

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-525352

(P2005-525352A)

(43) 公表日 平成17年8月25日(2005.8.25)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/7105	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 8 6
A 6 1 K 35/12	A 6 1 K 35/12	4 C 0 8 7
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 D	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-570776 (P2003-570776)	(71) 出願人	591018268
(86) (22) 出願日	平成15年2月20日 (2003.2.20)		アラーガン、インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年10月25日 (2004.10.25)		ALLERGAN, INCORPORATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/005125		ED
(87) 国際公開番号	W02003/072029		アメリカ合衆国92612カリフォルニア
(87) 国際公開日	平成15年9月4日 (2003.9.4)		州アーヴィン、デュポン・ドライブ252
(31) 優先権主張番号	10/081, 126		5番
(32) 優先日	平成14年2月22日 (2002.2.22)	(74) 代理人	100068526
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田村 恭生
		(74) 代理人	100103230
			弁理士 高山 裕貢
		(74) 代理人	100087114
			弁理士 齋藤 みの里
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 角膜移植片の生存を延長させる方法

(57) 【要約】

本発明は、患者に血管内皮細胞増殖因子レセプター - 3 (V E G F R - 3) インヒビターを含む医薬組成物を有効量で投与して、患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することにより、患者における角膜移植後の角膜移植片生存を延長する方法を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

血管内皮細胞増殖因子レセプター - 3 (V E G F R - 3) インヒビターを含む医薬組成物を患者に有効量で投与して、患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することを含む、患者における角膜移植後の角膜移植片の生存を延長させる方法。

【請求項 2】

V E G F R - 3 インヒビターが優性ネガティブ V E G F R - 3 レセプターである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

優性ネガティブ V E G F R - 3 レセプターがキナーゼ不活性である、請求項 2 に記載の方法。 10

【請求項 4】

優性ネガティブ V E G F R - 3 レセプターが可溶性である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

V E G F R - 3 インヒビターが優性ネガティブ V E G F R - 3 レセプターをコードする核酸分子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

優性ネガティブ V E G F R - 3 レセプターがキナーゼ不活性である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

優性ネガティブ V E G F R - 3 レセプターが可溶性である、請求項 5 に記載の方法。 20

【請求項 8】

V E G F R - 3 インヒビターが V E G F R - 3 キナーゼインヒビターである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

V E G F R - 3 キナーゼインヒビターが V E G F R - 3 触媒ドメインである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

V E G F R - 3 キナーゼインヒビターが A T P アナログである、請求項 9 に記載の方法。 30

【請求項 11】

V E G F R - 3 インヒビターが V E G F R - 3 結合分子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

V E G F R - 3 結合分子が V E G F R - 3 細胞外ドメインに結合する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

V E G F R - 3 結合分子が抗 V E G F R - 3 抗体物質である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

抗 V E G F R - 3 抗体物質がモノクローナルである、請求項 13 に記載の方法。 40

【請求項 15】

V E G F R - 3 インヒビターが V E G F R - 3 の発現をダウンレギュレートする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

V E G F R - 3 インヒビターが配列特異的リボヌクレアーゼである、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

配列特異的リボヌクレオチドがリボザイムである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

VEGFR - 3 インヒビターが VEGFR - 3 アンチセンス核酸分子である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

VEGFR - 3 インヒビターが抗 VEGF - C 中和抗体物質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

抗 VEGF - C 中和抗体物質がモノクローナルである、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

VEGFR - 3 インヒビターが VEGF - C 発現をダウンレギュレートする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

VEGFR - 3 インヒビターが配列特異的リボヌクレアーゼである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

配列特異的リボヌクレアーゼがリボザイムである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

VEGFR - 3 インヒビターが VEGF - C アンチセンス核酸分子である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 25】

VEGFR - 3 インヒビターを分泌する細胞を含む医薬組成物を投与することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

患者に抗血管新生薬剤を投与することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

患者に免疫抑制剤を投与することをさらに含む、請求項 1 または請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

医薬組成物を角膜移植前に投与する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

医薬組成物を角膜移植後に投与する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】

VEGFR - 3 インヒビターを含む医薬組成物を、2 または 3 回、有効量で患者に投与することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 31】

少なくとも 1 ヶ月間の反復投与を含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

少なくとも 6 ヶ月間の反復投与を含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

(a) VEGFR - 3 インヒビターを含む医薬組成物を角膜移植前に患者に投与すること、および

(b) 角膜移植に続いて、患者に VEGFR - 3 インヒビターを含む医薬組成物を投与することにより、患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制する、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 34】

医薬組成物の全身投与を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 35】

医薬組成物の局在性の投与を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 36】

医薬組成物の局所性投与を含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

10

20

30

40

50

医薬組成物の局所注射を含む、請求項 35 に記載の方法

【請求項 38】

医薬組成物が眼内または眼周囲インプラントから放出される、請求項 35 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、眼科、移植および分子医学の分野に関し、具体的には角膜同種移植片拒絶（反応）を阻害するために、リンパ管新生を調節（制御）する医薬の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

おそらく、角膜移植は、部分的には角膜の相対的な免疫学的寛容性に一部起因して、ヒトにおいて最もうまくいく組織移植である。角膜移植片の最初の一年の全体的な生存率は、慣用的な HLA 分類および最小限の免疫抑制療法を行わない場合ですら 90% もの高さである。しかしながら、角膜移植の初期の成功は長期成功率により損なわれ、5 年目までに約 74% まで低下し、10 年目までに約 62% まで低下する。さらに、角膜新血管形成または進行中の眼炎症を有する患者などの危険性の高い患者において、移植片 10 年生存率は 35% 未満である。免疫学的、外科的手順および内科的治療の発展にもかかわらず、角膜移植片の生存は最近 10 年間の間は、改善されていない (Naacke ら、Cornea 350-353 (2001); Waldock および Cook, Brit. J. Ophthalmol. 84:813-815 (2000)、および Foulks, 「Clinical Aspects of Corneal Allograft Rejection」 Krachmer ら、Cornea III 巻、16 87-1696 頁 (1997))。さらに、角膜移植は米国において比較的一般的であり、1 年間に約 45,000 件の手術が行われているので、同種移植片拒絶は多数の個人に影響を与える。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

角膜移植失敗の主な原因は同種移植片拒絶である。不幸なことに、同種移植片拒絶に関する現在の処置（主にコルチコステロイドのような免疫抑制剤）は、症例の約 50% にのみ有効である。さらに、レシピエントの角膜の血管新生が移植失敗に関与しているという証拠にもかかわらず、例えば、血小板活性化因子 (PAF) アンタゴニストを用いる同種移植片血管新生の阻害は、移植片生存の上昇においてうまくいっていない (Cohen ら、Curr. Eye Res. 13:139-144 (1994))。従って、移植片生存を延長させるために角膜同種移植片拒絶を治療する新規な方法に関する必要性が存在している。本発明はこの必要性を満たし、関連する利点をも同様に提供する。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、血管内皮細胞増殖因子レセプター - 3 (VEGFR-3) インヒビターを含む医薬組成物を有効量で患者に投与して患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することにより、患者における角膜移植後の角膜移植片生存を延長する方法を提供する。

【0005】

1 つの態様において、本発明は、優性（ドミナント）ネガティブな VEGFR - 3 レセプターを含む医薬組成物を有効量で患者に投与して患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することによる、患者における角膜移植の後の角膜移植片生存を延長する方法を提供する。このような優性ネガティブな VEGFR - 3 レセプターは、例えば、キナーゼ不活性化 VEGFR - 3 レセプターまたは可溶性 VEGFR - 3 レセプターであってもよい。同様に、角膜移植片生存を延長させるために有用な VEGFR - 3 インヒビターは、例えば、キナーゼ不活性化 VEGFR - 3 レセプターまたは可溶性 VEGFR - 3 レセプターのような優性ネガティブな VEGFR - 3 レセプターをコードする核酸分子であり得る。

【0006】

本発明はまた、VEGFR-3キナーゼインヒビターを含む医薬組成物を有効量で患者に投与して患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することにより、患者における角膜移植後の角膜移植片生存を延長させる方法を提供する。1つの態様において、VEGFR-3キナーゼインヒビターはVEGFR-3触媒ドメインに結合し、別の態様において、VEGFR-3キナーゼインヒビターはATPアナログである。

【0007】

さらに、本発明は、VEGFR-3結合分子であるVEGFR-3インヒビターを含む医薬組成物を有効量で患者に投与して、患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することにより、患者における角膜移植の後の角膜移植片生存を延長させる方法を提供する。この
10
ようなVEGFR-3結合分子は、例えば、VEGFR-3の細胞外ドメインに結合する。本発明に有用なVEGFR-3結合分子はまた、抗VEGFR-3抗体物質であり得、1つの態様においてモノクローナル抗体物質である。

【0008】

本発明はまた、VEGFR-3発現をダウンレギュレートするVEGFR-3インヒビターを含有する医薬組成物を有効量で患者に投与して患者の角膜のリンパ管新生を抑制することによる、患者における角膜移植の後の角膜移植片生存を延長させる方法を提供する。このようなVEGFR-3インヒビターは、例えば、配列特異的リボヌクレアーゼ（例
20
例えば、リボザイム）、または例えば、VEGFR-3アンチセンス核酸分子であってもよい。

【0009】

本発明はまた、抗VEGF-C中和抗体物質を含む医薬組成物を有効量で患者に投与して患者の角膜においてリンパ管新生が抑制されることによる、患者における角膜移植の後の角膜移植片生存を延長させる方法を提供する。本発明において有用な抗VEGF-C中和抗体物質は、例えば、モノクローナル抗体物質でありうる。

【0010】

さらに、本発明は、VEGF-Cの発現をダウンレギュレートするVEGFR-3インヒビターを含有する医薬組成物を有効量で患者に投与して、リンパ管新生が患者の角膜内で抑制することによる、患者の角膜移植後の角膜移植片生存を延長させる方法を提供する。この
30
ようなVEGFR-3インヒビターは、例えば、配列特異的リボヌクレアーゼ（例えば、リボザイム）、または、例えばVEGF-Cアンチセンス核酸分子であってもよい。

【0011】

本発明はまた、VEGFR-3インヒビターを発現する細胞を含有する医薬組成物を有効量で患者に投与して、患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することによる患者の角膜移植後の角膜移植片生存を延長する方法を提供する。

【0012】

本発明の方法において、VEGFR-3インヒビターを含む医薬組成物に加えて、抗血管形成薬剤を患者に投与しうる。同様に、VEGFR-3インヒビターを含む医薬組成物に加えて、免疫抑制剤を患者に投与してもよく、必要に応じて、抗血管新生薬剤と共に投
40
与してもよい。

【0013】

本発明の方法において、VEGFR-3インヒビターを含む医薬組成物を、角膜移植の前、間、またはその後に投与することができる。さらに、VEGFR-3インヒビターを含む医薬組成物の投与は、必要な場合、反復してもよい。1つの態様において、少なくとも1ヶ月の期間にわたり、投与を反復する。別の態様において、少なくとも6ヶ月の期間にわたり、投与を反復する。

【0014】

また、本発明は角膜移植前にVEGFR-3インヒビターを含有する医薬組成物を有効量で患者に投与すること、および角膜移植後にVEGFR-3インヒビターを含む医薬組
50

成物を有効量で患者に投与して、患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することによる、患者の角膜移植後の角膜移植片生存を延長させる方法を提供する。外科手術前または外科手術後用の医薬組成物は、同一であるかまたは異なっているとしてもよく、同一または異なる送達経路を用いて投与することができる。

【0015】

種々の投与経路が本発明の方法において有用であり得る。1つの態様において、本発明の角膜移植片生存を延長させる方法は、医薬組成物の全身投与により実行される。別の実施態様において、本発明の方法は医薬組成物の局在性投与により実施される。さらなる態様において、医薬組成物は、局所投与するか、または局所注射により投与するか、または眼内インプラントまたは眼周囲インプラントから放出される。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

発明の詳細な説明

本発明は、血管内皮細胞増殖因子レセプター-3 (VEGFR-3) インヒビターを含有する医薬組成物を有効量で患者に投与して患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することによる、患者の角膜移植後の角膜移植片生存を延長させる方法を提供する。

【0017】

本発明の方法は、患者の角膜移植後の角膜移植片生存を延長させるために有用である。本明細書中で用いる用語「角膜移植」は、同種または異種の角膜組織がレシピエント患者に同所的に (orthotopically) 移植される任意の方法を意味する。1つの態様において、同種角膜組織を角膜移植手順法で移植する。さらなる態様において、角膜移植手順は全層角膜の切片が移植される全層角膜移植である。また、本発明の方法は、角膜の前面半分にインタクトで残っている前房を移植する表層角膜移植、ドナー角膜物質を移植して視力を妨害するレシピエントの傷組織を取り替える視力補充角膜移植 (optical keratoplasty)、ドナー角膜の切片を所望の湾曲に成形し、レシピエントの角膜の層の間、またはレシピエントの角膜上に挿入してレシピエントの角膜の湾曲を変更し、視覚的な問題を校正する屈曲矯正的角膜形成術 (refractive keratoplasty)、(例えば、外傷の後に) 角膜物質を移植して欠損したレシピエント組織を移植する形成性角膜移植等のような角膜移植方法に適用される。

20

【0018】

角膜内の上皮中のランゲルハンス細胞または実質内に存在する樹状細胞のいずれかの表面でのMHCクラスII分子の常在性の発現は比較的低い、HLAクラスI抗原は、角膜上皮、実質および内皮細胞で豊富に発現される (Treseler, Am. J. Ophthalmol. 98:763-772 (1984); McCallumら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 34:1793-1803 (1993))。本発明の方法は、レシピエント患者と1種以上のHLA抗原で適合している角膜移植片の移植の後の角膜移植片の生存を延長するために有用であり得ることが理解される (WaldockおよびCook、既出、2000)。このような分子はメジャーな (major) またはクラスI抗原 (HLA-AおよびHLA-B) またはマイナーな (minor) またはクラスII抗原 (HLA-DR) でありうる。

30

40

【0019】

それゆえ、本発明の方法は、例えば、少なくとも1種のHLAクラスI抗原または少なくとも2種のクラスI抗原をレシピエント患者と共有するように選択されている角膜移植片の生存を延長するために実施されうる。同様に、本発明の方法は少なくとも1種のHLAクラスII抗原をレシピエント患者と共有するように選択されているか、または少なくとも1種のHLAクラスI抗原および少なくとも1種のHLAクラスII抗原をレシピエント患者と共有するように選択されている角膜移植片の生存を延長するために実施されうる。本発明の方法はまた、例えば、少なくとも1種のHLAクラスI抗原を共有するように選択されているが、HLAクラスII抗原に関してはミスマッチである角膜移植片の生存を延長するために実施されうる。

50

【0020】

本明細書中で用いる用語「患者」は、角膜移植方法におけるドナー角膜組織のレシピエントを意味する。患者は、例えば、哺乳動物（霊長類、ウサギまたは齧歯類等）でありうる。1つの実施態様において、患者はヒト患者である。

【0021】

本発明の方法は、角膜移植の後の角膜移植片生存を延長するために実施される。本明細書中で用いる語句「角膜移植片（の）生存の延長」は、概して、不可逆的な移植片拒絶を遅延または予防することを意味する。それゆえ、ある集団における、不可逆的同種移植片拒絶が起こる前の月数が、VEGFR-3インヒビターを含む医薬組成物で処置されていない対応する集団と比較して概して増加している場合、角膜移植片生存は「延長」されている。また、VEGFR-3インヒビターを含む医薬組成物で処置されていない対応する集団と比較して、ある集団内における不可逆的移植片拒絶を有する個体の割合が概して減少している場合に、その集団内において角膜移植片生存は延長されている。

10

【0022】

当業者は、不可逆的移植片拒絶が存在するかどうかを決定するための確立されている判断基準を用いる。通常、拒絶反応は移植した角膜に関連し、移植片の中心へと進行するが、レシピエントの角膜には生じない1つ以上の病理学的事象として顕れる。上皮拒絶反応は、上皮の隆起部として現れる上皮拒絶反応線により特徴付けられ、上皮下拒絶反応は、流行性角結膜炎で見られるのと似ている上皮下浸潤により特徴付けられる。さらに、実質拒絶は、移植片の中心へと進行する実質性浸潤により特徴付けられ、内皮拒絶反応は以下の少なくとも1つにより特徴付けられる。Khodadoust線、角膜裏面沈着物、実質浮腫または水疱性細胞（aqueous cells）。多くの場合において、拒絶反応は、局所デキサメタゾン、結膜下デキサメタゾン注射を伴う、および、必要であれば数日間の静脈内メチルプレドニゾンを伴う局所性デキサメタゾンのような処置を用いて改善することが可能であることを当業者は理解する。拒絶反応は、細隙灯検査を用いて観察される拒絶反応の徴候（拒絶反応線、上皮下浸潤、角膜裏面沈着物、実質浸潤、実質浮腫および水疱性細胞）が消失しなかった場合、または移植片の異常肥大または視力障害がある場合に、不可逆的であるとみなされる。

20

【0023】

本発明の方法は血管内皮細胞増殖因子レセプター-3のインヒビターまたは別の抗リンパ管新生薬剤に依る。少なくとも3種の血管内皮細胞増殖因子レセプターであるVEGFR-1、VEGFR-2およびVEGFR-3（もともとは、それぞれ、Flt1（Fms様チロシンキナーゼ）、KDR/Flk-1（キナーゼインサートドメイン含有レセプターまたは胎児肝臓キナーゼ）およびFlt4と命名されている）が存在する。血小板由来増殖因子（PDGF）レセプターファミリーに類似するこれらのサブクラス-IIIIレセプターチロシンキナーゼは、細胞外ドメイン内の7個のイムノグロブリンホモロジードメイン、およびキナーゼインサート配列により分割されているチロシンキナーゼ細胞内ドメインにより特徴付けされる（KlagsbrunおよびD'Amore, Cytokine Growth Factor Rev. 7: 259-270 (1996)）。

30

【0024】

ヒトVEGFR-3は、細胞外ドメインにおいてVEGFR-1およびVEGFR-2とおよそ35%のアミノ酸同一性を示し、チロシンキナーゼドメインにおいて約80%のアミノ酸同一性を示す。ヒトVEGFR-3を胎盤および赤白血病の細胞のcDNAライブラリーからクローニングされた（Aprilikovaら、Cancer Res. 52: 746-748 (1992)）；Gallandら、Genomics 13: 475-4878 (1992)；Gallandら、既出、1993；Pajusolaら、Cancer Res. 52: 5738-5743 (1992)；およびPajusolaら、既出、1993およびマウスおよびウズラのホモログもまたクローニングされている（Finnerlyら、Oncogene 8: 2293-2298 (1993)；Eichmannら、Gene 1

40

50

74 : 3 - 8 (1996))。VEGFR - 3 ホモログは進化において良好に保存されており、ウズラホモログはヒトレセプターと約 70 % のアミノ酸同一性を有し、類似のリガンド結合特性を有する。

【 0025 】

メジャーなヒト VEGFR - 3 mRNA 転写物はサイズが約 5 . 8 kb であり、別の 3' ポリアデニル化シグナルは C 末端での 65 残基縮重を有するタンパク質をコードするマイナーな 4 . 5 kb 転写物を生じる。組織中で検出されるメジャーな形態である、より長い形態の VEGFR - 3 は、195 kDa 前駆体として合成され、これはグリコシル化され、タンパク質分解により Arg 472 の後で切断されてジスルフィド結合した 2 鎖形態を生じる。より長い形態のカルボキシ末端領域は、短い方の転写物中ではコードされていない 3 個のチロシン残基が存在する (Tyr 1333、Tyr 1337 および Tyr 1363)。

10

【 0026 】

VEGFR - 3 はアミノ末端細胞外ドメイン、小さい膜貫通領域およびカルボキシ末端細胞質ドメインを有する。VEGFR - 3 の細胞外ドメインは 7 個のイムノグロブリン様 C2 型ドメインを有し、二量体化の際にタンパク質は 5 番目のイムノグロブリン様ドメイン内で結合してジスルフィドとなる。VEGFR - 3 は、約 20 残基の膜貫通領域を含む I 型膜タンパク質であり、カルボキシ末端細胞質ドメインは 2 個のチロシンキナーゼドメインを含んでいる (図 1 参照)。図 2 B に示されるように、長いイソ型 (long isoform) のヒト VEGFR - 3 (配列番号 2) は 1363 残基のタンパク質であり、これは成熟タンパク質を構成する 24 ~ 1363 アミノ酸を有する。ヒト VEGFR - 3 (配列番号 2) の残基 24 ~ 775 は、細胞外ドメインを構成し、残基 776 ~ 797 (配列番号 2) は膜貫通領域を構成し、残基 798 ~ 1363 (配列番号 2) は細胞質ドメインを構成する。7 個のイムノグロブリン様ドメインは、以下のようにヒト VEGFR - 3 (配列番号 2) の細胞外部分内に位置しうる。イムノグロブリン様ドメイン 1 (残基 44 ~ 118)、イムノグロブリン様ドメイン 2 (残基 151 ~ 213)、イムノグロブリン様ドメイン 3 (残基 245 ~ 317)、イムノグロブリン様ドメイン 4 (残基 351 ~ 403)、イムノグロブリン様ドメイン 5 (残基 438 ~ 541)、イムノグロブリン様ドメイン 6 (残基 571 ~ 660) およびイムノグロブリン様ドメイン 7 (残基 692 ~ 758)。VEGFR のリガンド結合ドメインは最初の 3 つのイムノグロブリン様ドメインから構成される。

20

30

【 0027 】

血管内皮細胞増殖因子である VEGF - A、VEGF - B、VEGF - C および VEGF - D は、典型的な構造的特性を共有するが、VEGF レセプター (VEGFR - 1、VEGFR - 2 および VEGFR - 3) に対する異なる特異性に起因する異なる生物学的活性を示す。増殖因子の VEGF ファミリーでは、VEGF - C および VEGF - D が最も密接に関連しており、共通の VEGF - ホモロジードメインに隣接する独特のアミノ - およびカルボキシ末端伸長部により特徴付けられるサブグループを形成する。ヒト VEGF - C は、推定分子量 46 . 9 kDa の 419 アミノ酸のタンパク質であり、マウス VEGF - C は 415 アミノ酸のタンパク質である。

40

【 0028 】

中心コア (VEGF ホモロジードメイン) は VEGF と約 30 % のアミノ酸同一性を示し、VEGF ファミリーの他のメンバーに関しては 7 個のエキシソンの 3 番目および 4 番目にコードされている。VEGF - C および VEGF - D の VEGF ホモロジードメインは 60 % アミノ酸同一性を共有する。カルボキシ末端ドメインは、昆虫ユスリカ (Chironomus tentans) の幼虫唾液腺で産生される絹の構成成分である分泌タンパク質のバルビアニン 3 タンパク質 (Balbiani ring 3 protein) に存在するモチーフに類似するシステイン残基の反復パターン (Cys - X₁₀ - Cys - X - Cys - Cys (配列番号 5) を有する。

【 0029 】

50

VEGF-Cは前駆体として合成され、次いでPDGF-AおよびB鎖プロセッシングに類似の様式でタンパク質分解により処理される。VEGF-Cは、C末端シルクドメインを含有するジスルフィド結合型ホモダイマーとして分泌される。分泌に続いて、カルボキシ末端シルクドメインが切断され、ジスルフィドはアミノ末端ドメインに結合して29および31kDaポリペプチドから構成されるジスルフィド結合型テトラマーを生じる。アミノ末端プロペプチドのタンパク質分解プロセッシングは、VEGFホモロジードメインをコードする2個の21kDaポリペプチド鎖から構成される成熟形態を遊離する。

【0030】

本明細書中に開示するように、角膜移植片生存はVEGFR-3インヒビターにより患者を処置することにより延長されうる。本明細書中で用いる用語「VEGFR-3インヒビター」は、VEGFR-3発現、活性または細胞内シグナル伝達を低下させる分子を意味する。このようなインヒビターは、例えば、低分子、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、リボザイム、核酸分子またはオリゴヌクレオチド、オリゴ糖、細胞、ファージまたはウイルス、またはそれらの組合せであり得る。さらに以下に記載するように、本発明において有用なVEGFR-3インヒビターとしては以下のものが挙げられるが、これらに限定されない。可溶性レセプターおよびキナーゼ不活性レセプターを含む優性ネガティブVEGFR-3レセプター、選択的VEGFR-3キナーゼインヒビターおよびATPアナログのようなVEGFR-3触媒ドメインと結合する分子を含むVEGFR-3キナーゼインヒビター、VEGFR-3細胞外ドメインに結合する分子を含む、およびVEGFR-3へのリガンド結合を阻害するまたは低下させる抗体、タンパク質、低分子およびオリゴヌクレオチドを含むVEGFR-3結合分子、抗VEGF-C抗体、VEGF-Cアンタゴニスト、VEGFR-3リガンドがトキシンに連結されている結合体、VEGFR-3発現を阻害または低下させるネガティブな調節性転写因子をコードするリボザイム、アンチセンス核酸分子および核酸分子ならびにこのようなりボザイムおよび核酸分子を含む細胞またはウイルス、VEGF-C発現を阻害または低下させるネガティブな調節性転写因子をコードするリボザイム、アンチセンス核酸分子および核酸分子ならびにこのようなりボザイムおよび核酸分子を含む細胞またはウイルス、例えば、優性ネガティブなVEGFR-3レセプター、転写因子および抗体およびそれらの抗原結合フラグメントをコードする核酸分子ならびにそのような核酸分子を含む細胞およびウイルス、ならびにVEGFR-3細胞内シグナル伝達の選択的インヒビター。当業者であれば、これらおよび他のVEGFR-3インヒビターが、以下にさらに記載する本発明の方法に有用であり得ることを理解し得る。

【0031】

VEGFR-3インヒビターは、VEGFR-3の発現、活性または細胞内シグナル伝達の特異的な、選択的または非選択的インヒビターであり得る。特定のVEGFR-3インヒビターは、関連のないレセプターチロシンキナーゼ（例えば、FGFR1）のほとんどまたは全ての活性よりも、およびVEGFR-1およびVEGFR-2の活性よりも、VEGFR-3の発現、活性または細胞内シグナル伝達を低下させる。選択的VEGFR-3インヒビターは、関連のないレセプターチロシンキナーゼ（例えば、FGFR1）のほとんどまたは全ての活性よりもVEGFR-3の発現、活性または細胞内シグナル伝達を低下させる。対照的に、非選択的VEGFR-3インヒビターはVEGFR-1またはVEGFR-2、または両方の発現、活性または細胞内シグナル伝達を、VEGFR-3の場合と同程度まで低下させる。当業者であれば、特異的な選択的および非選択的VEGFR-3キナーゼインヒビターが本明細書中に開示される方法において有用であり得ることを認識する。

【0032】

本明細書中に記載のように、種々のVEGFR-3インヒビターが本発明の角膜移植片生存の延長に有用である。1つの実施態様において、本発明は、優性ネガティブVEGFR-3レセプターを含む医薬組成物を有効量で患者に投与して、患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することにより患者における角膜移植後の角膜移植片生存を延長する方法

を提供する。このような優性ネガティブ V E G F R - 3 レセプターは、例えば、キナーゼ - 不活性 V E G F R - 3 レセプターまたは可溶性 V E G F R - 3 レセプターでありうる。同様に、角膜移植片生存の延長に有用な V E G F R - 3 インヒビターは、例えば、優性ネガティブ V E G F R - 3 レセプターをコードする核酸分子であるかもしれない。このような方法では、核酸分子は、例えば、キナーゼ - 不活性 V E G F R - 3 レセプターまたは可溶性 V E G F R - 3 レセプターをコードしうる。

【 0 0 3 3 】

本明細書中で用いる用語「優性ネガティブ V E G F R - 3 レセプター」は、野生型 V E G F R - 3 レセプターの活性を低下させるように作用する野生型 V E G F R - 3 レセプターの変異体を意味する。優性ネガティブレセプターが種々のメカニズムを通じて機能しうることは認識されているが、V E G F R - 3 優性ネガティブレセプターが機能し得る代表的なメカニズムとしては、遊離リガンドの枯渇および不活性な野生型 / 優性ネガティブレセプター二量体の形成が挙げられるがこれらに限定されない。従って、優性ネガティブ V E G F R - 3 レセプターは可溶性または膜結合型の V E G F R - 3 レセプターであるかもしれない。例えば、1 つまたは数個の点変異、または野生型レセプター配列と比較して数百個のアミノ酸のかなりの欠失を含むかもしれない。代表的な優性ネガティブ V E G F R - 3 レセプターとしては、基本的には細胞質ドメイン（可溶性 V E G F R - 3 ）または機能的なリガンド結合ドメインを含む別の可溶性レセプターから構成される変異 V E G F R - 3 レセプター、基本的には細胞質および膜貫通ドメインから構成される変異 V E G F R - 3 レセプター、例えば、チロシンキナーゼドメインのいくつかまたは全ての欠失またはチロシンキナーゼドメイン内に 1 ヶ所以上の点置換を有する、不活性なチロシンキナーゼドメインを有する変異 V E G F R - 3 レセプターが挙げられるが、これらに限定されない。また、優性ネガティブな V E G F R - 3 レセプターは V E G F R - 3 レセプター配列に加えて 1 以上の異種配列を含みうるということが理解される。優性ネガティブ血管内皮細胞増殖因子レセプターの製造方法は当該分野において周知である。例えば、M a k i n e n ら、N a t u r e M e d i c i n e 7 : 1 9 9 - 2 0 5 (2 0 0 1) および M i l l a u e r ら、N a t u r e 3 6 7 : 5 7 6 - 5 7 9 (1 9 9 4) を参照。

【 0 0 3 4 】

優性ネガティブ V E G F R - 3 レセプターまたはそれをコードする核酸は、角膜移植を受けた患者に存在する内因性 V E G F R - 3 レセプターの活性が低下するように作用する。患者がヒトである場合、優性ネガティブ V E G F R - 3 レセプターまたはそれをコードする核酸分子は内因性ヒト V E G F R - 3 レセプターの活性を低下させるように作用する。図 2 B に示すヒト V E G F R - 3 レセプター（長いイソ型）では、配列番号 2 の残基 2 4 ~ 7 7 5 が細胞外ドメインを構成し、配列番号 2 の残基 7 7 6 ~ 7 9 7 が膜貫通ドメインを構成し、配列番号 2 の残基 7 9 8 ~ 1 3 6 3 が細胞質ドメインを構成し、チロシンキナーゼドメインがアミノ酸 8 4 5 ~ 1 1 7 3 に配置されている。短いイソ型は長いイソ型と類似するが、カルボキシ末端の 6 5 残基を欠失している。代表的な優性ネガティブヒト V E G F R - 3 レセプターとしては、可溶性ヒト V E G F R - 3 レセプター変異体（例えば、配列番号 2 の残基 2 4 ~ 3 5 0（イムノグロブリン様ドメイン 1 ~ 3 を含むリガンド結合ドメイン）を有する変異体または残基 2 4 ~ 7 7 5（完全な細胞外ドメイン）を有する変異体、またはこれらの変異体をコードする核酸分子、残基 2 4 ~ 7 9 7（細胞外および膜貫通ドメイン）を有するヒト V E G F R - 3 レセプター変異体またはこの変異体をコードする核酸分子、残基 2 4 ~ 8 4 4 を有するヒト V E G F R - 3 レセプター変異体（チロシンキナーゼドメインを欠失している）またはこの変異体をコードする核酸分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 3 5 】

1 つの実施態様において、本発明は、可溶性 V E G F R - 3 レセプターである V E G F R - 3 インヒビターを投与することによる患者における角膜移植後の角膜移植片生存を延長する方法を提供する。このような可溶性 V E G F R - 3 レセプターは機能的な膜貫通ドメインを欠いている。可溶性 V E G F R - 3 レセプターは V E G F R - 3 変異体であり得

、これはネイティブな膜貫通ドメインの欠失を有する。1つの実施態様において、可溶性 VEGFR-3 レセプターは細胞外ドメインまたはその一部からなる。このような可溶性 VEGFR-3 レセプターは、例えば、VEGFR-3 (例えば、ヒト VEGFR-3) の3、4、5、6または7個の細胞外 Ig-ホモロジドメインを有する VEGFR-3 変異体であり得る。この、および他の可溶性 VEGFR-3 レセプターは、慣用的な方法で製造されうる。例えば、Makinenら、既出、2001 (これは、VEGFR-3 の3個のアミノ末端 Ig-ホモロジドメインおよび IgG Fcドメインからなり、VEGFR-3 を発現する内皮細胞において全長細胞外ドメインと同じ効率で VEGF-C と結合し、VEGF-C-誘発性 VEGFR-3 ホスホリル化および続いての p42/p44 マイトジェン活性型タンパク質キナーゼ (MAPK) 活性化を阻害する可溶性 VEGFR-3 レセプターを記載する) を参照。

10

【0036】

また、本発明は、VEGFR-3 キナーゼインヒビターを含有する医薬組成物を有効量で患者に投与して患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することにより、患者における角膜移植後の角膜移植片生存を延長する方法を提供する。ある態様では、VEGFR-3 キナーゼインヒビターは VEGFR-3 触媒ドメインに結合し、さらなる態様では、VEGFR-3 キナーゼインヒビターは ATP アナログである。

【0037】

本明細書中で用いる用語「VEGFR-3 キナーゼインヒビター」は、選択的または非選択的に VEGFR-3 レセプターのチロシンキナーゼ活性を低下させるレセプターチロシンキナーゼ活性のインヒビターを意味する。このようなインヒビターは、通常、VEGFR-3 の発現に顕著な影響は与えず、そして他の VEGFR-3 活性 (例えば、リガンド結合能力) に影響を与えずに、VEGFR-3 チロシンキナーゼ活性を低下させる。VEGFR-3 キナーゼインヒビターは、VEGFR-3 触媒ドメインに直接結合する分子 (例えば、ATP アナログ) であり得る。VEGFR-3 キナーゼインヒビターは、ATP のアデニン部分を VEGFR-3 に固定すると同様に、1ヶ所以上の水素結合を介して VEGFR-3 触媒ドメインに結合することができる (Englら、J. Biol. Chem. 271: 26157-26164 (1996); Tongら、Nature Struct. Biol. 4: 311-316 (1997) および Wilsonら、Chem. Biol. 4: 423-431 (1997))。また、VEGFR-3 キナーゼインヒビターはアデニン結合部位に隣接した疎水性ポケットに結合し得る (Mohamedら、EMBO J. 17: 5896-5904 (1998); Tongら、既出、1997; および Wilsonら、既出、1997)。

20

30

【0038】

本発明において有用な VEGFR-3 キナーゼインヒビターとしては、特異的 VEGFR-3 キナーゼインヒビター (例えば、VEGFR-2 と比較して VEGF-C および VEGF-D 誘発性 VEGFR-3 キナーゼ活性を特異的にブロックするインドリノン) が挙げられる。このような特異的 VEGFR-3 キナーゼインヒビター (例えば、MAE106 および MAZ51) は、Kirkkinら、Eur. J. Biochem. 268: 5530-5540 (2001) に記載されるように製造することができる。さらなる VEGFR-3 キナーゼインヒビター (特異的な、選択的および非選択的インヒビターを含む) は当該分野において公知であるか、またはレセプターチロシンキナーゼ阻害についての多数の周知のアッセイ方法のうちの1つを用いて同定することができる。

40

【0039】

例えば、VEGFR-3 キナーゼインヒビターは、例えば、Hennequinら、J. Med. Chem. 42: 5369-5389 (1999) および Wedgeら、Cancer Res. 60: 970-975 (2000) に記載のリン酸化チロシンの産生を分析するための周知の ELISA アッセイを用いて同定することができる。このようアッセイを用いて、VEGFR-1 のような他の血管内皮細胞増殖因子レセプターよりも、そして線維芽細胞増殖因子レセプター1 (FGFR1) のような関係のないチロシンキナ

50

ーゼよりも VEGFR - 3 を阻害する分子に関してスクリーニングすることができる。簡単に説明すると、スクリーニングする分子をポリ (Glu、Ala、Tyr) 6 : 3 : 1 ランダムコポリマー支持体 (SIGMA; St. Louis, MO) でコーティングした 96 ウェルプレート中、10 mM $MnCl_2$ および 2 μ M ATP を含む HEPES (pH 7.5) 緩衝化溶液中で、細胞質レセプタードメインと共に室温で 20 分間インキュベートする。リン酸化チロシンは、マウス IgG 抗ホスホチロシン抗体 (Upstate Biotechnology; Lake Placid, New York)、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合型ヒツジ抗マウスイムノグロブリン抗体 (Amersham; Piscataway, NJ) および 2, 2' アジノ - ビス (3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸) (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) との連続インキュベーションにより検出することができる。このようなインビトロキナーゼアッセイでは、VEGFR - 3 の供給源は、例えば、ヒト VEGFR - 3 (配列番号 2) の残基 798 ~ 1363 をコードするような細胞質レセプタードメインを含む組換えバキュロウィルスで感染させた昆虫細胞から調製した溶解調製物であってよい。

【0040】

本明細書中で用いる用語、VEGFR - 3 キナーゼインヒビターは、特異的な選択的および非選択的な VEGFR - 3 のインヒビターを含む。特異的 VEGFR - 3 キナーゼインヒビターは VEGFR - 3 のチロシンキナーゼの活性を、ほとんどまたは全ての関係のないレセプターチロシンキナーゼ (例えば、FGFR1) の活性よりも、そして血管内皮細胞増殖因子レセプター (VEGFR - 1 および VEGFR - 2) の活性よりも、低下させる。選択的 VEGFR - 3 キナーゼインヒビターは VEGFR - 3 のチロシンキナーゼ活性を、ほとんどまたは全ての関係のないレセプターチロシンキナーゼ (例えば、FGFR1) よりも低下させる。このような選択的 VEGFR - 3 インヒビターは、単離した VEGFR - 3 細胞質ドメインの阻害に関して、例えば、少なくとも VEGFR - 1 および VEGFR - 2 の両方の IC_{50} よりも少なくとも 10 倍低い IC_{50} を有しうる。特定の実施態様において、本発明は、単離した VEGFR - 3 細胞質ドメインの阻害に関して、VEGFR - 1 および VEGFR - 2 の両方の IC_{50} に関して、少なくとも 20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、100 倍、200 倍、300 倍、400 倍または 500 倍低い IC_{50} を有する選択的 VEGFR - 3 キナーゼインヒビターを提供する。反対に、非選択的 VEGFR - 3 キナーゼインヒビターは、VEGFR - 1 または VEGFR - 2 または両方のチロシンキナーゼ活性を、VEGFR - 3 の場合と同じ程度まで低下させる。特定の選択的および非選択的 VEGFR - 3 キナーゼインヒビターは、本発明の方法に従って角膜移植片生存を延長させるために有用でありうることを理解される。

【0041】

また、本発明は、VEGFR - 3 結合分子である VEGFR - 3 インヒビターを含む医薬組成物を有効量で患者に投与して患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することにより、患者における角膜移植後の角膜移植片生存を延長する方法を提供する。このような VEGFR - 3 結合分子は、例えば、VEGFR - 3 の細胞外ドメインまたは VEGFR - 3 のキナーゼドメインに結合しうる。本発明において有用な VEGFR - 3 結合分子はまた、1 つの態様においてはモノクローナル抗体である抗 VEGFR - 3 抗体物質でありうる。

【0042】

1 つの実施態様において、抗 VEGFR - 3 抗体物質は VEGFR - 3 のリガンド結合部位に結合し、VEGF - C または VEGF - D または両方の VEGFR - 3 への結合を阻害する。このような抗体物質はモノクローナルであっても良いし、ポリクローナルであっても良い。例えば、抗マウス VEGFR - 3 モノクローナル抗体 AFL4 は VEGF - C の VEGFR - 3 への結合をブロックし、さらにレセプターシグナル伝達を阻害する (Kubota, Blood 96 : 546 - 553 (2000))。本発明に有用な抗 VEGFR - 3 抗体物質は、例えば、VEGFR - 3 への VEGF - C 結合の阻害に関して 5

0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、または0.0005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満の IC_{50} を有しうる。特定の実施態様において、本発明の方法はヒト $\text{VEGFR}-3$ への $\text{VEGF}-\text{C}$ 結合の阻害に関して50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満または0.0005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満の IC_{50} を有する抗ヒト $\text{VEGFR}-3$ 抗体物質を利用する。 $\text{VEGF}-\text{C}$ または $\text{VEGF}-\text{D}$ または両方の $\text{VEGFR}-3$ への結合を阻害する抗 $\text{VEGFR}-3$ 抗体物質はまた、例えば、 $\text{VEGF}-\text{C}$ 誘発性の VEGFR のチロシンリン酸化の減少により実証されるレセプターシグナル伝達を低下させ得る。

【0043】

別の態様において、本発明は、抗 $\text{VEGF}-\text{C}$ 中和抗体物質を含む医薬組成物を有効量で患者に投与して患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することにより、患者における角膜移植後の角膜移植片生存を延長する方法を提供する。本発明に有用な抗 $\text{VEGF}-\text{C}$ 中和抗体物質は、例えば、モノクローナル抗 $\text{VEGF}-\text{C}$ 中和抗体物質であり得る。

【0044】

本明細書中で用いる用語「抗体物質」は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、 $\text{VEGFR}-3$ または $\text{VEGF}-\text{C}$ に関して少なくとも約 $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ の結合活性を保持する抗体のポリペプチドフラグメントを含む、最も広い意味で使用する。抗 $\text{VEGFR}-3$ 抗体フラグメントおよび抗 $\text{VEGF}-\text{C}$ 抗体フラグメント（例えば、 Fab 、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ および Fv フラグメント）は $\text{VEGFR}-3$ または $\text{VEGF}-\text{C}$ に対する結合活性を保持することができ、それゆえ、抗体物質の定義内に含まれることは、当業者であれば理解するであろう。さらに、本明細書中で用いる用語「抗体物質」は、天然には存在しない抗体およびフラグメント（最小で、1個の V_H および1個の V_L ドメインを含む。）は、以下のものを含む。例えば、 $\text{VEGFR}-3$ または $\text{VEGF}-\text{C}$ に特異的に結合するキメラ抗体、ヒト化抗体および単鎖 Fv フラグメント（ scFv ）。このような天然には存在しない抗体は、固相ペプチド合成を用いて構築し得るか、組換えにより産生し得るか、またはBorrebaeck（編）、Antibody Engineering（第2版）New York: Oxford University Press（1995）に記載の可変重鎖および可変軽鎖からなるコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすること等により得ることができる。

【0045】

$\text{VEGFR}-3$ に「特異的な」、すなわち $\text{VEGFR}-3$ に「特異的に結合する」抗体物質は、ほとんどまたは全ての関連しないレセプターチロシンキナーゼ（例えば、 $\text{FGFR}1$ ）および他の血管内皮細胞増殖因子レセプター（例えば、 $\text{VEGFR}-1$ および $\text{VEGFR}-2$ ）よりも実質的に高い親和性で $\text{VEGFR}-3$ に結合する。同様に、 $\text{VEGF}-\text{C}$ に「特異的な抗体物質」、すなわち $\text{VEGF}-\text{C}$ に「特異的に結合する」抗体物質は、他の血管内皮細胞増殖因子（例えば、 $\text{VEGF}-\text{B}$ ）と比較した場合、ほとんどまたは全ての関連のない増殖因子レセプターよりも実質的に高い親和性で $\text{VEGF}-\text{C}$ に結合する。

【0046】

$\text{VEGFR}-3$ に「選択的な」抗体物質、すなわち $\text{VEGFR}-3$ に「選択的に結合する」抗体物質は、 $\text{FGFR}1$ のようなほとんどまたは全ての関連のないレセプターチロシンキナーゼよりも実質的に高い親和性で $\text{VEGFR}-3$ に結合する。同様に、 $\text{VEGF}-\text{C}$ に「選択的な」抗体物質、すなわち $\text{VEGF}-\text{C}$ に「選択的に結合する」抗体物質は、ほとんどまたは全ての関連のない増殖因子レセプターよりも実質的に高い親和性で $\text{VEGF}-\text{C}$ に結合する。特異的および選択的な抗 $\text{VEGFR}-3$ および抗 $\text{VEGF}-\text{C}$ 抗体物質を本発明の方法に用い得ることが理解される。

【0047】

抗 $\text{VEGFR}-3$ 抗体物質は、例えば、 $\text{VEGFR}-3$ 融合タンパク質または $\text{VEGF}-\text{R}-3$ の一部（配列番号2など）をコードする合成ペプチドをイムノゲンとして用いて製

10

20

30

40

50

造することができる。同様に、抗 V E G F - C 抗体物質は、V E G F - C 融合タンパク質または V E G F - C の一部（配列番号 4 など）をコードする合成ペプチドをイムノゲンとして用いて製造することができる。組換えにより製造することができる精製 V E G F R - 3 または V E G F - C、または V E G F R - 3 または V E G F - C のフラグメント（合成ペプチドのような V E G F R - 3 または V E G F - C のペプチドの一部を含む）をイムノゲンとして用いることを当業者は理解するであろう。さらに、V E G F R - 3 または V E G F - C の非免疫原性フラグメントまたは合成ペプチドは、ハプテンをキャリア分子（例えば、ウシ血清アルブミン（B S A）またはキーホールリンペットヘモシアニン（K L H : k e y h o l e l i m p e t h e m o c y a n i n））にカップリングさせることにより免疫原性にする事ができる。さらに、種々の他のキャリア分子およびハプテンのキャリア分子へのカップリング方法が当該分野において周知であり、H a r l o w および L a n e , A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l (C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , 1 9 8 8) 等に記載されている。

10

20

30

【0048】

V E G F R - 3 のリガンド結合部位に結合し、V E G F R - 3 へのリガンド結合を阻害する抗 V E G F R - 3 抗体物質はまた、例えば、V E G F R - 3 の細胞外ドメインをイムノゲンとして（所望であれば F c 融合タンパク質として）用いる慣用的な方法により製造することができる。ハイブリドーマまたは抗体ライブラリーは、例えば、V E G F R - 3 の細胞外ドメイン（50 ng / ml）または V E G F R - 2 のような別のレセプターの細胞外ドメイン（同量）（コントロールとして）を用いてコーティングしたプレートを用いる E L I S A により、スクリーニングすることができる。続いて、マウス幹細胞因子および m y c エピトプタグの N - 末端シグナル配列を含む成熟 V E G F - C を用いる E L I S A アッセイ等を用いて、ポジティブハイブリドーマまたはライブラリークローンを V E G F - C 結合阻害に関してスクリーニングすることができる。V E G F R - 3 / F c の細胞外ドメインを用いてコーティングした E L I S A プレートを、種々の抗体希釈物と共にインキュベートし、次いで m y c タグ型 V E G F - C 遺伝子でトランスフェクトした細胞由来の順化培地と共にインキュベートしてもよい。m y c タグ型 V E G F - C との結合は、例えば、抗 m y c 抗体（9 E 1 0 ; S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y ; S a n t a C r u z , C A）を用いて検出することができる。例えば、K u b o ら

【0049】

実質的に精製した抗体物質を用いて本発明の医薬組成物を製造する場合、このような抗体物質は、通常は抗体が細胞中で会合しているポリペプチド、核酸および他の細胞性物質を実質的に有さない。また、このような実質的に精製した抗体物質は、関係のない特異性の抗体物質（すなわち、V E G F R - 3 に特異的に結合しない、または V E G F - C に特異的に結合しない）を実質的に有さない。抗体物質は、例えば、ポリクローナル抗 V E G F R - 3 抗血清の V E G F R - 3 アフィニティー精製により、V E G F R - 3 ポリペプチド（配列番号 2 等）に対するファージディスプレイ型抗体をスクリーニングすることにより、またはハイブリドーマ上清から精製したモノクローナル抗体として、実質的に精製した形態で製造することができる。

40

【0050】

また、本発明に有用な V E G F R - 3 インヒビターは V E G F R - 3 発現をダウンレギュレートする分子（例えば、リボザイムまたは V E G F R - 3 アンチセンス核酸分子のような配列特異的リボヌクレアーゼ）でありうる。従って、本発明はさらに V E G F R - 3 発現をダウンレギュレートする V E G F R - 3 インヒビターを含む医薬組成物を有効量で患者に投与して患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することにより、患者における角膜移植後の角膜移植片生存を延長する方法を提供する。

【0051】

同様に、本発明に有用な V E G F R - 3 インヒビターはまた、V E G F - C 発現をダウ

50

ンレギュレートする分子（例えば、リボザイムのような配列特異的リボヌクレアーゼ）であってもよいし、または V E G F - C アンチセンス核酸分子等であってもよい。それゆえ、1つの実施態様において、本発明は、V E G F - C 発現をダウンレギュレートする V E G F R - 3 インヒビターを含む医薬組成物を有効量で患者に投与して、患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することにより、患者における角膜移植後の角膜移植片生存を延長する方法を提供する。

【0052】

さらなる実施態様において、本発明の方法は、V E G F R - 3 または V E G F - C 発現をダウンレギュレートする配列特異的リボヌクレアーゼである V E G F R - 3 インヒビターを用いて実施される。このような配列特異的リボヌクレアーゼは、例えば、V E G F R - 3 m R N A または V E G F - C m R N A または V E G F R - 3 または V E G F - C の発現または活性をポジティブに調節する調節分子の m R N A の特異的な切断を触媒することができる。1つの実施態様において、本発明の方法は、V E G F R - 3 R N A の切断により V E G F R - 3 の発現をダウンレギュレートする配列特異的リボヌクレアーゼ（例えば、リボザイム）を用いて実施される。別の態様において、本発明の方法は、V E G F - C R N A の切断により V E G F - C の発現をダウンレギュレートする配列特異的リボヌクレアーゼ（例えば、リボザイム）を用いて実施される。

10

【0053】

本明細書中で用いる用語「配列特異的リボヌクレアーゼ」は、規定のリボヌクレオチド配列での R N A の切断を触媒する分子を意味する。配列特異的リボヌクレアーゼは、例えば、リボザイムまたは D N A 酵素であってもよい。本明細書中で用いる用語「リボザイム」は、規定のリボヌクレオチド配列での R N A の切断を触媒する R N A 分子を意味する。

20

【0054】

リボザイム（例えば、ハンマーヘッドおよびヘアピン）は、一般的な方法により設計および製造されうる。リボザイム（例えば、ハンマーヘッドおよびヘアピン）の標的切断部位（例えば、V E G F R - 3 または V E G F - C m R N A に存在する部位）に対する特異性は、リボザイムおよびおおよそその R N A 標的の間の塩基対合により決定される。例えば、ハンマーヘッドリボザイムは、「U X」ジヌクレオチド（X はグアノシンを除く任意のリボヌクレオチドであり、X がシトシンである場合に切断の割合が高い）の後を切断する。通常、標的配列中には「N U X」トリプレット（N は任意のリボヌクレオチドであり、G U C、C U C または U U C トリプレットが標的 R N A 中に頻繁に存在する）が存在する。次いで、6 ~ 8 ヌクレオチド長のアンチセンス配列の2個のストレッチ（これはその間に触媒性ハンマーヘッドを形成する21ヌクレオチド配列に隣接する）を、トリプレットの第3のヌクレオチド（「X」）の周りの標的配列に基づいて設計する。このヌクレオチドはリボザイムと塩基対形成しない。ハンマーヘッドリボザイムの設計方法は、例えば、H a u s w i r t h および L e w i n、P r o g . R e t i n . E y e R e s . 19 : 689 - 710 (2000) および L e w i n および H a u s w i r t h、T r e n d s . M o l . M e d . 7 : 221 - 228 (2001) に記載されるように周知である。

30

【0055】

また、ヘアピンリボザイムは当該分野において周知であり、本発明の方法に従って角膜移植片生存を延長させる際に有用であり得る。ヘアピンリボザイムは約34ヌクレオチドの触媒性コアを有し、配列 N N Y N G U C N N N N N N（配列番号6）（式中、N は任意のヌクレオチドであり、Y はピリミジンである）を認識する。「N G U C」（配列番号7）配列は、リボザイムと塩基対形成しない。1つの実施態様において、本発明の方法は、例えば、V E G F R - 3 または V E G F - C m R N A 中に存在する「N G U C」（配列番号7）モチーフを認識するヘアピンリボザイムを用いて実施される。さらなる実施態様において、本発明の方法は、触媒コア中に3塩基ループよりもテトラループを有するか、または触媒コアの39位にUのCへの置換を有するか、またはその両方を有するヘアピンリボザイムに依存する（H a u s w i r t h および L e w i n、既出、2000；および L e w i n および H a u s w i r t h、既出、2001）。

40

50

【0056】

当業者であれば、通常、VEGFR-3またはVEGF-C mRNA等の中の標的配列は、リボザイムが標的部位に結合する能力を干渉しうる二次構造を避けるように選択されることを理解する。周知の構造推定アルゴリズムを用いることができる。さらに、望ましい場合には、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて相補配列とのハイブリダイゼーションへの容易性(accessibility)に関して、可能性のあるリボザイムを評価することができる。ヒトVEGFR-3およびヒトVEGF-Cをコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、本明細書中において配列番号1および配列番号3として開示される。種ホモログをコードする追加のヌクレオチド配列もまた、Finnerlyら、既出、1993;およびEichmannら、既出、1996等に記載されるように、当該分野において周知である。

10

【0057】

配列特異的リボヌクレアーゼ(リボザイムおよびDNA酵素を含む)を上記の通りに設計し、核酸分子の合成に関する標準的な方法により製造する。Keら、Int. J. Oncol. 12:1391-1396(1998);Dohertyら、Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 30:457-475(2001);HauswirthおよびLewin、既出、2000;およびLewinおよびHauswirth、既出、2001をも参照。配列特異的リボザイムもまた、インビトロ選択によりランダム配列のプールから同定することができる。このような方法は、例えば、BartelおよびSzostak、Science 261:1411-1418(1993)、Breaker、Chem. Rev. 97:371-390(1997)およびSantoroおよびJoyce、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:4262-4266(1997)に記載されるように、非常に良く確立されている。

20

【0058】

リボザイムが、ウィルスまたは他のベクターを用いずに患者に投与されるべきである場合、望ましい場合には安定性を上昇させるためにリボザイムを修飾してもよい。治療用リボザイムに有用な修飾としては、分子の3'末端のブロック、ピリミジンの2'位のブロックが挙げられるが、これらに限定されない。安定型リボザイムは数時間の半減期を有し得、例えば、静脈内または局所注射(topical injection)を用いて反復的に投与することができる。当業者であれば、リボザイムはまた、ウィルス遺伝子治療ベクター中での発現により投与されうることを理解する。リボザイムをコードするDNAオリゴヌクレオチドは、RNA pol IIまたはRNA pol IIIプロモーターの下流にクローニングされ、望ましい場合にはtRNA_{val}、U6 snRNAまたはアデノウィルスVA1 RNAのような遺伝子の転写物内に組み込まれうる。

30

【0059】

また、本発明の方法に有用なVEGFR-3インヒビターは、VEGFR-3またはVEGF-Cの発現をダウンレギュレートするアンチセンス核酸分子であり得る。このようなアンチセンス核酸分子は、VEGFR-3またはVEGF-CのmRNA、またはVEGFR-3またはVEGF-Cの発現または活性をポジティブに調節する調節分子のmRNAの、mRNAの翻訳を低下させるか、またはmRNA分解を亢進させる。1つの実施態様において、本発明の方法は、VEGFR-3アンチセンス核酸分子を含む医薬組成物を用いて実施される。別の態様において、本発明の方法は、VEGF-Cアンチセンス核酸分子を含む医薬組成物を用いて実施される。

40

【0060】

本明細書中で用いる用語「アンチセンス核酸分子」は、メッセンジャーRNAまたは別の特定のRNA転写物の分子の全てまたは一部に配列が相補的である核酸分子を意味する。従って、VEGFR-3アンチセンス核酸分子は、VEGFR-3 mRNA(ヒトVEGFR-3 mRNA等)のいくらか、または全てに相補的である。同様に、VEGF-Cアンチセンス核酸分子は、VEGF-C mRNA(ヒトVEGF-C mRNA等)のいくらか、または全てに相補的である。アンチセンス核酸分子は、例えば、DNAま

50

たはRNAであってもよく、これは天然に存在するヌクレオチドおよび合成ヌクレオチド、または他の天然には存在しない改変（安定性を改善するリン酸骨格への修飾など）を含んでいてもよい。ホスホロチオエートおよび他の修飾オリゴヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、本明細書中で用いる用語アンチセンス核酸分子に含まれる。

【0061】

以下の記載により制限されることなく、本発明に有用なアンチセンス核酸分子はmRNA翻訳を低下させ、mRNA分解を亢進することにより、標的mRNA（例えば、ヒトVEGFR-3またはVEGF-C mRNA）の発現を低下させることができる。アンチセンス核酸分子は、例えば、VEGFR-3またはVEGF-C mRNA（ヒトVEGFR-3 mRNAまたはヒトVEGF-C mRNA等）中の標的核酸配列と完全に相補的であってもよいし、または内因性の親核酸配列に対して1ヶ所以上のミスマッチを含んでいてもよいことが理解される。アンチセンス方法を用いて発現を低下させるためのホモロジー要件は、経験則により決定することができる。通常、少なくとも約80～90%の核酸配列同一性が本発明で有用なアンチセンス核酸分子中に存在するが、アンチセンスオリゴヌクレオチド中でより高い核酸配列同一性が用いられることが多く、患者の内因性転写物と完全に同一であってもよい。望ましい場合、標的配列は、アンチセンス分子により侵入されて鎖のうちの1本が置き換えられている二本鎖のらせん状に並べられた幹（stem）に加えて、核形成が生じる部位に小さい一本鎖領域を有するように選択し得る（MirおよびSouthern, Nature Biotech. 17: 788-792 (1999)）。アンチセンス核酸分子を選択する方法および製造する方法は当該分野において周知であり、コンピューター内でのアプローチを含む（Patzelら、Nucleic Acids Res. 27: 4328-4334 (1999)；Chengら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93: 8502-8507 (1996)；LebedevaおよびStein, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 41: 403-419 (2001)；JulianoおよびYoo, Curr. Opin. Mol. Ther. 2: 297-303 (2000)；およびCho-Chung, Pharmacol. Ther. 82: 437-449 (1999)）。

【0062】

アンチセンス核酸分子は、例えば、配列番号1に示すヒトVEGFR-3配列または別のVEGFR-3をコードする配列またはコントロール配列または5'または3'非翻訳配列に相補的な少なくとも10個の連続ヌクレオチドを含みうる。また、アンチセンス核酸分子は、例えば、配列1または別のVEGFR-3コード配列またはコントロール配列または5'または3'非翻訳配列に相補的な、少なくとも15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、300、500またはそれ以上の連続ヌクレオチドを含み得る。望ましい場合、アンチセンス核酸分子は標的メッセンジャー（message）の全長に相補的であり得る。同様に、本発明に有用なアンチセンス核酸分子は、例えば、配列番号3に示すヒトVEGF-C配列または別のVEGF-Cコード配列またはコントロール配列または5'または3'非翻訳配列に相補的な少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、300またはそれ以上の連続ヌクレオチドを含み得る。ホスホロチオエートおよび他のオリゴヌクレオチド（そうでなければ修飾骨格）を含む本発明に有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、VEGFR-3またはVEGF-Cに相補的な（例えば、配列番号1に示すヒトVEGFR-3配列または配列番号3に示すヒトVEGF-C配列に相補的な）、例えば、12～100ヌクレオチド、例えば、12～50または12～30のヌクレオチド、または15～100、15～50または15～30ヌクレオチド、または20～100、20～50または20～30ヌクレオチドを有しうる。本発明に有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、配列番号1に示すヒトVEGFR-3配列または配列番号3に示すヒトVEGF-C配列に相補的な、例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ヌクレオチドを有しうる。

【0063】

1つの実施態様において、アンチセンス核酸分子はホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチドのような修飾骨格を有するヌクレアーゼ耐性核酸分子である（各リンにおいて非架橋酸素の代わりに硫黄分子が置き換えられている）。さらに、本発明に有用なアンチセンス核酸分子は、2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチド（2'-O-meRNA）またはメチルホスホネートオリゴデオキシヌクレオチド（me-PDNA）（これらはヌクレアーゼに対してより耐性であり、対応するホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチドよりも安定な二本鎖をRNAと形成する）のセグメントを含むホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチドのような混合型骨格オリゴヌクレオチドを含む。（Chong、Chung、既出、1999）。また、本発明に有用なアンチセンス核酸分子としては、いくつかの連続したオリゴデオキシ含有塩基の「中央コア」、および残りの塩基に組み込まれている2'-O-アルキルオリゴリボヌクレオチド（メチルまたはメトキシエトキシ）修飾を含み、骨格が全体的にホスホロチオエート連結から構成されているキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる（「gap-mer」と記載する）。例えば、6～8オリゴデオキシリボヌクレオチドの中央コアは、5'および3'末端で6～8個の2'-O-アルキルオリゴリボヌクレオチド（alkyloligoribonucleotides）が隣接し得る。

【0064】

以下の記載に拘束されることは意図しないが、アンチセンス活性は、ハイブリダイゼーション部位でRNase HによるmRNA鎖の切断から生じうる。それゆえ、1つの実施態様において、アンチセンス核酸分子はRNase Hコンピテント（competent）である骨格部分を含む。このようなコンピテント骨格は、ホスホジエステル連結またはホスホロチオエート連結、およびデオキシリボース糖部分を有する。荷電していない骨格（例えば、メチルホスホネートまたはペプチド核酸結合）または2'位での2'-O-メチルリボースまたは別の置換は、RNase Hによる切断に対してコンピテントではない。

【0065】

また、本発明に有用なVEGFR-3インヒビターは、VEGFR-3刺激の際に生じる細胞内シグナル伝達のインヒビターであるかもしれない。VEGFR-3シグナル伝達は、VEGF-CまたはVEGF-DのVEGFR-3の第2のイムノグロブリンホモロジドメインへの結合で始まり、レセプター二量体化およびトランスリン酸化が続く。VEGFR-3長形イソ型は、短形イソ型よりも高い割合で自己リン酸化され、また、2個のイソ型はシグナル伝達特性という点で異なる。長形イソ型はソフトアガー上での細胞増殖およびヌードマウスの腫瘍形成を媒介し得る（Fournierら、Oncogene 11:921-931（1995）；Pajusolaら、既出、1993；KarkkainenおよびPetrova, Oncogene 19:5598-5605（2000）；およびPetrovaら、Exper. Cell Res. 253:117-130（1999））。

【0066】

また、VEGFR-3リガンドでの刺激は、Shcタンパク質の迅速なチロシンリン酸化を誘発する。Shcリン酸化レベルはVEGFR-3の長形イソ型を発現する細胞においてより高く、唯一長形イソ型で存在するTyr1377のフェニルアラニンへの変異がShcリン酸化を低下させ、VEGFR-3による腫瘍形成細胞形質転換を阻害する。Shcリン酸化部位の変異はVEGFR-3の形質転換活性の上昇を導くので、Shcは、おそらくVEGFR-3活性のネガティブレギュレーターとして働く（Fournierら、18:507-514（1999））。さらに、両方のVEGFR-3イソ型はリガンド依存性の様式でGrb2およびPLCのSH2ドメインに結合するが、PI3-KのSH2ドメインには結合しない（Fournierら、既出、1995；Pajusolaら、Oncogene 9:3545-3555（1994）；およびFournierら、J. Biol. Chem. 271:12956-12963（1996））。

【0067】

VEGFR-3を高レベルで発現するヒト赤白血病細胞株で得られた結果は、VEGF-C刺激が細胞増殖およびシグナル伝達分子であるShc、Grb2およびヒト7なしの息子(hSOS、son of sevenless)の活性型VEGFR-3への補充を誘発する(Wangら、Blood 90:3507-3515(1997))。さらに、VEGF-C刺激は、細胞骨格タンパク質であるパキシリンのチロシンリン酸化を誘発し、パキシリンの関連接着焦点チロシンキナーゼ(RAFTK、related adhesion focal tyrosine kinase)との会合の上昇を生じる。c-Jun NH₂-末端キナーゼ(JNK)もまた、VEGF-C刺激に続いて活性化されうる(Liuら、J. Clin. Invest. 99:1798-1804(1997))。さらに、Shcのチロシンリン酸化は、マイトジェン活性型タンパク質キナーゼであるERK1およびERK2の活性化を導く(図1を参照)。

10

【0068】

従って、VEGFR-3インヒビターは、Shc、Grb2、hSOSまたはPLCの補充、発現または活性等を調節することにより作用するVEGFR-3細胞内シグナル伝達のインヒビターでありうる。また、VEGFR-3インヒビターは、例えば、パキシリンのRAFTKとの会合を調節することにより、またはパキシリンまたはRAFTKの発現または活性化を調節することにより、VEGFR-3細胞内シグナル伝達に影響を与えるかもしれない。同様に、VEGFR-3細胞内シグナル伝達のインヒビターは、JNKの補充、発現または活性、またはERK1またはERK2の補充、発現または活性を調節しうる。本明細書中で用いる用語「VEGFR-3細胞内シグナル伝達のインヒビター」は、VEGFR-3の発現または活性に直接影響を与えることなく、VEGF-CのVEGFR-3への結合に対する、VEGFR-3の下流にある1つ以上の細胞反応を低下させるように作用する分子を意味する。VEGFR-3細胞内シグナル伝達のインヒビターはVEGFR-3細胞内経路の構成成分に対して正または負に作用し得、このようなインヒビターは小分子、ATPアナログ、タンパク質または核酸分子(優性ネガティブタンパク質、キナーゼインヒビター、リボザイムまたはアンチセンス分子を含む)であり得る(しかし、これらに限定されない)ことが理解される。例えば、ShcはVEGFR-3シグナル伝達の負のレギュレーターであるので、VEGFR-3細胞内シグナル伝達のインヒビターは、Shcの補充、発現または活性を上昇させる分子であるかもしれない。

20

30

【0069】

VEGFR-3細胞内シグナル伝達のインヒビターは、特異的な、選択的または非選択的インヒビターであり得る。このような選択的インヒビターは、FGFR1のような無関係のレセプターチロシンキナーゼのほとんどまたは全てにより誘発されるシグナル伝達よりも、VEGFR-3シグナル伝達を低下させる。VEGFR-3細胞内シグナル伝達の特異的なインヒビターは、FGFR1のような無関係のレセプターチロシンキナーゼのほとんどまたは全てのシグナル伝達よりも、および血管内皮細胞増殖因子レセプターであるVEGFR-1およびVEGFR-2よりも、VEGFR-3シグナル伝達を低下させる。VEGFR-3細胞内シグナル伝達の特異的なインヒビターは、他のチロシンキナーゼレセプターおよび1種以上の他の血管内皮細胞増殖因子レセプターのシグナル伝達を、VEGFR-3により誘発されるシグナル伝達と同程度まで低下させる。当業者であれば、VEGFR-3細胞内シグナル伝達の特異的な、選択的および非選択的インヒビターが本明細書中に開示される方法に従う角膜移植片生存の延長に有用であり得ることを理解する。

40

【0070】

また、本発明は、抗リンパ管新生薬剤を患者に投与して患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することにより患者における角膜移植後の角膜移植片生存を延長する方法を提供する。本明細書中で用いる用語「抗リンパ管新生薬剤」は、既存のリンパ管からの新規な管の発生または形成を減少させるまたは阻害する分子を意味する。このような抗リンパ管新生薬剤は、例えば、VEGFR-3インヒビターまたはリンパ管新生を現実に促進する

50

様に機能する別の分子のインヒビターであってもよい。VEGFR-3インヒビターに関して上に記載したように、このような分子は、優性ネガティブインヒビター、配列特異的リボヌクレアーゼ、アンチセンス分子、抗体、小分子インヒビターまたは通常はリンパ管新生薬剤により活性化される細胞内経路のインヒビターであり得るが、これらに限定されない。

【0071】

1つの実施態様において、角膜移植片生存はまた、VEGFR-3インヒビターを含む医薬組成物に加えて、抗血管新生薬剤を患者に投与することにより、延長される。別の態様において、免疫抑制薬剤はVEGFR-3インヒビターを含む医薬組成物に加えて、望ましい場合には、抗血管新生薬剤の投与と併せて患者に投与される。

10

【0072】

本明細書中で用いる用語「抗血管新生薬剤」は、血管新生を低下させる、または阻害する分子を意味する。抗血管新生薬剤およびVEGFR-3インヒビター、または他の抗リンパ管新生薬剤は、同一または異なる医薬組成物中で独立して、または同時に、同一または異なる投与経路により投与されることが理解される。1つの実施態様において、本発明は、抗リンパ管新生および抗血管新生の活性の両方を有する二機能性分子を投与することにより実施される。さらなる実施態様において、本発明はVEGFR-3インヒビターおよび抗血管新生薬剤を含む二機能性分子を投与することにより実施される。

【0073】

本発明に有用な種々の抗血管新生薬剤が当該分野において公知であり、慣用的な方法により製造されうる。例えば、HagedornおよびBikfalvi, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 34: 89-110 (2000) およびKirschら, J. Neurooncol. 50: 149-163 (2000) を参照。抗血管新生薬剤としては、小分子、タンパク質（例えば、血管新生因子およびレセプター、転写因子および抗体およびその抗原結合フラグメント）、ペプチドおよびペプチド模倣物、および核酸分子（リボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド、および優性ネガティブな血管新生因子およびレセプター、転写因子、および抗体およびその抗原結合フラグメント等をコードする核酸分子を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0074】

抗血管新生薬剤は、例えば、正常な状態または病理学的状態における血管新生の主要誘導物質であり、初期の血管新生に必須である血管内皮細胞増殖因子（VEGF）のような血管新生因子の発現またはシグナル伝達を低下させるインヒビターまたは中和抗体でありうる。VEGFの生物学的効果としては、内皮細胞増殖、生存、移動および管形成の刺激、および血管透過性の調節が挙げられる。また、抗血管形成薬剤は線維芽細胞増殖因子（FGF）ファミリー（例えば、FGF-1（酸性）、FGF-2（塩基性）、FGF-4またはFGF-5（Slavinら, Cell Biol. Int. 19: 431-444 (1995); FolkmanおよびShing, J. Biol. Chem. 267: 10931-10934 (1992)）の1つのメンバー等の別の血管新生因子または内皮細胞特異的Tie2レセプターチロシンキナーゼ（Davisら, Cell 87: 1161-1169 (1996); およびSuriら, Cell 87: 1171-1180 (1996)）を介してシグナル伝達を行う因子であるアンジオポエチン-1、またはこれらの血管新生因子のうちの1つのレセプターを、阻害し得る。種々のメカニズムは血管新生因子の活性を阻害するように作用しうる（レセプター結合の直接阻害、血管新生因子の細胞外空間への分泌の減少による間接阻害または血管新生因子のシグナル伝達、発現または機能の阻害を含むが、これらに限定されない）が理解される。

30

40

【0075】

種々の他の分子もまた、本発明に有用な抗血管形成薬剤として機能しうる（アンジオスタチン、エンドスタチン、フィブロネクチンのヘパリン結合フラグメント、抗トロンビンの修飾型、コラゲナーゼインヒビター、基底膜ターンオーバーインヒビター、アンジオスタチンステロイド、血小板因子4およびそのフラグメントおよびペプチド、トロンボスポ

50

ンジンおよびそのフラグメントおよびペプチド、およびドキシソルピシン (O'Reilly ら、Cell 79: 315-328 (1994)) ; O'Reilly ら、Cell 88: 277-285 (1997) ; Homandberg ら、Am. J. Path. 120: 327-332 (1985) ; Biochim. Biophys. Acta 874: 61-71 (1986) ; および O'Reilly ら、Science 285: 1926-1928 (1999) が含まれるが、これらに限定されない)。

【0076】

本発明に有用な代表的な抗血管形成薬剤としては、アンジオスタチン、エンドスタチン、メタスタチンおよび 2ME2 (EntreMed; Rockville, MD)、抗 VEGF 抗体 (例えば、Avastin (Genentech; South San Francisco, CA)) ; および VEGFR-2 インヒビター (例えば、SU5416)、VEGFR-2 の小分子インヒビター (SUGEN; South San Francisco, CA) および SU6668 (SUGEN)、VEGFR-2 の小分子インヒビター、血小板由来増殖因子および線維芽細胞増殖因子レセプターが挙げられるが、これらに限定されない。当該分野において周知であるか、または慣用的な方法により製造することができるこれらおよび他の抗血管新生薬剤は、用語「抗血管新生薬剤」の範囲内にあり、本発明の方法に従って角膜移植片生存を延長するために使用し得ることが理解される。

10

【0077】

また、VEGFR-3 インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤に加えて、免疫抑制剤を角膜移植患者に投与することができる。このような免疫抑制剤は、例えば、同種移植片拒絶の危険性が高い角膜移植患者または同種移植片拒絶と一致する 1 種以上の症状を示す患者を治療するために有用であるかもしれない。本発明の方法で有用な免疫抑制剤には、コルチコステロイドのようなステロイド、ステロイドである酢酸プレドニゾロン、シクロスポリンおよびタクロリムス (FK506) および抗 T リンパ球、抗 CD4+ 細胞、抗-ICAM-1 および抗-IL-2 抗体のような治療用モノクローナル抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0078】

コルチコステロイド免疫抑制剤は、例えば、局所的に、眼周囲に、全身的にまたは複数の投与経路を用いて投与することができる。例えば、酢酸プレドニゾロンは 1% 製剤として局所的に投与することができる。局所用酢酸プレドニゾロンを、静脈内メチルプレドニゾロンパルス療法 (3~5 mg/kg IV プッシュ) と併用した緩和な反応用に 1 時間毎に塗布し、続いて強い反応用に 5 日間、経口用プレドニゾン (1 mg/kg/日) を投与してもよい。局所用治療と組み合わせた場合、望ましい場合、毎日の経口プレドニゾン (60~80 mg) を静脈内メチルプレドニゾロンの単回投与 (500 mg) で置き換えることができる。当業者であれば、これらおよび他のコルチコステロイド免疫抑制剤が本発明の方法に有用であり得ることを理解する。

30

【0079】

免疫抑制剤であるシクロスポリンもまた本発明の方法に有用であり、例えば、数ヶ月または数年の期間にわたり全身投与され得るか、または例えば 2% シクロスポリン製剤として局所投与されうる。治療用モノクローナル抗体もまた、本発明の方法において有用であり得、例えば、抗 T リンパ球または他の免疫抑制モノクローナル抗体を眼房内 (intracamerally) 投与することができる。望ましい場合、抗 VEGFR-3 インヒビターを含む医薬組成物と併用して、本発明の方法に従って、これらおよび他の免疫抑制剤を投与し得ることが理解される。

40

【0080】

本発明の方法において、VEGFR-3 インヒビターを含む医薬組成物は角膜移植の前、間またはその後に投与することができる。望ましい場合、VEGFR-3 インヒビターを含む医薬組成物の投与が、必要とされる場合に反復的に投与されうる。1 つの実施態様において、少なくとも 1 ヶ月の期間にわたり、投与が繰り返される。別の実施態様において

50

て、少なくとも6ヶ月の期間にわたり、投与が繰り返される。

【0081】

さらなる態様において、本発明は、角膜移植前にVEGFR-3インヒビターを含む医薬組成物を有効量で患者に投与し、および角膜移植後にVEGFR-3インヒビターを含む医薬組成物を有効量で患者に投与して患者の角膜におけるリンパ管新生を抑制することにより、患者内における角膜移植の後の角膜移植片生存を延長する方法を提供する。手術前および手術後用の医薬組成物は同一でも、異なってもよく、そして同一または異なる送達経路を用いて投与されうる。

【0082】

VEGFR-3インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤を含む医薬組成物は、角膜移植の前、角膜移植の間、または角膜移植に続いて、またはこれらの時点を組み合わせて、投与されることが理解される。さらに、VEGFR-3インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤を含む医薬組成物は、全ての患者に対する慣用的な予防として、手術の前、間またはその後に同種移植片拒絶の症状の発症前に投与することができ、または危険性の高い患者（例えば、移植片拒絶の病歴を有する患者）に選択的に投与されることが理解される。投与は、例えば、2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、1年または2年の期間にわたって、抗リンパ管新生薬剤の有利な効果を維持するために必要な頻度で反復されうる。当業者であれば、投与頻度がVEGFR-3インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤の正確な性質および投与される濃度、および必要であれば、用いる持続放出製剤に依存することを認識する。本発明の方法に有用な眼科用組成物は、例えば、1日1回または2回、または1日3回または4回投与され得る。重要な期間（例えば、手術直後、または同種移植片拒絶の1つ以上の症状の発生時）に、眼科用組成物（例えば、局所用眼科用組成物）は、例えば、一時間毎を基本として、より頻繁に投与し得ることが理解される。

10

20

【0083】

本発明の方法では、VEGFR-3インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤は医薬組成物中で投与される。本発明に有用な医薬組成物は、VEGFR-3インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤を、例えば、約0.0001重量%/体積～約0.1重量%/体積の濃度範囲で含む。本発明の方法に有用な医薬組成物はさらに、医薬組成物（例えば、眼科用組成物）の製造のために、当該分野において周知の賦形剤を含みうる。

30

【0084】

本発明に従い、VEGFR-3インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤はインヒビターまたは薬剤を眼に有効な量で送達するような十分な濃度で投与する。通常、眼用溶液は、例えば、VEGFR-3インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤を約0.0001%～約0.1%（重量/体積）の濃度範囲で、例えば、約0.0005%～約0.1%（重量/体積）で含有する。

【0085】

VEGFR-3インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤は、望ましい場合は、眼科用に許容されるキャリア（これは、投与する眼に対して有害な影響を長期間又は永続的に実質的に有さない任意のキャリアである）を含む眼科用組成物中で投与することができる。眼科用に許容されるキャリアの例としては、水（例えば、蒸留水または脱イオン水）、生理食塩水、および他の水性媒体が挙げられるが、これらに限定しない。1つの実施態様において、眼科用組成物は可溶性抗リンパ管新生薬剤（例えば、可溶性VEGFR-3インヒビター）を含む眼用溶液である。別の実施態様において、眼科用組成物はVEGFR-3インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤を適切なキャリア中の懸濁物として含有する。

40

【0086】

局所用眼科用組成物は、角膜移植片生存の延長に関して本発明の方法で有用であり得、これには点眼剤、眼軟膏、眼用ゲルおよび眼用クリームが挙げられるこれらに限定されない。このような眼科用組成物は塗布しやすく、活性成分を有効に送達し、全身性の副作用

50

の可能性を避ける。

【0087】

代表的な局所用 (t o p i c a l) 組成物の組成を以下の表 1 に示す。

【表 1】

表 I

成分	量 (% W/V)
VEGFR-3 インヒビターまたは 抗リンパ管新生薬剤	約 0.0001 ~ 約 0.1
保存剤	0-0.10
ビヒクル	0-40
張力調節剤	1-10
緩衝剤	0.01-10
pH 調節剤	適量 (pH4.5 ~ 7.5)
抗酸化剤	必要に応じて
精製水	100%にするために必要に応じて

10

20

【0088】

望ましい場合、本発明に有用な眼科用組成物 (例えば、表 1 に示す局所用組成物) 中に保存剤を含みうる。このような保存剤としては、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、チメロサル、酢酸フェニル水銀および硝酸フェニル水銀が挙げられるが、これらに限定されない。局所用眼科用組成物に有用なビヒクルとしては、ポリビニルアルコール、ポビドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポロキサマー、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースおよび精製水が挙げられ、これらに限定しない。

【0089】

望ましい場合、張力調節剤 (t o n i c i t y a d j u s t o r) は、本発明の方法に従って角膜移植片生存を延長するために投与される眼科用組成物中に含有することができる。このような張力調節剤は、例えば、塩 (例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、マンニトールまたはグリセリン) または、別の製薬上許容される、または眼科用に許容される張力調節剤であってもよい。

30

【0090】

得られた製剤は眼科用に許容されるならば、種々の緩衝剤および pH を調節するための方法を用いて、本発明に有用な眼科用組成物を製造することができる。このような緩衝剤としては、酢酸塩緩衝剤、クエン酸塩緩衝剤、リン酸塩緩衝剤およびホウ酸塩緩衝剤が挙げられるが、これらに限定されないことが理解される。酸または塩基を用いて必要とされる組成物の pH を調節することができる。眼科用組成物の製造に有用な、眼科用に許容される抗酸化剤としては、メタ重亜硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、アセチルシステイン、ブチル型ヒドロキシアニソールおよびブチル型ヒドロキシトルエンが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0091】

VEGFR-3 インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤は、部分的には投与する薬剤のタイプおよび薬歴、危険因子および患者の症状に応じて種々の方法により患者に投与することができる。本発明の方法に適した投与経路としては、全身投与および局在性投与の両方が挙げられる。従って、1つの実施態様において、角膜移植片生存を延長するための本発明の方法は、VEGFR-3 インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤を含む医薬組成物の全身投与により実施される。別の実施態様において、本発明の方法は、抗リン

50

パ管新生薬剤（例えば、VEGFR-3インヒビター）を含有する医薬組成物の局在性投与により実施される。さらなる実施態様において、VEGFR-3インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤を含む医薬組成物を局所的に、すなわち局所注射により投与するか、または眼内または眼周囲インプラントから放出させる。

【0092】

本明細書中で用いる用語「全身投与」は、基本的に患者の全身への医薬組成物の送達を生じる投与態様を意味する。全身投与の代表的な態様としては、静脈内注射および経口投与が挙げられるが、これらに制限されない。本明細書中で用いる用語「局所投与」は、医薬組成物が目から離れた領域よりも眼に、そして眼の回りにより著しく送達されることを生じる投与態様を意味する。

10

【0093】

本発明の方法に有用な全身および局在性の投与経路としては、経口胃管栄養法、静脈内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、経皮拡散およびエレクトロフォoresis（electrophoresis）、局部点眼および軟膏、眼周囲および眼内注射（結膜下注射を含む）、長期放出送達デバイス（局在性インプラント型長期放出デバイス）および眼内および眼周囲インプラント（生分解性およびリザーバーベースのインプラントを含む）が挙げられるが、これらに限定しない。

【0094】

1つの実施態様において、VEGFR-3インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤を含む眼科用組成物は局所的に眼に投与される。眼科用組成物は、例えば、眼用溶液（点眼）であり得る。別の実施態様において、VEGFR-3インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤を含む眼科用組成物は、眼に直接注射される。さらなる態様において、VEGFR-3インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤を含む眼科用組成物は、眼内または眼周囲インプラント（例えば、生分解性またはリザーバーベースのインプラント）から放出される。

20

【0095】

1つの実施態様において、VEGFR-3インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤を含む眼科用組成物は、長期放出製剤中で局在性投与される。例えば、VEGFR-3インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤を含む眼科用組成物を眼内または眼周囲インプラント（例えば、生分解性またはリザーバーベースであり得る）を介して投与することができる。本明細書中で用いる用語「インプラント」は、インプラント後に挿入部位から顕著には移動しない任意の物質を意味する。インプラントは、生分解性物質、非生分解性物質であってもよく、または生分解性物質および非生分解性物質の両方から構成されてもよい。望ましい場合、非生分解性インプラントは詰め替え可能なリザーバーを備えてもよい。本発明の方法に有用なインプラントとしては、例えば、パッチ、粒子、シート、プラーク（plaque）、マイクロカプセル等が挙げられ、選択した挿入部位（後眼房、前房、脈絡膜上または結膜下でありうるが、これらに限定しない）と適合した任意の形状およびサイズのものであり得る。本発明に有用なインプラントは、通常、長期間にわたり患者の角膜に有効な用量でインプラントした医薬組成物を放出することが理解される。種々の眼用インプラントおよび眼放出に適した長期放出製剤は、例えば、米国特許第5,869,079号および同第5,443,505号に記載されるように当該分野において周知である。

30

40

【0096】

VEGFR-3インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤が核酸分子である場合、核酸分子を含む医薬組成物の投与は遺伝子治療の分野で周知の多数の方法のうちの1つを用いて実施されうる。このような方法としては、さらに以下に記載する弾道銃（ballistic gun）送達、レンチウィルス形質転換、アデノウィルス形質転換、サイトメガロウィルス形質転換、マイクロインジェクションおよびエレクトロポレーションが挙げられるが、これらに限定しない。

【0097】

50

例えば、弾道銃送達は角膜移植片生存の延長に関して本発明の方法に有用であるかもしれないし、Tanelianら、BioTechniques, 23: 484 - 488 (1997)に記載されるように実施して、焦点送達および角膜上皮でのプラスミドの高効率での発現を達成しうる。この方法では、0.2 ~ 0.5 mgの金粒子をプラスミドDNAでコーティングし、次いで弾道銃を用いて角膜に送達する。プラスミドDNAの送達深度は、銃の圧力の関数であり、これによりプラスミドDNAの所望の深度までの送達を容易にする。

【0098】

レンチウイルスはまた、本発明の方法に従って核酸分子を含む医薬組成物を投与するために使用されうる。例えば、Wangら、Gene Therapy 7: 196 - 200 (2000)に記載されるように、レンチウイルスをインビトロまたはインサイチュで用いて細胞に導入することができる。ヒト角膜における角膜内皮細胞、上皮細胞および角膜実質細胞 (stromal keratocytes) を VEGFR - 3 インヒビターのような抗リンパ管新生薬剤である核酸分子を含むレンチウイルスに曝してもよい。暴露した細胞は、導入後少なくとも60日間、コードするタンパク質を発現し続けることができる。

10

【0099】

また、アデノウイルスは、角膜から表面上皮細胞を外科的に除去した後にインビボで核酸分子を角膜へと投与するために使用されうる。例えば、アデノウイルスは前眼房に投与されうる。例えば、米国特許第5,827,702号に記載されるように、アデノウイルスを投与する方法は当該分野において周知である。

20

【0100】

また、マイクロインジェクションおよび電気パルスは、VEGFR - 3 インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤である核酸分子を含む医薬組成物を投与するために使用されうる。マイクロインジェクションおよび電気パルスを、例えば、サイトメガロウイルスまたはプラスミド発現ベクターを角膜に導入するために用いることができる (Sakamotoら、Hum. Gene Ther. 10: 2551 - 2557 (1999) および Oshimaら、Gene Therapy 5: 1347 - 1354 (1998))。ウイルスまたはプラスミドの角膜輪部の前房への注入、続いて電気パルスにより、角膜内皮細胞の導入を生じる。望ましい場合に、これらおよび他の方法を用いて、VEGFR - 3 インヒビターまたは他の抗リンパ管新生薬剤が核酸分子である医薬組成物を投与できることが理解される。

30

【実施例】

【0101】

以下の実施例は本発明を例示することを意図するが、限定することは意図しない。

【0102】

実施例 I

リンパ管新生のインヒビターを用いて処置した動物での角膜移植片生存の上昇

Lewis 系統ラット由来の角膜の Wistar - Furth レシピエントへの移植での、よく特徴付けをされている角膜移植のラットモデルに従って、移植片を製造し、移した。(Callananら、Transplantation 45: 437 - 443 (1988))。ビヒクルまたは試験薬剤を投与した各処置群は9 ~ 14匹のラットを含む。移植片を、Callananら、既出、1988の判断基準に従って拒絶の徴候に関して1週間当たり3回、臨床的に観察し、スコア付けする。外科手術60日目に、Lewis / Wistar - Furth の組合せにおいて角膜移植片に関して期待平均生存時間に2倍の延長が示され、それゆえ、処置停止の有利な時点として選択する。60日目に拒絶されていない移植片を有するラットをさらに14日間観察して、宿主の免疫系が許容されたかどうかを決定する。この時点で、移植した眼の80%を低温切片法のために簡単に凍結させ、眼の残りの20%をH & E染色のためにホルマリン中で固定する。

40

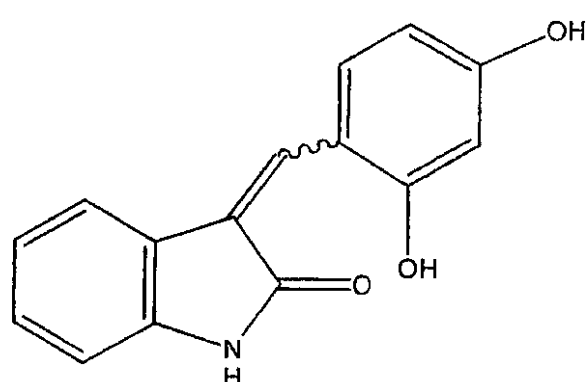
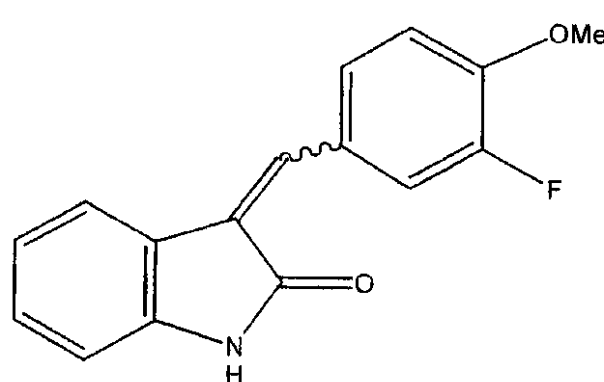
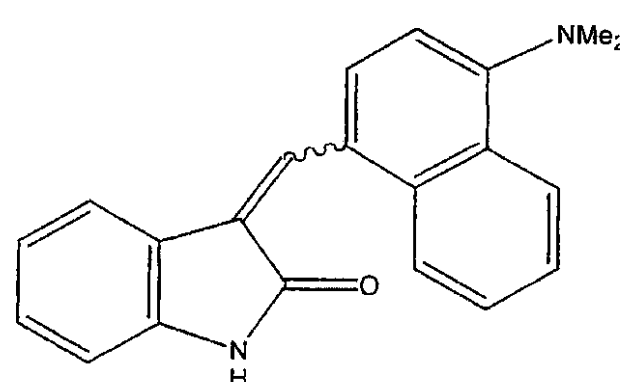
【0103】

50

3 - (2 , 4 - ジヒドロキシベンジリデン) - 1 , 3 - ジヒドロインドール - 2 - オン (M A E 8 7) 、 3 - (3 - フルオロ - 4 - メトキシベンジリデン) - 1 , 3 - ジヒドロインドール - 2 - オン (M A E 1 0 6) および 3 - (4 - ジメチルアミノナフタレン - 1 - イルメチレン) - 1 , 3 - ジヒドロインドール - 2 - オン (M A Z 5 1) を、基本的には以下の通りにして製造した。インドリン - 2 - オン (1 0 m m o l) を、2 , 4 - ジヒドロキシベンズアルデヒド (M A E 8 7) 、 3 - フルオロ - 4 - メトキシベンズアルデヒド (M A E 1 0 6) または 4 - ジメチルアミノナフタレン - 1 - カルバルデヒド (c a r b a l d e h y d e) (M A Z 5 1) のいずれか 1 0 m l と混合する。反応系を、エタノール (4 0 m L) 中ピペリジン 3 滴とともに 5 時間還流する (K i r k i n ら、既出、2 0 0 1) 。生成物をろ過し、エタノールで洗浄し、減圧下で乾燥させる。構造を以下の表 2 に示す。M A E 8 7 の融点は 2 5 0 である。M A E 1 0 6 の融点は 2 2 0 である。M A Z 5 1 の融点は 2 5 0 より高い。

【 0 1 0 4 】

【表 2】

表 2
<p data-bbox="638 291 734 324">MAE87</p> 
<p data-bbox="638 739 734 772">MAE106</p> 
<p data-bbox="638 1187 734 1220">MAZ51</p> 

10

20

30

40

【0105】

VEGFR-3チロシンキナーゼインヒビターであるMAE87、MAE106またはMAZ51を種々の濃度(0.5~200mg/kg/日の範囲)で全身投与する。他の動物で、化合物を種々の濃度(0.05%~5.0%)で、種々の頻度(1日1回、1日2回および1日3回)で、点眼液として投与する。

【0106】

ビヒクルのみを投与した動物は、平均して30日目に移植片拒絶の徴候を示す。反対に、MAE87、MAE106またはMAZ51を投与した動物では、移植片拒絶の証拠の顕著な遅延により実証されるように、平均移植片生存の増加が示される。

【0107】

これらの結果は、VEGFR-3チロシンキナーゼ活性のインヒビターがよく受け入れ

50

られているラット角膜移植モデルで平均角膜移植片生存期間を上昇させるように作用することを示す。

【0108】

上記の括弧内に記載した、または他の方法で記載した全ての雑誌文献、参考文献および特許引用を、本明細書中に参照して組み込む。

【0109】

本発明は上記の実施例に関して記載したが、本発明の範囲から逸脱することなく種々の変更が行われうることが理解されるべきである。従って、本発明は特許請求の範囲によってのみ限定される。

【図面の簡単な説明】

10

【0110】

【図1】図1は、内皮細胞レセプターチロシンキナーゼおよび脈管形成、血管形成およびリンパ管新生に関連する増殖因子の構造を示す。構造的に異なる Tie および血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) レセプターファミリーを、レセプターに対するリガンド結合の特異性 (矢印で示す) と共に示す。VEGF レセプターファミリーは3個の膜貫通レセプターである VEGFR-1、VEGFR-2 および VEGFR-3 を含む。可溶性形態の VEGFR-1 (sVEGFR-1) もまた、特徴付けを行った。VEGF レセプターの細胞外領域は、対合したシステイン残基間のジスルフィド結合 (SS) により安定化されている7個のイムノグロブリンドメインを含み、VEGFR-3 中では5番目のドメインは2個のジスルフィド結合型ポリペプチドへとタンパク質分解により処理される。VEGF レセプターの細胞内領域では、チロシンキナーゼドメインは、通常、キナーゼ挿入物と称するアミノ酸の小さいストレッチにより中断されている。また、レセプターにより媒介される生物学的プロセスもいくつか示す。

20

【図2】図2は、ヒト血管内皮細胞増殖因子レセプター-3 (VEGFR-3) のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。A. ヒト VEGFR-3 のヌクレオチド配列 (配列番号1)。B. ヒト VEGFR-3 のアミノ酸配列 (配列番号2)。開始コドンに下線を付す。Genbank アクセッション番号 X69878 および S66407。また、Gallandra、Oncogene 8:1233-1240 (1993) および Pajusola、Oncogene 8:2931-2937 (1993) を参照。

【図3】図3は、ヒト血管内皮細胞増殖因子-C (VEGF-C) のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。A. ヒト VEGF-C のヌクレオチド配列 (配列番号3)。B. ヒト VEGF-C のアミノ酸配列 (配列番号4)。開始コドンに下線を付す。Genbank アクセッション番号 NM_005429。

30

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> De Vries, Gerald W.

<120> Methods of Extending Corneal Graft
Survival

<130> P-AR 4951

<160> 7

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 4113

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (22)...(4110)

<400> 1

```

accacgcgc agcgcccgga g atg cag cgg ggc gcc gcg ctg tgc ctg cga 51
                        Met Gln Arg Gly Ala Ala Leu Cys Leu Arg
                          1             5             10

ctg tgg ctc tgc ctg gga ctc ctg gac ggc ctg gtg agt gac tac tcc 99
Leu Trp Leu Cys Leu Gly Leu Leu Asp Gly Leu Val Ser Asp Tyr Ser
                        15             20             25

atg acc ccc ccg acc ttg aac atc acg gag gag tca cac gtc atc gac 147
Met Thr Pro Pro Thr Leu Asn Ile Thr Glu Glu Ser His Val Ile Asp
                        30             35             40

acc ggt gac agc ctg tcc atc tcc tgc agg gga cag cac ccc ctc gag 195
Thr Gly Asp Ser Leu Ser Ile Ser Cys Arg Gly Gln His Pro Leu Glu
                        45             50             55

tgg gct tgg cca gga gct cag gag gcg cca gcc acc gga gac aag gac 243
Trp Ala Trp Pro Gly Ala Gln Glu Ala Pro Ala Thr Gly Asp Lys Asp
                        60             65             70

agc gag gac acg ggg gtg gtg cga gac tgc gag ggc aca gac gcc agg 291
Ser Glu Asp Thr Gly Val Val Arg Asp Cys Glu Gly Thr Asp Ala Arg
                        75             80             85             90

ccc tac tgc aag gtg ttg ctg ctg cac gag gta cat gcc aac gac aca 339
Pro Tyr Cys Lys Val Leu Leu Leu His Glu Val His Ala Asn Asp Thr
                        95             100             105

ggc agc tac gtc tgc tac tac aag tac atc aag gca cgc atc gag ggc 387

```

10

20

30

Gly	Ser	Tyr	Val	Cys	Tyr	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Lys	Ala	Arg	Ile	Glu	Gly		
			110					115					120				
acc	acg	gcc	gcc	agc	tcc	tac	gtg	ttc	gtg	aga	gac	ttt	gag	cag	cca	435	
Thr	Thr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Val	Phe	Val	Arg	Asp	Phe	Glu	Gln	Pro		
		125					130					135					
ttc	atc	aac	aag	cct	gac	acg	ctc	ttg	gtc	aac	agg	aag	gac	gcc	atg	483	
Phe	Ile	Asn	Lys	Pro	Asp	Thr	Leu	Leu	Val	Asn	Arg	Lys	Asp	Ala	Met		
	140						145					150					
tgg	gtg	ccc	tgt	ctg	gtg	tcc	atc	ccc	ggc	ctc	aat	gtc	acg	ctg	cgc	531	
Trp	Val	Pro	Cys	Leu	Val	Ser	Ile	Pro	Gly	Leu	Asn	Val	Thr	Leu	Arg		
155				160					165					170			
tcg	caa	agc	tcg	gtg	ctg	tgg	cca	gac	ggg	cag	gag	gtg	gtg	tgg	gat	579	
Ser	Gln	Ser	Ser	Val	Leu	Trp	Pro	Asp	Gly	Gln	Glu	Val	Val	Trp	Asp		
				175					180					185			
gac	cgg	cgg	ggc	atg	ctc	gtg	tcc	acg	cca	ctg	ctg	cac	gat	gcc	ctg	627	
Asp	Arg	Arg	Gly	Met	Leu	Val	Ser	Thr	Pro	Leu	Leu	His	Asp	Ala	Leu		
			190					195					200				
tac	ctg	cag	tgc	gag	acc	acc	tgg	gga	gac	cag	gac	ttc	ctt	tcc	aac	675	
Tyr	Leu	Gln	Cys	Glu	Thr	Thr	Trp	Gly	Asp	Gln	Asp	Phe	Leu	Ser	Asn		
	205						210					215					
ccc	ttc	ctg	gtg	cac	atc	aca	ggc	aac	gag	ctc	tat	gac	atc	cag	ctg	723	
Pro	Phe	Leu	Val	His	Ile	Thr	Gly	Asn	Glu	Leu	Tyr	Asp	Ile	Gln	Leu		
	220					225					230						
ttg	ccc	agg	aag	tcg	ctg	gag	ctg	ctg	gta	ggg	gag	aag	ctg	gtc	ctc	771	
Leu	Pro	Arg	Lys	Ser	Leu	Glu	Leu	Leu	Val	Gly	Glu	Lys	Leu	Val	Leu		
235					240				245					250			
aac	tgc	acc	gtg	tgg	gct	gag	ttt	aac	tca	ggg	gtc	acc	ttt	gac	tgg	819	
Asn	Cys	Thr	Val	Trp	Ala	Glu	Phe	Asn	Ser	Gly	Val	Thr	Phe	Asp	Trp		
				255				260						265			
gac	tac	cca	ggg	aag	cag	gca	gag	cgg	ggg	aag	tgg	gtg	ccc	gag	cga	867	
Asp	Tyr	Pro	Gly	Lys	Gln	Ala	Glu	Arg	Gly	Lys	Trp	Val	Pro	Glu	Arg		
			270					275					280				
cgc	tcc	caa	cag	acc	cac	aca	gaa	ctc	tcc	agc	atc	ctg	acc	atc	cac	915	
Arg	Ser	Gln	Gln	Thr	His	Thr	Glu	Leu	Ser	Ser	Ile	Leu	Thr	Ile	His		
		285					290					295					
aac	gtc	agc	cag	cac	gac	ctg	ggc	tcg	tat	gtg	tgc	aag	gcc	aac	aac	963	
Asn	Val	Ser	Gln	His	Asp	Leu	Gly	Ser	Tyr	Val	Cys	Lys	Ala	Asn	Asn		
	300					305					310						
ggc	atc	cag	cga	ttt	cgg	gag	agc	acc	gag	gtc	att	gtg	cat	gaa	aat	1011	
Gly	Ile	Gln	Arg	Phe	Arg	Glu	Ser	Thr	Glu	Val	Ile	Val	His	Glu	Asn		

10

20

30

315	320	325	330	
ccc ttc atc agc gtc gag tgg ctc aaa gga ccc atc ctg gag gcc acg				1059
Pro Phe Ile Ser Val Glu Trp Leu Lys Gly Pro Ile Leu Glu Ala Thr				
335		340	345	
gca gga gac gag ctg gtg aag ctg ccc gtg aag ctg gca gcg tac ccc				1107
Ala Gly Asp Glu Leu Val Lys Leu Pro Val Lys Leu Ala Ala Tyr Pro				
350	355		360	
cgc ccc gag ttc cag tgg tac aag gat gga aag gca ctg tcc ggg cgc				1155
Pro Pro Glu Phe Gln Trp Tyr Lys Asp Gly Lys Ala Leu Ser Gly Arg				
365	370		375	
cac agt cca cat gcc ctg gtg ctc aag gag gtg aca gag gcc agc aca				1203
His Ser Pro His Ala Leu Val Leu Lys Glu Val Thr Glu Ala Ser Thr				
380	385		390	
ggc acc tac acc ctc gcc ctg tgg aac tcc gct gct ggc ctg agg cgc				1251
Gly Thr Tyr Thr Leu Ala Leu Trp Asn Ser Ala Ala Gly Leu Arg Arg				
395	400	405	410	
aac atc agc ctg gag ctg gtg gtg aat gtg ccc ccc cag ata cat gag				1299
Asn Ile Ser Leu Glu Leu Val Val Asn Val Pro Pro Gln Ile His Glu				
415	420		425	
aag gag gcc tcc tcc ccc agc atc tac tgg cgt cac agc cgc cag gcc				1347
Lys Glu Ala Ser Ser Pro Ser Ile Tyr Ser Arg His Ser Arg Gln Ala				
430	435		440	
ctc acc tgc acg gcc tac ggg gtg ccc ctg cct ctc agc atc cag tgg				1395
Leu Thr Cys Thr Ala Tyr Gly Val Pro Leu Pro Leu Ser Ile Gln Trp				
445	450		455	
cac tgg cgg ccc tgg aca ccc tgc aag atg ttt gcc cag cgt agt ctc				1443
His Trp Arg Pro Trp Thr Pro Cys Lys Met Phe Ala Gln Arg Ser Leu				
460	465		470	
cgg cgg cgg cag cag caa gac ctc atg cca cag tgc cgt gac tgg agg				1491
Arg Arg Arg Gln Gln Gln Asp Leu Met Pro Gln Cys Arg Asp Trp Arg				
475	480	485	490	
gcg gtg acc acg cag gat gcc gtg aac ccc atc gag agc ctg gac acc				1539
Ala Val Thr Thr Gln Asp Ala Val Asn Pro Ile Glu Ser Leu Asp Thr				
495	500		505	
tgg acc gag ttt gtg gag gga aag aat aag act gtg agc aag ctg gtg				1587
Trp Thr Glu Phe Val Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Lys Leu Val				
510	515		520	
atc cag aat gcc aac gtg tct gcc atg tac aag tgt gtg gtc tcc aac				1635
Ile Gln Asn Ala Asn Val Ser Ala Met Tyr Lys Cys Val Val Ser Asn				
525	530		535	

10

20

30

aag gtg ggc cag gat gag cgg ctc atc tac ttc tat gtg acc acc atc	1683
Lys Val Gly Gln Asp Glu Arg Leu Ile Tyr Phe Tyr Val Thr Thr Ile	
540 545 550	
ccc gac ggc ttc acc atc gaa tcc aag cca tcc gag gag cta cta gag	1731
Pro Asp Gly Phe Thr Ile Glu Ser Lys Pro Ser Glu Glu Leu Leu Glu	
555 560 565 570	
ggc cag ccg gtg ctc ctg agc tgc caa gcc gac agc tac aag tac gag	1779
Gly Gln Pro Val Leu Leu Ser Cys Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Tyr Glu	
575 580 585	
cat ctg cgc tgg tac cgc ctc aac ctg tcc acg ctg cac gat gcg cac	1827
His Leu Arg Trp Tyr Arg Leu Asn Leu Ser Thr Leu His Asp Ala His	
590 595 600	
ggg aac ccg ctt ctg ctc gac tgc aag aac gtg cat ctg ttc gcc acc	1875
Gly Asn Pro Leu Leu Leu Asp Cys Lys Asn Val His Leu Phe Ala Thr	
605 610 615	
cct ctg gcc gcc agc ctg gag gag gtg gca cct ggg gcg cgc cac gcc	1923
Pro Leu Ala Ala Ser Leu Glu Glu Val Ala Pro Gly Ala Arg His Ala	
620 625 630	
acg ctc agc ctg agt atc ccc cgc gtc gcg ccc gag cac gag ggc cac	1971
Thr Leu Ser Leu Ser Ile Pro Arg Val Ala Pro Glu His Glu Gly His	
635 640 645 650	
tat gtg tgc gaa gtg caa gac cgg cgc agc cat gac aag cac tgc cac	2019
Tyr Val Cys Glu Val Gln Asp Arg Arg Ser His Asp Lys His Cys His	
655 660 665	
aag aag tac ctg tcg gtg cag gcc ctg gaa gcc cct cgg ctc acg cag	2067
Lys Lys Tyr Leu Ser Val Gln Ala Leu Glu Ala Pro Arg Leu Thr Gln	
670 675 680	
aac ttg acc gac ctc ctg gtg aac gtg agc gac tcg ctg gag atg cag	2115
Asn Leu Thr Asp Leu Leu Val Asn Val Ser Asp Ser Leu Glu Met Gln	
685 690 695	
tgc ttg gtg gcc gga gcg cac gcg ccc agc atc gtg tgg tac aaa gac	2163
Cys Leu Val Ala Gly Ala His Ala Pro Ser Ile Val Trp Tyr Lys Asp	
700 705 710	
gag agg ctg ctg gag gaa aag tct gga gtc gac ttg gcg gac tcc aac	2211
Glu Arg Leu Leu Glu Glu Lys Ser Gly Val Asp Leu Ala Asp Ser Asn	
715 720 725 730	
cag aag ctg agc atc cag cgc gtg cgc gag gag gat gcg gga ccg tat	2259
Gln Lys Leu Ser Ile Gln Arg Val Arg Glu Glu Asp Ala Gly Pro Tyr	
735 740 745	

10

20

30

ctg tgc agc gtg tgc aga ccc aag ggc tgc gtc aac tcc tcc gcc agc 2307
 Leu Cys Ser Val Cys Arg Pro Lys Gly Cys Val Asn Ser Ser Ala Ser
 750 755 760

gtg gcc gtg gaa ggc tcc gag gat aag ggc agc atg gag atc gtg atc 2355
 Val Ala Val Glu Gly Ser Glu Asp Lys Gly Ser Met Glu Ile Val Ile
 765 770 775

ctt gtc ggt acc ggc gtc atc gct gtc ttc ttc tgg gtc ctc ctc ctc 2403
 Leu Val Gly Thr Gly Val Ile Ala Val Phe Phe Trp Val Leu Leu Leu
 780 785 790

ctc atc ttc tgt aac atg agg agg ccg gcc cac gca gac atc aag acg 2451
 Leu Ile Phe Cys Asn Met Arg Arg Pro Ala His Ala Asp Ile Lys Thr
 795 800 805 810

ggc tac ctg tcc atc atc atg gac ccc ggg gag gtg cct ctg gag gag 2499
 Gly Tyr Leu Ser Ile Ile Met Asp Pro Gly Glu Val Pro Leu Glu Glu
 815 820 825

caa tgc gaa tac ctg tcc tac gat gcc agc cag tgg gaa ttc ccc cga 2547
 Gln Cys Glu Tyr Leu Ser Tyr Asp Ala Ser Gln Trp Glu Phe Pro Arg
 830 835 840

gag cgg ctg cac ctg ggg aga gtg ctc ggc tac ggc gcc ttc ggg aag 2595
 Glu Arg Leu His Leu Gly Arg Val Leu Gly Tyr Gly Ala Phe Gly Lys
 845 850 855

gtg gtg gaa gcc tcc gct ttc ggc atc cac aag ggc agc agc tgt gac 2643
 Val Val Glu Ala Ser Ala Phe Gly Ile His Lys Gly Ser Ser Cys Asp
 860 865 870

acc gtg gcc gtg aaa atg ctg aaa gag ggc gcc acg gcc agc gag cag 2691
 Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu Gln
 875 880 885 890

cgc gcg ctg atg tgc gag ctc aag atc ctc att cac atc ggc aac cac 2739
 Arg Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly Asn His
 895 900 905

ctc aac gtg gtc aac ctc ctc ggg gcg tgc acc aag ccg cag ggc ccc 2787
 Leu Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gln Gly Pro
 910 915 920

ctc atg gtg atc gtg gag ttc tgc aag tac ggc aac ctc tcc aac ttc 2835
 Leu Met Val Ile Val Glu Phe Cys Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Phe
 925 930 935

ctg cgc gcc aag cgg gac gcc ttc agc ccc tgc gcg gag aag tct ccc 2883
 Leu Arg Ala Lys Arg Asp Ala Phe Ser Pro Cys Ala Glu Lys Ser Pro
 940 945 950

gag cag cgc gga cgc ttc cgc gcc atg gtg gag ctc gcc agg ctg gat 2931

10

20

30

Glu Gln Arg Gly Arg Phe Arg Ala Met Val Glu Leu Ala Arg Leu Asp
 955 960 965 970
 cgg agg cgg ccg ggg agc agc gac agg gtc ctc ttc gcg cgg ttc tcg 2979
 Arg Arg Arg Pro Gly Ser Ser Asp Arg Val Leu Phe Ala Arg Phe Ser
 975 980 985
 aag acc gag ggc gga gcg agg cgg gct tct cca gac caa gaa gct gag 3027
 Lys Thr Glu Gly Gly Ala Arg Arg Ala Ser Pro Asp Gln Glu Ala Glu
 990 995 1000
 gac ctg tgg ctg agc ccg ctg acc atg gaa gat ctt gtc tgc tac agc 3075
 Asp Leu Trp Leu Ser Pro Leu Thr Met Glu Asp Leu Val Cys Tyr Ser
 1005 1010 1015
 ttc cag gtg gcc aga ggg atg gag ttc ctg gct tcc cga aag tgc atc 3123
 Phe Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile
 1020 1025 1030
 cac aga gac ctg gct gct cgg aac att ctg ctg tcg gaa agc gac gtg 3171
 His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Ser Asp Val
 1035 1040 1045 1050
 gtg aag atc tgt gac ttt ggc ctt gcc cgg gac atc tac aaa gac ccc 3219
 Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro
 1055 1060 1065
 gac tac gtc cgc aag ggc agt gcc cgg ctg ccc ctg aag tgg atg gcc 3267
 Asp Tyr Val Arg Lys Gly Ser Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala
 1070 1075 1080
 cct gaa agc atc ttc gac aag gtg tac acc acg cag agt gac gtg tgg 3315
 Pro Glu Ser Ile Phe Asp Lys Val Tyr Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp
 1085 1090 1095
 tcc ttt ggg gtg ctt ctc tgg gag atc ttc tct ctg ggg gcc tcc ccg 3363
 Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro
 1100 1105 1110
 tac cct ggg gtg cag atc aat gag gag ttc tgc cag cgc gtg aga gac 3411
 Tyr Pro Gly Val Gln Ile Asn Glu Glu Phe Cys Gln Arg Val Arg Asp
 1115 1120 1125 1130
 ggc aca agg atg agg gcc ccg gag ctg gcc act ccc gcc ata cgc cac 3459
 Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro Glu Leu Ala Thr Pro Ala Ile Arg His
 1135 1140 1145
 atc atg ctg aac tgc tgg tcc gga gac ccc aag gcg aga cct gca ttc 3507
 Ile Met Leu Asn Cys Trp Ser Gly Asp Pro Lys Ala Arg Pro Ala Phe
 1150 1155 1160
 tcg gac ctg gtg gag atc ctg ggg gac ctg ctc cag ggc agg ggc ctg 3555
 Ser Asp Leu Val Glu Ile Leu Gly Asp Leu Leu Gln Gly Arg Gly Leu

10

20

30

1165	1170	1175	
caa gag gaa gag gag gtc tgc atg gcc ccg cgc agc tct cag agc tca			3603
Gln Glu Glu Glu Glu Val Cys Met Ala Pro Arg Ser Ser Gln Ser Ser			
1180	1185	1190	
gaa gag ggc agc ttc tog cag gtg tcc acc atg gcc cta cac atc gcc			3651
Glu Glu Gly Ser Phe Ser Gln Val Ser Thr Met Ala Leu His Ile Ala			
1195	1200	1205	1210
cag gct gac gct gag gac agc ccg cca agc ctg cag cgc cac agc ctg			3699
Gln Ala Asp Ala Glu Asp Ser Pro Pro Ser Leu Gln Arg His Ser Leu			
1215	1220	1225	
gcc gcc agg tat tac aac tgg gtg tcc ttt ccc ggg tgc ctg gcc aga			3747
Ala Ala Arg Tyr Tyr Asn Trp Val Ser Phe Pro Gly Cys Leu Ala Arg			
1230	1235	1240	
ggg gct gag acc cgt ggt tcc tcc agg atg aag aca ttt gag gaa ttc			3795
Gly Ala Glu Thr Arg Gly Ser Ser Arg Met Lys Thr Phe Glu Glu Phe			
1245	1250	1255	
ccc atg acc cca acg acc tac aaa ggc tct gtg gac aac cag aca gac			3843
Pro Met Thr Pro Thr Thr Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gln Thr Asp			
1260	1265	1270	
agt ggg atg gtg ctg gcc tog gag gag ttt gag cag ata gag agc agg			3891
Ser Gly Met Val Leu Ala Ser Glu Glu Phe Glu Gln Ile Glu Ser Arg			
1275	1280	1285	1290
cat aga caa gaa agc ggc ttc agc tgt aaa gga cct ggc cag aat gtg			3939
His Arg Gln Glu Ser Gly Phe Ser Cys Lys Gly Pro Gly Gln Asn Val			
1295	1300	1305	
gct gtg acc agg gca cac cct gac tcc caa ggg agg cgg cgg cgg cct			3987
Ala Val Thr Arg Ala His Pro Asp Ser Gln Gly Arg Arg Arg Arg Pro			
1310	1315	1320	
gag cgg ggg gcc cga gga ggc cag gtg ttt tac aac agc gag tat ggg			4035
Glu Arg Gly Ala Arg Gly Gly Gln Val Phe Tyr Asn Ser Glu Tyr Gly			
1325	1330	1335	
gag ctg tog gag cca agc gag gag gac cac tgc tcc ccg tct gcc cgc			4083
Glu Leu Ser Glu Pro Ser Glu Glu Asp His Cys Ser Pro Ser Ala Arg			
1340	1345	1350	
gtg act ttc ttc aca gac aac agc tac taa			4113
Val Thr Phe Phe Thr Asp Asn Ser Tyr			
1355	1360		

<210> 2

<211> 1363

10

20

30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Gln Arg Gly Ala Ala Leu Cys Leu Arg Leu Trp Leu Cys Leu Gly
 1          5          10          15
Leu Leu Asp Gly Leu Val Ser Asp Tyr Ser Met Thr Pro Pro Thr Leu
 20          25          30
Asn Ile Thr Glu Glu Ser His Val Ile Asp Thr Gly Asp Ser Leu Ser
 35          40          45
Ile Ser Cys Arg Gly Gln His Pro Leu Glu Trp Ala Trp Pro Gly Ala
 50          55          60
Gln Glu Ala Pro Ala Thr Gly Asp Lys Asp Ser Glu Asp Thr Gly Val
 65          70          75          80
Val Arg Asp Cys Glu Gly Thr Asp Ala Arg Pro Tyr Cys Lys Val Leu
 85          90          95
Leu Leu His Glu Val His Ala Asn Asp Thr Gly Ser Tyr Val Cys Tyr
100          105          110
Tyr Lys Tyr Ile Lys Ala Arg Ile Glu Gly Thr Thr Ala Ala Ser Ser
115          120          125
Tyr Val Phe Val Arg Asp Phe Glu Gln Pro Phe Ile Asn Lys Pro Asp
130          135          140
Thr Leu Leu Val Asn Arg Lys Asp Ala Met Trp Val Pro Cys Leu Val
145          150          155          160
Ser Ile Pro Gly Leu Asn Val Thr Leu Arg Ser Gln Ser Ser Val Leu
165          170          175
Trp Pro Asp Gly Gln Glu Val Val Trp Asp Asp Arg Arg Gly Met Leu
180          185          190
Val Ser Thr Pro Leu Leu His Asp Ala Leu Tyr Leu Gln Cys Glu Thr
195          200          205
Thr Trp Gly Asp Gln Asp Phe Leu Ser Asn Pro Phe Leu Val His Ile
210          215          220
Thr Gly Asn Glu Leu Tyr Asp Ile Gln Leu Leu Pro Arg Lys Ser Leu
225          230          235          240
Glu Leu Leu Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Val Trp Ala
245          250          255
Glu Phe Asn Ser Gly Val Thr Phe Asp Trp Asp Tyr Pro Gly Lys Gln
260          265          270
Ala Glu Arg Gly Lys Trp Val Pro Glu Arg Arg Ser Gln Gln Thr His
275          280          285
Thr Glu Leu Ser Ser Ile Leu Thr Ile His Asn Val Ser Gln His Asp
290          295          300
Leu Gly Ser Tyr Val Cys Lys Ala Asn Asn Gly Ile Gln Arg Phe Arg
305          310          315          320
Glu Ser Thr Glu Val Ile Val His Glu Asn Pro Phe Ile Ser Val Glu
325          330          335
Trp Leu Lys Gly Pro Ile Leu Glu Ala Thr Ala Gly Asp Glu Leu Val
340          345          350
Lys Leu Pro Val Lys Leu Ala Ala Tyr Pro Pro Pro Glu Phe Gln Trp
355          360          365
Tyr Lys Asp Gly Lys Ala Leu Ser Gly Arg His Ser Pro His Ala Leu
370          375          380
Val Leu Lys Glu Val Thr Glu Ala Ser Thr Gly Thr Tyr Thr Leu Ala

```

10

20

30

```

385          390          395          400
Leu Trp Asn Ser Ala Ala Gly Leu Arg Arg Asn Ile Ser Leu Glu Leu
          405          410          415
Val Val Asn Val Pro Pro Gln Ile His Glu Lys Glu Ala Ser Ser Pro
          420          425          430
Ser Ile Tyr Ser Arg His Ser Arg Gln Ala Leu Thr Cys Thr Ala Tyr
          435          440          445
Gly Val Pro Leu Pro Leu Ser Ile Gln Trp His Trp Arg Pro Trp Thr
          450          455          460
Pro Cys Lys Met Phe Ala Gln Arg Ser Leu Arg Arg Arg Gln Gln Gln
          465          470          475          480
Asp Leu Met Pro Gln Cys Arg Asp Trp Arg Ala Val Thr Thr Gln Asp
          485          490          495
Ala Val Asn Pro Ile Glu Ser Leu Asp Thr Trp Thr Glu Phe Val Glu
          500          505          510
Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Lys Leu Val Ile Gln Asn Ala Asn Val
          515          520          525
Ser Ala Met Tyr Lys Cys Val Val Ser Asn Lys Val Gly Gln Asp Glu
          530          535          540
Arg Leu Ile Tyr Phe Tyr Val Thr Thr Ile Pro Asp Gly Phe Thr Ile
          545          550          555          560
Glu Ser Lys Pro Ser Glu Glu Leu Leu Glu Gly Gln Pro Val Leu Leu
          565          570          575
Ser Cys Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Tyr Glu His Leu Arg Trp Tyr Arg
          580          585          590
Leu Asn Leu Ser Thr Leu His Asp Ala His Gly Asn Pro Leu Leu Leu
          595          600          605
Asp Cys Lys Asn Val His Leu Phe Ala Thr Pro Leu Ala Ala Ser Leu
          610          615          620
Glu Glu Val Ala Pro Gly Ala Arg His Ala Thr Leu Ser Leu Ser Ile
          625          630          635          640
Pro Arg Val Ala Pro Glu His Glu Gly His Tyr Val Cys Glu Val Gln
          645          650          655
Asp Arg Arg Ser His Asp Lys His Cys His Lys Lys Tyr Leu Ser Val
          660          665          670
Gln Ala Leu Glu Ala Pro Arg Leu Thr Gln Asn Leu Thr Asp Leu Leu
          675          680          685
Val Asn Val Ser Asp Ser Leu Glu Met Gln Cys Leu Val Ala Gly Ala
          690          695          700
His Ala Pro Ser Ile Val Trp Tyr Lys Asp Glu Arg Leu Leu Glu Glu
          705          710          715          720
Lys Ser Gly Val Asp Leu Ala Asp Ser Asn Gln Lys Leu Ser Ile Gln
          725          730          735
Arg Val Arg Glu Glu Asp Ala Gly Pro Tyr Leu Cys Ser Val Cys Arg
          740          745          750
Pro Lys Gly Cys Val Asn Ser Ser Ala Ser Val Ala Val Glu Gly Ser
          755          760          765
Glu Asp Lys Gly Ser Met Glu Ile Val Ile Leu Val Gly Thr Gly Val
          770          775          780
Ile Ala Val Phe Phe Trp Val Leu Leu Leu Leu Ile Phe Cys Asn Met
          785          790          795          800
Arg Arg Pro Ala His Ala Asp Ile Lys Thr Gly Tyr Leu Ser Ile Ile
          805          810          815

```

10

20

30

Met Asp Pro Gly Glu Val Pro Leu Glu Glu Gln Cys Glu Tyr Leu Ser
 820 825 830
 Tyr Asp Ala Ser Gln Trp Glu Phe Pro Arg Glu Arg Leu His Leu Gly
 835 840 845
 Arg Val Leu Gly Tyr Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Ser Ala
 850 855 860
 Phe Gly Ile His Lys Gly Ser Ser Cys Asp Thr Val Ala Val Lys Met
 865 870 875 880
 Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu Gln Arg Ala Leu Met Ser Glu
 885 890 895
 Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly Asn His Leu Asn Val Val Asn Leu
 900 905 910
 Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gln Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu
 915 920 925
 Phe Cys Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Phe Leu Arg Ala Lys Arg Asp
 930 935 940
 Ala Phe Ser Pro Cys Ala Glu Lys Ser Pro Glu Gln Arg Gly Arg Phe
 945 950 955 960
 Arg Ala Met Val Glu Leu Ala Arg Leu Asp Arg Arg Arg Pro Gly Ser
 965 970 975
 Ser Asp Arg Val Leu Phe Ala Arg Phe Ser Lys Thr Glu Gly Gly Ala
 980 985 990
 Arg Arg Ala Ser Pro Asp Gln Glu Ala Glu Asp Leu Trp Leu Ser Pro
 995 1000 1005
 Leu Thr Met Glu Asp Leu Val Cys Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg Gly
 1010 1015 1020
 Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala
 1025 1030 1035 1040
 Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Ser Asp Val Val Lys Ile Cys Asp Phe
 1045 1050 1055
 Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly
 1060 1065 1070
 Ser Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp
 1075 1080 1085
 Lys Val Tyr Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu
 1090 1095 1100
 Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro Tyr Pro Gly Val Gln Ile
 1105 1110 1115 1120
 Asn Glu Glu Phe Cys Gln Arg Val Arg Asp Gly Thr Arg Met Arg Ala
 1125 1130 1135
 Pro Glu Leu Ala Thr Pro Ala Ile Arg His Ile Met Leu Asn Cys Trp
 1140 1145 1150
 Ser Gly Asp Pro Lys Ala Arg Pro Ala Phe Ser Asp Leu Val Glu Ile
 1155 1160 1165
 Leu Gly Asp Leu Leu Gln Gly Arg Gly Leu Gln Glu Glu Glu Val
 1170 1175 1180
 Cys Met Ala Pro Arg Ser Ser Gln Ser Ser Glu Glu Gly Ser Phe Ser
 1185 1190 1195 1200
 Gln Val Ser Thr Met Ala Leu His Ile Ala Gln Ala Asp Ala Glu Asp
 1205 1210 1215
 Ser Pro Pro Ser Leu Gln Arg His Ser Leu Ala Ala Arg Tyr Tyr Asn
 1220 1225 1230
 Trp Val Ser Phe Pro Gly Cys Leu Ala Arg Gly Ala Glu Thr Arg Gly

10

20

30

```

      1235              1240              1245
Ser Ser Arg Met Lys Thr Phe Glu Glu Phe Pro Met Thr Pro Thr Thr
      1250              1255              1260
Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val Leu Ala
1265              1270              1275              1280
Ser Glu Glu Phe Glu Gln Ile Glu Ser Arg His Arg Gln Glu Ser Gly
      1285              1290              1295
Phe Ser Cys Lys Gly Pro Gly Gln Asn Val Ala Val Thr Arg Ala His
      1300              1305              1310
Pro Asp Ser Gln Gly Arg Arg Arg Arg Pro Glu Arg Gly Ala Arg Gly
      1315              1320              1325
Gly Gln Val Phe Tyr Asn Ser Glu Tyr Gly Glu Leu Ser Glu Pro Ser
      1330              1335              1340
Glu Glu Asp His Cys Ser Pro Ser Ala Arg Val Thr Phe Phe Thr Asp
1345              1350              1355              1360
Asn Ser Tyr

```

10

```

<210> 3
<211> 2015
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (372)...(1628)

```

20

```

<400> 3
cgcggggtgt tctggtgtcc cccgccccgc ctctccaaaa agctacaccg acgcggaaccg 60
cgcgggcgct ctccctcgcc ctgccttcac ctgcgggct ccgaatgcgg ggagctcgga 120
tgtecggttt cctgtgaggg ttttacctga caccgcccgc ctttccccgg cactggctgg 180
gagggcgccc tgcaaagttg ggaacgcgga gccccggacc cgctccccgc gcctccggct 240
cgccccagggg gggtcgcggg gaggagcccg ggggagaggg accaggaggg gcccgcgccc 300
tcgcaggggc gcccgcgccc ccaccctgc ccccgccagc ggaccgggtcc cccacccccg 360
gtccttcac c atg cac ttg ctg ggc ttc ttc tct gtg gcg tgt tct ctg 410
      Met His Leu Leu Gly Phe Phe Ser Val Ala Cys Ser Leu
      1              5              10

ctc gcc gct gcg ctg ctc ccg ggt cct cgc gag gcg ccc gcc gcc gcc 458
Leu Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Pro Arg Glu Ala Pro Ala Ala Ala
      15              20              25

gcc gcc ttc gag tcc gga ctc gac ctc tcg gac gcg gag ccc gac gcg 506
Ala Ala Phe Glu Ser Gly Leu Asp Leu Ser Asp Ala Glu Pro Asp Ala
      30              35              40              45

ggc gag gcc acg gct tat gca agc aaa gat ctg gag gag cag tta cgg 554
Gly Glu Ala Thr Ala Tyr Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu Arg
      50              55              60

tct gtg tcc agt gta gat gaa ctc atg act gta ctc tac cca gaa tat 602
Ser Val Ser Ser Val Asp Glu Leu Met Thr Val Leu Tyr Pro Glu Tyr

```

30

65	70	75	
tgg aaa atg tac aag tgt cag cta agg aaa gga ggc tgg caa cat aac	650		
Trp Lys Met Tyr Lys Cys Gln Leu Arg Lys Gly Gly Trp Gln His Asn			
80	85	90	
aga gaa cag gcc aac ctc aac tca agg aca gaa gag act ata aaa ttt	698		
Arg Glu Gln Ala Asn Leu Asn Ser Arg Thr Glu Glu Thr Ile Lys Phe			
95	100	105	
gct gca gca cat tat aat aca gag atc ttg aaa agt att gat aat gag	746		
Ala Ala Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu			
110	115	120	125
tgg aga aag act caa tgc atg cca cgg gag gtg tgt ata gat gtg ggg	794		
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly			
130	135	140	
aag gag ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttt aaa cct cca tgt gtg	842		
Lys Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val			
145	150	155	
tcc gtc tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc	890		
Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys			
160	165	170	
atg aac acc agc acg agc tac ctc agc aag acg tta ttt gaa att aca	938		
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr			
175	180	185	
gtg cct ctc tct caa gcc ccc aaa cca gta aca atc agt ttt gcc aat	986		
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn			
190	195	200	205
cac act tcc tgc cga tgc atg tct aaa ctg gat gtt tac aga caa gtt	1034		
His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val			
210	215	220	
cat tcc att att aga cgt tcc ctg cca gca aca cta cca cag tgt cag	1082		
His Ser Ile Ile Arg Arg Ser Leu Pro Ala Thr Leu Pro Gln Cys Gln			
225	230	235	
gca gcg aac aag acc tgc ccc acc aat tac atg tgg aat aat cac atc	1130		
Ala Ala Asn Lys Thr Cys Pro Thr Asn Tyr Met Trp Asn Asn His Ile			
240	245	250	
tgc aga tgc ctg gct cag gaa gat ttt atg ttt tcc tgc gat gct gga	1178		
Cys Arg Cys Leu Ala Gln Glu Asp Phe Met Phe Ser Ser Asp Ala Gly			
255	260	265	
gat gac tca aca gat gga ttc cat gac atc tgt gga cca aac aag gag	1226		
Asp Asp Ser Thr Asp Gly Phe His Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu			
270	275	280	285

10

20

30

ctg gat gaa gag acc tgt cag tgt gtc tgc aga gcg ggg ctt cgg cct 1274
 Leu Asp Glu Glu Thr Cys Gln Cys Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg Pro
 290 295 300

gcc agc tgt gga ccc cac aaa gaa cta gac aga aac tca tgc cag tgt 1322
 Ala Ser Cys Gly Pro His Lys Glu Leu Asp Arg Asn Ser Cys Gln Cys
 305 310 315

gtc tgt aaa aac aaa ctc ttc ccc agc caa tgt ggg gcc aac cga gaa 1370
 Val Cys Lys Asn Lys Leu Phe Pro Ser Gln Cys Gly Ala Asn Arg Glu
 320 325 330

ttt gat gaa aac aca tgc cag tgt gta tgt aaa aga acc tgc ccc aga 1418
 Phe Asp Glu Asn Thr Cys Gln Cys Val Cys Lys Arg Thr Cys Pro Arg
 335 340 345

10

aat caa ccc cta aat cct gga aaa tgt gcc tgt gaa tgt aca gaa agt 1466
 Asn Gln Pro Leu Asn Pro Gly Lys Cys Ala Cys Glu Cys Thr Glu Ser
 350 355 360 365

cca cag aaa tgc ttg tta aaa gga aag aag ttc cac cac caa aca tgc 1514
 Pro Gln Lys Cys Leu Leu Lys Gly Lys Lys Phe His His Gln Thr Cys
 370 375 380

agc tgt tac aga cgg cca tgt acg aac cgc cag aag gct tgt gag cca 1562
 Ser Cys Tyr Arg Arg Pro Cys Thr Asn Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro
 385 390 395

20

gga ttt tca tat agt gaa gaa gtg tgt cgt tgt gtc cct tca tat tgg 1610
 Gly Phe Ser Tyr Ser Glu Glu Val Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp
 400 405 410

aaa aga cca caa atg agc taagattgta ctgttttcca gttcatcgat 1658
 Lys Arg Pro Gln Met Ser
 415

tttctattat ggaaaactgt gttgccacag tagaactgtc tgtgaacaga gagacccttg 1718
 tgggtccatg ctaacaaaga caaaagtctg tctttcctga accatgtgga taactttaca 1778
 gaaatggact ggagctcatc tgcaaaaaggc ctcttgtaaa gactgggtttt ctgccaatga 1838
 ccaaacagcc aagattttcc tcttgtgatt tctttaaaag aatgactata taattttattt 1898
 ccactaaaaa tattgtttct gcattcattt ttatagcaac aacaattggt aaaactcact 1958
 gtgatcaata tttttatata atgcaaaaata tgtttaaaat aaaatgaaaa ttgtatt 2015

30

<210> 4
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met His Leu Leu Gly Phe Phe Ser Val Ala Cys Ser Leu Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Pro Gly Pro Arg Glu Ala Pro Ala Ala Ala Ala Phe

30

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic construct

<221> VARIANT
 <222> 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 5
 Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Cys Cys
 1 5 10 15

10

<210> 6
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic construct

<221> misc_feature
 <222> 1, 2, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 13
 <223> n = A,T,C or G

20

<400> 6
 nnyngucnnn nnn 13

<210> 7
 <211> 4
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

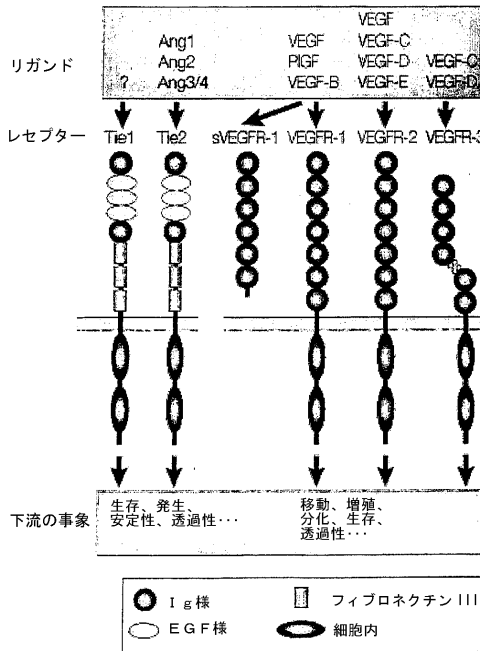
<220>
 <223> synthetic construct

<221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = A,T,C or G

30

<400> 7
 nguc 4

【図 1】



【図 2 A】

```

1  ACCACGCGC AGCGCGCGA GATGCGAGG GCGCGCGCG TGTGCTGCG ACTGTGGTC
61  TGTCTGGAG TCTGTGGAG CTTGTGTGAGT GACTACTTCA TGACCCCGCC GACCTGTGAAC
121  ATCAAGGAG AGTCAACCT CATCGACACC GTGTACAGCC TGTCTATCTC TGTCTGTGAAC
181  CAGCAGCCCC TCGAGTGGG TTTGGCCAGG GCTCAGAGG CCGCAGCCAC CCGAGACAGG
241  GACAGCGAGG ACACGGGGG GTGTGGAGAG GTGGAGAGG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
301  AAGGTGTGTC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
361  AAGTATGAG AGCGACACT GAGAGGAGCC ACAGCGGCG CCGCTATCTG GTGTGTGAG
421  GACTTGTGAG AGCGACACT GAGAGGAGCC ACAGCGGCG CCGCTATCTG GTGTGTGAG
481  ATGTGGGTGC CTTGTGTGAG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
541  TGTGTGTGTC GTGTGTGAG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
601  TCGAGCGCAC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
661  GACTTGTGAG AGCGACACT GAGAGGAGCC ACAGCGGCG CCGCTATCTG GTGTGTGAG
721  CTTGTGTGAG AGCGACACT GAGAGGAGCC ACAGCGGCG CCGCTATCTG GTGTGTGAG
781  GTGTGGGTGC AGTTTAACTC AGGTGTGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
841  GAGCGGGGTA AGTGTGTGAG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
901  ATCTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
961  AGCGGAGTGC AGCGACACT GAGAGGAGCC ACAGCGGCG CCGCTATCTG GTGTGTGAG
1021  AGCGGAGTGC AGCGACACT GAGAGGAGCC ACAGCGGCG CCGCTATCTG GTGTGTGAG
1081  CTGCGCGTGC AGTTTAACTC AGGTGTGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
1141  GACTGTGTCG GTGTGTGAG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
1201  AGCGGAGTGC AGCGACACT GAGAGGAGCC ACAGCGGCG CCGCTATCTG GTGTGTGAG
1261  CTGCGCGTGC AGTTTAACTC AGGTGTGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
1321  ATCTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
1381  CTGAGGATGC AGTTTAACTC AGGTGTGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
1441  GACTGTGTCG GTGTGTGAG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
1501  AGCGGAGTGC AGCGACACT GAGAGGAGCC ACAGCGGCG CCGCTATCTG GTGTGTGAG
1561  AAGAAATAGA CTGTGTGAG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
1621  TGTGTGTGTC CCAACAAGGT GTGTGTGAG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG
1681  ATCTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
1741  GTGTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
1801  AACTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
1861  CATCTGTGTC CCAACAAGGT GTGTGTGAG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG
1921  GCGAGGATGC AGTTTAACTC AGGTGTGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
1981  AAGTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
2041  GTGTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
2101  TGTGTGTGTC CCAACAAGGT GTGTGTGAG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG
2161  GCGAGGATGC AGTTTAACTC AGGTGTGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
2221  AAGTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
2281  GTGTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
2341  ATGTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
2401  CTCTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
2461  TGTGTGTGTC CCAACAAGGT GTGTGTGAG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG
2521  GCGAGGATGC AGTTTAACTC AGGTGTGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
2581  GTGTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
2641  GCGAGGATGC AGTTTAACTC AGGTGTGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
2701  ATGTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
2761  GCGAGGATGC AGTTTAACTC AGGTGTGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
2821  AAGTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
2881  GTGTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
2941  CTCTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
3001  GCGAGGATGC AGTTTAACTC AGGTGTGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
3061  GTGTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
3121  ATGTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG
3181  GTGTGTGAGC TGTGTGAGG GTGTATGAGC AAGCGAGAG CAGAGCCGAG CCGCTATCTG

```

FIGURE 2A

【図 2 A】

```

3241  GCGCGGTGTC CCGTGAAGTG GATGGGCGCT GAAAGCATCT TCGACAAGGT GTACACACAG
3301  CAGAGTGAGC TGTGTGTGTC TGTGTGTGTC TGTGTGTGTC TGTGTGTGTC TGTGTGTGTC
3361  CCGTGAAGTG GATGGGCGCT GAAAGCATCT TCGACAAGGT GTACACACAG CCGTGAAGTG
3421  ATGAGGCGTC CCGTGAAGTG GATGGGCGCT GAAAGCATCT TCGACAAGGT GTACACACAG
3481  GAGAGCGGAG GCGTGAAGTG GATGGGCGCT GAAAGCATCT TCGACAAGGT GTACACACAG
3541  CAGAGCGGAG GCGTGAAGTG GATGGGCGCT GAAAGCATCT TCGACAAGGT GTACACACAG
3601  TCGAGAGGAG GCGTGAAGTG GATGGGCGCT GAAAGCATCT TCGACAAGGT GTACACACAG
3661  GCGTGAAGTG GATGGGCGCT GAAAGCATCT TCGACAAGGT GTACACACAG GCGTGAAGTG
3721  GTGTGTGTC CCGTGAAGTG GATGGGCGCT GAAAGCATCT TCGACAAGGT GTACACACAG
3781  ACATTTGAGG AATTTCCGCT GCGTGAAGTG GATGGGCGCT GAAAGCATCT TCGACAAGGT
3841  GAGAGTGAGG TGTGTGTGTC TGTGTGTGTC TGTGTGTGTC TGTGTGTGTC TGTGTGTGTC
3901  GAAAGCGGCT TGTGTGTGTC TGTGTGTGTC TGTGTGTGTC TGTGTGTGTC TGTGTGTGTC
3961  GCGTGAAGTG GATGGGCGCT GAAAGCATCT TCGACAAGGT GTACACACAG GCGTGAAGTG
4021  AAGAGCGGCT TGTGTGTGTC TGTGTGTGTC TGTGTGTGTC TGTGTGTGTC TGTGTGTGTC
4081  CCGTGAAGTG GATGGGCGCT GAAAGCATCT TCGACAAGGT GTACACACAG CCGTGAAGTG

```

FIGURE 2A

【図 2 B】

```

1  MORGANALCLR LMLCLGLLDG LVSGYBMTPP TLNTERESSV IITDLSLSIS QKQHPLEWA
61  WEGAGREAPAT GDXDSHDTG VDCBETDAR PVCEVLLHIE VHANDTSHVY CYYIKXKPI
121  EETIAPASVY FVDPDEPPI NKPTLWNR KDMWVPCVL SPFLNVTLR SSSVLPWPG
181  QEVVNDDBRG MLVSTPLHLD ALYLQCEITW GDQFLSNFP LVHITGNELV DQLPLPKSL
241  ELIVSEKLVL NCTVBAEPNS GVTPEMDYFG KQASRGKWPV ERSSQTHTE LSLILTINIV
301  SQHLESLYVC KANNGIQRPB BTEVIVHBN PPISEVWIKG PILSATAGDE LVXLPVKLAA
361  YPPEPQWIK DSKALSGHS FIALVKEVT EASITUTTLA LARSAGLER NLSLILVNV
421  PPQHEKESAS SPSTYSRHSR QALTCTAYGV PLELSIQWHN RWPVCKMFA QSLVRRQOQ
481  DLMPCQDNWR AVTTQDAVNP IESLDTWIEF VBRNKNVSK LVQINAKVFA MYKCVNSNV
541  GQDERLIYFY VTTIPDGPTI BSKPSEELLE GQVLLSOQA DSKYVHLRW VYHNLSTLHD
601  AHGNPFLLDG KNVHLPATPL AASLSEVAPG ARHATLSLSI PRVAPHEHGH VYCVQDKRS
661  HXKHCNKVL SVQALRPRPL TQNLTDLLN VDSLEMQCL VAGAHAPSVI WYHDLLEE
721  KSGVLDLADSN QKLSIQVRRE RDCRQYLCVY CNRKCYNSS ASVAVSESD KSMELIVLV
781  GNGVIAVFFW VILLILFCNM RPPAHADIKT GYLSIIMDPC EVLEEQCEY LSYDASQWF
841  PREBLILGRV LGYGAFGKV BASAFTHKG SSCDTVAVM LKQATASBH RALMSKLIL
901  IHIGNHNVV NLGACTKPO GFLMVIFVC KYGNLSNPLR AKRAPSPCA KSPFQKRF
961  RAMVLEHLD RRPQSDRV LPAPFKTG CARHAPDCE ABULSLPT MEDVCTYSP
1021  VARGMEFLAS RKCHRDAA RNLSSSDV VKICDFGLAR DIYEDDYVR KGSARLPKW
1081  MAPSIFPKV YTTQSDVWSP GVLNWFSL GASFYGVQI NEFCQRLRD GPMRAPELA
1141  TPATRRIMLN CWSGDKARP AFSELVILG DLLQGRGLQ RREVCAPRS SSSRESGPS
1201  QVSTMLGHA QADABSPPS LGRSLAARY VNVSPFPCCL AKGATRGS RMTFEPFW
1261  TPTTYKSGVD NYDSGNVLA SEPRQIBSP HROSEFSECK GNGQVAVTR APDSQGRR
1321  RPERGARGQ VFMYSVGH SEPSSEDCS PSARVTFPTD NBY

```

FIGURE 2B

【図 3 A】

```
1   CGCGGGGTGT TCTGGTGTCC CCGCCCCCGC CTCTCCAAAA AGCTACACCG ACGCGGACCG
61  CGCGGGCGTC CTCCCTCGCC CTGCTTCAC CTGCGGGGCT CGGAATGCGG GGAGCTCGGA
121 TGTUCGGTIT CTGTGAGGCG TTTTACCTGA CACCGCGCCG CTTTCCCGGG CACTGCTGG
181 GAGGGCGGCC TGCAGATTG GGAACGCGGA GCGCCGGACC CGCTCCCGCC GCGTCCGSGT
241 CCGCCAGGGG GGGTGCCTGG GAGGAGCCCG GGGGAGAGGG ACCAGGAGGG GCGCGCGGCC
301 TCGCAGGGGG GCGCGGCGCC CACCCCTGCG CCGCGCCAGC GGACCGGTCC CCCACCCCGG
361 GTCCCTCCAC CAGTCACTTG CTGGGCTTCT TCTCTGTGCG GTGTTCTCTG CTGCGCGCTG
421 CGCTGCTCCG GGGTCTCTGC GAGGCGCCCG CGCGCGCCG CGGCTCGAG TCGGACTCG
481 ACCTCTCGGA CGCGGAGGCC GAGCGGGGCG AGGCCACGGC TTATGCAAGC AAGATCTGG
541 AGGAGCAGTT ACGGTCTGTG TCCAGTGTAG ATGAACATCAT GACTGTACTC TACCCAGAAT
601 ATTGAAATAT GTACAAGTGT CAGCTAAGGA AAGGAGGCTG GCAACATAAC AGAGAACAGG
661 CCAACTCAAA CTCAGGACA GAAGAGACTA TAAATTTGC TGCAGCACAT TATATACAG
721 AGATCTTGAA AAGTATTGAT AATCAGTGA GAAGACTCA ATGCAATGCA CGGAGGTGT
781 GTATGATGTT GGGGAAGAGG TTTGAGTCTG CAACAAACAC CTTCCTTAAA CCTCAGTGT
841 TGTCCGTCTA CAGATGTGGG GATTGTGCTA ATAGTAGAGG GCTGCAGTGC ATGAACACCA
901 GCACGAGCTA COTCAGCAAG ACGTTATTGT AAATTACAGT GCTCTCTCTT CAAGGCCCCA
961 AACCGATAC AATCAGTTTT GCCAATCACA CTTCCTGCGG ATGCAATGCT AAATGGATG
1021 TTTACAGACA AGTTCACTCC ATATTAGAC GTTCCCTGCG AGCAACACTA CACAGTGTG
1081 AGCGAGCGAA CAGACCTCGC CCCACCAATT ACATGTGAAA TAATCAATC TGCAGATGCC
1141 TCGCTCAGGA AGATTTTATG TTTTCTCGG ATGCTGGAGA TGAATCAACA GATGGATTCC
1201 ATGACATCTG TGGACCAAA C AAGGAGCTGG ATGAAGAGAC CTGTCACTGT GTCTGCAGAG
1261 CGGGGCTTGG GCTTCCGAGC TGTGGACCCC ACAAGAAGCT AGACAGAAAC TCATGCCAT
1321 GTGTCTGTAA AAGCAACCTC TTCTCGAGCG AATGTGGGCG CAACCGAGAA TTTGATGAAA
1381 ACACATGCCA GTGTGTATGT AAAAGAACCT GCCCGAGAAA TCAACCCCTA AATCCTGTAA
1441 AATGTGCTG TGAATGTACA GAAAGTCCAC AGAATGCTT GTTAAAGGA AAGAAGTTCC
1501 ACCACCAAAC ATGACAGTGT TACAGAGCGC CATGTACGAA CCGCCAGAGG GCTTGTGAGC
1561 CAGGATTTTC ATATAGTGA GAGGTGTGTC GTTGTGTCCC TCTATATGG AAGAGCAC
1621 AAATGAGCTA AGATTGTACT GTTTTCCACT TCAATGATTT TCTATATGG AAAACTGTGT
1681 TGCCACAGTA GAACGTCTG TGAACAGAGA GACCCCTGTG GGTCCATGCT AACAAAGACA
1741 AAGTCTGTCT TTTCTGAA C ATGTGGATA ACTTTACAGA AATGGACTGG AGCTCATCTG
1801 CAAAGGCGCT CTGTAAAGA CTGTTTTCTT GCCAATGACC AAGACGCAA GATTTCTCTC
1861 TTGTGATTC TTAAAGAA TGAACATATA ATTTATTTCC ACTAAATA TTTGTTCTG
1921 ATTCTATTTT ATAGCAACAA CAATGTGTAA AACTCACTGT GATCAATATT TTTATATCAT
1981 GCAAAATATG TTTAAATAA AATGAAATTT GTATT
```

FIGURE 3A

【図 3 B】

```
MHLLGFFSVACLLAAALLPQFRPAPAAAAFBSGLDLSAEPDAGRATYASKDLERQILRSVSVSDHLM
TULYPSYWHYKQDLREGGWQHNREQANLNSKTSKTKTFPAAATYNTILKSINDNWRKTQCMRPVUCIDV
KKEFGVATNTFFKPPCVSVYRQCGCCNSELQCMNTSTSYLSKTLFEITVPLSQGKPVITISFANHTSCR
CMSKLDVYRQVHSIIIRSLPATLPQCAANKTCTPTNYMNNHICRLAQSDPMSDSDAGDDSDTGPHDTC
GNKELDEBZCQVCRAGLRPASCGPHKRLDRNSCQCCKNLFPSQGANREPDENTCQVCKETCFRN
QPLNPFKCACTBSFQKCLRGKKFHHZTCBCYRRPCTNRQACFPFSYSEBVCRCVPYWRKQMS
```

FIGURE 3B

【手続補正書】

【提出日】平成16年10月25日(2004.10.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

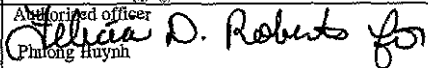
【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2005525352000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/05125
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 39/395, 39/38 US CL : 424/130.1, 184.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/130.1, 184.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, SCISEARCH, CAPLUS on STN		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG et al. Stimulation of beta Integrin Induces Tyrosine Phosphorylation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 and Modulates Cell Migration. J. Biol. Chem. 9 November 2001, Vol. 276, No. 45, pages 41950-41957.	1, 11-15, 19-20 and 25-32
A	Database NCBI, MIMURA, T. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor C and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 in Corneal Lymphangiogenesis. Exp. Eye Res. January 2001, Vol. 72, No. 1, pages 71-78, see abstract.	1, 11-15, 19-20 and 25-32
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 31 October 2003 (31.10.2003)	Date of mailing of the international search report 23 FEB 2004	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer  Phuong Huynh Telephone No. (703) 308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/05125

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claim Nos.: 2-10, 16-18 and 22-24
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Please See Continuation Sheet
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/05125

Continuation of Box I Reason 2:

Claims 2-7 were not search because no meaningful international search can be carried out since the structure such as the specific amino acid sequence or the specific nucleotide sequence of the "dominant negative receptor" is not recited in the claims.

Claims 8-10 were not search because no meaningful international search can be carried out since the structure of the specific "VEGFR-3 kinase inhibitor" and the specific "ATP analog" are not recited in the claims.

Claims 16-18 and 22-24 were not search because no meaningful international search can be carried out since the sequence that is specific for the "sequence specific ribonuclease", the "sequence specific ribozyme" and the "anti-sense nucleic acid molecule" are not recited in said claims.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/06	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 37/06	
// A 6 1 K 31/404	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	A 6 1 K 31/404	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN, GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC, EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,M X,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ジェラルド・ダブリュー・デ・ブリーズ

アメリカ合衆国 9 2 6 5 3 カリフォルニア州 ラグーナ・ヒルズ、ボーティスタ・ドライブ 2 5 1 4
2 番

F ターム(参考) 4C084 AA13 AA17 AA19 AA20 MA66 MA67 NA14 ZA331 ZA362 ZB081
ZB082 ZC202 ZC422
4C085 AA13 AA14 BB11 CC22 CC23 EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 BC10 EA16 MA01 MA02 MA04 MA66 MA67 NA14
ZA33 ZA36 ZB08 ZC20 ZC42
4C087 AA01 AA02 BB63 MA66 MA67 NA14 ZA33 ZA36 ZB08 ZC20
ZC42