



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 36 860 T2** 2007.05.16

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 928 203 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 36 860.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/17044**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 945 258.8**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/013071**
(86) PCT-Anmeldetag: **24.09.1997**
(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **02.04.1998**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.07.1999**
(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **25.10.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.05.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 48/00** (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
26641 P 24.09.1996 US

(73) Patentinhaber:
Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., US

(74) Vertreter:
Abitz & Partner, 81677 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL, PT, SE

(72) Erfinder:
THOMAS, A., Kenneth, Rahway, NJ 07065, US;
GOLDMAN, K., Corey, Birmingham, AL 35222, US;
KENDALL, L., Richard, Rahway, NJ 07065, US;
HUCKLE, R., William, Rahway, NJ 07065, US;
BETT, J., Andrew, Rahway, NJ 07065, US

(54) Bezeichnung: **VERBINDUNGEN ZUR HEMMUNG DER ANGIOGENESE DURCH GENTHERAPIE**

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 Verbindungen, welche von Nutzen sind zur Herstellung eines Medikaments für die Verwendung in der Genterapie zur Inhibierung der Angiogenese, die mit Tumorwachstum, Entzündung, Psoriasis, rheumatoider Arthritis, Hämangiomen, diabetischer Retinopathie, Angiofibromen und Makuladegeneration assoziiert ist.

[0002] Diese Erfindung betrifft auch Tiermodelle, welche zur Untersuchung einer gentherapievermittelten Inhibierung der Angiogenese von Nutzen sind. Die Erfindung betrifft auch rekombinante Vektoren, welche in den offenbarten Genterapie-Verfahren von Nutzen sind.

Hintergrund der Erfindung

[0003] Gefäßendothelzellen bilden eine luminale, nicht-thrombogene Monoschicht im Gefäßsystem. Mitogene fördern embryonale Gefäßentwicklung, Wachstum, Wiederherstellung und Angiogenese in diesen Zellen. Angiogenese beinhaltet den proteolytischen Abbau der Basalmembran, auf der sich die Endothelzellen befinden, gefolgt von der anschließenden chemotaktischen Migration und Mitose dieser Zellen, um das anhaltende Wachstum eines neuen Kapillarsprosses zu unterstützen. Eine Klasse von Mitogenen, welche für Gefäßendothelzellen selektiv sind, umfassen Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (als VEGF oder VEGF-A bezeichnet) und die Homologen Plazenta-Wachstumsfaktor (PIGF), VEGF-B und VEGF-C.

[0004] Human-VEGF liegt als glycosyliertes Homodimer in einer von fünf reifen prozessierten Formen vor, die 206, 189, 165, 145 und 121 Aminosäuren enthalten, wobei die häufigste die 165-Aminosäuren-Form ist.

[0005] Das US-Patent Nr. 5,240,848 offenbart die Nukleotid- und Aminosäuresequenz, welche für die 189-Aminosäuren-Form von Human-VEGF codieren.

[0006] Das US-Patent Nr. 5,332,671 offenbart die Nukleotid- und Aminosäuresequenz, welche für die 165-Aminosäuren-Form von Human-VEGF codieren.

[0007] Charnock-Jones et al. (1993, Biol. Reproduction 48: 1120-1128) offenbaren die VEGF145-Spleissvarianten-mRNA.

[0008] Das US-Patent Nr. 5,194,596 offenbart die Nukleotid- und Aminosäuresequenz, welche für die 121-Aminosäuren-Form von Human-VEGF codieren.

[0009] Die 206-Aminosäuren- und 189-Aminosäuren-Formen von Human-VEGF enthalten jeweils ein hochbasisches 24-Aminosäuren-Insert, welches die feste Bindung an Heparin und mutmaßlich Heparin-Proteoglycane auf Zelloberflächen und innerhalb extrazellulärer Matrices fördert (Ferrara et al., 1991, J. Cell. Biochem. 47: 211-218). Die VEGF165-Form bindet Heparin in einem geringeren Ausmaß, während VEGF121 Heparin nicht bindet.

[0010] Human-PIGF ist ebenfalls ein glycosyliertes Homodimer, welches auf der Proteinebene 46 % Homologie mit VEGF gemeinsam hat. Ein unterschiedliches Spleissen von Human-PIGF-mRNA führt zu einem Vorläufer von entweder 170 Aminosäuren oder 149 Aminosäuren, welche proteolytisch zu reifen Formen einer Länge von 152 bzw. 131 Aminosäuren prozessiert werden (Maglione et al., 1993, Oncogene 8: 925-931; Hauser und Weich, 1993, Growth Factors 9: 259-268).

[0011] VEGF-B wurde kürzlich isoliert und charakterisiert (Olofsson et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 2576-2581; Grimmond et al., 1996, Genome Research 6: 124-131). Die Vollängen-Human-cDNAs codieren für 188- und 207-Aminosäuren-Vorläufer, wobei die NH₂-terminalen Abschnitte proteolytisch zu den reifen Formen von 167 und 186 Aminosäuren Länge prozessiert werden. Human-VEGF-B-Expression wurde überwiegend im Herzen und Skelettmuskel als disulfid-verknüpftes Homodimer gefunden. Jedoch kann Human-VEGF-B auch ein Heterodimer mit VEGF bilden (ebendort @ 2580).

[0012] VEGF-C wurde ebenfalls kürzlich isoliert und charakterisiert (Joukov et al., 1996, EMBO J. 15: 290-298). Eine cDNA, codierend für VEGF-C, wurde von einer Human-Prostata-Adenokarzinom-Zelllinie erhalten. Ein 32-kD-Vorläuferprotein wird proteolytisch prozessiert, um die reife 23-kD-Form zu ergeben, welche

die Rezeptor-Tyrosinkinase Flt-4 bindet.

[0013] VEGF-D wurde in einer EST-Bank identifiziert, der codierende Bereich voller Länge wurde kloniert und erkannt, von den Aminosäuresequenzen der VEGF-Familie am meisten homolog zu VEGF-C zu sein (Yamada et al., 1997, Genomics 42: 483-488). Es wurde gezeigt, dass die Human-VEGF-D-mRNA in der Lunge und den Muskeln exprimiert wird.

[0014] VEGF und dessen Homologe entfalten ihre Aktivität durch Bindung an Gefäßendothelzell-Plasmamembran überspannende Tyrosinkinase-Rezeptoren, welche dann die Signal-transduktion und zellulären Signale aktiviert. Die Flt-Rezeptor-Familie ist ein Haupt-Tyrosinkinase-Rezeptor, welcher VEGF mit hoher Affinität bindet. Derzeit umfasst die flt-Rezeptor-Familie flt-1 (Shibuya et al., 1990, Oncogene 5: 519-524), KDR/flk-1 (Terman et al., 1991, Oncogene 6: 1677-1683; Terman et al., 1992, Biochem. Biophys. Res. Commun. 187: 1579-1586) und flt-4 (Pajusola et al., 1992, Cancer Res. 52: 5738-5743).

[0015] Die Beteiligung von VEGF an der Förderung von Tumor-Angiogenese veranlasste Studien zur Untersuchung möglicher Antagonisten des Prozesses. Von sowohl polyklonalen Antikörpern (Kondo et al., 1993, Biochem. Biophys. Res. Commun. 194: 1234-1241) als auch monoklonalen Antikörper (Kim et al., 1992, Growth Factors 7: 53-64; Kim et al., 1993, Nature 362: 841-844), induziert gegen VEGF, wurde gezeigt, dass sie die VEGF-Aktivität in vivo supprimieren. Anti-VEGF-Antikörper-Strategien zur Eliminierung von Angiogenese und deren begleitendem Tumor werden auch in Kim et al. (1993, Nature 362: 841-844) und Asano et al. (1995, Cancer Research 55: 5296-5301) angesprochen.

[0016] Kendall und Thomas (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 10705-10709) isolierten und charakterisierten eine cDNA, codierend für eine sekretierte lösliche Form von flt-1, aus kultivierten Human-Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC). Die rekombinante Version dieses Proteins wurde durch Bindung an immobilisiertes Heparin gereinigt. Es wurde gezeigt, dass isoliertes lösliches flt-1 VEGF-Aktivität in vitro inhibiert. Es wurden keine Vorschläge hinsichtlich Gentransfer-Protokolle offenbart.

[0017] Millauer et al. (1994, Nature 367: 576-579) offenbaren eine in vivo-Inhibierung von Tumor-Angiogenese durch Expression einer künstlich erzeugten flk-1-Mutante, bei der die intrazelluläre Kinasedomäne, jedoch nicht der membran-überspannende Anker deletiert wurde. Die Autoren bieten keinerlei Lehre oder Vorschläge, dass eine lösliche Form eines VEGF-Tyrosinkinase-Rezeptors in gentherapeutischen Anwendungen von Nutzen wäre.

[0018] Die Gefäßneubildung maligner Tumore ist ein integraler Prozess, der zum Wachstum eines soliden Tumors und neoplastischen Fortschritt beiträgt (Kondo et al., 1993, Biochemical & Biophysical Research Communications 194: 1234-1241; Carrau et al., 1995, Invasion & Metastasis 15: 197-202). In diesem Zusammenhang haben mehrere Studien eine positive Korrelation zwischen Gefäßneubildung in malignen Tumoren und schlechten klinischen Resultaten demonstriert (Volm et al., 1996, Anticancer Research 16: 213-217; Toi et al., 1994, Japanese Journal of Cancer Research 85: 1045-1049; Shpitzer et al., 1996, Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery 122: 865-868; Staibano et al., 1996, Human Pathology 27: 695-700; Giatromanolaki et al., 1996, J. of Pathology 179: 80-88). Obwohl der Angiogenese-Prozess mehrere Vermittler hat, scheint es, dass der Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (VEGF) ein kritischer Wachstumsfaktor bezüglich der Initiierung der Kaskade von Ereignissen, welche die Blutgefäßneubildung in mehreren Tumortypen stimulieren, sein könnte (Toi et al., 1996, Cancer 77: 1101-1106; Maeda et al., 1996, Cancer 77: 858-63; Anan et al., 1996, Surgery 199: 333-339).

[0019] Aiello et al. (1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 10457-10461) offenbaren gentechnisch manipulierte chimäre extrazelluläre VEGF-Rezeptoren zur Blockierung von Angiogenese in nicht-malignen Zellen.

[0020] Trotz kürzlicher Fortschritte bei der Identifizierung von Genen, welche für Liganden und Rezeptoren codieren, die an der Angiogenese beteiligt sind, wurde keine gentherapeutische Anwendung bereitgestellt, welche die nachteilige Wirkung eliminiert, die dieser Prozess bei der Förderung des Primärtumorstwachstums und der anschließenden Metastase hat. Die vorliegende Erfindung betrifft und erfüllt dieses Bedürfnis.

Zusammenfassung der Erfindung

[0021] Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen, welche von Nutzen sind zur Herstellung eines Medikaments für die Verwendung in der Gentherapie zur Inhibierung von VEGF-induzierter Angiogenese, die mit Wachstum eines soliden Tumors oder Tumormetastase assoziiert ist. Diese Störungen sind insofern verwandt,

als VEGF als Mitogen wirkt, um die lokale Angiogenese von Gefäßendothelzellen zu stimulieren, welche wiederum den Krankheitszustand verschlimmert.

[0022] Speziell wird bereitgestellt die Verwendung eines DNA-Vektors wie in Anspruch 1 definiert zur Herstellung eines Medikaments zur Inhibierung der Angiogenese eines soliden oder metastasierenden Tumors bei einem Säugerwirt.

[0023] Die vorliegende Erfindung betrifft einen DNA-Vektor und zugleich die in vivo-Expression einer löslichen Form einer Tyrosin-Rezeptor-Kinase (sVEGF-R) innerhalb des Säugerwirts, welche VEGF oder ein VEGF-Homologes an der und um die lokalisierte(n) Stelle der Störung bindet. Die Bildung eines sVEGF-R/VEGF-Komplexes wird die Bindung von VEGF an die FLT-1- und KDR-Tyrosinkinase-Rezeptoren, welche die Gefäßendothelzellmembran überspannen, inhibieren und somit die Initiierung der Signaltransduktion, welche die Angiogenese stimuliert, verhindern. Darüber hinaus könnte die Expression von sVEGF-R auch eine therapeutische Wirkung durch Bindung an membran-assoziierte VEGF-Rs entfalten. Es wird angenommen, dass VEGF-Rs durch Bindung von dimeren VEGF-Liganden dimerisiert werden, welches wiederum den intrazellulären Rezeptor-Tyrosinkinase-Domänen erlaubt, einander zu transphosphorylieren und phosphorylierte Tyrosinreste zu erzeugen, welche die anschließende Bindung und Aktivierung von stromabwärts gelegenen Signaltransduktionsproteinen erleichtern. sVEGF-Rs können Heterodimere mit Volllängen-VEGF-Rs bilden, welche, da den sVEGF-Rs eine intrazelluläre Tyrosinkinase-Region fehlt, die Transphosphorylierung der Rezeptor-Tyrosinkinase-Domäne, die Initiierung der Signaltransduktion und somit die VEGF-induzierte Mitogenese und Angiogenese in einer vorwiegend negativen Weise verhindern.

[0024] Eine bevorzugte Anwendung der vorliegenden Erfindung betrifft Verbindungen zur Förderung der Inhibierung von Angiogenese und Metastase eines soliden Tumors durch Anwendung der offenbarten Gentherapie-Methodik. Insbesondere werden Verbindungen offenbart zur Inhibierung von Primärtumorwachstum und Metastasen durch Gentransfer einer Nukleotidsequenz, codierend für einen sVEGF-R, an einen Säugerwirt. Die transferierte Nukleotidsequenz transkribiert mRNA und exprimiert den sVEGF-R, so dass der sVEGF-R an VEGF in extrazellulären Regionen in Nachbarschaft zu dem Primärtumor und in Gefäßendothelzellen bindet. Die Bildung eines sVEGF-R/VEGF-Komplexes wird die Bindung von VEGF an die KDR- und FLT-1-Tyrosinkinase-Rezeptoren verhindern und der Transduktion der normalen intrazellulären Signale, welche mit gefäßendothelzell-induzierter Tumor-Angiogenese assoziiert sind, entgegenwirken. Darüber hinaus könnte die Expression von sFLT-1 auch eine therapeutische Wirkung ausüben durch Bindung, entweder mit oder ohne VEGFs, an Volllängen-VEGF-Rs zur Bildung nicht-funktioneller Heterodimere und dadurch Inhibierung der mitogenen und angiogenen Aktivitäten von VEGFs.

[0025] In der vorliegenden Erfindung wird eine verkürzte Version einer löslichen oder Transmembran-Form von FLT-1 (Shibuya et al., 1990, Oncogene 5: 519-524) in Gentherapie-Protokollen verwendet. Es wird im Rahmen der Fähigkeiten des geschulten Fachmanns liegen, ein Konstrukt zu erzeugen, welches das verkürzte FLT-1-Protein exprimiert, das an VEGF oder ein VEGF-Homologes bindet und/oder mit einem Volllängen-VEGF-R dimerisiert und seine Aktivierung auf der Plasmamembran-Oberfläche von Gefäßendothelzellen inhibiert ([Fig. 1](#)). Ein solches Konstrukt kann durch rekombinante DNA-Techniken, die im Stand der Technik bekannt sind, unter Verwendung eines DNA-Fragments, codierend für eine Aminosäuresequenz eines FLT-Rezeptors, erzeugt werden. Unter Anwendung rekombinanter DNA-Techniken werden DNA-Moleküle konstruiert, welche mindestens für einen Teil des VEGF-Rezeptors codieren, der zur Bindung von VEGF in der Lage ist, ohne entweder Mitogenese oder Angiogenese zu stimulieren. Es werden rekombinante Standard-DNA-Techniken angewandt, wie z.B. die in Maniatis et al. (1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) gefundenen Techniken.

[0026] In der vorliegenden Erfindung ist eine natürlich exprimierte, alternativ gespleisste DNA, codierend für eine lösliche Form von FLT-1 (Kendall und Thomas, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 10705-10709), hier als sVEGF-RI oder sFLT-1 beschrieben und als SEQ-ID-Nr. 1 (Nukleotidsequenz) und SEQ-ID-Nr. 2 (Aminosäuresequenz) angegeben, die Matrize zur Konstruktion eines Gentherapie-Vektors, wobei exprimiertes sFLT-1 an VEGF bindet und Komplexbildung, Dimerisierung und Aktivierung von Volllängen-VEGF-Rs inhibiert und somit die pathologische Angiogenese.

[0027] Die vorliegende Erfindung betrifft sowohl virale als auch nicht-virale rekombinante Vektoren für die Abgabe an die Zielwirte. Diesbezüglich ist ein bevorzugtes nicht-virales rekombinantes Plasmid, das hier beschrieben wird, pcDNA3/sflt-1. Ein besonders bevorzugtes rekombinantes Plasmid der vorliegenden Erfindung ist pcDNAIASFLT-1, wie im Beispielsabschnitt 5 beschrieben.

[0028] Ein rekombinantes Adenovirus (Ad)-System ist für die Abgabe an und anhaltende Expression in Zielzellen in Nachbarschaft zu einem soliden Tumor bevorzugt. Ein besonders geeignetes Adenovirus-System, das in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, ist in Beispiel 4 beschrieben.

[0029] Das Konstrukt kann unter Verwendung eines Vektors oder eines anderen Abgabeverhikels an den Säugerwirt abgegeben werden. DNA-Abgabe-Vehikel können virale Vektoren, wie z.B. Adenoviren, adeno-assoziierte Viren und retrovirale Vektoren, einschließen. Siehe beispielsweise: Chu et al., 1994, Gene Therapy 1: 292-299; Couture et al., 1994, Hum. Gene Therapy 5: 667-277, und Eiverhand et al., 1995, Gene Therapy 2: 336-343. Nicht-virale Vektoren, welche ebenfalls geeignet sind, umfassen nackte DNA (siehe Beispielsabschnitte 1, 2, 3 und 5), DNA-Lipid-Komplexe, beispielsweise liposomen-vermittelte oder Ligand/Poly-L-Lysin-Konjugate, wie z.B. asialoglycoprotein-vermittelte Abgabesysteme. Siehe beispielsweise: Felgner et al., 1994, J. Biol. Chem. 269: 2550-2561; Derossi et al., 1995, Restor. Neurol. Neurol. 8: 7-10, und Abcallah et al., 1995, Biol. Cell 85: 1-7. Es ist bevorzugt, dass lokale Zellen, wie z.B. Fettgewebezellen oder glatte Muskelzellen sowie Tumorzellen, Ziele für die Abgabe und begleitende in vivo-Expression des jeweiligen sVEGF-R-Proteins sind, um die Inhibierung von Tumor-Angiogenese zu fördern.

[0030] Ein rekombinantes Ad/sVEGF-RI ist ein bevorzugtes Virus für die gezielte Ansteuerung von Zellen, welche sich in Nachbarschaft zu einem soliden Tumor befinden.

[0031] Ein besonders bevorzugtes rekombinantes Ad/sVEGF-RI-Virus ist AdHCMVsFLT-1.

[0032] Ein weiteres besonders bevorzugtes rekombinantes Ad/sVEGF-RI-Virus ist AdHCMV1sFLT.

[0033] Das Konstrukt kann primär Gefäßendothelzellen in Nachbarschaft zum Tumorwachstum als Ziel haben. Die oben beschriebenen DNA-Abgabe-Vehikel können dazu verwendet werden, um das Gentransfer-Konstrukt gezielt an Gefäßendothelzellen des Säugerwirts abzugeben.

[0034] Wie hier verwendet, bezieht sich "VEGF" oder "VEGF-A" auf Gefäßendothel-Wachstumsfaktor.

[0035] Wie hier verwendet, bezieht sich "Homologes von VEGF" auf Homodimere von VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und PlGF und irgendwelche funktionellen Heterodimere, welche zwischen VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und PlGF gebildet werden, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, ein VEGF-A/PlGF-Heterodimer.

[0036] Wie hier verwendet, bezieht sich "VEGF-B" auf Gefäßendothel-Wachstumsfaktor B.

[0037] Wie hier verwendet, bezieht sich "VEGF-C" auf Gefäßendothel-Wachstumsfaktor C.

[0038] Wie hier verwendet, bezieht sich "VEGF-D" auf Gefäßendothel-Wachstumsfaktor D.

[0039] Wie hier verwendet, bezieht sich "KDR" oder "FLK-1" auf einen eine Kinase-Insert-Domäne enthaltenden Rezeptor oder fetale Leber-Kinase.

[0040] Wie hier verwendet, bezieht sich "FLT-1" auf einen fms-ähnlichen Tyrosinkinase-Rezeptor.

[0041] Wie hier verwendet, bezieht sich "Ad" auf Adenovirus.

[0042] Wie hier verwendet, bezieht sich "HUVEC" auf (eine) Human-Umbilikalvenen-Endothelzelle(n).

[0043] Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff "Säugerwirt" auf jeden Säuger, einschließlich eines Menschen.

[0044] Wie hier verwendet, bezieht sich "sVEGF-R" allgemein auf eine lösliche Form eines Tyrosinkinase-Rezeptors, welche an seinen jeweiligen Gefäßendothel-Wachstumsfaktor, wie z.B. VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und PlGF, bindet, ohne Rezeptor-Aktivierung, Mitogenese von Gefäßendothelzellen oder Angiogenese zu stimulieren.

[0045] Wie hier verwendet, bezieht sich "sVEGF-RI" oder "sFLT-1" auf die native humane lösliche Form von sFLT, die hier als cDNA-Form (umfassend SEQ-ID-Nr. 1) und Proteinform (SEQ-ID-Nr. 2) dargestellt wird.

[0046] Wie hier verwendet, bezieht sich "VEGF-Rs" auf einen für Human-Wildtyp-VEGF/VEGF-Homologe spezifischen Tyrosinkinase-Rezeptor wie FLT-1 und KDR.

[0047] Wie hier verwendet, bezieht sich "mVEGF-R" allgemein auf einen für Human-Wildtyp-VEGF/VEGF-Homologe spezifischen Tyrosinkinase-Rezeptor, der membran-gebunden ist, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, FLT-1, VEGF-RTM1, KDR und VEGF-RTMII, wie in [Fig. 1](#) gezeigt.

[0048] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von Verbindungen zur Inhibierung von Angiogenese und Wachstum solider Tumore.

[0049] Es ist auch eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, sVEGF-RI zur Herstellung eines Medikaments für die Verwendung in Gentherapie-Verfahren zur Inhibierung von Angiogenese und Wachstum solider Tumore einzusetzen.

[0050] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Offenbarung von Tiermodellen zur Feststellung der Wirksamkeit von FLT-1-basierten Konstruktionen für die Zellabgabe und in vivo-Expression im Säugerwirt.

[0051] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung rekombinanter DNA-Vektoren, die sVEGF-RI-Konstrukte enthalten, zur Verwendung in der Gentherapie, um lokal die Angiogenese in einem Säugerwirt zu inhibieren.

Kurzbeschreibung der Figuren

[0052] [Fig. 1](#) zeigt ein schematisches Diagramm von Vollängen-VEGF-Rs (FLT-1 und KDR), den löslichen VEGF-Rezeptoren (sVEGF-RI und sVEGF-RII) und den löslichen Rezeptoren, welche die C-terminale Transmembranregion enthalten (sVEGF-RTM1 und sVEGF-RTMII), mit den jeweiligen Proteindomänen.

[0053] [Fig. 2](#) zeigt die Nukleotidsequenz, welche für Human-sFLT-1 [sVEGF-RI] codiert (SEQ-ID-Nr. 1).

[0054] [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) zeigen die Aminosäuresequenz von Human-sFLT-1 [sVEGF-RI] (SEQ-ID-Nr. 2).

[0055] [Fig. 4](#) zeigt die Inhibierung von in nackten Mäusen gewachsenen Tumorknoten für HT-1080-Mauszellen, die transient mit pcDNA3/sflt-1 (O) oder pcDNA3 (•) transfiziert wurden. 3×10^6 Zellen wurden am Tag 0 injiziert.

[0056] [Fig. 5](#) zeigt die Inhibierung von in nackten Mäusen gewachsenen Tumorknoten für HT-1080-Mauszellen, die stabil mit pcDNA3/sflt-1 (•) oder pcDNA3 (O) transfiziert wurden.

[0057] [Fig. 6](#) zeigt das Überlebensdiagramm von scid-Mäusen, denen (a) D-54MG-Human-Glioblastomzellen, stabil transfiziert mit pcDNA3 (■), (b) D-54MG-Human-Glioblastomzellen, stabil transfiziert mit pcDNA-sflt-1 (□), und (c) untransfizierte D-54MG-Human-Glioblastomzellen (•) injiziert wurden.

[0058] [Fig. 7](#) zeigt zusätzliche Datenpunkte für das in [Fig. 6](#) detailliert ausgeführte Experiment, nämlich dass ein CB-17-scid-Maus-Humangliom-Modell zur Beurteilung der Wirkung stabiler sflt-1-Expression hinsichtlich Tumorwachstum und Überleben verwendet wurde. (■) D-54MG-Human-Glioblastomzellen, stabil mit pcDNA3 transfiziert; (b) D-54MG-Human-Glioblastomzellen, stabil transfiziert mit pcDNA-sflt-1 (▲) und (c) untransfizierte D-54MG-Human-Glioblastomzellen (O).

[0059] [Fig. 8](#) zeigt, dass das Tumorwachstum in Mäusen, wie gemessen durch mittleres Volumen und Masse (\pm SD), durch die Expression des sflt-1-Gens, subkloniert in pcDNA1A3, resultierend in pcDNA1AsFLT-1, signifikant inhibiert wurde (1-endiger Student's t-Test, $p < 0,0001$ für den Massenvergleich).

[0060] [Fig. 9](#) zeigt, dass die Tumormassen in Mäusen von sFlt-1-exprimierenden Zellen signifikant kleiner waren als entweder bei den mit Adenovirus behandelten Kontrollzellen ($p = 0,035$) oder den mit keinem Virus behandelten Kontrollzellen ($p = 0,007$) unter Verwendung des geeigneten 1-seitigen Student's t-Tests.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0061] Wie unten beschrieben, wird die in vivo-Abgabe eines DNA-Konstrukts, das für sVEGF-R codiert, gezielt an Zellen und Gewebe gerichtet, welche den Tumor umgeben, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf,

Gefäßendothelzellen, Muskelzellen, Fettzellen sowie Tumorzellen und umgebende Gewebe wie Muskelgewebe und Fettgewebe.

[0062] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verbindungen zur therapeutischen Behandlung der metastatischen Verbreitung von Tumoren, der Hauptursache der Sterblichkeit bei Krebs. Tumorzellen können durch Eintritt in das Kreislaufsystem, Transport zu entfernten Stellen, Rückimplantation in das umgebende Gewebe und Wachstum Metastasen bilden. Die Inhibierung irgendeines Schritts in diesem Prozess würde erwartungsgemäß die letztliche Etablierung und das Wachstum von metastatischen Herden inhibieren. Diesbezüglich betrifft ein zusätzlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung die Verwendung der Gentherapie-Konstrukte der vorliegenden Erfindung zur Inhibierung der metastatischen Verbreitung von Tumoren. Die signifikante Inhibierung der Etablierung von metastatischen HT1080-Lungenherden durch sflt-Expression, wie in Beispiel 2 gezeigt, zeigt, dass sflt bei der Inhibierung dieses Prozesses wirksam ist. Das Experiment mit einer Injektion von sflt-1-transfizierten HT1080-Zellen in die Schwanzvene überprüft die Implantation und/oder das Wachstum zirkulierender Tumorzellen, zwei der kritischen Schritte bei der metastatischen Verbreitung. Es wird in Betracht gezogen, dass sflt die Effizienz der Tumorzellextravasation aus dem Blut und in das umgebende Gewebe verringern könnte, möglicherweise durch Inhibierung der VEGF-induzierten Gefäßpermeabilität, welche eine Zellmigration durch Gefäßwände erleichtern könnte. Zusätzlich steht zu erwarten, dass die Expression von sFlt die neovaskuläre Entwicklung innerhalb metastatischer Herde zum Stillstand bringt und somit deren Wachstum und/oder Lebensfähigkeit verringert.

[0063] Die Matrice zur Durchführung der vorliegenden Erfindung ist die cDNA, welche für eine lösliche Form von FLT-1 (sVEGF-RI), beschrieben in Kendall und Thomas (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 10705-10709), codiert. In Kürze, ein cDNA-Klon, codierend für sVEGF-RI, wurde in einem zweistufigen Ansatz unter Anwendung einer auf Polymerasekettenreaktion (PCR) basierenden Technik und cDNA-Bank-Screening isoliert. In der ersten Stufe wurden DNA-Oligonukleotide, abgeleitet aus der Sequenzinformation über die extrazelluläre Domäne von dem bekannten Vollängen-FLT, -KDR oder einem anderen VEGF-Rezeptor, dazu verwendet, Oligonukleotid-Primer zur Amplifizierung von sVEGF-R-spezifischen DNA-Fragmenten zu konstruieren. In der zweiten Stufe werden diese Fragmente kloniert, um als Sonden für die Isolierung einer vollständigen sVEGF-R-cDNA aus einer im Handel erhältlichen Lambda gt10-cDNA-Bank (Clontech), erhalten aus HUVECs (ATCC CRL 1730), zu dienen. Diese sVEGF-RI-cDNA exprimiert eine alternativ gespleissste Form der FLT-1-Vorläufer-mRNA, welche 31 einmalige Aminosäurereste am C-Terminus einschließt, die in FLT-1 nicht gefunden werden (siehe [Fig. 2](#) und SEQ-ID-Nr. 1 hinsichtlich der Nukleotidsequenz und [Fig. 3](#) und SEQ-ID-Nr. 2 hinsichtlich der Aminosäuresequenz). Diese 31 einmaligen Reste werden von einem Intron codiert, welches in dieser alternativ gespleisssten Version nicht entfernt wird. Die alternativ gespleissste mRNA wird in diese Intron-Region translatiert, bis das erste Stoppcodon angetroffen wird. Diese Matrice (sflt-1 oder sVEGF-RI) für einen Gentherapie-Vektor wird sVEGF-RI in vivo exprimieren und VEGF binden und/oder mit Vollängen-VEGF-Rs (z.B. VEGF-RI/FLT-1 und VEGF-RII/KDR) heterodimerisieren und somit Tumor-Angiogenese inhibieren.

[0064] Die klonierte sVEGF-RI-cDNA, welche mit den oben beschriebenen Verfahren erhalten wurde, kann durch molekulare Klonierung in einen Expressionsvektor, der einen geeigneten Promotor und andere geeignete regulatorische Transkriptionselemente enthält, rekombinant exprimiert und in prokaryotische oder eukaryotische Wirtszellen überführt werden, um rekombinantes sVEGF-RI zu produzieren. Techniken für solche Manipulationen sind in Maniatis et al. (oben) vollständig beschrieben und im Stand der Technik wohlbekannt.

[0065] Wie oben angesprochen, betrifft eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung Verbindungen, welche von Nutzen sind zur Herstellung eines Medikaments für die Verwendung in Verfahren zur Inhibierung der Angiogenese solider Tumore, um weiteres Tumorstadium und eventuell Metastasen zu verhindern. Diesbezüglich wird jeder solider Tumor oder die Region, welche den Tumor umgibt und für einen Gentransfer zugänglich ist, ein Ziel für die offenbarten therapeutischen Anwendungen sein. Ein sVEGF-RI-Gen, das von einem rekombinanten Gentransfer-System auf viraler oder nicht-viraler Basis beherbergt wird, kann zu Zielzellen in der Nachbarschaft des Tumors geführt werden durch irgendwelche im Stand der Technik bekannte Verfahren, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, (a) chirurgische Prozeduren, die mit der Verabreichung einer wirksamen Menge der DNA an der Stelle in und um den Tumor (beinhaltend die anfängliche Entfernung eines Teils oder der Gesamtheit des Tumors, falls möglich) gekoppelt sind, (b) Injektion des Gentransfer-Vehikels direkt in die Tumorstelle oder in deren Nachbarschaft, und (c) lokalisierte oder systemische Abgabe des Gentransfer-Vektors und/oder Genprodukts unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Verfahren, wie im folgenden aufgelistet.

[0066] Deshalb wird jeder solide Tumor, der VEGF exprimierende Zellen enthält, ein potentiell Ziel für die

Behandlung sein. Beispiele, die jedoch keineswegs als Beschränkung aufgeführt sind, von soliden Tumoren, welche besonders empfänglich für sVEGF-RI-Gentherapie-Anwendungen sein werden, sind (a) Neoplasmen des Zentralnervensystems, wie z.B., jedoch wiederum nicht notwendiger Weise beschränkt auf, Glioblastome, Astrozytome, Neuroblastome, Meningiome, Ependymome; (b) Tumore von hormon-abhängigen Geweben, wie z.B. Karzinome der Prostata, der Testikel, des Uterus, des Gebärmutterhalses, des Eierstocks, der Brustdrüsen, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Karzinome in situ, medulläres Karzinom, tubuläres Karzinom, invasive (infiltrierende) Karzinome und Schleimhaut-Karzinome; (c) Melanome, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, kutane und okuläre Melanome; (d) Tumore der Lunge, welche mindestens Plattenzell-Karzinom, Spindelzell-Karzinom, kleinzelliges Karzinom, Adenokarzinom und großzelliges Karzinom einschließen; und (e) Tumore des gastrointestinalen Systems, wie z.B. der Speiseröhre, des Magens, des Dünndarms, Dickdarms, der kolorektalen, rektalen und analen Region, welches mindestens Adenokarzinome des Dickdarms einschließen.

[0067] Expressionsvektoren sind hier definiert als DNA-Sequenzen, welche für die Transkription klonierter Kopien von Genen und die Translation ihrer mRNAs in einem geeigneten Wirt erforderlich sind. Solche Vektoren können zur Expression von eukaryotischen Genen in einer Vielfalt von Wirten, wie z.B. Bakterien, blaugrünen Algen, Pilzzellen, Hefezellen, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Tierzellen, eingesetzt werden.

[0068] Speziell konstruierte Vektoren erlauben das "Shuttling" von DNA zwischen Wirten wie Bakterien-Hefe oder Bakterien-Tierzellen oder Bakterien-Insektenzellen. Ein geeignet konstruierter Expressionsvektor sollte enthalten: einen Replikationsursprung für autonome Replikation in Wirtszellen, selektierbare Marker, eine begrenzte Anzahl geeigneter Restriktionsenzymstellen, ein Potential für eine hohe Kopienzahl und aktive Promotoren. Ein Promotor ist definiert als eine DNA-Sequenz, welche RNA-Polymerase dazu veranlasst, an DNA zu binden und RNA-Synthese zu initiieren. Ein starker Promotor ist einer, der die Initiierung von mRNAs mit hoher Frequenz veranlasst. Expressionsvektoren können einschließen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Klonierungsvektoren, modifizierte Klonierungsvektoren, speziell konstruierte Plasmide oder Viren.

[0069] Eine Vielfalt von Säuger-Expressionsvektoren kann zur Expression von rekombinantem sVEGF-RI in Säugerzellen verwendet werden. Im Handel erhältliche Säuger-Expressionsvektoren, welche für die Expression von rekombinantem sVEGF-RI geeignet sein mögen, umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, pcDNA3.1 (Invitrogen), pBlueBacHis2 (Invitrogen), pLITMUS28, pLITMUS29, pLITMUS38 und pLITMUS39 (New England Biolabs), pcDNA1, pcDNA1amp (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593), pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMT-neo (342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37199), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCtag (ATCC 37460) und λZD35 (ATCC 37565).

[0070] DNA, die für einen sVEGF-RI codiert, kann auch in einen Expressionsvektor zur Expression in einer rekombinanten Wirtszelle kloniert werden. Rekombinante Wirtszellen können prokaryotische oder eukaryotische Zellen sein, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Bakterien, Hefe, Säugerzellen, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Zelllinien, die von Menschen, Rindern, Schweinen, Affen und Nagern stammen, und Insektenzellen, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Zelllinien, die von Drosophila, einer Motte, einem Moskito und einem Heerwurm stammen. Der Expressionsvektor kann in Wirtszellen mittels irgendeiner von einer Vielfalt von Techniken eingeführt werden, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Transformation, Transfektion, Ad/Polylysin-DNA-Komplexe, Protoplastenfusion und Elektroporation. Aus Säuger-Spezies erhaltene Zelllinien, welche geeignet sein mögen und im Handel erhältlich sind, schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, CV-1 (ATCC CCL 70), COS-1 (ATCC CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), CHO-K1 (ATCC CCL 61), 3T3 (ATCC CCL 92), NIH/3T3 (ATCC CRL 1658), HeLa (ATCC CCL 2), C1271 (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26) und MRC-5 (ATCC CCL 171) und HEK-293-Zellen. Insektenzelllinien, welche geeignet sein mögen und im Handel erhältlich sind, schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, 3M-S (ATCC CRL 8851), Motte (ATCC CCL 80), Moskito (ATCC CCL 194 und 195; ATCC CRL 1660 und 1591) und Heerwurm (Sf9, ATCC CRL 1711).

[0071] Ein DNA-Fragment, das für sVEGF-RI codiert, kann entweder systemisch oder an Zielzellen in der Nähe eines soliden Tumors des Säugerwirts durch Verfahren auf viraler oder nicht-viraler Basis abgegeben werden. Virale Vektor-Systeme, welche in der vorliegenden Verwendung verwendet werden können, umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, (a) Adenovirus-Vektoren; (b) Retrovirus-Vektoren; (c) adeno-assoziierte Virusvektoren; (d) Herpes-Simplex-Virus-Vektoren; (e) SV40-Vektoren; (f) Polyomavirus-Vektoren; (g) Papillomavirus-Vektoren; (h) Picarnovirus-Vektoren und (i) Vacciniavirus-Vektoren. Nicht-virale Verfahren zur Abgabe umfassen, sind jedoch nicht unbedingt beschränkt auf, direkte Injektion nackter DNA, wie z.B. eines rekombinanten DNA-Plasmid-Expressionsvektors wie hier beschrieben, umfassend ein DNA-Fragment, das für

sVEGF-RI codiert.

[0072] Die vorliegende Erfindung betrifft deshalb nicht-virale rekombinante Vektoren zur Abgabe an die Zielempfänger. Diesbezüglich ist ein bevorzugtes rekombinantes Plasmid, das hier beschrieben wird, pcDNA3/sflt-1. Ein besonders bevorzugtes rekombinantes Plasmid der vorliegenden Erfindung ist pcDNAIASFLT-1, wie im Beispielsabschnitt 5 beschrieben.

[0073] Ein rekombinantes Adenovirus (Ad)-System ist für die Abgabe und anhaltende Expression in Zielzellen in Nachbarschaft zu einem soliden Tumor bevorzugt. Ein besonders geeignetes Adenovirus-System, das in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, ist in Beispiel 4 beschrieben.

[0074] Ein rekombinantes Ad/sVEGF-RI ist ein bevorzugtes Virus zur gezielten Abgabe an Zellen in Nachbarschaft zu einem soliden Tumor.

[0075] Ein besonders bevorzugtes rekombinantes Ad/sVEGF-RI-Virus ist AdHCMVsFLT-1.

[0076] Ein weiteres besonders bevorzugtes rekombinantes Ad/sVEGF-RI-Virus ist AdHCMV1sFLT.

[0077] Die rekombinanten Ad/sVEGF-RI-Viren der vorliegenden Erfindung, einschließlich AdHCMVsFLT-1 und AdHCMV1sFLT, werden dem Wirt/Empfänger vorzugsweise durch direkte Injektion in einen soliden Tumor und/oder ruhendes Gewebe in Nachbarschaft zu dem soliden Tumor, wie z.B. Fett- oder Muskelgewebe, verabreicht. Es wird natürlich von Nutzen sein, Tumorzellen im Bereich des als Ziel vorgesehenen Fett- und Muskelgewebes zu transfizieren. Eine transiente Expression eines sVEGF-RI in diesen umgebenden Zellen wird zu einer lokalen extrazellulären Erhöhung dieser Proteine führen und die Bindung mit VEGF und Vollängen-VEGF-Rs fördern und somit die Bildung von aktivierten Vollängen-VEGF-R-Dimeren inhibieren.

[0078] Die rekombinanten Ad/VEGF-RI-Viren der vorliegenden Erfindung, einschließlich AdHCMVsFLT-1 und AdHCMV1sFLT, können auch durch intravenöse Injektion verabreicht werden. Ein rekombinantes Adenovirus, das durch intravenöse Injektion verabreicht wird, wird bei intravenöser Verabreichung vorzugsweise Hepatozyten infizieren, wo die Expression für etwa 3-4 Wochen nach der anfänglichen Infektion andauert. Geeignete Titer werden von einer Reihe von Faktoren abhängen, wie z.B. dem gewählten speziellen Vektor, dem Wirt/Empfänger, der Stärke des verwendeten Promotors und der Schwere der behandelten Erkrankung.

[0079] Der geschulte Fachmann kann den Virustiter, der dem Patienten verabreicht wird, in Abhängigkeit von dem Abgabeverfahren, der Größe des Tumors und der Effizienz der Expression von dem rekombinanten Virus verändern. Eine Dosis im Bereich von 10^9 - 10^{11} Pfu Adenovirus ist zur Behandlung der meisten primären Tumore bevorzugt. Der geschulte Fachmann wird auch erkennen, dass die Anzahl der viralen Partikel, welche für das Transgen codieren, seien sie in einer komplementierenden Wirtszelle replikationskompetent oder nicht, eine relevante Dosierungseinheit ist. In den meisten Adenovirus-Konstrukten gibt es 50- bis 100fach mehr DNA-enhaltende Partikel als Pfus.

[0080] Nicht-virale Vektoren, welche ebenfalls geeignet sind, umfassen DNA-Lipid-Komplexe, beispielsweise liposom-vermittelte oder Ligand/Poly-L-Lysin-Konjugate, wie z.B. asialoglycoprotein-vermittelte Abgabesysteme (siehe z.B. Felgner et al., 1994, J. Biol. Chem. 269: 2550-2561; Derossi et al., 1995, Restor. Neurol. Neurol. 8: 7-10, und Abcallah et al., 1995, Biol. Cell 85:1-7).

[0081] Es gibt viele Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, welche Fachleute anhand der Beschreibung erkennen können. Diesbezüglich können verschiedene transkriptionale Promotoren, Terminatoren, Trägervektoren oder spezielle Gensequenzen erfolgreich verwendet werden.

[0082] Die vorliegende Erfindung stellt Verbindungen bereit, welche von Nutzen sind zur Herstellung eines Medikaments für die Verwendung in Verfahren der Genterapie, welche die Tumor-Angiogenese in einem Säuger-Empfänger inhibieren. Für den Fachmann wird unschwer ersichtlich sein, dass im Prinzip verschiedene Formen der für sVEGF-RI codierenden Nukleotidsequenz(en) verwendet werden können, um die Aminosäuresequenz des exprimierten Proteins zu verändern. Das veränderte exprimierte Protein kann eine veränderte Aminosäuresequenz aufweisen, jedoch immer noch an VEGF binden und wiederum die molekulare Kaskade, welche zur Stimulation von Tumor-Angiogenese erforderlich ist, inhibieren. Beispielsweise werden verschiedene COOH-terminal verkürzte Formen von sVEGF-RI in Betracht gezogen. Es wird für den geschulten Fachmann unschwer möglich sein, solche veränderten Formen nach dem Studium dieser Patentbeschreibung zu erzeugen. Jede solche verkürzte Version von FLT, welche löslich ist und an VEGF, ein VEGF-Homologes

und/oder FLT-1 oder KDR bindet, wird als funktionelles Äquivalent im Lichte der Lehre dieser Patentbeschreibung betrachtet.

[0083] Die folgenden Beispiele werden zur Erläuterung der vorliegenden Erfindung gegeben, ohne jedoch dieselbe darauf zu beschränken.

BEISPIEL 1

Isolierung einer cDNA, die für Human-sFLT-1 codiert

[0084] Mittels PCR erhaltene Produkte wurden als Hybridisierungssonden zum Screenen einer Lambda gt10-cDNA-Bank, erhalten aus HUVECs (Clontech), verwendet. Ausplattierung und Plaqueübertragungen der Bank wurden nach Standardverfahren durchgeführt (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Die Sonden wurden mittels statistischer Primer mit ^{32}P -dCTP auf eine hohe spezifische Aktivität markiert und ein separates Screening der Bank (1×10^6 Plaques pro Screening) wurde mit jeder Sonde durchgeführt. Die Sonden wurden zu Hybridisierungspuffer (50 % Formamid, 5 × Denhardts, 6 × SSC ($1 \times \text{SSC} = 0,15 \text{ M NaCl}$, $0,015 \text{ M Na}_3\text{citrat} \times 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0), 0,1 % SDS, 100 mg/ml Lachssperma-DNA) mit 1×10^6 CpM/ml zugegeben.

[0085] Vier positiv hybridisierende Phagen wurden unter Verwendung der flt-1-spezifischen Sonde nachgewiesen. Es wurde festgestellt, dass diese positiv hybridisierenden Phagen weniger als Vollängen-flt-1 enthielten.

[0086] Zwei flt-1-cDNA-Klone von etwa 2,0 kb und 2,7 kb Länge wurden in pGEM-Vektoren (Promega) subkloniert und in ihrer Gesamtheit nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci 74: 5463-5467) bidirektional sequenziert und befunden, einen einzigen offenen Leserahmen von etwa 569 Aminosäuren zu enthalten. Eine Sequenzanalyse demonstrierte, dass ein Abschnitt der 5'-flt-1-codierenden Region bei diesen Klonen fehlte. Der Rest des 5'-Endes wurde mittels PCR kloniert und mit der DNA der Klone, denen das 5'-Ende fehlte, kombiniert, um einen einzigen offenen Leserahmen zu ergeben, der für etwa 687 Aminosäuren codierte.

[0087] Die flt-1-abgeleitete sVEGF-RI (sflt-1)-cDNA-Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz ist in [Fig. 2](#) (Nukleotidsequenz: SEQ-ID-Nr. 1) und [Fig. 3](#) (Aminosäuresequenz: SEQ-ID-Nr. 2) gezeigt. Die Inspektion der abgeleiteten Aminosäuresequenz offenbart die Anwesenheit eines einzigen großen offenen Leserahmens von 687 Aminosäuren. Im Vergleich zu der Aminosäuresequenz des Vollängen-FLT-1-VEGF-Rezeptors werden 31 Aminosäuren am C-Terminus der sVEGF-RI-cDNA codiert, welche von denjenigen von FLT-1 verschieden sind.

BEISPIEL 2

Inhibierung von Tumor-Angiogenese in Mäusen durch Verabreichung von Zellen, welche transient sVEGF-RI exprimieren

[0088] Die in Beispiel 1 beschriebene sVEGF-RI-cDNA, kloniert in pGEM3z und als psflt-1 bezeichnet, wurde mit BamHI verdaut, gereinigt und in BamHI-verdauten pcDNA3 ligiert. Das resultierende Plasmid, pcDNA3/sflt-1 (alternativ als SFLT-1 bezeichnet), wurde durch Restriktionskartierung sowie DNA-Sequenzierung der 5' und 3' gelegenen 500 bp des BamHI-Inserts verifiziert. Das Plasmid wurde in Top10F' E. coli transformiert und unter Verwendung des Qiagen „Mega Prep“- und Qiagen „Endotoxin Removal“-Kits transformiert.

[0089] Das Expressionsplasmid pcDNA3/sflt-1 wurde mit Adenovirus-Polylysin (AdPI) gemischt und in Maus-HT-1080-Zellen (ATCC CRL 1730) transfiziert. Kontrolltransfektionen wurden in gleicher Weise unter Verwendung von unmodifiziertem pcDNA3 durchgeführt. HT-1080-Zellen wurden transfiziert, als sie zu 80 % konfluent waren, und nach 16-24 Stunden für die nachfolgende Untersuchung geerntet.

[0090] Eine Zellzählung in dreifachen Mulden wurde zu drei Zeitpunkten innerhalb von 7 Tagen nach der Transfektion unter Verwendung von Trypanblau-Ausschluss durchgeführt und offenbarte keinen Unterschied in den Wachstumskurven zwischen den beiden Gruppen.

[0091] Die geernteten Zellen wurden entweder subkutan oder über die Schwanzvene in nackte Mäuse injiziert und die Knoten wurden an ausgewählten Tagen für die subkutanen Knoten gemessen. Für die Schwanzve-

neninjektionen wurden zwei Sätze von Experimenten durchgeführt. Im ersten Experiment wurden die Tiere vor der Entwicklung von Knoten getötet; zwar gab es nachweisbare Unterschiede in den Gewichten der Lungen, jedoch waren die Gewichte nicht signifikant verschieden. Im zweiten Experiment gab es eindeutige Unterschiede in der Anzahl der Knoten pro Sektionen, wobei die sflt-1-Gruppe weniger Knoten/Gewebesektion aufwies.

[0092] Eine transiente Transfektion mit pcDNA3/sflt-1 ($n = 7$) im Vergleich zu einer pcDNA-Kontrolle ($n = 6$) führte zu langsamer wachsenden Tumorknoten an allen untersuchten Tagen ($p < 0,01$). Diese Zellen hatten identische Wachstumsraten in vitro über einen Zeitraum von 96 h. Durchschnittliche Knotenvolumen für sflt-1-transfizierte Zellen waren 50 mm^3 , 75 mm^3 und 190 mm^3 an den Tagen 7, 12 bzw. 17. Im Gegensatz dazu hatten bei Verwendung von mit Kontroll-pcDNA3 transfizierten Zellen die Knoten 151 mm^3 , 261 mm^3 und 474 mm^3 an den Tagen 7, 12 und 17. Gleichmaßen waren die mittleren Lungengewichte in Tieren, die mit pcDNA3/sflt-1 transfizierte Zellen (171 mg , $n = 3$) durch Schwanzveneninjektion erhielten, im Vergleich zu pcDNA3-Kontrollen (205 mg , $n = 3$) geringer. [Fig. 4](#) zeigt eine ausgeprägte Abnahme im Tumolvolumen in nackten Mäusen, denen HT-1080-Zellen injiziert wurden, welche transient sVEGF-RI in Form von pcDNA3/sflt-1 exprimieren.

[0093] Eine zweite Studie, gestaltet, um die Möglichkeit der Anwendung einer sFLT-basierten Gentherapie auf die Behandlung von Tumormetastasen zu untersuchen, ergab ähnliche Ergebnisse. HT-1080-Zellen wurden transient mit pcDNA3 oder pcDNA3/sflt-1 transfiziert. 4×10^6 Zellen wurden am Tag 0 über die Schwanzvene jeder Maus injiziert. Die Tiere wurden nach einem Monat getötet und die Lungen wurden extrahiert, gewogen und histologisch auf Tumorbelastrung untersucht. Eine Lungenhistologie, durchgeführt bei Tieren, die intravenös injizierte Tumore erhielten, offenbarte einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. pcDNA3-transfizierte Zellen waren mit einer intramuralen pulmonalen Tumorausbreitung, massiven parenchymalen Ödemen und mononukleärem Infiltrat 20 Tage nach intravenöser Injektion von Tumorzellen assoziiert. Im Gegensatz dazu waren pcDNA3/sflt-1-transfizierte Zellen mit seltenen Tumorherden, Abwesenheit von Ödemen und fast normaler Lungenparenchym-Histologie assoziiert. 8 von 9 Tieren, denen HT-1080-Zellen, die transient sVEGF-RI exprimierten, injiziert worden waren, waren frei von Tumorwachstum. Im Gegensatz dazu zeigten HT-1080-Tumorzellen, transfiziert mit dem pcDNA3-Kontrollplasmid, 2 von 9 ohne Tumorwachstum, während 7 von 9 Lungenknoten bildeten. Diese Daten zeigen, dass sFLT-basierte Gentherapieanwendungen zur Behandlung von Tumormetastasen eingesetzt werden könnten.

[0094] Drittens wurde ein syngenes Modell untersucht. Vereinigte Klone wurden für entweder pcDNA3 oder pcDNA3/sflt-1 in GL261-Maus-Gliomzellen generiert. Die Zellzählung der in Kultur gezüchteten Zellen offenbarte keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Allen drei pcDNA3-Tieren wuchsen große Tumore nach etwa einem Monat. Zwei von drei in der sFLT-1-Gruppe waren tumorfrei. Das dritte hatte einen sehr kleinen Tumor gebildet. Die Histopathologie differierte, jedoch hatten alle Tumore ein klar malignes Erscheinungsbild.

BEISPIEL 3

Inhibierung von Tumor-Angiogenese in Mäusen durch Verabreichung von Zellen, die stabil mit einem cDNA-Fragment, codierend für sVEGF-RI, transfiziert worden waren

[0095] Die in Beispiel 2 beschriebene Studie wurde mit HT-1080-Zellen wiederholt, die mit entweder der pcDNA3-Kontrolle oder pcDNA3/sflt-1 transfiziert worden waren. [Fig. 5](#) zeigt eine praktisch vollständige Inhibierung des Tumorwachstums im Vergleich zu den zusätzlichen Daten, die mit transient transfizierten Tumorzellen generiert worden waren.

[0096] Zur Feststellung der Wirkungen von sVEGF-RI auf das Überleben von Tieren wurde die Humangliom-Zelllinie D-54MG stabil mit pcDNA3/psflt-1 oder einer pcDNA-3-Kontrolle transfiziert. Die Klone wurden gepoolt und dieselbe Anzahl von Zellen wurde intrakranial unter Verwendung einer Maus-Stereotaxie-Vorrichtung mit Schädelnähnen als Markierungen injiziert. Es wurde zuvor festgestellt, dass das Modell zuverlässige Überlebenscharakteristiken aufweist. Die Tiere wurden nach der Operation identisch behandelt. [Fig. 6](#) zeigt, dass Mäuse, denen eine untransfizierte Kontrolle injiziert worden war, bis zum Tag 26 starben, Mäuse, denen pcDNA3-transfizierte Kontrollzellen injiziert worden waren, bis zum Tag 25 starben, während alle Mäuse, die pcDNA3/sVEGF-R-transfizierte Zellen erhielten, am Tag 41 lebendig waren. [Fig. 7](#) zeigt verlängerte Datenpunkte von diesem Experiment, welche zeigen, dass das mittlere Überleben für D-54MG-Zellen, transfiziert mit pcDNA3/sflt-1, 46,5 Tage betrug. Wie früher in diesem Absatz festgestellt, wurden D-54MG-Humangliom-Zellen mit pcDNA3/sflt-1 oder pcDNA3 unter Verwendung von AdpL-Transfektion transfiziert. Die Zellen wurden anschließend in vollständigem Medium, enthaltend $400 \mu\text{g/ml}$ des Antibiotikums G418 (Gibco BRL, Grand Island, NY), einen Monat propagiert, um hinsichtlich einer Population von Klonen zu selektionieren, welche das

pcDNA3/sflt-1- oder pcDNA3-Plasmid enthielten. Die selektionierten Zellen, repräsentierend eine Population von gepoolten Klonen, wurden dann unter Verwendung von Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco) geerntet und unter Verwendung eines Hämazytometers mit Trypanblau-Ausschluss gezählt. Die Zellen wurden auf eine Endkonzentration von 10^7 Zellen/100 μ l in serumfreiem DMEM/F12, enthaltend 5 % Methylcellulose als Vehikel zur Erhöhung der Zellebensfähigkeit, resuspendiert. Ein Einschnitt in der Mitte der Kopfhaut wurde durchgeführt, gefolgt von einem 0,5 mm Bohrloch 1,5-2,0 mm rechts der Mittellinie und 0,5-1,0 mm hinter der Kranznaht. Die Zellen wurden in eine 100- μ l-Mikrospritze geladen und 5 μ l wurden stereotaktisch injiziert. Eine 30-Zoll-Nadel, auf der Mikrospritze montiert, wurde vertikal durch das Bohrloch in eine Tiefe von 2,5 mm inseriert. 45 bis 60 Sekunden nach der Injektion wurde die Nadel langsam zurückgezogen und der Einschnitt mit 9-mm-Michel-Wundclips geschlossen. Die Mäuse wurden in sterile Mikroisolator-Polycarbonat-Käfige zurückgebracht, auf ein Heizkissen bis zur Erholung platziert und erhielten autoklavierte Labornahrung und steriles Wasser nach Belieben. Die Tiere wurden zweimal täglich hinsichtlich des Überlebens überprüft. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass sFLT-1-Tiere länger als die historischen Kontrollen und anschließenden Kontrollen überlebten.

BEISPIEL 4

Konstruktion von AdHCMVsFLT-1

[0097] Mehrere Systeme wurden zur Konstruktion von helfer-unabhängigen Adenovirus (Ad)-Vektoren entwickelt und wurden kürzlich von Graham und Prevec (1995, Mol. Biotech. 3: 207-220) und Hitt et al. (1995, Techniques for human adenovirus vector construction and characterization, in Methods in Molecular Genetics, Volume 7, Molecular Virology Techniques Part B, Hrsg. Kenneth W. Adolph, Academic Press, Inc., Orlando, Florida) im Überblick dargestellt. Alle diese Systeme beinhalten die Klonierung des Transgens von Interesse (codierende Region, flankiert von geeigneten regulatorischen Sequenzen) in ein Shuttle-Plasmid, in dem es von Ad-Sequenzen, homolog zu der Region des viralen Genoms, in welche das Transgen eingeführt werden wird, flankiert wird. Die DNA von dem Shuttle-Plasmid wird dann in Virus entweder durch direkte Ligierung in vitro, gefolgt von Transfektion oder durch homologe Rekombination in vivo nach Transfektion in 293-Zellen freigesetzt.

[0098] E1-Shuttle-Plasmide wurden zur Freisetzung von Inserts in die E1-Region entwickelt. Diese Plasmide enthalten die linken 16 % des Ad-Genoms mit einer Deletion von E1-Sequenzen und Klonierungsstellen, in die das Transgen eingeführt wird. Falls günstige Restriktionsstellen im Vektorgerüst verfügbar sind, kann eine direkte Ligierung des Shuttle-Plasmids mit gereinigter viraler DNA in vitro durchgeführt werden, gefolgt von Transfektion in 293-Zellen, um infektiöses Virus zu erzeugen. Dieses Verfahren kann, obwohl es effizient ist, ein umfangreiches Screening erfordern, wenn die virale DNA nicht vollständig restriktionsverdaut ist, und in vielen Fällen ist es aufgrund des Fehlens richtig positionierter, nur einmal vorkommender Restriktionsstellen nicht praktikabel. Aus diesen Gründen beruhen viele Protokolle auf einer homologen Rekombination in vivo, um infektiöses Virus zu erzeugen. Zur Konstruktion eines Virus durch homologe Rekombination kann das Shuttle-Plasmid in 293-Zellen transfiziert werden, mit gereinigter viraler DNA, welche am linken Ende gespalten wurde, oder mit viraler DNA, die in einem zweiten Plasmid enthalten ist. Wie bei der direkten Ligierung erfordert die Verwendung von gereinigter viraler DNA aufgrund der Regeneration des Ausgangsvirus manchmal ein ausgiebiges Screening, um den gewünschten Vektor zu erhalten, und aus diesem Grund sind Plasmidsysteme wünschenswerter. Eine Anzahl von Plasmidsystemen wurde zur Freisetzung von Inserts in E1 (McGrory et al., 1988, Virology 163: 614-617) oder E3 (Ghosh-Choudhury, et al., 1986, Gene 50: 161-171; Mittal et al., 1993, Virus Res. 28: 67-90) oder beiden Regionen (Bett et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8802-8806) entwickelt.

[0099] Die beteiligten Schritte bei der Konstruktion der helfer-unabhängigen Ad-Vektoren, welche sFLT-1 exprimieren, sind im folgenden dargestellt. Alle Schritte beinhalten die Verwendung von Standard-Protokollen zur Erzeugung von Adenovirus-Vektoren (Hitt et al., 1995, in Methods in Molecular Genetics, Volume 7, Molecular Virology Techniques Part B, Hrsg. Kenneth W. Adolph, Academic Press, Inc., Orlando, FL.). Die codierenden Sequenzen für sFLT wurden aus dem Plasmid psflt-1 durch BamHI-Verdauung erhalten und in die BamHI-Stelle in der Polyklonierungsregion des E1-Shuttle-Plasmids p Δ E1sp1HCMV-BGHpA inseriert, wodurch pHCMVsFLT-1 erzeugt wurde. p Δ E1sp1HCMV-BGHpA enthält Ad5-Sequenzen von bp 1 bis 341 und bp 3524 bis 5790 mit einer Promotorkassette, die aus dem HCMV-Promotor, einem Polyklonierungsbereich und dem Rinderwachstumshormon-Polyadenylierungssignal, inseriert in der zu E1 antiparallelen Orientierung zwischen bp 341 und bp 3524 von Ad5 besteht. pHCMVsFLT-1 wurde dann mit dem Ad-Genom-Plasmid pJM17 (McGrory et al., 1988, Virology 163: 614-617) in 293-Zellen cotransfiziert und das Virus AdHCMVsFLT-1 wurde durch Rekombination in vivo zwischen den Plasmiden erzeugt. pJM17 enthält im Wesentlichen das gesamte Ad-Ge-

nom, ist jedoch in Einzeltransfektionen von 293-Zellen nicht infektiös, da es eine Insertion eines pBR322-Derivats bei bp 1339 in Ad5-Sequenzen enthält, welche das resultierende virale Genom zu groß für die Verpackung macht. Eine in vivo-Rekombination zwischen pJM17 und pHCMVsFLT-1 erzeugt einen Vektor von einer verpackungsfähigen Größe, enthaltend die sFLT-1-Expressionskassette in der E1-Region.

[0100] Ein zusätzliches rekombinantes adenovirales Virus ist ebenfalls offenbart. Es ist im Wesentlichen dasselbe wie der oben beschriebene Vektor, verwendet jedoch ein leicht unterschiedliches HCMV-Promotor-Segment, bestehend aus dem HCMV-Promotor und dem ersten Intron (Intron A). Dieses Konstrukt erhöht die Expressionsniveaus innerhalb des Säugerwirts. Zur Konstruktion dieses Vektors wurden für sFLT-1 codierende Sequenzen aus dem Plasmid pHCMVsFLT-1 (oben beschrieben) durch Verdauung mit KpnI und EcoRI erhalten. Das sFLT-1-Fragment wurde dann in die KpnI- und EcoRI-Stellen in dem E1-Shuttle-Plasmid pHCMV11-BGHpA inseriert, welches pHCMV11sFLT-1 ergab. pHCMV11sFLT-1 wurde mit dem Ad-Genom-Plasmid pJM17 in 293-Zellen cotransfiziert. Alternativ wurde pHCMV11sFLT-1 mit PacI verdaut und mit gereinigter viraler DNA aus dem Virus AdDE1PacIE3, ebenfalls mit PacI verdaut, ligiert. Nach der Transfektion der Ligierungsprodukte in 293-Zellen wurden virale Plaques gescreent, um den Vektor AdHCMV11sFLT-1 zu erhalten.

BEISPIEL 5

Stabile Transfektion von Human-HT1080-Fibrosarkom-Zellen mit sFlt-1 inhibiert das Wachstum solider Tumore

[0101] Erzeugung des sFlt-1-Plasmids – Ein zusätzliches Plasmid (pcDNA1AsFLT-1) wurde konstruiert, welches das HCMV Intron-A stromaufwärts der sflt-1-cDNA enthielt, um HT-1080-Klone zu erzeugen, welche erhöhte Mengen an sflt-1 sekretieren. Von diesem Intron wurde in früheren Studien demonstriert, dass es die Genexpression um das 10-100fache gegenüber Plasmiden, welche den frühen Promotor von HCMV alleine enthalten, erhöht. Zur Konstruktion von pcDNA1AsFLT-1 wurde pcDNA3 mit NruI und KpnI verdaut (um den HCMV-Promotor zu entfernen) und mit dem MscI/KpnI-Fragment aus dem Plasmid pVIJNS-MCS (enthaltend den HCMV-Promotor und Intron A) ligiert, welches pcDNA1NTA ergab. pcDNA1NTA wurde dann mit KpnI und EcoRI verdaut und mit einem KpnI/EcoRI-Fragment ligiert, das die sFLT-1-codierenden Sequenzen enthielt, welches pcDNA1AsFLT-1 ergab.

[0102] Selektion von HT1080-Klonen, die stabil mit pcDNA1AsFLT-1 transfiziert worden waren und sFlt-1 exprimierten-Human-Fibrosarkom-HT1080-Tumorzellen (Rasheed et al., 1974, Cancer 33: 1027-1033) wurden mit dem Plasmid (pcDNA1AsFLT-1) transfiziert, welches das humane sFlt-1-Gen unter der Kontrolle des HCMV-Promotors, enthaltend das erste HCMV-Intron, und das selektierbare G418-Arzneiwirkstoffresistenzgen enthielt. Gepoolte, stabil transfizierte HT1080-Zellen wurden in 100-cm-Schalen in einer Dichte von 10 und 100 Zellen/Platte ausplattiert. Die Zellen wurden in ergänztem DMEM-Medium [Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12 (DMEM), GIBCO BRL (Kat.-Nr. 11331-030), 10 % fötales Rinderserum, (GIBCO BRL Kat.-Nr. 16000-028) und 1 × Penicillin-Streptomycin, (GIBCO BRL Kat.-Nr. 15070-063)] mit 500 µg/ml G418 (GIBCO BRL Kat.-Nr. 10131-035) gezüchtet. Das Medium wurde jeden zweiten Tag ersetzt, bis individuelle Kolonien auf Durchmesser von etwa 2,5 mm wuchsen. Isolierte Kolonien wurden mit Trypsin (GIBCO BRL Kat.-Nr. 25200-056) behandelt, in 24-Mulden-Platten überführt und bis zur Konfluenz gezüchtet. 1 ml Medium wurde entnommen und hinsichtlich VEGF-Bindungsaktivität getestet. Der für weitere Studien gewählte stabile Klon hatte ähnliche Wachstumsraten in vitro im Vergleich zu sowohl untransfizierten Zellen als auch Zellen, die mit pcDNA3 transfiziert worden waren, wobei die Zellteilung etwa alle 48 h geschah.

[0103] VEGF-Bindungsprotokoll-Heparin-Sepharose CL-6B (Pharmacia Kat.-Nr. 17-0467-01) wurde dreimal mit phosphatgepufferter Salzlösung [PBS] (GIBCO BRL Kat.-Nr. 20012-027) gewaschen und in einem gleichen Volumen PBS resuspendiert. 1 ml konditioniertes Medium wurde aus jeder Mulde entnommen, mit 50 µl der Heparin-Sepharose CL-6B-Aufschlammung gemischt und über Nacht bei 4° C unter konstantem Mischen inkubiert. Die Heparin-Sepharose-Perlen wurden durch Zentrifugation (10.000 × g für 2 Min.) pelletiert und dreimal mit PBS gewaschen. Gebundenes Protein wurde mit 40 µl PBS, enthaltend 1,2 M NaCl, eluiert. Ein Aliquot von 10 µl wurde entnommen und zu 10 µl DMEM/0,2 % Gelatine zugegeben, 1 µl ¹²⁵I-VEGF (Amersham Kat.-Nr. IM 274; 100.000 CpM/µl) wurde zugegeben und es wurde 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. 2 µl von 10 mM BS³ Bis(sulfosuccinimidyl)suberat [BS³], (Pierce Kat.-Nr. 21579 G) wurden der Reaktion zugegeben und es wurde weitere 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vernetzungsreaktion wurde durch die Zugabe von 20 µl 2 × Laemmli-Probenpuffer (BioRad Kat.-Nr. 161-0737) gestoppt. Vernetzte Komplexe wurden mittels SDS/7,5 % PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

[0104] Vorbereitung ausgewählter Klone für die Tumorstudie-Zellen wurden in T-75-Kolben ausplattiert und bis zur Konfluenz in ergänztem DMEM-Medium gezüchtet. Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 2 ml Trypsin behandelt. Die Trypsinbehandlung wurde durch die Zugabe von 8 ml ergänztem DMEM-Medium gestoppt und die abgelösten Zellen wurden entfernt und gezählt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (1000 UpM in einer Sorvall 6000B-Tischzentrifuge) fünf Minuten lang pelletiert und in PBS mit Calcium und Magnesium in einer Endkonzentration von $1,0 \times 10^7$ Zellen/ml resuspendiert und 0,5 ml Zellen wurden subkutan Mäusen injiziert.

[0105] Ergebnisse-HT-1080-Zellen ($0,5 \times 10^6$ Zellen/0,5 ml), stabil transfiziert mit entweder Kontrollplasmid oder für sflt-1 codierendes Plasmid [pcDNA1AsFLT-1] (n = 10/Gruppe), das kloniert und hinsichtlich hoher sflt-1-Expression selektioniert worden war, wurden subkutan in weibliche Balb/c nu/nu-Mäuse (Charles River Laboratories) injiziert. Tumormasse und -breite wurden als Funktion der Zeit gemessen und zur Berechnung des Tumorumfanges mit der folgenden Gleichung verwendet:

$$\text{Volumen} = \frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{\text{Länge}}{2}\right) \times \left(\frac{\text{Breite}}{2}\right) \times \left(\frac{\text{Länge} + \text{Breite}}{4}\right),$$

welche das Volumen einer Hälfte eines gestreckten Ellipsoids abschätzt, unter der Annahme, dass die Höhe das Mittel von Länge und Breite ist. Am Tag 12 nach der Implantation war eine Tumorgeschwulstbildung sichtbar, also wurden die Tumore entfernt und gewogen; eine Expression von sflt-1 verursachte eine 93%ige Verringerung der Tumormasse. Wie in [Fig. 8](#) gezeigt, wurde das Tumorstadium, wie gemessen durch mittleres Volumen und Masse (\pm SD), durch die Expression des sflt-1-Gens signifikant inhibiert (einseitiger Student's Test, $p < 0,0001$ für den Massenvergleich).

BEISPIEL 6

Infektion von Human-HT1080-Fibrosarkom-Zellen mit replikationsdefektem Adenovirus, welches Human-sflt-1 exprimiert, inhibiert das Tumorstadium

[0106] Die Erzeugung von sflt-1-Adenovirus-Konstrukten erfolgt wie im Beispielsabschnitt 4 beschrieben.

[0107] Adenovirus-Infektion von HT1080-Zellen in vitro und Implantation in vivo – Zellen wurden in T-75-Kolben ausplattiert und bis zur Konfluenz in ergänztem DMEM-Medium gezüchtet. Ein Kolben von Zellen wurde trypsinbehandelt (2 ml), die Zellen wurden entfernt und in ergänztem DMEM-Medium resuspendiert und gezählt, um die Anzahl der Zellen/Platte zu bestimmen. Das Wachstumsmedium wurde aus den Kolben entfernt und die anhaftenden Zellen wurden mit PBS, enthaltend Calcium und Magnesium, gewaschen. Entweder Kontroll-Adenovirus oder Adenovirus, das Human-sflt-1 unter der Kontrolle von HCMV/Intron A exprimiert, wurden Kolben in einer Infektionsmultiplizität von 20 Virus-Pfu (plaquebildende Einheiten)/Zelle in 2 ml PBS mit Calcium und Magnesium zugegeben und eine Stunde lang bei 37° C inkubiert. Das Virus wurde entfernt und die Zellen wurden in einem Feuchtluft-Inkubator mit 5 % CO₂ bei 37° C für weitere 24 h lang inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin trypsinbehandelt. Die Trypsinbehandlung wurde durch die Zugabe von ergänztem DMEM-Medium gestoppt und die abgelösten Zellen wurden entfernt und gezählt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1000 UpM in einer Sorvall 6000B-Tischzentrifuge) 5 Minuten lang pelletiert und in PBS mit Calcium und Magnesium in einer Endkonzentration von $1,0 \times 10^7$ Zellen/ml resuspendiert und 0,5 ml Zellen wurden subkutan 6-8 Wochen alten weiblichen Balb/c nu/nu-Mäusen injiziert.

[0108] Ergebnisse-Tumorzellen, die entweder keinem Virus, einem Kontroll-Adenovirus oder Adenovirus, das sflt-1 unter der Kontrolle des HCMV/Intron A-Promotors exprimiert [AdHCMV1sflt-1], ausgesetzt worden waren (n = 5/Gruppe), wurden subkutan in nackten Mäusen wachsen gelassen. Nach 11 Tagen des Wachstums in vivo begann die Haut über dem Tumor in den Kontrolltieren Geschwüre zu bilden, so dass die Tumore aus allen Tieren entfernt und gewogen wurden. Die mittleren Gruppentumormassen \pm SEMs sind in [Fig. 9](#) gezeigt.

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

- (i) ANMELDER: Merck & Co., Inc.
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: GENTHERAPIE ZUR INHIBIERUNG VON ANGIOGENESE
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
 - (A) ADRESSAT: J. Mark Hand – Merck & Co., Inc.
 - (B) STRASSE: 126 EAST LINCOLN AVENUE – P.O. BOX 2000
 - (C) STADT: RAHWAY
 - (D) STAAT: NJ
 - (E) LAND: USA
 - (F) PLZ: 07065-0900
- (v) COMPUTERLESBARE FORM:
 - (A) MEDIUMTYP: Diskette
 - (B) COMPUTER: IBM-kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: DOS
 - (D) SOFTWARE: FastSEQ, Version 1.5
- (vi) GEGENWÄRTIGE ANMELDUNGSDATEN:
 - (A) ANMELDUNGSNUMMER:
 - (B) EINREICHUNGSDATUM:
 - (C) KLASSIFIZIERUNG:
- (vii) FRÜHERE ANMELDUNGSDATEN:
 - (A) ANMELDUNGSNUMMER: US 60/026,641
 - (B) EINREICHUNGSDATUM: 24. September 1996
- (viii) ANWALT/VERTRETER-INFORMATION:
 - (A) NAME: Hand, J. Mark
 - (B) ZULASSUNGSNUMMER: 36,545
 - (C) REFERENZ/AKTENZEICHEN: 19810Y
- (ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:
 - (A) TELEFON: 908-594-3905
 - (B) TELEFAX: 908-594-4720
 - (C) TELEX:

(2) INFORMATION FÜR SEQ-ID-Nr. 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 2313 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP:

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID-Nr. 1:

```

GCGGACACTC CTCTCGGCTC CTCCCCGGCA GCGGCGGCGG CTCGGAGCGG GCTCCGGGGC 60
TCGGGTGCAG CGGCCAGCGG GCCTGGCGGC GAGGATTACC CGGGGAAGTG GTTGTCTCCT 120
GGCTGGAGCC GCGAGACGGG CGCTCAGGGC GCGGGGCCGG CGGCGGCGAA CGAGAGGACG 180
GACTCTGGCG GCCGGGTCGT TGGCCGGGGG AGCGCGGGCA CCGGGCGAGC AGGCCGCGTC 240
GCGCTACCA TGGTCAGCTA CTGGGACACC GGGGTCTGCT TGTGCGCGCT GCTCAGCTGT 300
CTGCTTCTCA CAGGATCTAG TTCAGTTCA AAATTAAAAG ATCCTGAACT GAGTTTAAAA 360
GGCACCACG ACATCATGCA AGCAGGCCAG AACTGTCATC TCCAATGCAG GGGGGAAGCA 420
GCCCATAAAT GGTCTTTGCC TGAATGGTG AGTAAGGAAA GCGAAAGGCT GAGCATAACT 480
AAATCTGCCT GTGAAGAAA TGGCAAACAA TTCTGCAGTA CTTTAACCTT GAACACAGCT 540
CAAGCAAACC AACTGGCTT CTACAGCTGC AAATATCTAG CTGTACCTAC TTCAAAGAAG 600
AAGGAAACAG AATCTGCAAT CTATATATTT ATTAGTGATA CAGGTAGACC TTTCTAGAG 660
ATGTACAGTG AAATCCCCGA AATTATACAC ATGACTGAAG GAAGGGAGCT CGTCATTCCC 720
TGCCGGGTTA CGTCACCTAA CATCACTGTT ACTTTAAAAA AGTTTCCACT TGACACTTTG 780
ATCCCTGATG GAAAACGCAT AATCTGGGAC AGTAGAAAGG GCTTCATCAT ATCAAATGCA 840
ACGTACAAAG AAATAGGGCT TCTGACCTGT GAAGCAACAG TCAATGGGCA TTTGTATAAG 900
ACAAACTATC TCACACATCG ACAAACCAAT ACAATCATAG ATGTCCAAAT AAGCACACCA 960
CGCCCAGTCA AATTACTTAG AGGCCATACT CTTGTCTCTCA ATGTACTGCT TACCACTCCC 1020
TTGAACACGA GAGTTCAAAT GACCTGGAGT TACCCTGATG AAAAAAATAA GAGAGCTTCC 1080
GTAAGGCGAC GAATTGACCA AAGCAATTCC CATGCCAACA TATTCTACAG TGTTCTTACT 1140
ATTGACAAAA TGCAGAACAA AGACAAAGGA CTTTATACTT GTCGTGTAAG GAGTGGACCA 1200
TCATTCAAAT CTGTTAACAC CTCAGTGCAT ATATATGATA AAGCATTGAT CACTGTGAAA 1260
CATCGAAAAC AGCAGGTGCT TGAAACCGTA GCTGGCAAGC GGTCTTACCG GCTCTCTATG 1320
AAAGTGAAGG CATTTCCCTC GCCGGAAGTT GTATGGTTAA AAGATGGGTT ACCTGCGACT 1380
GAGAAATCTG CTCGCTATTT GACTCGTGGC TACTCGTTAA TTATCAAGGA CGTAACTGAA 1440
GAGGATGCAG GGAATTATAC AATCTTGCTG AGCATAAAAC AGTCAAATGT GTTTAAAAAC 1500
CTCACTGCCA CTCTAATTGT CAATGTGAAA CCCCAGATTT ACGAAAAGGC CGTGTCTATCG 1560

```

```

TTTCCAGACC CGGCTCTCTA CCCACTGGGC AGCAGACAAA TCCTGACTTG TACCGCATAT 1620
GGTATCCCTC AACCTACAAT CAAGTGGTTC TGGCACCCCT GTAACCATAA TCATTCCGAA 1680
GCAAGGTGTG ACTTTTGTTC CAATAATGAA GAGTCCTTTA TCCTGGATGC TGACAGCAAC 1740
ATGGGAAACA GAATTGAGAG CATCACTCAG CGCATGGCAA TAATAGAAGG AAAGAATAAG 1800
ATGGCTAGCA CCTTGGTTGT GGCTGACTCT AGAATTTCCTG GAATCTACAT TTGCATAGCT 1860
TCCAATAAAG TTGGGACTGT GGGGAAGAAC ATAAGCTTTT ATATCACAGA TGTGCCAAAT 1920
GGGTTTCATG TTAACCTGGA AAAAATGCCG ACGGAAGGAG AGGACCTGAA ACTGTCTTGC 1980
ACAGTTAACA AGTTCTTATA CAGAGACGTT ACTTGGATTT TACTGCGGAC AGTTAATAAC 2040
AGAACAAATG ACTACAGTAT TAGCAAGCAA AAAATGGCCA TACTAAGGA GCACTCCATC 2100
ACTCTTAATC TTACCATCAT GAATGTTTCC CTGCAAGATT CAGGCACCTA TGCCTGCAGA 2160
GCCAGGAATG TATACACAGG GGAAGAAATC CTCCAGAAGA AAGAAATTAC AATCAGAGGT 2220
GAGCACTGCA ACAAAAAGGC TGTTTTCTCT CGGATCTCCA AATTTAAAAG CACAAGGAAT 2280
GATTGTACCA CACAAAGTAA TGTAAAACAT TAA 2313

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ-ID-Nr. 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 687 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID-Nr. 2:

```

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1             5             10             15
Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro
          20             25             30
Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr
          35             40             45
Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys Trp Ser Leu Pro
          50             55             60
Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala
65             70             75             80

```

Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr
 85 90 95
 Ala Gln Ala Asn His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val
 100 105 110
 Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile
 115 120 125
 Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
 130 135 140
 Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
 145 150 155 160
 Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
 165 170 175
 Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
 180 185 190
 Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
 195 200 205
 Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
 210 215 220
 Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val
 225 230 235 240
 Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr
 245 250 255
 Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys
 260 265 270
 Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His
 275 280 285
 Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys
 290 295 300
 Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys
 305 310 315 320
 Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val
 325 330 335
 Lys His Arg Lys Gln Gln Val Leu Glu Thr Val Ala Gly Lys Arg Ser
 340 345 350
 Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe Pro Ser Pro Glu Val Val
 355 360 365
 Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu Lys Ser Ala Arg Tyr Leu
 370 375 380

```

Thr Arg Gly Tyr Ser Leu Ile Ile Lys Asp Val Thr Glu Glu Asp Ala
385                      390                      395                      400
Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys Gln Ser Asn Val Phe Lys
                      405                      410                      415
Asn Leu Thr Ala Thr Leu Ile Val Asn Val Lys Pro Gln Ile Tyr Glu
                      420                      425                      430
Lys Ala Val Ser Ser Phe Pro Asp Pro Ala Leu Tyr Pro Leu Gly Ser
                      435                      440                      445
Arg Gln Ile Leu Thr Cys Thr Ala Tyr Gly Ile Pro Gln Pro Thr Ile
                      450                      455                      460
Lys Trp Phe Trp His Pro Cys Asn His Asn His Ser Glu Ala Arg Cys
465                      470                      475                      480
Asp Phe Cys Ser Asn Asn Glu Glu Ser Phe Ile Leu Asp Ala Asp Ser
                      485                      490                      495
Asn Met Gly Asn Arg Ile Glu Ser Ile Thr Gln Arg Met Ala Ile Ile
                      500                      505                      510
Glu Gly Lys Asn Lys Met Ala Ser Thr Leu Val Val Ala Asp Ser Arg
                      515                      520                      525
Ile Ser Gly Ile Tyr Ile Cys Ile Ala Ser Asn Lys Val Gly Thr Val
                      530                      535                      540
Gly Arg Asn Ile Ser Phe Tyr Ile Thr Asp Val Pro Asn Gly Phe His
545                      550                      555                      560
Val Asn Leu Glu Lys Met Pro Thr Glu Gly Glu Asp Leu Lys Leu Ser
                      565                      570                      575
Cys Thr Val Asn Lys Phe Leu Tyr Arg Asp Val Thr Trp Ile Leu Leu
                      580                      585                      590
Arg Thr Val Asn Asn Arg Thr Met His Tyr Ser Ile Ser Lys Gln Lys
                      595                      600                      605
Met Ala Ile Thr Lys Glu His Ser Ile Thr Leu Asn Leu Thr Ile Met
                      610                      615                      620

Asn Val Ser Leu Gln Asp Ser Gly Thr Tyr Ala Cys Arg Ala Arg Asn
625                      630                      635                      640
Val Tyr Thr Gly Glu Glu Ile Leu Gln Lys Lys Glu Ile Thr Ile Arg
                      645                      650                      655
Gly Glu His Cys Asn Lys Lys Ala Val Phe Ser Arg Ile Ser Lys Phe
                      660                      665                      670
Lys Ser Thr Arg Asn Asp Cys Thr Thr Gln Ser Asn Val Lys His
                      675                      680                      685

```

Patentansprüche

1. Verwendung eines DNA-Vektors, der eine lösliche Form eines Tyrosinkinase-Rezeptors, umfassend die in SEQ-ID-Nr. 2 angegebene Aminosäuresequenz, exprimiert, wobei der Tyrosinkinase-Rezeptor ein Dimer mit VEGF, einem VEGF-Homologen oder einem VEGF-spezifischen Tyrosinkinase-Rezeptorprotein bildet, zur Herstellung eines Medikaments zur Inhibierung der Angiogenese eines soliden oder metastasierenden Tumors bei einem Säugerwirt.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Säugewirt ein Mensch ist.
3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei der DNA-Vektor ein rekombinantes Adenovirus ist.
4. Verwendung nach Anspruch 2, wobei der DNA-Vektor ein rekombinanter DNA-Plasmidvektor ist.
5. Verwendung nach Anspruch 3, wobei das rekombinante Adenovirus mittels Infektion in Zellen eines soliden Tumors oder in Zellen in Nachbarschaft zu dem soliden Tumor eingebracht wird.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die Zellen aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Fettzellen, Muskelzellen und Gefäßendothelzellen besteht.
7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei das rekombinante Adenovirus AdHCMVsFLT-1 oder AdHCMVI1FLT ist.
8. Verwendung nach Anspruch 4, wobei der rekombinante DNA-Plasmidvektor mittels Injektion in Zellen eines soliden Tumors oder in Zellen in Nachbarschaft zu dem soliden Tumor eingebracht wird.
9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei die Nachbarzellen aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Fettzellen, Muskelzellen und Gefäßendothelzellen besteht.
10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei der rekombinante DNA-Plasmidvektor pcDNA3/sflt-1 oder pcDNA31A/sflt-1 ist.
11. Verfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit der Inhibierung von Tumor-Angiogenese, welches umfasst:
 - (a) Transfizieren von kultivierten Tumorzellen mit einem DNA-Vektor, welcher sFLT, umfassend die in SEQ-ID-Nr. 2 angegebene Aminosäuresequenz, exprimiert;
 - (b) Injizieren der transfizierten Tumorzellen in eine Maus;
 - (c) Töten der Maus nach einem Intervall, welches Tumorwachstum in der Maus erlaubt; und
 - (d) Beobachten der Bildung von Tumorknoten in der Maus im Vergleich zu einer Maus, der mit Vektor allein transfizierte Tumorzellen oder untransfizierte Tumorzellen injiziert wurden.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

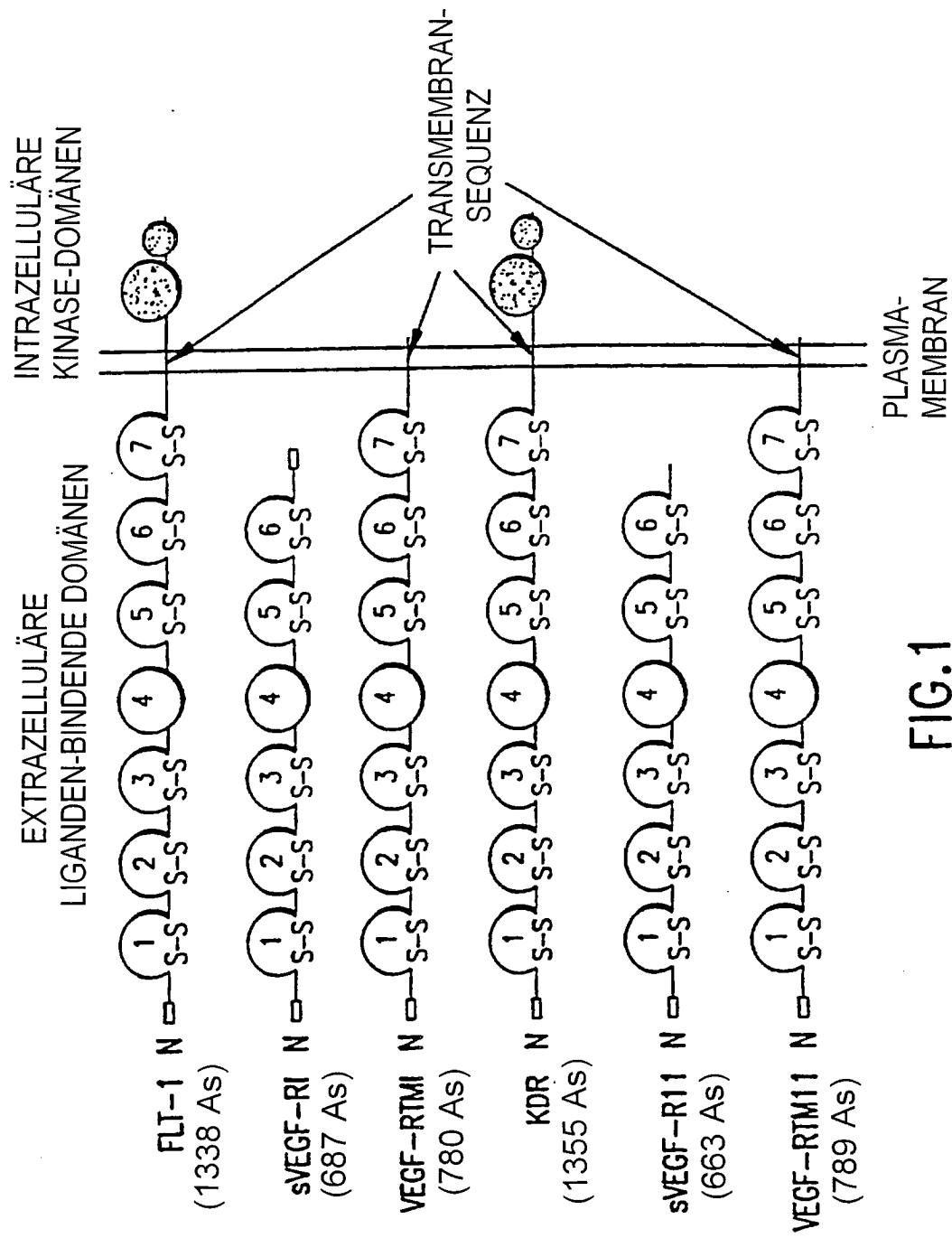


FIG.1

GCGGACACTC	CTCTCGGCTC	CTCCCCGGCA	GCGGCGGCGG	CTCGGAGCGG	GCTCCGGGGC	60
TCGGGTGCAG	CGGCCAGCGG	GCCTGGCGGC	GAGGATTACC	CGGGGAAGTG	GTTGTCTCCT	120
GGCTGGAGCC	GCGAGACGGG	CGCTCAGGGC	GCGGGGCCGG	CGGCGGCGAA	CGAGAGGACG	180
GACTCTGGCG	GCCGGGTCGT	TGGCCGGGGG	AGCGCGGGCA	CCGGGCGAGC	AGGCCGCGTC	240
GCGCTACCA	TGGTCAGCTA	CTGGGACACC	GGGGTCCTGC	TGTGCGCGCT	GCTCAGCTGT	300
CTGCTTCTCA	CAGGATCTAG	TTCAGGTTCA	AAATTAAGAG	ATCCTGAACT	GAGTTTAAAA	360
GGCACCCAGC	ACATCATGCA	AGCAGGCCAG	ACACTGCATC	TCCAATGCAG	GGGGGAAGCA	420
GCCCATAAAT	GGTCTTTGCC	TGAAATGGTG	AGTAAGGAAA	GCGAAAGGCT	GAGCATAACT	480
AAATCTGCCT	GTGGAAGAAA	TGGCAAACAA	TTCTGCAGTA	CTTTAACTT	GAACACAGCT	540
CAAGCAAACC	ACACTGGCTT	CTACAGCTGC	AAATATCTAG	CTGTACCTAC	TTCAAAGAAG	600
AAGGAAACAG	AATCTGCAAT	CTATATATTT	ATTAGTGATA	CAGGTAGACC	TTTCGTAGAG	660
ATGTACAGTG	AAATCCCCGA	AATTATACAC	ATGACTGAAG	GAAGGGAGCT	CGTCATTCCC	720
TGCCGGGTTA	CGTCACCTAA	CATCACTGTT	ACTTTAAAAA	AGTTTCCACT	TGACACTTTG	780
ATCCCTGATG	GAAAACGCAT	AATCTGGGAC	AGTAGAAAGG	GCTTCATCAT	ATCAAATGCA	840
ACGTACAAAG	AAATAGGGCT	TCTGACCTGT	GAAGCAACAG	TCAATGGGCA	TTTGTATAAG	900
ACAAACTATC	TCACACATCG	ACAAACCAAT	ACAATCATAG	ATGTCCAAAT	AAGCACACCA	960
CGCCCAGTCA	AATTACTTAG	AGGCCATACT	CTTGTCCTCA	ATTGTACTGC	TACCACTCCC	1020
TTGAACACGA	GAGTTCAAAT	GACCTGGAGT	TACCCTGATG	AAAAAAATAA	GAGAGCTTCC	1080
GTAAGGCGAC	GAATTGACCA	AAGCAATTCC	CATGCCAACA	TATTCTACAG	TGTTCTTACT	1140
ATTGACAAAA	TGCAGAACAA	AGACAAAGGA	CTTTATACTT	GTCGTGTAAG	GAGTGGACCA	1200
TCATTCAAAT	CTGTTAACAC	CTCAGTGCAT	ATATATGATA	AAGCATTTCAT	CACTGTGAAA	1260
CATCGAAAAC	AGCAGGTGCT	TGAAACCGTA	GCTGGCAAGC	GGTCTTACCG	GCTCTCTATG	1320
AAAGTGAAGG	CATTTCCCTC	GCCGGAAGTT	GTATGGTTAA	AAGATGGGTT	ACCTGCGACT	1380
GAGAAATCTG	CTCGCTATTT	GACTCGTGGC	TACTCGTTAA	TTATCAAGGA	CGTAAGTGAA	1440
GAGGATGCAG	GGAATTATAC	AATCTTGCTG	AGCATAAAAC	AGTCAAATGT	GTTTAAAAAC	1500
CTCACTGCCA	CTCTAATTGT	CAATGTGAAA	CCCCAGATTT	ACGAAAAGGC	CGTGTCAATG	1560
TTTCAGACC	CGGCTCTCTA	CCCACTGGGC	AGCAGACAAA	TCCTGACTTG	TACCGCATAT	1620
GGTATCCCTC	AACCTACAAT	CAAGTGGTTC	TGGCACCCTT	GTAACCATAA	TCATTCCGAA	1680
GCAAGGTGTG	ACTTTTGTTT	CAATAATGAA	GAGTCCTTTA	TCCTGGATGC	TGACAGCAAC	1740
ATGGGAAACA	GAATTGAGAG	CATCACTCAG	CGCATGGCAA	TAATAGAAGG	AAAGAATAAG	1800
ATGGCTAGCA	CCTTGGTTGT	GGCTGACTCT	AGAATTTCTG	GAATCTACAT	TTGCATAGCT	1860
TCCAATAAAG	TTGGGACTGT	GGGAAGAAAC	ATAAGCTTTT	ATATCACAGA	TGTGCCAAAT	1920
GGGTTTCATG	TAACTTGGA	AAAAATGCCG	ACGGAAGGAG	AGGACCTGAA	ACTGTCTTGC	1980
ACAGTTAACA	AGTTCTTATA	CAGAGACGTT	ACTTGGATTT	TACTGCGGAC	AGTTAATAAC	2040
AGAACAATGC	ACTACAGTAT	TAGCAAGCAA	AAAATGGCCA	TACTAAGGA	GCACTCCATC	2100
ACTCTTAATC	TTACCATCAT	GAATGTTTCC	CTGCAAGATT	CAGGCACCTA	TGCCTGCAGA	2160
GCCAGGAATG	TATACACAGG	GGAAGAAATC	CTCCAGAAGA	AAGAAATTAC	AATCAGAGGT	2220
GAGCACTGCA	ACAAAAAGGC	TGTTTTCTCT	CGGATCTCCA	AATTTAAAG	CACAAGGAAT	2280
GATTGTACCA	CACAAAGTAA	TGTAAAACAT	TAA			2313

FIG.2

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro
 20 25 30
 Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr
 35 40 45
 Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys Trp Ser Leu Pro
 50 55 60
 Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala
 65 70 75 80
 Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr
 85 90 95
 Ala Gln Ala Asn His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val
 100 105 110
 Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile
 115 120 125
 Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
 130 135 140
 Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
 145 150 155 160
 Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
 165 170 175
 Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
 180 185 190
 Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
 195 200 205
 Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
 210 215 220
 Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val
 225 230 235 240
 Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr
 245 250 255
 Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys
 260 265 270
 Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His
 275 280 285
 Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys
 290 295 300
 Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys
 305 310 315 320
 Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val
 325 330 335
 Lys His Arg Lys Gln Gln Val Leu Glu Thr Val Ala Gly Lys Arg Ser
 340 345 350
 Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe Pro Ser Pro Glu Val Val
 355 360 365
 Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu Lys Ser Ala Arg Tyr Leu
 370 375 380
 Thr Arg Gly Tyr Ser Leu Ile Ile Lys Asp Val Thr Glu Glu Asp Ala
 385 390 395 400
 Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys Gln Ser Asn Val Phe Lys
 405 410 415
 Asn Leu Thr Ala Thr Leu Ile Val Asn Val Lys Pro Gln Ile Tyr Glu
 420 425 430
 Lys Ala Val Ser Ser Phe Pro Asp Pro Ala Leu Tyr Pro Leu Gly Ser
 435 440 445
 Arg Gln Ile Leu Thr Cys Thr Ala Tyr Gly Ile Pro Gln Pro Thr Ile
 450 455 460
 Lys Trp Phe Trp His Pro Cys Asn His Asn His Ser Glu Ala Arg Cys
 465 470 475 480
 Asp Phe Cys Ser Asn Asn Glu Glu Ser Phe Ile Leu Asp Ala Asp Ser
 485 490 495

FIG. 3A

Asn	Met	Gly	Asn	Arg	Ile	Glu	Ser	Ile	Thr	Gln	Arg	Met	Ala	Ile	Ile
			500					505					510		
Glu	Gly	Lys	Asn	Lys	Met	Ala	Ser	Thr	Leu	Val	Val	Ala	Asp	Ser	Arg
		515					520					525			
Ile	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ile	Cys	Ile	Ala	Ser	Asn	Lys	Val	Gly	Thr	Val
	530					535					540				
Gly	Arg	Asn	Ile	Ser	Phe	Tyr	Ile	Thr	Asp	Val	Pro	Asn	Gly	Phe	His
545					550					555					560
Val	Asn	Leu	Glu	Lys	Met	Pro	Thr	Glu	Gly	Glu	Asp	Leu	Lys	Leu	Ser
			565						570					575	
Cys	Thr	Val	Asn	Lys	Phe	Leu	Tyr	Arg	Asp	Val	Thr	Trp	Ile	Leu	Leu
			580					585					590		
Arg	Thr	Val	Asn	Asn	Arg	Thr	Met	His	Tyr	Ser	Ile	Ser	Lys	Gln	Lys
		595					600					605			
Met	Ala	Ile	Thr	Lys	Glu	His	Ser	Ile	Thr	Leu	Asn	Leu	Thr	Ile	Met
	610					615					620				
Asn	Val	Ser	Leu	Gln	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Ala	Cys	Arg	Ala	Arg	Asn
625					630					635					640
Val	Tyr	Thr	Gly	Glu	Glu	Ile	Leu	Gln	Lys	Lys	Glu	Ile	Thr	Ile	Arg
			645						650					655	
Gly	Glu	His	Cys	Asn	Lys	Lys	Ala	Val	Phe	Ser	Arg	Ile	Ser	Lys	Phe
			660					665					670		
Lys	Ser	Thr	Arg	Asn	Asp	Cys	Thr	Thr	Gln	Ser	Asn	Val	Lys	His	
		675					680					685			

FIG. 3B

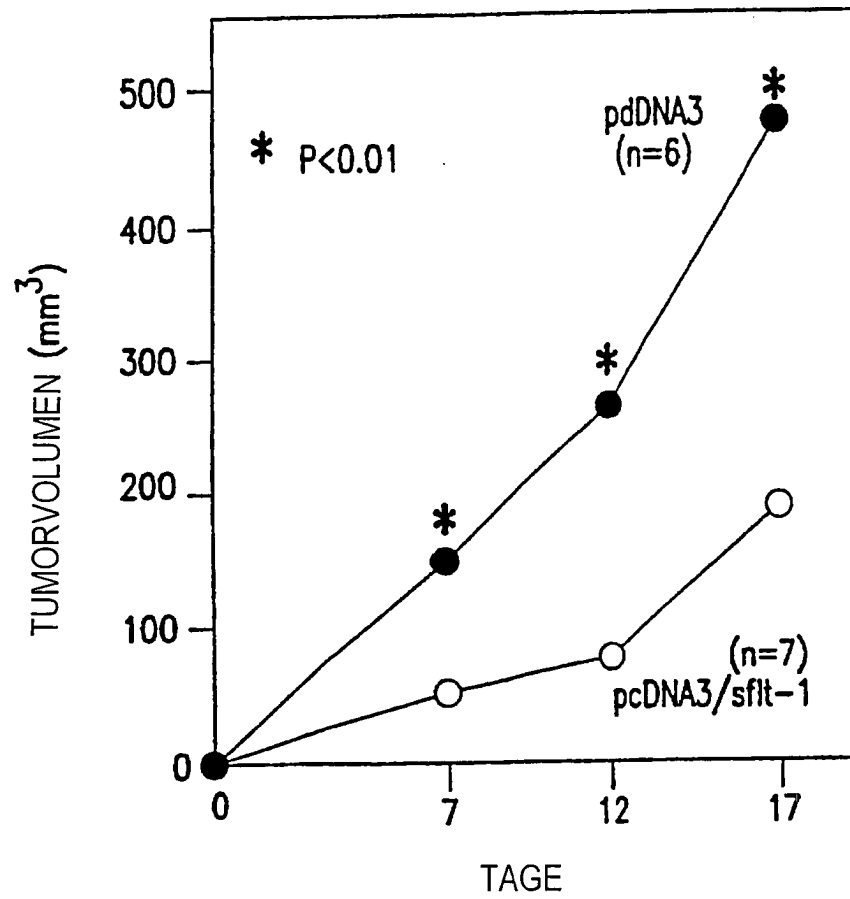


FIG.4

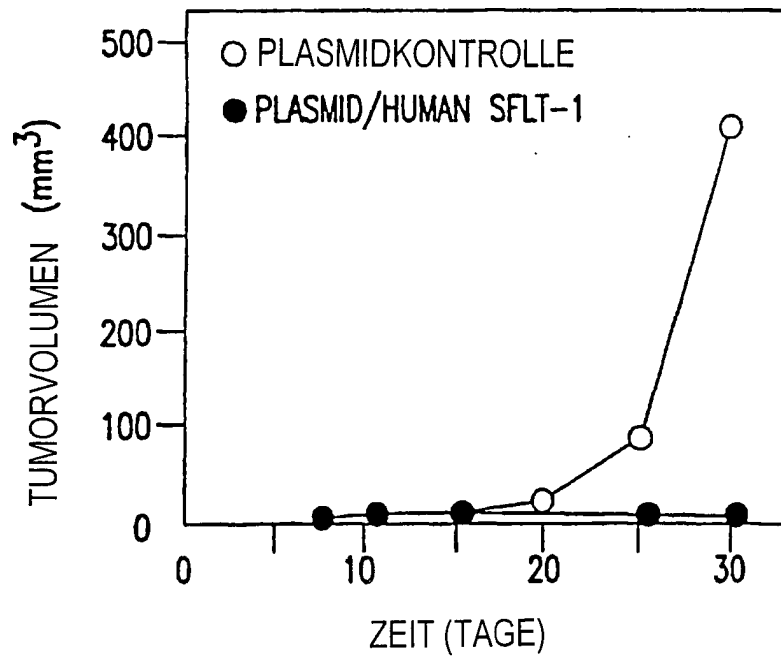


FIG.5

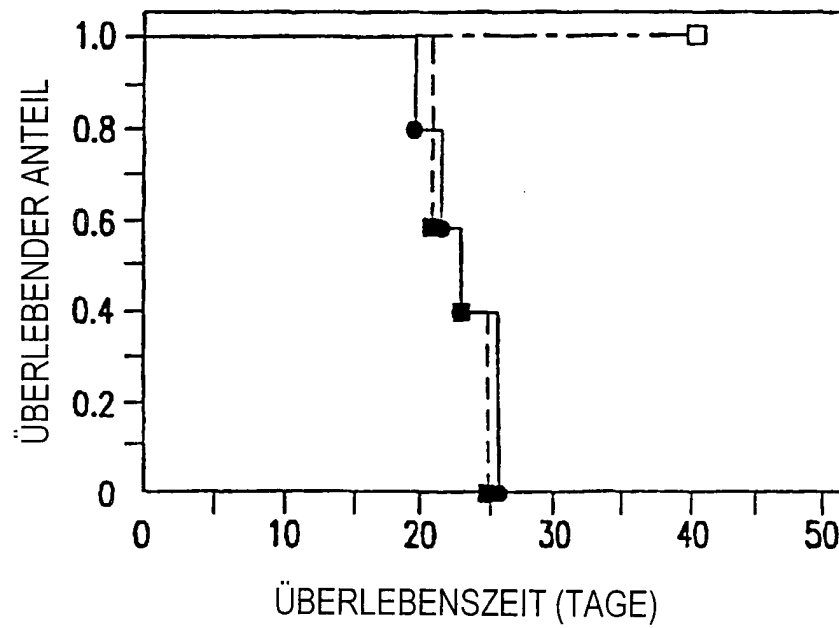


FIG.6

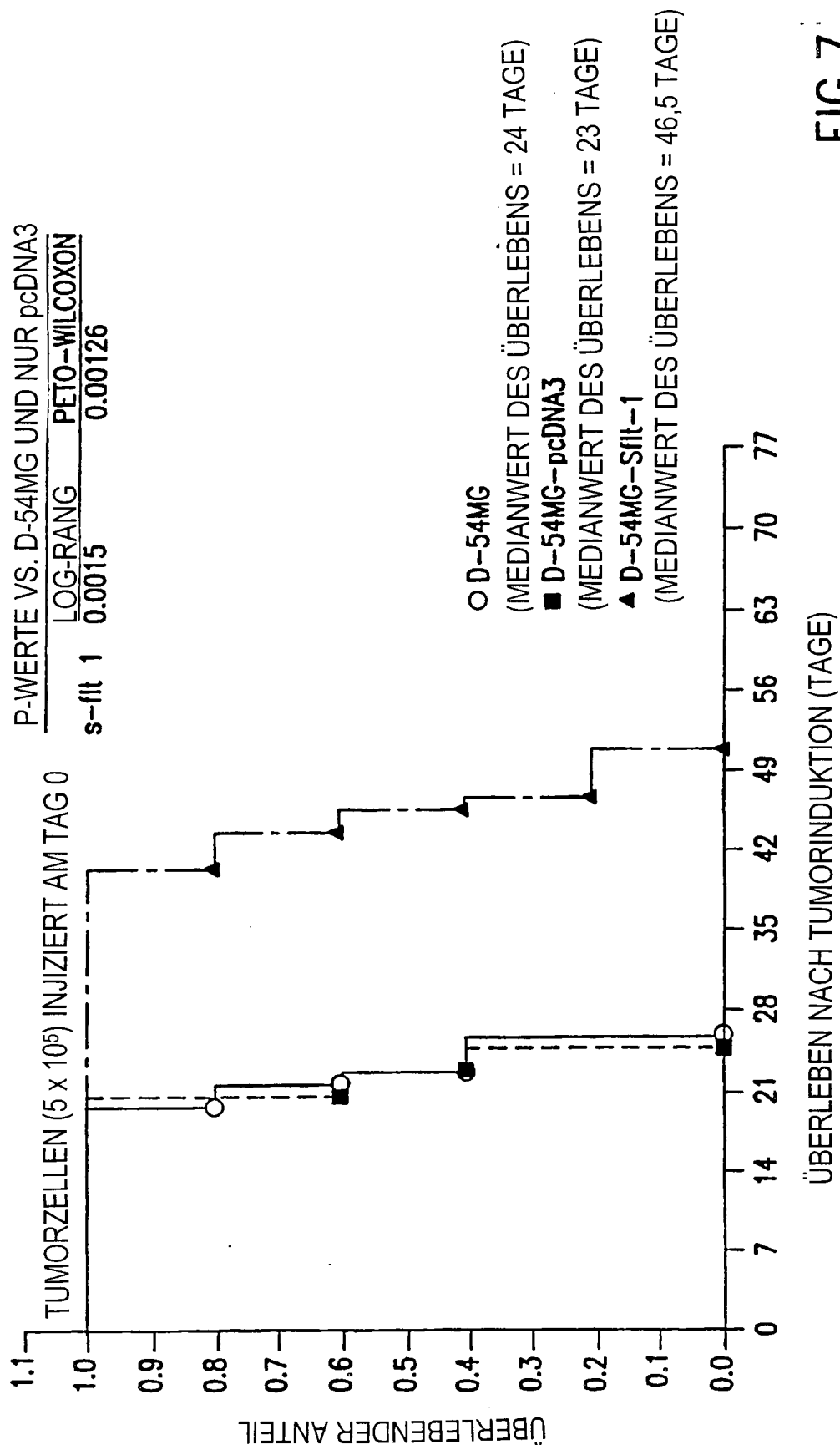


FIG.7

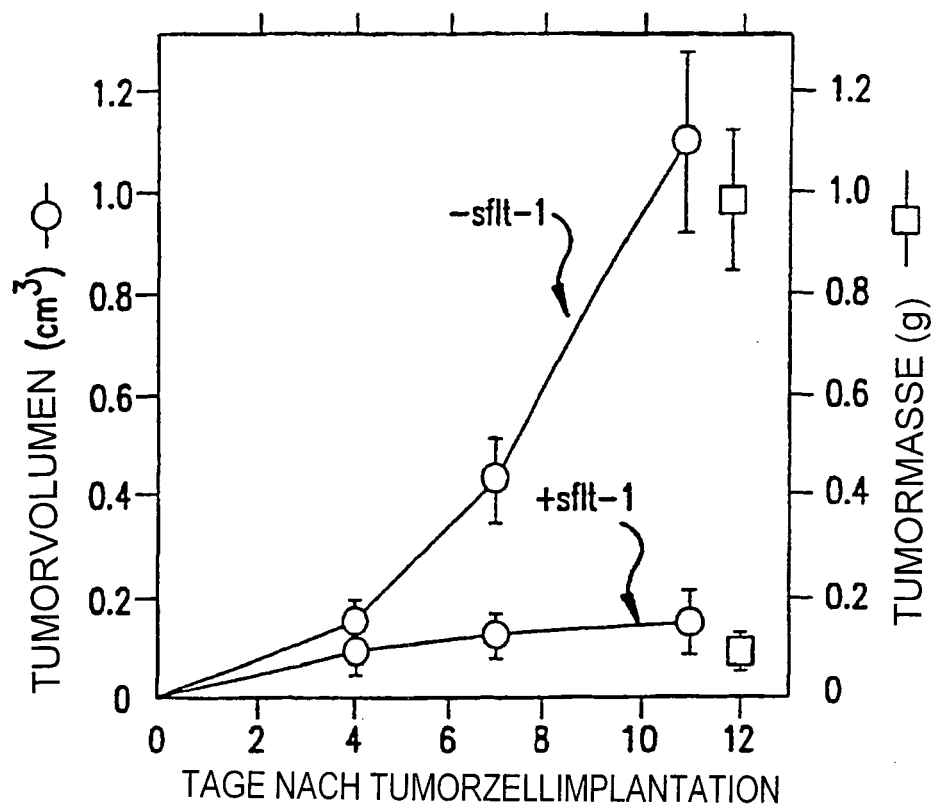


FIG.8

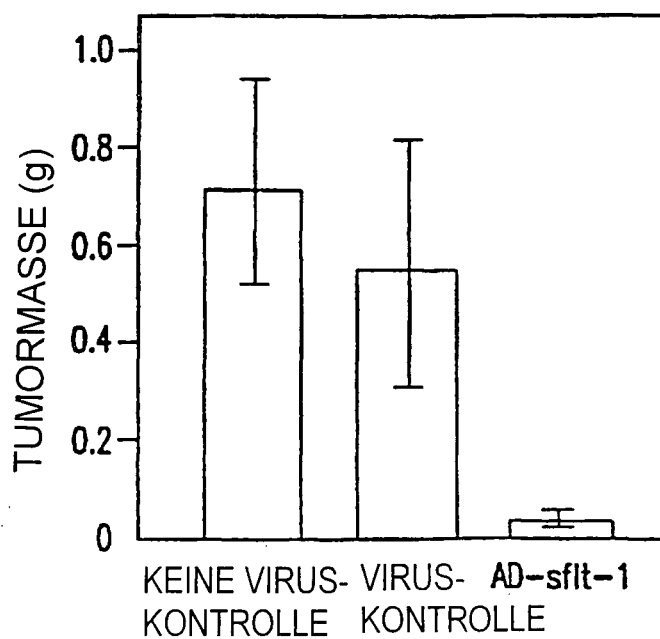


FIG.9