

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成19年11月8日(2007.11.8)

【公開番号】特開2007-167072(P2007-167072A)

【公開日】平成19年7月5日(2007.7.5)

【年通号数】公開・登録公報2007-025

【出願番号】特願2007-13569(P2007-13569)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)
C 0 7 K 14/475 (2006.01)
C 0 7 K 16/22 (2006.01)
C 0 7 K 16/46 (2006.01)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)
C 1 2 P 21/00 (2006.01)
A 6 1 K 38/22 (2006.01)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
A 6 1 K 35/76 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 P 35/04 (2006.01)
A 6 1 P 27/02 (2006.01)
A 6 1 P 17/06 (2006.01)
A 6 1 P 19/02 (2006.01)
A 6 1 P 9/10 (2006.01)
A 6 1 P 9/08 (2006.01)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)
A 6 1 P 17/02 (2006.01)
A 6 1 P 7/00 (2006.01)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/00 A
C 0 7 K 14/475
C 0 7 K 16/22
C 0 7 K 16/46
C 0 7 K 19/00
C 1 2 P 21/00 H
A 6 1 K 37/24
A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	35/76		
A 6 1 K	39/395		D
A 6 1 K	39/395		N
A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	35/04		
A 6 1 P	27/02		
A 6 1 P	17/06		
A 6 1 P	19/02		
A 6 1 P	9/10		
A 6 1 P	9/08		
A 6 1 P	9/00		
A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 P	17/02		
A 6 1 P	43/00	1 0 7	
A 6 1 P	7/00		
G 0 1 N	33/53		D
C 1 2 P	21/08		

【手続補正書】

【提出日】平成19年8月22日(2007.8.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、VEGFR-2の細胞外ドメインへの結合、及びVEGFR-3の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも1の活性を有する単離ポリペプチドであって、

以下の(a)、又は(b)のアミノ酸配列；

(a) 配列番号5のアミノ酸配列のフラグメントであって、配列番号5のアミノ酸配列のN-末端とC-末端が欠損してアミノ酸93～201となり、かつ前記活性を有するフラグメントのアミノ酸配列、

(b) 少なくとも1のアミノ酸の欠失、又は置換を有する前記(a)のバリエーションであって、前記活性を有し、かつストリンジентなハイブリダイゼーション条件(5×SSC、20mMのNaPO₄、pH6.8、50%のホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中で42℃でのハイブリダイゼーション、及び0.2×SSC中で42℃での洗浄)下で配列番号4のヌクレオチド配列の相補配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるバリエーションのアミノ酸配列、を含む単離ポリペプチド。

【請求項2】

配列番号5のアミノ酸配列のN-末端とC-末端が欠損してアミノ酸93～201となる、配列番号5のアミノ酸配列のフラグメントを含む請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】

少なくとも配列番号5のアミノ酸配列のアミノ酸101～196を含む請求項2に記載のポリペプチド。

【請求項4】

配列番号5のアミノ酸配列のアミノ酸93～201を含む請求項3に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

前記少なくとも1のアミノ酸の置換が保存的置換であり、かつ前記少なくとも1のアミノ酸の欠損、又は置換が、VEGF-D、VEGF-C、VEGF-165、VEGF-B、及びPLGFとの間で保存されたアミノ酸以外のアミノ酸に限定される、前記(b)のバリエーションである請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、VEGFR-2の細胞外ドメインへの結合、及びVEGFR-3の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも1の活性を有する単離ポリペプチドであって、

以下の(a)~(c)からなるグループから選択されるアミノ酸配列；

(a) 配列番号3のアミノ酸配列、

(b) 少なくとも1のアミノ酸の欠失、又は置換を有する前記(a)のバリエーションであって、前記活性を有し、かつストリンジентなハイブリダイゼーション条件(5×SSC、20mMのNaPO₄、pH6.8、50%のホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中で42℃でのハイブリダイゼーション、及び0.2×SSC中で42℃での洗浄)下で、配列番号1のヌクレオチド配列の相補配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるバリエーションのアミノ酸配列、

(c) アフィニティータグが取り付けられた前記(a)、又は(b)のアミノ酸配列、からなる単離ポリペプチド。

【請求項 7】

配列番号5のアミノ酸配列のアミノ酸101~196を含む請求項6に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

少なくとも配列番号3のアミノ酸配列のアミノ酸64~172を含む請求項6に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

VEGFR-2に結合する請求項1~8のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

VEGFR-2を活性化する請求項9に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

VEGFR-3に結合する請求項1~10のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

VEGFR-3を活性化する請求項11に記載のポリペプチド。

【請求項 13】

内皮細胞増殖を刺激する請求項1~12のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 14】

血管透過性を刺激する請求項1~13のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 15】

血管新生を刺激する請求項1~14のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 16】

内皮細胞の遊走を刺激する請求項1~15のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 17】

配列番号5のアミノ酸配列のアミノ酸93~201からなる請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 18】

アフィニティータグを含む請求項1~17のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 19】

前記タグが、FLAGタグである請求項18に記載のポリペプチド。

【請求項 20】

シグナルペプチドのアミノ酸配列を含む請求項1~19のいずれか一項に記載のポリペ

プチド。

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の単離ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子。

【請求項 2 2】

c D N Aヌクレオチド配列を含む請求項 2 1 に記載の核酸分子。

【請求項 2 3】

ゲノム D N A配列を含む請求項 2 1 に記載の核酸分子。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする配列からなるコード配列を有する単離核酸分子。

【請求項 2 5】

請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の核酸分子が、少なくとも 1 のプロモーターと作動するように結合する位置において、前記核酸分子をベクターに挿入する工程、を含むベクターを作る方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 2 7】

前記核酸分子の発現を促進するため、前記核酸分子に作動可能に関連するプロモーターを含む請求項 2 6 に記載のベクター。

【請求項 2 8】

請求項 2 6、又は 2 7 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 2 9】

核酸分子、又は前記核酸分子を含むベクターでトランスフォーム、又はトランスフェクトされた昆虫宿主細胞であって、前記核酸分子が、以下の (a) ~ (c) からなるグループから選択されるアミノ酸配列；

(a) 配列番号 3、及び配列番号 5 のアミノ酸配列、

(b) 前記 (a) のフラグメントであって、内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、V E G F R - 2 の細胞外ドメインへの結合、及び V E G F R - 3 の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも 1 の活性を有するフラグメントのアミノ酸配列、

(c) 少なくとも 1 のアミノ酸の欠失、挿入、又は置換を有する前記 (a)、又は (b) のバリエーションであって、内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、V E G F R - 2 の細胞外ドメインへの結合、及び V E G F R - 3 の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも 1 の活性を有し、かつストリンジентなハイブリダイゼーション条件 (5 × S S C、2 0 m M の N a P O 4、p H 6 . 8、5 0 % のホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中で 4 2 でのハイブリダイゼーション、及び 0 . 2 × S S C 中で 4 2 での洗浄) 下で、配列番号 4 のヌクレオチド配列の相補配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるバリエーションのアミノ酸配列、をコードするヌクレオチド配列を含む昆虫宿主細胞。

【請求項 3 0】

ポリペプチドを作る方法であって、前記方法が以下の (a)、及び (b) の工程；

(a) 請求項 2 6、又は 2 7 に記載のベクターを含む宿主細胞を、前記核酸によってコードされるポリペプチドが発現するような条件下で培養する工程、

(b) 前記宿主細胞、又は前記宿主細胞を培養した増殖培地から前記ポリペプチドを単離する工程、を含む方法。

【請求項 3 1】

前記単離工程が、(i) 前記細胞からの前記ポリペプチドの遊離を促進するため前記細胞をヘパリンに曝す工程と、(ii) 遊離したポリペプチドを精製する工程を有する、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

請求項 3 0、又は 3 1 に記載の方法により単離されたポリペプチド。

【請求項 3 3】

ポリペプチドを作る方法であって、前記方法が以下の (a)、及び (b) の工程；

(a) 前記ポリペプチドが発現するような条件下で、前記ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む発現ベクターを含む宿主細胞を培養する工程、ここで、コードされる前記アミノ酸配列が、以下の (i) ~ (iii) のグループから選択されるアミノ酸配列；

(i) 配列番号 3、及び配列番号 5 のアミノ酸配列、

(ii) 前記 (i) のフラグメントのアミノ酸配列、

(iii) 少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、挿入、又は欠失を有する前記 (i)、又は (ii) のバリエーションであって、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件 (5 × S S C、2 0 m M の N a P O 4、p H 6 . 8、5 0 % のホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中で 4 2 でのハイブリダイゼーション、及び 0 . 2 × S S C 中で 4 2 での洗浄) 下で、配列番号 4 のヌクレオチド配列の相補配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるバリエーションのアミノ酸配列、を含み、

ここで、前記細胞が前記核酸分子によってコードされるポリペプチドを分泌し、

分泌されたポリペプチドが V E G F R - 2 に結合するか、又は血管透過性を刺激するものである、

(b) 前記宿主細胞が培養される増殖培地から分泌された前記ポリペプチドを単離する工程、を有するポリペプチドを作る方法。

【請求項 3 4】

前記宿主細胞が哺乳動物のものであり、かつベクターが哺乳動物発現ベクターである請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

V E G F R - 3 に結合する、請求項 3 3、又は 3 4 に記載の方法によって作られる単離ポリペプチド。

【請求項 3 6】

ポリペプチドを作る方法であって、前記方法が以下の (a)、及び (b) の工程；

(a) 核酸分子によってコードされる前記ポリペプチドが発現するような条件下で、前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む前記核酸分子でトランスフォーム、又はトランスフェクトされた宿主細胞を培養する工程、ここで、発現される前記ポリペプチドが、以下の (i) ~ (iii) のグループから選択されるアミノ酸配列；

(i) 配列番号 3、及び配列番号 5 のアミノ酸配列、

(ii) 前記 (i) のフラグメントであって、前記フラグメントは内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、V E G F R - 2 の細胞外ドメインへの結合、及び V E G F R - 3 の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも 1 の活性を有するフラグメントのアミノ酸配列、

(iii) 少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、挿入、又は欠失を有する前記 (i) 又は (ii) のバリエーションであって、内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、V E G F R - 2 の細胞外ドメインへの結合、及び V E G F R - 3 の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも 1 の活性を有し、かつストリンジェントなハイブリダイゼーション条件 (5 × S S C、2 0 m M の N a P O 4、p H 6 . 8、5 0 % のホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中で 4 2 でのハイブリダイゼーション、及び 0 . 2 × S S C 中で 4 2 での洗浄) 下で、配列番号 4 のヌクレオチド配列の相補配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるバリエーションのアミノ酸配列、を含むものであり、

(b) 前記宿主細胞、又は前記宿主細胞が培養される増殖培地から前記ポリペプチドを単離する工程、ここで、前記単離工程が、以下の (i)、及び (ii) の工程；

(i) 前記宿主細胞からの前記ポリペプチドの遊離を促進するため前記宿主細胞をへバ

リンに曝す工程、

(ii) 遊離した前記ポリペプチドを精製する工程、を含む方法。

【請求項 37】

コードされるアミノ酸配列が、配列番号 5 のアミノ酸配列のアミノ酸 101 ~ 196 を含む請求項 33 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

コードされるアミノ酸配列が、配列番号 5 のアミノ酸配列のアミノ酸 93 ~ 201 を含む請求項 33 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

請求項 1 ~ 20、32、及び 35 のいずれか一項に記載のポリペプチドである第一のポリペプチドと、第二のポリペプチドを含む単離タンパク質ダイマー。

【請求項 40】

ホモダイマーであって、前記第二のポリペプチドと前記第一のポリペプチドが同じである請求項 39 に記載のタンパク質ダイマー。

【請求項 41】

ヘテロダイマーであって、前記第二のポリペプチドが、VEGF、VEGF-B、VEGF-C、PLGF、及び PDGF からなるグループから選択される請求項 39 に記載のタンパク質ダイマー。

【請求項 42】

第一のポリペプチドと、第二のポリペプチドを含む単離タンパク質ダイマーであって、ここで、前記第一のポリペプチドと、前記第二のポリペプチドが、それぞれ請求項 1 ~ 20、32、及び 35 のいずれか一項に記載のポリペプチドであるタンパク質ダイマー。

【請求項 43】

第一のポリペプチドと、第二のポリペプチドを含む単離タンパク質ダイマーであって、ここで、少なくとも 1 の前記ポリペプチドが、以下の (a) ~ (c) のグループから選択されるアミノ酸配列；

(a) 配列番号 3、及び配列番号 5 のアミノ酸配列

(b) 前記 (a) のフラグメントであって、内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、VEGFR-2 の細胞外ドメインへの結合、及び VEGFR-3 の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも 1 の活性を有するフラグメントのアミノ酸配列、

(c) 少なくとも 1 のアミノ酸の置換、挿入、又は欠失を有する前記 (a)、又は (b) のバリエーションであって、内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、VEGFR-2 の細胞外ドメインへの結合、及び VEGFR-3 の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも 1 の活性を有し、かつストリンジェントなハイブリダイゼーション条件 (5 × SSC、20 mM の NaPO₄、pH 6.8、50% のホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中で 42 でのハイブリダイゼーション、及び 0.2 × SSC 中で 42 での洗浄) 下で、配列番号 4 のヌクレオチド配列の相補配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるバリエーションのアミノ酸配列、を含む単離タンパク質ダイマー。

【請求項 44】

前記第一のポリペプチド、及び第二のポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 3、又は配列番号 5、若しくは前記活性を有する配列番号 3 又は配列番号 5 のフラグメントのアミノ酸配列を含む請求項 43 に記載のタンパク質ダイマー。

【請求項 45】

ホモダイマーである請求項 43、又は請求項 44 に記載のタンパク質ダイマー。

【請求項 46】

ジスルフィド結合されている請求項 39 ~ 45 のいずれか一項に記載のタンパク質ダイマー。

【請求項 47】

請求項 2 ~ 4、及び 17 のいずれか一項に記載のポリペプチドに対して特異的な免疫反応性を有する抗体。

【請求項 48】

ヒト化抗体である請求項 47 に記載の抗体。

【請求項 49】

検出可能なラベルで標識されている請求項 47、又は 48 に記載の抗体。

【請求項 50】

前記抗体と前記ポリペプチドとの結合が、前記ポリペプチドの V E G F R - 2 との結合を阻害する請求項 47 ~ 49 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 51】

前記抗体と前記ポリペプチドとの結合が、前記ポリペプチドの V E G F R - 3 との結合を阻害する請求項 47 ~ 50 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 52】

アンチセンスヌクレオチド配列を含むベクターであって、前記アンチセンスヌクレオチド配列が、請求項 17 に記載のポリペプチドをコードするゲノム DNA 配列、RNA 配列、cDNA の少なくとも一部に対して相補的であり、かつ前記ポリペプチドの少なくとも 1 の活性を阻害する、ベクター。

【請求項 53】

内皮細胞の増殖を生体外において刺激する方法であって、内皮細胞を増殖するのに有効な量の請求項 1 ~ 20、32、及び 35 のいずれか一項に記載のポリペプチドに接触させる工程、を含む方法。

【請求項 54】

前記内皮細胞が、血管内皮細胞、又はリンパ内皮細胞である請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

請求項 1 ~ 20、32、及び 35 のいずれか一項に記載のポリペプチド、及び薬用的に許容されるキャリア、又はアジュバントを含む医薬組成物。

【請求項 56】

V E G F、V E G F - B、V E G F - C、P I G F、P D G F、F G F、及びヘパリンからなるグループから選択される少なくとも 1 の物質を含む請求項 55 に記載の医薬組成物。

【請求項 57】

請求項 47 ~ 51 のいずれか一項に記載の抗体、及び薬用的に許容されるキャリア、又はアジュバントを含む医薬組成物。

【請求項 58】

生物試料中における請求項 1 ~ 20、32、及び 35 のいずれか一項に記載のポリペプチドを検出する方法であって、

前記試料を、前記ポリペプチドに結合する能力のある抗体に接触させる工程と、

前記抗体の結合の発生を検出する工程、とを含む方法。

【請求項 59】

生体外における V E G F R - 2 の活性化方法であって、前記 V E G F R - 2 を有する細胞を、前記 V E G F R - 2 を活性化するのに有効な用量の請求項 1 ~ 20、32、及び 35 のいずれか一項に記載のポリペプチドに接触させる工程を含む方法。

【請求項 60】

生体外における V E G F R - 3 の活性化方法であって、前記 V E G F R - 3 を有する細胞を、前記 V E G F R - 3 を活性化するのに有効な用量の請求項 1 ~ 20、32、及び 35 のいずれか一項に記載のポリペプチドに接触させる工程を含む方法。

【請求項 61】

請求項 1 ~ 20、32、及び 35 のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む内皮細胞増殖刺激用の医薬組成物。

【請求項 62】

請求項 1 ~ 20、32、及び35のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む血管新生刺激用の医薬組成物。

【請求項 63】

請求項 21 ~ 24のいずれか一項に記載の核酸分子を含むか、又は請求項 26若しくは27に記載のベクターを含む内皮細胞増殖刺激用の医薬組成物。

【請求項 64】

請求項 21 ~ 24のいずれか一項に記載の核酸分子を含むか、又は請求項 26若しくは27に記載のベクターを含む血管新生刺激用の医薬組成物。

【請求項 65】

請求項 47 ~ 51のいずれか一項に記載の抗体を含む内皮細胞増殖阻害用の医薬組成物。

【請求項 66】

請求項 47 ~ 51のいずれか一項に記載の抗体を含む血管新生刺激用の医薬組成物。

【請求項 67】

リンパ内皮細胞の増殖、又は分化刺激用の医薬組成物であって、VEGF-D核酸分子、又はVEGF-Dポリペプチドを含み、前記VEGF-Dポリペプチドは、以下(a) ~ (c)のグループから選択されるアミノ酸配列；

(a) 配列番号3、及び配列番号5のアミノ酸配列、

(b) 前記(a)のフラグメントであって、内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、VEGFR-2の細胞外ドメインへの結合、及びVEGFR-3の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも1の活性を有するフラグメントのアミノ酸配列、

(c) 少なくとも1のアミノ酸の置換、挿入、又は欠失を有する前記(a)、又は(b)のバリエーションであって、内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、VEGFR-2の細胞外ドメインへの結合、及びVEGFR-3の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも1の活性を有し、かつストリンジентなハイブリダイゼーション条件(5×SSC、20mMのNaPO₄、pH6.8、50%のホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中で42℃でのハイブリダイゼーション、及び0.2×SSC中で42℃での洗浄)下で、配列番号4のヌクレオチド配列の相補配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるバリエーションのアミノ酸配列、を含み、そして、

前記VEGF-D核酸分子が、前記(a)、(b)、又は(c)をコードするヌクレオチド配列を含む、医薬組成物。

【請求項 68】

請求項 47 ~ 51のいずれか一項に記載の抗体と、前記抗体の結合を検出するための手段を含むキット。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0054

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0054】

本発明の核酸およびポリペプチドは、合成的手段または組換え手段によって調製することができ、または、天然のソースから精製することができる、ということが明らかに理解されるであろう。

具体的には、本発明は以下の〔1〕~〔68〕に係る発明に関する。

〔1〕内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、VEGFR-2の細胞外ドメインへの結合、及びVEGFR-3の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも1の活性を有する単離ポリペプチドであって、

以下の(a)、又は(b)のアミノ酸配列；

(a) 配列番号5のアミノ酸配列のフラグメントであって、配列番号5のアミノ酸配列のN-末端とC-末端が欠損してアミノ酸93~201となり、かつ前記活性を有するフラグメントのアミノ酸配列、

(b) 少なくとも1のアミノ酸の欠失、又は置換を有する前記(a)のバリエーションであって、前記活性を有し、かつストリンジентなハイブリダイゼーション条件(5×SSC、20mMのNaPO₄、pH6.8、50%のホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中で42℃でのハイブリダイゼーション、及び0.2×SSC中で42℃での洗浄)下で配列番号4のヌクレオチド配列の相補配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるバリエーションのアミノ酸配列、を含む単離ポリペプチド。

[2] 配列番号5のアミノ酸配列のN-末端とC-末端が欠損してアミノ酸93~201となる、配列番号5のアミノ酸配列のフラグメントを含む上記[1]のポリペプチド。

[3] 少なくとも配列番号5のアミノ酸配列のアミノ酸101~196を含む上記[2]のポリペプチド。

[4] 配列番号5のアミノ酸配列のアミノ酸93~201を含む上記[3]のポリペプチド。

[5] 前記少なくとも1のアミノ酸の置換が保存的置換であり、かつ前記少なくとも1のアミノ酸の欠損、又は置換が、VEGF-D、VEGF-C、VEGF-165、VEGF-B、及びPLGFとの間で保存されたアミノ酸以外のアミノ酸に限定される、前記(b)のバリエーションである上記[1]のポリペプチド。

[6] 内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、VEGFR-2の細胞外ドメインへの結合、及びVEGFR-3の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも1の活性を有する単離ポリペプチドであって、

以下の(a)~(c)からなるグループから選択されるアミノ酸配列；

(a) 配列番号3のアミノ酸配列、

(b) 少なくとも1のアミノ酸の欠失、又は置換を有する前記(a)のバリエーションであって、前記活性を有し、かつストリンジентなハイブリダイゼーション条件(5×SSC、20mMのNaPO₄、pH6.8、50%のホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中で42℃でのハイブリダイゼーション、及び0.2×SSC中で42℃での洗浄)下で、配列番号1のヌクレオチド配列の相補配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるバリエーションのアミノ酸配列、

(c) アフィニティータグが取り付けられた前記(a)、又は(b)のアミノ酸配列、からなる単離ポリペプチド。

[7] 配列番号5のアミノ酸配列のアミノ酸101~196を含む上記[6]のポリペプチド。

[8] 少なくとも配列番号3のアミノ酸配列のアミノ酸64~172を含む上記[6]のポリペプチド。

[9] VEGFR-2に結合する上記[1]~[8]のいずれかのポリペプチド。

[10] VEGFR-2を活性化する上記[9]のポリペプチド。

[11] VEGFR-3に結合する上記[1]~[10]のいずれかのポリペプチド。

[12] VEGFR-3を活性化する上記[11]のポリペプチド。

[13] 内皮細胞増殖を刺激する上記[1]~[12]のポリペプチド。

[14] 血管透過性を刺激する上記[1]~[13]のポリペプチド。

[15] 血管新生を刺激する上記[1]~[14]のポリペプチド。

[16] 内皮細胞の遊走を刺激する上記[1]~[15]のポリペプチド。

[17] 配列番号5のアミノ酸配列のアミノ酸93~201からなる上記[1]のポリペプチド。

[18] アフィニティータグを含む上記[1]~[17]のいずれかのポリペプチド。

[19] 前記タグが、FLAGタグである上記[18]のポリペプチド。

[20] シグナルペプチドのアミノ酸配列を含む上記[1]~[19]のポリペプチド。

[21] 上記[1]~[20]のいずれかの単離ポリペプチドをコードするヌクレオチド

配列を含む単離核酸分子。

〔22〕 cDNAヌクレオチド配列を含む上記〔21〕の核酸分子。

〔23〕 ゲノムDNA配列を含む上記〔21〕の核酸分子。

〔24〕 上記〔1〕～〔20〕のいずれかのポリペプチドをコードする配列からなるコード配列を有する単離核酸分子。

〔25〕 上記〔21〕～〔24〕のいずれかの核酸分子が、少なくとも1のプロモーターと作動するように結合する位置において、前記核酸分子をベクターに挿入する工程、を含むベクターを作る方法。

〔26〕 上記〔21〕～〔24〕のいずれかの核酸分子を含むベクター。

〔27〕 前記核酸分子の発現を促進するため、前記核酸分子に作動可能に関連するプロモーターを含む上記〔26〕のベクター。

〔28〕 上記〔26〕、又は〔27〕のベクターを含む宿主細胞。

〔29〕 核酸分子、又は前記核酸分子を含むベクターでトランスフォーム、又はトランスフェクトされた昆虫宿主細胞であって、前記核酸分子が、以下の(a)～(c)からなるグループから選択されるアミノ酸配列；

(a) 配列番号3、及び配列番号5のアミノ酸配列、

(b) 前記(a)のフラグメントであって、内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、VEGFR-2の細胞外ドメインへの結合、及びVEGFR-3の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも1の活性を有するフラグメントのアミノ酸配列、

(c) 少なくとも1のアミノ酸の欠失、挿入、又は置換を有する前記(a)、又は(b)のバリエーションであって、内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、VEGFR-2の細胞外ドメインへの結合、及びVEGFR-3の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも1の活性を有し、かつストリンジェントなハイブリダイゼーション条件(5×SSC、20mMのNaPO₄、pH6.8、50%のホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中で42℃でのハイブリダイゼーション、及び0.2×SSC中で42℃での洗浄)下で、配列番号4のヌクレオチド配列の相補配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるバリエーションのアミノ酸配列、をコードするヌクレオチド配列を含む昆虫宿主細胞。

〔30〕 ポリペプチドを作る方法であって、前記方法が以下の(a)、及び(b)の工程；

(a) 上記〔26〕、又は〔27〕のベクターを含む宿主細胞を、前記核酸によってコードされるポリペプチドが発現するような条件下で培養する工程、

(b) 前記宿主細胞、又は前記宿主細胞を培養した増殖培地から前記ポリペプチドを単離する工程、を含む方法。

〔31〕 前記単離工程が、(i)前記細胞からの前記ポリペプチドの遊離を促進するため前記細胞をヘパリンに曝す工程と、(ii)遊離したポリペプチドを精製する工程を有する、上記〔30〕の方法。

〔32〕 上記〔30〕、又は〔31〕の方法により単離されたポリペプチド。

〔33〕 ポリペプチドを作る方法であって、前記方法が以下の(a)、及び(b)の工程；

(a) 前記ポリペプチドが発現するような条件下で、前記ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む発現ベクターを含む宿主細胞を培養する工程、ここで、コードされる前記アミノ酸配列が、以下の(i)～(iii)のグループから選択されるアミノ酸配列；

(i) 配列番号3、及び配列番号5のアミノ酸配列、

(ii) 前記(i)のフラグメントのアミノ酸配列、

(iii) 少なくとも1つのアミノ酸の置換、挿入、又は欠失を有する前記(i)、又は(ii)のバリエーションであって、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件(5×SSC、20mMのNaPO₄、pH6.8、50%のホルムアミドを含むハイブリダイゼ

ーション溶液中で42 でのハイブリダイゼーション、及び0.2×SSC中で42 での洗浄)下で、配列番号4のヌクレオチド配列の相補配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるバリエーションのアミノ酸配列、を含み、

ここで、前記細胞が前記核酸分子によってコードされるポリペプチドを分泌し、分泌されたポリペプチドがVEGFR-2に結合するか、又は血管透過性を刺激するものである、

(b)前記宿主細胞が培養される増殖培地から分泌された前記ポリペプチドを単離する工程、を有するポリペプチドを作る方法。

[34]前記宿主細胞が哺乳動物のものであり、かつベクターが哺乳動物発現ベクターである上記[33]の方法。

[35]VEGFR-3に結合する、上記[33]、又は[34]の方法によって作られる単離ポリペプチド。

[36]ポリペプチドを作る方法であって、前記方法が以下の(a)、及び(b)の工程;

(a)核酸分子によってコードされる前記ポリペプチドが発現するような条件下で、前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む前記核酸分子でトランスフォーム、又はトランスフェクトされた宿主細胞を培養する工程、ここで、発現される前記ポリペプチドが、以下の(i)~(iii)のグループから選択されるアミノ酸配列;

(i)配列番号3、及び配列番号5のアミノ酸配列、

(ii)前記(i)のフラグメントであって、前記フラグメントは内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、VEGFR-2の細胞外ドメインへの結合、及びVEGFR-3の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも1の活性を有するフラグメントのアミノ酸配列、

(iii)少なくとも1つのアミノ酸の置換、挿入、又は欠失を有する前記(i)又は(ii)のバリエーションであって、内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、VEGFR-2の細胞外ドメインへの結合、及びVEGFR-3の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも1の活性を有し、かつストリンジентなハイブリダイゼーション条件(5×SSC、20mMのNaPO₄、pH6.8、50%のホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中で42 でのハイブリダイゼーション、及び0.2×SSC中で42 での洗浄)下で、配列番号4のヌクレオチド配列の相補配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるバリエーションのアミノ酸配列、を含むものであり、

(b)前記宿主細胞、又は前記宿主細胞が培養される増殖培地から前記ポリペプチドを単離する工程、ここで、前記単離工程が、以下の(i)、及び(ii)の工程;

(i)前記宿主細胞からの前記ポリペプチドの遊離を促進するため前記宿主細胞をヘパリンに曝す工程、

(ii)遊離した前記ポリペプチドを精製する工程、を含む方法。

[37]コードされるアミノ酸配列が、配列番号5のアミノ酸配列のアミノ酸101~196を含む上記[33]~[36]のいずれかの方法。

[38]コードされるアミノ酸配列が、配列番号5のアミノ酸配列のアミノ酸93~201を含む上記[33]~[36]のいずれかの方法。

[39]上記[1]~[20]、[32]、及び[35]のいずれかのポリペプチドである第一のポリペプチドと、第二のポリペプチドを含む単離タンパク質ダイマー。

[40]ホモダイマーであって、前記第二のポリペプチドと前記第一のポリペプチドが同じである上記[39]のタンパク質ダイマー。

[41]ヘテロダイマーであって、前記第二のポリペプチドが、VEGF、VEGF-B、VEGF-C、PLGF、及びPDGFからなるグループから選択される上記[39]のタンパク質ダイマー。

[42]第一のポリペプチドと、第二のポリペプチドを含む単離タンパク質ダイマーであって、ここで、前記第一のポリペプチドと、前記第二のポリペプチドが、それぞれ上記[

〔 1 〕 ~ 〔 2 0 〕、〔 3 2 〕、及び〔 3 5 〕のいずれかのポリペプチドであるタンパク質ダイマー。

〔 4 3 〕第一のポリペプチドと、第二のポリペプチドを含む単離タンパク質ダイマーであって、ここで、少なくとも 1 の前記ポリペプチドが、以下の (a) ~ (c) のグループから選択されるアミノ酸配列；

(a) 配列番号 3、及び配列番号 5 のアミノ酸配列

(b) 前記 (a) のフラグメントであって、内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、VEGFR - 2 の細胞外ドメインへの結合、及び VEGFR - 3 の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも 1 の活性を有するフラグメントのアミノ酸配列、

(c) 少なくとも 1 のアミノ酸の置換、挿入、又は欠失を有する前記 (a)、又は (b) のバリエーションであって、内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、VEGFR - 2 の細胞外ドメインへの結合、及び VEGFR - 3 の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも 1 の活性を有し、かつストリンジェントなハイブリダイゼーション条件 (5 × SSC、20 mM の NaPO₄、pH 6.8、50 % のホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中で 42 でのハイブリダイゼーション、及び 0.2 × SSC 中で 42 での洗浄) 下で、配列番号 4 のヌクレオチド配列の相補配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるバリエーションのアミノ酸配列、を含む単離タンパク質ダイマー。

〔 4 4 〕前記第一のポリペプチド、及び第二のポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 3、又は配列番号 5、若しくは前記活性を有する配列番号 3 又は配列番号 5 のフラグメントのアミノ酸配列を含む上記〔 4 3 〕のタンパク質ダイマー。

〔 4 5 〕ホモダイマーである上記〔 4 3 〕、又は〔 4 4 〕のタンパク質ダイマー。

〔 4 6 〕ジスルフィド結合されている上記〔 3 9 〕 ~ 〔 4 5 〕のいずれかのタンパク質ダイマー。

〔 4 7 〕上記〔 2 〕 ~ 〔 4 〕、及び〔 1 7 〕のいずれかのポリペプチドに対して特異的な免疫反応性を有する抗体。

〔 4 8 〕ヒト化抗体である上記〔 4 7 〕の抗体。

〔 4 9 〕検出可能なラベルで標識されている上記〔 4 7 〕、又は〔 4 8 〕の抗体。

〔 5 0 〕前記抗体と前記ポリペプチドとの結合が、前記ポリペプチドの VEGFR - 2 との結合を阻害する上記〔 4 7 〕 ~ 〔 4 9 〕のいずれかの抗体。

〔 5 1 〕前記抗体と前記ポリペプチドとの結合が、前記ポリペプチドの VEGFR - 3 との結合を阻害する上記〔 4 7 〕 ~ 〔 5 0 〕のいずれかの抗体。

〔 5 2 〕アンチセンスヌクレオチド配列を含むベクターであって、前記アンチセンスヌクレオチド配列が、上記〔 1 7 〕のポリペプチドをコードするゲノム DNA 配列、RNA 配列、cDNA の少なくとも一部に対して相補的であり、かつ前記ポリペプチドの少なくとも 1 の活性を阻害する、ベクター。

〔 5 3 〕内皮細胞の増殖を生体外において刺激する方法であって、内皮細胞を増殖するのに有効な量の上記〔 1 〕 ~ 〔 2 0 〕、〔 3 2 〕、及び〔 3 5 〕のいずれかのポリペプチドに接触させる工程、を含む方法。

〔 5 4 〕前記内皮細胞が、血管内皮細胞、又はリンパ内皮細胞である上記〔 5 3 〕の方法。

〔 5 5 〕上記〔 1 〕 ~ 〔 2 0 〕、〔 3 2 〕、及び〔 3 5 〕のいずれかのポリペプチド、及び薬的に許容されるキャリア、又はアジュバントを含む医薬組成物。

〔 5 6 〕 VEGF、VEGF - B、VEGF - C、PlGF、PDGF、FGF、及びヘパリンからなるグループから選択される少なくとも 1 の物質を含む上記〔 5 5 〕の医薬組成物。

〔 5 7 〕上記〔 4 7 〕 ~ 〔 5 1 〕の抗体、及び薬的に許容されるキャリア、又はアジュバントを含む医薬組成物。

〔 5 8 〕生物試料中における上記〔 1 〕 ~ 〔 2 0 〕、〔 3 2 〕、及び〔 3 5 〕のいずれか

のポリペプチドを検出する方法であって、

前記試料を、前記ポリペプチドに結合する能力のある抗体に接触させる工程と、

前記抗体の結合の発生を検出する工程、とを含む方法。

〔59〕生体外におけるVEGFR-2の活性化方法であって、前記VEGFR-2を有する細胞を、前記VEGFR-2を活性化するのに有効な用量の上記〔1〕～〔20〕、〔32〕、及び〔35〕のいずれかのポリペプチドに接触させる工程を含む方法。

〔60〕生体外におけるVEGFR-3の活性化方法であって、前記VEGFR-3を有する細胞を、前記VEGFR-3を活性化するのに有効な用量の上記〔1〕～〔20〕、〔32〕、及び〔35〕のいずれかのポリペプチドに接触させる工程を含む方法。

〔61〕上記〔1〕～〔20〕、〔32〕、及び〔35〕のいずれかのポリペプチドを含む内皮細胞増殖刺激用の医薬組成物。

〔62〕上記〔1〕～〔20〕、〔32〕、及び〔35〕のいずれかのポリペプチドを含む血管新生刺激用の医薬組成物。

〔63〕上記〔21〕～〔24〕、〔26〕、及び〔27〕のいずれかの核酸分子、又はベクターを含む内皮細胞増殖刺激用の医薬組成物。

〔64〕上記〔21〕～〔24〕、〔26〕、及び〔27〕のいずれかの核酸分子、又はベクターを含む血管新生刺激用の医薬組成物。

〔65〕上記〔47〕～〔51〕の抗体を含む内皮細胞増殖阻害用の医薬組成物。

〔66〕上記〔47〕～〔51〕の抗体を含む血管新生刺激用の医薬組成物。

〔67〕リンパ内皮細胞の増殖、又は分化刺激用の医薬組成物であって、VEGF-D核酸分子、又はVEGF-Dポリペプチドを含み、前記VEGF-Dポリペプチドは、以下(a)～(c)のグループから選択されるアミノ酸配列；

(a) 配列番号3、及び配列番号5のアミノ酸配列、

(b) 前記(a)のフラグメントであって、内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、VEGFR-2の細胞外ドメインへの結合、及びVEGFR-3の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも1の活性を有するフラグメントのアミノ酸配列、

(c) 少なくとも1のアミノ酸の置換、挿入、又は欠失を有する前記(a)、又は(b)のバリエーションであって、内皮細胞増殖の刺激、血管透過性の刺激、VEGFR-2の細胞外ドメインへの結合、及びVEGFR-3の細胞外ドメインへの結合からなるグループから選択される少なくとも1の活性を有し、かつストリンジェントなハイブリダイゼーション条件(5×SSC、20mMのNaPO₄、pH6.8、50%のホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中で42℃でのハイブリダイゼーション、及び0.2×SSC中で42℃での洗浄)下で、配列番号4のヌクレオチド配列の相補配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるバリエーションのアミノ酸配列、を含み、そして、

前記VEGF-D核酸分子が、前記(a)、(b)、又は(c)をコードするヌクレオチド配列を含む、医薬組成物。

〔68〕上記〔47〕～〔51〕の抗体と、前記抗体の結合を検出するための手段を含むキット。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0097

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0097】

例9 内部VEGF-Dポリペプチドの生理活性

VEGF-Dの推定アミノ酸配列は、他のすべてのVEGFファミリーのメンバーの配列に類似した中央部分を含んでいる(図10におけるアラインメントに示すように、ヒトVEGF-Dアミノ酸配列のおよそ残基101から196)。したがってVEGF-Dの

生理活性の部分は、この保存領域に存在するであろうと考えられていた。この仮説についてテストするために、V E G F - Dの生合成について研究し、そしてヒトV E G F - Dの前記保存領域を哺乳動物細胞において発現させ、精製し、そして以下に記載するバイオアッセイにおいてテストした。