(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 538 T2** 2006.08.10

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 751 992 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 538.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/05291**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 923 874.5**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/024473**
(86) PCT-Anmeldetag: **12.05.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **14.09.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.01.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **09.11.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.08.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/19*** (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
207550 **08.03.1994** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Human Genome Sciences, Inc., Rockville, Md., US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:
HU, Jing-Shan, Gaithersburg, US; CAO, Liang, University of Hong Kong, HK; Rosen, Craig A., Laytonsville, US

(54) Bezeichnung: **Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor 2**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neu identifizierte Polynucleotide, Polypeptide, die durch solche Polynucleotide codiert sind, die Verwendung solcher Polynucleotide und Polypeptide und außerdem die Produktion solcher Polynucleotide und Polypeptide. Insbesondere ist das Polypeptid der vorliegenden Erfindung ein menschlicher Gefäßendothel-Wachstumsfaktor 2 (VEGF2). Außerdem betrifft die Erfindung die Hemmung der Wirkung eines solchen Polypeptids.

[0002] Die Bildung neuer Blutgefäße oder Angiogenese ist für die Embryonalentwicklung, das anschließende Wachstum und die Reparatur von Gewebe essentiell. Die Angiogenese ist ein essentieller Teil des Wachstums solider Tumoren beim Menschen, und außerdem ist eine abnorme Angiogenese mit anderen Erkrankungen assoziiert, z.B. der rheumatoiden Arthritis, Psoriasis und diabetischen Retinopathie (Folkman, J., und Klagsbrun, M., Science 235: 442–447, 1987).

[0003] Verschiedenen Faktoren sind an der Angiogenese beteiligt. Sowohl saure als auch basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Moleküle sind Mitogene für Endothelzellen und andere Zelltypen. Angiotropin und Angiogenin können die Angiogenese induzieren, obwohl ihre Funktionen noch unklar sind (Folkman, J., 1993, Cancer Medicine, S. 153–170, Lea und Febiger Press). Ein hochselektives Mitogen für Gefäßendothelzellen ist der Gefäßendothel-Wachstumsfaktor oder VEGF (Ferrara, N., et al., Endocr. Rev. 13: 19–32, 1992). Der Gefäßendothel-Wachstumsfaktor ist ein ausgeschiedenes angiogenes Mitogen, dessen Zielzellen-Spezifität auf Gefäßendothelzellen beschränkt zu sein scheint. Das murine VEGF-Gen wurde charakterisiert und sein Expressionsmuster in der Embryogenese analysiert. Eine persistierende Expression von VEGF wurde in Epithelzellen festgestellt, die benachbart zum gefensterten Endothel liegen, z.B. im Plexus chorioideus und in Nierenglomeruli. Die Ergebnisse stimmten mit einer Rolle von VEGF als multifunktioneller Regulator des Wachstums und der Differenzierung von Endothelzellen überein. Breier, G., et al., Development 114: 521–532, 1992.

[0004] VEGF kann die Angiogenese fördern. VEGF und der menschliche Thrombocyten-abgeleitete Wachstumsfaktor PDGFα und PDGFβ haben eine gemeinsame Sequenzhomologie (Leung, D. W., et al., Science 1306–1309, 1989). Das Ausmaß der Homologie beträgt etwa 21% bzw. 24%. Acht Cysteinreste sind zwischen allen drei Mitgliedern konserviert. Obwohl sie ähnlich sind, liegen spezifische Unterschiede zwischen VEGF und PDGF vor. Während PDGF einen Haupt-Wachstumsfaktor für das Bindegewebe darstellt, ist VEGF für Endothelzellen hochspezifisch. Außerdem ist VEGF als Gefäßpermeabilitätsfaktor (VPM) und Follikel-Sternzellen-abgeleiteter Wachstumsfaktor bekannt. Er ist ein Heparinbindendes dimeres Polypeptid.

[0005] VEGF hat vier verschiedene Formen mit 121, 165, 189 und 206 Aminosäuren, die auf ein unterschiedliches Spleißen zurückzuführen sind. VEGF121 und VEGF165 sind löslich und in der Lage, die Angiogenese zu fördern, während VEGF189 und VEGF206 an Heparin-enthaltende Proteoglycane in der Zelloberfläche gebunden sind. Die zeitliche und räumliche Expression von VEGF wurde mit der physiologischen Proliferation der Blutgefäße in Verbindung gebracht (Gajdusek, C. M., und Carbon, S. J., Cell Physiol. 139: 570–579, 1989; McNeil, P. L., Muthukrishnan, L., Warder, E., D'Amore, P. A., J. Cell Biol. 109: 811–822, 1989). Seine Hochaffinitäts-Bindungsstellen wurden nur auf Endothelzellen in Gewebeschnitten lokalisiert (Jakeman, L. B., et al., Clin. Invest. 89: 244–253, 1989). Der Faktor kann aus Hypophysenzellen und verschiedenen Tumorzelllinien isoliert werden und wurde mit einigen menschlichen Gliomen in Zusammenhang gebracht (Plate, K. H., Nature 359: 845–848, 1992). Interessanterweise verleiht die Expression von VEGF121 oder VEGF165 Ovarzellen des Chinesischen Hamsters die Fähigkeit, Tumoren in Nacktmäusen zu bilden (Ferrarra, N., et al., J. Clin. Invest. 91: 160–170, 1993). Schließlich wurde gezeigt, dass die Hemmung der VEGF-Funktion durch gegen VEGF gerichtete monoclonale Antikörper das Tumorwachstum in immundefekten Mäusen hemmt (Kim, K. J., Nature 362: 841–844, 1993).

[0006] Es wurde gefunden, dass der Gefäßpermeabilitätsfaktor, der auch als VEGF bekannt ist, für die persistierende Mikrogefäß-Hyperpermeabilität für Plasmaproteine verantwortlich ist, und zwar auch noch nach dem Ende einer Verletzung, dies ist ein charakteristisches Merkmal der normalen Wundheilung. Dies legt nahe, dass der VPF (oder VEGF) einen wichtigen Faktor in der Wundheilung darstellt. Brown, L. F., et al., J. Exp. Med. 176: 1375–1379, 1992.

[0007] Das US-Patent Nr. 5 073 492, erteilt am 17. Dezember 1991 an Chen et al., beschreibt ein Verfahren zur synergistischen Steigerung des Wachstums von Endothelzellen in einer geeigneten Umgebung, umfassend das Zufügen von VEGF, Effektoren und eines aus dem Serum abgeleiteten Faktors zu der Umgebung. Außerdem wurde die DNA der C-Untereinheit des Gefäßendothelzellen-Wachstumsfaktors durch Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion hergestellt. Die DNA codiert ein Protein, das entweder als ein Heterodimer

oder als ein Homodimer vorliegen kann. Das Protein ist ein Mitogen von Säuger-Gefäßendothelzellen und kann als solches für die Unterstützung der Entwicklung und Reparatur von Gefäßen eingesetzt werden, wie in der Europäischen Patentanmeldung Nr. 92302750.2, veröffentlicht am 30. September 1992, beschrieben.

[0008] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung werden ein neues reifes Polypeptid, das ein VEGF2 ist, und außerdem Fragmente davon bereitgestellt. Der VEGF2 der vorliegenden Erfindung stammt vom Menschen.

[0009] Gemäß einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Polynucleotide (DNA oder RNA) bereitgestellt, die solche Polypeptide codieren.

[0010] Gemäß einem noch weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Herstellen eines solchen Polypeptids durch Rekombinations-Techniken bereitgestellt.

[0011] Gemäß einem noch weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung kann ein solches Polypeptid oder ein Polynucleotid, das ein solches Polypeptid codiert, für therapeutische Zwecke eingesetzt werden, z.B. als Wundheilungsmittel, um das Wachstum beschädigter Knochen und Gewebe zu fördern und die Endothelialisierung zu unterstützen und außerdem für die Diagnose von Tumoren, für eine Krebstherapie und um unbekannte Rezeptoren von VEGF2 zu identifizieren und zu isolieren.

[0012] Gemäß einem noch weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden ein Antikörper gegen den VEGF2 und ein Verfahren zum Herstellen eines solchen Antikörpers bereitgestellt.

[0013] Gemäß einem noch weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Antagonisten/Inhibitoren von VEGF2 bereitgestellt, die eingesetzt werden können, um die Wirkung eines solchen Polypeptids zu hemmen, z.B. um eine Tumor-Angiogenese zu unterbinden. Diese Antagonisten/Inhibitoren sind Antikörper oder Antisense-Moleküle, wie in den Patentansprüchen definiert.

[0014] Diese und weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung sollten für den Fachmann aus den hier gemachten Angaben ersichtlich sein.

[0015] Die folgenden Zeichnungen sollen die Ausführungsformen der Erfindung erläutern und in keiner Weise den Umfang der Erfindung einschränken, der in den Patentansprüchen angegeben ist.

[0016] **Fig.** 1 zeigt die Polynucleotidsequenz, die VEGF2 codiert, und die entsprechende hergeleitete Aminosäuresequenz des vollständigen VEGF2-Polypeptids, umfassend 350 Aminosäurereste, von denen etwa die ersten 24 Aminosäuren die Leader-Sequenz darstellen. Die Aminosäuresequenz wurde anhand der herkömmlichen Drei-Buchstaben-Abkürzungen angegeben.

[0017] **Fig.** 2 zeigt die Homologie zwischen dem PDGFα, PDGFβ, VEGF und VEGF2 auf Ebene der Aminosäuren.

[0018] Fig. 3 zeigt in Tabellenform die prozentuale Homologie zwischen PDGFα, PDGFβ, VEGF und VEGF2.

[0019] Fig. 4 zeigt das Vorliegen von mRNA für VEGF2 in Brustkrebs-Zelllinien.

[0020] Fig. 5 stellt die Ergebnisse einer Northern-Blot-Analyse von VEGF2 in menschlichen erwachsenen Geweben dar.

[0021] Fig. 6 zeigt die Ergebnisse, die beim Laufenlassen von VEGF2 auf einem SDS-PAGE-Gel nach einer in vitro-Transkription/Translation erhalten wurden. Die vollständige und eine partielle VEGF2-cDNA wurden in einer gekoppelten Reaktion in Gegenwart von ^{35}S-Methionin transkribiert und translatiert. Die translatierten Produkte wurden durch 4–20% Gradienten-SDS-PAGE analysiert und gegen einen Röntgenfilm exponiert.

[0022] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine isolierte Nucleinsäure (Polynucleotid) bereitgestellt, die das reife Polypeptid codiert, welches die abgeleitete Aminosäuresequenz von **Fig.** 1 aufweist, oder die das reife Polypeptid codiert, welches durch die cDNA des Clons codiert ist, der als ATCC-Hinterlegungsnummer 75698 hinterlegt ist.

[0023] Ein Polynucleotid, das ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, kann aus einem menschli-

chen Embryo im frühen Stadium (der Woche acht bis neun), Osteoklastomen, erwachsenen Herz- oder verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien erhalten werden. Das Polynucleotid der vorliegenden Erfindung wurde in einer cDNA-Bank entdeckt, die von einem menschlichen Embryo im frühen Stadium der Woche 9 stammte. Es ist mit der VEGF/PDGF-Familie strukturell verwandt. Es enthält einen offenen Leserahmen, der ein Protein mit etwa 350 Aminosäureresten codiert, von denen etwa die ersten 24 Aminosäurereste wahrscheinlich eine Leader-Sequenz darstellen, so dass das reife Protein 326 Aminosäuren umfasst, wobei das Protein die höchste Homologie zu dem Gefäßendothel-Wachstumsfaktor zeigt (Identität von 30%), gefolgt von PDGFα (23%) und PDGFβ (22%) (vgl. Fig. 3). Besonders wichtig ist, dass alle acht Cysteinreste bei allen vier Mitgliedern der Familie konserviert sind (vgl. die mit Kästchen versehenen Bereiche von **Fig.** 2). Außerdem ist das Erkennungszeichen für die PDGF/VEGF-Familie, PXCVXXXRCXGCCN, in VEGF2 konserviert (vgl. **Fig.** 2). Die Homologie zwischen VEGF2, VEGF und den zwei PDGFs liegt auf der Ebene der Proteinsequenz. In der Nucleotidsequenz kann keine Homologie nachgewiesen werden, deshalb wäre es schwierig, den VEGF2 durch einfache Verfahren, z.B. eine Hybridisierung mit niedriger Stringenz, zu isolieren.

[0024] Das Polynucleotid der vorliegenden Erfindung kann in Form von RNA oder in Form von DNA vorliegen, wobei die DNA cDNA, genomische DNA und synthetische DNA umfasst. Die DNA kann doppelsträngig oder einzelsträngig sein, und wenn sie einzelsträngig ist, kann sie den codierenden Strang oder den nicht-codierenden Strang (Antisense-Strang) darstellen. Die codierende Sequenz, die das reife Polypeptid codiert, kann mit der in **Fig.** 1 dargestellten codierenden Sequenz oder mit der des hinterlegten Clons identisch sein, oder sie kann eine andere codierende Sequenz darstellen, wobei die codierende Sequenz als Ergebnis der Redundanz oder Degeneration des genetischen Codes das gleiche reife Polypeptid wie die DNA von **Fig.** 1 oder die hinterlegte cDNA codiert.

[0025] Das Polynucleotid, welches das reife Polypeptid von **Fig.** 1 oder das durch die hinterlegte cDNA codierte reife Polypeptid codiert, kann umfassen: nur die codierende Sequenz für das reife Polypeptid; die codierende Sequenz für das reife Polypeptid und eine weitere codierende Sequenz, z.B. eine Leader- oder sekretorische Sequenz oder eine Proprotein-Sequenz; die codierende Sequenz für das reife Polypeptid (und gegebenenfalls eine weitere codierende Sequenz) und eine nicht-codierende Sequenz, z.B. Introns oder eine nicht-codierende Sequenz 5' und/oder 3' der codierenden Sequenz für das reife Polypeptid.

[0026] So beinhaltet der Begriff „Polynucleotid, das ein Polypeptid codiert" ein Polynucleotid, das nur eine codierende Sequenz für das Polypeptid umfasst, sowie ein Polynucleotid, das eine weitere codierende und/oder nicht-codierende Sequenz umfasst.

[0027] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Varianten der vorstehend beschriebenen Polynucleotide, die Fragmente des Polypeptids mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz von **Fig.** 1 oder des Polypeptids codieren, das durch die cDNA des hinterlegten Clons codiert ist. Die Variante des Polynucleotids kann eine natürlich vorkommende Allelvariante des Polynucleotids oder eine nicht natürlich vorkommende Variante des Polynucleotids sein.

[0028] Somit umfasst die vorliegende Erfindung Polynucleotide, die das gleiche reife Polypeptid wie in **Fig.** 1 dargestellt oder das gleiche reife Polypeptid codieren, das durch die cDNA des hinterlegten Clons codiert ist, sowie Varianten solcher Polynucleotide, wobei die Varianten ein Fragment des Polypeptids von **Fig.** 1 oder des Polypeptids codieren, das durch die cDNA des hinterlegten Clons codiert ist. Solche Nucleotidvarianten umfassen Deletionsvarianten, Substitutionsvarianten und Additions- oder Insertionsvarianten.

[0029] Wie vorstehend angegeben, kann das Polynucleotid eine codierende Sequenz aufweisen, die eine natürlich vorkommende Allelvariante der in **Fig.** 1 angegebenen codierenden Sequenz oder der codierenden Sequenz des hinterlegten Clons ist. Wie dem Fachmann bekannt ist, ist eine Allelvariante eine andere Form einer Polynucleotidsequenz, bei der eine Substitution, Deletion oder Addition von einem oder mehreren Nucleotiden vorliegt, wodurch die Funktion des codierten Polypeptids nicht wesentlich verändert wird.

[0030] Außerdem umfasst die vorliegende Erfindung Polynucleotide, in denen die codierende Sequenz für das reife Polypeptid im gleichen Leserahmen mit einem Polynucleotid fusioniert sein kann, das die Expression und Sekretion eines Polypeptids aus einer Wirtszelle unterstützt, z.B. mit einer Leader-Sequenz, die als sekretorische Sequenz fungiert, welche den Transport eines Polypeptids aus der Zelle hinaus steuert. Das Polypeptid, das eine Leader-Sequenz aufweist, ist ein Präprotein, von dem die Leader-Sequenz durch die Wirtszelle abgespalten werden kann, so dass die reife Form des Polypeptids gebildet wird. Außerdem können die Polynucleotide ein Proprotein codieren, welches das reife Protein plus weitere 5'-Aminosäurereste darstellt. Ein reifes Protein, das eine Prosequenz aufweist, ist ein Proprotein und stellt eine inaktiv Form des Proteins dar. So-

bald die Prosequenz abgespalten ist, liegt ein aktives reifes Protein vor.

[0031] So kann das Polynucleotid der vorliegenden Erfindung z.B. ein reifes Protein oder ein Protein, das eine Prosequenz aufweist, oder ein Protein codieren, das sowohl eine Prosequenz als auch eine Präsequenz (Leader-Sequenz) besitzt.

[0032] In den Polynucleotiden der vorliegenden Erfindung kann die codierende Sequenz auch an eine Markersequenz im Rahmen fusioniert sein, wodurch die Reinigung des Polypeptids der vorliegenden Erfindung ermöglicht wird. Die Markersequenz kann eine Hexahistidin-Markierung sein, die durch einen pQE-9-Vektor geliefert wird, um die Reinigung des reifen Polypeptids, das mit dem Marker fusioniert ist, im Fall eines bakteriellen Wirts zu ermöglichen, oder die Markersequenz kann z.B. eine Hämagglutinin-(HA)Markierung sein, wenn ein Säugerwirt, z.B. COS-7-Zellen, verwendet werden. Die HA-Markierung entspricht einem Epitop, das von dem Influenza-Hämagglutinin-Protein hergeleitet ist (Wilson, I., et al., Cell 37: 767, 1984).

[0033] Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Polynucleotide, die mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen hybridisieren, wenn zwischen den Sequenzen eine Identität von mindestens 70% besteht. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Polynucleotide, die unter stringenten Bedingungen mit den vorstehend beschriebenen Polynucleotiden hybridisieren. Der hier verwendete Begriff „stringente Bedingungen" bedeutet, dass eine Hybridisierung nur dann stattfindet, wenn eine Identität von mindestens 95% und vorzugsweise von mindestens 97% zwischen den Sequenzen vorliegt. Die Polynucleotide, die mit den vorstehend beschriebenen Polynucleotiden in einer bevorzugten Ausführungsform hybridisieren, codieren Polypeptide, die im Wesentlichen noch die gleiche biologische Funktion oder Aktivität wie das reife Polypeptid besitzen, das durch die cDNA von **Fig.** 1 oder durch die hinterlegte cDNA codiert ist.

[0034] Die hier angesprochene(n) Hinterlegung(en) wird (werden) nach dem Budapester Vertrag über die Internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zwecke von Patentverfahren aufrechterhalten. Diese Hinterlegungen werden lediglich zur Erleichterung bereitgestellt. Die Sequenz der in dem hinterlegten Material enthaltenen Polynucleotide und auch die Aminosäuresequenz der hierdurch codierten Polypeptide sind hier durch Bezugnahme eingeschlossen und dienen im Falle eines Konflikts bezüglich der hier vorliegenden Beschreibung der Sequenzen als Kontrolle. Eine Lizenz kann erforderlich sein, um das hinterlegte Material herzustellen, zu verwenden oder zu verkaufen, wobei hierdurch keine solche Lizenz erteilt wird.

[0035] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein VEGF2-Polypeptid, das die abgeleitete Aminosäuresequenz von **Fig.** 1 oder die durch die hinterlegte cDNA codierte Aminosäuresequenz aufweist, sowie Fragmente eines solchen Polypeptids.

[0036] Der Begriff „Fragment", wenn er sich auf das Polypeptid von **Fig.** 1 oder auf das durch die hinterlegte cDNA codierte Polypeptid bezieht, bedeutet ein Polypeptid, das im Wesentlichen noch die gleiche biologische Funktion oder Aktivität wie ein solches Polypeptid besitzt. Die Proproteine können durch Abspalten des Proprotein-Teils aktiviert werden, wodurch ein aktives reifes Polypeptid hergestellt wird.

[0037] Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann ein rekombinantes Polypeptid, ein natürliches Polypeptid oder ein synthetisches Polypeptid, vorzugsweise ein rekombinantes Polypeptid, sein.

[0038] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung können (i) ein Polypeptid sein, in dem einer oder mehrere der Aminosäurereste durch einen konservierten oder nicht-konservierten Aminosäurerest (vorzugsweise einen konservierten Aminosäurerest) substituiert ist bzw. sind, wobei ein solcher substituierter Aminosäurerest einer sein kann, der durch den genetischen Code codiert ist, dies muss jedoch nicht der Fall sein, oder (ii) ein Polypeptid sein, in dem einer oder mehrere der Aminosäurereste eine Substituentengruppe umfasst bzw. umfassen, oder (iii) ein Polypeptid sein, in dem das reife Polypeptid an eine andere Verbindung fusioniert ist, z.B. eine Verbindung, um die Halbwertszeit des Polypeptids zu verlängern (z.B. Polyethylenglykol), oder (iv) ein Polypeptid sein, in dem die weiteren Aminosäuren an das reife Polypeptid gebunden sind, z.B. eine Leader- oder sekretorische Sequenz oder eine Sequenz, die zur Reinigung des reifen Polypeptids verwendet wird, oder eine Proprotein-Sequenz.

[0039] Die Polypeptide und Polynucleotide der vorliegenden Erfindung werden vorzugsweise in einer isolierten Form bereitgestellt und werden vorzugsweise zur Homogenität gereinigt.

[0040] Der Begriff „isoliert" bedeutet, dass das Material aus seiner ursprünglichen Umgebung (z.B. der natürlichen Umgebung, sofern es in der Natur vorkommt) entfernt ist. Z.B. ist ein natürlich vorkommendes Polynu-

cleotid oder Polypeptid, das in einem lebenden Tier vorliegt, nicht isoliert, dagegen ist das gleiche Polynucleotid, die gleiche DNA oder das gleiche Polypeptid isoliert, wenn es von einigen oder allen der in dem natürlichen System gleichzeitig vorliegenden Stoffe getrennt ist. Ein solches Polynucleotid könnte Teil eines Vektors und/oder ein solches Polynucleotid oder Polypeptid könnte Teil einer Zusammensetzung sein und dann immer noch isoliert vorliegen, da ein solcher Vektor oder eine solche Zusammensetzung kein Teil seiner natürlichen Umgebung ist.

[0041] Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, die Polynucleotide der vorliegenden Erfindung umfassen, Wirtszellen, die mit Vektoren der vorliegenden Erfindung gentechnisch verändert sind, und die Herstellung von Polypeptiden der Erfindung durch Rekombinations-Verfahren.

[0042] Wirtszellen werden mit den Vektoren der vorliegenden Erfindung, die z.B. ein Clonierungsvektor oder ein Expressionsvektor sein können, gentechnisch verändert (transduziert, transformiert oder transfiziert). Der Vektor kann z.B. in Form eines Plasmids, eines Viruspartikels, eines Phagen usw. vorliegen. Die veränderten Wirtszellen können in herkömmlichen Nährmedien gezüchtet werden, die geeignet modifiziert sind, um Promotoren zu aktivieren, Transformanten zu selektieren oder die VEGF2-Gene zu amplifizieren. Die Kulturbedingungen, z.B. Temperatur, pH-Wert und dergleichen, sind genauso, wie sie früher für die für die Expression ausgewählten Wirtszellen eingesetzt wurden, und sie sind dem Fachmann geläufig.

[0043] Das Polynucleotid der vorliegenden Erfindung kann eingesetzt werden, um ein Polypeptid anhand von Rekombinations-Techniken herzustellen. So kann die Polynucleotidsequenz z.B. in ein beliebiges von verschiedenen Expressionsvehikeln, insbesondere Vektoren oder Plasmiden, eingefügt werden, um ein Polypeptid zu exprimieren. Solche Vektoren umfassen chromosomale, nicht-chromosomale und synthetische DNA-Sequenzen, z.B. Derivate von SV40; bakterielle Plasmide; Phagen-DNA; Hefe-Plasmide; Vektoren, hergeleitet von Kombinationen aus Plasmiden und Phagen-DNA, Virus-DNA, z.B. Vaccinia, Adenovirus, Geflügelpocken-Virus und Pseudorabies. Jedoch kann auch jedes beliebige andere Plasmid oder jeder beliebige andere Vektor verwendet werden, so lange es/er in dem Wirt replizierbar und lebensfähig ist.

[0044] Wie vorstehend beschrieben, kann die geeignete DNA-Sequenz in den Vektor durch eine Vielzahl von Verfahren eingefügt werden. Im Allgemeinen wird die DNA-Sequenz in eine geeignete Restriktionsendonuclease-Stelle durch Verfahren eingefügt, die dem Fachmann bekannt sind. Solche und weitere Verfahren sollen im Umfang des Wissens eines Fachmanns liegen.

[0045] Die DNA-Sequenz ist im Expressionsvektor mit (einer) geeigneten Expressionskontrollsequenz(en) (Promotor) funktionell verbunden, um die mRNA-Synthese zu steuern. Als repräsentative Beispiele solcher Promotoren können erwähnt werden: LTR oder SV40-Promotor, der lac- oder trp-Promotor von E. coli, der P_L-Promotor des Lambda-Phagen und andere Promotoren, von denen bekannt ist, dass sie die Expression von Genen in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen oder ihren Viren steuern. Ferner enthält der Expressionsvektor eine Ribosomenbindungsstelle für die Initiation der Translation und einen Transkriptions-Terminator. Ferner kann der Vektor geeignete Sequenzen zum Verstärken der Expression umfassen.

[0046] Außerdem enthalten die Expressionsvektoren vorzugsweise ein Gen, um ein phänotypisches Merkmal für die Selektion von transformierten Wirtszellen bereitzustellen, z.B. die Dihydrofolat-Reduktase oder eine Neomycin-Resistenz für eine eukaryontische Zellkultur oder z.B. eine Tetracyclin- oder Ampicillin-Resistenz in E. coli.

[0047] Der Vektor, der die geeignete DNA-Sequenz, wie vorstehend beschrieben, und außerdem einen geeigneten Promotor oder eine geeignete Kontrollsequenz enthält, kann eingesetzt werden, um einen geeigneten Wirt zu transformieren, so dass der Wirt in die Lage versetzt wird, das Protein zu exprimieren. Als repräsentative Beispiele von geeigneten Wirten können erwähnt werden: Bakterienzellen, z.B. E. coli, Salmonella typhimurium, Streptomyces; Pilzzellen, z.B. Hefen; Insektenzellen, z.B. Drosophila und Sf9; tierische Zellen, z.B. CHO, COS oder Bowes-Melanom; Pflanzenzellen usw.. Die Auswahl eines geeigneten Wirts kann der Fachmann anhand der hier gemachten Angaben treffen.

[0048] Insbesondere umfasst die vorliegende Erfindung auch rekombinante Konstrukte, die eine oder mehrere der vorstehend gründlich beschrieben Sequenzen enthalten. Die Konstrukte umfassen einen Vektor, z.B. ein Plasmid oder einen viralen Vektor, in den eine Sequenz der Erfindung in Vorwärts- oder Rückwärts-Orientierung eingefügt wurde. In einem bevorzugten Aspekt dieser Ausführungsform enthält das Konstrukt weiterhin regulatorische Sequenzen, umfassend z.B. einen Promotor, der mit der Sequenz funktionell verbunden ist. Dem Fachmann sind zahlreiche geeignete Vektoren und Promotoren bekannt, die im Handel verfügbar sind.

Die folgenden Vektoren dienen als Beispiel. Bakterielle: pQE70, pQE9 (Qiagen), pBs, Phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eukaryontische: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Jedoch kann jedes beliebige andere Plasmid oder jeder beliebige andere Vektor eingesetzt werden, so lange sie im Wirt replizierbar und lebensfähig sind.

[0049] Promotorregionen von einem beliebigen gewünschten Gen können unter Verwendung von CAT-(Chloramphenicol-Transferase)Vektoren oder anderen Vektoren mit selektierbaren Markern ausgewählt werden. Zwei geeignete Vektoren sind pKK232-8 und pCM7. Besonders genannte bakterielle Promotoren umfassen lacI, lacZ, T3, T7, gpt, Lambda-P_R, P_L und trp. Eukaryontische Promotoren umfassen den unmittelbaren frühen Promotor von CMV, den Thymidinkinase-Promotor von HSV, den frühen und späten SV40-Promotor, LTRs von Retrovirus und den Metallothionein-I-Promotor der Maus. Die Auswahl des geeigneten Vektors und Promotors kann vom Fachmann durchgeführt werden.

[0050] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Wirtszellen, die das vorstehend beschriebene Konstrukt enthalten. Die Wirtszelle kann eine höhere eukaryontische Zelle, z.B. eine Säugerzelle, oder eine niedrigere eukaryontische Zelle, z.B. eine Hefezelle, sein, oder die Wirtszelle kann eine prokaryontische Zelle sein, z.B. eine Bakterienzelle. Das Konstrukt kann in die Wirtszelle durch Calciumphosphat-Transfektion, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion oder Elektroporation eingeführt werden (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, 1986).

[0051] Die Konstrukte in den Wirtszellen können in herkömmlicher Weise eingesetzt werden, um das durch die rekombinante Sequenz codierte Genprodukt zu exprimieren. Andererseits können die Polypeptide der vorliegenden Erfindung auch durch herkömmliche Peptidsynthesegeräte synthetisch hergestellt werden.

[0052] Reife Proteine können in Säugerzellen, Hefe-, Bakterien- oder anderen Zellen unter der Kontrolle geeigneter Promotoren exprimiert werden. Außerdem können zellfreie Translationssysteme verwendet werden, um solche Proteine unter Verwendung von RNAs herzustellen, die von den DNA-Konstrukten der vorliegenden Erfindung stammen. Geeignete Clonierungs- und Expressionsvektoren zur Verwendung bei prokaryontischen und eukaryontischen Wirten werden von Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Aufl., (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), beschrieben, diese Beschreibung ist hier durch Bezugnahme eingeschlossen.

[0053] Die Transkription einer die Polypeptide der vorliegenden Erfindung codierenden DNA durch höhere Eukaryonten wird gesteigert, indem eine Enhancer-Sequenz in den Vektor eingefügt wird. Enhancer sind cis-wirkende Elemente der DNA mit üblicherweise etwa 10 bis 300 bp, die auf einen Promotor einwirken, so dass seine Transkription gesteigert wird. Beispiele umfassen den SV40-Enhancer auf der späten Seite des Replikationsursprungs (bp 100 bis 270), einen frühen Promotor-Enhancer des Cytomegalievirus, einen Polyoma-Enhancer auf der späten Seite des Replikationsursprungs und Adenovirus-Enhancer.

[0054] Im Allgemeinen umfassen rekombinante Expressionsvektoren Replikationsursprünge und selektierbare Marker, die eine Transformation der Wirtszelle erlauben, z.B. das Ampicillin-Resistenz-Gen von E. coli, und das TRP1-Gen von S. cerevisiae, und einen Promotor, der von einem stark exprimierten Gen stammt, um die Transkription einer stromabwärts liegenden Struktursequenz zu steuern. Solche Promotoren können von Operons stammen, die glycolytische Enzyme, z.B. 3-Phosphoglyceratkinase (PGK), α-Faktor, saure Phosphatase, oder Hitzeschockproteine u.a. codieren. Die heterologe Struktursequenz wird in geeigneter Phase an Translations-Initiations- und -Terminationssequenzen und vorzugsweise an eine Leader-Sequenz angefügt, die in der Lage ist, die Sekretion eines translatierten Proteins in den periplasmatischen Raum oder das extrazelluläre Medium zu steuern. Gegebenenfalls kann die heterologe Sequenz ein Fusionsprotein codieren, umfassend ein N-terminales Identifizierungspeptid, das gewünschte Eigenschaften verleiht, z.B. eine Stabilisierung oder vereinfachte Reinigung des exprimierten rekombinanten Produkts.

[0055] Geeignete Expressionsvektoren für die Verwendung in Bakterien werden konstruiert, indem eine Struktur-DNA-Sequenz, die ein gewünschtes Protein codiert, zusammen mit geeigneten Translations-Initiations- und -Terminationssignalen in funktioneller Lesephase zusammen mit einem funktionellen Promotor eingefügt wird. Der Vektor umfasst einen oder mehrere selektierbare phänotypische Marker und einen Replikationsursprung, um die Aufrechterhaltung des Vektors sicherzustellen und um gegebenenfalls eine Amplifikation innerhalb des Wirts bereitzustellen. Geeignete prokaryontische Wirte für die Transformation umfassen E. coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium und verschiedene Arten der Gattungen Pseudomonas, Streptomyces und Staphylococcus, wobei jedoch auch andere wahlweise verwendet werden können.

[0056] Als repräsentatives, jedoch nicht-einschränkendes Beispiel können geeignete Expressionsvektoren für die Verwendung in Bakterien einen selektierbaren Marker und einen bakteriellen Replikationsursprung umfassen, hergeleitet von im Handel verfügbaren Plasmiden, umfassend genetische Elemente des bekannten Clonierungsvektors pBR322 (ATCC 37017). Solche kommerziellen Vektoren umfassen z.B. pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) und GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Diese pBR322-„Grundgerüst"-Abschnitte werden mit einem geeigneten Promotor und der Struktursequenz, die exprimiert werden soll, kombiniert.

[0057] Nach der Transformation eines geeigneten Wirtsstamms und dem Wachstum des Wirtsstamms bis zu einer geeigneten Zelldichte, wird der gewählte Promotor durch geeignete Mittel dereprimiert (z.B. durch eine Temperaturverschiebung oder eine chemische Induktion) und die Zellen werden eine weitere Zeitspanne gezüchtet.

[0058] Die Zellen werden typischerweise durch Zentrifugation geerntet, durch physikalische oder chemische Verfahren aufgeschlossen und der resultierende Rohextrakt wird für eine weitere Reinigung zurückbehalten.

[0059] Mikrobielle Zellen, die für die Expression von Proteinen verwendet werden, können durch ein zweckmäßiges Verfahren aufgeschlossen werden, umfassend Zyklen mit Einfrieren und Auftauen, Beschallung, mechanisches Aufschließen oder die Verwendung von Zell-lysierenden Mitteln.

[0060] Außerdem können verschiedene Säugerzell-Kultursysteme eingesetzt werden, um ein rekombinantes Protein zu exprimieren. Beispiele von Säuger-Expressionssystemen umfassen die COS-7-Linien von Affennieren-Fibroblasten, beschrieben von Gluzman, Cell 23: 175, 1981, und andere Zelllinien, die in der Lage sind, einen kompatiblen Vektor zu exprimieren, z.B. die Zelllinien C127, 3T3, CHO, HeLa und BHK. Säuger-Expressionsvektoren umfassen einen Replikationsursprung, einen geeigneten Promotor und Enhancer und außerdem die erforderlichen Ribosomenbindungsstellen, Polyadenylierungsstelle, Spleiß-Donor- und Akzeptorstellen, Transkriptions-Terminationssequenzen und 5'-flankierende nicht-transkribierte Sequenzen. DNA-Sequenzen, die von dem SV40-Virusgenom stammen, z.B. SV40-Ursprung, früher Promotor, Enhancer, Spleiß- und Polyadenylierungsstellen, können verwendet werden, um die erforderlichen nicht-transkribierten genetischen Elemente bereitzustellen.

[0061] VEGF2 wird aus rekombinanten Zellkulturen durch Verfahren gewonnen und gereinigt, die früher schon verwendet wurden, umfassend Ammoniumsulfat- oder Ethanolfällung, Säureextraktion, Anionen- oder Kationenaustausch-Chromatographie, Phosphocellulose-Chromatographie, hydrophobe-Wechselwirkung-Chromatographie, Affinitäts-Chromatographie, Hydroxyapatit-Chromatographie und Lectin-Chromatographie. Vorzugsweise sollten während der Reinigung niedrige Konzentrationen (etwa 0,1 bis 5 mM) von Calciumionen vorliegen (Price et al., J. Biol. Chem. 244: 917, 1969). Gegebenenfalls können Schritte zum Umfalten von Proteinen verwendet werden, um die Konfiguration des reifen Proteins zu vervollständigen. Schließlich kann eine Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) für die letzten Reinigungsschritte eingesetzt werden.

[0062] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung können ein natürlich gereinigtes Produkt oder ein durch chemische Syntheseverfahren hergestelltes Produkt sein, oder sie können durch Rekombinations-Verfahren anhand eines prokaryontischen oder eukaryontischen Wirts produziert werden (z.B. durch Bakterien-, Hefe-, höhere Pflanzen-, Insekten- und Säugerzellen in Kultur). Abhängig von dem in einem Rekombinations-Verfahren verwendeten Wirt können die Polypeptide der vorliegenden Erfindung mit Säuger- oder anderen eukaryontischen Kohlenhydraten glycosyliert sein, oder sie können nicht-glycosyliert sein.

[0063] VEGF2 kann als Wundheilungsmittel eingesetzt werden, insbesondere wenn es erforderlich ist, geschädigte Gewebe zu revaskularisieren, oder wenn eine neue Kapillarangiogenese wichtig ist. Deshalb kann er zur Behandlung von Vollhautwunden eingesetzt werden, z.B. Hautulzera, umfassend Druckgeschwüre, venöse Ulzera und diabetische Ulzera. Außerdem kann er in der Behandlung von Verbrennungen dritten Grades und Vollhautverletzungen verwendet werden, wo eine Angiogenese wünschenswert ist, um die Brandwunde an den verletzten Stellen für ein Hauttransplantat und einen Hautlappen vorzubereiten. In diesem Fall sollte er direkt auf die Stellen aufgetragen werden. Genauso kann VEGF2 in der plastischen Chirurgie eingesetzt werden, wenn eine Rekonstruktion nach einer Verbrennung oder einer anderen Verletzung oder auch aus kosmetischen Gründen erforderlich ist.

[0064] Außerdem kann VEGF2 eingesetzt werden, um das Wachstum von geschädigtem Knochen-, Periodontium- oder Bändergewebe zu induzieren. Er kann bei einer Erkrankung des Periodontiums eingesetzt wer-

den, wobei VEGF2 in einem Methylcellulose-Gel auf die Wurzeln der erkrankten Zähne aufgetragen wird, diese Behandlung könnte dazu führen, dass sich neuer Knochen und Zement mit einwachsenden Kollagenfasern bilden. Er kann zum Regenerieren des Stützgewebes von Zähnen verwendet werden, umfassend Alveolarknochen, Zement und Periodontium, die durch Krankheit und Verletzung beschädigt wurden.

[0065] Da die Angiogenese beim Sauberhalten von Wunden und Verhindern einer Infektion wichtig ist, kann VEGF2 in Zusammenhang mit Operationen und nach dem Verschließen von Einschnitten eingesetzt werden. Besonders gut sollte er für die Behandlung von Abdominalwunden geeignet sein, bei denen ein hohes Infektionsrisiko besteht.

[0066] VEGF2 kann für die Unterstützung der Endothelialisierung bei Gefäßersatzoperationen verwendet werden. Im Fall von Gefäßersatzmaterial, wobei entweder transplantiertes oder synthetisches Material eingesetzt wird, kann VEGF2 auf die Oberfläche des Ersatzmaterials oder auf den Übergang aufgetragen werden, um das Wachstum der Gefäßendothelzellen zu unterstützen. Hieraus folgt, dass VEGF2 eingesetzt werden kann, um die Schädigung eines Myokardinfarkts und anderer Ereignisse, bei denen eine Koronarbypassoperation erforderlich ist, zu beheben, indem das Wachstum des transplantierten Gewebes stimuliert wird. Hierzu zählt auch die Verwendung von VEGF2 zum Wiederherstellen des Herz-Gefäßsystems nach einer Ischämie.

[0067] Die Identifizierung von VEGF2 kann dazu genutzt werden, bestimmte Inhibitoren des Gefäßendothel-Wachstumsfaktors zu erzeugen. Da die Angiogenese und die Neovaskularisation beim Wachstum solider Tumoren essentielle Schritte darstellen, ist die Hemmung der angiogenen Aktivität des Gefäßendothel-Wachstumsfaktors sehr gut dazu geeignet, das weitere Wachstum zu verhindern, zu verzögern oder sogar eine Regression solider Tumore zu erreichen. Obwohl die Expressionsrate von VEGF2 in normalen Geweben, einschließlich Brustgewebe, extrem niedrig ist, wurde bei mindestens zwei Brustkrebs-Zelllinien, die von malignen Tumoren stammen, gefunden, dass der Faktor in mittleren Spiegeln exprimiert wird. Somit ist es möglich, dass VEGF2 an der Angiogenese und am Wachstum von Tumoren beteiligt ist.

[0068] VEGF2 kann zum in vitro-Züchten von Gefäßendothelzellen verwendet werden, wobei er zum konditionierten Medium in einer Konzentration von 10 pg/ml bis 10 ng/ml zugegeben werden kann.

[0069] Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann auch gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden, indem ein solches Polypeptid in vivo exprimiert wird, wobei dieses Verfahren häufig als „Gentherapie" bezeichnet wird.

[0070] So können z.B. Zellen wie Knochenmarkzellen mit einem Polynucleotid (DNA oder RNA), welches das Polypeptid codiert, ex vivo verändert werden, anschließend werden die veränderten Zellen an einen Patienten verabreicht, der mit dem Polypeptid behandelt werden soll. Solche Verfahren sind dem Fachmann bekannt. Z.B. können Zellen durch Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, verändert werden, wobei ein Retroviruspartikel eingesetzt wird, welches eine RNA enthält, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert.

[0071] Genauso können Zellen in vivo gentechnisch verändert werden, so dass sie das Polypeptid in vivo exprimieren, wobei z.B. Verfahren verwendet werden, die dem Fachmann bekannt sind. Wie dem Fachmann bekannt ist, kann eine Produzentenzelle zum Herstellen eines Retrovirus-Partikels, das die RNA enthält, welche das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, an einen Patienten verabreicht werden, so dass die Zellen in vivo verändert werden und die Expression des Polypeptids in vivo erfolgt. Diese und andere Verfahren zum Verabreichen eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung durch solche Verfahren sollten für den Fachmann aus den Angaben der vorliegenden Erfindung ersichtlich sein. Z.B. kann das Expressionsvehikel zum Verändern von Zellen ein anderes als ein Retrovirus-Partikel sein, z.B. ein Adenovirus, das nach Kombination mit einem geeigneten Transportvehikel eingesetzt werden kann, um Zellen in vivo zu verändern.

[0072] Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann in Kombination mit einem geeigneten pharmazeutischen Träger verwendet werden. Solche Zusammensetzungen umfassen eine therapeutisch wirksame Menge des Proteins und einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Exzipienten. Ein solcher Träger umfasst, ist jedoch nicht beschränkt auf Kochsalzlösung, gepufferte Kochsalzlösung, Dextrose, Wasser, Glycerin, Ethanol und Kombinationen davon. Die Formulierung sollte für die Verabreichungsart geeignet sein.

[0073] Außerdem stellt die Erfindung eine pharmazeutische Packung oder einen Kit bereit, umfassend einen oder mehrere Behälter, die mit einem oder mehreren der Bestandteile der Arzneimittel der Erfindung gefüllt sind. Zusammen mit einem solchen Behälter (mit solchen Behältern) kann eine schriftliche Mitteilung in der Form vorliegen, wie sie von der Regierungsbehörde vorgeschrieben ist, welche die Herstellung, Verwendung

oder den Verkauf von pharmazeutischen oder biologischen Produkten überwacht, wobei in der Mitteilung die Genehmigung für die Herstellung, Verwendung oder den Verkauf für die Verabreichung an Menschen durch die Behörde enthalten ist. Außerdem kann das Polypeptid der vorliegenden Erfindung zusammen mit anderen therapeutischen Verbindungen eingesetzt werden.

[0074] Die Arzneimittel können in zweckmäßiger Weise verabreicht werden, z.B. über die orale und intravenöse Route, bevorzugt werden sie topisch verabreicht. Die Mengen und Dosierungsschemata von VEGF2, die an ein Individuum verabreicht werden, hängen von einer Reihe von Faktoren ab, z.B. der Verabreichungsart, der Art des Zustands, der behandelt werden soll, dem Körpergewicht des Individuums, das behandelt werden soll, und der Beurteilung des verordnenden Arztes. Allgemein gesagt wird das Mittel z.B. in therapeutisch wirksamen Dosen von mindestens etwa 10 µg/kg Körpergewicht verabreicht, und in den meisten Fällen würde es in einer Menge verabreicht werden, die etwa 8 mg/kg Körpergewicht pro Tag nicht übersteigt, und vorzugsweise reicht die Dosierung von etwa 10 µg/kg Körpergewicht bis etwa 1 mg/kg Körpergewicht pro Tag, wobei die Verabreichungsrouten, die Symptome usw. berücksichtigt werden.

[0075] Die Sequenzen der vorliegenden Erfindung können auch zur Identifizierung von Chromosomen eingesetzt werden. Die Sequenz zielt spezifisch auf eine bestimmte Position auf einem einzelnen menschlichen Chromosom und kann damit hybridisieren. Außerdem besteht allgemein ein Bedarf, bestimmte Stellen auf dem Chromosom zu identifizieren. Zurzeit sind nur wenige Chromosomen-markierende Reagenzien verfügbar, die auf aktuellen Sequenzdaten beruhen (Wiederholungs-Polymorphismen), um bestimmte Positionen auf einem Chromosom zu markieren. Die Kartierung von DNAs auf Chromosomen gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein wichtiger erster Schritt, um solche Sequenzen den Genen zuzuordnen, die mit einer bestimmten Krankheit assoziiert sind.

[0076] Kurz gesagt, können Sequenzen auf Chromosomen kartiert werden, indem man PCR-Primer (vorzugsweise 15 bis 25 bp) aus der cDNA herstellt. Anhand einer Computeranalyse der cDNA können rasch die Primer selektiert werden, die in der genomischen DNA nicht mehr als ein einziges Exon überspannen, wodurch der Amplifikationsprozess kompliziert wird. Danach werden diese Primer für eine PCR-Durchmusterung von somatischen Zellhybriden eingesetzt, die einzelne menschliche Chromosomen enthalten. Nur diejenigen Hybride, die das menschliche Gen enthalten, das dem Primer entspricht, werden ein amplifiziertes Fragment ergeben.

[0077] Die PCR-Kartierung von somatischen Zellhybriden ist ein schnelles Verfahren, mit dem eine bestimmte DNA einem bestimmten Chromosom zugeordnet werden kann. Unter Verwendung der vorliegenden Erfindung kann mit den gleichen Oligonucleotid-Primern mit Gruppen von Fragmenten aus spezifischen Chromosomen oder Pools aus großen genomischen Clonen in entsprechender Weise eine Sublokalisation erreicht werden. Andere Kartierungsstrategien, die genauso zum Kartieren eingesetzt werden können, um die Position auf einem bestimmten Chromosom zu bestimmen, umfassen die in situ-Hybridisierung, die Vorabdurchmusterung mit markierten Durchfluss-sortierten Chromosomen und die Vorauswahl durch Hybridisierung, um Chromosomen-spezifische cDNA-Banken zu konstruieren.

[0078] Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) eines cDNA-Clons auf eine Aufspreitung von Metaphase-Chromosomen kann verwendet werden, um in einem einzigen Schritt eine genaue Position auf dem Chromosom zu bestimmen. Dieses Verfahren kann mit einer kurzen cDNA von 500 oder 600 Basen durchgeführt werden; jedoch haben Clone mit mehr als 2000 bp eine größere Wahrscheinlichkeit, dass sie an eine einmalige Chromosomenposition mit einer ausreichenden Signalintensität binden, so dass ein einfacher Nachweis möglich ist. Für eine FISH ist die Verwendung des Clons erforderlich, aus dem der EST stammt, wobei gilt, je länger desto besser. Z.B. sind 2000 bp gut, 4000 sind besser, und mehr als 4000 sind möglicherweise nicht erforderlich, um gute Ergebnisse in einem vernünftigen Zeitrahmen zu erhalten. Ein Übersichtsartikel zu dieser Technik findet sich in Verma et al., Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques. Pergamon Press, New York (1988).

[0079] Sobald eine Sequenz auf eine bestimmte Chromosomenposition kartiert wurde, kann die physikalische Position der Sequenz auf dem Chromosom mit den Daten der genetischen Karte korreliert werden. (Solche Daten finden sich z.B. in: V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (online verfügbar über Johns Hopkins University Welch Medical Library). Der Zusammenhang zwischen Genen und Krankheiten, die auf die gleiche Chromosomenregion kartiert wurden, kann sodann durch Kopplungsanalysen aufgeklärt werden (gemeinsame Vererbung von physikalisch nebeneinander liegenden Genen).

[0080] Als nächstes ist es erforderlich, die Unterschiede in der cDNA oder genomischen Sequenz zwischen

betroffenen und nicht betroffenen Individuen zu bestimmen. Wenn man eine Mutation bei einigen oder allen betroffenen Individuen, jedoch bei keinem der normalen Individuen feststellt, ist es wahrscheinlich, dass die Mutation das verursachende Agens der Krankheit ist.

[0081] Mit der derzeitigen Auflösung der Verfahren zur physikalischen Kartierung und genetischen Kartierung könnte eine cDNA, deren Position genau auf einer Chromosomenregion bestimmt wird, die mit der Krankheit assoziiert ist, einen Bereich zwischen 50 und 500 möglichen verursachenden Genen abdecken. (Dabei geht man von einer Auflösung bei der Kartierung von 1 Megabase und einem Gen pro 20 kb aus.)

[0082] Der Vergleich von betroffenen und nicht betroffenen Individuen umfasst im Allgemeinen zuerst, dass in den Chromosomen nach strukturellen Veränderungen gesucht wird, z.B. Deletionen oder Translokationen, die von Chrommosomenaufspreitungen sichtbar sind oder unter Verwendung einer auf dieser cDNA-Sequenz basierten PCR nachweisbar sind. Schließlich ist die vollständige Sequenzierung von Genen aus verschiedenen Individuen erforderlich, um das Vorliegen einer Mutation zu bestätigen und Mutationen von Polymorphismen zu unterscheiden.

[0083] Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Hemmung von VEGF2 in vivo durch die Verwendung der Antisense-Technologie. Die Antisense-Technologie kann eingesetzt werden, um die Genexpression durch eine Dreifaxhelix-Bildung oder Antisense-DNA oder RNA zu steuern, wobei beide Verfahren auf der Bindung eines Polynucleotids an DNA oder RNA beruhen. Z.B. wird der codierende 5'-Teil der reifen Polynucleotidsequenz, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, verwendet, um ein Antisense-RNA-Oligonucleotid mit einer Länge von 10 bis 40 Basenpaaren zu entwerfen. Ein DNA-Oligonucleotid wird so entworfen, dass es zu einer Region des Gens komplementär ist, die an der Transkription beteiligt ist (Dreifaxhelix: vgl. Lee et al., Nucl. Acids Res. 6: 3073, 1979; Cooney et al., Science 241: 456, 1988; und Dervan et al., Science 251: 1360, 1991), wodurch die Transkription und die Produktion von VEGF2 verhindert werden. Das Antisense-RNA-Oligonucleotid hybridisiert mit der mRNA in vivo und blockiert die Translation eines mRNA-Moleküls zu dem VEGF2 (Antisense: Okano, J. Neurochem. 56: 560, 1991; Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)).

[0084] Andererseits können die vorstehend beschriebenen Oligonucleotide durch Verfahren nach dem Stand der Technik an Zellen verabreicht werden, so dass die Antisense-RNA oder -DNA in vivo exprimiert werden kann, wodurch die Produktion von VEGF2 in der vorstehend beschriebenen Weise gehemmt wird.

[0085] Antisense-Konstrukte für VEGF2 können somit die angiogene Aktivität des VEGF2 hemmen und das weitere Wachstum von soliden Tumoren verhindern oder sogar ihre Regression bewirken, da die Angiogenese und die Neovaskularisation im Wachstum von soliden Tumoren essentielle Schritte darstellen. Diese Antisense-Konstrukte können auch eingesetzt werden, um rheumatoide Arthritis, Psoriasis und diabetische Retinopathie zu behandeln, die alle durch eine abnorme Angiogenese gekennzeichnet sind.

[0086] Die Polypeptide, ihre Fragmente oder Zellen, die sie exprimieren, können als Immunogen verwendet werden, um Antikörper hiergegen zu erzeugen. Diese Antikörper können z.B. polyclonale oder monoclonale Antikörper sein. Die vorliegende Erfindung umfasst auch chimäre, Einzelketten- und humanisierte Antikörper, außerdem Fab-Fragmente oder das Produkt einer Fab-Expressionsbank. Zum Herstellen solcher Antikörper und Fragmente können verschiedene Verfahren verwendet werden, die dem Fachmann bekannt sind.

[0087] Antikörper, die gegen das Polypeptid erzeugt werden, das einer Sequenz der vorliegenden Erfindung entspricht, können durch direkte Injektion des Polypeptids in ein Tier oder durch Verabreichen des Polypeptids an ein Tier, das vorzugsweise kein Mensch ist, hergestellt werden. Der auf diese Weise erhaltene Antikörper wird sodann an das Polypeptid selbst binden. Auf diese Weise kann sogar eine Sequenz, die nur ein Fragment des Polypeptids codiert, verwendet werden, um Antikörper zu erzeugen, die an das vollständige native Polypeptid binden. Anschließend können solche Antikörper eingesetzt werden, um das Polypeptid aus einem Gewebe zu isolieren, das dieses Polypeptid exprimiert. Zum Herstellen von monoclonalen Antikörpern kann eine beliebige Technik eingesetzt werden, mit der Antikörper bereitgestellt werden, die durch kontinuierliche Zelllinien-Kulturen erzeugt werden. Beispiele umfassen das Hybridom-Verfahren (Köhler und Milstein, Nature 256: 495–497, 1975), das Triom-Verfahren, das menschliche B-Zell-Hybridom-Verfahren (Kozbor et al., Immunology Today 4: 72, 1983) und das EBV-Hybridom-Verfahren, um menschliche monoclonale Antikörper herzustellen (Cole et al., 1985, in: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., S. 77–96).

[0088] Die Verfahren, die zur Produktion von Einzelkettenantikörpern beschrieben wurden (US-Patent 4 946 778) können so angepasst werden, dass Einzelkettenantikörper gegen immunogene Polypeptidprodukte der

vorliegenden Erfindung erzeugt werden.

[0089] Neutralisierende Antikörper können identifiziert und angewendet werden, um den Gefäßendothel-Wachstumsfaktor zu maskieren; dies wurde in Mausmodellsystemen gegen VEGF gezeigt. VEGF2 kann auch durch bestimmte dominante negative Mutanten innerhalb des Gens selbst inaktiviert werden. Es ist bekannt, dass sowohl PDGFα als auch -β entweder Heterodimere oder Homodimere bildet und dass VEGF Homodimere bildet. Man kann davon ausgehen, dass bei VEGF2 eine ähnliche Wechselwirkung vorliegt. Diese Antikörper können somit eingesetzt werden, um die angiogene Aktivität von VEGF2 zu blockieren und das Wachstum solider Tumoren zu verlangsamen. Außerdem können diese Antikörper dazu verwendet werden, eine Entzündung zu behandeln, die durch eine gesteigerte Gefäßpermeabilität verursacht ist, welche durch das Vorliegen von VEGF2 zustande kommt.

[0090] Weiterhin können diese Antikörper in einem Immuntest eingesetzt werden, um das Vorliegen von Tumoren in bestimmten Individuen nachzuweisen. Enzymimmuntests können an einer Blutprobe eines Individuums durchgeführt werden. Erhöhte Spiegel von VEGF2 können als Krebsdiagnose angesehen werden.

[0091] Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung Antagonisten/Inhibitoren der Polypeptide der vorliegenden Erfindung. Die Antagonisten/Inhibitoren sind solche, die die Funktion des Polypeptids hemmen oder ausschalten, wie in den Patentansprüchen definiert.

[0092] So binden z.B. Antagonisten an ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung und hemmen seine Funktion oder schalten sie aus. Der Antagonist könnte z.B. ein Antikörper gegen das Polypeptid sein, der an das Polypeptid bindet, oder in einigen Fällen ein Oligonucleotid.

[0093] Außerdem können verkürzte Versionen von VEGF2 hergestellt werden, die in der Lage sind, mit dem Wildtyp-VEGF2 zu interagieren und Dimere zu bilden, die das Wachstum von Endothelzellen nicht aktivieren können, so dass der endogene VEGF2 inaktiviert wird. Oder mutierte Formen von VEGF2 bilden selbst Dimere und besetzen zwar die Liganden-Bindungsdomäne der richtigen Tyrosinkinase-Rezeptoren auf der Zielzellen-Oberfläche, aktivieren jedoch nicht das Zellwachstum.

[0094] Die Antagonisten/Inhibitoren der vorliegenden Erfindung können verwendet werden, um eine Entzündung zu verhindern, die auf der gesteigerten Gefäßpermeabilitäts-Wirkung von VEGF2 beruht. Die Antagonisten/Inhibitoren können auch verwendet werden, um das Wachstum solider Tumoren, eine diabetische Retinopathie, Psoriasis und rheumatoide Arthritis zu behandeln.

[0095] Die Antagonisten/Inhibitoren der vorliegenden Erfindung können in einer Zusammensetzung zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, z.B. wie vorstehend beschrieben, verwendet werden.

[0096] Die vorliegende Erfindung wird mit Bezug auf die folgenden Beispiele noch weiter beschrieben; es ist jedoch so zu verstehen, dass die vorliegende Erfindung durch solche Beispiele in keiner Weise eingeschränkt werden soll. Alle Teile und Mengen beziehen sich auf das Gewicht, sofern nichts anderes angegeben ist.

[0097] Um die folgenden Beispiele besser verständlich zu machen, werden bestimmte, häufig vorkommende Verfahren und/oder Begriffe beschrieben.

[0098] „Plasmide" werden durch ein klein geschriebenes p, dem Großbuchstaben und/oder Ziffern vorangehen und/oder folgen, bezeichnet. Die hier verwendeten Ausgangsplasmide sind entweder im Handel erhältlich, öffentlich ohne Einschränkung zugänglich oder können aus verfügbaren Plasmiden gemäß veröffentlichten Verfahren konstruiert werden. Außerdem sind äquivalente Plasmide zu denen, die hier beschrieben sind, nach dem Stand der Technik bekannt und für den Fachmann ersichtlich.

[0099] „Spaltung" einer DNA bezieht sich auf eine katalytische Spaltung der DNA mit einem Restriktionsenzym, das nur auf bestimmte Sequenzen in der DNA wirkt. Die verschiedenen Restriktionsenzyme, die hier verwendet werden, sind im Handel erhältlich, und ihre Reaktionsbedingungen, Cofaktoren und andere Erfordernisse werden so verwendet, wie dem Fachmann bekannt ist. Für analytische Zwecke wird typischerweise 1 µg Plasmid oder DNA-Fragment zusammen mit etwa 2 Einheiten Enzym in etwa 20 µl Pufferlösung eingesetzt. Wenn DNA-Fragmente für die Plasmid-Konstruktion isoliert werden sollen, werden typischerweise 5 bis 50 µg DNA mit 20 bis 250 Einheiten Enzym in einem größeren Volumen gespalten. Geeignete Puffer und Substratmengen für bestimmte Restriktionsenzyme sind vom Hersteller angegeben. Normalerweise werden Inkubationszeiten von etwa einer Stunde bei 37°C verwendet, sie können jedoch auch gemäß den Anweisungen des

Herstellers variieren. Nach der Spaltung wird das Reaktionsgemisch direkt auf einem Polyacrylamid-Gel einer Elektrophorese unterworfen, um das gewünschte Fragment zu isolieren.

[0100] Die Größentrennung der gespaltenen Fragmente erfolgt unter Verwendung eines 8% Polyacrylamid-Gels, wie von Goeddel, D., et al., Nucleic Acids Res. 8: 4057, 1980, beschrieben.

[0101] Der Begriff „Oligonucleotide" bezieht sich entweder auf ein einzelsträngiges Polydesoxynucleotid oder auf zwei komplementäre Polydesoxynucleotidstränge, die chemisch synthetisiert werden können. Solche synthetischen Oligonucleotide haben kein 5'-Phosphat und werden sich somit nicht mit einem anderen Oligonucleotid ligieren, ohne dass ein Phosphat von einem ATP in Gegenwart einer Kinase angehängt wird. Ein synthetisches Oligonucleotid wird sich mit einem Fragment ligieren, das nicht dephosphoryliert wurde.

[0102] „Ligierung" bezieht sich auf den Prozess, bei dem zwischen zwei doppelsträngigen Nucleinsäurefragmenten Phosphodiesterbindungen gebildet werden (Maniatis, T., et al., ibid., S. 146). Wenn nichts anderes angegeben ist, kann eine Ligierung unter Verwendung bekannter Puffer und Bedingungen mit 10 Einheiten von T4-DNA-Ligase („Ligase") pro 0,5 µg von etwa äquimolaren Mengen der DNA-Fragmente, die ligiert werden sollen, erfolgen.

[0103] Wenn nichts anderes angegeben ist, wurde die Transformation wie beschrieben durch das Verfahren von Graham, F., und Van der Eb, A., Virology 52: 456–457, 1973, durchgeführt.

Beispiel 1

Expressionsmuster von VEGF2 in menschlichen Geweben und Brustkrebs-Zelllinien

[0104] Northern-Blot-Analysen wurden durchgeführt, um die Expressionsraten von VEGF2 in menschlichen Geweben und in Brustkrebs-Zelllinien in menschlichen Geweben zu bestimmen. Proben mit der gesamten zellulären RNA wurden mit dem RNAzol™ B-System (Biotecx Laboratories, Inc.) isoliert. Etwa 10 µg der Gesamt-RNA, die aus dem jeweiligen Brustkrebsgewebe und der jeweiligen Zelllinie, wie angegeben, isoliert wurde, wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt und auf ein Nylon-Filter geblottet (Molecular Cloning, Sambrook, Fritsch und Maniatis, Cold Spring Harbor Press, 1989). Die Markierungsreaktion erfolgte gemäß dem Stratagene-Prime-It-Kit mit 50 ng DNA-Fragment. Die markierte DNA wurde mit einer Select-G-50-Säule von 5' Prime -- 3 Prime, Inc., gereinigt. Danach wurde das Filter mit dem radioaktiv markierten vollständigen VEGF2-Gen bei 1000000 CpM/ml in 0,5 M $NaPO_4$ und 7% SDS über Nacht bei 65°C hybridisiert. Nach zweimaligem Waschen bei Raumtemperatur und zweimaligem Waschen bei 60°C mit 0,5 × SSC, 0,1% SDS, wurden die Filter sodann bei –70°C über Nacht gegen einen Verstärkungsschirm exponiert. Eine Boten-RNA von 1,6 kd wurde in zwei Brustkrebszelllinien festgestellt. Bahn 4 stellt eine stark tumorigene Zelllinie dar, deren Wachstum Östrogen-unabhängig ist, vgl. **Fig. 4**. Außerdem wurden 10 µg Gesamt-RNA aus zehn menschlichen erwachsenen Geweben auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und auf ein Nylon-Filter geblottet. Danach wurde das Filter mit einer radioaktiv markierten VEGF2-Sonde in 7% SDS, 0,5 M $NaPO_4$, pH 7,2, und 1% BSA über Nacht bei 65°C hybridisiert. Darauf folgte Waschen in 0,2 × SSC bei 65°C, danach wurde das Filter 24 Tage bei –70°C gegen einen Verstärkungsschirm exponiert vgl. **Fig. 5**.

Beispiel 2

Expression von VEGF2 durch in vitro-Transkription und -Translation

[0105] Die VEGF2-cDNA wurde in vitro transkribiert und translatiert, um die Größe des translatierbaren Polypeptids zu bestimmen, das durch die vollständige und durch die partielle VEGF2-cDNA codiert ist. Die vollständigen und partiellen cDNA-Insertionen von VEGF2 im Vektor pBluescript SK wurden durch PCR anhand von drei Primer-Paaren amplifiziert, 1) M13-Rückwärts- und Vorwärts-Primer; 2) M13-Rückwärts-Primer und VEGF-Primer F4; 3) M13-Rückwärts-Primer und VEGF-Primer F5. Die Sequenzen dieser Primer sind wie folgt:

M13-2-Rückwärts-Primer:

5‘-ATGCTTCCGGCTCGTATG-3‘

[0106] Diese Sequenz liegt stromaufwärts des 5'-Endes der VEGF2-cDNA-Insertion im pBluescript-Vektor und befindet sich in einer Antisense-Orientierung wie die cDNA. Eine T3-Promotor-Sequenz liegt zwischen diesem Primer und der VEGF2-cDNA.

M13-2-Vorwärts-Primer:

5‘-GGGTTTTCCCAGTCACGAC-3‘

[0107] Diese Sequenz liegt stromabwärts des 3'-Endes der VEGF2-cDNA-Insertion im pBluescript-Vektor und befindet sich in einer Antisense-Orientierung wie die cDNA-Insertion.

VEGF-Primer F4:

5‘-CCACATGGTTCAGGAAAGACA-3‘

[0108] Diese Sequenz liegt innerhalb der VEGF2-cDNA in einer Antisense-Orientierung von bp 1259 bis 1239, dies ist etwa 169 bp entfernt vom 3'-Ende des Stopp-Codons und etwa 266 bp vor dem letzten Nucleotid der cDNA.

[0109] Die PCR-Reaktionen mit allen drei Primer-Paaren erzeugen amplifizierte Produkte, bei denen die T3-Promotor-Sequenz vor der cDNA-Insertion liegt. Das erste und das dritte Primer-Paar produzieren PCR-Produkte, die das vollständige Polypeptid von VEGF2 codieren. Das zweite Primer-Paar erzeugt ein PCR-Produkt, dem 36 Aminosäuren der codierenden Sequenz am C-Terminus des VEGF2-Polypeptids fehlen.

[0110] Etwa 0,5 µg des PCR-Produkts von dem ersten Primer-Paar, 1 µg von dem zweiten Primer-Paar und 1 µg von dem dritten Primer-Paar wurden für eine in vitro-Transkription/Translation eingesetzt. Die in vitro-Transkription/Translationsreaktion wurde in einem Volumen von 25 µl durchgeführt, wobei die T_NT^{TM} Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega, Kat.-Nr. L4950) verwendet wurden. Insbesondere enthält das Reaktionsgemisch 12,5 µl T_NT-Kaninchen-Retikulocyten-Lysat, 2 µl T_NT-Reaktionspuffer, 1 µl T3-Polymerase, 1 µl 1 mM Aminosäuregemisch (minus Methionin), 4 µl ^{35}S-Methionin (> 1000 Ci/mMol, 10 mCi/ml), 1 µl 40 U/µl RNasin Ribonuclease-Inhibitor, 0,5 oder 1 µg PCR-Produkte. Nuclease-freies H_2O wurde zugegeben, so dass 25 µl erreicht wurden. Das Reaktionsgemisch wurde zwei Stunden bei 30°C inkubiert. 5 µl des Reaktionsprodukts wurden auf einem 4–20% Gradienten SDS-PAGE-Gel analysiert. Nach Fixieren in 25% Isopropanol und 10 Essigsäure wurde das Gel getrocknet und über Nacht bei –70°C gegen einen Röntgenfilm exponiert.

[0111] Wie in **Fig. 6** gezeigt, erzeugten PCR-Produkte, welche die vollständige VEGF2-cDNA enthielten, und solche, welche die cDNA enthielten, der 266 bp in der nicht-translatierten 3'-Region (3'-UTR) fehlten, translatierte Produkte der gleichen Länge, deren Molekulargewichte auf 38 bis 40 kd geschätzt wurden (Bahnen 1 und 3). Die cDNA, der alle 3'-UTR und die Sequenz, welche die C-terminalen 36 Aminosäuren codiert, fehlten, wurde in ein Polypeptid mit einem geschätzten Molekulargewicht von 36 bis 38 kd translatiert (Bahn 2).

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER: HU, ET AL.

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: VASKULÄRER ENDOTHELIALER WACHSTUMSFAKTOR 2

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) NAME: CARELLA, BYRNE, BAIN, GILFILLAN, CECCHI, STEWART & OLSTEIN

(B) STRASSE: 6 BECKER FARM ROAD

(C) STADT: ROSELAND

(D) STAAT: NEW JERSEY

(E) LAND: USA

(F) PLZ: 07068

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) ART DES MEDIUMS: 3,5 INCH-DISKETTE

(B) COMPUTER: IBM PS/2

(C) BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS

(D) SOFTWARE: WORD PERFECT 5.1

(vi) DERZEITIGE ANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER: 08/207,550

(B) TAG DER ANMELDUNG: 8. März 1994

(C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) FRÜHERE ANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER:

(B) ANMELDETAG:

(viii) ANGABEN ZU ANWALT/VERTRETER:

(A) NAME: FERRARO, GREGORY D.

(B) REGRISTIERUNGSNUMMER: 36,134

(C) REFERENZ/AKTEN-NUMMER: 325800-14B

(ix) ANGABEN ZU TELEKOMMUNIKATION:

(A) TELEFON: 201-994-1700

(B) TELEFAX: 201-994-1744

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 1525 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLE: cDNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 1:

```
CGAGGCCACG GCTTATGCAA GCAAAGATCT GGAGGAGCAG TTACGGTCTG TGTCCAGTGT      60
AGATGAACTC ATGACTGTAC TCTACCCAGA ATATTGGAAA ATGTACAAGT GTCAGCTAAG     120
GAAAGGAGGC TGGCAACATA ACAGAGAACA GGCCAACCTC AACTCAAGGA CAGAAGAGAC     180
TATAAAATTT GCTGCAGCAC ATTATAATAC AGAGATCTTG AAAAGTATTG ATAATGAGTG     240
GAGAAAGACT CAATGCATGC CACGGGAGGT GTGTATAGAT GTGGGGAAGG AGTTTGGAGT     300
CGCGACAAAC ACCTTCTTTA AACCTCCATG TGTGTCCGTC TACAGATGTG GGGGTTGCTG     360
CAATAGTGAG GGGCTGCAGT GCATGAACAC CAGCACGAGC TACCTCAGCA AGACGTTATT     420
TGAAATTACA GTGCCTCTCT CTCAAGCCCC CAAACCAGTA ACAATCAGTT TTGCCATCA      480
CACTTCCTGC CGATGCATGT CTAAACTGGA TGTTTACAGA CAAGTTCATT CCATTATTAG     540
ACGTTCCCTG CCAGCAACAC TACCACAGTG TCAGGCAGCG AACAAGACCT GCCCCACCAA     600
TTACATGTGG AATAATCACA TCTGCAGATG CCTGGCTCAG GAAGATTTTA TGTTTTCCTC     660
GGATGCTGGA GATGACTCAA CAGATGGATT CCATGACATC TGTGGACCAA ACAAGGAGCT     720
GGATGAAGAG ACCTGTCAGT GTGTCTGCAG AGCGGGGCTT CGGCCTGCCA GCTGTGGACC     780
CCACAAAGAA CTAGACAGAA ACTCATGCCA GTGTGTCTGT AAAAACAAAC TCTTCCCCAG     840
CCAATGTGGG GCCAACCGAG AATTTGATGA AAACACATGC CAGTGTGTAT GTAAAAGAAC     900
CTGCCCCAGA AATCAACCCC TAAATCCTGG AAAATGTGCC TGTGAATGTA CAGAAAGTCC     960

ACAGAAATGC TTGTTAAAAG GAAAGAAGTT CCACCACCAA ACATGCAGCT GTTACAGACG    1020
GCCATGTACG AACCCCCAGA AGGCTTGTGA GCCACGATTT TCATATAGTC AAGAAGTGTG    1080
TCGTTGTGTC CCTTCATATT GGCAAAGACC ACAAATGAGC TAAGATTGTA CTGTTTTCCA    1140
GTTCATCGAT TTTCTATTAT GGAAAACTGT GTTGCCACAG TAGAACTGTC TGTGAACAGA    1200
GAGACCCTTG TGGGTCCATG CTAACAAAGA CAAAAGTCTG TCTTTCCTGA ACCATGTGGA    1260
TAACTTTACA GAAATGGACT GGAGCTCATC TGCAAAAGGC CTCTTGTAAA GACTGGTTTT    1320
CTGCCAATGA CCAAACAGCC AAGATTTTCC TCTTGTGATT TCTTTAAAAG AATGACTATA    1380
TAATTTATTT CCACTAAAAA TATTGTTTCT GCATTCATTT TTATAGCAAC AACAATTGGT    1440
AAAACTCACT GTGATCAATA TTTTTATATC ATGCAAAATA TGTTTAAAAT AAAATGAAAA    1500
TTGTATTATA AAAAAAAAAA AAAAA                                          1525
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 350 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLE: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 2

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

```
Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
 85                  90                  95

Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala
100                 105                 110

Asn His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Val Tyr Arg
115                 120                 125

Gln Val His Ser Ile Ile Arg Arg Ser Leu Pro Ala Thr Leu Pro
130                 135                 140

Gln Cys Gln Ala Ala Asn Lys Thr Cys Pro Thr Asn Tyr Met Trp
145                 150                 155

Asn Asn His Ile Cys Arg Cys Leu Ala Gln Glu Asp Phe Met Phe
160                 165                 170

Ser Ser Asp Ala Gly Asp Asp Ser Thr Asp Gly Phe His Asp Ile
175                 180                 185

Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu Glu Thr Cys Gln Cys Val
190                 195                 200

Cys Arg Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys Gly Pro His Lys Glu
205                 210                 215

Leu Asp Arg Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys Asn Lys Leu Phe
220                 225                 230

Pro Ser Gln Cys Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu Asn Thr Cys
235                 240                 245

Gln Cys Val Cys Lys Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro Leu Asn
250                 255                 260

Pro Gly Lys Cys Ala Cys Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys
265                 270                 275

Cys Leu Leu Lys Gly Lys Lys Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys
280                 285                 290

Tyr Arg Arg Pro Cys Thr Asn Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly
295                 300                 305

Phe Ser Tyr Ser Glu Glu Val Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp
310                 315                 320

Gln Arg Pro Gln Met Ser
325
```

Patentansprüche

1. Polynucleotid, umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
(a) Nucleotidsequenzen, die die in SEQ ID NO: 2 dargestellte Aminosäuresequenz codieren;
(b) Nucleotidsequenzen, die die Aminosäuren +1 bis +326 der SEQ ID NO: 2 codieren;
(c) Nucleotidsequenzen, die ein Fragment der SEQ ID NO: 2 codieren, wobei das Fragment angiogene Aktivität aufweist und/oder die Endothelialisierung begünstigt;
(d) Nucleotidsequenzen, die ein Fragment des Polypeptids codieren, das von der cDNA enthalten in ATCC Deposit No. 75698 codiert wird, wobei das Fragment angiogene Aktivität aufweist und/oder die Endothelialisierung begünstigt;

(e) Nucleotidsequenzen, die das Polypeptid codieren, das von der cDNA enthalten in ATCC Deposit No. 75698 codiert wird; und
(f) Nucleotidsequenzen, die zu mindestens 70% identisch mit dem Polynucleotid von (a) bis (e) sind, wobei das Polynucleotid ein Polypeptid codiert, das angiogene Aktivität aufweist und/oder die Endothelialisierung begünstigt.

2. Polynucleotid nach Anspruch 1, welches die codierende Sequenz von SEQ ID NO: 1 umfasst.

3. Polynucleotid nach Anspruch 1, welches die codierende Sequenz der cDNA enthalten in ATCC Deposit No. 75698 umfasst.

4. Polynucleotid nach Anspruch 1, wobei die Nucleotidsequenzen aus Teil (f) zu mindestens 95% identisch mit den Nucleotidsequenzen von (a) bis (e) nach Anspruch 1 sind.

5. Polynucleotid nach Anspruch 1, wobei die Nucleotidsequenzen aus Teil (f) zu mindestens 97% identisch mit den Nucleotidsequenzen von (a) bis (e) nach Anspruch 1 sind.

6. Polynucleotid, umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
(a) einer Nucleotidsequenz, die die Aminosäuren +1 bis +326 der SEQ ID NO: 2 codiert;
(b) einer Nucleotidsequenz, die das Polypeptid codiert, das durch die cDNA enthalten in ATCC Deposit No. 75698 codiert wird, welches mit den Aminosäuren +1 bis +326 der SEQ ID NO: 2 übereinstimmt; und
(c) einer Nucleotidsequenz, die zu mindestens 70% identisch mit der Nucleotidsequenz von (a) oder (b) ist, wobei die Nucleotidsequenz ein Polypeptid codiert, das angiogene Aktivität aufweist und/oder die Endothelialisierung begünstigt;
wobei die Nucleotidsequenz im selben Leserahmen mit einem Polynucleotid fusioniert ist, das eine Aminosäureleadersequenz codiert, welche als sekretorische Sequenz zur Steuerung des Transports eines Polypeptids von einer Wirtszelle fungiert.

7. Polynucleotid nach Anspruch 6, wobei die Nucleotidsequenz aus (a) die Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 1 ist, die die Aminosäuren +1 bis +326 der SEQ ID NO: 2 codiert.

8. Polynucleotid nach Anspruch 6, wobei die Nucleotidsequenz aus (b) die Nucleotidsequenz der cDNA ist, die in ATCC Deposit No. 75698 enthalten ist, welche die Aminosäuren +1 bis +326 der SEQ ID NO: 2 codiert.

9. Polynucleotid nach Anspruch 6, wobei die Nucleotidsequenz aus (c) zu mindestens 95% identisch mit der Nucleotidsequenz aus (a) oder (b) ist.

10. Polynucleotid nach Anspruch 6, wobei die Nucleotidsequenz aus (c) zu mindestens 97% identisch mit der Nucleotidsequenz aus (a) oder (b) ist.

11. Polynucleotid nach einem der Ansprüche 6 bis 10, wobei die Wirtszelle eine eukaryontische Zelle ist.

12. Polynucleotid nach Anspruch 11, wobei die Wirtszelle eine Säugerzelle ist.

13. Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 12, umfassend mindestens eine zusätzliche codierende und/oder nicht-codierende Nucleotidsequenz.

14. Polynucleotid nach Anspruch 13, wobei die zusätzliche codierende Nucleotidsequenz ein Polypeptid codiert.

15. Polynucleotid nach Anspruch 14, wobei die zusätzliche codierende Nucleotidsequenz ein Polypeptid codiert, das die Aufreinigung des resultierenden Fusionspolypeptids erleichtert.

16. Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei das Polynucleotid DNA ist.

17. Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei das Polynucleotid RNA ist.

18. Vektor umfassend das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 17.

19. Vektor nach Anspruch 18, in welchem das Polynucleotid mit Expressionskontrollsequenzen verknüpft

ist, die eine Expression in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen ermöglichen.

20. Verfahren zur Herstellung einer Wirtszelle, umfassend die gentechnische Herstellung von Zellen mit dem Vektor nach Anspruch 18 oder 19.

21. Wirtszelle, hergestellt gemäß dem Verfahren nach Anspruch 20.

22. Wirtszelle, gentechnisch hergestellt mit dem Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 17.

23. Wirtszelle, umfassend das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 17, in welchem das Polynucleotid mit Expressionskontrollsequenzen verknüpft ist, die eine Expression in der Wirtszelle ermöglichen.

24. Wirtszelle, umfassend den Vektor nach Anspruch 18 oder 19.

25. Wirtszelle nach einem der Ansprüche 21 bis 24, welche das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 6 bis 12 umfasst und wobei die Aminosäureleadersequenz, die von dem Polynucleotid codiert wird, als eine sekretorische Sequenz zur Steuerung des Polypeptidtransports von der Wirtszelle funktioniert.

26. Wirtszelle nach einem der Ansprüche 21 bis 25, wobei die Wirtszelle eine eukaryontische Zelle, eine Pilzzelle, eine Pflanzenzelle, eine tierische Zelle, eine Insektenzelle, eine Säugerzelle, eine COS-Zelle oder eine CHO-Zelle ist.

27. Wirtszelle nach einem der Ansprüche 21 bis 25, wobei die Wirtszelle eine prokaryontische Zelle oder eine E. coli-Zelle ist.

28. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids umfassend:
(a) das Züchten der Wirtszelle nach einem der Ansprüche 21 bis 27 unter Bedingungen, die geeignet sind zur Herstellung des Polypeptids, das durch das Polynucleotid codiert wird; und
(b) das Gewinnen des Polypeptids.

29. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, umfassend die Expression eines Polypeptids, das von dem Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 17 codiert wird, und die Gewinnung des Polypeptids.

30. Verwendung des Polynucleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 17 zur Herstellung eines Polypeptids mittels Durchführung einer zellfreien Translation der RNA, die eine Nucleotidsequenz gemäß der Definition für das Polynucleotid hat.

31. Polypeptid, erhältlich durch das Verfahren nach Anspruch 28 oder 29 oder mittels Durchführung einer zellfreien Translation gemäß der Definition in Anspruch 30.

32. Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, wie sie durch ein Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 17 codiert wird.

33. Polypeptid nach Anspruch 31 oder 32, welches Teil eines Homodimers oder eines Heterodimers ist.

34. Polypeptid nach einem der Ansprüche 31 bis 33, welches glycosyliert ist.

35. Polypeptid nach einem der Ansprüche 31 bis 34, welches chemisch synthetisiert wurde.

36. Antikörper, der ein Polypeptid erkennt, das aus einer Aminosäuresequenz besteht, die von einer Nucleotidsequenz gemäß der Definition in Anspruch 1(a) bis (e) codiert wird.

37. Antikörper nach Anspruch 36, wobei der Antikörper ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
(a) einem Fab-Fragment;
(b) einem Einzelkettenantikörper;
(c) einem Antikörper hergestellt mittels einer Fab-Expressionsbibliothek;
(d) einem polyclonalen Antikörper;
(e) einem monoclonalen Antikörper;
(f) einem chimeren Antikörper; und
(g) einem humanisierten Antikörper.

38. Antikörper nach Anspruch 36 oder 37, wobei der Antikörper ein Antagonist ist.

39. Antikörper nach Anspruch 36 oder 37, wobei der Antikörper ein neutralisierender Antikörper ist.

40. Antagonist/Inhibitor des Polypeptids nach einem der Ansprüche 31 bis 35, wobei der Antagonist/Inhibitor ein Antisensemolekül von 10 bis 40 Nucleotiden Länge ist, das komplementär zur einer Nucleotidsequenz gemäß der Definition in SEQ ID NO: 1 ist und dadurch die Expression der Nucleotidsequenz hemmt.

41. Arzneimittel, umfassend den Antikörper nach Anspruch 38 oder 39 oder den Antagonist/Inhibitor nach Anspruch 40 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

42. Verwendung des Antikörpers nach Anspruch 38 oder 39 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer Entzündung.

43. Verwendung des Antikörpers nach Anspruch 38 oder des Antagonisten/Inhibitors nach Anspruch 40 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von rheumatoider Arthritis, Psoriasis oder diabetischer Retinopathie oder zur Vorbeugung einer Entzündung.

44. Verwendung des Antikörpers nach Anspruch 38 oder 39 oder des Antagonisten/Inhibitors nach Anspruch 40 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumoren.

45. Verwendung des Antikörpers nach Anspruch 38 oder 39 oder des Antagonisten/Inhibitors nach Anspruch 40 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Unterbindung oder Verzögerung des Wachstums oder Rückbildung von soliden Tumoren.

46. Verwendung des Antikörpers nach Anspruch 38 oder 39 oder des Antagonisten/Inhibitors nach Anspruch 40 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Hemmung von Tumor-Angiogenese.

47. Verwendung des Antikörpers nach Anspruch 38 oder 39 oder des Antagonisten/Inhibitors nach Anspruch 40 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Hemmung von Endothelialisierung in einem Patienten.

48. Verwendung des Antikörpers nach Anspruch 38 oder 39 oder des Antagonisten/Inhibitors nach Anspruch 40 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Hemmung des Wachstums vaskulärer Endothelzellen in einem Patienten.

49. Verwendung des Antikörpers nach Anspruch 38 oder 39 oder des Antagonisten/Inhibitors nach Anspruch 40 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Hemmung von Angiogenese in einem Patienten.

50. Arzneimittel, umfassend das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 17 oder das Polypeptid nach einem der Ansprüche 31 bis 35 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

51. Verwendung des Polynucleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 17 oder des Polypeptids nach einem der Ansprüche 31 bis 35 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Stimulierung der Proliferation vaskulärer Endothelzellen in einem Patienten, der eine solche Therapie benötigt.

52. Verwendung des Polynucleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 17 oder des Polypeptids nach einem der Ansprüche 31 bis 35 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Stimulierung der Angiogenese in einem Patienten, der eine solche Therapie benötigt.

53. Verwendung des Polynucleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 17 oder des Polypeptids nach einem der Ansprüche 31 bis 35 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Unterstützung der Endothelialisierung bei einer Gefäßersatzoperation in einem Patienten.

54. Verwendung nach Anspruch 53, wobei die Endothelialisierung die Vaskularisierung stimuliert.

55. Verwendung des Polynucleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 17 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Gentherapie eines Patienten, der eine Unterstützung der Endothelialisierung benötigt.

56. Verwendung des Polynucleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 17 oder des Polypeptids nach einem der Ansprüche 31 bis 35 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Stimulierung der Wundheilung, zur Unter-

stützung des Wachstums beschädigter Knochen, zur Unterstützung des Wachstums von geschädigtem Gewebe oder zur Unterstützung der Endothelialisierung.

57. Verwendung nach einem der Ansprüche 53, 55 und 56, wobei die Endothelialisierung zu einer Angiogenese führt.

58. Verwendung des Polynucleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 17 oder des Polypeptids nach einem der Ansprüche 31 bis 35 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Patienten, der dies benötigt, wobei der Patient Ischämie hat, einen Herzinfarkt hatte, eine Koronerbypassoperation hatte oder eine Revaskularisierung von geschädigtem Gewebe benötigt.

59. Verwendung des Polynucleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 17 oder des Polypeptids nach einem der Ansprüche 31 bis 35 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Patienten, wobei der Patient Wachstum des Knochen-, Peridontium- und/oder Bändergewebes benötigt.

60. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 55 und 57 bis 59, wobei der Patient ein Mensch ist.

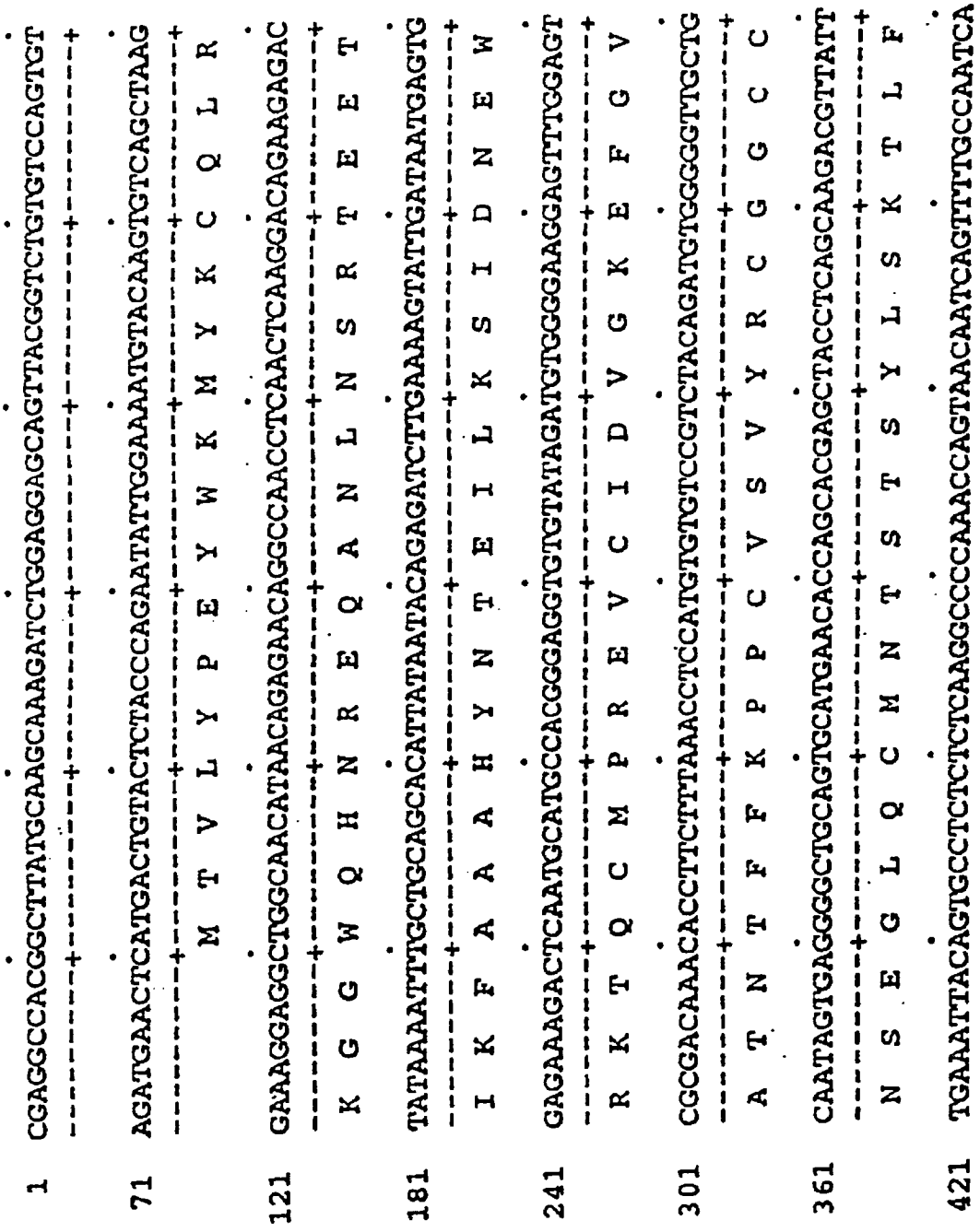
61. Diagnostische Zusammensetzung, umfassend ein Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 17, einen Antikörper nach einem der Ansprüche 36 bis 39 und/oder ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 31 bis 35.

62. Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins eines Tumors in einem Individuum, umfassend den Schritt des Nachweisens des Polypeptids nach einem der Ansprüche 31 bis 35 mittels eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 36 bis 39 in einer Blutprobe des Individuums.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

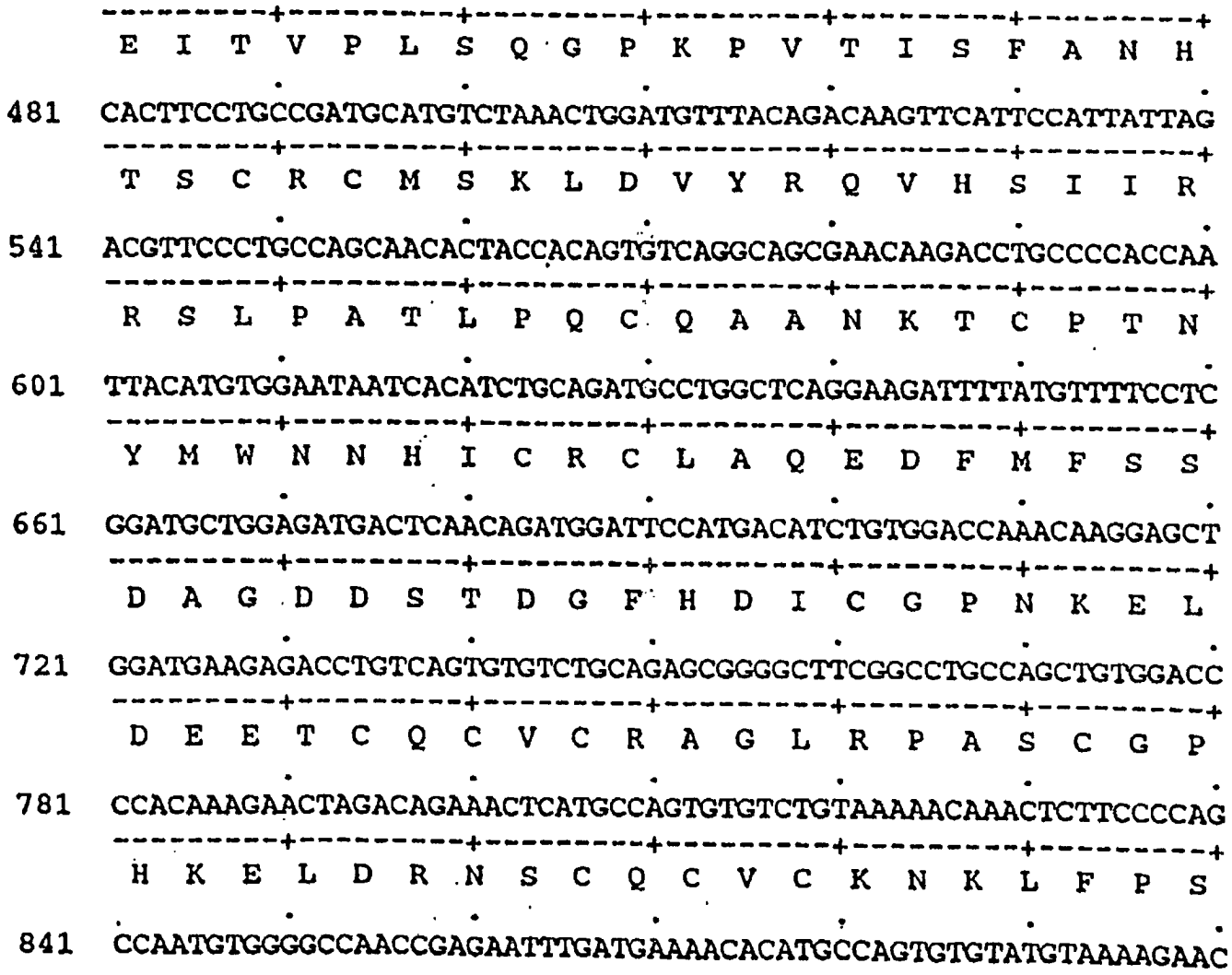
FIG. 1A



Fortsetzung in FIG. 1B

Fortsetzung von FIG. 1A

FIG. 1B

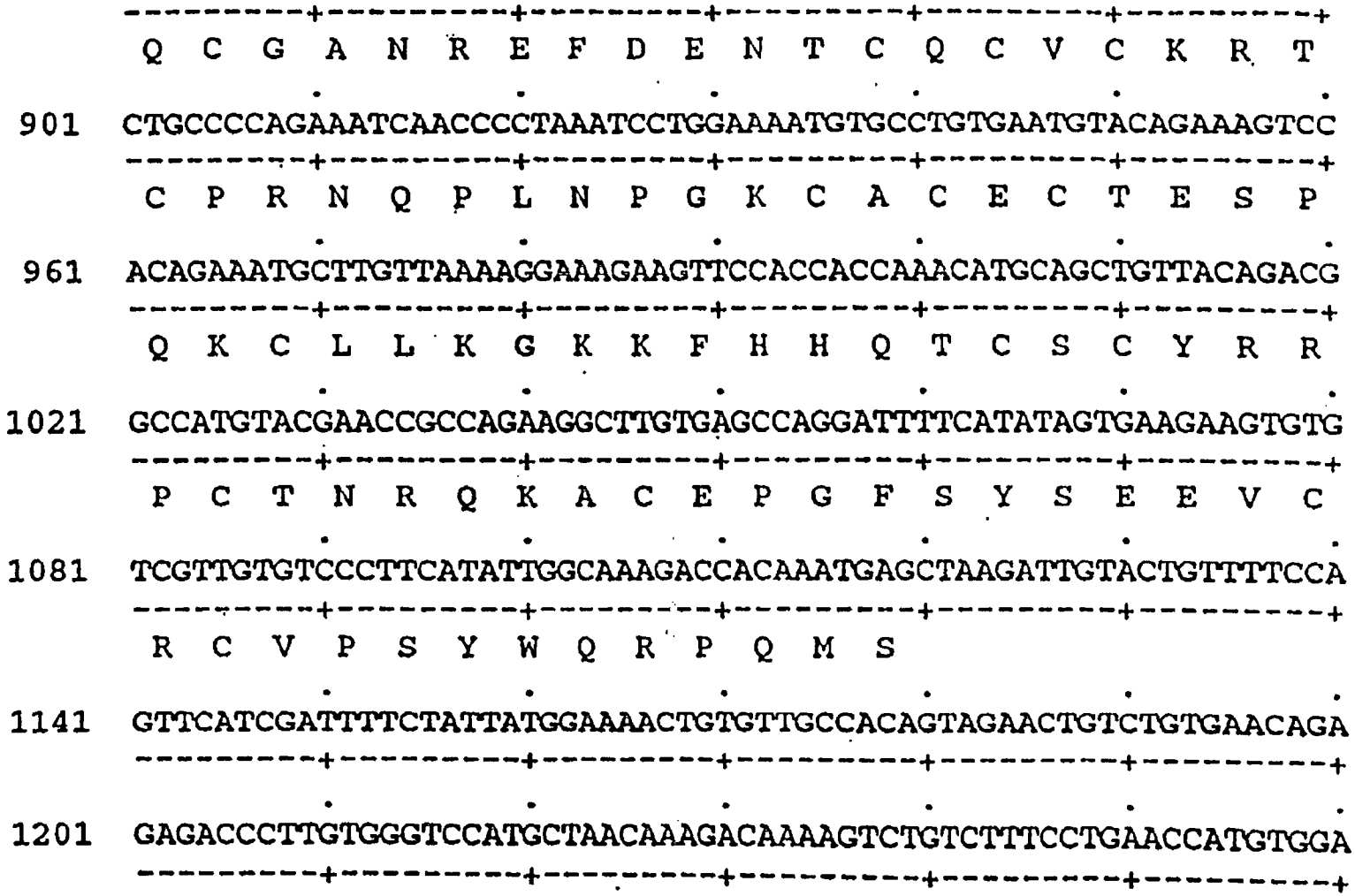


Fortsetzung in FIG. 1C

DE 694 34 538 T2 2006.08.10

Fortsetzung von FIG. 1B

FIG. 1C



Fortsetzung in FIG. 1D

DE 694 34 538 T2 2006.08.10

Fortsetzung von FIG. 1C

FIG. 1D

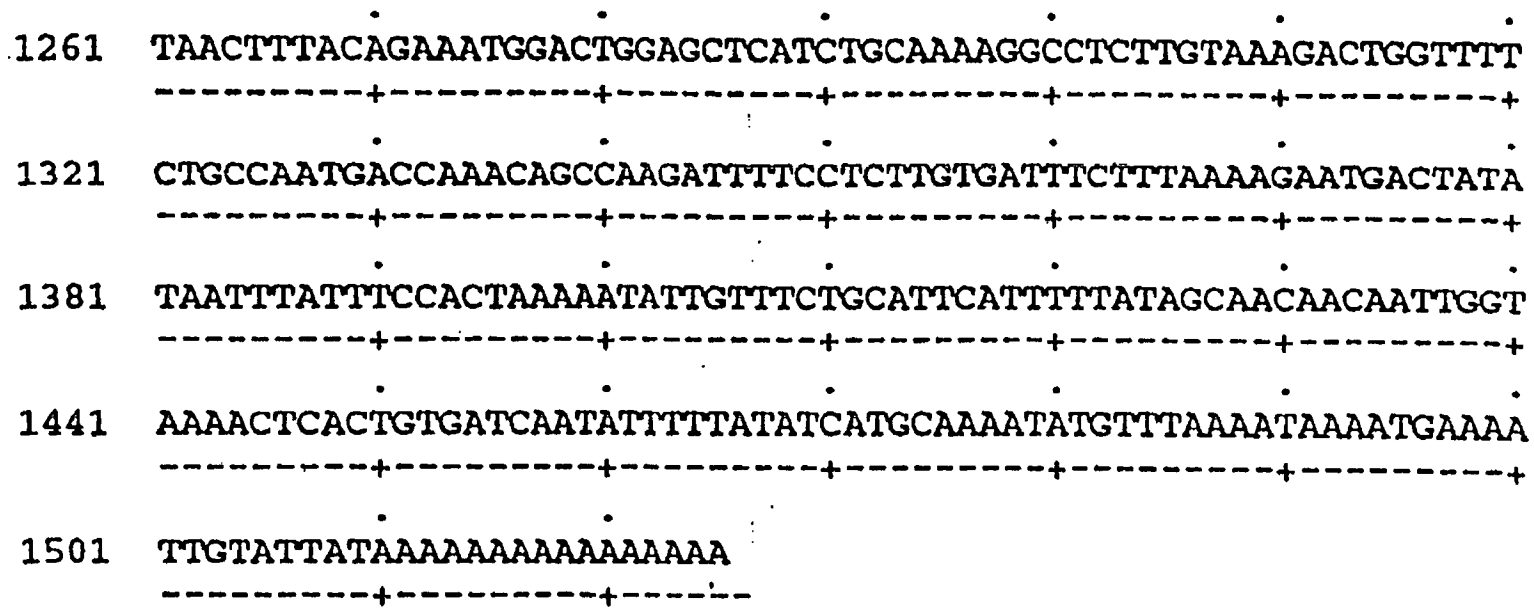
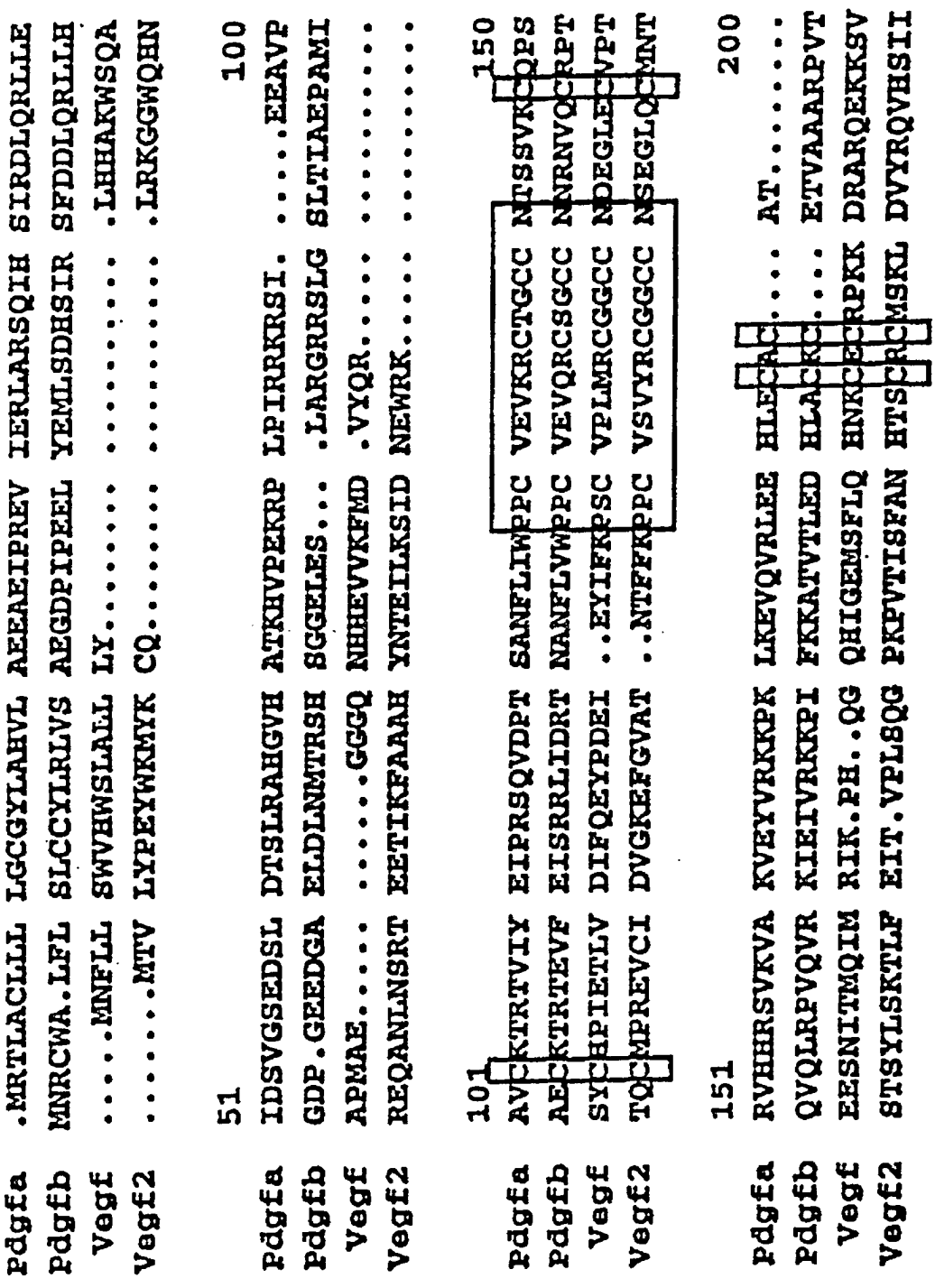


FIG. 2A



Fortsetzung in FIG. 2B

Fortsetzung von FIG. 2A

FIG. 2B

```
        201                                                  250
Pdgfa   ....TSLNPD YREEDTDVR. .......... .......... ..........
Pdgfb   RSPGGSQEQR AKTPQTRVTI RTVRVRRPPK GKHRKFKHTH DKTALKETLG
 Vegf   RGK....... .GKGQKRKRK KSRYKSWSVY VGARCCLMPW SLPGPHP...
Vegf2   RRSLPATLPQ CQAANKTCPT NYMWNNHICR CLAQEDFMFS SDAGDDSTDG

        251                                                  300
Pdgfa   .......... .......... .......... .......... ..........
Pdgfb   A......... .......... .......... .......... ..........
 Vegf   ....CGP... .......... .......CSE RRKHLFVQDP QTCKCSCKNT
Vegf2   FHDICGPNKE LDEETCQCVC RAGLRPASCG PHKEL...DR NSCQCVCKNK

        301                                                  350
Pdgfa   .......... .......... .......... .......... ..........
Pdgfb   .......... .......... .......... .......... ..........
 Vegf   ..DSRCKARQ LELNERTCRC DKPRR..... .......... ..........
Vegf2   LFPSQCGANR .EFDENTCQC VCKRTCPRNQ PLNPGKCACE CTESPQKCLL

        351                                                 398
Pdgfa   .......... .......... .......... .......... ........
Pdgfb   .......... .......... .......... .......... ........
 Vegf   .......... .......... .......... .......... ........
Vegf2   KGKKFHHQTC SCYRRPCTNR QKACEPGFSY SEEVCRCVPS YWQRPQMS
```

FIG. 3

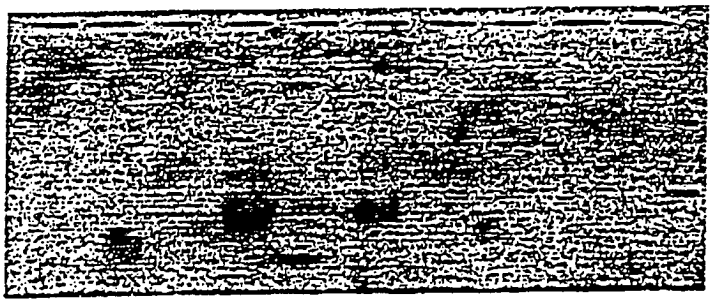
In der Fließtabelle ist der Prozentsatz (%) von Aminosäure-Identitäten zwischen dem Paar von Genen dargestellt

	PDGFα	PDGFβ	VEGF	VEGF2
PDGFα				
PDGFβ	48.0			
VEGF	20.7	22.7		
VEGF2	23.5	22.4	30.0	

FIG. 4

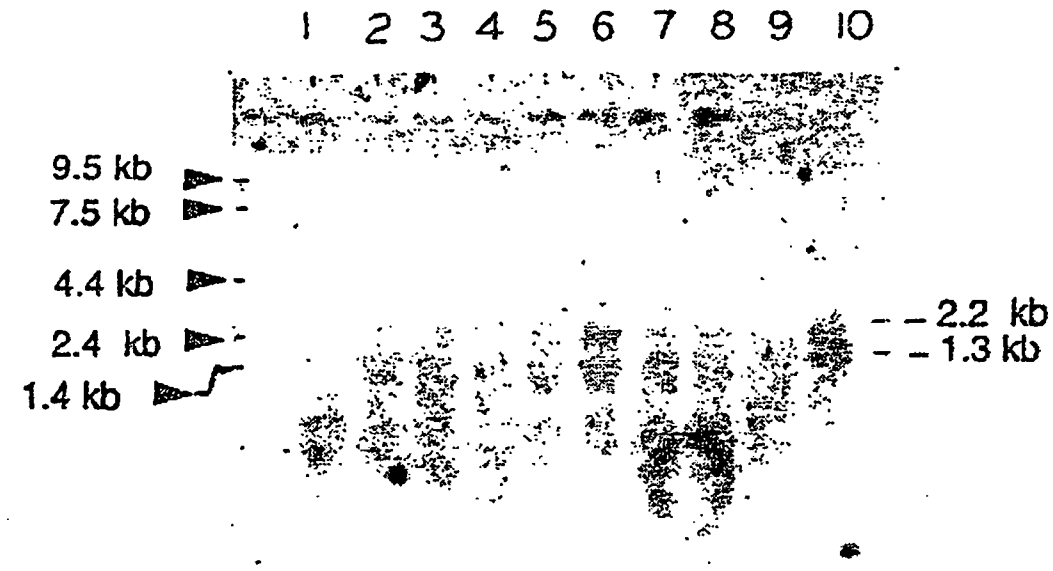
Expression von VEGF2 in menschlichen Brustkrebs-Zelllinien

1 2 3 4 5 6 7 8 9



1. Normale Brust
2. Brustkrebs
3.-9. Brustkrebs-Zelllinien

FIG. 5

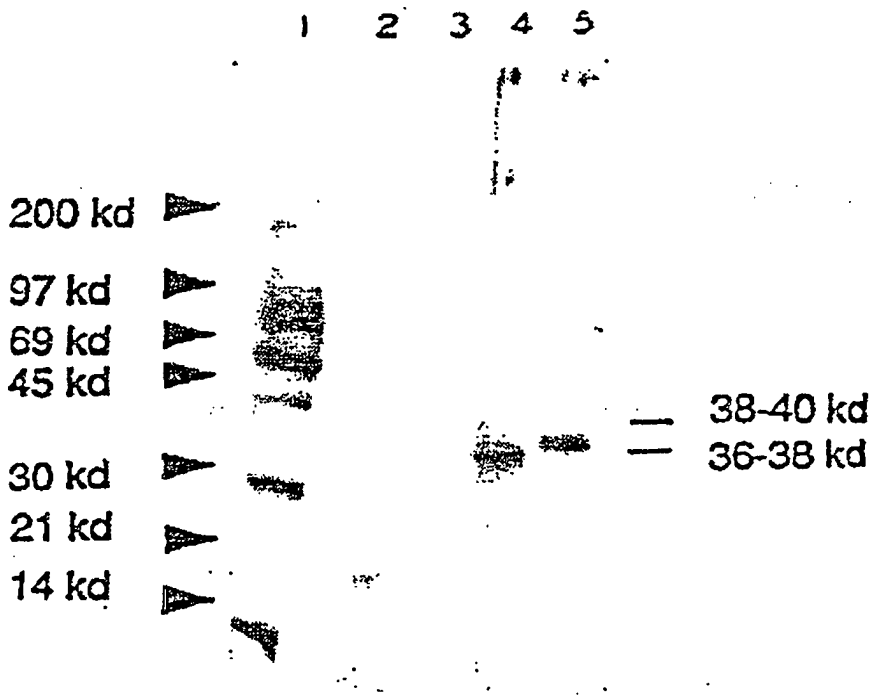


1.	Ovar	6.	Lunge
2.	Hoden	7.	Milz
3.	Gallenblase	8.	Prostata
4.	Niere	9.	Hippokampus
5.	Leber	10.	Herz

Expression von VEGF2-mRNA in menschlichen erwachsenen Geweben

FIG. 6

In vitro-Transkription/Translation des VEGF2-Proteins



Bahn 1:	14-C und Regenbogen-MG-Marker
Bahn 2:	FGF-Kontrolle
Bahn 3:	VEGF2 (M13-Rückwärts- und Vorwärts-Primer)
Bahn 4:	VEGF2 (M13-Rückwärts- und VEGF-F4-Primer)
Bahn 5:	VEGF2 (M13-Rückwärts- und VEGF-F5-Primer)