VEGF-C トランスジェニック・マウスの皮膚における VEGF-C の過度な発現は、白血球集団の明確な変化と相関性を示す（国際公開公報第 WO 98 / 33917 号を参照）。

トランスジェニック・マウスで好中球の顕著な増加が認められたことは注目に値する。

特異的白血球集団に発現するタンパク質を認識する抗体を使用する蛍光活性化細胞選別分析法によって、造血に対するハイブリッドタンパク質の効果を分析することができる。

白血球集団の分析は、実施例 1 3 に記載の F 1 トランスジェニック・マウスおよびそれら

10

20

30

40

50

と同腹の非トランスジェニック・マウスから採取した血液で行う。

【0353】

実施例12

In VitroにおけるヒトCD34⁺前駆細胞の増殖

および分化に対するハブリッドタンパク質の効果

臍帯血液のCD34⁺細胞の細胞培養物にVEGF-Cを添加すると細胞増殖が誘発される。

GM-CSF、IL-3またはGM-CSF+SCFとVEGF-Cとを共培養すると脊髄細胞の比率が増加する（国際公開公報第WO98/33917号を参照）。

本発明のハイブリッドタンパク質が、CD34⁺前駆細胞の増殖をin vitroで誘発する能力を調べることもできる。 10

ヒトCD34⁺前駆細胞（HPC、 10×10^3 ）は、骨髓または臍帯血液単核球から、MACS CD34前駆細胞分離キット（Miltenyi Biotec、Bergisch Gladbach、ドイツ）を使用し、製造者の使用説明書に従って分離し、L-グルタミン（2.5mM）、ペニシリン（125IE/ml）、ストレプトマイシン（125μg/ml）およびプールした10%臍帯血液（CB）血漿を添加したRPMI 1640培養液中、10ng/ml乃至乃至1μg/mlの濃度範囲でハイブリッドタンパク質の存在下または不在下に、5%CO₂含有調湿雰囲気中、37℃で数日間培養する。数日間経過後、各培養物についてそれぞれ全細胞数を決定する。

【0354】

組換えヒト幹細胞因子（rhSCF、20ng/ml PreproTech、Rocky Hill, NY）単独か、顆粒細胞マクロファージコロニー刺激因子（rhGM-CSF、100ng/ml、サンド、バーゼル、スイス）+SCFの組み合わせ、のいずれかを添加した培養物中におけるハイブリッドタンパク質の共刺激効果を調べることもできる。 20

GM-CSF単独か、IL3（rhIL-3、100U/ml、Behring AG、マールブルク、ドイツ）単独か、GM-CSF+IL-3の組み合わせの、いずれかを添加したCB CD34⁺HPC細胞の血清不含培養物の全細胞収率に対する、ハイブリッドタンパク質の共刺激効果を分析する実験も行うことができる。

【0355】

上記の血漿を添加した細胞（7日）についても、早期顆粒単細胞マーカー分子リゾチーム（LZ）およびミエロペルオキシダーゼ（MPO）、ならびに糖脂質（LPS）受容体CD14の発現が、免疫蛍光法によって分析される。 30

【0356】

別の実験シリーズでは、50ng/ml M-CSFを添加し、100ng/mlハイブリッドタンパク質を含む、または含まない培養液中でCD34⁺細胞を7日間培養する。7日後に培養物を分析にかけ、CD34⁺細胞百分率と平均蛍光強度を決定する。

【0357】

実施例13

CAMアッセーによるハイブリッドタンパク質の分析

In vivoにおける脈管形成因子の効果を調べるには、たとえばOh et al., Dev. Biol. 188:96~109 (1997)（全体を参考までに本明細書に組み込む）に記載の尿漿膜（CAM）アッセーが広く使用されている。

このアッセーを使って、VEGF-AおよびVEGF-Cの両者を含め、VEGF成長因子が、血管の形成を誘発することが明らかにされている（Ohら、Dev. Biol. 188:96~109 (1997)）。

このように、ハイブリッドタンパク質の血管形成特性を研究するために、この方法を使用することができる。

【0358】

実験方法の概要を述べれば、成長過程の4日目にニワトリまたはウズラの卵の殻に窓を切 50

り開ける。

胚が正常に成長していることを検査し、殻の窓をセロテープ（登録商標）でふさぎ、それから発育13日目まで卵を保温する。

あらかじめ直径約5mmの円板に切って乾燥させたThermanoxカバースリップ（Nime社、Naperville、IL）に蒸留水5μlに溶かしたハイブリッドタンパク質約3.3μgを加える。

対照にはタンパク質を加えない円板を使用する。

次に、乾燥した円板を上記卵の尿漿膜（CAM）上に当てがう。

3日後に円板を取り去り、3%グルタルアルデヒドおよび2%ホルムアルデヒド中で固定し、0.12Mカコジル酸ナトリウム緩衝液中ですすぐ。

固定された標本を写真撮影し、半（0.75μm）および超薄（70nm）切片を作製するためにエプソン樹脂（Serva社、ドイツ）中に埋め込む。

Ultracut S（Leika社、ドイツ）半薄切片および超薄切片を切り出す。

超薄切片をEM10（Zeiss社、ドイツ）で分析する。

標本は、毛細血管が新たに成長しているか否かの証拠を得るために分析され、もし証拠が得られれば、試験対象であるハイブリッドタンパク質が血管形成を刺激しうることが示唆される。

【0359】

実施例14

VEGF-A／VEGF-Cハイブリッドタンパク質の同種間または異種間での二量化の分析

チロシン・受容体の活性化には、多くの場合、リガンドによって誘発される受容体の二量化が介在する。

VEGFとVEGFR-2の間の相互作用の研究から、受容体の二量化は、両受容体が、ホモ二量体またはヘテロ二量体を構成する二つのリガンドタンパク質のそれぞれの部分を結合する、リガンドの二量化を経由して行われることが示唆される。

VEGFR-2に結合することができても、二量化することのできない突然変位VEGFは、受容体を活性化することはできない（Fuhら、J. Biol. Chem. 273: 11197～11204（1998））。

VEGFファミリーに属するメンバーは、すべて同種および／または異種間で二量化することができる。

VEGF-AとVEGF-Cは、互いに異種間で二量化することはできない。

しかし。

VEGF-A／VEGF-Cハイブリッドタンパク質の一部は、場合によっては、相互に二量することができるかもしれ乃至、母体分子の一方または両方と二量化することができるかもしれない。

さらに、ハイブリッドタンパク質は、同種間で二量化することができるかもしれない。

次に述べるプロトコルは、本発明のハイブリッドタンパク質が二量化できる能力があることを確認できるように作成されている。

候補となるハイブリッドタンパク質は、異なるハイブリッドタンパク質と共発現されるか、ある細胞系統、たとえば293T細胞またはS9細胞の母体分子の一つと共発現される。

これらの細胞から抽出物を調製し、それを、検査対象である二種類のタンパク質の一方だけを認識する抗体を使う免疫沈殿に使用する。

次に、免疫沈殿によって沈殿したタンパク質をSDS-PAGEにかけて分析する。

両タンパク質をゲル上で検出する場合は、検査対象である二つのタンパク質間でヘテロ二量化が起こった。

それに対して、免疫沈殿法で使用された抗体で認識されるタンパク質のみが検出される場合は、両タンパク質間で二量化は起こらなかった。

二量化は、受容体の活性化にきわめて重要であるように思われるため、受容体を結合して

も、それ自身同士で、または細胞によって内因的に発現される天然の VEGF 成長因子とは、二量化しないハイブリッドタンパク質は、内因性脈管内皮成長因子の活性の阻害剤となることが期待される。

【0360】

本発明の一つのポリペプチドと、本発明の残りのポリペプチドまたは成長因子の VEGF ファミリーの天然に存在するメンバーと、を含むヘテロ二量体は、基本的には、Ca o ら、J. Biol. Chem. 271: 3154~62 (1996) に記載されているようにして生成させることができよう。

簡潔に説明すると、組換えによって形成されるハイブリッドポリペプチドを、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PUGF、PDGF α 、PDGF β または c-fos によって誘発される成長因子ポリペプチドなど、組換えによって形成される別の対象ハイブリッドペプチドと混合する（たとえば、Collins ら、Nature, 316: 748~750 (1985) を参照）（PDGF- β 、GenBank Acc. No. X02811）；Claesson-Welsh ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 (13): 4917~4921 (1989)（PDGF- α 、GenBank Acc. No. M22734）；Claesson-Welsh ら、Mol. Cell. Biol. 8: 3476~3486 (1988)（PDGF- β 、GenBank Acc. No. M21616）；Olofsson ら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 93: 4257~4261 (1996)（VEGF-B、GenBank Acc. No. U48801）；Maglione ら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 88 (20): 9267~9271 (1991)（P1GF、GenBank Acc. No. X54936）；Heldin ら、Growth Factors, 8: 245~252 (1993)；Folkman、Nature Med. 1: 27~31 (1995)；Friesel ら、FASEB J. 9: 919~925 (1995)；Mustonen ら、J. Cell. Biol. 129: 895~908 (1995)；Orlandini、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 (21): 11675~11680 (1996)；および本明細書の別の所に引用されている参考文献。

混合したポリペプチドをグアニジン塩酸塩および DTT の存在下に保温する。

つづいて、チオール基を S-スルホン化によって保護し、タンパク質を、まず尿素／グルタチオン-SH、グルタチオン-S-S-グルタチオンに対して、それから 20 mM Tris-HCl に対して一晩透析をする。

【0361】

VEGF/PDGF ファミリー（特に、VEGFR-1、VEGFR-2 および VEGFR-3）の受容体に対する結合親和性および受容体を刺激する能力を決定する（たとえば、関係受容体を表面に発現する細胞中で行われる、二量体刺激受容体の、リン酸化を検定する）ため、ヘテロ二量体をスクリーニングにかける。

結合アッセイは、本明細書および従来技術に記載されている競争的結合アッセイであってもよい。

最初の結合アッセイでは、上記 VEGFR-2 および VEGFR-3 に対する実施例に記載したように、受容体の細胞外ドメインを含む、組換えによって形成されるタンパク質を使用することができる。

受容体を結合し、これを刺激するヘテロ二量体は、組換え成長因子ポリペプチドとして有用である。

それに対して、受容体を結合しても、これを刺激しないヘテロ二量体は、成長因子拮抗体として有用である。

【0362】

スクリーニング・アッセイで作動活性または拮抗活性を示すヘテロ二量体は、さらに内皮細胞移動アッセイ、脈管透過性アッセイおよび in vivo アッセイなどの検定法を使ってスクリーニングされる。

二種類の V E G F - C ポリペプチドを含む二量体（すなわち同じ V E G F - C ポリペプチドの二量体でも、異なる V E G F - C ポリペプチドの二量体でも）の作動活性および拮抗活性が同じアッセーを使って有利にスクリーニングされることも、上記実施例から明らかであろう。

【0363】

実施例 15

V E G F - A / V E G F - C ハイブリッドタンパク質の生物学的半減期の決定

ある化合物の *in vivo* での生物学的半減期を明らかにすることは治療に応用する上で重要なことである。

ハイブリッドタンパク質の *in vivo* での半減期は、決定されていないが、*in vitro* での予備的な結果によると、上に記載した V E G F - A / V E G F - C ハイブリッドタンパク質の半減期はさまざまであることが示唆されている。 10

特定のハイブリッドタンパク質を含む上清を 4℃ に約 2 か月間保温すると、各ハイブリッドタンパク質で異なるタンパク質安定性を示す。

in vivo での生物学的半減期は、ヨウ素で標識したハイブリッドタンパク質を動物に注射することによって決定することができる。

その概要を簡単に述べると、まず、I O D O - G E N (P i e r c e 社) を使用し製造者の指示に従って、ハイブリッドタンパク質 50 μg をヨウ素化し、約 2 ~ 10 μCi / μg タンパク質の比放射能を得る。

P D - 10 S e p h a d e x (ファルマシア社) を使用し製造者の指示に従って、ヨウ 20
素化したタンパク質を精製する。

使用する 12 ~ 16 週齢のマウス（体重 20 ~ 25 g）は、実験中ペントバルビタールナトリウム（1 mg / マウスの体重 20 g）で麻酔する。

滅菌食塩水 100 μl で希釈した放射能標識タンパク質 5 ~ 10 pmo l を尾部血管に 30 秒間かけて注入する。

所定の時間（1、2、4、8、15、30、60 および 120 分）に 40 ~ 50 μl の血液を眼窩周辺部から出血させて採血するか、尾部動脈から採血する。

各血液試料から血漿フラクション 25 μl をワットマンの濾紙上にスポットし、10% トリクロロ酢酸（T C A）で沈殿させ、それからエタノールですすぐ。

ガンマ線カウンターで放射能を測定して、血漿フラクション中に存在する放射能標識タン 30
パク質の量を定量する。

天然に存在する V E G F より半減期が向上したポリペプチドは、本発明のポリペプチドの中でも好ましい部類に入る。

とりわけ、天然に存在する V E G F より 25%、50%、75% または 100% 半減期が向上したポリペプチドは特に好ましい。

【0364】

実施例 16

他の V E G F または P D G F ファミリーのタンパク質を使用する

ハイブリッドタンパク質の構築

実施例 1 に記載した手順を拡張し、P D G F / V E G F 成長因子のどれを使用してもハイ 40
ブリッド分子を作り出すことができる。

少なくとも V E G F - A（配列番号：1 および 2）、P 1 G F（配列番号：114 および 115）、V E G F - B（配列番号：116 および 117）、V E G F - C（配列番号：21 および 22）、V E G F - D（配列番号：118 および 119）、V E G F - E（配列番号：120 および 121）、および N 22 V E G F（配列番号：122 および 123）、D 1701 V E G F（配列番号：X および X）、N Z 10 V E G F（国際出願第 P C T / U S 99 / 25869 号の配列番号：11 に記載されている；全体を参考までに本明細書に組み込む）、P D G F - A（配列番号：124 および 125）、P D G F - B（配列番号：126 および 127）および f a l l o t e i n（配列番号：148 および 149）を含む P D G F / V E G F ファミリーのメンバーは、受容体を結合するドメイ 50

ン内に十分な同族関係を共有しているため、VEGF-AおよびVEGF-Cに関して実施例1が教える独特な接着末端を有するオリゴヌクレオチドの設計が可能である。

そして、実施例1～3に記載の成功例から分かるように、3～6塩基の短い接着末端であっても接着末端を有する二重らせんの断片が得られるよう設計されたオリゴヌクレオチドであれば、新規ハイブリッド分子への組換えは十分可能である（意図に反する変異はきわめて少ない）。

【0365】

接着末端が存在すると、望む順序で望む方向に断片を結合することがきわめて容易になるが、接着末端がなくても、断片の結合は実現可能であることが理解できよう。

上に記載する方法に従い、平滑末端の断片を合成し、アニールさせてハイブリッドタンパク質を作り出すこともできる。 10

平滑末端を使用する方法の場合、接着末端の形成を可能にするヌクレオチドの同一性が存在するか否か、母体分子の塩基配列を調べる必要はない。

しかし、望む順序で望む方向に断片を含むハイブリッドを確認するには、結合後の追加的なスクリーニングが必要になるかもしれない。

【0366】

以上の指針に基づき、実施例1に記載に従ってオリゴヌクレオチド対を設計しアニールして、二個以上のVEGFタンパク質のドメインを結合するための受容体DNA断片を得る。

各種DNA断片をコンビナトリアル的に結合させて新規ハイブリッドタンパク質を合成し、それらを、受容体との結合、および生物学的な特性、たとえば内皮細胞の増殖と移動の促進または抑止能力および脈管透過性変調能力などに関して、スクリーニングにかける。 20

【0367】

実施例17

PCRによって推進されるDNAシャッフリング法を使用する

ハイブリッド分子の創出

次に記載するプロトコルは、ハイブリッド脈管内皮成長因子をコードするポリヌクレオチドおよびポリペプチドを合成するための別法、「DNAシャッフリング」法である。

文献には、酵素、具体的には抗生物質抵抗性を与えるタンパク質や少数の別のタンパク質ファミリーのためのDNAシャッフリング法が記載されている。 30

（例えば、Chang et al., Nature Biotechnology, 17:793～797 (1999); Kikuchi et al., Gene, 236:159～167 (1999); Harayama et al., TIBTECH, 16:76～82 (1998); Carmeri et al., Nature, 391:288291 (1998); Patten et al., Curr. Opin. Biotechnology, 8:724～733 (1997); Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4505～09 (1997); Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:10747～1074 (1994) および Stemmer, Nature, 370:389～391 (1994) を参照。 40

これらすべての文献の全体を参照してここに組み込む）。

【0368】

最初に、二個以上のcDNAをコードする脈管内皮成長因子ポリペプチドをクローニングし、増幅させる。

好ましい実施形態では、VEGF受容体を結合する最小ドメインをコードするcDNAの該当する部分のみと、随意に、cDNAからの小さい5'および3'追加配列とを増幅する。

【0369】

精製、分離したcDNAを、制限エンドヌクレアーゼおよび／またはデオキシリボヌクレアーゼIで約10～75塩基対の断片分解し、この所期サイズ範囲の断片を 50

(たとえば、アガロースゲル電気泳動法、電気溶離法およびエタノール沈殿法によって) 精製し単離する。

【0370】

二個以上のVEGFから得られた精製分離した断片を混合し、自己開始ポリメラーゼ連鎖反応にかけ、断片を、新規ハイブリッド分子を形成するためにシャッフルする。

模範的なプロトコルがK i k u c h i e t a l (1999) およびS t e m m e r (1994) に記載されている。

元のcDNA間の配列の一致度に基づいて、PCR反応におけるアニール温度を調整し、適合が不完全な異種配列のアニールリングを可能にする。

プライマーなしでPCRを25～50回行ったのち、PCR反応から一部を選択し、それを、元のcDNAの5'および3'配列に基づくプライマーによる第二ラウンドPCRのテンプレートとして使用する。

得られる第二ラウンドPCR産生物を発現ベクターにクローニングするのを助けるためには、制限エンドヌクレアーゼ認識配列をプライマーに組み込むことが好ましい。

【0371】

作製したクローンを発現ベクターに連結して形質転換させるか、宿主細胞に移入し、(もしあれば) それによってコードされた新規ハイブリッドVEGFポリペプチドを発現する。

上記実施例で述べた受容体結合法および/または活性アッセーを使ってタンパク質をスクリーニングし、望ましい受容体作動体/拮抗体プロフィールを持つポリペプチドをコードするクローンを選び出す。

【0372】

配列表の目次

配列番号：1および2は、VEGF-Aの塩基配列およびアミノ酸配列である。

【0373】

配列番号：3～11は、VEGF-Aの正プライマーである。

【0374】

配列番号：12～20は、VEGF-Aの逆プライマーである。

【0375】

配列番号：21および22は、VEGF-Cの塩基配列およびアミノ酸配列である。

【0376】

配列番号：23～31は、VEGF-Cの正プライマーである。

【0377】

配列番号：32～40は、VEGF-Cの逆プライマーである。

【0378】

配列番号：41は、pS e c T a g Iの塩基配列である。

【0379】

配列番号：42および43は、クローン11-1の塩基配列およびアミノ酸配列である。VEGF受容体結合ドメイン(VEGF-AおよびVEGF-Cから誘導)は、配列番号：43のアミノ酸1～102に対応する。

【0380】

配列番号：44および45は、クローン11-16の塩基配列およびアミノ酸配列である(VEGF受容体結合ドメイン=配列番号：45のアミノ酸1～104)。

【0381】

配列番号：46および47は、クローン22-1の塩基配列およびアミノ酸配列である(VEGF受容体結合ドメイン=配列番号：47のアミノ酸1～103)。

【0382】

配列番号：48および49は、クローン22-16の塩基配列およびアミノ酸配列である(VEGF受容体結合ドメイン=配列番号：49のアミノ酸1～105)。

【0383】

10

20

30

40

50

配列番号：50～51は、クローン12-1の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：51のアミノ酸1～102）。

【0384】

配列番号：52～53は、クローン12-2の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：53のアミノ酸1～102）。

【0385】

配列番号：54～55は、クローン12-3の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：55のアミノ酸1～102）。

【0386】

配列番号：56～57は、クローン12-4の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：57のアミノ酸1～102）。 10

【0387】

配列番号：58～59は、クローン12-5の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：59のアミノ酸1～102）。

【0388】

配列番号：60～61は、クローン12-6の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：61のアミノ酸1～102）。

【0389】

配列番号：62～63は、クローン12-7の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：63のアミノ酸1～102）。 20

【0390】

配列番号：64～65は、クローン12-8の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：65のアミノ酸1～102）。

【0391】

配列番号：66～67は、クローン12-9の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：67のアミノ酸1～104）。

【0392】

配列番号：68～69は、クローン12-10の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：69のアミノ酸1～104）。

【0393】

配列番号：70～71は、クローン12-11の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：71のアミノ酸1～104）。 30

【0394】

配列番号：72～73は、クローン12-12の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：73のアミノ酸1～104）。

【0395】

配列番号：74～75は、クローン12-13の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：75のアミノ酸1～104）。

【0396】

配列番号：76～77は、クローン12-14の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：77のアミノ酸1～104）。 40

【0397】

配列番号：78～79は、クローン12-15の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：79のアミノ酸1～104）。

【0398】

配列番号：80～81は、クローン12-16の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：81のアミノ酸1～54）。

【0399】

配列番号：82～83は、クローン3112-1の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：83のアミノ酸1～103）。 50

【0400】

配列番号：84～85は、クローン31-2の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：85のアミノ酸1～103）。

【0401】

配列番号：86～87は、クローン31-3の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：87のアミノ酸1～103）。

【0402】

配列番号：88～89は、クローン31-4の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：89のアミノ酸1～103）。

【0403】

配列番号：90～91は、クローン31-5の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：91のアミノ酸1～103）。

【0404】

配列番号：92～93は、クローン31-6の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：93のアミノ酸1～103）。

【0405】

配列番号：94～95は、クローン31-7の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：95のアミノ酸1～103）。

【0406】

配列番号：96～97は、クローン31-8の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：97のアミノ酸1～103）。

【0407】

配列番号：98～99は、クローン31-9の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：99のアミノ酸1～105）。

【0408】

配列番号：100～101は、クローン31-10の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：101のアミノ酸1～105）。

【0409】

配列番号：102～103は、クローン31-11の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：103のアミノ酸1～105）。

【0410】

配列番号：104～105は、クローン31-12の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：105のアミノ酸1～105）。

【0411】

配列番号：106～107は、クローン31-13の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：107のアミノ酸1～105）。

【0412】

配列番号：108～109は、クローン31-14の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：109のアミノ酸1～105）。

【0413】

配列番号：110～111は、クローン31-15の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：111のアミノ酸1～105）。

【0414】

配列番号：112～113は、クローン31-16の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：113のアミノ酸1～105）。

【0415】

配列番号：114および115は、P1GFの塩基配列およびアミノ酸配列である。

【0416】

配列番号：116および117は、VEGF-Bの塩基配列およびアミノ酸配列である。

【0417】

10

20

30

40

50

配列番号：118および119は、VEGF-Dの塩基配列およびアミノ酸配列である。

【0418】

配列番号：120および121は、VEGF-Eの塩基配列およびアミノ酸配列である。

【0419】

配列番号：122および123は、VNZ2 VEGFの塩基配列およびアミノ酸配列である。

【0420】

配列番号：124および125は、VEGF-Aの塩基配列およびアミノ酸配列である。

【0421】

配列番号：126および127は、VEGF-Bの塩基配列およびアミノ酸配列である。 10

【0422】

配列番号：128～136は、A1～A9断片のアミノ酸配列である。

【0423】

配列番号：137～145は、C1～C9断片のアミノ酸配列である。

【0424】

配列番号：146および147は、VEGF-Aの232アミノ酸がイソ型の塩基配列およびアミノ酸配列である。

【0425】

配列番号：148および149は、fallotinの塩基配列およびアミノ酸配列である。 20

【0426】

配列番号：150および151は、D1701 VEGFの塩基配列およびアミノ酸配列である。

【0427】

配列番号：152および153は、クローン14-9の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：153のアミノ酸1～104）。

【0428】

配列番号：154および155は、クローン23-10の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：155のアミノ酸1～105）。

【0429】

配列番号：156および157は、クローン32-14の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：157のアミノ酸1～105）。 30

【0430】

配列番号：158および159は、クローン52-15の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：159のアミノ酸1～105）。

【0431】

配列番号：160および161は、クローン53-3の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：161のアミノ酸1～103）。

【0432】

配列番号：162および163は、クローン82-7の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：163のアミノ酸1～102）。 40

【0433】

配列番号：164および165は、クローン82-9の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：165のアミノ酸1～104）。

【0434】

配列番号：166および167は、クローン82-11の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：167のアミノ酸1～104）。

【0435】

配列番号：168および169は、クローン82-13の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：169のアミノ酸1～104）。 50

【0436】

配列番号：170および171は、クローン83-15の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：171のアミノ酸1～104）。

【0437】

配列番号：172および173は、クローン84-9の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：173のアミノ酸1～104）。

【0438】

配列番号：174および175は、クローン84-11の塩基配列およびアミノ酸配列である（VEGF受容体結合ドメイン＝配列番号：175のアミノ酸1～104）。

【0439】

本明細書で引用したすべての文献および特許は、それら全体を参考までに本明細書に組み込む。

【0440】

具体的な実施例に沿って本発明を説明してきたが、当業者が様々な変更態様を想到できることは容易に理解されよう。

従って、特許請求の範囲に記載の制限のみが、本願発明に付加されるべきである。

【0441】

【配列表】

S E Q U E N C E L I S T I N G

〈110〉 Ludwig Institute for Cancer Research
Helsinki University Liscensing Ltd. Oy

〈120〉 MATERIALS AND METHODS INVOLVING HYBRID VASCULAR
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR DNAs AND PROTEINS

〈130〉 28967/35977A

〈140〉

〈141〉

〈150〉 US 60/205,331

〈151〉 2000-05-18

〈150〉 US 60/185,205

〈151〉 2000-02-25

〈160〉 175

〈170〉 PatentIn Ver. 2.0

〈210〉 1

〈211〉 990

〈212〉 DNA

〈213〉 Homo sapiens

〈220〉

10

20

30

40

<221> CDS

<222> (57).. (629)

<400> 1

```

cagtgtgtcgc gcggcccgcc gcgagccggc ccggcccgcc tcgggcctcc gaaacc atg      59
                                         Met
                                         1
aac ttt ctg ctg tct tgg gtg cat tgg agc ctc gcc ttg ctg ctc tac      107
Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu Tyr
      5              10              15
ctc cac cat gcc aag tgg tcc cag gct gca ccc atg gca gaa gga gga      155
Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly
      20              25              30
ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aag ttc atg gat gtc tat cag cgc      203
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
      35              40              45
agc tac tgc cat cca atc gag acc ctg gtg gac atc ttc cag gag tac      251
Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr
      50              55              60              65
cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgt gtg ccc ctg atg      299
Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
      70              75              80
cga tgc ggg ggc tgc tgc aat gac gag ggc ctg gag tgt gtg ccc act      347
Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
      85              90              95
gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg cgg atc aaa cct cac caa      395
Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
      100             105             110
ggc cag cac ata gga gag atg agc ttc cta cag cac aac aaa tgt gaa      443

```

10

20

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu
 115 120 125
 tgc aga cca aag aaa gat aga gca aga caa gaa aat ccc tgt ggg cct 491
 Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro
 130 135 140 145
 tgc tca gag cgg aga aag cat ttg ttt gta caa gat ccg cag acg tgt 539
 Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys
 150 155 160
 aaa tgt tcc tgc aaa aac aca gac tcg cgt tgc aag gcg agg cag ctt 587
 Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu
 165 170 175
 gag tta aac gaa cgt act tgc aga tgt gac aag ccg agg cgg 629
 Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 180 185 190
 tgagccgggc aggaggaagg agcctccctc agggtttcgg gaaccagatc tctcaccagg 689
 aaagactgat acagaacgat cgatacagaa accacgctgc cgccaccaca ccatcaccat 749
 cgacagaaca giccttaatc cagaaaccig aaatgaagga agaggagact ctgcgcagag 809
 cactttgggt cgggagggcg agactccggc ggaagcattc ccgggcgggt gaccagcac 869
 ggtccctctt ggaattggat tcgcatcttt attttcttig ctgctaaaac accgagcccg 929
 gaagattaga gagttttatt tctgggattc ctgtagacac accgcggccg ccagcacact 989
 g 990

10

20

<210> 2

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15
 Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
 20 25 30
 Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
 35 40 45
 Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 50 55 60
 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 65 70 75 80
 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
 85 90 95
 Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 100 105 110
 Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 115 120 125
 Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly
 130 135 140
 Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr
 145 150 155 160
 Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
 165 170 175
 Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 180 185 190

10

20

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 3

gacctgggc agaatacatca cgaagtggcg aaat

34

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 4

tcatggatgt ctatcagcgc agctactgcc at

32

<210> 5

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 5

ccgatcgaga cactgggtgga catcttccag gaatagaaga gc

42

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

10

<400> 6

cgctcttcga atacctgat gagatcgagt aca

33

<210> 7

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

20

<400> 7

tcttcaagcc atccigcgtg cccctgatga gatgtggc

38

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 8

ccgggttgct gcaatgacga agggctgg

28

<210> 9

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 9

agtgcgttcc caccgaggag tccaacatca ccatgcagat tatgag

46

<210> 10

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

10

20

<400> 10

aattaaacct caccaagggc agcacatcgg agagatgagc ttt

43

<210> 11

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

oligonucleotide

10

<400> 11

ctccagcata acaaatgiga atgtagacca aagaaagatt gagtcctcgc

50

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

oligonucleotide

<400> 12

ccacttcgtg atgattctgc ccag

24

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 13

tcggatggca gtagctgcgc tgatagacat ccatgaattt ca

42

10

<210> 14

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 14

tcgagctctt ctattcctgg aagaigtcca ccagigtctc ga

42

20

<210> 15

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 15
tggcttgaag atgtactcga tctcatcagg gtattcgaag agcgggtac 48

<210> 16
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 16
catggccaca tctcatcagg ggcacgcagg a 31

<210> 17
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 17
gcactccagc ccttcgtcat tgcagcaacc cgggtac 37

<210> 18
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 18
aatctcata atctgcatgg tgaatgttga ctctcggig ggaac 45

<210> 19
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 19
catctctccg atgtgctgcc ctgggtgagg ttt 33

<210> 20
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 20

ggccgcgaag actcaatctt tctttggctt acattcacat ttgttatgct ggagaaagct 60

<210> 21

<211> 1997

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> CDS

<222> (352)..(1608)

<400> 21

cccgcgccgc ctctccaaaa agctacaccg acgcggaccg cggcggcgic ctccctcgcc 60
ctcgcttcac ctgcgggctt ccgaatgcgg ggagctcggg tgtccggttt cctgtgaggg 120
ttttacciga caccgcgccg ctttccccgg cactggctgg gagggcgccc tgcaaagtig 180
ggaacgcgga gccccggacc cgtccccgcc gcctccggct cgtccagggg gggtcgccgg 240
gaggagcccc ggggagaggg accaggaggg gcccgcgccc tcgcaggggc gcccgcgccc 300
ccacccctgc ccccgccagc ggaccggicc cccacccccg gtctttccac c atg cac 357

Met His

1

ttg ctg ggc ttc ttc tct gtg gcg tgt tct ctg ctc gcc gct gcg ctg 405
Leu Leu Gly Phe Phe Ser Val Ala Cys Ser Leu Leu Ala Ala Ala Leu

5

10

15

20

ctc ccg ggt cct cgc gag gcg ccc gcc gcc gcc gcc gcc ttc gag tcc 453
 Leu Pro Gly Pro Arg Glu Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Phe Glu Ser
 20 25 30
 gga ctc gac ctc tcg gac gcg gag ccc gac gcg ggc gag gcc acg gct 501
 Gly Leu Asp Leu Ser Asp Ala Glu Pro Asp Ala Gly Glu Ala Thr Ala
 35 40 45 50
 tat gca agc aaa gat ctg gag gag cag tta cgg tct gtg tcc agt gta 549
 Tyr Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu Arg Ser Val Ser Ser Val
 55 60 65
 gat gaa ctc atg act gta ctc tac cca gaa tat tgg aaa atg tac aag 597
 Asp Glu Leu Met Thr Val Leu Tyr Pro Glu Tyr Trp Lys Met Tyr Lys
 70 75 80
 tgt cag cta agg aaa gga ggc tgg caa cat aac aga gaa cag gcc aac 645
 Cys Gln Leu Arg Lys Gly Gly Trp Gln His Asn Arg Glu Gln Ala Asn
 85 90 95
 ctc aac tca agg aca gaa gag act ata aaa ttt gct gca gca cat tat 693
 Leu Asn Ser Arg Thr Glu Glu Thr Ile Lys Phe Ala Ala Ala His Tyr
 100 105 110
 aat aca gag atc ttg aaa agt att gat aat gag tgg aga aag act caa 741
 Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys Thr Gln
 115 120 125 130
 tgc atg cca cgg gag gtg tgt ata gat gtg ggg aag gag ttt gga gtc 789
 Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu Phe Gly Val
 135 140 145
 gcg aca aac acc ttc ttt aaa cct cca tgt gtg tcc gtc tac aga tgt 837
 Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr Arg Cys
 150 155 160
 ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc atg aac acc agc acg 885
 Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr Ser Thr

10

20

165	170	175	
agc tac ctc agc aag acg tta ttt gaa att aca gtg cct ctc tct caa			933
Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu Ser Gln			
180	185	190	
ggc ccc aaa cca gta aca atc agt ttt gcc aat cac act tcc tgc cga			981
Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg			
195	200	205	210
tgc atg tct aaa ctg gat gtt tac aga caa gtt cat tcc att att aga			1029
Cys Met Ser Lys Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val His Ser Ile Ile Arg			
215	220	225	
cgt tcc ctg cca gca aca cta cca cag tgt cag gca gcg aac aag acc			1077
Arg Ser Leu Pro Ala Thr Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn Lys Thr			
230	235	240	
tgc ccc acc aat tac atg tgg aat aat cac atc tgc aga tgc ctg gct			1125
Cys Pro Thr Asn Tyr Met Trp Asn Asn His Ile Cys Arg Cys Leu Ala			
245	250	255	
cag gaa gat ttt atg ttt tcc tcg gat gct gga gat gac tca aca gat			1173
Gln Glu Asp Phe Met Phe Ser Ser Asp Ala Gly Asp Asp Ser Thr Asp			
260	265	270	
gga ttc cat gac atc tgt gga cca aac aag gag ctg gat gaa gag acc			1221
Gly Phe His Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu Glu Thr			
275	280	285	290
tgt cag tgt gtc tgc aga gcg ggg ctt cgg cct gcc agc tgt gga ccc			1269
Cys Gln Cys Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys Gly Pro			
295	300	305	
cac aaa gaa cta gac aga aac tca tgc cag tgt gtc tgt aaa aac aaa			1317
His Lys Glu Leu Asp Arg Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys Asn Lys			
310	315	320	
ctc ttc ccc agc caa tgt ggg gcc aac cga gaa ttt gat gaa aac aca			1365

10

20

Leu Phe Pro Ser Gln Cys Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu Asn Thr
 325 330 335
 tgc cag tgt gta tgt aaa aga acc tgc ccc aga aat caa ccc cta aat 1413
 Cys Gln Cys Val Cys Lys Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro Leu Asn
 340 345 350
 cct gga aaa tgt gcc tgt gaa tgt aca gaa agt cca cag aaa tgc ttg 1461
 Pro Gly Lys Cys Ala Cys Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys Cys Leu
 355 360 365 370
 tta aaa gga aag aag ttc cac cac caa aca tgc agc tgt tac aga cgg 1509
 Leu Lys Gly Lys Lys Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr Arg Arg
 375 380 385
 cca tgt acg aac cgc cag aag gct tgt gag cca gga ttt tca tat agt 1557
 Pro Cys Thr Asn Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser Tyr Ser
 390 395 400
 gaa gaa gtg tgt cgt tgt gtc cct tca tat tgg aaa aga cca caa atg 1605
 Glu Glu Val Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp Lys Arg Pro Gln Met
 405 410 415
 agc taagattgta ctgttttcca gtatcatgat ttctattat ggaaaactgt 1658
 Ser

10

gtgcccacag tagaactgtc tgtgaacaga gagacccttg tgggtccatg ctaacaaaga 1718
 caaaagtcig tctttcciga accaigtgga taactttaca gaaaaggact ggagctcatc 1778
 tgcaaaaggc ctcttgtaaa gactgggtttt ctgccaatga ccaaacagcc aagattttcc 1838
 tcttgatgatt tctttaaaag aatgactata taattttatt ccactaaaaa tattgtttct 1898
 gcattcattt ttatagcaac aacaattggt aaaactcact gtgatcaata tttttatac 1958
 atgcaaaaata tgtttaaaat aaaatgaaaa ttgtattat 1997

20

<210> 22

<211> 419

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met His Leu Leu Gly Phe Phe Ser Val Ala Cys Ser Leu Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Pro Gly Pro Arg Glu Ala Pro Ala Ala Ala Ala Phe
 20 25 30
 Glu Ser Gly Leu Asp Leu Ser Asp Ala Glu Pro Asp Ala Gly Glu Ala
 35 40 45
 Thr Ala Tyr Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu Arg Ser Val Ser
 50 55 60
 Ser Val Asp Glu Leu Met Thr Val Leu Tyr Pro Glu Tyr Trp Lys Met
 65 70 75 80
 Tyr Lys Cys Gln Leu Arg Lys Gly Gly Trp Gln His Asn Arg Glu Gln
 85 90 95
 Ala Asn Leu Asn Ser Arg Thr Glu Glu Thr Ile Lys Phe Ala Ala Ala
 100 105 110
 His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys
 115 120 125
 Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu Phe
 130 135 140
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 145 150 155 160
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
 165 170 175
 Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu
 180 185 190
 Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser

10

20

195 200 205
 Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val His Ser Ile
 210 215 220
 Ile Arg Arg Ser Leu Pro Ala Thr Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn
 225 230 235 240
 Lys Thr Cys Pro Thr Asn Tyr Met Trp Asn Asn His Ile Cys Arg Cys
 245 250 255
 Leu Ala Gln Glu Asp Phe Met Phe Ser Ser Asp Ala Gly Asp Asp Ser
 260 265 270
 Thr Asp Gly Phe His Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu
 275 280 285
 Glu Thr Cys Gln Cys Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys
 290 295 300
 Gly Pro His Lys Glu Leu Asp Arg Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys
 305 310 315 320
 Asn Lys Leu Phe Pro Ser Gln Cys Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu
 325 330 335
 Asn Thr Cys Gln Cys Val Cys Lys Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro
 340 345 350
 Leu Asn Pro Gly Lys Cys Ala Cys Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys
 355 360 365
 Cys Leu Leu Lys Gly Lys Lys Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr
 370 375 380
 Arg Arg Pro Cys Thr Asn Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser
 385 390 395 400
 Tyr Ser Glu Glu Val Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp Lys Arg Pro
 405 410 415
 Gln Met Ser

10

20

<210> 23

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 23

gatcctgcac attataatac cgagatcctg aaat

34

<210> 24

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 24

ctattgataa tgagtgagaga aagactcagt gcatg

35

<210> 25

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 25

ccgagagagg tgtgtatcga cgtggggaag gaatagaaga gc

42

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 26

cgctcttcga atttggagtc gcgacaaaca cct

33

<210> 27

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 27

tcttcaagcc accatgtgtg tccgtgtaca gatgtggc

38

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

10

<400> 28

ccgggttgct gcaatagtga ggggctgc

28

<210> 29

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

20

<400> 29

agtgcattgaa cagtcacag agctaccica gcaagacgct gtttga

46

<210> 30

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 30

aattacagtgc cctctctctc aaggcccaa accagtgaca atcagcttt 49

<210> 31

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 31

gccaatcaca cttcctgccg atgcatgtct aagctggatt gagtcttcgc 50

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

10

20

oligonucleotide

<400> 32

ggatctcggg attataatgt gcag

24

<210> 33

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

oligonucleotide

10

<400> 33

tcggcatgca ctgagtcctt cccactcat tatcaataga ttca

45

<210> 34

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

oligonucleotide

<400> 34

tcgagctctt ctattccttc cccacgtcga tacacaccic tc

42

<210> 35
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 35
tggcttgaag aagggtttg tcgcgactcc aaattcgaag agcggtag 48

10

<210> 36
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 36
catggccaca tctgtacacg gacacacatg g 31

20

<210> 37
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 37

gcactgcagc cctcactat tgcagcaacc cgggtac

37

<210> 38

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 38

aatttcaaac agcgtcttgc tgaggtagct cgtggacgtg ttcac

45

<210> 39

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 39

gattgtcact ggtttgggcc cttagagag aggcactgt

39

<210> 40

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

10

<400> 40

ggccgcgaag actcaatcca gcttagacat gcatcggcag gaagtgatg tggcaaagct

60

<210> 41

<211> 5070

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: pSecTagI
Vector

20

<400> 41

gacggatcgg gagaatccc gatccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg

60

ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg ctgtgtgtgt ggaggcgcct gactagtcgc

120

cgagcaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatcgc

180

ttagggtag gcgttttcgc ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt

240

gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata

300

tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgc tggctgaccg cccaacgacc 360
 cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggacittcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgccca ctggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtacggcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggacttic ctacttggca gtacatctac gtattagica 600
 tcgtattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt cttcacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780
 gtaggcgtgt acgggtggag gtctataata gcagagctcg gcgggttga caattaatca 840
 tcggcatagt atatcgcat agtataatc gacaaggiga ggaactaac catggagaca 900
 gacacactcc tgcattgggt actgcgtcgc tgggttcag gtccactgg tgacggggcc 960
 caggatccgt ctcccatgcc gatttgggtc tcgaacaaa actcatctca gaagaggatc 1020
 tgaatagcgc cgtcgaccat catcatcacc atcattgagt ttaaaccgc tgatcagcct 1080
 cgactgtgcc ttctagtgc cagccatcgt ttgtttgcc ctccccgtg ctttcttga 1140
 ccttggaaag tgcactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcat 1200
 gtctgagtag gtgtcattct atttggggg gtgggtggg gcaggacagc aagggggagg 1260
 attgggaaga taatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatggct tctgaggcgg 1320
 aaagaaccag ctggggctct agggggatc cccacggcc ctgtagcggc gcattaagcg 1380
 cggcgggtgt ggtgggtacg cgcagcgtga ccgtacact tgccagcgcc ctagcggccg 1440
 ctcttttcgc tttttccct tctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc 1500
 taaatgggg catcccttta ggttccgat ttagtcttt acggcacctc gaccccaaaa 1560
 aacttgatta ggtgatgtt tcacgtatg ggccatgcc ctgatagacg gtttttcgcc 1620
 ctttgacgtt ggagtcacg ttttttaata gtggactctt gtccaacct ggaacaacac 1680
 tcaacctat ctgggtctat tcttttgatt tataaggat tttggggatt tcggcctatt 1740
 ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaa ttaacgcgaa ttaattctgt ggaatgtgtg 1800
 tcagttaggg tgtggaaagt cccaggtc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca 1860
 tctcaattag tcagcaacca ggtgiggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat 1920
 gcaaagcatg catcicaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaacct cgcccatccc 1980
 gcccctaact ccgcccagtt ccgcccatt tccgcccatt ggctgactaa tttttttat 2040

10

20

ttaigcagag gccgaggccg cctctgccic tgagctatic cagaagtagt gaggaggctt 2100
 ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct cccgggagct tgtatatcca ttttcggatc 2160
 tgaicagcac gtgttgacaa ttaatcatcg gcatagtata tcggcatagt ataatacgac 2220
 aaggtaggga actaaacat ggctaagtg accagtgccg ttcgggtgct caccgcgcgc 2280
 gacgtcggc gacgggtcga gtctggacc gaccggctcg gggttcgccg ggacttcgtg 2340
 gaggacgact tcgccgggtg gtccgggac gacgtgaccc gtgtcatcag cgcgggtccag 2400
 gaccaggigg tgccggacaa caccctggcc tgggtgtggg tgcgcggcct ggacgagctg 2460
 tacgccgagt ggtcggaggc cgtgtccacg aacttcggg acgcttcgg gccggccatg 2520
 accgagatcg gcgagcagcc gtggggggcg gagttcgccc tgcgcgaccc ggccggcaac 2580
 tgcgtgact tcgtggcga ggagcaggac tgacacgtc tacgagatt cgattccacc 2640
 gccgccttct atgaaaggtt gggcttcgga atcgttttc gggacgccgg ctggatgac 2700
 ctccagcgcg gggatctcat gctggagtc ttgccccacc ccaacttgtt tatigcagct 2760
 tataatggtt acaataaag caatagcatc acaaatcca caataaagc attttttca 2820
 ctgcattcta gtgtgggtt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctgtataccg 2880
 tcgacctcta gctagagctt ggcgtaatca tggcatagc gtgttcctgt gtgaaatgt 2940
 tatccgtca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agctgggggt 3000
 gcctaattgag tgagctaaat cacattaatt gcgttcgct cactgccgcg ttccagtcg 3060
 ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcgccaac gcgcggggag aggcgggttg 3120
 cgtattgggc gctcttcgc ttctcgcic actgactgc tgcgtcgggt cgttcggctg 3180
 cggcgagcgg tatcagctca ctcaaggcg gtaatacgtt tatccacaga atcaggggat 3240
 aacgcaggaa agaacatgig agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc 3300
 gcgttcgigg cgttttcca taggcctcgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc 3360
 tcaagtcaga ggtggcgaaa ccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga 3420
 agtccctcg tgcgtctcc gtctcgacc ctgccgtta ccggatactt gtccgccttt 3480
 ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcaa tgcacacgt gtaggtatct cagttcggtg 3540
 taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgtgc 3600
 gccattaccg giaactatcg tcttagatcc aaccggtaa gacacgactt atgccactg 3660
 gcagcagcca ctgtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtc tacagagttc 3720
 ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttgggtat ctgcgtctcg 3780

10

20

ctgaagccag ttaccctcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 3840
 gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgagaaa aaaaggatct 3900
 caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt 3960
 taagggaatt ttgtcatgag attatcaaaa aggaatctta cctagatcct tttaaattaa 4020
 aaatgaagtt ttaaataaat cttaagtata tatgagtaaa ctgggtctga cagttaccaa 4080
 tgcitaaatc gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttctgttcac catagttgcc 4140
 tgactccccg tctgttagat aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct 4200
 gcaatgatac cgcgagaccg acgtcacccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca 4260
 gccggaaggc cggagcgagc aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagctatt 4320
 aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttgtt 4380
 gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tctctgtttg gtatggcttc attcagctcc 4440
 ggttcccaac gatcaaggcg agttacaatg tccccatgt tgtgcaaaa agcgggttagc 4500
 tcttccggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggcgg cagtgttacc actcatggtt 4560
 atggcagcac tgcataatc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt tctgtgact 4620
 ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgtcttgc 4680
 ccggcgtaaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt 4740
 ggaaaacgtt ctccggggcg aaaactctca aggaatctac cgctgttgag atccagttcg 4800
 atgtaacca ctctgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct 4860
 gggtagagca aaacagggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataaggcg gacacggaaa 4920
 tgttgaatac tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt 4980
 ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc 5040
 acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc 5070

10

20

<210> 42

<211> 388

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(385)

<400> 42

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat      49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
          1              5              10
cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag      97
      Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
          15              20              25              30
gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg ccc      145
      Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro
          35              40              45
ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt      193
      Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
          50              55              60
ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa cct      241
      Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro
          65              70              75
cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac aaa      289
      His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
          80              85              90
tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc atc      337
      Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
          95              100              105              110
tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat      385

```

10

20

Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

tga

388

<210> 43

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 43

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr
 20 25 30

Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
 35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
 50 55 60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
 65 70 75 80

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu
 85 90 95

Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 100 105 110

Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 44

<211> 394

10

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(391)

<400> 44

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat	49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr	
1 5 10	
cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag	97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln	
15 20 25 30	
gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtc ccc	145
Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro	
35 40 45	
ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc atg	193
Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met	
50 55 60	
aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca gtg	241
Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val	
65 70 75	
cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat cac	289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His	
80 85 90	

10

20

act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa 337
 Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys
 95 100 105 110
 ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat 385
 Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
 115 120 125
 cat cat tga 394
 His His

10

<210> 45

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 45

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

20

100 105 110
 Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 46
 <211> 391
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(388)

<400> 46
 ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa tct att gat aat gag 49
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
 tgg aga aag act cag tgc atg ccg aga gag gtg tgt atc gac gtg ggg 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly
 15 20 25 30
 aag gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg 145
 Lys Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val
 35 40 45
 tcc gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
 Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
 50 55 60

20

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa 241
 Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
 65 70 75
 cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac 289
 Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn
 80 85 90
 aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc 337
 Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 95 100 105 110
 atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125
 cat tga 391
 His

10

<210> 47

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<400> 47

Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15
 Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu
 20 25 30
 Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val
 35 40 45
 Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro

50 55 60
 Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 65 70 75 80
 Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 85 90 95
 Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 100 105 110
 Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

10

<210> 48
 <211> 397
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(394)

20

<400> 48
 ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa tct att gat aat gag 49
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
 tgg aga aag act cag tgc atg ccg aga gag gtg tgt atc gac gtg ggg 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly
 15 20 25 30

aag gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg 145
Lys Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val
35 40 45
tcc gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
50 55 60
atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca 241
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
65 70 75
gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat 289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
80 85 90
cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa 337
His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln
95 100 105 110
aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
115 120 125
cat cat cat tga 397
His His His

10

20

<210> 49

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 49

Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
1 5 10 15

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

10

<210> 50

<211> 322

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 50

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat      49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
          1              5              10
cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag      97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
  15              20              25              30
gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc      145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
          35              40              45
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt      193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
          50              55              60
ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa cct      241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro
          65              70              75
cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctg cag cat aac aaa      289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
          80              85              90
tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc      322
Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe
          95              100              105

```

10

20

<210> 51

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 51

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

10

<210> 52

<211> 388

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(385)

<400> 52

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat

49

20

Gly	Gln	Asn	His	His	Glu	Val	Val	Lys	Phe	Met	Asp	Val	Tyr			
1				5					10							
cag	cgc	agc	tac	tgc	cat	ccg	atc	gag	aca	ctg	gtg	gac	atc	ttc	cag	97
Gln	Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	Glu	Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	
15				20					25					30		
gaa	ttt	gga	gtc	gcg	aca	aac	acc	ttc	ttc	aag	cca	cca	tgt	gtg	tcc	145
Glu	Phe	Gly	Val	Ala	Thr	Asn	Thr	Phe	Phe	Lys	Pro	Pro	Cys	Val	Ser	
				35					40					45		
gtg	tac	aga	tgt	ggg	ggt	tgc	tgc	aat	gac	gaa	ggg	ctg	gag	tgc	atg	193
Val	Tyr	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Asn	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Met	
				50				55						60		
aac	acg	tcc	acg	agc	tac	ctc	agc	aag	acg	ctg	ttt	gaa	att	aaa	cct	241
Asn	Thr	Ser	Thr	Ser	Tyr	Leu	Ser	Lys	Thr	Leu	Phe	Glu	Ile	Lys	Pro	
				65				70						75		
cac	caa	ggg	cag	cac	atc	gga	gag	atg	agc	ttt	ctc	cag	cat	aac	aaa	289
His	Gln	Gly	Gln	His	Ile	Gly	Glu	Met	Ser	Phe	Leu	Gln	His	Asn	Lys	
				80				85						90		
tgt	gaa	tgt	aga	cca	aag	aaa	gat	ttg	gtc	ttc	gaa	caa	aaa	ctc	atc	337
Cys	Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp	Leu	Val	Phe	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	
				95				100						105		
tca	gaa	gag	gat	ctg	aat	agc	gcc	gtc	gac	cat	cat	cat	cat	cat	cat	385
Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Ser	Ala	Val	Asp	His	His	His	His	His	His	
				115				120						125		
tga																388

<210> 53

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

20

<400> 53

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

10

<210> 54

<211> 388

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(385)

<400> 54

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat	49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr	
1 5 10	
cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag	97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln	
15 20 25 30	
gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc	145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser	
35 40 45	
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt	193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val	
50 55 60	
ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa cct	241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro	
65 70 75	
cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac aaa	289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys	
80 85 90	
tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc atc	337
Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile	
95 100 105 110	
tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat	385
Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His	
115 120 125	
tga	388

10

20

<210> 55
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 55
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15
 Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
 50 55 60
 Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
 65 70 75 80
 Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu
 85 90 95
 Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 100 105 110
 Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

10

20

<210> 56
 <211> 388
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(385)

<400> 56

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat	49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr	
1 5 10	
cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag	97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln	
15 20 25 30	
gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc	145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser	
35 40 45	
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc atg	193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met	
50 55 60	
aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa cct	241
Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro	
65 70 75	
cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac aaa	289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys	
80 85 90	
tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc atc	337
Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile	
95 100 105 110	
tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat	385

10

20

Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

tga

388

<210> 57

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 57

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
 50 55 60

Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro His Gln
 65 70 75 80

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu
 85 90 95

Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 100 105 110

Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 58

<211> 322

10

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 58

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat	49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr	
1 5 10	
cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag	97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln	
15 20 25 30	
gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc	145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser	
35 40 45	
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt	193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val	
50 55 60	
ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa cct	241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro	
65 70 75	
cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act tcc	289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser	
80 85 90	

10

20

tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc
Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe
95 100 105

322

<210> 59
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 59
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
1 5 10 15
Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
20 25 30
Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
35 40 45
Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
50 55 60
Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
65 70 75 80
Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg
85 90 95
Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe
100 105

10

20

<210> 60
<211> 388
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(385)

<400> 60

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat	49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr	
1 5 10	
cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag	97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln	
15 20 25 30	
gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc	145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser	
35 40 45	
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc atg	193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met	
50 55 60	
aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa cct	241
Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro	
65 70 75	
cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act tcc	289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser	
80 85 90	
tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc atc	337
Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile	

10

20

10

20

(400) 61

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

<210> 62
 <211> 388
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(385)

10

<400> 62
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45
 gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
 50 55 60
 ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa cct 241
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro
 65 70 75
 cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act tcc 289

20

His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
 80 85 90
 tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc atc 337
 Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
 95 100 105 110
 tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat 385
 Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125
 tga 388

<210> 63

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 63

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

10

20

100 105 110
 Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 64
 <211> 388
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(385)

<400> 64
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45
 gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc atg 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met
 50 55 60

20

aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa cct 241
 Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro
 65 70 75
 cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act tcc 289
 His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
 80 85 90
 tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc atc 337
 Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
 95 100 105 110
 tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat 385
 Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125
 tga 388

10

<210> 65
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 65
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15
 Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
 50 55 60
 Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro His Gln

20

65 70 75 80
 Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg
 85 90 95
 Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 100 105 110
 Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 66

<211> 394

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(391)

<400> 66

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser

10

20

35	40	45	
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt	193		
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val			
50	55	60	
ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg	241		
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val			
65	70	75	
cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat	289		
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His			
80	85	90	
aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa	337		
Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys			
95	100	105	110
ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat	385		
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His			
115	120	125	
cat cat tga	394		
His His			

10

<210> 67

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<400> 67

Gly	Gln	Asn	His	His	Glu	Val	Val	Lys	Phe	Met	Asp	Val	Tyr	Gln	Arg
1			5					10					15		
Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	Glu	Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Glu	Phe
			20					25					30		

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

10

<210> 68

<211> 394

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

20

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(391)

<400> 68

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

49

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag	97	
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln		
15 20 25 30		
gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc	145	
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser		
35 40 45		
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc atg	193	
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met		
50 55 60		
aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca gtg	241	
Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val		10
65 70 75		
cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat	289	
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His		
80 85 90		
aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa	337	
Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys		
95 100 105 110		
ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat	385	
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His		
115 120 125		20
cat cat tga	394	
His His		

<210> 69

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 69

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

10

<210> 70

<211> 394

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(391)

<400> 70

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gfg gfg aaa ttc atg gat gtc tat	49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr	
1 5 10	
cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gfg gac atc ttc cag	97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln	
15 20 25 30	
gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gfg tcc	145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser	
35 40 45	
gfg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt	193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val	
50 55 60	
ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gfg	241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val	
65 70 75	
cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gfg aca atc agc ttt ctc cag cat	289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His	
80 85 90	
aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa	337
Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys	
95 100 105 110	
ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat	385
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His	
115 120 125	
cat cat tga	394
His His	

10

20

<210> 71
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 71
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15
 Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
 50 55 60
 Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80
 Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
 85 90 95
 Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
 100 105 110
 Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

10

20

<210> 72
 <211> 394
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(391)

<400> 72

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat      49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
          1             5             10
cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag      97
      Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
          15             20             25             30
gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc      145
      Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
          35             40             45
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc atg      193
      Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met
          50             55             60
aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca gtg      241
      Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val
          65             70             75
cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat      289
      Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
          80             85             90
aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa      337
      Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys
          95             100             105             110
ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat      385

```

10

20

Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
 115 120 125
 cat cat tga
 His His

394

<210> 73
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10

<400> 73
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15
 Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
 50 55 60
 Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80
 Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
 85 90 95
 Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
 100 105 110
 Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

20

<210> 74

<211> 394
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(391)

<400> 74
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45
 gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
 50 55 60
 ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
 65 70 75
 cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat cac 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His

10

20

80	85	90	
act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg aat ttg gtc ttc gaa caa aaa	337		
Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asn Leu Val Phe Glu Gln Lys			
95	100	105	110
ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat	385		
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His			
115	120	125	
cat cat tga	394		
His His			

10

<210> 75

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 75

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg	
1	5
Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe	
20	25
Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr	
35	40
Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr	
50	55
Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu	
65	70
Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser	
85	90
Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asn Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile	

20

100 105 110
 Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 76
 <211> 328
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(322)

<400> 76
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45
 gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc atg 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met
 50 55 60

20

aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca gtg 241
 Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val
 65 70 75
 cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gig aca atc agc ttt gcc aat cac 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His
 80 85 90
 act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtcctc 328
 Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu
 95 100 105

10

<210> 77

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 77

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

20

100

105

<210> 78

<211> 394

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(391)

<400> 78

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat	49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr	
1 5 10	
cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag	97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln	
15 20 25 30	
gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc	145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser	
35 40 45	
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt	193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val	
50 55 60	
ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg	241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val	

10

20

65 70 75
 cct ctc tct caa ~~ggg~~ ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat cac 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His
 80 85 90
 act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa 337
 Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys
 95 100 105 110
 ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat 385
 Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
 115 120 125
 cat cat tga 394
 His His

10

<210> 79

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 79

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15
 Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
 50 55 60
 Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80

20

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
 85 90 95
 Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
 100 105 110
 Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 80

<211> 392

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(169)

<400> 80

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45

20

gtg tac aga tgt ggg ttg ctg caa tagtgagggg ctgcagtgca tgaacacgtc 199
Val Tyr Arg Cys Gly Leu Leu Gln
50
cacgagctac ctacgcaaga cgctgtttga aattacagtg cctctctctc aagggcccaa 259
accagtgaca atcagctttg ccaatcacac ttcttgccga tgcatgtctc agctggattt 319
ggctttcgaa caaaaactca tctcagaaga ggaatctgaat agcgccgtcg accatcatca 379
tcatcatcat tga 392

<210> 81

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 81

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
1 5 10 15
Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
20 25 30
Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
35 40 45
Arg Cys Gly Leu Leu Gln
50

<210> 82

<211> 391

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

20

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(388)

<400> 82

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag	49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu	
1 5 10	
tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc	97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe	
15 20 25 30	
cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg	145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val	
35 40 45	
ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc	193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys	
50 55 60	
gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa	241
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys	
65 70 75	
cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac	289
Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn	
80 85 90	
aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc	337
Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu	
95 100 105 110	
atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat	385

10

20

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125

cat tga
 His

391

<210> 83
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 83
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15
 Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 20 25 30
 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 35 40 45
 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
 50 55 60
 Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 65 70 75 80
 Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 85 90 95
 Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 100 105 110
 Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 84

10

20

<211> 391
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(388)

<400> 84
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
 tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30
 cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45
 ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
 50 55 60
 atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa 241
 Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys
 65 70 75
 cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac 289
 Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn

10

20

80	85	90	
aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc			337
Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu			
95	100	105	110
atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat			385
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His			
115	120	125	
cat tga			391
His			

10

<210> 85

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 85

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

20

100 105 110
 Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 86
 <211> 391
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(388)

<400> 86
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
 tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30
 cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45
 ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
 50 55 60

20

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa 241
 Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
 65 70 75
 cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac 289
 Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn
 80 85 90
 aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc 337
 Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 95 100 105 110
 atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125
 cat tga 391
 His

10

<210> 87

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 87

20

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15
 Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 20 25 30
 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 35 40 45
 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro
 50 55 60

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 65 70 75 80
 Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 85 90 95
 Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 100 105 110
 Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 88

<211> 391

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(388)

<400> 88

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
 tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30
 cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145

10

20

Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45
 ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
 50 55 60
 atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa 241
 Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys
 65 70 75
 cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac 289
 Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn
 80 85 90
 aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc 337
 Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 95 100 105 110
 atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125
 cat tga 391
 His

10

<210> 89

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 89

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15
 Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu

20

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

10

<210> 90

<211> 391

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

20

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(388)

<400> 90

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu

49

1	5	10	
15	20	25	30
35	40	45	
50	55	60	
65	70	75	
80	85	90	
95	100	105	110
115	120	125	

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
 gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa 241
 Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
 cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act 289
 Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr
 tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc 337
 Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 cat tga 391
 His

10

20

<210> 91

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 91

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

10

<210> 92

<211> 391

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(388)

<400> 92

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag	49	
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu		
1 5 10		
tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc	97	
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe		
15 20 25 30		
cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg	145	
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val		10
35 40 45		
ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc	193	
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys		
50 55 60		
atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa	241	
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys		
65 70 75		
cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act	289	
Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr		20
80 85 90		
tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc	337	
Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu		
95 100 105 110		
atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat	385	
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His		
115 120 125		
cat tga	391	
His		

<210> 93
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 93
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15
 Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 20 25 30
 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 35 40 45
 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn
 50 55 60
 Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro His
 65 70 75 80
 Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys
 85 90 95
 Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 100 105 110
 Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

10

20

<210> 94
 <211> 391
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(388)

<400> 94

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gig gtg aaa tct att gat aat gag      49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
          1             5             10
tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc      97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
    15             20             25             30
cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg      145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
          35             40             45
ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc      193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
          50             55             60
gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa      241
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
          65             70             75
cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act      289
Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr
          80             85             90
tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc      337
Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
    95             100             105             110

```

10

20

atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125
 cat tga 391
 His

<210> 95

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<400> 95

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

20

<210> 96
 <211> 391
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(388)

10

<400> 96
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
 tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30
 cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45
 ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
 50 55 60
 atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa 241
 Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys
 65 70 75
 cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act 289

20

Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr
 80 85 90
 tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc 337
 Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 95 100 105 110
 atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125
 cat tga 391
 His

10

<210> 97

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 97

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

20

Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 100 105 110
 Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 98

<211> 397

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(394)

<400> 98

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag	49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu	
1 5 10	
tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc	97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe	
15 20 25 30	
cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg	145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val	
35 40 45	
ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc	193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys	

10

20

50	55	60	
ggt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca	241		
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr			
65	70	75	
gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag	289		
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln			
80	85	90	
cat aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa	337		
His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln			
95	100	105	110
aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat	385		
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His			
115	120	125	
cat cat cat tga	397		
His His His			

10

<210> 99

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<400> 99

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
1 5 10 15
Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
20 25 30
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
35 40 45
Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro

50 55 60
 Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro
 65 70 75 80
 Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn
 85 90 95
 Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 100 105 110
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125
 His

10

<210> 100

<211> 397

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(394)

<400> 100

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
 tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97

20

Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30
 cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45
 ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
 50 55 60
 atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca 241
 Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
 65 70 75
 gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag 289
 Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln
 80 85 90
 cat aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa 337
 His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln
 95 100 105 110
 aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
 Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
 115 120 125
 cat cat cat tga 397
 His His His

10

20

<210> 101

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 101

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

10

<210> 102

<211> 397

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

20

<222> (8)..(394)

<400> 102

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag	49	
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu		
1 5 10		
tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc	97	
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe		
15 20 25 30		
cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg	145	
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val		10
35 40 45		
ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc	193	
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys		
50 55 60		
gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca	241	
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr		
65 70 75		
gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag	289	
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln		20
80 85 90		
cat aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa	337	
His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln		
95 100 105 110		
aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat	385	
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His		
115 120 125		
cat cat cat tga	397	
His His His		

<210> 103
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 103
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15
 Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 20 25 30
 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 35 40 45
 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro
 50 55 60
 Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro
 65 70 75 80
 Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn
 85 90 95
 Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 100 105 110
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125
 His

10

20

<210> 104
 <211> 397
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(394)

<400> 104

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag	49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu	
1 5 10	
tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc	97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe	
15 20 25 30	
cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg	145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val	
35 40 45	
ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc	193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys	
50 55 60	
atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca	241
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr	
65 70 75	
gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag	289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln	
80 85 90	
cat aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa	337

10

20

His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln
 95 100 105 110
 aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
 Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
 115 120 125
 cat cat cat tga 397
 His His His

<210> 105

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<400> 105

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

20

115 120 125
His

<210> 106
<211> 397
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
<221> CDS
<222> (8)..(394)

<400> 106
ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30
cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45
ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
 50 55 60

10

20

```

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca 241
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr
      65              70              75
gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat 289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
      80              85              90
cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa 337
His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln
      95              100             105             110
aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
      115             120             125
cat cat cat tga 397
His His His

```

10

<210> 107

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 107

```

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
  1              5              10             15
Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
      20              25              30
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
      35              40              45
Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
      50              55              60

```

20

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro
 65 70 75 80
 Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr
 85 90 95
 Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 100 105 110
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125
 His

10

<210> 108

<211> 397

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(394)

20

<400> 108

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
 tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe

15	20	25	30	
cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg	145			
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val				
35	40	45		
ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc	193			
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys				
50	55	60		
atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca	241			
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr				
65	70	75		
gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat	289			
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn				
80	85	90		
cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa	337			
His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln				
95	100	105	110	
aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat	385			
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His				
115	120	125		
cat cat cat tga	397			
His His His				

10

20

<210> 109

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 109

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg

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

10

<210> 110

<211> 397

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(394)

<400> 110

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag      49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
          1              5              10
tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc      97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
    15              20              25              30
cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg      145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
          35              40              45
ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc      193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
          50              55              60
gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca      241
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr
          65              70              75
gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat      289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
          80              85              90
cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa      337
His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln
          95              100              105              110
aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat      385
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
          115              120              125
cat cat cat tga      397
His His His

```

10

20

<210> 111
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 111
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15
 Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 20 25 30
 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 35 40 45
 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro
 50 55 60
 Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro
 65 70 75 80
 Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr
 85 90 95
 Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 100 105 110
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125
 His

10

20

<210> 112
 <211> 397
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(394)

<400> 112

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag      49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
          1             5             10
tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc      97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
    15             20             25             30
cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg      145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
          35             40             45
ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc      193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
          50             55             60
atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca      241
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
          65             70             75
gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat      289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
          80             85             90
cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa      337
His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln

```

10

20

95 100 105 110
 aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
 Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
 115 120 125
 cat cat cat tga 397
 His His His

<210> 113

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<400> 113

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

20

His

<210> 114

<211> 1645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (322)..(768)

<220>

<400> 114

gggattcggg ccgcccagct acgggaggac ctggagtggc actgggcgcc cgacggacca	60
tccccgggac ccgcttgcgc ctggcgcccc cgccccgcgc ggccgctccc cgtcgggttc	120
cccagccaca gccitacctt cgggctccctg actccgcaag gcctccagaa gatgctcgaa	180
ccaccggccg gggcctcggg gcagcagtga gggaggcgtc cagcccccca ctacgtcttt	240
ctctctcgtt gccaggggct cccccgggga tgagcatggt ggttttcctt cggagccccc	300
tggctcggga cgtcigagaa g atg ccg gtc atg agg ctg ttc cct tgc ttc	351
Met Pro Val Met Arg Leu Phe Pro Cys Phe	
1 5 10	
ctg cag ctg ctg gcc ggg ctg gcg ctg cct gct gtg ccc ccc cag cag	399
Leu Gln Leu Leu Ala Gly Leu Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln	
15 20 25	
tgg gcc ttg tct gct ggg aac ggc tcg tca gag gtg gaa gtg gta ccc	447
Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro	

10

20

30	35	40	
ttc cag gaa gtg tgg ggc cgc agc tac tgc cgg gcg ctg gag agg ctg	495		
Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu			
45	50	55	
gtg gac gtc gtg tcc gag tac ccc agc gag gtg gag cac atg ttc agc	543		
Val Asp Val Val Ser Glu Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser			
60	65	70	
cca tcc tgt gtc tcc ctg ctg cgc tgc acc ggc tgc tgc ggc gat gag	591		
Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu			
75	80	85	90
aat ctg cac tgt gtg ccg gtg gag acg gcc aat gtc acc atg cag ctc	639		
Asn Leu His Cys Val Pro Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu			
95	100	105	
cta aag atc cgt tct ggg gac cgg ccc tcc tac gtg gag ctg acg ttc	687		
Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe			
110	115	120	
tct cag cac gtt cgc tgc gaa tgc cgg cct ctg cgg gag aag atg aag	735		
Ser Gln His Val Arg Cys Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys			
125	130	135	
ccg gaa agg tgc ggc gat gct gtt ccc cgg agg taaccacccc ctggaggag	788		
Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg			
140	145		
agagaccccc caccggctc gtgtatttat taccgtcaca ctcttcagtg actcctgctg	848		
giacctgccc tctatttatt agccaactgt ttcctgctg aatgcctcgc tcccttaag	908		
acgaggggca ggaaggaca ggaccctcag gaattcagtg ccttcaacaa cgtgagagaa	968		
agagagaagc cagccacaga cccctgggag ctccgccttt gaaagaagca agacacgtgg	1028		
cctcgtgagg ggcaagctag gcccagagg cctggaggt ctccaggggc ctgcagaagg	1088		
aaagaagggg gcccgtctac ctgttcttgg gcctcaggct ctgcacagac aagcagccct	1148		
tgctttcggg gctcctgtcc aaagttagga tgcggattct gctggggccg ccacggcctg	1208		

10

20

gttgtgggaa ggccggcagc gggcggagg gattcagcca ctccccctc ttcttctgaa 1268
 gatcagaaca ttacgtctcg gagaacagtg gtgcctggg ggcttttgcc actccttgtc 1328
 ccccgatgac tccccacaca ctttgccatt tgcctgtact gggacattgt tctttccggc 1388
 cgaggtgcca ccacctgcc ccactaaga gacacataca gattggggcc cgggctggag 1448
 aaagagctgc cggatgaga aacagctcag ccagtgggga tgaggtcacc aggggaggag 1508
 cctgtgcgic ccagctgaag gcagtggcag gggagcaggt tccccaagg ccctggcacc 1568
 ccacaagct gtccctgcag ggccatciga ctgccaagcc agattctctt gaataaagta 1628
 ttctagtgtg gaaacgc 1645

<210> 115

<211> 149

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 115

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

20

Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys
 115 120 125
 Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp
 130 135 140
 Ala Val Pro Arg Arg
 145

<210> 116

<211> 570

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(570)

<400> 116

acc atg agc cct ctg ctc cgc cgc ctg ctg ctc gcc gca ctc ctg cag 48
 Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln
 1 5 10 15
 ctg gcc ccc gcc cag gcc cct gtc tcc cag cct gat gcc cct ggc cac 96
 Leu Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His
 20 25 30
 cag agg aaa gtg gtg tca tgg ata gat gtg tat act cgc gct acc tgc 144
 Gln Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys
 35 40 45
 cag ccc cgg gag gtg gtg gtg ccc ttg act gtg gag ctc atg ggc acc 192
 Gln Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr
 50 55 60

20

gtg gcc aaa cag ctg gtg ccc agc tgc gtg act gtg cag cgc tgt ggt 240
 Val Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly
 65 70 75
 ggc tgc tgc cct gac gat ggc ctg gag tgt gtg ccc act ggg cag cac 288
 Gly Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His
 80 85 90 95
 caa gtc cgg atg cag atc ctc atg atc cgg tac ccg agc agt cag ctg 336
 Gln Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu
 100 105 110
 ggg gag atg tcc ctg gaa gaa cac agc cag tgt gaa tgc aga cct aaa 384
 Gly Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys
 115 120 125
 aaa aag gac agt gct gtg aag cca gac agc ccc agg ccc ctc tgc cca 432
 Lys Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Ser Pro Arg Pro Leu Cys Pro
 130 135 140
 cgc tgc acc cag cac cac cag cgc cct gac ccc cgg acc tgc cgc tgc 480
 Arg Cys Thr Gln His His Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Cys Arg Cys
 145 150 155
 cgc tgc cga cgc cgc agc ttc ctc cgt tgc caa ggg cgg ggc tta gag 528
 Arg Cys Arg Arg Arg Ser Phe Leu Arg Cys Gln Gly Arg Gly Leu Glu
 160 165 170 175
 ctc aac cca gac acc tgc agg tgc cgg aag ctg cga agg tga 570
 Leu Asn Pro Asp Thr Cys Arg Cys Arg Lys Leu Arg Arg
 180 185

10

20

<210> 117

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
 20 25 30
 Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
 35 40 45
 Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
 50 55 60
 Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
 65 70 75 80
 Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
 85 90 95
 Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
 100 105 110
 Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
 115 120 125
 Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Ser Pro Arg Pro Leu Cys Pro Arg
 130 135 140
 Cys Thr Gln His His Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Cys Arg Cys Arg
 145 150 155 160
 Cys Arg Arg Arg Ser Phe Leu Arg Cys Gln Gly Arg Gly Leu Glu Leu
 165 170 175
 Asn Pro Asp Thr Cys Arg Cys Arg Lys Leu Arg Arg
 180 185

10

20

<210> 118

<211> 2029

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (411)..(1472)

<400> 118

```

gttgggttcc agctttctgt agctgtaagc attggtggcc acaccacctc cttacaaagc   60
aactagaacc tgcggcatac attggagaga ttttttaaat ttctggaca tgaagtaaat   120
ttagagtgtt ttctaatttc aggtagaaga catgtccacc ttctgattat ttttggagaa   180
cattttgatt tttttcatct ctctctcccc acccctaaga ttgtgcaaaa aaagcgtacc   240
ttgcctaatt gaaataattt cattggattt tgatcagaac tgattatttg gttttctgtg   300
tgaagttttg aggtttcaaa ctttcttctt ggagaatgcc ttttgaaaca attttctcta   360
gctgcctgat gtcaactgct tagtaatcag tggatatiga aatattcaaa atg tac     416

```

Met Tyr

1

```

aga gag tgg gta gtg gtg aat gtt ttc atg atg ttg tac gtc cag ctg   464
Arg Glu Trp Val Val Val Asn Val Phe Met Met Leu Tyr Val Gln Leu

```

5

10

15

```

gtg cag ggc tcc agt aat gaa cat gga cca gtg aag cga tca tct cag   512
Val Gln Gly Ser Ser Asn Glu His Gly Pro Val Lys Arg Ser Ser Gln

```

20

25

30

```

tcc aca ttg gaa cga tct gaa cag cag atc agg gct gct tct agt ttg   560
Ser Thr Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser Ser Leu

```

35

40

45

50

```

gag gaa cta ctt cga att act cac tct gag gac tgg aag ctg tgg aga   608
Glu Glu Leu Leu Arg Ile Thr His Ser Glu Asp Trp Lys Leu Trp Arg

```

55

60

65

10

20

tgc agg ctg agg ctc aaa agt ttt acc agt atg gac tct cgc tca gca	656
Cys Arg Leu Arg Leu Lys Ser Phe Thr Ser Met Asp Ser Arg Ser Ala	
70 75 80	
tcc cat cgg tcc act agg ttt gcg gca act ttc tat gac att gaa aca	704
Ser His Arg Ser Thr Arg Phe Ala Ala Thr Phe Tyr Asp Ile Glu Thr	
85 90 95	
cta aaa gtt ata gat gaa gaa tgg caa aga act cag tgc agc cct aga	752
Leu Lys Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Thr Gln Cys Ser Pro Arg	
100 105 110	
gaa acg tgc gtg gag gtg gcc agt gag ctg ggg aag agt acc aac aca	800
Glu Thr Cys Val Glu Val Ala Ser Glu Leu Gly Lys Ser Thr Asn Thr	
115 120 125 130	
ttc ttc aag ccc cct tgt gtg aac gtg ttc cga tgt ggt ggc tgt tgc	848
Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg Cys Gly Gly Cys Cys	
135 140 145	
aat gaa gag agc ctt atc tgt atg aac acc agc acc tcg tac att tcc	896
Asn Glu Glu Ser Leu Ile Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Ile Ser	
150 155 160	
aaa cag ctc ttt gag ata tca gtg cct ttg aca tca gta cct gaa tta	944
Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro Glu Leu	
165 170 175	
gtg cct gtt aaa gtt gcc aat cat aca ggt tgt aag tgc ttg cca aca	992
Val Pro Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu Pro Thr	
180 185 190	
gcc ccc cgc cat cca tac tca att atc aga aga tcc atc cag atc cct	1040
Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln Ile Pro	
195 200 205 210	
gaa gaa gat cgc tgt tcc cat tcc aag aaa ctc tgt cct att gac atg	1088
Glu Glu Asp Arg Cys Ser His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile Asp Met	

10

20

215	220	225	
cta tgg gat agc aac aaa tgt aaa tgt gtt ttg cag gag gaa aat cca			1136
Leu Trp Asp Ser Asn Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Glu Glu Asn Pro			
230	235	240	
cit gct gga aca gaa gac cac tct cat ctc cag gaa cca gct ctc tgt			1184
Leu Ala Gly Thr Glu Asp His Ser His Leu Gln Glu Pro Ala Leu Cys			
245	250	255	
ggg cca cac atg atg ttt gac gaa gat cgt tgc gag tgt gtc tgt aaa			1232
Gly Pro His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val Cys Lys			
260	265	270	
aca cca tgt ccc aaa gat cta atc cag cac ccc aaa aac tgc agt tgc			1280
Thr Pro Cys Pro Lys Asp Leu Ile Gln His Pro Lys Asn Cys Ser Cys			
275	280	285	290
ttt gag tgc aaa gaa agt ctg gag acc tgc tgc cag aag cac aag cta			1328
Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Thr Cys Cys Gln Lys His Lys Leu			
295	300	305	
ttt cac cca gac acc tgc agc tgt gag gac aga tgc ccc ttt cat acc			1376
Phe His Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe His Thr			
310	315	320	
aga cca tgt gca agt ggc aaa aca gca tgt gca aag cat tgc cgc ttt			1424
Arg Pro Cys Ala Ser Gly Lys Thr Ala Cys Ala Lys His Cys Arg Phe			
325	330	335	
cca aag gag aaa agg gct gcc cag ggg ccc cac agc cga aag aat cct			1472
Pro Lys Glu Lys Arg Ala Ala Gln Gly Pro His Ser Arg Lys Asn Pro			
340	345	350	
tgattcagcg ttccaagttc cccatccctg tcatttttaa cagcatgctg ctttgccaag			1532
ttgctgtcac tgttttttc ccaggtgita aaaaaaaaaat ccattttaca cagcaccaca			1592
gtgaatccag accaaccttc cattcacacc agctaaggag tccciggttc attgatggat			1652
gtcttctagc tgcagatgcc tctgcgcacc aaggaatgga gaggagggga cccatgtaat			1712

10

20

```

ccttttggtt agttttggtt ttgttttttg gtgaatgaga aagggtgtgt ggtcatggaa 1772
tggcagggtt cataatgactg attactcaga gcagatgagg aaaactgtag tctctgagtc 1832
ctttgctaata cgcaactctt gtgaattatt ctgattcttt tttatgcaga atttgattcg 1892
tatgatcagt actgactttc tgattactgt ccagcttata gtcttccagt ttaatgaact 1952
accatctgat gtttcataat taagtgtatt taaagaaaaa aaacaccatt attcaagcca 2012
aaaaaaaaa aaaaaaa 2029

```

<210> 119

<211> 354

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 119

```

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

```

20

Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg Cys Gly Gly
 130 135 140
 Cys Cys Asn Glu Glu Ser Leu Ile Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr
 145 150 155 160
 Ile Ser Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro
 165 170 175
 Glu Leu Val Pro Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu
 180 185 190
 Pro Thr Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln
 195 200 205
 Ile Pro Glu Glu Asp Arg Cys Ser His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile
 210 215 220
 Asp Met Leu Trp Asp Ser Asn Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Glu Glu
 225 230 235 240
 Asn Pro Leu Ala Gly Thr Glu Asp His Ser His Leu Gln Glu Pro Ala
 245 250 255
 Leu Cys Gly Pro His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val
 260 265 270
 Cys Lys Thr Pro Cys Pro Lys Asp Leu Ile Gln His Pro Lys Asn Cys
 275 280 285
 Ser Cys Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Thr Cys Cys Gln Lys His
 290 295 300
 Lys Leu Phe His Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe
 305 310 315 320
 His Thr Arg Pro Cys Ala Ser Gly Lys Thr Ala Cys Ala Lys His Cys
 325 330 335
 Arg Phe Pro Lys Glu Lys Arg Ala Ala Gln Gly Pro His Ser Arg Lys
 340 345 350
 Asn Pro

10

20

<210> 120
 <211> 1830
 <212> DNA
 <213> Orf virus

<220>
 <221> CDS
 <222> (312)..(755)

<400> 120
 cggccacgcg gccgcgaact gcgcgctcgc gcgcgtggcg accgcgctga cgcgccgcgt 60
 gcccgcgagc cggcacggcc tcgcggaggg cggcacgccg ccgtggacgc tgcgtgtggc 120
 ggtggccgcg gtggcggcgc tcggcgtggc ggcaatttcg ctgctgcgcc gcgcgctaag 180
 aatacgggtt agatactcaa agtctatcca gacacttaga gtgtaacttt gagtaaaaaa 240
 tgtaataact aacgccaaaa ttctgatagt tgtaagcaa tatataacat ttttaaaacg 300
 tcataccag c atg aag tta aca gct acg tta caa gtt gtt gtt gca ttt 350
 Met Lys Leu Thr Ala Thr Leu Gln Val Val Val Ala Leu
 1 5 10
 tta ata tgt atg tat aat ttg cca gaa tgc gtg tct cag agt aat gat 398
 Leu Ile Cys Met Tyr Asn Leu Pro Glu Cys Val Ser Gln Ser Asn Asp
 15 20 25
 tca cct cct tca acc aat gac tgg atg cgt aca cta gac aaa agt ggt 446
 Ser Pro Pro Ser Thr Asn Asp Trp Met Arg Thr Leu Asp Lys Ser Gly
 30 35 40 45
 tgt aaa cct aga gat act gtt gtt tat ttg gga gaa gaa tat cca gaa 494
 Cys Lys Pro Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Pro Glu
 50 55 60

10

20

agc act aac cta caa tat aat ccc cgg tgc gta act gtt aaa cga tgc 542
 Ser Thr Asn Leu Gln Tyr Asn Pro Arg Cys Val Thr Val Lys Arg Cys
 65 70 75
 agt ggt tgc tgt aac ggt gac ggt caa ata tgt aca gcg gtt gaa aca 590
 Ser Gly Cys Cys Asn Gly Asp Gly Gln Ile Cys Thr Ala Val Glu Thr
 80 85 90
 aga aat aca act gta aca gtt tca gta acc ggc gtg tct agt tgc tct 638
 Arg Asn Thr Thr Val Thr Val Ser Val Thr Gly Val Ser Ser Ser Ser
 95 100 105
 ggt act aat agt ggt gta tct act aac ctt caa aga ata agt gtt aca 686
 Gly Thr Asn Ser Gly Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Ile Ser Val Thr
 110 115 120 125
 gaa cac aca aag tgc gat tgt att ggt aga aca acg aca aca cct acg 734
 Glu His Thr Lys Cys Asp Cys Ile Gly Arg Thr Thr Thr Thr Pro Thr
 130 135 140
 acc act agg gaa cct aga cga taactaataa caaaaaatgt ttatttttgt 785
 Thr Thr Arg Glu Pro Arg Arg
 145
 aaatacttaa ttattacaca ctttacaata atctcaaaaa taaattgcgt gcccgacgg 845
 ctgcagctgg tgacgtgct gtgtcacaca ctgcgtattc gattcaagtt cactaacgcc 905
 actaaactag ttgtgcgtgt ccgagtggt accgtacgtc aaactaacat cttacctgtc 965
 cgtgacaaga actaaaacti gaaccacata tttttaaggt atatttaaca aaatcactca 1025
 cactcacaca atcataaaca ccacaaccac aaccaaacac gcatgagaat taatattctt 1085
 acttatccgt aacactctat gctgtacatc aacgcatcag agcagtciga gtcgtactaa 1145
 tggcggcaaa cgggaacgca ggccgcgacat aatcactgag aatciccga gcaaccgctc 1205
 aaggacatct ctacgcgtaa cggctgtttg tcatccccc gtgtgttcat ctacacacgac 1265
 attgtgaccg tcgcaaagca cacattcaaa gtgccgcatg tggaagaatt caccgtcgag 1325
 acacacacca taattaaaca agatcagtcg ataagagaga ttagcattct acagcacacc 1385
 acgtgcgaat acggacctcg taattgttta gactagaaca cctctggctt aaacaacatg 1445

10

20


```

tccgacitaa gaacagagtt tatgacgcat atgtaactgt gtctttatg tagaagttat 1505
cttttatgtc actcccttgt cttagatgag ttatacatga catgatgtat gtgtcgcccg 1565
cggcggcgcg gggcgctcgg cggcggggct gctgcgcgcg gcgggcccgc ggtggcggcg 1625
gctggcgcgcg cgctgcggcc gcggcgcgcg ggcgggtag cggcccgccc gcccggcgcg 1685
ccgccgcagc ccttgccccg gaccaggcgc cacggagcaa agtgaaaaag gaccgcctag 1745
cagtcgagac cctcccgccg cagccgcgac accccacacc cgccttccac ccgccagacg 1805
ccaacaccac agccaacaag catgc 1830

```

<210> 121

<211> 148

<212> PRT

<213> Orf virus

<400> 121

```

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

```

10

20

115 120 125
 Lys Cys Asp Cys Ile Gly Arg Thr Thr Thr Thr Pro Thr Thr Thr Arg
 130 135 140
 Glu Pro Arg Arg
 145

<210> 122
 <211> 851
 <212> DNA
 <213> Orf virus

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (2)..(223)

<400> 122
 c ggc cac gcg gcc gcg aac tgc gcg ctc gcg cgc gtg gcg acc gcg ctg 49
 Gly His Ala Ala Ala Asn Cys Ala Leu Ala Arg Val Ala Thr Ala Leu
 1 5 10 15
 acg cgc cgc gtg ccc gcg agc cgg cac ggc ctc gcg gag ggc ggc acg 97
 Thr Arg Arg Val Pro Ala Ser Arg His Gly Leu Ala Glu Gly Gly Thr
 20 25 30
 ccg ccg tgg acg ctg ctg ctg gcg gtg gcc gcg gtg acg gtg ctc ggc 145
 Pro Pro Trp Thr Leu Leu Leu Ala Val Ala Ala Val Thr Val Leu Gly
 35 40 45
 gtg gtg gcg gtt tca ctg ctg cgg cgc gcg ctg cgg gta cgc tac cgc 193
 Val Val Ala Val Ser Leu Leu Arg Arg Ala Leu Arg Val Arg Tyr Arg
 50 55 60
 ttc gcg cgg ccg gcc gcg ctg cgc gcg tag ccgcgcaaaa tgtaaattat 243

20

Phe Ala Arg Pro Ala Ala Leu Arg Ala

65	70	
aacgccaac	ttttaagggt	gaggcgccat gaagttgctc gtcggcatac tagtagccgt 303
gtgcttgca	cagtaicgc	tgaacgcgga cagcaacacg aaaggatggt ccgaagtgt 363
gaaaggcag	cagtgcaagc	ciaggccgat tgttgttctt gtaagcgaga cgcacccaga 423
gctgacttct	cagcgggtca	acccgccgtg tgtcacgttg atgcgatgcg gcgggtgctg 483
caacgacgag	agcttggaat	gcgtcccccac ggaagaagta aacgtgagca tggaaactcct 543
ggggcgctcg	ggctccggta	gtaacgggat gcaacgtctg agcttcgtag agcataagaa 603
atgcgatgtg	agaccacgat	tcacaaccac gccaccgacg accacaaggc cggccagaag 663
acgccgctag	aactttttat	ggaccgcaga tccaaacgat ggatgcgac aggtacatgc 723
ggaagaaggc	gccacggagc	aaagtgaata aggaccgcct agcagtcgag accctccgcg 783
cgcagccgcg	gacacccacc	acccgccttc caccgccag acgccaacac cgcagccaac 843
aagcatgc		851

10

<210> 123

<211> 73

<212> PRT

<213> Orf virus

<400> 123

Gly His Ala Ala Ala Asn Cys Ala Leu Ala Arg Val Ala Thr Ala Leu

20

1	5	10	15

Thr Arg Arg Val Pro Ala Ser Arg His Gly Leu Ala Glu Gly Gly Thr

20	25	30

Pro Pro Trp Thr Leu Leu Leu Ala Val Ala Ala Val Thr Val Leu Gly

35	40	45

Val Val Ala Val Ser Leu Leu Arg Arg Ala Leu Arg Val Arg Tyr Arg

50	55	60

Phe Ala Arg Pro Ala Ala Leu Arg Ala

65

70

<210> 124

<211> 2305

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (404)..(991)

<400> 124

```

ttcttggggc tgaigtccgc aaatatgcag aattaccggc cgggtcgcctc ctgaagccag   60
cgcggggagc gagcgcgccg gcggccagca ccgggaacgc accgaggaag aagcccagcc   120
ccccccctcc gccccttccg tccccacccc ctaccggcg gccagaggagg ctccccggct   180
gcggcgcgca ciccctgttt ctctctctcc tggctggcgc tggctgcttc tccgcactca   240
ctgctcgccg ggcgcctcc gccagctccg tgcctcccgc gccaccttc tccgggcccgc   300
gtctccctaag ggatgggtact gaatttcgcc gccacaggag accggctgga gcgcccgcgc   360
cgcgccctgc ctctctccg agcagccagc gcctcgggac gcg atg agg acc ttg   415
                                     Met Arg Thr Leu
                                     1
gct tgc ctg ctg ctc ctc ggc tgc gga tac ctc gcc cat gtt ctg gcc   463
Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala His Val Leu Ala
   5             10             15             20
gag gaa gcc gag atc ccc cgc gag gtg atc gag agg ctg gcc cgc agt   511
Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg Leu Ala Arg Ser
           25             30             35
cag atc cac agc atc cgg gac ctc cag cga ctc ctg gag ata gac tcc   559

```

10

20

Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu Glu Ile Asp Ser
 40 45 50
 gta ggg agt gag gat tct ttg gac acc agc ctg aga gct cac ggg gtc 607
 Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg Ala His Gly Val
 55 60 65
 cac gcc act aag cat gtg ccc gag aag cgg ccc ctg ccc att cgg agg 655
 His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu Pro Ile Arg Arg
 70 75 80
 aag aga agc atc gag gaa gct gtc ccc gct gtc tgc aag acc agg acg 703
 Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys Lys Thr Arg Thr
 85 90 95 100
 gtc att tac gag att cct cgg agt cag gtc gac ccc acg tcc gcc aac 751
 Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro Thr Ser Ala Asn
 105 110 115
 ttc ctg atc tgg ccc ccg tgc gtg gag gtg aaa cgc tgc acc ggc tgc 799
 Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys
 120 125 130
 tgc aac acg agc agt gtc aag tgc cag ccc tcc cgc gtc cac cac cgc 847
 Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg Val His His Arg
 135 140 145
 agc gtc aag gtg gcc aag gtg gaa tac gtc agg aag aag cca aaa tta 895
 Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Lys Pro Lys Leu
 150 155 160
 aaa gaa gtc cag gtg agg tta gag gag cat ttg gag tgc gcc tgc gcg 943
 Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu Cys Ala Cys Ala
 165 170 175 180
 acc aca agc ctg aat ccg gat tat cgg gaa gag gac acg gat gtg agg 991
 Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp Thr Asp Val Arg
 185 190 195

10

20

tgaggatgag ccgcagccct ttccctgggac atggatgtac atggcgtgtt acattccctga 1051
 acctactatg tacgggtgctt tattgccagt gtgcgggtctt tgttctcttc cgtgaaaaac 1111
 tgtgtccgag aacactcggg agaacaaaga gacagtgcac atttgtttaa tgtgacatca 1171
 aagcaagtat gtagcactc ggtgaagcag taagaagctt ccttgicaaa aagagagaga 1231
 gagagagaga gagagaaaac aaaaccacaa atgacaaaaa caaacggac tcacaaaaat 1291
 atctaaactc gatgagatgg agggctgccc cgtgggatgg aagtgcagag gtctcagcag 1351
 actggatttc tgtccgggtg gtcacaggig cttttitgcc gaggatgcag agcctgcttt 1411
 gggaaacgact ccagaggggt gctgggtggc tctgcagggc ccgcaggag caggaatgtc 1471
 ttggaaaccg ccacgcgaac tttagaaacc acacctcttc gctgtagtat ttaagcccat 1531
 acagaaacct tctgagagc ctttaagtgt tttttttttt gttttgttt tgtttttttt 1591
 tttttgttt tttttttttt tttttttttt tacaccataa agtgattatt aagcttcttt 1651
 ttactctttg gctagctttt tttttttttt tttttttttt ttttttaat tatctcttgg 1711
 atgacattta caccgataac acacaggctg ctgtaactgt caggacagtg cgacgggtatt 1771
 tttcctagca agatgcaaac taatgagatg tattaaaata aacatgggtat acctacctat 1831
 gcatcatttc ctaaagtgtt ctggctttgt gtttctccct taccctgctt tatttgttaa 1891
 ttttaagccat tttagaaaga ctatgcgtca accaatcgtc cgccgtccct gcggcacctg 1951
 ccccagagcc cgtttgtggc tgagtgcaca ctgttccccc gcagtgaca cctagaatgc 2011
 tgtgttccca cgcggcacgt gagatgcatt gccgcttcgt tctgtgtgtt tgggtgtgcc 2071
 tgggtgccgtg gtggcgggtc ctccctctgc tgccagtgtt tggacagaac ccaaattctt 2131
 tatttttggg aagatatgtt gctttacctg tattaacaga aatgtgtgtg tgtggtttgt 2191
 tttttgtaa aggtgaagtt tgtatgttta cctaataata cctgttttgt atacctgaga 2251
 gcctgctaig ttcttctttt gttgatccaa aattaaaaaa aaaataccac caac 2305

10

20

<210> 125

<211> 196

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala
 1 5 10 15
 His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg
 20 25 30
 Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu
 35 40 45
 Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg
 50 55 60
 Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu
 65 70 75 80
 Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys
 85 90 95
 Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro
 100 105 110
 Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg
 115 120 125
 Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg
 130 135 140
 Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys
 145 150 155 160
 Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu
 165 170 175
 Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp
 180 185 190
 Thr Asp Val Arg
 195

10

20

<210> 126

<211> 2137

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (983)..(1705)

<400> 126

```

cccgcctgc ctccctgcgc acccgagcc tccccgcctg cctccctagg gctccccicc 60
ggccgccagc gcccattiti catccctag atagagatac ttgcgcgca cacacataca 120
tacgcgcgca aaaaggaaaa aaaaaaaaaa aagcccacc tccagcctcg ctgcaaaagag 180
aaaaccggag cagccgcagc tcgcagctcg cagccgcag cccgcagagg acgcccagag 240
cggcgagcgg gcgggcagac ggaccgacgg actcgcgccg cgtccacctg tcggccgggc 300
ccagccgagc gcgcagcggg cagccgcgc gcgcggagca gccgtgcccc ccgcccgggc 360
ccgcccagc gggcacacg ctccgcccc cctaccggc cgggcggga gtttgcacct 420
ctccctgcc gggtgctcga gctgccgtg caaagccaac ttggaaaaa gtttttggg 480
ggagacttgg gcctttaggt gccagctcc gcgctttccg attttggggg ctttccaga 540
aaaigtgca aaaaagctaa gccggcgggc agaggaaaac gcctgtagcc ggcgagtga 600
gacgaacctt cgactgccgt gtccctttc ctcttggagg ttggagtccc ctgggcggcc 660
ccacacggct agacgcctcg gctgggtcgc gacgcagccc cccggccgtg gatgctgcac 720
tcgggtcgg gatccgcca ggtagcgccc tcggaccag gtcttcgcc caggctctcc 780
ctgcccccc agcgacggag ccggggccgg gggcgggcgc gccgggggca tgcgggtgag 840
ccgcggctgc agaggcctga gcgcctgac gccgcggacc cgagccgagc ccacccccct 900
ccccagccc ccacctggc cgcgggggcg gcgcgctcga tctacgggtt cggggccccg 960
cggggccggg cccggagtcg gc atg aat cgc tgc tgg gcg ctc ttc ctg tct 1012
Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser
1 5 10
ctc tgc tgc tac ctg cgt ctg gtc agc gcc gag ggg gac ccc att ccc 1060
Leu Cys Cys Tyr Leu Arg Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro

```

10

20

15	20	25	
gag gag ctt tat gag atg ctg agt gac cac tcg atc cgc tcc ttt gat			1108
Glu Glu Leu Tyr Glu Met Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp			
30	35	40	
gat ctc caa cgc ctg ctg cac gga gac ccc gga gag gaa gat ggg gcc			1156
Asp Leu Gln Arg Leu Leu His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala			
45	50	55	
gag ttg gac ctg aac atg acc cgc tcc cac tct gga ggc gag ctg gag			1204
Glu Leu Asp Leu Asn Met Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu			
60	65	70	
agc ttg gct cgt gga aga agg agc ctg ggt tcc ctg acc att gct gag			1252
Ser Leu Ala Arg Gly Arg Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu			
75	80	85	90
ccg gcc atg atc gcc gag tgc aag acg cgc acc gag gtg ttc gag atc			1300
Pro Ala Met Ile Ala Glu Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile			
95	100	105	
tcc cgg cgc ctc ata gac cgc acc aac gcc aac ttc ctg gtg tgg ccg			1348
Ser Arg Arg Leu Ile Asp Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro			
110	115	120	
ccc tgt gtg gag gtg cag cgc tgc tcc ggc tgc tgc aac aac cgc aac			1396
Pro Cys Val Glu Val Gln Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn			
125	130	135	
gtg cag tgc cgc ccc acc cag gtg cag ctg cga cct gtc cag gtg aga			1444
Val Gln Cys Arg Pro Thr Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg			
140	145	150	
aag atc gag att gtg cgg aag aag cca atc ttt aag aag gcc acg gtg			1492
Lys Ile Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val			
155	160	165	170
acg ctg gaa gac cac ctg gca tgc aag tgt gag aca gtg gca gct gca			1540

10

20

Thr Leu Glu Asp His Leu Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala
 175 180 185
 cgg cct gtg acc cga agc ccg ggg ggt tcc cag gag cag cga gcc aaa 1588
 Arg Pro Val Thr Arg Ser Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys
 190 195 200
 acg ccc caa act cgg gtg acc att cgg acg gtg cga gtc cgc cgg ccc 1636
 Thr Pro Gln Thr Arg Val Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Arg Pro
 205 210 215
 ccc aag ggc aag cac cgg aaa ttc aag cac acg cat gac aag acg gca 1684
 Pro Lys Gly Lys His Arg Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr Ala
 220 225 230
 ctg aag gag acc ctt gga gcc taggggcac gccaggagag tgtgtgggca 1735
 Leu Lys Glu Thr Leu Gly Ala
 235 240
 ggggtatttta ataggtatt tgcgtattg ccccatggg gccttggagt agataatatt 1795
 gtttccctcg tccgtctgtc tcatgcccg attcggacgg ccaatgggtc ctccccacc 1855
 cctccacgtg tccgtccacc ctcccatcag cgggtctcct cccagcggcc tccggctctt 1915
 gcccagcagc tcaagaagaa aaagaaggac tgaactccat cgcctcttc ttccttaac 1975
 tccaagaact tgggataaga gtgtgagaga gactgatggg gtcgtctttt gggggaacg 2035
 gggtcttcc cctgcaccig gcctgggcca caccigagcg ctgtggactg tctgaggag 2095
 cctgaggac ctctcagcat agcctgccig atccctgaac cc 2137

10

20

<210> 127

<211> 241

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg

1 5 10 15
 Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met
 20 25 30
 Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu
 35 40 45
 His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met
 50 55 60
 Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg
 65 70 75 80
 Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu
 85 90 95
 Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp
 100 105 110
 Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln
 115 120 125
 Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr
 130 135 140
 Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg
 145 150 155 160
 Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu
 165 170 175
 Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser
 180 185 190
 Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val
 195 200 205
 Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg
 210 215 220
 Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly
 225 230 235 240

10

20

Ala

<210> 128

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

10

<400> 128

Asp Pro Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys

1

5

10

<210> 129

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 129

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His

1

5

10

<210> 130
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 130
Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
1 5 10

10

<210> 131
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

20

<400> 131
Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr
1 5

<210> 132
<211> 13
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 132

Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly

1

5

10

<210> 133

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 133

Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu

1

5

<210> 134

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

10

20

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 134

Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg
1 5 10 15

<210> 135

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 135

Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
1 5 10

<210> 136

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 136

Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp

1 5 10

<210> 137

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

10

<400> 137

Asp Pro Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys

1 5 10

<210> 138

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 138

Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met

1 5 10

<210> 139
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 139
Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys
1 5 10

10

<210> 140
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

20

<400> 140
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr
1 5

<210> 141
<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 141

Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr Arg Cys Gly
1 5 10

10

<210> 142

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 142

Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu
1 5

20

<210> 143

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 143

Gln	Cys	Met	Asn	Thr	Ser	Thr	Ser	Tyr	Leu	Ser	Lys	Thr	Leu	Phe	Glu
1				5					10					15	

<210> 144

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 144

Ile	Thr	Val	Pro	Leu	Ser	Gln	Gly	Pro	Lys	Pro	Val	Thr	Ile	Ser	Phe
1				5					10					15	

20

<210> 145

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 145

Ala Asn His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp

1

5

10

<210> 146

<211> 815

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (69)..(767)

<400> 146

gaattcgaat tccagtgtgc tggcggccgc gcgcgagccg cgccggcccc ggtcgggcct 60

ccgaaacc atg aac ttt ctg ctg tct tgg gtg cat tgg agc ctc gcc ttg 110

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu

1

5

10

ctg ctc tac ctc cac cat gcc aag tgg tcc cag gct gca ccc atg gca 158

Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala

15

20

25

30

gaa gga gga ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aag ttc atg gat gtc 206

Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val

35

40

45

tat cag cgc agc tac tgc cat cca atc gag acc ctg gtg gac atc ttc 254

Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe

50

55

60

cag gag tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgt gtg 302

10

20

Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 65 70 75
 ccc ctg atg cga tgc ggg ggc tgc tgc aat gac gag ggc ctg gag tgt 350
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
 80 85 90
 gtg ccc act gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg cgg atc aaa 398
 Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
 95 100 105 110
 cct cac caa ggc cag cac ata gga gag atg agc ttc cta cag cac aac 446
 Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn
 115 120 125
 aaa tgt gaa tgc aga cca aag aaa gat aga gca aga caa gaa aaa aaa 494
 Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys
 130 135 140
 tca gtt cga gga aag gga aag ggg caa aaa cga aag cgc aag aaa tcc 542
 Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser
 145 150 155
 cgg tat aag tcc tgg agc gtg tac gtt ggt gcc cgc tgc tgt cta atg 590
 Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met
 160 165 170
 ccc tgg agc ctc cct ggc ccc cat ccc tgt ggg cct tgc tca gag cgg 638
 Pro Trp Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg
 175 180 185 190
 aga aag cat ttg ttt gta caa gat ccg cag acg tgt aaa tgt tcc tgc 686
 Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys
 195 200 205
 aaa aac aca gac tcg cgt tgc aag gcg agg cag ctt gag tta aac gaa 734
 Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu
 210 215 220

10

20

cgt act tgc aga tgt gac aag ccg agg cgg tga gccgggctgg aggaaggagc 787
 Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 225 230
 ctccctcagg gtctcgggaa ccagatcc 815

<210> 147

<211> 232

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
 20 25 30
 Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
 35 40 45
 Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 50 55 60
 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 65 70 75 80
 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
 85 90 95
 Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 100 105 110
 Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 115 120 125
 Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
 130 135 140

10

20

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
 145 150 155 160
 Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp
 165 170 175
 Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys
 180 185 190
 His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn
 195 200 205
 Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr
 210 215 220
 Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 225 230

10

<210> 148
 <211> 3007
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (492)..(1529)

20

<400> 148
 gcccgagag ccgcatctat tggcagcttt gttattgac agaaactgct cgccgccgac 60
 ttggcttcca gtctggctgc gggcaacctt tgagtittcg cctcigtctt gtccccgaa 120
 ctgacaggig ctccagcaa ctgtctgggg acttctcgcc gtccccgc gtccccacc 180
 cctattcct cctcgcctt caccaccacc cccaccatt cgcacagct caggatttgt 240
 ttaaaccitg ggaaactggt tcaggccag gttitgctt gatccitttc aaaaactgga 300
 gacacagaag agggctctag gaaaaagitt tggatggat tatgtggaaa ctaccctgcg 360

attctctgct gccagagcag gctcggcgct tccaccccag tgcagccttc cctggcgggt 420
 ggtgaaagag actcgggagt cgctgcttcc aaagtgccg ccgtgagtga gctcicaccc 480
 cagtcagcca a atg agc ctc ttc ggg ctt ctc ctg ctg aca tct gcc ctg 530
 Met Ser Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Thr Ser Ala Leu
 1 5 10
 gcc ggc cag aga cag ggg act cag gcg gaa tcc aac ctg agt agt aaa 578
 Ala Gly Gln Arg Gln Gly Thr Gln Ala Glu Ser Asn Leu Ser Ser Lys
 15 20 25
 ttc cag ttt tcc agc aac aag gaa cag aac gga gta caa gat cct cag 626
 Phe Gln Phe Ser Ser Asn Lys Glu Gln Asn Gly Val Gln Asp Pro Gln
 30 35 40 45
 cat gag aga att att act gtc tct act aat gga agt att cac agc cca 674
 His Glu Arg Ile Ile Thr Val Ser Thr Asn Gly Ser Ile His Ser Pro
 50 55 60
 agg ttt cct cat act tat cca aga aat acg gtc ttg gta tgg aga tta 722
 Arg Phe Pro His Thr Tyr Pro Arg Asn Thr Val Leu Val Trp Arg Leu
 65 70 75
 gta gca gta gag gaa aat gta tgg ata caa ctt acg ttt gat gaa aga 770
 Val Ala Val Glu Glu Asn Val Trp Ile Gln Leu Thr Phe Asp Glu Arg
 80 85 90
 ttt ggg ctt gaa gac cca gaa gat gac ata tgc aag tat gat ttt gta 818
 Phe Gly Leu Glu Asp Pro Glu Asp Asp Ile Cys Lys Tyr Asp Phe Val
 95 100 105
 gaa gtt gag gaa ccc agt gat gga act ata tta ggg cgc tgg tgt ggt 866
 Glu Val Glu Glu Pro Ser Asp Gly Thr Ile Leu Gly Arg Trp Cys Gly
 110 115 120 125
 tct ggt act gta cca gga aaa cag att tct aaa gga aat caa att agg 914
 Ser Gly Thr Val Pro Gly Lys Gln Ile Ser Lys Gly Asn Gln Ile Arg
 130 135 140

10

20

ata aga ttt gta tct gat gaa tat ttt cct tct gaa cca ggg ttc tgc 962
 Ile Arg Phe Val Ser Asp Glu Tyr Phe Pro Ser Glu Pro Gly Phe Cys
 145 150 155
 atc cac tac aac att gtc atg cca caa ttc aca gaa gct gtg agt cct 1010
 Ile His Tyr Asn Ile Val Met Pro Gln Phe Thr Glu Ala Val Ser Pro
 160 165 170
 tca gtg cta ccc cct tca gct ttg cca ctg gac ctg ctt aat aat gct 1058
 Ser Val Leu Pro Pro Ser Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Asn Asn Ala
 175 180 185
 ata act gcc ttt agt acc ttg gaa gac ctt att cga tat ctt gaa cca 1106
 Ile Thr Ala Phe Ser Thr Leu Glu Asp Leu Ile Arg Tyr Leu Glu Pro
 190 195 200 205
 gag aga tgg cag ttg gac tta gaa gat cta tat agg cca act tgg caa 1154
 Glu Arg Trp Gln Leu Asp Leu Glu Asp Leu Tyr Arg Pro Thr Trp Gln
 210 215 220
 ctt ctt ggc aag gct ttt gtt ttt gga aga aaa tcc aga gtg gtg gat 1202
 Leu Leu Gly Lys Ala Phe Val Phe Gly Arg Lys Ser Arg Val Val Asp
 225 230 235
 ctg aac ctt cta aca gag gag gta aga tta tac agc tgc aca cct cgt 1250
 Leu Asn Leu Leu Thr Glu Glu Val Arg Leu Tyr Ser Cys Thr Pro Arg
 240 245 250
 aac ttc tca gtg tcc ata agg gaa gaa cta aag aga acc gat acc att 1298
 Asn Phe Ser Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys Arg Thr Asp Thr Ile
 255 260 265
 ttc tgg cca ggt tgt ctc ctg gtt aaa cgc tgt ggt ggg aac tgt gcc 1346
 Phe Trp Pro Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg Cys Gly Gly Asn Cys Ala
 270 275 280 285
 tgt tgt ctc cac aat tgc aat gaa tgt caa tgt gtc cca agc aaa gtt 1394
 Cys Cys Leu His Asn Cys Asn Glu Cys Gln Cys Val Pro Ser Lys Val

10

20

290	295	300	
act aaa aaa tac cac gag gtc ctt cag ttg aga cca aag acc ggt gtc			1442
Thr Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Gln Leu Arg Pro Lys Thr Gly Val			
305	310	315	
agg gga ttg cac aaa tca ctc acc gac gtg gcc ctg gag cac cat gag			1490
Arg Gly Leu His Lys Ser Leu Thr Asp Val Ala Leu Glu His His Glu			
320	325	330	
gag tgt gac tgt gtg tgc aga ggg agc aca gga gga tag ccgcatcacc			1539
Glu Cys Asp Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr Gly Gly			
335	340	345	
accagcagct cttgccccaga gctgtgcagt gcagtggctg attctattag agaacgtatg			1599
cgttatctcc atccttaate tcagttgttt gcttcaagga ctttcatct tcaggattta			1659
cagtgcattc tgaagagga gacatcaaac agaattagga gtgtgcaac agctcttttg			1719
agaggaggcc taaaggacag gagaaaaggt cttcaatcgt ggaaagaaaa ttaaatgttg			1779
tattaaatag atcaccagct agtttcagag ttacatgta cgtattccac tagctgggtt			1839
ctgtatttca gtcttttcca tacggcttag ggtaattgca gtacaggaaa aaaactgtgc			1899
aagttagcac ctgattccgt tgccttgctt aactctaaag cttcatgtcc tgggcctaaa			1959
atcgtataaa atctggattt tttttttttt ttttgcctat attcacatat gttaaaccaga			2019
acattctaig tactacaaac ctggttttta aaaaggaact atgttgctat gaattaaact			2079
tgtgtcgtgc tgataggaca gactggattt ttcataattc ttattaaaaa ttctgccatt			2139
tagaagaaga gaactacatt catggtttgg aagagataaa cctgaaaaga agagiggcct			2199
tatcttcact ttatcgataa gtcagtttat ttgtttcatt gtgtacatt ttatattcic			2259
cttttgacat tataactggt ggcttttcta atcttgttta atatattctat tttaccaaa			2319
ggtaattaat attctttttt atgacaactt agatcaacta ttttagctt ggtaaatitt			2379
tctaacaca attgttatag ccagaggaac aaagatgata taaaatatig ttgcctgac			2439
aaaaatacat gtatttcatt ctctatgggt gctagagtta gattaatcig cattttaaaa			2499
aactgaatig gaatagaatt ggtaagtgc aaagactitt tgaaaataat taaattatca			2559
tatcttccat tcctgttatt ggagatgaaa ataaaaagca acttatgaaa gtagacattc			2619
agatccagcc attactaacc taticctttt ttggggaaat ctgagcctag ctgagaaaaa			2679

10

20

cataaagcac cttgaaaaag acttggcagc ttcttgataa agcgtgctgt gctgtgcagt 2739
 aggaacacat cctatittatt gtgatgttgt ggttttattt tcttaaactc tgttcatac 2799
 acttgtataa atacatggat atttttatgt acagaagtat gtctcittaac cagttcactt 2859
 attgtactct ggcaatttaa aagaaaatca gtaaaatatt ttgcttgtaa aatgcittaat 2919
 atcgtgccia ggttatgtgg tgactatttg aatcaaaaat gtatigaatc atcaaatata 2979
 agaattgtgc tatittgggg agaaaatt 3007

<210> 149

<211> 345

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 149

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

20

Val Pro Gly Lys Gln Ile Ser Lys Gly Asn Gln Ile Arg Ile Arg Phe
 130 135 140
 Val Ser Asp Glu Tyr Phe Pro Ser Glu Pro Gly Phe Cys Ile His Tyr
 145 150 155 160
 Asn Ile Val Met Pro Gln Phe Thr Glu Ala Val Ser Pro Ser Val Leu
 165 170 175
 Pro Pro Ser Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Asn Asn Ala Ile Thr Ala
 180 185 190
 Phe Ser Thr Leu Glu Asp Leu Ile Arg Tyr Leu Glu Pro Glu Arg Trp
 195 200 205
 Gln Leu Asp Leu Glu Asp Leu Tyr Arg Pro Thr Trp Gln Leu Leu Gly
 210 215 220
 Lys Ala Phe Val Phe Gly Arg Lys Ser Arg Val Val Asp Leu Asn Leu
 225 230 235 240
 Leu Thr Glu Glu Val Arg Leu Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn Phe Ser
 245 250 255
 Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys Arg Thr Asp Thr Ile Phe Trp Pro
 260 265 270
 Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg Cys Gly Gly Asn Cys Ala Cys Cys Leu
 275 280 285
 His Asn Cys Asn Glu Cys Gln Cys Val Pro Ser Lys Val Thr Lys Lys
 290 295 300
 Tyr His Glu Val Leu Gln Leu Arg Pro Lys Thr Gly Val Arg Gly Leu
 305 310 315 320
 His Lys Ser Leu Thr Asp Val Ala Leu Glu His His Glu Glu Cys Asp
 325 330 335
 Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr Gly Gly
 340 345

10

20

<210> 150
 <211> 399
 <212> DNA
 <213> Orf virus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(399)

<400> 150

```

atg aag ttt ctc gtc ggc ata ctg gta gct gtg tgc ttg cac cag tat   48
Met Lys Phe Leu Val Gly Ile Leu Val Ala Val Cys Leu His Gln Tyr
   1             5             10            15
ctg ctg aac gcg gac agc acg aaa aca tgg tcc gaa gtg ttt gaa aac   96
Leu Leu Asn Ala Asp Ser Thr Lys Thr Trp Ser Glu Val Phe Glu Asn
      20             25             30
agc ggg tgc aag cca agg ccg atg gtc ttt cga gta cac gac gag cac   144
Ser Gly Cys Lys Pro Arg Pro Met Val Phe Arg Val His Asp Glu His
      35             40             45
ccg gag cta act tct cag cgg ttc aac ccg ccg tgt gtc acg ttg atg   192
Pro Glu Leu Thr Ser Gln Arg Phe Asn Pro Pro Cys Val Thr Leu Met
      50             55             60
cga tgc ggc ggg tgc tgc aac gac gag agc tta gaa tgc gtc ccc acg   240
Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ser Leu Glu Cys Val Pro Thr
      65             70             75            80
gaa gag gca aac gta acg atg caa ctc atg gga gcg tcg gtc tcc ggt   288
Glu Glu Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Met Gly Ala Ser Val Ser Gly
      85             90             95
ggg aac ggg atg caa cat ctg agc ttc gta gag cat aag aaa tgc gat   336

```

10

20

Gly Asn Gly Met Gln His Leu Ser Phe Val Glu His Lys Lys Cys Asp
 100 105 110
 tgt aaa cca cca ctc acg acc acg cca ccg acg acc aca agg ccg ccc 384
 Cys Lys Pro Pro Leu Thr Thr Thr Pro Pro Thr Thr Thr Arg Pro Pro
 115 120 125
 aga aga cgc cgc tag 399
 Arg Arg Arg Arg
 130

<210> 151

<211> 132

<212> PRT

<213> Orf virus

10

<400> 151

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

20

Cys Lys Pro Pro Leu Thr Thr Thr Pro Pro Thr Thr Thr Arg Pro Pro
 115 120 125
 Arg Arg Arg Arg
 130

<210> 152
 <211> 328
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(322)

<400> 152
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca tcc tgc gtg ccc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro
 35 40 45
 ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt 193
 Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val

10

20

```

      50              55              60
ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
      65              70              75
cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat 289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
      80              85              90
aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtcttc 328
Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
      95              100             105

```

10

<210> 153

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 153

```

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

```

20

Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
 100 105

<210> 154

<211> 331

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

10

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 154

```

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa tct att gat aat gag 49
      Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu
          1          5          10
tgg aga aag act cag tgc atg ccg aga gag gtg tgt atc gac gtg ggg 97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly
  15          20          25          30
aag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca cca tgt gtg 145
Lys Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Pro Cys Val
          35          40          45
tcc gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
          50          55          60
atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca 241

```

20

Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
65 70 75
gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag 289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln
80 85 90
cat aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttggcttc 331
His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp
95 100 105

<210> 155

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<400> 155

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

20

<210> 156
 <211> 331
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(322)

10

<400> 156
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
 tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30
 cag gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg 145
 Gln Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val
 35 40 45
 tcc gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
 Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
 50 55 60
 atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca 241
 Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
 65 70 75

20

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat 289
 Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
 80 85 90
 cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttggcttc 331
 His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp
 95 100 105

<210> 157

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<400> 157

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

20

<210> 158

<211> 331
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(322)

<400> 158
 ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa tct att gat aat gag 49
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
 tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30
 cag gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg 145
 Gln Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val
 35 40 45
 tcc gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
 Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
 50 55 60
 gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca 241
 Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr
 65 70 75
 gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat 289
 Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn

10

20

80 85 90
cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttggcttc 331
His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp
95 100 105

<210> 159

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 159

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

<210> 160

<211> 325

<212> DNA

10

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 160

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa tct att gat aat gag 49

Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu

1

5

10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97

Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe

15

20

25

30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca cca tgt gtg 145

Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Pro Cys Val

35

40

45

tcc gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193

Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys

50

55

60

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa 241

Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys

65

70

75

cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac 289

Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn

80

85

90

10

20

aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc 325
Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val
95 100 105

<210> 161
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 161
Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg 10
1 5 10 15
Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
20 25 30
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val
35 40 45
Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro
50 55 60
Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
65 70 75 80
Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys 20
85 90 95
Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val
100 105

<210> 162
<211> 322
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 162

```

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat      49
      Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
          1             5             10
cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag      97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
    15             20             25             30
gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc     145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
          35             40             45
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt     193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
          50             55             60
ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa cct     241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro
          65             70             75
cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act tcc     289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
          80             85             90
tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc                        322
Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe

```

10

20

95 100 105

<210> 163

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 163

Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg

1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe

20 25 30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr

35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr

50 55 60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln

65 70 75 80

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg

85 90 95

Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe

100 105

10

20

<210> 164

<211> 328

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 164

```

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat    49
      Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
          1             5             10
cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag    97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
      15             20             25             30
gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc    145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
          35             40             45
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt    193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
          50             55             60
ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg    241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
          65             70             75
cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat    289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
          80             85             90
aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtcttc                328
Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
      95             100             105

```

10

20

<210> 165
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 165
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15
 Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
 50 55 60
 Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80
 Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
 85 90 95
 Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
 100 105

10

20

<210> 166
 <211> 328
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 166

```

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat    49
      Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
          1             5             10
cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag    97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
      15             20             25             30
gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc    145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
          35             40             45
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt    193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
          50             55             60
ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg    241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
          65             70             75
cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtc aca atc agc ttt ctc cag cat    289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
          80             85             90
aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtcttc                328
Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
      95             100             105

```

10

20

<210> 167

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 167

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

10

<210> 168

<211> 328

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>

<221> CDS

20

<222> (8)..(322)

<400> 168

```

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat    49
      Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
          1             5             10
cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag    97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
      15             20             25             30
gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc    145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
          35             40             45
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt    193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
          50             55             60
ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg    241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
          65             70             75
cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat cac    289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His
          80             85             90
act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtcctc                328
Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu
      95             100             105

```

<210> 169

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

20

<400> 169

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

10

<210> 170

<211> 328

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 170

```

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat    49
      Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
          1             5             10
cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag    97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
  15             20             25             30
gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca cca tgt gtg tcc    145
Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
          35             40             45
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt    193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
          50             55             60
ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg    241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
          65             70             75
cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat cac    289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His
          80             85             90
act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtcttc                328
Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu
          95             100             105

```

10

20

<210> 171

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 171

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

10

<210> 172

<211> 328

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 172

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat 49

20

Ala	His	Tyr	Asn	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Phe	Met	Asp	Val	Tyr			
1				5					10							
cag	cgc	agc	tac	tgc	cat	ccg	atc	gag	aca	ctg	gtg	gac	atc	ttc	cag	97
Gln	Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	Glu	Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	
15				20					25				30			
gaa	ttt	gga	gtc	gcg	aca	aac	acc	ttc	ttc	aag	cca	tcc	tgc	gtg	ccc	145
Glu	Phe	Gly	Val	Ala	Thr	Asn	Thr	Phe	Phe	Lys	Pro	Ser	Cys	Val	Pro	
				35					40				45			
ctg	atg	aga	tgt	ggg	ggt	tgc	tgc	aat	gac	gaa	ggg	ctg	gag	tgc	gtt	193
Leu	Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Asn	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Val	
				50				55				60				
ccc	acc	gag	gag	tcc	aac	atc	acc	atg	cag	att	atg	aga	att	aca	gtg	241
Pro	Thr	Glu	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	Met	Gln	Ile	Met	Arg	Ile	Thr	Val	
				65				70				75				
cct	ctc	tct	caa	ggg	ccc	aaa	cca	gig	aca	atc	agc	ttt	ctc	cag	cat	289
Pro	Leu	Ser	Gln	Gly	Pro	Lys	Pro	Val	Thr	Ile	Ser	Phe	Leu	Gln	His	
				80				85				90				
aac	aaa	tgt	gaa	tgt	aga	cca	aag	aaa	gat	ttg	gtcttc					328
Asn	Lys	Cys	Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp	Leu						
95				100					105							

10

20

<210> 173

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 173

Ala	His	Tyr	Asn	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Phe	Met	Asp	Val	Tyr	Gln	Arg
1				5					10					15	

10

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

20

⟨222⟩ (8).. (322)

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat 49
Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
1 5 10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca tcc tgc gtg ccc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro
 35 40 45
 ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt 193
 Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
 50 55 60
 ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
 65 70 75
 cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
 80 85 90
 aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtcttc 328
 Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
 95 100 105

10

20

30

40

50

<210> 175

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 175

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

【図面の簡単な説明】

【図 1】選択 2 次構造要素が同定される、VEGF-A 単量体の 3 次元モデルの斜視図を描いている。VEGF-A-コードポリヌクレオチドは、VEGF-A/VEGF-C キメラの構築物に関して、9 つのセグメントに分けられ、また、標識 1 ～ 9 が、その 9 つのセグメントのそれぞれによりコードされるペプチドの位置を同定する。

【図 2】VEGF-A/VEGF-C ハイブリッド分子を構築するのに使用された 9 つの VEGF-A と 9 つの VEGF-C DNA 断片の略図である。これら断片は上面に 1 から 9 まで番号が振られている。

断片の N 1 2 3、N 4 5、C 6 7、C 8 9 グループもまた表記されている。

N 1 2 3 は 3 つの VEGF-A 断片と 3 つの VEGF-C 断片と（断片 1 ～ 3）からなり

、一方、N 4 5（断片 4～5）、C 6 7（断片 6～7）、C 8 9（断片 8～9）は、それぞれ、2つの V E G F－A 断片と、2つの V E G F－C 断片からなる。

選択された制限エンドヌクレアーゼ部位もまた描かれている。

【図 3】V E G F－A と V E G F－C から断片 4 と 5 の異なる組み合わせを結合させることから結果的に生じた C 6 7 領域に相当する全ての 4 つの可能性のある D N A 分子を図式的に描いている。

【図 4】V E G F－A と V E G F－C から断片 4 と 5 の異なる組み合わせを結合させることから結果的に生じた N 4 5 領域に相当する全ての 4 つの可能性のある D N A 分子を図式的に描いている。

【図 5】V E G F－A と V E G F－C から断片 6 と 7 の異なる組み合わせを結合させることから結果的に生じた C 6 7 領域に相当する全ての 4 つの可能性のある D N A 分子を図式的に描いている。 10

【図 6】V E G F－A と V E G F－C から断片 8 と 9 の異なる組み合わせを結合させることから結果的に生じた C 8 9 領域に相当する全ての 4 つの可能性のある D N A 分子を図式的に描いている。

【図 7】ボックスの中に、D N A 断片 A 1～A 9（配列番号：1 2 8～1 3 6）と、C 1～C 9（配列番号：1 3 7～1 4 5）によりコードされているアミノ酸配列を描き、また、より長くコードされているアミノ酸配列が N 1 2 3 ライゲーションにおける断片 A 1～A 3 と C 1～C 3 の結合により形成されたやり方を描いており（図 7 A）、N 4 5 ライゲーションにおける断片 A 4～A 5 と C 4～C 5 の結合により形成されたやり方を描いており（図 7 B）、C 6 7 ライゲーションにおける断片 A 6～A 7 と C 6～C 7 の結合により形成されたやり方を描いており、C 8 9 ライゲーションにおける断片 A 8～A 9 と C 8～C 9 の結合により形成されたやり方を描いている。 20

各図では、矢印は、適合性 D N A 断片の適当なライゲーションから結果的に生じるコードアミノ酸配列間のペプチド結合と、結果的に連結した D N A の翻訳を表わしている。

【図 8】V E G F－A 二量体の 2 つの V E G F R－1 分子との相互作用を示す 3 次元モデルである。

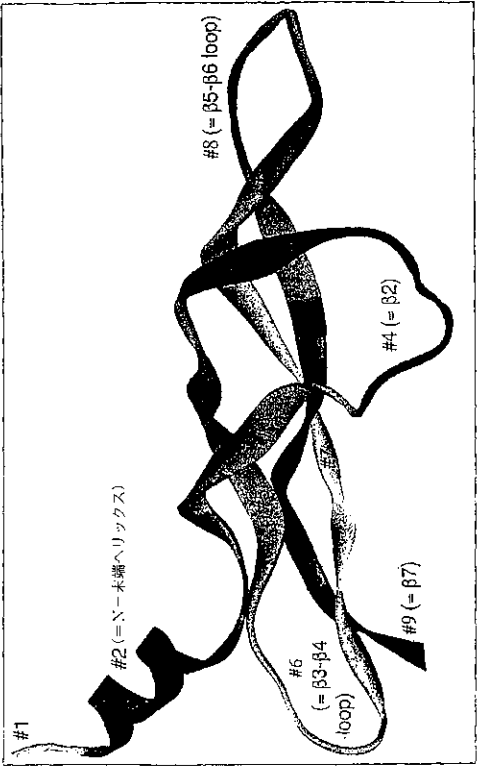
V E G F R－1 と界面上で接続するために重要な V E G F－A 単量体内の残基は、V E G F－A 二量体の 2 つの端部でクラスター化され、また、N 末端ヘリックスと β 5 鎖の一部を含む。 30

【図 9】V E G F－C 二量体により形成された溝を描いている 3 次元モデルである。

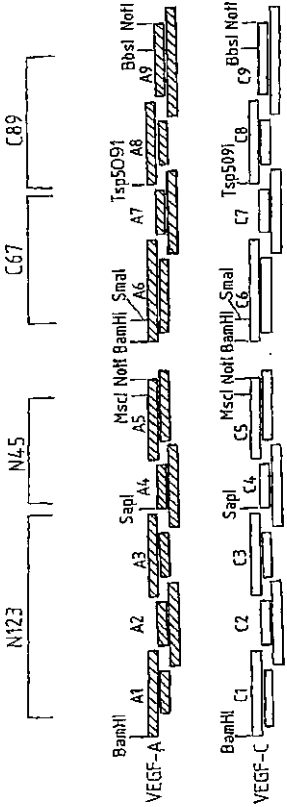
この溝の入口と両側は、実施例 4 で説明されている断片により形成され、V E G F R－3 特異性を与えるために重要であると考えられている。

【図 10】V E G F－C 二量体と、単一 V E G F R－3 分子との間の相互作用についての 3 次元モデルであり、V E G F－A／V E G F R－A モデルから補外されたものである。

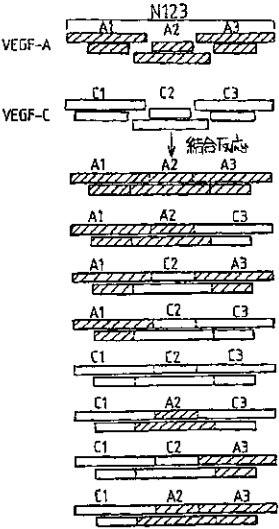
【図 1】



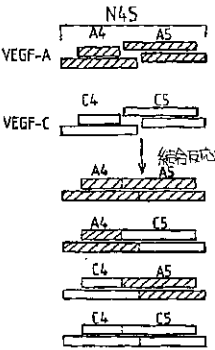
【図 2】



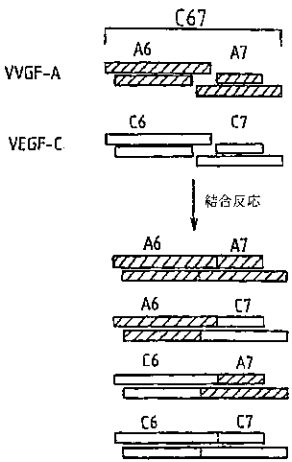
【図 3】



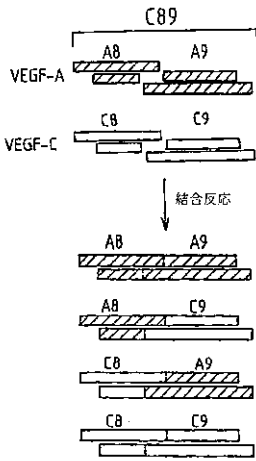
【図 4】



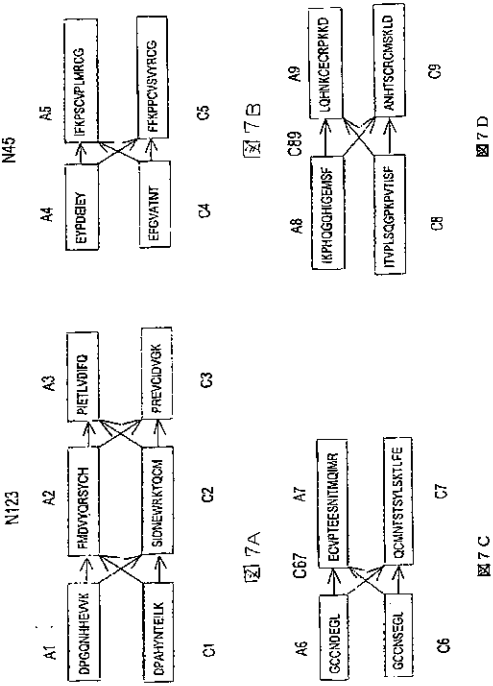
【図 5】



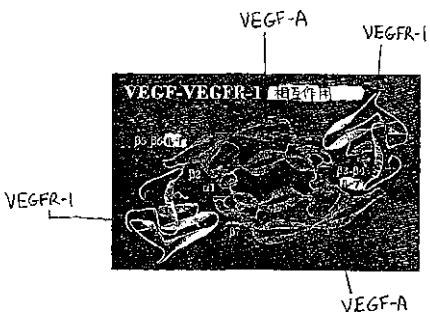
【図 6】



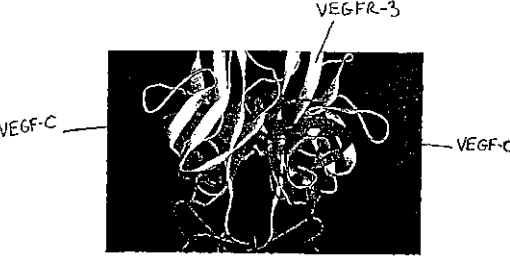
【図 7】



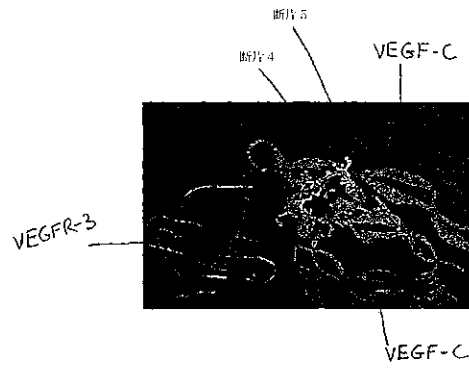
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【国際公開パンフレット】

WO 01/62942

PCT/US01/06113

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 August 2001 (30.08.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/62942 A2(51) International Patent Classification: C12N 15/62,
C07K 14/52, 19/00, G01N 33/68, A61K 38/17(74) Agents: GANS, David, A., Marshall, O'Toole, Gerstein,
Murray & Boron, 6300 Sears Tower, 233 South Wacker
Drive, Chicago, IL 60606 6-102 (U.S.)

(21) International Application Number: PCT/US01/06113

(22) International Filing Date: 26 February 2001 (26.02.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/185,205 25 February 2000 (25.02.2000) US
60/205,331 18 May 2000 (18.05.2000) US(71) Applicants: LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER
RESEARCH (US/US); 605 Third Avenue, New York, NY
10158 (U.S.); LICENTIA OY [FI/FI]; Erottajunkatu 19 B
5, FIN-00130 Helsinki (FI).(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
NO, NZ, PA, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, UZ, ZW); Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/62942 A2

(54) Title: MATERIALS AND METHODS INVOLVING HYBRID VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR DNAs
AND PROTEINS(57) Abstract: The present invention provides polypeptides that bind cellular receptors for vascular endothelial growth factor
polypeptides; polynucleotides encoding such polypeptides; compositions comprising the polypeptides and polynucleotides; and
methods and uses involving the foregoing. Some polypeptides of the invention exhibit unique receptor binding profiles compared
to known, naturally occurring vascular endothelial growth factors.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-I-

MATERIALS AND METHODS INVOLVING HYBRID VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR DNAs AND PROTEINS

The present application claims benefit of priority to U.S. Provisional Patent Application No. 60/205,331 filed May 18, 2000 and U.S. Provisional Patent Application No. 60/185,205 filed February 25, 2000. The entire text and drawing of each of the priority applications is specifically incorporated herein by reference, without prejudice or disclaimer.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The PDGF proteins and their receptors (PDGFRs) are involved in regulation of cell proliferation, survival and migration of several cell types. The VEGF proteins and their receptors (VEGFRs) play important roles in both vasculogenesis, the development of the embryonic vasculature from early differentiating endothelial cells, and angiogenesis, the process of forming new blood vessels from pre-existing ones [Risau *et al.*, *Dev Biol* 125:441-450 (1988); Zachary, *Int J Biochem Cell Bio* 30:1169-1174 (1998); Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13:9-22 (1999); Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999)]. Both processes depend on the tightly controlled endothelial cell proliferation, migration, differentiation, and survival. Dysfunction of the endothelial cell regulatory system is a key feature of cancer and several diseases associated with abnormal angiogenesis, such as proliferative retinopathies, age-related muscular degeneration, rheumatoid arthritis, and psoriasis. Understanding of the specific biological function of the key players involved in regulating endothelial cells will lead to more effective therapeutic applications to treat such diseases [Zachary, *Int J Biochem Cell Bio* 30:1169-1174 (1998); Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13:9-22 (1999); Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999)].

The PDGF/VEGF Family

The PDGF/VEGF family of growth factors includes at least the following members: PDGF-A (see *e.g.*, GenBank Acc. No. X06374), PDGF-B (see *e.g.*, GenBank Acc. No. M12783), VEGF (see *e.g.*, GenBank Acc. No. Q16889 referred to herein for clarity as VEGF-A or by particular isoform), PlGF (see *e.g.*, GenBank Acc. No. X54936 placental growth factor), VEGF-B (see *e.g.*, GenBank Acc. No. U48801;

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-2-

also known as VEGF-related factor (VRF), VEGF-C (see e.g., GenBank Acc. No. X94216; also known as VEGF related protein (VRP)), VEGF-D (also known as c-fos-induced growth factor (FIGF); see e.g., Genbank Acc. No. AJ000185), VEGF-E (also known as NZ7 VEGF or OV NZ7; see e.g., GenBank Acc. No. S67522), NZ2 VEGF (also known as OV NZ2; see e.g., GenBank Acc. No. S67520), D1701 VEGF-like protein (see e.g., GenBank Acc. No. AF106020; Meyer *et al.*, *EMBO J* 18:363-374), and NZ10 VEGF-like protein (described in International Patent Application PCT/US99/25869) [Stacker and Achen, *Growth Factors* 17:1-11 (1999); Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13:9-22 (1999); Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999)].

Members of the PDGF/VEGF family are characterized by a number of structural motifs including a conserved PDGF motif defined by the sequence: P-[PS]-C-V-X(3)-R-C-[QSTA]-G-C-C. The brackets indicate that this position within the polypeptide can be any one of the amino acids contained within the brackets. The number contained within the parentheses indicates the number of amino acids that separate the "V" and "R" residues. This conserved motif falls within a large domain of 70-150 amino acids defined in part by eight highly conserved cysteine residues that form inter- and intramolecular disulfide bonds. This domain forms a cysteine knot motif composed of two disulfide bonds which form a covalently linked ring structure between two adjacent β strands, and a third disulfide bond that penetrates the ring [see for example, Fig 1 in Muller *et al.*, *Structure* 5:1325-1338 (1997)], similar to that found in other cysteine knot growth factors, e.g., transforming growth factor- β (TGF- β). The amino acid sequence of all known PDGF/VEGF proteins, with the exception of VEGF-E, contains the PDGF domain. The PDGF/VEGF family proteins are predominantly secreted glycoproteins that form either disulfide-linked or non-covalently bound homo- or heterodimers whose subunits are arranged in an anti-parallel manner [Stacker and Achen, *Growth Factors* 17:1-11 (1999); Muller *et al.*, *Structure* 5:1325-1338 (1997)].

The PDGF subfamily

The PDGFs regulate cell proliferation, cell survival and chemotaxis of many cell types *in vitro* (reviewed in [Heldin *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*

1378:F79-113 (1998)]. The two chains that make up PDGF, PDGF-A and PDGF-B, can homo- or heterodimerize producing three different isoforms: PDGF-AA, PDGF-AB, or PDGF-BB. PDGF-A is only able to bind the PDGF α -receptor (PDGFR- α), whereas PDGF-B can bind both the PDGF- α and a second PDGF receptor (PDGF- β).

5 *In vivo*, the PDGF proteins exert their effects in a paracrine manner since they often are expressed in epithelial (PDGF-A) or endothelial (PDGF-B) cells in close apposition to the PDGF receptor-expressing mesenchyme (reviewed in Ataliotis *et al.*, *Int Rev Cytology* 172:95-127 (1997)). Overexpression of the PDGFs has been observed in several pathological conditions, including malignancies, atherosclerosis, and fibroproliferative diseases. In tumor cells and cell lines grown *in vitro*, co-
10 expression of the PDGFs and PDGF^r receptors generates autocrine loops, which are important for cellular transformation [Betscholtz *et al.*, *Cell* 39:447-57 (1984); Keating *et al.*, *Science* 239:914-6 (1988)].

The importance of the PDGFs as regulators of cell proliferation and cell
15 survival is well illustrated by recent gene targeting studies in mice. Homozygous null mutations for either PDGF-A or PDGF-B are lethal in mice. Approximately 50 % of the homozygous PDGF-A deficient mice have an early lethal phenotype, while the surviving animals have a complex postnatal phenotype with lung emphysema due to improper alveolar septum formation, and a dermal phenotype characterized by thin
20 dermis, misshapen hair follicles, and thin hair. PDGF-A is also required for normal development of oligodendrocytes and subsequent myelination of the central nervous system. The PDGF-B deficient mice develop renal, hematological and cardiovascular abnormalities; where the renal and cardiovascular defects, at least in part, are due to the lack of proper recruitment of mural cells (vascular smooth muscle cells, pericytes
25 or mesangial cells) to blood vessels.

The VEGF subfamily

The VEGF subfamily is composed of PDGF/VEGF members which share a VEGF homology domain (VHD) characterized by the sequence: C-X(22-24)-P-[PSR]-C-V-X(3)-R-C-[GSTA]-G-C-C-X(6)-C-X(32-41)-C. The VHD domain,
30

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-4-

determined through analysis of the VEGF subfamily members, comprises the PDGF motif but is more specific.

VEGF-A was originally purified from several sources on the basis of its mitogenic activity toward endothelial cells, and also by its ability to induce microvascular permeability, hence it is also called vascular permeability factor (VPF). VEGF-A has subsequently been shown to induce a number of biological processes including the mobilization of intracellular calcium, the induction of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 synthesis, promotion of monocyte migration *in vitro*, induction of antiapoptotic protein expression in human endothelial cells, induction of fenestrations in endothelial cells, promotion of cell adhesion molecule expression in endothelial cells and induction of nitric oxide mediated vasodilation and hypotension [Ferrara, *J Mol Med* 77: 527-543 (1999); Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13: 9-22 (1999); Zachary, *Int J Biochem Cell Bio* 30: 1169-1174 (1998)].

VEGF-A is a secreted, disulfide-linked homodimeric glycoprotein composed of 23 kD subunits. Five human VEGF-A isoforms of 121, 145, 165, 189 or 206 amino acids in length (VEGF₁₂₁₋₂₀₆), encoded by distinct mRNA splice variants, have been described, all of which are capable of stimulating mitogenesis in endothelial cells. However, each isoform differs in biological activity, receptor specificity, and affinity for cell surface- and extracellular matrix-associated heparan-sulfate proteoglycans, which behave as low affinity receptors for VEGF-A. VEGF₁₂₁ does not bind to either heparin or heparan-sulfate; VEGF₁₄₅ and VEGF₁₆₅ (GenBank Acc. No. M32977) are both capable of binding to heparin; and VEGF₁₈₉ and VEGF₂₀₆ show the strongest affinity for heparin and heparan-sulfates. VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, and VEGF₁₆₅ are secreted in a soluble form, although most of VEGF₁₆₅ is confined to cell surface and extracellular matrix proteoglycans, whereas VEGF₁₈₉ and VEGF₂₀₆ remain associated with extracellular matrix. Both VEGF₁₈₉ and VEGF₂₀₆ can be released by treatment with heparin or heparinase, indicating that these isoforms are bound to extracellular matrix via proteoglycans. Cell-bound VEGF₁₈₉ can also be cleaved by proteases such as plasmin, resulting in release of an active soluble VEGF₁₁₆. Most tissues that express VEGF are observed to express several VEGF isoforms simultaneously, although VEGF₁₂₁ and VEGF₁₆₅ are the predominant forms, whereas

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-5-

VEGF₂₀₆ is rarely detected [Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999)]. VEGF₁₄₅ differs in that it is primarily expressed in cells derived from reproductive organs [Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13:9-22 (1999)].

The pattern of VEGF-A expression suggests its involvement in the development and maintenance of the normal vascular system, and in angiogenesis associated with tumor growth and other pathological conditions such as rheumatoid arthritis. VEGF-A is expressed in embryonic tissues associated with the developing vascular system, and is secreted by numerous tumor cell lines. Analysis of mice in which VEGF-A was knocked out by targeted gene disruption indicate that VEGF-A is critical for survival, and that the development of the cardiovascular system is highly sensitive to VEGF-A concentration gradients. Mice lacking a single copy of VEGF-A die between day 11 and 12 of gestation. These embryos show impaired growth and several developmental abnormalities including defects in the developing cardiovascular system. VEGF-A is also required post-natally for growth, organ development, regulation of growth plate morphogenesis and endochondral bone formation. The requirement for VEGF-A decreases with age, especially after the fourth postnatal week. In mature animals, VEGF-A is required primarily for active angiogenesis in processes such as wound healing and the development of the corpus luteum. [Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13:9-22 (1999); Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999)]. VEGF-A expression is influenced primarily by hypoxia and a number of hormones and cytokines including epidermal growth factor (EGF), TGF- β , and various interleukins. Regulation occurs transcriptionally and also post-transcriptionally such as by increased mRNA stability [Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999)].

PlGF, a second member of the VEGF subfamily, is generally a poor stimulator of angiogenesis and endothelial cell proliferation in comparison to VEGF-A, and the *in vivo* role of PlGF is not well understood. Three isoforms of PlGF produced by alternative mRNA splicing have been described [Hauser *et al.*, *Growth Factors* 9:259-268 (1993); Maglione *et al.*, *Oncogene* 8:925-931 (1993)]. PlGF forms both disulfide-linked homodimers and heterodimers with VEGF-A. The PlGF-VEGF-A heterodimers are more effective at inducing endothelial cell proliferation

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-6-

and angiogenesis than PlGF homodimers. PlGF is primarily expressed in the placenta, and is also co-expressed with VEGF-A during early embryogenesis in the trophoblastic giant cells of the parietal yolk sac [Stacker and Achen, *Growth Factors* 17:1-11 (1999)].

5 VEGF-B, described in detail in International Patent Publication No. WO 96/26736 and U.S. Patents 5,840,693 and 5,607,918, shares approximately 44% amino acid identity with VEGF-A. Although the biological functions of VEGF-B *in vivo* remain incompletely understood, it has been shown to have angiogenic properties, and may also be involved in cell adhesion and migration, and in regulating the degradation of extracellular matrix. It is expressed as two isoforms of 167 and 186 amino acid residues generated by alternative splicing. VEGF-B₁₆₇ is associated with the cell surface or extracellular matrix via a heparin-binding domain, whereas VEGF-B₁₈₆ is secreted. Both VEGF-B₁₆₇ and VEGF-B₁₈₆ can form disulfide-linked homodimers or heterodimers with VEGF-A. The association to the cell surface of VEGF₁₆₅-VEGF-B₁₆₇ heterodimers appears to be determined by the VEGF-B component, suggesting that heterodimerization may be important for sequestering VEGF-A. VEGF-B is expressed primarily in embryonic and adult cardiac and skeletal muscle tissues [Joukov *et al.*, *J Cell Physiol* 173:211-215 (1997); Stacker and Achen, *Growth Factors* 17:1-11 (1999)]. Mice lacking VEGF-B survive but have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and exhibit impaired recovery from cardiac ischemia [Bellomo *et al.*, *Circ Res* 2000;E29-E35].

10 15 20

A fourth member of the VEGF subfamily, VEGF-C, comprises a VHD that is approximately 30% identical at the amino acid level to VEGF-A. VEGF-C is originally expressed as a larger precursor protein, prepro-VEGF-C, having extensive amino- and carboxy-terminal peptide sequences flanking the VHD, with the C-terminal peptide containing tandemly repeated cysteine residues in a motif typical of Balbiani ring 3 protein. Prepro-VEGF-C undergoes extensive proteolytic maturation involving the successive cleavage of a signal peptide, the C-terminal pro-peptide, and the N-terminal pro-peptide. Secreted VEGF-C protein consists of a non-covalently-linked homodimer, in which each monomer contains the VHD. The intermediate forms of VEGF-C produced by partial proteolytic processing show increasing affinity

25 30

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-7-

for the VEGFR-3 receptor, and the mature protein is also able to bind to the VEGFR-2 receptor. [Joikov et al., *EMBO J.*, 16:(13):3898-3911 (1997).] It has also been demonstrated that a mutant VEGF-C, in which a single cysteine at position 156 is either substituted by another amino acid or deleted, loses the ability to bind VEGFR-2 but remains capable of binding and activating VEGFR-3 [International Patent Publication No. WO 98/33917]. In mouse embryos, VEGF-C mRNA is expressed primarily in the allantois, jugular area, and the metanephros. [Joikov et al., *J Cell Physiol* 173:211-215 (1997)]. VEGF-C is involved in the regulation of lymphatic angiogenesis: when VEGF-C was overexpressed in the skin of transgenic mice, a hyperplastic lymphatic vessel network was observed, suggesting that VEGF-C induces lymphatic growth [Jeltsch et al., *Science*, 276:1423-1425 (1997)]. Continued expression of VEGF-C in the adult also indicates a role in maintenance of differentiated lymphatic endothelium [Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999)]. VEGF-C also shows angiogenic properties: it can stimulate migration of bovine capillary endothelial (BCE) cells in collagen and promote growth of human endothelial cells [see, e.g., International Patent Publication No. WO 98/33917, incorporated herein by reference].

VEGF-D is structurally and functionally most closely related to VEGF-C [see International Patent Publ. No. WO 98/07832, incorporated herein by reference]. Like VEGF-C, VEGF-D is initially expressed as a prepro-peptide that undergoes N-terminal and C-terminal proteolytic processing, and forms non-covalently linked dimers. VEGF-D stimulates mitogenic responses in endothelial cells *in vitro*. During embryogenesis, VEGF-D is expressed in a complex temporal and spatial pattern, and its expression persists in the heart, lung, and skeletal muscles in adults. Isolation of a biologically active fragment of VEGF-D designated VEGF-DΔNΔC, is described in International Patent Publication No. WO 98/07832, incorporated herein by reference. VEGF-DΔNΔC consists of amino acid residues 93 to 201 of VEGF-D linked to the affinity tag peptide FLAG[®].

Four additional members of the VEGF subfamily have been identified in poxviruses, which infect humans, sheep and goats. The orf virus-encoded VEGF-E and NZ2 VEGF are potent mitogens and permeability enhancing factors. Both show

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-8-

approximately 25% amino acid identity to mammalian VEGF-A, and are expressed as disulfide-linked homodimers. Infection by these viruses is characterized by pustular dermatitis which may involve endothelial cell proliferation and vascular permeability induced by these viral VEGF proteins. [Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999);

5 Stacker and Achen, *Growth Factors* 17:1-11 (1999)]. VEGF-like proteins have also been identified from two additional strains of the orf virus, D1701 [GenBank Acc. No. AF106020; described in Meyer *et al.*, *EMBO J* 18:363-374 (1999)] and NZ10 [described in International Patent Application PCT/US99/25869, incorporated herein by reference]. These viral VEGF-like proteins have been shown to bind VEGFR-2

10 present on host endothelium, and this binding is important for development of infection and viral induction of angiogenesis [Meyer *et al.*, *EMBO J* 18:363-374 (1999); International Patent Application PCT/US99/25869].

PDGF/VEGF Receptors

15 Seven cell surface receptors that interact with PDGF/VEGF family members have been identified. These include PDGFR- α (see e.g., GenBank Acc. No. NM006206), PDGFR- β (see e.g., GenBank Acc. No. NM002609), VEGFR-1/Flt-1 (*fms*-like tyrosine kinase-1; GenBank Acc. No. X51602; De Vries *et al.*, *Science* 255:989-991 (1992)); VEGFR-2/KDR/Flk-1 (kinase insert domain containing

20 receptor/fetal liver kinase-1; GenBank Acc. Nos. X59397 (Flk-1) and L04947 (KDR); Terman *et al.*, *Biochem Biophys Res Comm* 187:1579-1586 (1992); Matthews *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9026-9030 (1991)); VEGFR-3/Flt4 (*fms*-like tyrosine kinase 4; U.S. Patent No. 5,776,755 and GenBank Acc. No. X68203 and S66407; Pajusola *et al.*, *Oncogene* 9:3545-3555 (1994)), neuropilin-1 (Gen Bank Acc. No.

25 NM003873), and neuropilin-2 (Gen Bank Acc. No. NM003872). The two PDGF receptors mediate signaling of PDGFs as described above. VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF-B, PlGF-1 and PlGF-2 bind VEGFR-1; VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, and NZ2 VEGF bind VEGFR-2; VEGF-C and VEGF-D bind VEGFR-3; VEGF₁₆₅, PlGF-2, and NZ2 VEGF bind neuropilin-1; and VEGF₁₆₅ binds

30 neuropilin-2. [Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13:9-22 (1999); Stacker and Achen, *Growth Factors* 17:1-11 (1999); Ortega *et al.*, *Front Biosci* 4:141-152 (1999); Zachary, *Intl J*

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-9-

Biochem Cell Bio 30:1169-1174 (1998); Petrova *et al.*, *Exp Cell Res* 253:117-130 (1999)].

The PDGF receptors are protein tyrosine kinase receptors (PTKs) that contain five immunoglobulin-like loops in their extracellular domains. VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3 comprise a subgroup of the PDGF subfamily of PTKs, distinguished by the presence of seven Ig domains in their extracellular domain and a split kinase domain in the cytoplasmic region. Both neuropilin-1 and neuropilin-2 are non-PTK VEGF receptors. NP-1 has an extracellular portion includes a MAM domain; regions of homology to coagulation factors V and VIII, MEGPs and the DDR tyrosine kinase; and two CUB-like domains.

Several of the VEGF receptors are expressed as more than one isoform. A soluble isoform of VEGFR-1 lacking the seventh Ig-like loop, transmembrane domain, and the cytoplasmic region is expressed in human umbilical vein endothelial cells. This VEGFR-1 isoform binds VEGF-A with high affinity and is capable of preventing VEGF-A-induced mitogenic responses [Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999); Zachary, *Intl J Biochem Cell Bio* 30:1169-1174 (1998)]. A C-terminal truncated form of VEGFR-2 has also been reported [Zachary, *Intl J Biochem Cell Bio* 30:1169-1174 (1998)]. In humans, there are two isoforms of the VEGFR-3 protein which differ in the length of their C-terminal ends. Studies suggest that the longer isoform is responsible for most of the biological properties of VEGFR-3.

The receptors for the PDGFs, PDGF α -receptor (PDGFR- α) and the β -receptor (PDGFR- β), are expressed by many *in vitro* grown cell lines, and they are mainly expressed by mesenchymal cells *in vivo* (reviewed in [Raines *et al.*, Peptide growth factors and their receptors, Heidelberg, Springer-Verlag (1990)]. As mentioned above, PDGF-B binds both PDGFRs, while PDGF-A selectively binds PDGFR- α .

Gene targeting studies in mice have revealed distinct physiological roles for the PDGF receptors despite the overlapping ligand specificities of the PDGFRs [Rosenkranz *et al.*, *Growth Factors* 16:201-16 (1999)]. Homozygous null mutations for either of the two PDGF receptors are lethal. PDGFR- α deficient mice die during embryogenesis at e10, and show incomplete cephalic closure, impaired neural crest development, cardiovascular defects, skeletal defects, and edemas. The PDGFR- β

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-10-

deficient mice develop similar phenotypes to animals deficient in PDGF-B, that are characterized by renal, hematological and cardiovascular abnormalities; where the renal and cardiovascular defects, at least in part, are due to the lack of proper recruitment of mural cells (vascular smooth muscle cells, pericytes or mesangial cells) to blood vessels.

The expression of VEGFR-1 occurs mainly in vascular endothelial cells, although some may be present on monocytes, trophoblast cells, and renal mesangial cells [Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13:9-22 (1999)]. High levels of VEGFR-1 mRNA are also detected in adult organs, suggesting that VEGFR-1 has a function in quiescent endothelium of mature vessels not related to cell growth. VEGFR-1^{-/-} mice die *in utero* between day 8.5 and 9.5. Although endothelial cells developed in these animals, the formation of functional blood vessels was severely impaired, suggesting that VEGFR-1 may be involved in cell-cell or cell-matrix interactions associated with cell migration. Recently, it has been demonstrated that mice expressing a mutated VEGFR-1 in which only the tyrosine kinase domain was missing show normal angiogenesis and survival, suggesting that the signaling capability of VEGFR-1 is not essential. [Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13:9-22 (1999); Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999)].

VEGFR-2 expression is similar to that of VEGFR-1 in that it is broadly expressed in the vascular endothelium, but it is also present in hematopoietic stem cells, megakaryocytes, and retinal progenitor cells [Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13:9-22 (1999)]. Although the expression pattern of VEGFR-1 and VEGFR-2 overlap extensively, evidence suggests that, in most cell types, VEGFR-2 is the major receptor through which most of the VEGFs exert their biological activities. Examination of mouse embryos deficient in VEGFR-2 further indicate that this receptor is required for both endothelial cell differentiation and the development of hematopoietic cells [Joukov *et al.*, *J Cell Physiol* 173:211-215 (1997)].

VEGFR-3 is expressed broadly in endothelial cells during early embryogenesis. During later stages of development, the expression of VEGFR-3 becomes restricted to developing lymphatic vessels [Kaipainen, A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 3566-3570 (1995)]. In adults, the lymphatic endothelia and some

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-11-

high endothelial venules express VEGFR-3, and increased expression occurs in lymphatic sinuses in metastatic lymph nodes and in lymphangioma. VEGFR-3 is also expressed in a subset of CD34⁺ hematopoietic cells which may mediate the myeloopoietic activity of VEGF-C demonstrated by overexpression studies [WO 98/33917]. Targeted disruption of the VEGFR-3 gene in mouse embryos leads to failure of the remodeling of the primary vascular network, and death after embryonic day 9.5 [Dumont et al., *Science*, 282: 946-949 (1998)]. These studies suggest an essential role for VEGFR-3 in the development of the embryonic vasculature, and also during lymphangiogenesis.

Structural analyses of the VEGF receptors indicate that the VEGF-A binding site on VEGFR-1 and VEGFR-2 is located in the second and third Ig-like loops. Similarly, the VEGF-C and VEGF-D binding sites on VEGFR-2 and VEGFR-3 are also contained within the second Ig-loop [Taipale et al., *Curr Top Microbiol Immunol* 237:85-96 (1999)]. The second Ig-like loop also confers ligand specificity as shown by domain swapping experiments [Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999)]. Receptor-ligand studies indicate that dimers formed by the VEGF family proteins are capable of binding two VEGF receptor molecules, thereby dimerizing VEGF receptors. The fourth Ig-like loop on VEGFR-1, and also possibly on VEGFR-2, acts as the receptor dimerization domain that links two receptor molecules upon binding of the receptors to a ligand dimer [Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999)]. Although the regions of VEGF-A that bind VEGFR-1 and VEGFR-2 overlap to a large extent, studies have revealed two separate domains within VEGF-A that interact with either VEGFR-1 or VEGFR-2, as well as specific amino acid residues within these domains that are critical for ligand-receptor interactions. Mutations within either VEGF receptor-specific domain that specifically prevent binding to one particular VEGF receptor have also been recovered [Neufeld et al., *FASEB J* 13:9-22 (1999)].

VEGFR-1 and VEGFR-2 are structurally similar, share common ligands (VEGF₁₂₁ and VEGF₁₆₅), and exhibit similar expression patterns during development. However, the signals mediated through VEGFR-1 and VEGFR-2 by the same ligand appear to be slightly different. VEGFR-2 has been shown to undergo autophosphorylation in response to VEGF-A, but phosphorylation of VEGFR-1 under

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-12-

identical conditions was barely detectable. VEGFR-2 mediated signals cause striking changes in the morphology, actin reorganization, and membrane ruffling of porcine aortic endothelial cells recombinantly overexpressing this receptor. In these cells, VEGFR-2 also mediated ligand-induced chemotaxis and mitogenicity; whereas VEGFR-1-transfected cells lacked mitogenic responses to VEGF-A. Mutations in VEGF-A that disrupt binding to VEGFR-2 fail to induce proliferation of endothelial cells, whereas VEGF-A mutants that are deficient in binding VEGFR-1 are still capable of promoting endothelial proliferation. Similarly, VEGF stimulation of cells expressing only VEGFR-2 leads to a mitogenic response whereas comparable stimulation of cells expressing only VEGFR-1 also results in cell migration, but does not induce cell proliferation. In addition, phosphoproteins co-precipitating with VEGFR-1 and VEGFR-2 are distinct, suggesting that different signaling molecules interact with receptor-specific intracellular sequences.

The emerging hypothesis is that the primary function of VEGFR-1 in angiogenesis may be to negatively regulate the activity of VEGF-A by binding it and thus preventing its interaction with VEGFR-2, whereas VEGFR-2 is thought to be the main transducer of VEGF-A signals in endothelial cells. In support of this hypothesis, mice deficient in VEGFR-1 die as embryos while mice expressing a VEGFR-1 receptor capable of binding VEGF-A but lacking the tyrosine kinase domain survive and do not exhibit abnormal embryonic development or angiogenesis. In addition, analyses of VEGF-A mutants that bind only VEGFR-2 show that they retain the ability to induce mitogenic responses in endothelial cells. However, VEGF-mediated migration of monocytes is dependent on VEGFR-1, indicating that signaling through this receptor is important for at least one biological function. In addition, the ability of VEGF-A to prevent the maturation of dendritic cells is also associated with VEGFR-1 signaling, suggesting that VEGFR-1 may function in cell types other than endothelial cells. [Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999); Zachary, *Int J Biochem Cell Bio* 30:1169-1174 (1998)].

Neuropilin-1 was originally cloned as a receptor for the collapsin/semaphorin family of proteins involved in axon guidance [Stacker and Achen, *Growth Factors* 17:1-11 (1999)]. It is expressed in both endothelia and specific subsets of neurons

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-13-

during embryogenesis, and it thought to be involved in coordinating the developing neuronal and vascular system. Although activation of neuropilin-1 does not appear to elicit biological responses in the absence of the VEGF family tyrosine-kinase receptors, their presence on cells leads to more efficient binding of VEGF₁₆₅ and VEGFR-2 mediated responses. [Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13:9-22 (1999)] Mice lacking neuropilin-1 show abnormalities in the developing embryonic cardiovascular system. [Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13:9-22 (1999)]

Neuropilin-2 was identified by expression cloning and is a collapsin/semaphorin receptor closely related to neuropilin-1. Neuropilin-2 is an isoform-specific VEGF^r receptor in that it only binds VEGF₁₆₅. Like neuropilin-1, neuropilin-2 is expressed in both endothelia and specific neurons, and is not predicted to function independently due to its relatively short intracellular domain. The function of neuropilin-2 in vascular development is unknown [Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13:9-22 (1999); WO 99/30157].

Therapeutic applications for VEGF^r polypeptides and antagonists

The discovery of VEGF-A as a key regulator of vascular development has spurred active research using VEGF-based therapeutic angiogenesis in cardiovascular medicine, as well as for treating diseases characterized by pathological angiogenesis with VEGF antagonists. Subsequent identification of additional VEGF family proteins and their roles in vascularization have also led to the development of therapies based on these growth factors [Ferrara and Alitalo, *Nature Med* 5:1359-1364 (1999)]. Animal studies of hindlimb ischemia, and myocardial ischemia using VEGF-A or VEGF-C, delivered by administration of recombinant protein or gene transfer using naked DNA or adenoviral vectors, implicate these molecules in promoting vascularization and increasing coronary blood flow. These promising results have led to clinical trials in which patients with limb ischemia were treated by arterial or intramuscular gene transfer of naked DNA encoding VEGF₁₆₅. Patients with myocardial ischemia or Burger's disease (thromboangiitis obliterans) were also injected locally with VEGF₁₆₅ plasmid DNA. Although these trials were not placebo-controlled, the patients showed clinical improvement and evidence of angiogenesis in

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-14-

ischemic tissues. Trials using gene transfer of VEGF-C naked DNA or gene therapy with VEGF₁₂₁ using adenoviral vectors to treat patients with myocardial ischemia are currently in Phase I [Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999); Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13:9-22 (1999); Ferrara and Alitalo, *Nature Med* 5:1359-1364 (1999)]. The therapeutic effects of administering recombinant VEGF-A protein are also being tested in ongoing clinical trials. Results from a Phase I study of patients with coronary ischemia treated with intracoronary infusion of recombinant VEGF₁₆₅ show evidence of improved perfusion and collateralization. However, in the subsequent Phase II study, the patients did not show significant improvement over the placebo-controlled group. Other potential therapeutic uses for VEGF growth factors include using VEGF-C to promote lymphangiogenesis in patients whose axillary lymph nodes were removed during breast carcinoma surgery. Therapies using combinations of growth factors to promote vascularization in tissues may also prove to be preferable in treating certain diseases [Ferrara and Alitalo, *Nature Med* 5:1359-1364 (1999)].

Therapies based on inhibiting the activity of VEGF growth factors are being tested to treat disease states characterized by pathological angiogenesis. VEGF expression is upregulated in most human tumors including primary breast cancer and gastric carcinoma. Studies in mice indicate that tumor-associated angiogenesis and growth of the tumor cells can be inhibited by treating the animals with monoclonal antibodies against VEGF-A. Further animal studies showed that expression of a dominant negative VEGFR-2 mutant that prevents signaling through this receptor, or administration of recombinant VEGFR-1 or VEGFR-2 mutants, which only contain the extracellular portion of these receptors, suppresses growth of several tumor cell lines. These encouraging results led to clinical trials using humanized high affinity monoclonal antibodies against VEGF-A (rhMAb VEGF) as VEGF-A inhibitors. Phase II studies using rhMAb VEGF to treat non-small cell lung carcinoma, colorectal carcinoma, breast, and renal cell carcinoma are currently ongoing. Compounds targeting inhibition of VEGF-C activity are also being tested for therapeutic uses in cancer patients: small molecule inhibitors of VEGF-C are in Phase II trials, and monoclonal antibodies against VEGF-C are entering clinical trials.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-15-

Retinopathy associated with diabetes mellitus, occlusion of central retinal vein or prematurity has been correlated with increased levels of VEGF-A. Animal studies using monoclonal antibodies against VEGF-A or soluble VEGFR-1 or VEGFR-2 mutants containing only the extracellular domain fused to immunoglobulin γ domain show suppression of retinal angiogenesis. VEGF-A is also detected in age-related macular degeneration (AMD), and its expression is thought to be the cause of neovascularization in this disease. Intravitreal delivery of recombinant humanized anti-VEGF-A Fab antibody fragment or injection of 2'-fluoropyrimidine RNA oligonucleotide ligands (aptamers) to treat AMD are currently in clinical trials. Compounds that inhibit the activity of VEGF growth factors may also be used to treat other disease states involving abnormal angiogenesis. These include ischemic-reperfusion related brain edema and injury, conditions associated with ovarian hyperplasia and hypervascularity such as the polycystic ovary syndrome, endometriosis, and ovarian hyperstimulation syndrome [Ferrara and Altalo, *Nature Med* 5:1359-1364 (1999)].

From the foregoing discussion, it will be apparent that the VEGF family of growth factors, and inhibitors thereof, have tremendous potential as therapeutics. For example, such growth factors and inhibitors are useful to promote or inhibit angiogenesis where needed, such as in the treatment of ischemic disorders, the promotion of wound healing, or the inhibition or elimination of neoplastic disorders that are angiogenesis-dependent. However, the various naturally-occurring members of this growth factor family often bind multiple receptors, and the various known receptors are expressed on multiple cell types and have expression patterns that may vary depending on stage of development and the presence or absence of pathological conditions. The biological effects of any particular growth factor may be receptor-dependent, isoform dependent, and cell-type dependent. A desirable therapeutic effect mediated through one receptor may be accompanied by undesirable side-effects mediated through another receptor. Alternatively, a desirable therapeutic effect might be enhanced through stimulation of multiple receptors that cannot be stimulated with any single known growth factor that occurs in nature. Therefore, a need exists for

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-16-

novel peptide growth factors with their own unique profile of receptor binding and receptor-stimulating or receptor-inhibiting activities.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention satisfies needs identified above by providing novel polypeptide binding molecules for naturally occurring vascular endothelial growth factor receptors, and polynucleotides that encode the novel polypeptides and are useful for recombinant expression of the polypeptides. For the purpose of describing the invention, the term "vascular endothelial growth factor" and the abbreviation "VEGF" (without modifier) are used herein in a generic sense, to describe any of a family of growth factor polypeptides including but not limited to Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A), Vascular Endothelial Growth Factor-B (VEGF-B), Vascular Endothelial Growth Factor-C (VEGF-C), Vascular Endothelial Growth Factor-D (VEGF-D), Platelet Derived Growth Factor-A (PDGF-A), Platelet Derived Growth Factor-B (PDGF-B), Placenta Growth Factor (PGF), and virally encoded VEGF-like molecules. VEGF-A is commonly referred to in the art as "Vascular Endothelial Growth Factor" or as "VEGF," but for clarity shall be referred to herein as VEGF-A or referred to as specific isoforms (e.g., VEGF₁₆₅) of VEGF-A.

For example, in one aspect, the invention provides a chimeric polypeptide comprising a plurality of peptide subunits derived from two or more naturally-occurring vertebrate vascular endothelial growth factor polypeptides that have different vascular endothelial growth factor receptor binding profiles, wherein the chimeric polypeptide binds at least one receptor of one of the naturally-occurring vascular endothelial growth factor polypeptides, and wherein the chimeric polypeptide has a different receptor binding profile than the naturally-occurring growth factor polypeptides. Isolated and purified chimeric polypeptides are preferred.

In this context, the term "naturally-occurring vertebrate vascular endothelial growth factor polypeptides" means polypeptides having the following characteristics:

(1) the polypeptide is encoded by genomic DNA of a vertebrate (e.g., a reptile, amphibian, bird, or mammal, preferably a bird or mammal, most preferably a

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-17-

mammal; especially a primate mammal such as a monkey, ape, or human) or is encoded by the genome of a vertebrate pathogen such as mammalian pox viruses;

(2) the polypeptide comprises all or a portion of an amino acid sequence that is expressed by a vertebrate (*i.e.*, from transcription/translation of the vertebrate's genomic DNA or from virally-induced transcription/translation, in the case of polypeptides encoded by viral nucleic acids);

(3) the polypeptide or portion comprises a VEGF/PDGF homology domain (V/PHD) of about 70-150 amino acids that binds to naturally-occurring receptors and that is characterized in part by the amino acid motif: C-X(18-28)-P-X-C-X(4)-R-C-X-G-C(1-2)-X(6-12)-C-X(30-46)-C, where X represents any amino acid and numbers in parentheses represent a permissible range of amino acids (e.g., X(18-28) represents a stretch of any 18-28 amino acids; C(1-2) represents one or two cysteine residues). The V/PHD usually includes eight conserved cysteines which form a cysteine knot motif similar to that found in human Vascular Endothelial Growth Factors A, B, C, and D (VEGF-A, -B, -C, and -D), and human platelet-derived growth factors (PDGFs). Preferred polypeptides or portions comprise a V/PHD that is characterized by the more particular amino acid motif C-X(22-24)-P-[PSR]-C-V-X(3)-R-C-X-G-C-C-X(6)-C-X(32-41)-C, where amino acids in brackets (e.g., [PSR]) represent alternatives for a single position in the amino acid sequence; and

(4) the polypeptide binds to at least one cell surface receptor that is expressed on endothelial cells that line vertebrate blood or lymphatic vessels or pericytes/smooth muscle cells that line and support blood vessels. Preferred polypeptides bind to a least one cell surface receptor that is expressed on endothelial cells.

Thus, the term "naturally-occurring vertebrate VEGF polypeptides" means polypeptides that have certain specified structural and functional properties. The term is not intended in this context to imply a source of origin. Thus, recombinantly produced polypeptides that satisfy the above criteria because they have an amino acid sequences and receptor binding properties of VEGF polypeptides that exist in nature are considered "naturally-occurring". Numerous exemplary naturally occurring vascular endothelial growth factor polypeptides are already known in the art, including but not limited to human Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A),

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-18-

Vascular Endothelial Growth Factor-B (VEGF-B), Vascular Endothelial Growth Factor-C (VEGF-C), Vascular Endothelial Growth Factor-D (VEGF-D), Platelet Derived Growth Factor-A (PDGF-A), Platelet Derived Growth Factor-B (PDGF-B), Placenta Growth Factor (PlGF); mammalian and avian orthologs thereof (where the term "ortholog" means species homolog); and Vascular Endothelial Growth Factor E (VEGF-E), NZ2 VEGF, and the two VEGF-like proteins identified in strains D1701 and NZ10, which have been identified in poxviruses. The use of naturally occurring human VEGFs is preferred for the purposes of developing chimeric molecules that are useful as human therapeutics, in order to minimize the likelihood of developing chimerics that generate an immune response in humans. However, in many cases there is very high homology between VEGF species orthologs, especially in receptor binding domains, and it is contemplated that non-human naturally occurring VEGFs also can be used to generate chimeric molecules for use in treating humans. Although the invention is described herein in part with reference to particular VEGF-A/VEGF-C chimeric polypeptides, chimeric polypeptides derived from any pair, or three, or four, or more of the VEGFs described herein or their species orthologs is particularly contemplated.

As used to describe this aspect of the invention, the term "chimeric" requires that the amino acid sequence of the chimeric molecule include at least one stretch of one or more amino acids (preferably stretches of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, or more amino acids) from each of the naturally-occurring VEGFs from which it was derived. Thus, the chimeric polypeptide is a "hybrid" or "mosaic" of two or more polypeptides. By "chimeric" is meant that the polypeptide of the invention is not identical to any naturally occurring VEGF sequence (or fragment of a natural VEGF sequence).

As used to describe this aspect of the invention, the term "derived from" (as in "derived from two or more naturally occurring VEGF polypeptides") means that, when the amino acid sequences of the chimeric polypeptide and the two or more naturally occurring VEGFs are aligned using a standard algorithm, substantially all of the amino acids in the chimeric polypeptide are aligned with an identical residue in one or more of the naturally occurring VEGFs from which the chimeric was derived.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-19-

Standard protein alignment algorithms, for example, the clustal method [*Nucl Acids Res* 22:4673-80 (1994)], the Jotun-Hein method [*Methods Enzymol* 183:626-645 (1990)], or the Feng-Doolittle method [*J Mol Evol* 25:351-360 (1987)], can be used to align naturally-occurring vertebrate vascular endothelial growth factor polypeptides, such alignments being greatly facilitated by the presence of the eight highly conserved cysteines dispersed through the V/PHD. Thus, it is readily established that a chimeric polypeptide is "derived from" two or more naturally occurring VEGF's by performing an alignment using any generally accepted protein alignment algorithm. If, after aligning the amino acid sequences of a chimeric polypeptide and two or more naturally occurring VEGF's using any standard algorithm, substantially all of the amino acids in the chimeric polypeptide are aligned with an identical residue in one or more of the naturally occurring VEGF's, then the chimeric polypeptide was derived from the naturally occurring VEGF's. In one embodiment, all of the amino acids of the chimeric molecule will align in this manner. However, the use of the term "substantially all" reflects the fact that techniques described herein for making chimeric polypeptides will sometimes introduce mutations such as insertions, deletions, or substitutions, preventing 100% correlation to parent sequences. In such cases, at least about 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% of the residues of the chimeric polypeptide will align with identical residues from at least one of the natural VEGF's.

When presented with a chimeric polypeptide of the invention that aligns perfectly or substantially with the natural VEGF polypeptides from which it was derived, it is within the skill of the art to intentionally introduce mutations (especially conserved mutations) into the chimeric polypeptide and test such a modified chimeric polypeptide for its receptor binding profile. Modifications of chimeric polypeptides (especially conserved amino acid substitutions) that do not introduce substantial changes in receptor binding profile are intended as equivalents within the scope of the present invention.

In the context of such chimeric polypeptides, the term "plurality of peptide subunits" means two or more peptide subunits. Exemplified herein are chimeric polypeptides obtained by fragmenting two naturally occurring VEGF cDNA's (human

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-20-

VEGF-A and human VEGF-C) into nine subunits of about 8-16 codons each, recombining these fragments into all 512 permutations of the nine subunits (maintaining subunit order), and expressing the resultant chimeric cDNAs. The number and the size of fragments is not intended as a critical feature. In preferred
 5 embodiments, plurality comprises 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, or 25 or more subunits. As exemplified herein, the "subunits" are joined by peptide bonds to form a polypeptide chain.

In the context of chimeric polypeptides of the invention or naturally occurring VEGF polypeptides, determination of "vascular endothelial growth factor receptor
 10 binding profile" means the determination of the receptors to which a polypeptide will bind and the receptors to which it will not. Known VEGF receptors, including VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3, are described in greater detail elsewhere herein. Known PDGF receptors are also described in greater detail elsewhere herein. Where a chimeric polypeptide has been derived in part from a naturally occurring PDGF
 15 sequence, screening the chimeric polypeptide for binding to PDGF receptors is contemplated as part of the receptor binding profile determination.) By way of example, if a chimeric polypeptide was derived from a VEGF-A that binds to VEGFR-1 and VEGFR-2 and from a VEGF-C that binds to VEGFR-2 and VEGFR-3, the chimeric polypeptide has a different receptor binding profile than either of its
 20 parent molecules if it binds to only one of the three receptors, or if it binds to all three receptors, or if it binds to VEGFR-1 and VEGFR-3 but not VEGFR-2. In one preferred embodiment, the invention provides chimeric polypeptides wherein the chimeric polypeptide binds to at least two VEGF receptors bound by the two or more naturally occurring vertebrate VEGF polypeptides, and wherein each of the
 25 naturally-occurring VEGF polypeptides from which the chimeric polypeptide was derived fail to bind to one or more of the at least two VEGF polypeptides.

Screening polypeptides of the invention for binding to the neuropilins NP-1 and NP-2 are not contemplated as part of the receptor binding profile determination, because the portions of VEGF (and other family members) responsible for NP-1 and
 30 NP-2 binding are portions outside of the V/PHD core region. NP-1 binding is mediated by amino acid residues 142 to 185 of SEQ ID NO: 2 for VEGF-A, and

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-21-

amino acid residues 138 to 182 for VEGF-B [Soker *et al.*, *J Biol Chem* 271:5761-7 (1996); Mäkinen *et al.*, *J Biol Chem* 274:21217-22 (1999)]. As explained below, addition of upstream or downstream sequences to chimeric polypeptides of the invention is contemplated, and some added sequences are contemplated to result in NP-1 or NP-2 binding.

The present invention is believed to provide the first disclosure of a polypeptide that is capable of binding to all of VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3. All polypeptides having this receptor binding profile are intended as within the scope of the invention.

Naturally occurring VEGF polypeptides generally bind their respective receptors with high affinity, which is generally understood in this context to mean binding with a sub-nanomolar dissociation constant. For example, VEGF-A binds VEGFR-1 and VEGFR-2 with Kd of approximately 16 pM and 760 pM, respectively; and VEGF-C binds VEGFR-2 and VEGFR-3 with Kd of approximately 410 pM and 135 pM, respectively. Because it is possible to administer a therapeutic growth factor protein to achieve concentrations exceeding normal serum concentrations, and to formulate such polypeptides to increase biological half-life, it is contemplated that chimeric polypeptides having less receptor affinity (i.e., higher dissociation constants) nonetheless will be useful as receptor agonists and antagonists. For the purposes of scoring receptor binding of chimeric polypeptides, a 50 nanomolar dissociation constant cutoff is selected. Chimeric polypeptides that bind a receptor with a dissociation constant of less than 50 nanomolar as determined by any conventional and recognized method, such as those described in Coligan *et al.*, *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, New York, John Wiley & Sons, Inc., p. A.5A.1-A.5A.40 (1998), incorporated herein by reference, is scored as binding to a receptor, and polypeptides with lower affinities are scored as non-binding.

It is well known in the literature that naturally occurring VEGFs are expressed as splice variants and/or as pro-protein molecules and/or as prepro-protein molecules that undergo proteolytic processing. Chimeric polypeptides of the invention include chimeric (hybrid) receptor binding domains as explained in the preceding paragraphs, and optionally may include additional upstream or downstream sequences from

naturally occurring VEGF's, including upstream and downstream sequences that are present in mature isoforms of naturally occurring circulating VEGF's; and/or upstream or downstream pro-peptide sequences that are removed during normal intracellular or extracellular processing. By way of illustration, the chimeric polypeptides described in Example 1 were prepared using residues 34-135 (SEQ ID NO: 2) of VEGF-A and using 112-216 of human prepro-VEGF-C (SEQ ID NO: 22). Chimeric polypeptides of the invention include the peptides actually exemplified, and also include such peptides modified by the addition of upstream or downstream VEGF-A or VEGF-C sequences from SEQ ID NOs: 2 or 22. With respect to VEGF-A/VEGF-C chimeric polypeptides as exemplified herein, the addition of upstream and downstream sequences that correspond with amino- and/or carboxyl- terminal sequences characteristic of natural VEGF-A or VEGF-C isoforms is particularly contemplated.

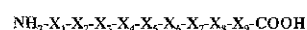
It is also well known in the literature to recombinantly express proteins with an initiator methionine, with a heterologous signal peptide, with one or more tag sequences to facilitate purification, as fusions with other polypeptides, and the like. It is also well known to modify polypeptides with glycosylation, pegylation, or other modifications, some of which improve stability, circulating half-life, or (in the case of glycosylation) may make the polypeptide more similar to endogenous vascular endothelial growth factors. Chimeric polypeptides according to the invention may comprise any such modifications and additions to the amino acid sequence derived from two or more naturally-occurring vertebrate vascular endothelial growth factor polypeptides.

In addition to chimeric molecules having different receptor binding profiles, an additional aspect of the invention includes chimeric molecules having increased receptor binding affinity. For example, the invention provides a chimeric polypeptide comprising a plurality of peptide subunits derived from two or more naturally-occurring vertebrate vascular endothelial growth factor polypeptides, wherein the chimeric polypeptide binds at least one naturally-occurring vascular endothelial growth factor receptor with an increased binding affinity compared to the binding affinity of the two or more naturally-occurring vascular endothelial growth factors for the receptor. Chimeric molecules that bind a receptor with greater affinity than

naturally occurring VEGF's are among the preferred chimeric molecules of the invention, even if the receptor binding profile for the chimeric molecules is identical to that of a naturally occurring VEGF. Increased receptor binding affinity is expected to correlate with great potency as receptor activators or inhibitors. Generally, dissociation constants (K_d) determined by any accepted procedure are indicative of receptor affinity, with lower K_d indicative of greater binding affinity. Particularly contemplated are chimeric molecules that display any reduction in K_d that is statistically significant at a level of $p < 0.05$ in side-by-side tests [see, e.g., Coligan *et al.*, *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, New York, John Wiley & Sons, Inc., p. A.5A.1-A.5A.40 (1998)] compared to naturally-occurring molecules from which the chimera was derived. Chimeras that show a twenty percent reduction in K_d (i.e., increased binding affinity) with respect to a VEGF receptor are preferred. Reductions of 33% or 50% are highly preferred. A 3-fold reduction (e.g., a K_d of 33.3 pM for a chimeric polypeptide compared to a 100 pM K_d of a naturally occurring VEGF), 5-fold reduction, 10-fold reduction, or 20-fold reduction in dissociation constants or is very highly preferred.

Another related preferred class of chimeric molecules are those molecules that display any reduction in EC_{50} concentration that is statistically significant at a level of $p < 0.05$ in side-by-side tests compared to naturally-occurring molecules from which the chimera was derived. Chimeras that show a twenty percent reduction in EC_{50} (i.e., increased binding affinity) with respect to a VEGF receptor are preferred. Reductions of 33% or 50% are highly preferred. EC_{50} , or the half effective concentration, is the concentration that produces 50% of a maximal effect. An exemplary assay for determining the EC_{50} of a putative ligand for a specific receptor is set forth in Example 6, below.

The Examples set forth below provide a description of the synthesis and assaying of numerous specific hybrid polypeptides of the invention, every one of which is itself intended as an aspect of the invention. A preferred group of hybrid polypeptides from among the exemplified polypeptides are polypeptides that comprise an amino acid sequence of the formula:



WO 01/62942

PCT/US01/06113

-24-

wherein X_1 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acids 3-11 of SEQ ID NO: 128 and amino acids 3-11 of SEQ ID NO:137; wherein X_2 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 129 and 138; wherein X_3 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 130 and 139; wherein X_4 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 131 and 140; wherein X_5 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 132 and 141; wherein X_6 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 133 and 142; wherein X_7 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 134 and 143; wherein X_8 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 135 and 144; wherein X_9 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 136 and 145; wherein $NH_2-X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-COOH$ is not identical to amino acids 34 to 135 of SEQ ID NO: 2 or amino acids 112 to 216 of SEQ ID NO: 22; and wherein the polypeptide binds to at least one receptor selected from the group consisting of human VEGFR-1, human VEGFR-2, and human VEGFR-3. As described below in greater detail, each of the specified amino acid sequence pairs (e.g., SEQ ID NO: 128 and 137) are encoded by a VEGF-A cDNA fragment or a VEGF-C cDNA fragment that align with each other when the receptor binding domains of VEGF-A and VEGF-C are aligned to maximize sequence homology, using standard alignment algorithms.

With respect to the foregoing genus of hybrid of polypeptides, one preferred subgenus comprises those polypeptides which bind to exactly one receptor selected from the group consisting of human VEGFR-1, human VEGFR-2, and human VEGFR-3. Initial screens suggest that the following specific constructs (described below in detail) satisfy this criteria: 82-14, 82-16, 22-3, 72-6, 12-14, 12-16, 32-9, 32-11, 32-14, 32-15, 32-16, 52-9, 52-11, 52-14, 52-15, 14-7, 23-10, 23-12, 23-14, 33-1, 33-3, 33-6, 33-9, 53-1, 53-3, 53-7, 62-8, 62-10, 62-13, 63-3, 63-6, 73-7, 73-15, -8, 74-10, 74-12, 11-9, 11-13, 12-1, 12-5, 81-9, 81-13, 13-9, 13-11, 13-13, 13-15, 14-1, 14-5, 41-1, 43-1, 83-9, 83-13, 83-15, 61-1, 61-3, 62-1, 82-5, 84-1, 84-5.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-25-

Another preferred subgenus comprises those hybrid polypeptides that bind to VEGFR-1 and VEGFR-3, but not to VEGFR-2. Initial screens suggest that the following specific constructs satisfy this criteria: 12-9, 12-13, 14-9, 82-9, 82-13, 84-9.

A highly preferred subgenus comprises hybrid polypeptides of the invention that bind VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3. Initial screens suggest that the following specific constructs satisfy this criteria: 12-7, 12-11, 82-11, 84-11.

Other subgenuses include hybrid polypeptides that bind VEGFR-1 and VEGFR-2 (both of which are bound by VEGF-A) but not VEGFR-3; and hybrid polypeptides that bind VEGFR-2 and VEGFR-3 (both of which are bound by fully processed VEGF-C) but not VEGFR-1.

As taught in greater detail below, the fourth fragment (X_4) appears to include residues that are important for conferring VEGFR-3 binding affinity. For this reason, another preferred genus of the hybrid polypeptides are those wherein X_4 comprises SEQ ID NO: 140, and wherein the polypeptide binds to VEGFR-3. Fragments 5 and 8 of VEGF-C also appear to contribute to VEGFR-3 binding. Thus, highly preferred are polypeptides further characterized by X_3 comprising SEQ ID NO: 141, and/or X_4 comprising SEQ ID NO: 144.

Similarly, the data below suggests that fragments 2 and 7 of VEGF-A contribute to VEGFR-1 binding. Thus, another preferred genus of the hybrid polypeptides are those wherein X_2 comprises SEQ ID NO: 129, and wherein the polypeptide binds to VEGFR-1. In a highly preferred embodiment, X_2 comprises SEQ ID NO: 134. In an embodiment where it is desirable for this polypeptide also to bind to VEGFR-3, a preferred construct is one wherein X_4 comprises SEQ ID NO: 140. To confer VEGFR-3 binding, it is still more preferable for X_3 to comprise SEQ ID NO: 141, and/or for X_5 to comprise SEQ ID NO: 144.

The recombination experiments described below to generate hybrid molecules were performed only with receptor binding domains of human VEGF-A and VEGF-C, rather than with sequences corresponding to natural secreted forms of VEGF-A and VEGF-C or pre-protein or prepro-protein sequences. However, routine recombinant DNA techniques, such as those described in Ausubel, *et al.* (Eds.), *Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1994-1999) or Sambrook *et al.*, (Eds.),

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-26-

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1989), can be used to join polynucleotides encoding the hybrid proteins with polynucleotides encoding VEGF-A or VEGF-C sequences that are found upstream or downstream of the receptor binding domain in naturally-occurring proteins, especially sequences found in naturally-occurring secreted and circulating forms of VEGF-A or VEGF-C.

Thus, the invention provides a polypeptide comprising an amino acid sequence of the formula X_N -V/PHD- X_C , wherein X_N is selected from the group consisting of amino acids 1-34 of SEQ ID NO: 2, amino acids 1-111 of SEQ ID NO: 22, amino acids 1-34 of SEQ ID NO: 147, or fragments thereof;

wherein V/PHD is a chimeric polypeptide as described elsewhere herein;

wherein X_C is selected from the group consisting of amino acids 136-191 of SEQ ID NO: 2, amino acids 217-419 of SEQ ID NO: 22, amino acids 136-232 of SEQ ID NO: 147, or fragments thereof; and

wherein X_N and X_C are each identical to amino acid sequence in a naturally occurring human VEGF-A or VEGF-C precursor protein or a naturally occurring human VEGF-A or VEGF-C isoform.

In one specific variation, the invention provides hybrid polypeptides as described above, wherein the polypeptide further includes one or more amino acid sequences selected from the group consisting of a prepro-VEGF-C signal peptide, a prepro-VEGF-C amino-terminal propeptide, and a prepro-VEGF-C carboxy-terminal pro-peptide.

Expression of hybrid polypeptides of the invention is not restricted to expression only with naturally-occurring flanking VEGF-A or VEGF-C sequences, however. Expression of polypeptides of the invention in bacteria may be accomplished by including an initiator methionine or methionine-lysine upstream of the hybrid VEGF sequences, whereas expression and secretion in mammalian cells is most conveniently accomplished by including at least a signal peptide. Thus, in one embodiment, the invention provides a polypeptide as described above, wherein the polypeptide further includes an amino terminal methionine residue or an amino-terminal Met-Lys sequence. In another embodiment, the polypeptide further includes

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-27-

a signal peptide amino acid sequence connected to the amino acid sequence of the formula $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-X}_3\text{-X}_4\text{-X}_5\text{-X}_6\text{-X}_7\text{-X}_8\text{-X}_9\text{-COOH}$.

Expression of polypeptides of the invention as fusions with other heterologous sequences, such as tag sequences to facilitate purification or expression as part of larger fusion peptides also is contemplated. An exemplary tag of this type is a poly-histidine sequence, generally around six histidine residues, that permits isolation of a compound so labeled using nickel chelation. Other labels and tags, such as the FLAG[®] tag (Fastman Kodak, Rochester, NY), well known and routinely used in the art, are embraced by the invention. Exemplary fusions include use of commercially available vectors that express a desired polypeptide as part of glutathione-S-transferase (GST) fusion product. After cleavage of the GST component from the desired polypeptide, an additional glycine residue at position -1 may remain. Variants which result from expression in other vector systems are also contemplated.

By virtue of the receptor binding and activity assays described herein, the present application also provides variants (analogs) of the hybrid polypeptides of the invention, wherein one or more amino acids of the hybrid peptide amino acid sequence has been added, deleted, or substituted by another amino acid, and wherein the hybrid retains the receptor binding and/or a biological activity characteristic of the hybrid polypeptide.

Substitution variants wherein merely conservative substitutions have been introduced (e.g., by modification of polynucleotides encoding polypeptides of the invention) are intended as equivalents of hybrid polypeptides of the invention. Amino acids can be classified according to physical properties and contribution to secondary and tertiary protein structure. A conservative substitution is recognized in the art as a substitution of one amino acid for another amino acid that has similar properties. Exemplary conservative substitutions based on amino acid side chain properties are set out in the table immediately below, using standard one letter abbreviations.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-28-

SIDE CHAIN	
<u>CHARACTERISTIC</u>	<u>AMINO ACID</u>
Aliphatic	
5 Non-polar	GA P I L V
Polar - uncharged	C S T M N Q
Polar - charged	D E K R
Aromatic	F W Y
Other	N Q D E

10

Alternatively, conservative amino acids can be grouped as described in Lehninger,
 [Biochemistry, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY:NY (1975), pp. 71-77] as
 set out in the table immediately below.

15

Non-polar (hydrophobic) side chain

Aliphatic: A L I V P

Aromatic: F W

Sulfur-containing: M

20

Borderline: G

Uncharged-polar side chain

Hydroxyl: S T Y

Amides: N Q

Sulfhydryl: C

25

Borderline: G

Positively Charged (Basic): K R H

Negatively Charged (Acidic): D E

30

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-29-

The following table provides still another alternative, exemplary set of conservative amino acid substitutions. Both one letter and three letter abbreviations are shown:

	<u>Original</u>	<u>Conservative</u>
	<u>Residue</u>	<u>Substitutions</u>
5	Ala (A)	Val, Leu, Ile
	Arg (R)	Lys, Gln, Asn
	Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
	Asp (D)	Glu
10	Cys (C)	Ser
	Gln (Q)	Asn
	Glu (E)	Asp
	His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
	Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,
15	Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
	Lys (K)	Arg, Gln, Asn
	Met (M)	Leu, Phe, Ile
	Phe (F)	Ile, Val, Ile, Ala
	Pro (P)	Gly
20	Ser (S)	Thr
	Thr (T)	Ser
	Trp (W)	Tyr
	Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
25	Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

For many proteins, the effects of any individual or small group of amino acid changes is unlikely to significantly alter biological properties, especially if the changes are conservative substitutions, provided the changes are not introduced at critical residues. Preferred variants of the hybrid polypeptides of the invention share at least

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-30-

about 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% amino acid identity with hybrids that consist entirely of amino acid sequences derived from naturally occurring VEGF's.

Identity and similarity of related nucleic acid molecules and polypeptides can be readily calculated by known methods. Such methods include, but are not limited to, those described in Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; and Carillo et al., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988).

Preferred methods to determine identity and/or similarity are designed to give the largest match between the sequences tested. Methods to determine identity and similarity are described in publicly available computer programs. Preferred computer program methods to determine identity and similarity between two sequences include, but are not limited to, the GCG program package, including GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res., 12:387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)). The BLASTX program is publicly available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and other sources (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul et al., supra). The well known Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity.

Preferred parameters for a polypeptide sequence comparison include the following:

Algorithm: Needleman et al., J. Mol. Biol., 48, 443-453 (1970);
 Comparison matrix: BLOSUM 62 from Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915-10919 (1992);
 Gap Penalty: 12
 Gap Length Penalty: 4
 Threshold of Similarity: 0

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-31-

Preferred parameters for nucleic acid molecule sequence comparisons include the following:

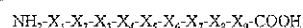
Algorithm: Needleman et al., J. Mol Biol., 48: 443-453 (1970);

Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0

5 Gap Penalty: 50

Gap Length Penalty: 3

Thus, in still another embodiment, the invention provides a polypeptide comprising a non-naturally occurring vascular endothelial growth factor amino acid sequence, wherein said non-naturally occurring vascular endothelial growth factor amino acid sequence consists of an amino acid sequence that is at least 95% identical to an amino acid sequence of the formula:



wherein X_1 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acids 3-11 of SEQ ID NO: 128 and amino acids 3-11 of SEQ ID NO: 137; wherein X_2 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 129 and 138; wherein X_3 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 130 and 139; wherein X_4 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 131 and 140; wherein X_5 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 132 and 141; wherein X_6 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 133 and 142; wherein X_7 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 134 and 143; wherein X_8 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 135 and 144; wherein X_9 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 136 and 145; and wherein the polypeptide binds to at least one receptor selected from the group consisting of human VEGFR-1, human VEGFR-2, and human VEGFR-3. In a preferred embodiment, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-X}_3\text{-X}_4\text{-X}_5\text{-X}_6\text{-X}_7\text{-X}_8\text{-X}_9\text{-COOH}$ is not identical to amino acids 34 to 135 of SEQ ID NO: 2 or amino acids 112 to 216 of SEQ ID NO: 22.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-32-

By "non-naturally occurring vascular endothelial growth factor amino acid sequence" is meant a sequence that is not identical to any known, naturally occurring amino acid sequence, such as, in this case, receptor binding domains from known VEGF-A or VEGF-C sequences.

5 Stated more generally, the invention provides a polypeptide that comprises an amino acid sequence that is at least about 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identical to any specific amino acid sequence of the invention, and that binds at least one of the naturally-occurring vascular endothelial growth factor or platelet
10 derived growth factor receptors, and that has a different receptor binding profile or an improved receptor binding affinity than a naturally-occurring growth factor polypeptide. Polypeptides that satisfy the percent identity criteria and that display the same receptor binding profile as the referent polypeptide are especially contemplated. For example, the invention provides a polypeptide that comprises an amino acid
15 sequence that is at least about 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identical to the amino acid sequences encoded by constructs 12-7 (SEQ ID NO: 63), 12-11 (SEQ ID NO: 71), 82-11, or 84-11, wherein the polypeptide binds VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3.

In yet another aspect, the invention provides a dimeric protein molecule comprising a first polypeptide associated with a second polypeptide, wherein at least
20 one of the polypeptides is a polypeptide according to the present invention. The association between the polypeptides may be by way of covalent bonding (e.g., disulfide bonding) or non-covalent bonding of polypeptide chains (e.g., hydrogen bonding, bonding due to stable or induced dipole-dipole interactions, bonding due to hydrophobic or hydrophilic interactions, combinations of these bonding mechanisms,
25 and the like).

In another embodiment, the invention provides polynucleotides (e.g., cDNA, cDNA with introns introduced to facilitate expression in eukaryotic systems, synthetic
DNA, RNA, or combinations thereof, single or double stranded) that comprise a
30 nucleotide sequence encoding the amino acid sequence of the polypeptides of the invention. Purified and isolated polynucleotides are preferred. Due to the well-known degeneracy of the genetic code, several polynucleotides sequences exist that

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-33-

encode each polypeptide amino acid sequence of the invention. Such polynucleotides are useful for recombinantly expressing the polypeptides of the invention.

The invention also embraces polynucleotides that encode VEGF receptor binding polypeptides and that hybridize under moderately stringent or high stringency conditions to the complete non-coding strand, or complement, of the polynucleotides specifically described herein that encode VEGF receptor binding polypeptides. This genus of polynucleotides embraces polynucleotides that encode polypeptides with one or a few amino acid differences (additions, insertions, or deletions) relative to amino acid sequences specifically taught herein. Such changes are easily introduced by performing site directed mutagenesis, for example, or by substituting a fragment from a non-human ortholog VEGF-A or VEGF-C polypeptide for a fragment of a human VEGF-A or VEGF-C polypeptide used to construct the hybrid polypeptides of the invention.

Exemplary highly stringent hybridization conditions are as follows:

hybridization at 65°C for at least 12 hours in a hybridization solution comprising 5X SSPE, 5X Denhardt's, 0.5% SDS, and 2 mg sonicated non-homologous DNA per 100 ml of hybridization solution; washing twice for 10 minutes at room temperature in a wash solution comprising 2X SSPE and 0.1% SDS; followed by washing once for 15 minutes at 65°C with 2X SSPE and 0.1% SDS; followed by a final wash for 10 minutes at 65°C with 0.1X SSPE and 0.1% SDS. Moderate stringency washes can be achieved by washing with 0.5X SSPE instead of 0.1X SSPE in the final 10 minute wash at 65°C. Low stringency washes can be achieved by using 1X SSPE for the 15 minute wash at 65°C, and omitting the final 10 minute wash. It is understood in the art that conditions of equivalent stringency can be achieved through variation of temperature and buffer, or salt concentration as described Ausubel, *et al.* (Eds.), *Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1994), pp. 6.0.3 to 6.4.10. Modifications in hybridization conditions can be empirically determined or precisely calculated based on the length and the percentage of guanosine/cytosine (GC) base pairing of the probe. The hybridization conditions can be calculated as described in Sambrook *et al.*, (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1989), pp. 9.47 to 9.51.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-34-

For example, the invention provides a polynucleotide that comprises a nucleotide sequence that hybridizes under moderately stringent or high stringency hybridization conditions to any specific nucleotide sequence of the invention, and that encodes a polypeptide that binds at least one of the naturally-occurring vascular endothelial growth factor or platelet derived growth factor receptors, and that has a different receptor binding profile or an improved receptor binding affinity than a naturally-occurring growth factor polypeptide. Polynucleotides that satisfy the hybridization criteria and that display the same receptor binding profile as the referent polynucleotide are especially contemplated. For example, the invention provides a polynucleotide that comprises a nucleotide sequence that hybridizes under moderately stringent or high stringency hybridization conditions to the nucleotide sequences taught herein for constructs 12-7 (SEQ ID NO: 62), 12-11 (SEQ ID NO: 70), 82-11, or 84-11, wherein the polynucleotide encodes a polypeptide that binds VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3.

In a related embodiment, the invention provides a polynucleotide that comprises a nucleotide sequence that is at least 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, or 99% identical to any specific nucleotide sequence of the invention, and that encodes a polypeptide that binds at least one of the naturally-occurring vascular endothelial growth factor or platelet derived growth factor receptors, and that has a different receptor binding profile or an improved receptor binding affinity than a naturally-occurring growth factor polypeptide. Polynucleotides that satisfy the percent identity criteria and that display the same receptor binding profile as the referent polynucleotide are especially contemplated. For example, the invention provides a polynucleotide that comprises a nucleotide sequence that is at least 95% identical to the nucleotide sequences taught herein for constructs 12-7 (SEQ ID NO: 62), 12-11 (SEQ ID NO: 70), 82-11, or 84-11, wherein the polynucleotide encodes a polypeptide that binds VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3.

In a related embodiment, the invention provides vectors comprising a polynucleotide of the invention. Such vectors are useful, e.g., for amplifying the polynucleotides in host cells to create useful quantities thereof. In preferred embodiments, the vector is an expression vector wherein the polynucleotide of the

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-35-

invention is operatively linked to a polynucleotide comprising an expression control sequence. Autonomously replicating recombinant expression constructs such as plasmid and viral DNA vectors incorporating polynucleotides of the invention are specifically contemplated. Expression control DNA sequences include promoters, enhancers, and operators, and are generally selected based on the expression systems in which the expression construct is to be utilized. Preferred promoter and enhancer sequences are generally selected for the ability to increase gene expression, while operator sequences are generally selected for the ability to regulate gene expression. Expression vectors are useful for recombinant production of polypeptides of the invention. Expression constructs of the invention may also include sequences encoding one or more selectable markers that permit identification of host cells bearing the construct. Expression constructs may also include sequences that facilitate, and preferably promote, homologous recombination in a host cell. Preferred constructs of the invention also include sequences necessary for replication in a host cell.

Vectors also are useful for "gene therapy" treatment regimens, wherein a polynucleotide that encodes a polypeptide of the invention is introduced into a subject in need of treatment involving the modulation (stimulation or blockage) of vascular endothelial growth factor receptors, in a form that causes cells in the subject to express the polypeptide of the invention *in vivo*.

In another related embodiment, the invention provides host cells, including prokaryotic and eukaryotic cells, that are transformed or transfected (stably or transiently) with polynucleotides of the invention or vectors of the invention. Polynucleotides of the invention may be introduced into the host cell as part of a circular plasmid, or as linear DNA comprising an isolated protein coding region or a viral vector. Methods for introducing DNA into the host cell well known and routinely practiced in the art include transformation, transfection, electroporation, nuclear injection, or fusion with carriers such as liposomes, micelles, ghost cells, and protoplasts. As stated above, such host cells are useful for amplifying the polynucleotides and also for expressing the polypeptides of the invention encoded by the polynucleotide. Such host cells are useful in assays as described herein. For

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-36-

expression of polypeptides of the invention, any host cell is acceptable, including but not limited to bacterial, yeast, plant, invertebrate (e.g., insect), vertebrate, and mammalian host cells. For developing therapeutic preparations, expression in mammalian cell lines, especially human cell lines, is preferred. Use of mammalian host cells is expected to provide for such post-translational modifications (e.g., glycosylation, truncation, lipidation, and phosphorylation) as may be desirable to confer optimal biological activity on recombinant expression products of the invention. Glycosylated and non-glycosylated forms of polypeptides are embraced by the present invention. Similarly, the invention further embraces polypeptides described above that have been covalently modified to include one or more water soluble polymeric attachments such as polyethylene glycol, polyoxyethylene glycol, or polypropylene glycol.

Polypeptides of the invention also may be chemically synthesized.

In still another related embodiment, the invention provides a method for producing a vascular endothelial growth factor receptor binding protein, comprising the steps of growing a host cell of the invention in a nutrient medium and isolating the polypeptide or variant thereof from the cell or the medium. Isolation of the polypeptide from the cells or from the medium in which the cells are grown is accomplished by purification methods known in the art, e.g., conventional chromatographic methods including immunoaffinity chromatography, receptor affinity chromatography, hydrophobic interaction chromatography, lectin affinity chromatography, size exclusion filtration, cation or anion exchange chromatography, high pressure liquid chromatography (HPLC), reverse phase HPLC, and the like. Still other methods of purification include those wherein the desired protein is expressed and purified as a fusion protein having a specific tag, label, or chelating moiety that is recognized by a specific binding partner or agent. The purified protein can be cleaved to yield the desired protein, or be left as an intact fusion protein. Cleavage of the fusion component may produce a form of the desired protein having additional amino acid residues as a result of the cleavage process.

Also within the scope of the invention are compositions comprising polypeptides or polynucleotides of the invention. In a preferred embodiment, such

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-37-

compositions comprise one or more polynucleotides or polypeptides of the invention that have been formulated with a pharmaceutically acceptable (e.g., sterile and non-toxic) diluent or carrier. Liquid, semisolid, or solid diluents that serve as pharmaceutical vehicles, excipients, or media are preferred. Any diluent known in the art may be used. Exemplary diluents include, but are not limited to, water, saline solutions, polyoxyethylene sorbitan monolaurate, magnesium stearate, methyl- and propylhydroxybenzoate, talc, alginates, starches, lactose, sucrose, dextrose, sorbitol, mannitol, glycerol, calcium phosphate, mineral oil, and cocoa butter. Such formulations are useful, e.g., for administration of polypeptides or polynucleotides of the invention to mammalian (including human) subjects in therapeutic regimens.

Similarly, the invention provides for the use of polypeptides or polynucleotides of the invention in the manufacture of a medicament for the treatment of disorders described herein, including but not limited to disorders characterized by undesirable endothelial cell proliferation and/or disorders characterized by ischemia and/or vessel occlusion, wherein neovascularization is desirable.

In a related embodiment, the invention provides a kit comprising a polynucleotide, polypeptide, or composition of the invention packaged in a container, such as a vial or bottle, and further comprising a label attached to or packaged with the container, the label describing the contents of the container and providing indications and/or instructions regarding use of the contents of the container to treat one or more disease states as described herein.

In yet another aspect, the present invention provides methods of producing polypeptides having novel VEGF receptor binding and stimulation properties, and methods for producing polynucleotides that encodes such polypeptides. For example, the invention provides a method for making a polynucleotide that encodes a polypeptide that modulates the growth of mammalian endothelial cells or mammalian pericytes/smooth muscle cells, comprising the steps of: preparing polynucleotides that encode amino acid fragments of at least two vertebrate vascular endothelial growth factor polypeptides; commingling the polynucleotides under conditions wherein the polynucleotides recombine to form hybrid polynucleotides; expressing the hybrid polynucleotides to make hybrid polypeptides encoded by the hybrid polynucleotides;

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-38-

screening the hybrid polypeptides to identify a hybrid polypeptide that binds to a receptor for a vertebrate vascular endothelial growth factor; and selecting the polynucleotide that encodes the hybrid polypeptide that binds to the receptor in the screening step. Expression of the selected polynucleotide (to produce the desired polypeptide) also is contemplated.

In this context, "modulate the growth of mammalian endothelial cells" means stimulate such growth by inducing a mitogenic signal through binding cell surface receptors expressed on vascular endothelial cells, or inhibiting such growth. As explained elsewhere herein, inhibition may be due to blockage of vascular endothelial growth factor receptors, or the formation of heterodimers with endogenous growth factors that prevent stimulation of endogenous receptors by the endogenous growth factors. Inhibition also may be achieved by conjugating cytotoxic agents to polypeptides of the invention that bind VEGF receptors. Exemplary toxins are known in the art and described elsewhere herein. Polypeptides of the invention conjugated to cytotoxic agents or other agents that modulate cell growth are contemplated as another aspect of the invention.

In this context, "vertebrate vascular endothelial growth factor polypeptides" again means polypeptides having the following characteristics:

(1) the polypeptide is encoded by genomic DNA of a vertebrate (e.g., a reptile, amphibian, bird, or mammal, preferably a bird or mammal, most preferably a mammal; especially a primate mammal such as a monkey, ape, or human) or is encoded by the genome of a vertebrate pathogen such as mammalian pox viruses;

(2) the polypeptide comprises all or a portion of a coding sequence that is expressed by a vertebrate (i.e., from transcription/translation of the vertebrate's genomic DNA or from virally-induced transcription/translation, in the case of polypeptides encoded by viral nucleic acids);

(3) the polypeptide or portion comprises a VEGF homology domain (V/PHD) of about 70-150 amino acids that binds to naturally occurring receptors and that is characterized in part by the amino acid motif: C-X(18-28)-P-X-C-X(4)-R-C-X-G-C(1-2)-X(6-12)-C-X(30-46)-C, where X represents any amino acid and numbers in parentheses represent a permissible range of amino acids (e.g., X(18-28) represents a

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-39-

stretch of any 18-28 amino acids; C(1-2) represents one or two cysteine residues).

The V/PHD includes eight conserved cysteines which form a cysteine knot motif similar to that found in human vascular endothelial growth factors A, B, C, and D (VEGF-A, -B, -C, and -D, and human platelet-derived growth factor (PDGF).

5 Preferred polypeptides or portions comprise a VPHD that is characterized by the more particular amino acid motif C-X(22-24)-P-[PSR]-C-V-X(3)-R-C-X-G-C-C-X(6)-C-X(32-41)-C, where amino acids in brackets (e.g., [PSR]) represent alternatives for a single position in the amino acid sequence; and

10 (4) the polypeptide binds to at least one cell surface receptor that is expressed on endothelial cells that line vertebrate blood or lymphatic vessels or pericytes/smooth muscle cells that line and support blood vessels. Preferred polypeptides bind to a least one cell surface receptor that is expressed on endothelial cells..

Several methods exist for practicing the preparing step. In one variation, single-stranded oligonucleotides are prepared based on knowledge of mammalian VEGF polypeptide sequences and the universal genetic code and using conventional chemical synthesis techniques. Example 1 below demonstrates such a technique, wherein synthetic oligonucleotide pairs were prepared and annealed to prepare double-stranded polynucleotides having single-stranded cohesive ends that encoded fragments of human VEGF-A and human VEGF-C. In another variation, cDNAs or genomic DNAs (preferably cDNAs) encoding natural VEGF's are fragmented using one or more restriction endonucleases, using DNaseI, or using Exonuclease III. [See, e.g., Chang *et al.*, *Nature Biotechnology*, 17: 793-797 (1999) (DNaseI procedure); Kikuchi *et al.*, *Gene*, 236: 159-167 (1999) (restriction endonuclease procedure); Harayama *et al.*, *TIBTECH*, 16: 76-82 (1998) (review); Patten *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnology*, 8: 724-733 (1997) (review, DNase I); Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 4504-09 (1997) (DNase I procedure); Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 10747-1074 (1997) (DNase I procedure); Stemmer, *Nature*, 370: 389-391 (1994) (DNase I procedure); and Ostermeier *et al.*, *Nature Biotechnology*, 17: 1205-1209 (1999) (ExoIII procedure), all incorporated herein by reference in their entirety].

25 In still another variation, a cDNA (coding or non-coding strand) is used as a template to synthesize complementary fragments, using DNA polymerase and chain-

30

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-40-

termination reagents. [See, e.g., Lehtovaara et al., Protein Engineering, 2: 63-68 (1988), incorporated by reference.]

Several methods also exist for practicing the comingling step. In one variation, the polynucleotides are prepared with complementary cohesive single-stranded ends, to facilitate annealing of fragments in a desired order under conventional annealing and ligation conditions for polynucleotides. Example 1 below provides a demonstration of this technique to generate 510 human VEGF-A/VEGF-C hybrids. Such a technique also may be suitable for annealing fragment mixtures of two or more VEGF cDNAs that have been digested with restriction endonucleases.

Alternatively, the comingling step is accomplished by mixing the polynucleotides and subjecting them to a self-priming PCR reaction that involves successive steps of denaturation, annealing, and extension. [See, e.g., Chang et al (1999); Kikuchi et al. (1999); Patten et al. (1997); Zhang et al. (1997); Stemmer *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 10747-1074 (1994); and Stemmer, *Nature*, 370: 389-391 (1994).] Optionally, the PCR is performed under conditions that introduce errors (mutations) in the PCR products. Such mutations introduce additional molecular variation, and are expected to reduce the overall percentage of biologically active molecules, but also may produce molecules with unexpectedly superior activities.

After synthesizing the hybrid DNA molecules, the molecules are expressed by any means known in the art. In one variation the molecules are cloned into expression vectors, which are in turn used to transform or transfect cells to express the polypeptides. In another variation, the polynucleotides are cloned into a phage display vector system for screening. [See, e.g., Chang et al (1999).] The screening assay may entail a direct receptor binding assay as described below in Example 3. Alternatively, receptor binding may be assayed indirectly by assaying for a biological activity induced by receptor binding. Thus, in one variation, the screening step comprises contacting the hybrid polypeptide to a cell that expresses the receptor, wherein changes in cell growth or cell survival induced by the hybrid polypeptide is indicative of binding between the hybrid polypeptide and the receptor.

In a preferred variation of the method, the screening and selecting steps are designed to select polynucleotides that encode polypeptides that have novel receptor

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-41-

binding profiles not possessed by the naturally occurring VEGFs from which the polypeptide was derived. For example, the method is practiced wherein the screening step comprises screening to identify a hybrid polypeptide that binds human VEGFR-1 and human VEGFR-3, and the selecting step comprises selecting a hybrid polypeptide that binds human VEGFR-1 and human VEGFR-3, but fails to bind human VEGFR-2. Alternatively, the method is practiced whereby the screening step comprises screening to identify a hybrid polypeptide that binds human VEGFR-1, VEGFR-2, and human VEGFR-3, and the selecting step comprises selecting a hybrid polypeptide that binds human VEGFR-1, VEGFR-2, and human VEGFR-3.

10 In a related embodiment, the invention provides a method for making a polynucleotide that encodes a polypeptide that modulates the growth of mammalian endothelial cells, comprising the steps of: (a) preparing a set of polynucleotide fragments having the following characteristics: (i) the set includes a first subset of coding polynucleotide fragments, wherein each coding polynucleotide fragment of the first subset encodes at least four amino acids of the amino acid sequence of a first mammalian vascular endothelial growth factor; (ii) the set includes a second subset of coding polynucleotide fragments, wherein each coding polynucleotide fragment of the second subset encodes at least four amino acids of the amino acid sequence of a second mammalian vascular endothelial growth factor; (b) commingling the polynucleotide fragments which comprise the set under conditions wherein the coding polynucleotide fragments from the first and second subsets recombine to form hybrid polynucleotides; (c) expressing the hybrid polynucleotides to make hybrid polypeptides encoded by the hybrid polynucleotides; (d) screening the hybrid polypeptides to identify a hybrid polypeptide that modulates the growth of mammalian endothelial cells; and (e) selecting the polynucleotide that encodes the hybrid polypeptide that modulates the growth of mammalian endothelial cells in the screening step.

Practice of these methods of generating hybrid polynucleotides using mammalian vascular endothelial growth factors that comprise a receptor binding domain characterized by eight cysteines that are conserved in human Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A), human Vascular Endothelial Growth Factor

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-42-

B (VEGF-B), human Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGF-C), and human Vascular Endothelial Growth Factor D (VEGF-D) is preferred. Exemplary starting molecules include VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF, PDGF-A, and PDGF-B polypeptides of human and other mammals. Also included is the recently described protein, follistatin, disclosed in the EMBL database (Acc. No. AF091434) (SEQ ID NO: 149), which has structural characteristics of the PDGF/VEGF family of growth factors. Thus, it is also contemplated to use follistatin in generating hybrid proteins together with other mammalian VEGFs.

The polynucleotide and encoded polypeptide products of the foregoing methods are themselves considered to be additional aspects of the present invention.

Antibodies that may be generated against polypeptides of the invention, and that bind polypeptides of the invention with an affinity greater than for any natural occurring VEGF, also are contemplated as aspects of the invention. Polypeptides comprising the antigen-binding fragments of such antibodies also are contemplated as an aspect of the invention. Antibodies that bind to the polypeptides of the invention but not to vertebrate VEGFs are contemplated.

In yet another embodiment, the invention provides numerous *in vitro* and *in vivo* methods of using polypeptides and polynucleotides of the invention. Such methods are described in greater detail below in the Detailed Description. Generally speaking, polypeptides of the invention are useful for modulating (stimulating or inhibiting) cellular processes that are mediated through any of the PDGF/VEGF family of receptors, such as PDGFR- α , PDGFR- β , VEGFR-1, VEGFR-2, and/or VEGFR-3. These receptors may be involved singularly in certain processes and in combination, to varying extents, in other processes. Polypeptides of the invention possess many different receptor binding profiles, and one of the advantages of the invention is the ability to select a polypeptide with a receptor binding profile that matches the receptor expression profile of the biological process to be modulated.

Thus, in one variation, the invention provides a method of modulating the signaling of one or more of PDGFR- α , PDGFR- β , VEGFR-1, VEGFR-2, and/or VEGFR-3 in a cell, comprising the step of contacting a cell that expresses one or more of PDGFR- α , PDGFR- β , VEGFR-1, VEGFR-2, and/or VEGFR-3 with a

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-43-

composition comprising a polypeptide of the invention. In one variation, modulation to activate signaling is contemplated, and the cell is contacted with a polypeptide of the invention that stimulates receptor signaling in an amount sufficient to bind to the one or more receptors and induce receptor signaling. In another variation, modulation to inhibit signaling is contemplated. The cell is contacted with a polypeptide that inhibits ligand-induced receptor activation (or a polypeptide conjugated to a cytotoxin), in an amount sufficient to inhibit signaling that is induced by receptor ligand and growth factor polypeptides that exist endogenously in the cell's environment. Dose-response studies permit accurate determination of a proper quantity of polypeptide to employ. Effective quantities can be estimated from measurements of the binding affinity of a polypeptide for a target receptor, of the quantity of receptor present on target cells, of the expected dilution volume (*e.g.*, patient weight and blood volume for *in vivo* embodiments), and of polypeptide clearance rates.

In another variation, the invention provides a method of modulating the signaling of one or more of PDGFR- α , PDGFR- β , VEGFR-1, VEGFR-2, and/or VEGFR-3, comprising the step or administering to a patient in need of modulation of the signaling of one or more of these receptors a composition comprising a polynucleotide of the invention, under conditions in which cells of the patient are transformed or transfected by the polynucleotide and express the polypeptide of the invention encoded thereby, wherein the expressed polypeptide modulates signaling of the one or more receptors.

As discussed below, analysis of the chimeras receptor binding properties and the sequences of VEGFR-3 ligands in relation to the sequence of VEGF-A suggests that Fragments 4 and 5 from the VEGF-C molecule are important for conferring VEGFR-3 binding affinity, and in particular the sequence of residues TNTFxxxP found within Fragments 4 and 5. Thus, in another variation, the invention provides molecules designed using these core residues and other substituents to modulate VEGFR-3 biological activity. For example, in one embodiment, the invention provides a molecule comprising the peptide sequence TNTPX_nP , wherein X_n comprises from one to seven amino acids, and wherein the molecule inhibits VEGF-C-mediated activation of VEGFR-3. The molecule may include additional residues or

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-44-

organic moieties. In one variation, it is contemplated that this epitope will be linked by a non-VEGF-C amino acid sequence to other epitopes involved in receptor binding, thereby creating a molecule capable of interacting with receptor loci involved in ligand binding and blocking ligand-mediated activation of the receptor. In a preferred embodiment, X_n comprises three amino acids, which represents the same amino acid spacing as native VEGF-C.

In a related embodiment, the invention provides a molecule comprising the human VEGF-C peptide sequence EFGVATNTFFKPPCVSVYRCG or a fragment or variant thereof, wherein the molecule inhibits VEGF-C-mediated activation of VEGFR-3. In one variation, the fragment is such that the molecule comprises the amino acid sequence EFGVATNTFFKPPCVSVYRCG. In another variation, the fragment is such that the molecule comprises the amino acid sequence INTFFKPP. In still another variation, the fragment or variant comprises the amino acid sequence TNTFFKPPCVxxxR, or the amino acid sequence TNTFFKPPCVxxxRCGGCC.

Data relating to binding properties and sequence of chimeric molecules of the invention also provides insight into the important amino acid targets for synthetic design of modulators of receptor/ligand interactions. For example, in one embodiment, the invention provides a method for identifying a modulator of VEGFR-1 binding to VEGF-A comprising the steps of (i) measuring binding between VEGFR-1 and VEGF-A in the presence and absence of a test compound under conditions that allow binding of VEGFR-1 to VEGF-A, and (ii) identifying as a modulator a test compound which alters VEGFR-1 binding to VEGF-A and which binds VEGF-A at a site defined by Phe³³, Met⁴², Tyr⁴⁷, Gln⁴⁸, Tyr⁵¹, Gln⁶⁵, and Met⁶⁷ of SEQ ID NO: 2, or which binds VEGFR-1 at VEGFR-1 residues which interface with said residues of SEQ ID NO: 2. Modulators that act as inhibitors, and are useful for ameliorating conditions characterized by undesirable or excessive ligand-mediated receptor activation, are a preferred class of modulators. Activators are another preferred class.

In a related embodiment, the invention provides a method for identifying a modulator of VEGFR-1 binding to VEGF-A comprising the steps of (i) measuring binding between VEGFR-1 and VEGF-A in the presence and absence of a test

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-45-

compound under conditions that allow binding of VEGFR-1 to VEGF-A, and (ii) identifying as a modulator a test compound which alters VEGFR-1 binding to VEGF-A and which binds VEGF-A at a site defined by Lys⁴², Phe⁴³, Met⁴⁴, Tyr⁴⁷, Gln⁴⁸, Tyr⁵¹, Ile⁵², Lys⁷⁴, Asp⁸⁹, Gly⁹¹, Leu⁹², Gln¹⁰⁵, Met¹⁰⁷, Ile¹⁰⁹, Phe¹¹¹, His¹¹², Gln¹¹⁵, Ile¹¹⁷, Glu¹²⁹, Arg¹³¹, and Pro¹³² of SEQ ID NO: 2, or which binds VEGFR-1 at VEGFR-1 residues which interface with said residues of SEQ ID NO: 2.

Similarly, the invention provides a method for identifying a modulator of VEGFR-3 binding to VEGF-C comprising the steps of (i) measuring binding between VEGFR-3 and VEGF-C in the presence and absence of a test compound under conditions that allow binding of VEGFR-3 to VEGF-C, and (ii) identifying as a modulator a test compound which alters VEGFR-3 binding to VEGF-C and which binds VEGF-C at a site defined by Lys¹²⁹, Ser¹²¹, Ile¹²², Trp¹²⁶, Arg¹²⁷, Gln¹³⁰, Phe¹³¹, Lys¹³³, Ser¹⁶³, Gly¹⁷⁰, Leu¹⁷¹, Tyr¹⁸⁴, Phe¹⁸⁶, Ile¹⁹⁰, Pro¹⁹¹, Pro¹⁹⁶, Pro¹⁹⁸, Arg²¹⁰, Met²¹², and Ser²¹³ of SEQ ID NO: 22, or which binds VEGFR-3 at VEGFR-3 residues which interface with said residues of SEQ ID NO: 22. The invention also provides a method for identifying a modulator of VEGFR-3 binding to VEGF-C comprising the steps of (i) measuring binding between VEGFR-3 and VEGF-C in the presence and absence of a test compound under conditions that allow binding of VEGFR-3 to VEGF-C, and (ii) identifying as a modulator a test compound which alters VEGFR-3 binding to VEGF-C and which binds VEGF-C at a site defined by Thr¹⁴⁸, Asn¹⁴⁹, Thr¹⁵⁰, Phe¹⁵¹, and Pro¹⁵³ of SEQ ID NO: 22, or which binds VEGFR-3 at VEGFR-3 residues which interface with said residues of SEQ ID NO: 22.

Also contemplated as aspects of the invention are compositions that comprise modulators identified by the foregoing methods, especially compositions comprising substantially purified modulators in a pharmaceutically acceptable carrier. Similarly, use of such modulators in the manufacture of a medicament for the treatment of disease states characterized by abnormal vascular endothelial growth factor receptor activity is contemplated.

In still another variation, any of the foregoing methods optionally include the additional step of administering the identified modulator to a patient in need of treatment for a disease state characterized by undesirable levels of receptor activity; or

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-46-

a step of contacting cells that express the receptor to modulate the level of receptor activity in the cells.

Additional embodiments, features, and variations of the invention will be apparent to those skilled in the art from the entirety of this application, including the Drawing and the Detailed Description, and all such features are intended as aspects of the invention.

Likewise, features of the invention described herein can be re-combined into additional embodiments that also are intended as aspects of the invention, irrespective of whether the combination of features is specifically mentioned above as an aspect or embodiment of the invention. Also, only such limitations which are described herein as critical to the invention should be viewed as such; variations of the invention lacking limitations which have not been described herein as critical are intended as aspects of the invention.

With respect to aspects of the invention that have been described as a set or genus, every individual member of the set or genus is intended, individually, as an aspect of the invention.

In addition to the foregoing, the invention includes, as an additional aspect, all embodiments of the invention narrower in scope in any way than the variations specifically mentioned above. Although the applicant(s) invented the full scope of the claims appended hereto, the claims appended hereto are not intended to encompass within their scope the prior art work of others. Therefore, in the event that statutory prior art within the scope of a claim is brought to the attention of the applicants by a Patent Office or other entity or individual, the applicant(s) reserve the right to exercise amendment rights under applicable patent laws to redefine the subject matter of such a claim to specifically exclude such statutory prior art or obvious variations of statutory prior art from the scope of such a claim. Variations of the invention defined by such amended claims also are intended as aspects of the invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING

Figure 1 depicts a perspective view of a three-dimensional model of a VEGF-A monomer, in which selected secondary structure elements are identified. A VEGF-

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-47-

A-encoding polynucleotide was divided into nine segments for construction of VEGF-A/VEGF-C chimeras, and labels 1-9 identify the location of the peptides encoded by each of the nine segments.

Figure 2 is a schematic diagram of the 9 VEGF-A and 9 VEGF-C DNA fragments used to construct the VEGF-A/VEGF-C hybrid molecules. These fragments are numbered 1 through 9 on top. The N123, N45, C67 and C89 groups of fragments are also indicated. N123 consists of 3 VEGF-A fragments and 3 VEGF-C fragments (fragments 1-3), whereas N45 (fragments 4-5), C67 (fragments 6-7), and C89 (fragments 8-9) each consist of 2 VEGF-A fragments and 2 VEGF-C fragments. Selected restriction endonuclease sites also are depicted.

Figure 3 schematically depicts all 8 possible DNA molecules corresponding to the N123 region, resulting from ligating different combinations of fragments 1,2, and 3 from VEGF-A (A1, A2, and A3) and VEGF-C (C1, C2, and C3).

Figure 4 schematically depicts all 4 possible DNA molecules corresponding to the N45 region resulting from ligating different combinations of fragments 4 and 5 from VEGF-A and VEGF-C.

Figure 5 schematically depicts all 4 possible DNA molecules corresponding to the C67 region resulting from ligating different combinations of fragments 6 and 7 from VEGF-A and VEGF-C.

Figure 6 schematically depicts all 4 possible DNA molecules corresponding to the C89 region resulting from ligating different combinations of fragments 8 and 9 from VEGF-A and VEGF-C.

Figures 7A-7D depict in boxes the amino acid sequences encoded by DNA fragments A1-A9 (SEQ ID NOs: 128 - 136) and C1-C9 (SEQ ID NOs: 137 - 145), and depict the manner in which longer encoded amino acid sequences were formed through the joining of fragments A1-A3 and C1-C3 in the N123 ligation (Fig 7A); of fragments A4-A5 and C4-C5 in the N45 ligation (Fig. 7B); of fragments A6-A7 and C6-C7 in the C67 ligation; and of fragments A8-A9 and C8-C9 in the C89 ligation. In each figure, arrows represent peptide bonds between encoded amino acid sequences that result from proper ligation of compatible DNA fragments and translation of the resultant ligated DNA.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-48-

Figure 8 is a three-dimensional model showing the interaction of a VEGF-A dimer with two VEGFR-1 molecules. Residues within the VEGF-A monomers important for interfacing with VEGFR-1 are clustered at the two ends of the VEGF-A dimer and include the N-terminal helix and part of the $\beta 5$ strand.

Figure 9 is a three-dimensional model depicting the groove formed by a VEGF-C dimer. The entry and the sides of this groove are formed by the fragments, described in Example 4, that appear to be important for conferring VEGFR-3 specificity.

Figure 10 is a three-dimensional model of a the interaction between a VEGF-C dimer and a single VEGFR-3 molecule, extrapolated from the VEGF-A/VEGFR-A model.

DETAILED DESCRIPTION

The present invention provides novel polypeptides that bind cellular receptors for vascular endothelial growth factor polypeptides; polynucleotides encoding such polypeptides; compositions comprising the polypeptides and polynucleotides; and methods and uses involving the foregoing. These materials and methods are described in detail in the preceding Summary of Invention section, which is hereby incorporated into the Detailed Description in its entirety. Some polypeptides of the invention exhibit unique receptor binding profiles compared to known, naturally occurring vascular endothelial growth factors.

Methods of Making Peptides

The peptides of the present invention may be synthesized using a variety of methods, including those described in the summary of invention and the examples. The peptides of the present invention can be synthesized in solution or on a solid support in accordance with conventional techniques. Various automatic synthesizers are commercially available and can be used in accordance with known protocols. See, for example, Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co., (1984); Tam *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, (1983); Merrifield, *Science*, 232: 341-347, (1986); and Barany and Merrifield, *The Peptides*, Gross and

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-49-

Meienhofer, eds, Academic Press, New York, 1-284; Barany *et al.*, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 30, 705-739 (1987); and U.S. Pat. No. 5,424,398), each incorporated herein by reference.

Solid phase peptide synthesis methods use a copoly(styrene-divinylbenzene) containing 0.1-1.0 mMol amines/g polymer. These methods for peptide synthesis use butyloxycarbonyl (t-BOC) or 9-fluorenylmethyloxy-carbonyl(FMOC) protection of alpha-amino groups. Both methods involve stepwise syntheses whereby a single amino acid is added at each step starting from the C-terminus of the peptide (See, Coligan, *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991, Unit 9)

On completion of chemical synthesis, the peptides can be deprotected to remove the t-BOC or FMOC amino acid blocking groups and cleaved from the polymer by treatment with acid at reduced temperature (e.g., liquid HF-10% anisole for about 0.25 to about 1 hours at 0°C). After evaporation of the reagents, the peptides are extracted from the polymer with 1% acetic acid solution which is then lyophilized to yield the crude material. This can normally be purified by such techniques as gel filtration on Sephadex G-15 using 5% acetic acid as a solvent. Lyophilization of appropriate fractions of the column will yield the homogeneous peptide or peptide derivatives, which can then be characterized by such standard techniques as amino acid analysis, thin layer chromatography, high performance liquid chromatography, ultraviolet absorption spectroscopy, molar rotation, solubility, and quantitated by the solid phase Edman degradation.

Other methods, such as selecting peptides from a phage display library, are available for improving upon peptide specifically described herein. Libraries can be prepared from sets of amino acids as described herein. Phage display can be particularly effective in identifying binding peptides useful according to the invention. Briefly, one prepares a phage library (using e.g. ml 13, fd, or lambda phage), displaying inserts from 4 to about 80 amino acid residues. The inserts may represent, for example, a completely degenerate or biased array. One then can select phage-bearing inserts which bind to the target VEGF receptor(s). This process can be repeated through several cycles of reselction of phage that bind to the target receptor(s). Repeated rounds lead to enrichment of phage bearing particular

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-50-

sequences. DNA sequence analysis can be conducted to identify the sequences of the expressed polypeptides. The minimal linear portion of the sequence that binds to the target receptor(s) can be determined. One can repeat the procedure using a biased library containing inserts containing part or all of the minimal linear portion plus one or more additional degenerate residues upstream or downstream thereof. These techniques may identify peptides of the invention with still greater receptor binding affinity than peptides already identified herein. Screening resultant peptide against multiple receptors will identify peptides with multiple receptor binding affinities. Yeast two-hybrid screening methods also may be used to identify polypeptides that bind to the target receptor(s).

Alternatively, a variety of expression vector/host systems may be utilized to contain and express the chimeric peptides of the present invention. These include but are not limited to microorganisms such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid or cosmid DNA expression vectors; yeast transformed with yeast expression vectors; insect cell systems infected with virus expression vectors (e.g., baculovirus); plant cell systems transfected with virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or transformed with bacterial expression vectors (e.g., Ti or pBR322 plasmid); or animal cell systems. Mammalian cells that are useful in recombinant protein productions include but are not limited to VERO cells, HeLa cells, Chinese hamster ovary (CHO) cell lines, COS cells (such as COS-7), W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 and 293 cells. Exemplary protocols for the recombinant expression of the protein are described herein below.

For example, the chimeric peptide may be recombinantly expressed in yeast using a commercially available expression system, e.g., the Picbia Expression System (Invitrogen, San Diego, CA), following the manufacturer's instructions. This system also relies on the pro-pro-alpha sequence to direct secretion, but transcription of the insert is driven by the alcohol oxidase (AOX1) promoter upon induction by methanol.

The secreted peptide is purified from the yeast growth medium by, e.g., the methods used to purify the chimeric peptide from bacterial and mammalian cell supernatants.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-51-

Alternatively, the cDNA encoding the peptide may be cloned into the baculovirus expression vector pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA). This vector is then used according to the manufacturer's directions (PharMingen) to infect *Spodoptera frugiperda* cells in sf9 protein-free media and to produce recombinant protein. The protein is purified and concentrated from the media using a heparin-Sepharose column (Pharmacia, Piscataway, NJ) and sequential molecular sizing columns (Amicon, Beverly, MA), and resuspended in PBS. SDS-PAGE analysis shows a single band and confirms the size of the protein, and Edman sequencing on a Porton 2090 Peptide Sequencer confirms its N-terminal sequence.

Alternatively, the peptide may be expressed in an insect system. Insect systems for protein expression are well known to those of skill in the art. In one such system, *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes in *Spodoptera frugiperda* cells or in *Trichoplusia* larvae. The peptide coding sequence is cloned into a nonessential region of the virus, such as the polyhedrin gene, and placed under control of the polyhedrin promoter. Successful insertion of the peptide will render the polyhedrin gene inactive and produce recombinant virus lacking coat protein coat. The recombinant viruses are then used to infect *S. frugiperda* cells or *Trichoplusia* larvae in which peptide is expressed (Smith *et al.*, *J Virol* 46: 584, 1983; Engelhard *et al.*, *Proc Nat Acad Sci* 91: 3224-7, 1994).

In another example, the DNA sequence encoding the peptide is amplified by PCR and cloned into an appropriate vector for example, pGEX-3X (Pharmacia, Piscataway, NJ). The pGEX vector is designed to produce a fusion protein comprising glutathione-S-transferase (GST), encoded by the vector, and a protein encoded by a DNA fragment inserted into the vector's cloning site. The primers for the PCR may be generated to include for example, an appropriate cleavage site.

Where the fusion partner was used solely to facilitate expression or is otherwise not desirable as an attachment to the peptide of interest, the recombinant fusion protein may then be cleaved from the GST portion of the fusion protein. The pGEX-3X/chimeric peptide construct is transformed into *E. coli* XL-1 Blue cells (Stratagene, La Jolla CA), and individual transformants were isolated and grown.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-52-

Plasmid DNA from individual transformants is purified and partially sequenced using an automated sequencer to confirm the presence of the desired chimeric peptide encoding nucleic acid insert in the proper orientation.

Particularly preferred peptide compositions of the present invention are those which are conjugated to any anti-tumor peptide such as a tumor necrosis factor (TNF). In a particularly preferred method, the TNF-peptides chimeras are generated as recombinant fusions with peptide-encoding sequences fused in frame to TNF (Novagen) encoding sequences. Peptide-TNF cDNA is cloned into pET-11b vector (Novagen) and the expression of TNF-peptides in BL21 *E. coli* is induced according to the pET11b manufacturer's instruction. Soluble TNF-peptides are purified from bacterial lysates by ammonium sulfate preparation, hydrophobic interaction chromatography on Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow, ion exchange chromatography on DEAE-Sepharose Fast Flow and gel filtration chromatography on Sephacryl-S-300 HR.

It is contemplated that recombinant protein production also may be used to produce the chimeric peptide compositions. For example, induction of the GST/chimeric peptide is achieved by growing the transformed XL-1 Blue culture at 37°C in LB medium (supplemented with carbenicillin) to an optical density at wavelength 600 nm of 0.4, followed by further incubation for 4 hours in the presence of 0.5 mM Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside (Sigma Chemical Co., St. Louis MO).

The fusion protein, expected to be produced as an insoluble inclusion body in the bacteria, may be purified as follows. Cells are harvested by centrifugation, washed in 0.15 M NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA; and treated with 0.1 mg/ml lysozyme (Sigma Chemical Co.) for 15 minutes at room temperature. The lysate is cleared by sonication, and cell debris is pelleted by centrifugation for 10 minutes at 12,000 X g. The fusion protein-containing pellet is resuspended in 50 mM Tris, pH 8, and 10 mM EDTA, layered over 50% glycerol, and centrifuged for 30 min. at 6000 X g. The pellet is resuspended in standard phosphate buffered saline solution (PBS) free of Mg^{++} and Ca^{++} . The fusion protein is further purified by fractionating the resuspended pellet in a denaturing SDS polyacrylamide gel (Sambrook *et al.*, *supra*).

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-53-

The gel is soaked in 0.4 M KCl to visualize the protein, which is excised and electroeluted in gel-running buffer lacking SDS. If the GST/chimeric peptide fusion protein is produced in bacteria as a soluble protein, it may be purified using the GST Purification Module (Pharmacia Biotech).

5 The fusion protein may be subjected to digestion to cleave the GST from the chimeric peptide of the invention. The digestion reaction (20-40 µg fusion protein, 20-30 units human thrombin (4000 U/mg (Sigma) in 0.5 ml PBS) is incubated 16-48 hrs. at room temperature and loaded on a denaturing SDS-PAGE gel to fractionate the reaction products. The gel is soaked in 0.4 M KCl to visualize the protein bands. The identity of the protein band corresponding to the expected molecular weight of
10 chimeric peptide may be confirmed by amino acid sequence analysis using an automated sequencer (Applied Biosystems Model 473A, Foster City, CA). Alternatively, the identity may be confirmed by performing HPLC and/or mass spectrometry of the peptides.

15 Alternatively, the DNA sequence encoding the chimeric peptide may be cloned into a plasmid containing a desired promoter and, optionally, a leader sequence (see, e.g., Better *et al.*, *Science*, 240:1041-43, 1988). The sequence of this construct may be confirmed by automated sequencing. The plasmid is then transformed into *E. coli* strain MC1061 using standard procedures employing CaCl_2 incubation and heat shock treatment of the bacteria (Sambrook *et al.*, *supra*). The transformed bacteria are grown in LB medium supplemented with carbenicillin, and production of the expressed protein is induced by growth in a suitable medium. If present, the leader sequence will effect secretion of the chimeric peptide and be cleaved during secretion.
20

The secreted recombinant protein is purified from the bacterial culture media by the method described herein below.
25

Mammalian host systems for the expression of the recombinant protein also are well known to those of skill in the art. Host cell strains may be chosen for a particular ability to process the expressed protein or produce certain post-translation modifications that will be useful in providing protein activity. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, carboxylation,
30 glycosylation, phosphorylation, lipidation and acylation. Different host cells such as

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-54-

CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, and the like have specific cellular machinery and characteristic mechanisms for such post-translational activities and may be chosen to ensure the correct modification and processing of the introduced, foreign protein.

5 It is preferable that the transformed cells are used for long-term, high-yield protein production and as such stable expression is desirable. Once such cells are transformed with vectors that contain selectable markers along with the desired expression cassette, the cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media before they are switched to selective media. The selectable marker is designed to confer resistance to selection and its presence allows growth and recovery of cells
10 that successfully express the introduced sequences. Resistant clumps of stably transformed cells can be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell.

A number of selection systems may be used to recover the cells that have been transformed for recombinant protein production. Such selection systems include, but
15 are not limited to, HSV thymidine kinase, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and adenine phosphoribosyltransferase genes, in tk-, hgppt- or apt- cells, respectively. Also, anti-metabolite resistance can be used as the basis of selection for dhfr, that confers resistance to methotrexate; gpt, that confers resistance to mycophenolic acid; neo, that confers resistance to the aminoglycoside G418; also
20 that confers resistance to chlorosulfuron; and hygromycin. Additional selectable genes that may be useful include tpkB, which allows cells to utilize indole in place of tryptophan, or hisD, which allows cells to utilize histinol in place of histidine. Markers that give a visual indication for identification of transformants include anthocyanins, beta-glucuronidase and its
25 substrate, GUS, and luciferase and its substrate, luciferin.

For certain applications, it may be desirable to produce peptides or polypeptides of the present invention which are resistant to proteolytic digestion. Such peptides may include non-hydrolyzable peptide bonds, and peptides having end
30 modifications such as an amide (e.g., CONH₂) at the C-terminus or a acetyl group at the N-terminus. It is contemplated that the peptides of the invention are modified

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-55-

such that their *in vivo* half life is increased, their physical stability is increased, rate of *in vivo* release and rate of *in vivo* clearance also may be affected.

To prepare non-hydrolyzable peptides, one may select peptides from a library non-hydrolyzable peptides, or introduce modifications to select peptides, such as one
 5 or more D-amino acids or one or more non-hydrolyzable peptide bonds linking amino acids. For example, one can select peptides having a desired receptor binding profile and then modify such peptides as necessary to reduce the potential for hydrolysis by proteases. For example, to determine the susceptibility to proteolytic cleavage,
 10 peptides may be labeled and incubated with cell extracts or purified proteases and then isolated to determine which peptide bonds are susceptible to proteolysis, e.g., by sequencing peptides and proteolytic fragments. Alternatively, potentially susceptible peptide bonds can be identified by comparing the amino acid sequence of the peptides of the present invention with the known cleavage site specificity of a panel of
 15 proteases. Based on the results of such assays, individual peptide bonds which are susceptible to proteolysis can be replaced with non-hydrolyzable peptide bonds by *in vitro* synthesis of the peptide.

Many non-hydrolyzable peptide bonds are known in the art, along with procedures for synthesis of peptides containing such bonds. Non-hydrolyzable bonds include $-\text{[CH}_2\text{NH]}-$ reduced amide peptide bonds, $-\text{[COCH}_2\text{]}-$ ketomethylene
 20 peptide bonds, $-\text{[CH(CN)NH]}-$ (cyanomethylene)amino peptide bonds, $-\text{[CH}_2\text{CH(OH)]}-$ hydroxyethylene peptide bonds, $-\text{[CH}_2\text{O]}-$ peptide bonds, and $-\text{[CH}_2\text{S]}-$ thiomethylene peptide bonds (see e.g., U.S. Patent 6,172,043).

Peptides useful in the invention can be linear, or maybe circular or cyclized by natural or synthetic means. For example, disulfide bonds between cysteine residues
 25 may cyclize a peptide sequence. Bifunctional reagents can be used to provide a linkage between two or more amino acids of a peptide. Other methods for cyclization of peptides, such as those described by Anwer et al. (Int. J. Pep. Protein Res. 36:392-399, 1990) and Rivera-Baeza et al. (Neuropeptides 30:327-333, 1996) are also known in the art.

30 Furthermore, nonpeptide analogs of peptides which provide a stabilized structure or lessened biodegradation, are also contemplated. Peptide mimetic analogs

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-56-

can be prepared based on a selected peptide by replacement of one or more residues by nonpeptide moieties. Preferably, the nonpeptide moieties permit the peptide to retain its natural conformation, or stabilize a preferred, *e.g.*, bioactive, conformation. One example of methods for preparation of nonpeptide mimetic analogs from peptides is described in Nachman *et al.*, *Regul. Pept.* 57:359-370 (1995). Peptide as used herein embraces all of the foregoing.

The polypeptides of the invention include polypeptides that are modified, for instance, by glycosylation, amidation, carboxylation, or phosphorylation, or by the creation of acid addition salts, amides, esters, in particular C-terminal esters, and N-acetyl derivatives.

Also, as described above, the invention embraces polypeptides modified by forming covalent or noncovalent complexes with other moieties. Covalently-bound complexes can be prepared by linking the chemical moieties to functional groups on the side chains of amino acids comprising the peptides, or at the N- or C-terminus.

In particular, it is anticipated that the aforementioned peptides can be conjugated to a reporter group, including, but not limited to a radiolabel, a fluorescent label, an enzyme (*e.g.*, that catalyzes a colorimetric or fluorometric reaction), a substrate, a solid matrix, or a carrier (*e.g.*, biotin or avidin). The invention accordingly provides a molecule comprising a chimeric polypeptide comprising a plurality of peptide subunits derived from two or more vascular endothelial growth factor polypeptides, wherein the chimeric polypeptide preferably further comprises a reporter group selected from the group consisting of a radiolabel, a fluorescent label, an enzyme, a substrate, a solid matrix, and a carrier. The use of such labels is well known and is described in, *e.g.*, U.S. No. Patent 3,817,837; U.S. Patent No. 3,850,752; U.S. Patent No. 3,996,345 and U.S. Patent No. 4,277,437. Other labels that will be useful include but are not limited to radioactive labels, fluorescent labels and chemiluminescent labels. U.S. Patents concerning use of such labels include for example U.S. Patent No. 3,817,837; U.S. Patent No. 3,850,752; U.S. Patent No. 3,939,350 and U.S. Patent No. 3,996,345. Any of the peptides of the present invention may comprise one, two, or more of any of these labels.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-57-

Methods of Using the Polypeptides of the Invention

The many biological activities mediated through the PDGF/VEGF receptor family (including but not limited to affecting growth and migration of vascular endothelial cells and blood vessels; promoting growth of lymphatic endothelial cells and lymphatic vessels; increasing vascular permeability; and affecting myelopoiesis) support numerous diagnostic and *in vitro* and *in vivo* clinical utilities for polypeptides of the invention that are capable of binding one or more members of the VEGF receptor family, for modulating (stimulating or inhibiting) these biological activities.

Multiple mechanisms exist through which polypeptides of the invention will act as growth factors (i.e., agonists or receptor stimulants). For example, polypeptides of the invention that form homodimers that bind and activate one or more members of the VEGF receptor family will be useful as vascular endothelial growth factors. Alternatively, polypeptides of the invention that form heterodimers with endogenous growth factor polypeptides (VEGF-A or VEGF-C or other family members) will also be effective agonists, provided that the heterodimers so formed are capable of binding and activating receptors to induce signal transduction.

Multiple mechanisms exist through which polypeptides of the invention will act as inhibitors (antagonists) of growth factors of the VEGF family. Polypeptides of the invention that bind but fail to stimulate one or more receptors will inhibit stimulation of the receptor by endogenous growth factor, thereby acting as an inhibitor of endogenous growth factor. Such failure to stimulate may be due, in whole or in part, to an inability to dimerize the receptor, perhaps due to an inability of the hybrid polypeptide of the invention to form growth factor homodimers. Polypeptides of the invention that form heterodimers with endogenous growth factor polypeptides will inhibit stimulation of VEGF receptors if the heterodimer fails to bind receptors, or if the heterodimer binds only to an individual receptor or a heterologous receptor pair in a manner that prevents receptor activation and signal transduction. Whichever the mechanism, polypeptides of the invention that form activity-destroying heterodimers with endogenous VEGF polypeptides (and that do not form active homodimers) are useful as antagonists of natural endogenous VEGF activity. Also, any polypeptide that binds a receptor can be conjugated to a cytotoxic or cytostatic agent in order to

deliver such agents to target cells. The attachment of such agent is another means for inhibiting growth of cells in which VEGF polypeptides exhibit a mitogenic response. Exemplary toxins include chemotherapeutic, radionuclide, ricin A chain, cholera toxin, pertussis toxin, *etc.*

5 It also will be apparent that two or more hybrid polypeptides of the invention can be mixed, and that heterodimers so formed will be useful as modulators depending upon their receptor binding and stimulating properties. Because polypeptides of the invention are hybrids derived from naturally-occurring vascular endothelial growth factors that may have different receptor binding profiles, it is
10 contemplated that some of the hybrids will act as activators of one or more receptors, and some will act as inhibitors of one or more receptors. Procedures described herein and other procedures known in the art can be used to determine receptor binding, receptor activation, and receptor inhibition properties of polypeptides of the invention.

The polypeptides of the invention that bind and activate one or more VEGF
15 receptors may be useful for promoting angiogenesis and/or lymphangiogenesis, for example, to promote wound healing, to facilitate tissue transplantation, and to promote the formation of collateral vessels around arterial stenoses, and into injured tissues after infarction, to treat ischemia. On the other hand, polypeptides of the invention that behave as antagonists of endogenous VEGF proteins can be used in
20 therapeutic applications to treat diseases such as neoplasias, retinopathy, rheumatoid arthritis, and psoriasis, in which suppression of angiogenesis is desirable.

Polypeptides of the present invention differ from natural VEGF receptor ligands in that some of them selectively bind one of the VEGF receptors and can thus be used to specifically induce signaling through one particular VEGF receptor. For
25 example, polypeptides that solely induce VEGFR-3 signaling can be used therapeutically to target the lymphatic endothelia of individuals affected with lymphatic disorders, to improve the structure and function of the lymphatic vasculature of such individuals. Such polypeptides also can be used to target neoplasia characterized by cells expressing VEGFR-3 on their surfaces. Chemotaxis
30 of monocytes/macrophages [Barleon *et al.*, *Blood* 87:3336-3343 (1996)] due to VEGFs is mediated by VEGFR-1. Thus, molecules that specifically target the

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-59-

VEGFR-1 receptor can be used to direct therapeutic effects on this particular VEGF receptor. For example, inhibitors of VEGFR-1 may be used to prevent virally induced angiogenesis, and molecules that specifically activate VEGFR-1 can be used to enhance monocyte/macrophage migration. VEGFR-2 is essential for angiogenesis and sufficient for virally-induced angiogenesis. Thus, inhibitors of VEGFR-2 may be used for inhibiting angiogenesis, including that induced by viral VEGFs, whereas molecules that stimulate VEGFR-2 can be useful for promoting angiogenesis.

A subset of the polypeptides of the present invention can bind combinations of VEGF receptors not demonstrated for known natural VEGF ligands, or are able to bind all three known VEGF receptors VEGFR-1, R-2, and R-3. These polypeptides may be useful for therapies in which the activation or inhibition of different combinations of VEGF receptors is desired.

Polypeptides of the invention that can activate VEGFR-3 can be used to promote the endothelial functions of lymphatic vessels and tissues such as to treat loss of lymphatic vessels, occlusions of lymphatic vessels, lymphangiomas, and primary idiopathic lymphedemas, including Milroy's disease and lymphedema praecox, as well as secondary lymphedemas, including those resulting from removal of lymph nodes and vessels, radiotherapy and surgery in treatment of cancer, trauma and infection. Polynucleotides or polypeptides of the invention could be administered purely as a prophylactic treatment to prevent lymphedema in subjects at risk for developing lymphedema, or as a therapeutic treatment to subjects afflicted with lymphedema, for the purpose of ameliorating its symptoms (e.g., swelling due to the accumulation of lymph).

The polynucleotides and polypeptides of the invention that activate VEGFR-3 can also be used to promote re-growth or permeability of lymphatic vessels in patients whose axillary lymphatic vessels were removed during surgical interventions in the treatment of cancer (e.g., breast cancer). Polynucleotides and polypeptides of the invention can be used to treat vascularization in, for example, organ transplant patients. A composition containing the polypeptide(s) of the invention may be directly applied to the isolated vessel segment prior to its being grafted *in vivo* to

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-60-

minimize rejection of the transplanted material and to stimulate vascularization of the transplanted materials.

Polypeptides of the invention that activate VEGF receptor activity may be used to treat wounds, surgical incisions, sores, and other indications where healing is reasonably expected to be promoted if the process of neovascularization can be induced and/or accelerated.

As explained in greater detail above and reported in the literature, the expression of receptors for vascular endothelial growth factors have been observed in certain progenitor cells, such as hematopoietic progenitor cells, and VEGF-C has been observed to have myelopoietic activity. These observations provide an indication that polynucleotides or polypeptides according to the invention may be used to treat or prevent inflammation, infection, or immune disorders by modulating the proliferation, differentiation and maturation, or migration of immune cells or hematopoietic cells. Polynucleotides or polypeptides according to the invention may also be useful to promote or inhibit trafficking of leukocytes between tissues and lymphatic vessels and migration in and out of the thymus.

Polynucleotides and polypeptides of the invention can be used for stimulating myelopoiesis (especially growth of neutrophilic granulocytes) or inhibiting it. Thus, the invention includes a method for modulating myelopoiesis in a mammalian subject comprising administering to a mammalian subject in need of modulation of myelopoiesis an amount of a polypeptide of the invention that is effective to modulate myelopoiesis. In one embodiment, a mammalian subject suffering from granulocytopenia is selected, and the method comprises administering to the subject an amount of a polypeptide effective to stimulate myelopoiesis. In particular, a polypeptide of the invention is administered in an amount effective to increase the neutrophil count in blood of the subject.

In a related embodiment, the invention includes a method of increasing the number of neutrophils in the blood of a mammalian subject comprising the step of expressing in a cell in a subject in need of an increased number of blood neutrophils a DNA encoding a polynucleotide of the invention that is able to activate signaling through VEGF receptors, the DNA operatively linked to a promoter or other control

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-61-

sequence that promotes expression of the DNA in the cell. Similarly, the invention includes a method of modulating the growth of neutrophilic granulocytes *in vitro* or *in vivo* comprising the step of contacting mammalian stem cells with a polypeptide of the invention in an amount effective to modulate the growth of mammalian endothelial cells.

The invention also includes a method for modulating the growth of CD34+ progenitor cells (especially hematopoietic progenitor cells and endothelial progenitor cells) *in vitro* or *in vivo* comprising the step of contacting mammalian CD34+ progenitor cells with a polypeptide of the invention in an amount effective to modulate the growth of mammalian endothelial cells. For *in vitro* methods, CD34+ progenitor cells isolated from cord blood or bone marrow are specifically contemplated. *In vitro* and *in vivo* methods of the invention for stimulating the growth of CD34+ precursor cells also include methods wherein polypeptides of the invention are employed together (simultaneously or sequentially) with other polypeptide factors for the purpose of modulating hematopoiesis/myelopoiesis or endothelial cell proliferation. Such other factors include, but are not limited to colony stimulating factors ("CSFs," e.g., granulocyte-CSF (G-CSF), macrophage-CSF (M-CSF), and granulocyte-macrophage-CSF (GM-CSF)), interleukin-3 (IL-3, also called multi-colony stimulating factor), other interleukins, stem cell factor (SCF), other polypeptide factors, and their analogs that have been described and are known in the art. See generally *The Cytokine Handbook, Second Ed.*, Angus Thomson (editor), Academic Press (1996); Callard and Gearing, *The Cytokine FactsBook*, Academic Press Inc. (1994); and Cowling and Dexter, *JIBTECH*, 10(10):349-357 (1992). The use of a polypeptide of the invention as a progenitor cell or myelopoietic cell growth factor or co-factor with one or more of the foregoing factors may potentiate previously unattainable myelopoietic effects and/or potentiate previously attainable myelopoietic effects while using less of the foregoing factors than would be necessary in the absence of a polypeptide of the invention.

Polynucleotides and polypeptides of the invention may also be used in the treatment of lung disorders to improve blood circulation in the lung and/or gaseous exchange between the lungs and the blood stream; to improve blood circulation to the

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-62-

heart and O₂ gas permeability in cases of cardiac insufficiency; to improve blood flow and gaseous exchange in chronic obstructive airway disease; and to treat conditions such as congestive heart failure, involving accumulations of fluid in, for example, the lung resulting from increases in vascular permeability, by exerting an offsetting effect on vascular permeability in order to counteract the fluid accumulation.

Polynucleotides and polypeptides of the invention could be used to treat malabsorptive syndromes in the intestinal tract as a result of its blood circulation increasing and vascular permeability increasing activities.

Polypeptides of the invention that bind but do not stimulate signaling through one or more of the VEGF receptors may be used to treat chronic inflammation caused by increased vascular permeability, retinopathy associated with diabetes, rheumatoid arthritis and psoriasis.

Polynucleotides or polypeptides according to the invention that are able to inhibit the function of one or more VEGF receptors can also be used to treat edema, peripheral arterial disease, Kaposi's sarcoma, or abnormal retinal development in premature newborns.

In another embodiment, the invention provides a method for modulating the growth of endothelial cells in a mammalian subject comprising the steps of exposing mammalian endothelial cells to a polypeptide according to the invention in an amount effective to modulate the growth of the mammalian endothelial cells. In one embodiment, the modulation of growth is affected by using a polypeptide capable of stimulating tyrosine phosphorylation of VEGF receptors in a host cell expressing the VEGF receptors. In modulating the growth of endothelial cells, the invention contemplates the modulation of endothelial cell-related disorders. In a preferred embodiment, the subject, and endothelial cells, are human. The endothelial cells may be provided *in vitro* or *in vivo*, and they may be contained in a tissue graft. An effective amount of a polypeptide is an amount necessary to achieve a reproducible change in cell growth rate (as determined by microscopic or macroscopic visualization and estimation of cell doubling time, or nucleic acid synthesis assays).

Since angiogenesis and neovascularization are essential for tumor growth, inhibition of angiogenic activity can prevent further growth and even lead to

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-63-

regression of solid tumors. Likewise inhibition of lymphangiogenesis may be instrumental in preventing metastases. Polynucleotides and polypeptides of the invention may be useful to treat neoplasias including sarcomas, melanomas, carcinomas, and gliomas by inhibiting tumor angiogenesis.

5 Thus, it is contemplated that a wide variety of cancers may be treated using the peptides of the present invention including cancers of the brain (glioblastoma, astrocytoma, oligodendroglioma, ependymomas), lung, liver, spleen, kidney, lymph node, pancreas, small intestine, blood cells, colon, stomach, breast, endometrium, prostate, testicle, ovary, skin, head and neck, esophagus, bone marrow, blood or
10 other tissue.

In many contexts, it is not necessary that the tumor cell be killed or induced to undergo normal cell death or "apoptosis." Rather, to accomplish a meaningful treatment, all that is required is that the tumor growth be slowed to some degree or localized to a specific area and inhibited from spread to disparate sites. It may be
15 that the tumor growth is completely blocked, however, or that some tumor regression is achieved. Clinical terminology such as "remission" and "reduction of tumor" burden also are contemplated given their normal usage. In the context of the present invention, the therapeutic effect may result from an inhibition of angiogenesis and/or an inhibition of lymphangiogenesis.

20 Thus, the invention includes a method of treating a mammalian organism suffering from a neoplastic disease characterized by expression of one or more VEGF receptor(s) in cells, comprising the steps of: identifying a mammalian organism suffering from a neoplastic disease state characterized by expression of VEGF receptor(s), and administering to the mammalian organism in need of such treatment a
25 composition, the composition comprising one or more polynucleotide(s) or polypeptide(s) of the invention effective to inhibit VEGF receptor-mediated proliferation of the cells. Such treatment methodologies are particularly indicated for neoplastic disease states that are characterized by neovascularization involving vessels lined with endothelial cells that express increased levels of one or more VEGF
30 receptors, relative to endothelial cells lining quiescent vessels; and disease states characterized by a cancer cells that express VEGF receptors. Targeting VEGFR-3 in

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-64-

tumor imaging and anti-tumor therapy is described in PCT/US99/23525 (WO 00/21560), published 20 April 2000, incorporated herein by reference. Other VEGF receptors (e.g., VEGFR-1) also have been implicated in tumor angiogenesis or metastasis.

5 Evidence exists that at least VEGF-C and VEGF-D of the VEGFR family of growth factors have utility for preventing stenosis or restenosis of blood vessels. See International Patent Application No. PCT/US99/24054 (WO 00/24412), "Use of VEGF-C or VEGF-D Gene or Protein to Prevent Restenosis," filed October 26, 1999, incorporated herein by reference in its entirety. Polypeptides and polynucleotides of the invention also will have utility for these indications. Thus, in another aspect, the invention provides a method of treating a mammalian subject to prevent stenosis or restenosis of a blood vessel, comprising the step of administering to a mammalian subject in need of treatment to prevent stenosis or restenosis of a blood vessel a composition comprising one or more polypeptide(s) of the invention, in an amount effective to prevent stenosis or restenosis of the blood vessel. In a preferred embodiment, the administering comprises implanting an intravascular stent in the mammalian subject, where the stent is coated or impregnated with the composition. Exemplary materials for constructing a drug-coated or drug-impregnated stent are described in literature cited above and reviewed in Lincoff et al., *Circulation*, 90: 2070-2084 (1994). In another preferred embodiment, the composition comprises microparticles composed of biodegradable polymers such as PLGA, non-degradable polymers, or biological polymers (e.g., starch) which particles encapsulate or are impregnated by a polypeptide(s) of the invention. Such particles are delivered to the intravascular wall using, e.g., an infusion angioplasty catheter. Other techniques for achieving locally sustained drug delivery are reviewed in Wilensky et al., *Trends Cardiovasc. Med.*, 3:163-170 (1993), incorporated herein by reference.

Administration via one or more intravenous injections subsequent to the angioplasty or bypass procedure also is contemplated. Localization of the polypeptides of the invention to the site of the procedure occurs due to expression of VEGF receptors on proliferating endothelial cells. Localization is further facilitated by recombinantly expressing the polypeptides of the invention as a fusion polypeptide

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-65-

(e.g., fused to an apolipoprotein B-100 oligopeptide as described in Shih et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1436-1440 (1990)). Co-administration of polynucleotides and polypeptides of the invention is also contemplated.

5 Likewise, the invention also provides surgical devices that are used to treat circulatory disorders, such as intravascular or endovascular stents, balloon catheters, infusion-perfusion catheters, extravascular collars, elastomeric membranes, and the like, which have been improved by coating with, impregnating with, adhering to, or encapsulating within the device a composition comprising a polynucleotide or polypeptide of the invention.

10 Polynucleotides or polypeptides of the invention could be administered purely as a prophylactic treatment to prevent stenosis, or shortly before, and/or concurrently with, and/or shortly after a percutaneous transluminal coronary angioplasty procedure, for the purpose of preventing restenosis of the subject vessel. In another preferred embodiment, the polynucleotide or polypeptide is administered before, during, and/or
15 shortly after a bypass procedure (e.g., a coronary bypass procedure), to prevent stenosis or restenosis in or near the transplanted (grafted) vessel, especially stenosis at the location of the graft itself. In yet another embodiment, the polynucleotide or polypeptide is administered before, during, or after a vascular transplantation in the vascular periphery that has been performed to treat peripheral ischemia or intermittent
20 claudication. By prevention of stenosis or restenosis is meant prophylactic treatment to reduce the amount/severity of, and/or substantially eliminate, the stenosis or restenosis that frequently occurs in such surgical procedures. The polynucleotide or polypeptide is included in the composition in an amount and in a form effective to promote stimulation of VEGF receptors in a blood vessel of the mammalian subject,
25 thereby preventing stenosis or restenosis of the blood vessel.

In a preferred embodiment, the mammalian subject is a human subject. For example, the subject is a person suffering from coronary artery disease that has been identified by a cardiologist as a candidate who could benefit from a therapeutic
30 balloon angioplasty (with or without insertion of an intravascular stent) procedure or from a coronary bypass procedure. Practice of methods of the invention in other mammalian subjects, especially mammals that are conventionally used as models for

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-66-

demonstrating therapeutic efficacy in humans (e.g., primate, porcine, canine, or rabbit animals), also is contemplated.

Polypeptides according to the invention may be administered in any suitable manner using an appropriate pharmaceutically-acceptable vehicle, e.g., a
5 pharmaceutically-acceptable diluent, adjuvant, excipient or carrier. The composition to be administered according to methods of the invention preferably comprises (in addition to the polynucleotide or vector) a pharmaceutically-acceptable carrier solution such as water, saline, phosphate-buffered saline, glucose, or other carriers conventionally used to deliver therapeutics intravascularly. Multi-gene therapy is also
10 contemplated, in which case the composition optionally comprises both the polynucleotide of the invention/vector and another polynucleotide/vector selected to prevent restenosis. Exemplary candidate genes/vectors for co-transfection with transgenes encoding polypeptides of the invention are described in the literature cited above, including genes encoding cytotoxic factors, cytostatic factors, endothelial
15 growth factors, and smooth muscle cell growth/migration inhibitors.

The "administering" that is performed according to the present method may be performed using any medically-accepted means for introducing a therapeutic directly or indirectly into the vasculature of a mammalian subject, including but not limited to injections (e.g., intravenous, intramuscular, subcutaneous, or catheter); oral ingestion;
20 intranasal or topical administration; and the like. In a preferred embodiment, administration of the composition comprising a polynucleotide of the invention is performed intravascularly, such as by intravenous, intra-arterial, or intracoronary arterial injection. The therapeutic composition may be delivered to the patient at multiple sites. The multiple administrations may be rendered simultaneously or may
25 be administered over a period of several hours. In certain cases it may be beneficial to provide a continuous flow of the therapeutic composition. Additional therapy may be administered on a period basis, for example, daily, weekly or monthly.

In general, peroral dosage forms for the therapeutic delivery of peptides is
30 ineffective because in order for such a formulation to be efficacious, the peptide must be protected from the enzymatic environment of the gastrointestinal tract.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-67-

Additionally, the peptide must be formulated such that it is readily absorbed by the epithelial cell barrier in sufficient concentrations to effect a therapeutic outcome. The peptides of the present invention may be formulated with uptake or absorption enhancers to increase their efficacy. Such enhancers include for example, salicylate, glycocholate/taurocholate, glycolate, aprotinin, bacitracin, SDS caprate and the like. For an additional discussion of oral formulations of peptides for therapeutic delivery, those of skill in the art are referred to *Fix (J. Pharm. Sci., 85(12) 1282-1285, 1996)* and *Ojiyai and Stella (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:521-544, 1993)*.

The amounts of peptides in a given dosage will vary according to the size of the individual to whom the therapy is being administered as well as the characteristics of the disorder being treated. In exemplary treatments, it may be necessary to administer about 50mg/day, 75 mg/day, 100mg/day, 150mg/day, 200mg/day, 250 mg/day. These concentrations may be administered as a single dosage form or as multiple doses.

The polypeptides may also be employed in accordance with the present invention by expression of such polypeptide *in vivo*, which is often referred to as gene therapy. The present invention provides a recombinant DNA vector containing a heterologous segment encoding a polypeptide of the invention that is capable of being inserted into a microorganism or eukaryotic cell and that is capable of expressing the encoded protein.

In a highly preferred embodiment, the composition is administered locally. Thus, in the context of treating restenosis or stenosis, administration directly to the site of angioplasty or bypass is preferred. For example, the administering comprises a catheter-mediated transfer of the transgene-containing composition into a blood vessel of the mammalian subject, especially into a coronary artery of the mammalian subject. Exemplary materials and methods for local delivery are reviewed in Lincoff et al., *Circulation*, 90: 2070-2084 (1994); and Wilensky et al., *Trends Cardiovasc. Med.*, 3:163-170 (1993), both incorporated herein by reference. For example, the composition is administered using infusion-perfusion balloon catheters (preferably microporous balloon catheters) such as those that have been described in the

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-68-

literature for intracoronary drug infusions. See, e.g., U.S. Patent No. 5,713,860 (Intravascular Catheter with Infusion Array); U.S. Patent No. 5,087,244; U.S. Patent No. 5,653,689; and Wolinsky et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 15: 475-481 (1990) (Wolinsky Infusion Catheter); and Lambert et al., *Coron. Artery Dis.*, 4: 469-475 (1993), all of which are incorporated herein by reference in their entirety. Use of such catheters for site-directed somatic cell gene therapy is described, e.g., in Mazur et al., *Texas Heart Institute Journal*, 21: 104-111 (1994), incorporated herein by reference. In an embodiment where the transgene encoding a polypeptide of the invention is administered in an adenovirus vector, the vector is preferably administered in a pharmaceutically acceptable carrier at a titer of 10^7 - 10^{13} viral particles, and more preferably at a titer of 10^9 - 10^{11} viral particles. The adenoviral vector composition preferably is infused over a period of 15 seconds to 30 minutes, more preferably 1 to 10 minutes.

For example, in patients with angina pectoris due to a single or multiple lesions in coronary arteries and for whom PTCA is prescribed on the basis of primary coronary angiogram findings, an exemplary protocol involves performing PTCA through a 7F guiding catheter according to standard clinical practice using the femoral approach. If an optimal result is not achieved with PTCA alone, then an endovascular stent also is implanted. (A nonoptimal result is defined as residual stenosis of > 30 % of the luminal diameter according to a visual estimate, and B or C type dissection.) Arterial gene transfer at the site of balloon dilatation is performed with a replication-deficient adenoviral vector expressing a polypeptide of the invention immediately after the angioplasty, but before stent implantation, using an infusion-perfusion balloon catheter. The size of the catheter will be selected to match the diameter of the artery as measured from the angiogram, varying, e.g., from 3.0 to 3.5F in diameter. The balloon is inflated to the optimal pressure and gene transfer is performed during a 10 minute infusion at the rate of 0.5 ml/min with virus titer of 1.15×10^{10} .

In another embodiment, intravascular administration with a gel-coated catheter is contemplated, as has been described in the literature to introduce other transgenes. See, e.g., U.S. Patent No. 5,674,192 (Catheter coated with tenaciously-adhered swellable hydrogel polymer); Riessen et al., *Human Gene Therapy*, 4: 749-758

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-69-

(1993); and Steg et al., *Circulation*, 96: 408-411 (1997) and 90: 1648-1656 (1994); all incorporated herein by reference. Briefly, DNA in solution (e.g., a polynucleotide of the invention) is applied one or more times *ex vivo* to the surface of an inflated angioplasty catheter balloon coated with a hydrogel polymer (e.g., Slider with

5 Hydroplus, Mansfield Boston Scientific Corp., Watertown, MA). The Hydroplus coating is a hydrophilic polyacrylic acid polymer that is cross-linked to the balloon to form a high molecular weight hydrogel tightly adhered to the balloon. The DNA covered hydrogel is permitted to dry before deflating the balloon. Re-inflation of the balloon intravascularly, during an angioplasty procedure, causes the transfer of the

10 DNA to the vessel wall.

In yet another embodiment, an expandable elastic membrane or similar structure mounted to or integral with a balloon angioplasty catheter or stent is employed to deliver the transgene encoding a polypeptide of the invention. See, e.g., U.S. Patent Nos. 5,707,385, 5,697,967, 5,700,286, 5,800,507, and 5,776,184, all

15 incorporated by reference herein.

In another variation, the composition containing the transgene encoding a polypeptide of the invention is administered extravascularly, e.g., using a device to surround or encapsulate a portion of vessel. See, e.g., International Patent Publication WO 98/20027, incorporated herein by reference, describing a collar that is placed

20 around the outside of an artery (e.g., during a bypass procedure) to deliver a transgene to the arterial wall via a plasmid or liposome vector.

In still another variation, endothelial cells or endothelial progenitor cells are transfected *ex vivo* with the transgene encoding a polypeptide of the invention, and the transfected cells are administered to the mammalian subject. Exemplary procedures

25 for seeding a vascular graft with genetically modified endothelial cells are described in U.S. Patent No. 5,785,965, incorporated herein by reference.

In preferred embodiments, polynucleotides of the invention further comprises additional sequences to facilitate the gene therapy. In one embodiment, a "naked" transgene encoding a polypeptide of the invention (i.e., a transgene without a viral, liposomal, or other vector to facilitate transfection) is employed for gene therapy. In

30 this embodiment, the polynucleotide of the invention preferably comprises a suitable

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-70-

promoter and/or enhancer sequence (e.g., cytomegalovirus promoter/enhancer [Lehner et al., J. Clin. Microbiol., 29:2494-2502 (1991); Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985)]; Rous sarcoma virus promoter [Davis et al., Hum. Gene Ther., 4:151 (1993)]; Tie promoter [Korhonen et al., Blood, 86(5): 1828-1835 (1995)]; or simian virus 40 promoter) for expression in the target mammalian cells, the promoter being operatively linked upstream (i.e., 5') of the polypeptide-coding sequence. The polynucleotides of the invention also preferably further includes a suitable polyadenylation sequence (e.g., the SV40 or human growth hormone gene polyadenylation sequence) operably linked downstream (i.e., 3') of the polypeptide-coding sequence. The polynucleotides of the invention also preferably comprise a nucleotide sequence encoding a secretory signal peptide fused in-frame with the polypeptide sequence. The secretory signal peptide directs secretion of the polypeptide of the invention by the cells that express the polynucleotide, and is cleaved by the cell from the secreted polypeptide. The signal peptide sequence can be that of another secreted protein, or can be a completely synthetic signal sequence effective to direct secretion in cells of the mammalian subject.

The polynucleotide may further optionally comprise sequences whose only intended function is to facilitate large-scale production of the vector, e.g., in bacteria, such as a bacterial origin of replication and a sequence encoding a selectable marker. However, in a preferred embodiment, such extraneous sequences are at least partially cleaved off prior to administration to humans according to methods of the invention. One can manufacture and administer such polynucleotides to achieve successful gene therapy using procedures that have been described in the literature for other transgenes. See, e.g., Isner et al., Circulation, 91: 2687-2692 (1995); and Isner et al., Human Gene Therapy, 7: 989-1011 (1996); incorporated herein by reference in the entirety.

Any suitable vector may be used to introduce the transgene encoding one of the polypeptides of the invention, into the host. Exemplary vectors that have been described in the literature include replication-deficient retroviral vectors, including but not limited to lentivirus vectors [Kim et al., J. Virol., 72(1): 811-816 (1998); Kingsman & Johnson, Scrip Magazine, October, 1998, pp. 43-46.]; adeno-associated

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-71-

viral vectors [U.S. Patent No. 5,474,935; U.S. Patent No. 5,139,941; U.S. Patent No. 5,622,856; U.S. Patent No. 5,658,776; U.S. Patent No. 5,773,289; U.S. Patent No. 5,789,390; U.S. Patent No. 5,834,441; U.S. Patent No. 5,863,541; U.S. Patent No. 5,851,521; U.S. Patent No. 5,252,479; Gnatenko et al., *J. Investig. Med.*, 45: 87-98 (1997)]; adenoviral vectors [See, e.g., U.S. Patent No. 5,792,453; U.S. Patent No. 5,824,544; U.S. Patent No. 5,707,618; U.S. Patent No. 5,693,509; U.S. Patent No. 5,670,488; U.S. Patent No. 5,585,362; Quantin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2581-2584 (1992); Stratford-Perricadot et al., *J. Clin. Invest.*, 90: 626-630 (1992); and Rosenfeld et al., *Cell*, 68: 143-155 (1992)]; an adenoviral-adenovirus hybrid (see for example, U.S. Patent No. 5,856,152) or a vaccinia viral or a herpesviral (see for example, U.S. Patent No. 5,879,934; U.S. Patent No. 5,849,571; U.S. Patent No. 5,830,727; U.S. Patent No. 5,661,033; U.S. Patent No. 5,328,688; Lipofectin-mediated gene transfer (BRI.); liposomal vectors [See, e.g., U.S. Patent No. 5,631,237 (Liposomes comprising Sendai virus proteins)]; and combinations thereof. All of the foregoing documents are incorporated herein by reference in their entirety. Replication-deficient adenoviral vectors constitute a preferred embodiment.

Other non-viral delivery mechanisms contemplated include calcium phosphate precipitation (Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973; Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987; Rippe et al., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990) DEAE-dextran (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985), electroporation (Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986; Potter et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984), direct microinjection (Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.), DNA-loaded liposomes (Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982; Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979; Felgner, *Sci Am.* 276(6):102-6, 1997; Felgner, *Hum Gene Ther.* 7(15):1791-3, 1996), cell sonication (Fechheimer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987), gene bombardment using high velocity microprojectiles (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:9568-9572, 1990), and receptor-mediated transfection (Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987;

Wu and Wu, *Biochemistry*, 27:887-892, 1988; Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993).

In a particular embodiment of the invention, the expression construct (or indeed the peptides discussed above) may be entrapped in a liposome. Liposomes are vesicular structures characterized by a phospholipid bilayer membrane and an inner aqueous medium. Multilamellar liposomes have multiple lipid layers separated by aqueous medium. They form spontaneously when phospholipids are suspended in an excess of aqueous solution. The lipid components undergo self-rearrangement before the formation of closed structures and entrap water and dissolved solutes between the lipid bilayers (Ghosh and Bachawal, *In: Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands*, Wu G, Wu C ed., New York: Marcel Dekker, pp. 87-104, 1991). The addition of DNA to cationic liposomes causes a topological transition from liposomes to optically birefringent liquid-crystalline condensed globules (Radler *et al.*, *Science*, 275(5301):810-4, 1997). These DNA-lipid complexes are potential non-viral vectors for use in gene therapy and delivery.

Liposome-mediated nucleic acid delivery and expression of foreign DNA *in vitro* has been very successful. Also contemplated in the present invention are various commercial approaches involving "lipofection" technology. In certain embodiments of the invention, the liposome may be complexed with a hemagglutinating virus (HVJ). This has been shown to facilitate fusion with the cell membrane and promote cell entry of liposome-encapsulated DNA (Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989). In other embodiments, the liposome may be complexed or employed in conjunction with nuclear nonhistone chromosomal proteins (HMG-1) (Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991). In yet further embodiments, the liposome may be complexed or employed in conjunction with both HVJ and HMG-1. In that such expression constructs have been successfully employed in transfer and expression of nucleic acid *in vitro* and *in vivo*, then they are applicable for the present invention.

Other vector delivery systems that can be employed to deliver a nucleic acid encoding a therapeutic gene into cells include receptor-mediated delivery vehicles. These take advantage of the selective uptake of macromolecules by receptor-mediated

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-73-

endocytosis in almost all eukaryotic cells. Because of the cell type-specific distribution of various receptors, the delivery can be highly specific (Wu and Wu, 1993, *supra*).

Receptor-mediated gene targeting vehicles generally consist of two
 5 components: a cell receptor-specific ligand and a DNA-binding agent. Several ligands have been used for receptor-mediated gene transfer. The most extensively characterized ligands are asialoglycosaminoglycan (ASOR) (Wu and Wu, 1987, *supra*) and transferrin (Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(9):3410-3414, 1990). Recently, a synthetic neoglycoprotein, which recognizes the same receptor as ASOR,
 10 has been used as a gene delivery vehicle (Ferkol *et al.*, *FASEB J.*, 7:1081-1091, 1993; Perales *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91:4086-4090, 1994) and epidermal growth factor (EGF) has also been used to deliver genes to squamous carcinoma cells (Myers, EPO 0273085).

In other embodiments, the delivery vehicle may comprise a ligand and a
 15 liposome. For example, Nicolau *et al.* (*Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987) employed lactosyl-ceramide, a galactose-terminal asialganglioside, incorporated into liposomes and observed an increase in the uptake of the insulin gene by hepatocytes. Thus, it is feasible that a nucleic acid encoding a therapeutic gene also may be specifically delivered into a particular cell type by any number of receptor-ligand
 20 systems with or without liposomes.

In another embodiment of the invention, the expression construct may simply consist of naked recombinant DNA or plasmids. Transfer of the construct may be performed by any of the methods mentioned above that physically or chemically permeabilize the cell membrane. This is applicable particularly for transfer *in vitro*,
 25 however, it may be applied for *in vivo* use as well. Dubensky *et al.* (*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7529-7533, 1984) successfully injected polyomavirus DNA in the form of CaPO₄ precipitates into liver and spleen of adult and newborn mice demonstrating active viral replication and acute infection. Benvenisty and Neshif (*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83:9551-9555, 1986) also demonstrated that direct intraperitoneal injection
 30 of CaPO₄ precipitated plasmids results in expression of the transfected genes.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-74-

Another embodiment of the invention for transferring a naked DNA expression construct into cells may involve particle bombardment. This method depends on the ability to accelerate DNA coated microprojectiles to a high velocity allowing them to pierce cell membranes and enter cells without killing them (Klein *et al.*, *Nature*, 327:70-73, 1987). Several devices for accelerating small particles have been developed. One such device relies on a high voltage discharge to generate an electrical current, which in turn provides the motive force (Yang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 87:9568-9572, 1990). The microprojectiles used have consisted of biologically inert substances such as tungsten or gold beads.

In embodiments employing a viral vector, preferred polynucleotides still include a suitable promoter and polyadenylation sequence as described above. Moreover, it will be readily apparent that, in these embodiments, the polynucleotide further includes vector polynucleotide sequences (e.g., adenoviral polynucleotide sequences) operably connected to the sequence encoding a polypeptide of the invention.

Thus, in one embodiment the composition to be administered comprises a vector, wherein the vector comprises a polynucleotide of the invention. In a preferred embodiment, the vector is an adenovirus vector. In a highly preferred embodiment, the adenovirus vector is replication-deficient, i.e., it cannot replicate in the mammalian subject due to deletion of essential viral-replication sequences from the adenoviral genome. For example, the inventors contemplate a method wherein the vector comprises a replication-deficient adenovirus, the adenovirus comprising the polynucleotide of the invention operably connected to a promoter and flanked on either end by adenoviral polynucleotide sequences.

Similarly, the invention includes kits which comprise compounds or compositions of the invention packaged in a manner which facilitates their use to practice methods of the invention. In a simplest embodiment, such a kit includes a compound or composition described herein as useful for practice of the invention (e.g., polynucleotides or polypeptides of the invention), packaged in a container such as a sealed bottle or vessel, with a label affixed to the container or included in the package that describes use of the compound or composition to practice the method of

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-75-

the invention. Preferably, the compound or composition is packaged in a unit dosage form. In another embodiment, a kit of the invention includes a composition of both a polynucleotide or polypeptide packaged together with a physical device useful for implementing methods of the invention, such as a stent, a catheter, an extravascular collar, a polymer film, or the like. In another embodiment, a kit of the invention includes compositions of both a polynucleotide or polypeptide of the invention packaged together with a hydrogel polymer, or microparticle polymers, or other carriers described herein as useful for delivery of the polynucleotides or polypeptides to the patient.

The polypeptides of the present invention are useful in diagnostic or prognostic assays for detecting VEGF receptor protein expression. Polypeptides of the invention that bind to one or more VEGF receptors may be used for detecting and measuring the presence of specific receptor proteins in samples for purposes such as e.g., medical imaging, detection, screening, or targeted therapy. Detectable labels such as radioactive or non-radioactive labels, including enzyme labels or labels of the biotin/avidin system, may be used to tag the polypeptide of the invention. The polypeptide may also be covalently or non-covalently coupled to a suitable supermagnetic, paramagnetic, electron dense, ecogenic or radioactive agent for imaging.

The present invention also relates to a diagnostic assay for detecting altered levels of VEGF receptor proteins in various tissues since over-expression of the proteins compared to normal control tissue samples may detect the presence of a disease or susceptibility to a disease, for example, abnormal cell growth or differentiation. Polypeptides of the invention can be used to quantify future metastatic risk by assaying biopsy material for the presence of active receptors or ligands in a binding assay or kit using detectably-labeled polypeptides of the invention.

A related aspect of the invention is a method for the detection of specific cells, e.g., endothelial cells. These cells may be found *in vivo*, or in *ex vivo* biological tissue samples. The method of detection comprises the steps of contacting a biological tissue comprising, e.g., endothelial cells, with a hybrid polypeptide according to the

invention which is capable of binding to VEGFR(s), under conditions wherein the hybrid polypeptide binds to the cells, optionally washing the biological tissue, and detecting the hybrid polypeptide bound to the cells in the biological tissue, thereby detecting the cells. It will be apparent that certain polypeptides of the invention are useful for detecting and/or imaging cells that express more than one VEGFR, whereas other polypeptides are useful for imaging cells which specifically express a particular VEGFR.

The invention also is directed to a method for imaging vertebrate tissue suspected of containing cells that express a specific VEGFR comprising the steps of: (a) contacting vertebrate tissue with a composition comprising polypeptide(s) of the invention that specifically bind the particular VEGFR; and (b) imaging the tissue by detecting the VEGFR-binding polypeptide bound to the tissue. Preferably, the tissue is human tissue, and the method further comprises the step of washing the tissue, after the contacting step and before the imaging step, under conditions that remove from the tissue polypeptides that are not bound to the VEGFR in the tissue.

In a related variation, the invention provides a method for imaging tumors in tissue from a vertebrate organism, comprising the steps of: (a) contacting vertebrate tissue suspected of containing a tumor with a composition comprising a VEGFR binding compound; (b) detecting the VEGFR binding compound bound to cells in said tissue; and (c) imaging solid tumors by identifying blood vessel endothelial cells bound by the VEGFR binding compound, wherein blood vessels expressing VEGFR are correlated with the presence and location of a tumor in the tissue.

The present invention also is directed to the use of hybrid polypeptides of the invention that bind VEGF receptors as specific markers for particular tissues and cell types. For example, those polypeptides of the invention that specifically bind VEGFR-3 can serve as markers for lymphatic endothelial cells.

Similarly, polypeptides of the invention may be screened for an ability to modulate the growth of isolated cells or cell lines. For example, certain neoplastic disease states are characterized by the appearance of VEGF receptors on cell surfaces [Valtola *et al.*, *Am J Path* 154:1381-90 (1999)]. Polypeptides of the invention may be screened to determine the ability of the polypeptide to modulate the growth of the

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-77-

neoplastic cells. Other disease states are likely characterized by mutations in VEGF receptors [Ferrell *et al.*, *Hum Mol Genetics* 7:2073-78 (1998)]. Polypeptides of the invention that modulate the activity of the mutant forms of the VEGF receptor in a manner different than naturally-occurring vascular endothelial growth factors will be useful at modulating the symptoms and severity of the such disease states.

In vivo imaging or tissue biopsy may reveal that certain neoplastic cells are expressing a particular combination of receptors, thereby providing an indication for polypeptides of the invention that bind the expressed set of receptors and inhibit ligand mediated growth.

The use of such diagnostic imaging is particularly suitable in obtaining an image of, for example, a tumor mass or the neovascularization near a tumor mass. It is contemplated that the peptides of the present invention may be employed for imaging in a manner analogous to the antibody-based methods disclosed in U.S. Patent No. 6,107,046, incorporated herein by reference.

Many appropriate imaging agents are known in the art, as are methods of attaching the labeling agents to the peptides of the invention (see, e.g., U.S. Patent No. 4,965,392, U.S. Patent No. 4,472,509, U.S. Patent No. 5,021,236 and U.S. Patent No. 5,037,630, incorporated herein by reference). The labeled peptides are administered to a subject in a pharmaceutically acceptable carrier, and allowed to accumulate at a target site having the VEGFR-3 receptor. This peptide imaging agent then serves as a contrast reagent for X-ray, magnetic resonance, sonographic or scintigraphic imaging of the target site. The peptides of the present invention are a convenient and important addition to the available arsenal of medical imaging tools for the diagnostic investigation of cancer and other VEGFR-3 related disorders.

Paramagnetic ions useful in the imaging agents of the present invention include for example chromium (III), manganese (II), iron (III), iron (II), cobalt (II), nickel (II) copper (II), neodymium (III), samarium (III), ytterbium(III), gadolinium (III), vanadium (II), terbium (III), dysprosium (III), holmium (III) and erbium (III). Ions useful for X-ray imaging include but are not limited to lanthanum (III), gold(III), lead (II) and particularly bismuth (III). Radioisotopes for diagnostic applications include for example, ^{211}At astatine, ^{14}C carbon, ^{51}Cr chromium, ^{36}Cl chlorine, ^{57}Co cobalt, ^{67}Cu copper,

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-78-

¹³²Eu, ⁶⁷Ga, ³H, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹¹¹In, ⁵⁹Fe, ³²P, ¹⁸⁶Re, ⁷⁵Se, ³⁵S, ^{99m}Tc and ⁹⁰Y.

The peptides of the present invention may be labeled according to techniques well known to those of skill in the art. For example, the peptides can be iodinated by contacting the peptide with sodium or potassium iodide and a chemical oxidizing agent such as sodium hypochlorite or an enzymatic oxidant such as lactoperoxidase. Peptides may be labeled with technetium-99m by ligand exchange, for example, by reducing pertechnetate with stannous solution, chelating the reduced technetium onto a Sephadex column and applying the peptide to the column. These and other techniques for labeling proteins and peptides are well known to those of skill in the art.

Using Polypeptides of the Invention in Combined Therapy for Neoplastic Disorders

Tumor cell resistance to DNA damaging agents represents a major problem in clinical oncology. One goal of current cancer research is to find ways to improve the efficacy of chemo- and radiotherapy. As described above, the peptides of the present invention may be administered in conjunction with chemo- or radiotherapeutic intervention, immunotherapy, or with other anti-angiogenic/anti-lymphangiogenic therapy.

To kill cells, inhibit cell growth, inhibit metastasis, inhibit angiogenesis or otherwise reverse or reduce the malignant phenotype of tumor cells via combination therapy, using the methods and compositions of the present invention, one would generally contact a "target" cell or tissue, (e.g., a tumor and/or its vasculature) with the therapeutic peptides of the present invention (either as a peptide composition or as an expression construct that will express the peptide) and at least one other agent, which optionally is conjugated to the peptide of the invention. These compositions would be provided in a combined amount effective to kill or inhibit proliferation of the cancer by killing and/or inhibiting the proliferation of the cancer cells and/or the endothelia of blood and lymphatic vessels supplying and serving the cancer cells. This process may involve contacting the cells with the peptide or expression construct and the agent(s) or factor(s) at the same time. This may be achieved by contacting the cell

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-79-

with a single composition or pharmacological formulation that includes both agents, or by contacting the cell with two distinct compositions or formulations, at the same time, wherein one composition includes the peptide or expression construct and the other includes the second agent.

5 Alternatively, the therapeutic treatment employing the peptides of the present invention may precede or follow the other agent treatment by intervals ranging from minutes to weeks. In embodiments where the other agent and expression construct are administered separately, one would generally ensure that a significant period of time did not expire between the time of each delivery, such that the agent and the
10 peptide-based therapeutic would still be able to exert an advantageously combined effect. In such instances, it is contemplated that one would administer both modalities within about 12-24 hours of each other and, more preferably, within about 6-12 hours of each other, with a delay time of only about 12 hours being most preferred. In some situations, it may be desirable to extend the time period for treatment significantly,
15 however, where several days (2, 3, 4, 5, 6 or 7) to several weeks (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8) lapse between the respective administrations. Repeated treatments with one or both agents is specifically contemplated. In specific embodiments, an anti-cancer therapy may be delivered which directly attacks the cancer cells in a manner to kill, inhibit or necrotize the cancer cell, in addition a therapeutic composition based on the
20 peptides of the present invention also is administered to the individual in amount effective to have an antiangiogenic and/or anti-lymphangiogenic effect. The peptide compositions may be administered following the other anti-cancer agent, before the other anti-cancer agent or indeed at the same time as the other anti-cancer agent, optionally conjugated to the other agent.

25 Agents or factors suitable for use in a combined therapy are any chemical compound or treatment method that induces DNA damage when applied to a cell. Such agents and factors include radiation and waves that induce DNA damage such as, γ -irradiation, X-rays, UV-irradiation, microwaves, electronic emissions, and the like. A variety of chemical compounds, also described as "chemotherapeutic agents," function
30 to induce DNA damage, all of which are intended to be of use in the combined treatment methods disclosed herein. Chemotherapeutic agents contemplated to be of use, include,

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-80-

e.g., adriamycin, 5-fluorouracil (5FU), etoposide (VP-16), camptothecin, actinomycin-D, mitomycin C, cisplatin (CDDP) and even hydrogen peroxide. The invention also encompasses the use of a combination of one or more DNA damaging agents, whether radiation-based or actual compounds, such as the use of X-rays with cisplatin or the use of

5 cisplatin with etoposide.

In treating cancer according to the invention, one would contact the tumor cells and/or the endothelia of the tumor vessels with an agent in addition to the therapeutic agent comprising one or more peptide of the present invention. This may be achieved by irradiating the localized tumor site with radiation such as X-rays, UV-light, gamma-rays or

10 even microwaves. Alternatively, the tumor cells may be contacted with the agent by administering to the subject a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising a compound such as, adriamycin, 5-fluorouracil, etoposide, camptothecin, actinomycin-D, mitomycin C, or cisplatin. Kinase inhibitors also contemplated to be useful in combination therapies with the peptides of the present

15 invention. The agent may be prepared and used as a combined therapeutic composition, or kit, by combining it with a chimeric peptide of the invention, as described above.

Agents that directly cross-link nucleic acids, specifically DNA, are envisaged to facilitate DNA damage leading to a synergistic, antineoplastic combination with chimeric peptide-based therapy. Agents such as cisplatin, and other DNA alkylating agents may be

20 used. Cisplatin has been widely used to treat cancer, with efficacious doses used in clinical applications of 20 mg/m² for 5 days every three weeks for a total of three courses. Cisplatin is not absorbed orally and must therefore be delivered via injection intravenously, subcutaneously, intratumorally or intraperitoneally.

Agents that damage DNA also include compounds that interfere with DNA

25 replication, mitosis and chromosomal segregation. Such chemotherapeutic compounds include adriamycin, also known as doxorubicin, etoposide, verapamil, podophyllotoxin, and the like. Widely used in a clinical setting for the treatment of neoplasms, these compounds are administered through bolus injections intravenously at doses ranging from 25-75 mg/m² at 21 day intervals for adriamycin, to 35-50 mg/m² for etoposide

30 intravenously or double the intravenous dose orally.

Agents that disrupt the synthesis and fidelity of nucleic acid precursors and subunits also lead to DNA damage. As such a number of nucleic acid precursors have been developed. Particularly useful are agents that have undergone extensive testing and are readily available. As such, agents such as 5-fluorouracil (5-FU), are preferentially
5 used by neoplastic tissue, making this agent particularly useful for targeting to neoplastic cells. Although quite toxic, 5-FU, is applicable in a wide range of carriers, including topical, however intravenous administration with doses ranging from 3 to 15 mg/kg/day being commonly used.

By way of example the following is a list of chemotherapeutic agents and the
10 cancers which have been shown to be managed by administration of such agents. Combinations of these chemotherapeutics with the peptides of the present invention may prove to be useful in amelioration of various neoplastic disorders. Examples of these compounds include adriamycin (also known as doxorubicin), VP-16 (also known as etoposide), and the like, daunorubicin (intercalates into DNA, blocks DNA-directed RNA
15 polymerase and inhibits DNA synthesis); mitomycin (also known as mifamycin and/or mitomycin-C) is an antibiotic isolated from the broth of *Streptomyces caespitosus* which has been shown to have antitumor activity, Actinomycin D also may be a useful drug to employ in combination with the peptides of the present invention because tumors which fail to respond to systemic treatment sometimes respond to local perfusion with
20 dactinomycin which also is known to potentiate radiotherapy. It also is used in combination with primary surgery, radiotherapy, and other drugs, particularly vincristine and cyclophosphamide and has been found to be effective against Ewing's tumor, Kaposi's sarcoma, and soft-tissue sarcomas, choriocarcinoma, metastatic testicular carcinomas, Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphomas.

25 Bleomycin is a mixture of cytotoxic glycopeptide antibiotics isolated from a strain of *Streptomyces verticillus*, is effective in the management of the following neoplasms either as a single agent or in proven combinations with other approved chemotherapeutic agents in squamous cell carcinoma such as head and neck (including mouth, tongue, tonsil, nasopharynx, oropharynx, sinus, palate, lip, buccal mucosa, gingiva, epiglottis,
30 larynx), skin, penis, cervix, and vulva. It has also been used in the treatment of lymphomas and testicular carcinoma.

Cisplatin has been widely used to treat cancers such as metastatic testicular or ovarian carcinoma, advanced bladder cancer, head or neck cancer, cervical cancer, lung cancer or other tumors and may be a useful combination with the peptides of the present invention. VP16 (etoposide) and is used primarily for treatment of testicular tumors, in
5 combination with bleomycin and cisplatin, and in combination with cisplatin for small-cell carcinoma of the lung. It is also active against non-Hodgkin's lymphomas, acute nonlymphocytic leukemia, carcinoma of the breast, and Kaposi's sarcoma associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Tumor Necrosis Factor [TNF; Cachectin] glycoprotein that kills some kinds of cancer cells, activates cytokine production, activates
10 macrophages and endothelial cells, promotes the production of collagen and collagenases, is an inflammatory mediator and also a mediator of septic shock, and promotes catabolism, fever and sleep. TNF can be quite toxic when used alone in effective doses, so that the optimal regimens probably will use it in lower doses in combination with other drugs. Its immunosuppressive actions are potentiated by γ -interferon, so that the
15 combination potentially is dangerous. A hybrid of TNF and interferon- α also has been found to possess anti-cancer activity.

Taxol an antimitotic agent original isolated from the bark of the ash tree, *Taxus brevifolia*, and its derivative paclitaxol have proven useful against breast cancer and may be used in the combination therapies of the present invention. Beneficial responses to
20 vincristine have been reported in patients with a variety of other neoplasms, particularly Wilms' tumor, neuroblastoma, brain tumors, rhabdomyosarcoma, and carcinomas of the breast, bladder, and the male and female reproductive systems. Vinblastine also is indicated as a useful therapeutic in the same cancers as vincristine. The most frequent clinical use of vinblastine is with bleomycin and cisplatin in the curative therapy of
25 metastatic testicular tumors. It is also active in Kaposi's sarcoma, neuroblastoma, and Letterer-Siwe disease (histiocytosis X), as well as in carcinoma of the breast and choriocarcinoma in women.

Melphalan also known as alkeran, L-phenylalanine mustard, phenylalanine mustard, L-PAM, or L-sarcosyls, is a phenylalanine derivative of nitrogen mustard.
30 Melphalan is a bifunctional alkylating agent which is active against selective human neoplastic diseases. Melphalan is the active L-isomer of the D-isomer, known as

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-83-

medphalan, which is less active against certain animal tumors, and the dose needed to produce effects on chromosomes is larger than that required with the L-isomer. Melphalan is available in form suitable for oral administration and has been used to treat multiple myeloma. Available evidence suggests that about one third to one half of the patients with multiple myeloma show a favorable response to oral administration of the drug. Melphalan has been used in the treatment of epithelial ovarian carcinoma.

Cyclophosphamide is stable in the gastrointestinal tract, tolerated well and effective by the oral and parental routes and does not cause local vesication, necrosis, phlebitis or even pain. Chlorambucil, a bifunctional alkylating agent of the nitrogen mustard type that has been found active against selected human neoplastic diseases. Chlorambucil is indicated in the treatment of chronic lymphatic (lymphocytic) leukemia, malignant lymphomas including lymphosarcoma, giant follicular lymphoma and Hodgkin's disease. It is not curative in any of these disorders but may produce clinically useful palliation.

Other factors that cause DNA damage and have been used extensively include what are commonly known as gamma-rays, X-rays, and/or the directed delivery of radioisotopes to tumor cells. Other forms of DNA damaging factors are also contemplated such as microwaves and UV-irradiation. It is most likely that all of these factors effect a broad range of damage DNA, on the precursors of DNA, the replication and repair of DNA, and the assembly and maintenance of chromosomes. Dosage ranges for X-rays range from daily doses of 50 to 200 roentgens for prolonged periods of time (3 to 4 weeks), to single doses of 2000 to 6000 roentgens. Dosage ranges for radioisotopes vary widely, and depend on the half-life of the isotope, the strength and type of radiation emitted, and the uptake by the neoplastic cells. (See, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, chapter 33, in particular pages 624-652.) Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject. Moreover, for human administration, preparations should meet sterility, pyrogenicity, general safety and purity standards as required by FDA Office of Biologics standards.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-84-

In addition to combining chimeric peptide-based therapies with chemo- and radiotherapies, it also is contemplated that combination with gene therapies will be advantageous. For example, targeting of chimeric peptide-based therapies and p53 or p16 mutations at the same time may produce an improved anti-cancer treatment. Any other tumor-related gene conceivably can be targeted in this manner, for example, p21, Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, BCRA2, p16, FHIT, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, FOC, MCC, *ras*, *myc*, *neu*, *raf*, *erb*, *src*, *fms*, *kit*, *trk*, *ret*, *gsp*, *hst*, *bcl* and *abl*.

In addition to the anticancer therapeutics discussed above, it is contemplated that the peptides of the invention may be combined with other angiogenesis inhibitors. The peptides of the present invention are expected to have both anti-lymphangiogenic and anti-angiogenic properties. Many anti-angiogenic drugs also may have anti-lymphangiogenic properties. <http://cancertrials.nci.nih.gov/news/angio> is a website maintained by the National Institutes of Health which provides current information on the trials presently being conducted with anti-angiogenic agents. These agents include, for example, Marimastat (British Biotech, Annapolis MD; indicated for non-small cell lung, small cell lung and breast cancers); AG3340 (Agouron, LaJolla, CA; for glioblastoma multiforme); COL-3 (Collagenex, Newtown PA; for brain tumors); Neovastat (Aeterna, Quebec, Canada; for kidney and non-small cell lung cancer) BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb, Wallingford CT; for metastatic non-small cell lung cancer); Thalidomide (Celgen; for melanoma, head and neck cancer, ovarian, metastatic prostate, and Kaposi's sarcoma; recurrent or metastatic colorectal cancer (with adjuvants); gynecologic sarcomas, liver cancer; multiple myeloma; CLL, recurrent or progressive brain cancer, multiple myeloma, non-small cell lung, nonmetastatic prostate, refractory multiple myeloma, and renal cancer); Squelamine (Magainin Pharmaceuticals Plymouth Meeting, PA; non-small cell cancer and ovarian cancer); Endostatin (EntroMED, Rockville, MD; for solid tumors); SU5416 (Sugen, San Francisco, CA; recurrent head and neck, advanced solid tumors, stage IIB or IV breast cancer; recurrent or progressive brain (pediatric); Ovarian, AML; glioma, advanced malignancies, advanced colorectal, von-Hippel Lindau disease, advanced soft tissue; prostate cancer, colorectal cancer, metastatic melanoma, multiple myeloma, malignant mesothelioma; metastatic renal, advanced or recurrent head and neck, metastatic colorectal cancer); SU6668 (Sugen San Francisco, CA; advanced

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-85-

tumors); interferon- α ; Anti-VEGF antibody (National Cancer Institute, Bethesda MD; Genentech San Francisco, CA; refractory solid tumors; metastatic renal cell cancer, in untreated advanced colorectal); BMD121974 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; HIV related Kaposi's Sarcoma, progressive or recurrent Anaplastic Glioma); Interleukin 12 (Genetics Institute, Cambridge, MA; Kaposi's sarcoma) and IM862 (Cytran, Kirkland, WA; ovarian cancer; untreated metastatic cancers of colon and rectal origin and Kaposi's sarcoma). The parenthetical information following the agents indicates the cancers against which the agents are being used in these trials. It is contemplated that any of these disorders may be treated with the peptides of the present invention either alone or in combination with the agents listed.

Additional features of the invention will be apparent from the following Examples.

Example 1

Construction of VEGF-A/VEGF-C hybrid molecules:

Although the amino acid residues of the receptor binding domain of VEGF family members share conserved motifs, these proteins exhibit different receptor specificities. In the following experiment, DNA molecules encoding polypeptides containing different portions of the receptor binding domains of either VEGF-A or VEGF-C were constructed using a combinatorial approach to create novel hybrid molecules with unique structural and functional characteristics.

To generate the novel molecules, the nucleotide sequences of VEGF-A and mature VEGF-C were analyzed to determine localized regions of nucleotide identity which would be suitable for designing short DNA fragments which could be synthesized and readily recombined. Eight corresponding regions of identity were selected in each molecule as sites for fragmentation (into nine fragments) and recombination into chimeric (hybrid) molecules. These fragmentation sites were chosen based on nucleotide sequence and also because the resultant fragments would correspond to structural elements (e.g., alpha helix, loop, etc.) based on the crystal structure of VEGF-A (see Fig. 1).

Fragmentation of VEGF-A

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-86-

Nine pairs of synthetic oligonucleotides were designed based on the coding sequence for VEGF₁₂₁, for the purpose of forming nine DNA fragments that encompass the receptor binding domain encoding region of VEGF-A (corresponding to nucleotides 156 to 461 of SEQ ID NO: 1, which encode amino acid residues 34 to 135 of SEQ ID NO: 2). Each oligonucleotide pair comprised a forward primer containing coding sequence and a reverse primer with nucleotide sequence complementary to a portion of the forward primer, to permit annealing of the primers to each other into a double-stranded DNA fragment. Either the forward or reverse primer of each pair also included a short 5' and 3' nucleotide sequence that was not complementary to any sequence of its paired primer. These short additional sequences correspond to the localized regions of nucleotide identity set forth above. Following annealing of primer pairs, this additional sequence formed single-stranded overhangs compatible with annealing with other double-stranded annealed primer pairs, as described in greater detail below. The nucleotide sequences from the VEGF-A forward and reverse primers are set forth below in Tables 1A and 1B, respectively.

Table 1A - Forward (Coding) Primers for VEGF-A

20	A1-F	gat cct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa t D P G Q N H H E V V K
	A2-F	TC ATG GAT GTC TAT CAG CCG AGC TAC TGC CAT F M D V Y Q R S Y C H
25	A3-F	cag atc gag aca ctg gtc gag atc ttc cag <u>GATACAGAGC</u> P I E T L V D I F Q
	A4-F	<u>GGCTCTTGGAA</u> TAC CCT GAT GAG ATC GAG TAC A E Y P D E I E Y
30	A5-F	tg ttc aag oca tcc tcc gtg ccc ctg atg aga tgt ggc I F K P S C V P J M R C G
35	A6-F	<u>CCG GGT TGC TGC</u> AAT GAC GAA GGG CTG G G C C N D E G L
	A7-F	ag tgc gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg ag E C V P T E E S N I T M Q I K R
40	A8-F	a att aaa cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt I K P H Q C Q H I G E M S F
	A9-F	CTC CAG CAT AAC AAA TGT GAA TGT AGA CCA AAG AAA <u>GATTGAGTCTTGG</u> I Q H N K C E C R P K K D

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-87-

The nucleotide sequences of forward primers A1-F to A9-F are set forth in SEQ ID NOs: 3-11, respectively. For each of the primers listed, the top strand shows the DNA sequence and the bottom strand indicates the amino acids encoded by that particular primer. In some instances, only two nucleotides of a given codon is contained in one primer, and the remaining nucleotide of the codon is contained in the preceding or following primer. In these cases, the amino acid is listed under the primer that contains 2 out of the 3 nucleotides of that particular codon. Boldface type indicate nucleotides coding for amino acids that constitute a protein linker region and are not part of the parent VEGF-A or VEGF-C molecule; underlined nucleotides are those that are removed during assembly of the fragments into hybrid constructs; and the lowercase letters are those nucleotides that produce an overhang when the oligonucleotide pairs are annealed to each other to produce the 9 fragments.

Table 1B - Reverse (Non-Coding) Primers for VEGF-A

15
A1-R CCACTTCGTGATGATTCGGCCAG
A2-R teggATGCGACTAGCTGCCCTGATAGACATCCATGAatttca
A3-R tccaGCTCTTCTTATTCCTGGAGATGTCACCACTGCTCTCGA
A4-R tggcttgaagatGTAATCGATCTCATCAGGATATTCGTAAGAGCGgtac
20 A5-R gataGCCACATCTCATCAGGGGCAAGCGAGA
A6-R gcaactCCAGCCCTTCGTCTATGACGCAACCCGGGTaC
A7-R aattCTCTTATCTGCAATGGTGAATTTGACTCTCTGGTGGGAAC
A8-R CATCTCCGATGCTGCTGCCCTGGTGAAGTTT
A9-R GGCCGCGAAGACTCAATCTTCTTGTGTACATTCACATTTGTATGCTGGGaaagct
25 The nucleotide sequences of reverse primers A1-R to A9-R are set forth in SEQ ID NOs: 12-20, respectively. Boldface, underlined and lowercase letters are used as described in Table 1A.

30 Nine VEGF-A polynucleotide fragments were assembled by annealing a matched pair of synthetic oligonucleotide primers. For example, fragment A1 was created by annealing primer A1-F with primer A1-R, fragment A2 was created by annealing A2-F with A2-R, and so on. Annealing was accomplished by incubating 2 pmol/ μ l of each appropriate primer, 20 mM Tris/HCl, 2mM MgCl₂, and 50 mM NaCl, pH 7.4 at 95°C for 5 minutes, followed by cooling of the solution to 37°C at a rate of 1°C/minute. As shown

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-88-

in Table 1A, fragment A1 encodes amino acid residues 34 to 42, and part of amino acid 43 of SEQ ID NO: 2; fragment A2 encodes part of amino acid 43, and amino acids 44-53 of SEQ ID NO: 2; fragment A3 encodes amino acids 54 to 63, and part of amino acid 64 of SEQ ID NO: 2; fragment A4 encodes part of amino acid 64, amino acids 65 to 71, and part of amino acid 72 of SEQ ID NO: 2; fragment A5 encodes part of amino acid 72, amino acids 73 to 83, and part of amino acid 84 of SEQ ID NO: 2; fragment A6 encodes part of amino acid 84, amino acids 85 to 92, and part of amino acid 93 of SEQ ID NO: 2; fragment A7 encodes part of amino acid 93, amino acids 94 to 107, and part of amino acid 108 of SEQ ID NO: 2; fragment A8 encodes part of amino acid 108, and amino acids 109 to 122 of SEQ ID NO: 2; and fragment A9 encodes amino acids 123 to 135 of SEQ ID NO: 2.

Fragmentation of VEGF-C

In a similar manner, nine pairs of oligonucleotides were designed and synthesized based upon the amino acid sequence of the receptor binding domain of VEGF-C (corresponding to nucleotides 658 to 999 of SEQ ID NO: 21, which encode amino acid residues 112 to 216 of SEQ ID NO: 22). The nucleotide sequences of the nine forward primers and nine reverse primers are set forth in Table 2A (SEQ ID NOs: 23-31) and Table 2B (SEQ ID NOs: 32-40), respectively.

Table 2A - Forward (Coding) Primers for VEGF-C

C1-F gat cct gca cat tat tat acc gag atc ctg aaa c
D P A H Y N T E I L K

C2-F ct att gat aat gag tgg aga agc acg tgc atg
S I D N E W R K T Q C H

C3-F ccg aca gag ctg tgt atc gac gtg ggg aag gattagagagac
P R E V C I D V G X

C4-F gctcttccaa ttt gga ctc gca aca aac acc t
E E G V A T N T

C5-F tc ttc aag cca cca tgt gtg tcc gtg tac aga tgt ggc
F F K P P C V S V Y R C G

C6-F ccg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg c
G C C N S E G L

C7-F ag tgc atg aac acc tcc acg acc tac ctg agc aag acg ctg ttt ga
Q C M N T S U S Y L S K T L F E

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-89-

C8-F a att ACA GTG CTT CTC TCT CAA GGG CCC AAA CCA GTG ACA ATC agcttt
 I T V P L S Q G P K P V T I S P
 5 C9-F GGC AAT CAC ACT TCC TCC CCA TGC ATG TCT ARG CTG GATTGAGTCTTCC
 A N H T S C R C M S K L D

Table 2B - Forward (Coding) Primers for VEGF-C

C1-R GGAATCGGTATTATTAATTCAG
 C2-R tcggCAGGACAGAGTCTTCTCCACTCATTAACAAATGatttaa
 10 C3-R tccagCTCTTCATTCCTTCCCACGTCGATACACCTCTC
 tgggtcgaggaAGGTGTTGTCTCCCACTCCAAATCGAAGAGCGctag
 C4-R gattgCCACATCTGTACACGGACACACTGG
 C5-R gcactGAGGCCCTCTCACTATTGACGACACCCGGctac
 C6-R aattTCAAACAGGCTCTGCTGAGTAGCTCGTGGACGCTTCAT
 15 C7-R GATTGCACTGGTTTGGGCCCTCAGAGAGGCACTGT
 gaccGCGAGAGCTCAATCCAGCTTAAACATGCATCGCAGGAGATGATTCGCaagct
 C8-R
 C9-R

Boldface, underlined and lowercase letters are used in Tables 2A and 2B as described in Table 1A.

Primer pairs were annealed to form nine double-stranded DNA fragments which together encoded the receptor binding domain of VEGF-C, and which possessed appropriate single stranded overhangs for annealing to other fragments, as described above for VEGF-A.

Fragment C1 encodes amino acid residues 112 to 120, and part of amino acid 121 of SEQ ID NO: 22; fragment C2 encodes part of amino acid 121 and amino acids 122 to 132 of SEQ ID NO: 22; fragment C3 encodes amino acids 133 to 142, and part of amino acid 143 of SEQ ID NO: 22; fragment C4 encodes part of amino acid 143, amino acids 144 to 150, and part of amino acid 151 of SEQ ID NO: 22; fragment C5 encodes part of amino acid 151, amino acids 152 to 162, and part of amino acid 163 of SEQ ID NO: 22; fragment C6 encodes part of amino acid 163, and amino acids 164 to 171, and part of amino acid 172 of SEQ ID NO: 22; fragment C7 encodes part of amino acid 172, amino acids 173 to 186, and part of amino acid 187 of SEQ ID NO: 22; fragment C8 encodes part of amino acid 187, amino acid 188 to 203 of SEQ ID NO: 22; and fragment C9 encodes amino acid 204 to 216 of SEQ ID NO: 22.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-90-

Discussion regarding the synthesis of the VEGF-A and VEGF-C fragments

Thus, by synthesizing and annealing nine pairs of primers designed from the VEGF-A amino acid sequence and nine pairs of primers designed from the VEGF-C amino acid sequence, eighteen DNA fragments were generated. Figure 2 is a schematic diagram illustrating the construction of the 9 VEGF-A and 9 VEGF-C DNA fragments. The oligonucleotides were designed to produce double-stranded DNA fragments containing unique cohesive ends upon annealing. Ligation of the 9 VEGF-A DNA fragments produces a single linear double-stranded DNA encoding amino acids 34-135 of VEGF-A (SEQ ID NO: 2), and ligation of the 9 VEGF-C DNA fragments results in a single DNA encoding amino acids 112-216 of VEGF-C (SEQ ID NO: 22).

While the insertion of cohesive ends greatly facilitated ligation of fragments in a desired order and orientation, it will be appreciated that ligation of fragments can also be accomplished without cohesive ends. Blunt-end fragments also can be synthesized and annealed to generate hybrid proteins using the method described above. With a blunt-end strategy, the nucleotide sequences of the parent molecules do not need to be examined for the presence of nucleotide identity to enable the creation of cohesive ends. However, additional post-ligation screening may be required to identify hybrids that contain fragments in the desired order and orientation.

Several additional details regarding the synthetic primers and the double-stranded DNA fragments deserve emphasis. First, it is worth noting that, for VEGF-A fragment A1 and VEGF-C fragment C1, the first two encoded amino acids, Asp and Pro, constitute a protein linker (encoded by an engineered BamHI recognition site) and do not correspond to either VEGF-A or VEGF-C sequences.

Second, referring to Figures 1 and 2, it is noteworthy that many of the fragments were designed to correspond to discrete structural elements within the receptor binding domain of VEGF family proteins. Fragment 2 corresponds to the N-terminal helix; fragment 4 corresponds to $\beta 2$; fragment 6 corresponds to the $\beta 3$ - $\beta 4$ loop; fragment 7 corresponds to $\beta 5$; fragment 8 corresponds to the $\beta 5$ - $\beta 6$ loop; and fragment 9 corresponds to $\beta 7$.

Third, it is noteworthy that the thirty-six oligonucleotides that were designed do not correspond exactly with native human VEGF-A or VEGF-C cDNA sequences (i.e.,

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-91-

DNA counterparts of naturally-occurring human mRNA sequences), notwithstanding the fact that the oligonucleotides were designed to retain encoded amino acid sequences of the human VEGF-A and VEGF-C polypeptides. For example, the oligonucleotides were designed such that the native (endogenous) human nucleotide sequence encoding the receptor binding domain for both VEGF-A and VEGF-C were modified to generate new restriction sites, to provide longer stretches of nucleotide identity where overlaps were desired between the "A" and "C" fragments, or to improve codon usage for expression in human cell culture. All nucleotide mutations (relevant to the native sequences) were silent. Thus, the amino acid sequences of the receptor binding domain of VEGF-A (resulting from annealing fragments A1-A9) and VEGF-C (from annealing fragments C1-C9) are identical to that of the respective parent molecule.

Fourth, referring again to Figure 2, it is noteworthy that each of the nine VEGF-A fragments aligns with the corresponding VEGF-C fragment, and has a compatible cohesive end to anneal to adjacent fragments from the other molecule. For example, fragments A1 and C1 correspond to the same relative portions of VEGF-A and VEGF-C, respectively, and have identical top strand cohesive ends. These cohesive ends are exactly complementary to bottom strand cohesive ends of both fragments A2 and C2, such that A1 could anneal to either A2 or C2, and C1 also could anneal to A2 or C2. Fragments A2 and C2 correspond to the same relative portions of VEGF-A and VEGF-C, and each possesses another bottom strand cohesive end that is exactly complementary to top strand cohesive ends of fragments A3 and C3, and so on. Thus, each set of nine fragments was designed not only to anneal to adjacent fragments of its parent VEGF-A/VEGF-C molecule, but also to anneal to adjacent fragments of the other molecule.

25 Assembly of chimeric (hybrid) VEGF molecules

Assembly of the 9 VEGF-A and 9 VEGF-C DNA fragments into hybrid DNAs containing regions from both VEGF-A and VEGF-C was accomplished by ligating different combinations of the VEGF-A and VEGF-C DNA fragments. All DNA fragments were isolated after digestion with appropriate restriction enzymes and gel electrophoresis using Qiaex II beads (Qiagen). It will be apparent that, if the proper order (1-2-3-4-5-6-7-8-9) of fragments is preserved, the nine VEGF-A fragments and the nine

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-92-

VEGF-C fragments can be recombined and annealed into 512 distinct hybrids, two of which represent naturally-occurring sequences (A1-A2-A3-A4-A5-A6-A7-A8-A9 and C1-C2-C3-C4-C5-C6-C7-C8-C9) and 510 of which represent novel hybrids. All 512 sequences were reconstructed using the following three step process.

5 First, the receptor binding domains of VEGF-A and VEGF-C were divided into 4 subdomains designated N123, N45, C67 and C89, as shown in Figure 2. N123 consists of the first 3 DNA fragments encoding the receptor binding domain of both VEGF-A and VEGF-C. N45, C67 and C89 each consists of 2 DNA fragments where N45 includes fragments 4 and 5, C67 consists of fragments 6 and 7, and C89 includes fragments 8 and 9.

10 Continuous DNA's corresponding to the N123 region were constructed by ligating fragments 1, 2, and 3 from either VEGF-A or VEGF-C, thus producing a total of eight possible different N123 DNA segments shown schematically in Figure 3. Similarly, continuous DNAs corresponding to the N45, C67, and C89 regions were constructed by 15 ligating the two appropriate DNA fragments from VEGF-A or VEGF-C. In these cases, all four possible different molecules were produced for each of the regions. Figure 4 is a schematic diagram illustrating all four possible N45 DNA segments, Figure 5 depicts all four possible C67 DNA segments, and Figure 6 shows all four possible C89 DNA segments. All of these molecules were cloned into the multiple cloning site of the pKO-Scribble-V912-BX vector (Lexicon Genetics Inc.) as part of the ligation reaction. All 20 ligations were carried out by combining 8 nmol/μl of vector cut with the appropriate restriction enzyme that enables cloning of the inserts into the vector, and dephosphorylated; 80 nmol/μl each of DNA fragments that are to be inserted into the vector; and 5 Weiss Units of T4 DNA ligase in 50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1mM ATP, 25 μg/ml BSA, and 5% PEG-4000, pH 7.5, followed by incubation for 25 12 hours at 16°C. Figures 7A-7D depict the amino acid sequences encoded by each of fragments A1-A9 and C1-C9; and schematically depict all the permutations of encoded peptides that result from recombinations that form the eight N123 constructs (Fig 7A), four N45 constructs (Fig. 7B), four C67 constructs (Fig. 7C), and four C89 constructs 30 (Fig. 7D).

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-93-

In the second step, the N123 fragments were joined with N45 fragments, and the C67 fragments were joined with C89 fragments. The N123 and N45 fragments were removed from their pKO-Scrambler-V912 host vector by digestion with restriction enzymes that allowed ligation of N123 to N45, and which also achieved removal of the non-protein coding regions of fragments 3 and 4 (see Tables 1A, 1B, 2A and 2B). By ligating each of the eight different N123 regions to all four possible N45 regions, 32 distinct N-terminal portions of the receptor binding domains were obtained. These clones were further inserted into the pSecTagI vector (SEQ ID NO: 41). The pSecTagI vector is a combined *E. coli*/mammalian expression vector which was constructed by modifying the pSecTagA vector (Invitrogen). pSecTagA was modified to eliminate specific restriction sites using site-directed mutagenesis and synthetic linkers, and the EM7 promoters from pICZα-A (Invitrogen) and pTRACER-CMV were added downstream to the CMV promoter of pSecTagA. Both pSecTagI and its parent vector, pSecTagA, allow high level of expression in mammalian cell culture using suitable cell lines e.g., 293T cells, *zeocin* selection of stably transfected mammalian cells, contain a mammalian signal peptide for secretion of the expressed protein, and contain a C-terminal myc epitope and polyhistidine tag for detection, quantitation and purification of the expressed protein. The pSecTagI vector differs from the pSecTagA vector in that expression in *E. coli* is constitutive and modification of the restriction sites facilitated cloning of the hybrid constructs.

The C67 and C89 fragments were removed from their pKO-Scrambler-V912 host vector by digestion with appropriate restriction enzymes, which also achieved removal of the non-protein coding regions of fragments 6 and 9 (see Tables 1A, 1B, 2A and 2B). Ligation of the four different C67 molecules to the four different C89 molecules produced 16 distinct C-terminal halves of the receptor binding domain. The C67-C89 fragments were cloned into the pKO-Scrambler vector during these ligations. Finally, 512 final ligations that combined the 32 different N-terminal portions and the 16 distinct C-terminal regions resulted in a total of 512 distinct molecules of which 510 are hybrids composed of both VEGF-A and VEGF-C amino acid residues. During this step the 512 constructs were cloned into the pSecTagI vector which contained the 32 different N-terminal

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-94-

portions. The remaining 2 molecules correspond to the original VEGF-A and VEGF-C sequences encoding the receptor binding domain.

Assembly of the hybrid molecules can also be accomplished in fewer ligation steps than outlined above. For example, ligation of N123, N45, C67 and C89 can be completed in a single ligation reaction. By designing fragments with cohesive ends that are perfect complements only with cohesive ends of adjacent fragments, it is possible to ligate multiple fragments in a correct order in a single ligation reaction.

Example 2

Expression of the hybrid molecules

Each of the 512 constructs were separately transfected transiently into 293T cells to express the different hybrid constructs. 293T cells were grown according to standard protocols in medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM), and 10% fetal bovine serum (FBS). Twenty-four hours prior to transfection, confluent dishes were diluted 1:10 with fresh media into 6 wells. Four hours prior to transfection, the medium was changed. For each construct, 3 μ g of DNA was transfected using standard protocols for calcium phosphate-mediated transfection [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual pp. 16.33-16.36 (1989)]. Twenty hours post-transfection, cells were washed twice with warm PBS and 2 ml of medium was added to each well.

Initial experiments were conducted to determine if the transfected cells were expressing the hybrid VEGF polypeptides encoded by the hybrid DNA molecules. Thus, 48 hours post-transfection, metabolic labeling with ^{35} S-methionine and ^{35} S-cysteine was initiated using 1.3 ml/well of labeling medium composed of MEM deficient for cysteine and methionine, 0.1% BSA, 24 μ Ci ^{35} S-methionine-cysteine/ml (Redivue PRO-MIX, Amersham). The cell supernatant was harvested 72-78 hours post-transfection, cleared by centrifugation, and stored at 4°C.

The supernatant was immunoprecipitated with anti-pentahistidine antibody (Qiagen) by mixing 175 μ l of sample supernatant with 100 μ l IP mix (PBS with 1.5% BSA, 0.05% Tween 20, and 12 μ l/ml anti-pentahistidine antibody) at 4°C overnight, with agitation. (The pSecTag I expression vector was engineered to express each of the hybrid VEGF proteins with a polyhistidine tag.) To collect immunoprecipitated protein, 50 μ l of

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-95-

a 30% protein A sepharose (PAS, Pharmacia) slurry in PBS was added and incubated under agitation for at least 1.5 hr at 4 °C. Standard buffer was added to each immunoprecipitation sample and boiled for 5 minutes at 95 °C during which the immunoprecipitated proteins become dissociated from the protein A sepharose. After centrifugation, 10 µl of each sample was analyzed on 15% SDS-PAGE under reducing conditions. The gels were dried and exposed for either 12 hours on phosphorimager plates or 4 weeks on X-ray film. Results of these experiments are shown in Table 3 below, in the column marked "EXP" for expression. As shown in the table with "Yes", initial attempts to express the vast majority of the hybrid constructs were successful. Constructs for which weak ("weak"), and no expression ("none") were observed in preliminary studies also are indicated. The failure to achieve expression in initial studies is reported for completeness, and not intended to reflect a conclusion of non-viability or other identified problems. However, it is noteworthy that of the non-expressed constructs, almost all were those chimeric molecules in which fragment 3 was derived from VEGF-A and fragment 7 was derived from VEGF-C. Analysis of the physical relationship between these two fragments shows that residues from these two fragments barely contact each other at the atomic level as judged from the VEGF-A crystal structure. The incompatibility of fragment 3 from VEGF-A and fragment 7 from VEGF-C may arise from incorrect folding of the molecule, perhaps caused in part by rapid glycosylation of the VEGF-C-derived fragment 7 when the molecule appears in the endoplasmic reticulum. The glycosylation sites within VEGF-A are located at a distance from the receptor binding domain, whereas the glycosylation sites within VEGF-C are positioned closer towards the region of the molecule formed by fragment 3 that is predicted to form contacts with the third domain of the receptor. The carbohydrate residues may also be involved in the interaction between ligand and receptor.

Example 3

Binding assays of hybrid molecules to soluble VEGF receptor-Fc fusion proteins.

The hybrid proteins that were expressed in 293T cells (see Example 2 and Table 1) were tested for the ability to bind soluble VEGF receptor-Fc fusion proteins. Binding of the hybrid proteins to all three VEGF receptors, VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3,

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-96-

was analyzed in this manner. Exemplary binding assays have been described in Achen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 95:548-53 (1998), incorporated by reference in its entirety.

It will be appreciated that binding assays can be performed with any form of naturally occurring VEGF receptors that retain the ability to bind their respective ligands, including but not limited to whole cells that naturally express a receptor or that have been recombinantly modified to express the receptor; truncated, solubilized extracellular ligand binding domains of receptors; fusions comprising receptor extracellular domains fused to other proteins such as alkaline phosphatase (e.g., VEGFR-2-AP described in Cao *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:3154-62 (1996)) or immunoglobulin sequences; and fusions comprising receptor extracellular domains fused to tag sequences (e.g., a polyhistidine tag) useful for capturing the protein with an antibody or with a solid support; and receptor extracellular domains chemically attached to solid supports such as CNBr-activated Sepharose beads.

For the present experiments, receptor binding was assayed using constructs comprising the extracellular domain of VEGFR-1, VEGFR-2, or VEGFR-3 fused to immunoglobulin constant region chains. The first three Ig domains of VEGFR-1 were fused to the Fc fragment from the Signal-pIgPlus vector (Ingenius/Novagen/R&D Systems). This construct (VEGFR-1-Fc) was stably expressed in *Drosophila Schneider* 2 (S2) cells, and purified using Protein A sepharose. Purity was analyzed by silver staining of a PAGE gel and the functionality of the fusion protein was tested by its ability to bind ³⁵S-labeled VEGF protein. The VEGFR-2-Fc receptor comprises the first 3 Ig domains of VEGFR-2 (encoded by nucleotides 64-972 of GenBank Acc. No. X61656) fused to the Fc fragment in the plg vector. The VEGFR-3-Fc receptor similarly consists of the first three Ig domains of VEGFR-3 (encoded by nucleotides 20-1005 of GenBank Acc. No. X68203) fused to the Fc fragment of the plg vector. VEGFR-2-Fc and VEGFR-3-Fc proteins were expressed in 293T cells and purified as described above for VEGFR-1-Fc.

The binding assay procedure was identical to the immunoprecipitation using pentahistidine antibody described in Example 2, apart from the composition of the immunoprecipitation (IP) mixes. The IP mixes used for the receptor binding analysis were as follows: For VEGFR-1 binding assays, the IP mix was phosphate buffered saline (PBS) containing 1.5% BSA, 0.06% Tween 20, 3 µg/ml heparin and 400 ng/ml VEGFR-1-Fc fusion protein (100 µl of this IP mix was added to 200 µl of sample

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-97-

supernatant); for VEGFR-2 binding assays, the IP mix was 82% conditioned cell supernatant from 293T cells transiently expressing VEGFR-2-I₂C fusion protein in mixture with 18% of a PBS solution that contained 5% BSA, 0.2% Tween 20, and 10 µg/ml heparin (250 µl of IP mix was added to 200 µl of sample supernatant); and for VEGFR-3 binding assays, the IP mix was 82% conditioned cell supernatant from 293T cells transiently expressing VEGFR-3-I₂C fusion protein, 18% of PBS containing 5% BSA, 0.2% Tween 20, and 10 µg/ml heparin (250 µl of IP mix was added to 200 µl of sample supernatant). A few selected constructs (clones 12-1, 12-5, 12-7, 12-9, 12-11, 12-13, 12-14, 14-9, 23-1, 32-14, 52-15, 53-3, 82-7, 82-9, 82-11, 82-13, 83-15, 84-9, and 84-11) were examined more than one time.

Results from the binding assays using ³⁵S labeled hybrid proteins are summarized in Table 3 below. The apparent molecular weights of the detected proteins were between 18 and 27 kD. Usually two bands were visible with different band intensities. Sometimes, the second band was only detectable after long exposures. The presence of two bands correlates with the origin of fragment 7 and 9 of the hybrid protein being examined. Fragment 7 contains a potential N-glycosylation site irrespective of whether it was derived from VEGF-A or VEGF-C, whereas fragment 9 only contains an N-glycosylation site if it originated from VEGF-C. Thus, the multiple bands are likely due to differential glycosylation of the hybrid protein being analyzed. The following are predicted bands for different combinations of glycosylation sites:

(1) fragment 7 derived from VEGF-A and fragment 9 from VEGF-A produces two bands of ~ 18 and ~ 22 kD

(2) fragment 7 derived from VEGF-A and fragment 9 from VEGF-C produces an ~ 26 kD band (a second band of ~ 22 kD is sometimes missing, a third extremely weak band of ~ 18 kD is sometimes visible)

(3) fragment 7 derived from VEGF-C and fragment 9 from VEGF-A produces an ~ 22 kD band (a second band of ~ 18 kD is sometimes missing)

(4) fragment 7 derived from VEGF-C and fragment 9 from VEGF-C produces one band of ~ 23 kD.

Results of the binding assays indicate that if both glycosylation sites were derived from VEGF-C, less heterogeneous glycosylation is observed. Molecules containing both

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-98-

fragment 7 from VEGF-A and fragment 9 from VEGF-C appear to promote artificial hyperglycosylation. The VEGF-A glycosylation site contained in fragment 7 is also prone to incomplete glycosylation

The binding assay data indicate that several of the hybrid molecules exhibit novel binding properties. Although the analysis was not quantitative, some of the hybrid molecules show different relative signal strengths. For example, clone 72-10 appears to have lost much of its affinity for VEGFR-3 while retaining most of its affinity for VEGFR-2. These results suggest that among the hybrid proteins that retained the receptor specificities of either parent protein (VEGF-A or VEGF-C), some may have undergone differential changes in their binding affinities towards the corresponding receptors.

In Table 3 below, column 1 lists the names of the constructs examined. Column 2 sequentially lists the 9 fragments of each construct, where A=fragment from VEGF-A, and C=fragment from VEGF-C. Column 3 labeled "EXP" lists the results from the experiments to express the constructs in 293T cells, as described in Example 2. In this column, "none" indicates that no detectable protein was expressed; "weak" indicates that weak expression was detectable; and "yes" indicates that the expressed protein was readily detectable. The final three columns list results from the receptor binding assays described in Example 3, where binding to VEGFR-1-Fc, VEGFR-2-Fc, and VEGFR-3-Fc were examined. For these last three columns, "yes" indicates binding, "none" indicates no detectable binding to the receptor, and "0" indicates that this construct was not expressed in 293T cells, thus, could not be used for binding assays.

Table 3 Results of hybrid molecule expression and receptor binding analysis

		EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3
31-1	A C A A A A A A A	yes	none	none	none
31-5	A C A A A A C A A	none	0	0	0
31-13	A C A A A C C A A	none	0	0	0
31-9	A C A A A C A A A	yes	none	none	none
31-2	A C A A A A A A C	yes	none	none	none
31-10	A C A A A C A A C	yes	none	none	none

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-99-

	31-6	ACAAAACAC	yes	none	none	none
	31-14	ACAAAACAC	none	0	0	0
	31-12	ACAAAACACA	yes	none	none	none
	31-11	ACAAAACACA	yes	none	none	none
5	31-7	ACAAAACCA	none	0	0	0
	31-4	ACAAAACCC	yes	none	none	none
	31-8	ACAAAACCC	yes	0	0	0
	31-3	ACAAAACCA	yes	none	none	none
	31-15	ACAAAACCA	none	0	0	0
10	31-16	ACAAAACCC	none	0	0	0
	21-1	CCCCAAAAA	yes	none	none	none
	21-2	CCCCAACAA	yes	none	none	none
	21-3	CCCCAACAA	yes	none	none	none
	21-4	CCCCAACAA	yes	none	none	none
15	21-5	CCCCAAAC	yes	none	none	none
	21-6	CCCCAACAC	yes	none	none	none
	21-7	CCCCAACAC	yes	none	none	none
	21-8	CCCCAACAC	yes	none	none	none
	21-9	CCCCAAACA	yes	none	none	none
20	21-10	CCCCAACCA	yes	none	none	none
	21-11	CCCCAACCA	yes	none	none	none
	21-12	CCCCAACCA	yes	none	none	none
	21-13	CCCCAAACC	yes	none	none	none
	21-14	CCCCAACCC	yes	none	none	none
25	21-15	CCCCAACCC	yes	none	none	none
	21-16	CCCCAACCC	yes	none	none	none
	22-1	CCCCCAAAA	yes	none	none	none
	22-2	CCCCCAAAA	yes	none	yes	yes
	22-3	CCCCCAAAA	yes	none	none	yes
30	22-4	CCCCCAAAA	yes	none	yes	yes
	22-5	CCCCCAAAA	yes	none	none	none
	22-6	CCCCCAAC	yes	none	yes	yes
	22-7	CCCCCAAC	yes	none	none	none
	22-8	CCCCCAAC	yes	none	yes	yes
35	22-9	CCCCCAACA	yes	none	none	none
	22-10	CCCCCAACA	yes	none	yes	yes
	22-11	CCCCCAACA	yes	none	none	none
	22-12	CCCCCAACA	yes	none	yes	yes

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-100-

	22-13	CCCCCAACC	yes	none	none	none
	22-14	CCCCCAACC	yes	none	yes	yes
	22-15	CCCCCAACC	yes	none	none	none
	22-16	CCCCCCCCC	yes	none	yes	yes
5	72-1	ACCCCAAAA	yes	none	none	none
	72-2	ACCCCACAA	yes	none	yes	yes
	72-3	ACCCCAAAA	yes	none	none	none
	72-4	ACCCCAAAA	yes	none	yes	yes
	72-5	ACCCCAAAC	yes	none	none	none
10	72-6	ACCCCAACC	yes	none	none	yes
	72-7	ACCCCAAAC	yes	none	none	none
	72-8	ACCCCAACC	yes	none	yes	yes
	72-9	ACCCCAACA	yes	none	none	none
	72-10	ACCCCAACC	yes	none	yes	yes
15	72-11	ACCCCAACA	yes	none	none	none
	72-12	ACCCCAACC	yes	none	yes	yes
	72-13	ACCCCAACC	yes	none	none	none
	72-14	ACCCCAACC	yes	none	yes	yes
	72-15	ACCCCAACC	yes	none	none	none
20	72-16	ACCCCAACC	yes	none	yes	yes
	11-1	AAAAAAAAA	yes	yes	yes	none
	11-2	AAAAAACAA	none	0	0	0
	11-3	AAAAAACAA	yes	yes	yes	none
	11-4	AAAAAACAA	none	0	0	0
25	11-5	AAAAAACAA	yes	yes	yes	none
	11-6	AAAAAACAA	none	0	0	0
	11-7	AAAAAACAA	yes	yes	yes	none
	11-8	AAAAAACAA	none	0	0	0
	11-9	AAAAAACAA	yes	yes	none	none
30	11-10	AAAAAACAA	none	0	0	0
	11-11	AAAAAACAA	yes	yes	yes	none
	11-12	AAAAAACAA	none	0	0	0
	11-13	AAAAAACAA	yes	yes	none	none
	11-14	AAAAAACAA	none	0	0	0
35	11-15	AAAAAACAA	yes	yes	yes	none
	11-16	AAAAAACAA	none	0	0	0
	12-1	AAACCAAAA	yes	yes	yes	yes
	12-2	AAACCAAAA	none	0	0	0

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-101-

	12-3	AAACCCAAA	yes	yes	yes	none
	12-4	AAACCCCAA	none	0	0	0
	12-5	AAACCCAAAC	yes	yes	none	none
	12-6	AAACCCACAC	none	0	0	0
5	12-7	AAACCCAAAC	yes	yes	yes	yes
	12-8	AAACCCACAC	none	0	0	0
	12-9	AAACCCAAAC	yes	yes	none	yes
	12-10	AAACCCACCA	none	0	0	0
	12-11	AAACCCACCA	yes	yes	yes	yes
10	12-12	AAACCCCCCA	none	0	0	0
	12-13	AAACCCAAAC	yes	yes	none	yes
	12-14	AAACCCACCC	yes	none	none	yes
	12-15	AAACCCACCC	yes	none	yes	yes
	12-16	AAACCCCCCC	yes	none	none	yes
15	81-1	CAAAAAAAAA	yes	yes	yes	none
	81-2	CAAAAAACAA	none	0	0	0
	81-3	CAAAAAACAA	yes	yes	yes	none
	81-4	CAAAAAACAA	none	0	0	0
	81-5	CAAAAAACAA	yes	yes	yes	none
20	81-6	CAAAAAACAC	none	0	0	0
	81-7	CAAAAAACAC	yes	yes	yes	none
	81-8	CAAAAAACAC	none	0	0	0
	81-9	CAAAAAACAA	yes	yes	none	none
	81-10	CAAAAAACCA	none	0	0	0
25	81-11	CAAAAAACCA	yes	yes	yes	none
	81-12	CAAAAAACCA	none	0	0	0
	81-13	CAAAAAACCC	yes	yes	none	none
	81-14	CAAAAAACCC	none	0	0	0
	81-15	CAAAAAACCC	yes	yes	yes	none
30	81-16	CAAAAAACCC	none	0	0	0
	13-1	AAACACAAAA	yes	yes	yes	none
	13-2	AAACACACAA	none	0	0	0
	13-3	AAACACACAA	none	0	0	0
	13-4	AAACACACAA	yes	none	none	none
35	13-5	AAACACACAC	yes	yes	yes	none
	13-6	AAACACACAC	yes	none	none	none
	13-7	AAACACACAC	yes	yes	yes	none
	13-8	AAACACACAC	yes	none	none	none

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-102-

5	13-9	AAAAACAACA	yes	yes	none	none
	13-10	AAAAACAACA	none	0	0	0
	13-11	AAAAACAACA	yes	yes	none	none
	13-12	AAAAACCCCA	none	0	0	0
	13-13	AAAAACAACC	yes	yes	none	none
	13-14	AAAAACAACC	yes	none	none	none
10	13-15	AAAAACAACC	yes	yes	none	none
	13-16	AAAAACCCCC	none	0	0	0
	14-1	AAACAACAAA	yes	yes	none	none
	14-2	AAACAACAAA	none	0	0	0
	14-3	AAACAACAAA	yes	yes	yes	none
	14-4	AAACAACAAA	none	0	0	0
15	14-5	AAACAACAAA	yes	yes	none	none
	14-6	AAACAACAAA	none	0	0	0
	14-7	AAACAACAAA	yes	none	yes	none
	14-8	AAACAACAAA	none	0	0	0
	14-9	AAACAACAAA	yes	yes	yes	yes
	14-10	AAACAACAAA	none	0	0	0
20	14-11	AAACAACAAA	none	0	0	0
	14-12	AAACAACAAA	none	0	0	0
	14-13	AAACAACAAA	yes	none	none	none
	14-14	AAACAACAAA	none	0	0	0
	14-15	AAACAACAAA	yes	none	none	none
	14-16	AAACAACAAA	none	0	0	0
25	23-1	CCCAACAAA	yes	none	none	none
	23-2	CCCAACAAA	yes	none	none	none
	23-3	CCCAACAAA	yes	none	none	none
	23-4	CCCAACAAA	yes	none	none	none
	23-5	CCCAACAAA	yes	none	none	none
	23-6	CCCAACAAA	yes	none	none	none
30	23-7	CCCAACAAA	yes	none	none	none
	23-8	CCCAACAAA	yes	none	none	none
	23-9	CCCAACAAA	yes	none	none	none
	23-10	CCCAACAAA	yes	none	yes	none
	23-11	CCCAACAAA	yes	none	none	none
	23-12	CCCAACAAA	yes	none	yes	none
35	23-13	CCCAACAAA	yes	none	none	none
	23-14	CCCAACAAA	yes	none	yes	none

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-103-

	23-15	CCCCCCCC	yes	none	none	none
	23-16	CCCCCCCC	yes	none	none	none
	33-1	ACAAACAAA	yes	none	yes	none
	33-2	ACAAACAAA	yes	none	none	none
5	33-3	ACAAACAAA	yes	none	yes	none
	33-4	ACAAACCAA	yes	none	none	none
	33-5	ACAAACAAAC	yes	none	none	none
	33-6	ACAAACACAC	yes	none	none	none
	33-7	ACAAACCAAC	yes	none	none	none
10	33-8	ACAAACCCAC	yes	none	none	none
	33-9	ACAAACAACA	yes	none	yes	none
	33-10	ACAAACCCA	none	0	0	0
	33-11	ACAAACACA	yes	none	none	none
	33-12	ACAAACCCA	none	0	0	0
15	33-13	ACAAACAACC	yes	none	none	none
	33-14	ACAAACACCC	yes	none	none	none
	33-15	ACAAACCAAC	yes	none	none	none
	33-16	ACAAACCCCC	yes	none	none	none
	34-1	ACACAAAAAA	yes	none	none	none
20	34-2	ACACAAACAA	none	0	0	0
	34-3	ACACACAAA	yes	none	none	none
	34-4	ACACACCAA	none	0	0	0
	34-5	ACACAAAAAC	yes	none	none	none
	34-6	ACACAAACAC	none	0	0	0
25	34-7	ACACACAAAC	yes	none	none	none
	34-8	ACACACACAC	none	0	0	0
	34-9	ACACAAACAA	yes	none	none	none
	34-10	ACACAAACCA	none	0	0	0
	34-11	ACACACACAA	yes	none	none	none
30	34-12	ACACACCCA	none	0	0	0
	34-13	ACACAAACCC	yes	none	none	none
	34-14	ACACAAACCC	yes	none	none	none
	34-15	ACACACACCC	yes	none	none	none
	34-16	ACACACCCCC	none	0	0	0
35	41-1	CACAAAAAAA	yes	yes	none	none
	41-2	CACAAACAA	none	0	0	0
	41-3	CACAAACAAA	yes	none	none	none
	41-4	CACAAACCAA	none	0	0	0

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-104-

5	41-5	CACAAAAAC	yes	none	none	none
	41-6	CACAAACAC	yes	none	none	none
	41-7	CACAAACAAC	yes	none	none	none
	41-8	CACAAACAC	none	0	0	0
	41-9	CACAAAAACA	yes	none	none	none
10	41-10	CACAAACCA	none	0	0	0
	41-11	CACAAACACA	yes	none	none	none
	41-12	CACAAACCCA	none	0	0	0
	41-13	CACAAAACC	yes	none	none	none
	41-14	CACAAAACC	yes	none	none	none
15	41-15	CACAAACAC	yes	none	none	none
	41-16	CACAAACCC	yes	none	none	none
	42-1	CACCCAAAA	yes	none	none	none
	42-2	CACCCACAA	none	0	0	0
	42-3	CACCCCAAA	yes	none	none	none
20	42-4	CACCCCCAA	none	0	0	0
	42-5	CACCCAAAC	none	0	0	0
	42-6	CACCCACAC	yes	none	none	none
	42-7	CACCCCAAC	yes	none	none	none
	42-8	CACCCCCAC	yes	none	none	none
25	42-9	CACCCAACA	yes	none	none	none
	42-10	CACCCACCA	yes	none	none	none
	42-11	CACCCACCA	yes	none	none	none
	42-12	CACCCCCCA	yes	none	none	none
	42-13	CACCCAACC	yes	none	none	none
30	42-14	CACCCACCC	yes	none	none	none
	42-15	CACCCCAAC	yes	none	none	none
	42-16	CACCCCCCC	yes	none	none	none
	43-1	CACACAATA	yes	yes	none	none
	43-2	CACACACAA	none	0	0	0
35	43-3	CACACCAAA	yes	none	none	none
	43-4	CACACCCA	none	0	0	0
	43-5	CACACAAAC	yes	none	none	none
	43-6	CACACACAC	yes	none	none	none
	43-7	CACACCAAC	yes	none	none	none
35	43-8	CACACCCAC	yes	none	none	none
	43-9	CACACAACA	yes	none	none	none
	43-10	CACACACCA	none	0	0	0

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-105-

	43-11	CACACCCACA	yes	none	none	none
	43-12	CACACCCCA	none	0	0	0
	43-13	CACACAACC	yes	none	none	none
	43-14	CACACACCC	yes	none	none	none
5	43-15	CACACCAAC	yes	none	none	none
	43-16	CACACCCCC	yes	none	none	none
	44-1	CACCAAAAA	yes	none	none	none
	44-2	CACCAACAA	yes	none	none	none
	44-3	CACCACAAA	yes	none	none	none
10	44-4	CACCAACCA	yes	none	none	none
	44-5	CACCAAAAC	yes	none	none	none
	44-6	CACCAACAC	none	0	0	0
	44-7	CACCAACAAC	yes	none	none	none
	44-8	CACCAACAC	yes	none	none	none
15	44-9	CACCAAAAC	yes	none	none	none
	44-10	CACCAACCA	yes	none	none	none
	44-11	CACCAACA	yes	none	none	none
	44-12	CACCAACCA	yes	none	none	none
	44-13	CACCAAAC	yes	none	none	none
20	44-14	CACCAACCC	yes	none	none	none
	44-15	CACCAACCC	yes	none	none	none
	44-16	CACCAACCC	yes	none	none	none
	54-1	CCACAAAAA	yes	none	none	none
	54-2	CCACAAACA	none	0	0	0
25	54-3	CCACACAAA	yes	none	none	none
	54-4	CCACACCAA	none	0	0	0
	54-5	CCACAAAAAC	yes	none	none	none
	54-6	CCACAAACAC	none	0	0	0
	54-7	CCACACAAAC	yes	none	none	none
30	54-8	CCACACCAAC	none	0	0	0
	54-9	CCACAAAAAC	yes	none	none	none
	54-10	CCACAAACCA	yes	none	none	none
	54-11	CCACACACCA	yes	none	none	none
	54-12	CCACACCCA	none	0	0	0
35	54-13	CCACAAAAAC	yes	none	none	none
	54-14	CCACAAACCC	none	0	0	0
	54-15	CCACACACCC	yes	none	none	none
	54-16	CCACACCCCC	none	0	0	0

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-106-

	64-1	A A C C A A A A A	yes	none	none	none
	64-2	A A C C A A C A A	yes	none	none	none
	64-3	A A C C A C A A A	yes	none	none	none
	64-4	A A C C A C C A A	yes	none	none	none
5	64-5	A A C C A A A A C	yes	none	none	none
	64-6	A A C C A A C A C	yes	none	none	none
	64-7	A A C C A C A A C	yes	none	none	none
	64-8	A A C C A C C A C	yes	none	none	none
	64-9	A A C C A A A C A	yes	none	none	none
10	64-10	A A C C A A C C A	yes	none	none	none
	64-11	A A C C A C A C A	yes	none	none	none
	64-12	A A C C A C C C A	yes	none	none	none
	64-13	A A C C A A A C C	yes	none	none	none
	64-14	A A C C A A C C C	yes	none	none	none
15	64-15	A A C C A C A C C	yes	none	none	none
	64-16	A A C C A C C C C	yes	none	none	none
	83-1	C A A A C A A A A	yes	yes	yes	none
	83-2	C A A A C A C A A	none	0	0	0
	83-3	C A A A C C A A A	yes	yes	yes	none
20	83-4	C A A A C C C A A	none	0	0	0
	83-5	C A A A C A A A C	yes	yes	yes	none
	83-6	C A A A C A C A C	yes	none	none	none
	83-7	C A A A C C A A C	yes	yes	yes	none
	83-8	C A A A C C C A C	none	0	0	0
25	83-9	C A A A C A A C A	yes	yes	none	none
	83-10	C A A A C A C C A	none	0	0	0
	83-11	C A A A C C A C A	yes	yes	yes	none
	83-12	C A A A C C C C A	none	0	0	0
	83-13	C A A A C A A C C	yes	yes	none	none
30	83-14	C A A A C A C C C	none	0	0	0
	83-15	C A A A C C A C C	yes	yes	yes	none
	83-16	C A A A C C C C C	none	0	0	0
	24-1	C C C C A A A A A	yes	none	none	none
	24-2	C C C C A A C A A	yes	none	none	none
35	24-3	C C C C A C A A A	yes	none	none	none
	24-4	C C C C A C C A A	yes	none	none	none
	24-5	C C C C A A A A C	yes	none	none	none
	24-6	C C C C A A C A C	yes	none	none	none

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-107-

5	24-7	CCCCACAAAC	yes	none	none	none
	24-8	CCCCACCAAC	yes	none	none	none
	24-9	CCCCAAACA	yes	none	none	none
	24-10	CCCCAACCA	yes	none	none	none
	24-11	CCCCACACA	yes	none	none	none
10	24-12	CCCCACCCA	yes	none	none	none
	24-13	CCCCAAACC	yes	none	none	none
	24-14	CCCCAACCC	yes	none	none	none
	24-15	CCCCACACC	yes	none	none	none
	24-16	CCCCACCCC	yes	none	none	none
15	32-1	ACACCAAAA	yes	none	none	none
	32-2	ACACCAACA	none	0	0	0
	32-3	ACACCAAAA	yes	none	none	none
	32-4	ACACCCCAA	none	0	0	0
	32-5	ACACCAAAC	yes	none	none	none
20	32-6	ACACCAACAC	yes	none	none	none
	32-7	ACACCAAAC	yes	none	none	none
	32-8	ACACCCCAAC	yes	none	none	none
	32-9	ACACCAACA	yes	none	none	yes
	32-10	ACACCAACA	none	0	0	0
25	32-11	ACACCAACA	yes	none	none	yes
	32-12	ACACCCCA	none	0	0	0
	32-13	ACACCAACC	yes	none	none	none
	32-14	ACACCAACC	yes	none	none	yes
	32-15	ACACCAACC	yes	none	none	yes
30	32-16	ACACCCCA	yes	none	none	yes
	51-1	CCAAAAAAA	yes	none	none	none
	51-2	CCAAAAACA	yes	none	none	none
	51-3	CCAAAAACA	yes	none	none	none
	51-4	CCAAAAACA	yes	none	none	none
35	51-5	CCAAAAAAC	yes	none	none	none
	51-6	CCAAAAAAC	yes	none	none	none
	51-7	CCAAAAAAC	yes	none	none	none
	51-8	CCAAAAAAC	yes	none	none	none
	51-9	CCAAAAACA	yes	none	none	none
	51-10	CCAAAAACA	none	0	0	0
	51-11	CCAAAAACA	yes	none	none	none
	51-12	CCAAAAACA	none	0	0	0

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-108-

	51-13	CCAAAAACC	yes	none	none	none
	51-14	CCAAAAACC	yes	none	none	none
	51-15	CCAAAAACC	yes	none	none	none
	51-16	CCAAAAACC	none	0	0	0
5	52-1	CCACC AAAA	yes	none	none	none
	52-2	CCACC AAA	none	0	0	0
	52-3	CCACC AAA	yes	none	none	none
	52-4	CCACC AAA	none	0	0	0
	52-5	CCACC AAAC	yes	none	none	none
10	52-6	CCACC AAC	yes	none	none	none
	52-7	CCACC AAC	yes	none	none	none
	52-8	CCACC AAC	yes	none	none	none
	52-9	CCACC AAC	yes	none	none	yes
	52-10	CCACC AAC	none	0	0	0
15	52-11	CCACC AAC	yes	none	none	yes
	52-12	CCACC AAC	none	0	0	0
	52-13	CCACC AAC	none	0	0	0
	52-14	CCACC AAC	yes	none	none	yes
	52-15	CCACC AAC	yes	none	none	yes
20	52-16	CCACC AAC	yes	none	yes	yes
	53-1	CCAAACAAA	yes	none	yes	none
	53-2	CCAAACAAA	none	0	0	0
	53-3	CCAAACAAA	yes	yes	yes	yes
	53-4	CCAAACAAA	none	0	0	0
25	53-5	CCAAACAAAC	yes	none	none	none
	53-6	CCAAACAAAC	yes	none	none	none
	53-7	CCAAACAAAC	yes	none	yes	none
	53-8	CCAAACAAAC	yes	none	none	none
	53-9	CCAAACAAAC	yes	none	none	none
30	53-10	CCAAACAAAC	none	0	0	0
	53-11	CCAAACAAAC	yes	none	none	none
	53-12	CCAAACAAAC	none	0	0	0
	53-13	CCAAACAAAC	yes	none	none	none
	53-14	CCAAACAAAC	yes	none	none	none
35	53-15	CCAAACAAAC	yes	none	none	none
	53-16	CCAAACAAAC	yes	none	none	none
	61-1	AACAAAAAA	yes	yes	none	none
	61-2	AACAAAAAA	yes	none	none	none

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-109-

	61-3	A A C A A C A A A	yes	yes	none	none
	61-4	A A C A A C C A A	yes	none	none	none
	61-5	A A C A A A A A C	yes	none	none	none
	61-6	A A C A A A C A C	yes	none	none	none
5	61-7	A A C A A C A A C	yes	none	none	none
	61-8	A A C A A C C A C	yes	none	none	none
	61-9	A A C A A A A C A	yes	none	none	none
	61-10	A A C A A A C C A	yes	none	none	none
	61-11	A A C A A C A C A	yes	none	none	none
10	61-12	A A C A A C C C A	yes	none	none	none
	61-13	A A C A A A A C C	yes	none	none	none
	61-14	A A C A A A C C C	yes	none	none	none
	61-15	A A C A A C A C C	yes	none	none	none
	61-16	A A C A A C C C C	yes	none	none	none
15	62-1	A A C C C A A A A	yes	yes	none	none
	62-2	A A C C C A C A A	yes	0	0	0
	62-3	A A C C C C A A A	yes	none	none	none
	62-4	A A C C C C C A A	yes	none	none	none
	62-5	A A C C C A A A C	yes	none	none	none
20	62-6	A A C C C A C A C	yes	none	none	none
	62-7	A A C C C C A A C	yes	none	none	none
	62-8	A A C C C C C A C	yes	none	yes	none
	62-9	A A C C C A A C A	yes	none	none	none
	62-10	A A C C C A C C A	yes	none	yes	none
25	62-11	A A C C C C A C A	yes	none	yes	yes
	62-12	A A C C C C C C A	yes	none	none	none
	62-13	A A C C C A A C C	yes	none	yes	none
	62-14	A A C C C A C C C	yes	none	none	none
	62-15	A A C C C C A C C	yes	none	none	none
30	62-16	A A C C C C C C C	yes	none	none	none
	63-1	A A C A C A A A A	yes	yes	yes	none
	63-2	A A C A C A C A A	none	0	0	0
	63-3	A A C A C C A A A	yes	none	yes	none
	63-4	A A C A C C C A A	none	0	0	0
35	63-5	A A C A C A A A C	yes	none	none	none
	63-6	A A C A C A C A C	yes	none	yes	none
	63-7	A A C A C C A A C	yes	none	yes	yes
	63-8	A A C A C C C A C	yes	none	none	none

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-110-

	63-9	A A C A C A A C A	yes	none	none	none
	63-10	A A C A C A C C A	yes	none	none	none
	63-11	A A C A C C A C A	yes	none	none	none
	63-12	A A C A C C C C A	yes	0	0	0
5	63-13	A A C A C A A C C	yes	none	none	none
	63-14	A A C A C A C C C	yes	none	none	none
	63-15	A A C A C C A C C	yes	none	none	none
	63-16	A A C A C C C C C	yes	none	none	none
	71-1	A C C A A A A A A	yes	none	none	none
10	71-2	A C C A A A C A A	yes	none	none	none
	71-3	A C C A A C A A A	yes	none	none	none
	71-4	A C C A A C C A A	yes	none	none	none
	71-5	A C C A A A A A C	yes	none	none	none
	71-6	A C C A A A C A C	yes	none	none	none
15	71-7	A C C A A C A A C	yes	none	none	none
	71-8	A C C A A C C A C	yes	none	none	none
	71-9	A C C A A A A C A	yes	none	none	none
	71-10	A C C A A A C C A	yes	none	none	none
	71-11	A C C A A C A C A	yes	none	none	none
20	71-12	A C C A A C C C A	yes	none	none	none
	71-13	A C C A A A A C C	yes	none	none	none
	71-14	A C C A A A C C C	yes	none	none	none
	71-15	A C C A A C A C C	yes	none	none	none
	71-16	A C C A A C C C C	yes	none	none	none
25	73-1	A C C A C A A A A	yes	none	none	none
	73-2	A C C A C A C A A	yes	none	none	none
	73-3	A C C A C C A A A	yes	none	none	none
	73-4	A C C A C C C A A	yes	0	0	0
	73-5	A C C A C A A A C	yes	none	none	none
30	73-6	A C C A C A C A C	yes	none	none	none
	73-7	A C C A C C A A C	yes	none	yes	none
	73-8	A C C A C C C A C	yes	none	none	none
	73-9	A C C A C A A C A	yes	none	none	none
	73-10	A C C A C A C C A	yes	none	none	none
35	73-11	A C C A C C A C A	yes	none	none	none
	73-12	A C C A C C C C A	yes	none	none	none
	73-13	A C C A C A A C C	yes	none	none	none
	73-14	A C C A C A C C C	yes	none	none	none

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-111-

	73-15	ACCCACCAAC	yes	none	yes	none
	73-16	ACCCACCCCC	yes	none	none	none
	74-1	ACCCAAAAAA	yes	none	none	none
	74-2	ACCCAAACAA	yes	none	none	none
5	74-3	ACCCACAAAA	yes	none	none	none
	74-4	ACCCACCCAA	yes	none	none	none
	74-5	ACCCAAAAAC	yes	none	none	none
	74-6	ACCCAAACAC	yes	none	none	none
	74-7	ACCCACCAAC	yes	none	none	none
10	74-8	ACCCACCCAC	yes	none	yes	none
	74-9	ACCCAAAACA	yes	none	none	none
	74-10	ACCCAAACCA	yes	none	yes	none
	74-11	ACCCACACCA	yes	none	none	none
	74-12	ACCCACCCCA	yes	none	yes	none
15	74-13	ACCCAAAAAC	yes	none	none	none
	74-14	ACCCAAACCC	yes	none	none	none
	74-15	ACCCACACCC	yes	none	none	none
	74-16	ACCCACCCCC	yes	none	none	none
	82-1	CAACCCAAAA	yes	none	none	none
20	82-2	CAACCCACAA	none	none	none	none
	82-3	CAACCCAAAA	yes	none	none	none
	82-4	CAACCCCCAA	none	none	none	none
	82-5	CAACCCAAAC	yes	yes	none	none
	82-6	CAACCCACAC	none	0	0	0
25	82-7	CAACCCCAAC	yes	yes	yes	yes
	82-8	CAACCCCCAC	none	0	0	0
	82-9	CAACCCAAAC	yes	yes	yes	yes
	82-10	CAACCCACCA	none	0	0	0
	82-11	CAACCCACCA	yes	yes	yes	yes
30	82-12	CAACCCCCCA	none	0	0	0
	82-13	CAACCCAAAC	yes	yes	none	yes
	82-14	CAACCCACCC	yes	none	none	yes
	82-15	CAACCCCAAC	yes	none	yes	yes
	82-16	CAACCCCCCC	yes	none	none	yes
35	84-1	CAACAAAAAA	yes	yes	none	none
	84-2	CAACAAACAA	none	0	0	0
	84-3	CAACACAAAA	yes	yes	yes	none
	84-4	CAACACCCAA	none	0	0	0

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-112-

	84-5	CAACAAAAC	yes	yes	none	none
	84-6	CAACAAACAC	none	0	0	0
	84-7	CAACACAAC	yes	none	none	none
	84-8	CAACACCAAC	none	0	0	0
5	84-9	CAACAAAACA	yes	yes	yes	yes
	84-10	CAACAAACCA	none	0	0	0
	84-11	CAACACAACA	yes	yes	yes	yes
	84-12	CAACACCCA	none	0	0	0
	84-13	CAACAAAACC	none	0	0	0
10	84-14	CAACAAACCC	none	0	0	0
	84-15	CAACACAACC	none	0	0	0
	84-16	CAACACCCC	none	0	0	0

15 Receptor binding properties were analyzed only for constructs that were expressed. If a clone was weakly expressed, its receptor binding properties were analyzed only if its size allowed distinction from endogenous VEGF-A expression, or if its amino acid composition allowed removal of endogenous VEGF-A using monoclonal anti-VEGF-A antibodies (R&D Systems) prior to assaying receptor binding. Although the

20 epitope recognized by this anti-VEGF-A antibody has not been characterized, our preliminary results indicate that the epitope is located within one or more of fragments 2, 3, 4, 7, or 9 of VEGF-A. Thus, antibody precipitation of endogenous VEGF-A was performed for all constructs in which fragments 2, 3, 4, 7, and 9 were derived from VEGFR-C. Further mapping of the epitope of this antibody may allow similar examination

25 of additional constructs. For example, if subsequent analysis indicates that the epitope does not reside in fragment 2, constructs in which fragment 2 was derived from VEGF-A can also be analyzed by this method. This procedure was performed for binding to VEGFR-1 or VEGFR-2, to assess how many low affinity binding hybrid molecules were not detected due to interference with endogenous VEGF. Failure to detect a signal or

30 detection of a weak signal in the receptor binding assays does not conclusively demonstrate lack of or low receptor binding affinity. The intrinsic set-up of the experiment does not allow detection of low affinity binders of VEGFR-1 and VEGFR-2 that are weakly expressed. Thus, the binding assays may have failed to detect low affinity

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-113-

binders of VEGFR-1 and VEGFR-2 for some of the hybrid proteins that were weakly expressed.

In this assay, apparent low receptor binding affinity of a low-level-expressed hybrid molecule could be due to heterodimerization with endogenous VEGF. For example, if a hybrid protein has no receptor-affinity itself, but is able to dimerize with endogenous VEGF-A, such a heterodimer may be capable of binding one or more receptor(s) with low affinity. Purification of chimeric polypeptides of the invention (e.g., using immunoaffinity chromatography with an antibody that recognizes either the *myc* or HA tag sequences) and using the purified polypeptide in receptor binding assays will resolve any ambiguities caused by endogenous VEGF-A in conditioned media. Alternatively, the hybrid proteins will be expressed in insect cells, e.g., S9 cells, to avoid contamination with endogenous VEGF-A.

Lack of expression or low level expression of a particular construct may be due to properties of the hybrid protein itself, variations in DNA quality, or may reflect mutations in the DNA acquired during construction of the hybrid clone. In the present case, all constructs were sequenced after the first ligation step, and selected clones were sequenced after the second ligation step. Analysis of these sequences indicated that no mutations occurred during the first step, and none of the sequences examined after the second step of construction contained mutations. Thus, any mutations present in the final clone most probably occurred during the final ligation step.

Thirty-six of the 512 clones were sequenced to determine the frequency with which constructs acquired mutations during construction of the clones that resulted in changes at the amino acid level. The constructs that were sequenced were clones 11-1 (SEQ ID NOS: 42-43), 11-16 (SEQ ID NOS: 44-45), 22-1 (SEQ ID NOS: 46-47), 22-16 (SEQ ID NOS: 48-49), 12-1 to 12-16 (SEQ ID NOS: 50-81), and 31-1 to 31-16 (SEQ ID NOS: 82-113). Only 2 of the 36 clones, 12-13 and 12-16, showed a deviation from the expected sequence. Clone 12-16 had undergone a loss of two base pairs at the ligation junction between N45 and C67, resulting in a frameshift mutation after the RCG triplet of fragment C5 and a stop codon only a few codons thereafter. Clone 12-13 had acquired a point mutation which results in the substitution of Asp by Asn at the last C-terminal amino acid of this hybrid protein.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-114-

From the 512 hybrid constructs examined, four were chosen for further analysis including sequencing to determine if any mutations occurred during construction of the hybrid protein and repetition of binding assays to confirm initial results. Results from binding assays of these four particular hybrid proteins: constructs 12-13, 12-11, 12-9, and 12-7 indicate that they show novel binding patterns that are not exhibited by known VEGF receptor ligands. 12-9 and 12-13 show binding to VEGFR-1 and VEGFR-3 but not VEGFR-2, whereas 12-7 and 12-11 exhibit binding to all three VEGF receptors.

These results show that it is possible by combinatorial approaches to provide VEGF-related growth factors having modified properties. The novel molecules constructed in some cases have been shown to have modified biological effects compared to their wild-type ancestors, and thus may be used in applications where specificity and fine-tuning of biological effects are necessary. In particular, these experiments demonstrate that it is possible to construct a "super-VEGF", such as clones 12-7 and 12-11, which binds all three known VEGFRs, and therefore should be uniquely potent in inducing vascular growth.

Example 4

Examination of VEGF-A and VEGF-C receptor binding epitopes

The VEGF-A/VEGF-C hybrid proteins can be used to examine interactions between VEGF-A or VEGF-C, and their receptors. Analysis of the results from the receptor binding assays, such as those described in Table 3 and Example 3, enable careful investigation of the receptor-binding epitopes of these two VEGF growth factors. The ability of particular hybrid proteins to bind one of the VEGF receptors may be correlated with the presence of one or more particular fragments derived from one of the parent molecules. Such data can help define the amino acid residues important for binding to a specific VEGF receptor. Knowledge of the precise receptor binding epitopes of a particular VEGF protein can facilitate the design of inhibitory molecules useful for therapeutic purposes.

Twenty-one VEGF residues important for interfacing with VEGFR-1 are indicated in large bold text:

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-115-

GQNHHEVV**KFM**dvYQrsYCHPIETLVDFQEYTPDEIY**IFK**PSCVPLMRGG
 GCCN**DEGL**ECVPTEESNITM**QIM**RJKPHQG**QHIG**MSPLQHKK**ECR**PK
 KD

- 5 Data from the chimera experiments indicates that those residues from fragment 2, which corresponds to the N-terminal helix and residues from fragment 7, which corresponds to strand $\beta 5$ appear particularly important for conferring VEGFR-1 specificity. Figure 8 is a three-dimensional model of the interaction of a VEGF-A dimer with two VEGFR-1 molecules. The two VEGF-A monomers are colored in green and blue, respectively.
- 10 Domain 2 of the two VEGFR-1 receptors are depicted in gray. Red represents the location of residues within the VEGF-A monomers important for VEGFR-1 interfacing. These residues are clustered at the two ends of the VEGF dimer and include the N-terminal helix and part of the $\beta 5$ strand.

- The corresponding twenty-one residues in VEGF-C that would analogously be involved in interfacing VEGFR-3 are indicated below in large bold text:
- 15

AHYNTEU**KSIDNEWRKTQ**CMRREVCIDVCKEFGVATNT**FFK**PPCVSVYRC
 GGCCN**SEGL**QCMNTSTSYLSK**TLF**ET**VPL**SQGP**PKP**VTISFANH**TS**CR**CM**
 SKLD

- 20 Interestingly, analysis of the receptor binding patterns from the chimera experiments indicates that a VEGF-C-derived fragment 4 (containing the $\beta 2$ strand of the molecule) is absolutely required for VEGFR-3 binding specificity. Fragments 5 (which includes the $\beta 3$ strand) and 8 appear to represent two other important VEGF-C fragments for VEGFR-3 binding. The amino acid sequence of VEGF-C fragments 4 and 5 is EUGVA**TNT**-
- 25 **FFK**PPCVSVYRCG. The TNTFFxxP quintet of residues is particularly noteworthy because these residues are conserved in human, quail, and bovine VEGF-C and human VEGF-D, all of which bind VEGFR-3. The analogous residues in human VEGF-A, which does not bind VEGFR-3, differ: IEYIxxxS. Figure 10 is a three-dimensional model

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-116-

of a the interaction between portions of a VEGF-C dimer and a single VEGFR-3 molecule, extrapolated from the VEGF-A/VEGFR-1 model. Blue and green represent the two VEGF-C monomers and grey represents VEGFR-3. Fragment 5 of the green VEGF-C monomer is shown in orange and fragment 4 of the same monomer is shown in white.

5 Residues in red are those located within fragment 4 or 5 that are probably in contact with the receptor.

Figure 9 is a three-dimensional model that depicts the groove formed by the fragments that appear to be important for VEGFR-3 specificity. This groove is speculated to accommodate the linker region between domain 2 and 3 of the VEGFR-3 receptor.

10 The entry and the sides of this groove are formed by the fragments that appear to be important for conferring VEGFR-3 specificity. The green and blue indicate the two VEGF-C monomers and the gray indicates the VEGFR-3 receptor molecule. The VEGF-C residues that are believed to participate in binding VEGFR-3 are indicated in yellow.

Although fragments 6 and 9 are involved in interaction with the VEGF receptors, 15 these fragments do not appear to be involved in determining receptor specificity.

Example 5

Analysis of receptor activation or inhibition by the hybrid VEGF proteins

The VEGF-A/VEGF-C hybrid proteins may be used for therapeutic applications 20 where either activation or inhibition of one or more VEGF receptors is desired. For example, a candidate hybrid protein can be added to stable cell lines expressing a particular VEGF receptor whose activation is necessary for cell survival. Survival of the cell line indicates that the candidate hybrid protein is able to bind and activate that particular VEGF receptor. On the other hand, death of the cell line indicates that the 25 candidate hybrid protein fails to activate the receptor. Exemplary examples of such cell-survival assays have been described in International Patent Publication No. WO 98/07832 and in Achen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 95:548-553 (1998), incorporated herein by reference. This assay employs Ba/F3-NYK-EpoR cells, which are Ba/F3 pro-B cells that have been transfected with a plasmid encoding a chimeric receptor consisting of the 30 extracellular domain of VEGFR-2 and the cytoplasmic domain of the erythropoietin receptor (EpoR). These cells are routinely passaged in interleukin-3 (IL-3) and will die in

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-117-

the absence of IL-3. However, if signaling is induced from the cytoplasmic domain of the chimeric receptor, these cells survive and proliferate in the absence of IL-3. Such signaling is induced by ligands which bind to the VEGFR-2 extracellular domain of the chimeric receptor. For example, binding of VEGF-A or VEGF-D to the VEGFR-2 extracellular domain causes the cells to survive and proliferate in the absence of IL-3. Parental Ba/F3 cells which lack the chimeric receptor are not induced by either VEGF-A or VEGF-D to proliferate in the absence of IL-3, indicating that the responses of the Ba/F3-NYK-EpoR cells to these ligands are totally dependent on the chimeric receptor.

Candidate hybrid proteins can be tested for binding to the VEGFR-2 extracellular domain and subsequent activation of the chimeric receptor by assaying cell survival in the absence of IL-3. On the other hand, hybrid proteins that interfere with the binding of VEGFR-2 ligands, such as VEGF-A or VEGF-D, to the extracellular domain, or with the activation of the cytoplasmic domain, will cause cell death in the absence of IL-3.

Cells are cultured in the presence of IL-3 until required, then washed three times in phosphate buffered saline (PBS), resuspended in IL-3-free cell culture medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with fetal calf serum (10%), L-glutamine (1%), geneticin (1mg/ml), streptomycin (100µg/ml) and penicillin (60µg/ml)), and replated in 72-well culture plates (Nunc, Denmark) at a density of approximately 1000 cells/well. To assay for receptor activity, candidate hybrid proteins are added to culture wells at final concentrations of 10^{-19} to 10^{-5} M and incubated for 1 hour at 37°C in 10% CO₂. For assaying the ability of the candidate hybrid protein to inhibit activation of the VEGFR-2/EpoR receptor, recombinant VEGF-A or VEGF-D is added to the hybrid protein-containing wells at a concentration to produce near-maximal survival of the Ba/F3-NYK-EpoR cells (typically 500ng/ml). Positive control cultures contain either VEGF-A or VEGF-D supernatant alone and negative control cultures contain neither hybrid protein nor growth factor. Cells are then grown in culture for 48 hours, after which time a solution of 3-(3,4-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; 500µg/ml) is added to the cultures, and incubated for another 30 minutes. MTT is converted to a blue formazan product by mitochondria, thus staining living cells blue. Surviving blue cells in experiments where either activation (hybrid protein alone) or inhibition (hybrid protein + VEGF-A or VEGF-D) was assayed are counted under a

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-118-

microscope with inverted optics (100X magnification) and compared to cell survival in the positive control (VEGF-A or VEGF-D only) wells. Cell survival is normalized such that survival in negative controls is set to 0 (typically no viable cells were seen in negative controls), while survival in positive controls is set to 100% (typically 300-400 cells/well).

5 Data is analyzed by one way analysis of variance (ANOVA), with a Bonferroni multiple comparisons test carried out post-hoc to test for differences between individual cultures of hybrid protein alone (to assay binding and activation of the receptor), or hybrid protein + VEGF-A or VEGF-D (to assay inhibition of receptor activation), with VEGF-A or VEGF-D alone (positive control).

10 Repetition of the same assay using cells transfected with different chimeric receptors (e.g., VEGFR-3/EpoR) allows screening for activation of different VEGFRs.

VEGFR-2 (KDR) and VEGFR-3 (Flt4) autophosphorylation assays

15 As an alternative indicator of activity, the ability of a hybrid protein to stimulate autophosphorylation of a particular VEGF receptor can also be examined. A candidate hybrid protein is added to cells expressing a particular VEGF receptor. The cells are then lysed and immunoprecipitated with anti-VEGF receptor antiserum and analyzed by Western blotting using anti-phosphotyrosine antibodies to determine hybrid protein-induced phosphorylation of the VEGF receptor.

20 An expression vector comprising a polynucleotide encoding a hybrid VEGF molecule of the invention is transfected into an appropriate host cell (e.g., 293-EBNA cells using a calcium phosphate transfection method. About 48 hours after transfection, the growth medium of the transfected cells is changed (e.g., to DMEM medium lacking fetal calf serum) and the cells are incubated (e.g. for 36 more hours) to provide a conditioned medium. The conditioned medium is collected and centrifuged at 5000 x g for 20 minutes, and the supernatant is concentrated.

25 The concentrated conditioned media is used to stimulate cells expressing a VEGF receptor. For example, PAE-KDR cells (Pajusola *et al.*, *Oncogene*, 9:3545-55 (1994); Waltenberger *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:26988-26995 (1994)) are grown in Ham's F12 medium-10% fetal calf serum (FCS), or confluent NIH 3T3 cells expressing VEGFR-3 are grown in DMEM medium. The cells are starved overnight in DMEM medium or

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-119-

Ham's F12 supplemented with 0.2% bovine serum albumin (BSA), and then incubated for 5 minutes with the unconcentrated, 2-fold, 5-fold, and/or 10-fold concentrated conditioned media. Recombinant human VEGF-A or VEGF-C and conditioned media from mock-transfected cells are exemplary controls. In addition to conditional media, purified hybrid polypeptide can be employed in this or other assays described herein.

After stimulation with conditioned media, the cells are washed twice with ice-cold Tris-Buffered Saline (TBS) containing 100 mM sodium orthovanadate and lysed in RIPA buffer containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.1 U/ml aprotinin and 1 mM sodium orthovanadate. The lysates are sonicated, clarified by centrifugation at 16,000 x g for 20 minutes and incubated for 3-6 hours on ice with 3-5 μ l of antisera specific for VEGFR-3 or VEGFR-2. Immunoprecipitates are bound to protein A-Sepharose, washed three times with RIPA buffer containing 1 mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate, washed twice with 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), and subjected to SDS-PAGE using a 7% gel. Polypeptides are transferred to nitrocellulose by Western blotting and analyzed using PY20 phosphotyrosine-specific monoclonal antibodies (Transduction Laboratories) or receptor-specific antiserum and the ECL detection method (Amersham Corp.).

The ability of a hybrid polypeptide to stimulate autophosphorylation (detected using the anti-phosphotyrosine antibodies) is scored as stimulating the receptor. The level of stimulation observed for various concentrations of hybrid polypeptide, relative to known concentrations of VEGF-A or VEGF-C, provide an indication of the potency of receptor stimulation. Polypeptides that have been shown to bind the receptor, but are incapable of stimulating receptor phosphorylation, are scored as inhibitors. Inhibitory activity can be further assayed by mixing a known receptor agonist such as recombinant VEGF-A or VEGF-C with either media alone or with concentrated conditioned media, to determine if the concentrated conditioned media inhibits VEGF-A-mediated or VEGF-C-mediated receptor phosphorylation.

In initial experiments to study tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 and VEGFR-3 mediated by selected hybrid molecules which bind VEGFR-2 or VEGFR-3, it was observed that all hybrid proteins tested were able to induce phosphorylation of the receptors, however to a lesser extent than that mediated by VEGF-A or VEGF-C. Further

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-120-

examination of the expression levels of the hybrid proteins in the baculovirus system used to produce the proteins indicate that the proteins are not all expressed in comparable amounts. Differential expression levels of the hybrid proteins may explain some of the lower activities exhibited by these proteins in assaying their ability to stimulate tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 and VEGFR-3. In addition, the extent of phosphorylation induced by these hybrid molecules determined using this particular assay may not correlate with biological activity *in vivo*.

Example 6

10 Analysis of receptor binding affinities of hybrid proteins

Preliminary analysis of the 512 hybrid proteins indicate that a number of them are able to bind one or more of the VEGFRs. In addition, results from these experiments suggest that some show differential binding affinities to one or more VEGFRs. For these experiments, the hybrid protein is expressed in an insect cell system, *e.g.*, S9 cells, to
15 eliminate contamination with endogenous VEGF-A found in mammalian cells. To measure the relative binding affinities of selected hybrid proteins, an ELISA-type approach is used. For example, to examine binding affinity for VEGFR-1, serial dilutions of competing VEGFR-1-IgG fusion proteins and a subsaturating concentration of the candidate hybrid protein tagged with the *myc* epitope is added to microtitre plates coated with VEGFR-1, and incubated until equilibrium is established. The plates are then washed
20 to remove unbound proteins. Hybrid molecules that remain bound to the VEGFR-1 coated plates are detected using an anti-*myc* antibody conjugated to a readily detectable label *e.g.*, horseradish peroxidase. Binding affinities (EC50) can be calculated as the concentration of competing VEGFR-IgG fusion protein that results in half-maximal binding. These values can be compared with those obtained from analysis of VEGF-A or
25 VEGF-C to determine changes in binding affinity of one or more of the VEGFRs. Similarly, binding to VEGFR-2 is accomplished by using a VEGFR-2-IgG fusion protein, and binding to VEGFR-3 is determined using a VEGFR-3-IgG fusion protein.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-121-

Example 7

**Endothelial cell migration in collagen gel
mediated by VEGF-A/VEGF-C hybrid proteins**

Both VEGF-A and VEGF-C stimulate endothelial cell migration in collagen gel.

5 The hybrid proteins of the invention are examined to determine if they are also capable of stimulating endothelial cell migration in collagen gel, thus providing another indicia of biological activity. Exemplary examples of such cell migration assays have been described in International Patent Publication No. WO 98/33917, incorporated herein by reference. Briefly, bovine capillary endothelial cells (BCE) are seeded on top of a
10 collagen layer in tissue culture plates. Conditioned media from cells transfected with an expression vector producing the candidate hybrid protein is placed in wells made in collagen gel approximately 4mm away from the location of the attached BCE cells. The number of BCE cells that have migrated from the original area of attachment in the collagen gel towards the wells containing the hybrid protein is then counted to assess the ability of the hybrid protein to induce cell migration.

15 BCE cells (Folkman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:5217-5221 (1979)) are cultured as described in Pertovaara *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:6271-74 (1994). Collagen gels are prepared by mixing type I collagen stock solution (5 mg/ml in 1 mM HCl) with an equal volume of 2x MEM and 2 volumes of MEM containing 10% newborn calf serum to give a final collagen concentration of 1.25 mg/ml. Tissue culture plates (5
20 cm diameter) are coated with about 1 mm thick layer of the solution, which is allowed to polymerize at 37°C. BCE cells are seeded atop this layer.

For the migration assays, the cells are allowed to attach inside a plastic ring (1 cm diameter) placed on top of the first collagen layer. After 30 minutes, the ring is removed
25 and unattached cells are rinsed away. A second layer of collagen and a layer of growth medium (5% newborn calf serum (NCS)), solidified by 0.75% low melting point agar (FMC BioProducts, Rockland, ME), are added. A well (3 mm diameter) is punched through all the layers on both sides of the cell spot at a distance of 4 mm, and media containing a hybrid VEGF polypeptide (or media alone or media containing VEGF-A or
30 VEGF-C to serve as controls) is pipetted daily into the wells. Photomicrographs of the cells migrating out from the spot edge are taken, e.g., after six days, through an Olympus CK 2 inverted microscope equipped with phase-contrast optics. The migrating cells are

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-122-

counted after nuclear staining with the fluorescent dye bisbenzimidazole (1 mg/ml, Hoechst 33258, Sigma).

The number of cells migrating at different distances from the original area of attachment towards wells containing media conditioned by the non-transfected (control) or transfected (mock; hybrid; VEGF-C; or VEGF-A) cells are determined 6 days after addition of the media. The number of cells migrating out from the original ring of attachment are counted in five adjacent 0.5 mm x 0.5 mm squares using a microscope ocular lens grid and 10x magnification with a fluorescence microscope. Cells migrating further than 0.5 mm are counted in a similar way by moving the grid in 0.5 mm steps.

The ability of a hybrid polypeptide to induce migration of BCE cells is indicative of receptor agonist activity. The number of migrating cells in the presence of a hybrid protein versus a similar concentration of VEGF-A or VEGF-C provides an indication of the potency of agonist activity. Polypeptides that have been shown to bind the receptors expressed on BCE cells, but are incapable of stimulating migration, are scored as potential inhibitors. Inhibitory activity can be further assayed by mixing a known receptor agonist such as recombinant VEGF-A or VEGF-C with either media alone or with concentrated conditioned media, to determine if the concentrated conditioned media inhibits VEGF-A-mediated or VEGF-C-mediated BCE migration.

Example 8

Analysis of the ability of hybrid proteins to induce vascular permeability

Both VEGF-A and VEGF-C are capable of increasing the permeability of blood vessels. The hybrid proteins of the invention are assayed to determine which of these proteins possess this biological activity and which inhibit it. For example, vascular permeability assays according to Miles and Miles, *J. Physiol* 118:228-257 (1952), incorporated herein in its entirety, are used to analyze the hybrid proteins. Briefly, following intravenous injection of a vital dye, such as pontamine sky blue, animals such as guinea pigs are injected intradermally with a composition containing the candidate hybrid protein being examined. For controls, media alone or media containing VEGF-A or VEGF-C is injected in the same manner. After a period of time, the accumulation of dye at the injection site on the skin is measured. Those hybrid proteins that increase

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-123-

permeability will result in greater accumulation of dye at the injection site as compared to those hybrid proteins that fail to induce vascular permeability.

In a variation of this assay, hybrid polypeptides that are suspected of being inhibitors of VEGF-A or VEGF-C are first mixed with VEGF-A or with VEGF-C at varying ratios (e.g., 50:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10) and the mixtures are injected intradonally into the animals. In this manner, the ability of the hybrid polypeptide to inhibit VEGF-A-mediated or VEGF-C-mediated vascular permeability is assayed.

Example 9

Endothelial Cell Proliferation Assay

The mitogenic activity of hybrid proteins can be examined using endothelial cell proliferation assays such as that described in Breier *et al.*, *Dev* 114:521-532 (1992), incorporated herein in its entirety. The hybrid proteins are expressed in a mammalian cell line e.g., COS cells. Culture supernatants are then collected and assayed for mitogenic activity on bovine aortic endothelial (BAE) cells by adding the supernatants to the BAE cells. After three days, the cells are dissociated with trypsin and counted using a cytometer to determine any effects of the hybrid protein on the proliferative activity of the BAE cells. As negative controls, DMEM supplemented with 10% FCS and the conditioned media from untransfected COS cells or from COS cells transfected with vector alone can be used. Supernatants from cells transfected with constructs expressing proteins that have been shown to induce proliferation of BAE cells (e.g., VEGF-A) can be used as a positive control.

Example 10

Examination of the ability of hybrid proteins expressed through the human K14 keratin promoter to induce growth of lymphatic vessels in skin of transgenic mice

Experiments are conducted in transgenic mice to analyze the specific effects of overexpression of hybrid proteins in tissues. The physiological effects *in vivo* provide an indication of receptor activation/inhibition profile and an indication of the potential therapeutic action of a hybrid protein. In one variation, the human K14 keratin promoter which is active in the basal cells of stratified squamous epithelia [Vassar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86:1563-1567 (1989)], is used as the expression control element in the

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-124-

recombinant hybrid protein transgene. The vector containing the K14 keratin promoter is described in Vassar *et al.*, *Genes Dev.*, 5:714-727 (1991) and Nelson *et al.*, *J. Cell Biol.* 97:244-251 (1983).

5 A DNA fragment containing the K14 promoter, hybrid protein cDNA, and K14 polyadenylation signal is synthesized, isolated, and injected into fertilized oocytes of the FVB-NH mouse strain. The injected zygotes are transplanted to oviducts of pseudopregnant C57BL/6 x DBA/2J hybrid mice. The resulting founder mice are then analyzed for the presence of the transgene by polymerase chain reaction of tail DNA using appropriate primers or by Southern analysis.

10 These transgenic mice are then examined for evidence of angiogenesis or lymphangiogenesis in the skin, such as the lymphangiogenesis seen in transgenic mice that overexpress VEGF-C [see International Publication WO98/33917]. Histological examination of K14-VEGF-C transgenic mice showed that in comparison to the skin of wildtype littermates, the dorsal dermis was atrophic and connective tissue was replaced by large lacunae devoid of red cells, but lined with a thin endothelial layer. These distended
15 vessel-like structures resembled those seen in human lymphangiomas. The number of skin adnexal organs and hair follicles were reduced. In the snout region, an increased number of vessels was also seen.

20 Examination of the vessels in the skin of the transgenic mice using antibodies that recognize proteins specific for either blood or lymphatic vessels can further verify the identity of these vessels. Collagen types IV, XVIII [Muragaki *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 8763-8776 (1995)] and laminin are expressed in vascular endothelial cells while desmoplakins I and II (Progen) are expressed in lymphatic endothelial cells. See Schmelz *et al.*, *Differentiation*, 57: 97-117 (1994).

25

Example 11

Analysis of hybrid proteins in promoting or inhibiting myelopoiesis

Overexpression of VEGF-C in the skin of K14-VEGF-C transgenic mice correlates with a distinct alteration in leukocyte populations [see International Publication
30 WO98/33917]. Notably, the measured populations of neutrophils were markedly increased in the transgenic mice. The effects of the hybrid proteins on hematopoiesis can

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-125-

be analyzed using fluorescence-activated cell sorting analysis using antibodies that recognize proteins expressed on specific leukocyte cell populations. Leukocytes populations are analyzed in blood samples taken from the F1 transgenic mice described in Example 13, and from their non-transgenic littermates.

5

Example 12

**Effects of hybrid proteins on growth and differentiation of
human CD34+ progenitor cells *in vitro***

Addition of VEGF-C to cultures of cord blood CD34+ cells induces cell proliferation. Co-culture of GM-CSF, IL-3, GM-CSF + IL-3, or GM-CSF + SCF with VEGF-C leads to an enhancement of proportions of myeloid cells [see International Publication WO98/33917]. Hybrid proteins of the invention can also be examined for their ability to induce growth of CD34+ progenitor cells *in vitro*. Human CD34+ progenitor cells (HPC, 10×10^5) are isolated from bone marrow or cord blood mononuclear cells using the MACS CD34 Progenitor cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany), according to the instructions of the manufacturer and cultured in RPMI 1640 medium supplemented with L-glutamine (2.5 mM), penicillin (125 IU/ml), streptomycin (125 µg/ml) and pooled 10 % umbilical cord blood (CB) plasma at 37 °C in a humidified atmosphere in the presence of 5% CO₂ for seven days, with or without hybrid protein at concentrations ranging from 10 ng/ml to 1 µg/ml. After seven days, total cell number is evaluated in each culture.

The co-stimulatory effect of hybrid proteins in cultures either supplemented with recombinant human stem cell factor (rhSCF, 20 ng/ml PreproTech, Rocky Hill, NY) alone or a combination of granulocyte macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF, 100 ng/ml, Sandoz, Basel, Switzerland) plus SCF can also be examined. Experiments can also be conducted to analyze the co-stimulatory effects of hybrid protein on total cell yields of serum-free cultures of CB CD34+ HPC cells supplemented with either GM-CSF alone, IL-3 (rhIL-3, 100 U/ml, Behring AG, Marburg, Germany) alone; or a combination of GM-CSF plus IL-3.

Cells from the (7 day) plasma-supplemented cultures described above are also analyzed for the expression of the early granulomonocytic marker molecules lysozyme

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-126-

(LZ) and myeloperoxidase (MPO) as well as the lipopolysaccharide (LPS) receptor CD14 using immunofluorescence.

In another series of experiments, CD34+ cells are cultured in medium supplemented with 50 ng/ml M-CSF, with or without 100 ng/ml hybrid protein, for seven days. After seven days, the cultures were analyzed to determine the percentages of CD14+ cells and mean fluorescence intensity.

Example 13

Analysis of hybrid proteins using CAM assays

The chorioallantoic membrane (CAM) assay described in e.g., Oh *et al.*, *Dev Biol* 188:96-109 (1997), incorporated herein in its entirety, is a commonly used method to examine the *in vivo* effects of angiogenic factors. Using this assay, VEGF growth factors including both VEGF-A and VEGF-C have been shown to induce the development of blood vessels [Oh *et al.*, *Dev Biol* 188:96-109 (1997)]. Thus, this method can be used to study the angiogenic properties of the hybrid proteins.

Briefly, on day 4 of development, a window is cut out into the eggshell of chick or quail eggs. The embryos are checked for normal development, the window in the eggshell is sealed with cello tape, and the eggs are incubated until day 13 of development. Approximately 3.3 µg of hybrid protein dissolved in 5 µl of distilled water is added to Thermanox coverslips (Nunc, Naperville, IL), which have been cut into disks with diameters of approximately 5 mm, and air dried. Disks without added protein are used as controls. The dried disks are then applied on the chorioallantoic membrane (CAM) of the eggs. After 3 days, the disks are removed and fixed in 3% glutaraldehyde and 2% formaldehyde and rinsed in 0.12 M sodium cacodylate buffer. The fixed specimens are photographed and embedded in Epon resin (Serva, Germany) for semi- (0.75 µm) and ultrathin (70 nm) sectioning. Both semi- and ultrathin sections are cut using an Ultracut S (Leika, Germany). Ultrathin sections are analyzed by an EM 10 (Zeiss, Germany). Specimens are then analyzed for evidence of growth of new capillaries, which would indicate that the hybrid protein being examined is capable of stimulating angiogenesis.

Example 14

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-127-

**Analysis of homo- or hetero dimerization
of the VEGF-A/VEGF-C hybrid proteins**

Activation of tyrosine receptors is commonly mediated by ligand-induced receptor dimerization. Investigation of interactions between VEGF and VEGFR-2 indicate that

5 receptor dimerization is accomplished via ligand dimerization in which both receptors bind parts of each of the two ligand proteins that constitute the homo- or heterodimer. Mutant VEGF proteins that can bind to VEGFR-2 but are unable to dimerize, cannot activate the receptor [Fuh et al., *J Biol Chem* 273:11197-11204 (1998)]. All of the VEGF family members are capable of homo- and/or heterodimerization. VEGF-A and VEGF-C

10 fail to heterodimerize with each other. However, some of the VEGF-A/VEGF-C hybrid proteins may dimerize with each other or with one or both of the parent molecules. The hybrid proteins may also be capable of homodimerization. The following protocols are designed to identify dimerization capabilities of the hybrid proteins of the invention. A candidate hybrid protein is co-expressed with a different hybrid protein or one of the

15 parent molecules in a cell line e.g., 293T or S9 cells. Extracts from these cells are prepared and used for immunoprecipitation using an antibody that recognizes only one of the two proteins being examined. The immunoprecipitated proteins are then subjected to SDS-PAGE and analyzed. If both proteins are detected on the gel, heterodimerization occurred between the two proteins being examined. On the other hand, if only the protein

20 recognized by the antibody used during immunoprecipitation is detected, dimerization failed to occur between the two proteins. Since dimerization appears to be critical for receptor activation, hybrid proteins that bind receptor but February 16, 2000 fail to dimerize with self or with natural VEGF growth factors endogenously expressed by cells are expected to be inhibitors of endogenous vascular endothelial growth factor activity.

25 Heterodimers comprising a polypeptide of the invention with other polypeptides of the invention or with naturally occurring members of the VEGF family of growth factors may be generated essentially as described in Cao et al., *J. Biol. Chem.*, 271:3154-62 (1996). Briefly, a recombinantly produced hybrid polypeptide is mixed at an

30 equimolar ratio with another recombinantly produced polypeptide of interest, such as a VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF, PDGF α , PDGF β , or *c-fos* induced growth factor polypeptide. (See, e.g., Collins et al., *Nature*, 316:748-750 (1985) (PDGF- β , GenBank Acc. No. X02811); Claesson-Welsh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-128-

86(13):4917-4921 (1989) (PDGF- α , GenBank Acc. No. M22734); Claesson-Welsh *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 8:3476-3486 (1988) (PDGF- β , GenBank Acc. No. M21616); Olofsson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 93:2576-2581 (1996) (VEGF-B, GenBank Acc. No. U48801); Maglione *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 88(20):9267-9271 (1996) (PlGF, GenBank Acc. No. X54936); Heldin *et al.*, *Growth Factors*, 8:245-252 (1993); Folkman, *Nature Med.*, 1:27-31 (1995); Friesel *et al.*, *FASEB J.*, 9:919-25 (1995); Mustonen *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 129:895-98 (1995); Orcandini, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(21):11675-11680 (1996); and others cited elsewhere herein. The mixed polypeptides are incubated in the presence of guanidine-HCl and DTT. The thiol groups are then protected with S-sulfonation, and the protein is dialyzed overnight, initially against urea/glutathione-SH, glutathione-S-S-glutathione, and subsequently against 20 mM Tris-HCl.

The heterodimers are screened to determine their binding affinity with respect to receptors of the VEGF/PDGF family (especially VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3), and their ability to stimulate the receptors (e.g., assaying for dimer-stimulated receptor phosphorylation in cells expressing the receptor of interest on their surface). The binding assays may be competitive binding assays such as those described herein and in the art. In the initial binding assays, recombinantly produced proteins comprising the extracellular domains of receptors are employable, as described in preceding examples for VEGFR-2 and VEGFR-3. Heterodimers that bind and stimulate receptors are useful as recombinant growth factor polypeptides. Heterodimers that bind but do not stimulate receptors are useful as growth factor antagonists. Heterodimers that display agonistic or antagonistic activities in the screening assays are further screened using, e.g., endothelial cell migration assays, vascular permeability assays, and *in vivo* assays. It will also be apparent from the preceding examples that dimers comprising two VEGF-C polypeptides (i.e., dimers of identical VEGF-C polypeptides as well as dimers of different VEGF-C polypeptides) are advantageously screened for agonistic and antagonistic activities using the same assays.

Example 15

Determination of biological half-life of the VEGF-A/VEGF-C hybrid proteins

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-129-

Knowledge of the *in vivo* biological half-life of a compound is valuable for therapeutic applications. Although the biological half-life of the hybrid proteins has not been determined *in vivo*, preliminary results *in vitro* indicate that the VEGF-A/VEGF-C hybrid proteins described above exhibit different half-lives. Incubation of cell supernatants containing specific hybrid proteins at 4°C for approximately two months reveal different protein stabilities for the various hybrid proteins. Examination of the *in vivo* biological half-life can be determined by injecting iodine-labeled hybrid protein into animals. Briefly, 50 µg of hybrid protein are iodinated using IODO-GEN (Pierce) according to the manufacturer's instructions to a specific radioactivity of approximately 2-10 µCi/µg protein. The iodinated protein is purified using PD-10 Sephadex (Pharmacia) according to the manufacturer's instructions. 12-16 week old mice (weighing 20-25 g) are anesthetized with sodium pentobarbital (1 mg/20 g body weight mouse) during the course of the experiment. 5-10 pmol of the radiolabeled protein diluted in 100 µl sterile saline are injected into the tail vein over 30 seconds. At specific time points (1 min, 2 min, 4 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min, and 120 min), 40-50 µl of blood is collected by periorbital bleeding or from the tail artery. 25 µl of the plasma fraction of each blood sample is then spotted onto Whatman filter paper, precipitated with 10% trichloroacetic acid (TCA), and rinsed with ethanol. The amount of radiolabeled protein present in the plasma fraction is determined by quantifying the radioactivity using a gamma counter. Polypeptides that display improved half-life relative to that of naturally occurring VEGFs are a preferred genus of polypeptides of the invention. Polypeptides that show 25%, 50%, 75% or 100% improvement of half-life to that of naturally occurring VEGFs are highly preferred.

25

Example 16**Construction of hybrid molecules using other VEGF or PDGF family proteins.**

The procedure described in Example 1 can be extended to create hybrid molecules using any of the PDGF/VEGF growth factors. Members of the PDGF/VEGF family, which comprises at least VEGF-A (SEQ ID NOS: 1 and 2), PlGF (SEQ ID NOS: 114 and 115), VEGF-B (SEQ ID NOS: 116 and 117), VEGF-C (SEQ ID NOS: 21 and 22), VEGF-D (SEQ ID NOS: 118 and 119), VEGF-E (SEQ ID NOS: 120 and 121), and

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-130-

NZ2 VEGF (SEQ ID NOS: 122 and 123), D1701 VEGF (SEQ ID NOS: X and X); NZ10 VEGF (described in SEQ ID NO: 11 of International Patent Application PCT/US99/25869, incorporated herein in its entirety); PDGF-A (SEQ ID NO: 124 and 125), PDGF-B (SEQ ID NO: 126 and 127), and follistatin (SEQ ID NO: 148 & 149) share
5 sufficient homology with each other within the receptor binding domain to permit designing oligonucleotides with unique cohesive ends as taught in Example 1 with respect to VEGF-A and VEGF-C. As shown by the successful results in Examples 1-3, oligonucleotides designed to provide double-stranded fragments having cohesive ends as short as 3-6 bases in length are sufficient to permit successful recombination into novel
10 hybrid molecules (with very few unintended mutations).

While the presence of cohesive ends greatly facilitated ligation of fragments in a desired order and orientation, it will be appreciated that ligation of fragments can also be accomplished without cohesive ends. Blunt-end fragments also can be synthesized and annealed to generate hybrid proteins using the method described above. With a blunt-end
15 strategy, the nucleotide sequences of the parent molecules do not need to be examined for the presence of nucleotide identity to enable the creation of cohesive ends. However, additional post-ligation screening may be required to identify hybrids that contain fragments in the desired order and orientation.

Using such guidelines, oligonucleotide pairs are designed and annealed as
20 described in Example 1 to provide DNA fragments of the receptor for binding domain of two or more VEGF proteins. Combinatorial ligation of the various DNA fragments produces novel hybrid polypeptides that are screened for receptor binding and for biological properties such as ability to stimulate or inhibit endothelial cell growth and migration and modulate vascular permeability.

Example 17

Generation of hybrid molecules using PCR-driven DNA shuffling.

The following protocol provides an alternative "DNA shuffling" methodology for
30 generating hybrid vascular endothelial growth factor-encoding polynucleotides and polypeptides. DNA shuffling procedures have been described in the literature for enzymes such as antibiotic-resistance-conferring proteins, and a few other protein

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-131-

families. [See, e.g., Chang *et al.*, *Nature Biotechnology*, 17: 793-797 (1999); Kikuchi *et al.*, *Gene*, 236: 159-167 (1999); Hatayama *et al.*, *THTECH*, 16: 76-82 (1998); Cramer *et al.*, *Nature*, 391: 288-291 (1998); Patten *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnology*, 8: 724-733 (1997); Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 4504-09 (1997); Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 10747-1074 (1994); and Stemmer, *Nature*, 370: 389-391 (1994), all incorporated herein by reference in their entirety.]

Two or more cDNAs encoding vascular endothelial growth factor polypeptides are first cloned and amplified. In a preferred embodiment, only those portions of the cDNAs that encode minimum VEGF receptor-binding domains, and optionally small 5' and 3' additional sequences from the cDNAs, are amplified.

The purified and isolated cDNAs are digested into fragments of about 10-75 base pairs using restriction endonucleases and/or DNaseI, and the fragments of this desired size range are purified and isolated (e.g., by agarose gel electrophoresis, electroelution, and ethanol precipitation).

The purified and isolated fragments from the two or more VEGFs are mixed and subjected to a self-priming polymerase chain reaction to shuffle the fragments in order to form new hybrid molecules. Exemplary PCR protocols are set forth in Kikuchi *et al.* (1999) and Stemmer (1994). The annealing temperature in the PCR reactions is adjusted based on the level of sequence identity between the original cDNAs, to assure that annealing of heterologous sequences containing imperfect matches is possible. After conducting 25-50 cycles of PCR without primers, an aliquot from the PCR reaction is selected and used as template for a second round of PCR with primers based on 5' and 3' sequences of the original cDNAs. Preferably, the primers also include restriction endonuclease recognition sequences to facilitate cloning the resultant second-round PCR products into an expression vector.

The resultant clones are ligated into an expression vector and transformed or transfected into host cells to express the novel hybrid VEGF polypeptides (if any) encoded thereby. The proteins are screened using receptor binding and/or activity assays as set forth in the preceding examples, to select those clones which encode polypeptides having desirable receptor agonist/antagonist profiles.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-132-

INDEX FOR SEQUENCE LISTING

- SEQ ID NOS: 1 & 2 are the nucleotide and amino acid sequences of VEGF-A
- SEQ ID NOS: 3-11 are VEGF-A forward primers
- 5 SEQ ID NOS: 12-20 are VEGF-A reverse primers
- SEQ ID NOS: 21 & 22 are the nucleotide and amino acid sequences of VEGF-C
- SEQ ID NOS: 23-31 are VEGF-C forward primers
- SEQ ID NOS: 32-40 are VEGF-C reverse primers
- SEQ ID NO: 41 is the nucleotide sequence of pSecTag1
- 10 SEQ ID NOS: 42 & 43 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 11-1. The VEGF receptor binding domain (derived from VEGF-A and VEGF-C) correspond to amino acids 1-102 of SEQ ID NO: 43.
- SEQ ID NOS: 44 & 45 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 11-16. (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-104 of SEQ ID NO: 45).
- 15 SEQ ID NOS: 46 & 47 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 22-1. (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-103 of SEQ ID NO: 47)
- SEQ ID NOS: 48 & 49 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 22-16. (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-105 of SEQ ID NO: 49)
- SEQ ID NOS: 50-51 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 12-1. (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-102 of SEQ ID NO: 51)
- 20 SEQ ID NOS: 52-53 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 12-2. (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-102 of SEQ ID NO: 53)
- SEQ ID NOS: 54-55 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 12-3. (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-102 of SEQ ID NO: 55)
- 25 SEQ ID NOS: 56-57 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 12-4. (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-102 of SEQ ID NO: 57)
- SEQ ID NOS: 58-59 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 12-5. (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-102 of SEQ ID NO: 59)
- SEQ ID NOS: 60-61 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 12-6. (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-102 of SEQ ID NO: 61)
- 30 SEQ ID NOS: 62-63 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 12-7.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-133-

- (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-102 of SEQ ID NO: 63)
 SEQ ID NOS: 64-65 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 12-8.
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-102 of SEQ ID NO: 65)
 SEQ ID NOS: 66-67 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 12-9.
- 5 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-104 of SEQ ID NO: 67)
 SEQ ID NOS: 68-69 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 12-10.
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-104 of SEQ ID NO: 69)
 SEQ ID NOS: 70-71 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 12-11.
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-104 of SEQ ID NO: 71)
- 10 SEQ ID NOS: 72-73 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 12-12.
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-104 of SEQ ID NO: 73)
 SEQ ID NOS: 74-75 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 12-13.
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-104 of SEQ ID NO: 75)
 SEQ ID NOS: 76-77 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 12-14.
- 15 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-104 of SEQ ID NO: 77)
 SEQ ID NOS: 78-79 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 12-15.
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-104 of SEQ ID NO: 79)
 SEQ ID NOS: 80-81 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 12-16.
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-54 of SEQ ID NO: 81)
- 20 SEQ ID NOS: 82-83 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 31-1.
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-103 of SEQ ID NO: 83)
 SEQ ID NOS: 84-85 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 31-2.
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-103 of SEQ ID NO: 85)
 SEQ ID NOS: 86-87 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 31-3.
- 25 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-103 of SEQ ID NO: 87)
 SEQ ID NOS: 88-89 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 31-4.
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-103 of SEQ ID NO: 89)
 SEQ ID NOS: 90-91 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 31-5.
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-103 of SEQ ID NO: 91)
- 30 SEQ ID NOS: 92-93 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 31-6.
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-103 of SEQ ID NO: 93)

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-134-

- SEQ ID NOS: 94-95 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 31-7
(VEGF receptor binding domain= amino acids 1-103 of SEQ ID NO: 95)
SEQ ID NOS: 96-97 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 31-8
(VEGF receptor binding domain= amino acids 1-103 of SEQ ID NO: 97)
- 5 SEQ ID NOS: 98-99 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 31-9
(VEGF receptor binding domain= amino acids 1-105 of SEQ ID NO: 99)
SEQ ID NOS: 100-101 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 31-10
(VEGF receptor binding domain= amino acids 1-105 of SEQ ID NO: 101)
SEQ ID NOS: 102-103 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 31-11
10 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-105 of SEQ ID NO: 103)
SEQ ID NOS: 104-105 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 31-12
(VEGF receptor binding domain= amino acids 1-105 of SEQ ID NO: 105)
SEQ ID NOS: 106-107 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 31-13
(VEGF receptor binding domain= amino acids 1-105 of SEQ ID NO: 107)
- 15 SEQ ID NOS: 108-109 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 31-14
(VEGF receptor binding domain= amino acids 1-105 of SEQ ID NO: 109)
SEQ ID NOS: 110-111 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 31-15
(VEGF receptor binding domain= amino acids 1-105 of SEQ ID NO: 111)
SEQ ID NOS: 112-113 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 31-16
20 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-105 of SEQ ID NO: 113)
SEQ ID NOS: 114 & 115 are the nucleotide and amino acid sequences of PlGF
SEQ ID NOS: 116 & 117 are the nucleotide and amino acid sequences of VEGF-B
SEQ ID NOS: 118 & 119 are the nucleotide and amino acid sequences of VEGF-D
SEQ ID NOS: 120 & 121 are the nucleotide and amino acid sequences of VEGF-E
- 25 SEQ ID NOS: 122 & 123 are the nucleotide and amino acid sequences of N22 VEGF
SEQ ID NOS: 124 & 125 are the nucleotide and amino acid sequences of PDGF-A
SEQ ID NOS: 126 & 127 are the nucleotide and amino acid sequences of PDGF-B
SEQ ID NOS: 128-136 are the amino acid sequences of fragments A1-A9
SEQ ID NOS: 137-145 are the amino acid sequences of fragments C1-C9
- 30 SEQ ID NOS: 146 & 147 are the nucleotide and amino acid sequences of the 232 amino acid isoform of VEGF-A

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-135-

- SEQ ID NOS: 148 & 149 are the nucleotide and amino acid sequences of falloitin
 SEQ ID NOS : 150 & 151 are the nucleotide and amino acid sequences D1701 VEGF
 SEQ ID NOS : 152 & 153 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 14-9
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-104 of SEQ ID NO: 153)
 5 SEQ ID NOS : 154 & 155 are the nucleotide and amino acid sequences of clones 23-10
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-105 of SEQ ID NO: 155)
 SEQ ID NOS : 156 & 157 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 32-14
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-105 of SEQ ID NO: 157)
 SEQ ID NOS : 158 & 159 are the nucleotide and amino acid sequences of clones 52-15
 10 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-105 of SEQ ID NO: 159)
 SEQ ID NOS : 160 & 161 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 53-3
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-103 of SEQ ID NO: 161)
 SEQ ID NOS : 162 & 163 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 82-7
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-102 of SEQ ID NO: 163)
 15 SEQ ID NOS : 164 & 165 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 82-9
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-104 of SEQ ID NO: 165)
 SEQ ID NOS : 166 & 167 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 82-11
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-104 of SEQ ID NO: 167)
 SEQ ID NOS : 168 & 169 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 82-13
 20 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-104 of SEQ ID NO: 169)
 SEQ ID NOS : 170 & 171 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 83-15
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-104 of SEQ ID NO: 171)
 SEQ ID NOS : 172 & 173 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 84-9
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-104 of SEQ ID NO: 173)
 25 SEQ ID NOS : 174 & 175 are the nucleotide and amino acid sequences of clone 84-11
 (VEGF receptor binding domain= amino acids 1-104 of SEQ ID NO: 175)

All publications and patents cited herein that are relevant to the description of the
 present invention are hereby incorporated by reference in their entirety.

- 30 While the present invention has been described in terms of specific embodiments,
 it is understood that variations and modifications will occur to those in the art.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-136-

Accordingly, only such limitations as appear in the appended claims should be placed on the invention.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-137-

CLAIMS

What is claimed is:

1. A chimeric polypeptide comprising a plurality of peptide subunits
5 derived from two or more naturally-occurring vertebrate vascular endothelial growth
factor polypeptides that have different vascular endothelial growth factor receptor binding
profiles,
wherein the chimeric polypeptide binds at least one receptor of one of the
naturally-occurring vascular endothelial growth factor polypeptides, and
10 wherein the chimeric polypeptide has a different receptor binding profile than the
naturally-occurring growth factor polypeptides.
2. A chimeric polypeptide according to claim 1, wherein the
naturally-occurring growth factor polypeptides are selected from the group consisting of
15 vascular endothelial growth factor A, vascular endothelial growth factor B, vascular
endothelial growth factor C, vascular endothelial growth factor D, vascular endothelial
growth factor E, platelet derived growth factor A, platelet derived growth factor B, and
placenta growth factor.
- 20 3. A composition comprising a polypeptide according to claim 1 in a
pharmaceutically acceptable carrier.
4. A polypeptide according to claim 1, wherein the polypeptide binds
25 to human VEGFR-1 and human VEGFR-3 and fails to bind to human VEGFR-2.
5. A polypeptide according to claim 1, wherein the polypeptide binds
to human VEGFR-1, human VEGFR-2, and human VEGFR-3.
6. A polynucleotide comprising a nucleotide sequence encoding a
30 polypeptide according to claim 1.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-138-

7. An expression vector comprising a polynucleotide according to claim 6 operably linked to an expression control sequence.

8. A host cell comprising a polynucleotide according to claim 6 that expresses the chimeric polypeptide encoded thereby.

9. A polypeptide comprising an amino acid sequence of the formula:

$$\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-X}_3\text{-X}_4\text{-X}_5\text{-X}_6\text{-X}_7\text{-X}_8\text{-X}_9\text{-COOH}$$
 wherein X_1 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acids 3-11 of SEQ ID NO: 128 and amino acids 3-11 of SEQ ID NO: 137;
 wherein X_2 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 129 and 138;
 wherein X_3 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 130 and 139;
 wherein X_4 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 131 and 140;
 wherein X_5 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 132 and 141;
 wherein X_6 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 133 and 142;
 wherein X_7 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 134 and 143;
 wherein X_8 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 135 and 144;
 wherein X_9 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 136 and 145;
 wherein $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-X}_3\text{-X}_4\text{-X}_5\text{-X}_6\text{-X}_7\text{-X}_8\text{-X}_9\text{-COOH}$ is not identical to amino acids 34 to 135 of SEQ ID NO: 2 or amino acids 112 to 216 of SEQ ID NO: 22;
 and

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-139-

wherein the polypeptide binds to at least one receptor selected from the group consisting of human VEGFR-1, human VEGFR-2, and human VEGFR-3.

10. A polypeptide according to claim 9, wherein the polypeptide binds to exactly one receptor selected from the group consisting of human VEGFR-1, human VEGFR-2, and human VEGFR-3.

11. A polypeptide according to claim 9, wherein the polypeptide further includes a signal peptide amino acid sequence connected to the amino acid sequence of the formula $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-X}_3\text{-X}_4\text{-X}_5\text{-X}_6\text{-X}_7\text{-X}_8\text{-X}_9\text{-COOH}$.

12. A polypeptide according to claim 9, wherein the polypeptide further includes an amino-terminal methionine residue.

13. A polypeptide according to claim 9, wherein the polypeptide further includes a tag amino acid sequence connected to the amino acid sequence of the formula $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-X}_3\text{-X}_4\text{-X}_5\text{-X}_6\text{-X}_7\text{-X}_8\text{-X}_9\text{-COOH}$.

14. A polypeptide according to claim 9, wherein the polypeptide further includes one or more amino acid sequences selected from the group consisting of a prepro-VEGF-C signal peptide, a prepro-VEGF-C amino-terminal propeptide, and a prepro-VEGF-C carboxy-terminal pro-peptide.

15. A polypeptide comprising an amino acid sequence of the formula $\text{X}_n\text{-V/PIID-X}_c$, wherein X_n is selected from the group consisting of amino acids 1-34 of SEQ ID NO: 2, amino acids 1-111 of SEQ ID NO: 22, amino acids 1-34 of SEQ ID NO: 47, or fragments thereof;

wherein V/PIID is a polypeptide according to claim 9;

wherein X_c is selected from the group consisting of amino acids 136-191 of SEQ ID NO: 2, amino acids 217-419 of SEQ ID NO: 22, amino acids 136-232, or fragments thereof; and

WO 01/62942

PCT/US01/06113

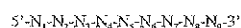
-140-

wherein X_N and X_C are identical to amino acid sequence in a naturally occurring human VEGF-A or VEGF-C precursor protein or a naturally occurring human VEGF-A or VEGF-C isoform.

5 16. A composition comprising a polypeptide according to claim 9 in a pharmaceutically acceptable carrier.

10 17. A polynucleotide comprising an a nucleotide sequence encoding a polypeptide according to claim 9.

18. A polynucleotide according to claim 17, comprising a nucleotide sequence of the formula:



15 wherein N_1 comprises the VEGF nucleotide sequence of A1-F or C1-F (SEQ ID NO: 3 or 23);

 wherein N_2 comprises the VEGF nucleotide sequence of A2-F or C2-F (SEQ ID NO: 4 or 24);

 wherein N_3 comprises the VEGF nucleotide sequence of A3-F or C3-F (SEQ ID NO: 5 or 25);

20 wherein N_4 comprises the VEGF nucleotide sequence of A4-F or C4-F (SEQ ID NO: 6 or 26);

 wherein N_5 comprises the VEGF nucleotide sequence of A5-F or C5-F (SEQ ID NO: 7 or 27);

25 wherein N_6 comprises the VEGF nucleotide sequence of A6-F or C6-F (SEQ ID NO: 8 or 28);

 wherein N_7 comprises the VEGF nucleotide sequence of A7-F or C7-F (SEQ ID NO: 9 or 29);

 wherein N_8 comprises the VEGF nucleotide sequence of A8-F or C8-F (SEQ ID NO: 10 or 30); and

30 wherein N_9 comprises the VEGF nucleotide sequence of A9-F or C9-F (SEQ ID NO: 11 or 31).

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-141-

19. An expression vector comprising a nucleotide sequence according to claim 17.
20. A host cell transformed or expressed with a polynucleotide according to claim 17.
21. A host cell according to claim 20 that expresses the polypeptide encoded by the polynucleotide.
22. A method of modulating the growth of mammalian endothelial cells or mammalian endothelial precursor cells, comprising the step of contacting the cells with a polypeptide according to claim 1, in an amount effective to modulate the growth of mammalian endothelial cells.
23. A method of modulating the growth of mammalian hematopoietic progenitor cells, comprising the step of contacting the cells with a polypeptide according to claim 1, in an amount effective to modulate the growth of mammalian endothelial cells.
24. A method of treating a mammalian subject to modulate the growth of endothelial cells in said subject, comprising the step of administering to the mammalian subject a polypeptide according to claim 1.
25. A method according to claim 24, wherein the mammalian subject is a human.
26. A polypeptide comprising a non-naturally occurring vascular endothelial growth factor amino acid sequence, wherein said non-naturally occurring vascular endothelial growth factor amino acid sequence consists of an amino acid sequence that is at least 95% identical to an amino acid sequence of the formula:
- $$\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-X}_3\text{-X}_4\text{-X}_5\text{-X}_6\text{-X}_7\text{-X}_8\text{-X}_9\text{-COOH}$$

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-142-

wherein X_1 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acids 3-11 of SEQ ID NO: 128 and amino acids 3-11 of SEQ ID NO: 137;

5 wherein X_2 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 129 and 138;

wherein X_3 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 130 and 139;

wherein X_4 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 131 and 140;

10 wherein X_5 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 132 and 141;

wherein X_6 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 133 and 142;

15 wherein X_7 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 134 and 143;

wherein X_8 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 135 and 144;

wherein X_9 comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 136 and 145; and

20 wherein the polypeptide binds to at least one receptor selected from the group consisting of human VEGFR-1, human VEGFR-2, and human VEGFR-3.

27. A method for making a polynucleotide that encodes a polypeptide that modulates the growth of mammalian endothelial cells, comprising the steps of:

25 preparing polynucleotides that encode amino acid fragments of at least two vertebrate vascular endothelial growth factor polypeptides;

combining the polynucleotides under conditions wherein the polynucleotides recombine to form hybrid polynucleotides;

30 expressing the hybrid polynucleotides to make hybrid polypeptides encoded by the hybrid polynucleotides;

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-143-

screening the hybrid polypeptides to identify a hybrid polypeptide that binds to a receptor for a vertebrate vascular endothelial growth factor; and

selecting the polynucleotide that encodes the hybrid polypeptide that binds to the receptor in the screening step.

5

28. A method according to claim 27, wherein said screening step comprises contacting the hybrid polypeptide to a cell that expresses the receptor, wherein changes in cell growth or cell survival induced by the hybrid polypeptide is indicative of binding between the hybrid polypeptide and the receptor.

10

29. A method according to claim 27 wherein the screening step comprises screening to identify a hybrid polypeptide that binds human VEGFR-1 and human VEGFR-3, and the selecting step comprises selecting a hybrid polypeptide that binds human VEGFR-1 and human VEGFR-3.

15

30. A method according to claim 27 wherein the screening step comprises screening to identify a hybrid polypeptide that binds human VEGFR-1, VEGFR-2, and human VEGFR-3, and the selecting step comprises selecting a hybrid polypeptide that binds human VEGFR-1, VEGFR-2, and human VEGFR-3.

20

31. A method for making a polynucleotide that encodes a polypeptide that modulates the growth of mammalian endothelial cells, comprising the steps of:

preparing a set of polynucleotide fragments having the following characteristics:

25

the set includes a first subset of coding polynucleotide fragments, wherein each coding polynucleotide fragment of the first subset encodes at least four amino acids of the amino acid sequence of a first mammalian vascular endothelial growth factor;

30

the set includes a second subset of coding polynucleotide fragments, wherein each coding polynucleotide fragment of the second subset encodes at least four amino acids of the amino acid sequence of a second mammalian vascular endothelial growth factor;

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-144-

combining the polynucleotide fragments which comprise the set under conditions wherein the coding polynucleotide fragments from the first and second subsets recombine to form hybrid polynucleotides;

5 expressing the hybrid polynucleotides to make hybrid polypeptides encoded by the hybrid polynucleotides;

screening the hybrid polypeptides to identify a hybrid polypeptide that modulates the growth of mammalian endothelial cells; and

selecting the polynucleotide that encodes the hybrid polypeptide that modulates the growth of mammalian endothelial cells in the screening step.

10

32. A method according to claim 31, wherein the mammalian vascular endothelial growth factors comprise a receptor binding domain characterized by eight cysteines that are conserved in human Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A), human Vascular Endothelial Growth Factor B (VEGF-B), human Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGF-C), and human Vascular Endothelial Growth Factor D (VEGF-D).

15

33. A method according to claim 31, wherein the first and second mammalian vascular endothelial growth factors are selected from the group consisting of VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF, PDGF- α , and PDGF- β polypeptides.

20

34. A method according to claim 30, wherein the first and second mammalian vascular endothelial growth factors are human.

25

35. A polypeptide comprising amino acids 1-102 as set forth in SEQ ID NO: 51.

36. A polypeptide comprising amino acids 1-102 as set forth in SEQ ID NO: 59.

30

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-145-

37. A polypeptide comprising amino acids 1-102 as set forth in SEQ
ID NO: 63.
38. A polypeptide comprising amino acids 1-104 as set forth in SEQ
ID NO: 67.
39. A polypeptide comprising amino acids 1-104 as set forth in SEQ
ID NO: 71.
40. A polypeptide comprising amino acids 1-104 as set forth in SEQ
ID NO: 75.
41. A polypeptide comprising amino acids 1-104 as set forth in SEQ
ID NO: 77.
42. A polypeptide comprising amino acids 1-104 as set forth in SEQ
ID NO: 153.
43. A polypeptide comprising amino acids 1-105 as set forth in SEQ
ID NO: 155.
44. A polypeptide comprising amino acids 1-105 as set forth in SEQ
ID NO: 157.
45. A polypeptide comprising amino acids 1-105 as set forth in SEQ
ID NO: 159.
46. A polypeptide comprising amino acids 1-103 as set forth in SEQ
ID NO: 161.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-146-

47. A polypeptide comprising amino acids 1-102 as set forth in SEQ
ID NO: 163.
48. A polypeptide comprising amino acids 1-104 as set forth in SEQ
5 ID NO: 165.
49. A polypeptide comprising amino acids 1-104 as set forth in SEQ
ID NO: 167.
- 10 50. A polypeptide comprising amino acids 1-104 as set forth in SEQ
ID NO: 169.
51. A polypeptide comprising amino acids 1-104 as set forth in SEQ
ID NO: 171.
- 15 52. A polypeptide comprising amino acids 1-104 as set forth in SEQ
ID NO: 173.
53. A polypeptide comprising amino acids 1-104 as set forth in SEQ
20 ID NO: 175.
54. A polynucleotide comprising a nucleotide sequence encoding a
polypeptide of any one of claims 35-53.
- 25 55. A vector comprising a polynucleotide comprising a nucleotide
sequence encoding a polypeptide of any one of claim 35-53.
56. A host cell comprising a polynucleotide comprising a nucleotide
sequence encoding a polypeptide of any one of claim 35-53.
- 30

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-147-

57. A polypeptide according to claim 9 or 26, wherein X_4 comprises SEQ ID NO: 140, and wherein the polypeptide binds to VEGFR-3.
58. A polypeptide according to claim 57, wherein X_5 comprises SEQ ID NO: 141.
59. A polypeptide according to claim 57 or 58, wherein X_6 comprises SEQ ID NO: 144.
60. A molecule comprising the peptide sequence $TNIFX_nP$, wherein X_n comprises from one to seven amino acids, and wherein the molecule inhibits VEGF-C-mediated activation of VEGFR-3.
61. A molecule according to claim 60, wherein X_n comprises three amino acids.
62. A molecule comprising the human VEGF-C peptide sequence EFGVATNITFFKPPCVSVYRCG or a fragment or variant thereof, wherein the molecule inhibits VEGF-C-mediated activation of VEGFR-3.
63. A molecule according to claim 62, wherein the molecule comprises the amino acid sequence EFGVATNITFFKPPCVSVYRCG.
64. A molecule according to claim 63, wherein the molecule comprises the amino acid sequence TNITFFKPP.
65. A molecule according to claim 62, wherein the fragment or variant comprises the amino acid sequence TNITFFKPPCVxxxR.
66. A molecule according to claim 62, wherein the fragment or variant comprises the amino acid sequence TNITFFKPPCVxxxRGGCC.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-148-

67. A polypeptide according to claim 9 or 26, wherein X₂ comprises SEQ ID NO: 129, and wherein the polypeptide binds to VEGFR-1.
- 5 68. A polypeptide according to claim 67, wherein X₂ comprises SEQ ID NO: 134.
69. A polypeptide according to claim 67 or 68, wherein X₂ comprises SEQ ID NO: 140, and wherein the polypeptide binds to VEGFR-3.
- 10 70. A polypeptide according to claim 69, wherein X₂ comprises SEQ ID NO: 141.
71. A polypeptide according to claim 70, wherein X₂ comprises SEQ ID NO: 144.
- 15 72. A method for identifying a modulator of VEGFR-1 binding to VEGF-A comprising the steps of (i) measuring binding between VEGFR-1 and VEGF-A in the presence and absence of a test compound under conditions that allow binding of VEGFR-1 to VEGF-A, and (ii) identifying as a modulator a test compound which alters VEGFR-1 binding to VEGF-A and which binds VEGF-A at a site defined by Phe⁴³, Met⁴⁴, Tyr⁴⁷, Gln⁴⁸, Tyr⁵¹, Gln¹⁰⁵, and Met¹⁰⁷ of SEQ ID NO: 2, or which binds VEGFR-1 at VEGFR-1 residues which interface with said residues of SEQ ID NO: 2.
- 20 73. A method for identifying a modulator of VEGFR-1 binding to VEGF-A comprising the steps of (i) measuring binding between VEGFR-1 and VEGF-A in the presence and absence of a test compound under conditions that allow binding of VEGFR-1 to VEGF-A, and (ii) identifying as a modulator a test compound which alters VEGFR-1 binding to VEGF-A and which binds VEGF-A at a site defined by Lys⁴², Phe⁴³, Met⁴⁴, Tyr⁴⁷, Gln⁴⁸, Tyr⁵¹, Ile⁷², Lys⁷⁴, Asp⁸⁹, Gly⁹¹, Leu⁹², Gln¹⁰⁵, Met¹⁰⁷, Ile¹⁰⁹, Phe¹¹¹, His¹¹², Gln¹¹⁵, Ile¹¹⁷, Gln¹²⁹, Arg¹³¹, and Pro¹³² of SEQ ID NO: 2, or which binds VEGFR-1 at VEGFR-1 residues which interface with said residues of SEQ ID NO: 2.
- 25 30

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-149-

74. A method for identifying a modulator of VEGFR-3 binding to VEGF-C comprising the steps of (i) measuring binding between VEGFR-3 and VEGF-C in the presence and absence of a test compound under conditions that allow binding of VEGFR-3 to VEGF-C, and (ii) identifying as a modulator a test compound which alters VEGFR-3 binding to VEGF-C and which binds VEGF-C at a site defined by Lys¹²⁶, Ser¹²⁷, Ile¹²², Trp¹²⁶, Arg¹²⁷, Gln¹³⁰, Phe¹³¹, Lys¹³³, Ser¹⁶⁸, Gly¹⁷⁰, Leu¹⁷¹, Tyr¹⁸⁴, Phe¹⁸⁶, Ile¹⁹⁰, Pro¹⁹¹, Pro¹⁹⁶, Pro¹⁹⁸, Arg²¹⁰, Met²¹², and Ser²¹³ of SEQ ID NO: 22, or which binds VEGFR-3 at VEGFR-3 residues which interface with said residues of SEQ ID NO: 22.
75. A method for identifying a modulator of VEGFR-3 binding to VEGF-C comprising the steps of (i) measuring binding between VEGFR-3 and VEGF-C in the presence and absence of a test compound under conditions that allow binding of VEGFR-3 to VEGF-C, and (ii) identifying as a modulator a test compound which alters VEGFR-3 binding to VEGF-C and which binds VEGF-C at a site defined by Thr¹⁵⁸, Asn¹⁶⁹, Thr¹⁸⁰, Phe¹⁸¹, and Pro¹⁸⁵ of SEQ ID NO: 22, or which binds VEGFR-3 at VEGFR-3 residues which interface with said residues of SEQ ID NO: 22.
76. A pharmaceutical composition comprising a modulator identified by the method of claim 72 or 73.
77. A pharmaceutical composition comprising a modulator identified by the method of claim 74 or 75.
78. Use of a modulator identified by the method of claim 72 or 73 in the production of a medicament to ameliorate pathologies arising from VEGFR-1 binding to a natural ligand that binds VEGFR-1.
79. Use of a modulator identified by the method of claim 74 or 75 in the production of a medicament to ameliorate pathologies arising from VEGFR-3 binding to a natural ligand that binds VEGFR-3.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

-150-

80. A method for inhibiting VEGFR-1 binding to a natural ligand that binds VEGFR-1 comprising the step of contacting cells that express VEGFR-1 with a pharmaceutical composition according to claim 76.

5 81. A method for inhibiting VEGFR-3 binding to a natural ligand that binds VEGFR-3 comprising the step of contacting cells that express VEGFR-3 with a pharmaceutical composition according to claim 77.

82. A method to ameliorate a pathology arising from VEGFR-1
10 binding to a natural ligand that binds VEGFR-1 comprising the step of administering to an individual in need thereof a negative regulator of VEGFR-1 binding to the ligand in an amount effective to inhibit VEGFR-1 binding to the ligand, said negative regulator binding to an VEGFR-1 regulatory site selected from the group consisting of a site defined by Phe⁴³, Met⁴⁴, Tyr⁴⁷, Gln⁴⁸, Tyr⁵¹, Gln¹⁰³, and Met¹⁰⁷ of SEQ ID NO: 2 and a site defined
15 by Lys⁴², Phe⁴³, Met⁴⁴, Tyr⁴⁷, Gln⁴⁸, Tyr⁵¹, Ile⁷², Lys⁷⁴, Asp⁸⁹, Gly⁹¹, Leu⁹², Gln¹⁰⁷, Met¹⁰⁷, Ile¹⁰⁹, Phe¹¹¹, His¹¹², Gln¹¹⁵, Ile¹¹⁷, Glu¹²⁰, Arg¹¹¹, and Pro¹³² of SEQ ID NO: 2.

83. A method to ameliorate a pathology arising from VEGFR-3
20 binding to a natural ligand that binds VEGFR-3 comprising the step of administering to an individual in need thereof a negative regulator of VEGFR-3 binding to the ligand in an amount effective to inhibit VEGFR-3 binding to the ligand, said negative regulator binding to an VEGFR-3 regulatory site selected from the group consisting of a site defined by Lys¹²⁰, Ser¹²¹, Ile¹²², Trp¹²⁶, Arg¹²⁷, Gln¹³⁰, Phe¹⁵¹, Lys¹⁵³, Ser¹⁶⁸, Gly¹⁷⁰, Leu¹⁷¹, Tyr¹⁸⁴, Phe¹⁸⁶, Ile¹⁹⁰, Pro¹⁹¹, Pro¹⁹⁶, Pro¹⁹⁸, Arg²¹⁰, Met²¹², and Ser²¹³ of SEQ ID NO: 22 and a site
25 defined by Thr¹⁴⁸, Asn¹⁴⁹, Thr¹⁵⁰, Phe¹⁵¹, and Pro¹⁵⁵ of SEQ ID NO: 22.

84. A pharmaceutical composition comprising a polypeptide according to any one of claims 1, 2, 4-6, 9-15, 26, 35-53, 57-59, and 67-71.

30 85. A pharmaceutical composition comprising a molecule according to any one of claims 60-66.

WO 01/62942

PCT/US01/06113

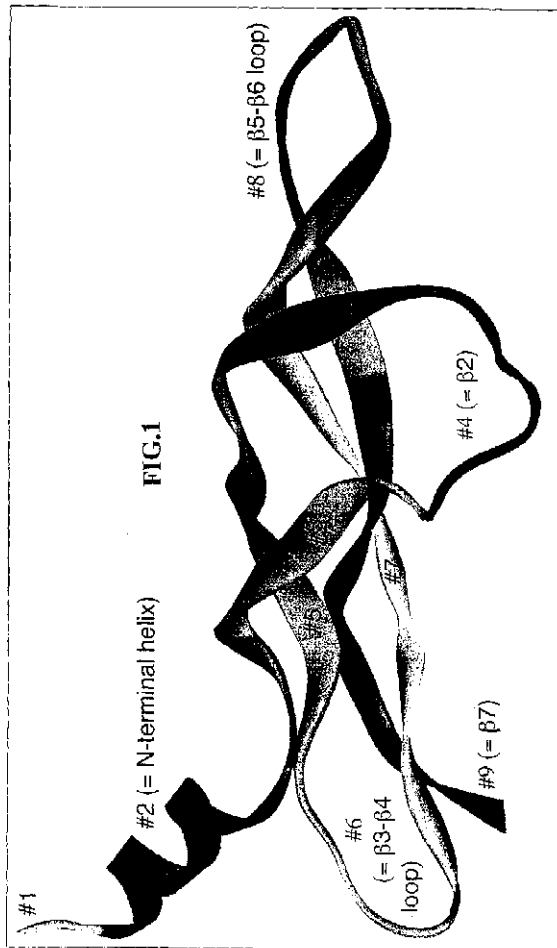
-151-

86. A method of treating a mammalian subject by administering a pharmaceutical composition according to claim 84 at a dosage effective to selectively stimulate VEGFR-1.

5 87. A method of treating a mammalian subject by administering a pharmaceutical composition according to claim 84 at a dosage effective to selectively stimulate VEGFR-3.

10 88. A method of treating a mammalian subject by administering a pharmaceutical composition according to claim 85 at a dosage effective to selectively stimulate VEGFR-1.

15 89. A method of treating a mammalian subject by administering a pharmaceutical composition according to claim 85 at a dosage effective to selectively stimulate VEGFR-3.



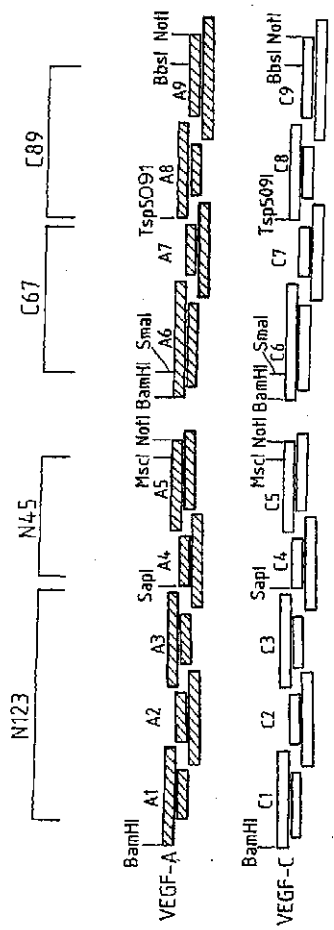


FIG. 2

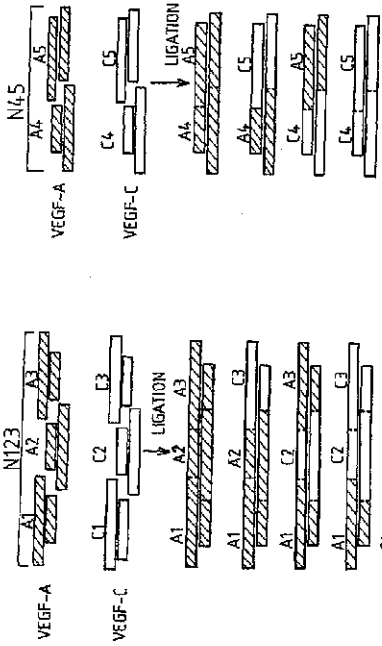


FIG. 3

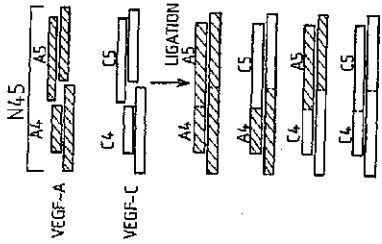


FIG. 4

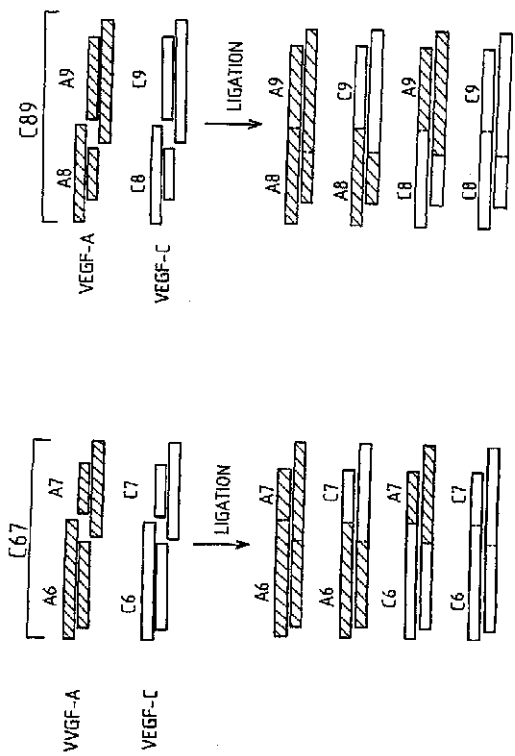


FIG. 6

FIG. 5

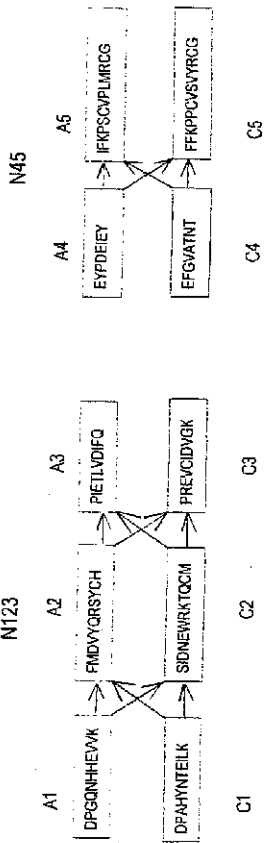


FIG. 7A

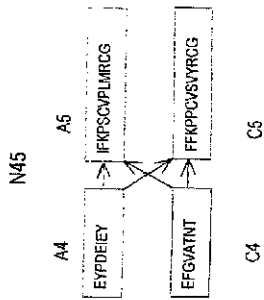


FIG. 7B

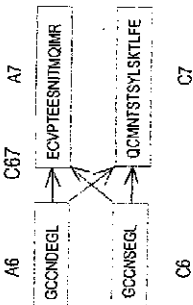


FIG. 7C

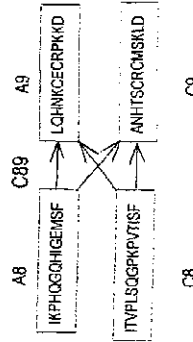


FIG. 7D

WO 01/62942

6/7

PCT/US01/06113

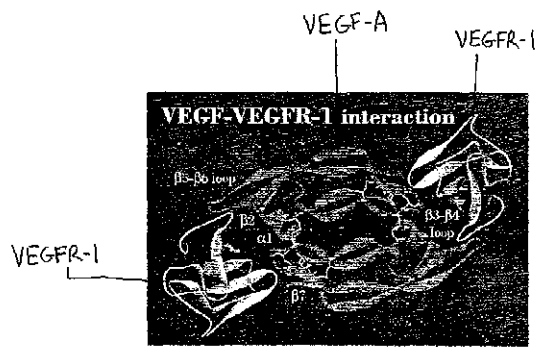


Figure 8

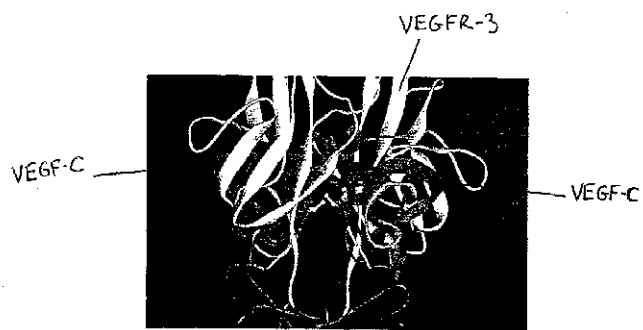


Figure 9

WO 01/62942

7/7

PCT/US01/06113

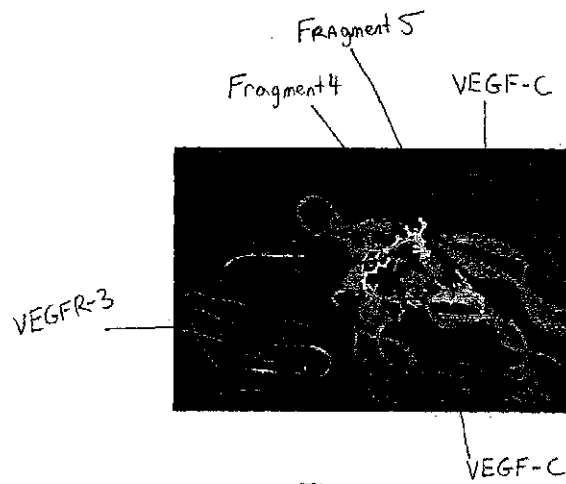


Figure 10

WO 01/62942

PCT/US01/06113

1

SEQUENCE LISTING

<110> Ludwig Institute for Cancer Research
Helsinki University Licensing Ltd. Oy

<120> MATERIALS AND METHODS INVOLVING HYBRID VASCULAR
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR DNAs AND PROTEINS

<130> 38967/35977A

<140>
<141>

<150> US 60/205,331
<151> 2000-05-18

<160> US 60/385,205
<161> 2000-02-25

<160> 1/5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 990
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (57) .. (629)

<400> 1
cagtgctctg gcggcccgcc gcggcccgcc ccggcccgcc ccggcccgcc gaaacc atg 59
Met
1

aac ttt ctg ctg tct tgg gtg cat tgg agc ctc gcc ttg ctg ctc tac 107
Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Tyr
10 15

ctc cac cat gcc aag tgg tcc cag gct gca ccc atg gca gaa gga gga 155
Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly
20 25 30

ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aag ttc atg gat gtc tat cag cgc 203
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
35 40 45

agc tac tgc cat cca atc gag acc ctg gtg gac atc ttc cag gag tac 251
Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr
50 55 60 65

cct gat gag atc gag taa atc ttc aag cca tcc tgt gtc ccc ctg atg 299
Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
70 75 80

cga tgc ggg ggc tgc tgc aat gac gag ggc ctg gag tgt gtg ccc aat 347
Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
85 90 95

gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg cgg atc aac cct cac caa 395

WO 01/62942

PCT/US01/06113

2

Gln Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
 100 105 110
 ggc cag cac ata gga gag atg agc ttc cta cag cac aac aaa tgt gaa 443
 Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu
 115 120 125
 tgc aga cca aag aac gat aga gca aga cca gaa aat ccc tgt ggg cct 491
 Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro
 130 135 140 145
 tgc tca gag cgg aga aag cat ttg ttt gta aca gat ccg cag acg tgt 539
 Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys
 150 155 160
 aaa tgt tcc tgc aac aac aca gac tgg cgt tgc aag ggg agg cag ctt 587
 Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu
 165 170 175
 gag tta aac gaa cgt act tgc aga tgt gac aag ccg agg cgg 629
 Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 180 185 190
 tgagccgggc agggggaagg agcccccctc agggtttcgg gaaccagatc tctcaccagg 689
 aaagactgat acagaacgat cgtaccgaa accacgctgc cggcaccaca ccatcaccat 749
 cgacagaaca gtccctaato cagaaacctg aatgaagga agaggagact ctggcgagag 809
 cactttgggt ccggaggggc agactccggc ggaagcactc ccgggggggt gaccccgac 869
 ggtccctcctt ggaattggat tcgcacattt akttttcttg ctgctaatac accagagccc 929
 gaggattaga gagttttatt tctgggatto ctgtagacac accgugyccg ccagcacact 989
 9 990
 <210> 2
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
 20 25 30
 Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
 35 40 45
 Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 50 55 60
 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 65 70 75 80
 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
 85 90 95
 Thr Glu Glu Ser Asn Ile Trp Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His

WO 01/62942

PCT/US01/06113

3

100 105 110
 Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 115 120 125
 Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly
 130 135 140
 Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Glu Asp Pro Gln Thr
 145 150 155 160
 Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
 165 170 175
 Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 180 185 190

<210> 3
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide

<400> 3
 gatcctgggc agaatacatca cgaagtggtg aaat 34

<210> 4
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide

<400> 4
 tcatggatgt ctatcagcgc agctactgcc at 32

<210> 5
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide

<400> 5
 ccgatacaga cactgggtgga catctctcag gaatacaga gc 42

<210> 6
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

WO 01/62942

PCT/US01/06113

4

<223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide
 <400> 6
 cgctcttcga alacctgat gagatcgagt aca 33

 <210> 7
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide
 <400> 7
 tcttcaagcc atctgcgtg cccctgatga gatgtgga 38

 <210> 8
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide
 <400> 8
 ccgggttgtt gcaatgacga agggctgg 28

 <210> 9
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide
 <400> 9
 agtgcgttcc caccagggag tccacatca ccagcagat tatgag 46

 <210> 10
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide
 <400> 10
 tattaacct cccaaggga agacatcgg agagatgagc ttt 43

 <210> 11
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

WO 01/62942

PCT/US01/06113

5

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide
 <400> 11
 ctccagcaca acaaagtga atgtagacca aagaagatt gactcttcgc 50
 <210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide
 <400> 12
 ccacttcgtg atgattctgc ccag 24
 <210> 13
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide
 <400> 13
 tcggatggua gtagctgcgc tgatgacat caatgaattt ca 42
 <210> 14
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide
 <400> 14
 tcgagctctt ctattctgg aagatgtca ccagtgtct ga 42
 <210> 15
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide
 <400> 15
 tggcttgag atgtactga tchcatcagg gtattcgaag agcggtac 48
 <210> 16
 <211> 31
 <212> DNA

WO 01/62942

PCT/US01/06113

6

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 16

catggccaca tctcatcagg ggcacgcagg a

31

<210> 17

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 17

gcactccaga ccttcgtcat tgcagcaacc cgggtac

37

<210> 18

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 18

aatctctata atctgcctgg tgatgttggc ctctctggtg ggaac

45

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 19

catctctcag atgtgctgcc outggtgagg ttt

33

<210> 20

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 20

ggccgcgaag actcaatctt tctttgtctt acattcacat ttgttatgct ggagaaagct 60

<210> 21

WO 01/62942

PCT/US01/06113

7

<211> 1997
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (352) .. (1608)

<400> 21
 ccgccccgc ctctccaaaa agctacaccc acccgggaccg cggcggcgctc ctccctcgcc 60
 ctgcttccac ctogcggggt ccgaatggcg ggaagctggg tctcgggttt cctgtgagcg 120
 ttttaactga caccggcgcc ctctcccgcg cactggctgg gaggcgccgc tgcagaagttg 180
 ggaacggcga gccccgggac cgtctccgac gctctcggtt cgcacaggcg gggctcgccgg 240
 gaggagcccg ggggagaggg accagagagg gccccgggac tgcagggggc gcccgcgccc 300
 ccacccctgc ccccgctagc ggaacggctc ccaccccggt gtccttcac c atg cac 357
 Met His
 1
 ttg ctg gac ttc ttc tat gta ggc tgt tct ctg ctg gac gct ggc ctg 405
 leu leu gly phe phe ser val ala cys ser leu leu ala ala ala leu
 5 10 15
 ctg ccg ggt cct cgc gag ggc ccc gcc gcc gcc gcc gcc ttc gag tcc 453
 leu pro gly pro arg glu ala pro ala ala ala ala ala phe glu ser
 20 25 30
 ggc ctg gac ctg tgg gac ggc gag ccc gac ggc ggc gag gcc acc gct 501
 gly leu asp leu ser asp ala glu pro asp ala gly glu ala thr ala
 35 40 45 50
 tat gca agc aac gat ctg gac gac cag tta cgg tct gtc tcc agt gta 549
 tyr ala ser lys asp leu glu glu gln leu arg ser val ser ser val
 55 60 65
 gat gaa ctg atg act gta ctg tac cca gaa tat tgg aac atg tac aag 597
 asp glu leu met thr val leu tyr pro glu tyr trp lys met tyr lys
 70 75 80
 tgt cag cta agc aac gga ggc tgg cca cat aac aga gaa cag gcc aac 645
 cys gln leu arg lys gly gly trp gln his asn arg glu gln ala asn
 85 90 95
 ctg aac tca agc aca gaa gag act ata aac ttt gct gca gca cat tat 693
 leu asn ser arg thr glu glu thr ile lys phe ala ala ala his tyr
 100 105 110
 aat aca gag atc ttg aac agt att gat aat gag tgg aga aag act caa 741
 asn thr glu ile leu lys ser ile asp asn gln trp arg lys thr gln
 115 120 125 130
 tgc atg cca cgg gag gtc tgt ata gat gtc ggc aag gag ttt gga gtc 789
 cys met pro arg glu val cys ile asp val gly lys glu phe gly val
 135 140 145
 gcc aca aac acc ttc ttt aac cct cca tgt gtc tcc gtc tac aga tgt 837
 ala thr asn thr phe phe lys pro pro cys val ser val tyr arg cys

WO 01/62942

PCT/US01/06113

8

150	155	160	
ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc atg aac acc agc acg	883		
Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr Ser Thr			
155	170	175	
agc tac ctg agc aag acg tta ttt gaa att aca gtc cct ctg tct caa	933		
Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu Ser Gln			
180	185	190	
ggc ccc aaa cca gta aca atc agt ttt gcc aat cac act tcc tgc cga	981		
Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg			
195	200	205	
tgc atg tct aaa ctg gat gtt tac aga caa gtt cat tcc att att aga	1029		
Cys Met Ser Lys Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val His Ser Ile Ile Arg			
210	215	220	
cgt tcc ctg cca gca aca cta cca cag tgt cag gca gcg aac aag acc	1077		
Arg Ser Leu Pro Ala Thr Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn Lys Thr			
230	235	240	
tgc ccc acc aat tac atg tgg aat aat cac atc tgc aga tgc ctg gct	1125		
Cys Pro Thr Asn Tyr Met Trp Asn Asn His Ile Cys Arg Cys Leu Ala			
245	250	255	
cag gaa gat ttt atg ttt tcc tgg gat gct gga gat gac tca aca gat	1173		
Gln Glu Asp Phe Met Phe Ser Ser Asp Ala Gly Asp Asp Ser Thr Asp			
260	265	270	
gga ttc cat gac atc tgt gga cca aac aag gag ctg gat gaa gag acg	1221		
Gly Phe His Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu Glu Thr			
275	280	285	
tgt cag tgt gtc tgc aga gcg ggg ctt cgg cct gcc agc tgt gga ccc	1269		
Cys Glu Cys Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys Gly Pro			
290	295	300	
cac aaa gaa cta gac aga aac tca tgc cag tgt gtc tgt aaa aac aaa	1317		
His Lys Glu Leu Asp Arg Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys Asn Lys			
310	315	320	
ctc ttc ccc agc caa tgt ggg gcc aac cga gaa ttt gat gaa aac aca	1365		
Leu Phe Pro Ser Gln Cys Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu Asn Thr			
325	330	335	
tgc cag tgt gta tgt aaa aga acc tgc ccc aga aat caa ccc tta aat	1413		
Cys Gln Cys Val Cys Lys Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro Leu Asn			
340	345	350	
cct gga aaa tgt gcc tgt gaa tgt aca gaa agt cca cag aaa tgc ttg	1461		
Pro Gly Lys Cys Ala Cys Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys Cys Leu			
355	360	365	
tta aaa gga aag aag ttc cac cac caa aca tgc agc tgt tac aga cgg	1509		
Leu Lys Gly Lys Lys Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr Arg Arg			
370	375	380	
cca tgt acg aac cgc cag aag gct tgt gag cca gga ttt tca tat agt	1557		
Pro Cys Thr Asn Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser Tyr Ser			
390	395	400	

WO 01/62942

PCT/US01/06113

9

gaa gaa gtg tgt cgt tgt gtc cct tca tat tgg aaa aga cca caa atg 1605
 Glu Glu Val Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp Lys Arg Pro Gln Met
 405 410 415
 agc taagattgta ctgttttcca gtccatcgat tttctattat ggaatacigt 1650
 Ser
 gtggccacaa tagaactgtc tgggaacaga gagacccctg tgggtccatg ctaacaaaga 1718
 caaaagtctg tctttcctga accatgtgga taactttaca gaaatggact ggagctcain 1778
 tgcataaaggc ctcttgtaaa gactgggttt ctgccaatga ccaaacagcc aagattttcc 1838
 tcttgatgatt totttaaag aatgaactata taatttatit ccaataaaaa tattgtttct 1898
 gcattcatatt ttatagcaac acaatttggt aaactcact gcatcaata tttttatctc 1958
 atgcaaaaaa tgtttaaant aaatgaaaa ttgtattat 1997

<210> 22
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Met His Leu Leu Gly Phe Phe Ser Val Ala Cys Ser Leu Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Pro Gly Pro Arg Glu Ala Pro Ala Ala Ala Ala Phe
 20 25 30
 Glu Ser Gly Leu Asp Leu Ser Asp Ala Glu Pro Asp Ala Gly Glu Ala
 35 40 45
 Thr Ala Tyr Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu Arg Ser Val Ser
 50 55 60
 Ser Val Asp Glu Leu Met Thr Val Leu Tyr Pro Glu Tyr Trp Lys Met
 65 70 75 80
 Tyr Lys Cys Gln Leu Arg Lys Gly Gly Trp Gln His Asn Arg Glu Gln
 85 90 95
 Ala Asn Leu Asn Ser Arg Thr Glu Glu Thr Ile Lys Phe Ala Ala Ala
 100 105 110
 His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys
 115 120 125
 Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu Phe
 130 135 140
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 145 150 155 160
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
 165 170 175
 Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu
 180 185 190
 Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser

WO 01/62942

PCT/US01/06113

10

195 200 205
 Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val His Ser Ile
 210 215 220
 Ile Arg Arg Ser Leu Pro Ala Thr Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn
 225 230 235 240
 Lys Thr Cys Pro Thr Asn Tyr Met Trp Asn Asn His Ile Cys Arg Cys
 245 250 255
 Leu Ala Gln Glu Asp Phe Met Phe Ser Ser Asp Ala Gly Asp Asp Ser
 260 265 270
 Thr Asp Gly Phe His Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu
 275 280 285
 Glu Thr Cys Gln Cys Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys
 290 295 300
 Gly Pro His Lys Glu Leu Asp Arg Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys
 305 310 315 320
 Asn Lys Leu Phe Pro Ser Gln Cys Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu
 325 330 335
 Asn Thr Cys Gln Cys Val Cys Lys Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro
 340 345 350
 Leu Asn Pro Gly Lys Cys Ala Cys Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys
 355 360 365
 Cys Leu Leu Lys Gly Lys Lys Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr
 370 375 380
 Arg Arg Pro Cys Thr Asn Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser
 385 390 395 400
 Tyr Ser Glu Glu Val Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp Lys Arg Pro
 405 410 415
 Gln Met Ser

<210> 23
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide

<400> 23
 gatcttgccat attatcctac ccagatcccttg aat

34

<210> 24
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

WO 01/62942

PCT/US01/06113

11

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 24
ctattgataa tyagtgagaga aagactcagt gcacg 35

<210> 25
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 25
ccgagagagg tgtgtataga cgtggggaag gaatagaaga gc 42

<210> 26
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 26
cgntcttcga atttggagtc ggcacsaaac cct 33

<210> 27
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 27
tcctcaagcc accatgtgtg tccgtgtaca gatgtggc 38

<210> 28
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 28
ccgggttgct gccatagtga ggggctgc 28

<210> 29
<211> 16
<212> DNA

WO 01/62942

PCT/US01/06113

12

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 29

agtgcacgaa caagtcacag agctacctca gcaagacgct gtttga 46

<210> 30

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 30

aattacagtg cctctctctc aaggcccca accagtgaca atcagcttt 49

<210> 31

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 31

gccacacaca ctctctgccc atgcattctt aagctggatt gagctctgc 50

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 32

ggatctcggg attataxgt gcag 24

<210> 33

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide

<400> 33

tcggatgca ctgagctttt ctccacatc tatcaataga ttcca 45

<210> 34

WO 01/62942

PCT/US01/06113

13

<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide
<400> 34
tcgagctcctt ctatctcttc ccaagtcga tacacacctc tc 42
<210> 35
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide
<400> 35
tggcttcacg aaggtgbltg tcgcactcc aaattcgag agcggtac 48
<210> 36
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide
<400> 36
catggccaca ttgtacacg gacacacatg g 31
<210> 37
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide
<400> 37
gcactgcagc cctctactat tgcagcaacc cgggtac 37
<210> 38
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide
<400> 38
aatttcacac agcgtcttgc tgaggtagct cgtggacgtg ttcac 45

WO 01/62942

PCT/US01/06113

14

```

<210> 39
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
        oligonucleotide

<400> 39
gattgtcaact ggtttgggca cttgagagag aggcactgt      32

<210> 40
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
        oligonucleotide

<400> 40
ggcgcgcagc actcaatcca gcttagacat gcacggcgag gaagrgtgat tggcaaacct 60

<210> 41
<211> 5070
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: psecTagr
        Vector

<400> 41
gacggatcgg gagatctcde gatccctat ggtcgactct cagtacaatc tgcctcgaag 60
ccgatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaagtcgct gactagtgcg 120
cgagcaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgacaga caattgcacg aagantctgc 180
ttagggttag gctttttgag ctgcttcgag atgtacgggc cagatatacg cgttcacatt 240
gattattgac tagttatlaa tagtaataaa ttacgggggc attagttcat agcccatata 300
tggagltcag cgttacalaa cttacggtaa atggcccgcc tggctgacag cccnagacc 360
cccgcccttt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagc aacgccata gggacttttc 420
attgaagta atgggtggac tatttacggc aaactgccca ctggccagta catcaagtgt 480
atcatatgcc aaglacgccc cctattgacg tcaatgacgg taatggccc gctgggcatt 540
atgccagta catgacctta tgggacttcc ctacttgga gtacatctac gtattagtcn 600
tcgotaltac catgggtgat cgggttcggc agtacatcgc tgggcgtgga tagcggtttg 660
actcaaggag atttcaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggaglttg ttttggacc 720
aaatcaacg ygaacttcca aaatgctga acaactccgc cccattgacg caatggggcg 780
gtaggcggtgt acggtgggag gtcctatata gcagagctcg gcggtgttga caattaatca 840

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

15

tccgnatagt atattggcat agtataatag gacaaggaga ggaactaacc catggagaca 980
 gacacpctcc tctatgggt actgtctctc tgggttccag gtcccactgg tgacgggccc 960
 caggatccgt ccccatgcc gatttggctc tgaacaaaa actnactcca gaagaggatc 1020
 lgaatagcgc cgtcgacccat catcatcacc atcattgagt ttaaacccgc tgaatagcgc 1080
 cgaatgtgc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc cccccctg ccttcttga 1140
 ccttggagg tgcactccc actgtctctt cctaaahaaa tgaagaaatt gcatcgcat 1200
 gtctgagtg gtgtcattct attctggggg gtggggtggg gcaggacagc aaggggggag 1260
 attgggaaga taatagcagg catgtctggg atgcgtggg cctataggct tctgaggcgg 1320
 aaagaaccgc ctggggctct agggggctac cccacggccc ctgtagcggc gcattaagcg 1380
 cgggggggtg ggtggttacc cgcagcgtga ccgtactact tgcacggccc ctaggccccc 1440
 ctcctttgc tttcttccc tctttctctg ccacgttctg cggctttccc cgtcaagctc 1500
 taactcggg catccctta gggttccgat ttagtcttt accgcacccc gaccccaaaa 1560
 aacttgatta ggtgatggg tcaatagtg gccatctgc ctgatagac gtctttctgc 1620
 ctctgaggt ggagtcacg tcttttaata gtgactctll gtcccaact ggaacacac 1680
 tcaacccat ctggctctat ccttttgatt tataagggat tttggggtt tgggcctatt 1740
 gggtaaaaa tgagctgatt taacaaaaa ttaacggaa ttaattctgt ggaatgttg 1800
 tcaatlagg tctggaagc cccagggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca 1860
 tctcaattag tcaacaacca ggtgtggaag gtccacaggc tcccagcag gcagaagtat 1920
 gcaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtccc cccctaactc cggccatccc 1980
 gccctaac! cggccaggt ccgcccctc tccgcccat ggtgactaa tttttttat 2040
 ttatgcagag ccgagggccg cctctgctc tgagctatc cagaagtat gaggaggctt 2100
 ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct ccggggagct tglatatcca ttttggatc 2160
 tgatcagac gtgttgacaa ttaactatc gcatagtata tggcatalgt ataactcagc 2220
 aaggtgaggx actaaacuat ggttaagttg accagtgccg ttccggctgt ccccgccgc 2280
 gacgtcccg gagggttga gtcttgagc gacggctcg ggttctccc ggaattctgt 2340
 gaggacact tgcgggtgt gtccgggac gacgtgacc tglctatcag cgggttcag 2400
 gacaggttg tgcgggacaa caccctggc tgggtgtggg tgcgggctt ggaagcctg 2460
 taagccaggt ggtcggagg cgtgtccacg aacttcggg acgctccg gcccgcctg 2520
 acagagatcg ccgacagcc gtggggggg gacttcgccc tgcgcagccc ggccggcacc 2580
 tgggtgact tglggcga ggagcaggac tgacacgtgc taagagattt cyattccacc 2640
 gccgcctct atgaagggt gggtctcga atcgttttcc gggagccgg ctgagatgc 2700
 ctcaagccg gggatctcat gctgagttc ttgcgccac ccaatttgtt tattgagct 2760

WO 01/62942

PCT/US01/06113

16

tataatgggtt acaataaag caatagcctc acaattttca caataaagc atttttttca 2820
 ctgaattcta gttgltgttt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctgtataccg 2880
 tggacctcta gctagagctt gggttaacta tggatcatgc tgtttcctgt gtgaaattgt 2940
 tctcgcctca caattccana caacatacga gcgggaagca taaagtgtta agcctggggg 3000
 gcctaatgag tgaactaaat cacttaattt gctttgcgtt cactgcctgc tttccagtcg 3060
 ggaacctgtt ctgtccagct gaattaatga atcgcccaac gcgcggggag aggcggtttg 3120
 cgtatttggtt gctcttcctc tctctcgttc actgaactgc tgcgtcaggt cgttcggctg 3180
 cggcagagcg tctcagctca ctcaaaaggc gtaatacgtt tatccanaga atcaggggat 3240
 aacgcagga agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccagggaaccg taataaggcc 3300
 gcgttctgtt cgttttttca taggtctcgc cccctgcagc agcatcacaa caatcgacgc 3360
 tcaagtcaag ggtggcgaaa ccgagacaggc ctataagat accaggcgtt tcccttggga 3420
 agctccctcg tgcctctctc tgttccagac ctgcctgtta ccggatacct gtccgctttt 3480
 ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcaa tgcctcagct gtaggtatct cagttcggcg 3540
 taggtcgttc gctccagctt gggctgtgtg caccgaaccc ccgttcagcc cgaacgctgc 3600
 gctctatcgc gtaactatgt tcttgagtc aaccgggtta gacacgactt ctgcgactg 3660
 gcagcagcca ctggtlaacag gattagcaga gcaggttatg taggcgtgcg tccagagttc 3720
 ttgaagtggc ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttgggtt ctgcgtctcg 3780
 ctgaagcagc ctaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcna acaaacaccc 3840
 gctggtagcg gttgtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaggatct 3900
 caagaagatc ctctgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtgaacga aaactcacgt 3960
 taagggtatt tggctatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct ttttaattaa 4020
 aaatgaagtt ttaaatcaat cttaagtata tatgagtaaa cttggctcga cagttaacaa 4080
 tgcctaacta gtagggcacc tatctcagcg atctgtctat ttctgtctat cactgttgcg 4140
 tgaatcccg tctgttagat aactacgata cgggagggct taccatctcg cccatgtgct 4200
 gcaatgctac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaacagccca 4260
 gcgggaaggc ccgagcgagc agtggtctct gcaactttat ccgctccat ccagttctat 4320
 aattgttgcg ggggaagctag agtaagtagt tgcacagtta atagtctgcg caacgtctgt 4380
 gccattgcta caggcatcgt ggtgtcaccg tctgtgtttg gtatggcttc attcagctcc 4440
 ggttcccaac gatcaggcg agttacatga tccccatgt tctgcaaaa agcgggttagc 4500
 tctcttggtc ctccgacgt tctcagaagt aagttggcgc cagtgttate actcatggtt 4560
 atggcagcac tgcataatc tcttctgtc atgcacccg taagatgctt tctgtgact 4620
 ggtgagtaac caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc gggaacagag tctgtcttgc 4680

PCT/US01/06113

cggggcgcaca tacgggatac tacgcgcgcac catagcagaa ctttaaaagt gctctcatt 4719
 ggaataacgt cttcggggcg aaactctca aggactctac cgcggttag atccagttcg 4803
 atgtaaccca ctctgcgcc caanlgatct tcagcatctt ttaacttcc cagcglttcl 4860
 gggtagacaa aacagggaag gcaaatgc ccaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa 4920
 tcttgatcac tcaactctt cttttttca tattattgaa gaattttca gggttattgt 4980
 cttatgcgac gatacatatt tgaattgatt tagaaaaata acaaatagtg gtttcgcgcg 5040
 acattctccc gaaactctcc aactgaatc ccaatgaatc ccaatgaatc ccaatgaatc 5070

```
<210> 42
<211> 380
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
<221> CDS
<222> (8) .. (385)

[illegible]

WO 01/62942

PCT/US01/06113

18

<210> 43
 <211> 126
 <212> PPT
 <213> Artificial Sequence

<400> 43
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg 1 5 10 15
 Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr 20 25 30
 Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr 50 55 60
 Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln 65 70 75 80
 Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu 85 90 95
 Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu 100 105 110
 Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His 115 120 125

<210> 44
 <211> 394
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (81)..(391)

<400> 44
 ggatccct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtc gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln 15 20 25 30
 gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg ccc 145
 Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro 35 40 45
 ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc atg 193
 Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met 50 55 60
 aac acg tcc acg agc tac ctc aac aag acg ctg ttt gaa att aca gtg 241
 Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val 65 70 75

WO 01/62942

PCT/US01/06113

19

```

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ggc aat cac 289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His
80 85 90

act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gai ttg gtc ttc gaa caa aaa 337
Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys
95 100 105 110

ccu atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac aat cat cat cat 385
Leu Ile Ser Glu Gln Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
115 120 125

cat cat tga 394
His His

```

<210> 45
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

```

<400> 45
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg 15
1 5 10

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr 30
20 25 30

Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met 45
35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr 60
50 55 60

Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu 80
65 70 75 80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser 95
85 90 95

Cys Arg Cys Met Ser Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile 110
100 105 110

Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His 125
115 120 125

```

<210> 46
 <211> 391
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (6)..(388)

```

<400> 46
ggatccct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa tct att gat aat gag 49
1 5 10
Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

- 20 -

```

tgg aga aag act cag tgc atg ccg aga gag gtg tgt atc gac gtg ggg 97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly
15 20 25 30

aag gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg 145
Lys Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Cys Pro Pro Cys Val
35 40 45

tcc atg tac aga tgt gga ggt tgc tgc aat gac gaa gga ctg gag tgc 193
Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
50 55 60

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa 241
Val Pro Thr Thr Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
65 70 75

cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac 289
Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn
80 85 90

aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc 337
Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
95 100 105 110

atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 395
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
115 120 125

cat tga 391
His

<210> 47
<211> 127
<212> CBT
<213> Artificial Sequence

<400> 47
Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
1 5 10 15
Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu
20 25 30
Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val
35 40 45
Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
50 55 60
Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
65 70 75 80
Gln Gly Glu His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
85 90 95
Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
100 105 110
Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
115 120 125

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

21

```

<210> 48
<211> 397
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
<221> CDS
<222> (8)..(394)

<400> 48
ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa tct att gat aat gag 49
      Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu
      1           5           10

tgg aga aag acc cag tgc atg ccg aga gag gtg tgt atc gac gtg ggg 97
      Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly
      15           20           25           30

aag gaa ttt gga gtc ggg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg 145
      Lys Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val
      35           40           45

tcc gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
      Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
      50           55           60

atg aac acg tcc acg agc tac ctg agc aag acg ctg ttt gaa att aca 241
      Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
      65           70           75

gtg cct ctg tct caa ggg ccg aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat 289
      Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
      80           85           90

cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat tgc gtc ttc gaa caa 337
      His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln
      95           100           105           110

aaa ctg atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
      Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
      115           120           125

cat cat cat tga 397
      His His His

<210> 49
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 49
Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
1           5           10           15

Lys Thr Glu Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu
20           25           30

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

22

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

<210> 50

<211> 322

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (81)..(322)

<400> 50

ggatcct ggc cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat ccc atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt gga gtc ggc aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45
 gtg tac aga tct ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
 50 55 60
 ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa cct 241
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro
 65 70 75
 cac caa ggg cag caa atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac aaa 289
 His Gln Gly Glu His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
 80 85 90
 tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat tgg gtc ttc 322
 Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe
 95 100 105

WO 01/62942

PCT/US01/06113

23

<210> 51
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 51
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15
 Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Phe Phe Gln Glu Phe
 20 25 30
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
 50 55 60
 Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
 65 70 75 80
 Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ile Gln His Asn Lys Cys Glu
 85 90 95
 Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe
 100 105

<210> 52
 <211> 388
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(385)

<400> 52
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa ctg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat ccc atc gag aca ctg gtg gaa atc ttc cag 97
 Glu Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45
 gtg tac aga tgl ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc atg 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met
 50 55 60
 aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttc gaa att aaa cct 241
 Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro
 65 70 75
 cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac aaa 289
 His Gln Gly Glu His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys

WO 01/62942

PCT/US01/06113

24

```

      80              85              90
tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc bta qaa caa aaa ctc atc 337
Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
95              100              105              110

tcx gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat 385
Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
115              120              125              130

tga 388

<210> 53
<211> 126
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 53
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
1 5 10 15
Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
20 25 30
Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
35 40 45
Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn Thr
50 55 60
Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro His Gln
65 70 75 80
Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu
85 90 95
Cys Arg Pro Lys Lys Asp Asn Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
100 105 110
Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
115 120 125 130

<210> 54
<211> 388
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
<221> CDS
<222> (8)..(385)

<400> 54
ggatcct ggg cag aat cat cxc gaa gtg gtg aaa ttc stg gat gtc tat 49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
1 5 10
cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gat atc ttc cag 97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln

```


WO 01/62942

PCT/US01/06113

25

```

15          20          25          30
gaa ttt gga gtc ggc aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
35          40          45
gig tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt 153
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
50          55          60
ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa cct 241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro
65          70          75
cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac aaa 269
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
80          85          90
tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc atc 337
Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
95          100          105          110
tca aaa ggg gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat 385
Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
115          120          125

tga 388

<210> 55
<211> 126
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 55
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
1 5 10 15

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

<210> 56
<211> 388

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(385)

<400> 55

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
      1             5             10

```

```

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
      15             20             25             30

```

```

gaa ttt gga gtc gag aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
      35             40             45

```

```

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc atg 193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met
      50             55             60

```

```

aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa cct 241
Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro
      65             70             75

```

```

cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac aaa 289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
      80             85             90

```

```

tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc atc 337
Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
      95             100             105             110

```

```

tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat 385
Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
      115             120             125

```

```

tga 388

```

<210> 57

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 57

```

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
      1             5             10             15

```

```

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
      20             25             30

```

```

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
      35             40             45

```

```

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
      50             55             60

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

27

```

Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro His Gln
65      70      75      80

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu
85      90      95

Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
100     105     110

Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
115     120     125

<210> 58
<211> 322
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>
<221> CDS
<222> (8)..(322)

<400> 58
ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
      1      5      10

cag cgc agc tac tgc cat cgg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
      Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Glu
      15      20      25      30

gaa ttt gga gtc ggc aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
      Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
      35      40      45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gac tgc gtt 193
      Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
      50      55      60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca cct 241
      Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro
      65      70      75

cac cca ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ggc aat cac act tcc 289
      His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
      80      85      90

tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc 322
      Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe
      95     100     105

<210> 59
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 59
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
1      5      10     15

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

28

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
 50 55 60
 Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
 65 70 75 80
 Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg
 85 90 95
 Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe
 100 105

<210> 60
 <211> 388
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA
 <220>
 <221> CDS
 <222> [6]..(385)

<400> 60
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45
 gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc atg 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met
 50 55 60
 aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa cct 241
 Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro
 65 70 75
 cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act tcc 289
 His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
 80 85 90
 tgc gga tgc atg tct xag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aca ctc atc 337
 Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
 95 100 105 110
 tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat 385
 Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

WO 01/62942

PCT/US01/06113

29

tga

388

<210> 61
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 61
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15
 Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn Thr
 50 55 60
 Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro His Gln
 65 70 75 80
 Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg
 85 90 95
 Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 100 105 110
 Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 62
 <211> 388
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (6) .. (389)

<400> 62
 ggatccct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aac ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat cag atc gag aca ctc gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt gaa gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45
 gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Glu Cys Val
 50 55 60

WO 01/62942

PCT/US01/06113

30

```

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aac cct 241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro
      65              70              75

cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act tcc 289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
      80              85              90

tgc cga tgc atg tct aag ctg gat atg gtc ttc gaa caa aaa ctg atc 337
Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
      95              100              105

tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat 385
Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
      110              115              120              125

tga 388

```

<210> 63
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

```

<400> 63
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1              5              10              15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
20              25              30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
35              40              45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
50              55              60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
65              70              75              80

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg
85              90              95

Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
100              105              110

Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
115              120              125

```

<210> 64
 <211> 388
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (R)..(385)

<400> 64

WO 01/62942

PCT/US01/06113

31

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aat ttc atg gat gtc tat 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
      1           5           10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gat atc ttc cag 97
      Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
      15           20           25           30

gaa ttt gga gtc ggg aca aac acc ttc ttc aag caa cca tgt gtg tcc 145
      Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
      35           40           45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc atg 193
      Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Glu Cys Met
      50           55           60

aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa cct 241
      Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro
      65           70           75

cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act tcc 289
      His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
      80           85           90

tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aac ctc atc 337
      Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
      95           100           105           110

tcx gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat 385
      Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
      115           120           125

tga 388

<210> 65
<211> 126
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 65
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
1           5           10           15
Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
20           25           30
Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
35           40           45
Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
50           55           60
Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro His Gln
65           70           75           80
Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg
85           90           95
Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
100           105           110
Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

32

115 120 125

<216> 66
 <211> 394
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(391)

<400> 66
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gal gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtc 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
 50 55 60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
 65 70 75

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc acc ttt ctc cag cat 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
 80 85 90

aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aca 337
 Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys
 95 100 105 110

ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat 385
 Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
 115 120 125

cat cat tga 394
 His His

<210> 67
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 67
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10
 Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe

WO 01/62942

PCT/US01/06113

33

```

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

<210> 60
<211> 394
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<221> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA
<222>
<223> CDS
<224> (1)..(391)

<400> 68
ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aac ttc atg gat gtc tat 49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
      1              5              10
cag cgc agc tac tgc cat cgc atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
      15              20              25              30
gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag aca cca tgt gtg tcc 145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
      35              40              45
gtg tac aga tgc ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc atg 193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met
      50              55              60
aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca gtg 241
Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val
      65              70              75
cct ctc tct caa ggg ccc aac cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat 289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
      80              85              90
aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa 337
Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys
      95              100              105              110
ctc atc tca gaa gag gat ctg nat agc gcc gtc gac cat cat cat cat 365

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

34

Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
 115 120 125

cat cat tga 394
 His His

<210> 69
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 69
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15
 Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Gln Phe
 20 25 30
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn Thr
 50 55 60
 Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80
 Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
 85 90 95
 Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
 100 105 110
 Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 70
 <211> 394
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(391)

<400> 70
 ggagcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 43
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca atg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgc gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45

WO 01/62942

PCT/US01/06113

35

```

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt 193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
50 55 60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtc 241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
65 70 75

cct ctc tct caa gag ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag ctt 289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
80 85 90

aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa 337
Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Arg Leu Val Phe Glu Gln Lys
95 100 105

ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gag cat cat cat cat 385
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
110 115 120 125

cat cat bga 394
His His

```

<210> 71
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

```

<400> 71
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
1 5 10 15
Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
20 25 30
Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
35 40 45
Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
50 55 60
Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
65 70 75 80
Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
85 90 95
Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
100 105 110
Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
115 120 125

```

<210> 72
 <211> 394
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

WO 01/62942

PCT/US01/06113

36

```

<220>
<221> CDS
<222> (8) .. (391)

<400> 72
ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtc gtg aaa ttc atg gat gtc tat 48
    Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
        1           5           10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac ahd ttc cag 97
    Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
        15           20           25           30

gaa ttt gga gtc gcg aca zaa acc ttc ttc aag cca cca tgt gtc ttc 145
    Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
        35           40           45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc atg 193
    Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met
        50           55           60

aac aag ttc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca gtc 241
    Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val
        65           70           75

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat 289
    Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
        80           85           90

aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa 337
    Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys
        95           100           105           110

ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gtc gtc gac cat cat cat cat 385
    Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
        115           120           125

cat cat tga 394
His His

<210> 73
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 73
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
    1           5           10

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
    20           25           30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
    35           40           45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
    50           55           60

Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu
    65           70           75           80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

37

```

      85              90              95
Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Glu Lys Leu Ile
      100              105              110
Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
      115              120              125

<210> 74
<211> 394
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<222> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA
<220>
<221> CDS
<222> (8)..(391)

<400> 74
ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
      1      5      10
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr

      15      20      25      30
cag cgt agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Lys Phe Gln

      35      40      45
gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser

      50      55      60
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt 193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val

      65      70      75
ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val

      80      85      90
cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat cxc 209
Pro Leu Ser Glu Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His

      95      100      105      110
act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg aat ttg gtc ttc gaa caa aaa 337
Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asn Leu Val Phe Glu Gln Lys

      115      120      125
ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat 385
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His

      130      135
cat cat tga 394
His His

<210> 75
<211> 128
<212> PRT

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

38

<212> Artificial Sequence

<400> 75

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

<210> 76

<211> 328

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 76

ggatccat ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag ggc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt ggc gtc gcg acn aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45
 gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc atg 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met
 50 55 60
 aac acg ttc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca gtc 241
 Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val
 65 70 75
 cct ctc tct cag ggg ccc aca cca gtg aca atc agc ttt gcc aat cac 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His

WO 01/62942

PCT/US01/06113

39

```

      80              85              90
act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gctcttc      328
Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu
  95              100              105

<210> 77
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 77
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
  1              5              10              15
Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
      20              25              30
Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
      35              40              45
Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn Thr
      50              55              60
Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu
      65              70              75              80
Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
      85              90              95
Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu
      100              105

<210> 78
<211> 394
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
<221> CDS
<222> (8)..(391)

<400> 78
ggatcct gga cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat      49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
  1              5              10
cag cgc agc tac tgc cat cag atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag      97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
  15              20              25              30
gaa ttt gga gtc ggc aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc      145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
      35              40              45
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt      193
Val Tyr Arg Cys Gly Cys Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
      50              55              60

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

40

```

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att acc gtc 241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln ile Met Arg Ile Thr Val
      65              70              75

ccr ctc tct caa ggg ccc aac cca gtc aca atc agc ttt gcc aat cae 289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His
      80              85              90

act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat tgg gtc ttc gaa cca aaa 327
Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys
      95              100              105

ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat 385
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
      115              120              125

cat cat tga 394
His His

```

<210> 79
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

```

<400> 79
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1              5              10              15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
      20              25              30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
      35              40              45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
      50              55              60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
      65              70              75              80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
      85              90              95

Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
      100              105              110

Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
      115              120              125

```

<210> 80
 <211> 392
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA
 <222>
 <223> CDS
 <224> (8) .. (169)

WO 01/62942

PCT/US01/06113

41

```

<400> 80
ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
    Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
        1         5         10

cag tgc agc tac tgc cat cag atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
    Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
        15         20         25         30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
    Gln Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
        35         40         45

gtg tac aga tgt ggg ttg ctg caa tagtgagggg ctgaagtcca tgaacacgtc 199
    Val Tyr Arg Cys Gly Leu Leu Gln
        50

cagagatcac ctccgcaaga cgcgttttga aattacagtg cctctctctc aagggcccaa 259
accagtgaca atcagctttg ccaatccac ttcttgccga tgcctgtctc agctggattt 319
ggctcttcga caaaaactca tctcagaaga ggaatctaat agcgccgtcg accatcatca 379
tcattatcat tga 392

<210> 81
<211> 54
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 81
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg 49
    1         5         10         15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe 97
    20         25         30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr 145
    35         40         45

Arg Cys Gly Leu Leu Gln 199
    50

<210> 82
<211> 391
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
<221> CDS
<222> (8)..(388)

<400> 82
ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
    Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
        1         5         10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gaa atc ttc 97

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

42

```

Tyr Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
15      20      25      30
cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc ctg 145
Gln Glu Tyr Pro Asp Gln Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
35      40      45
ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tcc aat gac gac ggg ctg gag tgc 193
Pro Leu Met Asn Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
50      55      60
gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aac 241
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
65      70      75
cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctg cag cat aac 289
Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn
80      85      90
aaa tgt gaa tgt aga cca aag aac gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctg 337
Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Gln Gln Lys Leu
95      100      105      110
atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
115      120      125
cat tga
His 391

<210> 83
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 83
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Tyr Arg
1      5      10      15
Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
20      25      30
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
35      40      45
Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
50      55      60
Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Tie Met Arg Tie Lys Pro His
65      70      75      80
Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
85      90      95
Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Gln Gln Lys Leu Ile Ser
100      105      110
Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
115      120      125

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

43

<210> 84
 <211> 291
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA
 <222>
 <223>
 <224> CDS
 <225> (8)...(388)
 <400> 84
 ggatccct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Glu Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
 tgg tga aag act cag tgc atg ccg etc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30
 cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45
 ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 192
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
 50 55 60
 atg aac aag tcc acg agc tac etc aag aag aag ctg ttt gaa att aen 241
 Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Tyr Leu Phe Glu Ile Lys
 65 70 75
 cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt etc cag cat aac 289
 Pro His Glu Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn
 80 85 90
 aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa etc 337
 Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 95 100 105 110
 atc taa gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125
 cat tga 391
 His
 <210> 85
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <400> 85
 Gly Glu Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15
 Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 20 25 30

WO 01/62942

PCT/US01/06113

44

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

<210> 86
 <211> 331
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA
 <230>
 <231> CDS
 <232> (8)..(388)

<400> 86
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
 tgg aga aag act cag tgc atg cag atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30
 cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45
 ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
 50 55 60
 gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aac 241
 Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
 65 70 75
 cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac 289
 Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn
 80 85 90
 aaa tgt gan tgt aga ccc aag aaa gat tgg gtc ttc gaa caa aac ctc 337
 Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 95 100 105 110
 atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125

WO 01/62942

PCT/US01/06113

45

cat tga
His

392

<210> 97
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 87
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg 15
 1 5 10
 Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu 30
 20 25 30
 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu 45
 35 40 45
 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro 60
 50 55 60
 Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His 80
 65 70 75 80
 Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys 95
 85 90 95
 Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser 110
 100 105 110
 Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His 125
 115 120 125

<210> 88
 <211> 391
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8) .. (388)

<400> 88
 ggatccct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu 1 5 10
 15
 tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe 15 20 25 30
 cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val 35 40 45
 ccc cag atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat aat gag ggg ctg cag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys 115 120 125

WO 01/62942

PCT/US01/06113

46

```

      50              55              60
atg sac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa 241
Met Ser Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys
      65              70              75
cct sac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac 289
Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn
      80              85              90
aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc 327
Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
      95              100              105              110
atc taa gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
      115              120              125
cat tga
His

<210> 89
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 89
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
  1              5              10              15
Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
  20              25              30
Tyr Pro Asp Glu Ile Gln Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
  35              40              45
Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn
  50              55              60
Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro His
  65              70              75              80
Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
  85              90              95
Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
  100              105              110
Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
  115              120              125

<210> 90
<211> 391
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
<221> CDS

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

47

<222> (8) (305)

<400> 90
 ggatccct ggg cag aat cat cat gaa gtg gtg aag tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac att ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Glu Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45

ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
 50 55 60

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa 241
 Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
 65 70 75

cct cac caa ggg cag cgc atc gga gag atg agc ttt gcc aat cgc act 289
 Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr
 80 85 90

tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aag ctc 327
 Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 95 100 105 110

atc cca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125

cat tga 391
 His

<210> 91

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 91
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg 15
 1 5 10

Lys Thr Gln Cys Met Ser Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu 30
 20 25 30

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu 45
 35 40 45

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro 60
 50 55 60

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His 80
 65 70 75 80

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys 95
 85 90 95

WO 01/62942

PCT/US01/06113

48

Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
100 105 110

Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His Min
115 120 125

<210> 92

<211> 391

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)...(388)

<400> 92

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
1 5 10

tgg aga aag act cag tgc atg cag atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
15 20 25 30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
35 40 45

ccc ctg atg aga tct ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggu ctg gag tgc 193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
50 55 60

atg aac atg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaz 241
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys
65 70 75

cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act 289
Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr
80 85 90

tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc 337
Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
95 100 105 110

atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
115 120 125

cat tga

391

His

<210> 93

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 93

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg

WO 01/62942

PCT/US01/06113

49

```

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

Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
100           105           110
Glu Gln Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
115           120           125

<210> 94
<211> 391
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
<221> CDS
<222> (8)..(328)

<400> 94
ggatccct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 19
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
      1           5           10
tgg aga aag act cag tgc atg cag atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 27
      Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
      15           20           25           30
cag gaa tac cat gat gag atc gag tcc atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
      Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Gln Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
      35           40           45
ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
      Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
      50           55           60
ggt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa 241
      Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
      65           70           75
cct cac cca ggc cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act 289
      Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr
      80           85           90
tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa atc 337

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

50

```

Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
95      100      105      110
atc tca gaa gag gat ctg aat ggc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
Tle Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
115      120      125
cat tga
His 391

<210> 95
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<400> 95
Gly Glu Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
5      10      15
Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
20      25      30
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
35      40      45
Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro
50      55      60
Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
65      70      75      80
Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys
85      90      95
Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
100      105      110
Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
115      120      125

<210> 95
<211> 391
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
<221> CDS
<222> (9)..(388)

<400> 96
ggatccat cgg cag aat cat ccc gaa gtc gtc aag tct att gat aat gag 49
1      5      10
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
15
tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtc gac atc ttc 97
15      20      25      30
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

51

```

cag gaa tac cct gat gag atc gng lac atc ttc aag cca tcc tgc gtc 145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
      35      40      45

ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggc ctg cag tgc 193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
      50      55      60

atg aac acg tcc act agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa 241
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys
      65      70      75

cct cac daa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act 289
Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr
      80      85      90

tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttc gtc ttc gaa caa aaa ctc 337
Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
      95     100     105     110

atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
      115     120     125

cat tga
His
      391

```

<210> 97
 <211> 127
 <212> FRT
 <213> Artificial Sequence

```

<400> 97
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
1      5      10

Lys Thr Glu Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
20     25     30

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
35     40     45

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn
50     55     60

Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro His
65     70     75     80

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys
85     90     95

Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
100    105    110

Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
115    120    125

```

<210> 98
 <211> 397
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

WO 01/62942

PCT/US01/06113

52

<220>

<221> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(394)

<400> 98

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag      49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
        1             5             10

```

```

tgg agc aag act cag tgc atg cgg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc      97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
  15             20             25             30

```

```

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc gag cca tcc tgc gtg      145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
  35             40             45

```

```

ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc      193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
  50             55             60

```

```

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca      241
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr
  65             70             75

```

```

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag      289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln
  80             85             90

```

```

cat aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa      337
His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Glu
  95             100             105             110

```

```

aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat      385
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
  115             120             125

```

```

cat cat cat taa                                     397
His His His

```

<210> 99

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 99

```

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
  1             5             10             15

```

```

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
  20             25             30

```

```

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
  35             40             45

```

```

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
  50             55             60

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

53

```

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro
65          70          75
Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn
85          90          95
Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Cys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
100        105        110
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
115        120        125
His

```

<210> 100
 <211> 397
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> {8}..{394}

```

<400> 100
ggatccct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
      1          5          10
tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
      Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
      15          20          25
cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
      Gln Glu Tyr Pro Asp Gln Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
      35          40          45
ccc ctg atg aga tgt ggg ggc tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
      Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
      50          55          60
atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca 241
      Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
      65          70          75
gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag 289
      Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln
      80          85          90
cat aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa 337
      His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln
      95          100        105        110
aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
      Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
      115        120        125
cat cat cat tga 397
His His His

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

54

<210> 101
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 101
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15
 Lys Thr Glu Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 20 25 30
 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 35 40 45
 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn
 50 55 60
 Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro
 65 70 75 80
 Leu Ser Glu Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Glu His Asn
 85 90 95
 Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 100 105 110
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125
 His

<210> 102
 <211> 397
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(394)

<400> 102
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
 tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Tyr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30
 cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45
 ccc ctg atg aga tct ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
 50 55 60

WO 01/62942

PCT/US01/06113

55

```

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att cca 241
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Glu Ile Met Arg Ile Thr
      65              70              75

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag 289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Glu
      80              85              90

cat aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa cca 337
His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Glu
      95              100              105

aaa gtc atc tca gaa gag gat ctg aat ayc gcc gtc gac cat cat cat 385
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
      110              115              120

cat cat cat tga 397
His His His

```

<210> 103
 <211> 129
 <212> FRT
 <213> Artificial Sequence

```

<400> 103
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
  1              5              10              15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
      20              25              30

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
      35              40              45

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro
      50              55              60

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro
      65              70              75              80

Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn
      85              90              95

Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
      100              105              110

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
      115              120              125

His

```

<210> 104
 <211> 397
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA
 <222>

WO 01/62942

PCT/US01/06113

56

<221> CDS
 <222> (8).. (394)

<400> 104
 ggatccct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10

 tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc ggg aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30

 cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45

 ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
 50 55 60

 atg aac acg ttc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca 241
 Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
 65 70 75

 gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag 289
 Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln
 80 85 90 :

 cat aac aac tgt gaa tgt aga cca aag aca gat ttg gtc ttc gaa cca 337
 His Asn Lys Cys Gln Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln
 95 100 105 110

 aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
 Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
 115 120 125

 cat cat cat tga 397
 His His His

<210> 105
 <211> 129
 <212> FRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 105
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15

 Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 20 25 30

 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 35 40 45

 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn
 50 55 60

 Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro
 65 70 75 80

 Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn
 85 90 95

WO 01/62942

PCT/US01/06113

57

Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 100 105 110

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125

His

<210> 166

<211> 397

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (6)...(394)

<400> 106

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtc gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Gln Ile Gln Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45

ccc ctg atg aga tgt gga ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
 50 55 60

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca 241
 Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr
 65 70 75

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat 289
 Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
 80 85 90

cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa 337
 His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln
 95 100 105 110

aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
 Lys Leu Ile Ser Gln Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
 115 120 125

cat cat cat tga 397
 His His His

<210> 107

<211> 129

<212> DRT

<213> Artificial Sequence

WO 01/62942

PCT/US01/06113

58

<400> 107
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15
 Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 20 25 30
 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 35 40 45
 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
 50 55 60
 Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro
 65 70 75 80
 Leu Ser Glu Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr
 85 90 95
 Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 100 105 110
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125
 His

<210> 108
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA
 <230>
 <231> CDS
 <232> (9)..(394)
 <400> 108
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gta gta aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
 tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gta gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Phe
 15 20 25 30
 cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gta 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45
 ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
 50 55 60
 atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca 241
 Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
 65 70 75
 ctg cct ctc tct caa ggg ccc aca cca gta aca atc agc ttt gcc aat 289

WO 01/62942

PCT/US01/06113

59

```

Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
  80                      85                      90
cac aat tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gac ttg gtc ttc gaa caa 337
His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Glu
  95                      100                      105                      110
aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc ggc gtc gac cat cat cat 385
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
  115                      120                      125

cat cat cat tga 397
His His His

<210> 109
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 109
Gly Gln Asn His His Gln Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
  1                      5                      10                      15
Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
  20                      25                      30
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
  35                      40                      45
Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn
  50                      55                      60
Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro
  65                      70                      75                      80
Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr
  85                      90                      95
Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
  100                      105                      110
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
  115                      120                      125
His

<210> 110
<211> 397
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<222> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
<221> CDS
<222> (8)..(394)

<400> 110
ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

60

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
 tgg aga aag act cag tgc atg cgg atc gag acc ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30
 cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45
 ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
 50 55 60
 gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca 241
 Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr
 65 70 75
 gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat 289
 Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
 80 85 90
 cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa 337
 His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln
 95 100 105 110
 aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
 Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
 115 120 125
 cat cat cat tga 397
 His His His

 <219> 111
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <400> 111
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15
 Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 20 25 30
 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 35 40 45
 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro
 50 55 60
 Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro
 65 70 75 80
 Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr
 85 90 95
 Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 100 105 110
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His

WO 01/62942

PCT/US01/06113

61

115 120 125

His

<210> 112
 <211> 397
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Hybrid DNA

<220>
 <221> UNK
 <222> (9)..(384)

<400> 112
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 45
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10

tgg aga aag act cag tgc atg cag atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45

ctc ctg atg aga tgt gga ggt tgc tgc aat agt gag gga ctg cag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
 50 55 60

atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca 241
 Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
 65 70 75

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat 289
 Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
 80 85 90

cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa 337
 His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Glu
 95 100 105 110

aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
 Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
 115 120 125

cat cat cat tga 397
 His His His

<210> 113
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 113
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15

WO 01/62942

PCT/US01/06113

62

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

<210> 114
 <211> 1645
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (322)..(768)
 <223>

<400> 114
 gggatcggg ccgcccggt acggaggac ctggagtggc actgggggccc cgaaggacca 60
 tccccgggac cgcctggcc ctggggccc cgcggccgc ggcgctccc cgtcgggttc 120
 ccagccaca gcctaccta cgggtctctg actccgcaag gctccagaa gatgctcga 180
 ccacggccg gggcctcggg gcagcagbga gggaggctc cagccccca ctacgtcttt 240
 ctctctctgt gccaggggct ccccggggga tgagcagctt gattttccct cggagcccc 300
 tggctcggga cgtctgagaa g atg ccc gtc atg agg ctg ttc cct tgc ttc 351
 Met Pro Val Met Arg Leu Phe Pro Cys Phe
 1 5 10
 ctg cag ctc ctg gcc ggg ctg ggc ctg cct gct gtg ccc ccc cag cag 399
 Leu Gln Leu Leu Ala Gly Leu Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln
 15 20 25
 tgg gcc ttg tct gct ggg aac gcc tgg tca gag gtg gaa gtg gtc ccc 447
 Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro
 30 35 40
 ttc cag gaa gtg tgg ggc cgc agc tac tgc cgg ggc ctg gag agg ctg 495
 Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu
 45 50 55

WO 01/62942

PCT/US01/06113

63

```

gtg gac gtc gtc tcc gag tac ccc agc gag gtc gag cac atg ttc agc 543
Val Asp Val Val Ser Glu Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser
60 65 70

cca tcc tgt gtc tcc atg atg agc tgc acc ggc tgc tgc ggc gat gag 591
Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu
75 80 85 90

aat atg cac tgt gtc ccc gtc gag atg gcc aat gtc acc atg cag ctc 639
Asn Leu His Cys Val Pro Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu
95 100 105

cta aag atc cgt tct ggg gac cgg ccc tcc tac gtc gag atg acg ttc 687
Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe
110 115 120

tct cag cac gtt cgc tgc gaa tgc cgg cct atg cgg gag aag atg aag 735
Ser Gln His Val Arg Cys Gln Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys
125 130 135

ccg gaa agg tgc gcc gat gct gtt ccc cgg agg taaccacaccc cttggaggag 788
Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg
140 145

agagaccoccc caccgggctc gtgtatttat taacgtcaca ctcttcagtg actcctgctg 849
gtacctgccc tctatttatt agccaactgt tccccgctg aatgcctcgc tcccttaag 908
acggggggcca ggaaggaca ggaacctcag gaattcagtg ccttcacaaa cgtgagagaa 968
agagagagagc cagccacaga cccctgggag ctcccgcttt gaaagaagcc agcacgtyg 1028
cctcgtgagg ggcagctag gccccagagg cctcggaggt ctccaggagc ctgcagaagg 1088
aaggaagggg gccctgctac ctgtttcttg gccctcggct ctgcacagac aagcagccct 1148
tgctttcggg gctcctgtcc aaagtaggga tgcggattct gctggggccg ccacggcctg 1208
gtgggtggaa ggcgggcagc gggcgagggg gattcagcca ctcccccctc tctctctgaa 1268
gatcagaaca ttacgtctg gagaacagtg gttgcctggg ggcttttgcc actccttgct 1328
cccctgctc tccctcaca ctctgcatt tcttctact gggacattgt tctttcggc 1388
cggggtgcca ccacctgccc cccactaaga gacacataca gagtgggccc cgggctggag 1448
aagagctgc ctgagtgaga aacagctcag ccagtgggga tgagytacc agggggaggag 1508
ctgtgcgtc ccagctgag gcagtgccg gggagcaggt tccccaagg ccttgccacc 1568
cccaacagct gtcctgccc ggcacatctg ctgcacagc agattctctt gaataagta 1628
ttctagtgty gaacgc 1645

<210> 175
<211> 149
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 115

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

64

```

Met Pro Val Met Arg Leu Phe Pro Cys Phe Leu Gln Leu Leu Ala Gly
 1      5      10      15
Leu Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly
 20      25      30
Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly
 35      40      45
Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu
 50      55      60
Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu
 65      70      75      80
Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro
 85      90      95
Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
100      105      110
Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys
115      120      125
Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp
130      135      140
Ala Val Pro Arg Arg
145

<210> 116
<211> 570
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (4)..(570)

<400> 116
acc atg agc cct ctg ctc cgc cgc ctg ctg ctc gcc gca ctc ctg cag 40
Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln
 1      5      10      15
ctg gcc ccc gcc cag gcc cct gtc tcc cag cct gat gcc cct gcc ccc 96
Leu Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His
 20      25      30
cag agg aaa gtg gtg tca tgg ata gat gtg tat act cgc gct acc tgc 144
Gln Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys
 35      40      45
cag ccc cgg gag gtg gtc gtg ccc ttg act gtg gag ctc atg gcc acc 192
Gln Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr
 50      55      60
gtg gcc aaa cag ctg gtg ccc agc tgc gtg acc gtg cag cgc tgt ggt 240
Val Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly
 65      70      75
ggc tgc tgc cct gac gat ggc ctg gag tgt gtc ccc act ggg cag cac 298
Gly Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His

```


WO 01/62942

PCT/US01/06113

65

80	85	90	95
caa gtc cgg atg cag atc ctc atg atc cgg tac cgg agc agl cag ctg	336		
Gln Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu	100	105	110
ggg gag atg tcc ctg gaa gaa cac agc cag tgt gaa tgc aga cct aaa	384		
Gly Glu Met Ser Leu Gln Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys	115	120	125
aaa aag gac agl ggt gtg aag cca gac agc ccc agg ccc ctc tgc cca	432		
Lys Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Ser Pro Arg Pro Leu Cys Pro	130	135	140
cgc tgc acc cag cac cac cag cgc cct gac ccc cgg acc tgc cgc tgc	480		
Arg Cys Thr Gln His His Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Cys Arg Cys	145	150	155
cgc tgc cgc cgc cgc agc ttc ctc cgt tgc caa ggg cgg ggc tta gag	528		
Arg Cys Arg Arg Arg Ser Phe Leu Arg Cys Gln Gly Arg Gly Leu Glu	160	165	170
ctc aac cca gac acc tgc agg tgc cgg aag ctg cga agg tga	576		
Leu Asn Pro Asp Thr Cys Arg Cys Arg Lys Leu Arg Arg	180	185	
<210> 117			
<211> 188			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 117			
Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu	1	5	10
Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln	20	25	30
Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln	35	40	45
Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val	50	55	60
Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly	65	70	75
Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln	85	90	95
Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly	100	105	110
Gln Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys	115	120	125
Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Ser Pro Arg Pro Leu Cys Pro Arg	130	135	140
Cys Thr Gln His His Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Cys Arg Cys Arg	145	150	155
	160		

WO 01/62942

PCT/US01/06113

66

Cys Arg Arg Arg Ser Phe Leu Arg Cys Gln Gly Arg Gly Ile Glu Leu
 165 170 175
 Asn Pro Asp Thr Cys Arg Cys Arg Lys Ile Arg Arg
 180 185

 <210> 118
 <211> 2029
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CDS
 <222> (411)..(1472)

 <400> 118
 gttgggttcc agctttctgt agctgtgagc attggtggcc acaccacctc ttacaaagc 60
 aactagaacc tgcggcctac attggagaga tttttttant ttctggaca tgaagtaaat 120
 ctagaagtgc ctctaatctt aggtagaaga catgtccacc ttctgattat ttttgagaa 180
 catttttgatt tttttctct ctctctccc accctcaga ttgtgcacaa aagcgtacc 240
 ttgcttaatt gaaataatt cattggattt tgatragaac tgattatttg gttttctgtg 300
 tgaagtttg aggtttcaca ctttctctt ggagatgct tttgaaaca attttctc 360
 gctgctgat gtcaactgct tagtaatag tggatattga aatattcaca atg tac 416
 Met Tyr
 1
 aga gag tgg gta gtg gtg aat gtt ttc atg atg tlg tac gtc cag ctg 464
 Arg Glu Trp Val Val Val Asn Val Phe Met Met Leu Tyr Val Gln Leu
 5 10 15
 gtg cag gcc tcc agt aat gaa cat gga cca gtg aag cga tca tct cag 512
 Val Gln Gly Ser Ser Asn Glu His Gly Pro Val Lys Arg Ser Ser Gln
 20 25 30
 tct aca ttg gaa cga tct gaa cag cag atc agg gct gct tct agt ttg 560
 Ser Thr Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser Ser Leu
 35 40 45 50
 gag gaa cta ctt cga att act cat tct gag gac tgg aag ctg tgg aga 608
 Glu Glu Leu Leu Arg Ile Thr His Ser Glu Asp Trp Lys Leu Trp Arg
 55 60 65
 tgc agg ctg agg ctg aza agt ttt acc agt atg gac tct cgc tca gaa 656
 Cys Arg Leu Arg Leu Lys Ser Phe Thr Ser Met Asp Ser Arg Ser Ala
 70 75 80
 tcc cat cgg tcc act agg ttt ggc gca act ttc tat gac att gaa aca 704
 Ser His Arg Ser Thr Arg Phe Ala Ala Thr Phe Tyr Asp Ile Glu Thr
 85 90 95

 cta aaa gtt ata gat gaa gaa tgg caa aga act cag tgc agc cct aga 752
 Leu Lys Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Thr Gln Cys Ser Pro Arg
 100 105 110

WO 01/62942

PCT/US01/06113

67

gaa acg tgc gtc gag gtg gcc agt gag atg ggg aag agt acc aac aca 800
 Glu Thr Cys Val Glu Val Ala Ser Glu Leu Gly Lys Ser Thr Asn Thr
 115 120 125 130
 ctc ttc aag ccc cct tgt gtg aac gtg ttc cga tgt ggt ggc tgc tgc 848
 Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg Cys Gly Gly Cys Cys
 135 140 145
 aat gaa gag agc ctt atc tgt atg aac acc agc acc tgc tac att tcc 896
 Asn Glu Glu Ser Leu Ile Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Ile Ser
 150 155 160
 aaa cag ctc ttt gag ata tca gtg cct ttg aca tca gta cct gaa tta 941
 Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro Glu Leu
 165 170 175
 gtg cct gtt aaa gtt gcc aat cat aca ggt tgt aag tgc ttg cca aca 992
 Val Pro Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu Pro Thr
 180 185 190
 gcc tcc cgc cat cca tac tca att atc aga aga tcc atc cag atc cct 1040
 Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln Ile Pro
 195 200 205 210
 gaa gaa gat cgc tgt tcc cat tcc aag aaa ctc tgt cct att gac atg 1088
 Glu Glu Asp Arg Cys Ser His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile Asp Met
 215 220 225
 cta tgg gat agc aac aat tgt aat tgt gtt ttg cag gag gaa aat cca 1136
 Leu Trp Asp Ser Asn Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Glu Glu Asn Pro
 230 235 240
 ctt gct gga aca gaa gac cac tct cat ctc cag gaa cca gct ctc tgt 1184
 Leu Ala Gly Thr Glu Asp His Ser His Leu Gln Glu Pro Ala Leu Cys
 245 250 255
 ggg cca cac atg atg ttt gac gaa gat cgt tgc gag tgt gtc tgt aaa 1232
 Gly Pro His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val Cys Lys
 260 265 270
 aca cca tgt ccc aaa gat cta atc cag cac ccc aaa aac tgc agt tgc 1280
 Thr Pro Cys Pro Lys Asp Leu Ile Gln His Pro Lys Asn Cys Ser Cys
 275 280 285 290
 ttt gag tgc aaa gaa agt ctg gag acc tgc tgc cag aag cac aag cta 1328
 Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Thr Cys Cys Gln Lys His Lys Leu
 295 300 305
 ttt cac cca gac acc tgc agc tgt gag gac aga tgc ccc ttt cat acc 1376
 Phe His Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe His Thr
 310 315 320
 aga cca tgt gca agt ggc aaa aca gca tgt gca aag cat tgc cgc ttt 1424
 Arg Pro Cys Ala Ser Gly Lys Thr Ala Cys Ala Lys His Cys Arg Phe
 325 330 335
 cca aag gag aaa agg gct gcc cag ggg ccc caa agc cga aag aal cct 1472
 Pro Lys Glu Lys Arg Ala Ala Gln Gly Pro His Ser Arg Lys Asn Pro
 340 345 350
 tgattacgcy ttcaagctc cccatcccty taatttltta cagcatgcty ctttgcacag 1532

WO 01/62942

PCT/US01/06113

68

ttgtgttccac tgtttttttt ccaggtgtta aaaaaaat caattttaca cagcaccaca 1592
 gtgaatccag acaaaccttc cattccacc agctaaaggag tccctgggttc attgatggat 1652
 gtcctctagc tgcagatgcc tctgcgcacc aaggcatgga gaggagggga cccatgtaat 1712
 cctttttgtt agttttgttt ttgttttttg gtgaatgaga aaggatgtgt ggtcatggaa 1772
 tggcaggtgt cactatgctg attatccaga gcaatgagc aaxactgtag tctctgagtc 1832
 ctttgtatct cgcacctctt gtgaattatt ctgattcttt ttatgcaga atttgattcg 1892
 tctgacagtg actgacttct cgattactgt ccagcttata gttctccagt ttaatgaact 1952
 accatctgat gttctatatt taagtgtatt taagaaaaat aacacacatt attcaagcca 2012
 aaaaaaaaaa aaaaaaa 2029

<210> 119
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 119
 Met Tyr Arg Glu Trp Val Val Val Asn Val Phe Met Met Leu Tyr Val
 1 5 10 15
 Gln Leu Val Gln Gly Ser Ser Asn Glu His Gly Pro Val Lys Arg Ser
 20 25 30
 Ser Gln Ser Thr Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser
 35 40 45
 Ser Leu Glu Glu Leu Leu Arg Ile Thr His Ser Glu Asp Trp Lys Leu
 50 55 60
 Trp Arg Cys Arg Leu Arg Leu Lys Ser Phe Thr Ser Met Asp Ser Arg
 65 70 75 80
 Ser Ala Ser His Arg Ser Thr Arg Phe Ala Ala Thr Phe Tyr Asp Ile
 85 90 95
 Glu Thr Leu Lys Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Thr Gln Cys Ser
 100 105 110
 Pro Arg Glu Thr Cys Val Glu Val Ala Ser Glu Leu Gly Lys Ser Thr
 115 120 125
 Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg Cys Gly Gly
 130 135 140
 Cys Cys Asn Glu Glu Ser Leu Ile Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr
 145 150 155 160
 Ile Ser Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro
 165 170 175
 Glu Leu Val Pro Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu
 180 185 190
 Pro Thr Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln

WO 01/62942

PCT/US01/06113

69

```

195          200          205
Ile Pro Glu Glu Asp Arg Cys Ser His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile
210          215          220
Asp Met Leu Trp Asp Ser Asn Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Glu Glu
225          230          235          240
Asn Pro Leu Ala Gly Thr Glu Asp His Ser His Leu Gln Glu Pro Ala
245          250          255
Leu Cys Gly Pro His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val
260          265          270
Cys Lys Thr Pro Cys Pro Lys Asp Leu Ile Gln His Pro Lys Asn Cys
275          280          285
Ser Cys Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Thr Cys Cys Gln Lys His
290          295          300
Lys Leu Phe His Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe
305          310          315          320
His Thr Arg Pro Cys Ala Ser Gly Lys Thr Ala Cys Ala Lys His Cys
325          330          335
Arg Phe Pro Lys Glu Lys Arg Ala Ala Gln Gly Pro His Ser Arg Lys
340          345          350
Asn Pro

<210> 120
<211> 1830
<212> DNA
<213> Orf virus

<220>
<221> CDS
<222> (312)..(755)

<400> 120
cgccacgagc gccgcgaact gcgcgctgac ggcgctggcg accgcgctga cgcgcctgct 60
gccgcgagac cggcaccgga tcgcggaggg cggcaccgcy ccgtggacgc tgcctgctggc 120
ggctggcgcg gtcggcgctgc tcggcgctggt gccaatcttc ctgctgcgcc gcgcgctaag 180
aatagcgctt agatactcaa agtctatcca gacactttag gtgttaacttt gacttaaaaa 240
tgttaatact aacgccaaaa ttctgtagt tgtaagcaa tatataaat ttttaaaacg 300

knataccag c atg aag tta acn gct acy tta cam gtl gtt gtt gca ttg 350
Met Lys Leu Thr Ala Thr Leu Gln Val Val Val Ala Leu
1 5 10
tta ata tgt atg tat aat ttg cca gan tgc gtg tet cag agt aat gat 398
Leu Ile Cys Met Tyr Asn Leu Pro Glu Cys Val Ser Gln Ser Asn Asp
15 20 25

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

70

tca cct cct tca acc aat gac tgg atg cgt acc cta gac aaa agt ggt 146
 Ser Pro Pro Ser Thr Asn Asp Trp Met Arg Thr Leu Asp Lys Ser Gly
 30 35 40 45
 tgt aaa cct aga gat act gtt gtt tat ttg gga gaa gaa tat cca gaa 154
 Cys Lys Pro Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Pro Glu
 50 55 60
 agc act aac cta cax tat aat ccc cgg tgc gta act gtt aax cga tgc 162
 Ser Thr Asn Leu Gln Tyr Asn Pro Arg Cys Val Thr Val Lys Arg Cys
 65 70 75
 agt ggt tgc tgt aac ggt gac ggt caa ata tgt aca gcg gtt gaa aca 170
 Ser Gly Cys Cys Asn Gly Asp Gly Gln Ile Cys Thr Ala Val Glu Thr
 80 85 90
 aga aat aca act gta aca gtt tca gta acc ggc gtg tct agt tgc tct 178
 Arg Asn Thr Thr Val Thr Val Ser Val Thr Gly Val Ser Ser Ser
 95 100 105
 . ggt act aat agt ggt gta tct act aac ctt caa aga ata agt gtt aca 186
 Gly Thr Asn Ser Gly Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Ile Ser Val Thr
 110 115 120 125
 . gaa cac aca aag tgc gat tgt att ggt aga aca acg aca aca cct acg 194
 Glu His Thr Lys Cys Asp Cys Ile Gly Arg Thr Thr Thr Thr Pro Thr
 130 135 140
 acc act agg gaa cct aga cga taactaataa caaaaatgt ttatttttgt 202
 Thr Thr Arg Glu Pro Arg Arg
 145
 aaatacttaa ttattacaca ctttacaata atcccaaaaa taaattgggt gcccggaagg 845
 ctgcagctgg tgcgcgtgct gtgtcacaca ctgcgtattc gattcaagtt cactaacggc 905
 actaaactay ttgttgcgtg cagagtgtta acgttacgtc aaactaacat cttaactgtc 965
 cgtgacaaga actnaaactt gaaccacata tttttaaggt atatttaaca aaatcactca 1025
 cactcacaca atcataaaca ccacaaccac aaacaaacac gcattgagaa taatattctt 1085
 acttatcngt aacactniat gclgtacac aacgcacag agcagctga gtctgaacta 1145
 tgggggcaaa cyggaacgca ggcgcgavat aatcaactgag aatctccgca gcaacggctc 1205
 aaggacactc ctacgcctaa cggctgtttg tcattccccc gtgtgttcat ctcaacgac 1265
 attgtgacgg tcgcaagca cactttcaaa gtgcccgatg tggagaatt caccgtcgag 1325
 acacacacca taattaaaca agatcagtg ataaagagaga ttacgattct acagcaaccc 1385
 acgtgagant acggacctcg taattgttta gactagaaca cctctggtct aaacaacatg 1445
 tcogacttta gaacagagtt tatgacgat atgtaactgt gtcttttatg tagaagttat 1505
 cttttatgtc actcccttgt cttagatgag ttatacatga catgatgtat gtgtgccc 1565
 cggcgcgcgc ggcgcgcgc gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc 1625
 gctgagcgcg cgtcgcgcgc gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc 1685
 ccgcgcgcgc cctgcgcgc gaccagcgc cagcgcgcgc agtgcgcgc gaccgcgcgc 1745

WO 01/62942

PCT/US01/06113

71

cagtagagac cctcccgccg cagccggcgc accccacacc cgccttcacc cggccagacg 1905
ccacacaccac agccaacacag catgc 1930

<210> 121
<211> 146
<212> Fat
<213> Orf virus

<400> 121
Met Lys Leu Thr Ala Thr Leu Gln Val Val Val Ala Leu Leu Ile Cys
1 5 10 15
Met Tyr Asn Leu Pro Glu Cys Val Ser Gln Ser Asn Asp Ser Pro Pro
20 25 30
Ser Thr Asn Asp Trp Met Arg Thr Leu Asp Lys Ser Gly Cys Lys Pro
35 40 45
Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Pro Glu Ser Thr Asn
50 55 60
Leu Gln Tyr Asn Pro Arg Cys Val Thr Val Lys Arg Cys Ser Gly Cys
65 70 75 80
Cys Asn Gly Asp Gly Gln Ile Cys Thr Ala Val Glu Thr Arg Asn Thr
85 90 95
Thr Val Thr Val Ser Val Thr Gly Val Ser Ser Ser Ser Gly Thr Asn
100 105 110
Ser Gly Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Ile Ser Val Thr Glu His Thr
115 120 125
Lys Cys Asp Cys Ile Gly Arg Thr Thr Thr Thr Pro Thr Thr Thr Arg
130 135 140
Glu Pro Arg Arg
145

<210> 122
<211> 851
<212> DNA
<213> Orf virus

<220>
<221> CDS
<222> (2)..(223)

<400> 122
c ggc cac gcc gcc gcc aac tgc gcc ctc gcc cgc gtg gcc acc gcc ctg 49
Gly His Ala Ala Ala Asn Cys Ala Leu Ala Arg Val Ala Thr Ala Leu
1 5 10 15
acg cgc cgc gtg ccc gcc agc cgg cac gcc ctc gcc gag gcc gcc acg 97
Thr Arg Arg Val Pro Ala Ser Arg His Gly Leu Ala Gln Gly Gly Thr
20 25 30
ccg cgg tgg acc ctg ctg ctg gcc gtg gcc gcc gtg acc gtg ctc gcc 145
Pro Pro Trp Thr Leu Leu Leu Ala Val Ala Val Thr Val Leu Gly
35 40 45

WO 01/62942

PCT/US01/06113

72

gtg gtg ggg gtt tca ctg ctg cgg cgc ggc ctg cgg gta cgc tac cgc 193
 Val Val Ala Val Ser Leu Leu Arg Arg Ala Leu Arg Val Arg Tyr Arg
 50 55 60

ttc ggc cgg cgc gcc ggc ctg cgc ggc tag cugugcaaaa tgtaattcat 243
 Phe Ala Arg Pro Ala Ala Leu Arg Ala
 65 70

aacgcccaac ttctaaaggt gagggcccat gaagttgctc gtcggcatac tagtagccgt 303
 gtgcttcgac cagtatctgc tgaacggga cagcaacccg aaagatggt cogaagtgt 363
 gaaaggcagc gaggcgaagc ctaggccgat tgttggttct gtaagcgaga cgcacccaga 423
 gctgaactct cagcgggtca acccgccgtg tgtcaugttg atgcatgag cggggtgctg 483
 caacgacgag agcttggaat gcylccccc ggaagaagta aacgtgagca tggaaactct 543
 gggggcgtcg ggtcccggtg gtaacgggat gcaacgtctg agcttcgtag agcataagaa 603
 atgcatgtgt agaccaagat tcacaaccac gccacccgag acdacaagga cgcacagag 663
 acgcgcgtag aactttttat ggaacgcaga tccnaacgat ggtgagatc aggtacatgc 723
 cgaaganggc gccacggagc aaagtgaaaa aggaacugctt agcatgag accctccgcg 783
 cgcagcgcgc gcaacccac acccgcttc caccgcgag acgcaacac cgcagcnaac 843
 aagcatgc 851

<210> 123
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Orf virus

<400> 123
 Gly His Ala Ala Ala Asn Cys Ala Leu Ala Arg Val Ala Thr Ala Leu
 1 5 10 15
 Thr Arg Arg Val Pro Ala Ser Arg His Gly Leu Ala Glu Gly Gly Thr
 20 25 30
 Pro Pro Trp Thr Leu Leu Leu Ala Val Ala Val Thr Val Leu Gly
 35 40 45
 Val Val Ala Val Ser Leu Leu Arg Arg Ala Leu Arg Val Arg Tyr Arg
 50 55 60

Phe Ala Arg Pro Ala Ala Leu Arg Ala
 65 70

<210> 124
 <211> 2309
 <212> DNA
 <213> Homo sapienn

<220>
 <221> CDS
 <222> (404)..(991)

WO 01/62942

PCT/US01/06113

73

```

<400> 124
ttttggggc tttgttccg aaatatgcag aattaccggc cgggtugctc ctgaagccag 60
cggcgggagc gagccggcg gcggccagca cggggaagc accgaggaag aagccagcc 120
cccgccctcc gcccttccg tccccccccc ctaccggcg gccaggagg ctcctcggt 180
ggggcgccca ctccctggtt ctctctctcc tggctgggag tgcctgctcc tcggcactcc 240
ctgtctcccg ggcgcctcc gccagctccg tgcctcccg gccacctcc tcggggcccg 300
gtctcttaag ggatgggtact gaatttggc gccacaggag accggctgga gcgcgcgc 360
cgcgcctcc ctctctccg agcagccagc gcctgggag gcg atg agg acc ttg 415
Met Arg Thr Leu
1
gct tgc ctg ctg ctg ctg ggc tgc gga tac ctg gcc cat gtt ctg gcc 463
Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala His Val Leu Ala
5 10 15 20
gag gaa gcc gag atc ccc cgc gag gtc atc gag agc ctg gcc cgc act 511
Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg Leu Ala Arg Ser
25 30 35
cag atc cac agc atc cgg gac ctg cag cga ctg ctg gag ata gac tcc 559
Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu Glu Ile Asp Ser
40 45 50
gta ggg agt gag gat tct ttg gac acc agc ctg aga gct ccc ggg gtc 607
Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg Ala His Gly Val
55 60 65
cac gcc act aag cat gtg ccc gag aag cgg ccc ctg ccc att cga agg 655
His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu Pro Ile Arg Arg
70 75 80
aag aga agc atc gag gaa gct gtc ccc gct gtc tgc aag acc agg acc 703
Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys Lys Thr Arg Thr
85 90 95 100
gtc att tac gag att cct cgg agt cag gtc gac ccc acc tcc gcc aac 751
Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro Thr Ser Ala Asn
105 110 115
tto ctg atc tgg ccc ccg tgc gtc gag gtc aag cgc tgc acc ggc tgc 799
Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys
120 125 130
tgc aac acg agc agt gtc aag tgc cag ccc tcc cgc gtc ccc ccc cgc 847
Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg Val His His Arg
135 140 145
agc gtc aag gtc gcc aag gtc gaa tac gtc agc aag aag ccc aaa tta 895
Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Lys Pro Lys Leu
150 155 160
aaa gaa gtc cag gtc agg tta gag gag cat ttg gag tgc gcc tgc cgc 943
Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu Cys Ala Cys Ala
165 170 175
acc aca agc ctg aat ccg gat tat cgg gaa gag gac acc gat gtc agc 991
Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp Thr Asp Val Arg

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

74

```

185      190      195
tgaggatgag ccgcagccct ttccctggac atggatgtac atggcggtgt acattccctga 1051
aactactatg tacggtgctc tattgccagc gtgcgggtct tglctctctc cgtgaaaaac 1111
tgtgtccgag aacactcggg aaaaacaaaga gacagtgac atttggttaa tgtgacatca 1171
aagcaagtat tgcagcavlc ygtgaugcag taagaagctt ccttgctnaa aagagagaga 1231
gagagagaga gagagaaaaa aaaaaccaca atgacaaaaa caaaacggac tcaacaatat 1291
atctaaactc gatgagatgg agggcgcgcc cgtgggatgg aagtgcagag gtctcagcag 1351
actggalttc tglccgggtg gtcacgggtg ctcttttgcg gaggatgcag agcctgcttt 1411
gggaacgact ccaggggggt gctgggtggg tctgcagggc ccgcaggaag caggaaatgc 1471
ttggaacccg ccacgggaac tttagaacc scacctctct gctgtagtat ttaagcccat 1531
acagaaacct tcccgagagc cttaagtggg tttttttttt gtttttgatt tgtttttttt 1591
ttttttgttt tttttttttt tttttttttt taosocataa agtgahtatt aagcttccct 1651
ttactctttg gctagctttt tttttttttt tttttttttt ttttttaatt tatctcttgg 1711
atgactttta caccgataac acacaggtg ctgtaactgt caggacagtg cagcgttatt 1771
ttctctagca agatgcacac taatgagatg tatttaataa aacatgggat acctacctat 1831
gcatactttc cttaaatgttt ctggctttgt gttttccct taacctgctt tatttgtaa 1891
tttaagccat ttgaagaa ctatgcgtca accaatcgtc cgcctccct gcgcacctg 1951
cccgagagcu cgtttgtggc ctagtgacaa cttgtccccc gcagtgcaca cctagaatgc 2011
tgtgttccca ccgcgcacgt gagatgcatt gccgttctg tctgtgttgt tgggtgcgcc 2071
tggtgccctg gtggcggtca ctccctctgc tgcagtggtt tggacagaac ccaaatcttt 2131
tatttttggc aagatattgt gctttacctg tattaacaga aatctgtgtg tgtggtttgt 2191
ttttttgtaa agctgaagtt cgtatgutta cctaatatta cctgttttgt atccctgaga 2251
gcctgctatg tctctctttt gttgacctaa aattaaaaaa aaataccac caac 2305

```

<210> 125
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 125
 Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala
 1 5 10 15
 His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg
 20 25 30
 Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu
 35 40 45
 Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg

WO 01/62942

PCT/US01/06113

75

80 55 60
 Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu
 65 70 75 80
 Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys
 85 90 95
 Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro
 100 105 110
 Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg
 115 120 125
 Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg
 130 135 140
 Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys
 145 150 155 160
 Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu
 165 170 175
 Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp
 180 185 190
 Thr Asp Val Arg
 195

<210> 126
 <211> 2137
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CDS
 <222> (983)..(1705)

<400> 126
 cctgcctgc ctcctgcgc accgcagcc tccccctgt ctcctcagg gtcctctcc 60
 ggccgcagc gccatthtt cattccctag atagagatac ttggcgcca cacacataa 120
 taagcgcca aaaggaaaa aaaaaaaaa aagccaccc tcagcctcg ctgcaagag 180
 aaaaacggag cagccgcagc tcgcagctcg cagcccgag ccgcagagg acgcccagag 240
 cggcgagcgg gcggcgagc ggaccgcgg actcgcgcc cgtccacctg tcggccgggc 300
 ccagccagc gcgcagcggg cagccgcgc ggcggagca gccgagccg ccgcccgggc 360
 ccgcgcagc ggccgcacg ctcccgccc cctaccggc ccggcgagg gttgcacct 420
 ctccctgcc gggtgcgca gctgcgctg caaagccaac ttggaaaaa gtttttggg 480
 ggagacttg gccctgaggt gccagcacc gcgctttccg attttgggg cttttccaga 540
 aaatgttgc aaaaagctaa gccggcgggc agaggaaac gctgtagcc ggcgagtga 600
 gacgaacct cgaactgcgt gtccctttc ctcttgagg ttgagtcac ctggcgccc 660
 ccacccgct agacgctcg gctggttccg gcgcagccc ccggcgctg gatgctgac 720

PCT/US01/06113

tgggtgtggtg	gaaagagccg	ggtagcgccg	tcgggcccag	gtcttgccgc	cagggtactcc	780
cctgcccccc	agcgacggag	cgggggcctg	ggggggcgcc	gcggggggca	tgcgggtgag	840
ccggggctgc	agaggctgta	ggcgctgac	gccgcgggac	cgagcccgagc	ccaccccccc	900
ccccagcccc	ccaccctggc	cggggggggc	ggcgctctga	tctacggctt	cggggggccc	960
cgggggcggg	cgggagtcgc	gc atg aat	cgc tgc tgg	ggg gac ctc	ttc ctg tct	1012
		Met Asn Arg	Cys Lrp Ala Leu	Phe Leu Ser		10
ctc tgc tgc tac ctg cgt ctg ctg atc agc gac gag ggg gac ccc att ccc						1060
Leu Cys Cys Tyr Leu	Leu Arg Leu Val	Ala Ser	Glu Glu Gly Asp	Pro Ile Pro		
	15		20	25		
gag gag ctt tat gag atg ctg agt gac cac tgc atc cgc tcc ttt gat						1108
Glu Glu Leu Tyr	Glu Met Leu Ser	Asp His Ser	ile Arg Ser	Phe Asp		
	30		35	40		
gat ctc caa cgc ctg ctg ccc gga gac ccc gga gag gaa gat ggg gcc						1156
Asp Leu Gln Arg	Leu Leu His	Gly Asp	Pro Gly	Glu Glu Asp	Gly Ala	
	45		50	55		
gag ctg gac ctg aac atg acc cgc tcc cac tct gga ggc gag ctg gag						1204
Glu Leu Asp Leu Asn Met Thr	Arg Ser His Ser	Gly Gly	Glu Leu Thr	Glu Leu Glu		
	60		65	70		
aga ttg gct cgt gga aga ags agc ctg ggt ttc ctg acc att gct gag						1252
Ser Leu Ala Arg	Gly Arg Arg	Leu Gly	Ser Leu Thr	Ile Ala Glu		
	75		80	85	90	
cgc gcc atg atc gcc gag tgc aag acg cgc acc gag thr ttc gag atc						1300
Pro Gln Cct Ile	Ala Glu Cys Lys	Thr Arg Thr	Glu Val Phe	Glu Ile		
	95		100	105		
tcc cgg cgc ctc ata gac cgc acc aac cgc aac ttc ctg glg tgc cgc						1348
Ser Arg Arg Leu Ile Asp Arg Thr	Asn Ala Asn	Phe Leu Val Trp	Pro			
	110		115	120		
ccc tgt gtg gag gtg cag cgc tgc tcc ggc tgc tgc aac aac cgc aac						1396
Pro Cys Val Glu Val	Gln Arg Cys Ser	Gly Cys Cys	Asn Asn Arg Asn			
	125		130	135		
gtg cag tgc cgc ccc acc acc gag ctg cag ctg cga cct gtc cag gtg aga						1444
Val Glu Cys Arg Pro Thr	Gln Val Gln	Leu Arg	Pro Val Gln Val Arg			
	140		145	150		
aag atc gag att gtg cgg aag aag cca atc ttt aag aag gcc acc gtc						1492
Lys Ile Glu Ile Val Arg Lys	Lys Pro Ile Phe	Lys Lys Ala Thr Val				
	155		160	165	170	
thr ctg gaa gac cac ctg gca tgc aag tgt gac aca gtc gca gtc gca						1540
Arg Leu Arg Arg His Leu Ala Cys Lys	Cys Glu Thr Val Ala Ala					
	175		180	185		
cgg cct gtg acc cga agc cgg ggg ggt tcc cag gag cag cga gcc aaa						1588
Arg Pro Val Thr Arg Ser Pro Gly	Gly Ser Gln Glu Gln Arg	Ala Lys				
	190		195	200		
acg ccc caa cct cgc gtc gtc acc att cgg acg gtc cga gtc cgc cgg ccc						1636

WO 01/62942

PCT/US01/06113

77

Thr Pro Gln Thr Arg Val Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Pro
 205 210 215
 ccc aag ggc aag cnc cgg aaa ttc aag cac arg cat gac aag acg gca 1684
 Pro Lys Gly Lys His Arg Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr Ala
 220 225 230
 ctg aag gag acc ctt gga gcc taggggcac gccaggagag tgggtgggca 1735
 Leu Lys Glu Thr Leu Gly Ala
 235 240
 ggggtattta atatggtatt tgggtatttg ccccatggg gccttggagt agataatatt 1795
 ggttccctcg tccgtctgtc tccatgcttg atcggaggg ccaatggtgc ctccccacc 1855
 cctccacgtg tccgtccacc ctccatcag cgggtctcct cccagcggcc tccggtcttt 1915
 gccacgcagc tcaagaagaa aaagaaggac tgaactccat cggcatcttc tcccttaac 1975
 tucagaact tgggataaga gtgtgagaga gactgatggg gtgctctctt gggggaaacg 2035
 ggttctctcc cctgcacctg gcctgggcca caactgagcg ctgtgagctg tccgaggag 2095
 cctgaggac ctctcagcat agcctgctg atccctgac cc 2137

 <210> 127
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 127
 Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg
 1 5 10 15
 Leu Val Ser Ala Gln Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met
 20 25 30
 Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu
 35 40 45
 His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met
 50 55 60

 Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg
 65 70 75 80
 Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu
 85 90 95
 Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp
 100 105 110
 Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln
 115 120 125
 Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr
 130 135 140
 Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg
 145 150 155 160

WO 01/62942

PCT/US01/06113

78

Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu
 165 170 175
 Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser
 180 185 190
 Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val
 195 200 205
 Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg
 210 215 220
 Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly
 225 230 235 240
 Ala

<210> 128

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 128

Asp Pro Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
 1 5 10

<210> 129

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 129

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His
 1 5 10

<210> 130

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 130

Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 1 5 10

WO 01/62942

PCT/US01/06113

79

<210> 131
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 131
Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr
1 5

<210> 132
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 132
Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly
1 5 10

<210> 133
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 133
Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu
1 5

<210> 134
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 134
Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg
1 5 10 15

<210> 135
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic

WO 01/62942

PCT/US01/06113

80

peptide

<400> 135
Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
1 5 10

<210> 136
<211> 13
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 136
Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp
1 5 10

<210> 137
<211> 11
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 137
Asp Pro Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys
1 5 10

<210> 138
<211> 12
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 138
Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met
1 5 10

<210> 139
<211> 10
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 139
Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys
1 5 10

WO 01/62942

PCT/US01/06113

81

<210> 140
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 140
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr
1 5

<210> 141
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 141
Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr Arg Cys Gly
1 5 10

<210> 142
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 142
Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu
1 5

<210> 143
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 143
Gln Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu
1 5 10 15

<210> 144
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic

WO 01/62942

PCT/US01/06113

82

peptide

<400> 144
 Ile Thr Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe
 1 5 10 15

<210> 145
 <211> 13
 <212> PPT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 peptide

<400> 145
 Ala Asn His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp
 1 5 10

<210> 146
 <211> 815
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (69)..(767)

<400> 146
 gaattcgaat tccagtggtc tggaggcgc gcgagcgcg ccagggccac ggtcgggact 60
 ccggaacn atg aac ttt ctg ctg tct tgg gtg cat tgg agc ctc gcc ttg 110
 Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu
 1 5 10
 ctg ctc tac ctc cac cat gcc aag tgg tcc cag gct gca ccc atg gca 158
 Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Glu Ala Ala Pro Met Ala
 15 20 25 30
 gaa gaa gga ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aag ttc atg gat gtc 206
 Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val
 35 40 45
 tat cag cgc agc tac tgc cat cca atc gag acc ctg gtg gac atc ttc 254
 Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 50 55 60
 cag gag tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgt gtg 302
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 65 70 75
 ccc ctg atg cga tgc ggg ggc tgc tgc aat gac gag ggc ctg gag tgt 350
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
 80 85 90
 gtg ccc act gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg cgg atc aaa 398
 Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
 95 100 105 110
 cct cac cca ggc cag cac ata gga gag atg agc ttc cta cag cac aac 446
 Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn

WO 01/62942

PCT/US01/06113

83

```

115      120      125
aaa tgt gaa tgc aga cda aag aaa gat aga gca aga caa gaa aaa aaa 494
lys cys glu cys arg pro lys lys asp arg ala arg gln gln lys lys
130      135      140

tca gtt cga gga aag gga aag ggg caa aaa cga aag cgc aag aaa tcc 542
ser val arg gly lys gly lys gly gln lys arg lys arg lys lys ser
145      150      155

egg tat aag tcc tgg agc gtg tac gtt ggt gcc cgc tgc tgt cta atg 590
arg tyr lys ser trp ser val tyr val gly ala arg cys cys neu met
160      165      170

ccc tgg agc ctc cct ggc ccc cat ccc tgt ggg cct tgc tca gag cgg 638
pro trp ser leu pro gly pro his pro cys gly pro cys ser glu arg
175      180      185

aga aag cat ttg ttt gta caa gat cgg cag acg tgt aaa tgt tcc tyc 696
arg lys his leu phe val gln asp pro gln thr cys lys cys ser cys
190      200      205

aaa aac aca gac tgg cgt tgc aag gcg agg cag ctt gag tta aac gaa 734
lys asn thr asp ser arg cys lys ala arg gln leu glu leu asn glu
210      215      220

cgt act tgc aga tgt gac aag cgg agg cgg tga gcggggctgg aggaaggagc 787
arg thr cys arg cys asp lys pro arg arg
225      230

ctccctcagg gtttcgggaa ccagatcc 815

<210> 147
<211> 232
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 147
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1      5      10      15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20      25      30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
35      40      45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Glu Glu
50      55      60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65      70      75      80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
85      90      95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100      105      110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

84

```

      115              120              125
Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
130              135              140
Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
145              150              155              160
Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp
165              170              175
Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys
180              185              190
His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn
195              200              205
Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr
210              215              220
Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
225              230

<210> 148
<211> 3007
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (492)..(1529)

<400> 148
gcccgagagag cgcctatcat tggcagcttt gttattgata agaaactgct cgcgcgcgac 60
ttgguttcca gtctggctgc gggcaacctc tgagttttcg cctctgtcct gtcccccga 120
ctgacaggtg ctccagcaa cttgtggggg acctctcgcc gctccccgcg gtcccaacc 180
cctcattcct cctcgcttt caaccccaac cccaccactt cgcacagct caggatttgt 240
ttaaacttg ggaactggg tcaggtccag gttttgctt gatcctttc aaaaactgga 300
gacacagaag agggctctag gaaaagttt tggatgggt tatgtggaa ctacctgag 360
attctctgct gccagagcag gctgggcgt tccacccag tgcagcttc cctggcggt 420
gggaaagag actggggagt cgtgcttcc aaagtgcct cgtgagtga gctctaccc 480
cagtcagcca a atg agc ctc ttc ggg ctt ctc ctg ctg ada tct gcc ctg 530
Met Ser Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Thr Ser Ala Leu
1 5 10

gcc ggc cag aga cag ggg act cag cag gaa tcc aac ctg agt agt aaa 578
Ala Gly Gln Arg Gln Gly Thr Gln Ala Glu Ser Asn Leu Ser Ser Lys
15 20 25

ctc cag ttt tcc agc aac aag gaa cag aac gga gta cna gat cct cag 626
Phe Gln Phe Ser Ser Asn Lys Glu Gln Asn Gly Val Gln Asp Pro Gln
30 35 40 45

cat gag aga att att act gtc tct act aat gga agt att cac agc cna 674

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

85

His Glu Arg Ile Ile Thr Val Ser Thr Asn Gly Ser Ile His Ser Pro
 50 55 60
 agg ttt cct cat act tat cca aga aat aag gtc ttg gta tgg aga tta 722
 Arg Phe Pro His Thr Tyr Pro Arg Asn Thr Val Leu Val Trp Arg Leu
 65 70 75
 gta cca gta gag gax aat gta tgg eta caa ctt aag ttt gat gaa aga 770
 Val Ala Val Glu Glu Asn Val Trp Ile Gln Leu Thr Phe Asp Glu Arg
 80 85 90
 ttt ggg ctt gaa gac cca gaa gat gac ata tgc aag tat gat ttt gta 818
 Phe Gly Leu Glu Asp Pro Glu Asp Asp Ile Cys Lys Tyr Asp Phe Val
 95 100 105
 gaa gtt gag gaa ccc agt gat gga act ata tta ggg cga tgg tgt ggt 856
 Glu Val Glu Glu Pro Ser Asp Gly Thr Ile Leu Gly Arg Trp Cys Gly
 110 115 120 125
 tct ggt act gta cca gga aaa cag att tct aaa gga aat caa att agg 914
 Ser Gly Thr Val Pro Gly Lys Gln Ile Ser Lys Gly Asn Gln Ile Arg
 130 135 140
 ata aga ttt gta tct gat gaa tat ttt cct tct gaa cca ggg ttc tgc 962
 Ile Arg Phe Val Ser Asp Glu Tyr Phe Pro Ser Glu Pro Gly Phe Cys
 145 150 155
 atc cac tac aac att gtc atg cca caa ttc acc gaa gct gtg agt cct 1010
 Ile His Tyr Asn Ile Val Met Pro Gln Phe Thr Glu Ala Val Ser Pro
 160 165 170
 tca gtg eta ccc cct tca gct ttg cca ctg gac ctg ctt aat aat gct 1058
 Ser Val Leu Pro Pro Ser Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Asn Asn Ala
 175 180 185
 ata act gac ttt agt acc ttg gaa gac ctt att cga tat ctt gaa cca 1106
 Ile Thr Ala Phe Ser Thr Leu Glu Asp Leu Ile Arg Tyr Leu Glu Pro
 190 195 200 205
 gag aga tgg cag ttg gac tta gaa gat eta tat agg cca act tgg caa 1154
 Glu Arg Trp Gln Leu Asp Leu Glu Asp Leu Tyr Arg Pro Thr Trp Gln
 210 215 220
 ctt ctt ggc aag gct ttt gtt ttt gga aga aaa tcc aga ctg gtg gat 1202
 Leu Leu Gly Lys Ala Phe Val Phe Gly Arg Lys Ser Arg Val Val Asp
 225 230 235
 ctg aac ctt eta aca gag gag gta aga tta tac agc tgc aca cct cgt 1250
 Leu Asn Leu Leu Thr Glu Glu Val Arg Leu Tyr Ser Cys Thr Pro Arg
 240 245 250
 aac ttc tca gtg tcc ata agg gaa gaa cta aag aga acc gat acc att 1298
 Asn Phe Ser Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys Arg Thr Asp Thr Ile
 255 260 265
 ttc tgg cca ggt tgt ctc ctg gtt aaa cgc tgt ggt ggg aac tgt gcc 1346
 Phe Trp Pro Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg Cys Gly Gly Asn Cys Ala
 270 275 280 285
 tgt tgt ctc cac aat tgc aat gaa tgt caa tgt gtc cca agc aca gtt 1394
 Cys Cys Leu His Asn Cys Asn Glu Cys Gln Cys Val Pro Ser Lys Val
 290 295 300

WO 01/62942

PCT/US01/06113

86

```

act aaa aaa tac cac gag gtc ctt cag tlg aga oca aag acc ggt gtc 1442
Thr Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Gln Leu Arg Pro Lys Thr Gly Val
303 310 315

agg gga ttg cac aaa tca ctc acc gac gtg gcc ctg gag cac cat gag 1450
Arg Gly Leu His Lys Ser Leu Thr Asp Val Ala Leu Glu His His Glu
320 325 330

gag tgt gac tgt gtg tgc aga ggg agc aca gga gga tag ccgcatcacc 1539
Glu Cys Asp Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr Gly Gly
335 340 345

accagcagct ctggccaga gctgtcagct gcagtggtg attcatttag agaacgtatg 1599
cggtatctcc atcttcaatc tcagttgttt gcttcaagga cctttcatct tcaggattta 1659
cagtgualtc tgaagaggga gacatcaaac agaatlagga gttgtgcaac agctcttttg 1719
agaggaggcc taaaggacag gagaaaaggt ctccaatcgt ggaagaaaaa ttaaatgttg 1779
tattaaatag atcaccagct agtttcagag ttaccatgta cgtattccac taactgggtt 1839
ctgtatttca gtctcttcca taaggcttag ggtaatgtca gtacaggaaa aaactgtgtc 1899
aagtgagcac ctgattccgt tgccttgctt aactctaaag ctccatgtcc tgggcctaaa 1959
atcgtataaa atctggattt tttttttttt ttttgcctat attcacatat gtaaacaga 2019
acattctatg tactacaaac ctggttttta aaaggaact atgttgtctat gaattaaact 2079
tgtgtcgtgc tgataggaca gactggattt ttcatttttc ttattaaact ttctgcatt 2139
tagaagaaga gaactacatt catggtttgg aagagataaa cctganaaga agagtggcct 2199
tatcttcact ttatcgataa gtcagtttat ttgtttcatt gtgtacatt ttatattctc 2259
cttttgacat tataacggtt ggcttttcta atcttgttaa atatatctat ttttaccaaa 2319
ggtatttaat attctttttt atgacaactt agatcaacta tttttagctt ggtaaatttt 2379
tctaaacaca atgttatatg caagagggaac aaagalgata taaaatattg ttgctctgac 2439
aaaatataat gtatttcatt ctgtatcgtt gctagagtta gattaatctg ctttttaaaa 2499
aactgaattg gaatagattt ggtaagttgc aaagactttt tgaaaataat taaattatca 2559
tatcttcact tctgttatc gtagatgaaa ataaaaagca acttatgaaa gttagacatc 2619
agatcaagac attactaac tttctctttt ttggggaaat ctgagcttag ctgagaaaa 2679
cataaagcac ctgaaaaag acttggcagc ttctgataa agctgtctgt gctgtcagct 2739
aggaacacat cctatttatt gtgatgtgtt ggttttatta tcttaacctc tgttcacac 2799
acttgataa ataatggat alttttatgt acagaagtat gtctcttaac cagttcacct 2859
attgtactct ggcaatttaa aagaaaatca gtataactatt ttgcttgtaa aatgcttaat 2919
atgtlcccta ggtlalgltg tgactatttg aatcaaaaat gtattgaatc atcaaataaa 2979
agaalgtggc tatlttgggg agaaaatt 3007

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

87

<210> 149
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 149
 Met Ser Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Thr Ser Ala Leu Ala Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Gln Gly Thr Gln Ala Glu Ser Asn Leu Ser Ser Lys Phe Gln Phe
 20 25 30
 Ser Ser Asn Lys Glu Gln Asn Gly Val Gln Asp Pro Gln His Glu Arg
 35 40 45
 Ile Ile Thr Val Ser Thr Asn Gly Ser Ile His Ser Pro Arg Phe Pro
 50 55 60
 His Thr Tyr Pro Arg Asn Thr Val Leu Val Trp Arg Leu Val Ala Val
 65 70 75 80
 Glu Glu Asn Val Trp Ile Gln Leu Thr Phe Asp Glu Arg Phe Gly Leu
 85 90 95
 Glu Asp Pro Glu Asp Asp Ile Cys Lys Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu
 100 105 110
 Glu Pro Ser Asp Gly Thr Ile Leu Gly Arg Trp Cys Gly Ser Gly Thr
 115 120 125
 Val Pro Gly Lys Gln Ile Ser Lys Gly Asn Gln Ile Arg Ile Arg Phe
 130 135 140
 Val Ser Asp Glu Tyr Phe Pro Ser Glu Pro Gly Phe Cys Ile His Tyr
 145 150 155 160
 Asn Ile Val Met Pro Gln Phe Thr Glu Ala Val Ser Pro Ser Val Leu
 165 170 175
 Pro Pro Ser Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Asn Asn Ala Ile Thr Ala
 180 185 190
 Phe Ser Thr Leu Glu Asp Leu Ile Arg Tyr Leu Glu Pro Glu Arg Trp
 195 200 205
 Gln Leu Asp Leu Glu Asp Leu Tyr Arg Pro Thr Trp Gln Leu Leu Gly
 210 215 220
 Lys Ala Phe Val Phe Gly Arg Lys Ser Arg Val Val Asp Leu Asn Leu
 225 230 235 240
 Leu Thr Glu Glu Val Arg Leu Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn Phe Ser
 245 250 255
 Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys Arg Thr Asp Thr Ile Phe Trp Pro
 260 265 270
 Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg Cys Gly Gly Asn Cys Ala Cys Cys Leu
 275 280 285
 His Asn Cys Asn Glu Cys Gln Cys Val Pro Ser Lys Val Thr Lys Lys

WO 01/62942

PCT/US01/06113

88

```

290                295                300
Tyr His Glu Val Leu Gln Leu Arg Pro Lys Thr Gly Val Arg Gly Leu
305                310                315                320
His Lys Ser Leu Thr Asp Val Ala Leu Glu His His Glu Glu Cys Asp
325                330                335
Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr Gly Gly
340                345

<210> 150
<211> 399
<212> DNA
<213> Orf virus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(399)

<400> 150
atg aag ttt ctc gtc gcc ata ctg gta gct gtg tgc ttg cac cag tat 48
Met Lys Phe Leu Val Gly Ile Leu Val Ala Val Cys Leu His Gln Tyr
1 5 10 15
ctg ctg aac gcg gac agc acg aaa aca tgg tcc gaa gtg ttt gaa aac 96
Leu Leu Asn Ala Asp Ser Thr Lys Thr Trp Ser Glu Val Phe Glu Asn
20 25 30
agc ggg tgc agc cca agg ccg atg gtc ttt cga gta cag gac gag cac 144
Ser Gly Cys Lys Pro Arg Pro Met Val Phe Arg Val His Asp Glu His
35 40 45
ccg gag cta act tct cag cgg ttc aac cug ccg tgt gtc acg ttg atg 192
Pro Glu Leu Thr Ser Gln Arg Phe Asn Pro Pro Cys Val Thr Leu Met
50 55 60
cga tgc gcc ggg tgc tgc aac gac gag agc tta gaa tgc gtc ccc acg 240
Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ser Leu Glu Cys Val Pro Thr
65 70 75 80
gaa gag gca aac gta acg atg caa ctc atg gga gcg tgg gtc tcc ggt 288
Glu Glu Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Met Gly Ala Ser Val Ser Gly
85 90 95
ggc aac ggg atg caa cat ctg agc ttc gta gag cat aag aaa tgc gat 336
Gly Asn Gly Met Gln His Leu Ser Phe Val Glu His Lys Lys Cys Asp
100 105 110
tgt aaa cca cca ctc acg acc acg cca ccg acg acc aca agg ccg ccc 384
Cys Lys Pro Pro Leu Thr Thr Thr Pro Pro Thr Thr Thr Arg Pro Pro
115 120 125

aga aga cgc cgc tag 399
Arg Arg Arg Arg
130

<210> 151
<211> 132
<212> PRT
<213> Orf virus

```


WO 01/62942

PCT/US01/06113

89

<400> 151
 Met Lys Phe Leu Val Gly Ile Leu Val Ala Val Cys Leu His Gln Tyr
 1 5 10 15
 Leu Leu Asn Ala Asp Ser Thr Lys Thr Trp Ser Glu Val Phe Glu Asn
 20 25 30
 Ser Gly Cys Lys Pro Arg Pro Met Val Phe Arg Val His Asp Glu His
 35 40 45
 Pro Glu Leu Thr Ser Gln Arg Phe Asn Pro Pro Cys Val Thr Leu Met
 50 55 60
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ser Leu Glu Cys Val Pro Thr
 65 70 75 80
 Glu Glu Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Met Gly Ala Ser Val Ser Gly
 85 90 95
 Gly Asn Gly Met Gln His Leu Ser Phe Val Glu His Lys Lys Cys Asp
 100 105 110
 Cys Lys Pro Pro Leu Thr Thr Thr Pro Pro Thr Thr Thr Arg Pro Pro
 115 120 125
 Arg Arg Arg Arg
 130

 <210> 152
 <211> 328
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

 <220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(322)

 <400> 152
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat cgg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt gga gtc gag aca aac acc ttc ttc aag cca tcc tgc gtg ccc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro
 35 40 45
 ctg atg aga tgt gga ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtl 193
 Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
 50 55 60
 ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Glu Ile Met Arg Ile Thr Val
 65 70 75
 cct ctg tct caa ggy ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctg cag cat 289

WO 01/62942

PCT/US01/06113

90

```

Pro Leu Ser Glu Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
 80                      85                      90
aac aca tgt gaa tgt aga cca aag aca gat ttg gtcttc          328
Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
 95                      100                      105

<210> 153
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 153
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1                      5                      10                      15
Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20                      25                      30
Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
 35                      40                      45
Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
 50                      55                      60
Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
 65                      70                      75                      80
Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
 85                      90                      95
Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
 100                      105

<210> 154
<211> 331
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>
<221> CDS
<222> (8)..(322)

<400> 154
ggacccc gca cat tat aat acc gag atc ctg aac tct att gat aat gag 49
Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1                      5                      10
tgg aga aag act cag tgc atg ccg aga gag gtg tgt atc gac gtg ggg 97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly
 15                      20                      25                      30
aag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca cca tgt gtg 145
Lys Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Pro Cys Val
 35                      40                      45
tcc gtg tac aga tgc ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

91

```

      50              55              60
atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att oca 241
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
      65              70              75
gtg cct ctc tct aac ggg ccc aac cca gtc aca atc agc ttt ctc cag 289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln
      80              85              90
cat aac aac tgt gaa tgt aga cca aag aac gat ttggtcttc 331
His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp
      95              100              105

<210> 155
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 155
Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
      1              5              10              15
Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu
      20              25              30
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val
      35              40              45
Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn
      50              55              60
Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro
      65              70              75              80
Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn
      85              90              95
Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp
      100              105

<210> 156
<211> 331
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>
<221> CDS
<222> (8)..(322)

<400> 156
ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aac tat att ggt aat gag 49
      1              5              10
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
      15              20              25              30
tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gar atc ttc 97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
      35              40              45              50

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

92

```

cag gaa ttt gga gtc ggc aca aac acc ttc ttc nag cca cca tgt gtg 145
Gln Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val
35 40 45

tac gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 153
Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
50 55 60

atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca 241
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
65 70 75

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat 289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
80 85 90

cac aat tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttggctcttc 331
His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp
95 100 105

```

<210> 157
 <211> 105
 <212> FET
 <213> Artificial Sequence

```

<400> 157
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Tyr Arg
1 5 10 15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
20 25 30

Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val
35 40 45

Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn
50 55 60

Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro
65 70 75 80

Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr
85 90 95

Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp
100 105

```

<210> 158
 <211> 331
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

 <220>
 <221> CDS
 <222> (81)..(322)

 <400> 158

WO 01/62942

PCT/US01/06113

93

```

ggatccat gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa tct att gat aat gag 49
      Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Ileu Lys Ser Ile Asp Asn Glu
      1           5           10
tgg aga aag aat cag tgc atg cgg etc gag aca ctg gtc gac atc ttc 97
      Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Asu Val Asp Ile Phe
      15           20           25           30
cag gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg 145
      Gln Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val
      35           40           45
tcc gbg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
      Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
      50           55           60
gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att acc 241
      Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr
      65           70           75
gtg cct ctg tct caa ggg ccc aaa cca gtc aca atc acc ttt gcc aat 289
      Val Pro Leu Ser Glu Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
      80           85           90
cac aat tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gac ctggtcttc 331
      His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp
      95           100           105

```

<210> 159

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 159

```

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

```

<210> 160

<211> 325

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

WO 01/62942

PCT/US01/06113

94

<223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<226>

<221> CDS

<222> (8)..[332]

<400> 160

```

ggatcct gca cct tat aat acc gag atc ctg aaa tct att gac aat gag 49
Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu
1 5 10

tgg aga aag act cag tgc atg cag atc gag aca atg gtg gac atc ttc 97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
15 20 25 30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca cca tgt gtg 145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Pro Cys Val
35 40 45

tcc gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
50 55 60

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa 241
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
65 70 75

cct cac caa ggg cag ccc atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac 289
Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn
80 85 90

aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc 325
Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val
95 100 105

```

<210> 161

<211> 165

<212> FET

<213> Artificial Sequence

<400> 161

```

Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
1 5 10 15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
20 25 30

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val
35 40 45

Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro
50 55 60

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
65 70 75 80

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
85 90 95

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

95

100

105

<210> 162

<211> 322

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(322)

<400> 162

ggatccct gca cat tat aet acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

cag cgc agc tcc tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc tcc tcc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
 50 55 60

ccc acc gag gag tcc acc atc acc atg cag att atg aga att ana cct 241
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro
 65 70 75

cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act tcc 289
 His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
 80 85 90

tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc 322
 Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe
 95 100 105

<210> 163

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 163

Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
 50 55 60

WO 01/62942

PCT/US01/06113

96

Gln Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
 65 70 75 80

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg
 85 90 95

Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe
 100 105

<210> 164

<211> 328

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (6)..(322)

<400> 164

ggatccct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

cag cgc aac tac tgc cat ccc atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30

gaa ttt gga gtc ggc aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45

gtg tac aga tct ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
 50 55 60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
 65 70 75

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
 80 85 90

aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtcttc 328
 Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
 95 100 105

<210> 165

<211> 105

<212> P&T

<213> Artificial Sequence

<400> 165

Ala His Tyr Asn Thr Gln Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30

WO 01/62942

PCT/US01/06113

97

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Gln Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
 50 55 60
 Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80
 Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
 85 90 95
 Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
 100 105

<210> 166

<211> 328

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 166

ggatccct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca cta gtc gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt gga gtc gcc aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtc tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45
 gtg tac aga tgt ggc ggt tgc tgc aat agt gag ggc ctg cag tgc gtt 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
 50 55 60
 ccc acc gag gag tcc aac atn acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
 65 70 75
 cct ctc tct caa ggc ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
 80 85 90
 aac asa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gcttcc 328
 Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
 95 100 105

<210> 167

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 01/62942

PCT/US01/06113

98

<400> 167
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr Glu Arg
 1 5 10 15
 Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
 50 55 60
 Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80
 Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
 85 90 95
 Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
 100 105

<210> 168
 <211> 323
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> {8}..(322)

<400> 168
 ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 1 5 10 15
 cag cgc agc lac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 15 20 25 30
 gaa ttc gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtc tcc 145
 35 40 45
 gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt 193
 50 55 60
 ctc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
 65 70 75
 cct ctc tct caa ggg ccc aca cca gtg aca atc agc ttt gcc aat cac 289
 80 85 90
 aat tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtcttc 328
 95 100 105

WO 01/62942

PCT/US01/06113

99

<210> 169
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <400> 169
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg 15
 1 5 10
 Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe 30
 20 25 30
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr 45
 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr 60
 50 55 60
 Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu 80
 65 70 75
 Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser 95
 85 90 95

 Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu 105
 100 105

 <210> 170
 <211> 328
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> Description of Artificial sequence: hybrid DNA

 <220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(322)

 <400> 170
 ggaatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 1 5 10
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr

 cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 15 20 25 30
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln

 gag tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 35 40 45
 Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser

 gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg sag tgc gtt 193
 50 55 60
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val

 ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
 65 70 75
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val

WO 01/62942

PCT/US01/06113

100

cct ctc tct cca ggg ccc aaa cca gtc aca atc agc ttt gcc aat cac 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His
 80 85 90

act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtcttc 328
 Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu
 95 100 105

<210> 171
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 171
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr
 20 25 30

Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
 50 55 60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Glu Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
 85 90 95

Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu
 100 105

<210> 172
 <211> 326
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8) .. (322)

<400> 172
 ggatccct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Ala His Tyr Asn Thr Gln Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtc gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca tcc tgc gtc ccc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro
 35 40 45

WO 01/62942

PCT/US01/06113

101

```

ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtc 193
leu met arg cys gly gly cys cys asn asp glu gly leu glu cys val
50 55 60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtc 241
pro thr glu glu ser asp ile thr met gln ile met arg ile thr val
65 70 75

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat 299
pro leu ser gln gly pro lys pro val thr ile ser phe leu gln his
80 85 90

aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag asa gat ttg gtattc 328
asn lys cys glu cys arg pro lys lys asp leu
95 100 105

```

<210> 173
 <211> 105
 <212> DPT
 <213> Artificial Sequence

```

<400> 173
Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
20 25 30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
50 55 60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
65 70 75 80

Ser Glu Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
85 90 95

Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
100 105

```

<210> 174
 <211> 328
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> Description of Artificial Sequence: hybrid DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (81)..(322)

```

<400> 174
ggatccat gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat 49
Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
1 5 10

```

WO 01/62942

PCT/US01/06113

102

```

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Gln Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
15 20 25 30

gaa ttt gga gtc ggc aca aac acc ttc ttc aag cca tcc tgc gtg ccc 145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro
35 40 45

ctg atg aga tgl ggc ggc tgc tgc aat agt gag ggc ctg cag tgc ggt 193
Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
50 55 60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
65 70 75

cct ctc tct caa ggc ccc aaa cca gtg acc atc agc ttt ctc cag cat 289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
80 85 90

aac aac tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gcttcc 328
Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
95 100 105

```

<210> 175
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

```

<400> 175
Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
20 25 30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
50 55 60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
65 70 75 80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
85 90 95

Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
100 105

```

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 August 2001 (30.08.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/62942 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/62,
C07K 14/52, 19/00, G01N 33/68, A61K 38/17(74) Agent: GASS, David, A.; Marshall, Gerstein and Borum,
6300 Sears Tower, 233 South Wacker Drive, Chicago, IL
60606-6402 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/06113

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GR, GT, GU, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) International Filing Date: 26 February 2001 (26.02.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/185,205 25 February 2000 (25.02.2000) US
60/205,331 18 May 2000 (18.05.2000) US(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Applicant: LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER
RESEARCH [US/US]; 605 Third Avenue, New York, NY
10158 (US), LICENTIA OY [FI/FI]; Erottajankatu 19 B
5, FIN-00030 Helsinki (FI).Published:
— with international search report(72) Inventors: ALITALO, Kari; Molecular/Cancer Biology
Laboratory, Hartman Institute, University of Helsinki,
P.O. Box 21, FIN-00014 Helsinki (FI), JELTSCH,
Markku; Molecular/Cancer Biology Laboratory,
Hartman Institute, University of Helsinki, P.O. Box
21, FIN-00014 Helsinki (FI).(88) Date of publication of the international search report:
21 March 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning
of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/62942 A3

(54) Title: MATERIALS AND METHODS INVOLVING HYBRID VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR DNAs
AND PROTEINS AND SCREENING METHODS FOR MODULATORS

(57) Abstract: The present invention provides polypeptides that bind cellular receptors for vascular endothelial growth factor polypeptides; polynucleotides encoding such polypeptides; compositions comprising the polypeptides and polynucleotides; and methods and uses involving the foregoing. Some polypeptides of the invention exhibit unique receptor binding profiles compared to known, naturally occurring vascular endothelial growth factors.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/06113
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/62 C07K14/52 C07K19/00 G01N33/68 A61K38/17		
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) IPC 7 C07K C12N		
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 practical, search terms used) EPO-internal, BIOSIS, MEDLINE, PAJ, WPI Data, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOTECHNOLOGY ABS, SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ¹	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91 02058 A (CALIFORNIA BIOTECHNOLOGY INC) 21 February 1991 (1991-02-21) abstract; claims 1-44; example 11	1-3, 6-8, 26-28, 31, 33, 84
X	BIRKENHAEGER RALF ET AL: "Synthesis and physiological activity of heterodimers comprising different splice forms of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor." BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 316, no. 3, 1996, pages 703-707, XP001010035 ISSN: 0264-6021 abstract; figure 1	1-3, 6-8, 27, 28, 31, 33
Y	abstract; figure 1	4, 5, 29, 30, 33, 34
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
¹ Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance; "E" earlier document but published on or after the international filing date; "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified); "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means; "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed; "T" later document published after the international filing date or priority date and yet is cited with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention; "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone; "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such comparison being obvious to a person skilled in the art; "Z" document member of the same patent family.		
Date of the actual completion of the international search 18 October 2001		Date of mailing of the international search report 22. 10. 01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office (P.O. Box 5010) Patentstr. 2 D-53850 HF Pfaffenhofen Tel. (+31-70) 340-2040, Fax (+31-70) 340-2040 Fax (+31-70) 340-2040		Authorized officer Gurdjian, D

Form PCT/ISA/210 (RAGAS) (March 2001)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/06113

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 33917 A (UNIV HELSINKI LICENSING ;ALITALO KARI (FI); JOUKOV VLADIMIR (US);) 6 August 1998 (1998-08-06) cited in the application	26, 60-66, 74,75
A	abstract; claims 1-57 page 5, line 24 - line 32 page 7, paragraph 2 - paragraph 4 page 8, line 12 - line 14 page 18, line 30 -page 19, line 7; claim 37; figure SEQ.ID.8 ---	27,28, 31,33
X	WO 97 09427 A (GENENTECH INC) 13 March 1997 (1997-03-13) page 8, line 30 - line 34 page 29, line 29 - line 33 ---	74,75,85
A	JOUKOV, VLADIMIR ET AL: "A novel vascular endothelial growth factor, VEGF - C, 1 a ligand for the Flt4 (VEGFR - 3) and KDR (VEGFR - 2) receptor tyrosine kinases" EMBO J. (1996), 15(2), 290-8 , XP001002001 abstract; figure 3 ---	60-66
X	WO 97 44453 A (CHEN HELEN HSIFEI ;FERRARA NAPOLEONE (US); GENENTECH INC (US); PRE) 27 November 1997 (1997-11-27)	72,73
A	claims 1-28 ---	1-3,6-8, 27,28, 31,33,84
X	FAIRBROTHER WAYNE J ET AL: "Novel peptides selected to bind vascular endothelial growth factor target the receptor-binding site." BIOCHEMISTRY, vol. 37, no. 51, 22 December 1998 (1998-12-22), pages 17754-17764, XP000876734 ISSN: 0006-2960 abstract: figures 8,9 --- -/-	72,73

16

Form PCT/US 210 (Rev. 10/97) Table of Contents printed July 1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/06113

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KEYT B A ET AL: "IDENTIFICATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR DETERMINANTS FOR BINDING KDR AND FLT-1 RECEPTORS GENERATION OF RECEPTOR-SELECTIVE VEGF VARIANTS BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 271, no. 10, 8 March 1996 (1996-03-08), pages 5638-5646, XP000993199 ISSN: 0021-9258 figures 1,3,5; table 1	72,73
Y		4,5,29, 30,33,34

16

Form PCT/ISA210 (Form 1, July 2000) at BAC/2001/0001 (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/06113
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 22-25, 82, 83, 86-89 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. ☒ Claims Nos.: 75-81 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/US 01/06113

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-59 ,67-71 ,84 , 86, 87

Chimeric polypeptide comprising a plurality of peptide subunits derived from two or more vascular endothelial growth factor polypeptides that have different growth factor receptor binding profiles , corresponding polynucleotide sequences , expression vector , host cell , method of making a polynucleotide and pharmaceutical composition

2. Claims: 60-66 , 74, 75, 77 , 79 , 81, 83, 85, 89

peptidic molecules inhibiting the interaction of a ligand with its receptor VEGFR-3, corresponding method for identifying the modulator and pharmaceutical, as long as not provided in invention 1

3. Claims: 72 ,73 , 76, 78, 80, 82, 88

peptidic molecules inhibiting the interaction of a ligand with its receptor VEGFR-1, corresponding method for identifying the modulator and pharmaceutical , as long as not provided in invention 1

International Application No. PCT/US 01/06113

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 76-81

Claims 76-81 relating to modulators to the polypeptide VEGFR-1 or VEGFR-3 could not be searched as its subject-matter was insufficiently disclosed.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.I(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/06113

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9102058	A	21-02-1991	US 5194596 A
			AT 142693 T
			AU 6079890 A
			CA 2063810 A1
			DE 69028535 D1
			DE 69028535 T2
			DK 484401 T3
			EP 0484401 A1
			ES 2094159 T3
			JP 10309191 A
			JP 5501350 T
			WO 9102058 A1
			US 5219739 A
			16-03-1993
WO 9833917	A	06-08-1998	US 6130071 A
			US 6245530 B1
			US 6221839 B1
			US 5776755 A
			AU 711578 B2
			AU 6616996 A
			EP 0842273 A2
			JP 11510689 T
			WO 9833917 A1
			AU 6262498 A
			EP 0972028 A1
			CA 2228248 A1
			WO 9705250 A2
			US 6107046 A
WO 9709427	A	13-03-1997	10-10-2000
			12-06-2001
			24-04-2001
			07-07-1998
			14-10-1999
WO 9744453	A	27-11-1997	26-02-1997
			29-05-1998
			21-09-1999
			06-08-1998
			25-08-1998
WO 9709427	A	13-03-1997	19-01-2000
			13-02-1997
			13-02-1997
			22-08-2000
			30-09-1999
WO 9709427	A	13-03-1997	27-03-1997
			24-06-1998
			21-12-1999
			13-03-1997
WO 9744453	A	27-11-1997	08-08-2000
			16-03-2000
			09-12-1997
			14-04-1999
			29-02-2000
WO 9744453	A	27-11-1997	29-06-1999
			27-11-1997
			14-09-1999
			2000502357 T
			332779 A
WO 9744453	A	27-11-1997	29-06-1999
			27-11-1997
			14-09-1999
			2000502357 T
			332779 A

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/475	C 0 7 K 14/475	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00	A
// A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 37/02	
	A 6 1 K 48/00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S,G,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100106242
弁理士 古川 安航

(74)代理人 100110951
弁理士 西谷 俊男

(74)代理人 100114834
弁理士 幅 慶司

(74)代理人 100122264
弁理士 内山 泉

(72)発明者 アリタロ, カリ
フィンランド ヘルシンキ エフアイエヌー０００１４ ピー. オー. ボックス ２１ ユニバーシテイ オブ ヘルシンキ ハートマン インスティテュート モレキュラー／キャンサー バイオロジー ラボラトリー

(72)発明者 ジェルツェ, マーク マイケル
フィンランド ヘルシンキ エフアイエヌー０００１４ ピー. オー. ボックス ２１ ユニバーシテイ オブ ヘルシンキ ハートマン インスティテュート モレキュラー／キャンサー バイオロジー ラボラトリー

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 BB52 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14
DA36 DA77 FB02 FB03 FB04 FB06 FB07 JA01
4B024 AA01 BA03 CA04 CA07 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA11
HA08
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA90Y AA93Y AB01 CA24 CA44
4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA01 BA22 CA53 ZA33 ZA36 ZA89
ZA96 ZB11 ZB15 ZB26
4H045 AA10 AA20 AA30 BA09 BA41 CA40 DA31 EA20 FA72 FA74