

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 38/18

[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 14/475 C07K 14/49

C12N 5/10 C12N 15/18

C12N 15/63

[21] 申请号 98812705.9

[43]公开日 2002 年 4 月 17 日

[11]公开号 CN 1345247A

[22]申请日 1998.12.23 [21]申请号 98812705.9

[30]优先权

[32]1997.12.24 [33]AU [31]PP1131

[32]1998.5.29 [33]US [31]60/087,392

[86]国际申请 PCT/US98/27373 1998.12.23

[87]国际公布 WO99/33485 英 1999.7.8

[85]进入国家阶段日期 2000.6.26

[71]申请人 路德维格癌症研究所

地址 美国纽约州

[72]发明人 马克·G·阿凯

史蒂文·艾伦·施特克尔

卡里·阿利塔洛

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

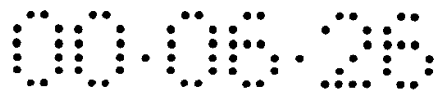
权利要求书 8 页 说明书 33 页 附图页数 11 页

[54]发明名称 表达血管内皮生长因子 D 的表达载体和细胞系以及治疗黑素瘤的方法

[57]摘要

本发明涉及包含 VEGF—D 及其生物学活性衍生物的表达载体,稳定表达 VEGF—D 及其生物学活性衍生物的细胞系,以及用这些表达载体和宿主细胞制备多肽的方法。本发明还涉及治疗和减轻黑素瘤或表达 VEGF—D 的肿瘤和各种疾病的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权 利 要 求 书

1、稳定表达 VEGF-D 或其具有 VEGF-D 的生物学活性的片段或类似物的哺乳动物细胞系。

2、权利要求 1 的哺乳动物细胞系，其中由所述细胞系产生的 VEGF-D 与附加表位相连。

3、权利要求 2 的哺乳动物细胞系，其中附加表位是 FLAG®、六组氨酸或 I-SPY™。

4、权利要求 1、2 或 3 的哺乳动物细胞系，其是 293-EBNA 人胎肾细胞系。

5、权利要求 1、2、3 或 4 的哺乳动物细胞系，其中所表达的 VEGF-D 是 VEGF-D_{FullN}Flag、VEGF-D_{FullC}Flag、VEGF-D Δ N Δ C 或 VEGF-D Δ C。

6、权利要求 1 的哺乳动物细胞系，其中 VEGF-D 的片段是 (PCT/US97/14696 的 SEQ ID NO: 5) 的氨基酸残基 93 至氨基酸残基 201 (SEQ ID NO: 1) 的 VEGF-D 部分。

7、权利要求 1 的哺乳动物细胞系，其中 VEGF-D 的片段是与 FLAG®肽相连的 (PCT/US97/14696 的 SEQ ID NO: 5) 的氨基酸残基 93 至氨基酸残基 201 (SEQ ID NO: 1) 的 VEGF-D 部分。

8、一种表达载体，包括插入哺乳动物表达载体中的编码 VEGF-D 或其具有 VEGF-D 的生物学活性的片段或类似物的人 DNA 序列。

9、权利要求 8 的表达载体，其中该表达载体是 Apex-3。

10、权利要求 8 或 9 的表达载体，其中该表达载体是 pVDApexFullNFlag、pVDApexFullCFlag、pVDApex Δ N Δ C 或 pVDApex Δ C。

11、权利要求 8 或 9 的表达载体，进一步包括编码亲和标记的序列。

12、权利要求 11 的表达载体，其中亲和标记是 FLAG®、六组氨酸或 I-SPY™。

13、用权利要求 8、9、10、11 或 12 的载体转化或转染的宿主细胞。

14、制备 VEGF-D 多肽或具有 VEGF-D 生物学活性的其片段或类似物的方法，包括在宿主细胞中表达权利要求 8 或 9 的表达载体，以及从宿主细胞或宿主细胞生长培养基分离多肽的步骤。

15、权利要求 14 的方法，其中表达载体进一步包括编码亲和标记的序列。

16、权利要求 15 的方法，其中亲和标记是 FLAG®、六组氨酸或 I-SPY™。

17、治疗或减轻恶性黑素瘤的方法，包括在黑素瘤附近给予有效抑制量的 VEGF-D 拮抗剂以抑制 VEGF-D 的表达或活性。

18、权利要求 17 的方法，其中 VEGF-D 拮抗剂是反义核酸或编码 VEGF-D 的三链 DNA。

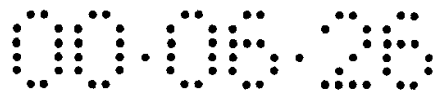
19、权利要求 17 的方法，其中 VEGF-D 拮抗剂是 VEGF-D 变体多肽。

20、权利要求 17 的方法，其中 VEGF-D 拮抗剂是包括特异与 VEGF-D 反应的抗体、其 F(ab')₂、F(ab')、F(ab)片段或嵌合抗体的组合物。

21、权利要求 20 的方法，其中抗体是单克隆抗体、其 F(ab')₂、F(ab')、F(ab)片段或嵌合单克隆抗体。

22、治疗或减轻表达 VEGF-D 的肿瘤的方法，包括在肿瘤附近给予有效抑制量的 VEGF-D 拮抗剂。

23、治疗或减轻表达 VEGF-D 的肿瘤的方法，包括给予有效抑制量的与具有肿瘤抑制活性的毒素或药物缀合的 VEGF-D 或其能与 VEGF-D 受体结合活性结合的片段或类似物。



24、增强皮肤移植物的被接受和/或愈合的方法，包括给予有效刺激血管发生和淋巴血管发生量的 VEGF-D，或具有 VEGF-D 生物学活性的其片段或类似物。

25、刺激皮肤的手术或外伤创伤愈合的方法，包括给予有效刺激血管发生和淋巴血管发生量的 VEGF-D，或具有 VEGF-D 生物学活性的其片段或类似物。

26、调节 VEGF-D 的受体结合特异性的方法，包括表达包括编码未加工的 VEGF-D 的核苷酸序列的表达载体，提供蛋白酶解量的至少一种用于加工所表达的未加工 VEGF-D 的酶，以产生蛋白酶解形式的 VEGF-D。

27、产生 VEGF-D 的蛋白酶解片段的方法，包括表达包括编码未加工的 VEGF-D 的核苷酸序列的表达载体，提供蛋白酶解量的至少一种用于加工所表达的未加工 VEGF-D 的酶，以产生蛋白酶解加工的 VEGF-D 片段。

28、在生物样品中检测表达 VEGF-D 的肿瘤的方法，包括将所述样品与 VEGF-D 的特异结合试剂接触，保持一段时间以使所述特异结合试剂与 VEGF-D 结合，以及检测所述的结合。

29、权利要求 28 的在生物样品中检测表达 VEGF-D 的肿瘤的方法，其中所述的特异结合试剂是第一抗体。

30、权利要求 29 的在生物样品中检测表达 VEGF-D 的肿瘤的方法，其中所述的结合通过具有可检测标记的第二抗体检测。

31、治疗或减轻淋巴水肿的方法，包括给予有效刺激淋巴血管发生量的 VEGF-D，或具有 VEGF-D 生物学活性的其片段或类似物。

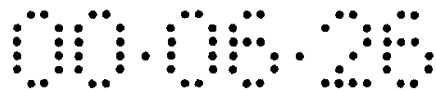
32、治疗或减轻银屑病的方法，包括给予有效抑制量的 VEGF-D 拮抗剂。

33、治疗或减轻硬皮病的方法，包括给予有效刺激内皮增殖量

的 VEGF-D，或具有 VEGF-D 生物学活性的其片段或类似物。

34、治疗或减轻脱水性外胚层发育异常的方法，包括给予有效刺激血管化量的 VEGF-D，或具有 VEGF-D 生物学活性的其片段或类似物。

35、刺激选自内皮细胞增殖、迁移、存活和分化以及不诱导血管通透性的淋巴血管发生的至少一种 VEGF-D 生物活性的方法，包括给予生物活性刺激量的完全加工的 VEGF-D。



说明书

表达血管内皮生长因子 D 的表达载体和细胞系 以及治疗黑素瘤的方法

发明背景及概述

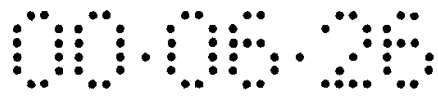
本发明涉及包含 VEGF-D 及其生物学活性衍生物的表达载体, 稳定表达 VEGF-D 及其生物学活性衍生物的细胞系, 以及用这些表达载体和宿主细胞制备多肽的方法。本发明还涉及治疗和减轻黑素瘤和各种疾病的方法。

发明背景

血管发生是组织的正常生长和发育所需的基本过程, 其涉及从原始血管增殖新的毛细血管。血管发生不仅参与胚胎发育和正常组织生长、修复和再生, 其也参与妇女或雌性动物的生殖周期, 妊娠的建立和保持以及创伤和骨折的修复。除了在正常个体中发生的血管发生之外, 血管发生事件也参与各种病理过程, 尤其是肿瘤生长和转移, 以及有血管增殖特别是微血管系统增殖的增加的其它状态, 如糖尿病性视网膜病、银屑病和关节病。对血管发生的抑制可用于防止或减轻这些病理过程。

另一方面, 在需建立或延伸血管化的情况下希望促进血管发生, 例如在组织或器官移植后, 或者在组织梗塞或动脉狭窄如在冠心病和闭塞性血栓性血管炎中刺激建立侧支循环时。

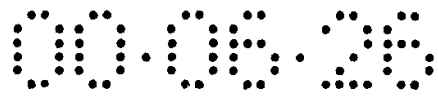
由于血管发生在如此多的生理和病理过程中的重要作用, 所以已深入研究了参与控制血管发生的因子。已证明许多生长因子参与血管发生的调节; 这样生长因子包括成纤维细胞生长因子 (FGFs), 血小板衍生生长因子 (PDGF), 转化生长因子 α (TGF α) 和肝细胞生长因子 (HGF)。综述例如参见 Folkman 等, 生物化学杂志 1992 267 10931-10934。



已提示一特定家族的内皮细胞特异性生长因子及其相应的受体主要负责刺激内皮细胞生长和分化，以及负责分化细胞的某些功能。这些因子是 PDGF 家族的成员，并看起来主要通过内皮受体酪氨酸激酶（RTKs）起作用。到目前为止已鉴别了几个血管内皮生长因子家族成员。血管内皮生长因子（VEGF）是一种同二聚体糖蛋白，已从几种来源分离出。VEGF 示出对内皮细胞的高度特异的促有丝分裂活性，并可刺激导致血管发生的整个事件顺序。另外，其对单核细胞具有强趋化活性，可以在内皮细胞中诱导纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂，并可影响微血管通透性。由于后一活性，其有时也被称为血管通透因子（VPF）。VEGF 的分离和性质已有综述，参见 Ferrara 等，细胞生物化学杂志，1991 47 211—218，Connolly，细胞生物化学杂志，1991 47 219—223。

最近鉴别了 VEGF 家族的 6 个另外的成员，它们是 VEGF-B，见路德维格癌症研究所和赫尔辛基大学的国际专利申请 PCT/US96/02957(WO96/26736)和美国专利 5,840,693 和 5,607,918 所述；VEGF-C，见 Joukov 等，EMBO 杂志，1996 15 290—298 所述；VEGF-D，见国际专利申请 PCT/US97/14696(WO98/07832)所述；胎盘生长因子（PlGF），见 Maglione 等，美国科学院院刊 1991 88 9267—9271；VEGF2，见人体基因组科学有限公司的国际专利申请 PCT/US94/05291(WO95/24473)所述；VEGF3，见人体基因组科学有限公司的国际专利申请 PCT/US95/07283(WO96/39421)所述。每个因子均示出与 VEGF 的 30—45%氨基酸相同性。VEGF 家族成员共享含有形成半胱氨酸结基序的 6 个半胱氨酸的 VEGF 同源性结构域。VEGF 家族的功能特征包括对内皮细胞的不同程度的促有丝分裂活性，对血管通透性的诱导以及血管和淋巴血管生成性质。

VEGF-B 具有与 VEGF 类似的血管生成性质和其它性质，但是在不同于 VEGF 分布和表达的组织中分布和表达。特别是，VEGF



—B 在心脏中非常强地表达，在肺中仅弱表达，而 VEGF 则正相反。这提示 VEGF 和 VEGF—B 尽管在许多组织中共表达，但是可能仍具有功能差异。

通过用酵母共交 (co-hybrid) 相互作用捕获筛选技术筛选可与 I 型细胞视黄酸结合蛋白 (CRABP—I) 相互作用的细胞蛋白而分离 VEGF—B。其分离和鉴定详见 PCT/US96/02597 和 Olofsson 等，美国科学院院刊 1996 93 2576—2581。

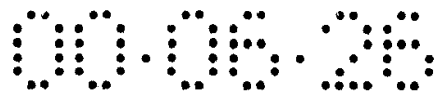
VEGF—C 是通过用转染表达 VEGFR—3 的 PC—3 前列腺腺癌细胞系 (CRL1435) 筛选其条件培养基产生内皮细胞特异性受体酪氨酸激酶 VEGFR—3 (Flt4) 的酪氨酸磷酸化的能力而从所述条件培养基中分离。用与 VEGFR—3 的亲合层析纯化 VEGF—C，并从 PC—3 cDNA 克隆。其分离和鉴定详见 Joukov 等，EMBO 杂志，1996 15 290—298。

VEGF—D 是通过用得自称为 “Soarse Breast 3NbHBst” 的人 cDNA 文库的表达序列标记作为杂交探针筛选购自 Clontech 的人乳腺 cDNA 文库而分离 (Achen 等，美国科学院院刊 1998 95 548—553)。其分离和鉴定详见国际专利申请 PCT/US97/14696。

在 PCT/US97/14696 中还描述了称为 VEGF—D Δ N Δ C 的 VEGF—D 的生物学活性片段的分离。这一片段由与亲和性标记肽 FLAG® 连接的 VEGF—D 氨基酸残基 93—201 组成。国际专利申请 PCT/US97/14696(WO98/07832)的全文引入本文作参考。

VEGF—D 与 VEGF 家族的其它成员具有结构相似性，但是尽管有这些结构相似性，其与 VEGF 家族的其它成员能够从结构和功能上区分开。人 VEGF—D 仅与 VEGF—C 具有 48% 相同性，VEGF—C 是该家族中与 VEGF—D 最相关的一个成员。

VEGF—D 基因在成人中广泛表达，但是当然不是普遍表达。VEGF—D 在心脏、肺和骨骼肌中强表达，在脾、卵巢、小肠和结肠



中中等程度表达，在肾、胰腺、胸腺、前列腺和睾丸中低表达。在来自脑、胎盘、肝或外周血白细胞的 RNA 中未检测到 VEGF-D mRNA。

PlGF 是从足孕胎盘 cDNA 文库中分离出来，其分离和鉴定详见 Maglione 等，美国科学院院刊 1991 88 9267—9271。目前其生物学功能尚未完全清楚。

VEGF2 是从高度致瘤性的不依赖于雌激素的人乳腺癌细胞系中分离出来的，尽管这一分子据称与 PDGF 具有约 22% 同源性，与 VEGF 具有约 30% 同源性，但是分离编码 VEGF2 的基因的方法不清楚，也没有公开对其生物学活性的鉴定。

VEGF3 从来自结肠组织的 cDNA 文库中分离出来。据称 VEGF3 与 VEGF 具有约 36% 相同性和 66% 相似性。分离编码 VEGF3 的基因的方法不清楚，也没有公开对其生物学活性的鉴定。

血管内皮生长因子似乎主要通过结合受体酪氨酸激酶起作用。已鉴别了 5 种内皮细胞特异性受体酪氨酸激酶，即 VEGFR-1 (Flt-1)、VEGFR-2 (KDR/Flk-1)、VEGFR-3 (Flt4)、Tie 和 Tek/Tie-2。所有这些受体均具有内在酪氨酸激酶活性，这种活性是信号转导所需的。通过在小鼠胚胎中定向突变失活这些受体已证实了 VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、Tie 和 Tek/Tie-2 在血管发生中的重要和特异作用。

已知结合 VEGF 的受体酪氨酸激酶是 VEGFR-1、VEGFR-2 和 VEGFR-3。VEGFR-1 和 VEGFR-2 以高亲和性与 VEGF 结合，VEGFR-1 也结合 VEGF-B。已表明 VEGF-C 是 VEGFR-3 的配体并也活化 VEGFR-2 (Joukov 等，EMBO 杂志，1996 15 290—298)。VEGF-D 与 VEGF-C 共享受体特异性 (Achen 等，美国科学院院刊 1998 95 548—553)。已描述了 Tek/Tie-2 的配体 (Regeneron 药公司的国际专利申请 PCT/US95/12935(WO96/11269))；但是尚未鉴

定 Tie 的配体。

VEGF-D 和 VEGF-C 的主要翻译产物除了中心 VEGF 同源结构域 (VHD) 之外, 还具有长的 C-末端多肽延伸。在 VEGF-C 中, 这些多肽延伸能蛋白酶解产生分泌形式, 该分泌形式仅由 VHD 组成并能结合 VEGFR-2 和 VEGFR-3 (Joukov 等, EMBO 杂志, 1996 15 290-298; Joukov 等, EMBO J., 1997 16 3898-3911)。类似地, 尽管 VEGF-D 加工未被鉴定, 但仅由 VHD 组成的重组形式的 VEGF-D 显示结合并活化这些受体并对于内皮细胞是促有丝分裂性的 (Achen 等, 美国科学院院刊 1998 95 548-553)。

最近, 已纯化和克隆了新的 130-135kDa VEGF-A 同种型特异性受体 (Soker 等, 细胞, 1998, 92 735-745)。发现 VEGF 受体经外显子 7 编码的序列与 VEGF-A₁₆₅ 同种型特异结合, 其显示对肝素的弱亲和性 (Soker 等, 细胞, 1998, 92 735-745)。令人惊奇地, 该受体显示与参与早期神经形态发生的一个受体, 人 neuropilin-1 (NP-1) 相同。PIGF 也表明与 NP-1 相互作用 (Migdal 等, 生物化学杂志, 1998, 273 22272-22278)。

基因寻靶研究已证实胚胎发育绝对需要 VEGFR-1、VEGFR-2 和 VEGFR-3。这些研究显示 VEGFR-1 在血管内皮管形成中起作用, VEGFR-2 对于内皮/造血细胞分化和有丝分裂很重要, VEGFR-3 参与调节血管重建, 大血管形成以及淋巴血管发生。这些受体的功能的综述见 Mustonen 和 Alitalo, 细胞生物学杂志, 1995 129 895-898。

VEGFR-3 在胎儿的静脉和淋巴内皮中表达并主要在成人的淋巴内皮中表达 (Kaipainen 等, 癌症研究 1994 54 6571-6577; 美国科学院院刊 1995 92 3566-3570)。VEGFR-3 在淋巴管出现之前在胚胎心血管系统发育中起重要作用 (Dumont 等, 科学, 1998 282 946-949)。已提示 VEGF-C 可能在淋巴内皮中具有主要功能, 而在

血管发生和通透性调节中具有与 VEGF 共享的次要功能 (Joukov 等, EMBO 杂志, 1996 15 290-298)。

发明概述

本发明一般地提供了包含 VEGF-D 及其生物学活性衍生物的表达载体, 稳定地表达 VEGF-D 及其生物学活性衍生物的细胞系, 以及用这些表达载体和宿主细胞制备多肽的方法。本发明还一般地提供了治疗和减轻黑素瘤或表达 VEGF-D 的肿瘤及各种疾病的方法。

根据第一个方面, 本发明提供了稳定表达 VEGF-D 或具有 VEGF-D 的生物学活性的 VEGF-D 片段或类似物的哺乳动物细胞系。任选地, 本发明细胞系产生的 VEGF-D 与附加表位如 FLAG®、六组氨酸或 I-SPY™连接以便于亲和纯化和 VEGF-D 的定位。优选地, 所述哺乳动物细胞系是 293-EBNA 人胚胎肾细胞系。优选地, 表达的 VEGF-D 是 VEGF-D_{FullN}Flag、VEGF-D_{FullC}Flag、VEGF-D_{ΔNΔC} 或 VEGF-D_{ΔC}, 如本文所述。

术语“VEGF-D 的生物学活性”应理解为指刺激内皮细胞增殖、分化、迁移、存活或血管通透性之一或多种功能的活性。

VEGF-D 的优选片段是任选地与 FLAG® 肽连接的 PCT/US97/14696 的 SEQ ID NO: 5 的氨基酸残基 93-氨基酸残基 201 (即 VEGF 同源结构域 (VHD)) (SEQ ID NO: 1) 的 VEGF-D 部分。当该片段与 FLAG®连接时, 在本文中称该片段为 VEGF-D_{ΔNΔC}。

如本文所用, 术语“VEGF-D”总地是指国际申请 PCT/US97/14696 中限定的 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9 的多肽中的任一种, 及其具有本文定义的 VEGF-D 生物学活性的片段或类似物。

根据第二个方面, 本发明提供了包含插入到哺乳动物表达载体

Apex-3 中的编码 VEGF-D 的人 cDNA 序列的表达载体。优选地，该表达载体是 pVDApexFullNFlag、VEGF-DFullCFlag、pVDApexΔNΔC 或 pVDApexΔC，如本文所述。

优选地，表达载体也包括编码亲和性标记如 FLAG®、六组氨酸或 I-SPY™ 的序列。

本发明进一步提供了制备本发明多肽的方法，包括在宿主细胞中表达本发明的表达载体并从宿主细胞或宿主细胞生长培养基中分离多肽的步骤。在本发明这一方面的一个优选实施方案中，表达载体进一步包括编码亲和性标记如 FLAG®、六组氨酸或 I-SPY™ 的序列，以便于经亲和层析纯化多肽。

很明显包括保守取代、插入或缺失但仍保持 VEGF-D 的生物学活性的多肽也属于本发明范畴。本领域技术人员很熟悉产生这种多肽的方法，例如用定点诱变或特异性酶裂解和连接。本领域技术人员也熟知肽模拟化合物或其中一或多个氨基酸残基被非天然存在的氨基酸或氨基酸类似物替换的化合物也可保持所需方面的 VEGF-D 生物学活性。这种化合物可用本领域已知的方法制备和测试并也属于本发明范畴。

另外，由可变剪接产生的 VEGF-D 多肽的变体形式，如已知在 VEGF 和 VEGF-B 中发生的那样，以及编码 VEGF-D 的核酸序列的天然存在的等位基因变体也包括在本发明范畴内。等位基因变体是本领域熟知的并代表了所编码多肽的可变形式。

这种变体形式的 VEGF-D 可通过使 VEGF-D 多肽非必需区域进行修饰而制备。这些非必需区域预计位于强保守区域之外。特别地，PDGF 家族生长因子包括 VEGF 是二聚的，并且 VEGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PDGF-A 和 PDGF-B 显示在 PDGF 类结构域中的 8 个半胱氨酸的完全保守 (Olofsson 等，美国科学院院报 1996 93 2576-2581; Joukov 等，EMBO 杂志，1996 15 290-

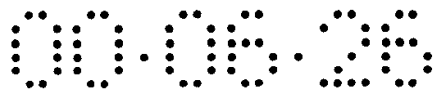
298)。据信这些半胱氨酸参与分子内和分子间二硫键。由分子内二硫键形成的每个亚基的环 1、2 和 3 参与生长因子 PDGF/VEGF 家族对受体的结合 (Andersson 等, 生长因子, 1995 12 159—164)。如上所述, 在 VEGF 家族以前已知的成员中保守的半胱氨酸在 VEGF-D 中也保守。

因此, 本领域技术人员理解这些半胱氨酸残基应存在于任何建议的变体形式中, 且环 1、2 和 3 中存在的活性位点也应存在。但是, 可预计该分子的其他区域对于生物学功能的重要性较低, 因此提供了用于修饰的合适的靶。通过常规活性分析程序如细胞增殖测试, 可容易地测试修饰多肽的活性是否显示 VEGF-D 的生物学活性。

应理解的是某些修饰的 VEGF-D 多肽具有结合内皮细胞即结合 VEGF-D 受体的活性, 但是不能刺激内皮细胞的增殖、分化、迁移或存活, 或不能诱导血管通透性。这些修饰的多肽预期能作为 VEGF-D 的竞争性或非竞争性抑制剂, 并用于需防止或降低 VEGF-D 作用的情况。因此, VEGF-D 的这些结合受体但非促有丝分裂的、不诱导分化的、不诱导迁移的或不促进存活的变体也属于本发明范畴, 并在本文中被称为“结合受体但无其他活性或干扰性变体”。

类似地, 应理解某些修饰的 VEGF-D 多肽具有结合 VEGF-D 的活性并防止二聚体与内皮细胞上的 VEGF-D 受体 (例如 VEGFR-2 和 VEGFR-3) 的结合。因此, 这些二聚体将不能刺激内皮细胞增殖、分化、迁移或存活, 或不能诱导血管通透性。这些修饰的多肽预期能作为 VEGF-D 的竞争性或非竞争性抑制剂, 并用于需防止或降低 VEGF-D 作用的情况。因此, 这种结合 VEGF-D 的但非促有丝分裂的、不诱导分化的、不诱导迁移的或不促进存活的变体也属于本发明范畴, 并在本文中被称为“结合 VEGF-D 但无其他活性或干扰性变体”。

根据第三个方面, 本发明提供了治疗或减轻恶性黑素瘤或表达



VEGF-D 的肿瘤的方法，包括抑制 VEGF-D 在黑素瘤或肿瘤周围的表达或活性的步骤。对 VEGF-D 表达的局部抑制可通过例如用反义核酸或编码 VEGF-D 的三链 DNA 实现。或者，如上所述的具有结合 VEGF-D 的活性并防止与 VEGF-D 受体结合的 VEGF-D 变体多肽，或者与 VEGF-D 受体结合但不能刺激内皮细胞增殖、分化、迁移或存活的 VEGF-D 变体多肽可用作 VEGF-D 的竞争性或非竞争性抑制剂。也可使用对 VEGF-D、VEGFR-2 或 VEGFR-3 的小分子抑制剂和抗 VEGF-D、VEGFR-2 或 VEGFR-3 的抗体。

上述方法也可用于非恶性的有增加或连续的 VEGF-D 的表达的状态，如银屑病。基于 VEGF-D 在发育的小鼠胚胎的皮肤中的分布，可能 VEGF-D 在高表皮细胞 turnover dermatoses 如银屑病的起始和持续中起作用，其中表层皮肤中的血管增殖是一持续和显著的组织病理学特征。

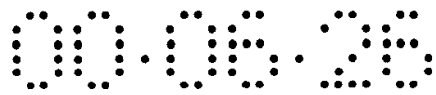
在本发明的另一方面，VEGF-D 与毒素或具有内皮细胞抑制活性的药物缀合，其可被导向表达 VEGF-D 受体，例如 VEGFR-2 和 VEGFR-3 的增殖血管和淋巴内皮细胞。因此，可以阻断对于许多病理状态如肿瘤生长很重要的血管生长。

根据第五个方面，本发明提供了增进皮肤移植物的被接受和/或愈合的方法，包括用有效剂量的 VEGF-D 或其具有 VEGF-D 生物学活性的片段或类似物刺激血管发生和淋巴血管发生的步骤。

根据第六个方面，本发明提供了刺激皮肤的手术或外伤创伤愈合的方法，包括用有效剂量的 VEGF-D 或其具有 VEGF-D 生物学活性的片段或类似物刺激血管发生和淋巴血管发生的步骤。

应理解的是本发明的后二个方面特别有益于烧伤治疗和整形手术。

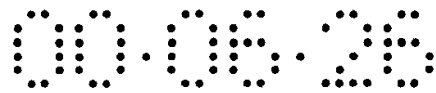
在本发明的另一方面中，提供了刺激淋巴血管发生以治疗或减



轻淋巴水肿的方法，包括用有效剂量的 VEGF-D 或其具有 VEGF-D 生物学活性的片段或类似物刺激淋巴血管发生的步骤。很少有疾病象淋巴水肿那样损伤外貌。当参与浸没（bathing）组织的流体流出（draining）的淋巴管阻塞时，发生淋巴水肿。这一阻塞的结果是淋巴或脂肪流体在组织内积累，并导致肢体和组织充血。最终结果通常是由于局部感染、不适和畸形导致的奇形怪状（grotesque）和严重的丧失功能。淋巴水肿有几种因素所致，最显著的是伴有淋巴结阻塞或手术切除的乳腺癌。继发感染和其他形式的手术也伴有淋巴水肿。很大一部分淋巴水肿的病人没有可鉴别的 precitant。增加 VEGF-D 的量应诱导淋巴血管发生并减轻淋巴和脂肪流体积累。

在胚胎发生中对 VEGF-D 合成的不合适的负调节可能对胚外结构发育不良包括脱水性（anhydrotic）外胚层发育异常起重要作用。通常皮肤中的汗腺由血管化脂肪结缔组织包围，如果由于可能丧失 VEGF-D 导致血管供应不足或不能补充，其将导致汗腺组织缺氧和功能失常。这些损害可能是由于在发育的某一阶段分化细胞丧失产生 VEGF-D 的能力或产生血管上的 VEGF-D 受体的阻断剂所致，所述血管相邻于产生这种阻断剂的分化胚外结构细胞。因此，本发明提供了通过刺激脂肪结缔组织血管化而治疗或减轻脱水性外胚层发育异常的方法，包括给予有效剂量的 VEGF-D 或其具有 VEGF-D 生物学活性的片段或类似物的步骤。

与 VEGF-D 的丧失或丧失对 VEGF-D 的应答相关的另一种疾病是硬皮病。硬皮病是一种不常见的结缔组织失调，其特征是皮肤的胶原化增厚并增加，其据信是由于血管化和/或成纤维细胞功能的改变所致。由于丧失 VEGF-D 或不能对 VEGF-D 应答所导致的内皮细胞的损害可能是血管不能修复的一个因素，由此导致观察到的血小板的持续聚集以及随后释放具有对成纤维细胞的促有丝分裂作用的生长因子。这导致胶原产生增加。同样的考虑适用于硬皮病的



系统性器官累及。因此，本发明提供了通过刺激血管内皮细胞增殖而治疗或减轻硬皮病的方法，包括给予有效剂量的 VEGF-D 或其具有 VEGF-D 生物学活性的片段或类似物的步骤。

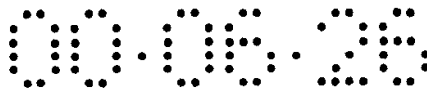
根据第七个方面，本发明提供了刺激 VEGF-D 的至少一种生物活性的方法，包括给予刺激生物活性量的完全加工的 VEGF-D 的步骤，所述的生物活性选自内皮细胞增殖、迁移、存活和分化，以及不诱导血管通透性的淋巴血管发生。

本发明的另一方面提供了调节 VEGF-D 的受体结合特异性的方法，包括表达一包括编码未加工的 VEGF-D 的核苷酸序列的表达载体，并提供蛋白酶解量的至少一种酶以加工所编码的 VEGF-D 以产生蛋白酶解加工形式的 VEGF-D。

很清楚应理解的是，本说明书中术语“完全加工的 VEGF-D”是指没有 N-末端和 C-末端前肽的 VEGF-D 多肽，术语“蛋白酶解加工形式的 VEGF-D”是指没有 N-末端和/或 C-末端前肽的 VEGF-D 多肽，术语“未加工的 VEGF-D”是指具有 N-末端和 C-末端前肽的 VEGF-D 多肽。

本发明还提供了在生物学样品中检测表达 VEGF-D 的肿瘤的方法，包括将所述样品与 VEGF-D 的特异结合试剂接触，保持一段时间以使所述特异结合试剂与 VEGF-D 结合，检测所述结合。在一优选的实施方案中，VEGF-D 的特异结合试剂是一种抗体，结合和/或结合程度由具有可检测标记的抗体进行检测。癌症活检样品中 VEGF-D 的定量可用作将来转移危险的指示。

本发明的抗体可用可检测标记物标记以用于诊断目的。抗体可与用于成象的合适的超磁性（supermagnetic），顺磁性，电子致密的生态性（ecogenic）或放射性试剂共价或非共价偶联。在诊断分析中可使用放射性或非放射性标记。放射性标记的例子包括放射性原子或基团，如 ^{125}I 或 ^{32}P 。非放射性标记的例子包括酶标记，如辣根过



氧化物酶，或荧光标记，如荧光素-5-异硫氰酸酯（FITC）。标记可以是直接或间接的，共价或非共价的。

诱导 VEGF-D 的生物学活性的多肽或抗体可与合适的药物载体结合应用。抑制 VEGF-D 的生物学活性的多肽、VEGF-D 拮抗剂或抗体也可与合适的药物载体结合应用。这种组合物包括治疗有效量的抗体，药物学可接受载体或佐剂。这种载体的例子包括但不限于盐水，缓冲盐水，矿物油，滑石，右旋糖，水，甘油，乙醇，增稠剂，稳定剂，悬浮剂及其组合。这种组合物可以是溶液，悬液，片剂，胶囊剂，霜剂，油膏剂，软膏剂或其他常规形式。配制品应选择适合给药模式。当多肽、VEGF-D 拮抗剂或抗体用作治疗目的时，施用的剂量和途径取决于患者的性质和待处理的症状，并应根据临床医生或兽医的判断选择。合适的途径包括皮下，肌肉，腹膜内或静脉内注射，局部应用，移植等。VEGF-D 的局部应用可以类似于 VEGF 的方式进行。

应理解的是本说明书中，单词“包括”是指“包括但不限于”。

附图的简要描述

图 1 示出用于在 293-EBNA 细胞中表达人 VEGF-D 衍生物的 Apex-3 质粒构建体的示意图;

图 2 示出由 293-EBNA 细胞对 VEGF-D 的表达;

图 3 示出经可溶性 VEGF 受体-免疫球蛋白融合蛋白对 VEGF-D 的沉淀:

图 4 示出经杂交筛选从商购小鼠肺 cDNA 文库分离的编码小鼠 VEGF-D1 的 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 2);

图 5 示出与 VEGF-D 反义和有义 RNA 杂交的小鼠性交后 15.5 天的组织切片曝光 2 天后的放射自显影:

图 6 示出经原位杂交分析性交后 15.5 天小鼠胚胎中 VEGF-D mRNA 的分布的结果;

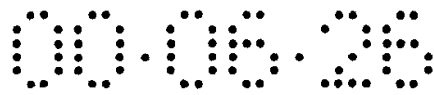


图 7 示出用 VEGF-D 单克隆抗体经免疫组织化学对人恶性黑色素瘤的分析；

图 8 提供了 VEGF-D 的结构域和一些 VEGF-D 衍生物的示意图；

图 9 示出由表达 VEGF-D_{FullNFlag} (A、B、C) 和 VEGF-D Δ C (D 和 E) 的 293-EBNA 细胞分泌的 VEGF-D 衍生物的分析；

图 10 示出经大小排阻层析和 SDS-PAGE 对 VEGF-D Δ N Δ C 的分析；

图 11 提供了 VEGF-D 加工模式的示意图。

优选实施方案的详细描述

实施例 1 稳定表达 VEGF-D 衍生物的细胞系

为产生组成型表达 VEGF-D 衍生物的细胞系，将人 VEGF-D cDNA 的区域插入哺乳动物表达载体 Apex-3 (Evans 等，分子免疫学，1995 32 1183-1195)。当转染进 293-EBNA 人胎肾细胞时，这一载体保持为附加型。为表达 VEGF-D Δ N Δ C，将 pEFBOSVEGF-D Δ N Δ C 的含有编码 IL-3 信号序列、FLAG®八肽和 VEGF-D Δ N Δ C 的 pEFBOSVEGF-D Δ N Δ C 的序列的区域插入 Apex-3 的 XbaI 位点(见国际专利申请 PCT/US97/14696 的实施例 9)。得到的质粒命名为 pVDApex Δ N Δ C，其示意图见图 1。制备类似类型的构建体以表达 VEGF-D_{FullNFlag}，其是在 N-末端用 FLAG®标记的全长人 VEGF-D 的衍生物，以及表达由氨基酸残基 2-202 组成的命名为 VEGF-D Δ C 的人 VEGF-D 截短衍生物。表达这些 VEGF-D 衍生物的表达构建体分别命名为 pVDApex_{FullNFlag} 和 pVDApex Δ C，并也在图 1 中示出。IL-3 SS 表示白介素-3 信号序列，箭头指示从巨细胞病毒启动子 (CMV) 至表达盒的转录方向。这些载体经磷酸钙方法转染进入胎肾细胞系 293-EBNA 细胞中，在潮霉素存在下选择稳定的转染子。表达高水平 VEGF-D_{FullNFlag}、VEGF-D Δ C 和

VEGF-D Δ N Δ C 的细胞系随后用代谢标记、免疫沉淀和 Western 印迹分析鉴别，如图 2 所示。

在图 2 中，表达 VEGF-DFullNFlag、VEGF-D Δ N Δ C 和 VEGF-D Δ C 的 293-EBNA 细胞系经代谢标记，用抗-FLAG 抗体 (M2) 或用特异于 VEGF-D 的 VEGF 同源结构域的抗血清 (A2) 免疫沉淀条件培养基样品中的蛋白质。对于 VEGF-DFullNFlag 和 VEGF-D Δ N Δ C，沉淀的蛋白质经 SDS-PAGE 分析并放射自显影观察，对于 VEGF-D Δ C，用 M2 抗体在 Western 印迹分析中检测。箭头表示 VEGF-D 衍生物的位置。这些衍生物在衍生自亲代 293-EBNA 细胞的对照上清中未检测到 (数据未示出)。在每个泳道的右边示出分子量标记(kDa)的位置。经 VEGF-D Δ C 的 Western 印迹分析检测的约 50kDa 条带相应于免疫球蛋白重链。

在表达 VEGF-DFullNFlag 和 VEGF-D Δ C 的细胞的上清中检测到许多 VEGF-D 衍生物，这些衍生物是由于作为 VEGF-D 生物合成的一部分的蛋白酶解加工的结果而形成的。表达 VEGF-DFullNFlag、VEGF-D Δ C 和 VEGF-D Δ N Δ C 的细胞系在潮霉素选择条件下保持并传代至少 20 次，并持续表达 VEGF-D 衍生物。

实施例 2 VEGF-D Δ N Δ C 与可溶性 VEGF 受体的结合

为进一步评价 VEGF-D 和 VEGF 受体的相互作用，测试 VEGF-D Δ N Δ C 结合包含人 VEGFR-1、人 VEGFR-2 和人 VEGFR-3 的胞外结构域的可溶性免疫球蛋白融合蛋白的能力。VEGF-C 的相应片段 VEGF-C Δ N Δ C 用作比较。为进行结合实验，用编码可溶性受体-免疫球蛋白融合蛋白 VEGFR-1-Ig、VEGFR-2-Ig 或 VEGFR-3-Ig 的质粒经磷酸钙 (Ca-磷酸) 方法转染 293T 人胎肾细胞。在这些融合蛋白中，相关 VEGF 受体的胞外结构域与人 IgG₁ 的 Fc 部分融合。转染后保温细胞 24 小时，用含有 0.2%牛血清白蛋白 (BSA) 的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM) 洗涤，并饥

饿 24 小时。然后收集培养基并离心澄清，用蛋白 A 琼脂糖珠沉淀融合蛋白。然后将琼脂糖珠在室温与 900 微升代谢 ^{35}S 标记的培养基保温 3 小时，所述培养基来自用编码人 VEGF-D Δ N Δ C、人 VEGF-C Δ N Δ C 或人 VEGF₁₆₅ 的表达质粒经磷酸钙方法转染的 293-EBNA 细胞。对 293-EBNA 细胞的代谢标记基本上如 (Joukov 等, 1997) 所述进行。然后在 4℃ 用结合缓冲液 (0.5% BSA, 0.02% Tween 20, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 肝素, 于磷酸缓冲盐水 (PBS) 中) 洗涤琼脂糖珠 2 次, 用 PBS 洗 1 次, 在 Laemmli 样品缓冲液中煮沸, 然后经 SDS-PAGE 分析蛋白质。结果示于图 3。

在图 3 中, 如上所述用 VEGFR-1-Ig、VEGFR-2-Ig 和 VEGFR-3-Ig 沉淀标记的 VEGF₁₆₅、VEGF-C Δ N Δ C 和 VEGF-D Δ N Δ C。用于沉淀的融合蛋白示于右边。“载体”表示从衍生自用缺少编码 VEGF 的序列的表达载体转染的细胞的培养基沉淀的结果。分子量标记以 kDa 示出。

用 VEGFR-2-Ig 和 VEGFR-3-Ig 从表达 VEGF-D Δ N Δ C 的细胞的培养基中沉淀出预计为 VEGF-D Δ N Δ C 大小的多肽 (约 22kDa)。相反, 用 VEGFR-1-Ig 从相同培养基中未沉淀出这一大小的蛋白质。VEGF-C Δ N Δ C 的沉淀基本上观察到相同结果。如所预期的, VEGFR-1-Ig 和 VEGFR-2-Ig 从表达 VEGF₁₆₅ 的细胞的培养基中沉淀出约 24kDa 的主要多肽, 但是用 VEGFR-3-Ig 未沉淀出。用这三种融合蛋白从用缺少编码 VEGF 的序列的表达载体转染的细胞的培养基中未沉淀出标记的多肽。这些数据提示 VEGF-D Δ N Δ C 可以与 VEGFR-2 和 VEGFR-3 结合但不与 VEGFR-1 结合。因此, 在与 VEGFR-2 和 VEGFR-3 的受体结合特异性方面, VEGF-D Δ N Δ C 类似于 VEGF-C Δ N Δ C。

实施例 3 在小鼠胚胎中 VEGF-D 基因表达的原位杂交研究

经原位杂交用相应于小鼠 VEGF-D1 cDNA (其序列见图 4)

的核苷酸 1—340 的放射标记的反义 RNA 探针研究 VEGF—D 基因表达的模式。该反义 RNA 用 T3 RNA 聚合酶和 $[^{35}\text{S}]\text{UTP}\alpha$ 经体外转录合成。小鼠 VEGF—D 在国际专利申请 PCT/US97/14696 中有充分描述。将该反义 RNA 探针与性交后 15.5 天的小鼠胚胎的石蜡包埋组织切片杂交，标记的切片进行放射自显影 2 天。与反义 RNA 和互补有义 RNA（作为阴性对照）杂交的切片的放射自显影图见图 5 所示。在图 5 中，“L”代表肺，“Sk”代表皮肤，所示两个组织切片是连续切片。在发育的肺中检测到强 VEGF—D mRNA 信号，并与皮肤相关。用对照有义 RNA 未检测到信号。

在图 6 中，矢状组织切片与 VEGF—D 反义 RNA 探针杂交，随后与照相乳液保温，显色并染色。显微镜分析揭示 VEGF—D mRNA 在发育肺的间充质细胞中丰富（图 6A—C）。相反，支气管和细支气管的上皮细胞是阴性的，围绕支气管的发育平滑肌细胞也是阴性的。支气管动脉的内皮细胞也是阴性的。在图 6A 中，暗视野显微镜照片示出肺中 VEGF—D mRNA 的强信号（Lu）。还示出了肝（Li）和肋骨（R）。图 6B 示出肺的较高放大倍数。亮视野显微镜照片示出支气管（Br）和支气管动脉（BA）。黑矩形代表图 6C 所示的切片区但是为较高的放大倍数。图 6C 示出支气管的上皮细胞（Ep），围绕上皮细胞层的发育平滑肌细胞（SM）以及间充质细胞（Mes）。与间充质细胞相关的银染丰富性是明显的。在图 6D 中，暗视野显微镜照片示出肢芽。强信号位于紧邻皮肤下富含成纤维细胞和发育黑素细胞的组织区域。图 6A 和 6D 的放大倍数是 40 倍，图 6B 的放大倍数是 200 倍，图 6C 的放大倍数是 500 倍。

结果提示 VEGF—D 可吸引血管和淋巴管进入发育肺中生长以及进入皮肤下紧邻的区域。由于 VEGF—D 基因在邻近皮肤处的表达，认为 VEGF—D 可在诱导与恶性黑素瘤相关的血管发生中起作用。恶性黑素瘤是非常高血管化的肿瘤。这提示例如用 VEGF—D

或 VEGF 受体-2 或 VEGF 受体-3 抗体对 VEGF-D 表达的局部抑制可用于治疗恶性黑素瘤。VEGF-D 活性的其他合适的抑制剂如反义核酸或三链 DNA 也可使用。

实施例 4 与人 VEGF-D 结合的单克隆抗体的产生

在小鼠中产生 VEGF-D Δ N Δ C 的单克隆抗体。VEGF-D Δ N Δ C 包括 VEGF-D 的 VHD 的氨基酸序列，并在序列上与 VEGF 家族的所有其他成员相似。因此，据信 VEGF-D 的生物活性类似地位于 VHD 中。编码人 VEGF-D 的残基 93-201 的截短部分的 DNA 片段，即除去 N-末端和 C-末端区，用 Pfu DNA 聚合酶经聚合酶链反应 (PCR) 扩增，包括全长人 VEGF-D cDNA 的质粒用作模板。扩增的 DNA 片段，其序列经核苷酸测序证实，然后插入表达载体 pEFBOSSFLAG (澳大利亚墨尔本的沃尔特伊丽莎白医学研究所 (WEHI) 的 Clare McFarlane 惠赠) 以产生质粒 pEFBOSVEGF-D Δ N Δ C。pEFBOSSFLAG 载体含有编码来自白介素-3 (IL-3) 基因的蛋白质分泌信号序列和 FLAG®八肽 (Sigma-Aldrich) 的 DNA。FLAG®八肽可由商购抗体如 M2 单克隆抗体 (Sigma-Aldrich) 识别。VEGF-D PCR 片段被插入到该载体中，从而使 IL-3 信号序列位于 FLAG®八肽的相邻上游，而 FLAG®八肽位于截短的 VEGF-D 序列的相邻上游。所有三个序列均位于相同读框，从而 pEFBOSVEGF-D Δ N Δ C 转染进哺乳动物细胞产生的 mRNA 的翻译将得到在其 N-末端具有 IL-3 信号序列，后接 FLAG®八肽和截短的 VEGF-D 序列的蛋白质。裂解信号序列并随后从细胞分泌蛋白质将得到相邻 N-末端用 FLAG®八肽标记的 VEGF-D 多肽。这一蛋白命名为 VEGF-D Δ N Δ C。经抗 FLAG®亲和层析从已用质粒 pEFBOSVEGF-D Δ N Δ C 瞬时转染的 COS 细胞的培养基中纯化 VEGF-D Δ N Δ C。(见国际专利申请 PCT/US97/14696 的实施例 9)。

用纯化的 VEGF-D Δ N Δ C 免疫雌性 Balb/C 小鼠，免疫时间为

收集免疫小鼠脾细胞之前第 85 天（腹膜内）、第 71 天（腹膜内）和第 4 天（静脉），随后将这些脾细胞与小鼠骨髓瘤 P3X63Ag8.653（NS-1）细胞融合。对于前 2 次免疫，注射在 PBS 和 TiterMax 佐剂（#R-1 研究佐剂；CytRx 公司，Norcross, GA）的 1:1 混合物中的约 10 μ g VEGF-D Δ N Δ C，而第 3 次免疫用在 PBS 中的 35 μ g VEGF-D Δ N Δ C。

用酶免疫分析在纯化的 VEGF-D Δ N Δ C 上筛选杂交瘤而选择对 VEGF-D Δ N Δ C 的单克隆抗体。简要地，用 VEGF-D Δ N Δ C 包被 96 孔微滴板，加入杂交瘤上清并在 4 $^{\circ}$ C 保温 2 小时，随后在含 0.02% Tween 20 的 PBS 中洗 6 次。随后在 4 $^{\circ}$ C 与辣根过氧化物酶缀合的抗小鼠 Ig（Bio-Rad, Hercules, CA）保温 1 小时。洗涤后，用 2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸)(ABTS)底物系统(Zymed, 费城, CA)显色分析，在多孔板阅读器(Flow Laboratories MCC/340, McLean, VA)中读 405nm 吸光度而定量分析。选择 6 个抗体进行进一步分析并经限制稀释亚克隆 2 次。这些抗体被命名为 2F8, 3C10, 4A5, 4E10, 4H4 和 5F12。用 IsostripTM同种型试剂盒（Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN）确定同种型抗体。抗体 2F8, 4A5, 4E10 和 5F12 是 IgG₁ 类，而 4H4 和 3C10 是 IgM 类。所有 6 个抗体均含 κ 轻链。

杂交瘤细胞系在含有 5% v/v 排除 IgG 的血清（Gibco BRL, Gaithersburg, MD）、5mM L-谷氨酰胺、50 μ g/ml 庆大霉素和 10 μ g/ml 重组 IL-6 的 DMEM 中培养。根据 Darby 等，免疫学方法，1993 159 125-129 的技术用蛋白 G-琼脂糖经亲和层析纯化抗体 2F8、4A5、4E10 和 5F12，并在 280nm 测吸光度而估计产量。

实施例 5 用抗人 VEGF-D 的单克隆抗体对人肿瘤进行免疫组织化学分析

为评价 VEGF-D 在肿瘤发生中的作用，用上述单克隆抗体对人恶性黑素瘤进行免疫组织化学分析。用 4 个单克隆抗体 2F8, 5F12, 4A5 和 4E10 进行分析。用一种针对粒细胞集落刺激因子受体产生的

单克隆抗体 LMM774 (Layton 等, 生长因子, 1997 14 117—130) 作为阴性对照。与 VEGF-D 单克隆抗体类似, LMM744 是小鼠 IgG₁ 同种型, 并因此作为同种型匹配的对照抗体。用免疫组织化学对两个随机选择的侵袭性恶性黑素瘤测试单克隆抗体。福尔马林固定的石蜡包埋的皮下恶性黑素瘤组织的 5 微米厚切片用作测试组织。将切片脱蜡并再水合, 然后用 PBS 洗涤。将稀释 1: 50 的正常兔血清施加到每个切片上保持 20 分钟, 吸印除去过量血清, 将第一抗体, 即粗略优化的稀释度 1: 100 和 1: 200 的 VEGF-D 单克隆抗体和 LMM774 加至切片, 并在保湿皿中于室温保温过夜。再次在 PBS 中洗涤切片 5 分钟, 随后加入在 PBS 中的 1: 400 稀释度的生物素化兔抗小鼠抗体 (DAKO 公司, Carpinteria, CA), 于室温保温 35 分钟。随后在 tris 缓冲盐水 (TBS) 中洗涤切片 5 分钟, 加入在 TBS 中 1: 500 稀释的链亲和素-碱性磷酸酶 (Silenus, 澳大利亚)。切片在 TBS 中洗涤 5 分钟并加入固红底物 (Sigma, St. Louis, MO), 于室温保温 20 分钟。切片在水中洗涤然后封固。使用红色反应产物以避免混淆对产生黑色素的肿瘤的阐明。包括一省略 VEGF-D 单克隆抗体的省略步骤对照, 以及使用 LMM774 抗体的同种型匹配对照。

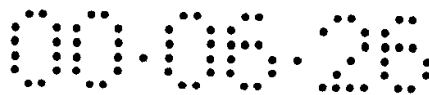
图 7A—C 示出使用相同黑素瘤样品的结果, 而图 7D 和 7E 示出在相同批次中染色的不同肿瘤。在图 7A 和 7B 中由箭头示出免疫反应性黑素瘤细胞岛, 在图 7C 中由箭头示出免疫反应性血管。在图 7E 中可见具有不同水平的 VEGF-D 的黑素瘤细胞。图 7A、7D 和 7E 的放大倍数约 60 倍, 图 7B 和 7C 的放大倍数约 300 倍。

使用所有 4 种 VEGF-D 单克隆抗体均可见阳性反应, 且染色图式基本上相同。图 7A—C 和 7E 中所示结果是使用单克隆抗体 2F8 获得的。经光学显微镜检查评价染色图式显示黑素瘤的可变染色。在较大的肿瘤中, 在侵袭部分周围的肿瘤细胞小岛 (图 7A 和 7B) 以及表皮内肿瘤细胞巢中染色较突出, 而在肿瘤的中心侵袭部分染

色密度较低或不可检出。在相邻于阳性反应肿瘤细胞的乳突状和网状真皮中的小的毛细血管显示于内皮细胞的细胞质中的抗体呈可变粒状反应（图 7C）。较小肿瘤的反应更平均地分布于肿瘤块中（图 7E）。水平相距肿瘤不同距离的血管，以及远离免疫反应性肿瘤细胞的中部和深部网状真皮和皮下组织的血管，不显示与 VEGF-D 单克隆抗体的任何反应。与使用 VEGF-D 单克隆抗体的结果相反，在相同肿瘤中的 LMM774 对照是阴性的（图 7D），省略步骤对照也是阴性的。

对于一些肿瘤已示出 VEGF 合成和分泌可在缺氧肿瘤细胞中被开启，并且肿瘤还可诱导附近血管的内皮细胞表达 VEGFR-2（Plate 等，癌症研究，1993 53 5822—5827）。以这种方式建立一旁分泌系统以诱导肿瘤血管发生，从而在肿瘤中分泌的 VEGF 扩散通过间质组织并与靶内皮细胞上的 VEGFR-2 结合，诱导内皮细胞增殖。肿瘤细胞中 VEGF-D 定位的结果提示 VEGF-D 可能在恶性黑素瘤中完成相似的功能。VEGF-D 单克隆抗体在所测的两种临床样品的黑素瘤细胞中检测到 VEGF-D。这些肿瘤细胞最可能产生 VEGF-D。另外，在这种生产肿瘤细胞附近的血管内皮细胞上检测到 VEGF-D，而在较远的血管中未检测到。VEGF-D 可能由于与 VEGFR-2 的相互作用而位于这些内皮细胞上，VEGFR-2 是经常在肿瘤血管上表达的 VEGF-D 的受体（Plate 等，癌症研究，1993 53 5822—5827）。需进行进一步的免疫组织化学分析以估计 VEGF-D 是否也位于肿瘤附近的淋巴管上。这种推想是可能的，因为淋巴内皮细胞表达 VEGFR-3，其是 VEGF-D 的一种高亲和性受体（Joukov 等，EMBO 杂志，1996 15 290—298）。

结果表明黑素瘤细胞可以表达 VEGF-D 基因。经原位杂交对性交后 15.5 天的小鼠胚胎的分析表明 VEGF-D 基因的表达位于发育皮肤的紧邻的下方，在富含发育黑素细胞和成纤维细胞的区域（实



施例 3 和图 5 和 6)。因此, 可能的是转化的黑素细胞如在胚胎发生中一样重新获得了表达 VEGF-D 基因的能力。如果非致癌转化事件可以诱导在黑素细胞中的 VEGF-D 基因表达, 该蛋白质可参与其它类型特征为血管和/或淋巴管炎症或增殖的皮肤疾病。在一治疗方案中, 施用 VEGF-D 应答组织损害可用于刺激相邻于再生皮肤的血管和淋巴管的生长。类似地, 施用 VEGF-D 刺激血管发生和淋巴血管发生可用于增加皮肤移植程序的成功率。这些可用于治疗各种症状, 如烧伤和其它外伤, 避免或减轻手术疤痕, 用于美容手术等。

实施例 6 测试抗体结合 VEGF-C 的能力

用上述酶免疫分析测试 6 种 VEGF-D 单克隆抗体结合 VEGF-C Δ N Δ C 的能力。VEGF-C Δ N Δ C 由 VEGF-C 的 VEGF 同源结构域(残基 103-215)组成,并且是最类似于 VEGF-D Δ N Δ C 的 VEGF-C 区域。用表达载体 pIC9 (Invitrogen, San Diego, CA) 根据厂商指导在巴斯德毕赤氏酵母菌株 GS115 中表达在 C-末端加有 6X 组氨酸标记的 VEGF-C Δ N Δ C, 并用 Ni-NTA Superflow 树脂 (QIAGEN, Valencia, CA) 纯化。经这一免疫分析测试的 6 种抗体中, 仅 4E10 与 VEGF-C Δ N Δ C 结合。

实施例 7 VEGF-D 以与 VEGF-C 相似方式被蛋白酶解加工

为研究 VEGF-D 的蛋白酶解加工，用 pVDApexΔC、pVDApexFullNFlag、pVDApexΔNΔC（实施例 1 和图 1）和 pVDApexFullCFlag 稳定转染 293-EBNA 细胞。这些表达构建体分别表达 VEGF-DΔC、VEGF-DFullNFlag、VEGF-DΔNΔC（实施例 1 和图 1）和 VEGF-DFullCFlag（图 8）。VEGF-D 结构域见图 8 上部所示。“SS”代表蛋白质分泌的信号序列，N-末端前肽和 C-末端前肽，VHD 代表 VEGF 同源结构域。下方是由箭头标出的 VEGF-D 中的已鉴定的和潜在的蛋白酶解位点。用作免疫原产生 A2

抗血清的 VEGF-D 区（下述）由黑条示出。该图的下半部分示出在 293-EBNA 细胞中表达的 VEGF-D 衍生物的主要翻译产物。为简便起见，蛋白质分泌的信号序列被省略。FLAG 八肽表位由圈成圆形的 F 表示。质粒 pVDApexFullCFlag 以类似于 pVDApexFullNFlag（实施例 1）的方式构建，但是保留了用于蛋白质分泌的内源性 VEGF-D 信号序列，并且用于翻译起始的“Kozak”共有序列被优化，其需要在 VEGF-D 的起始密码子之后插入 3 个氨基酸“A-R-L”。这一构建体还编码在蛋白质 C-末端的氨基酸“A-R-Q”，后接 FLAG 八肽序列。由于 293-EBNA 细胞系能蛋白酶解加工 VEGF-C（Joukov 等，EMBO 杂志，1997 16 3898-3911），这使得在细胞合成和加工过程中接着进行衍生自这些转染细胞的 VEGF-D 衍生物的分析。

根据厂商指导，在 M2（抗 FLAG）凝胶（Sigma-Aldrich）上经亲和层析从稳定转染的 293-EBNA 细胞的条件培养基中纯化 VEGF-D 衍生物，并用 FLAG®肽洗脱。用离心浓缩机（Amicon, Beverly, MA）除去 FLAG®肽。从 M2 亲和柱上洗脱的等份组分用 SDS-PAGE 和银染或者用 M2 抗体（Sigma-Aldrich）免疫印迹分析以证实纯化物质的性质。

经 SDS-PAGE 对表达各种 VEGF-D 衍生物的 293-EBNA 细胞的分析表明 VEGF-D 多肽被蛋白酶解加工。用来自表达 VEGF-DFullNFlag 的 293-EBNA 细胞的培养基纯化使得能特异分析在 N-末端具有 FLAG 八肽的那些 VEGF-D 多肽或与 FLAG®标记的多肽共价或非共价结合的衍生物（图 8 和图 11）。

在兔中，用相应于人 VEGF-D 的位于 VHD 中的残基 190-205 的合成肽 KCLPTAPRHPYSIIRR（SEQ ID NO: 3）（PCT/US97/14696 的 SEQ ID NO: 5）产生多克隆抗血清，称为 A2。

对于 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析，将含有纯化的 VEGF-

D 衍生物的样品与 2×SDS-PAGE 样品缓冲液以 1:1 合并, 煮沸并经 SDS-PAGE 分辨 (Laemmli, 自然, 1970 227 680—685)。然后将蛋白质转移到 Immobilon-P 膜 (Millipore, Bedford, MA), 在 3%BSA, 100mM Tris-HCl(pH7.5), 150mM NaCl 和 0.02%Tween 20 中保温以封闭非特异性结合位点。然后将印迹与 1:2000 稀释度的 A2 抗血清在室温保温 2 小时, 或者与 M2 (抗 FLAG) 抗体依厂商指导保温。在缓冲液 (3%BSA, 100mM Tris-HCl(pH7.5), 150mM NaCl 和 0.02%Tween 20) 中洗涤后, 用抗兔 Ig 辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合物或抗小鼠 Ig HRP 缀合物 (Biorad, Hercules, CA) 探查印迹, 并用化学发光物质 (ECL, Amersham, UK) 显色。

经还原条件下的 SDS-PAGE 和银染对由表达 VEGF-DFullNFlag 的细胞分泌的蛋白质的分析揭示了一种约 53kDa 的蛋白质, 其是未加工 VEGF-D 的预期大小, 以及约 31 和 29kDa 的两个多肽 (图 9A)。分子量大小标记 (以 kDa 表示) 示于左侧, VEGF-D 衍生物的位置 (及分子量 kDa) 由右侧箭头标示。这一结果与在 VHD 的 C-末端附近发生的蛋白酶解事件相一致。根据这一模型, 约 53kDa 的多肽代表未加工的 VEGF-D, 约 31kDa 的多肽由 N-末端前肽和 VHD 组成 (即缺少 C-末端前肽)。由 N-末端前肽和 VHD 组成的多肽的预计大小确实是 31kDa, 因为糖基化的 VHD 先前已表明为约 21kDa (Achen 等, 美国科学院院报, 1998 95 548—553; PCT/US97/14696 的图 12b), 且 FLAG 标记的 N-末端延伸的预计大小为 10kDa。如果 VEGF-D 的加工涉及在 VHD 的 N-末端附近裂解, 则表达 VEGF-DFullNFlag 的细胞应该也分泌仅由 N-末端延伸组成的 10kDa FLAG 标记的多肽。虽然通过银染分析这些细胞分泌的 VEGF-D 衍生物中未检测到 10kDa 的多肽 (图 9A), 但是用 M2 抗体对相同物质进行 Western 印迹分析很清楚地检测到 10kDa 多肽 (图 9B)。由银染检测到的约 29kDa 多肽没有被用 A2

多克隆抗血清对相同样品的 Western 印迹分析检测到 (图 9C), 因此其代表 C-末端前肽。这一点被该多肽的 N-末端氨基酸证实, 其鉴别该 N-末端序列为 “SIQIPEED” (SEQ ID NO: 4), 基于与 VEGF-C 的对比, 其紧邻 VHD 的预计的 C-末端裂解位点。因此, VEGF-D 的 C-末端裂解位点位于精氨酸 205 之后 (“R↓SIQIPEED”) (SEQ ID NO: 5)。通常这一约 29kDa 多肽存在于亲和纯化的物质中是因为 N-和 C-末端前肽之间的链间二硫键 (见图 11 所示 VEGF-D 加工示意图)。

为进一步检查在 VHD 的 N-末端附近的 VEGF-D 的蛋白酶解, 如上所述纯化并分析由表达 VEGF-DΔC 的 293-EBNA 细胞分泌的蛋白质。VEGF-DΔC 的构建体驱动 VEGF-D 衍生物的表达, 该衍生物的 C-末端延伸已被缺失并被 FLAG 替换 (图 8)。经银染分析, 来自这些细胞的条件培养基含有约 31kDa 和 21kDa 的两种 FLAG 标记的多肽 (图 9D)。这一结果与 N-末端裂解事件相一致, 该裂解事件发生在 VHD 的 N-末端附近, 距未加工的 VEGF-D 的 N-末端约 10kDa。因此, 约 31kDa 的多肽由 N-末端延伸和 VHD 组成, 而约 21kDa 的多肽仅由 VHD 组成。与这一模型相一致的是发现用 M2 抗体的 Western 印迹分析检测到约 31 和约 21kDa 的条带 (图 9E)。另外, 如所预期的, 用 A2 抗血清的 Western 印迹分析也检测到两条带 (数据未示出)。

为确定 VEGF-D 中的 N-末端蛋白酶解位点的精确位置, 将从表达 VEGF-DΔC 的细胞的上清中纯化的约 21kDa 多肽进行 N-末端氨基酸测序。用 G1000A 型惠普蛋白质测序仪 (惠普, Palo Alto, CA) 进行亲和纯化的蛋白质的 N-末端氨基酸测序。这一多肽的 N-末端序列是不均一的, 代表约 80% 该物质的主要序列起自 “FAATFY” (SEQ ID NO: 6), 而代表 10—15% 该物质的次要序列起自 “KVIDEE” (SEQ ID NO: 7)。因此, 如所预期的, 约 21kDa

多肽的 N-末端位于 VHD 的 N-末端的约相同位置。VEGF-D 的主要 N-末端裂解位点在精氨酸 88 之后 (“R↓FAATFY”) (SEQ ID NO: 8), 次要位点位于亮氨酸 99 之后 (L↓KVIDEE) (SEQ ID NO: 9) (图 8)。

实施例 8 VEGF-D 主要以非共价二聚体形式存在

通常, VEGF 家族成员以二硫键结合的同二聚体存在, 但是, VEGF- Δ N Δ C 主要以非共价二聚体形式存在 (Joukov 等, EMBO J., 1997 16 3898-3911)。VEGF-D 的成熟形式 VEGF-D Δ Npro Δ Cpro 也不是二硫键连接的二聚体, 因为这一多肽在还原条件下和非还原条件下在 SDS-PAGE 中迁移几乎相同。为了测试 VEGF-D 成熟形式的性质, 将亲和纯化的 VEGF-D Δ N Δ C 进行大小排阻层析, 大小排阻层析是通过将亲和纯化的蛋白质上样至 TSKG2000SW (7.5 $\times$ 60mm Id) 柱 (LKB Bromo, 瑞典) 而进行。柱用 PBS 平衡。以 0.25ml/min 的流速洗脱蛋白质并收集每分钟组分。在 215nm 监测蛋白质洗脱。从柱中洗脱表观分子量 (在每个峰上部以括号示出) 为 73kDa(峰 1)、49kDa(峰 2)和 25kDa(峰 3)的 3 个主峰, 分光光度法计算这些峰中的总蛋白比率约为 1:2.1:0.9 (图 10A)。用从已知蛋白牛血清白蛋白二聚体、牛血清白蛋白、卵白蛋白和胰蛋白酶抑制剂 (Sigma Aldrich 有限公司, 澳大利亚) 构建的校正曲线确定表观分子量。合并相应于这些峰的组分, 用离心浓缩器浓缩至 100 微升并在还原条件下经 SDS-PAGE 分析并银染 (图 10B)。泳道 1、2 和 3 分别相应于来自峰 1、2 和 3 的蛋白质。VEGF-D Δ N Δ C 亚基的位置在图 10B 中的左侧示出, 分子量标记(kDa)的位置在右侧示出。

VEGF-D Δ N Δ C 亚基 (约 21kDa) 在峰 2 中最丰富, 在峰 3 中易检测, 而在峰 1 中未检测到 (图 10B)。峰 1 中的主要种类是 73kDa 蛋白质, 其是在经 M2 亲和层析纯化的蛋白质样品中经常被检到的

污染物，其在用 M2 抗体或 A2 抗血清的 Western 印迹分析中不能检测到（数据未示出）。该 73kDa 蛋白质也在使用来自 293-EBNA 细胞（该细胞已用缺少编码 VEGF-D 的序列的 Apex-3 质粒转染）的上清的对照 M2 亲和层析中观察到（数据未示出）。从大小排阻层析确定的表观分子量表明峰 2 和峰 3 中的蛋白质分别是 VEGF-D Δ N Δ C 二聚体和 VEGF-D Δ N Δ C 单体。因此，一种非共价二聚体，其亚基在还原或非还原条件下在 SDS-PAGE 中分离，是 VEGF-D Δ N Δ C 的亲和纯化制备物中的主要分子种类。

用从柱中洗脱的组分估计二聚的和单体形式的 VEGF-D Δ N Δ C 结合 VEGFR-2 的能力，用国际专利申请 PCT/US95/16755 中描述的 Ba/F3 细胞生物分析法分析结合 VEGFR-2 的能力。峰 3 中的 VEGFR-2 结合活性约是峰 2 中的该活性的 2%，表明 VEGF-D Δ N Δ C 非共价同二聚体的生物活性比单体高得多。峰 1 中的 VEGFR-2 结合活性约是峰 2 的该活性的 1%，可能反映了在这一峰中有少量的 VEGF-D Δ N Δ C 非共价同二聚体。很清楚二聚体形式的 VEGF-D Δ N Δ C 比单体形式结合 VEGFR-2 要好得多。

实施例 6 中的数据证实 VEGF-D 被蛋白酶解加工，并且蛋白酶解位点类似于但不同于 VEGF-C 的位点。蛋白酶解加工可能具有相当的生物学重要性，因为不同的 VEGF-D 衍生物具有不同的活化 VEGF 受体的能力。尽管完全加工的 VEGF-D 结合并活化 VEGFR-2 和 VEGFR-3（Achen 等，美国科学院院报，1998 95 548-553），但是未加工形式的 VEGF-D 活化 VEGFR-3 但不活化

VEGFR-2（PCT/US97/14696 的图 14 和图 15）。因此，逐步的蛋白酶解加工可能是体内调节 VEGF-D 的受体结合特异性的方式。

大小排阻层析还证实亲和纯化的 VEGF-D Δ N Δ C 主要是非共价二聚体，但有一小部分是单体。仅二聚体形式可强烈活化含有 VEGFR

—2 的胞外结构域的嵌合受体。这一发现是能预料到的，因为细胞表面受体酪氨酸激酶的活化涉及受体二聚化。可能二聚的配体提供了每分子两个受体结合位点，而单体形式仅提供一个。因此，二聚的配体可诱导受体二聚化，但单体配体不能诱导。

图 11 示出了 293-EBNA 细胞采用的 VEGF-D 加工示意图，其可给出单体和二聚体。从细胞中分泌了两种形式的未加工的 VEGF-D：单体（左侧）和在 N-和 C-末端前肽之间具有二硫桥的反平行二硫键连接的二聚体（右侧）。箭头从胞内形式指向在 VHD 的 N-和 C-末端逐步蛋白酶解加工的产物，其最终产生由 VHD 的非共价二聚体和单体组成的 VEGF-D 的成熟形式。对来自本文所述的细胞系的 VEGF-D 衍生物的分析提示从 VHD 裂解 C-末端前肽比裂解 N-末端前肽更有效。为简化起见，没有示出来自蛋白酶解加工的所有可能的衍生物。在图 11 中，N-前肽代表 N-末端前肽；C-前肽代表 C-末端前肽；VHD 代表 VEGF 同源结构域；灰色框代表结构域之间的非共价相互作用；—S—代表亚基间二硫桥；N-代表多肽的 N-末端；箭头代表蛋白酶解位点的大概位置。

实施例 9 VEGF-D 和血管通透性

用 Miles 分析法测试了亲和纯化的人 VEGF-D Δ N Δ C 诱导血管通透性。用麻醉的豚鼠进行 Miles 分析 (Miles, A.A. 和 Miles, E.M., 生理学杂志, 1952 118 228—257)。为了定量由通透性因子诱导的溢出，切下样品注射区，在 42℃ 于甲酰胺中保温 3 天用 Evans 蓝染料抽提。通过在 620nm 读样品的吸收值用分光光度法定量抽提的染料量。使用 VEGF-D Δ N Δ C 是因为已知人 VEGF-C 的 VHD (VEGF-C Δ N Δ C) 诱导血管通透性 (Joukov 等, EMBO J., 1997 16 3898—3911)。纯化的小鼠 VEGF₁₆₄ 用作阳性对照。如所预期的，小鼠 VEGF₁₆₄ 强烈诱导血管通透性。诱导可检测的血管通透性的小鼠 VEGF₁₆₄ 的最低浓度为 60ng/ml。类似地，人 VEGF-C Δ N Δ C 也诱导

血管通透性，但是具有可检测活性的最低浓度是 250ng/ml。相反，VEGF-D Δ N Δ C 显示无活性，即使蛋白质浓度高达 1 μ g/ml 时也无活性。这些结果表明人 VEGF-D Δ N Δ C 在豚鼠中不是血管通透性的诱导因子。

VEGF-D 和 VEGF-C 被认为是 VEGF 家族的一亚家族成员 (Achen 等, 美国科学院院报, 1998 95 548-553), 因为其一级结构和受体结合特异性均相似。这两个分子的加工机制是相似但不相同的。但是这两个生长因子展现不同的生物活性, 例如 VEGF-D Δ N Δ C 不诱导血管通透性。相反, 尽管没有 VEGF 强, 但 VEGF-C Δ N Δ C 确实诱导血管通透性 (Joukov 等, EMBO J., 1997 16 3898-3911)。

上述描述和实施例仅为举例示出本发明而不是限制本发明。由于本领域技术人员可对掺入本发明的精神和实质的所公开的实施方案作出修改, 因此本发明应被认为包括落入所附权利要求书及其等价物的范围内的所有变化。

序列表

<110> ACHEN, Marc G.

<120> 表达血管内皮生长因子D的表达载体和细胞系以及治疗黑素瘤的方法

<130> PCT申请的序列表

<140>

<141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 109

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Phe Tyr Asp Ile Glu Thr Leu Lys Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg
1 5 10 15

Thr Gln Cys Ser Pro Arg Glu Thr Cys Val Glu Val Ala Ser Glu Leu
20 25 30

Gly Lys Ser Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe
35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Glu Glu Ser Leu Ile Cys Met Asn Thr
50 55 60

Ser Thr Ser Tyr Ile Ser Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu
65 70 75 80

Thr Ser Val Pro Glu Leu Val Pro Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly
85 90 95

Cys Lys Cys Leu Pro Thr Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser
100 105

<210> 2

<211> 1325

<212> DNA

<213> 鼠

<400> 2

```

ggagaatgcc ttttgcaaca cttttcagta gctgcctgga aacaactgct tagtcatcgg 60
tagacattta aaatattcaa aatgtatgga gaatggggaa tggggaatat cctcatgatg 120
ttccatgtgt acttggtgca gggcttcagg agcgaacatg gaccagtga ggatttttct 180
tttgagcgat catcccggtc catgttgga cgatctgaac aacagatccg agcagcttct 240
agtttgagg agttgctgca aatcgcgcac tctgaggact ggaagctgtg gcgatgccgg 300
ttgaagctca aaagtcttgc cagtatggac tcacgctcag catcccatcg ctccaccaga 360
tttgcggcaa ctttctatga cactgaaaca ctaaaagtta tagatgaaga atggcagagg 420
acccaatgca gccctagaga gacatgcgta gaagtcgcca gtgagctggg gaagacaacc 480
aacacattct tcaagcccc ctgtgtaaat gtcttccggt gtggaggctg ctgcaacgaa 540
gaggggtgtga tgtgtatgaa cacaagcacc tcctacatct ccaaacagct ctttgagata 600
tcagtgcctc tgacatcagt gcccgagtta gtgcctgtta aaattgccaa ccatacgggt 660
tgtaagtgtc tgcccacggg cccccgcat ccttactcaa ttatcagaag atccattcag 720
accccagaag aagatgaatg tcctcattcc aagaaactct gtcctattga catgctgtgg 780
gataacacca aatgtaaagtg tgttttgcaa gacgagactc cactgcctgg gacagaagac 840
cactcttacc tccaggaacc cactctctgt ggaccgcaca tgacgtttga tgaagatcgc 900
tgtgagtgcg tctgtaaagc accatgtccg ggagatctca ttcagcacco ggaaaactgc 960
agttgctttg agtgcaaaga aagtctggag agctgctgcc aaaagcacia gatttttcac 1020
ccagacacct gcagctgtga ggacagatgt ctttttcaca ccagaacatg tgcaagtaga 1080
aagccagcct gtggaaagca ctggcgcttt ccaaaggaga caagggccca gggactctac 1140
agccaggaga acccttgatt caacttcctt tcaagtcccc ccattctctgt cattttaaac 1200
agctcactgc tttgtcaagt tgctgtcact gttgccact accccttgaa catgtgcaaa 1260
cacagacaca cacacacaca cacacacaga gcaactagga ttatgttttc taggtgctgc 1320
ctaag

```

1325

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 3

Lys Cys Leu Pro Thr Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 4

Ser Ile Gln Ile Pro Glu Glu Asp
 1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 5

Arg Ser Ile Gln Ile Pro Glu Glu Asp
 1 5

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> 人
<400> 6

Phe Ala Ala Thr Phe Tyr
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> 人
<400> 7

Lys Val Ile Asp Glu Glu
1 5

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人
<400> 8

Arg Phe Ala Ala Thr Phe Tyr
1 5

00:06:28

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 9

Leu Lys Val Ile Asp Glu Glu
1 5

说明书附图

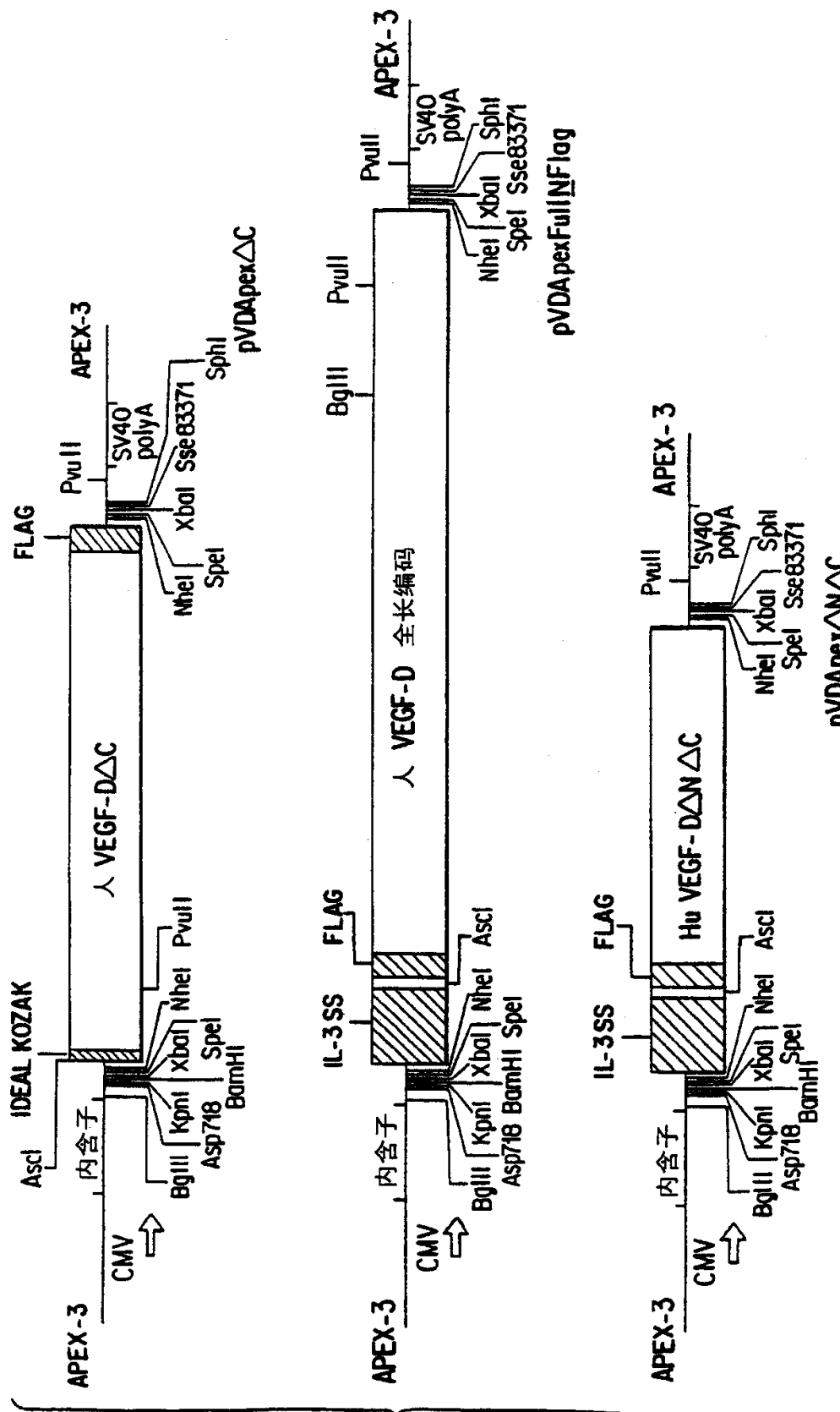


图 1

[100 nL]

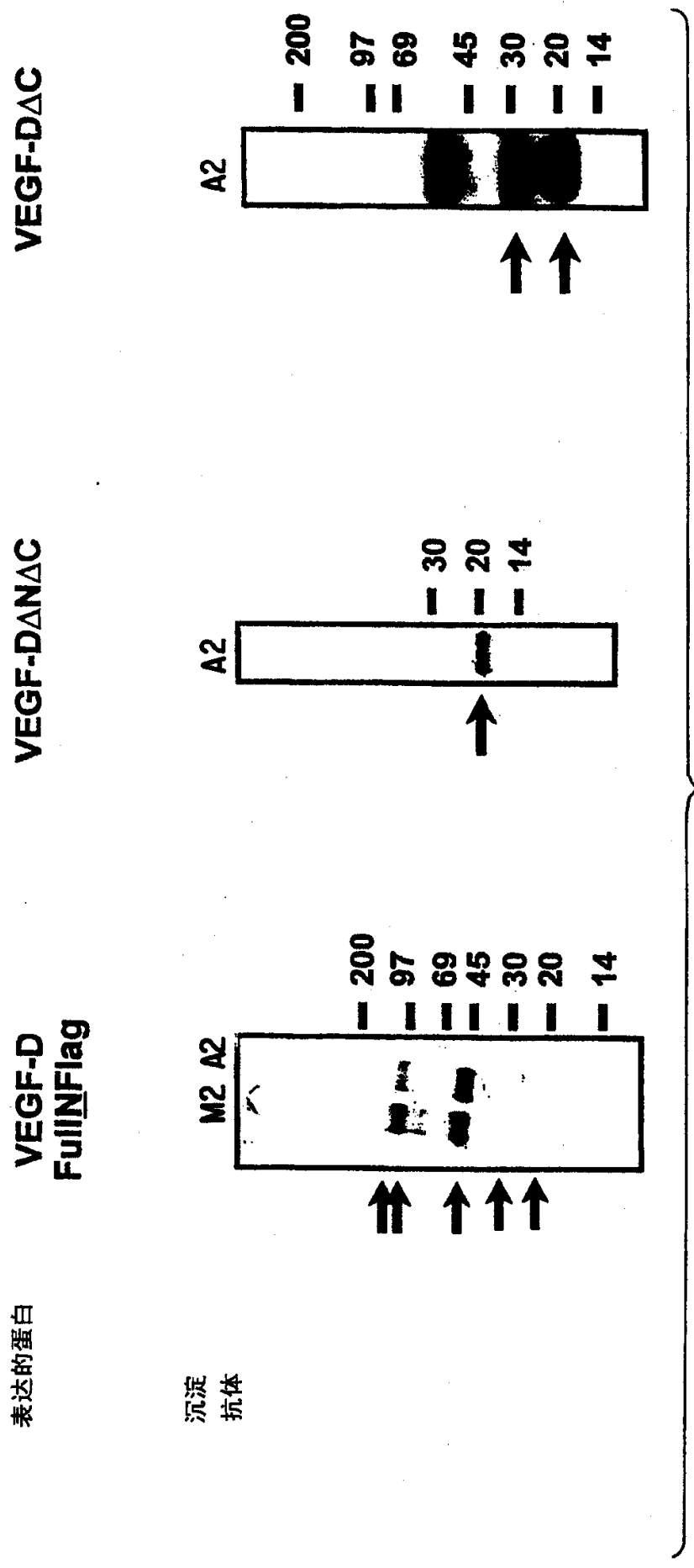


图2

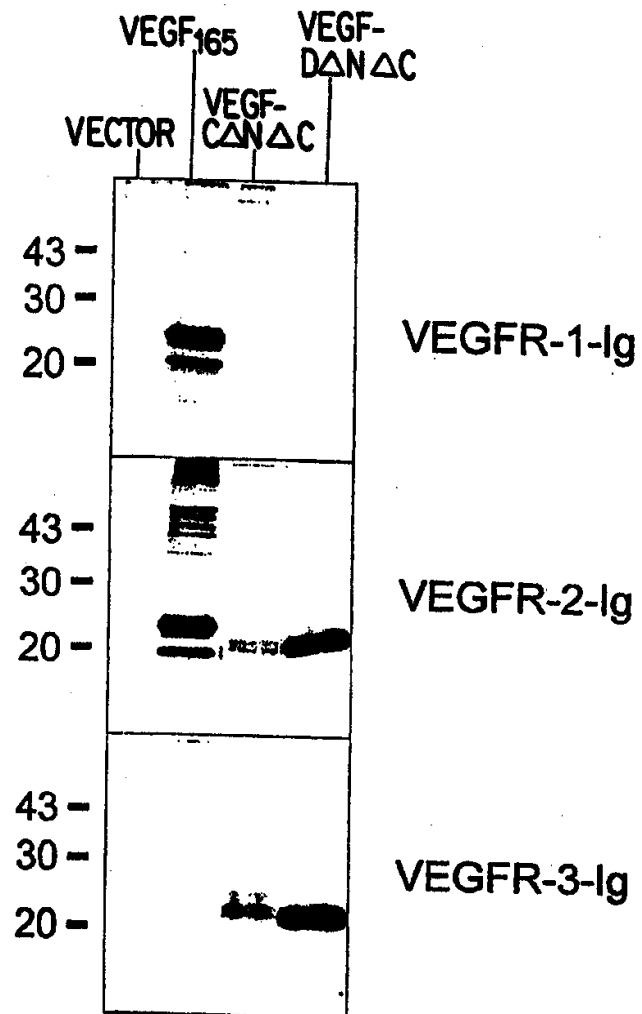
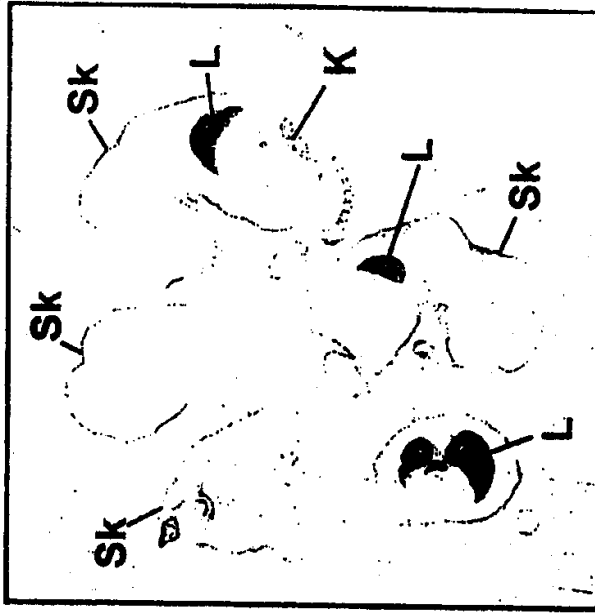


图3

GGAGAATGCC TTTTGCAACA CTTTTCAGTA GCTGCCTGGA AACAACTGCT
 TAGTCATCGG TAGACATTTA AAATATTCAA AATGTATGGA GAATGGGGAA
 TGGGGAATAT CCTCATGATG TTCCATGTGT ACTTGGTGCA GGGCTTCAGG
 AGCGAACATG GACCAGTGAA GGATTTTTCT TTTGAGCGAT CATCCCGGTC
 CATGTTGGAA CGATCTGAAC AACAGATCCG AGCAGCTTCT AGTTTGGAGG
 AGTTGCTGCA AATCGCGCAC TCTGAGGACT GGAAGCTGTG GCGATGCCGG
 TTGAAGCTCA AAAGTCTTGC CAGTATGGAC TCACGCTCAG CATCCCATCG
 CTCCACCAGA TTTGCGGCAA CTTTCTATGA CACTGAAACA CTAAAAGTTA
 TAGATGAAGA ATGGCAGAGG ACCCAATGCA GCCCTAGAGA GACATGCGTA
 GAAGTCGCCA GTGAGCTGGG GAAGACAACC AACACATTCT TCAAGCCCCC
 CTGTGTAAAT GTCTTCCGGT GTGGAGGCTG CTGCAACGAA GAGGGTGTGA
 TGTGTATGAA CACAAGCACC TCCTACATCT CCAAACAGCT CTTTGAGATA
 TCAGTGCCTC TGACATCAGT GCCCGAGTTA GTGCCTGTTA AAATTGCCAA
 CCATACGGGT TGTAAGTGCT TGCCACGGG CCCCCGCCAT CCTTACTCAA
 TTATCAGAAG ATCCATTAG ACCCCAGAAG AAGATGAATG TCCTCATTC
 AAGAACTCT GTCCTATTGA CATGCTGTGG GATAACACCA AATGTAAATG
 TGTTTTGCAA GACGAGACTC CACTGCCTGG GACAGAAGAC CACTCTTACC
 TCCAGGAACC CACTCTCTGT GGACCGCACA TGACGTTTGA TGAAGATCGC
 TGTGAGTGCG TCTGTAAAGC ACCATGTCCG GGAGATCTCA TTCAGCACCC
 GGAAAACATG AGTTGCTTTG AGTGCAAAGA AAGTCTGGAG AGCTGCTGCC
 AAAAGCACAA GATTTTTTAC CCAGACACCT GCAGCTGTGA GGACAGATGT
 CCTTTTCACA CCAGAACATG TGCAAGTAGA AAGCCAGCCT GTGGAAAGCA
 CTGGCGCTTT CCAAAGGAGA CAAGGGCCCA GGGACTCTAC AGCCAGGAGA
 ACCCTTGATT CAACTTCCTT TCAAGTCCCC CCATCTCTGT CATTTTAAAC
 AGCTCACTGC TTTGTCAAGT TGCTGTCACT GTTGCCCACT ACCCCTTGAA
 CATGTGCAAA CACAGACACA CACACACACA CACACACAGA GCAACTAGGA
 TTATGTTTTT TAGGTGCTGC CTAAG

图4

VEGF-D 反义



VEGF-D 有义

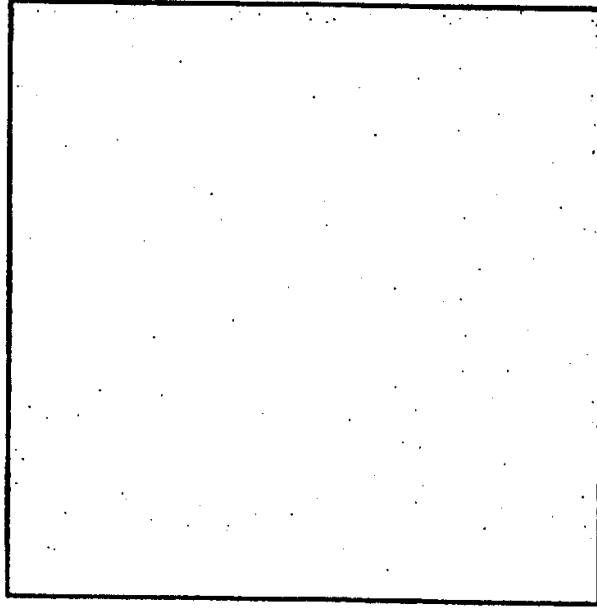


图5

图6A



图6B



图6C

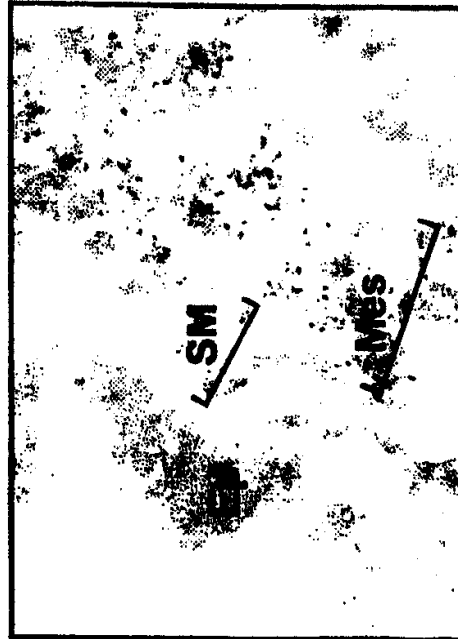


图6D



图7A



图7B



图7C



图7D



图7E



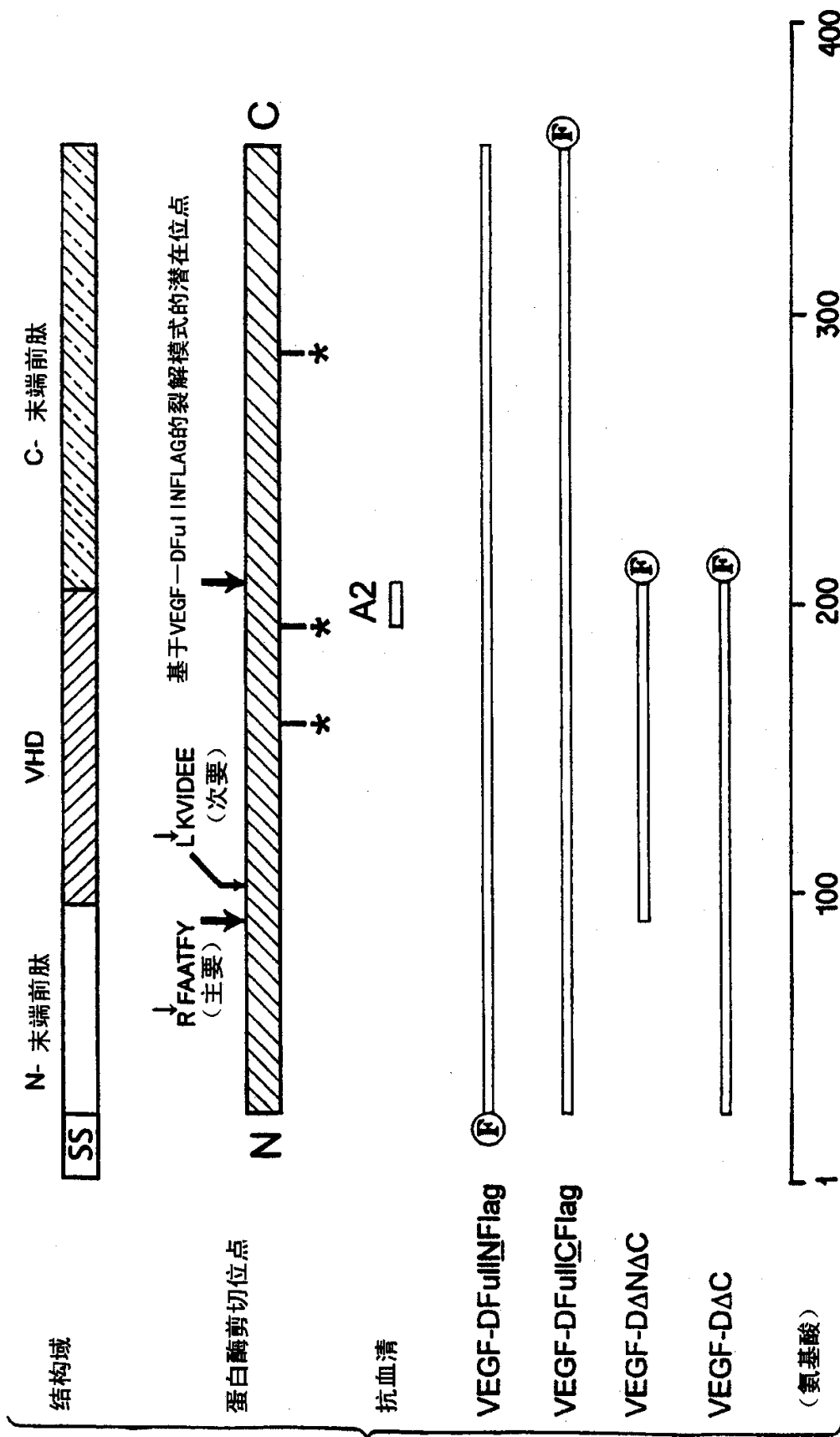


图8

VEGF-DFullINFlag

VEGF-D Δ C

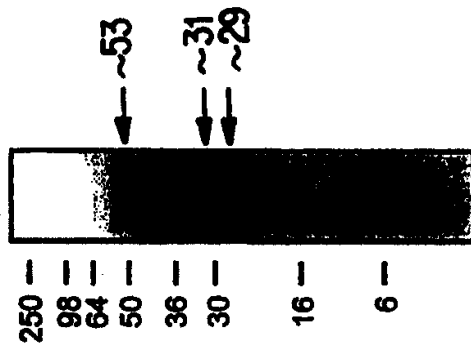


图9A

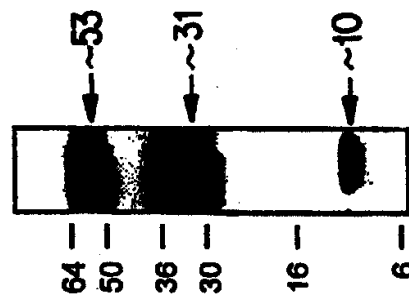


图9B

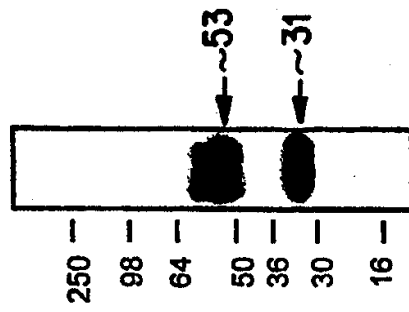


图9C

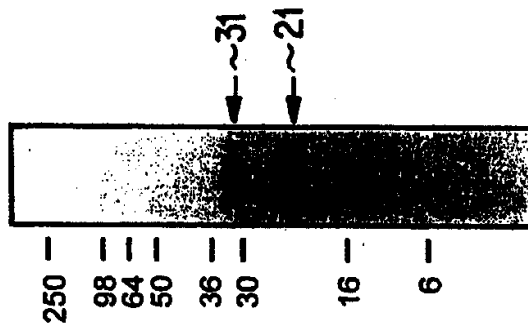


图9D

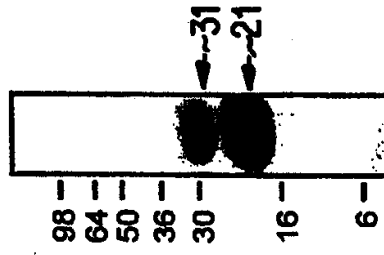


图9E

00.08.28

00:06:28

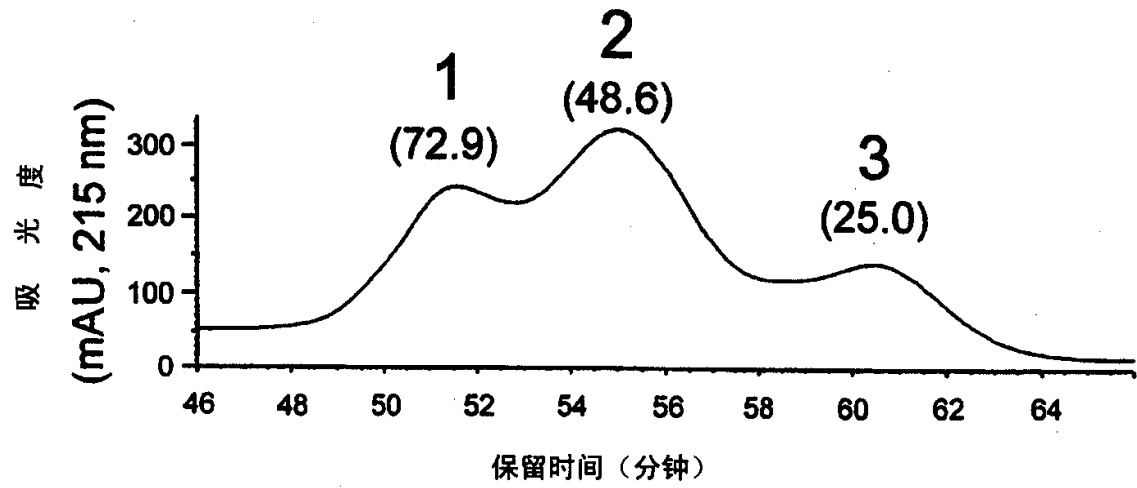


图10A



图10B

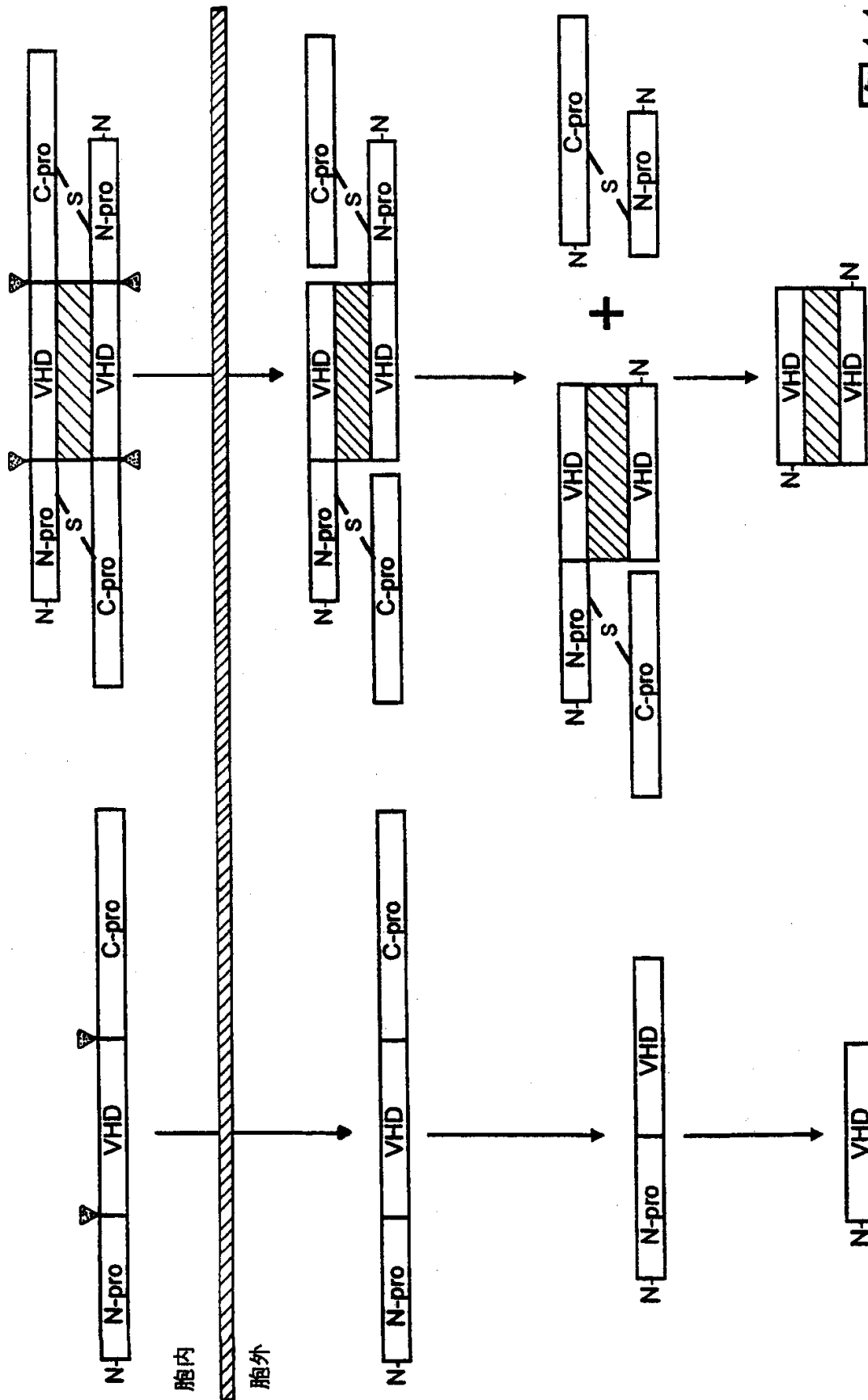


图 11

: : : : : : : : : : : : : : : :
权 利 要 求 书
按照条约第 19 条的修改

1、稳定表达 VEGF-D 或具有 VEGF-D 的生物学活性的其片段或类似物的人细胞系。

2、权利要求 1 的细胞系，其中由所述细胞系产生的 VEGF-D 与附加表位相连。

3、权利要求 2 的细胞系，其中附加表位是 FLAG®、六组氨酸或 I-SPY™。

4、权利要求 1、2 或 3 的人细胞系，其是 293-EBNA 胎肾细胞系。

5、权利要求 1、2、3 或 4 的细胞系，其中所表达的 VEGF-D 是 VEGF-D_{Full}N_{Flag}、VEGF-D_{Full}C_{Flag}、VEGF-D Δ N Δ C 或 VEGF-D Δ C。

6、权利要求 1 的细胞系，其中 VEGF-D 的片段是包括 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的 VEGF-D 部分。

7、权利要求 1 的细胞系，其中 VEGF-D 的片段是与 FLAG® 肽相连的包括 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的 VEGF-D 部分。

8、一种表达载体，包括插入哺乳动物表达载体中的编码包括 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的多肽或具有 VEGF-D 的生物学活性的其片段或类似物的人 DNA 序列。

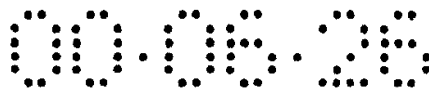
9、权利要求 8 的表达载体，其中该表达载体是 Apex-3。

10、权利要求 8 或 9 的表达载体，其中该表达载体是 pVDApex Δ N Δ C。

11、权利要求 8 或 9 的表达载体，进一步包括编码亲和标记的序列。

12、权利要求 11 的表达载体，其中亲和标记是 FLAG®、六组氨酸或 I-SPY™。

13、用权利要求 8、9、10、11 或 12 的载体转化或转染的宿主



细胞。

14、制备包括 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的多肽或具有 VEGF-D 生物学活性的其片段或类似物的方法，包括在宿主细胞中表达权利要求 8 或 9 的表达载体，以及从宿主细胞或宿主细胞生长培养基分离多肽的步骤。

15、权利要求 14 的方法，其中表达载体进一步包括编码亲和标记的序列。

16、权利要求 15 的方法，其中亲和标记是 FLAG®、六组氨酸或 I-SPY™。

17、治疗或减轻恶性黑素瘤的方法，包括在黑素瘤附近给予有效抑制量的 VEGF-D 拮抗剂以抑制 VEGF-D 的表达或活性。

18、权利要求 17 的方法，其中 VEGF-D 拮抗剂是反义核酸或编码 VEGF-D 的三链 DNA。

19、权利要求 17 的方法，其中 VEGF-D 拮抗剂是 VEGF-D 变体多肽。

20、权利要求 17 的方法，其中 VEGF-D 拮抗剂是包括特异与 VEGF-D 反应的抗体或其 F(ab')₂、F(ab')、F(ab)片段的组合物。

21、权利要求 20 的方法，其中抗体是单克隆抗体、其 F(ab')₂、F(ab')、F(ab)片段或嵌合单克隆抗体。

22、治疗或减轻表达 VEGF-D 的肿瘤的方法，包括在肿瘤附近给予有效抑制量的 VEGF-D 拮抗剂。

23、治疗或减轻表达 VEGF-D 的肿瘤的方法，包括给予有效抑制量的与具有肿瘤抑制活性的毒素或药物缀合的 VEGF-D 或其能与 VEGF-D 受体结合活性结合的片段或类似物。

24、增强皮肤移植物的被接受和/或愈合的方法，包括给予有效刺激血管发生和淋巴血管发生量的 VEGF-D，或具有 VEGF-D 生物学活性的其片段或类似物。

25、刺激皮肤的手术或外伤创伤愈合的方法，包括给予有效刺激血管发生和淋巴血管发生量的 VEGF-D，或具有 VEGF-D 生物学活性的其片段或类似物。

26、调节 VEGF-D 的受体结合特异性的方法，包括表达包括编码未加工的 VEGF-D 的核苷酸序列的表达载体，提供蛋白酶解量的至少一种用于加工所表达的未加工 VEGF-D 的酶，以产生蛋白酶解形式的 VEGF-D。

27、产生 VEGF-D 的蛋白酶解片段的方法，包括表达包括编码未加工的 VEGF-D 的核苷酸序列的表达载体，提供蛋白酶解量的至少一种用于加工所表达的未加工 VEGF-D 的酶，以产生蛋白酶解加工的 VEGF-D 片段。

28、在生物学样品中检测表达 VEGF-D 的肿瘤的方法，包括将所述样品与 VEGF-D 的特异结合试剂接触，保持一段时间以使所述特异结合试剂与 VEGF-D 结合，以及检测所述的结合。

29、权利要求 28 的在生物学样品中检测表达 VEGF-D 的肿瘤的方法，其中所述的特异结合试剂是第一抗体。

30、权利要求 29 的在生物学样品中检测表达 VEGF-D 的肿瘤的方法，其中所述的结合通过具有可检测标记的第二抗体检测。

31、治疗或减轻淋巴水肿的方法，包括给予有效刺激淋巴血管发生量的 VEGF-D，或具有 VEGF-D 生物学活性的其片段或类似物。

32、治疗或减轻银屑病的方法，包括给予有效抑制量的 VEGF-D 拮抗剂。

33、治疗或减轻硬皮病的方法，包括给予有效刺激内皮增殖量的 VEGF-D，或具有 VEGF-D 生物学活性的其片段或类似物。

34、治疗或减轻 anhydrotic ectodermal dysplasia 的方法，包括给予有效刺激血管化量的 VEGF-D，或具有 VEGF-D 生物学活性的

其片段或类似物。

35、刺激选自内皮细胞增殖、迁移、存活和分化以及不诱导血管通透性的淋巴血管发生的至少一种 VEGF-D 生物活性的方法，包括给予生物活性刺激量的完全加工的 VEGF-D。

36、稳定表达包括 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的多肽或具有 VEGF-D 的生物学活性的其片段或类似物的哺乳动物细胞系。

37、权利要求 36 的哺乳动物细胞系，其中由所述细胞系产生的多肽与附加表位相连。

38、权利要求 37 的哺乳动物细胞系，其中附加表位是 FLAG®、六组氨酸或 I-SPY™。

39、权利要求 37 或 38 的哺乳动物细胞系，其中附加表位是 FLAG®肽。

40、权利要求 36、37、38 或 39 的哺乳动物细胞系，其中所表达的多肽是 VEGF-D Δ N Δ C。

41、权利要求 36、37、38、39 或 40 的哺乳动物细胞系，其是 293-EBNA 人胎肾细胞系。

42、稳定表达 VEGF-D Δ FullNFlag、VEGF-D Δ FullCFlag、VEGF-D Δ N Δ C 或 VEGF-D Δ C 的哺乳动物细胞系。

43、权利要求 42 的哺乳动物细胞系，其是 293-EBNA 人胎肾细胞系。

44、权利要求 17 的方法，其中 VEGF-D 拮抗剂是特异与 VEGF-D 反应的嵌合抗体。