

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-501608

(P2004-501608A)

(43) 公表日 平成16年1月22日(2004.1.22)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
<b>A O 1 K 67/027</b>	A O 1 K 67/027	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 5
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 39/395	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 9/00</b>	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 272 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-568372 (P2001-568372)	(71) 出願人	500127955
(86) (22) 出願日	平成13年3月21日 (2001.3.21)		キュラゲン コーポレイション
(85) 翻訳文提出日	平成14年9月24日 (2002.9.24)		アメリカ合衆国 コネチカット 0651
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/009043		1, ニュー ヘブーン, ロング ワーフ
(87) 国際公開番号	W02001/070174		ドライブ 555, 11 ティーエイチ
(87) 国際公開日	平成13年9月27日 (2001.9.27)		フロアー
(31) 優先権主張番号	60/191, 201	(71) 出願人	596168317
(32) 優先日	平成12年3月21日 (2000.3.21)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(33) 優先権主張国	米国 (US)		GENENTECH, INC.
			アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
			0-4990・サウス・サン・フランシス
			コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
		(74) 代理人	100109726
			弁理士 園田 吉隆
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 V E G F 調節遺伝子及びそれらを利用する方法

## (57) 【要約】

本発明は少なくとも1種のV E G F 調節遺伝子ポリペプチドの活性を調節することを含む、血管形成及び/又はアポトーシスを調節するための方法を提供する。本発明はまたV E G F 調節遺伝子の発現に関連する疾患の予防又は治療のための、血管形成及びアポトーシスを調節する製薬組成物を提供する。本発明はまたV E G F 調節遺伝子をコードする天然に生じる配列とハイブリダイズするV E G F 調節遺伝子ポリヌクレオチド及びタンパク質に特異的に結合する抗体を使用する診断アッセイ法を提供する。本発明はまた新規なヒト及びマウスアルギニンリッチタンパク質 (A R P s) とヌクレオチド配列を提供する。本発明はA R P s をコードする核酸配列を含む遺伝子操作発現ベクター及び宿主細胞とタンパク質を生産する方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号：3 又は配列番号：22 の配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

## 【請求項 2】

前記ポリペプチドが活性な ARP ポリペプチドである請求項 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 3】

配列番号：3 又は配列番号：22 の配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する請求項 2 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 4】

配列番号：3 又は配列番号：22 の配列と少なくとも 98 % の配列同一性を有する請求項 2 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 5】

請求項 1 ないし 4 の何れか 1 項に記載のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドの相補鎖。

## 【請求項 6】

配列番号：2 又は配列番号：21 の配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドの相補鎖。

## 【請求項 7】

配列番号：2、又は配列番号：21 の配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する請求項 6 に記載のポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドの相補鎖。

## 【請求項 8】

配列番号：2 又は配列番号：21 の配列と少なくとも 98 % の配列同一性を有する請求項 6 に記載のポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドの相補鎖。

## 【請求項 9】

請求項 1 ないし 4 の何れか 1 項に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

## 【請求項 10】

少なくとも 1 種の VEGF 調節遺伝子ポリペプチドの活性を調節することを含んでなる、血管形成の調節方法。

## 【請求項 11】

上記血管形成の調節が血管形成の増大であり、上記活性の調節が、ネキシン、胎盤タンパク 5 (PP5)、アミロイド前駆体様タンパク 2 (APLP2)、G タンパク質シグナル伝達調節因子 - 3 (RGS3)、グラビン、アルギニンリッチタンパク質 (ARP)、ダウン症必須領域タンパク - 1 (DSCR1)、インスリン誘導遺伝子 - 1 (INSIG1)、プロゲステロン誘導脱落タンパク (DEPP)、NADH - ユビキノンオキシドレダクターゼ鎖 1 (ND1)、ヘパリン結合 EGF 様成長因子 (HB-EGF)、MKP - 1 様プロテインチロシンホスファターゼ、オステオニドジェン及び結合組織成長因子 (CTGF) からなる群から選択される少なくとも 1 種のポリペプチドの活性を増加させることを含む、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

上記血管形成の調節が血管形成の低減であり、上記活性の調節が、アミロイド前駆体タンパク (APP)、酵母 VPS41 に類似のヒト遺伝子 (hVSP41p)、チトクロムオキシダーゼサブユニット I (MTCO1)、NADH - ユビキノンオキシドレダクターゼ鎖 4 (ND4) からなる群から選択される少なくとも 1 種のポリペプチドの活性を増加させることを含む、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 13】

上記血管形成の調節が血管形成の低減であり、上記活性の調節が、ネキシン、PP5、APLP2、RGS3、グラビン、ARP、DSCR1、INSIG1、DEPP、ND1、HB-EGF、MKP - 1 様プロテインチロシンホスファターゼ、オステオニドジェン及び CTGF からなる群から選択される少なくとも 1 種のポリペプチドの活性を減少させ

10

20

30

40

50

ることを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

上記血管形成の調節が血管形成の増大であり、上記活性の調節が、APP、hVPS41p、MTCO1 及びND4 からなる群から選択される少なくとも 1 種のポリペプチドの活性を減少させることを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

上記活性の増加が、上記少なくとも 1 種のポリペプチドの発現を増加させることを含む、請求項 11 又は 12 に記載の方法。

【請求項 16】

上記活性の減少が、上記少なくとも 1 種のポリペプチドの発現を減少させることを含む、請求項 13 又は 14 に記載の方法。 10

【請求項 17】

上記発現の増加が、細胞を形質転換して、上記少なくとも 1 種のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を増加させることを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

上記発現の減少が、細胞を形質転換して、上記少なくとも 1 種のポリペプチドをコードする内因性ポリヌクレオチドの少なくとも一部に対してアンチセンスなポリヌクレオチドを発現させることを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

上記活性の減少が、細胞を形質転換して、上記少なくとも 1 種のポリペプチドに対するアプタマーを発現させることを含む、請求項 13 又は 14 に記載の方法。 20

【請求項 20】

上記活性の減少が、上記少なくとも 1 種のポリペプチドに対するアプタマーを細胞中に導入することを含む、請求項 13 又は 14 に記載の方法。

【請求項 21】

上記活性の減少が、上記少なくとも 1 種のポリペプチドに選択的に結合する抗体を細胞に投与することを含む、請求項 13 又は 14 に記載の方法。

【請求項 22】

請求項 12 又は 13 に記載の方法によって、血管形成を低減させることを含む、腫瘍の治療方法。 30

【請求項 23】

請求項 22 に記載の方法によって癌性腫瘍を治療することを含む、癌の治療方法。

【請求項 24】

請求項 11 又は 14 に記載の方法によって血管形成を増大させることを含む、心筋梗塞の治療方法。

【請求項 25】

請求項 11 又は 14 に記載の方法によって血管形成を増大させることを含む、治癒の促進方法。

【請求項 26】

化合物の VEGF 調節遺伝子の転写の上方制御又は下方制御活性を測定する方法であって 40

、  
上記化合物を、RNA ポリメラーゼと上記遺伝子を含有する組成物に接触させ、VEGF 調節遺伝子転写の量を測定することを含む方法。

【請求項 27】

上記組成物が細胞中にある、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

化合物の VEGF 調節遺伝子の翻訳の上方制御又は下方制御活性を測定する方法であって、

上記化合物を、上記遺伝子の mRNA に対応するポリヌクレオチドとリボソームを含有する組成物に接触させ、VEGF 調節遺伝子翻訳の量を測定することを含む方法。 50

## 【請求項 29】

上記組成物が細胞中にある、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 30】

請求項 5 ないし 8 の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

## 【請求項 31】

請求項 30 に記載のベクターを含む細胞。

## 【請求項 32】

腫瘍発生の可能性について組織サンプルをスクリーニングする方法であって、  
上記組織サンプル中における少なくとも 1 種の VEGF 調節遺伝子の発現を測定すること  
を含む、方法。

10

## 【請求項 33】

上記測定が、上記少なくとも 1 種の VEGF 調節遺伝子によりコードされるポリペプチド  
の量を測定することである、請求項 32 に記載の方法。

## 【請求項 34】

上記発現の測定が、上記少なくとも 1 種の VEGF 調節遺伝子に対応する mRNA の量を  
測定することである、請求項 32 に記載の方法。

## 【請求項 35】

破壊された ARP を有する、遺伝子組換え非ヒト動物。

## 【請求項 36】

非ヒト動物がマウスである請求項 35 に記載の遺伝子組換え非ヒト動物。

20

## 【請求項 37】

配列番号：2 又は配列番号 21 の配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する外来性の  
ポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドの相補鎖を含む遺伝子組換え非ヒト動物。

## 【請求項 38】

上記外来性ポリヌクレオチドが、配列番号：2 又は配列番号：21 の配列、又は該ポリヌ  
クレオチドの相補鎖と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、請求項 37 に記載の遺伝  
子組換え非ヒト動物。

## 【請求項 39】

上記外来性ポリヌクレオチドが、配列番号：2 又は配列番号：21 の配列、又は該ポリヌ  
クレオチドの相補鎖と少なくとも 98 % の配列同一性を有する、請求項 37 に記載の遺伝  
子組換え非ヒト動物。

30

## 【請求項 40】

ARP 変異についてサンプルをスクリーニングする方法であって、  
サンプル中の ARP ヌクレオチド配列を配列番号：2 又は配列番号 21 と比較することを含  
む、方法。

## 【請求項 41】

ネキシン、PP5、ARLP2、APP、グラビン、ARP、DSCR1、MTCO1、  
ND1、ND4、HB-EGF、MKP-1 様プロテインチロシンホスファターゼ、オス  
テオニドジェン及び CTGF からなる群から選択される少なくとも 1 種の VEGF 調節遺  
伝子ポリペプチドの活性を調節することにより、細胞生存を調節する方法。

40

## 【請求項 42】

上記細胞生存の調節が、細胞生存を増大させることであり、上記活性の調節が、ネキシン  
、PP5、ARLP2、APP、グラビン、ARP、DSCR1、MTCO1、ND1、  
ND4、HB-EGF、オステオニドジェン及び CTGF からなる群から選択される少な  
くとも 1 種のポリペプチドの活性を増加させることを含む、請求項 41 に記載の方法。

## 【請求項 43】

上記細胞生存の調節が、細胞生存を低減させることであり、上記活性の調節が、少なく  
とも 1 種の VEGF 調節遺伝子ポリペプチドの活性を増加させることを含み、該 VEGF 調  
節遺伝子ポリペプチドが MKP-1 様プロテインチロシンホスファターゼである、請求項  
41 に記載の方法。

50

## 【請求項 4 4】

上記細胞生存の調節が、細胞生存を低減させることであり、上記活性の調節が、ネキシン、PP5、ARLP2、APP、グラビン、ARP、DSCR1、MTCO1、ND1、ND4、HB-EGF、オステオニドジェン及びCTGFからなる群から選択される少なくとも1種のポリペプチドの活性を減少させることを含む、請求項41に記載の方法。

## 【請求項 4 5】

上記細胞生存の調節が、細胞生存を増大させることであり、上記活性の調節が、少なくとも1種のVEGF調節遺伝子ポリペプチドの活性を減少させることを含む、該VEGF調節遺伝子ポリペプチドがMKP-1様プロテインチロシンホスファターゼである、請求項41に記載の方法。

10

## 【請求項 4 6】

上記活性の増加が、上記少なくとも1種のポリペプチドの発現を増加させることを含む、請求項42又は43に記載の方法。

## 【請求項 4 7】

上記活性の減少が、上記少なくとも1種のポリペプチドの発現を減少させることを含む、請求項44又は45に記載の方法。

## 【請求項 4 8】

上記発現の増加が、細胞を形質転換して、上記少なくとも1種のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を増加させることを含む、請求項46に記載の方法。

## 【請求項 4 9】

上記発現の減少が、細胞を形質転換して、上記少なくとも1種のポリペプチドをコードする内因性ポリヌクレオチドの少なくとも一部に対してアンチセンスなポリヌクレオチドの発現を減少させることを含む、請求項47に記載の方法。

20

## 【請求項 5 0】

上記活性の減少が、細胞を形質転換して、上記少なくとも1種のポリペプチドに対するアプタマーを発現させることを含む、請求項44又は45に記載の方法。

## 【請求項 5 1】

上記活性の減少が、上記少なくとも1種のポリペプチドに対するアプタマーを細胞中に導入することを含む、請求項44又は45に記載の方法。

## 【請求項 5 2】

上記活性の減少が、上記少なくとも1種のポリペプチドに選択的に結合する抗体を細胞に投与することを含む、請求項44又は45に記載の方法。

30

## 【請求項 5 3】

請求項43又は44に記載の方法によって細胞生存を低減させることを含む、腫瘍の治療方法。

## 【請求項 5 4】

請求項53に記載の方法によって癌性腫瘍を治療することを含む、癌の治療方法。

## 【請求項 5 5】

上記少なくとも1種のVEGF調節遺伝子がDSCR1である、請求項41、42、44及び46ないし54の何れか1項に記載の方法。

40

## 【請求項 5 6】

サンプル中における少なくとも1種のVEGF調節遺伝子の発現を、コントロールサンプル中における上記少なくとも1種の遺伝子の発現と比較することを含む、腫瘍の臨床病期を決定する方法。

## 【請求項 5 7】

上記少なくとも1種のVEGF調節遺伝子が、DSCR1とARPからなる群から選択される少なくとも一のメンバーを含む、請求項56に記載の方法。

## 【請求項 5 8】

上記サンプルが卵巣腫瘍のサンプルである請求項56又は57に記載の方法。

## 【請求項 5 9】

50

腫瘍に転移の可能性があるかどうかを決定する方法であって、請求項 5 6 ないし 5 8 の何れか 1 項に記載の方法によって上記腫瘍の臨床病期を決定することを含む、方法。

【請求項 6 0】

上記化合物がカルシウムチャネル調節因子である、請求項 2 6 ないし 2 9 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 1】

上記カルシウムチャネル調節因子が、ニカルジフィン、ニフェジピン、ベラパミル及びジルチアゼムからなる群から選択される、請求項 6 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

10

( 関連出願 )

本出願は、2 0 0 0 年 3 月 2 1 日に出願した米国仮出願第 6 0 / 1 9 1 2 0 1 号に基づく優先権を主張する。

( 背景 )

都市には道路や路地があり、植物には木質部や節部があり、人々には動脈、静脈及びリンパ管がある。これらの管路なしには、脊椎動物細胞は餓死するか、その代謝廃棄物中でおぼれるであろう。血管は食物や酸素を運び、代謝廃棄物を運び去るばかりでなく、遠隔位置にあるが応答する必要がある細胞に通告するシグナル伝達物質を移送する。ホルモンのメッセージは一般的なシグナルである。

全ての血管は内腔壁を裏打ちする極めて可塑性の内皮細胞の傷つきやすい単層と基底層による鞘で覆われている。位置と機能に応じて、平滑筋と結合組織も存在している。

20

【0 0 0 2】

健康な細胞ばかりでなく、所望されない細胞：腫瘍発生及び悪性細胞も、循環系により移送される血液源に依存している。これらの細胞はコロニー化し、それら自身に血液源を流用可能であるならば増殖する。新しい血管が既存の血管の増殖から派生するタイプの血管形成 ( R i s a u , 1 9 9 5 ; R i s a u 及び F l a m m e , 1 9 9 5 ) は、例えば傷の治癒又は心筋梗塞の回復におけるような通常のプロセスによってばかりでなく、腫瘍それ自体、及び癌、糖尿病性網膜症、黄斑変性症、乾癬及び慢性関節リウマチによってもなされる。そのプロセスにかかわらず、病理的であれ通常の生理的であれ、内皮細胞は多段階の様式で血管形成を媒介する：( 1 ) 内皮細胞が細胞外合図を受け、( 2 ) 分泌されたプロテアーゼにより、シグナルを受けた細胞が基底膜鞘を破壊し、( 3 ) ついで細胞がシグナルにより移動して増殖し、最後に( 4 ) 細胞が管を形成して、形態形成がなされる ( A l b e r t s ら , 1 9 9 4 ) 。このプロセスの複雑さは、細胞生理及び形態、遺伝子発現及びシグナル伝達における複雑な変化に示される。合図である血管形成の協力物質には、塩基性線維芽細胞増殖因子 ( b F G F ) 、アンジオポイエチン ( 例えば A N G 1 ) 及び種々の形態の血管内皮増殖因子 ( V E G F ) が含まれる。

30

【0 0 0 3】

V E G F は、腫瘍細胞を含む、多くの細胞により分泌される多機能細胞分裂促進剤である ( F e r r a r a , 1 9 9 9 b ) 。血管内皮細胞 ( V E C ) は 2 つのレセプター：( 1 ) キナーゼ挿入ドメイン含有レセプター / 胎児肝臓キナーゼ 1 ( K D R / F l k - 1 ; V E G F R 1 ) 、及び( 2 ) F m s 様チロシンキナーゼ ( F L T - 1 ; V E G F R - 2 ) ( W a r r e n ら , 1 9 9 5 ) を使用して、V E G F に反応する。これらのレセプターは V E G F に対し異なる親和性を有し、異なる細胞反応性を有すると思われる ( A t h a n a s s i a d e s 及び L a l a , 1 9 9 8 ; L i ら , 1 9 9 9 ) 。V E G F R 1 及び V E G F R - 2 が無いマウスは胚発生の初期で死亡する ( F o n g ら , 1 9 9 5 ; S h a l a b y ら , 1 9 9 5 ) 。これらのノックアウト研究から、V E G F R 1 は血島形成と造血性前駆細胞の発生に必要である一方 ( S h a l a b y ら , 1 9 9 5 ) 、V E G F R - 2 は胚性脈管構造の組織化に必要である ( F o n g ら , 1 9 9 5 ) 。これら 2 種のレセプターのなかで、V E G F R 1 は有糸分裂誘発、血管拡張及び腫瘍血管新生を含む、V E G F の生物学的効果の全範囲を媒介する一方 ( F e r r a r a , 1 9 9 9 a ) 、V E

40

50

G F R - 2 は内皮生存を促進する ( C a r m e l l i e t r a , 1999 )。

【 0 0 0 4 】

分子イベントとそれらが生じる順序とこのプロセスに必要な経路は、血管形成を理解するために基本的に重要である。インビトロモデルは、血管形成中に生じる遺伝子発現の変化を同定するために有用である。特に有益なモデル系には、3次元I型コラーゲンゲルと種々の刺激剤、例えば酢酸ミリスチン酸ホルボール ( P M A )、塩基性線維芽細胞増殖因子 ( b F G F ) 及び V E G F との懸濁液が含まれる。刺激剤とコラーゲンゲルとの組合せにより、相互に連絡する内腔構造を有する内皮細胞の3次元管状網状組織が形成される。このモデルでは、管状構造体への内皮分化は、新規の m R N A 又はタンパク質合成のインヒビターにより完全にブロックされる。さらに、細胞は、協調的かつ同調的な形での分化を通して発達し、遺伝子発現の性状が最適化される ( K a h n r a , 2000 ; Y a n g r a , 1999 )。

【 0 0 0 5 】

V E G F と V E G F R - 2 は内皮細胞の生存を確実にする。発育中の網膜においては、隣接する細胞による V E G F 分泌の阻害に相関し、毛細管が過剰酸素症 ( 酸素 / 酸素圧の増加 ) に応じて消失する。これらの血管は、内皮細胞の選択的アポトーシスにより消失する ( A l o n r a , 1995 )。機能ブロック抗 V E G F 抗体を使用して V E G F を除去すると、また血管、さらには腫瘍の脈管構造を退行させる ( Y u a n r a , 1996 )。細胞生存を促進する V E G F の能力を媒介するメカニズムは V E G F R - 2 に関連している。V E G F R - 2 のライゲーションにより、細胞内皮 ( V E ) - カドヘリン、 - カテニン、ホスホイノシチド - 3 - O H キナーゼ ( P I 3 - K )、及び V E G F R 1 の複合体が誘導される。P I 3 - K が、セリン / スレオニンプロテインキナーゼ A k t ( プロテインキナーゼ B ) をリン酸化し活性化する ( C a r m e l l i e t r a , 1999 )。活性化された A k t は、V E G F - 依存性生存シグナルの媒介に必要であり、また十分なものである ( G e r b e r r a , 1998 )。

【 0 0 0 6 】

プログラムされた細胞死、すなわちアポトーシスと、細胞生存は、発生、ホメオスタシス、ストレス及び種々の病状において重要な役割を担っている。アポトーシス ( ネクローシスと対照的 ) はカスパーゼにより媒介される。カスパーゼは、プロアポトーシス性刺激に反応して活性化される不活性なプロ酵素として健康な細胞中に存在する。ミトコンドリアは、サイトゾル中にチトクロム c を放出し、アダプター分子 A p a f - 1 ( アポトーシス性プロテアーゼ活性化因子 1 ) に結合することによりカスパーゼを活性化する。A p a f 1 はプロカスパーゼ - 9 をオリゴマー化し、補充し、活性化する。活性化されたカスパーゼ - 9 は下流のカスパーゼを活性化し、アポトーシスが開始される。チトクロム c はミトコンドリアの透過性増大 ( P T ) 孔を通して放出される。B c l - 2 という抗アポトーシスインヒビターは、P T 孔と相互作用してチトクロム c の放出を防止する ( M a r z o r a , 1998 )。V E G F は V E C において B c l - 2 の発現を誘発し、ミトコンドリアの透過性の調節が V E G F 生存メカニズムの一部であることを示している ( G e r b e r r a , 1998 )。

【 0 0 0 7 】

腫瘍細胞は血管形成を利用し、腫瘍成長を助長する。低酸素症 - 酸素レベルの低減 - は腫瘍細胞を誘導して V E G F を分泌させ、新血管新生を促進する。V E G F の分泌に加えて、造血細胞 ( B e l l a m y r a , 1999 )、乳癌細胞 ( S p e i r s 及び A t k i n , 1999 ) 及びカポジ肉腫 ( M a s o o d r a , 1997 ) を含む腫瘍細胞では V E G F R 1 が発現している。V E G F は、パラ分泌及び自己分泌の双方の方式で作用可能で、内皮の増殖と生存を刺激する。V E G F とそのレセプターに加えて新血管新生を媒介し、最終的に、腫瘍の生存を可能にする分子は、腫瘍の診断、特徴付け及び最終的には治療に有用である。

【 0 0 0 8 】

V E G F により調節される遺伝子を同定することは、細胞増殖、リモデリング等々を含む

、複雑な内皮応答を理解するのに有用であるばかりでなく、多様な診断的また治療的用途にも有用である。例えば、ミトコンドリアのチトクロム c の放出がアポトーシスとそのような作用を阻害する V E G F の保護効果を開始するため、V E G F により調節される遺伝子を決定することは、治療的にアポトーシスを制御するのに有用である。このような遺伝子とそれらのタンパク質は、例えば遺伝子療法、又は遺伝子もしくはタンパク質それ自体の発現に作用する物質の発見により、調節され得る。V E G F 調節遺伝子の発現の評価は、腫瘍細胞の転移の可能性を評価するのに使用することができる。血管新生アッセイのための内皮特異的マーカーの収集物は腫瘍成長のアッセイに使用することができる。種々の病状は V E G F 媒介性血管形成を用いることにより治療され得る。

#### 【0009】

10

##### (発明の概要)

本発明は、V E G F 又は関連するサイトカインに反応して差次的に発現されるいくつかの V E C 遺伝子に関する。これらの差次的に発現される遺伝子は「V E G F 調節遺伝子 ( V E G F m g ) 」と称され：

- 1) グリア由来神経突起促進因子 ( G D N P F ) / ネキシン
- 2) 組織因子経路インヒビター - 2 ( T E P I 2 ) / 胎盤タンパク 5 ( P P 5 )
- 3) ヘパリン結合 E G F 様成長因子 ( H B - E G F )
- 4) G タンパク質シグナル伝達の制御因子 - 3 ( R G S 3 )
- 5) 重症筋無力症 ( M G ) 自己抗原 / グラビン ( g r a v i n )
- 6) M K P - 1 様プロテインチロシンホスファターゼ
- 7) アミロイド前駆体様タンパク 2 ( A P L P 2 ) C E I - ボックス結合タンパク
- 8) オステオニドジェン ( o s t e o n i d o g e n ) ( ニドジェン - 2 前駆体 )
- 9) アミロイド前駆体タンパク ( A P P )
- 10) 酵母 V P S 4 1 類似のヒト遺伝子 ( h V P S 4 1 p )
- 11) アルギニンリッチタンパク質 ( A R P )
- 12) ダウン症必須領域タンパク - 1 ( D S C R 1 )
- 13) インスリン誘発遺伝子 - 1 ( I N S I G 1 )
- 14) プロゲステロン誘導脱落タンパク ( D E P P )
- 15) チトクロムオキシダーゼサブユニット I ( M T C O 1 )
- 16) N A D H ユビキノンオキシドレダクターゼ鎖 1 ( N D 1 )
- 17) N A D H ユビキノンオキシドレダクターゼ鎖 4 ( N D 4 )
- 18) 結合組織成長因子 ( C T G F )

20

30

である。

#### 【0010】

第 1 の側面では、本発明は、配列番号： 3 又は配列番号： 2 2 の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する単離されたポリペプチド、それらをコードするポリヌクレオチド、及びそれらと特異的に結合する抗体にある。

第 2 の側面では、本発明は、配列番号： 2 又は配列番号： 2 1 の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する単離されたポリヌクレオチド、又はその相補鎖にある。

第 3 の側面では、本発明は破壊されたアルギニンリッチタンパク質 ( A R P ) 遺伝子を有する遺伝子組換え非ヒト動物、又は配列番号： 2 又は配列番号： 2 1 の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する外来性ポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドの相補鎖を発現している遺伝子組換え非ヒト動物にある。

40

第 4 の側面では、本発明は、A R P 変異のサンプルをスクリーニングするための方法にある。

#### 【0011】

第 5 の側面では、本発明は、少なくとも 1 種の V E G F 調節遺伝子ポリペプチドの活性を調節することを含む、血管形成を調節する方法にある。

第 6 の側面では、本発明は、少なくとも 1 種の V E G F 調節遺伝子ポリペプチドの活性を調節することを含む、血管形成を増大並びに低減する方法にある。V E G F 調節遺伝子ポ

50



リペプチドの活性の調節は、遺伝子を過剰発現させるか、又は発現をなくするか、もしくは特異的アンタゴニスト又はアゴニスト、例えば抗体又はアプタマーと接触させることにより V E G F 調節遺伝子ポリペプチドの機能を損傷させることによりなされ得る。

第 7 の側面では、本発明は、腫瘍、癌、心筋梗塞等を含む、種々の病状の治療方法にある。

第 8 の側面では、本発明は、化合物の、V E G F 調節遺伝子の転写及び翻訳の上方制御又は下方制御活性を測定する方法にある。ある実施態様では、化合物はカルシウムチャネル調節因子である。

#### 【 0 0 1 2 】

第 9 の側面では、本発明は、腫瘍発生の可能性について組織サンプルをスクリーニングする方法にある。 10

第 1 0 の側面では、本発明は、少なくとも 1 種の V E G F 調節遺伝子ポリペプチドの活性を調節することにより、細胞生存を調節する方法にある。

第 1 1 の側面では、本発明は、少なくとも 1 種の V E G F 調節遺伝子ポリペプチドの活性を調節することを含む、細胞生存を増大並びに低減させる方法にある。V E G F 調節遺伝子ポリペプチドの活性調節は、遺伝子を過剰発現させるか、又は発現をなくするか、もしくは特異的アンタゴニスト又はアゴニスト、例えば抗体又はアプタマーと接触させることにより V E G F 調節遺伝子ポリペプチドの機能を損傷させることによりなされ得る。

第 1 2 の側面では、本発明は、V E G F 調節遺伝子を調節することにより細胞生存を低減させることを含む、腫瘍及び癌の治療方法にある。一実施態様では、調節遺伝子は D S C 20 R 1 である。

#### 【 0 0 1 3 】

第 1 3 の側面では、本発明は、コントロールサンプルにおける少なくとも 1 種の V E G F 調節遺伝子の発現と、サンプルにおける少なくとも 1 種の V E G F 調節遺伝子の発現を比較することによる、腫瘍の臨床病期を決定する方法にある。他の実施態様では、V E G F 調節遺伝子は D S C R 1 及び / 又は A R P である。

第 1 4 の側面では、本発明は、腫瘍の臨床病期を決定することにより、腫瘍が転移する可能性があるか否かを決定する方法にある。

ここに記載したものと類似もしくは等価な方法及び物質を、本発明の実施又は試験に使用することは可能ではあるが、適切な方法及び物質を以下に記載しておく。物質、方法及び 30 実施例は例証のためだけのものであって、限定することを意図したものではない。

#### 【 0 0 1 4 】

( 発明の詳細な記載 )

Gene Calling ( Shimkets ら , 1999 ) と称される増幅及び画像化アプローチ法を使用して、V E G F により刺激された内皮細胞に差次的に発現する遺伝子を同定した。この方法は、既知の遺伝子と新規遺伝子の双方における m R N A の多さの定量的差異の感度の高い検出に関連して、c D N A 集団の包括的サンプリングを提供するものである ( Shimkets ら , 1999 )。本発明では、18 の差次的に発現した遺伝子を開示している。これら遺伝子の同定と差次的発現は、実時間定量的ポリメラーゼ連鎖反応 ( R T - P C R ) を使用する第二の独立した方法により確認される。一般に、本発 40 明は血管形成及び細胞生存に対する V E G F 調節遺伝子に関連する。

#### 【 0 0 1 5 】

定義

他に定義しない限り、全ての技術的及び科学的用語は本発明の属する技術分野において当業者によって通常理解されるものと同一の意味を持つ。以下の定義は明確にするために示されるものである。

遺伝学に関係する ( Demerec 等 , 1966 ) の推奨をここに適応させる。遺伝子 ( 及び関連する核酸 ) とそれらがコードするタンパク質とを区別するために、遺伝子に対する略語はイタリック体 ( 又は下線 ) で示され、一方タンパク質に対する略語は大文字で開始し、イタリック体ではない。従って、アルギニンリッチタンパク質 ( A R P ) 又はア 50

ルギニンリッチタンパク質 (ARP) は、ARP をコードするヌクレオチド配列を称する。同様に、VEGFmg は VEGF 調節遺伝子のヌクレオチド配列及び断片を表す一方、VEGFmg はコードされたポリペプチド及び断片を意味する。

分子を指す場合に「単離された」とは、同定され、その天然の環境の成分から分離され及び/又は回収された分子を意味する。その天然の環境の夾雑成分とは診断又は治療上の使用を妨害する物質である。

「生存」とは、血清不足及び低酸素を含む細胞ストレスの状態下でさえ、その形態及び生理学的活性の全て又はほとんどを維持し、生存し続けている細胞のことである。

#### 【0016】

細胞における VEGF 調節遺伝子の役割

10

##### 1. アポトーシス

細胞生存は、酸化ストレス及び血清欠乏化を含むストレス下で侵害される。VEGF 刺激により、反応性酸素種 (ROS) により誘発される致死量以下の酸化ストレスの反応に類似した反応が喚起されると思われる。細胞生存における重要な要因はミトコンドリアの呼吸である。本発明のいくつかの VEGF 調節遺伝子、例えば DSCR1、グラビン及び HB-EGF はまた ROS 反応に関連している (Kayano 等, 1999)。さらに、VEGF 投与により、いくつかのミトコンドリア遺伝子 (例えば、チトクロム c オキシダーゼサブユニット及び NADH-ユビキノレダクターゼ鎖 1、4 及び 5; 実施例) は下方制御され、呼吸は阻害される。

いくつかの知見により、本発明の VEGF 調節遺伝子の細胞生存における役割とそれらのミトコンドリア呼吸との関連性が裏付けされている。酸化ストレスは、HA-1 線維芽細胞におけるミトコンドリアポリヌクレオチドの一般的なカルシウム依存性分解を引き起こす (Crawford 等, 1998)。抗前立腺癌化合物 BMD188 にさらされた場合、アポトーシス誘発性は、ミトコンドリア呼吸鎖に依存する (Joshii 等, 1999)。最後に、ミトコンドリア Raf-1 は、アポトーシスに抗する Akt に反応して活性化される (Majewski 等, 1999)。

20

#### 【0017】

本明細書においてその差次的な発現が確認され、ミトコンドリアに局在化する可能性のある全ての遺伝子は、ここに開示する実験に基づき、細胞生存において重要な成分であることが確認された。これらの遺伝子には DSCR1、ARP、INSIG1 及び DEPP が含まれ、重要な治療目的を表している。DSCR1 が過剰発現すると、ヒト臍管内皮細胞 (HUECs) におけるアポトーシスが促進させることができたが、アンチセンス DSCR1 が発現すると、活性化 AKT が発現した場合と類似したレベルまで細胞生存が促進された (図 1 を参照)。

30

それらの基質から剥離した接着細胞はアポトーシスを受ける。それらが結合している基質、例えば細動脈及び細静脈の内側及び外側の細胞外マトリックス層に欠陥があるか、又はこれらが除去されると、細胞は死亡する。これらのマトリックスは、血管形成中に内皮細胞により補充される間葉細胞から一部分泌される。成長因子 HB-EGF は、間葉細胞の増殖及び遊走を刺激し、例えば腎臓内皮細胞生存を促進する (Takemura 等, 1997)。

40

#### 【0018】

セルピン (serpin) 活性は内皮における細胞死を防止し得る。血管形成中に内皮細胞が浸潤性の新しい非血管新生組織及びストローマである場合、トロンビン様活性を有するセリンプロテアーゼが存在する。セルピンであるネクシンは、トロンビン活性、組織の損傷部位に生成される多機能セリンプロテアーゼをブロックすることにより神経突起の成長及び生存を促進する。トロンピンは細胞表面プロテアーゼ活性化レセプター (PAR-1) を介して作用し、細胞内の遊離のカルシウムレベル ( $[Ca^{2+}]_i$ ) を増加させる (Smith-Swintosky 等, 1995)。本発明では、セリンプロテアーゼインヒビター (セルピン) ネクシン及び胎盤タンパク質 5 (PP5) / TEP12 (TFPI2) が VEGF に反応して誘導されることを証明している。APP 及び APLP2 は

50

、これらの膜結合タンパク質が、エンド型タンパク質分解的に加工され、セルピン様特性を有する分泌形態を生じるために、セルピン様の役割を担うものと思われる。

# 【 0 0 1 9 】

本発明で差次的に発現され、同定された遺伝子の説明

いくつかの遺伝子は、VEGF又は関連サイトカインと接触する場合に、VECsにおいて差次的に発現され、4つの一般的なクラスに分割することができる(表1)。これらの遺伝子は、集合的に「VEGF調節遺伝子」(VEGFmg)、「VEGF調節遺伝子の組」又は「VEGFと反応性のある遺伝子」と称される。さらに、VEGF調節遺伝子としては、新規の形態のARPが開示される。セルピン、Gタンパク質関連レセプター制御因子及び選択されたミトコンドリアタンパク質のクラスが特に好ましい。

10

表1 VEGF調節遺伝子

分類	メンバー
セルピン (セリンプロテアーゼインヒビター)	1) ネキシン/グリア由来神経突起促進因子(GDNPF) 2) 胎盤タンパク5(PP5)/組織因子経路インヒビター-2(TFPI2) 3) アミロイド前駆体様タンパク2(APLP2)/CEI-ボックス結合タンパク 4) アミロイド前駆体タンパク(APP)
Gタンパク質関連レセプターの制御因子	5) Gタンパク質シグナル伝達制御因子-3(RGS3) 6) グラビン/重症筋無力症(MG)自己抗原
ミトコンドリアタンパク質 (選択グループ)	7) アルギニンリッチタンパク質(ARP) 8) ダウン症必須領域タンパク-1(DSCR1)
その他	9) 酵母 VPS41 類似のヒト遺伝子(hVPS41p) 10) インスリン誘導遺伝子-1(INSIG1) 11) プログステロン誘導脱落タンパク(DEPP) 12) チトクロムオキシダーゼサブユニットI(MTCO1) 13) NADH-ユビキノンオキシドレダクターゼ鎖1(ND1) 14) NADH-ユビキノンオキシドレダクターゼ鎖4(ND4) 15) ヘパリン結合EGF様成長因子(HB-EGF) 16) MKP-1様プロテインチロシンホスファターゼ 17) オステオニドジェン(ニドジェン-2前駆体) 18) 結合組織成長因子(CTGF)

20

30

40

# 【 0 0 2 0 】

## 1. セルピン

セルピンは、セリンプロテアーゼインヒビターであり；それらは分泌性であっても、膜結合性であってもよい。VEGF調節セルピンには、ネキシン、PP5、APLP2及びAPPが含まれる。

# 【 0 0 2 1 】

(a) ネキシン/グリア由来神経突起促進因子(GDNPF)

プロテアーゼネキシンI(PNI又はPN1; Genbank A03911; 配列番号: 4及び5; (Monardら, EP233838, 1990))は、トロンビンの神

50

経突起阻害活性を除去することにより、星状細胞及び神経細胞からのインヴィトロでの神経突起の成長及び生存を促進する。ネキシンは、トロンビンと翻訳後共有結合複合体を形成することにより、トロンビンのタンパク質分解活性を調節する (Smith - Swintowsky ら, 1995)。多機能セリンプロテアーゼであるトロンビンは、組織損傷部位で急速に生成され、血液凝固の最終段階を触媒する。

本発明では、Gene Calling<sup>T M</sup> 分析により、24時間後、VEGF刺激内皮細胞においてネキシンが上方制御されていることが示される (実施例1)。

#### 【0022】

(b) 胎盤タンパク5 (PP5) / TFP12 (TFP12)

PP5 / TFP12 (配列番号: 6及び7; GenBank NM 006528, D2 9992) は、多くの、血液凝固及び線維素溶解セリンプロテアーゼを阻害する。胚形成において、PP5は栄養芽細胞の分化に関与しており、絨毛間の血流維持に助力している。PP5はまた卵巣腺癌に頻繁に発現する (Inaba ら, 1982)。PN1と同様、PP5はトロンビン活性をブロックすることにより作用する。

Gene Calling<sup>T M</sup> 分析により、24時間後、VEGF刺激内皮細胞においてPP5が上方制御されていることが見出された (実施例1)。

#### 【0023】

(c) アミロイド前駆体様タンパク2 (APLP2)

ヒトアミロイド前駆体様タンパク APLP2 (配列番号: 8及び9; GenBank L27631) は、アルツハイマーペプチド前駆体 (APP) ファミリーに属する。アミロイド前駆体タンパク (APP) に構造的には関連しているが、APLP2は異なった形で機能する。APPと同様、APLP2は膜貫通ドメインとKunitz型プロテアーゼインヒビタードメインを含むが; APPとは異なり、APLP2は、セントロメアDNA配列エレメントI (CDEI) モチーフ (5' - GTCACATG - 3'; 配列番号: 10) を認識する、DNAに結合する (Yang ら, 1996)。

APLP2は細胞の生存経路において重要な成分であると思われる。APLP2の発現はアポトーシスを受けているPC12ニューロン細胞で増加しており (ArakiとWurtman, 1998)、プロテアーゼインヒビターであると予想される。

APLP2は、24時間後、VEGF刺激内皮細胞において上方制御されていた。この結果はTaqqman<sup>T M</sup> 分析により確認された (実施例を参照)。

#### 【0024】

(d) アミロイド前駆体タンパク (APP)

アミロイド前駆体タンパク (配列番号: 11及び12; GenBank D87675) は、遍在的に発現される膜スパンニング糖タンパク質であり、エンド型タンパク質分解的に加工されて、プロテアーゼネキシンII (PN2) と同一の分泌タンパク質を産出し、内部移行した11.5 kDa、100残基のC末端誘導体 (CTD) である。PN2は、トリプシン等のプロテイナーゼのインヒビターである。APPは、アルツハイマー病 (AD) のアミロイドプラークに沈着する主成分である39-43アミノ酸ペプチドである - アミロイド (A) 源である。APPを発現するニューロンはアポトーシスから保護されているが (Xu ら, 1999)、内皮におけるAPPの過剰発現は毒性である (Jahroudi ら, 1998)。

APPは、6及び24時間後、VEGF刺激内皮細胞において下方制御される (実施例1)。

#### 【0025】

2. Gタンパク質シグナル伝達レセプターの制御因子

Gタンパク質シグナル伝達レセプターの2種の制御因子は、RGS3及びグラビンを含み、VEGFで調節されている。

(a) Gタンパク質シグナル伝達制御因子3 (RGS3、RGP3)

シグナル伝達経路を長時間刺激すると、応答性が低減する。この脱感作は、Gタンパク質関連レセプターによるMAPキナーゼの活性化が損なわれるために生じる。RGS3 (配

10

20

30

40

50

列番号：13及び14；GenBank U27655）は、Sst2p、つまり脱感作を媒介する酵母遺伝子の相同体をコードする（Drueyら，1996）。RGS3は、Gタンパク質 サブユニットのGTPアーゼ活性を増加させ、それらを不活性なGDP結合形態にすることで、シグナル伝達を阻害する。

Gene Calling<sup>TM</sup> 分析（実施例1）により、24時間後、VEGF刺激内皮細胞においてRGS3が上方制御されていることが明らかにされる。インサイツハイブリッド形成分析により、腫瘍及び肉腫、並びに成人の筋細胞における高度な発現が明らかにされている（実施例を参照）。RGS3発現は卵巣癌におけるVEGF及びVEGFR1の発現に相関しており、シグナル伝達経路が内皮細胞と腫瘍細胞との間で類似していることを示唆している。

10

#### 【0026】

（b）グラビン/重症筋無力症（MG）自己抗原/Aキナーゼアンカータンパク質（AKAP250）

グラビン（配列番号：15及び16；GenBank U81607）は、アンカータンパク質ファミリーに属し、細胞下部位に対してプロテインキナーゼA及びCの双方が固着する（Nauertら，1997）。グラビンは酸化反応により誘発され（Satoら，1998）、RGS3と同様にアゴニスト誘発性脱感作からの回復を媒介する（Shihら，1999）。

Gene Calling分析（実施例1）により、6及び24時間後、VEGF刺激内皮細胞においてグラビンが上方制御されていることが明らかにされる。また、インサイツハイブリッド形成分析により、胎児組織及び非血管腫瘍成分において高発現し、成人組織及び腫瘍血管成分において低発現であることが示された。グラビン発現は卵巣癌におけるVEGF発現と相関している（実施例）。

20

#### 【0027】

#### 3. ミトコンドリアタンパク質

（a）アルギニンリッチタンパク質（ARP）

本発明は、新規のアルギニンリッチタンパク質の核酸及びポリペプチド配列（配列番号：2、3、21及び22；表2及び3）を開示している。

以前に開示されたヒトARP（配列番号：1（アミノ酸）及び17（ヌクレオチド）；GenBank NM006010，M83751）は、ヒト染色体バンド3p21にマッピングし、塩基性で234アミノ酸残基のポリペプチドをコードする。高度に保存されたARPは、ハムスター、ラット、マウス、ウシ及び酵母を含む、全ての検査種に見出される（Shridharら，1996a；Shridharら，1996b）。ARP多形性はしばしば腫瘍形成に相関していることが観察されている（Evronら，1997；Shridharら，1996a；Shridharら，1996b；Shridharら，1997）。

30

一方、Shridhar（Shridharら，1996a）は、ARPの1kb mRNAクローン、並びに約850bpのより小さい形態を定義することができた。ゲノム配列分析及び5' RACEを使用して、このクローンの5'領域を確立した。反対に、本発明では、GenBankに寄託された配列の185アミノ酸残基のC末端断片のみを記載する（Curagen assembly No. 78893638）。新規のヌクレオチド配列（配列番号：2）及びコードされたポリペプチド（配列番号：3）の翻訳を表2及び3に示す。配列番号：1が疎水性ポリペプチドであり、P SORT（Nakai及びHorton，1999）により核に入ることが予期されているが（図2A参照）、配列番号：3はより親水性で、核局在であることが予期される（図2B参照）。他のARP配列にはショウジョウバエARP様タンパク質（配列番号：18及び19；GenBank AF132912）が含まれる。

40

#### 【0028】

表2 新規ヒトARPのヌクレオチド配列（配列番号：2）

atgaggagga tgaggaggat gtggggccacg caggggctgg cgggtgcgcgt ggctctgagc	60
gtgctgccgg gcagccgggc gctgcggccg ggcgactgcg aagtttgtat ttcttctctg	120
ggaagatddd accaggacct caaagacaga gatgtcacat tctcaccagc cactattgaa	180
aacgaactta taaagttctg ccgggaagca agaggcaaag agaatcggtt gtgctactat	240
atcggggcca cagatgatgc agccaccaa atcatcaatg aggtatcaa gcctctggcc	300
caccacatcc ctgtggagaa gatctgtgag aagcttaaga agaaggacag ccagatatgt	360
gagcttaagt atgacaagca gatcgacctg agcacagtgg acctgaagaa gctccgagtt	420
aaagagctga agaagattct ggatgactgg ggggagacat gcaaaggctg tgcagaaaag	480
tctgactaca tccggaagat aaatgaactg atgcctaaat atgccccaa ggcagccagt	540
gcaccgaccg atttgtagtc tgctcaatct ctgttgacc tgagggggaa aaaacagttc	600
aactgcttac tccaaaaca gcctttttgt aatttatttt ttaagtgggc tcctgacaat	660
actgtatcag atgtgaagcc tggagctttc ctgatgatgc tggccctaca gtacccccat	720
gaggggattc ccttccttct gttgctggtg tactctagga cttcaaagtg t	771

10

20

【 0 0 2 9 】

表3 新規ヒトARPのアミノ酸配列（配列番号：3）

Met	Arg	Arg	Met	Arg	Arg	Met	Trp	Ala	Thr	Gln	Gly	Leu	Ala	Val	Ala	
1			5					10						15		
Leu	Ala	Leu	Ser	Val	Leu	Pro	Gly	Ser	Arg	Ala	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	
			20				25						30			
Cys	Glu	Val	Cys	Ile	Ser	Tyr	Leu	Gly	Arg	Phe	Tyr	Gln	Asp	Leu	Val	
		35					40					45				
Glu	Gly	Phe	Arg	Asp	Val	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Thr	Ile	Glu	Asn	Glu	
	50					55					60					
Leu	Ile	Lys	Phe	Cys	Arg	Glu	Ala	Arg	Gly	Lys	Glu	Asn	Arg	Leu	Cys	
65					70				75						80	
Tyr	Tyr	Ile	Gly	Ala	Thr	Asp	Asp	Ala	Ala	Thr	Lys	Ile	Ile	Asn	Glu	
			85					90						95		
Val	Ser	Lys	Pro	Leu	Ala	His	His	Ile	Pro	Val	Glu	Lys	Ile	Cys	Glu	
			100					105					110			
Lys	Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Ser	Gln	Ile	Cys	Glu	Leu	Lys	Tyr	Asp	Lys	
		115					120					125				
Gln	Ile	Asp	Leu	Ser	Thr	Val	Asp	Leu	Lys	Lys	Leu	Arg	Val	Lys	Glu	
	130					135					140					
Leu	Lys	Lys	Ile	Leu	Asp	Asp	Trp	Gly	Glu	Thr	Cys	Lys	Gly	Cys	Ala	
145					150				155						160	
Glu	Lys	Ser	Asp	Tyr	Ile	Arg	Lys	Ile	Asn	Glu	Leu	Met	Pro	Lys	Tyr	
			165					170						175		
Ala	Pro	Lys	Ala	Ala	Ser	Ala	Arg	Thr	Asp	Leu						
			180					185								

10

20

30

## 【0030】

本発明は、EST配列から構築されたマウスARPの新規な遺伝子を開示している（配列番号：20；GenBank AI595930）。マウスヌクレオチド配列（配列番号：21）は表4に示し、それがコードする翻訳ポリペプチド配列（配列番号：22）を表5に示している。

表 4 新規マウスARPのヌクレオチド配列 (配列番号: 21)

ccgggtgcgg	ttcattcgcg	cggcatccgg	cggtggtgga	gacggctgag	gaggatgtgg	60
gctacgcgcg	ggctggcggt	acgctggccc	tgagcgtgct	gcctgacagc	cgggcgctgc	120
ggccaggaga	ctgtgaagtt	tgtatttctt	atctgggacg	attttaccag	gacctcaaag	180
acagagatgt	cacattttca	ccagccacta	ttgaagaaga	acttataaag	ttttgccgtg	240
aagcaagagg	caaagagaat	cggttgtgct	actacattgg	agccacagat	gatgctgcca	300
ccaagatcat	caatgaggtg	tcgaagcccc	tggcccacca	tatccctgtg	gaaaagatct	360
gtgagaagct	gaagaagaaa	gacagccaga	tctgtgaact	aaaatacgac	aagcagattg	420
acctgagcac	agtggacctg	aagaagctcc	gggtgaaaga	gctgaagaag	atcctggacg	480
actgggggga	gatgtgcaaa	ggctgtgcag	aaaagtctga	ctatatccgg	aagataaatg	540
aactgatgcc	taaatacgcc	ccaaggcag	ccagcgcacg	gactgatctg	tagtctgccc	600
aattcctgct	gcacctgaag	gggaaaaagc	agtttatctg	tctcttcccc	aaataaccat	660
tttgtaattt	attttttaag	cgggctcctg	acaatgagat	gtgaacctag	agctttccta	720
gtgatgctgg	ttttgcagtt	ccctcttgcc	catccccgag	tggggacaat	ttccccatcc	780
ccaagtgggg	acaatttact	tccttctttg	ctggtttact	ctaggacttc	aaagtttgtc	840
tgggattttt	ttattaaaaa	aaattgtctt	tggagagtta	aaaaaaaaaa		890

10

20

【 0 0 3 1 】



表5 新規マウスARPのアミノ酸配列(配列番号: 22)

Gly	Cys	Gly	Ser	Phe	Ala	Arg	His	Pro	Ala	Val	Val	Glu	Thr	Ala	Glu	
1				5					10					15		
Glu	Asp	Val	Gly	Tyr	Ala	Arg	Ala	Gly	Gly	Thr	Leu	Ala	Leu	Ser	Val	
			20					25					30			
Leu	Pro	Asp	Ser	Arg	Ala	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Cys	Glu	Val	Cys	Ile	
		35					40					45				
Ser	Tyr	Leu	Gly	Arg	Phe	Tyr	Gln	Asp	Leu	Val	Glu	Gly	Phe	Arg	Asp	
	50					55					60					
Val	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Thr	Ile	Glu	Glu	Glu	Leu	Ile	Lys	Phe	Cys	
65					70					75					80	
Arg	Glu	Ala	Arg	Gly	Lys	Glu	Asn	Arg	Leu	Cys	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Ala	
				85					90					95		
Thr	Asp	Asp	Ala	Ala	Thr	Lys	Ile	Ile	Asn	Glu	Val	Ser	Lys	Pro	Leu	
			100					105					110			
Ala	His	His	Ile	Pro	Val	Glu	Lys	Ile	Cys	Glu	Lys	Leu	Lys	Lys	Lys	
		115					120					125				
Asp	Ser	Gln	Ile	Cys	Glu	Leu	Lys	Tyr	Asp	Lys	Gln	Ile	Asp	Leu	Ser	
	130					135					140					
Thr	Val	Asp	Leu	Lys	Lys	Leu	Arg	Val	Lys	Glu	Leu	Lys	Lys	Ile	Leu	
145					150					155					160	
Asp	Asp	Trp	Gly	Glu	Met	Cys	Lys	Gly	Cys	Ala	Glu	Lys	Ser	Asp	Tyr	
			165						170					175		
Ile	Arg	Lys	Ile	Asn	Glu	Leu	Met	Pro	Lys	Tyr	Ala	Pro	Lys	Ala	Ala	
			180				185						190			
Ser	Ala	Arg	Thr	Asp	Leu											
			195													

10

20

30

## 【0032】

表6は本発明の新規のヒトARP(Curagen assembly 78893608; 配列番号: 3)、公表されているヒト配列(Shridarら(1996b); gbhm83751)、マウス(AI595930 EXT)及びキイロショウジョウバエ(Drosophila melanogaster)(AAD32615)の、ClustalWアライメントを使用したアライメントを示す。Shridarら(1996b)により記載されたタンパク質のみがより長いN末端配列を有しており; 本発明のものはN末端で切断されている。

40

表6 ヒト及びマウスARPのアラインメント

78893638	MRMRMRMWAT
ghh_m83751	PMCKWHVGGRRGSPROWGATARGDLEAVRRGCGSVERRRRRRRRRRMRMRMRMWAT
AI595930_EXT	CGGSFASHPAYMETAEEDVGY
AAD32615	MKTWY
78893638	QGLAVRLALSVLPGSRALRPGDCEVCISYLGFRVQDLKDRDVTTFSPATIENELIKFCREA
ghh_m83751	QGLAVRLALSVLPGSRALRPGDCEVCISYLGFRVQDLKDRDVTTFSPATIENELIKFCREA
AI595930_EXT	ARAGTTLALSVLPGSRALRPGDCEVCISYLGFRVQDLKDRDVTTFSPATIEELIKFCREA
AAD32615	MVTVHGGFLANQAQTEALKEEDCEVCYKTRRFADSLDS-TKKDYKQIETAFKFCQ
78893638	RGKENRLCYVIGATDDAATKIIINEVSKPLAHHIPVEKICEKLEKSDSQICELEKVDKQIDL
ghh_m83751	RGKENRLCYVIGATDDAATKIIINEVSKPLAHHIPVEKICEKLEKSDSQICELEKVDKQIDL
AI595930_EXT	RGKENRLCYVIGATDDAATKIIINEVSKPLAHHIPVEKICEKLEKSDSQICELEKVDKQIDL
AAD32615	KNEEHFFEN-ESGLEESATGLENESKPLSWSMAEKICEKLEKSDSQICELEKVDKQIDL
78893638	STVDLKKLRVEELKKILDDWGGETCKGCAEKSDYIRKINELMPKYAPKAASARTDI
ghh_m83751	STVDLKKLRVEELKKILDDWGGETCKGCAEKSDYIRKINELMPKYAPKAASARTDI
AI595930_EXT	STVDLKKLRVEELKKILDDWGGETCKGCAEKSDYIRKINELMPKYAPKAASARTDI
AAD32615	NSTVDLKKLRVEELKKILDDWDESDGLEKGRIRKIEELKPKYSRSEL

10

Gene Calling<sup>T M</sup> 分析（実施例1）は、最初の6時間のうちに、VEGF刺激内皮細胞においてARPが上方制御されることを明らかにする。インサイツハイブリッド形成分析は、胎児及び非血管新生腫瘍成分における高発現を明らかにする。ARPの過剰発現は卵巣癌と相関している。

#### 【0033】

(b) ダウン症必須領域タンパク1 (DSCR1)

DSCR1 (配列番号: 23及び24; GenBank NM 004414, U28833) は、ダウン症候群表現型の最小候補領域のメンバーである。DSCR1は、SH3ドメインリガンドと同様、プロリンリッチ領域、推定DNA結合ドメイン、セリン-プロリンモチーフ及び酸性ドメインを有している (Fuentesら, 1995)。ハムスター相同体、adapt78は、グルコース調節タンパク質であるGpr78、(Leahyら, 1999)に関連しており、オキシダント-及びカルシウム誘導性である。P SORT (Nakai及びHorton, 1999)はミトコンドリアの局在化を予想する。DSCR1の構造及び機能的特徴は転写調節及び/又はシグナル伝達における役割を示唆している。

Gene Calling<sup>T M</sup> 分析（実施例1）により、最初の6時間のうちに、VEGF刺激内皮細胞においてDSCR1が上方制御されることが証明された。Ta q m a n<sup>T M</sup> 分析では、内皮管形成のインビトロモデルにおいてDSCR1が上方制御されることが明らかにされている。インサイツハイブリッド形成分析により、胎児組織においては高発現しているが、成人及び腫瘍非管組織において低発現であることが示された。DSCR1の過剰発現は卵巣癌の臨床病期と相関している。アンチセンス実験によるDSCR1の除去により、内皮細胞の生存が増加する。

#### 【0034】

4. 他のVEGF調節遺伝子

(a) 酵母VPS41に類似のヒト遺伝子 (hVSP41p)

酵母n (VSP41) においてhVSP41p (配列番号: 25及び26; GenBank U87309) が、液胞輸送のために必要であり (Radiskyら, 1997)、エンドサイトーシスに関連している (Singer-Kruger及びFerro-Novick, 1997)。

本発明において、Gene Calling分析（実施例1）により、24時間後、VEGF刺激内皮細胞においてhVSP41が下方制御されていることが明らかにされている。インサイツハイブリッド形成分析では、腫瘍の非血管新生領域に発現が局在化していた。hVSP41の発現は卵巣癌と相関している（実施例）。

#### 【0035】

(b) インスリン誘発遺伝子1 (INSIG1)

20

30

40

50

INSIG1 (配列番号: 27及び28; GenBank 5031800, U96876) の発現は、ラットの再生肝臓において転写的に上方制御され、マウス脂肪細胞の分化において誘発され、これはINSIG1が代謝制御に関係する組織の成長及び分化に所定の役割を担っていることを示唆している (Pengら, 1997)。また、INSIG1はアテローム発生モデルにおいて単球により発現され、酸化されたりボタンパク質HB-EGF及びグラビンと同様である (Falb, WO9730065, 1997)。疎水性分析により膜貫通局在化が予想されている。タンパク質はナトリウムチャネル及びGタンパク質結合レセプターと相同である。PSORT (Nakai及びHorton, 1999) はミトコンドリア内膜への局在化を予想する。

Gene Calling分析 (実施例1) により、24時間後、VEGF刺激内皮細胞、及び内皮管形成のインビトロモデルにおいて、INSIG1が上方制御されていることが証明されている。

10

#### 【0036】

##### (c) プロゲステロン誘導脱落タンパク (DEPP)

DEPP (配列番号: 29及び30; GenBank AB022718) はデータベースにおいてのみ公開されている。配列番号: 29は、ステロイドプロゲステロンにより誘発される推定212アミノ酸ペプチドをコードする2114bp転写物を含む。ステロイドホルモンは血管形成、特に女性の生殖路において不可欠な役割を担っている (Hyder及びStancel, 1999)。

Gene Calling分析 (実施例1) により、6時間後、VEGF刺激内皮細胞において、DEPPが下方制御されていることが明らかにされている。

20

#### 【0037】

##### (d) チトクロムオキシダーゼサブユニットI (MTCO1)

チトクロムcオキシダーゼサブユニットI (MTCO1, 配列番号: 31 (完全ヒトミトコンドリアゲノム配列から抽出されたヌクレオチド配列、GenBank NC 001807) 及び配列番号: 32 (アミノ酸; GenBank NP 008344) は呼吸複合体IVの3つのミトコンドリアDNAコード化サブユニットの一つである。複合体IVはミトコンドリア内膜に局在し、酸化リン酸化の電子伝達鎖の最終段階を媒介する。複合体IVは還元チトクロムcから電子を集め、それらを酸素に移送し、エネルギーと水を生成する。放出されたエネルギーはミトコンドリア内膜を横切ってプロトンを送るのに使用される。

30

#### 【0038】

##### (e) NADHユビキノンオキシドレダクターゼ鎖1 (ND1又はDNHUN1) 及び

##### (f) NADHユビキノンオキシドレダクターゼ鎖4 (ND4又はDNHUN4)

プロトン転位置NADH:ユビキノンオキシドレダクターゼ又は複合体I鎖1 (配列番号: 33, GenBank NC 001807 及び34; GenBank DUNHUN1) 及び鎖4 (配列番号: 35, GenBank NC 001807 及び36; GenBank DUNHUN4) は、ミトコンドリアの内膜に局在している。複合体Iは、呼吸鎖へ入る電子のための部位であり、細胞エネルギーの保持に重要である。NADHの複合体I触媒酸化はプロトンの膜転位置に関連している。

40

#### 【0039】

##### (g) ヘパリン結合EGF様成長因子 (HB-EGF)

HB-EGF (配列番号: 37及び38; GenBank NM 001945) は、EGFレセプター1 (HER-1) 又は4 (HER-4) に結合して、細胞分裂促進及び/又は走化性活性を誘発するEGFファミリーのメンバーである。HB-EGFは、白血病細胞を含む多くの細胞型に発現しており (Vinanteら, 1999)、内皮細胞の有糸分裂を直接は誘発しないが、これらの細胞の移動を誘発し、血管平滑筋細胞の、内皮有糸分裂誘発のための因子の放出を誘発する (Moritaら, 1993)。以前にVEGFにより誘発されることが観察されているが (Arkonaćら, 1998)、内皮細胞生存における特定の役割については何の提案もされていない。

50

VEGFに加えて、反応性酸素種及びカルシウムは、DSCR1に行うのと同様に、HB-EGF発現を誘発する(Kayanokiら, 1999)。膜結合性HB-EGFは成長活性、付着能力を保持しており、腎臓内皮細胞の生存を促進する(Takemuraら, 1997)。プロHB-EGFは、HB-EGF発現の生存活性をまた増加させるテトラスパニン(tetraspanin)CD9と、原形質膜で複合体を形成する(Takemuraら, 1999)。

本発明において(実施例)、HB-EGFは24時間後、VEGF刺激内皮細胞において上方制御されていることが見出されている。インサイツハイブリッド形成分析では、腫瘍、胎児及び成人組織の非血管成分で発現が見られ、虫垂の内皮細胞で高発現していた。

#### 【0040】

10

(h)MKP-1様プロテインチロシンホスファターゼ(配列番号:39及び40;GenBank AF038844)

タンパク質配列は、細胞分裂促進剤活性化タンパク質(MAP)キナーゼホスファターゼ-1(MKP-1)、二重特異性プロテインチロシンホスファターゼに対して、58%の類似性がある。MKP-1様プロテインチロシンホスファターゼに特異的な基質は未だ記載されてないが、触媒ドメインに対する相同性は非常に高い。MAPキナーゼカスケードはアポトーシスの阻害、Bcl-2のリン酸化において重要な役割を担っている(Dengら, 2000)。MAPキナーゼはチロシン及びスレオニンのリン酸化により活性化され、脱リン酸化により不活性化される(Wilkinson及びMillar, 2000)。MKP-1は細胞生存を増加させ(Winterら, 1998)、上昇したカルシウムにより誘発される(Scimeccaら, 1997)。MKP-1に対する類似性の故に、MKP-1様プロテインチロシンホスファターゼは、細胞生存に関与する一又は複数のMAPキナーゼを調節しうる。

20

#### 【0041】

(i)オステオニドジェン(ニドジェン-2前駆体)

ニドジェン-2(配列番号:41及び42;GenBank D86425)は、基底膜(基底層)タンパク質ニドジェン-1/エナクチン(enactin)と46%同一性であり、類似したドメイン構造を有する。ニドジェン1及び2は類似しているが、基底膜成分に対する結合性及び付着特性は異なる(Lohiら, 1998)。ラミニン/エンタクチン(entactin)複合体は、用量依存的に血管形成を刺激し、また阻害することができる(Nicosiaら, 1994)。

30

本発明において、GeneCalling分析(実施例1)により、6及び24時間後、VEGF刺激内皮細胞において、ニドジェン-2が上方制御されていることが明らかにされている。インサイツハイブリッド形成分析では、胎児組織、炎症虫垂、及び腫瘍周囲のストローマの血管及び非血管成分における発現が示されており(Oivulaら, 1999)、癌腫の内皮基底層及びストローマでの発現も報告されている。

#### 【0042】

(j)結合組織成長因子(CTGF)

CTGF(結合組織成長因子;配列番号:43及び44, GenBank X78947)は、CYR61、Nov、Elm-1、Cop-1/WISP-2、WISP-3及びマウスCTGF相同体Fisp12を含む分泌タンパク質ファミリーのメンバーである。CTGFは線維芽細胞の移動を刺激し、インテグリンレセプター $\alpha$ 3を通して線維芽細胞と内皮細胞の双方における付着及び有糸分裂誘発を促進する。さらに、CTGFが存在すると、内皮細胞の生存が促進する。インヴィボにおいて、CTGFはラットの角膜マイクロポケット(micropocket)移植片における新血管新生を誘発する。

40

本発明において、CTGFは、6及び24時間後、VEGF刺激内皮細胞で上方制御されていた。インサイツハイブリッド形成分析では、CTGFは試験したほとんどの組織で発現しており、胎児組織で最も高い発現であったことが示されている。血管形成組織及びアテローム硬化型プラークにおけるCTGFの局在化を伴うこれらの観察により、発育、創傷治癒及び管疾患中の血管成長の調節におけるCTGFの可能性のある役割が示唆された

50

。

## 【 0 0 4 3 】

## V E G F m g ポリヌクレオチド

本発明の一側面は、V E G F m g をコードする単離された核酸分子、又は生物学的に活性なそれらの部分に関する。また、本発明に含まれるものは、V E G F m g コード化核酸（例えば V E G F m g m R N A ）を同定するためのハイブリッド形成プローブとしての使用に十分な核酸断片、及び V E G F m g 分子の増幅及び／又は変異のポリメラーゼ連鎖反応（P C R）プライマーとして使用される断片である。「核酸分子」には、D N A 分子（例えば、c D N A 又はゲノム D N A ）、R N A 分子（例えば、m R N A ）、ヌクレオチド類似体及び誘導体を用いて生成される D N A 又は R N A の類似体、断片及び相同体が含まれる。該核酸分子は一本鎖又は二本鎖であってもよいが、好ましくは二本鎖 D N A を含む

10

## 1 . コントロール配列

コントロール配列は特定の宿主生物において作用可能に結合されたコード化配列の発現を可能ならしめる D N A 配列のことである。原核生物のコントロール配列にはプロモーター、オペレーター配列、及びリボソーム結合部位が含まれる。真核細胞はプロモーター、ポリアデニル化シグナル、及びエンハンサーを利用する。

## 2 . 作用可能に結合され

核酸が他の核酸配列と機能的に関連のある状態に配置される場合、作用可能に結合されている。例えば、プロモーター又はエンハンサーが配列の転写に影響を与える場合、コード化配列と作用可能に結合されており、又は、リボソーム結合部位が翻訳を促進するために配置されている場合、コード化配列と作用可能に結合されている。一般に、「作用可能に結合され」とは、結合されている D N A 配列が隣接しており、分泌リーダーの場合には隣接し、読み枠が合っていることを意味する。しかし、エンハンサーは隣接する必要はない。結合は従来の組換え D N A 法によって達成される。

20

## 3 . 単離された核酸

単離された核酸分子は天然に見出される環境から精製され、少なくとも 1 つの夾雑核酸分子から分離される。単離された A R P 分子は、細胞内に存在する特定の A R P 分子とは区別される。しかし、単離された A R P 分子は、例えば、核酸分子が天然の細胞とは異なる染色体上の位置に存在し、普通に A R P を発現している細胞内に含まれる A R P 分子を含む。

30

## 【 0 0 4 4 】

## 4 . プローブ

プローブは可変な長さの核酸配列であり、好ましくは特定の用途に依存して、少なくとも約 1 0 ヌクレオチド（n t）、1 0 0 n t、又は多数（例えば、6 0 0 0 n t）の間である。プローブは同一、類似又は相補的核酸配列を検出するために使用される。より長いプローブは天然又は組換え体の原料から得ることが可能で、非常に特異的であって、より短い長さのオリゴマープローブよりハイブリダイズするのが遅い。プローブは一本又は二本鎖であり、P C R、メンブレンを用いたハイブリダイゼーション技術、又はエライザのような技術において特異性を持つようにデザインされる。プローブは、少なくとも至適には 1 2 , 2 5 , 5 0 , 1 0 0 , 1 5 0 , 2 0 0 , 2 5 0 , 3 0 0 , 3 5 0 , 又は 4 0 0 の連続したセンス鎖ヌクレオチド配列；又はアンチセンス鎖ヌクレオチド配列；又は関心ある V E G F m g の天然に生じる突然変異体を緊縮性の条件下においてハイブリダイズする実質的に精製されたオリゴヌクレオチドである。

40

全体又は部分的長さの天然配列 V E G F m g は；（ 1 ）何れかの種（例えば、ヒト、マウス、ネコ、イヌ、バクテリア、ウィルス、レトロウィルス、酵母）に由来する c D N A ライブラリーからの V E G F m g c D N A の全長又は断片、（ 2 ）細胞又は組織に由来する、（ 3 ）種内の変異体、及び（ 4 ）他の種由来の相同体及び変異体などの、類似な（相同な）配列を「取り出す」ために使用されうる（A u s u b e l 等 , 1 9 8 7 ; S a m b r o o k , 1 9 8 9 ）。関連遺伝子をコードしうる関連配列を見出すために、プロー

50

ブはユニークな配列又は縮重配列をコードするようにデザインされうる。また、配列は天然配列 V E G F m g のプロモーター、エンハンサーエレメント及びイントロンを含むゲノム配列であってもよい。

例えば、他の種における V E G F m g コード化領域はそのようなプローブを用いて単離することが可能である。約 40 ベースのプローブは、V E G F m g に基づいてデザインされ、作製される。ハイブリダイゼーションを検出するために、プローブは、例えば、<sup>32</sup>P 又は <sup>35</sup>S などの放射ヌクレオチド、又はプローブにアルカリホスファターゼを結合させたアビジン - ビオチンシステムによるような酵素ラベルを用いて標識される。標識化プローブは、所望の種の c D N A、ゲノム D N A ライブラリー又は m R N A において、V E G F m g の配列と相補的な配列を持つ核酸を検出するために使用される。

10

そのようなプローブは、被検対象由来の細胞サンプル中の V E G F m g レベルを測定することにより、例えば、V E G F m g m R N A レベルを検出し又はゲノム V E G F m g が変異を起こしているか又は欠失しているかどうかを決定することにより、V E G F m g を間違って発現させている細胞又は組織を同定するための診断テストキットの一部として使用することができる。

#### 【0045】

##### 5. 単離された核酸

単離された核酸分子は、核酸の天然原料中に存在する他の核酸分子から分離される。好ましくは、単離された核酸は、核酸が由来する生物のゲノム D N A 中の核酸と元来隣接する配列（即ち、該核酸の 5' - 及び 3' - 末端に位置する配列）が除かれ得る。例えば、種々の実施態様において、単離された V E G F m g 分子は、核酸が由来する細胞 / 組織（例えば、脳、心臓、肝臓、脾臓等）のゲノム D N A 中の核酸分子と元来隣接するヌクレオチド配列の約 5 k b、4 k b、3 k b、2 k b、1 k b、0.5 k b 又は 0.1 k b 未満を包含することができる。さらに、c D N A 分子などの単離された核酸分子は、組換え体技術によって生産される場合の他の細胞内物質又は培地、又は化学的に合成される場合の化学的前駆体または他の化学物質が実質的に除かれ得る。

20

本発明の核酸分子、例えば、V E G F m g 核酸分子又はこの上述したヌクレオチド配列は、標準的な分子生物学的技術及び提供される配列情報を用いて単離することができる。関心ある V E G F m g 核酸配列の全て又は部分をハイブリダイゼーションプローブとして用いて、V E G F m g 分子を標準的ハイブリダイゼーション及びクローニング技術（A u s u b e l 等， 1987；S a m b r o o k， 1989）を用いて単離することができる。

30

。P C R 増幅技術は c D N A、m R N A 又は或いはゲノム D N A をテンプレート及び適当なオリゴヌクレオチドプライマーとして用いて、V E G F m g を増幅するために使用することができる。そのような核酸は適当なベクター中にクローン化することができ、D N A 配列解析によって性質決定できる。さらに、V E G F m g 配列に相当するオリゴヌクレオチドは、標準的な合成技術、例えば、自動 D N A 合成装置などによって調製することができる。

#### 【0046】

##### 6. オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチドは、一連の連結されたヌクレオチド残基を含み、オリゴヌクレオチドは P C R 反応又は他の用途において使用されるのに十分な数のヌクレオチドベースを有する。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノム又は c D N A 配列に基づき又はそれからデザインされ、特定の細胞又は組織中の同一、類似又は相補的な D N A 又は R N A の存在を増幅し、確証し、又は明らかにするために用いられる。オリゴヌクレオチドは長さが約 10 n t、50 n t、又は 100 n t で、好ましくは長さが約 15 n t から 30 n t である核酸の部分を含む。本発明の一実施態様において、長さが 100 n t 未満の核酸分子を含むオリゴヌクレオチドがさらに関心ある V E G F m g 配列、又はその相補鎖の少なくとも 6 つの連続するヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは化学的に合成され、プローブとして使用されてもよい。

40

50

## 【 0 0 4 7 】

## 7 . 相補的核酸配列 ; 結合

他の実施態様において、単離された核酸分子は、本発明の V E G F m g ヌクレオチド配列、又はこのヌクレオチド配列の一部（例えば、プローブ又はプライマー又は V E G F m g の生物学的に活性な部分をコードする断片として使用され得る断片）と相補的である核酸分子を含む。関心ある V E G F m g ヌクレオチド配列と相補的な核酸分子は、該ヌクレオチド配列と十分相補的であるもの、つまり殆ど又は全くミスマッチな水素結合を形成せず、安定な二重鎖を形成する。

「相補的」とは、核酸分子のヌクレオチドユニット間のワトソン - クリック又はフーグスチンベース対形成のことを指し、「結合」という用語は、2つのポリペプチド又は化合物又は関連するポリペプチド又は化合物又はそれらの組み合わせ間の物理的又は化学的相互作用を意味する。結合には、イオンの、非イオンの、ファンデルワールスの、疎水の相互作用等が含まれる。物理的相互作用は直接的又は間接的のどちらかである可能性がある。間接的相互作用は、他のポリペプチド又は化合物の効果を通じ又は依存する可能性がある。直接的結合とは、他のポリペプチド又は化合物の効果を通じて又はその結果として起こらず、その代わりに他の実質的な化学的中間体無しでは起こらない相互作用を称する。核酸断片は少なくとも6（連続した）の核酸又は少なくとも4（連続した）のアミノ酸であって、核酸の場合には特異的なハイブリダイゼーション、又はアミノ酸の場合にはエピトープの特異的な認識をそれぞれ可能ならしめるのに十分な長さであり、長くても全長配列未満のある部分である。断片は選択された核酸又はアミノ酸配列の何れかの連続する部分に由来しう。

10

20

## 【 0 0 4 8 】

## 8 . 誘導体、及び類似体

誘導体は、天然化合物から直接、又は修飾により、又は部分置換によって形成される核酸配列又はアミノ酸配列である。類似体は、天然化合物と同一ではないが構造類似性を持ち、ある構成成分又は側鎖に関して異なる核酸配列又はアミノ酸配列である。類似体は、合成されるか又は異なる進化的起源に由来し、野生型と比較して類似の又は逆の代謝活性を持つ。相同体は異なる種から派生する特定の遺伝子の核酸配列又はアミノ酸配列のことである。

誘導体及び類似体は全長であり、又は誘導体又は類似体が以下に記述されるような修飾された核酸又はアミノ酸を含むならば、全長ではない。本発明の核酸又はタンパク質の誘導体又は類似体には、限定はしないが、本発明の核酸又はタンパク質と、種々の実施態様において、同じサイズの核酸又はアミノ酸配列に対して少なくとも約も70%、80%又は95%の同一性（好ましい同一性80 - 95%を有し）により、又はアライメントが当該技術分野において既知のコンピューターホモロジープログラムによって行われる整列配列と比較される場合、又はそのコード化核酸が緊縮性のストリンジェンシー、又は中程度のストリンジェンシー又は低いストリンジェンシーの条件下で前述のタンパク質をコードする配列の相補鎖とハイブリダイズすることができるような（A u s u b e l 等 , 1987）、実質的に相同である領域を含む分子が含まれる。

30

## 【 0 0 4 9 】

## 9 . オープンリーディングフレーム

V E G F m g 遺伝子のオープンリーディングフレーム（O R F）はV E G F m g をコードする。O R Fは開始コドン（A T G）を持ち、3つの「ストップ」コドン（T A A、T A G又はT G A）の一つによって終結するヌクレオチド配列である。しかしながら、本発明において、O R Fは開始コドン及びストップコドンを含むか又は含まないコード化配列の何れかの部分であり得る。ユニークな配列を達成するために、好ましいV E G F m g O R F s は少なくとも50アミノ酸をコードする。

40

## 【 0 0 5 0 】

## 10 . 相同性

「相同な核酸配列」又は「相同なアミノ酸配列」又はその変異は、上述のようなヌクレオ

50

チドレベル又はアミノ酸レベルでの相同性によって特徴付けられる配列のことを指す。相同なヌクレオチド配列は V E G F m g のアイソフォームをコードする配列をコードする。アイソフォームは、例えば、R N A の選択的スプライシングの結果同一の生物の異なる組織において発現し得る。或いは、異なる遺伝子がアイソフォームをコードすることもあり得る。本発明において、相同なヌクレオチド配列は、限定はしないが：脊椎動物、従って、例えば、カエル、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、及び他の生物を含むヒト以外の種の V E G F m g をコードするヌクレオチド配列を含む。また、相同なヌクレオチド配列には、限定はしないが、天然に生じる対立遺伝子変異及びここで記載したヌクレオチド配列の突然変異も含まれる。しかしながら、相同なヌクレオチド配列にはヒト V E G F m g をコードするヌクレオチド配列そのものは含まれない。相同な核酸配列には関心ある V E G F m g 配列の保存的なアミノ酸置換、並びに V E G F m g の生物学的活性を持つポリペプチドをコードするこれらの核酸配列が含まれる。V E G F m g の種々の生物学的活性は以下に記載する。

10

# 【 0 0 5 1 】

## 1 1 . 配列同一性

V E G F m g に対する「パーセント (%) 核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、特定の V E G F m g のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。 % 核酸配列同一性を決定する目的のためのアライメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えば B L A S T、B L A S T - 2、A L I G N 又は M e g a l i g n ( D N A S T A R ) ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアライメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アライメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。

20

ヌクレオチド配列を整列させる場合、与えられた核酸配列 C の、与えられた核酸配列 D との、又はそれに対する % 核酸配列同一性 (あるいは、与えられたアミノ酸配列 D と、又はそれに対して或る程度の % 核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列 C と言うこともできる) は次のように計算される：

$$\% \text{核酸配列同一性} = W / Z \cdot 100$$

ここで、

30

W は C 及び D の配列アラインメントプログラム又はアルゴリズムのアライメントによって同一に一致したコアされた核酸残基の数であり、

Z は D の全ヌクレオチド数である。

核酸配列 C の長さが核酸配列 D の長さとは等しくない場合、C の D に対する % 核酸配列同一性は、D の C に対する % 核酸配列同一性とは異なる。

# 【 0 0 5 2 】

## 1 2 . 緊縮性

相同体 (即ち、ヒト以外の種に由来する V E G F 調節分子をコードする核酸) 又は他の関連配列 (例えば、パラログ) は、核酸ハイブリダイゼーション及びクローニングに関する技術分野において周知の方法を用いて、プローブとして特定のヒト配列の全体又は部分を使用し、低い、中程度又は高い緊縮性のハイブリダイゼーションにより得ることができる。

40

相補性断片とハイブリダイズする一本鎖 D N A の特異性は、反応条件の「緊縮性」によって決められる。D N A 二重鎖を形成させる傾向が低下すると、ハイブリダイゼーションの緊縮性は増大する。核酸ハイブリダイゼーション反応において、緊縮性は、いずれかの好ましい特異性のハイブリダイゼーション (高い緊縮性) になるように選択することが可能であり、例えば、ライブラリーから全長クローンを同定するために用いることができる。より低い特異性のハイブリダイゼーション (低い緊縮性) は、関連性はあるが正確ではない D N A 分子 (相同体ではあるが同一ではない) 又はセグメントを同定するために用いることができる。

50



DNA二重鎖は、(1)相補的な塩基対の数、(2)塩基対のタイプ、(3)反応混合液の塩濃度(イオン強度)、(4)反応温度、及び(5)DNA二重鎖の安定性を低下させるホルムアミドなどのある種の有機溶媒の存在によって安定化される。一般に、プローブが長くなれば、適切なアニーリングのためにより高い温度が必要である。通常のアプローチは温度を変化させることである：より高い相対温度はより緊縮性のある反応条件となる。(Ausubelら, 1987)には、ハイブリダイゼーション反応の緊縮性に関する優れた説明が提示されている。

「緊縮性の条件」下でハイブリダイズするとは、互いに少なくとも60%の相同性を持つヌクレオチド配列がハイブリダイズした状態にあるようなハイブリダイズプロトコルのことである。一般に、緊縮性の条件は、設定されたイオン強度及びpHにおける特異的配列に対する熱融点( $T_m$ )より約5℃低いように選択される。 $T_m$ は標的の配列と相補的なプローブの50%が標的配列と平衡を保ってハイブリダイズする温度である(設定されたイオン強度、pH及び核酸濃度)。標的配列は通常過剰に存在するため、 $T_m$ ではプローブの50%が平衡状態となる。

10

### 【0053】

#### (a) 高い緊縮性

「緊縮性ハイブリダイゼーション条件」では、プローブ、プライマー又はオリゴヌクレオチドがその標的配列にのみハイブリダイズすることができる。緊縮性条件は配列依存的で、相違する。緊縮性条件には、(1)低いイオン強度及び高い温度での洗浄(例えば、50℃において、15 mMの塩化ナトリウム、1.5 mMのクエン酸ナトリウム、0.1%のドデシル硫酸ナトリウム)；(2)ハイブリッド形成中に変性剤、(例えば、50%(v/v)ホルムアミド、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%フィコール、0.1%のポリビニルピロリドン、50 mMのリン酸ナトリウムバッファー(pH 6.5；750 mMの塩化ナトリウム、75 mMクエン酸ナトリウム、42℃)；又は(3)50%ホルムアミド。典型的には、洗浄にも、5×SSC(0.75 M NaCl、75 mMクエン酸ナトリウム)、50 mMのリン酸ナトリウム(pH 6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハード液、超音波処理サケ精子DNA(50 µg/ml)、0.1% SDS、及び10%のデキストラン硫酸が含まれ、42℃における0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中の洗浄及び55℃での50%ホルムアミド、ついで55℃におけるEDTAを含む0.1×SSCからなる高い緊縮性洗浄が含まれる。好ましくは、条件は、少なくとも約65%、70%、75%、85%、90%、95%、98%又は99%の相同性を持つ配列が、典型的には互いにハイブリダイズした状態にあるような条件である。これらの条件は、実施例に示してあるが、限定することが意味されるものではない。

20

30

### 【0054】

#### (b) 中程度の緊縮性

「中程度の緊縮性条件」は、ポリヌクレオチドが標的VEGF mg標的配列の全長、断片、誘導体又は類似体とハイブリダイズするような、より低い緊縮性の洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件を用いる(Sambrook, 1989)。一実施例には、55℃において、6×SSC、5×デンハード液、0.5% SDS及び100 mg/ml変性サケ精子DNA中でのハイブリダイゼーション、ついで37℃において1×SSC、0.1% SDS中での一又は複数回の洗浄が含まれる。温度、イオン強度等は、プローブ長などの実験的要因を至適化させるように調整することができる。他の中程度の緊縮性条件は(Ausubel等, 1987; Krieger, 1990)中に記載されている。

40

#### (c) 低い緊縮性

「低い緊縮性条件」は、ポリヌクレオチドが標的VEGF mg標的配列の全長、断片、誘導体又は類似体とハイブリダイズするような、中程度の緊縮性よりも低い緊縮性の洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件を用いる(Sambrook, 1989)。低い緊縮性ハイブリダイゼーション条件の非限定的な実施例は、40℃において、35%のホルムアミド、5×SSC、50 mM Tris-HCl(pH 7.5)、5 mM EDTA

50

、0.02% PVP、0.02% フィコール、0.2% BSA、100 mg/ml 変性サケ精子DNA、10% (wt/vol) 硫酸デキストラン中でのハイブリダイゼーション、ついで50 において2x SSC、25 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM EDTA、及び0.1% SDS 中での一又は複数回の洗浄である。種間ハイブリダイゼーションなどの他の低い緊縮性条件は、(Ausubel等, 1987; Kriegerler, 1990; Shilo及びWeinberg, 1981)中に記載されている。

#### 【0055】

##### 13. 保存的変異

天然に生じるVEGFmg対立遺伝子変異に加えて、VEGF調節分子をコードするアミノ酸配列中のVEGF調節分子の機能を変えない変更を受ける変化は、VEGFmg配列中に突然変異により導入することができる。例えば、「本質的でない」アミノ酸残基においてアミノ酸置換を誘起するヌクレオチド置換を、VEGFmgポリペプチドの配列中に作製することができる。「本質的でない」アミノ酸残基とは、生物学的活性を変更することなくVEGFmgの野生型配列から変更され得る残基のことであり、「本質的な」アミノ酸残基は、そのような生物学的活性にとって必要である。例えば、本発明のVEGF分子中で保存されるアミノ酸残基は、特に変更を受けにくいものであると予測される。保存的置換が行われ得るアミノ酸は当該技術において周知である。

有用な保存的置換は、表Aの「好ましい置換」中に示される。一つのクラスのアミノ酸が同じタイプの他のアミノ酸と置換される保存的置換は、当該置換が物質的に化合物の生物学的活性を変更しない限りにおいて、当該発明の範囲内に入る。そのような置換によって生物学的活性に変化が生じる場合、その時は、例として表Bに示されるより本質的な変化が導入されており、生成物はVEGFmgポリペプチドの生物学的活性に対してスクリーニングされる。

10

20

表A 好ましい置換

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

10

20

## 【0056】

(1) - シート又は - ヘリックスコンフォメーションなどのポリペプチド骨格の構造、(2) 荷電又は(3) 疎水性、又は(4) 標的部位の側鎖部分に影響を与える非保存的な置換は、VEGFmgの機能又は免疫学的同一性を修飾することができる。残基は、表B中に示される一般的な側鎖の特性に基づいてグループに分類される。非保存的置換は、必然的にこれらのクラスの1メンバーを他のクラスと置換えることを伴うものである。置換は保存的置換部位、より好ましくは非保存部位に導入され得る。

30

表B アミノ酸クラス

クラス	アミノ酸
疎水性	ノルロイシン, Met, Ala, Val, Leu, Ile
中性親水性	Cys, Ser, Thr
酸性	Asp, Glu
塩基性	Asn, Gln, His, Lys, Arg
鎖配向に影響する残基	Gly, Pro
芳香族	Trp, Tyr, Phe

40

## 【0057】

変異体ポリペプチドはオリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異導入法、アラニンスクランニング、及びPCR突然変異導入法などの当該技術分野において既知の方法を用いて行うことができる。部位特異的突然変異導入法(Carter, 1986; Zoller及びSmith, 1987)、カセット突然変異導入法、限定的選択突然変異導入法(Wellls等, 1985)又は他の既知の技術は、VEGFmg変異DNAを生

50

産するために、クローン化されたDNA上で実施することができる (Ausbel等, 1987; Sambrook, 1989)。

一実施態様において、単離された核酸分子には、タンパク質をコードするヌクレオチド配列であって、該タンパク質が関心あるVEGFmgと少なくとも約45%、好ましくは60%、より好ましくは70%、80%、90%、及び最も好ましくは約95%の相同なアミノ酸配列を含むタンパク質を包含する。

変異体VEGFmgはインビトロにおける細胞生存及び/又は血管形成を調節することに関してアッセイすることができる。

#### 【0058】

14. VEGFmg変異体ポリヌクレオチド、遺伝子及び組換え遺伝子

10

さらに本発明は、遺伝子コードの縮重によるヌクレオチド配列とは異なるが、配列番号：2又は21に示されるARPヌクレオチド配列によってコードされるものと同じのVEGFmgをコードする核酸分子をも包含する。本発明の単離された核酸分子は、例えば配列番号：3又は22に示されるアミノ酸配列を持つARPタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

さらに、VEGFmgのアミノ酸配列を変化させる配列の多型が集団の中に存在しうる。例えば、個々の対立遺伝子変異がVEGFmg中の遺伝的多型を示すであろう。「遺伝子」及び「組換え遺伝子」という用語は、VEGFmg、好ましくは脊椎動物のVEGFmgをコードするオープンリーディングフレーム(ORF)を含む核酸分子を称する。このような天然の対立遺伝子の変異は、典型的にはVEGFmg中に1-5%の変動が生じる可能性がある。VEGFmg中のこのような何れか及び全てのヌクレオチド変異と結果的に生じるアミノ酸多型は、天然の対立遺伝子変異の結果であり、VEGFmgの機能的活性を変更しないものであって、本発明の範囲内のものである。

20

さらに、VEGFmgのヒト配列とは異なるヌクレオチド配列を持つ他の種由来のVEGFmgが考慮される。本発明のVEGFmg cDNAの天然の対立遺伝子変異及び相同体に相当する核酸分子は、緊縮性の条件下で相同なVEGFmg配列とハイブリダイズするcDNA由来のプローブを用いてVEGFmgとの相同性に基づいて単離することができる。

「VEGFmg変異体ポリヌクレオチド」又は「VEGFmg変異体核酸配列」とは、(1)全長の天然VEGFmg、(2)シグナルペプチドを欠く全長天然VEGFmg、(3)シグナルペプチドを持つか又は持たないVEGFmgの細胞外ドメイン、又は(4)全長VEGFmgの他の何れかの断片をコードする核酸配列と少なくとも約80%の核酸配列同一性を持つ活性なVEGFmgをコードする核酸分子を意味する。一般に、VEGFmg変異体ポリヌクレオチドは、全長の天然VEGFmgをコードする核酸配列と少なくとも約80%核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%の核酸配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも約99%の核酸配列同一性を持つであろう。VEGFmg変異体ポリヌクレオチドは、シグナルペプチドを欠く全長天然VEGFmg、シグナル配列を持つか又は持たないVEGFmgの細胞外ドメイン、又は全長VEGFmgの他の何れかの断片をコードする

30

40

可能性がある。変異体は天然ヌクレオチド配列を包含しない。一般に、VEGFmg変異体ポリヌクレオチドは少なくとも長さが約30ヌクレオチドであり、しばしば少なくとも長さが約60、90、120、150、180、210、240、270、300、450、600ヌクレオチドであり、さらにしばしば少なくとも長さが約900ヌクレオチド又はそれより長い。

#### 【0059】

VEGFmgポリペプチド

##### 1. 成熟

VEGFmgは成熟VEGFmgをコードする。当該発明で開示されるポリペプチド又はタンパク質の「成熟」形態は、天然に生じるポリペプチド又は前駆体形態又はプロタンパ

50

ク質である。天然に生じるポリペプチド、前駆体又はプロタンパク質には、非限定的な例として、対応する遺伝子によってコードされる全長遺伝子産物が含まれる。或いは、ここで記載されるオープンリーディングフレームによってコードされるポリペプチド、前駆体又はプロタンパク質として定義される。「成熟」形態産物は、再度非限定的な例示によると、その遺伝子産物が生じる細胞又は宿主細胞内で起こる一又は複数の天然に発生するプロセッシングのステップの結果生じる。そのようなポリペプチド又はタンパク質の「成熟」形態へと誘導するプロセッシングステップの例には、オープンリーディングフレームの開始コドンによってコードされるN末端メチオニン残基の切断、又はシグナルペプチドもしくはリーダー配列のタンパク質分解性の切断が含まれる。従って、残基1がN末端のメチオニンである残基1～Nからなる前駆体ポリペプチド又はタンパク質から生じる成熟形態は、N末端メチオニンを除去した残りの残基2～Nを持つ。或いは、残基1～残基Mに由来するN末端シグナル配列が切断される残基1～Nを持つ前駆体ポリペプチド又はタンパク質から生じる成熟形態は、残りの残基M+1～残基Nの残基を持つであろう。さらに、ここで使用されるように、ポリペプチド又はタンパク質の「成熟」形態は、タンパク質分解性切断よりもむしろ翻訳後修飾のステップから生じる可能性がある。このような更なるプロセスには、非限定的な例示によるが、グリコシル化、ミリスチル化又はリン酸化が含まれる。一般に、成熟ポリペプチド又はタンパク質はこれらのプロセスの一つだけ、又はそれらの何れかの組み合わせによる操作の結果生じる。

10

【0060】

## 2. 単離されたVEGFmgポリペプチド

20

「単離された」又は「精製された」ポリペプチド、タンパク質又は生物学的に活性な断片は、その自然環境の成分から分離され及び/又は回収される。夾雑成分には、ポリペプチドに対する診断又は治療上の使用を典型的に阻害する物質が含まれ、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様物質が含まれる。好ましくは、ポリペプチドは少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度にまで精製される。実質的に単離されるためには、乾燥重量で30%未満の非VEGFmg夾雑物質（夾雑物）、より好ましくは20%未満、10%未満、及び最も好ましくは5%未満の夾雑物を有する標品である。単離された組換え体として生産されたVEGFmg又は生物学的に活性な部分は、好ましくは実質的に、培地からフリーである、即ち、培地がVEGFmg標品の体積の20%未満、より好ましくは約10%未満、最も好ましくは約5%未満である。夾雑物の例には、細胞壊死片、培地、及びVEGFmgのインビトロにおける合成の間に使用され、生産された物質が含まれる。

30

分子が精製されたポリペプチドである場合、該ポリペプチドは(1)少なくともN末端又は内部アミノ酸配列の15残基を配列決定装置を用いて得るために、又は(2)クマシーブルー又は銀染色を用いた非還元又は還元条件下でのSDS-PAGEにより均一になるまで精製されるであろう。VEGFmgの天然環境の少なくとも1つの成分は存在していないため、単離されたポリペプチドには、遺伝学的に操作された細胞において異種結合的に発現され、又はインビトロにおいて発現されたものが含まれる。一般に、単離されたポリペプチドは少なくとも1つの精製段階によって調製される。

40

【0061】

## 3. 生物学的に活性な

VEGFmgの生物学的に活性な部分には、全長VEGFmgの配列より少ないアミノ酸を含み、少なくともVEGFmgの1の活性を示すVEGFmgアミノ酸配列と十分相同であるか、これから誘導されたアミノ酸配列を含むペプチドを包含する。生物学的に活性な部分は天然VEGFmgの少なくとも1の活性を持つドメイン又はモチーフを含む。VEGFmgの生物学的に活性な部分は、例えば、長さが10、25、50、100又はそれより長いアミノ酸残基であるポリペプチドであり得る。他の生物学的に活性な部分は、タンパク質の他の領域が欠失されており、組換え技術により調製することができ、天然のVEGFmgの一又は複数の機能的活性に関して評価することができる。

VEGFmgの生物学的に活性な部分は、タンパク質の機能的活性を保持するが、天然の

50

対立遺伝子変異又は突然変異導入によるアミノ酸配列とは異なる。

#### 【0062】

#### 4. 抗VEGFmg Abs

抗体とは、単一の抗VEGFmgモノクローナルAbs (mAbs; アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和Absを含む)、複数エピトープ特異的抗VEGFmg抗体組成物、単鎖抗VEGFmg Abs、及び抗VEGFmg Absの断片であり得る。「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一なAbs、即ち少量存在する天然に生じる変異を除いて同一である集団を含む個々のAbsを意味する。

#### 【0063】

#### 5. エピトープタグ

エピトープタグ化ポリペプチドとは、「タグポリペプチド」と融合したキメラポリペプチドを称する。このようなタグは、Absが作製され又利用可能であるが、ポリペプチドの活性を阻害しないエピトープを提供する。内在性エピトープと抗タグ抗体の反応性を減少させるために、タグポリペプチドは好ましくはユニークである。一般に、好適なタグポリペプチドは少なくとも6アミノ酸残基を有し、一般に、約8から50アミノ酸残基の間であり、好ましくは8から20アミノ酸残基の間である。エピトープタグ配列の例にはインフルエンザウィルス由来のHA及びFLAGが含まれる。

#### 【0064】

#### 6. 変異体VEGFmgポリペプチド

一般に、VEGFmg様機能を維持し、配列中の特定の位置の残基が他のアミノ酸によって置換されている何らかの変異を含み、さらに、親タンパク質の2残基間に更なる残基又は残基群を挿入する可能性、並びに親配列から位置又は複数の残基を欠失させる可能性を含むVEGFmg変異体。いずれのアミノ酸置換、挿入又は欠失も本発明によって包含される。好ましい状況において、置換は上述した保存的置換である。「VEGFmgポリペプチド変異体」とは、少なくとも：(1)全長天然配列VEGFmgポリペプチド配列と、(2)シグナルペプチドを欠失したVEGFmgポリペプチド配列と、(3)シグナルペプチドを持つか又は持たないVEGFmgポリペプチドの細胞外ドメインと、又は(4)全長VEGFmgポリペプチド配列の何れか他の配列と約80%のアミノ酸配列同一性を持つ活性なVEGFmgポリペプチドを意味する。例えば、VEGFmgポリペプチド変異体には、一又は複数のアミノ酸残基が全長天然アミノ酸配列のN又はC末端で付加又は欠失したVEGFmgポリペプチド配列が含まれる。VEGFmgポリペプチド変異体は、VEGFmgポリペプチド配列の全長天然配列と少なくとも約80%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、さらに好ましくは少なくとも約82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%のアミノ酸配列同一性、最も好ましくは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有するであろう。VEGFmgポリペプチド変異体は、シグナルペプチドを欠いた配列、シグナルペプチドを持つか又は持たないVEGFmgポリペプチドの細胞外ドメイン、又は全長VEGFmgポリペプチド配列の何れか他の断片を有する。一般に、VEGFmg変異体ポリペプチドは少なくとも長さが約10アミノ酸、しばしば少なくとも長さが約20アミノ酸、さらにしばしば少なくとも長さが約30、40、50、60、70、80、90、100、150、200又は300アミノ酸、又はそれより長い。

#### 【0065】

「パーセント(%)核酸配列同一性」は、2つの配列を整列させるとき、開示されるVEGFmgポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸同一性を決定するために、配列を整列させ、必要ならば、最大の%配列同一性を達成するために間隙が導入され；保存的置換は配列同一性の一部として考慮されない。パーセント同一性を決定するためのアミノ酸アライメント方法は、当業者にとって周知である。BLAST、BLAST-2、ALIGN2又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公に入手可能なコンピュー

10

20

30

40

50

タソフトウェアが、しばしばペプチド配列を整列するために使用される。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアライメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アライメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。

アミノ酸配列を整列させる場合、与えられたアミノ酸配列 A の、与えられたアミノ酸配列 B との、又はそれに対する % アミノ酸配列同一性（あるいは、与えられたアミノ酸配列 B と、又はそれに対して或る程度の % 核酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列 A と言うこともできる）は次のように計算される：

$$\% \text{アミノ酸配列同一性} = X / Y \cdot 100$$

ここで、

X は A 及び B の配列アラインメントプログラム又はアルゴリズムのアライメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、

Y は B の全アミノ酸残基数である。

アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さとは異なる場合、A の B に対する % アミノ酸配列同一性は、B の A に対する % アミノ酸配列同一性とは異なる。

【0066】

7.2 以上の配列間の相同性の決定

「VEGFmg 変異体」とは、少なくとも：(1) 全長天然配列 VEGFmg 配列と、(2) シグナルペプチドを欠失した VEGFmg 配列と、(3) シグナルペプチドを持つか又は持たない VEGFmg の細胞外ドメインと、又は(4) 全長 VEGFmg 配列の何れか他の断片と約 80 % のアミノ酸配列同一性を持つ活性な VEGFmg を意味する。例えば、VEGFmg 変異体には、一又は複数のアミノ酸残基が全長天然アミノ酸配列の N 又は C 末端で付加又は欠失した VEGFmg 配列が含まれる。VEGFmg 変異体は、VEGFmg 配列の全長天然配列と少なくとも約 80 % のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも約 81 % のアミノ酸配列同一性、さらに好ましくは少なくとも約 82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、80 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % のアミノ酸配列同一性、最も好ましくは少なくとも約 99 % のアミノ酸配列同一性を有するであろう。VEGFmg 変異体は、シグナルペプチドを欠いた配列、シグナルペプチドを持つか又は持たない VEGFmg の細胞外ドメイン、又は全長 VEGFmg 配列の何れか他の断片を有する。一般に、VEGFmg 変異体ポリペプチドは少なくとも長さが約 10 アミノ酸、しばしば少なくとも長さが約 20 アミノ酸、さらにしばしば少なくとも長さが約 30、40、50、60、70、80、90、100、150、200 又は 300 アミノ酸、又はそれより長い。

【0067】

「パーセント (%) アミノ酸配列同一性」は、2つの配列を整列させるとき、開示される VEGFmg 配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。% アミノ酸同一性を決定するために、配列を整列させ、必要ならば、最大の % 配列同一性を達成するために間隙が導入され；保存的置換は配列同一性の一部として考慮されない。パーセント同一性を決定するためのアミノ酸アライメント方法は、当業者にとって周知である。BLAST、BLAST-2、ALIGN2 又は Megalign (DNASTAR) ソフトウェアなどの公に入手可能なコンピュータソフトウェアが、しばしばペプチド配列をアラインするために使用される。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアライメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アライメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。

アミノ酸配列を整列させる場合、与えられたアミノ酸配列 A の、与えられたアミノ酸配列 B との、又はそれに対する % アミノ酸配列同一性（あるいは、与えられたアミノ酸配列 B と、又はそれに対して或る程度の % アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列 A と言うこともできる）は次のように計算される：

$$\% \text{アミノ酸配列同一性} = X / Y \cdot 100$$

ここで、

10

20

30

40

50

XはA及びBの配列アラインメントプログラム又はアルゴリズムのアライメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、

YはBの全アミノ酸残基数である。

アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なる。

【0068】

#### 8. キメラ及び融合タンパク質

融合ポリペプチドは、発現研究、細胞内局在、バイオアッセイ、及びVEGFmgの精製において有用である。VEGFmg「キメラタンパク質」又は「融合タンパク質」には、非VEGFmgポリペプチドに融合したVEGFmgが含まれる。VEGFmg融合タンパク質は、幾つかの生物学的に活性な部分を含む、VEGFmg全長の何れかの部分を含む。VEGFmgはGST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）配列のC末端に融合される。このような融合タンパク質は、組換え体VEGFmgの精製を促進する。ある宿主細胞において、（例えば、哺乳類）異種結合性シグナル配列融合体は、VEGFmg発現及び/又は分泌を改善する。更なる例示的な融合が表C中に示される。

他の融合相手が、治療上、VEGFmgに適用することが可能である。イムノグロブリン（Ig）タンパク質ファミリーのメンバーとの融合は、VEGFmgリガンド又は基質の相互作用を阻害し、結果的に、インビボにおけるVEGFmg媒介シグナル伝達を抑制するような治療において有用である。このような薬剤組成物中に取り込まれた融合体は、増殖及び分化障害を治療するため、並びに細胞の生存を調整するために使用することができる。VEGFmg-Ig融合ポリペプチドも、被検対象中で抗VEGFmg Absを生産させ、VEGFmgリガンドを精製し、及び他の分子とVEGFmgの相互作用を阻害する分子をスクリーニングするための免疫原としても使用可能である。

融合タンパク質は、組換え法を用いることで容易に作り出すことができる。VEGFmgをコードする核酸は、VEGFmgのNH<sub>2</sub>-もしくはCOO-末端、又は内部に対して非VEGFmgコード化核酸をインフレーションにて融合させることができる。また、融合遺伝子は、自動DNA合成装置を含む従来の技術により合成してもよい。また、引き続いてキメラ遺伝子配列を生成させるためにアニール及び再増幅され得る2つの連続的な遺伝子断片間に、相補的なオーバーハングを生じさせるアンカープライマーを用いたPCR増幅（Ausubel等，1987）も有用である。VEGFmgを融合部分とインフレーションでサブクロニングすることを促進させる多くのベクターは購入可能である。



表 C 有用な非VEGFmg融合ポリペプチド

レポーター	インヴィトロ	インヴィボ	注記	文献
ヒト成長ホルモン (hGH)	ラジオイムノアッセイ	無し	高価、非感受性、狭い直線性の範囲。	(Selden 等, 1986)
$\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS)	比色性、蛍光性又は化学発光性	比色性 (X-gluc を用いた組織化学的染色)	感受性、広い直線性の範囲、非放射性。	(Gallagher, 1992)
緑色蛍光タンパク質 (GFP) 及び関連分子 (RFP, BFP, VEGFmg 等)	蛍光性	蛍光性	生細胞中で使用可能；光褪色に耐性	(Chalfie 等, 1994)
ルシフェラーゼ (ホタル)	生物発光性	生物発光性	タンパク質は不安定、再現が困難、シグナルが短時間	(de Wet 等, 1987)
クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)	クロマトグラフィー、差動的抽出、蛍光性、又はイムノアッセイ	無し	高価、放射活性基質、時間がかかる、非感受性、狭い直線性の範囲	(Gorman 等, 1982)
$\beta$ -ガラクトシダーゼ	比色性、蛍光化学発光	比色性 (X-gal を用いた組織化学的染色)、生細胞中での生物発光性	感受性、広い直線性の範囲；ある種の細胞は高い内在性の活性を有する	(Alam と Cook, 1990)
分泌アルカリホスファターゼ (SEAP)	比色性、生物発光性、化学発光性	無し	化学発光アッセイは感受性で広い直線性の範囲；ある種の細胞は内在性のアルカリホスファターゼ活性を有する	(Berger 等, 1988)

10

20

30

## 【 0 0 6 9 】

## 9 . V E G F m g 組換え体発現ベクター及び宿主細胞

ベクターは宿主細胞間でDNAをシャトルするため、又はヌクレオチド配列を発現させる方法として用いられる道具である。幾つかのベクターは原核生物でのみ機能するが、他は原核生物と真核生物の両方で機能し、真核生物中での発現のために原核生物からの大規模DNA調製を可能にする。対象のDNA、VEGFmgヌクレオチド配列又は断片などの挿入は、ライゲーション技術及び/又は当業者において周知の接合方法により達成される。そのようなDNAは、その組み込みがベクターの何れか必要な構成成分を破壊しないように挿入される。挿入されたDNAをタンパク質に発現させるために使用されるベクターの場合、導入されたDNAは、その転写及び翻訳を支配するベクターエレメントに作用可能に連結される。

40

ベクターは、2つの一般的なクラスに分配される：クローニングベクターは、適切な宿主細胞中での伝播には必須ではなく、外来のDNAを挿入し得る領域を持つ複製可能なプラスミド又はファージである；外来DNAは、まるでベクターの構成成分であるかの如く、複製され、伝播される。発現ベクター（プラスミド、酵母、又は動物ウィルスゲノムなど）は、外来DNAを転写及び翻訳するために外来性の遺伝学的物質を宿主細胞又は組織中

50

へ導入するために用いられる。発現ベクターにおいて、導入されたDNAは、挿入DNAを転写するために宿主細胞へシグナルを送るためのプロモーターのようなエレメントに作用可能に連結される。特異的な因子に応答して遺伝子の転写をコントロールする誘導可能なプロモーターのような幾つかのプロモーターは非常に有用である。作用可能に連結するVEGFmg又はアンチセンスコンストラクトは、VEGFmg又は断片、又はアンチセンスコンストラクトの発現をコントロールすることができる。古典的な誘導可能なプロモーターの例には、 $\alpha$ -インターフェロン、ヒートショック、重金属イオン、及びグルココルチコイドなどのステロイド(Kaufman, 1990)及びテトラサイクリンに応答するものが含まれる。他の望ましい誘導可能なプロモーターには、コンストラクトが導入される細胞には内在しないものではあるが、誘導剤が外から供給された場合には細胞内で応答するものが含まれる。

10

ベクターは、多くの異なる徴候を持つ。「プラスミド」は、付加的なDNAセグメントが導入され得る環状二重鎖DNA分子のことである。ウィルスベクターは、付加的なDNAセグメントをウィルスゲノム中に受け入れることができる。ある種のベクターは宿主細胞中で自律複製することができる(例えば、バクテリアの複製起点を持つバクテリアのベクターと、エピソームである哺乳類のベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム性哺乳類ベクター)は宿主細胞中に導入されると宿主細胞中のゲノムに組み込まれ、それにより宿主ゲノムと一緒に複製される。通常、有用な発現ベクターはしばしばプラスミドである。しかしながら、発現ベクターの他の形態、ウィルスベクター(例えば、複製欠損レトロウィルス、アデノウィルス及びアデノ関連ウィルス)などが考慮される。VEGFmg(又は断片)を含む組換え体発現ベクターは、VEGFmgと作用可能に結合された一又は複数の宿主細胞応答(又はインビトロで操作可能な)制御配列を利用することにより、VEGFmgの転写を制御する。「作用可能に結合された」とは、関心あるヌクレオチド配列がヌクレオチド配列の発現が達成されるように制御配列と結合されていることを示す。

20

ベクターを種々の生物及び/又は細胞中に導入することができる(表D)。或いは、該ベクターは、例えば、T7プロモーター制御配列とT7ポリメラーゼを用いて、インビトロで転写及び翻訳することができる。

表 D クローニング又は発現のための宿主の例

生物体	例	ソース及び文献*
原核生物	大腸菌	
腸内細菌科	K12 株 MM294	ATCC 31,446
	X1776	ATCC 31,537
	W3110	ATCC 27,325
	K5772	ATCC 53,635
	エンテロバクター属	
	エルウィニア属	
	クレブシエラ属	
	プロテウス属	
	サルモネラ属 (サルモネラ菌)	
	セラチア属 ( <i>S. marcescans</i> )	
	赤痢菌属	
	桿菌 (枯草菌、及び <i>B. licheniformis</i> )	
	シュードモナス属 (緑膿菌)	
	ストレプトマイセス属	
真核生物	出芽酵母	
酵母	分裂酵母	
	クルベロマイセス ケー・ラクティス MW98-8C、 CBS683, CBS4574 ケー・フラジリス ケー・ブルガリカス ケー・ウィケラミイ ( <i>K. wickeramii</i> ) ケー・ワルチー ( <i>K. waltii</i> ) ケー・ドロソフィラルム ( <i>K. drosophilarum</i> ) ケー・サーモトレランス ( <i>K. thermotolerans</i> ) ケー・マルキシアナス ( <i>K. marxianus</i> ) ; ヤロウ イア ( <i>Yarrowia</i> )	(Fleer 等, 1991) (de Louvencourt 等, 1983) ATCC 12,424 ATCC 16,045 ATCC 24,178 ATCC 56,500 ATCC 36,906 (EPO 402226, 1990)
	ピチア・パストリス ( <i>Pichia pastoris</i> )	(Sreekrishna 等, 1988)
	カンジダ	
	トリコデルマ・レーシア ( <i>Trichoderma reesia</i> )	
	アカバンカビ	(Case 等., 1979)
	トルロプシス属	
	ロドトルラ属	
	シュワンニオマイセス ( <i>S. occidentalis</i> )	
	糸状真菌	
	ニューロスボラ	
	ペニシリウム	
	トリボクラジウム ( <i>Tolypocladium</i> )	(WO 91/00357, 1991)

10

20

30

40

	コウジカビ属 (エー・ニダランス、及びエー・ニガー)	(Kelly と Hynes, 1985; Tilburn 等, 1983; Yelton 等, 1984)
無脊椎動物細胞	ドロソフィラ S2	
	スポドプテラ (Sf9)	
脊椎動物細胞	チャイニーズハムスター卵巣 (CHO)	
	Simian COS COS-7	ATCC CRL 1651
	HEK 293	

10

\*文献の記載がない細胞は一般にアメリカンタイプカルチャーコレクション (Manassas,VA) より入手可能。

### 【 0 0 7 0 】

ベクターの選択は、用いられる生物又は細胞及びベクターの望まれる運命による。ベクターは、標的細胞中で一度複製するか、又は「自殺」ベクターであり得る。一般に、ベクターはシグナル配列、複製起点、マーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらのエレメントの選択は、ベクターが使用される生物に依存して、容易に決定される。これらのエレメントの幾つかは、誘導可能又は条件が整うと「オン」になる条件的プロモーターのような、条件的なものである。誘導可能なプロモーターの例には、組織特異的で、ある種の細胞型に対しては発現を低下させるもの、ステロイド応答性のもの、又はヒートショックに反応するものが含まれる。lacオペロンなどのある種のバクテリアの抑制システムは、哺乳類細胞及び遺伝子操作動物中で利用される (Fieck 等, 1992; Wyborski 等, 1996; Wyborski 及び Short, 1991)。ベクターはベクターが取り込まれた細胞の同定を促進するためにしばしば選択マーカーを使用する。多くの選択マーカーは原核生物の使用に関する技術において周知であり、通常、抗生物質耐性遺伝子又は独立栄養性及び栄養要求性突然変異である。

20

アンチセンス及びセンスのVEGFmgオリゴヌクレオチドを用いると、VEGFmgポリペプチド発現を妨げることができる。これらのオリゴヌクレオチドは標的核酸配列に結合し、二重鎖の分解を増強し、未成熟な転写又は翻訳を終結させること、又はその他の方法によって標的配列の転写又は翻訳を阻止する二重鎖を形成する。

30

アンチセンス又はセンスのオリゴヌクレオチドは、RNA又はDNAの何れかである単鎖核酸であり、標的VEGFmg mRNA (センス) 又はVEGFmg DNA (アンチセンス) 配列と結合することができる。当該発明によると、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも約14ヌクレオチド、好ましくは約14から30ヌクレオチドのVEGFmg DNAのコード化領域の断片を含む。一般に、アンチセンスRNA又はDNA分子は、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100塩基の長さ又はそれより長い塩基を含み得る。特に、(Stein及びCohen, 1988; vander Krol 等, 1988b) は付与されたcDNA配列に由来するアンチセンスまたはセンスのオリゴヌクレオチドを導き出す方法を記述する。

40

アンチセンス及びセンスのオリゴヌクレオチドの修飾は、それらの効果を増大させる。修飾された糖-リン酸ジエステル結合又は他の糖結合 (国際公開第91/06629号, 1990) は、標的配列に対する結合特異性は破壊せずに内在性のヌクレアーゼに対する耐性を付与することにより、インピボにおける安定性を増加させる。共有結合された有機的部分 (国際公開第90/10448号, 1991) 又はポリペプチド-(L)-リジンのような他の修飾は、標的に対するオリゴヌクレオチドの親和性を増加させることができる。他の吸着物は標的に対するオリゴヌクレオチドの結合特異性を修飾し、金属複合体

50

又はインターカレート化（例えば、エリプチシン）又はアルキル化剤が含まれる。

# 【0071】

アンチセンス又はセンスのオリゴヌクレオチドを標的細胞（標的核酸配列を含む細胞）中へ導入するために、何れかの遺伝子転移法が使用され、当業者において周知である。遺伝子転移法の例には、1）エプステイン・バーウィルス様遺伝子転移ベクター又は外来性のDNAをリガンド結合分子に結合させる（国際公開第91/04753号，1991）などの、生物学的方法、2）エレクトロポレーションのような物理的な方法、及び3）CaPO<sub>4</sub>沈殿及びオリゴヌクレオチド-脂質複合体（国際公開第90/10448号，1990）などの化学的な方法が含まれる。

「宿主細胞」及び「組換え体宿主細胞」という用語は、互いに交換可能に使用される。これらの用語は、特定の対象細胞だけではなく、これらの細胞の子孫又は潜在的な子孫をも意味する。突然変異又は環境による影響のどちらかによりある種の修飾が、次の世代で生じるため、実際は、このような子孫は親細胞と同一ではない可能性があるが、やはり発明の範囲に含まれる。

真核細胞のトランスフェクション及び原核細胞のトランスフォーメーションの方法は、当該技術において周知である。宿主細胞の選択は関心ある核酸を導入するための好適な技術を決定する。表Eには、限定を意味するものではないが、当該技術において多くの周知技術をまとめてある。また、生物への核酸の導入、もしあれば特定の生物に対してインヴィトロのトランスフェクション技術、並びに確立された遺伝学的技術を用いるエキソピボの技術によっても行われる可能性がある。

# 【0072】

表E 細胞内へ核酸を導入するための方法

細胞	方法	文献	注記
原核生物 (バクテリア)	塩化カルシウム	(Cohen 等, 1972; Hanahan, 1983 ; Mandel と Higa, 1970)	
	エレクトロポレーション	(Shigekawa と Dower, 1988)	
真核生物  哺乳動物細胞	リン酸カルシウムトランスフェクション	N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸(HEPES)緩衝化生理食塩水(Chen と Okayama, 1988 ; Graham と van der Eb, 1973 ; Wigler 等, 1978)  BES(N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸)緩衝溶液 (Ishiura 等, 1982)	細胞はトランスフェクション効率を増加させるために、グリセロール又はジメチルスルホキシド(DMSO)で「ショック」を与えてもよい (Ausubel 等, 1987)。
	ジエチルアミノエチル(DEAE)-デキストラントランスフェクション	(Fujita 等, 1986 ; Lopata 等, 1984 ; Selden 等, 1986)	安定なトランスフェクションではなく、一過性のトランスフェクションに最も有用である。クロロキンが効率を増加させるのに使用される。
	エレクトロポレーション	(Neumann 等, 1982 ; Potter, 1988; Potter 等, 1984; Wong と Neumann, 1982)	トランスフェクトし難いリンパ球に特に有用である。

10

20

30

40

50

	カチオン性脂質試薬によるトランスフェクション	(Elroy-Stein と Moss, 1990 ; Felgner 等, 1987 ; Rose 等, 1991 ; Whitt 等, 1990)	インヴィボ及びインヴィトロのトランスフェクションのどちらにも適用可能。
	逆転写ウイルス	(Cepko 等, 1984 ; Miller と Buttmore, 1986 ; Pear 等, 1993)によって実証された生産。 インヴィトロ及びインヴィボでのインフェクション : (Austin と Cepko, 1990 ; Bodine 等, 1991 ; Fekete と Cepko, 1993 ; Lemischka 等, 1986 ; Turner 等, 1990 ; Williams 等, 1984)	長いプロセス、多くのパッケージングされた株が ATCC にて入手できる。 インヴィボ及びインヴィトロのトランスフェクションのどちらにも適用可能。
	ポリブレン	(Chaney 等, 1986 ; Kawai と Nishizawa, 1984)	
	マイクロインジェクション	(Capecchi, 1980)	VEGFmgDNA 配列が挿入されたコピーを保持する細胞株を確立するために用いることができる。
	プロトプラスト融合	(Rassoulzadegan 等, 1982 ; Sandri-Goldin 等, 1981 ; Schaffner, 1980)	
昆虫細胞 (インヴィトロ)	バキュロウィルスのシステム	(Luckow, 1991 ; Miller, 1988 ; O'Reilly 等, 1992)	真核生物での修飾を持つタンパク質のインヴィトロでの生産のために有用。
酵母	エレクトロポレーション	(Becker と Guarente, 1991)	
	酢酸リチウム	(Gietz 等, 1998 ; Ito 等, 1983)	
	スフェエロプラスト融合	(Beggs, 1978 ; Hinnen 等, 1978)	手間が掛かかる、異数体を生産できる

10

20

30

40

植物細胞 (一般文 献:(Hansen と Wright, 1999))	アグロバクテリウム 形質転換	(Bechtold と Pelletier, 1998 ; Escudero と Hohn, 1997 ; Hansen と Chilton, 1999 ; Touraev 等, 1997)	
	微粒子銃 (マイクロプロジェクト イル)	(Finer 等, 1999 ; Hansen と Chilton, 1999 ; Shilito, 1999)	
	エレクトロポレーション (プロトプラスト)	(Fromm 等, 1985 ; Ou-Lee 等, 1986 ; Rhodes 等, 1988 ; Saunders 等, 1989) リポソームと組み合わせても よい(Trick 等, 1997)	
	ポリエチレングリコール (PEG) 処理	(Shillito, 1999)	
	リポソーム	エレクトロポレーションと 組み合わせてもよい(Trick 等, 1997)	
	インプラント(in planta) マイクロインジェクシ ョン	(Leduc 等, 1996 ; Zhou 等, 1983)	
	種子インビビション	(Trick 等, 1997)	
	レーザービーム	(Hoffman, 1996)	
	シリコンカーバイドウ ィスカー	(Thompson 等, 1995)	

10

20

## 【 0 0 7 3 】

ベクターは、該ベクターが取り込まれた細胞の同定を促進するためにしばしば選択マーカーが用いられる。多くの選択マーカーは、原核生物の使用、通常は、抗生物質耐性遺伝子又は独立栄養性及び栄養要求性突然変異の使用に関する技術分野において周知である。表 F には哺乳動物細胞のトランスフェクションに対するしばしば利用される選択マーカーが

30

列挙されている。

表 F 真核生物細胞のトランスフェクションに対して有用な選択マーカー

選択マーカー	選択	作用	文献
アデニンデアミナーゼ (ADA)	9-β-D-キシロフラノシルアデニン (Xyl-A)を含む培地	核酸に取り込まれ細胞を死滅させる Xyl-A から Xyl-ATP への転換。ADA が解毒する。	(Kaufman 等, 1986)
ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR)	メトトレキサート (MTX) 及び透析した血清 (プリン欠乏培地)	MTX は DHFR の競合阻害因子。外来性のプリンの非存在下にて、細胞はプリン合成に必須の酵素、DHFR を要求する。	(Simonsen と Levinson, 1983)
アミノグリコシド結合リン酸転移酵素 ("APH"、"neo"、"G418")	G418	G418、APH によって解毒化されるアミノグリコシド結合がリボソームの機能及び、これに続く翻訳を阻害する。	(Southern と Berg, 1982)
ハイグロマイシン・B・リン酸転移酵素 (HPH)	ハイグロマイシン・B	ハイグロマイシン・B、HPH によって解毒化されるアミノシクリトールがタンパク質の移行を乱し、ミス翻訳を促進させる。	(Palmer 等, 1987)
チミジンキナーゼ (TK)	前方選択 (TK+) : 培地 (HAT) がアミノプテリンを取り込む。 逆選択 (TK-) : 培地が 5-ブROMODEOキシウリジン (BrdU) を取り込む。	前方 : アミノプテリンによって細胞は TK を必要とする経路であるチミジンから dTTP の合成を余儀なくされる。 逆 : TK が BrdU をリン酸化し、核酸の中に取込み細胞を死滅させる。	(Littlefield, 1964)

10

20

30

## 【 0 0 7 4 】

原核細胞の又は真核細胞の宿主培養細胞などの本発明における宿主細胞は、VEGFmgを生産するために使用することができる。従って、本発明は本発明の宿主細胞を用いてVEGFmgを生産するための方法を提供する。一実施態様において、本方法は、VEGFmgが生成されるような適切な培地中で、本発明の宿主細胞 (VEGFmgをコードする組換え発現ベクターが導入される) を培養することを含む。他の実施態様において、本方法には、さらにVEGFmgを培地又は宿主細胞から単離することが含まれる。

## 【 0 0 7 5 】

遺伝子導入VEGFmg動物

遺伝子導入動物は、VEGFmgの機能及び/又は活性を研究し、VEGFmg活性の修飾因子を同定し及び/又は評価するために有用である。「遺伝子導入動物」は、非ヒト動物であり、好ましくは、哺乳動物、更に好ましくは、ラット又はマウスなどの齧歯類であって、その細胞の一又は複数に導入遺伝子を包含する。他の遺伝子導入動物には、霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、チキン、両生類などが含まれる。「導入遺伝子」は遺伝子導入動物が発育する細胞のゲノム中に組込まれ、成熟した動物のゲノム中にも残存する外来性のDNAである。遺伝子導入は、好ましくは一又は複数の細胞型又は組織中で天然にコードされる遺伝子産物の発現を妨げる (「ノックアウト」遺伝子導入動物)、又は組み込み、染色体上での配置、又は組換え領域のマーカー又は指示薬として役立つ (例えば cre/loxPマウス) 目的を持って、遺伝子導入動物の一又は複数の細胞型又は組織中でコードする遺伝子産物の発現を導く。「相同組換え動物」は、齧歯類のような非ヒト動

40

50



物であり、動物を发育させる前に（例えば、胎児性の）細胞中で内在性の V E G F m g と相同的に組換わる外来性 D N A 分子によって内在性 V E G F m g が変えられてきた。外来性の V E G F m g を持つ、V E G F m g コード化配列が導入された卵母細胞又は胎児性の幹細胞などの宿主細胞は、非ヒト遺伝子導入動物を生産するために使用される。その後、このような宿主細胞は非ヒト遺伝子導入動物又は相同組換え動物を創造するために用いることができる。

#### 【0076】

##### 1. 遺伝子導入動物の生産へのアプローチ

遺伝子導入動物は、V E G F m g を受精後の卵母細胞中のオスの前核中に導入し（例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって）、卵母細胞が疑似妊娠したメスの養育動物（p f f a）中で发育することを可能にすることにより創り出すことができる。V E G F m g c D N A 配列は、非ヒト動物のゲノム中に導入遺伝子として導入することができる。或いは、V E G F m g の相同体を導入遺伝子として用いることができる。また、介在配列及びポリアデニル化シグナルも導入遺伝子の発現を増加させるために導入遺伝子中に含まれることが可能である。組織特異的な制御配列は、特定の細胞で V E G F m g の発現を導くように V E G F m g 導入遺伝子と作用可能に結合させることができる。胎児の操作及びマイクロインジェクションを介した遺伝子導入動物、特にマウスなどの動物を生産するための方法は、当該技術分野において通常の方法、例えば、（E v a n s 等， 米国特許第 4, 870, 009 号， 1989；H o g a n, 0879693843, 1994；L e d e r 及び S t e w a r t, 米国特許第 4, 736, 866 号， 1988；W a g n e r 及び H o p p e, 米国特許第 4, 873, 191 号， 1989）となっている。他の非マウス遺伝子導入マウスは、類似の方法によって作製され得る。遺伝子導入創出動物は、更なる遺伝子導入動物を繁殖させるために用いることができ、そのゲノム中での導入遺伝子の存在及び／又は動物の組織又は細胞中での導入 m R N A の発現に基づいて同定することができる。遺伝子導入（例えば、V E G F m g）動物は、他の導入遺伝子を保有する遺伝子導入動物を繁殖させることができる。

#### 【0077】

##### 2. 遺伝子導入動物を作製するためのベクター

相同組換え動物を産み出すために、欠損、付加又は置換が、例えば、機能的に V E G F m g を破壊するような変更を行うように導入された V E G F m g の少なくとも一部を含むベクター。V E G F m g はマウス遺伝子、又は天然に生じる変異体などの他の V E G F m g 相同体であり得る。一つのアプローチは、ノックアウトベクターは、相同組換えによって、内在性 V E G F m g 遺伝子を機能的に破壊し、その結果、もしあれば非機能的な V E G F m g タンパク質が発現される。

或いは、ベクターは、相同組換えにおいて、内在性 V E G F m g が変異され、さもなくば変更されるが、依然として機能的なタンパク質をコードするように設計することができる（例えば、上流の制御領域は、結果的に内在性の V E G F m g の発現を変更するように変更することができる）。このタイプの相同組換えベクターにおいて、V E G F m g の変更された部分は、ベクターによって運ばれる外来性の V E G F m g と胎児性幹細胞中の内在性 V E G F m g との間に生じる相同組換えを可能ならしめるために、V E G F m g の付加的な核酸によってその 5' 及び 3' 末端に隣接される。付加的な隣接する V E G F m g 核酸は、内在性 V E G F m g と相同組換えを引き起こすために十分なものである。典型的には、数千ベースの隣接 D N A（5' 及び 3' の両末端における）は、ベクター中に包含される（T h o m a s 及び C a p e c c h i, 1987）。その後、ベクターは、胎児性幹細胞株中に導入され（例えば、エレクトロポレーションにより）、導入された V E G F m g が相同的に内在性の V E G F m g と組換わった細胞が選択される（L i 等, 1992）。

#### 【0078】

##### 3. V E G F m g 導入遺伝子の発生中の細胞への導入

選択された細胞は、その後、集合キメラを形成させるために動物（例えば、マウス）の胚

盤胞中へインジェクトされる (Bradley, 1987)。その後、キメラ胎児は偽妊娠の雌性乳母中へ移植され、胎児には名前が付けられる。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は、導入遺伝子の生殖系列伝達によって相同的に組換えられたDNAを動物の全細胞において含む動物を繁殖させるために使用される。相同組換えベクター及び相同組換え動物を構築するための方法が記述されている (Berns等, 国際公開第93/04169号, 1993; Bradley, 1991; Kucherlapa et al等, 国際公開第91/01140号, 1991; Le Mouellie et al及びBrullet, 国際公開第90/11354号, 1990)。

或いは、導入遺伝子の制御された発現を可能ならしめるような選択された系を含む遺伝子導入動物が産み出され得る。そのような系の例として、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系がある (Laks et al等, 1992)。他のリコンビナーゼの系は、出芽酵母のFLPリコンビナーゼの系である (O'Gorman等, 1991)。cre/loxPリコンビナーゼ系が導入遺伝子の発現を制御するために用いられる場合、Creリコンビナーゼ及び選択されたタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を持った動物が必要となる。そのような動物は、選択されたタンパク質をコードする導入遺伝子を持つ動物と、リコンビナーゼをコードする導入遺伝子を持つ動物とを交尾させることによって、「二重」遺伝子導入動物として作製することが可能である。

また、遺伝子導入動物のクローンも作製することができる (Wilmut等, 1997)。簡単に述べると、遺伝子導入動物由来の細胞は単離することができ、増殖サイクルを脱出してG<sub>0</sub>期に移行するように誘導することができる。その後、静止期の細胞は、該静止期細胞が単離された種と同一の動物由来の徐核卵母細胞と融合させることができる。再構成された卵母細胞は、その後、桑実胚又は未分化胚芽細胞に発生するまで培養し、次いで偽妊娠の雌性乳母中へ導入される。該雌の乳母から生まれた子孫は、「親」遺伝子導入動物のクローンとなる。

#### 【0079】

抗VEGFmg Abs

本発明は、何れかのVEGFmgエピトープと免疫特異的に結合するFab又は(Fab)<sub>2</sub>などのようなAbs及び抗体断片を含む。

「抗体」(Ab)はVEGFmg (抗VEGFmg Ab; アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和Absを含む) に対する単一Abs、ポリエピトープ特異的な抗VEGFmg Ab組成物、単一鎖抗Abs、及び抗VEGFmg Abs断片を含む。「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な集団から得られる、即ち、該集団を含む個々のAbsは少量存在するであろう起こりえる自然発生的な突然変異を除いて同一である。例として、Absには、ポリクローナル(pAb)、モノクローナル(mAb)、ヒト化、二重特異的な(bsAb)、及び異種結合性Absが含まれる。

#### 1. ポリクローナル Abs (pAbs)

ポリクローナルAbsは哺乳類ホスト中で、例えば、免疫原、及び所望であればアジュバントの一又は複数回のインジェクションによって生産される。典型的には、免疫原及び/又はアジュバントは複数回の皮下又は腹腔内へのインジェクションによってインジェクトされる。免疫原は、VEGFmg又は融合タンパク質を含む。アジュバントの例には、完全フロイト及びモノホスホリル脂質A合成-トレハロース ジコリノミコレート(MPL-TDM)が含まれる。免疫応答を改善するために、免疫原は、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、血清アルブミン、ウシチログロブリン、及び大豆トリプシンインヒビターなどのホスト中での免疫原性のタンパク質に結合させてもよい。抗体産生のためのプロトコールは、(Ausubel等, 1987; Harlow及びLane, 1988)によって記述されている。或いは、pAbsは、IgY分子を生産するチキン中で作製されてもよい (Schade等, 1996)。

#### 【0080】

#### 2. モノクローナル Abs (mAbs)

抗VEGFmg mAbsは、ハイブリドーマ法を用いて調製される (Milstein 50

及び C u e l l o , 1983)。ハイブリドーマ法は少なくとも4段階を含む：(1) ホストまたは、ホスト由来のリンパ球を免疫する；(2) m A b 分泌性(又は潜在的に分泌性)のリンパ球を収集し(3) リンパ球を不死化した細胞に融合させ、及び(4) 所望の m A b (抗 V E G F m g) を分泌させる細胞を選択する。

マウス、ラット、モルモット、ハムスター、又は他の適当なホストが、免疫原に特異的に結合するはずの A b s を生産し又は生産することができるリンパ球を誘発させるために免疫される。或いは、リンパ球はインヴィトロで免疫化してもよい。ヒト細胞が所望の場合、末梢血リンパ球(P B L s)が一般に使用される；しかしながら、他の哺乳類ソース由来の脾臓細胞又はリンパ球が好ましい。免疫原は典型的には V E G F m g 又は融合タンパク質を含む。

その後、リンパ球はハイブリドーマ細胞を樹立するために不死化細胞株と融合されが、ポリエチレングリコールなどの融合剤によって促進される(G o d i n g , 1996)。トランスフォーメーションによって不死化された齧歯類、ウシ、又はヒトのミエローマ細胞が使用されるか、ラットもしくはマウスのミエローマ細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞及び非融合不死化細胞ではない純粋な集団が好ましいため、融合後、非融合、不死化細胞の成長又は生存を阻害する一又は複数の基質を含む適切な培地中で、細胞を成長させる。通常の技術では、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(H G P R T 又は H P R T)を欠く親細胞を使用する。この場合、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンが H G P R T 欠損細胞の成長を阻害し、ハイブリドーマの成長を許容する培地(H A T 培地)に添加される。

10

20

#### 【0081】

好ましい不死化細胞は効率よく融合し、H A T などの培地中で選択することにより混合集団から単離することができ、融合後、安定で高レベルの抗体の発現をサポートする。好ましい不死化細胞株はマウスミエローマ株で、アメリカンタイプカルチャーコレクション(M a n a s s a s , V A)より入手可能である。ヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株についても、ヒト m A b s 産生に関し記述されている(K o z b o r 等, 1984; S c h o o k , 1987)。

ハイブリドーマ細胞は細胞外に抗体を分泌するため、V E G F m g に対する m A b s (抗 V E G F m g m A b s) の存在をアッセイすることが可能である。ラジオイムノアッセイ(R I A)又は酵素結合免疫吸着検定法(E L I S A)などの免疫沈降又はインヴィトロでの結合アッセイは、m A b s の結合特異性を測定し(H a r l o w 及び L a n e , 1988; H a r l o w 及び L a n e , 1999)、スクヤッチャード解析を含む(M u n s o n 及び R o d b a r d , 1980)。

30

抗 V E G F m g m A b s 分泌性ハイブリドーマ細胞は限界希釈法及びサブカルチャーにより単一クローンとして単離され得る(G o d i n g , 1996)。適切な培地にはダルベッコ改変イーグル培地、R P M I - 1640、又は所望ならば、タンパク質-フリー又は-低減又は血清-フリー培地が含まれる(例えば、U l t r a D O M A P F 又は H L - 1; B i o w h i t t a k e r; W a l k e r s v i l l e , M D)。ハイブリドーマ細胞は、腹水中でのインヴィボにおいて増殖させてもよい。

m A b s は培地又は腹水からプロテインAセファロース、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、硫酸沈殿又はアフィニティークロマトグラフィー(H a r l o w 及び L a n e , 1988; H a r l o w 及び L a n e , 1999)などの従来の I g 精製方法によって単離又は精製される。

40

また、m A b s は組換え技術によっても作製される(米国特許第4166452号, 1979)。D N A コード化抗 V E G F m g m A b s は、抗 V E G F m g 分泌 m A b s ハイブリドーマ細胞株から好ましい D N A をプローブするために、従来の方法、例えば、マウスの重及び軽鎖抗体遺伝子と特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより容易に単離され、配列決定することができる。一度単離されると、単離された D N A 断片は、m A b s を発現させるために、他に I g タンパク質を生産しないシミアン C O S - 7 細胞、チャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞、又はミエローマ細胞などの宿

50

主細胞中ヘトランスフェクトさせる発現ベクター中ヘサブクローニングされる。単離されたDNA断片は、例えば、ヒト重及び軽鎖定常ドメインに対するコード化配列を相同なマウス配列の代わりに置換することにより（米国特許第4816567号，1989；Morrisson等，1987）、又は非Igポリペプチドをコードする配列の全て又は一部に対するIgコード化配列を融合することにより、修飾することができる。そのような非Igポリペプチドは、キメラ二価抗体を創作するために、抗体の定常ドメインと置換することが可能であり、又は一抗原結合部位の定常ドメインと置換することができる。

#### 【0082】

#### 3．一価Abs

Absはお互いに結果的にはクロスリンクしない一価Absでもよい。例えば、ある方法には、Ig軽鎖及び修飾された重鎖の組換え体発現が関与する。Fc領域中の何れかのポイントにおける通常の重鎖切断は、重鎖のクロスリンクを妨げる。或いは、それに関わるシステイン残基が他のアミノ酸残基で置換されるか又は除去され、クロスリンクするのを妨げる。インビトロの方法も、一価Absの調製に適する。AbsはFab断片などの断片を生産するように消化することができる（Harlow及びLane，1988；Harlow及びLane，1999）。

#### 【0083】

#### 4．ヒト化及びヒトAbs

抗VEGFmg Absにはさらにヒト化又はヒトAbsが含まれる。非ヒトAbsのヒト化形態は、非ヒトIg由来の最小配列を含むキメラIgs、Ig鎖又は断片（Fv，Fab，Fab'，F(ab')<sub>2</sub>又は他のAbsの抗原結合サブ配列など）である。一般に、ヒト化抗体は非ヒト由来から導入された一又は複数のアミノ酸残基を持つ。これらの非ヒトアミノ酸残基はしばしば「移入」残基と称され、典型的には「移入」可変ドメインから選ばれる。ヒト化は齧歯類のCDRs又はCDR配列と対応するヒト抗体配列とを置換することにより達成される（Jones等，1986；Riechmann等，1988；Verhoeyen等，1988）。そのような「ヒト化」AbsはキメラAbsであり（米国特許第4816567号，1989）、実質的に無傷のヒト可変ドメインより少ない部分が非ヒト種由来の対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化Absは、典型的には、あるCDR残基及びおそらくあるFR残基が齧歯類Abs中の類似部位由来の残基と置換されているヒトAbsである。ヒト化Absには、マウス、ラット又はウサギなどの非ヒト種のCDRであって、所望の特異的な親和性及び能力を持つ残基により、レシピエントの相補性決定領域（CDR）由来の残基が置換されるヒトIgs（レシピエント抗体）が含まれる。ある場合には、対応する非ヒト残基がヒトIgのFvフレームワーク残基を置換する。ヒト化Absは、レシピエント抗体中にも移入CDR又はフレームワーク配列中にも見出されない残基を含んでもよい。一般に、ヒト化抗体には、全てではないがCDR領域のほとんどが非ヒトIgのものに対応し、全てではないがFR領域のほとんどがヒトIgコンセンサス配列のものに対応する、少なくとも1つ、及び典型的には2つの可変領域が含まれる。また、ヒト化抗体には少なくともIg定常領域（Fc）の少なくとも一部分、典型的には、ヒトIgの一部分も、最適に含まれる（Jones等，1986；Presta，1992；Riechmann等，1988）。また、ヒトAbsは、ファージディスプレイライブラリー（Hoogenboom等，1991；Marks等，1991）及びヒトmAbsの調製（Boerner等，1991；Reisfeld及びSell，1985）を含む、種々の技術を使用して生産できる。同様に、内在性Ig遺伝子が部分的に又は完全に不活性化された遺伝子導入動物へヒトIg遺伝子を導入することが、ヒトAbsを合成するために利用される。チャレンジすると、ヒト抗体産生が観察され、遺伝子再編成、構築、及びレパートリーを含む全ての面においてヒトにおいて見られるような状況に酷似している（米国特許第5545807号，1996；米国特許第5545806号，1996；米国特許第5569825号，1996；米国特許第5633425号，1997；米国特許第5661016号，1997；米国特許第5625126号，1997；Fishwild

10

20

30

40

50

等, 1996; Lonberg 及び Huszer, 1995; Lonberg 等, 1994; Marks 等, 1992)。

#### 【0084】

##### 5. 二重特異的 mAbs

二重特異的 A b s は、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を持つモノクローナルであり、好ましくはヒト又はヒト化である。例えば、結合特異性は、VEGFmg; 他は選択された何れかの抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニット。

伝統的には、二重特異的 A b s の組換え体産生は、2つの I g 重鎖 / 軽鎖対の共発現に基づいており、2つの重鎖は異なる特異性を有する (Milstein 及び Cuello, 1983)。I g 重鎖及び軽鎖のランダムな一揃いにより、生じるハイブリドーマ (クアドローマ) は10の異なる抗体分子の潜在的混合物を生産し、その内の一つだけが所望の二重特異的構造を持つ。所望の抗体は親和性クロマトグラフィー又は他の技術を用いて精製することができる (国際公開第93/08829号, 1993; Traunecker 等, 1991)。

二重特異的抗体 (Suresh 等, 1986) を製造するために、所望抗体 - 抗原結合部位を持つ可変ドメインを I g の定常ドメイン配列と融合させる。融合は好ましくは、ヒンジの少なくとも一部分、CH2 及び CH3 領域を含む I g 重鎖定常ドメインと行われる。好ましくは、軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域 (CH1) は、少なくとも融合体の一つの中に存在する。I g 重鎖融合体をコードする DNA 及び、所望であれば、I g 軽鎖は別々の発現ベクター中に挿入され、適切な宿主生物へ同時形質移入される。抗体分子対間の接点は、組換え体細胞培養から回収されるヘテロ二量体の割合を最大にするように設計される (国際公開第96/27011号, 1996)。好ましい接点には少なくとも抗体定常ドメインの CH3 領域の一部が含まれる。この方法において、第一の抗体分子の接点に由来する一又は複数の小アミノ酸側鎖は、より大きな側鎖 (例えば、チロシン又はトリプトファン) と置換される。大きな側鎖と同一又は同じサイズの代償性の「空洞」が、大きなアミノ酸側鎖をより小さなもの (例えば、アラニン又はスレオニン) で置換することにより第二の抗体分子の接点上に創られる。このメカニズムは、ホモ二量体のような望まれない最終産物以上にヘテロ二量体の収量を増大させる。

二重特異的な A b s は全長 A b s 又は抗体断片として調製される (例えば、F<sub>(a b)</sub><sub>2</sub> 二重特異的 A b s)。二重特異的 A b s を生産するための技術の一つは、化学結合を利用する。無傷の A b s は、F<sub>(a b)</sub><sub>2</sub> 断片を生産するためにタンパク質分解的に切断され得る (Brennan 等, 1985)。近接するジチオールを安定化させ、分子間のジスルフィド形成を妨げるために、亜ヒ酸塩ナトリウムなどのジチオール複合化剤により断片を還元させる。その後、生じた F<sub>a b</sub> 断片はチオニトロ安息香酸 (TNB) 誘導体へ変換される。その後、F<sub>a b</sub> - TNB 誘導体の一つは、メルカプトエチルアミンによる還元によって F<sub>a b</sub> - チオールへ再変換され、二重特異的抗体を作るために他の F<sub>a b</sub> - TNB 誘導体と等モル量で混合される。生産された二重特異的 A b s は酵素の選択的固定化に対する薬剤として使用することができる。

#### 【0085】

F<sub>a b</sub> 断片は大腸菌から直接回収され、二重特異的 A b s を作るために化学的にカップルされる。例えば、完全にヒト化された二重特異的 F<sub>(a b)</sub><sub>2</sub> A b s を生産することができる (Shalaby 等, 1992)。各 F<sub>a b</sub> 断片は、大腸菌から別々に分泌され、インヴィトロにおいて直接化学的にカップルされ、二重特異的抗体を作る。

組換え体細胞培養に直接由来する二重特異的抗体断片を作製し単離するための様々な技術も記述されている。例えば、ロイシンジッパーモチーフを利用することができる (Kostelný 等, 1992)。F o s 及び J u n タンパク質由来のペプチドは、遺伝子融合により2つの異なる A b s の F<sub>a b</sub> 部分と連結される。抗体のホモ二量体は、ヒンジ領域において、モノマーを形成させた後抗体ヘテロ二量体を形成させるために再び酸化される。この方法も抗体ホモ二量体を作り得る。「ダイアボディー」技術 (Holliger

10

20

30

40

50

等, 1993) は二重特異的抗体断片を生産するための代替の方法を提供する。断片には、短かすぎて同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を許容しないリンカーによって軽鎖可変ドメイン ( $V_L$ ) に結合された重鎖可変領域 ( $V_H$ ) が含まれる。一つの断片の  $V_H$  及び  $V_L$  ドメインは、他の断片の相補的な  $V_H$  及び  $V_L$  ドメインとの対形成を余儀なくされ、2つの抗原結合部位を形成する。二重特異的抗体を調製するための他の方策は、単一鎖  $F_v$  ( $sF_v$ ) ダイマーの使用である (Grubert 等, 1994)。三重特異的  $Ab_s$  などの二価以上の  $Ab_s$  も考慮される (Tutt 等, 1991)。

典型例である二重特異的  $Ab_s$  は、任意の  $VEGFmg$  上の2つの異なるエピトープに結合する。或いは、細胞防御機構を、特定の  $VEGFmg$  を発現する特定の細胞に限定することができる：抗  $VEGFmg$  のアームは、T細胞レセプター分子 (例えば、 $CD2$ 、 $CD3$ 、 $CD28$  又は  $B7$ ) などの白血球が誘因する分子、又は  $F_cRI(CD64)$ 、 $F_cRII(CD32)$  及び  $F_cRIII(CD16)$  などの  $IgG(F_cR)$  に対する  $F_c$  レセプターと結合するアームと組合わされる。また、二重特異的  $Ab_s$  は、特定の  $VEGFmg$  を発現させる細胞に対して細胞毒性剤を標的するためにも使用される。これらの  $Ab_s$  は  $VEGFmg$  結合アーム及び細胞毒性剤又は放射性核種キレーターと結合するアームを持つ。

10

#### 【0086】

##### 6. ヘテロ結合性 $Ab_s$

ヘテロ結合性  $Ab_s$  は、2つの共有結合性  $Ab_s$  から構成され、免疫系細胞を不要な細胞にターゲットさせること (4, 676, 980, 1987) 及びヒト免疫欠損ウイルス ( $HIV$ ) 感染の治療 (国際公開第91/00360号, 1991; 国際公開第92/20373号, 1992) のために提唱されてきた。架橋剤に関与することを含む合成タンパク質化学方法を用いてインビトロにおいて調製される  $Ab_s$  が考慮される。例えば、免疫毒は、ジスルフィド交換反応を使用し、又はチオエーテル結合を形成させることにより構築される。適切な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデートが含まれる (4, 676, 980, 1987)。

20

#### 【0087】

##### 7. 免疫複合体

免疫複合体は、化学療法剤などの細胞毒性剤、毒素 (例えば、バクテリア、真菌、植物、又は動物起源の酵素学的に活性な毒素又は断片)、又は放射活性アイソトープ (即ち、放射結合体)。

30

有用な酵素学的に活性な毒素及び断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、緑膿菌由来のエクソトキシンA鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 $\alpha$ -サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンシン ( $Dianthin$ ) タンパク質、ヨウシュヤマゴボウタンパク質、ツルレイシインヒビター、クルシン、クロチン、サパオナリア・オフィシナリス ( $sapaonaria officinalis$ ) インヒビター、ゲロニン、ミトゲリン ( $mitogellin$ )、レストリクトシン ( $restriktocin$ )、フェノマイシン ( $phenomycin$ )、エノマイシン ( $enomycin$ ) 及びトリコテセン ( $tricothecene$ ) が含まれる。<sup>212</sup> Bi、<sup>131</sup> I、<sup>131</sup> In、<sup>90</sup> Y、及び <sup>186</sup> Re などの様々な放射性ヌクレオチドが放射性結合  $Ab_s$  の生成に利用可能である。

40

抗体及び細胞障害薬の結合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート ( $SPDP$ )、イミノチオラン ( $IT$ )、イミドエステルの二官能性誘導体 (ジメチルアジピミデート  $HCl$  等)、活性エステル (ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド (グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物 (ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート (トリエン2, 6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物 (1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン等) を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素を、調製することができる (Vitetta 等, 1987)。

50

<sup>14</sup>C - 標識 1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX-DTPA) は、放射性核種の抗体への結合のためのキレート剤の例である (国際公開第 94/11026 号, 1994)。

#### 【0088】

他の実施態様では、腫瘍の予備標的化で使用するために、抗体は「レセプター」(ストレプトタビジン等)に結合されてもよく、抗体-レセプター結合体は被検対象に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合結合体を循環から除去し、次に細胞障害薬(放射性核種等)に結合されたストレプトタビジン「リガンド」(ビオチン等)を投与する。

#### 8. エフェクター機能の設計

本抗体は、癌などの疾病の治療における抗体の有効性を向上させるために改変することができる。例えば、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させるようにしてもよい。そのようなホモダイマーAbsは、増強した内部移行能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存性細胞性細胞毒性(ADCC)を有する(Caron等, 1992; Shopes, 1992)。向上した抗腫瘍活性を持つホモダイマーAbsは、異種二官能性架橋を用いても調製する(Wolff等, 1993)。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように設計し、補体溶解を向上させることもできる(Stevenson等, 1989)。

#### 【0089】

#### 9. 免疫リボソーム

また、抗体を含むリボソームが調製されてもよい(米国特許第4485045号, 1984; 米国特許第4544545号, 1985; 米国特許第5013556号, 1991; Eppstein等, 1985; Hwang等, 1980)。有用なリボソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。このような調製物は、所望の径を有するリボソームが生成されるように定められた孔サイズのフィルターを通して押し出される。抗体のFab断片は、ジスルフィド交換反応を介してリボソームに結合され得る(Martin及びPapahadjopoulos, 1982)。また、ドキソルピシンなどの化学療法剤もリボソーム中に含まれてもよい(Gabizon等, 1989)。他に異なる組成の有用なリボソームが考慮される。

#### 【0090】

#### 10. VEGFmgに対するAbsの診断上の利用

抗VEGFmg Absは、VEGFmgを局限化させ及び/又は定量するために使用することができる(例えば、組織サンプル中のVEGFmgレベルの測定における使用のため又は診断上の方法における使用のため等)。抗VEGFmgエピトープAbsは薬剂的に活性な化合物として利用することができる。

抗VEGFmg Absは、イムノアフィニティークロマトグラフィー又は免疫沈降などの標準的な技術によりVEGFmgを単離するために使用することができる。これらのアプローチは、細胞及び組織から内在性のVEGFmg抗原を含むポリペプチドの精製を促進する。これらのアプローチ並びに他のアプローチは、抗原性タンパク質の発現の量及びパターンを評価するためにサンプル中のVEGFmgを検出するために使用することができる。抗VEGFmg Absは臨床的なテスト手順の一部として組織中のタンパク質レベルをモニターするのに使用することができる; 例えば、任意の治療計画の有効性を決定するため。抗体を検出可能な基質(標識)とカップリングさせることにより、Ab-抗原複合体の検出が可能となる。標識のクラスには、蛍光性、発光性、生物発光性、及び放射活性物質、酵素、及び補欠分子族が含まれる。有用な標識には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、ストレプトタビジン/ビオチン、アビジン/ビオチン、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセイン イソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン フルオレセイン、ダンシル クロライド、フィコエリスリン、ルミノール、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、エクオリン、及び<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>35</sup>S又は<sup>3</sup>Hが含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0091】

## 11. 抗体治療

本発明のA b sには、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化及び完全体ヒトA b sが含まれ、治療上使用され得る。このような薬剤は、一般に、被検対象の疾病又は病態を治療又は予防するために用いられるであろう。抗体調製物は、好ましくは高い抗原特異性及び親和性を有しており、一般に標的エピトープ（群）に結合することにより効果を媒介する。一般に、そのようなA b sの投与は2つの効果のうち1つを媒介する：（1）抗体はリガンドの結合を妨げ、内在性のリガンド結合及びそれに続くシグナル伝達を除去する、又は（2）抗体が標的分子のエフェクター部位に結合することによる生理学的な結果を誘発し、シグナル伝達を開始させる。

10

治療上有効な量の抗体は、一般に、治療目的を達成するのに必要な量、エピトープ結合親和性、投与速度、及び被検対象からの抗体の除去速度と関係する。治療上有効な用量に関する通常の範囲は、限定はしないが、例えば、約0.1mg/kg体重から約50mg/kg体重である。投薬頻度は、例えば、一日二回から週に一回である。

## 【0092】

## 12. A b sの薬剤的組成物

抗VEGFmg A b s並びに他のアッセイで同定されたVEGFmg相互作用分子（アプタマーなど）は、種々の障害を治療するための薬剤的組成物中にて投与される。そのような組成物を調製することに関する原則及び考慮並びに構成成分の選択における指針は（de Boer, 1994; Gennaro, 2000; Lee, 1990）中に見出すことができる。

20

VEGFmgは細胞内に存在するため、A b sの完全体がインヒビターとして用いられる場合、細胞内移行するA b sが好ましい。また、リポソームが細胞内への導入のための送達媒体として使用されてもよい。抗体断片が使用される場合、エピトープと特異的に結合する最小の阻害断片が好ましい。例えば、有用な抗体の可変領域配列に基づいて好適なエピトープに結合するペプチド分子を設計することができる。このようなペプチドは、化学的に合成し、及び/又は組換えDNA技術によって合成することができる（Marasco等, 1993）。また、製剤には、1より多い特定の治療のための活性な化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない活性を伴うものも含まれる。組成物には、細胞毒性剤、サイトカイン、化学療法剤、又は成長阻害剤などの機能を増強させる薬剤が含まれる。また、活性成分は、コアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル中に包括させることもできる；例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ（メタクリル酸メチル）マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）中、又はマクロエマルジョン中。

30

インビボ投与に使用される製剤は無菌であることが極めて好ましい。これは、滅菌濾過膜を通した濾過又は多くの何れかの技術により容易に達成される。

抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリクスを含み、マトリクスが成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状であるような、徐放性製剤を調製してもよい。徐放性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）又はポリ（ビニルアルコール））、ポリアクチド（Boswell及びScribner, 米国特許第3,773,919号, 1973）、L-グルタミン酸及び-D-エチル-L-グルタメート、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、及びポリ（D）-3-ヒドロキシブチル酸酢から構成される注射可能な小球などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマーを含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。

40

## 【0093】

## VEGFmgの治療的適用

## 1. 病理関連の有用性

50



本発明のポリヌクレオチドとタンパク質は、腫瘍及び新生組織形成、血管腫、リウマチ様関節炎、アテローム性動脈硬化症、特発性肺線維症、血管再狭窄、動静脈奇形、髄膜腫、血管新生緑内障、乾癬、血管線維腫、血友病性関節、肥厚性瘢痕、オスラー - - ウェーバー症候群、化膿性肉芽腫水晶体後線維増殖症、強皮症、トラコーマ、血管固着病理 (vascular adhesion pathologies)、滑膜炎、皮膚炎、子宮内膜症、翼状片、糖尿病性網膜症、角膜外傷又は移植に伴う新血管新生、創傷、腫れ物、及び潰瘍 (皮膚、胃及び十二指腸) 治癒に関連する潜在的な治療用途において有用である。例えば、ARPをコードしているcDNAは、遺伝子療法において有用であり得、ARPタンパク質はそれを必要とする患者に投与する場合に有用でありうる。ARPをコードしている新規な核酸と、本発明のARPタンパク質、又はその断片は、核酸又はタンパク質の存在又は量が評価される、診断用途において更に有用でありうる。これらの物質は、治療又は診断方法に使用される本発明の新規物質に免疫特異的に結合するAbsの産生において更に有用である。

10

加えて、本発明は、患者から採取された細胞のバイオプシーのような、サンプルの臨床的状态又は病理を決定するために用いることができる。腫瘍又は癌のような増殖の臨床状態は、例えば癌の転移攻撃性を分類するものとして当業者によって認められている分類系である。

#### 【0094】

##### 2. アゴニスト及びアンタゴニスト

「アンタゴニスト」には、内在性VEGFmgの生物学的活性を一部又は完全に阻害し又は中和させる分子の何れもが含まれる。同様に、「アゴニスト」には、内在性VEGFmgの生物学的活性を模倣する分子の何れもが含まれる。アゴニスト又はアンタゴニストとして作用し得る分子には、Abs又は抗体断片、内在性VEGFmgの断片又は変異体、ペプチド、アンチセンス、オリゴヌクレオチド、小有機分子、などが含まれる。

20

#### 【0095】

##### 3. アンタゴニスト及びアゴニストの同定

アンタゴニストをアッセイするために、VEGFmg特定の活性に対してスクリーニングされる化合物と共に細胞に添加され、又は細胞中で発現される。VEGFmgの存在下において、対象活性を化合物が阻害する場合、その化合物は、VEGFmgに対するアンタゴニストである；VEGFmg活性が促進される場合、該化合物はアゴニストである。

30

##### (a) 潜在的アンタゴニスト及びアゴニストの特異的な例

VEGFmgの細胞内での効果を変更する何れかの分子は、アンタゴニスト又はアゴニストの候補である。当業者にとって周知のスクリーニング技術により、これらの分子を同定することができる。アンタゴニスト及びアゴニストの例には：(1) 小有機及び無機化合物、(2) 小ペプチド、(3) Abs及び誘導体、(4) VEGFmgに極めて関連性の強いポリペプチド、(5) アンチセンスDNA及びRNA、(6) リボザイム、(7) 三重鎖DNAらせん、及び(8) 核酸アプタマー、が含まれる。

VEGFmgの活性部位又は該ペプチドの他の関連部分に結合し、及びVEGFmgの生物学的活性を阻害する小分子は、アンタゴニストである。小分子アンタゴニストの例には、小ペプチド、ペプチド様分子、好ましくは可溶であり、及び合成非ペプチジル有機もしくはは無機化合物が含まれる。もしこれらがVEGFmg活性を促進するならば、これらと同一の分子がアゴニストの例となる。

40

VEGFmg機能に影響を及ぼす何れかの抗体のほとんどが、アンタゴニストの候補であり、時にはアゴニストの候補である。抗体アンタゴニストの例には、ポリクローナル、モノクローナル、単一鎖、抗イディオタイプ、キメラAbs、又はこのようなAbs又は断片のヒト化型が含まれる。Absは免疫応答が生じ得る何れかの種由来である。また、ヒト化Absも考慮される。

或いは、潜在的アンタゴニスト又はアゴニストは、極めて関連性のあるタンパク質、例えば、VEGFmg相互作用タンパク質を認識するVEGFmgの突然変異型であるが、なんら効果を示さず、そのためVEGFmgの作用を競合的に阻害するものである。或いは

50

、突然変異 V E G F m g は構成的に活性化され、アゴニストとして作用するかもしれない。

#### 【 0 0 9 6 】

アンチセンス R N A 又は D N A コンストラクトは有効なアンタゴニストであり得る。アンチセンス R N A 又は D N A 分子は標的の m R N A に対してハイブリダイズして翻訳を阻害することにより機能を阻止する。アンチセンス技術は、三重鎖ヘリックス形態、又は共に D N A 又は R N A に対するポリヌクレオチド結合に依存するようなアンチ D N A 又は R N A を通じて遺伝子発現のコントロールをするために使用することができる。例えば、V E G F m g 配列の 5 ' コード化部分は、長さが約 1 0 から 4 0 塩基対であるアンチセンス R N A オリゴヌクレオチドをデザインするために使用される。D N A オリゴヌクレオチドは、転写に關与する遺伝子領域に対して相補的であり（三重鎖ヘリックス）（B e a l 及び D e r v a n , 1 9 9 1 ; C o o n e y 等 , 1 9 8 8 ; L e e 等 , 1 9 7 9 ）そのため、転写及び V E G F m g の生産を阻害するようにデザインされる。アンチセンス R N A オリゴヌクレオチドは、インヴィボにおいて m R N A とハイブリダイズし、m R N A の V E G F m g への翻訳を阻止する（アンチセンス）（C o h e n , 1 9 8 9 ; O k a n o 等 , 1 9 9 1 ）。また、これらのオリゴヌクレオチドもアンチセンス R N A 又は D N A が V E G F m g の生産を阻害するようにインヴィボにおいて発現し得るように細胞へ導入することができる。アンチセンス D N A が用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の約 - 1 0 と + 1 0 の間の位置から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

リボザイムは、R N A の特異的な切断を触媒することができる酵素的 R N A 分子である。リボザイムは、相補的標的 R N A に対する配列特異的ハイブリダイゼーション、次いで、ヌクレオチド内的切断により作用する。潜在的 R N A 標的における特異的リボザイム切断部位は、既知の技術によって同定され得る（国際公開第 9 7 / 3 3 5 5 1 号 , 1 9 9 7 ; R o s s i , 1 9 9 4 ）。

転写を阻害するために、一本鎖化される、デオキシヌクレオチドを含む三重鎖ヘリックス核酸は有用なアンタゴニストである。これらのオリゴヌクレオチドはフーグスチン塩基対ルールを介した三重鎖ヘリックスが促進されるようにデザインされ、一般に、プリン又はピリミジンのストレッチを必要とする（国際公開第 9 7 / 3 3 5 5 1 号 , 1 9 9 7 ）。V E G F m g 活性には核酸結合が含まれるため、B A T m R N A のような V E G F m g 核酸結合部位と競合する分子は有効な細胞内競合因子となり得る。アプタマーは、ほぼ如何なる分子も認識し、特異的に結合するように用いることができる短いオリゴヌクレオチド配列である。指数関数的濃縮によるリガンドの体系的進化（S E L E X ）過程（A u s u b e l 等 , 1 9 8 7 ; E l l i n g t o n 及び S z o s t a k , 1 9 9 0 ; T u e r k 及び G o l d , 1 9 9 0 ）は強力で、そのようなアプタマーを見つけるために使用可能である。アプタマーは多くの診断及び臨床的な使用を有する；临床上、診断上使用されてきたほぼ全ての使用であって、アプタマーも使用され得るもの。さらに、一度同定されれば、より安価に作製され、製薬的な組成物、バイオアッセイ、診断テストにおいての投与を含む様々な形式において容易に適用することができる（J a y a s e n a , 1 9 9 9 ）。

#### 【 0 0 9 7 】

##### 製薬組成物

本発明の V E G F m g の核酸分子、V E G F m g のポリペプチド及び抗 V E G F m g A b s （活性化化合物）、及びその誘導體、断片、類似体及び相同体は、薬剂的組成物中へ取り込まれ得る。典型的に、そのような組成物には、核酸分子、タンパク質又は抗体及び製薬的に受容可能な担体が含まれる。「製薬的に受容可能な担体」は、何れかの及び全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌及び抗真菌剤、アイソトニックで吸着を遅らせる薬剤、及びその類似物を含み、薬剂的投与に適合する（G e n n a r o , 2 0 0 0 ）。そのような担体又は希釈剤の好ましい例には、限定はしないが、水、生理食塩水、フィンガー溶液、デキストロース溶液、及び 5 % のヒト血清アルブミンが含まれる。リボソーム及び

不揮発性油などの非水溶性媒体も用いられる。従来の培地又は薬剤が活性な化合物に適合しない場合以外は、これらの組成物の使用が考慮される。補充性の活性化合物も該組成物中に取り込まれる。

### 1. 一般的な考慮事項

本発明の薬剤的な組成物は、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入など）、経皮性（即ち、局所的な）、経粘膜、及び直腸の投与を含む、意図された投与経路に適合するように製剤化される。非経口、皮内、又は皮下への適用のために使用される溶液又は懸濁液は：注射用の水などの滅菌的希釈液、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、又は他の合成溶媒；ベンジルアルコール又は他のメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩、又はリン酸塩などのバッファー、及び塩化ナトリウム又はデキストロースなどの張性の調製のための薬剤を含み得る。pHは塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基で調製され得る。非経口的標品はアンプル、ガラスもしくはプラスチック製の使い捨てシリンジ又は複数回投与用バイアル中に収納される。

10

### 【0098】

### 2. 注射可能な製剤

注射に適する薬剤的組成物には、滅菌的な注射可能な溶液又は分散媒を即座に調製するための滅菌的水溶液（水溶性の）又は分散媒及び滅菌性のパウダーが含まれる。静脈内の投与に関し、適切な担体には生理食塩水、静菌水、CREMOPHORE<sup>TM</sup>（BASF, Parsippany, N.J.）、又はリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）が含まれる。全ての場合において、組成物は滅菌的であって、シリンジを用いて投与されるために流動的でなくてはならない。このような組成物は、調剤及び保存の間、安定であるべきで、バクテリア及び真菌などの微生物由来のコンタミネーションから保護されなくてはならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及び適切な混合物を含む溶媒又は分散媒培地であり得る。例えば、レクチンなどのコーティング剤を用い、分散媒においては必要とされる粒子サイズを維持し、界面活性剤を用いることにより適度な流動性が維持される。種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、及びチメロサルなどは、微生物のコンタミネーションを含み得る。例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール及び塩化ナトリウムのような等張性を保つ薬剤が組成物中に含まれ得る。吸着を遅らせることができる組成物には、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなどの薬剤が含まれる。

20

30

滅菌的な注射可能な溶液は、必要な成分の一又は組み合わせとともに、適切な溶媒中に必要量の活性化合物（例えば、VEGF<sub>m</sub>g又は抗VEGF<sub>m</sub>g抗体）を取り込み、次に滅菌することで調製することができる。一般に、分散媒は、基本的な分散培地及び上述したその他の必要成分を含む滅菌的媒体中に活性化合物を取り込むことにより調製される。滅菌的な注射可能な溶液の調製のための滅菌的なパウダーの調製方法には、活性な成分及び滅菌溶液に由来する何れかの所望な成分を含むパウダーをもたらす真空乾燥及び凍結乾燥が含まれる。

40

### 【0099】

### 3. 経口組成物

通常、経口組成物には、不活性な希釈剤又は食用に適する担体が含まれる。それらは、ゼラチンのカプセル中に包含されるか、加圧されて錠剤化される。経口治療的な投与の目的には、活性化合物は賦形剤と共に取り込まれ、錠剤、トローチ又はカプセルの形態で使用される。また、経口組成物は、うがい薬としての使用のための流動性担体を用いて調製することも可能であり、流動性担体中の該組成物は経口的に適用される。製薬的に適合する結合剤、及び/又はアジュバント物質が包含され得る。錠剤、丸薬、カプセル、トローチ及びその類似物は以下の成分又は類似の性質を持つ化合物の何れかを含み得る：微結晶性セルロース、ガム、トラガガント又はゼラチンなどの結合剤；スターチ又はラクトースな

50

どの賦形剤、アルギン酸などの崩壊性剤、P R I M O G E L、又はコーンスターチ；ステアリン酸マグネシウム又はS T E R O T E Sなどの潤滑剤；コロイド性シリコン二酸化物などの滑剤（g l i d a n t）；スクロース又はサッカリンなどの甘味剤；又はペパーミント、メチルサリシル酸又はオレンジフレーバーなどの香料添加剤。

#### 4．吸入用組成物

吸入による投与に対して、化合物は、例えば、二酸化炭素などのガスのような適切な噴霧剤を含むネブライザー又は加圧容器からのエアロゾルスプレーとして提供される。

【0100】

#### 5．全身投与

また、全身投与は経粘膜的又は経皮的でもあり得る。経粘膜的又は経皮的投与について、標的のバリアー（群）を透過することができる浸透剤が選択される。経粘膜浸透剤は界面活性剤、胆汁酸塩、及びフシジン酸誘導体が含まれる。経鼻スプレー又は坐薬は経粘膜的な投与に対して使用することができる。経粘膜的投与に対して、活性化合物はオイントメント、軟膏、ジェル又はクリーム中へ製剤化される。

10

また、化合物は、直腸への送達に対して、坐薬（例えば、ココアバター及び他のグリセリドなどの基剤と共に）又は滞留性の浣腸の形態で調製することもできる。

#### 6．担体

一実施態様において、活性化合物は、植込錠及びマイクロカプセルに封入された送達システムを含む制御放出製剤などの、体内からすぐに除去されることから化合物を保護する担体で調製される。エチレンビニル酢酸塩、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸などの、生物分解性、生物適合性ポリマーが使用され得る。このような材料は、A L Z A C o r p o r a t i o n ( M o u n t a i n V i e w , C A ) 及び N O V A P h a r m a c e u t i c a l s , I n c . ( L a k e E l s i n o r e , C A ) から入手可能であり、当業者によって調製されることが可能である。また、リポソームの懸濁液も製薬的に受容可能な担体として使用することができる。これらは、( E p p s t e i n 等 , 米国特許第 4 , 5 2 2 , 8 1 1 号 , 1 9 8 5 ) にあるように当業者にとって既知の方法に従って調製することができる。

20

【0101】

#### 7．単位投与量

単位投与量の形での経口製剤又は非経口製剤は、投与及び投与量の均一性を促進するように作成される。単位投与量形態は、治療されるべき被検対象に対する一回の投与量に適した物理的に別個の単位であって、必要とされる製薬的な担体と共に活性化合物の治療上の有効量を含む単位を意味する。本発明の単位投与量形態に対する特定化は、活性化合物のユニークな特徴及び特に所望される治療上の効果、及び活性化合物を化合物化すること固有の限界によって影響され、直接依存する。

30

#### 8．遺伝子治療組成物

本発明の核酸分子は、ベクター中に挿入することができ、遺伝子治療ベクターとして使用することができる。遺伝子治療ベクターは、被検対象へ、例えば、静脈内注射、局所的投与（N a b e l 及び N a b e l , 米国特許第 5 , 3 2 8 , 4 7 0 号 , 1 9 9 4 ）又は定位的な注射（C h e n 等 , 1 9 9 4 ）によって送達させることができる。遺伝子治療ベクターの製薬的調剤物は、受容可能な希釈剤を包含することができ、又は遺伝子送達媒体が組込まれた緩徐放出マトリックスを含むことができる。或いは、完全な遺伝子送達ベクターは、例えばレトロウィルスベクターのように、組換え体細胞から無傷で生産されるが、製薬的な調剤には、遺伝子送達系を生み出す一又は複数の細胞を包含し得る。

40

【0102】

#### 9．製薬的組成物のキット

製薬的組成物はキット、容器、パック、又はディスペンサー中に投与の説明書と共に含めることができる。本発明はキットとして供給される場合、組成物の異なる構成成分が別々の容器中に包装され、使用直前に混合される。このように構成成分を別々に包装することは、活性構成成分の機能を失うことなく、長期間の貯蔵を可能にすることができる。

50

また、キットは診断テスト又は組織タイピングなどの特異的なテストの実施を促進するように、別々の容器中に試薬を包含する。例えば、VEGFmg DNAテンプレート及び適切なプライマーが内部コントロールとして供給される。

(a) 容器又は器 (vessels)

キット中に含まれる試薬は、異なる構成成分の寿命が持続され、容器の材質によって吸着されず、変化されないような何れかの種類の容器中に供給される。例えば、封着されたガラスアンプルは、凍結乾燥されたルシフェラーゼ又は窒素ガスのような中性で、不反応性ガスの下で包装されたバッファーを含む。アンプルは、ガラス、ポリカーボネート、ポリスチレンなどの有機ポリマー、セラミック、金属、又は試薬を保持するために典型的に用いられる他の何れかの適切な材料など何れか適切な材質から構成される。他の適切な容器の例には、アンプルなどの類似の物質から作られる簡単なボトル、及びアルミニウム又は合金などのホイルで裏打ちされた内部によって構成される包装材が含まれる。他の容器には、試験管、バイアル、フラスコ、ボトル、シリンジ、又はその類似物が含まれる。容器は、皮下用注射針で貫通可能でストッパを有するボトルなどの無菌のアクセスポートを有する。他の容器には、容易に除去可能で、除去することで区画を混合させるような膜によって分離された2つの区画を有する。除去可能な膜は、ガラス、プラスチック、ラバーなどである。

10

(b) 使用説明書

また、キットには使用説明書も供給されている。指示は、紙又は他の材質上に印刷され、及び/又はフロッピー（登録商標）ディスク、CD-ROM、DVD-ROM、Zipディスク、ビデオテープ、オーディオテープなどの電氣的に読み取り可能な媒体として供給されてもよい。詳細な指示は、キットに物理的に付随していないかもしれない；その代わりに、使用者はキットの製造者又は流通業者によって指定され又は電子メールで供給されるウェブサイトが案内されるであろう。

20

【0103】

スクリーニング及び検出方法

本発明の単離された核酸分子は、VEGFmgを発現させ（例えば、遺伝子治療の適用における宿主細胞中での組換え体発現ベクターを介して）、VEGFmg mRNA（例えば、生物学的サンプル中の）を検出し、後述のようにVEGFmgの活性を変更させるために使用される。さらに、VEGFmgポリペプチドはVEGFmg活性又は発現を調節する薬剤又は化合物をスクリーニングし、並びにVEGFmgの不十分な又は過剰な生産又は減少されたVEGFmgの生産又はVEGFmgの野生型タンパク質と比較すると異常である活性によって特徴付けられる疾患を治療し、又はVEGFmgが関与する生物学的機能（例えば、血管形成）を調節するために使用することができる。さらに、本発明の抗VEGFmg Absは、VEGFmgを検出し、単離し、及びVEGFmg活性を調節するために使用することができる。

30

細胞の生存を調節することは、調節前の細胞と比較して、将来ある期間にわたって細胞が死ぬ確率を減少又は増加させることを意味する。

【0104】

1. スクリーニングアッセイ

40

本発明は、細胞中の遺伝子の翻訳、転写、活性又はコピーを含むVEGFmgへの刺激的又は阻害的な影響を与える様式、即ち、候補又はテスト化合物又は薬剤（例えば、ペプチド、ペプチドミメティクス、小分子、又は他の薬物）、食物、これらの組み合わせなどを同定するための方法（スクリーニングアッセイ）を提供する。また、本発明は、スクリーニングアッセイにおいて同定される化合物も含む。

VEGFmg活性を増大又は減少させる化合物をテストすることが望ましい。化合物は：（1）細胞中の遺伝子のコピー数に影響を与えることにより（増幅因子及び減少因子）；（2）VEGFmgの転写を増加又は減少させることにより（転写上方制御因子及び転写下方制御因子）；（3）タンパク質へのVEGFmg mRNAの翻訳を増大又は減少させることにより（翻訳上方制御因子及び翻訳下方制御因子）；又は（4）VEGFmgそ

50

れ自体の活性を増大又は減少させることにより（アゴニスト及びアンタゴニスト）、V E G F m g の活性を調節する。

（a）化合物の影響

D N A、R N A 及びタンパク質レベルで V E G F m g に影響を与える化合物を同定するために、細胞又は生物体を候補化合物と接触させ、V E G F m g D N A、R N A 又はタンパク質における対応する変化を評価する（A u s u b e l 等， 1 9 8 7）。D N A 増幅因子及び減少因子については、V E G F m g D N A の量が測定され、転写上方制御因子及び下方制御因子である化合物については、V E G F m g m R A N の量が測定され；翻訳上方制御因子及び下方制御因子である化合物については、V E G F m g ポリペプチドの量が測定される。アゴニスト又はアンタゴニストである化合物は、細胞又は生物体を化合物に接触させ、その後、インヴィトロにおける脂肪細胞の分化を測定することにより同定される。

一実施態様において、候補又は V E G F m g の活性又はポリペプチド又は生物学的に活性なタンパク質と結合又は調節するテスト化合物をスクリーニングするための多くのアッセイが利用可能である。テスト化合物は：生物学的ライブラリー；空間的アドレス可能固相又は液相ライブラリー；逆重畳積分を必要とする合成ライブラリー法；「一ビーズ化合物」ライブラリー法；及びアフィニティークロマトグラフィー選択を用いた合成ライブラリー法を含む、コンビナトリアルライブラリー法における多数のアプローチの何れかを用いて得ることが可能である。生物学的ライブラリーによるアプローチは、ペプチドに限定されるが、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマー又は化合物の小分子ライブラリーを包含する（L a m， 1 9 9 7）。

【0105】

（b）小分子

「小分子」とは約 5 k D 未満の分子量を持つ組成物のことを指し、最も好ましくは約 4 k D 未満であり、更により好ましくは 0 . 6 k D 未満である。小分子は、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチドミメティクス、炭水化物、脂質又は他の有機もしくは無機分子であり得る。化学及び/又は真菌、バクテリア、又は藻類の抽出物などの生物学的混合物のライブラリーは、当該技術分野において既知であり、本発明のアッセイの何れかによりスクリーニングすることができる。分子ライブラリーの合成のための方法の実例は：（C a r e l l 等， 1 9 9 4 a；C a r e l l 等， 1 9 9 4 b；C h o 等， 1 9 9 3；D e W i t t 等， 1 9 9 3；G a l l o p 等， 1 9 9 4；Z u c k e r m a n n 等， 1 9 9 4）中に見出すことができる。

化合物のライブラリーは溶液中（H o u g h t e n 等， 1 9 9 2）又はビーズ上（L a m 等， 1 9 9 1）、チップ上（F o d o r 等， 1 9 9 3）、バクテリア、孢子（L a d n e r 等， 米国特許第 5，223，409 号， 1 9 9 3）、プラスミド（C u l l 等， 1 9 9 2）又はファージ（C w i r l a 等， 1 9 9 0；D e v l i n 等， 1 9 9 0；F e l l i c i 等， 1 9 9 1；L a d n e r 等， 米国特許第 5，223，409 号， 1 9 9 3；S c o t t 及び S m i t h， 1 9 9 0）上に提供されてもよい。無細胞アッセイには、アッセイ混合物を形成させるために V E G F m g 又は生物学的に活性な断片に V E G F m g と結合する既知の化合物を接触させ、アッセイ混合物にテスト化合物を接触させ、テスト化合物が V E G F m g と相互作用する能力を決定することが含まれるが、テスト化合物が V E G F m g と相互作用する能力を決定することには、V E G F m g が V E G F m g 標的分子と優先的に結合し、又はその活性を調節する能力を決定することを含む。

（c）無細胞アッセイ

本発明の無細胞アッセイは V E G F m g の可溶性又は膜結合形態のどちらを利用してもよい。膜結合形態を含む無細胞アッセイの場合、V E G F m g を溶液中に保つために可溶化剤を要する。そのような可溶化剤の例には、n - オクチルグルコシド、n - ドデシルグルコシド、n - ドデシルマルトシド、オクタノイル - N - メチルグルカミド、デカノイル - N - メチルグルカミド、T R I T O N（登録商標）X - 100 及び T R I T O N（登録商標）シリーズから選択されるその他のもの、T H E S I T（登録商標）、イソトリデシボ

10

20

30

40

50

リ（エチレングリコールエーテル）<sub>n</sub>、N - ドデシル - N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホン酸、3 - （3 - コラミドプロピル）ジメチルアンモニオール - 1 - プロパンスルホン酸（CHAPS）、又は3 - （3 - コラミドプロピル）ジメチルアンモニオール - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホン酸（CHAPSO）が含まれる。

#### 【0106】

（d）スクリーニングを促進するための標的分子の固定化

アッセイ方法の2以上の実施態様において、VEGFmg又はそのパートナー分子の何れかを固定化することは、タンパク質の一方又は両方の複合化されていない形態から複合化されたものの分離を促進し、同時にハイスループットアッセイを適応化させる。VEGFmgへのテスト化合物の結合、又は候補化合物の存在下及び非存在下におけるVEGFmgの標的分子との相互作用は、反応物を収納するのに適した、マイクロタイタープレート、試験管、及び微小遠心管などの何れかの容器中で達成される。タンパク質の一方又は両方がマトリックスに結合することを許容するドメインを付加するように、融合タンパク質が提供され得る。例えば、GST - VEGFmg融合タンパク質又はGST - 標的融合タンパク質は、後にテスト化合物又はテスト化合物及び非吸着標的タンパク質又はVEGFmgの何れかと混合されるグルタチオンセファロースビーズ（SIGMA Chemical, St. Louis, MO）又はグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレートに吸着され、その混合物は複合体形成に至る条件下（例えば、塩及びpHに関して生理学的な条件にて）でインキュベートされる。インキュベーションの後、ビーズ又はマイクロタイタープレートウェルは、いずれの非結合成分をも除去するために洗浄され、ビーズの場合はマトリックスが固定化され、複合体は例えば上述のように直接又は間接的に決定される。或いは、複合体はマトリックスから分離され、VEGFmgの結合又は活性レベルが標準的な技術を用いて決定される。

また、マトリックス上にタンパク質を固定化するためのその他の技術がスクリーニングアッセイにおいて用いられ得る。VEGFmg又はその標的分子のどちらかをビオチン - アビジン又はビオチン - ストレプタビジンシステムを用いて固定化させることができる。ビオチン化は、ビオチン - NHS（N - ヒドロキシ - スクシンイミド；PIERCE Chemicals, Rockford, IL）などの多くの試薬によって達成され、ストレプタビジンでコートした96ウェルプレート（PIERCE Chemical）のウェル中に固定化され得る。或いは、VEGFmg又は標的分子に反応性のAbsが、標的分子とVEGFmgとの結合を妨げることなく、プレートウェルに誘導体化され、非結合標的又はVEGFmgが抗体結合によってトラップされる。そのような複合体を検出する方法は、GST - 固定化複合体に関して記載されているものに加えて、VEGFmg又はその標的と反応性のAbsを用いる複合体の免疫学的検出、並びにVEGFmg又は標的分子に関連する酵素活性の検出に基づく酵素共役アッセイを含む。

#### 【0107】

（e）調節因子を同定するためのスクリーニング

VEGFmg発現の調節因子は、細胞を候補化合物と接触する方法において同定することができ、細胞中でのVEGFmg mRNA又はタンパク質の発現が決定される。候補化合物の存在下におけるVEGFmg mRNAの発現レベルが、候補化合物の非存在下におけるVEGFmg mRNA又はタンパク質レベルと比較される。例えば、VEGFmg mRNA又はタンパク質の発現レベルが候補化合物の存在下において、その非存在下よりも多い（即ち、統計学的に有意に）場合、候補化合物は、VEGFmg mRNA又はタンパク質発現の刺激因子として同定される。或いは、VEGFmg mRNA又はタンパク質の発現が候補化合物の存在下において、その非存在下よりも少ない（統計学的に有意に）場合、候補化合物は、VEGFmg mRNA又タンパク質発現の阻害因子として同定される。VEGFmg mRNA又はタンパク質発現のレベルは、VEGFmg mRNA又はタンパク質を検出するために記述された方法によって決定することができる。

（f）ハイブリッドアッセイ

本発明のさらに他の態様において、VEGFmgは、VEGFmg (VEGFmg結合タンパク質 (VEGFmg-bps)) と結合もしくは相互作用し及びVEGFmg活性を修飾する他のタンパク質を同定するために2ハイブリッド又は3ハイブリット [Saifer, 1994 #38; Zervos, 1993 #382; Madura, 1993 #383; Bartel, 1993 #384; Iwabuchi, 1993 #385; Brent, 1994 #386] における「おとり」として使用され得る。また、そのようなVEGFmg-bpsは、例えば、VEGFmg経路の上流又は下流エレメントとしてVEGFmgによるシグナル伝達にも関与する。

2ハイブリッドシステムはほとんどの転写因子のモジュラー (modular) 的性質に基づいており、分離可能なDNA結合及び活性化ドメインから成る。簡単には、該アッセイは二つの異なるDNAコンストラクトを利用する。一方のコンストラクトにおいて、VEGFmgをコードする遺伝子は、既知の転写因子 (例えば、GAL4) のDNA結合ドメインをコードする遺伝子と融合される。他方のコンストラクトは、未同定タンパク質 (「捕獲」又は「試料」) をコードするDNA配列のライブラリーに由来するDNA配列が、既知の転写因子の活性化ドメインと融合される。「おとり」及び「捕獲」タンパク質がインヴィボにおいて相互作用することができると、VEGFmg依存的複合体を形成し、転写因子のDNA結合及び活性化ドメインが極めて近傍に位置せられることになる。この接近により転写因子に反応性の転写制御部位と作用可能に結合されたレポーター遺伝子 (例えば、lacZ) の転写が許容される。レポーター遺伝子の発現が検出され、機能的な転写因子を含む細胞コロニーが単離され、VEGFmg相互作用タンパク質をコードするクローン化遺伝子を得るために使用することができる。

10

20

#### 【0108】

##### (g) カルシウムチャネル調節因子

幾つかの部類のカルシウムチャネル遮断薬が知られており、有効なアンタゴニスト及びアゴニストでありうる。例えば、Mak等 (Mak等, 1995) は親油性カルシウムチャネル遮断薬ニカルジピン、ニフェルジピン、ベラパミル及びジルチアゼムの内皮細胞の保護剤及び抗酸化剤としての活性を報告している。カルシウムチャネルは、ここで同定した遺伝子が差次的に発現される細胞生存において有意な役割を担っている可能性がある。カルシウムの調節において有意であるVEGFmgとしてはDSCR1及びネキシンがある。例えば、DSCR1又はネキシンの発現を刺激し、ミトコンドリア呼吸鎖の活性を低減させる薬剤は、生存を促進し、血管形成関連疾患、つまり血管形成が抑制されるか不十分である疾患の治療に有用である。例えばDSCR1又はネキシンの発現を低減させ、ミトコンドリア呼吸鎖の活性を増大させる薬剤は、アポトーシスを誘発又は促進し、よって血管形成が刺激される疾患を治療するのに有用である。

30

さらに、本発明は上述のスクリーニングアッセイにより同定された新規薬剤及びここで上述した治療についてのその使用に関する。

#### 【0109】

##### 2. 検出アッセイ

ここで同定されるVEGFmg cDNA配列の部分又は断片 (及び完全なVEGFmg遺伝子配列) は、それら自体有用である。非限定的な例として、これらの配列は：(1) 極めて少ない生物学的試料から個人を同定したり (組織タイピング) ; 及び(2) 生物学的試料の法医学的な同定における手がかりとするために使用することができる。

40

##### (a) 組織タイピング

本発明のVEGFmg配列は、微少な生物学的試料から個人を同定するために使用され得る。この技術において、個人のゲノムDNAは一又は複数の制限酵素によって消化され、ユニークなバンドを生じさせるようにサザンブロット上でプローブ化される。本発明の配列はさらに「制限酵素断片長多型」(RFLP; (Smulson等, 米国特許第5, 272, 057号, 1993)) に対するDNAマーカーとして有用である。

さらに、VEGFmg配列は、個人のゲノムの標的部分の実際の塩基ごとのDNA配列を決定するために用いることができる。VEGFmg配列は、個人のゲノム由来の対応配列

50



を増幅し、その後増幅された断片の配列を決定するために使用できる配列の 5' 末端及び 3' 末端由来の 2 つの PCR プライマーを調製するために使用される。

各個人は、対立遺伝子の相違による DNA 配列のユニークなセットを持つであろうから、個人由来の DNA 配列に対応するパネルは、ユニークな個人の同定を提供することができる。本発明の配列は、そのように同定された個人及び組織由来の配列を得るために使用することができる。本発明の VEGFm g 配列は個人のゲノムの部分を独自に表現する。対立遺伝子の変異は、これらの配列のコード化領域中にある程度生じ、かなりの程度が非コード化領域に生じる。個々のヒトの間における対立遺伝子の変異は、約 500 塩基ごとの頻度で生じる。対立遺伝子変異の多くは、一ヌクレオチド多型 (SNPs) によるもので、RFLPs が含まれる。

10

ここで記載される各配列は、ある程度、個人に由来する DNA が同定の目的で比較され得る標準として使用される。非常に多くの数の多型が非コード化領域に生じているため、個人を区別するのに非常に少ない配列しか必要とされない。非コード化配列は、各々が 100 塩基の非コード化増幅配列を生み出す 10 から 1000 のプライマーのパネルによって個人をポジティブに同定することができる。

#### 【0110】

#### 3. オリゴヌクレオチドアレイを用いる VEGF 調節遺伝子のアッセイ

上述のヌクレオチドプローブ、抗体等々の使用に加えて、他の方法も VEGFm g の発現を同定するために利用できる。

本発明は、HUVECs のような、内皮細胞の生存に影響を及ぼす化合物をスクリーニングするための方法において差次的に発現されるものとして同定される遺伝子の用途を提供する。適切なコントロールとの VEGFm g 発現レベルの同時解析によって、薬物、タンパク質又は他の化合物及び製剤を評価することができる。VEGFm g s の差次的な発現の度合いの評価は VEGFm g s に対応する mRNAs に結合又はハイブリダイズ可能で、それに相補的なオリゴヌクレオチドを含むアレイ又は類似の装置を用いてなすことができる。例えば、そのようなアレイは、例えば化合物で処理された内皮細胞中での mRNA レベルを測定し、未処理細胞中の mRNA レベルと比較することができる。この装置の一例は、mRNAs のある集合に結合又はハイブリダイズ可能で、それに相補的なオリゴヌクレオチドの微細化高密度アレイである GeneChip<sup>TM</sup> (Affymetrix, C I T Y, C A) である。この方策の技術的な実施化は詳細に記載されている (Lipshutz 等, 1999)。

20

30

#### 【0111】

#### 予測的医薬

また、本発明は、診断上のアッセイ、予後のアッセイ、薬理ゲノム学、及び臨床試験をモニターすることが、予防的に個人を治療する予後の (予測的) 目的のために使用される予測的医薬の分野にも関する。従って、本発明の一態様は、個人が疾病又は疾患に冒されていないかどうか、又は疾患を進行させる危険にあるかどうか、血管形成と細胞生存を含む異常な VEGFm g の発現又は活性に関係しているかどうかを決定する生物学的試料 (例えば、血液、血清、細胞、組織) との関連において、VEGFm g 及び / 又は核酸の発現並びに VEGFm g の活性を決定するための診断上のアッセイに関する。また、本発明は個人が VEGFm g、核酸の発現又は活性に関連する疾患を進行させる危険に曝されているかどうかを決定するための予後の (予測的) アッセイにも関する。例えば、VEGFm g の突然変異は生物学的試料においてアッセイされる。このようなアッセイは、VEGFm g、核酸発現、又は生物学的活性により特徴付けられ又は関連した疾患の発症よりも前に、予防的に個人を治療する診断上又は予測的目的のために使用され得る。

40

本発明の他の態様は、そのような個人にとって適切な治療上又は予防的薬剤を選択するため (ここでは「薬理ゲノム学」と称される)、個人における VEGFm g 活性、又は核酸の発現を決定するための方法を提供する。薬理ゲノム学は、個人の遺伝子型 (例えば、特定の薬剤に対して応答する個人の能力を決定するための個人の遺伝子型) に基づいた個人の治療的又は予防的処置のための様式 (例えば、薬物、食物) の選択を可能にする。本発

50

明のその他の態様は、臨床試験における V E G F m g の発現又は活性における様式（例えば、薬物、食物）の影響をモニターすることに関する。

#### 【0112】

##### 1. 診断上のアッセイ

生物学的サンプル中の V E G F m g の存在又は非存在を検出するための例示的な方法は、被検対象から生物学的サンプルを得ること、サンプル中で V E G F m g の存在を確認するために生物学的サンプルを V E G F m g 又は V E G F m g 核酸（例えば、m R N A、ゲノム D N A）を検出することができる化合物又は薬剤と接触させることに関与する。V E G F m g m R N A 又はゲノム D N A を検出するための薬剤は、V E G F m g m R N A 又はゲノム D N A をハイブリダイズすることができる標識化された核酸プローブである。核酸 10  
プローブは、例えば、配列番号：1 又は 3 の核酸などの完全長 V E G F m g 核酸、又は少なくとも長さが 15、30、50、100、250 又は 500 ヌクレオチドであって、緊縮性の条件下で V E G F m g m R N A 又はゲノム D N A と特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチドなどのそれらの部分であり得る。

V E G F m g ポリペプチドを検出するための薬剤は、V E G F m g と結合することが可能な抗体であり、好ましくは検出可能な標識を持つ抗体である。A b s はポリクローナル抗体であり得、より好ましくはモノクローナル抗体である。無傷の抗体、又は断片（例えば、F<sub>a</sub>b 又は F ( a b ' )<sub>2</sub>）を用いることができる。標識化プローブ又は抗体は、直接標識化される他の試薬との反応性によるプローブ又は抗体の間接的な検出と同様に、検出 20  
可能な基質と共役される。間接的な標識の例には、蛍光標識した二次抗体を用いる一次抗体の検出、及び蛍光標識したストレプタビジンで検出することができるようなビオチンによる D N A プローブの末端ラベルが含まれる。「生物学的サンプル」という用語には、被検対象から単離された組織、細胞及び生物学的体液、並びに被検対象中に存在する組織、細胞及び体液が含まれる。本発明の検出方法は、インヴィトロ並びにインヴィボでの生物学的サンプル中の V E G F m g m R N A、タンパク質、又はゲノム D N A を検出するために用いられ得る。例えば、インヴィトロにおける V E G F m g m R N A の検出のための技術には、ノーザンハイブリダイゼーション及びインサイツハイブリダイゼーションが含まれる。V E G F m g ポリペプチドの検出のためのインヴィトロでの技術には、酵素結合免疫吸着検定法（E L I S A s）、ウェスタンブロット法、免疫沈降法、及び免疫蛍光法が含まれる。V E G F m g ゲノム D N A の検出のためのインヴィトロでの技術には、サ 30  
ザンハイブリダイゼーション法及びインサイツハイブリダイゼーション蛍光法（F I S H）が含まれる。さらに、V E G F m g を検出するためのインヴィボでの技術には、被検対象へ標識化された抗 V E G F m g 抗体を導入することが含まれる。例えば、抗体は、被検対象中における存在及び局在が標準的な画像化技術で検出することができる放射活性マーカーで標識化することができる。

#### 【0113】

一実施態様において、被検対象由来の生物学的サンプルには、タンパク質分子、及び / 又は m R N A 分子、及び / 又はゲノム D N A 分子が含まれる。好ましい生物学的サンプルは血液である。

他の実施態様において、さらにある方法が、コントロールを提供するために被検対象由来の生物学的サンプルを得ること、V E G F m g、m R N A、又はゲノム D N A を検出するために該サンプルを化合物又は薬剤と接触させること、及びテストサンプル中の V E G F m g、m R N A 又はゲノム D N A の存在と、コントロール中の V E G F m g、m R N A 又はゲノム D N A の存在を比較することに関与する。 40

また、本発明は生物学的サンプル中の V E G F m g を検出するためのキットも包含する。例えば、キットには：サンプル中の V E G F m g 又は V E G F m g m R N A を検出することができる標識化化合物又は薬剤；サンプル中の V E G F m g の量を決定するための試薬及び / 又は装置；及びサンプル中の V E G F m g の量を標準と比較するための試薬及び / 又は装置が含まれる。化合物又は薬剤は適切な容器中に包装される。キットはさらに V E G F m g 又は核酸を検出するためにキットを使用するための使用説明書を含み得る。 50

## 【 0 1 1 4 】

## 2. 予後のアッセイ

ここで記載された診断上の方法は、さらに、異常な V E G F m g 発現又は活性に関連した疾病又は疾患の進行の危険性を持つ又は危険状態にある被検対象を同定するために利用され得る。例えば、ここで記載されたアッセイは、V E G F m g、核酸発現又は活性に関連した疾病又は疾患の進行の危険性を持つ又は危険状態にある被検対象を同定するために使用され得る。或いは、予後のアッセイは疾病又は疾患の進行に関する危険性を持ち又は危険状態にある被検対象を同定するために使用され得る。本発明は、異常な V E G F m g 発現又は活性と関連する疾病又は疾患であって、テストサンプルが被検対象から得られ、V E G F m g 又は核酸（例えば、m R N A、ゲノム D N A）が検出される疾病又は疾患を同定する方法を提供する。テストサンプルは被検対象由来の生物学的サンプルである。例えば、テストサンプルは生物学的体液（例えば、血清）、細胞サンプル、又は組織であり得る。

予後のアッセイは、被検対象が異常な V E G F m g 発現又は活性と関連する疾病又は疾患を治療するための様式（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメチックス、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、食物など）を投与し得るかどうか決定するために使用することができる。そのような方法は、被検対象が疾患に対する薬剤で有効に治療され得るかどうか決定するために使用され得る。本発明は、テストサンプルが得られ、V E G F m g 又は核酸が検出される被検対象が異常な V E G F m g 発現又は活性と関連した疾患のための薬剤によって効果的に治療され得るかどうかを決定するための方法（例えば、V E G F m g 又は核酸の存在が、異常な V E G F m g 発現又は活性と関連した疾患を治療するための薬剤を投与し得る被検対象に対する診断）を提供する。

また、本発明の方法は、遺伝的な損傷を持つ被検対象が異常な細胞増殖又は分化によって特徴付けられる疾患に対する危険性があるかどうか決定するために V E G F m g における遺伝的な損傷を検出するために用いられ得る。被検対象由来のサンプル中において、変更位置における V E G F m g ポリペプチドをコードする遺伝子の完全性に影響を与えることにより特徴付けられる遺伝的損傷、又は V E G F m g の異常発現の存在又は非存在を検出することが含まれる。そのような遺伝的損傷は：（１）V E G F m g 由来の一又は複数の核酸の欠損；（２）一又は複数の核酸の V E G F m g への付加；（３）V E G F m g 中の一又は複数のヌクレオチドの置換；（４）V E G F m g 遺伝子の染色体再構成；（５）V E G F m g m R N A 転写産物のレベルの変更、（６）ゲノム D N A のメチル化の変化などの V E G F m g の異常な修飾、（７）V E G F m g m R N A 転写産物の非野生型スプライシングパターンの存在、（８）V E G F m g の非野生型タイプのレベル、（９）V E G F m g の対立遺伝子座の欠失、及び／又は（１０）V E G F m g ポリペプチドの不適切な翻訳後修飾、を確認することによって検出され得る。V E G F m g における損傷を検出するために使用され得る多くの既知のアッセイ技術が存在する。有核細胞を含む何れの生物学的サンプルを使用してもよい。

## 【 0 1 1 5 】

ある実施態様において、損傷の検出は、アンカー P C R 又は c D N A 末端の迅速な増幅（R A C E）P C R などのポリメラーゼ鎖反応（P C R）（例えば、（M u l l i s, 米国特許第 4, 6 8 3, 2 0 2 号, 1 9 8 7; M u l l i s 等, 米国特許第 4, 6 8 3, 1 9 5 号, 1 9 8 7）において、或いは、ライゲーション鎖反応（L C R）（例えば、（L a n d e g r e n 等, 1 9 8 8; N a k a z a w a 等, 1 9 9 4）においてプローブ / プライマーを用いてもよく、後者は特に V E G F m g 遺伝子群における点突然変異を検出するために有用である（A b r a v a y a 等, 1 9 9 5）。この方法には被検対象からサンプルを収集すること、サンプルから核酸を単離すること、V E G F m g（存在するならば）のハイブリダイゼーション及び増幅が生じるような条件下で、V E G F m g と特異的にハイブリダイズ化する一又は複数のプライマーと核酸とを接触させること、及び増幅産物の存在又は非存在を検出すること、又は増幅産物のサイズを検出すること、及び長さをコントロールサンプルと比較することが含まれる。P C R 及び／又は L C R は、ここ

で記載された突然変異を検出するために使用される何れかの技術と共に、予備的な増幅ステップとして使用するのが望ましいと予想される。

別の増幅法には：自己持続性配列複製 (Guatelli 等, 1990)、転写増幅系 (Kwoh 等, 1989); Q 複製 (Lizardi 等, 1988)、又はその他何れかの核酸増幅方法が含まれ、その後、当業者にとって周知の技術を用いて増幅された分子を検出する。これらの検出計画は特に低い存在量での核酸の存在の検出にとって有用である。

サンプルの VEGFmg 中の変異は、制限酵素の切断パターンの変化によって同定することができる。例えば、サンプル及びコントロール DNA が単離され、増幅され (付加的に)、一又は複数の制限エンドヌクレアーゼによって切断され、断片の長さがゲル電気泳動によって決定され、比較される。サンプルとコントロール DNA との断片の長さにおける違いは、サンプル DNA 中の変異を示す。さらに、配列特異的なリボザイムの配列の使用は、リボザイムの切断部位の発生又は喪失によって特異的な突然変異の存在に関してスコア化するために用いることができる。

10

#### 【0116】

サンプル及びコントロール核酸、例えば DNA 又は RNA を数百又は数千ものオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイに対してハイブリダイズすることにより、VEGFmg 中の遺伝的変異を同定することができる (Cronin 等, 1996; Kozal 等, 1996)。例えば、VEGFmg 中の遺伝的変異は、Cronin 等, 上掲中に記載されるように、光産生 DNA を含む 2 次元アレイ中で同定することができる。簡単には、プローブの第一のハイブリダイゼーションアレイは、配列間の塩基の変化を同定するため、連続的にオーバーラップするプローブの直線的なアレイを作製することにより、サンプル及びコントロール中の DNA の長いストレッチを通してスキャンするために使用することができる。このステップは、点突然変異の同定を可能ならしめる。この次に、検出されるべき全ての変異又は突然変異と相補的な、より小さく、特定化されたプローブアレイを用いることによって第二のハイブリダイゼーションアレイが行われる。各突然変異アレイは、一方は野生型遺伝子に相補的で、他方は突然変異遺伝子に相補的である、対応するプローブセットによって構成される。

20

さらに他の実施態様において、当該技術分野において知られている種々の配列決定反応の何れかが、VEGFmg 配列を直接決定し、サンプル VEGFmg の配列を対応する野生型 (コントロール) 配列と比較することによって突然変異を決定するために使用することができる。配列決定反応の例には、古典的な技術に基づくものが含まれる (Maxam 及び Gilbert, 1977; Sanger 等, 1977)。種々の自動配列決定方法の何れかが、マススペクトロメーターによる配列決定 (Cohen 等, 1996; Grifffin 及び Grifffin, 1993; Koster, 国際公開第 94/16101 号, 1994) を含む予後的なアッセイ (Naevé 等, 1995) を実施する場合に使用することができる。

30

#### 【0117】

VEGFmg 中の突然変異を検出するための他の方法には、切断剤からの保護が RNA / RNA 又は RNA / DNA のヘテロ二重鎖におけるミスマッチの塩基を検出するために用いられるような方法が含まれる (Myers 等, 1985)。一般に、「ミスマッチ切断」の技術は、野生型 VEGFmg を含む (標識化) RNA 又は DNA をサンプル由来の潜在的に変異のある RNA 又は DNA とハイブリダイズすることによって形成されるヘテロ二重鎖を提供することにより開始する。二本鎖化二重鎖は、コントロールとサンプル鎖の間の塩基対ミスマッチから生じるような二重鎖の一本鎖領域を切断する薬剤によって処理される。例えば、RNA / DNA 二重鎖は、RNase で処理することができ、DNA / DNA ハイブリッドは S<sub>1</sub> ヌクレアーゼによってミスマッチ領域を酵素的に切断するために処理することができる。他の実施態様では、DNA / DNA 又は RNA / DNA のいずれかの二重鎖が、ミスマッチ領域を切断するためにヒドロキシルアミン、四酸化オスミウム及びピペリジンで処理することができる。切断された物は、その後、突然変異部位

40

50

を決定するために変性ポリアクリルアミド上でサイズにより分離される (G r o m p e 等, 1989; S a l e e b a 及び C o t t o n, 1993)。コントロールDNA又はRNAは検出のための標識することができる。

ミスマッチ切断反応は、細胞サンプル由来のV E G F m g c DNA中で点突然変異を検出し、マッピングするために確定された系において二本鎖DNA中にミスマッチ塩基対を認識する (DNAミスマッチ修復) 又は複数のタンパク質を用いてもよい。例えば、大腸菌のm u t Y酵素はG / AミスマッチにおいてAを切断し、H e L a細胞由来のチミジンDNAグリコシル酵素はG / TミスマッチにおいてTを切断する (H s u 等, 1994)。典型的な実施態様に従うと、野生型V E G F m g 配列に基づくプローブは、テスト細胞由来のcDNA又は他のDNA産物とハイブリダイズ化する。二重鎖はDNAミスマッチ修復酵素で処理され、切断産物は、もしあれば、電気泳動法又は類似の方法で検出することができる (M o d r i c h 等, 米国特許第5, 459, 039, 1995)。

電気泳動上の移動度の変化は、V E G F m g における突然変異を同定するために用いることができる。例えば、一本鎖構造多型 (S S C P) は突然変異と野生型核酸との電気泳動上の移動度における差を検出するために用いてもよい (C o t t o n, 1993; H a y a s h i, 1992; O r i t a 等, 1989)。サンプル及びV E G F m g 核酸の一本鎖DNA断片は変性させた後再構成させる。一本鎖核酸変異体の二次構造は配列により変動する; 電気泳動度において生じる変化により一塩基の変化でさえ検出可能である。DNA断片は標識プローブにより標識され又は検出されてもよい。アッセイの感度はRNA (DNAよりはむしろ) を用いることにより増強され、この場合二次構造が配列変化に対してより感受性になる。対象の方法は、電気泳動上の移動度における変化に基づいて二本鎖のヘテロ二重鎖分子を分離するためにヘテロ二重鎖分析を用いることができる (K e e n 等, 1991)。

10

20

30

40

50

#### 【0118】

突然変異又は野生型断片の移動度は、変性濃度勾配ゲル電気泳動を用いてアッセイすることができる (D G G E; (M y e r s 等, 1985))。D G G Eにおいて、DNAは完全な変性を防ぐために、例えば約40bpの高融点GCリッチDNAのGCクランプをPCRによって付加することにより修飾される。また、コントロールとサンプルDNAの移動度における差を同定するために変性濃度勾配の代わりに温度勾配を用いてもよい (R o s s i t e r 及び C a s k e y, 1990)。

点突然変異を検出するための他の技術の例には、限定はしないが、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅法、又は選択的プライマー伸長法が含まれる。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーは、既知の突然変異が中心部分に引き起こされた後、完全にマッチが確認される場合にのみハイブリダイゼーションが可能となる条件下で標的DNAとハイブリダイズ化されるように調製される (S a i k i 等, 1986; S a i k i 等, 1989)。このような対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチドがハイブリダイズメンブレンに付着されると、PCR増幅標的又は多くの異なる突然変異に対してハイブリダイズし、標識された標的DNAとハイブリダイズ化される。

或いは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的な増幅技術が用いられてもよい。特異的増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーは、分子の中心部分に (増幅が差次的ハイブリダイゼーションに依存するように (G i b b s 等, 1989))、又は適切な条件下においてミスマッチを防ぐか又はポリメラーゼの伸長を減少させるように一方のプライマーの3'末端に (P r o s s e r, 1993) 目的の突然変異を保持する。変異領域における新規制限酵素部位が、切断に基づく検出を引き起こすために導入されてもよい (G a s p a r i n i 等, 1992)。また、特定の増幅は増幅に関してT a q リガーゼを用いて行ってもよい (B a r a n y, 1991)。このような場合において、ライゲーションは5'配列の3'端で完全にマッチする場合にのみ生じ、増幅をスコア化することにより既知の突然変異の検出を可能にする。

上述の方法は、例えば、V E G F m g に関する疾病又は病気の症状又は家族経歴を示す被

検対象を診断するための臨床的な設定において用いられる少なくとも1つのプローブ（核酸又は抗体）を含むプレパックのキットを使用することにより実施してもよい。

さらに、VEGFmgが発現されている任意の細胞型又は組織がここで記述された予後アッセイにおいて利用されてもよい。

【0119】

### 3. 薬理ゲノム学

スクリーニングアッセイによって同定されるような、VEGFmg活性又は発現に対して刺激的又は阻害的な影響を及ぼす薬剤又は修飾因子を、不十分な血液供給又は不適切な細胞生存を含む疾患を予防的又は治療的に処置されるべき個人に対して投与することができる。このような治療に関して、薬理ゲノム学（即ち、被検対象の遺伝子型と、食物、化合物又は薬剤などの外来の様式に対する被検対象の反応との関連性に関する研究）が検討され得る。治療物上の代謝的相違は、薬理学的に活性な薬剤の投与量と血中濃度との関係を変更させることによって、重篤な毒性又は治療上の過誤を導く可能性がある。従って、個人の薬理ゲノム学は、個人の遺伝子型の考慮に基づき予防的又は治療的処置に対して有効な薬剤（例えば、薬物）の選択を可能ならしめる。さらに、薬理ゲノム学は適切な用量及び治療計画を決定するために使用することができる。従って、個人におけるVEGFmgの活性、VEGFmg核酸の発現、又はVEGFmgの突然変異群は、治療上又は予防上の処置に対して適切な薬剤の選択を導くために決定され得る。

薬理ゲノム学は、病気に罹った人における様式の変化した性質及び異常な作用が原因である様式に対する反応における臨床的に有意な遺伝性の変異を扱う（Eichelbaum及びEvert, 1996; Linder等, 1987）。一般に、2つの薬理ゲノム学的状態が区別される：（1）様式と身体との相互作用を変化させる単独の因子（変化した薬物作用）として伝達される遺伝的状态又は（2）身体が様式に対して反応する方法を変化させる単独の因子（変化した薬物代謝）として伝達される遺伝的状态。これらの薬理ゲノム学的状態は、希な欠損又は核酸多型として生じ得る。例えば、グルコース-6-リン酸脱水素酵素（G6PD）の欠損は、主な臨床上の合併症が酸化的薬物（抗マラリア性薬、サルファ剤、鎮痛剤、ニトロフラン）の摂取及び空豆の消費後の溶血である一般的な遺伝性の酵素異常症である。

例証となる実施態様として、薬物代謝酵素の活性は、薬物活性の強度及び持続時間の主な決定要因である。薬物代謝酵素（例えば、N-アセチル転移酵素2（NAT2）及びチトクロームP450酵素CYP2D6及びCYP2C19）の遺伝的多型の発見により、標準的で安全な薬物用量を採用した後に過剰な薬物反応及び/又は重篤な毒性を示す被検対象達の現象が説明される。これらの多型は個体集団中の2つの表現型、多大な代謝型（EM）及び乏しい代謝型（PM）として発現される。PMの有病率は異なる集団間で異なる。例えば、CYP2D6遺伝子は高度に多型を示し、幾つかの突然変異がPMにおいて同定されており、それら全てが機能的CYP2D6が存在しないことを導く。突然変異体CYP2D6及びCYP2C19による乏しい代謝型は、標準的な用量を摂取する場合において、過剰な薬物反応及び副作用を頻繁に経験する。代謝産物が活性な治療成分である場合、PMはCYP2D6で形成される代謝産物のモルヒネによって介されるコデインの鎮痛効果に関して示されるような治療的反応はなんら示さない。他に極端な場合として、標準的な用量には反応しない、いわゆる超急速代謝型が挙げられる。最近、超急速代謝の分子的基礎がCYP2D6遺伝子の増幅に原因することが同定されている。

個体中でのVEGFmgの活性、VEGFmg核酸、又はVEGFmg突然変異含有量が個人の治療的又は予防的処置に対する適切な薬剤を選択するために決定することができる。さらに、薬理ゲノム学研究は、薬物代謝酵素をコードする多型的な対立遺伝子の遺伝子型タイピングを個々の薬物反応表現型の同定に適用するために用いることができる。投薬又は薬物選択に適用する場合、この知識は有害な反応又は治療的過誤を避け、その結果、記述の典型的スクリーニングアッセイの一つにより同定される修飾因子のようなVEGFmg修飾因子で被検対象を治療する場合、治療的又は予防的効果を増強させることができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 0 】

## 4 . 臨床的治験における効果のモニター

V E G F m g の活性発現又は活性（例えば、異常な細胞増殖及び／又は分化を修飾する能力）に対する薬剤（例えば、薬物、化合物）の影響をモニターすることは、基本的な薬物スクリーニングのみならず、臨床的治験においても適用することができる。例えば、V E G F m g 発現、タンパク質レベル、又は上方制御された V E G F m g 活性を増大させるためのスクリーニングアッセイによって決定される薬剤の効果は、減少した V E G F m g 発現、タンパク質レベル、又は下方制御された V E G F m g 活性を示す被検対象の臨床的治験においてモニターすることができる。或いは、V E G F m g 発現、タンパク質レベル、又は下方制御された V E G F m g 活性を減少させるためのスクリーニングアッセイによ

10

って決定される薬剤の効果は、増大した V E G F m g 発現、タンパク質レベル、又は上方制御された V E G F m g 活性を示す被検対象の臨床的治験においてモニターすることができる。このような臨床的治験において、V E G F m g 及び、好ましくは、例えば血管形成又はアポトーシスに関係する他の遺伝子の発現又は活性は、特定の細胞の反応性に対する「出力」又はマーカーとして用いることができる。

例えば、様式（例えば、食物、化合物、薬物又は小分子）による治療により細胞中において調節される V E G F m g を含む遺伝子が同定され得る。細胞増殖疾患に対する薬剤の影響を研究するために、例えば、臨床的治験において、細胞が単離され、R N A が調製され、V E G F m g 及び該疾患に関係する他の遺伝子の発現レベルについて分析される。遺伝子の発現パターンは、ノーザンブロット分析、核ラン・オンアッセイ又は R T - P C R 実験により、又はタンパク質の量を測定することにより、又は V E G F m g 又は他の遺伝子産物の活性レベルを測定することにより定量することができる。このように、遺伝子の発現パターン自体は、薬剤に対する細胞内の生理的応答を示すマーカーとして役立ち得る。従って、この反応状態は、薬剤で個人を治療する前、及び治療中の種々の時間点において決定される可能性がある。

20

本発明は、（１）被検対象から投与前のサンプルを得る；（２）投与前のサンプル中の V E G F m g 、 m R N A 、又はゲノム D N A の発現レベルを検出する；（３）被検対象から一又は複数の投与後のサンプルを得る；（４）投与後のサンプル中の V E G F m g 、 m R N A 、又はゲノム D N A の発現又は活性のレベルを検出する；（５）投与前のサンプル中の V E G F m g 、 m R N A 、又はゲノム D N A と投与後のサンプル中の V E G F m g 、 m R N A 、又はゲノム D N A の発現又は活性のレベルとを比較する；及び（６）結果に応じて被検対象に対する薬剤の投与を変化させるステップを含む、薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、食物又はここで記述のスクリーニングアッセイによって同定された他の薬物候補）による被検対象の治療の効果

30

## 【 0 1 2 1 】

## 5 . 治療方法

本発明は、異常な V E G F m g 発現又は活性と関係した疾患の危険性があり（又は感受性であり）又は疾患を有する被検対象を治療するための予防的及び治療的方法を提供する。

## 6 . 疾病及び疾患

増大した V E G F m g レベル又は生物学的活性によって特徴付けられる疾病及び疾患は、活性をアンタゴナイズする（即ち、減少又は阻害する）治療物によって治療される。アンタゴニストは治療的又は予防的方法で投与される。用いられる治療物は：（１）V E G F m g ペプチド、又はその類似体、誘導體、断片又は相同体；（２）V E G F m g ペプチドに対する A b s ；（３）V E G F m g 核酸；（４）アンチセンス核酸及び相同組換えによって（C a p e c c h i , 1 9 8 9 ）内在性の機能を除去するために用いられる「機能

40

50

障害性の」(即ち、コード化配列中における異種性の挿入による)核酸;又は(5)VEGFmgとその結合相手との相互作用を変化させる修飾因子(即ち、阻害因子、アゴニスト及びアンタゴニストであって、本発明の更なるペプチドミメチック又はVEGFmgに特異的なAbsを含む)などを含む。

減少したVEGFmgレベル又は生物学的活性によって特徴付けられる疾病及び疾患は、活性を増大させる(即ち、アゴニストとなる)治療物によって治療される。活性を上方制御する治療物は、治療的又は予防的に投与される。用いられる治療物には、ペプチド、又はその類似体、誘導體、断片又は相同体;又は生物学的利用性を増大させるアゴニストが含まれる。

増大または減少したレベルは、ペプチド及び/又はRNAを定量することにより、被検対象の組織サンプル(例えば、組織診からの)を得てインヴィトロでRNA又はペプチドレベル、構造及び/又は発現ペプチド(又はVEGFmg mRNA)の活性をアッセイすることにより容易に検出することができる。限定はしないが、方法にはイムノアッセイ(例えば、ウェスタンブロット分析、免疫沈降後のドデシル硫酸(SDS)ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、免疫組織化学、など)及び/又はmRNAの発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ(例えば、ノーザンアッセイ、ドットブロット、インサイツハイブリダイゼーション及び類似した方法)が含まれる。

#### 【0122】

##### 7. 予防的方法

本発明は、被検対象において、異常なVEGFmg発現又は活性と関連する疾病又は状態を、VEGFmgの発現又はVEGFmg活性の少なくとも1つを修飾する薬剤を投与することにより防止するための方法を提供する。異常なVEGFmg発現又は活性によって引き起こされ又は助長される疾病に対する危険のある被検対象は、例えば、診断上の又は予後的なアッセイの何れか又は組み合わせによって同定することができる。予防的薬剤の投与は、疾病又は疾患が防止され、或いは、その進行が遅れるように、VEGFmg異常性に特徴的な症状の出現前に行われる。VEGFmgの異常性のタイプに依存して、例えば、VEGFmgアゴニスト又はVEGFmgアンタゴニストが被検対象を治療するために用いられる。適切な薬剤は、スクリーニングアッセイに基づいて決定され得る。

VEGFmg核酸、又は断片はまた、核酸又はタンパク質の存在又は量が評価される診断用途にも有用であり得る。更なる用途は抗菌分子としてのものである(すなわち、あるペプチドは抗菌性を保有していることが見出されている)。これらの物質は、治療又は診断方法に使用される本発明の新規物質に免疫特異的に結合するAbsの産生に更に有用である。

#### 【0123】

##### 8. 治療的方法

本発明の他の態様は、治療目的のためにVEGFmg発現又は活性を調節するための方法に関する。本発明の調節方法は、細胞に関連する一又は複数のVEGFmg活性を調節する薬剤と細胞を接触させることを含む。VEGFmg活性を調節する薬剤は、核酸又はタンパク質、天然に生じる同起源のVEGFmgリガンド、ペプチド、VEGFmgペプチドミメチック、又は他の小分子であり得る。該薬剤はVEGFmg活性を刺激する。そのような刺激性薬剤の例には、活性VEGFmg及び細胞中へ導入されるVEGFmg核酸分子が含まれる。他の実施態様において、該薬剤はVEGFmg活性を阻害する。阻害性薬剤の例には、アンチセンスVEGFmg核酸及び抗VEGFmgAbsが含まれる。調節方法は、インヴィトロ(例えば、細胞を薬剤と共に培養することにより)で、又はインヴィボ(例えば、被検対象に薬剤を投与することにより)で実施することができる。このように、本発明はVEGFmg又は核酸分子の異常な発現又は活性によって特徴付けられる疾病又は疾患に悩まされている個人を治療するための方法を提供する。一実施態様において、該方法は、薬剤(例えば、スクリーニングアッセイによって同定された薬剤)、又はVEGFmg発現又は活性を調節する(例えば、上方制御又は下方制御)薬剤の組み合わせを投与することに関する。他の実施態様において、該方法は、減少した又は異常な



V E G F m g 活性又は活性を補償するための治療として V E G F m g 又は核酸分子を投与することに関する。

V E G F m g 活性の刺激は、V E G F m g が異常に下方制御され、及び／又は増大した V E G F m g 活性がおそらく有利な効果を有するような状況にあるのが望ましい。そのような刺激の一例は、被検対象が異常な細胞増殖及び／又は分化（例えば、癌又は免疫関連疾患）によって特徴付けられる疾患を持つ場合である。

#### 【0124】

##### 9．治療上の生物学的影響の決定

インビトロ又はインヴィボでの適切なアッセイは、特異的な治療物の効果を決定し、その投与が発症した組織の治療に対して望ましいかどうかを決定するために実施され得る。種々の特定の実施態様において、インビトロのアッセイは任意の治療物がその細胞タイプ（群）に所望の効果を発揮するかどうか決定するために、被検対象の疾患に関するタイプ（群）の代表的な細胞を用いて行われる。治療における使用に対する様式は、ヒト被検対象での治療に先立ち、限定はしないが、ラット、マウス、チキン、ウシ、サル、ウサギ、その他同種類のものを含む適切な動物モデル系においてテストされる。同様に、インヴィボでのテストに対して、当該技術分野における動物モデル系の何れかがヒト被検対象への投与に先立ち用いられる。血管形成誘導と細胞生存を測定するための様々なアッセイ法を使用することができる。

##### 10．アンチセンス核酸

アンチセンス及びセンス V E G F m g オリゴヌクレオチドは、V E G F m g ポリペプチドの発現を阻止することができる。これらのオリゴヌクレオチドは標的核酸配列と結合し、二重鎖の分解を促進し、未成熟な転写又は翻訳を終結させ、又は他の方法によって標的配列の転写又は翻訳をブロックする二重鎖を形成する。アンチセンス又はセンスのオリゴヌクレオチドは、RNA 又は DNA どちらかの一本鎖核酸であり、標的 V E G F m g m R N A（センス）又は V E G F m g D N A（アンチセンス）配列と結合することができる。アンチセンス核酸はワトソン-クリック又はフーグスチンの塩基対ルールに従ってデザインすることができる。アンチセンス核酸分子は V E G F m g m R N A の全コード化領域に対して相補的で、より好ましくは、V E G F m g m R N A のコード化又は非コード化領域の一部分だけに相補であり得る。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは V E G F m g m R N A の翻訳開始部位を囲む領域に対して相補的であり得る。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも約 14 ヌクレオチド、好ましくは約 14 から 30 ヌクレオチドの V E G F m g D N A コード化領域の断片を含む可能性がある。一般に、アンチセンス RNA 又は DNA 分子は少なくとも長さが 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 のベース又はそれより長いものを含む可能性がある。特に、(Stein 及び Cohen, 1988; van der Kroel 等, 1988a) には、任意の cDNA 配列からアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを誘導させる方法が記載されている。

#### 【0125】

アンチセンス核酸を生成するのに用いることができる修飾されたヌクレオチドの例として：5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、- D - ガラクトシルクエオシン、イノシン、N6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン N6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、- D - マンノシルクエオシン、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (V)、ワイプトキソ

シン、シュードウラシル、キュエオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (V)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、及び2, 6 - ジアミノプリンが含まれる。或いは、アンチセンス核酸は、転写されたRNAが対象の標的核酸に対して相補的になるようなアンチセンスの方向でサブクローン化された発現ベクターを用いて生物学的に発現させることができる。

アンチセンス又はセンスのオリゴヌクレオチドを標的細胞 (標的核酸配列を含む細胞) 中へ導入するためには、何らかの遺伝子導入法が用いられる。遺伝子導入法の例には、(1) エプステイン - バーウィルスなどの遺伝子導入ベクター、又は外来性のDNAをリガンド結合分子に結合させることなどの、生物学的な、(2) エレクトロポレーション及びインジェクションなどの物理的な、(3) CaPO<sub>4</sub> 沈殿及びオリゴヌクレオチド - 複合体などの化学的なものが含まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0126】

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは適切な遺伝子導入レトロウィルスベクター中へ挿入される。標的核酸配列を含む細胞を、インヴィボ又はエクスヴィボにおいて組換え体レトロウィルスベクターと接触させる。適当なレトロウィルスベクターの例には、マウスレトロウィルス M - MuLV、N2 (M - MuLVに由来するレトロウィルス)、又はDCT5A、DCT5B及びDCT5Cと表される二重コピーベクターが含まれる (国際公開第 90 / 13641号, 1990)。十分な核酸分子の転写を達成するためには、アンチセンス核酸分子の転写が強力なpol II又はpol IIIによってコントロールされるベクターコンストラクトが好ましい。

細胞の混合集団中の標的細胞を特定するために、標的細胞に対して特異的な細胞表面レセプターを開発することができる。アンチセンス及びセンスオリゴヌクレオチドを、(国際公開第 91 / 04753号, 1991) 中に記載されるように、リガンド結合分子と結合させる。リガンドは標的細胞に特異的なレセプターに対して選択される。適切なリガンド結合分子の例には、細胞表面レセプター、成長因子、サイトカイン、又は細胞表面レセプター又は分子と結合する他のリガンドが含まれる。好ましくは、リガンド結合分子の結合は、実質的に、レセプター又は分子のリガンド結合分子結合体と結合する能力を妨害せず、又はセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその結合体形態の細胞内への侵入を阻止しない。

リボソームは効率的にセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞へ導入する (国際公開第 90 / 10448, 1990)。センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド - 脂質複合体は、内在性のリパーゼによって細胞内で好適に分離される。

本発明のアンチセンス核酸分子は、  
- アノマー核酸分子であってもよい。  
- アノマー核酸分子は、通常の - ユニットとは反対に、ストランドが互いに平行に走るように、相補的RNAと特異的な二重鎖ハイブリッドを形成する (Gautier等, 1987)。  
。アンチセンス核酸分子は、2' - O - メチルリボヌクレオチド (Inoue等, 1987a) 又はキメラRNA - DNA類似体 (Inoue等, 1987b) も含み得る。

#### 【0127】

一実施態様において、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、相補的な領域を持つ、mRNAなどの一本鎖核酸を切断することができるリボヌクレアーゼ活性を持つ触媒性のRNAである。従って、ハンマーヘッドリボザイム (Haseloff及びGerlach, 1988) などのリボザイムは、VEGFmg mRNA転写産物を触媒的に切断するために用いることができ、その結果翻訳を阻害する。VEGFmg - コード化核酸に対して特異的なリボザイムは、VEGFmg cDNAのヌクレオチド配列に基づいてデザインすることができる。例えば、活性部位のヌクレオチド配列がVEGFmgコード化mRNA中で切断されるヌクレオチド配列と相補的であるテトラヒメナL - 19 IVS RNAの誘導体を構築することができる (Cech等, U. S. Patent No. 5, 116, 742, 1992; Cech等, U. S. Paten

nt No. 4, 987, 071, 1991)。また、VEGFmg mRNAは、RNA分子のプールから特異的なリボヌクレアーゼ活性を持つ触媒性RNAを選択するためにも使用することができる(Bartel及びSzostak, 1993)。

或いは、VEGFmgの発現は、標的細胞中でのVEGFmgの転写を阻害する三重らせん構造を形成するためのVEGFmgの制御領域(例えば、VEGFmgプロモーター及び/又はエンハンサー)と相補的な標的ヌクレオチド配列によって阻害することもできる(Helene, 1991; Helene等, 1992; Maher, 1992)。

#### 【0128】

アンチセンス及びセンスオリゴヌクレオチドの修飾は、それらの有効性を増大することができる。修飾された糖-ホスホジエステル結合又は他の糖連鎖(国際公開第91/06629, 1991)は、標的配列に対する結合特異性を損なうことなく内在性ヌクレアーゼに対する抵抗性を与えることによりインヴィボにおける安定性を増大させる。他の修飾は、標的に対するオリゴヌクレオチドの親和性を増大することができ、例えば、共有結合性有機体部分(国際公開第90/10448, 1990)又はポリ-(L)-リジンなどである。他の結合は、標的に対するオリゴヌクレオチドの結合特異性を修飾し、金属複合体又はインターカレート(例えば、エリブチシン)及びアルキル化剤を含む。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格は、ペプチド核酸を生産するために修飾することができる(Hyrup及びNielsen, 1996)。「ペプチド核酸」又は「PNAs」は、デオキシリボースリン酸骨格が疑似ペプチド骨格によって置換され、4つの元のヌクレオ塩基のみが保持される核酸模倣体(例えば、DNA模倣体)を指す。PNAの中性の骨格は、低イオン強度条件下において、DNA及びRNAに対する特異的なハイブリダイゼーションを可能にする。PNAオリゴマーの合成は、標準的固相ペプチド合成手順を用いて実施することができる(Hyrup及びNielsen, 1996; Perry-O'Keefe等, 1996)。VEGFmgのPNAsは、治療的及び診断上の適用において使用することができる。例えば、PNAsは、転写又は翻訳停止を誘導し、又は複製を阻害することにより遺伝子発現の配列特異的な修飾のためのアンチセンス又は抗遺伝子剤として使用することができる。VEGFmg PNAsは、単一塩基対変異の解析(例えば、PCRクランピングによるPNAにおいて;他の酵素、例えば、S1ヌクレアーゼ(Hyrup及びNielsen, 1996)と組合わせて使用するとき、人工的な制限酵素として;又はDNA配列及びハイブリダイゼーションのためのプローブ又はプライマーとして(Hyrup及びNielsen, 1996; Perry-O'Keefe等, 1996)用いることも可能であろう。

#### 【0129】

VEGFmgのPNAsはそれらの安定性または細胞内への取込みを増強するために修飾することができる。親油性又は他のヘルパーグループがPNAs、PNA-DNA二量体構造に付着してもよく、又はリポソーム又は他の薬剤デリバリー技術の使用でもよい。例えば、PNAとDNAの有利な特性を兼ね備えるPNA-DNAキメラを生成することができる。このようなキメラは、DNA認識酵素(例えば、RNase H及びDNAポリメラーゼ)がDNA部分と相互作用し、一方PNA部分は高い結合親和性及び特異性を提供することを可能にする。PNA-DNAキメラは、塩基のスタッキング、ヌクレオ塩基間の結合数、及び配向性という観点から選択される適切な長さのリンカーを用いて連結することができる(Hyrup及びNielsen, 1996)。PNA-DNAキメラの合成は実施可能である(Finn等, 1996; Hyrup及びNielsen, 1996)。例えば、DNA鎖を固体支持体上で標準的なホスホラミダイト共役化学反応を用いて合成することができ、修飾されたヌクレオチド類似体、例えば、5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジン ホスホラミダイトなどはPNA及びDNAの5'末端間で用いることができる。その後、PNA単量体は、5' PNAセグメントと3' DNAセグメントとのキメラ分子を生成するために段階的な方法で共役される(Finn等, 1996)。或いは、キメラ分子は5' DNAセグメント及び3' PNAセグメントにより合成することができる(Petersen等, 1976)。

オリゴヌクレオチドは、ペプチド（例えば、インヴィボにおいて宿主細胞レセプターを標的するために）、又は細胞膜（Lemaître等，1987；Lettinger等，1989）又はPCT発行 国際公開第88/09810号）若しくは脳血管閉門（例えば、CT発行 国際公開第89/10134号）を越えた輸送を促進させる薬剤などの他の付加されたグループを含み得る。さらに、オリゴヌクレオチドはハイブリダイゼーション トリガー切断剤（van ker rol等，1988b）又はインターカレート剤（Zon，1988）によって修飾することができる。オリゴヌクレオチドは他の分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション トリガークロスリンク剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション トリガー切断剤、その他同種類の分子に結合させてもよい。

#### 【0130】

10

次の実施例は本発明の様々な側面を非限定的な実施例により例証するものである。

#### 実施例

実施例1 ヒト臍帯内皮細胞（HUVECs）中での差次的遺伝子発現

##### 1. 背景

VEGF依存的な、又は変異VEGFR1依存的な生存経路の間に発現が調節される遺伝子の包括的な性状を得るために、一群の成長因子で処理した血清不足ヒト臍帯内皮細胞と10%血清の存在下で成長させた参照HUVEC細胞とに、Gene Calling<sup>TM</sup>法（Rothberg等，米国特許第5871697号，1999；Shimkets等，1999）を適用した。成長因子と血清を両方とも欠く状態で成長させた細胞をネガティブコントロールとした。Gene Calling<sup>TM</sup>法は所定の試料の遺伝子発現性状を得るために定量発現解析（Quantitative Expression Analysis）を実施し、ついで添加を含まないコントロールに対するこれらの性状を対にして比較する差次的な発現解析を実施する。差次的な発現を示すポリヌクレオチドは、増幅の検出を妨げる競合未標識プライマーを加えるGene Calling<sup>TM</sup>プロトコルに従ってPCR反応を実施することによって確認する。

20

##### 2. 使用される成長因子

###### (a) VEGF

この実施例において使用される主な成長因子はVEGFであり、これはVEGFR1とVEGFR2の双方に結合する。また、VEGFR1のみに結合するVEGFの変異体（VEGFR1s）を使用した。この実験で使用される他の成長因子はVEGFR1以外のレセプターに結合し、異なった血管形成能を有している。これらをポジティブコントロールとして（VEGF、VEGFR1s）及びネガティブコントロールとして（PLGF、bFGF、HGS/SF）含め、VEGFR1経路の解析に焦点を当てる。

30

#### 【0131】

###### (b) bFGF

塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）は腫瘍新血管新生及び血管増殖性疾患において血管内皮に発現される。VEGF及びbFGFはその組み合わせさせた分裂促進活性において潜在的に相乗的である。この相乗性の可能な説明は、bFGFがVEGFレセプターVEGFR1とVEGF自身の発現を誘導するという証拠である（Hata等，1999）。bFGFでの処理は、VEGF及びVEGFR1sによって調節されたものとオーバーラップして遺伝子の集合を調節する。

40

###### (c) HGF/SF

肝細胞増殖因子/細胞分散因子（HGF/SF）は内皮細胞の増殖と移動を刺激する多面的な成長因子である。bFGFと同様に、HGFとVEGFはその組み合わせさせた血管形成活性において相乗的である（Van Belle等，1997）。HGFはVEGFの発現を誘発する（Gillie等，1998）。従って、bFGFでの処理によって、VEGFによって調節されるものとオーバーラップして遺伝子の集合が調節されることが期待される。

###### (d) PLGF

胎盤成長因子（PLGF）はVEGFsのファミリー（VEGFs）に属する。3種のP

50

1 G Fアイソフォームが選択的スプライシングによって生産され、全てが内皮細胞の移動を誘発するが、細胞増殖には影響を及ぼさない (M i g d a l 等, 1998)。それらは V E G F R 2 レセプターに結合するが、V E G F の血管形成及び増殖効果の殆どを媒介すると考えられる V E G F R 1 には結合しない。P 1 G F での処理は V E G F によって調節されたものとオーバーラップするが V E G F R 1 s によって調節されたものとはオーバーラップしないで遺伝子の集合を調節する。この知見により、V E G F R 1 レセプターを介して V E G F によって特異的に調節される遺伝子の集合を同定することが可能になる。

#### 【0132】

3. 解析した遺伝子と対応する G e n B a n k 受託

表 E 1 はこの実施例において発現を解析した遺伝子の G e n B a n k 受託番号を提供する 10

表 E 1 解析した遺伝子の G e n B a n k 受託番号

遺伝子名	G e n B a n k 受託番号
ネキシン/グリア由来神経突起促進因子(G D N P F)	A 0 3 9 1 1
胎盤タンパク 5 (PP5)/組織因子経路インヒビター・2	5 7 3 0 0 9 0 D 2 9 9 9 2
ヘパリン結合 E G F 様成長因子(HB-EGF)	4 5 0 3 4 1 2
G タンパク質シグナル伝達制御因子・3 (RGS3)	U 2 7 6 5 5
グラビン/重症筋無力症(MG)自己抗原	U 8 1 6 0 7
MK P・1 様プロテインチロシンホスファターゼ(MKP1LPTP)	A F 0 3 8 8 4 4
アミロイド前駆体様タンパク 2 (APLP2)	L 2 7 6 3 1
オステオニドジェン, ニドジェン・2 前駆体	D 8 6 4 2 5
アミロイド前駆体タンパク (APP)	D 8 7 6 7 5
hVPS41p	U 8 7 3 0 9
アルギニンリッチタンパク質(ARP)	5 1 7 4 3 9 2 / M 8 3 7 5 1
ダウン症必須領域タンパク・1 (DSCR1)	4 7 5 8 1 9 5 / U 2 8 8 3 3
インスリン誘導遺伝子・1 (INSIG1)	5 0 3 1 8 0 0 / U 9 6 8 7 6
チトクロムオキシダーゼサブユニット I (MTCO1)	A F 0 3 5 4 2 9
NADH・ユビキノノキシドレダクターゼ鎖 1 (NH1)	D N H U N 1
NADH・ユビキノノキシドレダクターゼ鎖 4 (NH4)	D N H U N 4
プロゲステロン誘導脱落タンパク (DEPP)	A B 0 2 2 7 1 8
結合組織成長因子(CTGF)	X 7 8 9 4 7

20

30

#### 【0133】

#### 4. 結果

H U V E C s を様々な成長因子で処理し又は成長因子なしで処理し、6 又は 24 時間後に 40  
収集した。これにより、成長因子での処理 (6 時間後) によってより直接的に調節された  
遺伝子と、間接的に調節されうるものとの間の識別が可能になり、24 時間後にだけ調節  
されられると思われるものも同様である。

この解析の結果は表 E 2 にまとめる。

血清不足 H U V E C s は、細胞の 30 % が血清欠乏化後にアポトーシスを受け、血清不足  
のないコントロールに対して 6 倍の増加を示すので、有効なインヴィトロモデルを表す。  
V E G F 又は V E G F R 1 s の添加はアポトーシス細胞の数を強く減少させる一方、P 1  
G F 添加は生存を刺激しない (G e r b e r 等, 1998)。これらの結果は、V E G  
F R 1 を介し、P 1 G F レセプターを介さないシグナル伝達が V E G F の活性に重要であ  
ることを示している。

50

【 0 1 3 4 】

表 E 2 GeneCalling™ の結果

		処 理															
	遺伝子	時間 (時間) :		VEGF		血清		VEGF		VEGFR1s		BFGF		HGF		PIGF	
		6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24
	遺伝子																
	ネキシン	-	-	+1.2	+2.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PP5	b1i0-190.7																
	d0i0-227.9 i0n0-108.1	-1.6	-1.4	+1.9	+2.7	-	-	+2.4	+2.4	+2.1	+2	+2.3	-	-	-	-	+1.4
HB-EGF	u0r0-157.6	-	+3.9	+3.5	+4.1	+3	-2.6	+2.3	-	-	-	+2.1	-	-	-	-	-
RGS33	b1i0-75.5	-	-2.3	+2.2	+2.6	-	-2.9	-	-	-	+2.2	-	-	-	-	-	-
グラビン	d0y0-108.1 y0h0-123.3	+1.4	+5.7	+1.6	+5.7	+4.1	-	-	+2.7	-	-	-	-	-	-	-	-
MKP1LPTP	l1c0-184.5	+3	-	+2.1	+1.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
APLP2	d0v0-324.8	-	-	-1.2	-	-1.4	+1.9	+1.2	+3.2	+1.3	-	-	-	-1.5	+2.3	-	-
オステオニドジェン	h0a0-166.1	-	-2.2	+2.1	+2.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
APP	n0s0-112.8	-2	+2.8	-	-1.9	-2	+6.5	-	-	-	+5.6	-	-	-	-	-	-
hVPS41p	i0r0-152.3 w0c0-259	+1.6	+2.8	-2	-2.1	-	+3.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARP	i0c0-224.3	-	+2.1	-	-	+2.2	-	+2.3	-	+2.8	+2.4	+1.6	-	+1.3	-	-	-
DSCR1	h0a0-78.1	+1.2	-1.1	+6.3	+4.8	-	-	+3	+2.5	+3.1	-	-	+1.8	-	-	-	-

10

20

30

40

[illegible]

各遺伝子について、この表はその遺伝子にポジティブに関連すると確認した GeneCalling で得た cDNA断片（バンド）とそのバンドに対して各 GeneCalling 作業で観察された調節レベルを列挙する。

【 0 1 3 5 】

実施例 2 H U V E C s 中での差次的遺伝子発現の T a q M a n<sup>T M</sup> 分析  
Gene C a l l i n g 分析において調節されることが分かった遺伝子について T a q m  
a n<sup>T M</sup> 解析 ( T a q M a n<sup>T M</sup> ポリメラーゼ連鎖反応検出 ; P e r k i n E l m e r 50

100 ng の全 RNA を 50  $\mu$ l の RT-PCR 反応 (PCR-Access, Promega) に加えた。リアルタイム PCR 解析のためのプライマーとプローブは Oligo バージョン 4.0 プログラム (National Bioscience, Plymouth, MN) (Heid 等, 1996) を使用してデザインした。RT-PCR 反応と レポーター蛍光染料の発光の相対的増加の結果を 7700 シークエンスディテクター (Perkin Elmer, Foster City, CA) を用いてリアルタイムでモニターした。シークエンスディテクター 1.0 プログラム (PE) を用いてシグナルを解析した。条件は次の通りであった: 1 サイクル 48 で 45 分間、1 サイクル 94 で 2 分間、40 サイクル 94 で 30 秒、60 で 1 分、68 で 2 分。結果は表 E 3 に示す。

表 E 3 TaqMan™ 分析の結果

		血清			VEGF			
遺伝子	バンド	6 h	18 h	24 h	6 h	18 h	24 h	32 h
PP5	b1i0-190.7 d0l0-227.9 i0u0-108.1	nd	nd	nd	nd	5	nd	6
HB-EGF	U0f0-157.6	nd	nd	4	4	nd	4.9	nd
RGS3	B1i0-75.5	nd	nd	nd	4	4	nd	Nd
グラビン	D0y0-108.1 y0h0-123.3	nd	nd	nd	5	4	nd	4.5
MKP1LPTP	L1c0-184.5	1	2	nd	3	2	nd	Nd
APLP2	D0v0-324.8	1	nd	nd	1.6	nd	5	Nd
オステオニドジェン	H0a0-166.1	nd	nd	4	3	3	5.3	Nd
hVPS41p	I0r0-152.3 w0c0-259	nd	nd	nd	nd	2	nd	3
ARP	I0c0-224.3	nd	nd	nd	3	2	nd	3
DSCR1	H0a0-78.1 i0n0-136.2 i0n0-136.3	nd	nd	nd	4	6	nd	5
Nexin	F0n0-178.8	1	nd	1	1.5	nd	nd	2.4
INSIG1	G1n0-43.2	1	nd	1	1.5	nd	nd	3.2
CTGF	M0a0-399.6	nd	nd	nd	nd	1.7	nd	6

各遺伝子について、GeneCalling はその遺伝子にポジティブに関連すると確認した cDNA断片（バンド）を生じ、調節レベルはTaqMan 分析で観察した。



表 E 7 リアルタイム R T - P C R 分析に用いたプローブプライマーセット

	プローブ配列	#	正方向プライマー	#	逆方向プライマー	#
HSP5.P/#43	aaagtcccaaaagtgttgcggctgc	45	cgatgctgtctggaggataga	46	acactgggtgtccacactcact	47
HVPS41 1667.FP/#50	ttgcccagacatgtatccctgcag	48	atgtgcccgcgggatgatata	49	gtccccagccaataatcagt	50
HSARP 560.FP/#51	aggtatcaaaagccctctgcccacca	51	gcagccaccaaaaatcatcaat	52	tcacagatcttctccacagggat	53
HSDSCR1 1113.FP/#52	agggtgtgaaacagcagcaatgcaatgt	54	ccacagggaagccgcctagt	55	tgagggaagaagaaggaacgct	56
HSGRAVIN 4118.FP/#53	ctgaggcatcattcactctaacagcggc	57	gaggaggcaggtatgcaccaa	58	tgcaggctccaacgtttca	59
HSDOCK 180hg.259.FP#	agaaatgcccgcgtgttctctctgac	60	atgtaggacagaaacgggcctt	61	gttttgaattgcatttgcccc	62
HSRGS3 1696.FP/#55	aggacaaacctgcagagcgtcacgc	63	aagatgcgcttctgtgcca	64	aaacctggactcctacacgcg	65
HSPDK-1 1059.FP	tgtgaggaaatggaaggatacggacctttaa	66	gatgccacaaagcgggttagg	67	gtgaaggactcgaagaacggg	68
HSPTPLC100hg 183.FP/#57	tacaactgggtgaaagcccgccg	69	acaacgtgtgcctgctgga	70	cctacgttgggcctgatgac	71
HSV/EGF.294.FP/#92	tgtgcccactgaggagtgccaacatca	72	aatgacgaggccctggaggt	73	ttgatccgcataatctgcatg	74
HSHB-EGF.300.FP/	ctggctgcagttctctcgccactg	75	tgaacagtgagggtatgctgaact	76	ctccaggctctcgccagtc	77
HSF1t-1-2449T/#175	accacacagaaggctctgttgga	78	aagggtgtctatcactgcacaaagc	79	tgaacagtgagggtatgctgaact	80
HSKDR.1180.RP/#93	agacaggcgggtgaggggcg	81	cgcctctgtgggtaagga	82	cagagttagatctgggtttca	83

#, SEQ ID NO.:

10

20

30

40

50

## 【 0 1 3 7 】

実施例 3 差次的遺伝子発現の<sup>33</sup>P-ハイブリダイゼーション解析

インサイツmRNA発現についてホルマリン固定パラフィン包埋ヒト組織を調べた。組織には妊娠第1期(14-15週)胎盤、成人副腎皮質、大動脈、アテローム性動脈硬化症

を持つ筋性動脈、脳、胆嚢、心臓、脾臓、前立腺、胃、加齢黄斑変性症（A M D）を持つ目、及び炎症性盲腸、肺腺癌、管性乳腺癌、腎細胞癌を持つ腎臓、肝細胞癌、扁平上皮細胞癌、骨肉腫、及び軟骨肉腫を含んでいた。センス及びアンチセンスリボプローブのインヴィトロ転写と $[^3\text{H}]$ 標識を次のようにして実施した：解析される遺伝子の配列を、T3又はT7RNAポリメラーゼ開始部位をコードする遺伝子特異的プライマーを使用してプラスミドDNAからPCR増幅させた。センス及びアンチセンスリボプローブはPCR増幅した鋳型からのインヴィトロ転写によって調製し、 $1 \times 10^6$  c p m / m l の比活性になるまでハイブリダイゼーションバッファーで希釈した。5マイクロメートル厚の組織切片に脱パラフィン化処理を施し、37 で30分間4  $\mu$  g / m l のプロテインナーゼK中で除タンパク化し、55 にて一晚ハイブリダイズし、ついで高緊縮性条件（0.1 X S S C中で55 で2時間）で洗浄した。ガラススライドをN B T 2核トラックエマルジョン（イーストマンコダック）中に浸し、デシカントを含む密封プラスチックスライドボックス中に4 で4週間さらし、現像し、ヘマトキシリンとエオシンで対比染色した。インサイツハイブリダイゼーション実験の結果は表E 4に示す。

10

【0138】

表 E 4 インサイトツハイブリダイゼーション分析

	DSCR1	PP5	RGS3	ARP	hVPS41p	HB-EGF	グラビン	MKP1-LPTP	CTGF	ネキシリン	オステオニドジェン
HUVEC: ct 値	23.1	18.7	21.7	20.5	22.4	25.9	19.3	23	21	-	22
腫瘍：血管性	-	-	++	-	-	-	(+)	-	++	-	++
腫瘍：非血管性	+	-	+++	++	++	++	++	+/++	ストローム	+/++	++
胎性：血管性	++	+++	-	-	-	-	++	-	++	-	++
胎性：非血管性	++	+	+	++	-	+/++	++		++	+/++	++
成体：血管性	-	-	-	-	-	-	(+)	-	++	-	+
成体：非血管性	+	-	+	-	-	+	-	-	++	(+)	+
炎症	-	-	+	+++	-	+++	?	-	++		++

+ 弱い発現,      ++ 中程度の発現,      +++ 強い発現

表 4 の結果は、胎児血管組織において Gene Calling によって同定される差次的に発現された遺伝子のある種のものがまたインサイトツハイブリダイゼーションによっても差次的に同定されることを示している。しかし、成人血管組織では、腫瘍又は炎症の存在のような、病理状態のみが、差次的に発現された遺伝子の集合のなかで遺伝子の有意な調

10

20

30

40

50

節を生じる。

【0139】

実施例4 VEGF調節遺伝子の差次的発現との卵巢腫瘍の臨床病期の相関

インビトロでの組織培養条件で観察されたDSCR1発現とVEGF刺激の間の相関がまた高度のVEGF発現を伴う腫瘍でインビトロで翻訳したかどうかを試験するために、我々はリアルタイムRT-PCRによって同じ患者由来のコントロール組織(Clonetech)と卵巢腫瘍から取り出されたRNAの3つのマッチした集合を解析した。VEGFの過剰発現は、新血管新生と続いての固形腹腔内腫瘍の増殖を促進し、腫瘍脈管構造の透過性を増大させることによって腹水生成を誘発することによって、卵巢癌の進行に主要な役割を果たしていると考えられている(Mesiano等, Am. J. Pathol., 153, p1249, 1998)。卵巢癌中のVEGF mRNAレベルは正常な卵巢におけるよりも顕著に高い。正常組織に対して腫瘍組織におけるVEGFの発現の平均レベルは3.2倍増加し、腫瘍RNAのDSCR1発現において2.7倍の増加と相関していた。

10

上皮卵巢癌の2/3の患者が、高度に浸潤性の癌細胞(CA)の存在と急速に蓄積する腹水のために、診断の際に疾患を進行させ、予後に乏しかった。転移性が低い上皮腺癌(低悪性可能性(low malignant potential) = LMPs)の1/3の患者は極めて好ましい長期的結果を示した。過去の研究では疾患とVEGF発現の相関が示されたばかりでなく、VEGFが卵巢癌における腹水生成と血管形成の重要な調節因子として特定された(Fujimoto等, Cancer, 83, p2532, 1998)。

20

VEGFの発現に対してLMPsの12人の患者とCAの9人の患者から単離した一連の全RNAsを試験し、リアルタイムRT-PCRによってVEGFレセプターとDSCR1を試験した。発現レベルをGAPDH又はアクチンのレベルに正規化した(データ示さず)。これらの発現レベルに基づいて、StatView統計解析ソフトウェアプログラムを使用した統計解析により、VEGF、VEGFレセプター及びDSCR1の発現レベルの相関を特定した(表E5)。また、臨床病期(R=)、KDR(R=0.834)及びVEGF(R=)発現間の相関を示す。これらの知見は、VEGFの存在によって模倣された条件のような腫瘍に成長した内皮細胞での遺伝子性状決定実験は、腫瘍又は腫瘍脈管構造において特異的に上方制御される新規なVEGF標的遺伝子の検索の道具になるかも知れないことを示している。更に、DSCR1レベルと腫瘍発達の臨床病期との間の相関は、DSCR1が卵巢腫瘍患者及び他の徴候において腫瘍進行に対する予測的マーカーとなり得るかどうかという疑問を呈する。

30

【0140】

全RNAを、低悪性可能性(LMP)卵巢腫瘍の12人の患者と、より悪性の嚢胞腺癌(Cystoadenocarcinoma)(CA)卵巢腫瘍の9人の患者の腫瘍バイオプシーから単離した。そのRNAについて上述のようにしてTaqMan<sup>TM</sup>によってVEGF、VEGFレセプター及びVEGF標的遺伝子の発現を分析した。RNAを3通り実施して、HUV細胞RNAでの標準曲線を各プローブについて作成し、相対的発現レベルを、標準としてハウスキーピング遺伝子 - グルクロニダーゼ(GUS)を使用して計算し、内皮マーカーCD31を使用して存在する内皮細胞の量について補正した。結果を表E5にまとめる。第1の列は、与えられた遺伝子の発現と臨床病期LMP対CAに基づく腫瘍サンプルのグループ分けの間のANOVA解析の結果を報告する。第2と第3の列は与えられた遺伝子の発現と腫瘍サンプルによるVEGF又はVEGFR1レセプターの発現の間の相関を報告する。それらは、DSCR1及びARGリッチな遺伝子に対して高度な転移可能性と発現レベルの増加の間にポジティブな相関があることを示している。

40

。

表 E 5 卵巣腫瘍臨床病期相関解析

卵巣腫瘍 R N A											
	DSCR1	PP5	RGS3	ARP	HVPS41	HB-EGF	グラビン	MKP1LP TP	CTGF	Nexin	オステオニ ドジェン
以下との相関											
臨床病期 (LMP/CA)	p=0.0157	-	-	p=0.0157	-	nd	-	-	nd	nd	nd
VEGF 発現	-	R=0.949 p=0.0001	R=0.590 p=0.0049	-	R=0.665 p=0.001	nd	R=0.956 p=0.0001	-	nd	nd	nd
VEGFR1 発現	R=0.834 p<0.0001	-	R=0.667 p=0.0009	R=0.799 p=0.0001	R=0.662 p=0.0011	nd	-	R=0.662 p=0.0034	nd	nd	nd

10

20

30

40

50

## 【 0 1 4 1 】

実施例 5 V E G F m g s を形質移入した内皮細胞の生存

D S C R 1 が内皮細胞の生存を直接調節するかどうかを研究するために、我々は、E G F P の発現ベクターと共に D S C R 1 のエピトープタグ型を一過性に同時形質移入し、蛍光

顕微鏡でEGFPポジティブ及び健康な及びアポトーシス性内皮細胞の間の比を定量した。図1に示すように、DSCR1のエピトープタグ型(DSCR1-FLAG)の一過性の過剰発現により、細胞生存度が僅かに減少した。これに対して、アンチセンスコンストラクトの過剰発現により、Aktの構成型活性形態(Akt179)に対して観察されたものと同様な程度まで生存度が増加した。これらの知見は、内皮細胞において過剰発現した場合のDSCR1の直接の生存効果を除外しており、血清不足条件下での生存度の減少を示唆した。しかし、5%血清条件下で成長させた細胞ではそのような生存度の低下は観察されなかった(図1)。

コントロールでは、DSCR1の除去はアポトーシスを誘発し; 66時間で約25%の細胞だけが生存していることが分かる。他方、Akt2Dを形質移入した細胞の約80%が生

10

【0142】

実験の詳細:

本発明の遺伝子に対応するセンス及びアンチセンスポリヌクレオチドのHUVECs中での発現は次のようにして実施した:

a) 細胞:

6cmの組織培養皿(Falcon 3802, primary, 表面修飾ポリスチレン)にHUVEC、p6(Cell system)を入れる。ゼラチン被覆プラスチック上で成長。

20

6cm皿を、細胞塗布前にPBS中0.2%のゼラチンで>20分被覆した。

細胞を6cm皿当たり140000細胞の密度、つまり約5000細胞/cm<sup>2</sup>で被覆した。

細胞は少なくとも60%のコンフルエンスを達成しなければならない。さもないと毒性の増加が観察されるからである。高密度では、低形質移入効率になった。

微小血管細胞に対して、他のDNA/リポフェクチン比を決定しなければならない。さもないと毒性の増加が見られる。

コントロールサンプル:

#	VEGF (50 ng/ml)	GFP	アネキシン - PE
1	+	-	-
2	+	+	-
3	+	-	+
4	-	-	-
5	-	+	-
6	-	-	-

30

【0143】

DNA: 3.0 µg 全DNA / 6cm皿: 2.0 µg 試験、1.0 µg 緑色蛍光タンパク質(GFP)

F1: 4 µl / 6cm皿

40

OPTIMEM: 6cm皿当たり1.3 ml

Falcon透明チューブ(ポリスチレン)を使用

HME細胞に対して: 2 µg DNA + 4 µl F1

【0144】

b) 手順:

1日目: リポフェクチンの前に細胞を24時間分裂させる

2日目: 午後4時から午後6時: 使用前に20秒間透明Falconチューブ中で十分にリポフェクチン(Life Technologies, Inc., Rockville, MD)をボルテックスする。

最初に1.35 ml / サンプルのOPTIMEM(Gibco BRLカタログ番号31

50

985)を加える。ついで、1サンプル当たり3  $\mu$ gの全DNAを加え、ボルテックスにより十分に混合する。ついで、1サンプル当たり4  $\mu$ gのF1を加え、ボルテックスにより十分に混合する。DNAとリポフェクチンとOPTIMEMを混合し、20から30分の間、37にて水浴中でインキュベートする；ついでOPTIMEMで細胞を2回洗浄する。1.35 mlの形質移入混合物を加えて37で2時間インキュベートする。2時間後、3 mlの完全培地を加え、16から19時間インキュベートする。

3日目：午前10時：次の朝に培地を10%血清含有培地に置き換えるが、細胞を洗浄しない。別法として、更に24時間形質移入混合物を放置する；これによりより高度の形質移入効率を得られるが、また細胞死が増加する。

#### 【0145】

アポトーシスを決定する場合：

3日目：夕方：細胞を2 x PBSで洗浄し、培地を血清不足のものに交換し、ついでGF + WMを加える。

4日目：午後遅く：細胞をFACSセットを用いて分析し、%アポトーシス細胞に対して(30時の時点)アネキシン - PE及びFITCチャネルを検出する。グリーンランタンを形質移入した場合、72時間後に32%までの形質移入効率を観察した。

生存を研究する場合：

4日目の朝：細胞を2 x PBSで洗浄し、培地を血清不足のものに交換し、ついでGF + WMを加える。

4日目の夕方：GF Pポジティブ細胞をカウントし、アポトーシス/健康を比較する。

5日目(24時間後)：細胞をFACS分析のために収集する。

#### 【0146】

c) FACS分析：

1. 上清(3 ml)を引き上げ、0で上部にフィルターを有する予め標識した5 mlのFalconチューブに加え、チューブを3分間2000 rpmでスピンドウンした。その間に、

2. 細胞を3 mlのPBSで注意深く洗浄した。

3. 0.5 mlの2 x トリプシンを加え、混合物を37Cのインキュベーターにおいて3分間インキュベートした。

4. 3分後に、10%の血清を含む3 mlの培地を加え、分解を停止させた。

5. 工程1の上清を吸引によって引き上げ、工程4の3.5 mlを、細胞ペレットを含むチューブに加えた。

6. 細胞を3分間2000 rpmでペレット化した。

7. ペレットを2 mlの1 x Ca結合バッファーで1 x 洗浄した。

8. 細胞を3分間2000 rpmでペレット化し、上清を吸引して除いた。

9. ペレットを0.5 mlのCa結合バッファー(アネキシン - PEを含むプール、又はコントロールサンプルのための単純な1 x Ca - 結合バッファーをつくる)に取り上げ、6回ピペットで取ったり戻して、細胞を脱凝集する。

10. コントロールサンプルに、10  $\mu$ lのアネキシン - PE、又は1  $\mu$ lのBioVisonアネキシン - Cy3原液を加える。

11. チューブを氷上に保持し、FACSラボまで分析のために提出する。

#### 【0147】

d) 材料

F1：ターゲティングシステム、Targfect F-1 (2 mg/ml), カタログ番号#001 (1 ml)又は#002 (4 x 1 ml)。

成長因子：6 cm皿の5 ml培地に対して

VEGF：10  $\mu$ lの0.1 mg/ml原液 + 650  $\mu$ l無血清培地。100  $\mu$ lのこの原液を6 cm皿中に存在する5 mlの培地に加え、30 ng/mlの最終濃度を得た。

Wortmannin (ホスファチジルイノシトール3 - キナーゼの強力な不可逆的阻害剤；BIOMOL, #ST-415；カタログ番号1232, Tocris Cook

10

20

30

40

50

son, 英国)

バイアル (5 mg) の内容物を 500  $\mu$ l のジメチルスルホキシド (原液: 10 mg / ml 原液; 23.3 mM) に取り上げた。4.3  $\mu$ l の 10 mg / ml 原液を 1 ml 培地中で希釈して 100  $\mu$ M 溶液を得た。10  $\mu$ l のこの原液を 650  $\mu$ l の無血清培地で希釈し、100  $\mu$ l を、6 cm 皿中に存在する 5 ml の培地に加えた。

e) DNA

空のベクター: pRLCMV, 1.3  $\mu$ g /  $\mu$ l 2.7  $\mu$ l / 皿  
GreenLantern<sup>TM</sup>: 0.7  $\mu$ g /  $\mu$ l 1.5  $\mu$ l / 皿  
【0148】

f) FACS:

アネキシン - Cy3、GFP 及び Pi (良好に作用) を使用  
アネキシン - PE (R & D) は、10  $\mu$ l の未希釈の原液を細胞に添加。前のように静置  
アネキシン - Cy3、BioVision, 1002 - 1000  
Opti-MEM-1 Gibco, BRL カタログ番号 31985, 0.51  
CSC 培地、カタログ番号 4Z0 - 500、  
GF なし、無血清カタログ番号 4Z3 - 500 - S、  
内皮細胞を、pRLCMV (空のベクター、ネガティブコントロール) 又は上に概説した  
正方向の DSCR1 (DSCR1) 又は逆方向の DSCR1 (DSCR1AS)、又は A  
KT の活性化変異型 (Akt2D、細胞生存を誘発するポジティブコントロール) の何れ  
かを発現するヌクレオチド配列を更に含む pRLCMV で形質移入した。その細胞を、形  
質移入の効率の指標を与え生存細胞に対する可視できるマーカーを提供する緑色蛍光タン  
パク質を発現するグリーンランタンと共に同時形質移入した。形質移入の 18 時間後に血  
清を培地から取り除いた。

【0149】

実施例 6 DSCR1 の更なる分析

1. はじめに

ダウン症候群は精神遅滞と先天性心臓形成異常を誘発する。DSCR1 をコードしている  
オープンリーディングフレームはダウン症候群の表現型を誘発可能な染色体 21 上の最小  
領域内に位置する幾つかの一つである (Fuentes 等, Hum Mol Genet  
1995 Oct; 4 (10): 1935 - 44)。より最近になって、DSCR1 は、  
Ca (2+) / カルモジュリン依存性タンパク質ホスファターゼ PP2B の触媒サブユニ  
ットであるカルシニユリン A と物理的にかつ機能的に相互作用することが見出された。D  
SCR1 の一過性過剰発現は活性化された T 細胞の核因子 (NFAT) の核トランスロケ  
ーションの阻害を通じてカルシニユリン依存性遺伝子転写を遮断した。(Fuentes  
JJ, Hum Mol Genet 2000 年 7 月 1 日; 9 (11): 1681 - 90  
)。NFAT は T 細胞中でのサイトカイン遺伝子発現の活性化を支援する転写因子とし  
て、及びシクロスポリン A (CsA) 及び FK506 の免疫調節効果の一次標的として元  
々は記載されていた。活性化された内皮細胞での NFAT レベルの増加は、Cocker  
ill 等 (Blood 1995 Oct 1; 86 (7): 2689 - 98) によって最  
初に観察されたもので、CsA による NFAT 活性の妨害により TNF- $\alpha$  で刺激した内  
皮細胞での E-選択発現の 40% の低減と、好中球の接着の 29% の減少が生じた。これ  
らの知見は、DSCR1 の生物学的役割が、活性化された内皮細胞上での細胞接着分子の  
発現と NFAT 活性を調節することにあることを示唆している。

【0150】

2. 材料と方法

(a) 細胞

ヒト臍静脈内皮細胞 (HUVECs) を Cell Systems から購入し、5% の血  
清最終濃度まで補填した内皮成長培地 (CS - C 培地、Cell Systems) 中で  
増殖させた。細胞を 19000 細胞 / cm<sup>2</sup> の細胞密度で増殖させ、実験を 3 通り実施し  
た。蒔種 24 時間後に、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) と培地、0.1% BSA

10

20

30

40

50



又は0.1%BSA及びVEGF(10ng/ml)又は5%血清で3回洗浄した。

(b) RNA収集とリアルタイムRT-PCR解析

培地を培養物から吸引し、10mlのTrizol(Gibco)を $1 \times 10^6$ 細胞まで添加した。組織培養フラスコを10分間垂直シェイカー上でインキュベートした。RNAの単離及びcDNAの合成及びデータ解析を他の場所で記載されているようにして行った(Kahn等, 2000)。組織に対して、RNAをSTAT60法(TELETEST "B"; Friendswood, TX)を使用して各処理グループの5つの標本から死亡させて収集した凍結腫瘍組織から単離し、RNeasy Quickスピンカラム(Qiagen; Valencia, CA)で精製した。一反応あたり100ngの全RNAをパーキンエルマーのRT-PCRキットを使用し、製造者の指示に従って(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)、解析した。反応をモデル7700シーケンスディテクター(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)で96ウェルプレート中で実施し、シーケンスディテクションソフトウェア(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)を使用して結果を解析した。RT-PCR条件は48で30分、95で10分、及び95で30秒、60で90秒の40サイクルであった。各サンプルに対する相対的なRNA当量をGAPDHレベルに規格化することによって得た。グループ当たり5つのサンプルのそれぞれを2通り実施してサンプルの再現性を決定し、サンプル対当たりの平均の相対RNA当量を更なる分析に用いた。ANOVAソフトウェア(Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA)を用いて統計的解析を実施した。プローブプライマーセットの種特異性を、ヒト上皮細胞由来の全RNA又はマウス腎臓RNAを試験することによって証明した(データは示さず)。発現レベルを、それぞれヒト又はマウスGAPDHに特異的なプローブ/プライマー集合に正規化した。

10

20

【0151】

(c) 一次ヒト内皮細胞の一過性形質移入

継代6に達する前のHUVEC細胞と、継代4に達する前のHMVECを使用した。

Falconのprimaria 6ウェル皿を未被覆で使用する。(ゼラチンでの被覆は推奨されない)。

2xトリプシンで3~5分の間、室温でインキュベーションすることによって細胞を収集し、3容量の完全培地にトリプシン処理をした細胞を希釈する(あまりに長くトリプシン処理をしない)。

30

血球計算器で10µlの混合物をカウントする。

しばらくして2krpにて5分細胞を遠心処理する。

上清を除去し、3mlの完全培地中0.5x10<sup>5</sup>細胞まで完全培地で細胞を希釈し、プールをつくる。

プールから各ウェルに3mlの細胞を添加する(50000細胞/ウェル、(5000細胞/cm<sup>2</sup>))

細胞は<60%コンフルエントでなければならず、さもないと毒性の増加が観察されるかもしれない。細胞密度>80%では、低い形質移入効率が観察された。

40

リポフェクション:

HUVEC及びHMVEC細胞に対して:

次の量を3ウェルの形質移入に対して計算した。試験する各遺伝子に対して2通り又は3通りを持つために3つの形質移入のプールを産生することが好ましい。

DNAを15mlのFalcon透明チューブ(ポリスチレン)にピペット操作で取る。

最前の結果は、実験の直前にDNA濃度を測定したときである:

1. 25µgの発現ベクター(pRKNに載せたもの)

3. 75µgのルシフェラーゼレポーター

1. 0µgのSV-レニラ参照レポーター。

4. 5mlのOptimen(無血清)を添加する。

50

9. ) F1 ターゲフェクチン ( t a r g e f e c t i n ) 溶液を 30 秒間混合し、14  $\mu$ l の F1 を混合物に添加する。

10. ) 転倒させてリポフェクチン混合物を混合し、20 から 30 分間 37 C の水浴中でサンプルをインキュベートする。

10. ) 細胞を一度 P B S で洗浄し、P B S を除去し、皿当たり 5 m l のプラスチックピペットを用いて 1.5 m l のリポフェクション混合物を添加する。

11. ) C O 2 インキュベーター中で 2.5 時間細胞をインキュベートする。

12. ) 3 m l の完全培地を添加し、終夜インキュベートする ( 12 ~ 16 時間 )。延長したインキュベーションの効果はまだ決定されていない。

13. ) 1 x P B S で細胞を洗浄する。

10

14. ) 3 m l の完全培地を添加し、ドージング前に 24 時間待つ。

15. ) リポフェクチンから 36 時間後又はドージングから 6 ~ 9 時間後に細胞を収集する。

血清枯渇化 ( 0.5 % F C S ) :

1. ) 次の朝 : 3 m l の P B S で 1 x 細胞を洗浄する。

2. ) 0.5 % の F C S 培地、0.2 % の B S A、P e n / S t e p、ファンギゾンを添加する。

E G F P を形質移入したとき、72 時間後に 32 % までの形質移入効率が観察された。

【 0 1 5 2 】

細胞収集とルシフェラーゼ測定 :

20

吸引により培地を取り除き、P B S で 1 x 注意深く洗浄し、300  $\mu$ l の 1 x パッシブ溶解バッファーを加える。サンプルをこの時点で - 20 に保存することができるが、活性は 50 % まで減少するかもしれない。

照度計 :

100  $\mu$ l のルシフェラスト基質溶液でチューブを前もって満たす。

30  $\mu$ l の抽出物を添加する。

100  $\mu$ l の S T O P と G L O W を添加する。

更なる材料

材料 : F1 : ターゲッティングシステム、T a r g f e c t F - 1 ( 2 m g / m l ) , カタログ番号 # 001 ( 1 m l ) 又は # 002 ( 4 x 1 m l )、( T a r g e t h i n g s y s t e m s , T e l 6195621518, R h u m p i a )

30

培養皿 : 60 mm 細胞培養皿、F a l c o n 3802、p r i m a r i a、表面改変ポリスチレン。

細胞 : H U V E C : C e l l s y s t e m s , 2 V O - C 7 5

H D M E X , C e l l S y s t e m s , 2 M 1 - C 7 5

培地 :

5 % 血清含有 :

O p t i - M E M - 1 G i b c o , B R L カタログ番号 31985, 0.51

C S C 培地, カタログ番号 4Z0 - 500、110ドル

G F なし、無血清カタログ番号 4Z3 - 500 - S, 90ドル

40

【 0 1 5 3 】

3. D S C R 1 は腫瘍脈管構造及び新生物細胞中で発現される

様々なヒト腫瘍及び他の悪性腫瘍中での D S C R 1 の発現の細胞局在化を研究するために、異なった一連のヒト腫瘍を含み、様々な健康なヒトの器官から調製された切片についてもまた、インサイツハイブリダーゼーションを実施した。ヒトの胎児発育中、D S C R 1 は胎児肝臓中及び後根神経節中、A - V 弁挿入近くの房室結合の細胞中及び限局的に左心室中隔及び右心室尖部の心内膜下層内の細胞中に発現することが見出された。胚性大肝静脈内皮及び小血管内皮中で弱い発現があった。胚性脊髄では、神経細胞中に発現があった。成体チンパンジーで研究した場合、正常な乳管を囲む筋上皮細胞中及び正常なチンパンジーの副甲状腺中に D S C R 1 の発現を更に検出した。成体肝臓では、発現は硬変の正常

50

ではない肝臓の肝細胞と胆管上皮に局在化していた。乳腺のヒト腺癌中並びに腎細胞癌中に限局的な発現があった。センス制御が全てのサンプルで実施され、バックグラウンドシグナルを明らかにしなかった(データは示さず)。これらの知見は、内皮細胞と形質転換腫瘍細胞でのDSCR1の発現を調節するシグナル伝達経路のある程度の重複性を反映しているのかもしれない。あるいは、腫瘍細胞上のVEGFレセプターの上方制御とVEGF特異的シグナル伝達経路の刺激は我々の発見を説明するのに役立つ。要するに、我々は正常な個体発生の間の胎児脈管構造中と、成体の新生物腫瘍細胞中にDSCR1遺伝子の発現を見出し、従って遺伝子の腫瘍胎児ファミリーのメンバーとしてDSCR1を同定した。

#### 【0154】

10

4. 一次ヒト内皮細胞の一過性トランスフェクションによるDSCR1の機能分析  
最近、酵母の二つのハイブリッド実験において、DSCR1が、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインホスファターゼPP2Bの触媒サブユニットであるカルシニユリンAと物理的かつ機能的に相互作用することが示された。T細胞での研究において、DSCR1の一過性過剰発現がPMA/カルシウム刺激に応答してインターロイキン2プロモーターの転写活性化を阻害した。DSCR1形質移入細胞では、NFATはイオノマイシンのようなカルシウムイオノフォアでの刺激後に核内に蓄積できなかった。

PMA及びカルシウムイオノフォアA23187で細胞を刺激した後、一次ヒト内皮細胞中でのDSCRの過剰発現がNFAT活性化に効果をもたらしたかどうかを試験した。3つのNFAT結合部位を含むルシフェラーゼレポーターコンストラクト(NFAT-Luc)とDSCR1-FLAGをコードする発現ベクターの一過性同時形質移入実験により、PMAとイオノフォアに応答して刺激6時間後にNFAT活性の完全な除去が明らかになった。内皮細胞中でのDSCRの強制発現は、おそらくはカルシニユリン調節シグナル伝達経路との干渉によって、カルシニユリン調節シグナル伝達経路の有意な下方制御を生じる。

20

#### 【0155】

均等性

特定の実施態様をここに詳細に開示したが、これは例証の目的のための例としてのみ行ったもので、添付の特許請求の範囲について限定を加えることが意図されるものではない。特に、特許請求の範囲によって定まる本発明の精神及び範囲から逸脱せずに様々な置換、変更、及び改変を本発明に施してもよいことは、発明者によって考慮されることである。核酸発露物質、対象のクローン、又はライブラリーのタイプの選択は、ここに記述された実施態様に関する知識を有する当業者にとって常套的な事柄であると考えられる。他の側面、利点、及び変更は、特許請求の範囲内のものであると考えられる。

30

#### 【0156】

文献

米国特許 4166452号 Apparatus for testing human responses to stimuli. 1979.

米国特許 4485045号 Synthetic phosphatidyl choline useful in forming liposomes. 1984.

40

米国特許 4544545号 Liposomes containing modified cholesterol for organ targeting. 1985.

4,676,980. Target specific cross-linked heteroantibodies. 1987.

米国特許 4816567号 Recombinant immunoglobulin preparations. 1989.

国際公開第 90/10448号 Covalent conjugates of lipid and oligonucleotide. 1990.

国際公開第 90/13641号 Stably transformed eucaryotic cells comprising a foreign transcribable

50

- e DNA under the control of a pol III promoter. 1990.
- EPO 402226. Transformation vectors for yeast *Yarrowia*. 1990.
- 国際公開第 91/00360号 Bispecific reagents for AIDS therapy. 1991.
- 国際公開第 91/04753号 Conjugates of antisense oligonucleotides and therapeutic uses thereof. 1991.
- 米国特許 5013556号 Liposomes with enhanced circulation time. 1991. 10
- 国際公開第 91/06629号 Oligonucleotide analogs with novel linkages. 1991.
- 国際公開第 92/20373号 Heteroconjugate antibodies for treatment of HIV infection. 1992.
- 国際公開第 93/08829号 Compositions that mediate killing of HIV-infected cells. 1993.
- 国際公開第 94/11026号 Therapeutic application of chimeric and radiolabeled antibodies to human B lymphocyte restricted differentiation antigen for treatment of B cells. 1994. 20
- 国際公開第 96/27011号 A method for making heteromultimeric polypeptides. 1996.
- 米国特許. 5545807号 Production of antibodies from transgenic animals. 1996.
- 米国特許. 5545806号 Transgenic <sic> non-human animals for producing heterologous antibodies. 1996.
- 米国特許. 5569825号 Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies of various isotypes. 1996. 30
- 国際公開第 97/33551号 Compositions and methods for the diagnosis, prevention, and treatment of neoplastic cell growth and proliferation. 1997.
- 米国特許. 5633425号 Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies. 1997.
- 米国特許 5661016号 Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies of various isotypes. 1997. 40
- 米国特許 5625126号 Transgenic non-human animals for producing heterologous antibodies. 1997.
- AbraVaya, K., J.J. Carrino, S. Muldoon, 及び H.H. Lee. 1995. Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-LCR). *Nucleic Acids Res.* 23:675-82.
- Alam, J., 及び J.L. Cook. 1990. Reporter genes: Application to the study of mammalian ge 50

ne transcription. Anal. Biochem. 188:245-254.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff 等 1994. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., New York, NY. 1294 pp.

Alon, T., I. Hemo, A. Itin, J. Pe'er, 等 1995. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. Nat Med. 1:1024-8.

Araki, W., 及び R.J. Wurtman. 1998. Increased expression of amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2 during trophic factor withdrawal-induced death of neuronal PC12 cells. Brain Res Mol Brain Res. 56:169-77.

Arkonac, B.M., L.C. Foster, N.E. Sibinga, C. Patterson, 等 1998. Vascular endothelial growth factor induces heparin-binding epidermal growth factorlike growth factor in vascular endothelial cells. J Biol Chem. 273:4400-5.

Athanassiades, A., 及び P.K. Lala. 1998. Role of placenta growth factor (PIGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness. Placenta. 19:465-73.

Austin, C.P., 及び C.L. Cepko. 1990. Cellular migration patterns in the developing mouse cerebral cortex. Development. 110:713-732.

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, 等 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.

Barany, F. 1991. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. Proc Natl Acad Sci USA. 88:189-93.

Bartel, D.P., 及び J.W. Szostak. 1993. Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences [see comment]. Science. 261:1411-8.

Bartel, P., C.T. Chien, R. Sternglanz, 及び S. Fields. 1993. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. Biotechniques. 14:920-4.

Beal, P.A., 及び P.B. Dervan. 1991. Second structural motif for recognition of DNA by oligonucleotide-directed triple-helix formation. Science. 251:1360-3.

10

20

30

40

50

- Bechtold, N., 及び G. Pelletier. 1998. In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol*. 82:259-66.
- Becker, D.M., 及び L. Guarente. 1991. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol*. 194:182-187.
- Beggs, J.D. 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature*. 275:104-109. 10
- Bellamy, W.T., L. Richter, Y. Frutiger, 及び T.M. Grogan. 1999. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res*. 59:728-33.
- Berger, J., J. Hauber, R. Hauber, R. Geiger 等 1988. Secreted placental alkaline phosphatase: A powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. 20  
*Gene*. 66:1-10.
- 国際公開第 93/04169号 GENE TARGETING IN ANIMAL CELLS USING ISOGENIC DNA CONSTRUCTS. 1993.
- Bodine, D.M., K.T. McDonagh, N.E. Seidel, 及び A.W. Nienhuis. 1991. Survival and retrovirus infection of murine hematopoietic stem cells in vitro: effects of 5-FU and method of infection. *Exp. Hematol*. 19:206-212.
- Boerner, P., R. Lafond, W.Z. Lu, P. Brains, 等 1991. Production of antigen-specific human monoclonal antibodies from in vitro-primed human splenocytes. *J Immunol*. 147:86-95. 30
- 米国特許: 3,773,919号 Polylactide-drug mixtures. 1973.
- Bradley. 1987. *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*. Oxford University Press, Inc., Oxford. 268 pp.
- Bradley, A. 1991. Modifying the mammalian genome by gene targeting. *Curr Opin Biotechnol*. 2:823-9. 40
- Brennan, M., P.F. Davison, 及び H. Paulus. 1985. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science*. 229:81-3.
- 国際公開第 94/10300号 INTERACTION TRAP SYSTEM FOR ISOLATING NOVEL PROTEINS. 1994.
- Capeocchi, M.R. 1980. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA 50

- into cultured mammalian cells. *Cell*. 22:479.
- Capecchi, M.R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288-92.
- Carell, T., E.A. Wintner, 及び J. Rebek Jr. 1994a. A novel procedure for the synthesis of libraries containing small organic molecules. *Angewandte Chemie International Edition*. 33:2059-2061. 10
- Carell, T., E.A. Wintner, 及び J. Rebek Jr. 1994b. A solution phase screening procedure for the isolation of active compounds from a molecular library. *Angewandte Chemie International Edition*. 33:2061-2064.
- Carmeliet, P., M.G. Lampugnani, L. Moons, F. Breviario 等 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*. 98:147-57. 20
- Caron, P.C., W. Laird, M.S. Co, N.M. Avdalo vic 等. 1992. Engineered humanized dimeric forms of IgG are more effective antibodies. *J Exp Med*. 176:1191-5.
- Carter, P. 1986. Site-directed mutagenesis. *Biochem J*. 237:1-7.
- Case, M.E., M. Schweizer, S.R. Kushner, 及び N.H. Giles. 1979. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76:5259-63. 30
- 米国特許 5,116,742号 RNA ribozyme restriction endoribonucleases and methods. 1992.
- 米国特許 4,987,071. RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endoribonucleases and methods. 1991.
- Cepko, C.L., B.E. Roberts 及び R.E. Mulligan. 1984. Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell*. 37:1053-1062. 40
- Chalfie, M., Y. tu, G. Euskirchen, W.W. Ward 等 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263:802-805.
- Chaney, W.G., D.R. Howard, J.W. Pollard, S. Sallustio 等 1986. High-frequency transfection of CHO cells using Polybrene. *Somatic Cell Mol Genet*. 12:237.
- Chen, C., 及び H. Okayama. 1988. Calcium phosph 50

- phate-mediated gene transfer: A highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA. *BioTechniques*. 6:632-638.
- Chen, S.H., H.D. Shine, J.C. Goodman, R.G. Grossman 等. 1994. Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:3054-7.
- Cho, C.Y., E.J. Moran, S.R. Cherry, J.C. Stephens 等. 1993. An unnatural biopolymer. *Science*. 261:1303-5.
- Cohen, A.S., D.L. Smisek, 及び B.H. Wang. 1996. Emerging technologies for sequencing antisense oligonucleotides: capillary electrophoresis and mass spectrometry. *Adv Chromatogr*. 36:127-62.
- Cohen, J.S. 1989. Oligodeoxynucleotides: Antisense inhibitors of gene expression. CRC Press, Boca Raton, FL 255 pp.
- Cohen, S.M.N., A.C.Y. Chang, 及び L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 69:2110.
- Cooney, M., G. Czernuszewicz, E.H. Postel, S.J. Flint, 等. 1988. Site-specific oligonucleotide binding represses transcription of the human c-myc gene in vitro. *Science*. 241:456-9.
- Cotton, R.G. 1993. Current methods of mutation detection. *Mutat Res*. 285:125-44.
- Crawford, D.R., N.E. Abramova, 及び K.J. Davies. 1998. Oxidative stress causes a general, calcium-dependent degradation of mitochondrial polynucleotides. *Free Radic Biol Med*. 25:1106-11.
- Cronin, M.T., R.V. Fucii, S.M. Kim, R.S. Masino, 等. 1996. Cystic fibrosis mutation detection by hybridization to light-generated DNA probe arrays. *Hum Mutat*. 7:244-55.
- Cull, M.G., J.F. Miller, 及び P.J. Schatz. 1992. Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus of the lac repressor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:1865-9.
- Cwirla, S.E., E.A. Peters, R.W. Barrett, 及び W.J. Dower. 1990. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:6378-82.



- de Boer, A.G. 1994. Drug absorption enhancement: Concepts, possibilities, limitations and trends. Harwood Academic Publishers, Langhorne, PA. de Louvencourt, L., H. Fukuhara, H. Heslot, 及び M. Wesolowski. 1983. Transformation of *Kluyveromyces lactis* by killer plasmid DNA. *J Bacteriol.* 154:737-42.
- de Wet, J.R., K.V. Wood, M. DeLuca, D.R. Helinski, 等. 1987. Structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 7:725-737 10
- Demerec, M., E.A. Adelberg, A.J. Clark, 及び P.E. Hartman. 1966. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics.* 54:61-76.
- Deng, X., P. Ruvolo, B. Carr 及び W.S. May. 2000. Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:1578-83.
- Devlin, J.J., L.C. Panganiban, 及び P.E. Devlin. 1990. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science.* 249:404-6. 20
- DeWitt, S.H., J.S. Kiely, C.J. Stankovic, M.C. Schroeder 等 1993. "Diversomers": an approach to nonpeptide, nonoligomeric chemical diversity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:6909-13.
- Druey, K.M., K.J. Blumer, V.H. Kang, 及び J.H. Kehrl. 1996. Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family. *Nature.* 379:742-6. 30
- Eichelbaum, M 及び B. Evert. 1996. Influence of pharmacogenetics on drug disposition and response. *C Exp Pharmacol Physiol.* 23:983-5.
- Ellington, A.D 及び J.W. Szostak. 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 346:818-22.
- Elroy-Stein, O., 及び B. Moss. 1990. Cytoplasmic expression system based on constitutive synthesis of bacteriophage T7 RNA polymerase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:6743-6747. 40
- 米国特許 4,522,811号 Serial injection of muramyl dipeptides and liposomes enhances the anti-infective activity of muramyl dipeptides Serial injection of muramyl dipeptides and liposomes enhances the anti-infective activity of muramyl dipeptides. 1985. 50

- Eppstein, D.A., Y.V. Marsh, M. van der Pas, P.L. Felgner, 等 1985. Biological activity of liposome-encapsulated murine interferon gamma is mediated by a cell membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:3688-92.
- Escudero, J., 及び B. Hohn. 1997. Transfer and integration of T-DNA without cell injury in the host plant. *Plant Cell*. 9:2135-2142.
- 米国特許 4,870,009号 Method of obtaining gene product through the generation of transgenic animals. 1989. 10
- Evron, E., P. Cairns, N. Halachmi, S.A. Ahrendt, 等 1997. Normal polymorphism in the incomplete trinucleotide repeat of the arginine-rich protein gene. *Cancer Res*. 57:2888-9.
- 国際公開第 9730065号. COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT AND DIAGNOSIS OF CARDIOVASCULAR DISEASE. 1997.
- Fekete, D.M., 及び C.L. Cepko. 1993. Retroviral infection coupled with tissue transplantation limits gene transfer in the chick embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:2350-2354. 20
- Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, 等 1987. Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA/transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84:7413-7417.
- Felici, F., L. Castagnoli, A. Musacchio, R. Jappelli, 等 1991. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J Mol Biol*. 222:301-10. 30
- Ferrara, N. 1999a. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med*. 77:527-43.
- Ferrara, N. 1999b. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol*. 237:1-30.
- Fieck, A., D.L. Wyborski, 及び J.M. Short. 1992. Modifications of the E.coli Lac repressor for expression in eukaryotic cells: effects of nuclear signal sequences on protein activity and nuclear accumulation. *Nucleic Acids Res*. 20:1785-91. 40
- Finer, J.J., K.R. Finer, 及び T. Ponappa. 1999. Particle bombardment-mediated transformation. *Current Topics in microbiology and immunology*. 240:59-80.
- Finn, P.J., N.J. Gibson, R. Fallon, A. Hami 50

lton, 等 1996. Synthesis and properties of DNA-PNA chimeric oligomers. *Nucleic Acids Res.* 24:3357-63.

Fishwild, D.M., S.L. O'Donnell, T. Bengoechea, D.V. Hudson, 等 1996. High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice [see comments]. *Nat Biotechnol.* 14:845-51.

Fleer, R, P. Yeh, N. Amellal, I. Maury, 等 1991. Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeasts. *Biotechnology (NY)*. 9:968-75.

Fodor, S.P., R.P. Rava, X.C. Huang, A.C. Pease, 等 1993. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*. 364:555-6.

Fong, G.H., J. Rossant, M. Gertsenstein, 及び M.L. Breitman. 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 376:66-70.

Fromin, M., L.P. Taylor, 及び V. Walbot. 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82:5824-5828.

Fuentes, J.J., M.A. Pritchard, A.M. Planas, A. Bosch, 等 1995. A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Hum Mol Genet*. 4:1935-44.

Fujita, T., H. Shubiyah, T. Ohashi, K. Yamashita, 等 1986. Regulation of human interleukin-2 gene: Functional DNA sequences in the 5' flanking region for the gene expression in activated T lymphocytes. *Cell*. 46:401-407.

Gabizon, A., R. Shiotah, 及び D. Papahadjopoulos. 1989. Pharmacokinetics and tissue distribution of doxorubicin encapsulated in stable liposomes with long circulation times. *J Natl Cancer Inst*. 81:1484-8.

Gallagher, S.R. 1992. GUS protocols: Using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic Press, San Diego, CA.

Gallop, M.A., R.W. Barrett, W.J. Dower, S.P. Fodor, 等. 1994. Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries

10

20

30

40

50

s. J Med Chem. 37:1233-51.

Gasparini, P., A. Bonizzato, M. Dognini, 及び P. F. Pignatti. 1992. Restriction site generating-polymerase chain reaction (RG-PCR) for the probeless detection of hidden genetic variation: application to the study of some common cystic fibrosis mutations. Mol Cell Probes. 6:1-7.

Gautier, C., F. Morvan, B. Rayner, T. Huynh-Dinh, 等 1987.  $\alpha$ -DNA. IV:  $\alpha$ -anomeric and  $\beta$ -anomeric tetrathymidylates covalently linked to intercalating oxazolopyridocarbazole. Synthesis, physicochemical properties and poly(rA) binding. Nucleic Acids Res. 15:6625-41. 10

Gennaro, A. R. 2000. Remington: The science and practice of pharmacy. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Gerber, H. P., A. McMurtrey, J. Kowalski, M. Yan, 等 1998. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. J Biol Chem. 273:30336-43. 20

Gibbs, R. A., P. N. Nguyen, 及び C. T. Caskey. 1989. Detection of single DNA base differences by competitive oligonucleotide priming. Nucleic Acids Res. 17:2437-48.

Gietz, R. D., R. A. Woods, P. Manivasakam, 及び R. H. Schiestl. 1998. Growth and transformation of *Saccharomyces cerevisiae*. In Cells: A laboratory manual. Vol. I. D. Spector, R. Goldman, 及び L. Leinwand, editors. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. 30

Gille, J., M. Khalik, V. Konig, 及び R. Kaufmann. 1998. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) induces vascular permeability factor (VPF/VEGF) expression by cultured keratinocytes. J Invest Dermatol. 111:1160-5. 40

Goding, J. W. 1996. Monoclonal antibodies: Principles and Practice. Academic Press, San Diego. 492 pp.

Gorman, C. M., L. F. Moffat, 及び B. H. Howard. 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. Mol Cell Biol. 2:1044-1051.

Graham, F. L., 及び A. J. van der Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of 50

- human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 52:456 - .  
Griffin, H.G., 及び A.M. Griffin. 1993. DNA sequencing. Recent innovations and future trends. *Appl Biochem Biotechnol*. 38:147 - 59.  
Grompe, M., D.M. Muzny, 及び C.T. Caskey. 1989. Scanning detection of mutations in human ornithine transcarbamoylase by chemical mismatch cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:5888 - 92.
- Gruber, M., B.A. Schodin, E.R. Wilson, 及び D.M. Kranz. 1994. Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in *Escherichia coli*. *J Immunol*. 152:5368 - 74. 10
- Guatelli, J.C., K.M. Whitfield, D.Y. Kwoh, K.J. Barringer, et al 1990. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:1874 - 8. 20
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol*. 166:557 - 580.
- Hansen, G., 及び M.-D. Chilton. 1999. Lessons in gene transfer to plants by a gifted microbe. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 240:21 - 57.
- Hansen, G., 及び M.S. Wright. 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci*. 4:226 - 231. 30
- Harlow, E., 及び D. Lane. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 726 pp.
- Harlow, E., 及び D. Lane. 1999. *Using antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Haseloff, J., 及び W.L. Gerlach. 1988. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*. 334:585 - 91. 40
- Hata, Y., S.L. Rook, 及び L.P. Aiello. 1999. Basic fibroblast growth factor induces expression of VEGF receptor KDR through a protein kinase C and p44/p42 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Diabetes*. 48:1145 - 55.
- Hayashi, K. 1992. PCR-SSCP: A method for detection of mutations. *Genetic and Analytical Techniques Applications*. 9:73 - 79. 50

- Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak, 及び P.M Williams. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986-94.
- Helene, C. 1991. The anti-gene strategy: control of gene expression by triplex-forming-oligonucleotides. *Anticancer Drug Des.* 6:569-84.
- Helene, C., N.T. Thuong, 及び A. Harel-Bellan. 1992. Control of gene expression by triplex helix-forming oligonucleotides. The anti gene strategy. *Ann N Y Acad Sci.* 660:27-36. 10
- Hinnen, A., J.B. Hicks, 及び G.R. Fink. 1978. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad Sci. USA.* 75:1929-1933.
- Hoffman, F. 1996. Laser microbeams for the manipulation of plant cells and subcellular structures. *Plant Sci.* 113:1-11.
- Hogan, B., Beddington, R., Constantii, F., Lacy, E. 1994. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 500 pp. 20
- Holliger, P., T. Prospero, 及び G. Winter. 1993. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:6444-8.
- Hoogenboom, H.R., AD. Griffiths, K.S. Johnson, D.J. Chiswell, 等 1991. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* 19:41337. 30
- Houghten, R.A., J.R. Appel, S.E. Blondelle, J.H. Cuervo, 等 1992. The use of synthetic peptide combinatorial libraries for the identification of bioactive peptides. *Biotec hniques.* 13:412-21.
- Hsu, IC., Q. Yang, M.W. Kahng, 及び J.F. Xu. 1994. Detection of DNA point mutations with DNA mismatch repair enzymes. *Carcinogenesis.* 15:1657-62. 40
- Hwang, K.J., K.F. Luk, 及び P.L. Beaumier. 1980. Hepatic uptake and degradation of unilamellar sphingomyelin/cholesterol liposomes: a kinetic study. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77:4030-4
- Hyder, S.M., 及び G.M. Stancel. 1999. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Mol Endocrinol* 13:806-11.
- Hyrup, B., 及び P.E. Nielsen. 1996. Peptide n 50

- ucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. *Bioorg Med Chem*. 4:5-23.
- Inaba, N., H. Ishige, M. Ijichi, N. Satoh, 等 1982. Immunohistochemical detection of pregnancy-specific protein (SP1) and placenta-specific tissue proteins (PP5, PP10, PP11 and PP12) in ovarian adenocarcinomas. *Oncodev Biol Med*. 3:379-89.
- Inoue, H., Y. Hayase, A. Imura, S. Iwai, 等 1987a. Synthesis and hybridization studies on two complementary nona(2'-O-methyl)ribonucleotides. *Nucleic Acids Res*. 15:6131-48.
- Inoue, H., Y. Hayase, S. Iwai, 及び E. Ohtsuka. 1987b. Sequence-dependent hydrolysis of RNA using modified oligonucleotide splints and RNase H. *FEBS Lett*. 215:327-30.
- Ishiura, M., S. Hirose, T. Uchida, Y. Hamada, 等. 1982. Phage particle-mediated gene transfer to cultured mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*. 2:607-616.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, 及び A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol* 153:163-168.
- Iwabuchi, K., B. Li, P. Bartel, 及び S. Fields. 1993. Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene*. 8:1693-6.
- Jahroudi, N., J. Kitney, J.S. Greenberger, 及び R. Bowser. 1998. Endothelial cell dysfunction in response to intracellular overexpression of amyloid precursor protein. *J Neuosci Res*. 54:828-39.
- Jayasena, S.D. 1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem*. 45:1628-50.
- Jones, P.T., P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger, 等 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*. 321:522-5.
- Joshi, B., L. Li, B.G. Taffe, Z. Zhu 等 1999. Apoptosis induction by a novel anti-prostate cancer compound, BMD188 (a fatty acid-containing hydroxamic acid), requires the mitochondrial respiratory chain. *Cancer Res*. 59:4343-55.
- Kahn, J., F. Mehraban, G. Ingle, X. Xin, 等 2000. Gene expression profiling in an in vitro

- o model of angiogenesis. *Am J Pathol.* 156:1887-900.
- Kaufman, R. J. 1990. Vectors used for expression in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 185:487-511.
- Kaufman, R. J., P. Murtha, D. E. Ingolia, C. - Y. Yeung, 等 1986. Selection and amplification of heterologous genes encoding adenosine deaminase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad Sci. USA.* 83:3136-3140. 10
- Kawai, S., 及び M. Nishizawa. 1984. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* 4:1172.
- Kayanoki, Y., S. Higashiyama, K. Suzuki, M. Asahi, 等 1999. The requirement of both intracellular reactive oxygen species and intracellular calcium elevation for the induction of heparin-binding EGF-like growth factor in vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 259:50-5. 20
- Keen, J., D. Lester, C. Inglehearn, A. Curtis, 等. 1991. Rapid detection of single base mismatches as heteroduplexes on Hydrolink gels. *Trends Genet.* 7:5.
- Kelly, J. M., 及び M. J. Hynes. 1985. Transformation of *Aspergillus niger* by the amdS gene of *Aspergillus nidulans*. *Embo J.* 4:475-9.
- Kostelny, S. A., M. S. Cole, 及び J. Y. Tso. 1992. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol.* 148:1547-53. 30
- W094/16101. DNA SEQUENCING BY MASS SPECTROMETRY. 1994.
- Kozal, M. J., N. Shah, N. Shen, R. Yang, 等. 1996. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Med.* 2:753-9. 40
- Kozbor, D., P. Tripputi, J. C. Roder, 及び C. M. Croce. 1984. A human hybrid myeloma for production of human monoclonal antibodies. *J Immunol.* 133:3001-5.
- Kriegler, M. 1990. Gene transfer and expression: A laboratory manual. Stockton Press, New York. 242 pp.
- 国際公開第 91/01140号 HOMOLOGOUS RECOMBINATION FOR UNIVERSAL DONOR CELLS AND CHIMERIC MAMMALIAN HOSTS. 1991. 50



- Kwoh, D.Y., G.R. Davis, K.M. Whitfield, H.L. Chappelle, 等 1989. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:1173-7.
- 米国特許. 5,223,409. Directed evolution of novel binding proteins. 1993.
- Lakso, M., B. Sauer, B. Mosinger, E.J. Lee, 等. 1992. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:6232-6. 10
- Lam, K.S. 1997. Application of combinatorial library methods in cancer research and drug discovery. *Anticancer Drug Design*. 12:145-167.
- Lam, K.S., S.E. Salmon, E.M. Hershey, V.J. Hruby, 等. 1991. General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Nature*. 354:82-84. 20
- Landegren, U., R. Kaiser, J. Sanders, 及び L. Hood. 1988. A ligase-mediated gene detection technique. *Science*. 241:1077-80.
- 国際公開第 90/11354号 Process for the specific replacement of a copy of a gene present in the receiver genome via the integration of a gene. 1990.
- Leahy, K.P., K.J. Davies, M. Dull, J.J. Kort, 等 1999. adapt78, a stress-inducible mRNA, is related to the glucose-regulated protein family of genes. *Arch Biochem Biophys*. 368:67-74. 30
- 米国特許. 4,736,866号 Transgenic non-human animals. 1988.
- Leduc, N.等 1996. Isolated maize zygotes mimic in vivo embryogenic development and express microinjected genes when cultured in vitro. *Dev. Biol*. 10:190-203.
- Lee, J.S., D.A. Johnson, 及び A.R. Morgan. 1979. Complexes formed by (pyrimidine)n.(purine)n DNAs on lowering the pH are three-stranded. *Nucleic Acids Res*. 6:3073-91. 40
- Lee, V.H.L. 1990. Peptide and protein drug delivery. Marcel Dekker, New York, NY.
- Lemaitre, M., B. Bayard, 及び B. Lebleu. 1987. Specific antiviral activity of a poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84:648-52. 50

Lemischka, I.R., D.H. Raulet, 及び R.C. Mulligan. 1986. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell*. 45:917-927.

Letsinger, R.L., G.R. Zhang, D.K. Sun, T. Ikeuchi, 等. 1989. Cholesteryl-conjugated oligonucleotides: synthesis, properties, and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:6553-6.

10

Li, E., T.H. Bestor, 及び R. Jaenisch. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 69:915-26.

Li, J.M., J.S. Han, Y. Huang, P.K. Tain, 等 1999. A novel gene delivery system targeting cells expressing VEGF receptors. *Cell Res*. 9:11-25.

Linder, M.W., R.A. Prough, 及び R. Valdes. 1997. Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. *Clin Chem*. 43:254-66.

20

Lipshutz, R.J., S.P. Fodor, T.R. Gingeras, 及び D.J. Lockhart. 1999. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet*. 21:20-4.

Littlefield, J.W. 1964. Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science*. 145:709-710.

30

Lizardi, P.M., C.E. Guerra, Hi Lomeli, I. Tussie-Luna, 等 1988. Exponential amplification of recombinant-RNA hybridization probes. *Biotechnology*. 6:1197-1202.

Lohi, J., I. Leivo, J. Oivula, V.P. Lehto, 等 1998. Extracellular matrix in renal cell carcinomas. *Histol Histopathol*. 13:785-96.

Lonberg, N., 及び D. Huszar. 1995. Human antibodies from transgenic mice. *Int Rev Immunol*. 13:65-93.

40

Lonberg, N., L.D. Taylor, F.A. Harding, M. Trounstine, 等 1994. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications [コメント参照]. *Nature*. 368:856-9.

Lopata, M.A., D.W. Cleveland, 及び B. Sollner-Webb. 1984. High-level expression of a chloramphenicol acetyltransferase gene by DEA Edextran-mediated DNA transfection coupled with a dimethylsulfoxide or glycerol shock

50

- k treatment. *Nucleic Acids Research*. 12:5707.
- Luckow, V.A. 1991. Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. In *Recombinant DNA technology and applications*. A. Prokop, R.K. Bajpai, 及び C. Ho, editors. McGraw-Hill, New York. 97-152.
- Madura, K., R.J. Dohmen, 及び A. Varshavsky. 1993. N-recognin/Ubc2 interactions in the N-end rule pathway. *J Biol Chem*. 268:12046-54. 10
- Maher, L.J. 1992. DNA triple-helix formation: an approach to artificial gene repressors? *Bioessays*. 14:807-15.
- Majewski, M., M. Nieborowska-Skorska, P. Salomoni, A. Slupianek, 等. 1999. Activation of mitochondrial Raf-1 is involved in the antiapoptotic effects of Akt. *Cancer Res*. 59:2815-9. 20
- Mak, I.T., P. Boehme, 及び W.B. Weglicki. 1995. Protective effects of calcium channel blockers against free radical-impaired endothelial cell proliferation. *Biochem Pharmacol*. 50:1531-4.
- Mandel, M., 及び A. Higa. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. biol*. 53:159-162.
- Marasco, W.A., W.A. Haseltine, 及び S.Y. Chen. 1993. Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:7889-93. 30
- Marks, J.D., A.D. Griffiths, M. Malmqvist, T.P. Clackson, 等. 1992. By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology (NY)*. 10:779-83.
- Marks, J.D., H.R. Hoogenboom, T.P. Bonner, J. McCafferty, 等. 1991. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol*. 222:581-97. 40
- Martin, F.J., 及び D. Papahadjopoulos. 1982. Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting. *J Biol Chem*. 257:286-8.
- Marzo, I., C. Brenner, 及び G. Kroemer. 1998. 50

The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. Biomed Pharmacother. 52:248-51.

Masood, R., J. Cai, T. Zheng, D.L. Smith, 等 1997. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma. Proc Natl Acad Sci USA. 94:979-84.

Maxam, A.M., 及び W. Gilbert. 1977. A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci USA. 74:560-4

Migdal, M., B. Huppertz, S. Tessler, A. Comforti, 等 1998. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. J Biol Chem. 273:22272-8.

Miller, A.D., 及び C. Buttimore. 1986. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. Mol. Cell Biol 6:2895-2902.

Miller, L.K. 1988. Baculoviruses as gene expression vectors. Annu. Rev. Microbiol. 42:177-199.

Milstein, C., 及び A.C. Cuello. 1983. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. Nature. 305:537-40.

米国特許 5,459,039号 Methods for mapping genetic mutations. 1995.

EP 233838. NEURITE-PROMOTING FACTOR AND PROCESS FOR THE MANUFACTURE THEREOF. 1990.

Morita, T., M. Yoshizumi, H. Kurihara, K. Maemura, 等. 1993. Shear stress increases heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA levels in human vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 197:256-62.

Morrison, S.L., L. Wims, S. Wallick, L. Tan, 等. 1987. Genetically engineered antibody molecules and their application. Ann NY Acad Sci. 507:187-98.

米国特許 4,683,202号 Process for amplifying nucleic acid sequences. 1987.

米国特許 4,683,195号 Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences. 1987.

Munson, P.J., 及び D. Rodbard. 1980. Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. Anal Biochem. 107:220-39.

10

20

30

40

50

- Myers, R.M., Z. Larin, 及び T. Maniatis. 1985. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes. *Science*. 230:1242-6.
- 米国特許 5,328,470号 Treatment of diseases by site-specific instillation of cells or site-specific transformation of cells and kits therefor. 1994.
- Naeve, C.W., G.A. Buck, R.L. Niece, R.T. Ponn, 等. 1995. Accuracy of automated DNA sequencing: a multi-laboratory comparison of sequencing results. *Biotechniques*. 19:448-53. 10
- Nakai, K., 及び P. Horton. 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci*. 24:34-6.
- Nakazawa, H., D. English, P.L. Randell, K. Nakazawa, 等 1994. UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:360-4. 20
- Nauert, J.B., T.M. Klauck, L.K. Langeberg, 及び J.D. Scott. 1997. Gravin, an autoantigen recognized by serum from myasthenia gravis patients, is a kinasescaffold protein. *Curr Biol*. 7:52-62.
- Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, 及び P.H. Hofschneider. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J*. 1:841-845. 30
- Nicosia, R.F., E. Bonanno, M. Smith, 及び P. Yurchenco. 1994. Modulation of angiogenesis in vitro by laminin-entactin complex. *Dev Biol*. 164:197-206.
- O'Gorman, S., D.T. Fox, 及び G.M. Wahl. 1991. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science*. 251:1351-5.
- Oivula, J., J. Lohi, T. Tani, L. Kangas, 等 1999. Renal cell carcinomas and pancreatic adenocarcinomas produce nidogen in vitro and in vivo. *J Pathol*. 187:455-61. 40
- Okano, H., J. Aruga, T. Nakagawa, C. Shiota, 等 1991. Myelin basic protein gene and the function of antisense RNA in its repression in myelin-deficient mutant mouse. *J Neurochem*. 56:560-7.
- O'Reilly, D.R., L.K. Miller, 及び V.A. Luckow. 1992. Baculovirus expression vectors. W. 50

- H. Freeman and Company, New York.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, 等. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:2766-70.
- Ou-Lee, T.M., R. Turgeon, 及び R. Wu. 1986. Uptake and expression of a foreign gene linked to either a plant virus or *Drosophila* promoter in protoplasts of rice, wheat and sorghum. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*. 83:6815-6819. 10
- Palmer, T.D., R.A. Hock, W.R.A. Osborne, 及び A.D. Miller. 1987. Efficient retrovirus-mediated transfer and expression of a human adenosine deaminase gene in diploid skin fibroblasts from an adenosine-deficient human. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*. 84:1055-1059.
- Pear, W., G. Nolan, M. Scott, 及び D. Baltimore. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*. 90:8392-8396. 20
- Peng, Y., E.J. Schwarz, M.A. Lazar, A. Genin, 等 1997. Cloning, human chromosomal assignment, and adipose and hepatic expression of the CL-6/INSIG1 gene. *Genomics*. 43:278-84.
- Perry-O'Keefe, H., X.W. Yao, J.M. Coull, M. Fuchs, 等 1996. Peptide nucleic acid pre-gel hybridization: an alternative to southern hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:14670-5. 30
- Petersen, K.H., D.K. Jensen, M. Egholm, O. Buchardt, 等 1976. A PNA-DNA linker synthesis of N-((4,4'-dimethoxytrityloxy)ethyl)-N-(thymine-1-ylacetyl)glycine. *Biorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 5:1119-1124.
- Potter, H. 1988. Electroporation in biology: Methods, applications, and instrumentation. *Analytical Biochemistry*. 174:361-373. 40
- Potter, H., L. Weir, 及び P. Leder. 1984. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:7161-7165.
- Presta, L.G. 1992. Antibody engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 3:394-8.
- Prosser, J. 1993. Detecting single-base mutations. *Trends* 50

ds Biotechnol. 11:238-46.

Radisky, D.C., W.B. Snyder, S.D. Emr, 及び J. Kaplan. 1997. Characterization of VPS41, a gene required for vacuolar trafficking and high-affinity iron transport in yeast. Proc Natl Acad Sci USA. 94:5662-6.

Rassoulzadegan, M., B. Binetruy, 及び F. Cuzin. 1982. High frequency of gene transfer after fusion between bacteria and eukaryotic cells. Nature. 295:257.

10

Reisfeld, R.A., 及び S. Sell. 1985. Monoclonal antibodies and cancer therapy: Proceedings of the Roche-UCLA symposium held in Park City, Utah, January 26-February 2, 1985. Alan R. Liss, New York. 609 pp.

Rhodes, C.A., D.A. Pierce, I.J. Mettler, D. Mascarenhas, 等 1988. Genetically transformed maize plants from protoplasts. Science. 240:204-207.

Riechmann, L., M. Clark, H. Waldmann, 及び G. Winter. 1988. Reshaping human antibodies for therapy. Nature. 332:323-7.

20

Risau, W. 1995. Differentiation of endothelium. Faseb J. 9:926-33.

Risau, W., 及び I. Flamme. 1995. Vasculogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol. 11:73-91.

Rose, J.K., L. Buonocore, 及び M. Whitt. 1991. A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. BioTechniques. 10:520-525.

30

Rossi, J.J. 1994. Practical ribozymes. Making ribozymes work in cells. Curr Biol. 4:469-71.

Rossiter, B.J., 及び C.T. Caskey. 1990. Molecular scanning methods of mutation detection. J Biol Chem. 265:12753-6.

米国特許 5,871,697号 Method and apparatus for identifying, classifying, or quantifying DNA sequences in a sample without sequencing. 1999.

40

米国特許. 5,283,317. Intermediates for conjugation of polypeptides with high molecular weight polyalkylene glycols. 1994.

Saiki, R.K., T.L. Bugawan, G.T. Horn, K.B. Mullis, 等. 1986. Analysis of enzymatically amplified -globin and HLA-DQ DNA with allele-specific oligonucleotide probes. Nature. 324:163-6.

Saiki, R.K., P.S. Walsh, C.H. Levenson, 及び H.A. Erlich. 1989. Genetic analysis of ampl

50

- ified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:6230-4.
- Saleeba, J.A., 及び R.G. Cotton. 1993. Chemical cleavage of mismatch to detect mutations. *Methods Enzymol*. 217:286-95.
- Sambrook, J. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. Sandri-Goldin, R. M.; A.L. Goldin, J.C. Glorioso, 及び M. Levine. 1981. High-frequency transfer of cloned herpes simplex virus type I sequences to mammalian cells by protoplast fusion. *Mol. Cell Biol*. 1:7453-752.
- Sanger, F., S. Nicklen, 及び A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74:5463-7.
- Sato, N., K. Kokame, K. Shimokado, H. Kato, 等 1998. Changes of gene expression by lysophosphatidylcholine in vascular endothelial cells: 12 up-regulated distinct genes including 5 cell growth-related, 3 thrombosis-related, and 4 others. *J Biochem (Tokyo)*. 123:1119-26.
- Saunders, J.A., B.F. Matthews, 及び P.D. Miller. 1989. Plant gene transfer using electrofusion and electroporation. In *Electroporation and electrofusion in cell biology*. E. Neumann, A.E. Sowers, 及び C.A. Jordan, editors. Plenum Press, New York. 343-354.
- Schade, R., C. Staak, C. Hendriksen, M. Erhard, 等. 1996. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop. *Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)*. 24:925-934.
- Schaffner, W. 1980. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77:2163.
- Schook, L.B. 1987. Monoclonal antibody production techniques and applications. Marcel Dekker, Inc., New York. 336 pp.
- Scimeca, J.C., M.J. Servant, J.O. Dyer, 及び S. Meloche. 1997. Essential role of calcium in the regulation of MAP kinase phosphatase-1 expression. *Oncogene*. 15:717-25.
- Scott, J.K., 及び G.P. Smith. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*. 249:386-90.
- Selden, R.F., K. Burke-Howie, M.E. Rowe, H.



- M. Goodman, 等. 1986. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Molecular and Cellular Biology*. 6:3173 - 3179.
- Shalaby, F., J. Rossant, T.P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, 等 1995. Failure of blood-islet and formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 376:62 - 6.
- Shalaby, M.R., H.M. Shepard, L. Presta, M.L. Rodrigues, 等 1992. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *J Exp Med*. 175:217 - 25.
- Shigekawa, K., 及び W.J. Dower. 1988. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques*. 6:742 - 751.
- Shih, M., F. Lin, J.D. Scott, H.Y. Wang 等 1999. Dynamic complexes of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors with protein kinases and phosphatases and the role of gravin. *J Biol Chem*. 274:1588 - 95.
- Shillito, R. 1999. Methods of genetic transformations: Electroporation and polyethylene glycol treatment. In *Molecular improvement of cereal crop*. I. Vasil, editor. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. 9 - 20.
- Shilo, B.Z., 及び R.A. Weinberg. 1981. DNA sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78:6789 - 92.
- Shimkets, R.A., D.G. Lowe, J.T. Tai, P. Seh1, 等. 1999. Gene expression analysis by transcript profiling coupled to a gene database query. *Nat Biotechnol*. 17:798 - 803.
- Shopes, B. 1992. A genetically engineered human IgG mutant with enhanced cytolytic activity. *J Immunol*. 148:2918 - 22.
- Shridhar, R., V. Shridhar, S. Rivard, J.M. Siegfried, 等. 1996a. Mutations in the arginine-rich protein gene, in lung, breast, and prostate cancers, and in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res*. 56:5576 - 8.
- Shridhar, V., S. Rivard, R. Shridhar, C. Mullins, 等 1996b. A gene from human chromosomal band 3p21.1 encodes a highly conserved arginine-rich protein and is mutated in renal

- l cell carcinomas. *Oncogene*. 12:1931-9.
- Shridhar, V., S. Rivard, X. Wang, R. Shridhar, 等. 1997. Mutations in the arginine-rich protein gene (ARP) in pancreatic cancer. *Oncogene*. 14:2213-6.
- Simonsen, C.C., 及び A.D. Levinson. 1983. Isolation and expression of an altered mouse dihydrofolate reductase cDNA. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*. 80:2495-2499.
- Singer-Kruger, B., 及び S. Ferro-Novick. 1997. Use of a synthetic lethal screen to identify yeast mutants impaired in endocytosis, vacuolar protein sorting and the organization of the cytoskeleton. *Eur J Cell Biol*. 74:365-75. 10
- Smith-Swintosky, V.L., S. Zimmer, J.W. Fenton, 及び M.P. Mattson. 1995. Protease nexin-1 and thrombin modulate neuronal  $Ca^{2+}$  homeostasis and sensitivity to glucose deprivation-induced injury. *J Neurosci*. 15:5840-50 20
- 米国特許 5,272,057号 Method of detecting a predisposition to cancer by the use of restriction fragment length polymorphism of the gene for human poly (ADP-ribose) polymerase. 1993.
- Southern, P.J., 及び P. Berg. 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Gen.* 1:327-341. 30
- Speirs, V., 及び S.L. Atkin. 1999. Production of VEGF and expression of the VEGF receptors Flt-1 and KDR in primary cultures of epithelial and stromal cells derived from breast tumours. *Br J Cancer*. 80:898-903.
- Sreekrishna, K., R.H. Potenz, J.A. Cruze, W.R. McCombie, 等 1988. High level expression of heterologous proteins in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Basic Microbiol*. 40 28:265-78.
- Stein, C.A., 及び J.S. Cohen. 1988. Oligodeoxynucleotides as inhibitors of gene expression: a review. *Cancer Res*. 48:2659-68.
- Stevenson, G.T., A. Pindar, 及び C.J. Slade. 1989. A chimeric antibody with dual Fc regions (bisFabFc) prepared by manipulations at the IgG hinge. *Anticancer Drug Des*. 3:219-30.
- Suresh, M.R., A.C. Cuello, 及び C. Milstein. 50

1986. Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas. *Methods Enzymol.* 121: 210-28.
- Takemura, T., S. Hino, Y. Murata, H. Yanagida, 等 1999. Coexpression of CD9 augments the ability of membrane-bound heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (proHB-EGF) to preserve renal epithelial cell viability. *Kidney Int.* 55: 71-81.
- Takemura, T., S. Kondo, T. Homma, M. Sakai, 等. 1997. The membrane-bound form of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor promotes survival of cultured renal epithelial cells. *J Biol Chem.* 272: 31036-42. 10
- Thomas, K.R., 及び M.R. Capecchi. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.* 51: 503-12.
- Thompson, J.A. 等 1995. Maize transformation utilizing silicon carbide whiskers: A review. *Euphytica.* 85: 75-80. 20
- Tilburn, J., C. Scazzocchio, G.G. Taylor, J.H. Zabicky-Zissman, 等. 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene.* 26: 205-21.
- Touraev, A. 等 1997. Plant male germ line transformation. *Plant J.* 12: 949-956.
- Traunecker, A., F. Oliveri, 及び K. Karjalainen. 1991. Myeloma based expression system for production of large mammalian proteins. *Trends Biotechnol.* 9: 109-13. 30
- Trick, H.N. 等 1997. Recent advances in soybean transformation. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* 3: 9-26.
- Tuerk, C., 及び L. Gold. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 249: 505-10.
- Turner, D.L., E.Y. Snyder, 及び C.L. Cepko. 1990. Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron.* 4: 833-845. 40
- Tutt, A., G.T. Stevenson, 及び M.J. Glennie. 1991. Trispecific F(ab')<sub>3</sub> derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells. *J Immunol.* 147: 609.
- Van Belle, E., L. Maillard, F.O. Tio, 及び J.M 50

- . Isner . 1997 . Accelerated endothelialization by local delivery of recombinant human vascular endothelial growth factor reduces in-stent intimal formation . Biochem Biophys Res Commun . 235 : 311 - 6 .
- van der Krol , A . R . , J . N . Mol , 及び A . R . Stuitje . 1988a . Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences . Biotechniques . 6 : 958 - 76 .
- van der Krol , A . R . , J . N . Mol , 及び A . R . Stuitje . 1988b . Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences . Biotechniques . 6 : 958 - 76 . 10
- Verhoeyen , M . , C . Milstein , 及び G . Winter . 1988 . Reshaping human antibodies : grafting an antilysozyme activity . Science . 239 : 1534 - 6 .
- Vinante , F . , A . Rigo , E . Papini , M . A . Cassatella , 等 . 1999 . Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor/diphtheria toxin receptor expression by acute myeloid leukemia cells . Blood . 93 : 1715 - 23 . 20
- Vitetta , E . S . , R . J . Fulton , R . D . May , M . Till , 等 . 1987 . Redesigning nature's poisons to create anti-tumor reagents . Science . 238 : 1098 - 104 .
- 米国特許 4 , 873 , 191号 Genetic transformation of zygotes . 1989 .
- Warren , R . S . , H . Yuan , M . R . Matli , N . A . Gillett , 等 . 1995 . Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis . J Clin Invest . 95 : 1789 - 97 . 30
- Wells , J . A . , M . Vasser , 及び D . B . Powers . 1985 . Cassette mutagenesis : an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites . Gene . 34 : 315 - 23 .
- Whitt , M . A . , L . Buonocore , J . K . Rose , V . Ciccarone , 等 . 1990 . TransfectACE reagent promotes transient transfection frequencies greater than 90% . Focus . 13 : 8 - 12 . 40
- Wigler , M . , A . Pellicer , S . Silverstein , 及び R . Axel . 1978 . Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor . Cell . 14 : 725 .
- Wilkinson , M . G . , 及び J . B . Millar . 2000 . Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways . Faseb J . 14 : 2147 - 57 .

- Williams, D.A., I.R. Lemischka, D.G. Nathan, 及び R.C. Mulligan. 1984. Introduction of a new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. *Nature*. 310:476-480.
- Wilmut, I., A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind, 等. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385:810-3.
- Winter, C., J. Schenkel, M. Zimmermann, 及び T. Herdegen. 1998. MAP kinase phosphatase 1 is expressed and enhanced by FK506 in surviving mamillary, but not degenerating nigral neurons following axotomy. *Brain Res.* 801:198-205. 10
- Wolff, E.A., G.J. Schreiber, W.L. Cosand, 及び H.V. Raff. 1993. Monoclonal antibody homodimers: enhanced antitumor activity in nude mice. *Cancer Res.* 53:2560-5.
- Wong, T.K., 及び E. Neumann. 1982. Electric field mediated gene transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 107:584-587. 20
- Wyborski, D.L., L.C. DuCoeur, 及び J.M. Short. 1996. Parameters affecting the use of the lac repressor system in eukaryotic cells and transgenic animals. *Environ Mol Mutagen.* 28:447-58.
- Wyborski, D.L., 及び J.M. Short. 1991. Analysis of inducers of the E.coli lac repressor system in mammalian cells and whole animals. *Nucleic Acids Res.* 19:4647-53. 30
- Xu, X., D. Yang, T. Wyss-Coray, J. Yan, 等. 1999. Wild-type but not Alzheimer-mutant amyloid precursor protein confers resistance against p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:7547-52.
- Yang, S., J. Graham, J.W. Kahn, E.A. Schwartz, 等. 1999. Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. *Am J Pathol.* 155:887-95. 40
- Yang, Y., L. Martin, F. Cuzin, M.G. Mattei, et al. 1996. Genomic structure and chromosomal localization of the mouse CDEI-binding protein CDEBP (APLP2) gene and promoter sequences. *Genomics*. 35:24-9.
- Yelton, M.M., J.E. Hamer, 及び W.E. Timberlake. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proc Natl Aca* 50

d Sci USA. 81:1470-4.

Yuan, F., Y. Chen, M. Dellian, N. Safabakhsh, 等 1996. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. Proc Natl Acad Sci USA. 93:14765-70.

Zervos, A.S., J. Gyuris, and R. Brent. 1993. Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. Cell. 72:223-32. 10

Zhou, G. 等 1983. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. Methods Enzymol. 101:433-481.

Zoller, M.J., 及び M. Smith. 1987. Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template. Methods Enzymol. 154:329-50. 20

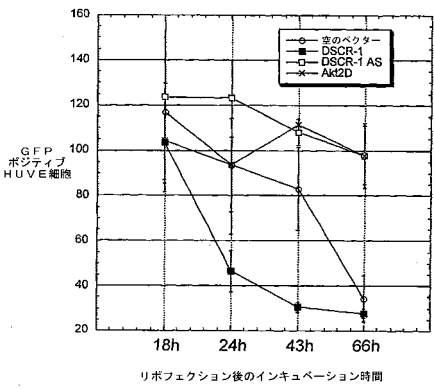
Zon, G. 1988. Oligonucleotide analogues as potential chemotherapeutic agents. Pharm Res. 5:539-49.

Zuckermann, R.N., E.J. Martin, D.C. Spellmeyer, G.B. Stauber, 等 1994. Discovery of nanomolar ligands for 7-transmembrane G-protein-coupled receptors from a diverse N-(substituted)glycine peptoid library. J Med Chem. 37:2678-85.

【図面の簡単な説明】 30

【図1】本発明に係る様々な遺伝子の形質移入後の、ヒト臍帯内皮細胞の生存を示す。

【図 1】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
27 September 2001 (27.09.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 01/70174 A2**

- (51) International Patent Classification: **A61K** (74) Agent: RAUCH, Paul, E.; Brinks Hofer Gilson & Lione, P.O. Box 10087, Chicago, IL 60610 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/09043
- (22) International Filing Date: 21 March 2001 (21.03.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/191,201 21 March 2000 (21.03.2000) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): CURAGEN CORPORATION [US/US]; 11th Floor, 555 Long Wharf Drive, New Haven, CT 06511 (US). GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): RASTELLI, Luca, K. [US/US]; 52 Pepperbush Lane, Guilford, CT 06437 (US). GERBER, Hans-Peter [US/US]; Apartment No. 5, 1121 Tennessee Street, San Francisco, CA 94107 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/70174 A2

(54) Title: VEGF-MODULATED GENES AND METHODS EMPLOYING THEM

(57) Abstract: The present invention provides methods for modulating angiogenesis and/or apoptosis comprising modulating the activity of at least one VEGF-modulated gene polypeptide. The invention also provides pharmaceutical compositions for modulating angiogenesis and apoptosis for the prevention or treatment of diseases associated with VEGF-modulated genes expression. The invention also provides diagnostic assays that use VEGF-modulated gene polynucleotides that hybridize with naturally occurring sequences encoding VEGF-modulated genes and antibodies that specifically bind to the protein. The invention also provides novel human and mouse arginine-rich proteins (ARPs) and nucleotide sequences. The invention provides for genetically engineered expression vectors and host cells comprising the nucleic acid sequence encoding ARPs and for a method for producing the protein.



WO 01/70174

PCT/US01/09043

**VEGF-MODULATED GENES AND METHODS EMPLOYING THEM****RELATED APPLICATIONS**

This application claims priority to U.S. provisional application Serial No.  
5 60/191,201 filed 03/21/2000.

**BACKGROUND**

Cities have roads and alleys, plants have xylem and phloem, and people have  
10 arteries, veins and lymphatics. Without these byways, the vertebrate animal cells  
would starve or drown in their metabolic refuse. Not only do blood vessels deliver  
food and oxygen and carry away metabolic wastes, but they also transport signaling  
substances that apprise cells of situations remote to them but to which they need to  
respond. Hormonal messages are a common signal.

15 All blood vessels are ensheathed by a basal lamina and a delicate monolayer  
of remarkably plastic endothelial cells lining the luminal walls. Depending on  
location and function, smooth muscle and connective tissue may also be present.

Not only do healthy cells depend on the blood resources transported by the  
circulatory system, but so, too, unwanted cells: tumorigenic and malignant cells.  
20 These cells colonize and proliferate if they are able to divert blood resources to  
themselves. Angiogenesis, the type of blood vessel formation where new vessels  
emerge from the proliferation of preexisting vessels (Risau, 1995; Risau and Flamme,  
1995), is exploited not only by usual processes, such as in wound healing or  
myocardial infarction repair, but also by tumors themselves and in cancers, diabetic  
25 retinopathy, macular degeneration, psoriasis, and rheumatoid arthritis. Regardless of  
the process, whether pathological or usual physiological, endothelial cells mediate  
angiogenesis in a multi-step fashion: (1) endothelia receive an extracellular cue, (2)  
the signaled cells breach the basal lamina sheath, abetted by proteases they secrete,  
(3) the cells then migrate to the signal and proliferate, and finally, (4) the cells form a  
30 tube, a morphogenic event (Alberts *et al.*, 1994). The complexity of this process  
indicates complex changes in cellular physiology and morphology, gene expression,  
and signaling. Angiogenic accomplices that are cues include basic fibroblast growth

WO 01/70174

2

PCT/US01/09043

factors (bFGF), angiopoietins (such as ANG1) and various forms of vascular endothelial growth factor (VEGF).

VEGF is a multifunctional mitogen that is secreted by many cells, including tumor cells (Ferrara, 1999b). Vascular endothelial cells (VECs) are responsive to VEGF, using two receptors: (1) kinase insert domain-containing receptor/fetal liver kinase 1 (KDR/Flk-1; VEGFR1), and (2) Fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1; VEGFR-2) (Warren *et al.*, 1995). These receptors have different affinities for VEGF and appear to have different cellular responses (Athanasias and Lala, 1998; Li *et al.*, 1999). VEGFR1 and VEGFR-2 null mice die early during embryogenesis (Fong *et al.*, 1995; Shalaby *et al.*, 1995). From these knockout studies, VEGFR1 is necessary for blood island formation and the development of haematopoietic progenitors (Shalaby *et al.*, 1995), while VEGFR-2 is required for organizing embryonic vasculature (Fong *et al.*, 1995). Of these two receptors, VEGFR1 mediates the full spectrum of VEGF's biological effects, including mitogenesis, vasodilation, and tumor vascularization (Ferrara, 1999a), while VEGFR-2 promotes endothelial survival (Carmeliet *et al.*, 1999).

The molecular events and the order in which they occur and the pathways that are required for this process are of fundamental importance to understand angiogenesis. *In vitro* models are useful for identifying alterations in gene expression that occur during angiogenesis. A particularly fruitful model systems involves the suspension in a three-dimensional type I collagen gel and various stimuli, such as phorbol myristate acetate (PMA), basic fibroblast growth factor (bFGF), and VEGF. The combination of the stimuli and the collagen gel results in the formation of a three-dimensional tubular network of endothelial cells with interconnecting lumens structures. In this model, endothelial differentiation into tubelike structures is completely blocked by inhibitors of new mRNA or protein synthesis. Furthermore, the cells progress through differentiation in a coordinated and synchronized manner, thus optimizing the profile of gene expression (Kahn *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1999).

VEGF and VEGFR-2 ensure endothelial cell survival. In the developing retina, capillaries disappear in response to hyperoxia (increase in oxygen/oxygen tension), correlating with an inhibition of VEGF secretion by neighboring cells. These vessels disappear by selective apoptosis of endothelial cells (Alon *et al.*, 1995).

WO 01/70174

3

PCT/US01/09043

Removing VEGF by using function-blocking anti-VEGF antibodies also causes blood vessels to regress, even tumor vasculature (Yuan *et al.*, 1996). The mechanisms that mediate VEGF's ability to promote cell survival involve VEGFR-2. Ligation of VEGFR-2 induces a complex of vascular endothelial (VE)-cadherin,  $\beta$ -catenin, 5 phosphoinositide-3-OH kinase (PI3-K), and VEGFR1. PI3-K phosphorylates and activates the serine/threonine protein kinase Akt (protein kinase B) (Carmeliet *et al.*, 1999). Activated Akt is necessary and sufficient to mediate VEGF-dependent survival signal (Gerber *et al.*, 1998).

Programmed cell death, apoptosis, and cell survival play crucial roles in 10 development, homeostasis, stress, and various pathologies. Apoptosis (as opposed to necrosis) is mediated by caspases. Caspases reside in healthy cells as inactive proenzymes, which are activated in response to pro-apoptotic stimuli. Mitochondria activate caspases by releasing cytochrome c into the cytosol, binding the adaptor molecule Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1). Apaf1 oligomerizes and 15 recruits and activates pro-caspase-9. Activated caspase-9 activates downstream caspases, and apoptosis has been initiated. Cytochrome c release may be released through mitochondrial permeability transition (PT) pores. Bcl-2, an anti-apoptosis inhibitor, prevents cytochrome c release by interacting with PT pores (Marzo *et al.*, 1998). VEGF induces expression of Bcl-2 in VECs, indicating that regulation of the 20 mitochondrial permeability is part of VEGF survival mechanism (Gerber *et al.*, 1998).

Tumor cells exploit angiogenesis to facilitate tumor growth. Hypoxia-- decreased levels of oxygen--induces tumor cells to secrete VEGF, promoting neovascularization. In addition to secreting VEGF, tumor cells, including hematopoietic cells (Bellamy *et al.*, 1999), breast cancer cells (Speirs and Atkin, 25 1999), and Kaposi's sarcoma (Masood *et al.*, 1997), express VEGFR1. VEGF can act both in a paracrine and autocrine fashion to stimulate endothelial proliferation and survival. The molecules that mediate neovascularization, in addition to VEGF and its receptors and that ultimately enable tumors to survive will be useful in diagnosis, characterization and ultimately in treatment of tumors.

30 Identifying genes that are modulated by VEGF is useful in not only understanding the complex endothelial responses, including cell differentiation, remodeling, *etc.*, but also in a variety of diagnostic and therapeutic applications. For

WO 01/70174

4

PCT/US01/09043

example, because mitochondrial cytochrome c release initiates apoptosis and the protective effect of VEGF in inhibiting such action, determining those genes that are modulated by VEGF is useful in controlling apoptosis therapeutically. Such genes and their proteins may be modulated, for example, by gene therapy methods, or the discovery of substances that act on the expression of the gene or the protein itself. Evaluating the expression of VEGF-modulated genes can be used to assess the metastatic potential of a tumor cell. Collections of endothelial-specific markers to assay for vascularization can be used to assay tumor growth. Various pathologies may be treated by exploiting VEGF-mediated angiogenesis.

10

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to several VEG genes that are differentially expressed in response to VEGF or related cytokines. These differentially expressed genes are collectively referred to as "VEGF-modulated genes" (VEGFmg) and are:

15

- 1) glia-derived neurite promoting factor (GDNPF)/nexin
- 2) tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI2)/placental protein 5 (PP5)
- 3) heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)
- 4) regulator of G-protein signaling-3 (RGS3)
- 5) myasthenia gravis (MG) autoantigen/gravin
- 6) MKP-1 like protein tyrosine phosphatase
- 7) amyloid precursor-like protein 2 (APLP2)/CEI-box binding protein
- 8) osteonidogen (nidogen-2 precursor)
- 9) amyloid precursor protein (APP)
- 10) Human gene similar to yeast VPS41 (hVPS41p)
- 11) arginine-rich protein (ARP)
- 12) Down's syndrome critical region protein-1 (DSCR1)
- 13) insulin induced gene-1 (INSIG1)
- 14) decidual protein induced by progesterone (DEPP)
- 15) cytochrome oxidase subunit I (MTCO1)
- 16) NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 (ND1)

WO 01/70174

5

PCT/US01/09043

17) NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 (ND4)

18) connective tissue growth factor (CTGF)

In a first aspect, the present invention is an isolated polypeptide having at least 80% sequence identity to the sequence SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:22, polynucleotides encoding the same, and antibodies that specifically bind the same.

5 In a second aspect, the present invention is an isolated polynucleotide having at least 80% sequence identity to the sequence SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:21, or a complement thereof.

In a third aspect, the present invention is a transgenic non-human animal, having a disrupted *arginine-rich protein (ARP)* gene or a transgenic non-human  
10 animal expressing an exogenous polynucleotide having at least 80% sequence identity to the sequence SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:21, or a complement of said polynucleotide.

In a fourth aspect, the present invention is a method of screening a sample for an ARP mutation

15 In a fifth aspect, the present invention is a method of modulating angiogenesis comprising modulating the activity of at least one VEGF-modulated gene polypeptide.

In a sixth aspect, the present invention is a method of increasing, as well as decreasing angiogenesis, comprising modulating the activity of at least one VEGF-modulated gene polypeptide. Activity modulation of VEGF-modulated gene  
20 polypeptides may be over-expressing or eliminating expression of the gene, or impairing a VEGF-modulated gene polypeptide's function by contact with specific antagonists or agonists, such as antibodies or aptamers.

25 In a seventh aspect, the present invention is a method of treating various pathologies, including tumors, cancers, myocardial infarctions and the like.

In an eighth aspect, the present invention is a method of measuring a VEGF-modulated gene transcriptional and translational up-regulation or down-regulation activity of a compound. In some embodiments, the compounds are calcium channel regulators.

WO 01/70174

PCT/US01/09043

6

In a ninth aspect, the invention is a method of screening a tissue sample for tumorigenic potential.

In a tenth aspect, the invention is a method of modulating cell survival by modulating the activity of at least one VEGF-modulated gene polypeptide.

5 In an eleventh aspect, the invention is a method of increasing, as well as decreasing cell survival, comprising modulating the activity of at least one VEGF-modulated gene polypeptide. Activity modulation of VEGF-modulated gene polypeptides may be over-expressing or eliminating expression of the gene, or impairing a VEGF-modulated gene polypeptide's function by contact with specific  
10 antagonists or agonists, such as antibodies or aptamers.

In a twelfth aspect, the invention is a method of treating tumors and cancers comprising decreasing cell survival by modulating VEGF-modulated genes. In one embodiment, the modulated gene is DSCR1.

15 In a thirteenth aspect, the invention is a method of determining the clinical stage of tumor which compares the expression of at least one VEGF-modulated gene in a sample with expression of said at least one gene in control samples. In other embodiments, the VEGF-modulated gene is DSCR1 and/or ARP.

In a fourteenth aspect, the invention is a method of determining if a tumor has a potential for metastasis by determining the clinical stage of the tumor.

20

Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, suitable methods and materials are described below. The materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

25

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING

FIG 1 Survival of human umbilical cord endothelial cells after transfection with various genes related to the present invention.

30

WO 01/70174

7

PCT/US01/09043

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Using amplification and an imaging approach called GeneCalling (Shimkets *et al.*, 1999), genes that are differentially expressed in endothelial cells stimulated by VEGF were identified. This method provides a comprehensive sampling of cDNA

5 populations in conjunction with the sensitive detection of quantitative differences in mRNA abundance for both known and novel genes (Shimkets *et al.*, 1999). In the instant invention, 18 differentially expressed genes are disclosed. Identification and differential expression of these genes is confirmed by a second independent method employing real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). In general,

10 the present invention relates VEGF-modulated genes to angiogenesis and cell survival.

*Definitions*

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms have the same meaning as is commonly understood by one of skill in the art to which this invention

15 belongs. The definitions below are presented for clarity.

The recommendations of (Demerec *et al.*, 1966) where these are relevant to genetics are adapted herein. To distinguish between genes (and related nucleic acids) and the proteins that they encode, the abbreviations for genes are indicated by

20 *italicized* (or underlined) text while abbreviations for the proteins start with a capital letter and are not italicized. Thus, *arginine rich protein* (*ARP*) or arginine rich protein (ARP) refers to the nucleotide sequence that encodes ARP. Likewise, *VEGFmg* represents the VEGF modulate genes nucleotide sequences and fragments, while VEGFmg refers to the encoded polypeptides and fragments.

25 "Isolated," when referred to a molecule, refers to a molecule that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials that interfere with diagnostic or therapeutic use.

"Survival" is a cell remaining alive and maintaining all or most of its

30 morphology and physiological activity, even under conditions of cellular stress, including serum starvation and hypoxia.

*Roles of VEGF-modulated genes in cells*

## 1. Apoptosis

Cell survival is impinged under stress, including oxidative stress and serum deprivation. VEGF stimulation appears to evoke a response similar to that of sub-lethal oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS). An important component of cell survival is mitochondrial respiration. Several VEGF-modulated genes of the instant invention, *e.g.* DSCR1, gravin, and HB-EGF, are also associated with ROS responses (Kayanoki *et al.*, 1999). In addition, VEGF administration down-regulates several mitochondrial genes (*e.g.* cytochrome c oxidase subunits and NADH-ubiquinone reductase chains 1, 4 and 5; Examples) and inhibits respiration.

Several observations support the cell survival role of VEGF-modulated genes of the instant invention and their link to mitochondrial respiration. Oxidative stress causes a general, calcium-dependent degradation of mitochondrial polynucleotides in HA-1 fibroblasts (Crawford *et al.*, 1998). When exposed to the anti-prostate cancer compound BMD188 apoptosis induction depends on the mitochondrial respiratory chain (Joshi *et al.*, 1999). Finally, mitochondrial Raf-1 is activated in response to Akt, which counteracts apoptosis (Majewski *et al.*, 1999).

All the genes whose differential expression was confirmed in the present disclosure and that potentially localize in the mitochondria are important components in cell survival based on the experiments disclosed herein. These genes include DSCR1, ARP, INSIG1 and DEPP represent important therapeutic targets. Over expression of DSCR1 was able to hasten apoptosis in human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs), while antisense DSCR1 expression promoted cell survival to similar levels as that of activated AKT expression (see Fig. 1).

Adherent cells that become detached from their substrates undergo apoptosis. If the substrate to which they bind, such as the medial and adventitial extracellular matrix layers of arterioles and venules, is defective or eliminated, cells die. These matrices are secreted in part by mesenchymal cells that are recruited by the endothelial cells during the course of angiogenesis. The growth factor, HB-EGF stimulates mesenchymal cell proliferation and migration, and, for example, promotes renal epithelial cell survival (Takemura *et al.*, 1997).



WO 01/70174

9

PCT/US01/09043

Serpin activity may prevent cell death in endothelia. During angiogenesis when endothelial cells are invading new unvascularized tissues and stroma, serine proteases having thrombin-like activity will be present. Nexin, a serpin, promotes neurite outgrowth and survival by blocking thrombin activity, a multifunctional serine protease that is produced at sites of tissue injury. Thrombin acts via a cell surface protease-activated receptor (PAR-1) and increases in intracellular free calcium levels ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (Smith-Swintosky *et al.*, 1995). The present invention demonstrates that serine protease inhibitors (serpins) nexin and placental protein 5 (PP5)/TFPI2 (TFPI2) are induced in response to VEGF. APP and APLP2 appear to play serpin-like roles since these membrane bound proteins can be processed endoproteolytically, yielding secreted forms with serpin-like properties.

*Description of genes differentially expressed and identified in the present invention*

Several genes are differentially expressed in VECs when contacted with VEGF or related cytokines, and can be divided into four general classes (Table 1). These genes are collectively referred to as "VEGF-modulated genes" (VEGFmgs), "the set of VEGF-modulated genes" or "genes responsive to VEGF". Furthermore, among the VEGF-modulated genes, a novel form of ARP is disclosed. The classes of Serpins, Regulators of G-protein-linked receptors and selected Mitochondrial proteins are especially preferred.

Table 1 VEGF modulated genes

Class	Members
<b>Serpins</b> (serine protease inhibitors)	1) nexin/glia-derived neurite promoting factor (GDNPF) 2) placental protein 5 (PP5)/tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI2) 3) amyloid precursor-like protein 2 (APLP2)/CE1-box binding protein 4) amyloid precursor protein (APP)
<b>Regulators of G-protein-linked receptors</b>	5) regulator of G-protein signaling-3 (RGS3) 6) gravin/myasthenia gravis (MG) autoantigen
<b>Mitochondrial proteins</b> (selected group)	7) arginine-rich protein (ARP) 8) Down's syndrome critical region protein-1 (DSCR1)
<b>Others</b>	9) Human gene similar to yeast VPS41 (hVPS41p) 10) insulin induced gene-1 (INSIG1) 11) decidual protein induced by progesterone (DEPP) 12) cytochrome oxidase subunit I (MTCO1) 13) NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 (ND1) 14) NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 (ND4) 15) heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) 16) MKP-1 like protein tyrosine phosphatase 17) osteonidogen (nidogen-2 precursor) 18) connective tissue growth factor (CTGF)

1. Serpins

WO 01/70174

11

PCT/US01/09043

Serpins are serine protease inhibitors; they may be secreted or membrane bound. VEGF-modulated serpins comprise nexin, PP5, APLP2, and APP.

(a) nexin/glia-derived neurite promoting factor (GDNPF)

- 5 Protease nexin I (PNI or PN1; GenBank A03911; SEQ ID NOS:4 and 5; (Monard *et al.*, EP 233838, 1990)) promotes neurite outgrowth and survival *in vitro* from neurons and astrocytes by eliminating thrombin's neurite-inhibitory activity. Nexin regulates thrombin's proteolytic activity by forming post-translational, covalent complexes with thrombin (Smith-Swintosky *et al.*, 1995). Thrombin, a  
10 multifunctional serine protease, is rapidly produced at sites of tissue injury and catalyzes the final steps in blood coagulation.

In the present invention GeneCalling™ analysis reveals that nexin is up-regulated in VEGF-stimulated endothelial cells at 24 hours (Example 1).

15 (b) Placental protein 5 (PP5)/TFPI2 (TFPI2)

- PP5/TFPI2 (SEQ ID NOS:6 and 7; GenBank NM\_006528, D29992) inhibits a number of blood coagulation and fibrinolysis serine proteases. In embryogenesis, PP5 is involved in trophoblast differentiation and helps maintain intervillous blood flow. PP5 is also frequently expressed in ovarian adenocarcinomas (Inaba *et al.*,  
20 1982). As PN1, PP5 acts by blocking thrombin's activity.

GeneCalling™ analysis found PP5 to be up-regulated in VEGF-stimulated endothelial cells at 24 hours (Example 1).

(c) Amyloid precursor-like protein 2 (APLP2)

- 25 The human amyloid precursor-like protein APLP2 (SEQ ID NOS:8 and 9; GenBank L27631) belongs to the Alzheimer peptide precursor (APP) family. While structurally related to amyloid precursor protein (APP), APLP2 functions differently. Like APP, APLP2 contains a transmembrane domain and a Kunitz type protease inhibitor domain; however, unlike APP, APLP2 binds DNA, recognizing the  
30 centromere DNA sequence element I (CDEI) motif (5'-GTCACATG-3'; SEQ ID NO:10) (Yang *et al.*, 1996).

WO 01/70174

12

PCT/US01/09043

APLP2 is likely an important component of the cell survival pathway. APLP2 expression is increased in PC12 neuronal cells that undergo apoptosis (Araki and Wurtman, 1998) and is predicted to be a protease inhibitor.

APLP2 was up-regulated in VEGF-stimulated endothelial cells at 24 hours.

5 This result was confirmed by Taqman™ analysis (See Examples).

(d) Amyloid precursor protein (APP)

Amyloid precursor protein (SEQ ID NOS:11 and 12; GenBank D87675) is a ubiquitously expressed, membrane spanning glycoprotein that is endoproteolytically  
10 processed yielding a secreted protein identical to protease nexin II (PN2) and an internalized 11.5 kDa, 100 residue C-terminal derivative (CTD). PN2 is an inhibitor of proteinases such as trypsin. APP is the source of the  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ), a 39-43 amino acid peptide that is the main component deposited in amyloid plaques in  
15 Alzheimer's Disease (AD). Neurons that express APP are protected from apoptosis (Xu *et al.*, 1999), although over-expression of APP in endothelia is toxic (Jahroudi *et al.*, 1998).

APP is down-regulated in VEGF-stimulated endothelial cells at 6 and 24 hours (Example 1).

20 2. *Regulator of G-protein signaling receptors*

Two regulators of G-protein signaling receptors are VEGF-modulated, comprising RGS3 and gravin.

(a) Regulator of G-protein signaling 3 (RGS3, RGP3)

25 Prolonged stimulation of signal transduction pathways decreases responsiveness. This desensitization occurs because MAP kinase activation by G-protein-linked receptors becomes impaired. RGS3 (SEQ ID NOS:13 and 14; GenBank U27655) encodes a homologue of Sst2p, a yeast gene that mediates desensitization (Druey *et al.*, 1996). RGS3 inhibits signal transduction by increasing  
30 the GTPase activity of G-protein  $\alpha$  subunits, driving them to the inactive GDP-bound form.

WO 01/70174

13

PCT/US01/09043

GeneCalling<sup>TM</sup> analysis (Example 1) reveals that RGS3 is up-regulated in VEGF-stimulated endothelial cells at 24 hours. *In situ* hybridization analysis reveals high expression in tumors and sarcomas, as well as in adult muscle cells (See Examples). RGS3 expression correlates with VEGF and VEGFR1 expression in  
 5 ovarian cancer, suggesting that signal transduction pathways are similar between endothelial and tumor cells.

(b) Gravin/myasthenia gravis (MG) autoantigen/A kinase-anchoring proteins (AKAP 250)

10 Gravin (SEQ ID NOS:15 and 16; GenBank U81607) belongs to the anchoring protein family and anchors both protein kinase A and C to their subcellular sites (Nauert *et al.*, 1997). Gravin is induced by oxidative response (Sato *et al.*, 1998), and mediates recovery from agonist-induced desensitization (Shih *et al.*, 1999), as does RGS3.

15 GeneCalling analysis (Example 1) reveals that gravin is up-regulated in VEGF-stimulated endothelial cells at 6 and 24 hours. *In situ* hybridization analysis also demonstrates high expression in fetal tissues and non-vascular tumor components, and lower expression in adult tissue and tumor vascular components. Gravin expression correlates with VEGF expression in ovarian cancer (Examples).

20

### 3. Mitochondrial proteins

#### (a) Arginine-rich protein (ARP)

The instant invention discloses novel arginine-rich protein nucleic acid and polypeptide sequences (SEQ ID NOS:2, 3, 21 and 22; Tables 2 and 3).

25 Previously described human ARP (SEQ ID NOS:1 (amino acid) and 17 (nucleotide); GenBank NM\_006010, M83751) maps to human chromosomal band 3p21, encoding a basic, 234 amino acid residue polypeptide. Highly conserved, ARP is found in all species examined, including hamster, rat, mouse, cow and yeast (Shridhar *et al.*, 1996a; Shridhar *et al.*, 1996b). ARP polymorphisms have been  
 30 sometimes observed to correlate with neoplasia (Evron *et al.*, 1997; Shridhar *et al.*, 1996a; Shridhar *et al.*, 1996b; Shridhar *et al.*, 1997).

WO 01/70174

14

PCT/US01/09043

While Shridar (Shridhar *et al.*, 1996a) was able to define a 1 kb mRNA clone for ARP, as well as a smaller form of about 850bp. Genomic sequence analysis and 5' RACE were used to establish the 5' region of this clone. Contrary, the instant invention defines (CuraGen assembly No. 78893638) only a C-terminal fragment of 185 amino acid residues of the sequence deposited in GenBank. The novel nucleotide sequence (SEQ ID NO:2) and the translation of the encoded polypeptide (SEQ ID NO:3) are shown in Tables 2 and 3. Although SEQ ID NO:1 is a hydrophobic polypeptide, predicted by PSORT (Nakai and Horton, 1999) to enter the nucleus (see Fig. 2A), SEQ ID NO:3 is more hydrophilic and predicted to be nuclear localized (see Fig. 2B). Other ARP sequences include a *Drosophila* ARP-like protein (SEQ ID NOS:18 and 19, Genbank AF132912).

**Table 2** Nucleotide sequence of novel human ARP (SEQ ID NO:2)

atgaggagga	tgaggaggat	gtgggccacg	caggggctgg	cggtgcgctg	ggctctgagc	60
gtgctgccgg	gcagccgggc	gctgcggcgg	ggcgactgcg	aagtttgtat	ttcttatctg	120
ggaagatttt	accaggacct	caaagacaga	gatgtcacat	tctcaccagc	cactattgaa	180
aacgaactta	taaagttctg	cgggaagca	agaggcaaa	agaatcggtt	gtgctactat	240
atcggggcca	cagatgatgc	agccacaaa	atcatcaatg	aggtatcaaa	gcctctggcc	300
caccacatcc	ctgtggagaa	gatctgtgag	aagcttaaga	agaaggacag	ccagatatgt	360
gagcttaagt	atgacaagca	gatcgacctg	agcacagtgg	acctgaagaa	gctccgagtt	420
aaagagctga	agaagattct	ggatgactgg	ggggagacat	gcaaaggctg	tgacagaaaag	480
tctgactaca	tcgggaagat	aaatgaactg	atgcctaaat	atgcccccaa	ggcagccagt	540
gcacogacog	attttagtgc	tgotcaatct	ctgttgccac	tgagggggaa	aaaacagtgc	600
aactgcttac	tcccaaaaca	gcotttttgt	aatttatatt	ttaagtgggc	tcctgacaat	660
actgtatcag	atgtgaagcc	tggagcttgc	ctgatgatgc	tggccctaca	gtaccccat	720
gaggggattc	ccttccttct	gttgctgggtg	tactctagga	cttcaaagtg	t	771

15

**Table 3** Amino acid sequence of novel human ARP (SEQ ID NO:3)

--

WO 01/70174

15

PCT/US01/09043

Met	Arg	Arg	Met	Arg	Arg	Met	Trp	Ala	Thr	Gln	Gly	Leu	Ala	Val	Ala	1	5	10	15
Leu	Ala	Leu	Ser	Val	Leu	Pro	Gly	Ser	Arg	Ala	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	20	25	30	
Cys	Glu	Val	Cys	Ile	Ser	Tyr	Leu	Gly	Arg	Phe	Tyr	Gln	Asp	Leu	Val	35	40	45	
Glu	Gly	Phe	Arg	Asp	Val	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Thr	Ile	Glu	Asn	Glu	50	55	60	
Leu	Ile	Lys	Phe	Cys	Arg	Glu	Ala	Arg	Gly	Lys	Glu	Asn	Arg	Leu	Cys	65	70	75	80
Tyr	Tyr	Ile	Gly	Ala	Thr	Asp	Asp	Ala	Ala	Thr	Lys	Ile	Ile	Asn	Glu	85	90	95	
Val	Ser	Lys	Pro	Leu	Ala	His	His	Ile	Pro	Val	Glu	Lys	Ile	Cys	Glu	100	105	110	
Lys	Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Ser	Gln	Ile	Cys	Glu	Leu	Lys	Tyr	Asp	Lys	115	120	125	
Gln	Ile	Asp	Leu	Ser	Thr	Val	Asp	Leu	Lys	Lys	Leu	Arg	Val	Lys	Glu	130	135	140	
Leu	Lys	Lys	Ile	Leu	Asp	Asp	Trp	Gly	Glu	Thr	Cys	Lys	Gly	Cys	Ala	145	150	155	160
Glu	Lys	Ser	Asp	Tyr	Ile	Arg	Lys	Ile	Asn	Glu	Leu	Met	Pro	Lys	Tyr	165	170	175	
Ala	Pro	Lys	Ala	Ala	Ser	Ala	Arg	Thr	Asp	Leu						180	185		

The present invention discloses a novel gene for murine ARP, assembled from EST sequences (SEQ ID NO:20; GenBank AI595930). The murine nucleotide sequence (SEQ ID NO:21) is shown in Table 4, and the translated polypeptide sequence it encodes (SEQ ID NO:22) is shown in Table 5.

**Table 4** Nucleotide sequence of novel murine ARP (SEQ ID NO:21)

ccgggtgcgg	ttcattcgcg	cggcatccgg	cggtggtgga	gacggctgag	gaggatgtgg	60
gctacgcgcg	ggctggcggt	acgtggccc	tgagcgtgct	gcctgacagc	cgggcgctgc	120
ggccaggaga	ctgtgaagtt	tgtatttctt	atctgggacg	atttaccag	gacgtcaaag	180
acagagatgt	cacattttca	ccagccacta	ttgaagaaga	acttataaag	ttttgccgtg	240

WO 01/70174

16

PCT/US01/09043

aagcaagagg	caaagagaat	cgggtgtgct	actacattgg	agccacagat	gatgctgcca	300
ccaagatcat	caatgaggtg	tcgaagcccc	tggcccacca	tatccctgtg	gaaaagatct	360
gtgagaagct	gaagaagaaa	gacagccaga	tctgtgaact	aaaatacgac	aagcagattg	420
acctgagcac	agtggaacctg	aagaagctcc	gggtgaaaga	gctgaagaag	atcctggacg	480
actgggggga	gatgtgcaaa	ggctgtgcag	aaaagtctga	ctatatccgg	aagataaatg	540
aactgatgcc	taaatacgcc	ccaaggcag	ccagcgcaag	gactgatctg	tagtctgccc	600
aattcctgct	gcacctgaag	gggaaaaagc	agtttatctg	tctcttcccc	aaataacct	660
tttgtaat	ttttttaag	cgggctcctg	acaatgagat	gtgaacctag	agctttccta	720
gtgatgtggt	ttttgcagtt	ccctcttgcc	catccocgag	tggggacaat	ttcccatcc	780
ccaagtgggt	acaatttact	tccttcttgg	ctggtttact	ctaggacttc	aaagtttgtc	840
tgggattttt	ttattaaaaa	aaattgtctt	tggagagtta	aaaaaaaaaa		890

Table 5 Amino acid sequence novel murine ARP (SEQ ID NO:22)

Gly	Cys	Gly	Ser	Phe	Ala	Arg	His	Pro	Ala	Val	Val	Glu	Thr	Ala	Glu
1				5				10						15	
Glu	Asp	Val	Gly	Tyr	Ala	Arg	Ala	Gly	Gly	Thr	Leu	Ala	Leu	Ser	Val
		20						25					30		
Leu	Pro	Asp	Ser	Arg	Ala	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Cys	Glu	Val	Cys	Ile
		35					40					45			
Ser	Tyr	Leu	Gly	Arg	Phe	Tyr	Gln	Asp	Leu	Val	Glu	Gly	Phe	Arg	Asp
	50					55				60					
Val	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Thr	Ile	Glu	Glu	Glu	Leu	Ile	Lys	Phe	Cys
	65				70					75				80	
Arg	Glu	Ala	Arg	Gly	Lys	Glu	Asn	Arg	Leu	Cys	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Ala
		85						90					95		
Thr	Asp	Asp	Ala	Ala	Thr	Lys	Ile	Ile	Asn	Glu	Val	Ser	Lys	Pro	Leu
	100							105					110		
Ala	His	His	Ile	Pro	Val	Glu	Lys	Ile	Cys	Glu	Lys	Leu	Lys	Lys	Lys
	115						120					125			
Asp	Ser	Gln	Ile	Cys	Glu	Leu	Lys	Tyr	Asp	Lys	Gln	Ile	Asp	Leu	Ser
	130					135					140				
Thr	Val	Asp	Leu	Lys	Lys	Leu	Arg	Val	Lys	Glu	Leu	Lys	Lys	Ile	Leu
	145				150					155				160	



PCT/US01/09043

17

[illegible]

Table 6 shows the alignment of the novel human ARP of the instant invention (Curagen assembly 78893608; SEQ ID NO:3), a published human sequence (Shridar *et al.* (1996b); gbh\_m83751), mouse (AI595930\_EXT), and *Drosophila melanogaster* (AAD32615) using ClustalW alignment. Only the protein described by Shridar *et al.* (1996b) has the longer N-terminal sequence; while that of the instant invention is truncated at the N-terminus.

Table 6 Alignment of human and mouse ARP

```

78853608
gdb_m35701
AA159500-DXT
AA1522615
MCKMVGWQDGRGPRQWVGAT AKRQSLJAVK
AC005
HPTAETEDS
MKTVWY

78853603
gdb_m35701
AA159500-DXT
AA1522615
QJLAJGALASVLPQSRALRPOCEVCIVS
YLRVQOLKREDVTFSPATIEBELIKPCREAA
QJLAJGALASVLPQSRALRPOCEVCIVS
YLRVQOLKREDVTFSPATIEBELIKPCREAA
ARAGOTLASVLPQSRALRPOCEVCIVS
YLRVQOLKREDVTFSPATIEBELIKPCREAA
MYVMYPLALASVLPQSRALRPOCEVCIVS
YLRVQOLKREDVTFSPATIEBELIKPCREAA
TQSDYKQJLITAFKRCISIAQ

78853602
gdb_m35701
AA159500-DXT
AA1522615
RKEENRLCYTIGATDAATKILNEVSP
LPAHHIPPEKICEKLEKXDSQCEKLYDKG
IDL
RKEENRLCYTIGATDAATKILNEVSP
LPAHHIPPEKICEKLEKXDSQCEKLYDKG
IDL
RKEENRLCYTIGATDAATKILNEVSP
LPAHHIPPEKICEKLEKXDSQCEKLYDKG
IDL
RKEENRLCYTIGATDAATKILNEVSP
LPAHHIPPEKICEKLEKXDSQCEKLYDKG
IDL

78853605
gdb_m35701
AA159500-DXT
AA1522615
BTVDLKELPVEKLEKILDDWQSPKQK
AKSDVYIKINILMLPKYAPKAAASRTDL
BTVDLKELPVEKLEKILDDWQSPKQK
AKSDVYIKINILMLPKYAPKAAASRTDL
BTVDLKELPVEKLEKILDDWQSPKQK
AKSDVYIKINILMLPKYAPKAAASRTDL
BTVDLKELPVEKLEKILDDWQSPKQK
AKSDVYIKINILMLPKYAPKAAASRTDL
BTVDLKELPVEKLEKILDDWQSPKQK
AKSDVYIKINILMLPKYAPKAAASRTDL

```

10

GeneCalling™ analysis (Example 1) reveals that ARP is up-regulated in VEGF-stimulated endothelial cells during the first 6 hours. *In situ* hybridization analysis reveals high expression in fetal and non-vascularized tumor components. Over-expression of ARP correlates with ovarian cancer.

15

(b) Down's syndrome critical region protein 1 (DSCR1)

DSCR1 (SEQ ID NOS:23 and 24; GenBank NM\_004414, U28833) is a member of the minimal candidate region for the Down syndrome phenotype. DSCR1

WO 01/70174

18

PCT/US01/09043

has an acidic domain, a serine-proline motif, a putative DNA binding domain and a proline-rich region, much like SH3 domain ligands (Fuentes *et al.*, 1995). The hamster homologue, adapt78, is related to Gpr78, a glucose-regulated protein (Leahy *et al.*, 1999) and is oxidant- and calcium-inducible. PSORT (Nakai and Horton, 5 1999) predicts mitochondrial localization. DSCR1's structural and functional features suggest roles in transcriptional regulation and/or signal transduction.

GeneCalling™ analysis (Example 1) demonstrated that DSCR1 is up-regulated in VEGF-stimulated endothelial cells during the first 6 hours. Taqman™ analysis revealed that DSCR1 is up-regulated in an *in vitro* model of endothelial tube 10 formation. *In situ* hybridization analysis reveals high expression in fetal tissues, but lower levels in adult and tumor non-vascular tissues. Over-expression of DSCR1 correlates with clinical stage of ovarian cancer. Elimination of DSCR1 by antisense experiments increases endothelial cell survival.

#### 15 4. Other VEGF-modulated genes

##### (a) Human gene similar to yeast VPS41 (hVSP41p)

hVSP41p (SEQ ID NOS:25 and 26; GenBank U87309) in yeast *n(VSP41)* is required for vacuolar traffic (Radisky *et al.*, 1997) and is involved in endocytosis (Singer-Kruger and Ferro-Novick, 1997).

20 In the present invention, GeneCalling analysis (Example 1) reveals that hVSP41 is down-regulated in VEGF-stimulated endothelial cells at 24 hours. *In situ* hybridization analysis localised expression to non-vascularized regions of tumors. Expression of hVSP41 correlates with ovarian cancer (Examples).

##### 25 (b) insulin induced gene 1 (INSIG1)

INSIG1 (SEQ ID NOS:27 and 28; GenBank 5031800, U96876) expression is transcriptionally up-regulated in rat regenerating livers, and is induced in murine adipocyte differentiation, suggesting that INSIG1 may play a role in growth and differentiation of tissues involved in metabolic control (Peng *et al.*, 1997). INSIG1 is 30 also expressed by monocytes in a model of atherogenesis, as are oxidized lipoprotein HB-EGF and gravin (Falb, WO9730065, 1997). Hydrophobicity analysis predicts a transmembrane localization. The protein is homologous to sodium channels and to G-

WO 01/70174

19

PCT/US01/09043

protein coupled receptors. PSORT (Nakai and Horton, 1999) predicts localization to the mitochondrial inner membrane.

GeneCalling analysis (Example 1) demonstrated that INSIG1 was up-regulated in VEGF-stimulated endothelial cells at 24 hours and in an *in vitro* model of  
5 endothelial tube formation.

(c) decidual protein induced by progesterone (DEPP)

DEPP (SEQ ID NOS:29 and 30; GenBank AB022718) is published only in the database. SEQ ID NO:29 comprises a 2114 bp transcript encoding a putative 212  
10 amino acid peptide that is induced by the steroid progesterone. Steroid hormones play vital roles in angiogenesis, especially in the female reproductive tract (Hyder and Stancel, 1999).

GeneCalling analysis (Example 1) reveals that DEPP was up-regulated in VEGF-stimulated endothelial cells at 6 hours.  
15

(d) cytochrome oxidase subunit I (MTCO1)

Cytochrome c oxidase subunit I (MTCO1, SEQ ID NO:31 (nucleotide sequence extracted from the complete human mitochondrial genome sequence, GenBank NC\_001807) and SEQ ID NO:32 (amino acid; GenBank NP\_008344) is 1  
20 of 3 mitochondrial DNA encoded subunits of respiratory Complex IV. Complex IV localizes to the mitochondrial inner membrane and mediates the final step in the electron transport chain of oxidative phosphorylation. Complex IV collects electrons from reduced cytochrome c and transfers them to oxygen, producing energy and water. The released energy is used to transport protons across the mitochondrial inner  
25 membrane.

(e) NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 (ND1 or DNHUN1) and

(f) NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 (ND4 or DNHUN4)

The proton-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase or complex I  
30 chain 1 (SEQ ID NOS:33, GenBank NC\_001807 and 34; GenBank DUNHUN1) and chain 4 (SEQ ID NOS:35, GenBank NC\_001807 and 36; GenBank DUNHUN4) are located in the inner membranes of mitochondria. Complex I is the site for electrons

entering the respiratory chain and important in conserving cell energy. The complex I-catalyzed oxidation of NADH is coupled to proton membrane translocation.

(g) heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)

5 HB-EGF (SEQ ID NOS:37 and 38; GenBank NM\_001945) is an EGF family member that ligates EGF receptors 1(HER-1) or 4 (HER-4) to induce mitogenic and/or chemotactic activities. HB-EGF is expressed by numerous cell types, including leukemia cells (Vinante *et al.*, 1999), and does not directly induce endothelial cell mitosis, but does induce these cells to migrate and induces the  
10 vascular smooth muscle cells to release factors that induce endothelial mitosis (Morita *et al.*, 1993). While previously observed to be induced by VEGF (Arkonac *et al.*, 1998), no specific role in endothelial cell survival has been proposed.

In addition to VEGF, reactive oxygen species and calcium induce HB-EGF expression (Kayanoki *et al.*, 1999) as they do for DSCR1. Membrane-bound HB-  
15 EGF retains growth activity, adhesion capabilities and promotes renal epithelial cell survival (Takemura *et al.*, 1997). ProHB-EGF forms a complex in the plasma membrane with the tetraspanin CD9 that also increases the survival activity of HB-EGF expression (Takemura *et al.*, 1999).

In the instant invention (Examples), HB-EGF was found to be up-regulated in  
20 VEGF-stimulated endothelial cells at 24 hours. *In situ* hybridization analysis reveals expression in non vascular component in tumors, fetal and adult tissue, and high expression in endothelial cells of the appendix.

(h) MKP-1 like protein tyrosine phosphatase (SEQ ID NOS:39 and 40;

25 GenBank AF038844)

The protein sequence is 58% similar to Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 (MKP-1), a dual-specificity protein tyrosine phosphatase. Homology for the catalytic domain is very high, although no specific substrate has yet  
30 been described for MKP-1 like protein tyrosine phosphatase. MAP kinase cascades play critical roles in inhibiting apoptosis, phosphorylating Bcl-2 (Deng *et al.*, 2000). MAP kinases are activated by tyrosine and threonine phosphorylation and inactivated by dephosphorylation (Wilkinson and Millar, 2000). MKP-1 increases cell survival

(Winter *et al.*, 1998), and is induced by elevated calcium (Scimeca *et al.*, 1997). Because of its similarity to MKP-1, the MKP-1-like protein tyrosine phosphatase may regulate one or more MAP kinases involved in cell survival.

5 (i) osteonidogen (nidogen-2 precursor)

Nidogen-2 (SEQ ID NOS:41 and 42; GenBank D86425) is 46% identical, and has a similar domain structure with the basement membrane (basal lamina) protein nidogen-1/enactin. Nidogens 1 and 2 have similar but distinct binding and adhesive properties for basement membrane components (Lohi *et al.*, 1998). The complex  
10 laminin-entactin can stimulate and inhibit angiogenesis in a dose-dependent fashion (Nicosia *et al.*, 1994).

In the present invention, GeneCalling analysis (Example 1) reveals that nidogen-2 is up-regulated in VEGF-stimulated endothelial cells at 6 and 24 hours. *In situ* hybridization analysis demonstrates expression in fetal tissues, inflamed appendix  
15 and vascular and non-vascular component of peritumoral stroma. (Oivula *et al.*, 1999) also report expression by the endothelial basal lamina and stroma in carcinomas.

(j) *Connective tissue growth factor (CTGF)*

CTGF (connective tissue growth factor; SEQ ID NOS: 43 and 44, GenBank  
20 X78947) is a member of a family of secreted proteins that includes CYR61, Nov, Elm-1, Cop-1/WISP-2, WISP-3 and the mouse CTGF homolog, Fisp12. CTGF stimulates fibroblast migration and promotes adhesion and mitogenesis in both fibroblasts and endothelial cells through the integrin receptor  $\alpha v \beta 3$ . In addition, the presence of CTGF promotes endothelial cell survival. *In vivo*, CTGF induces  
25 neovascularization in rat corneal micropocket implants.

In the instant invention, CTGF is up-regulated in VEGF-stimulated endothelial cells at 6 and 24 hours. *In situ* hybridization analysis reveals that CTGF is expressed in most tested tissues, which the highest expression in fetal tissues. These observations, with the localization of CTGF in angiogenic tissues and in  
30 atherosclerotic plaques, suggest a possible role for CTGF in the regulation of vessel growth during development, wound healing, and vascular disease.

WO 01/70174

22

PCT/US01/09043

*VEGFmg polynucleotides*

One aspect of the invention pertains to isolated nucleic acid molecules that encode VEGFmg or biologically-active portions thereof. Also included in the invention are nucleic acid fragments sufficient for use as hybridization probes to identify VEGFmg-encoding nucleic acids (*e.g.*, *VEGFmg* mRNAs) and fragments for use as polymerase chain reaction (PCR) primers for the amplification and/or mutation of *VEGFmg* molecules. A "nucleic acid molecule" includes DNA molecules (*e.g.*, cDNA or genomic DNA), RNA molecules (*e.g.*, mRNA), analogs of the DNA or RNA generated using nucleotide analogs, and derivatives, fragments and homologs.

The nucleic acid molecule may be single-stranded or double-stranded, but preferably comprises double-stranded DNA.

1. *control sequences*

Control sequence are DNA sequences that enable the expression of an operably-linked coding sequence in a particular host organism. Prokaryotic control sequences include promoters, operator sequences, and ribosome binding sites. Eukaryotic cells utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

2. *operably-linked*

Nucleic acid is operably-linked when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, a promoter or enhancer is operably-linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence, or a ribosome-binding site is operably-linked to a coding sequence if positioned to facilitate translation. Generally, "operably-linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by conventional recombinant DNA methods.

3. *isolated nucleic acids*

An isolated nucleic acid molecule is purified from the setting in which it is found in nature and is separated from at least one contaminant nucleic acid molecule. Isolated *ARP* molecules are distinguished from the specific *ARP* molecules, as they exist in cells. However, an isolated *ARP* molecule includes *ARP* molecules contained in cells that ordinarily express the *ARP* where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

4. *probes*

Probes are nucleic acid sequences of variable length, preferably between at least about 10 nucleotides (nt), 100 nt, or many (*e.g.*, 6,000 nt) depending on the specific use. Probes are used to detect identical, similar, or complementary nucleic acid sequences. Longer length probes can be obtained from a natural or recombinant source, are highly specific, and much slower to hybridize than shorter-length oligomer probes. Probes may be single- or double-stranded and designed to have specificity in PCR, membrane-based hybridization technologies, or ELISA-like technologies. Probes are substantially purified oligonucleotides that will hybridize under stringent conditions to at least optimally 12, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 or 400 consecutive sense strand nucleotide sequence; or an anti-sense strand nucleotide sequence; or of a naturally occurring mutant of the *VEGFmg* sequence of interest.

The full- or partial length native sequence *VEGFmg* may be used to "pull out" similar (homologous) sequences (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook, 1989), such as: (1) full-length or fragments of *VEGFmg* cDNA from a cDNA library from any species (*e.g.* human, murine, feline, canine, bacterial, viral, retroviral, yeast), (2) from cells or tissues, (3) variants within a species, and (4) homologues and variants from other species. To find related sequences that may encode related genes, the probe may be designed to encode unique sequences or degenerate sequences. Sequences may also be genomic sequences including promoters, enhancer elements and introns of native sequence *VEGFmg*.

For example, *VEGFmg* coding region in another species may be isolated using such probes. A probe of about 40 bases is designed, based on *VEGFmg*, and made. To detect hybridizations, probes are labeled using, for example, radionuclides such as <sup>32</sup>P or <sup>35</sup>S, or enzymatic labels such as alkaline phosphatase coupled to the probe via avidin-biotin systems. Labeled probes are used to detect nucleic acids having a complementary sequence to that of *VEGFmg* in libraries of cDNA, genomic DNA or mRNA of a desired species.

Such probes can be used as a part of a diagnostic test kit for identifying cells or tissues which mis-express a *VEGFmg*, such as by measuring a level of a *VEGFmg* in a sample of cells from a subject *e.g.*, detecting *VEGFmg* mRNA levels or determining whether a genomic *VEGFmg* has been mutated or deleted.

5. *isolated nucleic acid*

An isolated nucleic acid molecule is separated from other nucleic acid molecules which are present in the natural source of the nucleic acid. Preferably, an isolated nucleic acid is free of sequences that naturally flank the nucleic acid (*i.e.*, sequences located at the 5'- and 3'-termini of the nucleic acid) in the genomic DNA of the organism from which the nucleic acid is derived. For example, in various embodiments, isolated *VEGFmg* molecules can contain less than about 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb or 0.1 kb of nucleotide sequences which naturally flank the nucleic acid molecule in genomic DNA of the cell/tissue from which the nucleic acid is derived (*e.g.*, brain, heart, liver, spleen, *etc.*). Moreover, an isolated nucleic acid molecule, such as a cDNA molecule, can be substantially free of other cellular material or culture medium when produced by recombinant techniques, or of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized.

A nucleic acid molecule of the invention, *e.g.*, a *VEGFmg* nucleic acid molecule, or a complement of this aforementioned nucleotide sequence, can be isolated using standard molecular biology techniques and the provided sequence information. Using all or a portion of a *VEGFmg* nucleic acid sequence of interest as a hybridization probe, *VEGFmg* molecules can be isolated using standard hybridization and cloning techniques (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook, 1989).

PCR amplification techniques can be used to amplify *VEGFmg* using cDNA, mRNA or alternatively, genomic DNA, as a template and appropriate oligonucleotide primers. Such nucleic acids can be cloned into an appropriate vector and characterized by DNA sequence analysis. Furthermore, oligonucleotides corresponding to *VEGFmg* sequences can be prepared by standard synthetic techniques, *e.g.*, an automated DNA synthesizer.

6. *oligonucleotide*

An oligonucleotide comprises a series of linked nucleotide residues, which oligonucleotide has a sufficient number of nucleotide bases to be used in a PCR reaction or other application. A short oligonucleotide sequence may be based on, or designed from, a genomic or cDNA sequence and is used to amplify, confirm, or reveal the presence of an identical, similar or complementary DNA or RNA in a particular cell or tissue. Oligonucleotides comprise portions of a nucleic acid



WO 01/70174

25

PCT/US01/09043

sequence having about 10 nt, 50 nt, or 100 nt in length, preferably about 15 nt to 30 nt in length. In one embodiment of the invention, an oligonucleotide comprising a nucleic acid molecule less than 100 nt in length would further comprise at least 6 contiguous nucleotides of a *VEGF<sub>mg</sub>* sequence of interest, or a complement thereof.

5 Oligonucleotides may be chemically synthesized and may also be used as probes.

7. *complementary nucleic acid sequences; binding*

In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule comprises a nucleic acid molecule that is a complement of a *VEGF<sub>mg</sub>* nucleotide sequence of the invention, or a portion of this nucleotide sequence (*e.g.*, a fragment that can be used

10 as a probe or primer or a fragment encoding a biologically-active portion of a *VEGF<sub>mg</sub>*). A nucleic acid molecule that is complementary to a *VEGF<sub>mg</sub>* nucleotide sequence of interest, is one that is sufficiently complementary to that nucleotide sequence such that it can hydrogen bond with little or no mismatches, forming a stable duplex.

15 "Complementary" refers to Watson-Crick or Hoogsteen base pairing between nucleotides units of a nucleic acid molecule, and the term "binding" means the physical or chemical interaction between two polypeptides or compounds or associated polypeptides or compounds or combinations thereof. Binding includes ionic, non-ionic, van der Waals, hydrophobic interactions, and the like. A physical

20 interaction can be either direct or indirect. Indirect interactions may be through or due to the effects of another polypeptide or compound. Direct binding refers to interactions that do not take place through, or due to, the effect of another polypeptide or compound, but instead are without other substantial chemical intermediates.

Nucleic acid fragments are at least 6 (contiguous) nucleic acids or at least 4

25 (contiguous) amino acids, a length sufficient to allow for specific hybridization in the case of nucleic acids or for specific recognition of an epitope in the case of amino acids, respectively, and are at most some portion less than a full-length sequence. Fragments may be derived from any contiguous portion of a nucleic acid or amino acid sequence of choice.

30 8. *derivatives, and analogs*

Derivatives are nucleic acid sequences or amino acid sequences formed from the native compounds either directly or by modification or partial substitution.

Analogues are nucleic acid sequences or amino acid sequences that have a structure similar to, but not identical to, the native compound but differ from it in respect to certain components or side chains. Analogues may be synthetic or from a different evolutionary origin and may have a similar or opposite metabolic activity compared to wild type. Homologs are nucleic acid sequences or amino acid sequences of a particular gene that are derived from different species.

Derivatives and analogues may be full length or other than full length, if the derivative or analogue contains a modified nucleic acid or amino acid, as described below. Derivatives or analogues of the nucleic acids or proteins of the invention include, but are not limited to, molecules comprising regions that are substantially homologous to the nucleic acids or proteins of the invention, in various embodiments, by at least about 70%, 80%, or 95% identity (with a preferred identity of 80-95%) over a nucleic acid or amino acid sequence of identical size or when compared to an aligned sequence in which the alignment is done by a computer homology program known in the art, or whose encoding nucleic acid is capable of hybridizing to the complement of a sequence encoding the aforementioned proteins under stringent, moderately stringent, or low stringent conditions (Ausubel *et al.*, 1987).

#### 9. *open reading frames*

The open reading frame (ORF) of a *VEGFmg* gene encodes VEGFmg. An ORF is a nucleotide sequence that has a start codon (ATG) and terminates with one of the three "stop" codons (TAA, TAG, or TGA). In this invention, however, an ORF may be any part of a coding sequence that may or may not comprise a start codon and a stop codon. To achieve a unique sequence, preferable *VEGFmg* ORFs encode at least 50 amino acids.

#### 10. *homology*

A "homologous nucleic acid sequence" or "homologous amino acid sequence," or variations thereof, refer to sequences characterized by a homology at the nucleotide level or amino acid level as discussed above. Homologous nucleotide sequences encode those sequences coding for isoforms of VEGFmg. Isoforms can be expressed in different tissues of the same organism as a result of, for example, alternative splicing of RNA. Alternatively, different genes can encode isoforms. In the invention, homologous nucleotide sequences include nucleotide sequences

WO 01/70174

27

PCT/US01/09043

encoding for a VEGFmg of species other than humans, including, but not limited to: vertebrates, and thus can include, e.g., frog, mouse, rat, rabbit, dog, cat, cow, horse, and other organisms. Homologous nucleotide sequences also include, but are not limited to, naturally occurring allelic variations and mutations of the nucleotide

- 5 sequences set forth herein. A homologous nucleotide sequence does not, however, include the exact nucleotide sequence encoding a human VEGFmg. Homologous nucleic acid sequences include those nucleic acid sequences that encode conservative amino acid substitutions in a *VEGFmg* sequence of interest, as well as a polypeptide possessing VEGFmg biological activity. Various biological activities of the
- 10 VEGFmg are described below.

11. *sequence identity*

"Percent (%) nucleic acid sequence identity" with respect to a *VEGFmg* is defined as the percentage of nucleotides in a candidate sequence that are identical with the nucleotides in that particular *VEGFmg*, after aligning the sequences and

- 15 introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. Alignment for purposes of determining % nucleic acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate
- 20 parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared.

When nucleotide sequences are aligned, the % nucleic acid sequence identity of a given nucleic acid sequence C to, with, or against a given nucleic acid sequence D (which can alternatively be phrased as a given nucleic acid sequence C that has or

25 comprises a certain % nucleic acid sequence identity to, with, or against a given nucleic acid sequence D) can be calculated as follows:

$$\% \text{ nucleic acid sequence identity} = W/Z \cdot 100$$

where

- 30 **W** is the number of nucleotides corelated as identical matches by the sequence alignment program's or algorithm's alignment of C and D

And

$Z$  is the total number of nucleotides in  $D$ .

When the length of nucleic acid sequence  $C$  is not equal to the length of nucleic acid sequence  $D$ , the % nucleic acid sequence identity of  $C$  to  $D$  will not equal the % nucleic acid sequence identity of  $D$  to  $C$ .

#### 12. Stringency

Homologs (*i.e.*, nucleic acids encoding VEGF-modulated molecules derived from species other than human) or other related sequences (*e.g.*, paralogs) can be obtained by low, moderate or high stringency hybridization with all or a portion of the particular human sequence as a probe using methods well known in the art for nucleic acid hybridization and cloning.

The specificity of single stranded DNA to hybridize complementary fragments is determined by the "stringency" of the reaction conditions. Hybridization stringency increases as the propensity to form DNA duplexes decreases. In nucleic acid hybridization reactions, the stringency can be chosen to either favor specific hybridizations (high stringency), which can be used to identify, for example, full-length clones from a library. Less-specific hybridizations (low stringency) can be used to identify related, but not exact, DNA molecules (homologous, but not identical) or segments.

DNA duplexes are stabilized by: (1) the number of complementary base pairs, (2) the type of base pairs, (3) salt concentration (ionic strength) of the reaction mixture, (4) the temperature of the reaction, and (5) the presence of certain organic solvents, such as formamide which decreases DNA duplex stability. In general, the longer the probe, the higher the temperature required for proper annealing. A common approach is to vary the temperature: higher relative temperatures result in more stringent reaction conditions. (Ausubel *et al.*, 1987) provide an excellent explanation of stringency of hybridization reactions.

To hybridize under "stringent conditions" describes hybridization protocols in which nucleotide sequences at least 60% homologous to each other remain hybridized. Generally, stringent conditions are selected to be about 5°C lower than the thermal melting point ( $T_m$ ) for the specific sequence at a defined ionic strength

WO 01/70174

29

PCT/US01/09043

and pH. The  $T_m$  is the temperature (under defined ionic strength, pH and nucleic acid concentration) at which 50% of the probes complementary to the target sequence hybridize to the target sequence at equilibrium. Since the target sequences are generally present at excess, at  $T_m$ , 50% of the probes are occupied at equilibrium.

5 (a) *high stringency*

“Stringent hybridization conditions” conditions enable a probe, primer or oligonucleotide to hybridize only to its target sequence. Stringent conditions are sequence-dependent and will differ. Stringent conditions comprise: (1) low ionic strength and high temperature washes (e.g. 15 mM sodium chloride, 1.5 mM sodium citrate, 0.1 % sodium dodecyl sulfate at 50°C); (2) a denaturing agent during hybridization (e.g. 50% (v/v) formamide, 0.1% bovine serum albumin, 0.1% Ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 50mM sodium phosphate buffer (pH 6.5; 750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42°C); or (3) 50% formamide. Washes typically also comprise 5X SSC (0.75 M NaCl, 75 mM sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, 15 sonicated salmon sperm DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 50% formamide at 55°C, followed by a high-stringency wash consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55°C. Preferably, the conditions are such that sequences at least 20 about 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, or 99% homologous to each other typically remain hybridized to each other. These conditions are presented as examples and are not meant to be limiting.

(b) *moderate stringency*

“Moderately stringent conditions” use washing solutions and hybridization 25 conditions that are less stringent (Sambrook, 1989), such that a polynucleotide will hybridize to the entire, fragments, derivatives or analogs of a target *VEGFmg* target sequence. One example comprises hybridization in 6X SSC, 5X Denhardt's solution, 0.5% SDS and 100 mg/ml denatured salmon sperm DNA at 55°C, followed by one or more washes in 1X SSC, 0.1% SDS at 37°C. The temperature, ionic strength, etc., 30 can be adjusted to accommodate experimental factors such as probe length. Other moderate stringency conditions are described in (Ausubel *et al.*, 1987; Kriegler, 1990).

WO 01/70174

30

PCT/US01/09043

(c) *low stringency*

"Low stringent conditions" use washing solutions and hybridization conditions that are less stringent than those for moderate stringency (Sambrook, 1989), such that a polynucleotide will hybridize to the entire, fragments, derivatives or analogs of a target *VEGFmg* target sequence. A non-limiting example of low stringency hybridization conditions are hybridization in 35% formamide, 5X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.2% BSA, 100 mg/ml denatured salmon sperm DNA, 10% (wt/vol) dextran sulfate at 40°C, followed by one or more washes in 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, and 0.1% SDS at 50°C. Other conditions of low stringency, such as those for cross-species hybridizations are described in (Ausubel *et al.*, 1987; Kriegler, 1990; Shilo and Weinberg, 1981).

13. *Conservative mutations*

In addition to naturally-occurring allelic variants of *VEGFmg*, changes can be introduced by mutation into *VEGFmg* sequences that incur alterations in the amino acid sequences of the encoded VEGF-modulated molecules that do not alter VEGF-modulated molecules function. For example, nucleotide substitutions leading to amino acid substitutions at "non-essential" amino acid residues can be made in the sequence of a *VEGFmg* polypeptide. A "non-essential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequences of *VEGFmg* without altering their biological activity, whereas an "essential" amino acid residue is required for such biological activity. For example, amino acid residues that are conserved among the *VEGFmg* molecules of the invention are predicted to be particularly non-amenable to alteration. Amino acids for which conservative substitutions can be made are well-known in the art.

Useful conservative substitutions are shown in Table A, "Preferred substitutions." Conservative substitutions whereby an amino acid of one class is replaced with another amino acid of the same type fall within the scope of the subject invention so long as the substitution does not materially alter the biological activity of the compound. If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, indicated in Table B as exemplary are introduced and the products screened for *VEGFmg* polypeptide biological activity.

**Table A Preferred substitutions**

Original residue	Exemplary substitutions	Preferred substitutions
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucine	Leu

Non-conservative substitutions that effect (1) the structure of the polypeptide backbone, such as a  $\beta$ -sheet or  $\alpha$ -helical conformation, (2) the charge or (3)

- 5 hydrophobicity, or (4) the bulk of the side chain of the target site can modify VEGFmg function or immunological identity. Residues are divided into groups based on common side-chain properties as denoted in Table B. Non-conservative substitutions entail exchanging a member of one of these classes for another class. Substitutions may be introduced into conservative substitution sites or more
- 10 preferably into non-conserved sites.

**Table B Amino acid classes**

Class	Amino acids
hydrophobic	Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile
neutral hydrophilic	Cys, Ser, Thr

WO 01/70174

32

PCT/US01/09043

acidic	Asp, Glu
basic	Asn, Gln, His, Lys, Arg
disrupt chain conformation	Gly, Pro
aromatic	Trp, Tyr, Phe

The variant polypeptides can be made using methods known in the art such as oligonucleotide-mediated (site-directed) mutagenesis, alanine scanning, and PCR mutagenesis. Site-directed mutagenesis (Carter, 1986; Zoller and Smith, 1987), cassette mutagenesis, restriction selection mutagenesis (Wells *et al.*, 1985) or other known techniques can be performed on the cloned DNA to produce the *VEGFmg* variant DNA (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook, 1989).

In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence encoding a protein, wherein the protein comprises an amino acid sequence at least about 45%, preferably 60%, more preferably 70%, 80%, 90%, and most preferably about 95% homologous to that of a *VEGFmg* of interest.

A mutant *VEGFmg* can be assayed for modulating cell survival and/or angiogenesis *in vitro*.

#### 14. *VEGFmg variant polynucleotides, genes and recombinant genes*

The invention further encompasses nucleic acid molecules that differ from the nucleotide sequences due to degeneracy of the genetic code and thus encode the same *VEGFmg* as that encoded by, for example, the *ARP* nucleotide sequences shown in SEQ ID NO NOS:2 or 21. An isolated nucleic acid molecule of the invention has a nucleotide sequence encoding, for example, an *ARP* protein having an amino acid sequence shown in SEQ ID NOS:3 or 22.

In addition sequence polymorphisms that change the amino acid sequences of the *VEGFmg* may exist within a population. For example, allelic variation among individuals will exhibit genetic polymorphism in *VEGFmg*. The terms "gene" and "recombinant gene" refer to nucleic acid molecules comprising an open reading frame (ORF) encoding *VEGFmg*, preferably a vertebrate *VEGFmg*. Such natural allelic variations can typically result in 1-5% variance in *VEGFmg*. Any and all such nucleotide variations and resulting amino acid polymorphisms in the *VEGFmg*, which are the result of natural allelic variation and that do not alter the functional activity of the *VEGFmg* are within the scope of the invention.



WO 01/70174

33

PCT/US01/09043

Moreover, *VEGFmg* from other species that have a nucleotide sequence that differs from the human sequence of *VEGFmgs* are contemplated. Nucleic acid molecules corresponding to natural allelic variants and homologues of *VEGFmg* cDNAs of the invention can be isolated based on their homology to *VEGFmg* using cDNA-derived probes to hybridize to homologous *VEGFmg* sequences under stringent conditions.

"VEGFmg variant polynucleotide" or "VEGFmg variant nucleic acid sequence" means a nucleic acid molecule which encodes an active VEGFmg that (1) has at least about 80% nucleic acid sequence identity with a nucleotide acid sequence encoding a full-length native VEGFmg, (2) a full-length native VEGFmg lacking the signal peptide, (3) an extracellular domain of a VEGFmg, with or without the signal peptide, or (4) any other fragment of a full-length VEGFmg. Ordinarily, a *VEGFmg* variant polynucleotide will have at least about 80% nucleic acid sequence identity, more preferably at least about 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% nucleic acid sequence identity and yet more preferably at least about 99% nucleic acid sequence identity with the nucleic acid sequence encoding a full-length native VEGFmg. A *VEGFmg* variant polynucleotide may encode full-length native VEGFmg lacking the signal peptide, an extracellular domain of a VEGFmg, with or without the signal sequence, or any other fragment of a full-length VEGFmg. Variants do not encompass the native nucleotide sequence.

Ordinarily, *VEGFmg* variant polynucleotides are at least about 30 nucleotides in length, often at least about 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 450, 600 nucleotides in length, more often at least about 900 nucleotides in length, or more.

#### *VEGFmg polypeptides*

##### 1. *mature*

A VEGFmg can encode a mature VEGFmg. A "mature" form of a polypeptide or protein disclosed in the present invention is the product of a naturally occurring polypeptide or precursor form or proprotein. The naturally occurring polypeptide, precursor or proprotein includes, by way of nonlimiting example, the

WO 01/70174

34

PCT/US01/09043

full-length gene product, encoded by the corresponding gene. Alternatively, it may be defined as the polypeptide, precursor or proprotein encoded by an open reading frame described herein. The product "mature" form arises, again by way of nonlimiting example, as a result of one or more naturally occurring processing steps as they may take place within the cell, or host cell, in which the gene product arises. Examples of such processing steps leading to a "mature" form of a polypeptide or protein include the cleavage of the N-terminal methionine residue encoded by the initiation codon of an open reading frame, or the proteolytic cleavage of a signal peptide or leader sequence. Thus a mature form arising from a precursor polypeptide or protein that has residues 1 to N, where residue 1 is the N-terminal methionine, would have residues 2 through N remaining after removal of the N-terminal methionine. Alternatively, a mature form arising from a precursor polypeptide or protein having residues 1 to N, in which an N-terminal signal sequence from residue 1 to residue M is cleaved, would have the residues from residue M+1 to residue N remaining. Further as used herein, a "mature" form of a polypeptide or protein may arise from a step of post-translational modification other than a proteolytic cleavage event. Such additional processes include, by way of non-limiting example, glycosylation, myristoylation or phosphorylation. In general, a mature polypeptide or protein may result from the operation of only one of these processes, or a combination of any of them.

## 2. *Isolated VEGFmg polypeptide*

An "isolated" or "purified" polypeptide, protein or biologically active fragment is separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components include materials that would typically interfere with diagnostic or therapeutic uses for the polypeptide, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous materials. Preferably, the polypeptide is purified to a sufficient degree to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence. To be substantially isolated, preparations having less than 30% by dry weight of non-VEGFmg contaminating material (contaminants), more preferably less than 20%, 10% and most preferably less than 5% contaminants. An isolated, recombinantly-produced VEGFmg or biologically active portion is preferably substantially free of culture medium, *i.e.*, culture medium

represents less than 20%, more preferably less than about 10%, and most preferably less than about 5% of the volume of the VEGFmg preparation. Examples of contaminants include cell debris, culture media, and substances used and produced during *in vitro* synthesis of VEGFmg.

- 5        When the molecule is a purified polypeptide, the polypeptide will be purified (1) to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence using a sequenator, or (2) to homogeneity by SDS-PAGE under non-reducing or reducing conditions using Coomassie blue or silver stain. Isolated polypeptides include those expressed heterologously in genetically-engineered cells or expressed *in vitro*, since at  
10        least one component of the VEGFmg's natural environment will not be present. Ordinarily, isolated polypeptides are prepared by at least one purification step.

3.        *Biologically active*

- Biologically active portions of VEGFmgs include peptides comprising amino acid sequences sufficiently homologous to or derived from VEGFmg amino acid  
15        sequences that include fewer amino acids than the full-length VEGFmg, and exhibit at least one activity of a VEGFmg. Biologically active portions comprise a domain or motif with at least one activity of native VEGFmg. A biologically active portion of a VEGFmg can be a polypeptide that is, for example, 10, 25, 50, 100 or more amino acid residues in length. Other biologically active portions, in which other regions of  
20        the protein are deleted, can be prepared by recombinant techniques and evaluated for one or more of the functional activities of a native VEGFmg.

Biologically active portions of VEGFmg may retain the functional activity of the protein, yet differs in amino acid sequence due to natural allelic variation or mutagenesis.

- 25        4.        *anti-VEGFmg Abs*

- Antibody may be single anti-VEGFmg monoclonal Abs (mAbs; including agonist, antagonist, and neutralizing Abs), anti-VEGFmg antibody compositions with polypeptidic specificity, single chain anti-VEGFmg Abs, and fragments of anti-VEGFmg Abs. A "monoclonal antibody" refers to an antibody obtained from a  
30        population of substantially homogeneous Abs, *i.e.*, the individual Abs comprising the population are identical except for naturally-occurring mutations that may be present in minor amounts.

5. *epitope tags*

An epitope tagged polypeptide refers to a chimeric polypeptide fused to a "tag polypeptide". Such tags provide epitopes against which Abs can be made or are available, but do not interfere with polypeptide activity. To reduce anti-tag antibody reactivity with endogenous epitopes, the tag polypeptide is preferably unique. Suitable tag polypeptides generally have at least six amino acid residues and usually between about 8 and 50 amino acid residues, preferably between 8 and 20 amino acid residues. Examples of epitope tag sequences include HA from *Influenza A* virus and FLAG.

6. *Variant VEGFmg polypeptides*

In general, a VEGFmg variant that preserves VEGFmg-like function and includes any variant in which residues at a particular position in the sequence have been substituted by other amino acids, and further includes the possibility of inserting an additional residue or residues between two residues of the parent protein as well as the possibility of deleting one or more residues from the parent sequence. Any amino acid substitution, insertion, or deletion is encompassed by the invention. In favorable circumstances, the substitution is a conservative substitution as defined above.

"VEGFmg polypeptide variant" means an active VEGFmg polypeptide having at least: (1) about 80% amino acid sequence identity with a full-length native sequence VEGFmg polypeptide sequence, (2) a VEGFmg polypeptide sequence lacking the signal peptide, (3) an extracellular domain of a VEGFmg polypeptide, with or without the signal peptide, or (4) any other fragment of a full-length VEGFmg polypeptide sequence. For example, VEGFmg polypeptide variants include VEGFmg polypeptides wherein one or more amino acid residues are added or deleted at the N- or C- terminus of the full-length native amino acid sequence. A VEGFmg polypeptide variant will have at least about 80% amino acid sequence identity, preferably at least about 81% amino acid sequence identity, more preferably at least about 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% amino acid sequence identity and most preferably at least about 99% amino acid sequence identity with a full-length native sequence VEGFmg polypeptide sequence. A VEGFmg polypeptide variant may have a sequence lacking the signal peptide, an extracellular domain of a VEGFmg polypeptide, with or without

WO 01/70174

37

PCT/US01/09043

the signal peptide, or any other fragment of a full-length VEGFmg polypeptide sequence. Ordinarily, VEGFmg variant polypeptides are at least about 10 amino acids in length, often at least about 20 amino acids in length, more often at least about 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, or 300 amino acids in length, or more.

- 5 "Percent (%) amino acid sequence identity" is defined as the percentage of amino acid residues that are identical with amino acid residues in the disclosed VEGFmg polypeptide sequence in a candidate sequence when the two sequences are aligned. To determine % amino acid identity, sequences are aligned and if necessary, gaps are introduced to achieve the maximum % sequence identity; conservative  
10 substitutions are not considered as part of the sequence identity. Amino acid sequence alignment procedures to determine percent identity are well known to those of skill in the art. Often publicly available computer software such as BLAST, BLAST2, ALIGN2 or Megalign (DNASTAR) software is used to align peptide sequences. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for  
15 measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared.

- When amino acid sequences are aligned, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or  
20 comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) can be calculated as:

$$\%_{\text{amino acid sequence identity}} = X/Y \cdot 100$$

where

- 25 **X** is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program's or algorithm's alignment of A and B  
and

**Y** is the total number of amino acid residues in B.

- 30 If the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A.

7. *Determining homology between two or more sequences*

“VEGFmg variant” means an active VEGFmg having at least: (1) about 80% amino acid sequence identity with a full-length native sequence VEGFmg sequence, (2) a VEGFmg sequence lacking the signal peptide, (3) an extracellular domain of a VEGFmg, with or without the signal peptide, or (4) any other fragment of a full-length VEGFmg sequence. For example, VEGFmg variants include VEGFmg wherein one or more amino acid residues are added or deleted at the N- or C-terminus of the full-length native amino acid sequence. A VEGFmg variant will have at least about 80% amino acid sequence identity, preferably at least about 81% amino acid sequence identity, more preferably at least about 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% amino acid sequence identity and most preferably at least about 99% amino acid sequence identity with a full-length native sequence VEGFmg sequence. A VEGFmg variant may have a sequence lacking the signal peptide, an extracellular domain of a VEGFmg, with or without the signal peptide, or any other fragment of a full-length VEGFmg sequence. Ordinarily, VEGFmg variant polypeptides are at least about 10 amino acids in length, often at least about 20 amino acids in length, more often at least about 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, or 300 amino acids in length, or more.

“Percent (%) amino acid sequence identity” is defined as the percentage of amino acid residues that are identical with amino acid residues in the disclosed VEGFmg sequence in a candidate sequence when the two sequences are aligned. To determine % amino acid identity, sequences are aligned and if necessary, gaps are introduced to achieve the maximum % sequence identity; conservative substitutions are not considered as part of the sequence identity. Amino acid sequence alignment procedures to determine percent identity are well known to those of skill in the art. Often publicly available computer software such as BLAST, BLAST2, ALIGN2 or Megalign (DNASTAR) software is used to align peptide sequences. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared.

WO 01/70174

39

PCT/US01/09043

When amino acid sequences are aligned, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) can be calculated as:

$$\%_{\text{amino acid sequence identity}} = X/Y \cdot 100$$

where

- 10 **X** is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program's or algorithm's alignment of A and B  
and  
15 **Y** is the total number of amino acid residues in B.

If the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A.

#### 8. *Chimeric and fusion proteins*

- Fusion polypeptides are useful in expression studies, cell-localization, bioassays, and VEGFmg purification. A VEGFmg "chimeric protein" or "fusion protein" comprises VEGFmg fused to a non-VEGFmg polypeptide. A VEGFmg fusion protein may include any portion to the entire VEGFmg, including any number of the biologically active portions. VEGFmg may be fused to the C-terminus of the GST (glutathione S-transferase) sequences. Such fusion proteins facilitate the purification of recombinant VEGFmg. In certain host cells, (e.g. mammalian),  
25 heterologous signal sequences fusions may ameliorate VEGFmg expression and/or secretion. Additional exemplary fusions are presented in Table C.

- Other fusion partners can adapt VEGFmg therapeutically. Fusions with members of the immunoglobulin (Ig) protein family are useful in therapies that inhibit VEGFmg ligand or substrate interactions, consequently suppressing VEGFmg-mediated signal transduction *in vivo*. Such fusions, incorporated into pharmaceutical compositions, may be used to treat proliferative and differentiation disorders, as well as modulating cell survival. VEGFmg-Ig fusion polypeptides can also be used as

WO 01/70174

40

PCT/US01/09043

immunogens to produce anti-VEGFmg Abs in a subject, to purify VEGFmg ligands, and to screen for molecules that inhibit interactions of VEGFmg with other molecules.

- Fusion proteins can be easily created using recombinant methods. A nucleic acid encoding VEGFmg can be fused in-frame with a non-VEGFmg encoding nucleic acid, to the VEGFmg NH<sub>2</sub>- or COO- terminus, or internally. Fusion genes may also be synthesized by conventional techniques, including automated DNA synthesizers. PCR amplification using anchor primers that give rise to complementary overhangs between two consecutive gene fragments that can subsequently be annealed and reamplified to generate a chimeric gene sequence (Ausubel *et al.*, 1987) is also useful. Many vectors are commercially available that facilitate sub-cloning VEGFmg in-frame to a fusion moiety.

**Table C Useful non-VEGFmg fusion polypeptides**

Reporter	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	Notes	Reference
Human growth hormone (hGH)	Radioimmunoassay	none	Expensive, insensitive, narrow linear range.	(Selden <i>et al.</i> , 1986)
$\beta$ -glucuronidase (GUS)	Colorimetric, fluorescent, or chemiluminescent	colorimetric (histo-chemical staining with X-gluc)	sensitive, broad linear range, non-isotopic.	(Gallagher, 1992)
Green fluorescent protein (GFP) and related molecules (RFP, BFP, VEGFmg, etc.)	Fluorescent	fluorescent	can be used in live cells; resists photobleaching	(Chalfie <i>et al.</i> , 1994)
Luciferase (firefly)	bioluminescent	Bio-luminescent	protein is unstable, difficult to reproduce, signal is brief	(de Wet <i>et al.</i> , 1987)



WO 01/70174

41

PCT/US01/09043

Chloramphenicol acetyltransferase (CAT)	Chromatography, differential extraction, fluorescent, or immunoassay	none	Expensive radioactive substrates, time-consuming, insensitive, narrow linear range	(Gorman <i>et al.</i> , 1982)
$\beta$ -galactosidase	colorimetric, fluorescence, chemiluminescence	colorimetric (histochemical staining with X-gal), bioluminescent in live cells	sensitive, broad linear range; some cells have high endogenous activity	(Alam and Cook, 1990)
Secreted alkaline phosphatase (SEAP)	colorimetric, bioluminescent, chemiluminescent	none	Chemiluminescence assay is sensitive and broad linear range; some cells have endogenous alkaline phosphatase activity	(Berger <i>et al.</i> , 1988)

#### 9. *VEGFmg recombinant expression vectors and host cells*

Vectors are tools used to shuttle DNA between host cells or as a means to express a nucleotide sequence. Some vectors function only in prokaryotes, while

- 5 others function in both prokaryotes and eukaryotes, enabling large-scale DNA preparation from prokaryotes for expression in eukaryotes. Inserting the DNA of interest, such as VEGFmg nucleotide sequence or a fragment, is accomplished by ligation techniques and/or mating protocols well-known to the skilled artisan. Such DNA is inserted such that its integration does not disrupt any necessary components
- 10 of the vector. In the case of vectors that are used to express the inserted DNA protein, the introduced DNA is operably-linked to the vector elements that govern its transcription and translation.

Vectors can be divided into two general classes: Cloning vectors are replicating plasmid or phage with regions that are non-essential for propagation in an

15 appropriate host cell, and into which foreign DNA can be inserted; the foreign DNA

- is replicated and propagated as if it were a component of the vector. An expression vector (such as a plasmid, yeast, or animal virus genome) is used to introduce foreign genetic material into a host cell or tissue in order to transcribe and translate the foreign DNA. In expression vectors, the introduced DNA is operably-linked to elements, such as promoters, that signal to the host cell to transcribe the inserted DNA. Some promoters are exceptionally useful, such as inducible promoters that control gene transcription in response to specific factors. Operably-linking *VEGF<sub>mg</sub>* or anti-sense construct to an inducible promoter can control the expression of *VEGF<sub>mg</sub>* or fragments, or anti-sense constructs. Examples of classic inducible promoters include those that are responsive to  $\alpha$ -interferon, heat-shock, heavy metal ions, and steroids such as glucocorticoids (Kaufman, 1990) and tetracycline. Other desirable inducible promoters include those that are not endogenous to the cells in which the construct is being introduced, but, however, is responsive in those cells when the induction agent is exogenously supplied.
- Vectors have many difference manifestations. A "plasmid" is a circular double stranded DNA molecule into which additional DNA segments can be introduced. Viral vectors can accept additional DNA segments into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell (*e.g.*, bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (*e.g.*, non-episomal mammalian vectors) are integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. In general, useful expression vectors are often plasmids. However, other forms of expression vectors, such as viral vectors (*e.g.*, replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses) are contemplated.
- Recombinant expression vectors that comprise *VEGF<sub>mg</sub>* (or fragments) regulate *VEGF<sub>mg</sub>* transcription by exploiting one or more host cell-responsive (or that can be manipulated *in vitro*) regulatory sequences that is operably-linked to *VEGF<sub>mg</sub>*. "Operably-linked" indicates that a nucleotide sequence of interest is linked to regulatory sequences such that expression of the nucleotide sequence is achieved.
- Vectors can be introduced in a variety of organisms and/or cells (Table D). Alternatively, the vectors can be transcribed and translated *in vitro*, for example using T7 promoter regulatory sequences and T7 polymerase.

Table D Examples of hosts for cloning or expression

Organisms	Examples	Sources and References*
<b>Prokaryotes</b>		
Enterobacteriaceae	<i>E. coli</i>	
	K 12 strain MM294	ATCC 31,446
	X1776	ATCC 31,537
	W3110	ATCC 27,325
	K5 772	ATCC 53,635
	<i>Enterobacter</i>	
	<i>Erwinia</i>	
	<i>Klebsiella</i>	
	<i>Proteus</i>	
	<i>Salmonella</i> ( <i>S. typhimurium</i> )	
	<i>Serratia</i> ( <i>S. marcescans</i> )	
	<i>Shigella</i>	
	<i>Bacilli</i> ( <i>B. subtilis</i> and <i>B. licheniformis</i> )	
	<i>Pseudomonas</i> ( <i>P. aeruginosa</i> )	
	<i>Streptomyces</i>	
<b>Eukaryotes</b>		
Yeasts	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	
	<i>Kluyveromyces</i>	(Fleer <i>et al.</i> , 1991)
	<i>K. lactis</i> MW98-8C, CBS683, CBS4574	(de Louvencourt <i>et al.</i> , 1983)
	<i>K. fragilis</i>	ATCC 12,424
	<i>K. bulgaricus</i>	ATCC 16,045
	<i>K. wickerhamii</i>	ATCC 24,178
	<i>K. waltii</i>	ATCC 56,500
	<i>K. drosophilae</i>	ATCC 36,906
	<i>K. thermotolerans</i>	(EPO 402226, 1990)
	<i>K. marianus; yarrowia</i>	(Sreekrishna <i>et al.</i> , 1988)
	<i>Pichia pastoris</i>	
	<i>Candida</i>	
	<i>Trichoderma reesei</i>	
	<i>Neurospora crassa</i>	(Case <i>et al.</i> , 1979)
	<i>Torulopsis</i>	
	<i>Rhodotorula</i>	
	<i>Schwanniomyces</i> ( <i>S. occidentalis</i> )	
Filamentous Fungi	<i>Neurospora</i>	
	<i>Penicillium</i>	

Table D Examples of hosts for cloning or expression

Organisms	Examples	Sources and References*
	<i>Toxoplasma</i>	(WO 91/00357, 1991)
	<i>Aspergillus</i> ( <i>A. nidulans</i> and <i>A. niger</i> )	(Kelly and Hynes, 1985; Tilburn <i>et al.</i> , 1983; Yelton <i>et al.</i> , 1984)
Invertebrate cells	<i>Drosophila</i> S2	
	<i>Spodoptera</i> Sf9	
	Chinese Hamster Ovary (CHO)	
Vertebrate cells	simian COS	
	COS-7	ATCC CRL 1651
	HEK 293	

\*Unreferenced cells are generally available from American Type Culture Collection (Manassas, VA).

Vector choice is dictated by the organism or cells being used and the desired fate of the vector. Vectors may replicate once in the target cells, or may be "suicide" vectors. In general, vectors comprise signal sequences, origins of replication, marker genes, enhancer elements, promoters, and transcription termination sequences. The choice of these elements depends on the organisms in which the vector will be used and are easily determined. Some of these elements may be conditional, such as an inducible or conditional promoter that is turned "on" when conditions are appropriate. Examples of inducible promoters include those that are tissue-specific, which relegate expression to certain cell types, steroid-responsive, or heat-shock reactive. Some bacterial repression systems, such as the *lac* operon, have been exploited in mammalian cells and transgenic animals (Fieck *et al.*, 1992; Wyborski *et al.*, 1996; Wyborski and Short, 1991). Vectors often use a selectable marker to facilitate identifying those cells that have incorporated the vector. Many selectable markers are well known in the art for the use with prokaryotes, usually antibiotic-resistance genes or the use of autotrophy and auxotrophy mutants.

Using antisense and sense *VEGF* oligonucleotides can prevent VEGF polypeptide expression. These oligonucleotides bind to target nucleic acid sequences, forming duplexes that block transcription or translation of the target sequence by enhancing degradation of the duplexes, terminating prematurely transcription or translation, or by other means.

WO 01/70174

45

PCT/US01/09043

- Antisense or sense oligonucleotides are single-stranded nucleic acids, either RNA or DNA, which can bind target *VEGF<sub>m</sub>* mRNA (sense) or *VEGF<sub>m</sub>* DNA (antisense) sequences. According to the present invention, antisense or sense oligonucleotides comprise a fragment of the *VEGF<sub>m</sub>* DNA coding region of at least about 14 nucleotides, preferably from about 14 to 30 nucleotides. In general, antisense RNA or DNA molecules can comprise at least 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 bases in length or more. Among others, (Stein and Cohen, 1988; van der Krol *et al.*, 1988a) describe methods to derive antisense or a sense oligonucleotides from a given cDNA sequence.
- Modifications of antisense and sense oligonucleotides can augment their effectiveness. Modified sugar-phosphodiester bonds or other sugar linkages (WO 91/06629, 1991), increase *in vivo* stability by conferring resistance to endogenous nucleases without disrupting binding specificity to target sequences. Other modifications can increase the affinities of the oligonucleotides for their targets, such as covalently linked organic moieties (WO 90/10448, 1990) or poly-(L)-lysine. Other attachments modify binding specificities of the oligonucleotides for their targets, including metal complexes or intercalating (*e.g.* ellipticine) and alkylating agents.
- To introduce antisense or sense oligonucleotides into target cells (cells containing the target nucleic acid sequence), any gene transfer method may be used and are well known to those of skill in the art. Examples of gene transfer methods include 1) biological, such as gene transfer vectors like Epstein-Barr virus or conjugating the exogenous DNA to a ligand-binding molecule (WO 91/04753, 1991), 2) physical, such as electroporation, and 3) chemical, such as CaPO<sub>4</sub> precipitation and oligonucleotide-lipid complexes (WO 90/10448, 1990).
- The terms "host cell" and "recombinant host cell" are used interchangeably. Such terms refer not only to a particular subject cell but also to the progeny or potential progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term.
- Methods of eukaryotic cell transfection and prokaryotic cell transformation are well known in the art. The choice of host cell will dictate the preferred technique for

WO 01/70174

46

PCT/US01/09043

introducing the nucleic acid of interest. Table E which is not meant to be limiting, summarizes many of the known techniques in the art. Introduction of nucleic acids into an organism may also be done with *ex vivo* techniques that use an *in vitro* method of transfection, as well as established genetic techniques, if any, for that particular organism.

5

Table E Methods to introduce nucleic acid into cells

Cells	Methods	References	Notes
Prokaryotes (bacteria)	Calcium chloride	(Cohen <i>et al.</i> , 1972; Hanahan, 1983; Mandel and Higa, 1970)	
	Electroporation	(Shigekawa and Dower, 1988)	
Eukaryotes  Mammalian cells	Calcium phosphate transfection	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazine- <i>N'</i> -(2-ethanesulfonic acid (HEPES) buffered saline solution (Chen and Okayama, 1988; Graham and van der Eb, 1973; Wigler <i>et al.</i> , 1978)  BES ( <i>N,N</i> -bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid) buffered solution (Ishiura <i>et al.</i> , 1982)	Cells may be "shocked" with glycerol or dimethylsulfoxide (DMSO) to increase transfection efficiency (Ausubel <i>et al.</i> , 1987).
	Diethylaminoethyl (DEAE)-Dextran transfection	(Fujita <i>et al.</i> , 1986; Lopata <i>et al.</i> , 1984; Selden <i>et al.</i> , 1986)	Most useful for transient, but not stable, transfections. Chloroquine can be used to increase efficiency.
	Electroporation	(Neumann <i>et al.</i> , 1982; Potter, 1988; Potter <i>et al.</i> , 1984; Wong and Neumann, 1982)	Especially useful for hard-to-transfect lymphocytes.
	Cationic lipid reagent transfection	(Elroy-Stein and Moss, 1990; Felgner <i>et al.</i> , 1987; Rose <i>et al.</i> , 1991; Whitt <i>et al.</i> , 1990)	Applicable to both <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> transfection.

Table E Methods to introduce nucleic acid into cells

Cells	Methods	References	Notes
	Retroviral	Production exemplified by (Cepko <i>et al.</i> , 1984; Miller and Buttimore, 1986; Pear <i>et al.</i> , 1993) Infection <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> : (Austin and Cepko, 1990; Bodine <i>et al.</i> , 1991; Fekete and Cepko, 1993; Lemischka <i>et al.</i> , 1986; Turner <i>et al.</i> , 1990; Williams <i>et al.</i> , 1984)	Lengthy process, many packaging lines available at ATCC. Applicable to both <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> transfection.
	Polybrene	(Chaney <i>et al.</i> , 1986; Kawai and Nishizawa, 1984)	
	Microinjection	(Capecchi, 1980)	Can be used to establish cell lines carrying integrated copies of VEGFmg DNA sequences.
	Protoplast fusion	(Rassoulzadegan <i>et al.</i> , 1982; Sandri-Goldin <i>et al.</i> , 1981; Schaffner, 1980)	
Insect cells ( <i>in vitro</i> )	Baculovirus systems	(Luckow, 1991; Miller, 1988; O'Reilly <i>et al.</i> , 1992)	Useful for <i>in vitro</i> production of proteins with eukaryotic modifications.
Yeast	Electroporation	(Becker and Guarente, 1991)	
	Lithium acetate	(Gietz <i>et al.</i> , 1998; Ito <i>et al.</i> , 1983)	
	Spheroplast fusion	(Beggs, 1978; Hinnen <i>et al.</i> , 1978)	Laborious, can produce aneuploids.
Plant cells (general reference: (Hansen and Wright, 1999))	Agrobacterium transformation	(Bechtold and Pelletier, 1998; Escudero and Holm, 1997; Hansen and Chilton, 1999; Touraev and al., 1997)	
	Biolistics (microprojectiles)	(Finer <i>et al.</i> , 1999; Hansen and Chilton, 1999; Shillito, 1999)	

Table E Methods to introduce nucleic acid into cells

Cells	Methods	References	Notes
	Electroporation (protoplasts)	(Fromm <i>et al.</i> , 1985; Ou-Lee <i>et al.</i> , 1986; Rhodes <i>et al.</i> , 1988; Saunders <i>et al.</i> , 1989) May be combined with liposomes (Trick and al., 1997)	
	Polyethylene glycol (PEG) treatment	(Shillito, 1999)	
	Liposomes	May be combined with electroporation (Trick and al., 1997)	
	<i>in planta</i> microinjection	(Leduc and al., 1996; Zhou and al., 1983)	
	Seed imbibition	(Trick and al., 1997)	
	Laser beam	(Hoffman, 1996)	
	Silicon carbide whiskers	(Thompson and al., 1995)	

Vectors often use a selectable marker to facilitate identifying those cells that have incorporated the vector. Many selectable markers are well known in the art for the use with prokaryotes, usually antibiotic-resistance genes or the use of autotrophy and auxotrophy mutants. Table F lists often-used selectable markers for mammalian cell transfection.

Table F Useful selectable markers for eukaryote cell transfection

Selectable Marker	Selection	Action	Reference
Adenosine deaminase (ADA)	Media includes 9- $\beta$ -D-xylofuranosyl adenine (Xyl-A)	Conversion of Xyl-A to Xyl-ATP, which incorporates into nucleic acids, killing cells. ADA detoxifies	(Kaufman <i>et al.</i> , 1986)
Dihydrofolate reductase (DHFR)	Methotrexate (MTX) and dialyzed serum (purine-free media)	MTX competitive inhibitor of DHFR. In absence of exogenous purines, cells require DHFR, a necessary enzyme in purine biosynthesis.	(Simonsen and Levinson, 1983)
Aminoglycoside phosphotransferase	G418	G418, an aminoglycoside	(Southern and Berg,



**Table F Useful selectable markers for eukaryote cell transfection**

Selectable Marker	Selection	Action	Reference
("APH", "neo", "G418")		detoxified by APH, interferes with ribosomal function and consequently, translation.	1982)
Hygromycin-B-phosphotransferase (HPH)	hygromycin-B	Hygromycin-B, an aminocyclitol detoxified by HPH, disrupts protein translocation and promotes mistranslation.	(Palmer <i>et al.</i> , 1987)
Thymidine kinase (TK)	Forward selection (TK+): Media (HAT) incorporates aminopterin. Reverse selection (TK-): Media incorporates 5-bromodeoxyuridine (BrdU).	Forward: Aminopterin forces cells to synthesize dTTP from thymidine, a pathway requiring TK. Reverse: TK phosphorylates BrdU, which incorporates into nucleic acids, killing cells.	(Littlefield, 1964)

A host cell of the invention, such as a prokaryotic or eukaryotic host cell in culture, can be used to produce VEGF<sub>mg</sub>. Accordingly, the invention provides methods for producing VEGF<sub>mg</sub> using the host cells of the invention. In one

5 embodiment, the method comprises culturing the host cell of the invention (into which a recombinant expression vector encoding VEGF<sub>mg</sub> has been introduced) in a suitable medium, such that VEGF<sub>mg</sub> is produced. In another embodiment, the method further comprises isolating VEGF<sub>mg</sub> from the medium or the host cell.

#### 10 Transgenic VEGF<sub>mg</sub> animals

Transgenic animals are useful for studying the function and/or activity of VEGF<sub>mg</sub> and for identifying and/or evaluating modulators of VEGF<sub>mg</sub> activity. "Transgenic animals" are non-human animals, preferably mammals, more preferably rodents such as rats or mice, in which one or more of the cells include a transgene.

WO 01/70174

50

PCT/US01/09043

Other transgenic animals include primates, sheep, dogs, cows, goats, chickens, amphibians, *etc.* A "transgene" is exogenous DNA that is integrated into the genome of a cell from which a transgenic animal develops, and that remains in the genome of the mature animal. Transgenes preferably direct the expression of an encoded gene product in one or more cell types or tissues of the transgenic animal with the purpose of preventing expression of a naturally encoded gene product in one or more cell types or tissues (a "knockout" transgenic animal), or serving as a marker or indicator of an integration, chromosomal location, or region of recombination (*e.g. cre/loxP* mice). A "homologous recombinant animal" is a non-human animal, such as a rodent, in which endogenous *VEGFmg* has been altered by an exogenous DNA molecule that recombines homologously with endogenous *VEGFmg* in a (*e.g. embryonic*) cell prior to development the animal. Host cells with exogenous *VEGFmg* can be used to produce non-human transgenic animals, such as fertilized oocytes or embryonic stem cells into which *VEGFmg*-coding sequences have been introduced. Such host cells can then be used to create non-human transgenic animals or homologous recombinant animals.

#### 1. *Approaches to transgenic animal production*

A transgenic animal can be created by introducing *VEGFmg* into the male pronuclei of a fertilized oocyte (*e.g.*, by microinjection, retroviral infection) and allowing the oocyte to develop in a pseudopregnant female foster animal (pf/fa). The *VEGFmg* cDNA sequences can be introduced as a transgene into the genome of a non-human animal. Alternatively, a homologue of *VEGFmg* can be used as a transgene. Intronic sequences and polyadenylation signals can also be included in the transgene to increase transgene expression. Tissue-specific regulatory sequences can be operably-linked to the *VEGFmg* transgene to direct expression of *VEGFmg* to particular cells. Methods for generating transgenic animals via embryo manipulation and microinjection, particularly animals such as mice, have become conventional in the art, *e.g.* (Evans *et al.*, U.S. Patent No. 4,870,009, 1989; Hogan, 0879693843, 1994; Leder and Stewart, U.S. Patent No. 4,736,866, 1988; Wagner and Hoppe, US Patent No. 4,873,191, 1989). Other non-mice transgenic animals may be made by similar methods. A transgenic founder animal, which can be used to breed additional transgenic animals, can be identified based upon the presence of the transgene in its

genome and/or expression of the transgene mRNA in tissues or cells of the animals. Transgenic (*e.g.* *VEGFmg*) animals can be bred to other transgenic animals carrying other transgenes.

## 2. *Vectors for transgenic animal production*

5 To create a homologous recombinant animal, a vector containing at least a portion of *VEGFmg* into which a deletion, addition or substitution has been introduced to thereby alter, *e.g.*, functionally disrupt, *VEGFmg*. *VEGFmg* can be a murine gene or other *VEGFmg* homologue, such as the naturally occurring variant. In one approach, a knockout vector functionally disrupts the endogenous *VEGFmg* gene  
10 upon homologous recombination, and thus a non-functional VEGFmg protein, if any, is expressed.

Alternatively, the vector can be designed such that, upon homologous recombination, the endogenous *VEGFmg* is mutated or otherwise altered but still encodes functional protein (*e.g.*, the upstream regulatory region can be altered to alter  
15 the expression of endogenous VEGFmg). In this type of homologous recombination vector, the altered portion of the *VEGFmg* is flanked at its 5'- and 3'-termini by additional nucleic acid of the *VEGFmg* to allow for homologous recombination to occur between the exogenous *VEGFmg* carried by the vector and an endogenous *VEGFmg* in an embryonic stem cell. The additional flanking VEGFmg nucleic acid is  
20 sufficient to engender homologous recombination with endogenous *VEGFmg*. Typically, several kilobases of flanking DNA (both at the 5'- and 3'-termini) are included in the vector (Thomas and Capecchi, 1987). The vector is then introduced into an embryonic stem cell line (*e.g.*, by electroporation), and cells in which the introduced *VEGFmg* has homologously-recombined with the endogenous *VEGFmg*  
25 are selected (Li *et al.*, 1992).

## 3. *Introduction of VEGFmg transgene cells during development*

Selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (*e.g.*, a mouse) to form aggregation chimeras (Bradley, 1987). A chimeric embryo can then be  
implanted into a suitable pffa and the embryo brought to term. Progeny harboring the  
30 homologously-recombined DNA in their germ cells can be used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously-recombined DNA by germline transmission of the transgene. Methods for constructing homologous recombination

WO 01/70174

52

PCT/US01/09043

vectors and homologous recombinant animals are described (Berns *et al.*, WO 93/04169, 1993; Bradley, 1991; Kucherlapati *et al.*, WO 91/01140, 1991; Le Mouellie and Brullet, WO 90/11354, 1990).

Alternatively, transgenic animals that contain selected systems that allow for regulated expression of the transgene can be produced. An example of such a system is the *cre/loxP* recombinase system of bacteriophage P1 (Lakso *et al.*, 1992). Another recombinase system is the FLP recombinase system of *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman *et al.*, 1991). If a *cre/loxP* recombinase system is used to regulate expression of the transgene, animals containing transgenes encoding both the *Cre* recombinase and a selected protein are required. Such animals can be produced as "double" transgenic animals, by mating an animal containing a transgene encoding a selected protein to another containing a transgene encoding a recombinase.

Clones of transgenic animals can also be produced (Wilmot *et al.*, 1997). In brief, a cell from a transgenic animal can be isolated and induced to exit the growth cycle and enter G<sub>0</sub> phase. The quiescent cell can then be fused to an enucleated oocyte from an animal of the same species from which the quiescent cell is isolated. The reconstructed oocyte is then cultured to develop to a morula or blastocyte and then transferred to a pffa. The offspring borne of this female foster animal will be a clone of the "parent" transgenic animal.

20

#### *Anti-VEGFmg Abs*

The invention encompasses Abs and antibody fragments, such as F<sub>ab</sub> or (F<sub>ab</sub>)<sub>2</sub>, that bind immunospecifically to any VEGFmg epitopes.

"Antibody" (Ab) comprises single Abs directed against VEGFmg (anti-VEGFmg Ab; including agonist, antagonist, and neutralizing Abs), anti-VEGFmg Ab compositions with poly-epitope specificity, single chain anti-VEGFmg Abs, and fragments of anti-VEGFmg Abs. A "monoclonal antibody" is obtained from a population of substantially homogeneous Abs, *i.e.*, the individual Abs comprising the population are identical except for possible naturally-occurring mutations that may be present in minor amounts. Exemplary Abs include polyclonal (pAb), monoclonal (mAb), humanized, bi-specific (bsAb), and heteroconjugate Abs.

30

#### 1. *Polyclonal Abs (pAbs)*

WO 01/70174

53

PCT/US01/09043

Polyclonal Abs can be raised in a mammalian host, for example, by one or more injections of an immunogen and, if desired, an adjuvant. Typically, the immunogen and/or adjuvant are injected in the mammal by multiple subcutaneous or intraperitoneal injections. The immunogen may include VEGF<sub>mg</sub> or a fusion protein. Examples of adjuvants include Freund's complete and monophosphoryl Lipid A synthetic-trehalose dicorynomycolate (MPL-TDM). To improve the immune response, an immunogen may be conjugated to a protein that is immunogenic in the VEGF host, such as keyhole limpet hemocyanin (KLH), serum albumin, bovine thyroglobulin, and soybean trypsin inhibitor. Protocols for antibody production are described by (Ausubel *et al.*, 1987; Harlow and Lane, 1988). Alternatively, pAbs may be made in chickens, producing IgY molecules (Schäde *et al.*, 1996).

## 2. Monoclonal Abs (mAbs)

Anti-VEGF<sub>mg</sub> mAbs may be prepared using hybridoma methods (Milstein and Cuello, 1983). Hybridoma methods comprise at least four steps: (1) immunizing a host, or lymphocytes from a host; (2) harvesting the mAb secreting (or potentially secreting) lymphocytes, (3) fusing the lymphocytes to immortalized cells, and (4) selecting those cells that secrete the desired (anti-VEGF<sub>mg</sub>) mAb.

A mouse, rat, guinea pig, hamster, or other appropriate host is immunized to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing Abs that will specifically bind to the immunogen. Alternatively, the lymphocytes may be immunized *in vitro*. If human cells are desired, peripheral blood lymphocytes (PBLs) are generally used; however, spleen cells or lymphocytes from other mammalian sources are preferred. The immunogen typically includes VEGF<sub>mg</sub> or a fusion protein.

The lymphocytes are then fused with an immortalized cell line to form hybridoma cells, facilitated by a fusing agent such as polyethylene glycol (Goding, 1996). Rodent, bovine, or human myeloma cells immortalized by transformation may be used, or rat or mouse myeloma cell lines. Because pure populations of hybridoma cells and not unfused immortalized cells are preferred, the cells after fusion are grown in a suitable medium that contains one or more substances that inhibit the growth or survival of unfused, immortalized cells. A common technique uses parental cells that lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT). In this case, hypoxanthine, aminopterin and thymidine are added to the

medium (HAT medium) to prevent the growth of HGPRT-deficient cells while permitting hybridomas to grow.

Preferred immortalized cells fuse efficiently, can be isolated from mixed populations by selecting in a medium such as HAT, and support stable and high-level expression of antibody after fusion. Preferred immortalized cell lines are murine myeloma lines, available from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human mAbs (Kozbor *et al.*, 1984; Schook, 1987).

Because hybridoma cells secrete antibody extracellularly, the culture media can be assayed for the presence of mAbs directed against VEGFmg (anti-VEGFmg mAbs). Immunoprecipitation or *in vitro* binding assays, such as radio immunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA), measure the binding specificity of mAbs (Harlow and Lane, 1988; Harlow and Lane, 1999), including Scatchard analysis (Munson and Rodbard, 1980).

Anti-VEGFmg mAb secreting hybridoma cells may be isolated as single clones by limiting dilution procedures and sub-cultured (Goding, 1996). Suitable culture media include Dulbecco's Modified Eagle's Medium, RPMI-1640, or if desired, a protein-free or -reduced or serum-free medium (*e.g.*, Ultra DOMA PF or HL-1; Biowhittaker, Walkersville, MD). The hybridoma cells may also be grown *in vivo* as ascites.

The mAbs may be isolated or purified from the culture medium or ascites fluid by conventional Ig purification procedures such as protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, ammonium sulfate precipitation or affinity chromatography (Harlow and Lane, 1988; Harlow and Lane, 1999).

The mAbs may also be made by recombinant methods (U.S. Patent No. 4166452, 1979). DNA encoding anti-VEGFmg mAbs can be readily isolated and sequenced using conventional procedures, *e.g.*, using oligonucleotide probes that specifically bind to murine heavy and light antibody chain genes, to probe preferably DNA isolated from anti-VEGFmg-secreting mAb hybridoma cell lines. Once isolated, the isolated DNA fragments are sub-cloned into expression vectors that are then transfected into host cells such as simian COS-7 cells, Chinese hamster ovary

(CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce Ig protein, to express mAbs. The isolated DNA fragments can be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences (U.S. Patent No. 4816567, 1989; Morrison *et al.*, 1987), or by fusing the Ig coding sequence to all or part of the coding sequence for a non-Ig polypeptide. Such a non-Ig polypeptide can be substituted for the constant domains of an antibody, or can be substituted for the variable domains of one antigen-combining site to create a chimeric bivalent antibody.

### 3. *Monovalent Abs*

The Abs may be monovalent Abs that consequently do not cross-link with each other. For example, one method involves recombinant expression of Ig light chain and modified heavy chain. Heavy chain truncations generally at any point in the F<sub>c</sub> region will prevent heavy chain cross-linking. Alternatively, the relevant cysteine residues are substituted with another amino acid residue or are deleted, preventing crosslinking. *In vitro* methods are also suitable for preparing monovalent Abs. Abs can be digested to produce fragments, such as F<sub>ab</sub> fragments (Harlow and Lane, 1988; Harlow and Lane, 1999).

### 4. *Humanized and human Abs*

Anti-VEGFm Abs may further comprise humanized or human Abs.

Humanized forms of non-human Abs are chimeric Igs, Ig chains or fragments (such as F<sub>v</sub>, F<sub>ab</sub>, F<sub>ab</sub>', F<sub>(ab')2</sub> or other antigen-binding subsequences of Abs) that contain minimal sequence derived from non-human Ig.

Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced from a non-human source. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization is accomplished by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody (Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988; Verhoeven *et al.*, 1988). Such "humanized" Abs are chimeric Abs (U.S. Patent No. 4816567, 1989), wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized Abs are typically human Abs in which some CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues

from analogous sites in rodent Abs. Humanized Abs include human Igs (recipient antibody) in which residues from a complementary determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit, having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, corresponding non-human residues replace F<sub>v</sub> framework residues of the human Ig. Humanized Abs may comprise residues that are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. In general, the humanized antibody comprises substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which most if not all of the CDR regions correspond to those of a non-human Ig and most if not all of the FR regions are those of a human Ig consensus sequence. The humanized antibody optimally also comprises at least a portion of an Ig constant region (F<sub>c</sub>), typically that of a human Ig (Jones *et al.*, 1986; Presta, 1992; Riechmann *et al.*, 1988).

Human Abs can also be produced using various techniques, including phage display libraries (Hoogenboom *et al.*, 1991; Marks *et al.*, 1991) and the preparation of human mAbs (Boerner *et al.*, 1991; Reisfeld and Sell, 1985). Similarly, introducing human Ig genes into transgenic animals in which the endogenous Ig genes have been partially or completely inactivated can be exploited to synthesize human Abs. Upon challenge, human antibody production is observed, which closely resembles that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and antibody repertoire (U.S. Patent No. 5545807, 1996; U.S. Patent No. 5545806, 1996; U.S. Patent No. 5569825, 1996; U.S. Patent No. 5633425, 1997; U.S. Patent No. 5661016, 1997; U.S. Patent No. 5625126, 1997; Fishwild *et al.*, 1996; Lonberg and Huszar, 1995; Lonberg *et al.*, 1994; Marks *et al.*, 1992).

#### 5. *Bi-specific mAbs*

Bi-specific Abs are monoclonal, preferably human or humanized, that have binding specificities for at least two different antigens. For example, a binding specificity is VEGFmg; the other is for any antigen of choice, preferably a cell-surface protein or receptor or receptor subunit.

Traditionally, the recombinant production of bi-specific Abs is based on the co-expression of two Ig heavy-chain/light-chain pairs, where the two heavy chains have different specificities (Milstein and Cuello, 1983). Because of the random



WO 01/70174

57

PCT/US01/09043

assortment of Ig heavy and light chains, the resulting hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of ten different antibody molecules, of which only one has the desired bi-specific structure. The desired antibody can be purified using affinity chromatography or other techniques (WO 93/08829, 1993; Traunecker *et al.*, 5 1991).

To manufacture a bi-specific antibody (Suresh *et al.*, 1986), variable domains with the desired antibody-antigen combining sites are fused to Ig constant domain sequences. The fusion is preferably with an Ig heavy-chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. Preferably, the first 10 heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light-chain binding is in at least one of the fusions. DNAs encoding the Ig heavy-chain fusions and, if desired, the Ig light chain, are inserted into separate expression vectors and are co-transfected into a suitable host organism.

The interface between a pair of antibody molecules can be engineered to 15 maximize the percentage of heterodimers that are recovered from recombinant cell culture (WO 96/27011, 1996). The preferred interface comprises at least part of the CH3 region of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (*e.g.* tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical 20 or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (*e.g.* alanine or threonine). This mechanism increases the yield of the heterodimer over unwanted end products such as homodimers.

Bi-specific Abs can be prepared as full length Abs or antibody fragments (*e.g.* 25  $F_{(ab')_2}$  bi-specific Abs). One technique to generate bi-specific Abs exploits chemical linkage. Intact Abs can be proteolytically cleaved to generate  $F_{(ab')_2}$  fragments (Brennan *et al.*, 1985). Fragments are reduced with a dithiol complexing agent, such as sodium arsenite, to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The generated  $F_{ab'}$  fragments are then converted to thionitrobenzoate 30 (TNB) derivatives. One of the  $F_{ab'}$ -TNB derivatives is then reconverted to the  $F_{ab'}$ -thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount

WO 01/70174

58

PCT/US01/09043

of the other  $F_{ab'}$ -TNB derivative to form the bi-specific antibody. The produced bi-specific Abs can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

$F_{ab'}$  fragments may be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form bi-specific Abs. For example, fully humanized bi-specific  $F_{(ab')/2}$  Abs can be produced (Shalaby *et al.*, 1992). Each  $F_{ab'}$  fragment is separately secreted from *E.*  
5 *coli* and directly coupled chemically *in vitro*, forming the bi-specific antibody.

Various techniques for making and isolating bi-specific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, leucine zipper motifs can be exploited (Kostelny *et al.*, 1992). Peptides from the *Fos* and *Jun*  
10 proteins are linked to the  $F_{ab'}$  portions of two different Abs by gene fusion. The antibody homodimers are reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form antibody heterodimers. This method can also produce antibody homodimers. The "diabody" technology (Holliger *et al.*, 1993) provides an  
alternative method to generate bi-specific antibody fragments. The fragments  
15 comprise a heavy-chain variable domain ( $V_H$ ) connected to a light-chain variable domain ( $V_L$ ) by a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. The  $V_H$  and  $V_L$  domains of one fragment are forced to pair with the complementary  $V_L$  and  $V_H$  domains of another fragment, forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bi-specific antibody fragments is the use  
20 of single-chain  $F_v$  (sF<sub>v</sub>) dimers (Gruber *et al.*, 1994). Abs with more than two valencies are also contemplated, such as tri-specific Abs (Tutt *et al.*, 1991).

Exemplary bi-specific Abs may bind to two different epitopes on a given VEGF<sub>m</sub>. Alternatively, cellular defense mechanisms can be restricted to a particular cell expressing the particular VEGF<sub>m</sub>: an anti-VEGF<sub>m</sub> arm may be combined with  
25 an arm that binds to a leukocyte triggering molecule, such as a T-cell receptor molecule (e.g. CD2, CD3, CD28, or B7), or to Fc receptors for IgG (FcγR), such as FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16). Bi-specific Abs may also be used to target cytotoxic agents to cells that express a particular VEGF<sub>m</sub>. These Abs possess a VEGF<sub>m</sub>-binding arm and an arm that binds a cytotoxic agent or a  
30 radionuclide chelator.

#### 6. Heteroconjugate Abs

WO 01/70174

59

PCT/US01/09043

Heteroconjugate Abs, consisting of two covalently joined Abs, have been proposed to target immune system cells to unwanted cells (4,676,980, 1987) and for treatment of human immunodeficiency virus (HIV) infection (WO 91/00360, 1991; WO 92/20373, 1992). Abs prepared *in vitro* using synthetic protein chemistry methods, including those involving cross-linking agents, are contemplated. For example, immunotoxins may be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate (4,676,980, 1987).

#### 7. Immunoconjugates

Immunoconjugates may comprise an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, toxin (*e.g.*, an enzymatically active toxin or fragment of bacterial, fungal, plant, or animal origin), or a radioactive isotope (*i.e.*, a radioconjugate).

Useful enzymatically-active toxins and fragments include Diphtheria A chain, non-binding active fragments of Diphtheria toxin, exotoxin A chain from *Pseudomonas aeruginosa*, ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain,  $\alpha$ -sarcin, *Aleurites fordii* proteins, Dianthin proteins, *Phytolacca americana* proteins, *Momordica charantia* inhibitor, curcin, crotin, *Saponaria officinalis* inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated Abs, such as  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , and  $^{186}\text{Re}$ .

Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bi-functional protein-coupling agents, such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bi-functional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), *bis*-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), *bis*-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and *bis*-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared (Vitetta *et al.*, 1987).  $^{14}\text{C}$ -labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic

WO 01/70174

60

PCT/US01/09043

acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugating radionuclide to antibody (WO 94/11026, 1994).

In another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such as streptavidin) for utilization in tumor pre-targeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a streptavidin "ligand" (e.g., biotin) that is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a radionuclide).

#### 8. *Effector function engineering*

The antibody can be modified to enhance its effectiveness in treating a disease, such as cancer. For example, cysteine residue(s) may be introduced into the F<sub>c</sub> region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. Such homodimeric Abs may have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) (Caron *et al.*, 1992; Shopes, 1992). Homodimeric Abs with enhanced anti-tumor activity can be prepared using hetero-bifunctional cross-linkers (Wolff *et al.*, 1993). Alternatively, an antibody engineered with dual F<sub>c</sub> regions may have enhanced complement lysis (Stevenson *et al.*, 1989).

#### 9. *Immunoliposomes*

Liposomes containing the antibody may also be formulated (U.S. Patent No. 4485045, 1984; U.S. Patent No. 4544545, 1985; U.S. Patent No. 5013556, 1991; Epstein *et al.*, 1985; Hwang *et al.*, 1980). Useful liposomes can be generated by a reverse-phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol, and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Such preparations are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with a desired diameter. F<sub>ab</sub> fragments of the antibody can be conjugated to the liposomes (Martin and Papahadjopoulos, 1982) via a disulfide-interchange reaction. A chemotherapeutic agent, such as Doxorubicin, may also be contained in the liposome (Gabizon *et al.*, 1989). Other useful liposomes with different compositions are contemplated.

#### 10. *Diagnostic applications of Abs directed against VEGFmg*

Anti-VEGFmg Abs can be used to localize and/or quantitate VEGFmg (e.g., for use in measuring levels of VEGFmg within tissue samples or for use in diagnostic

methods, etc.). Anti-VEGFmg epitope Abs can be utilized as pharmacologically-active compounds.

Anti-VEGFmg Abs can be used to isolate a VEGFmg of choice by standard techniques, such as immunoaffinity chromatography or immunoprecipitation. These approaches facilitate purifying endogenous VEGFmg antigen-containing polypeptides from cells and tissues. These approaches, as well as others, can be used to detect a VEGFmg in a sample to evaluate the abundance and pattern of expression of the antigenic protein. Anti-VEGFmg Abs can be used to monitor protein levels in tissues as part of a clinical testing procedure; for example, to determine the efficacy of a given treatment regimen. Coupling the antibody to a detectable substance (label) allows detection of Ab-antigen complexes. Classes of labels include fluorescent, luminescent, bioluminescent, and radioactive materials, enzymes and prosthetic groups. Useful labels include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase,  $\beta$ -galactosidase, acetylcholinesterase, streptavidin/biotin, avidin/biotin, umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride, phycoerythrin, luminol, luciferase, luciferin, aequorin, and  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  or  $^3\text{H}$ .

#### 11. *Antibody therapeutics*

Abs of the invention, including polyclonal, monoclonal, humanized and fully human Abs, can be used therapeutically. Such agents will generally be employed to treat or prevent a disease or pathology in a subject. An antibody preparation, preferably one having high antigen specificity and affinity generally mediates an effect by binding the target epitope(s). Generally, administration of such Abs may mediate one of two effects: (1) the antibody may prevent ligand binding, eliminating endogenous ligand binding and subsequent signal transduction, or (2) the antibody elicits a physiological result by binding an effector site on the target molecule, initiating signal transduction.

A therapeutically effective amount of an antibody relates generally to the amount needed to achieve a therapeutic objective, epitope binding affinity, administration rate, and depletion rate of the antibody from a subject. Common ranges for therapeutically effective doses may be, as a nonlimiting example, from

WO 01/70174

62

PCT/US01/09043

about 0.1 mg/kg body weight to about 50 mg/kg body weight. Dosing frequencies may range, for example, from twice daily to once a week.

#### 12. *Pharmaceutical compositions of Abs*

Anti-VEGFmg Abs, as well as other VEGFmg interacting molecules (such as aptamers) identified in other assays, can be administered in pharmaceutical compositions to treat various disorders. Principles and considerations involved in preparing such compositions, as well as guidance in the choice of components can be found in (de Boer, 1994; Gennaro, 2000; Lee, 1990).

Because many VEGFmgs are intracellular, Abs that are internalized are preferred when whole Abs are used as inhibitors to these molecules. Otherwise, Abs that are not internalized are preferred, such as anti-osteonidogen Abs. Liposomes may also be used as a delivery vehicle for intracellular introduction. Where antibody fragments are used, the smallest inhibitory fragment that specifically binds to the epitope is preferred. For example, peptide molecules can be designed that bind a preferred epitope based on the variable-region sequences of a useful antibody. Such peptides can be synthesized chemically and/or produced by recombinant DNA technology (Marasco *et al.*, 1993). Formulations may also contain more than one active compound for a particular treatment, preferably those with activities that do not adversely affect each other. The composition may comprise an agent that enhances function, such as a cytotoxic agent, cytokine, chemotherapeutic agent, or growth-inhibitory agent.

The active ingredients can also be entrapped in microcapsules prepared by coacervation techniques or by interfacial polymerization; for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles, and nanocapsules) or in macroemulsions.

The formulations to be used for *in vivo* administration are highly preferred to be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes or any of a number of techniques.

Sustained-release preparations may also be prepared, such as semi-permeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are

WO 01/70174

63

PCT/US01/09043

in the form of shaped articles, *e.g.*, films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (Boswell and Scribner, U.S. Patent No. 3,773,919, 1973), copolymers of L-glutamic acid and  $\gamma$  ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers  
 5 such as injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer, and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods and may be preferred.

10

*Therapeutic applications of VEGFmg*

1. *Pathology-related utilities*

The polynucleotides and proteins of the invention are useful in potential therapeutic applications implicated in tumors and neoplasias, hamangiomas,  
 15 rheumatoid arthritis, atherosclerosis, idiopathic pulmonary fibrosis, vascular restenosis, arteriovenous malformations, meningioma, neovascular glaucoma, psoriasis, agnionfibroma, hemophilic joints, hypertrophic scars, Osler-Weber syndrome, pyogenic granuloma retrolental fibroplasias, scleroderma, trachoma, vascular adhesion pathologies, synovitis, dermatitis, enometriosis, pterygium, diabetic  
 20 retinopathy, neovascularization associated with corneal injury or grafts, wound, sore, and ulcers (skin, gastric and duodenal) healing. For example, a cDNA encoding *ARP* may be useful in gene therapy, and ARP protein may be useful when administered to a subject in need thereof. The novel nucleic acid encoding ARP, and the ARP protein of the invention, or fragments thereof, may further be useful in  
 25 diagnostic applications, wherein the presence or amount of the nucleic acid or the protein are to be assessed. These materials are further useful in the generation of Abs that bind immunospecifically to the novel substances of the invention for use in therapeutic or diagnostic methods.

In addition, the instant invention may be used to determine the clinical state or  
 30 pathology of a sample, such as a biopsy of cells taken from a patient. A clinical state of a growth, such as a tumor or cancer, is a classification system recognized by those of skill in the art to categorize, for example, the metastatic aggressiveness of a cancer.

## 2. *Agonists and antagonists*

"Antagonist" includes any molecule that partially or fully blocks, inhibits, or neutralizes a biological activity of endogenous VEGFmg. Similarly, "agonist" includes any molecule that mimics a biological activity of endogenous VEGFmg.

- 5 Molecules that can act as agonists or antagonists include Abs or antibody fragments, fragments or variants of endogenous VEGFmg, peptides, antisense oligonucleotides, small organic molecules, *etc.*

## 3. *Identifying antagonists and agonists*

- 10 To assay for antagonists, VEGFmg is added to, or expressed in, a cell along with the compound to be screened for a particular activity. If the compound inhibits the activity of interest in the presence of the VEGFmg, that compound is an antagonist to the VEGFmg; if VEGFmg activity is enhanced, the compound is an agonist.

### (a) *Specific examples of potential antagonists and agonist*

- 15 Any molecule that alters VEGFmg cellular effects, such as angiogenesis or cell survival, is a candidate antagonist or agonist. Screening techniques well known to those skilled in the art can identify these molecules. Examples of antagonists and agonists include: (1) small organic and inorganic compounds, (2) small peptides, (3) Abs and derivatives, (4) polypeptides closely related to VEGFmg, (5) antisense DNA  
20 and RNA, (6) ribozymes, (7) triple DNA helices and (8) nucleic acid aptamers.

- Small molecules that bind to the VEGFmg active site or other relevant part of the polypeptide and inhibit the biological activity of the VEGFmg are antagonists. Examples of small molecule antagonists include small peptides, peptide-like molecules, preferably soluble, and synthetic non-peptidyl organic or inorganic  
25 compounds. These same molecules, if they enhance VEGFmg activity, are examples of agonists.

- Almost any antibody that affects a VEGFmg's function is a candidate antagonist, and occasionally, agonist. Examples of antibody antagonists include polyclonal, monoclonal, single-chain, anti-idiotypic, chimeric Abs, or humanized  
30 versions of such Abs or fragments. Abs may be from any species in which an immune response can be raised. Humanized Abs are also contemplated.



WO 01/70174

65

PCT/US01/09043

Alternatively, a potential antagonist or agonist may be a closely related protein, for example, a mutated form of the VEGFmg that recognizes a VEGFmg-interacting protein but imparts no effect, competitively inhibiting VEGFmg action. Alternatively, a mutated VEGFmg may be constitutively activated and may act as an  
5 agonist.

Antisense RNA or DNA constructs can be effective antagonists. Antisense RNA or DNA molecules block function by inhibiting translation by hybridizing to targeted mRNA. Antisense technology can be used to control gene expression through triple-helix formation or antisense DNA or RNA, both of which depend on  
10 polynucleotide binding to DNA or RNA. For example, the 5' coding portion of the *VEGFmg* sequence is used to design an antisense RNA oligonucleotide of from about 10 to 40 base pairs in length. A DNA oligonucleotide is designed to be complementary to a region of the gene involved in transcription (triple helix) (Beal and Dervan, 1991; Cooney *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1979), preventing transcription and  
15 the production of the VEGFmg. The antisense RNA oligonucleotide hybridizes to the mRNA *in vivo* and blocks translation of the mRNA molecule into the VEGFmg (antisense) (Cohen, 1989; Okano *et al.*, 1991). These oligonucleotides can also be delivered to cells such that the antisense RNA or DNA may be expressed *in vivo* to inhibit production of the VEGFmg. When antisense DNA is used,  
20 oligodeoxyribonucleotides derived from the translation-initiation site, *e.g.*, between about -10 and +10 positions of the target gene nucleotide sequence, are preferred.

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. Ribozymes act by sequence-specific hybridization to the complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Specific  
25 ribozyme cleavage sites within a potential RNA target can be identified by known techniques (WO 97/33551, 1997; Rossi, 1994).

To inhibit transcription, triple-helix nucleic acids that are single-stranded and comprise deoxynucleotides are useful antagonists. These oligonucleotides are designed such that triple-helix formation via Hoogsteen base-pairing rules is  
30 promoted, generally requiring stretches of purines or pyrimidines (WO 97/33551, 1997).

Because a VEGFmg activity may include nucleic acid binding, molecules that compete for VEGFmg nucleic acid binding site(s) can be effective intracellular competitors. Aptamers are short oligonucleotide sequences that can be used to recognize and specifically bind almost any molecule. The systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) process (Ausubel *et al.*, 1987; Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990) is powerful and can be used to find such aptamers. Aptamers have many diagnostic and clinical uses; almost any use in which an antibody has been used clinically or diagnostically, aptamers too may be used. In addition, are cheaper to make once they have been identified, and can be easily applied in a variety of formats, including administration in pharmaceutical compositions, in bioassays, and diagnostic tests (Jayasena, 1999).

#### *Pharmaceutical compositions*

The VEGFmg nucleic acid molecules, VEGFmg polypeptides, and anti-VEGFmg Abs (active compounds) of the invention, and derivatives, fragments, analogs and homologs thereof, can be incorporated into pharmaceutical compositions. Such compositions typically comprise the nucleic acid molecule, protein, or antibody and a pharmaceutically acceptable carrier. A "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration (Gennaro, 2000). Preferred examples of such carriers or diluents include, but are not limited to, water, saline, finger's solutions, dextrose solution, and 5% human serum albumin. Liposomes and non-aqueous vehicles such as fixed oils may also be used. Except when a conventional media or agent is incompatible with an active compound, use of these compositions is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

##### *1. General considerations*

A pharmaceutical composition of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration, including intravenous, intradermal, subcutaneous, oral (*e.g.*, inhalation), transdermal (*i.e.*, topical), transmucosal, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include: a sterile diluent such as water for injection,

saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); buffers such as acetates, citrates or phosphates, and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. The pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

2. *Injectable formulations*

Pharmaceutical compositions suitable for injection include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, CREMOPHOR EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid so as to be administered using a syringe. Such compositions should be stable during manufacture and storage and must be preserved against contamination from microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (such as glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol), and suitable mixtures. Proper fluidity can be maintained, for example, by using a coating such as lecithin, by maintaining the required particle size in the case of dispersion and by using surfactants. Various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, and thimerosal, can contain microorganism contamination. Isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as manitol, sorbitol, and sodium chloride can be included in the composition. Compositions that can delay absorption include agents such as aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound (e.g., VEGFmg or anti-VEGFmg antibody) in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients as required, followed by sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium, and the other

required ingredients as discussed. Sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, methods of preparation include vacuum drying and freeze-drying that yield a powder containing the active ingredient and any desired ingredient from a sterile solutions.

5           3.     *Oral compositions*

Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. They can be enclosed in gelatin capsules or compressed into tablets. For the purpose of oral therapeutic administration, the active compound can be incorporated with excipients and used in the form of tablets, troches, or capsules. Oral compositions can also be prepared using a fluid carrier for use as a mouthwash, wherein the compound in the fluid carrier is applied orally. Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included. Tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an excipient such as starch or lactose, a disintegrating agent such as alginic acid, PRIMOGEL, or corn starch; a lubricant such as magnesium stearate or STEROTES; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring.

15           4.     *Compositions for inhalation*

For administration by inhalation, the compounds are delivered as an aerosol spray from a nebulizer or a pressurized container that contains a suitable propellant, e.g., a gas such as carbon dioxide.

20           5.     *Systemic administration*

Systemic administration can also be transmucosal or transdermal. For transmucosal or transdermal administration, penetrants that can permeate the target barrier(s) are selected. Transmucosal penetrants include, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Nasal sprays or suppositories can be used for transmucosal administration. For transdermal administration, the active compounds are formulated into ointments, salves, gels, or creams.

30           The compounds can also be prepared in the form of suppositories (e.g., with bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

6. *Carriers*

In one embodiment, the active compounds are prepared with carriers that protect the compound against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems.

- 5 Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Such materials can be obtained commercially from ALZA Corporation (Mountain View, CA) and NOVA Pharmaceuticals, Inc. (Lake Elsinore, CA), or prepared by one of skill in the art. Liposomal suspensions can also be used as pharmaceutically
- 10 acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art, such as in (Eppstein *et al.*, US Patent No. 4,522,811, 1985).

7. *Unit dosage*

Oral formulations or parenteral compositions in unit dosage form can be created to facilitate administration and dosage uniformity. Unit dosage form refers to

15 physically discrete units suited as single dosages for the subject to be treated, containing a therapeutically effective quantity of active compound in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the unit dosage forms of the invention are dictated by, and directly dependent on, the unique characteristics of the active compound and the particular desired therapeutic effect, and the inherent

20 limitations of compounding the active compound.

8. *Gene therapy compositions*

The nucleic acid molecules of the invention can be inserted into vectors and used as gene therapy vectors. Gene therapy vectors can be delivered to a subject by, for example, intravenous injection, local administration (Nabel and Nabel, US Patent

25 No. 5,328,470, 1994), or by stereotactic injection (Chen *et al.*, 1994). The pharmaceutical preparation of a gene therapy vector can include an acceptable diluent, or can comprise a slow release matrix in which the gene delivery vehicle is imbedded. Alternatively, where the complete gene delivery vector can be produced intact from recombinant cells, *e.g.*, retroviral vectors, the pharmaceutical preparation can include

30 one or more cells that produce the gene delivery system.

9. *Kits for pharmaceutical compositions*

WO 01/70174

70

PCT/US01/09043

The pharmaceutical compositions can be included in a kit, container, pack, or dispenser together with instructions for administration. When the invention is supplied as a kit, the different components of the composition may be packaged in separate containers and admixed immediately before use. Such packaging of the components separately may permit long-term storage without losing the active components' functions.

Kits may also include reagents in separate containers that facilitate the execution of a specific test, such as diagnostic tests or tissue typing. For example, *VEGFmg* DNA templates and suitable primers may be supplied for internal controls.

10 (a) *Containers or vessels*

The reagents included in the kits can be supplied in containers of any sort such that the life of the different components are preserved, and are not adsorbed or altered by the materials of the container. For example, sealed glass ampules may contain lyophilized luciferase or buffer that have been packaged under a neutral, non-reacting gas, such as nitrogen. Ampoules may consist of any suitable material, such as glass, organic polymers, such as polycarbonate, polystyrene, *etc.*, ceramic, metal or any other material typically employed to hold reagents. Other examples of suitable containers include simple bottles that may be fabricated from similar substances as ampules, and envelopes, that may consist of foil-lined interiors, such as aluminum or an alloy. Other containers include test tubes, vials, flasks, bottles, syringes, or the like. Containers may have a sterile access port, such as a bottle having a stopper that can be pierced by a hypodermic injection needle. Other containers may have two compartments that are separated by a readily removable membrane that upon removal permits the components to mix. Removable membranes may be glass, plastic, rubber, *etc.*

25 (b) *Instructional materials*

Kits may also be supplied with instructional materials. Instructions may be printed on paper or other substrate, and/or may be supplied as an electronic-readable medium, such as a floppy disc, CD-ROM, DVD-ROM, Zip disc, video tape, audio tape, *etc.* Detailed instructions may not be physically associated with the kit; instead, a user may be directed to an internet web site specified by the manufacturer or distributor of the kit, or supplied as electronic mail.

*Screening and detection methods*

Isolated nucleic acid molecules can be used to express VEGFmg (e.g., via a recombinant expression vector in a host cell in gene therapy applications), to detect  
 5 *VEGFmg* mRNA (e.g., in a biological sample) or a genetic lesion in a *VEGFmg*, and to modulate VEGFmg activity, as described below. In addition, VEGFmg polypeptides can be used to screen drugs or compounds that modulate VEGFmg activity or expression as well as to treat disorders characterized by insufficient or excessive production of VEGFmg or production of VEGFmg forms that have  
 10 decreased or aberrant activity compared to VEGFmg wild-type protein, or modulate biological function that involve VEGFmg (e.g. angiogenesis). In addition, the anti-VEGFmg Abs of the invention can be used to detect and isolate VEGFmg and modulate VEGFmg activity.

To modulate cell survival means to decrease or increase probability that a cell  
 15 will die in the future over a period of time as compared to cells prior to modulation.

1. *Screening assays*

The invention provides a method (screening assay) for identifying modalities, i.e., candidate or test compounds or agents (e.g., peptides, peptidomimetics, small  
 20 molecules or other drugs), foods, dosing regimens, combinations thereof, etc., that effect VEGFmg, a stimulatory or inhibitory effect, including translation, transcription, activity or copies of the gene in cells. The invention also includes compounds identified in screening assays.

Testing for compounds that increase or decrease VEGFmg activity are  
 25 desirable. A compound may modulate VEGFmg activity by affecting: (1) the number of copies of the gene in the cell (amplifiers and deamplifiers); (2) increasing or decreasing transcription of the *VEGFmg* (transcription up-regulators and down-regulators); (3) by increasing or decreasing the translation of *VEGFmg* mRNA into protein (translation up-regulators and down-regulators); or (4) by increasing or  
 30 decreasing the activity of VEGFmg itself (agonists and antagonists).

(a) *effects of compounds*

To identify compounds that affect VEGFmg at the DNA, RNA and protein levels, cells or organisms are contacted with a candidate compound and the corresponding change in VEGFmg DNA, RNA or protein is assessed (Ausubel *et al.*, 1987). For DNA amplifiers and deamplifiers, the amount of VEGFmg DNA is measured, for those compounds that are transcription up-regulators and down-regulators the amount of VEGFmg mRNA is determined; for translational up- and down-regulators, the amount of VEGFmg polypeptides is measured. Compounds that are agonists or antagonists may be identified by contacting cells or organisms with the compound, and then measuring, for example, angiogenesis or cell survival *in vitro*.

In one embodiment, many assays for screening candidate or test compounds that bind to or modulate the activity of VEGFmg or polypeptide or biologically-active portion are available. Test compounds can be obtained using any of the numerous approaches in combinatorial library methods, including: biological libraries; spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries; synthetic library methods requiring deconvolution; the "one-bead one-compound" library method; and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library approach is limited to peptides, while the other four approaches encompass peptide, non-peptide oligomer or small molecule libraries of compounds (Lam, 1997).

(b) *small molecules*

A "small molecule" refers to a composition that has a molecular weight of less than about 5 kD and most preferably less than about 4 kD, even more preferably less than 0.6 kD. Small molecules can be, nucleic acids, peptides, polypeptides, peptidomimetics, carbohydrates, lipids or other organic or inorganic molecules. Libraries of chemical and/or biological mixtures, such as fungal, bacterial, or algal extracts, are known in the art and can be screened with any of the assays of the invention. Examples of methods for the synthesis of molecular libraries can be found in: (Carell *et al.*, 1994a; Carell *et al.*, 1994b; Cho *et al.*, 1993; DeWitt *et al.*, 1993; Gallop *et al.*, 1994; Zuckermann *et al.*, 1994).

Libraries of compounds may be presented in solution (Houghten *et al.*, 1992) or on beads (Lam *et al.*, 1991), on chips (Fodor *et al.*, 1993), bacteria, spores (Ladner *et al.*, US Patent No. 5,223,409, 1993), plasmids (Cull *et al.*, 1992) or on phage (Cwirla *et al.*, 1990; Devlin *et al.*, 1990; Felici *et al.*, 1991; Ladner *et al.*, US Patent



WO 01/70174

73

PCT/US01/09043

No. 5,223,409, 1993; Scott and Smith, 1990). A cell-free assay comprises contacting VEGFmg or biologically-active fragment with a known compound that binds VEGFmg to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with

- 5 VEGFmg, where determining the ability of the test compound to interact with VEGFmg comprises determining the ability of the VEGFmg to preferentially bind to or modulate the activity of a VEGFmg target molecule.

(c) *cell-free assays*

The cell-free assays of the invention may be used with both soluble or a

- 10 membrane-bound forms of VEGFmg. In the case of cell-free assays comprising the membrane-bound form, a solubilizing agent to maintain VEGFmg in solution. Examples of such solubilizing agents include non-ionic detergents such as n-octylglucoside, n-dodecylglucoside, n-dodecylmaltoside, octanoyl-N-methylglucamide, decanoyl-N-methylglucamide, TRITON® X-100 and others from
- 15 the TRITON® series, THESIT®, Isotridecypoly(ethylene glycol ether)<sub>8</sub>, N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane sulfonate, 3-(3-cholamidopropyl)dimethylamminol-1-propane sulfonate (CHAPS), or 3-(3-cholamidopropyl)dimethylamminol-2-hydroxy-1-propane sulfonate (CHAPSO).

(d) *immobilization of target molecules to facilitate screening*

- 20 In more than one embodiment of the assay methods, immobilizing either VEGFmg or a partner molecule can facilitate separation of complexed from uncomplexed forms of one or both of the proteins, as well as to accommodate high throughput assays. Binding of a test compound to VEGFmg, or interaction of VEGFmg with a target molecule in the presence and absence of a candidate
- 25 compound, can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants, such as microtiter plates, test tubes, and micro-centrifuge tubes. A fusion protein can be provided that adds a domain that allows one or both of the proteins to be bound to a matrix. For example, GST-VEGFmg fusion proteins or GST-target fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical; St. Louis, MO)
- 30 or glutathione derivatized microtiter plates that are then combined with the test compound or the test compound and either the non-adsorbed target protein or VEGFmg, and the mixture is incubated under conditions conducive to complex

WO 01/70174

74

PCT/US01/09043

formation (e.g., at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtiter plate wells are washed to remove any unbound components, the matrix immobilized in the case of beads, complex determined either directly or indirectly, for example, as described. Alternatively, the complexes can be dissociated from the matrix, and the level of VEGFmg binding or activity determined using standard techniques.

Other techniques for immobilizing proteins on matrices can also be used in screening assays. Either VEGFmg or a target molecule can be immobilized using biotin-avidin or biotin-streptavidin systems. Biotinylation can be accomplished using many reagents, such as biotin-NHS (N-hydroxy-succinimide; PIERCE Chemicals, Rockford, IL), and immobilized in wells of streptavidin-coated 96 well plates (PIERCE Chemical). Alternatively, Abs reactive with VEGFmg or target molecules, but which do not interfere with binding of the VEGFmg to its target molecule, can be derivatized to the wells of the plate, and unbound target or VEGFmg trapped in the wells by antibody conjugation. Methods for detecting such complexes, in addition to those described for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using Abs reactive with VEGFmg or its target, as well as enzyme-linked assays that rely on detecting an enzymatic activity associated with the VEGFmg or target molecule.

(e) *screens to identify modulators*

Modulators of VEGFmg expression can be identified in a method where a cell is contacted with a candidate compound and the expression of VEGFmg mRNA or protein in the cell is determined. The expression level of *VEGFmg* mRNA or protein in the presence of the candidate compound is compared to VEGFmg mRNA or protein levels in the absence of the candidate compound. The candidate compound can then be identified as a modulator of VEGFmg mRNA or protein expression based upon this comparison. For example, when expression of VEGFmg mRNA or protein is greater (*i.e.*, statistically significant) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as a stimulator of VEGFmg mRNA or protein expression. Alternatively, when expression of VEGFmg mRNA or protein is less (statistically significant) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as an inhibitor of VEGFmg

WO 01/70174

75

PCT/US01/09043

mRNA or protein expression. The level of VEGFmg mRNA or protein expression in the cells can be determined by methods described for detecting VEGFmg mRNA or protein.

(f) *hybrid assays*

5 In yet another aspect of the invention, VEGFmg can be used as "bait" in two-hybrid or three hybrid assays (Bartel *et al.*, 1993; Brent *et al.*, WO94/10300, 1994; Iwabuchi *et al.*, 1993; Madura *et al.*, 1993; Saifer *et al.*, US Patent No. 5,283,317, 1994; Zervos *et al.*, 1993) to identify other proteins that bind or interact with VEGFmg (VEGFmg-binding proteins (VEGFmg-bps)) and modulate VEGFmg  
10 activity. Such VEGFmg-bps are also likely to be involved in the propagation of signals by the VEGFmg as, for example, upstream or downstream elements of a VEGFmg pathway.

The two-hybrid system is based on the modular nature of most transcription factors, which consist of separable DNA-binding and activation domains. Briefly, the  
15 assay utilizes two different DNA constructs. In one construct, the gene that codes for VEGFmg is fused to a gene encoding the DNA binding domain of a known transcription factor (*e.g.*, GAL4). The other construct, a DNA sequence from a library of DNA sequences that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") is fused to a gene that codes for the activation domain of the known transcription factor.  
20 If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact *in vivo*, forming a VEGFmg-dependent complex, the DNA-binding and activation domains of the transcription factor are brought into close proximity. This proximity allows transcription of a reporter gene (*e.g.*, LacZ) that is operably-linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor. Expression of the reporter gene can be  
25 detected, and cell colonies containing the functional transcription factor can be isolated and used to obtain the cloned gene that encodes the VEGFmg-interacting protein.

(g) *calcium channel regulators*

Several classes of calcium channel blocker are known and may be effective  
30 antagonists and agonists. For example, Mak *et al.* (Mak *et al.*, 1995) report the activity of the lipophilic calcium channel blockers, nicardipine, nifedipine, verapamil, and diltiazem as anti-oxidants and protectants for endothelial cells. Calcium channels

WO 01/70174

76

PCT/US01/09043

may play a significant role in the cell survival in which the genes identified herein are differentially expressed. Among the *VEGFmgs* that are significant in calcium regulation are DSCR1 and nexin. For example, those agents that stimulate the expression of DSCR1 or nexin and reduce the activity of the mitochondrial respiratory chain will promote survival and are useful to treat angiogenesis-related diseases, that is, diseases in which angiogenesis is repressed or insufficient. Agents that reduce the expression of *e.g.* DSCR1 or nexin and that increase the activity of the mitochondrial respiratory chain will induce or promote apoptosis and therefore are useful to treat diseases where the angiogenesis is stimulated.

10

The invention further pertains to novel agents identified by the aforementioned screening assays and uses thereof for treatments as described herein.

## 2. *Detection assays*

Portions or fragments of *VEGFmg* cDNA sequences identified herein (and the complete *VEGFmg* gene sequences) are useful in themselves. By way of non-limiting example, these sequences can be used to: (1) identify an individual from a minute biological sample (tissue typing); and (2) aid in forensic identification of a biological sample.

### (a) *Tissue typing*

The *VEGFmg* sequences of the invention can be used to identify individuals from minute biological samples. In this technique, an individual's genomic DNA is digested with one or more restriction enzymes and probed on a Southern blot to yield unique bands. The sequences of the invention are useful as additional DNA markers for "restriction fragment length polymorphisms" (RFLP; (Smulson *et al.*, US Patent No. 5,272,057, 1993)).

Furthermore, the *VEGFmg* sequences can be used to determine the actual base-by-base DNA sequence of targeted portions of an individual's genome. *VEGFmg* sequences can be used to prepare two PCR primers from the 5'- and 3'-termini of the sequences that can then be used to amplify an the corresponding sequences from an individual's genome and then sequence the amplified fragment.

Panels of corresponding DNA sequences from individuals can provide unique individual identifications, as each individual will have a unique set of such DNA

WO 01/70174

77

PCT/US01/09043

sequences due to allelic differences. The sequences of the invention can be used to obtain such identification sequences from individuals and from tissue. The *VEGFmg* sequences of the invention uniquely represent portions of an individual's genome.

Allelic variation occurs to some degree in the coding regions of these sequences, and to a greater degree in the noncoding regions. The allelic variation between individual  
5 humans occurs with a frequency of about once every 500 bases. Much of the allelic variation is due to single nucleotide polymorphisms (SNPs), which include RFLPs.

Each of the sequences described herein can, to some degree, be used as a standard against which DNA from an individual can be compared for identification  
10 purposes. Because greater numbers of polymorphisms occur in noncoding regions, fewer sequences are necessary to differentiate individuals. Noncoding sequences can positively identify individuals with a panel of 10 to 1,000 primers that each yield a noncoding amplified sequence of 100 bases.

3. *Assaying VEGF-modulated genes using oligonucleotide arrays*

15 In addition to using the nucleotide probes, antibodies, etc., described above, other methods are available to identify VEGFmg expression.

The invention provides for the use of the genes identified as differentially expressed in methods directed to screen for compounds that affect survival of endothelial cells, such as HUVECs. The simultaneous analysis of *VEGFmg*  
20 expression levels with appropriate controls can assess drugs, proteins, or other compounds and formulations. Assessing the extent of differential expression of *VEGFmgs* can be accomplished using an array or similar device containing oligonucleotides complementary to and capable of binding or hybridizing to the mRNAs corresponding to *VEGFmgs*. For example, such an array can measure  
25 mRNA levels in endothelial cells treated with, for example, a compound, and compared to mRNA levels in untreated cells. One example of this device is GeneChip™ (Affymetrix, CITY, CA), a miniaturized, high-density array of oligonucleotides complementary to and capable of binding or hybridizing to a set of mRNAs. The technical implementation of this strategy is described in detail  
30 (Lipshutz *et al.*, 1999).

*Predictive medicine*

The invention also pertains to the field of predictive medicine in which diagnostic assays, prognostic assays, pharmacogenomics, and monitoring clinical trials are used for prognostic (predictive) purposes to treat an individual prophylactically. Accordingly, one aspect of the invention relates to diagnostic assays for determining VEGFmg and/or nucleic acid expression as well as VEGFmg activity, in the context of a biological sample (*e.g.*, blood, serum, cells, tissue) to determine whether an individual is afflicted with a disease or disorder, or is at risk of developing a disorder, associated with aberrant VEGFmg expression or activity, including angiogenesis and cell survival. The invention also provides for prognostic (or predictive) assays for determining whether an individual is at risk of developing a disorder associated with VEGFmg, nucleic acid expression or activity. For example, mutations in *VEGFmg* can be assayed in a biological sample. Such assays can be used for prognostic or predictive purpose to prophylactically treat an individual prior to the onset of a disorder characterized by or associated with VEGFmg, nucleic acid expression, or biological activity.

Another aspect of the invention provides methods for determining VEGFmg activity, or nucleic acid expression, in an individual to select appropriate therapeutic or prophylactic agents for that individual (referred to herein as "pharmacogenomics"). Pharmacogenomics allows for the selection of modalities (*e.g.*, drugs, foods) for therapeutic or prophylactic treatment of an individual based on the individual's genotype (*e.g.*, the individual's genotype to determine the individual's ability to respond to a particular agent). Another aspect of the invention pertains to monitoring the influence of modalities (*e.g.*, drugs, foods) on the expression or activity of VEGFmg in clinical trials.

1. *Diagnostic assays*

An exemplary method for detecting the presence or absence of VEGFmg in a biological sample involves obtaining a biological sample from a subject and contacting the biological sample with a compound or an agent capable of detecting VEGFmg or *VEGFmg* nucleic acids (*e.g.*, mRNA, genomic DNA) such that the presence of a VEGFmg is confirmed in the sample. An agent for detecting *VEGFmg* mRNA or genomic DNA is a labeled nucleic acid probe that can hybridize to *VEGFmg* mRNA or genomic DNA. The nucleic acid probe can be, for example, a

WO 01/70174

79

PCT/US01/09043

full-length *VEGFmg* nucleic acid or a portion thereof, such as an oligonucleotide of at least 15, 30, 50, 100, 250 or 500 nucleotides in length and sufficient to specifically hybridize under stringent conditions to *VEGFmg* mRNA or genomic DNA.

- An agent for detecting VEGFmg polypeptide is an antibody capable of
- 5 binding to a VEGFmg, preferably an antibody with a detectable label. Abs can be polyclonal, or more preferably, monoclonal. An intact antibody, or a fragment (*e.g.*, F<sub>ab</sub> or F(ab')<sub>2</sub>) can be used. A labeled probe or antibody is coupled (*i.e.*, physically linking) to a detectable substance, as well as indirect detection of the probe or antibody by reactivity with another reagent that is directly labeled. Examples of
  - 10 indirect labeling include detection of a primary antibody using a fluorescently-labeled secondary antibody and end-labeling of a DNA probe with biotin such that it can be detected with fluorescently-labeled streptavidin. The term "biological sample" includes tissues, cells and biological fluids isolated from a subject, as well as tissues, cells and fluids present within a subject. The detection method of the invention can
  - 15 be used to detect *VEGFmg* mRNA, protein, or genomic DNA in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. For example, *in vitro* techniques for detection of *VEGFmg* mRNA include Northern hybridizations and *in situ* hybridizations. *In vitro* techniques for detection of VEGFmg polypeptide include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), Western blots, immunoprecipitations, and immunofluorescence. *In vitro*
  - 20 techniques for detection of *VEGFmg* genomic DNA include Southern hybridizations and fluorescence in situ hybridization (FISH). Furthermore, *in vivo* techniques for detecting VEGFmg include introducing into a subject a labeled anti-VEGFmg antibody. For example, the antibody can be labeled with a radioactive marker whose presence and location in a subject can be detected by standard imaging techniques.
  - 25 In one embodiment, the biological sample from the subject contains protein molecules, and/or mRNA molecules, and/or genomic DNA molecules. A preferred biological sample is blood.

- In another embodiment, the methods further involve obtaining a biological sample from a subject to provide a control, contacting the sample with a compound or
- 30 agent to detect *VEGFmg*, mRNA, or genomic DNA, and comparing the presence of *VEGFmg*, mRNA or genomic DNA in the control sample with the presence of VEGFmg, mRNA or genomic DNA in the test sample.

WO 01/70174

80

PCT/US01/09043

The invention also encompasses kits for detecting VEGFmg in a biological sample. For example, the kit can comprise: a labeled compound or agent capable of detecting VEGFmg or *VEGFmg* mRNA in a sample; reagent and/or equipment for determining the amount of VEGFmg in the sample; and reagent and/or equipment for comparing the amount of VEGFmg in the sample with a standard. The compound or agent can be packaged in a suitable container. The kit can further comprise instructions for using the kit to detect VEGFmg or nucleic acid.

## 2. *Prognostic assays*

The diagnostic methods described herein can furthermore be utilized to identify subjects having or at risk of developing a disease or disorder associated with aberrant VEGFmg expression or activity. For example, the assays described herein, can be used to identify a subject having or at risk of developing a disorder associated with VEGFmg, nucleic acid expression or activity. Alternatively, the prognostic assays can be used to identify a subject having or at risk for developing a disease or disorder. The invention provides a method for identifying a disease or disorder associated with aberrant VEGFmg expression or activity in which a test sample is obtained from a subject and VEGFmg or nucleic acid (*e.g.*, mRNA, genomic DNA) is detected. A test sample is a biological sample obtained from a subject. For example, a test sample can be a biological fluid (*e.g.*, serum), cell sample, or tissue.

Prognostic assays can be used to determine whether a subject can be administered a modality (*e.g.*, an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, small molecule, food, *etc.*) to treat a disease or disorder associated with aberrant VEGFmg expression or activity. Such methods can be used to determine whether a subject can be effectively treated with an agent for a disorder. The invention provides methods for determining whether a subject can be effectively treated with an agent for a disorder associated with aberrant VEGFmg expression or activity in which a test sample is obtained and VEGFmg or nucleic acid is detected (*e.g.*, where the presence of VEGFmg or nucleic acid is diagnostic for a subject that can be administered the agent to treat a disorder associated with aberrant VEGFmg expression or activity).

The methods of the invention can also be used to detect genetic lesions in a VEGFmg to determine if a subject with the genetic lesion is at risk for a disorder



- characterized by aberrant cell proliferation or differentiation. Methods include detecting, in a sample from the subject, the presence or absence of a genetic lesion characterized by an alteration affecting the integrity of a gene encoding a VEGFmg polypeptide, or the mis-expression of *VEGFmg*. Such genetic lesions can be detected
- 5 by ascertaining: (1) a deletion of one or more nucleotides from *VEGFmg*; (2) an addition of one or more nucleotides to a *VEGFmg*; (3) a substitution of one or more nucleotides in a *VEGFmg*; (4) a chromosomal rearrangement of a *VEGFmg* gene; (5) an alteration in the level of a *VEGFmg* mRNA transcripts, (6) aberrant modification of a *VEGFmg*, such as a change genomic DNA methylation, (7) the presence of a
- 10 non-wild-type splicing pattern of a *VEGFmg* mRNA transcript, (8) a non-wild-type level of a *VEGFmg*, (9) allelic loss of *VEGFmg*, and/or (10) inappropriate post-translational modification of *VEGFmg* polypeptide. There are a large number of known assay techniques that can be used to detect lesions in a *VEGFmg*. Any biological sample containing nucleated cells may be used.
- 15 In certain embodiments, lesion detection may use a probe/primer in a polymerase chain reaction (PCR) (*e.g.*, (Mullis, US Patent No. 4,683,202, 1987; Mullis *et al.*, US Patent No. 4,683,195, 1987), such as anchor PCR or rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR, or, alternatively, in a ligation chain reaction (LCR) (*e.g.*, (Landegren *et al.*, 1988; Nakazawa *et al.*, 1994), the latter is
- 20 particularly useful for detecting point mutations in *VEGFmg*-genes (Abravaya *et al.*, 1995). This method may include collecting a sample from a patient, isolating nucleic acids from the sample, contacting the nucleic acids with one or more primers that specifically hybridize to a *VEGFmg* under conditions such that hybridization and amplification of the *VEGFmg* (if present) occurs, and detecting the presence or
- 25 absence of an amplification product, or detecting the size of the amplification product and comparing the length to a control sample. It is anticipated that PCR and/or LCR may be desirable to use as a preliminary amplification step in conjunction with any of the techniques used for detecting mutations described herein.
- Alternative amplification methods include: self-sustained sequence replication
- 30 (Guatelli *et al.*, 1990), transcriptional amplification system (Kwoh *et al.*, 1989); Q $\beta$  Replicase (Lizardi *et al.*, 1988), or any other nucleic acid amplification method, followed by the detection of the amplified molecules using techniques well known to

those of skill in the art. These detection schemes are especially useful for the detection of nucleic acid molecules present in low abundance.

Mutations in a *VEGFmg* from a sample can be identified by alterations in restriction enzyme cleavage patterns. For example, sample and control DNA is isolated, amplified (optionally), digested with one or more restriction endonucleases, and fragment length sizes are determined by gel electrophoresis and compared. Differences in fragment length sizes between sample and control DNA indicates mutations in the sample DNA. Moreover, the use of sequence specific ribozymes can be used to score for the presence of specific mutations by development or loss of a ribozyme cleavage site.

Hybridizing a sample and control nucleic acids, *e.g.*, DNA or RNA, to high-density arrays containing hundreds or thousands of oligonucleotides probes, can identify genetic mutations in *VEGFmg* (Cronin *et al.*, 1996; Kozal *et al.*, 1996). For example, genetic mutations in *VEGFmg* can be identified in two-dimensional arrays containing light-generated DNA probes (Cronin, *et al.*, 1996). Briefly, a first hybridization array of probes can be used to scan through long stretches of DNA in a sample and control to identify base changes between the sequences by making linear arrays of sequential overlapping probes. This step allows the identification of point mutations. This is followed by a second hybridization array that allows the characterization of specific mutations by using smaller, specialized probe arrays complementary to all variants or mutations detected. Each mutation array is composed of parallel probe sets, one complementary to the wild-type gene and the other complementary to the mutant gene.

In yet another embodiment, any of a variety of sequencing reactions known in the art can be used to directly sequence the *VEGFmg* of interest and detect mutations by comparing the sequence of the sample *VEGFmg*-with the corresponding wild-type (control) sequence. Examples of sequencing reactions include those based on classic techniques (Maxam and Gilbert, 1977; Sanger *et al.*, 1977). Any of a variety of automated sequencing procedures can be used when performing diagnostic assays (Naeve *et al.*, 1995) including sequencing by mass spectrometry (Cohen *et al.*, 1996; Griffin and Griffin, 1993; Koster, WO94/16101, 1994).

Other methods for detecting mutations in a *VEGFmg* include those in which protection from cleavage agents is used to detect mismatched bases in RNA/RNA or RNA/DNA heteroduplexes (Myers *et al.*, 1985). In general, the technique of "mismatch cleavage" starts by providing heteroduplexes formed by hybridizing (labeled) RNA or DNA containing the wild-type *VEGFmg* sequence with potentially mutant RNA or DNA obtained from a sample. The double-stranded duplexes are treated with an agent that cleaves single-stranded regions of the duplex such as those that arise from base pair mismatches between the control and sample strands. For instance, RNA/DNA duplexes can be treated with RNase and DNA/DNA hybrids treated with S<sub>1</sub> nuclease to enzymatically digest the mismatched regions. In other embodiments, either DNA/DNA or RNA/DNA duplexes can be treated with hydroxylamine or osmium tetroxide and with piperidine in order to digest mismatched regions. The digested material is then separated by size on denaturing polyacrylamide gels to determine the mutation site (Grompe *et al.*, 1989; Saleeba and Cotton, 1993). The control DNA or RNA can be labeled for detection.

Mismatch cleavage reactions may employ one or more proteins that recognize mismatched base pairs in double-stranded DNA (DNA mismatch repair) in defined systems for detecting and mapping point mutations in *VEGFmg* cDNAs obtained from samples of cells. For example, the mutY enzyme of *E. coli* cleaves A at G/A mismatches and the thymidine DNA glycosylase from HeLa cells cleaves T at G/T mismatches (Hsu *et al.*, 1994). According to an exemplary embodiment, a probe based on a wild-type *VEGFmg* sequence is hybridized to a cDNA or other DNA product from a test cell(s). The duplex is treated with a DNA mismatch repair enzyme, and the cleavage products, if any, can be detected from electrophoresis protocols or the like (Modrich *et al.*, US Patent No. 5,459,039, 1995).

Electrophoretic mobility alterations can be used to identify mutations in *VEGFmg*. For example, single strand conformation polymorphism (SSCP) may be used to detect differences in electrophoretic mobility between mutant and wild type nucleic acids (Cotton, 1993; Hayashi, 1992; Orita *et al.*, 1989). Single-stranded DNA fragments of sample and control *VEGFmg* nucleic acids are denatured and then renatured. The secondary structure of single-stranded nucleic acids varies according to sequence; the resulting alteration in electrophoretic mobility allows detection of

even a single base change. The DNA fragments may be labeled or detected with labeled probes. The sensitivity of the assay may be enhanced by using RNA (rather than DNA), in which the secondary structure is more sensitive to a sequence changes. The subject method may use heteroduplex analysis to separate double stranded  
5 heteroduplex molecules on the basis of changes in electrophoretic mobility (Keen *et al.*, 1991).

The migration of mutant or wild-type fragments can be assayed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE; (Myers *et al.*, 1985). In DGGE, DNA is modified to prevent complete denaturation, for example by adding a GC  
10 clamp of approximately 40 bp of high-melting GC-rich DNA by PCR. A temperature gradient may also be used in place of a denaturing gradient to identify differences in the mobility of control and sample DNA (Rossiter and Caskey, 1990).

Examples of other techniques for detecting point mutations include, but are not limited to, selective oligonucleotide hybridization, selective amplification, or  
15 selective primer extension. For example, oligonucleotide primers may be prepared in which the known mutation is placed centrally and then hybridized to target DNA under conditions that permit hybridization only if a perfect match is found (Saiki *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1989). Such allele-specific oligonucleotides are hybridized to PCR-amplified target DNA or a number of different mutations when the  
20 oligonucleotides are attached to the hybridizing membrane and hybridized with labeled target DNA.

Alternatively, allele specific amplification technology that depends on selective PCR amplification may be used. Oligonucleotide primers for specific  
amplifications may carry the mutation of interest in the center of the molecule (so that  
25 amplification depends on differential hybridization (Gibbs *et al.*, 1989)) or at the extreme 3'-terminus of one primer where, under appropriate conditions, mismatch can prevent, or reduce polymerase extension (Prosser, 1993). Novel restriction site in the region of the mutation may be introduced to create cleavage-based detection (Gasparini *et al.*, 1992). Certain amplification may also be performed using *Taq*  
30 ligase for amplification (Barany, 1991). In such cases, ligation occurs only if there is a perfect match at the 3'-terminus of the 5' sequence, allowing detection of a known mutation by scoring for amplification.

The described methods may be performed, for example, by using pre-packaged kits comprising at least one probe (nucleic acid or antibody) that may be conveniently used, for example, in clinical settings to diagnose patients exhibiting symptoms or family history of a disease or illness involving VEGFmg.

- 5 Furthermore, any cell type or tissue in which VEGFmg is expressed may be utilized in the prognostic assays described herein.

### 3. Pharmacogenomics

- Agents, or modulators that have a stimulatory or inhibitory effect on VEGFmg activity or expression, as identified by a screening assay can be administered to  
10 individuals to treat, prophylactically or therapeutically, disorders, including insufficient blood supply or improper cell survival. In conjunction with such treatment, the pharmacogenomics (*i.e.*, the study of the relationship between a subject's genotype and the subject's response to a foreign modality, such as a food, compound or drug) may be considered. Metabolic differences of therapeutics can  
15 lead to severe toxicity or therapeutic failure by altering the relation between dose and blood concentration of the pharmacologically active drug. Thus, the pharmacogenomics of the individual permits the selection of effective agents (*e.g.*, drugs) for prophylactic or therapeutic treatments based on a consideration of the individual's genotype. Pharmacogenomics can further be used to determine  
20 appropriate dosages and therapeutic regimens. Accordingly, the activity of VEGFmg, expression of *VEGFmg* nucleic acid, or *VEGFmg* mutation(s) in an individual can be determined to guide the selection of appropriate agent(s) for therapeutic or prophylactic treatment.

- Pharmacogenomics deals with clinically significant hereditary variations in the  
25 response to modalities due to altered modality disposition and abnormal action in affected persons (Eichelbaum and Evert, 1996; Linder *et al.*, 1997). In general, two pharmacogenetic conditions can be differentiated: (1) genetic conditions transmitted as a single factor altering the interaction of a modality with the body (altered drug action) or (2) genetic conditions transmitted as single factors altering the way the  
30 body acts on a modality (altered drug metabolism). These pharmacogenetic conditions can occur either as rare defects or as nucleic acid polymorphisms. For example, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is a common

inherited enzymopathy in which the main clinical complication is hemolysis after ingestion of oxidant drugs (anti-malarials, sulfonamides, analgesics, nitrofurans) and consumption of fava beans.

As an illustrative embodiment, the activity of drug metabolizing enzymes is a major determinant of both the intensity and duration of drug action. The discovery of genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes (*e.g.*, N-acetyltransferase 2 (NAT 2) and cytochrome P450 enzymes CYP2D6 and CYP2C19) explains the phenomena of some patients who show exaggerated drug response and/or serious toxicity after taking the standard and safe dose of a drug. These polymorphisms are expressed in two phenotypes in the population, the extensive metabolizer (EM) and poor metabolizer (PM). The prevalence of PM is different among different populations. For example, the *CYP2D6* gene is highly polymorphic and several mutations have been identified in PM, which all lead to the absence of functional CYP2D6. Poor metabolizers due to mutant *CYP2D6* and *CYP2C19* frequently experience exaggerated drug responses and side effects when they receive standard doses. If a metabolite is the active therapeutic moiety, PM shows no therapeutic response, as demonstrated for the analgesic effect of codeine mediated by its CYP2D6-formed metabolite morphine. At the other extreme are the so-called ultra-rapid metabolizers who are unresponsive to standard doses. Recently, the molecular basis of ultra-rapid metabolism has been identified to be due to *CYP2D6* gene amplification.

The activity of VEGFmg, expression of *VEGFmg* nucleic acid, or mutation content of *VEGFmg* in an individual can be determined to select appropriate agent(s) for therapeutic or prophylactic treatment of the individual. In addition, pharmacogenetic studies can be used to apply genotyping of polymorphic alleles encoding drug-metabolizing enzymes to the identification of an individual's drug responsiveness phenotype. This knowledge, when applied to dosing or drug selection, can avoid adverse reactions or therapeutic failure and thus enhance therapeutic or prophylactic efficiency when treating a subject with a VEGFmg modulator, such as a modulator identified by one of the described exemplary screening assays.

#### 4. Monitoring effects during clinical trials

Monitoring the influence of agents (*e.g.*, drugs, compounds) on the expression or activity of VEGFmg (*e.g.*, the ability to modulate aberrant cell proliferation and/or differentiation) can be applied not only in basic drug screening, but also in clinical trials. For example, the effectiveness of an agent determined by a screening assay to increase *VEGFmg* expression, protein levels, or up-regulate VEGFmg activity can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting decreased *VEGFmg* expression, protein levels, or down-regulated VEGFmg activity. Alternatively, the effectiveness of an agent determined to decrease *VEGFmg* expression, protein levels, or down-regulate VEGFmg activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting increased *VEGFmg* expression, protein levels, or up-regulated VEGFmg activity. In such clinical trials, the expression or activity of VEGFmg and, preferably, other genes that have been implicated in, for example, angiogenesis or apoptosis, can be used as a "read out" or markers for a particular cell's responsiveness.

For example, genes, including *VEGFmg*, that are modulated in cells by treatment with a modality (*e.g.*, food, compound, drug or small molecule) can be identified. To study the effect of agents on cellular proliferation disorders, for example, in a clinical trial, cells can be isolated and RNA prepared and analyzed for the levels of expression of *VEGFmg* and other genes implicated in the disorder. The gene expression pattern can be quantified by Northern blot analysis, nuclear run-on or RT-PCR experiments, or by measuring the amount of protein, or by measuring the activity level of VEGFmg or other gene products. In this manner, the gene expression pattern itself can serve as a marker, indicative of the cellular physiological response to the agent. Accordingly, this response state may be determined before, and at various points during, treatment of the individual with the agent.

The invention provides a method for monitoring the effectiveness of treatment of a subject with an agent (*e.g.*, an agonist, antagonist, protein, peptide, peptidomimetic, nucleic acid, small molecule, food or other drug candidate identified by the screening assays described herein) comprising the steps of (1) obtaining a pre-administration sample from a subject; (2) detecting the level of expression of a VEGFmg, mRNA, or genomic DNA in the preadministration sample; (3) obtaining one or more post-administration samples from the subject; (4) detecting the level of expression or activity of the VEGFmg, mRNA, or genomic DNA in the

post-administration samples; (5) comparing the level of expression or activity of the VEGFmg, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample with the VEGFmg, mRNA, or genomic DNA in the post administration sample or samples; and (6) altering the administration of the agent to the subject accordingly. For

- 5 example, increased administration of the agent may be desirable to increase the expression or activity of VEGFmg to higher levels than detected, *i.e.*, to increase the effectiveness of the agent. Alternatively, decreased administration of the agent may be desirable to decrease expression or activity of VEGFmg to lower levels than detected, *i.e.*, to decrease the effectiveness of the agent.

10 5. *Methods of treatment*

The invention provides for both prophylactic and therapeutic methods of treating a subject at risk of (or susceptible to) a disorder or having a disorder associated with aberrant VEGFmg expression or activity.

6. *Diseases and disorders*

- 15 Diseases and disorders that are characterized by increased VEGFmg levels or biological activity may be treated with therapeutics that antagonize (*i.e.*, reduce or inhibit) activity. Antagonists may be administered in a therapeutic or prophylactic manner. Therapeutics that may be used include: (1) VEGFmg peptides, or analogs, derivatives, fragments or homologs thereof; (2) Abs to a VEGFmg peptide; (3) 20 *VEGFmg* nucleic acids; (4) administration of antisense nucleic acid and nucleic acids that are "dysfunctional" (*i.e.*, due to a heterologous insertion within the coding sequences) that are used to eliminate endogenous function of by homologous recombination (Capecchi, 1989); or (5) modulators (*i.e.*, inhibitors, agonists and antagonists, including additional peptide mimetic of the invention or Abs specific to 25 VEGFmg) that alter the interaction between VEGFmg and its binding partner.

- Diseases and disorders that are characterized by decreased VEGFmg levels or biological activity may be treated with therapeutics that increase (*i.e.*, are agonists to) activity. Therapeutics that upregulate activity may be administered therapeutically or prophylactically. Therapeutics that may be used include peptides, or analogs, 30 derivatives, fragments or homologs thereof; or an agonist that increases bioavailability.



Increased or decreased levels can be readily detected by quantifying peptide and/or RNA, by obtaining a patient tissue sample (*e.g.*, from biopsy tissue) and assaying *in vitro* for RNA or peptide levels, structure and/or activity of the expressed peptides (or *VEGF<sub>m</sub>* mRNAs). Methods include, but are not limited to, immunassays (*e.g.*, by Western blot analysis, immunoprecipitation followed by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis, immunocytochemistry, *etc.*) and/or hybridization assays to detect expression of mRNAs (*e.g.*, Northern assays, dot blots, *in situ* hybridization, and the like).

#### 7. Prophylactic methods

- 10 The invention provides a method for preventing, in a subject, a disease or condition associated with an aberrant *VEGF<sub>m</sub>* expression or activity, by administering an agent that modulates *VEGF<sub>m</sub>* expression or at least one *VEGF<sub>m</sub>* activity. Subjects at risk for a disease that is caused or contributed to by aberrant *VEGF<sub>m</sub>* expression or activity, such as tumorigenesis or metastasis, can be identified by, for example, any or a combination of diagnostic or prognostic assays.
- 15 Administration of a prophylactic agent can occur prior to the manifestation of symptoms characteristic of the *VEGF<sub>m</sub>* aberrancy, such that a disease or disorder is prevented or, alternatively, delayed in its progression. Depending on the type of *VEGF<sub>m</sub>* aberrancy, for example, a *VEGF<sub>m</sub>* agonist or *VEGF<sub>m</sub>* antagonist can be used to treat the subject. The appropriate agent can be determined based on screening assays.

*VEGF<sub>m</sub>* nucleic acids, or fragments, may also be useful in diagnostic applications, wherein the presence or amount of the nucleic acid or the protein is to be assessed. A further use could be as an anti-bacterial molecule (*i.e.*, some peptides have been found to possess anti-bacterial properties). These materials are further useful in the generation of Abs that immunospecifically bind to the novel substances of the invention for use in therapeutic or diagnostic methods.

#### 8. Therapeutic methods

- Another aspect of the invention pertains to methods of modulating *VEGF<sub>m</sub>* expression or activity for therapeutic purposes. The modulatory method of the invention involves contacting a cell with an agent that modulates one or more of the activities of *VEGF<sub>m</sub>* activity associated with the cell. An agent that modulates
- 30

VEGFmg activity can be a nucleic acid or a protein, a naturally occurring cognate ligand of VEGFmg, a peptide, a VEGFmg peptidomimetic, or other small molecule. The agent may stimulate VEGFmg activity. Examples of such stimulatory agents include active VEGFmg and a *VEGFmg* nucleic acid molecule that has been introduced into the cell. In another embodiment, the agent inhibits VEGFmg activity. Examples of inhibitory agents include antisense *VEGFmg* nucleic acids and anti-VEGFmg Abs. Modulatory methods can be performed *in vitro* (e.g., by culturing the cell with the agent) or, alternatively, *in vivo* (e.g., by administering the agent to a subject). As such, the invention provides methods of treating an individual afflicted with a disease or disorder characterized by aberrant expression or activity of a VEGFmg or nucleic acid molecule. In one embodiment, the method involves administering an agent (e.g., an agent identified by a screening assay), or combination of agents that modulates (e.g., up-regulates or down-regulates) VEGFmg expression or activity. In another embodiment, the method involves administering a VEGFmg or nucleic acid molecule as therapy to compensate for reduced or aberrant VEGFmg expression or activity.

Stimulation of VEGFmg activity is desirable in situations in which VEGFmg is abnormally down-regulated and/or in which increased VEGFmg activity is likely to have a beneficial effect. One example of such a situation is where a subject has a disorder characterized by aberrant cell proliferation and/or differentiation (e.g., cancer or immune associated disorders).

#### 9. *Determination of the biological effect of the therapeutic*

Suitable *in vitro* or *in vivo* assays can be performed to determine the effect of a specific therapeutic and whether its administration is indicated for treatment of the affected tissue.

In various specific embodiments, *in vitro* assays may be performed with representative cells of the type(s) involved in the patient's disorder, to determine if a given therapeutic exerts the desired effect upon the cell type(s). Modalities for use in therapy may be tested in suitable animal model systems including, but not limited to rats, mice, chicken, cows, monkeys, rabbits, and the like, prior to testing in human subjects. Similarly, for *in vivo* testing, any of the animal model system known in the

art may be used prior to administration to human subjects. Various assays directed at measuring angiogenesis and cell survival may be used.

#### 10. *Anti-sense nucleic acids*

Using antisense and sense VEGFmg oligonucleotides can prevent VEGFmg polypeptide expression. These oligonucleotides bind to target nucleic acid sequences, forming duplexes that block transcription or translation of the target sequence by enhancing degradation of the duplexes, terminating prematurely transcription or translation, or by other means.

Antisense or sense oligonucleotides are single-stranded nucleic acids, either RNA or DNA, which can bind target *VEGFmg* mRNA (sense) or *VEGFmg* DNA (antisense) sequences. Anti-sense nucleic acids can be designed according to Watson and Crick or Hoogsteen base pairing rules. The anti-sense nucleic acid molecule can be complementary to the entire coding region of *VEGFmg* mRNA, but more preferably, to only a portion of the coding or noncoding region of *VEGFmg* mRNA. For example, the anti-sense oligonucleotide can be complementary to the region surrounding the translation start site of *VEGFmg* mRNA. Antisense or sense oligonucleotides may comprise a fragment of the *VEGFmg* DNA coding region of at least about 14 nucleotides, preferably from about 14 to 30 nucleotides. In general, antisense RNA or DNA molecules can comprise at least 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 bases in length or more. Among others, (Stein and Cohen, 1988; van der Krol *et al.*, 1988a) describe methods to derive antisense or a sense oligonucleotides from a given cDNA sequence.

Examples of modified nucleotides that can be used to generate the anti-sense nucleic acid include: 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xanthine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil,  $\beta$ -D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil,  $\beta$ -D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v), wybutosine, pseudouracil,

WO 01/70174

92

PCT/US01/09043

queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (v), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)w, and 2,6-diaminopurine. Alternatively, the anti-sense nucleic acid can be produced

- 5 biologically using an expression vector into which a nucleic acid has been sub-cloned in an anti-sense orientation such that the transcribed RNA will be complementary to a target nucleic acid of interest.

To introduce antisense or sense oligonucleotides into target cells (cells containing the target nucleic acid sequence), any gene transfer method may be used.

- 10 Examples of gene transfer methods include (1) biological, such as gene transfer vectors like Epstein-Barr virus or conjugating the exogenous DNA to a ligand-binding molecule, (2) physical, such as electroporation and injection, and (3) chemical, such as  $\text{CaPO}_4$  precipitation and oligonucleotide-lipid complexes.

- An antisense or sense oligonucleotide is inserted into a suitable gene transfer  
15 retroviral vector. A cell containing the target nucleic acid sequence is contacted with the recombinant retroviral vector, either *in vivo* or *ex vivo*. Examples of suitable retroviral vectors include those derived from the murine retrovirus M-MuLV, N2 (a retrovirus derived from M-MuLV), or the double copy vectors designated DCT5A, DCT5B and DCT5C (WO 90/13641, 1990). To achieve sufficient nucleic acid  
20 molecule transcription, vector constructs in which the transcription of the anti-sense nucleic acid molecule is controlled by a strong pol II or pol III promoter are preferred.

To specify target cells in a mixed population of cells cell surface receptors that are specific to the target cells can be exploited. Antisense and sense oligonucleotides are conjugated to a ligand-binding molecule, as described in (WO 91/04753, 1991).

- 25 Ligands are chosen for receptors that are specific to the target cells. Examples of suitable ligand-binding molecules include cell surface receptors, growth factors, cytokines, or other ligands that bind to cell surface receptors or molecules. Preferably, conjugation of the ligand-binding molecule does not substantially interfere with the ability of the receptors or molecule to bind the ligand-binding molecule  
30 conjugate, or block entry of the sense or antisense oligonucleotide or its conjugated version into the cell.

Liposomes efficiently transfer sense or an antisense oligonucleotide to cells (WO 90/10448, 1990). The sense or antisense oligonucleotide-lipid complex is preferably dissociated within the cell by an endogenous lipase.

The anti-sense nucleic acid molecule of the invention may be an  $\alpha$ -anomeric nucleic acid molecule. An  $\alpha$ -anomeric nucleic acid molecule forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual  $\alpha$ -units, the strands run parallel to each other (Gautier *et al.*, 1987). The anti-sense nucleic acid molecule can also comprise a 2'-o-methylribonucleotide (Inoue *et al.*, 1987a) or a chimeric RNA-DNA analogue (Inoue *et al.*, 1987b).

In one embodiment, an anti-sense nucleic acid of the invention is a ribozyme. Ribozymes are catalytic RNA molecules with ribonuclease activity that are capable of cleaving a single-stranded nucleic acid, such as an mRNA, to which they have a complementary region. Thus, ribozymes, such as hammerhead ribozymes (Haseloff and Gerlach, 1988) can be used to catalytically cleave *VEGF<sub>m</sub>* mRNA transcripts and thus inhibit translation. A ribozyme specific for a *VEGF<sub>m</sub>*-encoding nucleic acid can be designed based on the nucleotide sequence of a *VEGF<sub>m</sub>* cDNA. For example, a derivative of a *Tetrahymena* L-19 IVS RNA can be constructed in which the nucleotide sequence of the active site is complementary to the nucleotide sequence to be cleaved in a *VEGF<sub>m</sub>*-encoding mRNA (Cech *et al.*, U.S. Patent No. 5,116,742, 1992; Cech *et al.*, U.S. Patent No. 4,987,071, 1991). *VEGF<sub>m</sub>* mRNA can also be used to select a catalytic RNA having a specific ribonuclease activity from a pool of RNA molecules (Bartel and Szostak, 1993).

Alternatively, *VEGF<sub>m</sub>* expression can be inhibited by targeting nucleotide sequences complementary to the regulatory region of the *VEGF<sub>m</sub>* (e.g., the *VEGF<sub>m</sub>* promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the *VEGF<sub>m</sub>* in target cells (Helene, 1991; Helene *et al.*, 1992; Maher, 1992).

Modifications of antisense and sense oligonucleotides can augment their effectiveness. Modified sugar-phosphodiester bonds or other sugar linkages (WO 91/06629, 1991), increase *in vivo* stability by conferring resistance to endogenous nucleases without disrupting binding specificity to target sequences. Other modifications can increase the affinities of the oligonucleotides for their targets, such as covalently linked organic moieties (WO 90/10448, 1990) or poly-(L)-lysine. Other

attachments modify binding specificities of the oligonucleotides for their targets, including metal complexes or intercalating (*e.g.* ellipticine) and alkylating agents. For example, the deoxyribose phosphate backbone of the nucleic acids can be modified to generate peptide nucleic acids (Hyrup and Nielsen, 1996). "Peptide nucleic acids" or "PNAs" refer to nucleic acid mimics (*e.g.*, DNA mimics) in that the
 5 deoxyribose phosphate backbone is replaced by a pseudopeptide backbone and only the four natural nucleobases are retained. The neutral backbone of PNAs allows for specific hybridization to DNA and RNA under conditions of low ionic strength. The synthesis of PNA oligomers can be performed using standard solid phase peptide
 10 synthesis protocols (Hyrup and Nielsen, 1996; Perry-O'Keefe *et al.*, 1996). PNAs of VEGFmg can be used in therapeutic and diagnostic applications. For example, PNAs can be used as anti-sense or antigene agents for sequence-specific modulation of gene expression by inducing transcription or translation arrest or
 inhibiting replication. VEGFmg PNAs may also be used in the analysis of single base
 15 pair mutations (*e.g.*, PNA directed PCR clamping; as artificial restriction enzymes when used in combination with other enzymes, *e.g.*, *S*<sub>1</sub> nucleases (Hyrup and Nielsen, 1996); or as probes or primers for DNA sequence and hybridization (Hyrup and Nielsen, 1996; Perry-O'Keefe *et al.*, 1996).

PNAs of VEGFmg can be modified to enhance their stability or cellular
 20 uptake. Lipophilic or other helper groups may be attached to PNAs, PNA-DNA dimers formed, or the use of liposomes or other drug delivery techniques. For example, PNA-DNA chimeras can be generated that may combine the advantageous properties of PNA and DNA. Such chimeras allow DNA recognition enzymes (*e.g.*, RNase H and DNA polymerases) to interact with the DNA portion while the PNA
 25 portion provides high binding affinity and specificity. PNA-DNA chimeras can be linked using linkers of appropriate lengths selected in terms of base stacking, number of bonds between the nucleobases, and orientation (Hyrup and Nielsen, 1996). The synthesis of PNA-DNA chimeras can be performed (Finn *et al.*, 1996; Hyrup and Nielsen, 1996). For example, a DNA chain can be synthesized on a solid support
 30 using standard phosphoramidite coupling chemistry, and modified nucleoside analogs, *e.g.*, 5'-(4-methoxytrityl)amino-5'-deoxy-thymidine phosphoramidite, can be used between the PNA and the 5' end of DNA (Finn *et al.*, 1996; Hyrup and Nielsen,

WO 01/70174

95

PCT/US01/09043

1996). PNA monomers are then coupled in a stepwise manner to produce a chimeric molecule with a 5' PNA segment and a 3' DNA segment (Finn *et al.*, 1996). Alternatively, chimeric molecules can be synthesized with a 5' DNA segment and a 3' PNA segment (Petersen *et al.*, 1976).

5 The oligonucleotide may include other appended groups such as peptides (*e.g.*, for targeting host cell receptors *in vivo*), or agents facilitating transport across the cell membrane (Lemaitre *et al.*, 1987; Letsinger *et al.*, 1989) or PCT Publication No. WO88/09810) or the blood-brain barrier (*e.g.*, PCT Publication No. WO 89/10134). In addition, oligonucleotides can be modified with hybridization-triggered cleavage  
10 agents (van der Krol *et al.*, 1988b) or intercalating agents (Zon, 1988). The oligonucleotide may be conjugated to another molecule, *e.g.*, a peptide, a hybridization triggered cross-linking agent, a transport agent, a hybridization-triggered cleavage agent, and the like.

15 The following examples illustrate by way of non-limiting example various aspects of the invention.

#### EXAMPLES

20 Example 1 *Differential gene expression in human umbilical cord endothelial cells (HUVECs).*

##### 1. Background

To obtain a comprehensive profile of those genes whose expression is modulated during VEGF-dependent, or mutant VEGFR1-dependent, survival  
25 pathway, GeneCalling™ technology (Rothberg *et al.*, US Patent No. 5,871,697, 1999; Shinkets *et al.*, 1999), was applied to serum-starved human umbilical cord endothelial cells treated with a set of growth factors and to reference HUVEC cells grown in the presence of 10% serum. Cells grown in the absence of both any growth factor and serum served as the negative control. GeneCalling™ technology relies on  
30 Quantitative Expression Analysis to generate the gene expression profile of a given sample and then generates differential expression analysis of pairwise comparison of these profiles to controls containing no addition. Polynucleotides exhibiting differential expression are confirmed by conducting a PCR reaction according to the

GeneCalling™ protocol with the addition of a competing unlabelled primer that prevents the amplification from being detected.

2. Growth factors used

(a) VEGF

5 A principal growth factor employed in this example is VEGF, which binds to both VEGFR1 and VEGFR2. In addition, a mutant of VEGF that binds only VEGFR1 (VEGFR1s) was used. The other growth factors used in this study bind to receptors other than VEGFR1 and have different angiogenic potential. They are included as positive (VEGF, VEGFR1s) and negative (PIGF, bFGF, HGS/SF)

10 controls to focus the analysis on the VEGFR1 pathway.

(b) bFGF

Basic fibroblast growth factor (bFGF) is expressed in vascular endothelium during tumor neovascularization and angioproliferative diseases. VEGF and bFGF are potentially synergistic in their combined mitogenic activity. A possible explanation

15 for this synergism is the evidence that bFGF induces the expression of VEGF receptor VEGFR1 and of VEGF itself (Hata *et al.*, 1999). Treatment with bFGF will modulate a set of genes overlapping with those modulated by VEGF and VEGFR1s.

(c) HGF/SF

Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is a pleiotropic growth

20 factor that stimulates proliferation and migration of endothelial cells. Similarly to bFGF, HGF and VEGF are synergistic in their combined angiogenic activity (Van Belle *et al.*, 1997). HGF induces VEGF expression (Gille *et al.*, 1998). Therefore it could be expected that treatment with bFGF will modulate a set of genes overlapping with those modulated by VEGF.

(d) PIGF

25 Placenta growth factor (PIGF) belongs to the family of VEGFs (VEGFs). Three PIGF isoforms are produced by alternative splicing and all induce migration of endothelial cells while having no effect on cell proliferation (Migdal *et al.*, 1998). They ligate VEGFR2 receptor but not to VEGFR1 that is thought to mediate most of

30 the angiogenic and proliferative effects of VEGF. Treatment with PIGF will modulate a set of genes overlapping with those modulated by VEGF but not with



those modulated by VEGFR1s. This observation allows for the identification of the set of genes specifically modulated by VEGF via the VEGFR1 receptor.

3. Genes analysed and corresponding GenBank accession

- 5 Table E1 provides the GenBank Accession numbers for the genes whose expression was analyzed in this example.

**Table E1 GenBank Accessions for analysed genes**

Gene Name	GenBank Accession
Nexin/Glia derived neurite promoting factor (GDNPF)	A03911
placental protein 5 (PP5)/tissue factor pathway inhibitor 2	5730090 D29992
heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)	4503412
Regulator of G-protein signaling 3 (RGS3)	U27655
Gravin/myasthenia gravis autoantigen	U81607
MKP-1 like protein tyrosine phosphatase (MKP1LPTP)	AF038844
amyloid precursor-like protein 2 (APLP2)	L27631
Osteonidogen, nidogen-2 precursor	D86425
amyloid precursor protein (APP)	D87675
hVPS41p	U87309
arginine-rich protein (ARP)	5174392/M83751
Down's syndrome critical region protein 1 (DSCR1)	4758195/ U28833
insulin induced protein 1 (INSIG1)	5031800/ U96876
cytochrome oxidase subunit I (MTCO1)	AF035429
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 (NH1)	DNHUN1
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 (NH4)	DNHUN4
decidual protein induced by progesterone (DEPP)	AB022718
connective tissue growth factor (CTGF)	X78947

## 4. Results

HUVECs were treated with various growth factors, or none, and harvested after 6 or 24 hours. This permits distinguishing between those genes that are more directly regulated by growth factor treatment (after 6 hours) vs. those that may be indirectly regulated, and so appear to be modulated only after 24 hours.

The results of this analysis are summarized in Table E2.

The serum-starved HUVECs represent a valid *in vitro* model because 30% of the cells undergo apoptosis after serum deprivation, representing a 6 fold increase over non-serum starved controls. VEGF or VEGFR1s addition strongly decreases the number of apoptotic cells, while PlGF addition does not stimulate survival (Gerber *et al.*, 1998). These results show that signaling via VEGFR1 and not via the PlGF receptor is important for VEGF activity.

Table E2 GeneCalling™ results

Gene	Time (hours): GeneCalling bands	Treatment											
		Serum			VEGF			Scrum			VEGF		
		6	24	6	24	6	24	6	24	6	24	6	24
Nestin	fluo-178.8	-	-	+1.2	+2.7	-	-	-	-	-	-	-	-
PP5	b10-190.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	d00-227.9	-1.6	-1.4	+1.9	+2.7	-	-	+2.4	+2.4	+2.1	+2	-	+1.4
	i00-108.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HB-EGF	u00-157.6	-	-	+3.9	+3.5	+4.1	+3	-2.6	+2.3	-	-	+2.1	-
RG833	b10-75.5	-	-	-2.3	+2.2	+2.6	-	-2.9	-	-	+2.2	-	-
gravin	d00-108.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	y00-123.3	+1.4	+3.7	+1.6	+5.7	+4.1	-	-	+2.7	-	-	-	-
MKP1LTP	l10-184.5	+3	-	+2.1	+1.6	-	-	-	-	-	-	-	-
APLP2	d00-324.8	-	-	-1.2	-	-1.4	+1.9	+1.2	+3.2	+1.3	-	-	-
Osteonidogen	h00-166.1	-	-	+2.2	+2.1	+2.4	-	-	-	-	-	-	-
APP	m00-112.8	-2	+2.8	-	-1.9	-2	+6.5	-	-	-	+5.6	-	-
hVPS41p	i00-152.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	w00-259	+1.6	+2.8	-2	-2.1	-	+3.7	-	-	-	-	-	-
ARP	j00-224.3	-	+2.1	-	-	+2.2	-	+2.3	-	+2.8	+2.4	+1.6	-
DSCR1	h00-78.1	+1.2	-1.1	+6.3	+4.8	-	-	+3	+2.5	+3.1	-	+1.8	-

[illegible]

Example 2 TaqMan<sup>TM</sup> analysis of differential gene expression in HUVECs

Genes that were shown to be modulated in the GeneCalling analysis were then subjected to Taqman<sup>TM</sup> analysis (TaqMan<sup>TM</sup> polymerase chain reaction detection; Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA).

100 ng of total RNA was added to a 50 µl RT-PCR reaction (PCR-Access, Promega). Primers and probes for real time PCR analysis were designed using the Oligo Version 4.0 program (National Bioscience, Plymouth, MN) (Heid *et al.*, 1996). RT-PCR reactions and the resulting relative increase in reporter fluorescent dye emission were monitored in real time with the 7700 Sequence Detector (Perkin Elmer, Foster City, CA). Signals were analyzed using the sequence detector 1.0 program (PE). Conditions were as follows: 1 cycle 48° C for 45 min., 1 cycle 94° C for 2 min., 40 cycles 94° C, 30 sec., 60° C, 1 min., 68° C, 2 min.

The results are shown in Table E3.

Table E3 TaqMan™ analysis results.

Gene	Bands	SERUM			VEGF			
		6 h	18 h	24 h	6 h	18 h	24 h	32 h
PP5	b1i0-190.7							
	d0i0-227.9	nd	nd	nd	nd	5	nd	6
	i0u0-108.1							
HB-EGF	U0f0-157.6	nd	nd	4	4	nd	4.9	nd
RGS3	BH0-75.5	nd	nd	nd	4	4	nd	Nd
Gravin	D0y0-108.1	nd	nd	nd	5	4	nd	4.5
	y0h0-123.3							
MKP1LTP	L1c0-184.5	1	2	nd	3	2	nd	Nd
APLP2	D0v0-324.8	1	nd	nd	1.6	nd	5	Nd
Osteonidogen	H0a0-166.1	nd	nd	4	3	3	5.3	Nd
hVPS41p	I0r0-152.3	nd	nd	nd	nd	2	nd	3
	w0c0-259							
ARP	I0c0-224.3	nd	nd	nd	3	2	nd	3
DSCR1	H0a0-78.1							
	i0n0-136.2	nd	nd	nd	4	6	nd	5
	i0n0-136.3							
Nexin	F0n0-178.8	1	nd	1	1.5	nd	nd	2.4
INSIG1	G1n0-43.2	1	nd	1	1.5	nd	nd	3.2
CTGF	M0a0-399.6	nd	nd	nd	nd	1.7	nd	6

For each gene, the GeneCalling generated cDNA fragments (bands) that were positively associated with that gene by confirmation and the modulation levels observed by TaqMan analysis.

WO 01/70174

103

PCT/US01/09043

- 103/154 -

Table E7 Probe Primer sets used for Real-time RT-PCR analysis.

	Probe sequence	#	Forward primer	#	Reverse primer	#
HSP5.P/#43	aaagtcccaagttgcccgtgc	45	cgatgtctgtggagataga	46	acactgtgtccactcaact	47
HVPS41.1667.FP/#50	ttgcgcagacatgatcctctgcag	48	atgtgcctccgggagatata	49	gtcccccagccaataatagt	50
HSARP.560.FP/#51	aggatataaagcctctggccacca	51	gcagccaccaaaatcataat	52	tcacagatctctccacagggat	53
HSDSCR1.1113.FP/#52	agggttggaataacagcagcaatgcattgt	54	ccacagtgagccgcctagt	55	tgaagggaagaaggaaacgct	56
HSGRAVIN.4118.FP/#53	ctgagcgcatcatcacttaacagcggc	57	ggagagcgagtgatgacaaa	58	tgcaggtctcaacgtttca	59
HSDOCK.180hg.259.FP#	agaaatgcgcgggtgtctctctgac	60	atgttagagacagaacgggcttt	61	gttttgattgcatggccc	62
HSRGS3.1696.FP/#55	aggacaacctgcagagcgtcacgc	63	aagatgctgtctctgtgcca	64	aaacctggactctacacgcg	65
HSPDK-1.1059.FP	tgttgagggaatggagatacggacaccttaaa	66	ggtggccacaagcgggttagtg	67	gttgacggactcgaagaaggg	68
HSPTPLC100hg.183.FP/#57	tacactgggtggaagcccgcg	69	acaagtggtgctgctggga	70	ccacgtgtgggcttgatgac	71
HSVEGF.294.FP/#92	tgtgcccactggaggagtcacatca	72	aattgacgaggggctgtggagt	73	ttgatcggataatctgcatg	74
HSHB-EGF.300.FP/	ctggctgcagttctctcggcactg	75	tgaacagttgagatgctgaact	76	ctccaggctctctgcccagtc	77
HSFlt-1-2449T/#175	accaaacagaaagggtctctgtggaa	78	aagggtgtctatcacatgcaaacg	79	tgaacagttgagatgctgaact	80
HSKDR.1180.RP/#93	agacacgggtcgggtgaggagcg	81	cgcctctgtgtgtgtaagga	82	ccgagttgagatcgtgctttca	83

#, SEQ ID NO.

Example 3 <sup>33</sup>P-hybridization analysis of differential gene expression

Formalin fixed, paraffin-embedded human tissues were investigated for *in situ* mRNA expression. Tissues included first trimester (14-15 week) placenta, adult adrenal cortex, aorta, muscular artery with atherosclerosis, brain, gall bladder, heart, pancreas, prostate, stomach, eye with age related macular degeneration (AMD), and inflamed appendix, pulmonary adenocarcinoma, ductal mammary adenocarcinoma, kidney with renal cell carcinoma, hepatocellular carcinoma, squamous cell carcinoma, osteosarcoma, and chondrosarcoma. *In vitro* transcription and [<sup>33</sup>P] labeling of sense and anti-sense riboprobes was performed as follows: Sequences for the genes to be analyzed were PCR-amplified from plasmid DNA using gene-specific primers that encoded T3 or T7 RNA polymerase initiation sites. Sense and antisense riboprobes were prepared by *in vitro* transcription from the PCR -amplified templates and diluted in hybridization buffer to a specific activity of  $1 \times 10^6$  cpm/ml. Tissue sections 5 micrometers thick were deparaffinized, deproteinized in 4 µg/ml of proteinase K for 30 minutes at 37°C, hybridized at 55°C overnight, then washed at high stringency (55°C in 0.1 X SSC for 2 hours). Glass slides were dipped in NBT2 nuclear track emulsion (Eastman Kodak), exposed in sealed plastic slide boxes containing dessicant for 4 weeks at 4°C, developed and counterstained with hematoxylin and eosin.

The results of the in-situ hybridization experiments are shown in Table E4.



Table E4    *In situ* hybridization analysis

	DSCR1	PPS	RGS3	ARP	hVPS41p	HB-EGF	Gravm	MKPI-LPTP	CTGF	necln	Osteo-nidogen
HUVEC: ct values	23.1	18.7	21.7	20.5	22.4	25.9	19.3	23	21	-	22
tumor: vascular	-	-	++	-	-	-	(+)	-	++	-	++
tumor : non vascular	+	-	+++	++	++	++	++	+/+	stromal	+/+	++
fetal: vascular	++	+++	-	-	-	-	++	-	+++	-	++
fetal: non vascular	++	+	+	++	-	+/+	++	-	+++	+/+	++
adult vascular	-	-	-	-	-	-	(+)	-	++	-	+
adult non vascular	+	-	+	-	-	+	-	-	++	(+)	+
Inflammation	-	-	+	+++	-	+++	?	-	++	-	++

+ weak expression, ++ moderate expression, +++ strong expression

The results in Table E4 show that in fetal vascular tissue certain of the differentially expressed genes identified by GeneCalling are also differentially identified by in-situ hybridization. In adult vascular tissue, however, only pathological states, such as presence of a tumor or of inflammation, lead to significant modulation of genes among the set of differentially expressed genes.

Example 4 Clinical stage correlation of ovarian tumors with differential expression of VEGF-modulated genes

In order to test, whether the correlation between VEGF stimulation and DSCR1 expression observed in tissue culture conditions *in vitro* did also translate *in vivo* in tumors associated with high VEGF expression, we have analyzed 3 matched sets of RNA derived from ovarian tumors and control tissues from the same patients (Clontech) by real-time RT-PCR. VEGF overexpression is thought to play a major role in the progression of ovarian cancer by promoting the neovascularization and subsequent growth of solid intraperitoneal tumors and by inducing ascites formation by increasing the permeability of the tumor vasculature (Mesiano et al, Am. J. Pathol, 153, p1249, 1998). VEGF mRNA levels in ovarian carcinomas are significantly higher than in normal ovaries. The average levels of VEGF expression in normal versus tumor tissues was increased 3.2 fold and correlated with the 2.7 fold increase in DSCR1 expression in the tumor RNA.

Two thirds of patients with epithelial ovarian carcinomas have advanced disease at diagnosis and have poor prognosis because of the presence of highly invasive carcinoma cells (CA) and rapidly accumulating ascites fluid. One third of patients with low metastatic epithelial adenocarcinomas (low malignant potential=LMPs), have extremely favorable long term outcomes. Previous studies indicated not only a correlation between disease and VEGF expression, but identified VEGF as key regulator of angiogenesis and ascites formation in ovarian cancer. (Fujimoto et al, Cancer, 83, p.2532, 1998.)

A series of total RNAs isolated from 12 patients with LMPs and 9 patients with CAs for expression of VEGF were tested, VEGF receptors and DSCR1 by real-time RT-PCR. Expression levels were normalized to the levels of GAPDH or  $\beta$ -actin (data not shown). Based on these expression levels, statistical analysis using StatView

statistical analysis software program, lead to the identification of a correlation between VEGF, VEGF receptors and the expression levels of DSCR1 (Table E5). In addition, a correlation between clinical stage ( $R=$ ), KDR ( $R=0.834$ ) and VEGF ( $R=$ ) expression. These findings indicate that gene profiling experiments in endothelial cells grown in tumor like conditions mimicked by the presence of VEGF, might be instrumental in the search of novel VEGF target genes that are specifically upregulated in tumors or the tumor vasculature. Moreover, the correlation between with clinical stages of tumor development and DSCR1 levels opens the question whether DSCR can serve as a predictive marker for tumor progression in ovarian tumor patients and in other indications.

Total RNA was isolated from tumor biopsies of 12 patients with Low Malignant Potential (LMP) ovarian tumor and from 9 patients with the more malignant Cystoadeno Carcinoma (CA) ovarian tumor. The RNA was analyzed for the expression of VEGF, VEGF receptors and VEGF target genes by TaqMan<sup>TM</sup> as described above. RNA was run in triplicate, a standard curve with HUVE cell RNA was generated for each probe and relative expression levels were calculated using as a standard the housekeeping gene  $\beta$ -glucuronidase (GUS) and the endothelial marker CD31 to correct for the amount of endothelial cells present. The results are summarized in Table E5. The first row reports the results of ANOVA analysis between the expression of a given gene and grouping the tumor samples based on the clinical stage, LMP vs CA. The second and third rows report the correlation between expression of a given gene and the expression of VEGF or VEGFR1 receptor by the tumor samples. They indicate that there is a positive correlation between high metastatic potential and increased expression level for DSCR1 and ARG rich genes.

Table E5 Ovarian tumor clinical stage correlation analysis

Ovarian tumor RNA											
Correlation with:	DSCR1	PP5	RGS3	ARP	HVPS41	HB-EGF	Gravin	MKP1LP TP	CTGF	Nexin	Osteonid ogen
clinical stage (LMP/CA)	p=0.0157	-	-	p=0.0157	-	nd	-	-	nd	nd	nd
VEGF expression	-	R=0.949 p=0.0001	R=0.590 p=0.0049	-	R=0.665 p=0.001	nd	R=0.956 p=0.0001	-	nd	nd	nd
VEGFR1 expression:	R=0.834 p<0.0001	-	R=0.667 p=0.0009	R=0.799 p=0.0001	R=0.662 p=0.0011	nd	-	R=0.662 p=0.0034	nd	nd	nd

**Example 5 Survival of endothelial cells transfected with VEGFmgs**

In order to study whether DSCR1 directly regulates endothelial cell survival, we transiently cotransfected epitope tagged version of DSCR1 with an expression vectors for EGFP and quantified the ratio between EGFP positive and healthy and apoptotic endothelial cells by fluorescenz microscopy. As shown in Figure 1, transient overexpression of epitope tagged version of DSCR1 (DSCR1-FLAG) led to a modest decrease in cell viability. Overexpression of the antisense construct, in contrast, increased survival to similar extends as observed for a constitutive active form of Akt (Akt 179). These findings excluded a direct survival effect of DSCR1 when overexpressed in endothelial cells and suggested a decrease in viability under serum starvation conditions. However, no such decrease in viability was observed in cells grown in 5 % serum conditions (Fig 1).

It is seen that in the control, DSCR1 removal induces apoptosis; at 66 hours only about 25% of the cells are alive. On the other hand, about 80% of the cells transfected with Akt2D survive. Cells transfected with DSCR1 have a survival rate similar to Akt2d while transfection with the sense strand of DSCR1, presumably leading to higher expression, induces faster cell death.

*Experimental details:*

Expression in HUVECs of sense and antisense polynucleotides corresponding to genes in this invention was carried out as follows:

## a) Cells:

HUVEC, p6 (Cell system) in 6 cm tissue culture dish (Falcon 3802, primaria, surface modified polystyrene). grown on gelatin coated plastic.

6 cm dishes were coated for >20 min with 0.2% gelatin in PBS, before applying the cells.

Cells were coated at a density of 140,000 cells per 6 cm dish, i.e., ca. 5000 cells/cm<sup>2</sup>

Cells should attain at least 60% confluency, since otherwise increased toxicity was observed. At high density, low transfection efficiency was observed.

WO 01/70174

110

PCT/US01/09043

For microvascular cells, other DNA/lipofectin ratios have to be determined, otherwise increased toxicity is found.

control samples:

#	VEGF (50ng/ml)	GFP	Annexin-PE
1	+	-	-
2	+	+	-
3	+	-	+
4	-	-	-
5	-	+	-
6	-	-	-

DNA: 3.0 µg total DNA/ 6 cm dish: 2. 0 µg test, 1.0 µg Green Fluorescent Protein (GFP)

F1: 4 µl/ 6 cm dish

OPTIMEM: 1.3 ml per 6 cm dish

Use Falcon clear tubes (polystyrene)

For HMVE cells: 2µg DNA+4 µl F1

b) Procedure:

Day1: Split cells 24 hours before Lipofectin,

Day 2: 4pm to 6pm: Vortex Lipofectin (Life Technologies, Inc. , Rockville, MD) thoroughly in clear Falcon tubes for 20 sec before using.

First add 1.35 ml/sample of OPTIMEM (Gibco BRL Cat No. 31985). Next add 3 µg total DNA per sample and mix well by vortexing. Then add 4 µl of F1 per sample and mix well by vortexing. Mix DNA+Lipofectin+OPTIMEM and incubate in a water bath at 37 C for 20 to 30 min; then wash the cells twice with OPTIMEM.

WO 01/70174

111

PCT/US01/09043

Add 1.35 ml of the transfection mix and incubate for 2 h at 37 C. After 2h, add 3 ml of complete medium and incubate 16 to 19 hours.

Day 3: 10 am: replace media next morning to 10% serum-containing medium, but do not wash the cells. Alternatively, leave the transfection mix for another 24 hours; this will lead to a higher transfection efficiency but also lead to increased cell death.

If apoptosis is being determined:

Day 3: evening: The cells are washed with 2x PBS and the medium is changed to serum starvation, then GF+WM are added.

Day 4: late afternoon: The cells are analyzed by using FACS set to detect annexin-PE and FITC channels for % apoptotic cells (30 h time point). Up to 32% transfection efficiency after 72 h was observed when Green Lantern was transfected.

If survival is being studied:

Day 4, morning: The cells are washed with 2x PBS and the medium is changed to serum starvation, then GF+WM are added.

Day 4, evening: count GFP positive cells and compare apoptotic/ healthy

Day 5 (24 h later): The cells are harvested for FACS analysis.

c) FACS analysis:

1. The supernatant (3ml) is pulled off and added to prelabelled 5 ml Falcon tubes with a filter on top at 0 C, and the tubes were spun down at 2000 rpm for 3 min. In the meantime:

2. The cells were washed carefully with 3 ml PBS.

3. 0.5 ml 2x Trypsin was added, and the mixture was incubated for 3 min. in the 37 C incubator

4. After 3 min, 3 ml of medium was added, containing 10% serum, to stop the digestion.

WO 01/70174

112

PCT/US01/09043

5. The supernatant from step 1 was drawn off by aspiration and 3.5ml from step 4 were added to the tubes containing the cell pellets.
6. The cells were pelleted at 2000 rpm for 3 min.
7. The pellets were washed 1x with 2 ml of 1x Ca binding buffer.
8. The cells were pelleted at 2000 rpm for 3 min, and the supernatant was aspirated off.
9. The pellet was taken up in 0.5 ml Ca-binding buffer (generate pool containing Annexin-PE, or simple 1xCa-binding buffer for control samples), and the cells were disaggregated by pipetting up and down 6 times.
10. Add 10  $\mu$ l of Annexin-PE to the control samples, or 1  $\mu$ l of the BioVison annexin-Cy3 stock solution.
11. The tubes were kept on ice and submitted to the FACS lab for analysis.

d) Materials

F1: targeting systems, Targfect F-1 (2mg/ml), Cat No #001 (1ml) or #002 (4x1ml).

Growth Factors: for 5 ml medium in 6 cm dishes

VEGF: 10 $\mu$ l of 0.1mg/ml stock+650 $\mu$ l serum-free medium. 100  $\mu$ l of this stock was added to 5 ml medium present in 6 cm dish to give a 30 ng/ml final concentration.

Wortmannin (a potent, irreversible inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase; BIOMOL, #ST-415; Catalogue Number 1232, Tocris Cookson, United Kingdom)

The contents of the vial (5 mg) were taken up in 500  $\mu$ l dimethylsulfoxide (stock: 10mg/ml stock; 23.3 mM). 4.3  $\mu$ l of the 10mg/ml stock solution was diluted in 1 ml medium to give a 100  $\mu$ M solution. 10  $\mu$ l of this stock was diluted in 650  $\mu$ l serum-free medium, and 100  $\mu$ l was added to the 5 ml medium present in the 6 cm dishes.



WO 01/70174

113

PCT/US01/09043

## e) DNA

empty vector: pRLCMV,	1.3 µg/µl	2.7 µl/dish
GreenLantern <sup>TM</sup> :	0.7 µg/µl	1.5 µl/dish

## f) FACS:

Use Annexin-Cy3, GFP and Pi (works well)

Annexin-PE (R&D), add 10 µl of stock, undiluted, to the cells. Rest as before

Annexin -Cy3, BioVision, 1002-1000

Opti-MEM-1 Gibco, BRL Cat No. 31985, 0.5 l

CSC medium, Cat. No. 4Z0-500,

noGF, no serum Cat. no 4Z3-500-S,

Endothelial cells were transfected with pRLCMV (empty vector, negative control) or with pRLCMV further containing nucleotide sequences expressing either DSCR1 in the sense direction (DSCR1), or DSCR1 in the anti-sense direction (DSCR1 AS), or the activated mutant of AKT (Akt2D, a positive control that induces cell survival) as outlined above. The cells were co-transfected with Green Lantern expressing Green Fluorescent Protein that gives an indication of the efficiency of transfection and provides a visible marker for surviving cells. 18 hours after transfection, serum was removed from the media.

## Example 6 Further analysis of DSCR1

## 1. Introduction

Down's Syndrome induces mental retardation and congenital heart malformations. The open reading frame encoding DSCR1 was one of several located within the minimal region on chromosome 21 capable to induces the down syndrome phenotype (Fuentes et al, Hum Mol Genet 1995 Oct;4(10):1935-44). More recently, DSCR1 was found to interact physically and functionally with calcineurin A, the catalytic subunit of the Ca(2+)/calmodulin-dependent protein phosphatase PP2B. Transient overexpression of DSCR1 blocked calcineurin-dependent gene transcription

through the inhibition of the nuclear translocation of nuclear factor of activated T cells (NFAT). (Fuentes JJ, Hum Mol Genet 2000 Jul 1;9(11):1681-90).

NFAT was originally described as transcription factor that supported the activation of cytokine gene expression in T-cells and as the primary target of the immunoregulatory effects of cyclosporin A (CsA) and FK506. Elevated levels of NFAT in activated endothelial cells were first observed by Cockerill et al (Blood 1995 Oct 1;86(7):2689-98) and interference with NFAT activity by CsA resulted in a 40 % reduction of E-selection expression on endothelial cells stimulated with TNF- $\alpha$  as well as a 29 % decrease in neutrophil adhesion. These findings suggested a biological role of DSCR1 to regulate NFAT activity and the expression of cell adhesion molecules on activated endothelial cells.

## 2. Materials and methods

### (a) cells

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were purchased from Cell Systems and were grown in endothelial growth medium (CS-C medium, Cell Systems)) complemented to a final concentration of 5% serum. Cells were split at a cell density of  $19,000 \text{ cell/cm}^2$  and experiments were run in triplicates. 24 hours after seeding, the cells were washed three times with phosphate buffered saline (PBS) and media, 0.1 % BSA or 0.1 % BSA and VEGF (10ng/ml) or 5 % serum.

### (b) RNA harvest and Real Time RT-PCR analysis

Medium was aspirated from the cultures, and 10 ml of Trizol (Gibco) was added to  $1 \times 10^6$  cells. The tissue culture flasks were incubated on vertical shaker for 10 min. RNA isolation and cDNA synthesis and data analysis were as described elsewhere (Kahn *et al.*, 2000). For tissues, RNA was isolated from frozen tumor tissue harvested at necropsy from five specimens of each treatment group using the STAT 60 method (TEL-TEST "B"; Friendswood, TX), and purified on RNeasy Quick spin columns (Qiagen, Valencia, CA). One hundred ng of total RNA/reaction was analyzed using the RT-PCR kit from Perkin Elmer, following the manufacturer's instructions (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Reactions were run in 96 well plates in a Model 7700 Sequence Detector (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) and results were analyzed using Sequence Detection Software (PE Applied

Biosystems, Foster City, CA). RT-PCR conditions were 30 min at 48°C, 10 min at 95°C, and 40 cycles of 30 seconds at 95°C, 90 seconds at 60°C. Relative RNA equivalents for each sample were obtained by standardizing to GAPDH levels. Each of the five samples per group was run in duplicates to determine sample reproducibility, and the average relative RNA equivalents per sample pair was used for further analysis. Statistical analysis was performed using ANOVA software (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). Species specificity of the probe/primer sets was verified by testing total RNA derived from human epithelial cells or mouse kidney RNA (data not shown). Expression levels were standardized to the probe/primer sets specific for human or murine GAPDH, respectively.

(c) Transient transfection of primary human endothelial cells

Use HUVE cells before they reach passage 6 and HMVEC before reaching passage 4.

Use Falcon Primaria 6 well dishes uncoated. (coating with gelatin is not recommended).

Harvest cells by incubation with 2x trypsin at rt for 3 to 5 min, dilute trypsinized cells in 3 volumes complete medium (do not trypsinize too long).

Count 10  $\mu$ l of mix on the hemocytometer

Spin cells 5 min at 2 krp in the meantime.

Remove supernatant and dilute cells with complete medium to 0.5 x 10<sup>5</sup> cells in 3ml of complete medium, make a pool

Add 3 ml of cells from the pool to each well (50000 cells/well, (5000 cells/cm<sup>2</sup>))

Cells should not be < 60% confluent, otherwise increased toxicity might be observed. At cell densities > 80%, lower transfection efficiency was observed.

Lipofection:

For HUVE and HMVEC cells:

The following amounts were calculated for transfection of 3 wells. It is advisable to generate a pool of 3 transfections in order to have duplicate or triplicates for each gene tested.

Pipette DNA into 15 ml Falcon clear tubes (polystyrene), best results when DNA concentration measured immediately prior to experiment:

WO 01/70174

116

PCT/US01/09043

- 11.25 µg of expression vector (pRKN driven)
- 3.75 µg of luciferase reporter
- 1.0 µg of SV-renilla reference reporters

Add 4.5 ml of *Optimem* (serum free)

- 9.) Vortex F1 targetectin solution for 30 sec and add 14 µl of F1 to the mix.

10.) Mix the lipofection mix by inversion and incubate samples in 37 C water-bath for 20 to 30 minutes

10.) Wash cells once with PBS, remove PBS and add 1.5 ml of lipofection mix using 5ml plastic pipette per dish.

- 11.) Incubate cells for 2.5 hours in CO2 incubator,

- 12.) Add 3 ml of complete medium and incubate overnight (12 to 16 hours).

The effects of prolonged incubation are not determined yet.

- 13.) Wash cells 1x PBS

- 14.) Add 3 ml of complete medium, wait for 24 hours before dosing.

- 15.) harvest cells after 36 hours after lipfection or 6 to 9 hours after dosing.

Serum Starvation (0.5 % FCS):

- 1.) Next morning: wash cells 1x with 3 ml PBS

- 2.) Add 3 ml of 0.5 % FCS medium, 0.2 % BSA, Pen/Step, fungizone

Up to 32% transfection efficiency after 72 h was observed when EGFP was transfected .\

Cell Harvest and luciferase measurement:

Remove medium by aspiration, wash carefully 1x with PBS and add 300 µl 1 x passive lysis buffer, sample can be stored at -20 C at this point, however activity might decrease up to 50 %.

Luminometer:

Prefill tube with 100 µl luciferast substrate solution

Add 30 µl extract

WO 01/70174

117

PCT/US01/09043

Add 100  $\mu$ l STOP and GLOW

#### Additional materials

Materials: F1: targeting systems, Targfect F-1 (2mg/ml), Cat No #001 (1ml) or #002 (4x1ml), (Targeting systems, Tel 619 562 15 18, Rhumipia)

Culture dishes: 60 mm cell culture dishes, Falcon 3802, primaria, surface modified polystyrene.

Cells: HUVEC: Cell systems, 2VO-C75

HDMEC, Cell Systems, 2M1-C75

Medium:

5% serum containing:

Opti-MEM-1 Gibco, BRL Cat No. 31985, 0.5 l

CSC medium, Cat. no. 4Z0-500, 110\$

noGF. no serum Cat. no 4Z3-500-S, 90\$

### 3. DSCR1 is expressed in tumor vasculature and in neoplastic cells

In order to study the cellular localization of DSCR1 expression within various human tumors and other malignancies, in situ hybridization experiments including a series of different human tumors as well on sections prepared from a variety of healthy human organs were performed. During fetal development in humans, DSCR1 was found to be expressed in the fetal liver and in dorsal root ganglia, in cells of the atrio-ventricular junction near the A-V valve insertions and focally in the cells within the subendocardial layer of the left ventricular septum and right ventricular apex. There was weak expression in embryonic large hepatic vein endothelium and small vessel endothelium. In the embryonic spinal cord, there was expression in neurons. When studied in adult chimpansees, DSCR1 expression was further detected in myoepithelial cells surrounding normal mammary ducts and in normal chimp parathyroid. In adult liver, expression was localized to hepatocytes and bile duct

epithelium of cirrhotic, but not normal liver. There was focal expression within human adenocarcinomas of the mammary gland as well as in renal cell carcinoma and. Sense control were run on all samples and revealed no background signals (data not shown). These findings might reflect some degree of redundancy in the signal transduction pathways regulating DSCR1 expression on endothelial cells and transformed tumor cells. Alternatively, upregulation of VEGF receptors on tumors cells and stimulation of the VEGF specific signal transduction pathways could help to explain our findings. In summary, we found DSCR1 gene expression in fetal vasculature during normal ontogeny as well as in neoplastic tumor cells in adults and therefore identified DSCR1 as a member of the oncofetal family of genes.

4. Functional analysis of DSCR1 by transient transfection of primary human endothelial cells

Recently it was shown in yeast two hybrid experiments, that DSCR1 interacts physically and functionally with calcineurin A, the catalytic subunit of the  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein phosphatase PP2B. In studies in T-cells, transient overexpression of DSCR1 inhibited the transcriptional activation of the interleukin 2 promoter in response to PMA/calcium stimulation. In DSCR1 transfected cells, NFAT was unable to accumulate in the nucleus after stimulation with calcium ionophores such as ionomycin.

Overexpression of DSCR in primary human endothelial cells had any effect on the NFAT activation after stimulating the cells with PMA and the calcium Ionophore A23187 was tested. Transient cotransfection experiment of expression vector encoding DSCR1-FLAG and a luciferase reporter construct containing three NFAT binding sites (NFAT-Luc) revealed complete ablation of NFAT activity in response to PMA and ionophore after 6 hours of stimulation. Enforced expression of DSCR in endothelial cells leads to a significant downregulation of calcineurin regulated signal transduction pathways, presumably via interference with calcineurin regulated signal transduction pathways.

**EQUIVALENTS**

Although particular embodiments have been disclosed herein in detail, this has been done by way of example for purposes of illustration only, and is not intended to be limiting with respect to the scope of the appended claims that follow. In particular, it is contemplated by the inventors that various substitutions, alterations, and modifications may be made to the invention without departing from the spirit and scope of the invention as defined by the claims. The choice of nucleic acid starting material, clone of interest, or library type is believed to be a matter of routine for a person of ordinary skill in the art with knowledge of the embodiments described herein. Other aspects, advantages, and modifications considered to be within the scope of the following claims.

**References**

- U.S. Patent No. 4166452. Apparatus for testing human responses to stimuli. 1979.
- U.S. Patent No. 4485045. Synthetic phosphatidyl cholines useful in forming liposomes. 1984.
- U.S. Patent No. 4544545. Liposomes containing modified cholesterol for organ targeting. 1985.
- 4,676,980. Target specific cross-linked heteroantibodies. 1987.
- U.S. Patent No. 4816567. Recombinant immunoglobulin preparations. 1989.
- WO 90/10448. Covalent conjugates of lipid and oligonucleotide. 1990.
- WO 90/13641. Stably transformed eucaryotic cells comprising a foreign transcribable DNA under the control of a pol III promoter. 1990.
- EPO 402226. Transformation vectors for yeast *Yarrowia*. 1990.
- WO 91/00360. Bispecific reagents for AIDS therapy. 1991.
- WO 91/04753. Conjugates of antisense oligonucleotides and therapeutic uses thereof. 1991.
- U.S. Patent No. 5013556. Liposomes with enhanced circulation time. 1991.
- WO 91/06629. Oligonucleotide analogs with novel linkages. 1991.
- WO 92/20373. Heteroconjugate antibodies for treatment of HIV infection. 1992.
- WO 93/08829. Compositions that mediate killing of HIV-infected cells. 1993.
- WO 94/11026. Therapeutic application of chimeric and radiolabeled antibodies to human B lymphocyte restricted differentiation antigen for treatment of B cells. 1994.
- WO 96/27011. A method for making heteromultimeric polypeptides. 1996.
- U.S. Patent No. 5545807. Production of antibodies from transgenic animals. 1996.
- U.S. Patent No. 5545806. Transgenic non-human animals for producing heterologous antibodies. 1996.
- U.S. Patent No. 5569825. Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies of various isotypes. 1996.
- WO 97/33551. Compositions and methods for the diagnosis, prevention, and treatment of neoplastic cell growth and proliferation. 1997.
- U.S. Patent No. 5633425. Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies. 1997.



- U.S. Patent No. 5661016. Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies of various isotypes. 1997.
- U.S. Patent No. 5625126. Transgenic non-human animals for producing heterologous antibodies. 1997.
- Abravaya, K., J.J. Carrino, S. Muldoon, and H.H. Lee. 1995. Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap- LCR). *Nucleic Acids Res.* 23:675-82.
- Alam, J., and J.L. Cook. 1990. Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription. *Anal. Biochem.* 188:245-254.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, *et al.* 1994. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., New York, NY. 1294 pp.
- Alon, T., I. Hemo, A. Itin, J. Pe'er, *et al.* 1995. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med.* 1:1024-8.
- Araki, W., and R.J. Wurtman. 1998. Increased expression of amyloid precursor protein and amyloid precursor- like protein 2 during trophic factor withdrawal-induced death of neuronal PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 56:169-77.
- Arkonac, B.M., L.C. Foster, N.E. Sibinga, C. Patterson, *et al.* 1998. Vascular endothelial growth factor induces heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 273:4400-5.
- Athanassiades, A., and P.K. Lala. 1998. Role of placenta growth factor (PlGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness. *Placenta.* 19:465-73.
- Austin, C.P., and C.L. Cepko. 1990. Cellular migration patterns in the developing mouse cerebral cortex. *Development.* 110:713-732.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, *et al.* 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
- Barany, F. 1991. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:189-93.
- Bartel, D.P., and J.W. Szostak. 1993. Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences [see comment]. *Science.* 261:1411-8.

- Bartel, P., C.T. Chien, R. Sternglanz, and S. Fields. 1993. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques*. 14:920-4.
- Beal, P.A., and P.B. Dervan. 1991. Second structural motif for recognition of DNA by oligonucleotide-directed triple-helix formation. *Science*. 251:1360-3.
- Bechtold, N., and G. Pelletier. 1998. In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol*. 82:259-66.
- Becker, D.M., and L. Guarente. 1991. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol*. 194:182-187.
- Beggs, J.D. 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature*. 275:104-109.
- Bellamy, W.T., L. Richter, Y. Frutiger, and T.M. Grogan. 1999. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res*. 59:728-33.
- Berger, J., J. Hauber, R. Hauber, R. Geiger, *et al*. 1988. Secreted placental alkaline phosphatase: A powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene*. 66:1-10.
- WO 93/04169. GENE TARGETING IN ANIMAL CELLS USING ISOGENIC DNA CONSTRUCTS. 1993.
- Bodine, D.M., K.T. McDonagh, N.E. Seidel, and A.W. Nienhuis. 1991. Survival and retrovirus infection of murine hematopoietic stem cells *in vitro*: effects of 5-FU and method of infection. *Exp. Hematol*. 19:206-212.
- Boerner, P., R. Lafond, W.Z. Lu, P. Brams, *et al*. 1991. Production of antigen-specific human monoclonal antibodies from *in vitro*-primed human splenocytes. *J Immunol*. 147:86-95.
- U.S. Patent No. 3,773,919. Polylactide-drug mixtures. 1973.
- Bradley. 1987. Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. Oxford University Press, Inc., Oxford. 268 pp.
- Bradley, A. 1991. Modifying the mammalian genome by gene targeting. *Curr Opin Biotechnol*. 2:823-9.

- Brennan, M., P.F. Davison, and H. Paulus. 1985. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science*. 229:81-3.
- WO94/10300. INTERACTION TRAP SYSTEM FOR ISOLATING NOVEL PROTEINS. 1994.
- Capecchi, M.R. 1980. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*. 22:479.
- Capecchi, M.R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 244:1288-92.
- Carrell, T., E.A. Wintner, and J. Rebek Jr. 1994a. A novel procedure for the synthesis of libraries containing small organic molecules. *Angewandte Chemie International Edition*. 33:2059-2061.
- Carrell, T., E.A. Wintner, and J. Rebek Jr. 1994b. A solution phase screening procedure for the isolation of active compounds from a molecular library. *Angewandte Chemie International Edition*. 33:2061-2064.
- Carmeliet, P., M.G. Lampugnani, L. Moons, F. Breviario, *et al.* 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*. 98:147-57.
- Caron, P.C., W. Laird, M.S. Co, N.M. Avdalovic, *et al.* 1992. Engineered humanized dimeric forms of IgG are more effective antibodies. *J Exp Med*. 176:1191-5.
- Carter, P. 1986. Site-directed mutagenesis. *Biochem J*. 237:1-7.
- Case, M.E., M. Schweizer, S.R. Kushner, and N.H. Giles. 1979. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:5259-63.
- U.S. Patent No. 5,116,742. RNA ribozyme restriction endoribonucleases and methods. 1992.
- U.S. Patent No. 4,987,071. RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endoribonucleases and methods. 1991.
- Cepko, C.L., B.E. Roberts, and R.E. Mulligan. 1984. Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell*. 37:1053-1062.
- Chalfie, M., Y. tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, *et al.* 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263:802-805.

- Chaney, W.G., D.R. Howard, J.W. Pollard, S. Sallustio, *et al.* 1986. High-frequency transfection of CHO cells using Polybrene. *Somatic Cell Mol. Genet.* 12:237.
- Chen, C., and H. Okayama. 1988. Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA. *BioTechniques.* 6:632-638.
- Chen, S.H., H.D. Shine, J.C. Goodman, R.G. Grossman, *et al.* 1994. Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:3054-7.
- Cho, C.Y., E.J. Moran, S.R. Cherry, J.C. Stephans, *et al.* 1993. An unnatural biopolymer. *Science.* 261:1303-5.
- Cohen, A.S., D.L. Smisek, and B.H. Wang. 1996. Emerging technologies for sequencing antisense oligonucleotides: capillary electrophoresis and mass spectrometry. *Adv Chromatogr.* 36:127-62.
- Cohen, J.S. 1989. Oligodeoxynucleotides: Antisense inhibitors of gene expression. CRC Press, Boca Raton, FL. 255 pp.
- Cohen, S.M.N., A.C.Y. Chang, and L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69:2110.
- Cooney, M., G. Czernuszewicz, E.H. Postel, S.J. Flint, *et al.* 1988. Site-specific oligonucleotide binding represses transcription of the human c-myc gene *in vitro*. *Science.* 241:456-9.
- Cotton, R.G. 1993. Current methods of mutation detection. *Mutat Res.* 285:125-44.
- Crawford, D.R., N.E. Abramova, and K.J. Davies. 1998. Oxidative stress causes a general, calcium-dependent degradation of mitochondrial polynucleotides. *Free Radic Biol Med.* 25:1106-11.
- Cronin, M.T., R.V. Fucini, S.M. Kim, R.S. Masino, *et al.* 1996. Cystic fibrosis mutation detection by hybridization to light-generated DNA probe arrays. *Hum Mutat.* 7:244-55.
- Cull, M.G., J.F. Miller, and P.J. Schatz. 1992. Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus of the lac repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:1865-9.

- Cwirla, S.E., E.A. Peters, R.W. Barrett, and W.J. Dower. 1990. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:6378-82.
- de Boer, A.G. 1994. Drug absorption enhancement: Concepts, possibilities, limitations and trends. Harwood Academic Publishers, Langhorne, PA.
- de Louvencourt, L., H. Fukuhara, H. Heslot, and M. Wesolowski. 1983. Transformation of *Kluyveromyces lactis* by killer plasmid DNA. *J Bacteriol*. 154:737-42.
- de Wet, J.R., K.V. Wood, M. DeLuca, D.R. Helinski, *et al*. 1987. Structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol*. 7:725-737.
- Demerec, M., E.A. Adelberg, A.J. Clark, and P.E. Hartman. 1966. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics*. 54:61-76.
- Deng, X., P. Ruvolo, B. Carr, and W.S. May. 2000. Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:1578-83.
- Devlin, J.J., L.C. Panganiban, and P.E. Devlin. 1990. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science*. 249:404-6.
- DeWitt, S.H., J.S. Kiely, C.J. Stankovic, M.C. Schroeder, *et al*. 1993. "Diversomers": an approach to nonpeptide, nonoligomeric chemical diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:6909-13.
- Druey, K.M., K.J. Blumer, V.H. Kang, and J.H. Kehrl. 1996. Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family. *Nature*. 379:742-6.
- Eichelbaum, M., and B. Evert. 1996. Influence of pharmacogenetics on drug disposition and response. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 23:983-5.
- Ellington, A.D., and J.W. Szostak. 1990. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 346:818-22.
- Elroy-Stein, O., and B. Moss. 1990. Cytoplasmic expression system based on constitutive synthesis of bacteriophage T7 RNA polymerase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:6743-6747.
- US Patent No. 4,522,811. Serial injection of muramyl dipeptides and liposomes enhances the anti-infective activity of muramyl dipeptides Serial injection of

- muramyl dipeptides and liposomes enhances the anti-infective activity of muramyl dipeptides. 1985.
- Eppstein, D.A., Y.V. Marsh, M. van der Pas, P.L. Felgner, *et al.* 1985. Biological activity of liposome-encapsulated murine interferon gamma is mediated by a cell membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:3688-92.
- Escudero, J., and B. Hohn. 1997. Transfer and integration of T-DNA without cell injury in the host plant. *Plant Cell*. 9:2135-2142.
- U.S. Patent No. 4,870,009. Method of obtaining gene product through the generation of transgenic animals. 1989.
- Evron, E., P. Cairns, N. Halachmi, S.A. Ahrendt, *et al.* 1997. Normal polymorphism in the incomplete trinucleotide repeat of the arginine-rich protein gene. *Cancer Res*. 57:2888-9.
- WO9730065. COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT AND DIAGNOSIS OF CARDIOVASCULAR DISEASE. 1997.
- Fekete, D.M., and C.L. Cepko. 1993. Retroviral infection coupled with tissue transplantation limits gene transfer in the chick embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:2350-2354.
- Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, *et al.* 1987. Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA/transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84:7413-7417.
- Felici, F., L. Castagnoli, A. Musacchio, R. Jappelli, *et al.* 1991. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J Mol Biol*. 222:301-10.
- Ferrara, N. 1999a. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med*. 77:527-43.
- Ferrara, N. 1999b. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol*. 237:1-30.
- Fieck, A., D.L. Wyborski, and J.M. Short. 1992. Modifications of the E.coli Lac repressor for expression in eukaryotic cells: effects of nuclear signal sequences on protein activity and nuclear accumulation. *Nucleic Acids Res*. 20:1785-91.
- Finer, J.J., K.R. Finer, and T. Ponappa. 1999. Particle bombardment-mediated transformation. *Current Topics in microbiology and immunology*. 240:59-80.

- Finn, P.J., N.J. Gibson, R. Fallon, A. Hamilton, *et al.* 1996. Synthesis and properties of DNA-PNA chimeric oligomers. *Nucleic Acids Res.* 24:3357-63.
- Fishwild, D.M., S.L. O'Donnell, T. Bengoechea, D.V. Hudson, *et al.* 1996. High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice [see comments]. *Nat Biotechnol.* 14:845-51.
- Fleer, R., P. Yeh, N. Amellal, I. Maury, *et al.* 1991. Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeasts. *Biotechnology (N Y)*. 9:968-75.
- Fodor, S.P., R.P. Rava, X.C. Huang, A.C. Pease, *et al.* 1993. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature.* 364:555-6.
- Fong, G.H., J. Rossant, M. Gertsenstein, and M.L. Breitman. 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 376:66-70.
- Fromm, M., L.P. Taylor, and V. Walbot. 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:5824-5828.
- Fuentes, J.J., M.A. Pritchard, A.M. Planas, A. Bosch, *et al.* 1995. A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Hum Mol Genet.* 4:1935-44.
- Fujita, T., H. Shubiyu, T. Ohashi, K. Yamanishi, *et al.* 1986. Regulation of human interleukin-2 gene: Functional DNA sequences in the 5' flanking region for the gene expression in activated T lymphocytes. *Cell.* 46:401-407.
- Gabizon, A., R. Shiotu, and D. Papahadjopoulos. 1989. Pharmacokinetics and tissue distribution of doxorubicin encapsulated in stable liposomes with long circulation times. *J Natl Cancer Inst.* 81:1484-8.
- Gallagher, S.R. 1992. GUS protocols: Using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic Press, San Diego, CA.
- Gallop, M.A., R.W. Barrett, W.J. Dower, S.P. Fodor, *et al.* 1994. Applications of combinatorial technologies to drug discovery. I. Background and peptide combinatorial libraries. *J Med Chem.* 37:1233-51.
- Gasparini, P., A. Bonizzato, M. Dognini, and P.F. Pignatti. 1992. Restriction site generating-polymerase chain reaction (RG-PCR) for the probeless detection of

- hidden genetic variation: application to the study of some common cystic fibrosis mutations. *Mol Cell Probes*. 6:1-7.
- Gautier, C., F. Morvan, B. Rayner, T. Huynh-Dinh, *et al.* 1987.  $\alpha$ -DNA. IV: A-anomeric and  $\beta$ -anomeric tetrathymidylates covalently linked to intercalating oxazolopyridocarbazole. Synthesis, physicochemical properties and poly (rA) binding. *Nucleic Acids Res.* 15:6625-41.
- Gennaro, A.R. 2000. Remington: The science and practice of pharmacy. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Gerber, H.P., A. McMurtrey, J. Kowalski, M. Yan, *et al.* 1998. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*. 273:30336-43.
- Gibbs, R.A., P.N. Nguyen, and C.T. Caskey. 1989. Detection of single DNA base differences by competitive oligonucleotide priming. *Nucleic Acids Res.* 17:2437-48.
- Gietz, R.D., R.A. Woods, P. Manivasakam, and R.H. Schiestl. 1998. Growth and transformation of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Cells: A laboratory manual*. Vol. I. D. Spector, R. Goldman, and L. Leinwand, editors. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Gille, J., M. Khalik, V. Konig, and R. Kaufmann. 1998. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) induces vascular permeability factor (VPF/VEGF) expression by cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 111:1160-5.
- Goding, J.W. 1996. Monoclonal antibodies: Principles and Practice. Academic Press, San Diego. 492 pp.
- Gorman, C.M., L.F. Moffat, and B.H. Howard. 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2:1044-1051.
- Graham, F.L., and A.J. van der Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 52:456-.
- Griffin, H.G., and A.M. Griffin. 1993. DNA sequencing. Recent innovations and future trends. *Appl Biochem Biotechnol*. 38:147-59.



- Grompe, M., D.M. Muzny, and C.T. Caskey. 1989. Scanning detection of mutations in human ornithine transcarbamoylase by chemical mismatch cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:5888-92.
- Gruber, M., B.A. Schodin, E.R. Wilson, and D.M. Kranz. 1994. Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in *Escherichia coli*. *J Immunol*. 152:5368-74.
- Guatelli, J.C., K.M. Whitfield, D.Y. Kwok, K.J. Barringer, *et al*. 1990. Isothermal, *in vitro* amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:1874-8.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- Hansen, G., and M.-D. Chilton. 1999. Lessons in gene transfer to plants by a gifted microbe. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:21-57.
- Hansen, G., and M.S. Wright. 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.* 4:226-231.
- Harlow, E., and D. Lane. 1988. Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 726 pp.
- Harlow, E., and D. Lane. 1999. Using antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Haseloff, J., and W.L. Gerlach. 1988. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*. 334:585-91.
- Hata, Y., S.L. Rook, and L.P. Aiello. 1999. Basic fibroblast growth factor induces expression of VEGF receptor KDR through a protein kinase C and p44/p42 mitogen-activated protein kinase- dependent pathway. *Diabetes*. 48:1145-55.
- Hayashi, K. 1992. PCR-SSCP: A method for detection of mutations. *Genetic and Analytical Techniques Applications*. 9:73-79.
- Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak, and P.M. Williams. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 6:986-94.
- Helene, C. 1991. The anti-gene strategy: control of gene expression by triplex-forming- oligonucleotides. *Anticancer Drug Des.* 6:569-84.

- Helene, C., N.T. Thuong, and A. Harel-Bellan. 1992. Control of gene expression by triple helix-forming oligonucleotides. The antigene strategy. *Ann NY Acad Sci.* 660:27-36.
- Hinnen, A., J.B. Hicks, and G.R. Fink. 1978. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:1929-1933.
- Hoffman, F. 1996. Laser microbeams for the manipulation of plant cells and subcellular structures. *Plant Sci.* 113:1-11.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E. 1994. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 500 pp.
- Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter. 1993. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:6444-8.
- Hoogenboom, H.R., A.D. Griffiths, K.S. Johnson, D.J. Chiswell, *et al.* 1991. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* 19:4133-7.
- Houghten, R.A., J.R. Appel, S.E. Blondelle, J.H. Cuervo, *et al.* 1992. The use of synthetic peptide combinatorial libraries for the identification of bioactive peptides. *Biotechniques.* 13:412-21.
- Hsu, I.C., Q. Yang, M.W. Kahng, and J.F. Xu. 1994. Detection of DNA point mutations with DNA mismatch repair enzymes. *Carcinogenesis.* 15:1657-62.
- Hwang, K.J., K.F. Luk, and P.L. Beaumier. 1980. Hepatic uptake and degradation of unilamellar sphingomyelin/cholesterol liposomes: a kinetic study. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77:4030-4.
- Hyder, S.M., and G.M. Stancel. 1999. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Mol Endocrinol.* 13:806-11.
- Hyrup, B., and P.E. Nielsen. 1996. Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. *Bioorg Med Chem.* 4:5-23.
- Inaba, N., H. Ishige, M. Ijichi, N. Satoh, *et al.* 1982. Immunohistochemical detection of pregnancy-specific protein (SP1) and placenta-specific tissue proteins (PP5, PP10, PP11 and PP12) in ovarian adenocarcinomas. *Oncodev Biol Med.* 3:379-89.

- Inoue, H., Y. Hayase, A. Imura, S. Iwai, *et al.* 1987a. Synthesis and hybridization studies on two complementary nona(2'-O- methyl)ribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 15:6131-48.
- Inoue, H., Y. Hayase, S. Iwai, and E. Ohtsuka. 1987b. Sequence-dependent hydrolysis of RNA using modified oligonucleotide splints and RNase H. *FEBS Lett.* 215:327-30.
- Ishiura, M., S. Hirose, T. Uchida, Y. Hamada, *et al.* 1982. Phage particle-mediated gene transfer to cultured mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology.* 2:607-616.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153:163-168.
- Iwabuchi, K., B. Li, P. Bartel, and S. Fields. 1993. Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene.* 8:1693-6.
- Jahroudi, N., J. Kitney, J.S. Greenberger, and R. Bowser. 1998. Endothelial cell dysfunction in response to intracellular overexpression of amyloid precursor protein. *J Neurosci Res.* 54:828-39.
- Jayasena, S.D. 1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem.* 45:1628-50.
- Jones, P.T., P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger, *et al.* 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature.* 321:522-5.
- Joshi, B., L. Li, B.G. Taffe, Z. Zhu, *et al.* 1999. Apoptosis induction by a novel anti-prostate cancer compound, BMD188 (a fatty acid-containing hydroxamic acid), requires the mitochondrial respiratory chain. *Cancer Res.* 59:4343-55.
- Kahn, J., F. Mehraban, G. Ingle, X. Xin, *et al.* 2000. Gene expression profiling in an *in vitro* model of angiogenesis. *Am J Pathol.* 156:1887-900.
- Kaufman, R.J. 1990. Vectors used for expression in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 185:487-511.
- Kaufman, R.J., P. Murtha, D.E. Ingolia, C.-Y. Yeung, *et al.* 1986. Selection and amplification of heterologous genes encoding adenosine deaminase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:3136-3140.

- Kawai, S., and M. Nishizawa. 1984. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* 4:1172.
- Kayanoki, Y., S. Higashiyama, K. Suzuki, M. Asahi, *et al.* 1999. The requirement of both intracellular reactive oxygen species and intracellular calcium elevation for the induction of heparin-binding EGF-like growth factor in vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 259:50-5.
- Keen, J., D. Lester, C. Inglehearn, A. Curtis, *et al.* 1991. Rapid detection of single base mismatches as heteroduplexes on Hydrolink gels. *Trends Genet.* 7:5.
- Kelly, J.M., and M.J. Hynes. 1985. Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *Embo J.* 4:475-9.
- Kostelny, S.A., M.S. Cole, and J.Y. Tso. 1992. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol.* 148:1547-53.
- WO94/16101. DNA SEQUENCING BY MASS SPECTROMETRY. 1994.
- Kozal, M.J., N. Shah, N. Shen, R. Yang, *et al.* 1996. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Med.* 2:753-9.
- Kozbor, D., P. Tripputi, J.C. Roder, and C.M. Croce. 1984. A human hybrid myeloma for production of human monoclonal antibodies. *J Immunol.* 133:3001-5.
- Kriegler, M. 1990. Gene transfer and expression: A laboratory manual. Stockton Press, New York. 242 pp.
- WO 91/01140. HOMOLOGOUS RECOMBINATION FOR UNIVERSAL DONOR CELLS AND CHIMERIC MAMMALIAN HOSTS. 1991.
- Kwong, D.Y., G.R. Davis, K.M. Whitfield, H.L. Chappelle, *et al.* 1989. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:1173-7.
- US Patent No. 5,223,409. Directed evolution of novel binding proteins. 1993.
- Lakso, M., B. Sauer, B. Mosinger, E.J. Lee, *et al.* 1992. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:6232-6.

- Lam, K.S. 1997. Application of combinatorial library methods in cancer research and drug discovery. *Anticancer Drug Design*. 12:145-167.
- Lam, K.S., S.E. Salmon, E.M. Hersh, V.J. Hruby, *et al.* 1991. General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Nature*. 354:82-84.
- Landegren, U., R. Kaiser, J. Sanders, and L. Hood. 1988. A ligase-mediated gene detection technique. *Science*. 241:1077-80.
- WO 90/11354. Process for the specific replacement of a copy of a gene present in the receiver genome via the integration of a gene. 1990.
- Leahy, K.P., K.J. Davies, M. Dull, J.J. Kort, *et al.* 1999. adapt78, a stress-inducible mRNA, is related to the glucose-regulated protein family of genes. *Arch Biochem Biophys*. 368:67-74.
- U.S. Patent No. 4,736,866. Transgenic non-human animals. 1988.
- Leduc, N., and *et al.* 1996. Isolated maize zygotes mimic *in vivo* embryogenic development and express microinjected genes when cultured *in vitro*. *Dev. Biol.* 10:190-203.
- Lee, J.S., D.A. Johnson, and A.R. Morgan. 1979. Complexes formed by (pyrimidine)<sub>n</sub> . (purine)<sub>n</sub> DNAs on lowering the pH are three-stranded. *Nucleic Acids Res.* 6:3073-91.
- Lee, V.H.L. 1990. Peptide and protein drug delivery. Marcel Dekker, New York, NY.
- Lemaitre, M., B. Bayard, and B. Lebleu. 1987. Specific antiviral activity of a poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:648-52.
- Lemischka, I.R., D.H. Raulet, and R.C. Mulligan. 1986. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell*. 45:917-927.
- Letsinger, R.L., G.R. Zhang, D.K. Sun, T. Ikeuchi, *et al.* 1989. Cholesteryl-conjugated oligonucleotides: synthesis, properties, and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:6553-6.
- Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 69:915-26.

- Li, J.M., J.S. Han, Y. Huang, P.K. Tain, *et al.* 1999. A novel gene delivery system targeting cells expressing VEGF receptors. *Cell Res.* 9:11-25.
- Linder, M.W., R.A. Prough, and R. Valdes. 1997. Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. *Clin Chem.* 43:254-66.
- Lipshutz, R.J., S.P. Fodor, T.R. Gingeras, and D.J. Lockhart. 1999. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet.* 21:20-4.
- Littlefield, J.W. 1964. Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science.* 145:709-710.
- Lizardi, P.M., C.E. Guerra, H. Lomeli, I. Tussie-Luna, *et al.* 1988. Exponential amplification of recombinant-RNA hybridization probes. *Biotechnology.* 6:1197-1202.
- Lohi, J., I. Leivo, J. Oivula, V.P. Lehto, *et al.* 1998. Extracellular matrix in renal cell carcinomas. *Histol Histopathol.* 13:785-96.
- Lonberg, N., and D. Huszar. 1995. Human antibodies from transgenic mice. *Int Rev Immunol.* 13:65-93.
- Lonberg, N., L.D. Taylor, F.A. Harding, M. Trounstein, *et al.* 1994. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications [see comments]. *Nature.* 368:856-9.
- Lopata, M.A., D.W. Cleveland, and B. Sollner-Webb. 1984. High-level expression of a chloramphenicol acetyltransferase gene by DEAE-dextran-mediated DNA transfection coupled with a dimethylsulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Research.* 12:5707.
- Luckow, V.A. 1991. Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. *In* Recombinant DNA technology and applications. A. Prokop, R.K. Bajpai, and C. Ho, editors. McGraw-Hill, New York. 97-152.
- Madura, K., R.J. Dohmen, and A. Varshavsky. 1993. N-recognition/Ubc2 interactions in the N-end rule pathway. *J Biol Chem.* 268:12046-54.
- Maher, L.J. 1992. DNA triple-helix formation: an approach to artificial gene repressors? *Bioessays.* 14:807-15.
- Majewski, M., M. Nieborowska-Skorska, P. Salomoni, A. Slupianek, *et al.* 1999. Activation of mitochondrial Raf-1 is involved in the antiapoptotic effects of Akt. *Cancer Res.* 59:2815-9.

- Mak, I.T., P. Boehme, and W.B. Weglicki. 1995. Protective effects of calcium channel blockers against free radical- impaired endothelial cell proliferation. *Biochem Pharmacol.* 50:1531-4.
- Mandel, M., and A. Higa. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. biol.* 53:159-162.
- Marasco, W.A., W.A. Haseltine, and S.Y. Chen. 1993. Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:7889-93.
- Marks, J.D., A.D. Griffiths, M. Malmqvist, T.P. Clackson, *et al.* 1992. By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology (N Y).* 10:779-83.
- Marks, J.D., H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, *et al.* 1991. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol.* 222:581-97.
- Martin, F.J., and D. Papahadjopoulos. 1982. Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting. *J Biol Chem.* 257:286-8.
- Marzo, I., C. Brenner, and G. Kroemer. 1998. The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. *Biomed Pharmacother.* 52:248-51.
- Masood, R., J. Cai, T. Zheng, D.L. Smith, *et al.* 1997. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:979-84.
- Maxam, A.M., and W. Gilbert. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:560-4.
- Migdal, M., B. Huppertz, S. Tessler, A. Comforti, *et al.* 1998. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem.* 273:22272-8.
- Miller, A.D., and C. Buttimore. 1986. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol. Cell biol.* 6:2895-2902.

- Miller, L.K. 1988. Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu. Rev. Microbiol.* 42:177-199.
- Milstein, C., and A.C. Cuello. 1983. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature*. 305:537-40.
- US Patent No. 5,459,039. Methods for mapping genetic mutations. 1995.
- EP 233838. NEURITE-PROMOTING FACTOR AND PROCESS FOR THE MANUFACTURE THEREOF. 1990.
- Morita, T., M. Yoshizumi, H. Kurihara, K. Maemura, *et al.* 1993. Shear stress increases heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA levels in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 197:256-62.
- Morrison, S.L., L. Wims, S. Wallick, L. Tan, *et al.* 1987. Genetically engineered antibody molecules and their application. *Ann NY Acad Sci.* 507:187-98.
- US Patent No. 4,683,202. Process for amplifying nucleic acid sequences. 1987.
- US Patent No. 4,683,195. Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences. 1987.
- Munson, P.J., and D. Rodbard. 1980. Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem.* 107:220-39.
- Myers, R.M., Z. Larin, and T. Maniatis. 1985. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes. *Science.* 230:1242-6.
- US Patent No. 5,328,470. Treatment of diseases by site-specific instillation of cells or site-specific transformation of cells and kits therefor. 1994.
- Naeve, C.W., G.A. Buck, R.L. Niece, R.T. Pon, *et al.* 1995. Accuracy of automated DNA sequencing: a multi-laboratory comparison of sequencing results. *Biotechniques.* 19:448-53.
- Nakai, K., and P. Horton. 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci.* 24:34-6.
- Nakazawa, H., D. English, P.L. Randell, K. Nakazawa, *et al.* 1994. UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:360-4.



- Nauert, J.B., T.M. Klauck, L.K. Langeberg, and J.D. Scott. 1997. Gravin, an autoantigen recognized by serum from myasthenia gravis patients, is a kinase scaffold protein. *Curr Biol.* 7:52-62.
- Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P.H. Hofschneider. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1:841-845.
- Nicosia, R.F., E. Bonanno, M. Smith, and P. Yurchenco. 1994. Modulation of angiogenesis *in vitro* by laminin-entactin complex. *Dev Biol.* 164:197-206.
- O'Gorman, S., D.T. Fox, and G.M. Wahl. 1991. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science.* 251:1351-5.
- Oivula, J., J. Lohi, T. Tani, L. Kangas, *et al.* 1999. Renal cell carcinomas and pancreatic adenocarcinomas produce nidogen *in vitro* and *in vivo*. *J Pathol.* 187:455-61.
- Okano, H., J. Aruga, T. Nakagawa, C. Shiota, *et al.* 1991. Myelin basic protein gene and the function of antisense RNA in its repression in myelin-deficient mutant mouse. *J Neurochem.* 56:560-7.
- O'Reilly, D.R., L.K. Miller, and V.A. Luckow. 1992. Baculovirus expression vectors. W.H. Freeman and Company, New York.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, *et al.* 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:2766-70.
- Ou-Lee, T.M., R. Turgeon, and R. Wu. 1986. Uptake and expression of a foreign gene linked to either a plant virus or *Drosophila* promoter in protoplasts of rice, wheat and sorghum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:6815-6819.
- Palmer, T.D., R.A. Hock, W.R.A. Osborne, and A.D. Miller. 1987. Efficient retrovirus-mediated transfer and expression of a human adenosine deaminase gene in diploid skin fibroblasts from an adenosine-deficient human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:1055-1059.
- Pear, W., G. Nolan, M. Scott, and D. Baltimore. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:8392-8396.

- Peng, Y., E.J. Schwarz, M.A. Lazar, A. Genin, *et al.* 1997. Cloning, human chromosomal assignment, and adipose and hepatic expression of the CL-6/INSIG1 gene. *Genomics*. 43:278-84.
- Perry-O'Keefe, H., X.W. Yao, J.M. Coull, M. Fuchs, *et al.* 1996. Peptide nucleic acid pre-gel hybridization: an alternative to southern hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:14670-5.
- Petersen, K.H., D.K. Jensen, M. Egholm, O. Buchardt, *et al.* 1976. A PNA-DNA linker synthesis of N-((4,4'-dimethoxytrityloxy)ethyl)-N-(thymine-1-ylacetyl)glycine. *Biorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 5:1119-1124.
- Potter, H. 1988. Electroporation in biology: Methods, applications, and instrumentation. *Analytical Biochemistry*. 174:361-373.
- Potter, H., L. Weir, and P. Leder. 1984. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:7161-7165.
- Presta, L.G. 1992. Antibody engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 3:394-8.
- Prosser, J. 1993. Detecting single-base mutations. *Trends Biotechnol*. 11:238-46.
- Radisky, D.C., W.B. Snyder, S.D. Emr, and J. Kaplan. 1997. Characterization of VPS41, a gene required for vacuolar trafficking and high-affinity iron transport in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:5662-6.
- Rassoulzadegan, M., B. Binetruy, and F. Cuzin. 1982. High frequency of gene transfer after fusion between bacteria and eukaryotic cells. *Nature*. 295:257.
- Reisfeld, R.A., and S. Sell. 1985. Monoclonal antibodies and cancer therapy: Proceedings of the Roche-UCLA symposium held in Park City, Utah, January 26-February 2, 1985. Alan R. Liss, New York. 609 pp.
- Rhodes, C.A., D.A. Pierce, I.J. Mettler, D. Mascarenhas, *et al.* 1988. Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science*. 240:204-207.
- Riechmann, L., M. Clark, H. Waldmann, and G. Winter. 1988. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*. 332:323-7.
- Risau, W. 1995. Differentiation of endothelium. *Faseb J*. 9:926-33.
- Risau, W., and I. Flamme. 1995. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 11:73-91.

- Rose, J.K., L. Buonocore, and M. Whitt. 1991. A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *BioTechniques*. 10:520-525.
- Rossi, J.J. 1994. Practical ribozymes. Making ribozymes work in cells. *Curr Biol*. 4:469-71.
- Rossiter, B.J., and C.T. Caskey. 1990. Molecular scanning methods of mutation detection. *J Biol Chem*. 265:12753-6.
- US Patent No. 5,871,697. Method and apparatus for identifying, classifying, or quantifying DNA sequences in a sample without sequencing. 1999.
- US Patent No. 5,283,317. Intermediates for conjugation of polypeptides with high molecular weight polyalkylene glycols. 1994.
- Saiki, R.K., T.L. Bugawan, G.T. Horn, K.B. Mullis, *et al*. 1986. Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -globin and HLA-DQ  $\alpha$  DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*. 324:163-6.
- Saiki, R.K., P.S. Walsh, C.H. Levenson, and H.A. Erlich. 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:6230-4.
- Saleeba, J.A., and R.G. Cotton. 1993. Chemical cleavage of mismatch to detect mutations. *Methods Enzymol*. 217:286-95.
- Sambrook, J. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Sandri-Goldin, R.M., A.L. Goldin, J.C. Glorioso, and M. Levine. 1981. High-frequency transfer of cloned herpes simplex virus type I sequences to mammalian cells by protoplast fusion. *Mol. Cell. Biol*. 1:7453-752.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:5463-7.
- Sato, N., K. Kokame, K. Shimokado, H. Kato, *et al*. 1998. Changes of gene expression by lysophosphatidylcholine in vascular endothelial cells: 12 up-regulated distinct genes including 5 cell growth-related, 3 thrombosis-related, and 4 others. *J Biochem (Tokyo)*. 123:1119-26.
- Saunders, J.A., B.F. Matthews, and P.D. Miller. 1989. Plant gene transfer using electrofusion and electroporation. *In* Electroporation and electrofusion in cell

- biology. E. Neumann, A.E. Sowers, and C.A. Jordan, editors. Plenum Press, New York. 343-354.
- Schade, R., C. Staak, C. Hendriksen, M. Erhard, *et al.* 1996. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop. *Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)*. 24:925-934.
- Schaffner, W. 1980. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77:2163.
- Schook, L.B. 1987. Monoclonal antibody production techniques and applications. Marcel Dekker, Inc., New York. 336 pp.
- Scimeca, J.C., M.J. Servant, J.O. Dyer, and S. Meloche. 1997. Essential role of calcium in the regulation of MAP kinase phosphatase-1 expression. *Oncogene*. 15:717-25.
- Scott, J.K., and G.P. Smith. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*. 249:386-90.
- Selden, R.F., K. Burke-Howie, M.E. Rowe, H.M. Goodman, *et al.* 1986. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Molecular and Cellular Biology*. 6:3173-3179.
- Shalaby, F., J. Rossant, T.P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, *et al.* 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 376:62-6.
- Shalaby, M.R., H.M. Shepard, L. Presta, M.L. Rodrigues, *et al.* 1992. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *J Exp Med*. 175:217-25.
- Shigekawa, K., and W.J. Dower. 1988. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques*. 6:742-751.
- Shih, M., F. Lin, J.D. Scott, H.Y. Wang, *et al.* 1999. Dynamic complexes of  $\beta$ 2-adrenergic receptors with protein kinases and phosphatases and the role of gravin. *J Biol Chem*. 274:1588-95.
- Shillito, R. 1999. Methods of genetic transformations: Electroporation and polyethylene glycol treatment. In Molecular improvement of cereal crop. I. Vasil, editor. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. 9-20.

- Shilo, B.Z., and R.A. Weinberg. 1981. DNA sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78:6789-92.
- Shinkets, R.A., D.G. Lowe, J.T. Tai, P. Sehl, *et al.* 1999. Gene expression analysis by transcript profiling coupled to a gene database query. *Nat Biotechnol*. 17:798-803.
- Shopes, B. 1992. A genetically engineered human IgG mutant with enhanced cytolytic activity. *J Immunol*. 148:2918-22.
- Shridhar, R., V. Shridhar, S. Rivard, J.M. Siegfried, *et al.* 1996a. Mutations in the arginine-rich protein gene, in lung, breast, and prostate cancers, and in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res*. 56:5576-8.
- Shridhar, V., S. Rivard, R. Shridhar, C. Mullins, *et al.* 1996b. A gene from human chromosomal band 3p21.1 encodes a highly conserved arginine-rich protein and is mutated in renal cell carcinomas. *Oncogene*. 12:1931-9.
- Shridhar, V., S. Rivard, X. Wang, R. Shridhar, *et al.* 1997. Mutations in the arginine-rich protein gene (ARP) in pancreatic cancer. *Oncogene*. 14:2213-6.
- Simonsen, C.C., and A.D. Levinson. 1983. Isolation and expression of an altered mouse dihydrofolate reductase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80:2495-2499.
- Singer-Kruger, B., and S. Ferro-Novick. 1997. Use of a synthetic lethal screen to identify yeast mutants impaired in endocytosis, vacuolar protein sorting and the organization of the cytoskeleton. *Eur J Cell Biol*. 74:365-75.
- Smith-Swintosky, V.L., S. Zimmer, J.W. Fenton, and M.P. Mattson. 1995. Protease nexin-1 and thrombin modulate neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis and sensitivity to glucose deprivation-induced injury. *J Neurosci*. 15:5840-50.
- US Patent No. 5,272,057. Method of detecting a predisposition to cancer by the use of restriction fragment length polymorphism of the gene for human poly (ADP-ribose) polymerase. 1993.
- Southern, P.J., and P. Berg. 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistanced with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Gen*. 1:327-341.

- Speirs, V., and S.L. Atkin. 1999. Production of VEGF and expression of the VEGF receptors Flt-1 and KDR in primary cultures of epithelial and stromal cells derived from breast tumours. *Br J Cancer*. 80:898-903.
- Sreekrishna, K., R.H. Potenz, J.A. Cruze, W.R. McCombie, *et al.* 1988. High level expression of heterologous proteins in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Basic Microbiol*. 28:265-78.
- Stein, C.A., and J.S. Cohen. 1988. Oligodeoxynucleotides as inhibitors of gene expression: a review. *Cancer Res*. 48:2659-68.
- Stevenson, G.T., A. Pindar, and C.J. Slade. 1989. A chimeric antibody with dual Fc regions (bisFabFc) prepared by manipulations at the IgG hinge. *Anticancer Drug Des*. 3:219-30.
- Suresh, M.R., A.C. Cuello, and C. Milstein. 1986. Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas. *Methods Enzymol*. 121:210-28.
- Takemura, T., S. Hino, Y. Murata, H. Yanagida, *et al.* 1999. Coexpression of CD9 augments the ability of membrane-bound heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (proHB-EGF) to preserve renal epithelial cell viability. *Kidney Int*. 55:71-81.
- Takemura, T., S. Kondo, T. Homma, M. Sakai, *et al.* 1997. The membrane-bound form of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor promotes survival of cultured renal epithelial cells. *J Biol Chem*. 272:31036-42.
- Thomas, K.R., and M.R. Capecchi. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 51:503-12.
- Thompson, J.A., and e. al. 1995. Maize transformation utilizing silicon carbide whiskers: A review. *Euphytica*. 85:75-80.
- Tilburn, J., C. Scazzocchio, G.G. Taylor, J.H. Zabicky-Zissman, *et al.* 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*. 26:205-21.
- Touraev, A., and e. al. 1997. Plant male germ line transformation. *Plant J*. 12:949-956.
- Trautnecker, A., F. Oliveri, and K. Karjalainen. 1991. Myeloma based expression system for production of large mammalian proteins. *Trends Biotechnol*. 9:109-13.

- Trick, H.N., and e. al. 1997. Recent advances in soybean transformation. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* 3:9-26.
- Tuerk, C., and L. Gold. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 249:505-10.
- Turner, D.L., E.Y. Snyder, and C.L. Cepko. 1990. Lineage-independent determinationh of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron.* 4:833-845.
- Tutt, A., G.T. Stevenson, and M.J. Glennie. 1991. Trispecific F(ab')<sub>3</sub> derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells. *J Immunol.* 147:60-9.
- Van Belle, E., L. Maillard, F.O. Tio, and J.M. Isner. 1997. Accelerated endothelialization by local delivery of recombinant human vascular endothelial growth factor reduces in-stent intimal formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 235:311-6.
- van der Krol, A.R., J.N. Mol, and A.R. Stuitje. 1988a. Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *Biotechniques.* 6:958-76.
- van der Krol, A.R., J.N. Mol, and A.R. Stuitje. 1988b. Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *Biotechniques.* 6:958-76.
- Verhoeyen, M., C. Milstein, and G. Winter. 1988. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science.* 239:1534-6.
- Vinante, F., A. Rigo, E. Papini, M.A. Cassatella, *et al.* 1999. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor/diphtheria toxin receptor expression by acute myeloid leukemia cells. *Blood.* 93:1715-23.
- Vitetta, E.S., R.J. Fulton, R.D. May, M. Till, *et al.* 1987. Redesigning nature's poisons to create anti-tumor reagents. *Science.* 238:1098-104.
- US Patent No. 4,873,191. Genetic transformation of zygotes. 1989.
- Warren, R.S., H. Yuan, M.R. Matli, N.A. Gillett, *et al.* 1995. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest.* 95:1789-97.

- Wells, J.A., M. Vasser, and D.B. Powers. 1985. Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. *Gene*. 34:315-23.
- Whitt, M.A., L. Buonocore, J.K. Rose, V. Ciccarone, *et al.* 1990. TransfectACE reagent promotes transient transfection frequencies greater than 90%. *Focus*. 13:8-12.
- Wigler, M., A. Pellicer, S. Silverstein, and R. Axel. 1978. Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell*. 14:725.
- Wilkinson, M.G., and J.B. Millar. 2000. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *Faseb J*. 14:2147-57.
- Williams, D.A., I.R. Lemischka, D.G. Nathan, and R.C. Mulligan. 1984. Introduction of a new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. *Nature*. 310:476-480.
- Wilmut, I., A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind, *et al.* 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385:810-3.
- Winter, C., J. Schenkel, M. Zimmermann, and T. Herdegen. 1998. MAP kinase phosphatase 1 is expressed and enhanced by FK506 in surviving mamillary, but not degenerating nigral neurons following axotomy. *Brain Res*. 801:198-205.
- Wolff, E.A., G.J. Schreiber, W.L. Cosand, and H.V. Raff. 1993. Monoclonal antibody homodimers: enhanced antitumor activity in nude mice. *Cancer Res*. 53:2560-5.
- Wong, T.K., and E. Neumann. 1982. Electric field mediated gene transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 107:584-587.
- Wyborski, D.L., L.C. DuCoeur, and J.M. Short. 1996. Parameters affecting the use of the lac repressor system in eukaryotic cells and transgenic animals. *Environ Mol Mutagen*. 28:447-58.
- Wyborski, D.L., and J.M. Short. 1991. Analysis of inducers of the E.coli lac repressor system in mammalian cells and whole animals. *Nucleic Acids Res*. 19:4647-53.
- Xu, X., D. Yang, T. Wyss-Coray, J. Yan, *et al.* 1999. Wild-type but not Alzheimer-mutant amyloid precursor protein confers resistance against p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:7547-52.



- Yang, S., J. Graham, J.W. Kahn, E.A. Schwartz, *et al.* 1999. Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. *Am J Pathol.* 155:887-95.
- Yang, Y., L. Martin, F. Cuzin, M.G. Mattei, *et al.* 1996. Genomic structure and chromosomal localization of the mouse CDEI- binding protein CDEBP (APLP2) gene and promoter sequences. *Genomics.* 35:24-9.
- Yelton, M.M., J.E. Hamer, and W.E. Timberlake. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:1470-4.
- Yuan, F., Y. Chen, M. Delian, N. Safabakhsh, *et al.* 1996. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:14765-70.
- Zervos, A.S., J. Gyuris, and R. Brent. 1993. Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell.* 72:223-32.
- Zhou, G., and e. al. 1983. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. *Methods Enzymol.* 101:433-481.
- Zoller, M.J., and M. Smith. 1987. Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template. *Methods Enzymol.* 154:329-50.
- Zon, G. 1988. Oligonucleotide analogues as potential chemotherapeutic agents. *Pharm Res.* 5:539-49.
- Zuckermann, R.N., E.J. Martin, D.C. Spellmeyer, G.B. Stauber, *et al.* 1994. Discovery of nanomolar ligands for 7-transmembrane G-protein-coupled receptors from a diverse N-(substituted)glycine peptoid library. *J Med Chem.* 37:2678-85.

## CLAIMS

1. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 80% sequence identity to the sequence SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:22.
2. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide is an active ARP polypeptide.
3. The polypeptide of claim 2, having at least 90% sequence identity to the sequence SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:22.
4. The polypeptide of claim 2, having at least 98% sequence identity to the sequence SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:22.
5. An isolated polynucleotide encoding the polypeptide of any one of claims 1-4, or a complement of said polynucleotide.
6. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence having at least 80% sequence identity to the sequence SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:21, or a complement of said polynucleotide.
7. The polynucleotide of claim 6, having at least 90% sequence identity to the sequence SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:21, or a complement of said polynucleotide.
8. The polynucleotide of claim 6, having at least 98% sequence identity to the sequence SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:21, or a complement of said polynucleotide.
9. An antibody that specifically binds to the polypeptide of any one of claims 1-4.

10. A method of modulating angiogenesis comprising modulating the activity of at least one VEGF-modulated gene polypeptide.

11. The method of claim 10 wherein said modulating angiogenesis is increasing angiogenesis, and said modulating the activity comprises increasing the activity of at least one polypeptide selected from the group consisting of nexin, placental protein 5 (PP5), amyloid precursor-like protein 2 (APLP2), regulator of G-protein signaling-3 (RGS3), gravin, arginine-rich protein (ARP), Down's syndrome critical region protein-1 (DSCR1), insulin induced gene-1 (INSIG1), decidual protein induced by progesterone (DEPP), NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 (ND1), heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), MKP-1 like protein tyrosine phosphatase, osteonidogen and connective tissue growth factor (CTGF).

12. The method of claim 10 wherein said modulating angiogenesis is decreasing angiogenesis, and said modulating the activity comprises increasing the activity of at least one polypeptide selected from the group consisting of amyloid precursor protein (APP), Human gene similar to yeast VPS41 (hVPS41p), cytochrome oxidase subunit I (MTCO1), NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 (ND4).

13. The method of claim 10 wherein said modulating angiogenesis is decreasing angiogenesis, and said modulating the activity comprises decreasing the activity of at least one polypeptide selected from the group consisting of nexin, PP5, APLP2, RGS3, gravin, ARP, DSCR1, INSIG1, DEPP, ND1, HB-EGF, MKP-1 like protein tyrosine phosphatase, osteonidogen and CTGF.

14. The method of claim 10 wherein said modulating angiogenesis is increasing angiogenesis, and said modulating the activity comprises decreasing the activity of at least one polypeptide selected from the group consisting of APP, hVPS41p, MTCO1 and ND4.

15. The method of claim 11 or 12 wherein said increasing activity comprises increasing the expression of said at least one polypeptide.

16. The method of claim 13 or 14 wherein said decreasing activity comprises decreasing the expression of said at least one polypeptide.
17. The method of claim 15 wherein said increasing expression comprises transforming a cell to increase expression of a polynucleotide encoding said at least one polypeptide.
18. The method of claim 16 wherein said decreasing expression comprises transforming a cell to express a polynucleotide anti-sense to at least a portion of an endogenous polynucleotide encoding said at least one polypeptide.
19. The method of claim 13 or 14 wherein said decreasing activity comprises transforming a cell to express an aptamer to said at least one polypeptide.
20. The method of claim 13 or 14 wherein said decreasing activity comprises introducing into a cell an aptamer to said at least one polypeptide.
21. The method claim 13 or 14 wherein said decreasing activity comprises administering to a cell an antibody that selectively binds to said at least one polypeptide.
22. A method of treating tumors comprising decreasing angiogenesis by the method of claim 12 or 13.
23. A method of treating cancer comprising treating a cancerous tumor by the method of claim 22.
24. A method of treating myocardial infarction comprising increasing angiogenesis by the method of claim 11 or 14.

WO 01/70174

149

PCT/US01/09043

25. A method of promoting healing comprising increasing angiogenesis by the method of claim 11 or 14.

26. A method of measuring a VEGF-modulated gene transcriptional up-regulation or down-regulation activity of a compound, comprising:

contacting said compound with a composition comprising a RNA polymerase and said gene and measuring the amount of VEGF-modulated gene transcription.

27. The method of claim 26, wherein said composition is in a cell.

28. A method of measuring VEGF-modulated gene translational up-regulation or down-regulation activity of a compound, comprising:

contacting said compound with a composition comprising a ribosome and a polynucleotide corresponding to a mRNA of said gene and measuring the amount of VEGF-modulated gene translation.

29. The method of claim 28, wherein said composition is in a cell.

30. A vector, comprising the polynucleotide of any one of claims 5-8.

31. A cell, comprising the vector of claim 30.

32. A method of screening a tissue sample for tumorigenic potential, comprising:

measuring expression of at least one VEGF-modulated gene in said tissue sample.

33. The method of claim 32, wherein said measuring is measuring an amount of a polypeptide encoded by said at least one VEGF-modulated gene.

34. The method of claim 32, wherein said measuring expression is measuring an amount of mRNA corresponding to said at least one VEGF-modulated gene.
35. A transgenic non-human animal, having a disrupted *ARP*.
36. The transgenic non-human animal of claim 35, wherein the non-human animal is a mouse.
37. A transgenic non-human animal, comprising an exogenous polynucleotide having at least 80% sequence identity to the sequence SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:21, or a complement of said polynucleotide.
38. The transgenic non-human animal of claim 37, wherein said exogenous polynucleotide has at least 90% sequence identity to the sequence SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:21, or a complement of said polynucleotide.
39. The transgenic non-human animal of claim 37, wherein said exogenous polynucleotide has at least 98% sequence identity to the sequence SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:21, or a complement of said polynucleotide.
40. A method of screening a sample for an ARP mutation, comprising:  
comparing an ARP nucleotide sequence in the sample with SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:21.
41. A method of modulating cell survival by modulating the activity of at least one VEGF-modulated gene polypeptide selected from the group consisting of nexin, PP5, APLP2, APP, gravin, ARP, DSCR1, MTCO1, ND1, ND4, HB-EGF, MKP-1 like protein tyrosine phosphatase, osteonidogen and CTGF.

42. The method of claim 41 wherein said modulating cell survival is increasing cell survival, and said modulating the activity comprises increasing the activity of at least one polypeptide selected from the group consisting of nexin, PP5, APLP2, APP, gravin, ARP, DSCR1, MTCO1, ND1, ND4, HB-EGF, osteonidogen and CTGF.

43. The method of claim 41 wherein said modulating cell survival is decreasing cell survival, and said modulating the activity comprises increasing the activity of at least one VEGF-modulated gene polypeptide, wherein said VEGF-modulated gene polypeptide is MKP-1 like protein tyrosine phosphatase.

44. The method of claim 41 wherein said modulating cell survival is decreasing cell survival, and said modulating the activity comprises decreasing the activity of at least one polypeptide selected from the group consisting of nexin, PP5, APLP2, APP, gravin, ARP, DSCR1, MTCO1, ND1, ND4, HB-EGF, osteonidogen and CTGF.

45. The method of claim 41 wherein said modulating cell survival is increasing cell survival, and said modulating activity comprises decreasing the activity of at least one VEGF-modulated gene polypeptide, wherein said VEGF-modulated gene polypeptide is MKP-1 like protein tyrosine phosphatase.

46. The method of claim 42 or 43 wherein said increasing activity comprises increasing the expression of said at least one polypeptide.

47. The method of claim 44 or 45 wherein said decreasing activity comprises decreasing the expression of said at least one polypeptide.

48. The method of claim 46 wherein said increasing expression comprises transforming a cell to increase expression of a polynucleotide encoding said at least one polypeptide.

WO 01/70174

152

PCT/US01/09043

49. The method of claim 47 wherein said decreasing expression comprises transforming a cell to decrease expression of a polynucleotide anti-sense to at least a portion of an endogenous polynucleotide encoding said at least one polypeptide.

50. The method of claim 44 or 45 wherein said decreasing activity comprises transforming a cell to express an aptamer to said at least one polypeptide.

51. The method of claim 44 or 45 wherein said decreasing activity comprises introducing into a cell an aptamer to said at least one polypeptide.

52. The method claim 44 or 45 wherein said decreasing activity comprises administering to a cell an antibody that selectively binds to said at least one polypeptide.

53. A method of treating tumors comprising decreasing cell survival by the method of claim 43 or 44.

54. A method of treating cancer comprising treating a cancerous tumor by the method of claim 53.

55. The method of any one of claims 41, 42, 44 and 46-54, wherein said at least one VEGF-modulated gene is DSCR1.

56. A method of determining the clinical stage of tumor comprising comparing expression of at least one VEGF-modulated gene in a sample with expression of said at least one gene in control samples.

57. The method of claim 56, wherein said at least one VEGF-modulated gene comprises at least one member selected from the group consisting of DSCR1 and ARP.



WO 01/70174

153

PCT/US01/09043

58. The method of claim 56 or 57, wherein said sample is a sample from an ovarian tumor.

59. A method of determining if a tumor has a potential for metastasis comprising determining the clinical stage of said tumor by the method of any one of claims 56-58.

60. The method of any one of claims 26-29, wherein said compound is a calcium channel regulator.

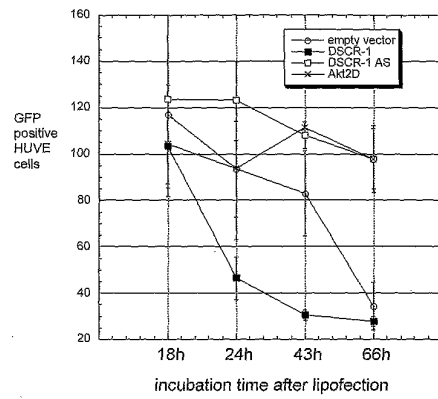
61. The method of claim 60, wherein said calcium channel regulator is selected from the group consisting of nicardipine, nifedipine, verapamil, and diltiazem.

WO 01/70174

1/1

PCT/US01/09043

Fig. 1



## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
27 September 2001 (27.09.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 01/70174 A3**

- (51) International Patent Classification: C07H 19/00. (74) Agent: RAUCH, Paul, E.; Brinks Hofer Gilson & Lione, P.O. Box 10087, Chicago, IL 60610 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/09043 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 21 March 2001 (21.03.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/191,201 21 March 2000 (21.03.2000) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): CURAGEN CORPORATION [US/US]; 11th Floor, 555 Long Wharf Drive, New Haven, CT 06511 (US). GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): RASTELLI, Luca, K. [US/US]; 52 Popperbush Lane, Guilford, CT 06437 (US). GERBER, Hans-Peter [US/US]; Apartment No. 5, 1121 Tennessee Street, San Francisco, CA 94107 (US).
- Published:  
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:  
11 April 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/70174 A3

(54) Title: VEGF-MODULATED GENES AND METHODS EMPLOYING THEM

(57) Abstract: The present invention provides methods for modulating angiogenesis and/or apoptosis comprising modulating the activity of at least one VEGF-modulated gene polypeptide. The invention also provides pharmaceutical compositions for modulating angiogenesis and apoptosis for the prevention or treatment of diseases associated with VEGF-modulated genes expression. The invention also provides diagnostic assays that use VEGF-modulated gene polynucleotides that hybridize with naturally occurring sequences encoding VEGF-modulated genes and antibodies that specifically bind to the protein. The invention also provides novel human and mouse arginine-rich proteins (ARPs) and nucleotide sequences. The invention provides for genetically engineered expression vectors and host cells comprising the nucleic acid sequence encoding ARPs and for a method for producing the protein.

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
27 September 2001 (27.09.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/070174 A3(51) International Patent Classification: C07H 19/00  
C12P 21/06, C07K 1/00

(21) International Application Number: PCT/US01/09043

(22) International Filing Date: 21 March 2001 (21.03.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/191,201 22 March 2000 (22.03.2000) US

DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, IIR, IIU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Published:

— with international search report  
upon request of the applicant, before the expiration of the  
time limit referred to in Article 21(2)(a)(88) Date of publication of the international search report:  
11 April 2002(71) Applicants (for all designated States except US): CURA-  
GEN CORPORATION [US/US]; 11th Floor, 555 Long  
Wharf Drive, New Haven, CT 06511 (US). GENEN-  
TECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco,  
CA 94080 (US).(72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): RASTELLI, Luca,  
K. [US/US]; 52 Pepperbush Lane, Guilford, CT 06437  
(US). GERBER, Hans-Peter [US/US]; Apartment No. 5,  
1121 Tennessee Street, San Francisco, CA 94107 (US).(74) Agent: RAUCH, Paul, E.; Brinks Hofer Gilson & Liene,  
P.O. Box 10087, Chicago, IL 60610 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,(48) Date of publication of this corrected version:  
16 January 2003(15) Information about Correction:  
see PCT Gazette No. 03/2003 of 16 January 2003, Sec-  
tion IIFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/070174 A3

(54) Title: VEGF-MODULATED GENES AND METHODS EMPLOYING THEM

(57) Abstract: The present invention provides methods for modulating angiogenesis and/or apoptosis comprising modulating the activity of at least one VEGF-modulated gene polypeptide. The invention also provides pharmaceutical compositions for modulating angiogenesis and apoptosis for the prevention or treatment of diseases associated with VEGF-modulated genes expression. The invention also provides diagnostic assays that use VEGF-modulated gene polynucleotides that hybridize with naturally occurring sequences encoding VEGF-modulated genes and antibodies that specifically bind to the protein. The invention also provides novel human and mouse arginine-rich proteins (ARPs) and nucleotide sequences. The invention provides for genetically engineered ex-  
pression vectors and host cells comprising the nucleic acid sequence encoding ARPs and for a method for producing the protein.

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. _____ PCT/US01/09043
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C07H 19/00; C12P 21/06; C07K 1/00 US CL : 536/22.1; 435/69.1; 503/350 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/22.1; 435/69.1; 503/350 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, GENBANK, CAPLUS, LIFESCI, EAST search terms: VEGF, angiogenesis, tumorigenesis, arginine-rich proteins		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SRIDHAR, V. A gene from human chromosomal band 3p21.1 encodes a highly conserved arginine-rich protein and is mutated in renal cell carcinomas. <i>Oncogene</i> , May 1996, Vol 12, No. 9, pages 1931-1939, especially page 1932, Fig. 3 paragraphs 1-2.	1-8 and 30-31
X	SRIDHAR, R et al. Mutations in the arginine-rich protein gene, in lung, breast, and prostate cancers, and in squamous cell carcinoma of the head and neck. <i>Cancer Research</i> , December 1996, Vol 56, No. 24, pages 5576-5578, entire document.	1-3, 5, and 6-7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents	"1" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or on which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" documents referring to oral disclosure, use, exhibition, or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 20 SEPTEMBER 2001		Date of mailing of the international search report 26 DEC 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Dorthea Lawrence for</i> SURYAPRABHA CHUNDURU Telephone No. (703) 308-0196

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/US01/09043
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 55, 59-61 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  Please See Extra Sheet.	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-8 and 30-31	
<b>Remark on Protest</b> <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

## — INTERNATIONAL SEARCH REPORT —

International application No.  
PCT/US01/09043**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING**  
This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Groups 1-2, claims 1-8 and 30-31, all in part, drawn to a vector, a cell with an isolated polynucleotide of SEQ ID NO. X or a polypeptide of SEQ ID NO. Y, wherein X and Y are values that correlate to  
If Group 1 is elected, X correlates to SEQ ID NO. 2, Y correlates to SEQ ID NO. 3.  
If Group 2 is elected, X correlates to SEQ ID NO. 21, Y correlates to SEQ ID NO. 22.

Groups 3-4, claim(s) 9, all in part, drawn to an antibody of SEQ ID NO. Y, wherein Y that correlate to  
If group 3 is elected, Y correlates to SEQ ID NO. 3.  
If Group 4 is elected, Y correlates to SEQ ID NO. 22.

Group 5, claims 10-21, all in part, drawn to a method of modulating angiogenesis comprising at least a polypeptide.

Group 6, claims 22-25 and 53-54, all in part, drawn to a method of treating tumors.

Group 7, claim(s) 26-29, all in part, drawn to a method of measuring a VEGF-modulated gene transcriptional upregulation or down-regulation activity of a compound.

Group 8, claims 32-34 and 40, drawn to a method of screening a tissue samples for tumorigenic potential.

Groups 9-10, claims 35-39, all in part, drawn to a transgenic non-human animal comprising a polynucleotide of SEQ ID NO. X, wherein X correlates to

If Group 9 is elected, X correlates to SEQ ID NO. 2.  
If Group 10 is elected, X correlates to SEQ ID NO. 21.

Group 11, claims 41-52, drawn to a method of modulating cell survival.

Group 12, claims 56-58, drawn to a method of determining the clinical stage of tumor.

The inventions listed as Groups 1-12 do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the isolated polynucleotides and polypeptides of each of the inventions in Groups 1-4 and 9-10 are not linked to each other because each polypeptide can only be made from the corresponding polynucleotide and can not be substituted with other polynucleotides. Additionally, the claimed methods of inventions in Groups 5-8 and 11-12 for modulating angiogenesis, measuring VEGF-modulated gene transcriptional regulation, screening tissue samples for tumorigenic potential, modulating cell survival, determining the clinical stage, provide different products and results which do not coexist and do not share the same technical feature.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 14/47	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 16/18	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/19	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 Q 1/48	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/48	Z
	C 1 2 Q 1/68	A
	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 5/00	B

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S G,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100101199

弁理士 小林 義教

(72)発明者 ラステッリ, ルカ, ケー.

アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 4 3 7, ギルフォード, ペPPERブッシュ レーン 5 2

(72)発明者 ガーバー, ハンス - ピーター

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, テネシー ストリート 1 1  
2 1, アpartment ナンバー 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA12 DA02 EA04 GA11 HA12 HA17  
4B063 QA01 QQ08 QQ43 QQ53 QQ79 QQ91 QR08 QR32 QS34  
4B065 AA19X AA25X AA26X AA29X AA40X AA41X AA46X AA48X AA50X AA62X  
AA67X AA71X AA72X AA73X AA78X AA82X AA90X AA91X AA93X AB01  
AC14 BA02 CA24 CA44 CA46  
4C084 AA17 ZA40 ZA89 ZB21 ZB26  
4C085 AA13 AA14 BB31 EE01  
4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA75 EA20 FA74