



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 28 565 T2 2007.06.06**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 171 594 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 28 565.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/09483**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 921 966.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/063380**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.04.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **26.10.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.01.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **07.06.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.06.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/12 (2006.01)**

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

129788 P 16.04.1999 US

184235 P 23.02.2000 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., US

(72) Erfinder:

**CUNNINGHAM, Brian, San Mateo, CA 94402, US;
DEVOS, Abraham, Oakland, CA 94610, US; LI,
Bing, Foster City, CA 94404, US**

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(54) Bezeichnung: **VASKULÄRE ENDOTHELZELLEN WACHSTUMSFAKTOR (VEGF) VARIANTEN UND DESSEN
VERWENDUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Gefäßendothelzellwachstumsfaktor-(VEGF-)Varianten, Verfahren zur Herstellung solcher Varianten und Verfahren, Zusammensetzungen und Tests, die solche Varianten verwenden. Insbesondere betrifft die Erfindung VEGF-Varianten, die Bindungsaffinitätseigenschaften für die VEGF-Rezeptoren KDR und FLT-1 aufweisen, die sich von jenen von nativem VEGF unterscheiden.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die zwei zellulären Hauptkomponenten der Vaskulatur sind Endothel- und Glattmuskelzellen. Die Endothelzellen bilden die Auskleidung der inneren Oberfläche aller Blutgefäße und stellen eine nicht thrombogene Grenzfläche zwischen Blut und Gewebe dar. Darüber hinaus sind Endothelzellen eine wichtige Komponente für die Entwicklung neuer Kapillaren und Blutgefäße. Somit proliferieren Endothelzellen im Laufe der Angiogenese, oder Neovaskularisation, die mit Tumorwachstum und Metastasenbildung sowie mit zahlreichen verschiedenen, nicht neoplastischen Erkrankungen oder Leiden zusammenhängt.

[0003] Verschiedene natürlich vorkommende Polypeptide induzieren laut Berichten die Proliferation von Endothelzellen. Zu diesen Polypeptiden zählen die basischen und sauren Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF), Burgess & Maciag, Annual Rev. Biochem. 58, 575 (1989), der aus Blutplättchen gewonnene Endothelzellwachstumsfaktor (PD-ECGF), Ishikawa et al., Nature 338, 557 (1989), und der Gefäßendothelwachstumsfaktor (VEGF), Leung et al., Science 246, 1306 (1989); Ferrara & Henzel, Biochem. Biophys. Res. Commun. 161, 851 (1989); Tischer et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 165, 1198 (1989); Ferrara et al., PCT-Patentveröffentlichung Nr. WO 90/13649 (veröffentlicht am 15. November 1990).

[0004] VEGF wurde zuerst in Medium identifiziert, das mit bovinen Hypophysen-Follikelzellen oder follikulostellaren Zellen konditioniert war. Biochemische Analysen weisen darauf hin, dass boviner VEGF ein dimeres Protein mit einer scheinbaren Molmasse von etwa 45.000 Da und mit einer scheinbaren mitogenen Spezifität für Gefäßendothelzellen ist. Für bovinen VEGF kodierende DNA wurde durch Screenen einer cDNA-Bibliothek, die aus solchen Zellen erstellt worden war, unter Verwendung von Oligonucleotiden, basierend auf der Amino-terminalen Aminosäuresequenz des Proteins als Hybridisierungs sonden, isoliert.

[0005] Menschlicher VEGF wurde zuerst durch Screenen einer cDNA-Bibliothek, erstellt aus menschlichen Zellen, unter Verwendung von boviner VEGF-cDNA als Hybridisierungssonde erhalten. Eine dadurch identifizierte cDNA kodiert für ein 165 Aminosäuren umfassendes Protein mit mehr als 95% Homologie zu bovinem VEGF; dieses 165 Aminosäuren umfassende Protein wird typischerweise als menschlicher VEGF (hVEGF) oder VEGF₁₆₅ bezeichnet. Die mitogene Aktivität von menschlichem VEGF wurde durch Expression der menschlichen VEGF-cDNA in Säugetierwirtszellen bestätigt. Medium, das durch Zellen, die mit der menschlichen VEGF-cDNA transfiziert waren, konditioniert war, förderte die Proliferation von Kapillarendothelzellen, während Kontrollzellen dies nicht taten (siehe Leung et al., Science 246, 1306 (1989)).

[0006] Auch wenn ein Gefäßendothelzellwachstumsfaktor aus natürlichen Quellen zur darauf folgenden therapeutischen Verwendung isoliert und gereinigt werden konnte, erwiesen sich die relativ geringen Konzentrationen des Proteins in Follikelzellen und der hohe Aufwand, sowohl hinsichtlich des Arbeitsaufwandes als auch der Kosten, für die Gewinnung von VEGF als wirtschaftlich uninteressant. Folglich wurden weitere Bemühungen unternommen, um VEGF über DNA-Rekombinationstechniken zu klonieren und zu exprimieren. (Siehe z.B. Laboratory Investigation 72, 615 (1995), und die darin zitierten Verweise.)

[0007] Es wurde berichtet, dass VEGF zur Behandlung von Leiden, in denen eine bestimmte Wirkung auf Gefäßendothelzellen, in Abwesenheit von übermäßigem Gewebewachstum, wichtig ist, beispielsweise von diabetischen Geschwüren und Gefäßverletzungen, die aus Traumata wie z.B. subkutanen Wunden entstehen, nützlich ist. VEGF, ein Gefäß-(Arterien- und Venen-)Endothelzellwachstumsfaktor, kann geschädigte Zellen wiederherstellen, ein Verfahren, das als Vaskulogenese bezeichnet wird, und kann die Bildung neuer Blutgefäße stimulieren, ein Verfahren, das als Angiogenese bezeichnet wird (siehe z.B. Ferrara et al., Endocrinol. Rev. 18, 4–25 (1997)).

[0008] VEGF wird in zahlreichen verschiedenen Geweben als multiple homodimere Formen exprimiert (121, 165, 189 und 206 Aminosäuren pro Monomer), was aus alternativer RNA-Spleißung resultiert. VEGF₁₂₁ ist ein lösliches Mitogen, das Heparin nicht bindet; die längeren Formen von VEGF binden Heparin mit progressiv an-

steigender Affinität. Die Heparin-bindenden Formen von VEGF können am Carboxy-Terminus durch Plasmin gespalten werden, um (a) (eine) diffundierbare Form(en) von VEGF freizusetzen. Aminosäuresequenzieren des Carboxy-terminalen Peptids, identifiziert nach Plasmin-Spaltung, ist Arg₁₁₀-Ala₁₁₁. Amino-terminales "Kern"-Protein, VEGF (1–110), isoliert als ein Homodimer, bindet neutralisierende monoklonale Antikörper (wie z.B. die Antikörper, die als 4.6.1 und 3.2E3.1.1 bezeichnet werden) und lösliche Formen von FLT-1- und KDR-Rezeptoren mit ähnlicher Affinität wie das intakte VEGF₁₆₅-Homodimer.

[0009] VEGF enthält zwei Stellen, die jeweils für Bindung der KDR-(Kinasedomänenregion) und FLT-1-(FMS-ähnliche Tyrosinkinase) Rezeptoren verantwortlich sind. Von diesen Rezeptoren wird angenommen, dass sie nur an Endothel-(Gefäß-)Zellen existieren. VEGF-Produktion steigt in Zellen an, in denen es beispielsweise als Resultat eines Traumas und dergleichen zu einer Sauerstoffverarmung kommt, wodurch die Bindung von VEGF an die jeweiligen Rezeptoren ermöglicht wird, um so die Signalstoffwechselwege zu aktivieren, die wiederum zu einer biologischen Reaktion führen. Die Bindung von VEGF an solche Rezeptoren kann beispielsweise zu erhöhter Gefäßdurchlässigkeit führen, was die Zellen dazu veranlasst, sich zu teilen und zu vermehren, um neue Gefäßstoffwechselwege zu bilden – d.h. Vaskulogenese und Angiogenese. (Siehe z.B. Malavaud et al., Cardiovascular Research 36, 276–281 (1997).) Es wird berichtet, dass VEGF-induzierte Signalgebung durch den KDR-Rezeptor für die mitogenen Wirkungen von VEGF und möglicherweise, zu einem großen Ausmaß, die angiogene Aktivität von VEGF verantwortlich ist. (Waltenberger et al., J. Biol. Chem. 269, 26988–26995 (1994).) Die biologische(n) Rolle(n) von FLT-1 ist/sind jedoch weniger gut bekannt.

[0010] Die Stellen oder Regionen des VEGF-Proteins, die in Rezeptorbindung eingebunden sind, wurden bereits identifiziert und nahe zueinander lokalisiert gefunden (siehe Weismann et al., Cell 28, 695–704 (1997); Muller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 7192–7197 (1997); Muller et al., Structure 5, 1325–1338 (1997); Fuh et al., J. Biol. Chem. 273, 11197–11204 (1998)). Für den KDR-Rezeptor wurde erkannt, dass er VEGF vorwiegend über die Stellen an einer Schleife bindet, die Arginin (Arg oder R) an Position 82 von VEGF, Lysin (Lys oder K) an Position 84 und Histidin (His oder H) an Position 86 enthält. Für den FLT-1-Rezeptor wurde erkannt, dass er VEGF vorwiegend über die Stellen an einer Schleife bindet, die Asparaginsäure (Asp oder D) an Position 63, Glutaminsäure (Glu oder E) an Position 64 und Glutaminsäure (Glu oder E) an Position 67 enthält (Keyt et al., J. Biol. Chem. 271, 5638–5646 (1996)). Basierend auf der Kristallstruktur von VEGF und dem funktionellen Kartieren der KDR-Bindungsstelle von VEGF wurde weiters erkannt, dass VEGF KDR-Rezeptoren unter Verwendung von zwei symmetrischen Bindungsstellen, die an den gegenüberliegenden Enden des Moleküls angeordnet sind, einbindet. Jede Stelle besteht aus zwei "Hot-Spots" für Bindung, die sich aus Resten aus beiden Untereinheiten des VEGF-Homodimers zusammensetzen (Muller et al., s.o.). Zwei dieser Bindungsdeterminanten sind innerhalb des dominanten Hot-Spot an einem kurzen 3-Strang- β -Faltblatt angeordnet, das im Transformationswachstumsfaktor $\beta 2$ (TGF- β) und in dem aus Blutplättchen gewonnenen Wachstumsfaktor (PDGF) konserviert ist.

[0011] Bestimmte VEGF-verwandte Moleküle, die sich selektiv eher an einen Rezeptor als an einen anderen binden, wurden identifiziert. Ein Molekül, PIGF, weist 53% Identität mit der PDGF-ähnlichen Domäne von VEGF auf. PIGF scheint Flt-1 mit hoher Affinität zu binden, ist jedoch nicht in der Lage, mit KDR zu reagieren. Wie in der Literatur beschrieben, zeigte PIGF große Variabilität bezüglich seiner mitogenen Aktivität für Endothelzellen (Maglione et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 9267–9271 (1991); Park et al., J. Biol. Chem. 269, 25646–25654 (1994); Sawano et al., Cell Growth & Differentiation 7, 213–221 (1996); Landgren et al., Oncogene 16, 359–367 (1998)).

[0012] Erst jüngst beschrieben Ogawa et al. ein Gen, das für ein Polypeptid kodiert, (genannt VEGF-E) mit etwa 25% Aminosäureidentität mit Säugetier-VEGF. VEGF-E wurde im Genom von Orf-Virus (NZ-7-Stamm), einem Parapoxvirus, das seine Wirkung an Schafen und Ziegen und gelegentlich an Menschen zeigt, identifiziert und rief Läsionen mit Angiogenese hervor. Die Forscher führten einen Zellproliferationstest durch und berichteten, dass VEGF-E das Wachstum von menschlichen Nabelschnurvenen-Endothelzellen sowie von sinusoidalen Rattenleber-Endothelzellen auf beinahe demselben Niveau stimulierten wie menschlicher VEGF. Es wurden auch Studien bezüglich Bindung veröffentlicht. Ein Konkurrenzversuch wurde durch Inkubieren von Zellen, die entweder den KDR-Rezeptor oder den FLT-1-Rezeptor überexprimierten, mit festgelegten Mengen an ¹²⁵I-markiertem menschlichem VEGF oder VEGF-E und anschließendes Zusetzen von steigenden Mengen an nicht markiertem menschlichem VEGF oder VEGF-E durchgeführt. Die Forscher berichteten, dass VEGF-E im Vergleich zu FLT-1 KDR-Rezeptor selektiv band (Ogawa et al., J. Biological Chem. 273, 31273–31281 (1998)).

[0013] Meyer et al., EMBO J. 18, 363–374 (1999), identifizierten auch ein Element der VEGF-Familie, das als VEGF-E bezeichnet wird. Das VEGF-E-Molekül, über das von Meyer et al. berichtet wurde, wurde im Genom

des Orf-Virusstamms D1701 identifiziert. In vitro wurde für VEGF-E erkannt, dass er die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Proliferation von Gefäßendothelzellen stimuliert. In einem In-vivo-Kaninchen-Modell stimulierte VEGF-E Angiogenese in der Hornhaut des Kaninchens. Eine Analyse der Bindungseigenschaften des VEGF-E-Moleküls, über die Meyer et al. berichteten, in bestimmten Tests zeigte, dass sich das Molekül im Vergleich mit dem FLT-1-Rezeptor selektiv an den KDR-Rezeptor band. Siehe auch Wise et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 3071–3076 (1999).

[0014] Olofsson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 11709–11714 (1998), berichten, dass ein Protein, das als "VEGF-B" bezeichnet wird, FLT-1 selektiv bindet. Die Forscher offenbarten einen Mutageneseversuch, in dem die Reste Asp63, Asp64 und Glu67 in VEGF-B zu Alaninresten mutiert wurden. Eine Analyse der Bindungseigenschaften der mutierten Form von VEGF-B zeigte auf, dass das mutierte Protein eine reduzierte Affinität zu FLT-1 aufwies.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0015] Die Anmelder identifizierten VEGF-Varianten, die zumindest eine Aminosäuremutation (im Vergleich zur nativen VEGF-Aminosäuresequenz) enthalten, insbesondere zumindest eine Aminosäuremutation an oder zwischen den Aminosäurepositionen 17 bis 25 und/oder den Positionen 63 bis 65. Die Anmelder identifizierten auch VEGF-Varianten, die zumindest eine Aminosäuremutation (im Vergleich zur nativen VEGF-Aminosäuresequenz) an den Positionen 43, 46, 79 oder 83 umfassen, und insbesondere solche, die Aminosäuresubstitutionen zu Alanin an jeder der Positionen 43, 46, 79 und 83 umfassen. Die Anmelder erkannten überraschenderweise, dass verschiedene VEGF-Varianten wechselnde Bindungsaffinitäten bezogen auf die KDR- und FLT-1-Rezeptoren (im Vergleich zu nativem VEGF) aufwiesen und darüber hinaus selektive Bindungsaffinität zum KDR-Rezeptor oder FLT-1-Rezeptor zeigten.

[0016] Die Erfindung stellt VEGF-Varianten wie in den Ansprüchen definiert bereit, die Aminosäuresubstitutionen (im Vergleich zur nativen VEGF-Aminosäuresequenz) umfassen und selektive Bindungsaffinität zum KDR-Rezeptor aufweisen.

[0017] Die Erfindung stellt VEGF-Varianten bereit, die zumindest eine Aminosäuresubstitution an oder zwischen den Positionen 17 bis 25 von VEGF und wie in den Ansprüchen näher definiert umfassen. Bestimmte Aminosäuresubstitutionen umfassen F171, M18E, Y21L, Y21F, Q22R, Q22K, Q22E, Y25S oder Y25I. In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen solche VEGF-Varianten zumindest eine Aminosäuresubstitution an den Positionen 18 und/oder 21 von VEGF, worin der Methionin-Aminosäurerest an Position 18 durch Glutaminsäure und/oder der Tyrosin-Aminosäurerest an Position 21 durch Leucin substituiert sind/ist.

[0018] In einer Ausführungsform stellt die Erfindung VEGF-Varianten bereit, die zumindest eine Aminosäuresubstitution an oder zwischen den Positionen 63 bis 66 von VEGF umfassen. Bestimmte Aminosäuresubstitutionen umfassen D63S, G65M, G65A, L66R oder L66T. Bevorzugte VEGF-Varianten weisen eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 63, 65 und/oder 66 von VEGF auf, worin der Aminosäurerest Asparaginsäure an Position 63 durch Serin substituiert ist, der Aminosäurerest Glycin an Position 65 durch Methionin substituiert ist und/oder der Aminosäurerest Leucin an Position 66 durch Arginin substituiert ist.

[0019] Weitere bevorzugte VEGF-Varianten umfassen mehrfache (d.h. mehr als eine) Aminosäuremutationen an den Positionen 63, 65 und/oder 66 von VEGF und/oder eine oder mehrere Aminosäuremutationen an einer oder mehreren Positionen 17, 18, 21, 22 und/oder 25 von VEGF. Sogar noch bevorzugter umfassen die VEGF-Varianten eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 18 und/oder 21 von VEGF, worin Position 18 durch Glutaminsäure substituiert ist und/oder Position 21 durch Leucin substituiert ist, und eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 63, 65 und/oder 66 von VEGF, worin Position 63 durch Serin substituiert ist, Position 65 durch Methionin substituiert ist und/oder Position 66 durch Arginin substituiert ist. Am bevorzugtesten können die VEGF-Varianten eine der folgenden Gruppen an Aminosäuresubstitutionen umfassen: M18E, Y21L, Q22R, Y25S; D63S, G65M, L66R; M18E, D63S, G65M, L66R; oder Y21L, D63S, G65M, L66R.

[0020] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die VEGF-Variante ein Polypeptid, das die VEGF165-Aminosäuresequenz umfasst, die eine oder mehrere der in der vorliegenden Anmeldung beschriebene Aminosäuresubstitutionen umfasst.

[0021] Zusätzliche bevorzugte VEGF-Varianten, die mehrfache Aminosäuresubstitutionen an solchen Positionen in der VEGF-Sequenz umfassen, werden in Tabelle 2 beschrieben.

[0022] In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung isolierte Nucleinsäuren bereit, die für die hierin beschriebenen VEGF-Varianten kodieren. Expressionsvektoren, die in der Lage sind, die VEGF-Varianten der Erfindung zu exprimieren, Wirtszellen, die solche Vektoren enthalten, und Verfahren zur Produktion von VEGF-Varianten durch Kultivieren der Wirtszellen unter Bedingungen, um die VEGF-Varianten zu produzieren, werden ebenfalls bereitgestellt.

[0023] In zusätzlichen Ausführungsformen stellt die Erfindung Zusammensetzungen bereit, die eine VEGF-Variante und einen Träger umfassen. Gegebenenfalls kann der Träger ein pharmazeutisch annehmbarer Träger sein.

[0024] Die Erfindung stellt ferner Verfahren zur Behandlung von Leiden bereit, in denen Vaskulogenese oder Angiogenese wünschenswert ist, wie z.B. von Traumata am vaskulären Netzwerk, beispielsweise aufgrund von chirurgischen Einschnitten, Wunden, Schnittwunden, Penetrationen von Blutgefäßen und Oberflächengeschwüren. In den Verfahren kann eine wirksame Menge an VEGF-Variante einem Säugetier, das (ein) solche(s) Leiden aufweist, verabreicht werden.

[0025] Die Erfindung stellt auch diagnostische Verfahren zur Verwendung der VEGF-Varianten in vitro bereit. In einer Ausführungsform umfassen die Verfahren das Testen von Zellen oder Gewebe unter Verwendung von VEGF-Variante(n), um die Gegenwart oder Abwesenheit des KDR- und/oder FLT-1-Rezeptors nachzuweisen.

[0026] Schließlich stellt die Erfindung Sets und Herstellungsartikel bereit, die die hierin offenbarte(n) VEGF-Variante(n) enthalten.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0027] Die [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) zeigen die Nucleotidsequenz (Seq.-ID Nr. 3) und mutmaßliche Aminosäuresequenz (Seq.-ID Nr. 4) des 165 Aminosäure umfassenden nativen ("Wildtyp") VEGF.

[0028] [Fig. 2](#) zeigt die ELISA-Test-Titrationskurve für den nativen VEGF (8–109).

[0029] [Fig. 3](#) zeigt die KIRA-Test-Titrationskurve für den nativen VEGF (8–109).

[0030] [Fig. 4](#) zeigt die HUVEC-Proliferationstest-Titrationskurve für den nativen VEGF (8–109).

[0031] [Fig. 5](#) zeigt die Bindungsaffinitäten für KDR durch nativen VEGF ("WT-VEGF"), LK-VRB-2s* (KDR-selektive Variante) und Flt-1-sel (Flt-1-selektive Variante), gemessen durch kompetitive Verdrängung von ¹²⁵I-VEGF (1–165) aus KDR-exprimierenden NIH3T3-Zellen unter Verwendung verschiedener Konzentrationen an Ligand. Der Test wird im Detail in Beispiel 7 beschrieben. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von doppelt ausgeführten Bestimmungen dar, und Fehler werden auf weniger als 15% der Werte geschätzt.

[0032] [Fig. 6](#) zeigt die Bindungsaffinitäten für Flt-1 durch nativen VEGF ("WT-VEGF"), LK-VRB-2s* (KDR-selektive Variante) und Flt-1-sel (Flt-1-selektive Variante), gemessen durch kompetitive Verdrängung von ¹²⁵I-VEGF (1–165) aus FLT-1-exprimierenden NIH3T3-Zellen unter Verwendung verschiedener Konzentrationen an Ligand. Der Test wird im Detail in Beispiel 7 beschrieben. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von doppelt ausgeführten Bestimmungen dar, und Fehler werden auf weniger als 15% der Werte geschätzt.

[0033] [Fig. 7](#) zeigt eine Tabelle, die die x-fache Reduktion von Bindung verschiedener VEGF-Alaninsubstitutionsvarianten identifiziert. Wie in Beispiel 8 beschrieben, wurden Protein-ELISAs mit verschiedenen Alaninvarianten durchgeführt. Für jeden Rest wird das Verhältnis der IC₅₀ der Variante zur IC₅₀ von nativem VEGF (1–109) aufgelistet, das die x-fache Reduktion von Bindung der Variante im Vergleich mit dem nativen VEGF darstellt. IC₅₀s für den nativen VEGF (1–109) sind in Klammern angegeben. Fettgedruckte Reste wurden verwendet, um die Flt-1-selektive Variante zu bilden. Um KDR-selektive Varianten zu bilden, wurden die mutierten Regionen in fünf Gruppen, wie gezeigt, aufgeteilt, und die ersten vier wurden verwendet, um Bibliotheken für darauf folgende Phagendisplay-Selektionen zu konstruieren. Die mit einem Sternchen (*) gekennzeichneten Reste wurden für eine 50%ige Vorbestimmung hin zur Wildtypform leicht randomisiert, und die mit zwei Sternchen gekennzeichneten Reste wurden stark randomisiert.

[0034] [Fig. 8A](#) zeigt die Resultate eines Radioimmunrezeptor-Bindungstests (RIA), in dem für die Flt-1-selektive Variante ("Flt-1-sel") gezeigt wurde, dass sie zumindest 470fach reduzierte KDR-Bindungsaffinität aufweist. Die Bindungsaffinität für nativen VEGF ("WT-VEGF") ist ebenfalls gezeigt. Jeder Punkt steht für den Mit-

telwert von doppelt durchgeführten Bestimmungen, und Fehler werden auf weniger als 15% der Werte geschätzt.

[0035] [Fig. 8B](#) zeigt die Resultate eines Radioimmunrezeptor-Bindungstests (RIA), in dem für die Flt-1-selektive Variante ("Flt-1-sel") gezeigt wurde, dass sie eine ähnliche Bindungsaffinität zu FLT-1 aufweist wie auch nativer VEGF ("WT-VEGF") hierzu aufweist. Jeder Punkt steht für den Mittelwert von doppelt durchgeführten Bestimmungen, und Fehler werden auf weniger als 15% der Werte geschätzt.

[0036] [Fig. 9](#) zeigt die Resultate eines KIRA-Tests, der die Fähigkeit von nativem VEGF ("WT-VEGF") und Flt-1-selektiver Variante ("Flt-1-sel") misst, KDR-Phosphorylierung zu induzieren.

[0037] [Fig. 10](#) zeigt die Resultate eines HUVEC-Proliferationstests, der die Fähigkeit von nativem VEGF ("WT-VEGF") und Flt-1-selektiver Variante ("Flt-1-sel") misst, HUVEC-Zellproliferation zu induzieren. Jeder Datenpunkt steht für den Mittelwert von dreifach durchgeführten Versuchen mit einem geschätzten Fehler von 10–20%.

[0038] [Fig. 11](#) zeigt die Resultate einer Gelatine-Zymographieanalyse zur Messung der Fähigkeit von nativem VEGF, LK-VRB-2s* (KDR-selektive Variante), Flt-sel (Flt-1-selektive Variante) und PIGF, MMP-9-Sekretion durch menschliche ASMC-Zellen zu stimulieren. Das gezeigte Zymogramm ist einer von zwei unabhängigen Versuchen. x-fache Änderung stellt die relative Bandendichte dar.

[0039] Die [Fig. 12A](#) und [Fig. 12B](#) veranschaulichen Western-Blot-Analysen, die durchgeführt werden, um die Aktivierung von MAP-Kinasen durch nativen VEGF ("WT-VEGF"), Flt-1-selektive Variante ("Flt-sel") und KDR-selektive Variante ("KDR-sel") zu bestimmen. Der Test wird in Beispiel 10 detailliert beschrieben.

[0040] Die [Fig. 13A](#) und [Fig. 13B](#) veranschaulichen Western-Blot-Analysen, die durchgeführt wurden, um die Rolle von nativem VEGF ("wt" oder "VEGF"), KDR-selektiver Variante ("KDR-sel") und Flt-1-selektiver Variante ("Flt-sel") und KDR in PLC-gamma- und PI3'-Kinasephosphorylierung zu bestimmen. Die Tests werden in Beispiel 11 detailliert beschrieben.

[0041] Die [Fig. 14A](#) und [Fig. 14B](#) zeigen Säulendiagramme, die die Resultate von HUVEC-Migrationstests, durchgeführt in modifizierten Boyden-Kammern, veranschaulichen. [Fig. 14A](#) zeigt die HUVEC-Migration, die durch die angegebenen Konzentrationen an nativem VEGF ("wt"), Flt-selektiver Variante ("Flt-sel") und KDR-selektiver Variante ("KDR-sel") erreicht wurde. [Fig. 14B](#) zeigt die Resultate eines Versuchs, in dem der Zusatz von PI3'-Kinaseinhibitor ("LY") HUVEC-Migration als Reaktion auf nativen VEGF ("VEGF") behinderte. Die Versuche wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt, und die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

[0042] Die [Fig. 15A](#) und [Fig. 15B](#) zeigen die Resultate eines Hornhauttaschen-Angiogenesetests in vivo. Die Objektträger in [Fig. 15A](#) zeigen repräsentative Beispiele des Ausmaßes an kornealer Angiogenese als Reaktion auf Kontrollbehandlung, nativen VEGF ("VEGF"), auf KDR-selektive Variante und Flt-selektive Variante. [Fig. 15B](#) veranschaulicht eine quantitative Analyse der Oberflächenbereiche von kornealer Angiogenese, die aus Kontrollbehandlung, Behandlung mit nativem VEGF ("VEGF"), KDR-selektiver Variante ("KDR-sel"), Flt-1-selektiver Variante ("Flt-sel") und PIGF resultiert.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

A. Definitionen

[0043] Die Bezeichnung "VEGF" und "nativer VEGF" wie hierin verwendet bezieht sich auf den 165 Aminosäuren umfassenden Gefäßendothelzellwachstumsfaktor und die verwandten, 121, 145, 189 und 206 Aminosäuren umfassenden Gefäßendothelzellwachstumsfaktoren, wie von Leung et al., Science 246, 1306 (1989), und Houck et al., Mol. Endocrin. 5, 1806 (1991), beschrieben (und in den [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) näher dargestellt), zusammen mit den natürlich vorkommenden Allelformen und den verarbeiteten Formen dieser Wachstumsfaktoren. Die Bezeichnungen "VEGF" und "nativer VEGF" werden auch verwendet, um auf trunkierte Formen des Polypeptids Bezug zu nehmen, die die Aminosäuren 8 bis 109 oder 1 bis 109 des 165 Aminosäuren umfassenden Gefäßendothelzellwachstumsfaktors umfassen. Ein Verweis auf beliebige solcher Formen von VEGF kann in der vorliegenden Anmeldung z.B. durch "VEGF (8–109)", "VEGF (1–109)" oder "VEGF165 oder VEGF (1–165)" identifiziert werden. Die Aminosäurepositionen für einen "trunkierten" nativen VEGF sind wie in der nativen VEGF-Sequenz angegeben nummeriert. Aminosäureposition 17 beispielsweise (Methionin) im

trunkierten nativen VEGF ist auch Position 17 (Methionin) im nativen VEGF. Der trunkierte native VEGF weist vorzugsweise Bindungsaffinität zu den KDR- und FLT-1-Rezeptoren auf, die mit jener von nativem VEGF vergleichbar ist.

[0044] Die Bezeichnung "VEGF-Variante" wie hierin verwendet bezieht sich auf ein VEGF-Polypeptid, das eine oder mehrere Aminosäuremutationen in der nativen VEGF-Sequenz umfasst und selektive Bindungsaffinität zum KDR-Rezeptor aufweist. KDR-selektive VEGF-Varianten der Erfindung umfassen Aminosäuremutationen und weisen vorzugsweise Bindungsaffinität zum KDR-Rezeptor auf, die der Bindungsaffinität von nativem VEGF zum KDR-Rezeptor entspricht oder größer als jene ist (\geq), und noch bevorzugter weisen die VEGF-Varianten weniger Bindungsaffinität ($<$) zum FLT-1-Rezeptor auf als der native VEGF zu FLT-1 zeigt. Ist Bindungsaffinität einer solchen VEGF-Variante zum KDR-Rezeptor im Vergleich zu nativem VEGF etwa gleich (unverändert) oder höher (gesteigert) und ist die Bindungsaffinität der VEGF-Variante zum FLT-1-Rezeptor im Vergleich zum nativen VEGF geringer oder beinahe auf Null reduziert, so wird die Bindungsaffinität der VEGF-Variante, für die vorliegenden Zwecke, als für den KDR-Rezeptor "selektiv" betrachtet. Bevorzugte KDR-selektive VEGF-Varianten der Erfindung weisen zumindest 10fach weniger Bindungsaffinität zu FLT-1-Rezeptor (im Vergleich zu nativem VEGF) auf, und noch bevorzugter weisen sie zumindest 100fach weniger Bindungsaffinität zu FLT-1-Rezeptor (im Vergleich zu nativem VEGF) auf. Die jeweilige Bindungsaffinität der VEGF-Variante kann mittels ELISA-, RIA- und/oder BIAcore-Tests bestimmt werden, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind und in den nachstehenden Beispielen näher beschrieben werden. Bevorzugte KDR-selektive VEGF-Varianten der Erfindung weisen auch Aktivität in KIRA-Tests auf (wie in den Beispielen beschrieben), was die Fähigkeit widerspiegelt, Phosphorylierung des KDR-Rezeptors zu induzieren. Bevorzugte KDR-selektive VEGF-Varianten der Erfindung induzieren zusätzlich oder alternativ dazu Endothelzellproliferation (was durch auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Verfahren, wie z.B. durch den in den Beispielen dargestellten HUVEC-Proliferationstest, bestimmt werden kann). Es wird zur Zeit angenommen, dass die Induktion von Endothelzellproliferation das Resultat von Signalübertragung durch den KDR-Rezeptor ist.

[0045] Bezüglich Abkürzungen von hierin beschriebenen VEGF-Varianten gilt anzumerken, dass sich Zahlen auf die Aminosäurerestposition entlang der Aminosäuresequenz des mutmaßlichen nativen VEGF beziehen (bereitgestellt in Leung et al., s.o., und Houck et al., s.o.). Aminosäureidentifikation verwendet das Ein-Buchstaben-Alphabet für Aminosäuren, d.h.:

| | | | | | |
|-----|---|----------------|-----|---|--------------|
| Asp | D | Asparaginsäure | Ile | I | Isoleucin |
| Thr | T | Threonin | Leu | L | Leucin |
| Ser | S | Serin | Tyr | Y | Tyrosin |
| Glu | E | Glutaminsäure | Phe | F | Phenylalanin |
| Pro | P | Prolin | His | H | Histidin |
| Gly | G | Glycin | Lys | K | Lysin |
| Ala | A | Alanin | Arg | R | Arginin |
| Cys | C | Cystein | Trp | W | Tryptophan |
| Val | V | Valin | Gln | Q | Glutamin |
| Met | M | Methionin | Asn | N | Asparagin |

[0046] "Operabel gebunden" bezieht sich auf eine Nebeneinanderstellung, sodass die normale Funktion der Komponenten durchgeführt werden kann. Somit bezieht sich eine Kodiersequenz, die "operabel" an Kontrollsequenzen gebunden ist, auf eine Konfiguration, in der die Kodiersequenz unter der Steuerung dieser Sequenzen exprimiert werden kann und in der die gebundenen DNA-Sequenzen zusammenhängend sind und im Fall eines Sekretionsleaders zusammenhängend und in Lesephase sind. DNA für eine Präsequenz oder einen Sekretionsleader beispielsweise ist operabel an DNA für ein Polypeptid gebunden, wenn sie als ein Präprotein exprimiert wird, das an der Sekretion des Polypeptids beteiligt ist; ein Promotor oder ein Enhancer ist operabel an eine Kodiersequenz gebunden, wenn er die Transkription der Sequenz beeinflusst; oder eine Ribosombindungsstelle ist operabel an eine Kodiersequenz gebunden, wenn sie so positioniert ist, dass sie Translation unterstützt. Bindung erfolgt durch Ligation an passenden Restriktionsstellen. Bestehen solche Stellen nicht, so werden die synthetischen Oligonucleotidadaptoren oder -linker gemäß herkömmlichen Praktiken verwendet.

[0047] "Kontrollsequenzen" bezieht sich auf DNA-Sequenzen, die zur Expression einer operabel gebundenen Kodiersequenz in einem bestimmten Wirtsorganismus erforderlich sind. Die Kontrollsequenzen, die beispielsweise für Prokaryoten geeignet sind, schließen beispielsweise einen Promotor, gegebenenfalls eine Operatorsequenz und eine Ribosombindungsstelle ein. Eukaryotische Zellen sind bekannt dafür, Promotoren, Polyadenylierungssignale und Enhancer zu verwenden.

[0048] "Expressionssystem" bezieht sich auf DNA-Sequenzen, die eine erwünschte Kodiersequenz und Kontrollsequenzen in operabler Bindung enthalten, sodass Wirte, die mit diesen Sequenzen transformiert sind, in der Lage sind, die kodierten Proteine zu produzieren. Um Transformation zu bewirken, kann das Expressionssystem in einen Vektor eingebunden werden; die relevante DNA kann dann jedoch auch in das Wirtschromosom integriert werden.

[0049] Wie hierin verwendet, werden die Bezeichnungen "Zelle", "Zelllinie" und "Zellkultur" synonym verwendet, und alle diese Bezeichnungen beziehen Nachkommenschaft mit ein. Somit umfassen die Termini "Transformanten" und "transformierte Zellen" die primär bearbeitete Zelle und die davon abgeleiteten Kulturen, ohne Berücksichtigung der Anzahl der Transfers. Es gilt auch zu verstehen, dass die gesamte Nachkommenschaft aufgrund von beabsichtigen oder unbeabsichtigten Mutationen nicht exakt identisch bezüglich DNA-Gehalt sein kann. Mutierte Nachkommenschaft, die dieselben Funktionen, auf die in der ursprünglich transformierten Zelle gescleent wurden, aufweisen, sind eingebunden. Sind spezifische Bezeichnungen beabsichtigt, so wird dies aus dem Zusammenhang hervorgehen.

[0050] "Plasmide" werden durch ein Kleinbuchstaben-"p" gekennzeichnet, dem Großbuchstaben und/oder Zahlen vorangehen und/oder nachfolgen. Die vorliegenden Ausgangsplasmide sind im Handel erhältlich, auf uneingeschränkter Ebene öffentlich zugänglich, oder sie können aus solchen verfügbaren Plasmiden gemäß veröffentlichten Verfahren konstruiert werden. Darüber hinaus sind äquivalente Plasmide auf dem Gebiet der Erfindung sowie durchschnittlichen Fachleuten bekannt.

[0051] Die Bezeichnung "VEGF-Rezeptor" wie hierin verwendet bezieht sich auf einen Zellrezeptor für VEGF, üblicherweise einen Zelloberflächenrezeptor, der an Gefäßendothelzellen zu finden ist, sowie Fragmente und Varianten davon, die die Fähigkeit beibehalten, VEGF zu binden (wie z.B. Fragmente oder trunkierte Formen der extrazellulären Rezeptordomäne). Ein Beispiel für einen VEGF-Rezeptor ist die fmsähnliche Tyrosinkinase (FLT oder FLT-1), ein Transmembranrezeptor der Tyrosinkinasefamilie. Die in der Anmeldung verwendete Bezeichnung "FLT-1-Rezeptor" bezieht sich auf den VEGF-Rezeptor, der beispielsweise von DeVries et al., Science 255, 989 (1992); und von Shibuya et al., Oncogene 5, 519 (1990), beschrieben wird. Der FLT-1-Rezeptor voller Länge umfasst eine extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität. Die extrazelluläre Domäne ist in die Bindung von VEGF eingebunden, während die intrazelluläre Domäne in Signaltransduktion eingebunden ist. Ein anderes Beispiel für einen VEGF-Rezeptor ist der KDR-Rezeptor (auch als FLK-1 bezeichnet). Die in der Anmeldung verwendete Bezeichnung "KDR-Rezeptor" bezieht sich auf den VEGF-Rezeptor, der beispielsweise von Matthews et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 9026 (1991); und von Terman et al., Oncogene 6, 1677 (1991); Terman et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 187, 1579 (1992), beschrieben wird.

[0052] "Behandlung" bezieht sich sowohl auf therapeutische Behandlung als auch auf prophylaktische oder präventive Maßnahmen, worin das Ziel die Prävention oder Verlangsamung (Abschwächung) des betreffenden pathologischen Leidens oder der Störung ist. Jene, die solch einer Behandlung bedürfen, schließen jene ein, die bereits erkrankt sind, als auch jene, die eine Neigung zeigen, diese Erkrankung zu erleiden, oder jene, in denen es die Erkrankung zu unterbinden gilt.

[0053] "Chronische" Verabreichung bezieht sich im Gegensatz zu einem akuten Modus auf die Verabreichung des Mittels/der Mittel auf kontinuierliche Weise, um die anfängliche therapeutische Wirkung (Aktivität) über eine längere Zeitspanne aufrechtzuerhalten. Diskontinuierliche Verabreichung ist eine Behandlung, die nicht in Serie ohne Unterbrechung erfolgt, sondern eher auf zyklische Weise durchgeführt wird.

[0054] "Säugetier" für die Zwecke der Behandlung bezieht sich auf jedes beliebige Tier, das als Säugetier klassifiziert ist, einschließlich Mensch, Nutz- und Zuchttiere, Zoo-, Sport- und Haustiere, wie beispielsweise Hunde, Katzen, Rinder, Pferde, Schafe oder Schweine. Vorzugsweise ist das Säugetier ein Mensch.

[0055] Verabreichung "in Kombination mit" einem oder mehreren therapeutischen Mitteln schließt simultane (gleichzeitige) und aufeinander folgende Verabreichung in jeder beliebigen Reihenfolge ein.

B. Verfahren und Zusammensetzungen

1. Herstellung von VEGF-Varianten

[0056] Aminosäuresequenzvarianten von VEGF können durch Mutationen in der VEGF-DNA hergestellt werden. Solche Varianten umfassen beispielsweise Deletionen aus, Insertionen in oder Substitutionen von Resten innerhalb der Aminosäuresequenz, die in Leung et al., s.o., und Houck et al., s.o., gezeigt wird. Jegliche Kombination von Deletion, Insertion und Substitution kann durchgeführt werden, um das endgültige Konstrukt mit der erwünschten Aktivität zu erzielen. Offensichtlich dürfen die Mutationen, die in der für die Variante kodierenden DNA vorgenommen werden, die Sequenz nicht aus dem Leseraster bringen und schaffen vorzugsweise keine komplementären Regionen, die sekundäre mRNA-Struktur bilden könnten (siehe EP 75.444A).

[0057] Die VEGF-Varianten werden gegebenenfalls durch ortsspezifische Mutagenese von Nucleotiden in der DNA, die für den nativen VEGF kodiert, oder durch Phagendisplay-Verfahren, wodurch für die Variante kodierende DNA gebildet wird, und hiernach durch Expressieren der DNA in rekombinanter Zellkultur hergestellt.

[0058] Während die Stelle zur Einführung einer Aminosäuresequenzvariante vorbestimmt ist, muss die Mutation an sich nicht vorbestimmt sein. Um beispielsweise die Leistung einer Mutation an einer gegebenen Stelle zu optimieren, kann zufällige Mutagenese am Target-Codon oder der Target-Region durchgeführt und können die exprimierten VEGF-Varianten auf die optimale Kombination erwünschter Aktivität gescreent werden. Verfahren zur Herstellung von Substitutionsmutationen an vorgegebenen Stellen in DNA mit einer bekannten Sequenz sind allgemein bekannt wie beispielsweise ortsspezifische Mutagenese.

[0059] Die Herstellung der hierin beschriebenen VEGF-Varianten wird vorzugsweise durch Phagendisplay-Verfahren wie beispielsweise jene, die in Beispiel 1 beschrieben werden, erreicht.

[0060] Nachdem ein solcher Klon selektiert wurde, kann die mutierte Proteinregion entfernt und zur Proteinproduktion in einen geeigneten Vektor, im Allgemeinen in einen Expressionsvektor des Typs, der zur Transformation eines geeigneten Wirts verwendet werden kann, gegeben werden.

[0061] Aminosäuresequenzdeletionen liegen im Allgemeinen im Bereich von etwa 1 bis 30 Resten, noch bevorzugter von 1 bis 10 Resten, und sind typischerweise zusammenhängend.

[0062] Aminosäuresequenzinsertionen umfassen Amino- und/oder Carboxyl-terminale Fusionen von einem Rest hin zu Polypeptiden mit im Wesentlichen uneingeschränkter Länge sowie Intrasequenzinsertionen einzelner oder mehrfacher Aminosäurereste.

[0063] Intrasequenzinsertionen (d.h. Insertionen innerhalb der nativen VEGF-Sequenz) können im Allgemeinen im Bereich von etwa 1 bis 10 Resten, noch bevorzugter von 1 bis 5 Resten, liegen. Ein Beispiel für eine terminale Insertion umfasst eine Fusion einer Signalsequenz, unabhängig davon, ob heterolog oder homolog zur Wirtszelle, an den N-Terminus, um die Sekretion aus rekombinanten Wirten zu unterstützen.

[0064] Zusätzliche VEGF-Varianten sind jene, in denen zumindest ein Aminosäurerest im nativen VEGF entfernt und ein anderer Rest an seiner Stelle inseriert wurde. Solche Substitutionen können in Übereinstimmung mit jenen gemacht werden, die in Tabelle 1 gezeigt sind.

Tabelle 1

| Ursprünglicher Rest | Beispielhafte Substitutionen |
|---------------------|------------------------------|
| Ala (A) | gly; ser |
| Arg (R) | lys |
| Asn (N) | gln; his |
| Asp (D) | glu |
| Cys (C) | ser |
| Gln (Q) | asn |

| | |
|---------|---------------|
| Glu (E) | asp |
| Gly (G) | pro; ala |
| His (N) | asn; gln |
| Ile (I) | leu; val |
| Leu (L) | ile; val |
| Lys (K) | arg; gln; glu |
| Met (M) | leu; tyr; ile |
| Phe (F) | met; leu; tyr |
| Ser (S) | thr |
| Thr (T) | ser |
| Trp (W) | tyr |
| Tyr (Y) | trp; phe |
| Val (V) | ile; leu |

[0065] Veränderungen von Funktion oder immunologischer Identität können durch Selektieren von Substitutionen, die weniger konservativ als jene in Tabelle 1 sind, d.h. durch Auswählen von Resten, die sich in ihrer Wirkung auf das Aufrechterhalten (a) der Struktur der Polypeptidhauptkette im Bereich der Substitution, beispielsweise in Form einer Faltblatt- oder Helixkonformation, (b) der Ladung oder Hydrophobizität des Moleküls an der Targetstelle oder (c) der Sperrigkeit der Seitenkette signifikanter unterscheiden, erzielt werden. Die Substitutionen, von denen im Allgemeinen erwartet wird, dass sie die größten Veränderungen an den Eigenschaften von VEGF-Varianten hervorrufen, sind jene, in denen (a) Glycin und/oder Prolin (P) durch eine andere Aminosäure substituiert ist oder deletiert oder insertiert ist; (b) ein hydrophiler Rest, z.B. Seryl oder Threonyl, anstelle von einem (oder durch einen) hydrophoben Rest, z.B. Leucyl, Isoleucyl, Phenylalanyl, Valyl oder Alanyl, substituiert ist; (c) ein Cysteinrest anstelle von einem (oder durch einen) anderen Rest substituiert ist; (d) ein Rest mit einer elektropositiven Seitenkette, z.B. Lysyl, Arginyl oder Histidyl, anstelle von einem (oder durch einen) Rest mit einer elektronegativen Ladung, z.B. Glutamyl oder Aspartyl, substituiert ist; (e) ein Rest mit einer elektronegativen Seitenkette anstelle von einem (oder durch einen) Rest mit einer elektropositiven Ladung substituiert ist; oder (f) ein Rest mit einer sperrigen Seitenkette, z.B. Phenylalanin, anstelle von einem (oder durch einen) mit keiner solchen Seitenkette, z.B. Glycin, substituiert ist.

[0066] Die Wirkung der Substitution, Deletion oder Insertion kann von Fachleuten unter Verwendung von routinemäßigen Screeningtests leicht bewertet werden. Eine Phagendisplay-selektierte VEGF-Variante kann beispielsweise in rekombinanter Zellkultur exprimiert und gegebenenfalls aus der Zellkultur gereinigt werden. Die VEGF-Variante kann dann auf KDR- oder FLT-1-Rezeptorbindungsaffinität und andere biologische Aktivitäten, wie beispielsweise jene, die in der vorliegenden Anmeldung offenbart sind, bewertet werden. Die Bindungseigenschaften oder Aktivitäten des Zelllysats oder der gereinigten VEGF-Variante können in einem geeigneten Screeningtest auf eine wünschenswerte Eigenschaft gescreent werden. Eine Veränderung der immunologischen Eigenschaft der VEGF-Variante im Vergleich zum nativen VEGF, wie z.B. Affinität zu einem gegebenen Antikörper, kann beispielsweise wünschenswert sein. Solch eine Veränderung kann durch einen Immunoassay der kompetitiven Art gemessen werden, der gemäß Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, durchgeführt werden kann. Die jeweilige Rezeptorbindungsaffinität der VEGF-Variante kann durch ELISA-, RIA- und/oder BIAcore-Tests, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und in den nachstehenden Beispielen näher beschrieben sind, bestimmt werden. Bevorzugte VEGF-Varianten der Erfindung weisen auch Aktivität in KIRA-Tests (wie in den Beispielen beschrieben) auf, was die Fähigkeit widerspiegelt, Phosphorylierung des KDR-Rezeptors zu induzieren. Bevorzugte VEGF-Varianten der Erfindung induzieren Endothelzellproliferation (die mittels bekannter Verfahren wie dem HUVEC-Proliferationstest in den Beispielen bestimmt werden kann).

[0067] VEGF-Varianten können mittels Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, beispielsweise mittels Rekombinationsverfahren, hergestellt werden. Isolierte DNA, die in diesen Verfahren verwendet wird, soll hierin eine chemisch synthetisierte DNA, cDNA, chromosomale oder extrachromosomale DNA mit den oder ohne die 3' und/oder 5'-flankierenden Regionen bezeichnen. Vorzugsweise werden die VEGF-Varianten hierin durch Synthese in rekombinanter Zellkultur hergestellt.

[0068] Für eine solche Synthese ist es zuerst erforderlich, Nucleinsäure sicherzustellen, die für einen VEGF oder eine VEGF-Variante kodiert. DNA, die für ein VEGF-Molekül kodiert, kann aus bovinen Hypophysen-Follikelzellen durch (a) Erstellen einer cDNA-Bibliothek aus diesen Zellen, (b) Durchführen von Hybridisierungsanalyse mit markierter DNA, die für den VEGF oder Fragmente davon (mit einer Länge von bis zu oder mehr als 100 Basenpaaren) kodiert, um Klone in der Bibliothek zu detektieren, die homologe Sequenzen enthält, und (c) Analysieren der Klone durch Restriktionsenzymanalyse und Nucleinsäuresequenzieren, um Klone voller Länge zu identifizieren, erhalten werden. Sind keine Vollängen-Klone in einer cDNA-Bibliothek vorhanden,

so können geeignete Fragmente aus den verschiedenen Klonen unter Verwendung der hierin zum ersten Mal offenbarten Nucleinsäuresequenzinformation gewonnen und an Restriktionsstellen, die die Klone gemein haben, ligiert werden, um einen Klon voller Länge, der für den VEGF kodiert, zu assemblieren. Alternativ dazu liefern genomische Bibliotheken die erwünschte DNA.

[0069] Nachdem diese DNA identifiziert und aus der Bibliothek isoliert wurde, wird sie in einen replizierbaren Vektor für weiteres Klonieren oder für Expression ligiert.

[0070] In einem Beispiel eines Rekombinationsexpressionssystems wird ein für VEGF kodierendes Gen in einem Zellsystem durch Transformation mit einem Expressionsvektor, der für den VEGF kodierende DNA umfasst, exprimiert. Es ist vorzuziehen, Wirtszellen zu transformieren, die in der Lage sind, eine solche Verarbeitung zu bewirken, um den VEGF im Kulturmedium oder Periplasma der Wirtszelle zu erhalten, d.h. um ein sekretiertes Molekül zu erhalten.

[0071] "Transfektion" bezieht sich auf die Aufnahme eines Expressionsvektors durch eine Wirtszelle, unabhängig davon, ob Kodiersequenzen tatsächlich exprimiert werden oder nicht. Zahlreiche Transfektionsverfahren sind durchschnittlichen Fachleuten bekannt, beispielsweise CaPO_4 und Elektroporation. Erfolgreiche Transfektion wird im Allgemeinen erkannt, wenn jeglicher Hinweis auf das Agieren dieses Vektors innerhalb der Wirtszelle zu Tage tritt.

[0072] "Transformation" bezieht sich auf das Einführen von DNA in einen Organismus, sodass die DNA replizierbar ist, entweder als extrachromosomales Element oder durch chromosomale Integranten. Je nach verwendeter Wirtszelle erfolgt Transformation unter Verwendung von Standardverfahren, die für solche Zellen geeignet sind. Die Calciumchlorid einsetzende Calciumbehandlung, wie von Cohen, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69, 2110 (1972), und Mandel et al., J. Mol. Biol. 53, 154 (1970), beschrieben, wird im Allgemeinen für Prokaryoten oder andere Zellen, die wesentliche Zellwandbarrieren enthalten, verwendet. Für Säugetierzellen ohne solche Zellwände wird das Calciumphosphat-Ausfällungsverfahren von Graham & van der Eb, Virology 52, 456–457 (1978), bevorzugt. Allgemeine Aspekte zu Säugetierzell-Wirtssystemtransformationen werden von Axel im US-Patent Nr. 4.399.216, ausgegeben am 16. August 1983, beschrieben. Transformationen in Hefe werden typischerweise gemäß dem Verfahren von Van Solingen et al., J. Bact. 130, 946 (1977), und Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 3829 (1979), durchgeführt. Es können jedoch auch andere Verfahren zum Einführen von DNA in Zellen, beispielsweise Kerninjektion oder Protoplastenfusion, verwendet werden.

[0073] Die hierin offenbarten Vektoren und Verfahren sind zur Verwendung in Wirtszellen für einen breiten Bereich an prokaryotischen und eukaryotischen Organismen geeignet.

[0074] Im Allgemeinen werden natürlich Prokaryoten für das anfängliche Klonieren von DNA-Sequenzen und zur Konstruktion der Vektoren, die im Rahmen der Erfindung nützlich sind, bevorzugt. Der E.-coli-K12-Stamm MM 294 (ATCC-Nr. 31.446) beispielsweise ist besonders nützlich. Andere Mikrobenstämme, die verwendet werden können, umfassen E.-coli-Stämme wie z.B. E. coli B und E. coli X1776 (ATCC-Nr. 31.537). Diese Beispiele sollen natürlich nur der Veranschaulichung und nicht der Einschränkung dienen.

[0075] Prokaryoten können auch zur Expression verwendet werden. Die zuvor erwähnten Stämme sowie die E.-coli-Stämme W3110 (F-, lambda-, prototrophisch, ATCC-Nr. 27.325), K5772 (ATCC-Nr. 53.635) und SR101, Bacilli wie Bacillus subtilis und andere Enterobacteriaceae wie Salmonella typhimurium oder Serratia marcescens und verschiedene Pseudomonas-Spezies können verwendet werden.

[0076] Im Allgemeinen werden Plasmidvektoren, die Replicon- und Kontrollsequenzen aus Spezies, die mit der Wirtszelle kompatibel sind, enthalten, in Verbindung mit diesen Wirten verwendet. Der Vektor trägt üblicherweise eine Replikationsstelle sowie Markierungssequenzen, die in der Lage sind, phänotypische Selektion in transformierten Zellen bereitzustellen. E. coli beispielsweise wird typischerweise unter Verwendung von pBR322, einem Plasmid, das aus einer E.-coli-Spezies stammt, transformiert (siehe z.B. Bolivar et al., Gene 2, 95 (1977)). pBR322 enthält Gene für Ampicillin- und Tetracyclinresistenz und liefert somit ein einfaches Mittel zur Identifikation transformierter Zellen. Das pBR322-Plasmid, oder ein anderes/r mikrobielles/r Plasmid oder Phage, muss auch Promotoren enthalten oder modifiziert werden, um sie zu enthalten, die von Mikrobenorganismen zur Expression ihrer eigenen Proteine verwendet werden können.

[0077] Diese Promotoren, die am üblichsten in DNA-Rekombinationskonstruktion verwendet werden, umfassen die β -Lactamase (Penicillinase) und Lactose-Promotorsysteme (Chang et al., Nature 375, 615 (1978); Itakura et al., Science 198, 1056 (1977); Goeddel et al., Nature 281, 544 (1979)) und ein Tryptophan-(trp-)Pro-

motorsystem (Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.* 8, 4057 (1980); EPO-Anmeldung Veröffentlichungs-Nr. 0.036.776). Während diese die am häufigsten verwendeten sind, wurden auch andere mikrobielle Promotoren entdeckt und verwendet, und Details bezüglich ihrer Nucleotidsequenzen wurden bereits veröffentlicht, was erfahrenen Fachleuten die Möglichkeit verleiht, sie funktionell mit Plasmidvektoren zu ligieren (siehe z.B. Siebenlist et al., *Cell* 20, 269 (1980)).

[0078] Zusätzlich zu Prokaryoten können auch eukaryotische Mikroben, wie z.B. Hefekulturen, verwendet werden. *Saccharomyces cerevisiae*, oder gewöhnliche Bäckerhefe, ist der am häufigsten verwendete unter den eukaryotischen Mikroorganismen, auch wenn zahlreiche andere Stämme üblicherweise erhältlich sind. Zur Expression in *Saccharomyces* wird beispielsweise das Plasmid YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature* 282, 39 (1979); Kingsman et al., *Gene* 7, 141 (1979); Tschemper et al., *Gene* 10, 157 (1980)) üblicherweise verwendet. Dieses Plasmid enthält bereits das *trp1*-Gen, das einen Selektionsmarker für einen mutierten Hefestamm liefert, dem die Fähigkeit fehlt, in Tryptophan zu wachsen, z.B. ATCC-Nr. 44.076 oder PEP4-1 (Jones, *Genetics* 85, 12 (1977)). Die Gegenwart der *trp1*-Läsion als eine Eigenschaft des Hefewirtszellengenoms liefert dann eine wirksame Umgebung zur Detektion von Transformation durch Wachstum in Abwesenheit von Tryptophan.

[0079] Geeignete Promotorsequenzen in Hefevektoren umfassen die Promotoren für 3-Phosphoglyceratkinase (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255, 2073 (1980)) oder andere glykolytische Enzyme (Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.* 7, 149 (1968); Holland et al., *Biochemistry* 17, 4900 (1978)), wie Enolase, Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-phosphatisomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glucokinase. Bei der Konstruktion geeigneter Expressionsplasmide werden die mit diesen Genen assoziierten Terminationssequenzen auch in den Expressionsvektor 3' der Sequenz ligiert, von der erwünscht ist, dass sie exprimiert wird, um Polyadenylierung der mRNA und Termination bereitzustellen. Andere Promotoren, die den zusätzlichen Vorteil von Transkription, die durch Wachstumsbedingungen gesteuert wird, aufweisen, sind die Promotorregion für Alkoholdehydrogenase 2, Isocytochrom C, saure Phosphatase, abbauende Enzyme, die mit Stickstoffmetabolismus assoziiert sind, und die zuvor genannte Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase sowie Enzyme, die für Maltose- und Galactoseverwendung verantwortlich sind. Jeglicher Plasmidvektor, der Hefe-kompatible Promotor, Replikationsursprung und Terminationssequenzen enthält, ist geeignet.

[0080] Zusätzlich zu Mikroorganismen können auch Kulturen von Zellen, die aus multizellulären Organismen stammen, als Wirte verwendet werden. Im Prinzip ist jegliche solche Zellkultur bearbeitungsfähig, sowohl aus Wirbeltier- als auch aus Wirbellosenkultur. Das Interesse war jedoch an Wirbeltierzellen am größten, und die Vermehrung von Wirbeltierzellen in Kultur (Gewebekultur) wurde in den vergangenen Jahren zu einem Routineverfahren (*Tissue Culture*, Academic Press, Kruse & Patterson (Hrsg.) (1973)). Beispiele für nützliche Wirtszelllinien sind VERO- und HeLa-Zellen, Chinahamster-Eierstock-(CHO)-Zelllinien und W138-, BHK-, COS-7-, 293- und MDCK-Zelllinien. Expressionsvektoren für solche Zellen umfassen üblicherweise (sofern erforderlich) einen Replikationsursprung, einen vor dem zu exprimierenden Gen angeordneten Promotor, zusammen mit jeglichen notwendigen Ribosombindungsstellen, RNA-Spleißstellen, Polyadenylierungsstellen und Transkriptionsterminationssequenzen.

[0081] Bei der Verwendung in Säugetierzellen werden die Steuerungsfunktionen an den Expressionsvektoren häufig durch virales Material bereitgestellt. Üblicherweise verwendete Promotoren beispielsweise stammen aus Polyoma, Adenovirus 2 und am häufigsten aus Simian-Virus 40 (SV40). Die frühen und späten Promotoren von SV40-Virus sind besonders nützlich, da sie beide leicht aus dem Virus als ein Fragment gewonnen werden, das auch den viralen SV40-Replikationsursprung enthält (Fiers et al., *Nature* 273, 113 (1978)). Kleinere oder größere SV40-Fragmente können auch verwendet werden, vorausgesetzt, dass die etwa 250 bp umfassende Sequenz, die sich von der HindIII-Stelle in Richtung der BglII-Stelle, angeordnet im viralen Replikationsursprung, erstreckt, eingebunden ist. Weiters ist es auch möglich, und auch oft wünschenswert, Promotor- oder Kontrollsequenzen zu verwenden, die normalerweise mit der erwünschten Gensequenz assoziiert sind, vorausgesetzt, solche Kontrollsequenzen sind mit den Wirtszellsystemen kompatibel.

[0082] Ein Replikationsursprung kann entweder durch die Konstruktion des Vektors, sodass dieser einen exogenen Ursprung umfasst, wie er z.B. aus SV40 oder einer anderen viralen Quelle (z.B. Polyomavirus, Adenovirus, VSV, BPV) stammt, bereitgestellt werden oder kann durch den chromosomalen Wirtszellen-Replikationsmechanismus bereitgestellt werden. Wird der Vektor in das Wirtszellenchromosom integriert, so ist die letztgenannte Möglichkeit häufig ausreichend.

[0083] Zufriedenstellende Mengen an Protein werden mittels Zellkulturen produziert; Verfeinerungen unter Verwendung einer sekundären Kodiersequenz dienen jedoch einer noch weiteren Steigerung der Produktions-

niveaus. Eine sekundäre Kodiersequenz umfasst Dihydrofolatreductase (DHFR), die durch einen von außen gesteuerten Parameter wie Methotrexat (MTX) beeinflusst wird, wodurch die Steuerung von Expression durch die Steuerung der Methotrexatkonzentration ermöglicht wird.

[0084] Bei der Selektion einer bevorzugten Wirtszelle zur Transfektion durch die Vektoren der Erfindung, die DNA-Sequenzen umfassen, die sowohl für VEGF- als auch für DHFR-Protein kodieren, ist es angebracht, den Wirt gemäß dem verwendeten Typ von DHFR-Protein zu selektieren. Wird das Wildtyp-DHFR-Protein verwendet, so ist es vorzuziehen, eine Wirtszelle zu selektieren, die einen Mangel an DHFR aufweist, wodurch die Verwendung der DHFR-Kodiersequenz als ein Marker zur erfolgreichen Transfektion in selektivem Medium, dem Hypoxanthin, Glycin und Thymidin fehlt, ermöglicht wird. Eine geeignete Wirtszelle in diesem Fall ist die Chinahamstereierstock-(CHO-)Zelllinie, der DHFR-Aktivität fehlt, hergestellt und vermehrt wie von Urlaub & Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 4216 (1980), beschrieben.

[0085] Andererseits ist es, wenn DHFR-Protein mit geringer Bindungsaffinität für MTX als Kontrollsequenz verwendet wird, nicht erforderlich, DHFR-defiziente Zellen zu verwenden. Da die mutierte DHFR gegenüber Methotrexat resistent ist, kann MTX-haltiges Medium als ein Mittel zur Selektion verwendet werden, vorausgesetzt, dass die Wirtszellen selbst Methotrexat-empfindlich sind. Die meisten eukaryotischen Zellen, die in der Lage sind, MTX zu absorbieren, scheinen auf Methotrexat empfindlich zu sein. Eine solche nützliche Zelllinie ist eine CHO-Linie, CHO-K1 (ATCC-Nr. CCL 61).

[0086] Die Konstruktion geeigneter Vektoren, die die erwünschten Kodier- und Kontrollsequenzen enthalten, setzt standardmäßige Ligationsverfahren ein. Isolierte Plasmide oder DNA-Fragmente werden gespalten, zugeschnitten und neuerlich in erwünschter Form, um die erforderlichen Plasmide zu bilden, ligiert.

[0087] Sofern stumpfe Enden erforderlich sind, kann das Präparat 15 min lang bei 15°C mit 10 Einheiten Polymerase I (Klenow) behandelt, Phenol-Chloroform-extrahiert und Ethanol-gefällt werden.

[0088] Größentrennung der gespaltenen Fragmente kann unter Verwendung von beispielsweise 6% Polyacrylamidgel, wie von Goeddel et al., Nucleic Acids Res. 8, 4057 (1980), beschrieben wird, erfolgen.

[0089] Um zu bestätigen, dass korrekte Sequenzen in Plasmiden konstruiert wurden, werden die Ligationsgemische typischerweise verwendet, um E.-coli-K12-Stamm 294 (ATCC 31.446) oder andere geeignete E.-coli-Stämme zu transformieren, und erfolgreiche Transformanten werden durch Ampicillin- oder Tetracyclinresistenz, je nach Bedarf, selektiert. Plasmide aus den Transformanten werden mittels Restriktionskartierung und/oder DNA-Sequenzierung durch das von Messing et al., Nucleic Acids Res. 9, 309 (1981), beschriebene Verfahren oder durch das von Maxam et al., Methods of Enzymology 65, 499 (1980), beschriebene Verfahren hergestellt und analysiert.

[0090] Nach der Einführung der DNA in den Säugetierzellwirt und der Selektion von stabilen Transfektanten in Medium wird die Amplifikation von für DHFR-Protein kodierenden Sequenzen durch Züchten von Wirtszellkulturen in Gegenwart von Konzentrationen von etwa 20.000–500.000 nM Methotrexat (MTX), einem kompetitiven Inhibitor von DHFR-Aktivität, bewirkt. Der wirksame Konzentrationsbereich ist natürlich äußerst stark von der Beschaffenheit des DHFR-Gens und den Eigenschaften des Wirts abhängig. Es können somit natürlich keine allgemein definierten Ober- und Untergrenzen festgestellt werden. Geeignete Konzentrationen anderer Folsäureanaloge oder anderer Verbindungen, die DHFR inhibieren, könnten ebenfalls verwendet werden. MTX selbst ist jedoch praktisch, leicht erhältlich und wirksam.

2. Kovalente Modifikationen von VEGF-Varianten

[0091] Die VEGF-Varianten der Erfindung können auch weitere Modifikationen umfassen. Beispiele umfassen kovalente Modifikation(en) an einem oder mehreren Aminosäureresten. Cysteinyreste beispielsweise können mit Halogenacetaten (und entsprechenden Aminen) wie z.B. Chloressigsäure oder Chloracetamid umgesetzt werden, um Carboxymethyl- oder Carboxyamidomethyl-derivate zu ergeben. Cysteinyreste können auch durch Umsetzung mit Bromtrifluoracetat; β -Brom-(5-imidazolyl)propionsäure; Chloracetylphosphat; N-Acetylmaleinimiden, 3-Nitro-2-pyridyldisulfid; Methyl-2-pyridyldisulfid; p-Chlormercuribenzoat; 2-Chlormercuri-4-nitrophenol; oder Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol derivatisiert werden.

[0092] Ein anderes Beispiel umfasst das Derivatisieren von Histidylresten durch Umsetzung mit Diethylpyrocarbonat bei einem pH von 5,5–7,0. Parabromphenacylbromid, eine Reaktion, die vorzugsweise in 0,1 M Natriumcacodylat bei einem pH von 6,0 erfolgt, kann nützlich sein.

[0093] Lysinyl- und Amino-terminale Reste können mit Bernsteinsäure- oder anderen Carbonsäureanhydriden umgesetzt werden. Derivatisierung mit diesen Mitteln hat die Wirkung, die Ladung der Lysinylreste umzukehren. Andere geeignete Reagenzien zur Derivatisierung von β -Amino-hältigen Resten umfassen Imidoester wie Methylpicolinimidat; Pyridoxalphosphat; Pyridoxal; Chlorborhydrid; Trinitrobenzolsulfonsäure; O-Methylisoharnstoff; 2,4-Pentandion; und Transaminase-katalysierte Reaktion mit Glyoxylat.

[0094] Arginylreste können durch Umsetzung mit einem oder mehreren herkömmlichen Reagenzien, darunter Phenylglyoxal, 2,3-Butandion, 1,2-Cyclohexandion und Ninhydrin, modifiziert werden. Diese Reagenzien können auch verwendet werden, um die Epsilon-Aminogruppe von Lysin zu modifizieren. Derivatisierung von Argininresten sollte unter alkalischen Bedingungen erfolgen, da die Guanidin-funktionelle Gruppe einen hohen pK_a aufweist.

[0095] Die spezifische Modifikation von Tyrosylresten an sich wurde ausführlich untersucht, wobei besonderes Interesse auf das Einführen von Spektralmarkierungen in Tyrosylreste durch Umsetzung mit aromatischen Diazoniumverbindungen oder Tetranitromethan gelegt wurde. Am häufigsten werden N-Acetylimidazol und Tetranitromethan verwendet, um O-Acetyltyrosylspezies bzw. 3-Nitroderivate zu bilden. Tyrosylreste können unter Verwendung von ^{125}I oder ^{131}I , beispielsweise unter Verwendung des Chloramin-T-Verfahrens, das nachstehend beschrieben wird, iodiert werden, wodurch markierte Proteine zur Verwendung in Radioimmuntests hergestellt werden.

[0096] Carboxylseitengruppen (Aspartyl oder Glutamyl) können durch Umsetzung mit Carbodiimiden ($R'-N-C-N-R'$) wie 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-(4-ethyl))carbodiimid oder 1-Ethyl-3-(4-azonia-4,4-dimethylpentyl)carbodiimid selektiv modifiziert werden. Weiters können Aspartyl- und Glutamylreste zu Asparaginy- und Glutaminylresten durch Umsetzung mit Ammoniumionen umgesetzt werden.

[0097] Derivatisierung mit bifunktionellen Mitteln ist zur Vernetzung der VEGF-Variante zu einer wasserunlöslichen Trägermatrix oder -oberfläche nützlich. Üblicherweise verwendete Vernetzungsmittel umfassen z.B. 1,1-Bis(diazoacetyl)-2-phenylethan, Glutaraldehyd, N-Hydroxysuccinimidester, beispielsweise Ester mit 4-Azidosalicylsäure, homobifunktionelle Imidoester, einschließlich Disuccinimidylester wie 3,3'-Dithio-bis(succinimidylpropionat) und bifunktionelle Maleinimide wie Bis-N-maleinimido-1,8-octan. Derivatisierungsmittel wie Methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimidat ergeben photoaktivierbare Zwischenprodukte, die in der Lage sind, Vernetzungen in der Gegenwart von Licht zu bilden. Alternativ dazu können reaktive, wasserunlösliche Matrices wie Cyanogenbromid-aktivierte Kohlenhydrate und die in den US-Patent-Nr. 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; und 4.330.440 beschriebenen reaktiven Substrate zur Proteinimmobilisierung verwendet werden.

[0098] Glutaminyl- und Asparaginyreste werden häufig zu den entsprechenden Glutamyl- und Aspartylresten desamidiert. Alternativ dazu können diese Reste unter mild sauren Bedingungen desamidiert werden. Beide Formen dieser Reste liegen im Schutzzumfang dieser Erfindung.

[0099] Andere Modifikationen umfassen Hydroxylierung von Prolin und Lysin, Phosphorylierung von Hydroxylgruppen von Seryl- oder Threonylresten, Methylierung der α -Aminogruppen von Lysin-, Arginin- und Histidin-Seitenketten (Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 79-86 (1983)), Acetylierung des N-terminalen Amins und, in manchen Fällen, Amidierung der C-terminalen Carboxylgruppe.

[0100] Weitere Modifikationen umfassen das Binden oder Fusionieren der VEGF- oder VEGF-Variante (oder des VEGF-Agonisten) an ein nicht-proteinartiges Polymer wie Polyethylenglykol (PEG). Solche Verfahren zur PEGylierung von Proteinen sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt.

[0101] Die VEGF-Aminosäuresequenzvariante kann zumindest eine Aminosäuresequenz enthalten, die das Potenzial aufweist, durch eine N-Bindung glykosyliert zu werden, und die normalerweise im nativen VEGF nicht glykosyliert ist.

[0102] Das Einführen einer N-gebundenen Glykosylierungsstelle in die Variante erfordert eine Tripeptidylsequenz der Formel: Asparagin-X-Serin oder Asparagin-X-Threonin, worin Asparagin den Akzeptor darstellt und X jede beliebige der zwanzig genetisch kodierten Aminosäuren außer Prolin, die Glykosylierung unterbinden würde, ist. (Siehe Struck & Lennarz, in: *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* 35, Lennarz (Hrsg.), Plenum Press (1980); Marshall, *Biochem. Soc. Symp.* 40, 17 (1974); und Winzler, in: *Hormonal Proteins and Peptides*, Li (Hrsg.), Academic Press, New York, 1-15 (1973).) Die vorliegende Aminosäuresequenz-

variante wird durch Substituieren der Aminosäure(n) an der/den geeigneten Stelle(n) durch die geeigneten Aminosäuren, um Glykosylierung zu bewirken, modifiziert.

[0103] Ist O-gebundene Glykosylierung zu verwenden, so tritt O-glykosidische Bindung in Tierzellen zwischen N-Acetylgalactosamin, Galactose oder Xylose und einer oder mehreren Hydroxyaminosäuren, am üblichsten Serin oder Threonin, in manchen Fällen jedoch auch einem 5-Hydroxyprolin- oder 5-Hydroxylysinrest, platziert in der geeigneten Region des Moleküls, auf.

[0104] Glykosylierungsmuster für Proteine, die von Säugetieren produziert werden, werden im Detail in *The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control*, Putnam (Hrsg.), 2. Auflage, Academic Press, New York, 271–315 (1984), beschrieben. In diesem Kapitel werden Asparagin-gebundene Oligosaccharide erörtert, einschließlich ihrer Unterteilung in zumindest drei Gruppen, die als komplexe, mannosereiche und Hybridstrukturen bezeichnet werden, sowie O-glucosidisch gebundene Oligosaccharide.

[0105] Chemische und/oder enzymatische Bindung von Glykosiden an Proteine kann unter Verwendung zahlreicher verschiedener, aktivierter Gruppen erfolgen, wie beispielsweise von Apelin & Wriston in *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 259–306 (1981), beschrieben wird. Die Vorteile der chemischen Bindungstechniken sind, dass sie relativ einfach sind und die komplizierten enzymatischen Mechanismen, die für natürliche O- und N-gebundene Glykosylierung erforderlich sind, nicht benötigen. Je nach dem verwendeten Bindungsmodus kann/können der/die Zucker an (a) Arginin oder Histidin, (b) freie Carboxylgruppen wie jene von Glutaminsäure oder Asparaginsäure, (c) freie Sulfhydrylgruppen wie jene von Cystein, (d) freie Hydroxylgruppen wie jene von Serin, Threonin oder Hydroxyprolin, (e) aromatische Reste wie jene von Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan oder (f) die Amidgruppe von Glutamin gebunden werden. Diese Verfahren sind ausführlich in der PCT WO 87/05330, veröffentlicht am 11. September 1987, beschrieben.

[0106] Glykosylierungsmuster für Proteine, die von Hefe produziert werden, werden im Detail von Tanner & Lehle, *Biochim. Biophys. Acta* 906(1), 81–99 (1987), und von Kukuruzinska et al., *Annu. Rev. Biochem.* 56, 915–944 (1987), beschrieben.

[0107] Während die Glykosylierung von nativem VEGF für Bioaktivität nicht wesentlich ist (Walter et al., *Laboratory Investigation* 74, 546 (1996)), können die oben erwähnten Verfahren verwendet werden, um Glykosylierung einer VEGF-Variante, sofern erwünscht, zu verändern.

3. Therapeutische und diagnostische Verfahren

[0108] Die Erfindung stellt auch Verfahren zur Verwendung der offenbarten VEGF-Varianten bereit. Die Verfahren umfassen therapeutische Verwendungen sowie Verwendungen der Varianten zur Herstellung eines Medikaments zur Induktion von Vaskulogenese oder Angiogenese. Die Medikamente können auch für die Behandlung von Traumata am vaskulären Netzwerk hinsichtlich der Proliferation von Gefäßendothelzellen, die die Traumata umgeben würden, konzipiert werden. Beispiele für solche Traumata, die so behandelt werden könnten, umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, chirurgische Einschnitte, insbesondere jene, die das Herz einbinden, Wunden, einschließlich Schnittwunden, Inzisionen und Penetrationen von Blutgefäßen, und Oberflächengeschwüre, die das Gefäßendothel einbinden, wie z.B. diabetische Geschwüre, Blutergeschwüre und *Ulcus varicosum*. Es wird erwogen, dass VEGF-Varianten mit selektiver Bindungsaffinität zum KDR-Rezeptor verwendet werden können, wobei erwünscht wird, KDR-Rezeptoraktivierung zu erzielen, jedoch mögliche Nebenwirkungen, die mit FLT-1-Rezeptoraktivierung einhergehen, zu vermeiden.

[0109] Die VEGF-Variante kann auf eine Weise formuliert und dosiert werden, die mit üblicher medizinischer Praxis (GMP) konform geht, wobei das spezifische zu behandelnde Leiden, der Zustand des einzelnen Patienten, die Stelle der Zufuhr der VEGF-Variante, das Verabreichungsverfahren und andere Faktoren, die Fachleuten bekannt sind, in Betracht gezogen werden. Eine "wirksame Menge" einer VEGF-Variante umfasst Mengen, die das zu behandelnde Leiden oder Symptome davon unterbinden, dessen bzw. deren Verschlechterung eindämmen, sie erleichtern oder heilen.

[0110] VEGF-Varianten können durch Vermischen der VEGF-Variante mit dem erwünschten Reinheitsgrad mit physiologisch annehmbaren Trägern, Arzneimittelträgern oder Stabilisatoren zur Lagerung oder Verabreichung hergestellt werden. Geeignete Trägervehikel und ihre Formulierung, einschließlich anderer menschlicher Proteine, z.B. menschliches Serumalbumin, werden beispielsweise in Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16. Auflage, Mack Publishing Co., hrsg. von Oslo et al. (1980), beschrieben. Typischerweise wird eine geeignete Menge eines pharmazeutisch annehmbaren Salzes in der Formulierung verwendet, um die Formu-

lierung isotonisch zu machen. Beispiele für den Träger umfassen Puffer wie Kochsalzlösung, Ringer-Lösung und Dextrose-Lösung. Der pH der Lösung liegt vorzugsweise im Bereich von etwa 5,0 bis etwa 8,0. Ist die VEGF-Variante beispielsweise in Wasser löslich, kann sie in einem Puffer wie z.B. Phosphat oder in einem anderen Salz einer organischen Säure bei einem pH von etwa 7,0 bis 8,0 formuliert werden. Ist eine VEGF-Variante nur teilweise in Wasser löslich, so kann sie als Mikroemulsion durch Formulieren mit einem nichtionischen Tensid wie Tween, Pluronic oder PEG, z.B. Tween 80, in einer Menge von 0,04–0,05% (Gew./Vol.) formuliert werden, um ihre Löslichkeit zu steigern.

[0111] Weitere Träger umfassen Retardpräparate, die die Bildung von Mikrokapselpartikeln und implantierbaren Herstellungsartikeln umfassen. Beispiele für Retardpräparate umfassen beispielsweise semipermeable Matrices von festen hydrophoben Polymeren, worin die Matrices in der Form von Formartikeln, z.B. Filmen, Liposomen oder Mikropartikeln, vorliegen. Zur Herstellung von Retard-VEGF-Zusammensetzungsvarianten wird die VEGF-Variante vorzugsweise in eine biologisch abbaubare Matrix oder eine Mikrokapsel inkorporiert. Ein geeignetes Material für diesen Zweck ist ein Polylactid, auch wenn andere Polymere von Poly-(β -hydroxycarbonsäuren), wie z.B. Poly-D(-)-3-hydroxybuttersäure (EP 133A.988A), verwendet werden können. Andere biologisch abbaubare Polymere wie z.B. Poly(lactone), Poly(acetale), Poly(orthoester) oder Poly(orthocarbonate) sind ebenfalls geeignet.

[0112] Beispiele für Retardzusammensetzungen sind im US-Patent Nr. 3.773.919, in der EP 58.481A, dem US-Patent Nr. 3.887.699, der EP 158.277A, dem kanadischen Patent Nr. 1176565, in Sidman et al., Biopolymers 22, 547 (1983), und in Langer et al., Chem. Tech. 12, 98 (1982), zu finden.

[0113] Fachleuten wird ersichtlich sein, dass bestimmte Träger je nach beispielsweise der Art der Verabreichung und der Konzentration der verabreichten VEGF-Variante bevorzugter sein können.

[0114] Gegebenenfalls können andere Bestandteile wie Antioxidanzien, z.B. Ascorbinsäure; niedermolekulare Polypeptide (mit weniger als etwa zehn Resten), z.B. Polyarginin oder Tripeptide; Proteine, wie Serumalbumin, Gelatine oder Immunglobuline; hydrophile Polymere wie Polyvinylpyrrolidon; Aminosäuren wie Glycin, Glutaminsäure, Asparaginsäure oder Arginin; Monosaccharide, Disaccharide und andere Kohlenhydrate, einschließlich Cellulose oder ihre Derivate, Glucose, Mannose oder Dextrine; Chelatbildner wie EDTA; und Zuckeralkohole wie Mannit oder Sorbit zugesetzt werden. Die Verwendung von Arzneimittelträgern, Trägern, Stabilisatoren oder anderen Additiven kann zur Bildung von Salzen der VEGF-Variante dienen.

[0115] Bei der Auswahl von Trägern, Arzneimittelträgern, Stabilisatoren oder anderen Additiven sollten die ausgewählte(n) Verbindung(en) und entsprechenden Abbauprodukte nichttoxisch sein und ein Verschlimmern des behandelten Leidens und/oder der Symptome davon vermeiden. Dies kann mittels routinemäßigen Screenings an Tiermodellen mit dem betreffenden Leiden oder, sofern solche Modelle nicht verfügbar sind, an normalen Tieren bestimmt werden.

[0116] Die zur Verwendung zur therapeutischen Verabreichung beabsichtigte VEGF-Variante sollte steril sein. Sterilität wird leicht durch Filtration durch sterile Filtrationsmembranen (z.B. 0,2- μ m-Membranen) erhalten. Die VEGF-Variante wird üblicherweise in lyophilisierter Form oder als wässrige Lösung gelagert. Der pH der VEGF-Zusammensetzungsvarianten liegt typischerweise im Bereich von 5,0 bis 8,0, auch wenn höhere oder niedrigere pH-Werte in manchen Fällen auch geeignet sein können.

[0117] Die Verabreichung an ein Säugetier kann durch Injektion (z.B. intravenös, intraperitoneal, subkutan, intramuskulär) oder durch andere Verfahren wie Inhalation oder Infusion, die die Zufuhr in den Blutkreislauf in einer wirksamen Form sicherstellen, erfolgen. Gilt es, die VEGF-Variante parenteral zu verwenden, so werden therapeutische Zusammensetzungen, die die VEGF-Variante enthalten, im Allgemeinen in ein Behältnis gegeben, das eine sterile Zugriffsöffnung aufweist, beispielsweise in einen Beutel oder eine Phiole für eine intravenöse Lösung mit einem mittels einer Nadel zur subkutanen Injektion durchstechbaren Septum.

[0118] Im Allgemeinen kann, sofern es das Leiden zulässt, die VEGF-Variante für ortsspezifische Zufuhr formuliert und dosiert werden. Dies ist im Fall von Wunden und Geschwüren zweckdienlich.

[0119] Bei topischer Anwendung wird die VEGF-Variante geeigneterweise mit Additiven, wie z.B. Trägern, Adjuvantien, Stabilisatoren oder Arzneimittelträgern, kombiniert. Wie oben beschrieben sollten bei der Auswahl von Additiven für eine Beimischung mit einer VEGF-Variante die Additive pharmazeutisch annehmbar und für ihre beabsichtigte Verabreichung wirksam sein. Darüber hinaus sollten die Additive die Aktivität der VEGF-Varianten nicht beeinflussen. Beispiele für geeignete topische Formulierungen umfassen Salben, Cre-

men, Gele oder Suspensionen mit oder ohne gereinigtem/s Collagen. Die Zusammensetzungen können auch in transdermale Pflaster, Heftpflaster und Bandagen, vorzugsweise in flüssiger oder halbflüssiger Form, imprägniert werden.

[0120] Eine Gelformulierung mit der erwünschten Viskosität kann durch Vermischen einer VEGF-Variante mit einem wasserlöslichen Polysaccharid wie z.B. einem Cellulosederivat oder einem synthetischen Polymer wie z.B. Polyethylenglykol hergestellt werden. Die Bezeichnung "wasserlöslich", wenn im Zusammenhang mit Polysacchariden und Polyethylenglykolen verwendet, soll kolloidale Lösungen und Dispersionen umfassen. Im Allgemeinen wird die Löslichkeit beispielsweise von Cellulosederivaten durch den Substitutionsgrad der Ethergruppen bestimmt, und die hierin nützlichen, stabilisierenden Derivate sollten eine ausreichende Menge an solchen Ethergruppen pro Anhydroglucose-Einheit in der Cellulosekette aufweisen, um die Derivate wasserlöslich zu machen. Ein Ether-Substitutionsgrad von zumindest 0,35 Ethergruppen pro Anhydroglucose-Einheit ist im Allgemeinen ausreichend. Darüber hinaus können die Cellulosederivate in Form von Alkalimetallsalzen, z.B. Li-, Na-, K- oder Cs-Salzen, vorliegen.

[0121] Beispiele für geeignete Polysaccharide umfassen beispielsweise Cellulosederivate wie veretherte Cellulosederivate, einschließlich Alkylcellulosen, Hydroxyalkylcellulosen und Alkylhydroxyalkylcellulosen, z.B. Methylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Carboxymethylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose und Hydroxypropylcellulose; Stärke und fraktionierte Stärke; Agar; Algininsäure und Alginate; Gummiarabikum; Pullulan; Agarose; Carrageen; Dextrane; Dextrine; Fructane; Inulin; Mannane; Xylane, Arabinane; Chitosane; Glykogene; Glucane; und synthetische Biopolymere; sowie Gummiarten wie Xanthangummi; Guaran; Johannisbrotgummi; Gummiarabikum; Tragantgummi; und Karaya-Gummi; und Derivate und Gemische davon. Das hierin bevorzugte Geliermittel ist eines, das gegenüber biologischen Systemen inert, nichttoxisch, einfach herzustellen und nicht zu dünnflüssig oder zu zähflüssig ist und die in ihm gehaltene VEGF-Variante nicht destabilisiert.

[0122] Vorzugsweise ist das Polysaccharid ein verethertes Cellulosederivat, noch bevorzugter eines, das gut definiert, gereinigt und in der USP gelistet ist, beispielsweise Methylcellulose und die Hydroxyalkylcellulosederivate, wie z.B. Hydroxypropylcellulose, Hydroxyethylcellulose und Hydroxypropylmethylcellulose. Am meisten bevorzugt hierin ist Methylcellulose. Eine Gelformulierung beispielsweise, die Methylcellulose umfasst, umfasst etwa 2–5% Methylcellulose und 300–1.000 mg VEGF-Variante pro ml Gel. Noch bevorzugter umfasst die Gelformulierung etwa 3% Methylcellulose.

[0123] Das für eine Gelformulierung nützliche Polyethylenglykol ist typischerweise ein Gemisch mit nieder- und hochmolekularen Polyethylenglykolen, um die geeignete Viskosität zu erhalten. Ein Gemisch aus einem Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht von 400–600 und einem mit einem Molekulargewicht von 1.500 würde beispielsweise für diesen Zweck wirksam sein, wenn es im geeigneten Verhältnis vermischt wird, um eine Paste zu erhalten.

[0124] Die zu verwendende Dosierung hängt von den zuvor beschriebenen Faktoren ab. Als ein allgemeiner Vorschlag wird die VEGF-Variante in einer Dosierung formuliert und an die Targetstelle oder das Targetgewebe abgegeben, die in der Lage ist, im Gewebe zu einer VEGF-Variantenkonzentration von über 0,1 ng/cc zu führen, bis hin zu einer maximalen Dosis, die wirksam, jedoch nicht übermäßig toxisch ist. Diese Konzentration im Gewebe sollte, sofern möglich, durch kontinuierliche Infusion, Retardzufuhr, topische Anwendung oder Injektion in empirisch festgelegten Intervallen aufrechterhalten werden.

[0125] Es liegt im Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung, die VEGF-Varianten-Therapie mit anderen neuen oder herkömmlichen Therapien (z.B. mit auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Wachstumsfaktoren wie aFGF, bFGF, HGF, PDGF, IGF, NGF, anabolen Steroiden, EGF oder TGF- β) zur Steigerung der Aktivität von jedem beliebigen der Wachstumsfaktoren, einschließlich des nativen VEGF, bei der Förderung von Zellproliferation und -wiederherstellung zu kombinieren. Es ist nicht erforderlich, dass solche Wirkstoffe zur kombinierten Behandlung an sich in die Zusammensetzungen dieser Erfindung eingebunden sind, auch wenn dies günstig ist, wenn solche Wirkstoffe proteinartig sind. Solche Beimischungen werden in derselben Weise und für z.B. dieselben Zwecke wie die VEGF-Variante alleine geeignet verabreicht.

[0126] Wirksame Dosierungen und Verabreichungspläne können empirisch festgelegt werden, und solche Bestimmungen fallen in den Bereich der Erfindung.

[0127] Die VEGF-Varianten der Erfindung sind auch in Diagnoseverfahren und -tests nützlich. Die VEGF-Varianten können beispielsweise in Diagnosetests verwendet werden, um Expression oder Gegenwart von KDR-Rezeptor in Zellen und Geweben nachzuweisen. Verschiedene Diagnosetestverfahren, die auf dem Ge-

biet der Erfindung bekannt sind, können verwendet werden, wie z.B. In-vivo-Bildgebungstests, In-vitro-Konkurrenzbindungstests, direkte oder indirekte Sandwichtests und Immundefällungstests, die entweder in heterogenen oder homogenen Phasen durchgeführt werden. Die in solchen Tests verwendeten VEGF-Varianten können mit einer nachweisbaren Gruppierung markiert werden. Die nachweisbare Gruppierung sollte in der Lage sein, entweder direkt oder indirekt ein nachweisbares Signal zu produzieren. Die nachweisbare Gruppierung kann beispielsweise ein Radioisotop wie z.B. ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S oder ^{125}I , eine fluoreszierende oder chemolumineszierende Verbindung, wie Fluoresceinisothiocyanat, Rhodamin oder Luciferin, oder ein Enzym, wie alkalische Phosphatase, beta-Galactosidase oder Meerrettichperoxidase, sein. Jedes beliebige, auf dem Gebiet der Erfindung zum Konjugieren der VEGF-Variante an die nachweisbare Gruppierung bekannte Verfahren kann verwendet werden.

[0128] Die VEGF-Varianten können auch für Affinitätsreinigung von KDR-Rezeptor oder Flt-1-Rezeptor aus einer rekombinanten Zellkultur oder natürlichen Quellen verwendet werden. Die VEGF-Varianten können an einem geeigneten Träger, wie z.B. einem Harz oder einem Filterpapier, unter Verwendung von auf dem Gebiet der Erfindung bekannter Verfahren immobilisiert werden. Die immobilisierte VEGF-Variante kann dann mit der Probe, die KDR-Rezeptor oder Flt-1-Rezeptor enthält, kontaktiert werden, und hiernach wird der Träger mit einem geeigneten Lösungsmittel, das im Wesentlichen das gesamte Material in der Probe außer dem KDR-Rezeptor oder dem Flt-1-Rezeptor, der an die VEGF-Variante gebunden ist, entfernt, gewaschen. Sofern erwünscht, kann der Träger mit einem anderen geeigneten Lösungsmittel gewaschen werden, das den KDR-Rezeptor oder den Flt-1-Rezeptor von der VEGF-Variante freisetzt.

4. Herstellungsartikel

[0129] Herstellungsartikel und Sets werden ferner von der vorliegenden Anmeldung bereitgestellt. Ein Herstellungsartikel wie z.B. ein Set, das eine VEGF-Variante enthält, die für diagnostische Tests oder die Behandlung von hierin beschriebenen Leiden nützlich ist, umfasst zumindest ein Behältnis und eine Markierung. Geeignete Behältnisse umfassen beispielsweise Flaschen, Phiolen, Spritzen und Teströhrchen. Die Behältnisse können aus zahlreichen verschiedenen Materialien wie z.B. Glas oder Kunststoff hergestellt werden. Das Behältnis enthält eine Zusammensetzung, die zur Diagnose oder Behandlung des Leidens nützlich ist, und kann eine sterile Zugriffsöffnung aufweisen (beispielsweise kann das Behältnis ein Beutel für eine intravenöse Lösung oder eine Phiole mit einem Septum, das mit einer Nadel zur subkutanen Injektion durchstoßen werden kann, sein). Der Wirkstoff in der Zusammensetzung ist die VEGF-Variante. Die Markierung am Behältnis oder in Verbindung mit dem Behältnis weist darauf hin, dass die Zusammensetzung für diagnostische Zwecke oder zur Behandlung des jeweiligen Leidens verwendet wird. Der Herstellungsartikel kann ferner ein zweites Behältnis umfassen, das einen pharmazeutisch annehmbaren Puffer, wie z.B. phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Ringer-Lösung und Dextroselösung, umfasst. Es kann weiters andere Materialien umfassen, die aus kommerzieller Sicht und der Sicht des Verbrauchers wünschenswert sind, einschließlich anderer Puffer, Verdünnungsmittel, Filter, Nadeln, Spritzen und Packungsbeilagen mit Anleitungen zur Verwendung. Der Herstellungsartikel kann auch ein zweites oder drittes Behältnis mit einem anderen Wirkstoff, wie zuvor beschrieben, umfassen.

[0130] Die folgenden Beispiele werden lediglich zur Veranschaulichung und in keiner Weise zur Einschränkung des Schutzzumfangs der vorliegenden Erfindung bereitgestellt.

[0131] Alle in der vorliegenden Beschreibung zitierten Patente und Literaturverweise sind hierin durch Verweis in ihrer Gesamtheit aufgenommen.

BEISPIELE

[0132] Handelsübliche Reagenzien, auf die in den Beispielen Bezug genommen wird, werden, außer spezifisch anders festgehalten, gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Quelle jener Zellen, die in den folgenden Beispielen und auch in der gesamten Beschreibung durch ATCC-Zugriffsnummern identifiziert werden, ist die American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

BEISPIEL 1

Selektion von KDR-spezifischen VEGF-Varianten

[0133] Um KDR-spezifische Varianten zu bilden, wurden zwei Phagenbibliotheken konstruiert, in denen die Reste von VEGF(1–109), für die erkannt wurde, dass sie für Flt-1-Bindung, jedoch nicht für KDR-Bindung wichtig sind, nach dem Zufallsprinzip mutiert.

Phagemidkonstruktion

[0134] Um die Phagenbibliotheken zu konstruieren, wurde zuerst ein Phagemidvektor, der cDNA enthält, die für die Reste 1–109 von VEGF kodiert, hergestellt. Phagemidvektor pB2105 (Genentech, Inc.) wurde durch PCR-Amplifikation der für die Reste 1–109 von VEGF kodierenden cDNA unter Verwendung von Primern, die die darauf folgende Ligation von Nsi-I-/Xba-I-Restriktionsfragment in den Phagemidenvektor pHGHam-g3 (Genentech, Inc.) ermöglichen, produziert. Dieser führte ein Amber-Codon unmittelbar nach Rest 109 ein und fusionierte die VEGF-1–109-cDNA an die C-terminale Hälfte von gIII, die die Reste 249 bis 406 umfasste.

[0135] In einer Bibliothek waren alle möglichen Restekombinationen für VEGF 1–109 an den Positionen 18, 21, 22 und 25 (unter Verwendung von Oligonucleotiden, die Target-Codons zu NNS-Sequenzen änderten, worin N = G, A, T oder C und S = C oder G) zulässig, und eine Änderung war bei einer 40%igen Wahrscheinlichkeit für Position 17 (durch Auferlegen einer 70%igen Wahrscheinlichkeit von Wildtyp und einer 10%igen Wahrscheinlichkeit von jedem der drei anderen Basentypen für jede Base im Target-Codon) zugelassen.

[0136] Die folgenden Oligonucleotide wurden verwendet, um Target-Codons zu NNS-Sequenzen umzuändern.

L-528: CAC GAA GTG GTG AAG TTC NNS GAT GTC NNS NNS CGC AGC NNS TGC CAT
CCA ATC GAG (Seq.-ID Nr. 1)

L-530: GGG GGC TGC TGC AAT NNS GAG NNS NNS GAG TGT GTG CCC ACT (Seq.-ID
Nr. 2).

[0137] In der zweiten Bibliothek waren alle möglichen Reste-Kombinationen für VEGF 1–109 an den Positionen 63, 65 und 66 zulässig, und eine Veränderung wurde bei 40%iger Wahrscheinlichkeit für Position 64 zugelassen.

[0138] In der dritten Bibliothek waren alle möglichen Reste-Kombinationen für VEGF (1–109) an den Positionen 47 und 48 zulässig, und eine Veränderung wurde bei 50%iger Wahrscheinlichkeit für die Positionen 43 und 46 zugelassen. In der vierten Bibliothek waren alle möglichen Reste-Kombinationen für VEGF (1–109) an den Positionen 63, 65 und 66 zulässig, und eine Veränderung wurde bei 50%iger Wahrscheinlichkeit für Position 64 zugelassen.

[0139] Um KDR-selektive Varianten zu bilden, wurden die mutierten Regionen wie gezeigt in fünf Gruppen aufgeteilt, und die ersten vier wurden verwendet, um Bibliotheken für darauf folgende Phagendisplayselektionen zu konstruieren. Reste, die mit Sternchen (*) bezeichnet sind, wurden bei einer Vorgabe von 50% bezogen auf den Wildtyp "leicht randomisiert", und die mit zwei Sternchen markierten Reste wurden "stark randomisiert" (siehe [Fig. 7](#), unten).

Synthese von Heteroduplex-DNA

[0140] Heteroduplex-DNA wurde gemäß einem Verfahren von Kunkel et al., Meth. Enzym. 204, 125–139 (1991), das angepasst wurde, synthetisiert. Über dieses Verfahren wurde ein mutagenes Oligonucleotid in ein biologisch aktives, kovalent geschlossenes, ringförmiges DNA-(CCC-DNA-)Molekül inkorporiert. Das Verfahren wurde gemäß den folgenden Schritten ausgeführt.

[0141] Zuerst wurden die zuvor beschriebenen Oligonucleotide 5'-phosphoryliert. Dies erfolgte durch Kombinieren von 2 µg Oligonucleotid, 2 µl 10 × 100 TM-Puffer (500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, pH 7,5), 2 µl 10 mM ATP und 1 µl 100 mM DTT in einem Eppendorf-Röhrchen und anschließendes Zusetzen von Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl. Zwanzig Einheiten von T4-Polynucleotidkinase (Weiss-Einheiten) wurden zum Gemisch zugesetzt und 1 h lang bei 37°C inkubiert.

[0142] Als Nächstes wurde 5'-phosphoryliertes Oligonucleotid an eine Phagemidenmatrix (einzelssträngige DNA, gereinigt aus einem dut-/ung-E.-coli-Stamm CJ-236) anelliert.

[0143] Dies erfolgte zuerst durch Kombinieren von 1 µg einzelssträngiger DNA-Matrix, 0,12 µg phosphoryliertem Oligonucleotid und 2,5 µl 10 × TM-Puffer (500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, pH 7,5) und anschließend durch Zusetzen von Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 µl. Die DNA-Mengen lieferten ein Molverhältnis von Oligonucleotid:Matrix von 3:1, wobei angenommen wird, dass das Längenverhältnis von Oligonucleo-

tid:Matrix 1:100 beträgt. Das Gemisch wurde bei 90°C 2 min lang inkubiert, anschließend bei 50°C 3 min lang inkubiert und dann bei 20°C 5 min lang inkubiert.

[0144] Jedes 5'-phosphorylierte Oligonucleotid wurde dann enzymatisch verlängert und ligiert, um durch Zusetzen der folgenden Reagenzien zum anellierten Gemisch ein CCC-DNA-Molekül zu bilden: 1 µl 10 mM ATP, 1 µl 25 mM dNTPs, 1,5 µl 100 mM DTT, 3 Einheiten T4-DNA-Ligase und 3 Einheiten T7-DNA-Polymerase. Das Gemisch wurde dann bei 20°C zumindest 3 h lang inkubiert.

[0145] Die DNA wurde durch Ethanolfällung gereinigt und in 15 µl Wasser resuspendiert.

E.-coli-Elektroporation

[0146] Die Bibliotheksphagen wurden in einem E.-coli-Suppressorstamm, bekannt als E. coli XL1-blue (Stratagene, LaJolla, CA), durch E.-coli-Elektroporation gebildet. Zur Elektroporation wurde gereinigte Heteroduplex-DNA zuerst in einer Elektroporationsküvette mit einem 0,2-cm-Spalt auf Eis gekühlt, und eine 100-µl-Aliquote von elektrokompetentem E. coli XL1-blue wurde auf Eis aufgetaut. Die E.-coli-Zellen wurden zur DNA zugesetzt und durch mehrmaliges Pipettieren vermischt.

[0147] Das Gemisch wurde auf die Küvette transferiert und unter Verwendung eines "Gene Pulser" (Bio-rad, Hercules, CA) mit den folgenden Einstellungen Elektroporation unterzogen: 2,5 kV Feldstärke, 200 Ω Widerstand und 25 mF Kapazität. Unmittelbar hiernach wurde 1 ml SOC-Medium (5 g Bacto-Hefeextrakt, 20 g Bacto-Trypton, 0,5 g NaCl, 0,2 g KCl Zusatz von Wasser auf 1 l und Einstellen des pH auf 7,0 mit NaOH; Autoklavieren; dann Zusatz von 5 ml an autoklaviertem 2 M MgCl₂ und 20 ml von filtersterilisierter 1 M Glucose) zugesetzt, und das Gemisch wurde auf ein steriles Kulturröhrchen transferiert und 30 min lang bei 37°C unter Schütteln gezüchtet.

[0148] Um die Bibliotheksdiversität zu bestimmen, wurden Reihenverdünnungen auf 2YT-(10 g Bacto-Hefeextrakt, 16 g Bacto-Trypton, 5 g NaCl; Zusatz von Wasser auf 1 l und Einstellen des pH auf 7,0 mit NaOH; Autoklavieren)Platten (ergänzt mit 50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Darüber hinaus wurde die Kultur auf einen 250-ml-Kolben mit Prallflächen, der 25 ml 2YT, 25 mg/ml Ampicillin, M13-VCS (10¹⁰ pfu/ml) (Stratagene, LaJolla, CA) enthielt, transferiert und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

[0149] Die Kultur wurde dann 10 min lang bei 10.000 U/min, 2°C, in einem Sorvall-GSA-Rotor (16.000 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein frisches Röhrchen transferiert, und 1/5 Volumen von PEG-NaCl-Lösung (200 g/l PEG-8000, 146 g/l NaCl; autoklaviert) wurde zugesetzt, um den Phagen auszufällen. Die Überstands/PEG-NaCl-Lösung wurde 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und neuerlich zentrifugiert, um ein Phagenpellet zu erhalten.

[0150] Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Das Phagenpellet wurde neuerlich kurz zentrifugiert, und der verbleibende Überstand wurde entfernt und verworfen. Das Phagenpellet wurde in 1/20 Volumen von PBT-Puffer (PBS, 0,2% BSA, 0,1% Tween 20) resuspendiert, und unlösliches Material wurde durch 5-minütiges Zentrifugieren des resuspendierten Pellets bei 15.000 U/min, 2°C, in einem SS-34-Rotor (27.000 g) entfernt und verworfen. Der verbleibende Überstand enthielt den Phagen.

[0151] Der Überstand wurde abgenommen und zum Sortieren von VEGF-Varianten durch ihre Bindungsaffinitäten verwendet. Durch Produzieren des Phagen in einem Suppressorstamm von E. coli wurde VEGF(1–109)-Varianten-gIII-Fusionsprotein exprimiert und an der Phagenoberfläche präsentiert, was es ermöglichte, dass sich der Phage an KDR- und/oder Flt-1-Rezeptoren band.

Affinitätssortieren der Bibliotheken

[0152] Jede Bibliothek wurde auf Bindung an KDR(1–3)-Monomer unter Verwendung eines kompetitiven Bindungsverfahrens sortiert, das einem Verfahren ähnlich war, das von N. Jin, J. Clin. Invest. 98, 969 (1996), verwendet wurde und sich für die Bildung von Rezeptor-selektiven Varianten als nützlich erwies.

[0153] Um das Konkurrenzbindungsverfahren durchzuführen, wurde jede Bibliothek auf Bindung an immobilisiertes KDR(1–3)-Monomer (Genentech, South San Francisco, Kalifornien) in Gegenwart einer hohen Konzentration (100 nM) von konkurrierendem Flt-1(1–3)-Monomer (Genentech, Inc.) in Lösung sortiert. Dies erfolgte zuerst durch Beschichten von Maxisorp-Immunplattenwells (Nalge Nunc International, Rochester, New York) mit 80 µl pro Well von 2–5 µg/ml KDR(1–3)-Monomer in Beschichtungspuffer (50 mM Natriumcarbonat

bei pH 9,6) und Inkubieren über Nacht bei 4°C. Die Anzahl der erforderlichen Wells hängt von der Diversität der Bibliothek ab. Die Beschichtungslösung wurde entfernt und 1 h lang mit 200 µl von 0,2% BSA in PBS blockiert. Zum selben Zeitpunkt wurde eine entsprechende Anzahl an nicht beschichteten Wells als negative Kontrolle blockiert.

[0154] Die Wells wurden achtmal mit PT-Puffer (PBS, 0,05% Tween 20) gewaschen, um den Blockierungspuffer zu entfernen. Aliquoten von 100 µl Bibliotheksphagenlösung (10^{12} Phage/ml) in PBT-Puffer (PBS, 0,2% BSA, 0,1% Tween 20) wurden dann zu jedem der beschichteten und unbeschichteten Wells zugesetzt. Das Flt-1(1–3)-Monomer wurde mit der Phagenlösung zugesetzt. Die Wells wurden bei Raumtemperatur 2 h lang bei sanftem Schütteln inkubiert.

[0155] Die Wells wurden dann zehnmal mit PT-Puffer (PBS, 0,05% Tween 20) gewaschen, um die Phagenlösung und jeglichen Flt-1-gebundenen Phagen zu entfernen. KDR-gebundener Phage wurde aus den Wells durch Inkubieren der Wells mit 100 µl von 0,2 mM Glycin, bei einem pH von 2, 5 min lang bei Raumtemperatur eluiert. Um den KDR-gebundenen Phagen abzunehmen, wurde die Glycinlösung in ein Eppendorf-Röhrchen transferiert und mit 1,0 M Tris-HCl bei pH 8,0 neutralisiert.

[0156] Der KDR-gebundene Phage wurde dann durch Zusetzen der Hälfte der eluierten Phagenlösung zu 10 Volumina von aktiv wachsendem *E. coli* XL1-blue ($OD_{600} < 10$) und 30-minütigem Inkubieren bei 37°C unter Schütteln neuerlich vermehrt. Die Reihenverdünnungen der Kultur wurden dann auf 2YT/amp-Platten (2YT ergänzt mit 50 mg/ml Ampicillin) ausplattiert, um die Anzahl an eluierten Phagen zu bestimmen. Dies wurde sowohl für die mit KDR(1–3)-Monomer beschichteten Wells als auch für die unbeschichteten Kontroll-Wells bestimmt.

[0157] Die Kultur aus den Platten wurde auf 10 Volumina von 2YT/amp/VCS (2 YT ergänzt mit 50 mg/ml Ampicillin und 10^{10} pfu/ml M13-VCS) transferiert und über Nacht bei 37° unter Schütteln inkubiert. Die Phagen wurden dann isoliert.

[0158] Die Phagen, die sich neuerlich vermehrten, wurden wiederum auf Bindung an immobilisiertes KDR(1–3)-Monomer in Gegenwart einer hohen Konzentration (100 nM) an konkurrierendem Flt-1(1–3)-Monomer sortiert, gefolgt von Abwaschen der Flt-1-gebundenen Phagen und neuerlichem Vermehren des KDR-gebundenen Phagen. Das Affinitätssortierungsverfahren wurde durch Berechnen des Anreicherungsverhältnisses überwacht und wurde wiederholt, bis das Anreicherungsverhältnis einen Maximalwert erreicht hatte (etwa 5 bis 6 Sortierungszyklen).

[0159] Das Anreicherungsverhältnis ist die Anzahl an Phagen, die aus einem mit KDR(1–3)-Monomer beschichteten Well eluiert wurden, dividiert durch die Anzahl an Phagen, die sich an einen unbeschichteten Kontroll-Well binden. Ein Verhältnis größer als eins ist üblicherweise ein Hinweis auf Phagen, die sich spezifisch an das KDR(1–3)-Protein binden, wodurch gleichzeitig Resistenz gegenüber Bindung an zugesetztes Flt-1(1–3)-Monomer aufgezeigt wird. Hat das Anreicherungsverhältnis ein Maximum erreicht, so wurden einzelne Klone auf spezifische Bindung analysiert.

Phagen-ELISA

[0160] Spezifische Bindung von Phagen mit VEGF-1–109-Varianten-gIII-Protein an seiner Oberfläche an das KDR(1–3)-Monomer wurde unter Verwendung einer Phagen-ELISA gemäß Muller et al., PNAS 94, 7192 (1997), gemessen. Für die Phagen-ELISA wurden Mikrotiter-Platten (Maxisorp, Nunc-Immunoplate, Nalge Nunc International, Rochester, New York) mit gereinigtem KDR(1–3)-Monomer oder Flt-1(1–3)-Monomer (5 µg/ml) in 50 mM Natriumcarbonat bei einem pH von 9,6 beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Platten wurden mit 0,5% BSA blockiert. Als Nächstes wurden Reihenverdünnungen von VEGF-1–109-Varianten zusammen mit einer nicht sättigenden Konzentration von konkurrierendem Rezeptor (KDR(1–3)-Monomer oder Flt-1(1–3)-Monomer) zu den Wells in 100 µl Bindungspuffer (PBS, 0,5% Tween 20, 0,5% BSA) zugesetzt. Nach Gleichgewicht wurden die Platten gewaschen, und die gebundenen Phagemiden wurden mit Meerrettichperoxidasekonjugiertem Anti-M13-Antikörper (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) gemäß den Anweisungen des Herstellers gefärbt. Affinitäten (EC_{50}) wurden als die Konzentration von konkurrierendem Rezeptor berechnet, der zu halbmaximaler Phagemidenbindung führte.

[0161] Die Sequenzen von VEGF-1–109-Varianten, die aus der Affinitätssortierung erhalten wurden und Resistenz gegenüber Flt-1(1–3)-Monomer zeigten, wurden aus der Sequenz der Phagemiden-DNA bestimmt.

Reinigung von VEGF-1–109-Varianten

[0162] VEGF-1–109-Proteinvarianten wurden als Refraktilkörper aus der Schüttelkolbenkultur von *E. coli* (27c7) isoliert. Das Neufalten der mutierten Proteine erfolgte wie von Yihai et al., *J. Biol. Chem.* 271, 3154–3162 (1996), beschrieben. Die Varianten wurden vermischt und mit 6 M Guanidin-HCl plus 1 mM oxidiertes Glutathion bei pH 6 aufgefaltet und gegen 10 Volumina von 2 M Harnstoff mit 2 mM reduziertem Glutathion und 0,5 mM oxidiertem Glutathion in 20 mM Tris-HCl bei einem pH von 8 10 h lang dialysiert. Harnstoff wurde durch langsames Dialysieren gegen 20 Volumina von 20 mM Tris-HCl (pH 8) über Nacht bei 4°C entfernt. Jede der Varianten wurde durch Anionenaustausch (Pharmacia HiTrap Q, 1 ml) (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) weiter gereinigt, um Spuren von fehlgefaltetem Monomer zu entfernen. Die Identität der resultierenden reinen Varianten wurde durch SDS-PAGE und Massenspektrometrie bestätigt.

[0163] Tabelle 2 zeigt den VEGF-Varianten-Identifikationsnamen, die eingeführten Aminosäuresubstitutionen und das für die jeweiligen substituierten Aminosäuren kodierende Codon. Das Sternchen (*) neben bestimmten Variantennamen (wie z.B. LK-VRB-1s) weist auf verschiedene VEGF-Varianten hin, die besonders bevorzugte Bindungsaffinitäten und/oder biologische Aktivitäten aufweisen. Die Varianten-Identifikationsnamen, die ein "s" enthalten (wie z.B. LK-VRB-1s), bezeichnen VEGF-Polypeptidvarianten, die aus der 1–109-trunkierten Form von VEGF bestanden und die in der Tabelle bereitgestellten, angeführten Mutationen enthielten. Die Varianten-Identifikationsnamen, die ein "f" enthalten (wie z.B. LK-VRB-1f), bezeichnen VEGF-Polypeptidvarianten, die aus der Vollängen-1–165-Form von VEGF bestanden und die in der Tabelle bereitgestellten, angeführten Mutationen enthielten. Die Benennung und Identifikation der Mutationen in den variablen Sequenzen erfolgte gemäß der Namensgebungskonvention. Im ersten Eintrag in Tabelle 2 beispielsweise wird die Mutation als "M18E" bezeichnet. Dies bedeutet, dass die 18. Position der nativen VEGF-Sequenz (unter Verwendung der Nummerierung in der Aminosäuresequenz für nativen menschlichen VEGF wie von Leung et al., s.o., und Houck et al., s.o., berichtet) mutiert wurde, sodass das native Methionin (M) an dieser Position durch einen Glutaminsäure-(E-)Rest substituiert war, um die VEGF-Variante zu bilden. Die Säule in Tabelle 2 mit dem Titel "Nucleotidsequenz" stellt die jeweiligen Codons bereit, die (5' → 3') für jede der jeweiligen Aminosäuremutationen kodieren. Im ersten Eintrag in Tabelle 2 beispielsweise kodiert das Codon "GAG" für die M18E-Mutation.

TABELLE 2

VEGF-Varianten und entsprechende Mutationen

| Variante-Identifikationsname | Aminosäuremutation | Nucleotidsequenz |
|------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| LK-VRB-1s* | M18E/Y21L/Q22R/Y25S | GAG/CTC/CGG/AGC |
| LK-VRB-2s* | D63S/G65M/L66R | AGC/ATG/CGC |
| LK-VRB-3s | F17I/M18E/Y21F/Q22K/Y25S | ATT/GAG/TTC/AAG/AGC |
| LK-VRB-4s | F17I/M18E/Y21F/Q22E/Y25I | ATC/GAG/TTC/GAG/CAC |
| LK-VRB-5s | D63S/L66R | AAG/CAG |
| LK-VRB-6s | D63S/G65A/L66T | AAG/GGC/ATG |
| LK-VRB-7s* | M18E/D63S/G65M/L66R | GAG/AGC/ATG/CGC |
| LK-VRB-8s* | Y21L/D63S/G65M/L66R | CTC/AGC/ATG/CGC |
| LK-VRB-9s | Q22R/D63S/G65M/L66R | CGG/AGC/ATG/CGC |
| LK-VRB-10s | Y25S/D63S/G65M/L66R | AGC/AGC/ATG/CGC |
| LK-VRB-11s | M18E/Y21L/D63S/G65M/L66R | GAG/CTC/AGC/ATG/CGC |
| LK-VRB-12s | M18E/Q22R/D63S/G65M/L66R | GAG/CGG/AGC/ATG/CGC |
| LK-VRB-13s | M18E/Y25S/D63S/G65M/L66R | GAG/AGC/AGC/ATG/CGC |
| LK-VRB-14s | Y21L/Q22R/D63S/G65M/L66R | CTC/CGG/AGC/ATG/CGC |
| LK-VRB-15s | Y21L/Y25S/D63S/G65M/L66R | CTC/AGC/AGC/ATG/CGC |
| LK-VRB-16s | Q22R/Y25S/D63S/G65M/L66R | CGG/AGC/AGC/ATG/CGC |
| LK-VRB-17s | M18E/Y21L/Q22R/D63S/G65M/L66R | GAG/CTC/GAG/AGC/ATG/CGC |
| LK-VRB-18s | M18E/Q22R/Y25S/D63S/G65M/L66R | GAG/CGG/AGC/AGC/ATG/CGC |
| LK-VRB-19s | M18E/Q22R/Y25S/D63S/G65M/L66R | GAG/CGG/AGC/AGC/ATG/CGC |
| LK-VRB-20s | Y21L/Q22R/Y25S/D63S/G65M/L66R | CTC/CGG/AGC/AGC/ATG/CGC |
| LK-VRB-21s | D63S/M18E/Y21L/Q22R/Y25S | TCC/GAG/CTC/CGG/AGC |
| LK-VRB-22s | G65M/M18E/Y21L/Q22R/Y25S | ATG/GAG/CTC/CGG/AGC |
| LK-VRB-23s | L66R/M18E/Y21L/Q22R/Y25S | AGG/GAG/CTC/CGG/AGC |
| LK-VRB-24s | D63S/G65M/M18E/Y21L/Q22R/Y25S | TCC/ATG/GAG/CTC/CGG/AGC |
| LK-VRB-25s | D63S/L66R/M18E/Y21L/Q22R/Y25S | TCC/AGG/GAG/CTC/CGG/AGC |
| LK-VRB-26s | G65M/L66R/M18E/Y21L/Q22R/Y25S | ATG/AGG/GAG/CTC/CGG/AGC |
| LK-VRB-27s | M18E/Y21L/Q22R/Y25S/D63S/G65M/L66R | GAG/CTC/CGG/AGC/AGC/ATG/CGC |
| LK-VRB-1f | M18E/Y21L/Q22R/Y25S | GAG/CTC/CGG/AGC |
| LK-VRB-2f | D63S/G65M/L66R | AGC/ATG/CGC |

BEISPIEL 2

Bindung von VEGF-Varianten an KDR-Rezeptor

[0164] Die Bindung von VEGF(1-109)-Varianten und VEGF165-Varianten (beschrieben in Beispiel 1) an KDR-Rezeptor wurde durch Messen der Fähigkeit der Varianten, Bindung von biotinyliertem nativem VEGF(8-109) an KDR-Rezeptor zu inhibieren, evaluiert. Die evaluierten VEGF-Varianten enthielten die in Tabelle 2 gezeigten Mutationen.

[0165] Rezeptorbindungstests wurden in 96-Well-Immunplatten (Maxisorp, Nunc-Immunoplate, Nalge Nunc

International, Rochester, New York) durchgeführt. Jeder Well wurde mit 100 µl einer Lösung, die 8 µg/ml eines monoklonalen Antikörpers gegen KDR, bekannt als MAKD5 (Genentech, South San Francisco, Kalifornien), enthielten, in 50 mM Carbonatpuffer bei pH 9,6 beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Der Überstand wurde verworfen, die Wells wurden dreimal in Waschpuffer (0,05 Tween 20 in PBS) gewaschen, und die Platte wurde (150 µl pro Well) mit Blockierungspuffer (0,5% BSA, 0,01% Thimerosal in PBS) bei Raumtemperatur eine Stunde lang blockiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Wells wurden gewaschen.

[0166] In Serie verdünntes natives VEGF(8–109), natives VEGF(1–165), native VEGF(1–109)-Varianten oder VEGF165-Varianten (0,16–168 nM in Monomer) wurde(n) mit biotinyliertem nativem VEGF(8–109) (84 nM) und KDR(1–3) (1 µg/ml) 2 h lang bei Raumtemperatur in Testpuffer (0,5% BSA, 0,05% Tween 20 in PBS) inkubiert. Aliquoten dieses Gemischs (100 µl) wurden zu den vorbeschichteten Mikrotiterwells zugesetzt, und die Platte wurde 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Der Komplex aus KDR(1–3) und biotinyliertem nativem VEGF, der an die Mikrotiterplatte gebunden war, wurde durch Inkubieren der Wells mit Peroxidase-markiertem Streptavidin (0,2 mg/ml, Sigma, St. Louis, Missouri) 30 min lang bei Raumtemperatur nachgewiesen. Die Wells wurden dann mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (0,2 g/l; Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland) etwa 10 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Absorption wurde bei 450 nm an einem Vmax-Plattenleser (Molecular Devices, Menlo Park, Kalifornien) abgelesen.

[0167] Titrationskurven wurden mit einem Kurven-Anpassungsprogramm mit nicht-linearer Regression mit vier Parametern (KaleidaGraph, Synergy Software, Reading, Pennsylvania) angepasst. Es wurden Konzentrationen von VEGF-Varianten entsprechend der Mittelpunktaborption der Titrationskurve des nativen VEGF(8–109) berechnet und anschließend durch die Konzentration des nativen VEGF, die der Mittelpunktaborption der nativen VEGF-Titrationskurve entsprach, dividiert (siehe [Fig. 2](#)).

[0168] Die für die VEGF(1–109)-Varianten und VEGF165-Varianten bestimmten Bindungsaffinitäten sind in Tabelle 3 gezeigt. Zahlreiche der VEGF-Varianten zeigten Bindung an KDR-Rezeptor, die innerhalb des Zweifachen der Bindung von nativem VEGF(8–109) lag.

BEISPIEL 3

Bindung von VEGF-Varianten an Flt-1-Rezeptor

[0169] Die Bindung der VEGF(1–109)-Varianten und VEGF165-Varianten (beschrieben in Beispiel 1) an Flt-1-Rezeptor wurde durch Messen der Fähigkeit der Varianten, Bindung von biotinyliertem nativem VEGF(8–109) an Flt-1-Rezeptor zu inhibieren, evaluiert. Die bewerteten VEGF-Varianten enthielten die in Tabelle 2 gezeigten Mutationen.

[0170] Rezeptorbindungstests wurden in 96-Well-Immunplatten (Maxisorp, Nunc-Immunoplate, Nalge Nunc International, Rochester, New York) durchgeführt. Jeder Well wurde mit 100 µl einer Lösung, die 2 µg/ml Kaninchen-F(ab')₂ gegen menschliches IgG Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania) enthielt, in 50 mM Carbonatpuffer bei pH 9,6 beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Der Überstand wurde dann verworfen, die Wells wurden dreimal in Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS) gewaschen, und die Platte wurde (150 µl pro Well) mit Blockierungspuffer (0,5% BSA, 0,01% Thimerosal in PBS) bei Raumtemperatur eine Stunde lang blockiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Wells wurden gewaschen.

[0171] Die Wells wurden mit 100 µl einer Lösung, die Flt-IgG (ein chimäres Flt-menschliches Fc-Molekül) bei 50 ng/ml in Testpuffer (0,5% BSA, 0,05% Tween 20 in PBS) enthielt, aufgefüllt. Die Wells wurden bei Raumtemperatur 1 h lang inkubiert und dann dreimal in Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS) gewaschen.

[0172] In Serie verdünntes natives VEGF(8–109), natives VEGF165, VEGF(1–109)-Varianten oder VEGF165-Varianten (0,03–33 nM in Monomer) wurde(n) mit biotinyliertem nativem VEGF(8–109) (0,21 nM) oder biotinyliertem nativem VEGF165 (0,66 nM) vermischt. Aliquoten dieses Gemischs (100 µl) wurden zu den vorbeschichteten Mikrotiterwells zugesetzt, und die Platte wurde 2 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Der Komplex aus Flt-IgG und biotinyliertem nativem VEGF, der an die Mikrotiterplatte gebunden war, wurde durch Inkubieren der Wells mit Peroxidasemarkiertem Streptavidin (0,2 mg/ml, Sigma, St. Louis, Missouri) 30 min lang bei Raumtemperatur nachgewiesen. Die Wells wurden dann mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (0,2 g/l; Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland) etwa 10 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Absorption wurde bei 450 nm an einem Vmax-Plattenleser (Molecular Devices, Menlo Park, Kalifornien) abgelesen.

[0173] Titrationskurven wurden mit einem Kurven-Anpassungsprogramm mit nicht-linearer Regression mit vier Parametern (KaleidaGraph, Synergy Software, Reading, Pennsylvania) angepasst. Es wurden Konzentrationen von VEGF-Varianten entsprechend der Mittelpunktaborption der Titrationskurve des nativen VEGF(8-109) berechnet und anschließend durch die Konzentration des nativen VEGF, die der Mittelpunktaborption der nativen VEGF-Titrationskurve entsprach, dividiert.

[0174] Die für die VEGF(1-109)-Varianten und VEGF165-Varianten bestimmten Bindungsaffinitäten sind in Tabelle 3 gezeigt. Zahlreiche der VEGF-Varianten zeigten Bindung an Flt-1-Rezeptor, die mehr als 2.000fach geringer als die Bindung von nativem VEGF(8-109) war. Die in Tabelle 3 dargestellten relativen Bindungsaffinitätsdaten für bestimmte VEGF-Varianten (beispielsweise LK-VRB-7s* und LK-VRB-8s*) an FLT-1-Rezeptor sind nicht in nM-Werten angegeben, da das Ausmaß an nachweisbarer Bindung über der Empfindlichkeit des ELISA-Tests lag.

TABELLE 3

Bindung von VEGF-Varianten an KDR-Rezeptor und FLT-1-Rezeptor

| Varianten-Identifikationsname | Relative Bindungsaffinität | |
|---------------------------------|----------------------------|----------------|
| | KDR-Rezeptor | FLT-1-Rezeptor |
| LK-VRB-1s* | 1 nM/1 | 2700 nM/6000 |
| LK-VRB-2s* | 1 nM/1 | >400 nM/>1000 |
| LK-VRB-3s | 1 nM/1 | 170 nM/400 |
| LK-VRB-4s | 1 nM/1 | 100 nM/200 |
| LK-VRB-5s | 1 nM/1 | 233 nM/550 |
| LK-VRB-6s | 0.5 nM/0.5 | 4 nM/10 |
| LK-VRB-7s* | 1 nM/1 | />15000 |
| LK-VRB-8s* | 0.5 nM/0.5 | />21000 |
| LK-VRB-9s | 0.5 nM/0.5 | /300 |
| LK-VRB-10s | 0.5 nM/0.5 | />2400 |
| LK-VRB-11s | 2 nM/2 | />14000 |
| LK-VRB-12s | 0.4 nM/0.4 | />5600 |
| LK-VRB-13s | 14 nM/14 | />14000 |
| LK-VRB-14s | 0.5 nM/0.5 | />2900 |
| LK-VRB-15s | 2 nM/2 | />21000 |
| LK-VRB-16s | 0.6 nM/0.6 | />1400 |
| LK-VRB-17s | 3 nM/3 | />1900 |
| LK-VRB-18s | 130 nM/130 | />3900 |
| LK-VRB-19s | 7 nM/7 | />35000 |
| LK-VRB-20s | 2 nM/2 | />10000 |
| LK-VRB-21s | 3 nM/3 | />5600 |
| LK-VRB-22s | 4 nM/4 | />30 |
| LK-VRB-23s | 11 nM/11 | />8500 |
| LK-VRB-24s | 10 nM/10 | />18000 |
| LK-VRB-25s | 4 nM/4 | />12000 |
| LK-VRB-26s | 23 nM/23 | />25000 |
| LK-VRB-2f | 1 nM/1 | 19 nM/70 |
| Nativer Vergleichs-VEGF (8-109) | 1 nM/1 | 0.42 nM/1 |

BEISPIEL 4

Induktion von KDR-Rezeptor-Phosphorylierung durch VEGF(1–109)-Varianten

[0175] Um die Aktivität der VEGF-Varianten zu bestimmen, wurde die Fähigkeit der Varianten, Phosphorylierung des KDR-Rezeptors zu induzieren, in einem KIRA-Test bemessen. Die bewerteten VEGF-Varianten enthielten die in Tabelle 2 angegebenen Mutationen. Insbesondere wurden die folgenden VEGF(1–109)-Varianten untersucht: LK-VRB-1s*; LK-VRB-2s*; LK-VRB-3s; LK-VRB-4s; LK-VRB-5s; und LK-VRB-6s.

[0176] In Serie verdünnte VEGF(1–109)-Varianten (0,01–10 nM) wurden zu CHO-Zellen zugesetzt, die den KDR-Rezeptor mit einer gD-Markierung am N-Terminus (Genentech, South San Francisco, Kalifornien) exprimierten. Zellen wurden durch 0,5% Triton-X100, 150 mM NaCl, 50 mM Hepes bei pH 7,2 lysiert, und phosphorylierter gD-KDR-Rezeptor im Lysat wurde mittels Durchführung einer ELISA quantifiziert.

[0177] Für die ELISA wurden 96-Well-Immunplatten (Maxisorp, Nunc-Immunoplate, Nalge Nunc International, Rochester, New York) verwendet. Jeder Well wurde mit 100 µl einer Lösung, die 1 µg/ml eines monoklonalen Maus-Antikörpers gegen gD, bekannt als 3C8 (Genentech, South San Francisco, Kalifornien), in 50 mM Carbonatpuffer bei einem pH von 9,6 enthielt, beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen, die Wells wurden dreimal in Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS) gewaschen, und die Platte wurde (150 µl pro Well) mit Blockpuffer (0,5% BSA, 0,01% Thimerosal in PBS) 1 h lang bei Raumtemperatur blockiert. Der Überstand wurde dann verworfen, und die Wells wurden gewaschen.

[0178] Aliquoten des Lysats (100 µl) wurden zu den vorbeschichteten Mikrotiterwells zugesetzt 2 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Der phosphorylierte gD-KDR-Rezeptor wurde durch 2-stündiges Inkubieren der Wells mit biotinyliertem monoklonalem Antikörper gegen Phosphotyrosin, bekannt als 4G10 (0,05 mg/ml) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, New York) bei Raumtemperatur nachgewiesen, woraufhin Inkubieren der Wells mit Peroxidase-markiertem Streptavidin (0,2 mg/ml, Sigma, St. Louis, Missouri) 1 h lang bei Raumtemperatur folgte. Die Wells wurden dann mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (0,2 g/l; Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland) etwa 15–20 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Absorption wurde bei 450 nm an einem Vmax-Plattenleser (Molecular Devices, Menlo Park, Kalifornien) abgelesen.

[0179] Titrationskurven wurden mit einem Kurven-Anpassungsprogramm mit nicht-linearer Regression mit vier Parametern (KaleidaGraph, Synergy Software, Reading, Pennsylvania) angepasst. Es wurden Konzentrationen von VEGF-Varianten entsprechend der Mittelpunktaborption der Titrationskurve des nativen VEGF(8–109) berechnet und anschließend durch die Konzentration des nativen VEGF, die der Mittelpunktaborption der nativen VEGF-Titrationskurve entsprach, dividiert (siehe [Fig. 3](#)).

[0180] Die Phosphorylierung induzierenden Aktivitäten der VEGF-Varianten sind in Tabelle 4 bereitgestellt. Die VEGF-Varianten wiesen im Allgemeinen Phosphorylierung induzierende Aktivität auf, die innerhalb des Zweifachen der Aktivität von nativem VEGF(8–109) lag.

TABELLE 4

Induktion von KDR-Rezeptor-Phosphorylierung durch VEGF(1–109)-Varianten

| Varianten-Identifikationsname | Phosphorylierung induzierende Aktivität |
|--------------------------------|---|
| LK-VRB-1s* | 1 nM/0,5 |
| LK-VRB-2s* | 2 nM/1 |
| LK-VRB-3s | 2 nM/1 |
| LK-VRB-4s | 1 nM/0,5 |
| LK-VRB-5s | 1 nM/0,5 |
| LK-VRB-6s | 1 nM/0,5 |
| Nativer Vergleichs-VEGF(8-109) | 2 nM/1 |

BEISPIEL 5

Endothelzellproliferationstest

[0181] Die mitogene Aktivität von VEGF(1–109)- oder VEGF165-Varianten (sowie einer VEGF165-Variante LK-VRB-2f) wurde unter Verwendung von humanen venösen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) (Cell Systems, Kirkland, Washington) als Targetzellen bestimmt. Die evaluierten VEGF-Varianten enthielten die Mutationen aus Tabelle 2. Insbesondere wurden die folgenden VEGF(1–109)-Varianten untersucht: LK-VRB-1s*; LK-VRB-2s*; LK-VRB-7s*; und LK-VRB-8s*.

[0182] HUVEC ist eine primäre Zelllinie, die mit Wachstumsfaktoren wie saurem FGF in "CS-C Complete Growth Media" (Cell Systems, Kirkland, Washington) aufrechterhalten und gezüchtet wird. Als Vorbereitung für den Test wurde eine frühe Passage (weniger als fünf Passagen) der Zellen gewaschen und in 96-Well-Platten (3.000 Zellen in 100 µl pro Well) überimpft und in CS-C-Medium ohne jeglichen Wachstumsfaktor, jedoch ergänzt mit 2% dialysiertem fötalem Rinderserum (GibcoBRL, Gaithersburg, MD), 24 h lang bei 37°C mit 5% CO₂-Inkubator Fastenbedingungen unterzogen, bevor dies durch frisches Fastenmedium ersetzt wurde. VEGF-Varianten wurden in mehreren Konzentrationen (etwa 10 nM bis 0,01 nM), verdünnt im selben Fastenmedium, zu den Wells zugesetzt, um das Volumen auf 150 µl pro Well zu bringen, und 18 h lang inkubiert.

[0183] Um die durch die VEGF-Varianten induzierte DNA-Synthese zu messen, wurde ³H-Thymidin (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL) zu jedem Well bei 0,5 µCi pro Well zugesetzt und weitere 24 h lang inkubiert, sodass die Zellen die Radioaktivität aufnehmen konnten. Die Zellen wurden dann auf eine andere 96-Well-Filterplatte hin abgenommen, und die überschüssige Markierung wurde abgewaschen, bevor die Platten auf den Topcount (Packard, Meriden, Connecticut) geladen wurden.

[0184] Die Zellen wurden mittels Topcount gezählt. Die gemessenen Zählungen pro Minute (cpm) wurden in Diagrammform gegenüber der Konzentration einzelner Varianten dargestellt, um ihre Aktivitäten zu vergleichen ([Fig. 4](#)).

[0185] Die Zellproliferationsfähigkeiten der VEGF-Varianten sind in Tabelle 5 gezeigt. Die VEGF-Varianten wiesen im Allgemeinen Proliferationsfähigkeit auf, die innerhalb des Zweifachen der Fähigkeit des nativen VEGF(8–109) lag.

TABELLE 5

Mitogene Aktivität von VEGF(1–109)-Varianten

| Varianten-Identifikationsname | Endothelzell-Proliferationsaktivität |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| LK-VRB-1s* | 0,1 nM/0,2 |
| LK-VRB-2s* | 0,05 nM/0,1 |
| LK-VRB-7s* | 0,5 nM/1 |
| LK-VRB-8s* | 0,5 nM/1 |
| LK-VRB-2f | 0,05 nM/0,1 |
| Nativer Vergleichs-VEGF (8-109) | 0,5 nM/1 |

BEISPIEL 6

RIA-Test zur Bestimmung von Bindung von

VEGF-Varianten an KDR- und FLT-1-Rezeptoren

[0186] Ein RIA-Test wurde im Wesentlichen wie von Muller et al., RNAS 94, 7192–7197 (1997), beschrieben durchgeführt, um relative Bindungsaffinitäten mehrerer der VEGF-Varianten (in Tabelle 2 beschrieben) an den KDR-Rezeptor und FLT-1-Rezeptor im Vergleich zum nativen VEGF165 oder nativen VEGF(8–109) zu untersuchen. Die Resultate sind nachstehend in Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 6

| Relative Bindungsaffinität | | |
|-------------------------------|--------------|----------------|
| Varianten-Identifikationsname | KDR-Rezeptor | FLT-1-Rezeptor |
| Nativer VEGF165 | 1 (97 pM) | 1 (37 pM) |
| Nativer VEGF(8-109) | 12 | 29 |
| LK-VRB-1f | 8 | 1.700 |
| LK-VRB-1s* | 20 | 14.000 |
| LK-VRB-2f | 1 | 2.400 |
| LK-VRB-2s* | 2 | 27.000 |

BEISPIEL 7

[0187] Bindung von VEGF-Varianten an KDR- oder FLT-1-transfizierte Zellen Die Bindungseigenschaften von LK-VRB-2s* (siehe Beispiel 1, Tabelle 2) wurden in einem Rezeptor-transfizierten Zellbindungstest näher untersucht. KDR- oder Flt-1-transfizierte NIH3T3-Zellen wurden wie von Fuh et al., J. Biol. Chem. 273, 11187–11204 (1998), beschrieben hergestellt. Die transfizierten Zellen wurden in F12-Medium, ergänzt mit 10% FBS und 400 µg/ml G418 (GibcoBRL), aufrechterhalten. Für die Bindungstests wurden die Zellen in 12-Well-Platten bei 1×10^6 Zellen/Well ausplattiert, um am nächsten Tag Konfluenz zu erzielen. Die Zellen wurden dann gewaschen und in Hank's gepufferter Kochsalzlösung (HBS) mit 1% BSA 1 h lang vor dem Zusatz von 125 I-VEGF(1–109) (hergestellt mittels herkömmlichen Chloramin-T-Verfahrens) und Erhöhen der Konzentrationen an nicht markierten VEGF-Varianten blockiert. 50 pM und 10 pM an markiertem VEGF(1–109) wurden für KDR- bzw. Flt-1-Zellbindung verwendet. Die Platten wurden bei 4°C drei Stunden lang inkubiert und anschließend zweimal mit HBS mit 0,5% BSA gewaschen. Der gebundene markierte VEGF wurde durch Solubilisieren der gewaschenen Zellen mit 1 N NaOH gesammelt und dann in einem Gamma-Zähler (Isodata, ICN) gezählt.

[0188] Wie in [Fig. 5](#) gezeigt, zeigte LK-VRB-2s* Bindung an die transfizierten Zellen, die KDR exprimierten, die nativer VEGF-Bindung ähnlich war. Die Variante LK-VRB-2s* wies jedoch eine 200fach reduzierte Bindung an die mit Flt-1 transfizierten Zellen auf (siehe [Fig. 6](#)).

BEISPIEL 8 (Bezugsbeispiel)

Bildung und Selektion einer Flt-1-spezifischen VEGF-Variante

[0189] Ein Alanin-Scan (Wells, Methods Enzymol. 202, 390–411 (1991)) wurde verwendet, um die relative Bedeutung von einzelnen VEGF-Resten für KDR- gegenüber Flt-1-Bindung zu definieren. Die für Mutagenese selektierten Reste umfassten die 22 Kontaktreste, die in der Kristallstruktur des Komplexes zwischen der Rezeptor-Bindungsdomäne von VEGF und Domäne 2 von Flt-1 beobachtet wurden (Wiesmann et al., Cell 91, 695–704 (1997)), sowie Phe 47 und Glu 64, die davor als KDR-Bindungsdeterminanten identifiziert worden waren (Muller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 7192–7197 (1997)). Ortspezifische Mutagenese erfolgte unter Verwendung des Verfahrens von Kunkel et al., Methods Enzymol. 204, 125–139 (1991), im Hintergrund der Rezeptor-Bindungsdomäne (Reste 1 bis 109) von VEGF. Alle Mutationen wurden mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Die folgenden VEGF-Reste wurden individuell zu Alanin mutiert: Lys 16, Phe 17, Met 18, Tyr 21, Gln 22, Tyr 25, Ile 43, Ile 46, Phe 47, Lys 48, Asp 63, Glu 64, Gly 65, Leu 66, Gln 79, Met 81, Ile 83, His 86, Gln 89, Ile 91, Lys 101, Glu 103, Arg 105, Pro 106. Diese Reste wurden individuell zu Alanin im Hintergrund der Rezeptor-Bindungsdomäne von VEGF (Reste 1 bis 109; Keyt et al., J. Biol. Chem. 271, 7788–7795 (1996); Muller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 7192–7197 (1997)) mutiert.

[0190] Jedes mutierte Protein wurde produziert und bis zur Homogenität gereinigt, und eine enzymgekoppelte Immunadsorptionsbestimmung (ELISA) wurde verwendet, um Bindungsaffinitäten für die Domänen 1 bis 3 von KDR und Flt-1 zu bestimmen (diese drei Domänen enthalten die gesamte VEGF-Bindungsstelle; Wiesmann et al., Cell 91, 695–704 (1997); Fuh et al., J. Biol. Chem. 273, 11197–11204 (1998)). Für die ELISA wurden Mikrotiterplatten mit gereinigtem VEGF(8–109) (bei 5 µg/ml) in 50 mM Natriumcarbonat (pH 9,6) bei 4°C

über Nacht beschichtet. Die Platten wurden mit 0,5% BSA blockiert, und Reihenverdünnungen von konkurrierenden VEGF-Alaninmutanten und eine nicht sättigende Konzentration (100 pM) von Biotinmarkiertem Rezeptor (KDR(1–3) oder Flt1(1–3)) wurden zu den Wells in 100 µl Bindungspuffer (0,5% Tween20, 0,5% BSA in PBS) zugesetzt. Nach 1 Stunde wurden die Platten gewaschen, und das gebundene Protein wurde mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Pharmacia) gefärbt und getestet. Affinitäten wurden als IC_{50} -Werte geschätzt: die Konzentration von KDR(1–3) oder Flt1(1–3), die 50% von Proteinbindung blockierte.

[0191] Die Resultate dieser Analyse sind in [Fig. 7](#) gezeigt. Für jeden Rest ist das Verhältnis der IC_{50} der Mutante zur IC_{50} des Wildtyp-VEGF(8–109) aufgelistet, das die x-fache Reduktion von Bindung der Mutante im Vergleich mit jener des Wildtypproteins darstellt. IC_{50} s für Wildtyp-VEGF(8–109) sind in Klammern angegeben. Die in Fettdruck angegebenen Reste wurden verwendet, um die Flt-1-selektive Variante zu bilden.

[0192] Die gleichzeitige Analyse der VEGF-Mutanten für Flt-1-Bindung zeigt eine ähnliche und überlappende Rezeptor-Bindungsregion auf, die vorwiegend in der 20s-Helix und der 60s-Schleife angeordnet ist, wobei die wichtigsten Flt-1-Bindungs determinanten Phe 17, Tyr 21, Gln 22 und Leu 66 sind ([Fig. 7](#)). Dahingegen neigte eine Mutation der maßgeblichen Flt-1-Bindungs determinanten dazu, Affinität zu KDR signifikant zu reduzieren ([Fig. 7](#)).

[0193] Eine VEGF-Variante mit hoher Selektivität für den Flt-1-Rezeptor wurde durch Kombinieren von vier Mutationen, die KDR-Bindung umfassend beeinflussten, jedoch nicht Flt-1-Bindung, gebildet. Mutation zu Alanin von Ile 43, Ile 46, Gln 79 oder Ile 83 zeigte, dass die Seitenketten dieser Reste für feste Bindung an KDR maßgeblich, jedoch für Flt-1-Bindung bedeutungslos sind. Eine Variante (hierin als "Flt-sel" bezeichnet) wurde mit Alaninsubstitutionen an den Positionen Ile 43, Ile 46, Gln 79 und Ile 83 unter Verwendung von Verfahren für ortsgerichtete Mutagenese (Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 204, 125–139 (1991)) konstruiert. Diese bestimmte Flt-sel-Variante kann gemäß der in Beispiel 1 zuvor beschriebenen (und in Tabelle 2 veranschaulichten) Nomenklatur auch durch den Identifikationsnamen I43A/I46A/Q79A/I83A dargestellt werden. Die entsprechenden Codons für diese vier Alaninsubstitutionen an den Positionen 43, 46, 79 bzw. 83 sind GCC/GCC/GCG/GCC (gemäß der in Beispiel 1, oben, beschriebenen und in Tabelle 2 veranschaulichten Nomenklatur).

[0194] Verschiedene Tests wurden durchgeführt, um die Eigenschaften und biologischen Aktivitäten der I43A/I46A/Q79A/I83A-Flt-sel-Variante zu untersuchen. Quantitative Bindungsmessungen wurden beispielsweise unter Verwendung eines löslichen Radioimmun-Rezeptorbindungstests (RIA), wie oben in Beispiel 6 beschrieben, durchgeführt. In diesem Test zeigte nativer VEGF(8–109) Affinitäten zu KDR und Flt-1 von 0,5 nM bzw. 0,4 nM ([Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#)). Für die Variante Flt-sel wurde erkannt, dass sie zumindest 470fach reduzierte KDR-Bindungsaffinität in diesem Test aufwies ([Fig. 8A](#)). Da geringe Reduktionen von Flt-1-Bindung an den einzelnen Punktmutanten in der ELISA (oben beschrieben) beobachtet wurden, war die Beobachtung, dass die Affinität der Flt-sel-Variante zu Flt-1 im Wesentlichen identisch mit jener des nativen Proteins war ([Fig. 8B](#)), etwas überraschend.

[0195] Die Aktivität der Flt-sel-Variante wurde auch im in Beispiel 7 beschriebenen Zellbindungstest an 3T3-transfizierten Zellen getestet. In Übereinstimmung mit den RIA-Daten zeigte Flt-sel keine nachweisbare Bindung an KDR-transfizierte 3T3-Zellen und geringfügig verbesserte Bindung an Flt-1-transfizierte Zellen ([Fig. 5](#) und [Fig. 6](#)).

[0196] Die Aktivität der Flt-sel-Variante wurde auch im in Beispiel 4 beschriebenen KIRA-Test getestet. Die Resultate sind in [Fig. 9](#) gezeigt.

[0197] Die Aktivität der Flt-sel-Variante wurde im in Beispiel 5 beschriebenen HUVEC-Proliferationstest näher getestet. Die Resultate sind in [Fig. 10](#) gezeigt.

BEISPIEL 9

Matrixmetalloprotease-9-Test

[0198] Es wurde ein Test, der die Sekretion von Matrixmetalloprotease-9 nach Aktivierung von Flt-1, exprimiert an menschlichen Aorta-Glattmuskelzellen, misst, durchgeführt (Wang & Keiser, *Circ. Res.* 83, 832–840 (1998)). Menschliche Aorta-Glattmuskelzellen (ASMC) (Clonetics) wurden in SM2-Medium (Clonetics) bei 37°C in 5% CO₂ und 95% Umgebungsluft in der Gegenwart von 10% fötalem Rinderserum in 6-Well-Polystyrolplatten (Becton-Dickinson) aufrechterhalten. Sobald die Zellen 90%ige Konfluenz erreicht hatten, wurden

sie 24 h lang in serumfreiem Medium, das 0,2% bovines Serumalbumin (BSA) enthielt, in ihrem Wachstum angehalten. VEGF(1–109), PIGF (R & D Systems, Minneapolis, MN) oder VEGF(1–109)-Varianten (LK-VRB-2s* und Flt-sel (oben beschrieben)) wurden auf eine Endkonzentration von 40 ng/ml zugesetzt, und die Zellen wurden weitere 24 h lang in serumfreiem Medium, das 0,2% BSA enthielt, kultiviert. Gelatinase im konditionierten Medium wurde dann mittels Zymographie analysiert. Das Medium wurde abgenommen und eingengt, und 25-µl-Aliquoten wurden mit 2 × Probenpuffer ohne Reduktionsmittel oder Erhitzen vermischt. Die Proben wurden auf ein 10%iges Polyacrylamidgel, das 0,1% Gelatine (Novex, San Diego, CA) enthielt, zur Elektrophorese geladen. Zusätzlich zur Verwendung von regulären Molekulargewichtsmarkern wurden die MMP-2- und MMP-9-Zymographiestandards (Chemicon, Temecula, CA) als Standards für Gelatinasen verwendet. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Proteine durch 30-minütige Inkubation der Gele bei Raumtemperatur in Renaturierungspuffer und in Entwicklungspuffer (Novex) über Nacht bei 37°C renaturiert. Die Gele wurden mit 0,25% Coomassie Brilliant Blue (Sigma) gefärbt. Gelatinase-Aktivität wurde als leicht gefärbte oder klare Banden nach dem Entfärben identifiziert.

[0199] Die Resultate sind in [Fig. 11](#) dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Zymogramm eines der zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche. x-fache Veränderung stellt die relative Bandendichte der VEGF(1–109)-, VEGF(1–109)-Varianten- oder PIGF-behandelten Gruppen gegenüber der Vehikel-behandelten (PBS-)Kontrolle dar. Im Gegensatz zu LK-VRB-2s* war Flt-sel in diesem Test vollständig aktiv im Vergleich zur Aktivität des nativen VEGF(1–109) oder PIGF ([Fig. 11](#)).

BEISPIEL 10

Aktivierung von MAP-Kinasen

[0200] Es wurden Tests durchgeführt, um zu bestimmen, ob nativer VEGF, KDR-selektive VEGF-Variante oder Flt-selektive VEGF-Variante in der Lage waren, mitogene Signalgebung zu vermitteln.

[0201] Passage-4-7-HUVEC-Zellen (Cell Systems, Kirkland, WA) wurden in komplettem Medium von Cell System (AZ0-500) mit 10% fötalem Kälberserum und Wachstumsfaktoren auf mit Gelatine beschichteten Schalen gezüchtet und wurden durch 14-stündiges Aushungern in 0,2%igem Serum in Ruhezustand versetzt. Ruhende HUVEC-Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder mit nativem VEGF(1–165) oder mit VEGF-Varianten (einer Flt-selektiven Variante, die Vollängen-165-Sequenz umfasst und die Alaninaminosubstitutionen I43A/I46A/Q79A/I83A, die für die "kurze Form" (1–109) der Flt-sel-Variante in Beispiel 8, oben, beschrieben wurde, enthielt; oder mit der KDR-selektiven Variante (die auch die Vollängen-165-Sequenz umfasst), bezeichnet als LK-VRB-2f (siehe Beispiel 1; Tabelle 2)) (in Konzentrationen von entweder 50 ng/ml oder 10 ng/ml) 5 min lang stimuliert. Sowohl der native VEGF(1–165) als auch die VEGF-Varianten wurden in *E. coli* exprimiert und wie in Keyt et al., *J. Biol. Chem.* 271, 5638–5646 (1996), beschrieben gereinigt. Die HUVEC-Zellen wurden dann in 0,5–1 ml RIPA-Puffer, der 0,1 mM Natriumorthovanadat, 5 mM para-Nitrophenylphosphat, 10 mM Natriumfluorid, 0,5 µM Okadainsäure und eine Protease-Inhibitor-Mischung (Roche MB 1836145) enthielt, lysiert. Western-Blot-Analyse wurde dann durchgeführt, wobei auf phosphorylierte ERK1 und ERK2 unter Verwendung von Anti-Phospho-ERK-Antiserum (Promega) sondiert wurde.

[0202] Aktivierung durch die KDR-selektive VEGF-Variante LK-VRB-2f löste Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 in HUVEC-Zellen aus ([Fig. 12A](#)). Das Ausmaß von Phosphorylierung war von jenem, das unter Verwendung von nativem VEGF(1–165) erzielt wurde, nicht zu unterscheiden. Die Flt-1-selektive VEGF-Variante (bei der höchsten verwendeten Konzentration) führte zu kaum nachweisbarer Phosphorylierung von ERK2. Von den in dieser Untersuchung verwendeten, homodimeren VEGF-Varianten wird nicht erwartet, dass sie Rezeptorheterodimer-Bildung fördern. Somit trägt Flt-1 nicht zur MAP-Kinaseaktivierung bei.

[0203] Von VEGF wurde bereits früher berichtet, dass er stressaktivierte p38-MAP-Kinase stimuliert (Rousseau et al., *Oncogene* 15, 2169–2177 (1997); Yu et al., *J. Cell. Phys.* 178, 235–246 (1999)). Um zu analysieren, welcher VEGF-Rezeptor eingebunden ist, wurde der Phosphorylierungsstatus von p38 nach Stimulierung mit nativem VEGF(1–165), Flt-1-selektiver Variante oder LK-VRB-2f (oben beschrieben) untersucht.

[0204] Passage-4-7-HUVEC-Zellen (Cell Systems, Kirkland, WA) wurden in komplettem Medium von Cell System (AZ0-500) mit 10% fötalem Kälberserum und Wachstumsfaktoren auf mit Gelatine beschichteten Schalen gezüchtet und wurden durch 14-stündiges Aushungern in 0,2%igem Serum in Ruhezustand versetzt. Ruhende HUVEC-Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder mit nativem VEGF(1–165) oder mit VEGF-Varianten (Flt-sel (Vollängen-165-Form) oder LK-VRB-2f; beide oben für den ERK1- und ERK2-Test beschrieben) (in Konzentrationen von entweder 50 ng/ml oder 10 ng/ml) 5 min lang stimuliert. Die Zellen wurden

dann in 0,5–1 ml RIPA-Puffer, der 0,1 mM Natriumorthovanadat, 5 mM para-Nitrophenylphosphat, 10 mM Natriumfluorid, 0,5 μ M Okadainsäure und eine Protease-Inhibitor-Mischung (Roche MB 1836145) enthielt, lysiert. Der Phosphorylierungszustand von stressaktivierter p38-MAP-Kinase wurde mit einem spezifischen Anti-Phospho-p38-Antiserum (NEB) bewertet.

[0205] [Fig. 12B](#) zeigt, dass die KDR-selektive VEGF-Variante in der Lage war, p38-Phosphorylierung zu stimulieren.

BEISPIEL 11

KDR stimuliert PI-3'-Kinase und PLC-gamma-Phosphorylierung

[0206] PLC-gamma-Phosphorylierung und -Aktivierung wurden bereits früher in VEGF-Signalgebung eingebunden. Über PLC-gamma-Bindung sowohl an KDR (Dougher et al., *Oncogene* 18, 1619–1627 (1999); Cunningham et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 240, 635–639 (1997)) als auch an Flt-1 (Seetharam et al., *Oncogene* 10, 135–147 (1995); Sawano et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 238, 487–491 (1997); Ito et al., *J. Biol. Chem.* 273, 23410–23418 (1998)) wurde bereits berichtet.

[0207] Um zu bestimmen, welche(r) VEGF-Rezeptor(en) in PLC-gamma-Aktivierung in primären Endothelzellen eingebunden ist/sind, wurden HUVEC-Zellen mit nativem VEGF oder VEGF-Rezeptor-selektiven Varianten behandelt, und PLC-gamma-Phosphorylierung wurde nach Immunfällung bewertet.

[0208] Passage-4-7-HUVEC-Zellen (Cell Systems, Kirkland, WA) wurden in komplettem Medium von Cell System (AZ0-500) mit 10% fötalem Kälberserum und Wachstumsfaktoren auf mit Gelatine beschichteten Schalen gezüchtet und wurden durch 14-stündiges Aushungern in 0,2%igem Serum in Ruhezustand versetzt. Ruhende HUVEC-Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder mit nativem VEGF(1–165) oder mit VEGF-Varianten (Flt-sel (Vollängen-165-Form) oder LK-VRB-2f; beide oben in Beispiel 10 beschrieben) (in Konzentrationen von 20 ng/ml) 5 min lang stimuliert. Die Zellen wurden dann in 0,5–1 ml RIPA-Puffer, der 0,1 mM Natriumorthovanadat, 5 mM para-Nitrophenylphosphat, 10 mM Natriumfluorid, 0,5 μ M Okadainsäure und eine Protease-Inhibitor-Mischung (Roche MB 1836145) enthielt, lysiert. PLC-gamma wurde dann aus Ganzzelllysaten unter Verwendung monoklonaler Antikörper (Upstate Biotechnology) immungefällt und auf Tyrosinphosphorylierung analysiert ([Fig. 13A](#)), oder die Lysate wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen p85-PI-3'-Kinase (erworben bei Transduction Labs (P13020) und Neomarkers (MS424-P)) immungefällt und auf Phosphotyrosin unter Verwendung von Phosphotyrosin-Antikörpern PY20 oder E120H (Transduction Labs) getestet ([Fig. 13B](#)). Immunfällung wurde wie folgt durchgeführt. Protein-A/G-Kügelchen (Pierce) wurden für nichtspezifische Proteinbindung in 50 mM HEPES, pH 7,2, 0,1% TX-100, 150 mM NaCl und 1 mg/ml Ovalbumin 30 min lang blockiert. Antikörper wurden im selben Puffer 1 h lang bei 4°C mittels Kopf-über-Ende-Rotation vorgebunden, und die Kügelchen wurden dreimal in Lysepuffer gewaschen. Die Kügelchen wurden zu den Lysaten zugesetzt und über Nacht rotieren gelassen. Die Kügelchen wurden in Folge in 50 mM Tris, pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% TX-100, 1 mM CaCl_2 ; 50 mM Tris, pH 7,6, 500 mM NaCl, 0,1% TX-100, 1 mM CaCl_2 und 50 mM Tris, pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,05% TX-100, 1 mM CaCl_2 gewaschen. Die Kügelchen wurden dann in 2 \times Probenpuffer resuspendiert und gesiedet. Die Überstände wurden direkt auf 4–12%ige Tris-Glycin-Gradientengele (Novex) aufgetragen.

[0209] Wie in [Fig. 13A](#) gezeigt, waren sowohl nativer VEGF als auch KDR-selektive VEGF-Variante in der Lage, PLC-gamma-Phosphorylierung zu einem ähnlichen Ausmaß zu stimulieren. Die Flt-1-selektive VEGF-Variante steigerte PLC-gamma-Phosphorylierung nicht über Hintergrundniveaus, was gegen eine Rolle von Flt-1 bei PLC-gamma-Aktivierung in HUVEC-Zellen spricht.

[0210] Für PI-3'-Kinase wurde gezeigt, dass sie Überlebenssignale durch die Aktivierung von Akt in mehrere Zelltypen überträgt (Marte et al., *Trends Biochem. Sci.* 22, 355–358 (1997)). VEGF wirkt auch als ein Überlebensfaktor für Endothelzellen, und dieses Signal erfordert PI-3'-Kinase- und Akt-Kinaseaktivität (Gerber et al., *J. Biol. Chem.* 273, 30366–30343 (1998)). In zahlreichen verschiedenen Zelltypen wurde für PI-3'-Kinaseaktivität gezeigt, dass sie in Zytoskelett-Veränderungen nach Wachstumsfaktorstimulierung sowie in Migration eingebunden ist (Wennstrom et al., *Curr. Biol.* 4, 385–393 (1994)). Daher wurde die Fähigkeit der VEGF-Proteine, Phosphorylierung der p85-Regulationsuntereinheit von PI-3'-Kinase zu verursachen, nach der Immunfällung bewertet. Nur nativer VEGF und die KDR-selektive VEGF-Variante waren in der Lage, Phosphorylierung der PI-3'-Kinase-Regulationsuntereinheit, wie in [Fig. 13B](#) gezeigt, zu verursachen.

BEISPIEL 12

Wirkungen auf Endothelzellmigration

[0211] Einer der zentralen Aspekte von VEGF-Wirkung auf Endothelzellen ist ihre Fähigkeit, als ein chemisches Attraktans zu wirken und die Migration von Endothelzellen zu stimulieren. HUVEC-Zellmigration wurde in einem modifizierten Boyden-Kammer-Test wie folgt analysiert.

[0212] Falcon-8,0-µm-Filterinserts (Falcon 3097) wurden mit Typ-1-Collagen (VITROGEN, COHESION) beschichtet. HUVEC (erhalten bei Cell Systems, <Passage 8) wurden in komplettem Medium von Cell System (4ZO-500) mit 10% FCS gezüchtet. Die Zellen wurden trypsinisiert und auf EBM ("Endothelial Basal Media", Clonetics) mit 0,1% BSA für den Test transferiert. Die Zellen wurden bei 5×10^4 pro obere Kammer ausplattiert. Wachstumsfaktoren (VEGF(1–165); Flt-1-selektive Variante; LK-VRB-2f; beschrieben in Beispiel 10) wurden in die untere Kammer (in den in den [Fig. 14A](#) und [Fig. 14B](#) angegebenen Konzentrationen) und Inhibitoren in die obere Kammer gegeben. Der Test war routinemäßig ein 18-h-Test, durchgeführt bei 37°C. Für die LY294002-Inhibitorversuche wurden Zellen 30 min lang vor Zusatz des Inhibitors anhaften gelassen. 20 min nach Inhibitorzusatz wurde VEGF zum untersten Well zugesetzt, und der Test wurde nur 4 h weiter laufen gelassen, um das Auftreten von Apoptose zu vermeiden, die mit der Behandlung dieser primären Zellen mit LY294002 (erhalten bei Biomol) assoziiert ist.

[0213] Die Zellen wurden von der oberen Seite der Membran durch Abschaben mit einem Polyurethantupfer entfernt, und dann wurden die verbleibenden Zellen an der unteren Seite der Membran mit Methanol fixiert. Die Zellen wurden mit Yo-Pro-Iodid-Nuclearstamm (Molecular Probes) gefärbt und unter schwacher Fluoreszenz unter Verwendung eines Image-Pro-Zellerkennungsprogramms gezählt.

[0214] [Fig. 14A](#) zeigt die Wirkung von Rezeptor-selektiven VEGF-Varianten auf HUVEC-Zellen (in den angegebenen Konzentrationen) in einem modifizierten Boyden-Kammer-Test (die Versuche wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt; Fehlerbalken stehen für den Standardfehler). In mehreren unabhängigen Versuchen verursachte nativer VEGF eine 4- bis 5fache Steigerung von HUVEC-Zellmigration. Die KDR-selektive VEGF-Variante war bei der Förderung von HUVEC-Zellmigration gleich wirksam wie der native VEGF. Die Flt-1-selektive Variante war nicht in der Lage, Zellmigration über Hintergrundniveaus hinaus zu steigern.

[0215] Um den Beitrag von PI-3-Kinase zu Endothelzellmigration zu bestimmen, wurden verschiedene Konzentrationen des Inhibitors LY 294002 zum Test zugesetzt, nachdem die Zellen an die Membran anhaften gelassen worden waren. Aufgrund der schädlichen Wirkungen von PI-3'-Kinaseinhibierung auf das Überleben von Endothelzellen wurde ein kurzer Test durchgeführt (wie oben beschrieben). [Fig. 14B](#) zeigt, dass LY 294002 in seiner höchsten Konzentration eine 56%ige Inhibierung von HUVEC-Zellmigration verursachte. Somit trägt PI-3'-Kinaseaktivität zu Endothelzellmigration signifikant bei.

BEISPIEL 13

Hornhauttaschen-Angiogenesetest

[0216] Die Tests wurden wie von Polverini et al., Methods Enzymol. 198, 440–450 (1991), beschrieben unter Einhaltung der folgenden Änderungen durchgeführt. Sprague-Dawley-Ratten wurden unter Verwendung einer Kombination aus Gas (Isofluran), injizierbarem Ketamin (80 mg/kg) und Xylazin (15 mg/kg) anästhesiert. Die Augen wurden sanft vorgewölbt und in dieser Position unter Verwendung von Pinzetten, die keine traumatische Einwirkung haben, gehalten. Mit einer #15-Klinge wurde ein 1,5 mm langer Einschnitt etwas unter dem Zentrum der Hornhaut vorgenommen. Unter Verwendung einer Mikro-Spatel (ST80017, ASSI) wurde der Einschnitt vorsichtig durch das Stroma in Richtung des äußeren Canthus des Auges mittels stumpfen Schnitts fortgesetzt. Ein mit Hydron beschichtetes Pellet (2 mm × 2 mm), das Wachstumsfaktor (200 ng) (VEGF(1–165); Flt-1-selektive Variante; LK-VRB-2f; (wie oben in Beispiel 10 beschrieben) oder PlGF (R & D Systems)) oder Methylcellulose und Aluminiumsucralfat (100 µg) (Kontrolle) enthielt, wurde in den Boden der Tasche inseriert. Nach der Operation wurden die Augen mit Gentamicin-Salbe eingecremt. Am Tag 6 wurde den Tieren hochmolekulares FITC-Dextran injiziert, und sie wurden getötet, um ein Sichtbarmachen der Vaskulatur zu ermöglichen. Hornhaut-Ganzpräparate wurden von den ausgeschälten Augen gefertigt, und die Messungen der neovaskulären Bereiche wurden unter Verwendung von computergestützter Bildanalyse (Image-Pro Plus) durchgeführt.

[0217] Wie in [Fig. 15A](#) gezeigt war die KDR-selektive VEGF-Variante zur Induktion von Hornhaut-Angioge-

nese gleich wirksam wie nativer VEGF. Während die Flt-1-selektive VEGF-Variante gelegentlich geringfügige Angiogenese induzierte ([Fig. 15A](#)), zeigte eine Analyse der angiogenetischen Oberflächenbereiche in mehreren Tieren, dass die Flt-1-selektive VEGF-Variante nicht in der Lage war, Angiogenese über Kontrollniveaus hinaus zu stimulieren. PlGF ergab nur eine geringfügige Reaktion ([Fig. 15B](#)). Folglich wird zur Zeit angenommen, dass KDR, jedoch nicht Flt-1, in der Lage ist, Angiogenese in vivo zu fördern.

[0218] Die obige Beschreibung wird als ausreichend betrachtet, um Fachleuten die Möglichkeit zu geben, die Erfindung umzusetzen. Verschiedene Modifikationen der Erfindung zusätzlich zu jenen, die hierin gezeigt und beschrieben wurden, werden Fachleuten aus der obigen Beschreibung ersichtlich sein und fallen in den Schutzzumfang der beiliegenden Ansprüche.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Genentech, Inc.

<120> GEFÄSSENDOTHELZELLWACHSTUMSFAKTORVARIANTEN
UND VERWENDUNGEN DAFÜR

<130> P1734R1PCT

<140> PCT/US00/09483

<141> 10. 04. 2000

<150> US 60/129.788

<151> 16. 04. 1999

<150> US 60/184.235

<151> 23. 02. 2000

<160> 4

<210> 1

<211> 57

<212> DNA

<213> Künstlich

<220>

<221> Gemischte Eigenschaften

<222> 1-57

<223> Sequenz ist synthetisiert.

<220>

<221> ungewiss

<222> 19, 20, 21, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 40, 41, 42

<223> N an angegebenen Positionen kann G, A, T oder C sein;
S an angegebenen Positionen kann C oder G sein

<400> 1

cacgaagtgg tgaagttcnn sgatgtcnns nnsctgcagcn nstgccatcc 50

aatcgag 57

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> Künstlich

<220>

<221> Gemischte Eigenschaften

<222> 1-42

<223> Sequenz ist synthetisiert.

<220>

<221> ungewiss

<222> 16, 17, 18, 22, 23, 24, 25, 26, 27

<223> N an angegebenen Positionen kann G, A, T oder C sein;
S an angegebenen Positionen kann C oder G sein

<400> 2
 gggggctgct gcaatnnsga gnnsnnsqag tgtgtgcccc ct 42

<210> 3
 <211> 990
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 cagtgtgctg gcgggccggc gcgagccggc ccggccccgg tcgggcctcc 50
 gaaaccatga actttctgct gtcttgggtg cattggagcc tcgccttgct 100
 gctctacctc caccatgcc aagtgtccca ggctgcaccc atggcagaag 150
 gaggagggca gaatcatcac gaagtgggta agttcatgga tgtctatcag 200
 cgcagctact gccatccaat cgagaccctg gtggacatct tccaggagta 250
 ccctgatgag atcgagtaca tcttcaagcc atcctgtgtg cccctgatgc 300
 gatgcggggg ctgctgcaat gacgagggcc tggagtgtgt gccactgag 350
 gagtccaaca tcaccatgca gattatgcgg atcaaaccctc accaaggcca 400
 gcacatagga gagatgagct tcctacagca caacaaatgt gaatgcagac 450
 caaagaaaga tagagcaaga caagaaaatc cctgtggggc ttgctcagag 500
 cggagaaagc atttgtttgt acaagatccg cagacgtgta aatgttcctg 550
 caaaaacaca gactcgcggt gcaaggcgag gcagcttgag ttaaacgaac 600
 gtacttgag atgtgacaag ccgaggcggt gagccgggca ggaggaagga 650
 gcctccctca gggtttcggg aaccagatct ctaccagga aagactgata 700
 cagaacgata gatacagaaa ccacgtgcc gccaccacac catcaccatc 750
 gacagaacag tccttaatcc agaaacctga aatgaaggaa gaggagactc 800
 tgcgcagagc actttgggtc cggagggcga gactccggcg gaagcattcc 850
 cgggcgggtg acccagcacg gtccctcttg gaattggatt cgccatttta 900
 tttttcttgc tgctaaatca ccgagccccg aagattagag agttttattt 950
 ctgggattcc ttagacaca ccgcggccgc cagcacactg 990

<210> 4
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

```

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu
 1           5           10           15

Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala
           20           25           30

Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp
           35           40           45

Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp
           50           55           60

Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro
           65           70           75

Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
           80           85           90

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln
           95           100          105

Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met
          110          115          120

Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp
          125          130          135

Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg
          140          145          150

Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys
          155          160          165

Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn
          170          175          180

Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
          185          190

```

Patentansprüche

1. VEGF-Polypeptid-Variante, die im Vergleich zu nativem VEGF selektive Bindungsaffinität für KDR-Rezeptor aufweist, umfassend:

- a) eine Vielzahl an Aminosäuresubstitutionen an oder zwischen Aminosäureresten 17–25 des nativen VEGF, worin ein oder mehrere Aminosäurerest(e) 18, 21, 22 oder 25 substituiert sind; oder
- b) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen an oder zwischen Aminosäureresten 17–25 des nativen VEGF, worin ein oder mehrere Aminosäurerest(e) 18, 21, 22 oder 25 substituiert sind, und eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen an oder zwischen Aminosäureresten 63–66 des nativen VEGF.

2. VEGF-Variante nach Anspruch 1, umfassend zumindest eine der Aminosäuresubstitutionen F17I, M18E, Y21L, Y21F, Q22R, Q22K, Q22E, Y25S und Y25I.

3. VEGF-Variante nach Anspruch 1 oder 2, umfassend die Aminosäuresubstitutionen M18E, Y21L, Q22R und Y25S.

4. VEGF-Variante nach Anspruch 1 oder 2, umfassend die Aminosäuresubstitutionen F17I, M18E, Y21F, Q22K und Y25S.

5. VEGF-Variante nach Anspruch 1 oder 2, umfassend die Aminosäuresubstitutionen F17I, M18E, Y21F, Q22E und Y25I.
6. VEGF-Variante nach Anspruch 1 oder 2, umfassend zumindest eine der Aminosäuresubstitutionen D63S, G65M und L66R.
7. VEGF-Variante nach Anspruch 6, umfassend die Aminosäuresubstitutionen D63S, G65M und L66R.
8. VEGF-Variante nach Anspruch 6 oder 7, umfassend eine der folgenden Kombinationen von Aminosäuresubstitutionen:
 - (a) M18E, D63S, G65M, und L66R;
 - (b) Y21L, D63S, G65M, und L66R;
 - (c) Q22R, D63S, G65M, und L66R;
 - (d) Y25S, D63S, G65M, und L66R;
 - (e) M18E, Y21L, D63S, G65M und L66R;
 - (f) M18E, Q22R, D63S, G65M, und L66R;
 - (g) M18E, Y25S, D63S, G65M, und L66R;
 - (h) Y21L, Q22R, D63S, G65M, und L66R;
 - (i) Y21L, Y25S, D63S, G65M, und L66R;
 - (j) Q22R, Y25S, D63S, G65M, und L66R;
 - (k) M18E, Y21L, Q22R, D63S, G65M, und L66R;
 - (l) M18E, Q22R, Y25S, D63S, G65M, und L66R;
 - (m) Y21L, Q22R, Y25S, D63S, G65M, und L66R;
 - (n) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, und D63S;
 - (o) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, und G65M;
 - (p) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, und L66R;
 - (q) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, D63S, und G65M;
 - (r) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, D63S, und L66R;
 - (s) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, G65M, und L66R; oder
 - (t) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, D63S, G65M, und L66R.
9. Isoliertes Polynucleotid, das für die VEGF-Variante nach einem der Ansprüche 1 bis 8 kodiert.
10. Vektor, umfassend das Polynucleotid nach Anspruch 9.
11. Wirtszelle, umfassend den Vektor nach Anspruch 10.
12. Zusammensetzung, umfassend die VEGF-Variante nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und einen Träger.
13. Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin der Träger ein pharmazeutisch annehmbarer Träger ist.
14. Test zur Detektion eines KDR-Rezeptors, umfassend das Kontaktieren einer isolierten Zelle oder eines isolierten Gewebes mit einer VEGF-Variante nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und das Testen auf Bindung der VEGF-Variante an die Zelle oder an das Gewebe.
15. VEGF-Variante nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Verwendung in einem Behandlungsverfahren.
16. Verwendung der VEGF-Variante nach einem der Ansprüche 1 bis 8 bei der Herstellung eines Medikaments zur Stimulation von Vaskulogenese oder Angiogenese in einem Säugetier.
17. Verwendung nach Anspruch 16, worin das Medikament zur Behandlung eines Traumas am Blutgefäßsystem vorgesehen ist.
18. Verwendung nach Anspruch 17, worin das Medikament für die Behandlung von:
chirurgischen Einschnitten, einschließlich jenen, die das Herz einbinden;
Wunden, einschließlich Schnittwunden, Inzisionen und Penetrationen von Blutgefäßen; oder
Oberflächengeschwüren, die das Gefäßendothel einbinden, einschließlich diabetischer, Bluter- oder variköser Geschwüre,
vorgesehen ist.

19. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, worin das Säugetier ein Mensch ist.

20. In-vitro-Verfahren zur Stimulation von Phosphorylierung eines KDR-Rezeptors, MAP-Kinaseaktivierung, PLC- γ -Aktivierung oder PI-3'-Kinase-Aktivierung, umfassend das Kontaktieren einer Zelle, die KDR-Rezeptor exprimiert, mit einer VEGF-Variante nach einem der Ansprüche 1 bis 8.

21. In-vitro-Verfahren zur Stimulation von Endothelzellen-Proliferation, umfassend das Kontaktieren einer Zelle, die KDR-Rezeptor exprimiert, mit einer VEGF-Variante nach einem der Ansprüche 1 bis 8.

22. In-vitro-Verfahren zur Förderung der Migration von Endothelzellen, umfassend das Kontaktieren von Endothelzellen, die KDR-Rezeptor exprimieren, mit einer VEGF-Variante nach einem der Ansprüche 1 bis 8.

23. Herstellungsgegenstand, umfassend einen Behälter, der die Zusammensetzung nach Anspruch 12 oder 13 enthält, und eine Markierung am Behälter, die Anweisungen zur Verwendung der Zusammensetzung in vitro oder in vivo bereitstellt.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

1 CAGTGTGCTG GCGGCCCGGC GCGAGCCGGC CCGGCCCGG TCGGGCCTCC
 -26
 GAAACC ATG AAC TTT CTG CTG TCT TGG GTG CAT TGG AGC
 M N F L L S W V H W S
 -26 -20
 90 CTC GCC TTG CTG CTC TAC CTC CAC CAT GCC AAG TGG TCC CAG
 -15 L A L L L Y L H H A K W S Q
 -10
 GCT GCA CCC ATG GCA GAA GGA GGA GGG CAG AAT CAT CAC
 A A P M A E G G G Q N H H
 -1 +1 +5 +10
 171 GAA GTG GTG AAG TTC ATG GAT GTC TAT CAG CGC AGC TAC TGC
 13 E V V K F M D V Y Q R S Y C
 +15 +20 +25
 CAT CCA ATC GAG ACC CTG GTG GAC ATC TTC CAG GAG TAC
 H P I E T L V D I F Q E Y
 +30 +35
 252 CCT GAT GAG ATC GAG TAC ATC TTC AAG CCA TCC TGT GTG CCC
 40 P D E I E Y I F K P S C V P
 +40 +45 +50
 CTG ATG CGA TGC GGG GGC TGC TGC AAT GAC GAG GGC CTG
 L M R C G G C C N D E G L
 +55 +60 +65
 333 GAG TGT GTG CCC ACT GAG GAG TCC AAC ATC ACC ATG CAG ATT
 67 E C V P T E E S N I T M Q I
 +70 +75 +80
 ATG CGG ATC AAA CCT CAC CAA GGC CAG CAC ATA GGA GAG
 M R I K P H Q G Q H I G E
 +85 +90
 414 ATG AGC TTC CTA CAG CAC AAC AAA TGT GAA TGC AGA CCA AAG
 94 M S F L Q H N K C E C R P K
 +95 +100 +105
 AAA GAT AGA CCA AGA CAA GAA AAT CCC TGT GGG CCT TGC
 K D R A R Q E N P C G P C
 +110 +115 +120
 495 TCA GAG CGG AGA AAG CAT TTG TTT GTA CAA GAT CCG CAG ACG
 121 S E R R K H L F V Q D P Q T
 +125 +130
 TGT AAA TGT TCC TGC AAA AAC ACA GAC TCG CGT TGC AAG
 C K C S C K N T D S R C K
 +135 +140 +145

FIG. 1A

576 GCG AGG CAG CTT GAG TTA AAC GAA CGT ACT TGC AGA TGT GAC
 148 A R Q L E L N E R T C R C D
 +150 +155 +160

 AAG CCG AGG CGG TGA GCCGGGCA GGAGGAAGGA GCCTCCCTCA
 K P R R O
 +165

 661 GGGTTTCGGG AACCAGATCT CTCACCAGGA AAGACTGATA CAGAACGATC
 GATACAGAAA CCACGCTGCC GCCACCACAC CATCACCATC GACAGAACAG
 761 TCCTTAATCC AGAAACCTGA AATGAAGGAA GAGGAGACTC TGCGCAGAGC
 ACTTTGGGTC CGGAGGGCGA GACTCCGGCG GAAGCATTCC CGGGCGGGTG
 861 ACCCAGCACG GTCCCTCTTG GAATTGGATT CGCCATTTTA TTTTCTTGC
 TGCTAAATCA CCGAGCCCGG AAGATTAGAG AGTTTTATTT CTGGGATTCC
 961 TGTAGACACA CCGCGGCCGC CAGCACACTG

FIG. 1B

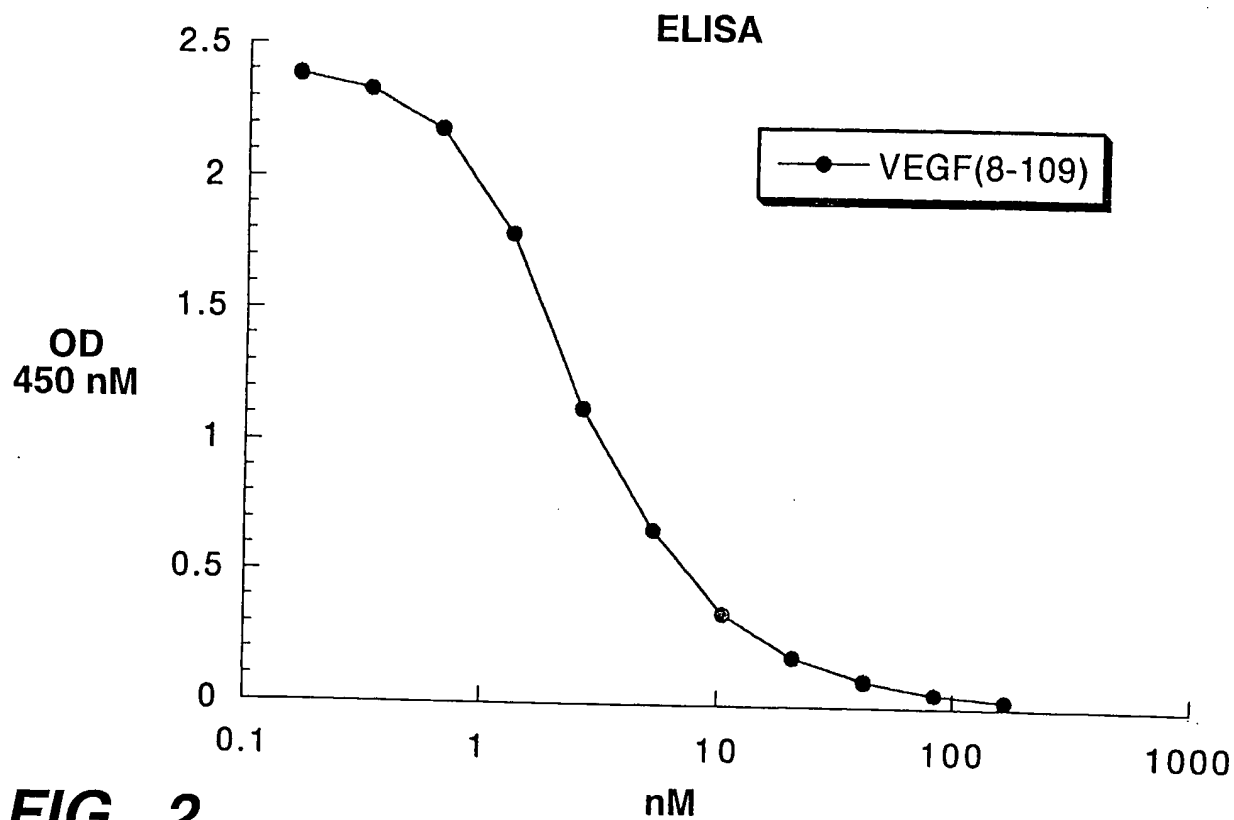


FIG._2

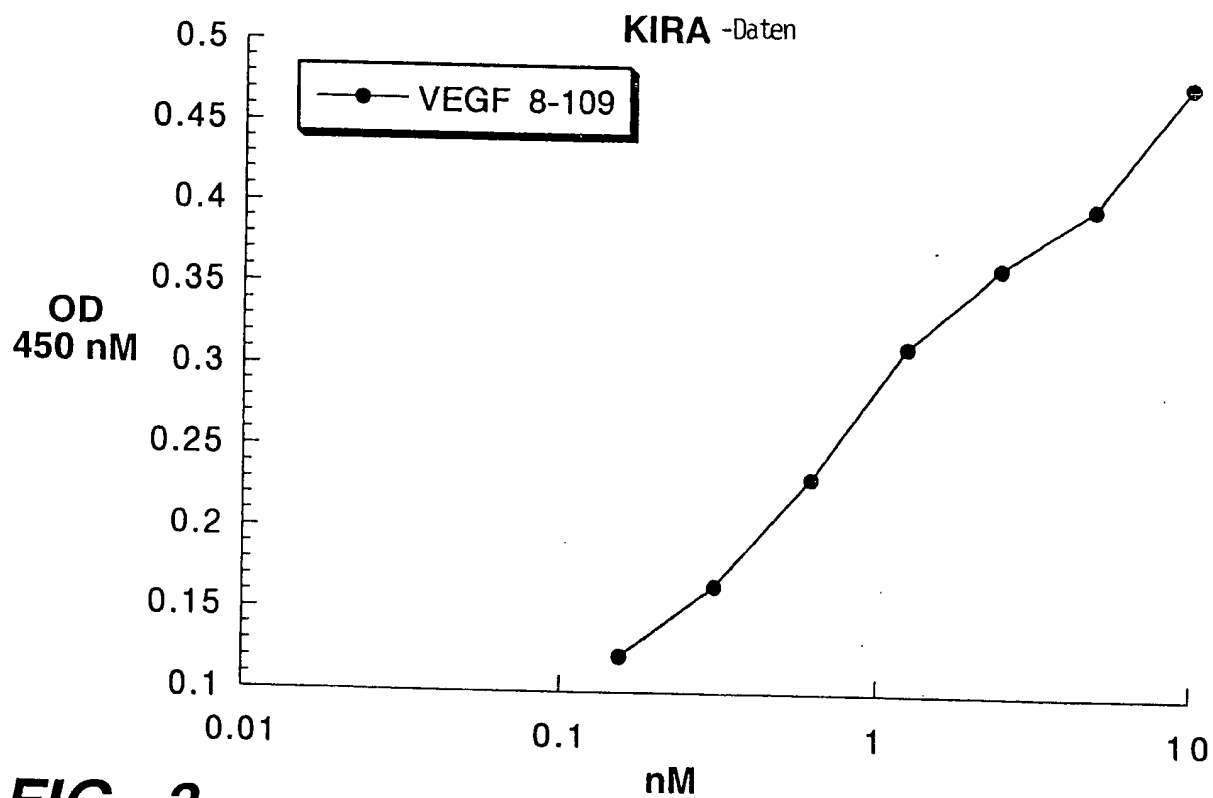
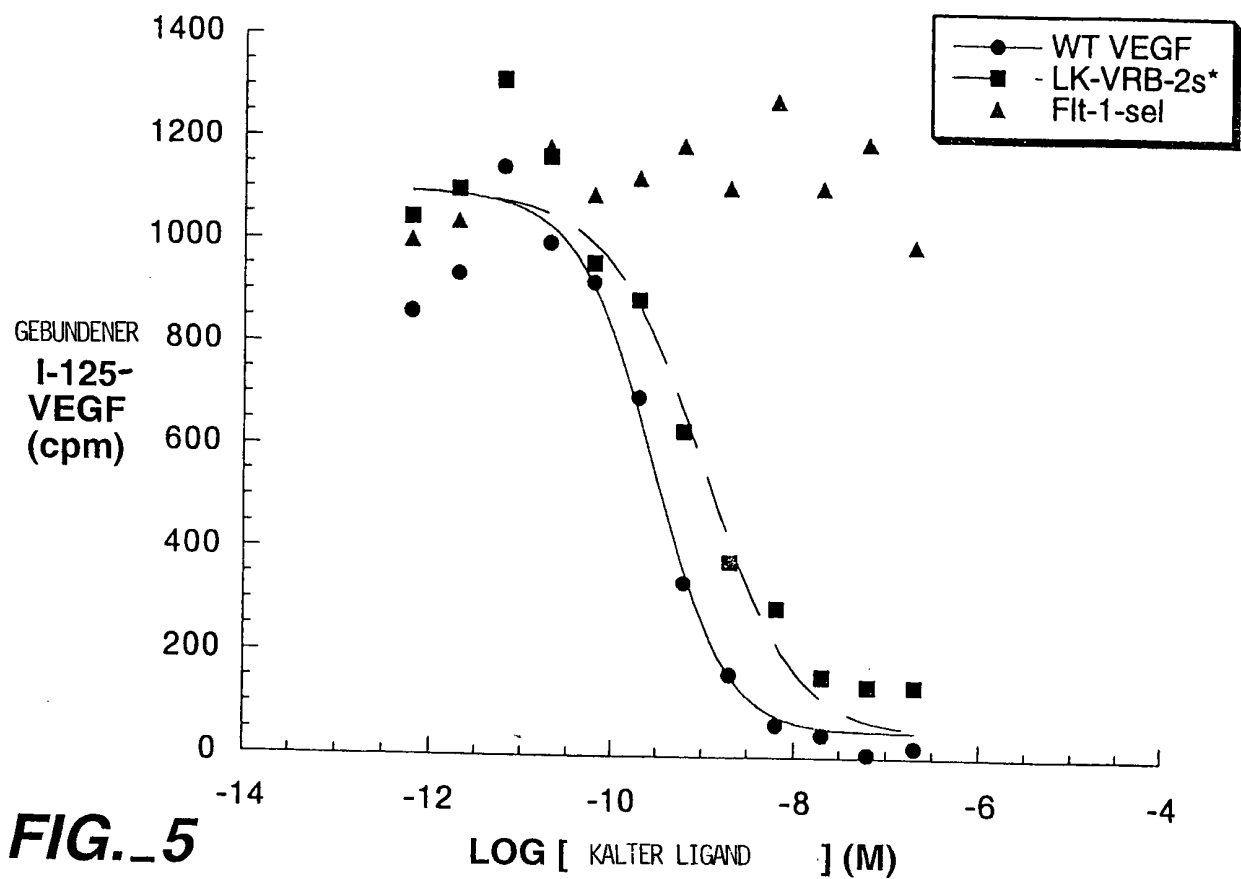
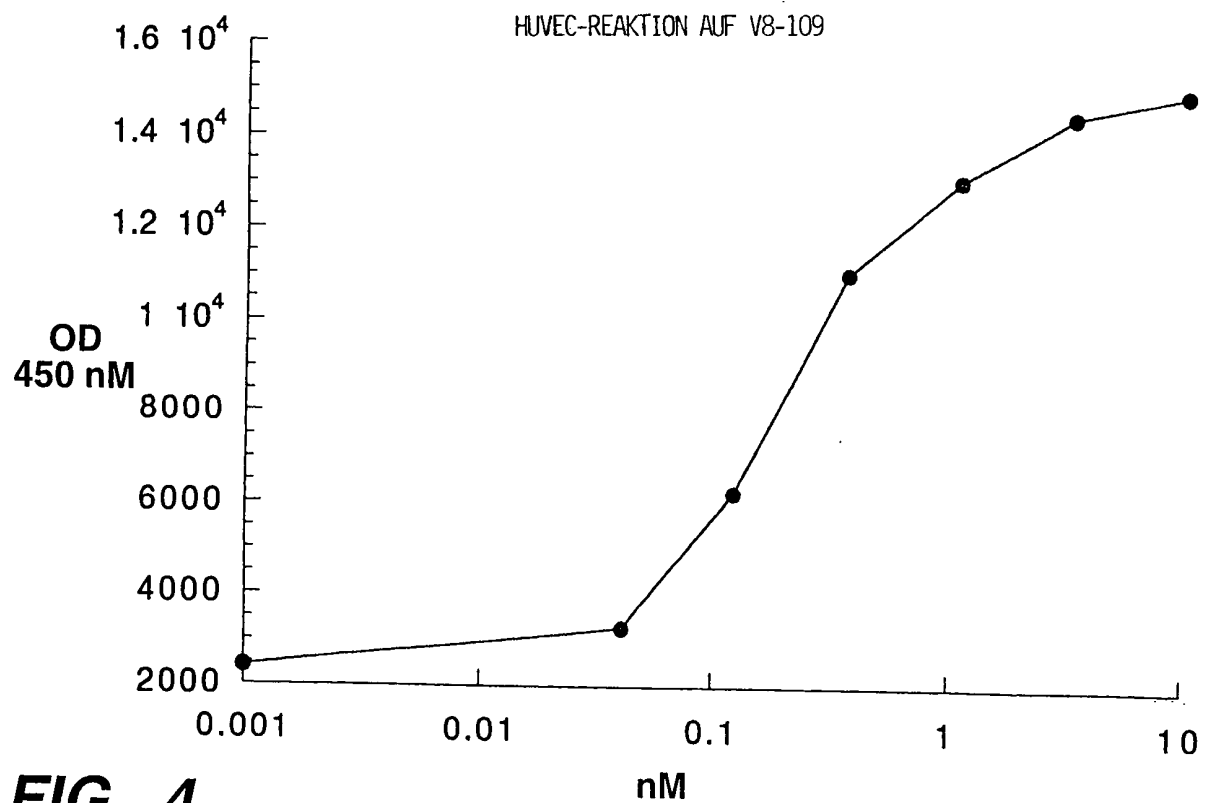
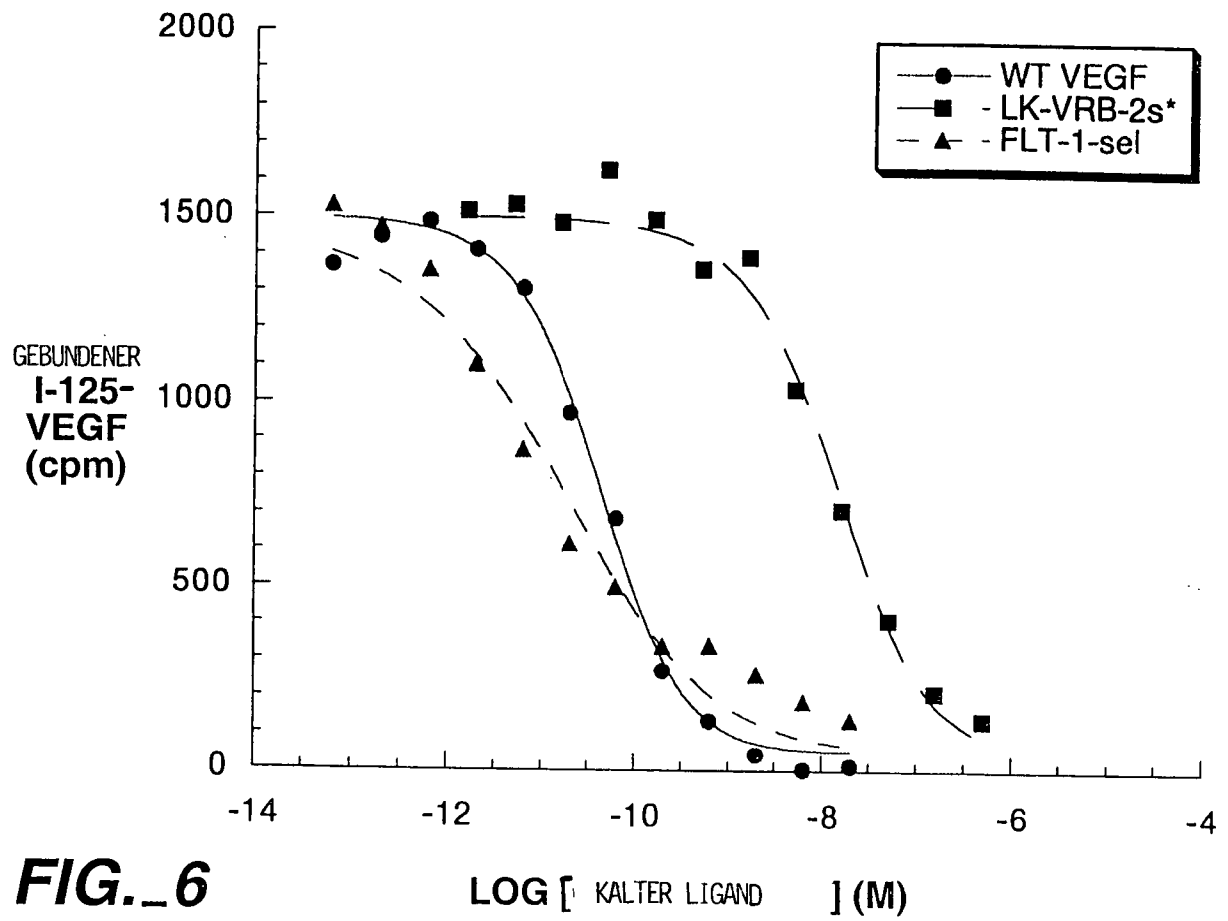


FIG._3

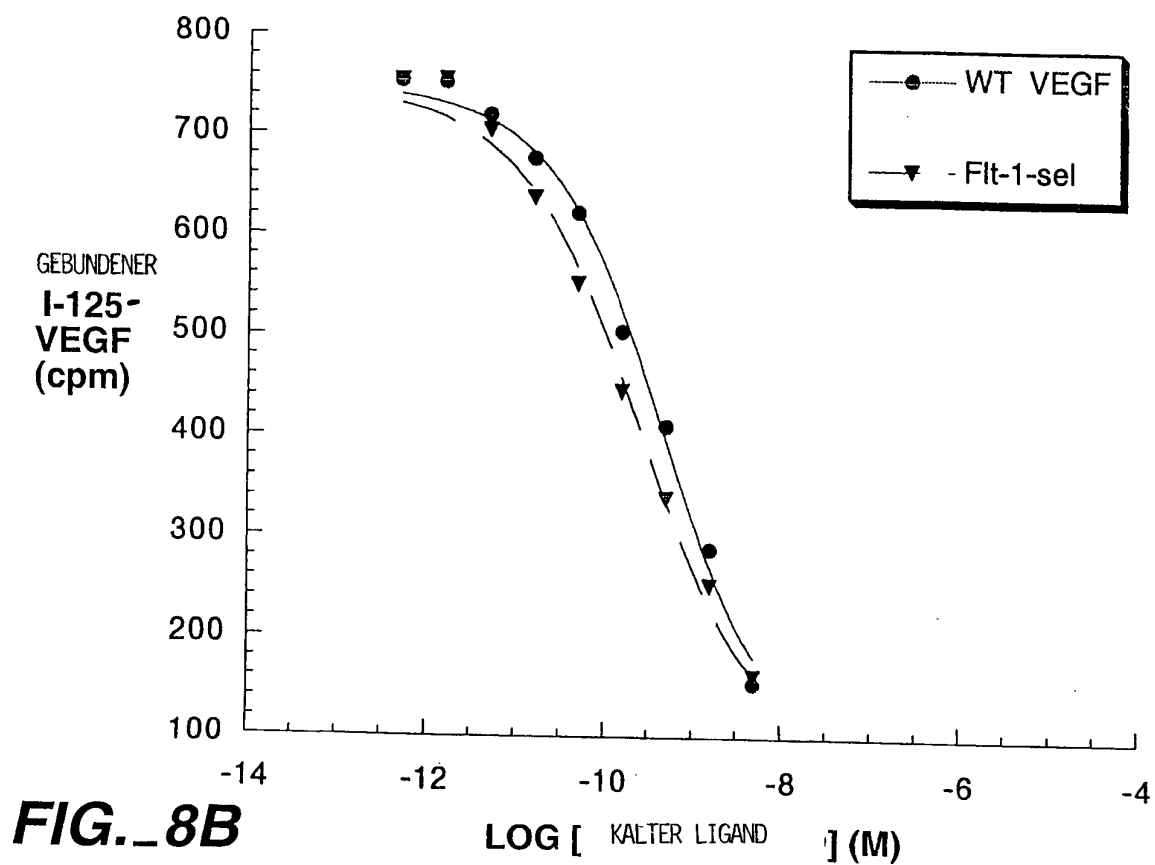
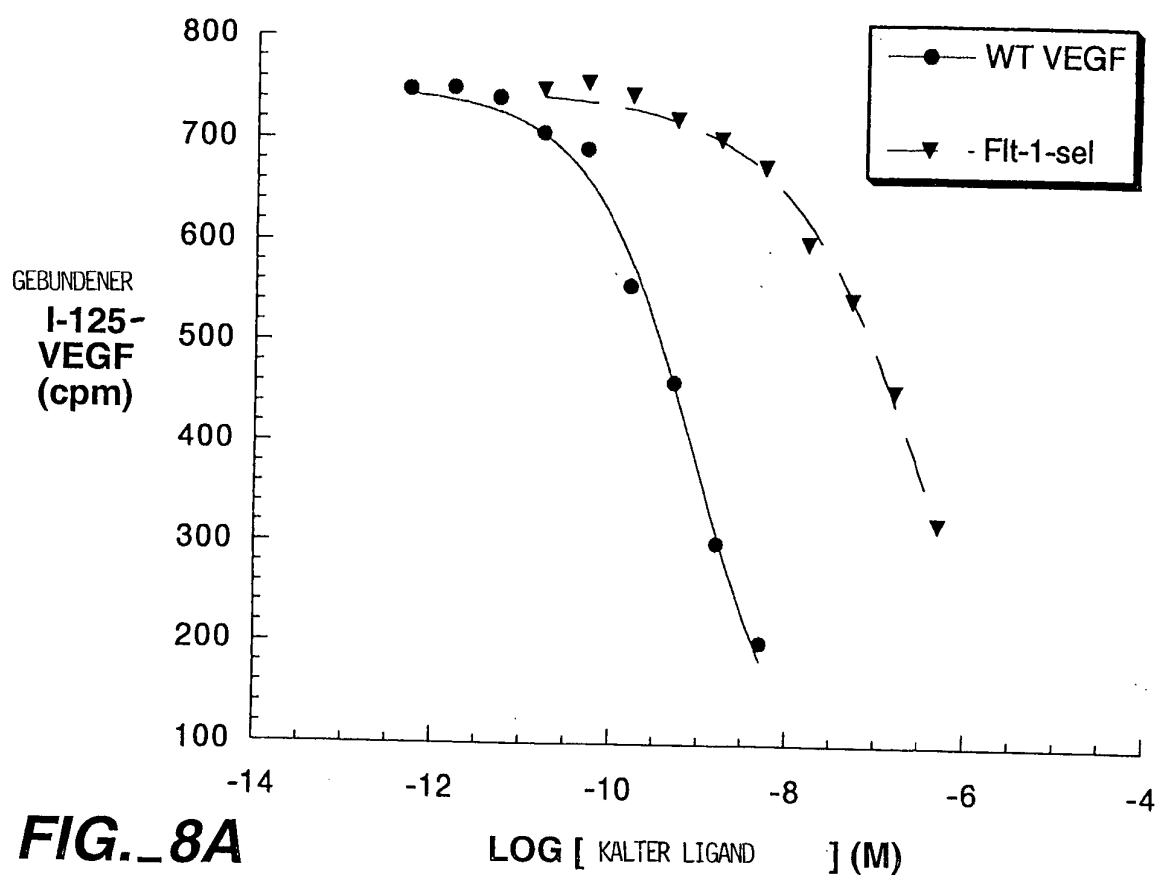


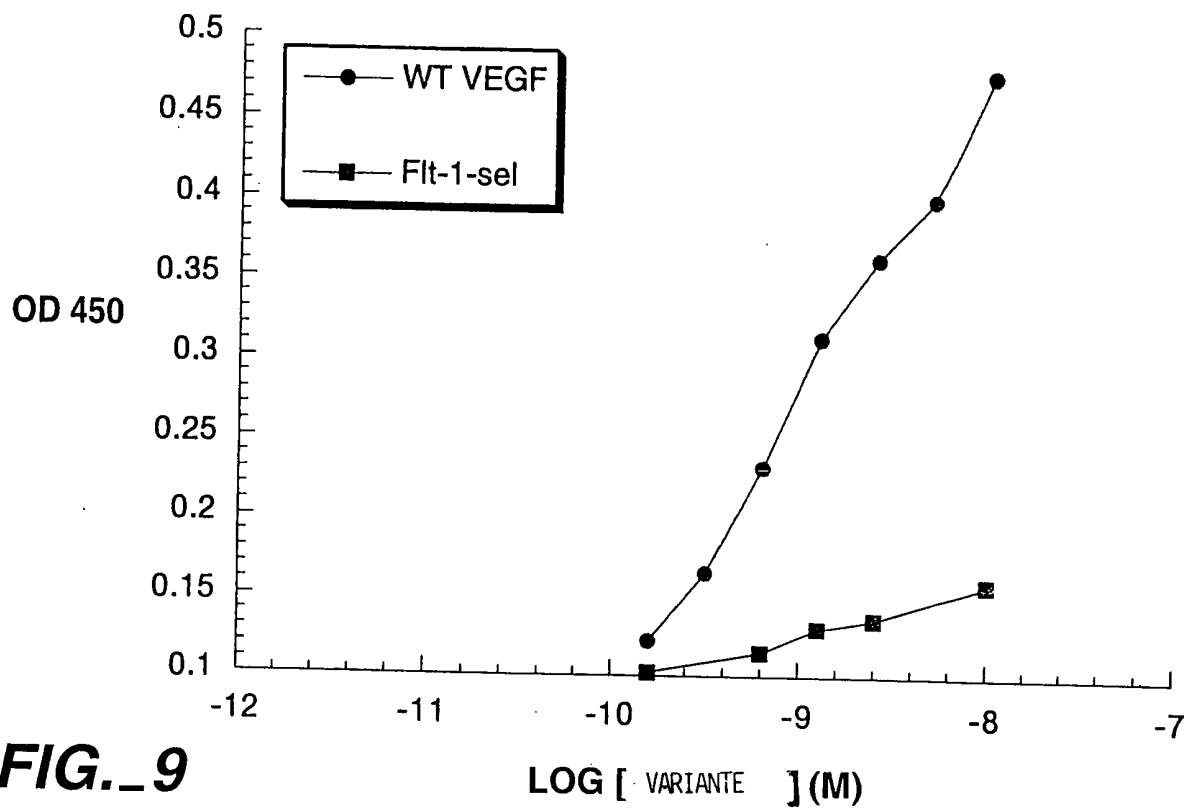
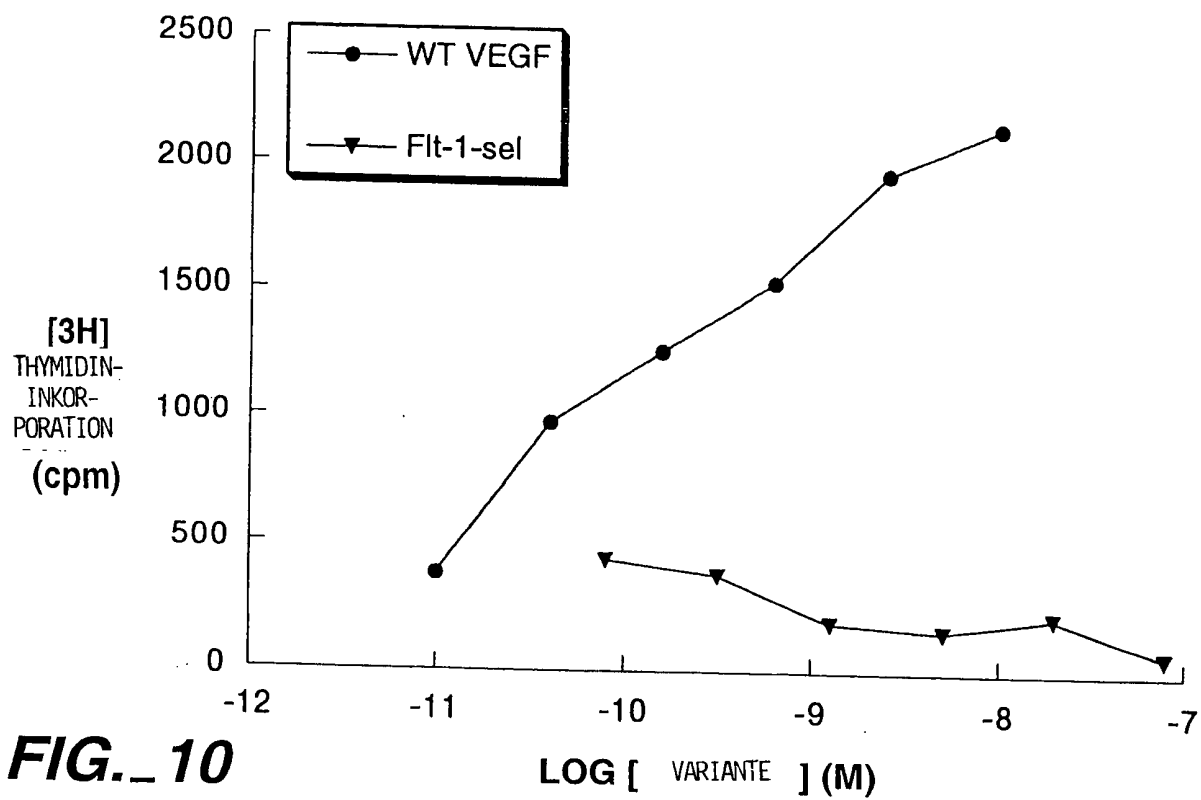


X-FACHE REDUKTION DER BINDUNG VON VEGF-ALANINMUTANTEN

| REST | KDR(1-3) | Flt(1-3) |
|-----------------|----------|----------|
| VEGF(1-109) | 1 (10nM) | 1 (6 nM) |
| 20s -Helix : | | |
| Lys 16 | 1 | 1 |
| Phe 17* | 45 | 34 |
| Met 18** | 5 | 9 |
| Tyr 21** | 19 | 29 |
| Gln 22** | 6 | 15 |
| Tyr 25** | 6 | 7 |
| 40s -Schleife: | | |
| Ile 43* | 21 | 3 |
| Ile 46* | 96 | 4 |
| Phe 47** | 5 | 3 |
| Lys 48** | 1 | 1 |
| 60s -Schleife : | | |
| Asp 63** | 1 | 8 |
| Glu 64* | 10 | 5 |
| Gly 65** | 1 | 1 |
| Leu 66** | 1 | 10 |
| 80s -Schleife : | | |
| Gln 79* | 55 | 3 |
| Met 81** | 9 | 5 |
| Ile 83* | 89 | 7 |
| His 86** | 2 | 1 |
| Gln 89 | 1 | 1 |
| Ile 91 | 1 | 1 |
| 100s -Schleife: | | |
| Lys 101 | 1 | 1 |
| Glu 103 | 1 | 1 |
| Arg 105 | 1 | 1 |
| Pro 106 | 1 | 1 |

FIG._7



**FIG. 9****FIG. 10**

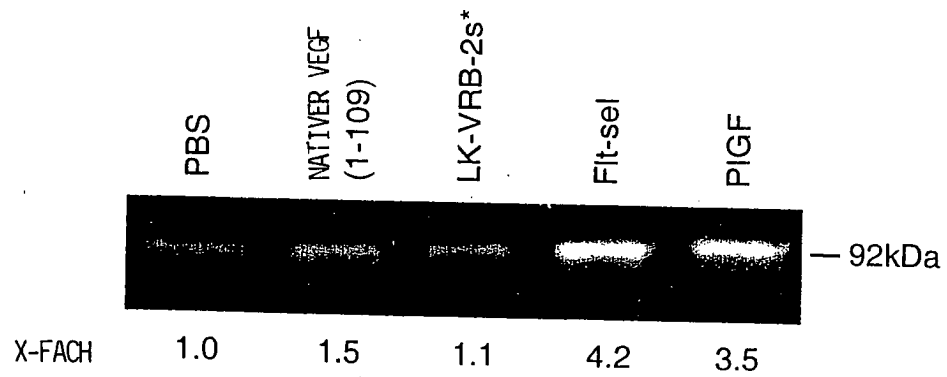


FIG._11

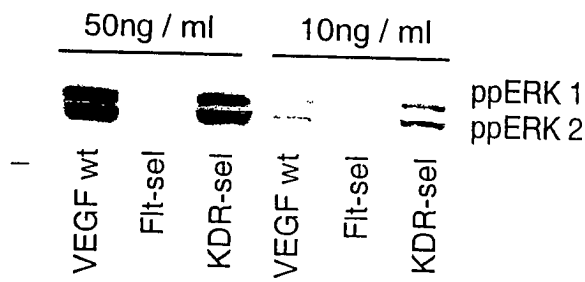


FIG._12A

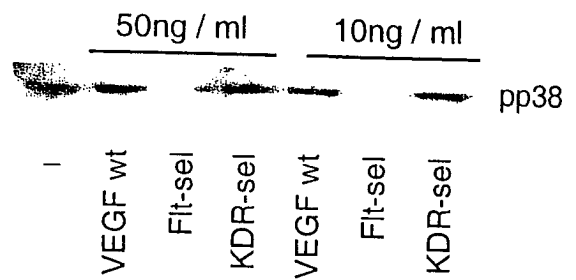


FIG._12B

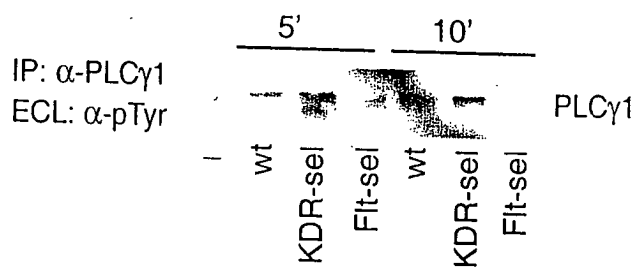


FIG._13A

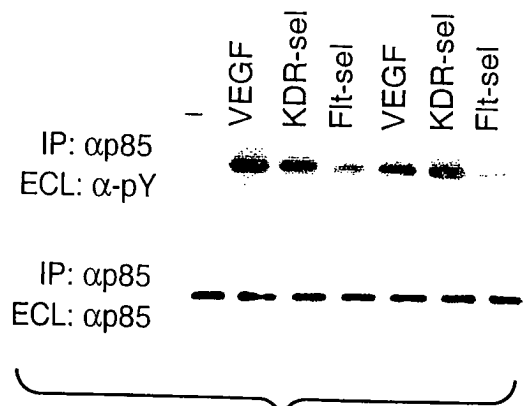
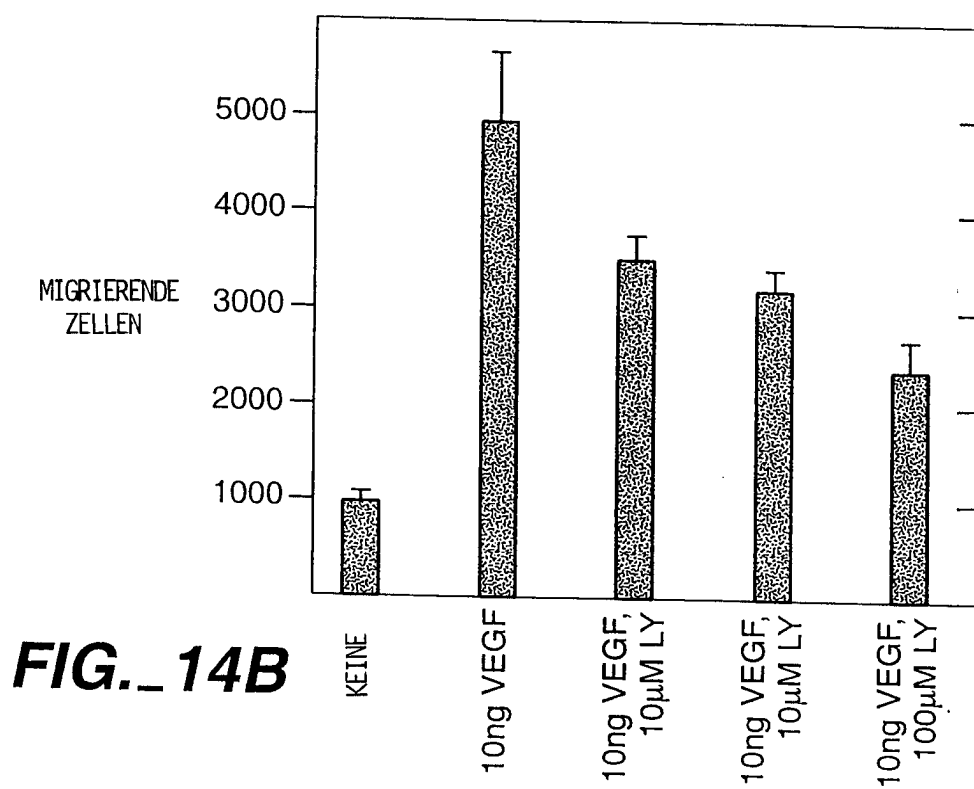
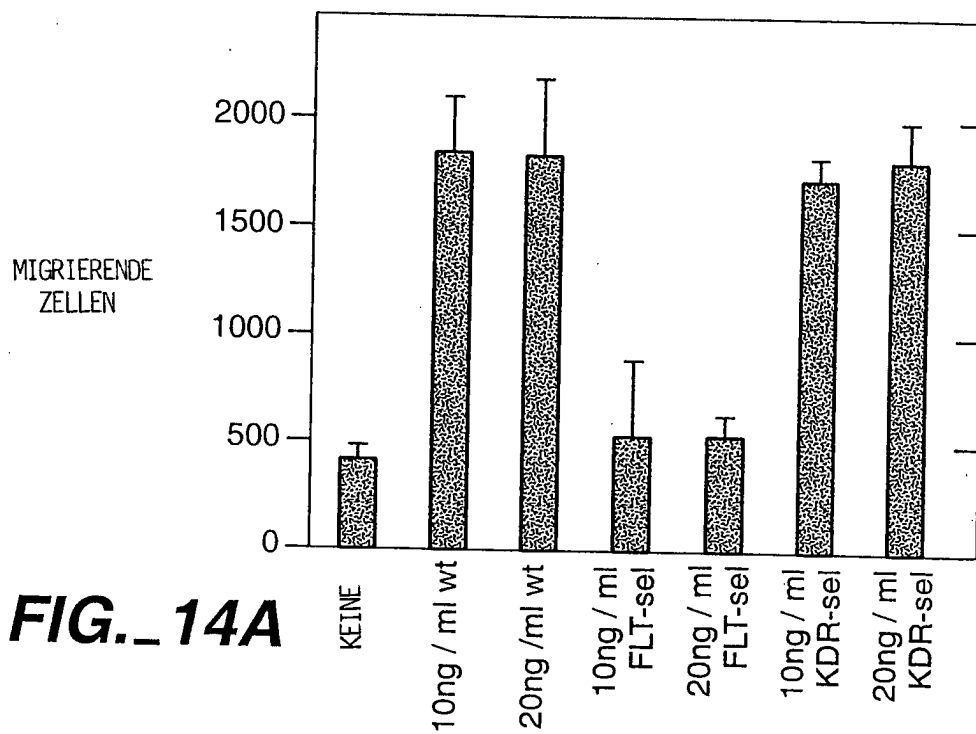
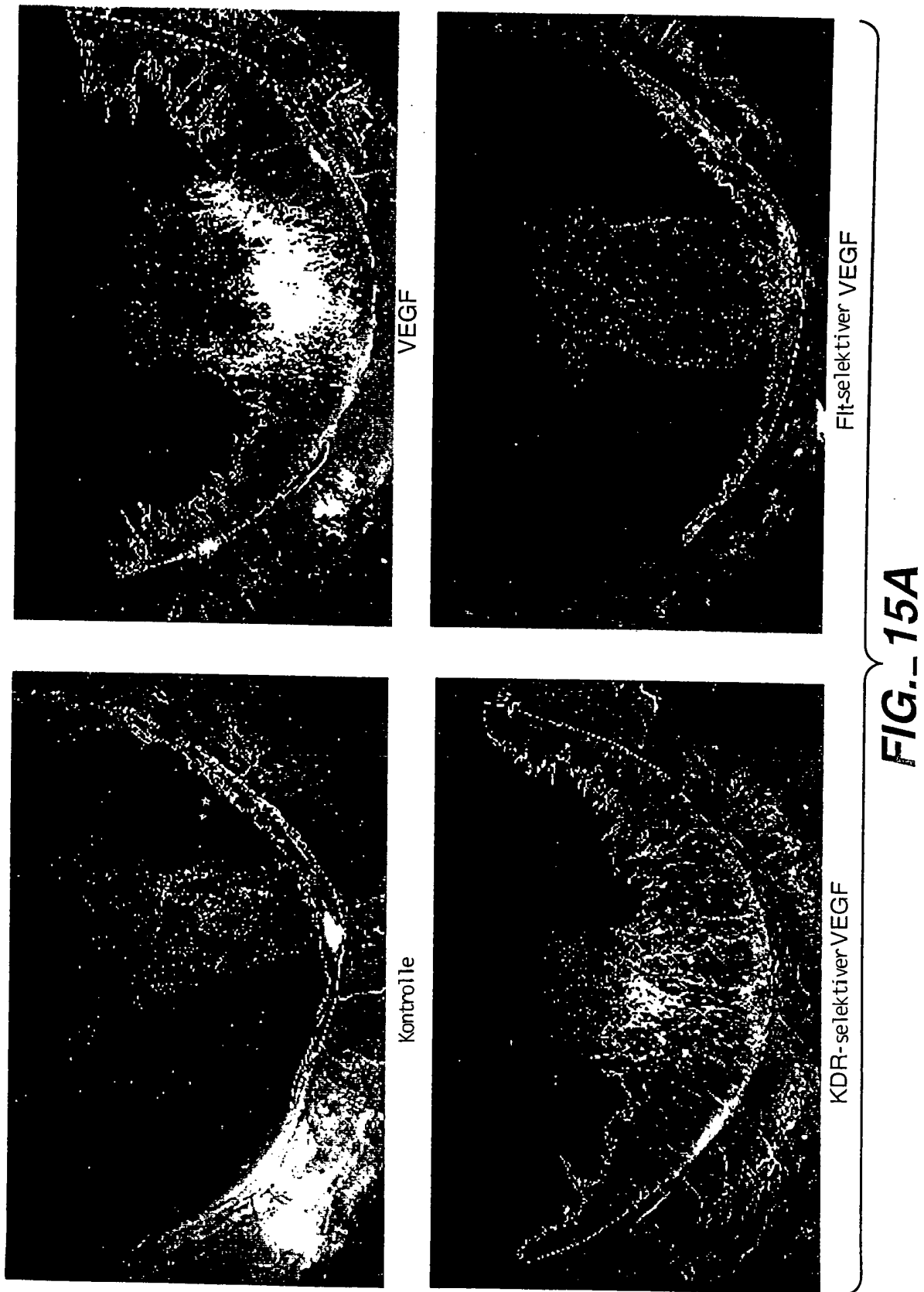


FIG._13B





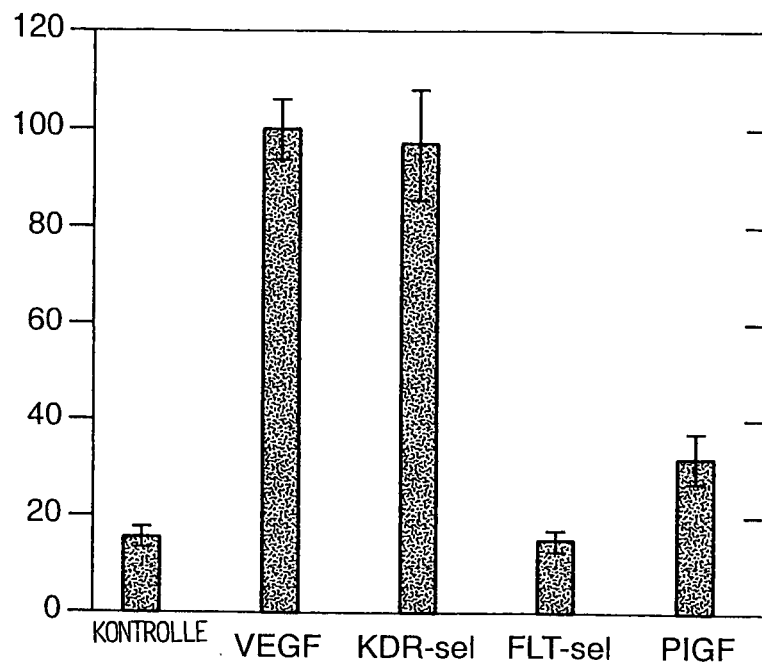


FIG._15B