

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00808101.8

[51] Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 7 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1328376C

[22] 申请日 2000.4.10 [21] 申请号 00808101.8

[30] 优先权

[32] 1999. 4. 16 [33] US [31] 60/129,788

[32] 2000. 2. 23 [33] US [31] 60/184,235

[86] 国际申请 PCT/US2000/009483 2000.4.10

[87] 国际公布 WO2000/063380 英 2000.10.26

[85] 进入国家阶段日期 2001.11.26

[73] 专利权人 杰南技术公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 布赖恩·坎宁安 亚伯拉罕·德沃斯
李 冰

[56] 参考文献

CN1145636A 1997.3.19

WO9708313A1 1997.3.6

CN1185159A 1998.6.17

审查员 欧阳石文

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 3 页 说明书 48 页 附图 18 页

[54] 发明名称

血管内皮细胞生长因子变体及其应用

[57] 摘要

本发明提供了在天然 VEGF 序列上具有至少单个氨基酸突变且对 KDR 受体或 FLT-1 受体具有选择性结合亲和力的 VEGF 变体。还提供了制备 VEGF 变体的方法和使用 VEGF 变体的方法。

- 1、一种 VEGF 变体多肽，它含有
 - (a) 天然 VEGF 的氨基酸残基 D63 - L66 处的一个或多个氨基酸取代，
和
 - (b) 天然 VEGF 的氨基酸残基 F17 - Y25 处的一个或多个氨基酸取代，
其中残基 M18、Y21、Q22 或 Y25 中的至少一个被取代，
其中该 VEGF 变体多肽对 KDR 的结合与对 Flt-1 的结合的比例高于天然 VEGF 的该比例。
- 2、权利要求 1 的 VEGF 变体多肽，其中所述的氨基酸取代包含 D63S，G65M，G65A，L66T 或 L66R。
- 3、权利要求 1 的 VEGF 变体多肽，其中所述的氨基酸取代还包含：M18E，Y21L，Y21F，Q22R，Q22K，Q22E，Y25I 或 Y25S。
- 4、权利要求 2 的 VEGF 变体多肽，其中所述的氨基酸取代还包括：M18E，Y21L，Q22R 和 Y25S。
- 5、权利要求 1 的 VEGF 变体多肽，其中所述的氨基酸取代包括：D63S，G65M 和 L66R。
- 6、权利要求 5 的 VEGF 变体多肽，其中所述的氨基酸取代还包括：M18E，Y21L，Y21F，Q22R，Q22K，Q22E，Y25I 或 Y25S。
- 7、权利要求 5 的 VEGF 变体多肽，其中所述的氨基酸取代还包含 M18E，Y21L，Q22R 和 Y25S。
- 8、权利要求 1 的 VEGF 变体多肽，其包含下列氨基酸取代的组合：
 - (a) M18E，D63S，G65M和L66R；
 - (b) Y21L，D63S，G65M和L66R；
 - (c) Q22R，D63S，G65M和L66R；
 - (d) Y25S，D63S，G65M和L66R；
 - (e) M18E，Y21L，D63S，G65M和L66R；
 - (f) M18E，Q22R，D63S，G65M和L66R；
 - (g) M18E，Y25S，D63S，G65M和L66R；
 - (h) Y21L，Q22R，D63S，G65M和L66R；
 - (i) Y21L，Y25S，D63S，G65M和L66R；

- (j) Q22R, Y25S, D63S, G65M和L66R;
- (k) M18E, Y21L, Q22R, D63S, G65M和L66R;
- (l) M18E, Q22R, Y25S, D63S, G65M和L66R;
- (m) Y21L, Q22R, Y25S, D63S, G65M和L66R;
- (n) M18E, Y21L, Q22R, Y25S和D63S;
- (o) M18E, Y21L, Q22R, Y25S和G65M;
- (p) M18E, Y21L, Q22R, Y25S和L66R;
- (q) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, D63S和G65M;
- (r) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, D63S和L66R;
- (s) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, G65M和L66R; 或
- (t) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, D63S, G65M 和 L66R。

9、一种分离的核酸序列,其编码权利要求 1-8 之一的 VEGF 变体多肽。

10、包含权利要求 9 的核酸序列的载体。

11、包含权利要求 10 的载体的宿主细胞。

12、一种组合物,它含有权利要求 1-8 之一的 VEGF 变体多肽和一种载体。

13、权利要求 12 的组合物,其中所述的载体是一种药用上可接受的载体。

14、一种 VEGF 变体多肽,它含有天然 VEGF 的氨基酸残基 F17 - Y25 处的一个或多个氨基酸取代,其中所述氨基酸取代包括 M18E, Y21L, Y21F, Q22R, Q22K, Q22E, Y25I 或 Y25S 中的一或多个,且该 VEGF 变体多肽对 KDR 的结合与对 Flt-1 的结合的比例高于天然 VEGF 的该比例。

15、权利要求 14 的 VEGF 变体多肽,其中所述的氨基酸取代包含: M18E, Y21L, Q22R 和 Y25S。

16、权利要求 14 的 VEGF 变体多肽,其中所述的氨基酸取代包括: F17I, M18E, Y21F, Q22K 和 Y25S。

17、权利要求 14 的 VEGF 变体多肽,其中所述的氨基酸取代包括: F17I, M18E, Y21F, Q22E 和 Y25I。

18、一种分离的核酸序列,其编码权利要求 14-17 之一的 VEGF 变体多肽。

19、权利要求 1-8 或 14-17 任一项的 VEGF 变体多肽在制备刺激哺乳动

物血管发生或血管形成的药物中的应用。

20、权利要求 19 的应用，其中所述哺乳动物是人。

21、权利要求 1-8 或 14-17 任一项的 VEGF 变体多肽在制备促进哺乳动物内皮细胞增殖的药物中的应用。

22、权利要求 21 的应用，其中所述哺乳动物是人。

23、权利要求 21 的应用，其中所述内皮细胞围绕血管网络的创伤。

24、权利要求 23 的应用，其中所述创伤包含伤口或溃疡。

25、权利要求 24 的应用，其中所述伤口选自撕裂伤，切口，或血管穿刺。

26、权利要求 24 的应用，其中所述溃疡选自糖尿病性溃疡，血友病性溃疡或肿胀性溃疡。

血管内皮细胞生长因子变体及其应用

发明领域

本发明涉及血管内皮细胞生长因子(VEGF)变体, 制备所述变体的方法, 使用所述变体的方法, 组合物和测定法。更具体地说, 本发明涉及对 VEGF 受体, KDR 和 FLT-1 具有不同于天然 VEGF 的结合亲和力的 VEGF 变体。

发明背景

血管的两种主要细胞成分是内皮和平滑肌细胞。内皮细胞形成所有血管内表面的衬里并构成血液和组织之间的非血栓形成性界面。另外, 内皮细胞是形成新的毛细血管和血管的重要成分。因此, 内皮细胞在与肿瘤生长和转移以及各种非致瘤性疾病或紊乱相关的血管发生或新血管形成期间增生。

已报道各种天然存在的多肽诱导内皮细胞的增生。这些多肽中有碱性和酸性成纤维细胞生长因子(FGF), Burgess 和 Maciag, 生物化学年鉴, 58: 575(1989), 血小板衍生的内皮细胞生长因子(PD-ECGF), Ishikawa 等, 自然, 338: 557(1989)和血管内皮生长因子(VEGF), Leung 等, 科学, 246: 1306(1989); Ferrara 和 Henzel, 生物化学和生物物理研究通讯, 161: 851(1989); Tischer 等, 生物化学和生物物理研究通讯, 165: 1198(1989); Ferrara 等, PCT 专利公开号 WO90/13649(1990 年 11 月 15 日公开)。

VEGF 首先在牛垂体滤泡或滤泡星形细胞的条件培养基中证实。生化分析表明牛 VEGF 是二聚体蛋白质, 具有大约 45,000 道尔顿的表观分子量和具有对血管内皮细胞的表观促细胞分裂特异性。使用以该蛋白质氨基末端氨基酸序列为基础的寡核苷酸作杂交探针经过筛选从该细胞制备的 cDNA 文库分离了编码牛 VEGF 的 DNA。

使用牛 VEGF cDNA 作杂交探针经过首次筛选从人细胞制备的 cDNA

文库获得了人 VEGF。由此鉴定的一个 cDNA 编码与牛 VEGF 具有超过 95 % 同源性的 165 个氨基酸的蛋白质；该 165 个氨基酸的蛋白质一般称为人 VEGF(hVEGF)或 VEGF₁₆₅。经过在哺乳动物宿主细胞中表达人 VEGF cDNA 证实了人 VEGF 的促细胞分裂活性。用人 VEGF cDNA 转染的细胞为条件的培养基可促进毛细血管内皮细胞的增生，而对照细胞不能。[见 Leung 等，科学，246：1306(1989)]。

尽管可从天然来源分离和纯化血管内皮细胞生长因子用于随后的治疗用途，但回收 VEGF 时在滤泡细胞中相对低的该蛋白质浓度和在劳力和花费方面的高成本证实在商业上不可行。因此，进行了进一步的努力以便经过重组 DNA 技术来克隆和表达 VEGF。[参见，例如，实验室调查，72：615(1995)，并在此引用该参考文献]。

已报道 VEGF 用于治疗在不存在过度组织生长的情况下，对血管内皮细胞的选择性作用重要的病情，例如，糖尿病型溃疡和由诸如皮下伤口的创伤引起的血管损伤。VEGF，即血管(动脉和静脉)内皮细胞生长因子可恢复损伤的细胞(称为血管发生的过程)和可刺激新血管形成(称为血管形成的过程)。[参见，例如，Ferrara 等，内分泌学回顾，18：4-25(1997)]。

VEGF 在各种组织中由于可选择 RNA 剪接导致以多种同型二聚体形式表达(每个单体 121，165，189 和 206 个氨基酸)。VEGF₁₂₁ 是一种不结合肝素的可溶性促细胞分裂剂；更长的 VEGF 形式以逐渐更高的亲和力结合肝素。VEGF 的肝素结合形式可被纤溶酶在羧基末端裂解释放出 VEGF 的可扩散形式。纤溶酶裂解后鉴定的羧基末端肽的氨基酸测序为 Arg110-Ala111。氨基末端“核心”蛋白，即作为同型二聚体分离的 VEGF(1-110)与完整的 VEGF₁₆₅ 同型二聚体相比以相似的亲和力结合单克隆中和抗体(例如称为 4.6.1 和 3.2E3.1.1 的抗体)和 FLT-1 以及 KDR 受体的可溶性形式。

VEGF 含有分别负责结合 KDR(激酶结构域区)和 FLT-1(FMS 样酪氨酸激酶)受体的两个位点。据信这些受体仅存在于内皮(血管)细胞上。在由，例如创伤等引起的缺氧的细胞中 VEGF 生产增加，从而允许 VEGF 与各自的受体结合以触发产生生物学反应的信号途径。例如，VEGF 与该受体的结合可导致增加血管通透性，引起细胞分裂和扩展以形成新的血管通道，即血管发生和血管形成。[参见，例如，Malavaud 等，心血管研究，36：276-281(1997)]。据报道 VEGF 诱导的通过 KDR 受体的信号负责 VEGF 的

促细胞分裂效应且可能在很大程度上负责 VEGF 的血管形成活性。[Waltenberger 等, 生物学和化学杂志, 269: 26988 - 26995(1994)]。然而, FLT-1 的生物学作用尚未完全明白。

已鉴定了 VEGF 蛋白质与受体结合有关的位点或区域且发现位置接近。[参见, Weismann 等, 细胞, 28: 695 - 704(1997); Muller 等, 美国国家科学院院报, 94: 7192 - 7197(1997); Muller 等, 结构, 5: 1325 - 1338(1997); Fuh 等, 生物学化学杂志, 273: 11197 - 11204(1998)]。已发现 KDR 受体主要通过位于含有 VEGF 上第 82 位的精氨酸(Arg 或 R), 第 84 位的赖氨酸(Lys 或 K), 和第 86 位的组氨酸(His 或 H)的环上的位点结合 VEGF。已发现 FLT-1 受体主要通过位于含有第 63 位的天冬氨酸(Asp 或 D), 第 64 位的谷氨酸(Glu 或 E), 和第 67 位的谷氨酸(Glu 或 E)的环上的位点结合 VEGF。[Keyt 等, 生物学化学杂志, 271: 5638 - 5646(1996)]。根据 VEGF 的晶体结构和 VEGF 的 KDR 结合位点的功能定位, 还发现了 VEGF 使用位于分子相反端的两个对称结合位点结合 KDR 受体。每个位点由两个用于结合的“热点”组成, 该“热点”由 VEGF 同型二聚体的两个亚基上的残基组成。[Muller 等, 出处同上]。这些结合决定簇中的两个位于短的, 3-链 β -折叠上的决定簇热点内, 该 β -折叠在转化生长因子 β 2(TGF- β)和血小板衍生生长因子(PDGF)中是保守的。

已鉴定了相对于其它受体选择性地结合一种受体的某些 VEGF 相关分子。一种分子, 即 PlGF, 与 VEGF 的 PDGF 样结构域具有 53% 的相同性。PlGF 表现出以高亲和力结合 Flt-1 而不能与 KDR 反应。如文献所述, PlGF 在对内皮细胞的促细胞分裂活性中表现出极大的可变性[Maglione 等, 美国国家科学院院报, 88: 9267 - 9271(1991); Park 等, 生物学化学杂志, 269: 25646 - 25654(1994); Sawano 等, 细胞生长和分化, 7: 213 - 221(1996); Landgren 等, 癌基因, 16: 359 - 367(1998)]。

最近, Ogawa 等描述了一种编码与哺乳动物 VEGF 具有大约 25% 的氨基酸相同性的多肽(称为 VEGF-E)的基因。VEGF-E 在 Orf 病毒(NZ-7 菌株)基因组中鉴定, 该病毒是一种感染绵羊和山羊且偶尔也感染人类产生具有血管形成的病灶的副痘病毒。研究人员进行了细胞增生试验且报道了 VEGF-E 几乎以与人 VEGF 相同的程度刺激人脐静脉内皮细胞和大鼠肝窦状隙内皮细胞的生长。结合研究也有报道。经过将过度表达 KDR 受体或 FLT

-1 受体的细胞与固定量的 ^{125}I -标记的人 VEGF 或 VEGF-E 一起培养, 然后加入增加量的未标记的人 VEGF 或 VEGF-E 进行了竞争实验。研究人员报道了与 FLT-1 相比 VEGF-E 选择性地结合 KDR 受体。[Ogawa 等, 生物学化学杂志, 273: 31273-31281(1998)]。

Meyer 等, EMBO J., 18: 363-374(1999)也鉴定了 VEGF 家族的一个成员, 称为 VEGF-E。Meyer 等报道的 VEGF-E 分子在 Orf 病毒株 D1701 的基因组中鉴定。在体外, 发现 VEGF-E 刺激组织因子的释放且刺激血管内皮细胞的增生。在兔体内模型中, VEGF-E 刺激兔角膜中的血管形成。Meyer 等报道了 VEGF-E 分子结合特性的分析, 在一些测定中揭示了与 FLT-1 受体相比该分子选择性地结合 KDR 受体。也参见 Wise 等, 美国国家科学院院报, 96: 3071-3076(1999)。

Olofsson 等, 美国国家科学院院报, 95: 11709-11714(1998)报道了称为“VEGF-B”的蛋白质选择性地结合 FLT-1。研究人员公开了 VEGF-B 中 Asp63, Asp64 和 Glu67 残基突变成丙氨酸残基的诱变实验。对 VEGF-B 的突变形式的结合特性分析揭示突变蛋白表现出对 FLT-1 的亲和力降低。

发明简述

申请人鉴定了包括至少一个氨基酸突变(与天然 VEGF 的氨基酸序列相比), 特别是在氨基酸位置 17 至 25 和/或位置 63 至 65 处或之间至少一个氨基酸突变的 VEGF 变体。申请人还鉴定了在位置 43, 46, 79 或 83 处包括至少一个氨基酸突变(与天然 VEGF 的氨基酸序列相比), 特别是在位置 43, 46, 79 或 83 各处的氨基酸取代为丙氨酸的 VEGF 变体。申请人惊奇地发现各种 VEGF 变体对 KDR 和 FLT-1 受体表现出改变的结合亲和力(与天然 VEGF 相比), 而且对 KDR 受体或 FLT-1 受体表现出选择性结合亲和力。

本发明提供了包括至少一个氨基酸突变(与天然 VEGF 的氨基酸序列相比)且对 KDR 受体具有选择性结合亲和力的 VEGF 变体。可任选的是, 至少一个氨基酸突变包括天然 VEGF 多肽中的一个氨基酸取代。

在一个实施方案中, 本发明提供了在 VEGF 位置 17 至 25 处或之间包括至少一个氨基酸突变的 VEGF 变体。任选的是, 所述 VEGF 变体在位置

17 至 25 处或之间包括一个氨基酸取代。具体的氨基酸取代包括 F17I, M18E, Y21L, Y21F, Q22R, Q22K, Q22E, Y25S 或 Y25I。在一个优选的实施方案中, 所述 VEGF 变体在 VEGF 的位置 18 和/或 21 处包括至少一个氨基酸取代, 其中用谷氨酸取代 18 位的甲硫氨酸残基和/或用亮氨酸取代 21 位的酪氨酸残基。

在另一实施方案中, 本发明提供了在 VEGF 的第 63 至 66 位或之间含有至少一个氨基酸突变的 VEGF 变体。任选的是, 所述 VEGF 变体包括在位置 63 至 66 处或之间的一个氨基酸取代。具体的氨基酸取代包括 D63S, G65M, G65A, L66R 或 L66T。优选的 VEGF 变体在 VEGF 位置 63, 65, 和/或 66 处具有一个或多个氨基酸取代, 其中用丝氨酸取代 63 位的天冬氨酸残基, 用甲硫氨酸取代第 65 位的甘氨酸残基, 和/或用精氨酸取代 66 位的亮氨酸残基。

另一优选的 VEGF 变体包括在 VEGF 的第 63, 65, 和/或 66 位有多个(即, 一个以上)氨基酸突变和/或在 VEGF 第 17, 18, 21, 22 和/或 25 位的一处或多处有一个或多个氨基酸突变。更优选的是, VEGF 变体包含在 VEGF 的位置 18 和/或 21 处有一个或多个氨基酸取代(其中第 18 位用谷氨酸取代和/或第 21 位用亮氨酸取代)且在 VEGF 的位置 63, 65, 和/或 66 处有一个或多个氨基酸取代(其中第 63 位用丝氨酸取代, 第 65 位用甲硫氨酸取代, 和/或第 66 位用精氨酸取代)。更优选的是, VEGF 变体可包括下列氨基酸取代组中之一: M18E, Y21L, Q22R, Y25S; D63S, G65M, L66R; M18E, D63S, G65M, L66R; 或 Y21L, D63S, G65M, L66R。

在一个优选的实施方案中, VEGF 变体是含有包括本申请所述的一个或多个氨基酸取代的 VEGF₁₆₅ 氨基酸序列的多肽。

在表 2 中描述了其它的优选 VEGF 变体, 它们在 VEGF 序列的这些位置上含有多个氨基酸取代。

在另一实施方案中, 本发明提供的 VEGF 变体对 FLT-1 受体具有选择结合亲和力, 且优选所述 VEGF 变体在 43, 46, 79 或 83 位的一处或多处包括一个或多个氨基酸突变。优选的是, 所述 FLT-1 选择性 VEGF 变体在 VEGF 的第 43, 46, 79 和/或 83 位包括多个(即, 一个以上)氨基酸突变。更优选的是, 所述 FLT-1 选择性 VEGF 变体在 VEGF 的第 43, 46, 79 和/或 83 位包括一个或多个氨基酸取代成丙氨酸。最优选的是, 该 FLT-1 选

择性 VEGF 变体包含一组氨基酸取代：I43A，I46A，Q79A，和 I83A。

在另一方面，本发明提供了编码本文所述的 VEGF 变体的分离的核酸。还提供了能表达本发明的 VEGF 变体的表达载体，含有所述载体的宿主细胞，及通过在产生 VEGF 变体的条件下培养所述宿主细胞来生产 VEGF 变体的方法。

在另一实施方案中，本发明提供了含有 VEGF 变体和一种载体的组合物。任选的是，该载体可以是一种药用上可接受的载体。

本发明还提供了治疗需要血管发生或血管形成的病情的方法，例如，血管网络的创伤，如手术切口，伤口，撕裂伤，穿刺血管和表面溃疡。在这些方法中，可给具有所述病情的哺乳动物施用有效量的 VEGF 变体。

本发明还提供了使用该 VEGF 变体的体外诊断方法。在一个实施方案中，所述方法包括使用 VEGF 变体分析细胞或组织以检测是否存在 KDR 和/或 FLT-1 受体。

最后，本发明提供了含有本文所公开的 VEGF 变体的试剂盒和产品。

附图简述

图 1A 和 1B 显示了 165 个氨基酸的天然(“野生型”)VEGF 的核苷酸序列(SEQ ID NO:3)和推断的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)。

图 2 显示了天然 VEGF(8-109)的 ELISA 测定的滴定曲线。

图 3 显示了天然 VEGF(8-109)的 KIRA 测定的滴定曲线。

图 4 显示了天然 VEGF(8-109)的 HUVEC 增生试验测定的滴定曲线。

图 5 显示了通过使用各种浓度的天然 VEGF(“WT VEGF”), LK-VRB-2s*(KDR 选择性变体)和 Flt-1-sel(Flt-1 选择性变体)从表达 KDR 的 NIH3T3 细胞竞争性取代 ^{125}I -VEGF(1-165)所测量的配体对 KDR 的结合亲和力。该测定法在实施例 7 中详细描述。各点代表两次测定的平均值，据估计误差小于该值的 15%。

图 6 显示了通过使用各种浓度的天然 VEGF(“WT VEGF”), LK-VRB-2s*(KDR 选择性变体)和 Flt-1-sel(Flt-1 选择性变体)从表达 FLT-1 的 NIH3T3 细胞竞争性取代 ^{125}I -VEGF(1-165)所测量的配体对 Flt-1 的结合亲和力。该测定法在实施例 7 中详细描述。各点代表两次测定的平均值，估

计误差小于该值的 15 %。

图 7 显示了鉴定各种 VEGF 丙氨酸取代变体在结合中的倍数下降表。如实施例 8 所述，用各种丙氨酸变体进行蛋白质 ELISA。对各残基列出了变体的 IC_{50} 与天然 VEGF (1-109) 的 IC_{50} 的比率，代表与天然 VEGF 相比变体结合的倍数下降。天然 VEGF (1-109) 的 IC_{50} 在括号中表示。以黑体字表示的残基用于产生 Flt-1 选择性变体。为了产生 KDR 选择性变体，将突变区分成所示的 5 组，使用前 4 组构建文库用于随后的噬菌体展示选择。对星号(*)标记的残基软随机化(soft randomized)为针对野生型的 50 % 偏差(bias)，对两个星号标记的残基进行硬性随机化(hard randomized)。

图 8A 显示了放射免疫受体结合试验(RIA)的结果，其中显示了 Flt-1 选择性变体(“Flt-1-sel”)的 KDR 结合亲和力下降了至少 470 倍。还显示了天然 VEGF(“WT VEGF”)的结合亲和力。各点代表两次测定的平均值，估计误差小于该值的 15 %。

图 8B 显示了放射免疫受体结合试验(RIA)的结果，其中显示了 Flt-1 选择性变体(“Flt-1-sel”)对 FLT-1 的结合亲和力与天然 VEGF(“WT VEGF”)表现出的结合亲和力相似。各点代表两次测定的平均值，估计误差小于该值的 15 %。

图 9 显示了测量天然 VEGF(“WT VEGF”)和 Flt-1 选择性变体(“Flt-1-sel”)诱导 KDR 磷酸化的能力的 KIRA 分析结果。

图 10 显示了测量天然 VEGF(“WT VEGF”)和 Flt-1 选择性变体(“Flt-1-sel”)诱导 HUVEC 细胞增生的能力的 HUVEC 增生试验结果。各数据点是三次实验的平均值，估计的误差为 10 - 20 %。

图 11 显示了测定天然 VEGF，LK - VRB - 2s*(KDR 选择性变体)，Flt-sel(Flt-1 选择性变体)，和 P1GF 刺激人 ASMC 细胞的 MMP - 9 分泌的能力的明胶酶谱分析结果。所示的酶谱是两个独立实验之一。倍数改变代表相对带密度。

图 12A 和 12B 显示了为测定天然 VEGF(“WT VEGF”)， Flt-sel (Flt-1 选择性变体),和 KDR 选择性变体(“KDR - sel”)对 MAP 激酶的激活所进行的 Western 印迹分析。该测定在实施例 10 中详细描述。

图 13A 和 13B 显示了为测定天然 VEGF(“wt”或“VEGF”)，KDR 选择性变体(“KDR - sel”),和 Flt-1 选择性变体 (“Flt-sel”)和 KDR 在 PLC

- γ 和 PI3'-激酶磷酸化中的作用所进行的 Western 印迹分析。该测定在实施例 11 中详细描述。

图 14A 和 14B 所示的柱状图显示了在改良的 Boyden 室中进行的 HUVEC 迁移试验的结果。图 14A 显示了以所示浓度的天然 VEGF(“wt”), Flt-选择性变体(“Flt-sel”),和 KDR 选择性变体(“KDR-sel”)获得的 HUVEC 迁移。图 14B 显示了在应答天然 VEGF(“VEGF”)时加入 PI3'-激酶抑制剂(“LY”)对 HUVEC 迁移的不利影响的实验结果。实验进行一式三份,且误差线段代表标准误差。

图 15A 和 15B 显示了体内角膜囊血管形成试验的结果。图 15A 中的玻片显示了应答对照处理,天然 VEGF(“VEGF”), KDR-选择性变体和 Flt-选择性变体时角膜血管形成程度的代表性例子。图 15B 显示了由对照处理,天然 VEGF(“VEGF”), KDR-选择性变体(“KDR-sel”), Flt-1 选择性变体(“Flt-sel”),和 PlGF 引起的角膜血管形成的表面积定量分析。

本发明的详细描述

A.定义

本文使用的术语“VEGF”和“天然 VEGF”是指 Leung 等,科学, 246: 1306(1989)和 Houck 等, 分子内分泌学, 5: 1806(1991)所述,(且已在图 1A 和 1B 中提供)的 165 个氨基酸的血管内皮细胞生长因子和相关的 121-, 189-和 206 个氨基酸的血管内皮细胞生长因子, 及其天然存在的等位基因形式和加工形式。术语“VEGF”和“天然 VEGF”也用于指含有 165 个氨基酸的血管内皮细胞生长因子的氨基酸 8 至 109 或 1 至 109 的截短形式。VEGF 的任意这类形式在本申请中可用例如,“VEGF(8-109)”,“VEGF(1-109)”或“VEGF165 或 VEGF(1-165)”来表示。“截短的”天然 VEGF 的氨基酸位置按天然 VEGF 序列中所示编号。例如,截短的天然 VEGF 中氨基酸位置 17(甲硫氨酸)在天然 VEGF 中也是位置 17(甲硫氨酸)。截短的天然 VEGF 优选具有相当于天然 VEGF 的对 KDR 和 FLT-1 受体的结合亲和力。

本文使用的术语“VEGF 变体”是指在天然 VEGF 序列中包括一个或多个氨基酸突变且对 KDR 受体或 FLT-1 受体具有选择性结合亲和力的 VEGF 多肽。在一个实施方案中,对 KDR 受体具有选择性结合亲和力的

VEGF 变体在天然 VEGF 序列的第 17 至 25 和/或 63 至 66 位中任一处有一个或多个氨基酸突变。任选的是，一个或多个氨基酸突变包括氨基酸取代。优选的 KDR 选择性 VEGF 变体包括一个或多个氨基酸突变并且对 KDR 受体表现出的结合亲和力等于或大于($\geq$)天然 VEGF 对 KDR 受体的结合亲和力，且更优选的是，VEGF 变体表现出对 FLT-1 受体的结合亲和力小于($<$)天然 VEGF 对 FLT-1 表现出的结合亲和力。当该 VEGF 变体对 KDR 受体的结合亲和力与天然 VEGF 相比大约相等(不变)或更大(增加)，且该 VEGF 变体对 FLT-1 受体的结合亲和力与天然 VEGF 相比更小或几乎消失时，本文中认为该 VEGF 变体对 KDR 受体的结合亲和力是“选择性”的。本发明优选的 KDR 选择性 VEGF 变体对 FLT-1 受体的结合亲和力至少低 10 倍(与天然 VEGF 相比)，更优选的是，对 FLT-1 受体的结合亲和力至少低 100 倍(与天然 VEGF 相比)。用本领域已知的且在下面实施例中将进一步描述的 ELISA，RIA，和/或 BIAcore 测定法可测定 VEGF 变体各自的结合亲和力。本发明优选的 KDR 选择性 VEGF 变体在反映诱导 KDR 受体磷酸化的能力的 KIRA 测定法(如实施例中所述)中也表现出活性。本发明优选的 KDR 选择性 VEGF 变体另外或任选可诱导内皮细胞增生(可用本领域已知方法，如实施例中的 HUVEC 增生测定法测定)。目前相信内皮细胞增生的诱导是经过 KDR 受体进行信号传递的结果。

在一个实施方案中，对 FLT-1 受体具有选择性结合亲和力的 VEGF 变体包括在天然 VEGF 序列的第 43，46，79 或 83 位中任一处有一个或多个氨基酸突变。任选的是，一个或多个氨基酸突变包括氨基酸取代，且优选的是，氨基酸取代成丙氨酸。优选的 FLT-1 选择性 VEGF 变体包括一个或多个氨基酸突变并对 FLT-1 受体表现出的结合亲和力等于或大于($\geq$)天然 VEGF 对 FLT-1 受体的结合亲和力，且更优选的是，该 VEGF 变体表现出对 KDR 受体的结合亲和力小于($<$)天然 VEGF 对 KDR 表现出的结合亲和力。当该 VEGF 变体对 FLT-1 受体的结合亲和力与天然 VEGF 相比大约相等(不变)或更大(增加)，且该 VEGF 变体对 KDR 受体的结合亲和力与天然 VEGF 相比更小或几乎消失时，本文中认为该 VEGF 变体对 FLT-1 受体的结合亲和力是“选择性”的。本发明优选的 FLT-1 选择性 VEGF 变体对 KDR 受体的结合亲和力至少低 10 倍(与天然 VEGF 相比)，更优选的是，对 KDR 受体的结合亲和力至少低 100 倍(与天然 VEGF 相比)。用本领域

域已知的且在下面实施例中将进一步描述的 ELISA, RIA, 和/或 BIAcore 测定法可测定该 VEGF 变体各自的结合亲和力。

为了速记本文所述的 VEGF 变体的名称, 应注意数字是指沿推断的天然 VEGF 氨基酸序列的氨基酸残基的位置(参见 Leung 等, 出处同上和 Houck 等, 出处同上)。氨基酸标识符使用氨基酸的单字母代码, 即:

Asp	D	天冬氨酸	Ile	I	异亮氨酸
Thr	T	苏氨酸	Leu	L	亮氨酸
Ser	S	丝氨酸	Tyr	Y	酪氨酸
Glu	E	谷氨酸	Phe	F	苯丙氨酸
Pro	P	脯氨酸	His	H	组氨酸
Gly	G	甘氨酸	Lys	K	赖氨酸
Ala	A	丙氨酸	Arg	R	精氨酸
Cys	C	半胱氨酸	Trp	W	色氨酸
Val	V	缬氨酸	Gln	Q	谷氨酰胺
Met	M	甲硫氨酸	Asn	N	天冬酰胺

“可操作连接”指并列后能执行成份的正常功能。因此, 编码序列“可操作连接”到调控序列上是指这样一种构象, 即其中在这些序列的调控下可表达该编码序列且其中被连接的 DNA 序列是连续的, 且对于分泌型先导序列, 是连续的并在阅读相中。例如, 如果 DNA 以参与多肽分泌的前蛋白的形式进行表达, 那么前序列或分泌型先导序列的 DNA 与多肽的 DNA 可操作连接; 如果启动子或增强子影响编码序列的转录, 则它们是与编码序列可操作连接的; 或如果核糖体结合位点的位置有助于翻译, 则它与编码序列可操作连接。连接可在常规限制性位点进行。如果不存在该位点, 可按常规实践使用合成寡核苷酸衔接子或接头。

“调控序列”是指为了在具体宿主生物中表达可操作连接的编码序列所必须的 DNA 序列。适用于原核生物的调控序列包括, 例如, 启动子, 任选的操纵子序列和核糖体结合位点。已知真核生物利用启动子, 多聚腺苷化信号, 和增强子。

“表达系统”指含有可操作连接的目的编码序列和对照序列的 DNA 序列, 使得用这些序列转化的宿主能产生所编码的蛋白质。为了实现转化, 表达系统可包含在一个载体中; 然而, 也可将有关 DNA 整合进宿主染色体

中。

本文所用的“细胞”，“细胞系”，和“细胞培养物”可互换所用且所有这些定义包括后代。因此，“转化子”或“转化细胞”包括原代试验细胞和由其产生的培养物而不考虑转移的次数。还应明白所有后代在DNA成份上可以并不精确相同，因为可能出现故意的或无心的突变。应包括在原始转化细胞中筛选的具有相同功能的突变后代。如果意指不同的定义，从内容上将是清楚的。

“质粒”以前面的小写字母“p”和/或随后的大写字母和/或数字表示。本文的起始质粒是可买到的，在不受限制的基础上可公开获得的，或可用公开的方法从这类可获得的质粒构建的。另外，其它的等价质粒在本领域中是已知的且对普通技术人员而言是显而易见的。

本文所用的术语“VEGF受体”是指VEGF的细胞受体，一般是在血管内皮细胞上发现的细胞表面受体，及其保留结合VEGF之能力的片断和变体(例如，受体细胞外结构域的片断或截短形式)。VEGF受体的一个例子是fmz样酪氨酸激酶(FLT或FLT-1)，酪氨酸激酶家族的跨膜受体。本申请中所用的术语“FLT-1受体”指诸如 DeVries 等，科学，255：989(1992)；和 Shibuya 等，癌基因，5：519(1990)所述的 VEGF 受体。全长 FLT-1 受体包含胞外结构域，跨膜区，和具有酪氨酸激酶活性的胞内结构域。胞外结构域涉及 VEGF 的结合，而胞内结构域涉及信号转导。VEGF 受体的另一例子是 KDR 受体(也称为 FLK-1)。本申请所用的术语“KDR 受体”指诸如 Matthews 等，美国国家科学院院报，88：9026(1991)；和 Terman 等，癌基因，6：1677(1991)；Terman 等，生物化学和生物物理学研究通讯，187：1579(1992)所述的 VEGF 受体。

“治疗”是指治疗性处理和预防性或防止性措施，其中目的是防止或延缓(缓解)靶向的病理学情况或疾病。需要治疗的个体包括已具有该疾病的个体以及倾向于具有该疾病的个体或需要防止该疾病的个体。

“慢性”用药指相对于急性方式以连续的方式施用药剂，以便在更长的时间段内维持起始治疗效果(活性)。间歇性用药是指不中断的不连续进行且具有周期性特点的治疗。

作为治疗目标的“哺乳动物”是指分类为哺乳动物的任何动物，包括人类，家养和农场动物，和动物园，运动场或宠物动物，例如狗，猫，奶

牛，马，绵羊或猪。优选的是，哺乳动物是人类。

与一种或多种其它治疗剂“组合”用药包括同时(并存)和以任意顺序连续用药。

B.方法和组合物

1.VEGF 变体的制备

经过在 VEGF DNA 中进行突变可制备 VEGF 的氨基酸序列变体。例如，所述变体包括在 Leung 等，出处同上和 Houck 等，出处同上所示的氨基酸序列内的残基缺失，插入或取代。可对缺失，插入和取代作出任意组合以获得具有所需活性的最终构建体。显然，在编码变体的 DNA 中进行的突变不必将该序列放在阅读框外且优选不构建能产生二级 mRNA 结构的互补区域[见 EP75444A]。

任选的是，经过在编码天然 VEGF 的 DNA 中进行核苷酸定点诱变或噬菌体展示技术，从而产生编码变体的 DNA 并随后在重组细胞培养物中表达该 DNA 可制备 VEGF 变体。

尽管导入氨基酸序列变异的位点是预定的，但突变本身不必预定。例如，为了最优化给定位点的诱变效果，可在靶密码子或靶区域进行随机诱变并对表达的 VEGF 变体筛选所需活性的最佳组合。在具有已知序列的 DNA 的预定位点作出取代突变的技术是熟知的，例如，定点诱变。

优选经过诸如实施例 1 所述的噬菌体展示技术实现本文所述的 VEGF 变体的制备。

选出所述克隆后，可取出突变的蛋白质区域并放入用于蛋白质生产的合适载体中，一般是可用于转化合适宿主的表达载体类型。

氨基酸序列缺失的范围一般从 1 至 30 个残基，更优选的是 1 至 10 个残基，且一般是连续的。

氨基酸序列插入包括一个残基到基本上不限长度的多肽融合到氨基和/或羧基末端以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。序列内插入(即，天然 VEGF 序列内插入)的范围一般是从 1 到 10 个残基，优选 1 到 5 个残基。末端插入的例子包括对宿主细胞而言为异源性的或者同源性的信号序列融合到 N-末端以利于从重组宿主中分泌。

其它的 VEGF 变体是天然 VEGF 中至少一个氨基酸残基被去掉且在其

位置插入一个不同的残基的变体。该取代可按照表 1 所示制备。

表 1

原残基	取代举例
Ala(A)	gly;ser
Arg(R)	lys
Asn(N)	gln;his
Asp(D)	glu
Cys(C)	ser
Gln(Q)	asn
Glu(E)	asp
Gly(G)	ala;pro
His(H)	asn;gln
Ile(I)	leu;val
Leu(L)	ile;val
Lys(K)	arg;gln;glu
Met(M)	leu;tyr;ile
Phe(F)	met;leu;tyr
Ser(S)	thr
Thr(T)	ser
Trp(W)	tyr
Tyr(Y)	trp;phe
Val(V)	ile;leu

经过选择比表 1 中所示更不保守的取代可产生功能或免疫学同一性的改变，即，选择在其对维持(a)取代区域多肽骨架的结构，例如，折叠或螺旋构象，(b)靶位点的分子电荷或疏水性，或(c)侧链的大小的影响上区别更明显的残基。一般预期在 VEGF 变体特性中产生最大改变的取代是(a)甘氨酸和/或脯氨酸(P)被另一氨基酸取代或被缺失或插入；(b)亲水残基，例如，丝氨酰基或苏氨酰基取代疏水残基，例如，亮氨酰基，异亮氨酰基，苯丙氨酰基，缬氨酰基或丙氨酰基或被其取代；(c)半胱氨酸残基取代任意其它残基或被其取代；(d)带正电荷侧链的残基，例如，赖氨酰基，精氨酰基或组氨酰基取代带负电荷的残基，例如，谷氨酰基或天冬氨酰基或者被其取

代；(e)带负电荷侧链的残基取代带正电荷的残基或者被其取代；或(f)具有大型侧链的残基，例如，苯丙氨酸被不具有这类侧链的残基，例如，甘氨酸取代或者被其取代。

本领域的技术人员使用常规筛选试验可容易地评估取代，缺失或插入的效果。例如，可在重组细胞培养物中表达，且任选从细胞培养物中纯化噬菌体展示选择的 VEGF 变体。然后可评估 VEGF 变体的 KDR 或 FLT-1 受体结合亲和力和其它生物学活性，例如本申请中所公开的那些生物学活性。可在用于所需特征的合适筛选试验中筛选细胞裂解产物或纯化的 VEGF 变体的结合特性或活性。例如，与天然 VEGF 相比，VEGF 变体的免疫学特征，例如，对给定抗体的亲和力的改变可能是所需要的。可用按照本领域的已知技术进行的竞争性免疫测定来测量该改变。可用本领域已知的且在下面实施例中进一步描述的 ELISA, RIA 和/或 BIAcore 试验来测定 VEGF 变体各自的受体结合亲和力。本发明优选的 VEGF 变体在反映诱导 KDR 受体磷酸化能力的 KIRA 测定(例如实施例中所述)中也显示出活性。本发明优选的 VEGF 变体另外或者任选诱导内皮细胞增生(可用本领域已知方法，例如实施例中的 HUVEC 增生试验测定)。

用本领域已知的技术，例如重组方法可制备 VEGF 变体。这些方法中使用的分离的 DNA 在本文中理解为具有或不含 3' 和/或 5' -侧翼区的化学合成的 DNA, cDNA, 染色体或者染色体外 DNA。优选的是，经过在重组细胞培养物中合成可制备本文的 VEGF 变体。

对于这类合成，首先必须获得编码 VEGF 或者 VEGF 变体的核酸。编码 VEGF 分子的 DNA 可从牛垂体滤泡细胞获得，方法是(a)从这些细胞制备 cDNA 文库，(b)用编码 VEGF 或其片断的标记 DNA(长度达到或者超过 100 个碱基对)进行杂交分析以检测文库中含有同源序列的克隆，和(c)以限制性酶分析和核酸测序来分析克隆以鉴定全长克隆。如果在 cDNA 文库中不存在全长克隆，那么可使用本文首次公开的核酸序列信息从各种克隆回收合适的片断并在这些克隆共有的限制性位点连接以装配编码 VEGF 的全长克隆。另外，基因组文库可提供所需的 DNA。

一旦从文库中鉴定并分离出该 DNA，将它连接进可复制载体中用于进一步克隆或者用于表达。

在一个重组表达系统的例子中，在经过用含有编码 VEGF 的 DNA 的

表达载体转化的细胞系统中表达编码 VEGF 的基因。优选转化能实现该方法的宿主细胞以便在培养基或宿主细胞周质中获得该 VEGF，即获得分泌分子。

“转染”是指表达载体被宿主细胞吸收，而不论事实上是否表达任何编码序列。许多转染方法对于普通技术人员而言是已知的。例如， CaPO_4 和电穿孔。当在宿主细胞内出现该载体的任何作用迹象时一般认为转染成功。

“转化”是指作为染色体外成份或者经过染色体整合将 DNA 导入生物以便该 DNA 能够复制。根据所用的宿主细胞，使用适合于该细胞的标准技术进行转化。Cohen，美国国家科学院院报，69：2110(1972)和 Mandel 等，分子生物学杂志，53：154(1970)所述的采用氯化钙的钙处理一般用于原核或其它含有大量细胞壁障碍的细胞。对于没有该细胞壁的哺乳动物细胞，优选 Graham 和 van der Eb，病毒学，52：456-457(1978)的磷酸钙沉淀法。Axel 在 1983 年 8 月 16 日出版的美国专利号 4399216 中已经描述了哺乳动物细胞宿主系统转化的一般情况。转化进酵母一般按照 Van Solingen 等，细菌杂志，130：946(1977)和 Hsiao 等，美国国家科学院院报，76：3829(1979)的方法进行。然而，也可使用诸如经过核注射或经过原生质融合将 DNA 导入细胞的其它方法。

本文公开的载体和方法适合于在原核和真核生物大范围内的宿主细胞中使用。

当然，一般来说，优选原核生物用于 DNA 序列的起始克隆和用于本发明的载体构建。例如，大肠杆菌 K12 菌株 MM294(ATCC 31,446)是特别有用的。可使用的其它微生物菌株包括大肠杆菌菌株，例如大肠杆菌 B 和大肠杆菌 X1776(ATCC 31537)。当然，这些例子是用于说明而不是限制。

原核生物也可用于表达。可使用上述菌株，以及大肠杆菌菌株 W3110(F⁻， λ ⁻，原养型，ATCC 27,325)，K5772(ATCC 53635)，和 SR101，诸如枯草芽孢杆菌等芽孢杆菌和诸如鼠伤寒沙门氏菌或粘质沙雷氏菌等肠杆菌科其它细菌，和各种假单胞菌属的种。

一般来说，含有来自与宿主细胞相适合的种类的复制子和调控序列的质粒载体与这些宿主结合使用。载体一般携带复制位点以及可在转化细胞中提供表型选择的标记序列。例如，大肠杆菌一般使用 pBR322，一种来自

大肠杆菌种类的质粒进行转化[参见, 例如, Bolivar 等, 基因, 2: 95(1977)]。pBR322 含有氨苄青霉素和四环素抗性基因且因此提供了鉴定转化细胞的简便方法。pBR322 质粒, 或其它微生物质粒或噬菌体也必须含有, 或被修饰成含有微生物用于其自身蛋白质表达的启动子。

最常用于重组 DNA 构建的启动子包括 β -内酰胺酶(青霉素酶)和乳糖启动子系统[Chang 等, 自然, 375: 615(1978); Itakura 等, 科学, 198: 1056(1977); Goeddel 等, 自然, 281: 544(1979)]及色氨酸(trp)启动子系统[Goeddel 等, 核酸研究, 8: 4057(1980); EPO 申请公开号 0036776]。尽管这些是最常用的, 已发现并使用了其它的微生物启动子, 并且已公开了其核苷酸序列的详情, 技术人员能够将它们与质粒载体可操作连接[参见, 例如, Siebenlist 等, 细胞, 20: 269(1980)]。

除了原核生物外, 也可使用真核微生物, 例如酵母培养物。尽管许多其它菌株通常是可得到的, 但酿酒酵母, 或常见的面包酵母在真核微生物中是最常用的。为了在糖酵母属中表达, 常用质粒 YRp7[Stinchcomb 等, 自然, 282: 39(1979); Kingsman 等, 基因, 7: 141(1979); Tschemper 等, 基因, 10: 157(1980)]。该质粒已含有 trp1 基因, 该基因可以为在色氨酸中缺乏生长能力的酵母突变菌株, 例如, ATCC 44076 或 PEP4-1[Jones, 遗传学, 85: 12(1977)]提供选择标记。trp1 损伤的出现作为酵母宿主细胞基因组的一个特征提供了经过在不含色氨酸下生长来检测转化的有效环境。

酵母载体中合适的启动序列包括 3-磷酸甘油酸激酶 [Hitzeman 等, 生物学化学杂志, 255: 2073(1980)]或其它糖酵解酶[Hess 等, 酶研究进展杂志, 7: 149(1968); Holland 等, 生物化学, 17: 4900(1978)], 例如烯醇化酶, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 己糖激酶, 丙酮酸脱羧酶, 磷酸果糖激酶, 葡萄糖-6-磷酸异构酶, 3-磷酸甘油酸变位酶, 丙酮酸激酶, 丙糖磷酸异构酶, 磷酸葡萄糖异构酶和葡萄糖激酶的启动子。在构建合适的表达质粒时, 与这些基因相关的终止序列也连接进表达载体中需要表达的序列的 3' 端以提供 mRNA 的多聚腺苷化和终止。具有受生长条件控制的附加转录优势的其它启动子是乙醇脱氢酶 2, 同种细胞色素(isocytochrome)C, 酸性磷酸酶, 与氮代谢相关的降解酶和前述甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区域。含有酵母适用性启动子, 复制原点和终止序列的任意质粒载体都是合适的。

除了微生物外，来自多细胞生物的细胞培养物也可用作宿主。原则上，任何这类细胞培养物都是可行的，无论来自脊椎动物或是无脊椎动物的培养物。然而，最感兴趣的是脊椎动物细胞且最近几年在培养物(组织培养物)中脊椎动物细胞的繁殖已成了常规方法[组织培养，学术出版社，Kruse 和 Patterson,编辑(1973)]。这类有用的宿主细胞系的例子是 VERO 和 Hela 细胞，中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系，和 W138，BHK，COS-7，293，和 MDCK 细胞系。这类细胞的表达载体通常包括(如果需要)复制原点，位于待表达的基因之前的启动子，以及任意必须的核糖体结合位点，RNA 剪接位点，多聚腺苷化位点和转录终止子序列。

为用于哺乳动物细胞，通常由病毒材料提供对表达载体的调控功能。例如，常用的启动子来自多瘤病毒，腺病毒 2，最常见的来自猴病毒 40(SV40)。特别有用的是 SV40 病毒的早期和晚期启动子，因为两者都容易从病毒中作为也含有 SV40 病毒复制原点的片断获得[Fiers 等，自然，273: 113(1978)]。也可使用更小或更大的 SV40 片断，只要它包括从位于病毒复制原点上的 HindIII 位点到 BglII 位点的大约 250-bp 的序列。而且，还可以且通常需要使用正常情况下与目的基因序列相关的启动子或调控序列，前提是该调控序列与宿主细胞系统相容。

经过构建包括异源性原点，例如可来自 SV40 或其它病毒(例如，多瘤病毒，腺病毒，VSV，BPV)来源的原点的载体可提供复制原点，或者由宿主细胞染色体复制机制提供复制原点。如果载体整合进宿主细胞染色体，后者通常就足够。

细胞培养物可产生满意量的蛋白质，然而，使用第二编码序列的设计可用于进一步增强生产水平。第二编码序列包括二氢叶酸还原酶(DHFR)，它受诸如氨甲蝶呤(MTX)的外部控制参数的影响，因此允许经过控制氨甲蝶呤的浓度来控制表达。

为了用本发明的含有编码 VEGF 和 DHFR 蛋白质两者的 DNA 序列的载体进行转染，在选择优选的宿主细胞时，合适的情况是根据所用的 DHFR 蛋白质的类型来选择宿主。如果使用野生型 DHFR 蛋白质，优选选择 DHFR 缺陷型宿主细胞，从而允许使用 DHFR 编码序列作为在缺乏次黄嘌呤，甘氨酸和胸苷的选择培养基中成功转染的标记。在这种情况下合适的宿主细胞是按 Urlaub 和 Chasin，美国国家科学院院报，77: 4216(1980)所述制备

和繁殖的 DHFR 活性缺陷型中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

另一方面，如果对 MTX 具有低结合亲和力的 DHFR 蛋白质用作调控序列，则不必使用 DHFR 缺陷型细胞。由于突变型 DHFR 对氨甲蝶呤有抗性，可使用含有 MTX 的培养基作为选择工具，前提是宿主细胞本身是氨甲蝶呤敏感性。能吸收 MTX 的大多数真核细胞表现出氨甲蝶呤敏感性。一个这类有用的细胞系是一种 CHO 细胞系，CHO-K1(ATCC CCL 61)。

采用标准连接技术构建含有所需编码序列和调控序列的合适载体。裂解分离的质粒或 DNA 片断，剪切并以所需形式再连接以制备所需的质粒。

如果需要平端，用 10 单位的聚合酶 I(Klenow)在 15℃ 下处理制剂 15 分钟，酚-氯仿提取，并乙醇沉淀。

裂解片断的大小分离可使用，例如，Goeddel 等，核酸研究，8:4057(1980)所述的 6% 聚丙烯酰胺凝胶进行。

为了证实在质粒中构建了正确的序列，一般使用连接混合物转化大肠杆菌 K12 菌株 294(ATCC 31446)或其它合适的大肠杆菌菌株，且如果合适，以氨苄青霉素或四环素抗性选择成功的转化子。按 Messing 等，核酸研究，9:309(1981)的方法或 Maxam 等，酶学方法，65:499(1980)的方法从转化子制备质粒并经过限制性酶切图谱和/或 DNA 测序进行分析。

DNA 导入哺乳动物细胞宿主并在培养基中选择稳定转染子后，经过在大约 20000 - 500000nM 浓度的氨甲蝶呤(MTX, DHFR 活性的竞争性抑制剂)存在下培养宿主细胞培养物来实现 DHFR - 蛋白质 - 编码序列的扩增。当然，浓度的有效范围高度依赖于 DHFR 基因的性质和宿主的特征。显而易见，不能确定一般定义的上限和下限。也可使用抑制 DHFR 的其它叶酸类似物或其它化合物的合适浓度。然而，MTX 本身是方便，容易获得和有效的。

2. VEGF 变体的共价修饰

本发明的 VEGF 也可包含进一步的修饰。例子包括对一个或多个氨基酸残基的共价修饰。例如，半胱氨酰残基可与卤代乙酸(和相应的胺)，例如氯乙酸或氯乙酰胺反应以产生羧甲基或羧基酰胺甲基衍生物。半胱氨酰残基经过与溴三氟丙酮； β -溴-(5-imidazolyl)丙酸；氯乙酰磷酸；N-烷基马来酰亚胺；3-硝基-吡啶基二硫化物；甲基 2-吡啶基二硫化物；对氯汞苯甲酸；2-氯汞-4-硝基苯酚；或氯-7-硝基苯并-2-噁-1,3-二

唑反应也可衍化。

另一例子包括使组氨酰残基与焦碳酸二乙酯在 pH5.5-7.0 下反应而衍生化。对 - 溴苯甲酰甲基溴化物，一种优选在 0.1M 二甲胍酸钠 pH6.0 下进行的反应也是有用的。

赖氨酰残基和氨基末端残基可与琥珀酸酐或其它羧酸酐反应。用这些试剂衍化具有逆转赖氨酰残基的电荷的效果。适于衍化含 β -氨基的残基的其它试剂包括诸如甲基吡啶甲酰亚氨酸酯(picolinimide)等亚氨酸酯；磷酸吡哆醛；吡哆醛；氯氢硼化物；三硝基苯磺酸；O-甲基异脲；2,4-戊二酮；和与乙醛酸的由转氨酶催化的反应。

精氨酰残基经过与选自苯甲酰甲醛，2,3-丁二酮，1,2-环己二酮，和茚三酮的一种或几种常规试剂反应可修饰。这些试剂也可用于修饰赖氨酸的 ϵ -氨基。精氨酸残基的衍生化应在碱性条件下进行，因为胍官能团具有高 pKa。

酪氨酰残基本身的特异性修饰已被广泛研究，尤其对于经过与芳香族重氮化合物或四硝基甲烷反应将光谱标记引入酪氨酰残基特别感兴趣。最常见的是，使用 N-acetylimidazole 和四硝基甲烷分别形成 O-乙酰酪氨酰类和 3-硝基衍生物。经过，例如，使用下文所述的氯胺 T 方法，使用 ^{125}I 或 ^{131}I 可对酪氨酰残基进行碘标记，从而制备标记的蛋白质用于放射免疫测定。

经过与诸如 1-环己基-3-(2-吗啉基-(4-乙基))碳二亚胺或 1-乙基-3-(4-氮杂-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺等碳二亚胺($\text{R}'\text{-N-C-N-R}'$)反应可选择性地修饰羧基侧基团(天冬氨酰基或谷氨酰基)。而且，经过与铵离子反应可将天冬氨酰基和谷氨酰残基转变成天冬酰胺酰基和谷酰胺酰残基。

用双功能试剂进行的衍生化可将 VEGF 变体有效交联到不溶于水的支持基质或表面上。常用的交联剂包括，例如，1,1-双(重氮乙酰基)-2-苯乙烷，戊二醛，N-羟基琥珀酰亚胺酯，例如，与 4-叠氮水杨酸形成的酯，同型双功能亚氨酸酯，包括双琥珀酰亚胺基酯如 3,3'-二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸)，和双功能马来酰亚胺如双-N-马来酰亚胺基-1,8-辛烷。诸如甲基-3-[(p-叠氮苯基)二硫代]丙酰亚胺等衍生化试剂产生可光活化的中间体，其在有光的条件下能形成交联。另外，诸如溴化氰激活型碳水化

合物等反应性不溶于水的基质和在美国专利号 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 和 4330440 中所述的反应性底物可用于蛋白质固定化。

谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基通常被去酰胺化以形成相应的谷氨酰残基和天冬氨酰残基。另外, 这些残基可在中度酸性条件下去酰胺化。这些残基的任一形式都落在本发明的范围内。

其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化, 丝氨酰或苏氨酰残基的羟基的磷酸化, 赖氨酸, 精氨酸和组氨酸侧链 α -氨基的甲基化[Creighton, 蛋白质: 结构和分子特征, 79-86(W.H.Freeman&Co., San Francisco(1983))], N-末端胺的乙酰化, 和有时 C-末端羧基的酰胺化。

其它修饰包括将 VEGF 或 VEGF 变体(或 VEGF 拮抗剂)连接或融合到诸如聚乙二醇等非蛋白类聚合物上。这种使 PEG 连接蛋白质的方法在本领域是已知的。

VEGF 变体氨基酸序列可含有至少一个具有通过 N-连接被糖基化的潜力且在天然 VEGF 中通常不被糖基化的氨基酸序列。

在变体中导入 N-连接的糖基化位点需要具有通式: 天冬酰胺-X-丝氨酸或天冬酰胺-X-苏氨酸的三肽序列, 其中天冬酰胺是受体且 X 是除了可阻止糖基化的脯氨酸外的 20 个遗传编码的氨基酸中的任何一个。[参见 Struck 和 Lennarz, 糖蛋白和蛋白聚糖的生物化学 35(Lennarz 编辑, Plenum 出版社(1980)), Marshall, 生物化学协会专题论文集, 40: 17(1974); 和 Winzler, 激素蛋白和肽, 1-15(Li 编辑, 纽约学术出版社(1973))]. 本文的氨基酸序列变体可经过用合适的氨基酸取代合适位点的氨基酸进行修饰以实现糖基化。

如果采用 O-连接的糖基化, O-糖苷键在动物细胞中出现在 N-乙酰半乳糖胺, 半乳糖, 或木糖与数种羟基氨基酸之一, 最常见丝氨酸或苏氨酸, 但有时是位于该分子中合适区域的 5-羟基脯氨酸或 5-羟基赖氨酸残基之间。

哺乳动物产生的蛋白质的糖基化形式在《血浆蛋白质: 结构, 功能和遗传控制》: 271-315(Putnam 编辑, 第二版, 纽约学术出版社(1984))中详细描述。在该章中, 讨论了天冬酰胺连接的寡糖, 包括将它们再分成至少三组复合物: 高甘露糖, 杂合结构, 以及 O-糖苷连接的寡糖。

使用例如, Aplin 和 Wriston 在 CRC Crit. Rev. Biochem.259-306(1981)

中所述的各种活化基团可实现将糖苷经化学和/或酶促偶联到蛋白质上。化学偶联技术的优势在于它们相对简单且不需天然 O- 和 N- 连接的糖基化所需的复杂的酶促机制。根据所用的偶联方式, 可将糖附着到(a)精氨酸或组氨酸, (b)游离羧基, 例如谷氨酸或天冬氨酸的游离羧基, (c)游离巯基, 例如半胱氨酸的游离巯基, (d)游离羟基, 例如丝氨酸, 苏氨酸或羟脯氨酸的游离羟基, (e)芳香残基, 例如苯丙氨酸, 酪氨酸或色氨酸的芳香残基, 或(f)谷氨酰胺的酰胺基上。这些方法在 1987 年 9 月 11 日公开的 PCT WO87/05330 中有更充分的描述。

酵母产生的蛋白质的糖基化形式在 Tanner 和 Lehle, 生物化学和生物物理学学报, 906(1):81-99(1987)和 Kukuruzinska 等, 生物化学年鉴, 56: 915-944(1987)中详细描述。

尽管天然 VEGF 的糖基化对生物活性不是必须的[Walter 等, 实验室考察, 74: 546(1996)], 但如果需要, 可使用上述方法改变 VEGF 变体的糖基化。

3. 治疗和诊断方法

本发明还提供了使用所公开的 VEGF 变体的方法。所述方法包括治疗方法, 例如诱导血管形成或血管发生的方法。所述方法还涉及对血管网的创伤的治疗, 因为围绕伤口的血管内皮细胞会增生。可这样治疗的这类创伤的例子包括, 但不限于, 手术切口, 特别是涉及心脏的手术切口, 伤口, 包括撕裂伤, 切口, 和血管穿刺, 涉及血管内皮的表面溃疡, 例如糖尿病性, 血友病性和肿胀性溃疡。预期可采用对 KDR 受体具有选择性结合亲和力的优选 VEGF 变体, 其中需要实现 KDR 受体激活但避免伴随 FLT-1 受体激活的潜在副作用。同样, 可采用对 FLT-1 受体具有选择性结合亲和力的优选 VEGF 变体, 其中需要实现 FLT-1 受体激活但避免伴随 KDR 受体激活的潜在副作用。

可配制 VEGF 变体并按照良好的医学实践方式考虑所要治疗的具体病症, 个体病人的状况, VEGF 变体的传递位点, 用药方法和开业医生已知的其它因素后进行用药。“有效量”的 VEGF 变体包括防止, 减小其恶化, 缓解或治愈所要治疗的病症或其症状的量。

经过将具有所需纯度的 VEGF 变体与生理学上可接受的载体, 赋形剂或稳定剂混合可配制 VEGF 变体用于贮存或用药。例如, 在 Remington's

制药科学，第 16 版，1980，Mack 出版公司，Oslo 等编辑，中描述了合适的载体及其包含其它人类蛋白质，例如人血清白蛋白的配制品。一般来说，在配制品中使用适量的制药上可接受的盐使配制品等渗。载体的例子包括诸如盐水，Ringer's 溶液和葡萄糖溶液等缓冲液。溶液的 pH 优选从大约 5.0 到大约 8.0。例如，如果 VEGF 变体是水溶性的，可在诸如磷酸盐或其它有机酸盐等缓冲液中在大约 7.0 至 8.0 的 pH 下配制。如果 VEGF 变体仅部分可溶于水，经过将它与诸如吐温，Pluronic，或 PEG 等非离子表面活性剂，例如吐温 80 以 0.04-0.05%(w/v)的量进行配制以增加其可溶性可将其制备成微乳状液。

其它载体包括控释制剂，它包括形成微囊颗粒和可植入物。控释制剂的例子包括，例如，固体疏水性聚合物的半渗透性基质，该基质以成形物的形式存在，例如，膜，脂质体或微粒。为了制备控释 VEGF 变体组合物，优选将 VEGF 变体掺入生物可降解的基质或微囊中。用于该目的合适材料是聚交酯，尽管也可使用聚-(β -羟基羧酸)，例如聚-D-(-)-3-羟基丁酸[EP 133988A]的聚合物。其它生物可降解的聚合物，例如，聚内酯，聚缩醛，聚原酸酯，或聚原碳酸酯也是适用的。

对于控释组合物的例子，可参见美国专利号 3773919，EP58481A，美国专利号 3887699，EP158277A，加拿大专利号 1176565，Sidman 等，生物多聚体，22: 547(1983)，和 Langer 等，化学技术，12: 98(1982)。

对于本领域的技术人员而言显而易见的是，根据例如，用药途径和所施用的 VEGF 变体的浓度，某些载体可能是更优选的。

可任选加入其它成份，例如抗氧化剂，如：抗坏血酸；低分子量(不超过 10 个残基)多肽，如：聚精氨酸或三肽；蛋白质，如：血清白蛋白，明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物，如：聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，如：甘氨酸，谷氨酸，天冬氨酸，或精氨酸；单糖，二糖和其它碳水化合物，包括纤维素或其衍生物，葡萄糖，甘露糖或糊精；螯合剂，如 EDTA；和糖醇，如：甘露糖醇或山梨糖醇。赋形剂，载体，稳定剂或其它添加剂的使用可导致形成 VEGF 变体的盐。

当选择载体，赋形剂，稳定剂或其它添加剂时，选择的化合物和相应的降解产物应是无毒的且避免加重所治疗的病症和/或且症状。经过在靶疾病的动物模型中，或者如果不能得到该模型，可在正常动物中进行常规筛

选可确定这点。

用于治疗性用药的 VEGF 变体应是无菌的。通过除菌滤膜(例如, 0.2 微米膜)进行过滤可实现无菌。VEGF 变体一般以冻干形式或作为水溶液存贮。VEGF 变体组合物的 pH 一般是大约 5.0 至 8.0, 尽管更高或更低的 pH 值在某些情况下也是合适的。

对哺乳动物的用药可经过注射(例如, 静脉内, 腹膜内, 皮下, 肌肉内)或经过诸如确保以有效形式传递进血流的吸入或输注等其它方法完成。如果 VEGF 变体经肠胃外途径使用, 含 VEGF 变体的治疗性组合物一般放入具有无菌输入口的容器中, 例如, 静脉溶液袋或者具有可被皮下注射针头穿刺的瓶塞的小瓶。

一般来说, 如果条件许可, 可配制并施用定点传递的 VEGF 变体。这在有伤口和溃疡的情况下较方便。

当进行局部用药时, VEGF 变体适合于与诸如载体, 佐剂, 稳定剂或赋形剂的添加剂组合。如上所述, 当选择添加剂用于与 VEGF 变体混合时, 添加剂应是药用上可接受的且对于其目的用药是有效的。而且, 添加剂不应影响 VEGF 变体的活性。合适的局部配制品的例子包括软膏, 乳剂, 凝胶, 或悬液, 含有或不含纯化的胶原蛋白。组合物也可浸渗进皮肤膏药, 橡皮膏和绷带中, 优选以液体或半液体的形式浸渗。

经过将 VEGF 变体与诸如纤维素衍生物等水溶性多糖或诸如聚乙二醇等合成聚合物混合可制备具有所需粘度的凝胶配制品。用于多糖和聚乙二醇的术语“水溶性”是指包括胶体溶液和分散液。例如, 一般来说, 纤维素衍生物的可溶性可用醚基团的取代程度来测定, 本文有用的稳定衍生物应在纤维素链的每个脱水葡萄糖单位具有足够量的该醚基团以使得该衍生物具有水溶性。一般每个脱水葡萄糖单位上至少 0.35 个醚基团的醚取代程度就足够。另外, 纤维素衍生物可以是碱金属盐的形式, 例如, Li, Na, K, 或 Cs 盐。

合适的多糖的例子包括, 例如, 纤维素衍生物, 如醚化的纤维素衍生物, 包括烷基纤维素, 羟基烷基纤维素, 和烷基羟基烷基纤维素, 例如, 甲基纤维素, 羟乙基纤维素, 羧甲基纤维素, 羟丙基甲基纤维素和羟丙基纤维素; 淀粉和分级淀粉; 琼脂; 藻酸和藻酸盐; 阿拉伯胶; 支链淀粉; 琼脂糖; 角叉藻聚糖; 葡聚糖; 糊精; 果聚糖; 菊粉; 甘露聚糖; 木聚糖;

阿拉伯聚糖；脱乙酰壳多糖；糖原；葡聚糖；和合成性生物多聚体；以及胶，例如黄原胶；瓜尔豆胶；槐豆荚胶；阿拉伯胶；西黄蓍胶；和刺梧桐树胶；及其衍生物和混合物。本文优选的胶化剂是对生物学系统为惰性的，无毒的，制备简单的，且不太流动或粘滞的胶化剂，且不会使其中的 VEGF 变体去稳定。

优选的多糖是醚化的纤维素衍生物，更优选的是充分鉴定，纯化并在 USP 中列出的多糖，例如，甲基纤维素和羟烷基纤维素衍生物如羟丙基纤维素，羟乙基纤维素和羟丙基甲基纤维素。本文最优选的是甲基纤维素。例如，含有甲基纤维素的凝胶配制品优选包括大约 2-5% 的甲基纤维素和每毫升凝胶 300-1000mg 的 VEGF 变体。更优选的是，凝胶配制品含有大约 3% 的甲基纤维素。

用于凝胶配制的聚乙二醇一般是低和分子量聚乙二醇的混合物以获得适当的粘度。例如，分子量 400-600 与分子量 1500 的聚乙二醇混合物当以合适的比率混合而获得药膏时对该目的是有效的。

所用的剂量依赖于上述因素。作为一般建议，可配制 VEGF 变体并能在组织中建立超过大约 0.1ng/cc 到有效但不过分有毒的最大量的 VEGF 变体水平的剂量传递给靶位点或组织。如果可能，应经过连续输注，持续释放，局部施用或以按经验确定的频率进行注射来维持组织内浓度。

组合 VEGF 变体疗法与其它新的或常规疗法(例如，本领域已知的生长因子，如：aFGF, bFGF, HGF, PDGF, IGF, NGF, 合成类固醇, EGF 或 TGF- β)以增强包括天然 VEGF 在内的任意生长因子在促进细胞增生和修复中的活性均在其范围内。这种共同治疗的药品本身不必包含在本发明的组合物中，尽管如果该药品是蛋白类时这样会很方便。该混合物与单独使用的 VEGF 变体以相同的方式且用于例如，相同的目的是进行适当的用药。

有效剂量和用药程序可凭经验确定，且作出该决定在本领域的技术人员能力范围内。

本发明的 VEGF 变体在诊断方法和检测中也具有实用性。例如，VEGF 变体可用于诊断试验以检测细胞和组织中 KRD 受体的表达或存在。可使用本领域已知的各种诊断试验技术，例如体内成像试验，体外竞争性结合试验，直接或间接夹心试验和在多相或均相中进行的免疫沉淀试验。用于所述试验的 VEGF 变体可用可检测组分进行标记。可检测组分应能够产生可

直接或间接检测的信号。例如，可检测组分可以是放射性同位素，如， ^3H ， ^{14}C ， ^{32}P ， ^{35}S 或 ^{125}I ，荧光或化学发光的化合物，如异硫氰酸荧光素，罗丹明或萤光素，或酶，如碱性磷酸酶， β -半乳糖苷酶，或辣根过氧化物酶。可采用本领域已知的任何方法将 VEGF 变体与可检测组分偶联。

VEGF 变体也可用于从重组细胞培养物或天然来源亲和纯化 KDR 受体或 Flt-1 受体。使用本领域已知的方法可将 VEGF 变体固定在合适的支持物，如树脂或滤纸上。然后可将固定的 VEGF 变体与含 KDR 受体或 Flt-1 受体的样品接触，随后用合适的溶剂洗涤支持物，除了与 VEGF 变体结合的 KDR 受体或 Flt-1 受体外，该溶剂基本上去掉样品中所有的物质。如果需要，可用另一合适的溶剂洗涤支持物，这种溶剂可从 VEGF 变体上释放出 KDR 受体或 Flt-1 受体。

4.制造的商品

本申请还提供了制造的商品和试剂盒。制造的商品，例如用于诊断试验或本文所述病症治疗的含有 VEGF 变体的试剂盒包括至少一个容器和一个标记。合适的容器包括，例如，瓶子，小瓶，注射器和试管。容器可用诸如玻璃或塑料等各种材料制成。该容器容纳用于诊断或治疗病症的组合物且具有无菌输出口(例如，容器可以是静脉溶液袋或具有可被皮下注射针头刺穿的瓶塞的小瓶)。组合物中的活性试剂是 VEGF 变体。容器上的或与之相联的标记表明该组合物用于诊断目的或治疗选定的病症。制造的商品还可包括容纳了药用上可接受的缓冲液，例如，磷酸盐缓冲液，Ringer's 溶液和葡萄糖溶液的第二容器。它还可包括从商业和用户的角度所需的其它物质，包括其它缓冲液，稀释剂，滤纸，针头，注射器和带有使用说明的包装插页。制造的商品也可包括含有上述另一活性试剂的第二或第三容器。

提供下面的实施例仅用作说明性的目的而不打算以任何方式限制本发明的范围。

本说明书中引证的所有专利和参考文献以其全文引入本文以供参考。

实施例

实施例中涉及的商业上可获得的试剂按照厂商的说明书使用，除非另有说明。下面实施例，和整个说明书中以 ATCC 保藏号限定的细胞的来源

是美国典型培养物保藏中心, Manassas, Virginia。

实施例 1

KDR - 特异性 VEGF 变体的筛选

为了产生 KDR - 特异性变体, 构建了两个噬菌体文库, 其中随机突变了对 Flt-1 结合很重要但对 KDR 结合不重要的 VEGF(1-109)残基。

噬菌粒的构建

为了构建噬菌体文库, 首先产生具有编码 VEGF 残基 1 - 109 的 cDNA 的噬菌粒载体。使用允许随后将 Nsi I/Xba I 限制性片段连接进噬菌粒载体 phGHam-g3(Genentech, Inc.)的引物, 经过对编码 VEGF 残基 1 - 109 的 cDNA 进行 PCR 扩增产生噬菌粒载体 pB2105(Genentech, Inc.)。这使得在紧靠残基 109 之后导入一个琥珀密码子并将 VEGF 1 - 109 cDNA 融合到含有残基 249 到 406 的 gIII 位点的 C 末端一半上。

在一个文库中, VEGF 1 - 109 的位置 18, 21, 22 和 25 允许所有可能的残基组合(其需借助将靶密码子改变成 NNS 序列的寡核苷酸, 其中 N = G, A, T, 或 C, S = C 或 G), 位置 17 允许有 40 % 的概率发生改变(对靶密码子中每个碱基而言有 70 % 的概率为野生型, 其它三个碱基类型各 10 % 的概率)。

使用下面的寡核苷酸将靶密码子改变成 NNS 序列:

L - 528: CAC GAA GTG GTG AAG TTC NNS GAT GTC NNS NNS
CGC AGC NNS TGC CAT CCA ATC GAG(SEQ ID NO:1)

L-530:GGG GGC TGC TGC AAT NNS GAG NNS NNS GAG TGT GTG
CCC ACT(SEQ ID NO:2)

在第二个文库中, VEGF 1 - 109 在位置 63, 65 和 66 允许所有可能的残基组合, 在位置 64 允许有 40 % 的概率发生改变。

在第三个文库中, VEGF (1 - 109)在位置 47 和 48 允许所有可能的残基组合, 在位置 43 和 46 允许有 50 % 的概率发生改变。在第四个文库中, VEGF (1 - 109)在位置 63, 65 和 66 允许所有可能的残基组合, 在位置 64 允许有 50 % 的概率发生改变。

为了产生 KDR - 选择性变体, 可将突变区分成所示的 5 组, 使用前四组构建文库, 该文库用于随后的噬菌体展示筛选。用星号(*)标记的残基经“软随机化”为 50 % 偏向野生型, 用两个星号标记的残基经“硬随机化”(见

下文图 7)。

异源双链 DNA 的合成

根据从 Kunkel 等, 酶学方法, 204: 125 - 139(1991)修改的方法合成异源双链 DNA。通过该方法, 将诱变的寡核苷酸插入具有生物学活性的共价闭环 DNA(CCC-DNA)分子中。按下述步骤实现该方法。

首先, 将上述寡核苷酸 5' 磷酸化。这可通过在 eppendof 管中将 2 μ g 寡核苷酸, 2 μ l 10xTM 缓冲液(500mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, pH7.5), 2 μ l 10mM ATP 和 1 μ l 100mM DTT 混合, 然后加水至 20 μ l 的总体积而实现。向该混合物中加入 20 单位的 T4 多核苷酸激酶(Weiss 单位)并在 37℃ 下温育 1 小时。

接着, 使每种 5' 磷酸化的寡核苷酸与噬菌粒模板(从 dut/ung-大肠杆菌菌株 CJ-236 纯化的单链 DNA)退火。这可通过首先混合 1 μ g 单链 DNA 模板, 0.12 μ g 磷酸化的寡核苷酸和 2.5 μ l 10xTM 缓冲液(500mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, pH7.5), 然后加水至总体积 25 μ l 而实现。DNA 的量使得寡核苷酸与模板的摩尔比率为 3:1, 其中假定寡核苷酸与模板长度的比率是 1:100。混合物在 90℃ 温育 2 分钟, 然后在 50℃ 温育 3 分钟, 然后在 20℃ 温育 5 分钟。

然后向已退火的混合物中加入下列试剂: 1 μ l 10 mM ATP, 1 μ l 25 mM dNTPs, 1.5 μ l 100 mM DTT, 3 单位的 T4 DNA 连接酶, 和 3 单位的 T7 DNA 聚合酶, 使每种 5' 磷酸化的寡核苷酸酶促延伸并连接以形成 CCC-DNA 分子。然后将混合物在 20℃ 下温育至少 3 小时。

经过乙醇沉淀纯化 DNA 并重悬于 15 μ l 水中。

大肠杆菌电穿孔

在称为大肠杆菌 XL1-blue(Stratagene, LaJolla, CA)的大肠杆菌抑制型菌株中经过大肠杆菌电穿孔产生文库噬菌体。为进行电穿孔, 首先将纯化的异源双链 DNA 在 0.2-cm 缺口的电穿孔杯中在冰上冷冻, 将 100 μ l 等分试样的电感受态大肠杆菌 XL1-blue 在冰上解冻。将大肠杆菌细胞加入所述 DNA 中并吸取几次以混合。

将混合物转移到杯中并使用基因脉冲仪(Bio-rad, Hercules, CA)在如下条件: 2.5kv 电场强度, 200 欧姆电阻和 25mF 电容下进行电穿孔。随后立即加入 1ml SOC 培养基(5g 细菌用酵母提取物, 20g 细菌用胰蛋白胨, 0.5g

NaCl, 0.2g KCl; 加水至 1 升并用 NaOH 调至 pH7.0; 高压灭菌; 然后加入 5mL 已高压灭菌的 2M $MgCl_2$ 和 20mL 滤膜除菌的 1M 葡萄糖)并将混合物转移到无菌培养管中 37℃ 下振荡培养 30 分钟。

为了测定文库的多样性, 将系列稀释液涂布在 2YT(10g 细菌用酵母提取物, 16g 细菌用胰蛋白胨, 5gNaCl;加水至 1 升并用 NaOH 调 pH 至 7.0; 高压灭菌)平板上(补充了 50 μ g/ml 氨苄青霉素)。另外, 将培养物转移到含有 25ml 2YT, 25mg/ml 氨苄青霉素, M13-VCS(10^{10} pfu/mL) (Stratagene, LaJolla, CA)的 250ml 带档板的摇瓶中并在 37℃ 下振荡培养过夜。

然后将培养物在 Sorvall GSA 离心机(16000g)中以 10krpm, 2℃ 离心 10 分钟。将上清转移到新试管中并加入 1/5 体积的 PEG-NaCl 溶液(200g/l PEG-8000, 146g/l NaCl; 高压灭菌)以沉淀噬菌体。上清/PEG-NaCl 溶液在室温下培养 5 分钟并再次离心以获得噬菌体沉淀。

倾析并弃去上清。再次简短离心噬菌体沉淀并去掉残留的上清。噬菌体沉淀重悬于 1/20 体积的 PBT 缓冲液(PBS, 0.2%BSA, 0.1% 吐温 20)中, 经过在 SS-34 离心机中以 15krpm(27000g), 2℃ 离心重悬的沉淀 5 分钟弃去不溶物。所得的上清含有噬菌体。

保存上清用于以其结合亲和力分选 VEGF 变体。经过在大肠杆菌抑制型菌株中产生噬菌体, 可表达 VEGF(1-109)变体-gIII 融合蛋白并在噬菌体表面展示, 使得噬菌体与 KDR 和/或 Flt-1 受体结合。

文库的亲和力分选

使用相似于 H. Jin, 临床研究杂志, 98: 969(1996)所述方法的竞争性结合技术分选各文库对 KDR(1-3)单体的结合, 显示所述文库对于产生受体选择性变体有用。

为了进行竞争性结合技术, 在溶液中存在高浓度(100nM)的竞争性 Flt-1(1-3)单体(Genentech, Inc.)的条件下分选各文库对固相 KDR(1-3)单体(Genentech, South San Francisco, California)的结合。即, 首先用包被缓冲液(pH9.6 的 50mM 碳酸钠)中的 2-5 μ g/ml KDR(1-3)单体以 80 μ l/孔包被 Maxisorp 免疫平板孔(Nalge Nunc International, Rochester, 纽约)并在 4℃ 温育过夜。所需孔的数目依赖于文库的多样性。去掉包被液并用 200 μ l 0.2% BSA 的 PBS 溶液封闭 1 小时。同时, 封闭相等数目的未包被孔作为阴性对照。

各孔用 PT 缓冲液(PBS, 0.05% 吐温 20)洗涤 8 次以去掉封闭缓冲液。然后向包被或未包被的各孔中加入在 PBT 缓冲液(PBS, 0.2%BSA, 0.1% 吐温 20)中的文库噬菌体溶液(10^{12} 个噬菌体/ml)100 μ l。向该噬菌体溶液中加入 Flt-1(1-3)单体。所有孔在室温下轻轻摇动培养 2 小时。

然后各孔用 PT 缓冲液(PBS, 0.05% 吐温 20)洗涤 10 次以去掉噬菌体溶液和 Flt-1 - 结合的任何噬菌体。用 100 μ l 0.2mM 的甘氨酸在 pH2 室温下培养各孔 5 分钟, 而从孔中洗脱 KDR 结合的噬菌体。为了收集 KDR 结合的噬菌体, 将甘氨酸溶液转移到 eppendorf 管中并用 1.0M Tris-HCl, pH8.0 中和。

将洗脱的噬菌体溶液取一半加入 10 倍体积的活跃生长的大肠杆菌 XL1 - blue ($OD_{600} < 10$)中并在 37 $^{\circ}$ C 下摇动培养 30 分钟, 从而再繁殖 KDR 结合的噬菌体。然后将该培养物的系列稀释液涂布在 2YT/amp 平板(补充了 50mg/ml 氨苄青霉素的 2YT)上以测定洗脱的噬菌体数。对用 KDR(1-3)单体包被的孔和未包被的孔都进行测定。

将来自平板的培养物转移到 10 倍体积的 2YT/amp/VCS (补充了 50mg/ml 氨苄青霉素和 10^{10} puf/ml M13-VCS 的 2YT)中并在 37 $^{\circ}$ C 下摇动培养过夜。然后分离噬菌体。

在高浓度(100nM)的竞争性 Flt-1(1-3)单体存在的条件下再分选再繁殖后的噬菌体对固相 KDR(1-3)单体的结合, 随后洗去 Flt-1 结合的噬菌体并再繁殖 KDR 结合的噬菌体。通过计算富集比率来监测亲和力分选过程并重复直至富集比率达到最大值(大约 5 到 6 个分选循环)。

富集比率是 KDR(1-3)单体包被孔洗脱的噬菌体数除以与未包被的对照孔结合的噬菌体数。比率大于 1 通常表明噬菌体与 KDR(1-3)蛋白质特异性结合, 从而表明对于与所加的 Flt-1(1-3)单体的结合有抗性。当富集比率达到最大值时, 分析单个克隆的特异性结合。

噬菌体 ELISA

按照 Muller 等, PNAS, 94: 7192(1997)所述使用噬菌体 ELISA 测量在其表面具有 VEGF 1 - 109 变体 - gIII 蛋白质的噬菌体与 KDR(1-3)单体的特异性结合。为进行噬菌体 ELISA, 用在 50mM 碳酸钠, pH9.6 中的纯化的 KDR(1-3)单体或 Flt-1(1-3)单体(5 μ g/ml)包被微量滴定平板(Maxisorp, Nunc-Immunoplate, Nalge Nunc International, Rochester, 纽约)并在 4 $^{\circ}$ C 下

温育过夜。用 0.5%的 BSA 封闭平板。接着，向孔中加入在 100ul 结合缓冲液(PBS, 0.5% 吐温 20, 0.5%BSA)中的 VEGF 1-109 变体的系列稀释液以及亚饱和浓度的竞争性受体(KDR(1-3)单体或 Flt-1(1-3)单体)。平衡后，洗涤平板，按厂商说明书用辣根过氧化物酶偶联的抗-M13 抗体(Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)染色结合的噬菌粒。亲和力(EC50)计算为产生最大噬菌粒结合的一半的竞争性受体浓度。

从噬菌粒 cDNA 的序列测定从亲和力分选获得的且显示出对 Flt-1(1-3)单体有抗性的 VEGF 1-109 变体的序列。

VEGF 1-109 变体的纯化

从大肠杆菌(27c7)摇瓶培养物分离可回收体形式的 VEGF 1-109 变体蛋白质。按 Yihai 等，生物化学杂志，271: 3154-3162(1996)所述进行突变蛋白质的重折叠。混合变体并用 6M 盐酸胍加 1mM 氧化型谷胱甘肽在 pH6 下解折叠，用 10 倍体积的 2mM 还原型谷胱甘肽和 0.5mM 氧化型谷胱甘肽和 2M 尿素的 20mM Tris-HCl pH8 溶液中透析 10 小时。用 20 倍体积的 20mM Tris-HCl(pH8)在 4℃下缓慢透析过夜以去掉尿素。经过阴离子交换(Pharmacia HiTrap Q, 1ml)(Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)进一步纯化各变体以去掉微量的错误折叠的单体。以 SDS-PAGE 和质谱法证实所得的纯变体的均一性。

表 2 显示了 VEGF 变体的标识符名称，导入的氨基酸取代，和编码被取代的氨基酸的相应密码子。某个变体标识符(例如 LK-VRB-1s)之后的星号(*)表示被证实具有特别优选的结合亲和力和/或生物学活性的各种 VEGF 变体。含有“s”的变体标识符(例如 LK-VRB-1s)表示由 VEGF 的 1-109 截短形式组成且含有表中所引的突变的 VEGF 变体多肽。含有“f”的变体标识符(例如 LK-VRB-1f)表示由 VEGF 的全长 1-165 形式组成且含有表中所列举的突变的 VEGF 变体多肽。变体序列中突变的命名和鉴定按常规命名。例如，对于表 2 中的最开始处，突变称为“M18E”。这意味着天然 VEGF 序列的第 18 位(使用 Leung 等，出处同上和 Houck 等，出处同上报道的天然人 VEGF 的氨基酸序列中的编号)发生突变使得在该位置的天然甲硫氨酸(M)被谷氨酸(E)残基取代以制备 VEGF 变体。表 2 中称为“核苷酸序列”的一栏提供了各氨基酸突变的各自密码子(5' → 3')。例如，对于表 2 中的最开始处，M18E 突变由密码子“GAG”编码。

表 2
VEGF 变体和相应的突变

变体标识符	氨基酸突变	核苷酸序列
LK-VRB-1s*	M18E/Y21L/Q22R/Y25S	GAG/CTC/CGG/AGC
LK-VRB-2s*	D63S/G65M/L66R	AGC/ATG/CGC
LK-VRB-3s	F17I/M18E/Y21F/Q22K/Y25S	ATT/GAG/TTC/AAG/ AGC
LK-VRB-4s	F17I/M18E/Y21F/Q22E/Y25I	ATC/GAG/TTC/GAG/ CAC
LK-VRB-5s	D63S/L66R	AAG/CAG
LK-VRB-6s	D63S/G65A/L66T	AAG/GGC/ATG
LK-VRB-7s*	M18E/D63S/G65M/L66R	GAG/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-8s*	Y21L/D63S/G65M/L66R	CTC/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-9s	Q22R/D63S/G65M/L66R	CGG/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-10s	Y25S/D63S/G65M/L66R	AGC/AGC/ATG/CGC
LK-VRB-11s	M18E/Y21L/ D63S/G65M/L66R	GAG/CTC/ AGC/ATG/CGC
LK-VRB-12s	M18E/Q22R/ D63S/G65M/L66R	GAG/CGG/ AGC/ATG/CGC
LK-VRB-13s	M18E/Y25S/ D63S/G65M/L66R	GAG/AGC/ AGC/ATG/CGC
LK-VRB-14s	Y21L/Q22R/ D63S/G65M/L66R	CTC/CGG/ AGC/ATG/CGC
LK-VRB-15s	Y21L/Y25S/ D63S/G65M/L66R	CTC/AGC/ AGC/ATG/CGC
LK-VRB-16s	Q22R/Y25S/ D63S/G65M/L66R	CGG/AGC/ AGC/ATG/CGC
LK-VRB-17s	M18E/Y21L/Q22R/ D63S/G65M/L66R	GAG/CTC/GAG/ AGC/ATG/CGC
LK-VRB-18s	M18E/Q22R/Y25S/ D63S/G65M/L66R	GAG/CGG/AGC/ AGC/ATG/CGC
LK-VRB-19s	M18E/Q22R/Y25S/ D63S/G65M/L66R	GAG/CGG/AGC/ AGC/ATG/CGC
LK-VRB-20s	Y21L/Q22R/Y25S/ D63S/G65M/L66R	CTC/CGG/AGC/ AGC/ATG/CGC
LK-VRB-21s	D63S/ M18E/Y21L/Q22R/Y25S	TCC/ GAG/CTC/CGG/AGC
LK-VRB-22s	G65M/ M18E/Y21L/Q22R/Y25S	ATG/ GAG/CTC/CGG/AGC
LK-VRB-23s	L66R/ M18E/Y21L/Q22R/Y25S	AGG/ GAG/CTC/CGG/AGC
LK-VRB-24s	D63S/G65M/ M18E/Y21L/Q22R/Y25S	TCC/ATG/ GAG/CTC/CGG/AGC
LK-VRB-25s	D63S/L66R/ M18E/Y21L/Q22R/Y25S	TCC/AGG/ GAG/CTC/CGG/AGC
LK-VRB-26s	G65M/L66R/ M18E/Y21L/Q22R/Y25S	ATG/AGG/ GAG/CTC/CGG/AGC
LK-VRB-27s	M18E/Y21L/Q22R/Y25S/D63S /G65M/L66R	GAG/CTC/CGG/AGC/ AGC/ATG/CGC
LK-VRB-1f	M18E/Y21L/Q22R/Y25S	GAG/CTC/CGG/AGC
LK-VRB-2f	D63S/G65M/L66R	AGC/ATG/CGC

实施例 2

VEGF 变体与 KDR 受体的结合

经过测量 VEGF(1-109)变体和 VEGF165 变体(实施例 1 所述)抑制生物

素标记的天然 VEGF(8-109)结合 KDR 受体的能力可评价所述变体与 KDR 受体的结合。所评价的 VEGF 变体含有表 2 所示的突变。

在 96 孔免疫平板 (Maxisorp, Nunc-Immunoplate, Nalge Nunc International, Rochester, 纽约)中进行受体结合试验。每孔用 100 μ l 在 pH9.6 的 50mM 碳酸盐缓冲液中含 8 μ g/ml 称为 MAKD5(Genentech, South San Francisco, California)的抗 KDR 单克隆抗体的溶液包被并在 4℃ 下温育过夜。弃去上清,各孔在洗涤缓冲液(PBS 含 0.05% 吐温 20)中洗涤三遍,用封闭缓冲液(PBS 含 0.5%BSA, 0.01%硫柳汞)在室温下封闭平板(每孔 150 μ l)1 小时。弃去上清并洗涤孔。

将系列稀释的天然 VEGF(8-109),天然 VEGF(1-165),天然 VEGF(1-109)变体,或 VEGF165 变体(0.16-168nM 的单体)与生物素标记的天然 VEGF(8-109)(84nM)和 KDR(1-3)(1 μ g/ml)在试验缓冲液(在 PBS 中含 0.5% BSA, 0.05% 吐温 20)中室温下培养 2 小时。将等分试样的该混合物(100 μ l)加入预包被的微量滴定孔中且在室温下培养该平板 1 小时。经过用过氧化物酶标记的链霉抗生物素蛋白(0.2mg/ml, Sigma, St. Louis, Missouri)在室温下温育各孔 30 分钟来检测与微量滴定平板结合的 KDR(1-3)与生物素标记型天然 VEGF 的复合物。然后用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(0.2 克/升;Kirkegaard & Perry 实验室, Gaithersburg, Maryland)在室温下与各孔一起温育约 10 分钟。在 Vmax 读板仪(Molecular Devices, Menlo Park, California)上于 450nm 处阅读吸光度。

用四参数非线性回归曲线吻合程序(KaleidaGraph, Synergy Software, Reading, Pennsylvania)来调整滴定曲线。计算相应于天然 VEGF(8-109)滴定曲线的中点吸光度处的 VEGF 变体浓度,然后除以相应于天然 VEGF 滴定曲线的中点吸光度处的天然 VEGF 浓度(见图 2)。

VEGF(1-109)变体和 VEGF165 变体的测定的结合亲和力在表 3 中显示。多种 VEGF 变体表现出与 KDR 受体的结合在天然 VEGF(8-109)结合的大约 2 倍范围内。

实施例 3

VEGF 变体与 Flt-1 受体的结合

经过测量 VEGF(1-109)变体和 VEGF165 变体(实施例 1 所述)抑制生物

素标记的天然 VEGF(8-109)与 Flt-1 受体结合的能力可评价所述与 Flt-1 受体的结合。所评价的 VEGF 变体含有表 2 所示的突变。

在 96 孔免疫平板 (Maxisorp, Nunc-Immunoplate, Nalge Nunc International, Rochester, 纽约)中进行受体结合试验。每孔用 100 μ l 在 pH9.6 的 50mM 碳酸盐缓冲液中含 2 μ g/ml 抗人 IgG Fc 的兔 F(ab')₂(Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania)的溶液包被并在 4℃下温育过夜。然后弃去上清,各孔在洗涤缓冲液(PBS 含 0.05% 吐温 20)中洗涤三遍,用封闭缓冲液(PBS 含 0.5%BSA, 0.01%硫柳汞)在室温下封闭平板(每孔 150 μ l)1 小时。弃去上清并洗涤各孔。

每孔用 100 μ l 在试验缓冲液(PBS 含 0.5%BSA, 0.05% 吐温 20)中含 50ng/ml Flt-IgG (嵌合 Flt-人 Fc 分子)的溶液包被。孔在室温下温育 1 小时并然后在洗涤缓冲液(PBS 含 0.05% 吐温 20)中洗涤三次。

将系列稀释的天然 VEGF(8-109), 天然 VEGF165, VEGF(1-109)变体, 或 VEGF165 变体(0.03-33nM 的单体)与生物素标记的天然 VEGF(8-109)(0.21nM)或生物素标记的天然 VEGF165(0.66nM)混合。向预包被的微滴定孔中加入等分试样的该混合物(100 μ l)并将平板在室温下温育 2 小时。经过用过氧化物酶标记的链霉抗生物素蛋白(0.2mg/ml, Sigma, St. Louis, Missouri)在室温下温育各孔 30 分钟来检测与微量滴定平板结合的 Flt-IgG 与生物素标记型天然 VEGF 的复合物。然后各孔与 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(0.2 克/升; Kirkegaard & Perry 实验室, Gaithersburg, Maryland)在室温下温育约 10 分钟。在 Vmax 读板仪(Molecular Devices, Menlo Park, California)上阅读 450nm 处吸光度。

用四参数非线性回归曲线吻合程序(KaleidaGraph, Synergy Software, Reading, Pennsylvania)来调整滴定曲线。计算相应于天然 VEGF(8-109)滴定曲线的中点吸光度处的 VEGF 变体浓度,然后除以相应于天然 VEGF 滴定曲线的中点吸光度处的天然 VEGF 浓度。

VEGF(1-109)变体和 VEGF165 变体的测定的结合亲和力在表 3 中显示。多种 VEGF 变体显示出对 Flt-1 受体的结合比天然 VEGF(8-109)的结合低 2000 倍以上。表 3 中报道的某些 VEGF 变体(例如, LK-VRB-7s*和 LK-VRB-8s*)对 FLT-1 受体的相对结合亲和力没有以 nM 值报道,因为可检测的结合量超出了 ELISA 试验的灵敏度。

表 3
VEGF 变体对 KDR 受体和 FLT-1 受体的结合

变体标识符	相对结合亲和力	
	KDR 受体	FLT-1 受体
LK-VRB-1s*	1 nM/1	2700 nM/6000
LK-VRB-2s*	1 nM/1	>400 nM/>1000
LK-VRB-3s	1 nM/1	170 nM/400
LK-VRB-4s	1 nM/1	100 nM/200
LK-VRB-5s	1 nM/1	233 nM/550
LK-VRB-6s	0.5 nM/0.5	4 nM/10
LK-VRB-7s*	1 nM/1	/>15000
LK-VRB-8s*	0.5 nM/0.5	/>21000
LK-VRB-9s	0.5 nM/0.5	/300
LK-VRB-10s	0.5 nM/0.5	/>2400
LK-VRB-11s	2 nM/2	/>14000
LK-VRB-12s	0.4 nM/0.4	/>5600
LK-VRB-13s	14 nM/14	/>14000
LK-VRB-14s	0.5 nM/0.5	/>2900
LK-VRB-15s	2 nM/2	/>21000
LK-VRB-16s	0.6 nM/0.6	/>1400
LK-VRB-17s	3 nM/3	/>1900
LK-VRB-18s	130 nM/130	/>3900
LK-VRB-19s	7 nM/7	/>35000
LK-VRB-20s	2 nM/2	/>10000
LK-VRB-21s	3 nM/3	/>5600
LK-VRB-22s	4 nM/4	/>30
LK-VRB-23s	11 nM/11	/>8500
LK-VRB-24s	10 nM/10	/>18000
LK-VRB-25s	4 nM/4	/>12000
LK-VRB-26s	23 nM/23	/>25000
LK-VRB-2f	1 nM/1	19 nM/70
Compare Native VEGF (8-109)	1 nM/1	0.42 nM/1

实施例 4

VEGF(1-109)变体诱导 KDR 受体磷酸化

为了测定 VEGF 变体的活性，在 KIRA 试验中测量变体诱导 KDR 受体磷酸化的能力。所评价的 VEGF 变体含有表 2 中的突变。具体地说，研

究了下列 VEGF(1-109)变体: LK-VRB-1s*; LK-VRB-2s*; LK-VRB-3s; LK-VRB-4s; LK-VRB-5s 和 LK-VRB-6s。

向表达 N 末端具有 gD 标记的 KDR 受体的 CHO 细胞(Genentech, South San Francisco, California)中加入系列稀释的 VEGF(1-109)变体(0.01-10nM)。用 0.5% Triton-X100, 150mM NaCl, 50mM Hepes 在 pH7.2 下裂解细胞, 经 ELISA 定量裂解产物中磷酸化的 gD-KDR 受体。

为进行 ELISA, 使用 96 孔免疫平板 (Maxisorp, Nunc-Immunoplate, Nalge Nunc International, Rochester, 纽约)。每孔用 100 μ l 在 pH9.6 的 50mM 碳酸盐缓冲液中含 1 μ g/ml 称为 3C8(Genentech, South San Francisco, California)的抗 gD 小鼠单克隆抗体的溶液包被并在 4 $^{\circ}$ C 下温育过夜。弃去上清, 在洗涤缓冲液(PBS 含 0.05% 吐温 20)中洗涤各孔三遍, 用封闭缓冲液(PBS 含 0.5%BSA, 0.01%硫柳汞)在室温下封闭平板(每孔 150 μ l)1 小时。然后弃去上清并洗涤各孔。

向预包被的孔中加入等分试样的裂解产物(100 μ l)并在室温下温育 2 小时。每孔用生物素标记的称为 4G10(0.05mg/ml)(Upstate Biotechnology, Lake Placid, 纽约)的抗磷酸酪氨酸单克隆抗体在室温下温育 2 小时, 接着用过氧化物酶标记的链霉抗生物素蛋白(0.2mg/ml, Sigma, St. Louis, Missouri)在室温下温育孔 1 小时来检测磷酸化 gD-KDR 受体。然后每孔与 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(0.2 克/升; Kirkegaard & Perry 实验室, Gaithersburg, Maryland)在室温下温育约 15-20 分钟。在 Vmax 读板仪(Molecular Devices, Menlo Park, California)上阅读 450nm 处吸光度。

用四参数非线性回归曲线吻合程序(KaleidaGraph, Synergy Software, Reading, Pennsylvania)来调整滴定曲线。计算相应于天然 VEGF(8-109)滴定曲线的中点吸光度处的 VEGF 变体浓度, 然后除以相应于天然 VEGF 滴定曲线的中点吸光度处的天然 VEGF 浓度(图 3)。

表 4 中提供了 VEGF 变体诱导磷酸化的活性。VEGF 变体一般表现出的诱导磷酸化的活性在天然 VEGF(8-109)活性的 2 倍范围内。

表 4

VEGF(1-109)变体对 KDR 受体磷酸化的诱导

变体标识符	诱导磷酸化的活性
LK-VRB-1s*	1nM/0.5
LK-VRB-2s	2nM/1
LK-VRB-3s	2nM/1
LK-VRB-4s	1nM/0.5
LK-VRB-5s	1nM/0.5
LK-VRB-6S	1nM/0.5
天然 VEGF(8-109)对照	2nM/1

实施例 5内皮细胞增生试验

使用人脐静脉内皮细胞(HUVEC)(细胞系统, Kirkland, 华盛顿)作靶细胞测定 VEGF(1-109)或 VEGF165 变体(以及一个 VEGF165 变体, LK-VRB-2f)的促有丝分裂活性。所评价的 VEGF 变体含有表 2 中的突变。具体地说, 研究了下列 VEGF(1-109)变体: LK-VRB-1s*; LK-VRB-2s*; LK-VRB-7s*; 和 LK-VRB-8s*。

HUVEC 是在 CS-C 完全生长培养基(细胞系统, Kirkland, 华盛顿)中用诸如酸性 FGF 等生长因子维持和生长的原代细胞系。为了制备用于该试验, 洗涤所述细胞的早期传代培养物(不超过 5 代)并接种在 96 孔平板(每孔 100 μ l 含 3000 个细胞)中且在不合任何生长因子但补充了 2% 已渗滤的胎牛血清(GibcoBRL, Gaithersburg, MD)的 CS-C 培养基中于 37℃ 的 5% CO₂ 培养箱内绝食(fast)24 小时, 之后用新鲜的绝食培养基替换。向孔中加入在相同绝食培养基中稀释的几个浓度的 VEGF 变体(约 10nM-0.01nM)使体积达到每孔 150 μ l 并温育 18 个小时。

为了测量 VEGF 变体诱导的 DNA 合成, 以每孔 0.5 μ Ci 向各孔中加入 ³H-胸苷(Amersham Life Science, Arlington Heights, IL)并再培养 24 小时以便细胞吸收放射活性。然后将细胞收获到另一 96 孔过滤平板上并且在将平板上样到 Topcount(Packard, Meriden, Connecticut)之前洗去过量的标记。

用 Topcount 计数细胞。每分钟测量的读数(CPM)对各变体浓度绘图以

比较其活性。(图 4)

表 5 中显示了 VEGF 变体的细胞增生能力。VEGF 变体一般表现出的细胞增生能力在天然 VEGF(8-109)能力的 2 倍范围内。

表 5

VEGF(1-109)变体的促有丝分裂活性

变体标识符	内皮细胞增生活性
LK-VRB-1s*	0.1nM/0.2
LK-VRB-2s*	0.05nM/0.1
LK-VRB-7s*	0.5nM/1
LK-VRB-8s*	0.5nM/1
LK-VRB-2f	0.05nM/0.1
天然 VEGF(8-109)对照	0.5nM/1

实施例 6

测定 VEGF 变体与 KDR 和 FLT-1 受体结合的 RIA 试验

基本上按照 Muller 等, PNAS, 94: 7192 - 7197(1997)所述进行 RIA 试验以检查与天然 VEGF 165 或天然 VEGF(8-109)相比,几个 VEGF 变体(表 2 中所述)与 KDR 受体和 FLT-1 受体的相对结合亲和力。结果在下面表 6 中显示。

表 6

相对结合亲和力		
变体标识符	KDR 受体	FLT-1 受体
天然 VEGF 165	1 (97 pM)	1 (37 pM)
天然 VEGF (8-109)	12	29
LK-VRB-1f	8	1700
LK-VRB-1s*	20	14,000
LK-VRB-2f	1	2400
LK-VRB-2s*	2	27,000

实施例 7

VEGF 变体与 KDR - 或 FLT - 1 - 转染的细胞的结合

在受体转染的细胞结合试验中进一步检查了 LK - VRB - 2s*(见实施例 1, 表 2)的结合特性。按 Fuh 等, 生物化学杂志, 273: 11187 - 11204(1998)所述制备 KDR 或 Flt-1 转染的 NIH3T3 细胞。转染的细胞在补充了 10% FBS 和 400ug/ml G418(GibcoBRL)的 F12 培养基中维持。为进行结合试验, 将细胞以 1×10^6 /孔涂布在 12 孔平板中以便在第二天达到铺满。然后洗涤细胞并在含 1% BSA 的 Hank' s 缓冲盐水(HBS)中封闭 1 小时, 之后加入 ^{125}I - VEGF(1-109)(以标准氯胺 - T 方法制备)和浓度递增的未标记型 VEGF 变体。50pM 和 10pM 标记型 VEGF(1-109)分别用于 KDR 和 Flt-1 细胞结合。平板在 4℃ 下温育 3 小时, 然后用含 0.5% BSA 的 HBS 洗涤两次。用 1N NaOH 溶解已洗涤的细胞来收集结合的标记型 VEGF, 然后在 γ - 计数器(Isodata, ICN)中计数。

如图 5 所示, LK - VRB - 2s*表现出与表达 KDR 的转染细胞的结合类似于天然 VEGF 结合。然而, LK - VRB - 2s*表现出与 Flt-1 转染的细胞的结合减少了大约 200 倍(见图 6)。

实施例 8

Flt-1 特异性 VEGF 变体的产生和筛选

使用丙氨酸扫描(Wells, 酶学方法, 202:309 - 411(1991))限定单个 VEGF 残基对 KDR 与 Flt-1 结合的相对重要性。选择用于诱变的残基包括在 VEGF 的受体结合结构域和 Flt-1 结构域 2 之间的复合物晶体结构中观察到的 22 个接触残基(Wiesmann 等, 细胞, 91: 695 - 704(1997)), 以及以前作为 KDR 结合决定簇鉴定的 Phe47 和 Glu64(Muller 等, 美国国家科学院院报, 94:7192 - 7197(1997))。使用 Kunkel 等, 酶学方法, 204: 125 - 139(1991)的方法在 VEGF 的受体结合结构域(残基 1-109)骨架中进行定点诱变。经过 DNA 测序证实所有突变。将下列 VEGF 残基分别突变成丙氨酸: Lys 16, Phe17, Met18, Tyr21, Gln22, Tyr25, Ile43, Ile46, Phe47, Lys48, Asp63, Glu64, Gly65, Leu66, Gln79, Met81, Ile83, His86, Gln89, Ile91, Lys101, Glu103, Arg105, Pro106。在 VEGF 的受体结合结构域背景(残基 1-109: Keyt 等, 生物化学杂志, 271: 7788 - 7795(1996); Muller 等, 美国国家科学院院报, 94: 7192

- 7197(1997))中将这些残基分别诱变成丙氨酸。

生产每种突变蛋白并纯化成均一物质,使用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定对 KDR 和 Flt-1 的结构域 1 至 3 的结合亲和力(这三个结构域含有完整的 VEGF-结合位点; Wiesmann 等, 细胞, 91: 695 - 704(1997); Fuh 等, 生物学化学杂志, 273: 11197 - 11204(1998))。为进行 ELISA, 用在 50mM 碳酸钠(pH9.6)中的纯化 VEGF(8-109)(5 μ g/ml)4 $^{\circ}$ C 下包被微量滴定平板过夜。用 0.5% BSA 封闭平板,并向孔中加入在 100 μ l 结合缓冲液(PBS 含 0.5% 吐温 20, 0.5%BSA)中的竞争性 VEGF 丙氨酸变体的系列稀释液和亚饱和浓度(100pM)的生物素标记型受体(KDR(1-3)或 Flt1(1-3))。1 小时后,洗涤平板,用链霉抗生物素蛋白辣根过氧化物酶偶联物(Pharmacia)染色结合蛋白并测定。亲和力按 IC_{50} 值评估:即抑制 50% 蛋白结合的 KDR(1-3)或 Flt(1-3)的浓度。

该分析的结果在图 7 中显示。针对各残基列出突变体 IC_{50} 与野生型 VEGF(8-109) IC_{50} 的比率,其代表了与野生型蛋白相比突变体结合的倍数下降。野生型 VEGF(8-109)的 IC_{50} 在括号中表示。黑体字显示的残基用于产生 Flt-1-选择性变体。

同时分析 VEGF 突变体的 Flt-1 结合显示出相似并重叠的受体结合区,主要是位于 20s 螺旋和 60s 环上,最重要的 Flt-1-结合决定簇是 Phe17, Tyr21, Gln22 和 Leu66(图 7)。相反,关键的 Flt-1-结合决定簇的突变也倾向于明显降低对 KDR 的亲和力(图 7)。

通过将极大地影响 KDR 结合但不影响 Flt-1 结合四个突变组合可产生对 Flt-1 受体具有高选择性的 VEGF 变体。Ile43, Ile46, Gln79 或 Ile83 向丙氨酸的突变表明这些残基的侧链对于牢固结合 KDR 是关键的,但对 Flt-1-结合不重要。使用定点诱变方法(Kunkel 等, 酶学方法, 204: 125 - 139(1991))在 Ile43, Ile46, Gln79 和 Ile83 位置用丙氨酸取代可构建变体(本文称为“Flt-sel”)。按照上面实施例 1 所述(和表 2 所示)的命名法也可用标识符 I43A/I46A/Q79A/I83A 表示该具体 Flt-sel 变体。在位置 43, 46, 79 和 83 的这四个丙氨酸取代的相应密码子分别是 GCC/GCC/GCG/GCC(按照上面实施例 1 所述和表 2 所示的命名法)。

进行各种试验以检查 I43A/I46A/Q79A/I83A Flt-sel 变体的特征和生物学活性。例如,使用上面实施例 6 所述的可溶性放射免疫受体结合试验(RIA)

进行定量结合测量。在该试验中，天然 VEGF(8-109)对 KDR 和 Flt-1 的亲合力分别是 0.5nM 和 0.4nM(图 8A 和 8B)。发现 Flt-sel 在该试验中的 KDR 结合亲和力降低至少 470 倍(图 8A)。有点令人惊奇的是，由于在 ELISA(上述)中从单个点突变已观察到 Flt-1 结合少量下降，Flt-sel 变体对 Flt-1 的亲合力基本上相同于天然蛋白质(图 8B)。

在实施例 7 所述的 3T3 转染细胞-结合试验中也检验了 Flt-sel 变体的活性。与 RIA 数据一致，Flt-sel 未显示出可检测到的对 KDR 转染的 3T3 细胞的结合且略为提高了对 Flt-1-转染的细胞的结合(图 5 和 6)。

在实施例 4 所述的 KIRA 试验中也检验了 Flt-sel 变体的活性。结果在图 9 中显示。

在实施例 5 所述的 HUVEC 增生试验中进一步检验了 Flt-sel 变体的活性。结果在图 10 中显示。

实施例 9

基质金属蛋白酶 9 试验

可进行试验测量激活人主动脉平滑肌细胞中表达的 Flt-1 后基质金属蛋白酶 9 的分泌(Wang 和 Keiser, 循环研究, 83: 832-840(1998))。人主动脉平滑肌细胞(ASMC)(Clonetics)在 6 孔聚苯乙烯平板(Becton-Dickinson)中在 10%胎牛血清存在的条件下在 5%CO₂和 95%环境空气中 37℃下在 SM2 培养基(Clonetics)中维持。当细胞达到 90%铺满时，在含有 0.2%牛血清白蛋白(BSA)的无血清培养基中限制(arrested)生长 24 小时。以 40ng/ml 的终浓度加入 VEGF(1-109)，PlGF(R&D 系统, Minneapolis, MN)或 VEGF(1-109)变体(LK-VRB-2s*)和 Flt-sel(上述)并在含有 0.2%BSA 的无血清培养基中再培养细胞 24 小时。经过酶谱法分析该条件培养基中的明胶酶。收集并浓缩培养基，将 25 μl 等分试样与无还原剂或未加热的 2X 样品缓冲液混合。将样品上样到含有 0.1%明胶(Novex, San Diego, CA)的 10%聚丙烯酰胺凝胶中用于电泳。除了使用标准分子量标记外，用 MMP-2 和 -9 酶谱标准(Chemicon, Temecula, CA)作明胶酶的标准。电泳后，凝胶在复性缓冲液中室温下温育 30 分钟使蛋白质复性并在显色缓冲液(Novex)中 37℃下过夜。凝胶用 0.25%考马斯亮兰(Sigma)染色。明胶酶活性鉴定为脱色后明亮(lightly)染色或清楚的带。

结果在图 11 中显示。显示的是两个独立实验中的一个代表性酶谱。倍数改变代表 VEGF(1-109)-, VEGF(1-109)变体 - 或 PlGF - 处理组与载体处理(PBS)对照组的相对带密度。与 LK-VRB-2s*相反, 当与天然 VEGF(1-109)或 PlGF 的活性相比时, 该试验中的 Flt-sel 具有完全活性(图 11)。

实施例 10

MAP 激酶的激活

进行试验以确定天然 VEGF, KDR - 选择性 VEGF 变体, 或 Flt-选择性 VEGF 变体是否能介导促有丝分裂信号传导。

第 4-7 代 HUVEC 细胞(Cell Systems, Kirkland, WA)在明胶包被板上含 10% 胎牛血清和生长因子的 Cell Systems 完全培养基(AZ0-500)中生长并在 0.2% 血清中饥饿培养 14 小时使其休眠。休眠的 HUVEC 细胞保持未处理或用天然 VEGF(1-165)或 VEGF 变体(含有全长 165 序列并含有上面实施例 8 中对“短形式”(1-109)Flt-sel 所述的丙氨酸取代 I43A/I46A/Q79A/I83A 的 Flt-1 选择性变体; 或称为 LK-VRB-2f(见实施例 1; 表 2)的 KDR - 选择性变体(也含有全长 165 序列))(以 50ng/ml 或 10ng/ml 的浓度)刺激 5 分钟。天然 VEGF(1-165)和 VEGF 变体均在大肠杆菌中表达并按 Keyt 等, 生物化学杂志, 271: 5638-5646(1996)所述纯化。然后在含有 0.1mM 正钒酸钠, 5mM 对硝基苯磷酸, 10mM 氟化钠, 0.5 微摩尔冈田酸和蛋白酶抑制剂混合物(Roche MB1836145)的 0.5-1ml RIPA 缓冲液中裂解 HUVEC 细胞。然后进行 Western 印迹分析, 使用抗磷酸 ERK 抗血清(Promega)探测磷酸化 ERK1 或 ERK2。

KDR 选择性 VEGF 变体, LK-VRB-2f 引起的激活触发了 HUVEC 细胞中 ERK1 和 ERK2 的磷酸化(图 12A)。磷酸化程度与使用天然 VEGF(1-165)获得的结果不易区别。Flt-1 选择性 VEGF 变体(以最高浓度使用)导致几乎检测不到 ERK2 的磷酸化。在该研究中使用的同型二聚体 VEGF 变体预期不能促进受体异二聚体的形成。因此 Flt-1 不会导致 MAP 激酶的激活。

以前已报道了 VEGF 可刺激应激激活的 p38 MAP 激酶[Rousseau 等, 癌基因, 15: 2169-2177(1997); Yu 等, 细胞生理学杂志, 178: 235-246(1999)]。为了分析所涉及的 VEGF 受体, 用天然 VEGF(1-165), Flt-1 选择性变体, 或 LK-VRB-2f(上述)刺激后检测 p38 的磷酸化状态。

第 4-7 代 HUVEC 细胞(Cell Systems, Kirkland, WA)在明胶包被板上含 10%胎牛血清和生长因子的 Cell Systems 完全培养基(AZ0-500)中生长并在 0.2%血清中饥饿培养 14 小时使其休眠。休眠的 HUVEC 细胞保持未处理或用天然 VEGF(1-165)或 VEGF 变体(Flt-sel(全长 165 形式)或 LK-VRB-2f;两者在上文中用于 ERK1 和 ERK2 试验)(以 50ng/ml 或 10ng/ml 的浓度)刺激 5 分钟。然后在含有 0.1mM 正钒酸钠, 5mM 对硝基苯磷酸, 10mM 氟化钠, 0.5 微摩尔冈田酸和蛋白酶抑制剂混合物(Roche MB1836145)的 0.5-1ml RIPA 缓冲液中裂解细胞。使用抗磷酸 p38 特异性抗血清(NEB)评估 p38 应激激活的 MAP 激酶的磷酸化状态。

图 12B 表明 KDR 选择性 VEGF 变体能刺激 p38 磷酸化。

实施例 11

KDR 刺激 PI 3'-激酶和 PLC- γ 磷酸化

以前在 VEGF 信号传导中涉及 PLC- γ 磷酸化和激活。已报道 PLC- γ 与两种 KDR 均结合[Dougher 等, 癌基因, 18: 1619-1627(1999); Cunningham 等, 生物化学和生物物理学研究通讯, 240: 635-639(1997)]和 Flt-1[Seetharam 等, 癌基因, 10: 135-147(1995); Sawano 等, 生物化学和生物物理学研究通讯, 238: 487-491(1997); Ito 等, 生物学化学杂志, 273: 23410-23418(1998)]。

为了确定哪种(些)VEGF 受体与原代内皮细胞中的 PLC- γ 激活相关, 用天然 VEGF 或 VEGF 受体-选择性变体处理 HUVEC 细胞并在免疫沉淀后评估 PLC- γ 的磷酸化。

第 4-7 代 HUVEC 细胞(Cell Systems, Kirkland, WA)在明胶包被板上含 10%胎牛血清和生长因子的 Cell Systems 完全培养基(AZ0-500)中生长并在 0.2%血清中饥饿培养 14 小时使其休眠。休眠的 HUVEC 细胞保持未处理或用天然 VEGF(1-165)或 VEGF 变体(Flt-sel(全长 165 形式)或 LK-VRB-2f;上面实施例 10 中所述)(以 20ng/ml 的浓度)刺激 5 分钟。然后在 0.5-1ml 含有 0.1mM 正钒酸钠, 5mM 对硝基苯磷酸, 10mM 氟化钠, 0.5 微摩尔冈田酸和蛋白酶抑制剂混合物(Roche MB1836145)的 RIPA 缓冲液中裂解细胞。然后使用单克隆抗体(Upstate Biotechnology)从全细胞裂解产物中免疫沉淀 PLC- γ 并分析酪氨酸磷酸化作用(图 13A)或用抗 p85 PI 3'-激酶的单

克隆抗体(购自转导实验室(P13020)和新标记(MS424-P))免疫沉淀裂解产物并使用磷酸酪氨酸抗体 PY20 或 E120H(转导实验室)检验磷酸酪氨酸(图 13B)。按下述进行免疫沉淀。在 50mM HEPES pH7.2, 0.1% TX-100, 150mM NaCl 和 1mg/ml 卵清蛋白中封闭蛋白质 A/G 珠(Pierce)的非特异性蛋白质结合 30 分钟。在相同缓冲液中 4℃下颠倒旋转使抗体预偶联并在裂解缓冲液中洗涤珠 3 次。将珠加入裂解物中并旋转过夜。依次在 50mM Tris pH7.6, 150mM NaCl, 1% TX-100, 1mM CaCl_2 ; 50mM Tris pH7.6, 500mM NaCl, 0.1% TX-100, 1mM CaCl_2 和 50mM Tris pH7.6, 150mM NaCl, 0.05% TX-100, 1mM CaCl_2 中洗涤珠子。然后将珠子重悬于 2X 样品缓冲液中并煮沸。将上清直接上样到 4-12% Tris-甘氨酸梯度凝胶(Novex)上。

如图 13A 所示, 天然 VEGF 和 KDR 选择性 VEGF 变体能刺激 PLC- γ 磷酸化到相似程度。Flt-1 选择性 VEGF 变体相对于背景水平不能增加 PLC- γ 的磷酸化, 这不支持 Flt-1 在 HUVEC 细胞的 PLC- γ 激活中起作用的论点。

已证实 在一些细胞类型中 PI 3'-激酶通过激活 Akt 来传递存活信号 [Marte 等, 生物化学科学动态, 22: 355-358 (1997)]。VEGF 也起内皮细胞存活因子的作用且该信号需要 PI 3'-激酶和 Akt 激酶活性 [Gerber 等, 生物学化学杂志, 273:30366-30343(1998)]。在各种细胞类型中, 已证实 PI 3'-激酶活性与生长因子刺激后细胞骨架的改变及细胞迁移有关 [Wennstrom 等, 当今生物学, 4: 385-393(1994)]。因此, 免疫沉淀后评价 VEGF 蛋白质引起 PI 3'-激酶的 p85 调节亚基磷酸化的能力。仅天然 VEGF 和 KDR-选择性 VEGF 变体能引起 PI-3' 激酶调节亚基的磷酸化, 如图 13B 所示。

实施例 12

对内皮细胞迁移的影响

VEGF 对内皮细胞的作用的一个核心方面是其用作化学引诱物并刺激内皮细胞迁移的能力。在如下改良的 Boyden 室试验中分析 HUVEC 细胞迁移。

用 1 型胶原(VITROGEN, COHESION)包被 Falcon 8.0 微米滤膜插条 (Falcon 3097)。HUVEC(从 Cell Systems 公司获得, 小于 8 代)在含 10% FCS 的 Cell Systems 完全培养基(4ZO-500)中生长。细胞用胰酶消化并转移到含 0.1% BSA 的 EBM(内皮细胞基础培养基, Clonetics)中用于试验。以每上层

室中 5×10^4 个细胞进行铺板。生长因子(VEGF(1-165); Flt-1 选择性变体; LK-VRB-2f; 上面实施例 10 所述)放在下层室中(以图 14A 和 14B 所示的浓度), 抑制剂放在上层室中。试验按常规在 37°C 下进行 18 小时。对于 LY294002 抑制剂实验, 在加入抑制剂之前使细胞附着 30 分钟。加入抑制剂 20 分钟后, 向底孔中加入 VEGF 且使试验仅进行 4 小时以避免出现与用 LY294002(购自 Biomol)处理这些原代细胞相关的细胞凋亡。

经过用聚氨基甲酸酯拭子从膜的上侧刮取细胞, 然后将膜的底侧上剩下的细胞用甲醇固定。用 Yo-Pro 碘化物核染料(分子探针)染色细胞并使用 Image-Pro 细胞识别程序在低能荧光下计数。

图 14A 显示了在改良的 Boyden 室试验中受体选择性 VEGF 变体对 HUVEC 细胞(在所示浓度)的影响(实验进行 3 份; 误差线段代表标准误差)。在几个独立的实验中, 天然 VEGF 引起 HUVEC 细胞迁移增加 4-5 倍。在 HUVEC 细胞迁移的促进方面 KDR-选择性 VEGF 变体与天然 VEGF 一样有效。Flt-1 选择性 VEGF 变体相对于背景水平不能增加细胞迁移。

为了确定 PI 3-激酶对内皮细胞迁移的贡献, 在使细胞附着到膜上后向试验液中加入不同浓度的抑制剂 LY 294002。由于 PI 3'-激酶抑制对内皮细胞存活的有害影响, 只进行短期试验(如上所述)。图 14B 显示了在其最高浓度下, LY 294002 导致对 HUVEC 细胞迁移的 56% 抑制。因此, PI 3'-激酶活性明显影响内皮细胞迁移。

实施例 13

角膜囊血管形成试验

按 Polverini 等, 酶学方法, 198: 440-450(1991)所述经过下述改良后进行试验。使用气体(异氟醚)/可注射的氯胺酮(80mg/kg)/甲苯噻嗪(15mg/kg)组合麻醉 Sprague-Dawley 大鼠。轻轻凸出眼睛并使用无损伤镊子固定。用 #15 刀片在角膜中央略下面作出一个 1.5mm 的切口。使用微型药勺(ST80017, ASSI)从眼睛基质到外眼角对切口进行仔细钝解剖。将含有生长因子(200ng)hydron 包裹的片剂(2mm x 2mm)(VEGF(1-165); Flt-1 选择性变体; LK-VRB-2f; (上面实施例 10 所述)或 PlGF(R&D 系统)), 或者甲基纤维素和硫糖铝(100ug)(对照)的插入囊的基部。手术后, 用庆大霉素软膏覆盖眼睛。6 天后, 用高分子量的 FITC-葡聚糖注射动物并使其安乐死以

允许观察其脉管系统。从摘出的眼球制备角膜整体封片并使用计算机辅助成像分析(Image-Pro Plus)完成新血管区的测量。

如图 15A 所示, KDR 选择性 VEGF 变体与天然 VEGF 在诱导角膜血管形成中一样有效。尽管 Flt-1 选择性 VEGF 变体偶尔诱导边缘血管形成(图 15A), 对一些动物中血管形成表面区域的分析显示 Flt-1 选择性 VEGF 变体相对于对照水平不能刺激血管形成。PlGF 仅产生边缘反应(图 15B)。因此, 目前相信 KDR 而不是 Flt-1 能促进体内血管形成。

上面所写的说明书认为足以使得本领域的技术人员能够实现本发明。除了本文所示和所述外, 对本发明的各种修改对于本领域的技术人员而言, 根据上面说明书是显而易见的且落在所附权利要求书的范围内。

序列表

<110> 杰南技术公司 (GENENTECH, INC.)

<120> 血管内皮细胞生长因子变体及其应用

<130> P1734R1PCT

<140> PCT/US00/09483

<141> 2000-04-10

<150> US 60/129,788

<151> 1999-04-16

<150> US 60/184,235

<151> 2000-02-23

<160> 4

<210> 1

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> Misc-feature

<222> 1-57

<223> 序列是合成的。

<220>

<221> 不确定

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

<223> 指定位置的 N 可以是 G、A、T 或 C; 指定位置的 S 可以是 C 或 G

<400> 1

cacgaagtgg tgaagtcnn sgatgtcnns nmscgagcn nstgccatcc 50

aatcgag 57

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> Misc-feature

<222> 1-42

<223> 序列是合成的。

<220>

<221> 不确定

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

<223> 指定位置的 N 可以是 G、A、T 或 C; 指定位置的 S 可以是 C 或 G

<400> 2

gggggctgct gcaatnnsga gnnsnnsag tgtgtgccca ct 42

<210> 3

<211> 990

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 3

cagtgtgctg gcggcccggc gcgagccggc ccggccccgg tcgggcctcc 50
gaaacatga actttctgct gtcttgggtg cattggagcc tcgccttgct 100
gtcttacctc caccatgcca agtgggtcca ggctgcaccc atggcagaag 150
gaggagggga gaatcatcac gaagtgggtga agttcatgga tgtctatcag 200
cgcagctact gccatccaat cgagaccctg gtggacatct tccaggagta 250
ccctgatgag atcgagtaca tcttcaagcc atcctgtgtg cccctgatgc 300
gatgcggggg ctgctgcaat gacgagggcc tggagtgtgt gccactgag 350
gagtccaaca tcacatgca gattatgcgg atcaaacctc accaaggcca 400
gcacatagga gagatgagct tcctacagca caacaaatgt gaatgcagac 450
caaagaaaga tagagcaaga caagaaaatc cctgtgggcc ttgctcagag 500
cggagaaagc atttgtttgt acaagatccg cagacgtgta aatgttcctg 550
caaaaacaca gactgcgtt gcaaggcgag gcagcttgag ttaaacgaac 600
gtacttgagc atgtgacaag ccgaggcggt gagccgggca ggaggaagga 650
gcctccctca gggtttcggg aaccagatct ctaccagga aagactgata 700
cagaacgac gatacagaaa ccacgtgcc gccaccacac catcaccatc 750
gacagaacag tccttaatcc agaaacctga aatgaaggaa gaggagactc 800
tgcgagagc actttgggtc cgaggggcga gactccggcg gaagcattcc 850
cgggcgggtg acccagcacg gtccctcttg gaattggatt cgccatttta 900
ttttcttgc tgctaaatca ccgagcccg aagattagag agttttatit 950
ctgggattcc tgiagacaca ccgcggccgc cagcacactg 990

<210> 4

<211> 191

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

1   CAGTGTGCTG GCGGCCCGGC GCGAGCCGGC CCGGCCCCGG TCGGGCCTCC
-26

    GAAACC   ATG AAC TTT CTG CTG TCT TGG GTG CAT TGG AGC
           M  N  F  L  L  S  W  V  H  W  S
           -26                      -20

90   CTC GCC TTG CTG CTC TAC CTC CAC CAT GCC AAG TGG TCC CAG
-15  L  A  L  L  L  Y  L  H  H  A  K  W  S  Q
           -10

    GCT GCA CCC ATG GCA GAA GGA GGA GGG CAG AAT CAT CAC
    A  A  P  M  A  E  G  G  G  Q  N  H  H
    -1 +1                +5                +10

171  GAA GTG GTG AAG TTC ATG GAT GTC TAT CAG CGC AGC TAC TGC
13   E  V  V  K  F  M  D  V  Y  Q  R  S  Y  C
           +15                +20                +25

    CAT CCA ATC GAG ACC CTG GTG GAC ATC TTC CAG GAG TAC
    H  P  I  E  T  L  V  D  I  F  Q  E  Y
           +30                +35

252  CCT GAT GAG ATC GAG TAC ATC TTC AAG CCA TCC TGT GTG CCC
40   P  D  E  I  E  Y  I  F  K  P  S  C  V  P
           +40                +45                +50

    CTG ATG CGA TGC GGG GGC TGC TGC AAT GAC GAG GGC CTG
    L  M  R  C  G  G  C  C  N  D  E  G  L
           +55                +60                +65

333  GAG TGT GTG CCC ACT GAG GAG TCC AAC ATC ACC ATG CAG ATT
67   E  C  V  P  T  E  E  S  N  I  T  M  Q  I
           +70                +75                +80

    ATG CGG ATC AAA CCT CAC CAA GGC CAG CAC ATA GGA GAG
    M  R  I  K  P  H  Q  G  Q  H  I  G  E
           +85                +90

414  ATG AGC TTC CTA CAG CAC AAC AAA TGT GAA TGC AGA CCA AAG
94   M  S  F  L  Q  H  N  K  C  E  C  R  P  K
           +95                +100                +105

    AAA GAT AGA CCA AGA CAA GAA AAT CCC TGT GGG CCT TGC
    K  D  R  A  R  Q  E  N  P  C  G  P  C
           +110                +115                +120

495  TCA GAG CGG AGA AAG CAT TTG TTT GTA CAA GAT CCG CAG ACG
121  S  E  R  R  K  H  L  F  V  Q  D  P  Q  T
           +125                +130

    TGT AAA TGT TCC TGC AAA AAC ACA GAC TCG CGT TGC AAG
    C  K  C  S  C  K  N  T  D  S  R  C  K
    +135                +140                +145

```

图 1A

```
576 GCG AGG CAG CTT GAG TTA AAC GAA CGT ACT TGC AGA TGT GAC
148 A R Q L E L N E R T C R C D
      +150      +155      +160
      AAG CCG AGG CGG TGA GCCGGGCA GGAGGAAGGA GCCTCCCTCA
      K P R R O
      +165
661 GGGTTTCGGG AACCAGATCT CTCACCAGGA AAGACTGATA CAGAACGATC
      GATACAGAAA CCACGCTGCC GCCACCACAC CATCACCATC GACAGAACAG
761 TCCTTAATCC AGAAACCTGA AATGAAGGAA GAGGAGACTC TGCGCAGAGC
      ACTTTGGGTC CQGAGGGCGA GACTCCGGCG GAAGCATTCC CGGGCGGGTG
861 ACCCAGCACG GTCCCTCTTG GAATTGGATT CGCCATTTTA TTTTCTTGC
      TGCTAAATCA CQGAGCCCGG AAGATTAGAG AGTTTTATTT CTGGGATTCC
961 TGTAGACACA CQGCGGCCGC CAGCACACTG
```

图 1B

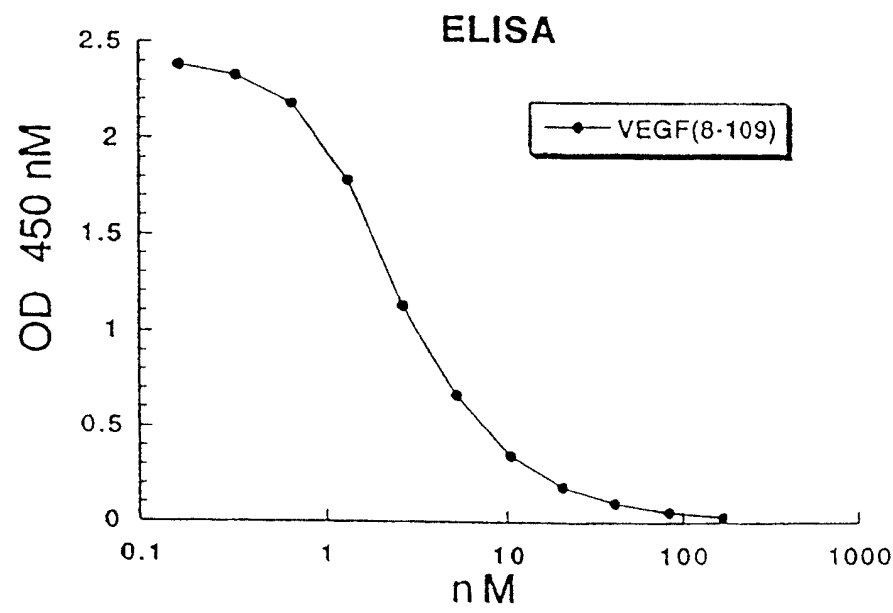


图 2

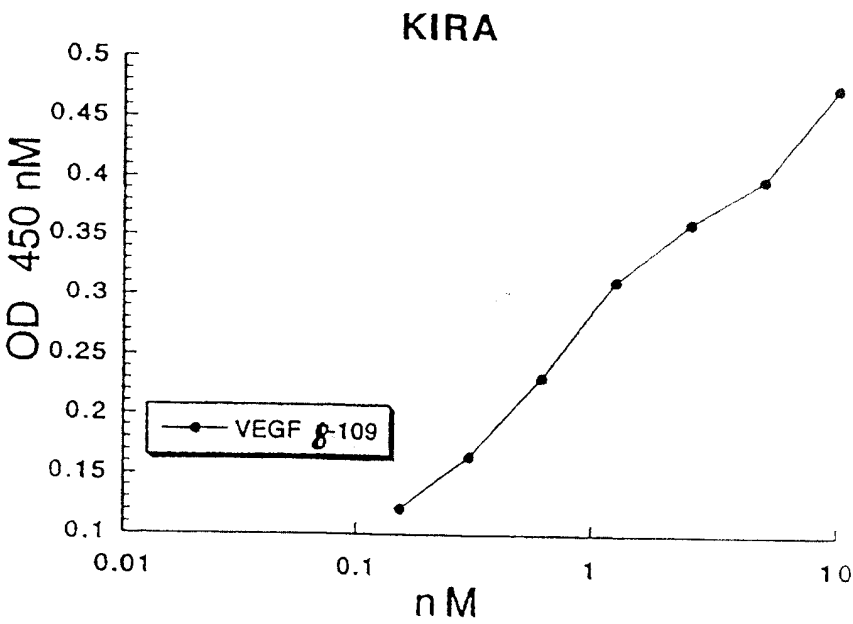


图 3

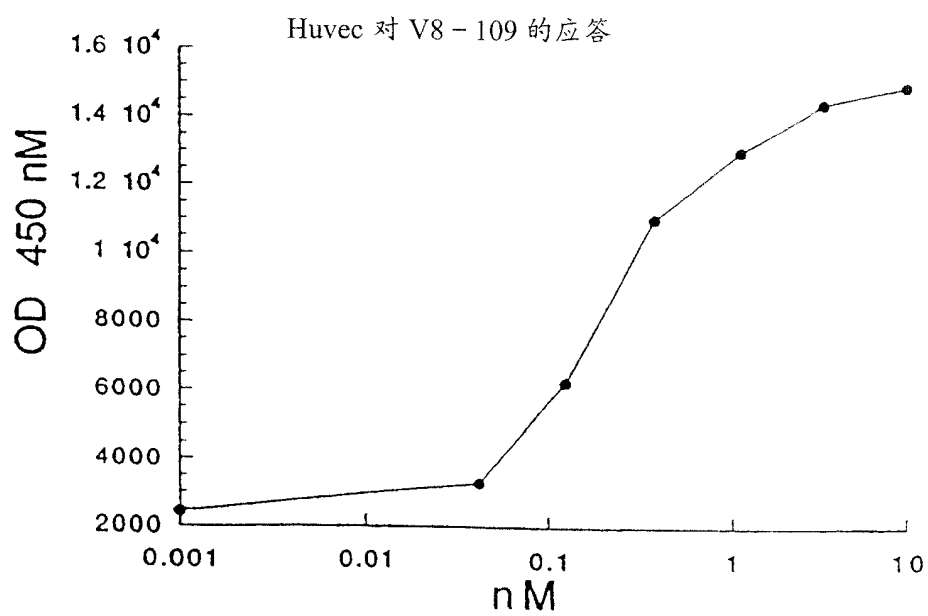


图 4

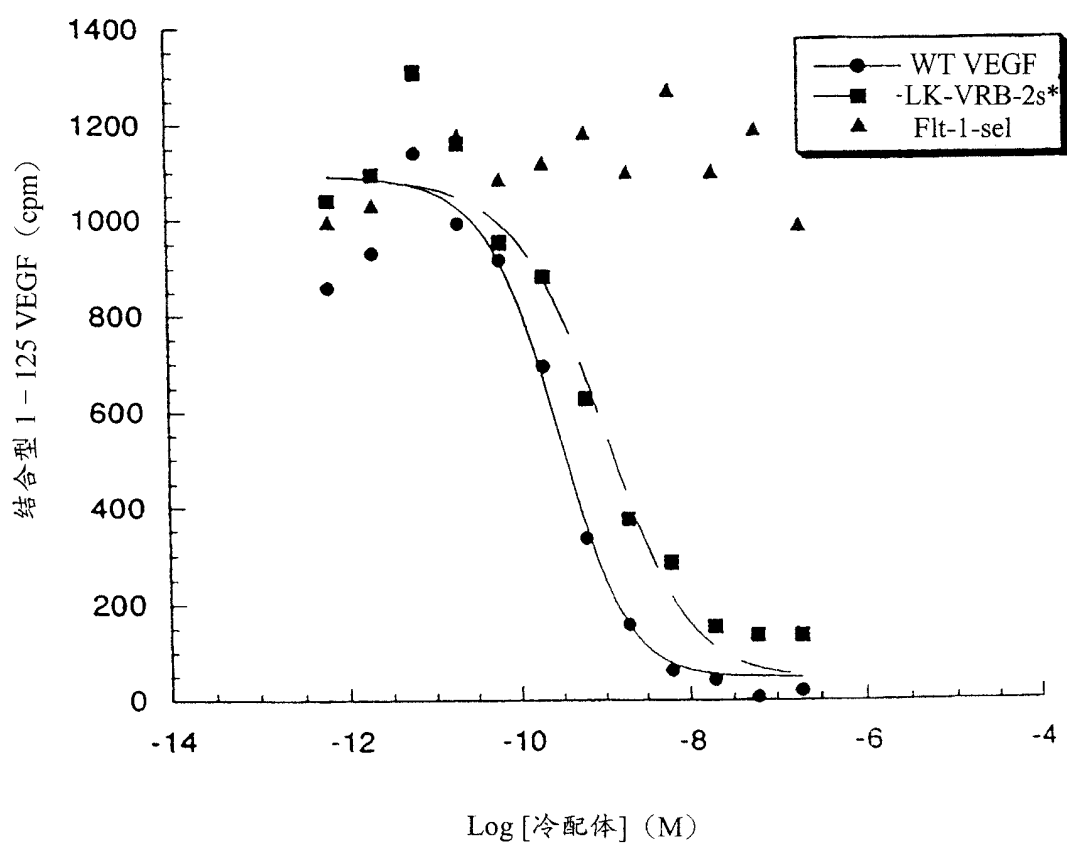


图 5

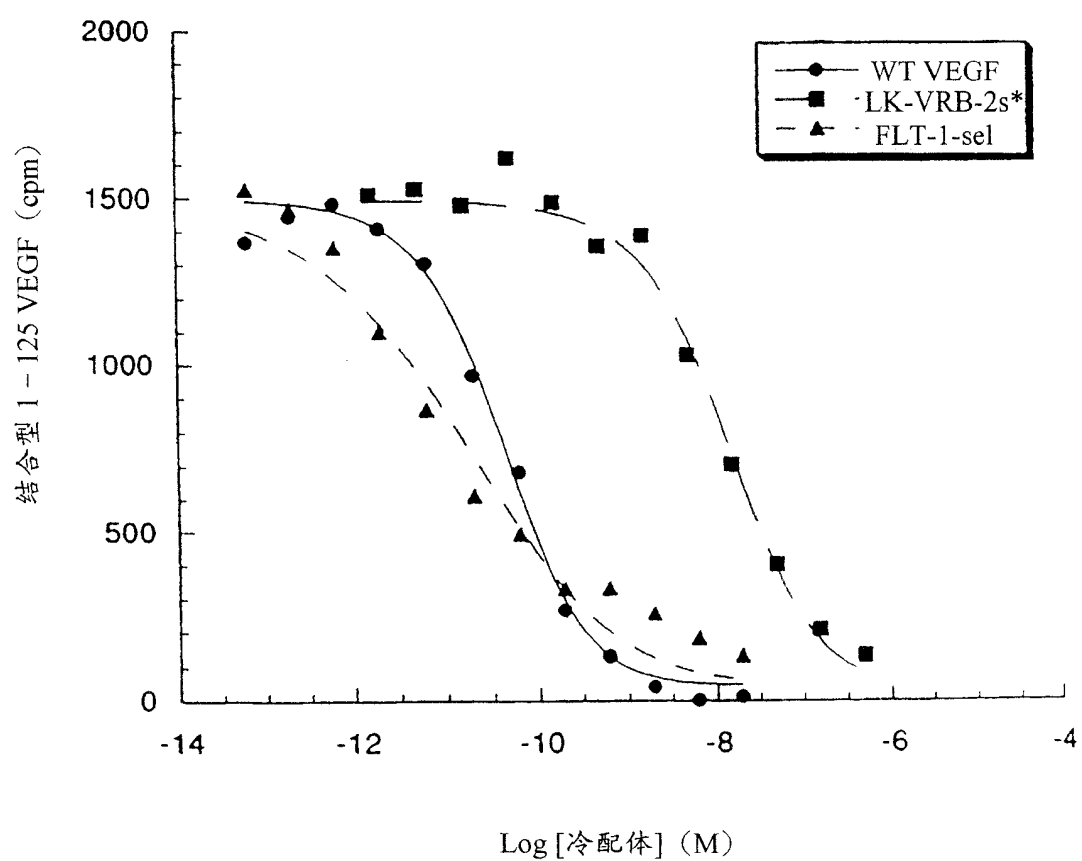


图 6

VEGF 丙氨酸突变体结合的倍数下降

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

图 7

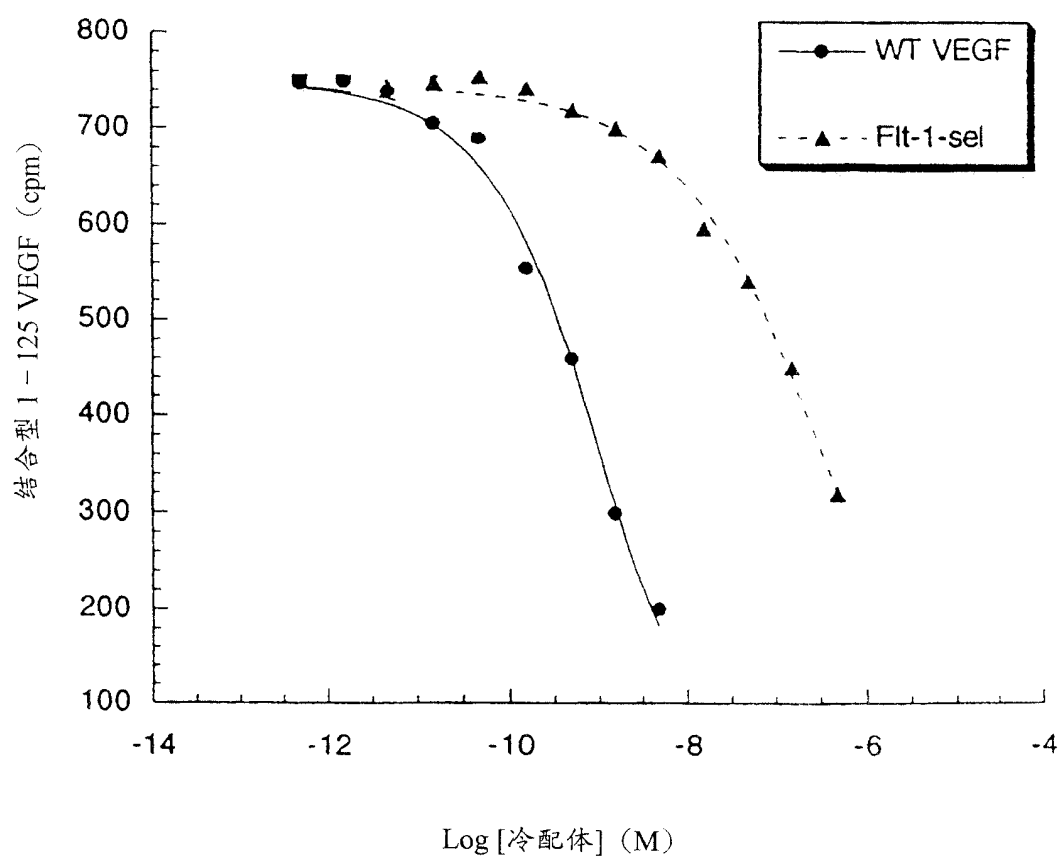


图 8A

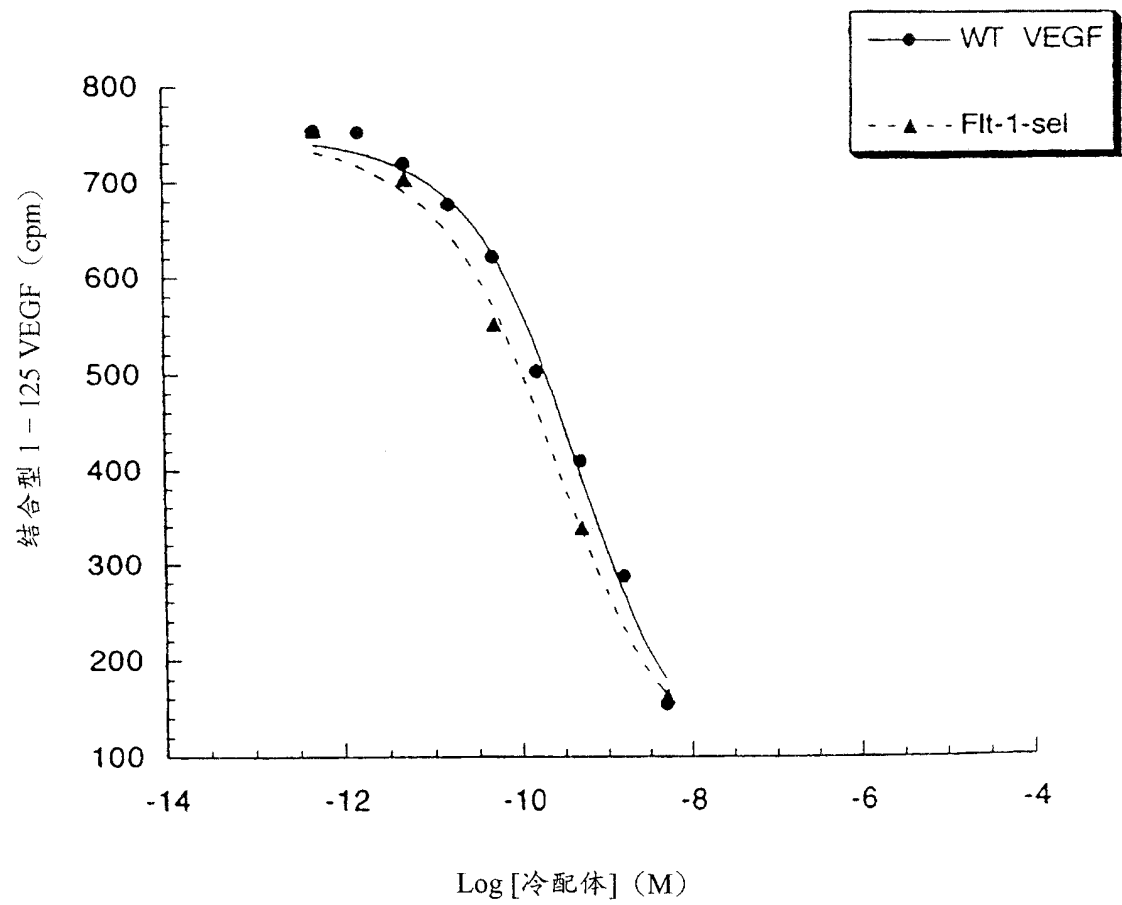


图 8B

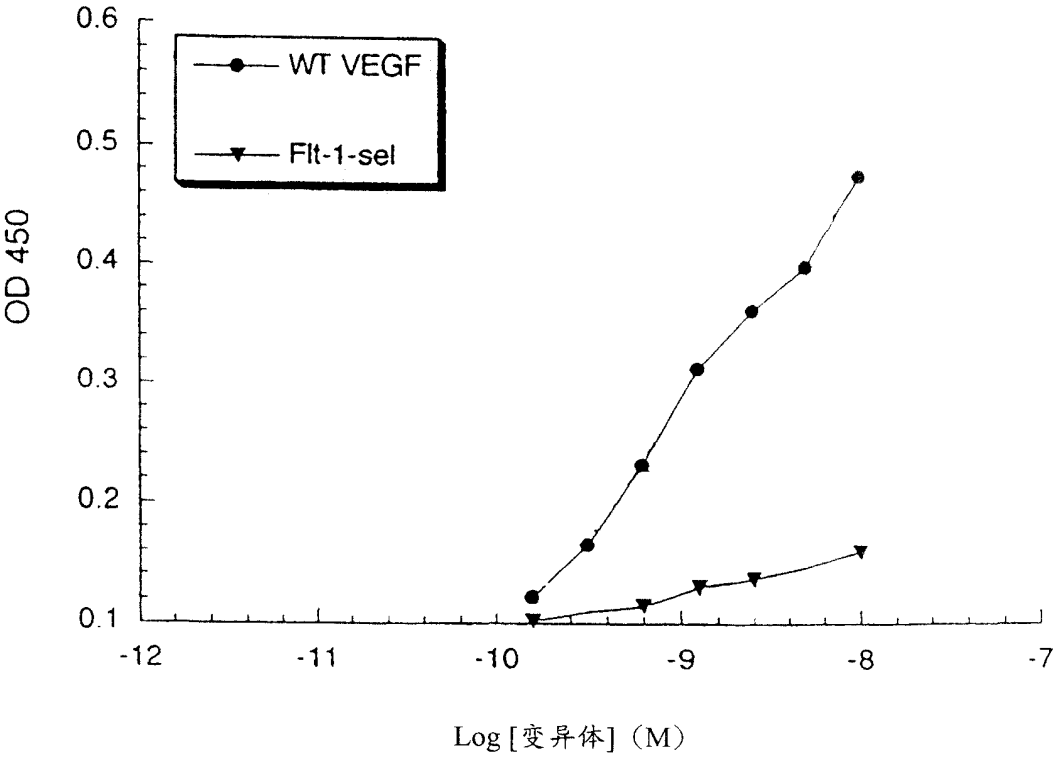


图 9

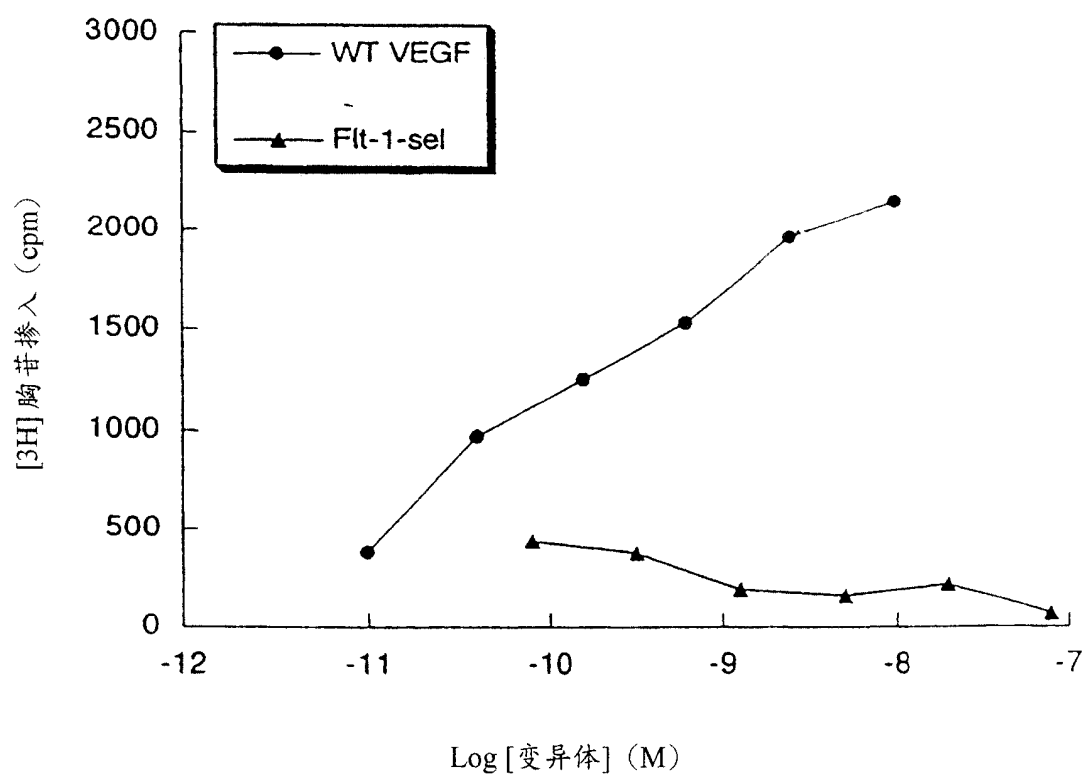


图 10

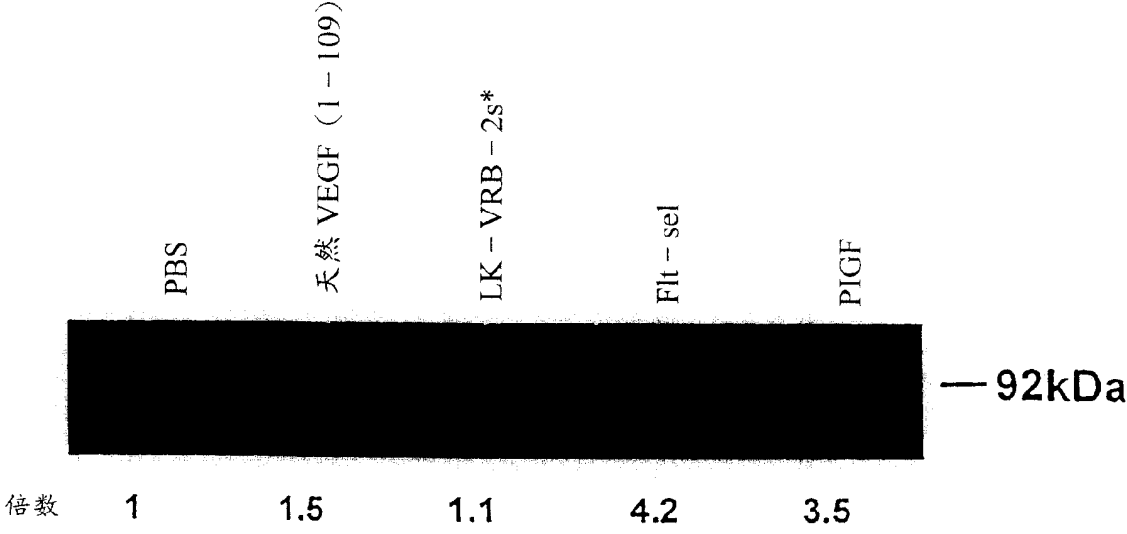


图 11

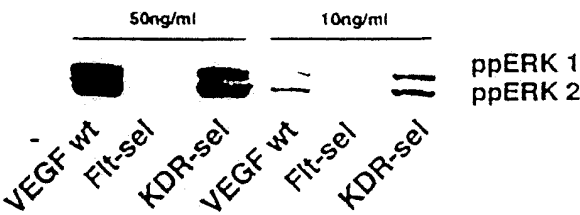


图 12A

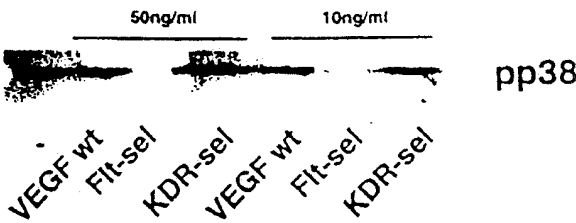
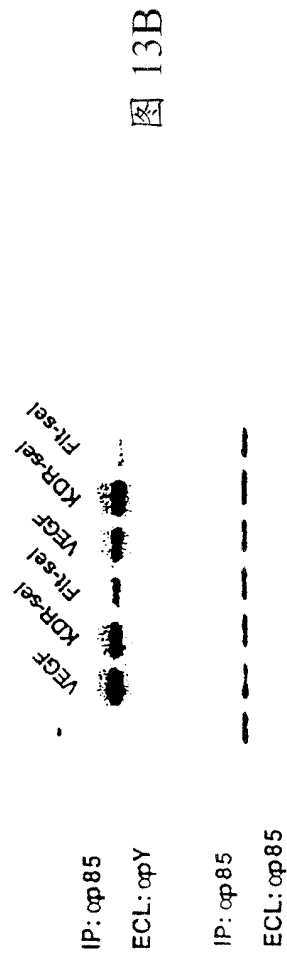
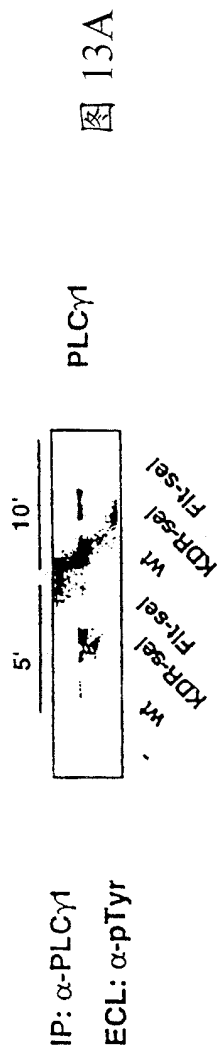


图 12B



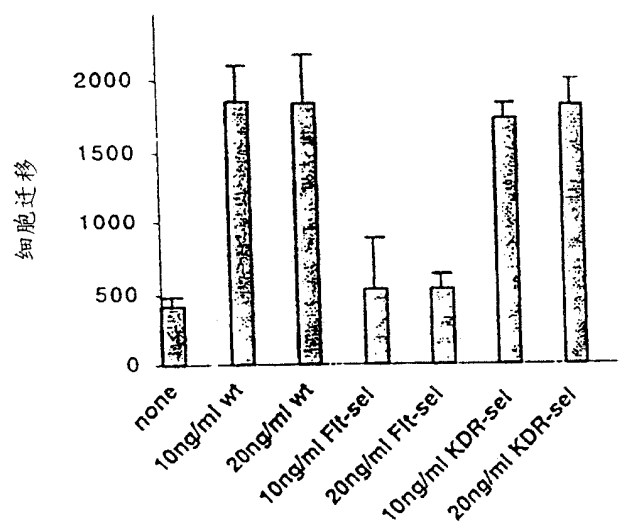


图 14A

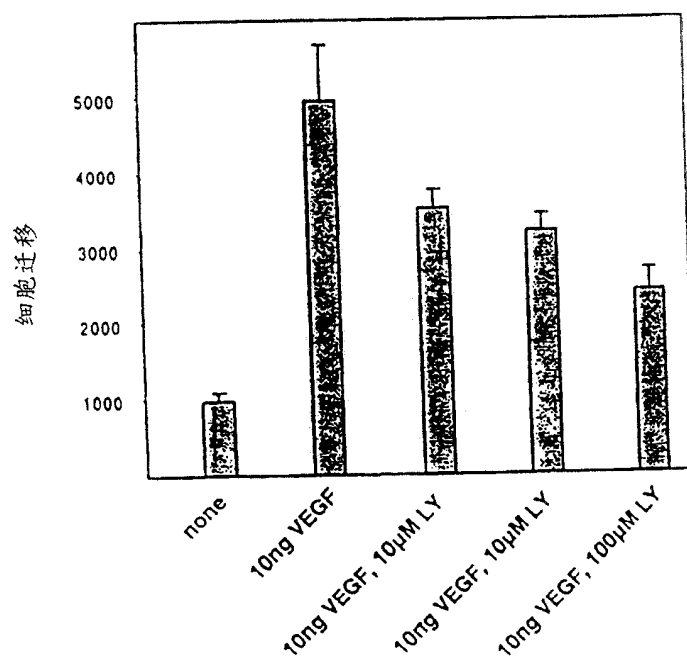
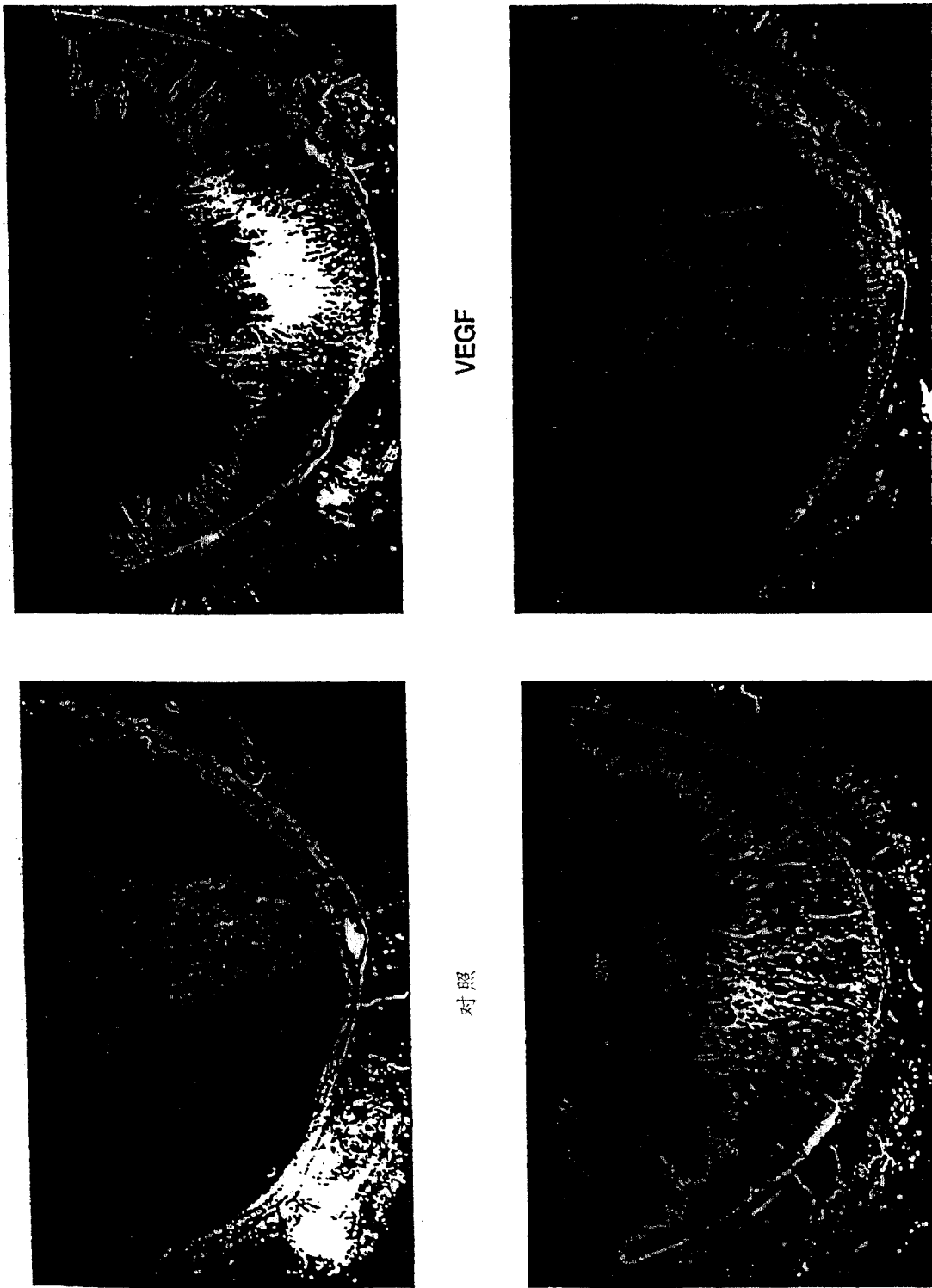


图 14B



Flt-1 - 选择性 VEGF

KDR - 选择性 VEGF

图 15A

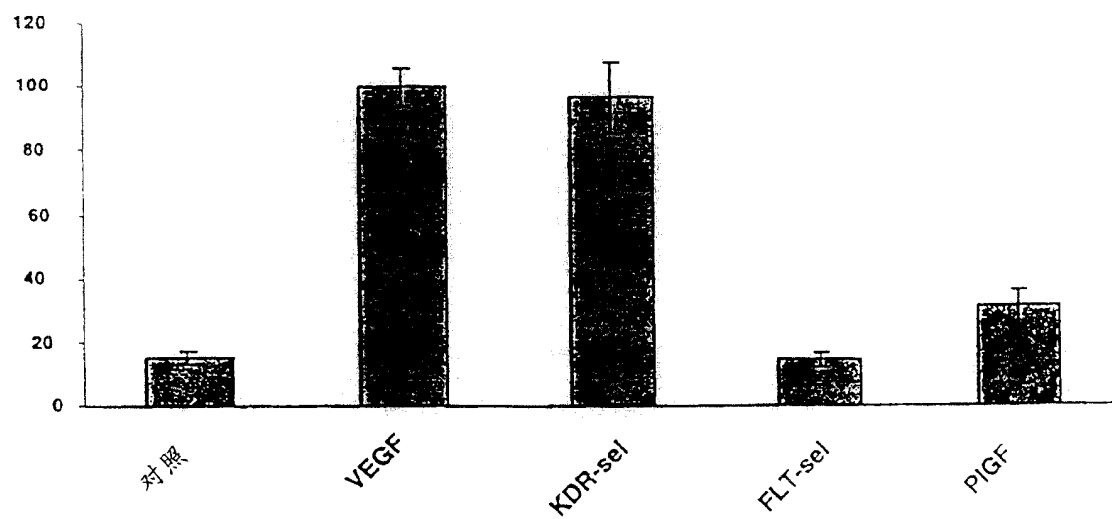


图 15B